



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari

Scuola di Dottorato in Scienze Farmacologiche

XXVI ciclo

Settore disciplinare BIO/14

**Nuove strategie di studio della biogenesi delle membrane:
il problema del corretto "targeting" post-traduzionale**

Tesi di Dottorato di ricerca di

Patrizia Cassella

Docente guida: Prof. Nica Borgese

Coordinatore del corso: Prof. Alberto Panerai

A handwritten signature in black ink, appearing to read "A. Panerai".

Anno Accademico 2012/2013

SOMMARIO

SOMMARIO	2
ABBREVIAZIONI	5
RIASSUNTO	6
CAPITOLO 1	7
INTRODUZIONE	8
1.1 Il problema dell'indirizzamento delle proteine ai compartimenti delle cellule eucariotiche.....	8
1.2. Le proteine Transmembrana	12
1.3 Le Proteine Tail Anchored.....	15
1.4 Meccanismi di Inserimento in membrana	16
1.4.1 I meccanismi co-traduzionali.....	17
1.4.1.a Il Sistema SRP-Sec per la traslocazione di proteine solubili	18
1.4.1.b. Il pathway SRP-Sec per le proteine di membrana	24
1.4.1.c Il sistema Tat	30
1.4.1.d Il sistema YidC/Oxa1.....	30
1.4.2 I meccanismi post traduzionali.....	31
1.4.2 a Il sistema TOM/TIM	32
1.4.2.b Il sistema Pex.....	37
1.5 Inserimento delle proteine Tail Anchored	42
1.5.1 l'inserimento non assistito	43
1.5.2 L'inserimento assistito.....	44
1.5.2a Inserimento nel ER.....	44
1.5.2 b Inserimento nella membrana dei perossisomi.	47
1.5.3. Inserimento nella Membrana esterna mitocondriale: processo assistito o non assistito?	48
CAPITOLO 2	51
SCOPO DELLA TESI.....	52
CAPITOLO 3	53
MATERIALI E METODI.....	54
3.1 Plasmidi	54
3.2 Espressione induzione e purificazione di proteine in batteri	56

3.2.1 Purificazione di proteine di fusione GST-b5.....	56
3.2.2 Purificazione delle proteine ricombinanti N-CAML, MBP-WRBcc e MBP.....	57
3.3 Colture cellulari	57
3.4 Trasfezioni e microiniezione	58
3.4.1 Microiniezione	58
3.4.2 Trasfezione con Calcio fosfato e jetPEI.....	58
3.4.3 Silencing TRC40	58
3.5. Trattamenti delle cellule.....	60
3.6. Preparazione di una frazione di citosol di fegato di ratto e di lisato di reticolociti di coniglio (Rabbit reticulocyte lysate, RRL).....	61
3.7 Semipermeabilizzazione di cellule HeLa	62
3.8 Anticorpi, Western blot e immunofluorescenza	62
3.8.1 Anticorpi	62
3.8.2 Immunofluorescenza	63
3.9 Microscopia	64
3.10 Analisi di immagine e test statistici.....	64
CAPITOLO 4	65
RISULTATI	66
4.1 Il ruolo di TRC40	66
4.2 La nuova strategia di studio	67
4.3 Localizzazione delle proteine microiniettate.	67
4.4 In acuto TRC40 ha un ruolo nel targeting?.....	67
4.5 Effetto del colesterolo sul targeting del b5.....	68
4.5.1 Overload di colesterolo nelle membrane cellulari	68
4.5.2 Effetto della deplezione del colesterolo sul targeting del b5	68
4.6 Effetto di un ossidante sul targeting	69
4.7 Coinvolgimento di chaperones e della calmodulina nel targeting.....	69
4.8 Localizzazione delle isoforme b5ER e b5RR in cellule semipermeabilizzate.....	70
FIGURE E LEGENDE	72
CAPITOLO 5	116
DISCUSSIONE	117
5.1. Il problema del targeting di proteine TA capaci di inserimento non assistito. Mancanza di un ruolo per TRC40.....	117
5.2 Risultati ottenuti <i>in vivo</i> (in cellula).....	118
5.3. Risultati ottenuti con cellule semi-permeabilizzate	122

5.4. Conclusioni e implicazioni	123
BIBLIOGRAFIA.....	127
Ringraziamenti	135

ABBREVIAZIONI

TMD: trans membrane domain, dominio trans-membrana

TA: Tail Anchored proteins, Proteine con ancora al C-terminale

RNC : Ribosome-nascent Chain Complex, complesso ribosoma catena nascente

RRL: Rabbit reticulocyte lysate, lisato di reticulociti di coniglio

Pex: peroxisome, perossisomi

PTS1: peroxisomal targeting signal type 1, segnale di targeting ai perossisomi tipo 1

PTS2: peroxisomal targeting signal type 2, segnale di targeting ai perossisomi tipo 2

PMP: peroxisome membrane proteine, proteine di membrana perossisomali

SRP signal recognition particle

SR: SRP receptor, recettore di SRP

IMM: internal mitochondrial membrane, membrana interna mitocondriale

MOM: Mitochondrial outer membrane, Membrana esterna mitocondriale

ER: Endoplasmic Reticulum, reticolo endoplasmatico

TIM: Translocase of inner mitochondrial membrane, traslocasi della membrana interna mitocondriale

TOM: Translocase of outer mitochondrial membrane, traslocasi della membrana esterna mitocondriale

TRC40: Transmembrane Recognition Complex subunit di 40 KDa, complesso di riconoscimento del dominio transmembrana

Get3: Guided Entry of TA protein

PDI: protein disolfuro isomerasi

RIASSUNTO

Le proteine "tail-anchored" (TA) hanno un dominio transmembrana vicino all'estremità carbossi terminale e una parte N-terminale citosolica; per questo motivo non hanno accesso alla via co-traduzionale, mediata da SRP, di inserzione nella membrana del reticolo endoplasmatico (ER) e la loro integrazione in membrana avviene solo in maniera post-traduzionale. Il sistema Get3/TRC40 gioca un ruolo importante nel "targeting" post-traduzionale all'ER. Tuttavia molte proteine TA possono inserirsi nei doppi strati lipidici indipendentemente da questo sistema, come illustrato dal citocromo b5: sono conosciute due isoforme di questa proteina, ciascuna con un "targeting" specifico o per l'ER o per la membrana esterna mitocondriale (MOM) (b5 ER e b5 RR rispettivamente); tuttavia *in vitro* entrambe sono capaci di inserirsi in liposomi privi di proteine. In questa tesi ho allestito nuovi sistemi *in vivo* e *in vitro* per indagare le basi molecolari del "targeting". Il sistema *in vivo* consiste nella microiniezione in cellule in coltura delle due proteine b5 ricombinanti, in condizioni di controllo o perturbate, e la successiva determinazione della localizzazione delle stesse mediante immunofluorescenza. A 15 minuti dalla microiniezione, ciascuna delle due isoforme è localizzata correttamente a indicare che nessun fattore ribosomale è richiesto per il "targeting". Mediante "silencing" e utilizzo di proteine dominanti negative, è stata confermata l'assenza di coinvolgimento di TRC40/Get3. Invece, l'inibizione farmacologica ha dimostrato il coinvolgimento di altri chaperon, quali Hsp90, Hsp70 e anche della calmodulina, in modo differente per le due isoforme. Oltre al coinvolgimento di proteine citosoliche sono implicate le proprietà fisico-chimiche delle membrane bersaglio, in quanto il sovraccaricamento con colesterolo inibisce l'inserzione. Il sistema *in vitro* consiste in cellule semi-permeabilizzate con digitonina. In questo sistema, in assenza di citosol, o in presenza di una frazione citosolica di reticolociti, ambedue le proteine si inseriscono esclusivamente nella MOM; invece, in presenza di una frazione citosolica derivante da fegato di ratto, b5 ER è solo parzialmente localizzata sull'ER. I miei risultati indicano che uno o più chaperon limitanti sono richiesti per il "targeting" corretto di b5 ER e che in assenza di tali fattori la MOM è la destinazione preferita di ambedue le isoforme. Questi risultati hanno implicazioni importanti per proteine TA della famiglia Bcl-2, coinvolte nella regolazione dell'apoptosi.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Il problema dell'indirizzamento delle proteine ai compartimenti delle cellule eucariotiche

La caratteristica fondamentale delle cellule eucariotiche è la loro suddivisione in compartimenti delimitati da membrane. Ciascun compartimento ha una sua dotazione specifica di proteine al suo interno e sulla membrana che lo delimita. Tuttavia, la stragrande maggioranza delle proteine è sintetizzata su ribosomi citoplasmatici, per cui si pone il problema dello smistamento delle proteine di nuova sintesi alla loro destinazione corretta.

Le proteine neo-sintetizzate possono essere destinate a rimanere nel citosol oppure indirizzate ai mitocondri, ai perossisomi, ai cloroplasti (nelle piante) e al reticolo endoplasmatico (Fig. 1.1). Dal reticolo endoplasmatico possono poi raggiungere gli altri compartimenti della via di secrezione tramite trasporto vescicolare, processo per la cui caratterizzazione è stato conferito il premio Nobel per la Fisiologia o Medicina di quest'anno.

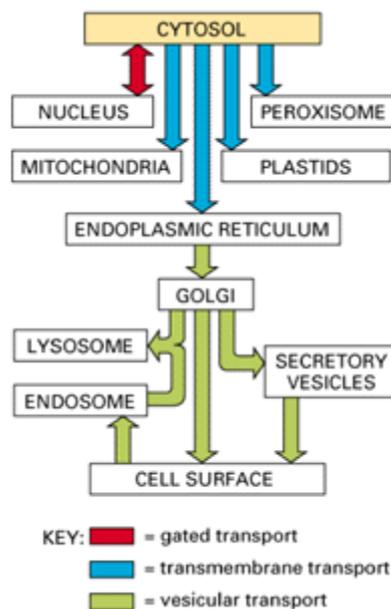


Fig.1.1 Il traffico proteico (Alberts et al, 2009)

Lo smistamento delle migliaia di diverse proteine dipende in generale da brevi sequenze aminoacidiche, chiamate sequenza segnale. Tali segnali sono costituiti da pochi aminoacidi, spesso situati ad una delle estremità della catena polipeptidica ma possono anche essere interni alla proteina o addirittura ripartiti in diversi punti. In questo ultimo caso il segnale dipende dal folding della proteina, in quanto risulta dalla giustapposizione di aminoacidi fisicamente separati prima del "folding" (Fig. 1.2)

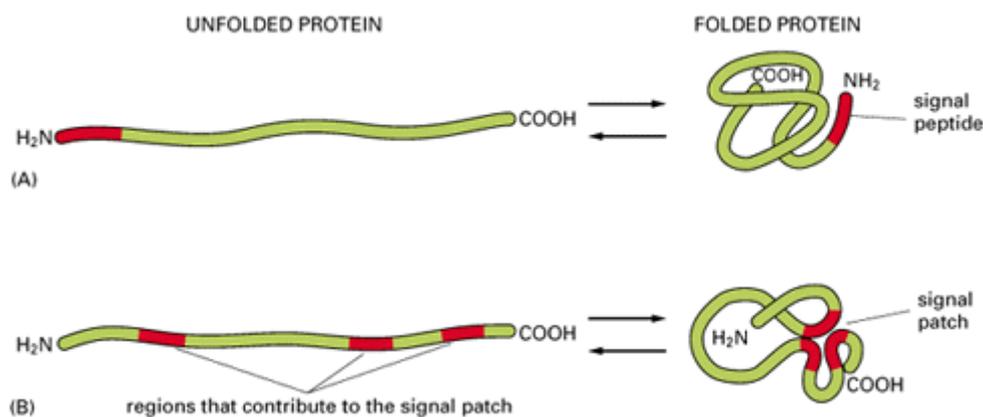


Fig.1.2 I peptidi segnale (Alberts et al, 2009)

Le sequenze segnale sono riconosciute da proteine citosoliche che guidano il substrato a specifici recettori posti sulla membrana dell'organello di destinazione. Ogni organello cellulare è, così, "riconosciuto" dalle proteine che le competono. E le proteine che risiedono in un compartimento cellulare hanno un caratteristico segnale, che può assumere posizioni diverse o può essere rimosso dopo l'internalizzazione (Tabella 1.1)

Target Organelle	Usual Signal Location within Protein	Signal Removal*	Nature of Signal
Endoplasmic reticulum	N-terminal	(+)	"Core" of 6–12 mostly hydrophobic amino acids, often preceded by one or more basic amino acids
Mitochondrion†	N-terminal	(+)	3 – 5 nonconsecutive Arg or Lys residues, often with Ser and Thr, no Glu or Asp residues
Chloroplast†	N-terminal	(+)	No common sequence motifs; generally rich in Ser, Thr, and small hydrophobic amino acid residues and poor in Glu and Asp residues
Peroxisome	C-terminal	(–)	Usually Ser-Lys-Leu at extreme C-terminus
Nucleus	Internal	(–)	One cluster of 5 basic amino acids, or two smaller clusters of basic residues separated by ≈10 amino acids

*. Indicates whether signal sequence usually is (+) or is not (–) removed after a protein enters its target organelle.
†. These signals direct the protein from the cytosol into the matrix space of the mitochondrion or the corresponding stroma of the chloroplast; other signals discussed in the text redirect proteins into other subcompartments of these organelles.

Tabella 1.1. Natura dei peptidi segnale (Alberts et al, 2009)

Una volta che una proteina dal citosol ha raggiunto il comparto di destinazione, potrà essere ulteriormente smistato a un subcompartimento dell'organello. Per esempio, proteine destinate ai mitocondri devono essere smistate alla membrana esterna, quella interna, la matrice o lo spazio intermembrana. Nel caso dell'indirizzamento alla via di secrezione, lo smistamento successivo è particolarmente complesso. La proteina neosintetizzata potrebbe contenere un segnale di ritenzione per il reticolo endoplasmatico oppure lasciare il reticolo per raggiungere un altro compartimento della via (Golgi, membrana plasmatica, lisosomi, endosomi (Fig. 1.3).

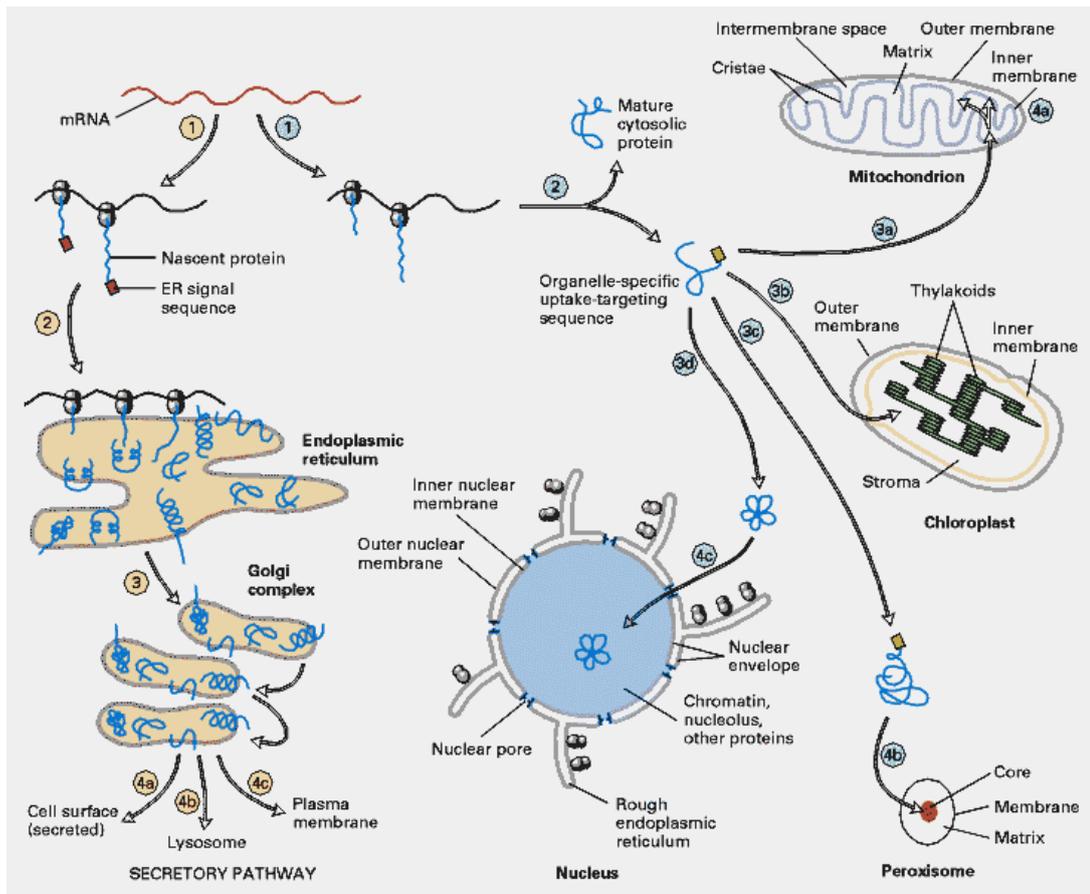


Fig. 1.3 Il sorting delle proteine codificate dal nucleo (Lodish et al, 2009). Tutti gli mRNA sono tradotti dai ribosomi nel citosol. Le catene nascenti destinate al pathway secretorio hanno un segnale di indirizzamento all'ER (1), dove vi entrano durante la sintesi (2). Quando la sintesi è terminata attraversano il complesso di Golgi (3), per poi arrivare alla destinazione finale (4a, 4b, 4c). Se la nuova catena nascente manca un segnale di localizzazione all'ER, la sintesi termina e viene rilasciata nel citosol. Può possedere così un segnale di localizzazione per altri compartimenti (3a, 3b, 3c, 3d) possono poi traslocare all'interno dopo il completo folding.

Si ritiene che l'esportazione di proteine lungo la via di secrezione tramite il trasporto vescicolare non richieda specifici segnali di sorting; al contrario sono richiesti segnali di ritenzione per evitare il trasporto di proteine fino alla superficie cellulare. Tuttavia, l'efficienza del trasporto è aumentata da specifici segnali di esporto, che reclutano le proteine nei siti dove si formano vescicole di trasporto (Fig. 1.4)

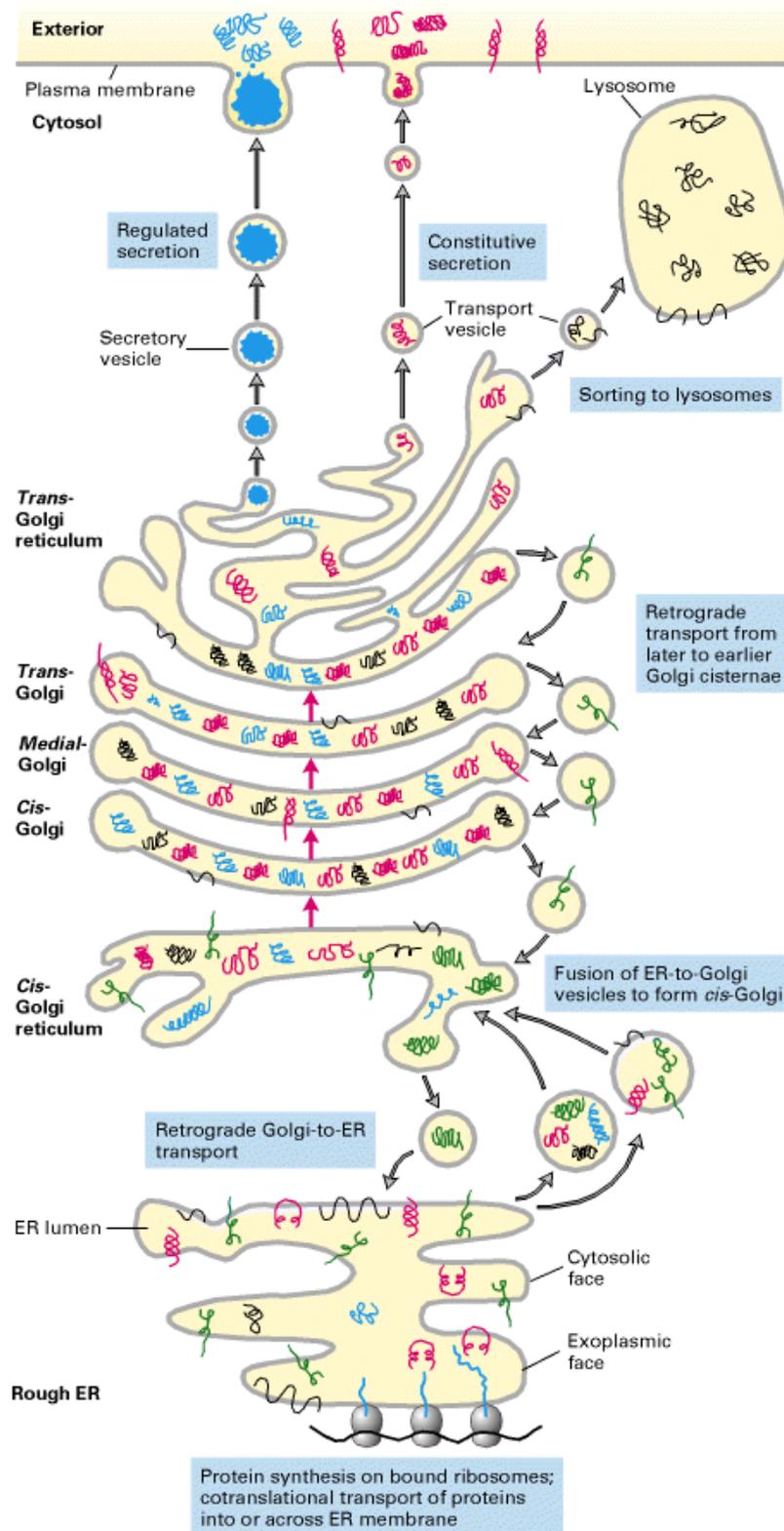


Fig 1.4 Il pathway secretorio. (Lodish et al, 2009) Appena ha inizio la sintesi , il peptide di localizzazione all'ER emerge dal tunnel del ribosoma e guida l'inserimento della proteina nel ER. Il segnale può poi essere rimosso. Le proteine residenti nell'ER hanno un dominio di ritenzione, le altre intraprendono la via secretoria, sono quindi internalizzate in vescicole che si fondono con il cis-Golgi. Da qui poi le cisterne progrediscono fino al tran-Golgi, da cui emergono le vescicole che via esocitosi localizzeranno le proteine nella membrana finale.

1.2. Le proteine Transmembrana

Tutte le membrane cellulari sono costituite da un doppio strato fosfolipidico; membrane diverse hanno proporzione e composizione lipidica diversa e queste differenze sono alla base delle differenti caratteristiche fisico-chimiche di membrane diverse (spessore, fluidità, presenza di sottodomini rigidi, ecc.). Le membrane biologiche contengono circa il 50% in peso di proteine, che sono responsabili per le proprietà funzionali della membrana stessa.

Le proteine di membrana sono associate in modi diversi al doppio strato fosfolipidico (Fig. 1.5). Le proteine che attraversano il doppio strato fosfolipidico sono chiamate proteine integrali di membrana o transmembrana o intrinseche. Costituiscono il 30% del proteoma cellulare. Svolgono funzioni essenziali quali la comunicazione cellulare, trasporto e morfogenesi di membrana. Sono proteine anfipatiche, per la presenza di domini idrofilici e uno o più domini idrofobici. Le regioni idrofobiche, chiamate domini trans membrana (TMD) attraversano la membrana e interagiscono con le code idrofobiche dei lipidi. Le proteine estrinseche di membrana, invece, sono associate ad uno dei lati della membrana, mediante una α elica o una coda lipidica o un oligosaccaride, o ancora in maniera indiretta, mediante legame con una proteina a sua volta intrinseca o estrinseca (Alberts et al, 2009).

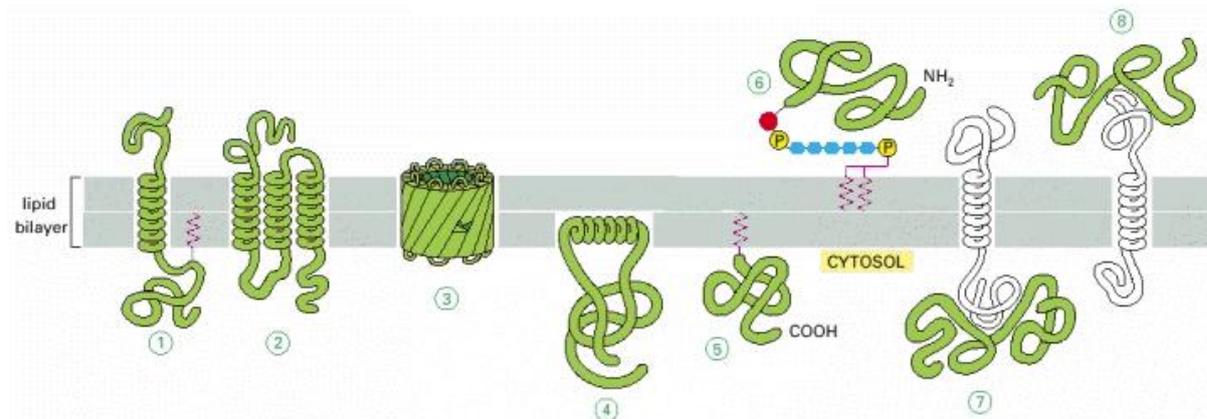


Fig.1.5 Le modalità di associazione delle proteine alla membrana. (Alberts et al, 2009). Le proteine integrali possono attraversare la membrana una volta (1) o diverse volte (2) e i TMD possono essere α elica o β barrel (3). Possono essere legate alla membrana anche mediante domini che non attraversano la membrana (4,5, 6), tali domini possono essere α eliche (4) o catene lipidiche (5) o una catena di un fosfatidilinositolo (6). Inoltre possono essere legate non covalentemente a proteine integrali (7,8)

Ogni proteina transmembrana ha un solo orientamento; tale orientamento è cruciale per la sua funzione e viene assunto nel momento della nascita della proteina stessa, durante il processo di inserimento.

Le proteine transmembrana, in relazione al numero di TMD, si possono classificare in proteine “single spanning”, che attraversano la membrana una sola volta, o “multi spanning”, che invece la attraversano molteplici volte (Fig. 1.6) I TMD sono composti da aminoacidi con residui non polari, che interagiscono con la regione idrofobica della

membrana. Nelle proteine single spanning i TMD sono organizzati principalmente in α eliche, struttura secondaria che permette di massimizzare i legami idrogeni tra i legami peptidici della catena. Nelle proteine multispanning oltre alla conformazione ad α -elica, possono presentare una struttura secondaria a foglietto β . I vari TMD si dispongono a formare dei foglietti β , che a loro volta si organizzano a formare un " β barrel". In entrambi i casi tutti i domini possono disporsi a generare un poro all'interno del core idrofobico della membrana, delimitato dai TMD (Fig. 1.7). Esempi di proteine multispanning o politopiche sono i recettori associati alle G proteine o i canali di membrana (Fig1.8)

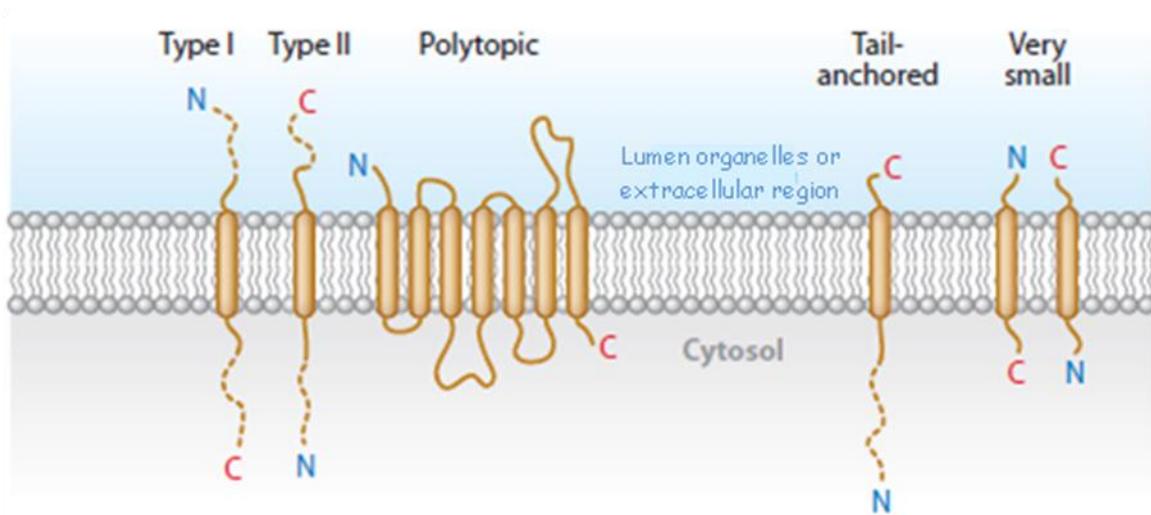


Fig.1.6 Proteine Transmembrana Single e multi spanning (Shao et al, 2011)

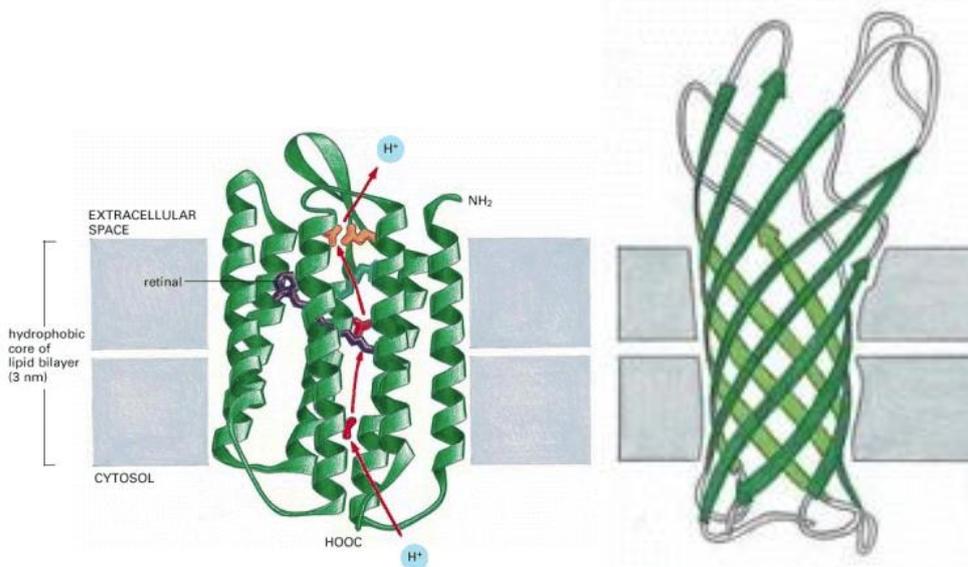


Fig. 1.7 Organizzazione dei TMD, ad α elica a sinistra e a β barrel a destra (Alberts et al 2009)

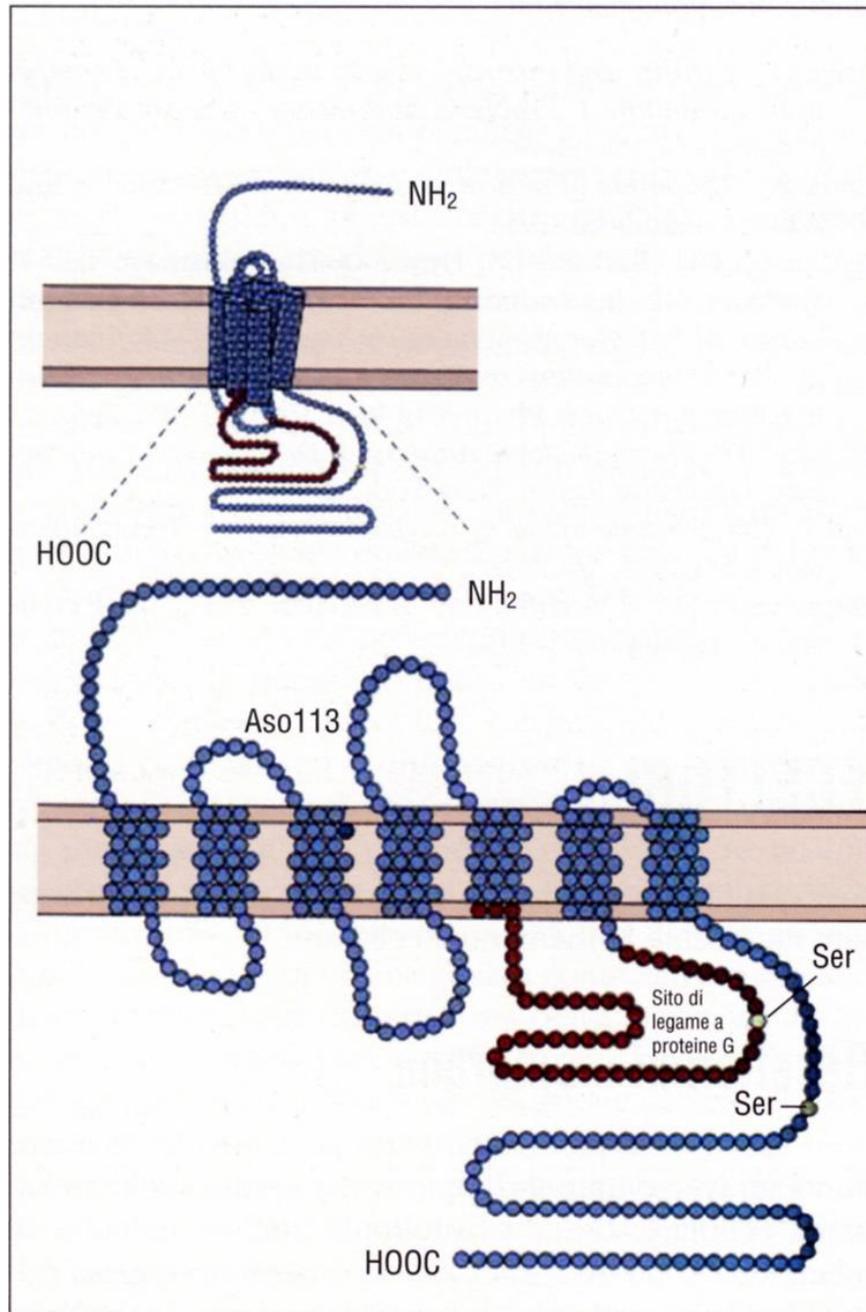


Fig. 1.8 Schema del recettore a 7 TMD associato a proteine G (Lodish et al, 2009)

Le proteine single spanning a loro volta si classificano in Tipo 1 e Tipo 2 in relazione all'orientamento delle estremità N-terminale e C-terminale. Le proteine di tipo 1 hanno il dominio C-terminale rivolto verso il citosol e l'N-terminale verso l'esterno o nel lume di organelli cellulari. Appartengono a questa classe il recettore delle LDL, il recettore dell'insulina, il recettore dell'ormone della crescita, e la glicoforina A (Alberts et al, 2009) (Fig. 1.9). Le proteine di tipo 2, invece espongono il C-terminale verso l'interno degli organelli o verso l'ambiente extracellulare e il dominio N- terminale al citoplasma. Appartengono a questa classe il recettore della transferrina, il recettore della Asialoglicoproteina, e il precursore del TNF alpha (Alberts et al, 2009).

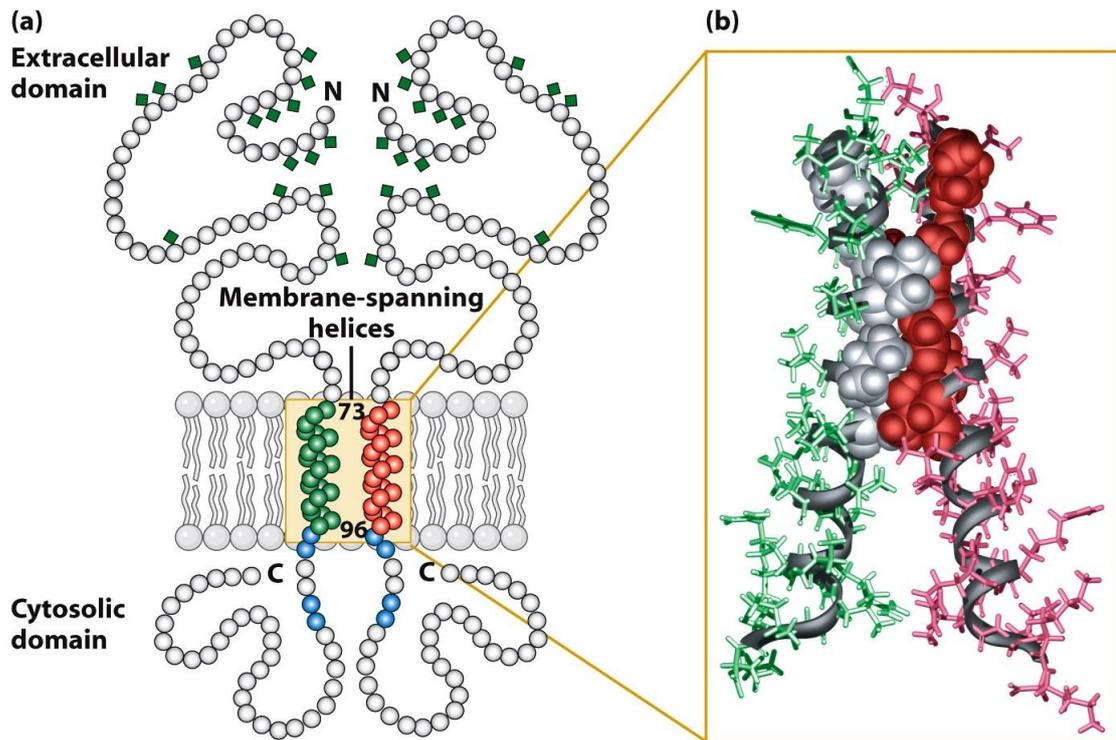


Fig. 1.9 Struttura della glicoforina A (Lodish et al, 2009). Ogni monomero è una proteina tipo 1.

1.3 Le Proteine Tail Anchored

Un particolare gruppo di proteine appartenenti alle proteine single spanning di gruppo 2 sono le proteine Tail Anchored (TA). Rappresentano il 3-5 % di tutte le proteine di membrana (Beilharz et al, 2003), (Kalbfleisch et al, 2007), (Kriechbaumer et al, 2009). Ne sono state identificate circa 400 localizzate in tutte le membrane cellulari, dove assolvono ad una vasta gamma di funzioni, dalla biogenesi di membrana all'apoptosi, traffico vescicolare, traslocazione e degradazione proteica, e catalisi enzimatica (Borgese & Fasana, 2011), (Hegde & Keenan, 2011) (Tab 1.2). Le TA hanno il dominio catalitico all'N-terminale esposto al citosol, un TMD che le ancora alla membrana e un dominio C-terminale polare costituito da un massimo di 30 residui (Borgese et al, 2003) (Fig 1.10).

Function	Examples	Localization
Enzymatic	Cytochrome b(5) MOM isoform of cytochrome b(5) Heme oxygenase I and II UBC6	ER MOM ER ER
Protein localization		
Translocation	Sec61 γ , Sec61 β TOM5, TOM6 Pex15p	ER MOM Peroxisomes
Adaptors	OMP25	MOM
Vesicular traffic		
SNARE proteins	Target SNAREs (Syntaxins) Vesicular SNAREs (e.g., Synaptobrevins)	Target membranes for vesicular fusion
Tethering proteins	Giantin	Transport vesicles Golgi complex
Regulation of apoptosis (Bcl-2 family)	Bcl-2 Bcl-X _L Bax	MOM and ER MOM Cytosol and MOM
Constituent of viral envelope	Us9 protein of α herpes viruses	Trans-Golgi network

Tabella 1.2 Funzioni e localizzazione delle TA protein

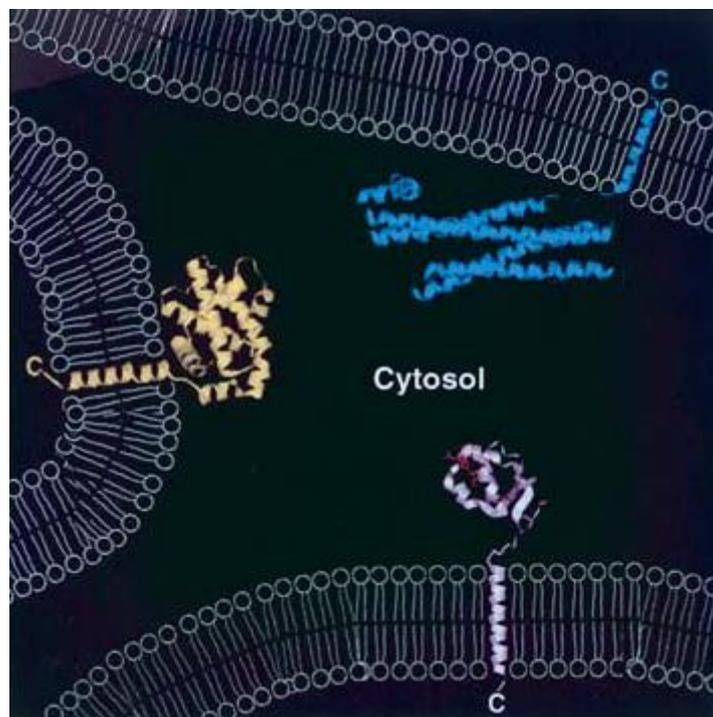


Fig 1.10 Le TA. In giallo Bcl-XI sulla Membrana esterna mitocondriale, in rosa il citocromo b5 sulla membrana del reticolo e in azzurro la sintaxina Sso1p, sulla membrana plasmatica (Borgese et al, 2003).

1.4 Meccanismi di Inserimento in membrana

La caratteristica determinante delle proteine di membrana è il TMD idrofobico, che consente l'ancoraggio in membrana. La presenza di questa regione perciò guida il processo di inserzione (Hegde & Keenan, 2011).

Una volta sintetizzato nel citosol, il TMD deve “muoversi” verso il doppio strato lipidico dove è energeticamente più stabile. Questo processo consta di quattro tappe: il riconoscimento del TMD, la “difesa” dall'ambiente acquoso, il targeting alla superficie della membrana e

l'integrazione del TMD nel doppio strato lipidico nel corretto orientamento. Tutte le proteine di membrana devono superare questi passaggi, ognuna con un proprio meccanismo e coinvolgendo fattori regolatori citosolici o di membrana (Hegde & Keenan, 2011).

Una volta sintetizzate dai ribosomi citosolici, le proteine possono localizzarsi su tutte le membrane cellulari o all'interno dei lumi degli organelli citosolici. L'inserimento sui mitocondri (Chacinska et al, 2009), perossisomi (Heiland et al, 2005) e cloroplasti (Inaba et al, 2008) avviene in maniera diretta, per qualsiasi altra destinazione le proteine vengono inserite nell'ER e da qui intraprendono la via di secrezione (Shao & Hegde, 2011). L'inserimento al reticolo endoplasmatico può avvenire in maniera co-traduzionale e post-traduzionale (Wickner et al, 2005) (Rapoport TA, 2007). Nel pathway co-traduzionale, tutti i passaggi avvengono durante la sintesi della nuova catena nascente; in quella post-traduzionale, invece, avvengono a sintesi ultimata, quindi quando la proteina è ormai libera nel citosol.

1.4.1 I meccanismi co-traduzionali

Nelle cellule eucariotiche, il meccanismo co-traduzionale interessa le proteine che devono essere inserite nel Reticolo o devono attraversare la membrana del reticolo, per poi intraprendere la via secretoria e raggiungere la membrana plasmatica o altri compartimenti cellulari della via di secrezione. Per poter accedere al sistema co-traduzionale è necessario che la proteina abbia una sequenza segnale che guida la traslocazione. La sequenza segnale è localizzata generalmente all'N-terminale della catena nascente, deve essere idrofobica e deve avere una struttura secondaria ad α -elica (Mitra et al, 2006). Ultimata la traslocazione della catena polipeptidica, la sequenza può essere rimossa. Nel caso di proteine di membrana, può essere la sequenza idrofobica destinata a diventare il primo TMD, a fungere da sequenza segnale (Hegde & Keenan, 2011). I meccanismi co-traduzionali noti sono il sistema Sec, il sistema Tat e il sistema YidC/Oxa. Tutt'e' tre questi sistemi sono stati ritrovati sia in procarioti che in eucarioti (Wang et al, 2011). Nei procarioti i sistemi assistono l'uscita delle proteine del citosol all'ambiente periplasmatico e l'inserimento in membrana plasmatica delle proteine sintetizzate nel citoplasma; negli eucarioti, invece, il sistema Sec è associato alla membrana del reticolo endoplasmatico (e nelle cellule vegetali anche ai cloroplasti), e guida la biogenesi delle proteine transmembrana e di quelle interne a lisosomi, endosomi, e organelli della via secretoria (e nelle cellule vegetali dirige l'import di proteine dalle membrane dei tilacoidi all'interno del lume del tilacoide) (Wang et al, 2011). Il sistema eucariotico Oxa invece, omologo al procariotico YidC, è associato ai mitocondri. L'evoluzione ha apportato cambiamenti nella complessità dei complessi eucariotici, ma nonostante ciò i sistemi sono assolutamente analoghi tra loro. L'omologia supporta e giustifica l'ipotesi dell'origine endosimbiontica di mitocondri (Gray et al, 1999) e cloroplasti (Martin et al, 1998); teoria secondo la quale si ritiene che i mitocondri siano ciò che resta di

una antica specie di alphaproteobatterio che abitava il citosol dei primi eucarioti, e i cloroplasti derivati dalla fusione di un ancestrale cianobatterio fotosintetico e una cellula nucleata con mitocondri. In entrambi i casi, il trasferimento di geni al nucleo ha aumentato la dipendenza dell'organello dalla sintesi proteica citosolica, e reso indispensabili i sistemi di import export per e dagli organelli.

1.4.1.a Il Sistema SRP-Sec per la traslocazione di proteine solubili

In questo paragrafo descriverò prima il processo di traslocazione Sec-dipendente a carico delle proteine solubili, dirette al lume del ER (o allo spazio periplasmico dei batteri) per poi illustrare nel paragrafo successivo come il sistema si adatti anche all'inserimento di proteine di membrana.

