

Bioinformatica della proteina GFP e sue applicazioni per la localizzazione intracellulare: trasfezione ed analisi dei trasfettati mediante microscopia di fluorescenza

Laboratorio di Biochimica Strutturale ed Immunologia (Responsabile attività: Proff. M.A. Castiglione Morelli e V. Infantino, Tutor: Dr.ssa Anna Santarsiero)

~~~~~

## **Bioinformatica della proteina GFP**

**(dal sito della Protein Data Bank, PDB)**

Questa esercitazione guidata di bioinformatica esplora la relazione fra sequenza del gene, struttura della proteina e funzione biologica della *green fluorescent protein* (GFP).

- ✓ Si troveranno nel sito della PDB le strutture;
- ✓ Si useranno strumenti per visualizzare ed esplorare struttura e funzione della GFP;
- ✓ Si costruirà un modello della GFP di carta;
- ✓ Si troverà il gene per la GFP e si visualizzeranno alcune importanti mutazioni.

L'archivio PDB è il principale sito per il deposito delle strutture 3D determinate sperimentalmente di proteine, acidi nucleici ed insiemi complessi; tale risorsa aiuta gli studenti ed i ricercatori a comprendere tutti gli aspetti della biomedicina ed agricoltura, dalla sintesi delle proteine alla salute e alla malattia. La PDB cura ed annota i dati strutturali provenienti da ricercatori di tutto il mondo; il sito fornisce anche una grande varietà di strumenti e risorse per cercare, visualizzare, scaricare ed analizzare le strutture delle biomolecole.

### **Parte I. Trovare ed esplorare la struttura 3D della GFP**

Scopo di questa parte dell'esercitazione è indagare le relazioni fra la struttura della GFP e la sua funzione biologica. La GFP è espressa dalla medusa *Aequorea victoria* (Fig. 1) che vive nelle acque dell'oceano Pacifico; essa assorbe radiazione UV dalla luce solare e la riemette come radiazione verde di minore energia. La proteina è stata largamente utilizzata negli ultimi decenni come marcatore per monitorare in tempo reale l'attività delle proteine e l'espressione dei geni all'interno di una cellula vivente. La sua scoperta e le sue applicazioni sono valse il premio Nobel per la Chimica a Shimomura, Chalfie, Tsien nel 2008.

#### **Compito 1: Trovare ed esplorare le strutture della GFP sul sito web della PDB**

Andare sul sito: <http://www.rcsb.org>

Fare una ricerca dando come parola chiave: *green fluorescent protein*.

La pagina dei risultati contiene una lista di proteine correlate alla GFP. Si possono così esplorare tutte le strutture cliccando sui differenti esempi; oppure creare dei report in vari formati con diverse informazioni; o si può generare un collage delle varie immagini (selezionando in view: *Gallery*). Provare qualcuna di queste opzioni.

Per maggiori informazioni sulla proteina andare in *Learn* e poi su *Molecule of the month*.

Per il resto dell'esercitazione si utilizzerà la proteina GFP dell'*Aequorea victoria* con sigla PDB ID: 1EMA (Fig. 2).

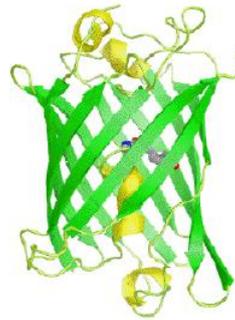


Fig.1: Medusa Aequorea Victoria Fig.2: Struttura della GFP (1EMA)

### **Compito 2: Esplorare il backbone della GFP usando il programma Simple Viewer**

Sul lato sinistro della pagina, si vede un riquadro con una immagine e dei link a dei programmi di grafica molecolare. Alcuni di questi programmi grafici lavorano solo con le molecole viste come unità asimmetriche; altri funzionano sia con le unità asimmetriche che con l'unità biologica (cioè quella che è funzionante dal punto di vista biologico).

- Selezionare "Asymmetric unit" utilizzando le frecce poste ai lati dell'immagine.
- Selezionare qui il programma grafico *Simple Viewer*
- Nella finestra appare la rappresentazione schematica della molecola; con il mouse traslare e ruotare la molecola.
- Cliccando con il mouse sulla struttura appare il nome ed il numero del residuo toccato e il tipo di atomo selezionato
- Identificare le estremità N e C terminale della molecola
- Quali sono il primo e l'ultimo amminoacido che appaiono nella struttura? Quale può essere il motivo per cui mancano alcuni aa?

### **Compito 3. Visualizzazione della GFP mediante il programma Protein Workshop**

Il programma grafico precedente permette di avere un'immagine della forma complessiva della struttura ma non permette di avere un esame più da vicino delle catene laterali degli amminoacidi e delle loro interazioni. Usando il programma ***Protein Workshop*** potremo esaminare in maggiore dettaglio la struttura della GFP.

- Tornare alla pagina riassunto Structure Summary.
- Sotto l'immagine cliccare sul link *Protein Workshop*.
- Verrà caricato il programma (se viene richiesto conferma, scaricare il programma ed accettare l'esecuzione cliccando su *Run* quando richiesto)
- La finestra grafica è sulla sinistra ed il pannello di controllo è a destra
- Cliccando con il mouse sulla figura: ruotarla (tasto sx), traslarla (tasto dx) e fare zoom (tasto centrale). Prendere confidenza con questi comandi del mouse.

Il programma fornisce una rappresentazione *ribbon* (nastro) del *backbone* con delle frecce per rappresentare i foglietti beta e un nastro arrotolato per le eliche. La struttura è mostrata in colori pastello che vanno dal violetto (N-ter) al rosso (C-ter).

