

Traffico intracellulare di proteine COP dipendente: rilevanza nella patologia umana

Roberta Russo*, Maria Rosaria Esposito*, Achille Iolascon* **

* CEINGE Biotechnologie Avanzate, Napoli, Italia; ** Dipartimento di Biochimica e Biotechnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italia

Riassunto

L'interazione dinamica tra il *folding* e l'esporto/trasporto delle proteine, definita *proteostasi*, è un argomento di notevole interesse per il suo potenziale ruolo in un elevato numero di patologie. Molte malattie, attribuite a difetti del traffico vescicolare, sono disturbi primari del ripiegamento delle proteine e del loro assemblaggio. Tuttavia, un numero crescente di patologie sono direttamente imputabili a difetti del macchinario di trasporto. In questo contesto, il complesso proteico di rivestimento vescicolare di tipo II (COPII) svolge un ruolo fondamentale: esso, infatti, media il trasporto anterogrado dal reticolo endoplasmatico verso l'apparato di Golgi di una vasta gamma di proteine (cargo).

Questa *review* si propone di descrivere i disordini genetici associati a difetti nelle funzioni della via secretoria. In particolare, ci concentreremo sulle patologie dovute ad alterazioni di I) componenti del complesso COPII, II) recettori-cargo del compartimento intermedio reticolo endoplasmatico-Golgi, III) proteine residenti nel reticolo endoplasmatico, IV) proteine coinvolte nel traffico vescicolare ciliare.

Summary

The dynamic interplay between folding and export of proteins, termed proteostasis, is a very exciting topic receiving considerable interest for its potential to intervene in a number of disease states. Many diseases that are attributed to trafficking defects are primary disorders of protein folding and assembly. However, an increasing number of disease states are now directly attributable to defects in trafficking machinery. In this context, cytoplasmic coat protein (COP)II complex plays a pivotal role. It is a multi-subunit complex which mediates the accumulation of secretory cargo, the deformation of the membrane and generation of subsequent anterograde transport of correctly folded secretory cargo that bud from the ER towards the Golgi apparatus. This review attempts to describe human genetic disorders associated to defects in secretory pathway functions. In particular, we will focus on diseases due to alterations of I) COPII components, II) cargo-receptor proteins of the ERGIC compartment, III) ER-resident proteins, IV) proteins involved into vesicular trafficking to the cilium.

Introduzione

L'omeostasi delle proteine negli eucarioti, definita *proteostasi*, è l'insieme di processi biologici che preservano l'integrità del proteoma mediante il controllo della sintesi proteica, del *folding* e dell'esporto/trasporto delle proteine. Quest'ultimo rappresenta un argomento di notevole interesse per il suo potenziale ruolo in un certo numero di patologie.

Le nostre attuali conoscenze circa la via di secrezione delle proteine originano dal lavoro di Palade, in cui venne descritta l'ipotesi del trasporto vescicolare, secondo la quale il trasferimento di molecole cargo tra organelli intracellulari è mediato da vescicole di trasporto (Palade, 1975) (Fig. 1). In tal modo, le proteine di nuova sintesi passano attraverso una serie di organelli, tra cui il reticolo endoplasmatico (ER), il complesso del Golgi e i granuli secretori, dirette verso lo spazio extracellulare.

La caratterizzazione dei meccanismi molecolari e dei singoli componenti coinvolti nel trasporto vescicolare origina dai lavori di Schekman e Rothman. Il primo ha avuto la lungimiranza di scegliere come organismo modello *Saccharomyces cerevisiae*, quando non era ancora chiaro che il lievito avesse un apparato secretorio molto simile a quello degli eucarioti superiori. La facilità di manipolare geneticamente il lievito ha permesso di isolare mutanti sensibili alla temperatura (Sec) e difettivi nella secrezione proteica (Novick et al., 1980). Ancora oggi, *S. cerevisiae* è il sistema migliore nell'ambito

dello studio del trasporto vescicolare. D'altro canto, gli studi condotti dal gruppo di Rothman hanno permesso la caratterizzazione del complesso vescicolare nelle cellule eucariotiche di mammifero: si è così scoperto che le proteine Sec del lievito sono filogeneticamente ortologhe a quelle di mammifero, rivelando che gli elementi principali del macchinario di trasporto sono conservati in eucarioti evolutivamente lontani (Balch et al., 1984).

Le proteine nascenti contengono nella loro sequenza primaria elementi di localizzazione che vengono decifrate dal macchinario di trasporto, che provvede così al loro corretto indirizzamento (Fig. 1). I complessi proteici di rivestimento vescicolare sono i componenti principali di questa macchina organizzativa. Tre sono quelli ben caratterizzati: rivestimento di tipo I e II (COPI e COPII), e la clatrina (Fig. 2).

Un numero cospicuo di patologie genetiche sono imputabili a difetti del macchinario di trasporto. Questa *review* si propone di descrivere le patologie genetiche umane associate ad alterazioni nelle funzioni della via secretoria. I dati discussi sono stati reperiti sul database PubMed-NCBI e coprono un lasso di tempo che va dal 1975 al 2011.

