

FACOLTÀ	Scuola delle Scienze di Base e Applicate
ANNO ACCADEMICO	2014/2015
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE	Biologia Cellulare e Molecolare
INSEGNAMENTO	Metodologie Biochimiche
TIPO DI ATTIVITÀ	Caratterizzante
AMBITO DISCIPLINARE	Discipline del settore Biomolecolare
CODICE INSEGNAMENTO	05176
ARTICOLAZIONE IN MODULI	NO
NUMERO MODULI	1
SETTORI SCIENTIFICO DISCIPLINARI	BIO/10
DOCENTE RESPONSABILE (MODULO 1)	Antonella D'Anneo Ricercatore Università di Palermo
CFU	6
NUMERO DI ORE RISERVATE ALLO STUDIO PERSONALE	102
NUMERO DI ORE RISERVATE ALLE ATTIVITÀ DIDATTICHE ASSISTITE	40+12
PROPEDEUTICITÀ	Nessuna
ANNO DI CORSO	Primo
SEDE	Attività da programmare e consultabile sul sito del Corso di Laurea http://www.unipa.it/cmb/it/
ORGANIZZAZIONE DELLA DIDATTICA	Lezioni frontali ed esercitazioni di laboratorio
MODALITÀ DI FREQUENZA	Obbligatoria
METODI DI VALUTAZIONE	Prova Orale
TIPO DI VALUTAZIONE	Voto in trentesimi
PERIODO DELLE LEZIONI	Attività da programmare e consultabile sul sito del Corso di Laurea http://www.unipa.it/cmb/it/
CALENDARIO DELLE ATTIVITÀ DIDATTICHE	Attività da programmare e consultabile sul sito del Corso di Laurea http://www.unipa.it/cmb/it/
ORARIO DI RICEVIMENTO DEGLI STUDENTI	Dott. A. D'Anneo Lunedì, Mercoledì Venerdì Ore 14.30-15.30

<p>RISULTATI DI APPRENDIMENTO ATTESI</p> <p>Conoscenza e capacità di comprensione Acquisizione dei principi teorici delle metodologie biochimiche avanzate e valutazione del loro impatto sulla ricerca biochimica.</p> <p>Capacità di applicare conoscenza e comprensione Il corso è rivolto a studenti con buone conoscenze di base in biochimica generale, biologia molecolare e biologia cellulare. In particolare il corso si propone di sviluppare la capacità degli studenti di:</p> <ul style="list-style-type: none"> - individuare approcci metodologici adeguati dando particolare risalto a procedure e tecnologie di recente concezione; - riconoscere e individuare in autonomia specifici design sperimentali da applicare alla ricerca biochimica di base e applicata.

Autonomia di giudizio

Essere in grado di - leggere criticamente un lavoro scientifico valutandone la validità dei risultati descritti in rapporto all'approccio metodologico impiegato; - elaborare opinioni personali sui temi trattati e sviluppare in maniera interdisciplinare l'attitudine all'analisi critica dei problemi, evidenziando gli aspetti non sufficientemente convincenti o trasparenti nelle ipotesi proposte;-trasferire in ambito professionale le nozioni acquisite per progettare in autonomia strategie sperimentali commisurate con la problematica scientifica da affrontare.

Abilità comunicative

Acquisizione di competenza nella presentazione e divulgazione delle nozioni di base con particolare attenzione all'uso di un appropriato lessico tecnico-scientifico.

In particolare lo studente dovrà acquisire: a) un certo grado di competenza comunicativa, sviluppando una dimensione linguistica efficace e appropriata al contesto scientifico nel quale si trova ad operare; b) la capacità di utilizzare adeguate risorse informatiche per la presentazione e la discussione in ambito scientifico.

Capacità d'apprendimento

Abilità nella consultazione di materiale bibliografico, banche dati e materiale in rete. Capacità, di orientarsi in autonomia nell'aggiornamento delle tematiche sviluppate e nel trasferimento delle nozioni apprese in situazioni applicative reali.