Una volta che il complesso ribosoma-mRNA è assemblato, comincia la sintesi della nuova catena polipeptica, che si allunga per l'aggiunta degli aminoacidi specificata dai codoni del mRNA. Il complesso ribosoma e catena nascente è conosciuto col nome Ribosome-nascent Chain Complex (RNC). Una volta sintetizzata, la sequenza segnale idrofobica emerge dal ribosoma e viene riconosciuta dal Signal Recognition Particle (SRP) (Saraogi et al, 2011). Si genera così il complesso RNC-SRP. Il complesso in primo luogo si lega alla membrana, mediante il recettore dell' SRP (SR), poi al traslocone, mediante un'interazione diretta tra il ribosoma e il canale Sec61/SecYEG (Sec61 negli eucarioti, SecYEG nei procarioti). Una volta contattato il complesso Sec61, la sintesi continua, e la proteina è così convogliata al lume dell'ER, dove si ripiega nella sua conformazione finale (Fig. 1.11).

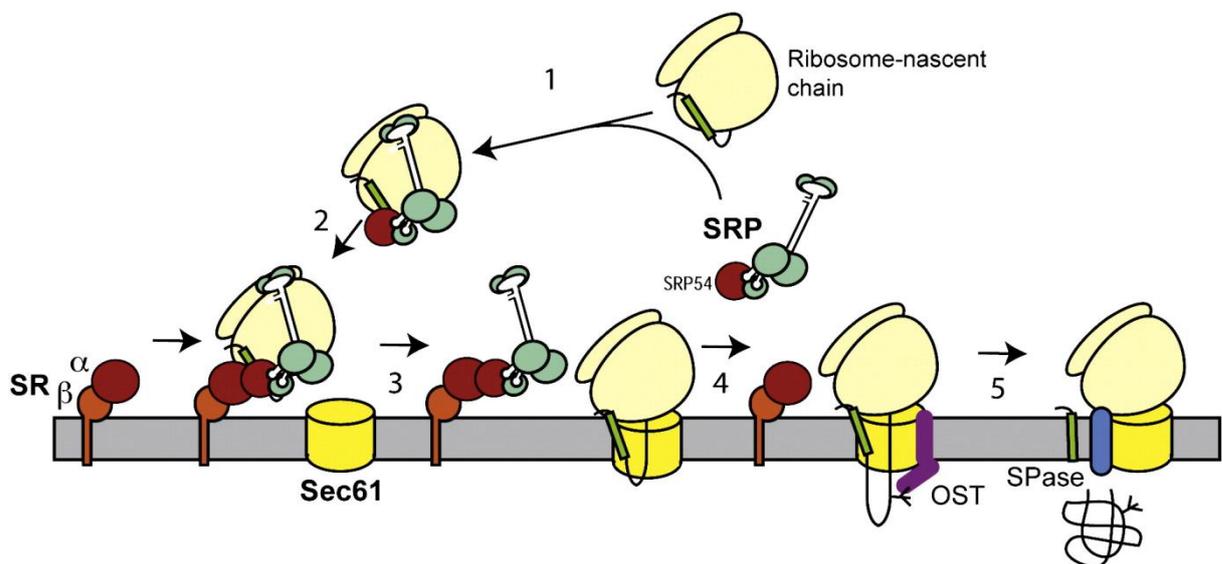


Fig 1.11 Schema della traslocazione co-traduzionale (Nyathi et al, 2013). SRP lega la sequenza segnale (in verde)(1), quando emerge dal ribosoma generando così il complesso RNC-SRP (2). Questo complesso lega il recettore SR, così la RNC è passata al traslocone Sec61 (3), e il recettore è rilasciato (4). Concomitante alla traslocazione vengono reclutate anche una peptidasi del segnale (SPase) e un enzima oligosaccaril transferasi (OST) (5). La proteina è poi rilasciata

SRP è un complesso ribonucleoproteico, ritrovato in tutte le cellule procariotiche ed eucariotiche; la sua funzione è conservata, ma la sua complessità è aumentata durante l'evoluzione (MR Pool, 2005) (Fig.1.12 a). L'isoforma mammifera è composta da una molecola di RNA di circa 300 nucleotidi (sub unità 7S RNA) a forma di Y, complessata con sei sub unità proteiche, SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68, SRP72 (Fig 1.12b) (Walter & Blobel, 1983). Questi componenti possono essere divisi in due domini strutturali, il dominio Alu ,che comprende le eliche 3-5 del 7SLRNA e l'eterodimero SRP9-SRP14, e il dominio S, che comprende la forca della 7SLRNA, e SRP19, SRP54, SRP68, SRP72. La composizione della molecola SRP di lieviti è simile, ma con notevoli differenze. In particolare l'eterodimero SRP9/14 è sostituito da un omodimero SRP14,e vi è una proteina specifica di lievito SRP21, strutturalmente omologa a SRP9; l'omologo di SRP19, SRP65, è più grande; infine la porzione di RNA contiene elementi aggiuntivi, ripiegati ad ansa. L'isoforma batterica è molto più semplice; consiste di un omologo di SRP54 (Ffh), complessata con una subunità di RNA molto più piccola, di 4.5S, che contiene il dominio IV (elica 8), molto conservato del 7S. Nonostante la complessità dell'SRP di mammifero, il complesso SRP-SR procariotico (Ffh-FtsY), riesce a traslocare proteine di mammifero al reticolo; ciò dimostra che l'elica 8 è il core funzionale e che il processo di traslocazione è molto conservato dai procarioti ai mammiferi, lungo la scala evolutiva.

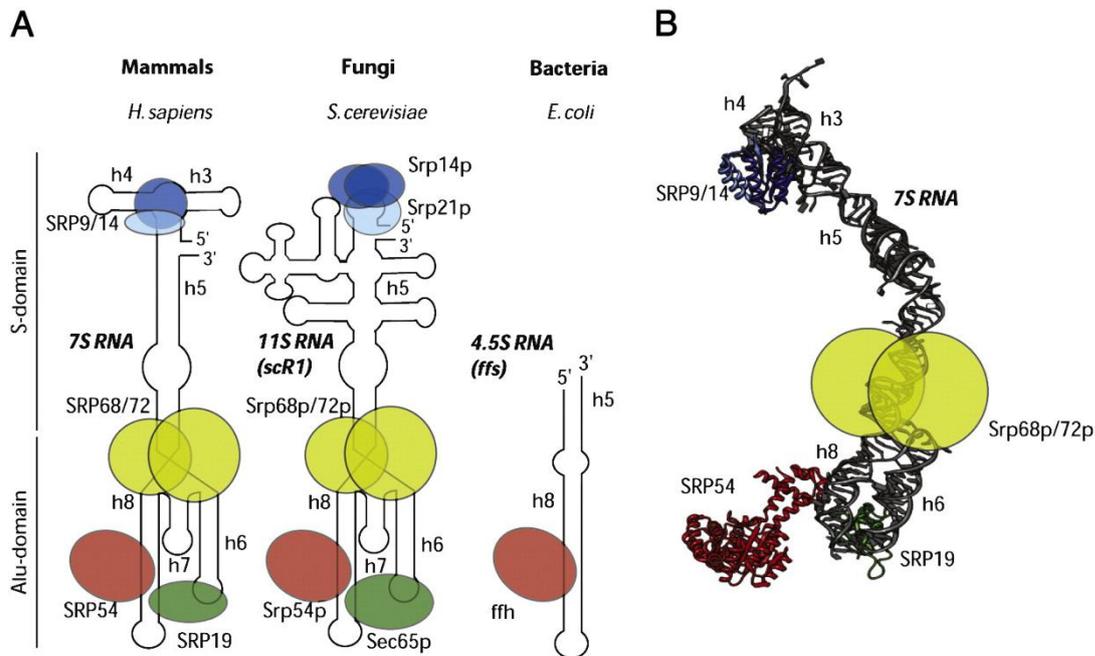


Fig. 1.12 A: rappresentazione schematica di SRP in mammiferi, lievito e E.coli; B: struttura 3D dei SRP di mammifero, i cui componenti sono stati tutti risolti mediante cristallografia tranne il complesso Srp68p/72p, rappresentato da due sfere (Nyathi et al, 2013)

SRP54 è un componente chiave nel processo di targeting cotraduzionale, mediando l'interazione SRP ribosoma (Pool MR, 2005). E' costituito da tre domini: M, C-terminale ricco in metionine; G, dominio GTPase e N,N-terminale, formato da quattro eliche. I domini N e G sono molto vicini e interagiscono con il recettore SR; sono connessi al dominio M da un linker flessibile e altamente conservato, che permette all'SRP54 i riarrangiamenti durante il ciclo di targeting e permette la comunicazione interdominio (Freyman et al, 1997) (Montoya et al, 1997). Il dominio M è costituito da quattro eliche anfipatiche che avvolgono un core idrofobico. Il core idrofobico è una regione implicata nel

legame alla sequenza segnale e contiene inoltre un motivo ricco di arginine, richiesto per il legame di SRP all'RNA. Prima che il dominio M di SRP54 si leghi all'RNA, SRP19 lega le eliche 6 e 8, inducendo dei cambi conformazionali nell'elica 8 che consente poi il legame di SRP54 (Janda et al, 2010).

Le sequenze segnale riconosciute da SRP sono molto diverse in lunghezza, forma e composizione. Il principale componente è un core idrofobico di 8-12 aminoacidi che preferenzialmente forma un α elica (Zheng et al, 1996). Studi recenti danno evidenza che nonostante l'idrofobicità sia un determinante chiave nel riconoscimento della sequenza segnale da parte dell' SRP, non è un sufficiente discriminante; ciò è supportato dal fatto che le differenze di idrofobicità tra sequenze segnale SRP-dipendenti e quelle SRP-indipendenti sono veramente minime. Per cui sono necessari altri fattori, quali la conformazione, la lunghezza e l'orientamento, la presenza di residui basici all'N-terminale, o la lunghezza della catena nascente. Se la sequenza segnale non è sufficientemente idrofobica non sarà riconosciuta dalla molecola SRP, per cui interverranno altri fattori citosolici, la traduzione sarà ultimata e la traslocazione avverrà in maniera post traduzionale mediata da Sec61 (Huber et al, 2005).

Appena la sequenza segnale con alta idrofobicità emerge dal ribosoma attraverso il poro di uscita, SRP la lega, precludendone così la sua esposizione al citosol e quindi l'aggregazione. SRP è legato ai ribosomi, con bassa affinità, in assenza della sequenza segnale; l'affinità aumenta di dieci volte se il ribosoma è in fase di traduzione, e aumenta drasticamente quando emerge la sequenza segnale (Bradshaw et al, 2009). L'analisi cristallografica ha evidenziato i punti di contatto di SRP con il ribosoma. In particolare SRP54 è in prossimità del sito di uscita della sequenza segnale, così il dominio M interagisce con essa e con gli elementi dell'rRNA 25S. Il dominio NG interagisce con la proteina L23a e L35 del ribosoma. Studi recenti hanno mostrato che sequenze segnale isolate legano SRP con affinità minore; inoltre l'affinità di legame tra RNC e SRP aumenta progressivamente in concomitanza con l'uscita della sequenza dal poro. Ciò dimostra che i cambiamenti conformazionali, necessari all'aumento di affinità, sono sequenza specifica e che la sequenza stessa è il segnale avvertito e trasmesso dal ribosoma per il reclutamento di SRP al ribosoma stesso, infine che il ribosoma agisce sinergicamente con la sequenza segnale nella formazione del legame SRP-RNC

Una volta formato, il complesso ternario SRP-RNC muove in direzione del Recettore di SRP (SR) sulla membrana del reticolo. Il recettore SR è composto di due sub unità, SR α e SR β , proteine del reticolo rispettivamente di 70 e 30 KDa. SR β è una proteina integrale di membrana e ancora SR α . SR α è composta a sua volta da tre domini, l'N terminale SRX, mediante il quale prende contatti con SR β , il C-terminale, responsabile del legame al dominio NG di SRP54, con cui condivide un alto grado di omologia, e un dominio GTPasi (Schwartz et al, 2003) (Miller et al, 1995). I due domini NG formano un pseudo dimer, l'interfaccia dei due domini G forma il core catalitico per il nucleotide, e sono disposti in maniera antiparallela in modo che il fosfato γ di un nucleotide interagisce con il gruppo idrossile 3' del nucleotide opposto, così che il legame stretto tra SRP e recettore avviene solo quando entrambi sono legati a GTP (Egea et al, 2004) (Focia et al, 2004) (Fig 1.13). Appena sono in contatto, SRP-SR subiscono una serie di cambi conformazionali, per trasferire l'RNC al traslocone. Si passa da uno stato precoce ad uno chiuso, ad uno attivato, Questi riarrangiamenti sono accompagnati da una diminuzione dell'affinità di legame dell'SRP all'RNC, per facilitare il legame di quest'ultimo al complesso di traslocazione. L'idrolisi del GTP disassembla in maniera irreversibile il legame SRP-SR. Contemporaneamente l'RNC prima stabilizza il legame SRP-SR nello stato precoce e poi ritarda il riarrangiamento allo stato chiuso, e quindi l'idrolisi del GTP

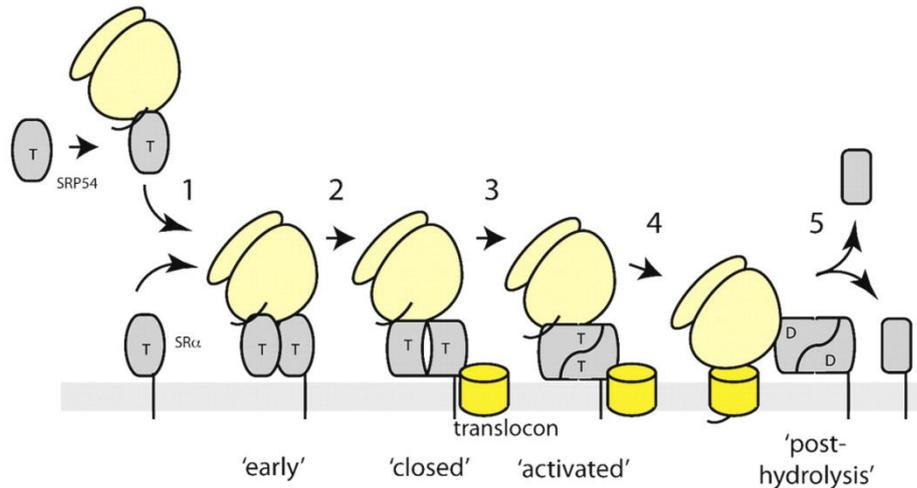


Fig. 1.13 il ciclo GTPasi di SRP54 SR (Nyathi et al, 2013). L'RNC con una sequenza segnale è legata da SRP (1), SRP e SR si associano a formare un complesso precoce (2); questo complesso si riarrangia e genera un complesso chiuso, che diventa attivato in seguito all'interazione con il complesso Sec. La proteina è così rilasciata al complesso Sec (4). L'idrolisi del GTP media il disassemblaggio e il riciclo di SRP e SR.

Infine, è stato anche dimostrato che una volta che SRP è legato all' RNC provoca un temporaneo blocco della sintesi proteica, inibendo il legame con il fattore di allungamento eEF2. Questo blocco è assolutamente indispensabile per l'efficienza di traslocazione, e in concomitanza con i riarrangiamenti del recettore genera una finestra di tempo utile al reclutamento dei sistemi di traslocazione, prevenendo, così, targeting errati (Walter & Blobel, 1981) (Siegel et al, 1985) (Thomas et al, 1997).

L'apparato di traslocazione è il complesso Sec61/SecYEG Fig (1.14). E' una proteina canale conservata lungo la scala evolutiva. E' definito Sec61 negli eucarioti e SecYEG nei procarioti. L'analisi cristallografica del complesso SecY ha evidenziato una omologia di struttura tra il complesso batterico e quello degli Archea. Inoltre, pur non essendo disponibile il cristallo della proteina eucariotica, la conservazione della sequenza e l'analisi mediante microscopia elettronica suggeriscono simile struttura e funzione. Il canale è composto da un monomero che consta di tre subunità α , β , γ . Le subunità α e γ sono altamente conservate. Il loro Knockout non è vitale. La subunità β non è né conservata né essenziale. La subunità α forma il poro. È divisa in due metà, i segmenti TM 1-5 e 6-10. L'ansa tra il 5 e il 6 permette alla subunità α di formare il cancello (gate) laterale, essenziale per l'inserimento di proteine transmembrana (si veda il paragrafo 1.4.1.b). La subunità γ si lega alle due metà della α . La β prende pochissimi contatti con la α . Visto in sezione il poro ha la forma di una clessidra, con una costrizione nella zona centrale, formata da un anello di sei residui idrofobici, che nella isoforma batterica sono sei isoleucine.

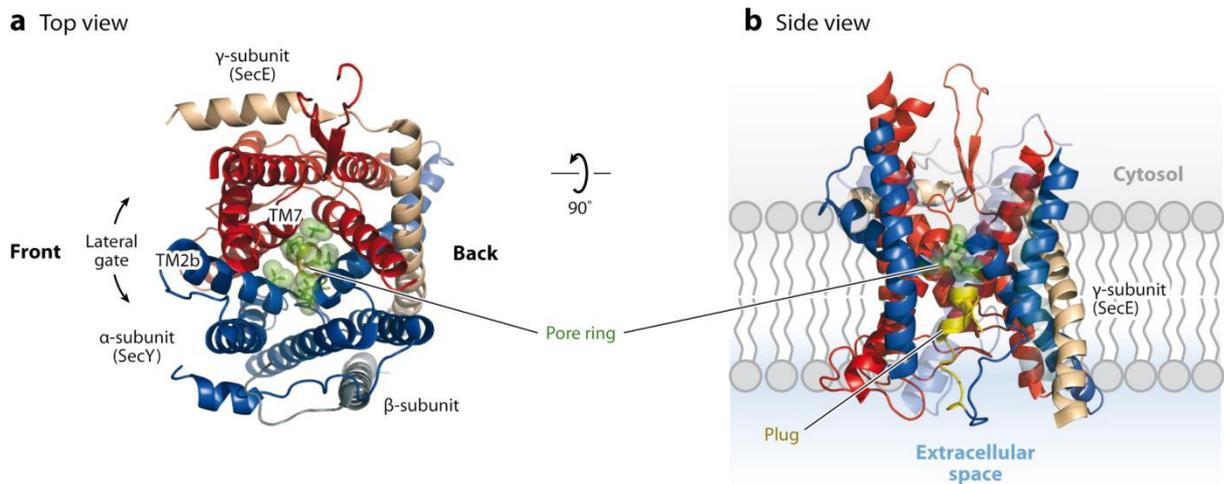


Fig.1.14 Struttura 3D del canale SecY di *Methanococcus jannaschii* (Park & Rapoport, 2012). Vista dall'alto in a e longitudinale in b

Il meccanismo di traslocazione inizia quando l'ansa della nuova catena nascente entra nel canale: la sequenza segnale è intercalata nella parete del canale e il segmento immediatamente successivo nel poro. L'analisi della struttura mediante microscopia elettronica ha evidenziato che il sito di uscita della sequenza segnale dal ribosoma è allineato con il poro del canale, quindi trasferita direttamente nel canale Sec61. L'apertura del canale avviene in due tappe: il primo è il legame del complesso RNC al Sec61, il secondo è l'inserzione della sequenza segnale nel cancello laterale del canale; infine, lo stato aperto è stabilizzato dall'ingresso della catena nascente nel centro del poro. Una volta aperto il canale, la sequenza segnale rimane ferma e il resto della catena lo attraversa, fino a completa traslocazione. Poi la sequenza segnale può essere rimossa. Durante la traslocazione il canale assicura anche l'esclusione del passaggio di piccole molecole: quando è chiuso l'anello centrale di sei aminoacidi idrofobici blocca il canale, quando aperto i residui idrofobici generano una "guarnizione" intorno alla catena polipeptidica che si sta inserendo (Park & Rapoport, 2012).

E' stato descritto anche un meccanismo di traslocazione post traduzionale dipendente dal complesso Sec61. In questo meccanismo, la sequenza segnale non è riconosciuta dall'SRP, per cui la sintesi procede. Per evitare che la proteina aggregi, è legata da chaperones citosolici, tra cui Hsp90 e Hsp70, che continuano ciclicamente a legare la proteina. La sintesi termina e la proteina esce dal ribosoma. Si ritrova nel citosol completamente avvolta da chaperones. La traslocazione è mediata da un complesso Sec ingrandito, costituito dal Sec61 $\alpha/\beta/\gamma$ e dal complesso Sec62/Sec63. Una volta che il polipeptide è inserito nel canale, gli chaperones sono rilasciati e perdono l'affinità per la proteina, la quale entra nel poro. La

traslocazione avviene attraverso un meccanismo a nottolino. Questo consiste nell'intrappolamento della catena polipeptidica all'interno del lume tramite l'interazione con BiP, un abbondante chaperone del ER. Il polipeptide neosintetizzato, tramite movimenti browniani, è infatti in grado di muoversi nelle due direzioni (da citosol a lume ER e viceversa), ma la porzione che penetra nel lume viene legata da BiP che impedisce la retrotraslocazione al citosol. La proteina è quindi "tirata" verso l'interno da Bip. Bip ha un'attività ATPasica. Lega la proteina, interagisce con il dominio J della proteina Sec63 e idrolizza ATP. L'interazione con il dominio J assicura che Bip sia attivo solo vicino al canale. Infine le sue dimensioni impediscono che la proteina possa regredire all'indietro. Appena traslocata una sufficiente porzione di proteina, una seconda molecola di Bip la lega e procede così fino alla completa traslocazione (Park & Rapoport, 2012)(Fig 1.15)

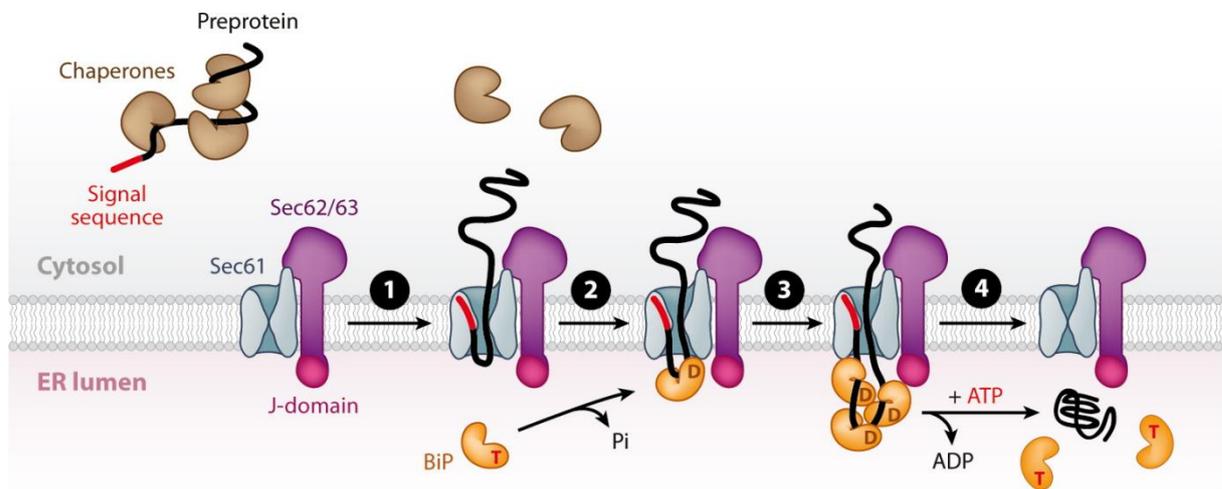


Fig 1.15 Modello della traslocazione post-traduzionale negli eucarioti (Park & Rapoport, 2012). Il polipeptide si lega al complesso SEC, e gli chaperones ad esso associati sono rilasciati (1); Bip legato all'ATP interagisce con il dominio J di Sec63 (2); L'idrolisi di ATP previene lo scivolamento all'indietro del polipeptide (2). Quando una porzione sufficiente di peptide è traslocato viene legato da altre molecole di Bip (3). Alla fine il peptide è rilasciato e lo scambio nucleotidico da ADP ad ATP, promuove il rilascio di Bip.

Nei procarioti il meccanismo post-traduzionale Sec dipendente è mediato dalla proteina SecA. Sec A è uno chaperone citosolico con attività ATPasica. È una proteina costituita da diversi domini: due domini che legano nucleotidi, NBD1 e NBD2, un dominio scaffold ad α -elica, HSD costituito da due sottodomini HSD1 HSD2 e un linker HWD, e un dominio di legame al polipeptide, PPXD. La disposizione tridimensionale genera una tasca (Clamp) tra i domini NBD2 PPXD e HSD che è stato osservato può

essere aperta, parzialmente aperta o chiusa. Sec A interagisce con SecY attraverso i domini PPXD e HSD. SecA interagisce con proteine diverse, in maniera sequenza indipendente, inducendo la formazione di un β strand nella proteina, che a sua volta induce un β -sheet. In questo meccanismo è coinvolto anche il complesso di membrana SecD/F. SecD/F fa parte della famiglia dei trasportatori RND (Resistance nodulation divisions proteins), che accoppiano il flusso ionico con l'esportazione di composti dalla cellula. E' stato dimostrato che, grazie all'intervento di SecD/F, la traslocazione mediata da SecA diventa nelle fasi finali ATP indipendente e accoppiata invece al gradiente protonico di membrana.

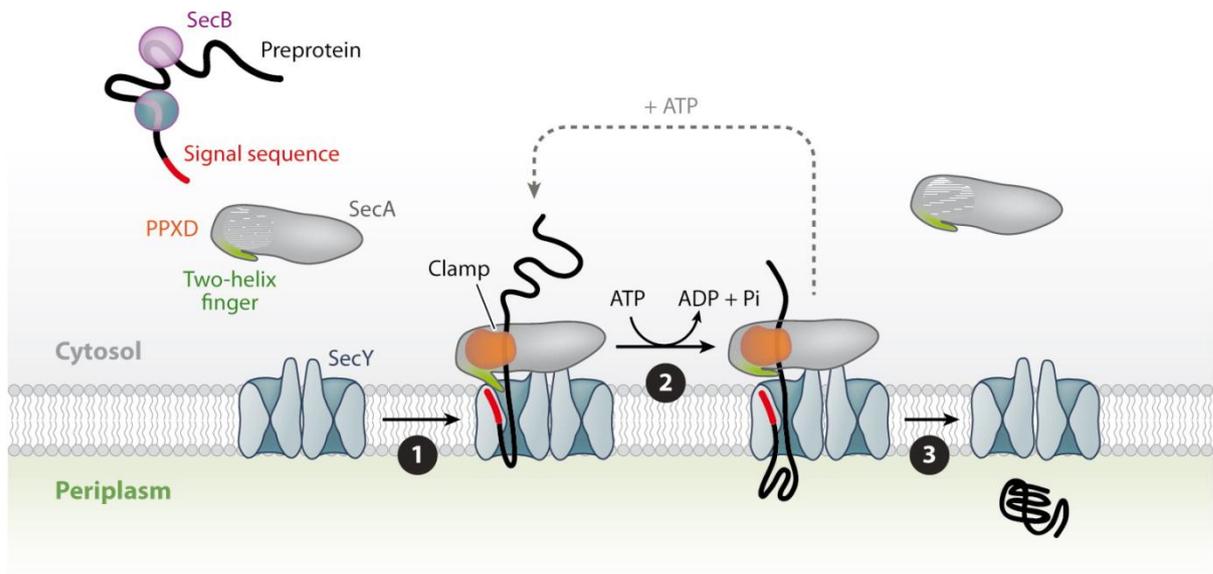


Fig1.16 Traslocazione post-traduzionale mediata da Sec A nei procarioti (Park & Rapoport, 2012). Sec A lega la catena polipeptidica e la inserisce nel canale secY, SecB viene rilasciato (1). Ripetuti cicli di ATP e i movimenti delle due eliche spingono il polipeptide nel canale: il Clamp potrebbe sostenere il polipeptide, le due eliche potrebbero afferrarlo e farlo scivolare (2). Quando la traslocazione è terminata, SecA è rilasciato. PPXD: polypeptide-cross-linking domain

Completata la traslocazione la proteina viene rilasciata nel lume del Reticolo, negli eucarioti, e nel periplasma, nei procarioti. La sequenza segnale può essere rimossa e la proteina completa il suo folding (Park & Rapoport, 2012) (Fig 1.16).

1.4.1.b. Il pathway SRP-Sec per le proteine di membrana

Avendo descritto il meccanismo di traslocazione delle proteine solubili, passo ad analizzare come il canale Sec sia in grado anche di promuovere l'inserimento di proteine transmembrana nel doppio strato fosfolipidico. Abbiamo visto nel paragrafo precedente

come, nel caso delle proteine solubili, il traslocone Sec possa funzionare sia in modalità co- che post-traduzionale. E' da notare invece che le proteine di membrana, con l'importante eccezione delle proteine TA, si inseriscono nella membrana ER (e in quella citoplasmatica delle cellule procariotiche) esclusivamente con modalità co-traduzionale.

Come avviene l'inserimento? Il caso più semplice è quello delle proteine di tipo 1 con sequenza segnale N-terminale. Le prime tappe dell'inserimento sono identiche alla traslocazione delle proteine solubili. Quando la sintesi arriva al futuro TMD, la traslocazione si arresta e il segmento transmembrana diffonde attraverso il lateral gate nel doppio strato lipidico. La parte restante della proteina non viene quindi traslocata e rimane citosolica, mentre la sequenza segnale all'N terminale viene rimossa dalla Peptidasi del segnale (Fig1.17)

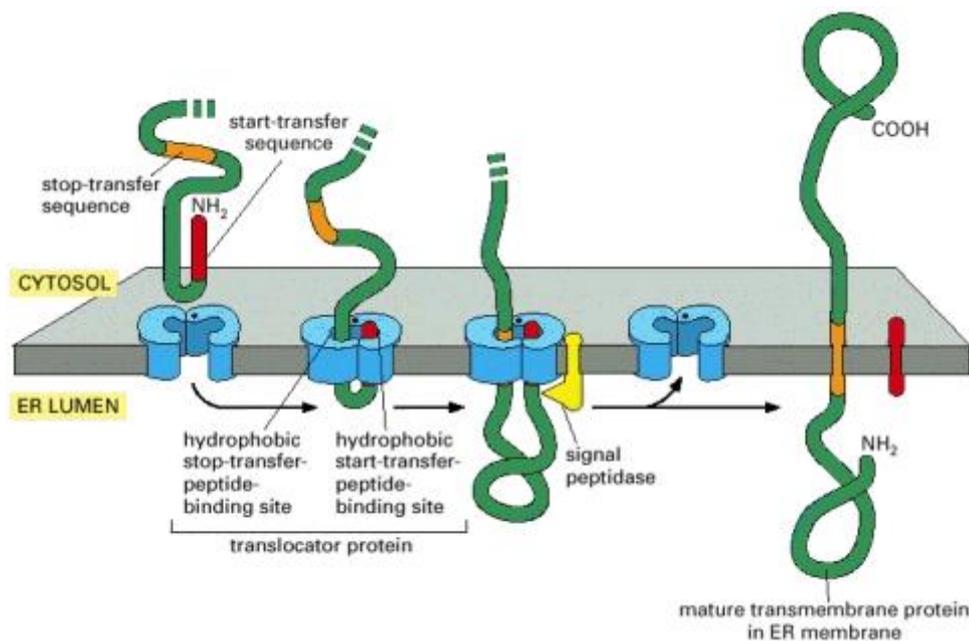


Fig. 1.17 Traslocazione di proteine tipo 1 (Alberts et al, 2009). La traslocazione inizia con la traslocazione della sequenza segnale all'N terminale. Quando arriva il TMD la traduzione si blocca, il TMD è rilasciato nella membrane e la sequenza segnale è rimossa. Così l'N terminale è traslocato e il C-terminale resta citosolico.

Per quanto riguarda le proteine il cui segnale non viene rimosso invece, è il futuro segmento transmembrana che funge da segnale, e viene quindi a chiamarsi ancora segnale. Come per le proteine con segnale all'N-terminale, la sequenza ancora è riconosciuta da SRP, che trasferisce il polipeptide al traslocone e questa sequenza nel traslocone comincia la traslocazione della catena. Dopo il rilascio dal complesso SEC, la sequenza interna non viene riconosciuta dalla peptidasi del segnale e diffonde nel doppio strato lipidico attraverso il lateral gate; la proteina risulta quindi inserita come single spanning ad α elica. Nel caso delle proteine di tipo 2, l'ancora segnale mantiene l'N-terminale nel citosol intanto che la parte a valle della catena polipeptidica viene traslocata co-traduzionalmente (Fig 1.18a).

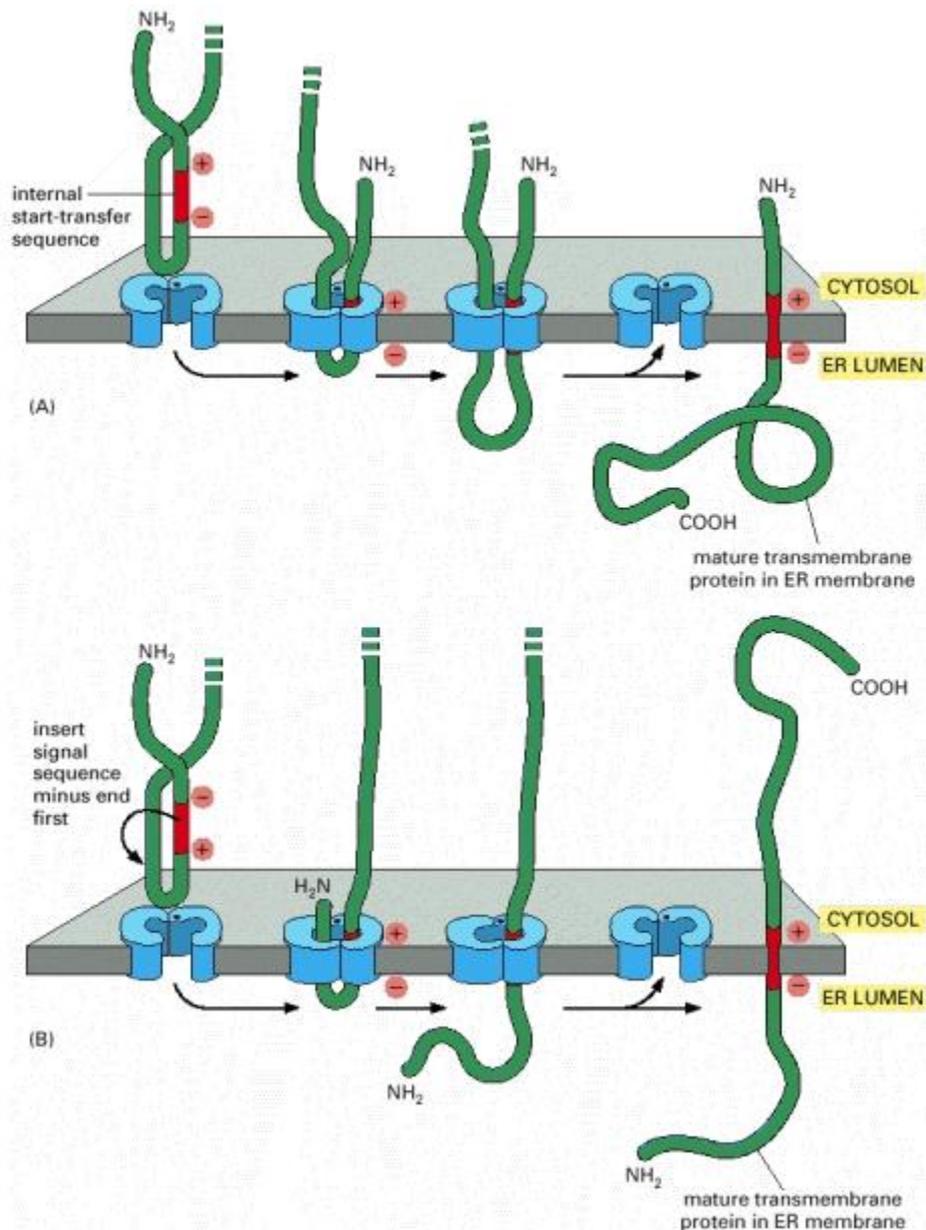


Fig. 1.18. La traslocazione di proteine con ancora segnale. (Alberts et al, 2009). La sequenza segnale interna che funziona come starter della traslocazione si lega al traslocone, in modo che le cariche positive rimangono nel lato citoplasmatico. Se le cariche positive sono maggiori nella regione che precede il core idrofobico rispetto a quelle che lo seguono, l'inserimento della sequenza orienta la proteina a traslocare il C- terminale: proteina tipo 2 (A). Al contrario se le cariche positive che precedono sono inferiori quelle che seguono il core idrofobico della sequenza segnale si ha una proteina tipo 1 (B), quindi secondo la regola che le cariche positive sono sempre citosoliche. Mentre questa regola è seguita nel caso delle cellule procariotiche, la situazione negli eucarioti è più complessa (si veda il testo).

Molte proteine con ancora segnale (non rimossa dalla peptidasi del segnale) possono però inserirsi con topologia opposta (cioè con topologia di tipo I): in questo caso, l'estremità N-terminale viene traslocata e la parte C-terminale rimane citosolica. I fattori che determinano la traslocazione o non-traslocazione dell'N-terminale sono complessi (Fig1.18b). È stato osservato nei procarioti che la composizione aminoacidica delle regioni fiancheggianti il TMD

influenza la loro topologia: in presenza di un'asimmetria di cariche ai due lati del TMD, il lato con più cariche positive è sempre citosolico; questa disposizione è da attribuirsi sia al gradiente protonico a cavallo della membrana, che alla maggior concentrazione di fosfolipidi anionici sull'emistrato citoplasmatico del doppio strato fosfolipidico. Esistono quindi due modi di ottenere proteine con tipologia 1 (Figs. 1.17 e 1.18b)

La membrana del Reticolo endoplasmatico eucariotico però non gode di queste caratteristiche, per cui altri fattori intervengono nella regolazione dell'inserimento dei domini idrofobici. È stato visto che TMD più lunghi e idrofobici favoriscono la traslocazione del N-terminale ma il fattore più importante è la sequenza aminoacidica della regione a monte del segnale ancora. Se l'N terminale è lungo o si ripiega rapidamente, la topologia tipo 1 è sfavorita, non potendo la parte N-terminale traslocare attraverso il doppio strato. Se quindi il TMD è lontano all'N-terminale (>60residui), una proteina di topologia 1 si può ottenere solamente se vi è una sequenza segnale che sarà rimossa all'N-terminale, perché in questo caso è questa che guida l'inserimento, così il TMD si inserisce in maniera passiva, senza poter esplorare la possibilità alternativa (Kida et al, 2005) (Kida et al, 2001). In assenza di sequenza segnale N-terminale, a lunghezza dell'N- terminale a monte del segnale-ancora che sfavorisce la topologia è tra 50 e 60 residui (Wallin & Heijne, 1995). Quindi, in assenza di una sequenza segnale N-terminale, la topologia è determinata da una combinazione di diverse caratteristiche, l'idrofobicità del TMD, le cariche fiancheggianti e non ultima la regione precedente il TMD, che nel complesso vengono definiti fattori agenti in *cis* 2 (Shao & Hegde, 2011).

Per le proteine politopiche la situazione è più complessa. Poiché i TMD sono orientati con orientamento alternato, il primo guida l'inserimento di tutti gli altri. Quando la prima sequenza segnale arriva al traslocone comincia la traslocazione fino ad una sequenza stop, che potrebbe essere il secondo TM, che arresta la traslocazione. Nelle proteine con due TMD, la proteina è così rilasciata nel doppio strato lipidico (Fig. 1.19).

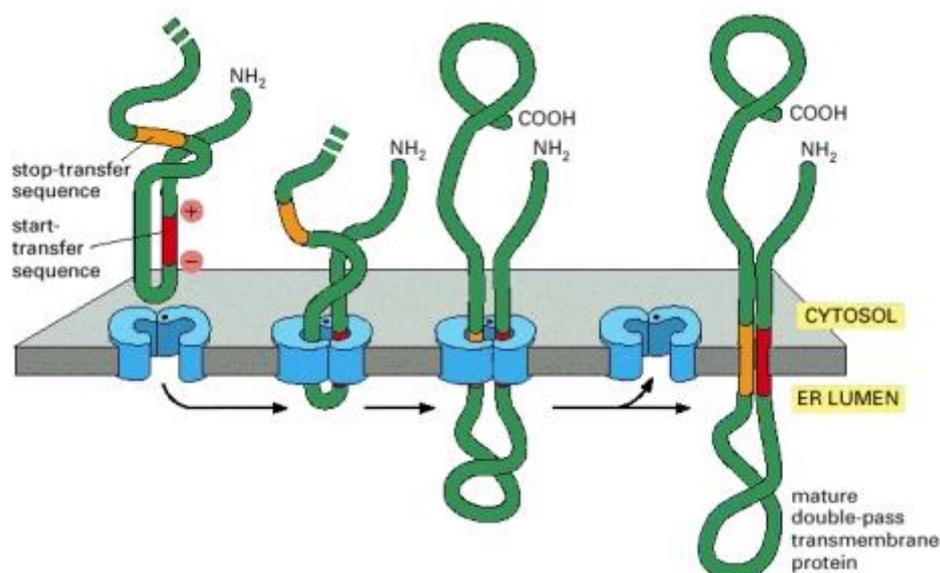


Fig. 1.19 Traslocazione di una proteina con due TMD. (Alberts et al, 2009). In questo caso Una sequenza interna agisce come starter della traslocazione e comincia a trasferire il C-

terminale, e una seconda sequenza detta di stop, blocca la traslocazione, determinando il rilascio della proteina dal cancello laterale del complesso SEC.

Nelle proteine con più di due TMD, una seconda sequenza segnale dopo quella di stop ricomincia la traslocazione, e procede fino al prossimo stop. La traslocazione dell'intera proteina così procede seguendo queste tappe fino alla fine (Fig. 1.20) È stato osservato, però che l'inserimento dei TMD successivi al primo potrebbe non essere sequenziale (Goder et al, 1999) (Kauko et al, 2010) (Yamagishi et al, 2011). Se un TMD non ha un forte determinante di topologia, il suo inserimento può avvenire dopo di quello del TMD che lo segue nella sequenza (Fig. 1.21). Come mostrato in figura, il secondo TMD non ha un forte determinante. Però quando il terzo TMD è traslocato, il secondo è obbligato ad assumere una conformazione compatibile con la topologia del terzo. Infine potrebbero intervenire anche fattori chaperonici, definiti agenti in *trans*.

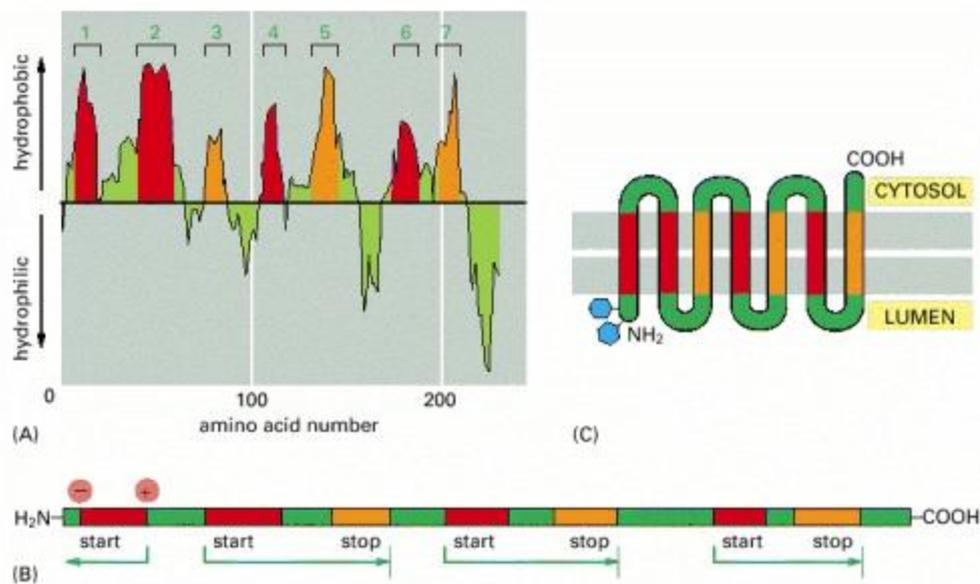


Fig. 1.20 Un esempio di proteina multispawning. L'immagine rappresenta la Rodopsina (Alberts et al, 2009). Il plot dell'idrofobicità identifica sette TMD (A). Le prime due servono come regioni start, che determinano l'inserimento dell'N-terminale, quelle seguenti funzionano da starter e stop alternativamente le frecce indicano la parte della proteina che è inserita nel traslocone (B). La rodopsina quindi ha l'N-terminale verso l'interno e il C-terminale verso il citosol.

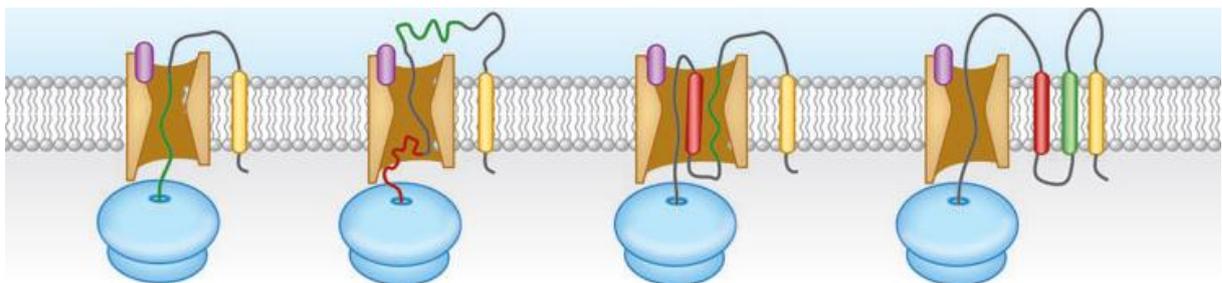


Fig. 1.21 Modello di inserimento non sequenziale dei TMD di una proteina politopica (Shao & Hegde, 2011). Il Primo TMD, in giallo si inserisce nel doppio strato, Il secondo (in verde)

però non è riconosciuto dal traslocone, per cui la sintesi e la traslocazione procedono fino al terzo (in rosso). Quest'ultimo però si inserisce e così costringe l'orientamento del secondo.

