

BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

Insegnamento di Biologia Molecolare

Codice Disciplina: BT071 Codice Insegnamento: BT022	Settore: BIO/11	N° CFU: 5
Docente: Graziani Andrea	Ore : 40	Corso di Laurea : Biotechnologie Anno : II Semestre : I

Obiettivo del modulo

Fornire le basi teoriche e pratiche delle metodiche e tecnologie utilizzate nello studio ed analisi dell'espressione genica.

Conoscenze ed abilità attese

Lo studente deve conoscere i meccanismi molecolari e cellulari che regolano la replicazione, la crescita cellulare e il programma di espressione genica sia in organismi procarioti che eucarioti.

Programma del corso

la parte: Biologia Molecolare del Gene

Le basi genomiche della complessità: il ruolo del controllo dell'espressione genica:

- cenni di genomica comparata
- esempi riguardo al ruolo di omeogeni nello sviluppo.

Basi molecolari dell'epigenetica: struttura e regolazione della cromatina

- struttura dei nucleosomi e organizzazione della cromatina
- Gli istoni e le loro modificazioni (acetilazione, metilazione, fosforilazione).
- Meccanismi del rimodellamento istonico e delle modificazioni della cromatina e loro ruolo nella regolazione dell'espressione genica. Bromodomini e cromodomini. Ruolo e esempi di enzimi modificatori istonici: istone acetil transferasi (HAT), istone deacetilasi. Complessi di rimodellamento istonico.
- Esempi di meccanismi di eterocromatizzazione: HP1 nella eterocromatizzazione telomerica e nella diffusione della eterocromatina. Ruolo e meccanismi degli elementi isolatori.
- Metilazione del DNA: significato biologico, DNA metil-transferasi de novo e di mantenimento, meccanismi mediante cui la metilazione del DNA regola l'espressione genica: domini MeCP2.
- Ruolo della metilazione nella gametogenesi, nel differenziamento delle cellule embrionali staminali e nel meccanismo di imprinting di IGF2 e H19.
- Regolazione, funzione e significato biologico dei complessi Polycomb e Trithorax, e delle loro attività metil-transferasi e demetilasi. Nella regolazione del destino cellulare.
- ruolo dei long non coding RNA nella funzione di Polycomb.
- Cenni sui meccanismi di eterocromatizzazione del cromosoma X

Regolazione della trascrizione

- cenni sulle differenze fra la trascrizione dei procarioti e degli eucarioti
- meccanismi di riconoscimento dei siti di avvio della trascrizione: TATA box e formazione dei complessi di avvio della trascrizione.
- Ruolo delle sequenze regolatrici della trascrizione e i fattori che regolano la trascrizione (fattori di trascrizione e loro organizzazione modulare e dimerica).
- Ruolo delle interazioni fra i fattori di trascrizione e i complessi di rimodellamento della cromatina e di modificazione degli istoni nella regolazione della trascrizione. Esempi.

- Meccanismi di repressione della trascrizione.
- Natura combinatoriale della regolazione della trascrizione da molteplici fattori. Esempi.
- Diverse strategie di regolazione della funzione degli attivatori della trascrizione. Esempi (NF- κ B, FOXO3, NFAT, MEF2, SREBP, omodimeri e eterodimeri STAT, SMAD/Co-SMAD).
- Le principali quattro classi strutturali dei fattori di trascrizione: elica-ansa-elica (omeogeni), elica-giro-elica (Myc/MAX/Mad, MyoD/ED12/Id), Cerniera di leucine (Jun, Fos, CREB, NFAT), dita di zinco (recettori ormoni lipidici, Miz). Per ciascuna classe: elementi strutturali e meccanismi di interazione con il DNA, regolazione della funzione, cenni sulla funzione e sui geni regolati)

