

DIFFUSIONE DEL MATERIALE DIDATTICO

Queste immagini sono fornite agli studenti che hanno frequentato il corso di “Biologia Fisiologia Anatomia” tenuto dalla Prof.ssa Giovanna Pontarin nel Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica dell’Università di Padova nell’anno accademico 2024-2025.

Nel rispetto dei diritti di proprietà, non ne è consentito l’uso per altri scopi o la diffusione su Internet o ad altre persone.

E’ inoltre vietata la diffusione di video, foto, registrazioni, dispense delle lezioni e del materiale delle esercitazioni.

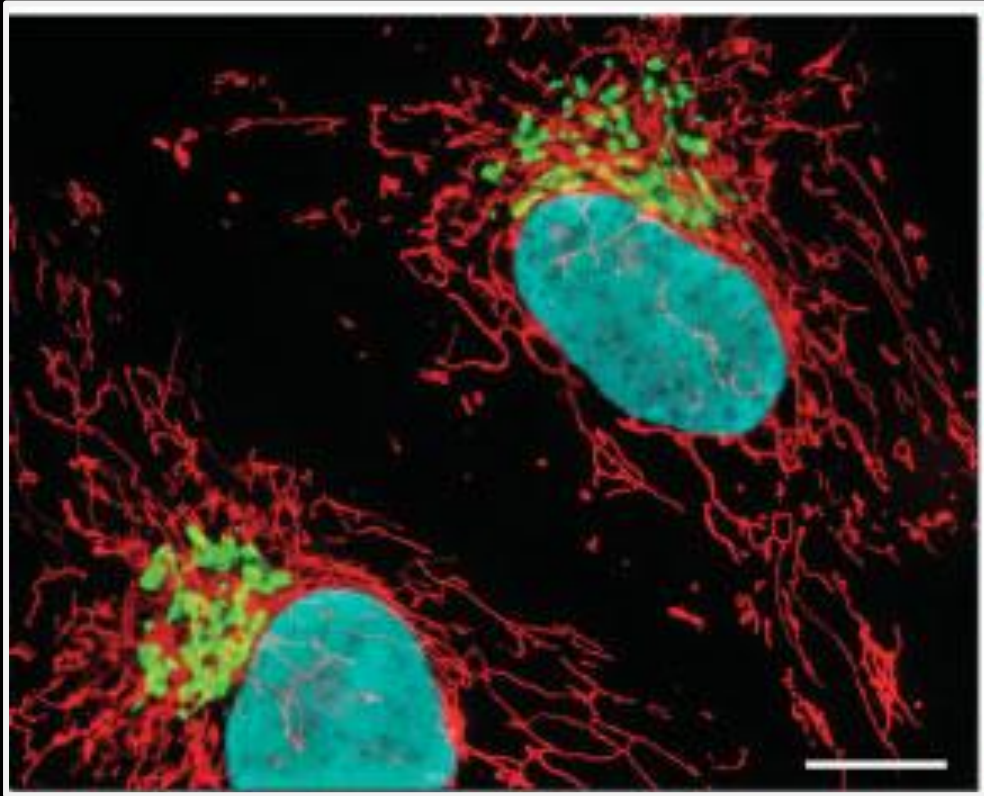
Nella lezione precedente

- ✓ Principali componenti di un microscopio
- ✓ Ingrandimento e qualità dell'immagine
- ✓ Microscopio ottico ed elettronico
- ✓ Visualizzazione di preparati biologici
 - campo chiaro-contrasto di fase
 - coloranti fluorescenti (immunofluorescenza, microscopio a fluorescenza)

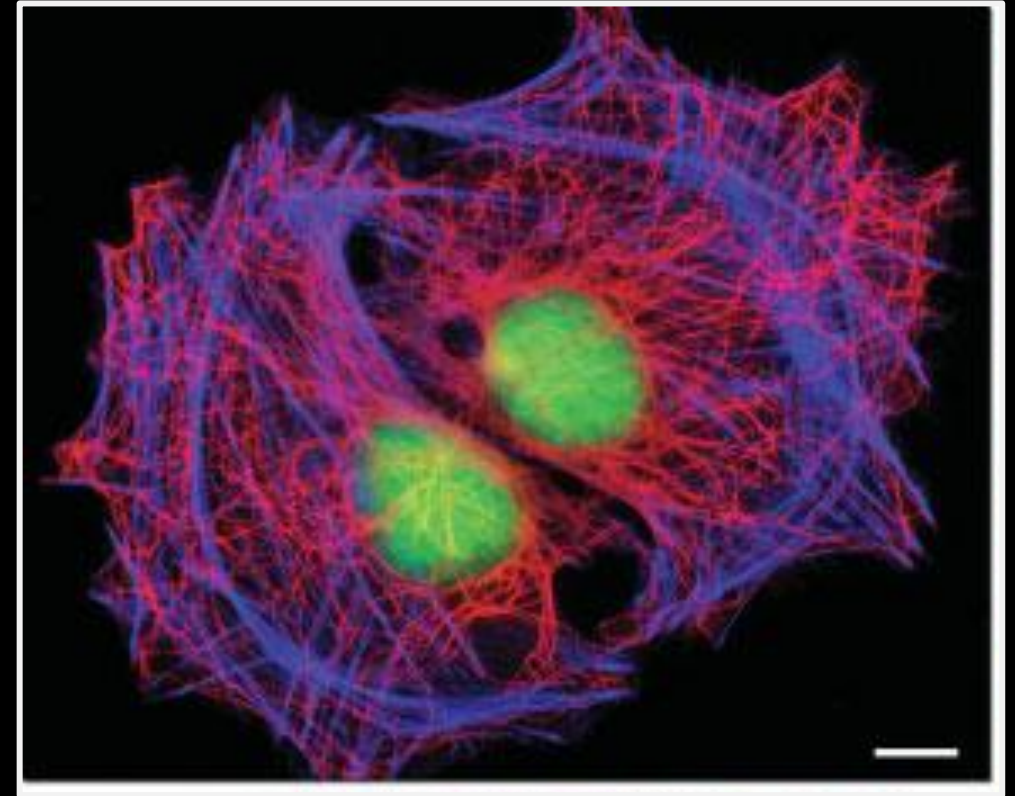
Equazione di Abbè

$$d = \frac{0,61 \times \lambda}{NA}$$

L'immunofluorescenza consente di visualizzare contemporaneamente proteine diverse nella stessa cellula. Visualizzazione con microscopio a fluorescenza o confocale.



Nucleo = azzurro
Mitocondri = rosso
Apparato di Golgi = verde



Nucleo = verde
Microtubuli = blu
Filamenti di actina = rosso

Che tipo di immagini si ottengono osservando le cellule con un microscopio elettronico?

La formazione dell'immagine al microscopio elettronico **dipende dalla dispersione differenziale di elettroni prodotta dalle diverse parti del campione.**

Nella microscopia elettronica il contrasto dipende dal numero atomico del campione: più alto è il numero, più gli e^- vengono dispersi, maggiore è il contrasto.

Per rendere visibili i campioni biologici (atomi con numero atomico basso), è necessario impregnarli con sali di metalli pesanti, quali **tetrossido di osmio, acetato di uranio, citrato di piombo.**

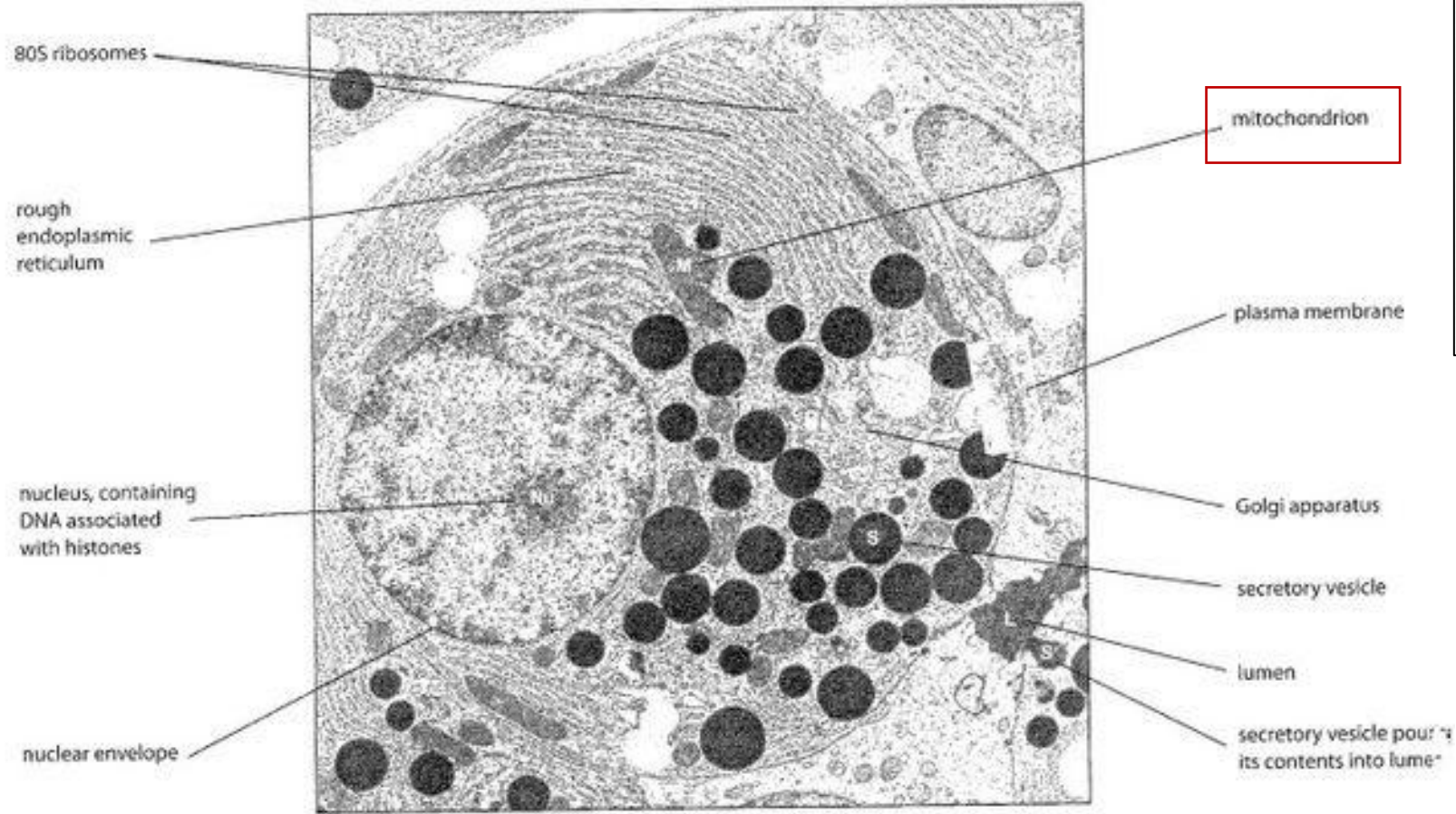
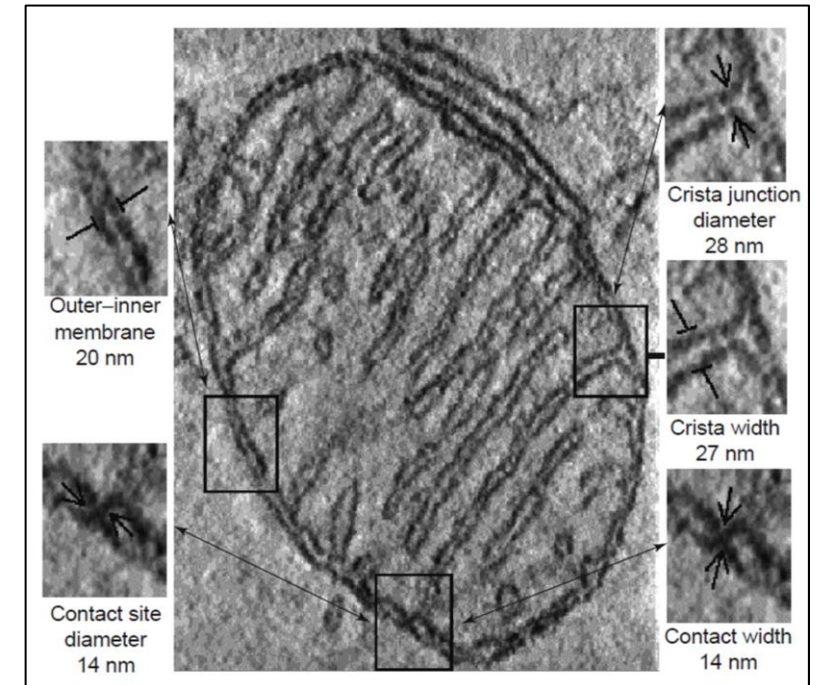
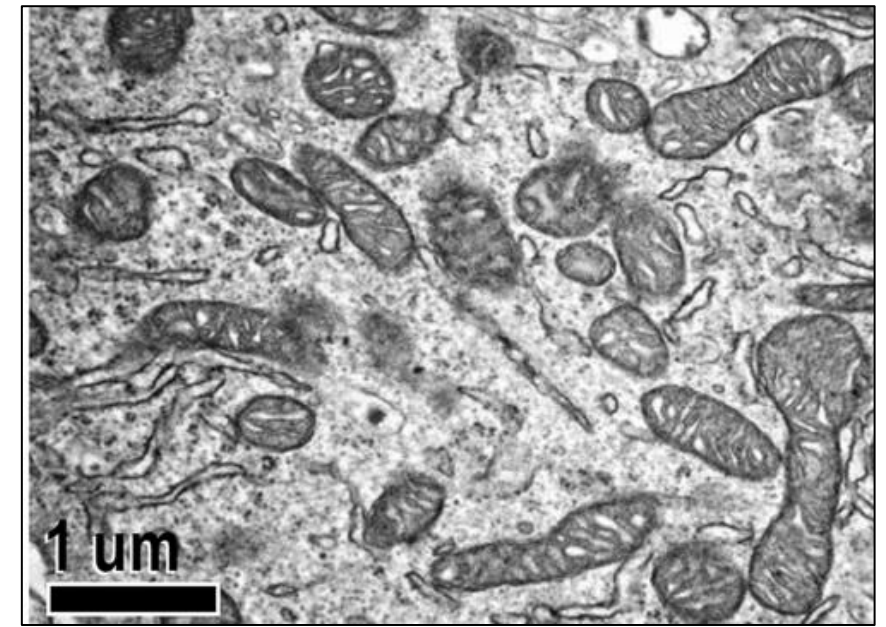
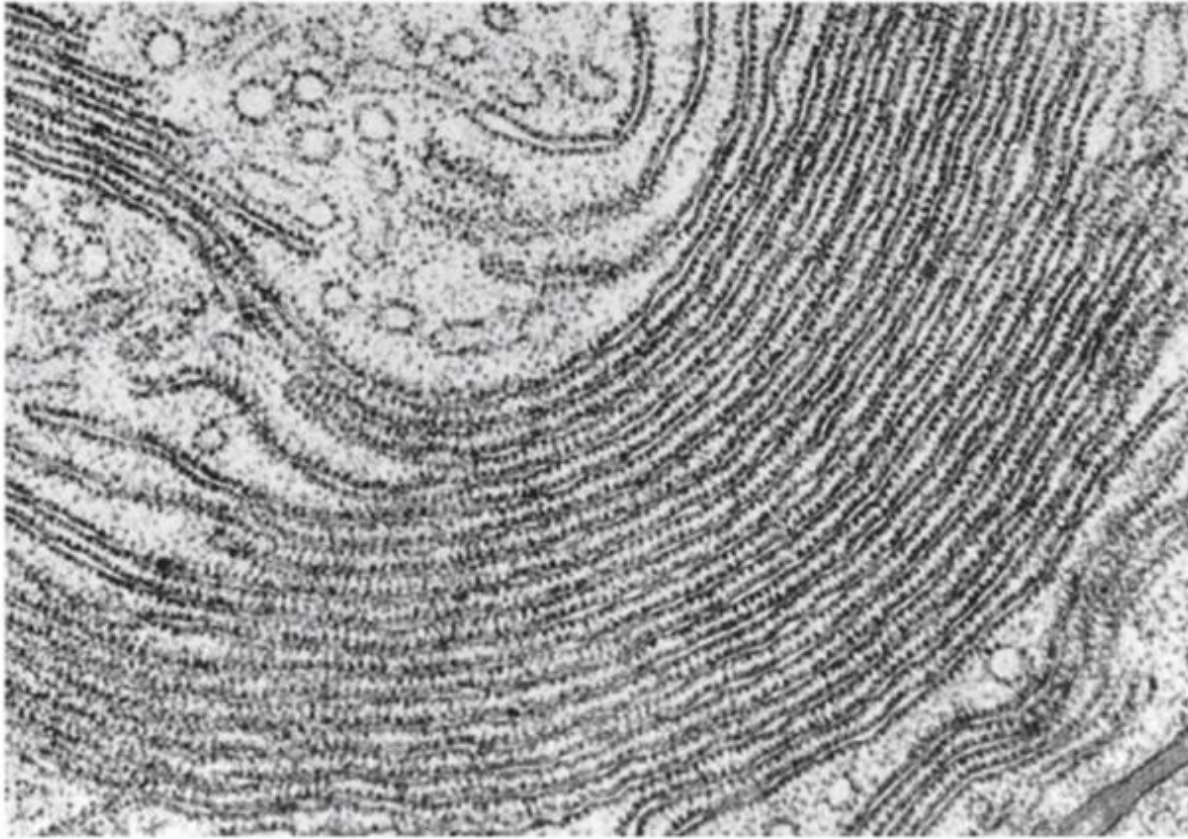


