

DOMANDE APERTE

TRASPORTO CITOSOL MITOCONDRIO

I mitocondri sono composti da due membrane (interna ed esterna), che identificano altri due spazi: spazio intermembrana e matrice. L'import nei mitocondri è un processo post traduzionale, mentre nel reticolo è co-traduzionale.

La sequenza segnale si trova all'N-terminale: presenta una met in N-t, una leu o un aa idrofobico qualsiasi in C-t e presenta delle zone idrofobiche di ala, phe e pro intervallate da aa polari che determinano la conformazione di elica anfipatica della proteina.

La proteina deve mantenersi il più possibile denaturata per poter entrare nel mitocondrio.

Per fare ciò intervengono delle proteine (Hsp70), che sfavoriscono il folding. Le proteine in questo stato sono chiamate Pre-proteine, cioè non sono proteine mature, ma contengono la sequenza segnale. Possono essere anche Pre-Pro-proteine, in cui il dominio Pro aiuta il successivo folding e verrà tagliata da proteasi quando la proteina diventerà matura.

La Pre-proteina passa la membrana esterna attraverso il sistema TOM grazie all'aiuto di proteine recettoriali. Successivamente la proteina perde la sequenza segnale e può avere diversi destini a seconda delle sequenze segnale secondarie. Il sistema SAM si occupa delle proteine che devono essere espresse nella membrana mitocondriale esterna. Il sistema TIM trasloca la proteina attraverso la membrana interna: TIM22 si occupa delle proteine integrali della membrana interna; TIM23 si occupa delle proteine della matrice. MIA è il sistema dello spazio intermembrana, che si occupa dell'import e assemblaggio. PAM è un complesso di chaperoni molecolari.

Per studiare il sistema di traslocazione, sono stati usati diversi approcci, sono stati isolati mutanti con modificazione nei geni per la traslocazione. Si può dare una proteina associata nella conformazione pre al mitocondrio che riconosce la sequenza segnale e interagisce con essa. Se si abbassa la temperatura, il processo è poco efficiente. Trattando con proteasi, la parte di proteina non entrata nel mitocondrio viene degradata quindi posso vedere se la sequenza segnale è dentro o fuori dal mitocondrio.

Nell'entrata della proteina nel mitocondrio ci sono due fasi:

- 1) Riconoscimento ed ancoraggio → non è un processo bloccato a basse temperature e dipende dal potenziale di membrana
- 2) Traslocazione → avviene solo a temperatura fisiologica

A tal punto la proteina all'interno del mitocondrio è protetta dall'azione delle proteasi. Troverò proteine degradate all'esterno solo se tratto la membrana con detergenti, degradandola. In tal modo le proteine possono uscire ed essere degradate dalle proteasi.

L'importazione delle proteine richiede energia: una volta che la proteina entra in TOM si ha il seguente distacco di Hsp70 che richiede l'idrolisi di ATP così come le Hsp70 mitocondriali poiché si attaccano alla proteina dopo TIM richiedono ATP.

Non tutte le proteine devono arrivare alla matrice mitocondriale e il destino della proteina (Pre-proteina) è determinato sequenze segnale secondarie, perché intervengono dopo che la proteina ha attraversato il complesso TOM. Una volta che la proteina ha attraversato il complesso TOM, interagisce con delle proteine chaperone che la mantengono unfolded e ne permettono l'internalizzazione con il complesso SAM, anch'esso sulla membrana esterna. La proteina entra ed esce più volte formando una struttura a β -barrell e rimane nella membrana esterna. Per rimanere nella membrana interna, la proteina deve interagire con un complesso TIM e deve possedere una sequenza detta stop-transfer sequence, che determina che la proteina non venga ulteriormente trasportata oltre la membrana interna. La proteina non deve necessariamente restare ancorata alla membrana interna, ma grazie all'azione di una proteasi può lasciare la sequenza stop nella membrana interna e muoversi nello spazio intermembrana. La proteina potrebbe anche entrare nella matrice e interagire col complesso OXA, nella membrana interna, che lo riporta nella membrana interna e nello spazio intermembrana. Il sistema TIM22 opera nel caso in cui la proteina possenga più sequenze intermembrana. In questo caso la proteina resta nella membrana interna.

SISTEMA DEL GALATTOSIO CON APPLICAZIONI DI SYSTEM BIOLOGY

Il sistema GAL permette ai lieviti di sfruttare il galattosio come fonte di carbonio: i 9 geni necessari per questo fenomeno metabolico prendono il termine di regulone.

Ci sono i geni regolatori: GAL3, GAL6, GAL4 e GAL80. GAL4 è l'attivatore trascrizionale mentre GAL80 è l'inibitore che in assenza di galattosio va ad inattivare il gene GAL4.

I geni strutturali sono:

- GAL2 e HTX che codificano per i trasportatori del galattosio, di cui il primo è specifico e quindi ad alta affinità per il galattosio mentre il secondo è aspecifico e quindi ad alta affinità per il glucosio ed a bassa affinità per il galattosio
- GAL1 che codificano per la galattochinasi e che permette la trasformazione del galattosio in galattosio-1-P
- GAL7 e GAL10 che permettono la trasformazione del galattosio-1-P in glucosio-1-P ed utilizzano come substrato l'UDP
- GAL5 che permette la trasformazione del glucosio 1P in glucosio 6P che può così entrare in glicolisi.

Lo scopo di questo studio è quello di perturbare in maniera sistematica il metabolismo del galattosio attuando modifiche che possono essere sia ambientali che genetiche. Ci si avvale innanzitutto di espressione genica sia della cellula wild type che delle cellule mutate in maniera specifica per ognuno dei 9 geni coinvolti (GAL1, GAL2, GAL3, GAL4, GAL5, GAL6, GAL7, GAL80, GAL10) e si compara il profilo di espressione genica dei mutanti con quello delle cellule wild type. Dal punto di vista ambientale, questo sistema è controllato dalla disponibilità degli zuccheri che compongono il sistema di crescita: il sistema GAL è inducibile quando è presente galattosio nel terreno. Se nel terreno è però presente il glucosio, il lievito lo preferisce e si ha il fenomeno della glucose repression. Altri zuccheri, come il raffinose, non sono soggetti a repressione da glucosio ma non permettono neanche l'attivazione del sistema GAL. Si allestiscono quindi due condizioni nutrizionali diverse:

- ➔ una con galattosio e raffinose
- ➔ una con raffinose soltanto

Alla fine avremo 20 condizioni totali da porre in esame.

Faccio delle analisi di trascrittomiche con microarray e ottengo una tabella in cui verranno messe le condizioni di tutti i geni in tutte le perturbazioni prese in considerazione, usando come condizione di confronto quella del wt che cresce su raffinose e galattosio. In questo modo si ottiene come varia l'espressione dei diversi geni a seconda delle perturbazioni, se c'è un'espressione maggiore si avrà il punto che indica il gene colorato in nero, se c'è un'espressione minore in bianco, se l'espressione resta uguale in grigio. Una volta ottenuti questi dati si possono inserire i diversi geni in cluster, raggruppamenti di geni che mostrano delle caratteristiche simili, per esempio i geni GAL1, 7 e 10 faranno parte del primo cluster. Durante lo studio si può vedere che alcuni geni che non fanno parte direttamente del metabolismo del galattosio sono espressi in modo diverso rispetto al normale, quindi indica che ci sono delle vie metaboliche che subiscono delle mutazioni a causa della mutazioni introdotte.

