



UNIVERSITÀ DI PISA

BIOCHIMICA APPLICATA

FRANCESCO BALESTRI

Academic year	2018/19
Course	BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI
Code	367EE
Credits	6

Modules	Area	Type	Hours	Teacher(s)
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.

Corequisiti

Non richiesti



UNIVERSITÀ DI PISA

Prerequisiti per studi successivi

Non applicabile

Indicazioni metodologiche

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

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

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: fitasi, 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.

Biosensori enzimatici per la rilevazione dei pesticidi. Biosensore multi-enzimatico per la valutazione della qualità del refluo. Indice di impatto della funzionalità enzimatica. Biosensore non enzimatico per la rilevazione di erbicidi e metalli. Biosensore non enzimatico per la valutazione dei 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 alpha cristalline. Modelli dei complessi oligomerici. Azione delle Alpha cristalline come chaperon molecolari in collaborazioni con altri chaperon. Ruolo protettivo delle Alpha cristalline in relazione alla precipitazione e inattivazione enzimatica. Trigger factor. 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 reductasi 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 Tiroredossina/Tiroredossina Reduttasi: struttura e ruolo fisiologico. Drug discovery della Tiroredossina Reduttasi.

Schistosomiasi e ruolo della tiroredossina glutatione reductasi di Schistosoma nell'insorgenza della malattia. Drug discovery della tiroredossina glutatione reductasi 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 della 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 monomeric 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 ultrarapida: Glargina, Detemir, Glutadec. Mutazioni sito-specifiche su enzimi utilizzati nelle industrie: glucosio isomerasi, beta-glucosidasi, subtilisina. Mutazioni sito-specifiche: fenilalanina ammonia-liasi, laccasi. Dalla patologia all'identificazione del target biologico. Enzima come target biologico. Le complicanze del diabete: la cataratta. Stress osmotico sorbitolo dipendente. Aldoso reductasi 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. Cataratta indotta da Streptozotocina e da Mafatalene. 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 eluzione relativo alla colonna per affinità. Effetto dell'ossigeno iperbarico sull'attività dell'Aldoso reductasi 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. Ruolo del GS-DHN nella risposta infiammatoria. Correlazione tra l'Aldoso Reduttasi e l'attivazione delle cellule della Microglia e nell'insorgenza dell'infiammazione nelle cellule epiteliali della lente.

Danno cellulare indotto da acroleina e correlazione con l'Aldoso reductasi. Inibitori dell'Aldoso Reduttasi: inibitori di nuova sintesi e di origine naturale. Inibitori differenziali dell'Aldoso Reduttasi. Inibitori dell'Aldoso Reduttasi quali potenziali farmaci anticatarattici: effetto del trattamento topico. Ruolo della Piruvato Deidrogenasi Kinasi nel metabolismo cellulare. Effetto Warburg. Drug discovery relativo alla Piruvato Deidrogenasi Chinasi. Inibizione covalente.



UNIVERSITÀ DI PISA

Bibliografia e materiale didattico

Materiale didattico: slides presentate durante le lezioni frontali.
Articoli scientifici su richiesta dello studente.

Indicazioni per non frequentanti

nessuna indicazione

Modalità d'esame

prova orale finale

Stage e tirocini

Non previsti

Altri riferimenti web

non applicabile

Note

nessuna

Ultimo aggiornamento 24/01/2019 18:26