

<b>Attività formativa</b>	INGEGNERIA PROTEICA				
<b>Modulo didattico</b>					
<b>CFU</b>	6				
<b>Ore</b>	48				
<b>tipo</b>	Lezioni frontali				
<b>Obiettivo formativo</b>	Al termine del Corso, lo Studente possiede conoscenze riguardanti l'enzimologia generale e l'ingegneria proteica. In particolare, lo Studente è in grado di analizzare la cinetica di reazioni catalizzate da enzimi e di verificare le potenzialità dell'ingegnerizzazione di proteine. Infine, lo Studente è in grado di valutare l'opportunità di utilizzare enzimi naturali o modificati in campo industriale, alla luce delle prestazioni catalitiche e dei costi di produzione.				
<b>TEMATICA</b>			<b>LEZIONI</b>		
<b>Tema</b>	<b>Obiettivo</b>	<b>Ore</b>		<b>Argomenti</b>	<b>Durata (ore)</b>
Introduzione. Richiami di cinetica.	Lo studente apprende gli argomenti dell'insegnamento, l'organizzazione del Corso ed i metodi didattici. Lo studente conosce le diverse tipologie cinetiche delle reazioni chimiche.	2	1	Presentazione del Corso. Contenuti, materiale didattico, modalità di svolgimento della prova d'esame. Richiami di cinetica. Molecolarità e ordine di reazione. Reazioni di ordine zero, di primo o di secondo ordine. Metodi grafici per la identificazione dell'ordine cinetico di reazione. Dimensioni delle costanti di velocità.	2
Cinetica di reazioni catalizzate da enzimi.	Lo studente apprende le caratteristiche cinetiche delle reazioni catalizzate da enzimi, nonché i metodi utili allo studio di queste ultime.	6	2	Enzimi e catalizzatori. Catalisi e incremento delle costanti di velocità della reazione diretta ed inversa. Modello cinetico di Michaelis-Menten. Postulati del modello. Condizioni di velocità iniziale ed assunzione della irreversibilità della reazione. La formazione del complesso enzima-substrato in condizioni di pseudo-equilibrio. La costante di catalisi e lo stadio limitante la velocità di reazione. Equazione di Michaelis-Menten integrata e ordine cinetico misto.	2
			3	Caratterizzazione cinetica di preparazioni enzimatiche omogenee o parzialmente purificate: $k_{cat}$ e $V_{max}$ . Determinazione dell'attività enzimatica. Saggi di attività discontinui o continui. Concetto di Unità enzimatica. Arbitrarietà della definizione di Unità e commercializzazione di enzimi. Saggi di attività di enzimi per i quali non è possibile definire $K_m$ in termini molari.	2
			4	Stato stazionario e modello cinetico di Briggs-Haldane. Significato della costante $K_m$ nel modello cinetico di Briggs-Haldane. Determinazione grafica di $V_{max}$ e $K_m$ : rappresentazione di Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee. Inibitori enzimatici. Inibizione competitiva, non competitiva, incompetitiva.	2
Meccanismi di reazioni catalizzate da enzimi.	Lo studente conosce i meccanismi catalitici utilizzati dagli enzimi per accelerare il decorso di diverse tipologie di reazioni.	10	5	Le seril proteasi. Valori di $k_{cat}$ di reazioni catalizzate da proteasi e valori delle costanti di velocità delle corrispondenti reazioni non catalizzate. Chimotripsinogeno ed $\alpha$ -chimotripsina; ponti disolfuro inter- ed intra-catena nella chimotripsina. La triade catalitica della chimotripsina: Serina195, Istidina57 ed Aspartato102. Catalisi covalente. Cavità dell'ossianione e stabilizzazione dell'intermedio covalente.	2
			6	Specificità della chimotripsina e tasca di legame dei substrati. Andamento di $k_{cat}$ e $K_m$ in funzione del pH: ruolo dell'Isoleucina16 e dell'Aspartato194. Cinetica dei due stadi della reazione catalizzata dalla chimotripsina ed il "burst" iniziale di prodotto. Gli inibitori proteici delle seril proteasi.	2
			7	Le DNA polimerasi. La struttura terziaria delle DNA polimerasi: domini del pollice, del palmo e delle dita. La associazione dell'enzima al DNA e le interazioni del complesso binario. Il sito attivo ed il legame di due atomi di Magnesio. Il deossinucleosidtrifosfato entrante e l'attacco nucleofilo al fosfato $\alpha$ da parte	2

				dell'ossidrilile in 3' del primer. Cambiamenti conformazionali dell'enzima associati al progredire della reazione di estensione del DNA. Forma aperta e forma chiusa dell'enzima.	
