

Titolo del progetto: “La pianta come sistema modello per lo studio del controllo di qualità del reticolo endoplasmico in condizioni fisiologiche e di stress”.

Descrizione intervento:

Introduzione

Tutti gli eucarioti dipendono per la loro sopravvivenza da N-glicoproteine per lo svolgimento di importanti processi cellulari come trasporto, mobilità, metabolismo ed immunità per citarne alcuni. Data la centralità di questi processi cellulari non è sorprendente che le N-glicoproteine siano soggette ad uno stretto **controllo di qualità nel reticolo**. Questo macchinario comprende molti enzimi e chaperoni ivi residenti ed esplica la sua funzione di controllo per mezzo di quello che viene chiamato “*ciclo della Calnexina*”.

I punti chiave di questo ciclo sono costituiti da due enzimi: UDP-glucosio glicoproteina glucosiltransferasi (**UGGT**) e α -glucosidasi II (**α -Glu II**). UGGT è un enzima che funge da checkpoint, riconosce glicoproteine malripiegate e le contrassegna trasferendo un glucosio dall'UDP-glucosio al glicano della proteina: con questo segnale le glicoproteine malripiegate sono impossibilitate a lasciare il reticolo endoplasmico e le glicoproteine monoglucosilate possono entrare di nuovo in contatto con le lectine di reticolo (Calnexina e Calreticulina) e gli chaperoni ad esse associati. La riglucosilazione mediata da UGGT dà quindi alla glicoproteina malripiegata una nuova opportunità di assumere la giusta conformazione.

Quando la glicoproteina ha assunto la giusta conformazione, l' α -Glu II rimuove il glucosio aggiunto da UGGT, e la glicoproteina può lasciare il reticolo endoplasmico e riprendere il percorso lungo la via di secrezione. Se, invece, la glicoproteina risultasse ancora malripiegata questa può essere nuovamente ri-glucosilata da UGGT che la sottopone ad un nuovo ciclo di interazione con le lectine e gli chaperoni, oppure, se irrimediabilmente malripiegata, subisce un altro ri-arrangiamento del glicano da parte delle **mannosidasi** presenti nel reticolo endoplasmico e viene inviata al complesso di degradazione associato al RE.

Attività sperimentale

Nel corso del presente progetto di collaborazione con il Dipartimento di Biochimica dell'Università di Oxford abbiamo partecipato al progetto che ha portato alla definizione della struttura di due importanti componenti del controllo qualità del reticolo endoplasmico: l'UDP-glucosio glicoproteina glucosiltransferasi (**UGGT**, Roversi et al. 2017. PNAS 114: 8544-8549) e α -glucosidasi II (**α -Glu II**, Caputo et al. 2016. PNAS 113: E4630-8) del fungo termofilo *Chaetomium thermophilum*.

Durante la presenza in Italia del Dott. Pietro Roversi presso il CNR-ISPA, Unità di Lecce abbiamo posto le basi per un nuovo progetto di ricerca finalizzato alla produzione biotecnologica su larga scala delle ERAD mannosidasi di reticolo (EDEM mannosidases; ER degradation-enhancing mannosidases). A tal fine abbiamo condotto un'analisi bioinformatica per identificare i geni di *C. thermophilum* ortologhi a quelli di *S. cerevisiae* che codificano per il complesso eterodimerico HTM1P:PDI1P, che comprende un α (1,2)-mannosidasi (HTM1P) e una disolfuro isomerasi (PDI1P). Infatti è stato ipotizzato che le EDEM-mannosidasi utilizzino disolfuro isomerasi per il sensing del malripiegamento delle glicoproteine.

Primers specifici per HTM1P e PDI1P sono stati disegnati ed utilizzati in prove di amplificazione utilizzando cDNA di *C. thermophilum*.

Al momento è stato messo a punto il protocollo di amplificazione della PDI1P. Il gene è stato sequenziato e poi clonato in un opportuno vettore. Sono attualmente in corso esperimenti per il clonaggio del gene in un vettore per l'espressione su media scala della proteina ricombinante.

Attività di discussione e preparazione manoscritto

Lo stage del Dott. Pietro Roversi è stato un momento molto utile per la discussione e la revisione critica di un nuovo lavoro scientifico finalizzato allo studio funzionale dei domini tioredossina-simili presenti e descritti per la prima volta nella struttura di UGGT nel lavoro recentemente pubblicato (Roversi et al. 2017. PNAS 114: 8544-8549). Tale lavoro sarà inviato per la pubblicazione a breve.

Attività seminariale

Durante il suo stage presso l'ISPA-CNR di Lecce, il dott. Pietro Roversi ha tenuto il 15 dicembre un seminario dal titolo:

“Il magico mondo delle proteine e della loro struttura”, presso l'aula magna del liceo scientifico “C. De Giorgi” nell'ambito di una serie di seminari di divulgazione scientifica sulle biotecnologie.

Lecce, 13-02-2018

In Fede

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Angelo B...', is written below the text 'In Fede'.