

Lezione 12

Folding

Parleremo degli esperimenti di Anfinsen.

Anfinsen ha utilizzato una piccola proteina, la *ribonucleasi A*, che poi è diventata una delle proteine modello più usate per lo studio del ripiegamento delle proteine.

La ribonucleasi A è un enzima che interviene nel metabolismo dell'RNA. È formata da 124 aminoacidi ed ha 4 ponti disolfuro.

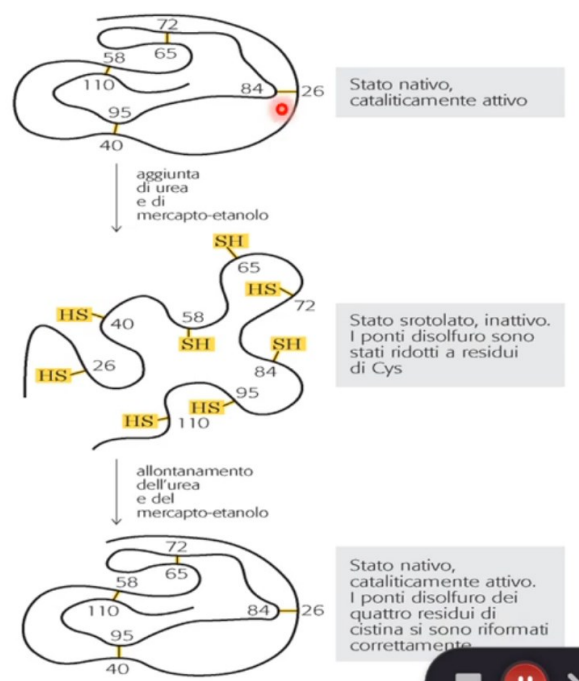
Ci permette di studiare non solo il ripiegamento ma anche il *ripiegamento ossidativo*, in cui alla fine del processo devono riformarsi i 4 legami covalenti dei ponti disolfuro.

L'esperimento di Anfinsen è un esperimento di denaturazione reversibile. Si è dimostrato infatti che rimuovendo le cause che hanno portato alla denaturazione della proteina questa ritorna alla sua forma nativa.

Nell'immagine a destra vediamo, in alto la struttura semplificata della proteina nella forma nativa. La forma nativa è definita come la conformazione a cui corrisponde l'attività biologica della proteina.

Per denaturare la proteina si aggiunge *urea*. Si usa anche *mercaptoetanolo* per rompere i *ponti disolfuro*.

Il ponte disolfuro si forma tra residui di cisteina, che espongono gruppi tiolici SH, che si trovano alla distanza adatta per formare il legame. Il ponte si forma per mezzo di una reazione di ossidazione tra i gruppi tiolici SH, che formano un legame S-S.



Aggiungiamo il mercaptoetanolo come agente riducente perché anche in forma disordinata la proteina manterrebbe il ponte disolfuro.

Nella proteina nello stato denaturato l'attività catalitica è pari a 0.

Questo per vari motivi, ma il più rilevante è che gli aminoacidi che formano il sito attivo di solito non sono vicini nella sequenza. Nel momento in cui abbiamo la denaturazione gli aminoacidi del sito attivo si allontanano, abbassando o rimuovendo l'attività catalitica.

Ad enzima denaturato si levano tutti gli agenti denaturanti. Il metodo può essere la dialisi, in cui rimpiazziamo la miscela denaturante con un tampone adatto.

A questo punto si aspetta e poi si controlla l'esito del processo.

Dopo aver aspettato il tempo necessario al folding, si valutano i risultati del processo.

Misurando l'attività della proteina ci accorgiamo che questa ha ripreso totalmente la sua attività catalitica, il che indica che la proteina si è ripiegata correttamente.

Sono successi due eventi.

Il primo è che la proteina si è ripiegata. Questo è importante perché significa che le informazioni sul ripiegamento sono contenute nella sequenza amminoacidica.

Il secondo è che si sono riformati i ponti disolfuro.

Il ponte disolfuro è un legame covalente che si forma per ossidazione dei gruppi tiolici. Basta la presenza dell'ossigeno, che si trova in soluzione, per ossidare i tioli e formare i ponti disolfuro.

Questo succede in modo spontaneo ma con una cinetica lenta (circa 10 ore).

Questo lascia intuire che nelle cellule ci sono enzimi in grado di catalizzare la reazione di formazione dei ponti disolfuro.

