



BIOCHIMICA

9 CFU - 1° semestre

Docenti titolari dell'insegnamento

VITTORIA RITA ANNAMARIA SPINA - Modulo BIOCHIMICA MEDICA - BIO/10 - 4 CFU

Email: spinavit@unict.it

Edificio / Indirizzo: Dpt. Scienze Biomediche e Biotecnologiche sez Biochimica Medica via Santa Sofia 64 ed.2

Telefono: 0957384225

Orario ricevimento: Tutti i giorni previo appuntamento per email

VINCENZA BARRESI - Modulo TECNOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI - BIO/12 - 5 CFU

Email: barregi@unict.it

Edificio / Indirizzo: Via Santa Sofia 97

Telefono: 0954781155

Orario ricevimento: Da concordare tramite richiesta mail

OBIETTIVI FORMATIVI

- **BIOCHIMICA MEDICA**

Acquisizione di conoscenze e competenze avanzate di Biochimica Medica nell'ambito della ricerca biotecnologica di base e delle sue applicazioni alla Medicina.

- **TECNOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI**

Possedere competenze per la rilevazione di marcatori biochimici fisiologici e patologici in campo umano attraverso l'utilizzo e la gestione di tecnologie di analisi molecolare e tecnologie biomediche avanzate, possedere la capacità di disegnare e applicare strategie diagnostiche e terapeutiche a base biotecnologica negli ambiti di competenza.

MODALITÀ DI SVOLGIMENTO DELL'INSEGNAMENTO

- **BIOCHIMICA MEDICA**

Slides mostrate durante le lezioni frontali messe a disposizione all' inizio del corso e commentate durante la lezione.

PREREQUISITI RICHIESTI

- **BIOCHIMICA MEDICA**

Pregressa frequenza e superamento degli esami finali di corsi di base di Biochimica.

▪ **TECNOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI**

Conoscenze di chimica e biochimica, biologia cellulare e molecolare, genetica, anatomia e fisiologia acquisite durante la laurea triennale

FREQUENZA LEZIONI

▪ **BIOCHIMICA MEDICA**

E' richiesta la frequenza del corso per almeno il 70% delle lezioni per essere ammessi all'esame conclusivo del corso.

▪ **TECNOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI**

Frequenza settimanale nel I semestre, I anno accademico

CONTENUTI DEL CORSO

▪ **BIOCHIMICA MEDICA**

Si richiamano in sintesi i principali metabolismi, interrelazioni metaboliche e bioenergetica cellulare e mitocondriale

Glicemia e assunzione del glucosio nelle cellule: principali trasportatori e cenni sul ruolo dell'insulina. Fasi della glicolisi anaerobica e reazioni.

Enzimi e meccanismo d'azione. Regolazione termodinamica e cinetica. Difetti enzimatici e inibitori degli enzimi.

Destino del piruvato nel citosol: fermentazione lattica e alcolica, con descrizione delle reazioni e degli enzimi coinvolti. Bilancio energetico.

Piruvato deidrogenasi e ciclo degli acidi tricarbossilici, regolazione del flusso, bilancio energetico, reazioni anaplerotiche.

Gluconeogenesi. Regolazione coordinata di glicolisi e gluconeogenesi.

Glicemia e omeostasi del glucosio.

Metabolismo del glicogeno.

Ciclo dei pentosi.

Metabolismo dei grassi: catabolismo e sintesi degli acidi grassi e loro regolazione; bilancio energetico.

Principali reazioni nel metabolismo degli amminoacidi. Mitocondri: struttura e dinamica. Fosforilazione ossidativa mitocondriale: potenziale elettrochimico e forza protonmotrice nel meccanismo di fosforilazione dell'ADP. Struttura e meccanismo catalitico del complesso ATP sintasi.

Biochimica funzionale

Caratteristiche metaboliche di fegato, muscolo, tessuto adiposo, cervello. Omeostasi del glucosio. Il diabete.

Biochimica della comunicazione cellulare

Generalità. I recettori ormonali; interazione ligando-recettore; caratteristiche molecolari dei recettori. Recettori per ormoni steroidei e loro meccanismo d'azione. Recettori di membrana. Proteine GTP-leganti: Gi, Gs, Gq, e loro attivazione. Ruolo dei dimeri beta e gamma. Effettori intracellulari regolati dalle proteine GTP-leganti: adenilato ciclasi fosfolipasi C (PLCbeta), fosfatidilinositolo 3-chinasi. Adenilato ciclasi e cAMP. Protein chinasi cAMP-dipendente (PKA). Esempi di substrati fosforilati da PKA: conseguenze sul metabolismo e sulla trascrizione genica. Inositoli fosfati e diacilglicerolo, calcio. NO, cGMP e PKG. Recettori con attività tirosin chinasi. Meccanismo di attivazione e trans-fosforilazione. Formazione di complessi sopramolecolari di segnalazione: ruolo dei domini SH2 ed SH3. Effettori attivati da recettori tirosin chinasi. Attivazione delle MAP chinasi. Attivazione cellulare da insulina: via Ras dipendente e Ras indipendente.