OBIETTIVI FORMATIVI DEL MODULO 1 "Metodologie biochimiche"

Gli obiettivi formativi del corso "Metodologie Biochimiche" sono orientati verso il conseguimento di un livello di competenza che permetta allo studente di partecipare alla ricerca scientifica pertinente alla laurea specialistica.

A tal fine il corso si propone di sviluppare e approfondire le conoscenze dello studente su metodologie biochimiche applicate allo studio di proteine, alla loro identificazione, alle interazioni proteina-proteina e alle possibili modifiche post-traduzionali che ne regolano la funzione. Particolare attenzione sarà anche rivolta alla valutazione della tecnica di Real time PCR e al suo impiego in campo biomedico e agro-alimentare. Saranno approfonditi alcuni aspetti inerenti lo studio di RNA regolatori, lo shuttling nucleo-citoplasmatico degli RNAs e le metodologie impiegate per la loro identificazione. Il corso si propone anche di sviluppare alcune conoscenze sulle tecniche adottate per lo studio della degradazione ed il folding degli RNA. Completano il corso le metodologie impiegate per la caratterizzazione e lo studio delle cellule staminali cancerose.

Le attività formative proposte forniranno complessivamente adeguate competenze metodologiche tali da rendere lo studente in grado di pianificare in autonomia design sperimentali e valutare criticamente gli approcci metodologici più appropriati alla ricerca biochimica di base e applicata.

MODULO 1	METODOLOGIE BIOCCHIMICHE
ORE FRONTALI	LEZIONI FRONTALI
1	Obiettivi della disciplina e sua suddivisione.
6	Metodi di studio delle proteine: Introduzione allo studio della proteomica. Frazionamento e purificazione delle proteine. Preparazione del campione per le analisi di proteomica: solubilizzazione, prefrazionamento e rimozione di agenti contaminanti. Elettroforesi 2D delle proteine: Isoelettrofocalizzazione (IEF) e scelta del gradiente di pH. IPG strip. SDS PAGE. Metodi per l'identificazione delle proteine nel gel: colorazione con Blue comassie, silver stain, Sybro Ruby, potenzialità e limiti dei coloranti utilizzati. Analisi mediante spettrometria di massa: principi della spettrometria e struttura di uno spettrometro di massa. Sorgenti: Ionizzazione diretta, MALDI, ESI. Analizzatori di massa: Time of Flight (Tof), quadrupolo, trappola ionica. Rivelatori. Peptide Mass Fingerprinting. Applicazioni della proteomica: proteomica in analisi clinica. Ricerca ed identificazione di modifiche post traduzionali.
4	Metodologie per lo studio delle interazioni proteina-proteina: Ruolo delle interazioni proteina-proteina e loro classificazione. L'origine delle interazioni proteiche e ruolo dell'allosteroismo nella colocalizzazione. Allosteroismo nelle interazioni

