

Classificazione CATH:

Classe:

Contenuto di struttura secondaria

Architettura:

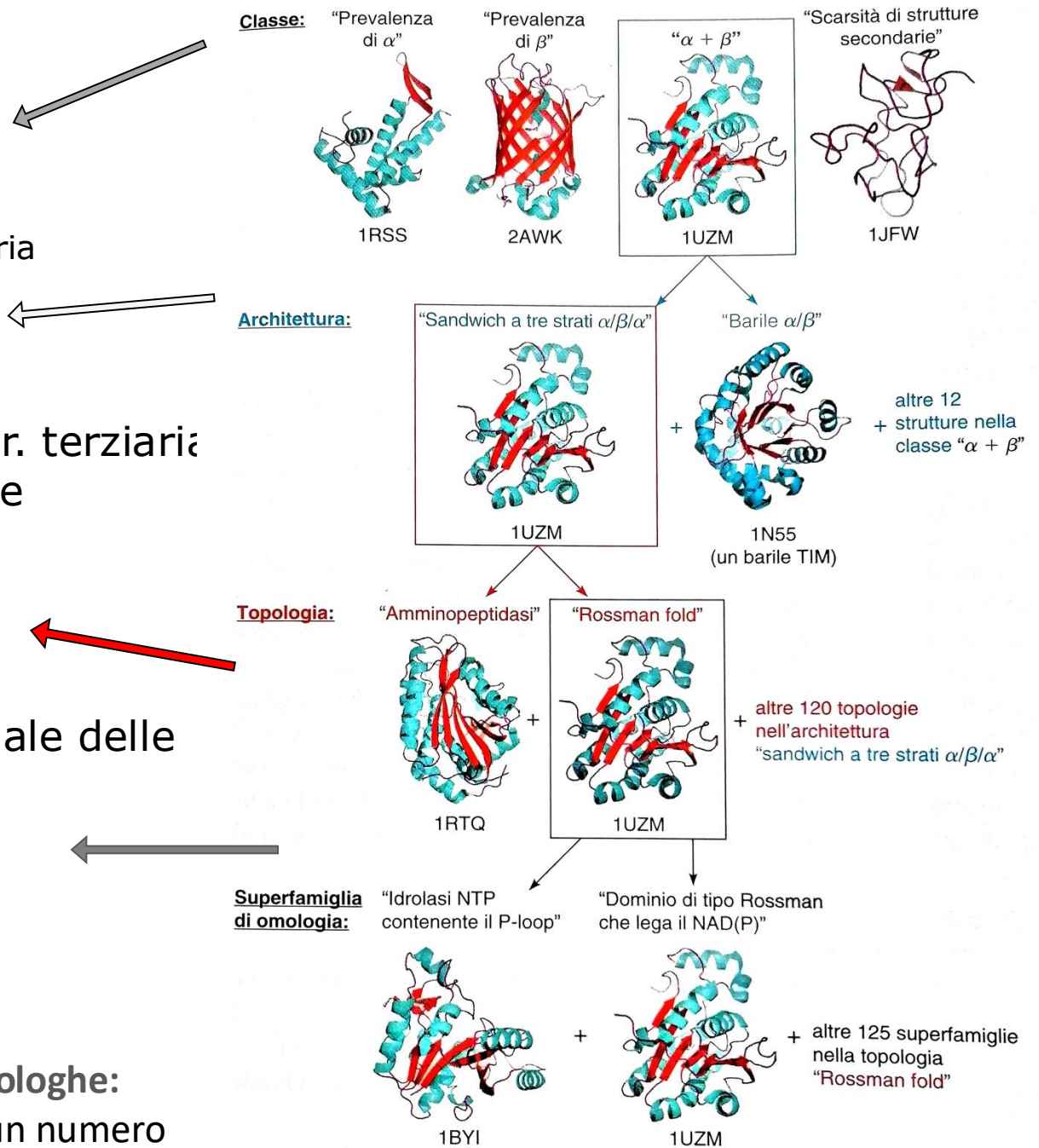
Disposizione spaziale (str. terziaria) delle strutture secondarie

Topologia:

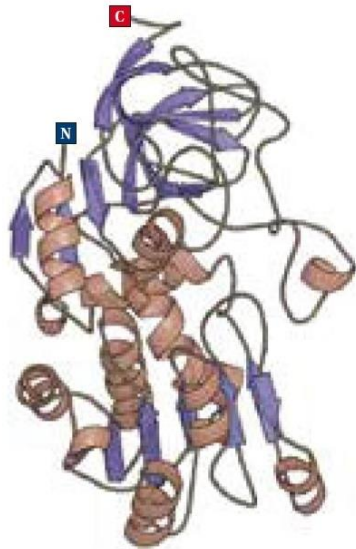
Organizzazione sequenziale delle strutture secondarie

Superfamiglia di strutture omologhe:

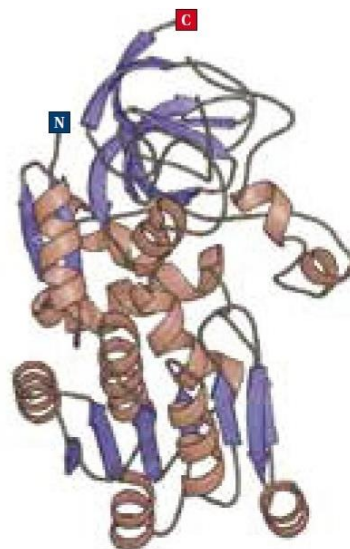
Domini strutturali comuni ad un numero significativo di proteine con forti omologie



Struttura simile, sequenza e organismo differente



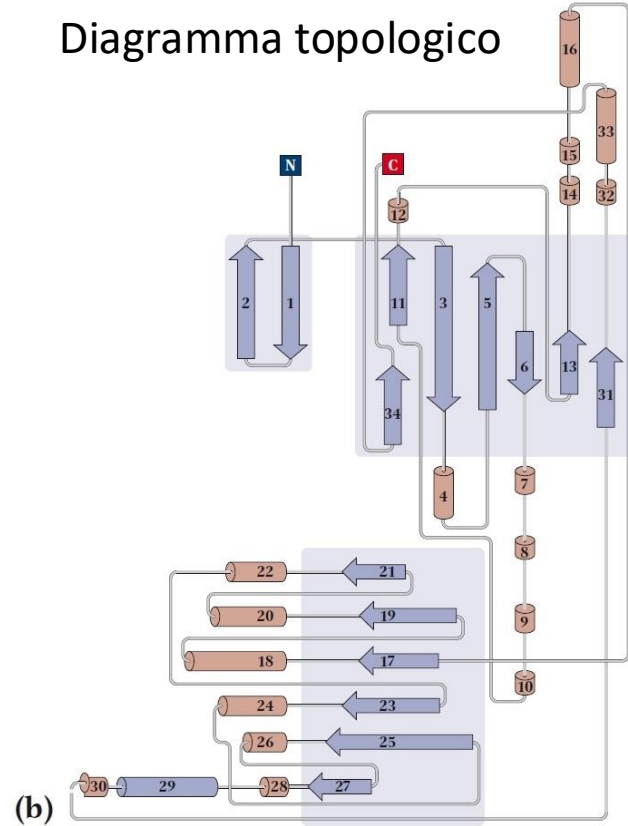
2JHF
Alcol deidrogenasi
Equus caballus
Cavallo



1F8F
Alcol deidrogenasi
Acinetobacter calcoaceticus
Batterio del microbiota
intestinale umano

(a)

Diagramma topologico



(b)

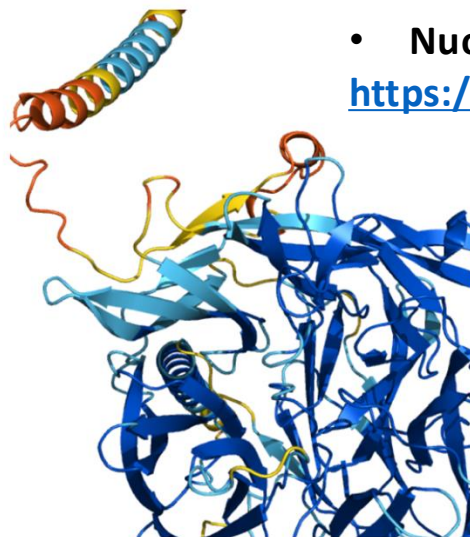


DOVE REPERIRE LE INFORMAZIONI STRUTTURALI?

- RCSB PDB (www.rcsb.org/pdb/home/home.do)

AlphaFold is an AI system developed by **DeepMind** that predicts a protein's 3D structure from its amino acid sequence. It regularly achieves accuracy competitive with experiment.

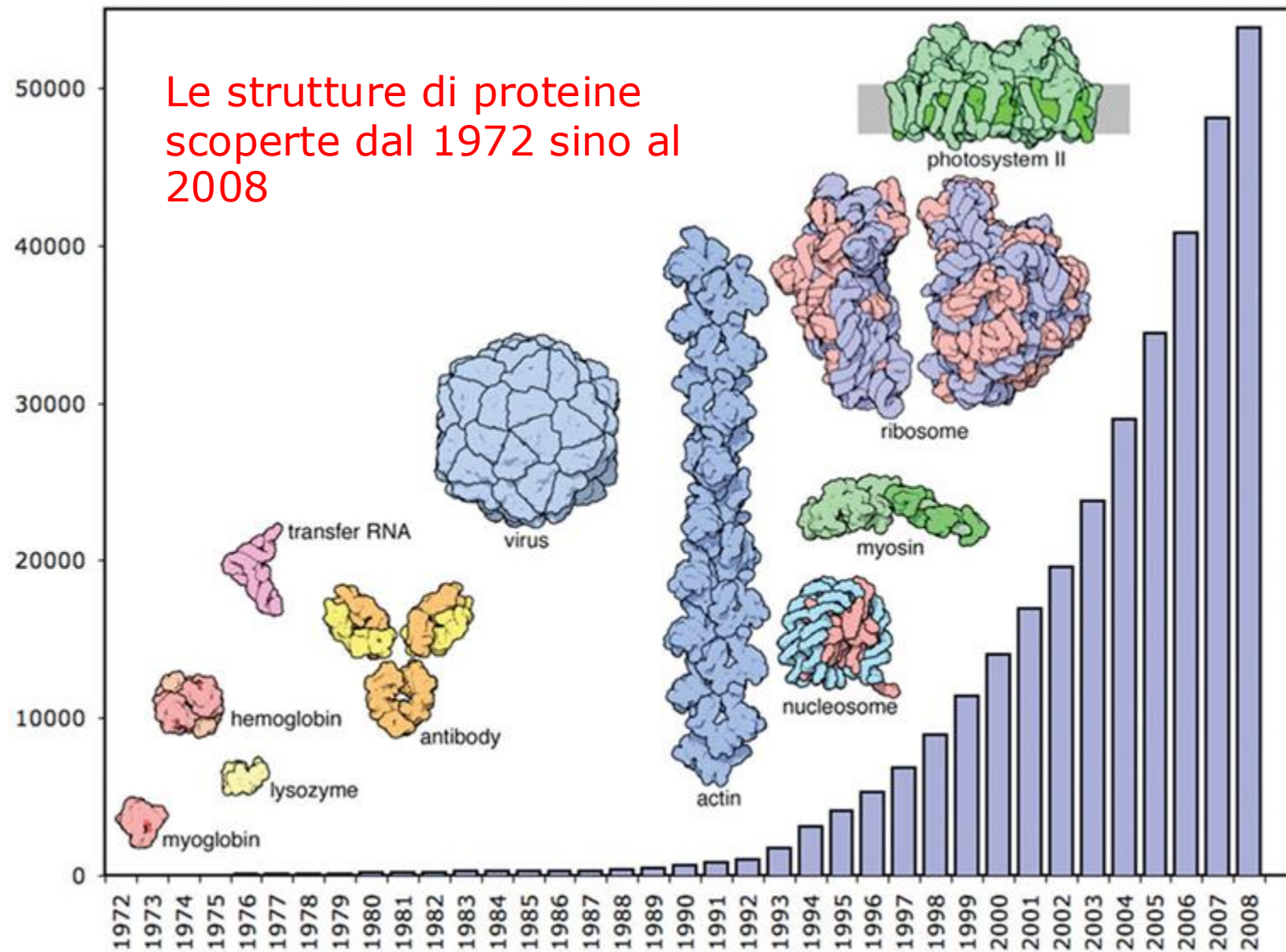
DeepMind and EMBL's European Bioinformatics Institute (**EMBL-EBI**) have partnered to create AlphaFold DB to make these predictions freely available to the scientific community. The first release covers the human proteome and the proteomes of several other **key organisms**. In the coming months we plan to expand the database to cover a large proportion of all catalogued proteins (the over 100 million in **UniRef90**).



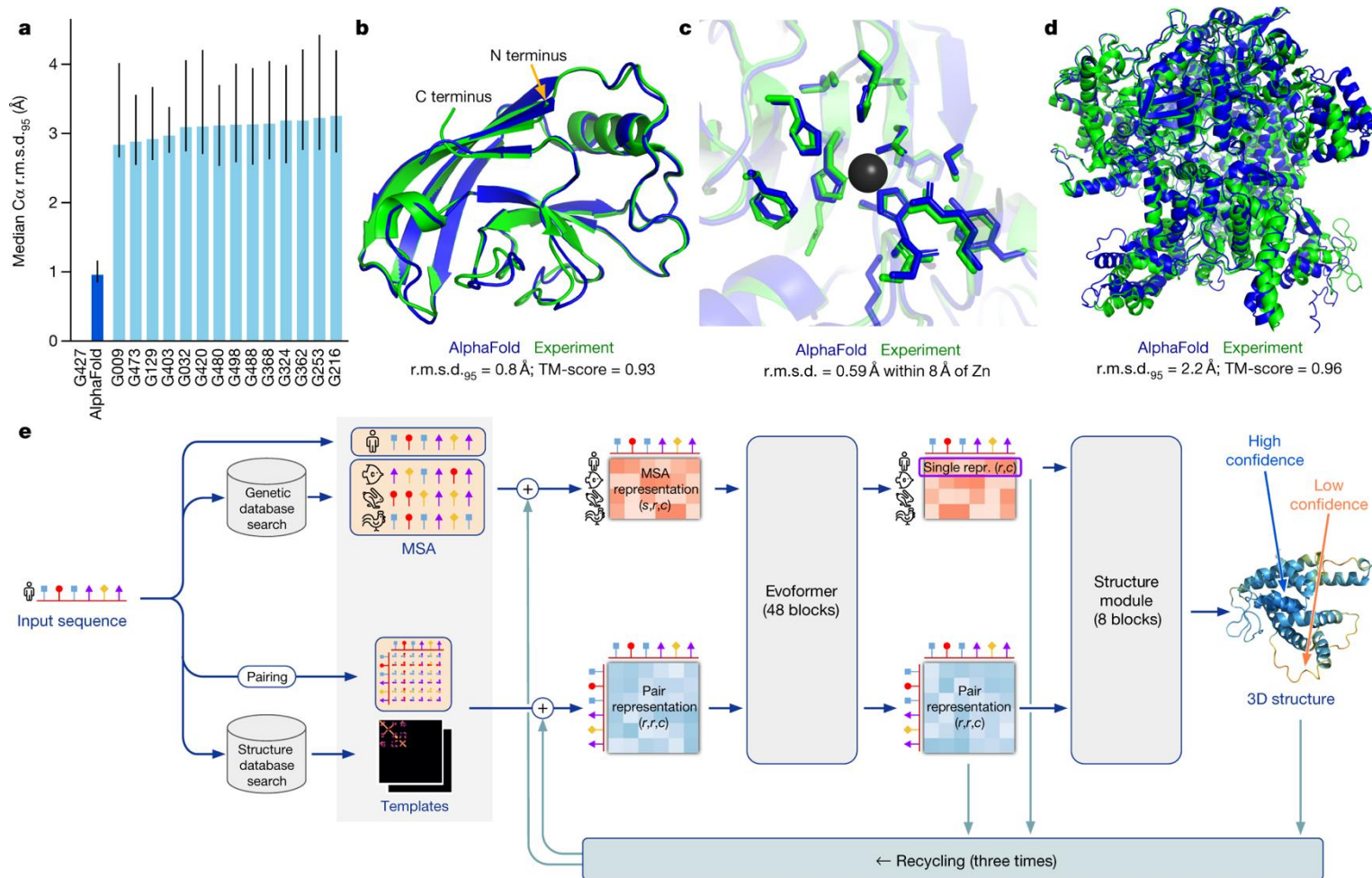
- **Nuovi sistemi di predizione basati su AI:**
<https://alphafold.ebi.ac.uk/>

Q8I3H7: May protect the malaria parasite against attack by the immune system.
Mean pLDDT 85.57.

