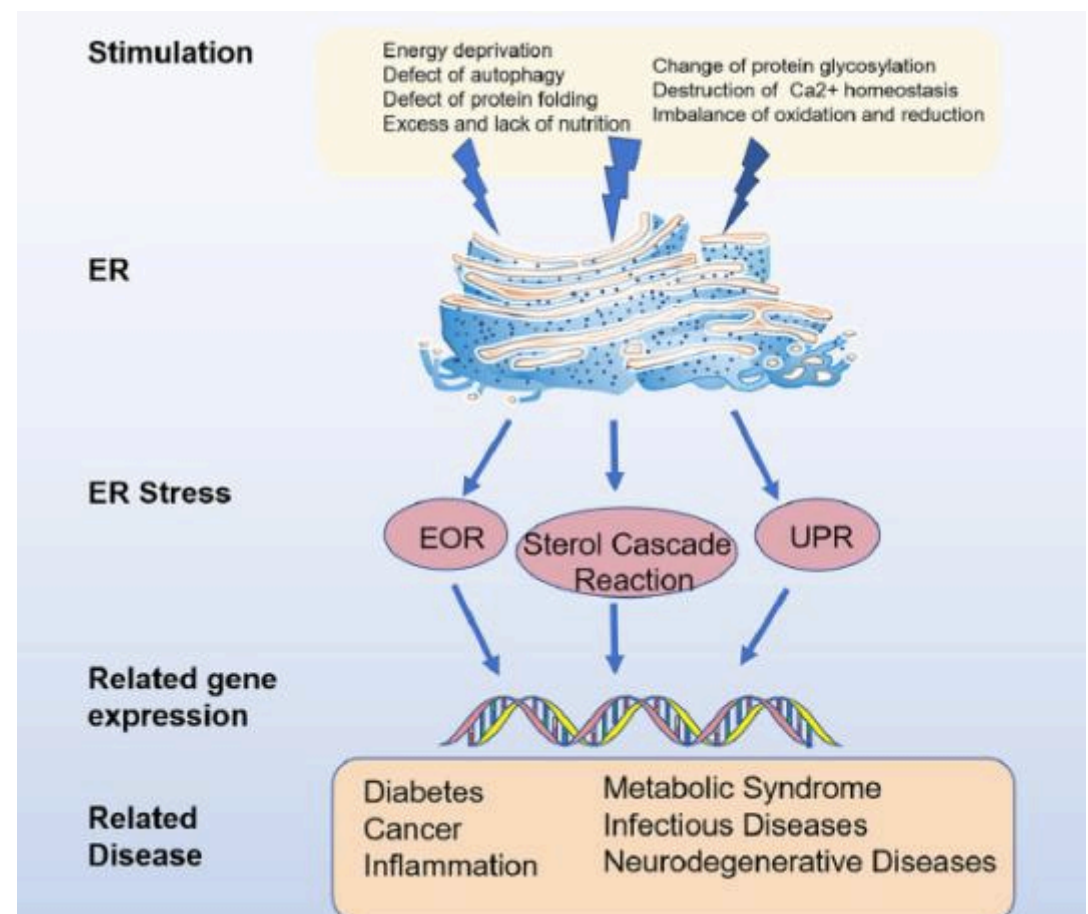


Stress del Reticolo Endoplasmatico

meccanismi omeostatici e DANNO CELLULARE



La risposta allo stress del Reticolo Endoplasmatico

Un ulteriore danno che può fortemente alterare **l'equilibrio omeostatico** di una cellula è dovuto al **sovraccarico del Reticolo Endoplasmatico**.

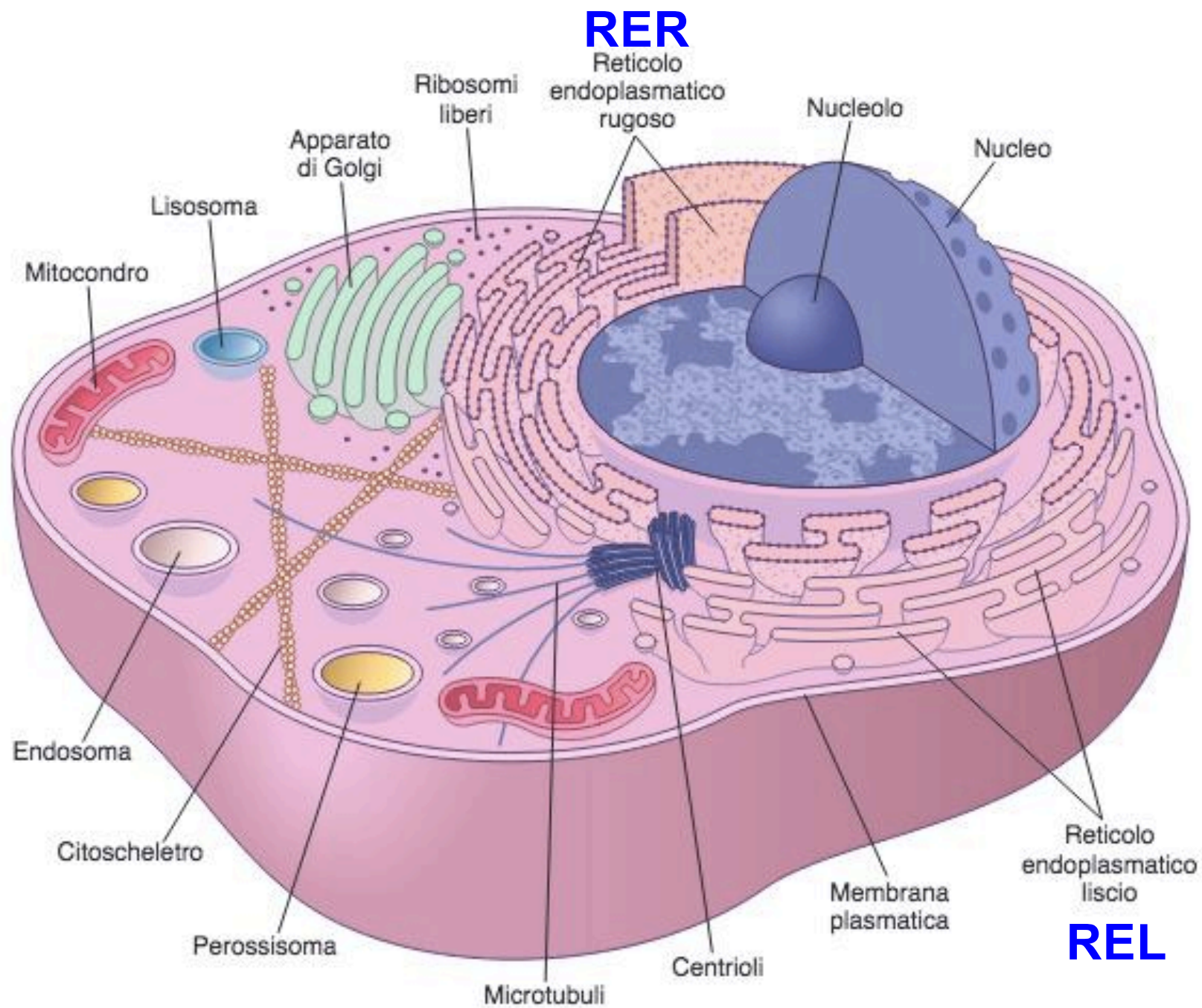
Questo accade in varie circostanze come ad esempio in un'infezione virale oppure in presenza di proteine malripiegate condizione che può verificarsi nelle malattie neurodegenerative.

La cellula risponde attivando alcuni meccanismi di regolazione per ricostituire l'equilibrio omeostatico e, se questo non è possibile, può andare incontro ad apoptosi.

Questa risposta cellulare è definita

UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR)

