

Insegnamento di “Biotecnologie Cellulari”

Modulo di “Biochimica Cellulare”

Indicazioni generali sul programma.

Lo studente deve acquisire la conoscenza dei principali meccanismi molecolari coinvolti nella comunicazione tra cellule (parte A), con particolare riferimento ai meccanismi di segnalazione che portano all'innesco o al blocco della proliferazione cellulare (parte B), e alla definizione del ruolo di una cellula nel contesto del tessuto e dell'organismo di appartenenza (parte C). La conoscenza di questi meccanismi è indispensabile per la comprensione delle tecniche di coltura e manipolazione in vitro di cellule e tessuti eucariotici.

La conoscenza dell'organizzazione e delle modificazioni stabili a cui va incontro il materiale genetico all'interno del nucleo (parte D) è invece necessaria per capire come i segnali provenienti dall'esterno della cellula vengano integrati nelle modificazioni semi-permanenti della cromatina, e quindi dell'assetto trascrizionale della cellula, e come sia necessario agire a livello della cromatina per la produzione di cellule staminali derivanti dalla riprogrammazione di cellule differenziate.

Suggerimenti per lo studio.

Nelle pagine seguenti è riportato un programma dettagliato che segue, argomento per argomento, lo schema delle lezioni tenute durante il corso. All'inizio di ogni sezione del programma sono riportati i libri di testo (con i relativi capitoli) suggeriti per lo studio e per la consultazione. Lo studente è comunque incoraggiato a reperire da solo eventuali fonti alternative, avendo come riferimento il programma dettagliato, i files delle diapositive e gli appunti.

Sul sito docente sono disponibili i files .PDF delle diapositive utilizzate per le lezioni. Non tutte le diapositive sono state proiettate o discusse: in questi casi si faccia riferimento al programma dettagliato e agli appunti presi a lezione. Le presentazioni sono anche disponibili in formato “movie” compatto (.m4v), senza audio. Per la visione usare QuickTime o iTunes. Dall'inizio di luglio saranno resi disponibili i files movie con commento audio.

Per lo studio si suggerisce di seguire un approccio del tipo “problema —> soluzione”, identificando i meccanismi generali in base alle funzioni che sono chiamati a svolgere, e evitando uno studio di tipo nozionistico: è molto più importante capire a cosa serve un processo o un meccanismo molecolare, piuttosto che ricordare il nome di tutte le macromolecole o dei complessi molecolari coinvolti. I capitoli di cui si suggerisce la “lettura” servono per aiutare lo studente a costruirsi un quadro d'insieme e una rete di riferimento. Non è richiesta, per questi argomenti, la conoscenza dei dettagli.

Buon lavoro.

Vincenzo De Simone

A) La Trasduzione del segnale

Testi di riferimento: Lewin B. – Il Gene VIII – Zanichelli – (Cap. 28)

Nelson & Cox – Principi di Biochimica di Lehninger- Zanichelli IV ed. (Cap. 23, leggere)

A1- Recettori nucleari

- Attivazione diretta e indiretta, ed effetto del segnale sull'espressione genica.
- Recettori nucleari per segnalatori liposolubili. Alcuni ormoni liposolubili.
- La "superfamiglia" dei recettori nucleari: organizzazione strutturale; domini a dita di zinco del tipo C4; regioni di specificità dei domini ZnC4.
- I due meccanismi di attivazione dei recettori nucleari; recettori nucleari di classe I e II. Traslocazione nucleare di recettori omodimerici; attivazione dei recettori dei glucocorticoidi. Repressione in assenza del ligando.
- Elementi di risposta a recettori nucleari omo ed etero-dimerici; siti di legame palindromici e a ripetizione diretta. I *partners* di RXR.

A2 - Recettori associati a proteine G trimeriche

- Amplificazione del messaggio ormonale. Secondi messaggeri (cAMP, cGMP, DAG, ITP, Ca⁺⁺).
- Il recettore a "serpentina" e il complesso delle proteine G trimeriche. Proteine G attivate dalla luce o da sostanze volatili (Golf). Recettori β -adrenergici e cAMP.
- Attivazione dell'adenilato- ciclasi. Struttura del complesso G trimerico e dell'adenilato-ciclasi. Il complesso Gsa - adenilato ciclasi.
- I recettori α -adrenergici e le sub unità Gsi. Domini funzionali dei recettori α e β -adrenergici.
- Attivazione della protein-chinasi A (PKA) cAMP-dipendente. Attivazione di CREB.
- Attivazione della glicogenolisi e inibizione della glicogeno-sintesi ad alta [cAMP].
- Recettori che attivano la fosfolipasi C- β . La Protein-Chinasi C (PKC) DAG-dipendente.
- Regolazione da CALMODULINA. Struttura della calmodulina. Protein-chinasi Calmodulina-dipendente.

A3 Recettori a tirosina-chinasi

- La famiglia dei recettori ad attività Tyr-K.
- Auto-fosforilazione dei recettori Tyr-K; interattori multipli delle Tyr-P: l'esempio del recettore PDGF. I domini SH2 ed SH3.
- Fosfolipasi C- γ e attivazione della via del fosfatidil-inositolo e della PKC.
- Fattori di crescita e attivazione della via di Ras. La "cascata" delle MAP-chinasi. Mutazioni Oncogeniche della via di Ras.
- Convergenza di vie di trasduzione diverse.

B) Il Controllo della Proliferazione Cellulare.