Archivio universale delle strutture proteiche: <https://pdb101.rcsb.org/>



OGGI POSSIAMO ANCHE PREDIRRE CON ACCURATEZZA
 LE STRUTTURE TRIDIMENSIONALI DELLE PROTEINE...: <https://alphafold.ebi.ac.uk/>



<https://www.nature.com/articles/s41586-021-03819-2>

Qualsiasi processo che avviene in natura è regolato dalle **LEGGI della TERMODINAMICA**

PRIMA legge della TERMODINAMICA (PRINCIPIO DI CONSERVAZIONE DELL'ENERGIA): in qualsiasi modificazione chimica o fisica, la quantità totale di energia dell'universo resta costante; l'energia può cambiare forma o essere trasferita da una zona ad un'altra, ma non può essere né creata né distrutta.

SECONDA legge della TERMODINAMICA: un processo può avvenire spontaneamente solo se la somma delle variazioni di entropia del sistema e dell'ambiente aumenta:

$$\Delta S_{\text{sistema}} + \Delta S_{\text{ambiente}} > 0$$

In tutti i processi naturali, l'entropia tende ad aumentare

Come facciamo a stabilire se una determinata reazione è spontanea?

Si ricorre per questo alla funzione **energia libera (G) di Gibbs** che tiene conto dei parametri interni al sistema ed esclude i parametri legati all'ambiente

Nei sistemi biologici

(a temperatura e pressione costanti) $\Delta G_{\text{sistema}} \sim \Delta H_{\text{sistema}} - T\Delta S_{\text{sistema}}$

Questi parametri permettono di valutare l'energia effettivamente spendibile dal sistema.

TABLE 13-1 Some Physical Constants and Units Used in Thermodynamics

Boltzmann constant, $k = 1.381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$

Avogadro's number, $N = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

Faraday constant, $\mathcal{F} = 96,480 \text{ J/V} \cdot \text{mol}$

Gas constant, $R = 8.315 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$

(= 1.987 cal/mol · K)

Units of ΔG and ΔH are J/mol (or cal/mol)

Units of ΔS are J/mol · K (or cal/mol · K)

1 cal = 4.184 J

Units of absolute temperature, T , are Kelvin, K

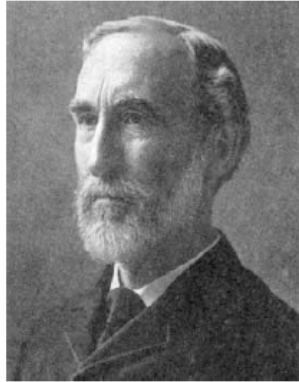
25 °C = 298 K

At 25 °C, $RT = 2.479 \text{ kJ/mol}$

(= 0.592 kcal/mol)

$$\Delta G_{\text{sistema}} \sim \Delta H_{\text{sistema}} - T\Delta S_{\text{sistema}}$$

1. Se ΔG è negativo ($\Delta G < 0$) la reazione può avvenire SPONTANEAMENTE. E' una reazione che procede con rilascio di energia libera (il sistema si modifica verso uno stato che possiede meno energia libera). Reazione ESOERGONICA.
2. Se $\Delta G = 0$ il sistema è in EQUILIBRIO TERMODINAMICO.
3. Se $\Delta G > 0$ la reazione NON PUO' avvenire SPONTANEAMENTE. Il sistema guadagna energia libera. REAZIONE ENDOERGONICA.



Josiah Willard Gibbs
Newhaven 1839 - Newhaven 1903

Energia Libera

$$G = H - TS$$

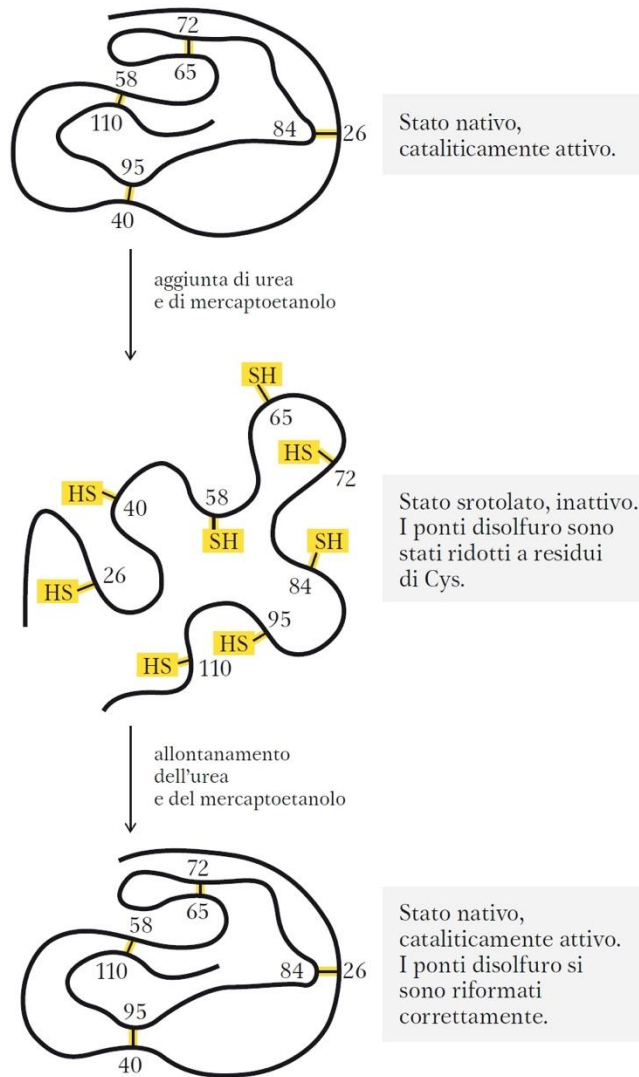
Per un processo a pressione e temperatura costanti:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

per un processo spontaneo: $\Delta G < 0$

all'equilibrio: $\Delta G = 0$

La legge di Gibbs, non considera la cinetica cui le trasformazioni avvengono (il ΔG è indipendente dalla cinetica della trasformazione).



Il ripiegamento delle proteine è un processo energeticamente spontaneo/favorito, perciò ha energia libera di Gibbs negative $\Delta G < 0$!!

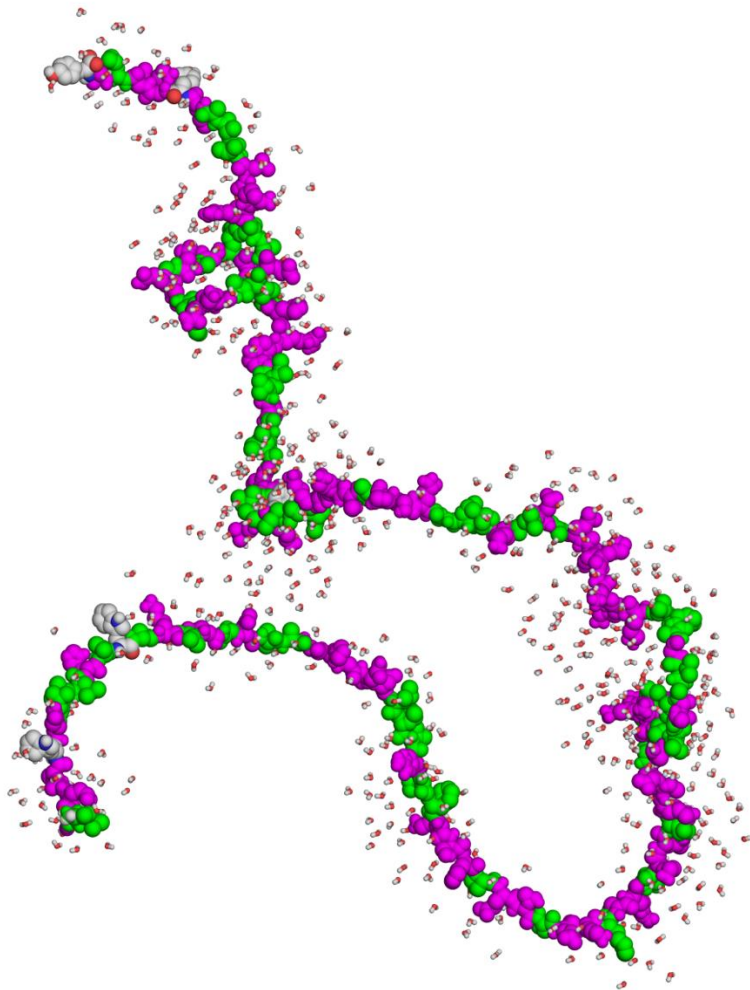
Quali fattori intervengono?

Perchè?

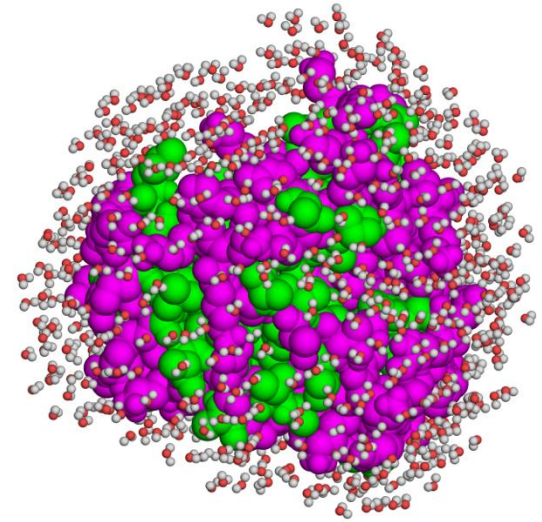
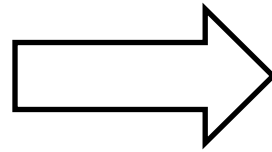
Come variano Entalpia ed Entropia in questo processo?

La denaturazione di una proteina è un processo reversibile (esperimento di Anfinsen)

Figura 4.27 Rinaturazione della ribonucleasi srotolata e denaturata. L'urea è usata per denaturare la ribonucleasi, e il mercaptoetanolo ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) riduce e quindi scinde i ponti disolfuro, formando otto residui di Cys. La rinaturazione ristabilisce i ponti disolfuro nelle posizioni corrette.

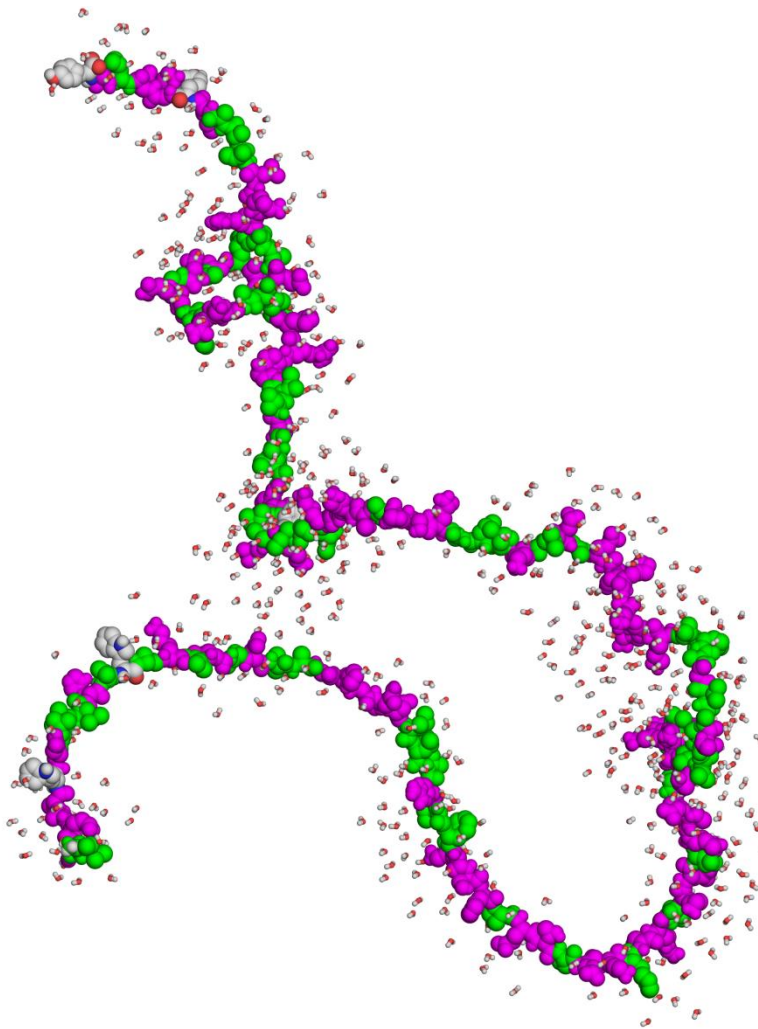


Unfolded /Denaturato

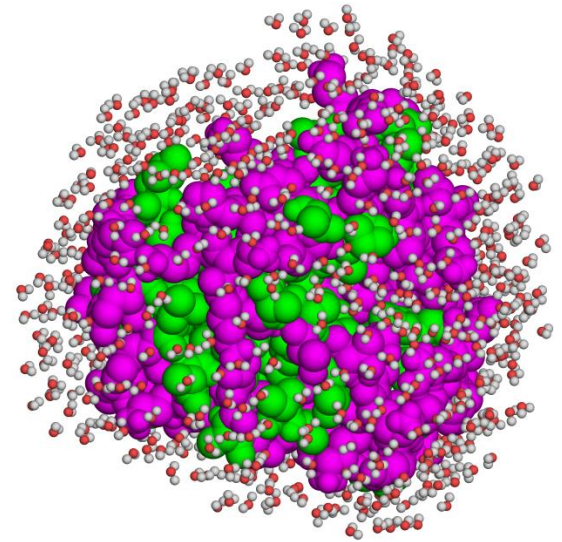
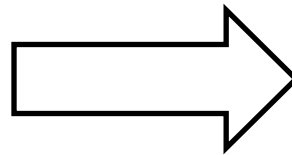


