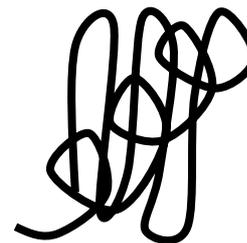
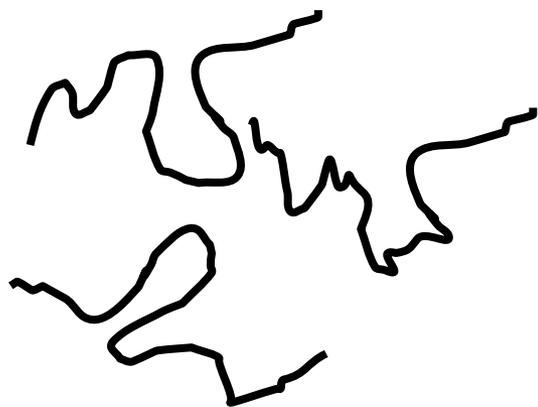


Modulo 5

Folding delle proteine

STRUTTURAZIONE DELLE PROTEINE (Ripiegamento, Folding)



Molti diversi tipi di struttura non avvolta
(*unfolded states*)

Un solo tipo di struttura avvolta
(*folded state*)
struttura NATIVA

► Principi della strutturazione proteica:

- 1) la **sequenza determina la struttura**
- 2) la **struttura determina la funzione**
- 3) esiste (generalmente) **SOLO UNA** struttura nativa
- 4) la catena **collassa ad una struttura compatta** a causa delle **interazioni idrofobiche**
- 5) la struttura nativa dipende da **FORZE DEBOLI** (non covalenti)
 - forze idrofobiche, vdW, elettrostatiche e **massimo numero di legami-H**
- 6) strutture native diverse hanno **COMPONENTI STRUTTURALI COMUNI**

FOLDING DELLE PROTEINE (ripiegamento)

▶ DOGMA CENTRALE: “ La sequenza determina la struttura “ (Anfinsen)

- la struttura finale di una proteina è quella con l'**energia interna minore** (in assoluto o cineticamente accessibile)

- **Paradosso di Levinthal:**

catena di 100 residui, 3 conformazioni/residuo → 3^{100} possibili strutture

- se la catena saggia ogni possibile conformazione per trovare il minimo energetico, restando 10^{-13} secondi in ciascuna conformazione (tempo medio di rotazione)

$$3^{100} \times 10^{-13} = 3 \times 10^{88} \text{ s} \approx 10^{27} \text{ anni} \quad (> \text{vita dell'universo})$$

Con 10 possibili conformazione → 10^{77} anni

- una caratteristica essenziale del processo di ripiegamento è la **conservazione di elementi parzialmente corretti**

- questo **riduce il tempo necessario per il ripiegamento** a millisecondi/secondi