Pathway di trasporto ER-Golgi

Le proteine neosintetizzate acquisiscono la loro conformazione nativa all'interno del reticolo, dove un robusto sistema di controllo di qualità opera per assicurare che la nascente proteina non ven-

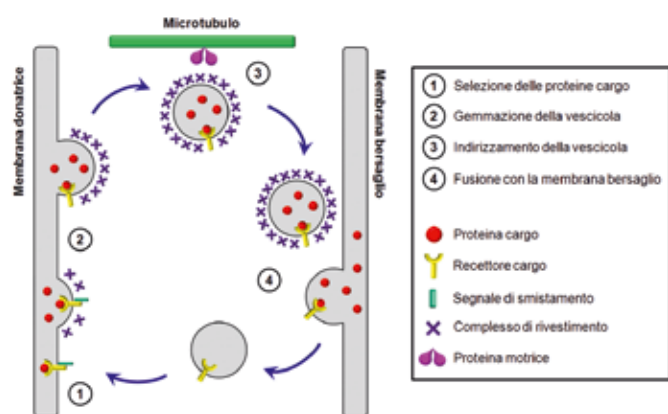
**Figura 1.**

Diagramma esemplificativo del trasporto vescicolare.

Il trasporto vescicolare può essere suddiviso in quattro fasi: 1) selezione delle proteine da trasportare, 2) gemmazione della vescicola, 3) indirizzamento della vescicola e 4) fusione con la membrana bersaglio. La vescicola gemma da una membrana definita donatrice, che permette l'incorporazione selettiva del cargo al suo interno e trattiene le proteine residenti nel compartimento donatore. La vescicola è poi indirizzata verso specifici compartimenti, dove può riversare il cargo in seguito alla fusione con la membrana bersaglio.

ga riconosciuta dal macchinario di esporto fin quando non risulti completamente conformata. Tale sistema agisce mediante proteine residenti nell'ER che identificano ed eventualmente indirizzano

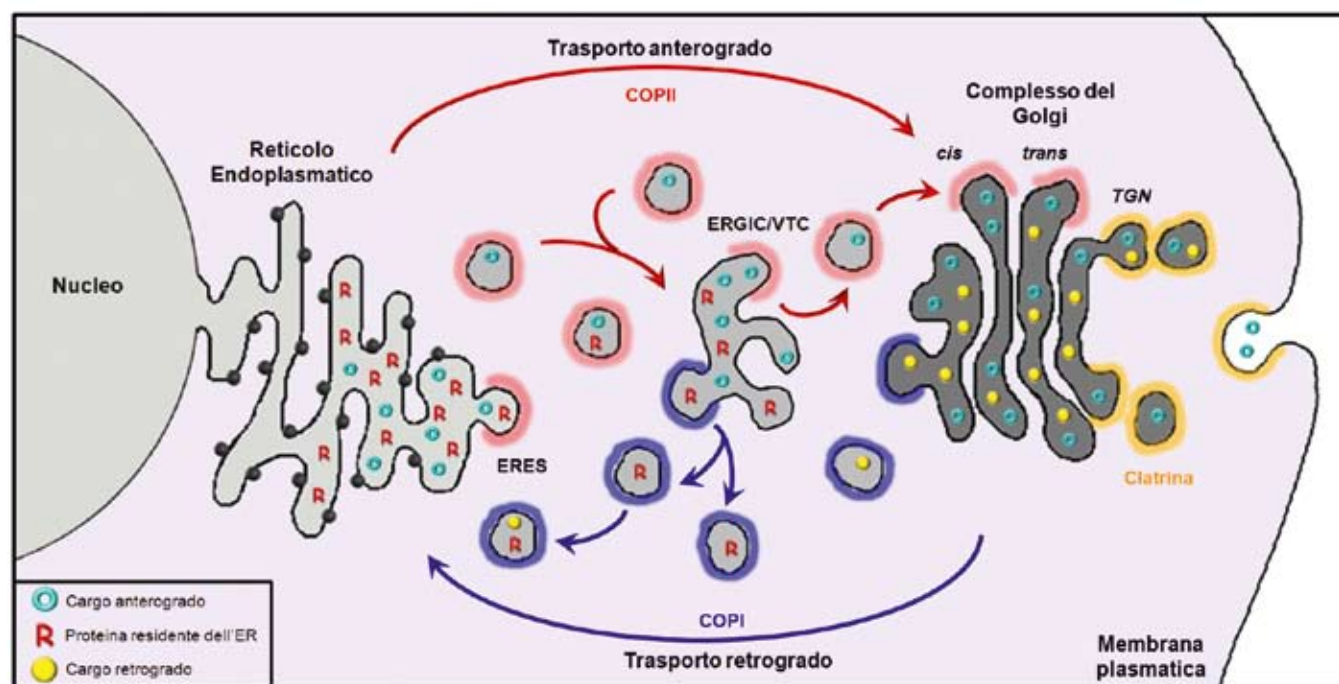
i polipetidi non correttamente conformati alla degradazione. Il conseguimento della corretta conformazione è mediato da *chaperoni* molecolari, il principale tra i quali è la proteina BiP/GRP78 (Schröder et al., 2005).

