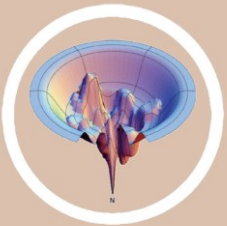
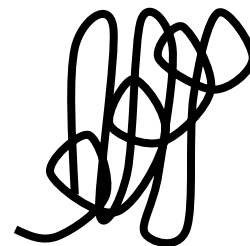
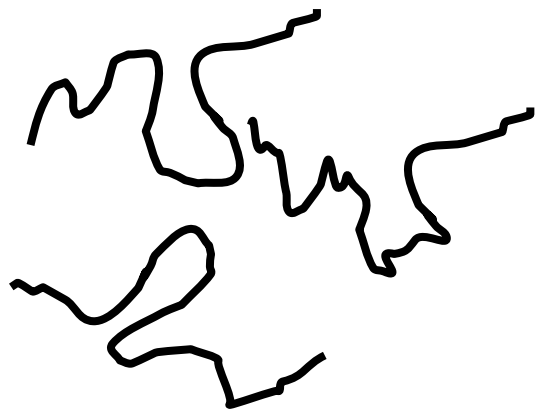


Modulo 3B

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

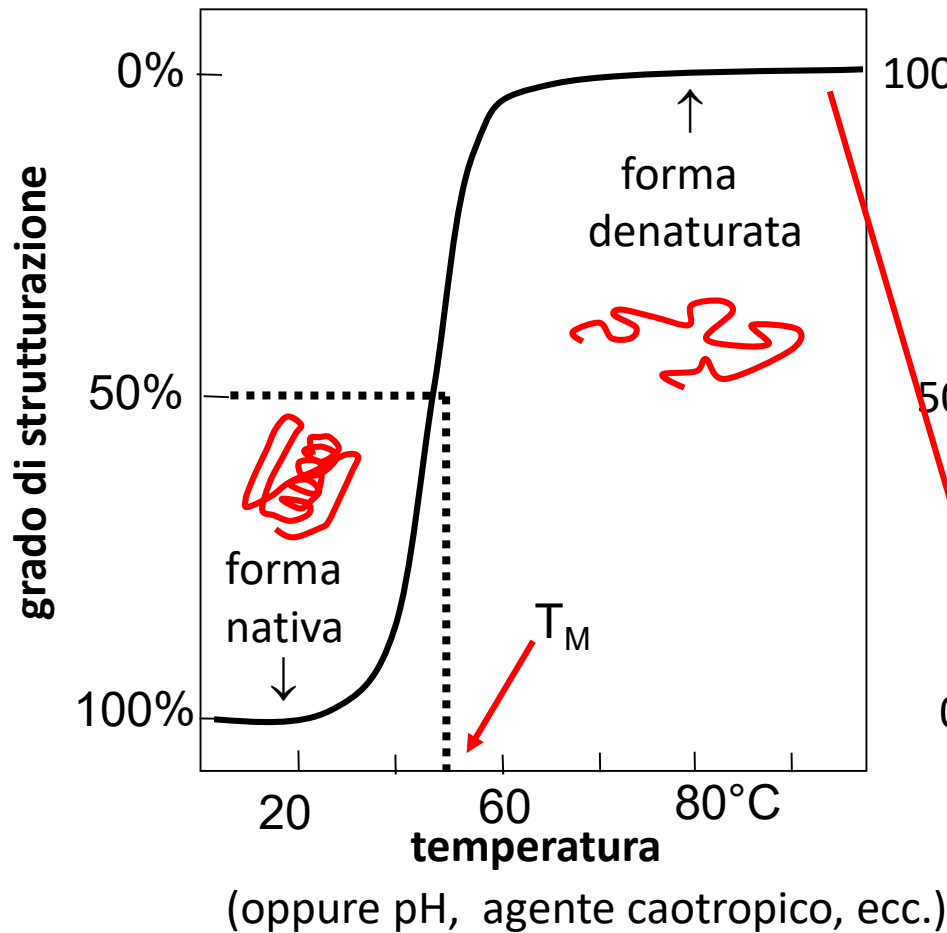
```
200 ?T(\G{+s x[A.N5~, #ATxSGpn`e00
400 oDr'Jh7s DFR:W4l'u+^v6zpJse0i
600 e2ih'8zs n527x8l8d_ih=Hldseb.
800 S#dh>)/s )tZqC%lP%DK<||^ase2.
1000 V0th>nLs ut/isjl_kwojjWMasef.
1200 juth+nvs it is(lukh?SCw-ase5.
1400 Iithdn4s it is0l/ks/IxwLase~.
1600 M?thinrs it is lXk?T"_woasel.
1800 MStthinWs it is lwkN7Kw{asel.
2000 Mnthin`s it is likv,aww_asel.
2200 Mthinns 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-YlG!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.SlGeutks.
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.
```