Conservazione di elementi parzialmente corretti

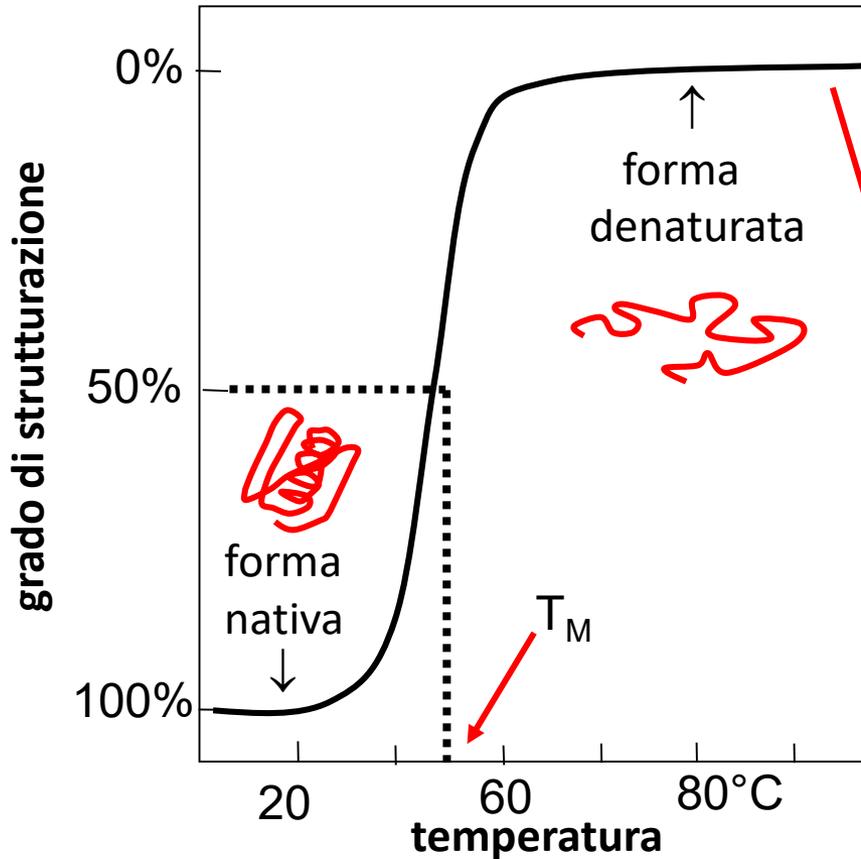
```
200 ?T(\G{+s x[A.N5~, #ATxSGpn`e00
400 oDr'Jh7s DFR:W4l'u+^v6zpJse0i
600 e2ih'8zs n527x8l8d_ih=Hldseb.
800 S#dh>)/s )tZqC%lP%DK<!!^ase2.
1000 V0th>nLs ut/isjl_kwojjWMasef.
1200 juth+nvs it is(lukh?SCw-ase5.
1400 Iithdn4s it is0l/ks/IxwLase~.
1600 M?thinrs it is lXk?T"_woasel.
1800 MStthinWs it is lwkN7Kw{asel.
2000 Mhthin`s it is likv,aww_asel.
2200 MMthinns it is lik+5avwlasel.
2400 MethinXs it is likydaqw)asel.
2600 Methin4s it is lik2dasweasel.
2800 MethinHs it is likeaTweasel.
2883 Methinks it is like a weasel.
```

```
200 )z~hg)W4({cu!kO{d6jS!NlEyUx}p
400 "W hi\kR.<&CfA&4-Y1G!iT$6({|6
600 .L=hinkm4(uMGP^lAWoE6klwW=yiS
800 AthinkaPa_vYH liR\Hb,Uo4\-"(
1000 OFthinksP)@fZO li8v] /+Eln26B
1200 6ithinksMvt -V likm+gl#K~)BFk
1400 vxthinksaEt w like.S1Geutks.
1600 :Othinks<it MC likesN2[eaVe4.
1800 uxthinksqit Or likeQh)weaoeW.
2000 Y/thinks it id like7alwea)e&.
2200 Methinks it iW like a[weaWel.
2400 Methinks it is like a;weasel.
2431 Methinks it is like a weasel.
```

- ▶ **Ogni tappa nel ripiegamento porta ad una riduzione di energia**
 - questa riduzione è **dell'ordine dell'energia termica** (può essere invertita)
- ▶ **la formazione di un segmento con conformazione corretta:**
 - **influisce sulla formazione di un successivo segmento a conformazione corretta**
 - il ripiegamento è un processo **altamente cooperativo**

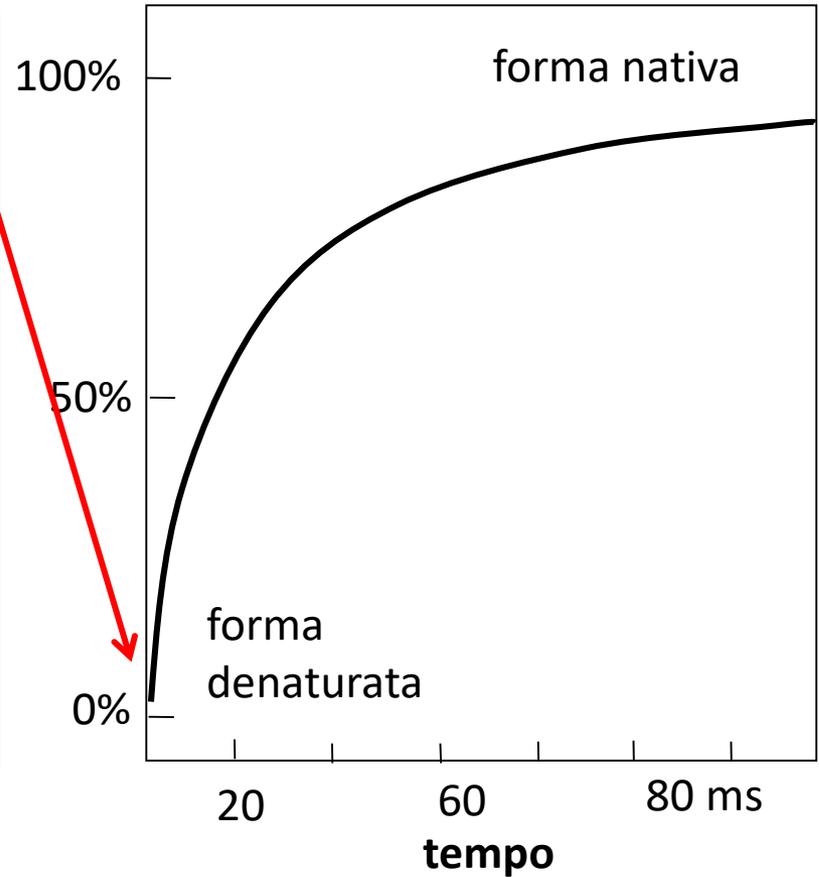
Denaturazione / rinaturazione delle proteine

Curva di denaturazione



(oppure pH, agente caotropico, ecc.)

