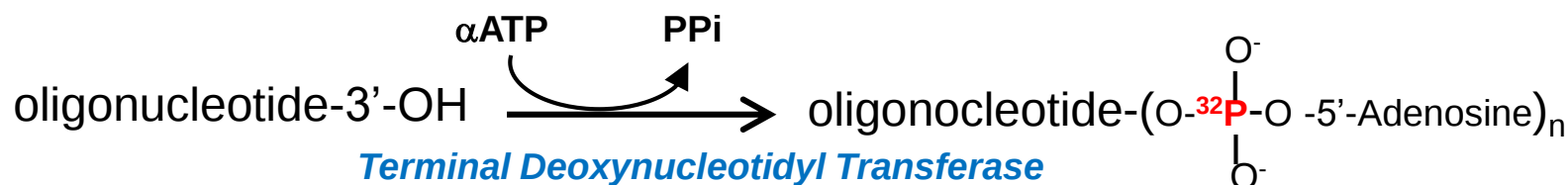
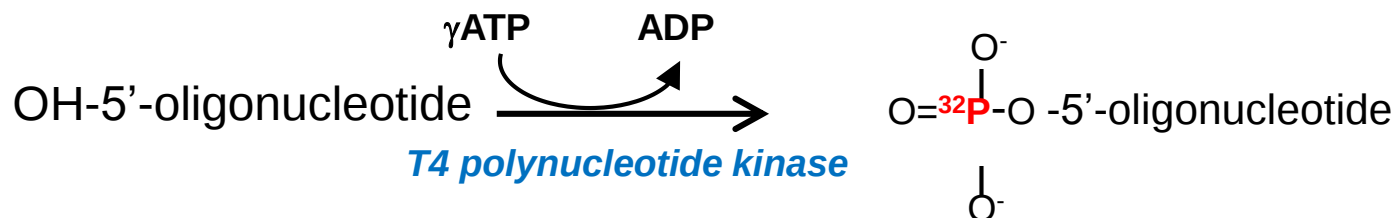
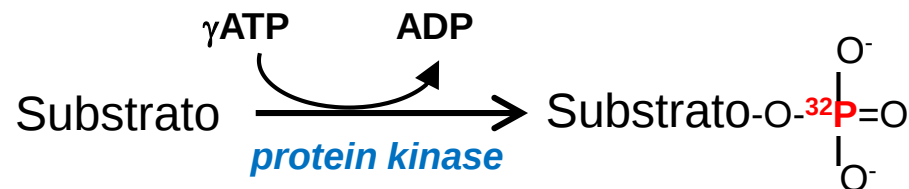
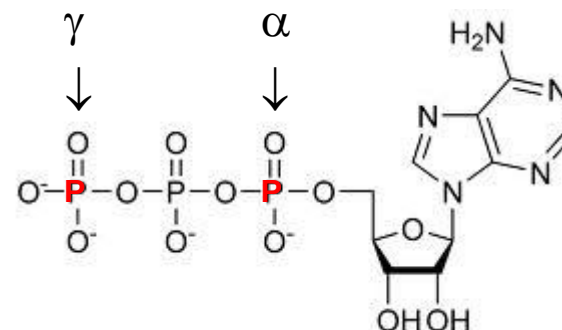