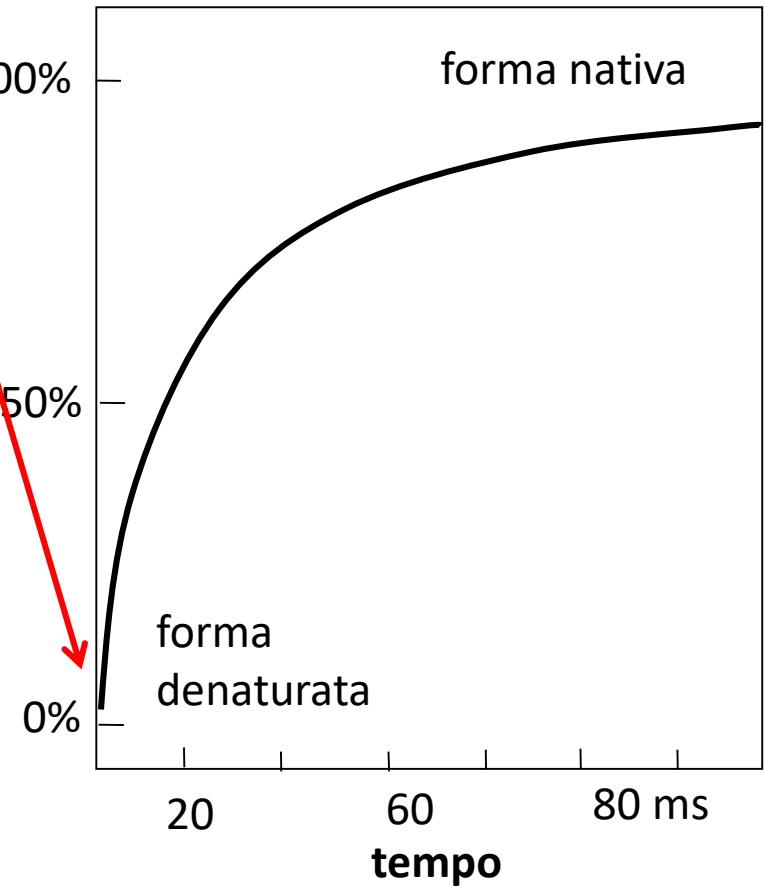
- ▶ Ogni tappa nel ripiegamento porta ad una riduzione di energia
 - questa riduzione è dell'ordine dell'energia termica (può essere invertita)
- ▶ la formazione di un segmento con conformazione corretta:
 - influisce sulla formazione di un successivo segmento a conformazione corretta
 - il ripiegamento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

Denaturazione / rinaturazione delle proteine

Curva di denaturazione



**Cinetica di ripiegamento
(o di rinaturazione)**



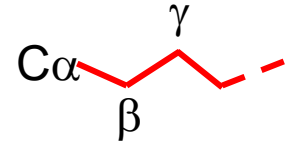
Riportare in condizioni rinaturanti

Ruolo dei singoli residui

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

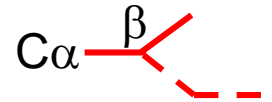
- catene non ramificate in C_β favoriscono la formazione di α -elica

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

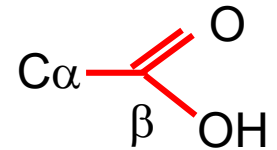


- altre catene laterali non la favoriscono per ragioni steriche:

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



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

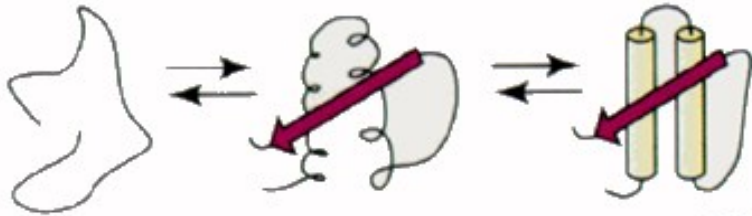


Pro → destabilizza α -eliche e β -strutture 1) per **ragioni steriche**
e 2) per l'**incapacità di formare legami-H** con N imminico

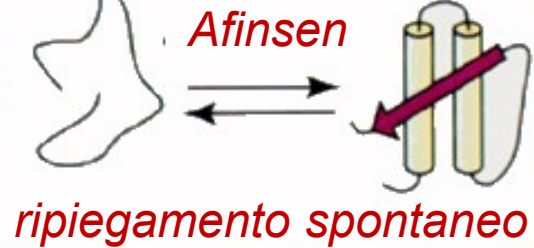
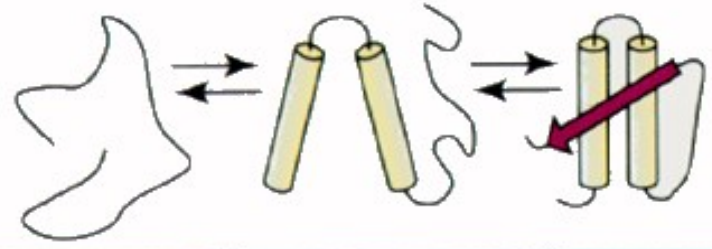


Modelli per il ripiegamento

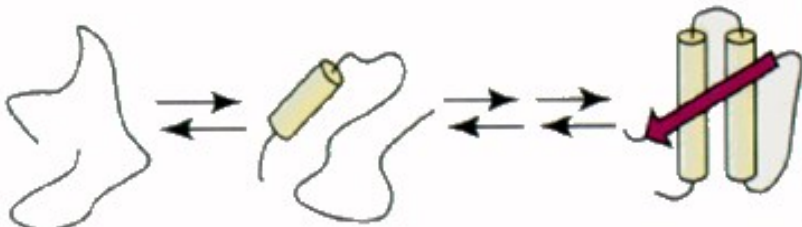
Collasso idrofobico (globulo fuso)



