

CORSO DI CHIMICA BIOLOGICA, METODOLOGIE BIOCHIMICHE E LABORATORIO

Il corso di “Chimica Biologica, metodologie biochimiche e laboratorio” (*curriculum* Biologia Molecolare e cellulare) è costituito da un modulo di “Chimica Biologica e laboratorio” (9 CFU) (comprensivo di lezioni frontali, esercitazioni in aula e ricapitolazioni e di esercitazioni di laboratorio) e da un modulo di “Metodologie biochimiche e laboratorio” (5 CFU) (comprensivo di lezioni frontali, esercitazioni in aula, ricapitolazioni e di esercitazioni di laboratorio).

OBIETTIVI FORMATIVI DA ACQUISIRE:

Conoscenze:

Conoscenze delle caratteristiche strutturali e funzionali delle biomolecole, delle proprietà degli enzimi, dell'organizzazione del materiale genetico, e dei principali processi metabolici di carboidrati, lipidi e proteine. Competenze teoriche e capacità applicative delle metodologie biochimiche di base, riguardanti tecniche di purificazione ed analisi di macromolecole, determinazioni strutturali basate su analisi biochimiche, determinazione qualitativa e quantitativa di attività enzimatiche.

Capacità:

Capacità di applicare metodologie biochimiche e biotecnologiche di base.
Analisi biologiche, biochimiche e biomediche.

Comportamenti:

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

PROPEDEUTICITA'

“Chimica organica e laboratorio”

PREREQUISITI:

Conoscenze di Termodinamica, Matematica e Citologia ed Istologia.

NOTA:

L'esame di “Chimica Biologica, metodologie biochimiche e laboratorio” è propedeutico agli esami di “Biologia Molecolare e laboratorio”, “Fisiologia e laboratorio”, “Genetica e ingegneria genetica e laboratorio” e di alcuni esami a scelta.

PROGRAMMA

Modulo di Chimica Biologica e laboratorio

- Introduzione alla Biochimica
- Principali classi di biomolecole - Gruppi funzionali nelle biomolecole – Struttura tridimensionale: configurazione e conformazione – Interazioni tra molecole (legame idrogeno, interazioni ioniche, interazioni di van der Waals, interazioni idrofobiche)

Proteine

- Struttura: Le unità monomeriche: caratteristiche strutturali e proprietà chimiche degli amminoacidi (curve di titolazione, punto isoelettrico; caratteristiche delle catene laterali) – Formazione della catena polipeptidica e livelli superiori di organizzazione strutturale: alfa-elica, strutture beta, inversioni di catena, strutture supersecondarie, struttura terziaria, domini, struttura quaternaria – Relazioni struttura e funzione: denaturazione/rinaturazione; effetti della temperatura, del pH, di denaturanti chimici (urea, guanidina, sodio dodecil-solfato, agenti riducenti).
- Analisi: Principi di purificazione e caratterizzazione delle proteine.
- Funzione: Proteine fibrose: alfa-cheratine - beta-cheratine – collagene.
- Funzione: Proteine globulari. Mioglobina e Emoglobina.
- Funzione: Enzimi. Concetti di base: cinetica delle reazioni non catalizzate; variazione dell'energia libera delta-G – relazione tra delta-G e costante di equilibrio di una reazione. Classificazione degli enzimi, specificità di reazione, il sito attivo, interazione con il substrato – Meccanismi di catalisi enzimatica - Cinetica enzimatica: il modello di Michaelis-Menten; trasformazioni dell'equazione di Michaelis-Menten: il grafico dei doppi reciproci – Inibizione enzimatica reversibile (competitiva, non competitiva) e irreversibile – Effetti di pH e temperatura sulla velocità delle reazioni enzimatiche. Regolazione: Enzimi allosterici – modificazioni post-traduzionali- attivazione di zimogeni.

- I cofattori: coenzimi piridinici e flavinici, tiamina pirofosfato, coenzima A, acido lipoico, biotina, piridossal fosfato. I gruppi funzionali e il meccanismo d'azione.

Acidi Nucleici

- Struttura: Le unità monomeriche: basi, nucleosidi, nucleotidi -struttura primaria e secondaria; la struttura a doppia elica. Processi di denaturazione: ipercromismo – temperatura di fusione; denaturazione reversibile; ibridazione. Idrolisi enzimatica (esonucleasi, endonucleasi, enzimi di restrizione). Principi di tecniche di analisi. Organizzazione della cromatina (generalità).
- Funzione: Aspetti generali della biosintesi di DNA, RNA e proteine. Le reazioni della DNA polimerasi; la DNA ligasi; le RNA polimerasi-DNA dipendenti nei procarioti e negli eucarioti; ruolo delle DNA topoisomerasi; cenni sulla maturazione degli RNA; struttura e funzione degli RNA di trasferimento; il codice genetico; la reazione di attivazione degli amminoacidi; le fasi della sintesi proteica; inizio, allungamento, terminazione, con particolare riferimento al processo nei procarioti.