In tutti questi processi di integrazione di proteine transmembrana il cancello laterale del canale svolge un ruolo fondamentale (Fig. 1.22). Esso è costituito dalle eliche 2 e 7, 3 e 8 (Heinrich et al, 2000). Non è ancora stato chiarito se il cancello laterale oscilla tra uno stato aperto e chiuso indipendentemente dalla natura della catena nascente in passaggio, oppure se la sua apertura è spinta dalla presenza di una sequenza idrofobica nel canale. Nell'apertura del canale potrebbero essere coinvolte proteine accessorie, che, nel caso delle proteine politopiche potrebbero stabilizzare gli stati intermedi durante l'integrazione. Gli stadi intermedi potrebbero richiedere una funzione di stabilizzazione, per contrastare eventuali conformazioni energeticamente sfavorevoli. Questa funzione si suppone sia svolta dalla proteina YidC, nei procarioti, e TRAM negli eucarioti, anche se è una questione che resta comunque da chiarire (Rapoport et al, 2004).

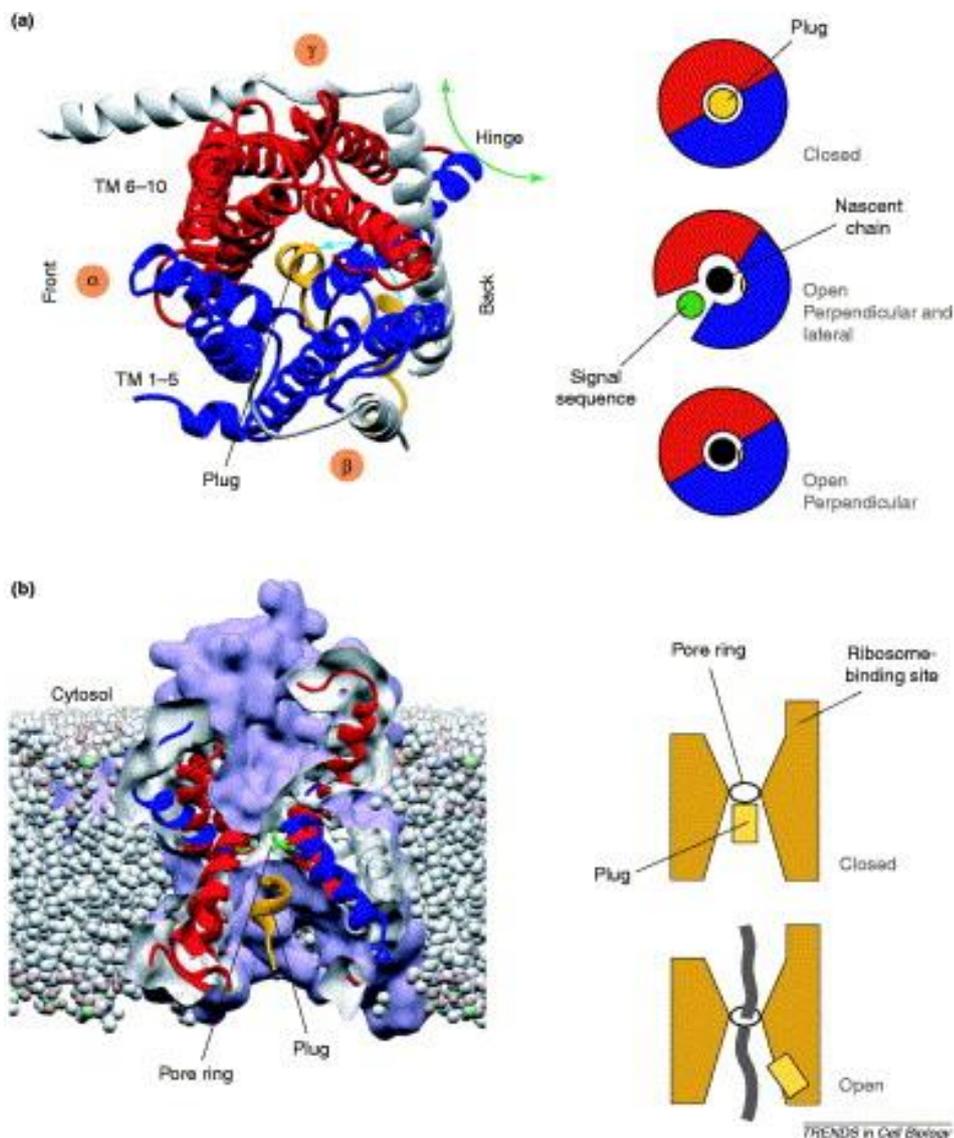


Fig. 1.22 Il traslocone Sec61 e il possibile funzionamento del cancello laterale (Rapoport et al, 2004). A: vista dall'alto del traslocone: in blu i TM 1-6, in rosso i TM 6-10, in grigio α - β - γ . In giallo il plug; il suo movimento è indicato dalla freccia a due teste blu. Nella parte a destra sono invece indicati i modelli di apertura e chiusura del cancello laterale (nel mezzo) e del poro centrale (in basso), visto dall'alto. B sezione longitudinale del poro e schema della traslocazione.

1.4.1.c Il sistema Tat

Un altro sistema cotraduzionale coinvolto nella biogenesi dei compartimenti cellulari è quello Tat. Il complesso Tat è stato identificato nei procarioti, ma ha un omologo anche negli eucarioti, nei cloroplasti. Il complesso Tat, come il Sec, nei procarioti trasloca proteine attraverso la membrana interna, nello spazio periplasmatico, però a differenza del complesso Sec, trasloca proteine contenenti cofattori metallici. L'omologo eucariotico è implicato nella biogenesi delle proteine dei cloroplasti. Le proteine che seguono questo pathway hanno un segnale contenente un motivo RR, che precede il dominio idrofobico della classica sequenza segnale e sono traslocate già ripiegate. Poiché questo complesso è coinvolto esclusivamente nella traslocazione di proteine solubili e non nell'inserimento di proteine di membrana, non lo descrivo dettagliatamente in questa tesi.

1.4.1.d Il sistema YidC/Oxa1

Il complesso SecYEG procariotico è stato ritrovato associato ad un'ulteriore proteina transmembrana, YidC. Ci sono evidenze che dimostrano il suo coinvolgimento nella stabilizzazione delle tappe intermedie durante la traslocazione di proteine con molteplici TMD; sembra inoltre agire come integrasi di proteine Sec dipendenti, in collaborazione con il complesso Sec (Wang & Dalbey, 2011). YidC ha anche un'attività da insertasi indipendente da Sec: la subunità c del complesso ATP sintasi si inserisce attraverso questo meccanismo Sec indipendente. È coinvolta sia in traslocazioni cotraduzionali, che posttraduzionali. Il meccanismo alla base dell'inserimento YidC dipendente non è noto; si ipotizza che il suo legame con la proteina da traslocare la stabilizzi, generando una configurazione ad α -elica e abbassando l'energia di attivazione per l'inserimento della proteina nella fase lipidica. La grande particolarità dell'attività di YidC è la sua completa indipendenza dall'idrolisi di nucleotidi. È costituita da sei domini transmembrana, e studi di mutagenesi hanno evidenziato che i domini transmembrana sono indispensabili per la sua funzione. Studi di crioelettromicroscopia fanno ipotizzare che sia composto da un dimero che forma un canale, e che inoltre la regione periplasmatica sia coinvolta nell'interazione con il complesso Sec.

Negli eucarioti sono state identificate due isoforme omologhe di YidC, una nei mitocondri, Oxa1, l'altra nei cloroplasti, Alb3. Oxa1 facilita l'inserimento nella membrana interna mitocondriale (IMM) di proteine mitocondriali sintetizzate nella matrice, ma anche di qualche specie proteica codificata dal nucleo. Oxa 1, così, può traslocare sia in maniera co (se le proteine sono sintetizzate nella matrice) che post traduzionale (proteine codificate dal nucleo). Una proteina codificata dal genoma mitocondriale, inserita attraverso Oxa1 in maniera cotraduzionale è CoxII (Citocromo ossidasi sub unità II) (Hell et al, 1997). CoxII è una proteina con due TMD e sia il suo N-terminale che il C-terminale

sono rivolti verso lo spazio intermembrana. Il precursore di CoxII possiede una sequenza all’N terminale rimossa dopo l’inserimento del primo TMD (Nunnari et al, 1993). Oxa1 trasloca il primo TMD, ma per la traslocazione del secondo TMD e del lungo dominio C-terminale necessita di un’ulteriore traslocasi, Cox18, anche detta Oxa2.(Fig1.23).

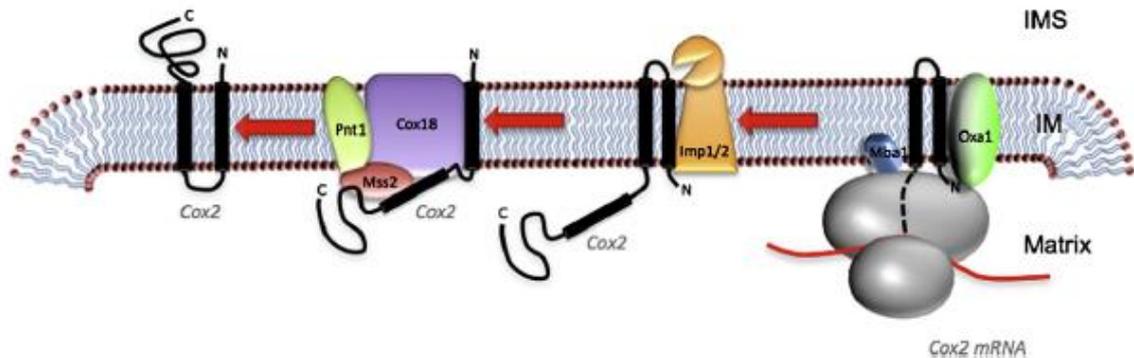


Fig 1.23. Inserimento di Cox2. (Wang & Dalbey, 2011). Durante la traduzione Cox2 comincia la sua traslocazione, una volta inserito il primo TMD, la sequenza all’N-terminale è rimossa dalla peptidasi Imp1/2, poi tramite Cox18 (Oxa2). La proteina trasloca anche il secondo TMD.

Oxa1, come YidC può traslocare proteine anche in maniera posttraduzionale: esempi sono le sub unità Atp9 e Atp6 del complesso F1F0 ATP sintasi (Altamura et al , 1996). A differenza della proteina batterica, Oxa1 presenta cinque domini transmembrana. Come per il suo ortologo, la delezione di tali domini abolisce la sua funzionalità (Wang & Dalbey, 2011).

La seconda isoforma eucariotica, Alb3, è stata identificata nei cloroplasti (Moore et al, 2000). Anche Alb3 interagisce con il complesso Sec, e probabilmente ha un ruolo nella traslocazione Sec dipendente. La sua struttura è analoga a quella di Oxa1. E’ stato inoltre identificato un omologo di Alb3, chiamato Alb4, in Arabidopsis (Gerdes et al, 2006). Mutanti di delezione per queste proteine mostrano fenotipi severi. Inoltre studi di mutagenesi hanno dimostrato che Alb3 e Alb4 non hanno funzioni ridondanti.

1.4.2 I meccanismi post traduzionali

Nel capitolo precedente, abbiamo visto che sia il sistema SEC che quello YidC/Oxa possono funzionare in modalità sia co- che post-traduzionale. Qui tratterò invece di due sistemi che funzionano esclusivamente in modalità post-traduzionale e che sono responsabili per la biogenesi dei mitocondri e dei perossisomi. I meccanismi post traduzionali permettono l’inserimento e la traslocazione di proteine attraverso membrane, una volta che la sintesi proteica è ultimata. Esistono diversi meccanismi di questo tipo, ritrovati sia in procarioti che in eucarioti. Di seguito saranno descritti in dettaglio il sistema TOM/TIM e il sistema Pex.

1.4.2 a Il sistema TOM/TIM

I precursori delle proteine mitocondriali codificate dal nucleo possiedono una sequenza segnale, riconosciuta dai recettori presenti sulla superficie mitocondriale. Questo segnale guida la destinazione finale nei subcompartimenti mitocondriali. Si possono distinguere due gruppi principali di segnali. I segnali del primo gruppo sono costituiti da una estensione dell'N terminale della proteina precursore, che viene poi rimossa. Il secondo gruppo di segnali comprende sequenze che non saranno rimosse, ma sono parte della proteina stessa.

Le proteine mitocondriali precursori si possono classificare in cinque gruppi differenti e ognuna segue un pathway differente (Fig. 1.24): pathway della matrice e membrana interna; pathway per i trasportatori o carrier della membrana interna, pathway del folding ossidativo dello spazio intermembrana, pathway delle proteine β barrel della membrana mitocondriale esterna, pathway delle proteine ad α -elica della membrana esterna. Ognuno segue una via diversa di traslocazione ma tutte hanno in comune il primo sistema di ingresso, la Traslocasi TOM (Translocase of the outer membrane), che consente di oltrepassare la membrana esterna mitocondriale (MOM) (Schmidt et al, 2010).

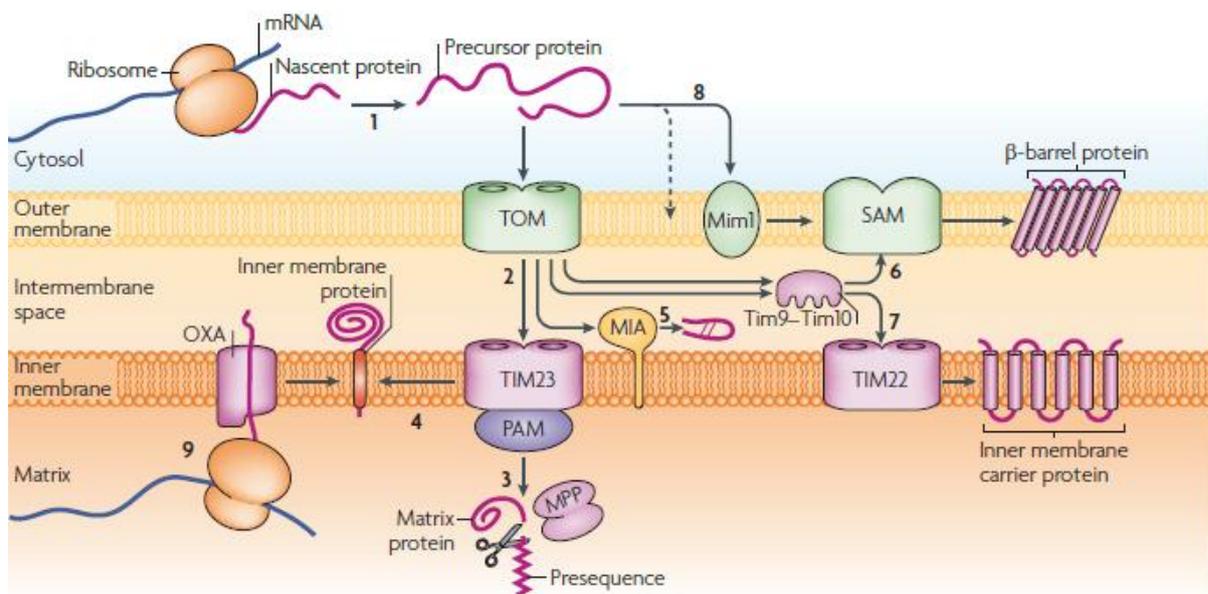


Fig 1.24 Le cinque vie di importazione di proteine dal citosol ai mitocondri TOM/TIM (Schmidt et al, 2010) La proteina precursore viene sintetizzata dai ribosomi citosolici (1); viene poi traslocato attraverso il complesso TOM (2) oppure, nel caso di proteine ad alfa elica della MOM viene inserito tramite Mim/SAM (8); Le proteine dirette alla matrice vengono consegnate al complesso TIM23 e la loro sequenza segnale viene rimossa nella matrice (3). Le proteine della IMM si inseriscono nel doppio strato uscendo da DIM23 mediante un "lateral gate" (4); le proteine dello spazio intermembrana sono traslocate tramite TOM e processato dal sistema MIA (5); le proteine carrier della IMM, dopo importazione mediante TOM, vengono inserite mediante il complesso TIM22 (7); Le proteine beta barrel dopo passaggio attraverso TOM utilizzano il sistema SAM per l'inserimento nella MOM (6); Le proteine codificate dal genoma mitocondriale sono inseriti dal complesso OXA (9).

Pathway della matrice e della membrana interna. Le proteine destinate alla matrice o alla membrana interna comprendono la quasi totalità del proteoma mitocondriale. La sequenza segnale è localizzata all'N terminale e consta di un numero variabile di aminoacidi da 15 a 5. E' costituita da un'alternanza di aminoacidi basici e apolari/idrofobici, disposti in modo da generare un' α -elica anfipatica riconosciuta dai complessi TOM/TIM23 (Translocase of inner mitochondrial membrane). Le proteine destinate alla membrana interna mitocondriale (IMM) contengono in più un segnale idrofobico che blocca la traslocazione attraverso IMM con conseguente inserimento nel doppio strato lipidico (Fig. 1.25).

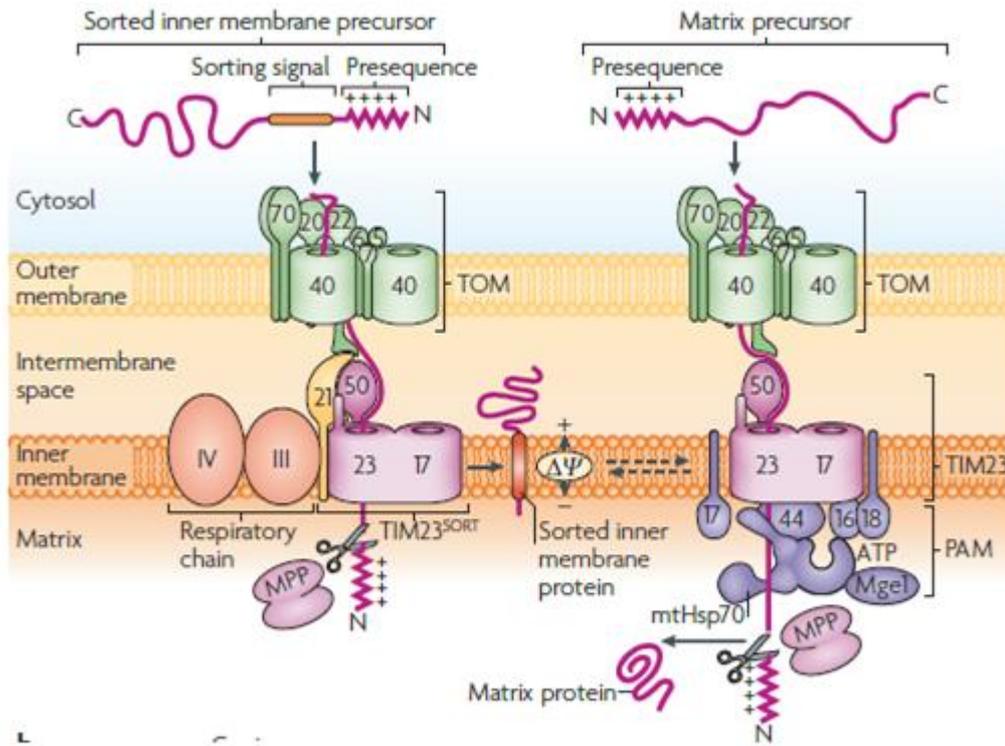


Fig.1.25. L'inserimento delle proteine alla matrice (Schmidt et al, 2010). I precursori delle proteine sono importate dalla traslocasi TOM, che coinvolge i recettori Tom 20 e Tom22 per il riconoscimento e Tom40 per la traslocazione. La traslocasi della membrana interna mitocondriale, TIM23, ha due isoforme. TIM23^{SORT} (a sinistra) per le proteine della IMM e Tim23-PAM (a destra) per quelle della matrice. Il potenziale di membrana guida la traslocazione. Le peptidasi mitocondriali (MPP) rimuovono la presequenza.

Il complesso TOM è costituito da un componente centrale, Tom40, tre proteine recettoriali Tom 20, Tom22, e Tom70 e diverse piccole proteine TOM. I recettori Tom 20 e Tom22 riconoscono la sequenza segnale; Tom 20 riconosce le superfici idrofobiche, Tom 22 le cariche positive. La catena polipeptidica, in maniera lineare o ad α - elica è traslocata, poi, dalla proteina a β -barrel Tom40. Una volta nello spazio intermembrana, la proteina lega la coda citosolica di Tom22. La traslocazione nella membrana interna o nella matrice è mediata dal complesso TIM23. TIM23 è costituito dai canali Tim23 e Tim17 e dalle proteine Tim50 e Tim21. Questi ultimi, insieme a Tim23 hanno un dominio esposto nello spazio intermembrana che connette il complesso TIM23 al complesso TOM. Tim23 consente il passaggio di una proteina con una conformazione ad α -elica. Il passaggio di una proteina

potrebbe dissipare il gradiente protonico a cavallo della IMM, così l'apertura del canale deve essere finemente regolata. Il dominio nello spazio intermembrana di Tim50 blocca il canale e ne permette l'apertura solo in presenza di una sequenza segnale. Una volta traslocata la proteina, il canale è richiuso. Tim21 lega la coda intermembranaria di Tom22 e contribuisce alla connessione tra i due sistemi di traslocasi. La traslocazione della sequenza segnale carica positivamente attraverso Tim23 è però regolata dal gradiente della IMM: questo attiva Tim23, e ha un effetto elettroforetico sulle sequenza stessa.

La catena polipeptidica che attraversa lo spazio intermembrana può essere integrata nella IMM oppure arrivare fino alla matrice. Sono stati identificate due isoforme del complesso TIM23, TIM23^{SORT} e TIM23/PAM, coinvolte rispettivamente nella traslocazione di precursori della IMM o della matrice (Fig. 1.25). TIM23^{SORT} è stato osservato essere in comunicazione con i complessi III e IV della catena respiratoria, e presenta un componente in più, Tim21. Tim21 ha un duplice ruolo, non solo lega il complesso TOM, ma media il legame di TIM23 con la catena respiratoria. Si ritiene che, come il traslocone Sec61, anche il complesso TIM23^{SORT} abbia la capacità di aprirsi lateralmente per permettere l'integrazione dei TMD nel doppio strato fosfolipidico, ma il meccanismo di apertura non è stato ancora chiarito. TIM23/PAM invece manca di Tim21 ma è associato al complesso motore PAM. Il nucleo di PAM è costituito dallo chaperone mtHsp70 legata a Tim44 e a diversi co-chaperone: Pam16 (forma un complesso con il Pam18), Pam17 (coinvolto nell'organizzazione strutturale di TIM23/PAM), Pam18 (è un co-chaperone di tipo J coinvolto nell'attività ATPasica di mt Hsp70), Mge1 funge da scambiatore di nucleotidi per mtHsp70 . Una volta traslocate, le proteine subiscono il taglio da parte delle peptidasi mitocondriali (MPP), che rimuovono la presequenza. Quelle dirette alla matrice sono poi integrate attraverso il complesso Tim23/Pam, se invece sono dirette alla IMM, rimosso il primo segnale ad opera delle MPP, la proteina espone il segnale di sorting , quello di localizzazione alla membrana; così si inserisce nel doppio strato.

Pathway delle proteine carrier. Le proteine Carrier destinate alla IMM possiedono più TMD, integrati in membrana come domini ad α -elica. Queste proteine utilizzano il complesso TOM, ma con alcune importanti differenze rispetto al pathway classico di importazione alla IMM e alla matrice (Fig 1.26).

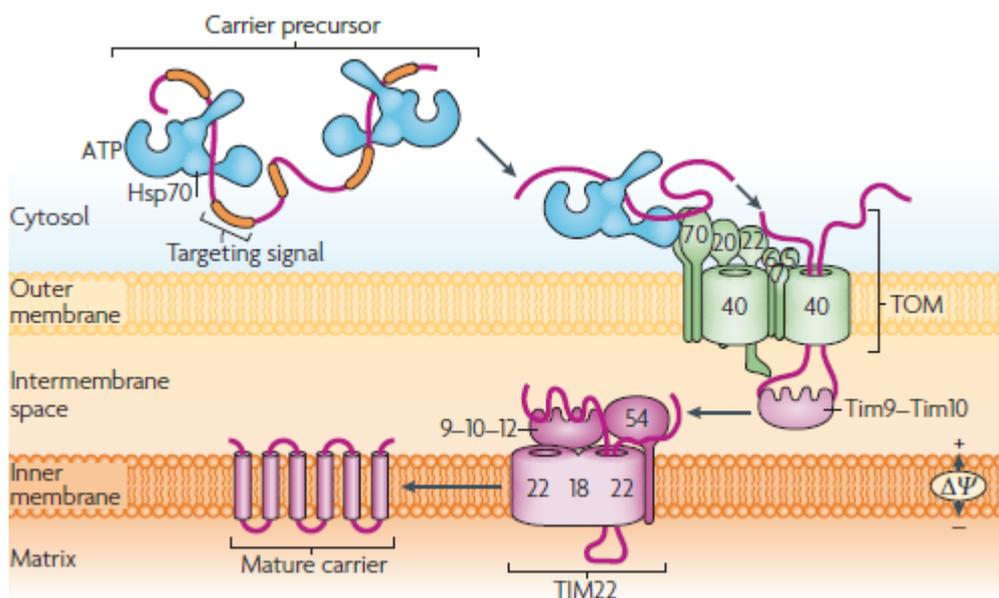


Fig 1.26 la traslocazione delle proteine carrier sulla IMM (Schmidt et al, 2010). I precursori delle proteine carrier contengono segnali di targeting interni. Gli chaperones citosolici prevengono l'aggregazione. Il recettore Tom70 possiede un sito di legame per il precursore e gli chaperones. Dopo la traslocazione di Tom40, il precursore è trasferito dal complesso Tim9-Tim10 attraverso lo spazio intermembrana, poi il complesso TIM22 trasloca la proteina nella IMM, e la reazione dipende dal potenziale di membrana.

Intervengono chaperones citosolici, quali Hsp70, Hsp90, che prevengono l'aggregazione dei domini idrofobici. Inoltre Hsp70 guida il precursore al complesso TOM, legandosi al recettore Tom70 in membrana. Il rilascio della proteina dagli chaperones è ATP dipendente. Le proteine Carriers non sono traslocate in maniera lineare, ma nello spazio intermembrana, la proteina viene riconosciuta dal complesso esamerico Tim9 e Tim10 che la trasporta sulla membrana, in prossimità del complesso TIM22. TIM22 è costituito dal canale Tim22 (omologo a Tim23 e Tim17, generato probabilmente per duplicazione genica nel corso dell'evoluzione), dalle proteine Tim54 e Tim18, coinvolti rispettivamente nelle interazioni con Tim9 e Tim10 e nell'assemblamento del complesso. L'attivazione del canale Tim22 è dipendente dal gradiente protonico a cavallo della IMM. La proteina entra nel canale, ed è rilasciata lateralmente nella fase lipidica. Ad oggi purtroppo il meccanismo attraverso cui avviene questo rilascio è ancora sconosciuto.

Proteine destinate allo spazio intermembrana. Le proteine destinate allo spazio intermembrana sono generalmente piccole proteine contenenti motivi ricchi di Cisteine. Sono sintetizzate nel citosol e traslocate attraverso la MOM, dal complesso TOM, non foldate e ridotte. Nello spazio intermembrana, poi, subiscono un processo di ossidazione mediato dal complesso MIA. Del complesso MIA fa parte la proteina transmembrana Mia40 che catalizza la formazione di ponti disolfuro tra le cisteine delle proteine appena traslocate, e ne induce il folding. Mia40 è ossidato da Erv1; questa ossidazione permette a Mia40 di generare ponti disolfuro con le catene polipeptidiche, generandosi così un legame misto Mia40 proteina. A questo punto Mia40 trasferisce il legame al nuovo peptide, riducendosi in questo processo. Viene poi riossidato da Erv1, il quale a sua volta trasferisce gli elettroni alla catena respiratoria.

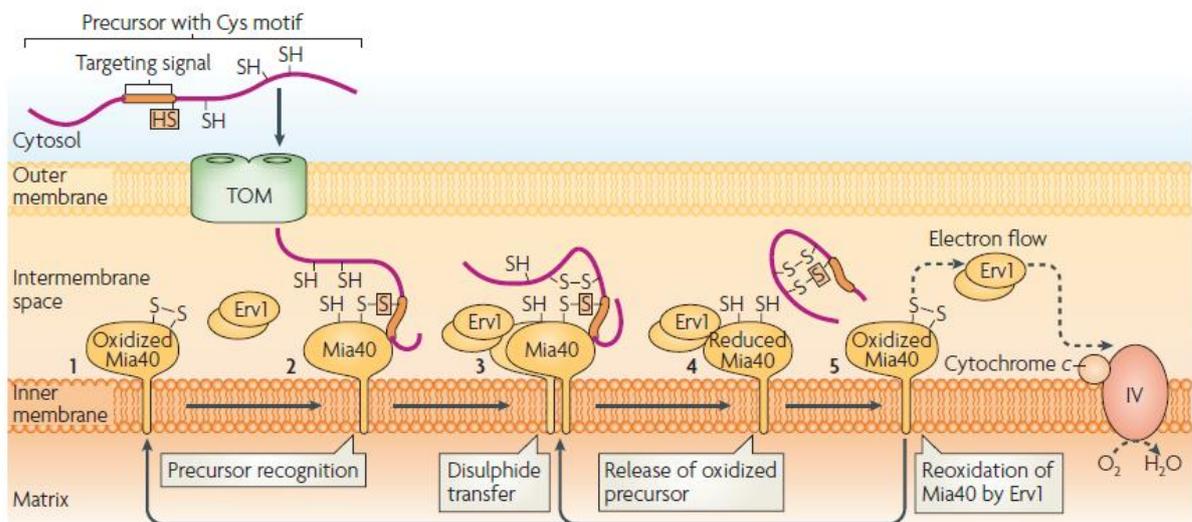


Fig. 1.27. Le proteine dello spazio intermembrana. (Schmidt et al, 2010). La proteina integrata attraverso il complesso TOM, arriva nello spazio intermembrana, qui la proteina transmembrana

della IMM, Mia40, nel suo stato ossidato (1) induce la formazione di ponti disoluro (2) misti polipeptide-Mia40; Erv1 ossida Mia40 e il legame è trasferito al polipeptide (3), Erv1 riossida Mia40 (4) e la proteina è rilasciata. Erv1 trasferisce gli elettroni al complesso IV della catena respiratoria.

Proteine β -barrel della MOM. Le proteine β -barrel attraversano la MOM attraverso il complesso TOM, e, una volta nello spazio intermembrana, sono inserite nella MOM mediante il complesso SAM. Il complesso SAM è costituito dalla proteina Sam50, Sam37 e Sam35. Sam50 è omologa alla proteina batterica Bama (β -barrel assembly machinery), complesso che trasloca proteine β -barrel dallo spazio periplasmatico alla membrana esterna. I precursori β -barrel non sono trasferiti direttamente dal complesso TOM al complesso SAM, ma vengono legati prima dalle proteine Tim9 -Tim10 e Tim 8-Tim13. Il segnale di sorting, che corrisponde al β -strand più C-terminale, dirige l'inserzione nel complesso SAM, e lega la proteina Sam35. Sam37, poi, la terza subunità del complesso, promuove il rilascio del precursore in membrana. Tom 40 è inserito in membrana seguendo questa strada. Il meccanismo, anche in questo caso non è ancora del tutto chiaro (Fig 1.28 a.)

Proteine ad α -elica della MOM. Le proteine ad α -elica della MOM possono essere distinte in base alla localizzazione del TMD, che può essere all'N-terminale, centrale o al C-terminale. Il TMD funge anche da sequenza segnale. Queste proteine non seguono tutte lo stesso pathway, ma possono intervenire diversi complessi. Le proteine ancorate all'N-terminale utilizzano una proteina del macchinario di importazione nota come Mim1, che interagisce con il complesso Sam per l'inserimento in membrana. Le proteine con segnale interno utilizzano un differente meccanismo. Il precursore di Tom22, con il segnale localizzato nel centro della sequenza, è un esempio di questa categoria. Usa il complesso TOM per essere trasportato ai mitocondri e poi il complesso SAM per l'inserimento. Precursori con TMD multipli utilizzano Tom70 per localizzarsi ai mitocondri e nessun altro complesso noto. Probabilmente vi è una insertasi dedicata, non ancora nota (Fig 1.28 b).

Quanto invece alle proteine ancorate al C-terminale non è stato ancora identificato nessun componente coinvolto. Nessuno dei meccanismi noti sembra essere coinvolto nella traslocazione o nel targeting. Queste proteine potrebbero utilizzare un'insertasi non ancora identificata o essere inserite in maniera diretta nella fase lipidica, e questo implicherebbe un ruolo dominante della composizione lipidica della membrana stessa. Parte dello scopo di questa tesi è stata di cercare di capire i meccanismi di biogenesi delle proteine Tail Anchored della MOM.

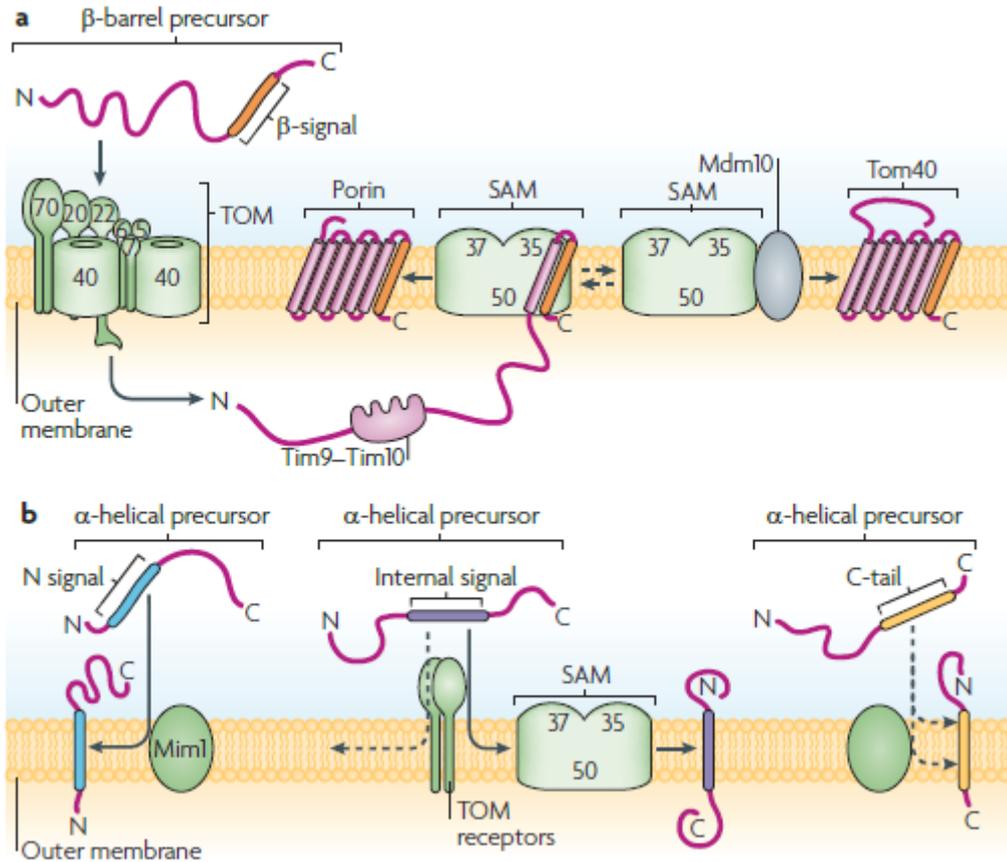


Fig 1.28. Le proteine della MOM (Schmidt et al, 2010). **A:** le proteine β barrel sono importate dalla traslocasi TOM, poi interagisce con Tim9-Tim10 nello spazio intermembrana. Il segnale di sorting inizia l'inserimento del precursore attraverso il complesso SAM, poi in maniera voltaggio dipendente sono inserite nella fase lipidica. **B:** le proteine ad α elica sono importate in diversi modi a seconda della posizione del segnale. Se il segnale è all'N-terminale, la traslocazione è mediata da Mim1; se è interno è traslocato attraverso il recettore Tom e il complesso SAM. Se il segnale è al C-terminale, non è ancora ben noto il meccanismo coinvolto.

1.4.2.b Il sistema Pex

Un altro sistema di import proteico posttraduzionale è quello dedicato all'inserimento delle proteine dei perossisomi. I perossisomi sono organelli privi di DNA. La funzione principale è la beta-ossidazione degli acidi grassi, con detossificazione del perossido di idrogeno che viene prodotto durante questo processo. La beta-ossidazione perossisomiale è destinata agli acidi grassi a catena molto lunga, per i quali non esistono carrier ed enzimi adatti nel mitocondrio. La prima differenza è che l'acil-CoA viene importato nel perossisoma tramite un sistema indipendente dalla carnitina, la seconda risiede nell'acil-CoA deidrogenasi, che usa come accettore di elettroni l'ossigeno e non il FADH2 (come nel mitocondrio): in sostanza la reazione è $\text{acil-CoA} + \text{O}_2$ che genera $2 \text{ enoil-CoA} + \text{H}_2\text{O}_2$. Per la detossificazione dell'acqua ossigenata il perossisoma possiede la catalasi che la trasforma in H_2O e ossigeno molecolare. I cicli di beta-ossidazione continuano finché

la catena diviene abbastanza corta da essere importata e metabolizzata nel mitocondrio. Questo perché nel perossisoma non vi è il corredo enzimatico necessario all'elaborazione di acidi grassi a catena media e corta.

I perossisomi costituiscono una parte semi-autonoma della via di secrezione: vengono originati de novo dal reticolo endoplasmatico, ma sono poi in grado di replicarsi autonomamente. La loro maturazione richiede pertanto, al pari degli altri organelli cellulari, il trasporto post-traduzionale, nella matrice e nella membrana, di proteine sintetizzate nel citosol. Le proteine della matrice e quelle della membrana, seguono pathway diverse. A loro volta le proteine di membrana perossisomiali (PMP) possono essere integrate attraverso due modi differenti, uno diretto da citoplasma ai perossisomi e l'altro a partire dal reticolo endoplasmatico.

Le proteine destinate alla matrice dei perossisomi vengono ripiegate nel citosol e mantengono la conformazione nativa durante l'importo, caratteristica che i perossisomi condividono con il sistema TAT dei tilacoidi e dei batteri, o con il trasporto attivo nucleare. Nel caso del nucleo, tuttavia, la struttura responsabile del passaggio di grossi complessi macromolecolari, il poro nucleare, è ben conosciuta e visibile in microscopia elettronica. Al contrario, negli altri due sistemi, la natura del poro rimane elusiva. Il processo di importo può essere suddiviso in quattro fasi: riconoscimento della proteina da parte di un recettore solubile nel citosol e indirizzamento alla membrana perossisomiale, traslocazione del complesso recettore-cargo nel lume del perossisoma, disassemblaggio del complesso recettore-cargo nella matrice, riciclo del recettore nel citosol (Platta & Erdmann, 2007).

Sono stati individuati due tipi di segnale di importo: PTS1 (peroxisomal targeting signal type 1), riconosciuto da Pex5; è posizionato all'estremità C-terminale e consiste in una sequenza tripeptidica Serina-Lisina-leucina (SKL), o sue varianti; PTS2 (peroxisomal targeting signal type 2), riconosciuto da Pex7 assieme a Pex18 e Pex21, è una sequenza di nove aminoacidi (R/K-L/V/I-X5-H/Q-L/A) vicino all'N-terminale. I recettori dirigono il cargo verso la membrana del perossisoma, dove si ritiene che il passaggio del complesso recettore-cargo avvenga tramite un poro transiente formato dal recettore stesso con l'ausilio di co-recettori (Erdmann & Schliebs, 2005).

Pex5 ha sei domini tetratricopeptidici per il legame della peroxine (proteine perossisomiali). Due proteine di membrane, Pex14 e Pex13, assieme alla periferica Pex17, fungono da ancora nelle fasi iniziali della formazione del poro, permettendo la concentrazione di complessi recettore-cargo alla membrana (Eckert & Erdmann, 2003). L'elevata concentrazione di Pex5 faciliterebbe la sua inserzione in membrana. Assieme ad altre proteine come Pex8 o le proteine Pex2, Pex10 e Pex12, che hanno dei particolari domini a dito di zinco denominati RING-finger, sarebbe responsabile della conseguente formazione del poro transiente di traslocazione. Il meccanismo sarebbe simile a quello che utilizzano le tossine formanti pori, come ad esempio l'antrace, per l'inserimento nella cellula di proteine letali: entrambi non richiedono energia e sfruttano come forza motrice la elevata concentrazione di monomeri di proteina vicino alla membrana. Una volta traslocato nella matrice, il complesso recettore-cargo viene dissociato e il poro disassemblato, in modo da consentire il riciclo del recettore e non perdere la impermeabilità della membrana. Il disassemblaggio e la dislocazione del recettore, similmente ai meccanismi di esporto e degradazione associati al reticolo endoplasmatico, utilizza un complesso formato da proteine AAA⁺: le peroxine Pex1 e Pex6, con la loro ancora di membrana Pex15/Pex26. Queste riconoscono un segnale di mono-, di o poliubiquitinazione sulle proteine. Si è visto che Pex5 può essere mono o poli- ubiquitinata da Pex22, membro degli enzimi E2 ubiquitinasi, e dal complesso delle proteine Pex2, pex10, Pex12, che contengono domini simili alle E3 ubiquitina-ligasi. Una cascata di interazione proteina-proteina porterebbe alla ubiquitinazione e alla

Fig 1.29 L'import delle proteine della matrice. (Hasan et al, 2013). Questo tipo di import necessita un meccanismo ciclico di recettori. Il processo si può dividere in cargo e riconoscimento del recettore, nel citosol, avvicinamento alla membrana e traslocazione; infine il recettore è rilasciato nel citosol per un nuovo ciclo (A). Il riconoscimento in particolare avviene quando una proteina espone un segnale tipo 1 (PTS1) o 2 (PTS2). Questo segnale è riconosciuto dai recettori specifici Pex5p e Pex7p rispettivamente. Se le proteine non espongono un segnale canonico possono legarsi all'N-terminale di Pex5. A questo punto il complesso è diretto alla membrana perossisomiale. Pex7p invece richiede altre proteine accessorie, Pex18p e Pex21p per traslocare proteine con segnale PTS2 (B). La traslocazione del cargo così può avvenire. L'associazione di Pex14 e Pex5 comporta la formazione di un poro che funziona come una proteina canale. Come avvenga la traslocazione non è ancora noto (C). Alla fine i recettori ritornano nel citosol, per questo motivo Pex5p è monoubiquitinato da Pex22p, Pex4p e Pex12p. L'ubiquitina è rimossa da Ubp15, e il recettore così ricomincia il ciclo. Se il recettore è però poliubiquitinato Ubc4, procede verso la degradazione mediata da proteasoma

Mentre nel caso dei mitocondri e del ER lo stesso macchinario garantisce la traslocazione di proteine solubili e l'integrazione di proteine di membrana, nel caso dei perossisomi i due macchinari sono distinti. L'inserzione dal citosol delle proteine di membrana del perossisoma (peroxisomal membrane proteins – PMP – di classe I) richiede la presenza delle proteine Pex19, Pex3 e in alcuni organismi di Pex16 (Fig 1.30). Pex19 è solubile nel citosol e pare funzionare come chaperon e recettore per le PMP: molte, che funzionano come segnali di indirizzamento, contengono siti di legame a Pex19. Oltre a questo, per un corretto indirizzamento, le proteine integrali necessitano di una sequenza di ancoraggio alla membrana, mentre quelle periferiche di una sequenza di legame ad altre proteine della membrana perossisomiale. Pex3 funziona come ancora di membrana per il complesso Pex19-PMP. Le proteine di classe 2, invece seguono una via reticolo mediata. Pex3 e Pex16 stessi appartengono a questa classe. Pex3 è una proteina integrale che interviene sia nei processi di generazione de novo dei perossisomi sia nei processi di importo durante la maturazione. Inizialmente viene localizzata nel RE in foci che poi si staccano in modo dipendente da Pex19 divenendo perossisomi.

