

**1) Come si sceglie la soluzione tamponante dove inserire le proteine? Motiva la tua risposta**

Uno delle variabili fondamentali da considerare prima della preparazione di un estratto grezzo è il tampone da utilizzare. Il tampone ha la funzione di mantenere il valore di pH all'interno della soluzione stabile e costante, in modo da limitare e "tamponare" le variazioni di pH indotte dall'aggiunta di basi o di acidi.

Generalmente si preferisce utilizzare un acido debole con la sua base coniugata per formare un soluzione tampone. La costante di dissociazione acida  $K_a$  permette di definire l'equilibrio della reazione ed è calcolata come il rapporto tra la forma dissociata e la forma associata dell'acido. Da questa si può calcolare un altro valore fondamentale in biochimica, ovvero la  $pK_a$ , definita come il  $-\log K_a$ . Esiste una relazione diretta tra pH e  $pK_a$ , definita dall'equazione di Henderson-Hasselbach:  $pK_a = pH + \log K_a$ , che indica quindi i valori di  $pK_a$  in base alle variazioni di pH. Quando le concentrazioni di acido dissociato e della sua base coniugata sono uguali, si instaura un equilibrio e la  $pK_a$  risulta essere uguale al pH. In questo caso viene massimizzata la capacità tamponante del sistema. Per questo motivo è ideale utilizzare valori di  $pK_a + 0 - 1$  del valore del pH. Nel caso si utilizzi una base come tampone, si andrà a definire la costante di dissociazione basica, ma il concetto è analogo a quello prima elaborato.

Parlando di proteine, esse sono molecole caratterizzate da una carica netta, data dai gruppi ionizzabili acidi e basici presenti sulle catene laterali degli amminoacidi. Il loro stato di ionizzazione varia in base al valore del pH della soluzione in cui si trovano. La  $pK_a$  delle proteine dunque non è un valore assoluto, ma è un valore medio che rispecchia le caratteristiche della struttura e la funzione della proteina stessa. Ad esempio, una Lys associata in ponti salini sarà più basica di una Lys libera nel solvente.

Questo è anche visibile graficamente tramite curve di titolazione, che mostrano l'andamento della carica netta in funzione del pH. Le curve sono decrescenti perchè la carica netta diminuisce all'aumentare di pH, dato che in questo modo i gruppi acidi tendono a deprotonarsi, spostando l'equilibrio verso la dissociazione. Il punto isoelettrico è una caratteristica intrinseca delle proteine e corrisponde al valore di pH al quale la carica netta della proteina è uguale a zero. Esso si può identificare graficamente nei punti di intersezione della curva di titolazione con la linea dello zero.

**2) qual è l'effetto dei sali caotropici in una soluzione e cita un esempio**

Un aspetto fondamentale da considerare quando si vuole preparare un estratto grezzo è la concentrazione salina, strettamente legata alla forza ionica. Secondo il principio del "il simile scioglie il simile", dato che le proteine sono composti anfoteri dotate di gruppi carichi, risultano più solubili a basse concentrazioni di sali, data la presenza di ioni. Se aumentiamo la concentrazione di sali all'interno della soluzione, si può verificare una situazione di riduzione della solubilità, con successiva precipitazione delle proteine in agglomerati insolubili.

Possiamo però valutare in modo differente l'azione dell'aumento della solubilità sulle proteine, in base alle caratteristiche dei sali.

Ad alte concentrazioni, esistono sali che favoriscono il fenomeno del "salting-in". Essi sono chiamati sali caotropici, che interferiscono nella struttura ordinata dell'acqua, aumentando la probabilità di formazione di strutture disordinate chiamati clatrati. Questo diminuisce l'effetto idrofobico e, nonostante ci sia un aumento della solubilità, le proteine tendono a una parziale denaturazione rimanendo però in soluzione. I sali caotropici sono soggetti al fenomeno del "preferential exclusion". I sali caotropici sono formati dagli ioni posti nella parte destra della scala di Hoffmeister, come per esempio il guanidinio e l'urea.