La maturazione dell'RNA e il controllo post-trascrizionale

- Significato di del capping e della poliadenilazione dei trascritti. Cenni sui meccanismi di capping, poliadenilazione e terminazione del mRNA.
- Generalità sulla natura discontinua dei geni e significato dello splicing.
- Lo spliceosoma e i meccanismi molecolari dello splicing. Lo splicing alternativo
- Regolazione del riconoscimento dei siti di splicing: le sequenze ESE/ISE e ESS/ISS. Le proteine SR (contenenti i domini RRS) e le proteine hRNPs nella regolazione dello splicing. Esempi (determinazione del sesso nella Drosophyla, regolazione dello splicing di CD44 e della Piruvato chinasi).
- Esempi di patologie causate da mutazioni che deregolano lo splicing.
- Cenni sui meccanismi di editing del mRNA.
- Cenni sulla regolazione del trasporto e della localizzazione degli mRNA.
- Regolazione della stabilità degli RNA (Esempio mRNA Caseina e delle seq. IRE nella regolazione della stabilità e traduzione degli mRNA per il recettore della Transferrina e della Ferritina).
- Regolazione della velocità della traduzione: ruolo di mTORC1.
- I micro-RNA: struttura genica, trascrizione e maturazione, ruolo delle proteine Dicer e Argonata, diversi meccanismi di regolazione dell'espressione genica (trascrizione, stabilità mRNA e traduzione). Natura combinatoriale delle interazioni fra micro-RNA e geni target. Esempi.
- Impatto della scoperta dei microRNA nello studio della funzione dei geni e prospettive cliniche.

2a parte: Biologia Molecolare della Cellula

Regolazione del Ciclo Cellulare

- Principi generali del controllo del ciclo cellulare.
- Ruolo dei complessi ciclina/Cdk nella progressione del ciclo cellulare.
- Meccanismi molecolari della regolazione delle Cdk: interazione con cicline, fosforilazioni attivatorie e inibitorie, interazione con proteine inibitrici (p121, p16, p27 ecc...). Meccanismi di regolazione delle cicline: trascrizione, ubiquitinazione/degradazione.
- Ruolo dei diversi complessi ciclina/cdk nella progressione delle diverse fasi del ciclo e concetto del "checkpoint".
- Regolazione dei complessi ciclina/Cdk in fase G1 e S: ruolo dell'attivazione di Jun/Fos e Myc e dei principali geni target di Myc; regolazione di E2F1 da Ciclina D/Cdk4, Rb e ciclinaE/Cdk2; regolazione del ciclo cellulare dai soppressori tumorali della famiglia p21, p16, p27 ecc... e loro regolazione da TGFbeta/SMAD e da p53.

Risposta cellulare allo stress

- Cenni sul ruolo adattativo della risposta allo stress, definizione di stress e esempi (stress ossidativo, stress meccanico/osmotico, stress da proteine non foldate, stress da radiazioni uv/ionizzanti e da agenti genotossici).
- Ruolo della membrana plasmatica nell'attivazione di vie di trasduzione del segnale (stress-activated kinases) in risposta a stress da radiazioni e agenti ossidanti e suo ruolo nella risposta cellulare.
- La risposta al danno al DNA e i complessi sensori, trasduttori e effettori: meccanismo di attivazione di ATM e ruolo di BRCA1. Meccanismi mediante cui l'attivazione di Atm e Chk1/2 regolano l'arresto del ciclo cellulare: ruolo di Cdc25 e p53.
- p53: struttura, regolazione (da Mdm2, da Arf e da fosforilazione via Atm/Chk) e funzione nella risposta al danno al DNA, nella senescenza cellulare e nella risposta all'ipossia. Ruolo e meccanismi mediante cui p53 promuove arresto del ciclo cellulare e apoptosi. Significato delle mutazioni di p53 nei tumori.
- risposta allo stress ipossico: meccanismi di regolazione di HIF-1 α (ruolo di PHD come sensore della

concentrazione di ossigeno), funzione di HIF1 e HIF2 nella risposta adattativa all'ipossia (induzione geni glicolitici, induzione angiogenesi, repressioni geni metabolismo ossidativo, attivazione di p53).