			8	Caratterizzazione cinetica delle fasi di pre-stato-stazionario di reazioni catalizzate da enzimi: lo stopped-flow ed il quench-flow. Domini esonucleasici 3'-5' in DNA polimerasi: il caso dell'enzima Klenow. Contributo dell'attività esonucleasica 3'-5' alla fedeltà di replicazione. Il sito attivo ed il legame di due atomi di Zinco. Le DNA polimerasi e l'amplificazione ed il sequenziamento del DNA.	2
			9	Le lattato deidrogenasi. Struttura primaria e secondaria dell'enzima di squalo. Il dominio di legame del $\beta$ -NADH ed il dominio catalitico. Il legame ordinato dei due substrati della lattato deidrogenasi. Conformazione aperta dell'enzima e transizione alla forma chiusa indotta dal legame del $\beta$ -NADH. Le interazioni intramolecolari caratteristiche dell'apo e dell'olo-enzima. Allineamento di strutture primarie di deidrogenasi NADH-dipendenti e sito di legame del cofattore. L- e D-lattico deidrogenasi. Il meccanismo della reazione catalizzata dall'enzima: ruolo dell'Istidina194, dell'Arginina170, dell'Arginina107 e dell'Aspartato167.	2
Anticorpi catalitici.	Lo studente riconosce la peculiarità degli enzimi, in particolare paragonando le caratteristiche di questi ultimi a quelle degli anticorpi.	2	10	Anticorpi ed enzimi: il paradigma di Linus Pauling. Stabilizzazione dello stato di transizione e catalisi enzimatica. Il caso della galattoside transacetilasi di <i>Escherichia coli</i> : massimizzazione di $k_{cat}$ e di $K_m$ . Sintesi di analoghi dello stato di transizione e produzione di anticorpi catalitici. L'antigene come inibitore competitivo. Efficienza catalitica degli anticorpi catalitici e confronto con quella di enzimi analoghi.	2
Ingegneria proteica razionale.	Lo studente apprende i principi ed i metodi della ingegneria proteica razionale.	10	11	Ingegneria proteica razionale: principi e requisiti. Entropia di denaturazione e termostabilità delle proteine. Pluralità di stati conformazionali ed entropia. Grafico di Ramachandran per la glicina e per la prolina. Valutazione comparativa dell'entropia conformazionale in differenti dipeptidi. L'area del grafico di Ramachandran occupata da un amminoacido come parametro diagnostico dell'entropia conformazionale. Sostituzioni amminoacidiche e diminuzione dell'entropia di denaturazione di una proteina.	2
			12	Entropia di denaturazione ed ingegnerizzazione del lisozima di fago T4. Analisi della struttura terziaria dell'enzima e individuazione di siti idonei ad una sostituzione Glicina-Alanina. Valori degli angoli $\phi$ e $\psi$ delle glicine del lisozima e valori tipici delle alanine. L'intorno della Glicina77 e valutazione di eventuali conflitti sterici provocati dalla presenza di un gruppo metile addizionale (Alanina). Costruzione del mutante G77A. Variazione della entropia di denaturazione associata alla sostituzione di una Alanina con una Prolina e costruzione del mutante A92P. Termostabilità del lisozima wild-type e dei mutanti G77A e A92P.	2
			13	Ingegnerizzazione di proteasi termostabili. La metallo-proteasi di <i>Bacillus stearothermophilus</i> . Individuazione delle regioni termolabili dell'enzima. Introduzione di sostituzioni amminoacidiche ideate per diminuire l'entropia di denaturazione della proteasi. Analisi comparativa di strutture primarie di metallo-proteasi omologhe e sostituzioni sito-specifiche associate ad un incremento della termostabilità. Costruzione di mutanti multipli e verifica della additività dell'effetto di ciascuna mutazione. Introduzione di un ponte disolfuro artificiale nella metallo-proteasi e stabilità di quest'ultima in condizioni ossidanti o riducenti.	2

				Enzimi stabili a 100 °C? Un mutante ottuplo della metallo-proteasi di <i>Bacillus stearothermophilus</i> . Proprietà catalitiche acquisite dall'enzima grazie all'incremento della sua termostabilità.	