### **Compito 4: Diversi modi di guardare la GFP**

Per passare ad una rappresentazione con tutti gli atomi si devono eseguire vari passaggi. Nel pannello di controllo sotto *Tools* bisogna togliere la rappresentazione in ribbon:

- Cliccare su *Visibility*
- Scegliere *Ribbons*
- Nel riquadro bianco in basso cliccare su 1EMA e scompare il ribbon (Se si clicca di nuovo su 1EMA il ribbon ricompare)
- Cliccare su *Visibility*
- Scegliere *Atoms and bonds*

- Cliccare su 1EMA e si ha la rappresentazione *balls and sticks*

Gli atomi sono ora mostrati con sfere verdi (C), blu (N), rosse (O), gialle (S). Gli atomi H non sono mostrati. Le linee fra gli atomi rappresentano i legami covalenti.

Questo tipo di rappresentazione mostra molte informazioni che rendono però difficile trovare specifiche caratteristiche strutturali quando vengono mostrati tutti gli atomi

Gli atomi di S sono nelle Cys e Met; i singoli atomi di O in rosso sono le molecole di H<sub>2</sub>O. Il cromoforo è però difficile da visualizzare (anello a 5 termini connesso ad un anello a 6) ed è nascosto all'interno della GFP.

Per ritornare alla vista precedente:

- Cliccare su 1EMA e la GFP scompare
- Selezionare *Ribbons*
- Cliccare su 1EMA e la GFP ricompare sotto forma di ribbon

### **Compito 5: Esplorare il cromoforo in modalità *ribbon* e *atom view***

- Selezionare *Visibility*
- Scegliere *Atoms and bonds*

Nella box 4 aprire *Chain A* e selezionare la posizione del cromoforo: 66 CRO. Selezionando e deselezionando, il cromoforo apparirà e scomparirà sotto forma di atomi. Si può ruotare la struttura per vedere meglio come il cromoforo si adatta nella forma complessiva della GFP.

### **Compito 6: Visualizzare i legami idrogeno nella GFP con il programma *JSmol***

Le strutture secondarie, come i foglietti beta della GFP, sono stabilizzate da H-bond. I legami più importanti sono quelli fra atomi di idrogeno degli NH e gli ossigeni dei C=O nel backbone proteico e che stabilizzano lo stato ripiegato. Può essere difficile visualizzare i legami idrogeno in quanto le strutture cristallografiche tipicamente non includono gli atomi H. Gli H-bond si possono ad esempio visualizzare con il programma *Jmol*.

- Ritornare alla PDB entry 1EMA
- Selezionare in 3D View il programma *JSmol*
- Nella box *Display options* selezionare in *Style: backbone*
- In *scripting options* (si apre una finestra in cui poter dare dei comandi) dare: *wireframe 100*. Appaiono tutte le catene laterali degli aa.
- Con il tasto destro del mouse nella finestra appariranno altre funzioni.
- Per vedere i legami idrogeno *Selezionare H-bonds*

### **Compito 7: Costruire un modello in carta della GFP**

- ✓ Seguire le istruzioni riportate sul foglio fornito

## **Parte II. Gene e sequenze della proteina GFP**

Verranno usate diverse risorse *on-line* per: (i) trovare la sequenza del gene per la GFP; (ii) tradurre questa sequenza nella sequenza della proteina; (iii) usare la sequenza della GFP per trovare forme mutanti della proteina con funzioni alterate.

### **Compito 1: trovare nel DNA la sequenza del gene GFP in UniProtKB**

La UniProtKB è una banca dati che organizza ed annota le sequenze delle proteine; questo *database* contiene importanti informazioni per i ricercatori che studiano le relazioni fra sequenze proteiche e funzioni delle proteine. Per accedervi si userà il sito ExPASy, portale delle Risorse bioinformatiche dell'Istituto

Svizzero di Bioinformatica (SIB) che fornisce accesso a database scientifici e strumenti software in diverse aree delle scienze della vita (proteomica, genomica, filogenesi, evoluzione, trascrittomica, etc).

Andare su: <http://www.expasy.org/>

- ✓ Selezionare nel menù a tendina: UniProtKB e dare come testo: “*green fluorescent protein*”
- ✓ Restringere la ricerca prima cliccando solo su *reviewed*; poi filtrare usando il termine “green” al nome della proteina.
- ✓ Selezionare: GFP\_AEQVI(P42212), si arriva così alla pagina riassunto della GFP
- ✓ Leggere: Funzione, Nome e tassonomia; Patologia e Biotecnologia; modificazioni post-traslazionali; espressione; interazione; famiglia.
- ✓ Cliccare su *Cross-references* a sinistra nella pagina; nel *sequence database* scegliere Genbank e poi cliccare sul link mRNA (M62654) alla cima della lista.

Si raccoglierà così il dato relativo alla sequenza del gene mRNA che codifica per la sequenza proteica della GFP. Tale sequenza rappresenta l'intera sequenza genomica del gene, incluso le *5'untranslated region* (UTR), gli introni e le 3'UTR; la sequenza rappresenta il pre-mRNA prima dello splicing e della traduzione. Solamente alcune parti della sequenza sono usate per la proteina.

Il gene intero contiene 5170 basi; l'mRNA contiene le basi: 198-413, 946-1240, 2308-2744. A fondo pagina c'è l'intera sequenza del DNA che si traduce nella proteina GFP:

Si può accedere direttamente a questa pagina anche andando sul sito web dell'NCBI (*National Center for Biotechnology Information* negli USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) selezionando nel menù a tendina il data base *Nucleotide* e dando l'entry **M62654**.

Selezionare qui l'mRNA, vengono evidenziate in marrone le 3 regioni (198..413, 946..1240, 2308..2744) e in DISPLAY a fondo pagina selezionare il formato FASTA (che ha sempre una prima linea di intestazione e poi tutte le altre linee contengono la sequenza). Copiare la sequenza nella memoria del computer (*clipboard*) (comando: ctrl + C) tralasciando la prima linea che inizia con >gci.....

## **Compito 2: traduzione della sequenza del DNA in sequenza proteica.**

Una volta ottenuta la sequenza del DNA, tradurla di nuovo in sequenza proteica usando lo strumento *Translate* del sito web ExpASY.

- ✓ Andare su <http://www.expasy.org/>
- ✓ Cliccare a sinistra su *Resources A..Z* (a sinistra nella pagina) e qui selezionare alla lettera T: *Translate* (oppure in *Transcriptomics* selezionare *Translate*)
- ✓ Inserire la sequenza copiata prima (ctrl + v), scegliere come formato di output “*Includes Nucleotide Sequence*” e dare il comando TRANSLATE SEQUENCE

Si ottengono 6 differenti sequenze, ognuna delle quali rappresenta i diversi schemi di lettura del DNA (3 in direzione 5'3' e 3 nell'altra direzione 3'5'). Solamente uno di questi *reading frame* è quello corretto usato per tradurre la proteina: tipicamente, il corretto frame di lettura è la traduzione più lunga e senza interruzioni (assenza di codoni interni di stop).

Nel risultato viene mostrato come è tradotta la sequenza: ogni linea contiene la sequenza del DNA ed evidenzia il codone a 3 lettere insieme con l'aa corrispondente (vedi appendice 1). Guardando il 5'3' Frame

2 vediamo che la “g” non è usata; “ata” si traduce in “I”; “aca” si traduce in “T”; “aag” si traduce in “K”; “atg” si traduce in “M”.

Il frame 5’3’ Frame 2 è quello che genera la migliore traduzione (proteina di 238 aa)

Il codone di inizio è AUG nell’ mRNA (ATG nel DNA), ciò significa che il processo di traduzione dove la sequenza dell’ mRNA è convertita in sequenza proteica, richiede questo codice a 3 lettere per iniziare (11° dall’inizio)

Cliccare sul link del 5’3’ Frame 2

La pagina mostra i residui di Met (M) o i punti di partenza della sequenza proteica, in corrispondenza del codone ATG.

Cliccare sulla prima “M” in sequenza: si ottiene una sequenza che rassomiglia alla sequenza della proteina con cui abbiamo iniziato.

Come possiamo dire che è la stessa di questa ottenuta ora? Per rispondere al quesito, proseguire nell’esercitazione.

### **Compito 3. Trovare proteine con sequenze simili nella PDB**

- ✓ Nella pagina precedente cliccare sul link in blu FASTA, si ottiene così la sequenza in formato FASTA da usare successivamente. Si usa la sequenza per paragonarla quindi con altre sequenze della PDB. Se si trova una sequenza che è la stessa, vuol dire che un ricercatore in qualche parte del mondo ha risolto la struttura 3D di questa proteina.
- ✓ Copiare la sequenza (senza la prima linea);
- ✓ Andare sul sito della PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- ✓ A destra della barra di testo dare *Advanced search* e qui in *Choose a query type* scegliere *Sequence* (BLAST/FASTA/PSI-BLAST). Qui inserire nella box di testo la sequenza copiata prima.
- ✓ Dare il comando *Submit Query*

Il risultato è una lista di tutte le proteine depositate nella PDB che hanno una sequenza che si accorda con quella data. Si può guardare la somiglianza utilizzando il riquadro dell’allineamento delle sequenze per ognuna delle strutture. Come si può osservare il numero di proteine con sequenze simili è elevato (526 strutture depositate, dato aggiornato a maggio 2016) ed include proteine molto simili alla GFP e suoi mutanti.

### **Compito 4: Visualizzare le mutazioni genetiche della GFP in 3D**

La tabella mostra le mutazioni puntiformi che sono necessarie per avere diversi colori della GFP

|                    |                   |
|--------------------|-------------------|
| Green Fluorescent  | Nessuna mutazione |
| Yellow Fluorescent | S65G, S72A, T203F |
| Cyan Fluorescent   | Y66W              |
| Blue Fluorescent   | Y66H, Y145F       |

Dove per esempio “S65G” è un’abbreviazione che indica che nella posizione 65 della sequenza un residuo di Ser (S) è cambiato in Gly (G). Nel mutante della BFP, la proteina fluorescente blu, sono cambiati due residui: Y66H e Y145F, dove la TYR 66 è sostituita con una His modificata e la TYR 145 con una Phe.

Usare il programma *Protein Workshop* per osservare il mutante presente nella PDB con ID: 1BFP. In file selezionare Open PDB ID e dare 1BFP

- Procedere come già fatto per 1EMA (selezionare: Visibility/Atoms and backbone)
- Selezionare 145 PHE
- Selezionare la posizione 66. Notare che l'amminoacido modificato F145 è vicino al cromoforo in posizione 66

Le applicazioni biologiche e la struttura della GFP possono essere viste nel breve video (in inglese):

<https://www.youtube.com/watch?v=wx4a4SX84A>

