

## **SCHEDA DELL'INSEGNAMENTO DI CHIMICA BIOLOGICA, METODOLOGIE BIOCHIMICHE E LABORATORIO**

### **BIOLOGICAL CHEMISTRY, BIOCHEMICAL METHODOLOGIES AND LABORATORY**

Il corso di “Chimica Biologica, metodologie biochimiche e laboratorio” (*curriculum* Biologia Molecolare e cellulare) è costituito da un modulo di “Chimica Biologica e laboratorio” (9 CFU) (comprensivo di lezioni frontali, esercitazioni in aula e ricapitolazioni e di esercitazioni di laboratorio) e da un modulo di “Metodologie biochimiche e laboratorio” (5 CFU) (comprensivo di lezioni frontali, esercitazioni in aula, ricapitolazioni e di esercitazioni di laboratorio).

#### **OBIETTIVI FORMATIVI DA ACQUISIRE:**

##### **Conoscenze:**

Conoscenze delle caratteristiche strutturali e funzionali delle biomolecole, delle proprietà degli enzimi, dell'organizzazione del materiale genetico, e dei principali processi metabolici di carboidrati, lipidi e proteine. Competenze teoriche e capacità applicative delle metodologie biochimiche di base, riguardanti tecniche di purificazione ed analisi di macromolecole, determinazioni strutturali basate su analisi biochimiche, determinazione qualitativa e quantitativa di attività enzimatiche.

##### **Capacità:**

Capacità di applicare metodologie biochimiche e biotecnologiche di base.

Analisi biologiche, biochimiche e biomediche.

##### **Comportamenti:**

Valutazione, interpretazione di dati sperimentali di laboratorio, sicurezza in laboratorio, valutazione della didattica

#### **PROPEDEUTICITA'**

“Chimica organica e laboratorio”

#### **PREREQUISITI:**

Conoscenze di Termodinamica, Matematica e Citologia ed Istologia.

#### **NOTA:**

L'esame di “Chimica Biologica, metodologie biochimiche e laboratorio” è propedeutico agli esami di “Biologia Molecolare e laboratorio”, “Fisiologia e laboratorio”, “Genetica e ingegneria genetica e laboratorio”.

#### **PROGRAMMA**

##### **Modulo di Chimica Biologica e laboratorio**

- Introduzione alla Biochimica
- Principali classi di biomolecole - Gruppi funzionali nelle biomolecole – Struttura tridimensionale: configurazione e conformazione – Interazioni tra molecole (legame idrogeno, interazioni ioniche, interazioni di van der Waals, interazioni idrofobiche)

##### **Proteine**

- Struttura: Le unità monomeriche: caratteristiche strutturali e proprietà chimiche degli amminoacidi (curve di titolazione, punto isoelettrico; caratteristiche delle catene laterali) – Formazione della catena polipeptidica e livelli superiori di organizzazione strutturale: alfa-elica, strutture beta, inversioni di catena, strutture supersecondarie, struttura terziaria, domini, struttura quaternaria – Relazioni struttura e funzione: denaturazione/rinaturazione; effetti della temperatura, del pH, di denaturanti chimici (urea, guanidina, sodio dodecil-solfato, agenti riducenti).
- Analisi: Principi di purificazione e caratterizzazione delle proteine.
- Funzione: Proteine fibrose: alfa-cheratine - beta-cheratine – collagene.
- Funzione: Proteine globulari. Mioglobina e Emoglobina.
- Funzione: Enzimi. Concetti di base: cinetica delle reazioni non catalizzate; variazione dell'energia libera  $\Delta G$  – relazione tra  $\Delta G$  e costante di equilibrio di una reazione. Classificazione degli enzimi, specificità di reazione, il sito attivo, interazione con il substrato – Meccanismi di catalisi enzimatica - Cinetica enzimatica: il modello di Michaelis-Menten; trasformazioni dell'equazione di Michaelis-Menten: il grafico dei doppi reciproci – Inibizione enzimatica reversibile (competitiva, non competitiva) e irreversibile – Effetti di pH e temperatura sulla velocità delle reazioni enzimatiche. Regolazione: Enzimi allosterici – modificazioni post-traduzionali- attivazione di zimogeni.