L'analisi di proteomica è stata fatta solo sul wt che cresce su raffinose e su galattosio perché si utilizza un metodo molto costoso: silac. Questo è un metodo di comparazione tra due campioni che vengono fatti crescere uno su deuterio, l'altro no, in questo modo sono distinguibili una volta che vengono espresse le proteine e vengono sottoposte a spettrofotometro. Si può quindi vedere se ci sono delle differenze di quantità di proteine prodotte in uno o nell'altro campione grazie al fatto che il deuterio che resta legato alle proteine di uno dei due campioni aggiunge una massa specifica alla proteina stessa.

Si è visto che l'espressione di un trascritto di RNA è proporzionale alla presenza della proteina stessa, si è messo in grafico il risultato e si è visto che nella maggior parte dei casi l'RNA trascritto poi viene tradotto nella proteina, mentre in casi specifici come i geni per le subunità ribosomiali, questo non avviene, vuol dire che ci sono più controlli a cui è sottoposto.

Si fa poi una mappa di interazione delle proteine e si vede che molte sono raggruppate in gruppi in base al pathway di cui fanno parte, ma poi ci sono anche delle interazioni tra le proteine che fanno parte di metabolismi diversi, questo fa capire come alcuni di essi siano collegati.

Alla fine si studiano tutte le informazioni ottenute, la maggior parte di queste dicono cose che già ci aspettavamo altre invece possono sembrare comportamenti strani. Un esempio sono i geni GAL7 e 10, i ceppi che li hanno deletati hanno una diminuzione anche in tutti gli altri geni GAL, si è pensato che questo dipendesse dal fatto che i geni GAL7 e 10 trasformano il galattosio 1P in glucosio 1P, in mancanza di questi c'è un eccesso di galattosio 1P all'interno della cellula e si è pensato che fosse tossico. In effetti andando a deletare anche il gene GAL1 che trasforma il galattosio in galattosio 1P nei ceppi con già deleti GAL7 e 10, si è visto che la concentrazione del galattosio 1P diminuisce e questa riprende a funzionare normalmente.

Un altro esempio è quello dei ceppi GAL80 cresciuti su raffinoso che, al contrario di tutti gli altri ceppi cresciuti su raffinoso, cresce come se fosse in presenza di galattosio e molto più lentamente. Si è pensato che questo comportamento derivasse dal fatto che GAL4 facesse iniziare la trascrizione di tutti i geni GAL sempre se non ci fosse GAL80 a fermarlo. Quindi se GAL80 è deletato, GAL 4 si attiva e produce geni che però in mancanza di galattosio sono inutili e quindi spreca energia per niente e la cellula cresce più lentamente. Deletando anche GAL4 la funzionalità torna simile a quella del ceppo wt ce cresce su raffinoso.

MOLTE VIE DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE SI AVVALGONO DI SECONDI MESSAGGERI: ESPONETE QUALI PROPRIETÀ SONO RICHIESTE AD UN SECONDO MESSAGGERO E CHIARITO UN ESEMPIO

2° messaggero:

- basso MW
- non proteico
- solubile
- amplificazione del segnale
- rapida sintesi/degradazione

Un esempio di 2° messaggero è il cAMP sintetizzato a partire da ATP ad opera dell'adenilato cilasi una volta attivata.

Epinefrina, glucagone e ACTH sono ormoni stimolatori (stimolano la proteina G ad attivare l'adenilato ciclasi), mentre adenosina e PGE1 sono ormoni inibitori.

Lo spegnimento del segnale è data da una fosfodiesterasi che tagli il legame del P a rendere la molecola non ciclica.

Il cAMP è una struttura ciclica in cui il P è legato al 3' e al 5' del ribosio. Per creare questa molecola serve un'energia pari a 2 ATP in quanto prima viene rotto l'ATP in AMP e PP, poi viene scisso il pirofosfato a dare 2P (questa reazione, poiché il legame del pirofosfo è ad alta energia, richiede un'energia o/pari a 1ATP). La funzione di cAMP è quella di attivare PKA cAMP dipendente, una proteina chinasi costituita da 4 subunità: 2 con funzione catalitica e 2 con funzione regolatoria. In assenza di cAMP le subunità con funzione regolatoria legano e coprono il sito catalitico della PKA ma quando è presente il cAMP, questo si lega alle subunità regolatorie (ciascuna presenta 2 siti di legame per il cAMP) causandone il distacco dalle subunità catalitiche e portando all'attivazione dell'enzima.

La funzione del cAMP è l'attivazione dell'enzima PKA cAMP dipendente, una proteina chinasi costituita da 4 subunità in cui 2 hanno attività catalitica e 2 funzione regolatoria. Quando cAMP si lega in modo allosterico alle subunità regolatorie, queste si staccano da quelle catalitiche rendendole attive.

I substrati della PKA possono essere diversi ed intervenire in due principali categorie di fenomeni. Fenomeni che hanno a che fare col metabolismo → la PKA fosforila la glicogeno sintasi (a → b) inattivandola, e la fosforilasi chinasi attivandola. Questa fosforila la glicogeno fosforilasi (b → a) attivandola e portando alla degradazione di glicogeno.

Fenomeni che modificano il profilo trascrizionale → la PKA attivata si trasferisce nel nucleo passando all'interno dei pori nucleari presenti nella doppia membrana nucleare, dove è in grado di agire su fattori di trascrizione chiamati CREB fosforilandoli; CREB fosforilato si lega al gene bersaglio e richiama CBP (CREB binding protein) formando un complesso in grado di attivare la trascrizione.

La concentrazione dell'epinefrina nello spazio extracellulare è di 10^{-6} e causa la produzione di una concentrazione di cAMP di 10^{-4} con un fattore di amplificazione quindi di 10^4 .

RUOLO DELLE INTERAZIONI PROTEINA-PROTEINA NELLA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE MEDIATA DA RAS IN CELLULE DI MAMMIFERO

L'RTK sulla membrana, dopo legame col fattore di crescita GF (es. EGF), dimerizza con la fosforilazione e lega un complesso Grb2-Sos e lo porta in membrana in modo tale da legare Sos a Ras che è presente anch'esso sulla membrana plasmatica. La proteina Grb2 è formata da un dominio SH2 che lega il P legato a tyr sul recettore e poi due domini SH3 che interagiscono con degli effettori a valle: il primo SH3 interagisce con Sos legando domini ricchi di prolina che si trovano a valle di Sos. A monte della Sos ho domini funzionali che legano Ras-GEF in modo da far uscire GDP a favore di GTP. A valle della attivazione di Ras, troviamo diverse vie di trasduzione del segnale. La parte a monte è comune mentre a valle possono verificarsi diversi eventi. Una delle più importanti è la cosiddetta via delle MAPK in cui abbiamo una serie di fosforilazioni a cascata che portano all'attivazione trascrizionale di una via specifica, in particolare vengono sintetizzate una serie di proteine coinvolte nella trascrizione G1/S. La via delle MAPK parte dall'interazione di Ras-GTP con una chinasi chiamata Raf1 che si attiva interagendo con la proteina. Raf1 allora fosforila MEK, che fosforila la MAPK (o ERK) che una volta fosforilata trasloca all'interno del nucleo. Il trasferimento nel nucleo porta alla fosforilazione di Jun o Ets, fattori a favorire trascrizione di geni precoci. Poi in associazione con Fos, Myc, prodotti da questi geni precoci, vi è la formazione di fattori di trascrizione che attivano la trascrizione dei geni tardivi come il fattore E2F per la trascrizione di cicline Cdk. Le vie delle MAPK sono estremamente conservate nei pathways di segnalazione.

