

Lezione 16

Disaggregasi

L'aggregazione delle proteine è un rischio costante nelle cellule. Abbiamo visto come gli chaperoni di folding cercano di salvaguardare le proteine dall'aggregazione.

Quando si verifica uno stress nella cellula, che sia termico, ossidativo o altri eventi di questo tipo, si ha un aumento della quota di proteine mal ripiegate. Un aumento di chaperoni durante queste condizioni può spostare l'equilibrio verso il folding corretto.

Una condizione di stress di nostro particolare interesse è la produzione di proteine ricombinanti. Far produrre alla cellula proteine ricombinanti significa reindirizzare gran parte dell'attività sintetica e metabolica verso una certa proteina, che essendo prodotta in grande quantità aumenta la tendenza all'aggregazione. Questa sintesi si aggiunge al normale funzionamento cellulare, il che provoca uno stress nel metabolismo cellulare, che potrebbe non essere compensato dal sistema degli chaperoni.

L'aggregazione è un problema importante, non solo in applicazioni biotecnologiche, ma anche nel mantenimento di farmaci e nelle patologie da misfolding.

Chaperoni

Abbiamo visto che nel folding delle proteine intervengono enzimi come PDI e PPI, che non sono chaperoni, ma enzimi che aiutano a velocizzare passaggi lenti del folding.

Abbiamo poi visto gli chaperoni di folding, quali trigger factor, Hsp70, Hsp60 ed Hsp90, la quale ha funzioni particolari.

Questa può essere definita come la prima linea di difesa della cellula nei confronti dell'aggregazione.

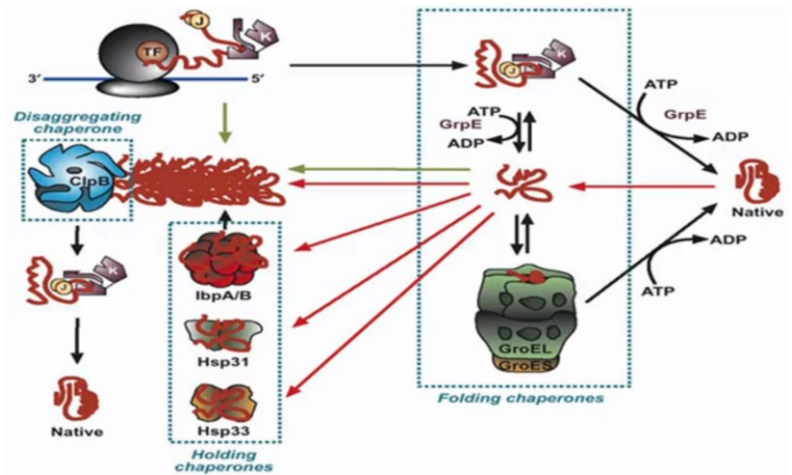
Non sempre siamo però nelle condizioni di poter evitare che l'aggregazione si verifichi.

Abbiamo quindi una seconda linea di difesa, che si attiva quando al livello cellulare c'è già una discreta quantità di proteine ripiegate male, e quindi si cerca di evitare che queste siano disponibili all'aggregazione.

In questa fase sono importanti gli **holding chaperons**, di cui fanno parte le *small heat shock proteins* ed altre proteine.

Se anche questa linea di difesa fallisce ci sono degli ulteriori sistemi che possono promuovere la disaggregazione di aggregati insolubili.

Seguendo il flusso degli eventi che attraversa la proteina neosintetizzata, all'uscita del ribosoma questa può interagire con chaperoni di folding per raggiungere lo stato nativo. Nel passaggio tra forme intermedie, nonostante il supporto dei folding chaperons, possono essere in sovrannumero per evitarne l'aggregazione. A questo punto entrano in azione gli holding chaperons e successivamente le disaggregasi.



Anche in queste fasi successive possono intervenire le Hsp70, che sono proteine molto versatili, assieme ad una varietà di altre proteine.

Small heat shock proteins (sHsp)

Queste proteine servono a fornire superfici neutre, sulle quale le proteine che espongono residui idrofobici (quindi almeno parzialmente denaturate) possono essere attratte ed aggregate, per essere poi eventualmente rilasciate al miglioramento delle condizioni cellulari.

Queste proteine sono ampiamente diffuse i tutti gli organismi.

Sono proteine piccole, da 10 a 40kDa, con domini conservati ed indipendenti dall'ATP.

La concentrazione di queste proteine aumenta in condizioni di stress. Le sHsp si organizzano e svolgono la loro funzione in oligomeri, formando ampie superfici sulle quali le proteine denaturate possono associarsi e disassociarsi.

Vedremo 2 proteine dei batteri: IbpA ed IbpB.

Le sHsp a seguito di uno shock possono associarsi a fare complessi più grandi. Su questi oligomeri le proteine mal ripiegate possono temporaneamente aderire.