Cinetica di ripiegamento (o di rinaturazione)



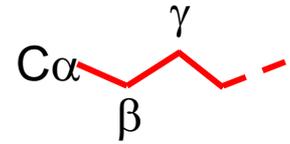
Riportare in condizioni rinaturanti

Ruolo dei singoli residui

► Gli AA hanno diverse tendenze intrinseche a formare strutture 2°

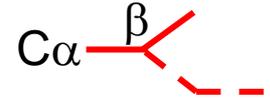
- catene non ramificate in C_β favoriscono la formazione di α -elica

es. **Ala**, **Leu**, **Arg**, **Lys**, **Gln**, **Met**

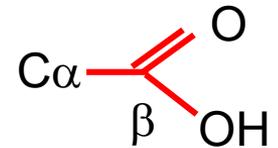


- altre catene laterali non la favoriscono per ragioni steriche:

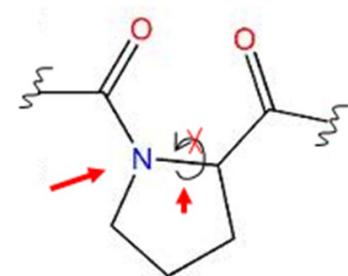
ramificazione al C_β (es **Val**, **Ile**)



gruppi donatori/accettori per **legami-H vicini al C_α** (es. **Asp**, **Ser**)

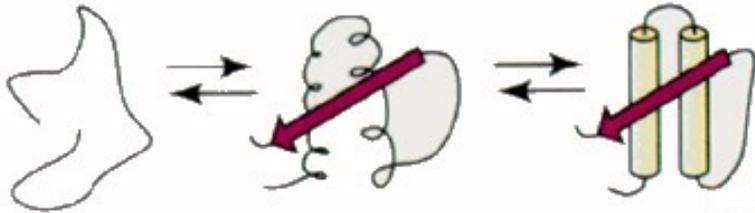


Pro → destabilizza α -eliche e β -strutture 1) per **ragioni steriche**
e 2) per l'**incapacità di formare legami-H** con N imminico

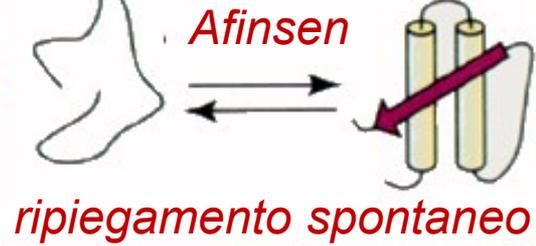
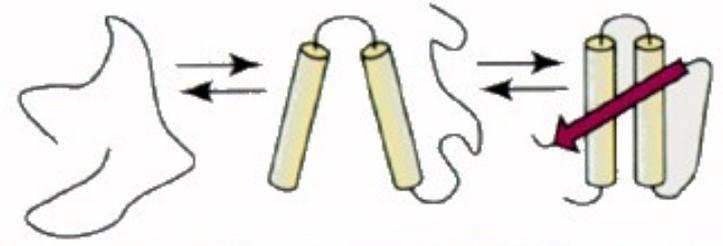


Modelli per il ripiegamento

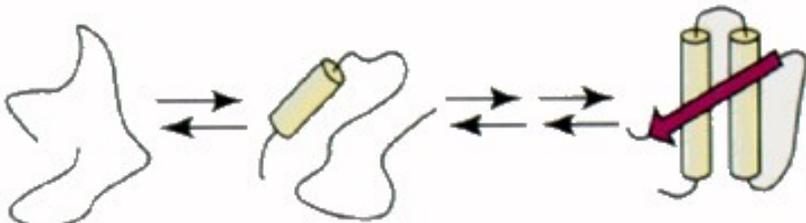
Collasso idrofobico (globulo fuso)



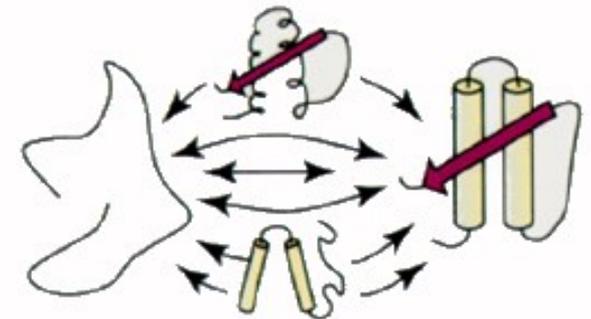
Gerarchico (elementi strutturali)