Folded/Ripiegato

$$\Delta G_{folding} = G_{folded} - G_{unfolded} < 0$$



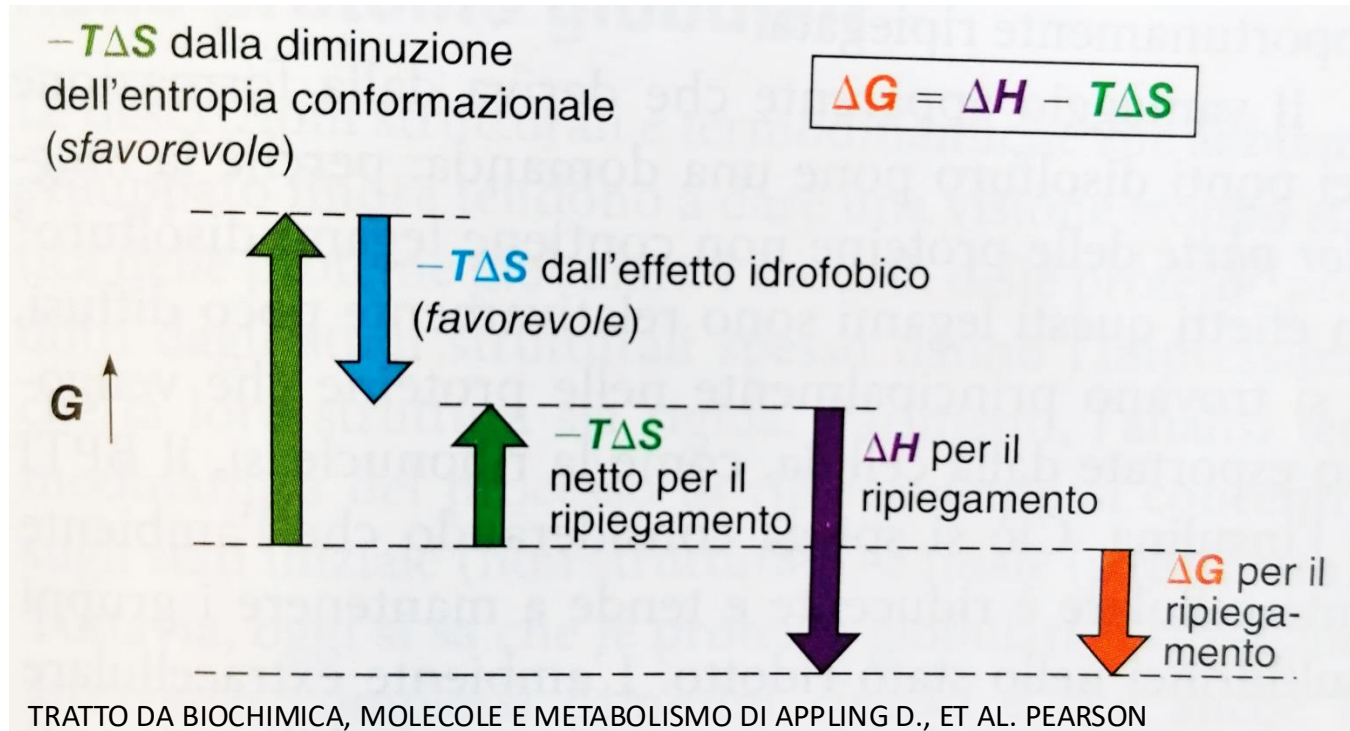
Unfolded



Folded

$$\Delta G_{\text{folding}} = -5 \text{ to } -20 \text{ kcal/mol}$$

LA TERMODINAMICA DEL RIPIEGAMENTO (FOLDING) DELLE PROTEINE

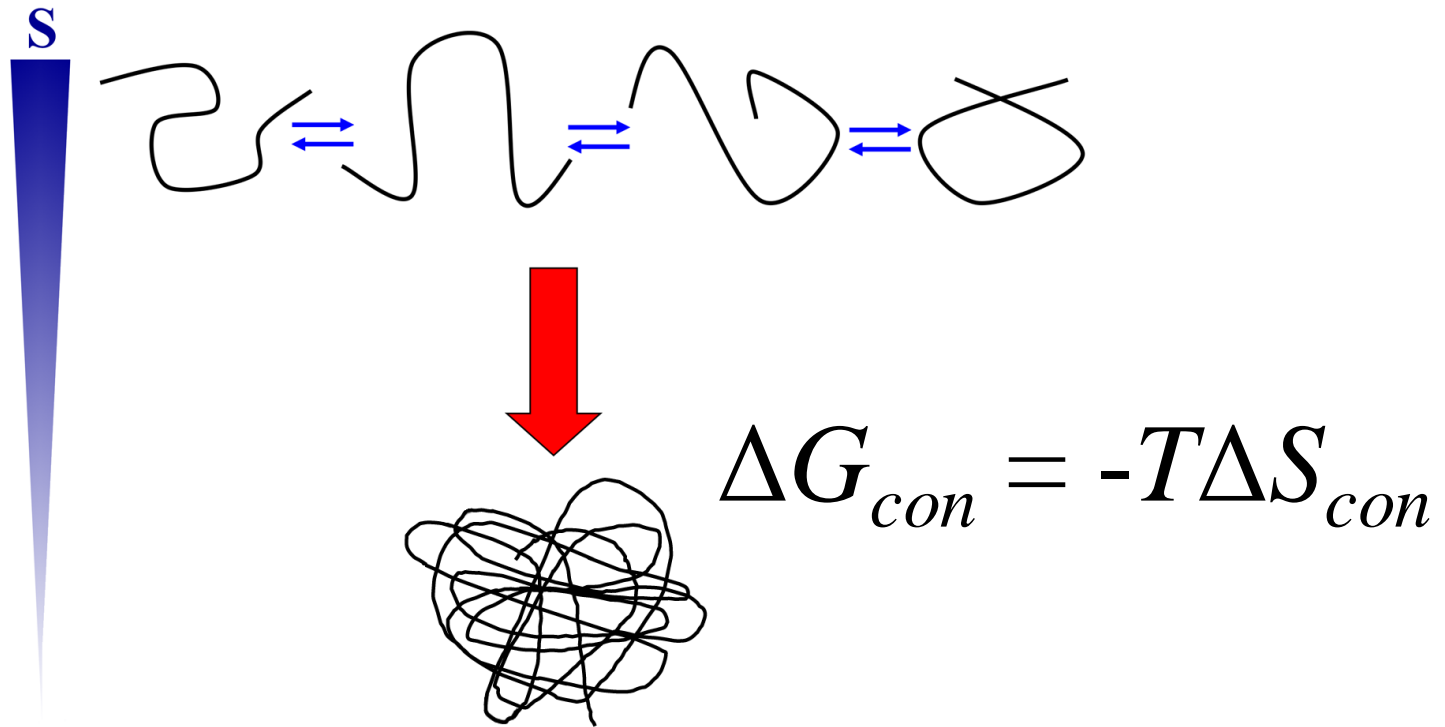


La stabilità del ripiegamento proteico è il risultato di:

1. Contributo favorevole dell'entalpia dovuta alle interazioni intramolecolari non covalenti (mentre i legami idrogeno sono pressochè equivalenti, le interazioni di Van Der Waals sono maggiori e più favorevoli nella proteina ripiegata rispetto alla forma denaturata)
1. Contributo favorevole dell'entropia del solvente dovuta al ripiegamento verso l'interno delle porzioni idrofobiche della sequenza proteica
2. Contributo sfavorevole dell'entropia conformazionale, dove sarebbe favorita la struttura disordinata e denaturata anziché una struttura ripiegata regolare e compatta;

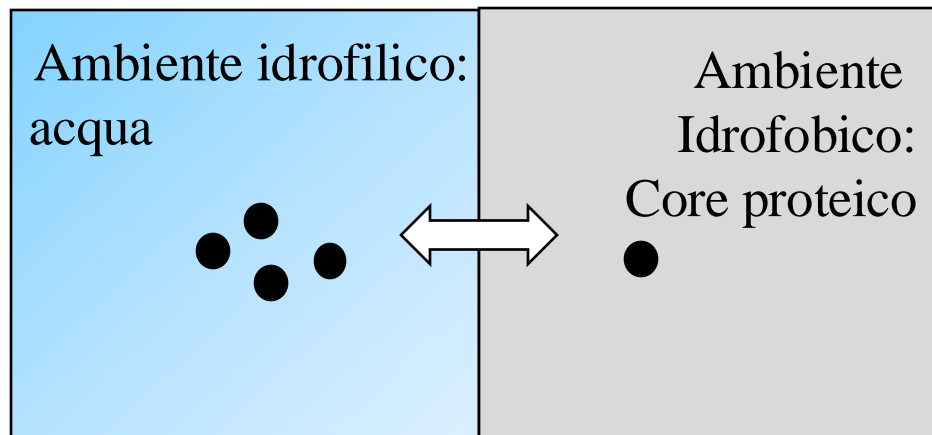
Contributi entropici

- Il ripiegamento comporta perdita di libertà (=entropia) conformazionale → sfavorevole per il ripiegamento



Contributi entropici

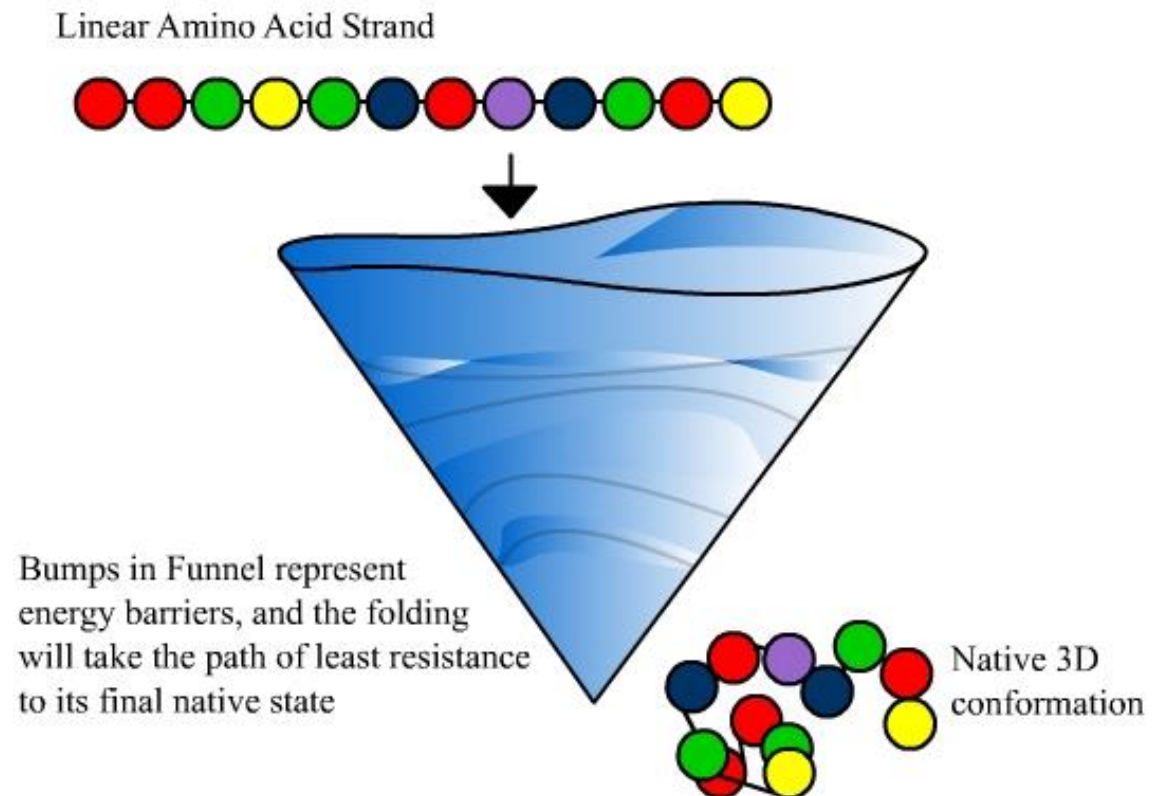
Ma il ripiegamento comporta anche esclusione dell'esposizione al solvente delle regioni idrofobiche della proteina, lasciando libera l'acqua e riducendo la superficie esposta → **contributo entropico favorevole per il ripiegamento**



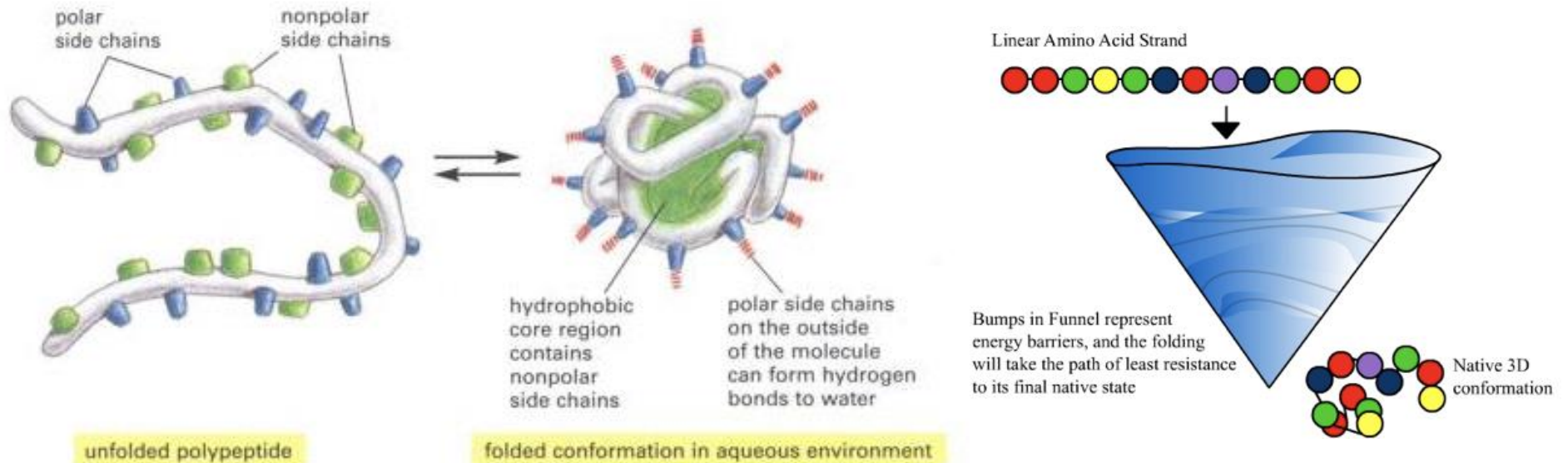
LA CINETICA DEL RIPIEGAMENTO (FOLDING) DELLE PROTEINE: PROCESSO COOPERATIVO

IL PARADOSSO DI LEVINTHAL afferma come una proteina di soli 150 aa e che possa esplorare, semplificando, 3 principali orientazioni (sulla base degli angoli diedri) avrebbe 3^{150} o meglio 10^{68} conformazioni possibili da esplorare
Per assumere la propria struttura tridimensionale ed esplorare tali conformazioni ci metterebbe qualcosa come 10^{48} anni, un tempo superiore alla vita dell'universo....