D'altro canto, ad alte concentrazioni, esistono sali che sfavoriscono la solubilità di una proteina, chiamati sali cosmotropici. Essi favoriscono il fenomeno del "salting-out", per il quale, una proteina, seppur rimanendo nella sua struttura nativa, precipita in agglomerati insolubili, causati dal fatto che i sali interagiscono con l'acqua, lasciando le proteine disidratate e soggette maggiormente all'effetto idrofobico. Questi sali, che sono composti dagli ioni posti a sinistra della serie di Hoffmeister, come il solfato di ammonio, sono sottoposti al fenomeno del "preferential binding".

**3) quali tecniche di separazione del solvente conosci?**

Una tecnica utilizzata per la separazione selettiva del solvente dal pellet contenente le proteine d'interesse è la dialisi. Essa è una tecnica che permette di sostituire il solvente e rimuovere piccoli soluti. Il campione viene inserito in una membrana semipermeabile con cut-off inferiore per le proteine e maggiore per il solvente da eliminare. Esso viene inoltre inserito in un buffer: le piccole molecole diffondono secondo gradiente di concentrazione. Dopo aver raggiunto l'equilibrio, si cambia il buffer esterno e si ripete la procedura fino a completa rimozione dei soluti iniziali. Si ottiene così un campione purificato in un nuovo solvente.

Esiste anche la tecnica di ultrafiltrazione che si presenta e si attua in modo analogo alla dialisi, con l'aggiunta però di un sistema di pompe e di una centrifuga.

**4) perchè bisogna raffreddare il campione durante la preparazione di un estratto grezzo?**

Tutte le tipologie di lisi cellulare meccanica, quindi i metodi di rottura della membrana e della parete cellulare mediante l'applicazione di una trazione meccanica, prevedono un riscaldamento del campione. È necessario quindi alternarli con incubazioni sequenziali su ghiaccio. L'aumento della temperatura causa una denaturazione delle proteine e una possibile riattivazione dell'attività proteolitica delle proteasi.

**5) parallelo tra due forze apparenti: forze idrofobiche e forze centrifughe**

L'effetto idrofobico è fondamentale per il mantenimento del folding proteico all'interno di una soluzione. Quando i gruppi idrofobici delle proteine sono esposti al solvente acquoso, le molecole di acqua si organizzano in strutture ordinate, chiamati clatrati, intorno al soluto idrofobico, formando delle sfere di solvatazione. Questo è un fenomeno termodinamicamente sfavorito. Invece, quando i gruppi idrofobici si associano tra di loro, avviene una riduzione nella superficie esposta al solvente acquoso e molte molecole di acqua vengono rilasciate nell'ambiente. Questo comporta un aumento dell'entropia del sistema, che compensa la perdita di entropia delle proteine. Il fenomeno è dunque termodinamicamente favorito. Non esiste una forza effettiva che traina l'effetto idrofobico, ma l'associazione dei gruppi idrofobici delle proteine è alimentata dalla spinta entropica generata dal solvente, che costringe i gruppi apolari ad avvicinarsi, per minimizzare l'interazione con l'acqua.

Un'altra forza apparente fondamentale è la forza centrifuga, molto rilevante quando si parla delle varie tecniche di centrifugazione. Essa è definita come il prodotto tra la velocità angolare e il quadrato del raggio. La centrifugazione è una tecnica che permette di velocizzare il processo spontaneo di sedimentazione della particelle che avviene a causa della forza gravitazionale. Per generare un campo centrifugo, e dunque una forza centrifuga, è necessario applicare un rotore, ad angolo fisso o ad angolo mobile, che ruota intorno a un asse. Non esiste un'effettiva interazione tra la massa all'interno della provetta posta nel rotore e l'esterno, ma il risultato è dato dall'inerzia del corpo che si oppone al cambio di direzione imposto dalla rotazione.