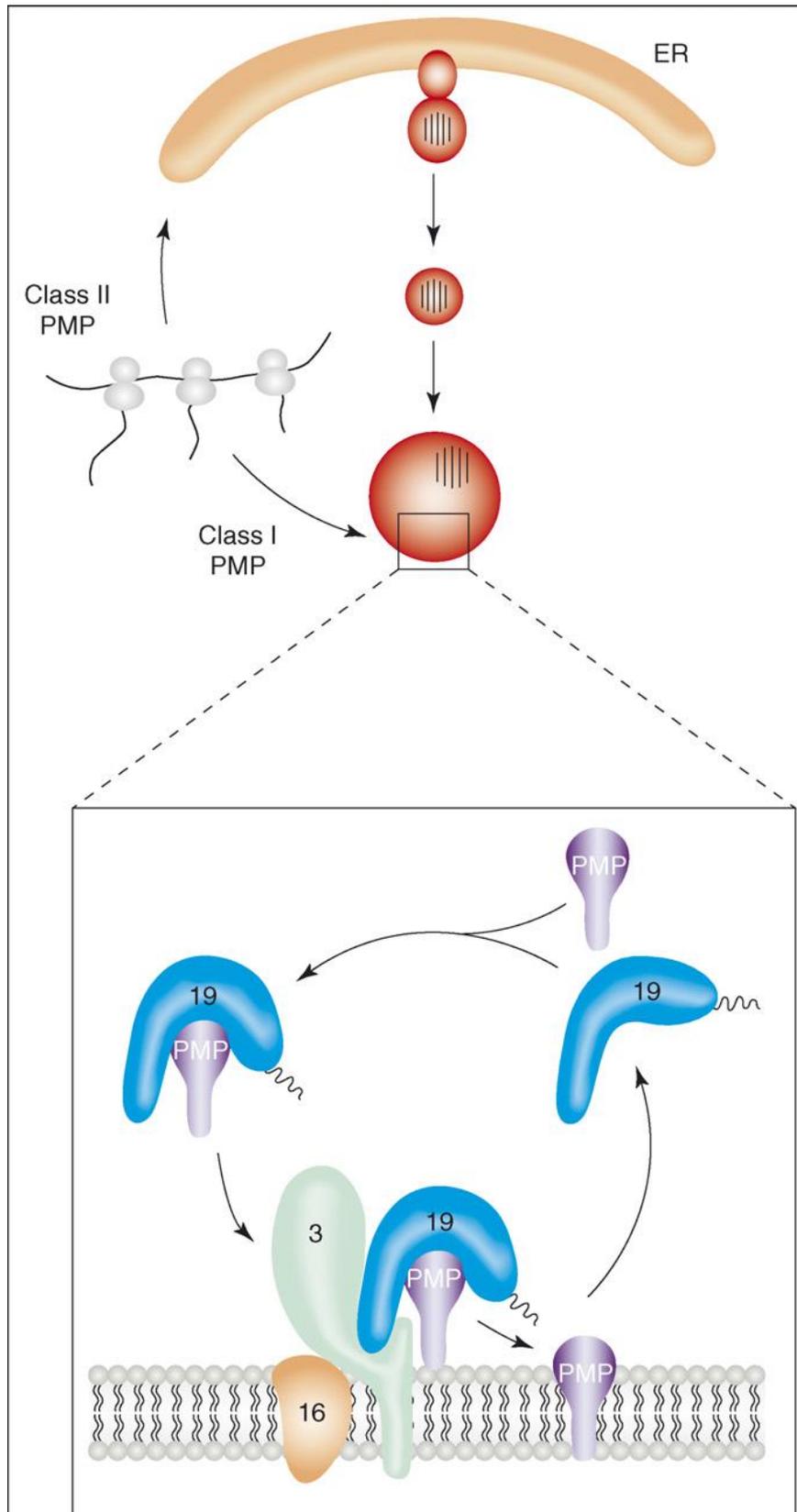


Fig 1.30 L'inserimento delle proteine perossisomiali di Classe 1 e 2 (Platta & Erdmann, 2007).La PMP di classe 1 è riconosciuta da Pex19, il quale interagisce con il complesso Pex3 Pex16 sulla membrana e rilascia così la proteina. Per le proteine di classe 2 invece il processo è più lungo perché è previsto l'inserimento al reticolo, poi arrivano ai perossisomi in maniera Pex19 dipendente.

1.5 Inserimento delle proteine Tail Anchored

Tutti i meccanismi di inserimento proteico osservati fino ad ora (con l'eccezione del sistema dei perossisomi, vedi paragrafo 1.5.2 b) non consentono l'inserimento della classe di proteine con ancora al C-Terminale. Queste proteine non hanno un segnale di localizzazione all'N-terminale, hanno un solo TMD, che è la sequenza segnale, con una conformazione ad α -elica, e una idrofobicità variabile. A causa della sua posizione, la sequenza segnale, il TMD fuoriesce dal ribosoma solo quando ormai la sintesi è completata, per cui non riesce ad interagire con SRP, e quindi non segue la via cotraduzionale, da esso mediata. La traslocazione deve avvenire necessariamente in maniera post-traduzionale (Fig 1.31).

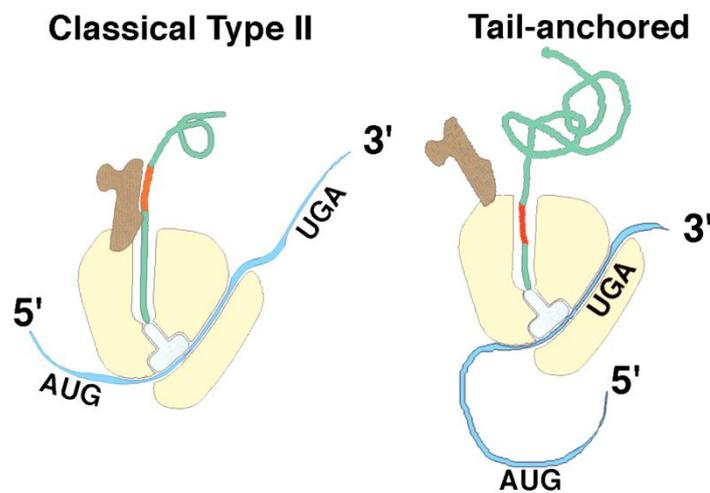


Fig 1.31 Le Proteine di classe 2 e le TA. (Borgese et al, 2003). Quest'ultime non riescono ad interagire con SRP in quanto il TMD emerge dal ribosoma quando la traduzione è ormai completata, per cui l'inserimento è necessariamente post-traduzionale.

Abbiamo visto nei paragrafi precedenti come il traslocone Sec61 possa essere utilizzato in modalità sia co- che post-traduzionale, ragione per cui per molto tempo si è pensato che le TA potessero utilizzare Sec61 in modalità post-traduzionale per la loro inserzione. Tuttavia, diversi studi hanno escluso un coinvolgimento del complesso Sec61 nell'inserimento delle TA in membrana. Yabal et al., (2003) utilizzando un sistema di lievito, difettivo per il traslocone, e una isoforma del citocromo b5 con un sito di glicosilazione nella regione luminale dimostrano che il citocromo viene traslocato attraverso le membrane dei ceppi difettivi per il traslocone (che non riescono invece ad inserire proteine che normalmente utilizzano Sec). Brambillasca et al, (2005) dimostrarono mediante un saggio di protezione da proteasi, che l'inserimento del citocromo b5 avviene normalmente in membrane microsomiali depletati di componenti del traslocone Sec. Risultati analoghi furono ottenuti da Stefanovic and Hegde (2007) con altri substrati TA. Lo studio di Brambillasca et al. (2006) dimostrò anche che un ruolo determinante della composizione lipidica delle membrane nel processo di inserimento delle proteine TA. Nessuno dei sistemi analizzati finora quindi consente la biogenesi

delle proteine TA, ma allora come riescono a inserirsi nella membrana?. Gli studi compiuti finora hanno dimostrato l'esistenza di una via assistita o chaperon mediata ed energia dipendente e una via non assistita (Fig 1.32) (Brambillasca et al, 2006) (Brambillasca et al, 2005) (Stefanovic & Hegde, 2007).

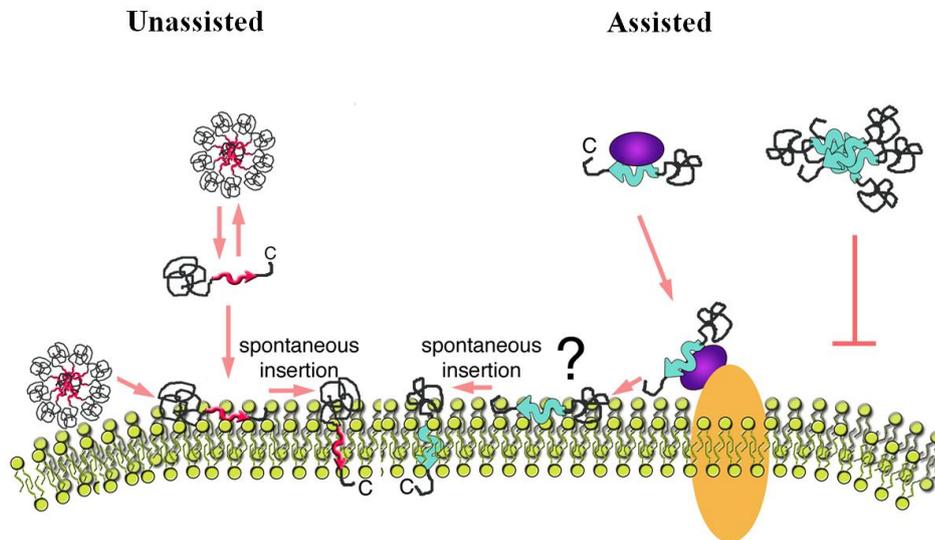


Fig1.32 I meccanismi assistito e non assistito delle TA del RE (Borgese et al , 2007). Nel meccanismo non assistito, proteine TA con TMD moderatamente idrofobico sono capaci di inserirsi spontaneamente nella membrana del Reticolo. Probabilmente una volta nel citosol, per evitare l'aggregazione, si generano delle micelle che nascondono così le regioni idrofobiche. Nel meccanismo assistito, proteine con TMD più idrofobico non sono capaci di giungere da soli sulla membrana, per cui necessitano di un ausilio operato da un chaperone. Lo chaperone più importante identificato negli ultimi anni è TRC40. Probabilmente evita l'aggregazione di questa proteina nel citosol, ma poi una volta giunti sul recettore (WRB/CAML) in membrana la proteina è rilasciata nella fase lipidica. Il meccanismo è tuttora ignoto.

1.5.1 l'inserimento non assistito

Il capostipite della famiglia delle proteine TA capace di inserirsi in maniera spontanea è il citocromo b5 (b5). Diversi studi sono presenti in letteratura che dimostrano la sua capacità di inserirsi in membrana senza l'ausilio di chaperone e senza richiesta di energia, almeno in vitro. b5, sintetizzato in vitro in lisato di reticolocita (RRL), è capace di inserirsi in membrane microsomiali ma anche in liposomi privi di proteine. Anche la proteina ricombinante, purificata da batteri, è capace di traslocare in vescicole lipidiche, prive di proteine, escludendo così l'azione di eventuali chaperone presenti nel RRL (Colombo et al 2009). L'unico fattore che è stato dimostrato avere un ruolo è la composizione lipidica delle membrane: la presenza di colesterolo nelle vescicole inibisce l'inserimento spontaneo (Brambillasca et al, 2005). La capacità del b5 di inserirsi in maniera non assistita è dovuta alla moderata idrofobicità del suo TMD (Brambillasca et al, 2006). La sostituzione

del suo TMD con un TMD di una proteina TA che si inserisce in maniera chaperon mediata o semplicemente mutazioni che variano la idrofobicità, sono sufficienti a bloccare il suo inserimento spontaneo. Come avvenga questo processo non è ancora del tutto chiaro. Come faccia la proteina libera nel citosol a rimanere solubile senza aggregarsi non è noto. Probabilmente forma micelle proteiche in cui i domini transmembrana vengono nascosti all'interno riuscendo così a non esporre i residui idrofobici, poi una volta nei pressi del ER riesce a traslocare il suo C-Terminale. Oltre al citocromo b5, diverse altre proteine sono capaci in vitro di inserirsi in maniera completamente non assistita. Un esempio è la proteina tirosin fosfatasi 1B (PTP1B) (Brambillasca et al, 2006). Anche diverse proteine TA della MOM sono in grado di inserirsi spontaneamente in liposomi privi di proteine. È stato infatti dimostrato che Fis1, una proteina TA mitocondriale, segue questa via di traslocazione. Oltre che in mitocondri isolati, è capace di inserirsi anche in liposomi privi di proteine (Kemper et al, 2008). Come per il b5 è stato osservato in vitro che elevati livelli di ergosterolo bloccano il suo inserimento. Una questione aperta è di come proteine TA a inserimento non assistito riescano a localizzarsi in modo specifico a una sola membrana *in vivo*.

1.5.2 L'inserimento assistito

1.5.2a Inserimento nel ER

Se il TMD ha una idrofobicità piuttosto alta, la proteina TA non riesce ad inserirsi nel doppio strato fosfolipidico in maniera non assistita. Necessita di un pathway chaperone mediato. Sono state identificate due principali vie dipendenti da chaperones per le TA dirette al ER: la prima mediata da Hsp70/Hsp40, e la seconda da una nuova ATPasi denominata TRC40 (Transmembrane Recognition Complex subunit di 40 KDa) o Asna1, nei mammiferi, Get3 (Guided Entry of TA protein) nei lieviti. Inoltre, il gruppo di Stephen High ha individuato un nuovo ruolo post-traduzionale di SRP nell'inserimento di proteine TA con TMD particolarmente idrofobico (Johnson et al, 2013).

Delle tre vie elencate sopra la più importante e la più studiata è quella mediata da TRC40/Get3. TRC40 è stato identificato nel sistema di lisato di reticolociti di coniglio (RRL): esperimenti di cross-linking dimostrarono che esso interagisce con il TMD di numerose proteine TA prima della loro consegna al RE, ma non con il citocromo b5, capace di inserzione non assistita (Stefanovic & Hegde 2007), (Favaloro et al, 2008). TRC40 è un'ATPasi altamente conservata attraverso la scala filogenetica; L'embrione murino KO di questa proteina non è vitale. Il suo ruolo nell'inserimento delle proteine TA nei mammiferi è stato dimostrato nel sistema acellulare RRL mediante l'introduzione di una forma mutante dominante negativa (deficitaria nell'attività ATPasica) e mediante immunodeplezione della forma endogena presente nel RRL (Stefanovic & Hegde 2007), (Favaloro et al, 2008); (Colombo et al., 2009). Tuttavia non è ancora chiaro quanto sia importante il ruolo delle altre vie di inserzione delle proteine TA in vivo.

La stessa via TRC40 è stata anche identificata in lievito. Schuldiner et al. (2008), identificarono l'intera via Get in uno "screen" volta a chiarire il ruolo e le interazioni di geni coinvolti nella funzionalità della via di secrezione, e dimostrarono il ruolo della via in vivo e in vitro. Get 1 e Get 2 sono proteine del

RE che formano il recettore a cui si lega Get3. Questo legame localizza Get3 all'ER, e in assenza di uno dei due, Get3 perde questa localizzazione. L'utilizzo di ceppi di lievito difettivi per uno dei componenti del recettore o di entrambi porta all'aggregazione citosolica del complesso TA/Get3. E proteine TA "overespresso" in questi ceppi sono soggette a "mistargeting" ai mitocondri, probabilmente a causa della saturazione del sistema Get3, che non essendo più in grado di traslocare le proteine al reticolo per l'assenza di Get1/Get2, non riesce a più a legarsi alle proteine, che quindi si inseriscono in maniera aspecifica in un compartimento scorretto. Infine mediante un saggio in vitro di glicosilazione, utilizzando un estratto da un ceppo delecto per Get3 e microsomi da ceppi delecti per Get1 e/o Get2, dimostrano definitivamente il ruolo del complesso GET nell'inserimento delle TA al reticolo e l'esclusione di questo pathway per le TA dei mitocondri.

Studi di cristallografia di Get3 hanno rivelato che essa esiste come un omodimero (Mariappan et al 2011) (Stefer et al 2011). In uno studio recente è stato anche identificato un doppio omodimero, costituito quindi da quattro sub unità (Chartron et al, 2012). All'interfaccia tra i due monomeri unione di zinco è coordinato da due residui di cisteine, ognuna su di un monomero, così da ottenere uno Zinc finger. I due residui Cys sono assolutamente indispensabili per la sua funzionalità di Get3. Ogni monomero è dotato di un dominio ATPasico, che idrolizza ATP, e un dominio ad α -elica, molto dinamico, ricco in Metionine. Studi di mutagenesi hanno evidenziato che questa è la regione responsabile del legame alle TA. Dagli studi strutturali è emerso che Get3 può trovarsi in una conformazione completamente chiusa, chiusa o aperta. La conformazione completamente chiusa si osserva quando è legato all'ADP- AlF_4 , la conformazione chiusa sia prima che dopo l'idrolisi (con ADP- Mg^{2+} legato), e quella aperta quando non è legato al nucleotide o quando lega ADP senza Mg^{2+} . Nella conformazione completamente chiusa le due subunità presentano una grossa area all'interfaccia; il riarrangiamento del dominio ad α -elica, risulta nella generazione di una tasca idrofobica, dove è accomodato il TMD della proteina TA (Fig 1.33).

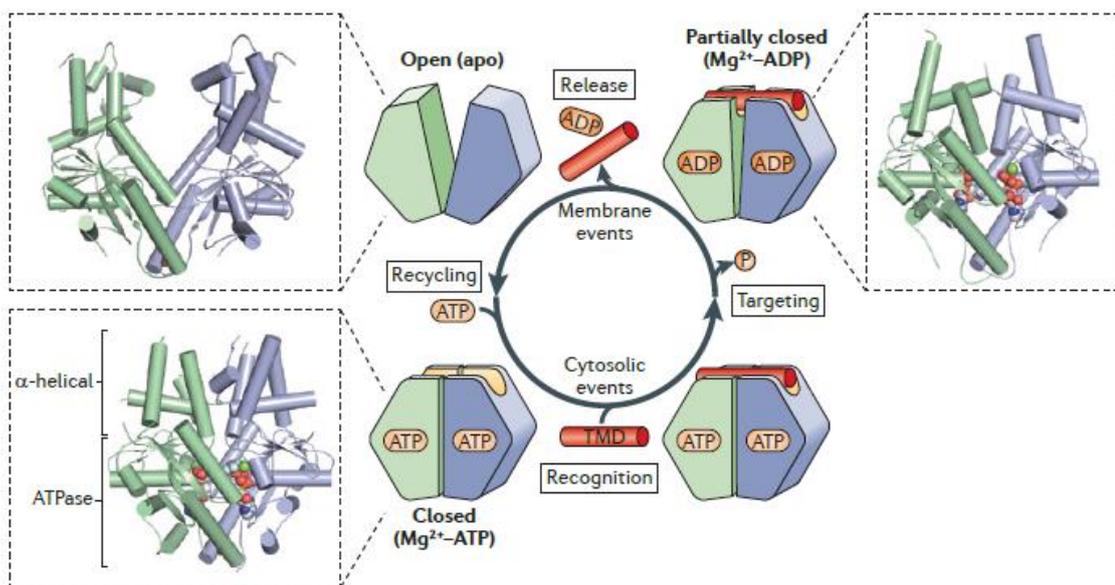


Fig 1.33 Cambi conformazionali dipendenti dall'ATP del dimero Get3 (Hegde & Keenan, 2011). Il TMD di una TA nel citosol è riconosciuto e legato dal dimero, che è legato ad ATP in una conformazione chiusa. Il legame alla TA rende la conformazione completamente chiusa. Nel processo di targeting l'ATP è idrolizzata ad ADP e si genera uno stato parzialmente chiuso. Quando

la proteina è rilasciata in membrana, il dimero rilascia ADP e si apre. Il nuovo legame all'ATP fa ricominciare il ciclo.

Ma quale è il meccanismo di traslocazione mediato da TRC40/Get3? I ribosomi in fase di traduzione sono reversibilmente legati a complessi molecolari citosolici. Così quando una proteina è tradotta viene catturata da complessi che possono guidare la loro biogenesi. Nel caso delle TA, è coinvolto un complesso detto di "pretargeting", costituito da SGTA, Bag6 TRC35 e UBL4 (rispettivamente Sgt2, Get4 e Get5 nel lievito; Bag 6 non ha un omologo nel lievito). Quando la TA emerge dal ribosoma, è reclutata da questo complesso che ha dei siti di legame per TRC40. In particolare TRC35/Get4 e UBL4/Get5 esistono come dimero; la coda N-terminale di TRC35 lega TRC40, mentre Ubl4 lega Bag6 (nel lievito lega Sgt2). A questo stadio, Get3/TRC40 hanno legato ATP che favorisce la forma chiusa.

Gli studi di cristallografia hanno rivelato le fasi del reclutamento di Get3 alla membrana dell'ER. Get2 fungerebbe da "tether" (legaccio), catturando il complesso Get3/proteina TA; il successivo legame con Get1 spingerebbe un cambiamento conformazionale di Get3, con passaggio dalla conformazione chiusa a quella aperta, rilascio di ADP e della proteina TA alla membrana. La proteina è così rilasciata nell'ER (Fig. 1.34). Come possa traslocare attraverso il doppio strato non è ancora del tutto chiaro; potrebbe inserirsi da sola o essere coadiuvata da un poro o canale fornito dal complesso Get1/2, ma questa questione rimane ancora irrisolta.

Mentre il recettore Get1/2 è ben caratterizzato nel lievito, fino a recentemente è rimasto ignoto il recettore di TRC40 nei mammiferi. Gli studi di Vilardi et al. (2011) e di Yamamoto et al. (2012) hanno adesso identificato tale recettore anche nei mammiferi. Esso è costituito da due proteine transmembrana, WRB e CAML. WRB ha una debole omologia con Get1, mentre CAML non ha omologia strutturale, ma viene considerato l'omologo funzionale di Get2. L'utilizzo di saggi di inserzione di proteine TA in cellule semi-permeabilizzate deplete di CAML o WRB ha dimostrato un ruolo funzionale di queste due proteine (Yamamoto et al, 2012).

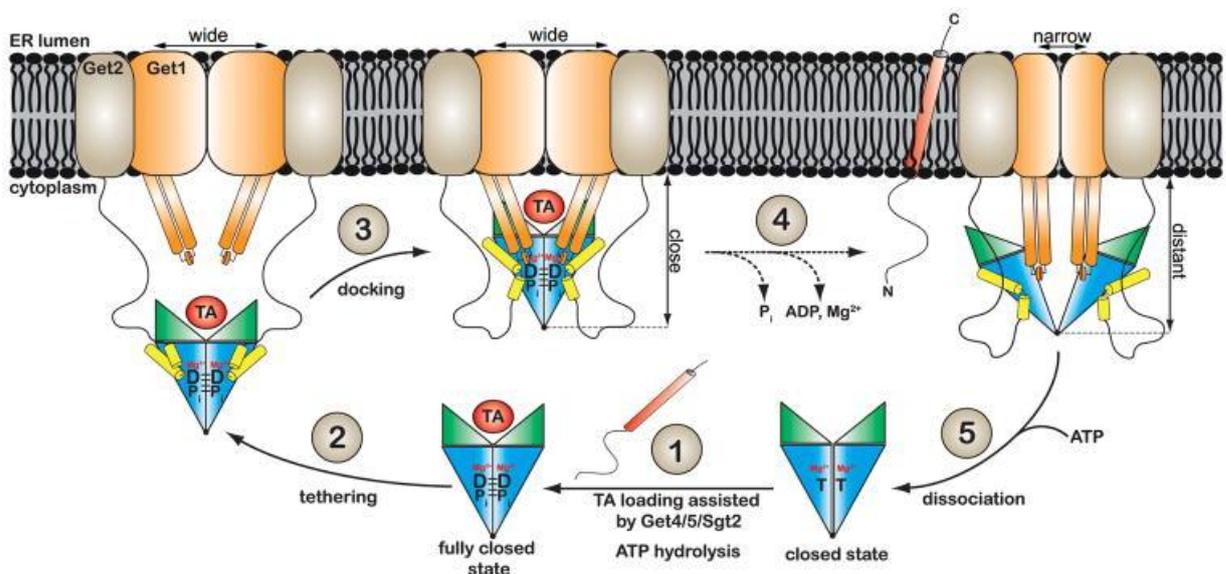


Fig 1.34 Modello di inserimento delle TA mediato dal sistema GET (Stefer et al., 2011). La TA lega mediante i componenti citosolici Get3 (1), che assume così un conformazione completamente chiusa (2). Mediante l'interazione con la porzione citosolica di Get2, il complesso Get3/TA si avvicina alla membrana (3). La porzione citosolica di Get1, interagisce con Get3, e mediante

idrolisi di ATP la proteina è rilasciata in membrana (4). Get3 è rilasciato dal recettore e il ciclo può ricominciare (5).

Come ho accennato all'inizio di questo capitolo, oltre al sistema Get, la biogenesi delle TA può essere mediata anche da altri fattori citosolici. Studi in vitro con Hsp70/Hsp40 purificati, ATP e precursori di TA, dimostrano che questi chaperones sono capaci di mediare l'inserimento di alcune TA, mentre l'inibizione di Hsp70 risulta in un blocco di inserzione di queste stesse TA. Inoltre studi di crosslinking e di pulldown hanno identificato un legame tra SRP e il TMD delle TA; in accordo con gli esperimenti di crosslinking, la traslocazione delle TA al reticolo si riduce inattivando il recettore SR (Johnson et al., 2013). È stato suggerito che la scelta del pathway possa essere determinata dalla idrofobicità del TMD. Così in presenza di più possibilità, proteine con TMD molto idrofobico scelgono la via di SRP o TRC40, e quelle con TMD con più moderata idrofobicità, usano il pathway non assistito o altri chaperone dedicati come Hsp70. I pathway sarebbero comunque ridondanti e si compenserebbero tra loro. Questo spiegherebbe perché ceppi di lievito difettivi per i componenti del sistema Get sono vitali.

1.5.2 b Inserimento nella membrana dei perossisomi.

Mentre per le proteine TA del reticolo vi è una via dedicata, per i perossisomi, gli studi condotti finora indicano che esse sono inserite con un meccanismo comune alle PMP di classe 1; questa classe (vedi paragrafo 1.4.2 b) dipende dal recettore Pex19, che si lega al substrato nel citosol; poi, mediante l'interazione con il suo recettore integrale di membrana Pex3, libera le TA nella membrana. Uno studio recente (Yagita et al, 2013) ha dimostrato inequivocabilmente che nel mammifero la proteina TA Pex26 utilizza questo pathway. Ma rimangono ancora poco definiti i determinanti per la via. Nella proteina Pex26 sono state identificate due sequenze di riconoscimento per Pex19, una nel TMD e una nella regione luminale (Halbach et al, 2006). L'interazione tra la sequenza luminale e Pex19 è richiesta per l'inserimento di Pex26 nei perossisomi. Uno studio recente invece dimostra che i discriminanti per l'inserimento Pex19 dipendente sono i residui basici luminali di Pex26 (Yagita et al, 2013). In assenza della regione luminale Pex26 è inserita ai mitocondri. Sequenze simili di riconoscimento di Pex19, sono state identificate anche in Pex15, l'ortologo di lievito di Pex26. L'interpretazione dei dati della proteina di lievito è tuttavia complicata, perché in ceppi deficienti per il complesso Get essa è inserita nei mitocondri, a indicare che in lievito Pex15 è un PMP di classe 2: non sarebbe cioè capace di inserimento diretto nella membrana perossisomiale, ma dovrebbe transitare obbligatoriamente attraverso il RE, utilizzando il sistema Get per l'inserimento. In assenza del sistema Get, verrebbe destinata a un compartimento scorretto (la MOM).

Una ulteriore proteina studiata è Fis 1. Nell'uomo è principalmente mitocondriale, ma una piccola porzione è localizzata ai perossisomi. Come nel caso di Pex26, il targeting ai perossisomi è Pex19 dipendente e la sequenza di riconoscimento per Pex19 è al C-terminale.

1.5.3. Inserimento nella Membrana esterna mitocondriale: processo assistito o non assistito?

A tutt'oggi il meccanismo di inserimento delle proteine TA nella MOM rimane misterioso. Esiste una via assistita o le proteine TA riescono ad integrarsi spontaneamente? Caratteristiche comuni delle TA della MOM sono una moderata idrofobicità del TMD e la presenza di cariche positive fiancheggiando il TMD stesso. Studi bioinformatici su proteine TA della MOM e dell'ER hanno evidenziato che a parità di idrofobicità del TMD, le proteine della MOM presentano una netta carica positiva, rispetto a quelle del reticolo (Borgese et al, 2007). Il ruolo delle cariche positive è stato dimostrato anche in esperimenti di mutagenesi. È stato dimostrato per esempio che la sostituzione dei 7 residui polari del citocromo b5 con due arginine determina il cambiamento di "targeting" del citocromo: la forma mutata si localizza infatti esclusivamente alla MOM in vivo. Il dominio catalitico della proteina non ha alcuna rilevanza (Borgese et al., 2001) (Fig 1.35).

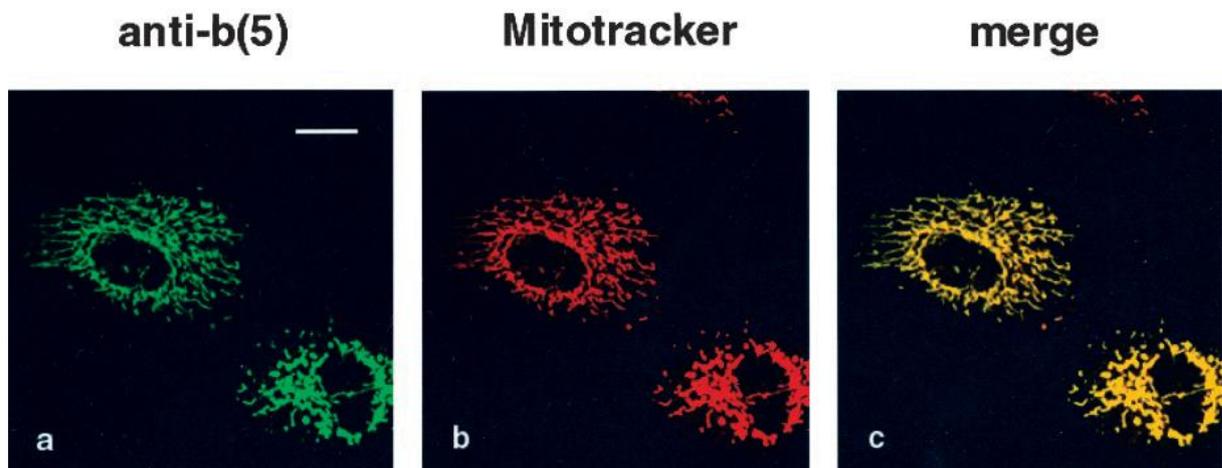


Fig 1.35. Localizzazione del b5RR (Borgese et al, 2001). La sostituzione dei residui luminali nella sequenza del b5ER è capace di rilocalizzare completamente la proteina, dal reticolo ai mitocondri. In verde il b5, in rosso il marcatore dei mitocondri Mitotracker, e in giallo il merge. La colocalizzazione è perfetta.

Se le caratteristiche del segnale di targeting delle proteine TA per la MOM sono relativamente ben comprese, rimane invece sconosciuta la natura del macchinario (chaperone o recettori di membrana) che interpretano questo segnale. Diverse osservazioni hanno portato all'ipotesi che la MOM rappresenti la destinazione "default" delle proteine TA. L'idea sarebbe che, in assenza di interazione con sistemi di "targeting" specifici, la proteina TA si inserirebbe nella MOM senza assistenza. Le

caratteristiche richieste (TMD poco idrofobico e presenza di residui basici ai lati del TMD) servirebbero quindi non per riconoscere un sistema di targeting specifico ma piuttosto per evitare il legame con sistemi di targeting per altri organelli (RE e perossisomi). A favore di questa ipotesi è l'osservazione che in lievito, in assenza del sistema Get, diverse proteine TA si localizzano ai mitocondri (Schuldiner et al., 2008). Uno studio sul meccanismo responsabile nei mammiferi ha portato ad escludere il complesso TOM per la traslocazione di tre TA mitocondriali: Bak, BclXI, OMP25. I risultati di questo stesso studio hanno inoltre dimostrato che queste proteine TA possono inserirsi nella MOM in cellule semi-permeabilizzate trattate con proteasi, nella quali presumibilmente qualsiasi recettore della MOM sarebbe degradata, e anche in assenza di fattori citosolici (Setoguchi et al, 2006). Recentemente è stato suggerito che la composizione lipidica della MOM possa spiegare la sua particolare propensione ad accogliere le proteine TA; in particolare, è stato ipotizzato che la bassa concentrazione di steroli nella MOM possa favorire l'inserzione non assistita (Krumpe et al., 2012).

I risultati appena riportati appoggerebbero quindi l'ipotesi che le proteine TA della MOM si inseriscano con modalità non assistita in questa membrana, che rappresenterebbe la destinazione "default". Tuttavia, vi sono anche osservazioni che non supportano questa ipotesi. Intanto, c'è da osservare che nei mammiferi il contenuto di colesterolo della MOM e del RE sono molto simili (Colbeau et al., 1971); quindi, se le proteine della MOM sono capaci di inserimento non assistito, che cosa le impedisce di inserirsi anche nell'ER? Il problema è ben illustrato dal confronto del comportamento delle due isoforme di b5, quella diretta al ER (b5-ER) e quella mutagenizzata diretta alla MOM (b5-RR) (Fig.1.36). Nel laboratorio in cui ho svolto il mio lavoro di dottorato, le due forme sono state modificate per aggiunta di una corta sequenza al C-terminale che ne consente la N-glicosilazione, purché la sequenza sia esposta al lume dell'ER. Dopo espressione *in vivo*, gli autori dello studio (Borgese et al., 2001) hanno osservato che b5-ER veniva glicosilata, coerentemente con il suo targeting al RE, mentre la proteina b5-RR non riceveva questa modifica, coerentemente con il suo targeting alla MOM (Fig 1.36). La stessa proteina, però, tradotta *in vitro*, e poi incubata in presenza di microsomi viene efficientemente glicosilata, a indicare che è perfettamente in grado di traslocare il suo C-terminale attraverso il doppio strato lipidico del RE. Questa osservazione suggerisce che *in vivo* venga legata da chaperone o recettori che le impediscono di inserirsi nel reticolo e non appoggiano l'ipotesi della MOM come destinazione "default" per le proteine TA.

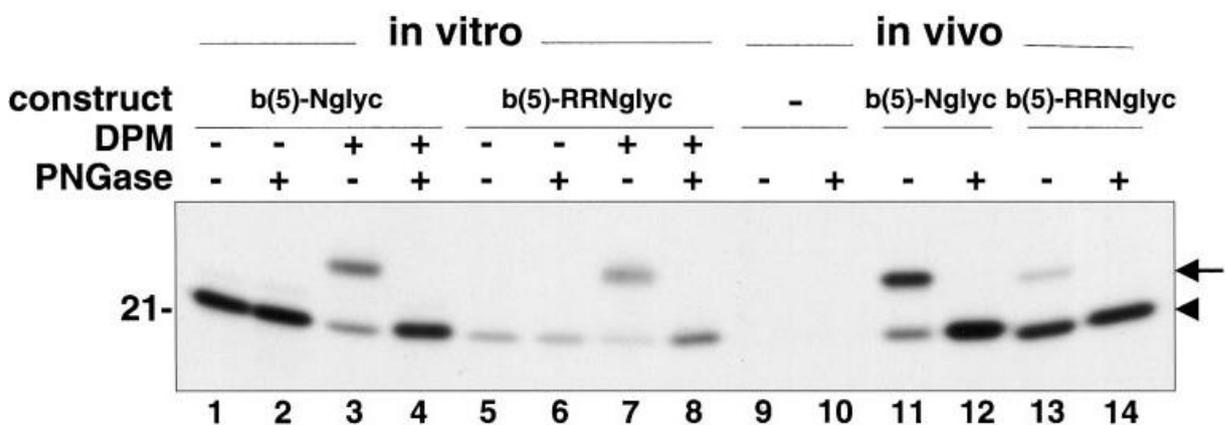


Fig 1.36. Confronto tra targeting in vivo e in vitro. (Borgese et al 2001). Le proteine b5ER e b5RR, *in vivo* si localizzano al RE e alla MOM rispettivamente; infatti solo l'isoforma b5ER mostra una banda di glicosilazione (lane 11). *In vitro* però entrambe le isoforme si inseriscono nel reticolo, infatti entrambe mostrano una banda glicosilata (lanes 3 e 4).

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni sono state fatte molte scoperte riguardo la biogenesi delle membrane, molti meccanismi sono stati identificati, e molte strutture risolte. Ciò nonostante, molti punti restano ancora oscuri e molti studi serviranno ancora per chiarire il ruolo e l'esatto funzionamento di attori coinvolti nel trasporto e nell'inserimento delle proteine. In particolare, i meccanismi di "targeting" e di inserimento delle proteine TA sono studiati da meno anni di quelli classici Sec e TOM/TIM-dipendenti e quindi molto rimane ancora da scoprire riguardo la biogenesi di questa classe di proteine. Tutti i componenti chiave della via TRC40/Get3 sono stati scoperti e il meccanismo generale è ormai noto, ma molte tappe nel citosol o sulla membrana sono ignote. Un problema ancora aperto è il meccanismo di "targeting" di proteine TA capaci di inserimento non assistito nel doppio strato fosfolipidico. Poiché *in vivo* hanno una destinazione precisa, è chiaro che devono essere coinvolti fattori di targeting, ma tali fattori a tutt'oggi non sono stati identificati.

Scopo di questa tesi e del mio lavoro durante gli anni di dottorato è stato cercare di indirizzare verso una soluzione il problema del "targeting" di proteine TA capaci di inserzione non assistita. A questo scopo ho utilizzato come modelli la proteina b5 wild-type, indirizzata all'ER, e la proteina b5-RR, indirizzata alla MOM, che differiscono soltanto negli ultimi 7 aminoacidi C-terminali. Utilizzando metodiche di transfezione, di microiniezione e saggi con cellule semi-permeabilizzate, ho cercato di capire la base della specificità del "targeting" tra reticolo e MOM; se esiste una via dedicata per ciascuna delle due isoforme e quali sono gli attori implicati. Ho valutato il coinvolgimento di diversi fattori, sia delle caratteristiche fisico-chimiche delle membrane "target", sia il ruolo di chaperone citosolici. In particolare, ho valutato se l'interferenza farmacologica con specifici chaperon possa provocare un cambiamento nel targeting, con lo scopo di comprendere così un loro possibile coinvolgimento nel corretto indirizzamento delle proteine TA.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Plasmidi

In questo studio sono state utilizzati diversi costrutti codificanti per due isoforme del citocromo b5 (Fig. 3.1).

pCB6-b5ER-OP3
pCB6-b5RR-OP3
pCB6-b5ER
pcDNA3-b5RR
pGEX2T-b5ER
pGEX2T-b5RR

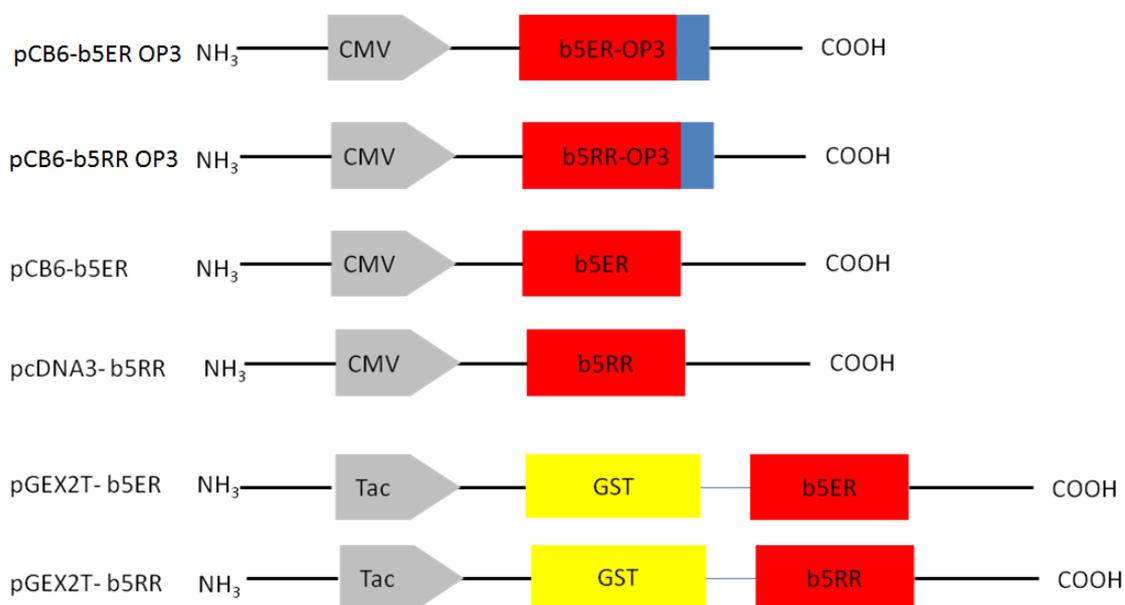


Fig 3.1 Schema dei costrutti utilizzati

I primi quattro servono per l'espressione dei costrutti in cellule di mammifero, sotto il promotore del Cytomegalovirus (CMV), gli ultimi due per l'espressione e la purificazione della proteina ricombinante da batteri. I costrutti b5ER-OP3 e b5RR-OP3 contengono al C-terminale un "tag" derivante dalla sequenza N-terminale dell'opsina bovina; il tag contiene un sito per la N-glicosilazione, che consente di determinare se il C-terminale della proteina sotto studio è traslocata o meno nel lume del ER. I due plasmidi pGEX2T-b5ER e pGEX2T-b5RR codificano per proteine di fusione GST sotto il promotore inducibile Tac.

I plasmidi pcb6-b5ER-OP3 e pcb6-b5RR-OP3, pCB6-b5ER e pGEX2T-b5ER erano già presenti in laboratorio e sono stati descritti precedentemente (Borgese et al, 2001; Colombo et al., 2009).

Per generare il plasmide pGEX2T-b5RR, la sequenza codificante per la proteina b5RR è stata sub clonata nel vettore pGEX-2T. La sequenza da subclonare è stata ottenuta tramite amplificazione con PCR del costrutto pGEM4-b5RR-OP3 (Borgese et al, 2001). Gli oligonucleotidi usati come primers hanno permesso l'inserimento di siti di restrizione BamH1 e EcoR1 (sottolineati nella sequenza) rispettivamente a monte e a valle della sequenza amplificata. Inoltre hanno permesso l'eliminazione del tag OP3, presente nel vettore templato, con l'introduzione di un codone di arresto subito dopo i due codoni che specificano la coppia RR.

Le sequenze dei primers sono:

Forward 5' GCGGATCCATGGCTGCGCAGTCAGAC 3'

Reverse 5' GGAATTCTCACCGCCGGTACATCAGTGCC 3'

La miscela di reazione di PCR (100 µl) è così composta: 10 ng di templato, 0.4 µM primer forward, 0.4 µM primer reverse, 0.25 mM mix dNTPs, 1U/50µl DNA polimerasi Deep VentR (New England Biolabs, NEB) nel tampone fornito dalla casa produttrice. Le condizioni a cui è stata eseguita la reazione sono le seguenti : 5 minuti 95 °C, poi 30 secondi 95°, 30 secondi 65°,90 secondi 72° ripetuti per 30 cicli, infine una elongazione finale di 10 minuti a 72°.

Il prodotto di PCR è stato poi purificato da gel di agarosio con il Kit PCR clean-up, nucleospin Extact II (Machery Nagel) seguendo il protocollo del produttore.

Una volta purificato, l'amplicone è stato digerito con gli enzimi BamH1 (NEB) ed EcoR1 (NEB), per generare le estremità appiccicose (sticky) (reazione e tampone secondo le istruzioni del produttore), e inserito nel vettore pGEX2T, digerito a sua volta con gli enzimi BamH1 ed EcoR1 e defosforilato con fosfatasi alcalina di gambero (SAP) (Promega) nel tampone fornito dalla casa produttrice. La ligazione è stata eseguita in un volume totale di 20 µl osservando un rapporto di 10 moli di inserto per una mole di vettore, per 20 ng totali di vettore. La reazione è avvenuta a 16°C, con 1U di T4 DNA ligasi (Invitrogen), in tampone di ligazione (Invitrogen). Il prodotto della ligazione è stato trasformato in batteri competenti E.coli ceppo DH5α. Le colonie positive sono state poi controllate mediante digestione di controllo con enzima Nco1 (NEB), che presentava un sito unico di restrizione in tutta la sequenza del plasmide pGEX-2T b5 RR stop, all'interno dell'inserto. Dalle colonie positive è stato poi estratto il DNA mediante il Plasmid Midi KIT Qiagen, secondo il protocollo della casa produttrice.

Il plasmide così ottenuto è stato poi trasformato in batteri competenti E.coli ceppo BL21. Questi batteri mancano delle proteasi lon e ompT.

L'amplicone codificante per b5RR appena descritto è stato utilizzato anche per ottenere il plasmide pcDNA3-b5RR. La ligazione è stata eseguita con pcDNA3 digerito con BamH1 ed EcoR1 e defosforilato come descritto per pGEX2T.

L'assenza di errori nei plasmidi generati è stata controllata mediante sequenziamento.

3.2 Espressione induzione e purificazione di proteine in batteri

3.2.1 Purificazione di proteine di fusione GST-b5

Per esprimere e purificare le proteine b5 ER e b5 RR in batteri è stato utilizzato il Glutathione S-transferase (GST) Gene fusion System seguendo le istruzioni del produttore (Amersham Pharmacia Biotech). Il sistema consente l'espressione inducibile della proteina sotto il promotore Tac e la purificazione della proteina tramite legame a matrice di affinità seguito da taglio proteolitico con la Trombina, che riconosce un sito di taglio presente tra la sequenza della GST e quella del b5. Il vettore pGEX2T contiene il promotore Tac, inducibile da Isopropil D-1 tiogalattopiranoside (IPTG), sotto cui è espressa la GST, necessaria per la purificazione della proteina di fusione, inserita a valle della GST stessa e dopo il sito di taglio per la trombina.

I batteri BL21 sono stati fatti crescere in terreno 2x-YTG e carbenicillina (il vettore ha un sito di resistenza all'ampicillina). Una volta raggiunta la concentrazione di $A_{600}=0.6$ è stato aggiunto IPTG 0.5 mM; è stata prelevata un'aliquota per controllo su gel di acrilamide. L'induzione è avvenuta a temperatura ambiente per 4 ore. I batteri sono stati poi pellettati a 4°. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in tampone di lisi (2% Triton X100, 150 mM NaCl, 25mM Tris-HCl pH 7.5, con 1mM PMSF, 0.2 mg/ml lisozima, 0.04mg/ml DNAsi e una miscela di inibitori di proteasi, PIC1 e PIC2, come descritto in Bulbarelli et al., 1998) per 2 ore. Poi è stato aggiunto EDTA 10mM. È stata prelevata un'aliquota per controllo. Dopo 30 minuti, il lisato batterico è stato sedimentato 40 minuti a 10550g a 4°C. Il pellet insolubile è stato risospeso e si è prelevata un'aliquota per il controllo, ugualmente per il surnatante. Al surnatante è stata poi aggiunta 1/50 di volume di resina Glutathione Sepharose 4B (GE Helthcare) 1:2 in PBS, che contiene il glutathione legato ad una matrice immobile di agarosio; consente quindi di legare la GST. La miscela è stata lasciata a 4°C per la notte a mescolare per rotazione. Il giorno successivo la resina è stata sedimentata, il surnatante è stato scartato, conservandone una aliquota. Per staccare eventuali chaperon batterici legati alla proteina, la resina è stata incubata 30 minuti a 37°C con un tampone contenete ATP (1% Triton X100, 2mM ATP, 5mM MgSO₄ 50mM Tris-HCl pH7.5). E' stato poi effettuato un lavaggio con PBS e 1% Triton X100, quindi 10 volte con PBS soltanto. Alla fine è stato aggiunto un volume di PBS paragonabile al volume di resina. Del campione è stata prelevata una aliquota, ed è stata aggiunta 1U di Trombina (Sigma Aldrich), il campione è stato lasciato per la notte in agitazione. Il giorno successivo. La resina è stata sedimentata e il surnatante, contenete la proteina senza la GST , prelevato. È stata raccolta un'aliquota sia della proteina che della resina. La preparazione della proteina è stata poi controllata mediante SDS-PAGE in tutti i vari passaggi dell'induzione e della purificazione. Il gel è stato colorato con Coomassie Blue e il contenuto di proteina totale è stato determinato con il metodo Lowry (Lowry et al.,

1951). La concentrazione finale della proteina è stata stimata dopo correzione per la presenza di bande minori presenti sul gel, corrispondenti a prodotti di degradazione della proteina ricombinante.