Biochimica degli ormoni

Classificazione, meccanismi biosintetici e loro controllo. Ormoni ipofisari ed ipotalamici; ormoni tiroidei; ormoni della corticale e della midollare del surrene; ormoni pancreatici; paratormone e calcitonina; ormoni delle gonadi maschili e femminili, eicosanoidi. Correlazioni biochimiche ed effetti metabolici.

Ciclo cellulare

Cicline e chinasi ciclino dipendenti

Progressione nelle varie fasi del ciclo ed eventi molecolari correlati.

Regolazione: localizzazione delle cicline, ruolo e caratterizzazione di p53 e Rb.

Oncogeni ed oncosoppressori.

L'apoptosi.

Basi molecolari e meccanismi biochimici associati al processo infiammatorio

[Il Corso in aula sarà integrato con le seguenti esercitazioni in laboratorio]- [Attività didattica esercitativa].

Principi fondamentali della tecnologia delle colture cellulari.

Introduzione alle conoscenze pratiche di base per l'allestimento e il mantenimento di colture cellulari in condizioni di sterilità.

Organizzazione di un laboratorio di colture cellulari: sterilità, pH, temperatura, terreni di coltura, sieri.

Mantenimento in coltura di linee cellulari primarie, immortalizzate e tumorali.

Tecniche di base di coltura cellulare: coltura in sospensione, la coltura monostrato, la coltura 3D.

Contare e piastrare una quantità nota di cellule, congelare e scongelare le cellule, acquisire e presentare immagini digitali e filmati delle proprie cellule in coltura. Tripsinizzazione delle cellule e allestimento di subcolture cellulari.

Protocolli per la valutazione della proliferazione e vitalità cellulare.

Estrazione di proteine da cellule in coltura: preparazione di buffer di lisi e lisi cellulare. Elettroforesi di proteine. Gel di poliacrilammide. Elettroforesi. Sistema per la corsa elettroforetica.

Western blot.

▪ **TECNOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI**

I campioni biologici: tipi, prelievi, trattamento e conservazione.

Estrazione e purificazione di acidi nucleici da cellule umane mediante colonnine cromatografiche per gel di filtrazione, a scambio ionico e per affinità. Purificazione di acidi nucleici con biglie magnetiche.

Dosaggio e valutazione qualitativa di acidi nucleici con metodo spettrofotometrico e fluorimetrico.

Tecnologie basate sulla complementarietà dei nucleotidi purinici e pirimidinici.

Sintesi di cDNA tramite trascrizione inversa.

Reazione a catena delle polimerasi (PCR). PCR qualitativa o End Point PCR quantitativa o q-Real Time PCR. Programmi per la progettazione dei primers da utilizzare per le reazioni PCR.

Reazione di digestione con enzimi di restrizione. Reazioni con enzimi di modificazione.

Elettroforesi in gel d'agarosio di acidi nucleici. Elettroforesi capillare di acidi nucleici per l'analisi di singoli nucleotidi e per l'analisi di microsatelliti.

Estrazione e dosaggio spettrofotometrico di proteine. Elettroforesi di proteine. Analisi di proteine tramite Western blot.

DNA- e RNA-microarrays: Preparazione di campioni di DNA o di RNA per l'analisi globale del genoma e del trascrittoma. Analisi molecolare del cariotipo umano mediante microarray genomici fotolitografici basati su sonde a "Single Nucleotide Polymorphism-SNP" e "Copy Number Variation-CNV". Utilizzo di algoritmi e softwares per l'interpretazione dei dati (CN state, Allele difference). Analisi del trascrittoma mediante microarray di espressione. Microarray a cDNA. Microarray di espressione ad oligonucleotidi ottenuti per sintesi fotolitografia. Microarray di espressione ad oligonucleotidi supportati da biglie. Array-CGH. Utilizzo di algoritmi e softwares per l'interpretazione dei dati (RMA e SAM).

Applicazione delle tecnologie "microarrays" per lo studio dei tumori solidi ed ematologici.

