

Chaperoni di Folding

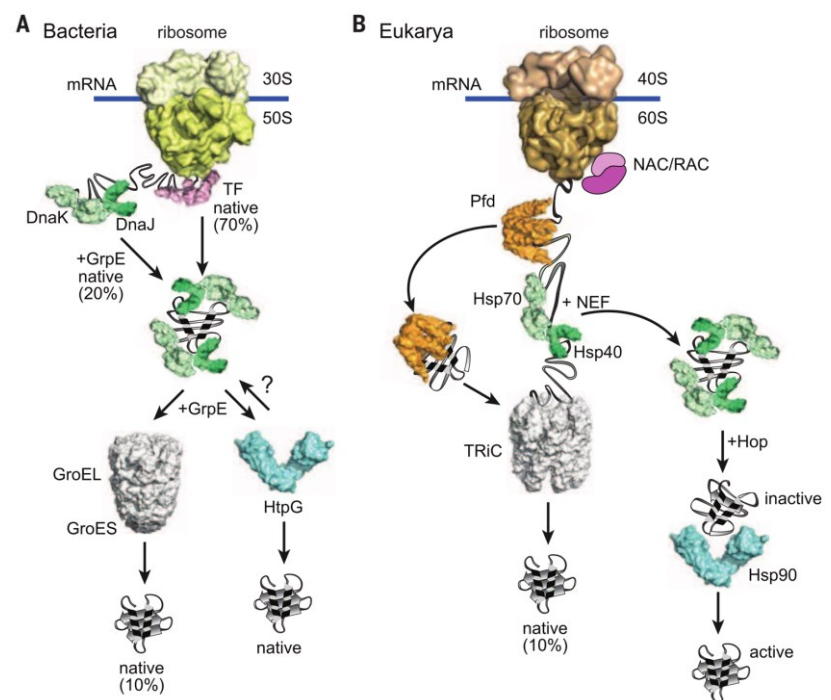
Gli chaperoni di folding comprendono un insieme di famiglie di proteine. Queste proteine vengono classificate in base alla loro massa molecolare.

Confronteremo cosa succede in una cellula procariote e cosa succede in una cellula eucariote.

La proteina neosintetizzata in uscita dal ribosoma esce dal ribosoma e trova all'uscita il primo chaperone di folding (*trigger factor* nei procarioti e NAC/RAC negli eucarioti). Successivamente, in forma completamente distesa, incontra la prima famiglia di chaperoni, gli Hsp70.

La proteina comincia così a ripiegarsi e strutturarsi.

A questo punto può diventare il target della famiglia di chaperoni Hsp60, oppure con un altro meccanismo può interagire con gli chaperoni della famiglia Hsp90.



Non tutte le proteine hanno bisogno di ricorrere all'aiuto degli chaperoni nel folding. Proteine a folding rapido non hanno problemi nel folding, quindi non intervengono chaperoni nel processo. Alcune proteine saranno assistite solo dagli Hsp70, altre da Hsp70 ed Hsp60. Altre ancora avranno bisogno dell'Hsp90 per mantenere una conformazione metastabile.

Solo circa il 10% delle proteine avranno bisogno di tutti questi passaggi per il ripiegamento. Alcune si ripiegheranno senza utilizzo di chaperoni, circa il 70% userà solo il primo chaperone in uscita dal ribosoma.

Gli chaperoni sono quindi importantissimi, non sono però tutti indispensabili nella stessa combinazione per tutte le proteine.

Hsp70

Oltre ad intervenire in una fase precoce del folding delle proteine, questi enzimi hanno molte altre funzioni.

Hsp è l'acronimo di Heat Shock Protein, usato perché queste proteine sono state isolate in cellule che erano state sottoposte a stress termico.

La concentrazione di queste proteine aumenta in condizioni di stress, anche se comunque sono espresse in modo costitutivo, ed a livelli anche abbastanza alti.

Le Hsp70 sono presenti sia nei procarioti che negli eucarioti, e sono specializzate in base al compartimento in cui si trovano. Negli eucarioti troviamo chaperoni citoplasmatici, chaperoni localizzati nel reticolo endoplasmico e chaperoni che troviamo nei mitocondri o nei cloroplasti.

