

IL DESTINO DELLE CATENE POLIPEPTIDICHE DALLA SINTESI FINO ALLA MATURAZIONE: UNA PANORAMICA.

THE FATE OF NASCENT POLYPEPTIDES FROM SYNTHESIS TO FUNCTION: AN OVERVIEW.

Alessia Gallo¹, Patrizia Saladino², Patrizia Proia³.

¹Sjogren's Syndrome Clinic, National Institute of Dental and Craniofacial research\ National Institute of Health, Bethesda, MD.

²Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy

³Studi giuridici Economici, Biomedici, Psicosociopedagogici delle Scienze Motorie Sportive (DISMOT)

SOMMARIO: 1. Introduzione.- 2. Teoria del “folding” proteico. – 3. Il “folding” in vivo: le proteine chaperones e gli aggregati proteici. – 4. Bibliografia

ABSTRAT ITALIANO: La strada che seguono le catene polipeptidiche dalla sintesi dal centro peptidil trasferasico del ribosoma fino ad arrivare all'acquisizione della struttura terziaria (maturazione), prevede o coinvolge interazioni multiple, modificazioni e eventi di avvolgimento. E' ormai chiaro, che la cinetica di traduzione delle proteine e' modulata prevalentemente attraverso “codon usage” alternativi lungo la catena dell'RNA messaggero e che questo fornisce un meccanismo attivo per coordinare la sintesi, la maturazione e l'avvolgimento della catena polipeptidica. Molteplici sistemi di controllo-qualita' garantiscono che le proteine raggiungano la loro forma nativa funzionale. La maggior parte delle chaperones riconosce e lega le superfici idrofobe, esposte delle proteine non native, e facilita, complessivamente rallentandolo, il raggiungimento della struttura terziaria nativa.

ABSTRAT INGLESE: The protein folding, starting from the peptidyl transferase center of the ribosome up to the acquisition of the tertiary structure, involves multiple interactions, changes and folding events. The protein translation kinetics is mainly modulated through alternative codon usage. This mechanism provides an active regulation of the synthesis,

SEZIONE 2

maturation and folding of the polypeptide. Several quality-control systems ensure that the proteins reach their functional native form. Most chaperones recognize and bind to the hydrophobic surface, exposed non-native proteins, and facilitate the achievement of the native tertiary structure.

Parole chiave: Catena polipeptidica, “folding proteico”, struttura terziaria, modificazioni post-trascrizionali, Cinetica.

Keywords: Polypeptidic chain, folding, tertiary structure, post-transcriptional modifications, kinetics.

1. Introduzione

La maggior parte delle funzioni vitali nelle cellule sono affidate alle proteine. Il sostegno meccanico, il controllo della crescita e del differenziamento cellulare, la catalisi enzimatica, il trasporto di metaboliti, la risposta immunitaria, sono alcuni esempi delle loro funzioni. Tutte queste attività sono mediate e regolate dall'interazione delle proteine con altre molecole, interazione che genera cambiamenti più o meno estesi della struttura macromolecolare. E' ovvio, quindi, che le proprietà e la plasticità strutturali delle proteine, determinando il modellamento tridimensionale di siti specifici di riconoscimento e interazione, sono fondamentali per il loro corretto funzionamento.

La conoscenza delle proprietà strutturali, in relazione a quelle funzionali, delle proteine è alla base della comprensione delle loro funzioni vitali.

La relazione struttura-funzione non è però semplice da definire: un'analisi globale rivela certo l'esistenza di regole di base ma per ciascuna regola sono state trovate sempre delle eccezioni (fig.1)!

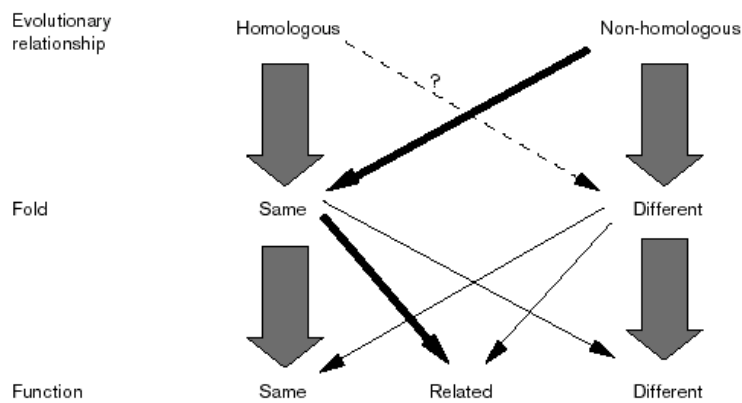


Figura 1: Rappresentazione schematica delle relazioni tra avvolgimento e funzione

Le proteine possono essere omologhe o non omologhe; i loro avvolgimenti e le loro funzioni possono essere identici, correlati o totalmente differenti.