oppure **ER stress signaling**

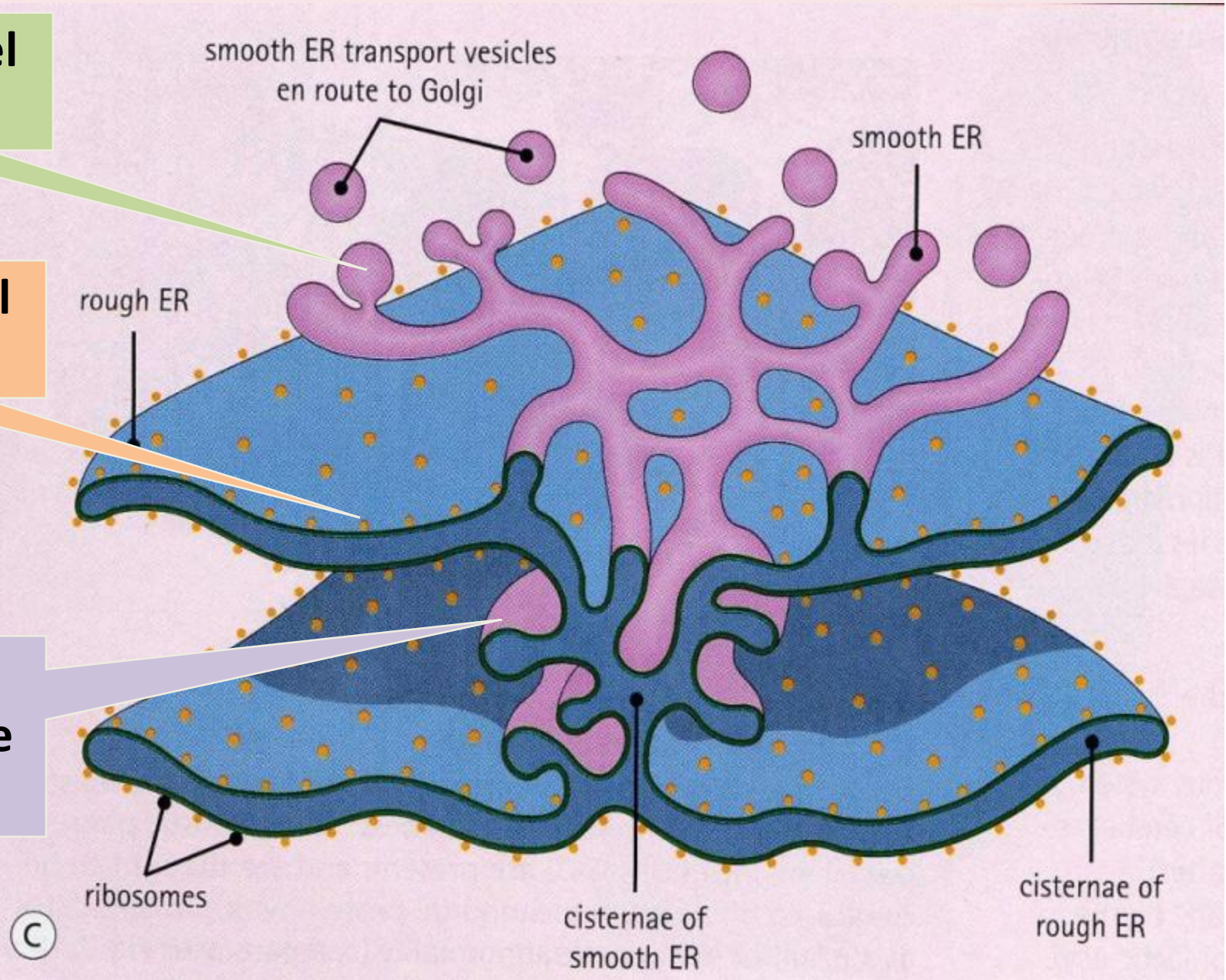


Reticolo endoplasmatico

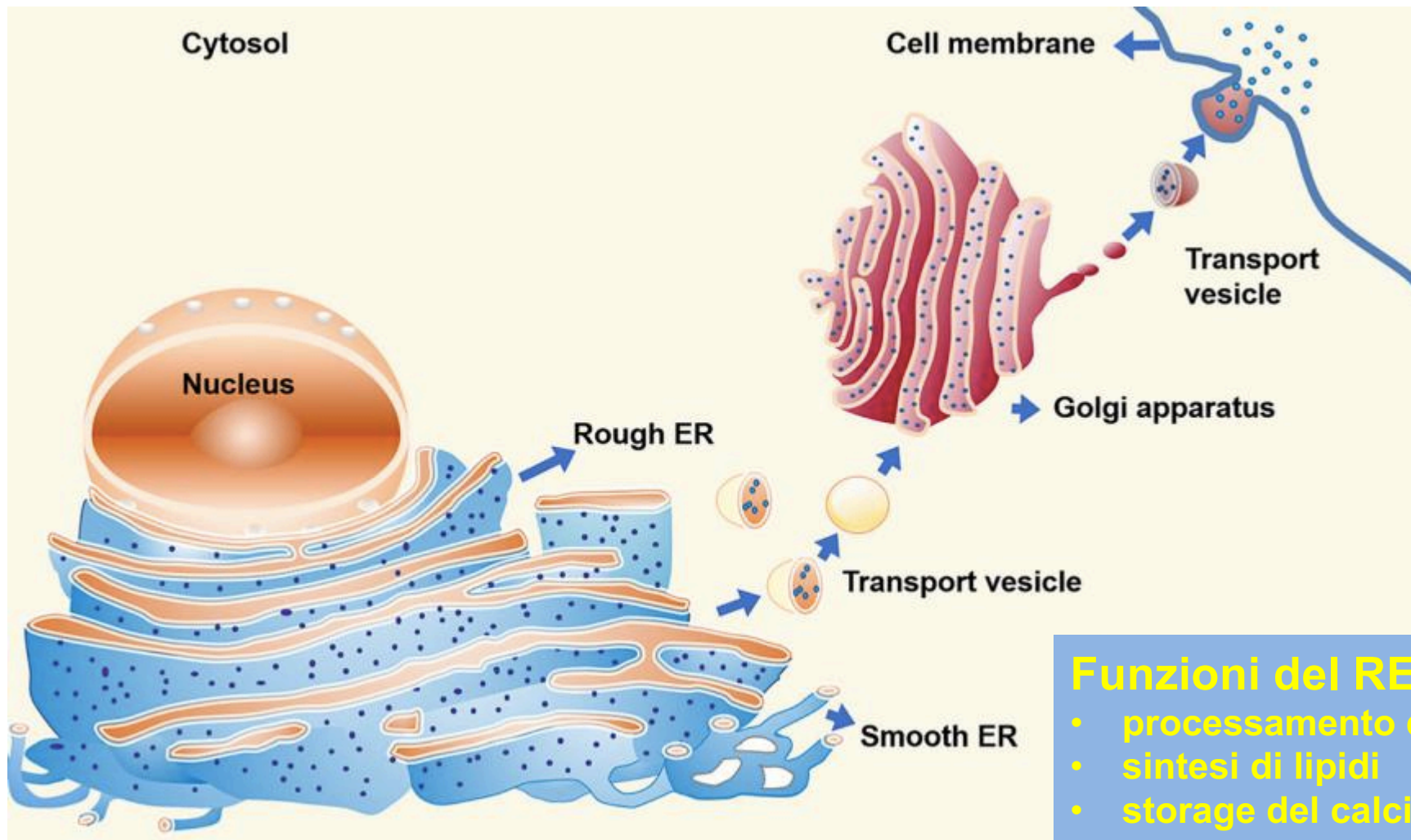
Morfologia del
REL

Morfologia del
RER

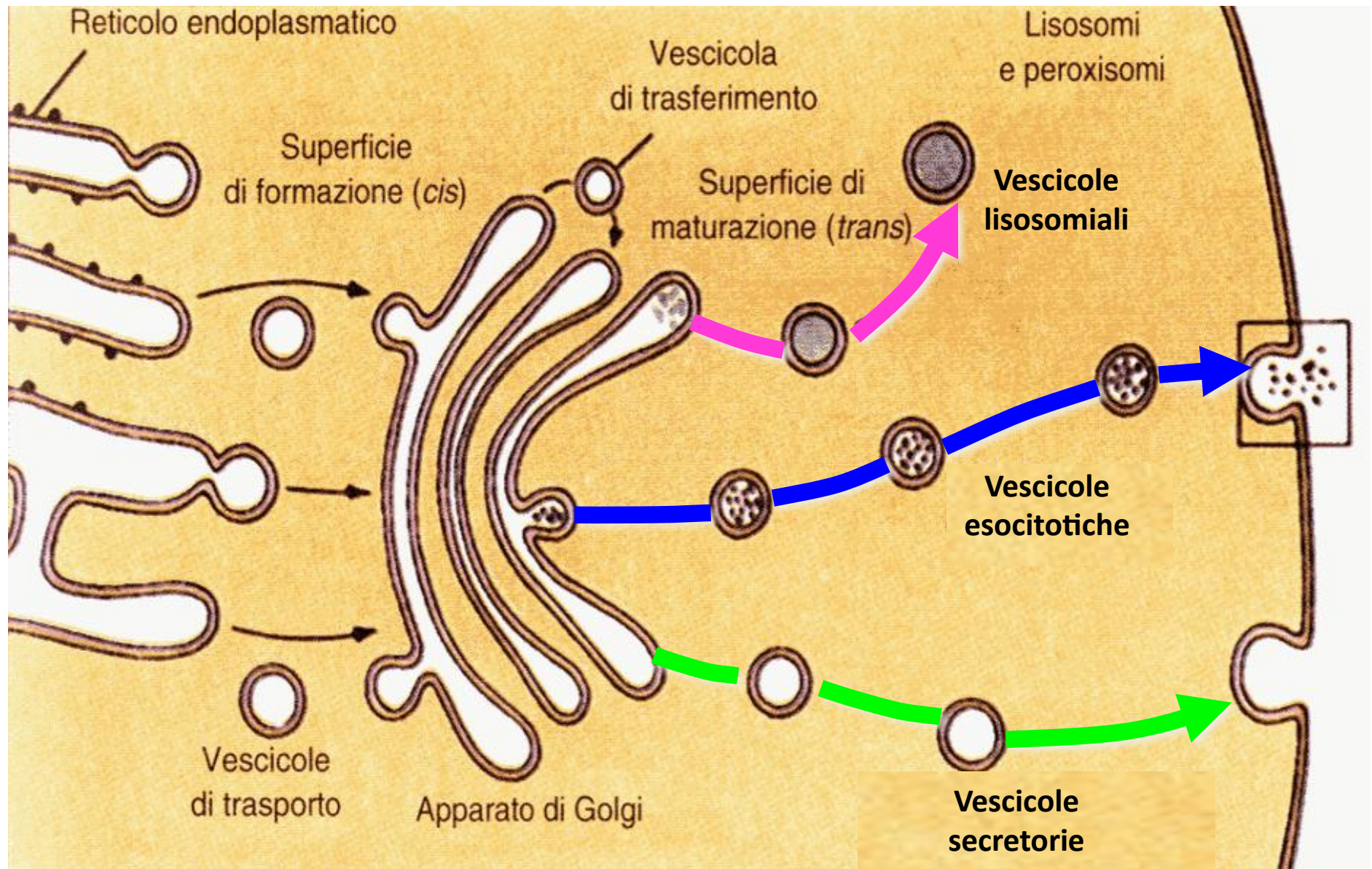
Possibile
comunicazione
fra di essi



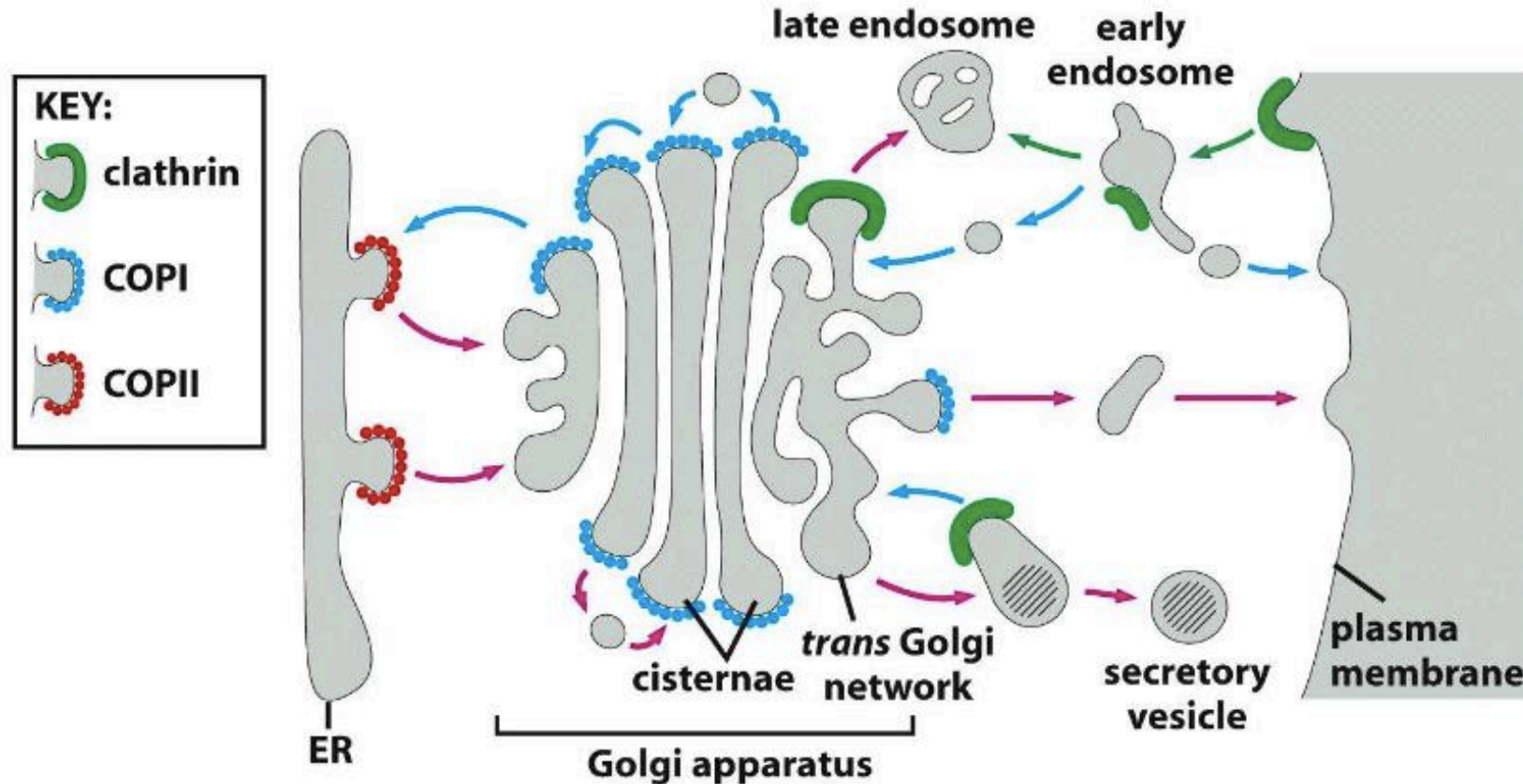
Funzioni del reticolo endoplasmatico



Diversi “destini” delle vescicole prodotte dal Golgi



Trafficking vescicolare



Trasporto vescicolare-Formazione delle vescicole

Vescicole rivestite di **CLATRINA**

mediano il trasporto dalla membrana plasmatica (via endocitica) e tra i compartimenti endosomiali e del Golgi (via secretoria).

Vescicole rivestite da COAT PROTEIN (COP)

COP I

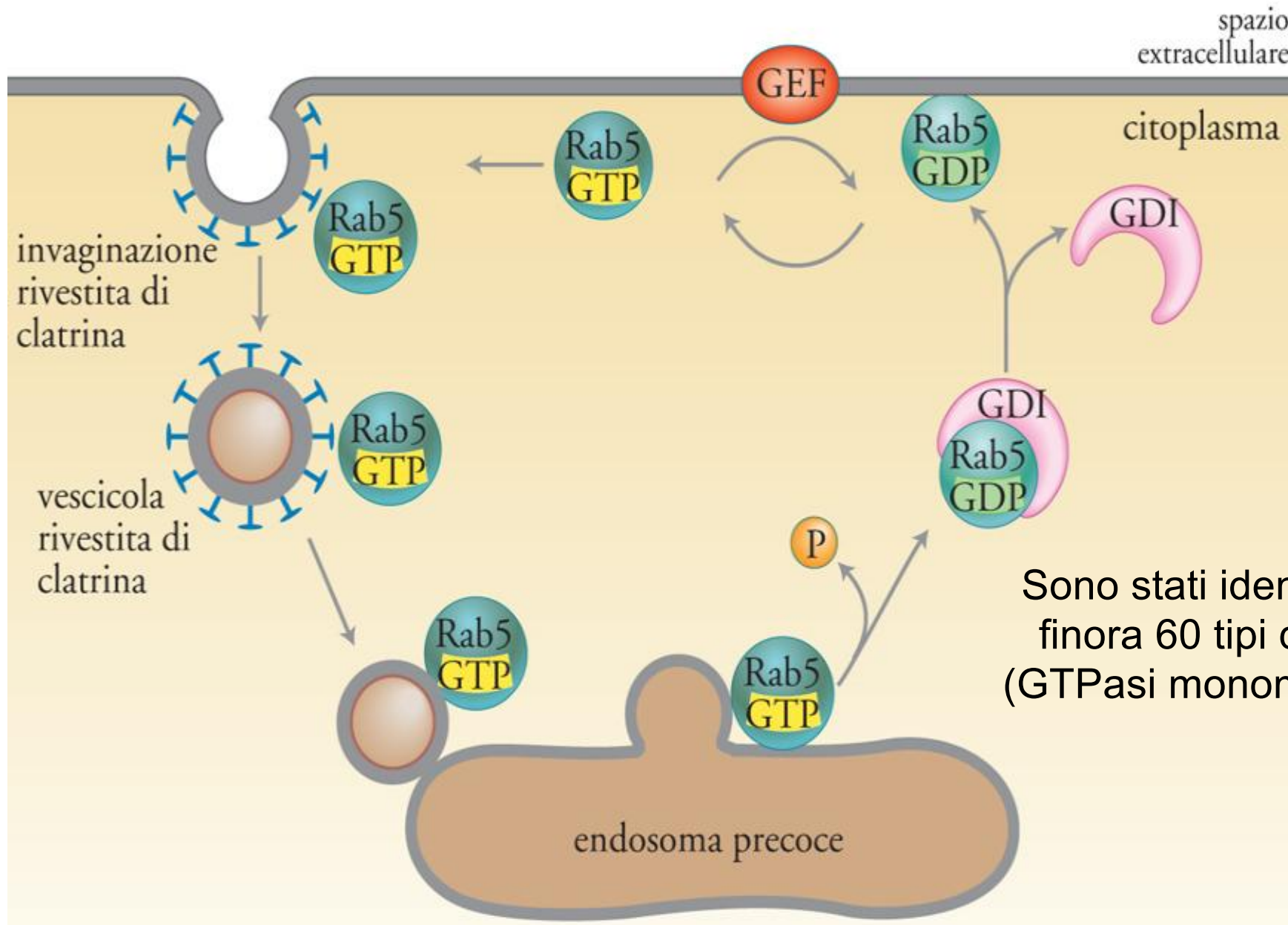
gemmano dal Golgi

COP II

gemmano dal RE

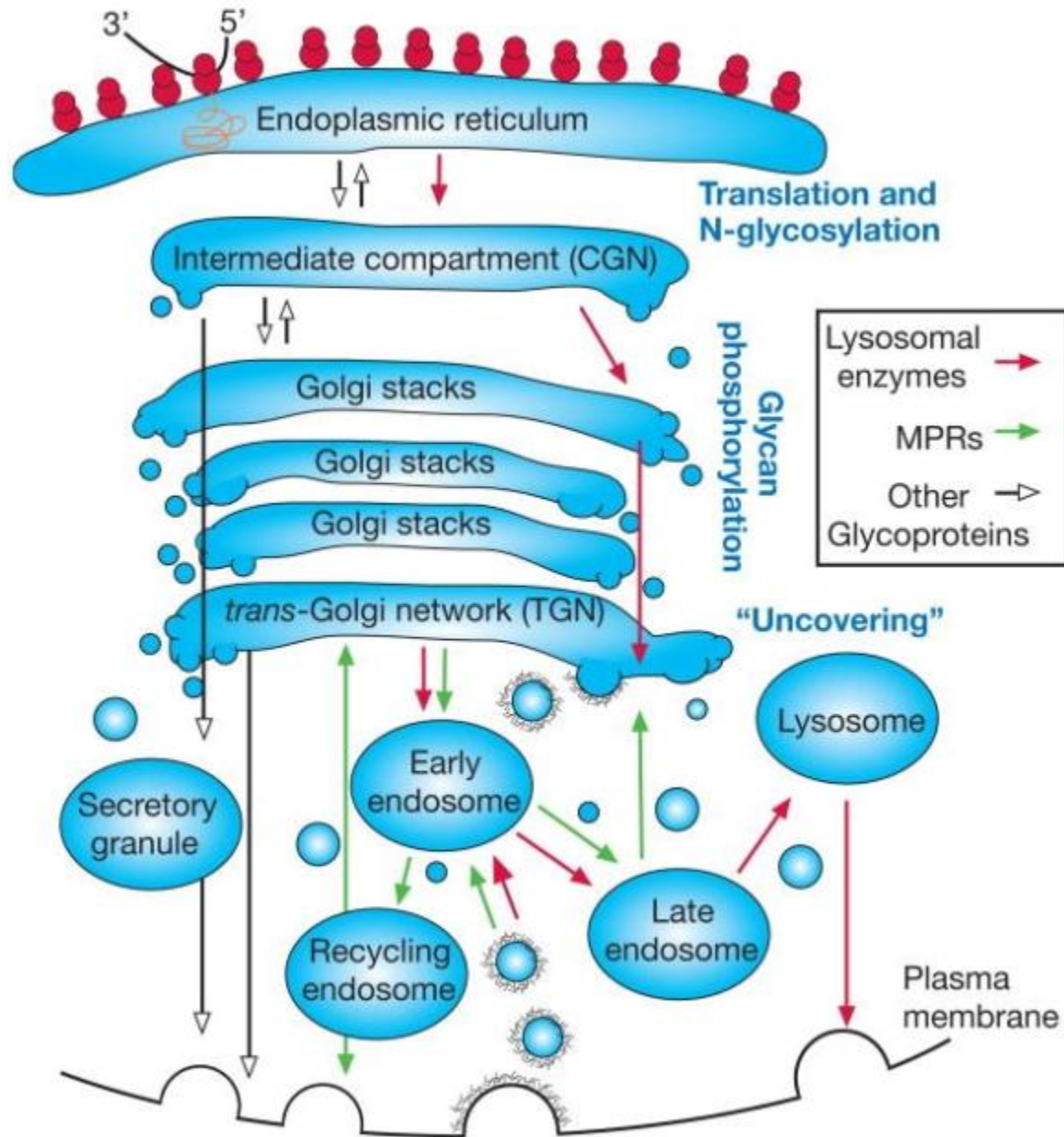
La formazione di vescicole richiede **GTP**