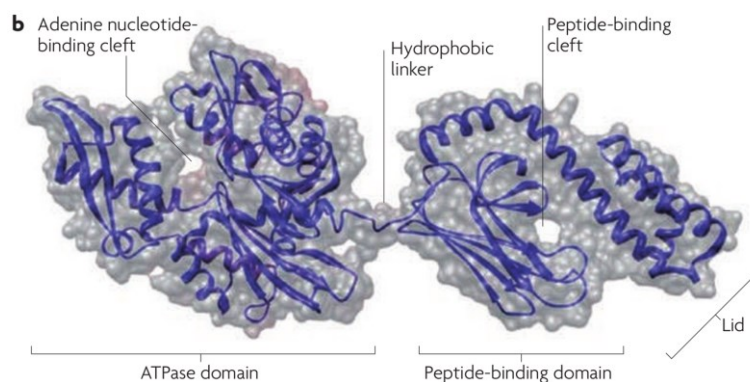
Nella trattazione ci riferiremo agli chaperoni dei procarioti.

Nei batteri lo chaperone Hsp70 si chiama DnaK, ed usa due cofattori: DnaJ e GrpE, quest'ultimo è un fattore di scambio dei nucleotidi.

Negli eucarioti avremo proteine simili, con nomi diversi e qualche dettaglio diverso nel funzionamento.

Dello chaperone Hsp70 abbiamo dati sulle prove di funzionamento e la struttura cristallografica, anche in complesso col suo substrato.

La figura mostra la struttura di Hsp70, che è un polipeptide diviso in due domini, uniti da un linker flessibile.



Il dominio N terminale (a sinistra) ha la funzione di legare nucleotidi. Lega ATP ed ha capacità ATPasica lenta. Tutto

questo dominio è molto simile a quello di altre proteine che legano ATP.

Nella regione C terminale (a destra) troviamo il dominio che lega la proteina in via di ripiegamento.

Questa regione è organizzata in due parti: una parte a foglietto beta che ha la funzione di riconoscere ed interagire con la proteina in via di ripiegamento. Questa si associa al polipeptide substrato, formando legami deboli (legami ad idrogeno e interazioni di van der Waals).

L'altra parte del dominio C terminale è il lid, strutturato in alfa eliche. Il lid si muove, aprendosi e chiudendosi. Quando si apre il lid lo chaperone lega il polipeptide target con bassa affinità. Quando il lid si chiude avremo un lid ad alta affinità.

Il fatto che il lid sia aperto o chiuso dipende dalla presenza o meno di ATP nel dominio ATPasico.

Questo chaperone è quindi in grado di cambiare affinità per il substrato in base al nucleotide legato al dominio ATPasico.

Quando Hsp70 è legato ad ATP si associa facilmente al substrato, ma lo lega con bassa affinità.

L'ATP viene lentamente idrolizzato in ADP; ad idrolisi avvenuta lo chaperone acquisisce una alta affinità alla proteina substrato che si sta ripiegando.

La DnaK richiede due cofattori. Uno è il co-chaperone J, che riconosce per primo la proteina denaturata e quando legato alla DnaK ne fa partire l'attività idrolitica.

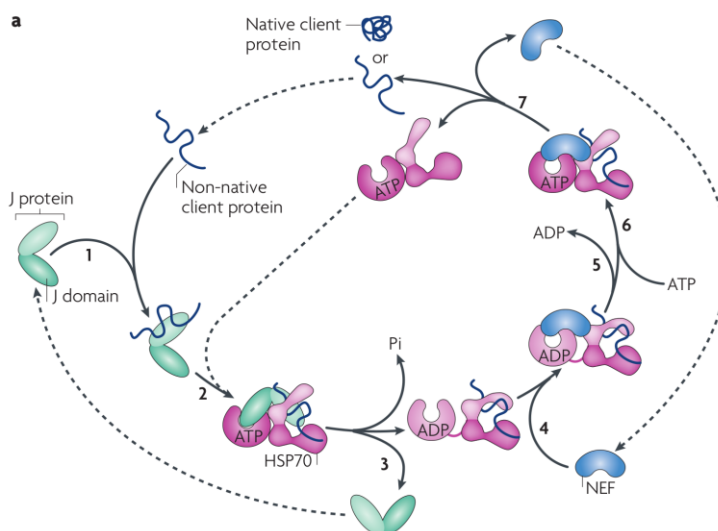
C'è anche bisogno di un fattore di scambio dei nucleotidi, che permette di rimuovere l'ADP dal dominio ATPasico.

Il processo è ciclico, per cui è necessario rigenerare lo chaperone.

Nell'immagine la Hsp70 è indicata in rosa, il co-chaperone proteina J è colorata in verde, il fattore di scambio dei nucleotidi è indicato in blu e la proteina substrato è indicata come un filamento blu.

Le Hsp70 riconoscono proteine che sono in maggioranza in struttura estesa.