Lo stimolo mitogenico attiva la proteina Ras che a sua volta attiva il sistema delle Cdk ovvero la ciclina D1 che con una Cdk4 che va ad agire col retinoblastoma, porta all'attivazione di un fattore di trascrizione E2F che promuove la sintesi di ciclina E e ciclina A necessarie per l'entrata nel ciclo cellulare finale. In condizioni basali, il retinoblastoma è legato al fattore E2F inibendolo. Se Rb viene fosforilato dal sistema di CycD1-Cdk4, si stacca da E2F che è libero di agire come fattore di trascrizione. La CycD1-Cdk4 è, prima di essere attivata da Ras, inattivata dall'inibitore delle cicline chiamato p16. L'Rb può essere iperfosforilato se viene fosforilato da CycE-Cdk2 prodotti dalla prima ondata di trascrizione, favorendo ancora di più l'attivazione di E2F.

QUALI SONO I PASSAGGI CHIAVE NELLA FORMAZIONE DI AGGREGATI FIBRILLARI

QUALI CARATTERISTICHE PERMETTONO DI CLASSIFICARE UNA PROTEINA COME INTRINSECAMENTE DISORDINATA

Le IDP hanno la caratteristica di essere interattori multipli perché possiedono regioni flessibili che consentono ad esse di adempiere a diverse funzioni. Da qui nasce il concetto di promiscuità ovvero la plasticità di una determinata proteina nell'interagire con diversi partner proteici. Le IDP sono proteine promiscue perché sono costruite in modo modulare per cui riescono a cambiare la loro struttura a seconda che incontrino diverse tipologie molecolari. Hanno diverse regioni che legano diverse proteine oppure una stessa regione può legare proteine diverse assolvendo a diverse funzioni. Nel caso del virus, ho una singola proteina responsabile di diverse funzioni in modo tale da risparmiare spazio nel genoma virale per cui si ha un pool di proteine molto piccolo a dare tante funzioni diverse.

Le IDP dunque sono degli interaction HUB ovvero nodi di interazione in un proteoma. Le IDP possono formare dei complessi e stabilire interazioni in modi complessi che non riuscirebbero per le proteine globulari. Questa proprietà fa riferimento alla capacità dell'IDP di adeguare la sua conformazione al partner di interazione.

Le IDP possono legarsi attraverso clamping mode, dynamic complex e folding upon binding.

- clamping mode: la regione flessibile non è stato possibile identificarla con cristallografia a raggi X in cui ho un'immagine sfocata che non mi permette la definizione della sequenza (fuzzy complex);
- dynamic complex: vi sono più regioni ordinate che interagiscono ma in toto la proteina rimane complessivamente disordinata e ciò è stato possibile visualizzarlo attraverso NMR;
- folding upon binding: proteine anche completamente disordinate in cui non sono presenti strutture 2D sono in grado di ottenere regioni ordinate a seguito di un'interazione con partner globulari.

Affinità e specificità di legame sono disaccoppiate. Le interazioni a cui danno luogo possono essere interazioni contemporaneamente a bassa affinità e alta specificità. Solitamente l'affinità (complementarietà delle superfici) e specificità sono direttamente proporzionali. Tanto più due superfici sono complementari, maggiore è la probabilità che avvengano incontri utili, che si legano solo la proteina di interesse e non altre. Le IDP quando sono libere non hanno una struttura complementare definita quindi sono dotate di bassa affinità per il ligando, mentre quando incontrano il partner proteico, si ha il folding indotto, tale cambiamento di conformazione aumenta notevolmente la specificità.

VIA DI TRASDUZIONE DEL GLUCAGONE

Epinefrina e glucagone promuovono la degradazione del glicogeno mentre l'insulina promuove la sintesi del glicogeno, questo processo di regolazione segue un meccanismo di recettori associati a proteina G. Adrenalina e glucagone sono definiti ormoni stimolatori dell'adenilato ciclasi che, una volta attiva, è in grado di sintetizzare cAMP a partire da ATP. Il cAMP ha funzione di segnalazione e amplificazione, è una struttura ciclica in cui il P è legato al 3' e al 5' del ribosio. Per creare questa molecola serve un'energia pari a 2 ATP in quanto prima viene rotto l'ATP in AMP e PP, poi viene scisso il pirofosfato a dare 2P (questa reazione, poiché il legame del pirofosfato è ad alta energia, richiede un'energia pari a 1ATP). La funzione di cAMP è quella di attivare PKA cAMP dipendente, una proteina chinasi costituita da 4 subunità: 2 con funzione catalitica e 2 con funzione regolatoria. In assenza di cAMP le subunità con funzione regolatoria legano e coprono il sito catalitico della PKA ma quando è presente il cAMP, questo si lega alle subunità regolatorie (ciascuna presenta 2 siti di legame per il cAMP) causandone il distacco dalle subunità catalitiche e portando all'attivazione dell'enzima. La PKA fosforila la glicogeno sintasi (a → b) inattivandola, e la fosforilasi chinasi attivandola. Questa fosforila la glicogeno fosforilasi (b → a) attivandola e portando alla degradazione del glicogeno. L'insulina invece attiva la proteina fosfatasi che ha invece effetto opposto.

DESCRIVETE LE CARATTERISTICHE STRUTTURALI E FUNZIONALI DELLA SIGNAL RECOGNITION PARTILCE ED IL SUO RUOLO NEL PROCESSO DI SECREZIONE

L'SPR ha un ruolo chiave nel trasporto al RE che è un tipo di traslocazione co-traduzionale.

La sequenza segnale del RE ha:

- nell'estremità N-t un tratto lungo 1-5 residui di cui uno deve essere carico positivamente
- un tratto centrale di 10-15 residui idrofobici
- un tratto di 3-7 residui neutri e polari in C-t
- un ultimo piccolo residuo neutro come gly, ala, ser, thr che viene poi eliminato da peptidasi del segnale.

Vi sono delle sequenze segnale che però sono all'interno delle proteine, quindi non in N-t, e rappresentano domini transmembrana che non sono tagliati: esse segnalano la necessità che la proteina rimanga ancorata alla membrana.