L'*export* di proteine dall'ER è stato ben caratterizzato sia in lievito (*S. cerevisiae* e *Pichia pastoris*) che in cellule di mammifero. In *S. cerevisiae* la gemmazione delle vescicole COPII dalla membrana del reticolo sembra avvenire in maniera casuale; al contrario, in *P. pastoris* e in cellule di mammifero gli eventi di vescicolazione avvengono in specifici siti del reticolo, chiamati siti di uscita dall'ER (ERES). Gli ERES si affacciano su strutture vescicolo-tubulari (VTC) note come cluster ERGIC, compartimenti membranosi intermedi ER-Golgi ricchi di proteine cargo, che mediano il trasporto proteico tra ER e Golgi. Il traffico anterogrado COPII-mediato è bilanciato da quello retrogrado, mediato da COPI, che svolge il ruolo di riciclare i componenti di rivestimento vescicolare e di recuperare le proteine residenti dell'ER (Lee et al., 2004) (Fig. 2).

Assemblaggio del complesso COPII

Nel lievito, le vescicole COPII originano dal legame sequenziale di Sar1-GTP, delle proteine del rivestimento interno Sec23-Sec24 e di quelle del rivestimento esterno Sec13-Sec31 sul reticolo endoplasmatico (Fromme et al., 2008) (Fig. 3).

A differenza del lievito, la complessità del macchinario di trasporto nelle cellule di mammifero è di gran lunga maggiore; si assiste, infatti, ad un aumento del numero e dei tipi di proteine di rivestimento, GTPasi regolatorie, segnali di indirizzamento. Come vedremo nel

**Figura 2.**

Pathway di trasporto intracellulare.

Le vescicole COPII, in rosso, gemmano dal reticolo endoplasmatico in specifici siti, chiamati ERES (*ER exit sites*), che si affacciano su strutture vescicolo-tubulari, note come VTC (*vesicular-tubular structures*) o cluster ERGIC (*ER-Golgi intermediates compartment*), ovvero compartimenti membranosi intermedi ER-Golgi. Il compartimento ERGIC/VTC è ricco di proteine cargo, indirizzate al Golgi, e di proteine residenti dell'ER, che vengono recuperate dal traffico retrogrado COPI (in blu), che svolge anche il ruolo di riciclare i componenti dei complessi proteici di rivestimento vescicolare. Inizialmente si riteneva che le vescicole di clatrina partecipassero alla maggior parte, se non a tutte, le fasi di trasporto vescicolare all'interno della cellula. Tuttavia, studi successivi hanno dimostrato che la funzione di queste vescicole è limitata a percorsi post-Golgi, tra cui la membrana plasmatica e la *network* trans-Golgi (TGN).

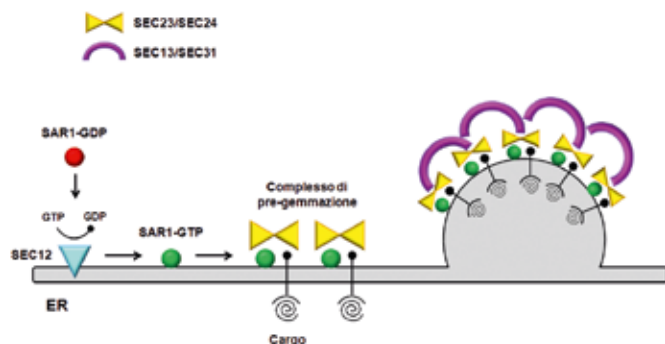


Figura 3.

Assemblaggio del complesso COPII.

La formazione delle vescicole COPII sulla membrana dell'ER inizia con l'attivazione della piccola proteina GTPasi Sar1 ad opera del suo fattore di scambio nucleotidico GDP a GTP (*guanine exchange factor*, GEF), Sec12. Segue il reclutamento del complesso eterodimerico Sec23/24. Sec23 è una proteina GAP, ovvero attivante la funzione GTPasica di Sar1, laddove Sec24 è la proteina adattatrice adibita al reclutamento del cargo specifico nella vescicola nascente. Il complesso di pre-gemazione, composto da Sar1-GTP/Sec23/Sec24, recluta a sua volta il complesso eterotetramero Sec13/Sec31, il rivestimento esterno, che funziona da collegamento trasversale tra i complessi pre-gemazione adiacenti e garantisce la completa biogenesi della vescicola.

prossimo paragrafo, uno dei modi in cui l'evoluzione modifica una funzione biologica è quello di sviluppare proteine ortologhe (proteine omologhe in specie diverse) e paraloghe (proteine omologhe nella stessa specie) e isoforme, mediante, ad esempio, duplicazione genica e/o *splicing* alternativo dell'RNA messaggero.

Disordini associati a difetti del complesso COPII

Nei mammiferi sono stati identificati geni ortologhi per ciascuna delle cinque proteine fondamentali del complesso COPII e, in alcuni casi, paraloghi di queste proteine esistono, ciascuno codificato da un gene diverso. Essi sono indicati con un suffisso alfabetico. Sono stati descritti due paraloghi delle proteine Sar1, Sec23 e Sec31, indicati con A e B, e quattro di Sec24, da A a D. Ad oggi, mutazioni in tre componenti COPII sono state associate a patologie genetiche umane (Tab. I), come verrà descritto di seguito nel paragrafo.

