



# UNIVERSITÀ DI PISA

## BIOCHIMICA APPLICATA

---

### FRANCESCO BALESTRI

Anno accademico	2023/24
CdS	BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI
Codice	367EE
CFU	6

Moduli	Settore/i	Tipo	Ore	Docente/i
BIOCHIMICA APPLICATA	BIO/10	LEZIONI	48	FRANCESCO BALESTRI

#### Obiettivi di apprendimento

##### *Conoscenze*

Il corso fornisce allo studente le conoscenze relative alle moderne applicazioni della biochimica utilizzate per la drug discovery, drug delivery, ingegneria proteica per applicazioni cliniche e produzione industriale di target commerciali mediante l'utilizzo di bioreattori ed enzimi modificati e/o immobilizzati su matrici apposite.

##### *Modalità di verifica delle conoscenze*

In sede d'esame lo studente dovrà dimostrare di essere a conoscenza degli argomenti relativi agli utilizzi applicativi delle conoscenze biochimiche che ci permettono di sfruttare le proteine ed in particolar modo gli enzimi come agenti biologici utilizzabili nelle industrie e nei centri di ricerca.

##### *Capacità*

Al termine del corso lo studente avrà acquisito le competenze di base relative all'utilizzo delle proteine, in special modo di enzimi, nei campi applicativi relativi alle bioconversioni industriali per la produzione di molecole di interesse commerciale, nella quantificazione di molecole in diagnostica clinica e rilevamento di inquinanti ambientali. Lo studente al termine del corso, avrà la capacità di razionalizzare ed interpretare i processi di ricerca applicativi relativi all'individuazione e studio chimico-biologico di un target enzimatico coinvolto nell'eziogenesi di una patologia specifica con l'obiettivo di applicare su di esso una ricerca mirata di molecole capaci di inibire e/o modulare la sua attività biologica.

##### *Modalità di verifica delle capacità*

Il docente valuta durante la prova d'esame se lo studente ha acquisito le competenze relative alle applicazioni biochimiche presentate durante il corso.

##### *Comportamenti*

Il corso offre allo studente gli strumenti utili per comprendere come affrontare le problematiche relative alla stabilità chimico-fisica di una proteina, a migliorare l'efficienza della catalisi di una proteina enzimatica, alla sua regolazione mediante effettori/inibitori e modulazione della stabilità del complesso proteina-ligando.

Questa conoscenza è utile per l'utilizzo di proteine e complessi proteina-ligando in ambito industriale e di diagnostica clinica.

##### *Modalità di verifica dei comportamenti*

In sede di esame lo studente dovrà dimostrare di conoscere gli aspetti metodologici utilizzati per lo studio di una proteina al fine di renderla utilizzabile in ambiti applicativi di diagnostica clinica e/o produzione commerciale.

##### *Prerequisiti (conoscenze iniziali)*

Lo studente deve essere a conoscenza di concetti acquisiti con il superamento dell'esame di Biochimica quali struttura e caratteristiche degli amminoacidi, struttura delle proteine, concetti basilari di enzimologia.

Lo studente è invitato a verificare l'esistenza di eventuali propedeuticità consultando il Regolamento del Corso di studi relativo al proprio anno di immatricolazione. Un esame sostenuto in violazione delle regole di propedeuticità è nullo (Regolamento didattico d'Ateneo, art. 24, comma 3)

##### *Indicazioni metodologiche*

Le lezioni frontali saranno accompagnate da slides che potranno essere successivamente scaricate sul portale e-learning.



## UNIVERSITÀ DI PISA

### Programma (contenuti dell'insegnamento)

Interazione proteina ligando: considerazioni generali. definizione della costante di dissociazione e associazione. Valutazione IC50 ed EC50. Proteine a siti multipli non dipendenti equivalenti e non equivalenti. Proteine a siti multipli dipendenti. Equazione di Adair. Valutazione delle interazioni aspecifiche. Metodi grafici per la determinazione della Kd. metodi per la determinazione della concentrazione del complesso enzima-ligando. Dialisi all'equilibrio. utilizzo della metodica di ultrafiltrazione. Cromatografia per gel filtrazione, cromatografia frontale Cromatografia affinità per la valutazione interazione proteina ligando. Ligandi cromofori e fluorofori. Complesso ternario per ottenere interazione tra proteine. Bioconversioni: Aspetti generali. Vantaggi e svantaggi delle bioconversioni.

Uso di enzimi in soluzione nell'industria chimica e farmaceutica: Metionina gamma liasi e cisteina desulfidrilasi. Produzione in ambito industriale di amminoacidi: esempi. Purine e pirimidine: aspetti generali e loro utilizzo come agenti antivirali e antineoplastici. Sintesi inosina marcata uniformemente nella porzione ribosidica. Metodiche di immobilizzazione di enzimi:metodi fisici e metodi chimici. Attivazione dei supporti nella immobilizzazione covalente. Immobilizzazione cross-link. Immobilizzazione della tripsina. Immobilizzazione dell'ureasi e amilasi. Utilizzo degli enzimi coinvolti nel catabolismo dell'amido, cellulosa, emicellulosa e lignina: applicazioni industriali.