1. La proteina in conformazione non nativa viene inizialmente riconosciuta dal co-chaperone DnaJ, a cui si associa.



2. Il co-chaperone ha siti di interazione con lo chaperone DnaK, con cui interagisce formando un complesso ternario.
3. In questo momento nel dominio ATPasico dell'Hsp70 è legato ATP, quindi si trova nella forma a bassa affinità. Il co-chaperone quindi si dissocia e nel frattempo si è attivata l'attività ATPasica di Hsp70, che idrolizza l'ATP in ADP. Hsp70 cambia così la sua conformazione ed aumenta l'affinità verso la proteina substrato. La proteina substrato in questa condizione è limitata nel ripiegamento e non può interagire con le proteine circostanti, limitando la possibilità di aggregazione.
4. A questo punto interviene il fattore di scambio dei nucleotidi, che si lega al complesso chaperone-proteina
5. Il fattore di scambio facilita la dissociazione dell'ADP dalla Hsp70, che può quindi legare nuovamente ATP.
6. Al legame dell'ATP la Hsp70 cambia nuovamente conformazione, si apre il lid e diminuisce l'affinità al substrato
7. Il complesso si dissocia e la proteina libera può riprovare a ripiegarsi

Se la proteina non riesce a ripiegarsi può entrare in un altro ciclo di ripiegamento assistito da chaperoni, oppure aggregherà con altre proteine e verrà poi degradata dal proteasoma.

Il movimento della zona lid è spiegato dal fatto che l'idrolisi dell'ATP causa un cambiamento conformazionale nel dominio ATPasico, che si trasmette al peptide-binding domain attraverso la regione linker.

Funzioni di Hsp70

Gli chaperoni della famiglia Hsp70 hanno più funzioni.

Una funzione è il folding di proteine neosintetizzate, in cui hanno un ruolo chiave nell'evitarne l'aggregazione.

Le Hsp70 servono anche a garantire la corretta oligomerizzazione della proteina, proteggendo le superfici di interazione che si trovano nelle varie subunità.

Un ulteriore ruolo è la partecipazione nel processo di recupero di proteine dagli aggregati e successivo folding di queste.

Le Hsp70 mantengono le proteine nella loro forma distesa. Questo è importante nel trasporto delle proteine attraverso le membrane mitocondriali o nel reticolo endoplasmatico.

I mitocondri hanno un patrimonio genetico e sintetizzano proteine al loro interno. Alcune proteine necessarie nei mitocondri vengono però sintetizzate nel citoplasma e poi trasportate nel mitocondrio.

Trasportare proteine globulari ripiegate attraverso le membrane è molto difficile. Il mitocondrio permette l'accesso di proteine attraverso i complessi TIM e TOM. Perché le proteine sintetizzate nel citoplasma possano passare all'interno del canale devono essere mantenute in forma estesa. Questo passaggio è mediato da chaperoni citoplasmatici che mantengono la proteina in forma estesa e ne facilitano l'attraversamento della membrana. All'interno del mitocondrio si trovano chaperoni che esercitano una azione di traino della proteina, cioè grazie al ciclo di associazione e dissociazione alla proteina mediato dalla funzionalità ATPasica esercitano una forza che facilita l'ingresso della proteina all'interno del mitocondrio. Una volta all'interno del mitocondrio la proteina trova chaperoni che ne coadiuvano il folding.

Chaperoni con funzioni simili si trovano anche nel reticolo endoplasmatico. Tra le più importanti troviamo la proteina Bip.

Il meccanismo di funzionamento delle Hsp70 è molto generico. Il co-chaperone J esiste in diverse varianti e può conferire della specificità verso specifiche famiglie di proteine o classi strutturali, seppur non strettissima.

Le Hsp70 generalmente non lavorano da sole, ma si integrano in un network di chaperoni che collabora nell'esplicazione delle funzioni.

La Hsp70 può interagire anche con chaperoni della famiglia Hsp90, oppure con le disaggregasi.

La funzione delle Hsp70 è molto importante per la fisiologia della cellula ed esistono più prodotti genici con funzioni parzialmente sovrapponibili. In genere la distruzione di un gene per l'Hsp70 non è letale per la cellula, perché la funzione può essere rimpiazzata da altre varianti o da altre famiglie di chaperoni.

Hsp60

Anche la famiglia di chaperoni Hsp60 è ubiquitaria nei tessuti e negli organismi, e ci riferisce spesso a questi come *chaperonine*.

Si dividono generalmente in *chaperonine di gruppo I* e *chaperonine di gruppo II*.

Alle chaperonine di gruppo I appartengono le Hsp60 batteriche e quelle che si trovano negli organelli intracellulari.