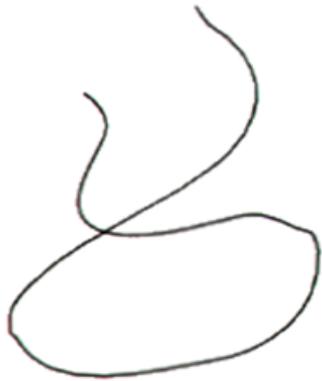
Nucleazione



Multimodale

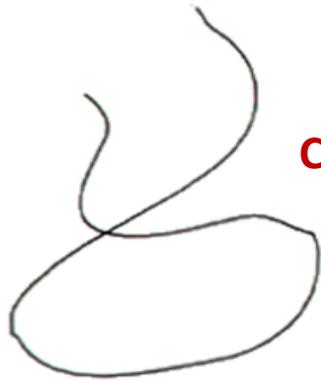


Processi di ripiegamento



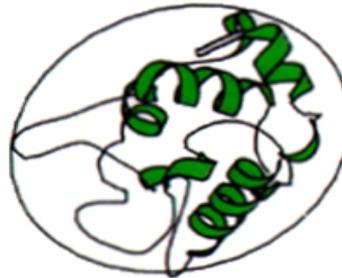
Two-state folding – proteine piccole (~100 AA)
formazione cooperativa delle interazioni native

(modello di Anfinsen)

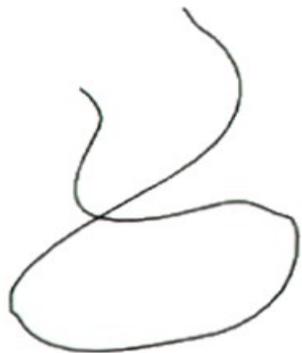
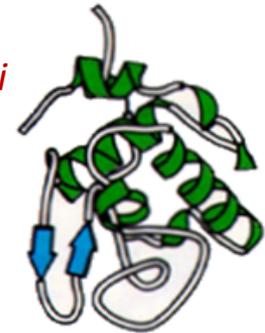


Collasso idrofobico

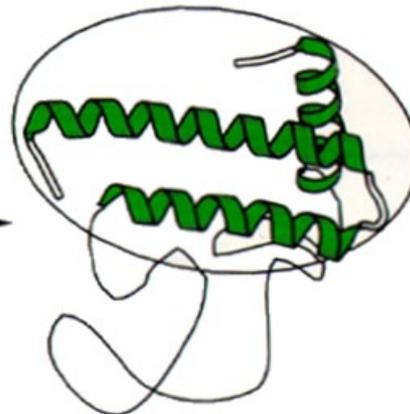
globulo fuso



*riposizionamento degli
elementi strutturali*



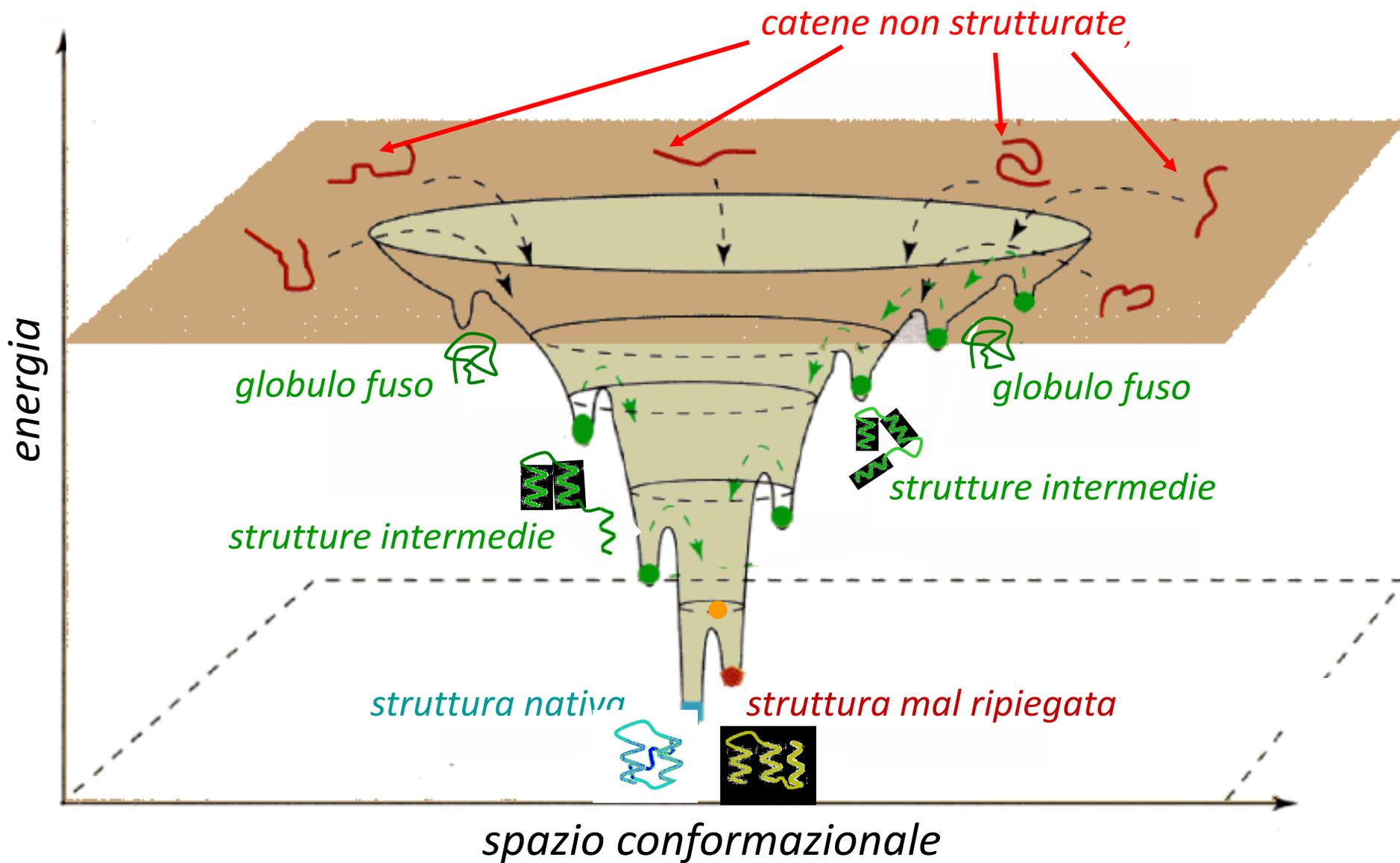
**Formazione
di un primo
dominio
strutturale**



