

SCHEDA DELL'INSEGNAMENTO DI BIOLOGIA MOLECOLARE E LABORATORIO MOLECULAR BIOLOGY AND LABORATORY

Il corso di "Biologia molecolare e laboratorio" (10 CFU) (comune a tutti i *curricula*) è comprensivo di 9,5 CFU di lezioni frontali, esercitazioni in aula e ricapitolazioni e di 0,5 CFU di esercitazioni di laboratorio.

OBIETTIVI FORMATIVI DA ACQUISIRE:

Conoscenze:

Competenze teoriche ed operative dei meccanismi molecolari dei principali processi biologici che sono alla base del mantenimento dell'informazione genetica e della sua espressione in microrganismi, organismi animali e vegetali.

Conoscenza teorico/ pratica di metodologie biomolecolari di base di supporto all'analisi sperimentale.

Capacità:

Competenze applicative delle metodologie biomolecolari rivolte all'analisi del DNA.

Competenze applicative da impiegare nel campo delle discipline biomolecolari.

Analisi biologiche e biomediche

Comportamenti:

Valutazione, interpretazione di dati sperimentali di laboratorio, sicurezza in laboratorio, valutazione della didattica

PROPEDEUTICITA'

"Chimica Biologica, metodologie biochimiche e laboratorio" (*curriculum* Biologia molecolare e cellulare) o "Chimica Biologica e laboratorio" (*curriculum* Biologia della nutrizione).

PREREQUISITI:

Conoscenze di citologia

PROGRAMMA

Basi, nucleosidi, nucleotidi. Struttura primaria e secondaria degli acidi nucleici. Struttura tridimensionale del DNA a doppia elica: DNA B, DNA A e DNA Z. Strutture alternative alla doppia elica del DNA: DNA H, DNA cruciforme. Movimenti delle basi nel DNA. Strutture di RNA. Superstrutture del DNA. Parametri della superelica. Topoisomerasi.

Processo di denaturazione del DNA. Temperatura media di fusione e %CG. Complessità del genoma. *Cinetica di rinaturazione del DNA e determinazione del Cot. Analisi delle sequenze uniche e ripetute.* Trasposoni.

Dimensione dei genomi. Organizzazione del materiale genetico in virus e procarioti. Organizzazione del materiale genetico in eucarioti: cromatina, nucleosomi, istoni, cromosomi. Modifiche chimiche degli istoni (codice istonico) ed espressione genica. Geni e varianti istoniche.

Duplicazione del DNA. Inizio, allungamento e termine. *Esempi di meccanismi molecolari della duplicazione in virus, procarioti ed eucarioti.* Proteine coinvolte nella sintesi duplicativa. DNA polimerasi di E. coli e loro caratteristiche. DNA polimerasi di eucarioti. *Telomerasi.*

Tipi di RNA e loro abbondanza. Confronto della trascrizione in procarioti ed eucarioti. Trascrizione in procarioti: RNA polimerasi. Unità trascrizionale. Maturazione di trascritti di rRNA e tRNA. *Cenni sulla regolazione della trascrizione in procarioti (operoni ed attenuazione).* Trascrizione in eucarioti: RNA polimerasi I, II, III. Promotori specifici. *Maturazione dei trascritti primari di mRNA, rRNA e tRNA.* Fenomeni di editing. Concetto di introni. Meccanismi di cis-splicing in pre-mRNA, pre-tRNA e pre-rRNA. *Splicing alternativi.* Trans-splicing. *Regolazione dell'espressione genica: struttura cromatinica e metilazione del DNA.* Regolazione trascrizionale e fattori trascrizionali. Enhancer e silencer. Insulator. Regolazioni post-trascrizionali. Silenziamento genico (iRNA, microRNA). lncRNA. Stabilità e degradazione degli RNA in procarioti ed eucarioti.

Utilizzo del codice genetico nella traduzione. Sintesi proteica in procarioti ed eucarioti. Attivazione degli aminoacidi ed aminoacil-tRNAsintetasi. Ribosomi. Inizio, allungamento e termine. Fattori coinvolti.

Regolazione dell'espressione genica a livello traduzionale. Maturazione post-traduzionale delle proteine. SRP.

Virus a DNA. Virus a RNA e replicasi. Retrovirus e trascrittasi inversa. Cenni su oncogeni.

Famiglie geniche (globine) e meccanismi che ne regolano l'espressione.