- I cofattori: coenzimi piridinici e flavinici, tiamina pirofosfato, coenzima A, acido lipoico, biotina, piridossal fosfato. I gruppi funzionali e il meccanismo d'azione.

### Acidi Nucleici

- **Struttura:** Le unità monomeriche: basi, nucleosidi, nucleotidi -struttura primaria e secondaria; la struttura a doppia elica. Processi di denaturazione: ipercromismo – temperatura di fusione; denaturazione reversibile; ibridazione. Idrolisi enzimatica (esonucleasi, endonucleasi, enzimi di restrizione). Principi di tecniche di analisi. Organizzazione della cromatina (generalità).
- **Funzione:** Aspetti generali della biosintesi di DNA, RNA e proteine. Le reazioni della DNA polimerasi; la DNA ligasi; le RNA polimerasi-DNA dipendenti nei procarioti e negli eucarioti; ruolo delle DNA topoisomerasi; cenni sulla maturazione degli RNA; struttura e funzione degli RNA di trasferimento; il codice genetico; la reazione di attivazione degli amminoacidi; le fasi della sintesi proteica: inizio, allungamento, terminazione, con particolare riferimento al processo nei procarioti.

### Metabolismo

- **Premessa:** Concetti generali di energetica: le funzioni di stato (entalpia, entropia, energia libera); composti ad alto contenuto energetico e loro ruolo nel metabolismo - reazioni accoppiate – vie metaboliche e loro regolazione
- **Carboidrati:** monosaccaridi; polisaccaridi di riserva (glicogeno e amido). Glicolisi: reazioni, meccanismi (fosfoglicerato mutasi, gliceraldeide 3-P deidrogenasi,), regolazione – Vie fermentative del piruvato (fermentazione lattica e fermentazione alcolica) – Decarbossilazione ossidativa del piruvato e meccanismo di reazione – La via del fosfogluconato e suo significato; meccanismi d'azione di transchetolasi e transaldolasi – Gluconeogenesi: reazioni e regolazione – Metabolismo dei polisaccaridi: degradazione e sintesi del glicogeno: reazioni, regolazione.
- **Lipidi:** Aspetti generali della struttura e funzione dei lipidi; Acidi grassi saturi e insaturi; Triacilgliceroli – lipasi – degradazione e sintesi degli acidi grassi saturi: reazioni, regolazione.
- **Proteine:** generalità sul destino dello scheletro carbonioso degli amminoacidi. Destino del gruppo amminico degli amminoacidi: transamminazioni: significato e meccanismo – deaminazione ossidativa – ciclo dell'urea
- La combustione completa degli atomi di carbonio provenienti dai diversi distretti metabolici e la produzione di energia in condizioni di aerobiosi: Ciclo degli acidi tricarbossilici: reazioni e regolazione – Le reazioni anaplerotiche: piruvato carbossilasi ed enzima malico. La catena di trasporto degli elettroni; fosforilazione ossidativa