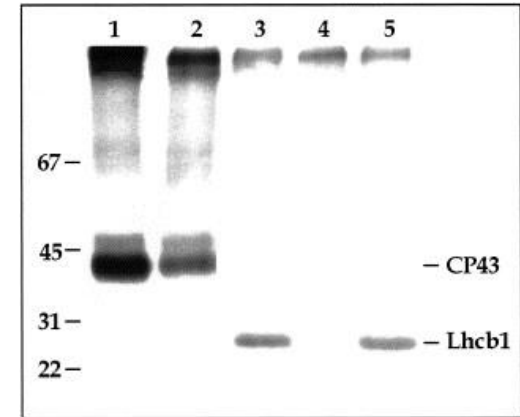
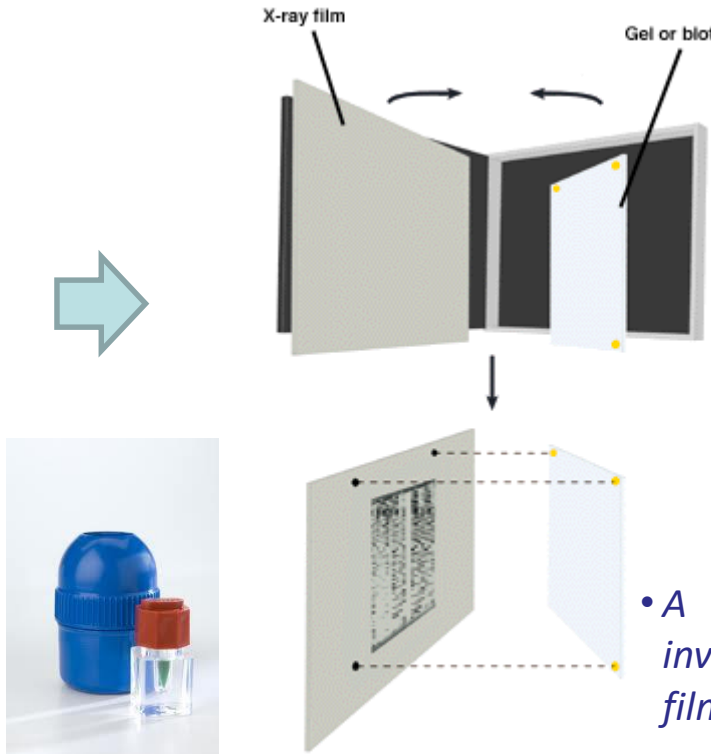
Utilizzo di ^{32}P per studiare i processi di fosforilazione

Radioisotopi utili per studiare le biomolecole

Isot.	Em.	$t_{1/2}$	En (Mev)
^3H	β	12.5anni	0.02
^{14}C	β	5700anni	0.16
^{35}S	β	87giorni	0.17
^{32}P	β	14giorni	0.24
^{125}I	γ	60giorni	0.04



Autoradiografia



• A typical autoradiographic technique involves enclosing the gel or blot with X-ray film for at least 24 h in an X-ray cassette.

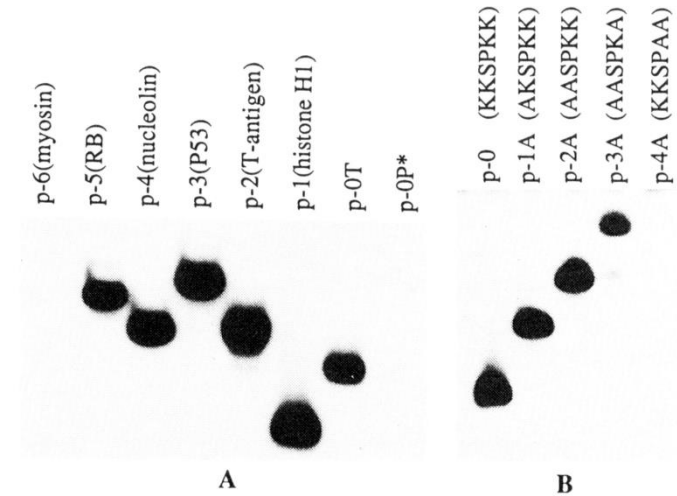
- The cassette has a phosphorescent inner surface to amplify the signal.
- Development of the film reveals the gel or blot image.
- Dots must be placed on the film to record its orientation
- Nowadays, Phosphorimagers allow safe and efficient digital recording of radioactive gels



- Electrophoresis is used to separate proteins labelled with ^{32}P .
- The gel electrophoresis apparatus is behind a plexiglass screen that prevents β -radiation from passing
- Work is carried out in a special radioactivity lab. No equipment, including pipettes, can leave the lab.
- Reagents are stored in special containers and their use is logged

Caratterizzazione della proteina chinasi cdc2

			Relative phosphorylation rate (%)
p-1	Histone H1	AVA A K K S P K K A K K P A	100
p-2	SV40 T-antigen	D S Q H S T P P K K K R K V E D P K D F	98
p-3	P53	P N N T S S S P Q P K K K P L	78
p-4	Nucleolin	A V T P A K K A V T P A K K A	75
p-5	RB-P105	M Y L S P L R S P K K R T S T	54
p-6	Myosin CL	S S K R A K A K T T K K R	2
p-0		G A G A K K S P K K A G A G A	100 ^a
p-1A		G A G A A K S P K K A G A G A	85
p-2A		G A G A A A S P K K A G A G A	51
p-3A		G A G A A A S P K A A G A G A	4
p-4A		G A G A K K S P A A A G A G A	2
p-0P*		G A G A K K S P * K K A G A G A	3
p-0T		G G G A K K T P K K A G A G A	34