Metabolismo

- Premessa: Concetti generali di energetica: le funzioni di stato (entalpia, entropia, energia libera); composti ad alto contenuto energetico e loro ruolo nel metabolismo - reazioni accoppiate – vie metaboliche e loro regolazione
- Carboidrati: monosaccaridi; polisaccaridi di riserva (glicogeno e amido). Glicolisi: reazioni, meccanismi (fosfoglicerato mutasi, gliceraldeide 3-P deidrogenasi,); regolazione – Vie fermentative del piruvato (fermentazione lattica e fermentazione alcolica) – Decarbossilazione ossidativa del piruvato e meccanismo di reazione – La via del fosfogluconato e suo significato; meccanismi d'azione di transchetolasi e transaldolasi – Gluconeogenesi: reazioni e regolazione – Metabolismo dei polisaccaridi: degradazione e sintesi del glicogeno: reazioni, regolazione.
- Lipidi: Aspetti generali della struttura e funzione dei lipidi; Acidi grassi saturi e insaturi; Triacilgliceroli – lipasi – degradazione e sintesi degli acidi grassi saturi: reazioni, regolazione.
- Proteine: generalità sul destino dello scheletro carbonioso degli amminoacidi. Destino del gruppo amminico degli amminoacidi: transamminazioni: significato e meccanismo – deaminazione ossidativa – ciclo dell'urea
- La combustione completa degli atomi di carbonio provenienti dai diversi distretti metabolici e la produzione di energia in condizioni di aerobiosi: Ciclo degli acidi tricarbossilici: reazioni e regolazione – Le reazioni anaplerotiche: piruvato carbossilasi ed enzima malico. La catena di trasporto degli elettroni; fosforilazione ossidativa

Modulo di Metodologie biochimiche e laboratorio

Tecniche separative ed analitiche e strumentazione relativa. Unità di misura, sicurezza in laboratorio Sistemi biologici utilizzati nell'indagine biochimica. **Culture cellulari** eucariotiche e procariotiche. Preparazione di **omogenati** di tessuti e di cellule.

Separazione mediante solubilità: frazionamento mediante sali, solvente, calore.

Separazione mediante membrane: filtrazione, dialisi.

Centrifugazione: principi generali. Centrifugazione preparativa e sue applicazioni: differenziale, in gradiente di densità. Centrifugazione analitica e sue applicazioni

Cromatografia: principi generali, cromatografia a scambio ionico, di esclusione, di affinità. Sistemi cromatografici. Rappresentazione grafica dei risultati e loro interpretazione.

Elettroforesi: principi generali. Supporti: gel di agar e di agarosio, gel di poliacrilammide. Elettroforesi di proteine: elettroforesi nativa, in SDS; rivelazione. Western blotting. Focalizzazione isoelettrica; elettroforesi bidimensionale.

Elettroforesi di acidi nucleici. Southern blotting, Northern blotting.

Tecniche spettroscopiche: principi generali, spettrofotometria nell'ultravioletto e nel visibile. Legge di Lambert e Beer. Applicazioni. Spettrofluorimetria e applicazioni.

Tecniche radioisotopiche: rilevazione e misura della radioattività, autoradiografia, impiego dei radioisotopi in biochimica.

Tecniche immunochimiche: principi generali, produzione di anticorpi policlonali e monoclonali, dosaggio radioimmunologico; dosaggio immunoenzimatico; immunofluorescenza.

Applicazioni alla ricerca biochimica

Purificazione e caratterizzazione delle proteine. Criteri di purezza. Dosaggio delle proteine; metodi per lo studio dell'attività enzimatica; esempi di saggi enzimatici. Determinazione della massa molecolare relativa, determinazione del numero e del peso molecolare delle subunità.

Esercitazioni Svolte:

Cromatografia a scambio ionico e determinazione colorimetrica della concentrazione di una miscela proteica. Saggio enzimatico

MATERIALE DIDATTICO UTILIZZATO E CONSIGLIATO

- Nelson DL e Cox MM – **I Principi di Biochimica di Lehninger** – Zanichelli (ed.)
 - Nelson DL e Cox MM – **Introduzione alla Biochimica di Lehninger** – Zanichelli (ed.)
 - Campbell e Farrell – **Biochimica** – EdiSES (ed.)
 - Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L – **Biochimica**- Zanichelli (ed.)
 - Voet D, Voet JG, Pratt CW – **Fondamenti di Biochimica** – Zanichelli (ed.)
 - Per alcuni argomenti (proteine, membrane) consultare anche: AA.VV. **Chimica Biologica** (Monduzzi Editore)
 - Stoppini e V- Bellotti: **Biochimica Applicata**- EDISES
 - M.C. Bonacorsi di Patti, R. Contestabile, M.L. Di Salvo: **Metodologie Biochimiche** – Casa Editrice Ambrosiana
 - C. De Marco e C. Cini: **Principi di Metodologia Biochimica**. Piccin Editore
 - K. Wilson, J. Walzer- **Biochimica e biologia molecolare: Principi e tecniche** -Raffaello Cortina Editore
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Altro materiale didattico

Appunti del docente, reperibili sul sito www.docenti.unina.it

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.

COMPOSIZIONE DELLA COMMISSIONE PER LA VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

1°gruppo: Piera Quesada (presidente), Simonetta Bartolucci, Danila Limauro, Gabriella Fiorentino, Patrizia Contursi, Marcello Merola.

2°gruppo: Alberto Di Donato (presidente), Valeria Cafaro, Danila Limauro, Gabriella Fiorentino, Patrizia Contursi, Piera Quesada, Marcello Merola, Maria Rosaria Faraone Mennella, Salvatore Sorrentino, Eugenio Notomista, Eliodoro Pizzo, Simonetta Bartolucci.

3°gruppo: Valeria Cafaro (presidente), Danila Limauro, Gabriella Fiorentino, Patrizia Contursi, Alberto Di Donato, Piera Quesada, Maria Rosaria Faraone Mennella, Salvatore Sorrentino, Eugenio Notomista, Eliodoro Pizzo, Simonetta Bartolucci, Anna De Maio.