Figure 1.12 Electron micrograph of an exocrine cell from the pancreas (x 12 000).

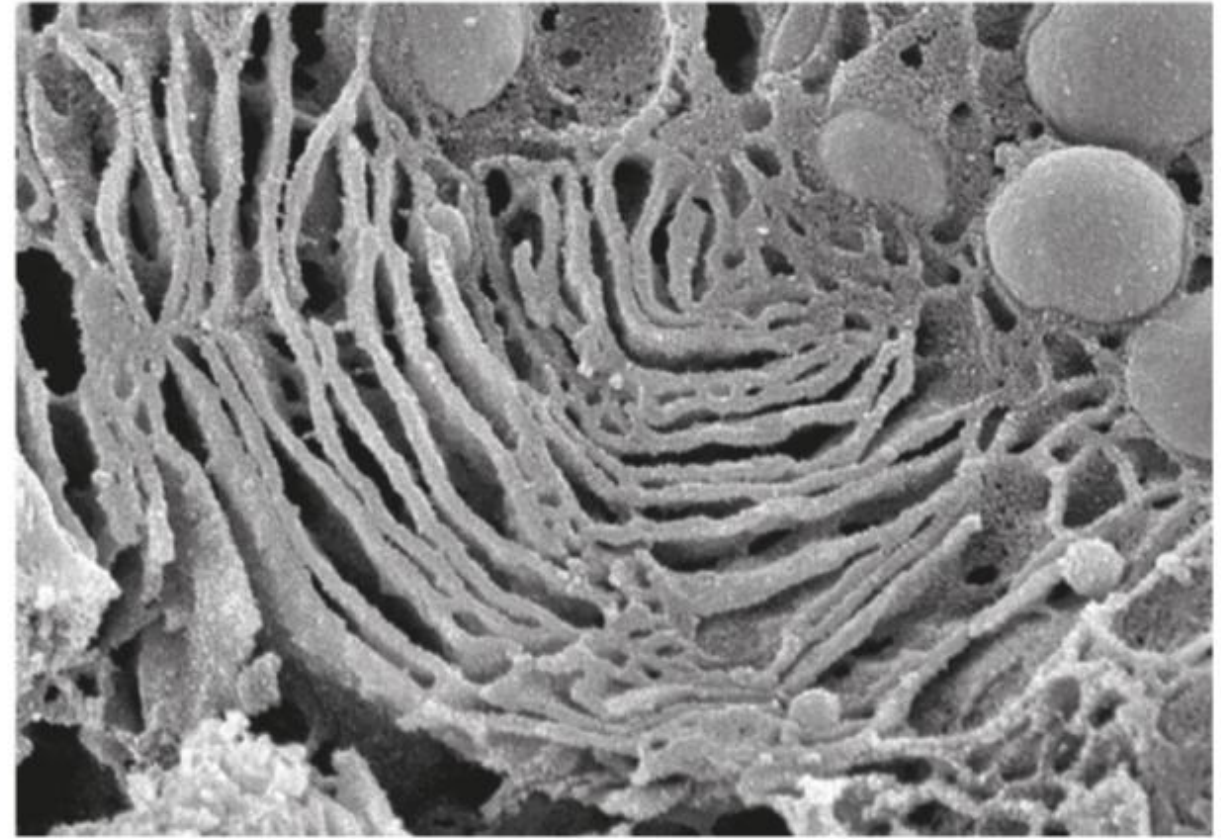




(a) Micrografia elettronica a trasmissione

0,5 μm

FIGURA A.25 Confronto fra micrografie elettroniche a trasmissione e a scansione. (a) La micrografia elettronica a trasmissione mostra le membrane del reticolo endoplasmatico rugoso nel citoplasma di una cellula pancreatica di ratto. L'aspetto "rugoso" delle membrane in questo campione è conferito



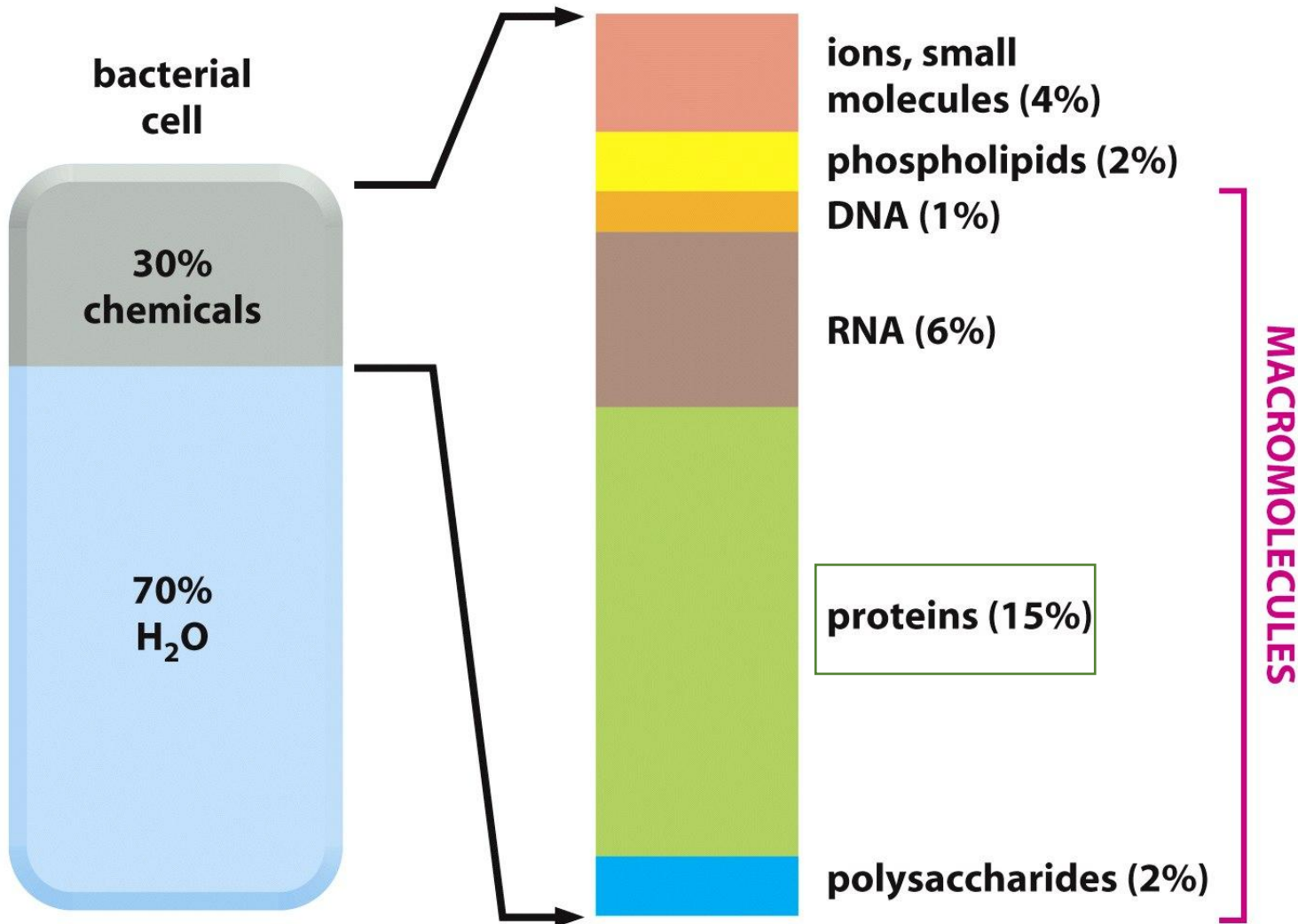
(b) Micrografia elettronica a scansione

2 μm

dalla presenza di numerosi ribosomi legati alla membrana. (b) Un campione simile visto tramite la microscopia elettronica a scansione rivela l'aspetto tridimensionale del reticolo endoplasmatico rugoso, anche se i singoli ribosomi non possono essere risolti.