**6) Quali forze ci sono in gioco in un esperimento di centrifugazione e come influenzano il comportamento dei nostri analiti?**

Le forze in gioco in un esperimento di centrifugazione sono differenti:

-La forza centrifuga, definita come  $\frac{3}{4}\pi R_p^3 \rho_p \omega^2 r$

-La forza di Archimede, pari al volume di liquido spostato e opposta alla forza centrifuga, definita come  $\frac{3}{4}\pi R_p^3 \rho_m \omega^2 r$

-La forza di attrito, che entra in gioco solo se la velocità di sedimentazione è diversa da zero, quindi in condizioni di NON equilibrio, definita come  $6\pi\eta R_p v$

-La forza netta di sedimentazione, che è data dalla differenza tra la Forza Centrifuga e la Forza di Archimede.

$$F_s = F_c - F_A = \frac{3}{4}\pi R_p^3 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 r$$

Si possono dunque, in base alle densità, definire differenti situazioni:

-Se la densità della particella è uguale alla densità del mezzo, la forza di sedimentazione è uguale a zero.

-Se la densità della particella è maggiore della densità del mezzo, avremo sedimentazione e quindi prevale la forza centrifuga.

-Se la densità della particella è minore della densità del mezzo, avremo galleggiamento e prevale la forza di Archimede.

Dopo un breve transitorio, si raggiunge, all'interno dell'esperimento di centrifugazione, un equilibrio tra le varie forze, dove la risultante tra di esse è pari a zero e la particella si muove a velocità costante. La velocità costante di sedimentazione è definita come  $v = R_p^2 (\rho_p - \rho_m)$  e può essere espressa in Svedberg, unità fondamentale in biochimica.

Il fatto che la risultante tra le forze sia nulla, non indica un'assenza di forze, ma significa che l'accelerazione è nulla, trascurando ovviamente  $g$ , la velocità è costante e la particella si muove di moto rettilineo uniforme.

I protocolli di centrifugazione sono strettamente influenzati dall'andamento di queste forze. Infatti possiamo definirne due tipologie: la centrifugazione all'equilibrio, in cui la velocità di sedimentazione è costante, uguale a zero, e la centrifugazione non all'equilibrio.

Nella centrifugazione non all'equilibrio, come quella differenziale e quella zonale, i campioni vengono sottoposti a variazioni di velocità e di tempi di centrifugazione, consentendo la sedimentazione sequenziale dei componenti.

Per quanto riguarda la centrifugazione all'equilibrio, come quella isopinica, la densità della particella è uguale a quella del mezzo, di conseguenza la forza centrifuga e la forza di Archimede sono uguali e opposte e la forza di attrito è pari a zero.

**7) Che tipo di centrifugazione usiamo per separare le componenti cellulari all'inizio del processo di purificazione?**

Per separare le componenti cellulari all'inizio del processo di purificazione, usiamo il protocollo di centrifugazione differenziale. È una tecnica non all'equilibrio e permette di separare i componenti sulla base delle loro dimensioni e densità. I campioni vengono sottoposti a velocità e tempi di centrifugazione differenti, consentendo la sedimentazione sequenziale. Ottengo così pellet sempre differenti.

**8) Come si prepara il gradiente di densità per le tecniche di centrifugazione zonale e isopinica?**

La centrifugazione secondo gradiente di densità non all'equilibrio, quindi la centrifugazione zonale, utilizza come gradiente di densità il saccarosio e le particelle sedimentano in base alla velocità di sedimentazione.

La centrifugazione isopinica utilizza anch'essa un gradiente di densità. Le molecole migrano fino al raggiungimento del punto del gradiente in cui la loro densità eguaglia quella del mezzo circostante. È una tecnica indipendente dal tempo di centrifugazione: le particelle non sedimentano oltre il loro punto di equilibrio. In questo caso, il gradiente di densità è creato da cloruro di cesio.