L'esperimento va avanti, in modo da valutare la risposta della proteina al variare della quantità di agente denaturante.

Si lascia quindi una minima percentuale di urea e si lascia rifoldare la proteina. Alla fine del refolding si vede che solo una piccola percentuale dell'attività è stata recuperata.

Se ne conclude che si sono riformati ponti disolfuro non reattivi, cioè che non si riformavano con il corretto accoppiamento.

Considerando gli 8 gruppi tiolici che possono formare legami tra loro si vede che ci sono 105 possibilità di accoppiamento. Eseguendo il folding in condizioni non ottimali potrebbero quindi formarsi dei legami disolfuro definiti *non-nativi*.

Anfinsen ha definito questa forma di RNAsi come *scrambled RNase*.

Dalla scrambled RNAsi si riesce però ad ottenere la proteina in forma nativa aggiungendo mercaptoetanolo. Il mercaptoetanolo riduce i ponti disolfuro non-nativi, ed aspettando il tempo di refolding si vede che la proteina riacquista totalmente la sua attività.

La scelta della RNAsi per compiere questo esperimento è stata una scelta fortunata, perché altre proteine avrebbero potuto tendere ad aggregare quando si fossero trovate in soluzione in forma denaturata, o durante stadi intermedi di folding.

La conclusione di questo esperimento è che la conformazione nativa deve essere stabile dal punto di vista energetico, ed è quella a cui la proteina tende se non perturbata.

Controllo termodinamico sul folding delle proteine

Gli esperimenti di Anfinsen ci dicono che l'informazione utile a determinare la struttura tridimensionale della proteina è contenuta nella sequenza amminoacidica.

La struttura nativa nelle condizioni ottimali è quella favorita dal punto di vista energetico e si troverà in un minimo di energia dell'ipersuperficie dell'energia libera della proteina.

Siamo quindi in grado di misurare i parametri termodinamici correlati alla reazione di folding.

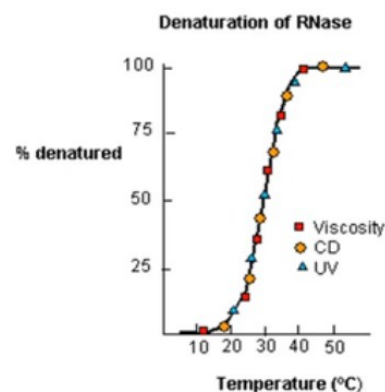
Possiamo misurare la costante di equilibrio mediante il rapporto tra i due stati, nativo e denaturato.

$$K_{eq} = [D]/[N]$$

Questa equazione vale se si ipotizza l'esistenza di soli due stati: D ed N

Per fare un esperimento di questo tipo può essere utile usare la temperatura come agente denaturante, perché la temperatura è facilmente reversibile senza dializzazione della soluzione.

Si fa quindi una scala di temperature. Ad ogni punto di temperatura si misura la K_{eq} . Ad ogni punto si ha sempre una condizione di equilibrio, ma la K_{eq} cambierà.



La ribonucleasi A a pH 2.5 è un po' meno stabile rispetto al pH fisiologico, è quindi più facile denaturalarla a temperature relativamente più basse. Misurando la K_{eq} lungo la scala di temperature vediamo come c'è un punto in cui la $K_{eq} = [D]/[N] = 1$. Quello è il punto di midpoint T_m .

Si possono usare diversi metodi analitici per studiare la curva di denaturazione.

Oltre a dicroismo circolare e fluorescenza, un altro parametro che ci dice se la proteina è in stato nativo o in stato denaturato è la viscosità della soluzione. La viscosità cambia perché la proteina in stato denaturato tende a formare interazioni con altre proteine in soluzione, aumentandone la viscosità.

È importante che i punti misurati con vari metodi cadano sulla stessa curva, perché la sovrapposizione di varie misurazioni che rilevano proprietà diverse ci conferma il fatto in questo esperimento si hanno solo due stati: stato nativo o stato denaturato.

Se ci fosse stata una parziale denaturazione si avrebbero potuto avere risultati diversi, ad esempio dati da misurazioni che misuravano la riformazione di strutture secondarie avrebbero dato un risultato diverso rispetto alla fluorescenza data dall'esposizione dei triptofani.

In questo caso invece ogni regione della proteina denatura assieme a tutte le altre.