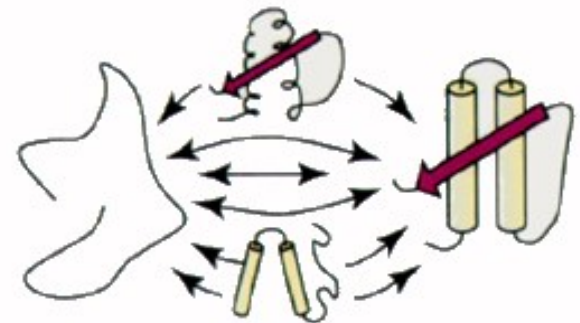
Gerarchico (elementi strutturali)



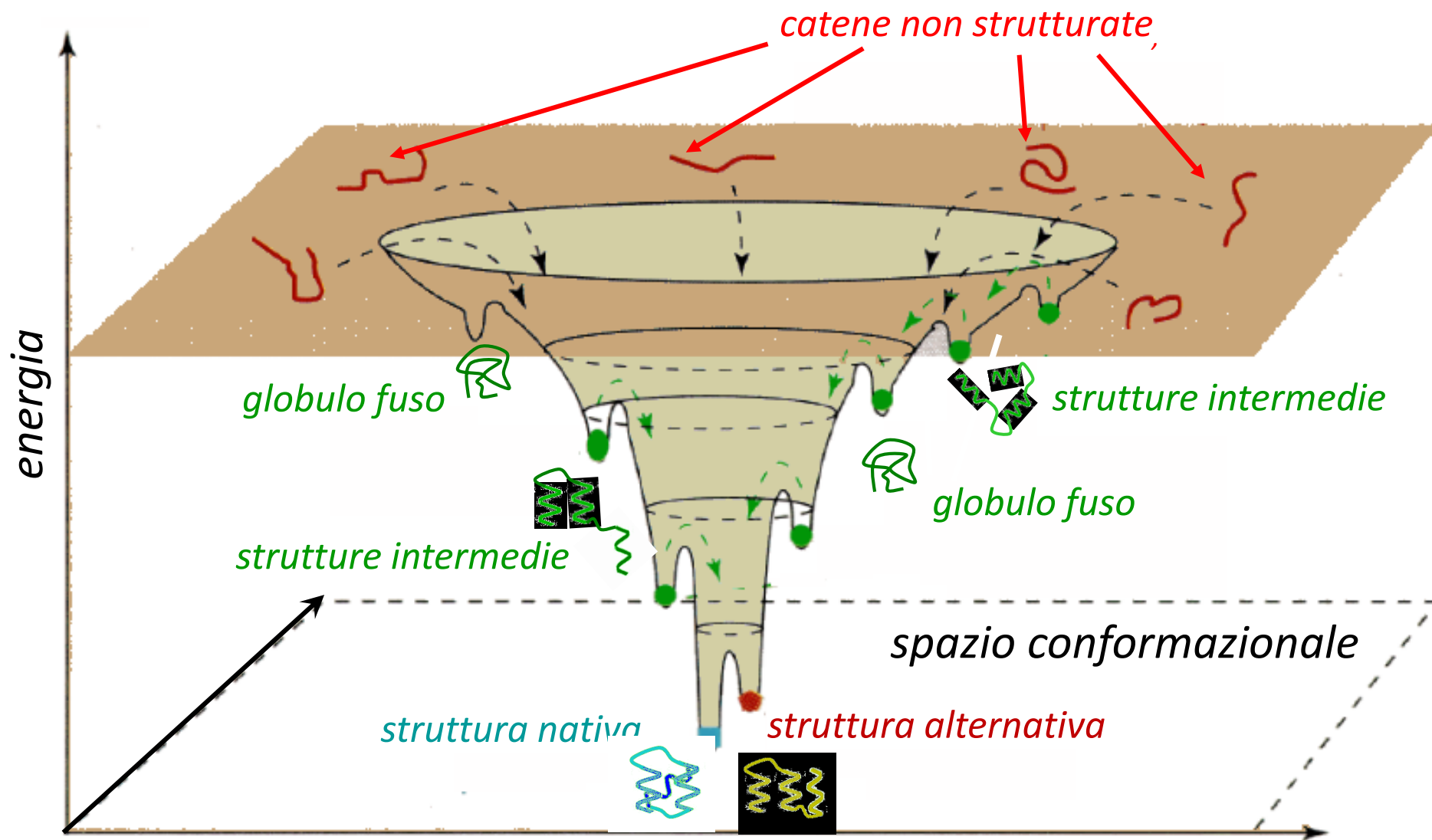
Nucleazione



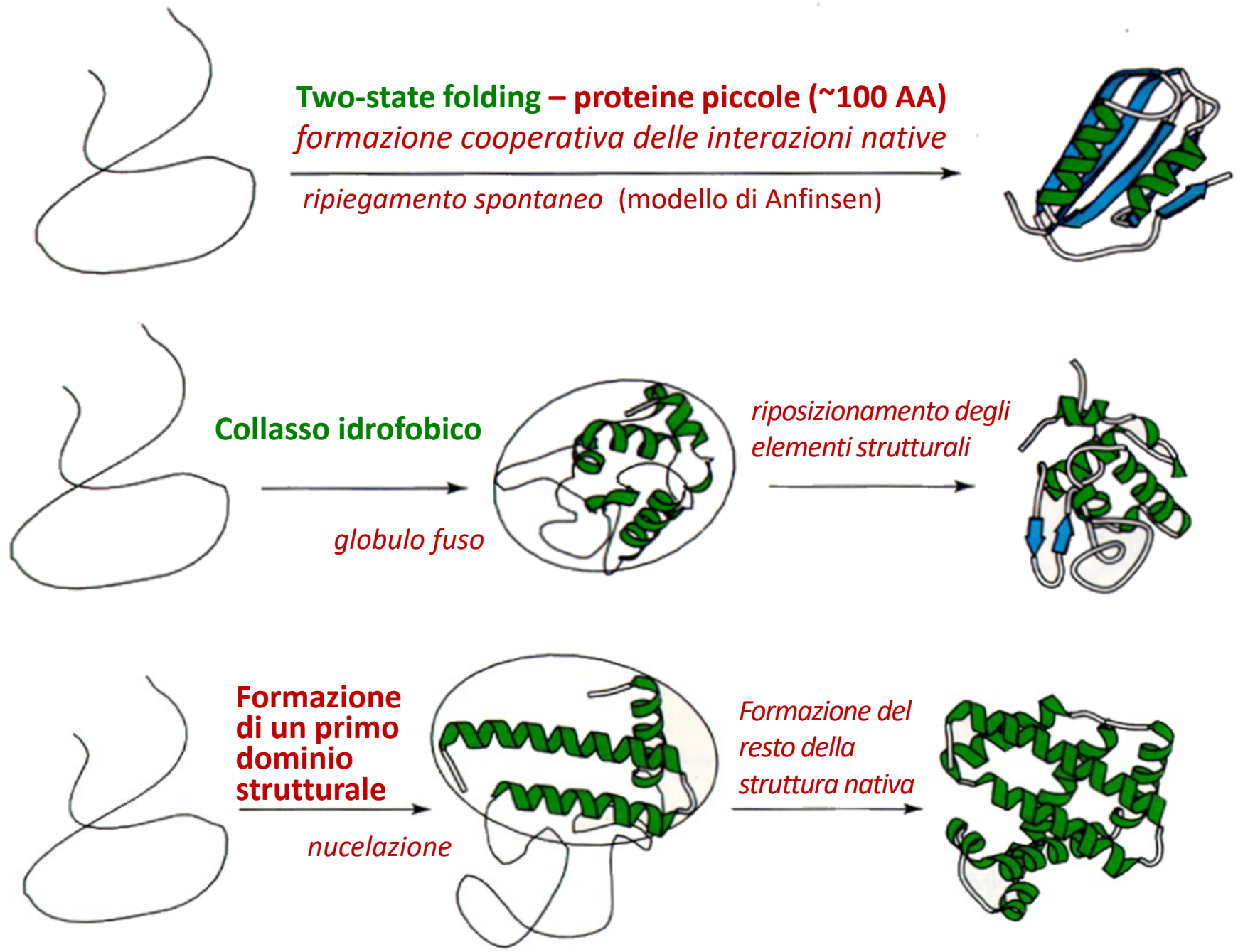
Multimodale



Panorama energetico per il folding delle proteine



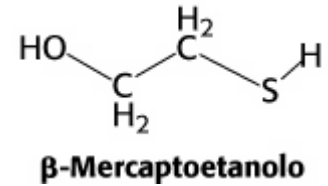
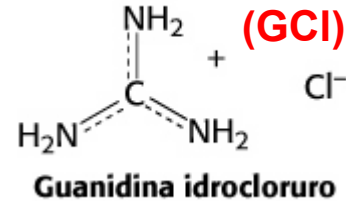
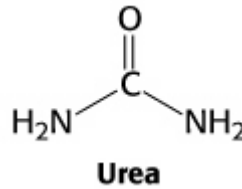
Processi di ripiegamento – verifica sperimentale



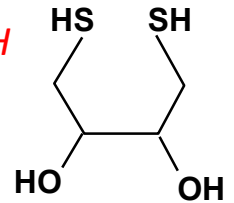
Tecniche per studiare il folding delle proteine