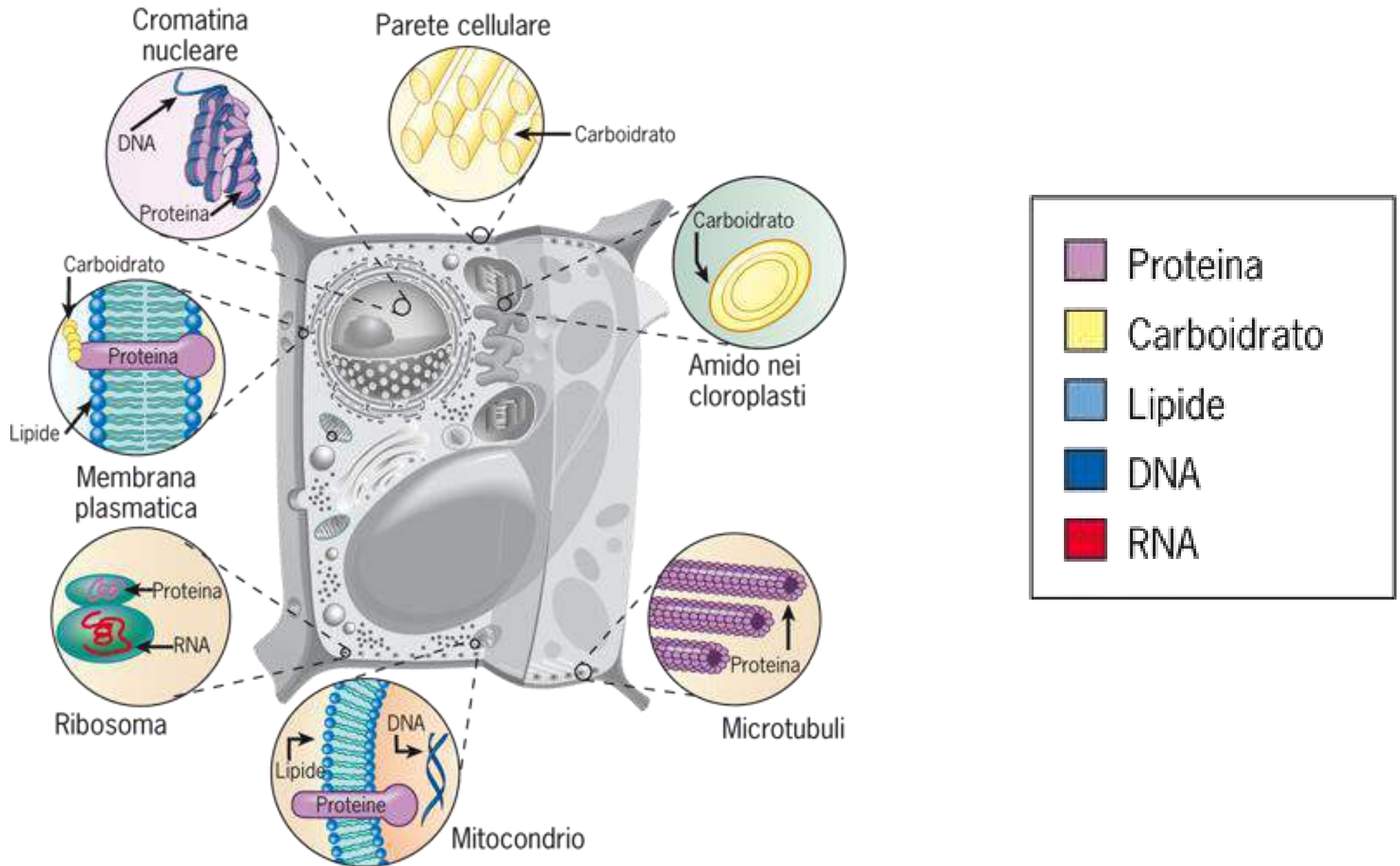
LE PROTEINE

Componenti della cellula



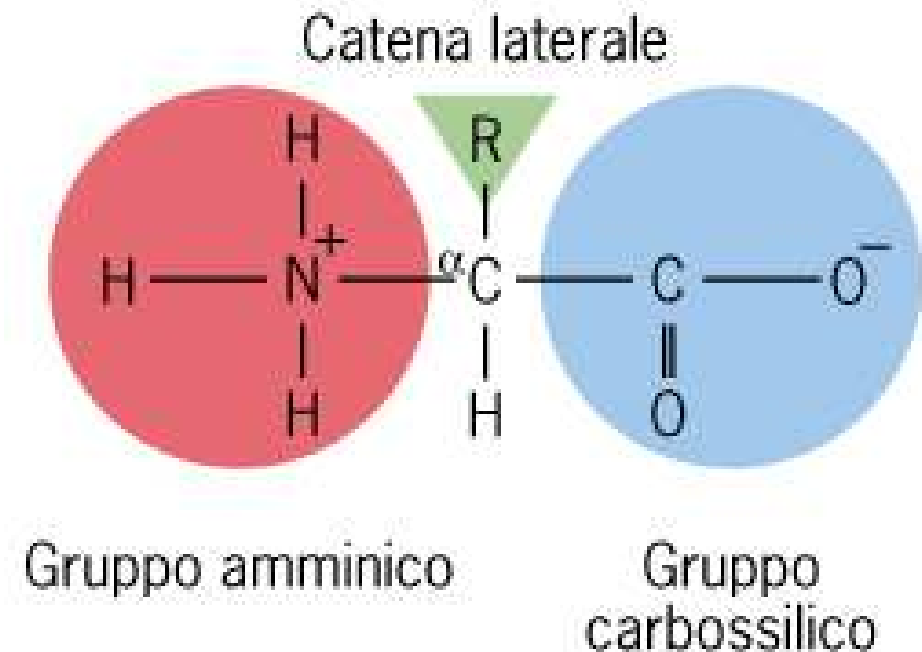
La proteine rappresentano la classe di macromolecole più abbondanti con molteplici funzioni.

Distribuzione delle macromolecole nella cellula



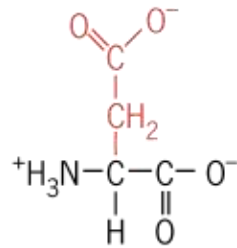
Le proteine sono polimeri formati a partire da 20 amminoacidi naturali.

Gli **aminoacidi** sono molecole organiche contenenti sia gruppi carbossilici che amminici legati al carbonio centrale α , assieme ad un idrogeno e a un gruppo variabile indicato con la lettera R.

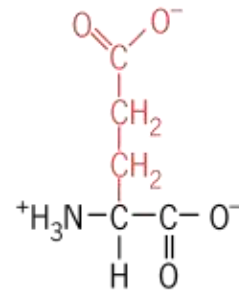


Le proprietà specifiche di un particolare aminoacido dipendono dalla natura chimica del gruppo R.

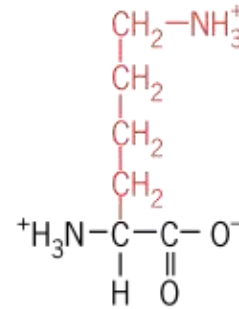
Polari con carica



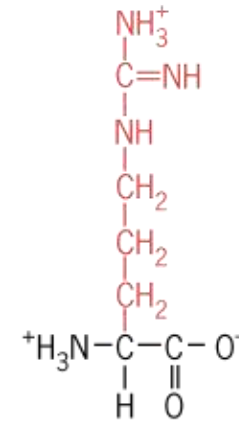
Acido aspartico
(Asp o D)



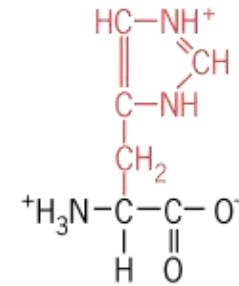
Acido glutammico
(Glu o E)



Lisina
(Lys o K)



Arginina
(Arg o R)

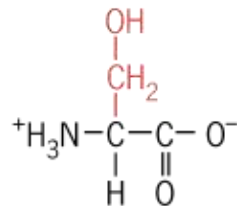


Istidina
(His o H)

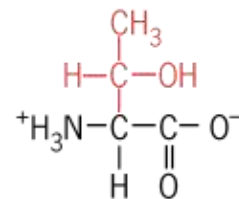
Proprietà delle catene laterali (gruppi R):

Le catene laterali idrofiliche agiscono come acidi o basi tendendo ad essere completamente cariche (+ o -) in condizioni fisiologiche.
Le catene laterali formano legami ionici e sono spesso coinvolte in reazioni chimiche.

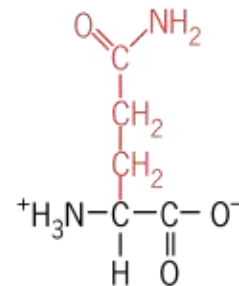
Polari privi di carica



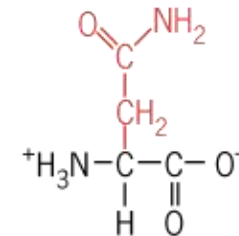
Serina
(Ser o S)



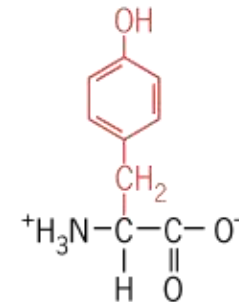
Treonina
(Thr o T)



Glutamina
(Gln o Q)



Asparagina
(Asn o N)

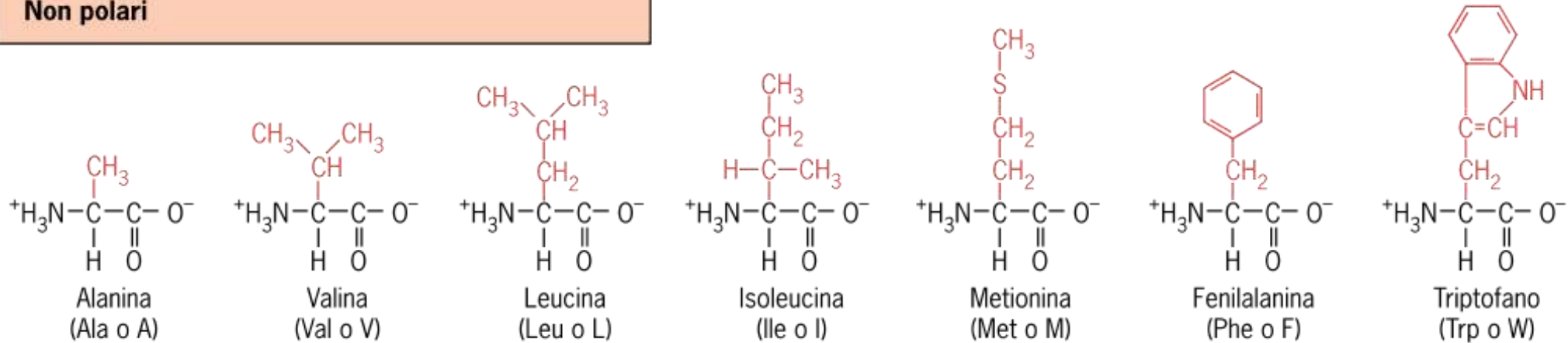


Tirosina
(Tyr o Y)

Proprietà delle catene laterali:

Le catene laterali idrofiliche tendono ad avere parziale carica + o - che permette loro di partecipare a reazioni chimiche, di formare legami H e associarsi con l'acqua.

