

---

# Testi del Syllabus

---

Resp. Did.	<b>MANTOVANI FIAMMA</b>	<b>Matricola: 009267</b>
Docenti	<b>MANTOVANI FIAMMA, 3 CFU</b> <b>RUSTIGHI ALESSANDRA, 3 CFU</b>	
Anno offerta:	<b>2017/2018</b>	
Insegnamento:	<b>221SM - LABORATORIO DI BIOLOGIA CELLULARE</b>	
Corso di studio:	<b>SM51 - SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE</b>	
Anno regolamento:	<b>2015</b>	
CFU:	<b>6</b>	
Settore:	<b>BIO/13</b>	
Tipo Attività:	<b>D - A scelta dello studente</b>	
Anno corso:	<b>3</b>	
Periodo:	<b>Secondo Semestre</b>	
Sede:	<b>TRIESTE</b>	

---

## Testi in italiano

**Lingua insegnamento** ITALIANO

**Contenuti (Dipl.Sup.)** 1. Introduzione. Tecniche di coltura cellulare in vitro. Applicazioni nella ricerca biomedica, in diagnostica e in terapia. 2. Tecniche di microscopia e applicazioni allo studio della biologia cellulare. ESPERIENZA: passaggio di cellule in coltura. 3. Analisi della proliferazione cellulare: metodi e applicazioni. Senescenza e immortalizzazione cellulare. 4. Analisi citogenetiche. 5. Trasfezione di cellule in coltura: vettori, tecniche. ESPERIENZA: trasfezione di vettori di espressione. 6. Tecniche immunochimiche. Produzione di anticorpi specifici, applicazioni sperimentali, diagnostiche e terapeutiche. ESPERIENZA: immunofluorescenza e microscopia a epifluorescenza. 7. Metodiche per l'analisi dell'interazione proteina-proteina. 8. Metodiche per l'analisi della morte cellulare. 9. Metodiche applicate nella ricerca oncologica. La medicina oncologica di precisione. Il processo di drug discovery, validazione preclinica. ESPERIENZA: saggio di migrazione cellulare in vitro. 10. Sistemi reporter in vitro e in vivo. 11. Studio della regolazione genica. Metodiche per l'analisi dell'interazione proteina-DNA. Sistemi reporter per lo studio dell'attività trascrizionale. ESPERIENZA: studio dell'attività trascrizionale di fattori di trascrizione mediante sistemi reporter. 12. Elaborazione e discussione di un progetto di ricerca

### Testi di riferimento

A. Fantoni, S. Bozzaro, G. Del Sal, S. Ferrari "Biologia Cellulare e Genetica" parte prima: BIOLOGIA CELLULARE; Piccin Nuova Libreria SpA, Padova, 2009. B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter "L' essenziale di biologia molecolare della cellula." Zanichelli editore, 2005, seconda edizione. G.M. Cooper and R.E. Hausman "La cellula: un approccio molecolare" III edizione italiana sulla

V di lingua inglese, Piccin editore, 2012. Materiale didattico di supporto: mediante il sito Moodle del corso, gli studenti hanno accesso alle diapositive mostrate a lezione, e a link a siti di approfondimento inerenti gli argomenti trattati a lezione.

## Obiettivi formativi

CONOSCENZA E COMPrensIONE. Acquisire conoscenze teoriche sulle tecniche di biologia cellulare utilizzate nella ricerca biomedica, in diagnostica e in terapia. APPLICARE CONOSCENZA E COMPrensIONE. Effettuare esercitazioni pratiche per familiarizzare con le tecniche di coltura cellulare in vitro e applicarle allo studio di processi fisiologici e patologici quali proliferazione, morte cellulare e trasformazione neoplastica. Imparare a compilare un quaderno di laboratorio per la documentazione degli esperimenti e la conservazione e discussione dei risultati. Conoscere e applicare il metodo scientifico. AUTONOMIA DI GIUDIZIO. Raccogliere ed interpretare i dati sperimentali Rilevanti, pianificare una strategia sperimentale scegliendo i controlli sperimentali adeguati. ABILITA' COMUNICATIVE. Proporre e discutere una strategia sperimentale originale.

## Prerequisiti

Gli studenti devono aver frequentato il corso di Biologia Molecolare e Cellulare ed aver appreso argomenti quali: membrane e organelli cellulari; regolazione della trascrizione; proliferazione cellulare e duplicazione del DNA; morte cellulare; trasformazione neoplastica.

## Metodi didattici

Lezioni frontali con l'ausilio di presentazioni Power Point; esperienze pratiche di laboratorio individuali e di gruppo, svolte in laboratorio didattico.

## Altre informazioni

Sul sito Moodle del corso sono disponibili: il programma dettagliato, le presentazioni PowerPoint, link a siti web di approfondimento e altro materiale didattico di supporto (solo per studenti iscritti).

