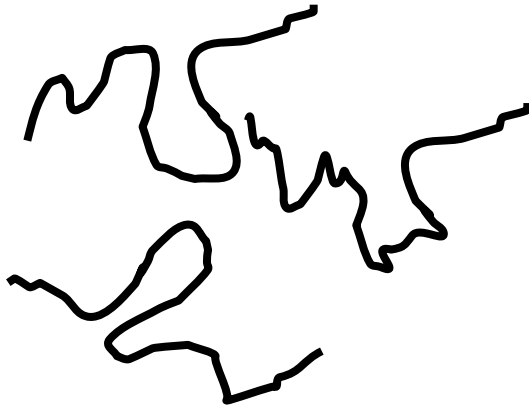


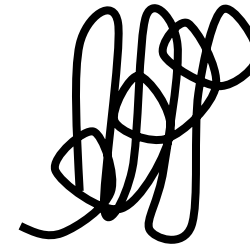
**- Struttura delle proteine -
Ripiegamento e denaturazione**

**Mario Mardirossian
A.A. 2025/2026**

STRUTTURA DELLE PROTEINE



Strutture non avvolte
(*unfolded states*)



Struttura avvolta
(*folded state*)
Proteina NATIVA

Principi della strutturazione proteica:

- 1) La sequenza determina la struttura
- 2) La struttura determina la funzione
- 3) Esiste (generalmente) SOLO UN TIPO di struttura nativa
- 4) La struttura dipende prevalentemente da FORZE DEBOLI (non covalenti) - *forze idrofobiche, massimo numero di legami-H, ecc.*
- 5) Strutture native di diverse proteine hanno COMPONENTI STRUTTURALI COMUNI

Alcune regole

- 1) Le proteine sfruttano la libertà conformazionale per strutturarsi
- 2) interazioni idrofobiche favoriscono una struttura più compatta perché questo riduce l'area di superficie molecolare apolare esposta al solvente
- 3) nella struttura finale si forma il **massimo numero** possibile di legami-H
- 4) legami elettrostatici e di VDW contribuiscono a rendere più stabile la struttura
- 5) la struttura finale è quella termodinamicamente più stabile

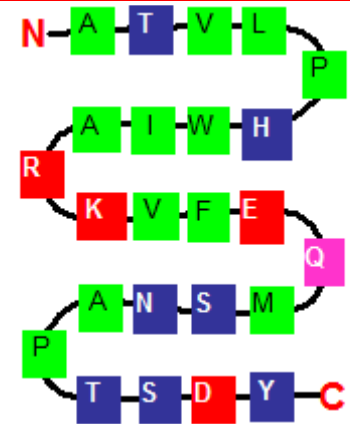
GERARACHIE DI STRUTTURA NELLE PROTEINE

La struttura delle proteine può essere concettualmente suddivisa in **QUATTRO** livelli di organizzazione:

Struttura primaria (1^a)

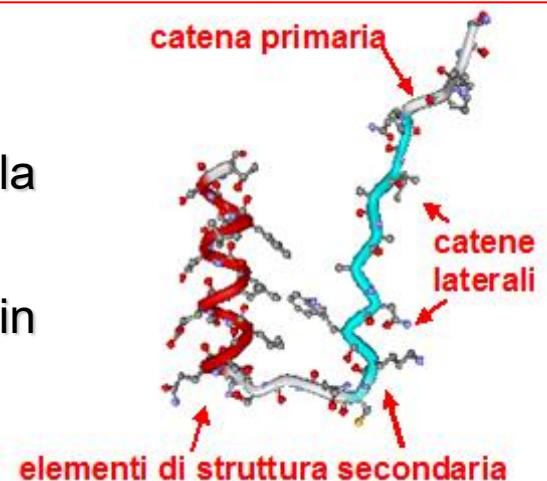
- la precisa sequenza amminoacidica lungo la catena del polimero

(per convenzione dall'N-terminale → C-terminale)



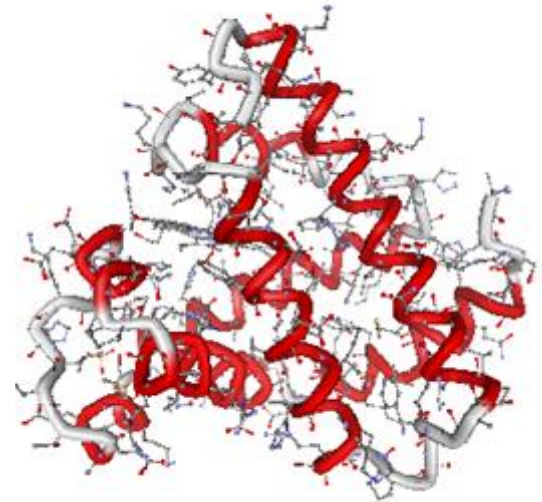
Struttura secondaria (2^a)

- 1) la conformazione dei singoli residui lungo la catena primaria
- 2) ripetizione periodica della conformazione in segmenti di catena
(strutture regolari → elementi di struttura 2^a)



- **Struttura terziaria (3^a)**

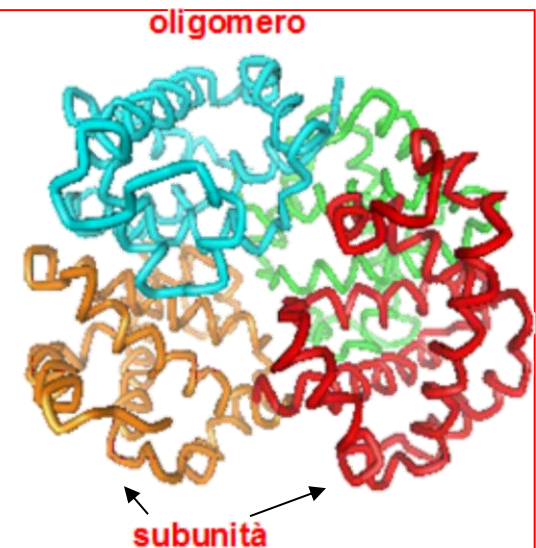
- 1) ripiegamento dell'intera catena in una struttura tridimensionale definita
- 2) collocazione precisa nello spazio di tutti gli atomi che compongono la catena



- **Struttura quaternaria (4^a)**

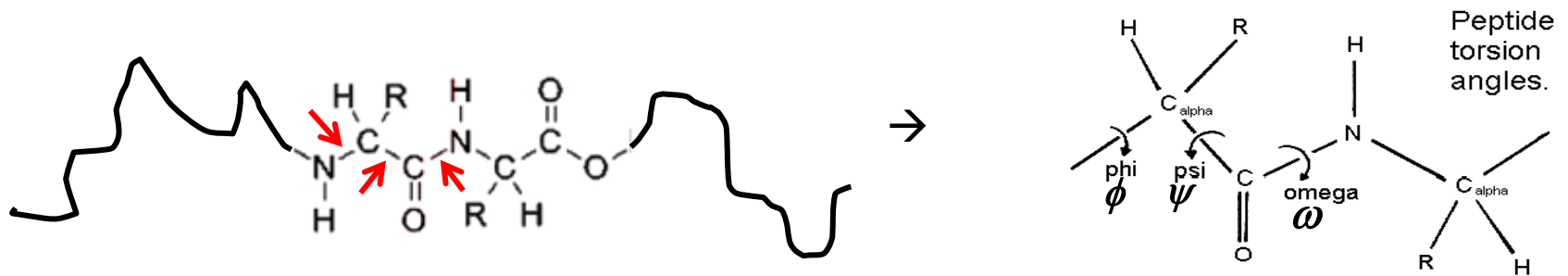
associazione di diverse catene polipeptidiche (subunità), con sequenze identiche o differenti, in strutture oligomeriche

NB - ogni subunità ha una sua precisa struttura 3^a



STRUTTURA SECONDARIA

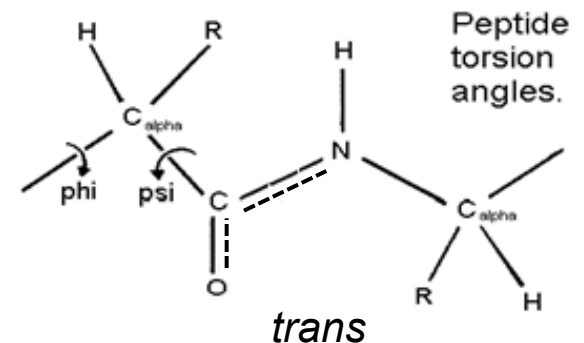
- 1) la **conformazione** di ogni residuo lungo la catena è definita dagli **angoli di rotazione (torsione)** attorno a tre legami



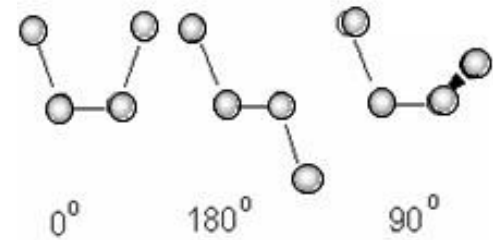
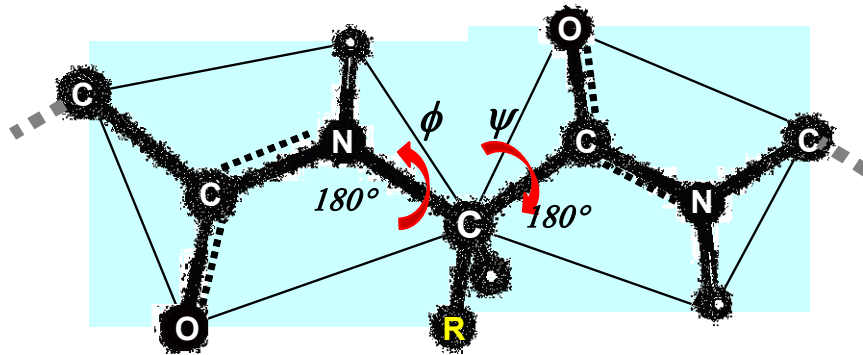
Per una catena contenente numerosi residui, il numero di conformazioni possibili sarebbe enorme.

Però:

la rotazione attorno al legame peptidico è impedita dalla delocalizzazione del doppio legame carbonilico che conferisce rigidità

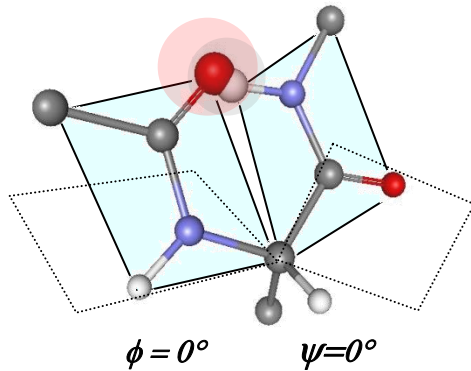


la **conformazione** di ogni residuo lungo la catena è quindi definita solo dagli **angoli di rotazione o torsione** ϕ (phi) e ψ (psi)

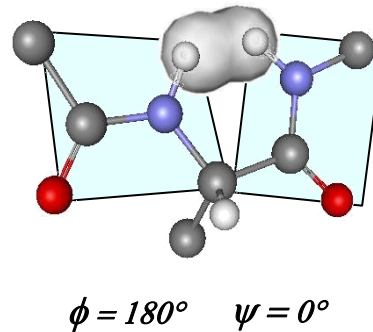


2) molte combinazioni di angoli ϕ e ψ sono **escluse per motivi sterici**

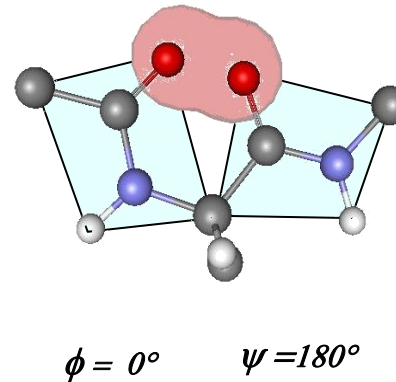
escluso



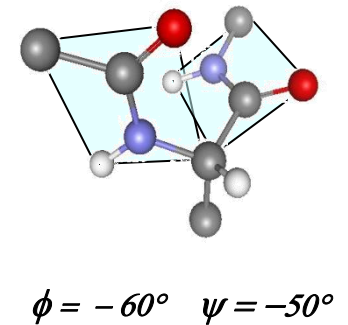
escluso



escluso

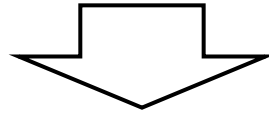


permesso



Fattori determinanti per la struttura secondaria

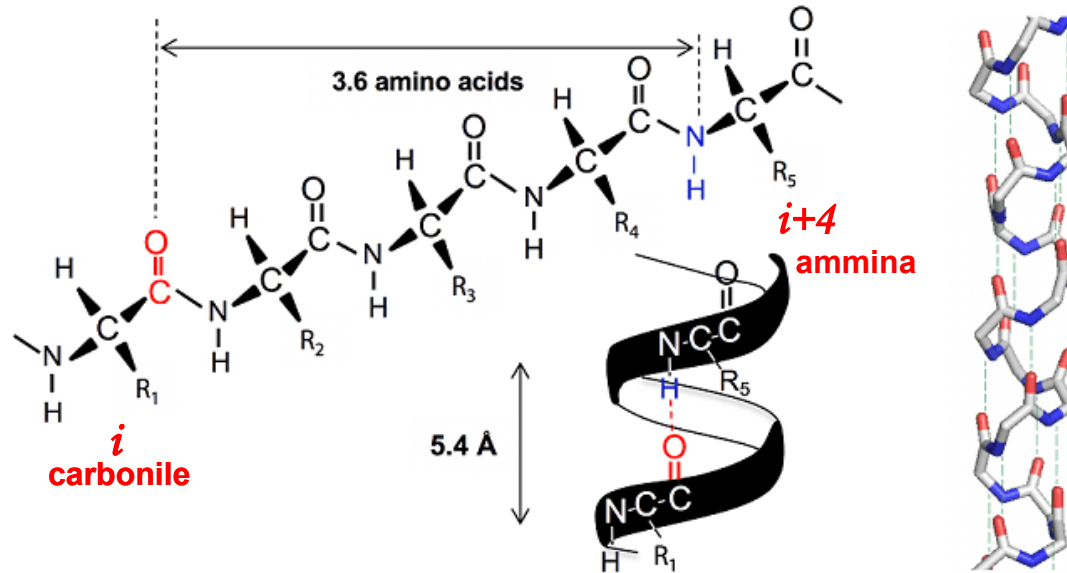
- distanze standard di legame
(C–C, C=O, C–N)
- **legame peptidico rigido e planare**
- combinazioni limitate degli angoli di rotazione ϕ e ψ
- **tutti i gruppi amminici e carbonilici impegnati in legami peptidici differenti tendono a formare legami-H**



