

## **Biologia Molecolare**

### **Programma**

Dal DNA alle proteine. Il DNA come materiale genetico. Struttura chimica e struttura fisica del DNA. La scoperta della struttura a doppia elica. Strutture alternative del DNA (A, B, Z) e superstrutture (s.cruciformi, superavvolgimento, DNA curvo). Struttura dell'RNA. Codice genetico e sintesi proteica. Decifrazione, proprietà ed evoluzione del codice genetico. I componenti dell'apparato di traduzione: ribosomi, mRNA, tRNA e amminoacil-sintetasi. Meccanismo della traduzione nei procarioti e negli eucarioti: inizio, allungamento e terminazione. Regolazioni generali e specifiche della traduzione.

Organizzazione ed evoluzione di geni, cromosomi, e genomi. Contenuto di DNA e complessità genetica; sequenze uniche, e sequenze ripetute del DNA; regioni codificanti e non codificanti del genoma; la struttura esoni/introni dei geni; origine ed evoluzione degli introni; funzioni degli introni; organizzazione ed evoluzione delle famiglie geniche; sequenze semplici e DNA satelliti; organizzazione e struttura dei cromosomi; centromeri e telomeri; istoni, struttura dei nucleosomi e organizzazione della cromatina.

Replicazione del DNA. Replicazione semiconservativa e progressiva del DNA; repliconi, forche di replicazione ed origini; repliconi unidirezionali e bidirezionali; repliconi ed origini di replicazione dei cromosomi procariotici; repliconi ed origini dei cromosomi eucariotici; modelli topologici della replicazione del DNA; replicazione discontinua e frammenti di Okazaki; DNA polimerasi proc. ed euc.; apparato enzimatico di replicazione; controllo della replicazione; replicazione della cromatina. Trasposoni procariotici ed eucariotici. Cenni ai meccanismi di riparazione del DNA.

Trascrizione e sua regolazione. RNA polimerasi e promotori procariotici; meccanismo di trascrizione e regolazione nei procarioti; il paradigma dell'Operone Lattosio. RNA polimerasi e promotori eucariotici: Pol I, Pol II e Pol III; regolazione della trascrizione negli eucarioti. Fattori di trascrizione. Terminazione, antiterminazione ed attenuazione della trascrizione. Struttura della cromatina e trascrizione: cromatina attiva e rimodellamento della cromatina. Metilazione del DNA e trascrizione; imprinting genetico.

Processamento dell'RNA. Maturazione dei trascritti nei procarioti: la maturazione degli mRNA del fago T7, e degli rRNA e tRNA di E.coli; autotaglio dell'RNA; la "testa di martello". Maturazione dell'RNA negli eucarioti; tagli e modificazioni chimiche degli RNA ribosomali; metilazione e pseudouridilazione dell'RNA; snoRNA e snoRNP. Maturazione degli mRNA eucariotici: struttura dell' M7G-cap e della coda di poli(A), meccanismi enzimatici di "capping" e "poliadenilazione". Meccanismi di "splicing" dell'RNA: introni di tipo I e di tipo II; autosplicing; splicing nucleare e spliceosoma; splicing dei tRNA di lievito. "Editing" dell'RNA: editing degli RNA mitocondriali di tripanosoma; editing degli mRNA negli eucarioti superiori; meccanismi di editing; RNA guida. Regolazione della stabilità degli mRNA. Controllo qualità dell'mRNA ("non sense mediated decay" e "non stop mediated decay").

Regolazioni complesse e controlli globali: Regolazione dei cicli virali: ciclo litico e ciclo lisogeno del fago lambda. Regolazione genica a vari livelli: livello del genoma: ("variazione di fase" nel fago Mu e in salmonella, locus MAT di lievito, antigeni di superficie in tripanosoma, geni per le IG); livello trascrizionale e post-trascrizionale; livello traduzionale. Controllo del ciclo, della crescita e della proliferazione cellulare negli eucarioti; oncogeni e cancro.

Tecniche di Biologia molecolare: Proprietà chimico-fisiche del DNA. Proprietà idrodinamiche e metodi di ultracentrifugazione: gradienti di CsCl e gradienti di saccarosio; spettrofotometria degli acidi nucleici; spettro di assorbimento; denaturazione e riassociazione della doppia elica; Cot e Rot; ibridazione DNA-RNA. Enzimi di restrizione: ruolo naturale ed uso in laboratorio; costruzione di mappe di restrizione; elettroforesi degli acidi nucleici; "Northern e Southern blot"; preparazione delle sonde radioattive. Clonaggio di sequenze di DNA: vettori di clonaggio; preparazione del DNA da clonare; formazione delle molecole ricombinanti; reinserimento in vivo delle molecole ricombinanti; metodi di selezione. Genoteche e banche di DNA. Mutagenesi sito-specifica. Metodi di sequenziamento del DNA.