La SRP è data da proteine e RNA e il suo compito è quello di riconoscere la LS (sequenza segnale) e di condurre il ribosoma che sta traducendo al sistema di traslocazione sul RE. L'SRP dunque è un sistema adattatore che accoppia il sistema traduttore con quello di traslocazione. Negli eucarioti si compone di un RNA di 300 nucleotidi e 6 proteine la cui principale è la SRP54 data da:

- un dominio M: ricco di met, forma un solco idrofobico che accoglie la parte centrale della sequenza segnale, ovvero quella idrofobica, per cui c'è complementarità di regioni idrofobiche
- un dominio G che lega e idrolizza GTP
- un dominio N che è N-terminale

In generale ci sono altre zone nella SRP:

- un dominio di pausa traduzionale che rallenta il processo nel momento in cui l'SRP si lega alla proteina col ribosoma, in modo tale da non permettere alla proteina di essere ulteriormente sintetizzata perché sarebbe difficile poi traslocarla
- hinge (o snodo) che consente alle due braccia di SRP di avvicinarsi o allontanarsi
- la sequenza legame per la sequenza segnale

La proteina SRP54 va incontro a cambiamenti conformazionali a carico del dominio N della SRP54, innescati dal legame di LS. La LS interagisce col solco idrofobico (dominio M) facendo ruotare il dominio N-t di 90°. Sulla sequenza segnale, la carica positiva, quando si lega, si trova a contatto con la carica negativa di un P dell'RNA che ha funzione di riconoscimento. Il legame di SRP al complesso ribosoma-poli-peptide fa aumentare l'affinità del dominio G con il GTP. L'SRP va dunque ad "abbracciare" il ribosoma grazie al movimento consentito dall'hinge: una volta formato questo complesso il ribosoma non è in grado di continuare la traduzione. Perché il sistema funzioni sulla membrana devo avere un recettore per SRP (SRP receptor) e il traslocatore della proteina. L'SRP si attacca al recettore e questo legame fa sì che SRP si stacchi dal complesso ribosoma-poli-peptide, pronta per fare un nuovo ciclo, per cui la traduzione può continuare. La sequenza segnale invece viene catturata subito dal traslocatore in modo tale che inizi la traslocazione. Il ribosoma a questo punto si trova attaccato sul RE attraverso il traslocatore. Il ribosoma viene passato al sistema di traslocazione con idrolisi di GTP da parte di SR, mentre SRP si stacca con idrolisi di GTP da parte di SRP. Il recettore SRP è un eterodimero formato da due subunità α e β la cui prima è legata alla subunità β che è legata alla membrana: entrambe hanno attività GTPasica. Anche qui nei procarioti ho un recettore semplificato in cui ho solamente una subunità. Quindi l'SRP si trova in tre diversi stati: free, targeting e docking.

RUOLO DEI RECETTORI TIROSIN CHINASI NEL CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE IN EUCARIOTI SUPERIORI. ENUNCIATE LE PROPRIETÀ GENERALI E CHIARITE CON ESEMPIO

Questi recettori sono in grado di reagire con un primo messaggero che è solitamente un fattore di crescita. Il loro dominio intracellulare è un enzima che fosforila altre proteine sui residui tyr. Gli RTKs hanno diversi domini extracellulari ma hanno una fisionomia simile. Abbiamo per esempio il recettore EGF che riconosce il fattore di crescita per l'epidermide, oppure abbiamo il recettore per il PDGF che ha un dominio tirosinchinasico che è diviso in due intervalli. I due recettori hanno domini extracellulari diversi: nel primo ho domini ricchi di cisteina, nel secondo ho domini immunoglobulino-simili. Ho anche un tipo di recettore corrispondente al recettore per l'insulina e per l'IGF1: sono due recettori uniti nel dominio extracellulare da ponti disolfuro. Nei recettori tirosin-chinasici il dominio enzimatico è in mezzo tra un lobo superiore e un lobo inferiore: la proteina chinasi quando è in forma monomerica ha un'attività catalitica estremamente bassa ma comunque c'è, in modo da poter poi far partire il sistema. Il monomero è formato da due subunità legate fra loro da un ponte disolfuro. I recettori monometrici vanno incontro a dimerizzazione quando vengono attivati dal loro ligando. In particolare ho una zona che è l'activation lip (ansa di attivazione) che è un dominio che, nella configurazione inattiva, copre il sottodominio inferiore ovvero il lobo inferiore in modo tale da rendere la proteina cataliticamente inattiva. In termini probabilistici l'activation lip si trova in due tipi di conformazione: in conformazione chiusa ovvero

in posizione per la chiusura per cui la proteina è inattiva, se il coperchio è in conformazione aperta invece è consentita la dimerizzazione e la sua fosforilazione perché si attivi l'enzima rendendo disponibile il dominio catalitico. Il dominio catalitico difatti usa come substrato il recettore stesso secondo un processo di autofosforilazione crociata in cui una catena fosforila l'altra. La fosforilazione del lip induce un cambiamento conformazionale nel dominio chinasi che si apre perché il fosfato, portando carica negativa ed essendo ingombrante, induce una repulsione. Così il dominio chinasi riesce a fosforilare gli altri residui di tirosina. I residui fosforilati di tyr vanno a favorire il legame con delle zone ad essi adiacenti con domini SH2 e PTB di altre proteine dove verrà poi trasmesso il segnale secondo la cascata di trasduzione. Questo significa che il sito di legame per le proteine a seguire se non fosforilato su tyr risulta inattivo.

L'RTK sulla membrana, dopo legame col fattore di crescita GF (es. EGF), dimerizza con la fosforilazione e lega un complesso Grb2-Sos e lo porta in membrana in modo tale da legare Sos a Ras che è presente anch'esso sulla membrana plasmatica. La proteina Grb2 è formata da un dominio SH2 che lega il P legato a tyr sul recettore e poi due domini SH3 che interagiscono con degli effettori a valle: il primo SH3 interagisce con Sos legando domini ricchi di prolina che si trovano a valle di Sos. A monte della Sos ho domini funzionali che legano Ras-GEF in modo da far uscire GDP a favore di GTP. A valle della attivazione di Ras, troviamo diverse vie di trasduzione del segnale. La parte a monte è comune mentre a valle possono verificarsi diversi eventi. Una delle più importanti è la cosiddetta via delle MAPK in cui abbiamo una serie di fosforilazioni a cascata che portano all'attivazione trascrizionale di una via specifica, in particolare vengono sintetizzate una serie di proteine coinvolte nella trascrizione G1/S. La via delle MAPK parte dall'interazione di Ras-GTP con una chinasi chiamata Raf1 che si attiva interagendo con la proteina. Raf1 allora fosforila MEK, che fosforila la MAPK (o ERK) che una volta fosforilata trasloca all'interno del nucleo. Il trasferimento nel nucleo porta alla fosforilazione di Jun o Ets, fattori a favorire trascrizione di geni precoci. Poi in associazione con Fos, Myc, prodotti da questi geni precoci, vi è la formazione di fattori di trascrizione che attivano la trascrizione dei geni tardivi come il fattore E2F per la trascrizione di cicline Cdk.