strutture regolari con ripetizione di conformazioni simili

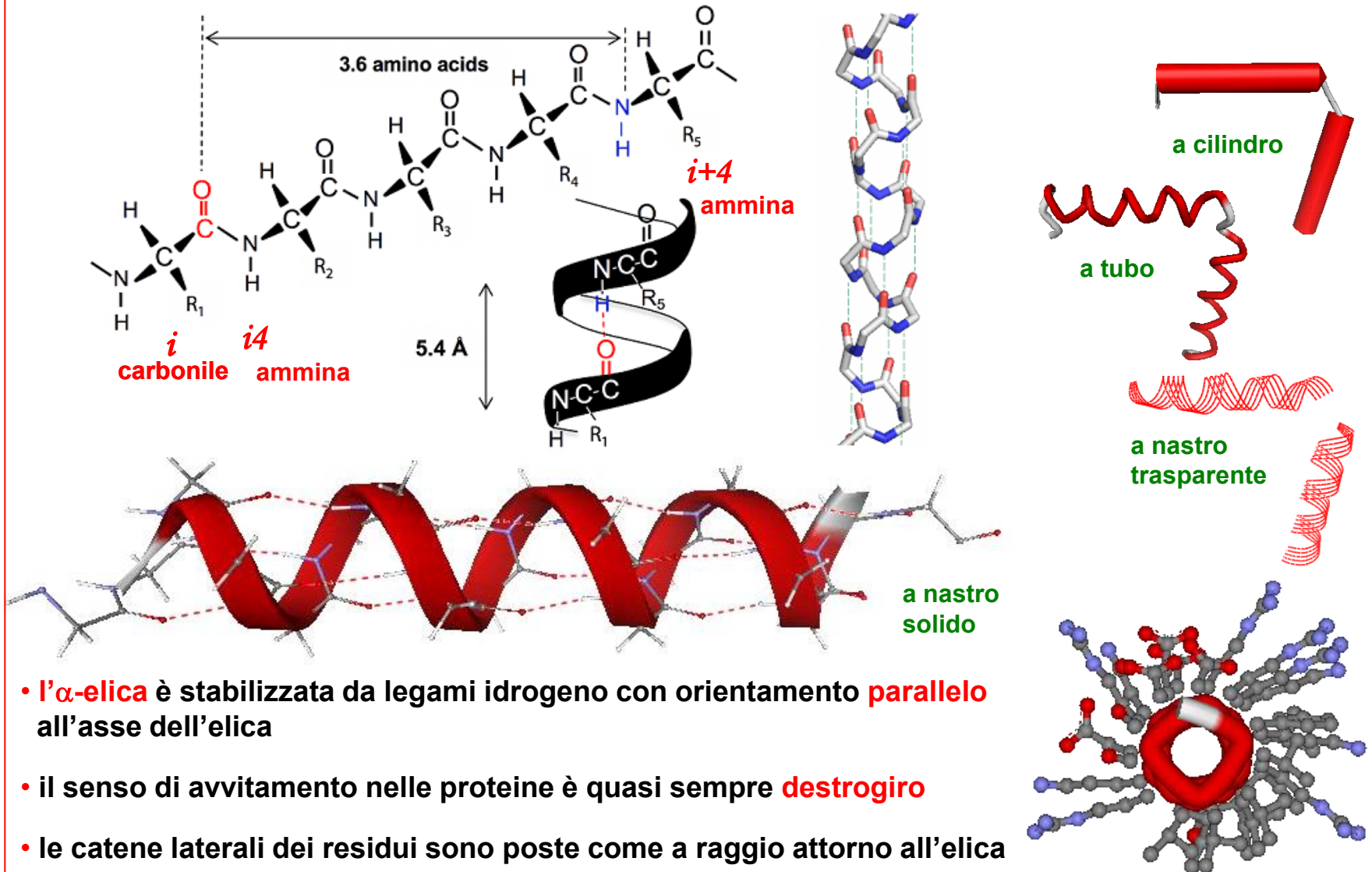
Esempi di struttura secondaria: l'alfa elica (α -elica)

$\phi \approx -60^\circ$; $\psi = -45^\circ - -50^\circ$; 3.6 residui / giro ; 5.4 Å di passo (1.5 Å / residuo)



Esempi di struttura secondaria: l'alfa elica (α -elica)

$\phi \approx -60^\circ$; $\psi = -45^\circ - -50^\circ$; 3.6 residui / giro; 5.4 Å di passo (1.5 Å / residuo)



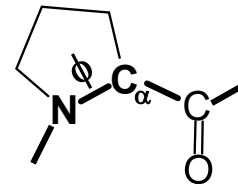
Es: mioglobina, miosina, cheratina....

Il ruolo dei singoli residui nel determinare strutture elicoidali

- Alcuni amminoacidi favoriscono la formazione di α - eliche più di altri

Ala, Leu, Met, Glu > Gly, Asp, Ser >> Pro

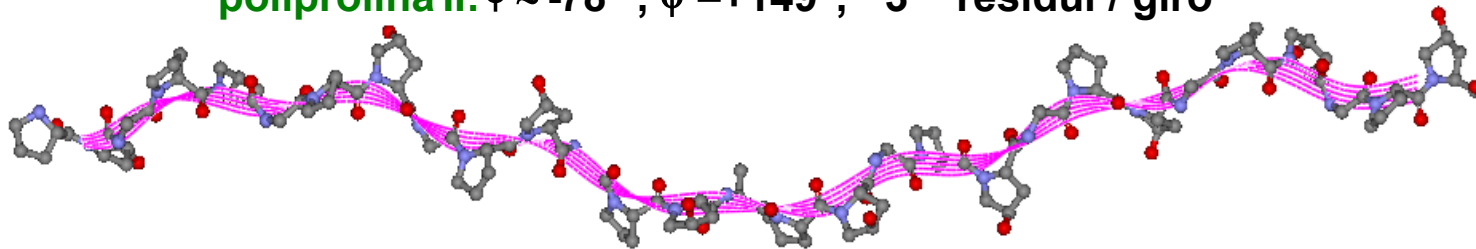
- Pro interrompe o distorce la conformazione ad α - elica
- ϕ bloccato a -65° , nel residuo successivo è quindi impedita la formazione dell'elica
- N imminico non è in grado di formare legami-H



- Sequenze ricche in Pro formano strutture elicoidali più estese e non stabilizzate da legami-H:

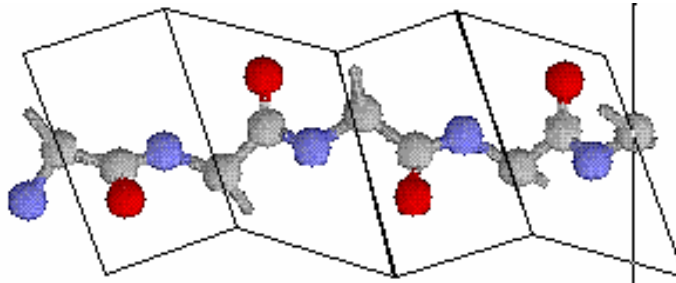
poliprolina I: $\phi \approx -83^\circ$; $\psi = +158^\circ$; 3.3 residui / giro;

poliprolina II: $\phi \approx -78^\circ$; $\psi = +149^\circ$; 3 residui / giro

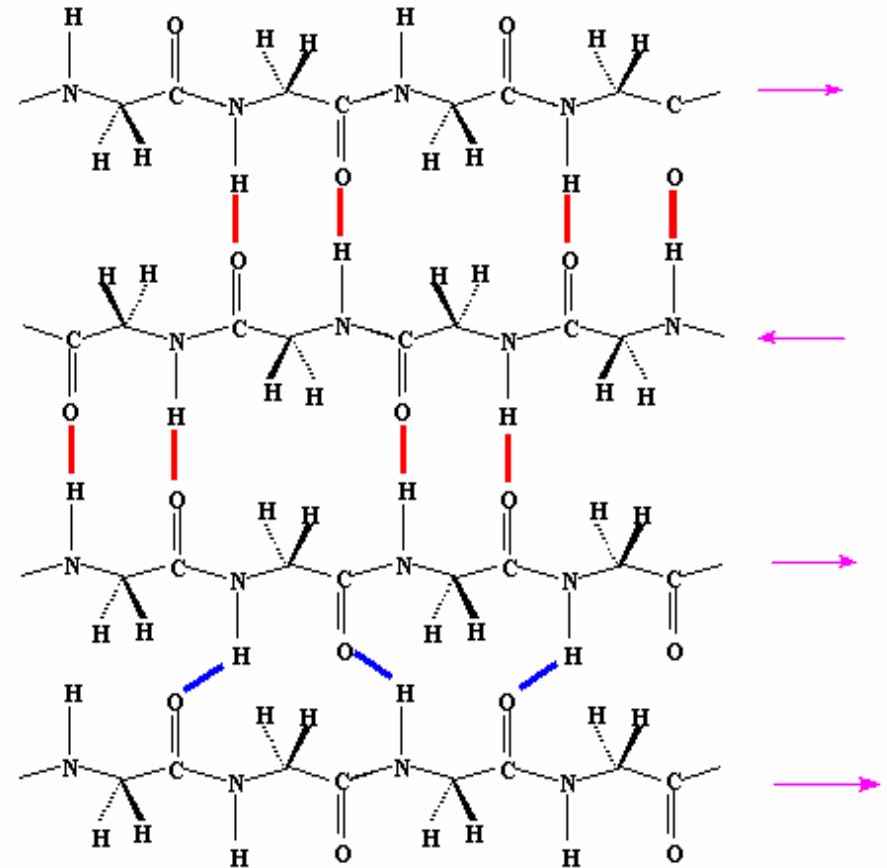


la struttura β e il β -foglietto

$\phi \approx -120^\circ$ a -140° ; $\psi = 110^\circ$ a $150^\circ \rightarrow \beta$ -struttura

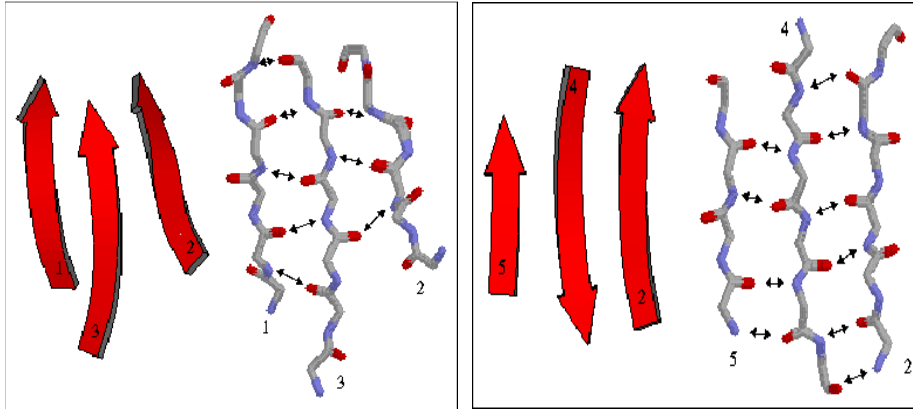


- i β -foglietti sono formati da due o più tratti con β -struttura
- i gruppi CO in un tratto a β -struttura formano legami-H con i gruppi NH di un altro tratto, formando il β -foglietto
- le catene laterali dei residui adiacenti puntano in direzioni opposte (zig-zag) sopra e sotto il piano del foglietto



