

## Lezione 13

### Passaggi che limitano il Folding

Il ripiegamento delle proteine è un processo spontaneo e molto veloce. Ci sono però dei passaggi che limitano la velocità del processo di folding.

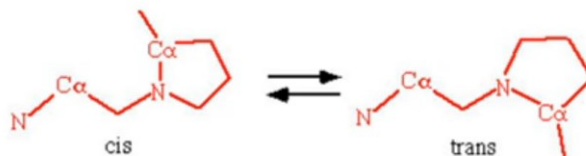
#### Isomerizzazione della prolina

Le proteine sono formate da aminoacidi legati da un legame peptidico. I gruppi funzionali di aminoacidi consecutivi nella catena polipeptidica possono trovarsi in posizione cis, quindi dallo stesso lato, oppure in trans, da lati opposti.

In generale è favorito il legame in trans perché limita le collisioni delle catene laterali. Il legame in cis è comunque possibile, ma meno frequente.

Abbiamo quindi proteine che hanno tutti i legami peptidici in trans, ad esempio il *lisozima* o il *citocromo C*, e altre proteine che contengono anche legami in cis, tra queste la RNAsi A.

Questa preponderanza di configurazioni in trans è vera per tutti i legami peptidici, tranne che per quelli che comprendono l'aminoacido prolina, cioè i legami che chiamiamo XP. Questo succede per la particolare struttura dell'aminoacido prolina, con la catena laterale chiusa su se stessa, che riduce la differenza tra la configurazione cis e quella trans.



Nel 1973 Gaul e Baldwin stavano studiando la denaturazione e rinaturazione della RNAsi. La RNAsi denaturata, quando posta in condizioni di rinaturazione, sembrava dividersi in due sottopopolazioni. Una parte delle molecole aveva un folding più rapido ed una parte aveva un folding più lento.

Se andiamo a vedere la struttura tridimensionale dell'enzima vediamo che ci sono 4 legami X-Prolina, di cui due in cis e due in trans.

L'ipotesi del gruppo di ricerca è stato che ci fossero due specie diverse in soluzione, e la differenza era lo stato in cui si trovavano i legami X-Prolina.

Nello stato nativo i legami X-Prolina hanno una configurazione ben precisa, cis oppure trans. In seguito a denaturazione si perdono i constraints sulle rotazioni intorno ai legami peptidici che conosciamo nelle proteine. Una volta che la proteina è denaturata si tende ad andare verso un equilibrio in cui la configurazione in cui si trovano questi legami sarà circa metà cis e metà trans. Il processo di denaturazione ha quindi prodotto degli isomeri non nativi per quanto riguarda questi legami.

Ci si può aspettare che la porzione di proteina denaturata che si trova nella configurazione nativa avrà una cinetica di folding più veloce, mentre la parte che si trova nella configurazione non nativa avrà una cinetica più lenta perché si deve riformare la condizione di isomerizzazione nativa.

L'isomerizzazione richiede tra i 10 e i 100 secondi a temperatura ambiente. Se consideriamo che i tempi di folding normali sono nell'ordine dei millisecondi vediamo come l'isomerizzazione possa rallentare di molto il processo di folding.

Questo processo è stato dimostrato in modo sperimentale.

### Double Jump Experiment

Se prendiamo una proteina nativa che ha legami in cis, la proteina si srotola e raggiunge un equilibrio tra le conformazioni cis e trans.

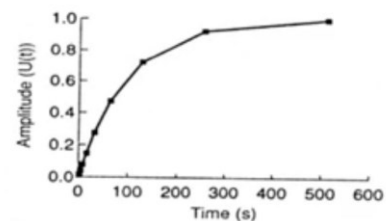
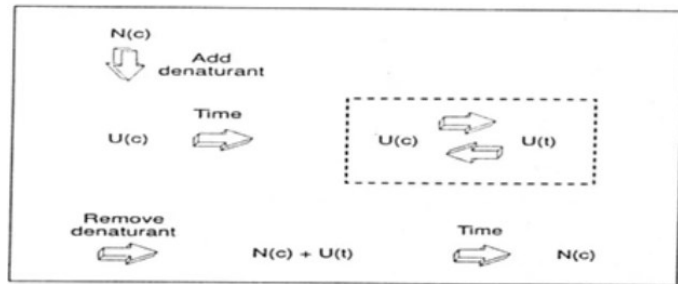
L'esperimento è stato fatto giocando col fattore tempo. È stata messa la proteina in presenza di un denaturante in concentrazione tale da farla denaturare.

