

Attività formativa:	Biochimica della Segnalazione Cellulare con laboratorio			
Modulo didattico:	Biochimica della Segnalazione Cellulare			
CFU	3			
Ore	24			
Tipo	Lezioni frontali			
TEMA	ORE COMPLESSIVE DI CIASCUN TEMA	CONTENUTI	DURATA (ORE) DI CIASCUN CONTENUTO	TIPO (F= frontale, L= Laboratorio, E=esercitazioni)
Introduzione al corso	1	Organizzazione generale del corso, del laboratorio sperimentale e modalità di verifica dell'apprendimento. Panoramica dei principali argomenti del corso. La segnalazione intracellulare oltre i recettori. Segnali ed interazioni tra organelli: il caso dei mitocondri, del reticolo endoplasmico e dei lisosomi.	1	F
La funzione mitocondriale	2	Efficienza energetica cellulare: di cosa si tratta e come si misura. Consumo di ossigeno in cellule e mitocondri isolati.	1	F
		Le caratteristiche morfologiche e funzionali del reticolo mitocondriale; diverse sonde fluorescenti per evidenziare il reticolo e misurare il potenziale elettrico sfruttando inibitori specifici e disaccoppianti.	1	F
Organizzazione dei complessi respiratori	5	I complessi/supercomplessi respiratori: cosa sono e come si isolano in condizioni native; detergenti e principi della tecnica BN-PAGE. Identificazione del respirosoma.	2	F
		Organizzazione dei complessi redox: modello solido e fluido e il "plasticity model". Modulazione dinamica dei supercomplessi nel metabolismo e nelle patologie.	2	F
		Il genoma mitocondriale: caratteristiche generali, gli aplogruppi mitocondriali. I nucleoidi: come si osservano e metodologie per identificare i componenti proteici.	1	F
Ultrastruttura	2	Microscopia elettronica e tomografia per la definizione dell'ultrastruttura dei mitocondri: definizione di cristae e cristae junctions. Biosintesi PE e cardiolipina.	1	F
		Crio-microscopia elettronica e ruolo strutturale dei dimeri di ATP sintasi; il complesso MICOS nel mantenimento delle cristae junctions.	1	F
Dinamica mitocondriale	4	Panoramica sulle GTPasi coinvolte nella dinamica del reticolo mitocondriale. Drp1: struttura, localizzazione, regolazione, interazione con RE. Le mitofusine 1 e 2: diversa topologia tra lieviti e mammiferi.	2	F
		OPA1: struttura della proteina, ruolo nella fusione, nell'ultrastruttura e nell'apoptosi. Le 8 isoforme e maturazione proteolitica. Nuovo modello in vitro per lo studio della fusione.	2	F

I secondi messaggeri intracellulari: nuove acquisizioni	6	Calcio come segnale universale. Sonde per le misure del calcio citosolico. Il "calcium signalling toolkit". Aspetti temporali e spaziali della segnalazione da calcio. Definizione dei componenti molecolari dei canali store-dependent.	2	F
		Calcio nei mitocondri: funzione dell'uniporto e identificazione di MCU. Microdomini mitocondri-ER ed esperimenti con equorina ricombinante indirizzata.	2	F
		MAMs: marcatori molecolari. Contatti mito-ER: ruolo IP3-R e VDAC per il trasporto di calcio. Effetto nel ciclo del citrato e nell'induzione autofagia. Fasi dell'autofagia.	1	F
		Misure di cAMP in vivo mediante una PKA ricombinante fluorescente. Aspetti spaziali e ruolo critico delle fosfodiesterasi. AKAP e specificità delle risposte da cAMP.	1	F
Lisosomi: una centrale strategica di segnalazione	2	I lisosomi: struttura, attività enzimatiche, componenti della membrana. Complesso mTORC1, sua localizzazione lisosomiale e attivazione. Regolazione del catabolismo/anabolismo.	1	F
		TFEB: localizzazione e attivazione di CLEAR. Meccanismi di attivazione calcio-dipendenti.	1	F
Gli oncometaboliti	2	Mitocondri e cancro: dall'effetto Warburg agli oncometaboliti. Mutazioni della succinato deidrogenasi e fumarasi e tumori. Oncometaboliti come stabilizzatori di HIF1alfa. Switch metabolico alla base dell'effetto Warburg; alterazioni molecolari degli enzimi glicolitici.	1	F

Attività formativa:	Biochimica della Segnalazione Cellulare con Laboratorio
Modulo didattico:	Laboratorio di Biochimica della Segnalazione Cellulare
CFU	3
Ore	8 ore frontali + 30 ore Laboratorio
Tipo	Laboratorio

TEMA	ORE COMPLESSIVE DI CIASCUN TEMA	CONTENUTI	DURATA (ORE) DI CIASCUN CONTENUTO	TIPO (F= frontale, L= Laboratorio, E=esercitazioni)
Le colture cellulari	4	Diverse tipologie di cellule in coltura. Descrizione della strumentazione minima necessaria. Composizione dei terreni di crescita.	2	F
		La condizioni di sterilità. Il problema delle contaminazioni. Stoccaggio delle cellule: modalità di congelamento e scongelamento. Protocolli per la tripsinizzazione e conta.	2	F
Metodologie per lo studio di funzioni cellulari	4	Spettrofotometria e misure di metaboliti, microscopia a fluorescenza in vivo e immunofluorescenza.	2	F
		Descrizione dei diversi metodi per la misura della vitalità cellulare.	2	F
Esperimento n. 1. analisi di metaboliti	10	Osservazione, tripsinizzazione, conta e semina di cellule in petri con vetrino.	3	L
		Prelievo dei terreni, congelamento e conta delle cellule.	3	L
		Deproteinizzazione dei campioni e allestimento del dosaggio spettrofotometrico di metaboliti.	4	L
Esperimento n.2. immunofluorescenza	10	Uso delle cappe e dell'incubatore. Osservazione, tripsinizzazione, conta e semina di cellule in petri con vetrino.	2	L
		Incubazione on marcatori del DNA, fissaggio dei campioni, permeabilizzaione e incubazione con anticorpo primario.	3,5	L
		Lavaggio ed incubazione con anticorpo secondario e montaggio dei vetrini sul coprioggetto.	3,5	L
		Osservazione dei campioni al microscopio a fluorescenza.	1	L
Esperimento n. 3. Vitalità cellulare	10	Allestimento dei materiali sotto cappa. Osservazione, tripsinizzazione, conta e semina di cellule in multiwells.	3	L
		Cambio terreno e calcoli degli esperimenti precedenti.	2	L
		Fissaggio delle cellule, incubazione con SRB e misura spettrofotometrica dell'assorbanza.	5	L