~~~~~

Applicazioni per la localizzazione intracellulare della GFP: trasfezione ed analisi dei trasfettati mediante microscopia di fluorescenza

L'esperienza di laboratorio prevede, il primo giorno, la trasfezione di cellule HepG2 e HEK293 con i plasmidi SLC25A12_pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO e SLC25A12mut_pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO. Le cellule trasfettate a 48 ore, quindi il terzo giorno, saranno osservate mediante microscopia a fluorescenza. Per dare un'idea complessiva di tutte le fasi procedurali, il secondo giorno sarà effettuata una conta e semina cellulare in piastre che saranno utilizzate per la colorazione, con opportuni fluorocromi, di DNA e mitocondri.

I plasmidi SLC25A12_pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO e SLC25A12mut_pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO sono stati costruiti inserendo la regione codificante del gene umano SLC25A12, rispettivamente, privo di mutazione e con una mutazione nella MTS (*mitochondria-targeting sequence*), nel vettore pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (**Figura 1**) in frame con la regione codificante della GFP. Dopo aver effettuato il clonaggio, mediante sequenziamento del DNA, sono stati selezionati un clone contenente l'intera regione di SLC25A12, priva di mutazioni, all'interno del vettore e un clone contenente la mutazione nella MTS. I cloni sono stati poi amplificati in cellule di *Escherichia coli* e il DNA plasmidico è stato estratto.

Il DNA plasmidico sarà utilizzato negli esperimenti di trasfezione.

Le HEK293 sono cellule umane embrionali renali non tumorali mentre le HepG2 sono cellule umane di carcinoma epatocellulare. Entrambe le linee cellulari, per continuare a proliferare, hanno bisogno del seguente terreno di crescita: DMEM high glucose, 10 % siero fetale bovino, glutammina 2 mM, miscela di penicillina 100U e streptomina 100µg/ml.

La trasfezione sarà effettuata secondo il seguente protocollo:

1. Preparare tre eppendorf da 500 µl;
2. Mettere in tutte le eppendorf 25 µl di OptiMEM;
3. Aggiungere in una eppendorf 0.5 µg di DNA plasmidico SLC25A12_pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (1 µg/µl), in un'altra 0.5 µg di DNA plasmidico SLC25A12mut_pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (1 µg/µl) e nell'altra ancora 0,5 µl di soluzione controllo;
4. Aggiungere in ogni eppendorf 0,9 µl di Fugene HD (tenere prima dell'uso a temperatura ambiente per circa 10 minuti) senza toccare le pareti della eppendorf e pipettare molto;
5. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente;
6. Aggiungere alla piastra tutto il contenuto della eppendorf (DNA+lipidi);
7. Lasciar crescere per 48 ore;