*Formazione del
resto della
struttura nativa*



Panorama energetico per il folding delle proteine

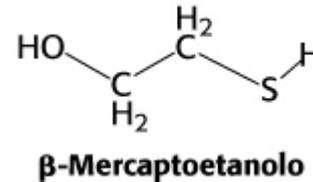
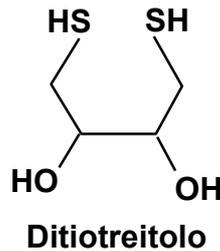


Tecniche per studiare il folding delle proteine

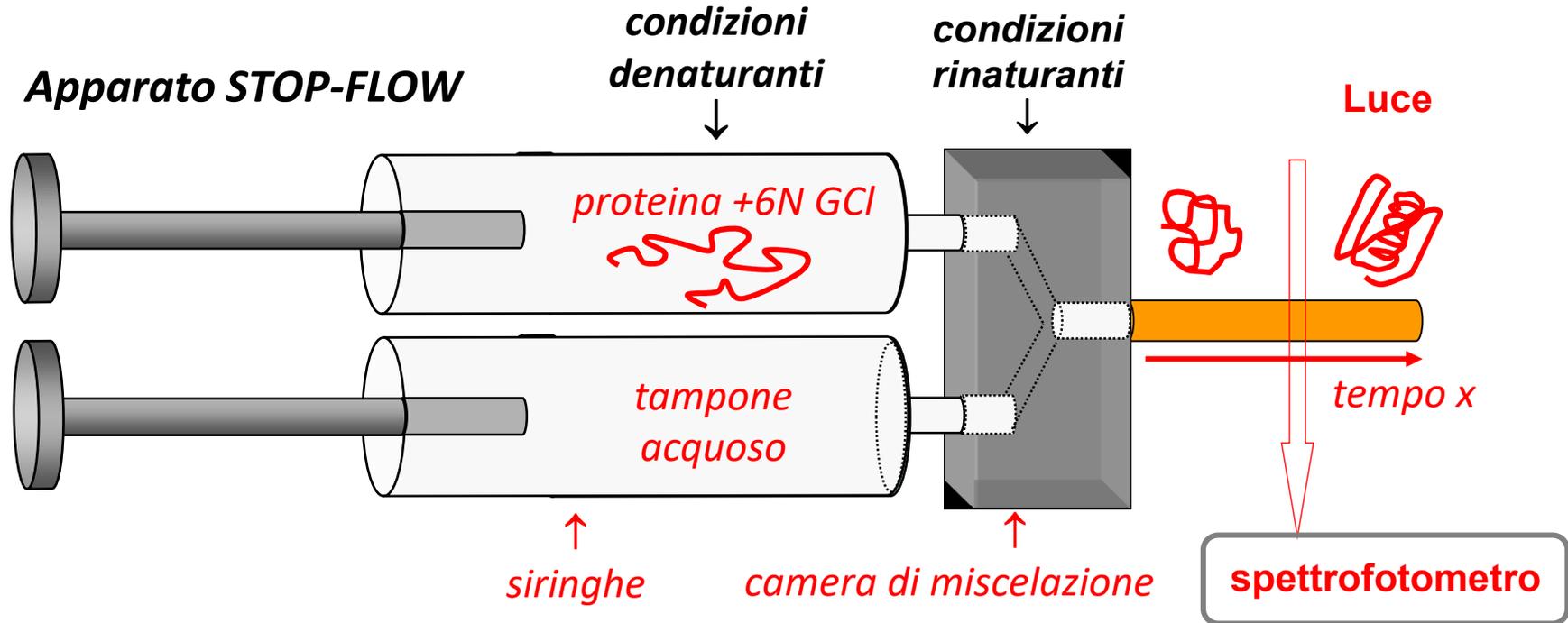
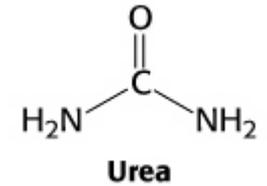
► In primo luogo è necessario portare la proteina in uno stato UNFOLDED