RUOLO DELLA FOSFORILAZIONE DELLE PROTEINE NEL CONTROLLO DELLA FUNZIONALITÀ CELLULARE: CHIARIRE LA LOGICA MOLECOLARE, ENUNCIARE I PRINCIPI ALLA BASE DELLA SPECIFICITÀ E CHIARITE CON UN ESEMPIO

La fosforilazione concorre a modificare lo stato funzionale di una proteina essa deve essere ristretta nel tempo e nello spazio sulla proteina che deve essere controllata. Dunque devo anche riuscire a eliminare il gruppo P. La fosforilazione è a carico di un residuo OH di una proteina che si può trovare su tre aa ovvero ser, thr e tyr. Un piccolo gruppo di chinasi batteriche fosforila anche his. Il donatore del P che viene trasferito sull'ossidrilico è una molecola di nucleotide trifosfato che non sia per forza ATP ma anche il GTP. Sulla proteina fosforilata quindi si trova un P in un legame con l'O col rilascio di una molecola di ADP. La rimozione del gruppo P invece presuppone l'idrolisi del legame e la liberazione del fosfato ma non comporta la sintesi di ATP, dunque non è l'esatto inverso in termini biochimici ma lo è in termini funzionali. Gli enzimi che trasferiscono un P su proteina sono chinasi, le proteine che catalizzano la funzione inversa invece sono le fosfatasi. La tyr è molto più ingombrante rispetto a ser e thr, e ciò è molto importante per la specificità.

Le fosforilazioni sono suddivise in base al fatto che quelle in ser/thr hanno un effetto sulla funzionalità catalitica degli enzimi, mentre quelle in tyr hanno spesso un effetto sulla localizzazione di una proteina o interazione con altre proteine.

Ho tre classi principali di chinasi classificate sulla base dei residui che posso fosforilare:

- classe I include le serina/treonina chinasi riesce a trasferire il P su uno dei questi residui, ma non sulla tyr
- classe II include enzimi in grado di trasferire un P su ognuno dei tre amminoacidi ed è una classe poco abbondante
- classe III include chinasi specifiche per la tyr. Qui troviamo le chinasi citosoliche (piccole e solubili) e le proteine recettoriali ovvero le RTK tra cui l'EGF

Vi sono diverse sequenze bersaglio (o sequenze consenso di fosforilazione) che sono molto diverse tra le differenti famiglie e sono espresse con un modulo abbastanza simile.

Isocitrato deidrogenasi → ho una ser113 che se fosforilata dalla chinasi corrispondente non riesce più a catalizzare la reazione. La sua fosforilazione introduce una carica negativa nel sito attivo che impedisce l'entrata dell'isocitrato, perché l'isocitrato è un acido carbossilico che quindi contiene delle cariche negative, che causano una repulsione di carica tra il substrato e l'intorno del sito attivo fosforilato.

Glicogeno fosforilasi → ho la ser14 che, se fosforilata, induce un cambiamento conformazionale reversibile che cambia la conformazione di un monomero rispetto all'altro e non permette l'azione dell'enzima a livello dell'apertura del sito attivo.

Per riuscire a capire la sequenza bersaglio di una proteina posso utilizzare dei piccoli peptidi che contengano la sequenza e riuscire a farli interagire con l'enzima. Lo posso fare col band shift essay esaminando lo spostamento della banda. Posso avere lo stato non fosforilato, lo stato ipofosforilato (pochi siti fosforilati) e stato iperfosforilato (tutti i siti fosforilati). Per controllare poi il fenomeno di fosforilazione in vivo, posso esaminare le proteine col western blotting e posso avere diverse bande date dal riconoscimento dell'anticorpo specifico dando un effetto di smearing. La proteina, se ha molti gruppi fosfato che pesano 80 Da l'uno, assume un profilo di migrazione che non dipende dalla massa aggiunta dei gruppi fosfato ma da fatto che siano elettricamente attivi a dare cariche negative. Una seconda possibilità è quella di avere anticorpi diretti contro uno specifico residuo fosforilato.

Un modo più diretto per vedere la fosforilazione è l'utilizzo della spettrometria di massa. Se immagino di avere una proteina fosforilata e una non fosforilata a livello di un singolo residuo amminoacidico avrò una differenza di 80 Da. Questa differenza la posso notare attraverso questa tecnica grazie alla misurazione del rapporto m/z. Se tratto con fosfatasi alcalina e vedo lo spostamento del picco di 80 Da vuol dire che il peptide che lo rappresentava era fosforilato. Le fosforilazioni sono suddivise in base al fatto che quelle in ser/thr hanno un effetto sulla funzionalità catalitica degli enzimi, mentre quelle in tyr hanno spesso un effetto sulla localizzazione di una proteina quindi su una localizzazione subcellulare o interazione con altre proteine. Il modo in cui il P esercita la sua azione dipende dalle caratteristiche chimico fisiche del gruppo fosfato: l'ingombro sterico e la carica. Se la serina o la treonina si trovano in uno spazio piccolo, l'aggiunta del P porta a un cambio drammatico della struttura della proteina nell'immediato intorno che si può trasmettere anche a lunga distanza sull'intera proteina.

INGEGNERIA PROTEICA

Tecniche di mutagenesi

Mutagenesi sito-diretta → presupposto di andare a mutare in maniera specifica una singola base amminoacidica. Ho un codone codificante per un amminoacido e voglio modificarlo in modo da codificare per un altro amminoacido: per far ciò cambio una, due o tre basi di quel codone a seconda di quello che voglio. Un esperimento di mutagenesi sito-diretta classica ha qualche problema perché se non so quale è l'amminoacido bersaglio desiderato nella posizione di mutagenesi vuol dire che devo vedere cosa accade cambiando con tutti i 19 amminoacidi per vedere che mutazione ottengo. Per cui posso chiamare questa mutagenesi semi-casuale perché so da dove parto ma non dove arrivo. Devo per questo cercare di ottenere con un'unica operazione di mutagenesi tutte le varianti che voglio: il codone deve essere sostituito da tutti gli altri codoni possibili in modo casuale. Utilizzo dunque 64 codoni che si inseriranno e porteranno a una variabilità casuale di proteine producibili. Vado a sintetizzare oligonucleotidi degenerati il che significa che si farà in modo che per un codone in una certa posizione utilizzo 4 oligo con una diversa base: ogni oligo generato nella prima variante potrà portare un codone ad essere unito nella seconda posizione con ognuno dei 4 nucleotidi e poi lo stesso per la terza posizione fino a ottenere 64 oligo diversi. Si usa un sintetizzatore che è in grado di sintetizzare su una colonna di sintesi un oligonucleotide in modo chimico: devo avere 4 reservoir ognuno configurato come fonte di una base differente. Nella sintesi chimica l'oligonucleotide è sintetizzato 3'→5'. Poiché si vogliono creare oligonucleotidi degenerati, si aprono tutti e 4 i reservoir allo stesso momento in modo da

ottenere nella colonna di sintesi miscele di tutti e 4 i nucleotidi. Questi oligonucleotidi dunque sono tutti differenti per il codone che portano in quella posizione: li utilizzo per la PCR e produco una grande quantità di varianti.