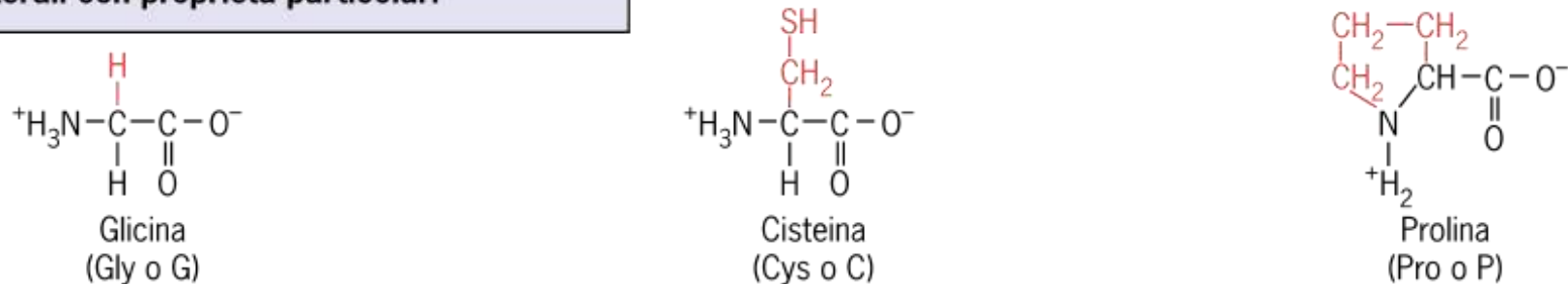
Non polari



Proprietà delle catene laterali:

La catena laterale idrofobica è costituita quasi interamente da atomi di C ed H. Questi amminoacidi tendono a formare il nucleo più interno delle proteine solubili, lontano dal mezzo acquoso. Essi giocano un ruolo importante nelle membrane, associandosi con il doppio strato lipidico.

Catene laterali con proprietà particolari

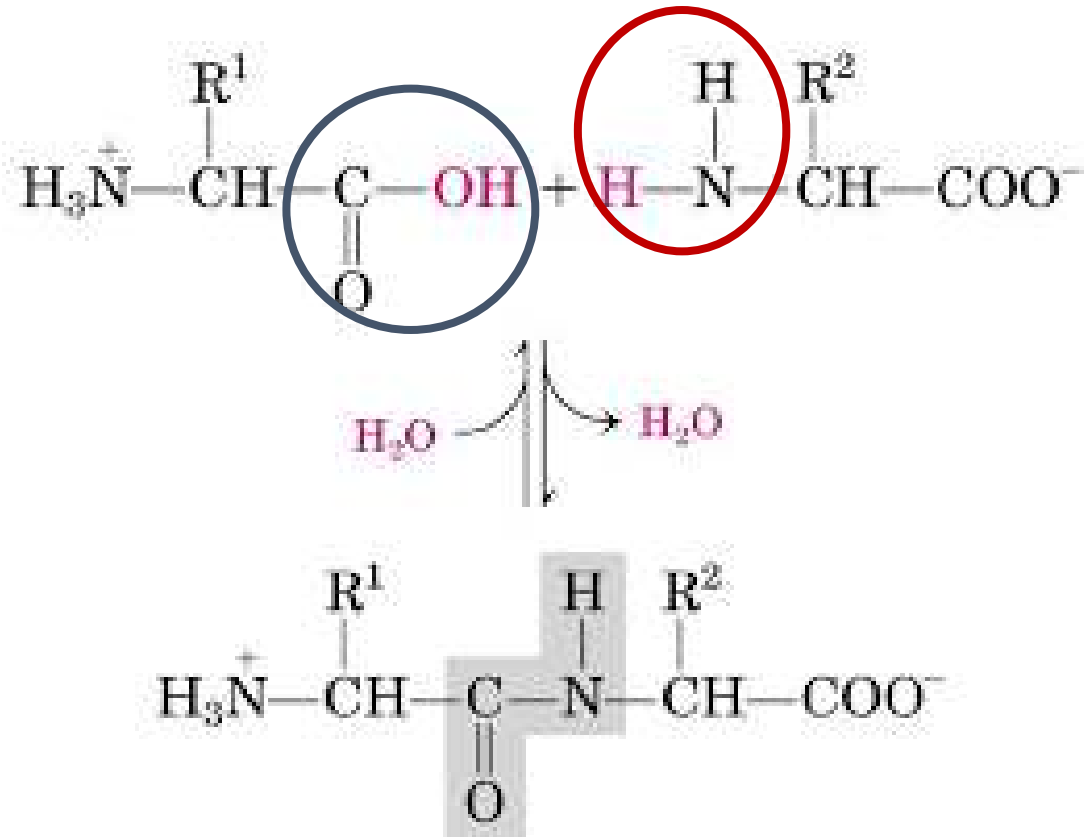


La catena laterale è formata solo da un atomo di idrogeno e può adattarsi ad un ambiente sia idrofilico sia idrofobico. La glicina spesso si trova in siti dove due polipeptidi vengono in stretto contatto.

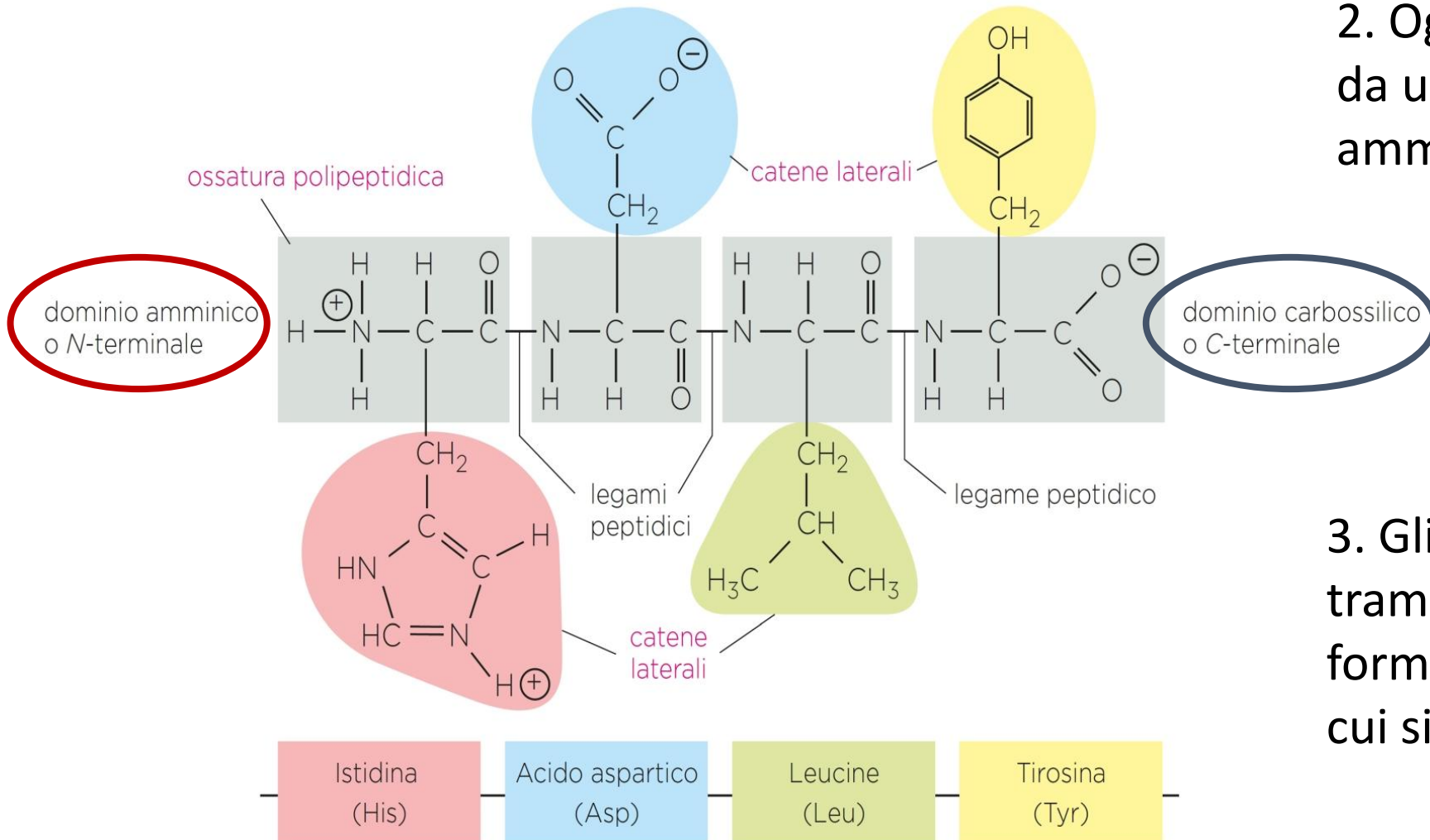
Sebbene la catena laterale abbia carattere polare non carico, essa ha la particolarità di costituire un legame covalente con un'altra cisteina, per formare un ponte disolfuro.

Sebbene la catena laterale abbia carattere idrofobico, essa ha la proprietà particolare di creare snodi nelle catene polipeptidiche e interrompere la struttura secondaria ordinata.

Legame peptidico



1. Direzionalità durante la polimerizzazione



2. Ogni proteina è caratterizzata da una specifica sequenza di amminoacidica.

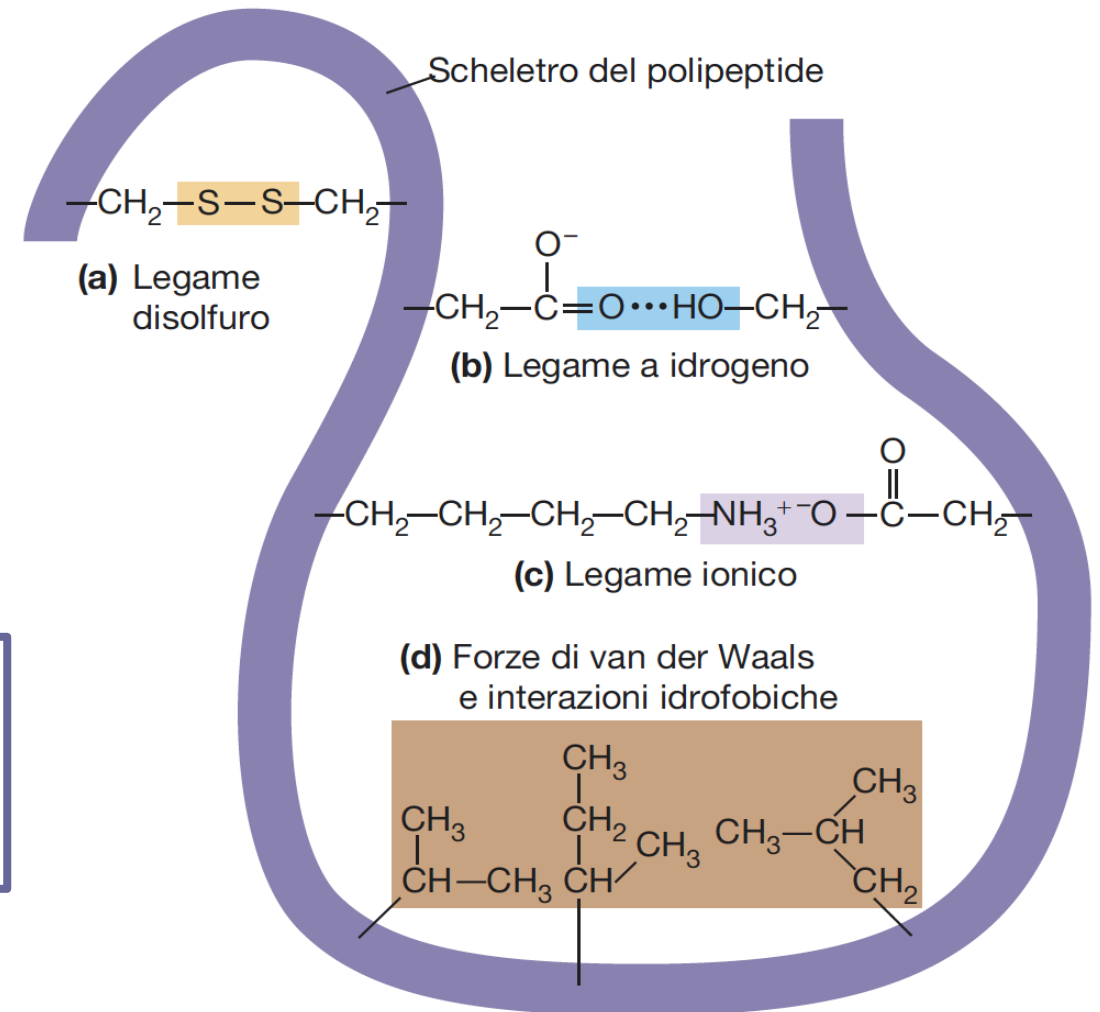
3. Gli amminoacidi sono uniti tramite legami peptidici a formare l'ossatura peptidica da cui si proiettano le catene laterali.

