

BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA
corso integrato di Biochimica e Biologia molecolare

Codice Disciplina : M0225 Codice Corso integrato : M0225	Settore : BIO/12	N° CFU: 4
Docente: Graziani Andrea	Ore : 40	Corso di Laurea : Tecniche di laboratorio biomedico Anno : I Semestre : II

Obiettivo del modulo

Principi che presiedono la cinetica enzimatica.
Meccanismi di regolazione della funzione degli enzimi.
Principi generali del metabolismo bioenergetico e principali vie metaboliche.
Meccanismi molecolari della regolazione cellulare.
Tecnologie per lo studio delle molecole biologiche.
Principali metodologie biologico-molecolari.

Conoscenze ed abilità attese

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

Programma del corso

Tecnologie per lo studio delle molecole biologiche.

- Tecniche di preparazione dei campioni biologici per l'analisi delle molecole biologiche.
- Tecniche di arricchimento e frazionamento sub-cellulare.
- Precipitazione salina delle proteine.
- Metodi di quantificazione delle proteine.
- Separazione delle proteine mediante tecniche elettroforetiche su gel (SDS-PAGE, isoelectrofocusing, elettroforesi bidimensionale).
- Metodi per la colorazione delle proteine.
- Separazione delle proteine mediante cromatografia su colonna:
 - rilevanza del supporto, criterio per l'eluizione
 - colonne a scambio ionico
 - gel filtrazione
 - colonne di affinità
- Metodi per l'identificazione delle proteine:
 - dosaggio enzimatico
 - western blot
 - ELISA e RIA
 - Immunoprecipitazione
 - sequenziamento via Edman
 - sequenziamento spettrometria di massa

Metabolismo generale.

- Definizione e significato dei termini: catabolismo, anabolismo; ossidazione e riduzione delle macromolecole biologiche. Significato biologico di equivalenti riducenti (NADH, FADH₂, NADPH) e dei nucleotidi ad alta energia (ATP).

Metabolismo glucidico.

- I polisaccaridi di riserva: amido e glicogeno.
- La digestione dei carboidrati: amilasi salivare e pancreatica, disaccaridasi e assorbimento dei monosaccaridi. Trasportatori del glucosio.
- La glicolisi: significato e inquadramento generale. Descrizione di ogni tappa della glicolisi: nome dell'enzima, dei reagenti, dei cofattori e dei prodotti, struttura dei reagenti e dei prodotti, direzione della reazione all'equilibrio. Bilancio energetico. Inoltre, in particolare: esocinasi e glucocinasi (caratteristiche e differenze); energia di idrolisi dell'ATP e significato delle fosforilazioni nella prima fase della glicolisi; concetto di fosforilazione a livello del substrato. La fermentazione lattica: isoenzimi della lattico deidrogenasi, significato fisiologico, ciclo di Cori. Destino del piruvato nei diversi tessuti.
- Siti di regolazione della glicolisi: esocinasi/glucocinasi, fosfofruttocinasi e piruvato cinasi. Regolazione da metaboliti e ormonale. Il fruttosio-2,3-bisfosfato e regolazione dell'enzima bifunzionale (fosfofruttocinasi₂/fruttosio-bisfosfato 2-fosfatasi) epatico e cardiaco da glucagone, adrenalina e insulina.
- Gluconeogenesi: significato e principali precursori del glucosio (lattato, piruvato e alanina; ciclo di Cori e ciclo del piruvato/alanina); ingresso dei diversi precursori della gluconeogenesi; descrizione di ogni tappa (nome dell'enzima, dei reagenti, dei cofattori e dei prodotti, struttura dei reagenti e dei prodotti, compartimentalizzazione delle diverse tappe). Bilancio energetico. Regolazione della gluconeogenesi: allosterica o da induzione/repressione, e da metaboliti o ormonale. Confronto con la regolazione della glicolisi.
- Metabolismo del glicogeno: ruolo fisiologico del glicogeno epatico e cardiaco. Glicogeno-sintesi e glicogenolisi: descrizione di ogni tappa (nome dell'enzima, dei reagenti, dei cofattori, e dei prodotti, struttura dei reagenti e dei prodotti); regolazione ormonale di glicogeno sintasi e di glicogeno fosforilasi. Ruolo di glicogeno sintasi cinasi, fosforilasi cinasi, fosfo-proteina-fosfatasi 1 (PP1), e loro regolazione da Insulina e Glucagone/Adrenalina. Differenze fra la regolazione del metabolismo del glicogeno epatico e muscolare.
- Il ciclo dei pentosi: conversione del glucosio-6-fosfato in ribosio-5-fosfato e suo significato biologico.
- Sintesi di acido glucuronico e suo significato nella sintesi di catene oligosaccaridiche, come precursore dell'acido ascorbico e nella detossificazione e eliminazione di sostanze esogene e endogene (l'ittero del lattante).

La piruvico deidrogenasi, ciclo dell'acido citrico e respirazione mitocondriale.