Le chaperonine di gruppo II si trovano negli eucarioti e negli Archaea.

Nei batteri abbiamo un sistema chaperone/co-chaperone. Lo chaperone è GroEL, mentre il co-chaperone è GroES.

Questa denominazione deriva da Gro Essential Large e Gro Essential Small.

Questo nome è dato dal fatto che probabilmente in seguito alla distruzione di geni codificanti Hsp60 non si sono avute cellule vitali.

Questo chaperone non è effettivamente essenziale per la vitalità cellulare, possiamo distruggere uno di questi geni e la cellula sarà comunque vitale, per la sovrapposizione funzionale che si ha con gli altri chaperoni.

Solo una piccola frazione di proteine cellulari ha bisogno del sistema di chaperoni Hsp60 per permetterne il corretto funzionamento del folding. Perché sia essenziale almeno una delle proteine che vengono aidate nel folding da Hsp60 deve essere una proteina essenziale.

Queste sono proteine sintetizzate in maniera costitutiva, e la loro espressione aumenta in seguito all'esposizione a stress. Anche qui il nome si riferisce alle Heat Shock Proteins.

Il loro meccanismo di funzionamento è ATP dipendente.

Le Hsp60 svolgono un'azione conseguente a quella svolta dalle Hsp70. Il loro substrato non sarà quindi una proteina completamente denaturata ma avrà già una parziale strutturazione, ma non ancora in forma nativa.

Le Hsp60 riconoscono passaggi intermedi del folding. Alcuni di questi chaperoni sono più specifici, altri meno.

Le chaperonine del gruppo I sono poco specifiche e interagiscono con proteine non native, parzialmente ripiegate.

Le chaperonine del gruppo II notiamo una maggiore specificità per le proteine che vengono aidate a ripiegarsi.

E. coli GroEL-GroES

La struttura di GroEL è relativamente complessa, così come il suo funzionamento.

La struttura di GroEL è grande, formato da 14 subunità identiche, ognuna delle quali pesa 60kDa.

Queste subunità si organizzano in due anelli sovrapposti.

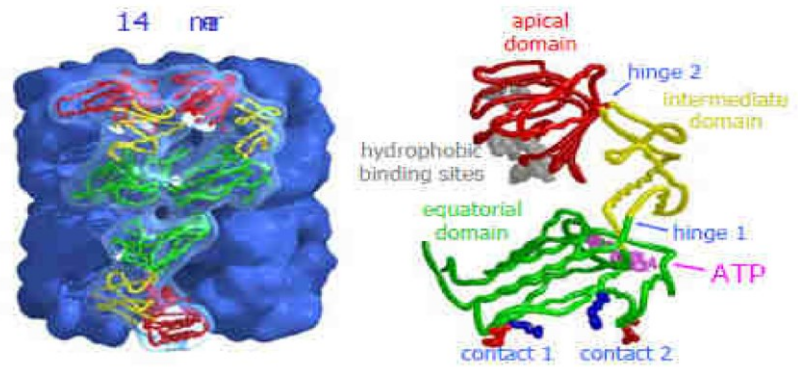
Ognuna delle subunità è organizzata in tre domini.

Il dominio verde è il *dominio equatoriale*, dove si trova il sito di legame per l'ATP. I domini equatoriali delle subunità dei due anelli vengono a contatto tra loro.

In giallo abbiamo una *regione cerniera* poco strutturata.

In rosso troviamo il *dominio apicale*, che si dirige verso l'esterno della struttura.

L'aggregazione delle subunità nello chaperone delimita uno spazio interno che è un compartimento di folding, nel passato spesso chiamato *gabbia di Anfinsen*.



Il dominio equatoriale ha essenzialmente una struttura ad alfa-elica. Nella zona di contatto tra i due anelli si trova il sito di legame per l'ATP, con relativa attività ATPasica.

A questa regione contribuiscono sia la porzione N-terminale che quella C-terminale del peptide.

Il dominio apicale ha una struttura con alfa-elica e beta-foglietti. Il ruolo funzionale è quello di legare i substrati, quindi le proteine non native, e di legare il co-chaperone GroES.

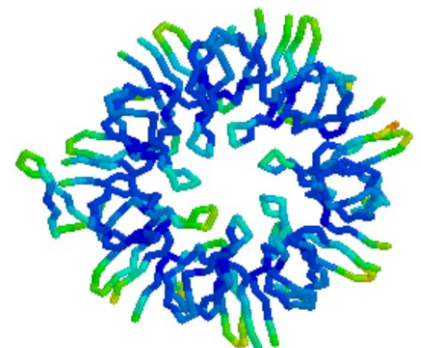
La parte intermedia è poco strutturata e molto flessibile. La flessibilità permette di avere dei pori nello chaperone assemblato, che permettono l'ingresso e l'uscita dei nucleotidi.