E' EVIDENTE CHE SERVE UN
PROCESSO DIVERSO,
NON COMPLETAMENTE CASUALE
OSSIA COOPERATIVO
PER SPIEGARE
IL RIPIEGAMENTO DELLE PROTEINE



IL RIPIEGAMENTO TRIDIMENSIONALE DELLE PROTEINE: IL COLLASSO IDROFOBICO



Alcuni amminoacidi hanno catene laterali polari (idrofiliche), altre non polari (idrofobiche). Gli amminoacidi idrofilici si dispongono in modo da massimizzare la loro interazione con acqua ed altre molecole idrofiliche o comunque polari, mentre gli amminoacidi idrofobici possono formare un numero molto limitato di interazioni polari mentre sperimentano un numero elevato di repulsioni dovute al solvente acquoso. L'interazione con l'acqua sarebbe fortemente sfavorita per ragioni entropiche...è come se le parti idrofobiche si comportassero con olio e minimizzassero quindi il contatto con l'acqua (che tende ad escludere il solvente per limitare al massimo l'interazione con la frazione oleosa).

Da questo risulta la tendenza delle proteine di sequestrare nel loro interno (core) le componenti maggiormente idrofobiche, dando luogo al cosiddetto collasso idrofobico e definendo invece un network di interazioni di Van der Waas nel loro core, ed assemblando strutture secondarie nascenti, quest'ultime guidate da interazioni ad idrogeno intramolecolari, come abbiamo già visto.

Mano a mano si forma quello che si definisce «molten globule»....che si assembla ed esplora stati più stabili della proteine completamente denaturata.

IL MODELLO A PROFILO ENERGETICO DEL RIPIEGAMENTO PROTEICO

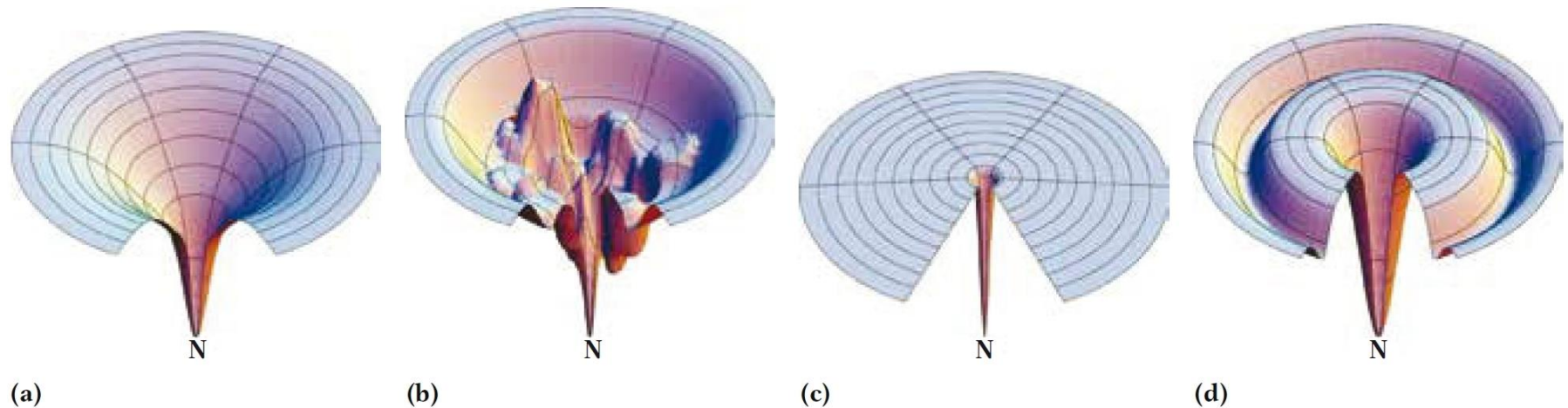


Figura 4.29 Termodinamica del processo di ripiegamento delle proteine rappresentato in forma di imbuto di energia libera. Nel momento in cui una proteina si ripiega, lo spazio che può essere esplorato dalla struttura si riduce notevolmente. In questa rappresentazione a imbuto termodinamico tridimensionale, il ΔG è rappresentato dalla profondità dell'imbuto e la struttura nativa (N) è in fondo (in corrispondenza del punto con la minore energia libera). L'imbuto di una determinata proteina può assumere diverse forme in base al numero e alle tipologie degli intermedi di ripiegamento presenti nelle vie di ripiegamento. Ciascun intermedio di ripiegamento che ha una stabilità significativa e una definita emivita dovrebbe essere rappresentato come un punto di minimo di energia libera, quindi come una depressione, sulla superficie dell'imbuto. (a) Un imbuto semplice relativamente ampio e liscio rappresenta una proteina che ha vie multiple di ripiegamento (cioè l'ordine in cui le diverse parti della proteina si ripiegano dovrebbe essere in qualche modo casuale), ma che assume la sua struttura tridimensionale

senza intermedi di ripiegamento che abbiano una stabilità significativa. (b) Questo imbuto rappresenta una proteina più comune che ha molteplici intermedi di ripiegamento possibili, con una stabilità significativa lungo le diverse vie che portano al raggiungimento della sua struttura nativa. (c) Un imbuto con una depressione molto stretta che porta al raggiungimento della struttura nativa è tipico di una proteina caratterizzata da una struttura nativa stabile, essenzialmente senza alcun intermedio ripiegato dotato di stabilità significativa e solo con una o poche vie di ripiegamento efficaci. (d) Un imbuto con una depressione principale che circonda la depressione che porta al raggiungimento della struttura nativa rappresenta una proteina con intermedi di ripiegamento a elevata stabilità presenti praticamente su ogni via che porta alla formazione della struttura nativa (cioè una proteina in cui un particolare motivo o dominio si ripiega sempre molto velocemente, mentre le altre parti della proteina si ripiegano molto più lentamente e secondo un ordine casuale). [Fonte: da K. A. Dill et al., *Annu. Rev. Biophys.* 37:289, 2008, Fig. 9.]

La denaturazione di una proteina segue un processo cooperativo

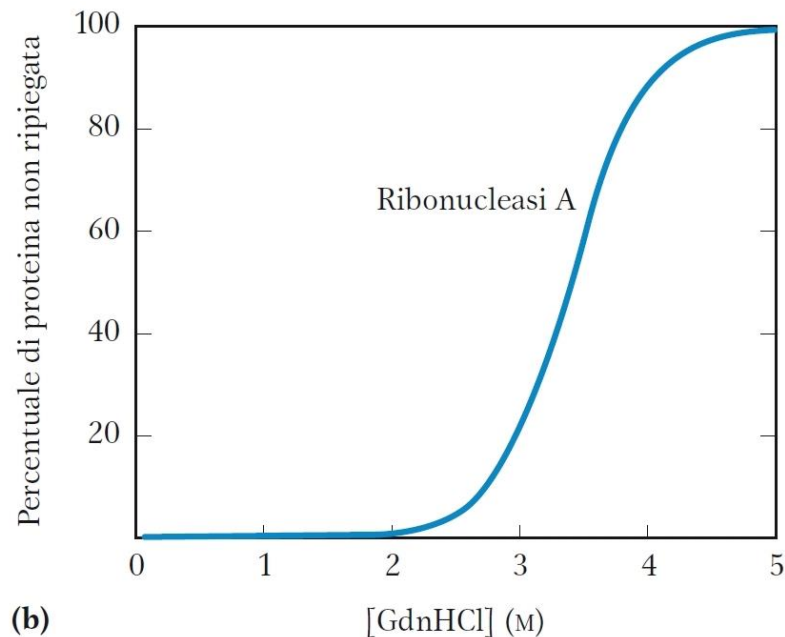
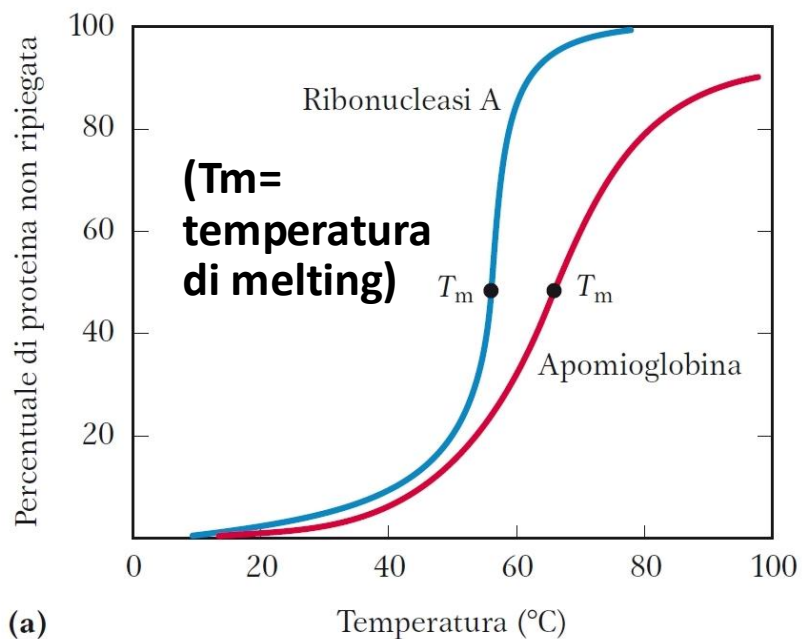


Figura 4.26 Denaturazione delle proteine. I risultati mostrati nella figura si riferiscono alla denaturazione di proteine dovuta a due modificazioni ambientali diverse. In ogni caso la transizione tra lo stato ripiegato e quello non ripiegato è molto brusca, probabilmente per effetto di un processo cooperativo che facilita lo srotolamento della catena polipeptidica. (a) Denaturazione termica dell'apomioglobina (mioglobina senza il gruppo prostetico eme) di cavallo e della ribonucleasi A (con i ponti disolfuro intatti; vedi la Figura 4.27). Il punto di mezzo dell'intervallo di temperatura in cui avviene la denaturazione viene detto temperatura di fusione, T_m . La denaturazione dell'apomioglobina è stata valutata mediante dicroismo

circolare (vedi la Figura 4.10), una tecnica che misura la quantità di strutture elicoidali presenti in una macromolecola. La denaturazione della ribonucleasi A è stata eseguita monitorando i cambiamenti della fluorescenza intrinseca della proteina, che varia in funzione delle modificazioni dell'ambiente dei residui di Trp. (b) Denaturazione della ribonucleasi A, con i ponti disolfuro intatti, mediante idrocloruro di guanidina (GdnHCl), valutata con dicroismo circolare. [Fonti: (a) dati da R. A. Sendak et al., *Biochemistry* 35:12,978, 1996; I. Nishii et al., *J. Mol. Biol.* 250:223, 1995; (b) dati da W. A. Houry et al., *Biochemistry* 35:10,125, 1996.]

Sequenza amminoacidica di un peptide di 56 residui

MTYKLLIL **NGKTLKGE** TTTEAVDAATAEKV **FKQYANDNGVDGEWT** **YDDATKTF** TVTE

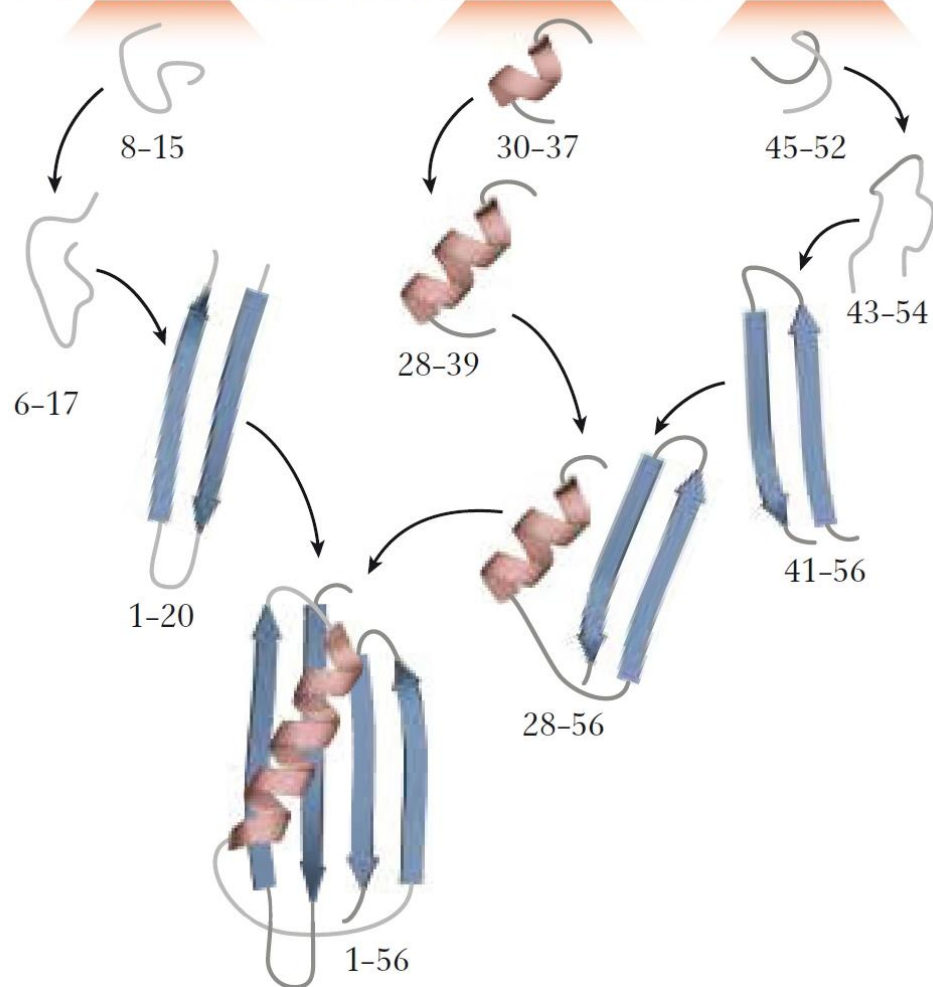
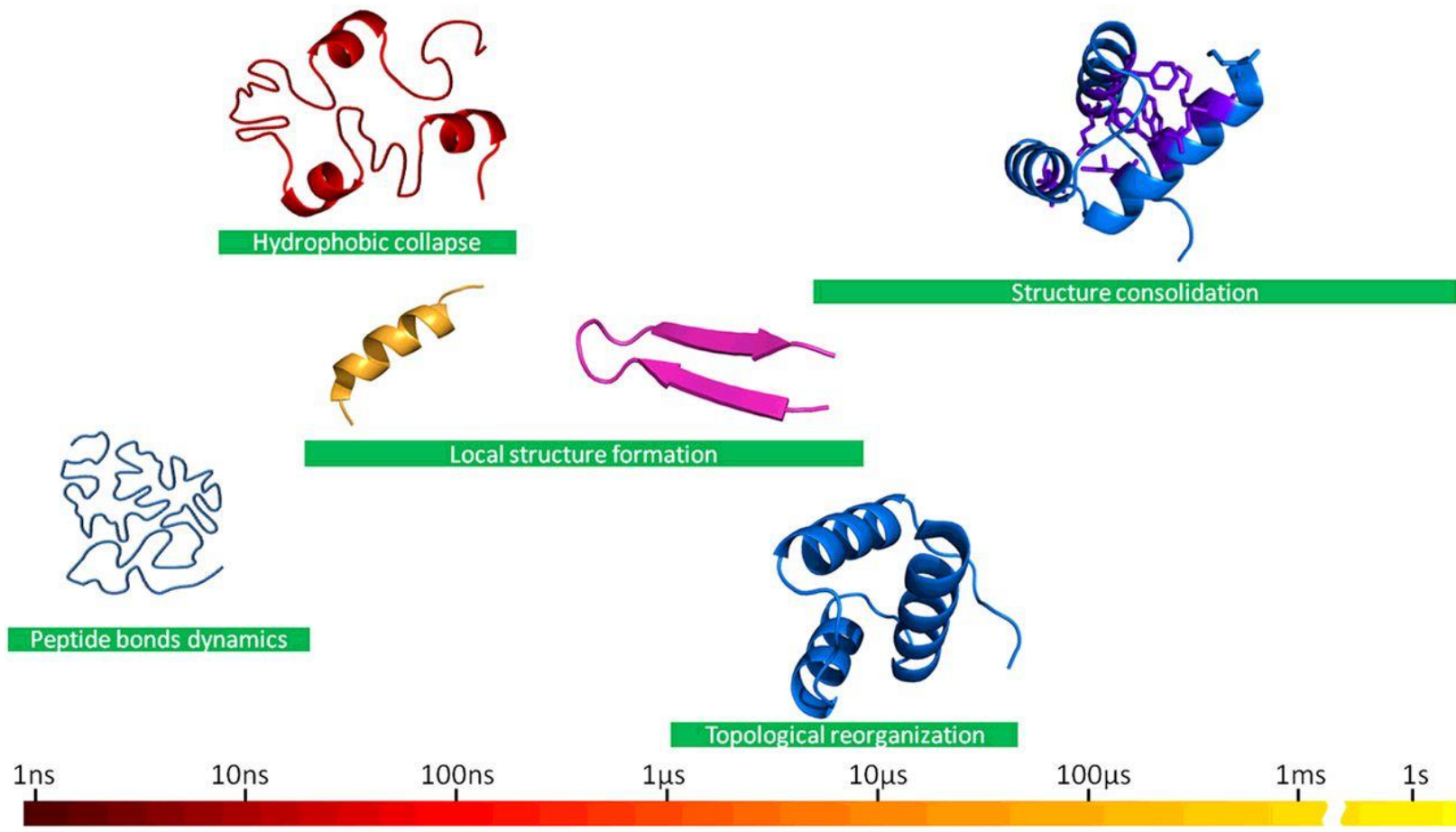