Alterazioni del gene SEC23A. La displasia cranio-lenticolo-suturale (CLSD) (MIM 607812) o sindrome di Boyadjiev-Jabs è una condizione

autosomica recessiva caratterizzata da ritardo nella chiusura delle fontanelle, cataratta suturale, dismorfismi facciali e difetti scheletrici. È stata originariamente descritta in cinque maschi e una femmina appartenenti ad una grande famiglia saudita di origine beduina e nati da genitori consanguinei. Questa malattia dello sviluppo deriva da una mutazione missenso (F382L) nel gene *SEC23A*, mappato sul cromosoma 14q13-q21, che determina una perdita di funzione del suo prodotto proteico (Boyadjiev et al., 2006). Studi su embrioni di *zebrafish* in cui è stato iniettato il *morfolino* antisense di *sec23*, una molecola oligomerica che ne modifica l'espressione genica, hanno suggerito che l'alterato esporto dall'ER delle proteine secretorie essenziali per la corretta morfogenesi sia la causa alla base della patologia (Lang et al., 2006). L'analisi mediante microscopia elettronica e saggi di localizzazione intracellulare hanno evidenziato la presenza di una dilatazione dell'ER nei fibroblasti di individui affetti. Inoltre, tali cellule mostrano anche un'anomalia nella localizzazione citoplasmatica della proteina Sec31. Infatti, saggi *in vitro* hanno rivelato che la forma mutata di *SEC23A* recluta erroneamente il complesso Sec13-Sec31, inibendo la formazione delle vescicole. Le cellule dei pazienti affetti accumulano numerosi ERES tubulari ricchi di proteine cargo ma privi del rivestimento vescicolare; questa osservazione suggerisce che il complesso di pre-gemazione Sec23-24 è sufficiente a formare tubuli contenenti cargo, mentre il complesso Sec13-31 è fondamentale per la fissazione della membrana.

Alterazioni del gene SEC23B. Il gene *SEC23B*, localizzato sul cromosoma 20p11.23, codifica per la seconda proteina paraloga di Sec23. Mutazioni a suo carico causano l'anemia congenita diseritropoietica di tipo II (CDA II, MIM 224100), un disordine autosomico recessivo caratterizzato da anemia da moderata a grave, ittero cronico o intermittente, splenomegalia, eritropoiesi inefficace, reticolocitosi non adeguata al grado di anemia (Iolascon et al., 2001). Il midollo osseo presenta iperplasia eritroide, con più del 10% di bi- o multi-nuclearità degli eritroblasti, che mostrano al microscopio elettronico un peculiare aspetto di doppia membrana plasmatica: l'effetto è, in realtà, generato dalla presenza di vescicole dell'ER che si localizzano parallelamente al di sotto della membrana stessa, suggerendo un difetto nel traffico vescicolare. Ulteriore caratteristica è l'alterazione del processo di glicosilazione a carico di diverse proteine eritrocitarie: patognomica della condizione è, infatti, la ridotta glicosilazione della proteina di membrana Banda 3 (Iolascon et al., 2011). La distribuzione geografica dei pazienti suggerisce una elevata prevalenza in Italia (2.49 casi/milione) rispetto all'Europa centro-nord (0.04 casi/milione) (Heimpel et al., 2010). Ad oggi, 53 differenti mutazioni patogenetiche sono state descritte, localizzate

Tabella I.

Patologie umane associate a difetti di proteine del complesso COP II.

Patologia	Gene	Localizzazione cromosomica	Funzione proteica	Trasmissione	Caratteristiche cliniche	Prevalenza
Displasia cranio-lenticolo-suturale (CLSD)	SEC23A	14q21.1	GAP	AR	Ritardo nella chiusura delle fontanelle, cataratta suturale, dismorfismi facciali, difetti scheletrici	< 1/1000000
Anemia diseritropoietica congenita di tipo II (CDA II)	SEC23B	20p11.2	GAP	AR	Anemia, ittero, ridotto numero di reticolociti, splenomegalia, emocromatosi	2.49/1000000*
Malattia da ritenzione di chilomicroni (CMRD)	SAR1B	5q31.1	GTPase	AR	Malassorbimento dei grassi, ipobetalipoproteinemia	Non nota

* Prevalenza relativa alla popolazione italiana.

lungo l'intera regione codificante del gene (Schwarz et al., 2009; Iolascon et al., 2011). Pazienti omozigoti per mutazioni nonsense non sono stati identificati; ciò suggerisce che tale genotipo possa essere letale. Nonostante l'elevata eterogeneità allelica, esiste una correlazione genotipo-fenotipo nei pazienti affetti: infatti, l'associazione di una mutazione missenso e una nonsense tende a produrre una presentazione clinica più grave del genotipo composto da due mutazioni missenso. Sebbene la maggior parte delle mutazioni siano il risultato di eventi sporadici e indipendenti, quattro rappresentano più del 50% degli alleli mutati, il che costituisce una guida per una diagnosi molecolare mirata (Iolascon et al., 2010). Un clusterizzazione di queste mutazioni sembra essere rilevante nel Sud Italia, dove è stato osservato un effetto fondatore per una delle mutazioni più frequenti (R14W) (Russo et al., 2011).