E' stato osservato che le coppie di proteine sinora esaminate, con sequenze che indicano una relazione evolutiva ben definita, tendono ad assumere uno stesso avvolgimento, con piccole variazioni soltanto (domini orientati diversamente, variazioni nella lunghezza dei "loop", strutture secondarie aggiuntive, ecc.). Per esempio, le globine di una grande varietà di specie adottano tutte lo stesso avvolgimento e mantengono la loro funzione di immagazzinamento e trasporto dell'ossigeno (Martin et al., 1998).

Ci sono però anche proteine omologhe che hanno funzioni differenti, pur adottando la stessa struttura: un classico esempio è quello del lisozima e dell'alfa-lattalbumina. Nonostante queste due proteine posseggano il 35% di identità di sequenza, la seconda ha perso i residui catalitici necessari per l'idrolisi del legame glicosidico tra NAM e NAG del peptidoglicano (Acharya et al., 1991).

D'altra parte, alcune proteine non omologhe, attraverso un processo di evoluzione convergente, possono arrivare ad assumere strutture tridimensionali molto simili. Un esempio di ciò è rappresentato da alcuni fattori di virulenza di agenti patogeni che sfruttano la somiglianza con alcune proteine dell'ospite per portare avanti l'infezione: diverse proteine della membrana esterna di *Chlamydia trachomatis* presentano una scarsa omologia di sequenza rispetto a proteine umane, ma sono a queste molto simili nella struttura tridimensionale (Cherkasov e Jones, 2004).

Vi sono infine esempi di proteine che svolgono la stessa funzione ma che non sono evolutivamente correlate. Tra queste, le proteasi a serina tripsina e subtilisina che, pur avendo strutture totalmente differenti, hanno la stessa funzione e hanno persino evoluto lo stesso meccanismo di catalisi basato sul coinvolgimento della triade Asp-His-Ser: un caso incredibilmente interessante di convergenza funzionale (Barth et al., 1993; Wallace et al., 1996)!

2. Teoria del "folding" proteico

Per diventare funzionalmente attiva, una catena polipeptidica di nuova sintesi deve avvolgersi in una precisa ed unica struttura tridimensionale. Numerosi esperimenti in vitro hanno dimostrato che le informazioni riguardanti la struttura tridimensionale di una proteina sono contenute nella sequenza aminoacidica (Anfinsen, 1973; Dobson e Karplus, 1999).

Tuttavia, l'avvolgimento delle proteine ("folding") è un processo complesso; le proteine devono andare incontro ad una precisa sequenza di cambiamenti conformazionali, per di più influenzati dal solvente (Onuchic and Wolynes, 2004).

Un primo modello del "folding" considerava la transizione di una proteina dallo stato denaturato alla conformazione nativa come costituito da una serie di reazioni chimiche all'equilibrio, in cui tutti i reagenti si trovano su un unico percorso, che comprende sempre gli stessi stati di transizione e gli stessi intermedi di reazione. Nel caso delle proteine, i reagenti sono le diverse forme strutturali della catena polipeptidica, a vari gradi di avvolgimento, mentre il prodotto finale sarebbe la proteina in "forma nativa" (Creighton, 1992). Questa idea implicava

SEZIONE 2

l'esistenza di intermedi "discreti" di "folding", che sarebbero dovuti essere gli stessi sia che la proteina passasse dallo stato denaturato a quello nativo, sia che, invece, si denaturasse.

Nel corso degli anni, sono stati condotti esperimenti molto dettagliati su piccole proteine globulari (100-200 aminoacidi), ricche in alfa-eliche, che in vitro si riavvolgono spontaneamente e raggiungono la conformazione nativa quando trasferite da condizioni denaturanti a condizioni non-denaturanti. I risultati di questi esperimenti hanno portato gli scienziati a formulare un modello schematico più complesso di quello precedentemente esposto.