«Conformazione nativa»

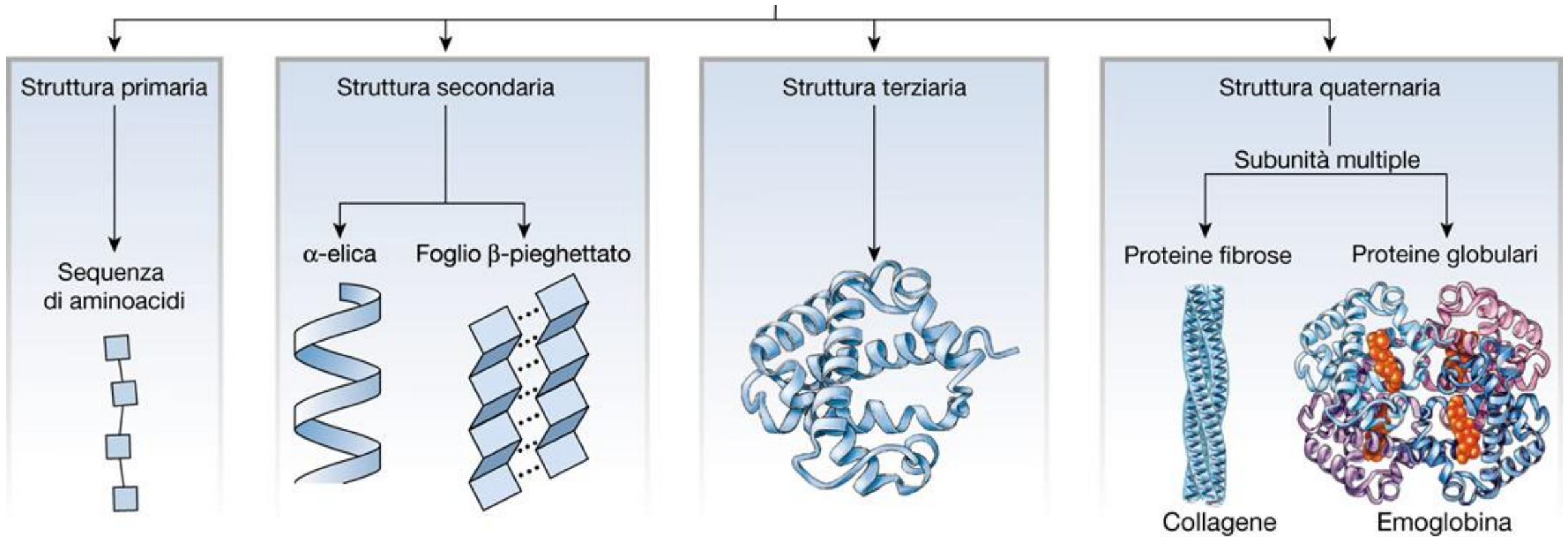
La forma di una proteina è definita da legami non covalenti deboli e dalla formazione di ponti disolfuro.

Le proteine assumono la conformazione termodinamicamente più stabile.

Tutta l'informazione richiesta per specificare la conformazione finale è contenuta nella sequenza amminoacidica della proteina stessa.



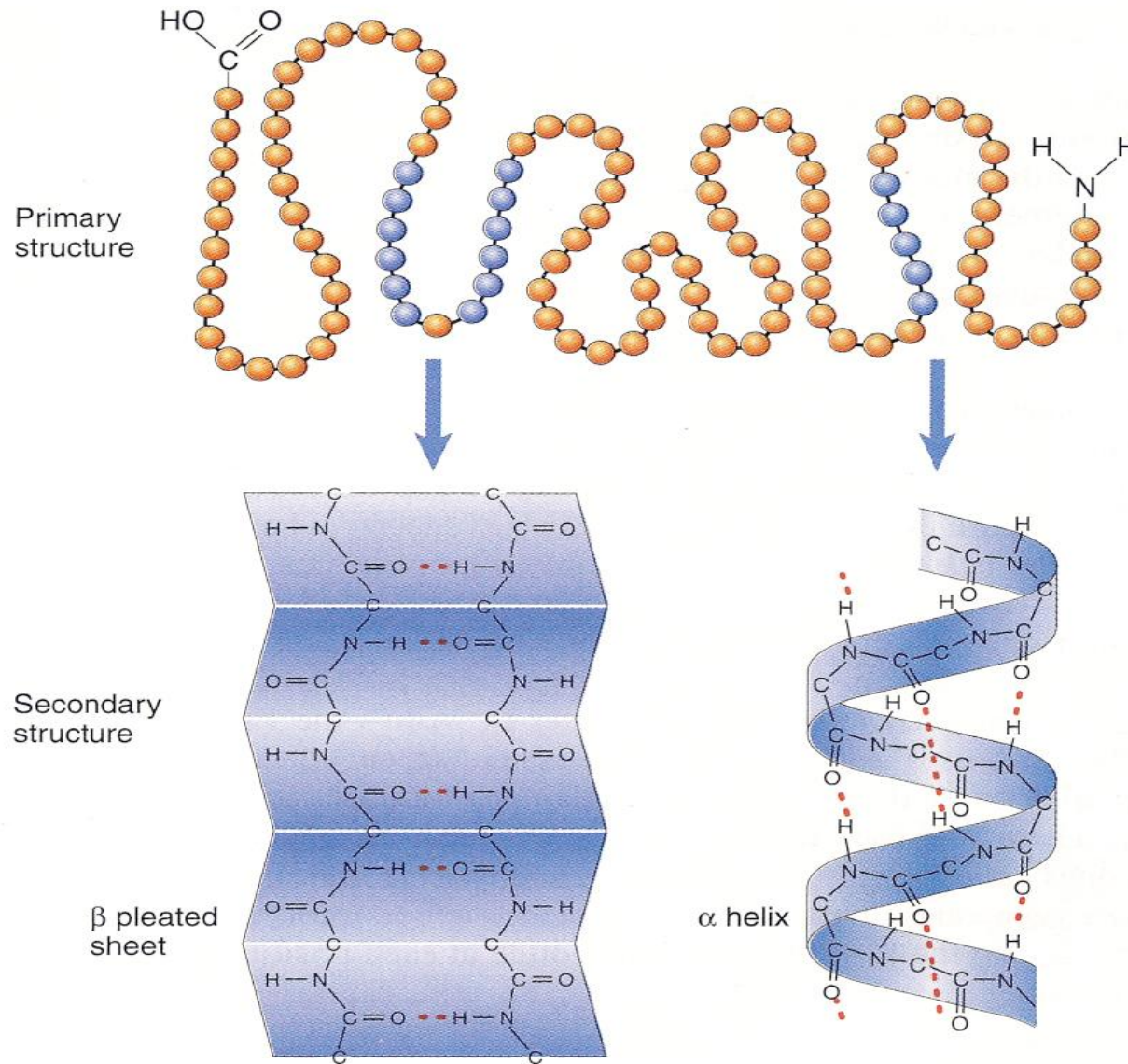
Livelli di organizzazione della struttura proteica



β -sheet

Gli atomi di carbonio che costituiscono l'ossatura della catena polipeptidica sono localizzati in successione sopra e sotto il piano del foglio mentre i gruppi R sporgono alternativamente nei due lati opposti del foglietto.

isoleucina,
valina,
fenilalanina

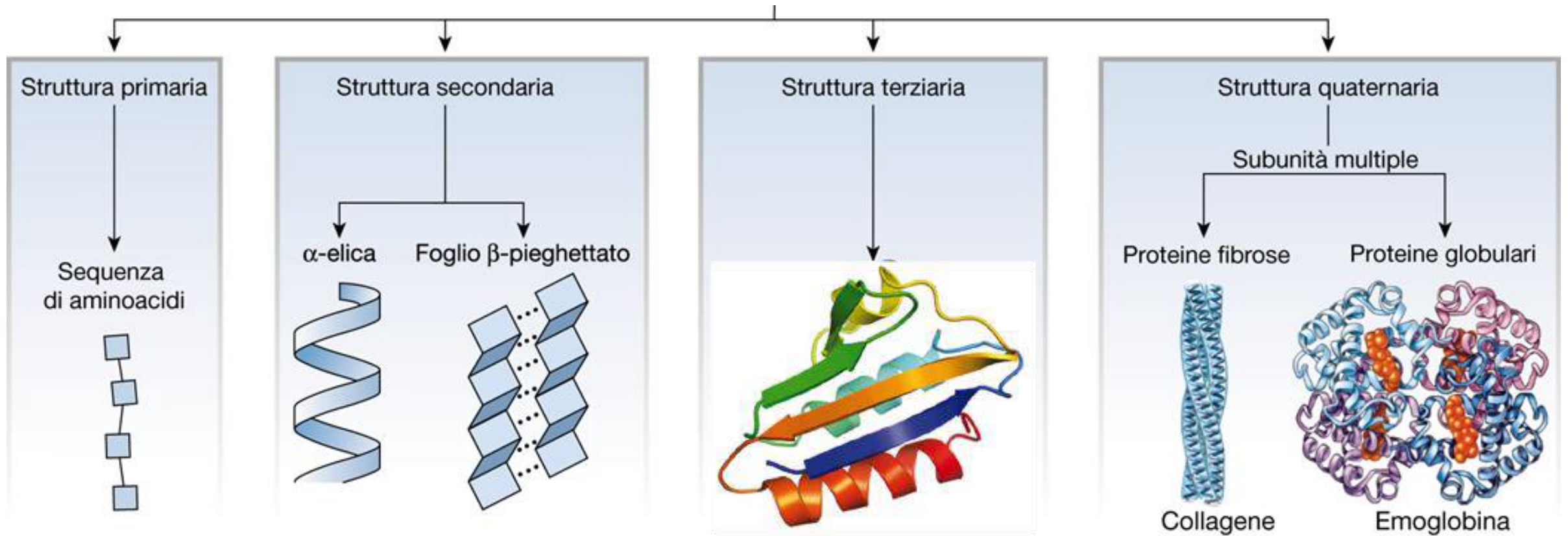


α -elica

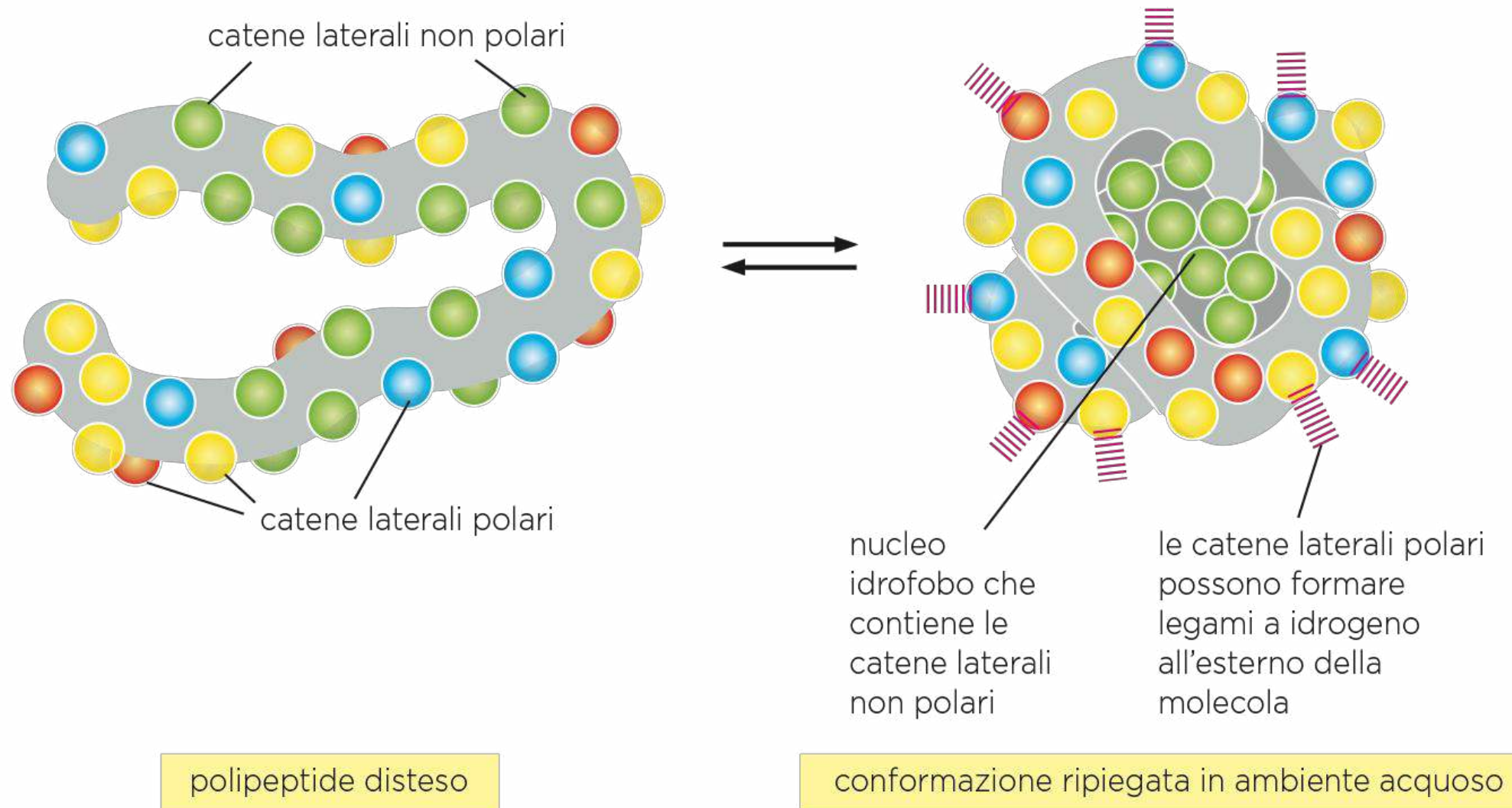
Lo scheletro è all'interno dell'elica e le catene laterali si proiettano all'esterno.