Strutture a β -foglietto

- Nelle proteine, i β -foglietti sono raramente piatti. Formano piani distorti (1) o strutture cilindriche (2).



rappresentazione a freccia e a bastoncino



I filamenti- β sono comunemente rappresentati da nastri con punta a freccia che indica la direzione N-t $\rightarrow$ C-t



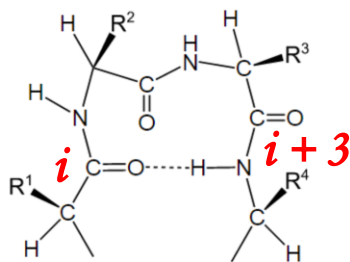
(2) β -barile

Ripiegamenti (*turn*) e strutture disordinate (*loop*)

i ripiegamenti

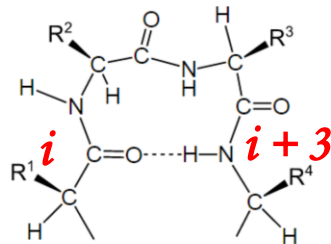
- permettono alla catena di cambiare direzione fra due tratti a conformazione regolare (fattori sterici permettendo)
- coinvolgono un legame-H fra l' α -carbonile di un residuo i ed il gruppo NH del residuo $i+2$ o $i+3$.
- residui come **Gly** e **Pro** sono frequenti nei ripiegamenti
- ci sono quattro tipi di **ripiegamenti stretti**, ciascuno con varianti:

β -turn type I



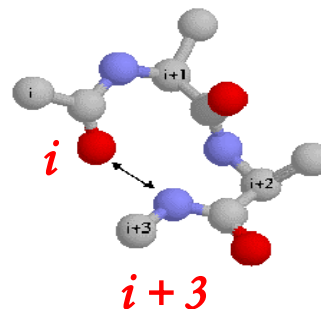
β turn: Type I

β -turn type II

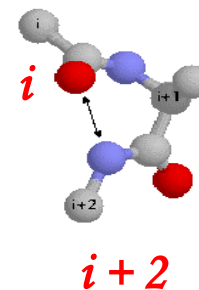


β turn: Type II

β -turn type III



γ -turn



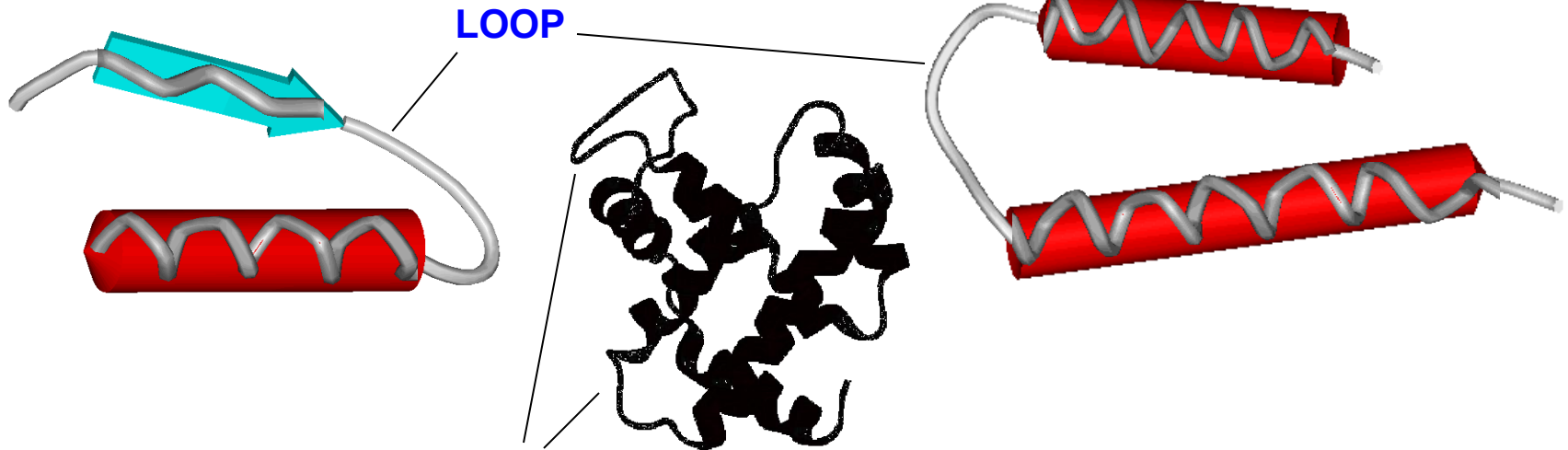
La β -forcina

- Un particolare elemento di struttura 2^a nel quale un ripiegamento congiunge due filamenti- β antiparalleli è noto come **β -forcina**



Strutture irregolari (*loop* o *cappi*)

- tratti con conformazione irregolare (generalmente da 6 a 16 residui) spesso congiungono tratti a conformazione regolare con un maggiore ingombro sterico.



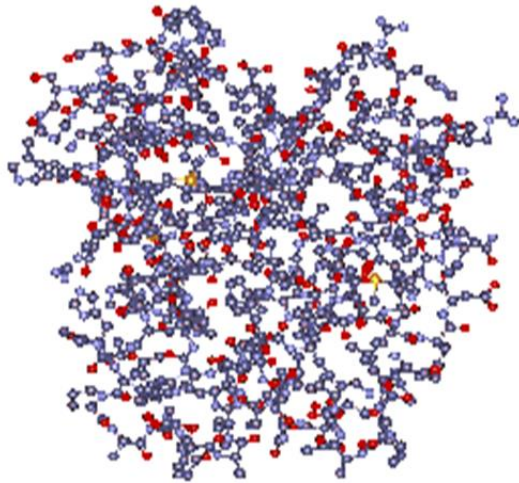
- tendono a collocarsi sulla superficie delle strutture proteiche

STRUTTURA TERZIARIA

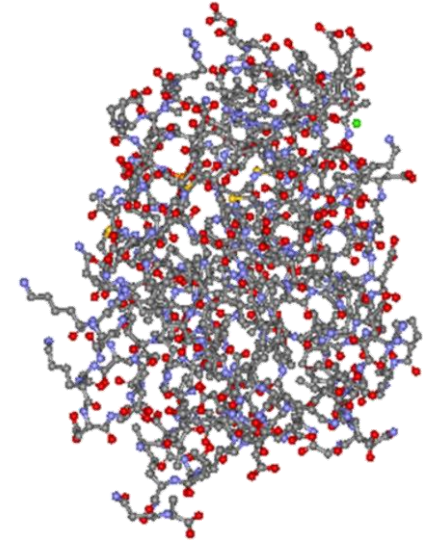
- Descrive il ripiegamento nello **spazio tridimensionale** di una **singola catena** polipeptidica e comprende **l'esatta posizione nello spazio di tutti gli atomi** che la compongono.
- A questo livello di struttura:
 - **tutti gruppi C=O ed NH** presenti nei legami peptidici, e gruppi presenti sulle catene laterali, tendono a formare **legami-H**
 - tratti con struttura secondaria regolare (α -eliche / β -foglietti) si associano
 - interazioni VDW ed idrofobiche iniziano ad avere un ruolo stabilizzante
 - I tratti di congiunzione (turn e loop) sono brevi e generalmente posti sulla superficie
 - **non vi è spazio libero** nel nucleo della struttura
- In generale, nelle **proteine globulari**, idrosolubili:
 - le catene laterali dei **residui apolari** si raggruppano **all'interno** della struttura
 - le catene laterali dei **residui polari** restano sulla **superficie**

STRUTTURA TERZIARIA

- Descrive il ripiegamento nello **spazio tridimensionale** di una **singola catena** polipeptidica e comprende **l'esatta posizione nello spazio** di tutti gli **atomi** che la compongono.