In entrambi i casi, sia il cloruro di cesio che il saccarosio, sono molecole più piccole rispetto alle proteine e diffondono più velocemente. I gradienti sono quindi creati in modo tale da ottimizzare la velocità di rotazione al fine di creare un equilibrio tra diffusione e sedimentazione. Dunque, nel caso della centrifugazione isopinica, la diffusione deve essere utilizzata per creare un gradiente di densità. In provetta s'inserisce sia il campione, che il cloruro di cesio a concentrazioni omogenee. La

centrifugazione viene portata avanti ottimizzando i tempi e le velocità di rotazione, in modo tale da favorire la formazione del gradiente, mentre l'analita si sposta in su e in giù fino a quando non incontra la zona con la densità uguale alla propria.

### 9) In quale tecnica non si trascura il fenomeno di diffusione?

Il fenomeno di diffusione non si può trascurare in due tecniche di centrifugazione: nella centrifugazione isopinica e nell'ultracentrifugazione analitica con protocollo all'equilibrio di sedimentazione.

Per il primo caso vedere la risposta alla domanda precedente.

Nella centrifugazione analitica con protocollo all'equilibrio di sedimentazione si lavora a un basso numero di g, così da non trascurare la diffusione. La diffusione è un fenomeno che tende a far spostare le molecole secondo gradiente di concentrazione. Avendo una zona ad alta concentrazione e una a bassa concentrazione di analiti, in assenza di barriere, viene promosso lo spostamento delle molecole dalla regione a più alta concentrazione a quella a più bassa concentrazione. La diffusione agisce in modo opposto alla forza centrifuga, che invece tende ad accumulare tutti gli analiti verso la parte esterna, quella più ad alta concentrazione. Ottimizzando la velocità di rotazione, è possibile raggiungere una condizione in cui la forza centrifuga e la diffusione sono esattamente bilanciate. In questo modo, la velocità di sedimentazione interna è nulla e si instaura un gradiente di concentrazione stabile all'interno della provetta.

### 10) Come definiamo la risoluzione della cromatografia e che valori consideriamo soddisfacenti?

La risoluzione è un parametro fondamentale per valutare l'andamento di un cromatogramma. Essa è la misura di quanto possono essere simili i tempi di ritenzione di due composti perché eluiscano in due picchi distinti. Maggiore è la risoluzione, più gli analiti saranno separati al meglio. Una bassa risoluzione, invece, può essere indotta da un errato caricamento di volumi troppo grossi o di una quantità di proteine superiore alla capacità della colonna. Per avere picchi risolti, devo avere una distanza tra due massimi maggiore alla somma delle semi-ampiezze alla base, ovvero della somma di una metà di destra e di una metà di sinistra.

La risoluzione è quindi definita come 
$$R = \frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2 / 2}$$

Se R risulta uguale a 1, i due picchi risulterebbero essere sovrapposti, dato che le due semi-ampiezze si calcolano prendendo in considerazione i punti d'intersezione con l'asse x delle tangenti.

Quindi per avere dei picchi abbastanza risolti, è utile che la risoluzione sia maggiore di uno, circa 1,5.

### 11) Come posso aumentare il numero di piatti teorici?

I piatti teorici sono un valore fondamentale da considerare per definire l'efficienza cromatografica. Si calcola come 
$$N = 16 \left( \frac{L}{w} \right)^2$$
 Quando otteniamo un rapporto elevato, significa che l'ampiezza della curva è molto inferiore rispetto alla lunghezza della colonna e dunque avremo una buona efficienza cromatografica. Il numero di piatti teorici può essere aumentato allungando la colonna, riducendo il volume di caricamento e aumentando, a parità di lunghezza d'onda, la superficie attiva della resina usando sfere più piccole, amplificando così le interazioni.

### 12) Come si può eluire una proteina idrofobica alla resina?

Per staccare gli analiti, è necessario indebolire le interazioni elettrostatiche tra proteine e fase stazionaria. Possiamo utilizzare due metodi differenti:

-Aumento della forza ionica a causa dell'aggiunta di sale, tipicamente NaCl.