8. Osservare al microscopio a fluorescenza.

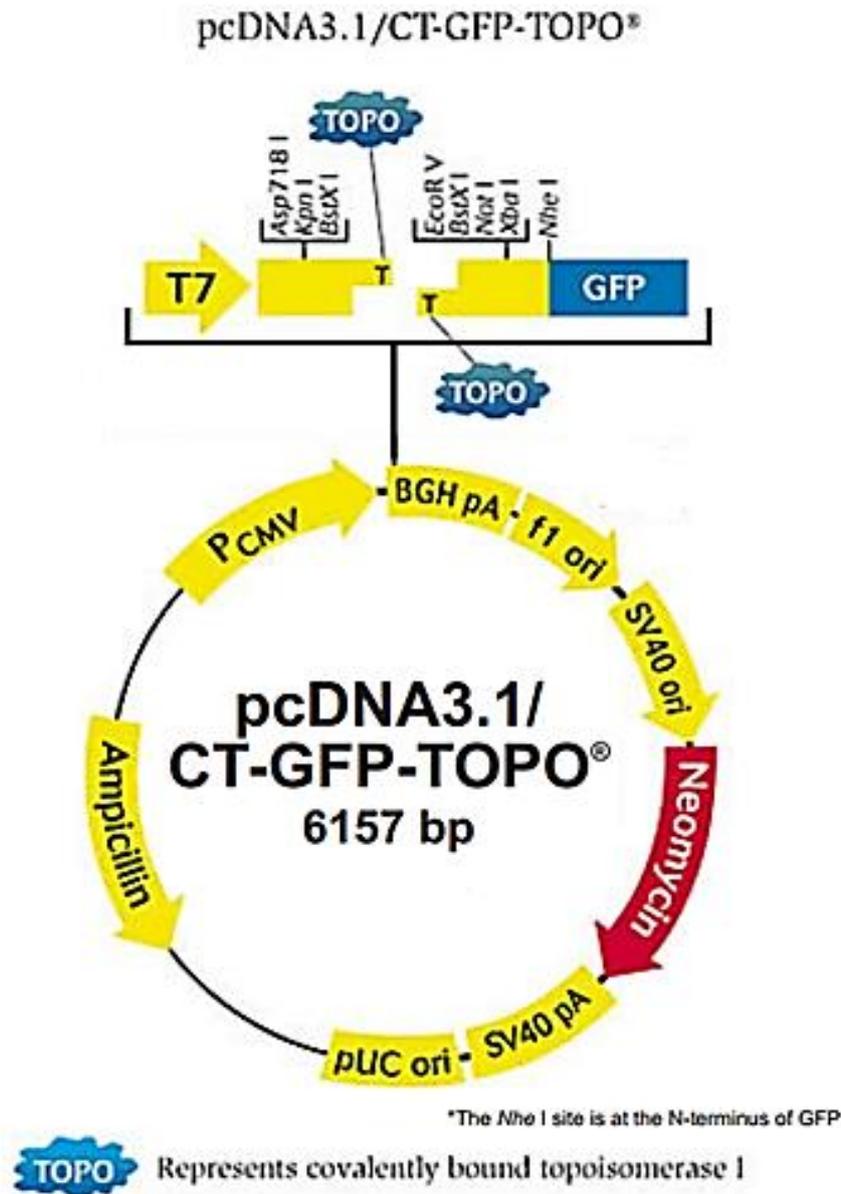


Figura 1: Vettore pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO utilizzato per il clonaggio di SLC25A12

Dopo 48 ore le cellule saranno osservate al microscopio a fluorescenza FLoid® Cell Imaging Station (**Figura 2**). Questo strumento consente una semplice osservazione delle cellule in quanto non prevede l'uso di oculari, ma le immagini sono visualizzate direttamente al monitor. In questo modo è più facile mettere a fuoco i preparati. Inoltre le cellule potranno essere osservate direttamente nelle fiasche durante la loro normale crescita. Non occorre quindi preparare vetrini. Sarà utilizzato il filtro verde e cioè 485 nm (lunghezza d'onda di eccitazione) e 515 nm (lunghezza d'onda di emissione). In questo modo si potrà osservare in quale compartimento intracellulare è presente la GFP. Poiché la sequenza codificante della GFP è stata unita alla sequenza di SLC25A12, e cioè un gene che codifica per una proteina mitocondriale, ci aspettiamo che la fluorescenza sia localizzata a livello mitocondriale nelle cellule trasfettate con il DNA

plasmidico SLC25A12_pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO. Nelle cellule trasfettate con il DNA plasmidico SLC25A12mut_pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO, poiché la mutazione interessa la MTS (*mitochondria-targeting sequence*), la fluorescenza potrà essere osservata a livello citosolico.