Alterazioni del gene *SAR1B*. Malattia di Anderson (ANDD) o malattia da ritenzione di chilomicroni (CMRD) (MIM 246700) sono termini utilizzati per descrivere un disordine da malassorbimento dei lipidi, causato da un difetto intestinale nel trasporto degli stessi e dal fallimento della formazione di chilomicroni; la malattia è caratterizzata da ipobetalipoproteinemia con assenza selettiva di apoB48 (Peretti et al., 2010). I primi casi di neonati con steatorrea grave sono stati descritti circa 30 anni fa (Anderson et al., 1961). La condizione viene di solito diagnosticata nei bambini che presentano deficit di crescita, diarrea cronica e ipocolesterolemia. Il difetto molecolare che sottende la patologia è stato descritto nel 2003 e consiste in mutazioni a carico del gene *SAR1B*, codificante per una delle due proteine paraloghe di Sar1 (Jones et al., 2003). Analogamente a quanto osservato nella CDA II, è stato ipotizzato un carenza nella formazione e nella secrezione dei chilomicroni derivante da un difetto di glicosilazione; infatti, studi *in vitro* condotti su espianti intestinali da pazienti CMRD hanno evidenziato una normale sintesi di apoB48, con una glicosilazione aberrante (Levy et al., 1987). Gli enterociti dei pazienti non riescono a secernere chilomicroni nella linfa e di conseguenza sono sovraccarichi di piccole gocce lipidiche, che si accumulano nel citoplasma e formano strutture delle dimensioni di lipoproteine legate alla membrana, come è possibile osservare alla biopsia intestinale (Boldrini et al., 2001). La CMRD è una malattia molto rara ad ereditarietà recessiva con meno di 50 casi riportati in letteratura. I livelli ridotti sia di lipidi plasmatici che di vitamine liposolubili causano danni neurologici. In pazienti giovani sono state spesso riscontrate manifestazioni neuro-retiniche. I segni neurologici si possono sviluppare più frequentemente in fase tardiva in soggetti non trattati e, in genere, consistono nella perdita di riflessi tendinei profondi (Peretti et al., 2009).

Patologie umane associate a difetti del compartimento ERGIC

Nell'ambito del trasporto tra ER e Golgi, fondamentali sono i recettori-cargo (Fig. 1), proteine transmembrana che legano specifici cargo nel lume dell'ER. Ad oggi, sono stati identificati diversi recettori-cargo nel lievito. L'unico ad essere stato ben caratterizzato nelle cellule di mammifero è il complesso LMAN1-MCFD2 (Zheng et al. 2010). Alterazioni a carico di tale complesso sono alla base del deficit combinato di fattore V e fattore VIII (F5F8D), un disturbo autosomico recessivo della coagulazione, ben distinto dalla co-eredità della carenza dei due fattori. La condizione è caratterizzata da una tendenza al sanguinamento che si manifesta durante o dopo traumi, interventi chirurgici, e aborti. Comune è la menorragia, mentre risultano piut-

tosto rare ematuria, sanguinamento gastrointestinale e intramuscolare. Si tratta di una malattia molto rara, con meno di 150 casi riportati (Mohanty et al., 2005). La più alta frequenza è stata riscontrata in ebrei orientali e sefarditi in Israele, dove consueti sono i matrimoni tra consanguinei. La maggioranza (70%) dei pazienti ha mutazioni nel gene *LMAN1* (MIM 227300) (Nichols et al., 1998), il restante in *MCFD2* (MIM 607788) (Zhang et al., 2003). Il gene *LMAN1* codifica per la proteina omonima (nota anche come ERGIC-53), una lectina che fa la spola tra l'ER e l'ERGIC. Il fattore MCFD2 è una piccola proteina solubile, che interagisce con LMAN1 e forma un complesso che funge da recettore-cargo specifico per il trasporto di FV e FVIII (Zhang et al., 2005). Oltre ai due fattori della coagulazione, anche gli enzimi lisosomiali catepsina C, catepsina Z e α 1-antitripsina sono stati segnalati come potenziali cargo del recettore. Il modello murino *Lman1* *-/-* riproduce il fenotipo umano seppur in maniera lieve; il topo deficitario, infatti, mostra livelli plasmatici di FV e FVIII del 50% rispetto ai livelli dei topi *wild type*, laddove nei pazienti affetti essi oscillano tra 5% e 30%. Inoltre, contrariamente a quanto osservato nei pazienti, non sono state riportate differenze nei livelli di enzimi lisosomiali (Zhang et al., 2011).

