



SCHEDA DELL'INSEGNAMENTO (SI)

BIOCHIMICA AVANZATA E INGEGNERIA PROTEICA

SSD BIO10

DENOMINAZIONE DEL CORSO DI STUDIO: LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

INFORMAZIONI GENERALI - DOCENTE

DOCENTE: PROF. DANILA LIMAURO

TELEFONO: 081679069

EMAIL: LIMAURO@UNINA.IT

INFORMAZIONI GENERALI - ATTIVITÀ

ANNO DI CORSO: I

SEMESTRE: I

CFU: 8

INSEGNAMENTI PROPEDEUTICI

Nessuno

EVENTUALI PREREQUISITI

nessuno

OBIETTIVI FORMATIVI

Il corso ha come obiettivo formativo quello di fornire conoscenza sull'evoluzione e organizzazione strutturale delle proteine, sulle loro modifiche e loro interazione *in vivo* per la comprensione dei sistemi biologici complessi. Saranno illustrate tecniche di biochimica avanzata comprendenti lo studio conformazionale delle proteine, l'interazione proteina-proteina e proteina-ligando al fine di comprendere quali conoscenze possono essere ottenute dai diversi approcci sperimentali evidenziandone potenzialità e limiti. Saranno illustrate tecniche di ingegneria proteica mediante approcci di mutagenesi sito-diretta e direct evolution per migliorare proteine esistenti. Numerosi esempi, tra cui ingegnerizzazione di proteine fluorescenti e di estremozimi, serviranno a comprendere come si possono creare nuove proteine con specifiche funzioni per applicazioni biotecnologiche nella diagnostica e nell'industria

The course is focused on knowledge on evolution and structural organization, modification and interaction of proteins to understand complex biological systems. Advanced biochemical techniques will be shown to analyze the structure and function of proteins, protein-protein and protein-ligand interactions. Several techniques of protein engineering will be carried out to ameliorate protein functions and/or assign new properties through site direct mutagenesis and direct evolution. Several examples using fluorescent proteins and extremozymes will be carried out to understand how to generate new proteins with specific functions for diagnostics and industrial applications.

RISULTATI DI APPRENDIMENTO ATTESI (DESCRITTORI DI DUBLINO)

Conoscenza e capacità di comprensione

Conoscenze dei principi biologici e chimico-fisici alla base della struttura e della funzione delle macromolecole. Fornire conoscenze teoriche e pratiche delle tecniche utilizzate nei laboratori biochimici per analizzare la struttura e la funzione delle biomolecole, in particolare proteine ed enzimi; fornire conoscenze sulle applicazioni degli enzimi nella diagnostica e nell'industria. Fornire, attraverso alcuni esempi, le basi teoriche per la costruzione e la caratterizzazione di proteine ingegnerizzate con nuove proprietà.

Knowledge of the biological and physico-chemical principles of the structure and function of macromolecules. Theoretical and practical knowledge of biochemical techniques to analyze the structure and function of biomolecules, especially proteins and enzymes; knowledge of the applications of enzymes in diagnostics and industry. Ability to use the theoretical basis for the construction and characterization of engineered proteins with new properties.

Capacità di applicare conoscenza e comprensione

Utilizzare la conoscenza sull'organizzazione strutturale delle proteine, sulle loro modifiche, sulla loro interazione *in vivo* per la comprensione dei sistemi biologici complessi. Capacità di applicare metodologie biochimiche per analisi biologiche. Saper individuare fra le tecniche di ingegneria proteica quelle più adeguate per creare nuove proteine con specifiche funzioni per applicazioni biotecnologiche nella diagnostica e nell'industria.

Use the knowledge regarding the structural organization of proteins, their modifications and their interaction *in vivo* for the understanding of complex biological systems. Ability to apply biochemical methodologies for biological analysis. Knowing how to identify among the protein engineering techniques those most suitable to create new proteins with specific functions for biotechnological applications in diagnostics and industry.