I membri della famiglia Rab sono essenziali per il traffico vescicolare

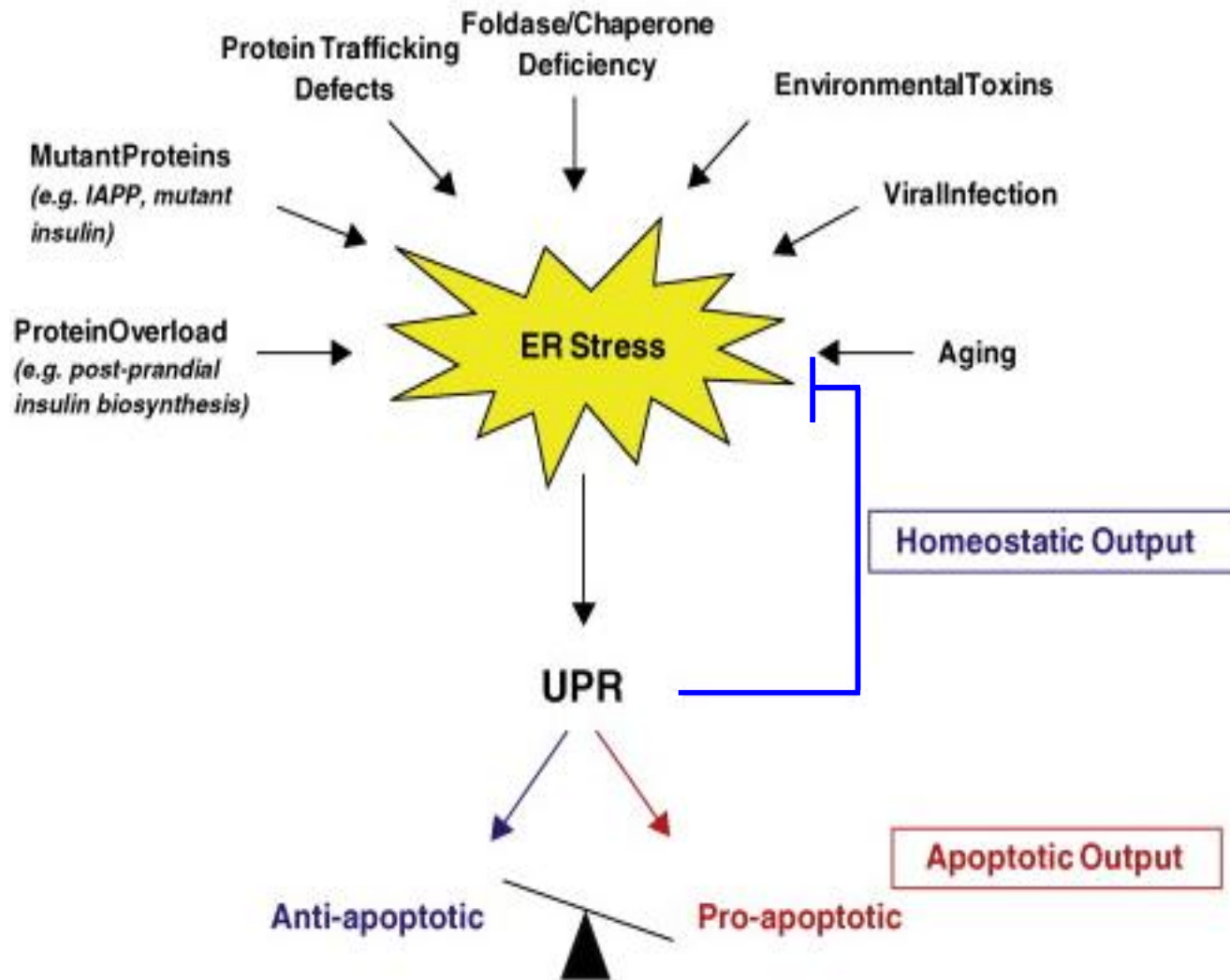


Sono stati identificati finora 60 tipi di Rab (GTPasi monomeriche)

Reticolo endoplasmatico, Apparato del Golgi e sistema delle vescicole



Risposta cellulare allo stress del Reticolo Endoplasmatico



Stress del RE. Ci sono diverse cause di stress da RE, incluso il sovraccarico di proteine. Lo stress RE attiva la risposta definita **UPR** (unfoded protein response) che ha due esiti:

(1) **omeostatico (blu)**

(2) **apoptotico (rosso)**

L'output omeostatico porta alla risoluzione dello stress del RE, mentre l'output apoptotico, risultante da un **UPR** insufficiente, favorisce l'attivazione di componenti UPR proapoptotiche rispetto a quelle antiapoptotiche.

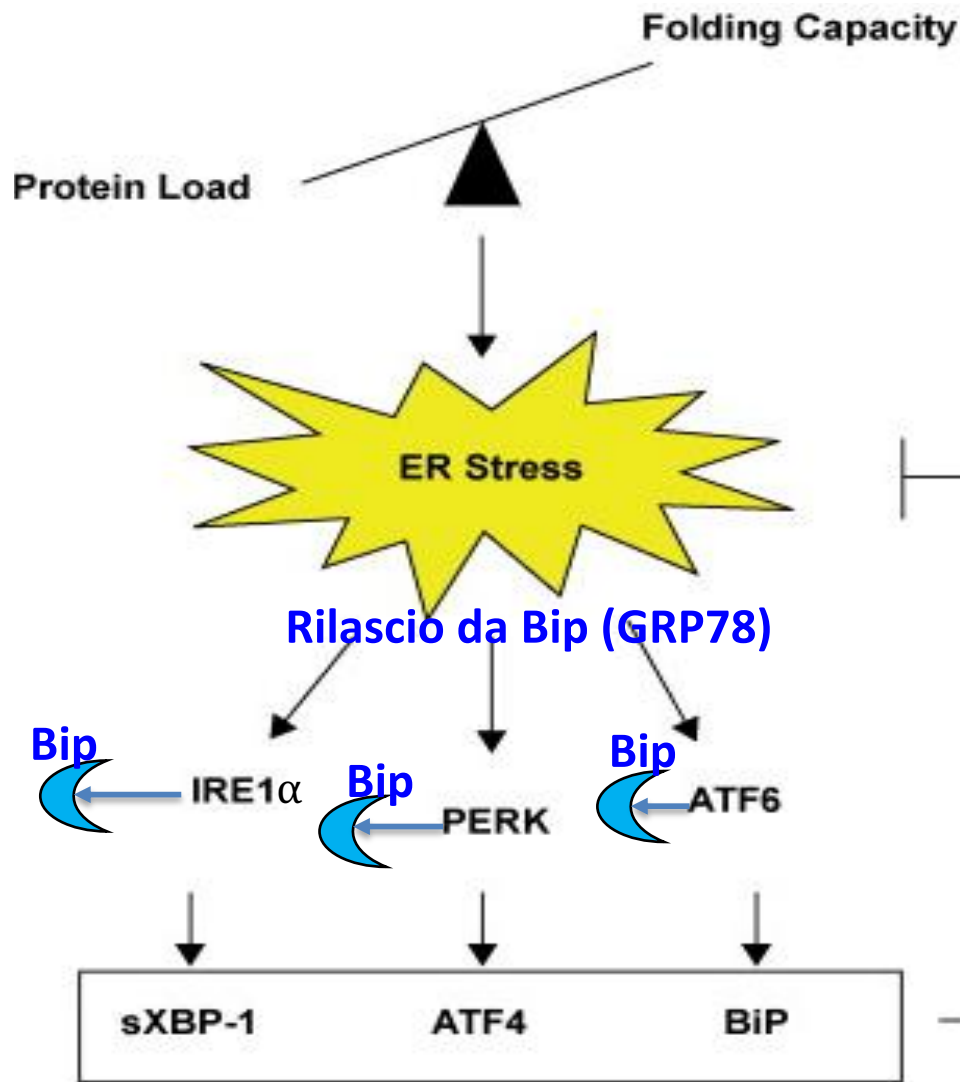
ER stress signaling network

Ci sono tre principali regolatori di **UPR**:

IRE1 α (Inositol-Requiring enzyme 1 α)

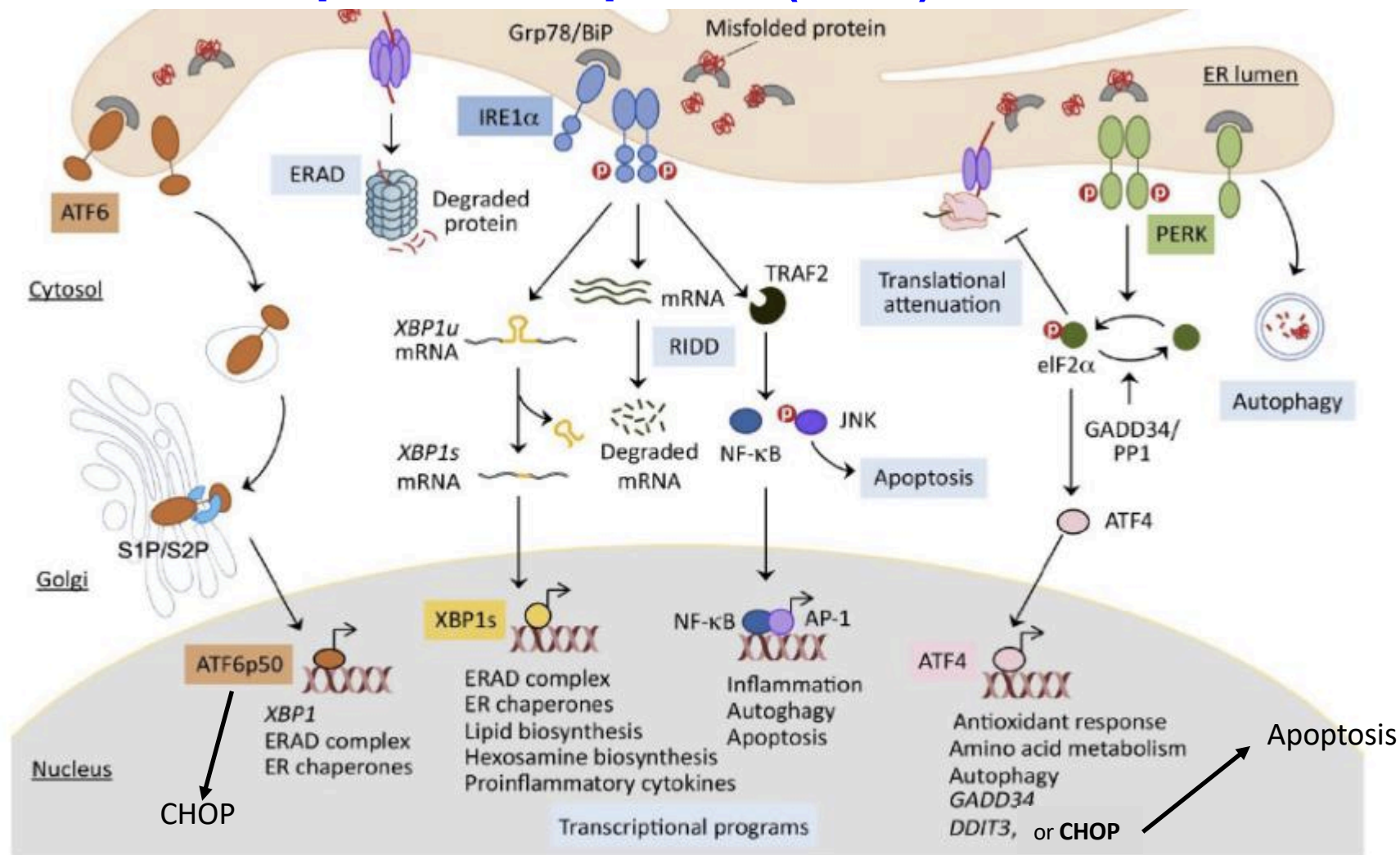
PERK (PKR-like ER kinase)

ATF6 (Activating transcription factor 6)



In cellule non stressate, queste proteine sono legate al chaperone molecolare **BiP/GRP78** (Binding Immunoglobulin protein/ glucose-regulated protein 78; appartenente alle heat shock protein, HSP70) e sono inattive. In seguito all'aumento delle proteine "unfolded", BiP lega queste ultime proteine e rilascia **IRE1 α** , **PERK** e **ATF6**. Ciascuno di questi trasduttori attiva targets a valle, che a loro volta mitigano lo stress o possono indurre apoptosi.

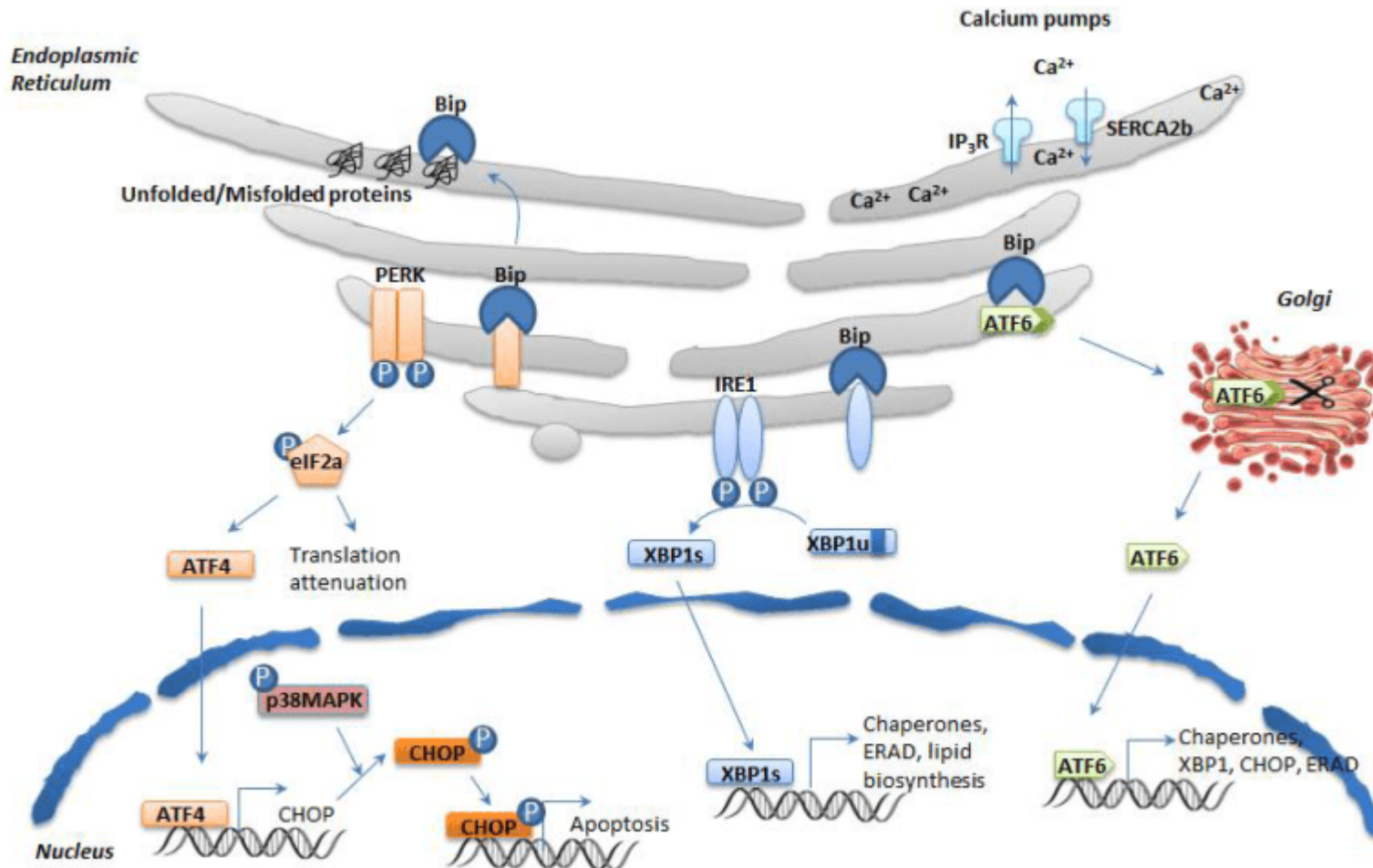
Unfolded protein response (UPR) nei mammiferi



Ci sono quattro risposte distinte dell'UPR:

- 1) Up-regolazione di chaperoni molecolari** per aumentare l'attività di ripiegamento e ridurre l'aggregazione proteica.
- 2) Attenuazione sintesi proteica** per ridurre il carico di lavoro del RE e prevenire l'ulteriore accumulo di proteine misfoldate.
- 3) Degradazione delle proteine associata a RE (ERAD)** per promuovere la clearance delle proteine malripiegate.
- 4) Apoptosi** quando la funzione è ampiamente compromessa.