### Modulo di Metodologie biochimiche e laboratorio

- **Tecniche separative ed analitiche e strumentazione relativa.** Unità di misura, sicurezza in laboratorio Sistemi biologici utilizzati nell'indagine biochimica. **Colture cellulari** eucariotiche e procariotiche. Preparazione di **omogenati** di tessuti e di cellule.
- **Separazione mediante solubilità:** frazionamento mediante sali, solvente, calore.
- **Separazione mediante membrane:** filtrazione, dialisi.
- **Centrifugazione:** principi generali. Centrifugazione preparativa e sue applicazioni: differenziale, in gradiente di densità. Centrifugazione analitica e sue applicazioni
- **Cromatografia:** principi generali, cromatografia a scambio ionico, di esclusione, di affinità. Sistemi cromatografici. Rappresentazione grafica dei risultati e loro interpretazione.
- **Elettroforesi:** principi generali. Supporti: gel di agar e di agarosio, gel di poliacrilammide. Elettroforesi di proteine: elettroforesi nativa ed in condizioni denaturanti in SDS (SDS-PAGE); rivelazione. Western blotting. Focalizzazione isoelettrica; elettroforesi bidimensionale.
- Elettroforesi di acidi nucleici. Southern blotting, Northern blotting.
- **Tecniche spettroscopiche:** principi generali, spettrofotometria nell'ultravioletto e nel visibile. Legge di Lambert e Beer. Applicazioni. Spettrofluorimetria e applicazioni.
- **Tecniche immunochimiche:** principi generali, produzione di anticorpi policlonali e monoclonali, dosaggio radioimmunologico; dosaggio immunoenzimatico ELISA; immunofluorescenza.

### Applicazioni allo studio della struttura e funzione delle proteine

- Purificazione e caratterizzazione delle proteine. Criteri di purezza. Dosaggio delle proteine; metodi per lo studio dell'attività enzimatica; esempi di saggi enzimatici. Determinazione della massa molecolare relativa, determinazione del numero e del peso molecolare delle subunità.

### **Esercitazioni Svolte:**

- Cromatografia a scambio ionico e determinazione della concentrazione di una miscela proteica. Saggio enzimatico

### **MATERIALE DIDATTICO UTILIZZATO E CONSIGLIATO**

- Nelson DL e Cox MM – **I Principi di Biochimica di Lehninger** – Zanichelli (ed.)
  - Nelson DL e Cox MM – **Introduzione alla Biochimica di Lehninger** – Zanichelli (ed.)
  - Campbell e Farrell – **Biochimica** – EdiSES (ed.)
  - Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L – **Biochimica**- Zanichelli (ed.)
  - Voet D, Voet JG, Pratt CW – **Fondamenti di Biochimica** – Zanichelli (ed.)
  - Per alcuni argomenti (proteine, membrane) consultare anche: AA.VV. **Chimica Biologica** (Monduzzi Editore)
  - Stoppini e V- Bellotti: **Biochimica Applicata**- EDISES
  - M.C. Bonacorsi di Patti, R. Contestabile, M.L. Di Salvo: **Metodologie Biochimiche** – Casa Editrice Ambrosiana
  - C. De Marco e C. Cini: **Principi di Metodologia Biochimica**. Piccin Editore
  - K. Wilson, J. Walzer- **Biochimica e biologia molecolare: Principi e tecniche** -Raffaello Cortina Editore
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

### **Altro materiale didattico**

Appunti del docente, reperibili sul sito [www.docenti.unina.it](http://www.docenti.unina.it)

### **MODALITA' VERIFICA E VALUTAZIONE DELL'APPRENDIMENTO**

Esame orale.

La commissione d'esame, nominata dal CCS accerterà e valuterà collegialmente la preparazione dello studente attribuendo il voto finale sulla base di un adeguato numero di prove e di verifiche. La frequenza assidua e la partecipazione alle attività in aula e laboratorio sono considerati elementi positivi di valutazione.