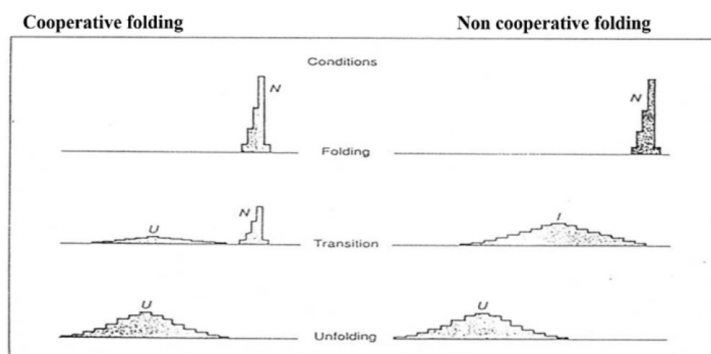
Questo tipo di interpretazione escludeva la presenza di stati intermedi.

In realtà si possono effettivamente osservare proteine che passano dallo stato nativo a quello denaturato senza attraversare stadi intermedi. Si dice che queste sono *folding altamente cooperativi*. In questi casi la formazione dei primi legami è molto utile per la formazione dei legami successivi, perché si riduce fortemente lo spazio conformazionale che la proteina deve esplorare.

Non tutte le proteine seguono un folding cooperativo.

Si è visto che ci sono proteine che seguono un folding cooperativo ed altre che seguono un folding non cooperativo. Nel folding cooperativo man mano che si ha il folding si osservano solo due stati: proteine in stato denaturato e proteine in stato nativo.

Nel folding non cooperativo si osservano degli intermedi, che non appartengono né allo stato denaturato né a quello nativo.

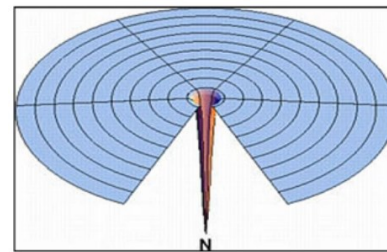


Condizioni che favoriscono il folding

Seguendo la teoria del meccanismo a due stadi, vedremo che l'ipersuperficie dell'energia libera della proteina (*folding funnel*) ha un solo minimo.

Questa teoria si è però rapidamente evoluta, perché è subito apparso difficile che la proteina debba esplorare tutte le possibili conformazioni (che si trovano alla stessa energia) prima di trovare il minimo.

È probabile che ci sia un percorso energeticamente favorito che la proteina segue nel ripiegamento.



Il paradosso di Levintahl

Se consideriamo una piccola proteina, costituita da solo 100 aminoacidi, ognuno dei quali può assumere solo 2 possibili conformazioni, le conformazioni raggiungibili dalla proteina sarebbero $2^{100} = 1,27 * 10^{30}$ conformazioni.

Ipotizzando che la proteina possa assumere una conformazione ogni 10^{-13} secondi, per esplorare tutte le conformazioni sarebbero necessari $10^{-13} * 1,27 * 10^{30} = 1,27 * 10^{17}$ secondi = $4 * 10^9$ anni.

È evidente che 4 miliardi di anni non è un tempo ragionevole per il ripiegamento della proteina.

Sappiamo che il ripiegamento della proteina è un evento rapido che richiede tempi nell'ordine dei microsecondi fino a pochi millisecondi.

Escludendo quindi che la proteina provi tutte le conformazioni possibili, si ragiona sulla possibilità che il ripiegamento segua percorsi specifici.

Controllo cinetico

La proteina si ripiega seguendo il percorso più accessibile da punto di vista cinetico, quindi la forma nativa sarà la forma più stabile raggiungibile in tempi biologici.

Per dimostrare l'esistenza di questi pathway dovremmo riuscire ad isolare delle forme intermedie, attraverso cui la proteina passa nel percorso dalla sua forma denaturata alla forma nativa.

Lo studio degli intermedi di folding non è facile, perché queste sono conformazioni poco stabili che la proteina assume per tempi brevi, e sono quindi difficili da isolare.

Iniziali esperimenti hanno dimostrato che nel percorso di folding sia del citocromo C che della RNAsi sono coinvolte forme intermedie.

In anni passati ci si è chiesti se quelle forme intermedie fossero passaggi intermedi del folding o se fossero *off-pathways*. Gli *off-pathway* sono forme che vengono sottratte al processo di folding produttivo, perché troppo stabili per proseguire il folding, forme che quindi sono intrappolate in un minimo di energia, le cosiddette *trappole cinetiche*.