3.2.2 Purificazione delle proteine ricombinanti N-CAML, MBP-WRBcc e MBP

La proteina N-CAML (che corrisponde al dominio N-terminale citosolico della proteina CAML), è stata ottenuta come plasmide codificante per la proteina di fusione con la GST dal gruppo di Richard Bram (Mayo Clinic). La proteina ricombinante è stata preparata dalla Dott.ssa Sara Colombo, del laboratorio in cui ho effettuato il dottorato secondo la procedura appena descritta.

Le proteine MBP e MBP- WRBcc, sono state ottenute dal gruppo di Bernhard Dobberstein (Vilardi et al, 2012). WRBcc (WRB coiled-coil) corrisponde al dominio citosolico di WRB. Il plasmide ottenuto codifica per WRBcc fusa all'MBP (Maltose binding protein), clonata nel vettore inducibile pQE80 (Qiagen). Come controllo nei miei esperimenti, ho utilizzato la MBP semplice. Le proteine sono tradotte in BL21, come per il sistema pGEX. I batteri sono stati fatti crescere a 37 ° fino a OD_{600 nm}, 0.6, poi indotti con IPTG 1mM per 2 ore a 30°C. I batteri raccolti per centrifugazione sono risospesi in tampone di sonicazione (20 mM Tris-HCl pH 7.4, NaCl 200mM, PMSF 1mM). Il lisozima non può essere utilizzato in questo caso, perché i prodotti di degradazione della parete cellulare si legano all'MBP, interferendo con la successiva purificazione. I batteri risospesi vengono quindi lisati mediante un ciclo di congelamento rapido - scongelamento, seguito da sonicazione (15 cicli da 15" ognuno, con amplitudine 100, ognuno con un intervallo di 15" in ghiaccio). Dopo centrifugazione per 30 minuti a 10000g, il surnatante è stato utilizzato per la purificazione. Dopo diluizione cinque volte in tampone di sonicazione, veniva incubato con 1/3 di volume di resina Amylose (NEB) 1:2 in tampone di sonicazione per 2 ore a 4°C con agitazione. La resina è stata raccolta per centrifugazione a 1000g 5 minuti e il surnatante, che contiene le proteine non legate, è stato eliminato. La proteina è stata eluita mediante una soluzione di maltosio 10mM (Sigma Aldrich). Anche in questo caso la purificazione è stata controllata su gel SDS-poliacrilamide, colorato con Coomassie Brilliant Blue, e quantificata mediante saggio BCA (Euroclone)

3.3 Colture cellulari

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti su cellule CV1, ad eccezione del protocollo di semipermeabilizzazione, per il quale sono state utilizzate cellule HeLa. Le cellule sono state

coltivate in DMEM (Invitrogen) contenete 10% v/v di FBS (Invitrogen), 1% v/v di mix di antibiotici penicillina-streptomina e 1% v/v di glutammina a 37°C con 10% CO₂. Il terreno per le CV1 è stato completato anche con 10 µg/ml di gentamicina.

3.4 Trasfezioni e microiniezione

In tutti gli esperimenti le cellule sono state seminate su vetrini copri oggetto 18x18 mm, in Petri per colture cellulari da 35 mm².

3.4.1 Microiniezione

La microiniezione è stata eseguita con un microiniettore Eppendorf 5200, applicando una pressione di 80-90 hPa, che inietta la proteina (diluata in soluzione acquosa ad una concentrazione di 200-500ng/µl) nel citoplasma delle cellule CV1 coltivate ad una confluenza dell'80%. Le cellule microiniettate sono state poi trattate per i tempi indicati e fissate con paraformaldeide 4 % per 20 minuti a 37° o con Metanolo per 5 minuti in ghiaccio.

3.4.2 Trasfezione con Calcio fosfato e jetPEI.

Cellule CV1 sono state trasfettate transientemente con i costrutti indicati con il sistema jetPEI (Polyplus transfection), secondo il protocollo del produttore, o con il metodo del Calcio fosfato come precedentemente descritto (Bulbarelli et al, 2002)

3.4.3 Silencing TRC40

Il silencing della proteina TRC40 è stato effettuato utilizzando lipofectamine RNAimax (Invitrogen), seguendo il protocollo del produttore. I siRNA (Invitrogen) sono stati disegnati sulla sequenza di primate di TRC40, che mostra una omologia molto alta con quella umana (Fig. 3.2) E' stata utilizzata una miscela di tre siRNA (Invitrogen), ognuno ad un concentrazione 10 nM. Il controllo è stato trasfettato con un oligonucleotide di controllo (scrambled, Controllo Negativo Universale (Invitrogen) 30 nm. Le cellule sono state poi coltivate per le successive 72-80 ore.

```

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      ---GAGCCAGTTCACAAATGGCGGCAGGGGTGGCCGGGTGGGGGGTTGAG 47
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CGTGAGCCAGTTCGAAGATGGCGGCAGGGGTGGCCGGGTGGGGGGTTGAG 50
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      GCAGAGGAGTTCGAAGATGCTCCTGATGTGGAGCCGCTGGAGCCTACACT 97
gi|544509045|ref|XM_005588139.  GCAGAGGAGTTCGAAGATGCGCCTGATGTGGAGCCGCTGGAGCCTACGCT 100
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      TAGCAACATCATCGAGCAGCGCAGCCTGAAGTGGATCTTCGTCGGGGGCA 147
gi|544509045|ref|XM_005588139.  TAGCAACATCATCGAGCAGCGCAGCCTGAAGTGGATCTTCGTCGGGGGCA 150
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      AGGGTGGTGTGGGCAAGACCACCTGCAGCTGCAGCCTGGCAGTCCAGCTC 197
gi|544509045|ref|XM_005588139.  AGGGTGGAGTGGGCAAGACCACCTGCAGCTGCAGCTGGCAGTCCAGCTC 200
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      TCCAAGGGCGCTGAGAGTGTTCGATCATCTCCACAGACCCAGCACACAA 247
gi|544509045|ref|XM_005588139.  TCCAAGGGCGCTGAGAGTGTTCGATCATCTCCACAGACCCAGCTCACAA 250
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      CATCTCAGATGCTTTTGACCAGAAGTTCTCAAAGGTGCCTACCAAGGTCA 297
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CATCTCAGATGCTTTTGACCAGAAGTTCTCAAAGGTGCCTACTAAGGTCA 300
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      AAGGCTATGACAACCTCTTTGCTATGGAGATTGACCCAGCCTGGGCGTG 347
gi|544509045|ref|XM_005588139.  AAGGCTATGACAACCTCTTTGCTATGGAGATTGACCCAGCCTGGGCGTG 350
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      GCGGAGCTGCCTGACGAGTTCCTCGAGGAGGACAACATGCTGAGCATGGG 397
gi|544509045|ref|XM_005588139.  GCGGAGCTGCCTGACGAGTTCCTCGAGGAGGACAACATGCTGAGCATGGG 400
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      CAAGAAGATGATGCAGGAGGCCATGAGCGCATTTCGCCGCATCGATGAGG 447
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CAAGAAGATGATGCAGGAGGCCATGAGCGCATTTCGCCGCATCGATGAGG 450
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      CCATGAGCTATGCCGAGGTCATGAGGCTGGTGAAGGGCATGAACTTCTCG 497
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CCATGAGCTATGCCGAGGTCATGAGGCTGGTGAAGGGCATGAACTTCTCG 500
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      GTGGTGGTATTTGACACGGCACCCACGGGCCACACCTGAGGCTGCTCAA 547
gi|544509045|ref|XM_005588139.  GTGGTGGTATTTGACACGGCACCCACGGGCCACACCTGAGGCTGCTCAA 550
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      CTTCACCACATCGTGGAGCGGGCCCTGGGCCGCTTATGCAGATCAAGA 597
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CTTCACCACATCGTGGAGCGGGCCCTGGGCCGCTTATGCAGATCAAGA 600
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      ACCAGATCAGCCCTTTCATCTCACAGATGTGCAACATGCTGGGCCTGGGG 647
gi|544509045|ref|XM_005588139.  ACCAGATCAGCCCTTTCATCTCACAGATGTGCAACATGCTGGGCCTGGGG 650
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      GACATGAACGCAGACCAGCTGGCCTCCAAGCTGGAGGAGACGCTGCCCGT 697
gi|544509045|ref|XM_005588139.  GACATGAACGCAGACCAGCTGGCCTCCAAGCTGGAGGAGACTGTGCCCGT 700
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      CATCCGCTCAGTCAGCGAACAGTTCGAAGACCTGAGCAGACAACCTTCA 747
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CATCCGCTCAGTCAGCGAACAGTTCGAAGACCTGAGCAGACAACCTTCA 750
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      TCTGCGTATGCAATTGCTGAGTTCCTGTCCCTGTATGAGACAGAGAGGCTG 797
gi|544509045|ref|XM_005588139.  TCTGCGTATGCAATTGCGGAGTTCCTGTCCCTGTATGAGACAGAGAGGCTG 800
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      ATCCAGGAGCTGGCCAAGTGAAGATTGACACACACAATATAATTGTCAA 847
gi|544509045|ref|XM_005588139.  ATCCAGGAGCTGGCCAAGTGAAGATTGACACACACAATATAATTGTCAA 850
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      CCAGCTCGTCTTCCCGACCCGAGAAGCCCTGCAAGATGTGTGAGGCC 897
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CCAGCTCGTCTTCCCGACCCGAGAAGCCCTGCAAGATGTGTGAGGCC 900
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      GTCACAAGATCCAGGCCAAGTATCTGGACCAGATGGAGGACCTGTATGAA 947
gi|544509045|ref|XM_005588139.  GCCACAAGATCCAGGCCAAGTATCTGGACCAGATGGAGGACCTGTATGAA 950
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      GACTTCCACATCGTGAAGCTGCCGCTGTTACCCCATGAGGTGCGGGGGGC 997
gi|544509045|ref|XM_005588139.  GACTTCCACATCGTGAAGCTGCCGCTGTTACCCCATGAGGTGCGGGGGGC 1000

```

```

*****
gi|50428937|ref|NM_004317.2|      AGACAAGGTCAACACCTTCTCGGCCCTCCTCGGAGCCCTACAAGCCCC 1047
gi|544509045|ref|XM_005588139.  AGACAAGGTCAACACCTTCTCAGCCCTCCTCGGAGCCCTATAAGCCCC 1050
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      CCAGTGCCCAGTAGCACAGCTGCCAGCCCAACCGCTGCCATTTACACT 1097
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CCAGTGCCCAGTAGCACAGCTGCCAGCCCAACCGCTGCCATTTACACT 1100
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      CACCCTCCACCCTCCCCACCCCTCGGGGCAGAGTTTGCACAAAGTCCCC 1147
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CACCCTCCACCCTCCCCACCCCTCGGGGCAGAGTTTGCACAAAGTCCCC 1150
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      CCATAATACAGGGGGAGCCACTTGGGCAGGAGGCAGGGAGGGTCCATT 1197
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CCTATAATACAGGGGGAGCCACTTGGGCAGGAGGCAGGGAGGGTCCATT 1200
** *****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      CCCCCTGGTGGGGCTGGTGGGGAGCTGTAGTTGCCCCCTACCTCTCCAC 1247
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CCCCCTGGTGGGGCTGGTGGGGAGCTGTAGTTGCCCTCCTACCTCTCCAC 1250
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      CTCTTGCTCTTCAATAAAATGATCTTAAACTGCAAAAAAAAAAAAAAAA 1297
gi|544509045|ref|XM_005588139.  CTCTTGCTCTTCAATAAAATGATCTTAAACTGC----- 1283
*****

gi|50428937|ref|NM_004317.2|      A 1298
gi|544509045|ref|XM_005588139.  -

```

Fig. 3.2 Allineamento sequenza TRC40 Homo Sapiens (1) versus Macaca Facicularis (2). Evidenziate le sequenze dei tre SiRNA

3.5. Trattamenti delle cellule

Le cellule sono state trattate con uno dei composti elencati in tabella, sempre in incubatore a 37 gradi con il 10% di CO₂. Nella tabella è indicato anche il solvente nel quale ciascuna sostanza è stata sciolta a una concentrazione almeno 100 volte superiore a quella finale. Con l'eccezione del colesterolo, della lovastatina e della geldanamicina, i trattamenti sono stati fatti su cellule microiniettate, subito dopo la microiniezione. Nel caso della geldanamicina, le cellule sono state esposte al farmaco per 30 minuti e poi microiniettate. Nel caso del colesterolo, la microiniezione è stata eseguita su cellule preincubate con lo steroide per 16 h. Il trattamento con lovastatina è stato eseguito in presenza di terreno con 5% di FBS delipidato su cellule transfettate con i costrutti. Per ogni trattamento le cellule di controllo erano incubate col vettore. Alla fine del trattamento, le cellule sono state fissate con paraformaldeid

e.Composto	Provenienza	Concentrazione e solvente	Tempo di incubazione	Azione
Trifluoperazine dihydrochloride (TFP)	Sigma Aldrich	10 μ M - PBS	15 min	Inibitore della calmodulina
Diamide	Sigma Aldrich	2 mM – H ₂ O	15 min	Ossidante
Mal2 11B	Jeff Brodsky (University of Pennsylvania)	100 μ M -DMSO	15 min	Inibitore di Hsp70
Mal3 51	Jeff Brodsky (University of Pennsylvania)	100 μ M -DMSO	15 min	Controllo negativo per Mal2 11B
Geldanamicina	Calbiochem	10 μ M - DMSO	30 min	Inibitore di Hsp90
Colesterolo	Sigma Aldrich	10 μ g/ μ l- etanolo	16 h	Sovraccarico di colesterolo nelle membrane
Mevinolin o Lovastatina	Sigma Aldrich	40 μ M - EtOH	4 h	Deplezione di colesterolo

3.6. Preparazione di una frazione di citosol di fegato di ratto e di lisato di reticolociti di coniglio (Rabbit reticulocyte lysate, RRL)

Il lisato di reticolociti di coniglio (RRL) e la frazione di citosol di fegato di ratto sono stati utilizzati nei saggi compiuti su cellule semi-permeabilizzate descritti nel paragrafo 3.7.

L'RRL, acquistato da Green Hectares, è stato addizionato dei seguenti componenti: 0.07mM ogni amminoacido, 22.75mM Hepes, 18.63mM KOH, 17.5mM ATP, 1,75mM GTP, 87.6mM KOAc, 2,2 mM MgCl₂, 0,07 mg/ml Creatine Kinase, glutatione 2mM. E' da notare che l'RRL normalmente viene trattato con nucleasi, per rimuovere gli mRNA endogeni, e la nucleasi viene poi inattivata con EGTA. Nel mio caso, poiché ho lavorato con le proteine ricombinanti, non è stato necessario trattare con nucleasi, e quindi ho evitato la presenza di EGTA e quindi mantenuto i livelli endogeni di Ca²⁺.

Il Fegato di citosol di ratto è stato ottenuto con il protocollo descritto in Nohthurff et al. (2000), ma il tampone di omogeneizzazione era 110 mM KOAc, 20 mM Hepes-K, pH 7.2, 2mM Mg(OAc)₂, chiamato qui KHM. Sono stati prelevati due fegati di ratto maschi Sprague Dawley, perfusi con NaCl 0,9 % e omogeneizzati con KHM; l'omogenato è stato centrifugato a 830 g per 10 minuti, così abbiamo eliminato la porzione nucleare. Il soprannatante ottenuto è stato ricentrifugato a 20500 g per 20 minuti, eliminando così la parte dei mitocondri e parte dei microsomi, quelli aggregati e più pesanti. Il soprannatante ancora ottenuto è stato centrifugato a 190000 g per 1h per due volte. Si è ottenuto così la porzione citosolica.

Questa è stata addizionata di 1,5 mM ATP, 1,5 mM GTP, 0,07 mg/ml, proteina kinasi, 17.5 mM Creatina fosfato.

3.7 Semipermeabilizzazione di cellule HeLa

Per questa procedura abbiamo apportato qualche modifica al metodo molto ben descritto in Setoguchi et al. (2006) adattandolo alle nostre condizioni. Questa procedura permette di valutare l'inserimento delle nostre proteine in un sistema a metà tra una coltura in vivo e un sistema acellulare. La digitonina a basse concentrazioni permeabilizza la membrana plasmatica mentre lascia intatte le membrane intracellulari. In questo modo l'interno della cellula ha accesso a macromolecole aggiunte, come le nostre proteine ricombinanti.

Le cellule HeLa sono state seminate su vetrini di 18x18 mm, in piastre per colture cellulari da 35 mm₂ e coltivate fino ad una confluenza del 70%. Sono stati effettuati due lavaggi con 1 ml di tampone import (0,25M saccarosio, 20 mM Hepes-K pH7.5, 2,5mM Mg (OAc)₂, 25 mM KCl, 1 μM Taxolo). Sono state quindi permeabilizzate con 0,8 ml di tampone import contenete 25 μM digitonina per 5 minuti a 26°C, poi lavate con 1 ml di tampone import. Le cellule sono quindi state esposte a una delle due proteine ricombinanti (b5ER o b5RR) in presenza di solo tampone (KHM + 1 μM Taxolo), di RRL oppure di citosol di fegato di ratto. In tutti i casi era sempre presente 1 μM Taxolo. Dopo 1 h a 26°C, i vetrini sono stati lavati tre volte con KHM e quindi fissate con Paraformaldeide 4%.

3.8 Anticorpi, Western blot e immunofluorescenza

3.8.1 Anticorpi

Per le immunofluorescenze sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

Mouse anti-Tom 22, clone 1c9-2 mAb (Sigma Aldrich), diluito 1:2000

Mouse anti-PDI SPA-891, mAb (Stressgen), diluito 1:500

Rabbit anti-b5, come descritto in precedenza (Borgese et al, 2001), diluito 1:200

Per i Western blot,

l'anti-PDI già citato diluito 1:1000 e :

Mouse anti OP3, mAb, clone R2-15 (Adamus, et al 1991)

Rabbit anti-Ribophorin (Yu et al., 1989), Dr. Gert Kreibich

Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati:

anti-Mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen), diluito 1:400

anti-rabbit 549 Dylight (Jackson Immunoresearch), diluito 1:400

anti-goat Alexa Fluor 633 1:2 (Invitrogen), diluito 1:400
anti-mouse e anti-rabbit perossidasi (Pierce e Sigma Aldrich rispettivamente) entrambi diluiti 1:150000

3.8.2 Immunofluorescenza

La colorazione con anticorpo è stata effettuata seguendo due protocolli, in relazione all'anticorpo da visualizzare. Uno prevedeva concentrazioni saline alte Soluzione HS (High salt) 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl); nell'altro invece, sono ridotte (PBS). È stata effettuato un protocollo in PBS per ogni colorazione della PDI e per le colorazioni delle cellule semipermeabilizzate.

La procedura con sali bassi prevede un passaggio iniziale di permeabilizzazione in Triton-X100 0.1% in PBS per 15 minuti. Le cellule poi sono lavate con PBS per rimuovere il Triton e incubate in soluzione blocking (0.1% gelatina in PBS) per 30 minuti. I vetrini sono poi incubati per 2 ore con anticorpo primario diluito in blocking. Seguono 5 lavaggi in PBS, e poi incubazione con il secondario diluito in blocking per un'ora. Alla fine vengono eseguiti 3 lavaggi in PBS, e i vetrini sono montati con Moviol.

La procedura con i sali alti prevede invece un bloccaggio e contemporanea permeabilizzazione iniziali in soluzione blocking HS (gelatina 0,1%, Triton-X100 0.3%, 40 mM tampone fosfato pH 7.6, NaCl 0.45 M). Segue l'incubazione con primario in blocking HS per due ore, 5 lavaggi con soluzione HS e incubazione col secondario in soluzione blocking HS per un'ora. Alla fine i vetrini sono lavati 3 volte con soluzione HS, 3 volte con soluzione LS (Sali bassi 150mM NaCl , 20 mM Tris-HCl), una volta con H₂O e montati con Moviol.

Per valutare la deplezione di colesterolo è stato effettuato una colorazione con Filipin III (Sigma Aldrich). La Filipin III è un antibiotico che si lega al colesterolo, ed emette fluorescenza quando eccitato con una lampada a 405 nm. Così in caso di ridotte quantità di colesterolo nelle membrane cellulari, si osserva una riduzione del segnale. Per la colorazione con Filipin III è stato eseguito un protocollo specifico, incubando le cellule in glicina 0,2 M pH 7.2, per 30 minuti; i vetrini sono stati poi lavati con PBS e incubati con Filipin III 125 ng/μl, in PBS. Alla fine i vetrini sono stati lavati con PBS per 3 volte e montati con Moviol.

3.8.3. SDS-PAGE e Western Blot

Per l'SDS-PAGE sono stati utilizzati metodi standard. Sono stati utilizzati gel al 12 o 11%.

Per il "Western blot", proteine separate con SDS-PAGE sono state trasferite su filtri di nitrocellulosa e la banda di interesse è stato rivelato mediante anticorpi specifici. Gli

anticorpo sono stati rilevati mediante ECL (Perkin Elmer) seguito da esposizione a lastra Hyperfilm.

3.9 Microscopia

Le immagini confocali delle immunofluorescenze sono state acquisite con il sistema LSM510 Meta (Carl Zeiss) connesso a un microscopio Axiovert 200M (Carl Zeiss), oppure con il sistema confocale Spinning Disk LCI Ultraview (Perkin Elmer) connesso a un Microscopio Axiovert 200M Carl Zeiss. In tutti i casi le immagini sono state acquisite usando un obiettivo 63X PlanApo

Le immagini Wide-field sono state acquisite con un microscopio Axioplan (Carl Zeiss), con un obiettivo 40 X PlanNeofluar. Gli stessi parametri di acquisizione sono stati applicati ai campioni trattati e di controllo, facendo attenzione di aggiustare il tempo di esposizione in modo da evitare saturazione dei pixel.

3.10 Analisi di immagine e test statistici

Per valutare l'effetto di ciascuno dei trattamenti sul targeting di b5ER e b5RR, l'analisi delle immagini è stata effettuata manualmente in modalità cieca, vale a dire è stata effettuata un'analisi della localizzazione delle proteine microiniettate nelle cellule ignorando se si trattasse di campioni di controllo o trattati. Per assicurare omogeneità ed uniformità nell'analisi dei vari trattamenti, le immagini sono state analizzate sempre dallo stesso sperimentatore, riducendo al minimo, così, la soggettività di interpretazione. Le immagini sono state attribuite a diverse categorie come indicato nelle figure (per esempio: solo mitocondri, solo ER, ER e mitocondri) e la significatività statistica determinata con il testo chi quadro.

Le immagini acquisite in wide field per lo staining della Filipin III sono state analizzate con il software ImageJ. E' stata valutata l'intensità media di fluorescenza nelle cellule di controllo e in quelle trattate con lovastatina. Per verificare se la differenza osservata fosse quantitativa è stato effettuato un test statistico T Student.

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1 Il ruolo di TRC40

Per i miei esperimenti ho utilizzato i costrutti descritti in Fig. 4.1 e Fig. 3.1. La proteina b5-ER è la proteina WT del reticolo, che sia si localizza all' ER ma in vitro è in grado di inserirsi in liposomi privi di proteine senza assistenza da parte di chaperone. b5-RR è identica a b5-ER tranne che per gli ultimi residui luminali, che sono sostituiti con due arginine; essa si localizza *in vivo* alla MOM e, come b5-ER, è in grado di inserirsi in liposomi senza assistenza. Le due versioni delle stesse proteine con il tag OP3, che ne consente la N-glicosilazione, hanno lo stesso comportamento delle proteine non taggate.

Come ho spiegato nel capitolo precedente, negli ultimi anni è stato scoperto lo chaperone coinvolto nell'inserimento delle TA al reticolo, l'ATPasi TRC40. TRC40 media l'inserimento nell'ER delle TA con TMD idrofobico. Il citocromo b5 però non necessita di assistenza, ma anzi in vitro si inserisce da solo nella quasi totale assenza di energia (Favaloro et al, 2008; Brambillasca et al., 2006). Tuttavia, una debole interazione di b5 con TRC40 è stata dimostrata (Colombo et al, 2009; Stefanovic & Hegde, 2007; Favaloro et al 2010). Ci siamo perciò chiesti se TRC40 avesse un ruolo in vivo nel determinare il targeting di b5 all'ER. Per valutare un eventuale ruolo di TRC40, ho silenziato lo chaperone con una miscela di tre coppie di oligonucleotidi (si veda la Fig. XX del capitolo Materiali e Metodi). Dopo silencing per 60 o 72 h, la quantificazione dei blot (Fig. 4.2) ha dimostrato una riduzione dei livelli di TRC40 di circa 85%. Le cellule sono state transfettate con i costrutti esperimenti b5ER-OP3 e b5RR-OP3 12 h prima della raccolta; il lisato è stato analizzato mediante Western blot; la glicosilazione è stata considerata reporter della localizzazione all'ER, dato che l'enzima glicosilante (oligosaccaril transferasi) è un enzima del lume dell'ER. Sia a 60 che a 72 ore b5ER è glicosilato, mentre b5-RR non lo è, coerentemente con la sua localizzazione alla MOM (Borgese et al., 2001). Abbiamo anche osservato che nelle cellule silenziate si ha un aumento del segnale della PDI, che potrebbe indicare un'attivazione della risposta UPR (Unfolded Protein Response) del reticolo.

Cellule silenziate per TRC40 sono state anche analizzate mediante immunofluorescenza; in questo caso le cellule silenziate sono state transfettate con i costrutti esperimenti le due proteine senza OP3 (Fig. 4.3). Come è possibile osservare, il silenziamento di TRC40 non ha nessun effetto sulla localizzazione delle due isoforme del b5. Infatti il b5 ER si localizza al reticolo e il b5 RR alla MOM, come si può vedere dalla perfetta colocalizzazione con il marcatore dei mitocondri TOM22. Abbiamo, così concluso che in queste condizioni il corretto targeting delle isoforme del b5 non è influenzato da TRC40.

4.2 La nuova strategia di studio

Per cercare di individuare il meccanismo alla base del targeting ho messo a punto una nuova strategia in vivo, un protocollo di microiniezione. La microiniezione può essere considerata una transfezione transiente acuta (Fig. 4.4). Le cellule vengono iniettate con le due isoforme del b5, purificate da batteri *E.coli* (Fig. 4.5) e fissate dopo soli 15 minuti dalla microiniezione. Questo tempo così breve permette di effettuare trattamenti acuti e potenzialmente tossici per le cellule (se effettuati per lungo tempo) e vedere l'effetto che tali trattamenti farmacologici e non potrebbero avere sul targeting delle due proteine.

Le due proteine, b5 ER e b5 RR sono state prodotte in batteri come proteine di fusione con GST. La proteina di interesse è tradotta legata alla GST, che viene poi utilizzata per la purificazione. Alla fine, poi, mediante taglio proteolitico da parte della trombina, la proteina è rilasciata libera dalla GST. In figura sono mostrati i gel SDS-PAGE, colorati con Coomassie Brilliant Blue, che illustrano i vari passaggi della purificazione.

4.3 Localizzazione delle proteine microiniettate.

Una volta purificate da batteri, ho microiniettato le due isoforme del b5 in nel citoplasma di cellule CV1 (Fig. 4.6 A). Come si può osservare dalla figura, dopo soli 15 minuti dalla microiniezione le due proteine sono ben localizzate. Il b5 ER è localizzato al reticolo, colocalizzando con il marker del reticolo PDI e il b5RR ai mitocondri. colocalizzando con il marcatore mitocondriale TOM22. b5 RR non è mai stato visto colocalizzare con marcatori del reticolo (Fig. 4.6 B), mentre in qualche cellula, si osservava una debolissima localizzazione di b5 ER a qualche mitocondrio, in aggiunta alla sua principale localizzazione all'ER. Questo dato è in accordo con studi sulla localizzazione delle due isoforme endogene: mentre la isoforma mitocondriale è esclusivamente presente sulla MOM, una piccola quota (circa il 5%) della forma ER si trova sulla MOM (D'Arrigo et al, 1993). L'analisi quantitativa delle nostre osservazioni è mostrata in Fig.5.6B. Abbiamo preso in considerazione per l'analisi solo cellule che mostrano strutture subcellulari intatte, evitando quelle sofferenti o morenti a causa della procedura. Da questa analisi si evince che in circa 80% delle cellule il b5ER microiniettato non mostra colocalizzazione alcuna con i mitocondri. La proteina b5RR invece in tutte le cellule si localizza ai mitocondri e mai all'ER; tuttavia in circa il 30% delle cellule si osserva anche una quota diffusa nel citoplasma, forse dovuta all'eccesso di proteina che viene somministrata alla cellula. Questi dati indicano chiaramente che per la loro localizzazione le due isoforme di b5 non necessitano di fattori ribosomali o citosolici connessi con la traduzione.

4.4 In acuto TRC40 ha un ruolo nel targeting?

Ci siamo chiesti se la mancanza di effetto della deplezione di TRC40 in cellule transfettate (paragrafo 4.1) fosse dovuto a un adattamento delle cellule alla mancanza dello chaperon, con attivazione di sistemi alternativi di targeting durante le molte ore del silencing. Perciò abbiamo utilizzato il sistema della microiniezione per indagare l'effetto dello spegnimento della via TRC40 in acuto. Con questa finalità, abbiamo co-microiniettato assieme alle due forme di b5 una delle due proteine dominante negativo della via TRC40: WRBcc (Fig. 4.7). La proteina corrisponde alla porzione citosolica di uno dei due componenti del recettore di TRC40. È stato dimostrato che la presenza di queste porzioni del recettore è capace di inibire l'inserimento delle TA TRC40-dipendenti (Vilardi et al 2011;). Non è stato possibile verificare direttamente la presenza della proteina microiniettata, perché mancano buoni anticorpi anti-WRB utilizzabili per l'immunofluorescenza. Tuttavia, anche in questo caso non abbiamo rilevato alcun effetto della proteina dominante negativa microiniettata sulla localizzazione di b5ER.

4.5 Effetto del colesterolo sul targeting del b5

4.5.1 Overload di colesterolo nelle membrane cellulari

Come già detto, è stato precedentemente dimostrato che, *in vitro*, l'inserimento non assistito di b5 in microsomi e in liposomi privi di proteine è inibito dalla presenza di colesterolo nel bilayer a concentrazioni superiori al 5% (Brambillasca et al, 2005). Per verificare la rilevanza di questa informazione alla situazione *in vivo*, ho incubato cellule CV1 in un mezzo contenente 10 µg/ml colesterolo per 16 h, condizione conosciuta dalla letteratura per l'overloading di cellule con lo steroide (Runz et al., 2006). Dopo microiniezione con b5ER o b5RR, le cellule sono state fissate e trattate per immunofluorescenza (Fig. 4.8 A). L'analisi quantitative delle immagini (condotta in cieco) ha dimostrato che la percentuale di cellule nelle quali b5ER mostrava una localizzazione diffusa era significativamente aumentata (Fig. 4.8 B). Non abbiamo invece osservato alcun effetto sul targeting del b5 RR. Questo risultato conferma *in vivo* l'effetto inibitorio del colesterolo osservato *in vitro* e dimostra che le caratteristiche chimico fisiche della membrana del reticolo influenza il targeting delle TA. La mancanza di effetto su b5RR era inatteso e potrebbe essere spiegato o da un mancato accumulo di colesterolo nella MOM oppure da una minore sensibilità di b5RR ai livelli di colesterolo.

4.5.2 Effetto della deplezione del colesterolo sul targeting del b5

Come ho già accennato nella Introduzione, un ruolo del colesterolo per il targeting delle TA alla MOM è stato suggerito da studi in lievito (Krumpe et al., 2012) . Più specificamente, gli autori di questo studio hanno ipotizzato che le proteine TA della MOM evitano l'ER a causa delle concentrazioni più elevate di colesterolo nell'ER in confronto alla MOM. Secondo questa ipotesi, quindi, la deplezione di colesterolo dovrebbe portare a un targeting sbagliato delle proteine TA della MOM all'ER. Per verificare se in cellule di mammifero la deplezione di colesterolo provoca uno spostamento di b5RR dalla MOM all'ER, ho transfettato cellule CV1 con i costrutti b5 e contemporaneamente le ho incubate in mezzo depleto di lipoproteine in presenza di lovastatina, sostanza che inibisce la via del mevalonato di sintesi degli steroidi. È stato necessario utilizzare la transfezione e non la

microiniezione in questi esperimenti, perché le cellule cresciute in condizioni di deplezione di colesterolo non sopportavano la microiniezione.

Per prima cosa ho valutato i livelli di colesterolo dopo il trattamento, mediante colorazione con Filipin III, un antibiotico fluorescente che si lega al colesterolo. Ho acquisito cellule di controllo e cellule trattate e misurato l'intensità media di fluorescenza. Il t test di Student ha rivelato una diminuzione statisticamente significativa dei livelli di colesterolo nelle cellule trattate (Fig. 4.9 A).

Le cellule sono state processate per immunofluorescenza con anti b5 e l'anti Tom22, contate, e analizzate. Non abbiamo però osservato alcun cambiamento nelle cellule trattate rispetto ai controlli. Il b5 ER continua a localizzarsi al reticolo e il b5 RR continua a localizzarsi a mitocondri (Fig. 4.9 B e C).

Abbiamo così concluso che il colesterolo è un fattore importante per l'inserimento del b5 ER; l'eccesso di colesterolo ne blocca infatti l'inserimento, la diminuzione però non ha effetto.

4.6 Effetto di un ossidante sul targeting

Colombo et al. (2009) hanno dimostrato l'effetto inibitorio *in vitro* sull'inserimento del b5 ER dell'agente ossidante del glutatione, diamide. La diamide provoca il blocco dell'inserimento del b5-ER in membrane microsomiali e liposomi quando è presente nella reazione un estratto citosolico, ma non in sua assenza, a suggerire che il substrato (che non ha cisteine ossidabili) rimanga intrappolato con uno chaperone ossidato, chaperone che in condizioni normali si trova sulla via di targeting della proteina TA all'ER. Per investigare se anche in vivo la diamide ha un ruolo inibitorio (Fig. 4.10), cellule microiniettate con b5ER o b5RR sono state trattate con diamide per 15 minuti. Dopo fissazione e immunofluorescenza abbiamo osservato che il b5 ER è inibito quasi completamente nel suo inserimento, rimanendo per lo più diffuso nel citoplasma; un effetto simile, ma un po' meno marcato, si vede anche nel caso di b5RR (Fig. 4.10 A). L'analisi quantitativa ha dimostrato che la differenza tra cellule non trattate e trattate con diamide è statisticamente significativa per ambedue le proteine ricombinanti.

4.7 Coinvolgimento di chaperones e della calmodulina nel targeting

L'effetto della diamide suggerisce il coinvolgimento di uno o più chaperone che in presenza di un ossidante non riesce a rilasciare il substrato con conseguente blocco dell'inserimento. Per identificare possibili proteine coinvolte, abbiamo effettuato dei trattamenti farmacologici, che inibissero specificamente un fattore cellulare, per valutare così il coinvolgimento di ognuno.

In letteratura è riportato un effetto inibitorio del Ca^{2+} -Calmodulina sull'inserimento delle TA al reticolo (Hassdenteufel et al., 2011). Abbiamo ipotizzato che, in presenza di Ca^{2+} basale *in vivo*, una

debole attività della calmodulina potesse limitare l'inserimento aspecifico delle due isoforme di b5 in compartimenti erranei. Per saggiare questa ipotesi ho trattato le cellule microiniettate con trifluoperazina. La Trifluoperazina (TFP) è un inibitore della calmodulina, utilizzato in clinica quale antipsicotico. In seguito a legame con il calcio, la calmodulina espone un dominio che lega la TFP, e questo legame inibisce la funzionalità della calmodulina. Come è ben visibile dall'immagine della Fig. 4.11, il blocco dell'attività della calmodulina provoca "mistargeting" di ambedue le isoforme di b5: in molte cellule b5 ER, oltre che alla sua normale localizzazione all'ER, è presente anche sui mitocondri; analogamente, b5RR era rilevata, oltre che sui mitocondri, anche sull'ER, come evidenziato dalla positività dell'involucro nucleare (Fig. 4.11 A). L'analisi quantitativa delle immagini ha confermato l'effetto della TFP (Fig. 4.11B)

Un'altra proteina che esperimenti in vitro hanno implicato nel targeting di b5 è Hsp70 (Rabu et al 2009). Inoltre sui mitocondri è presente un recettore per Hsp70 (TOM70) (Neupert et al, 1990), per cui abbiamo ipotizzato che questo chaperone potesse essere specificamente coinvolto nel targeting di b5RR. Abbiamo perciò trattato le cellule con un inibitore di Hsp70, Mal2 11B, molecola che inibisce l'attività ATPasica endogena e quella mediata dall'antigene T (del virus SV40) di Hsp70 (Huryn et al., 2011). Con grande sorpresa abbiamo osservato un effetto di mistargeting del b5 ER che in seguito a 15 minuti di trattamento si localizza parzialmente ai mitocondri (Fig. 4.12 A), mentre non abbiamo osservato effetti sul targeting di b5RR (dati non mostrati). L'analisi quantitativa, come nel caso della TFP, ha dimostrato un aumento statisticamente delle cellule che mostrano una colocalizzazione del b5ER con i mitocondri (Fig. 4.12 B). Come controllo negativo ho trattato le cellule anche con il composto Mal3 51, che è strutturalmente simile a Mal2 11B ma che non ha affinità per Hsp70. Come si osserva in Fig. 4.12, le cellule esposte a questa sostanza non differivano dalle non trattate.

Abbiamo, infine, valutato anche il coinvolgimento di un altro chaperone, Hsp90. a questo scopo ho trattato le cellule con l'antibiotico geldanamicina per 30 minuti prima della microiniezione. La geldanamicina blocca l'azione di Hsp90, occupando il sito di legame dell'ATP e bloccando il rilascio dei substrati (clienti) dallo chaperone. Come si può osservare in Fig. 5.13 A e B, sia b5ER che b5RR mostrano una percentuale di proteina diffusa nel citoplasma. Tuttavia, l'analisi quantitativa dei dati ha rivelato che l'effetto è più marcato per b5RR.

4.8 Localizzazione delle isoforme b5ER e b5RR in cellule semipermeabilizzate

Nonostante le utili informazioni ottenute con la microiniezione, questo metodo non permette l'acquisizione di dati biochimici. Abbiamo perciò deciso di applicare un sistema intermedio tra quello in vivo e una acellulare: le cellule semipermeabilizzate. Questo metodo è illustrato in Fig. 4.14 A.. La digitonina permeabilizza solo la membrana plasmatica lasciando intatte quelle interne. Nelle cellule semipermeabilizzate possono poi essere le macromolecole desiderate.

Come prima cosa, ho analizzato mediante immunofluorescenza lo stato dell'ER e dei mitocondri nelle cellule semipermeabilizzate, colorando anticorpi per Tom22 e PDI, marcatori rispettivamente di mitocondri ed ER (Fig. 4.14 B). Dopo il trattamento con digitonina, le cellule sono state incubate per un'ora a 26 °C o in tampone KHM o in presenza di lisato di reticulociti di coniglio (RRL – vedi Metodi). L'immunofluorescenza è stata effettuata sia in seguito a permeabilizzazione con Triton-X100 che in assenza di permeabilizzazione con questo detergente (che permeabilizza tutte le membrane). Questo controllo mi ha permesso di valutare se le membrane interne rimangono intatte dopo il trattamento con digitonina, in quanto la PDI è una proteina interna al reticolo, e quindi non accessibile agli anticorpi se la membrana ER è intatta; invece la proteina Tom22 è esposta al citosol e dovrebbe quindi essere accessibile agli anticorpi nelle cellule semipermeabilizzate anche senza successiva esposizione a Triton. Come è visibile in Figura 4.14B, e secondo le aspettative, TOM22 era rilevabile nelle cellule semipermeabilizzate sia senza o dopo successiva permeabilizzazione con Triton, mentre per la rilevazione di PDI era necessaria l'esposizione dei vetrini a Triton. gli stessi risultati sono stati ottenuti con cellule preincubate in KHM o in RRL, anche se la conservazione della morfologia dell'ER era peggiore nelle cellule incubate in RRL ed era presente una colorazione aspecifica dei nuclei (ultimo riquadro in basso di Fig. 4.14B).

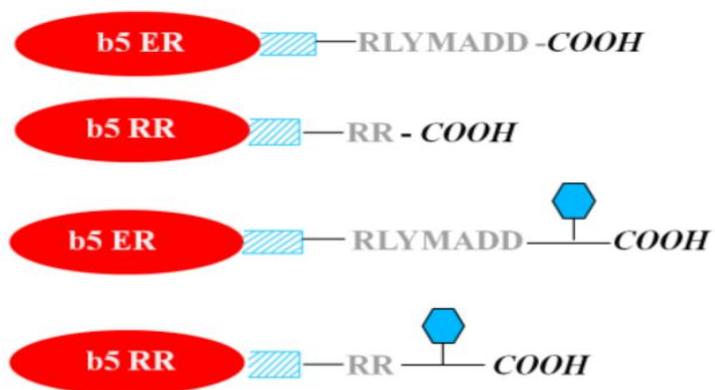
Ho anche valutato se le due colorazioni Tom22 e PDI, in seguito a semipermeabilizzazione rimangono distinte. Come si può osservare in Fig. 4.15, sia che le cellule siano state incubate in buffer KHM, che in RRL, il reticolo, pur con morfologia alterata, rimane ben distinta dai mitocondri. Ho quindi concluso che il sistema di cellule semipermeabilizzate potesse essere utilizzato per studiare il targeting di b5ER e b5RR.

Nel primo esperimento, Le cellule sono state prima transfettate con una proteina fluorescente rossa che si localizza all'ER (RFP-KDEL) (Snapp EL, 2009), poi permeabilizzate con digitonina e infine incubate in RRL, come sorgente di chaperone, in presenza di 100 ng o 1µg di b5RR (Fig. 4.16 A, B, C), oppure con 1µg di b5ER (Fig. 4.16 D, E). Il b5 RR, nonostante che nel sistema cell-free sia in grado di inserirsi nei microsomi (Borgese et al., 2001), nelle cellule semipermeabilizzate si inserisce nella MOM, in entrambe le condizioni, e non nell'ER, evidenziata dalla fluorescenza di RFP-KDEL nelle cellule transfettate. Invece, il b5 ER si localizza ai mitocondri, e solo in parte al reticolo, marcato dalla presenza di RFP-KDEL, coerentemente con il suo comportamento nel sistema cell-free e diversamente dal suo comportamento in vivo.

Infine ho cercato di trovare una condizione in cui il b5 ER avesse una specificità di localizzazione; ho effettuato, così, il suo inserimento parallelamente in KHM o in citosol di fegato di ratto (Fig. 4.17). In KHM, con nostra sorpresa, abbiamo osservato che il b5 ER colocalizza esclusivamente con TOM22 e non con PDI, a indicare che in assenza di chaperone la sua destinazione preferita è rappresentata dai mitocondri. Invece una colocalizzazione con la PDI è stata osservata quando l'incubazione era eseguita in presenza di citosol, anche se permane una parziale localizzazione ai mitocondri. Benché preliminari, questi dati suggeriscono che chaperone richiesti per il targeting di b5 ER siano limitanti nel RRL e più abbondanti nel citosol di fegato e il sistema delle cellule semipermeabilizzate potrebbe quindi rappresentare un punto di partenza per la identificazione molecolare dei fattori richiesti per questa via di targeting.

FIGURE E LEGENDE

Figura 4.1



In vivo	In vitro
ER	Non - Specific
MOM	Non-Specific
ER	Non- Specific
MOM	Non-specific

Figura 4.1. I costrutti utilizzati in questo studio. Il b5 ER sia con il tag che in assenza di tag si localizza la reticolo in vivo mentre in vitro. Non ha un targeting specifico. Il b5 RR in vivo si localizza alla MOM ma in vitro non ha specificità di membrana.