Le subunità vanno incontro a modifiche conformazionali importanti, quindi questa porzione flessibile è fondamentale per la funzione.

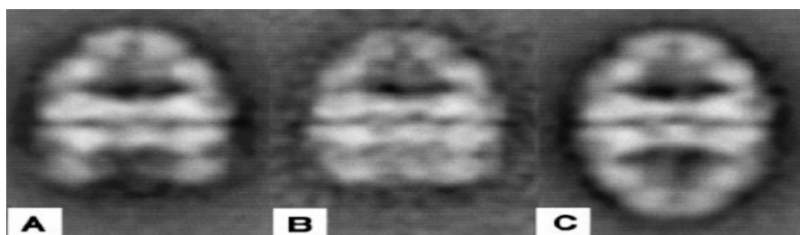
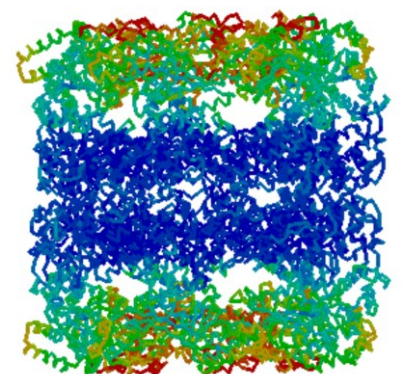
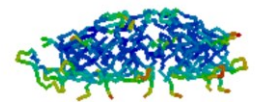
Anche il co-chaperone GroES è formato da subunità ed ha la particolarità di avere una serie di loop che protrudono dalla struttura complessiva e saranno quelli che andranno ad avere un contatto con GroEL.

Nel complesso GroEL-GroES possiamo vedere i due anelli con i domini equatoriali che si toccano, i pori nei pressi delle regioni cerniera e i domini apicali.

Il co-chaperone GroES ha dei loop idrofobici che legheranno la regione apicale di GroEL.



Questo chaperone in funzione non è però simmetrico. Le differenze conformazionali dipendono dal legame o meno dell'ATP e dal legame del co-chaperone.



Meccanismo di funzionamento

Anche lo chaperone Hsp70 è regolato dal legame de dall'idrolisi dell'ATP.

Il substrato è una proteina in forma parzialmente ripiegata. Il substrato fa dei contatti idrofobici con lo chaperone, per poi essere indirizzato nella camera di folding.

In questo meccanismo i vari domini tendono a riorganizzarsi ed a ruotare, in maniera regolata dal ciclo dell'ATPasi, con una serie di interazioni allosteriche che si propagano in tutto il complesso.

Il sistema mostra cooperatività positiva per il legame all'ATP. Avremo invece cooperatività negativa nel legame dell'ATP nell'anello opposto. Quindi ad esempio se l'ATP si lega ad una subunità dell'anello in alto sarà favorito il legame dell'ATP alle altre subunità che compongono quell'anello, mentre sarà sfavorito il legame di ATP all'anello opposto, in questo caso quello inferiore.

L'anello attivo è definito cis, mentre l'altro è definito trans. In ogni caso queste definizioni sono in parte sbagliate, perché nello chaperone entrambi gli anelli funzionano, ed inoltre gli anelli possono invertire la loro funzione.

Nel legame all'ATP i due anelli hanno una cooperazione negativa, questo ci assicura che il complesso sia sempre asimmetrico da questo punto di vista.

L'idrolisi dell'ATP è importante per il funzionamento del complesso, ed è inibita se nell'anello in trans è legato ADP.

Inoltre GroES si lega all'anello solo se l'anello è legato ad ATP o ADP. GroES si lega in maniera più efficiente all'anello che lega ATP.

Al legame di GroES l'ATP dell'anello cis viene idrolizzato.

A questo punto l'anello trans può legare ATP, ma non può idrolizzarlo fino a quando l'altro anello lega l'ADP prodotto dall'idrolisi dell'ATP.

La dissociazione dell'ADP dall'anello causa anche la dissociazione di GroES.

Il legame dell'ATP causa il rilascio della proteina substrato dal dominio apicale e permette il legame del co-chaperone.