Esercitazioni di laboratorio: estrazione di DNA plasmidico con mini-prep da 3 colture batteriche. Visualizzazione del DNA purificato in gel di agarosio. Quantificazione del DNA purificato tramite misura allo spettrofotometro. Digestione con enzimi di restrizione, corsa in gel di agarosio. Interpretazione dei risultati

Program

From DNA to proteins. DNA as genetic material. DNA structure. Discovery of the double helix. Alternative structures (A, B, Z) and super structures (cruciform, supercoiled, etc) of the DNA. RNA structure. Genetic code and protein synthesis. Decoding the genetic code. Translation apparatus: ribosomes, mRNA, tRNA and aminoacyl-synthetases. Translation mechanisms in procaryotes and eukaryotes: initiation, elongation and termination. Mechanisms of general and specific regulation in translation.

Organization and evolution of genes, chromosomes, and genomes. DNA content and genetic complexity; unique and repeated sequences in DNA; coding and non-coding regions in the genome; exon/intron structure in genes;

origin and evolution of introns; intron functions; organization and evolution of genic families; low-complexity regions and satellite DNA; chromosome organization and structure; centromeres and telomeres; histones, nucleosome structure and chromatin organization.

DNA replication. Semi-conservative and progressive replication; replicons, forks and origins of replication; uni- and bi-directional replicons; replicons and replication origins in prokaryotes and eukaryotes; topological models for DNA replication; discontinuous replication and Okazaki fragments; prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases; enzymes involved in DNA replication; replication control; chromatin replication. Prokaryotic and eukaryotic transposons. Basics of DNA repair mechanisms.

Transcription and transcription regulation. RNA polymerase and prokaryotic promoters; transcription and regulation in prokaryotes; the lactose Operon. RNA polymerase and eukaryotic promoters: Pol I, Pol II, and Pol III; transcription regulation in eukaryotes. Transcription factors. Termination, antitermination and attenuation. Chromatin structure and transcription: active chromatin and chromatin remodelling. DNA methylation and transcription; genetic imprinting. RNA processing. Transcript maturation in prokaryotes: T7 mRNA, E. coli rRNA and tRNA; RNA self-cleavage; the "hammerhead" ribozyme. RNA maturation in eukaryotes; modifications of rRNA; snoRNA and snoRNP. Maturation of eukaryotic mRNA: 5'G-cap and poly(A) structure, enzymatic mechanisms of capping and poly-adenylation. RNA splicing: type I and II introns; self-splicing; nuclear splicing and spliceosome; yeast tRNA splicing. RNA editing: editing in trypanosome mtRNA; editing in eukaryotic mRNA.

Complex regulations and global controls: regulation of viral cycles: the lambda phage.

Gene regulation: at the genomic level, at the transcriptional and post-transcriptional level, in translation.

Cell cycle, growth and proliferation control; cancer and oncogenes.

Laboratory techniques: chemico-physical properties of DNA. Ultracentrifugation in saccharose and CsCl gradients; spectrophotometry of NA; DNA-RNA hybridization. Restriction enzymes: in nature and in the lab. Electrophoresis, northern and southern blot; preparation of probes. DNA cloning techniques; cloning vectors; DNA purification; transformation. Site-directed mutagenesis. Methods for DNA sequencing.

Practicals: plasmid mini-prep from three bacterial cultures; Visualization of the purified DNA in agarose gel with EtBr; quantification of the mini-prep with OD260. Digestion with restriction enzymes. Agarose gel and gel electrophoresis to check digestion.

## **Svolgimento esame finale**

ITA

test scritto con 5 domande a scelta multipla + 2 domande a risposta aperta  
+ test orale a scelta dello studente

ENG

written exam with 5 multiple choice questions and two open questions  
+ oral exam upon request

## **Risultati di apprendimento attesi**

ITA

Conoscenze pratiche e teoriche di Biologia molecolare. Solida preparazione di base sulla struttura degli acidi nucleici, il codice genetico, organizzazione strutturale di geni e genomi in procarioti ed eucarioti. I meccanismi della replicazione e della trascrizione del DNA. La traduzione e meccanismi di regolazione associati. Processamento dell'RNA. Epigenetica, cancro.

ENG

Basic knowledge of practical and theoretical Molecular Biology. Strong basic knowledge of nucleic acids structure, the genetic code, structural organization of genes and genomes in prokaryotes and eukaryotes. Mechanisms of DNA replication and transcription and associated regulation. Protein translation and associated regulation mechanisms. RNA processing, epigenetics, cancer.

**Svolgimento eventuali test *in itinere***

ITA

test scritto con 5 domande a scelta multipla + 2 domande a risposta aperta  
a metà e a fine corso

ENG

written exam with 5 multiple choice questions and two open questions in the middle  
and at the end of the course