L'incubazione nel denaturante durerà per tempi diversi in diversi campioni. Se la proteina era in cis, alla sua denaturazione questa configurazione inizialmente rimane, ma col passare del tempo il legame può isomerizzare.

Se l'incubazione è corta ci si aspetta di trovare la gran parte delle proteine nel campione in cis, e solo una piccola parte in trans.

Quindi dopo diversi tempi di incubazione nel denaturante, si toglie il denaturante e si lascia rifoldare la proteina.

Avremo quindi le due sottopopolazioni cis e trans, la popolazione trans sarà tanto maggiore quando maggiore è stato il tempo di incubazione col denaturante. Il parametro che misura la l'isomerizzazione si chiama *ampiezza* (amplitude), ed indica la percentuale di molecole che isomerizzano in base all'esposizione al denaturante.



Questi esperimenti hanno effettivamente permesso di individuare un passaggio limitante nel folding delle proteine.

Di solito una proteina che rispetto alla proteina nativa ha l'isomerizzazione di un legame X-prolina riesce comunque a ripiegarsi, in una forma che somiglia a quella nativa, ma meno ottimizzata nella sua organizzazione. Sarà quindi meno stabile.

Lo studio della stabilità è un altro modo per studiare se ci sono due popolazioni a folding diverso, e quanto sono ampie queste popolazioni.

### Isomerizzazione In vivo

Ci si è chiesti come questo sia compatibile coi tempi coi tempi osservati *in vivo*. Il problema viene risolto da enzimi che accelerano questi passaggi di isomerizzazione.

Si sono quindi cercati gli enzimi che catalizzavano questa reazione.

In quegli anni l'enzima doveva essere isolato dalle cellule, e questo non era semplice.

Serviva quindi un saggio che permettesse di monitorare l'attività di isomerizzazione.

Il gruppo di Fisher ha sviluppato un saggio a questo scopo. Il saggio era fatto usando la *chimotripsina*, che è una serina proteasi.

Un substrato sintetico per monitorare la reazione di isomerizzazione era un tetrapeptide che contiene un gruppo cromogenico, che se viene tagliato dalla proteasi rilascia un reporter, ma può essere idrolizzato solo se il legame Alanina-Prolina è in configurazione trans.

In soluzione questo tetrapeptide è per il 90% in trans e per il 10% in cis. La porzione in cis avrà una idrolisi molto lenta.

Partendo da omogenati cellulari si cerca di arricchire per questa reazione di idrolisi. Si restringono quindi man mano le soluzioni in cui si osserva il rilascio di reporter fino ad ottenere la proteina purificata.

La proteina si è rivelata essere un enzima da 18kDa, la Peptidylprolyl Isomerase (PPI), inizialmente isolati da epatociti, si è rivelato essere presente in tutti i tessuti ed organismi analizzati.

Questa proteina è inoltre molto abbondante, come monomero oppure come dominio di complessi più grandi.

Questo mostra che il processo di isomerizzazione dei legami della prolina è molto importante.

Inoltre queste proteine possono modulare l'attività di altre proteine cellulari.

Una proteina in una certa conformazione potrebbe essere attiva, ed essere inattiva in un'altra conformazione. L'azione delle PPI potrebbe effettivamente funzionare da switch tra diverse conformazioni e quindi tra diverse funzionalità di una proteina.

### **Legami disolfuro**

Anche la formazione dei legami disolfuro è un passaggio lento nel folding. Il legame disolfuro si forma tra due residui di cisteina. Questo aminoacido quando si trova nello stato ridotto espone un gruppo tiolico S-H; quando due residui di cisteina si trovano spazialmente vicini nella struttura tridimensionale della proteina possono ossidarsi dando luogo ad un ponte disolfuro S-S, che è un legame covalente.

La formazione dei legami disolfuro non è direttamente rilevante nel folding, ma hanno una funzione di stabilizzazione della struttura foldata.

Come proteina modello per lo studio dei ponti disolfuro si è usata la BPTI, inibitore della tripsina bovina. Questo inibitore si lega alla tripsina inserendo nel sito attivo della proteasi una lisina e la regione circostante a questa. L'inibitore verrà attaccato dall'enzima e resterà attaccato alla proteasi con un legame covalente, inattivandola.