Il sale scherma le cariche, indebolendo così le interazioni. NaCl è un sale ideale poiché i suoi ioni sono neutri nella scala di Hoffmeister, dunque si evitano effetti indesiderati come salting out o denaturazione. A volte è utile ricorrere a un gradiente di sale discontinuo. Questo permette l'eluizione sequenziale degli analiti: prima eluiscono quelli più debolmente legati o con carica minore, poi eluiscono quelli con carica maggiore o con affinità maggiore.

-Modificando il pH della fase mobile si alterano direttamente le cariche nette delle proteine, riducendo l'affinità per la resina. Per uno scambiatore anionico, si usa un gradiente di pH decrescente, mentre per uno scambiatore cationico si usa un gradiente di pH crescente.

-Utilizzo di un mezzo più polare, con variazione della costante dielettrica del mezzo.

### 13) Come posso eluire una proteina da una colonna a fase inversa?

L'eluizione si effettua tipicamente aumentando in gradiente la concentrazione di un solvente organico apolare, come metanolo, che riduce l'effetto solvofobico, indebolendo le interazioni tra proteina e resina.

### 14) Una proteina pura dà una banda a 20 kDa su SDS-PAGE ma ha un peso molecolare apparente su GF di 40 kDa. Quali possibili interpretazioni?

L'SDS page è una tecnica denaturante e riducente che separa le varie subunità. È stata rilevata solo una banda da 20 kDa relativa alla subunità monomerica.

La gel filtrazione, invece, è una tecnica che esegue la separazione della proteina in condizioni native. Dunque la proteina si comporta come una molecola unica da 40 kDa, il che significa che in condizioni native essa si trova sotto forma di dimero da 20 + 20 kDa.

**15) Sulla base di quale principio lo stacking gel focalizza le bande in questa tecnica?**

Il gel elettroforetico viene colato all'interno di due lastre di vetro verticali, con spaziatori per regolarne lo spessore. La struttura è discontinua, formata da due strati: lo stacking gel e il running gel. Il primo serve a caricare i campioni e a focalizzare le bande, mentre il secondo è lo strato in cui avviene la separazione. Gli ioni  $\text{Cl}^-$  del gel sono di piccole dimensioni, fortemente carichi e migrano rapidamente verso l'anodo. Gli ioni glicinati, appartenenti al tampone, si trovano, nel pH dello stacking gel (circa di 6,8), vicino a loro punto isoelettrico e risultano così neutri, quindi non migrano. Le proteine, che hanno invece mobilità intermedia tra gli ioni  $\text{Cl}^-$ , che si trovano a valle, e gli ioni glicinati, che si trovano a monte, risultano impaccate tra le due soluzioni. Questo fenomeno comporta un'elevata risoluzione iniziale. Quando gli ioni glicinati raggiungono la superficie del running gel, sentendo la variazione di pH, acquisiscono carica negativa e superano le proteine. Le proteine vengono così separate in base al loro peso molecolare.

**16) Come si determina il peso molecolare delle proteine nella SDS page? Disegna la retta di calibrazione per il calcolo del peso molecolare nella SDS page.**

La determinazione del peso molecolare delle proteine nella SDS page si calcola confrontando la loro mobilità nel gel con quella di proteine a peso molecolare noto, elaborando poi una retta di taratura.

Per ogni banda ottenuta a seguito della migrazione si calcola la distanza migrata dalla proteina e si fa il rapporto con la distanza totale del fronte di migrazione, definendo così la mobilità relativa della proteina d'interesse. Per ogni proteina si calcola il logaritmo in base 10 del peso molecolare, che si pone sull'asse delle y, e la  $R_f$ , che invece rappresenta l'asse x, andando così a creare una retta di calibrazione decrescente.

In questo modo posso anche calcolare il peso molecolare ignoto di una proteina.