- La piruvico deidrogenasi: reazione generale con indicazione dei reagenti e dei prodotti e dei cofattori. Localizzazione subcellulare. Regolazione covalente e allosterica.
- Il ciclo dell'acido citrico o ciclo di Krebs: significato e inquadramento generale. Descrizione di ogni tappa. Reazioni anaplerotiche: la piruvico carbossilasi. Ruolo di alcuni intermedi del ciclo come precursori per la sintesi di altre molecole, e del citrato come regolatore di altre vie metaboliche. Regolazione del ciclo di Krebs.
- La catena respiratoria mitocondriale. Localizzazione sub-cellulare. L'ubichinone (struttura generale), i centri Fe-S, i citocromi. I complessi I (NADH deidrogenasi), II (succinato deidrogenasi), III (citocromo riduttasi), IV (citocromo ossidasi): descrizione biochimica, localizzazione. Trasporto degli equivalenti ridotti attraverso la membrana mitocondriale: shuttle del malato/aspartato e del glicerofosfato. Descrizione generale del percorso compiuto dagli elettroni e dei meccanismi di ossido-riduzione. Veleni della catena respiratoria. Teoria chemosmotica, accoppiamento del trasporto degli elettroni e della riduzione dell'ossigeno al trasporto di protoni e alla sintesi di ATP. ATP sintasi: struttura e meccanismo. Traslocasi di ADP/ATP. Gli agenti disaccoppianti della fosforilazione ossidativa. Metabolismo lipidico.
- Digestione e assorbimento dei trigliceridi: ruolo dei sali biliari, lipasi pancreatica, chilomicroni, lipoproteina lipasi, VLDL. Demolizione dei trigliceridi del tessuto adiposo: TG-lipasi ormone-sensibile. Metabolismo del glicerolo.
- Ingresso degli acidi grassi nelle cellule e loro attivazione ad acilCoA. Il sistema di trasporto mitocondriale carnitina-dipendente (formula passiva della carnitina). La β -ossidazione: descrizione di ogni tappa, prendendo come modello un acido grasso saturo a catena lunga. Bilancio energetico dell'ossidazione completa di un acido grasso. Regolazione della β -ossidazione.
- Chetogenesi e utilizzo dei corpi chetonici (chetolisi): descrizione delle diverse tappe enzimatiche; significato fisiopatologico (digiuno e diabete) dei corpi chetonici.

- Cenni sulla sintesi degli acidi grassi: localizzazione sub-cellulare, trasporto di acetyl-CoA e NADPH, acil-CoA carbossilasi, ruolo del malonilCoA e del citrato, l'acido grasso sintasi. Bilancio energetico. Regolazione da metaboliti e ormonale.
- Cenni sulla struttura dei trigliceridi e dei fosfolipidi.
- Metabolismo del colesterolo e delle lipoproteine: LDL e HDL. Internalizzazione delle LDL. Biosintesi del colesterolo: conoscenza delle tappe e delle strutture dei metaboliti intermedi dall'acetyl-CoA al mevalonato; linee generali della conversione da mevalonato a colesterolo. Sintesi degli esteri del colesterolo. Regolazione della sintesi del colesterolo. Linee generali del catabolismo del colesterolo a acidi biliari.

Metabolismo aminoacidico.

- Digestione delle proteine. Digestione gastrica: secrezione di HCl, pepsinogeno-pepsina. Digestione duodenale: attivazione tripsinogeno-tripsina, chimotripsinogeno-chimotripsina, proelastasi-elastasi (specificità delle serina proteasi), carbossi-peptidasi e aminopeptidasi. Assorbimento degli aminoacidi.
- Sistemi di deaminazione degli aminoacidi: transaminasi (cenni sul ruolo del piridossalfosfato), glutammina deidrogenasi. Modalità di trasferimento dei gruppi amminici in eccesso dai tessuti extraepatici al fegato: ruolo della glutamina e della alanina (ciclo alanina-glucosio). Ciclo dell'urea: descrizione di ogni tappa. Interrelazioni tra ciclo dell'urea e ciclo dell'acido citrico. Regolazione del ciclo dell'urea.
- Catabolismo della parte carboniosa degli aminoacidi: i) identificazione degli aminoacidi gluconeogenici, chetogenici e chetogenici/gluconeogenici; individuazione degli intermedi metabolici principali cui danno origine gli aminoacidi al termine delle rispettive vie cataboliche e del loro successivo utilizzo nella produzione di energia e nella sintesi di glucosio e di corpi chetonici.

Integrazione delle vie metaboliche nei principali organi e tessuti e controllo della disponibilità di nutrienti.

- Caratteristiche peculiari del metabolismo dell'epatocita, dell'adipocita, del muscolo scheletrico, del miocardio, del cervello, ovvero quali sono i principali "combustibili" e le principali vie biosintetiche in ciascun tessuto.
- Il controllo della glicemia: adrenalina, glucagone e insulina; riassunto dei loro effetti metabolici.
- Il metabolismo dopo assunzione di alimenti e in corso di digiuno: analisi dell'integrazione delle diverse vie metaboliche nei principali organi e tessuti.
- Cenni sul metabolismo nel diabete.

Metabolismo dei nucleotidi.

- Biosintesi ex-novo e vie di recupero delle purine. Regolazione della sintesi dei nucleotidi purinici. Tetraidrofolato. Cenni sulla sintesi delle pirimidine. Ruolo della ribonucleotide redattasi e della timidilato sintasi. Degradazione delle purine ad acido urico. Basi biochimiche della gotta (iperuricemia).

Metabolismo dell'eme: biosintesi delle porfirine, malattie ereditarie, catabolismo, glucuronazione.

Vitamine.

- Vitamine idrosolubili come precursori di enzimi. Vitamina C. Vitamine liposolubili: A (rodopsina e acido retinoico), E (effetto anti-ossidanti), D (calcificazione).

Esercitazioni

non previste

Attività a scelta dello studente

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

Testi consigliati:

1. Biochimica di Lehinger, Zanichelli
2. Biologia Molecolare del Gene, Watson, Zanichelli

Verifica dell'apprendimento

L'esame si compone di una prova scritta con numerose domande guidate a scelta aperta, con spazio per la risposta definito.

Le domande coprono i diversi capitoli del programma.