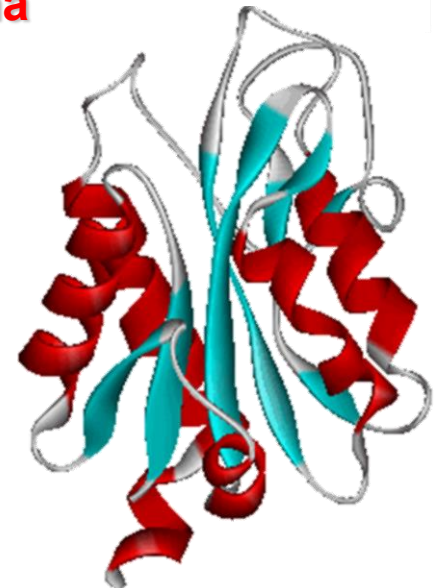
rappresentazione
ball & stick



Flavodossina

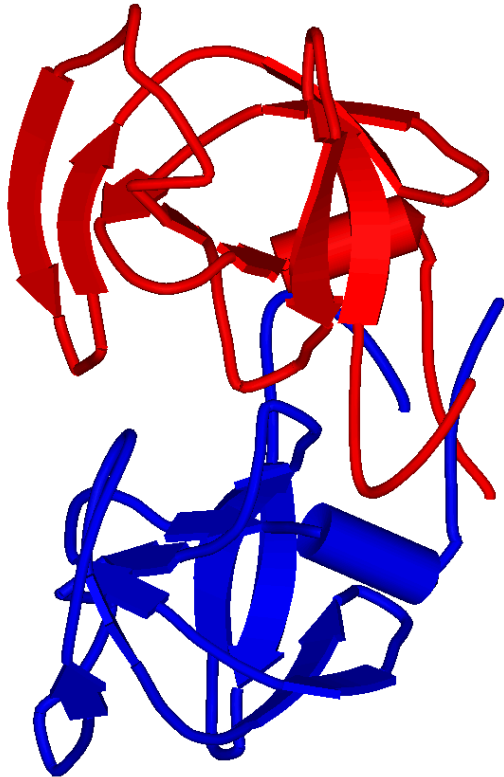


rappresentazione
a nastro

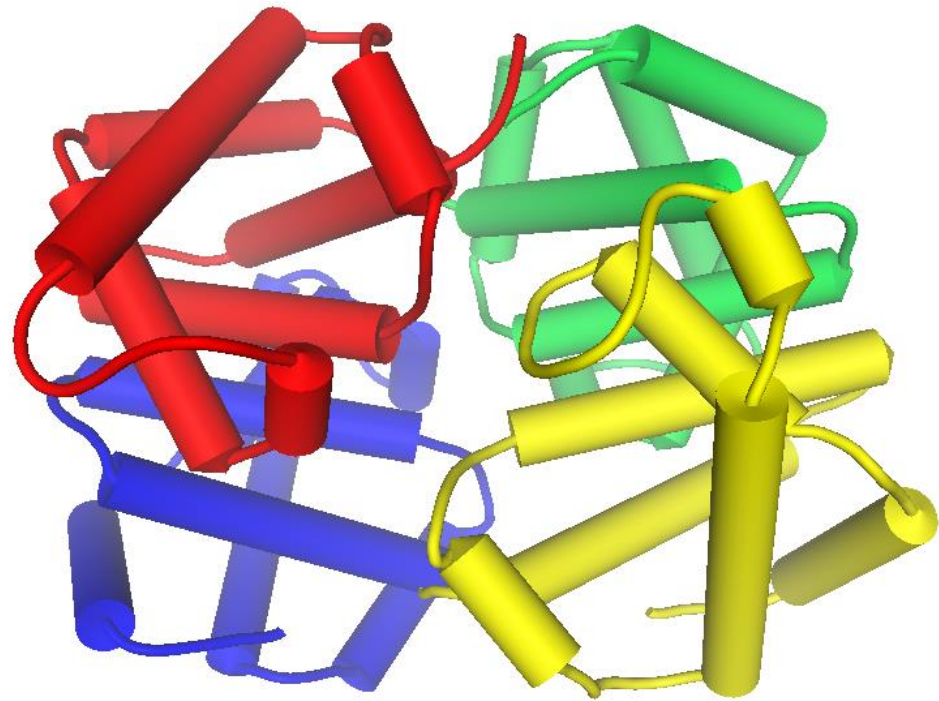


STRUTTURA QUATERNARIA

associazione di più catene polipeptidiche (subunità) per formare oligomeri



**l'aspartico proteasi di HIV-1:
un omodimero**

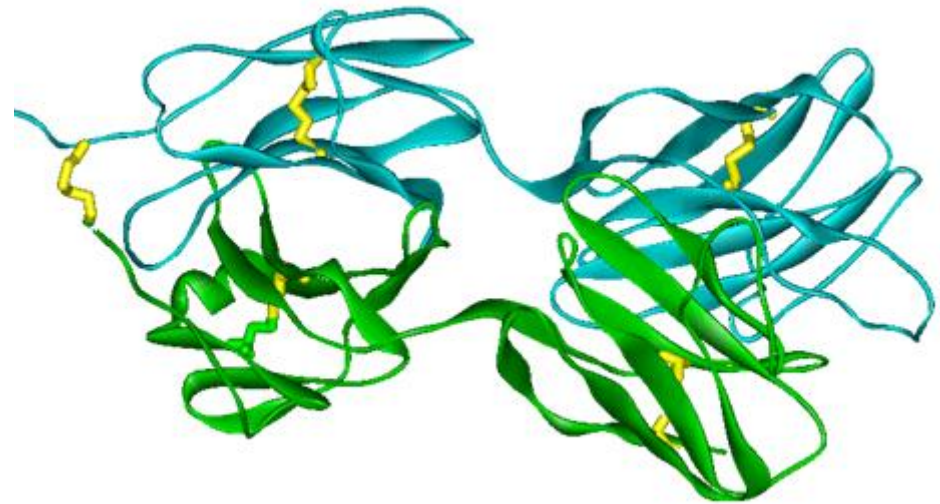


**l'emoglobina :
un eterotetramero di tipo $\alpha_2\beta_2$**

3^a (+) MODIFICAZIONI COVALENTI

- **PONTI DISOLFURO:**

molte proteine sono composte da due o più catene legate da ponti disolfuro

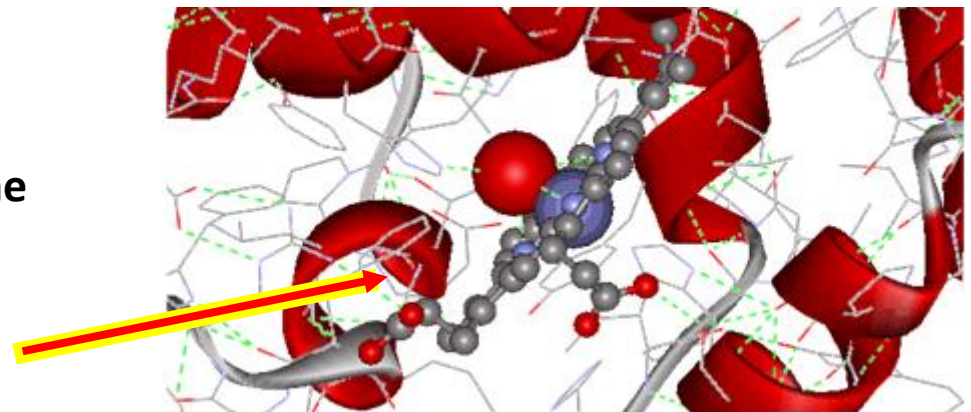


*Immunoglobulina
(frammento)*

- **GRUPPI PROSTETICI:**

molecole legate covalentemente o non-covalentemente a molte proteine e necessarie per la loro funzione.

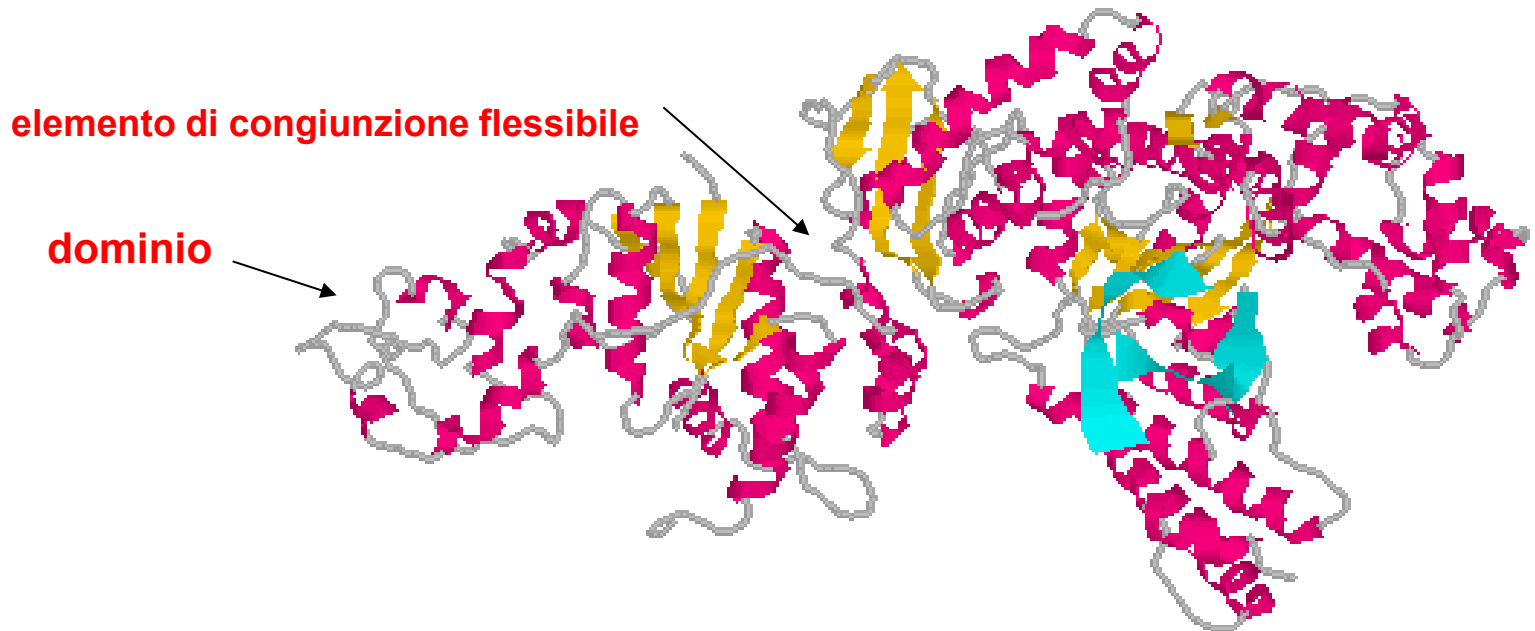
per esempio, molte proteine, come l'emoglobina, legano un gruppo eme (porfirina)



sito attivo dell'emoglobina

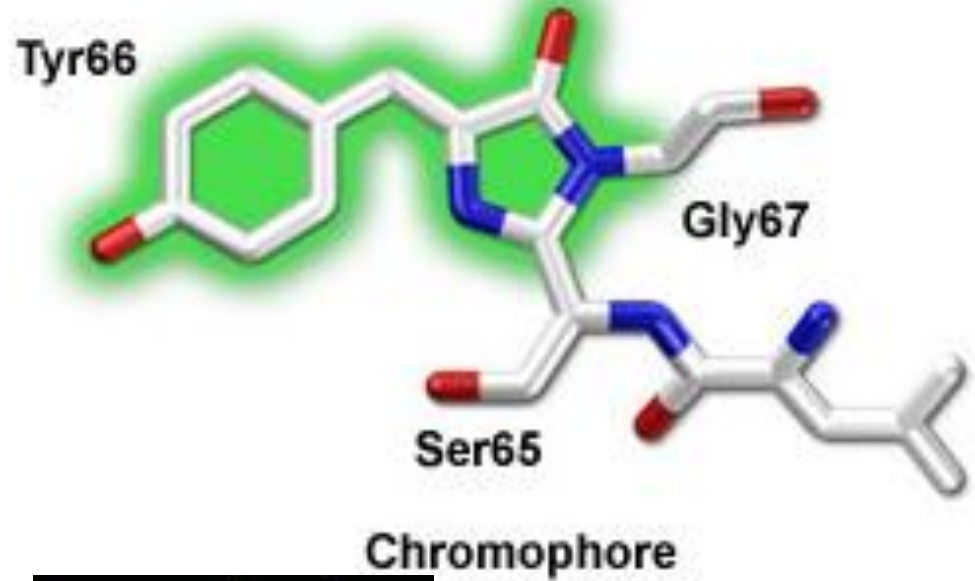
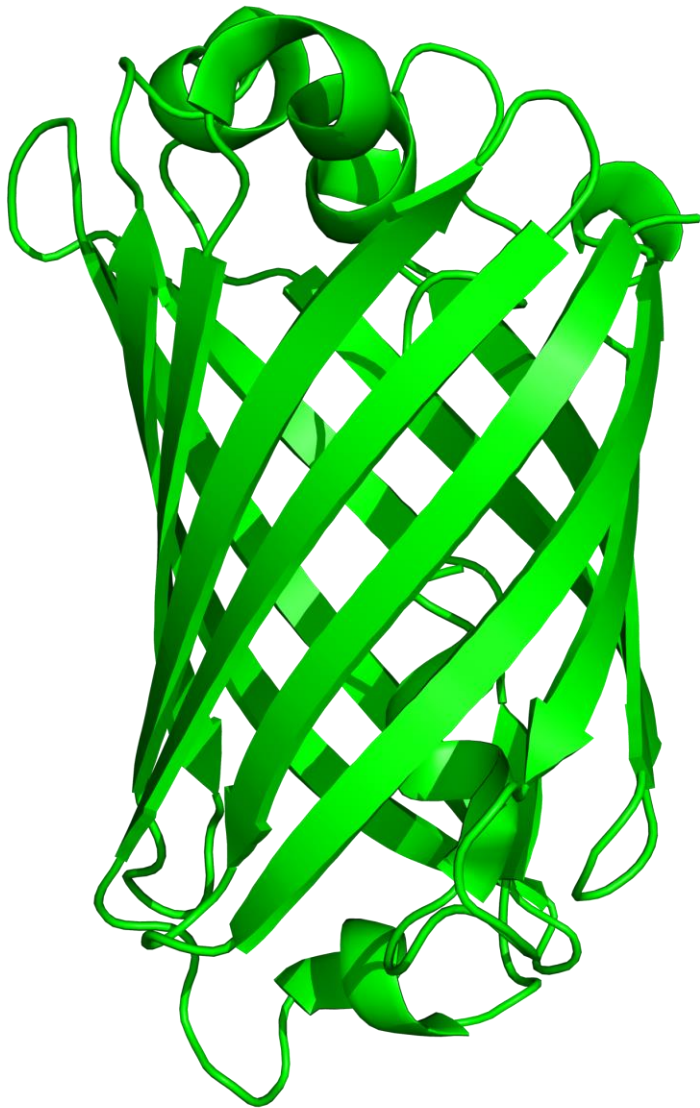
3^a (+) DOMINI STRUTTURALI

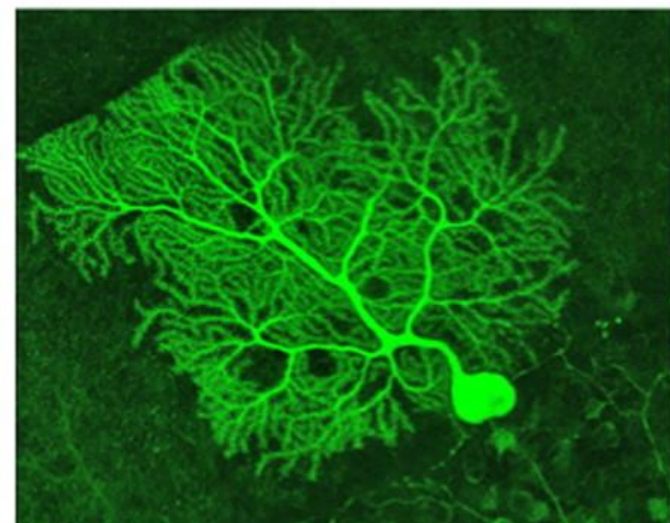
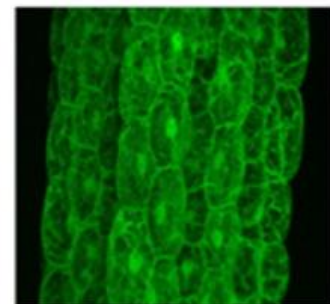
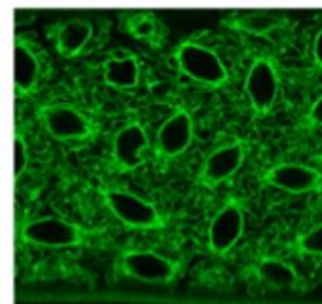
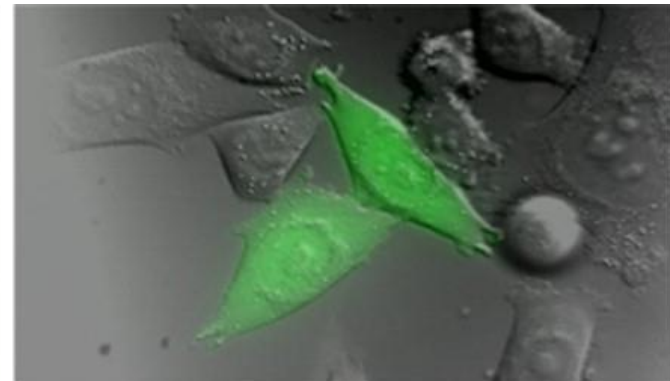
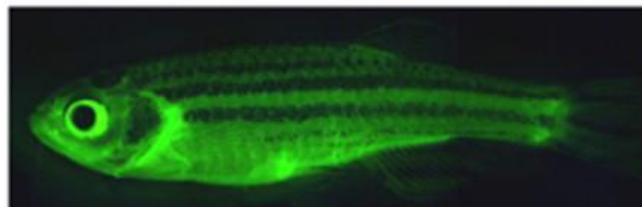
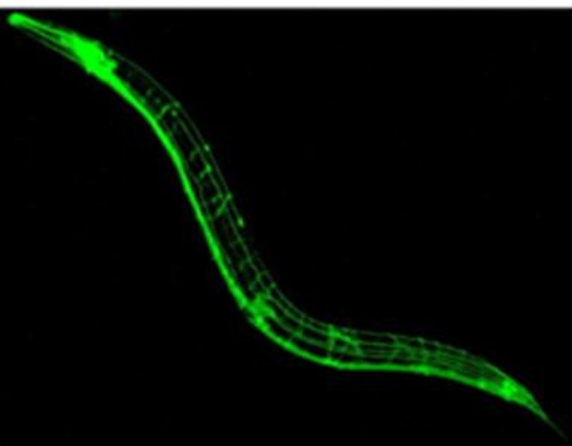
- Alcune proteine, anche se a singola catena, hanno domini strutturali ben distinti.
- Tratti di sequenza che si strutturano autonomamente dando luogo a regioni strutturali compatte (moduli proteici) separate da segmenti flessibili.
- Molte proteine hanno una struttura composta da moduli proteici che si susseguono, simili (es. immunoglobuline) o completamente diversi (es. DNA polimerasi, acido grasso sintasi)