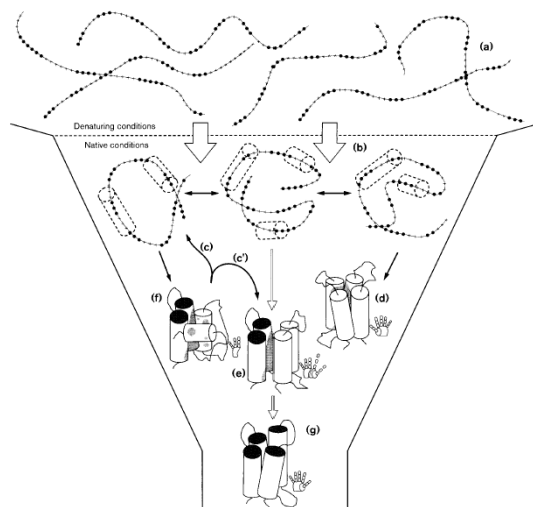


Figura 2: Diagramma ad imbuto che rappresenta in maniera schematica il "folding" di una proteina semplice

In condizioni denaturanti, la proteina nel suo stato non avvolto può assumere un elevato numero di stati conformazionali, limitati esclusivamente da impedimenti sterici (fig.2a). Quando la catena polipeptidica viene posta in condizioni di rinaturazione, le interazioni tra i residui aminoacidici determineranno casualmente la formazione di strutture secondarie nascenti; a questo stadio, la percentuale di interazioni native è piccola e queste hanno un basso grado di cooperatività (fig.2b). D'altra parte, quasi subito si verifica un fenomeno di "collasso", dovuto all'instaurarsi di un numero significativo di interazioni fra i residui idrofobi, che "facilita" la formazione di strutture secondarie molto simili a quelle presenti nella forma nativa. Questo evento è guidato principalmente dall'intrinseca tendenza di un polipeptide a formare un core idrofobo quando si trova in soluzione acquosa: la disposizione dei residui (polari e idrofobi) è fondamentale per stabilizzare le strutture secondarie e determinare l'architettura globale dello stato collassato. Una proteina può raggiungere lo stato collassato tramite vari percorsi che determinano la formazione di diverse famiglie strutturali, delle quali alcune avranno delle topologie scorrette. Queste famiglie possono presentare dei livelli energetici simili

ed uno stesso numero di contatti nativi, ma nelle forme avvolte in maniera scorretta, saranno presenti delle interazioni destabilizzanti causate dall'errata disposizione spaziale dei residui (fig.2 d-e-f). Soltanto le molecole con il corretto avvolgimento avranno probabilità elevate di raggiungere la conformazione nativa (fig.2g); quelle con avvolgimenti non-nativi potranno andare incontro ad una parziale riorganizzazione, che le guida verso la formazione di intermedi produttivi (fig.2c'), oppure ad una nuova denaturazione (fig.2c), che darà loro la possibilità di avvolgersi nuovamente (Miranker e Dobson, 1996).

Il fenomeno del "collasso idrofobico" costituisce una fase molto importante nel processo di folding di una proteina e porta alla formazione del cosiddetto "molten globule" (globulo denaturato), un intermedio stabile e compatto, dotato di un insieme di strutture secondarie che coincidono in parte con quelle native, ma privo di una rigida struttura terziaria (quindi, in qualche modo, denaturato) (Creighton, 1992).

Il raggiungimento dello stato nativo, partendo da quello di "molten globule", coinvolge un fenomeno di desolvatazione che determina la totale espulsione delle molecole d'acqua presenti in prossimità del core parzialmente idratato, facilitando le interazioni corrette, che stabilizzano la struttura terziaria nativa della proteina (Cheung et al., 2002).

Questa visione del processo di folding viene rappresentata efficacemente utilizzando diagrammi "ad imbuto", che consistono in una rappresentazione dello spazio conformazionale che la catena polipeptidica può occupare durante il "folding" (Dill e Chan, 1997). Una forma semplificata di questo tipo di diagrammi è appunto quella mostrata in Fig. 2.