			14	Innesto di attività in proteine bersaglio. Introduzione della triade catalitica delle seril proteasi nella ciclofillina di <i>Escherichia coli</i> . Legami X-Prolina ed isomeria cis-trans. La prolil-isomerasi (ciclofillina) di <i>E. coli</i> ed il sito di legame dei substrati. Distanze tra gli amminoacidi della triade catalitica nella tripsina libera o associata ad inibitori tripsinici di natura proteica. Introduzione di una serina nella ciclofillina e valutazione della eventuale attività proteasica introdotta. Innesto nella ciclofillina della triade catalitica completa (Serina, Istidina ed Aspartato) e attività proli-proteasica. Meccansimo della reazione dell'enzima mutante.	2
			15	Psicrozimi, enzimi attivi a basse temperature. La termostabilità e le caratteristiche di attività degli enzimi prodotti da organismi psicrofili. Valori di $k_{cat}$ e $K_m$ in lattato deidrogenasi isolate da organismi le cui temperature corporee sono marcatamente diverse. Entalpia ed entropia di attivazione in psicrozimi e confronto con i corrispondenti parametri in enzimi mesofili. Ingegnerizzazione di un enzima mesofilo e conversione di quest'ultimo in un enzima attivo a basse temperature.	2
Progettazione de novo di proteine ed enzimi. Costruzione di enzimi contenenti amminoacidi non naturali.	Lo studente apprende i principi della progettazione de novo di enzimi artificiali.	4	16	Progettazione <i>de novo</i> di proteine e di siti attivi artificiali. La progettazione e costruzione di proteine costituite da fasci di $\alpha$ -eliche. Identificazione di sequenze artificiali idonee a produrre elementi di struttura conformati ad $\alpha$ -elica. Progettazione di connessioni elica-elica. La progettazione di un sito attivo artificiale in grado di catalizzare la eliminazione di Kemp. Identificazione di architetture molecolari adatte ad essere innestate con siti attivi artificiali. Costruzione, caratterizzazione e miglioramento di Kemp-eliminasi artificiali.	2
			17	L'alfabeto amminoacidico e la produzione di enzimi artificiali. Produzione di enzimi contenenti un numero limitato di amminoacidi diversi. Sintesi di enzimi contenenti amminoacidi non naturali. La espansione del codice genetico e la produzione <i>in vivo</i> di proteine contenenti amminoacidi artificiali. La sintesi di peptidi con D-amminoacidi. Costruzione di proteine ed enzimi contenenti esclusivamente D-amminoacidi. Chiralità della catalisi di D-enzimi.	2
Evoluzione orientata di enzimi.	Lo studente apprende i principi ed i metodi della evoluzione orientata di enzimi.	10	18	Evoluzione orientata di enzimi: principi e requisiti. Costruzione di librerie di mutanti enzimatici, screening delle loro caratteristiche e reiterazione del processo fino all'ottenimento di un enzima mutante caratterizzato dalle proprietà desiderate. Introduzione di variabilità nella sequenza nucleotidica codificante un enzima. Le DNA polimerasi e la fedeltà di replicazione. La PCR mutagenica e la frequenza delle mutazioni introdotte in geni bersaglio.	2