Ciclo dello chaperone

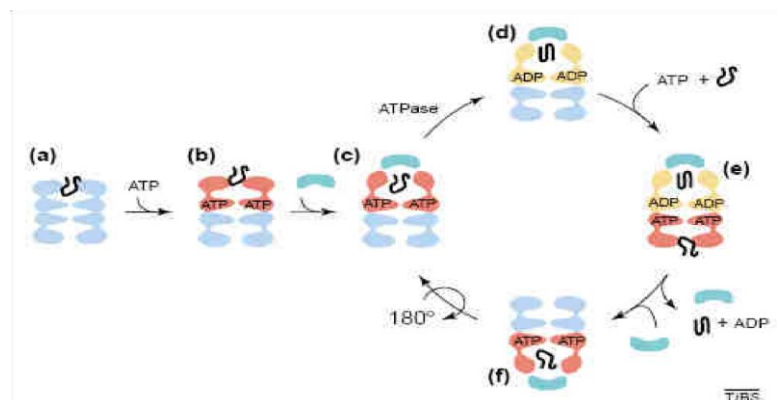
Il ciclo dei cambiamenti conformazionali dello chaperone inizia quando la proteina che si deve ripiegare si lega ai domini apicali.

Dopo il legame al substrato si ha il legame dell'ATP in modo cooperativo. Questo facilita il legame di GroES all'anello che lega ATP.

L'ipotesi di funzionamento è che quando l'ATP si lega allo chaperone inizia un importante cambiamento conformazionale che fa ruotare la parte apicale di ogni subunità.

All'inizio questi domini rivolgevano verso il citoplasma dei domini idrofobici, utili a catturare il substrato. Quando l'ATP viene idrolizzato queste subunità ruotano, togliendo dall'interno dello chaperone le regioni idrofobiche ed espongono residui idrofilici. Come risultato la proteina substrato viene rilasciata all'interno della camera di folding.

Questo processo dura circa 10 – 20 (da articolo circa 2s) secondi, ed il timer è l'idrolisi dell'ATP. GroEL è infatti una ATPasi lenta.



Hsp60 processa una proteina per volta, e c'è anche un limite sulle dimensioni della proteina, dato proprio dalla grandezza dello chaperone. Il limite è stimato intorno ai 60-70kDa. Su questo non c'è molto accordo, perché si ritiene che alcuni polipeptidi possano usare la gabbia di folding per fare foldare solo alcuni dei loro domini.

Hsp60 fornisce un ambiente ottimale di folding, limita lo spazio conformazionale del polipeptide e lo schermo da interazioni con altri polipeptidi.

Si ritiene anche che Hsp60 contribuisca in maniera attiva a far uscire l'intermedio di folding da eventuali trappole cinetiche, per poi renderlo competente al raggiungimento della conformazione nativa.

Da qui è partita la teoria per la quale gli chaperoni hanno anche un ruolo nella denaturazione di alcuni stati intermedi di folding.

Alcuni autori per questo motivo dicono che gli chaperoni sono delle *unfoldase*, che quindi denaturano effettivamente i loro substrati

Chaperonine di gruppo II

TRiC è una chaperonina della famiglia Hsp60 che si trova negli eucarioti.

Ha una organizzazione a subunità simile a quella di GroEL, con alcune differenze.

Le subunità di TRiC possono essere di due o più tipi diversi, a seconda dell'organismo.

Questi chaperoni sono più specifici rispetto a quelli di cui abbiamo parlato.

Queste proteine sono prive di co-chaperoni. Le proteine Hsp60 del gruppo II hanno però dei loop apicali molto lunghi, che possono interagire tra loro e chiudere l'anello, rimpiazzando effettivamente il co-chaperone.

Si sono fatti studi di biologia strutturale, cercando di comprendere che conformazione assumesse la proteina all'interno dello chaperone. Si è visto che il substrato può assumere varie conformazioni, sempre più o meno strutturate, fino ad assomigliare alla struttura precedentemente definita come *globulo fuso* (molten globule).

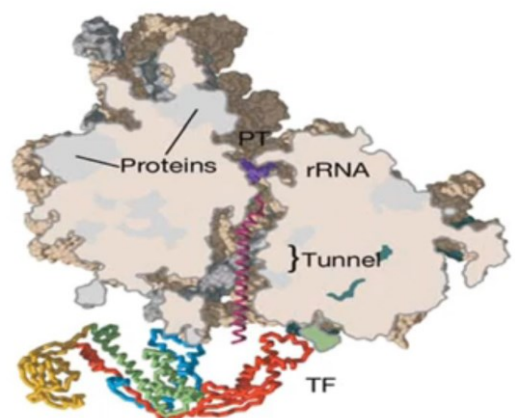
Chaperoni di folding – Trigger Factor

Con il nome *Trigger Factor* (TF) ci riferiamo alla proteina procariote che facilita il folding delle proteine all'uscita del ribosoma.