leucina,
glutammato,
metionina

Livelli di organizzazione della struttura proteica



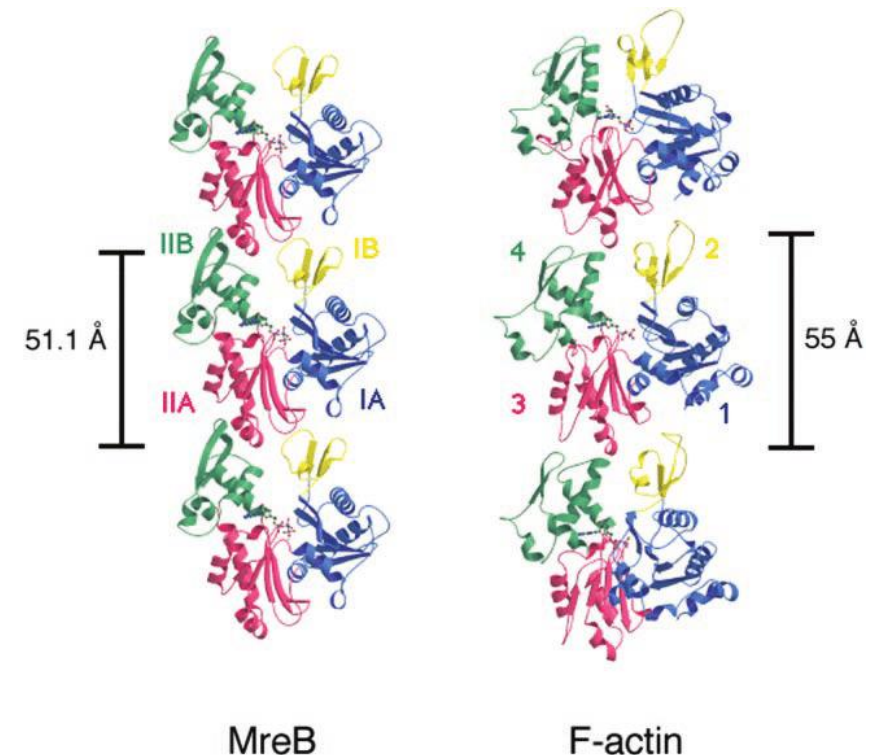
La conformazione finale è anche in relazione all'ambiente in cui si trova la proteina.



Tutta l'informazione richiesta per specificare la corretta conformazione è contenuta nella sequenza amminoacidica della proteina stessa.

Si può sempre predire la conformazione di una proteina conoscendo la sua sequenza amminoacidica?

La proteina MreB batterica e la proteina F-actina di una cellula eucariote hanno una struttura tridimensionale molto simile ma sequenze amminoacidiche diverse.



Metodologie per determinare la conformazione di una proteina

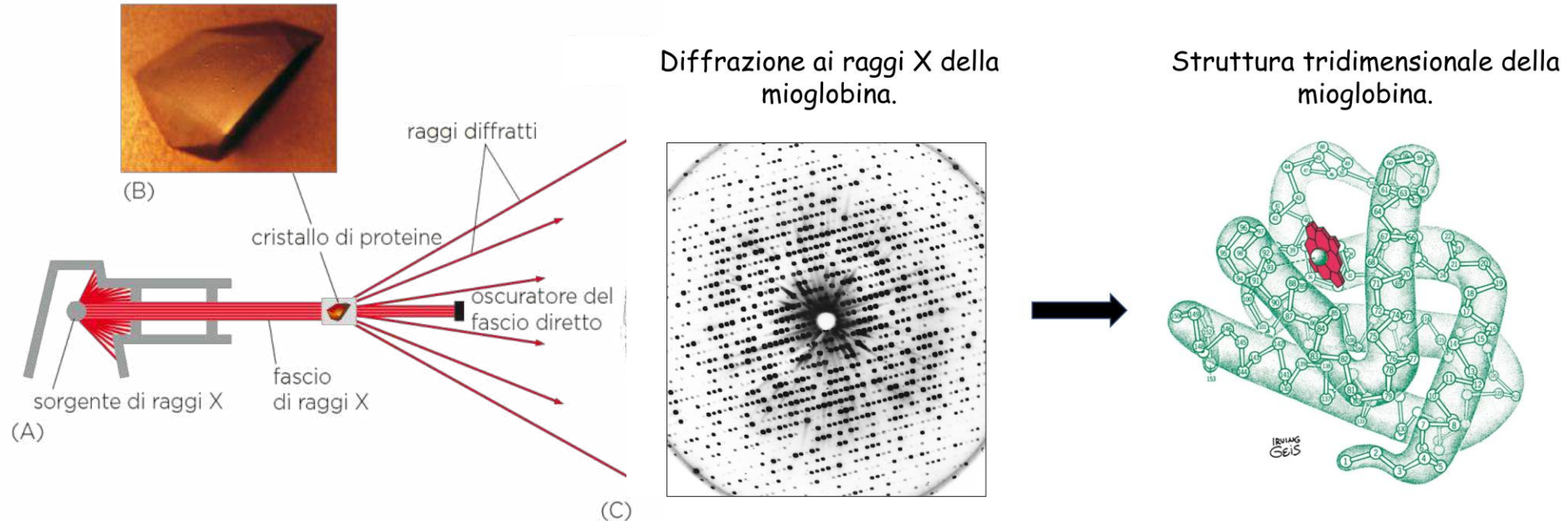
Cristallografia ai raggi X

Spettrometria di risonanza magnetica nucleare (RMN)

Microscopia crioelettronica (cryo-EM)

CRISTALLOGRAFIA A RAGGI X

Tecnica ad alta risoluzione che consente di determinare la disposizione dei singoli atomi dentro una molecola.



1. Un fascio di raggi X viene diretto contro un cristallo
2. Dispersione dei raggi X secondo un modello caratteristico determinato dalla posizione degli atomi entro la molecola (*quadro di diffrazione*)
3. Calcolo della struttura in base allo schema di diffrazione

Chaperon molecolari

I *chaperon molecolari* sono proteine che si legano ad altri polipeptidi promuovendone il loro corretto ripiegamento e prevenendone l'aggregazione.

Possono

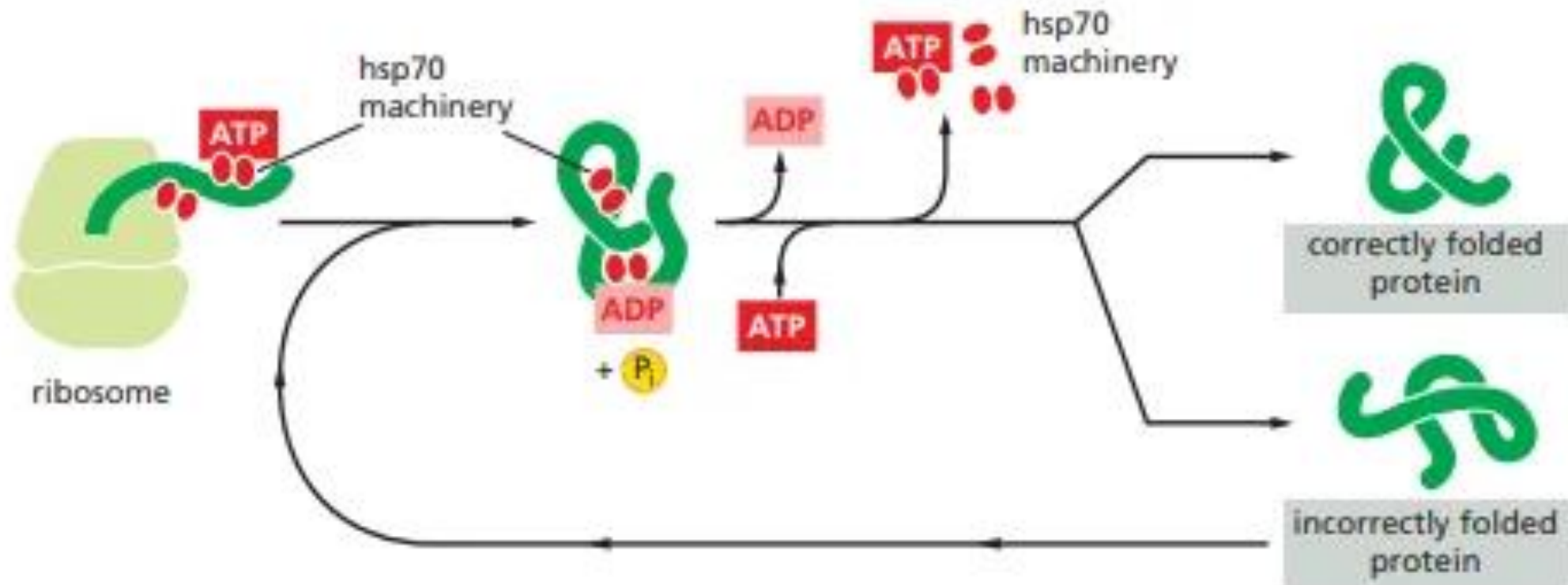
- ✓ agire sulle proteine che stanno sintetizzando o già sintetizzate
- ✓ recuperano proteine mal ripiegate o parzialmente denaturate

Sono una categoria di proteine presenti in tutti gli organismi viventi.

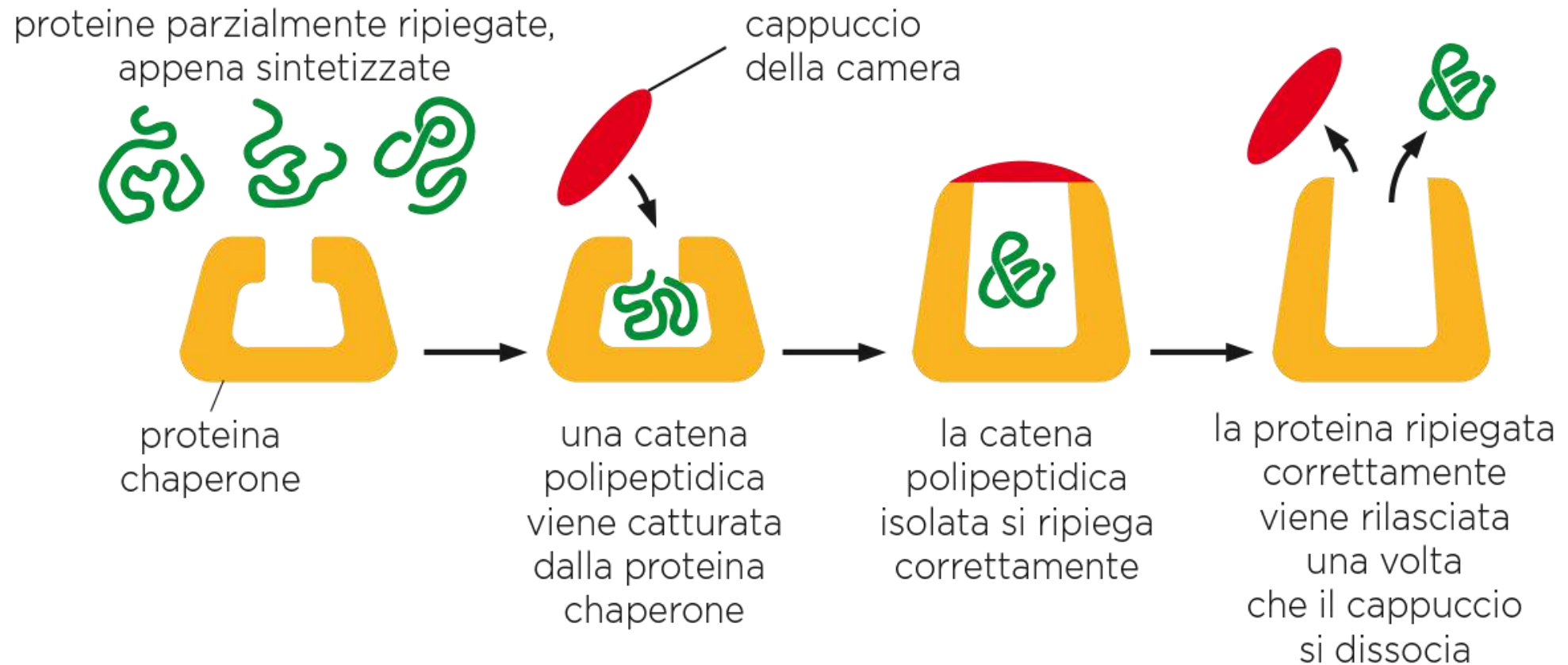
Sono indicate con la sigla *Hsp* = heat shock protein.

