



## UNIVERSITÀ DI PISA

---

### BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

**ANTONIETTA RAFFAELLA MARIA SABBATINI**

Anno accademico 2018/19  
CdS MEDICINA E CHIRURGIA  
Codice 050EE  
CFU 15

Moduli	Settore/i	Tipo	Ore	Docente/i
BIOCHIMICA	BIO/10	LEZIONI	150	SANDRA GHELARDONI ANTONIETTA RAFFAELLA MARIA SABBATINI
BIOLOGIA MOLECOLARE	BIO/11	LEZIONI	37.50	SILVIA PELLEGRINI

Obiettivi di apprendimento

#### *Conoscenze*

#### **Corso Integrato di Biochimica e Biologia Molecolare**

#### **CORE CURRICULUM**

#### **MODULO DI BIOCHIMICA**

- Struttura, proprietà e funzioni dei nucleotidi e dei polinucleotidi.
- Struttura e proprietà degli amminoacidi.
- Peptidi.
- Proteine: struttura, proprietà chimico-fisiche e funzioni.
- Proteine globulari.
- Esempi di struttura terziaria e quaternaria delle proteine: mioglobina e emoglobina.
- Meccanismi biochimici di ossigenazione dell'emoglobina.
- Proteine fibrose.
- Enzimi: proprietà generali.
- Enzimi: cinetica.
- Enzimi: meccanismi di azione.
- Enzimi: regolazione dell'attività.
- Coenzimi.
- Struttura e funzione delle vitamine idrosolubili.
- Struttura e funzione delle vitamine liposolubili.
- Introduzione al metabolismo.
- Organizzazione metabolica della cellula.
- Bioenergetica: ruolo dell'ATP.
- Ossidazioni biologiche.
- Biochimica dei carboidrati di importanza fisiologica.
- Le glicoproteine.
- La glicolisi: ruolo, reazioni e regolazione.
- L'ossidazione del piruvato.
- Il ciclo degli acidi tricarbossilici.
- Catena respiratoria e fosforilazione ossidativa.
- Metabolismo del glicogeno.
- Gluconeogenesi e controllo del glucosio ematico.
- La via del pentoso fosfato e altre vie del metabolismo degli esosi.
- Biochimica dei lipidi di importanza fisiologica.
- Biosintesi degli acidi grassi.
- Ossidazione degli acidi grassi e chetogenesi.
- Metabolismo degli acilgliceroli e degli sfingolipidi.
- Trasporto ed accumulo dei lipidi.
- Sintesi, trasporto ed escrezione del colesterolo.
- Metabolismo degli amminoacidi e catabolismo proteico.
- Reazioni di transaminazione e deaminazione.
- Reazioni di organizzazione dell'ammoniaca.
- Il ciclo dell'urea.



## UNIVERSITÀ DI PISA

---

- Enzimologia della sintesi proteica.
- Porfirine e pigmenti biliari.
- Metabolismo dei nucleotidi purinici.
- Metabolismo dei nucleotidi pirimidinici.
- Enzimologia della sintesi degli acidi nucleici e del rimaneggiamento post-trascrizionale.
- Metabolismo delle molecole costituenti le membrane biologiche.
- Classificazione biochimica, meccanismo biochimico d'azione, azioni metaboliche e regolazione del metabolismo di molecole endogene (ormoni, mediatori chimici, fattori di crescita ecc.).
- Interrelazioni fra il metabolismo amminoacidico, lipidico e glucidico.
- Biochimica sistematica umana di tessuto e di organo.
- Metabolismo idrosalino.
- Integrazione del metabolismo cellulare tra i vari organuli subcellulari.
- Integrazione del metabolismo dei tessuti e degli organi.
- Biochimica degli xenobiotici.
- L'elettroforesi in biochimica.
- Metodi di studio delle proteine.
- Metodi di studio degli enzimi.
- Metodi di studio per il frazionamento cellulare.
- La cromatografia in biochimica.
- Tecniche di studio del metabolismo.
- Biochimica applicata allo studio del metabolismo subcellulare, cellulare e d'organo.

### **MODULO DI BIOLOGIA MOLECOLARE**

- Le origini della Biologia Molecolare. Impatto della Biologia Molecolare in medicina.
- La tecnologia del DNA ricombinante, clonaggio e ibridazione di acidi nucleici.
- Amplificazione del DNA. La PCR, principi ed applicazioni. La PCR quantitativa: real-time PCR.
- Sequenziamento del DNA, metodo di Sanger e next generation sequencing.
- Progetto Genoma Umano, organizzazione e obiettivi. Strategie di sequenziamento, identificazione dei geni e degli elementi funzionali.
- Variabilità del genoma, Polimorfismi, fattori di suscettibilità e studi di associazione.
- La medicina personalizzata: test di suscettibilità e screening di popolazione.
- La tipizzazione del DNA, DNA fingerprinting: applicazioni in ambito forense.
- Analisi dell'RNA, Northern blotting, RT-PCR e ibridazione in situ.
- Analisi del trascrittoma, i microarray e l'RNA seq.
- Identificazione della funzione dei geni nell'era postgenomica.
- Organismi geneticamente modificati.
- Approcci bioinformatici per studiare la funzione dei geni.
- Identificazione dei geni-malattia, il clonaggio posizionale e le altre strategie.
- Terapia genica, principi e applicazioni.

Lo studente sarà in grado di interpretare in chiave biochimica i processi biologici normali e patologici, fornendogli le conoscenze necessarie per la comprensione delle caratteristiche chimiche dei composti che costituiscono gli organismi viventi e delle correlazioni struttura-funzione degli stessi composti; delle vie metaboliche, delle loro interrelazioni, della loro regolazione e della loro distribuzione nei compartimenti cellulari; della specializzazione a livello molecolare, sovramolecolare e metabolico di cellule, tessuti ed organi. Lo studente acquisirà inoltre conoscenze sulle principali tecniche di biologia molecolare, sulle modalità di analisi del genoma e del trascrittoma, sulla variabilità del genoma tra individui e le applicazioni in medicina legale, sulla produzione di proteine ricombinanti ad uso terapeutico, sulla terapia genica e la terapia sostitutiva, sulla tecnologia di produzione di OGM. Infine, lo studente apprenderà anche le principali metodologie per lo studio delle proteine.

#### *Modalità di verifica delle conoscenze*

L'acquisizione delle conoscenze sarà verificata con un esame scritto (10-12 domande aperte su un ampio argomento) alla fine del corso.

#### *Capacità*

Lo studente al termine del corso sarà capace di capire e possibilmente analizzare criticamente argomenti che coinvolgono i processi biochimici cellulari, le tecnologie di biologia molecolare e nuove frontiere terapeutiche.

#### *Modalità di verifica delle capacità*

Durante le ore di lezioni ed al termine del corso saranno svolti tests per verificare l'acquisizione delle capacità.

#### *Comportamenti*

Lo studente potrà acquisire sensibilità e spirito analitico riguardo ai processi biologici e alla loro correlazione, alle tecnologie di studio, analisi e manipolazione degli acidi nucleici e delle proteine.



## UNIVERSITÀ DI PISA

### Modalità di verifica dei comportamenti

Nel test finale sarà verificato non solo l'apprendimento, ma anche lo spirito analitico e critico riguardo agli argomenti affrontati nel corso.

#### Prerequisiti (conoscenze iniziali)

Conoscenze di base di chimica e chimica organica; conoscenze di biologia cellulare (cellule procariotiche ed eucariotiche).

#### Programma (contenuti dell'insegnamento)

### PROGRAMMA DEL MODULO DI BIOCHIMICA DEL CORSO INTEGRATO DI BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

#### Proteine

Classificazione e funzione delle proteine. Struttura primaria delle proteine. Proprietà del legame peptidico. Struttura secondaria delle proteine (alfa-elica, beta-struttura): proprietà e legami che la stabilizzano. Esempi di proteine fibrose. Struttura terziaria delle proteine e legami che la stabilizzano. Strutture supersecondarie e domini. Struttura quaternaria delle proteine. Esempi di proteine monomeriche e polimeriche. Denaturazione e rinaturazione delle proteine. Le proteine come elettroliti. Proteine trasportatrici di ossigeno: mioglobina ed emoglobina. Struttura dell'eme e rapporto eme-globina. Il legame dell'ossigeno all'eme. Variazioni della struttura terziaria e quaternaria indotte dal legame con l'ossigeno. Curve di ossigenazione di mioglobina ed emoglobina. Effetto Bohr. Basi molecolari della tossicità del CO. Emoglobine fetali. Metaemoglobina.

#### Enzimi e coenzimi

Enzimi: definizione, natura, nomenclatura e classificazione. Meccanismi di catalisi enzimatica. Cinetica enzimatica: teoria di Michaelis e Menten. L'equazione di Michaelis e Menten:  $K_m$  e  $V_{max}$ . Determinazione dell'attività enzimatica, definizione di unità enzimatica. Fattori che influenzano l'attività enzimatica. Inibizione enzimatica. Regolazione dell'attività enzimatica. Sistemi multienzimatici. Isoenzimi. Concetto di coenzima e rapporto coenzimi-vitamine idrosolubili.

#### Glucidi

Monosaccaridi, disaccaridi e polisaccaridi. Acidi aldonici, saccarici e uronici. Glicoproteine e proteoglicani.

#### Lipidi

Vari tipi di lipidi. Acidi grassi saturi, insaturi e ramificati. Acidi grassi essenziali. Eicosanoidi. Stereoisomeria dei gliceridi. Triacilgliceroli. Fosfogliceridi e acido fosfatidico. Sfingolipidi. Gli steroli e gli steroidi: colesterolo, acidi biliari e derivati.

#### Nucleotidi e introduzione al metabolismo

Significato e struttura dei ribonucleotidi e dei desossiribonucleotidi. Nucleosidi di- e trifosfati. ATP ed altri composti ad alta energia di idrolisi. Concetto di metabolismo: catabolismo ed anabolismo. Reazioni esoergoniche ed endoergoniche. Reazioni accoppiate. Ruolo centrale dell'ATP nel metabolismo energetico. Gli stadi idrolitici ed ossidativi del catabolismo. Struttura e funzione dei coenzimi piridinici e flavinici. Sintesi dei monomeri e dei polimeri. Rapporti tra anabolismo e catabolismo.

#### Metabolismo glucidico

Utilizzazione e ruolo del glucosio nel metabolismo. Reazioni della glicolisi. I destini metabolici del piruvato. Reazione generale della glicolisi. Regolazione della glicolisi. Gluconeogenesi e sua regolazione. Substrati della gluconeogenesi. Ruolo del glicogeno. Glicogenolisi e glicogenosintesi. Glicogeno fosforilasi e glicogeno sintasi come modelli di enzimi interconvertibili. Regolazione del metabolismo del glicogeno. Utilizzazione e sintesi di zuccheri diversi dal glucosio (galattosio, fruttosio, pentosi).

#### Processi ossidativi: ciclo di Krebs e via dei pentosi fosfati

Decarbossilazione ossidativa del piruvato. Struttura, meccanismo di azione e regolazione della piruvato deidrogenasi. I coenzimi coinvolti nell'ossidazione del piruvato e nel ciclo di Krebs. Reazioni ed enzimi del ciclo di Krebs. Reazione globale, resa energetica e regolazione. Ruolo biosintetico del ciclo di Krebs. Ruolo della via dei pentosi nella genesi di NADPH e di zuccheri a 4, 5, 7 atomi di carbonio. Reazioni e loro regolazione. Ruolo del NADPH nel metabolismo.

#### Trasporto degli elettroni e fosforilazione ossidativa

I costituenti della catena respiratoria: organizzazione in complessi, potenziali di ossidoriduzione. Le flavoproteine. Il coenzima Q. Citocromi a, b, c. La catena respiratoria: struttura e funzione dei complessi I, II, III e IV. Meccanismo molecolare della fosforilazione ossidativa. Regolazione della catena respiratoria e della fosforilazione ossidativa. Gli inibitori della catena respiratoria e della fosforilazione ossidativa; agenti disaccoppianti. Trasporto degli elettroni dal citoplasma al mitocondrio (sistemi navetta). Trasporto dell'ATP formato nel mitocondrio. Altri enzimi che utilizzano l'ossigeno: ossigenasi, ossidasi, perossidasi. Meccanismo di idrossilazione e ruolo del citocromo P450. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS): natura chimica e meccanismi biochimici del danno cellulare. Sistemi difensivi enzimatici e non enzimatici.

#### Metabolismo lipidico

Ossidazione degli acidi grassi: funzione, attivazione, trasporto mitocondriale e beta-ossidazione. La carnitina. Resa energetica. Beta-ossidazione perossisomiale; catabolismo degli acidi grassi insaturi, a numero dispari di atomi di carbonio e ramificati. Formazione e destino del propionil-CoA. Formazione dei corpi chetonici e loro utilizzazione. Sintesi del palmitato: reazioni, enzimi e regolazione. Allungamento ed insaturazione degli acidi. Sintesi e degradazione dei trigliceridi, fosfogliceridi e sfingolipidi. Metabolismo degli eicosanoidi. Sintesi del colesterolo e sua regolazione. Esteri del colesterolo. Metabolismo e ruolo degli acidi biliari. Trasporto dei lipidi nel sangue. Classificazione, struttura, funzione delle lipoproteine plasmatiche. Aspetti biochimici del trasporto di membrana.

#### Metabolismo degli amminoacidi

Digestione delle proteine: proteasi, endo ed esopeptidasi. Degradazione intracellulare delle proteine: degradazione lisosomiale e sistema dell'ubiquitina. Destino metabolico degli amminoacidi. Amminoacidi essenziali. Reazioni di transaminazione e deaminazione e loro ruolo.



## UNIVERSITÀ DI PISA

Reazione e regolazione della glutammato deidrogenasi. Decarbossilazione degli amminoacidi e poliammine. Destino metabolico dell' $\text{NH}_3$ . Reazioni e regolazione del ciclo dell'urea. Correlazione tra ciclo dell'urea e ciclo di Krebs. Amminoacidi gluco e lipogenetici. I principali coenzimi del metabolismo dell'azoto. Porfirine. Sintesi e catabolismo dell'eme. Formazione dell'acido-amminolevulinico e regolazione. Pigmenti biliari (origine, coniugazione ed escrezione).

### Metabolismo dei nucleotidi e degli acidi nucleici

Sintesi de novo dei nucleotidi purinici: origine degli atomi dell'anello purinico; reazione generale, richiesta energetica e regolazione. Formazione del PRPP e suo impiego nella sintesi dei nucleotidi purinici e pirimidinici. Sintesi dell'AMP e del GMP da IMP. Regolazione. Reazioni di fosforilazione dei nucleosidi purinici e pirimidinici mono e difosfati. Reimpiego delle basi e dei nucleosidi purinici. Catabolismo dei nucleotidi purinici ad acido urico. Sintesi dei nucleotidi pirimidinici: origine degli atomi dell'anello pirimidinico, reazione generale, richiesta energetica e regolazione. Catabolismo dei nucleotidi pirimidinici. Sintesi dei deossiribonucleotidi e sua regolazione. Il DNA: l'elica del DNA e le forze che la stabilizzano. Interazioni fra DNA e proteine. Replicazione del DNA nei procari e negli eucarioti: enzimi coinvolti e meccanismi biochimici che assicurano la fedeltà della replicazione. Tipi di RNA e loro struttura. I ribozimi e la catalisi da RNA. Sintesi dell'RNA (trascrizione) nei procari e negli eucarioti: RNA polimerasi, fattori di trascrizione generali e specifici, co-attivatori. Modificazioni post-trascrizionali dell'RNA (splicing alternativo, editing dell'RNA e regolazione da parte di microRNA). Il turnover dell'RNA.

### Sintesi proteica

Enzimologia e regolazione della sintesi proteica. RNA transfer e loro aminoacilazione. Interazioni fra ribosomi, mRNA, tRNA e fattori solubili della sintesi proteica. Velocità e richiesta energetica per la sintesi. Acquisizione della struttura tridimensionale. Modificazioni della catena polipeptidica dopo la sintesi. Esportazione delle proteine.

### Meccanismi biochimici di trasduzione del segnale

Recettori di membrana: classificazione. Recettori a 7 segmenti transmembrana, recettori catalitici, recettori ionotropici. Le proteine G e vie di trasduzione del segnale da essi attivate. Proteine chinasi e proteine fosfatasi. Meccanismi di amplificazione e di modulazione del segnale. Recettori intracellulari: struttura e funzione. Concetto di ormone e neurotrasmettitore. Analisi delle caratteristiche biochimiche (struttura, metabolismo e vie di trasduzione del segnale attivate) delle seguenti sostanze: insulina, glucagone, catecolamine, ormoni tiroidei, ormoni steroidei (glucocorticoidi, mineralcorticoidi, androgeni, estrogeni, progestinici), acido retinoico, fattori di crescita, NO e vitamina D.

### Biochimica sistematica umana

Biochimica del fegato, del rene, del muscolo, del cuore, del tessuto adiposo, del sistema nervoso e del sangue.

### Analisi delle proteine.

Tecniche cromatografiche: cromatografia a scambio ionico, per filtrazione e per affinità. Elettroforesi su gel di SDS. Elettroforesi bidimensionale. Spettrometria di massa per l'identificazione delle proteine. Metodi per lo studio delle interazioni tra proteine: doppio ibrido, phage display. Tecniche immunologiche: Western blotting, ELISA, immunistochemica.

### PROGRAMMA DEL MODULO DI BIOLOGIA MOLECOLARE DEL CORSO INTEGRATO DI BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

**Introduzione.** Breve storia della Biologia Molecolare. Esperimenti di Griffith, di Avery, di Hershey e Chase per l'identificazione del DNA come depositario dell'informazione genetica. Modello della doppia elica del DNA di Watson e Crick. Collocazione temporale della messa a punto delle principali metodiche utilizzate in Biologia Molecolare.

Impatto della Biologia Molecolare in Medicina.

**Analisi del DNA.** Tecnologia del DNA ricombinante: clonaggio in cellule batteriche, tipi di vettori utilizzati (plasmidi, fagi, cosmidi, BAC, YAC, MAC): Sistemi di clonaggio per studiare l'espressione genica. Ibridazione di acidi nucleici: principi e applicazioni. Costruzione di librerie genomiche, a cDNA e di espressione, vaglio delle genoteche (utilizzo di sonde degenerate, sonde EST, anticorpi). PCR (Polymerase Chain Reaction), PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System), PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), Real-time PCR. Metodi di sequenziamento del DNA: metodo di Sanger manuale ed automatizzato. Next generation sequencing: tecnologia pyrosequencing, Illumina e ABI solid.

**Genoma Umano:** Organizzazione ed obiettivi del Progetto Genoma Umano. Il mappaggio del genoma: mappe genetiche e fisiche.

Sequenziamento e annotazione del genoma: approccio gerarchico (top down) e approccio shotgun. Identificazione dei geni: il sequenziamento delle EST (Expressed Sequence Tags), la ricerca delle ORF (Open Reading Frames). Identificazione degli elementi funzionali presenti nella sequenza del Genoma Umano: progetto ENCODE.

Caratteristiche delle sequenze genomiche (sequenze uniche, ripetute e polimorfiche).

**Variabilità del genoma.** I polimorfismi genetici (VNTR, SNP, CNV). I polimorfismi come fattori di suscettibilità genetica a malattie complesse o come responsabili della diversa risposta ai trattamenti con i farmaci. Studi di associazione per l'identificazione di fattori di rischio polimorfici. Identificazione dei principali aplotipi umani: progetto HAPMAP e progetto 1000 GENOMES. La tipizzazione del DNA: utilizzo dei microsatelliti come marcatori per l'identificazione forense dei campioni di DNA (DNA fingerprinting). Forensic DNA phenotyping. Profilo genetico e comportamento violento, nuove implicazioni della genetica in ambito forense.

**Analisi dell'RNA.** Northern blotting. Ibridazione in situ. Saggio di protezione dalla RNasi. RT-PCR (Reverse Trascrittasi-PCR). Real-time PCR a partire da RNA. Analisi del trascrittoma: microarray a DNA (principio e metodi). RNAseq.

**Studio della funzione dei geni nell'era postgenomica.** Studi di espressione genica differenziale. Correlazioni genotipo-fenotipo. Inattivazione o modificazione selettiva dei geni. Creazione ed utilizzo di organismi geneticamente modificati per lo studio della funzione dei geni (animali transgenici, knockout, knockin, knockdown, knockout condizionali). Identificazione di geni-malattia.

**Terapia genetica.** Farmaci, proteine e vaccini ricombinanti. Cellule staminali e loro impieghi terapeutici. Principi di terapia genica: vettori virali, RNA e oligonucleotidi terapeutici. Successi e insuccessi della terapia genica.



## UNIVERSITÀ DI PISA

---

### Bibliografia e materiale didattico

#### **Libri di testo consigliati:**

Nelson D.L., Cox M.M.: "*I Principi di Biochimica di Lehninger*", VI edizione, Zanichelli 2014.

Voet D., Voet J.G., Pratt C.W.: "*Fondamenti di Biochimica*", III edizione, Zanichelli 2013.

Mathews C.K., Van Holde K.E., Ahern K.G.: "*Biochimica*", edizione Piccin 2014.

Genetica molecolare umana. T. Strachan, A. Read. ZANICHELLI

Introduzione alla Genomica. A.M. Lesk ZANICHELLI

Biologia Molecolare. F Amaldi et al. CASA EDITRICE AMBROSIANA

L'essenziale di Biologia Molecolare della Cellula B. Alberts et al. ZANICHELLI

#### Modalità d'esame

Esame finale scritto contestuale.

#### Note

#### **RICEVIMENTO STUDENTI**

I docenti ricevono su appuntamento preso via e-mail o per telefono.

*Ultimo aggiornamento 24/01/2019 16:26*