



UNIVERSITÀ DI PISA

BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

SANDRA GHELARDONI

Academic year 2018/19
Course MEDICINA E CHIRURGIA
Code 050EE
Credits 15

Modules	Area	Type	Hours	Teacher(s)
BIOCHIMICA	BIO/10	LEZIONI	150	GRAZIA CHIELLINI SANDRA GHELARDONI RICCARDO ZUCCHI
BIOLOGIA MOLECOLARE	BIO/11	LEZIONI	37.50	MARIA ROSA MAZZONI

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.
- Peptici.
- 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 organificazione dell'ammoniaca.
- Il ciclo dell'urea.
- Enzimologia della sintesi proteica.



UNIVERSITÀ DI PISA

- 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 biochimici e alla loro correlazione, alle tecnologie di studio, analisi e manipolazione degli acidi nucleici e delle proteine.

Modalità di verifica dei comportamenti



UNIVERSITÀ DI PISA

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 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' 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.

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 polimerfici. 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.

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, immunoistochimica.

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.



UNIVERSITÀ DI PISA

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 16:11