### **DOMANDE D'ESAME PIU' FREQUENTI**

- LIVELLI DI ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE DELLE PROTEINE
- STRUTTURE SECONDARIE
- STRUTTURA TERZIARIA
- LEGAMI DEBOLI TRA LE CATENE LATERALI DEGLI AMMINOACIDI
- LA DENATURAZIONE DELLE PROTEINE
- L'EQUAZIONE DI MICHAELIS E MENTEN
- LA STRUTTURA A DOPPIA ELICA DEL DNA
- LA REAZIONE DELLA DNA POLIMERASI
- LA REAZIONE DELLE RNA POLIMERASI
- LA DNA LIGASI
- LE FASI DELLA SINTESI PROTEICA
- LA GLICOLISI
- IL DESTINO DEL PIRUVATO
- IL CICLO DI KREBS
- LA VIA DEL FOSFOGLUCONATO
- LA DEGRADAZIONE E LA SINTESI DEGLI ACIDI GRASSI
- LE REAZIONI DI TRANSAMMINAZIONE
- IL CICLO DELL'UREA
- GLICOGENOLISI E SINTESI DEL GLICOGENO
- OMOGENIZZAZIONE DI CELLULE E TESSUTI
- SEPARAZIONE MEDIANTE SOLUBILITA': FRAZIONAMENTO MEDIANTE SALI
- SEPARAZIONE CON MEMBRANI: DIALISI
- CENTRIFUGAZIONE: CENTRIFUGAZIONE PREPARATIVA
- TECNICHE CROMATOGRAFICHE: CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO
- TECNICHE CROMATOGRAFICHE: CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE MOLECOLARE
- TECNICHE CROMATOGRAFICHE: CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

- ELETTROFORESI DI PROTEINE: ELETTROFORESI NATIVA ED IN CONDIZIONI DENATURANTI (SDS-PAGE)
- TECNICHE SPETTROSCOPICHE: LA LEGGE DI LAMBERT E BEER
- TECNICHE IMMUNOCHEMICHE: PRODUZIONE DI ANTICORPI

## **COURSE OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, BIOCHEMICAL METHODOLOGIES AND LABORATORY**

The course of “Biological Chemistry, Biochemical Methodologies and Laboratory” (Molecular and cellular biology *curriculum*) is composed by a “Biological Chemistry and Laboratory” module (9 CFU of lessons, exercises, summaries and laboratory experience) and a module of “Biochemical Methodologies and Laboratory” (5 CFU of lessons, exercises, summaries and laboratory experience).

### **LEARNING ACHIEVEMENTS**

#### **Knowledge and understanding:**

Knowledge of structural and functional properties of biomolecules, of enzyme properties, of the organization of genetic material, and of the main metabolic processes of carbohydrates, lipids and proteins. Theoretical knowledge and ability to use basic biochemical methodologies for the purification and the analysis of macromolecules, structural determinations based on biochemical analyses, qualitative and quantitative determination of enzyme activity.

#### **Applying knowledge and understanding:**

Ability to apply basic biochemical and biotechnological methodologies  
Biological, biochemical and biomedical analyses.

#### **Making judgements**

Evaluation and interpretation of experimental laboratory results, lab security, teaching evaluation.

### **ENTRY REQUIREMENTS**

“Organic Chemistry and laboratory” examination.

### **PRE- REQUIREMENTS**

Knowledge of Thermodynamics, Mathematics, Cytology and Histology

### **NOTE:**

The course of “Biological Chemistry, Biochemical Methodologies and Laboratory” is an entry requirement for the examination of “Molecular Biology and Laboratory”, “Physiology and Laboratory”, “Genetics and genetic engineering and Laboratory”.

### **CONTENTS**

#### **Module of Biological Chemistry and Laboratory**

- Introduction to Biochemistry
- Main classes of biomolecules – Functional groups in biomolecules – Three-dimensional structures: conformation and configuration – Interactions between molecules (hydrogen, ionic and van der Waals bonds, hydrophobic interactions)

#### **Proteins**

- Structure: Monomeric units: structural characteristics and chemical properties of amino acids (titration curves, isoelectric point; characteristics of side chains) – Formation of the polypeptide chain and levels of structural organization: alpha-helix, beta structures, turns, super-secondary structures, tertiary structure, domains, quaternary structure – Relationships between structure and function: denaturation/renaturation; effects of temperature, pH, chemical denaturants (urea, guanidine, sodium dodecyl-sulfate, reducing agents).
- Analysis: Principles of purification and characterization of proteins.
- Function: Fibrous proteins: alpha-keratins - beta-keratins – collagen.
- Function: Globular proteins. Myoglobin and Hemoglobin.
- Function: Enzymes. Basic concepts: kinetics of uncatalyzed reactions; free energy variations  $\Delta G$  – relationships between  $\Delta G$  and equilibrium constant of a reaction. Classification of enzymes, reaction specificity, the active site, interaction between enzyme and substrate – Mechanisms of enzymatic catalysis – Enzyme kinetics: the model of Michaelis-Menten; transformations of Michaelis-Menten equation: double-reciprocal plot – Reversible enzymatic inhibition (competitive, non-competitive) and irreversible inhibition – Effects of pH and temperature on the rate of enzymatic reactions. Regulation: Allosteric enzymes– post-translational modifications- activation of zymogens.
- Cofactors: pyridine and flavin coenzymes, thiamine pyrophosphate, coenzyme A, lipoic acid, biotin, pyridoxal phosphate. Functional groups and mechanism of action.