PROGRAMMA-SYLLABUS

- Biochimica avanzata: Livelli di organizzazione strutturale delle proteine. Le proprietà conformazionali delle catene polipeptidiche con particolare riguardo alle strutture secondarie. I motivi strutturali delle strutture terziarie e i domini. I metodi per la determinazione della struttura tridimensionale: Proteine intrinsecamente disordinate. Il folding delle proteine in vitro e in vivo, ruolo degli chaperoni, Degradazione delle proteine: proteasoma e ruolo dell'ubiquitina. Topogenesi e modificazioni post-traduzionali delle proteine. **(2.5 cfu)**.
- Metodologie biochimiche avanzate: richiami di tecniche di base per la purificazione ed analisi delle proteine Analisi e determinazione della massa molecolare delle proteine: protein cross linking, ultracentrifugazione analitica, light scattering, spettrometria di massa. Studio conformazionale delle proteine mediante spettrofotometria e fluorescenza. Studio delle interazioni proteina-proteina e proteina-ligando: FRET, BRET, equilibrio di dialisi, Pull down, EMSA risonanza plasmonica di superficie **(2 cfu)**.
- Ingegneria proteica: Espressione e purificazione di proteine ricombinanti. Mutagenesi delle proteine mediante rational design ed evoluzione diretta. Modificazione della termostabilità e delle caratteristiche catalitiche di enzimi mediante evoluzione orientata. Progettazione e costruzione di proteine chimeriche e multifunzionali. Le proteine auto fluorescenti e bioluminescenti come esempi di proteine mutagenizzate mediante approcci combinati. Ingegneria proteica degli enzimi per uso industriale, esempi. Estremofili come fonte di proteine per uso industriale **(3 cfu)** . Esercitazioni in laboratorio **(0.5 cfu)**.

CONTENTS

- Advanced biochemistry: Levels of structural organization of proteins. The conformational properties of polypeptide chains with particular regard to secondary structures Structural motifs of tertiary structures and domains. Analyses of tridimensional structure. Proteins intrinsically disordered. In vivo protein interaction, post-translational modifications of proteins. Protein folding in vitro and in vivo, role of molecular chaperones..Protein degradation; proteasome and role of ubiquitin. Topogenesis and post-translational modifications of proteins **(2.5 cfu)**.
- Advanced biochemical methods: recap of basic techniques for the purification and analysis of proteins. Analysis and determination of the molecular mass of proteins: protein cross linking, analytical ultracentrifugation, light scattering, mass spectrometry. Conformational study of proteins by spectrophotometry and fluorescence. Study of protein-protein and protein-ligand interactions: FRET, BRET, dialysis balance, Pull down, EMSA surface plasmon resonance **(2 cfu)**.
- Protein engineering: Expression and purification of recombinant proteins. Protein mutagenesis by rational design and direct evolution. Modification of the thermostability and catalytic characteristics of enzymes through oriented evolution. Design and construction of chimeric and multifunctional proteins. Self-fluorescent and bioluminescent proteins as examples of mutagenized proteins by combined approaches. Protein engineering of enzymes for industrial use, examples. Extremophiles as a source of protein for industrial use **(3 cfu)**. Laboratory experience **(0.5cfu)**.

MATERIALE DIDATTICO

- L. Stryer: Biochimica.-Zanichelli
 - A.L. Lehninger: I Principi di Biochimica -Zanichelli
 - M.C. Bonaccorsi di Patti, R. Contestabile, M.L.Di Salvo: Metodologie biochimiche-Casa Editrice Ambrosiana
 - M. Maccarone: Metodologie Biochimiche e Biomolecolari-Zanichelli
 - . Duranti: Introduzione allo studio delle proteine Zanichelli-
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
 Appunti delle lezioni e articoli originali che saranno illustrati durante il corso.