Gli *off-pathways* si osservano sicuramente, ma si osserva anche che esistono intermedi nel processo di folding.

Il secondo punto importante in questa discussione è stata la dimostrazione che non in tutte le proteine la forma nativa è la più stabile.

Si sono osservate proteine che sono attive in forma metastabile, tra queste le *serpine*.

Serpine

Le Serine Protease Inhibitors (serpine) sono *inibitori delle serina proteasi*.

Le serina proteasi sono enzimi proteolitici coinvolti in importanti processi biologici, tra cui l'idrolisi delle proteine nel processo di digestione, nel processo di coagulazione ed altri processi biologici.

Le serina proteasi sono enzimi potenzialmente pericolosi in ambiente cellulare, perché potrebbero idrolizzare anche le proteine intracellulari.

La loro attività è regolata principalmente mediante due meccanismi:

- le serina proteasi vengono sintetizzate in forma inattiva, detta *zimogeno*, e vengono attivate mediante taglio proteolitico.
- Quando attivate, le serina proteasi possono essere inibite da particolari proteine, che sono appunto le serpine. Ogni serina proteasi ha la sua serpina specifica.

Le serpine sono piccole proteine che esplicano la loro azione inibente attraverso una porzione in grado di inserirsi nel sito attivo della serina proteasi. La serina proteasi riconosce il substrato e lo taglia. L'inibitore tagliato però non si allontana dal sito attivo, ma vi resta legato in maniera covalente.

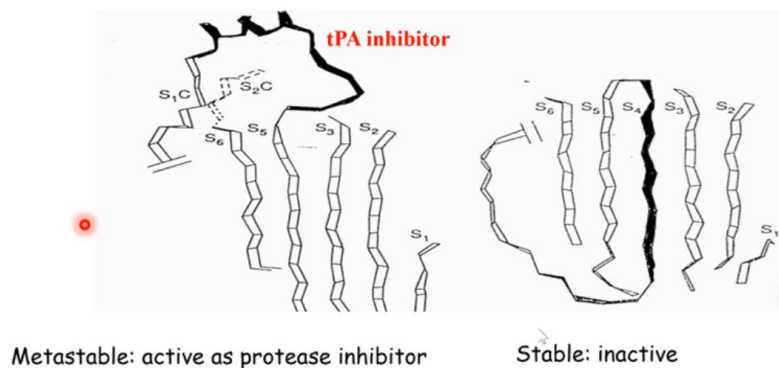
Si tratta quindi di inibitori irreversibili, che agiscono con un meccanismo di inibizione suicida.

Le serpine non processate da una serina proteasi hanno un comportamento particolare.

In condizioni fisiologiche la forma nativa non è stabile (metastabile), e tende spontaneamente a convertirsi in una forma stabile, ma inattiva, in circa due ore. La parte attiva della proteina, in nero nell'immagine, passa da una configurazione ad alfa elica nella forma metastabile, ad una struttura a foglietto beta nella forma stabile.

La cosa interessante è che la proteina nativa è metastabile, e nel tempo si converte nella forma stabile, che è inattiva.

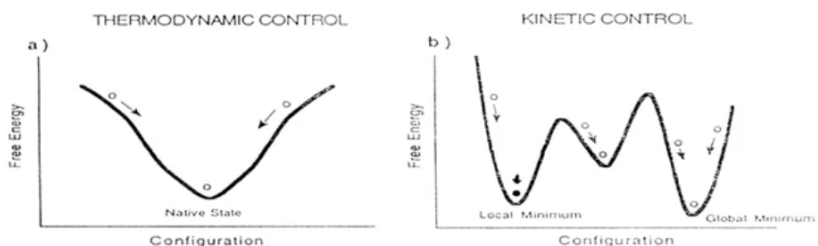
Se la forma stabile viene denaturata, nel momento in cui si riporta la soluzione in condizioni che permettono il folding la proteina tenderà a foldare nella forma metastabile, che a sua volta tenderà di nuovo a ripiegarsi nella forma stabile, detta *forma latente*.



Gli esperimenti con le serpine sono stati importanti perché hanno dimostrato che la forma nativa della proteina non sempre è la più stabile.