#### **Nucleic Acids**

- Structure: Monomeric units: bases, nucleosides, nucleotides – primary and secondary structure; double-helix structure. Denaturation of nucleic acids: hyperchromism – melting temperature; reversible denaturation; hybridation. Enzymatic hydrolysis (exonucleases, endonucleases, restriction enzymes). Principles of analysis techniques. Organization of chromatin.
- Function: General aspects of the biosynthesis of DNA, RNA and proteins. The reactions of DNA polymerase; DNA ligase; DNA-dependent RNA polymerase in prokaryotes and eukaryotes; role of DNA topoisomerases; maturation of RNA; structure and function of transfer RNA; the genetic code; the reaction of amino acids activation; the phases of protein: initiation, elongation, termination, with particular reference to prokaryotes.

### Metabolism

- Introduction: General concepts of energetics: the state functions (enthalpy, entropy, free energy); molecules with high energy content and their role in metabolism – coupled reactions – metabolic pathways and their regulation.
- Carbohydrates: monosaccharides; storage polysaccharides (glycogen and starch). Glycolysis: reactions, mechanisms (phosphoglycerate mutase, glyceraldehyde 3-P dehydrogenases, etc.), regulation – Fermentation of pyruvate (lactic fermentation and alcoholic fermentation) – Oxidative decarboxylation of pyruvate and mechanism of reaction – Phosphogluconate pathway and its metabolic meaning; reaction mechanisms of transketolase and transaldolase – Gluconeogenesis: reactions and regulation – Metabolism of polysaccharides: degradation and synthesis of glycogen: reactions and regulation.
- Lipids: Structure and function of lipids; Saturated and unsaturated fatty acids; Triacylglycerols – lipases – degradation and synthesis of saturated fatty acids: reactions and regulation.
- Proteins: the fate of the carbon skeleton of amino acids. The fate of the amino acids amine group: transamination: meaning and mechanism – oxidative deamination – urea cycle
- The complete combustion of carbon atoms derived from different metabolic districts and the production of energy under aerobic conditions: Tricarboxylic acids cycle: reactions and regulation – Anaplerotic reactions: pyruvate carboxylase and malic enzyme. Electron transport chain; oxidative phosphorylation

### Module of Biochemical Methodologies and Laboratory

#### Analytical and preparative separation techniques and relative equipment

- Units of measurements. Health and safety in the laboratory. Biological model systems used for biochemical experiments. **Microbial and animal cell cultures**. Homogenization of cells and tissues.
- **Separation by solubility**: salt fractionation, organic solvent fractionation, thermal precipitation.
- **Separation with membranes**: Filtration, Dialysis.
- **Centrifugation techniques**: Principles. Preparative centrifugation and application: differential centrifugation, density gradient centrifugation; Analytical ultracentrifugation and applications.
- **Chromatographic techniques**: general principles; Ion-exchange, Molecular exclusion, Affinity chromatography; Chromatographic systems; Graphical representation of results and their interpretation.
- **Electrophoresis**: general principles. Protein Electrophoresis on polyacrylamide gel under native and denaturing conditions (SDS-PAGE); Protein staining; Western blotting; Isoelectrofocusing. Two-dimensional gel electrophoresis.
- Nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. Southern blotting, Northern blotting.
- **Spectroscopic Techniques**: principles and purposes, Ultraviolet and visible light spectroscopy, the Beer-Lambert law; colorimetric assays. Spectrofluorimetry and applications.
- **Immunochemical techniques**: general principles; production of monoclonal and polyclonal antibodies. Direct and indirect ELISA systems. Radiochemical methods (RIA). Immunofluorescence.