Tecniche di base di Biologia molecolare e del DNA ricombinante. Analisi della sequenza del DNA manuale ed automatica. Nucleasi di restrizione e mappe di restrizione. Analisi di sequenze specifiche mediante blotting ed ibridazione con sonde specifiche (Southern e Northern blotting). Preparazione delle sonde marcate con radioisotopi. Radioattività. Problematiche collegate al clonaggio del DNA. Tipi di vettori diversi. Preparazione di library genomiche e di cDNA. PCR, RT-PCR, real-time PCR. Metodi di studio dell'interazione DNA-proteine. Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP). Microarray.

MATERIALE DIDATTICO UTILIZZATO E CONSIGLIATO

- Biologia molecolare, Amaldi et al, Casa Editrice Ambrosiana, II Ed., 2014
- Biologia molecolare, Capranico et al. EdiSES, 2016
- Il gene, edizione compatta, Lewin B., Zanichelli, II ed., 2011
- Biologia molecolare del gene, Watson et al., Zanichelli, VII ed., 2015
- Biologia molecolare, Weaver R.F., McGraw-Hill, II ed., 2011
- Dai geni ai genomi, J.D.W. Dale, EdiSES, 2008
- Analisi dei geni e genomi, R.J. Reece, EdiSES, 2006

MODALITA' VERIFICA E VALUTAZIONE DELL'APPRENDIMENTO

Esame orale.

La commissione d'esame, nominata dal CCS accerterà e valuterà collegialmente la preparazione dello studente attribuendo il voto finale sulla base di un adeguato numero di prove e di verifiche. La frequenza assidua e la partecipazione alle attività in aula e laboratorio sono considerati elementi positivi di valutazione.

DOMANDE D'ESAME PIU' FREQUENTI

- Rappresentazione nello spazio di due coppie di basi successive nel DNA B
- Caratteristiche del DNA A, DNA B, DNA Z e DNA H
- Organizzazione della cromatina, siti sensibili e ipersensibili alle DNAsi
- Istoni, loro geni e modifiche
- Replicazione del DNA in eucarioti e procarioti e bolla di replicazione
- Siti d'inizio della duplicazione in procarioti ed eucarioti e loro regolazione
- Caratteristiche delle DNA polimerasi in procarioti e eucarioti
- Telomerasi
- Caratteristiche dei vari RNA cellulari e loro abbondanza
- Maturazione dei diversi tipi di trascritti in eucarioti e procarioti
- RNA polimerasi eucariotiche e procariotiche
- Processo di trascrizione in procarioti ed eucarioti
- Caratteristiche di geni per rRNA, tRNA e mRNA in eucarioti e procarioti
- Enhancer e Silencer di trascrizione; insulator
- Regolazione dell'espressione genica in procarioti
- Regolazione dell'espressione genica in eucarioti
- Emivita di un trascritto e metodi di studio
- Metilazione del DNA
- Meccanismi di splicing
- Editing
- Fattori di trascrizione e metodi di studio dell'interazione proteine-DNA
- Inizio della sintesi proteica in eucarioti e procarioti
- Allungamento e termine della sintesi proteica
- Meccanismi molecolari alla base delle talassemie
- Virus: a RNA di procarioti, fago lambda e retrovirus
- RNA viruses in prokaryotes, lambda phages and retroviruses
- PCR and RT-PCR
- Southern Blotting e Northern Blotting

- Libraries genomiche e di cDNA
- Maxiprep, Midiprep e Miniprep plasmidica
- Preparazione di sonde marcate
- Tecniche di clonaggio del DNA
- ChIP

COURSE OF MOLECULAR BIOLOGY AND LABORATORY

The “Molecular Biology and laboratory” course (10 CFU) (common to all *curricula*) is composed by 9,5 CFU of frontal lectures inclusive of exercises and summaries and by 0,5 CFU of laboratory experience.

LEARNING ACHIEVEMENTS

Knowledge and understanding:

Theoretical skills of the main biological processes at the basis of the maintenance of the genetic information e its expression in microorganisms, plants and animals.

Theoretical knowledge of the bio-molecular basic methods supporting the experimental approaches.

Applying knowledge and understanding:

Analyses in biology and biomedicine

Making judgements:

Evaluation and interpretation of the experimental data, laboratory safety, teaching evaluation

ENTRY REQUIREMENTS

“Biological Chemistry, biochemical methodologies and laboratory” (*curriculum* Cellular and Molecular Biology) or “Biological Chemistry and laboratory” (*curriculum* Nutrition Biology).

REQUIREMENT:

Knowledge of cytology

CONTENTS

Bases, nucleosides, nucleotides. Primary and secondary structure of the nucleic acids. Three-dimensional structure of double helix: B-DNA, A-DNA and Z- DNA. Alternative structure of the DNA double helix: H-DNA, Cruciform structure. Bases movement in DNA. RNA structures. Supercoiled DNA structures. Superhelix parameters. Topoisomerases.