Patologie umane associate a difetti di proteine residenti dell'ER o di loro interattori

La sindrome di Marinesco-Sjögren (MSS) (MIM 248800) è una malattia autosomica recessiva multisistemica, le cui caratteristiche principali sono atassia cerebellare, cataratta, debolezza muscolare progressiva, bassa statura, ritardo dello sviluppo mentale; possono, inoltre, manifestarsi ipogonadismo ipergonadotropo, anomalie scheletriche, dismorfismi, epilessia, miopatia progressiva, neuropatia (Slavotinek et al., 2005). Mutazioni a carico del gene *SIL1*, mappato sul cromosoma 5q31, sono responsabili della maggior parte dei casi di MSS. Tuttavia, sono stati riportati anche alcuni casi tipici senza alterazioni in *SIL1*. *SIL1* è una proteina reticolare, associata a GRP78, fondamentale per la traslocazione delle proteine al reticolo, agendo da fattore di scambio nucleotidico per lo *chaperone*. La riduzione dei suoi livelli influenza la traslocazione, con conseguente riduzione della sintesi proteica. L'identificazione di modelli di espressione tissutale, spaziale e temporale, simili tra i due geni *SIL1* e *GRP78*, ha suggerito che l'alterata interazione *SIL1*-GRP78 costituisca l'elemento determinante per la manifestazione della sindrome. Le mutazioni in *SIL1* determinano una perdita di funzione della proteina, con conseguente scorretto ripiegamento di proteine neosintetizzate (van Raamsdonk, 2006), come si evince da biopsie di muscolo scheletrico di pazienti affetti, in cui la proteina mutata non risulta visibile (Anttonen et al., 2005). *SIL1* è espressa anche nei neuroni corticali e nelle cellule di Purkinje del cervelletto determinando manifestazioni cliniche quali le anomalie cerebrali, l'atrofia e il coinvolgimento della sostanza bianca (Reinhold et al., 2003). Il modello murino (topo *wo-ozy*), originato da una mutazione omozigote in *SIL1*, presenta atassia progressiva con perdita delle cellule di Purkinje del cervelletto, in cui si accumulano proteine ubiquitinate, con conseguente neurodegenerazione da apoptosi o da autofagia (Zhao et al., 2005).

Patologie umane associate a difetti di proteine coinvolte nel traffico vescicolare verso il ciglio

La sindrome di Bardet-Biedl (BBS, MIM 209900) è un disordine autosomico recessivo caratterizzato da degenerazione retinica, poli-dattilia e ipogonadismo. Il rene policistico è la più comune causa di

morte prematura nei bambini affetti, in associazione con le complicanze causate dall'obesità, incluso il diabete di tipo II, l'ipertensione e l'ipercolesterolemia (Tobin et al., 2007). La prevalenza stimata oscilla tra 1/160000 nel Nord Europa fino a 1/13500 in Kuwait e Terranova. La condizione è caratterizzata da un elevato livello di eterogeneità genetica: ad oggi, 14 sono i geni causativi ad essa associati. Dal momento che una correlazione genotipo-fenotipo non è stata riscontrata, è stato ipotizzato che le diverse proteine BBS agiscano tutte all'interno di un comune processo cellulare: in particolare, l'eziologia della sindrome è relazionata alla disfunzione ciliare. Il ciglio primario è un organello antico degli eucarioti che proietta dalla superficie cellulare, adibito alla trasduzione del segnale di numerosi *pathway* coinvolti nei processi di differenziamento e omeostasi cellulare (Tobin et al., 2007).

Recentemente è stato identificato il *BBSoma*, un complesso otta-merico composto da 7 proteine altamente conservate (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9) e dalla nuova BBIP10, tutte alla base del meccanismo patogenetico della BBS. Sembra che tale complesso agisca nell'ambito del traffico vescicolare verso il ciglio, formando un rivestimento e leggendo segnali di smistamento di proteine cargo. Il *BBSoma*, infatti, condivide elementi strutturali comuni alle vescicole COPI, COPII e clatrina; il suo meccanismo di assemblaggio *in vitro* si avvicina strettamente a quello delle vescicole rivestite di clatrina (Jin et al., 2010). A sostegno dell'ipotesi di un suo ruolo nel traffico vescicolare ciliare, è stato dimostrato che il recettore 3 della somatostatina fallisce nel raggiungere il ciglio primario dei neuroni ippocampali nei topi *knockout* per le proteine *bbs2* e *bbs4*.

Conclusioni

Sebbene il traffico vescicolare sia stato ormai ben caratterizzato, e un numero elevato di disordini umani risulti associato a sue alterazioni, restano ancora da chiarire diversi aspetti patogenetici. Se da un lato le alterazioni a carico delle proteine residenti del reti-