			19	PCR mutagenica e costruzione di una libreria di mutanti clonati in un opportuno vettore di espressione. La utilizzazione di piastre Petri contenenti caseina e dimetilformammide per effettuare lo screening dei mutanti. Reiterazione del processo e sequenziamento dei cloni più performanti. Mutazioni introdotte casualmente che aumentano l'attività generale dell'enzima, che ne incrementano specificamente l'attività e/o la stabilità in ambienti contenenti dimetilformammide.	2
			20	Il DNA shuffling. La ricombinazione in vitro di librerie di mutanti casuali. Digestione con DNasi I e PCR inversa di popolazioni di molecole di DNA. I principi della PCR inversa. Analisi del linkage tra	2

				mutazioni in esperimenti di DNA shuffling: valutazione quantitativa con il test dell' $\alpha$ -complementazione. Evoluzione della $\beta$ -galattosidasi di <i>Escherichia coli</i> in una $\beta$ -fucosidasi. DNA shuffling mutagenico. Screening qualitativo e quantitativo dei mutanti casuali ottenuti mediante DNA shuffling mutagenico. Reiterazione della procedura ed evoluzione dell'enzima bersaglio. Le caratteristiche catalitiche della $\beta$ -fucosidasi artificiale prodotta con l'evoluzione orientata.	
			21	Le chimere proteiche. La glucosio deidrogenasi di <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ed il cofattore pirrolochinolina-chinone (PQQ). L'alcol deidrogenasi di <i>Comamonas testosteroni</i> e le chinoemoproteine contenenti PQQ ed un gruppo eme. Costruzione di una chimera contenente la glucosio deidrogenasi di <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ed il gruppo eme dell'alcol deidrogenasi di <i>Comamonas testosteroni</i> . Trasferimento diretto di elettroni dal PQQ della chimera ad un elettrodo di grafite. DNA shuffling e costruzione di chimere proteiche.	2
			22	STaggered Extension Process (STEP) ed evoluzione di enzimi mesofili in enzimi psicrofili. La procedura STEP e la ricombinazione di librerie di mutanti casuali ottenuti mediante PCR mutagenica. La subtilisina di <i>Bacillus sphaericus</i> e la sua evoluzione in un enzima attivo a basse temperature. Gli enzimi attivi a basse temperature sono necessariamente termolabili? Il caso della subtilisina artificiale P3C9.	2
Evoluzione in vivo di enzimi mutanti. Evoluzione di ceppi microbici.	Lo studente conosce le metodologie adatte ad evolvere enzimi o genomi utilizzando opportuni ceppi batterici.	4	23	La DNA polimerasi I di <i>Escherichia coli</i> e la costruzione <i>in vivo</i> di librerie di mutanti. Replicazione <i>in vivo</i> di plasmidi ColE1 e ruolo delle diverse DNA polimerasi di <i>E. coli</i> . Mutanti <i>polA</i> e mantenimento di plasmidi ColE1. Costruzione di ceppi di <i>E. coli</i> privi dell'attività 3'-5' esonucleasica della DNA polimerasi I. Clonaggio di geni bersaglio in plasmidi ColE1 in posizioni vicine o lontane all'origine di replicazione e introduzione di mutazioni casuali. Stabilità genetica dei ceppi privi dell'attività 3'-5' esonucleasica della DNA polimerasi I.	2
			24	Evoluzione artificiale di ceppi di <i>Escherichia coli</i> . La replicazione del genoma di <i>E. coli</i> e l'attività 3'-5' esonucleasica della subunità $\epsilon$ della DNA polimerasi III. Varianti mutageniche della subunità $\epsilon$ . Espressione condizionale <i>in vivo</i> di varianti mutageniche della subunità $\epsilon$ e screening di popolazioni di mutanti casuali. L'evoluzione artificiale di <i>E. coli</i> verso la resistenza ai solventi organici (dimetilformammide).	2