(-)
AK**T**TKK
AA**S**PKA
AA**S**PAA

(+)
HS**T**PPK
SS**S**PPQ
AV**T**PAK
LR**S**PPK
AA**S**PPK
KK**T**PPK

(+++)
KK**S**PPK
AK**S**PPK

Uso della spettrometria di massa per seguire le fosforilazione

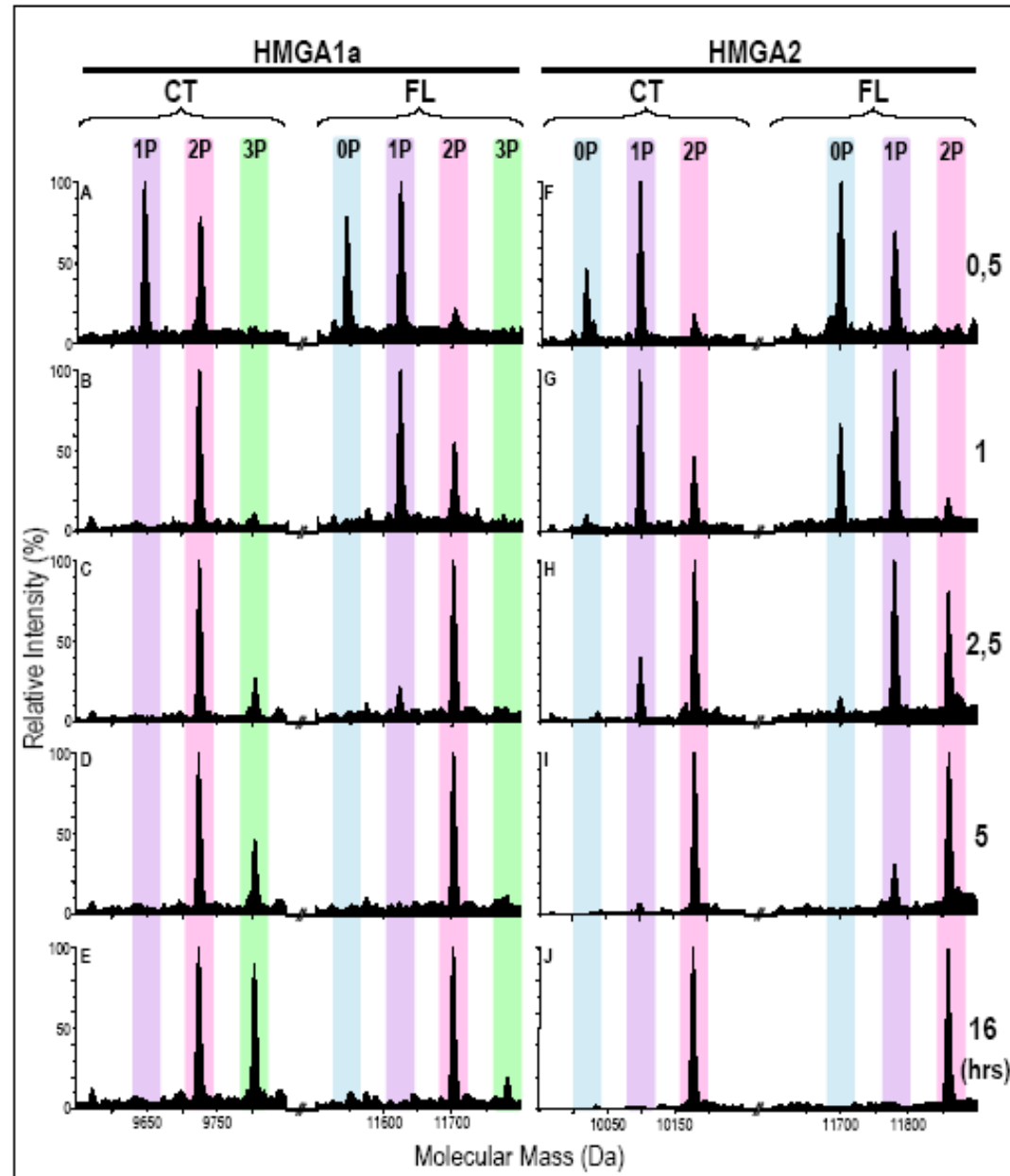
• Vantaggio: metodo non radioattivo

- *HMGA are proteins in the chromatin network that affect key cellular functions during fetal development and in actively proliferating tissues.*
- *They are modulated by phosphorylation.*
- *Out of their normal context HMGA display oncogenic potential which increases in the truncated forms.*
- *C-terminally truncated forms (CT) are more susceptible than full-length (FL) forms to phosphorylation and proteolytic degradation, which correlates with increased oncogenic potential.*
- *This could be shown by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS)*