MODALITÀ DI SVOLGIMENTO DELL'INSEGNAMENTO

Il docente utilizzerà lezioni frontali e seminari di altri esperti del settore
 Oral communication lessons and seminars.

VERIFICA DI APPRENDIMENTO E CRITERI DI VALUTAZIONE

L'esame di fine corso mira a verificare e valutare il raggiungimento degli obiettivi didattici relativi agli argomenti riportati in grassetto nel programma.

Durante la prova finale lo studente verrà interrogato sugli argomenti indicati nella sezione “domande di esame più frequenti”. Sarà oggetto di valutazione il grado di completezza della risposta, il livello di integrazione tra i vari contenuti del corso e l'appropriatezza scientifica del linguaggio. Il raggiungimento da parte dello studente di una visione organica dei temi affrontati a lezione, congiunta alla loro utilizzazione critica, la capacità di fare collegamenti, la dimostrazione del possesso di una padronanza espressiva e di linguaggio specifico saranno valutati con voti di eccellenza. La frequenza assidua e la partecipazione alle attività in aula saranno considerati elementi positivi di valutazione.

The final exam aims at verifying the achievement of educational targets related to the subjects highlighted in bold under contents. During the final examination, the student will be asked about the subjects indicated in the section “frequently asked questions during exam”. The degree of completeness of the answer, the level of integration between the different topics of the course and the scientific suitability of the speech will be assessed. The achievement of a comprehensive view of themes presented during lessons, together with their critical presentation, the ability to make connections, technical language skills, will be evaluated with excellent scores. The score will be given also taking into account the attendance to the course and the participation in the classroom activities.

a) Modalità di esame:

L'esame si articola in prova	
scritta e orale	
solo scritta	
solo orale	X
discussione di elaborato progettuale	
altro	

b) Modalità di valutazione:

L'esame di fine corso mira a verificare e valutare il raggiungimento degli obiettivi didattici relativi agli argomenti riportati in grassetto nel programma. Durante la prova finale lo studente verrà interrogato sugli argomenti indicati nella sezione “domande di esame più frequenti”.

The final exam aims at verifying the achievement of educational targets related to the subjects highlighted in bold under contents. During the final examination, the student will be asked about the subjects indicated in the section “frequently asked questions during exam”.

DOMANDE D'ESAME FREQUENTI

Modificazioni post-traduzionali delle proteine

Domini strutturali delle proteine

Proteine intrinsecamente disordinate

Folding delle proteine

Il Proteasoma

Vettori di espressione e protein ricombinanti

Il sistema dell'ubiquitina
Chaperoni molecolari
Tappe della purificazione delle proteine
Dosaggio delle proteine
Metodi per lo studio dell'attività enzimatica
Determinazione della massa molecolare relativa,
Determinazione del numero e del peso molecolare delle subunità
Applicazioni della Spettrometria di massa
Determinazione del proteoma
Analisi di cambi conformazionali
Interazioni proteina-ligandi, proteina-proteina
Rational design: Mutagenesi Sito-diretta
Directed Evolution: Mutagenesi Random
Progettazione e costruzione di proteine chimeriche
Esempi di proteine fluorescenti con nuove proprietà

FREQUENTLY ASKED QUESTIONS

Post-translational modifications of proteins
Structural domain of proteins
Proteins intrinsically disordered
Folding
Proteasome
Ubiquitin
Molecular chaperons
protein purification
Protein purity criteria
Protein dosage
Methods for the study of enzymatic activity
Determination of the relative molecular mass
Determination of the number and molecular weight of the subunits
Applications of mass spectrometry
Determination of the proteome
Analysis of conformational changes
Protein-ligand, protein-protein interactions
Molecular diagnostics: use of radioisotopes in biochemistry
Rational design: Site-directed mutagenesis
Direct Evolution: Random Mutagenesis
Design and construction of chimeric proteins
Examples of fluorescent proteins with new properties