Il trigger factor si associa al ribosoma, nella regione in cui si ha l'uscita della proteina di neosintesi.

Il trigger factor può essere una parte di proteine più grandi e può essere associato ad altre funzioni, importante quella di *pep dil prolin isomerasi* (PPI), prolina isomerasi.

Se il gene codificante TF è deletato la cellula resta vitale, tranne se non viene contemporaneamente deletato il gene per Hsp70. La rimozione di entrambi i geni è letale. Questo ci fa intuire che i due chaperoni hanno funzioni sovrapposte.



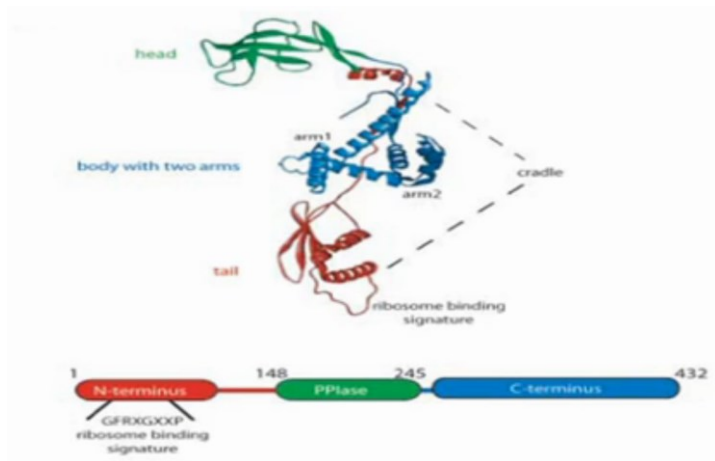
Trigger factor è un polipeptide organizzato in tre domini.

Il dominio in rosso serve ad associarsi alla struttura del ribosoma.

In blu troviamo la porzione carbossi-terminale.

In verde troviamo il dominio con attività peptidil-prolil isomerasi.

L'enzima si trova quindi in una condizione tale da poter rapidamente legare la proteina uscente da ribosoma e controllarne lo stato di isomerizzazione dei legami X-prolina.

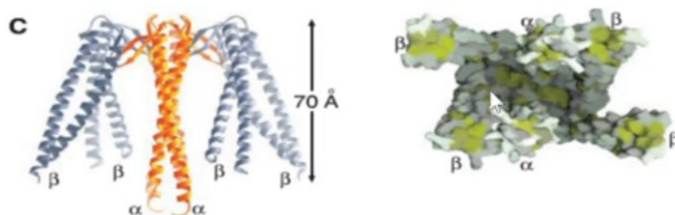


In altri organismi ci sono proteine simili. Negli eucarioti troviamo la proteina NAC, che però non funziona da PPIasi.

Prefoldina

Negli Archaea c'è una proteina che si chiama *prefoldina*, che è un complesso formato da varie subunità.

Questa proteina ha una struttura ad alfa elica che ha delle strutture simili a dita, con residui idrofobici che permettono l'interazione con proteine in uscita dal ribosoma, per poi passarla ad altri chaperoni.



Hsp90

La Hsp90 è stata ritrovata prima negli eucarioti e successivamente nei procarioti. Nei procarioti la proteina con attività simile è HtpG, che non è essenziale.

Le Hsp90 sono invece essenziali negli eucarioti.

Queste proteine non sono coinvolte direttamente nel folding, ma interagiscono con proteine client in un momento successivo. La funzione delle Hsp90 è tenere il proprio client in una conformazione metastabile e attiva. Limitano quindi il ripiegamento del client in una configurazione stabile, ma non attiva.

Il caso tipo sono i recettori degli ormoni steroidei.

Le Hsp90 non funzionano mai da sole ma funzionano in complessi multiproteici che contengono anche altri chaperoni, soprattutto Hsp70 e co-chaperoni che regolano specificità di interazione e capacità di idrolizzare l'ATP.

Nel corso degli anni sono state individuate alcune centinaia di client di Hsp90. Si tratta di proteine spesso con una funzione particolarmente rilevante, quali proteine che intervengono nel signaling, nella trasduzione del segnale, nel ciclo cellulare e nella divisione cellulare.

Si ipotizza quindi che le Hsp90 svolgano un ruolo di regolazione nel funzionamento di queste proteine.

Molti substrati della Hsp90 sono chinasi coinvolte nella proliferazione cellulare. Questo ha aperto un campo di ricerca importante nello sviluppo di farmaci antitumorali (geldanamicin)

Interazioni con recettore degli ormoni steroidei

Gli ormoni steroidei sono ormoni lipidici che passano la membrana cellulare e si legano al loro recettore nel nucleo della cellula.