- si utilizzano **agenti denaturanti**:

- *per rompere legami S-S*

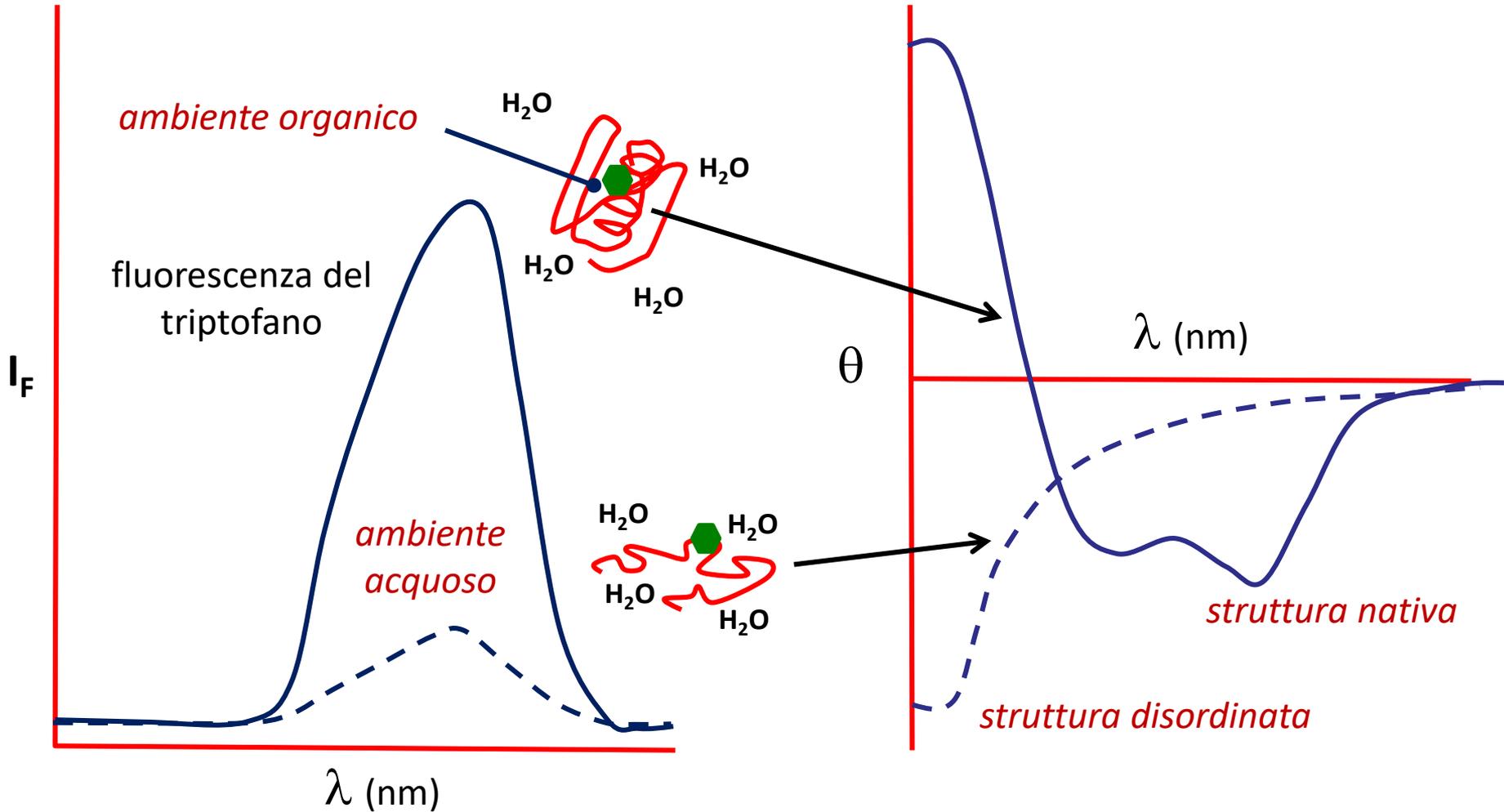


Per rompere legami-H



Monitoraggio sperimentale del ripiegamento

- Il dichroismo circolare e la spettroscopia a fluorescenza sono tecniche utili per seguire i processi di ripiegamento