Figura 4.2

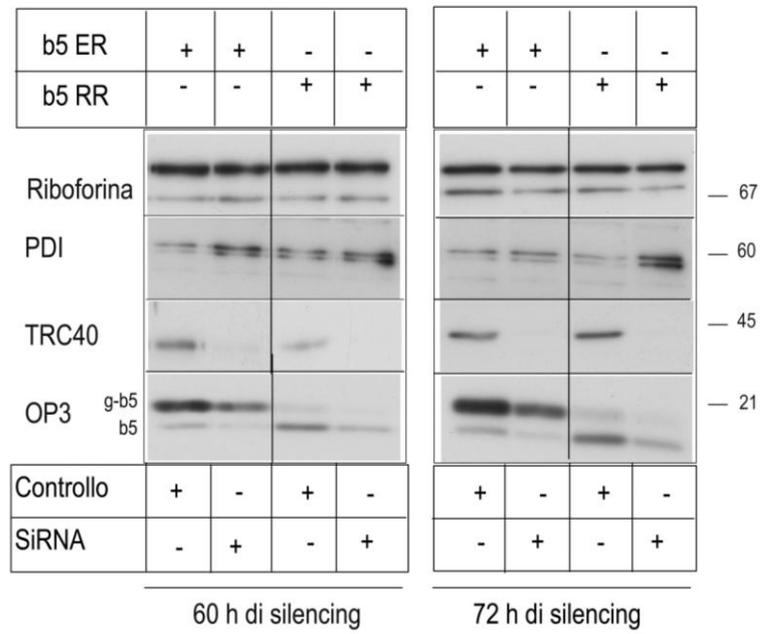


Figura 4.2. Mancanza di effetto del silencing di TRC40 sulla localizzazione di b5 ER e b5 RR, saggiata mediante western blot. Il western blot a sinistra mostra il silencing effettuato per 60 ore: a 48ore di silencing le cellule sono state trasfettate con i plasmidi codificanti per b5 ER OP3 e b5 RR OP3. Già dopo 60 ore l'espressione di TRC40 è fortemente inibita. In questo esperimento sono state utilizzate le due isoforme con il tag opsina, che permette una N glicosilazione, quando la proteina è inserita al reticolo. La rivelazione della proteina è stata, infatti ottenuta con l'anticorpo anti OP3, che permette di rivelare la proteina glicosilata e la porzione non glicosilata (la proteina con la glicosilazione ha un peso molecolare maggiore, per cui si rivela una banda più alta). Come è possibile osservare dalla figura, le cellule silenziate per TRC40 sono capaci di inserire, allo stesso modo dei controlli, la proteina b5 ER: si osserva, infatti che la proteina b5 ER è quasi tutta glicosilata, come nel controllo. Nel caso di b5 RR, invece non si osserva nessuna banda glicosilata, né nei controlli né nelle cellule silenziate, questo fa presupporre che la proteina sia localizzata ai mitocondri. Come controllo di caricamento abbiamo utilizzato la Riboforina, una proteina del reticolo espressa in maniera ubiquitaria. Si osserva un leggero aumento della PDI nelle cellule silenziate, e non si ha un cambiamento nell'inserimento del b5. L'espressione del b5 nelle cellule silenziate è inferiore rispetto alle cellule di controllo, ma questo effetto potrebbe dipendere da un'attivazione dell'UPR, con conseguente rallentamento della traduzione proteica. Il western blot a destra mostra il silencing a 72 ore. La trasfezione è effettuata dopo 60 ore di silencing. Non si osservano cambiamenti rispetto al silencing a 60 ore.

Figura 4.3

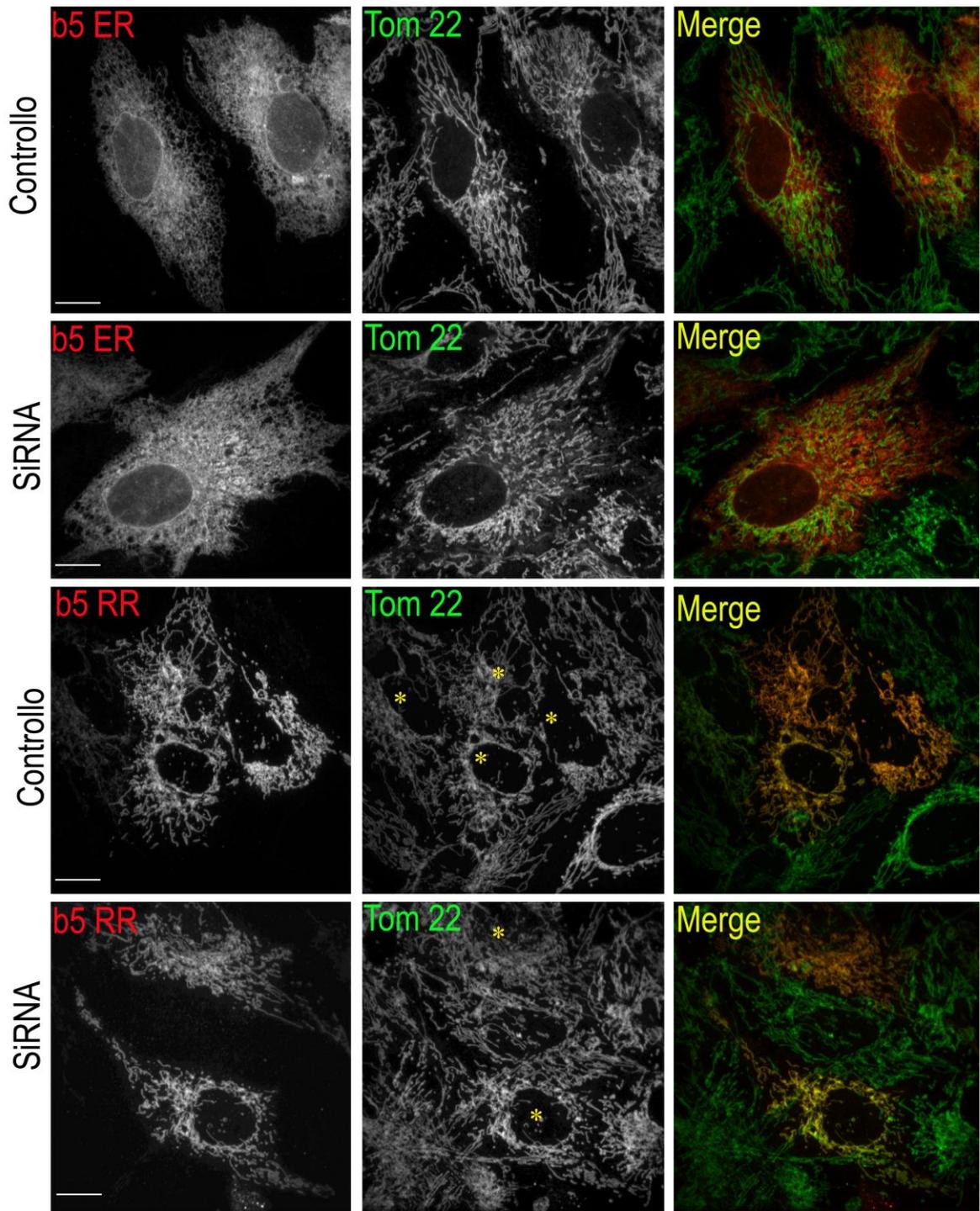


Figura 4.3. Mancanza di effetto del silencing di TRC40 sulla localizzazione di b5 ER e b5 RR, saggiata mediante immunofluorescenza.

Immunofluorescenza di cellule silenziate e di controllo. Dall'alto: cellule trasfettate con b5ER, controllo e SiRNA e b5 RR, controllo e SiRNA. In rosso l'anti b5 , in verde l'anti Tom22, in giallo il merge (Barra 10 μm). L'asterisco indica le cellule trasfettate. Le immagini sono sezioni singole acquisite con sistema confocale LSM510 Meta (Carl Zeiss) connesso a un microscopio Axiovert 200M (Carl Zeiss).

Figura 4.4

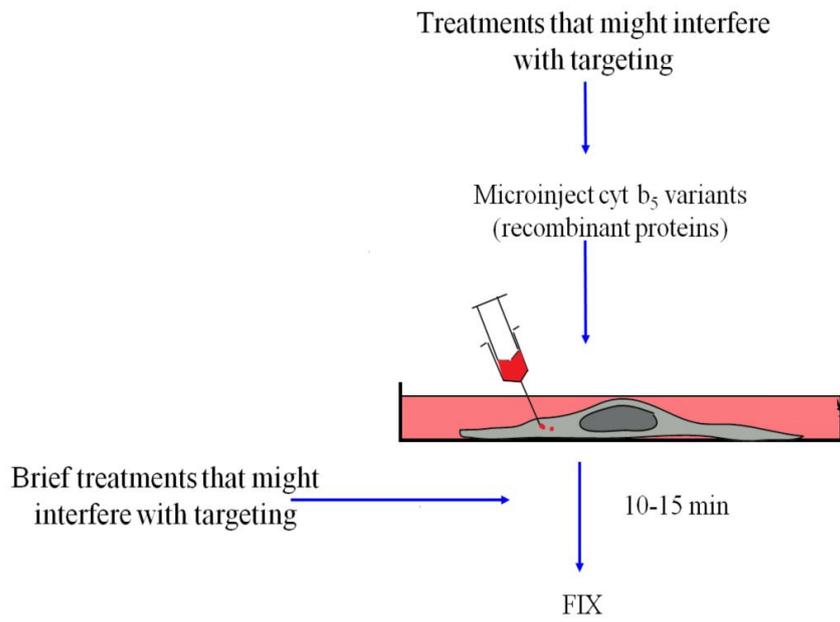


Figura 4.4. Lo schema della microiniezione.

Le cellule sono microiniettate con le proteine ricombinanti purificate da batteri, e poi fissate dopo 15 minuti. È possibile effettuare trattamenti prima della microiniezione, come nel caso del silencing o del caricamento di colesterolo, o dopo, nel caso di tutti gli altri trattamenti effettuati in questo lavoro.

Figura 4.5

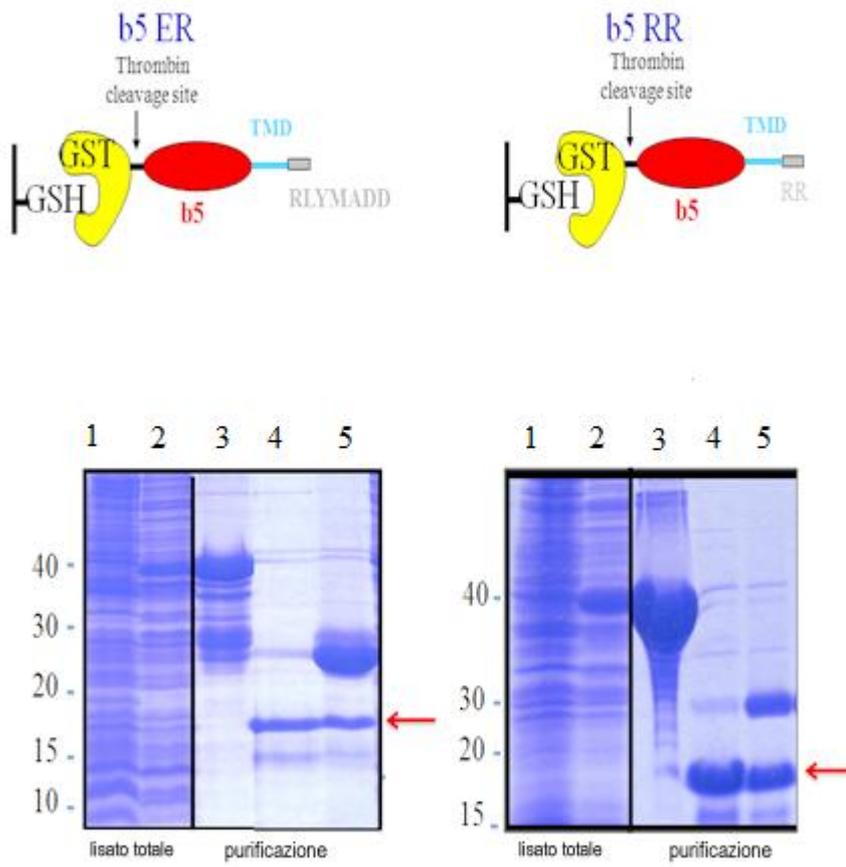
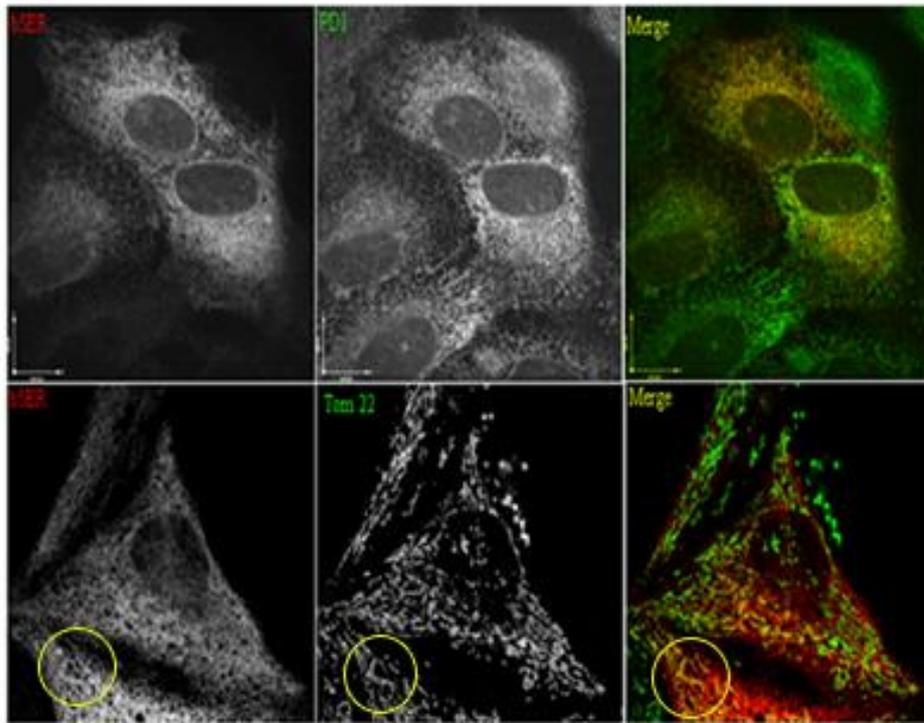


Figura 4.5 Purificazione delle proteine ricombinanti b5 ER e b5 RR

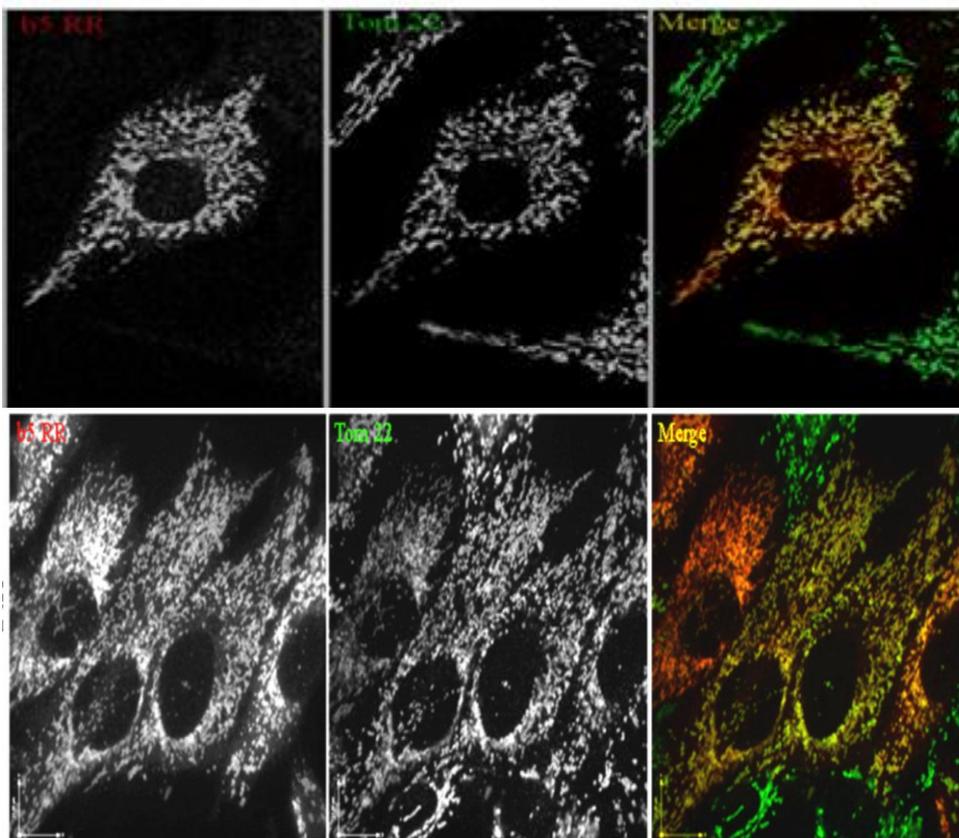
In alto è mostrato lo schema della proteina espressa dai batteri fusa all GST. Tra la sequenza della GST e la sequenza del b5 vi è un sito di taglio per la trombina, per cui la digestione in presenza di trombina risulta nel rilascio della proteina b5. Nei due gel colorati con Comassie sono mostrate le tappe della purificazione di entrambe le isoforme. Per entrambi i gel l'ordine di carica è lo stesso :da sinistra la prima lane indica il lisato totale non indotto, la seconda quello indotto; la terza la parte di campione legata alla resina GSH, la quarta il materiale eluito in seguito a taglio proteolitico, l'ultima la resina GSH recuperata dopo il taglio con trombina.. La freccia indica la proteina purificata, dopo proteolisi.

Figura 4.6

A



B



C

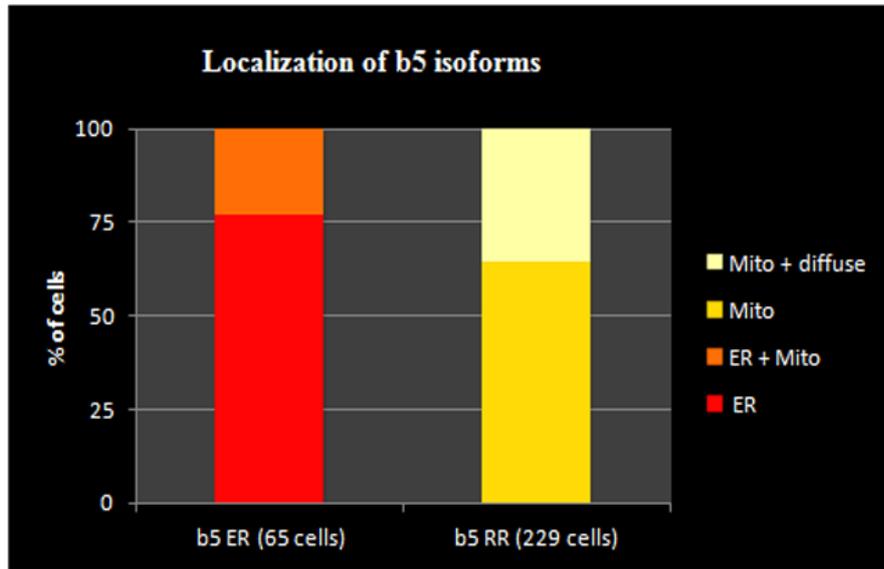


Figura 4.6. Localizzazione di b5 ER e b5 RR microiniettate. A e B : Le cellule sono state microiniettate con le proteine b5 ER e b5 RR, rispettivamente, successivamente fissate e trattate per immunofluorescenza con anticorpi anti-b5 (rosso), anti PDI (marcatore dell'ER – verde, pannello centrale della riga alta) o anti-TOM22 (marcatore dei mitocondri-verde). Si nota una ottima colocalizzazione di b5 ER e b5 RR con PDI e TOM22 rispettivamente. Viceversa, si vede scarsissima colocalizzazione di b5 ER con TOM22. Nel cerchio giallo della figura A è evidenziato un raro esempio di colocalizzazione del b5 ER con i mitocondri. **C:** Analisi quantitativa della localizzazione di b5 ER e b5 RR. Le cellule microiniettate con b5 ER sono state catalogate rispetto alla localizzazione della proteina in ER e ER+Mitocondri (come la cellula indicata col cerchio giallo nel pannello centrale). Circa l'80% mostra una localizzazione esclusiva al reticolo. Le cellule microiniettate con b5 RR sono state classificate in due categorie: Esclusivamente mitocondri e e mitocondri più colorazione diffusa citosolica (Mito + diffuso). Il 100% delle cellule mostra una localizzazione ai mitocondri ma circa un 30% presenta una percentuale minima diffusa nel citoplasma. Una localizzazione all'ER non è mai stata osservata. Le immagini sono sezioni singole acquisite con sistema confocale LSM510 Meta (Carl Zeiss) connesso a un microscopio Axiovert 200M (Carl Zeiss)

Figura 4.7

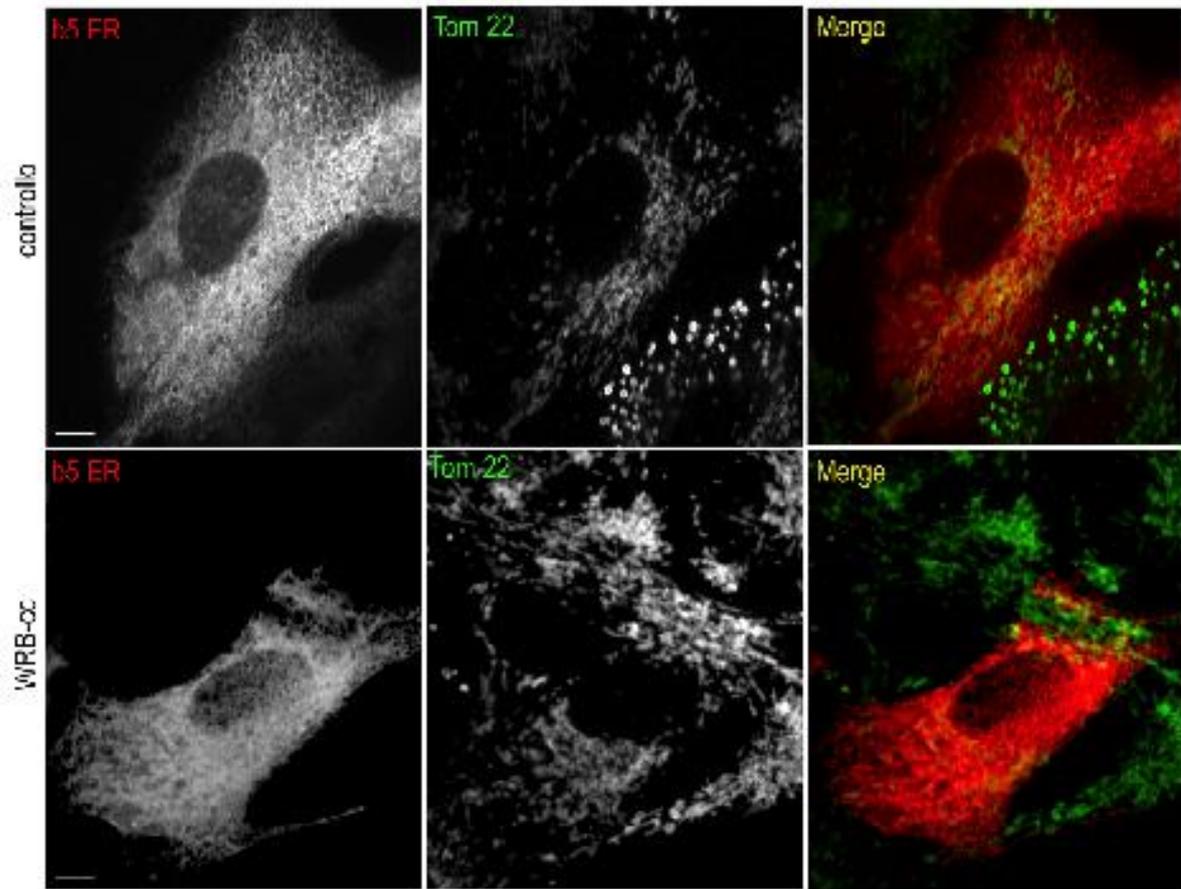
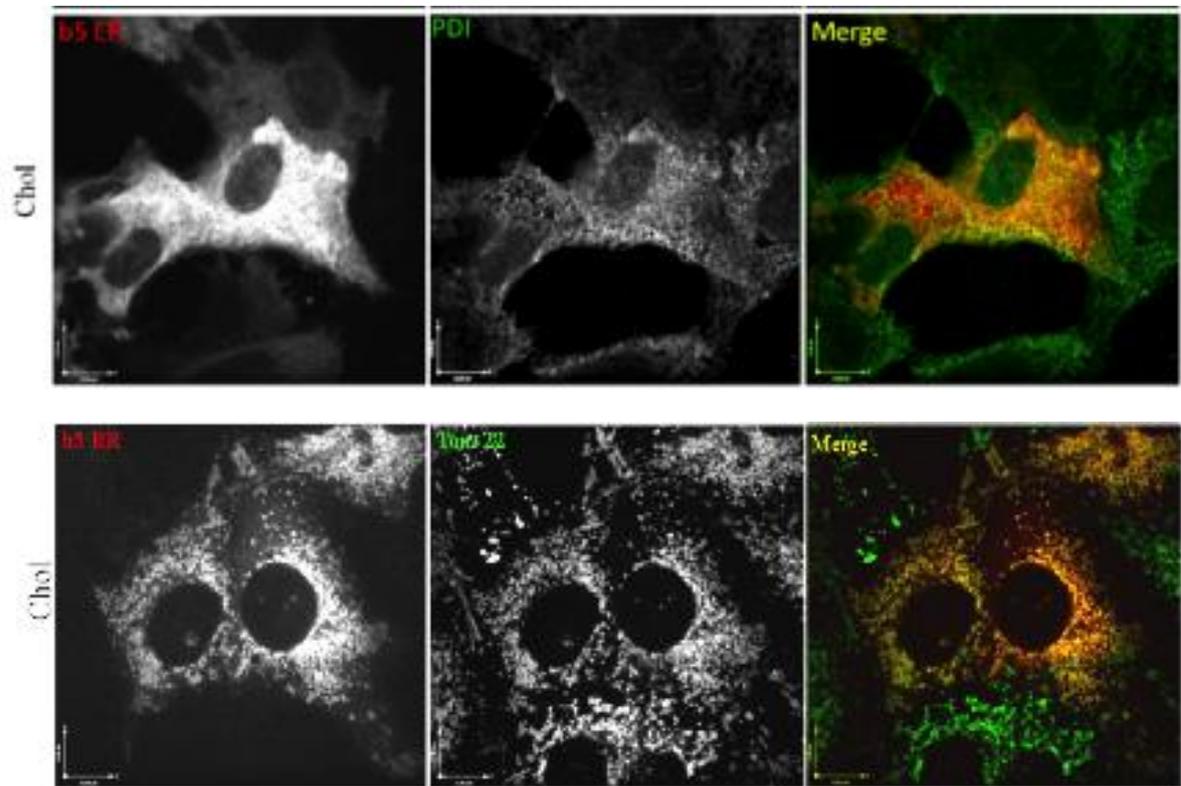


Figura 4.7: Silenziamento di TRC40 in acuto : Microiniezione b5 ER/MBP (nel controllo), e b5 ER/MBP-WRB-cc (800ng/ μ l). In rosso l'anti b5, in verde l'antiTom22, in giallo il merge. Barra 10 μ m. Immagini acquisite con sistema confocale Spinning Disk LCI Ultraview (Perkin Elmer) connesso a un Microscopio Axiovert 200M Carl Zeiss. La figura del controllo è una sezione di uno Z-stack, l'immagine con il WRB-cc è una maximum projection di uno Z.stack.

Figura 4.8

A



B

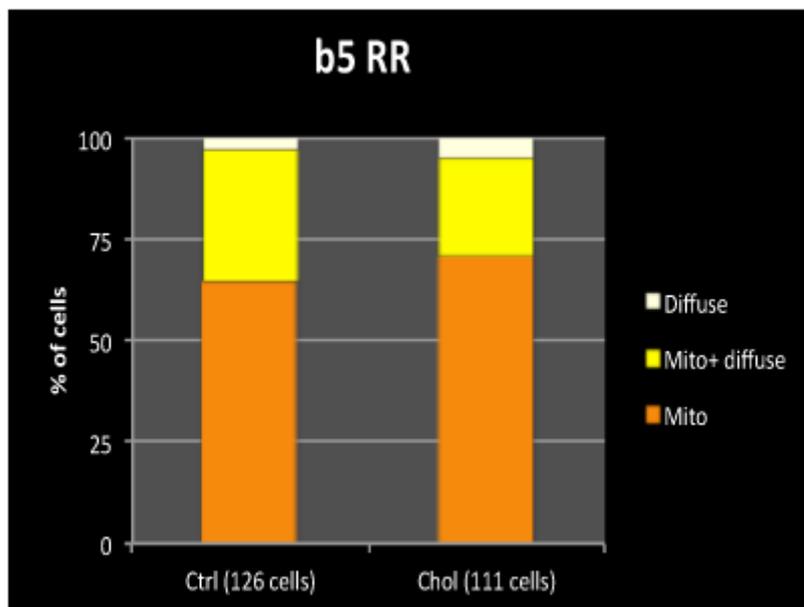
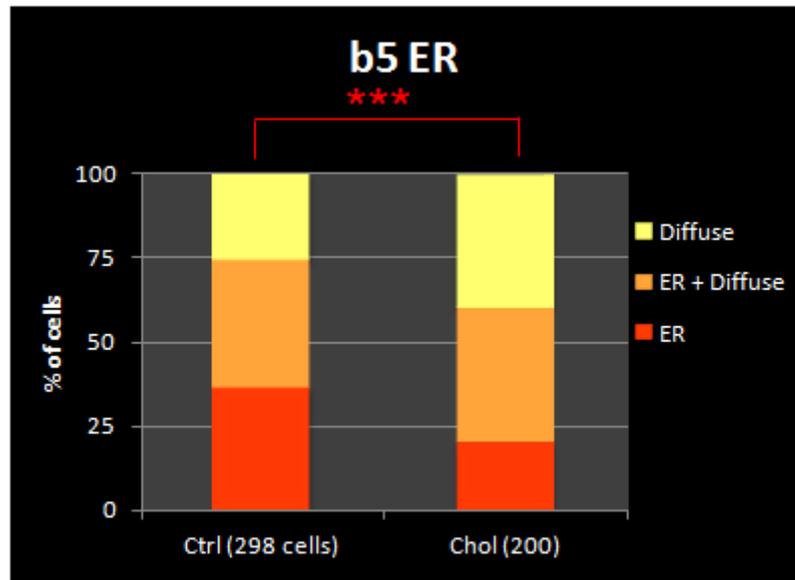
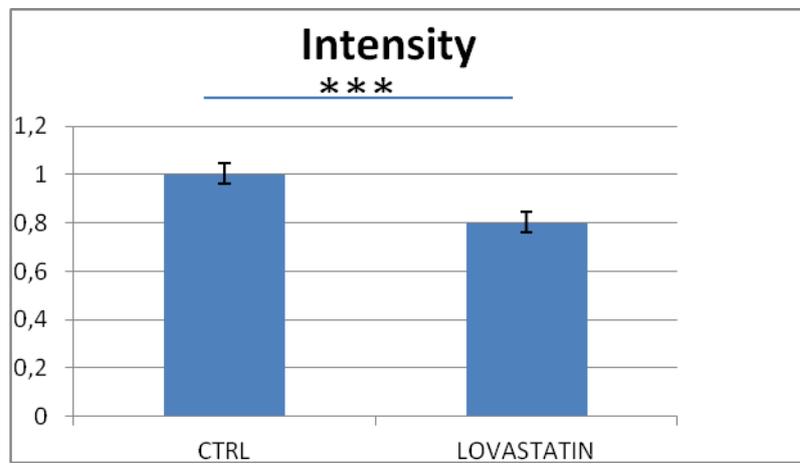
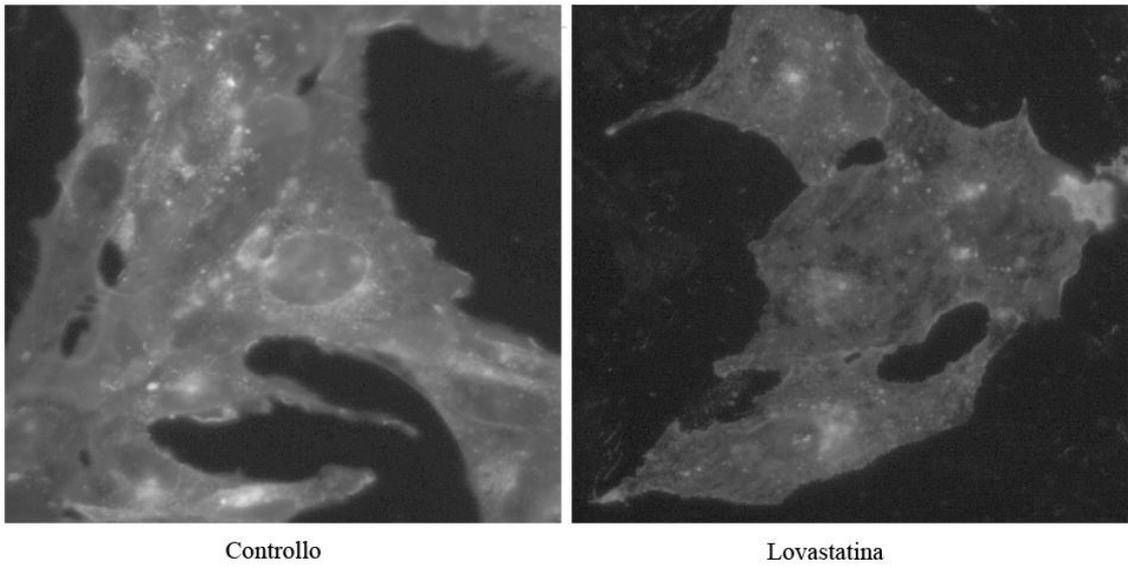


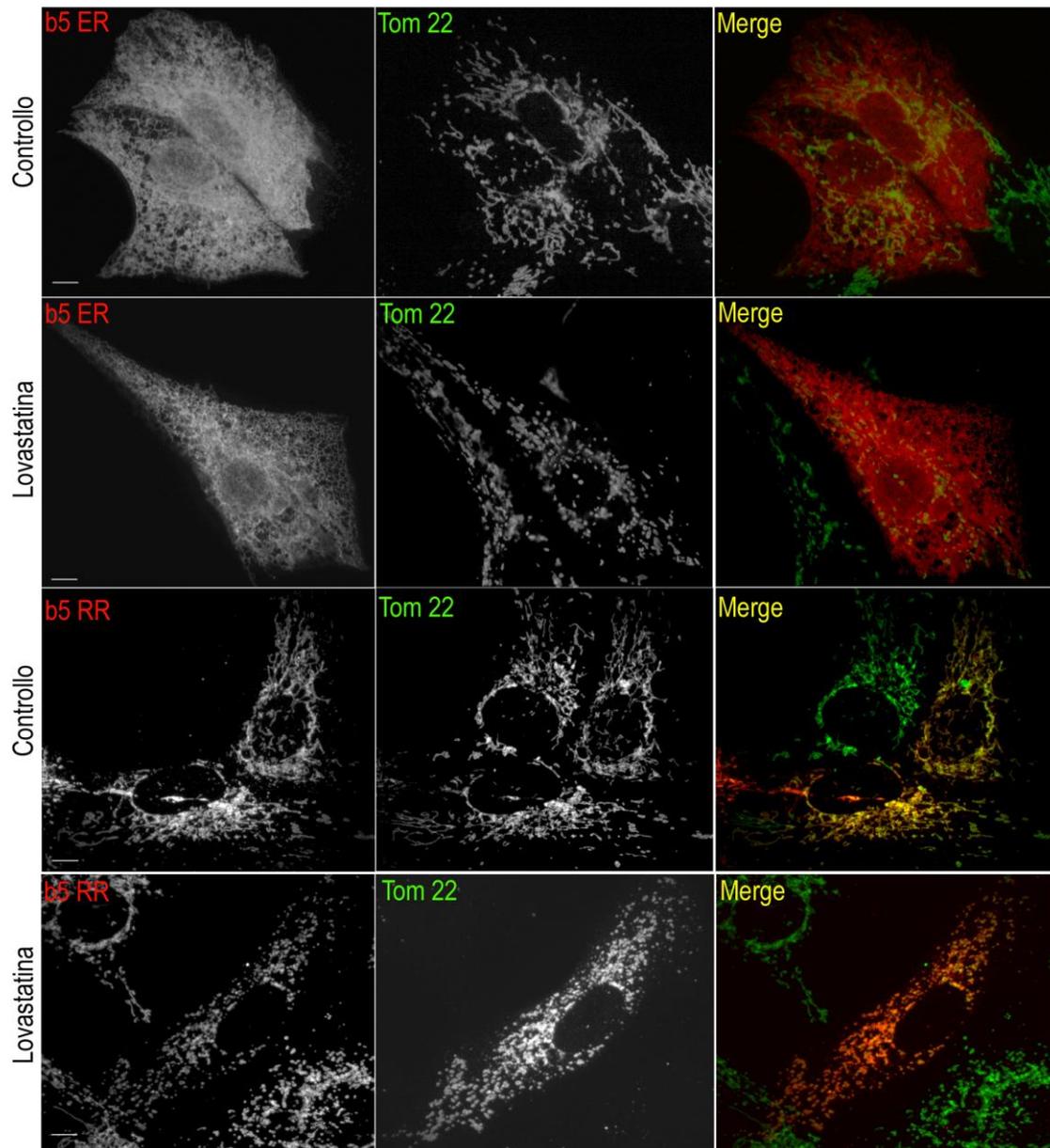
Figura 4.8. A: microiniezione b5 ER, e b5 RR. con trattamento colesterolo. In rosso l'anti b5, in verde, l'anti PDI o l'anti Tom22, come indicato, in giallo il merge. B: analisi quantitativa: dell'effetto del trattamento di sovraccaricamento di colesterolo. L'inibizione per l'isoforma b5 ER è significativa ($p= 0,0002$). Per il b5 RR non si ha nessun effetto. Barra 10 μm . Le immagini sono singole sezioni acquisite con sistema confocale LSM510 Meta (Carl Zeiss) connesso a un microscopio Axiovert 200M (Carl Zeiss).

Figura 4.9

A



B



c

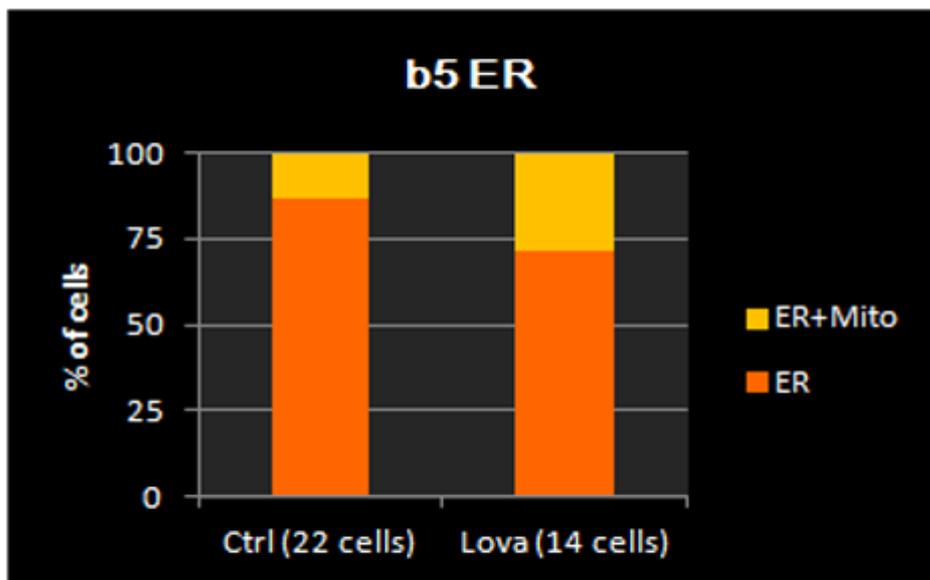
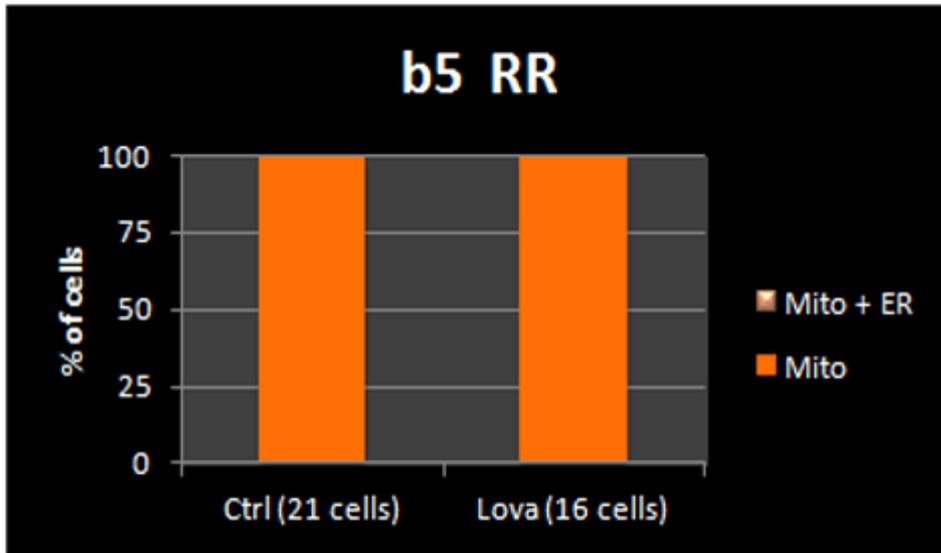
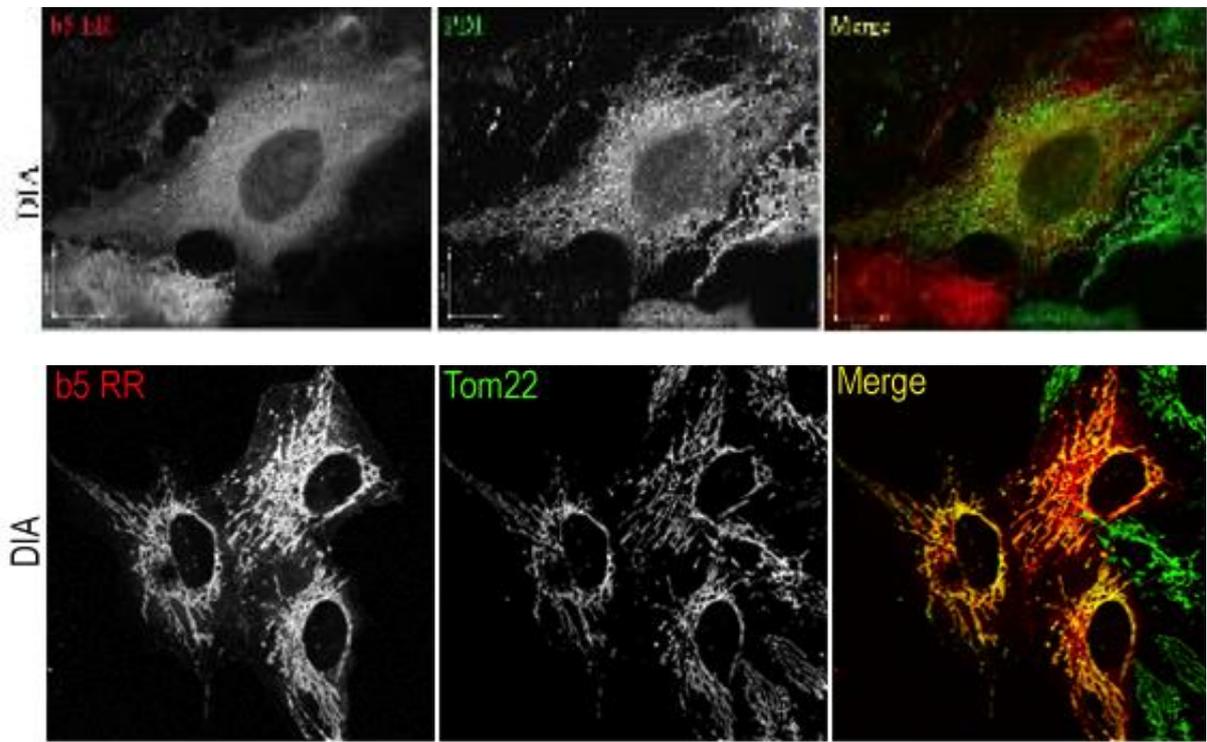


Figura 4.9. A: Deplezione di colesterolo in seguito a trattamento con lovastatina. Le cellule sono state colorate con Filipin III; campi casuali sono stati acquisiti con microscopio wide-field con gli stessi parametri di acquisizione per controlli e trattati la differenza di intensità osservata tra controllo e trattate è statisticamente significativa ($p = 0,001$, con t test di Student). Sotto le immagini è mostrato un grafico con le medie dell'intensità di colorazione del controllo e delle cellule trattate \pm SEM ($n = 15$ campi di immagini analizzate) Il valore dell'intensità media dei controlli era 21,7. Tale valore è stato fissato ad 1. Il valore dell'intensità media delle cellule trattate con lovastatina era 17,33. Il valore mostrato nel grafico è il rapporto con il valore di controllo. Il SEM, mostrato con la barra di errore del controllo era pari a 1,01, e il SEM delle cellule trattate, 0,6. Anche questi valori, nel grafico mostrati con le barre di errore sono stati rapportati ad uno. . B: Cellule di controllo o trattate con lovastatina, transfettate con b5 ER e b5 RR, come indicato. In rosso l'anti b5, in verde l'anti Tom22 e in giallo il merge. Barra 10 μ m. C: analisi quantitativa delle cellule transfettate. La deplezione di colesterolo non comporta cambiamenti significativi nel targeting delle due isoforme del b5. le immagini acquisite con sistema confocale Spinning Disk LCI Ultraview (Perkin Elmer) connesso a un Microscopio Axiovert 200M Carl Zeiss, sono singole sezioni di uno Z-stack,

