

Attività formativa	METODI CHIMICO-MOLECOLARI PER LO STUDIO DELLE PROTEINE				
Modulo didattico	Modulo unico				
CFU	4				
Ore	32				
tipo	Lezioni frontali				
Obiettivo formativo	Al termine del corso, lo studente possiede conoscenze approfondite di alcuni metodi largamente utilizzati per l'identificazione, la produzione e la purificazione di proteine. Inoltre, apprende i principi fisici e le applicazioni di alcune tecniche calorimetriche, spettroscopiche e di scattering della luce volte alla caratterizzazione della conformazione e dello stato oligomerico delle proteine in soluzione, allo studio dei loro cambiamenti conformazionali, e all'analisi delle interazioni che intervengono durante il loro funzionamento. In particolare, lo studente è in grado di: - proporre le strategie sperimentali per isolare le proteine nella loro forma nativa; - comprendere l'uso di tecniche per analizzare la loro struttura secondaria e terziaria e i cambiamenti conformazionali; - comprendere l'uso di tecniche per definire le proprietà idrodinamiche delle proteine in soluzione, quali il loro peso molecolare e lo stato oligomerico; - comprendere l'uso della calorimetria per definire lo stato conformazionale delle proteine e le interazioni proteina-proteina e proteina-ligando; - utilizzare alcuni programmi di analisi dei dati sperimentali.				
TEMATICA			LEZIONI		
Tema	Obiettivo	Ore		Argomenti	Durata (ore)
Introduzione	Lo studente conosce l'organizzazione dell'insegnamento, gli argomenti trattati e la procedura di verifica.	2	1	Organizzazione dell'insegnamento e procedura di verifica. Introduzione allo studio delle proteine e ai metodi per isolarle dalla fonte biologica o in forma ricombinante.	2
Produzione di proteine	Lo studente apprende come disegnare una strategia sperimentale per produrre proteine ricombinanti. In particolare, comprende i diversi vantaggi e svantaggi della scelta del metodo di clonaggio, del vettore e dell'ospite di espressione.	8	2	Metodi di clonaggio per proteine ricombinanti. Uso di <i>E. coli</i> come ospite di espressione. Ottimizzazione dell'espressione di una proteina in <i>E. coli</i> . Promotori inducibili. Stabilità della proteina. Corpi di inclusione. Come aumentare la solubilità di una proteina: secrezione nel periplasma, uso di chaperones, coespressione. Uso di "tags" e proteine di fusione. Come ottimizzare le condizioni di crescita di <i>E. coli</i> per aumentare la resa in proteina ricombinante.	4
			3	Espressione di proteine ricombinanti in cellule eucariotiche: lievito, insetto, mammifero, pianta. Sistemi di espressione "cell-free".	4
Purificazione di proteine	Lo studente comprende l'applicazione delle tecniche di separazione delle proteine e capisce come proporre una strategia in tre fasi per la purificazione di proteine.	4	4	Tecniche cromatografiche per la separazione di proteine. Salting in/out.	2
			5	Controllo qualità delle proteine purificate: stabilità e misura della concentrazione e della purezza delle proteine ottenute.	2
Stabilità strutturale delle proteine	Lo studente comprende quali siano i fattori termodinamici e cinetici che influenzano la stabilità delle proteine in soluzione e sa come quantificarli sperimentalmente, attraverso la determinazione delle strutture secondaria e terziaria delle proteine in soluzione.	10	6	Dicroismo circolare di proteine.	2
			7	"Protein-folding": considerazioni termodinamiche e cinetiche. Forze che guidano il ripiegamento proteico. Teoria dell'imbuto conformazionale. Studio della stabilità strutturale attraverso la perturbazione della struttura proteica. Denaturazione chimica e termica seguita da dicroismo circolare, fluorimetria a scansione differenziale e calorimetria a scansione differenziale.	6
			8	Proteine intrinsecamente disordinate	2
Interazioni molecolari	Lo studente impara le basi delle tecniche per studiare le interazioni proteina-proteina, proteina-ligando e proteina-DNA, e apprende come trattare e interpretare i dati sperimentali con l'utilizzo di software specifici.	8	9	"Isothermal titration calorimetry". Teoria e applicazioni.	2
			10	"Scattering" della luce per studiare la struttura quaternaria delle proteine. Termoforesi di microscala.	2
			11	Uso di software per analizzare i dati di titolazione di una proteina con ioni metallici e dell'attività di un metallo-enzima con "isothermal titration calorimetry". Interpretazione quantitativa degli spettri di dicroismo circolare.	4