Dal punto di vista energetico, la larghezza dell'imbuto rappresenta tutte le possibili conformazioni della catena polipeptidica (entropia della catena): l'estremità superiore sarà quindi molto ampia perché rappresenta le numerosissime conformazioni che un polipeptide può assumere allo stato denaturato, mentre l'estremità inferiore avrà un'ampiezza minima, che corrisponde all'unica conformazione nativa determinata per cristallografia a raggi X o per NMR. La distanza fra la sommità e il fondo dell'imbuto rappresenta gli altri contributi energetici (entalpia della catena, entropia ed entalpia del solvente) per ogni possibile conformazione della proteina.

In realtà, in una rappresentazione più veritiera di quella mostrata in Fig.2, le pareti dell'imbuto avrebbero diverse irregolarità, alcune delle quali talmente marcate da costituire delle vere e proprie "trappole cinetiche", cioè dei minimi relativi di energia.

Queste valli locali sono popolate da catene polipeptidiche parzialmente avvolte, che non sono in grado di superare la barriera energetica associata al loro specifico stato intermedio e di proseguire lungo una delle vie che conducono ad un "folding" completo e "nativo". L'esistenza di percorsi alternativi costituisce la differenza fondamentale rispetto al modello che considera il folding come una

SEZIONE 2

serie di reazioni chimiche di equilibrio, e contempla, quindi, un unico percorso per il raggiungimento dello stato nativo (Clark, 2004).

Anche il più complesso diagramma ad imbuto, tuttavia, non è in grado di descrivere correttamente il comportamento delle catene polipeptidiche in condizioni fisiologiche: il modello è valido solo per singole molecole a diluizione infinita e non per popolazioni di uno stesso polipeptide, in quanto non tiene conto delle collisioni intermolecolari tra intermedi parzialmente avvolti. Infatti, una catena polipeptidica parzialmente avvolta può continuare ad avvolgersi correttamente, oppure può associarsi con le altre molecole della popolazione e formare degli aggregati (Fig 3a).

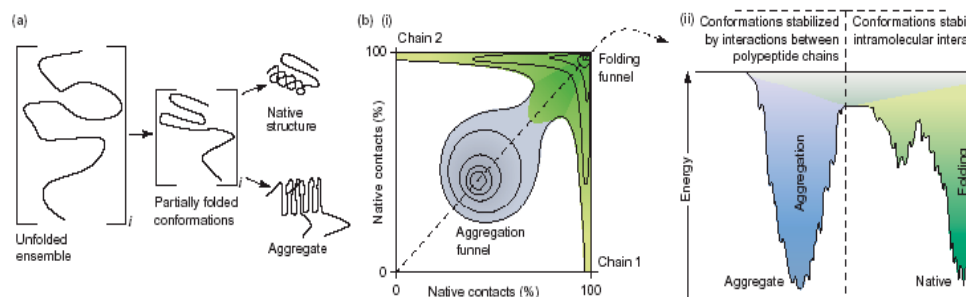


Figura 3: Diagrammi a imbuto che considerano anche i processi di aggregazione.

Per rappresentare graficamente questa competizione tra folding corretto e aggregazione viene utilizzato un diagramma “a doppio imbuto”, che tiene conto delle interazioni tra le varie catene che portano alla formazione di aggregati stabili (Fig. 3b) (Clark, 2004).

Il realtà, a causa dell'estrema rapidità del “folding”, dissezionarne i passaggi rimane un obiettivo importante ma difficile da raggiungere. Diversi ricercatori hanno pertanto cercato di mettere a punto strategie sperimentali mirate a rallentare il processo.

Recentemente, per esempio, è stato descritto un metodo, basato sull'intrappolamento della proteina da analizzare in una matrice porosa di silice, attraverso il quale l'intero processo di folding può essere drasticamente rallentato e monitorato direttamente con una combinazione di tecniche spettroscopiche (Shibayama N, 2008).

3. Il “folding” in vivo: le proteine chaperones e gli aggregati proteici

Il “misfolding” (cioè un processo di avvolgimento dal quale non si ottiene proteina funzionale) e l'aggregazione delle proteine sono alcune delle maggiori minacce per la vita delle cellule. L'aggregazione può avvenire durante l'avvolgimento di proteine nascenti o in conseguenza della denaturazione proteica, indotta da stress.