Le proteine chaperon consumano ATP per funzionare.

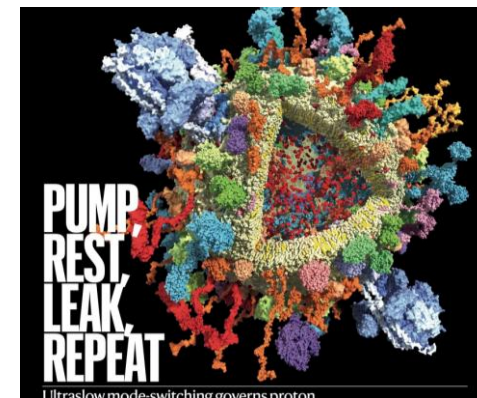
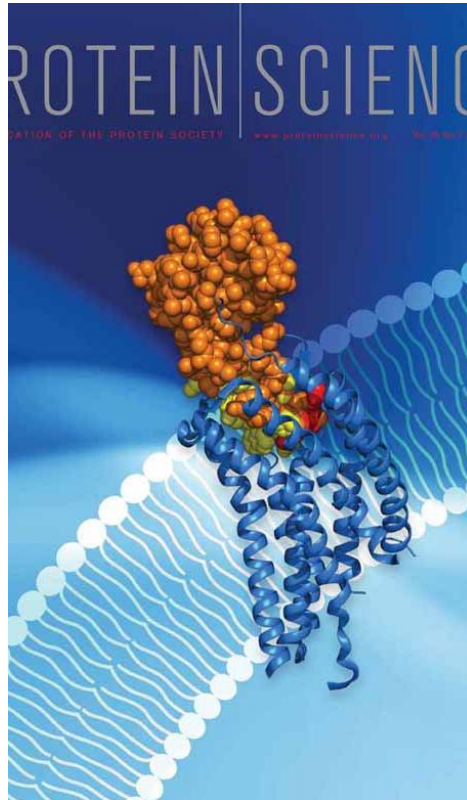
Le proteine **chaperon Hsp70** si legano alle regioni idrofobiche del peptide nascente e coadiuvano formazione la corretta struttura finale.



Le proteine chaperon **Hsp60** sono complessi proteici in cui i polipeptidi appena sintetizzati vengono ripiegati nel modo corretto senza subire interferenze da parte di altre macromolecole.

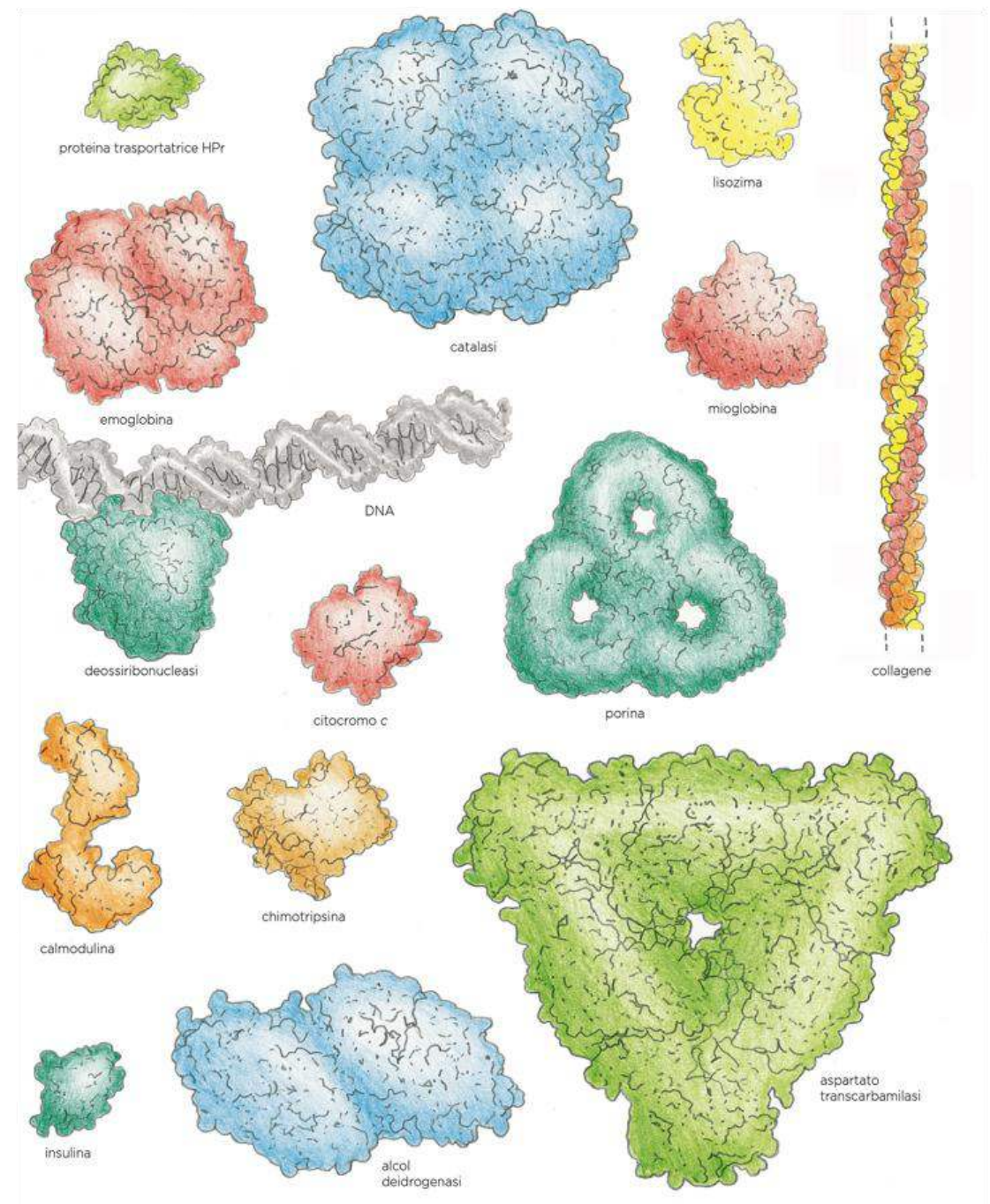


Per poter diventare una proteina funzionante la catena polipeptidica deve assumere una determinata conformazione necessaria all'attività biologica.



Ogni proteina assume una specifica conformazione che ne determina la funzione.

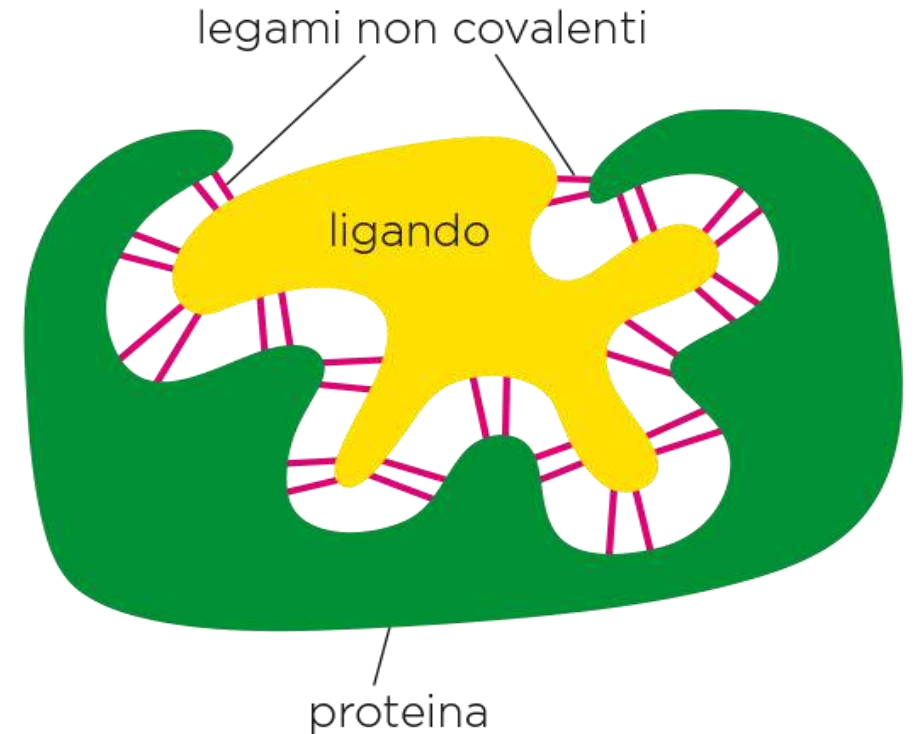
- ✓ Enzimi
- ✓ Proteine regolatrici
- ✓ Proteine strutturali
- ✓ Proteine motrici
- ✓ Proteine di trasporto
- ✓ Proteine ormonali
- ✓ Proteine recettoriali
- ✓



L'attività delle proteine dipende dalla loro capacità di legarsi specificamente ad altre molecole (ligandi).

Tale legame

- ✓ avviene a livello del *sito di legame*
- ✓ è altamente selettivo (*specificità di legame*)
- ✓ implica interazioni non covalenti
- ✓ può essere transitoria o stabile

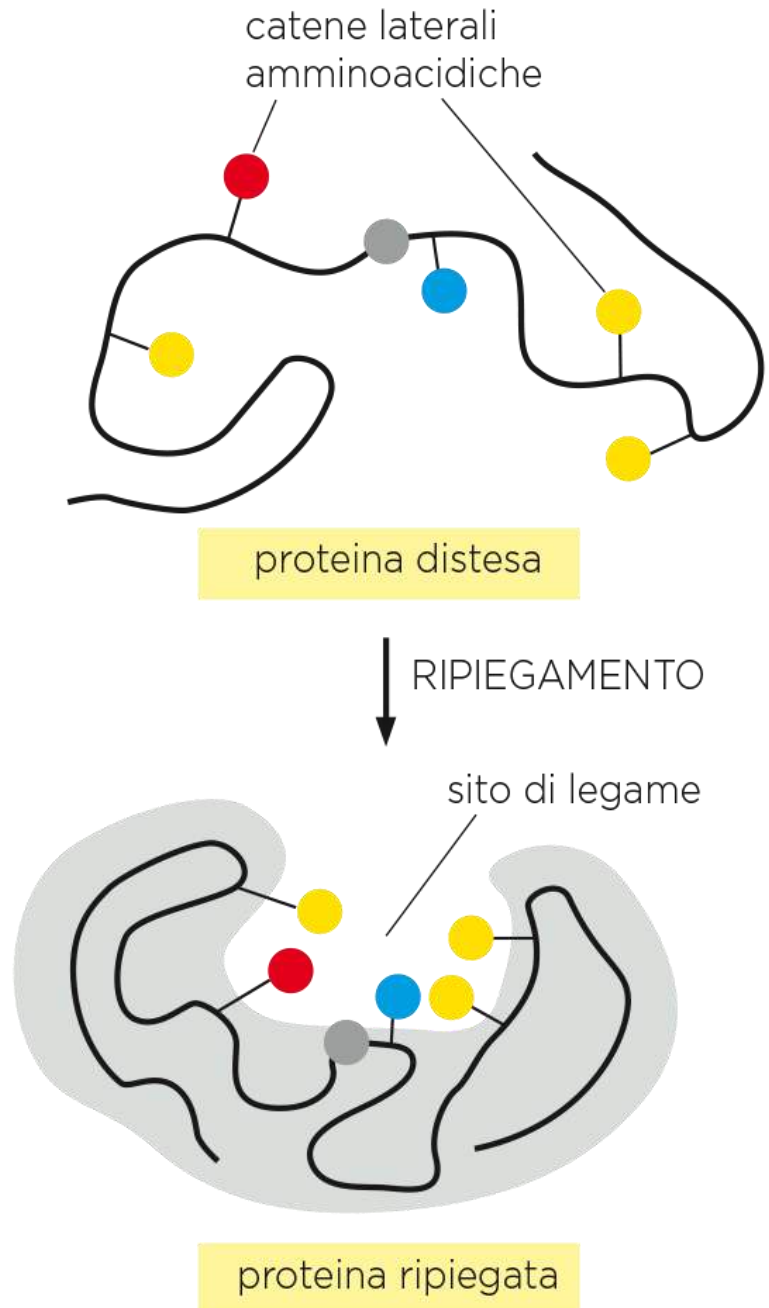


Sito di legame

Il sito di legame è la regione della proteina che interagisce con il ligando.