Nella figura vediamo che il recettore neosintetizzato (il filamento nero), incontra subito lo chaperone Hsp70.

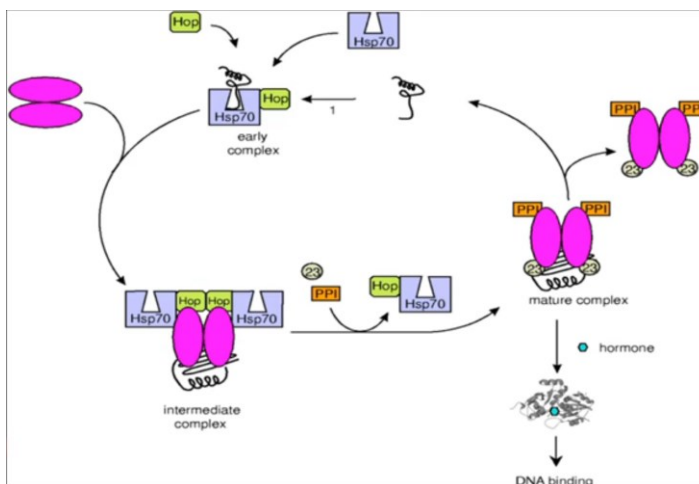
Il complesso chaperone-recettore si lega alla proteina Hop. Hip e Hop sono co-chaperoni di Hsp70 e regolano la funzione dello chaperone **negli eucarioti**.

Quando Hop si lega al complesso *Hsp70*-recettore degli ormoni steroidei, questo complesso può legare lo chaperone Hsp90 in forma di dimero.

A questo punto Hop è sostituito da una PPI (prolina isomerasi) e si aggiungono delle proteine che conferiscono specificità al recettore degli ormoni steroidei. Si forma quindi il complesso *Hsp90*-*PPI*-recettore ormoni steroidei-proteine di specificità.

Questa configurazione di associazione con Hsp90 mantiene il recettore in una configurazione metastabile, in grado di legare l'ormone. Quando l'ormone si lega il complesso ormone-recettore viene rilasciato dallo chaperone.

Senza chaperone il recettore tende ad una configurazione stabile ma non attiva.



Hsp90 è un dimero, ed ogni subunità è organizzata in domini.

Nella porzione amminoterminale c'è il sito di legame per l'ATP, ed è anche il sito di legame di alcuni farmaci inibitori di Hsp90.

Abbiamo poi un dominio linker, che contiene aminoacidi carichi, ed è l'interfaccia alle proteine client.

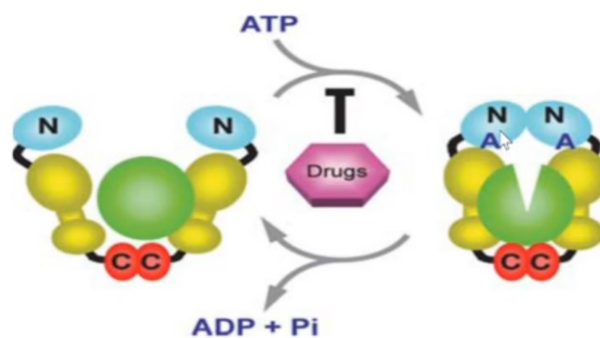
Il dominio carbossiterminale è fatto da due segmenti: M lega proteine client e co-chaperoni, D è il sito di dimerizzazione.

La struttura dello chaperone Hsp90 è mobile e va incontro a cambiamenti conformazionali in base al nucleotide che lega.

Il meccanismo è interessante. Quando l'ATP non è legato i monomeri interagiscono attraverso il dominio carbossiterminale, il dimero è aperto e può legare il substrato.

Quando si lega ATP si ha un cambiamento conformazionale che porta le due estremità N terminali della Hsp90 ad associarsi tra loro. In questa conformazione la proteina client interagisce con entrambe le subunità dell'Hsp90 e sarà portata ad assumere una conformazione che nel caso del recettore degli ormoni steroidei è una configurazione metastabile in grado di legare l'ormone.

Per questo modo di azione le Hsp90 sono chiamate *molecular clamp*.



Chaperoni come target di farmaci

Gli chaperoni, in particolare quelli specifici per proteine importanti nella proliferazione cellulare, sono bersagli di farmaci.

Questo vale per molti chaperoni tra cui la Hsp90. Ci sono già farmaci che inibiscono la Hsp90, alcuni impediscono il legame tra client e Hsp90, altri impediscono il legame dell'ATP allo chaperone.