Questa proteina ha 3 legami disolfuro nativi:

- C5 – C55
- C30 – C51
- C14 – C38

L'esperimento si fa denaturando la BPTI e aggiungendo un agente riducente per ridurre i ponti disolfuro. La proteina passa quindi allo stato denaturato e non è attiva.

Se aggiungiamo un agente ossidante si riformano i ponti disolfuro e la proteina torna attiva.

Vogliamo studiare se c'è una sequenzialità in cui i ponti disolfuro si riformano, analizzando quindi gli stati intermedi di questo pathway di folding, che sarà un folding ossidativo dato che si devono ossidare i residui di cisteina.

Le forme intermedie non sono stabili, ma in questo caso abbiamo un metodo che consente di fissare gli stati intermedi. Questo metodo consiste nell'uso di agenti alchilanti che si legano a gruppi tiolici liberi.

L'esperimento inizia con la denaturazione e la riduzione della proteina. Si inizia il processo di rinaturazione aggiungendo anche il glutatione, che è l'agente ossidante tipico anche nelle cellule.

Il glutatione è formato da tre aminoacidi, di cui uno è una cisteina. Nella forma ossidata due molecole di glutatione sono unite mediante un ponte disolfuro tra le cisteine.

Il glutatione viene generalmente usato in forma ossidata. La reazione continua per un po' e poi si aggiunge l'agente alchilante *iodio acetato*. Lo iodio acetato si lega in maniera covalente ai gruppi S-H liberi. Le cisteine che non avevano ancora formato ponti disolfuro possono essere alchilate.

L'agente alchilante non lega gruppi già legati.

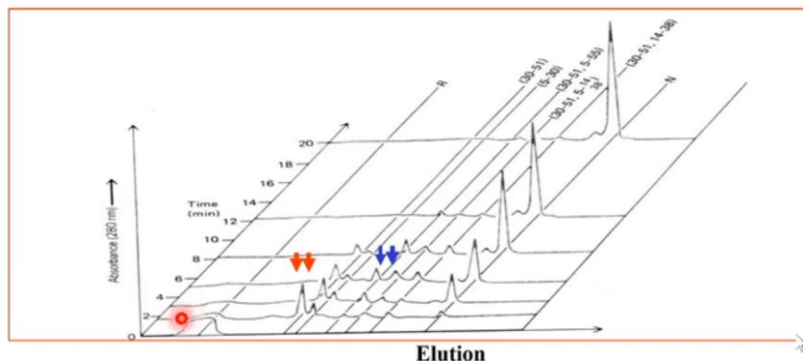
Gli intermedi possono essere isolati mediante la cromatografia a scambio ionico, perché queste proteine portano ad una carica, che dipenderà dalla quantità di iodio acetato.

Sull'asse y vediamo i tempi per cui abbiamo fatto procedere prima di aggiungere l'agente alchilante.

La cromatografia a scambio ionico.

A proteina denaturata non si osservava nulla a breve termine.

A tempi di incubazione più lunghi la proteina nativa viene rappresentata.



3 native S-S :

[5-55]

[30-51]

[14-38]

A tempi di lunghi si osservano proteine che mostrano picchi anche molto importanti.

### *Seguire l'evoluzione della sequenza nel folding*

È stato possibile seguire la sequenza di ripiegamento della proteina.

Ci si potrebbe aspettare che i ponti disolfuro si formano in sequenza, ma non è propriamente così.

Cominciando dalla proteina denaturata seguiamo la formazione del primo ponte disolfuro.

La popolazione che si è formata all'inizio dell'esperimento contiene molte specie diverse a seconda delle possibili combinazioni di ponti disolfuro.

La maggior parte delle proteine contiene il ponte disolfuro C30-C51.

Questo vuol dire che questa specie è importante nel percorso del folding.

Nel secondo passaggio troviamo una serie di proteine con diverse combinazioni, tra cui la combinazione C14-C38. Nel momento in cui questo legame si dovesse verificare nel secondo step, viene rotto per far sì che prima si formi il ponte C5-C55. Si riforma poi il ponte C14-C38.

Inserire troppo presto il legame C14-C38 causa il fatto che il C5-55 non può più formarsi perché queste due cisteine si troverebbero troppo lontane nella struttura terziaria della proteina.

Il legame tra C14-C38 si rompe perché c'è il glutathione in soluzione.