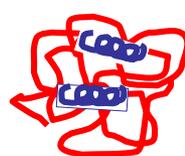
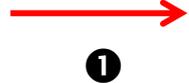
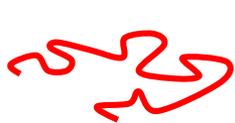


random coil

molten globule

2^y structure

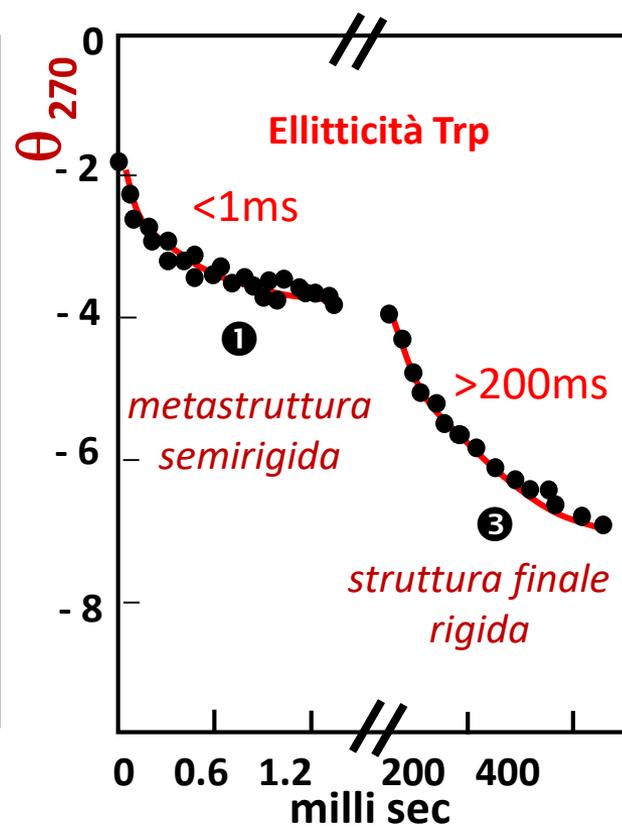
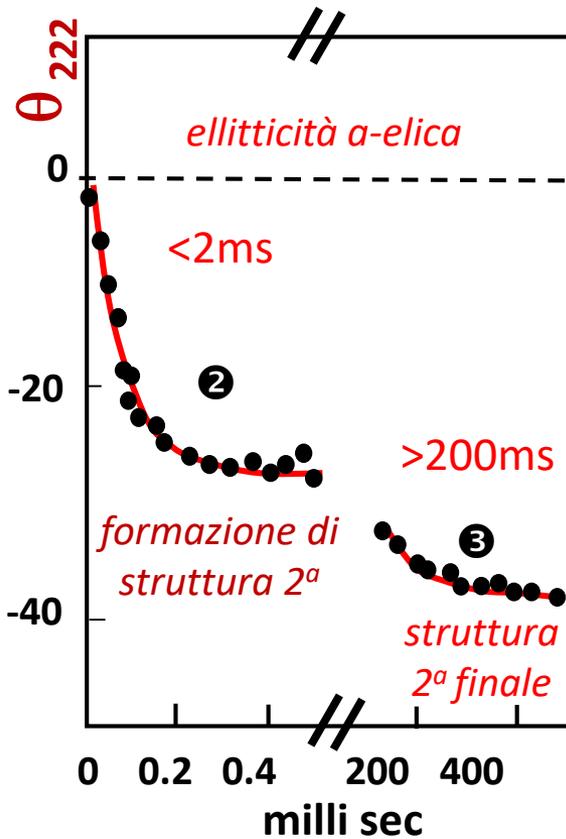
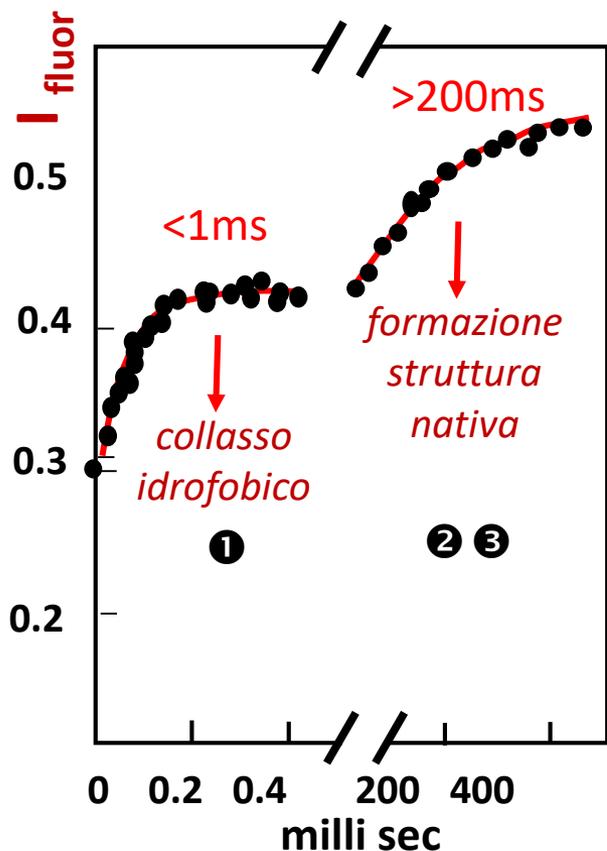
3^y structure



