

BIOLOGIA MOLECOLARE **Insegnamento di *Biochimica***

Codice Disciplina : MC017 Codice Insegnamento: MC008	Settore : BIO/11	N° CFU: 2
Docente: Graziani Andrea	Ore : 16	Corso di Laurea : Medicina e Chirurgia Anno : II Semestre : I

Obiettivo del modulo

Il modulo ha l'obiettivo di permettere l'apprendimento delle principali tecnologie biologico molecolari, delle strategie gnomiche per lo studio della funzione dei geni e della regolazione della trascrizione.

Conoscenze ed abilità attese

Lo studente deve essere in possesso delle indispensabili nozioni di Biochimica, Genetica e Biologia Cellulare.

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). 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).
- Deregolazione dello splicing da mutazioni patogene.
- 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).
- Cenni sulla 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: danno al DNA e ipossia

- 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-1a (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 effettrorie (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

A partire dal II anno gli studenti hanno la possibilità di partecipare all'attività del laboratorio di Biochimica.

Supporti alla didattica in uso alla docenza

Videoproiettore e computer con collegamento Internet in dotazione all'aula.

Strumenti didattici

Presentazioni in formato MS-Power Point, CD-ROM interattivi e siti internet didattici.

Materiali di consumo previsti

Agli studenti verrà consegnata una copia elettronica delle immagini proiettate.

Eventuale bibliografia

Libri di testo consigliati:

- Alberts et al.: Biologia Molecolare della Cellula (Zanichelli)
- Lodish et al.: Biologia Molecolare della cellula (Zanichelli)

Approfondimenti per “Biologia Molecolare del Gene”:

- Lewin: Il Gene X (solo inglese) (Zanichelli)
- Amaldi et al.: Biologia Molecolare (Ambrosiana)

Verifica dell'apprendimento

L'esame finale costituisce parte di una prova scritta volta a verificare la preparazione di base dello studente; la preparazione di un elaborato scritto ed una breve esposizione, eventualmente in lingua inglese, di un argomento libero scelto dallo studente (lavoro sviluppato nell'ambito delle attività didattiche interattive); un colloquio coi Docenti, tendente a verificare il livello di preparazione e la capacità dello studente di integrare le informazioni acquisite.