colo, coinvolte nel controllo di qualità del *folding* proteico, esitano in condizioni multisistemiche, ad esempio la MSS, dall'altro alterazioni di singoli componenti del complesso COPII sono alla base dell'insorgenza di fenotipi clinici altamente specifici e tessuto-confinati. Ciò è sicuramente dovuto alla ridondanza funzionale del complesso COPII, osservata nelle cellule di mammifero. L'esempio migliore di tale situazione ci viene offerto dai difetti a carico dei due geni paraloghi *SEC23A* e *SEC23B* che causano condizioni patologiche molto differenti tra loro, la CLSD e la CDA II. Eppure, le sequenze di queste due proteine esibiscono una similarità del 99%. Dunque, perché la loro compromissione porta a fenotipi così specifici? L'ipotesi principale è quella di un fenotipo determinato da una espressione tessuto-specifica di entrambe. In accordo a tale ipotesi, durante il differenziamento eritroide *in vitro* di cellule CD34+, si assiste ad un aumento di espressione di *SEC23B* 5-7 volte maggiore rispetto a quello di *SEC23A*, laddove nelle cellule progenitrici CD34+ i livelli di espressione di entrambi i paraloghi sono sostanzialmente uguali (Schwarz et al., 2009). Un discorso analogo sussiste per le alterazioni a carico del gene *SAR1B*, alla base della malattia di Anderson, in cui risultano colpite primariamente le cellule intestinali, pur esprimendo entrambe le isoforme di Sar1. Un'altra possibilità è quella di una distribuzione del cargo differente tra i vari paraloghi. Ulteriori studi sono indispensabili per comprendere il ruolo della ridondanza funzionale del macchinario di trasporto, definendone i cargo selettivi, al fine di riuscire ad approntare una terapia sostitutiva mirata.

Dichiarazioni finali

Gli autori non hanno alcun conflitto d'interesse da dichiarare. RR e MRE hanno reperito le informazioni in letteratura. RR ha realizzato le figure. RR, MRE e AI hanno provveduto alla stesura del testo. Siamo grati al Ministero italiano dell'Università e della Ricerca, al MUR (contributi MUR-PS 35-126/Ind), alla Regione Campania (sovvenzioni DGRC2362/07), alla Fondazione italiana Telethon (Grant GGP09044 ad AI).

Box di orientamento

Cosa si sapeva prima:

Le nostre attuali conoscenze circa la via di secrezione delle proteine originano dal lavoro di Palade che, nel 1975, descrive per la prima volta l'ipotesi del trasporto vescicolare

Negli anni '80 Schekman e Rothman iniziarono la caratterizzazione delle reazioni e dei componenti proteici coinvolti nel trasporto vescicolare. Il gruppo di Schekman ha caratterizzato nell'organismo modello *S. Cerevisiae* gli elementi principali del macchinario di trasporto vescicolare

Cosa sappiamo adesso:

Il processo evolutivo ha comportato, nelle cellule eucariotiche superiori, una maggiore specializzazione dei meccanismi di trasporto e indirizzamento delle proteine nei corretti compartimenti subcellulari

Ad ogni ortologo di lievito corrisponde, per un fenomeno di speciazione, un set di paraloghi nei mammiferi, la cui funzione in taluni casi è ancora da definire

Esiste un numero sempre crescente di patologie ereditarie direttamente imputabili a difetti del macchinario di trasporto

Quali ricadute sulla pratica clinica:

Per alcune patologie (ad esempio la CDA II) la correlazione genotipo/fenotipo ha dimostrato la rilevanza della diagnosi molecolare per la gestione clinica dei pazienti

Chaperoni molecolari potrebbero essere utilizzati come farmaci per mediare il corretto *folding* in patologie da alterato controllo di qualità delle proteine neosintetizzate (ad esempio, la MSS da deficit del gene *SIL1*)

La comprensione della ridondanza funzionale degli elementi COP, nonché la definizione del ruolo nella selezione del cargo specifico, potrebbe essere il punto di partenza per lo sviluppo di terapie future