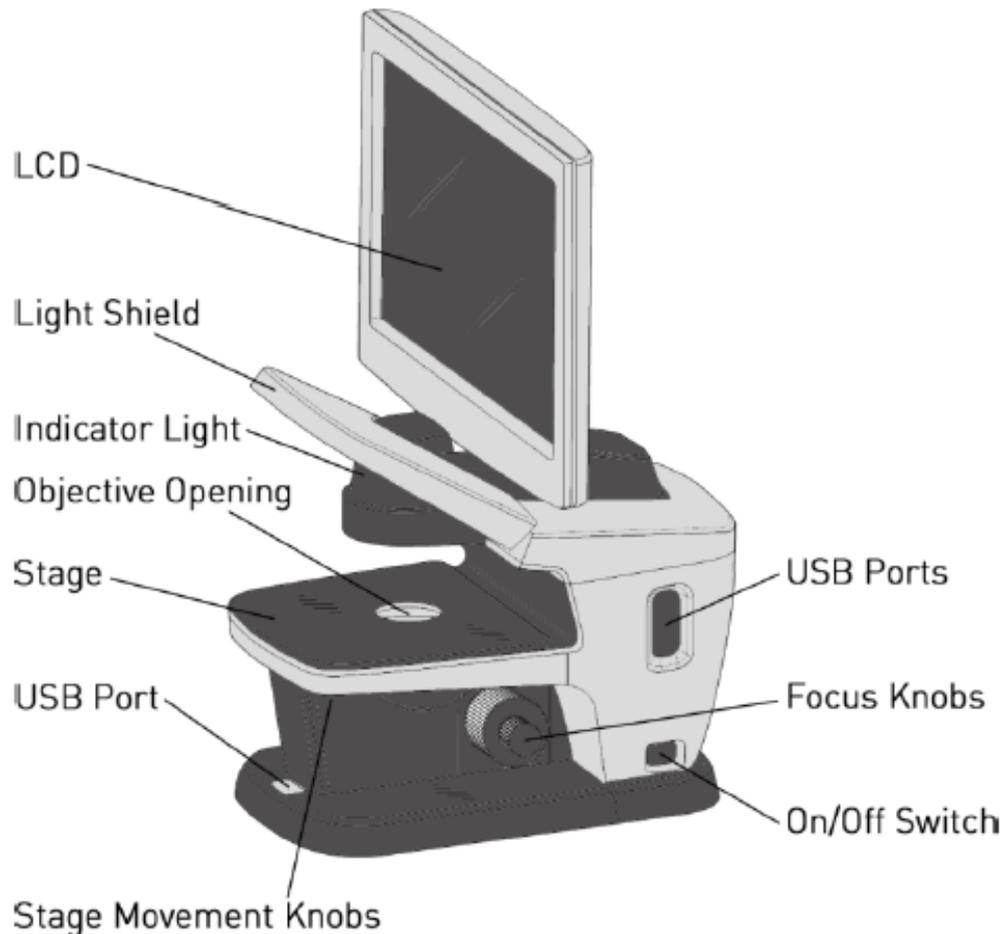


Figura 2: Microscopio a fluorescenza FLoid® Cell Imaging Station

La conta cellulare sarà effettuata mediante l'ausilio della camera di Burker (**Figura 3**), una camera contaglobuli formata da due reticoli di conta indipendenti. Le due celle di conta sono 3 x 3 mm, profonde 0,1 mm, ciascuna divisa in 9 quadrati di 1 mm, ognuno con 16 quadrati di 0,2 x 0,2 mm, e superficie di 1/25 mm²; vi sono inoltre 9 quadrati più piccoli, (0,05 mm e 1/400 mm²), e 24 rettangoli con una superficie di 1/100 mm² interposti ai nove quadrati da 1 mm.

Dopo l'assemblaggio della camera di Burker, sul margine esterno del vetrino coprioggetti, appoggiandosi con il puntale, si pipettano 10 µl della sospensione cellulare permettendo al liquido di riempire per capillarità la camera di conteggio. Poiché bisogna fare una statistica, si contano le cellule in più quadrati.

Il numero di cellule per ml (C) è dato dalla formula:

$$C = n \times 10^4 \times V$$

$$n = (n_1 + n_2 + n_3 + n_4) / 4$$

10^4 = fattore di conversione

V = volume sospensione cellulare

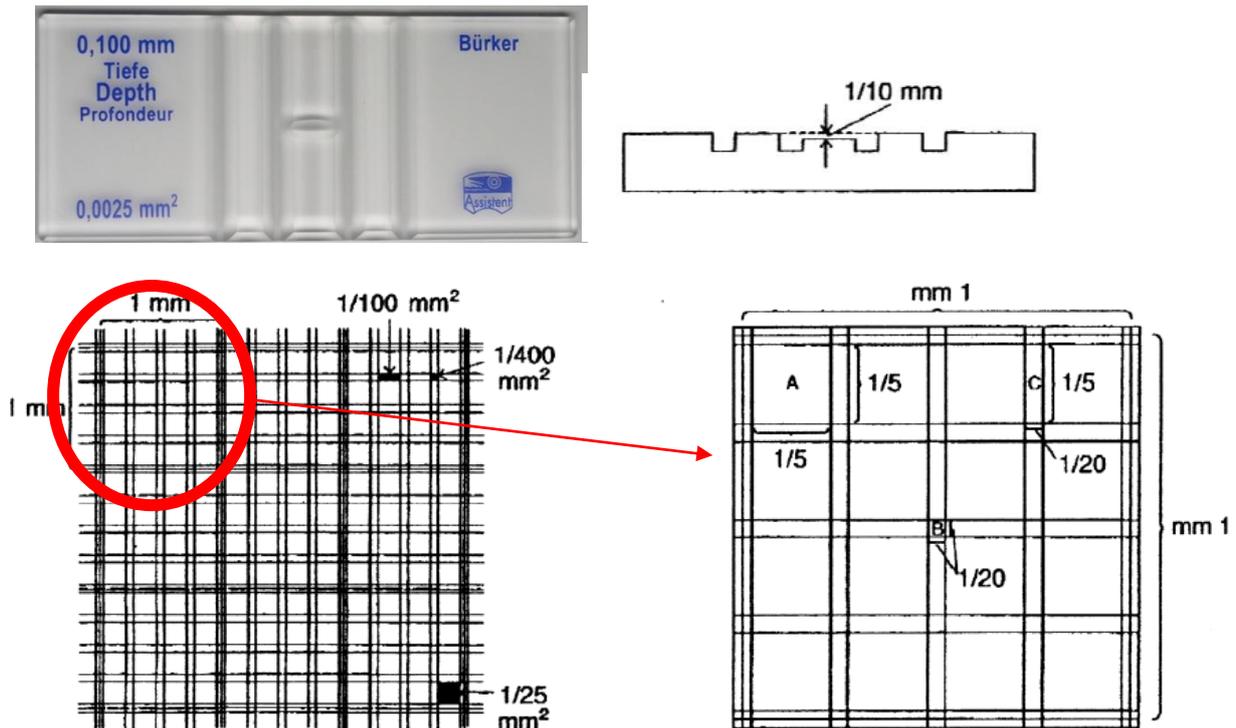


Figura 3: Camera di Burker.

