

Llicenciatura de Bioquímica

Assignatura optativa: **ESPECTROSCÒPIA DE BIOMOLÈCULES (20176)**

Curs 2007-2008

6 crèdits (3 teoria + 1,5 problemes + 1,5 pràctiques)

Professors: Joan-Ramon Daban, Josep Cladera i Carles Arús.
Coordinador: Josep Cladera.

1. Introducció

- 1.1. Interacció de la radiació electromagnètica amb la matèria.
- 1.2. Dispersió, absorció i emissió.

2. Espectroscòpia d'absorció en l'ultraviolat i visible

- 2.1. Principis físics.
- 2.2. Disseny experimental.
- 2.3. Espectrofotometria d'absorció.
- 2.4. Aplicacions: estudi de proteïnes, àcids nucleics i altres cromòfors bioquímics.
- 2.5. Influència de l'entorn sobre l'espectre d'absorció: espectres de diferència i de derivades.

3. Espectroscòpia de fluorescència

- 3.1. Bases físiques: conversió interna, relaxació vibracional, relaxació emissiva i no emissiva.
- 3.2. Disseny experimental: problemàtica associada a les mesures de fluorescència, estratègies i components que permeten augmentar la sensibilitat.
- 3.3. Fluorescència resolta en el temps: temps de vida de l'estat excitat, instruments de mesura, aplicacions bioquímiques.
- 3.4. Fenòmens que poden afectar l'emissió fluorescent: efectes de l'embolcall i del dissolvent, quenching col·lisional de la fluorescència, polarització, formació de dímers excitats (excímers), transferència d'energia.
- 3.5. Aplicació a l'anàlisi estructural de sistemes macromoleculars: fluoròfors intrínsecs i extrínsecs, accessibilitat, difusió rotacional, mesurament de distàncies.
- 3.6. Aplicacions a l'anàlisi Bioquímica i en Biologia Molecular.
- 3.7. Aplicació a estudis de Biologia Cel·lular: microscòpia de fluorescència, citofluorometria de flux.
- 3.8. Bases físiques i aplicacions d'altres fenòmens emissius: quimioluminescència i bioluminescència.

4. Espectroscòpia de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

- 4.1. Introducció. Bases físiques del fenomen de la ressonància: spin nuclear, condició de ressonància, magnetització macroscòpica i model vectorial, sistema de coordenades giratori.
- 4.2. Disseny experimental, qüestions instrumentals: imant, bobines per a la pertorbació dels sistema i la seva detecció, puls de 90°, FID i transformació de Fourier. Quocient senyal/soroll.
- 4.3. Paràmetres que caracteritzen l'espectre de RMN d'una mostra biològica. Àrea de la ressonància. Desplaçament químic. Multiplicitat (desacoblament). Relaxació: temps de relaxació T2 (concepte d'eco de spin) i T1. Efecte nuclear Overhauser.
- 4.4. Aplicacions biomèdiques de la RMN. Problemes instrumentals i metodològics específics. Informació accessible: anatomia morfològica i funcional (gradients i concepte d'excitació selectiva, contrast a les imatges de RM, concepte d'espai k). Bioenergètica tisular, patrons metabòlics, marcatge de vies metabòliques.
- 4.5. Aplicacions de la RMN a l'estudi de biopolimers. Proteïnes. Estudis funcionals amb RMN monodimensional. Estudis estructurals. Càlcul de l'estructura tridimensional. El problema de l'assignació espectral a biopolimers, l'espectroscòpia bi i multidimensional. Assignació seqüencial i determinació de l'estructura secundària. Aplicacions de la RMN a l'estudi d'àcids nucleics i membranes biològiques.

5. Espectroscòpia d'infraroig

- 5.1. Interacció de la radiació d'infraroig amb les molècules. Modes de vibració.
- 5.2. Principis, disseny experimental i transformació de Fourier. L'interferograma. L'apodització.
- 5.3. Aspectes pràctics: les dissolucions aquoses. Avantatges de la transformació de Fourier.
- 5.4. Aplicació de tècniques matemàtiques per a la resolució de bandes superposades. Derivades, desconvolucions i ajust de bandes.
- 5.5. Proteïnes: bandes de vibració dels enllaços amida. Bandes corresponents als aminoàcids. Espectroscòpia de diferència. Determinació de l'estructura secundària. Intercanvi H/D. Espectres de dicroïsmo.
- 5.6. Altres aplicacions: Lípids, membranes, àcids nucleics, aplicacions biomèdiques.

6. Dicroïsmo Circular (CD)

- 6.1. Fonaments. Activitat òptica. Espectre de dicroïsmo circular.
- 6.2. Instrumentació.
- 6.3. Estructura secundària de proteïnes. Polipèptids en conformacions α , β i aperiòdica. Quantificació de l'estructura secundària. Espectres de CD de les cadenes laterals.
- 6.4. Exemples: hemoglobina, ribonucleasa, pèptids relacionats amb la malaltia d'Alzheimer.

7. Espectroscòpia de Ressonància Paramagnètica Electrònica (RPE, ESR)

- 7.1. Fonaments i disseny experimental.
- 7.2. Marcadors de spin covalents i no covalents: Espectres dels radicals nitròxid. Tipus d'informació obtenible. Inconvenients de la tècnica. Espectres de proteïnes marcades en

- dissolució: exemples. Espectres de mostres cristal·lines. Aplicacions en membranes biològiques. Saturació de transferència (ST-RPE).
- 7.3. Altres aplicacions en Biologia i Medicina.

BIBLIOGRAFIA

1. An Introduction to Spectroscopy for Biochemists. S.B. Brown, 1980. Academic Press.
2. Principles of Fluorescence Spectroscopy. J.R. Lakowicz, 1983. Plenum Press.
3. Biological Spectroscopy. I.D. Campbell i R.D. Dwek, 1984. Benjamin-Cummings.
4. NMR of Proteins and Nucleic Acids. K. Wüthrich, 1986. Wiley.
5. NMR in Medicine and Biology. Structure Determination, Tomography, in vivo Spectroscopy. K.H. Hausser i H.R. Kalbitzer, 1989. Springer-Verlag.
6. Espectroscopía *in vivo* por Resonancia Magnética Nuclear. J.M. García Segura, 1991. Eudema Universidad.
7. Fluorescence Spectroscopy. New Methods and Applications. O.S. Wolfbeis, 1993. Springer Verlag.
8. Biomolecular NMR Spectroscopy. J.N.S. Evans, 1995. Oxford University Press.
9. NMR and its Applications to Living Systems, 2nd Edition. D.G. Gadian, 1995. Oxford University Press.
10. Infrared Spectroscopy of Biomolecules. H.H. Mantsch i D. Chapman, 1996, Wiley-Liss.
11. Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica. J-M. García Segura y col., 1999, Editorial Síntesis, Madrid
12. Fluorescent and Luminiscent Probes for Biological Activity. W.T. Mason, 1999. Academic Press
13. Magnetic Resonance in Chemistry and Medicine. Ray Freeman, 2003. Oxford University Press.
14. Optical Spectroscopy in Chemistry and Life Sciences. Werner Schmidt, 2005. Wiley-VCH.
15. Spectroscopy for the Biological Sciences. Gordon G. Hammes. 2005. Wiley-Interscience.
16. Physical principles and techniques of protein chemistry (1973). Sydney J. Leach Ed. Academic Press, New York and London.

PRÀCTIQUES

1. Estudi del funcionament de: colorímetre, espectrofotòmetre de doble feix, espectrofotòmetre diode-array, espectrofluorímetre, densitòmetre, microscopi de fluorescència, i altres instruments relacionats amb fenòmens d'absorció, fluorescència i quimioluminescència. Visita guiada al Laboratori d'Anàlisi i Fotodocumentació d'Electroforesis, Autoradiografies i Luminescència.
2. Pràctiques a l'aula d'informàtica d'assignació d'espectres de protó amb el paquet informàtic "Problem solving in NMR spectroscopy for IBM PC. Biosoft". Visita guiada al Servei de RMN de la UAB.
3. Adquisició i interpretació d'espectres d'infraroig de proteïnes amb un espectròmetre d'infraroig amb transformada de Fourier.

AVALUACIÓ DE L'ASSIGNATURA

1. Examen final amb preguntes curtes/problemes i una secció de tipus test.
L'examen inclourà preguntes relacionades amb les pràctiques.
L'avaluació també tindrà en compte la participació al Campus Virtual.
L'avaluació de les parts de RMN i d'infraroig/ESR/CD pot incloure la realització d'un treball bibliogràfic.
2. **L'assistència a les pràctiques és obligatòria.**