DNA polimerasi: una singola catena con tre domini, ciascuno con la propria struttura e funzione

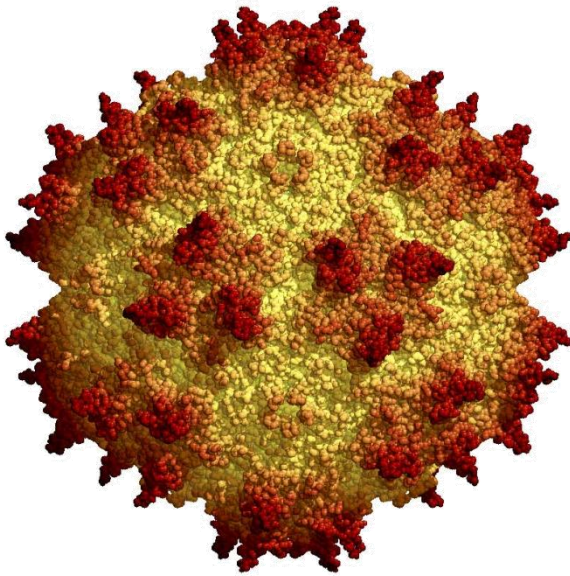
Green fluorescent protein (GFP)



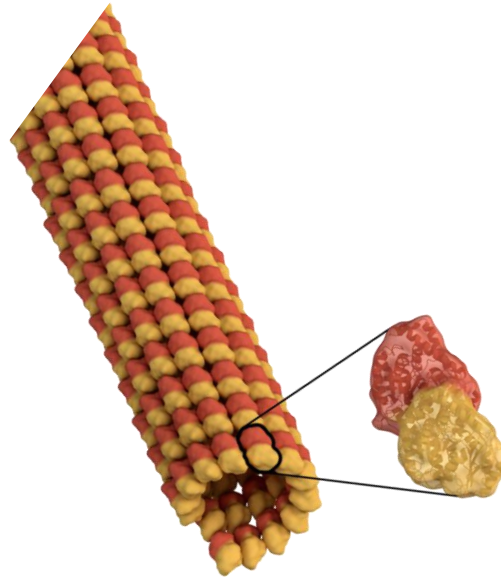


STRUTTURE SUPRAMOLECOLARI

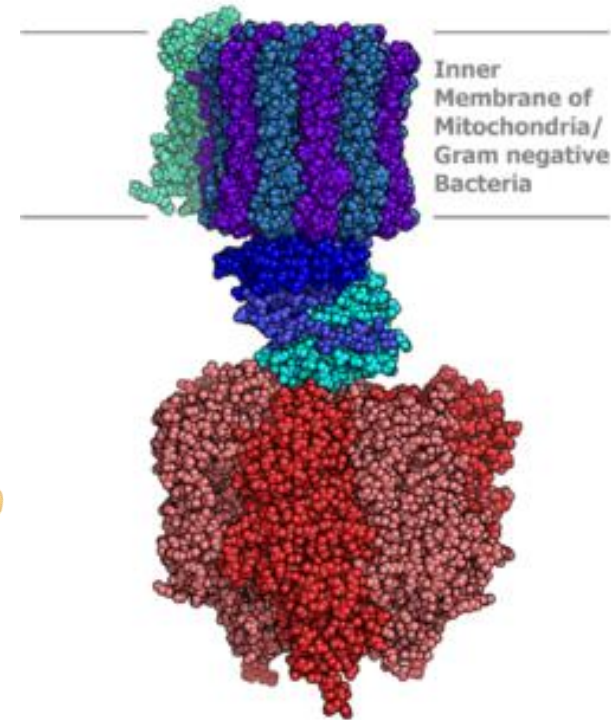
- La struttura quaternaria può comprendere moltissime subunità proteiche in complessi su larga scala. Questi possono essere di tipo '*chiuso*' o '*aperto*'



*capside di virus
(struttura chiusa)*



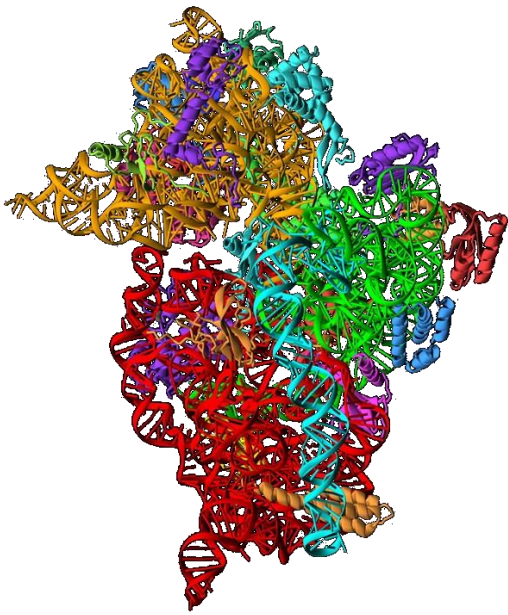
*protofilamento
di microtubulo
(struttura aperta)*



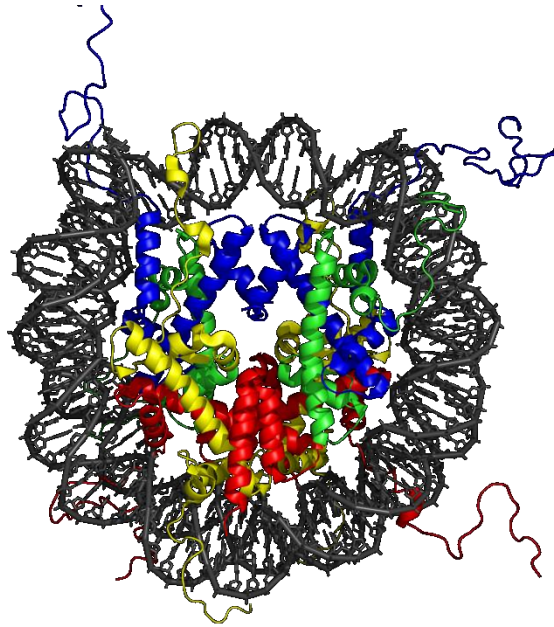
*ATP sintasi
(struttura chiusa)*

4^a (+) **STRUTTURE SUPRAMOLECOLARI**

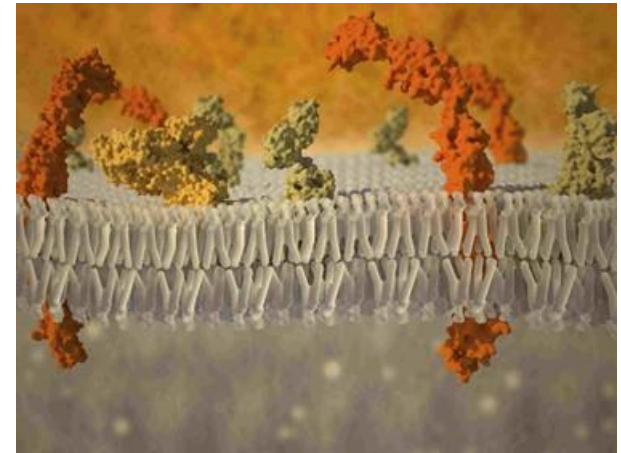
- Le subunità proteiche possono interagire con macromolecole non proteiche; per esempio gli acidi nucleici (es. nucleosomi e ribosomi).



subunità proteiche
+ acidi nucleici
ribosoma

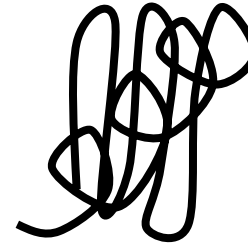
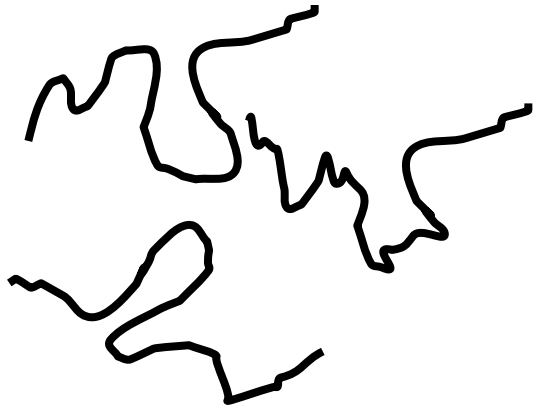


subunità proteiche
+ acidi nucleici
nucleosoma



fosfolipidi
+ glicoproteine
membrane biologiche

STRUTTURAZIONE DELLE PROTEINE



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

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

Proteina NATIVA

Principi della strutturazione proteica:

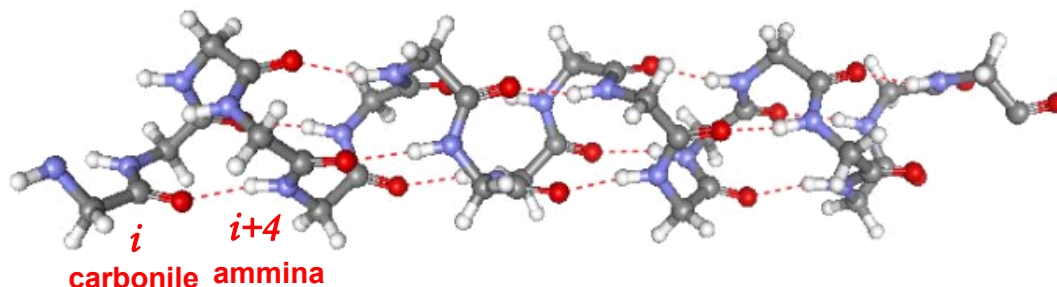
- 1) La sequenza determina la struttura
- 2) ...

Tendenze intrinseche degli amminoacidi a formare strutture 2^{ie}

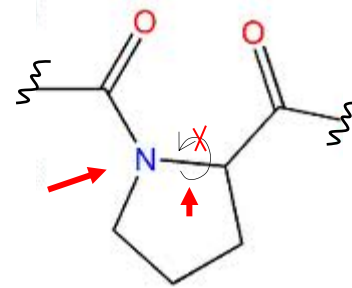
- **Ala, Leu, Arg, Gln** → favoriscono la formazione di α -elica
- Altri amminoacidi invece non la favoriscono per ragioni steriche:

$C\alpha - \beta$ ramificazione al carbonio β (es **Val, Ile**)

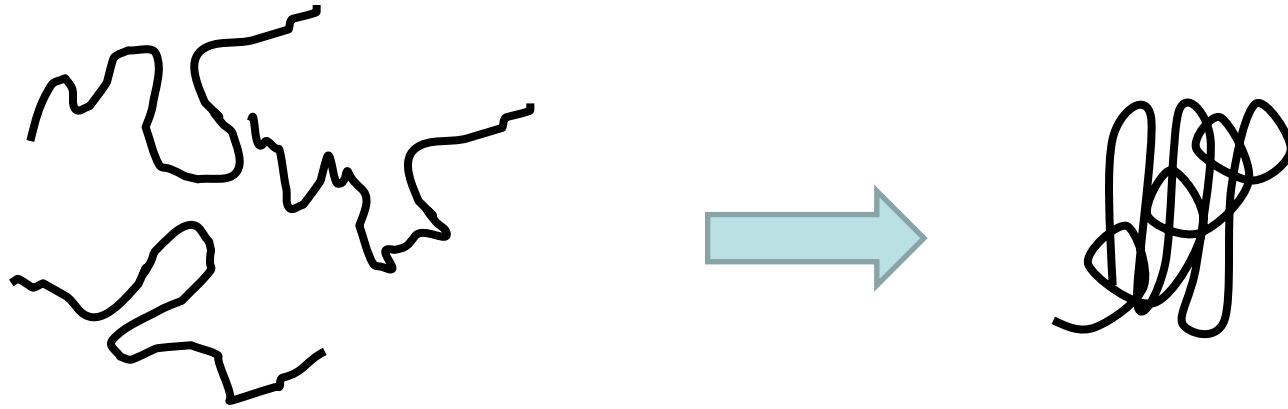
$C\alpha - \begin{matrix} \text{O} \\ \text{C} \\ \text{OH} \end{matrix}$ $C\alpha - OH$ gruppi donatori/accettori per legami-H vicini al $C\alpha$
(es. **Asp, Ser**)