Si procederà con la semina di 500000 cellule in due piastre Petri \varnothing 35 mm, che saranno messe in crescita nell'incubatore per 24 ore a 37°C e 5% di CO₂.

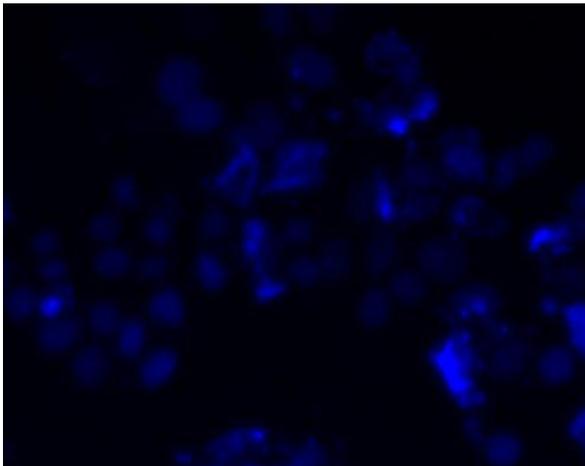
La colorazione del DNA sarà effettuata con il DAPI, quella dei mitocondri con il MitoTracker RED.

Il DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) è un colorante fluorescente che si lega fortemente alle regioni ricche in A-T del DNA. Il DAPI colora preferenzialmente il dsDNA associandosi ai cluster AT nel solco minore, con un aumento di fluorescenza di circa 20 volte. Ha la capacità di attraversare la membrana delle cellule intatte ed emette una fluorescenza azzurra. Per il DAPI legato a dsDNA λ_{ex} =358nm e λ_{em} = 461 nm.

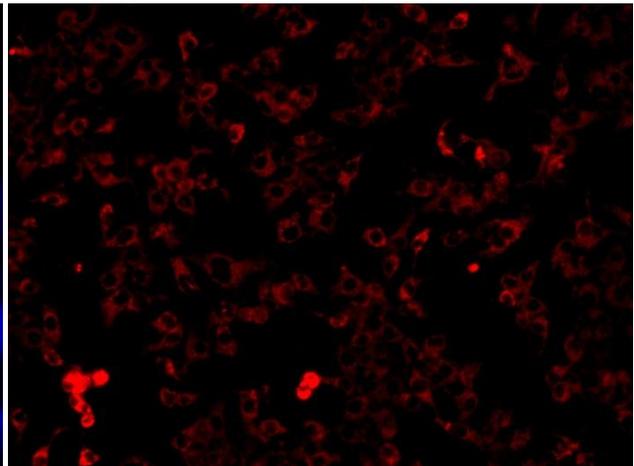
Il MitoTracker Red è un colorante utilizzato per visualizzare i mitocondri. Diffonde passivamente attraverso la membrana cellulare e si accumula nei mitocondri funzionali: entra in cellula per diffusione passiva dove è ossidato a catione fluorescente. Emette fluorescenza rossa: λ_{ex} 579 nm e λ_{em} =599 nm

Il protocollo per la colorazione è il seguente:

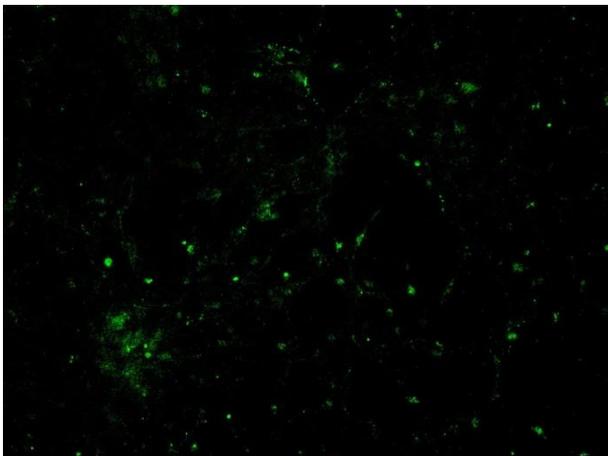
1. Aspirare il terreno di coltura e effettuare un lavaggio con 1 ml di PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4);
2. Aggiungere 1 μl di DAPI (concentrazione finale 300nM) o di MitoTracker RED (concentrazione finale 50 nM) in 1 ml di PBS;
3. Incubare 30 min a 37°C;
4. Visualizzare al microscopio a fluorescenza.