Cinetica del folding

La figura indica la differenza tra un controllo esclusivamente termodinamico rispetto ad un controllo cinetico. Nel controllo cinetico vediamo che la conformazione che la proteina acquisisce nel processo di folding non sempre cade nel minimo globale di energia, ma può cadere in un minimo locale, il quale rappresenta la conformazione più accessibile dal punto di vista cinetico.



Quando ci si limita all'analisi termodinamica si riesce a distinguere l'inizio e la fine del processo di folding, ma non si riesce ad ottenere informazioni sul percorso che la proteina fa nel processo di ripiegamento.

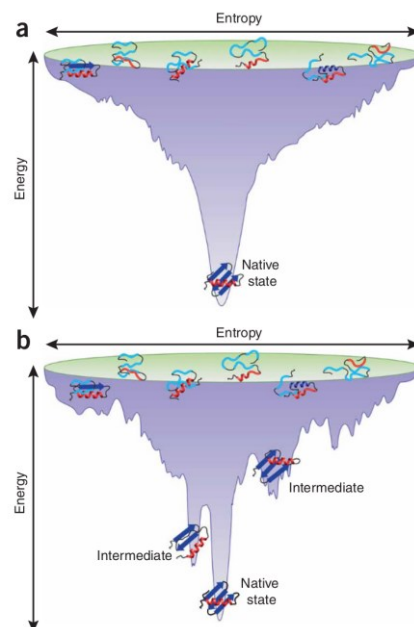
Negli anni si è evoluto il concetto di *folding funnel*, l'imbuto di ripiegamento.

Il concetto è che partendo dalla proteina in stato denaturato, questa si trova in uno stato ad alta entropia ed alta energia.

Durante il ripiegamento si ha una riduzione dell'entropia e dell'energia libera della proteina, secondo un percorso che può essere più o meno favorito, con la possibilità di avere stati intermedi in minimi locali.

Nell'immagine *a* si vede il folding funnel di una proteina che segue un percorso poco vario nel ripiegamento. Questo percorso è tipico di proteine che si ripiegano con folding cooperativo.

L'immagine *b* mostra un folding funnel in cui ci sono degli intermedi durante il folding. Questo percorso riguarda proteine che ripiegano con folding non cooperativo.



Lo stile di ripiegamento della proteina dipende dalla proteina stessa, quindi dalla sua sequenza e dalle condizioni in cui si viene a trovare.

Modelli di folding

Modello nucleazione e crescita

Questo modello si ispira alla crescita dei cristalli. Nella proteina denaturata, parti che sono vicine tra loro formano elementi di struttura secondaria. Da questi elementi di struttura secondari si accresce la struttura nativa.

Modello del Framework

Il folding inizia dalla formazione delle strutture secondarie. Questi elementi sono inizialmente instabili, ma successivamente si organizzano a formare intermedi via via più stabili. Si arriva così ad un ultimo passaggio in cui si ha il compattamento delle catene laterali degli aminoacidi. In questa teoria si inseriscono argomenti della teoria di O.B. Ptitsyn, che nel 1973 suggerisce uno stato intermedio universale nelle proteine, chiamato *molten globule*.

Collasso idrofobico

Questa teoria propone che la catena denaturata vada incontro ad un collasso idrofobico, quindi un compattamento tra aminoacidi idrofobici, che riduce lo spazio conformazionale della sequenza. Questa teoria mette in rilievo le interazioni a lungo raggio nel processo di folding.

Questa differenza di vedute era probabilmente dovuta al fatto che questi gruppi di ricerca studiavano proteine diverse, anche con metodi diversi.
Le osservazioni erano quindi corrette, ma difficilmente generalizzabili se prese singolarmente.

Negli anni '70 e '80 si sono rese disponibili una serie di tecniche di studio del folding molto performanti, che hanno permesso un'accelerazione degli studi sul folding. (Da: *An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms*. Alice I Bartlett & Sheena E Radford).

NMR per lo studio del folding

Nell'esperimento che analizziamo vogliamo verificare se diverse parti della proteina si ripiegano in tempi diversi.

All'inizio la proteina è completamente denaturata ed in acqua deuterata e si avrà quindi uno scambio tra idrogeno e deuterio.

Il campione viene miscelato ad un tampone di rinaturazione. La proteina comincerà a ripiegarsi. A fine ripiegamento, la soluzione campione viene miscelata ad una seconda soluzione ad alto pH senza deuterio, che favorisce lo scambio isotopico. Viene alla fine neutralizzata la soluzione e si può analizzare il campione con la NMR per comprendere quali sono le zone che foldano per prime e quali seguono nel tempo.