DNA denaturation process. Melting temperature and %CG content. Genome complexity. *DNA kinetic reannealing e Cot study*. Repetitive and unique sequences. Transposons.

Genome sizes. Genome organization in viruses and prokaryotes. Genome organization in eukaryotes: cromatin, nucleosomes, histones, chromosomes. Chemical modifications of histones (histone code) ed regulation of gene expression. Genes and histone variants.

DNA replication. Initiation, elongation and termination stages. *Examples of replication mechanisms in viruses, prokaryotes and eukaryotes*. Proteins involved in *prokaryotes and eukaryotes*. DNA replication. *Telomerase*.

Types and amounts of transcripts. Transcription in *prokaryotes and eukaryotes*. Transcription in *prokaryotes*: RNA polymerases. Transcription unit. Processing of pre-rRNA and pre-tRNA. *Transcriptional regulation in prokarytes (operons and attenuators)*.

Transcription in *eukaryotes*: RNA polymerase I, II, III. Promoters. *Processing of pre- mRNA,pre- rRNA and pre-tRNA*. Editing. Introns. mechanisms of pre-mRNA, pre-tRNA e pre-rRNA cis-splicing. *Alteervative splicing*. Trans-splicing. *Regulation of gene expression: chromatin structure and DNA methylation*. Transcriptional regulation *and transcriptional factors*. Enhancer e silencer. Insulator. Post-transcriptional regulation. Gene silencing (iRNA, microRNA). lncRNA. RNA stability and degradation in prokaryotes and eukaryotes.

Genetic code. Protein synthesis in *prokaryotes and eukaryotes*. Aminoacid activation and aminoacil-tRNA synthesases. Ribosomes. Initiation, elongation and termination stages and involved factors. *Gene expression regulation at level of translation*. Post-translational processing of proteins. SRP.

DNA viruses and replicase. Retroviruses and inverse transcriptase. Oncogenes.

Gene families (globins) and mechanisms of gene expression regulation.

Molecular Biology and recombinant DNA technology. DNA sequencing. Restriction endonucleases and restriction maps. Southern e Northern blotting. *Probes labelled with a radioactive and other detectable label.* *Radioactivity.* DNA cloning technology. *Various types of cloning and expression vectors.* Genomic and cDNA libraries. PCR. *RT-PCR*, real-time PCR. Methods for the study of protein-DNA interactions. Chromatin immunoprecipitation (ChIP). DNA chips.

TEXTBOOKS

- Biologia molecolare, Amaldi et al, Casa Editrice Ambrosiana, II Ed.,2014
- Biologia molecolare, Capranico et al. EdiSES, 2016
- Il gene, edizione compatta, Lewin B., Zanichelli, II ed., 2011
- Biologia molecolare del gene, Watson et al., Zanichelli, VII ed., 2015
- Biologia molecolare, Weaver R.F., McGraw-Hill, II ed., 2011
- Dai geni ai genomi, J.DW. Dale, EdiSES, 2013
- Analisi dei geni e genomi, R.J. Reece, EdiSES, 2006

ASSESSMENT

Oral exam.

The commission will evaluate student's skills, and the score will be given also taking into account the attendance to the course.

FREQUENTLY ASKED QUESTIONS DURING EXAMS

- Picture of two following base pairs in the B-DNA
- Characteristics of A-DNA, B-DNA, Z-DNA, and H-DNA conformations
- Chromatin structure, DNase sensitive and hypersensitive sites
- Istone types, variants, chemical modifications and genes
- DNA replication in prokaryotes and eukaryotes and replication bubble
- Origins of DNA replication in prokaryotes and eukaryotes and their regulation
- DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes
- Telomerase
- Characteristics of the main RNA types and their abundance
- Processing of several RNA types in prokaryotes and eukaryotes
- RNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes
- Transcription in prokaryotes and eukaryotes
- rRNA, tRNA e mRNA genes in prokaryotes and eukaryotes
- Enhancer, Silencer and Insulator
- Regulation of gene expression in prokaryotes
- Regulation of gene expression in eukaryotes
- Transcript half-lives and techniques of study
- DNA methylation
- Splicing processes
- Editing
- Transcription factors and techniques of protein-DNA interaction studies
- Initiation of protein synthesis in prokaryotes and eukaryotes
- Elongation and termination of protein synthesis
- Molecular mechanisms at the basis of thalassemia
- RNA viruses in prokaryotes, lambda phages, retroviruses
- PCR and RT-PCR
- Southern and Northern blotting
- Genomic and cDNA libraries
- Maxi-, midi- and mini- plasmid preparations
- Probes labelling
- DNA Cloning techniques
- ChIP