La formazione di ponti disolfuro deve quindi a volte essere sequenziale nel folding di una proteina, seguendo un preciso ordine. Nel momento in cui questo ordine non viene rispettato è necessario avere un modo per rimuovere temporaneamente il ponte prematuro. Questa attività è svolta dal glutathione.

### *In vivo*

Le proteine citoplasmatiche generalmente non contengono ponti disolfuro. La formazione di ponti disolfuro avviene nel reticolo endoplasmatico negli eucarioti, e nel periplasma nei procarioti.

Negli eucarioti troviamo ponti disolfuro nelle proteine secrete e nelle proteine di membrane, localizzazioni che seguono il pathway di secrezione.

Enzimi che intervengono nella formazione di ponti disolfuro si trovano nel reticolo endoplasmatico.

Negli Archaea si è dimostrata l'esistenza di proteine con ponti disolfuro nel citoplasma.

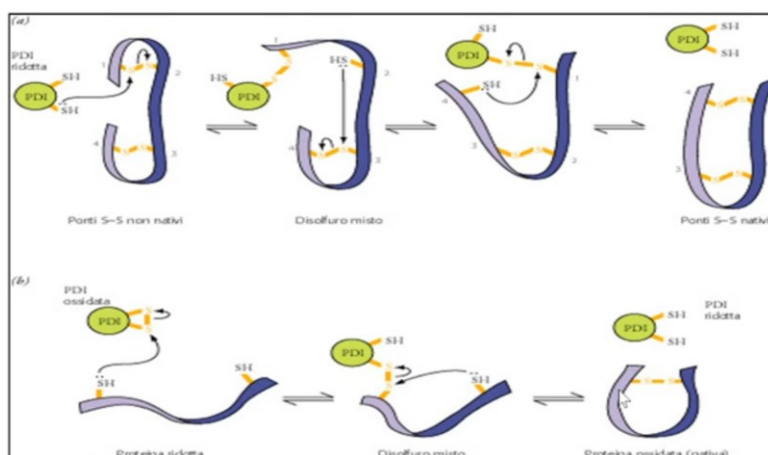
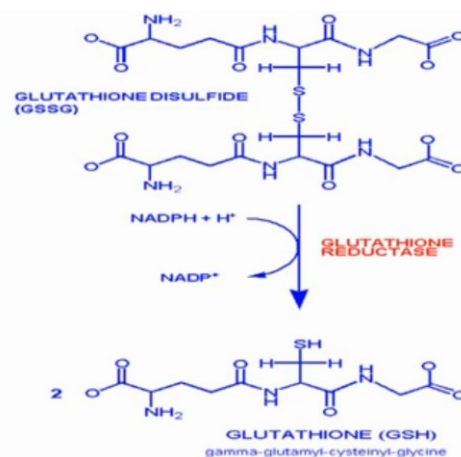
Il glutathione si può trovare in forma ossidata, con due molecole di glutathione legate da un ponte disolfuro, oppure in forma ridotta, come singola molecola di glutathione. I compartimenti cellulari sono diversi per quanto riguarda il loro stato di ossidazione.

Il citoplasma è un ambiente riducente, mentre il reticolo endoplasmatico e altri sono più ossidanti.

In vivo ci sono due casi in cui dobbiamo considerare la formazione di ponti disolfuro: la neoformazione di un ponte disolfuro e la rottura di ponti disolfuro non nativi ed isomerizzazione della proteina. L'enzima stesso contiene gruppi tiolici che possono essere ossidati o ridotti.

Le Disolfuro Isomerasi (Protein Disulfide Isomerase – PDI) sono delle ossidoreduttasi, perché le reazioni di formazione e rottura di ponti disolfuro sono delle ossidoriduzioni.

La loro struttura tridimensionale è simile a quella della *tioredossina*, ed infatti appartengono alla stessa famiglia di proteine. Hanno un sito attivo caratterizzato da una sequenza CXXC.



## Procarioti

### Neoformazione di legami S-S

Lo studio di questi enzimi si è fatto all'inizio nei batteri. Una proteina molto studiata è stata la DsbA, che è una proteina periplasmatica da 21kDa.

Ha un sito attivo fatto da C30 – P31 – H32 – C33. Il sito attivo è esposto sulla superficie dell'enzima.

A pH fisiologico è completamente ionizzata, con pKa 3,5.

Ha un'ampia specificità di substrato, perché devono poter catalizzare la reazione nel più alto numero di proteine.