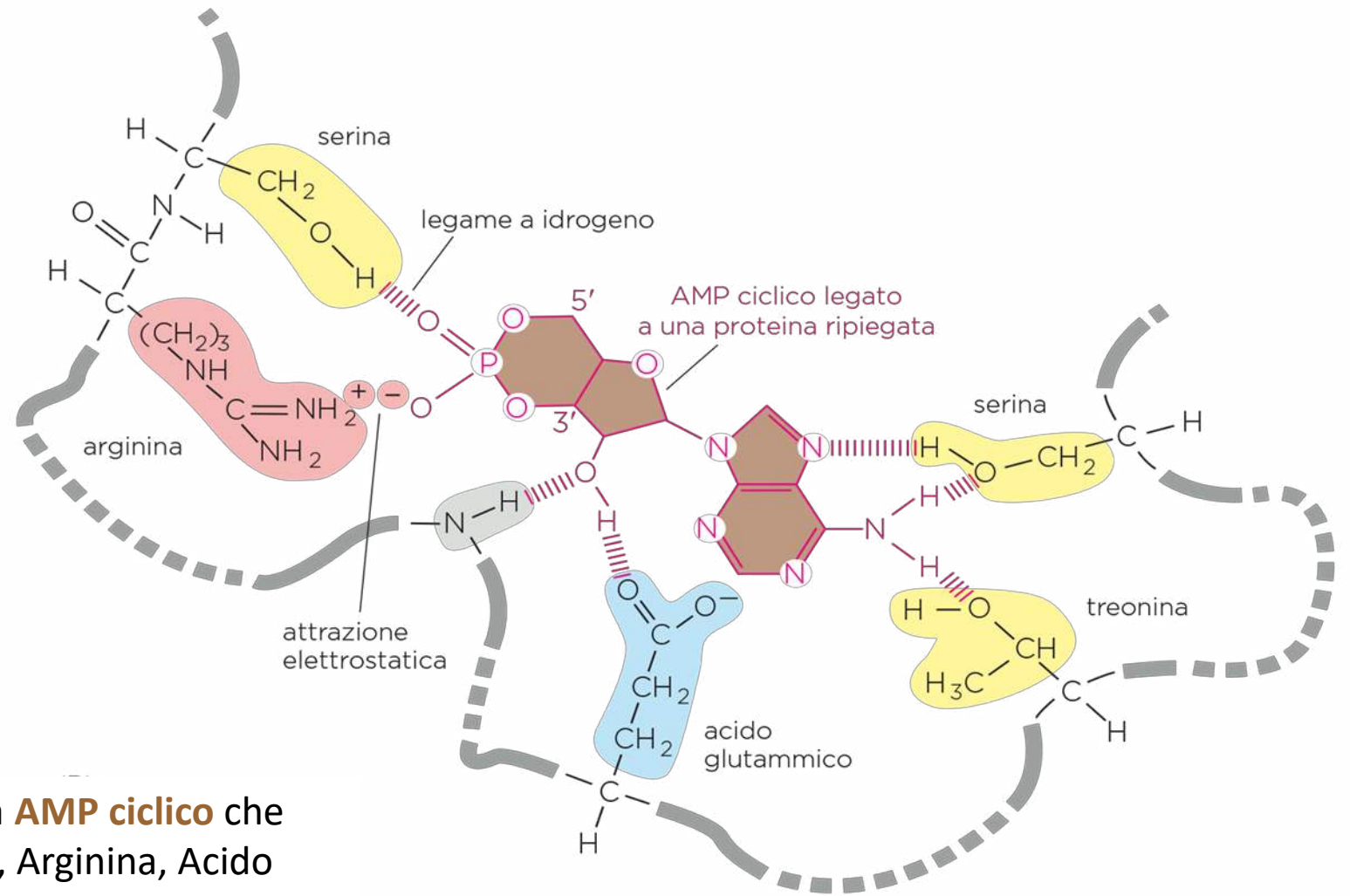
E' formato da una particolare disposizione delle catene laterali degli aminoacidi che stabiliscono interazioni deboli tra la proteina e il suo ligando.

Una proteina che non assume la corretta struttura tridimensionale (mal ripiegata o distesa) non presenta il sito di legame e perde la sua funzione.

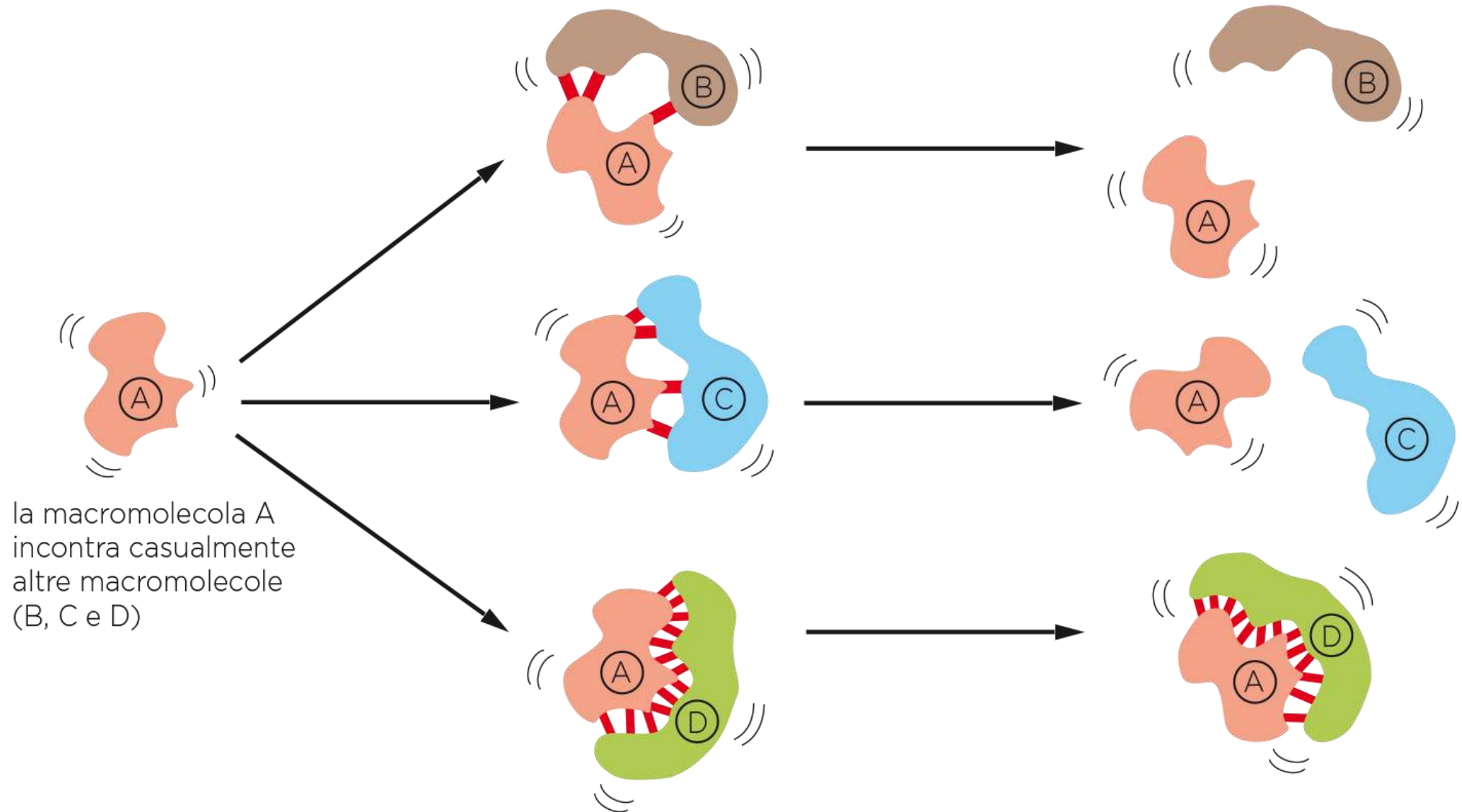


Il ripiegamento della catena polipeptidica crea il **sito di legame** che permette il maggior numero di interazioni non covalenti con specifici ligandi.

In questo esempio il ligando è la molecola **AMP ciclico** che interagisce con le catene laterali di Serina, Arginina, Acido Glutammico, Treonina e Serina nel sito di legame della proteina.



Il numero di interazioni deboli della proteina con il suo ligando determinerà la stabilità del legame.

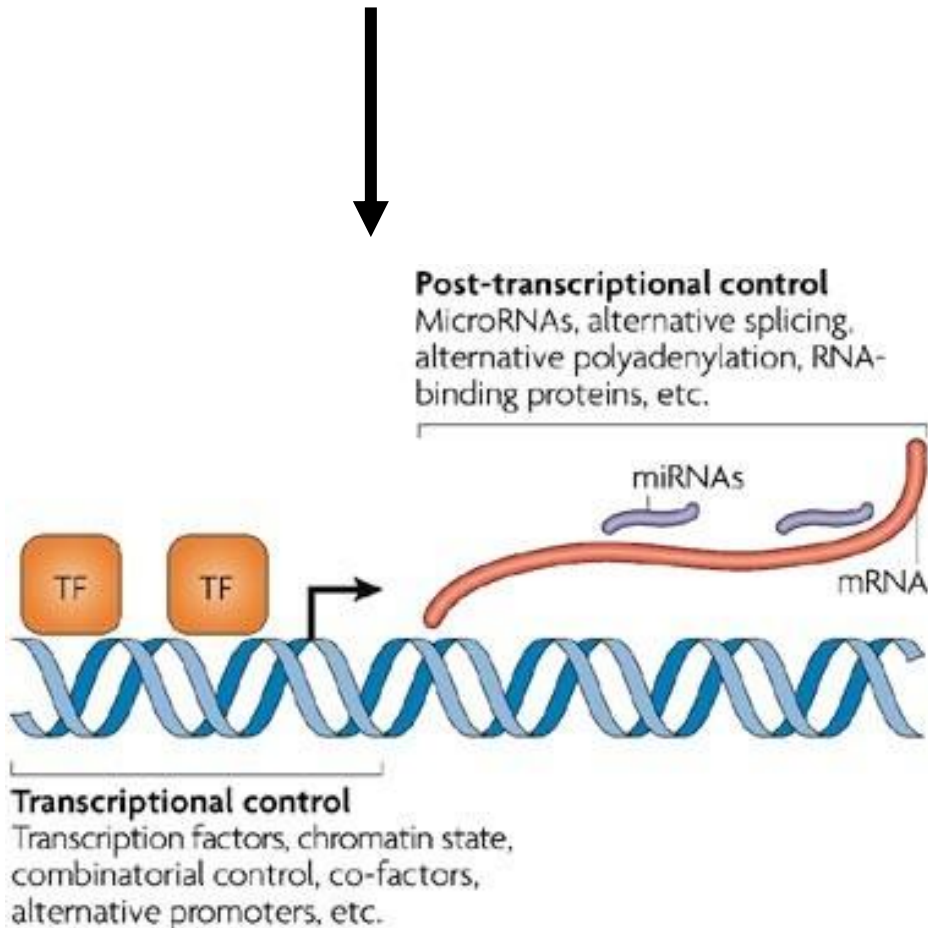


L'attività di alcune proteine è regolata in modo da adattarsi in modo ottimale allo stato in cui la cellula si trova.

La regolazione delle proteine avviene su diversi livelli:

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)

1) Sintesi e/o degradazione



Nature Reviews | Genetics



Le proteasi per la degradazione
si trovano nei

- ✓ Proteasomi
- ✓ Lisosomi