I due maggiori meccanismi che proteggono la cellula da questa minaccia sono gli chaperons molecolari e il sistema ubiquitina-proteasoma. Il primo, facilita

il corretto avvolgimento mentre il secondo, rimuove in modo irreversibile proteine danneggiate o tossiche (Szolajska et al., 2011).

Il mantenimento della corretta struttura tridimensionale delle proteine, e' il requisito fondamentale per la sopravvivenza cellulare. Questo processo e' strettamente regolato e nel tempo si e' evoluto al fine di minimizzare il "misfolding" proteico.

Data la gravità delle eventuali conseguenze di errori nei processi di avvolgimento e recupero degli aggregati, nelle cellule si è evoluto un elaborato sistema di protezione, basato su "chaperones" molecolari che assistono l'avvolgimento e il riavvolgimento, prevenendo così l'aggregazione e il "misfolding".

La maggior parte delle chaperones riconosce e lega le superfici idrofobe, esposte delle proteine non native, e facilita, complessivamente rallentandolo, il raggiungimento della struttura terziaria nativa. Il rilascio del substrato proteico è spesso accoppiato ad una modificazione conformazionale ATP-dipendente delle chaperones. In seguito al rilascio, il polipeptide ha una occasione per avvolgersi correttamente; se ciò non avviene, la persistenza di superfici idrofobe esposte provoca un nuovo evento di legame alla proteina-chaperone. Il processo si ripete finché la proteina-substrato non raggiunge la conformazione nativa.

Le catene polipeptidiche di nuova sintesi, sono soggette ad interazioni contraddizionali con enzimi appartenenti alla famiglia delle proteine disolfuro isomerasi. Essi catalizzano la formazione, la riduzione e l'isomerizzazione di ponti disolfuro, così come membri del sistema controllo qualità chaperons/calnexina dirette verso le glicoproteine di secrezione (Asn-linked glycosilate) (Rutkevich, L.A. et al, 2010).

In condizioni di crescita ottimali, molte proteine hanno probabilmente un bisogno limitato di assistenza; le chaperones, però, diventano vitali in condizioni di stress. Uno shock termico, per esempio, provoca un incremento del "misfolding" e della tendenza delle proteine ad aggregare. La cellula si difende sintetizzando una maggiore quantità di chaperones. Una frazione significativa dei geni codificanti chaperones sono, infatti, inducibili da diverse condizioni di stress (Schlieker et al., 2002). Per esempio, è noto che in condizioni nelle quali si accumulano proteine denaturate nel reticolo endoplasmatico, le cellule attivano una risposta nota come "risposta alle proteine non avvolte" (UPR) (Ron, 2007). Esistono quattro classi di agenti che inducono lo stress nell'ER: gli agenti riducenti, l'ipossia, gli inibitori della glicosilazione e alcune molecole che interferiscono con il metabolismo del calcio. La risposta consiste nella trasduzione a feedback di un segnale che arriva al nucleo ed attiva la trascrizione di geni che codificano chaperones del reticolo. In casi estremi, la risposta allo stress dell'ER può indurre apoptosi (Yoshida, 2007).

Le chaperones, chiamate anche HSP ("Heat Shock Protein", proteine da shock da calore) vengono raggruppate in famiglie, in base alla loro massa molecolare. Le classi maggiori sono: HSP60 e HSP10, HSP70 e HSP40, HSP90,

SEZIONE 2

HSP100, sHSP (“small HSP”, piccole HSP). Nel processo di “folding” sono inoltre implicate alcune proteine con funzioni catalitiche, tra le quali le PDI (Protein-Disolfuro-Isomerasi) e le PPI (Peptidil-Protil-Isomerasi) (Fink, 1999).

L’aggregazione avviene a causa di interazioni non corrette, tra proteine parzialmente avvolte o completamente denaturate, che portano alla formazione di agglomerati proteici di forma casuale (Jaenicke, 1995). Le interazioni avvengono principalmente tra superfici idrofobe che, nella conformazione nativa, si troverebbero nascoste all’interno della proteina, ma che nelle molecole non native sono esposte e determinano la formazione di grandi complessi molto stabili (Jaenicke, 1998; De Bernardez Clark et al., 1999).

Il destino di un polipeptide (raggiungimento dello stato nativo o, invece, formazione di aggregati) è determinato dalla competizione tra processi di folding, degradazione e aggregazione (Cardinale et al., 2001) (Fig.4).