## Modalità di verifica dell'apprendimento

Esame scritto su tutti gli argomenti del corso, della durata di 90 minuti, costituito da 4 sezioni, ciascuna delle quali può essere costituita da una domanda con breve risposta aperta o da 2-3 domande a riempimento o risposta multipla. Le 4 sezioni hanno lo stesso peso nella valutazione finale.

## Programma esteso

1. Tecniche di coltura cellulare in vitro: strumenti, metodi, reagenti, sterilità. Colture cellulari primarie in 2D e 3D, allestimento e manipolazione di colture di organoidi ex-vivo. 2. Tecniche di microscopia e applicazioni allo studio della biologia cellulare. Microscopio ottico, elettronico, microscopia a fluorescenza: microscopio confocale e a deconvoluzione. 3. Metodi per l'analisi della proliferazione cellulare e loro applicazioni. Analisi della capacità replicativa di cellule in coltura e della senescenza cellulare. Immortalizzazione cellulare. 4. Analisi citogenetiche. Sonde di DNA, SKY, FISH. 5. Trasfezione di cellule in coltura: vettori, tecniche chimiche, tecniche fisiche e metodi biologici (vettori retro- e lenti-virali) per l'ottenimento di trasfettanti transienti, stabili, sistemi inducibili. Esempi di applicazioni. 6. Tecniche immunochimiche. La risposta immune adattativa. Tecniche per la produzione di anticorpi specifici utilizzati in biologia cellulare per ricerca biomedica, applicazioni diagnostiche e terapeutiche. Tecniche immunochimiche per la rilevazione e il dosaggio di antigeni: ELISA, Western blot, far-western blot, protein arrays, immunoprecipitazione, immunofluorescenza e immunistochemica, immunopurificazione, citofluorimetria. Applicazioni in saggi biologici di proliferazione e di apoptosi. 7. Analisi dell'interazione proteina-proteina. Pull-down, co-immunoprecipitazione, far-western blot, ELISA, protein arrays, in situ proximity ligation assay. 8. Studio della morte cellulare. Tecniche per l'analisi di apoptosi, necrosi e autofagia. 9. Lo studio della trasformazione

neoplastica. Metodologie applicate in ricerca biomedica per lo studio di geni e processi responsabili della trasformazione tumorale e della metastasi. Saggi di trasformazione in vitro: saggi di crescita indipendente dal substrato, motilità e migrazione cellulare, invasività, angiogenesi, morfogenesi, chemioresistenza. La medicina oncologica di precisione. Il processo di Drug discovery: screening high-throughput. Saggi di tumorigenicità ex vivo, in vivo. Validazione preclinica. 10. Sistemi reporter in vitro e in vivo. 11. Studio della regolazione genica. Analisi dell'interazione proteina-DNA: ELISA, DNA footprinting, chromatin IP. Sistemi reporter. 12. Elaborazione e discussione di un progetto di ricerca sperimentale. Dati preliminari. Formulazione dell'ipotesi. Piano sperimentale. Esercitazioni: 1) passaggio di cellule in coltura. Gli studenti imparano ad utilizzare il microscopio ottico rovesciato e la cappa a flusso laminare ed eseguono individualmente le operazioni per il passaggio di cellule in coltura. 2) Sovraespressione di proteine in cellule in coltura e analisi della loro localizzazione subcellulare. Gli studenti eseguono la trasfezione di vettori per l'espressione di proteine mediante la tecnica del calcio-fosfato. In seguito eseguono un esperimento di immunofluorescenza per il riconoscimento in situ delle proteine sovra espresse e ne analizzano il risultato al microscopio a epifluorescenza. 3) Saggio di migrazione. Gli studenti studiano l'effetto di fattori solubili sulla migrazione cellulare mediante camera di Boyden. In seguito effettuano un'analisi statistica dei risultati ottenuti. 4) Studio di un fattore di trascrizione. Gli studenti analizzano e confrontano l'attività trascrizionale di due isoforme di un fattore di trascrizione in cellule in coltura mediante doppi sistemi reporter e imparano a scegliere i controlli appropriati e ad interpretare i risultati ottenuti. 5) Il metodo scientifico. Gli studenti imparano a formulare ipotesi per spiegare i risultati osservati; propongono e discutono delle linee sperimentali per confermare le ipotesi.