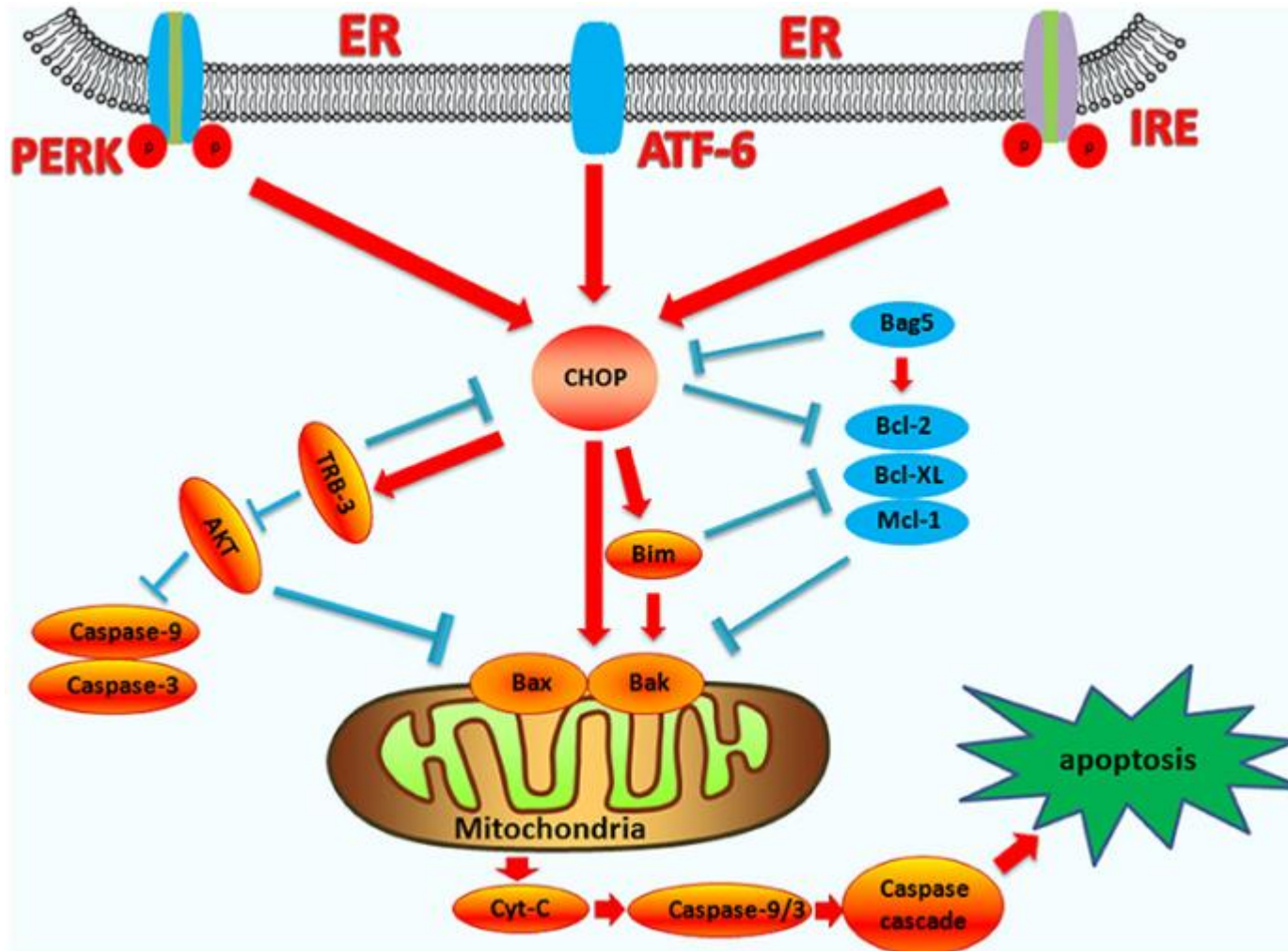
ER stress e risposta UPR



IP₃R receptor and calcium pump SERCA are responsible for the efflux and influx of calcium in ER, respectively. Intracellular calcium dysregulation induces ER stress. ER stress induces the UPR. Unfolded or misfolded proteins are recognized by Bip, which then releases itself from PERK, IRE1, and ATF6, leading to their activation.

The activation of PERK involves its homodimer formation and autophosphorylation. It subsequently phosphorylates eIF2α, which in turn attenuates general translation but facilitates the translation of ATF4, thus increasing its protein level. ATF4 is a transcription factor that activates the transcription of CHOP. Phosphorylated p38 MAPK phosphorylates CHOP, which then triggers the transcription of apoptotic genes. Similar to PERK, IRE1α activates after the formation and autophosphorylation of IRE1α homodimers. This activates IRE1α RNase activity. IRE1α then splices Xbp1, removing 26 nucleotides from its transcript. Then, the XBP1s spliced form of XBP1 acts as a transcription factor for chaperones, as well as genes involved in ERAD and lipid biosynthesis. ATF6 activation involves its release from Bip, and its translocation into the Golgi, where it undergoes cleavage by S1P/S2P proteases. This allows its nuclear translocation and subsequent transcriptional activation of chaperones, XBP1, CHOP, and ERAD genes. Abbreviations: IP₃R (inositol 1,4,5-tris-phosphate(IP₃R) receptor).

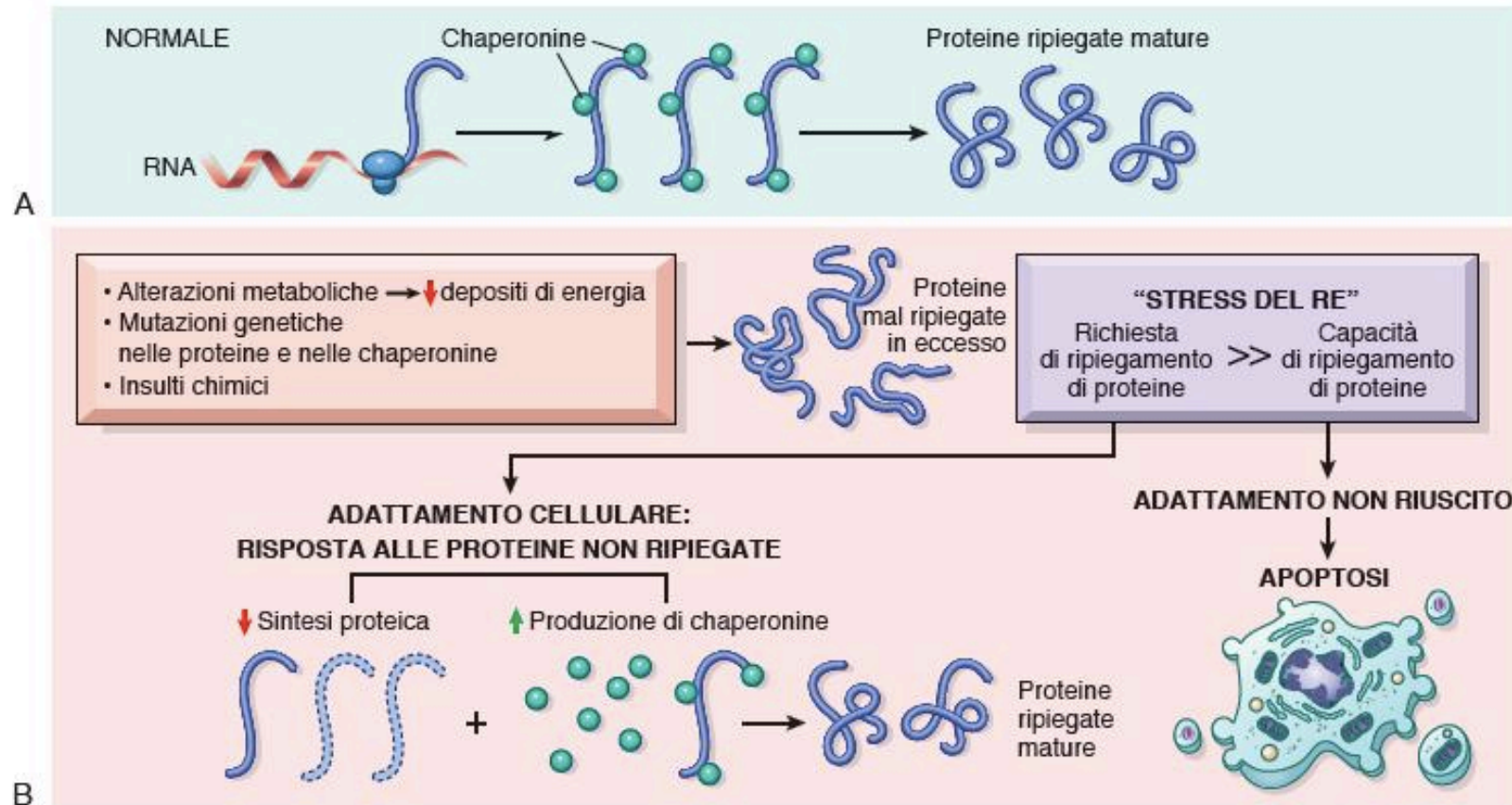
La proteina CHOP media il processo apoptotico da stress del reticolo endoplasmatico (UPR)



CHOP innesca la via apoptotica intrinseca attraverso l'inibizione di BCL-2, BCL-XL, MCL-1 (fattori anti-apoptotici) e la up-regolazione di BIM (fattore pro-apoptotico), che regola la permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale mediata da BAX-BAK.

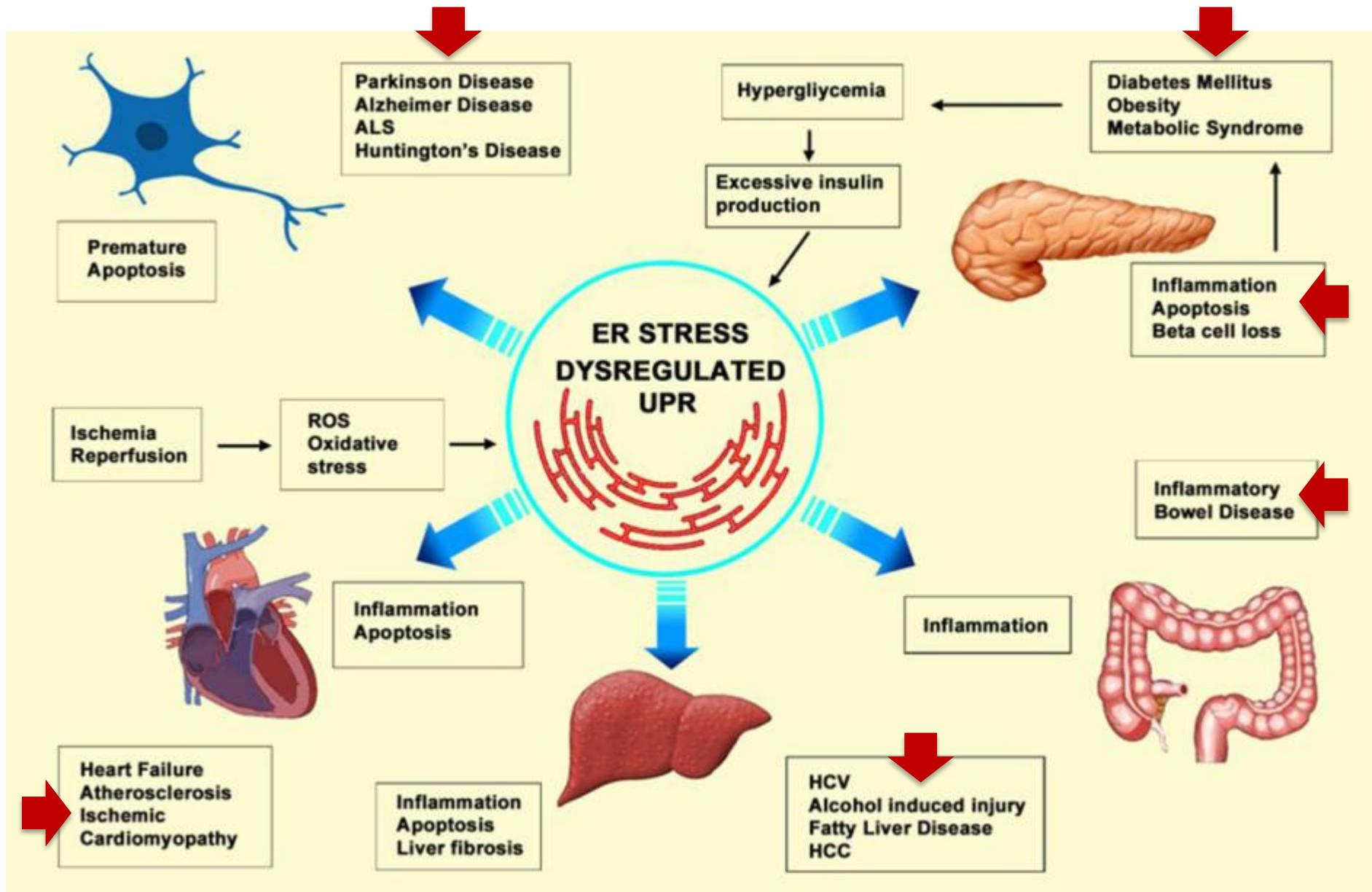
CHOP = C/EBP homologous protein attiva programmi trascrizionali pro-apoptotici