1) DENATURAZIONE: In primo luogo è necessario indurre lo stato UNFOLDED

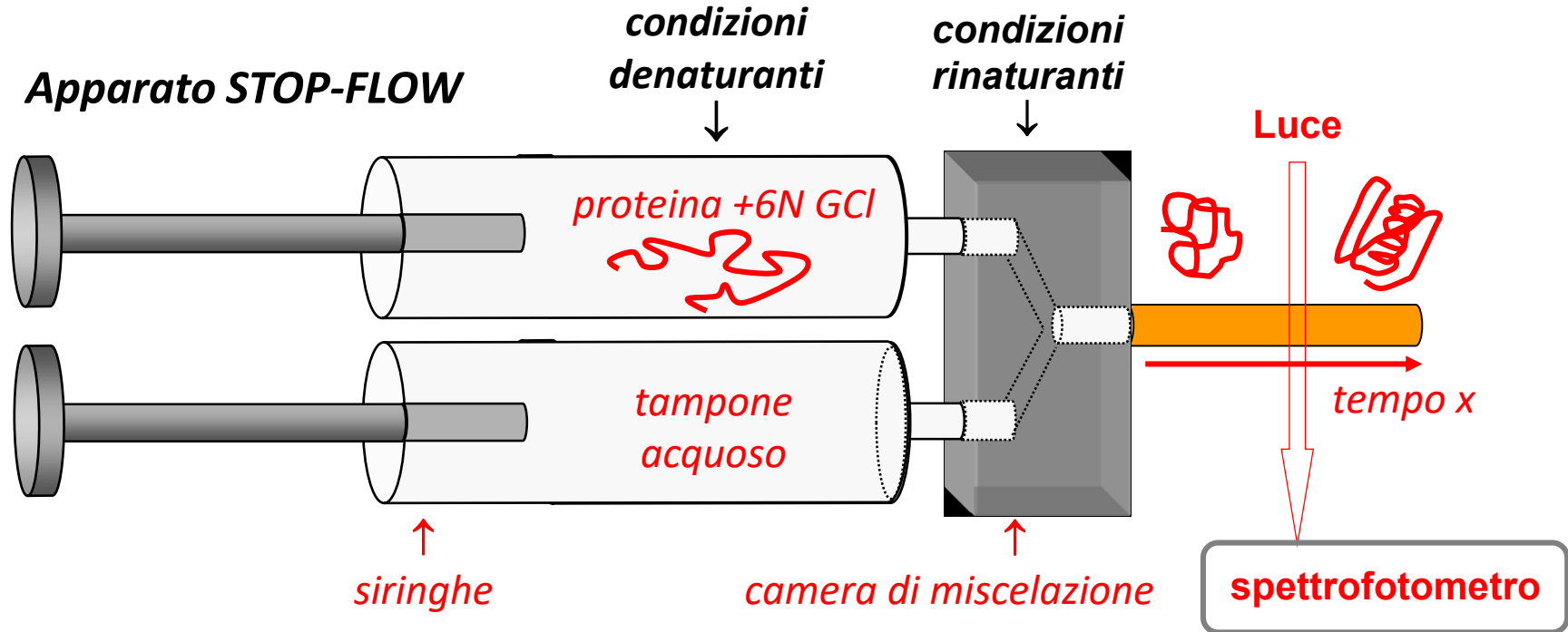
- si utilizzano **agenti denaturanti**:
- agenti riducenti per rompere legami S-S



