

## Lezione 14

### Folding *in vivo*

Le condizioni in ambiente *in vitro* ed ambiente *in vivo* possono anche essere molto diverse. Negli studi *in vitro* si usano proteine pure, isolate o ricombinanti, diluite in un tampone. Si usano denaturanti chimici e fisici per lo studio del folding delle proteine *in vitro*. La conseguenza è che nella nostra soluzione la proteina va incontro ai processi di folding e unfolding tutta insieme.

Nella cellula non sempre tutto il polipeptide è libero di andare incontro al processo di folding. *In vivo* non si hanno condizioni di diluizione, anzi l'ambiente cellulare è molto affollato da altre proteine e molecole.

Le proteine neosintetizzate nella cellula escono dal ribosoma gradualmente e sempre in un particolare senso, che vede per prima l'uscita della porzione amino-terminale. Questa porzione può quindi foldare per prima, mentre il resto della proteina è ancora in fase di sintesi.

Ci sono quindi molte differenze tra ambiente *in vitro* ed *in vivo*. In primis lo spazio conformazionale che la proteina si trova ad esplorare *in vivo* è diverso rispetto a quello esplorabile *in vitro*.

L'affollamento che si ha all'interno della cellula influenza sia la velocità delle reazioni sia le interazioni tra molecole. Il crowding intracellulare in parte favorisce il ripiegamento delle proteine; allo stesso tempo espone però le proteine al rischio di andare incontro ad aggregazione.

*In vivo* dobbiamo quindi considerare le seguenti condizioni:

- Alta concentrazione di proteine, specialmente in condizioni di elevati tassi di sintesi proteica. Si calcola che il 30-40% del volume cellulare è occupato da proteine.
- Le cellule eucariotiche sono caratterizzate dalla presenza di compartimenti, quindi il folding può avvenire in parti diverse della cellula.

Ne consegue che le proteine che si trovano in configurazione non nativa si trovano ad esporre le loro regioni idrofobiche in un ambiente in cui ci sono molte altre proteine che a loro volta potrebbero esporre superfici idrofobiche. In questi casi si ha un serio rischio di aggregazione. Nella maggior parte dei casi la proteina che aggrega difficilmente riesce ad invertire questa condizione e a tornare su un pathway di folding corretto.

Ne consegue che al livello cellulare c'è un controllo stretto sia spaziale (sulla zona in cui avviene) che temporale sul folding, proprio per evitare eventi di aggregazione.

La proteina denaturata può andare incontro ad una serie di eventi. L'evento più favorevole è che questa raggiunga la sua configurazione nativa. Possono avvenire però eventi alternativi, in cui la proteina può aggregare in aggregati, ordinati o disordinati, oppure può andare incontro ad un percorso di ripiegamento che porta alla formazione di intermedi. Gli intermedi di folding sono configurazioni non correttamente ripiegate, e quindi espone residui idrofobici. Anche l'intermedio è quindi a rischio di aggregare.

Ci sono tutta una serie di meccanismi cellulari per evitare l'aggregazione. Si è recentemente introdotto il concetto di *proteostasi*, che si riferisce allo stato conformazionale del *proteoma* cellulare. Il proteoma è l'insieme dinamico delle proteine nella cellula, che cambia la sua composizione nel tempo, in seguito alle variazioni metaboliche della cellula.

La cellula mantiene la proteostasi per mezzo di strategie e proteine, gli chaperoni, le quali nel loro insieme costituiscono il *network di proteostasi* (proteostasis network, PN).

La capacità di tamponare problemi di folding nel sistema diminuisce con l'età, il che spiegherebbe in parte perché con l'età aumenta l'incidenza delle patologie da misfolding.

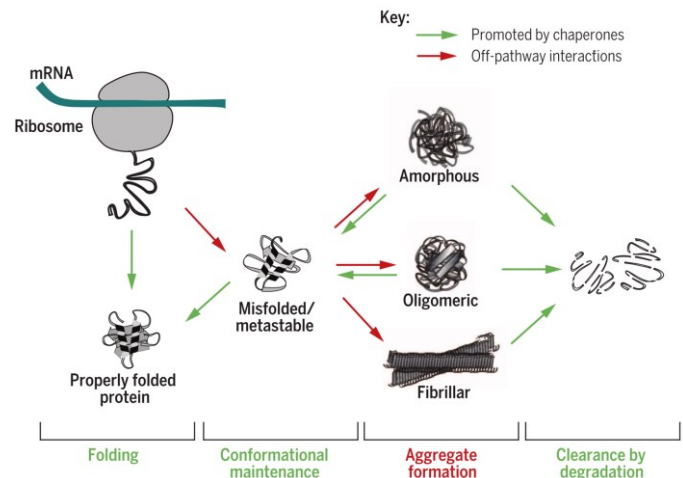
(Da *In vivo aspects of protein folding and quality control*. D. Balchin)

La figura ci mostra quale potrebbe essere il destino di una proteina di nuova sintesi.