Apoptosi

- Significato generale dell'apoptosi nell'omeostasi cellulare.
- Via estrinseca dell'attivazione dell'apoptosi: recettori pro-apoptotici, il death domain (DD) e il death effector domain (DED) e la trasduzione del segnale apoptotico fino all'attivazione delle caspasi regolatorie (caspasi 8).
- Meccanismo di attivazione delle caspasi effettorie (caspasi 3) e ruolo dei loro substrati nel determinare l'apoptosi (cambiamento di forma, frammentazione del DNA, esternalizzazione della fosfatidilserina) e il riconoscimento da cellule con attività fagocitica.
- Via intrinseca dell'attivazione dell'apoptosi: ruolo centrale della regolazione della permeabilità della membrana mitocondriale esterna nel determinare il rilascio di citocromo C, Smac/Diablo e altre proteine che regolano l'apoptosi. Meccanismo di attivazione delle caspasi 9 da parte del citocromo c. Ruolo delle proteine IAP (inibitori di caspasi) nella regolazione dell'apoptosi.
- I diversi meccanismi di regolazione delle 3 principali famiglie di caspasi (caspasi 8, 9 e 3)
- Formazione del poro della membrana mitocondriale esterna: le proteine Bcl2 pro-apoptotiche, le proteine Bcl2 anti-apoptotiche e le proteine BH3-only. Significato funzionale dei domini BH1, BH2 e BH3.
- Regolazione delle proteine BH3 only: ruolo di Bid (substrato di caspasi 8), Bad, Bim ecc... e loro regolazione da p53 e altri stress cellulari.
- L'attivazione di Akt/PKB da fattori di crescita nell'antagonizzare l'apoptosi: ruolo della fosforilazione di Bad, IKK e FOXOP3. Significato delle mutazioni di PTEN e della via di PI3K come meccanismo di evasione dall'apoptosi nella tumorigenesi.

Autofagia

- Significato generale dell'autofagia.
- Cenni sui meccanismi generali di formazione del complesso pre-autofagosomiale. Ruolo della lipidazione di Atg8/LC3-II e suo ruolo nel reclutare p62 e quindi i cargo destinati alla lisi nei lisosomi.
- Cenni sul ruolo del complesso Beclin/Vps34 e del PI(3)P nel reclutare e stabilizzare il complesso pre-autofagosomiale (LC3-II e p62). Regolazione inibitoria di Beclin da Bcl2.
- Cenni sul ruolo di Atg9 nella maturazione dell'autofagosoma e sua regolazione positiva da parte del complesso Atg1/ULK1. Inibizione del complesso Atg1/ULK1 da parte di mTORC1. nella
- Ruolo centrale di mTORC1 nella regolazione dell'autofagia basale da parte di nutrienti, attivazione da fattori di crescita, bilancio energetico, e disponibilità di ossigeno.

Esercitazioni

Non previste

Attività a scelta dello studente

Non previste

Supporti alla didattica in uso alla docenza

Dispense, materiale didattico, presentazioni in powerpoint delle lezioni ed articoli forniti dal docente

Strumenti didattici

Laboratorio didattico di biologia molecolare

Materiali di consumo previsti

Non previsti

Eventuale bibliografia

Alberts et al. "Biologia Molecolare dell Cellula" V ed. Zanichelli
Lodish et al. "Biologia molecolare della cellula", IV ed. Zanichelli

Approfondimenti per "Biologia Molecolare del Gene":

Lewin "Il gene X", ed. Zanichelli

Amaldi et al. "BIOLOGIA MOLECOLARE", I ed Ambrosiana

Verifica dell'apprendimento

Prova scritta a domande aperte e verifica orale delle conoscenze e competenze acquisite.