Figura 4.28 Il processo di ripiegamento di una piccola proteina. Nella figura è rappresentato un percorso gerarchico basato su modelli e ricostruzioni condotti con l'aiuto di un programma di predizione. Le piccole regioni della struttura secondaria vengono prima organizzate e poi incorporate in strutture più grandi. Il programma utilizzato per ottenere questo modello si è rivelato di grandissima attendibilità nel prevedere la struttura tridimensionale di piccole proteine partendo dalla loro sequenza amminoacidica. I numeri presenti in ciascuna delle tappe riportate indicano i residui amminoacidici nel peptide di 56 residui che hanno raggiunto la loro struttura finale. [Fonte: da K. A. Dill et al., *Annu. Rev. Biophys.* 37:289, 2008, Fig. 5.]



Hydrophobic collapse

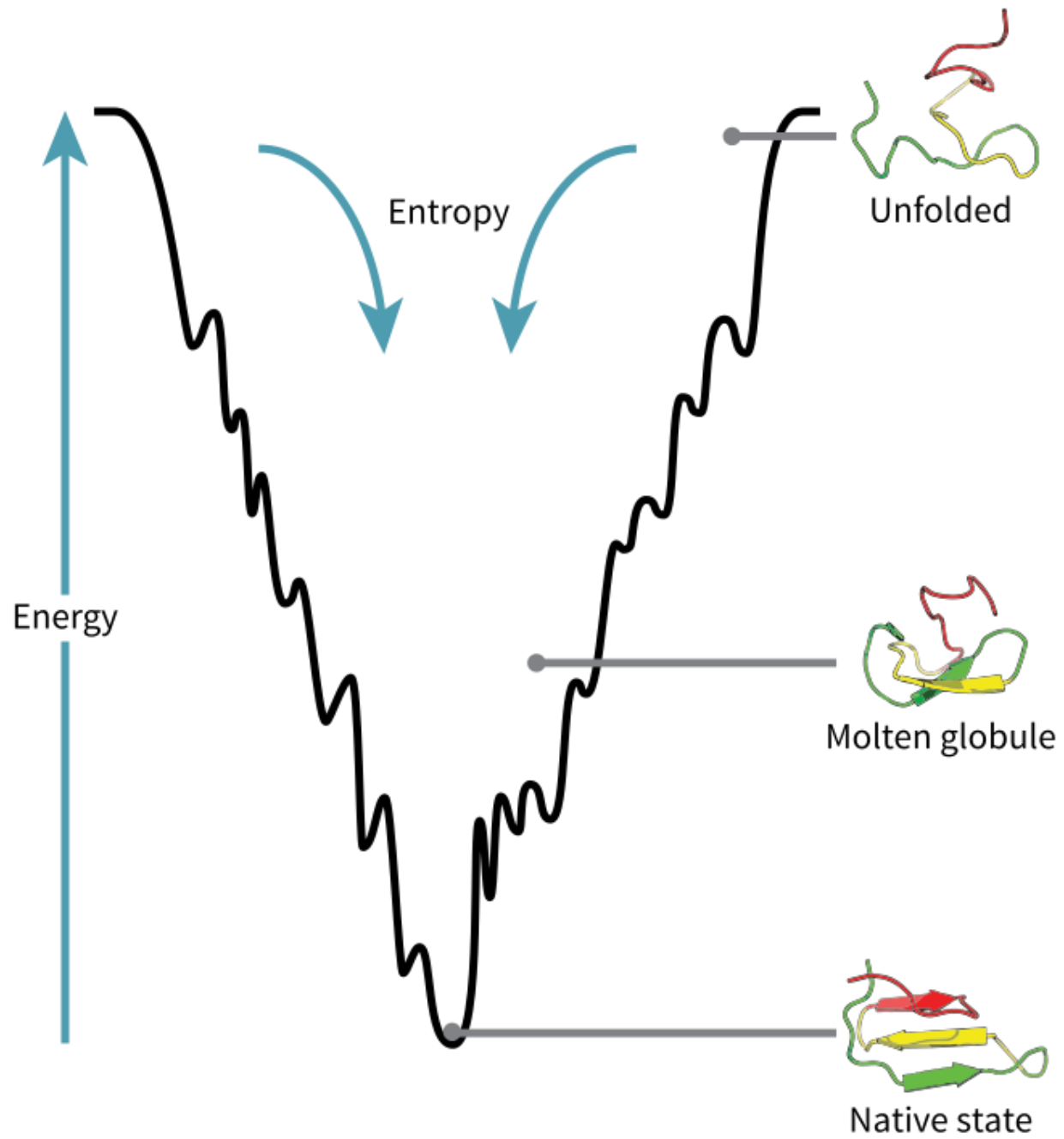
Structure consolidation

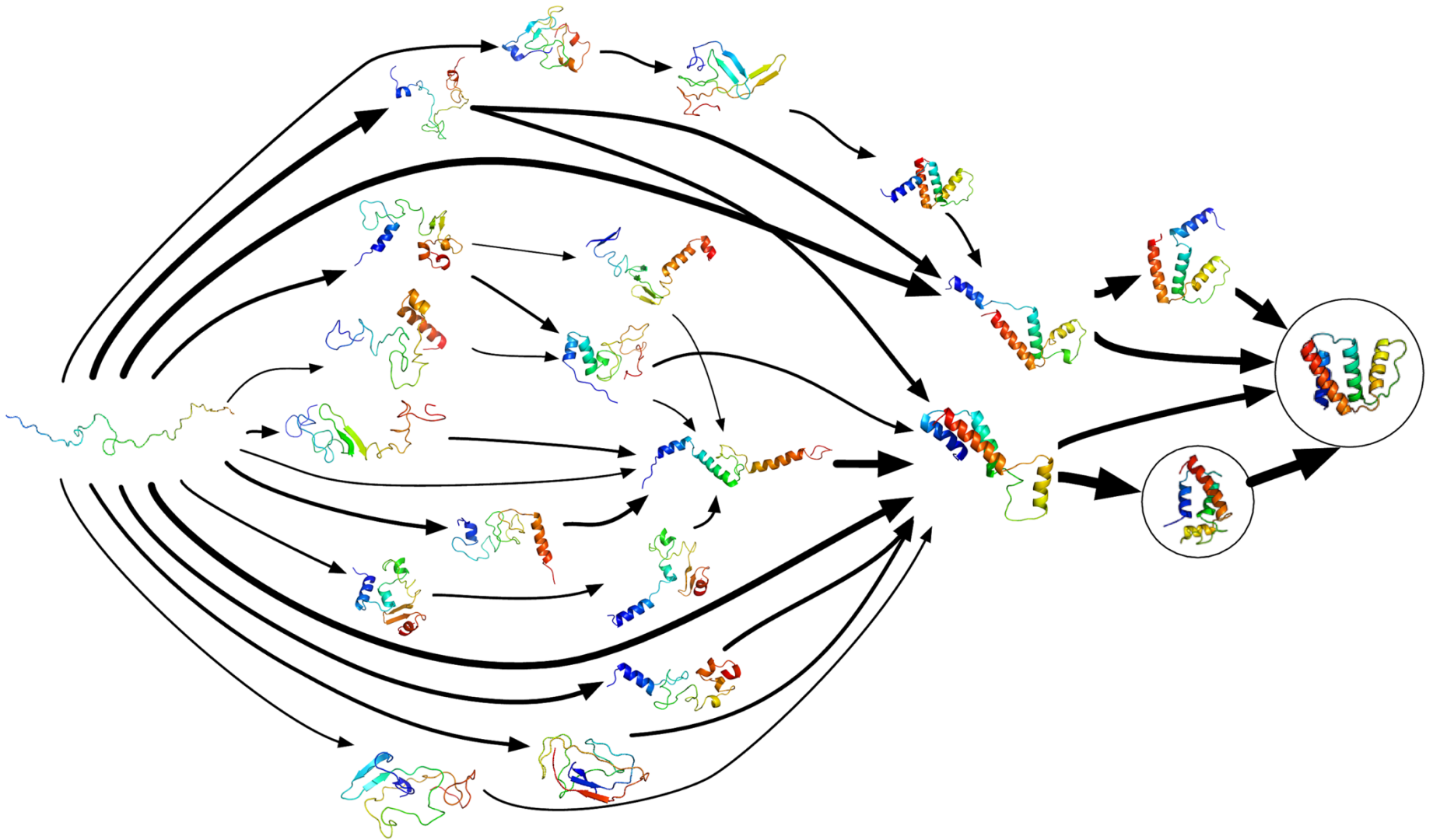
Local structure formation

Peptide bonds dynamics

Topological reorganization

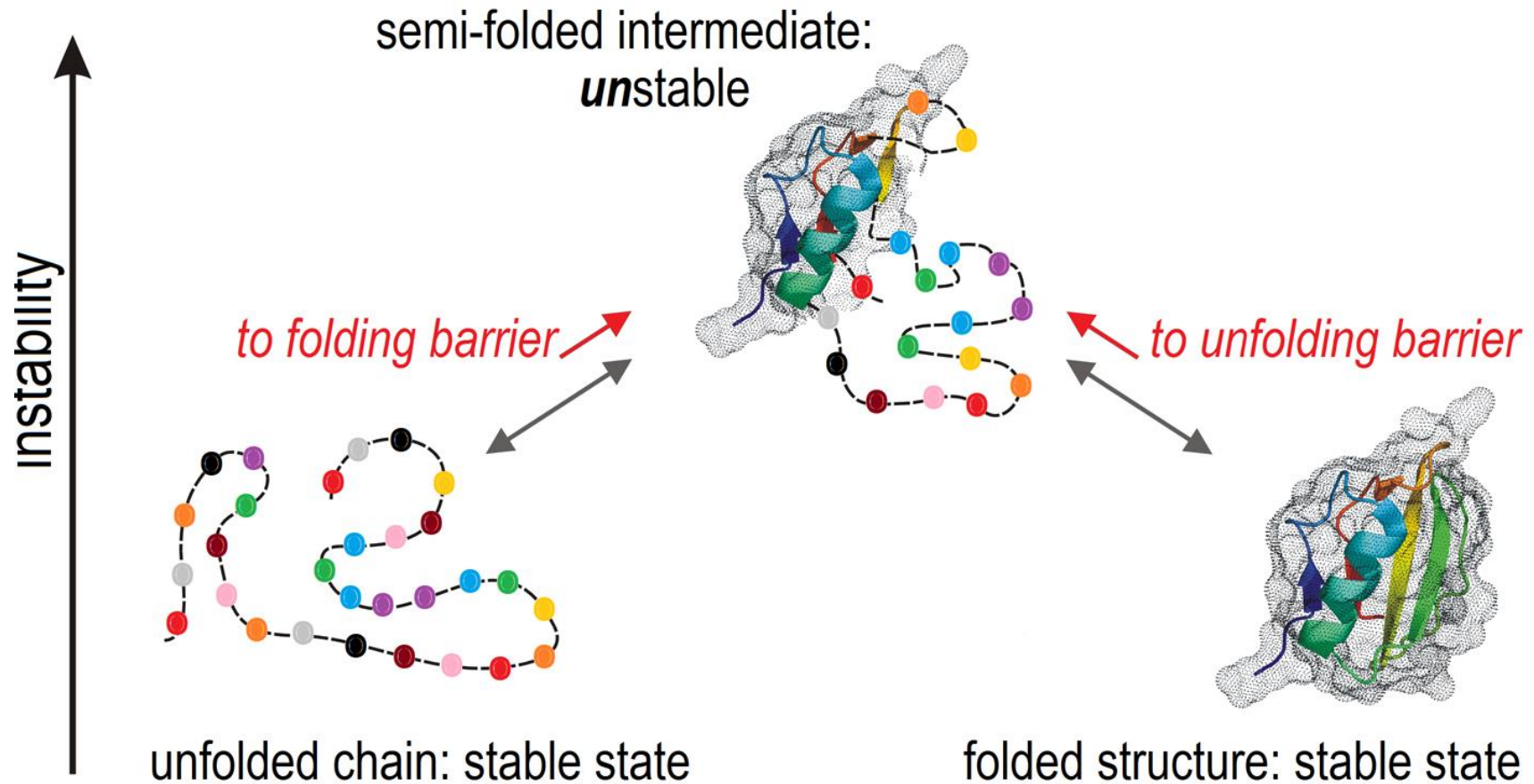






Markov states models,

like the one diagrammed here, to model the possible shapes and folding pathways a protein can take as it condenses from its initial randomly coiled state (left) into its native 3D structure (right).