## Testi in inglese

	Italian
	<p>1. Introduction to in vitro cell culture methods and their research, diagnostic and therapeutic applications. 2. Microscopy techniques for cell observation. LAB EXPERIENCE: in vitro cell passaging. 3. Analysis of cell proliferation: methods and applications. Cellular senescence and immortalization. 4. Cytogenetic analyses. 5. Cell transfection: vectors, methods. LAB EXPERIENCE: transfection of expression-vectors. 6. Immunochemical techniques. Techniques for antibody production. Applications for research, diagnostics and therapy. LAB EXPERIENCE: immunofluorescence experiments and analysis by epifluorescence microscopy. 7. Analysis of protein-protein interactions. 8. Analysis of cell death. 9. Cell biology techniques in cancer research. Precision cancer therapy: the processes of drug discovery and preclinical validation. LAB EXPERIENCE: in vitro cell migration assays. 10. Reporter genes. 11. Study of transcriptional regulation. Techniques for analysis of protein-DNA interactions. Reporter systems for analysis of promoter activity. LAB EXPERIENCE: analysis of transcriptional activity by luciferase reporter assays. 12. Writing a research proposal.</p>
	<p>A. Fantoni, S. Bozzaro, G. Del Sal, S. Ferrari "Biologia Cellulare e Genetica" parte prima: BIOLOGIA CELLULARE; Piccin Nuova Libreria SpA, Padova, 2009. B. Alberts. D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter "L' essenziale di biologia molecolare della cellula." Zanichelli editore, 2005, seconda edizione. G.M. Cooper and R.E. Hausman "La cellula: un approccio molecolare" III edizione italiana sulla V di lingua inglese, Piccin editore, 2012. Through the Moodle platform, students can access the slides of the lectures and other support material.</p>

Knowledge and understanding. To know cell biology techniques and methodologies and their use in biomedical research, diagnostic and therapeutic applications. Applying knowledge and understanding. To perform lab experiences to become familiar with cell culture methods applied to the study of biological processes including cell proliferation, cell death, neoplastic transformation etc. To understand the importance and the correct use of the laboratory notebook. To apply the scientific method throughout the lab experiences. Making judgements. To collect and interpret relevant experimental data. To plan a experimental strategy, choosing appropriate controls. Communication skills. To propose and discuss a new experimental strategy.

Students should have attended the course of Molecular and Cellular Biology; they should have previous knowledge on Cell Biology topics including: cell membranes and organelles, regulation of eukaryotic gene transcription, cell proliferation, DNA replication, cell death, neoplastic cell transformation.

Oral lectures (with Powerpoint presentations); lab experiences.

The detailed syllabus, PowerPoint slides of the lectures and other teaching material will be loaded on the Moodle site of the course.

Written exam on the whole program, divided in 4 sections, each constituted by either one brief open-answer question, or 2-3 multiple choice questions. Duration: 90 minutes.

Introducing in vitro cell culture: instruments, reagents, methods, sterility. Establishing and maintaining primary cell cultures. 2D and 3D cell culture, ex-vivo organoid culture. Principles of microscopy: optical, electronic and epifluorescence microscopes, confocal and deconvolution microscopes. Analysis of cell proliferation and of cell growth arrest: quiescence, contact inhibition, Hayflick replicative limit, senescence and immortalization. Origins of genomic instability, structural mutations and aneuploidy. Karyotype, FISH and SKY analyses. Cell transfection: expression vectors, transfection techniques, retroviral and lentiviral vectors, transient and stable assays, systems for inducible expression. Immunochemical techniques. Adaptive immune response. Techniques for antibody production. Techniques for antigen visualization, dosage, purification: western blot, ELISA, IP, immunofluorescence, immunohistochemistry, cytofluorimetry, antibody-based cell purification. Applications for proliferation and apoptosis assays. Analysis of protein-protein interactions: pull-down, co-IP, far-western, protein arrays, in situ proximity ligase assay. Techniques for analysis of cell death: apoptosis, necrosis and autophagy. Cell biology techniques in cancer research. Cell transformation and tumorigenicity assays. Substrate-independent cell growth assays, motility and migration assays, matrix invasion assays, angiogenesis, 3D morphogenesis, chemoresistance assays. Personalized cancer therapy: functional screenings for selection of anticancer drugs. Reporter genes: reporter systems used to study transcriptional activity, reporters for in vivo assays (e.g. tumorigenicity assays). Study of transcriptional regulation. Techniques for analysis of protein-DNA interactions: ELISA, DNA footprinting, chromatin IP, ChIP-seq, RNA-IP. Reporter systems for analysis of promoter activity. 12. Writing a research proposal: preliminary data, hypothesis and aims, research plan. Lab experiences: 1) In vitro cell passaging. Students learn to observe growing cells by inverted optical microscope and to work under laminar flow hood. 2) Over-expression of HA-tagged proteins and analysis of their subcellular localization. Students perform calcium-phosphate transfection of expression vectors encoding several proteins with different subcellular localization. Subsequently, they perform immunofluorescence

experiments and analyze their experiments by epifluorescence microscopy. 3) Cell migration assays. Students evaluate the effect of soluble factors on cell migration by Boyden chamber assays. They subsequently perform statistical analysis of their results. 4) Study of gene regulation. Students compare the transcriptional activity of 2 isoforms of a TF differing in their C-terminal region, by using the firefly/renilla-luciferase reporters. Students learn how to choose correct experimental controls and to normalize data. 5) Applying the she scientific method. Upon analyzing the results of the previous experience, students learn to generate hypotheses to explain their observations. Subsequently, they propose an experimental strategy to validate their hypothesis, discussing it with their colleagues and with teachers.