Mal ripiegamento delle proteine e stress del RE

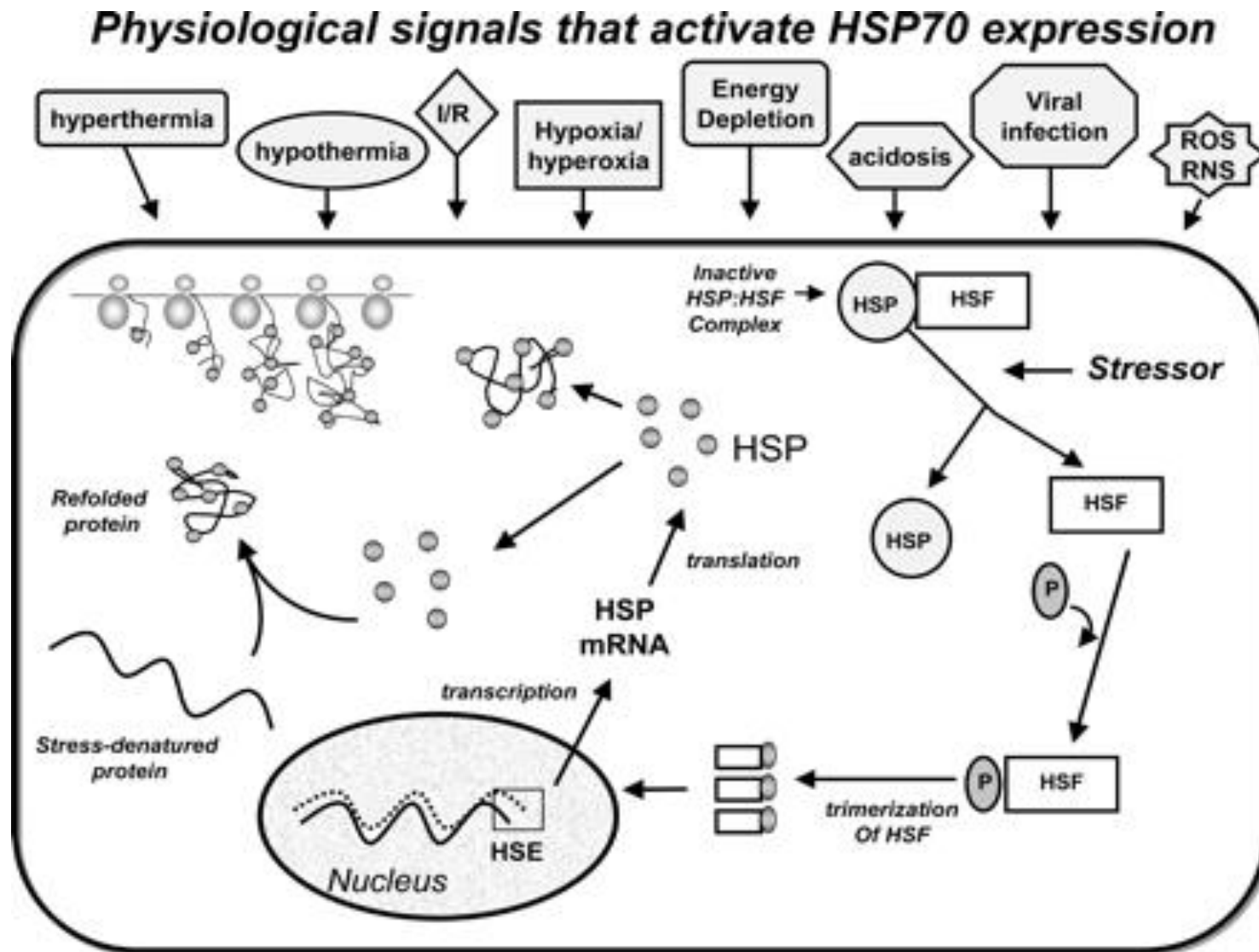


Nelle cellule sane, le proteine recentemente sintetizzate sono ripiegate nel RE e con l'aiuto di chaperoni. Varie sollecitazioni esterne o mutazioni inducono uno stato chiamato stress del RE in cui la cellula non è in grado di far fronte al carico di proteine mal ripiegate. L'accumulo di queste proteine nel RE innesca la risposta UPR (unfolded protein response) che prova a ristabilire l'omeostasi delle proteine (proteostasi). Se questa risposta è inadeguata viene indotta l'apoptosi.

Stress del RE e malattie



Le proteine HSP aiutano il ripiegamento delle proteine ed attenuano gli effetti tossici dell'accumulo di proteine



Heat shock proteins (HSP) = chaperoni molecolari che agiscono sia in condizioni normali che di stress

Cellular locations and proposed functions of mammalian heat shock protein families

HSP Family	Cellular Location	Proposed Function
HSP27 (sHSP)	Cytosol, nucleus	Microfilament stabilization, antiapoptotic
HSP60	Mitochondria	Refolds proteins and prevents aggregation of denatured proteins
HSP70 family:		Antiapoptotic
HSP72 (Hsp70)	Cytosol, nucleus	Protein folding, cytoprotection
HSP73 (Hsc70)	Cytosol, nucleus	Molecular chaperones
HSP75 (mHSP70)	Mitochondria	Molecular chaperones
HSP78 (GRP78/BiP)	ER	Cytoprotection, molecular chaperones
HSP90	Cytosol, ER, nucleus	Regulation of steroid hormone receptors, protein translocation
HSP110/104	Cytosol	Protein folding

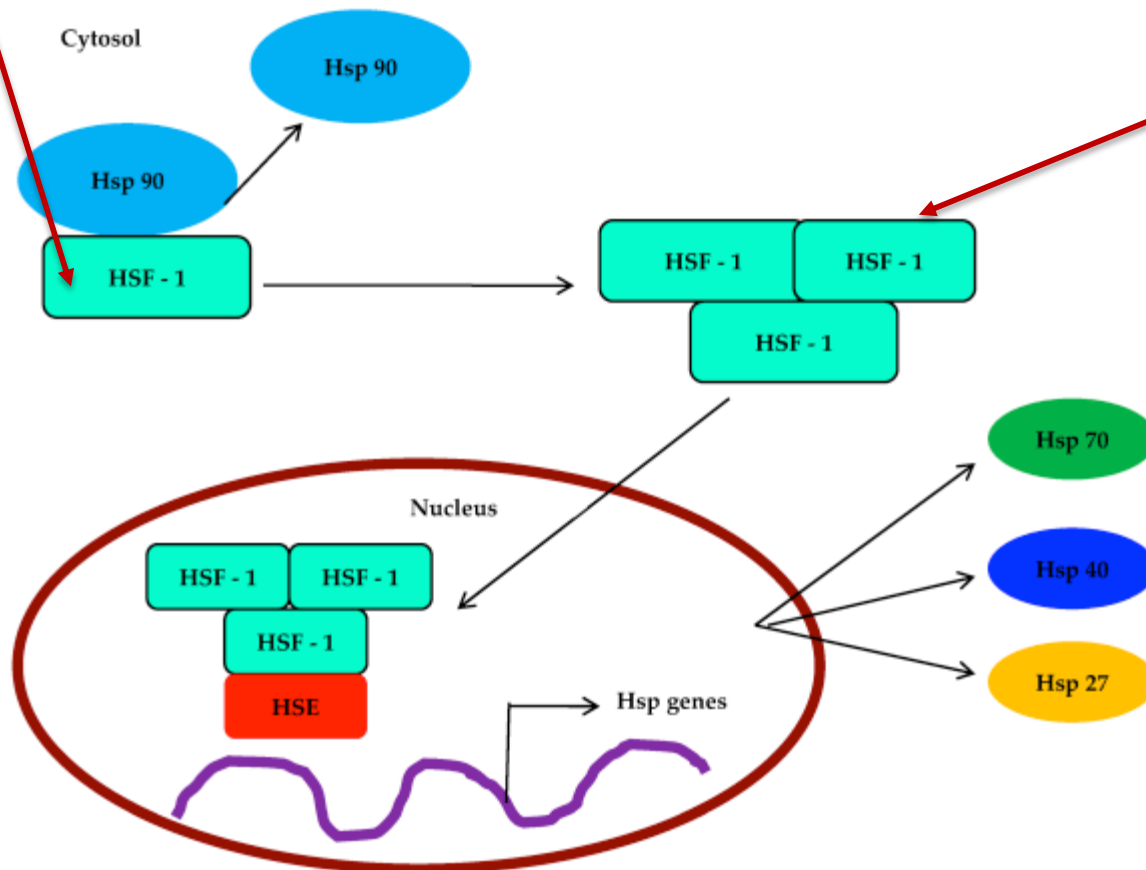
HSP, heat shock protein; sHSP, small HSP; Hsc, Heat shock cognate

Aiutano le proteine nascenti ad assumere la corretta conformazione evitando di formare aggregati insolubili.

Modulano l'attività delle proteine modificando la loro conformazione.

Meccanismo di trascrizione genica delle Heat Shock Proteins (chaperoni molecolari)

In condizioni normali HSF-1 è monomero, citoplasmatico ed in forma inattiva perchè associato alle HSPs che lo inibiscono.



In seguito a stress, le HSPs si staccano da HSF-1 che trimerizza, si iperfosforila, e trasloca nel nucleo dove induce la trascrizione delle HSPs

HSFs = heat shock transcription factors

Nelle cellule eucariotiche, HSF-1 è il fattore di trascrizione principale delle Heat Shock Proteins

Le proteine Hsp70

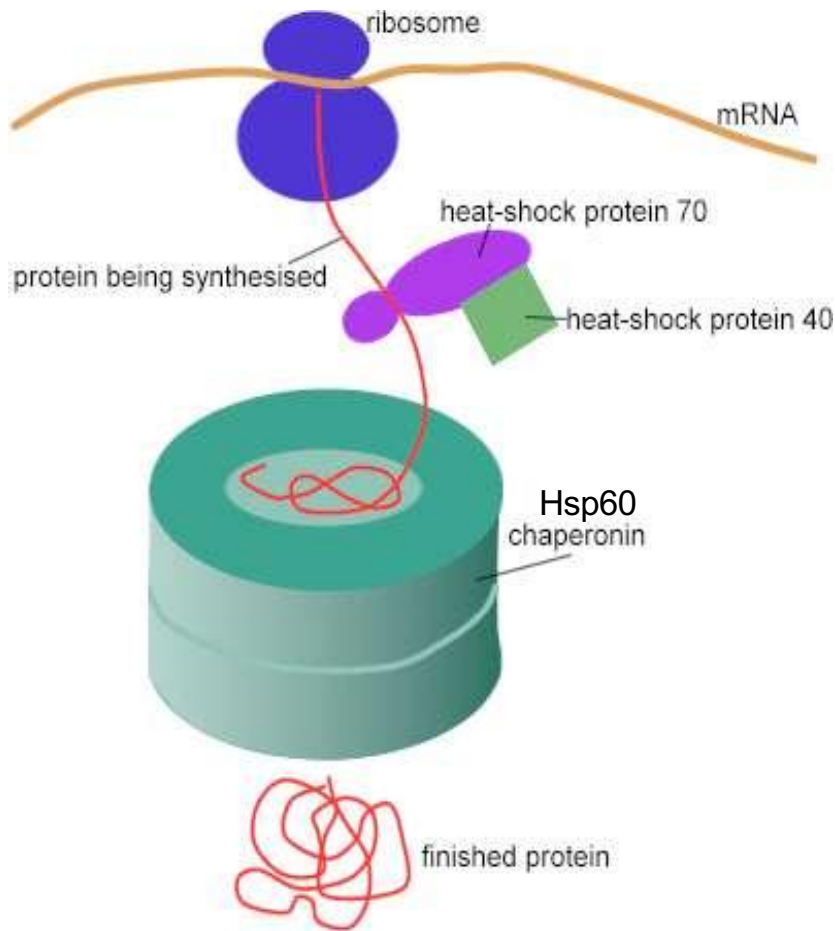
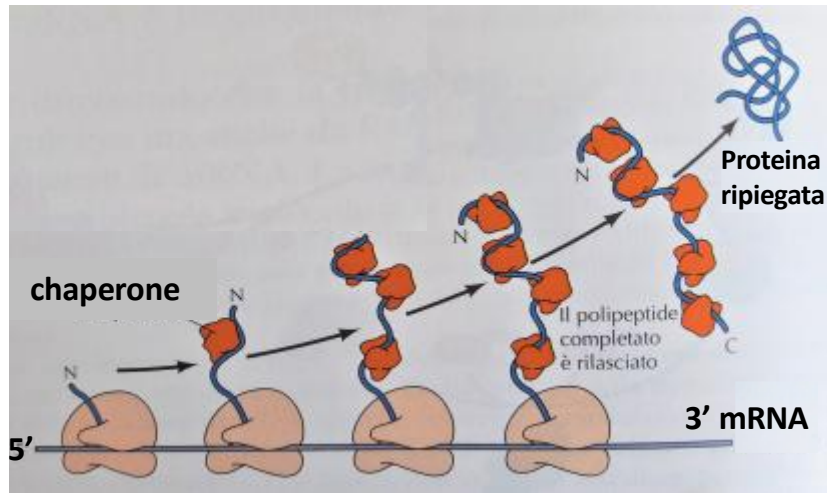
Le proteine Hsp70 contengono un dominio aminotermine con attività ATPasica, un dominio C-terminale idrofobico che lega il polipeptide e un'alfa elica più variabile.

Queste proteine Hsp70 legate all'ATP si associano alle proteine nascenti o "misfoldate". Questo causa un cambiamento conformazionale che induce l'attività ATPasica e aumenta l'associazione con HSP40.

Membri delle famiglie Hsp70 e HSP60 possono agire in sequenza (le Hsp70 stabilizzano il polipeptide nascente in una conformazione non ripiegata fino alla fine della traduzione. Poi le HSP60 prendono il polipeptide all'interno del loro cilindro e l'aiutano nel folding in un processo che richiede ATP).

Insieme a molecole accessorie (Hip, Hop, Hup, Hap, CHIP) coordinano il ripiegamento delle proteine nascenti o quello delle proteine denaturate, favoriscono il traffico delle proteine attraverso le membrane cellulari, il disassemblaggio delle vescicole ricche in clatrina, inibiscono l'aggregazione di proteine, e coadiuvano la marcatura di proteine destinate alla degradazione via proteasoma.

Livelli elevati di Hsp70 si associano all'inibizione dell'apoptosi.

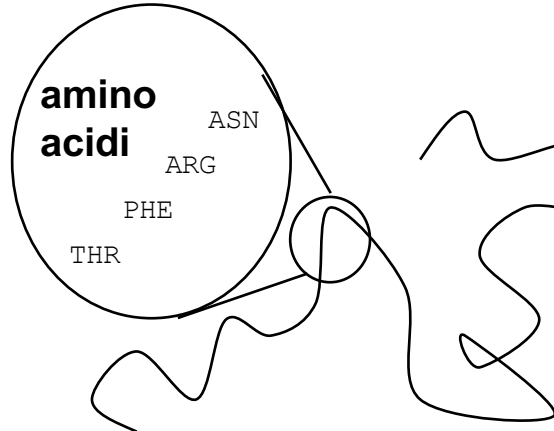


Dal genoma:

... ACU UUC CGU AAC...

Alla sequenza proteica:

... THR PHE ARG ASN...