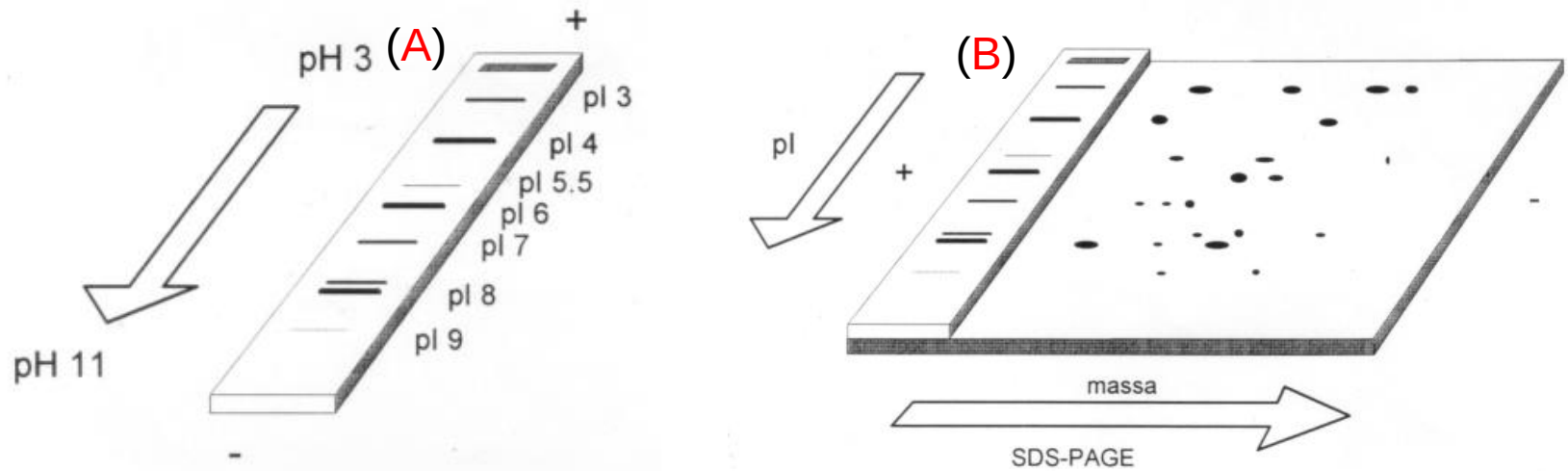
Proteina-PO₄ Δmassa = +80 Da

HMGA1 1 P 2 P 3 P
CT 9650 → 9730 → 9810

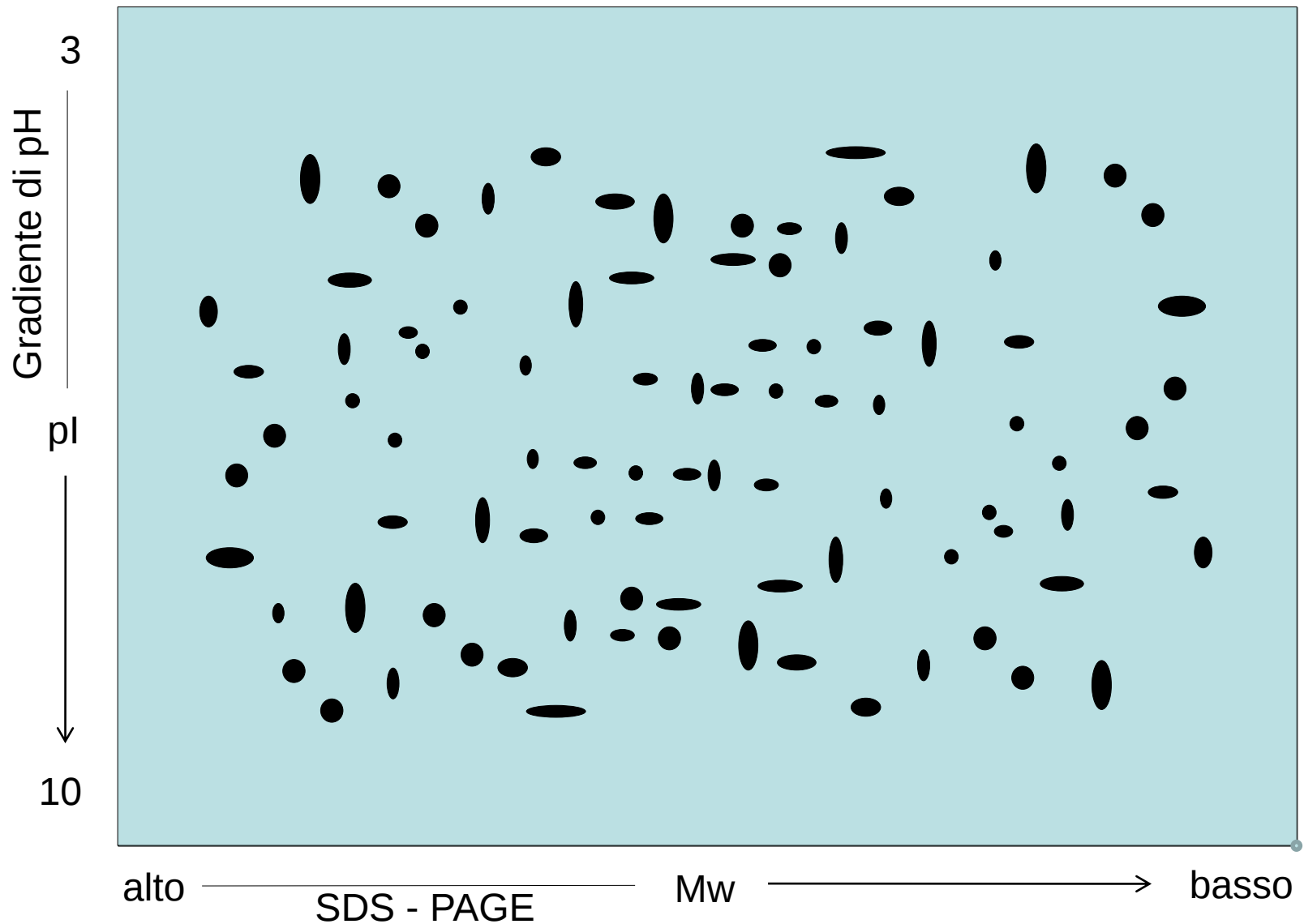
 OP 1P 2P
FL 11550 → 11630 → 11710



Uso della elettroforesi bidimensionale (2-DE) per seguire la fosforilazione

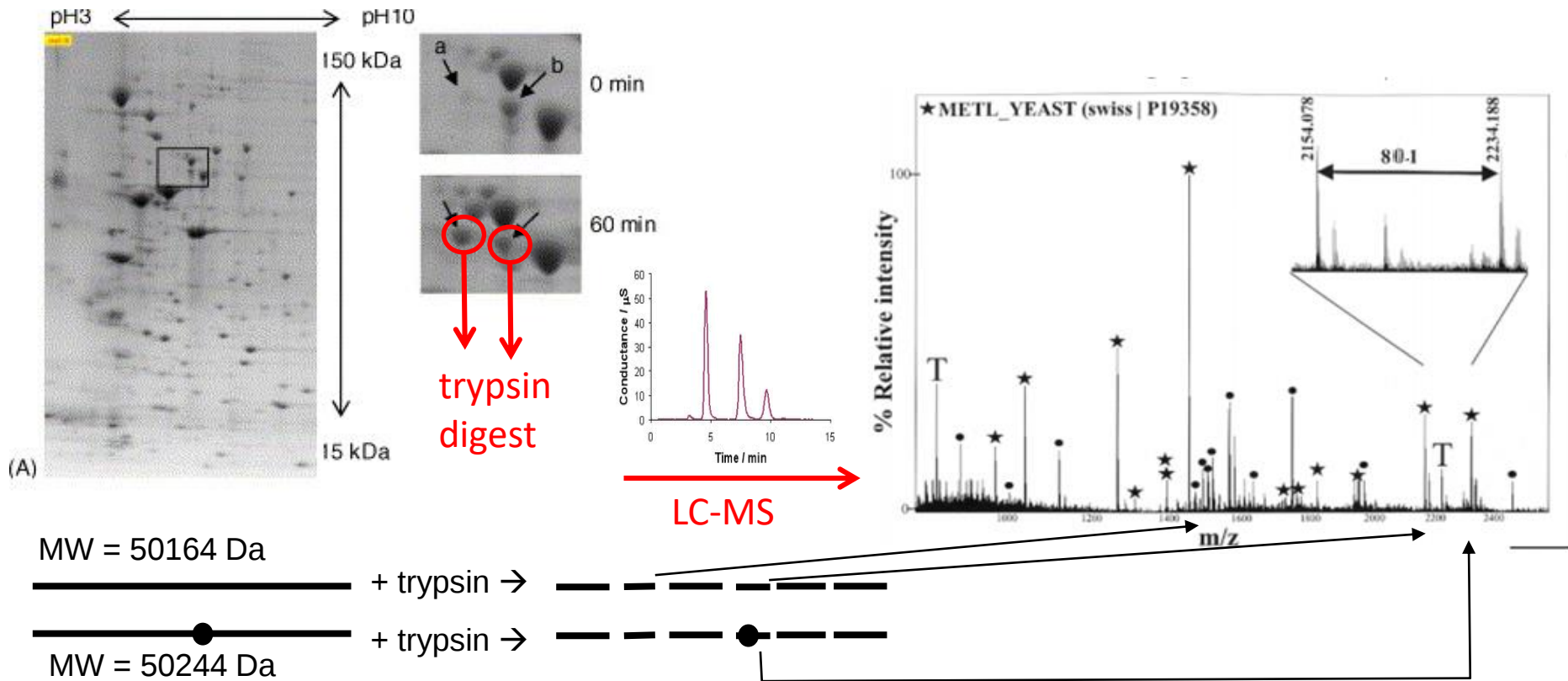


- le proteine sono molecole anfoteriche (hanno gruppi sia acidi che basici)
- Per ogni proteina c'è un valore di pH al quale il numero di gruppi con carica (+) equivale al numero di gruppi con carica (-). Questo è il punto isoelettrico, **pI**, al quale la carica netta = 0.