The process takes from milliseconds to seconds to occur;

The folding evolve through intermediate states, populated by ensemble of structures (=not a 2-states-reaction-like process);

The process by which proteins fold into their functional structures is dictated by the chemical blueprints encoded into their amino acid sequence.

IL RPIEGAMENTO TRIDIMENSIONALE DELLE PROTEINE: UN PROCESSO ASSISTITO

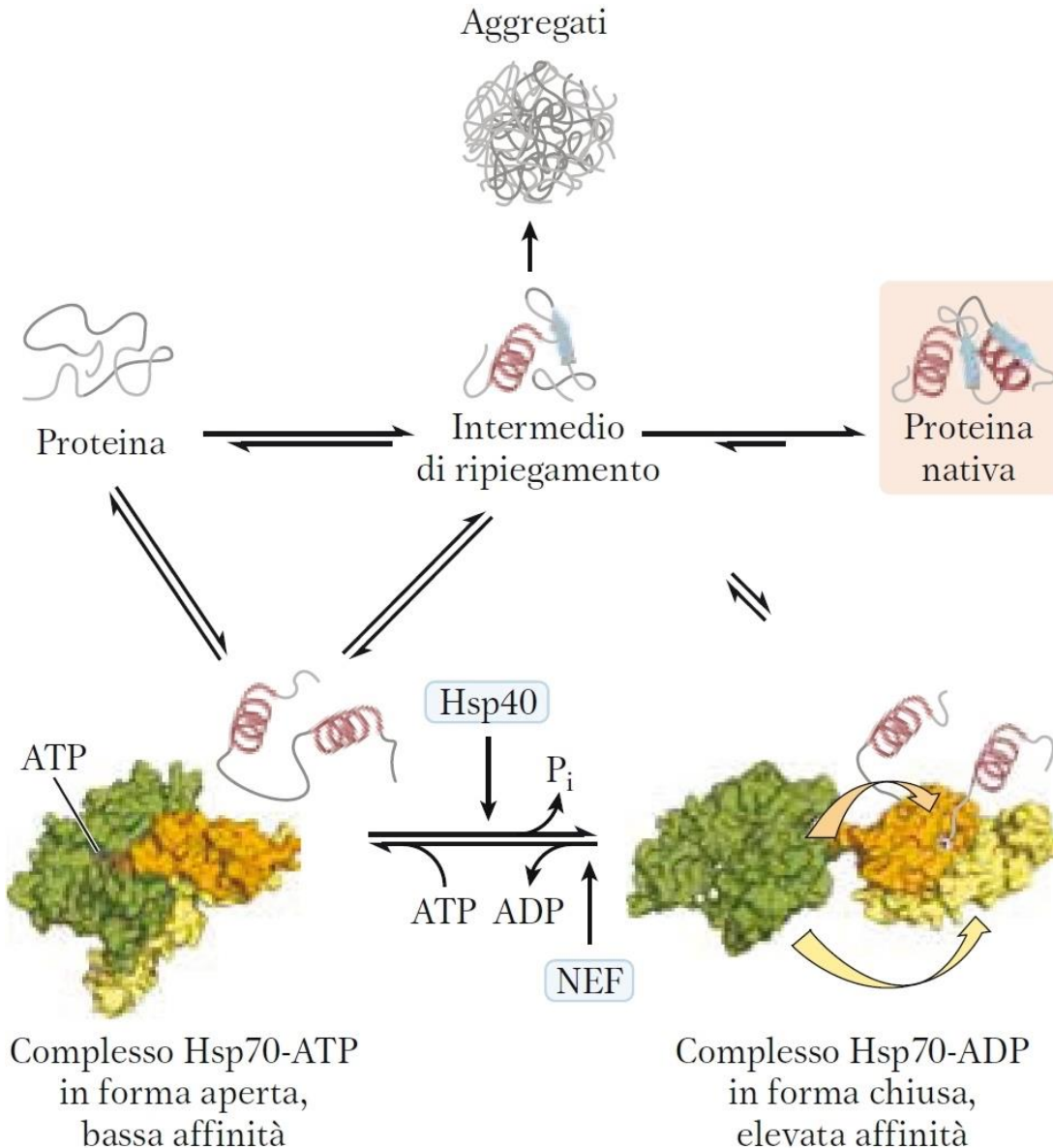
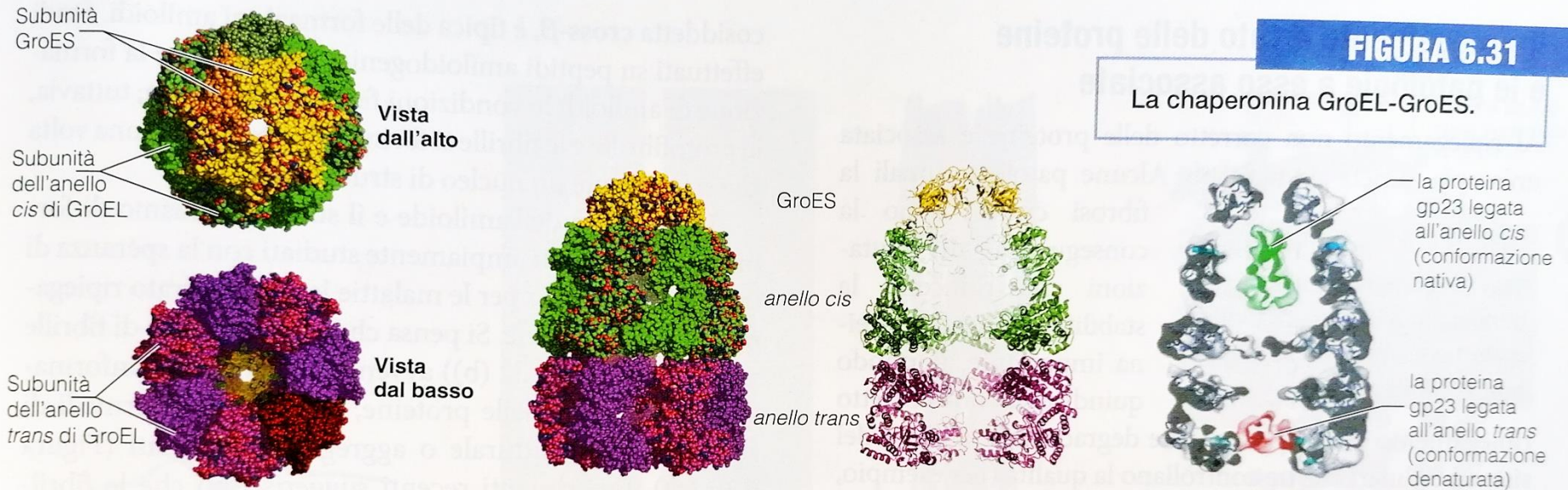


Figura 4.30 Gli chaperoni nel ripiegamento delle proteine.

La figura illustra la via con cui gli chaperoni della classe delle Hsp70 legano e rilasciano i polipeptidi; come esempio sono mostrati gli chaperoni eucariotici Hsp70 e Hsp40. Gli chaperoni non promuovono attivamente il ripiegamento dei loro substrati proteici, ma impediscono invece l'aggregazione delle parti non ripiegate. Le proteine non ripiegate o parzialmente ripiegate si legano prima alla forma aperta dell'Hsp70, con l'ATP legato. L'Hsp40 poi interagisce con questo complesso e favorisce l'idrolisi dell'ATP che produce la forma chiusa del complesso, in cui i domini colorati in arancione e in giallo si associano come le due parti di una mascella, intrappolando al loro interno le parti della proteina non ripiegata. La dissociazione dell'ADP e il riciclo dell'Hsp70 richiedono l'interazione con un'altra proteina, il fattore di scambio dei nucleotidi (NEF). Per una popolazione di molecole polipeptidiche, una frazione delle molecole rilasciate dopo il legame provvisorio delle proteine parzialmente ripiegate da parte dell'Hsp70 assumerà la sua conformazione nativa. Le rimanenti vengono legate nuovamente dall'Hsp70 o indirizzate verso il sistema delle chaperonine (Hsp60, vedi la Figura 4.31). Nei batteri, gli chaperoni Hsp70 e Hsp40 sono chiamati, rispettivamente, DnaK e DnaJ. DnaK e DnaJ sono stati identificati per la prima volta come proteine necessarie alla replicazione *in vitro* di alcune molecole di DNA virale (da qui la designazione "Dna"). [Fonti: da F. U. Hartl et al., *Nature* 475:324, 2011, Fig. 2. Hsp70-ATP aperto: PDB ID 2QXL, Q. Liu e W. A. Hendrickson, *Cell* 131:106, 2007. Hsp70-ADP chiuso: da PDB ID 2KHO, E. B. Bertelson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:8471, 2009, e PDB ID 1DKZ, X. Zhu et al., *Science* 272:1606, 1996.]

FIGURA 6.31

La chaperonina GroEL-GroES.

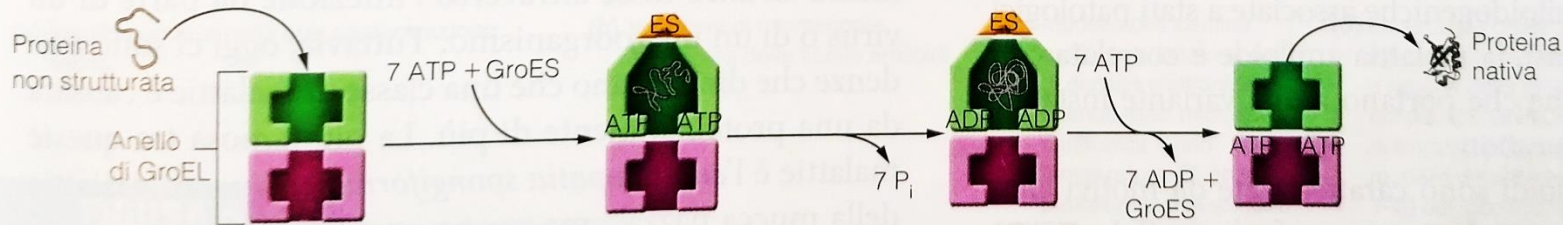


(a) Le subunità di GroES sono riportate in oro e arancione, le subunità dell'anello *trans* di GroEL (per esempio, l'anello opposto a GroES) sono evidenziate in fucsia e rosso e quelle dell'anello *cis* di GroEL (legati a GroES) sono in verde.

(b) Vista laterale a sfere piene della chaperonina, colorata come in (a).

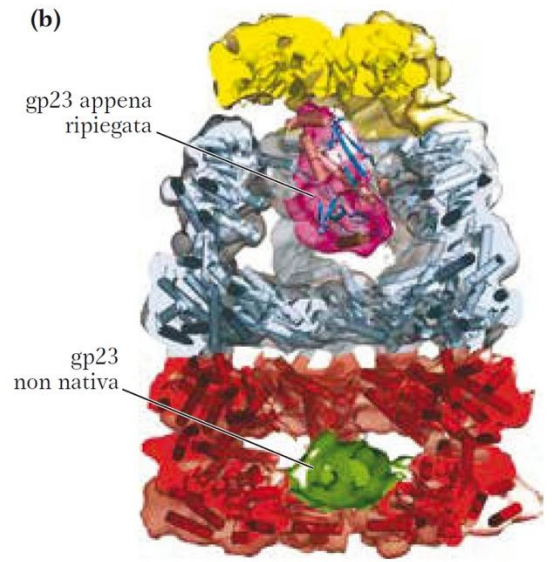
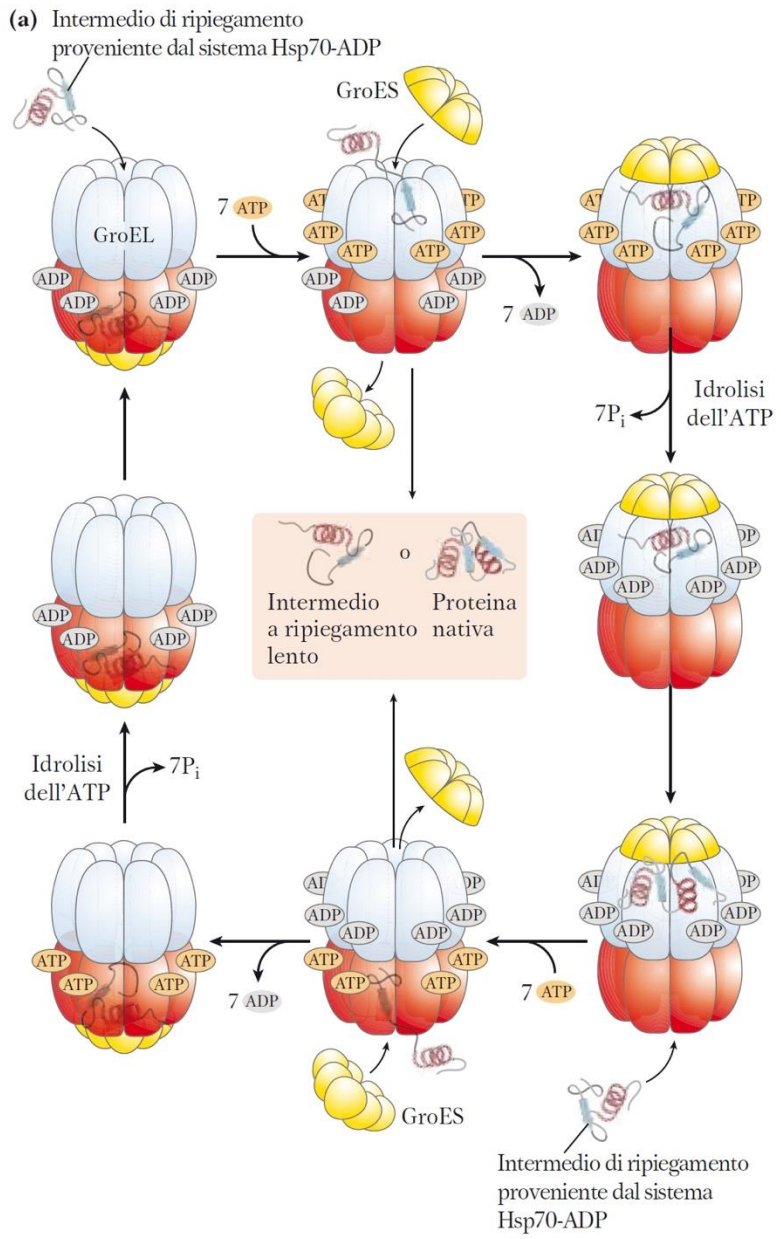
(c) Visualizzazione a "cartoon" che mostra la cavità interna formata dagli anelli *cis* di GroEL e GroES (in alto), così come la struttura compatta degli anelli *trans* rispetto agli anelli *cis* (in basso).