L'associazione delle sHsp in oligomeri modula l'attività del piccolo chaperone rispetto alle proteine mal ripiegate. Le proteine che aderiscono agli oligomeri non sono disponibili ad aggregare con altre proteine, non possono quindi formare aggregati difficili da solubilizzare. Alla fine dello shock i complessi tendono a dissociarsi ed a rilasciare le proteine legate, che poi aiutate dagli altri chaperoni possono eventualmente ripiegarsi.

Le sHsp lavorano sempre insieme ad altri chaperoni.

Le sHsp hanno un ruolo di stabilizzazione della membrana cellulare in condizioni di stress. Quando la sHsp si lega alla membrana, la stabilizza e induce dei segnali di disattivazione della risposta da stress. Quindi non solo le sHsp riducono l'impatto dello stress sulla vitalità cellulare, ma sono in grado di modulare la risposta stessa allo stress.

Disaggregasi

Quando gli chaperoni di holding non riescono ad evitare la formazione di aggregati, la cellula può reagire con altri tipi di chaperoni, le **disaggregasi**.

Le disaggregasi appartengono ad una superfamiglia di proteine, le AAA (ATPasi Associated with many intracellular Activity).

Le disaggregasi possono essere classificate a seconda della loro funzione:

- **disaggregazione:** troviamo la ClpB (batteri) e la Hsp104 (lievito)
- **unfolding e controllo qualità:** proteine che in associazione a proteasi (ClpP e ClpQ) catalizzano l'idrolisi delle proteine in maniera ATP dipendente (ClpA, ClpC, ClpX, ClpY)

La disaggregasi Hsp104 ha un dominio N terminale che serve all'interazione con il substrato. Possiede due domini Nucleotide Binding Domain (NBD 1 e 2) legati da un linker. Gli NBD sono i principali responsabili dell'attività idrolitica.

Nel dominio NBD1 c'è un dominio, detto *propeller*, che protrude dalla struttura della proteina ed è quello che aiuta nella lisi dell'aggregato. Questo dominio è tipico delle disaggregasi e non si trova nelle altre proteine AAA.

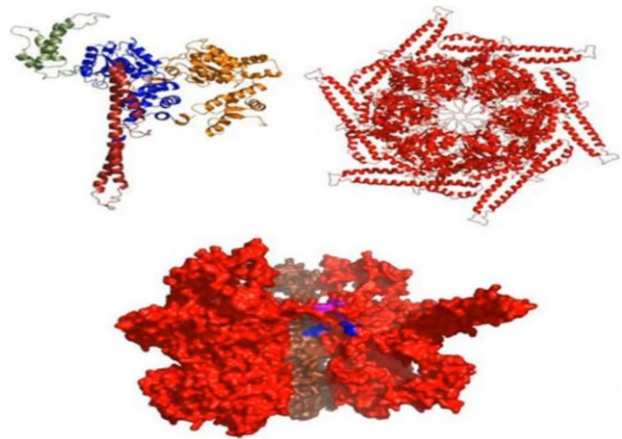
Le disaggregasi sono tutte oligomeri.

La disaggregasi ClpB di *Thermus thermophilus* è un oligomero formato da due dischi, ognuno dei quali è un esamero con un foro centrale.



Ogni subunità ha una struttura con una lunga porzione uscente (in rosso), la regione *propeller*, simile ad un uncino.

Quando la disaggregasi svolge la sua azione, i domini *propeller* si legheranno all'aggregato cercando di rimuovere le varie proteine. La disaggregasi lega ATP e può avere una attività idrolitica.



Le Hsp100 lavorano in combinazione alle Hsp70. Anche l'Hsp ha mostrato *in vitro* di avere attività di disaggregasi.

Ci sono stati vari modelli sull'effettivo funzionamento del sistema.

L'Hsp70 potrebbe intervenire per primo, rendendo più disponibili le proteine aggregate ed indirizzandole nella disaggregasi.

È possibile che intervenga per prima la disaggregasi, probabilmente effettuando tagli proteolitici alle proteine e rimuovendo le proteine dell'aggregato, e dopo interverrebbe la Hsp70.

Una interpretazione più recente del processo di disaggregazione è che si ha inizialmente l'intervento di una proteasi. Interviene poi il sistema Hsp70 completo di co-chaperone, che fa una prima interazione con le proteine e le indirizza verso il canale centrale della Hsp104.

L'idrolisi di ATP consente non solo cambiamenti conformazionali, ma probabilmente da l'energia per costringere la proteina nel canale della disaggregasi.

L'aggregazione può quindi non essere un vicolo cieco nella vita delle proteine, perché possono essere recuperate con una serie di metodi.

Se comunque il recupero non funziona, le proteine aggregate vanno incontro alla degradazione nel proteasoma.

Hsp33

È un piccolo chaperone individuato nei batteri, la cui concentrazione intracellulare aumenta quando la cellula attraversa uno stress ossidativo.