

## CORSO DI BIOCHIMICA APPLICATA E INGEGNERIA PROTEICA

Il corso di “Biochimica Applicata e Ingegneria Proteica” (*curriculum* Biomolecolare) è costituito da un modulo 8 CFU di lezioni frontali, esercitazioni in aula e ricapitolazioni.

### OBIETTIVI FORMATIVI DA ACQUISIRE

#### **Conoscenze:**

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.

#### **Capacità:**

Capacità approfondite di applicare metodologie biochimiche, biotecnologiche e di metodologie strumentali. Analisi biologiche, biochimiche e biomediche.

#### **Comportamenti:**

Valutazione, interpretazione di dati sperimentali di laboratorio, sicurezza in laboratorio, valutazione della didattica. Valutazione, interpretazione e rielaborazione di dati di letteratura.

### PREREQUISITI

Conoscenze di “Chimica Biologica”, “Biologia Molecolare e laboratorio”, “Genetica e ingegneria genetica”.

### PROGRAMMA

#### **Tecniche separative ed analitiche e loro applicazioni alla ricerca biochimica**

Purificazione e caratterizzazione delle proteine: tabella di purificazione; omogeneizzazione; centrifugazione: differenziale, in gradiente di densità; solubilità; separazione con membrane; cromatografia: scambio ionico, esclusione molecolare, affinità, adsorbimento, interazione idrofobica, partizione, covalente; cromatografia liquida ad elevata risoluzione (HPLC), FPLC; *downstream processing*.

Criteri di purezza delle proteine: Elettroforesi nativa e in SDS (SDS-PAGE), trasferimenti su membrane; cromatografia per esclusione molecolare; ultracentrifugazione analitica; focalizzazione al pI; metodi immunochimici.

Dosaggio delle proteine: metodi spettrofotometrici: spettri di assorbimento, Legge di Lambert e Beer; metodi colorimetrici; metodi immunochimici.

Metodi per lo studio dell'attività enzimatica: saggi spettrofotometrici; spettrofluorimetrici; con bioluminescenza; chemiluminescenza; radioisotopici; immunoenzimatici.

Determinazione della massa molecolare relativa, determinazione del numero e del peso molecolare delle subunità: cromatografia per esclusione molecolare; SDS-PAGE, *Protein Cross-Linking*; ultracentrifugazione analitica; *Light scattering*.

Determinazione della sequenza amminoacidica di proteine e peptidi. Produzione e separazione di frammenti peptidici

Spettrometria di massa: principi ed applicazioni.

Determinazione del proteoma.

Analisi conformazionali: cromatografia per esclusione molecolare; ultracentrifugazione analitica; parziale proteolisi; spettrofotometria (perturbazione da solvente); fluorescenza intrinseca ed estrinseca (perturbazione da solvente; ANS); proteine fluorescenti, FRET, FRAP.

Interazioni proteina-ligandi, proteina-proteina: fluorescenza intrinseca; FRET; BRET; equilibrio di dialisi; cromatografia per esclusione molecolare; ultracentrifugazione analitica; EMSA; *pull down*; *cross linking*; *surface plasmon resonance*.

Diagnostica molecolare: analisi con radioisotopi; natura della radioattività, rilevazione e misura della radioattività, autoradiografia, impiego dei radioisotopi in biochimica; citometria a flusso FACS; elettroforesi capillare; biosensori.

#### **Ingegneria proteica**

Modifica della struttura delle proteine per la costruzione e l'impiego di **proteine ingegnerizzate** allo scopo di conferire nuove caratteristiche (stabilità, specificità di reazione, etc.) e per lo studio delle relazioni struttura funzione:

- Progettazione di nuove proteine.
- Tecniche di modificazione: modifica chimica di specifici residui di una proteina.
- Mutagenesi sito-diretta; Mutagenesi *semi-rational*
- Mutagenesi *random*. Evoluzione di laboratorio.
- Costruzione di nuovi sistemi: progettazione e costruzione di proteine chimeriche e multifunzionali. Inserimento di sequenze amminoacidiche utili per la purificazione e l'identificazione. Anticorpi terapeutici. Permutazioni circolari.
- Immunotossine chimeriche.
- Singoli Domini.
- Analisi e Selezione dei prodotti ottenuti.
- Esempi di proteine con nuove proprietà: proteine fluorescenti.

### MATERIALE DIDATTICO UTILIZZATO E CONSIGLIATO

- K. Wilson, J. Walker: **Biochimica e biologia molecolare: Principi e tecniche**-Raffaello Cortina Editore
- R.L. Dryer, G.F. Lata: **Metodologia biochimica** -Antonio Delfino Editore
- D. Freifelder: **Physical Biochemistry** -Freeman
- AJ Ninfa, DP Ballou: **Metodologie di base per la biochimica e la biotecnologia** –Zanichelli
- A.L. Lehninger: **Principi di Biochimica** -Zanichelli
- J.D. Rawn: **Biochimica**, McGraw-Hill
- L. Stryer: **Biochimica**.-Zanichelli

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Appunti delle lezioni e articoli originali che saranno illustrati durante il corso.

### 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 sono considerati elementi positivi di valutazione.

### COMPOSIZIONE DELLA COMMISSIONE PER LA VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

Simonetta Bartolucci (presidente), Patrizia Contursi, Gabriella Fiorentino, Danila Limauro.