Per rompere legami-H

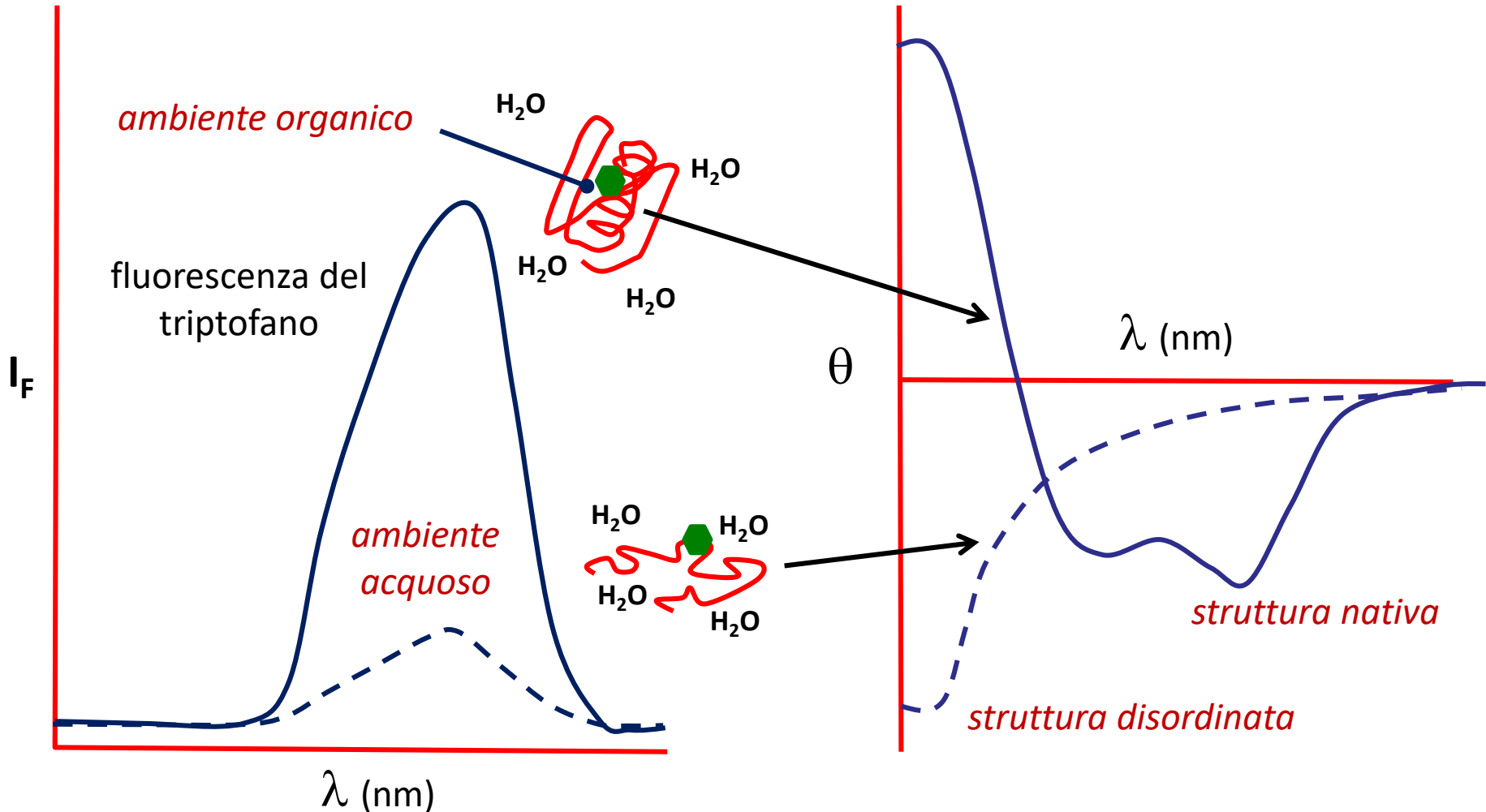


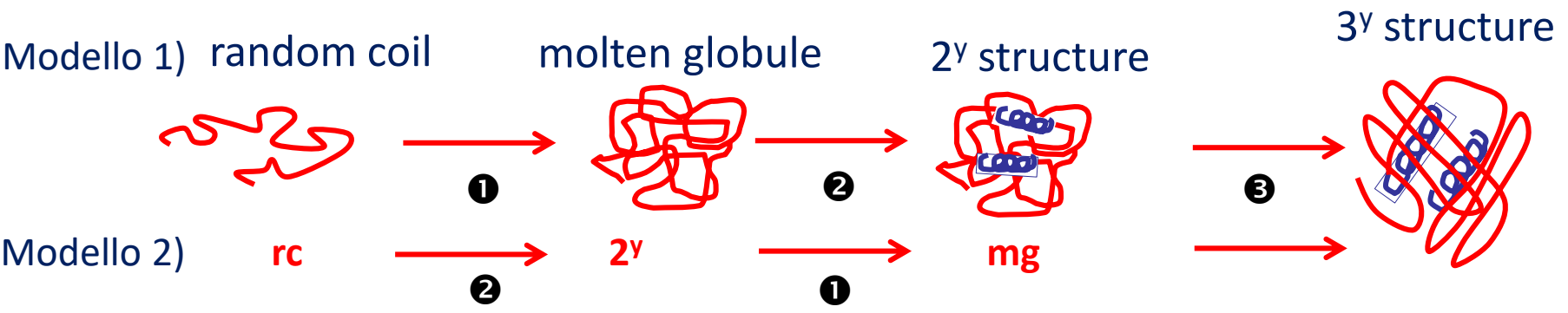
2) Riportare rapidamente in condizioni rinaturanti – RAPID MIXING



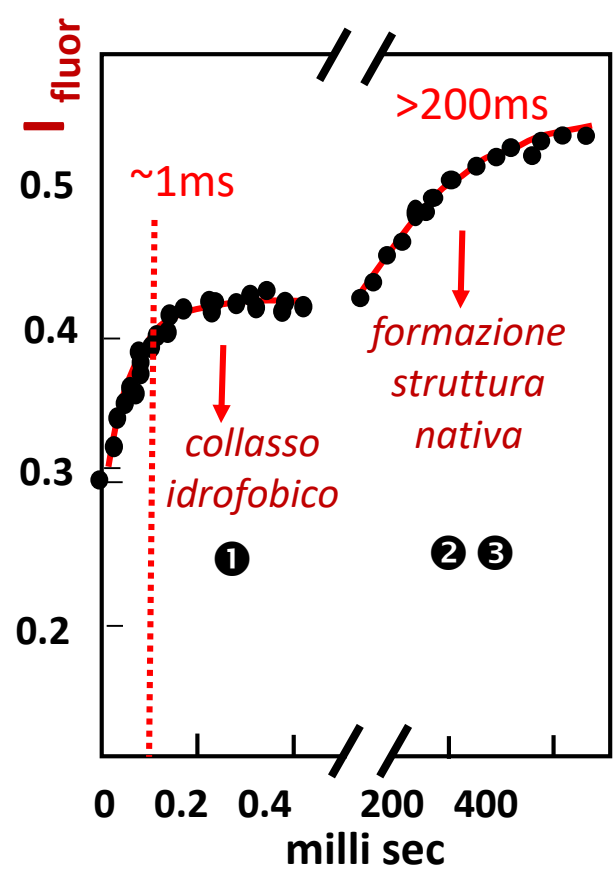
Monitoraggio sperimentale del ripiegamento