#### Applications to the structural and functional study of proteins

- Protein purification and characterization. Monitoring protein purification. Protein estimation; Measurement of enzymatic activity. Determination of relative molecular mass, number and relative molecular mass of subunits.

#### Students will perform the following lab experiments

- Ion-exchange chromatography; colorimetric assays of protein concentration; assay of enzymatic activity.

#### TEXTBOOKS

- Nelson DL e Cox MM – **I Principi di Biochimica di Lehninger** – Zanichelli (ed.)
- Nelson DL e Cox MM – **Introduzione alla Biochimica di Lehninger** – Zanichelli (ed.)

- Campbell e Farrell – **Biochimica** – EdiSES (ed.)
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L – **Biochimica**- Zanichelli (ed.)
- Voet D, Voet JG, Pratt CW – **Fondamenti di Biochimica** – Zanichelli (ed.)
- Per alcuni argomenti (proteine, membrane) consultare anche: AA.VV. **Chimica Biologica** (Monduzzi Editore)
- Stoppini e V- Bellotti: **Biochimica Applicata**- EDISES
- M.C. Bonacorsi di Patti,R. Contestabile,M.L. Di Salvo: **Metodologie Biochimiche** – Casa Editrice Ambrosiana
- C. De Marco e C. Cini: **Principi di Metodologia Biochimica**. Piccin Editore
- K. Wilson, J. Walzer- **Biochimica e biologia molecolare: Principi e tecniche** -Raffaello Cortina Editore
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

### **Other teaching material**

Professor's notes available at [www.docenti.unina.it](http://www.docenti.unina.it)

### **ASSESSMENT**

Oral examination.

The commission will evaluate student's skills, and the score will be given also taking into account the attendance to the course.

### **FREQUENTLY ASKED QUESTIONS DURING EXAM**

- PROTEIN STRUCTURAL LEVELS
- SECONDARY STRUCTURES
- TERTIARY STRUCTURE
- WEAK NON BONDED INTERACTIONS BETWEEN AMINO ACIDS SIDE CHAINS
- PROTEIN DENATURATION
- MICHAELIS – MENTEN EQUATION
- DOUBLE ELIX STRUCTURE OF DNA
- DNA POLYMERASE REACTION
- RNA POLYMERASE REACTION
- DNA LIGASE
- PROTEIN SYNTHESIS
- GLYCOLYSIS
- THE FATE OF PYRUVATE
- KREBS CYCLE
- PHOSPHOGLUCONATE PATHWAY
- FATTY ACIDS SYNTHESIS AND DEGRADATION
- TRANSAMINATION REACTIONS
- UREA CYCLE
- GLYCOGENOLYSIS AND THE SYNTHESIS OF GLYCOGEN
- HOMOGENIZATION OF CELLS AND TISSUES
- SEPARATION BY SOLUBILITY: SALT FRACTIONATION
- SEPARATION WITH MEMBRANES: DIALYSIS
- CENTRIFUGATION TECHNIQUES: PREPARATIVE CENTRIFUGATION
- CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES: ION-EXCHANGE, CHROMATOGRAPHY
- CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES MOLECULAR EXCLUSION CHROMATOGRAPHY
- CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES: AFFINITY CHROMATOGRAPHY
- PROTEIN ELECTROPHORESIS ON POLYACRYLAMIDE GEL UNDER NATIVE AND DENATURING CONDITIONS (SDS-PAGE)
- SPECTROSCOPIC TECHNIQUES THE BEER -LAMBERT LAW
- IMMUNOCHEMICAL TECHNIQUES: PRODUCTION OF ANTIBODIES.