EpPCR → Il sistema della PCR in modalità error prone mi permette di generare una grande variabilità. E' una PCR condotta in condizioni tali che gli errori di replicazione vengano amplificati: utilizzo la Taq pol con bassa attività di proofreading, aumento la concentrazione di Mg^{2+} o lo sostituisco in parte con Mn^{2+} , inserisco un solvente come il propanolo all'8% che interferisce con l'attività dell'enzima, infine molto importante è anche utilizzare concentrazioni non molto elevate di nucleotidi. Posso inserire anche degli analoghi di nucleotidi come la 2-aminopurina (sostituisce A ma lega C) o il 5-bromouracile al posto della timina che lega G, ciò mi porta a mutazioni a livello di una singola base. Tra le polimerasi che posso utilizzare vi sono quelle modificate ad-hoc che hanno un deficit nell'incorporazione dei nucleotidi. Per lo stesso meccanismo di funzionamento della PCR vedo che gli eventi mutazionali nei primi istanti vengono amplificati e dunque saranno over rappresentati nelle amplificazioni successive: per cui una mutazione iniziale domina rispetto ad una mutazione finale. Alcuni aa possono essere sostituiti preferenzialmente al posto di altri e ciò dipende dal codice genetico.

DNA shuffling → Tra gli altri metodi abbiamo quelli di ricombinazione che si basano sulla possibilità di fare ricombinazione genetica fra geni diversi o fra famiglie di geni ottenuti per mutagenesi: ciò mi consente di avere un numero abbastanza elevato di varianti geniche che uso per effettuare il mio lavoro. Più è alta la frequenza di mutagenesi e più mutazioni contemporanee ho all'interno della proteina, allontanandomi sempre di più dalla sequenza naturale. Si parte da una famiglia genica di mio interesse e alla fine ottengo una serie di geni ibridi in cui si interdisperdono sequenze che provengono da DNA di specie diverse. La procedura si avvale di diversi passaggi:
I. frammentazione del DNA di partenza con DNasi: devo tagliare in maniera casuale non specifica, perciò non uso un enzima di restrizione, per questo utilizzo la DNasi I. Se faccio digestione non completa con questo enzima, ottengo su gel d'agarosio un'eterogeneità di dimensioni. A questo punto estraggo direttamente dal gel o con tecniche cromatografiche, i frammenti che mi interessano che saranno di circa 50-70 bp.

II. ricostruzione di frammenti genici: devo fare in modo tale da costituire la lunghezza del gene per cui passo a frammenti a ssDNA aumentando la temperatura e preparandoli per la PCR che dovrà effettuare in modo corretto. I frammenti a singolo filamento che si sono formati possono ibridarsi fra di loro a livello centrale, quindi avrò due estremità 5': la polimerasi sintetizza i pezzi mancanti a dare dei frammenti maggiori in dimensioni rispetto ai frammenti iniziali. Ad ogni passaggio di amplificazione per cui avrò la formazione di frammenti ibridi sempre più grandi fino ad avere alla fine dei frammenti di DNA con la stessa lunghezza di partenza ma, che contengono sequenze tutte differenti in modo da creare una variante unica.

RATIONAL DESIGN → mutagenesi sito direttamente

SEMIRATIONAL DESIGN → spazio di sequenza. Scambio combinatorio di frammenti: 1 modellazione per omologia 2 primer omologhi a regioni esterne

DIRECTED EVOLUTION → 1 libreria DNA mutanti 2 selezione 3 screening 4 secondo ciclo di evoluzione diretta

PHAGE DISPLAY

Il phage display è una tecnica che consente di esprimere delle proteine o frammenti di proteine sulla superficie di un fago filamentoso. Il punto preliminare per fare l'analisi è quello di costruire delle proteine di fusione tra una proteina del capsido fagico e la proteina che si vuole studiare.

Successivamente si dovranno selezionare quelle varianti delle proteine di fusione che si legano in modo più efficace al recettore e sulla base del sequenziamento del DNA ottenuto all'interno delle particelle fagiche, si potrà identificare la sequenza responsabile della maggiore interazione con il recettore.

Il phage display è un metodo per operare la selezione molecolare sulla base dell'affinità di legame proteina-ligando. La selezione viene fatta a livello della funzionalità della proteina e la mutazione

introdotta viene identificata sequenziando il DNA contenuto all'interno della particella fagica. Nella prima fase dell'esperimento si esprimono le varianti della sotto forma di proteina di fusione e si formano delle particelle di fagemide. Le varianti si prendono da una libreria ottenuta per mutagenesi a saturazione. Il fagemide ha un'origine di replicazione fagica e un'origine di replicazione plasmidica e a seconda delle condizioni in cui viene inserito in E.coli si comporta come un plasmide o come un fago. Per potersi comportare come un fago, si deve aggiungere il fago helper che porta su un separato genoma il resto delle proteine che servono per assemblare il fago. Il fago helper manca della proteina sotto forma di proteina di fusione, che è presente nel fagemide. All'N- terminale della proteina di fusione si trova la proteina di interesse, che invece che essere fuso in frame direttamente con la proteina 3 o 8 del fago M13, si trova nella stessa fase di lettura: in mezzo è stato inserito un codone TAG. Quindi esprimendo questa proteina di fusione in un normale ceppo batterico, TAG viene riconosciuto come un codone di stop e quindi non viene espressa la proteina di fusione. Se questa proteina viene espressa in un ceppo soppressore che ha un tRNA che riconosce il TAG inserendo un amminoacido, TAG non viene letto come codone di stop e si produce la proteina di fusione. Poi le varianti della proteina espresse come proteine di fusione sulle particelle di fagemide, vengono selezionate usando il recettore della proteina legato a una superficie solida. Si troveranno mutanti che non si legano, che vengono persi attraverso il lavaggio (tampone di glicina a pH 2), e un pool arricchito di varianti che si legano al recettore. Il pool può essere processato più volte, in modo da essere sicuri che si leghi specificatamente al recettore, oppure si può operare a condizioni sempre più restrittive, in maniera tale che solo le proteine che si legano in maniera molto forte riescano a passare la selezione. Non è detto che queste siano varianti migliori rispetto al wild type, perché non si è imposto nessun metodo di screening che consenta di favorire varianti con un'affinità maggiore del wild type, rispetto a quelle che hanno affinità uguale o più bassa del wild type, quindi si varia l'eluizione dei fagi selezionati. Viene effettuato un trattamento di eluizione in cui il distacco del fago dalla piastra viene effettuato mediante l'interazione con la proteina stessa stesso che compete con le varianti: in questo modo si isoleranno solo quelle varianti con affinità uguale o maggiore al wt. Infine si andrà a sequenziare il DNA a singolo filamento del fagemide esprimendo il fagemide in un ceppo di E.coli non soppressore in modo tale da isolare solo la proteina di interesse per fare l'analisi di legame al recettore. Nel ceppo soppressore, il codone TAG viene letto normalmente come un codone di stop, in modo da ottenere la proteina nella forma solubile, non fusa alla proteina 3 o 8 di M13, in modo tale da usarla per fare saggi quantitativi sull'affinità di legame con il recettore e determinare la costante di dissociazione. Inoltre isolo l'ssDNA che caratterizza la mia variante migliorata ed effettuo sequenziamento in modo da conoscerne precisamente la sequenza.