Pro → destabilizza α -elica e β -foglietto sia per ragioni steriche sia per l'incapacità di formare legami-H



STRUTTURAZIONE DELLE PROTEINE



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

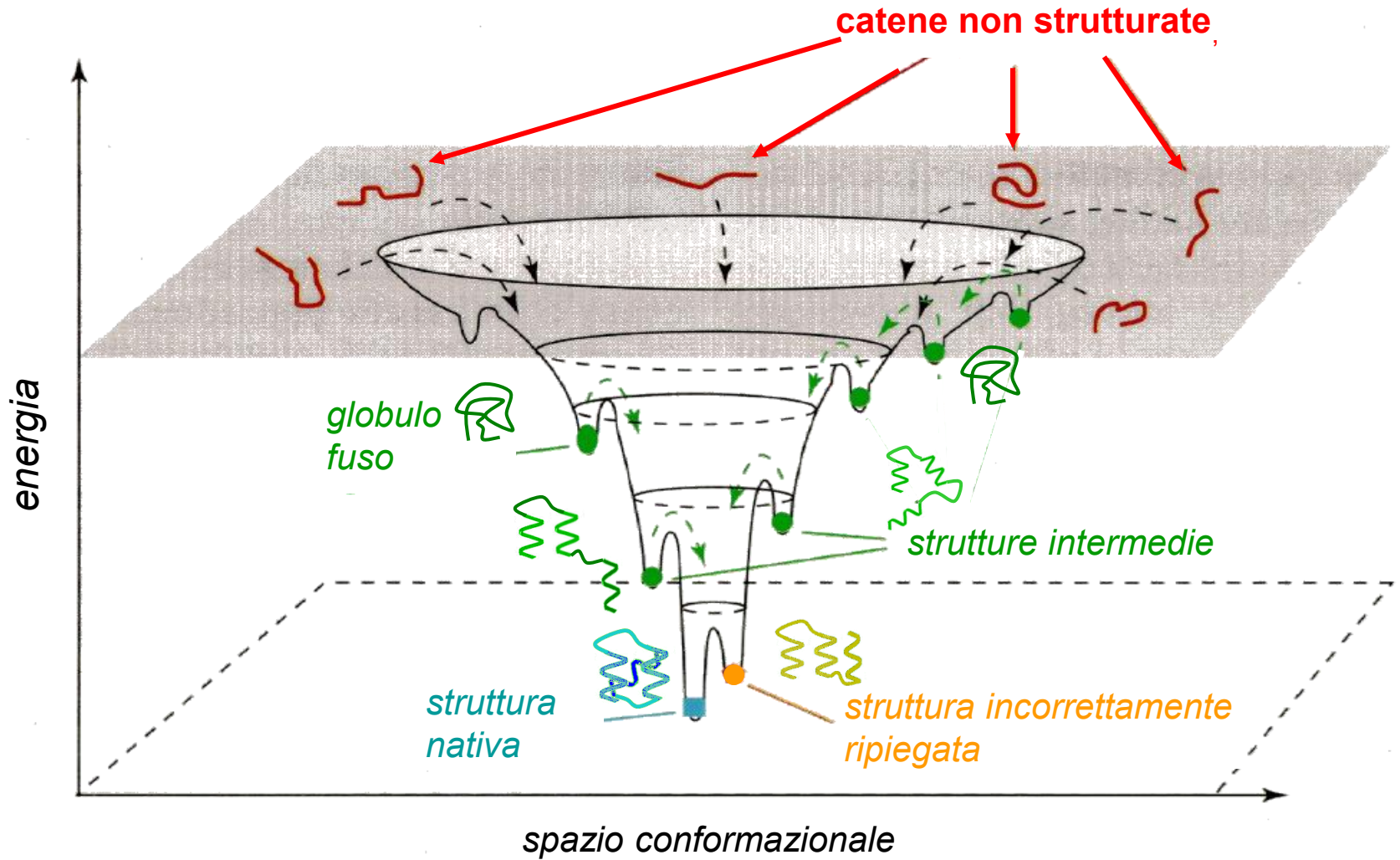
Un solo tipo di struttura avvolta
(*folded state*)

Proteina NATIVA

Principi della strutturazione proteica:

- 2) ... La struttura determina la funzione
- 3) Esiste (generalmente) SOLO UNA struttura nativa
- 4) La struttura dipende da FORZE DEBOLI (non covalenti)
 - forze idrofobiche - massimo numero di legami-H
- 5) Strutture native diverse hanno COMPONENTI STRUTTURALI COMUNI

Panorama energetico per il ripiegamento



RIPIEGAMENTO (FOLDING) DELLE PROTEINE

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 → **99 legami peptidici** → 3 possibili angoli phi/psi →

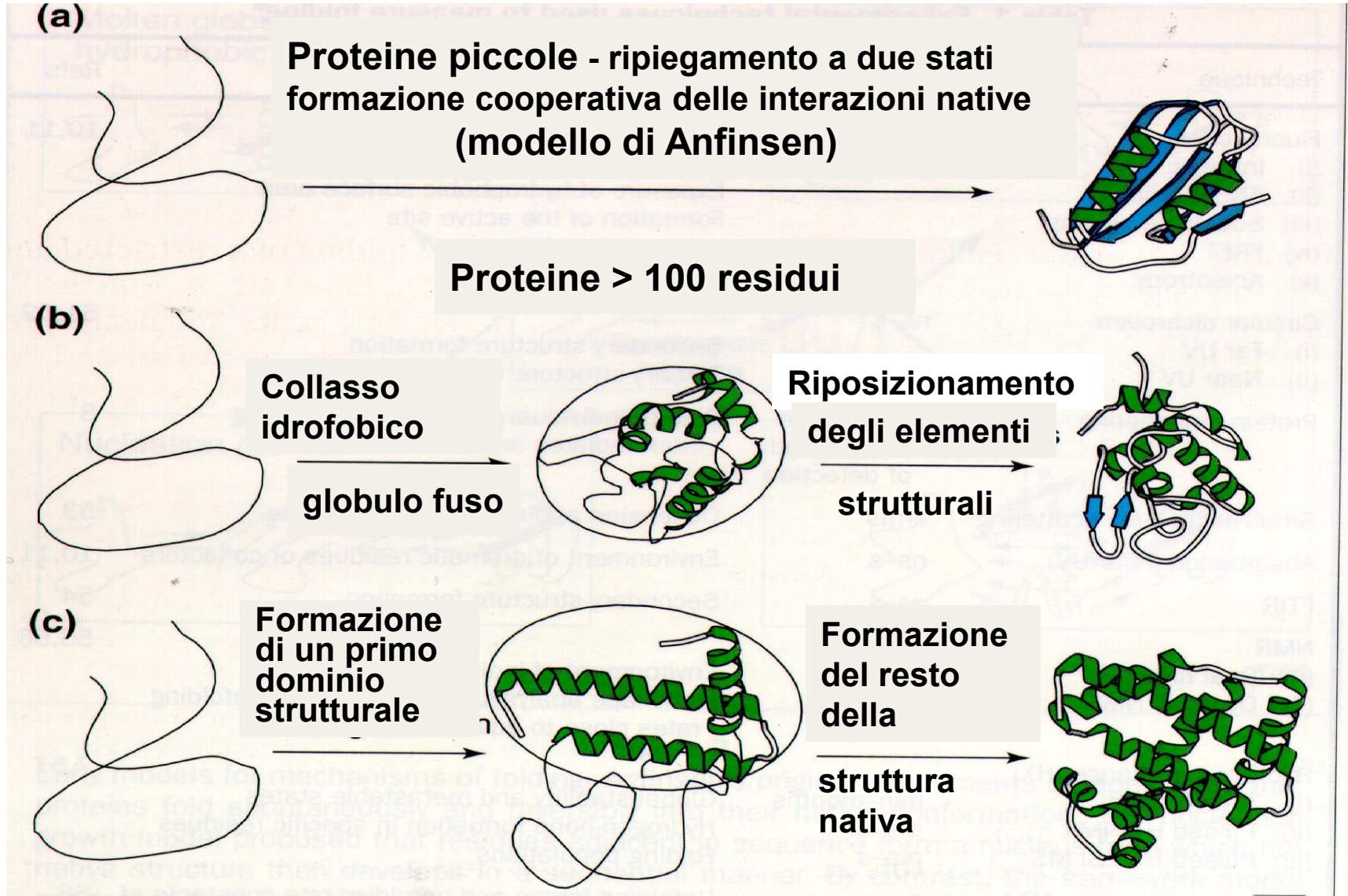
3^{198} possibili strutture → tempo enorme (>miliardi di anni)

MA (!!)...

Una caratteristica essenziale del processo di ripiegamento riduce il tempo necessario per il ripiegamento a millisecondi/secondi: la conservazione di elementi parzialmente corretti

→ elementi ben ripiegati sono stabili e aiutano a stabilizzare regioni vicine: il ripiegamento delle proteine è un processo COOPERATIVO.

Processi di ripiegamento



DENATURAZIONE DELLE PROTEINE

Il processo di ripiegamento delle proteine non è irreversibile

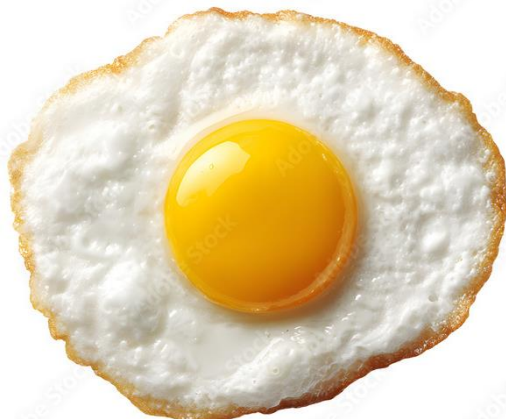
- modificando le condizioni che hanno portato al ripiegamento alla proteina ripiegata, possiamo farla «uscire» dalla sua conformazione nativa e più stabile.
- Cambio di T, pH, solvente, forza ionica...

DENATURAZIONE DELLE PROTEINE

Il processo di ripiegamento delle proteine non è irreversibile

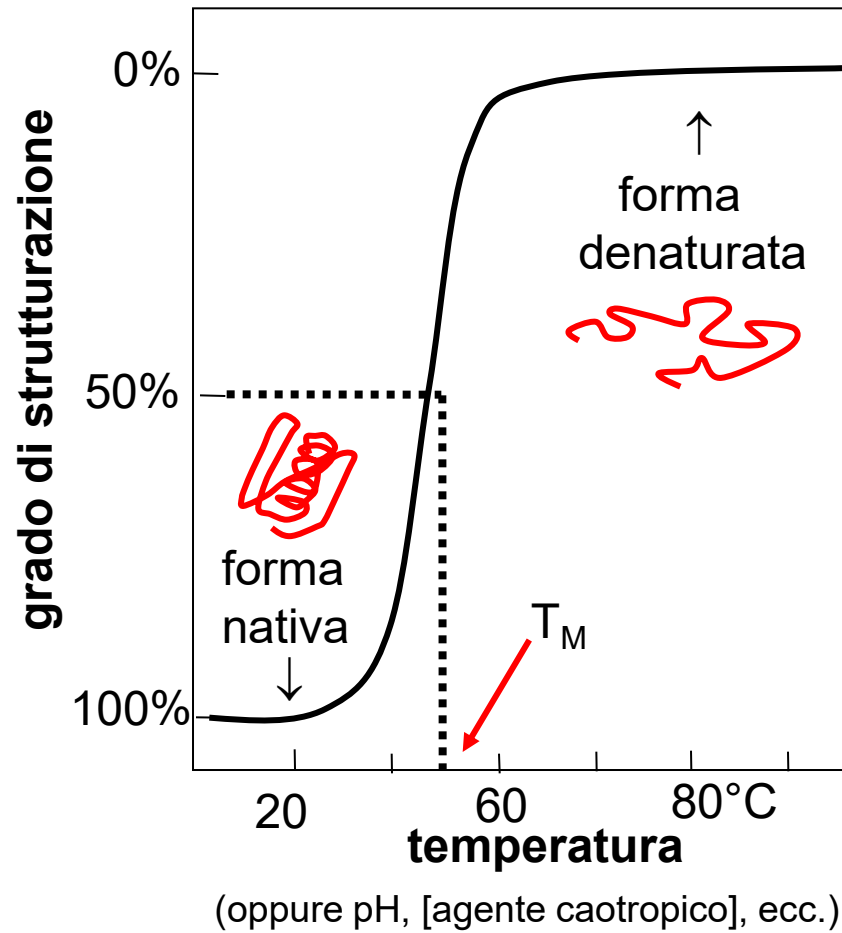
→ modificando le condizioni che hanno portato al ripiegamento alla proteina ripiegata, possiamo farla «uscire» dalla sua conformazione nativa e più stabile.