Figura 4.10

A



B

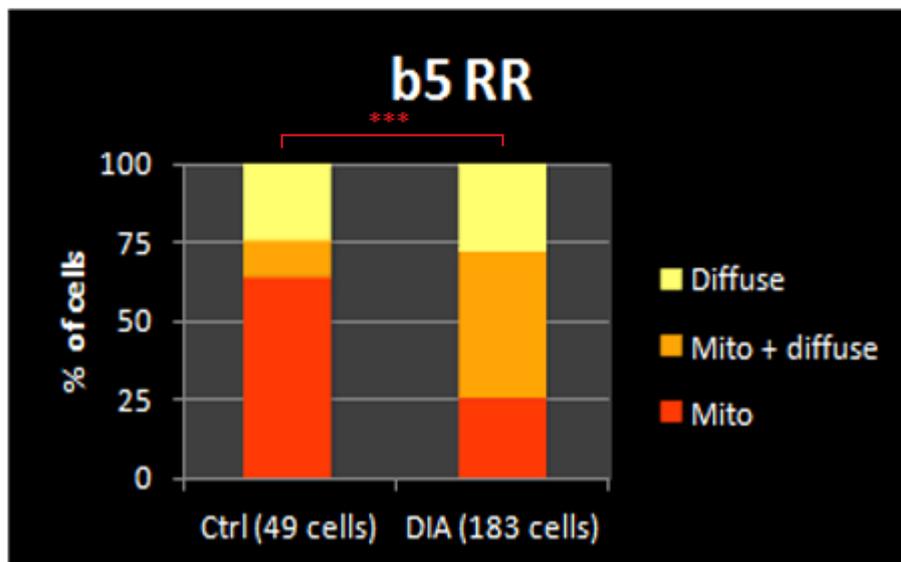
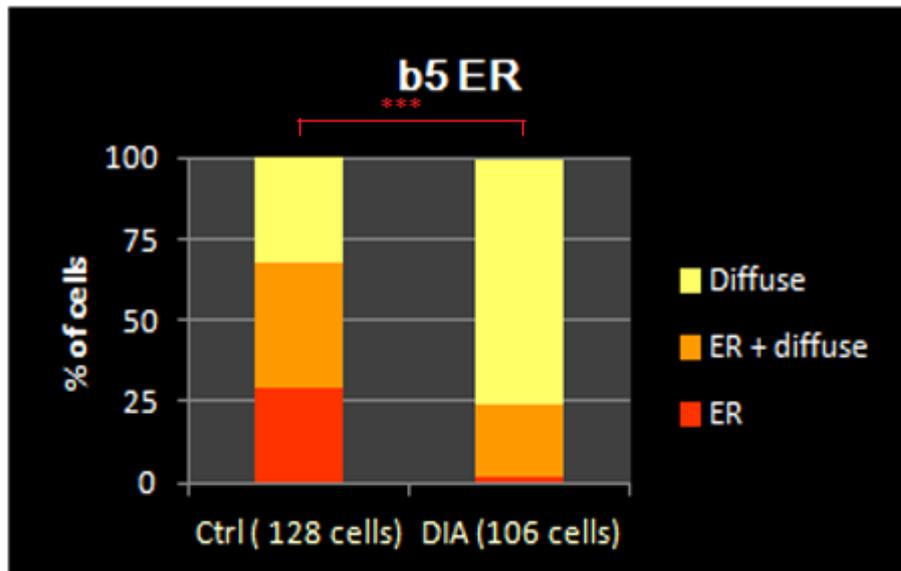
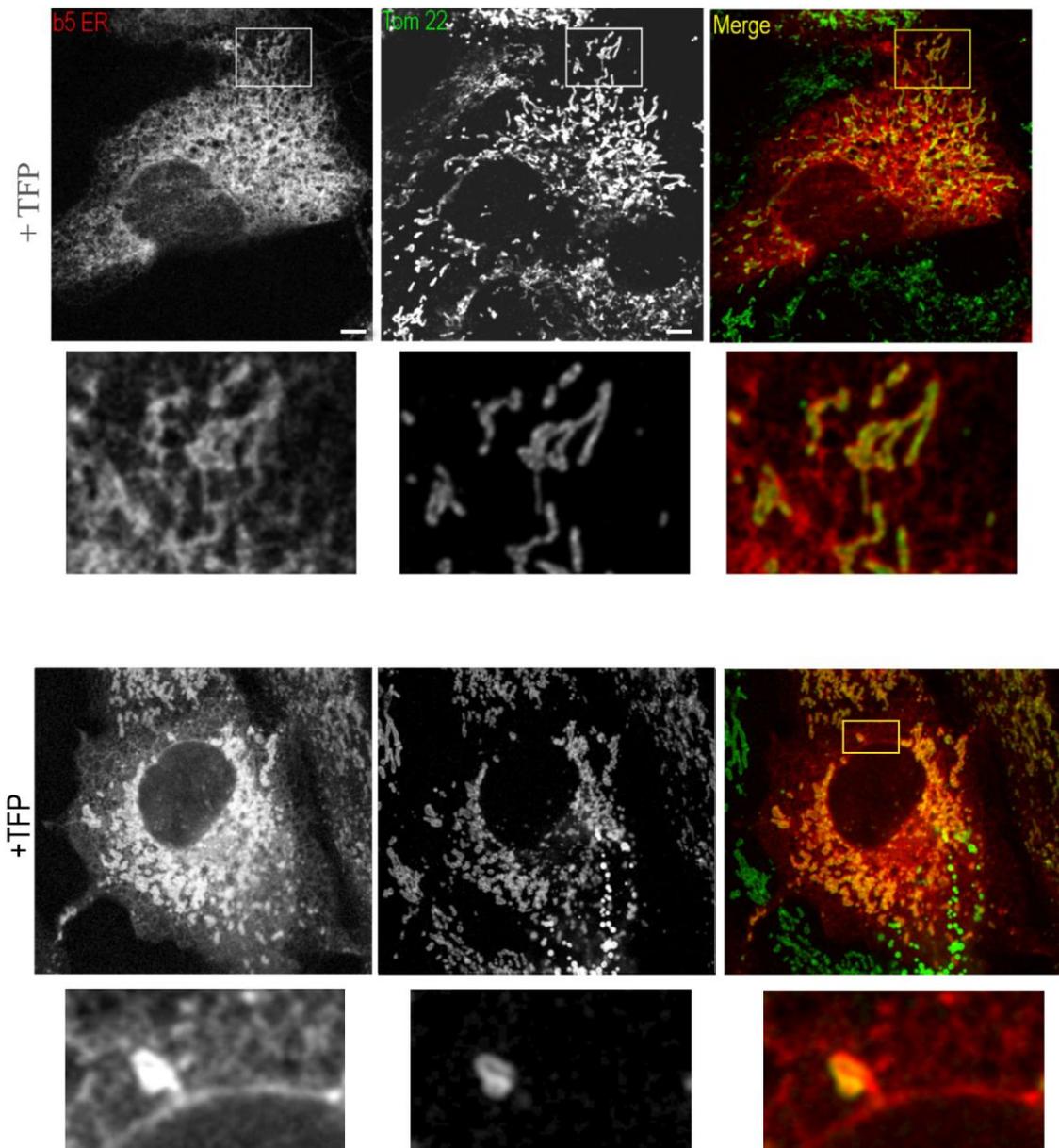


Figura 4.10 Effetto del trattamento con diamide sulla localizzazione di b5ER e b5RR. **A:** cellule microiniettate con b5 ER e b5 RR controlli e trattamenti con diamide. In rosso l'anti b5, in verde l'anti PDI o l'anti Tom22 come indicato, in giallo il merge. È evidente l'effetto inibitorio sull'inserimento in entrambe le isoforme. Barra 10 μm . **B.** Analisi quantitativa dell'effetto del trattamento (b5 ER $p=0,0001$; b5 RR $p=0.0001$). È possibile osservare che entrambe le isoforme del b5 subiscono un'inibizione del targeting, con un aumento della percentuale di celle che mostrano una localizzazione diffusa della proteina ricombinante. Le immagini sono sezioni singole acquisite con sistema confocale LSM510 Meta (Carl Zeiss) connesso a un microscopio Axiovert 200M (Carl Zeiss).

Figura 4.11

A



B

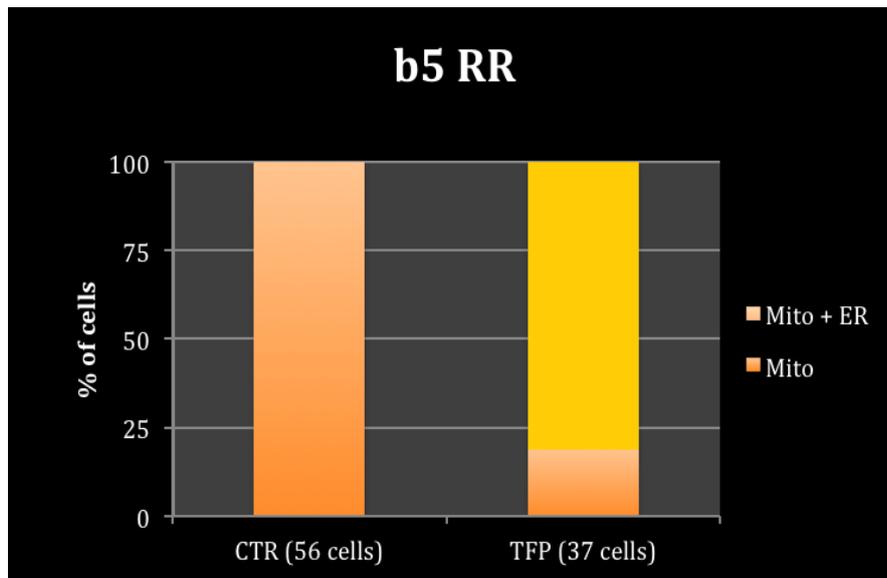
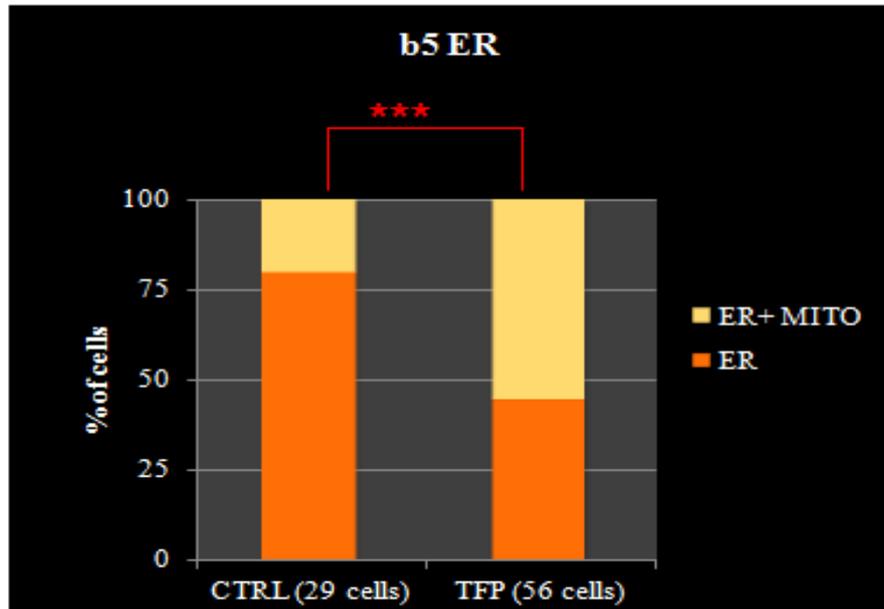
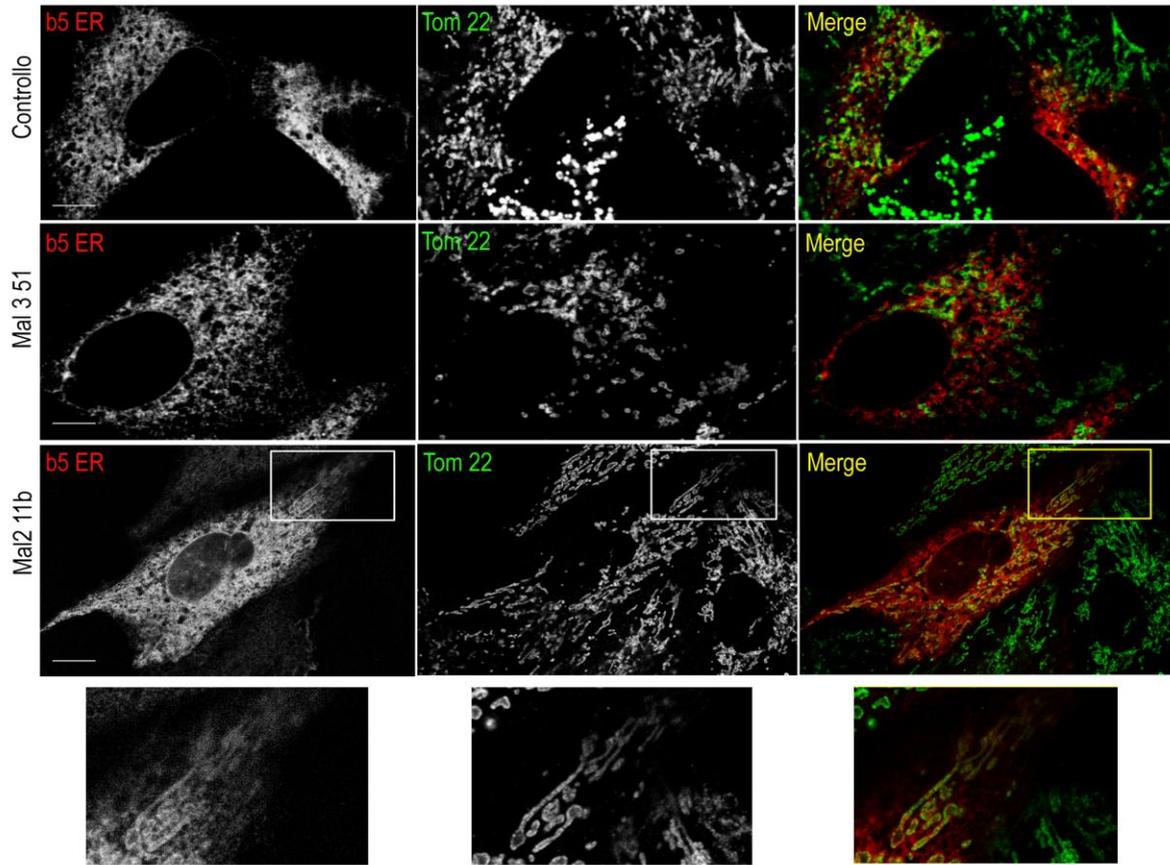


Figura 4.11 A: Microiniezione di b5 ER e b5 RR trattati con TFP. In rosso l'anti b5, in verde, l'anti Tom22, in giallo il merge. La prima riga mostra il trattamento TFP in seguito a microiniezione di b5 ER; nella riga centrale l'ingrandimento della regione evidenziata. Nella riga in basso il trattamento TFP in seguito a microiniezione b5 RR. Nell'ultima riga l'ingrandimento della regione evidenziata. La freccia indica l'involucro nucleare. Barra 10 μm . Ingrandimento b5 ER 4X, Ingrandimento b5 RR 5X. B: analisi quantitativa del trattamento TFP. Nei campioni trattati con TFP, la percentuale di cellule in cui b5 ER si localizza anche ai mitocondri è significativamente aumentato ($p = 0,0022$). Dopo trattamento con TFP, il b5 RR mostra una localizzazione al reticolo assente nei controlli. Le immagini sono sezioni singole acquisite con sistema confocale LSM510 Meta (Carl Zeiss) connesso a un microscopio Axiovert 200M (Carl Zeiss)

Figura 4.12

A



B

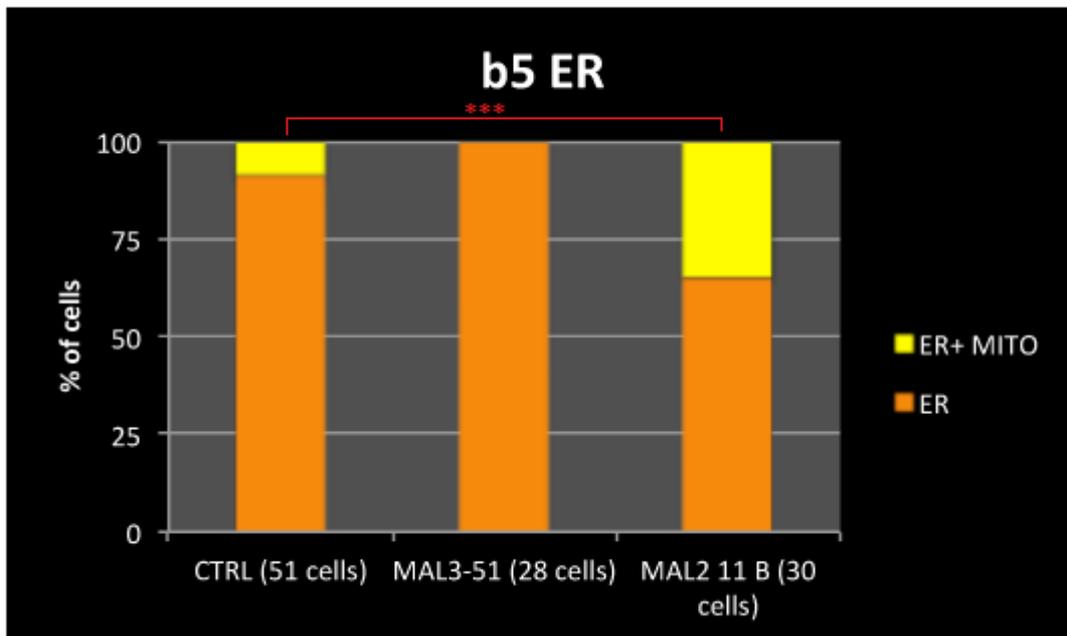
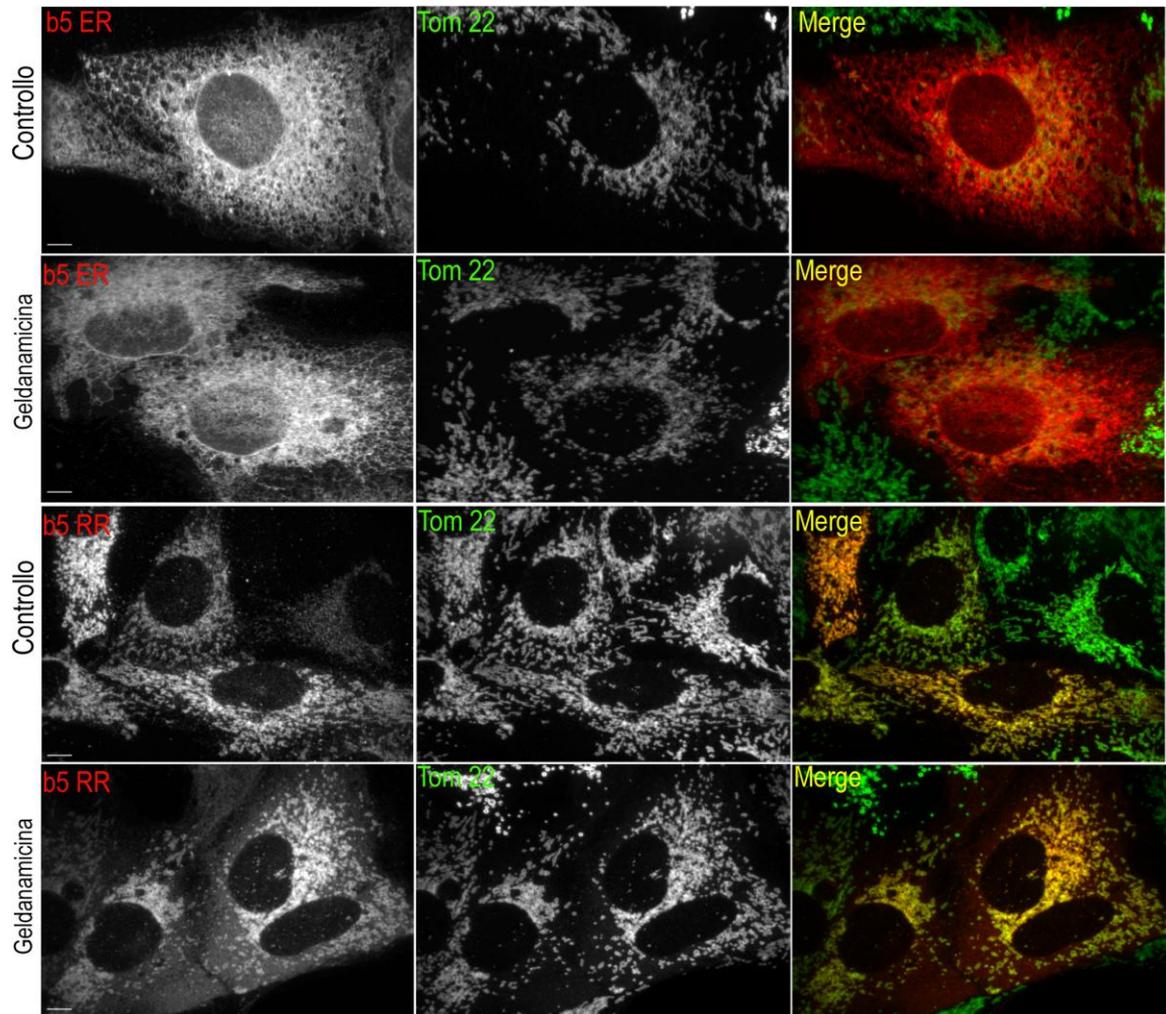


Figura 4.12. A: microiniezione di cellule con b5 ER e trattamento con Mal2 11B e Mal3 51. In rosso l'anti b5, in verde l'anti Tom22 e in giallo il merge. Nell'ultima riga è mostrato l'ingrandimento della regione evidenziata dal rettangolo, in cui è ben visibile la colocalizzazione del b5 ER con i mitocondri. Barra 10 μm . Ingrandimento 2X. B: analisi quantitativa del trattamento. Il test chi quadro rivela che l'aumento del numero di cellule che mostrano la colocalizzazione con i mitocondri è statisticamente significativo ($p=0,0013$).

Figura 4.13

A



B

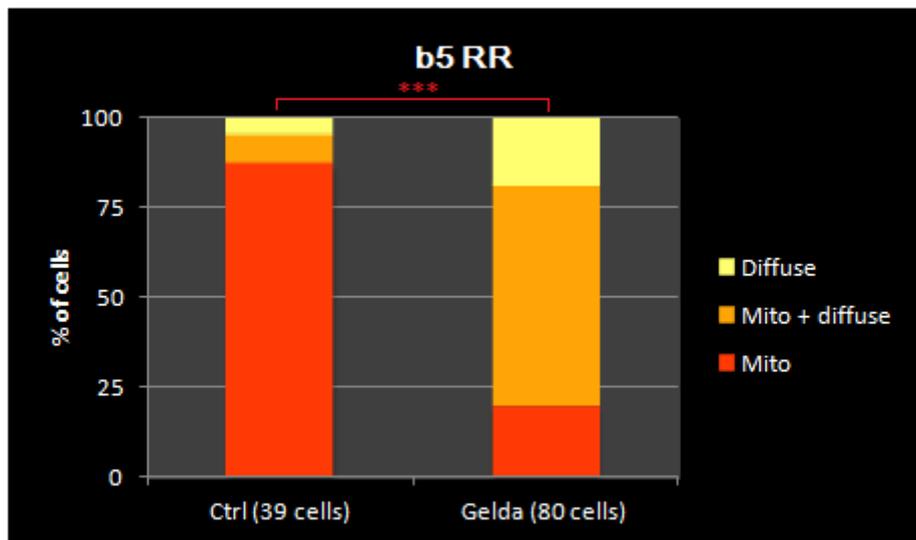
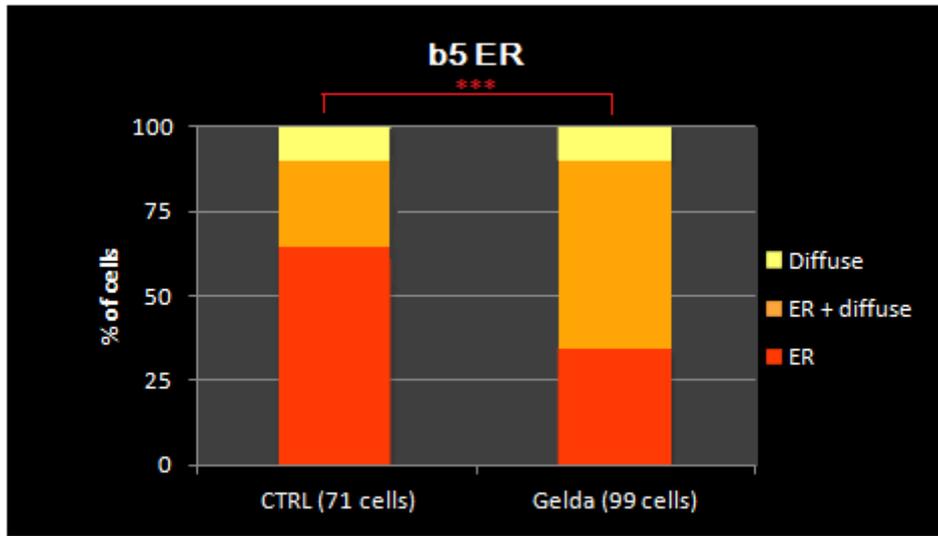
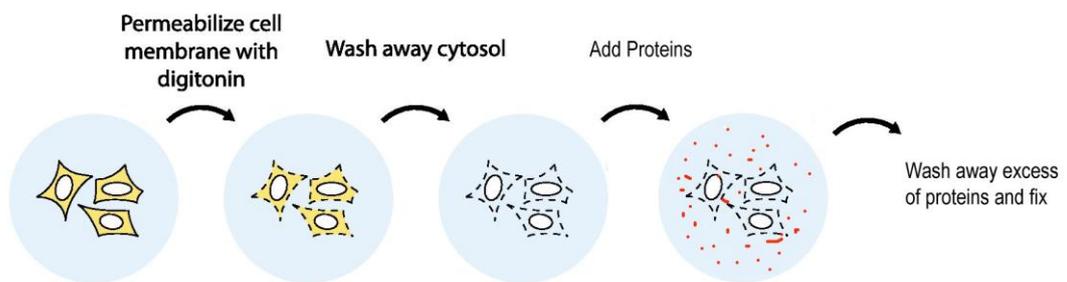


Figura 5.13 A Microiniezione di cellule CV1 trattate con geldanamicina con b5ER e b5RR. In rosso l'anti b5, in verde l'anti Tom22, in giallo il merge. Barra 10 μm . Soprattutto nel caso di b5RR, è chiaramente visibile che in una parte della proteina microiniettata resta diffusa nel citoplasma. **B:** analisi quantitativa delle immagini: Si osserva un aumento significativo del numero di cellule con proteina diffusa (nel caso di b5 ER il test chi quadro ha un valore $p=0,0002$, nel caso di b5 RR il test del chi quadro mostra un valore di $p=0,0001$).

Figura 4.14

A



B

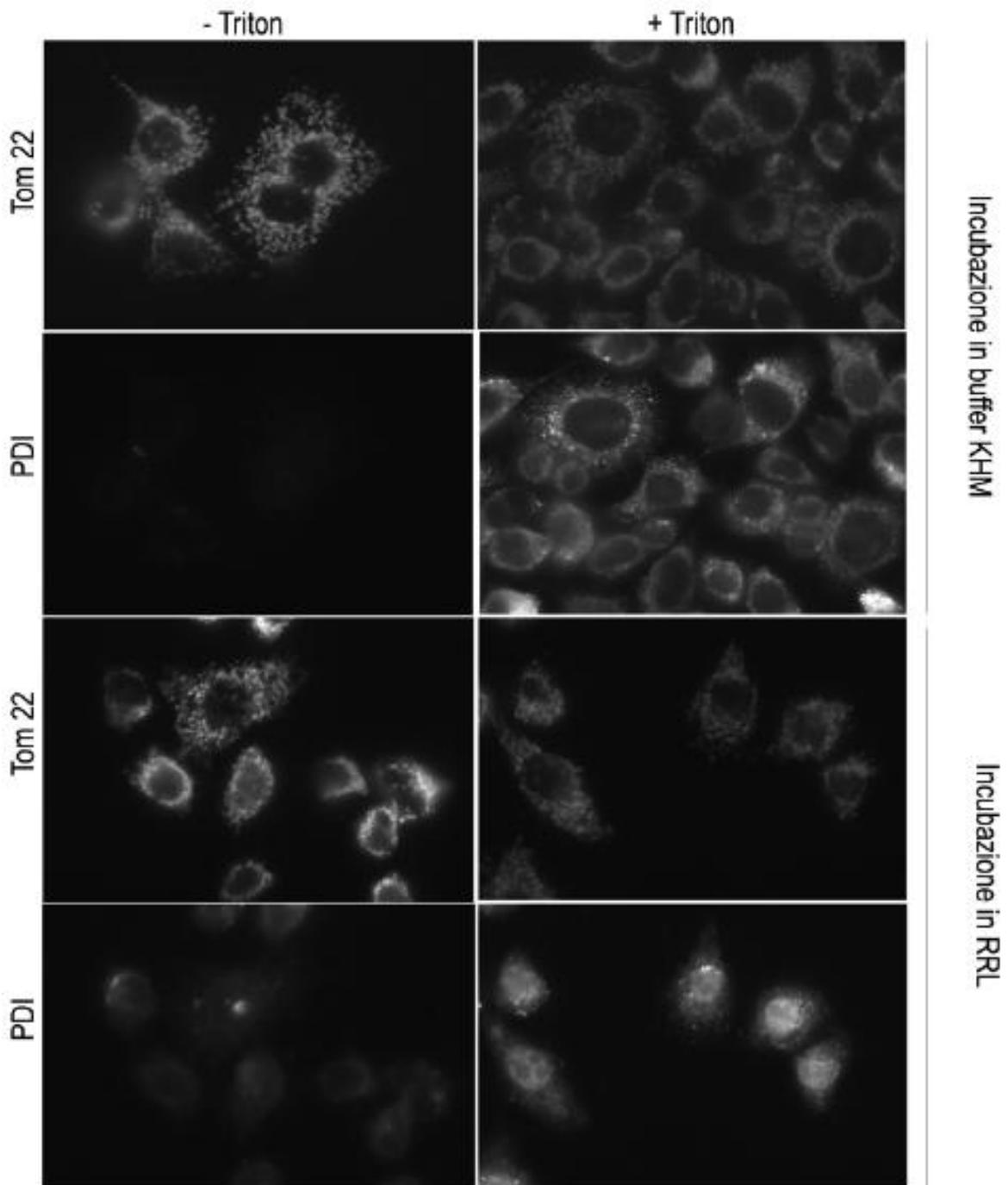


Figura 4.14 A: schema del protocollo di semipermeabilizzazione. B: Immunocolorazione di Tom22 e PDI in cellule semipermeabilizzate non trattate o trattate con Triton-X100 come descritto nel testo. Le immagini sono state acquisite con microscopio wide-field e i parametri di acquisizione sono stati mantenuti costanti per tutte le immagini relative allo stesso anticorpo.

Figura 4.15

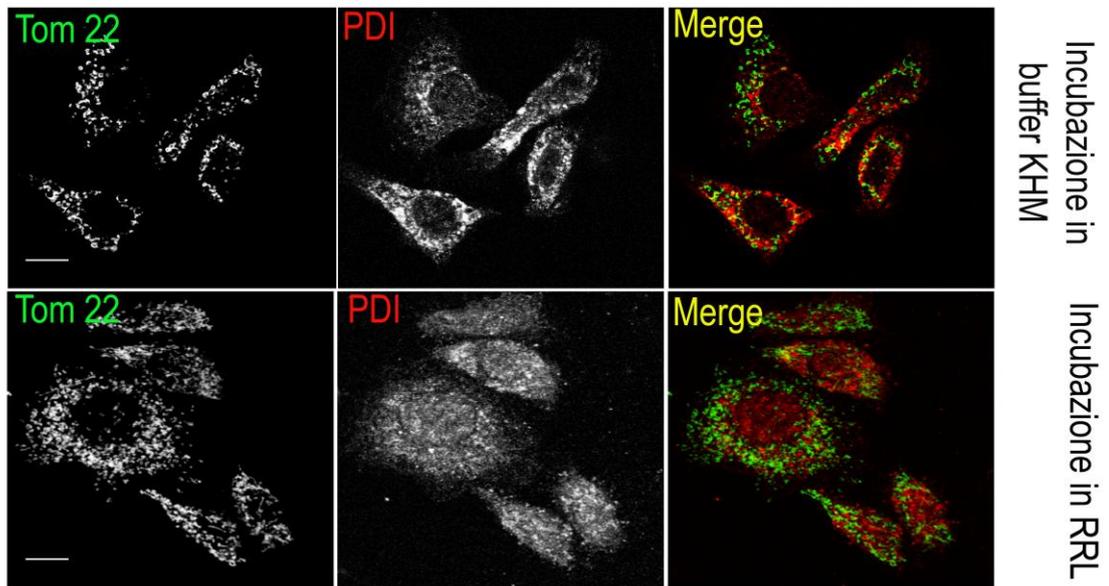


Figura 4.15 Immunofluorescenza di Tom22 e PDI in cellule semipermeabilizzate trattate con Triton-X100. Sono mostrate sezioni singole acquisite con il microscopio confocale Zeiss. In rosso PDI, in verde Tom22, in giallo il merge. Le due colorazioni sono ben distinguibili.

Figura 4.16

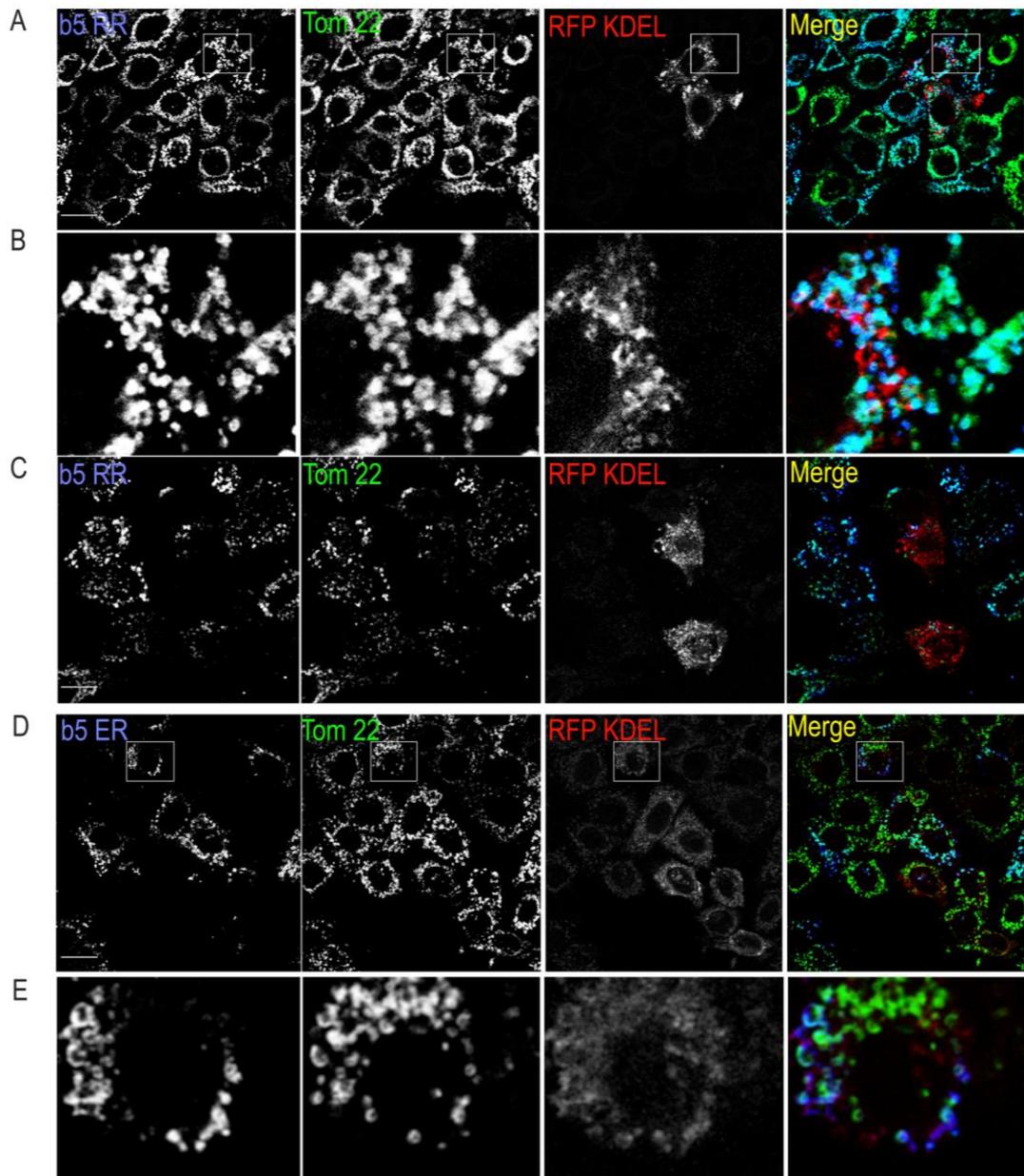


Figura 4.16 Targeting di b5RR e b5ER in RRL in cellule semipermeabilizzate. Le cellule sono state transfettate con RFP-KDEL, marcatore del ER. A: b5 RR (100ng); B: Ingrandimento del quadrato evidenziato in A. C: b5 RR (1 µg). D: b5ER (1µg); E: ingrandimento del quadrato evidenziato in D. In rosso RFP-KDEL, in verde anti Tom22, in blu anti b5; nel merge, il colore viola indica colocalizzazione tra b5 e RFP-KDEL (blu + rosso); il colore ciano indica colocalizzazione tra b5 e TOM22 (blu + verde). Nel pannello E merge si può notare che vi sono zone sia viola che ciano a indicare la presenza di b5ER sia sui mitocondri che sull'ER. Sono mostrate sezioni singole acquisite al microscopio confocale Zeiss. Barra 20 µm

Figura 4.17

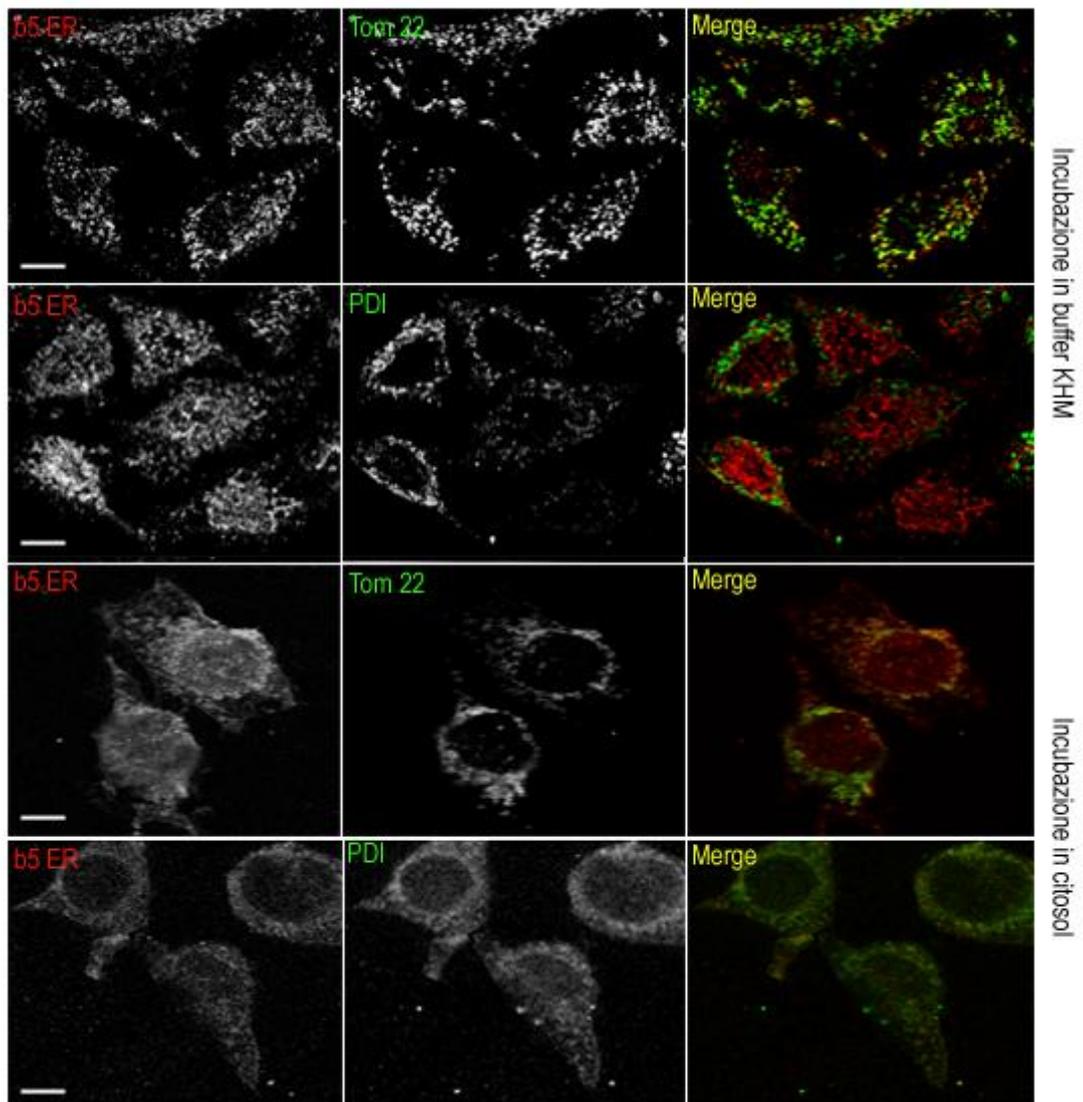


Figura 4.17 Localizzazione di b5 ER (100ng) in cellule semipermeabilizzate dopo incubazione in tampone KHM, o citosol di fegato di ratto. In rosso l'anti b5, in verde l'anti Tom22 o l'anti PDI come indicato, in giallo il merge. Sono mostrate sezioni confocali singole acquisite con il microscopio confocale Zeiss. Barra 10 μm .

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

5.1. Il problema del targeting di proteine TA capaci di inserimento non assistito. Mancanza di un ruolo per TRC40

Lo scopo di questa tesi è stato di comprendere la discrepanza tra i risultati sul targeting di proteine TA ottenuti in sistemi acellulari da una parte, in cellule vive dall'altra. Come spiegato nella Introduzione, la mia attenzione si è focalizzata su proteine TA che *in vitro* sono in grado di inserirsi spontaneamente e aspecificamente in qualsiasi doppio strato fosfolipidico, purché povero di colesterolo, ma che nelle cellule mostrano uno specifico targeting a un compartimento preciso; devono quindi essere coinvolti fattori di targeting che non agiscono nei sistemi acellulari. Va notato che il lisato di reticolociti di coniglio (RRL), nel quale è stata eseguita la maggior parte degli esperimenti *in vitro*, è una ricca sorgente di chaperone e fattori di targeting e proprio per questo è stato il sistema in cui sono stati identificati importanti sistemi come quello SRP e quello TRC40. Nel caso delle proteine TA capaci di inserimento non assistito, è evidente invece che il RRL non contribuisce i fattori necessari a ricapitolare gli avvenimenti *in vivo*.

Nella prima fase del mio lavoro, ho saggiato l'ipotesi che, sebbene non richiesto *in vitro*, TRC40 fosse responsabile *in vivo* del targeting specifico di b5 ER. Come notato nella introduzione, infatti, un complesso tra b5 ER e TRC40 è stato isolato da batteri nei quali le due proteine ricombinanti sono co-esprese (Favaloro, Vilardi et al. 2010). Tuttavia, gli esperimenti di silencing di TRC40 eseguiti in questa tesi suggeriscono che questo chaperone non sia coinvolto nel targeting delle due versioni di b5 (b5 ER e b5 RR), la cui localizzazione, saggiata con metodi sia biochimici che di immunofluorescenza, non era modificata dalla deplezione di oltre l'80% del contenuto di TRC40.

Per identificare fattori di targeting alternativi a TRC40, ho messo a punto e utilizzato nella maggior parte dei miei esperimenti un sistema di microiniezione delle due versioni del citocromo b5 ricombinanti in cellule in coltura. Questo sistema mi ha permesso di analizzare il fenomeno del targeting in tempi brevi (pochi minuti), potendo così sottoporre le cellule a brevi trattamenti farmacologici, che in condizioni prolungate sarebbero stati tossici. Solo alcuni esperimenti, per motivi tecnici, sono stati eseguiti su cellule transfettate. Nell'ultima parte del mio lavoro di tesi, per arrivare a replicare le osservazioni fatte in cellula in un sistema *in vitro*, ho sviluppato un sistema di cellule semi-permeabilizzate che costituirà il punto di partenza per studi futuri volti all'identificazione molecolare dei fattori che sono alla base del targeting di proteine TA che non utilizzano TRC40.

5.2 Risultati ottenuti *in vivo* (in cellula)

Le differenze osservate tra targeting in cellula e in sistema acellulare negli studi che precedono l'inizio del mio lavoro di tesi avrebbero potuto essere spiegate in vari modi: un'ipotesi possibile, anche se improbabile, era che gli mRNA codificanti per le due versioni di b5 fossero localizzate in modo diverso e che rilasciassero il proprio prodotto di traduzione nella stretta vicinanza dell'organello bersaglio; un'altra ipotesi che era stata considerata era della necessità di fattori di targeting associati ai ribosomi e agenti immediatamente al momento del rilascio della catena polipeptidica; infatti, nei sistemi acellulari di inserimento post-traduzionale, al termine della traduzione i ribosomi vengono rimossi per centrifugazione e si potrebbe pensare che durante questa tappa i polipeptidi neosintetizzati perdano i fattori necessari per la seguente tappa di "targeting". I risultati ottenuti con la microiniezione delle proteine ricombinanti dimostrano invece che non sono richiesti fattori associati ai ribosomi e che l'informazione di targeting, contenuta nella sequenza aminoacidica dei substrati, è interpretabile dalla cellula anche in condizioni di sovraccarico acuto di proteina da smistare.

Avendo stabilito che la microiniezione delle proteine ricombinanti fornisce un sistema sperimentale adatto a studiare il targeting, ho proseguito i miei studi trattando le cellule microiniettate con vari agenti che ho ipotizzato potere interferire col targeting; solo per il trattamento con lovastatina ho utilizzato la tecnica della transfezione, perché le cellule deplete di colesterolo non sopportavano la microiniezione. Gli effetti che i vari trattamenti da me eseguiti hanno avuto sul targeting delle due isoforme di b5 sono riassunti in Tabella 5.1.