	proteina-proteina e proteina-DNA. Metodi di studio delle interazioni proteina-proteina per interazioni stabili e transienti. Two hybrid assay. MAPPIT. Immunoprecipitazione/Co-immunoprecipitazione. TAP tag method. Far western blotting. Phage display. Protein arrays. Crosslinking. FRET.
6	Real time PCR- Cinetica di amplificazione. Sonde fluorogeniche (TaqMan probes, scorpion primers, molecular beacons, FRET, SYBR Green, sonde Plexor, BD QZyme). Curve di melting. Quantificazione assoluta e relativa. Determinazione del Ct e metodi matematici per la quantificazione. Applicazioni della Real Time PCR in campo biomedico e nell'identificazione degli OGM.
7	Tecnologie antisense e RNA interference per lo studio degli RNA. RNA antisense. Oligonucleotidi antisense di I, II e III generazione. Ribozimi. RNA interference e meccanismo d'azione. Effetti degli dsRNA. Design dei siRNA secondo Tuschl. Effetti del silenziamento e metodi per la valutazione del knockdown genico. Controlli sperimentali nei saggi di silenziamento. Fattori che influenzano un ridotto knockdown. Effetto Off-Target. Strategie per minimizzare l'effetto Off-Target: concentrazione, pooling, modificazione delle basi. Cenni su approcci bioinformatici. Metodi per il siRNA delivery: uso di lipoplessi e nanoparticelle per la terapia in vivo. Cenni sui piRNA e loro azione nei processi di interferenza dei trasposoni nelle cellule germinali. MicroRNA: biogenesi e processamento. Complesso microprocessore: Drosha e DGCR8. Proteine Argonata nei meccanismi di processamento degli RNA. Ruolo dei mir nei processi di sviluppo: lin4/lin14. Ruolo dei mir nel controllo dell'emiocitosi delle vescicole di insulina. Oncomir e antioncomir e loro ruolo nei tumori. Metodi di studio dei miRNA.
5	Shuttling nucleocitoplasmatico dell'RNA e fattori di export nucleare. Export di tRNAs, microRNAs, snRNAs. Introduzione ai meccanismi di export degli mRNA. Controllo qualità e nuclear surveillance nell'export degli RNAs. Export degli mRNAs nel lievito e nei metazoi. Export di RNA ribosomali.
2	Metodi di studio per l'export nucleare. Analisi dell'export di RNA mediante l'impiego di cellule permeabilizzate con digitonina e molecular beacons.
3	Degradazione dell'RNA. Meccanismi di degradazione degli RNA. Degradosoma dei batteri. Il complesso dell'esosoma. Ruolo dell'esosoma nel controllo della maturazione, nel controllo qualità e nella degradazione dell'RNA. Struttura e caratteristiche dell'esosoma degli archea, fattori per il riconoscimento dell'RNA e sua degradazione. Esosoma degli eucarioti e modalità di azione. Degradazione associata a fattori dipendenti e indipendenti da sequenze.
4	Metodi di studio nei meccanismi di folding degli RNA. Gerarchie nella organizzazione strutturale degli RNA. Strategie per il folding e l'assemblaggio degli RNA. Ruolo dei cationi nel processo di folding. Landscape energetico. Proteine che assistono il folding degli RNA. Proteine con attività RNA chaperones: Histone like proteins (StpA1), Cps. RNA annealers. RNA helicase. Metodi di studio delle proteine con funzione di RNA chaperone: RNA annealing, Strand displacement, saggi cis-splicing e trans-splicing, saggio di taglio da ribozima. Folding-trap e anti-terminazione della trascrizione.
2	Metodi di studio di cellule staminali cancerose. caratteristiche delle cellule staminali, loro classificazione e potenziali applicazioni nella medicina rigenerativa. Cellule staminali cancerose. Markers di staminalità e loro studio. Purificazione e isolamento di cellule staminali cancerose. Tecniche di studio: side population, selezione attraverso markers di superficie, tumor sphere, determinazione del potenziale invasivo e del potenziale tumorigenico.
ESERCITAZIONI DI LABORATORIO	
12	Durante il corso le conoscenze acquisite saranno approfondite da approcci sperimentali al fine di garantire agli studenti una conoscenza adeguata delle metodologie e delle loro applicazioni nella routine di laboratorio.
TESTI CONSIGLIATI	<u>Lecture Consigliate</u> 1. <i>METODOLOGIA BIOCHIMICA</i> - WILSON KEITH-WALKER JOHN - RAFFAELLO CORTINA EDITORE - BIOLOGIA. 2. <i>PRINCIPI DI METODOLOGIA BIOCHIMICA</i> - DE MARCO C., CINI C. PICCIN. 3. <i>IL GENE X</i> - LEWIN B., KREBS J., GOLDSTEIN E., KILPATRICK S. ZANICHELLI. Durante il corso verranno anche forniti articoli e monografie sugli argomenti svolti, nonché tutto il materiale informatico proposto durante il corso.