

# Esercizio 1

## Traccia

In seguito ad una variazione locale di pH la proteina  $P_1$  subisce un cambiamento conformazionale che la rende attiva. La forma attiva della proteina ( $P_{1a}$ ) è in grado di legare la proteina  $P_2$  in modo reversibile con le costanti cinetiche  $k_{as} = 3.4 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$  e  $k_{dis} = 5 \times 10^{-2} s^{-1}$ .

Sapendo che le concentrazioni iniziali della proteina  $P_1$  e della proteina  $P_2$  sono rispettivamente  $35 \mu M$  e  $24 \mu M$  e che la costante cinetica di variazione conformazionale della proteina  $P_1$  è  $k_{conf} = 7 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$  simulare il sistema dinamicamente e rispondere ai seguenti quesiti:

1. Sono sufficienti 0.2 secondi (200 ms) per stabilire l'equilibrio?
2. Assumendo che a  $t=20s$  il sistema sia all'equilibrio, determinare empiricamente la costante di equilibrio e confrontarla con la costante di equilibrio teorica.
3. Supponendo ora che la proteina  $P_{1a}$  sia soggetta a degradazione con una costante cinetica  $k_{deg} = 1.2 \times 10^{-1} M^{-1} s^{-1}$ , per quanto tempo nel sistema si può rilevare la presenza di  $P_3$ ?

## Soluzione

```
*****MODEL NAME

*****MODEL NOTES

*****MODEL STATE INFORMATION
P1(0)=25e-6    %M (moli/I)
P2(0)=24e-6    %M (moli/I)

*****MODEL PARAMETERS
k_conf=7e3  \%M^-1 s^-1
k_as=3.4e5  \%M^-1 s^-1
k_dis=5e-2  \%s^-1
k_deg=1.2e-2 %aggiunto successivamente
              %all'esercizio 3

*****MODEL VARIABLES

*****MODEL REACTIONS
P1 => P1a : r1
vf=k_conf*P1
```

```

P1a + P2 <=> P3: r2
    vf=k_as*P1a*P2
    vr=k_dis*P3
P1a => :r3      %aggiunto successivamente
    vf=k_deg*P1a    %all'esercizio 3

*****MODEL FUNCTIONS

*****MODEL EVENTS

*****MODEL MATLAB FUNCTIONS

```

## Risposte

**Domanda 1** Sono sufficienti per la prima reazione sono sufficienti, ma per la seconda no. Né  $P_3$  né  $P_{1a}$  hanno raggiunto l'equilibrio. Già dopo 10 secondi invece è visibile l'equilibrio raggiunto da tutte le specie. Quindi non sono sufficienti per stabilire l'equilibrio dell'intero sistema.

**Domanda 2**

$$k_{eq} = \frac{P_3}{P_{1a} * P_2} = 6.8 \times 10^6$$

$$K_{as} * P_{1a} * P_2 = k_{dis} * P_3$$

Dobbiamo ora calcolare la costante di equilibrio empirica:

$$P_3(20)c.a. = 2.3 \times 10^{-5}$$

$$P_{1a}(20)c.a. = 1.13 \times 10^{-5}$$

$$P_2(20)c.a. = 3.08 \times 10^{-7}$$

$$k_{eq} = \frac{P_3(20)}{P_{1a}(20) * P_2(20)} = \frac{2.3 \times 10^{-5}}{1.13 \times 10^{-5} * 3.08 \times 10^{-7}} = 6.8 \times 10^6$$

**Domanda 3** Per capirlo aggiungiamo la reazione 3, con una nuova costante  $k_{deg}$ .

Dopo circa  $10^5$  secondi (quindi circa 28 ore) abbiamo raggiunto lo zero (più o meno) per  $P_3$ .

Spiegazione: dopo la prima reazione, di dissociazione di  $P_1$ ,  $P_{1a}$  tende a dissiparsi, quindi non è possibile dopo le 28 ore che si formi  $P_3$  e quindi poi tende a sparire.

# Esercizio 2

## Traccia

La proteina P, è sintetizzata dai ribosomi con una costante cinetica  $kl$  pari a  $3.5 \times 10^{-7} M^{-1} s^{-1}$ . È noto che la proteina  $P_1$  dimerizza (formando il dimero  $P_2$ ) con una  $K_{Dim.} = 5 nM$  e che il dimero può reversibilmente dissociare con una costante cinetica di dissociazione  $k_{dim\_d} = 5 \times 10^{-5} s^{-1}$ .

Nella stessa cellula, un enzima  $E$  lega irreversibilmente un cofattore  $C$  con una costante cinetica  $k_{cof} = 8.4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$  a formare l'enzima attivo  $E_a$ . Quest'ultimo catalizza l'attivazione del dimero  $P_2$ , trasformandolo quindi in  $P_{2a}$ , con una costante di catalisi  $k_{cat} = 1.2 \times 10^{-2} s^{-1}$  ed una costante di Michaelis  $K_M = 5 \mu M$ . Il dimero attivato lega poi un recettore intracellulare  $R$  in modo reversibile a formare il complesso  $P_{2a}R$  con costanti cinetiche di associazione e dissociazione rispettivamente  $k_{Ra} = 1.3 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$  e  $k_{Rd} = 10^{-2} s^{-1}$ . Il complesso  $P_{2a}R$  dissocia poi in modo irreversibile nel dimero  $P_2$  inattivo e nel recettore attivo  $R$ . con costante cinetica  $k_{Ract} = 4 \times 10^{-1} s^{-1}$ . Sapendo che le concentrazioni iniziali delle specie molecolari presenti nel sistema sono:  $P_1(0) = 13.5 \mu M$ ,  $E(0) = 10.5 \mu M$ ,  $C(0) = 5.3 \mu M$ ,  $R(0) = 320 \mu M$ , simulare dinamicamente il sistema e rispondere ai seguenti quesiti:

1. Dopo quanto tempo il recettore  $R$  è totalmente saturato da  $P_{2a}$ ? Qual è il rispettivo valore massimo di produzione di  $R_a$ , la sua forma attiva?
2. Assumendo che a  $t=20s$  il sistema sia all'equilibrio, determinare empiricamente la costante di equilibrio e confrontarla con la costante di equilibrio teorica.
3. Supponendo ora che la proteina  $P_{1a}$  sia soggetta a degradazione con una costante cinetica  $k_{deg} = 1.2 \times 10^{-1} M^{-1} s^{-1}$ , per quanto tempo nel sistema si può rilevare la presenza di  $P_3$ ?

## Soluzione

\*\*\*\*\*MODEL NAME

Esercizio 2

\*\*\*\*\*MODEL NOTES

\*\*\*\*\*MODEL STATE INFORMATION

P1(0)=13.5e-6      %M (moli/I)

E(0)=10.5e-6      %M (moli/I)

C(0)=5.3e-6      %M (moli/I)

R(0)=320e-6      %M (moli/I)

\*\*\*\*\*MODEL PARAMETERS

```

k_1=3.5e-7      %M^-1 s^-1
k_Dim=5e-9      %M^-1 s^-1
kdim_d=5e-5      %s^-1
k_cof=8.4e4      %M^-1s^-1 %alla terza domanda cambia
k_cat=1.2e-2      %s^-1
KM=5e-6          %M
k_Ra=1.3e5
k_Rd=1e-2
k_Ract=4e-1

*****MODEL VARIABLES
kdim_a=kdim_d/k_Dim
VMax=k_cat*Ea

*****MODEL REACTIONS
P1 => P1 : r1 % biosintesi della proteina P1
    vf=k_1
P1 + P1 <=> P2: r2 %dimerizzazione della proteina P1
    vf=kdim_a * P1^2
    vr=kdim_d * P2
E + C => Ea : r3 %enzima lefa cofattore irreversibilmente e diventa attiva
    vf=kcof*E*C
P2 => P2a :r4 %attivazione enzimatica di P2
    vf=VMax*P2)/(P2+KM)
P2a + R <=> P2aR :r5 %il dimero attivato
    vf=kRa * P2a * R
    vr=kRd*P2aR
P2aE => P2 + Ra :r6 %di
    vf=kRact*P2aR

*****MODEL FUNCTIONS

*****MODEL EVENTS

*****MODEL MATLAB FUNCTIONS

```

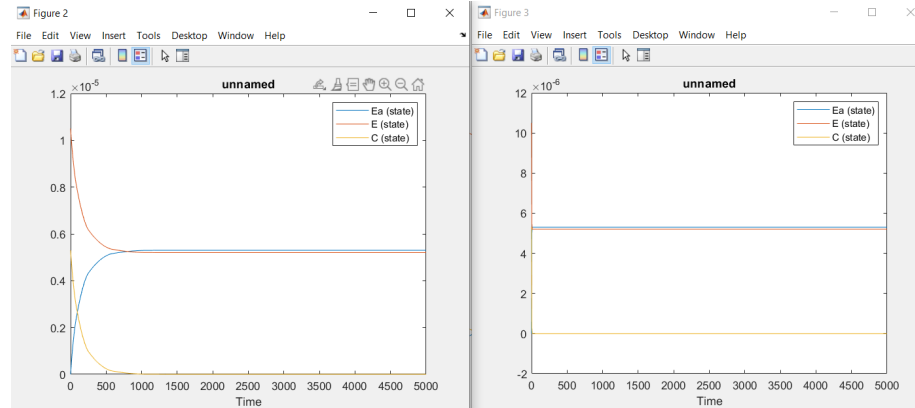
## Risposte

**Domanda 1** Dopo i 5500 secondi il reagente R è completamente saturato.

**Domanda 2** Decresce più velocemente E.

**Domanda 3** Le due figure differiscono, perchè con  $10^2$  su si vedono bene le curve con cui aumentano e diminuiscono i reagenti sui 5000 secondi; inizialmente con  $10^4$  non si nota quasi, perché troppo veloce per essere visualizzata bene.

La misura di E, C e Ea cambia (ma non abbiamo visto come).



**Domanda 4** Per vederlo abbiamo runnato per 400 secondi:  
 La concentrazione di Ra è circa  $2.1 \times 10^{-5}$ , mentre quella mutata è  $14.5 \times 10^{-6}$ .  
 Calcoliamo la percentuale di Ra mutata relativamente alla quantità normalmente prodotta: dopo 400 secondi la proteina mutata è il 70% di quella non mutata.

**Domanda 5** Raddoppiamo  $R(0)$  per verificare la differenza con Wild Type in caso di overespressione e poi lo dimezziamo per vedere una down-regolazione:  
 In 2000 secondi si nota sui grafici la differenza:

