



## UNIVERSITÀ DI PISA

### BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

---

**RICCARDO ZUCCHI**

Anno accademico 2017/18  
CdS MEDICINA E CHIRURGIA  
Codice 050EE  
CFU 15

| Moduli              | Settore/i | Tipo    | Ore   | Docente/i         |
|---------------------|-----------|---------|-------|-------------------|
| BIOCHIMICA          | BIO/10    | LEZIONI | 150   | RICCARDO ZUCCHI   |
| BIOLOGIA MOLECOLARE | BIO/11    | LEZIONI | 37.50 | SILVIA PELLEGRINI |

#### Obiettivi di apprendimento

##### *Conoscenze*

L'obiettivo del corso è quello di rendere lo studente 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 struttura del genoma umano e della regolazione dell'espressione genica;
- della specializzazione a livello molecolare, sovramolecolare e metabolico di cellule, tessuti ed organi;
- delle metodiche che consentono lo studio dei fenomeni biologici a livello molecolare e sovramolecolare.

##### *Modalità di verifica delle conoscenze*

L'esame si svolge in forma scritta ed è contestuale per tutti i moduli che compongono il corso.

E' prevista una prova in itinere prima delle vacanze natalizie, riservata agli studenti iscritti al secondo anno.

##### *Capacità*

Lo studente deve acquisire la capacità di applicare i principi della biochimica e della biologia molecolare a tematiche di ordine fisiologico e fisiopatologico.

##### *Modalità di verifica delle capacità*

L'esame comporterà anche una verifica capacità della capacità di applicare i principi della biochimica e della biologia molecolare a temi e problemi non esplicitamente trattati a lezione.

##### *Comportamenti*

N.a.

##### *Modalità di verifica dei comportamenti*

N.a.

##### *Prerequisiti (conoscenze iniziali)*

Si richiede la conoscenza dei principi di chimica generale, chimica organica, citologia e termodinamica.

##### *Indicazioni metodologiche*

Oltre alle lezioni frontali verrà stimolata la capacità critica degli studenti anche attraverso colloqui individuali e prove in itinere.



## UNIVERSITÀ DI PISA

Programma (contenuti dell'insegnamento)

### 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.

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



## UNIVERSITÀ DI PISA

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, fosfolipidi 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. 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.

### Introduzione alla Biologia Molecolare

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.

Concetto di genoma. Caratteristiche delle sequenze genomiche (sequenze uniche, ripetute e polimorfiche). Impatto della Biologia Molecolare in Medicina.

Metodi di isolamento e di studio della struttura delle proteine (centrifugazione, tecniche spettroscopiche, cromatografiche ed elettroforetiche, degradazione di Edman, cristallografia a raggi X).

### 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. Southern blotting, ibridazione in situ, sistemi di ibridazione basati su microarray.

Costruzione di librerie genomiche, a cDNA e di espressione, vaglio delle genoteche (utilizzo di sonde degenerate, sonde EST, anticorpi). PCR



## UNIVERSITÀ DI PISA

(Polymerase Chain Reaction), PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System), PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), PCR-HAD (HeteroDuplex Analysis), PCR-DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis), 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.

### 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 1000GENOMES. La medicina personalizzata: test di suscettibilità e screening di popolazione. 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, array di tipologie diverse, sistemi di marcatura dei campioni, acquisizione delle immagini e interpretazione dei dati). Iniziali applicazioni diagnostiche dei microarray. RNAseq.

### Studio della funzione dei geni nell'era postgenomica

Studi di espressione genica differenziale. Correlazioni genotipo-fenotipo. Inattivazione o modificazione selettiva dei geni. Organismi modello e genomica comparata, i geni orologi. Creazione ed utilizzo di organismi geneticamente modificati per lo studio della funzione dei geni (animali transgenici, knockout, knockin, knockdown, knockout condizionali). Interazioni proteina-proteina e proteine-DNA. Approcci bioinformatici per studiare la funzione dei geni. Identificazione di geni-malattia, clonaggio posizionale e strategie alternative.

### 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.

### Bibliografia e materiale didattico

#### Testi 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.

Strachan T., Read A.: *"Genetica molecolare umana"* I edizione, Zanichelli 2012.

1. Amaldi et al. *"Biologia Molecolare"* II edizione Casa Edidrice Ambrosiana 2014

Allison L.A.: *"Fondamenti di Biologia Molecolare"*, I edizione, Zanichelli 2008.

Craig NL et al. *"Biologia Molecolare. Principi di funzionamento del genoma."* Pearson, 2013.

1. Alberts et al. *"L'essenziale di Biologia Molecolare della Cellula"* Zanichelli.

### Indicazioni per non frequentanti

In base al regolamento del CdL la frequenza è obbligatoria.

### Modalità d'esame

Esame scritto, costituito in generale da 12 domande aperte.

### Altri riferimenti web

Per gli argomenti svolti a lezioni si vedano i registri didattici dei docenti.

### Note

I docenti sono disponibili per chiarimenti al termine delle lezioni o previo appuntamento concordato per email.