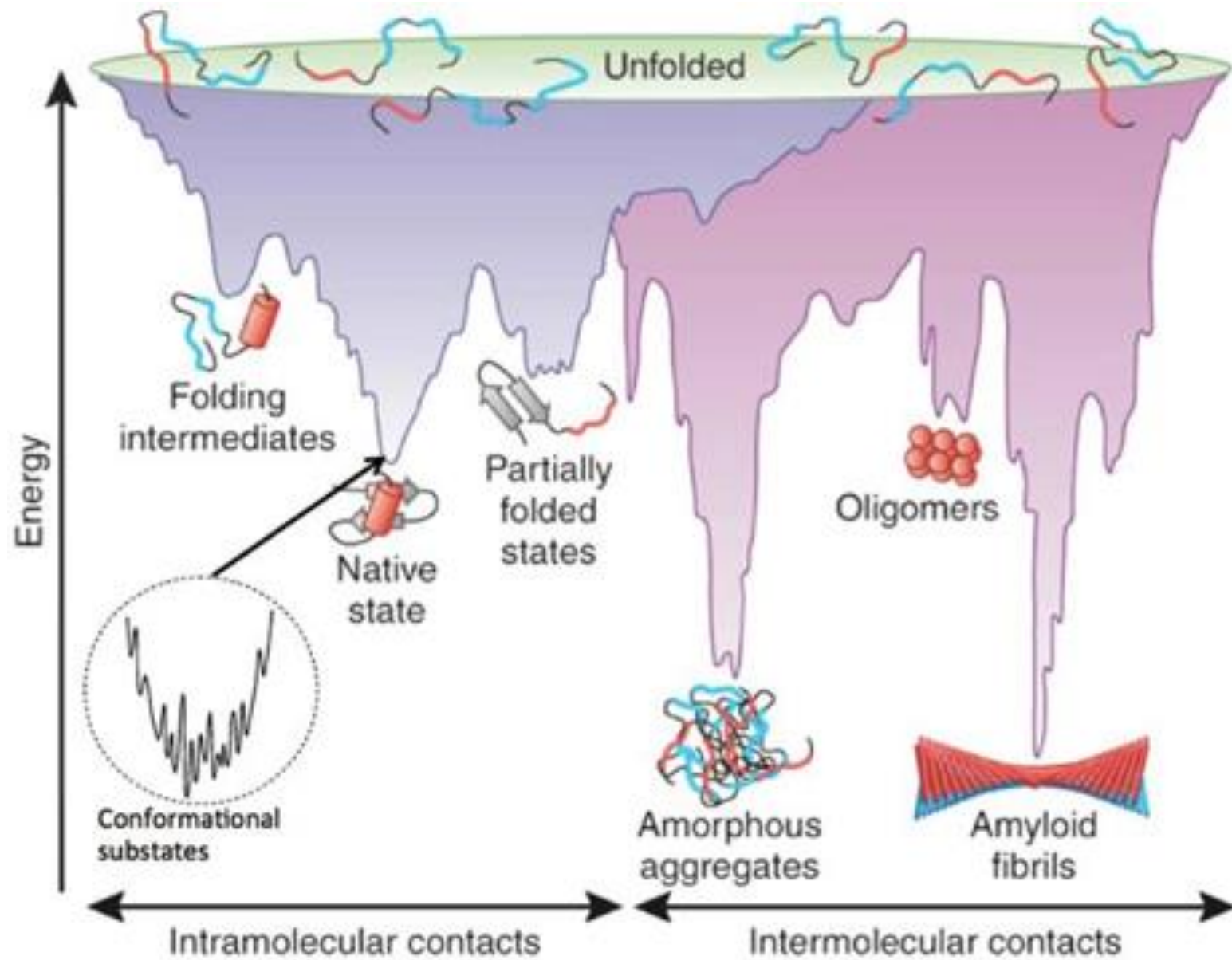
(d) Mappa della densità elettronica ottenuta da esperimenti di microscopia elettronica a crio temperature effettuati su una chaperonina in complesso con la proteina gp23 del rivestimento del batteriofago T4. La proteina gp23 legata all'anello *cis* è riportata in verde e nella sua conformazione nativa.

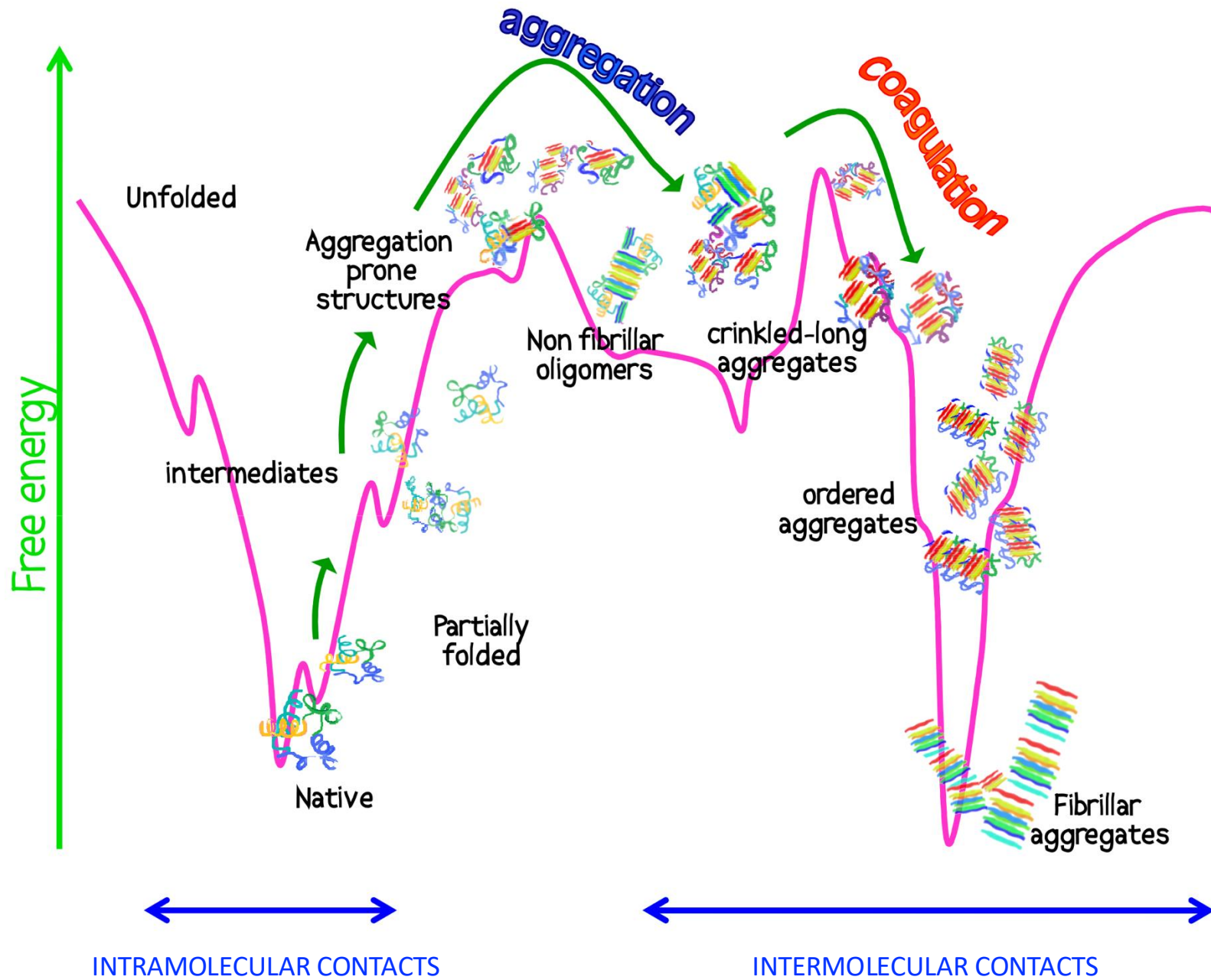


(e) Schema del funzionamento della chaperonina. I colori sono gli stessi del pannello (c).

Figura 4.31 Le chaperonine nel ripiegamento delle proteine. (a) Un meccanismo d'azione proposto per le chaperonine GroEL (membri della famiglia delle proteine Hsp60) e GroES di *E. coli*. Ogni complesso GroEL contiene due grandi camere formate da due anelli eptamerici (ogni subunità ha M_r 57 000). GroES, anch'essa un eptamero (subunità con M_r 10 000), blocca una delle camere di GroEL dopo che una proteina non ripiegata si è legata al suo interno. La camera contenente la proteina non ripiegata è detta *cis*; la camera contenente la proteina non ripiegata è detta *trans*. Il ripiegamento avviene all'interno della camera *cis* nel tempo che essa impiega per idrolizzare le sette molecole di ATP legate alle subunità dell'anello eptamerico. Dopodiché le molecole di ADP e di GroES si dissociano e la proteina viene rilasciata. Le due camere dei sistemi GroEL/Hsp60 si alternano nel legare e nel favorire il ripiegamento delle proteine che vengono loro consegnate. (b) Una sezione del complesso GroEL/GroES. La struttura secondaria ad α elica è rappresentata con dei cilindri con superficie trasparente. In alto è mostrata una proteina ripiegata (gp23) all'interno dell'ampio spazio della camera superiore; nella camera in basso è mostrata una versione non ripiegata di gp23. [Fonti: (a) da F. U. Hartl et al., *Nature* 475:324, 2011, Fig. 3. (b) Superficie di GroEL/GroES con la gp23 non ripiegata: EMDB-1548, D. K. Clare et al., *Nature* 457:107, 2009; GroEL/GroES: PDB ID 2CGT, D. K. Clare et al., *J. Mol. Biol.* 358:905, 2006; gp23 ripiegata: PDB ID 1YUE, A. Fokine et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:7163, 2005.]







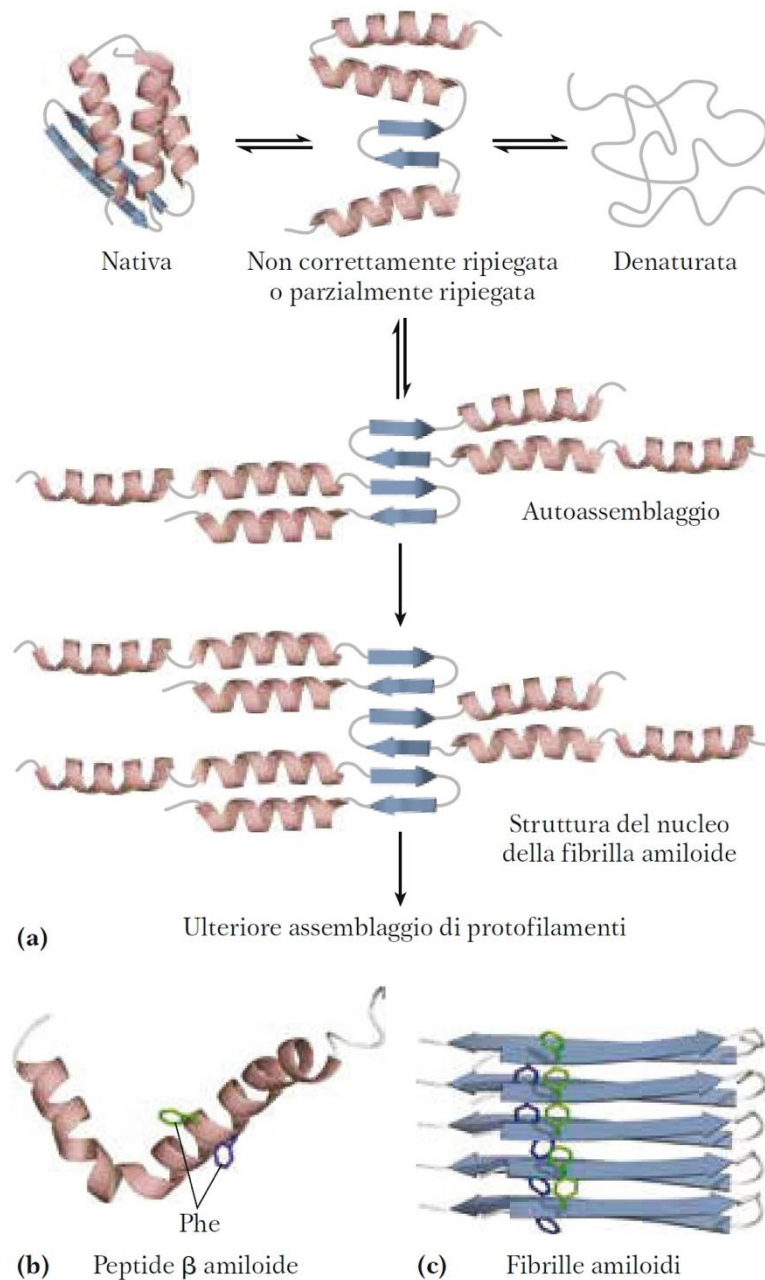
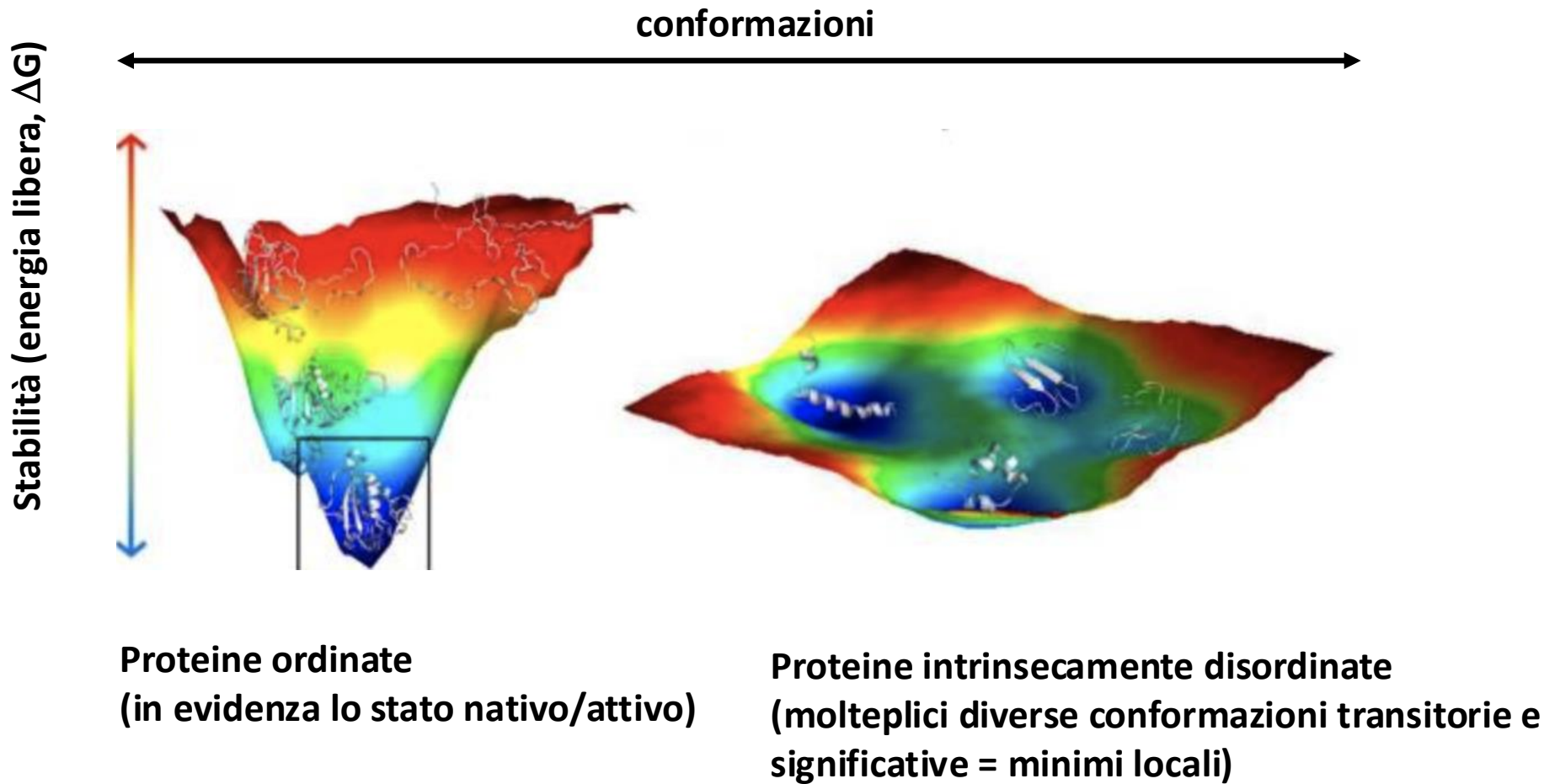