fluorescenza (Trp)

dicroismo circolare
catena

dicroismo circolare
Trp



tempo di ripiegamento

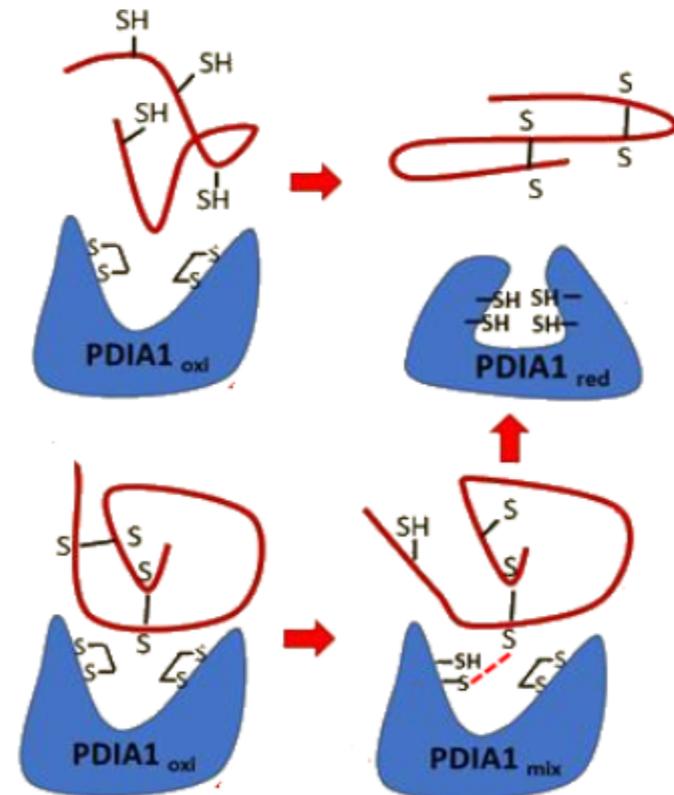
Ripiegamento in vivo – ripiegamento assistito

► Le isomerasi velocizzano il ripiegamento

- questi sono enzimi che catalizzano conversioni conformazionali o configurazionali a livello di singoli residui (ma **non** dirigono folding)
- **PPlasi - (Peptidilprolil isomerasi o cis/trans isomerasi):** proteine ubiquitarie e abbondanti, con diversi ruoli fra i quali quello di catalizzare la conversione fra le **configurazioni cis e trans del legame peptidico dopo Pro** (5% casi *cis*)
- **PDIasi - (Proteindisolfuro isomerasi):** ponti disolfuro incorretti sono una causa principale di **ripiegamento incorretto**. le **PDIasi** catalizzano il **riarrangiamento di ponti disolfuro** all'interno di proteine.

► Chaperone molecolari e Caperonine

- le **chaperone molecolari** sono proteine che **assistono il processo di folding** (monomeriche, spesso Heat Shock Proteins, **HSP**)
- le **chaperonine** sono multimeriche che forniscono **un ambiente favorevole** per il folding



Chaperone molecolari

Proteine piccole

ribosoma



polipeptide nascente

folding spontaneo



proteina ripiegata



Le proteina si ripiegano secondo il modello di Anfinsen

Proteine più grandi

ribosoma



polipeptide nascente

folding assistito



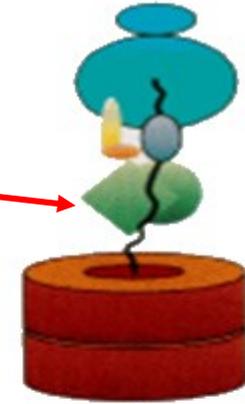
HSP70/HSP40
(heat-shock protein)



HSP70 (DnaK)

(chaperonine

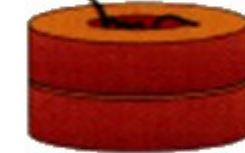
HSP60 (GroEL)



folding assistito



HSP10
(GroES)



Chaperone molecolari

► Le «chaperonine» proteggono da interazioni dannose

- *In vivo*, il folding avviene in un ambiente affollato, con molte catene in fase di ripiegamento; la possibilità di interazioni illecite, che portano a precipitazione, sono elevate
- anche la parziale denaturazione dovuta a stress termico deve essere contrastata