Enzimi applicati all'industria alimentare: lipasi e lattasi. Bioreattori utilizzati per l'idrolisi del lattato. Biosensori, aspetti generali. Classificazione dei biosensori. Biosensori amperometrici. Biosensori di prima e seconda generazione

Cenni biosensore di terza generazione. Biosensori utilizzati in diagnostica clinica. Amplificazione del segnale. Biosensori ottici per la determinazione di ossigeno, glucosio e lisina. Biosensore per la determinazione dei metalli pesanti. Valutazione della qualità del refluo. Biosensore non enzimatico per la rilevazione di erbicidi e metalli. Biosensore non enzimatico per la valutazione del B.O.D. Fattori che possono indurre perdita dell'attività biologica di una proteina. Organismi estremofili. Esperimento di Anfinsen. Patologie correlate alla denaturazione proteica. Chaperon molecolari: caratteristiche generali. Un esempio di Hsp60: il sistema di GroE di E.Coli ed il suo funzionamento. Altri esempi di chaperons molecolari: Hsp70, Hsp90 e Hsp100. Small heat shock protein. Utilizzo chaperons molecolari per eliminare aggregazione proteica durante sovra-espressione della proteina di interesse. Ruolo fisiologico del cristallino. Proteine cristalline: alfa cristalline. Caratteristiche generali.

Struttura delle alfa cristalline. Modelli dei complessi oligomerici. Azione delle Alfa cristalline come chaperon molecolari in collaborazioni con altri chaperon. Ruolo protettivo delle Alfa cristalline in relazione alla precipitazione e inattivazione enzimatica. Utilizzo di un bioreattore contenente chaperons molecolari. Utilizzo di molecole inibenti l'azione degli chaperon.

Stress ossidativo. Specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) e loro effetti sulle funzionalità cellulari. Meccanismi di detossificazione da ROS enzima dipendenti: superossido dismutasi, catalasi e glutatione perossidasi. Meccanismi di detossificazione da ROS enzima indipendenti: acido ascorbico, tocoferolo, glutatione. Anabolismo e catabolismo del glutatione. Funzionalità del glutatione. Glutatione reduttasi e transferasi. Proteine deputati allo stoccaggio e trasporto dell'atomo di ferro.

Aspetti biochimici del drug discovery. Ricerca, sviluppo e diffusione di un farmaco. Trials clinici. Complesso della Tioredossina/Tioredossina Reduttasi: struttura e ruolo fisiologico. Drug discovery della Tioredossina Reduttasi. Schistosomiasi e ruolo della tioredossina glutatione reduttasi di Schistosoma nell'insorgenza della malattia. Drug discovery della tioredossina glutatione reduttasi di Schistosoma: screening di inibitori in vitro e loro caratterizzazione, prove della loro efficacia in vivo.

Tripanotione. Sintesi e ruolo fisiologico. Tripanotione Reduttasi. Drug discovery della Tripanotione Reduttasi: ricerca di inibitori dell'enzima come strategia per la cura dalla Tripanosomiasi. Screening combinato in vitro e in vivo per la ricerca di inibitori della Tripanotione Reduttasi. Drug discovery combinata in vitro e in vivo: aspetti applicativi. Mutazioni sito specifiche delle proteine. Direct evolution proteico. Insulina: struttura e ruolo fisiologico. Forma monomerica ed esamerica dell'insulina. Tipologie di insulina in base alle tempistiche d'azione. Mutazioni sito specifiche dell'insulina: aspartato insulina, insulina lys-pro.

Insulina AspB10 come insulina a risposta ultrarapida e fattore mitogenico in correlazione con IGF1. Insulina ad azione lenta: Glargina, Detemir, Glutadec. Mutazioni sito-specifiche su enzimi utilizzati nelle industrie:alcuni esempi.

Dalla patologia all'identificazione del target biologico. Enzima come target biologico. Le complicanze del diabete:la cataratta. Stress osmotico sorbitolo dipendente. Aldoso reduttasi di tipo 2 (ALR2): caratteristiche generali. Coinvolgimento di ALR2 nell'insorgenza della cataratta diabetica.

Utilizzo linee transgeniche murine per valutare la correlazione tra l'insorgenza della cataratta e l'espressione dell'Aldoso Reduttasi. Stress glicativo e ossidativo associato alla Via dei Polioli. Mutanti sito-specifici per valutare il meccanismo catalitico dell'Aldoso Reduttasi e la presenza di cisteine sensibili alla variazione dello stato redox della cellula.

Attività dell'enzima Aldoso Reduttasi modificata da tioli. Effetto dell'incubazione con il glutatione disolfuro sull'attività dell'enzima e nella variazione del profilo di eluizione relativo alla colonna per affinità. Effetto dell'ossigeno iperbarico sull'attività dell'Aldoso reduttasi in estratti di lente. Inattivazione dell'Aldoso Reduttasi da HNE.

Effetto del rame sull'attività dell'Aldoso Reduttasi. Formazione ponti disolfuro nell'Aldoso Reduttasi indotta dal rame.

### Bibliografia e materiale didattico

Materiale didattico: slides presentate durante le lezioni frontali e pubblicazioni scientifiche inerenti agli argomenti trattati.

### Indicazioni per non frequentanti

nessuna

### Modalità d'esame

prova orale

### Pagina web del corso

<https://polo3.elearning.unipi.it/course/view.php?id=2944>

### Altri riferimenti web



non presenti

**Note**

Composizione della commissione esame di profitto

Presidente: Prof. Francesco Balestri

Presidente supplente: Prof.ssa Antonella del Corso

Membri: Dott. Giovanni Signore, Dott.ssa Francesca Felice, Prof. Mario Cappiello, Prof.ssa Roberta Moschini

Membri supplenti: Dott.ssa Lucia Piazza, Dott. Simone Allegrini, Dott.ssa Rossella Mosca

*Ultimo aggiornamento 19/12/2023 13:15*