Tecnologie di sequenziamento di acid nucleici di prima generazione, seconda generazione e terza generazione. Metodi per la preparazione di librerie per l'analisi dell'esoma e di specifiche regioni tramite multiplex. Metodi di amplificazione clonale. Tecniche per la rilevazione dei nucleotidi

incorporati. Metodi bio-informatici e statistici per l'interpretazione dei dati ottenuti da piattaforme di sequenziamento di seconda generazione (NGS).

Applicazione delle tecniche di sequenziamento di prima generazione per la rivelazione di mutazioni con significato prognostico e predittivo di risposta alla terapia. Applicazione delle tecnologie di seconda generazione per l'analisi di tumori solidi ed ematologici.

Rilevazione di aberrazioni cromosomiche mediante la tecnologia MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

Colture cellulari umane primarie e continue.

Banche dati.

TESTI DI RIFERIMENTO

▪ **BIOCHIMICA MEDICA**

1. **Biochimica con aspetti clinici** di Thomas M. Devlin.

Casa ed. Idelson-Gnocchi.

2. **Principi di Biochimica Medica**

G. Meisenberg- W.H.Simmons III edizione

Casa ed. Minerva

3. **I Principi di Biochimica** di Lehninger

Casa ed. Zanichelli (4° edizione)

4. **Biochimica per le discipline biomediche** J.W. Baynes M.H. Dominiczak

Casa ed. Ambrosiana (2° edizione)

▪ **TECNOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI**

1) Biologia molecolare, F.Amaldi, et al. Casa Editrice Ambrosiana – Zanichelli, 2) Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso, 3) Video-corsi online

ALTRO MATERIALE DIDATTICO

▪ **BIOCHIMICA MEDICA**

Power points delle lezioni forniti dal docente

▪ TECNOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI

Video-corso online di "Biotecnologie Diagnostiche" composto da 3 lezioni ed una esercitazione di laboratorio prodotto all'interno di un progetto didattico europeo (D.F. Condorelli, V. Barresi)
<http://www.dsf.unict.it/index.php?page=progetto-phar-in>

Video-corso online "Riparazione del Dna e mutagenesi nel cancro" (D.F. Condorelli): Mismatch repair (MMR) instabilità dei microsatelliti (V. Barresi)

Video-lezione Tecnologie avanzate per la Bio-Medicina Genomica (Vincenza Barresi)

Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso

PROGRAMMAZIONE DEL CORSO

BIOCHIMICA MEDICA

Argomenti	Riferimenti testi
1 Enzimi e meccanismo d'azione. Difetti enzimatici e inibitori degli enzimi.	
2 Destino del piruvato nel citosol: fermentazione lattica e alcolica, con descrizione delle reazioni e degli enzimi coinvolti. Bilancio energetico	
3 Piruvato deidrogenasi e ciclo degli acidi tricarbossilici, regolazione del flusso, bilancio energetico, reazioni anaplerotiche.	3. I Principi di Biochimica di Lehninger
4 Glicemia e omeostasi del glucosio. Metabolismo del glicogeno. Ciclo dei pentosi.	3. I Principi di Biochimica di Lehninger
5 Metabolismo dei grassi: catabolismo e sintesi degli acidi grassi e loro regolazione; bilancio energetico.	3. I Principi di Biochimica di Lehninger
6 Principali reazioni nel metabolismo degli amminoacidi. Mitochondri: struttura e dinamica. Fosforilazione ossidativa mitocondriale: potenziale elettrochimico e forza protonmotrice nel meccanismo di fosforilazione dell'ADP. Struttura e meccanismo catalitico del complesso ATP sintasi.	3. I Principi di Biochimica di Lehninger

7	Generalità. I recettori ormonali; interazione ligando-recettore; caratteristiche molecolari dei recettori. Recettori per ormoni steroidei e loro meccanismo d'azione. Recettori di membrana. Proteine GTP-leganti: Gi, Gs, Gq, e loro attivazione. Ruolo dei dimeri beta e gamma. Effettori intracellulari regolati dalle proteine GTP-leganti: adenilato ciclasi fosfolipasi C (PLCbeta), fosfatidilinositolo 3-chinasi. Adenilato ciclasi e cAMP. Protein chinasi cAMP-dipendente (PKA). Esempi di substrati fosforilati da PK	3. I Principi di Biochimica di Lehninger 1. Biochimica con aspetti clinici di Thomas M. Devlin.
8	Ciclo cellulare Cicline e chinasi ciclino dipendenti Progressione nelle varie fasi del ciclo ed eventi molecolari correlati. Regolazione: localizzazione delle cicline, ruolo e caratterizzazione di p53 e Rb. Oncogeni ed oncosoppressori. L'apoptosi.	3. I Principi di Biochimica di Lehninger -Materiale Didattico

TECNOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI

Argomenti	Riferimenti testi
1 I campioni biologici: tipi, prelievi, trattamento e conservazione.	Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso
2 Estrazione e purificazione di acidi nucleici da cellule umane mediante colonnine cromatografiche per gel di filtrazione, a scambio ionico e per affinità. Purificazione di acidi nucleici con biglie magnetiche.	Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso
3 Dosaggio e valutazione qualitativa di acidi nucleici con metodo spettrofotometrico e fluorimetrico.	Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso
4 Tecnologie basate sulla complementarità dei nucleotidi purinici e pirimidinici.	1) Biologia molecolare, F.Amaldi, et al. Casa Editrice Ambrosiana - Zanichelli, 2) Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso
5 Sintesi di cDNA tramite trascrizione inversa.	Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso
6 Reazione a catena delle polimerasi (PCR). PCR qualitativa o End Point	1) Biologia molecolare, F.Amaldi, et al. Casa Editrice Ambrosiana - Zanichelli, 2) Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso

7	Reazione di polimerizzazione a catena (PCR), PCR quantitativa	1) Biologia molecolare, F.Amaldi, et al. Casa Editrice Ambrosiana - Zanichelli,
8	Reazione di digestione con enzimi di restrizione. Reazioni con enzimi di modificazione.	1) Biologia molecolare, F.Amaldi, et al. Casa Editrice Ambrosiana - Zanichelli, 2) Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso
9	Elettroforesi in gel d'agarosio di acidi nucleici. Elettroforesi capillare di acidi nucleici per l'analisi di singoli nucleotidi e per l'analisi di microsatelliti.	1) Biologia molecolare, F.Amaldi, et al. Casa Editrice Ambrosiana - Zanichelli, 2) Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso
10	DNA- e RNA-microarrays: Preparazione di campioni di DNA o di RNA per l'analisi globale del genoma e del trascrittoma. Analisi molecolare del cariotipo umano mediante microarray genomici fotolitografici basati su sonde a "Single Nucleotide Polymorphism-SNP" e "Copy Number Variation-CNV". Utilizzo di algoritmi e softwares per l'interpretazione dei dati (CN state, Allele difference). Analisi del trascrittoma mediante microarray di espressione. Microarray a cDNA. Microarray di espressione ad oligonucleotidi ott	1) Biologia molecolare, F.Amaldi, et al. Casa Editrice Ambrosiana - Zanichelli, 2) Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso, 3) Video-corsi online
11	Applicazione delle tecnologie "microarrays" per lo studio dei tumori solidi ed ematologici.	1) Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso, 2) Video-corsi online
12	Tecnologie di sequenziamento di acid nucleici di prima generazione, seconda generazione e terza generazione. Metodi per la preparazione di librerie per l'analisi dell'esoma e di specifiche regioni tramite multiplex. Metodi di amplificazione clonale. Tecniche per la rilevazione dei nucleotidi incorporati. Metodi bio-informatici e statistici per l'interpretazione dei dati ottenuti da piattaforme di sequenziamento di seconda generazione (NGS).	1) Biologia molecolare, F.Amaldi, et al. Casa Editrice Ambrosiana - Zanichelli, 2) Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso, 3) Video-corsi online
13	Applicazione delle tecniche di sequenziamento di prima generazione per la rivelazione di mutazioni con significato prognostico e predittivo di risposta alla terapia. Applicazione delle tecnologie di seconda generazione per l'analisi di tumori solidi ed ematologici.	1) Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso, 2) Video-corsi online

14 Rilevazione di aberrazioni cromosomiche mediante la tecnologia MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).	1) Biologia molecolare, F.Amaldi, et al. Casa Editrice Ambrosiana - Zanichelli, 2) Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso, 3) Video-corsi online
15 Colture cellulari umane primarie e continue	1) Biologia molecolare, F.Amaldi, et al. Casa Editrice Ambrosiana - Zanichelli, 2) Lavori scientifici e materiale didattico fornito dalla docente del corso, 3) Video-corsi online

VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

MODALITÀ DI VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

- **BIOCHIMICA MEDICA**
Esame orale
- **TECNOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI**
Prova orale

ESEMPI DI DOMANDE E/O ESERCIZI FREQUENTI

- **BIOCHIMICA MEDICA**
Regolazione del metabolismo del glicogeno.

Recettori di membrana.

Inibitori degli enzimi.

Basi del cancro.

Invecchiamento.
- **TECNOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI**
Applicazioni delle analisi di sequenziamento di prima generazione

Applicazioni analisi microarrays

Parametri per la rilevazione della perdita di eterozigotità a copie neutre

Applicazione del sequenziamento "NGS" per l'analisi di molecole di RNA