Sostanza	Meccanismo d'azione	Effetti sul Targeting del b5	
		b5-ER	B5 RR
TRC40 SiRNA (cellule transfettate)	Inibisce il targeting mediato da TR40	Nessun effetto	Nessun effetto
WRB-cc	Inibisce il targeting mediato da TR40	Nessun effetto	Esperimento non eseguito
Colesterolo	Carica le membrane di colesterolo	Parzialmente spostato al citosol	Nessun effetto
Lovastatina (cellule transfettate)	Depleta il colesterolo	Nessun effetto	Nessun effetto
Diamide	Ossidante del glutatione	Parzialmente spostato al citosol	Parzialmente spostato al citosol
Trifluoperazina	Inibitore della calmodulina	Parzialmente spostato ai mitocondri	Parzialmente spostato all'ER
MAL2-11B	Inibitore di Hsp70	Parzialmente spostato ai mitocondri	Nessun effetto
Geldanamicina	Inibitore di Hsp90	Parzialmente spostato al citosol	Vistoso spostamento al citosol

Tabella 5.1. Riassunto degli effetti dei trattamenti utilizzati in questa tesi sul targeting delle proteine TA *in cellula*

Inibizione acuta della via TRC40. Come discusso nel paragrafo precedente, i risultati ottenuti con gli esperimenti di silencing su cellule transfettate hanno suggerito che TRC40 non sia coinvolto nel targeting delle due isoforme di b5 (Tabella 5.1, prima riga). Ci siamo chiesti tuttavia se un potenziale ruolo di questa ATPasi potesse essere meglio rilevabile in un sistema acuto, e abbiamo quindi co-microiniettato b5 ER con la porzione citosolica di WRB (WRB-coiled coil); come spiegato nell'Introduzione, WRB è il recettore di TRC40, e la sua porzione citosolica agisce come dominante negativo, interferendo con il targeting TRC40-dipendente (Vilardi, Lorenz et al. 2011). Tuttavia, anche in questo contesto sperimentale non abbiamo rilevato un ruolo di questo sistema nel targeting di b5 ER.

Manipolazione del contenuto di colesterolo. Ho voluto prima indagare come la composizione lipidica delle membrane potesse influire sul targeting delle proteine TA modello utilizzate. Studi precedenti eseguiti nel mio laboratorio (Brambillasca, Yabal et al. 2005) e successivamente da altri gruppi (Kemper, Habib et al. 2008) avevano dimostrato che gli steroli, al di sopra delle basse concentrazioni trovate normalmente nell'ER, blocca l'inserimento di proteine TA non assistite. Per saggiare se anche in vivo il colesterolo ha un effetto simile, ho condotto esperimenti di microiniezione in cellule soggette a un trattamento di sovraccarico di colesterolo. Coerentemente con quanto ottenuto in vitro, nelle cellule sovraccaricate b5 ER restava in gran parte bloccato nel citosol. Sorprendentemente però non abbiamo rilevato un effetto sul targeting di b5 RR (Tabella 5.1, riga 3). Benché si potrebbe ipotizzare che l'inserimento di b5 RR è meno sensibile ai livelli di colesterolo, ci pare più probabile che il sovraccarico di colesterolo sia maggiormente a carico delle membrane della via di secrezione e che la composizione lipidica della MOM non sia alterata dal trattamento.

In vista di un recente lavoro sul targeting di proteine TA alla MOM in lievito (Krumpe, Frumkin et al. 2012), ci era parso interessante tentare di alterare il targeting mediante abbassamento del contenuto di colesterolo delle membrane. Krumpe et al. (2012) hanno riportato che in lievito l'abbassamento dei livelli di ergosterolo porta a rilocalizzazione di una proteina TA modello della MOM all'ER. Hanno perciò ipotizzato che livelli più alti di steroli nell'ER siano inibitori all'inserimento spontaneo. In altre parole, la localizzazione alla MOM sarebbe quella "default" e l'inserimento nell'ER richiederebbe fattori di targeting a causa dei contenuti più elevati di steroli. Abbiamo perciò abbassato i livelli di colesterolo mediante incubazione delle nostre cellule con siero depleto di lipoproteine seguito da trattamento con lovastatina; questo protocollo sperimentale è mirato ad abbassare specificamente i livelli di colesterolo nell'ER (Ridsdale, Denis et al. 2006). In base ai risultati di Krumpe et al., ci aspettavamo di osservare un "mistargeting" di b5 RR all'ER in queste condizioni. Nonostante che il trattamento abbia causato un significativo abbassamento di colesterolo totale, rivelato con la colorazione Filipin III, non abbiamo osservato alcun cambiamento nel targeting delle due forme di b5 (Tabella 5.1, riga 4). C'è però da notare che negli esperimenti di Krumpe et al. si è osservato un effetto sul targeting solamente a livelli di deplezione dell'ergosterolo superiore al 50%. Questa deplezione così severa potrebbe portare a effetti indiretti dovuti a sofferenza cellulare. Io non ho potuto diminuire i livelli di colesterolo sotto l'80% del normale, per evitare sofferenza e morte cellulare. Inoltre, nel mio protocollo (transfezione di b5 in presenza di siero delipidato, seguito, 12 h dopo da 4 h di lovastatina), la deplezione piena di colesterolo c'è solamente nelle ultime ore di incubazione, per cui la quota di proteina soggetta a "mistargeting" sopra un background di proteina inserita correttamente nelle ore precedenti - ci sarebbe potuta essere sfuggita. Quindi, mentre i miei esperimenti non hanno confermato l'ipotesi di Krumpe et al. (2012), il ruolo del colesterolo nello smistamento delle proteine TA tra ER e MOM rimane ancora aperto. C'è però da ricordare che, nonostante la carenza di informazioni sulla composizione lipidica della MOM, i

dati pubblicati in letteratura danno un contenuto di colesterolo della MOM di mammifero molto vicino a quello dell'ER (Colbeau, Nachbaur et al. 1971; van Meer, Voelker et al. 2008). La pochezza di dati sulla composizione lipidica della MOM è da attribuire in gran parte alla difficoltà di ottenere preparazioni sufficientemente pure di questa membrana.

Interferenza con l'azione di chaperone candidati per il targeting. In un lavoro precedente eseguito nel mio laboratorio, è stato dimostrato che il targeting *in vitro* di b5 ER in presenza di citosol trattato con l'ossidante DIA è totalmente inibito (Colombo, Longhi et al. 2009); poiché il b5 non ha cisteine (e quindi non è aggredito dalla DIA) e poiché la DIA è senza effetto quando il saggio di targeting è eseguito in assenza di citosol, questi dati suggerivano che b5 ER nel citosol interagisce con chaperone, anche se in assenza di essi è in grado di integrarsi nel bilayer. Per indagare se la DIA ha un effetto simile anche *in vivo*, ho trattato le cellule microiniettate con questo ossidante, e ho constatato che questo trattamento inibiva l'inserimento di ambedue le forme di b5.

Mentre il risultato con la DIA ci indicava che *in vivo* ambedue le forme interagiscono con proteine citosoliche prima di inserirsi in membrana, non ci davano indicazioni riguardo la natura delle proteine interagenti, poiché qualsiasi proteina che dipenda da gruppi SH ridotti per la sua attività potrebbe essere implicata. Abbiamo perciò cercato di identificare possibili fattori proteici, inibendo i più noti sistemi chaperone, quello Hsp70 e 90 con inibitori specifici. Il rationale di inibire Hsp70 era poi rafforzato dai risultati di uno studio precedente che ha implicato Hsc70 (Heat Shock cognate protein 70) nel targeting del citocromo b5 (Rabu, Wipf et al. 2008). È interessante che l'inibizione dei due sistemi ha provocato risultati diversi sulle due forme di b5: l'inibizione di Hsp90 con la geldanamicina provocava infatti l'intrappolamento di una notevole proporzione di b5 RR nel citosol, mentre l'effetto su b5 ER era meno marcato (Tabella 5.1, ultima riga). Invece l'inibizione di Hsp70 non aveva effetto su b5 RR ma provocava un parziale "mistargeting" di b5 ER ai mitocondri. Questi risultati suggeriscono che b5 RR sia legato da Hsp90 durante il suo transito all'organello bersaglio. La geldanamicina, bloccando il ciclo ATP-ADP della Hsp90 (Whitesell, Mimnaugh et al. 1994; Schneider, Sepp-Lorenzino et al. 1996) ritarda il rilascio di substrati (clienti) dello chaperon, meccanismo che potrebbe spiegare l'accumulo di b5 RR nel citosol in cellule trattate con l'antibiotico. Il composto Mal2-11B invece blocca l'interazione di proteine Hsp70 con il cochaperone Hsp40, con conseguente inibizione dell'attività ATPasica di Hsp70. L'inibizione dell'attività ATPasica di Hsp70 causerebbe maggior rilascio del substrato; se b5 ER viene normalmente legato da Hsp70, in condizione di diminuzione dell'attività ATPasica dello chaperon, ci aspettiamo una maggior concentrazione di b5 ER libero, fenomeno che potrebbe alterare il suo targeting (si veda il paragrafo 5.4), come in effetti abbiamo osservato (Tabella 5.1, penultima riga).

Infine, abbiamo indagato se la calmodulina potesse essere coinvolta nel targeting delle due forme di b5. Il rationale per questa indagine era la precedente dimostrazione di un ruolo di questa proteina nel targeting di proteine TA *in vitro* (Hassdenteufel, Schauble et al. 2011). Utilizzando l'inibitore specifico trifluoperazina, ho osservato un effetto di "mistargeting" su ambedue le forme di b5.

In conclusione di questa parte dei miei studi, il targeting delle due forme di b5 nelle cellule è preciso e robusto, intendendo con il termine "robusto" che si mantiene almeno parzialmente fedele in condizioni molto diverse. Più specificamente, solo in un caso (trattamento con TFP) ho osservato un parziale "mistargeting" di b5 RR all'ER, e anche in questo caso la proteina mostrava una localizzazione prevalentemente mitocondriale; qualche altro trattamento (DIA, geldanamicina) ha parzialmente spostato la proteina al citosol. Anche nel caso di b5 ER, il "mistargeting" osservato (causato da TFP e Mal2-11B) era comunque di entità modesta, con la maggior parte della proteina

localizzata all'ER. La robustezza del targeting osservata è sorprendente in considerazione dell'assenza di specificità osservata *in vitro* e dei risultati in lievito, dove l'abolizione del sistema Get3 porta alla localizzazione mitocondriale di diversi substrati TA (Schuldiner, Metz et al. 2008).

5.3. Risultati ottenuti con cellule semi-permeabilizzate

Mentre gli esperimenti di microiniezione ci hanno consentito di indagare possibili fattori coinvolti nel targeting nel contesto cellulare, erano tuttavia inaccessibili ad analisi biochimiche molecolari. Per colmare il "gap" tra sistemi acellulari e sistemi *in cellula*, ho allora allestito un sistema che potrebbe essere considerato intermedio tra *in vitro* e *in vivo*: quello delle cellule semi-permeabilizzate. Si intende con questo termine cellule la cui membrana plasmatica è permeabilizzata e le cui membrane interne sono intatte (Wilson and Bulleid 2000). Abbiamo pensato che questo sistema sperimentale ci avrebbe consentito l'analisi del targeting nel contesto cellulare ma con la possibilità di cambiare/modulare l'ambiente citosolico.

I risultati ottenuti con questo sistema sono stati inattesi e pongono le basi per nuove direzioni nelle nostre ricerche: la proteina b5 ER, che *in vivo* è indirizzato all'ER e pochissimo ai mitocondri (anche in presenza di vari agenti perturbanti) mostrava, in presenza di solo tampone, una localizzazione esclusivamente mitocondriale. Lo stesso risultato era ottenuto per b5 RR (risultati non mostrati). Gli esperimenti precedenti in sistemi acellulari avevano mostrato che le due proteine sono in grado di inserirsi in liposomi di fosfatidilcolina, di fosfatidilcolina più fosfatidiletanolamina o di lipidi totali estratti dai microsomi (Brambillasca, Yabal et al. 2005). Sempre in un sistema acellulare, ciascuna delle due forme di b5 era stata esposta a una miscela di mitocondri e microsomi e in questa condizione era stato verificato che si legano ad ambedue le membrane (dati non pubblicati). La nostra aspettativa era quindi che ambedue le proteine, in assenza di chaperon, si sarebbero associate sia all'ER che alla MOM ma così non è stato. C'è da aggiungere che, mentre il comportamento di b5 RR da noi osservato è in accordo con quanto riportato da (Setoguchi, Otera et al. 2006) sul targeting di altre proteine TA della MOM, il risultato con b5 ER è nuovo e, come detto sopra, del tutto inatteso. Così, nonostante la capacità b5 ER che b5 RR di inserirsi in qualsiasi bilayer povero di colesterolo, la destinazione preferita per tutt'e due le proteine, in assenza di fattori di targeting, è rappresentata dalla MOM. Non sappiamo al momento quale sia la caratteristica della MOM - composizione lipidica o presenza di una proteina recettoriale - che le conferisce la caratteristica di destinazione preferita. La risoluzione di questo problema sarà oggetto di ricerche future.

Poiché i dati ottenuti con cellule semi-permeabilizzate in presenza di solo tampone KHM suggerivano il coinvolgimento di uno chaperone/fattore di targeting nella consegna di b5 ER al compartimento di destinazione, abbiamo eseguito gli stessi saggi in presenza di una frazione citosolica ottenuto da lisato di reticolociti di coniglio (RRL) oppure da fegato di ratto. Nel primo caso ho osservato un piccolo spostamento di b5 ER dai mitocondri all'ER, mentre b5 RR rimaneva esclusivamente mitocondriale. L'effetto modesto del RRL su b5 ER è in accordo con la mancanza di specificità trovata in sistemi acellulari in presenza di questo lisato. Invece, un risultato più netto è stato ottenuto con citosol di fegato di ratto, in presenza del quale una quota notevole di b5 ER era rilevabile sull'ER,

riconosciuto dalla positività per il marcatore PDI. Questi risultati suggeriscono che un fattore di targeting limitante è necessario per impedire a b5 ER di inserirsi nella MOM e per indirizzarla alla destinazione corretta.

5.4. Conclusioni e implicazioni

L'interpretazione dei risultati che emergono dall'insieme dei miei esperimenti in cellule microiniettate e semi-permeabilizzate è riassunto nella Figura 5.1. Come detto sopra, in assenza di chaperone, la destinazione preferita sia di b5 ER che di b5 RR risulta essere la MOM. Da questa osservazione si deduce che fattori di targeting devono essere coinvolti *in vivo* per indirizzare b5 ER alle membrane del reticolo. Tuttavia, i nostri dati ottenuti in cellule microiniettate indicano che *in vivo* anche b5 RR lega degli chaperon che hanno un ruolo nel suo targeting.

Nel caso di b5 ER, il problema della cellula è di ridurre al minimo la quota libera in grado di inserirsi senza assistenza nella destinazione preferita, la MOM. Perciò potrebbe essere necessario l'intervento di diversi chaperone (Hsp70, calmodulina) che servirebbero come trappola, mantenendo molto bassa la quota di b5 ER libera. Tale quota libera si legherebbe con alta affinità a uno o più fattori di targeting per l'ER, per adesso non identificati. Quando sono inibiti gli chaperone con cui b5 ER normalmente si lega, la quota libera sarebbe aumentata, con saturazione dei fattori di targeting, e conseguente inserimento spontaneo nella MOM (Fig. 5.1A).

Per b5 RR, il problema sarebbe speculare. La cellula deve impedire che questa proteina si leghi ai fattori di targeting per l'ER, ai quali presumibilmente b5 RR si lega, ma con affinità più bassa dell'isoforma b5 ER. Anche in questo caso, quindi, il legame a chaperone (Hsp90 e calmodulina) diminuirebbe la quota libera della proteina. La piccola quota libera, avendo bassa affinità per i fattori di targeting per l'ER, si inserirebbe spontaneamente nella MOM. Quando però la quota libera aumenta (a causa della inibizione della calmodulina, per esempio), la maggiore concentrazione di b5 RR libera consente il suo legame ai fattori di targeting dell'ER con conseguente "mistargeting" di una parte della proteina alle membrane del reticolo (Fig. 5.1B).

I risultati di questa tesi hanno implicazioni importanti per la biologia delle proteine TA della MOM e dell'ER. E' risaputo che alcune proteine TA hanno duplice localizzazione ER- MOM. Un esempio conosciuto è quello della proteina anti-apoptotica Bcl2, la cui azione anti-apoptotica ha meccanismo diverso nei due organelli (Cory and Adams, 2002). Data la possibilità delle proteine TA di inserirsi in ambedue le membrane (MOM ed ER), si può speculare che la localizzazione di alcune di esse sia diversa in contesti cellulari diversi e che possa essere soggetta a regolazione, con importanti implicazioni per decisioni che riguardano il destino (vita o morte) delle cellule.

Targeting di b5 ER

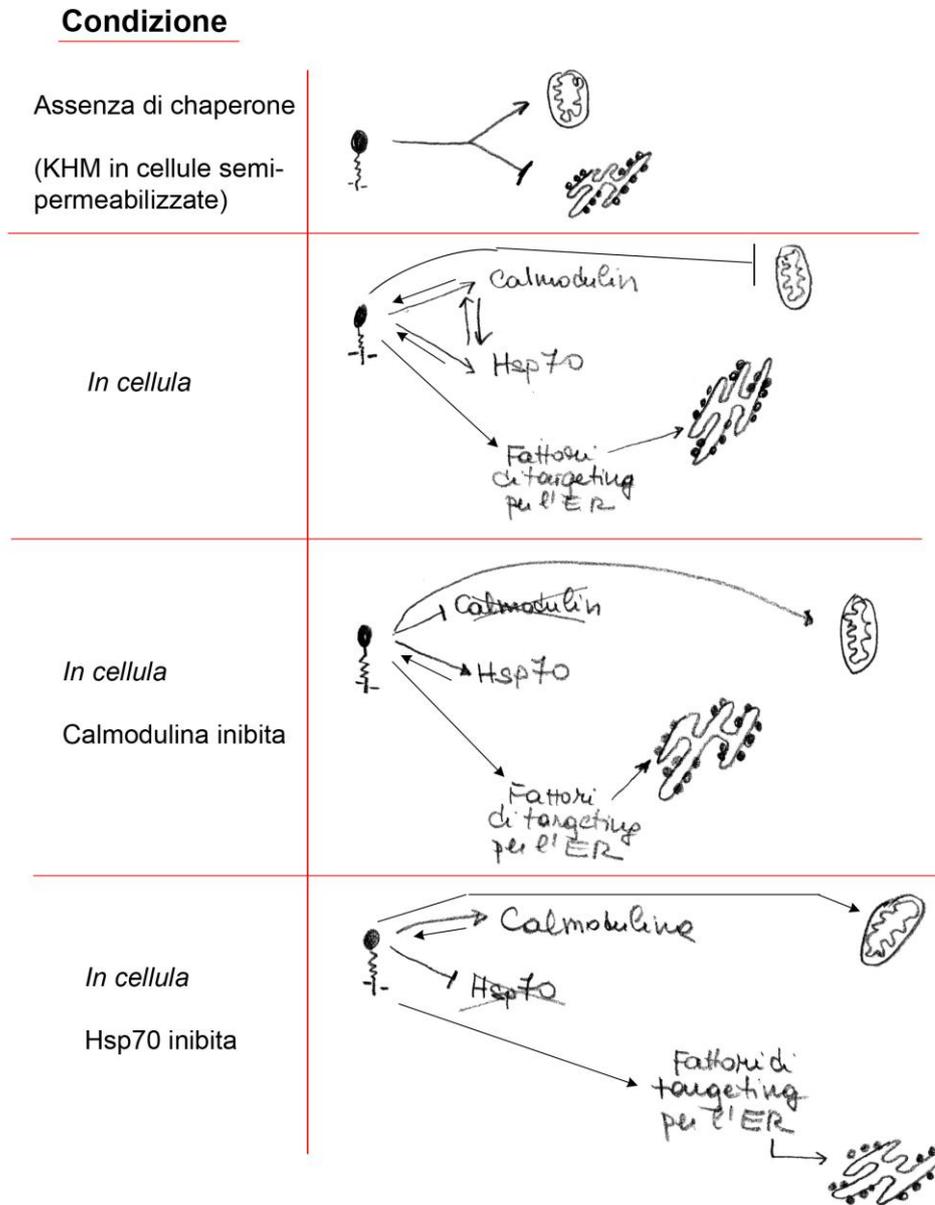


Figura 5A

Targeting di b5 RR

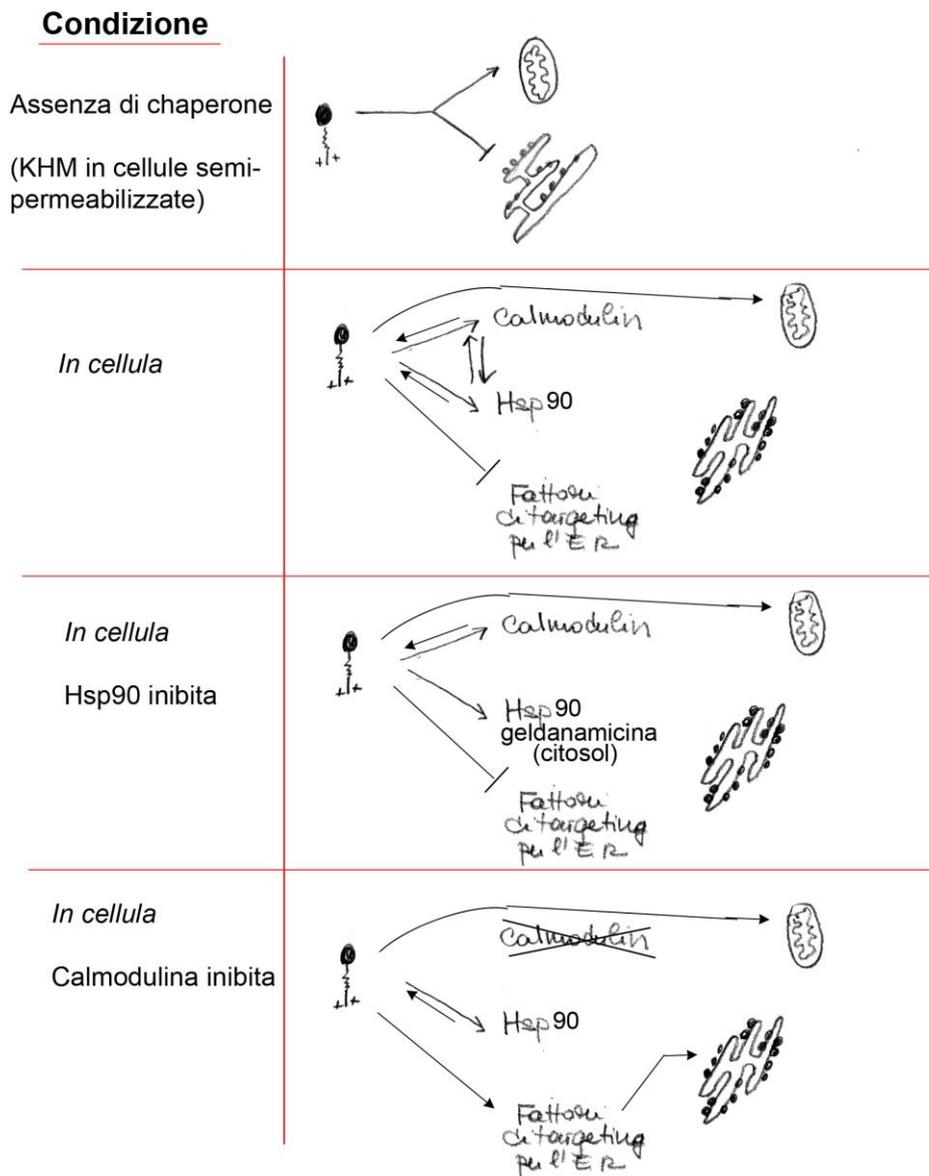


Figura 5B

Figura 5.1. Modello illustrante la mia interpretazione sul ruolo di chaperon in base ai dati ottenuti in cellule microiniettate e semi-permeabilizzate. I pannelli A e B mostrano il targeting per b5 ER e b5 RR, rispettivamente. Si veda il testo per dettagli.

BIBLIOGRAFIA

Adamus G Arendt A, Hargrave PA. Genetic control of antibody response to bovine rhodopsin in mice: epitope mapping of rhodopsin structure. [Rivista]. - [s.l.] : J Neuroimmunol. 1991 Nov;34(2-3):89-97, 1991.

Alberts B Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. [Libro]. - 2009.

Altamura N Capitanio N, Bonnefoy N, Papa S, Dujardin G The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. [Rivista]. - [s.l.] : FEBS Lett. 1996 Mar 11;382(1-2):111-5., 1996.

Beilharz T Egan B, Silver PA, Hofmann K, Lithgow T. Bipartite signals mediate subcellular targeting of tail-anchored membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. [Rivista]. - [s.l.] : J Biol Chem. 2003 Mar 7;278(10):8219-23. Epub 2003 Jan 3., 2003.

Borgese N Brambillasca S, Colombo S. How tails guide tail-anchored proteins to their destinations [Rivista]. - [s.l.] : Curr Opin Cell Biol. 2007 Aug;., 2007. - Vol. 19(4):368-75. Epub 2007 Jul 16.

Borgese N Brambillasca S, Soffientini P, Yabal M, Makarow M Biogenesis of tail-anchored proteins [Rivista]. - [s.l.] : Biochem Soc Trans. 2003 Dec;., 2003. - Vol. 31(Pt 6):1238-42.

Borgese N Colombo S, Pedrazzini E. The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane [Rivista]. - [s.l.] : J Cell Biol. 2003 Jun 23, 2003. - 161 (6):1013-9.

Borgese N Fasana E. Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. [Journal] // Biochim Biophys Acta. 2011 Mar; . - 2011. - pp. 1808(3):937-46.

Borgese N Righi M. Remote origins of tail-anchored proteins [Rivista]. - [s.l.] : Traffic. 2010 Jul 1;., 2011. - Vol. 11(7):877-85.

Bradshaw N Neher SB, Booth DS, Walter P. Signal sequences activate the catalytic switch of SRP RNA. [Rivista]. - [s.l.] : Science. 2009 Jan 2;323(5910):127-30. doi: 10.1126/science.1165971, 2009.

Brambillasca S Yabal M, Makarow M, Borgese N. Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers [Rivista]. - [s.l.] : J Cell Biol. 2006 Dec 4;., 2006. - Vol. 175(5):767-77. Epub 2006 Nov 27..

Brambillasca S Yabal M, Soffientini P, Stefanovic S, Makarow M, Hegde RS, Borgese N. Transmembrane topogenesis of a tail-anchored protein is modulated by membrane lipid composition. [Rivista]. - [s.l.] : EMBO J. 2005 Jul 20, 2005. - Vol. 24(14):2533-42. Epub 2005 Jun 23.

Bulbarelli A Sprocati T, Barberi M, Pedrazzini E, Borgese N. Trafficking of tail-anchored proteins: transport from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane and sorting between surface domains in polarised epithelial cel [Rivista]. - [s.l.] : J Cell Sci. 2002 Apr 15;115(Pt 8):1689-702, 2002.

Bulbarelli A Valentini A, DeSilvestris M, Cappellini MD, Borgese N. An erythroid-specific transcript generates the soluble form of NADH-cytochrome b5 reductase in humans. [Rivista]. - [s.l.] : Blood. 1998 Jul 1;92(1):310-9, 1998.

Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nature Reviews/Cancer **2**: 647-656.

Chacinska A Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. [Rivista]. - [s.l.] : Cell. 2009 Aug 21;; 2009. - Vol. 138(4):628-44. doi: 10.1016/j.cell.2009.08.005.

Chartron JW Clemons WM Jr, Suloway CJ The complex process of GETting tail-anchored membrane proteins to the ER [Rivista]. - [s.l.] : Curr Opin Struct Biol. 2012 Apr;22(2):217-24. doi: 10.1016/j.sbi.2012.03.001. Epub 2012 Mar 21., 2012.

Colbeau A Nachbaur J, Vignais PM. Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes [Rivista]. - [s.l.] : Biochim Biophys Acta. 1971 Dec 3;249(2):462-92, 1971.

Colombo SF Longhi R, Borgese N. The role of cytosolic proteins in the insertion of tail-anchored proteins into phospholipid bilayers. [Rivista]. - [s.l.] : J Cell Sci. 2009 Jul 15;; 2009. - Vol. 122(Pt 14):2383-92. doi: 10.1242/jcs.049460. Epub 2009 Jun 16.

Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nature Reviews/Cancer **2**: 647-656.

Eck M.J., Sprang, S.R. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. [Rivista]. - [s.l.] : J.Biol.Chem. v264 pp.17595-17605 , 1989., 1982.

Eckert JH Erdmann R Peroxisome biogenesis. [Rivista]. - [s.l.] : Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2003;147:75-121. Epub 2003 Mar 25, 2003.

Egea PF Shan SO, Napetschnig J, Savage DF, Walter P, Stroud RM. Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor [Rivista]. - [s.l.] : Nature. 2004 Jan 15;427(6971):215-21, 2004.

EL Snapp Fluorescent proteins: a cell biologist's user guide. [Rivista]. - [s.l.] : Trends Cell Biol. 2009 Nov;19(11):649-55. doi: 10.1016/j.tcb.2009.08.002. Epub 2009 Oct 8.

Erdmann R Schliebs W. Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model [Rivista]. - [s.l.] : Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Sep;6(9):738-42., 2005.

Favaloro, V., F. S. Vilardi, et al. (2010). "Asna1/TRC40-mediated membrane insertion of tail-anchored proteins." J. Cell Sci **123**: 1522-1530.

Favaloro V Spasic M, Schwappach B, Dobberstein B. Distinct targeting pathways for the membrane insertion of tail-anchored (TA) proteins. [Rivista]. - [s.l.] : J Cell Sci. 2008 Jun 1;121(Pt 11):1832-40. doi: 10.1242/jcs.020321. Epub 2008 May 13., 2008.

Focia PJ Shepotinovskaya IV, Seidler JA, Freymann DM Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. [Rivista]. - [s.l.] : Science. 2004 Jan 16;303(5656):373-7, 2004.

Freymann DM Keenan RJ, Stroud RM, Walter P Structure of the conserved GTPase domain of the signal recognition particle. [Rivista]. - [s.l.] : Nature. 1997 Jan 23;385(6614):361-4, 1997.

Gerdes L Bals T, Klostermann E, Karl M, Philippar K, Hünken M, Soll J, Schünemann D. A second thylakoid membrane-localized Alb3/Oxal/YidC homologue is involved in proper chloroplast biogenesis in Arabidopsis thaliana. [Rivista]. - [s.l.] : J Biol Chem. 2006 Jun 16;281(24):16632-42. Epub 2006 Apr 4., 2006.

Goder V Bieri C, Spiess M. Glycosylation can influence topogenesis of membrane proteins and reveals dynamic reorientation of nascent polypeptides within the translocon. [Rivista]. - [s.l.] : J Cell Biol. 1999 Oct 18;147(2):257-66, 1999.

Gray MW Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. [Rivista] // Science. 1999 Mar 5;283(5407):1476-81.. - 1999. - p. 283(5407):1476-81..

Halbach A Landgraf C, Lorenzen S, Rosenkranz K, Volkmer-Engert R, Erdmann R, Rottensteiner H. Targeting of the tail-anchored peroxisomal membrane proteins PEX26 and PEX15 occurs through C-terminal PEX19-binding sites. [Rivista]. - [s.l.] : J Cell Sci. 2006 Jun 15;119(Pt 12):2508-17., 2006.

Hasan S Platta HW, Erdmann R. Import of proteins into the peroxisomal matrix. [Rivista]. - [s.l.] : Front Physiol. 2013 Sep 24;4:261., 2013.

Hassdenteufel, S., N. Schauble, et al. (2011). "Ca²⁺-calmodulin inhibits tail-anchored protein insertion into the mammalian endoplasmic reticulum membrane." FEBS Lett **585**(21): 3485-90.

Hegde RS Keenan RJ. Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. [Rivista]. - [s.l.] : Nat Rev Mol Cell Biol. 2011 Nov 16;, 2011. - Vol. 12(12):787-98. doi: 10.1038/nrm3226..

Heiland I Erdmann R. Topogenesis of peroxisomal proteins does not require a functional cytoplasm-to-vacuole transport. [Rivista]. - [s.l.] : Eur J Cell Biol. 2005 Oct;, 2005. - Vol. 84(10):799-807..

Heinrich SU Mothes W, Brunner J, Rapoport TA. The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain [Rivista]. - [s.l.] : Cell. 2000 Jul 21;102(2):233-44., 2000.

Hell K Herrmann J, Pratje E, Neupert W, Stuart RA. Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. [Rivista]. - [s.l.] : FEBS Lett. 1997 Dec 1;418(3):367-70, 1997.

High S Dobberstein B The signal sequence interacts with the methionine-rich domain of the 54-kD protein of signal recognition particle. [Rivista]. - [s.l.] : J Cell Biol. 1991 Apr;113(2):229-33., 1991.

Higy M Junne T, Spiess M. Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum [Rivista]. - [s.l.] : Biochemistry. 2004 Oct 12;43(40):12716-22, 2004.

Huber D Boyd D, Xia Y, Olma MH, Gerstein M, Beckwith J Use of thioredoxin as a reporter to identify a subset of Escherichia coli signal sequences that promote signal recognition particle-dependent translocation [Rivista]. - [s.l.] : J Bacteriol. 2005 May;187(9):2983-91, 2005.

Inaba T Schnell DJ. Protein trafficking to plastids: one theme, many variations [Rivista]. - [s.l.] : Biochem J. 2008 Jul 1; 2008. - Vol. 413(1):15-28. doi: 10.1042/BJ20080490.

Janda CY Li J, Oubridge C, Hernández H, Robinson CV, Nagai K. Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. [Rivista]. - [s.l.] : Nature. 2010 May 27;465(7297):507-10. doi: 10.1038/nature08870. Epub 2010 Apr, 2010.

Johnson N Powis K, High S. Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. [Rivista]. - [s.l.] : Biochim Biophys Acta. 2013 Nov;1833(11):2403-9. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.12.008. Epub 2012 Dec 20, 2013.

Kalbfleisch T Cambon A, Wattenberg BW. A bioinformatics approach to identifying tail-anchored proteins in the human genome. [Rivista]. - [s.l.] : Traffic. 2007 Dec;8(12):1687-94. Epub 2007 Oct 17, 2007.

Kauko A Hedin LE, Thebaud E, Cristobal S, Elofsson A, von Heijne G. Repositioning of transmembrane alpha-helices during membrane protein folding. [Rivista]. - [s.l.] : J Mol Biol. 2010 Mar 19;397(1):190-201. doi: 10.1016/j.jmb.2010.01.042. Epub 2010 Jan 25., 2010.

Kemper C Habib SJ, Engl G, Heckmeyer P, Dimmer KS, Rapaport D Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. [Rivista]. - [s.l.] : J Cell Sci. 2008 Jun 15;121(Pt 12):1990-8. doi: 10.1242/jcs.024034. Epub 2008 May 21., 2008.

Kida Y Mihara K, Sakaguchi M. Translocation of a long amino-terminal domain through ER membrane by following signal-anchor sequence. [Rivista]. - [s.l.] : EMBO J. 2005 Sep 21;24(18):3202-13. Epub 2005 Aug 18, 2005.

Kida Y Sakaguchi M, Fukuda M, Mikoshiba K, Mihara K Amino acid residues before the hydrophobic region which are critical for membrane translocation of the N-terminal domain of synaptotagmin II. [Rivista]. - [s.l.] : FEBS Lett. 2001 Nov 2;507(3):341-5., 2001.

Kriechbaumer V Shaw R, Mukherjee J, Bowsher CG, Harrison AM, Abell BM. Subcellular distribution of tail-anchored proteins in Arabidopsis [Rivista]. - [s.l.] : Traffic. 2009 Dec; 2009. - Vol. 10(12):1753-64. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00991.x. Epub 2009 Sep 17.

Krumpe K Frumkin I, Herzig Y, Rimon N, Özbalci C, Brügger B, Rapaport D, Schuldiner M. Ergosterol content specifies targeting of tail-anchored proteins to mitochondrial outer membranes. [Rivista]. - [s.l.] : Mol Biol Cell. 2012 Oct;23(20):3927-35. doi: 10.1091/mbc.E11-12-0994. Epub 2012 Aug 23..

Lodish Berk, Kaiser, Krieger, Scott, Bretscher, Ploegh & Matsudaira Biologia Molecolare della Cellula, Zanichelli, 2009 (III edizione). [Libro]. - [s.l.] : Zanichelli, 2009.

LOWRY OH ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ Protein measurement with the Folin phenol reagent. [Rivista]. - [s.l.] : J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75, 1951.

Mariappan M Mateja A, Dobosz M, Bove E, Hegde RS, Keenan RJ. The mechanism of membrane-associated steps in tail-anchored protein insertion. [Rivista]. - [s.l.]: Nature. 2011 Aug 24;477(7362):61-6. doi: 10.1038/nature10362., 2011.

Martin W Herrmann RG. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? [Rivista] // Plant Physiol. 1998 Sep; - 1998. - p. 118(1):9-17.

Miller JD Tajima S, Lauffer L, Walter P. The beta subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the alpha subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane. [Rivista]. - [s.l.]: J Cell Biol. 1995 Feb;128(3):273-82, 1995.

Mitra K Frank J, Driessen A. Co- and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work? [Rivista] // Nat Struct Mol Biol. 2006 Nov; - 2006. - p. 13(11):957-64..

Montoya G Svensson C, Luirink J, Sinning I Crystal structure of the NG domain from the signal-recognition particle receptor FtsY. [Rivista]. - [s.l.]: Nature. 1997 Jan 23;385(6614):365-8, 1997.

Moore M Harrison MS, Peterson EC, Henry R. Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membrane [Rivista]. - [s.l.]: J Biol Chem. 2000 Jan 21;275(3):1529-32, 2000.

MR Pool Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (review). [Rivista]. - [s.l.]: Mol Membr Biol. 2005 Jan-Apr; 2005. - Vol. 22(1-2):3-15.

Nohturfft A Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, Espenshade PJ Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. [Rivista]. - [s.l.]: Cell. 2000 Aug 4;102(3):315-23., 2000.

Nyathi Y Baker A Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. [Rivista]. - [s.l.]: Biochim Biophys Acta. 2006 Dec; 2006. - Vol. 1763(12):1478-95. Epub 2006 Aug 26.

Nyathi Y Wilkinson BM, Pool MR Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. [Rivista]. - [s.l.]: Biochim Biophys Acta. 2013 Nov; 2013. - Vol. 1833(11):2392-402. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.02.021. Epub 2013 Feb 2.

Park E Rapoport TA. Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes [Rivista]. - [s.l.]: Annu Rev Biophys. 2012; 2012. - Vol. 41:21-40. doi: 10.1146/annurev-biophys-050511-102312. Epub 2011 Dec 16.

Platta HW Erdmann R Peroxisomal dynamics. [Rivista]. - [s.l.]: Trends Cell Biol. 2007 Oct;17(10):474-84, 2007.

Rabu, C., P. Wipf, et al. (2008). "A precursor-specific role for Hsp40/Hsc70 during tail-anchored protein integration at the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **283**(41): 27504-13.

Rapoport TA Goder V, Heinrich SU, Matlack KE. Membrane-protein integration and the role of the translocation channel [Rivista]. - [s.l.]: Trends Cell Biol. 2004 Oct;14(10):568-75, 2004.

Rapoport TA Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes [Rivista]. - [s.l.] : Nature. 2007 Nov 29; 2007. - Vol. 450(7170):663-9..

Ridsdale, A., M. Denis, et al. (2006). "Cholesterol is required for efficient endoplasmic reticulum-to-Golgi transport of secretory membrane proteins." Mol Biol Cell **17**(4): 1593-605.

Saraogi I Shan SO Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. [Rivista]. - [s.l.] : Traffic. 2011 May, 2011. - Vol. 12(5):535-42. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01171.x. Epub 2011 Feb 25.

Schmidt O Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. [Rivista]. - [s.l.] : Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Sep;11(9):655-67. doi: 10.1038/nrm2959, 2010.

Schuldiner M Metz J, Schmid V, Denic V, Rakwalska M, Schmitt HD, Schwappach B, Weissman JS The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. [Rivista]. - [s.l.] : Cell. 2008 Aug 22;134(4):634-45. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.025., 2008.

Schwartz T Blobel G. Structural basis for the function of the beta subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor. [Rivista]. - [s.l.] : Cell. 2003 Mar 21;112(6):793-803, 2003.

Setoguchi K Otera H, Mihara K. Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins [Rivista]. - [s.l.] : EMBO J. 2006 Dec 13;25(24):5635-47. Epub 2006 Nov 16, 2006.

Shao S Hegde RS Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum [Rivista]. - [s.l.] : Annu Rev Cell Dev Biol. 2011; 2011. - Vol. 27:25-56. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154125. Epub 2011 Jul 21.

Shao S Hegde RS. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum [Rivista]. - [s.l.] : Annu Rev Cell Dev Biol. 2011; 2001. - Vol. 27:25-56. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154125. Epub 2011 Jul 21.

Siegel V Walter P. Elongation arrest is not a prerequisite for secretory protein translocation across the microsomal membrane. [Rivista]. - [s.l.] : J Cell Biol. 1985 Jun;100(6):1913-21., 1985.

Schneider, C., L. Sepp-Lorenzino, et al. (1996). "Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14536-41.

Schuldiner, M., J. Metz, et al. (2008). "The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane." Cell **134**(4): 634-45.

Setoguchi, K., H. Otera, et al. (2006). "Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins." Embo J **25**(24): 5635-47.

Stefanovic S Hegde RS. Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. [Rivista]. - [s.l.] : Cell. 2007 Mar 23;128(6):1147-59., 2007.

- Thomas Y Bui N, Strub K** A truncation in the 14 kDa protein of the signal recognition particle leads to tertiary structure changes in the RNA and abolishes the elongation arrest activity of the particle [Rivista]. - [s.l.] : *Nucleic Acids Res.* 1997 May 15;25(10):1920-9., 1997.
- Tom A. Rapoport Veit Goder, Sven U. Heinrich, and Kent E.S. Matlack** Membrane-protein integration and the role of the translocation channel [Rivista]. - [s.l.] : *Trends Cell Biol.* 2004 Oct; 2004. - Vol. 14(10):568-75.
- van Meer, G., D. R. Voelker, et al.** (2008). "Membrane lipids: where they are and how they behave." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(2): 112-24.
- Vilardi, F., H. Lorenz, et al.** (2011). "WRB is the receptor for TRC40/Asna1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane." *J Cell Sci* **124**(Pt 8): 1301-7.
- Wallin E von Heijne G.** Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study [Rivista]. - [s.l.] : *Protein Eng.* 1995 Jul;8(7):693-8, 1995.
- Walter P Blobel G** Disassembly and reconstitution of signal recognition particle [Rivista]. - [s.l.] : *Cell.* 1983 Sep; 1983. - Vol. 34(2):525-33.
- Walter P Blobel G.** Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes [Rivista]. - [s.l.] : *J Cell Biol.* 1981 Nov;91(2 Pt 1):557-61, 1981.
- Wang P Dalbey RE** Inserting membrane proteins: the YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts [Rivista]. - [s.l.] : *Biochim Biophys Acta.* 2011 Mar;1808(3):866-75. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.08.014. Epub 2010 Aug 26., 2011.
- Whitesell, L., E. G. Mimnaugh, et al.** (1994). "Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18): 8324-8.
- Wilson, R. R. and N. J. Bulleid** (2000). "Semi-permeabilized cells to study procollagen assembly." *Methods Mol Biol* **139**: 1-9.
- Y H Yu Y Y Zhang, D D Sabatini, and G Kreibich** Reconstitution of translocation-competent membrane vesicles from detergent-solubilized dog pancreas rough microsomes [Rivista]. - [s.l.] : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9931-9935., 1989.
- Yabal M Brambillasca S, Soffientini P, Pedrazzini E, Borgese N, Makarow M** Translocation of the C terminus of a tail-anchored protein across the endoplasmic reticulum membrane in yeast mutants defective in signal peptide-driven translocation. [Rivista].- [s.l.] : *J Biol Chem.* 2003 Jan 31;278(5):3489-96. Epub 2002 Nov 22., 2003.
- Yagita Y Hiromasa T, Fujiki Y** Tail-anchored PEX26 targets peroxisomes via a PEX19-dependent and TRC40-independent class I pathway. [Rivista]. - [s.l.] : *J Cell Biol.* 2013 Mar 4;200(5):651-66. doi: 10.1083/jcb.201211077, 2013.
- Yamagishi M Fujita H, Morimoto F, Kida Y, Sakaguchi M.** A sugar chain at a specific position in the nascent polypeptide chain induces forward movement during translocation through the translocon

[Rivista]. - [s.l.] : J Biochem. 2011 May;149(5):591-600. doi: 10.1093/jb/mvr011. Epub 2011 Jan 28, 2011.

Yamamoto Y Sakisaka T Molecular machinery for insertion of tail-anchored membrane proteins into the endoplasmic reticulum membrane in mammalian cells. [Rivista]. - [s.l.] : Mol Cell. 2012 Nov 9;48(3):387-97. doi: 10.1016/j.molcel.2012.08.028. Epub 2012 Oct 4, 2012.

Zheng N Gierasch LM Signal sequences: the same yet different [Rivista]. - [s.l.] : Cell. 1996 Sep 20; 1996. - Vol. 86(6):849-52.

Zopf D Bernstein HD, Johnson AE, Walter P. The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence [Rivista]. - [s.l.] : EMBO J. 1990 Dec;9(13):4511-7, 1990.

Ringraziamenti

.....e alla fine di questa esperienza la mia più sincera e forte gratitudine è dedicata a Nica. Con la sua passione e grande esperienza è stata guida, sostegno mentore e modello. È soprattutto a Lei che devo la mia crescita professionale. Grazie di vero cuore.....

...un sentito grazie a tutte le persone del gruppo Borgese con cui ho condiviso questi anni, quelle ancora in laboratorio e quelle ormai lontane. Grazie.

...un caloroso ringraziamento a tutte le persone del primo piano , con cui ho condiviso questi anni ogni giorno. Grazie.

.....infine ringrazio Enrico, la persona che più di tutti mi è stata vicina, supportandomi in ogni momento di gioia e di sconforto. Grazie di ogni cosa.....