Figura 4.32 Formazione delle fibrille amiloidi che causano malattie. (a) Molecole proteiche, la cui normale struttura comprende regioni a foglietto β che vanno incontro a un avvolgimento parziale. In un piccolo numero di molecole, prima che si completi l'avvolgimento normale, le regioni a foglietto β di un polipeptide si associano con le stesse regioni di un altro polipeptide, formando il nucleo di una struttura amiloide. Altre molecole proteiche si associano lentamente all'amiloide, che si estende a forma di fibrilla. (b) Il peptide β amiloide si origina da due segmenti ad α elica di una proteina più grande. La scissione proteolitica di questa proteina più grande rilascia il peptide β amiloide relativamente instabile, che perde la sua struttura ad α elica. Il peptide si può quindi organizzare lentamente in fibrille amiloidi (c), che contribuiscono a formare le caratteristiche placche presenti all'esterno del tessuto nervoso dei soggetti affetti dalla malattia di Alzheimer. Le catene laterali aromatiche mostrate nella figura hanno un ruolo significativo nella stabilizzazione della struttura amiloide. L'amiloide è ricca di strutture β , con le catene β che si dispongono perpendicolarmente all'asse della fibrilla amiloide. Il peptide β amiloide prende la forma di due strati di foglietti β paralleli estesi e sovrapposti. Alcuni peptidi che formano le amiloidi possono ripiegarsi per dar vita a eliche β sinistrorse. [Fonti: (a) da D. J. Selkoe, *Nature* 426:900, 2003, Fig. 1. (b) PDB ID 1IYT, O. Crescenzi et al., *Eur. J. Biochem.* 269:5642, 2002. (c) PDB ID 2BEG, T. Lührs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:17,342, 2005.]



UN ESEMPIO CALZANTE.....di degenerazione strutturale in condizioni patologiche

Transtiretina (TTR) vs HIU-idrolasi (HIUase)

Tre proteine differenti garantiscono il trasporto dell'ormone tiroideo : TBG, HSA, TTR
Globine leganti Tiroxina, Albumina e Transtiretina



TTR Appartiene alla famiglia delle

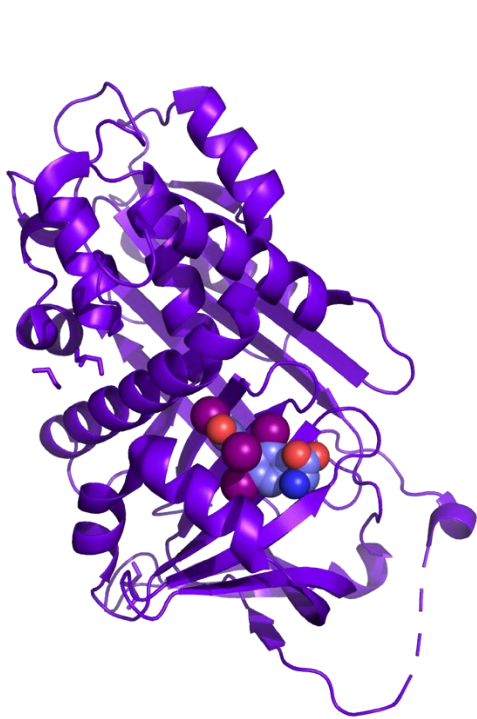
TLPs = Transthyretin like proteins

CATH = Transthyretin / Hydroxyisurate hydrolase

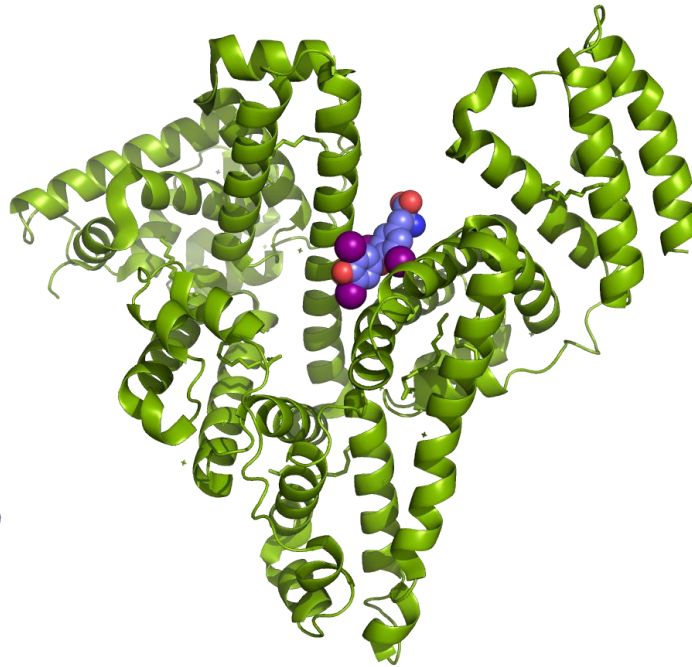
<http://www.cathdb.info/version/latest/superfamily/2.60.40.180>

>> Proteine con funzione simile possono avere sequenze e strutture completamente differenti

Es: Tre proteine differenti garantiscono il trasporto dell'ormone tiroideo : TBG, HSA, TTR



TBG (Globina legante Tiroxina)



HSA (Albumina)



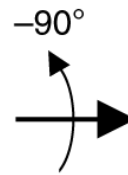
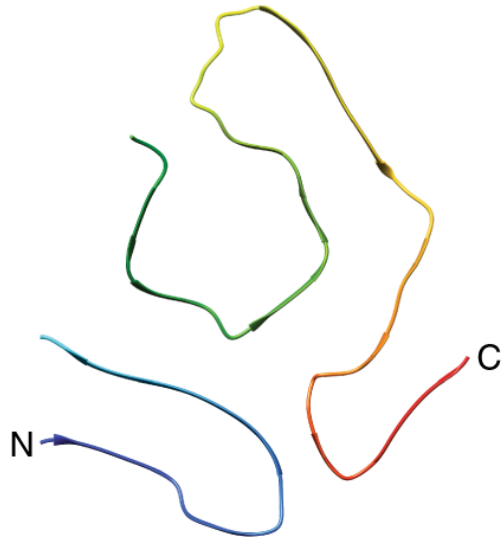
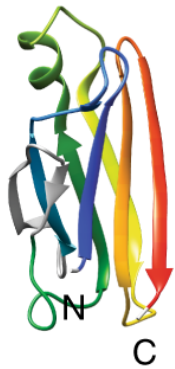
TTR (Transtiretina)

Transizione strutturale da forma nativa a forme aggregate (FIBRILLE):

TRANSIZIONE STRUTTURALE CHE SI TRADUCE IN DEGENERAZIONE FUNZIONALE

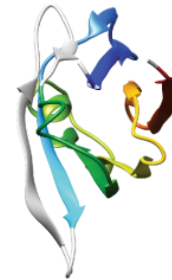
Native

Fibril



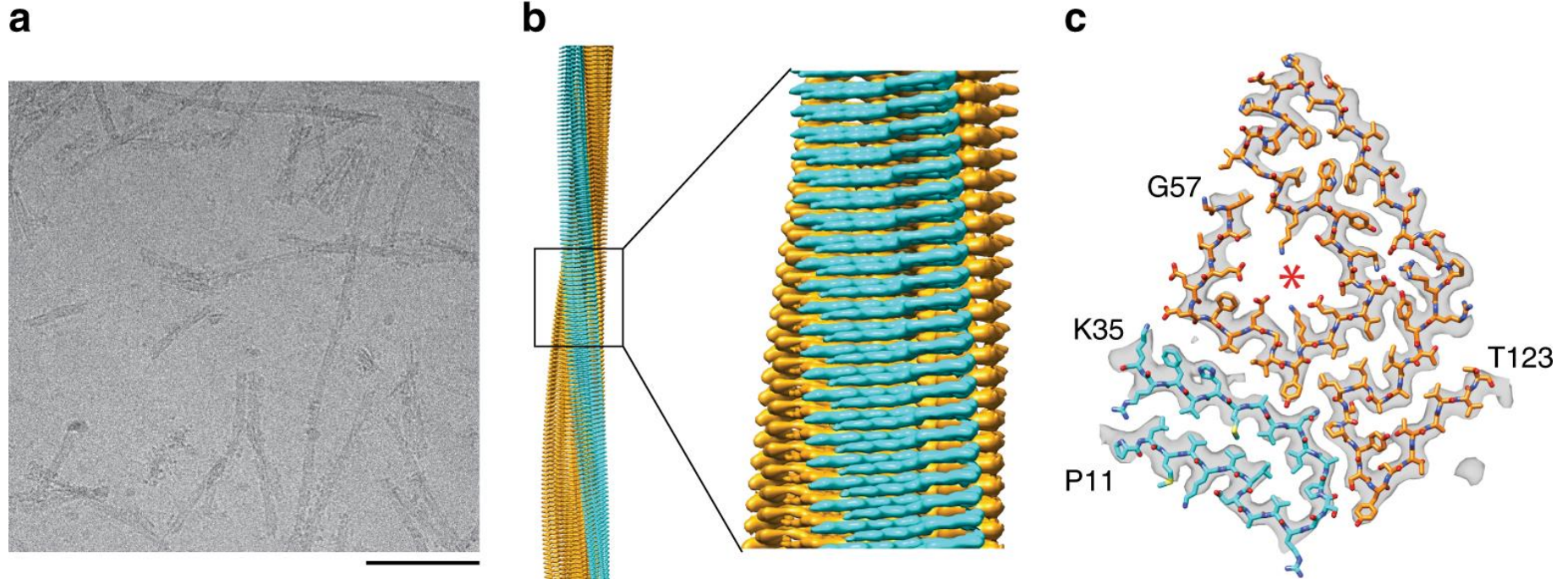
Native

Fibril



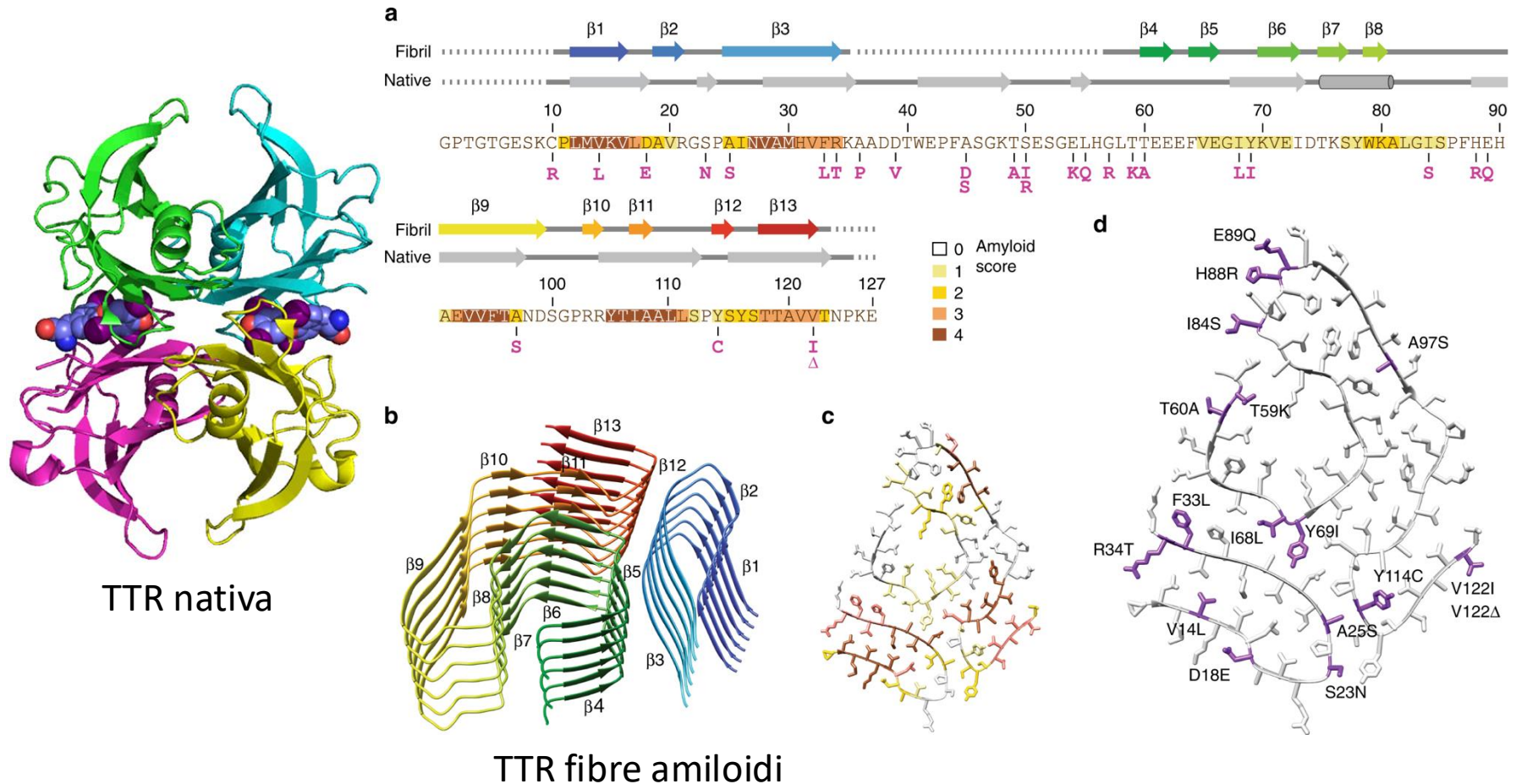
Adattato da SCHMIDT ET AL., NATURE COMM. 2019

MICROSCOPIA Cryo-EM DI TRANSTIRETINA (WT/Val30Met)



Adattato da SCHMIDT ET AL., NATURE COMM. 2019

Confronto strutturale tra TTR nativa ed in fibrilla: da globulare a fibrosa!



Segmenti di sequenza amiloidogenici contribuiscono a definire il core delle fibrille!