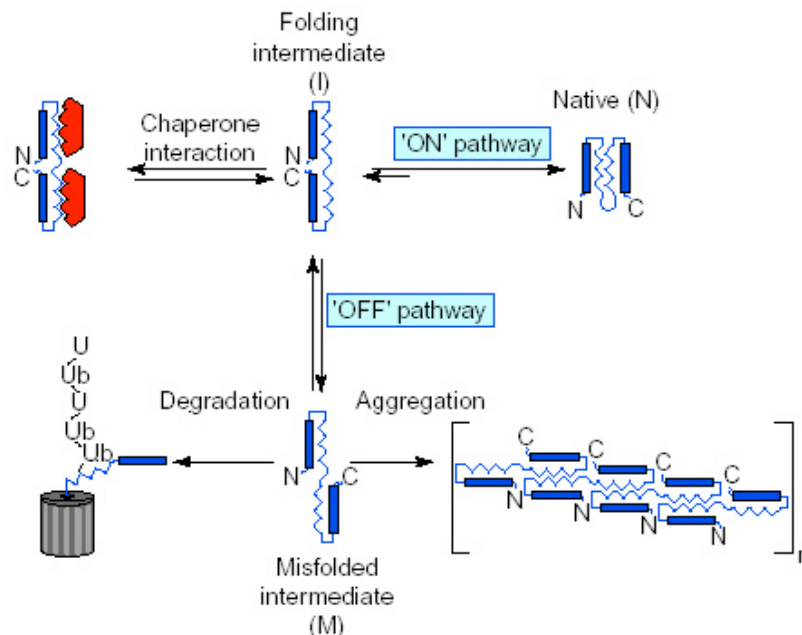


Figura 4 : Rappresentazione schematica della competizione tra processi di “folding”, degradazione e aggregazione.

I fattori non direttamente dipendenti dalla specifica catena polipeptidica che favoriscono l’aggregazione sono l’elevato numero di macromolecole all’interno di una cellula, le variazioni delle condizioni ambientali (pH, temperatura, forza ionica, stato redox) e l’inibizione del sistema di degradazione cellulare (Van den Berg et al., 1999; Ellis e Hartl, 1996; Minton, 2000). Variazioni significative di tali fattori favoriscono il “misfolding” delle proteine, rendendole più suscettibili all’aggregazione (Buchner, 1996; Plaxco et al., 1998; Garcia-Mata et al., 1999). Un ulteriore fattore “generale” è, per esempio, l’espressione nelle cellule di geni

virali (Wiertz et al., 1996; Levitskaya et al., 1997), i quali possono interferire con il folding dei polipeptidi nascenti e causare aggregazione.

Nelle cellule, l'aggregazione proteica può anche derivare dal "misfolding" di specifiche proteine, causato da mutazioni o da altri errori verificatisi al momento della trascrizione, della maturazione dell'mRNA o della traduzione (Perutz, 1997; Chiti et al., 2003).

Il "misfolding" di proteine integrali di membrana può impedire l'incorporazione di queste nel doppio strato fosfolipidico, lasciando esposte le loro regioni idrofobe che possono interagire con aggregati già esistenti (Perutz, 1997).

Il processo di aggregazione può essere suddiviso in uno stadio di nucleazione ed uno stadio di crescita (Kurganov, 2002) e può essere paragonato ad una reazione radicalica di polimerizzazione a catena: in quest'ultima, i centri attivi della reazione sono i radicali liberi, mentre nel processo di aggregazione sono i punti di crescita dell'aggregato (Turnell e Finch, 1992).

Le caratteristiche degli aggregati amorfi o strutturati sono: scarsa solubilità in ambienti acquosi e presenza di strutture secondarie non-native (Fink, 1998). Le proteine aggregate sono funzionalmente inattive e spesso ricche in foglietti beta antiparalleli (Turnell e Finch, 1992).

Gli aggregati possono essere sia strutture amorfe, come i corpi d'inclusione ("inclusion bodies"), o fibrille ordinate, come le placche amiloidi o le particelle prioniche (Kopito, 2000; McLaurin et al., 2000; Serio e Lindquist, 2000). Le fibrille amiloidi sono formate da varie proteine che hanno strutture comuni, indipendentemente dalla sequenza aminoacidica, e consistono in piccoli protofilamenti costituiti da catene polipeptidiche "impacchettate" in strutture a foglietto beta, che corrono perpendicolarmente all'asse longitudinale della fibrilla (Markossian e Kurganov, 2004).