DNA

mRNA

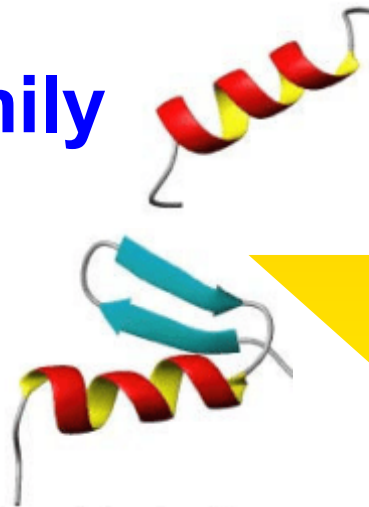
**amino
acidi**

**stato
unfolded**

**folding
intermedio**

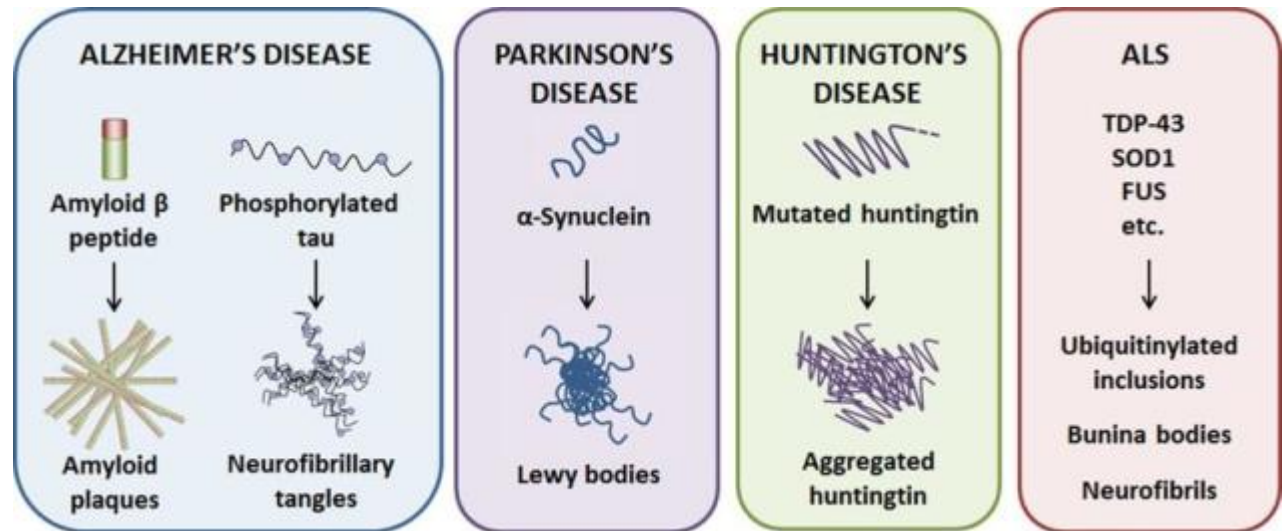
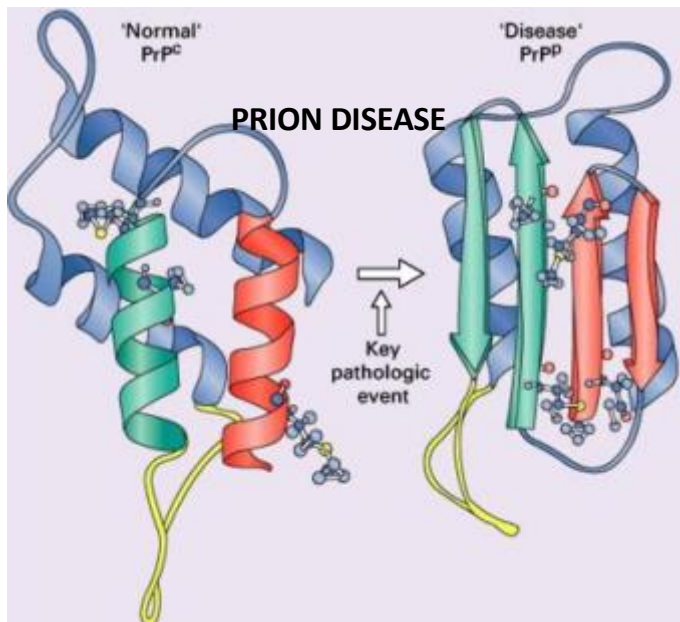
**stato
nativo**

HSP Family



Struttura e funzione della proteina

Malattie da “MISFOLDING” delle proteine



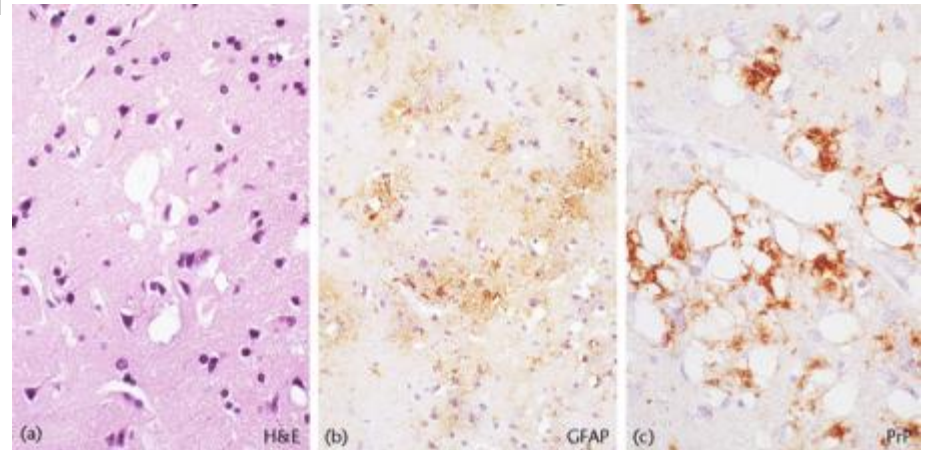
Malattie da Prioni:

Encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSEs)



- Encefalopatia spongiforme bovina o Malattia della mucca pazza (BSE)
- Scrapie ovina
- Malattia di Creutzfeldt-Jacob (CJD)

Un gruppo di malattie trasmesse (?) da una glicoproteina (il prione)



Prove istologiche (*post mortem*) nel cervello: vacuoli circondati da depositi di placche

Stanley Prusiner

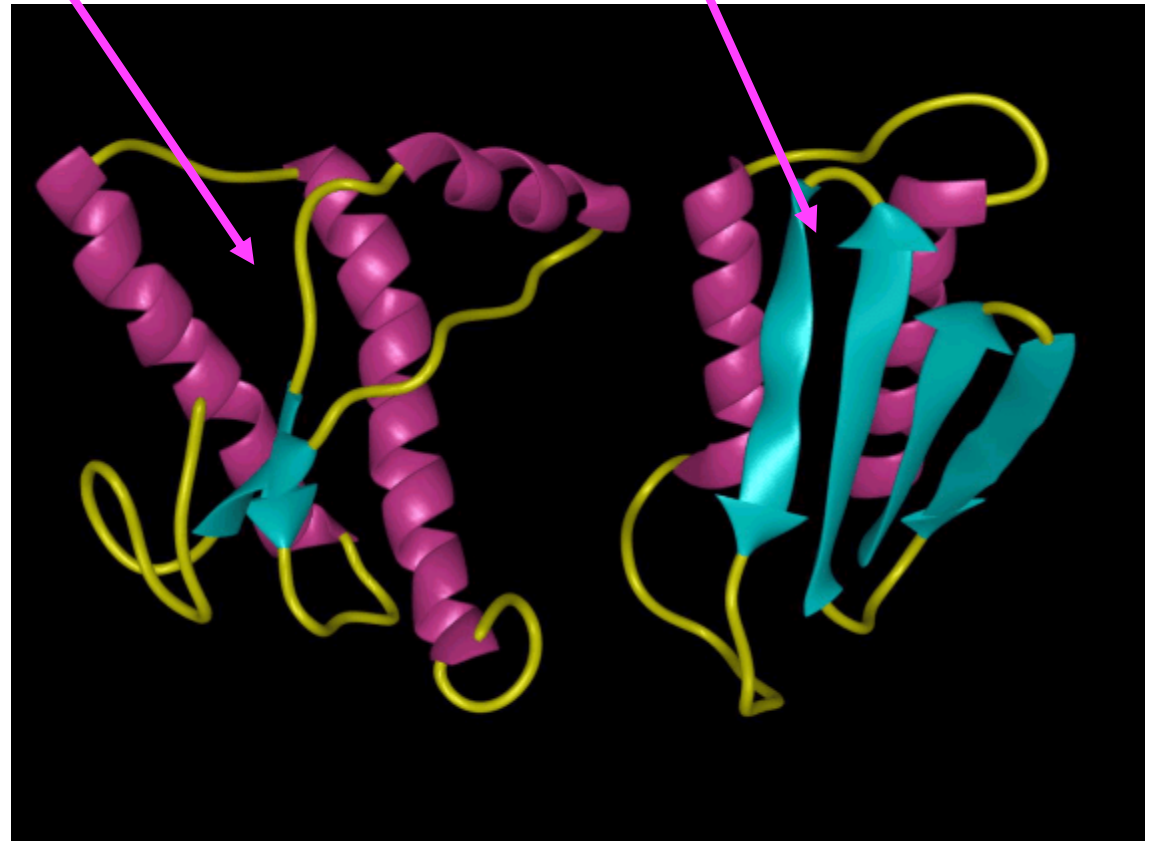
The Nobel prize in Physiology or Medicine 1997 was awarded to Stanley B. Prusiner "for his discovery of Prions- a new biological principle of infection"



Le malattie prioniche

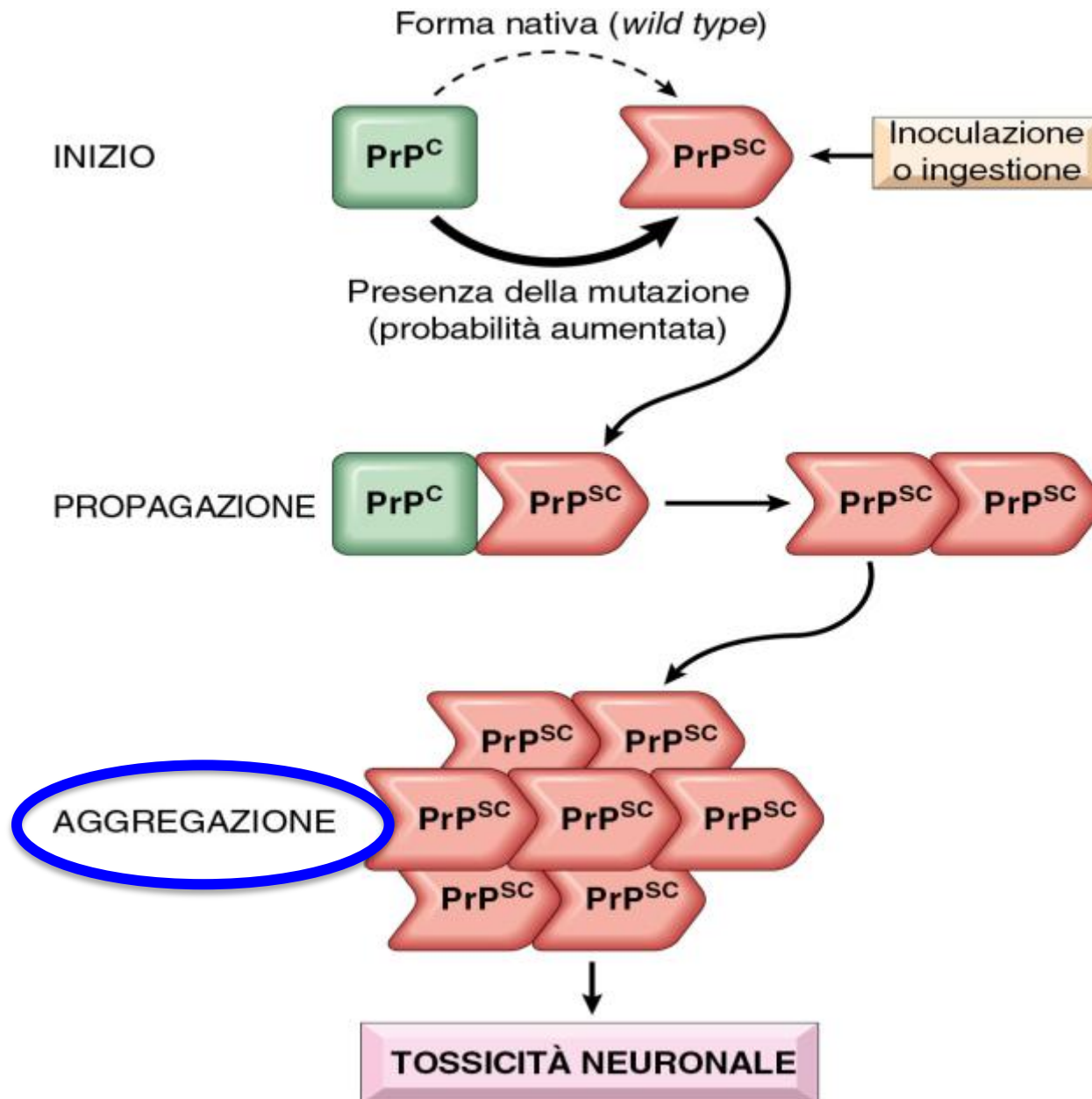
Il prione buono (PrPc).... e quello cattivo (PrPsc)
resistente a tutto e “contagioso”

Le proteine prioniche esistono in una conformazione solubile ad α -elica che può ripiegarsi erroneamente costituendo una struttura a foglietti β che forma aggregati. Questi ultimi catalizzano alterazioni conformazionali di altre molecole propagando l'aggregazione e la formazione di fibre insolubili.



La conversione PrPc \rightarrow
PrPsc è autocatalitica

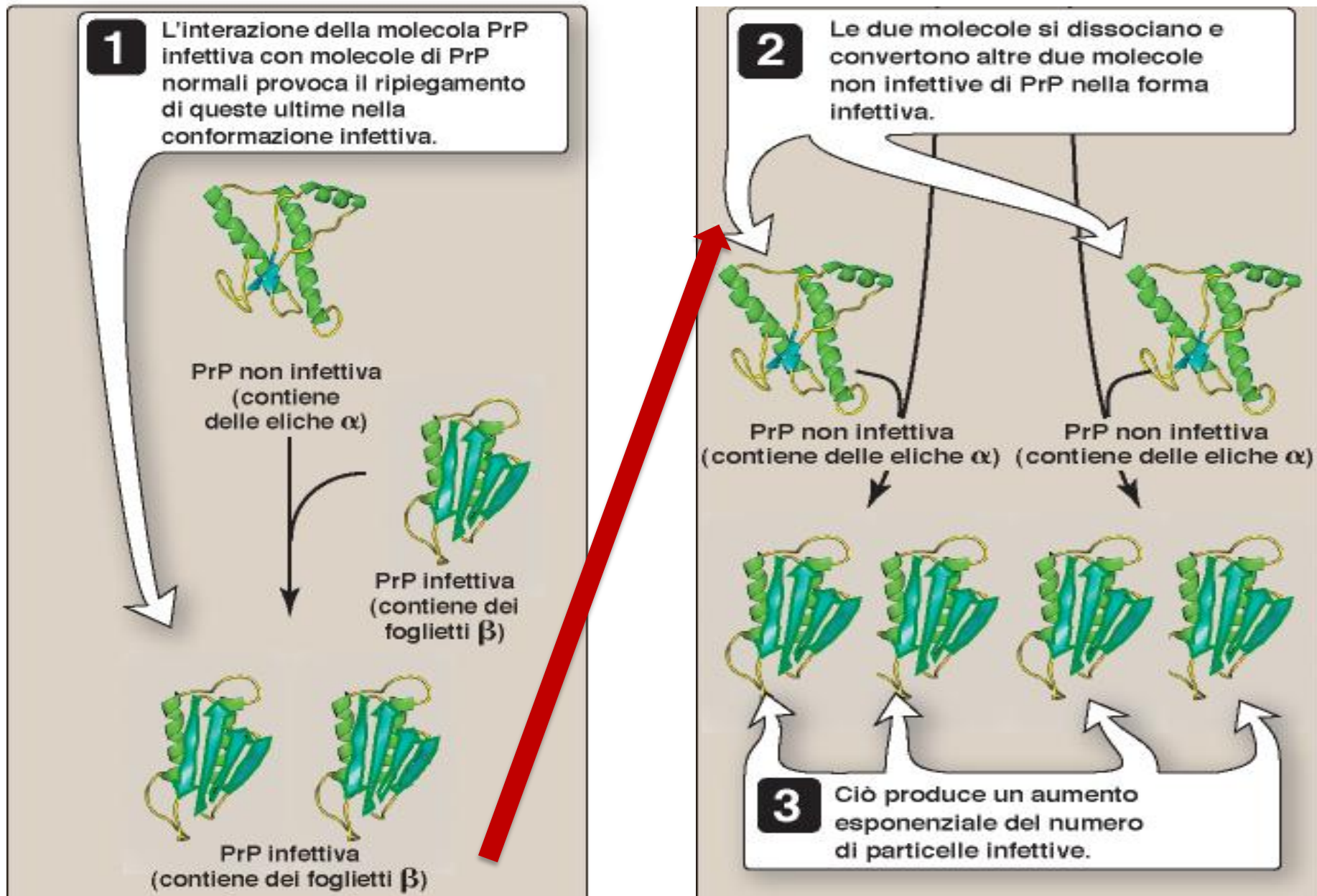
Patogenesi delle malattie prioniche



La PrP^C ad α -elica può passare spontaneamente alla conformazione PrP^{Sc} a foglietti β evento più frequente nelle forme familiari associate a PrP della linea germinale.