Ogni volta che si trova un'alterazione dell'efficienza con cui le proteine interagiscono, questo avviene per due motivi:

- viene alterata specificatamente la superficie di interazione
- per un effetto indiretto, dove la mutazione effettuata sulla proteina è in una posizione che non appartiene alla superficie di legame, ma questa mutazione introdotta provoca un cambiamento conformazionale nella struttura tridimensionale, che si ripercuote a distanza sulla superficie di interazione.

Per poter discriminare tra queste due possibilità si deve conoscere l'epitopo strutturale, infatti se si trova un residuo che influenza fortemente l'affinità di legame, ma non fa parte dell'epitopo strutturale, vuol dire che si ha un cambiamento strutturale della proteina, ed è stato proprio questo a dare un'alterazione nel legame.

Verificando il rapporto KD_{mut}/KD_{wt} (maggiore è questo rapporto, più si perde affinità), si vede come a seconda dei frammenti che sono stati alterati, si possono avere modifiche di affinità.

L'epitopo strutturale è un sovra insieme dell'epitopo funzionale, ovvero non tutti i residui che fanno parte dell'interazione sono importanti per l'interazione stessa.

PROBLEMA

PROPORRE ALMENO UNA STRATEGIA PER IDENTIFICARE VARIANTI DI UNA PROTEASI CON RIDOTTA KM. DETTAGLIARE: PRESUPPOSTI, METODOLOGIE ED ESPERIMENTI PER LA VALIDAZIONE

LA FIGURA RAPPRESENTA IL PATTERN DI MIGRAZIONE SU GEL 2D DELLA REGUCALCINA. SUGGERITE LE POSSIBILI MODIFICHE DI CIASCUNA POSIZIONE (A-B) E MOTIVARE LA RISPOSTA

A → è probabilmente andata incontro a modifiche post-traduzionali come per esempio fosforilazione, glicosilazione o lipidazione perché il peso molecolare è più alto. È variato il punto isoelettrico perché il gruppo fosfato da carica negativa alla molecola.

B → probabilmente è appena stata trasferita in un organello e ha perso la sequenza segnale. Ha subito un taglio della sequenza segnale grazie a una peptidasi durante il passaggio in un organello.

INIBIRE LA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE DEL GLUGAGONE PER RIPRISTINARE IL METABOLISMO GLUCIDICO (IDEA, METODO, RISULTATI)
CESSAZIONE DELLA TRADUZIONE DEL SEGNALE

I recettori devono essere attivati ma anche inattivati in modo da permettere alla cellula di rispondere ad altri segnali. I recettori vengono rimossi mediante endocitosi. Desensitizzazione di un recettore accoppiato a proteine eterotrimeriche fosforilazione-dipendente: il recettore viene fosforilato in semplici siti, viene riconosciuto da proteine dette arrestine che agiscono in due modi: determinano ingombro sterico impedendo l'interazione con il trasduttore intracellulare (protein G) permettono il riconoscimento del recettore. I recettori possono essere attivati non solo dal legame con un ligando ma anche da variazioni nella concentrazione di un metabolita come l'ossigeno o i nutrienti, oppure da stimoli di tipo fisico come luce, contatto, calore. Il legame ligando-recettore è altamente specifico e dipende dalla formazione di forze non covalenti, ma ioniche, Van der Waals, interazioni idrofobiche. Il legame deve essere irreversibile.

L'ORMONE PROTEICO GOOFY LEGA IL PROPRIO RECETTORE SCROOGE ATTIVANDO UNA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE CHE (QUANDO IPERATTIVA) PORTA A DIFETTI NELLO SVILUPPO CEREBRALE. NOTA LA STRUTTURA 3D DEL COMPLESSO GOOFY-SCROOGE, PROPONETE ALMENO UNA STRATEGIA PER OTTENERE UNA MOLECOLA CON ATTIVITÀ ANTAGONISTA CAPACE DI INIBIRE TALE DIFETTO. ESPONETE I PRESUPPOSTI SU CUI SI BASA LA VOSTRA PROPOSTA, DELINEATE L'APPROCCIO METODOLOGICO ED INDICATE CON PRECISIONE QUALI RISULTATI VI ATTENDERETE AL TERMINE DEI VOSTRI ESPERIMENTI

UN CONFRONTO TRA IL GENOMA E IL PROTEOMA UMANO RIVELA CHE ESISTONO 2000000 DI PROTEINE STIMATE MA SOLO 23000 GENI. FORNIRE UNA BREVE SPIEGAZIONE DI TALE DISCREPANZA

A partire da un singolo gene possiamo avere più trascritti che possono avere diversi livelli di maturazione. Sappiamo che le proteine possono andare incontro a diverse modificazioni post traduzionali che sono connesse con la stabilità della struttura proteica, con la sua funzionalità, con la localizzazione, ecc. Quindi da un unico trascritto posso originare diversi prodotti proteici che differiscono sia dal punto di vista della struttura primaria che dal punto di vista della funzione.

Un esempio delle modificazioni post traduzionali che può subire una proteina è la glicosilazione, in particolare la N-glicosilazione o la O-glicosilazione.

La glicosilazione conferisce protezione dalle proteasi e dalle alte temperature.

L'N glicosilazione avviene su un residuo di asparagina che si trova in una determinata sequenza ovvero Asn-X-Ser/Thr dove X sta per qualsiasi amminoacido fuorchè la Prolina. Il donatore dell'oligosaccaride è il dolicolo, formato da unità isopreniche ripetute circa 20 volte. Il dolicolo

reagisce con il CTP a formare dolicolo-P e CDP. Il dolicolo-P reagisce poi con l'oligosaccaride a formare dolicolo-PP-oligosaccaride grazie all'enzima glicosil transferasi. L'oligosaccaride è costituito da 3 molecole di glucosio, 9 di mannosio e 2 di N-acetilglucosammina. Questo gruppo è trasferito poi all'asparagina grazie alla oligosaccaril transferasi: si crea un legame beta-N-glicosidico tra NH₂ dell'Asn e l'OH dello zucchero.

DEFINIRE IL PROTEOMA E ILLUSTRATE IL FLUSSO OPERATIVO DI UN ESPERIMENTO DI 2D-DIGE, DALLA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE, ALL'ANALISI DEI DATI

Posso definire il proteoma come l'insieme di proteine presenti in un tipo cellulare in una data condizione fisiopatologica. Le proteine oltre che all'interno di una cellula possono essere secrete all'esterno dunque distinguo endoproteoma ed esoproteoma. A partire da un singolo gene possiamo avere più trascritti che possono avere diversi livelli di maturazione. Sappiamo che le proteine possono andare incontro a diverse modificazioni post traduzionali che sono connesse con la stabilità della struttura proteica, con la sua funzionalità, con la localizzazione, ecc. Quindi da un unico trascritto posso originare diversi prodotti proteici che differiscono sia dal punto di vista della struttura primaria che dal punto di vista della funzione. La proteomica è la tecnologia che studia le proteine tenendo conto di tutte queste modificazioni e deve essere in grado di fornirci tutte le informazioni contenute nell'endoproteoma o nell'esoproteoma che stiamo considerando. Noi dobbiamo studiare nella proteomica dei data set molto complessi: il dato che ottengo dall'analisi potrà essere espresso sotto forma di una lista di proteine o una lista di proteine differientemente espresse (analisi di comparazione) che deve essere elaborata e analizzata mediante tecniche simili a quelle utilizzate nella trascrittomica. Posso usare difatti dei database come KEGG o GO.