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

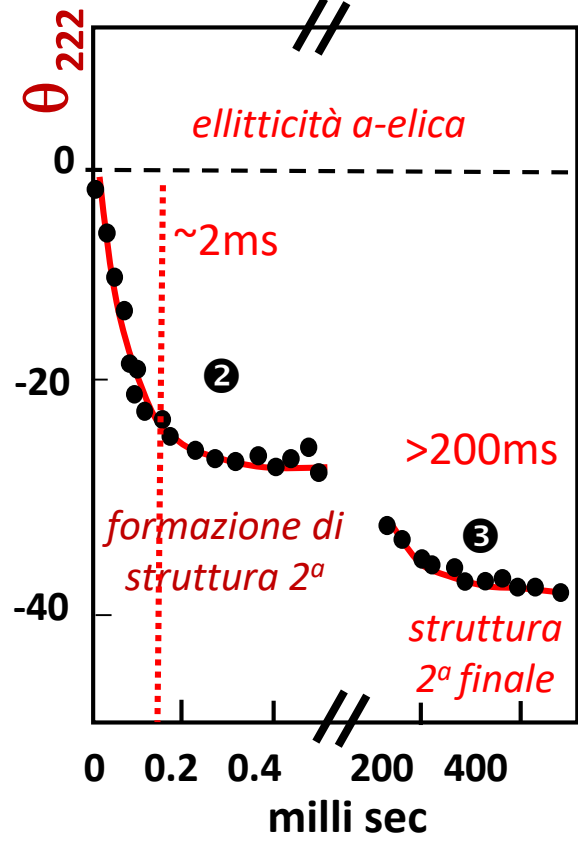




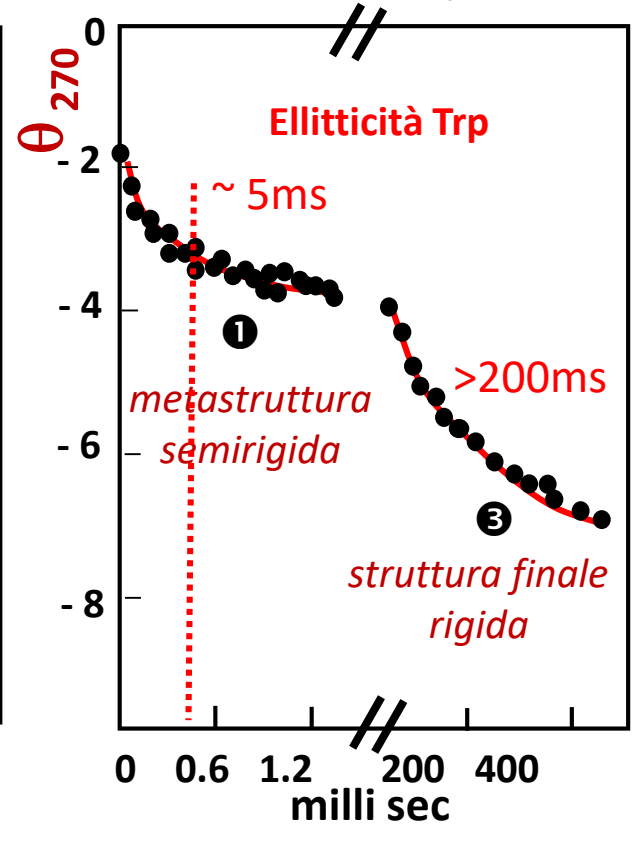
fluorescenza (Trp)



dicroismo circolare catena



dicroismo circolare Trp

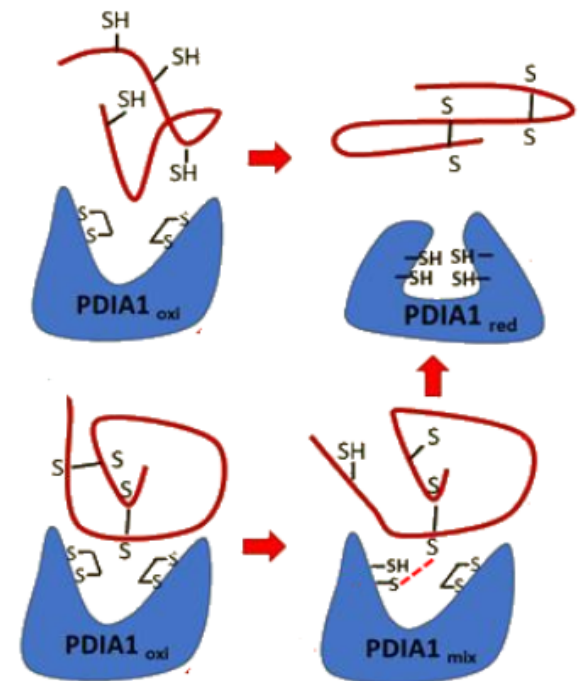


tempo di ripiegamento

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*)
- **PDlasi - (Proteindisolfuro isomerasi):** ponti disolfuro incorretti sono una causa principale di **ripiegamento incorretto**. le **PDlasi** catalizzano il **riarrangiamento di ponti disolfuro** all'interno di proteine.