**17) Alla fine di un processo di purificazione, ho più bande su SDS page, come faccio a capire quale tra queste è la mia proteina d'interesse?**

A seguito di un SDS page è sempre utile attuare una western blot, tecnica che permette di trasferire con un campo elettrico, le proteine separate precedentemente per elettroforesi su SDS page, su una membrana di nitrocellulosa o nylon, in modo che esse siano esposte a un riconoscimento da parte di un anticorpo. Tramite questa analisi, sono in grado di risalire alla mia proteina d'interesse, perché essa si legherà all'anticorpo.

La western blot prevede quindi il trasferimento delle proteine, attraverso l'aggiunta di un campo magnetico, su un filtro di nitrocellulosa o nylon. Per eseguire il trasferimento si eseguono i seguenti passaggi:

- Si adagia il gel su una membrana in modo di catturare le proteine sulla sua superficie.

- Si crea un sandwich tra due strati di carta da filtro e due spugnette.

- Si inserisce questo sandwich verticalmente all'interno di un campo elettrico trasversale.

Poiché il filtro cattura tutte le proteine presenti nel campione, si effettua una fase di blocking con latte scremato o BSA, per evitare un legame aspecifico degli anticorpi a regioni vuote della membrana.

Segue poi l'incubazione con un anticorpo primario, specifico per la proteina d'interesse. Per visualizzare il sito di legame dell'anticorpo primario, si aggiunge un anticorpo secondario che riconosce la regione costante  $F_c$  dell'anticorpo primario.

Esso è coniugato covalentemente con un enzima, che consente la rilevazione di un segnale.

**18) Descrivimi la tecnica di SPR e commenta gli andamenti dei vari grafici**

La risonanza plasmonica è una tecnica ottica utilizzata per lo studio in tempo reale delle interazioni intermolecolari, fondamentali per la caratterizzazione della funzione di una proteina. Essa consente di rilevare sia la presenza che la cinetica e l'affinità di legame tra una proteina immobilizzata e un ligando.

La proteina viene immobilizzata su uno strato solido, chiamato chip, stratificato in vetro, oro e di ossido di stagno chimicamente modificato. L'immobilizzazione avviene spesso in modo covalente, sfruttando la reattività delle ammine primarie di lisine o gruppi N-terminali, oppure mediante interazioni non covalenti molto specifiche, come quelle dell'affinity tag.

Lo strumento irradia il chip con luce infrarossa sul lato del vetro, variando l'angolo d'incidenza. Questo induce una risposta nel plasmone di superficie, che genera un'onda evanescente a rapido decadimento spaziale. A un particolare angolo d'incidenza, la luce viene assorbita anziché riflessa, causando un minimo d'intensità rilevata dal sistema.

L'associazione di analiti alla proteina immobilizzata modifica lo spessore e la composizione della superficie, spostando l'angolo di risonanza. Il risultato è un sensogramma, che riporta la risposta in RU in funzione del tempo, che consente di misurare in tempo reale sia l'associazione che la dissociazione del complesso. Durante l'iniezione dell'analita si verifica il processo di associazione, con un aumento della risposta fino al raggiungimento di un plateau di equilibrio dinamico, in cui l'associazione e la dissociazione si bilanciano. Successivamente un lavaggio con un tampone, provoca la dissociazione, visibile come diminuzione della risposta.

Dal sensogramma si estraggono delle costanti cinetiche:

-  $K_{on}$ , ovvero la costante di associazione, che descrive la velocità con cui si forma il complesso analita-proteina.

-  $K_{off}$ , ovvero la costante di dissociazione, che descrive la velocità con cui il complesso si dissocia.

-  $K_d$ , che è definita dal rapporto tra  $K_{off}/K_{on}$ , indica l'affinità di legame.

Per una valutazione più completa, è utile effettuare una titolazione variando la concentrazione dell'analita: questo permette di osservare la saturazione della superficie e ottenere stime precise dei parametri cinetici e termodinamici. Confrontando

curve di binding a concentrazioni identiche si può valutare la specificità dell'interazione.

Tuttavia, è importante considerare che il segnale SPR dipende dalla massa legata e non dal numero di molecole, quindi per confrontare l'affinità, gli analiti devono avere peso molecolare simile.