Modelli recenti del Folding delle proteine

Si è man mano cercato di unificare i vari modelli di folding.

Studi recenti su piccole proteine hanno permesso di tracciare la posizione di tutti gli atomi durante il folding. Molti metodi sono di grande aiuto nello studio del folding, tra cui ingegneria proteica, NMR, spettroscopia ultrarapida e dinamica molecolare.

Il concetto che è emerso e che nella reazione di folding da stato denaturato a stato nativo si passa attraverso uno *stato di transizione*, che è uno stato ad energia libera molto alto, che è un insieme di stati conformazionali con la stessa probabilità di ripiegarsi o meno.

Nello stato di transizione di una singola proteina troviamo un insieme di strutture in gran parte organizzate ma ancora diverse tra loro.

Passi chiave nel folding.

- Si formano elementi di struttura secondaria che gradualmente diventano più stabili ed interagiscono con altre regioni della sequenza
- Ad un certo punto si ha una interazione idrofobica
- Questi riarrangiamenti iniziali causano una forte riduzione dello spazio conformazionale esplorabile dalla proteina
- Si arriva allo stato di transizione, con rilascio di molecole d'acqua

Le proteine differiscono tra loro per la velocità con cui superano queste fasi e per il momento in cui si ha il collasso idrofobico.

Analisi degli stati di transizione

La Φ Analysis si propone di mappare in maniera dettagliata le interazioni che ogni aminoacido stabilisce lungo la traiettoria di folding e nello stato nativo.

L'approccio consiste nel fare una mutagenesi sistematica sulla sequenza della proteina, ogni aminoacido viene singolarmente sostituito con Alanina. Si misurano le cinetiche di folding e si rilevano variazioni nel ΔG della proteina.

Φ è un parametro che ci fa vedere quali cambiamenti nell'energia libera si sono verificati in seguito alle sostituzioni.

$$\Phi = \Delta\Delta G_{TS-D} / \Delta\Delta G_{N-D}$$

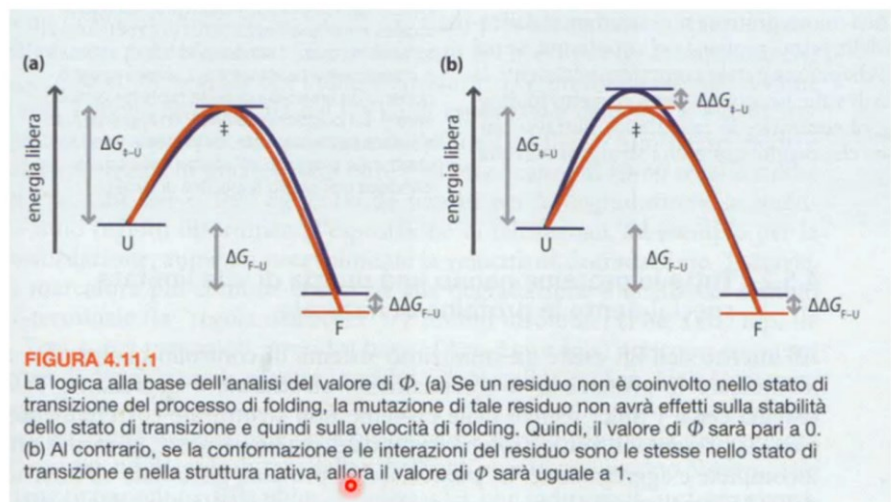
Dove TS è lo stato di transizione, D è lo stato denaturato, N è lo stato nativo, $\Delta\Delta G$ è la differenza nella variazione di energia libera tra gli elementi ai pedici.

Φ varia tra 0 e 1

Se $\Phi = 0$, la sostituzione non ha cambiato nulla e non era rilevante nel passaggio da TS a N.

Se $\Phi = 1$, il residuo è importante nella struttura dello stato di transizione.

In base a questi risultati è possibile fare una mappatura molto precisa di come è fatto lo stato di transizione.



Si è visto che proteine omologhe, anche con buona identità di sequenza e struttura molto simile possono ripiegarsi in modi diversi, come misurato con l'analisi Φ . Questo indica che lo stato di transizione è importante per lo sviluppo della struttura nativa.