La PrP^{Sc} può anche essere di origine esogena (da cibo contaminato, strumenti medici o farmaci). Una volta formata la PrP^{Sc} interagisce fisicamente con altre PrP^C e le converte a PrP^{Sc} inducendo **la formazione di aggregati patogeni**.

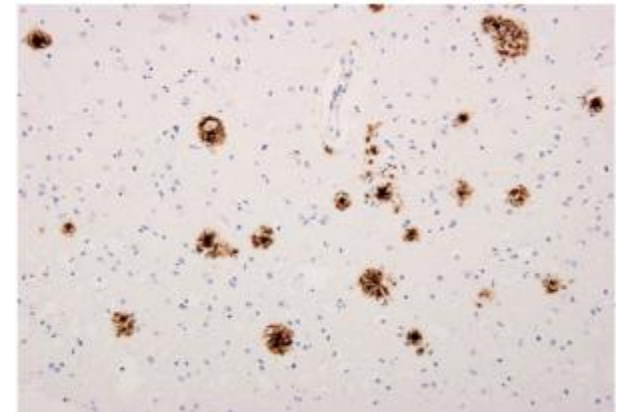
Le proteine prioniche alterate sono a loro volta capaci di "infettare" quelle adiacenti



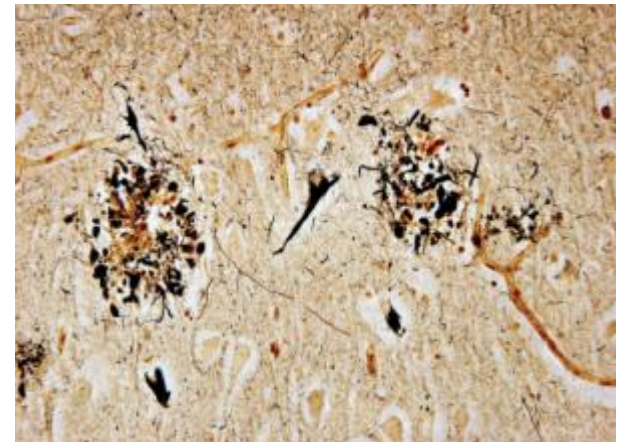
Malattia di Alzheimer



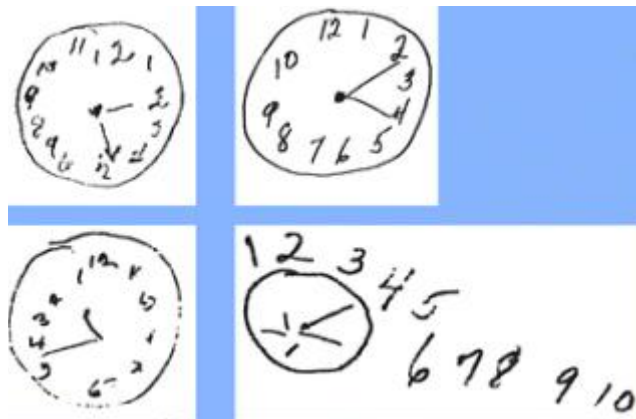
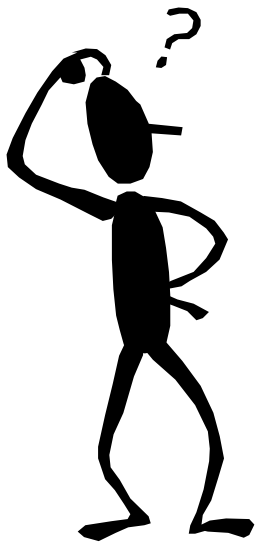
Malattia neurologica progressiva debilitante che porta a perdita irreversibile di memoria, orientamento, linguaggio, giudizio, personalità ed altre capacità, fino alla completa dipendenza da assistenza. Tempo di sviluppo: circa 8 anni dopo la diagnosi.



Placche β -amiloidi costituite dall'aggregazione del peptide A β nell'encefalo.



Grovigli neurofibrillari (NFTs) costituiti dall'aggregazione della proteina Tau iperfosforilata nei neuroni

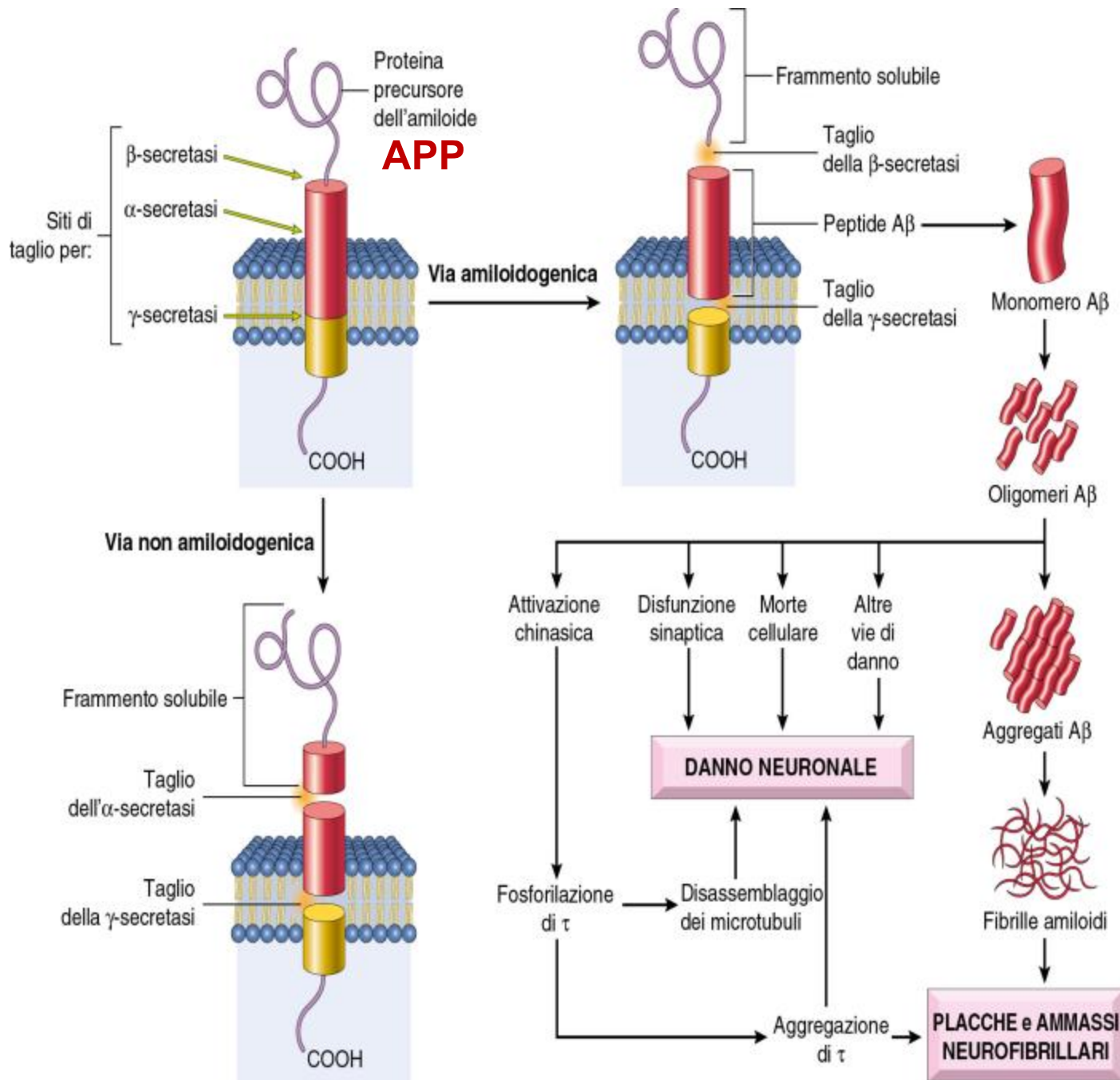


Diagnosi per mezzo di Test neuropsicologici

Prove istologiche (*post-mortem*) nel cervello: depositi di placche β -amiloidi e ammassi neurofibrillari (*in vivo* con PET)

Diagnosi *in vivo* con Tomografia da emissione di positroni (PET)

Formazione del peptide β amiloide ($A\beta$) nella malattia di Alzheimer



Il taglio della proteina precursore della β amiloide (APP) a opera della α -secretasi e della γ -secretasi genera un peptide solubile innocuo, mentre il taglio da parte dell'enzima di conversione della β -amiloide o β -secretasi e della γ -secretasi rilascia peptidi $A\beta$ che formano aggregati patogeni e contribuiscono alle placche e agli ammassi neurofibrillari tipici di questa patologia.

APP=amyloid precursor protein

Cosa hanno in comune queste patologie?

- **Malattia di Alzheimer**



- **Encefalopatie spongiformi Trasmissibili (TSEs) o malattie prioniche:**

nell' uomo: malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD)

sporadica

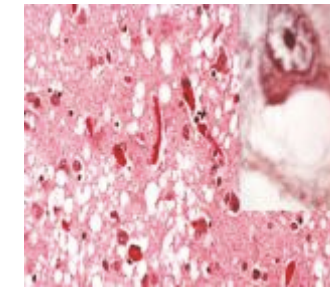
familiare

iatrogena

varianti della CJD

nella pecora: Scrapie ovina

nei bovini: Encefalopatia Spongiforme Bovina



- **Malattia di Parkinson; Demenza con corpi di Lewy**



- **Sclerosi amiotrofica laterale**



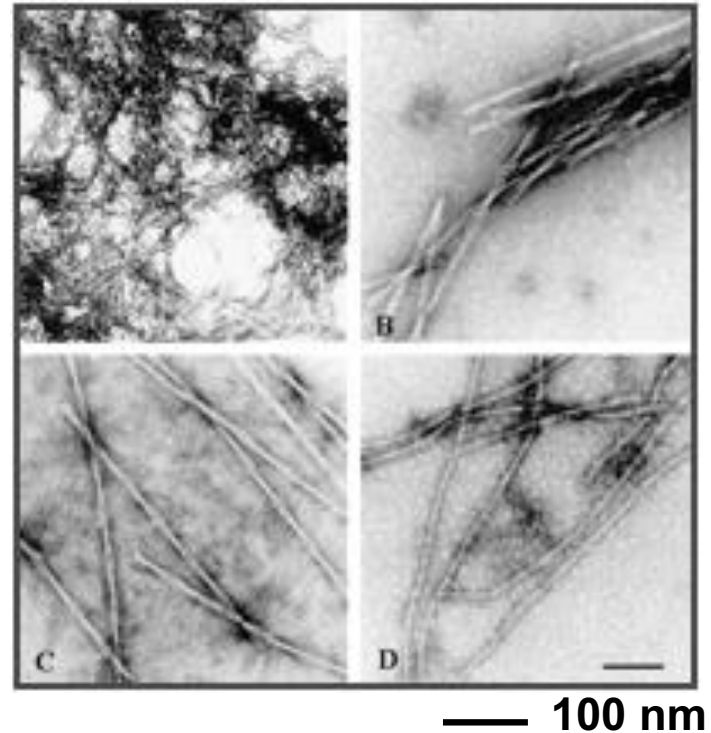
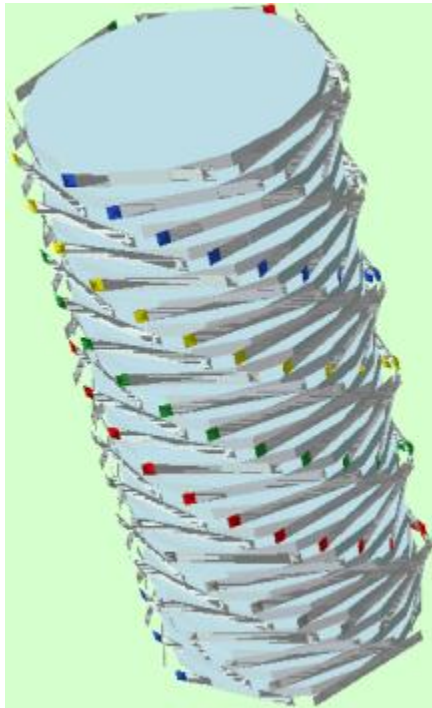
- **Malattia di Huntington**



*fotomicrografie
«post mortem»
di sezioni
istologiche di
tessuto
cerebrale*

Cosa hanno in comune queste patologie?

Formazione di fibrille amiloidi che costituiscono il centro del deposito



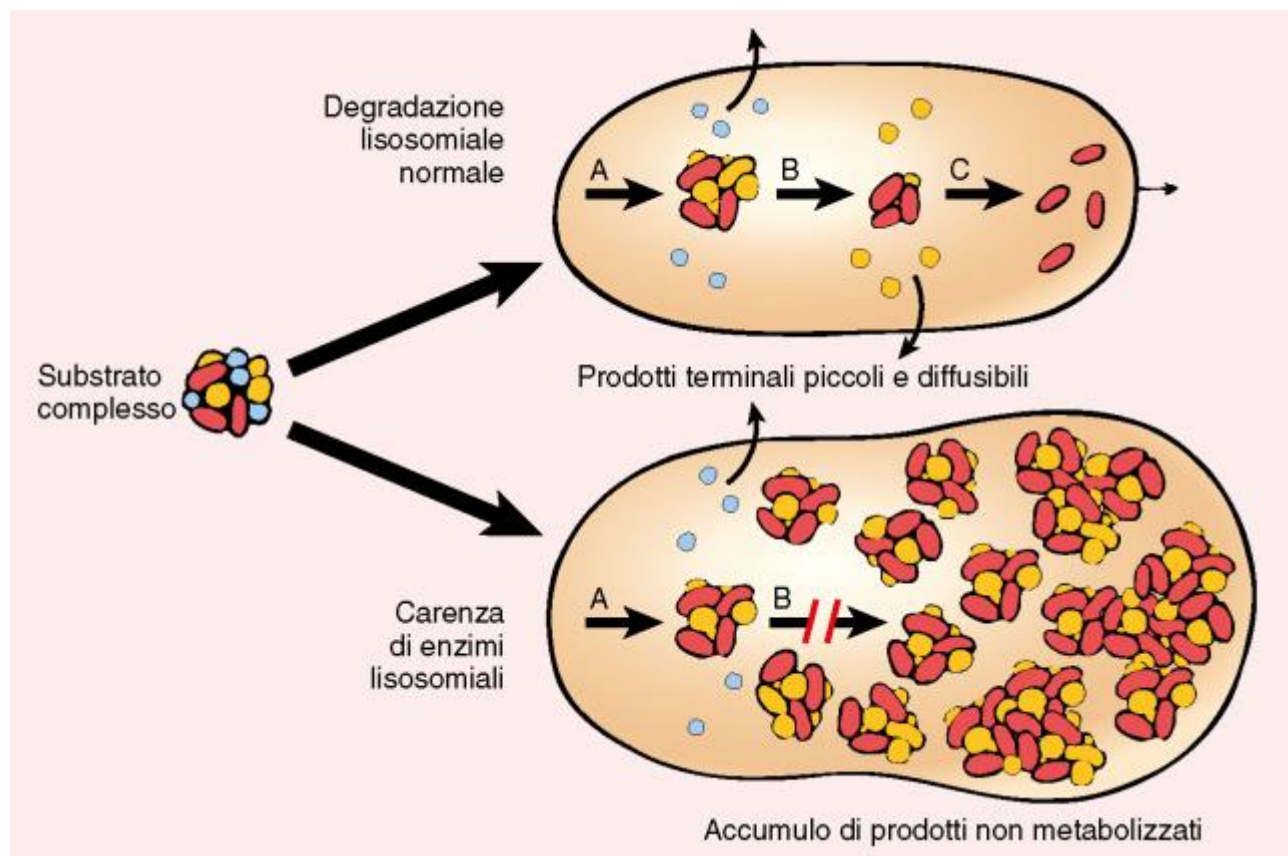
Le fibrille si formano per **aggregazione di peptidi o proteine** che vivono spesso un'esistenza da Dr. Jekyll - Mr. Hyde (PrP, APP, α -sinucleina) nel **processo folding - misfolding**.