→ Cambio di T, pH, solvente, forza ionica...



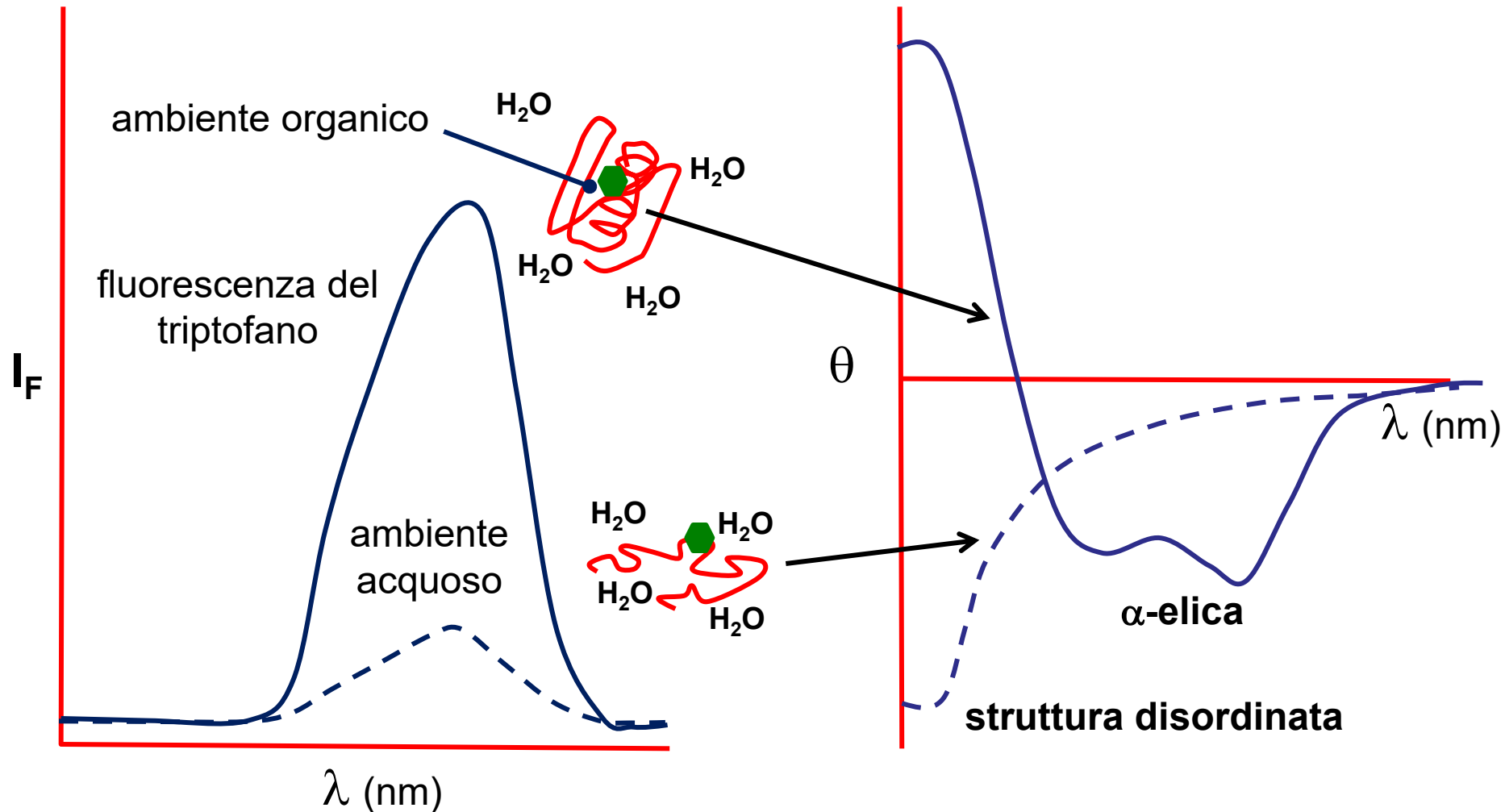
Denaturazione delle proteine

Curva di denaturazione



Monitoraggio sperimentale del ripiegamento

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

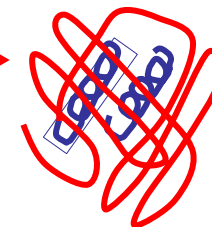
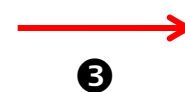
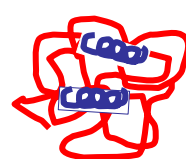
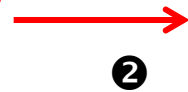
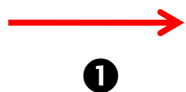


random coil

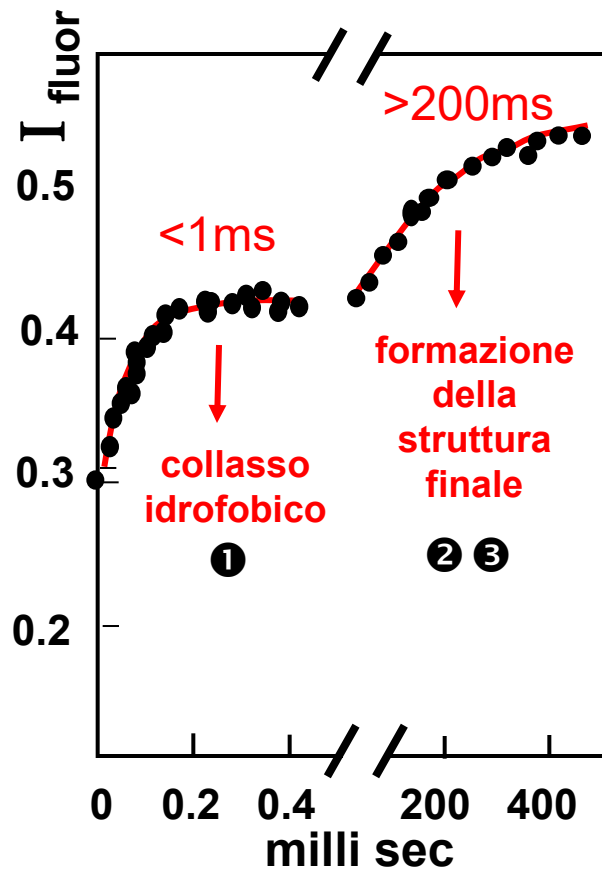
molten globule

2^y structure

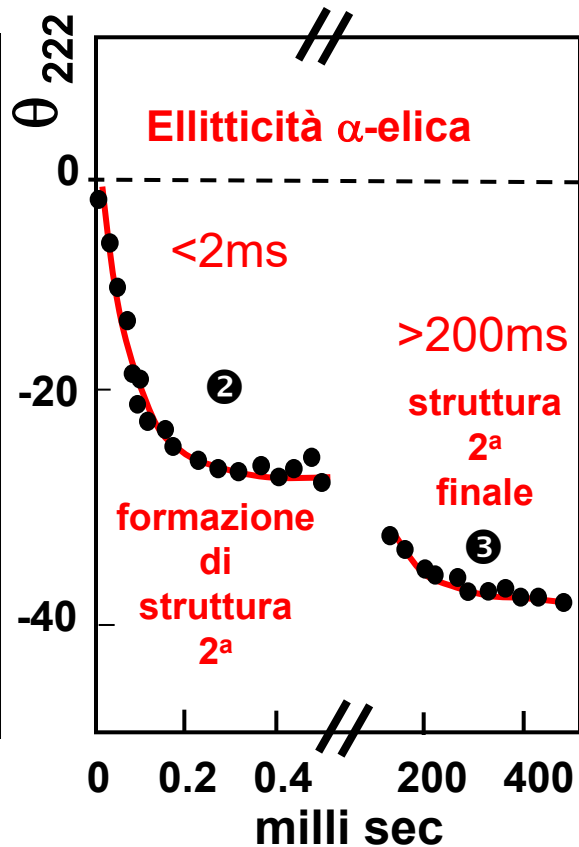
3^y structure



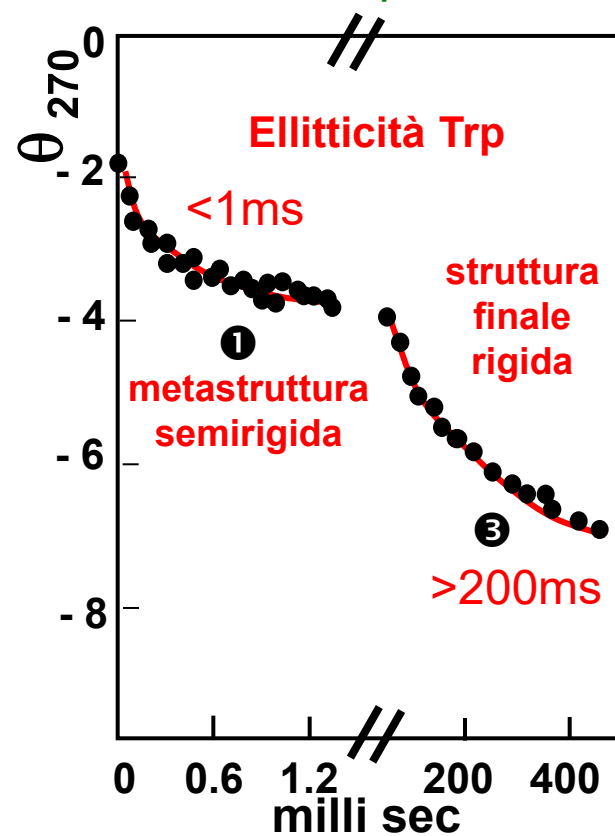
fluorescenza (Trp)



dicroismo circolare
catena



dicroismo circolare
Trp



tempo di ripiegamento

Ripiegamento *in vitro* ed *in vivo* – ripiegamento assistito

- **Le isomerasi velocizzano il ripiegamento:** questi sono enzimi che catalizzano conversioni stereoisomeriche a livello di singoli residui (ma **non** dirigono folding)

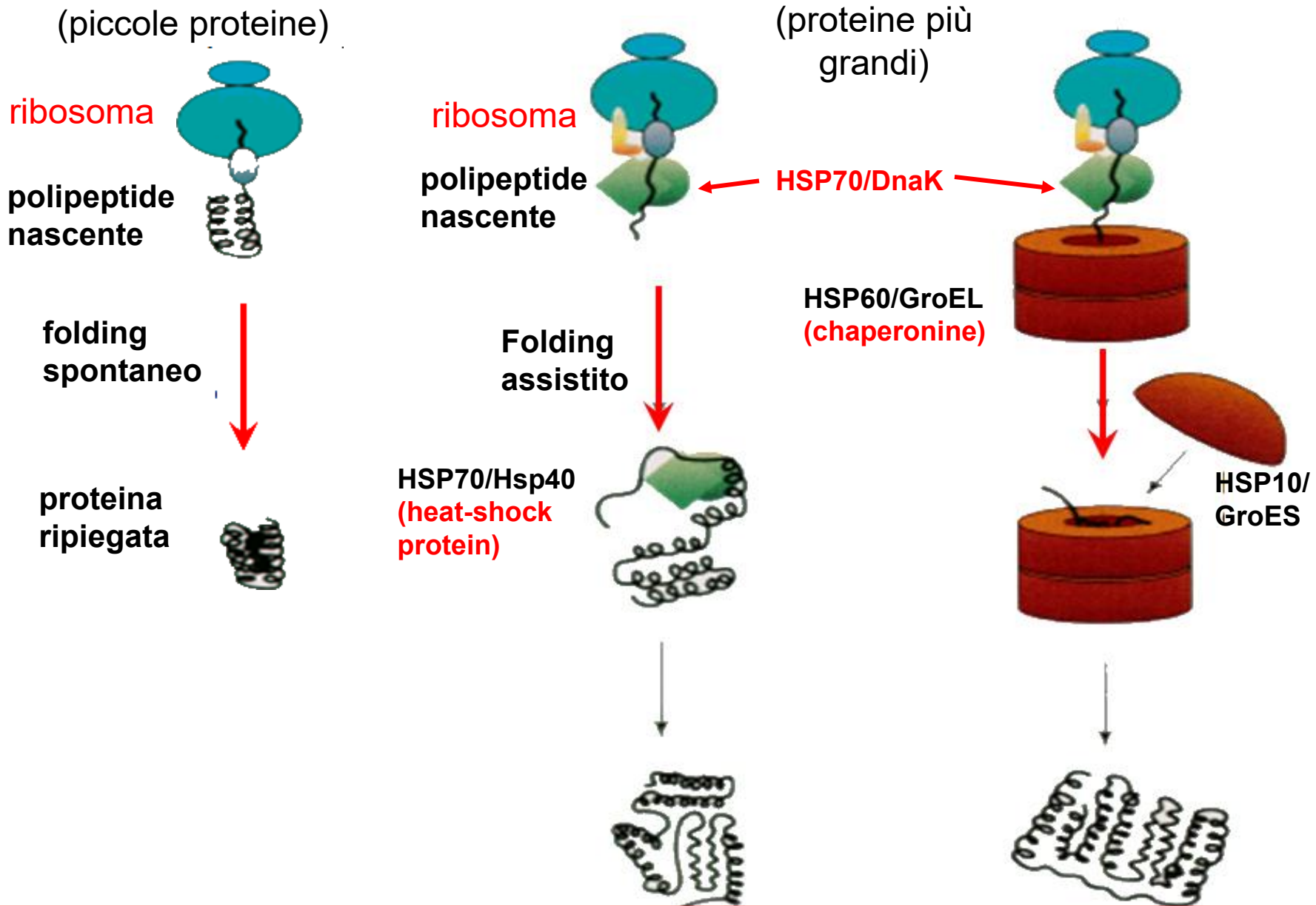
PPlasi - (Peptidilprolil isomerasi o cis/trans isomerasi)

- proteine ubiquitarie e abbondanti, con diversi ruoli.
- catalizzano la conversione fra le configurazioni *cis* e *trans* nei residui di prolina

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.**
- contengono residui di cisteina reattivi che possono sostituirsi temporaneamente ad una delle due cisteine in un ponte disolfuro, permettendo all'altra di formare un legame con un partner diverso.