Quando la proteina DsbA si ossida a seguito di una reazione, deve essere rigenerata. Verrà rigenerata mediante meccanismi di trasporto degli elettroni. Nella membrana cellulare è presente una proteina, DsbB, il cui ruolo è proprio quello di rigenerare la DsbA.

### Isomerizzazione di legami S-S

I batteri dispongono di un enzima specifico per eseguire la reazione di isomerizzazione, la DsbC. Questa proteina ha una struttura particolare, fatta da due monomeri uguali che interagiscono tra loro attraverso una superficie di dimerizzazione.

Ognuno dei due monomeri ha un sito attivo. La regione interna della proteina andrà a riconoscere il substrato proteico da modificare.

Il riconoscimento della proteina che ha formato un ponte disolfuro in posizione non nativa potrebbe avvenire perché l'errata configurazione causa l'espressione di regioni idrofobiche in superficie.

Questa è una caratteristica rilevata anche dagli *chaperoni*. La DsbC è quindi sia una Isomerasi che uno Chaperone, perché in grado di riconoscere stati di folding non nativi. Anche la DsbC deve essere rigenerata da un altro enzima per poter svolgere la sua funzione. La funzione di rigenerazione è in questo caso svolta da DsbD.

Queste informazioni riguardano i procarioti, in cui troviamo due attività diverse per formare ponti disolfuro ed isomerizzare ponti non corretti.

### ***Eucarioti***

Abbiamo un'unica proteina che svolge entrambe le funzioni. Tra queste proteine la più conosciuta è la Protein Disulfide Isomerase (PDI).

Questa proteina si trova nel reticolo endoplasmico ed è attiva sia nella formazione che nell'isomerizzazione dei ponti disolfuro.

Anche in questo caso ci sono una serie di proteine che intervengono nel trasporto degli elettroni per rigenerarne la funzione, tra cui Ero1p.

La proteina PDI umana ha due siti attivi.

Ha anche una sequenza che serve a trattenerla nel reticolo endoplasmatico. Le proteine che si trovano nel reticolo endoplasmatico tendono a seguire il pathway di secrezione, per cui ci sarebbe il pericolo di perderle. Le proteine che devono localizzarsi nel reticolo endoplasmatico hanno quindi delle sequenze di localizzazione specifiche per il reticolo endoplasmatico.

Le PDI degli eucarioti sono una grande famiglia di proteine, che possono avere significati fisiologici diversi, dalla segnalazione all'evitare l'aggregazione di proteine intracellulari.

### **Folding ossidativo e produzione di proteine ricombinanti**

Potrebbe essere necessario produrre proteine ricombinanti con ponti disolfuro. Gli accorgimenti da prendere dipendono dal sistema di espressione che si vuole usare.

Generalmente si usano i batteri come sistema di espressione, i quali prevedono una espressione citoplasmatica. In questo caso specifico potremmo però avere delle difficoltà tecniche, perché il citoplasma non è l'ambiente ideale in cui si formano i ponti disolfuro.

Non è detto che non riusciamo a produrre la proteina, ma potrebbe essere che questa sia meno stabile per la mancata stabilizzazione dei ponti S-S.

Potrebbe anche verificarsi l'aggregazione della proteina neosintetizzata, con formazione di corpi di inclusione.

Potremmo quindi decidere di far esprimere la nostra proteina nel periplasma, dove c'è un ambiente più adatto, c'è la proteina DsbA, chaperoni e foldasi.

Per indirizzare una proteina nel periplasma va fusa ad una sequenza segnale di trasporto. Questo approccio può funzionare, ma in alcuni casi potrebbero esserci problemi, ad esempio con proteine molto grandi o con ripiegamenti che ne limitano il trasporto. In questi casi potrebbe essere necessario cambiare sistema di espressione.

Quando si esprimono proteine con ponti disolfuro si possono usare altre strategie, come la coespressione con DsbA, chaperoni e foldase, quindi enzimi che possono aiutare un corretto ripiegamento.

Una opzione recente è data da ceppi mutati di *E. coli*, la cui rimozione di alcuni geni ha portato il citoplasma ad essere un ambiente ossidante. Questi ceppi sono stati sviluppati apposta per permettere l'espressione intracellulare di proteine con ponti disolfuro.

Potrebbe essere comunque che non si riesce ottenere la proteina nella forma nativa.

Nel caso in cui la proteina aggrega o comunque non si folda correttamente, è possibile recuperarla, denaturalarla in vitro e far avvenire un ripiegamento in condizione controllate di ossidazione.