Testi di riferimento: Lewin B – Il Gene VIII – Zanichelli – (Cap. 29)

Nelson DL, Cox MM – Principi di Biochimica di Lehninger - Zanichelli IV ed. (Cap. 12, leggere)

Lewin B – Il Gene VIII – Zanichelli –(Cap. 30, leggere)

B1 - Controllo molecolare del ciclo cellulare.

- Schema generale del ciclo cellulare. I principali punti di controllo del ciclo cellulare.
- I complessi ciclina/chinasi. Il ciclo dei complessi MPF e START nel lievito.
- L'ubiquitinazione delle proteine, il proteasoma eucariotico, le sequenze di "distruzione" delle cicline. I due complessi APC. Attivazione e cambiamenti conformazionali della chinasi MPF.
- *S. pombe* e *S. cerevisiae* a confronto. Il ciclo di cdc2 nel lievito *S. pombe*. I complessi Cdk-Cyc nel lievito *S. cerevisiae*. I complessi Cdk-Cyc negli eucarioti superiori.
- Inibitori dei complessi START G1/S in cellule eucariotiche.
- La proteina pRb nel ciclo e in cellule in Go. Il ciclo di fosforilazione di Rb e la regolazione di E2F. Induzione del passaggio Go—>G1 Geni della risposta "precoce" e "ritardata". I "sensori" del DNA danneggiato.

B2 - La morte cellulare programmata.

- Apoptosi o morte cellulare programmata (PCD). Le vie di controllo dell'apoptosi Pathway intrinseco ed estrinseco Risposte cellulari al danneggiamento del DNA
- Apoptosi indotta via recettori di membrana (Fas-FADD). La "cascata" delle Caspasi e il ruolo del Citocromo C. Fattori pro- e anti-apoptotici.
- Fattori di sopravvivenza (trofine). Apoptosi ed omeostasi tissutale.
- p53 e la repressione del ciclo cellulare. Inibizione dei complessi cdk-cyc G1. Modificazioni di p53 indotte da danni al DNA. Apoptosi indotta da p53.

C) Dalla Cellula all'Organismo.

Testi di riferimento: Lewin B – Il Gene VIII – Zanichelli – (Cap. 31)

Watson J et al. – Biologia Molecolare del Gene - Zanichelli VI ed. (Cap. 19, leggere)

C1 - Controllo molecolare dello sviluppo embrionale (i concetti generali).

- Sviluppo di *Drosophila Melanogaster* -I Il gradiente antero-posteriore I dischi immaginali della larva. Trasporto e localizzazione degli mRNA bicoid e oskar.
- Gradienti morfogenetici e geni bersaglio. Segmenti e parasegmenti in *Drosophila*. Gerarchie di regolatori dello sviluppo. Esempi di mutazioni omeotiche (Ubx e Antp). Meccanismo combinatorio per la definizione dell'identità cellulare.
- Geni Hom (*Drosophila*) e Hox (vertebrati). Colinearità A/P dei geni Hom ed Hox.

C2- Differenziamento cellulare e multipotenza (i concetti generali).

- Le cellule staminali embrionali (ES). Embriogenesi precoce del topo. Cellule ES e topi transgenici. Geni del controllo della "staminalità". Conseguenze del "knock-out" dei geni di controllo Geni di controllo e sviluppo embrionale.
- Tecniche per generare cellule staminali pluripotenti. La "ri-programmazione" cellulare. Fattori di pluripotenza esogeni e endogeni. Pluripotenza degli stadi embrionali precoci. Possibili applicazioni delle iPSC.

D) La Cromatina Eucariotica.

Testi di riferimento: Lewin B – Il Gene VIII – Zanichelli – (Cap. 23)

Watson J et al. – Biologia Molecolare del Gene - Zanichelli VI ed. (Cap. 7 e 17, leggere)

D1 - Cromatina e Differenziamento Cellulare.

- Nucleosomi generati per digestione con DNasi. Lunghezza minima del DNA coperto dal nucleo soma. Organizzazione dell'ottamero istonico. Acetilazione o metilazione degli istoni. Struttura degli istoni del nucleosoma. Assemblaggio del nucleosoma.
- Istone H1 e compattamento della cromatina e del cromosoma. Due modelli per la fibra da 30 nm. Estremità aminoterminali e compattamento. L' "impalcatura" dei cromosomi eucariotici.
- Regioni libere da nucleosomi. Proteine adiuvanti del riasssemblaggio dei nucleosomi (histone chaperons). Acetilazione dei nucleosomi e replicazione.
- Modificazioni degli istoni. Proteine che legano gli istoni modificati. Il "rimodellamento" della cromatina. Gli attivatori possono modificare la cromatina.
- Cromosomi a spazzola degli oociti di anfibi I cromosomi politenici delle ghiandole salivari di *Drosophila*. Anse ed interazioni tra regioni distanti.
- Colinearità tra POSIZIONE dei geni sul cromosoma ed ESPRESSIONE lungo l'asse antero-posteriore dell'embrione. I loci delle beta-globine. Modelli d'interazione a distanza.

D2 - Tecniche di Studio della Cromatina Eucariotica.

- Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE). FAIRE-Chip e FAIRE-seq.
- Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP). ChIP-Chip e ChIP-seq
- Chromosome Conformation Capture (3C). 3C "Carbon Copy" (5C). Hi-C e l'architettura generale dei genomi eucariotici.

Alcuni lavori di riferimento per le tecniche:

- Dekker J et al. - Capturing Chromosome Conformation - Science 295:1306 (2002).
- Dostie J et al. - Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. - Genome Res. 16:1299 (2006).
- Lieberman-Aiden E et al. - Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome. - Science 326:289 (2009).
- Giresi PG et al. - FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin - Genome Res. 17: 877 (2007).