Degradazione lisosomiale

I lisosomi sono elementi chiave del "sistema digestivo intracellulare"
catabolismo cellulare

I lisosomi sono ricchi di enzimi idrolitici definiti **idrolasi acide**.

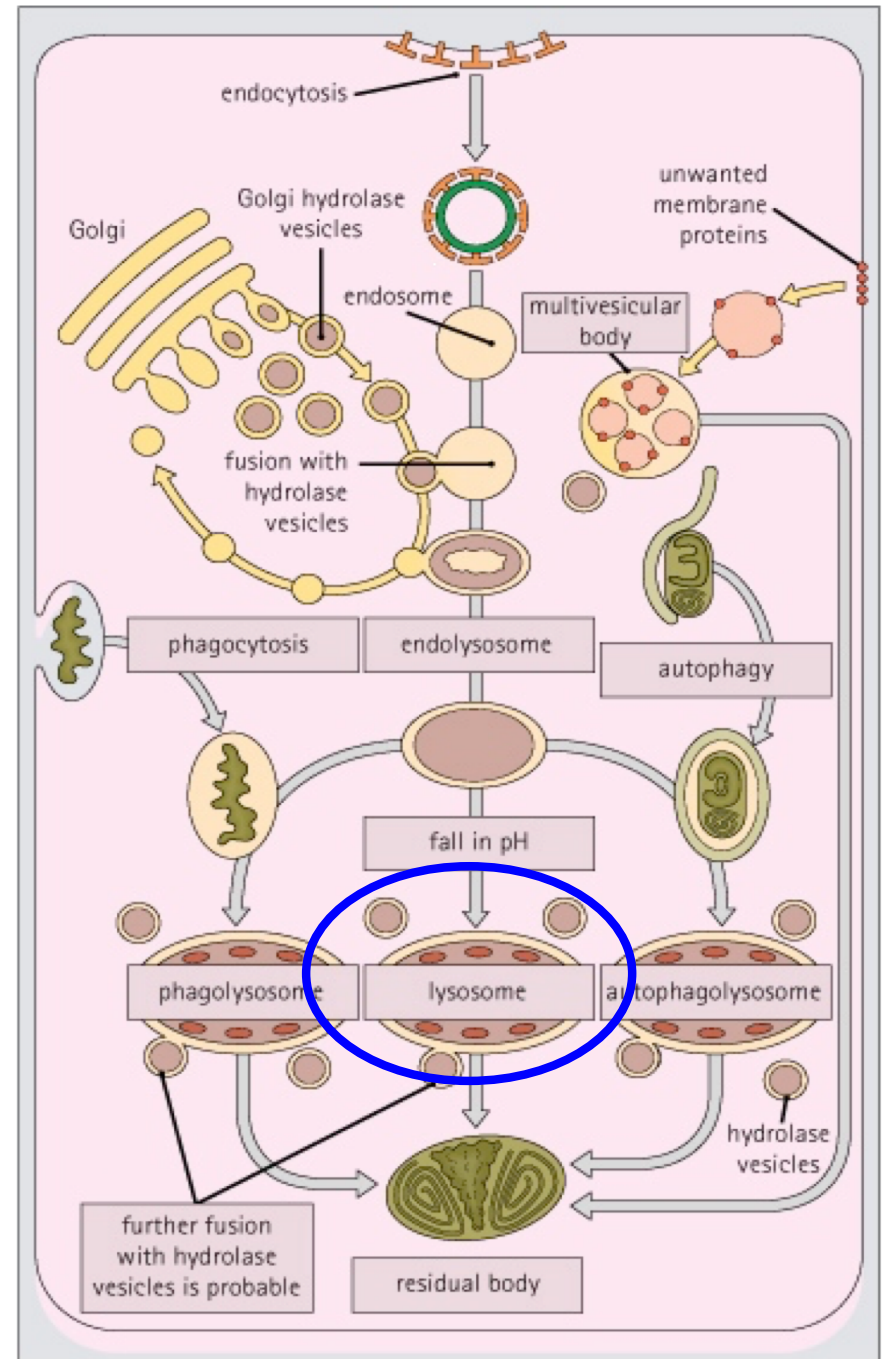
Le **malattie da accumulo lisosomiale** (malattia di Tay-Sachs, malattia di Gaucher, malattia di Pompe) sono dovute a mutazioni ereditarie di geni per enzimi lisosomiali che provocano accumulo e stoccaggio di substrati complessi nei lisosomi con deficit di autofagia e lesioni cellulari.



In questo esempio un substrato complesso è normalmente degradato da una serie di enzimi lisosomiali (A; B e C) in prodotti terminali solubili. In caso di carenza o disfunzione di uno degli enzimi (nell'esempio B) il catabolismo è parziale e gli intermedi insolubili si accumulano nei lisosomi.

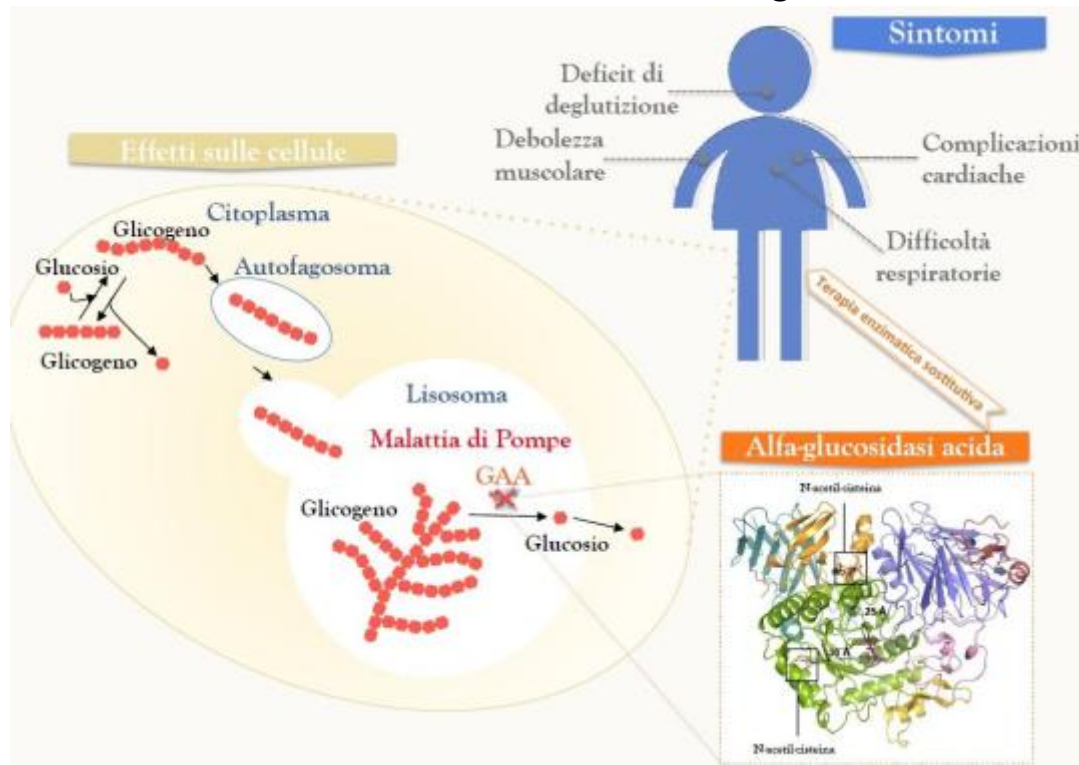
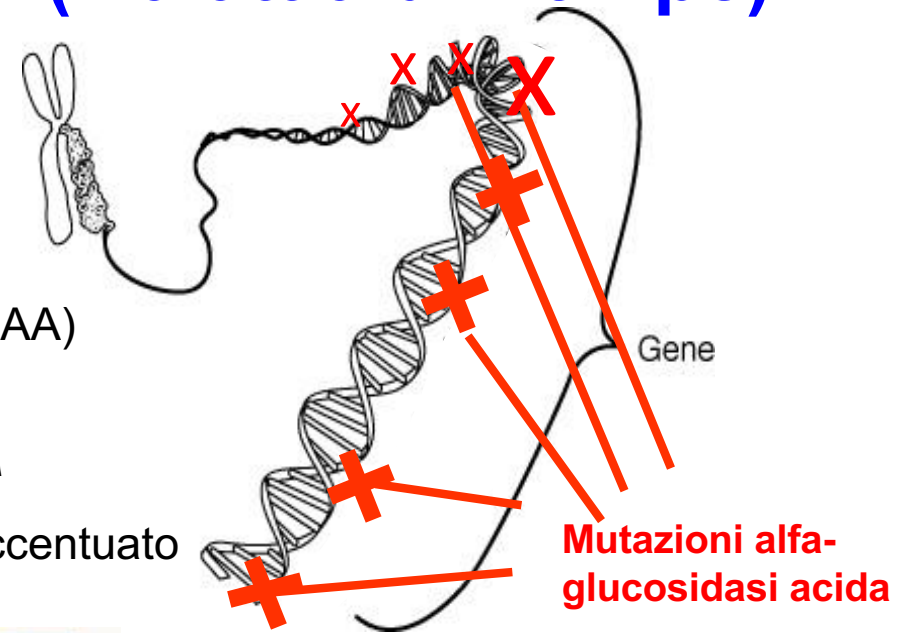
Malattie da accumulo di glicogeno

Malattie da accumulo sono anche alcune forme di **glicogenosi** che riguardano il malfunzionamento di sistemi di smaltimento cellulare ed interessano i sistemi vescicolari (lisosomi).

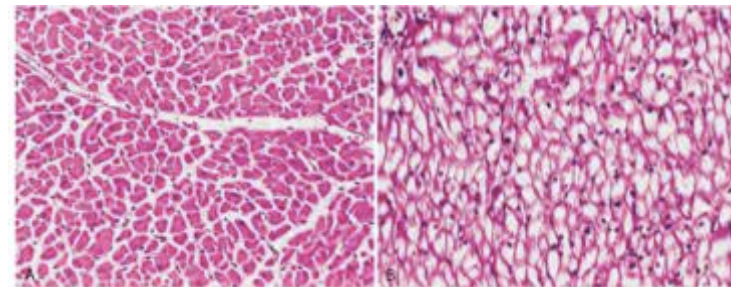


Glicogenosi di tipo II (Malattia di Pompe)

- Frequenza: 1: 40.000
- Accumulo di glicogeno nei lisosomi dovuto al mancato smaltimento
- Deficit enzimatico: alfa-glucosidasi acida (GAA) (**maltasi acida**) che risiede nei lisosomi
- Difetto molecolare: mutazioni del gene GAA
- Accumulo generalizzato di glicogeno, più accentuato nel cuore, muscolo scheletrico, fegato



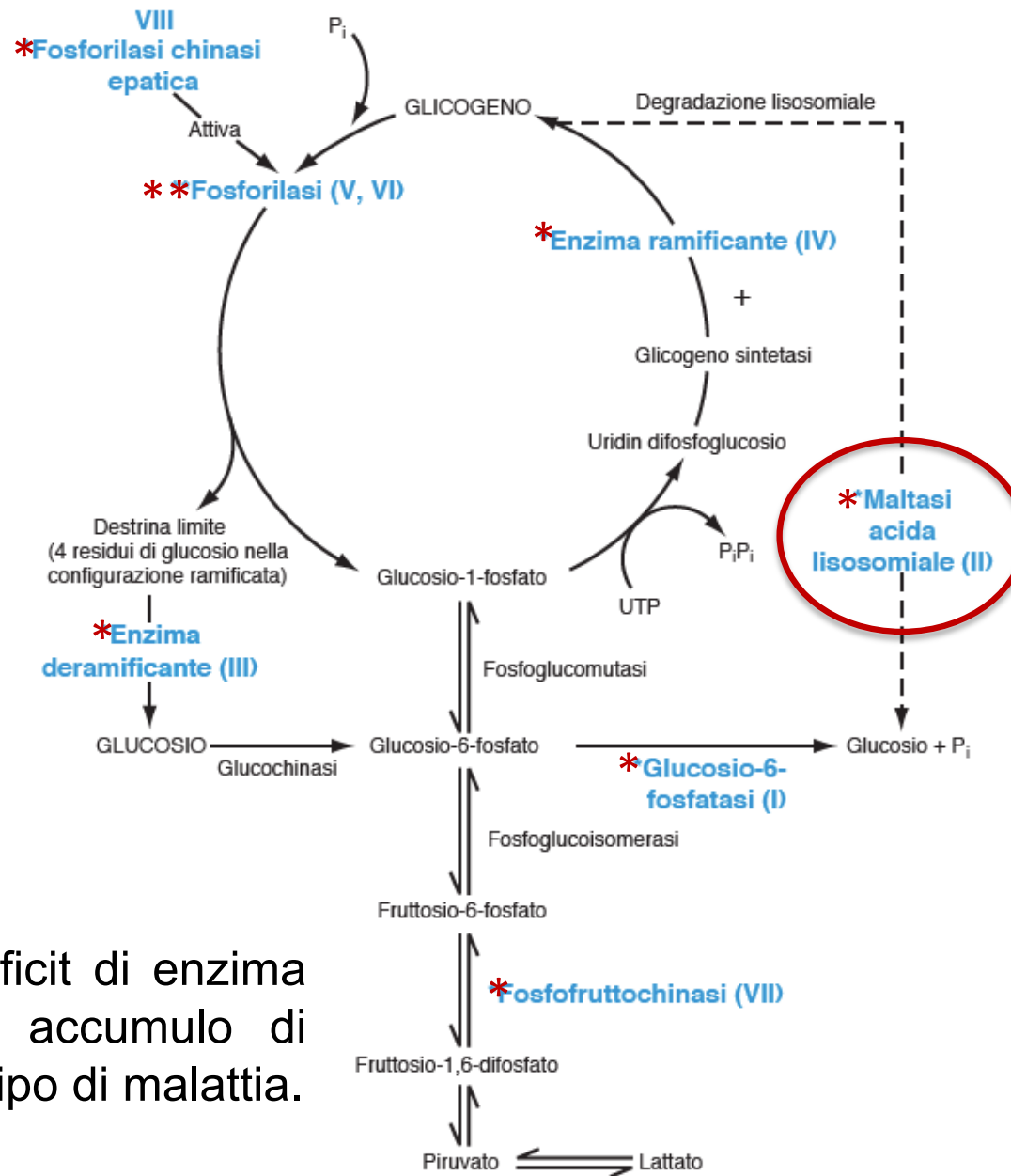
Eterogeneità genetica:
finora descritte 272 mutazioni del gene GAA malattia
autosomica recessiva
(<http://www.pompecenter.nl>)



Miocardio normale con
abbondante citoplasma
eosinofilo

Miocardio da paziente con malattia
di Pompe. Fibre miocardiche con
accumuli di glicogeno visibili come
spazi chiari

Vie del metabolismo del glicogeno e malattie da accumulo (glicogenosi)



Gli asterischi marcano i deficit di enzima associati alle malattie da accumulo di glicogeno ed in parentesi il tipo di malattia.