La proteina esce dal ribosoma. Può ripiegarsi correttamente in un processo facilitato dalla presenza di Chaperoni.

La proteina può anche andare in uno stato che non è perfettamente ripiegato. Sia perché è un intermedio sia perché non si è ripiegata correttamente. In questo caso la presenza di

chaperoni può riportare la proteina verso una corretta conformazione. Se questo però non avviene la proteina può aggregare in aggregati amorfi, oligomeri o fibrille. Negli stati di aggregato amorfo e di oligomero ci sono degli chaperoni che possono riportare la proteina verso un path di folding corretto. Se questo non avviene la proteina viene degradata, in modo che la cellula possa recuperare gli aminoacidi che la costituivano.



### Problemi di folding nella cellula

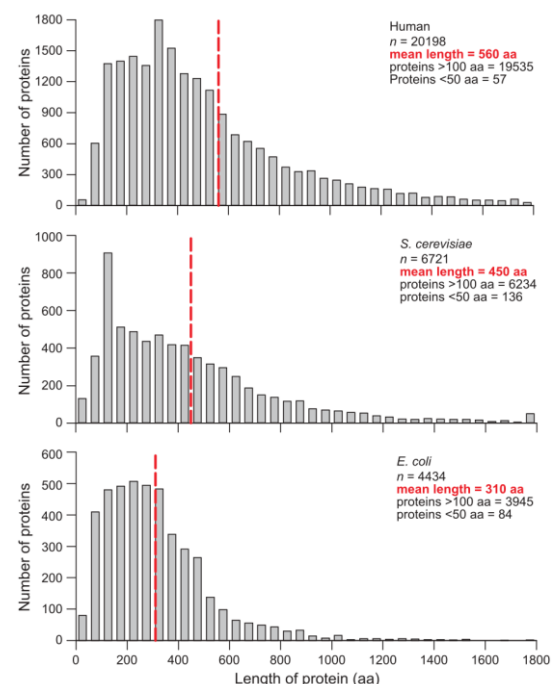
Nel ripiegamento *in vitro* si è visto che le proteine piccole ripiegano più velocemente.

Questa velocità in un certo senso riduce il rischio di aggregazione con altre proteine.

Il problema della velocità di folding in ambiente cellulare è effettivamente rilevante, e riguarda sia la dimensione del proteoma che la dimensione delle proteine espresse. Spostandoci da E.coli a S.cerevisiae fino ad H.sapiens vediamo che con l'aumento della complessità degli organismi aumentano sia il numero di proteine espresse che la dimensione media di queste proteine.

Inoltre le proteine eucarioti sono proteine multidominio, cioè singoli polipeptidi ma organizzati in regioni discrete ad organizzazione strutturale e funzione diversa.

Una possibile soluzione è stata trovata col fatto che il folding della proteina può iniziare in fase di sintesi.



Quindi man mano che i primi domini escono dal ribosoma possono iniziare a ripiegarsi, e quindi non sono più suscettibili al processo di aggregazione. Inoltre il processo di folding è coadiuvato dagli chaperoni, che agiscono sia sulla porzione di polipeptide in uscita dal ribosoma che successivamente al completamento della sintesi.

### *L'aggregazione compete col folding*

Nel folding funnel il contributo degli chaperoni indirizza la proteina non foldata verso lo stato nativo, permettendone l'uscita dai minimi locali corrispondenti a stati intermedi o ad aggregati. Gli chaperoni limitano anche l'accesso della proteina a stati di folding non produttivo, che possono anche avere stati energetici molto favorevoli.

### **Chaperoni**

Il termine chaperone compare in letteratura alla fine degli anni '70, quando ricercatori che stavano lavorando alla *rubisco-binding protein* si accorgono che per ottenere un ripiegamento corretto risultavano

importanti alcune proteine, che loro chiamano *chaperoni*, "con riferimento ad un termine tipico ottocentesco, dove lo chaperone era quella persona che accompagnava le signorine di buona famiglia in alcune occasioni, per salvaguardarne la reputazione" Cit. Professoressa Lotti <3

La scelta del termine è quantomai azzeccata, perché effettivamente la funzione dello chaperone è preservare la proteina da interazioni non consone al folding, che potrebbero risultare in aggregazioni.

Sono state ormai caratterizzate molte famiglie di chaperoni con funzioni diverse all'interno della cellula.