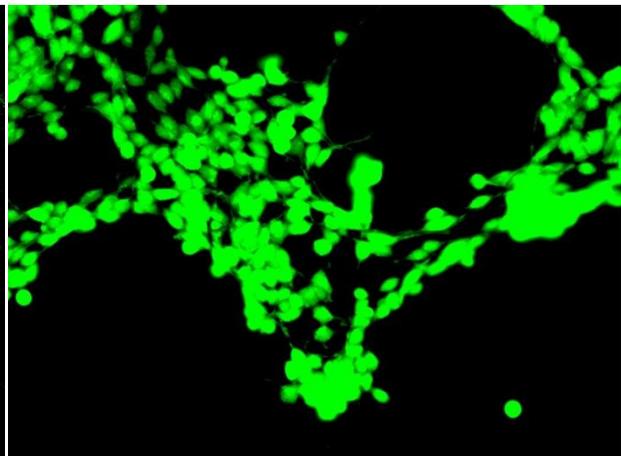
Dapi-HepG2



Mito-Tracker-HepG2



SLC25A12-Hek293

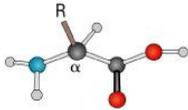


SLC25A12-mut Hek293

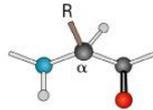
Appendice 1

Strutture chimiche degli aminoacidi

From **Protein Structure and Function** by Gregory A Petsko and Dagmar Ringe



The chemical structure of an amino acid. The backbone is the same for all amino acids and consists of the amino group (NH_2), the alpha carbon and the carboxylic acid group (COOH). Different amino acids are distinguished by their different side chains, R. The neutral form of an amino acid is shown: in solution at pH 7 the amino and carboxylic acid groups ionize, to NH_3^+ and COO^- . Except for glycine, where $\text{R}=\text{H}$, amino acids are chiral (that is, they have a left-right asymmetry). The form shown is the L-configuration, which is most common.



An amino-acid residue as it is incorporated into a polypeptide chain. The R group is the side chain. The 20 different side chains that occur in proteins are depicted below. For proline, the side chain is fused back to the nitrogen of the backbone. The configuration about the alpha carbon is L for most amino acids in proteins.

○ Hydrogen ● Carbon ● Oxygen ● Sulfur ● Nitrogen | bond to functional group (R) || double bond | partial double bond | single bond



Hydrophobic



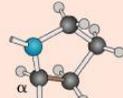
Alanine
Ala
A



Valine
Val
V



Phenylalanine
Phe
F



Proline
Pro
P

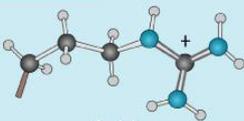


Leucine
Leu
L

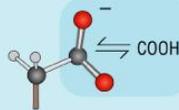


Isoleucine
Ile
I

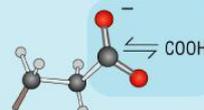
Hydrophilic



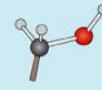
Arginine
Arg
R



Aspartic acid
Asp
D



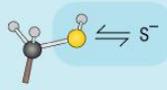
Glutamic acid
Glu
E



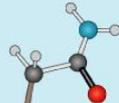
Serine
Ser
S



Threonine
Thr
T



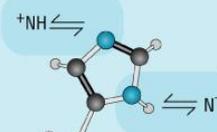
Cysteine
Cys
C



Asparagine
Asn
N

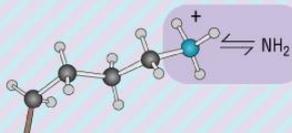


Glutamine
Gln
Q

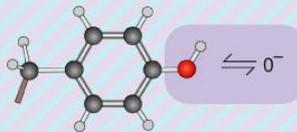


Histidine
His
H

Amphipathic



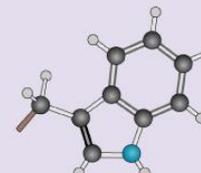
Lysine
Lys
K



Tyrosine
Tyr
Y



Methionine
Met
M



Tryptophan
Trp
W

Appendice 2

Abbreviazioni per gli amminoacidi a 3 lettere, ad 1 lettera e codoni corrispondenti

Amino acids	Abbreviations	Codons
Alanine	Ala A	GCA GCC GCG GCU
Cysteine	Cys C	UGC UGU
Aspartic acid	Asp D	GAC GAU
Glutamic acid	Glu E	GAA GAG
Phenylalanine	Phe F	UUC UUU
Glycine	Gly G	GGA GGC GGG GGU
Histidine	His H	CAC CAU
Isoleucine	Ile I	AUA AUC AUU
Lysine	Lys K	AAA AAG
Leucine	Leu L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Methionine	Met M	AUG
Asparagine	Asn N	AAC AAU
Proline	Pro P	CCA CCC CCG CCU
Glutamine	Gln Q	CAA CAG
Arginine	Arg R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serine	Ser S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Threonine	Thr T	ACA ACC ACG ACU
Valine	Val V	GUA GUC GUG GUU
Tryptophan	Trp W	UGG
Tyrosine	Tyr Y	UAC UAU

Appendice 3

Formazione del legame peptidico fra amminoacidi

From [Protein Structure and Function](#) by Gregory A Petsko and Dagmar Ringe