La 2D DIGE è un esempio di tecnica top down per lo studio del proteoma. In questa tecnica le proteine le separo attraverso un'isoelettrofocalizzazione e poi con l' SDS PAGE in modo da ottenere alla fine un'elettroforesi bidimensionale. Il potere separativo che ho è dato dal prodotto del potere separativo delle due tecniche che rispettivamente separano per pI e per massa. Posso tagliare con un accurato livello di precisione l'area corrispondente allo spot (spot picking). Per questo motivo faccio l'elettroforesi 2D in cui marco il campione con delle cianine che si legano alle proteine che danno una particolare fluorescenza (rossa o verde): marco i due campioni presi in condizioni diverse con due fluorescenze differenti. Metto insieme i due campioni ponendo la massima attenzione nell'utilizzare la stessa quantità di estratto per entrambe le marcature, faccio l'elettroforesi e acquisisco l'immagine attraverso uno scanner che legge la fluorescenza. In alcuni casi ho delle proteine che hanno entrambe le fluorescenze o delle proteine che ne hanno solo una. La quantità di fluorescenza viene stabilita dal mio software e le rapporta nei due campioni in modo tale da capire se la proteina sia espressa in una o in un'altra condizione e in quali quantità.

Dopo aver isolato una specie proteica in un frammento di gel posso procedere in due direzioni:

- MALDI-TOF: faccio una digestione proteica con un enzima (es. tripsina), il digerito lo sottopongo ad un'analisi di spettrometria di massa in cui ottengo un profilo di peptidi in cui ho una serie di picchi a rappresentarmi diverse masse. Questa analisi di peptide fingerprinting mi permette di confrontare il profilo peptidico sperimentale con il profilo di proteine che conosco attraverso traduzione simulata seguita da una simulazione della digestione con tripsina da cui ricavo teoricamente le diverse masse peptidiche. Posso avere una totale sovrapposizione oppure un disaccordo negli spettri, per cui non ho sempre un'elevata sicurezza della procedura sperimentale perché mi baso su dati probabilistici. Lo strumento utilizzato è il MALDI-TOF in cui i peptidi generati sono assorbiti da una matrice e fatti passare da una parte all'altra dello strumento calcolando il tempo di percorrenza chiamato tempo di volo
- Spettrometria di massa in tandem: ottengo dapprima un profilo di spettrometria simile a quello ottenuto dal MALDI, ma ogni peptide viene sottoposto a ulteriori analisi in cui il peptide viene frammentato. La frammentazione ulteriore toglie uno o più aa al peptide. Dal momento che i singoli aa hanno delle masse molecolari diverse allora una semplice analisi di sottrazione di dimensioni di peptide frammentato rispetto a quello intatto mi indica quali

aa siano stati tolti. E' un modo per ottenere dunque la sequenza peptidica. Quindi quello che comparo è la sequenza peptidica: anche qui non ho una certezza ma i livelli di confidenza sono più elevati rispetto alla prima tecnica. Inoltre se ho un peptide fosforilato avrò una massa specifica per il residuo di ser, thr o tyr fosforilata. E' chiaro che quando faccio un'analisi di tipo differenziale devo sapere anche quali siano le proteine nel gel e quali siano quelle che cambiano in diverse condizioni.

DEFINIZIONI

DEFINIRE QUALI CARATTERISTICHE SONO ATTRIBUITE A "MOLTEN GLOBULE", "PRE-MOLTEN GLOBULE" E "RANDOM COIL"

Pre-molten globule → proteina che inizia a presentare pochi elementi di struttura secondaria. Si iniziano a intravedere alpha eliche e beta foglietti ma comunque molto presente random coil.

Molten-globule → inizia ad assumere una conformazione tridimensionale, più compatta (diminuzione del raggio idrodinamico della proteina). Struttura secondaria che inizia a diventare terziaria (quasi foldata)

Random coil → stato disordinato della struttura di una proteina, in cui le conformazioni possibili sono moltissime. Il random coil è l'effetto dell'azione di agenti denaturanti sull'organizzazione strutturale delle proteine native che, distruggendo le interazioni non covalenti, generano una struttura disorganizzata ed estremamente flessibile. Per niente foldata.

COS'È UNA STOP TRANSFER SEQUENCE

È una sequenza transmembrana idrofobica di una proteina. La stop transfer sequence costituita da residui amminoacidici idrofobici posta dopo la sequenza segnale all'N-terminale.

La proteina scorre attraverso il poro finché non si inserisce nel traslocone la stop transfer sequence. Il traslocatore cambia conformazione si apre lateralmente, in questo modo viene arrestato il processo di traslocazione e quindi la proteina si dissocia e diffonde nello strato fosfolipidico. La peptidasi rimuove la sequenza segnale di importazione, l'Nterminale libero rimane all'interno del reticolo mentre il C-terminale all'esterno.

DESCRIVERE COME SI ALLESTISCE UN SAGGIO DI SCAMBIO DEL NUCLEOTIDE GUANILICO LEGATO A RAS

saggio → Inizialmente si ha una proteina Ras legata a GDP. Viene aggiunto (in un campione opportuno contenente magnesio) il nucleotide fluorescente che avrà una fluorescenza di base (valore zero) e GEF proteina che catalizza la reazione. Avviene lo scambio GDP non fluorescente/GTP fluorescente. Viene monitorata contemporaneamente l'uscita del nucleotide non fluorescente (non direttamente mediante fluorescenza ma perché è una condizione indispensabile affinché entri il nucleotide fluorescente) e l'ingresso della molecola fluorescente.

DEFINIRE COS'È UN EFFETTORE OMOTROPICO POSITIVO

Un effettore omotropico positivo è un effettore che si lega ad un enzima allosterico e che può dare un effetto di attivazione dell'enzima. L'effettore viene definito omotropica perché ha una conformazione simile al substrato dell'enzima quindi si legherà nel sito catalitico. Esistono poi effettori eterotropici che invece hanno una conformazione diversa rispetto al substrato.

DEFINIRE COSA SI INTENDE PER ARRICCHIMENTO IN TERMINI DI GO ALL'INTERNO DI UNA LISTA DI GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI

Per arricchimento dei termini GO all'interno di una lista di geni si intende quando alcuni geni sono presenti in quantità maggiori rispetto a quella prevista all'interno della lista. Questo solitamente indica che i geni a cui fanno riferimento questi termini sono maggiormente espressi nella condizioni che si stanno analizzando