Una prima definizione è che gli chaperoni sono un gruppo di famiglie di proteine non correlate tra loro che hanno la funzione di stabilizzare le proteine non ripiegate, e di assistere il folding e l'oligomerizzazione.

Erano state fatte diverse ipotesi sul meccanismo di funzionamento degli chaperoni.

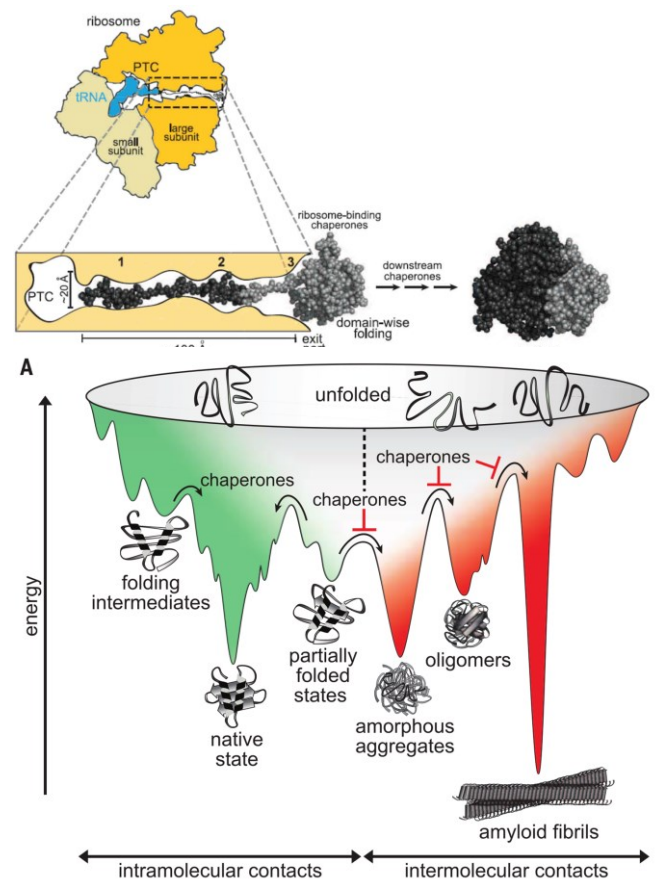
Si era proposto che lo chaperone fosse un template intorno al quale la proteina non ripiegata potesse organizzarsi strutturalmente. NON È COSÌ, lo chaperone non contiene nessuna informazione strutturale sul ripiegamento della struttura; questa informazione, come dimostrato da Anfinsen, è contenuta nella sequenza stessa della proteina.

Gli chaperoni svolgono quindi un ruolo nel processo di folding, ma non si ritrovano mai associati alla conformazione nativa della proteina.

La loro funzione è quella di legarsi e stabilizzare conformeri instabili della proteina, impedendone l'interazione con altre proteine che si trovano nelle stesse condizioni.

Un altro ruolo dello chaperone è che in realtà questo serve a destabilizzare i conformeri, a farli quindi uscire dai minimi energetici in modo che possano riprendere il percorso di folding.

Gli chaperoni sono proteine ubiquitarie, presenti in tutti i tessuti ed organismi, e sono anche piuttosto conservati all'interno delle stesse famiglie di proteine.



Gli chaperoni sono stati caratterizzati per la maggior parte in condizioni di stress, si potrebbe quindi pensare che questi siano proteine prodotte solo in certe condizioni. NON È COSÌ, se pur è vero che il loro livello aumenta in condizione di stress, data la loro funzione fondamentale nel ripiegamento delle proteine questi sono espressi in modo costitutivo.

Per quanto riguarda alcune famiglie di chaperoni, questi sono enzimi che generalmente non hanno specificità per particolari proteine, ma rilevano elementi strutturali che sono espressi nello stato non-nativo. Tipicamente lo chaperone riconosce regioni idrofobiche esposte.

Gli chaperoni agiscono con cicli di cambiamenti conformazionali al loro interno, che di solito comportano legame ed idrolisi dell'ATP.

Dato l'ampio range di funzioni delle chaperoni, distinguiamo ***folding chaperons***, che intervengono sulla proteina neosintetizzata oppure su una proteina denaturata che deve ritornare alla sua forma nativa.

Ci sono anche gli ***holding chaperons***, che non intervengono direttamente nel processo di folding, ma sequestrano e stabilizzano proteine denaturate in modo che non aggregino.

Se questi metodi non riescono a limitare l'aggregazione, possono intervenire le ***disaggregasi***, che sono enzimi che separano proteine in stato non nativo dagli aggregati, in modo che possano ripiegarsi nella forma nativa.