In vivo, l'aggregazione proteica avviene sia all'interno della cellula che nello spazio extracellulare, quando la formazione di proteine non avvolte correttamente è maggiore delle capacità di degradazione della cellula (Buckig et al., 2002).

Studi recenti dimostrano che la via proteasoma-indipendente che elimina le proteine non avvolte correttamente, nota come via-aggregosoma dipendente, risulta in una degradazione autofagica dei corpi inclusi (Bennett, 2005).

In genere, l'aggregazione avviene tra proteine uguali o molto simili (Markossian e Kurganov, 2004), ma sono stati osservati anche eteroaggregati, nei quali una proteina non-nativa può influenzare la cinetica di aggregazione di un'altra (Ben-Zvi e Goloubinoff, 2002).

L'importanza dei meccanismi del "folding" risulta ancora più evidente quando si considera che diverse patologie umane derivano dall'incapacità di alcune proteine di adottare e/o mantenere lo stato nativo; almeno in alcuni casi, il difetto è dovuto ad una anormale cinetica di avvolgimento (Chiti et al, 2006; Chen et al, 2008).

SEZIONE 2

Nei neuroni, la deposizione di proteine “unfolded” e la conseguente formazione di corpi inclusi, sono caratteristiche comuni a molte malattie neurodegenerative; ciò suggerisce che queste malattie condividano una forma di “fallimento” dei processi di degradazione delle proteine “misfolded” (Taylor et al., 2002).

Malattie come Morbo di Alzheimer, Morbo di Parkinson, Corea di Huntington, encefalopatie prioniche, sclerosi laterale amiotrofica, fibrosi cistica e molte altre, sono associate alla formazione di corpi inclusi insolubili, sia citoplasmatici che nucleari, fortemente tossici per le cellule (Markossian e Kurganov, 2004).

Purtroppo, non è facile studiare la patogenesi di queste malattie perchè è praticamente impossibile, al momento, ricostruirne le prime fasi.

Inoltre, nonostante i progressi fatti in questo campo e la disponibilità di nuove tecnologie e nuovi programmi informatici, il codice di decodificazione del “folding” proteico ancora rimane indeciftrato (Jha et al., 2011).

4. Bibliografia

1. Martin ACR, Orengo CA, Gail Hutchinson E, Jones S, Karmirantzou M, Laskowski RA, Mitchell JBO, Taroni C, Thornton JM: Protein folds and functions. *Structure*. 1998, 6(7):875–884.
2. Acharya KR, Ren JS, Stuart DI, Phillips DC, Fenna RE: Crystal-structure of human α -lactalbumin at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol*. 1991, 221(2): 571-581.
3. Cherkasov A, Jones SJM: An approach to large scale identification of non-obvious structural similarities between proteins. *BMC Bioinformatics*. 2004, 5:61-72
4. Barth A, Wahab M, Brandt W, Frost K: Classification of serine proteinases derived from steric comparisons of their active sites. *Drug Des Discov*. 1993,10: 297-317.
5. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM: Derivation of 3D coordinate templates for searching structural databases: application to Ser-His-Asp catalytic triads in serine proteinases and lipases. *Protein Sci*. 1996, 5: 1001-1013.
6. Anfinsen CB: Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 1973, 181(96): 223-230.
7. Dobson CM, Karplus M: The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol*. 1999, 9(1):92-101.
8. Onuchic JN and Wolynes PG: Theory of protein folding. *Curr Op Struct Biol*. 2004, 14(1):70-75
9. Creighton TE: Protein Folding. Up the kinetic pathway. *Nature* 1992, 356(6366):194-5