Bibliografia

- Anderson CM, Townley RRW, Freeman M, et al. *Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood*. Med J Aust 1961;48:617-22.
- Anttonen AK, Mahjneh I, Hämäläinen RH, et al. *The gene disrupted in Marinesco-Sjögren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone*. Nat Genet 2005;37:1309-11.
- ** In questo lavoro è descritta l'identificazione del gene causativo *SIL1* della sindrome di Marinesco-Sjögren.
- Balch WE, Dunphy WG, Braell WA et al. *Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine*. Cell 1984;39:405-416.
- * Questo lavoro ha il merito di aver approntato un ingegnoso saggio, chiamato *cell free*, che è risultato essere essenziale per la caratterizzazione del complesso vescicolare nelle cellule eucariotiche di mammifero.
- Boldrini R, Biselli R, Bosman C. *Chylomicron retention disease-the role of ultrastructural examination in differential diagnosis*. Pathol Res Pract 2001;197:753-7.
- Boyadjev SA, Fromme JC, Ben J, et al. *Cranio-lenticulo-sutural dysplasia is caused by a SEC23A mutation leading to abnormal endoplasmic-reticulum-to-Golgi trafficking*. Nat Genet. 2006;38:1192-7.
- ** In questo lavoro è descritta l'identificazione del gene causativo *SEC23A* della displasia cranio-lenticolo-suturale.
- Fromme JC, Orci L, Schekman R. *Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23*. Trends Cell Biol. 2008;18:330-6.
- Heimpel H, Matuschek A, Ahmed M, et al. *Frequency of congenital dyserythropoietic anemias in Europe*. Eur J Haematol. 2010;85:20-5.
- Iolascon A, Delaunay J, Wickramasinghe SN, et al. *Natural history of congenital dyserythropoietic anemia type II*. Blood 2001;98:1258-60.
- Iolascon A, Russo R, Delaunay J. *Congenital dyserythropoietic anemias*. Curr Opin Hematol 2011;18:146-51.
- Iolascon A, Russo R, Esposito MR, et al. *Molecular analysis of 42 patients with congenital dyserythropoietic anemia type II: new mutations in the SEC23B gene and a search for a genotype-phenotype relationship*. Haematologica. 2010;95:708-15.
- * In questo studio è descritta l'esistenza di una correlazione genotipo-fenotipo nei pazienti affetti da CDA II.
- Jin H, Roehl WS, Shida T, et al. *The conserved Bardet-Biedl Syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia*. Cell 2010;141:1208-19.
- ** In questo lavoro è descritto il ruolo del complesso BBSoma nell'ambito del traffico vescicolare verso il ciglio.
- Jones B, Jones EL, Bonney SA, et al. *Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders*. Nat Genet 2003;34:29-31.
- ** In questo lavoro è descritta l'identificazione del gene causativo *SAR1B* della malattia di Anderson.
- Lang MR, Lapiere LA, Frotscher M, et al. *Secretory COPII coat component Sec23a is essential for craniofacial chondrocyte maturation*. Nat Genet. 2006;38:1198-203.
- Lee MC, Miller EA, Goldberg J, et al. *Bi-directional protein transport between the ER and Golgi*. Annu Rev Cell Dev Biol 2004;20:87-123.
- Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, et al. *Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease*. J Lipid Res 1987;28:1263-74.
- Mohanty D, Ghosh K, Shetty S, et al. *Mutations in the MCFD2 gene and a novel mutation in the LMAN1 gene in Indian families with combined deficiency of factor V and VIII*. Am J Hematol. 2005;79:262-6.
- Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, et al. *Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII*. Cell 1998;93:61-70.
- ** Questo lavoro descrive l'identificazione di mutazioni causative a carico del gene *LMAN1*, alla base della patogenesi del deficit combinato di fattore V e fattore VIII.
- Novick P, Field C, Schekman R. *Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway*. Cell 1980;21:205-15.
- Palade G. *Intracellular aspects of the process of protein synthesis*. Science 1975;189:347-58.
- ** In questo lavoro si descrive per la prima volta l'ipotesi del trasporto vescicolare.
- Peretti N, Roy CC, Sassolas A, et al. *Chylomicron retention disease: a long term study of two cohorts*. Mol Genet Metab 2009;97:136-42.
- Reinhold A, Scheer I, Lehmann R, et al. *MR imaging features in Marinesco-Sjögren syndrome: severe cerebellar atrophy is not an obligatory finding*. Am J Neuroradiol 2003;24:825-8.
- Russo R, Gambale A, Esposito MR, et al. *Two founder mutations in the SEC23B gene account for the relatively high frequency of CDA II in the Italian population*. Am J Hematol. 2011;86:727-32.
- Schröder M, Kaufman RJ. *The mammalian unfolded protein response*. Annu Rev Biochem. 2005;74:739-89.
- Schwarz K, Iolascon A, Delaunay J, et al. *Mutation affecting the secretory COPII coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II*. Nat Genet 2009;41:936-40.
- ** In questo lavoro è descritta l'identificazione del gene causativo *SEC23B* dell'anemia congenita diseritropoietica di tipo II.
- Slavotinek A, Goldman J, Weisiger K, et al. *Marinesco-Sjögren syndrome in a male with mild dysmorphism*. Am J Med Genet 2005;133A:197-201.
- Tobin JL, Beales PL. *Bardet-Biedl syndrome: beyond the cilium*. Pediatr Nephrol 2007;22:926-36.
- van Raamsdonk JM. *Loss of function mutations in SIL1 cause Marinesco-Sjögren syndrome*. Clin Genet 2006;69:399-403.
- Zhang B, Cunningham MA, Nichols WC et al. *Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex*. Nat Genet 2003;34:220-225.
- ** Questo lavoro descrive l'identificazione di mutazioni causative a carico del secondo locus, *MCFD2*, del deficit combinato di fattore V e fattore VIII
- Zhang B, Kaufman RJ, Ginsburg D. *LMAN1 and MCFD2 form a cargo receptor complex and interact with coagulation factor VIII in the early secretory pathway*. J Biol Chem 2005;280:25881-6.
- Zhang B, Zheng C, Zhu M, et al. *Mice deficient in LMAN1 exhibit FV and FVIII deficiencies and liver accumulation of α 1-antitrypsin*. Blood 2011;118:3384-91.
- Zhao L, Longo-Guess C, Harris BS, et al. *Protein accumulation and neurodegeneration in the woozymutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP*. Nat Genet 2005;37:974-9.
- Zheng C, Liu H, Yuan S, et al. *Molecular basis of LMAN1 in coordinating LMAN1-MCFD2 cargo receptor formation and ER-to-Golgi transport of FV/FVIII*. Blood 2010;116:5698-706.

Corrispondenza

Achille Iolascon, CEINGE - Biotecnologie Avanzate, via Gaetano Salvatore 486, 80145 Napoli, Italia. Tel. +39 081 3737898. Fax +39 081 3737804.
E-mail: achille.iolascon@unina.it