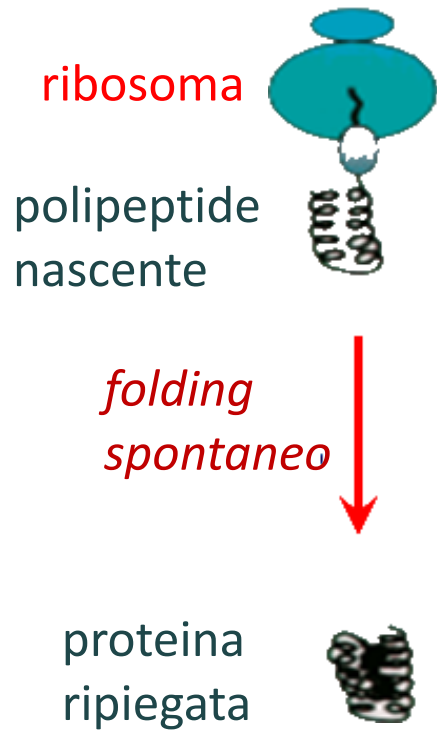


► Chaperone molecolari e Chaperonine

- le **chaperone molecolari** sono proteine che **assistono il processo di folding** (monomeriche, spesso Heat Shock Proteins, **HSP**)
- le **chaperonine** (multimeriche) e usano energia (idrolisi di ATP) per denaturare proteine incorrettamente ripiegate e poi forniscono **un ambiente favorevole** per il folding corretto

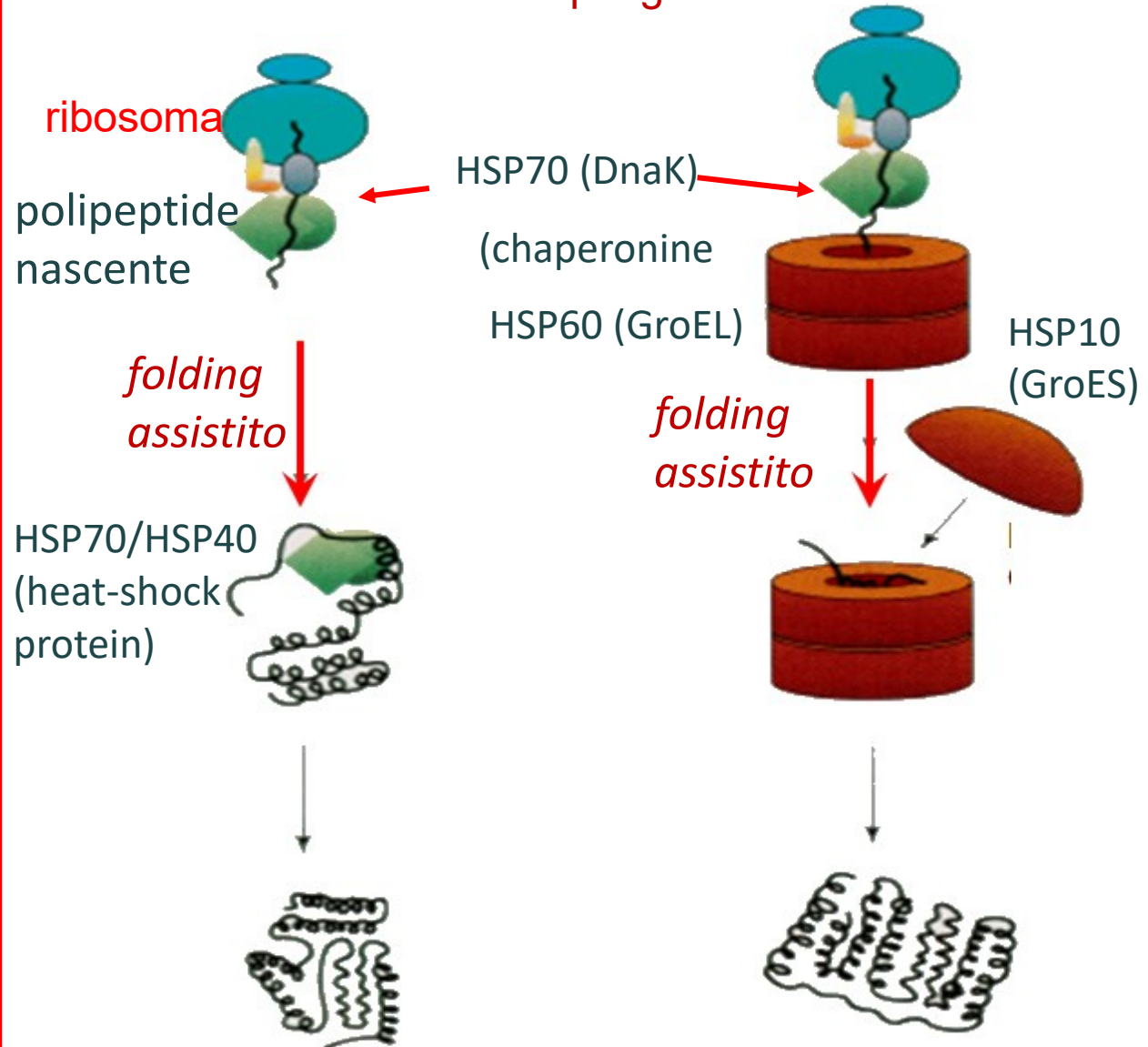
Chaperone molecolari

Proteine piccole



Le proteina si ripiegano secondo il modello di Anfinsen

Proteine più grandi



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