- Il focusing isoelettrico (IEF) utilizza un gel (A) preparato con molecole anfoteriche (formano un gradiente di pH) nel quale le proteine si fermano al pH che corrisponde al loro **pI**.
- In seguito sono poste su un gel SDS-PAGE (B), e si muovono nella direzione ortogonale, in base alla loro **massa/grandezza**.
- La 2-DE associata alla spettrometria di massa è di fondamentale importanza per la proteomica, e permette anche di individuare eventi di **fosforilazione** poiché questa **ha un forte effetto sul pI**



- Le proteine estratte da una cellula/tessuto sono separate in un 2Dgel, e questo è poi confrontato con un il 2Dgel delle stesse proteine ma prese in diverse condizioni (es. *Fed vs Fasting*)
- Gli 'spot' che variano corrispondono a proteine modificate (es. fosforilate, zimogeni attivati, $\pm$ espresse)

Uso della spettrometria di massa con elettroforesi bidimensionale



- NB:**
- la tripsina e chimotripsina sono serina proteasi, enzimi digestivi
 - tagliano le catene polipeptidiche in siti specifici
 - la tripsina taglia sul lato carbossilico di Arg e Lys (AA cationici)
 - la chimotripsina di residui come Phe, Leu o Ile (aromatici/alifatici idrofobici e grossi)