10. Miranker AD and Dobson CM: Collapse and cooperativity in protein folding. *Curr Op Struct Biol.* 1996, 6(1): 31-42
11. Cheung MS, Garcia AE, Onuchic JN: Protein folding mediated by solvation: water expulsion and formation of the hydrophobic core occurs after structural collapse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002, 99:685-690.
12. Dill KA and Chan HS: From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol.* 1997, 4(1):10-9
13. Clark PL: Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel. *Trends Biochem Sci.* 2004, 29:527-534
14. Shibayama N, Slow Motion Analysis of Protein Folding Intermediates within Wet Silica Gels. *Biochemistry* 2008; 47:5784-5794
15. Schlieker C, Bukau B, Mogk A: Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the E. coli cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol.* 2002, 96(1):13-21.
16. D. Ron, P. Walter, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8 519-529.
17. H. Yoshida, ER stress and diseases, *FEBS J.* 2007 274(3):630-58.
18. Fink AL: Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev.* 1999, 79(2):425-449
19. Jaenicke R: Folding and association versus misfolding and aggregation of proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1995; 348(1323):97-105.
20. Jaenicke R: Protein self-organization in vitro and in vivo: partitioning between physical biochemistry and cell biology. *Biol Chem.* 1998; 379(3):237-243.
21. De Bernardes Clark E, Schwarz E, Rudolph R: Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol.* 1999; 309:217-236.
22. Cardinale A, Filesi I, Biocca S: Aggresome formation by anti-Ras intracellular scFv fragments. The fate of the antigen-antibody complex. *Eur J Biochem.* 2001;268(2):268-277.
23. Van den Berg B, Ellis RJ, Dobson CM: Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.* 1999; 18(24):6927-6933.
24. Ellis RJ, Hartl FU: Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *FASEB J.* 1996; 10(1):20-26.
25. Minton AP: Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr Opin Struct Biol.* 2000; 10(1):34-9.

SEZIONE 2

26. Buchner J: Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* 1996; 10(1):10-19.
27. Plaxco KW, Simons KT, Baker D: Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins. *J Mol Biol.* 1998; 277(4):985-994.
28. Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, Sztul ES Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol.* 1999;146(6):1239-1254.
29. Wiertz EJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, Rapoport TA, Ploegh HL: Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature.* 1996; 384(6608):432-438.
30. Levitskaya J, Sharipo A, Leonchiks A, Ciechanover A, Masucci MG: Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(23):12616-12621
31. Perutz MF. Amyloid fibrils. Mutations make enzyme polymerize. *Nature.* 1997; 385(6619):773- 775.
32. Chiti F, Stefani M, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM: Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature.* 2003; 424(6950):805-808.
33. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science.* 2002; 296(5575):1991-5.
34. Kurganov BI: Kinetics of protein aggregation. Quantitative estimation of the chaperone-like activity in test-systems based on suppression of protein aggregation. *Biochemistry (Mosc).* 2002; 67(4):409-422.
35. Turnell WG, Finch JT: Binding of the dye congo red to the amyloid protein pig insulin reveals a novel homology amongst amyloid-forming peptide sequences. *J Mol Biol.* 1992; 227(4):1205-1223.
36. Kopito RR: Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 2000; 10(12):524-530.
37. McLaurin J, Yang D, Yip CM, Fraser PE: Review: modulating factors in amyloid-beta fibril formation. *J Struct Biol.* 2000; 130(2-3):259-270.
38. Serio TR, Lindquist SL: Protein-only inheritance in yeast: something to get [PSI⁺]-ched about. *Trends Cell Biol.* 2000; 10(3):98-105.
39. Markossian KA, Kurganov BI: Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggresomes. *Biochemistry (Mosc).* 2004; 69(9):971-984.

40. Bückig A, Tikkanen R, Herzog V, Schmitz A. Cytosolic and nuclear aggregation of the amyloid beta-peptide following its expression in the endoplasmic reticulum. *Histochem Cell Biol.* 2002;118(5):353-60.
41. Bennett EJ, Bence NF, Jayakumar R, Kopito RR. Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell.* 2005;17(3):351-65.
42. Ben-Zvi AP, Goloubinoff P. Proteinaceous infectious behavior in non-pathogenic proteins is controlled by molecular chaperones. *J Biol Chem.* 2002, 277(51):49422-49427.
43. Chen Y, Ding F, Nie H, Serohijos AW, Sharma S, Wilcox KC, Yin S, Dokholyan NV, Protein folding: Then and now. *Arch of Biochem Biophys.* 2008;469(1):4-19
44. Szolajska E and Chroboczek J. Faithful chaperones. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(20):3307-22
45. Rutkevich LA, Williams DB, Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010;23 157-166
46. Jha S and Komar A, Birth, life and death of nascent polypeptide chains. *Biotechnol. J.* 2011;6 623-640