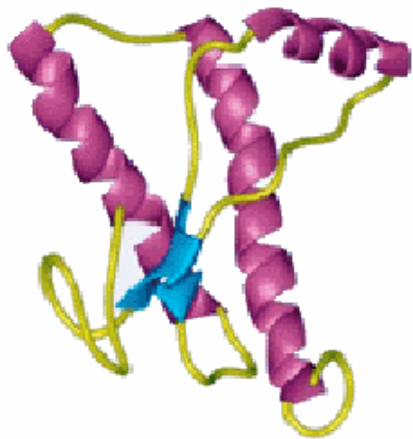
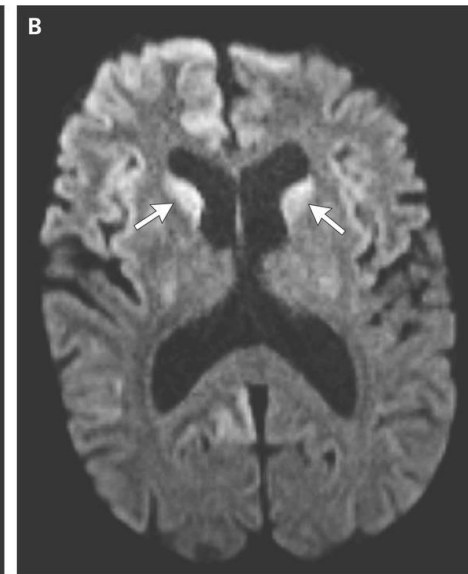
'CHAPERONE' MOLECOLARI: un aiuto, specie contro l'affollamento





Heat-shock proteins





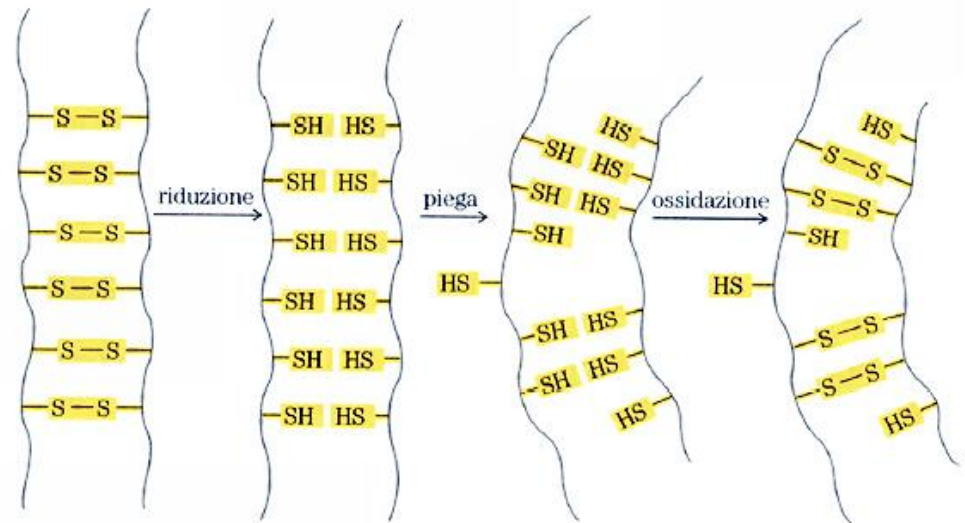
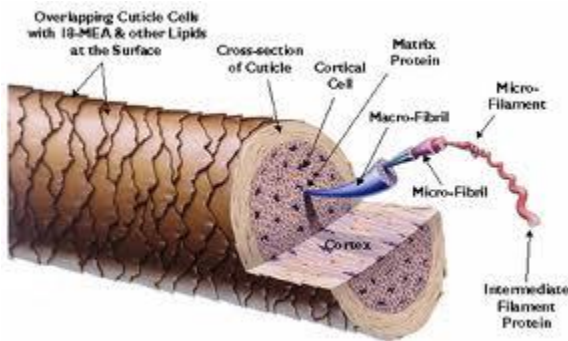
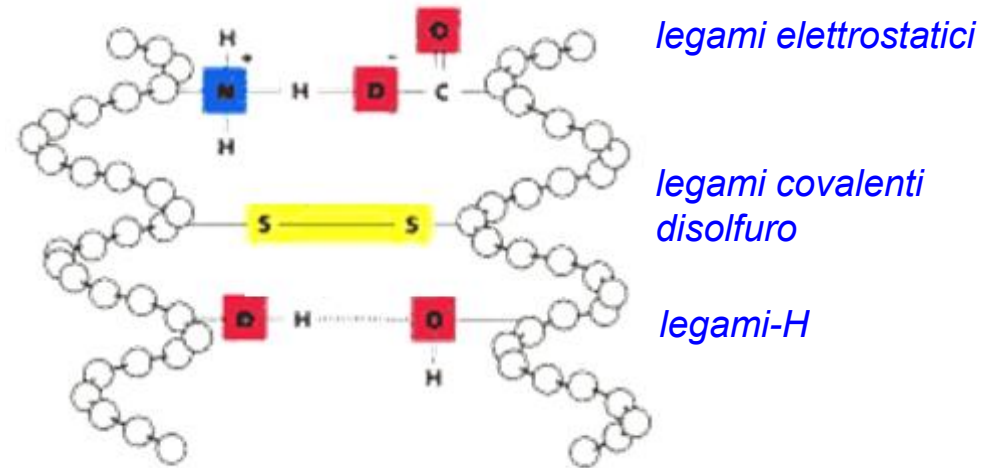
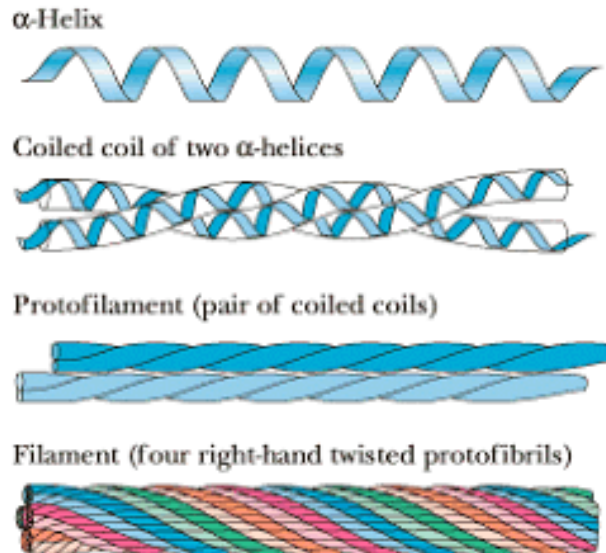
forma fisiologica

**Proteine fibrillari
Mieloidi
prioni**



forma patologica

«Messa in piega» e «permanente» - operazioni di ingegneria biochimica sulla struttura della cheratina



Relazioni

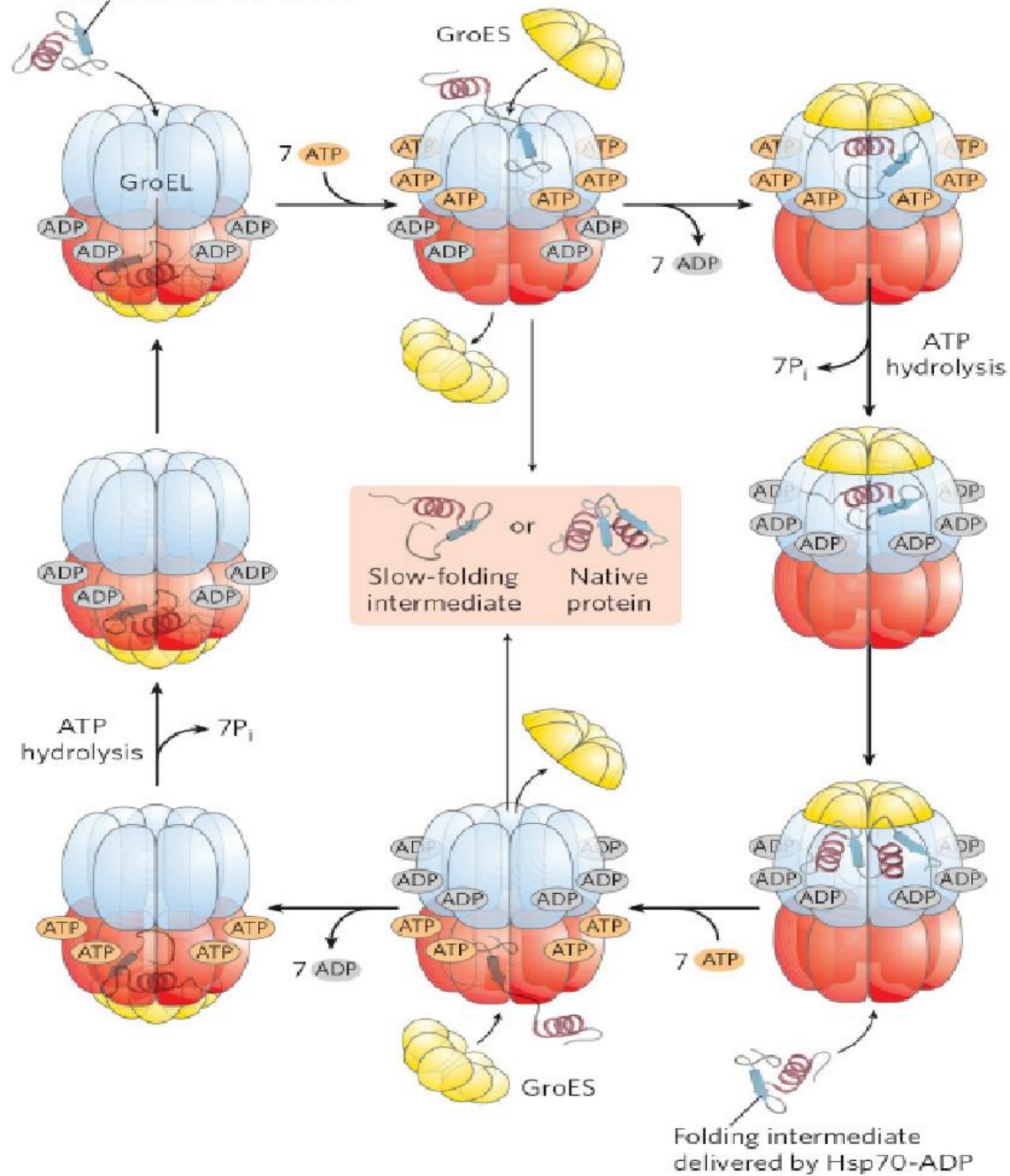
Contenuti:

- Nome cognome, altri membri del gruppo
- Un paio di frasi ad inquadrare l'argomento dell'esperienza
- Per ogni procedura, spiegare il razionale: es. «diluisco il campione per evitare che la concentrazione troppo alta impedisca la misura».
- Per ogni serie di conti (diluizioni, calcoli di concentrazione), riportare il razionale del calcolo (la formula impiegata ed un esempio applicativo), poi bastano i risultati.
- Se richiesto, grafico, con etichette degli assi ben indicate.
- Breve commento critico del risultato sperimentale finale ottenuto. Es. «la concentrazione misurata del lisato è X, quindi....sembra abbastanza concentrato, molto meno concentrato di tutti i colleghi, abbiamo sbagliato, etc.».
- Max 2 facciate grafici inclusi. Possibile sforare con penalità.

Siamo stati tutti agli inizi...



(a) Folding intermediate delivered by Hsp70-ADP



GROES

