

Testi del Syllabus

Resp. Did. **MANTOVANI FIAMMA** **Matricola: 009267**

Docente **MANTOVANI FIAMMA, 4 CFU**

Anno offerta: **2020/2021**

Insegnamento: **221SM - LABORATORIO DI BIOLOGIA CELLULARE**

Corso di studio: **SM51 - SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE**

Anno regolamento: **2018**

CFU: **6**

Settore: **BIO/13**

Tipo Attività: **D - A scelta dello studente**

Anno corso: **3**

Periodo: **Secondo Semestre**

Sede: **TRIESTE**



Testi in italiano

Lingua insegnamento ITALIANO

Contenuti (Dipl.Sup.)

Il corso si prefigge di fornire le basi teoriche e pratico/metodologiche delle principali tecniche di biologia cellulare utilizzate nella ricerca biomedica. Il corso ha inoltre l'obiettivo di insegnare la corretta compilazione del quaderno di laboratorio per la documentazione degli esperimenti e la conservazione e discussione dei dati sperimentali. Infine, il corso si prefigge di insegnare il metodo scientifico mediante l'elaborazione di un piano di ricerca sperimentale che viene attuato dagli studenti mediante un lavoro di gruppo svolto nel corso di esercitazioni successive ed infine discusso con l'intera classe.

Argomenti del corso:

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.
3. Analisi della proliferazione cellulare, senescenza e immortalizzazione cellulare: metodi e applicazioni.
4. Tecniche per il trasferimento di acidi nucleici in cellule di mammifero. Sistemi di espressione di proteine in cellule di mammifero.
5. Tecniche immunochimiche. Produzione di anticorpi specifici, applicazioni sperimentali, diagnostiche e terapeutiche.
6. Metodiche per l'analisi dell'interazione proteina-proteina.
7. Uso di sistemi reporter in biologia cellulare per lo studio della localizzazione subcellulare e della regolazione dell'espressione genica.
8. Modelli cellulari complessi nella ricerca biomedica. Metodiche di analisi

preclinica ex-vivo e in vivo.

9. Metodiche per l'analisi della morte cellulare.

10. Metodiche di biologia cellulare nella ricerca oncologica di base. Screening funzionali cell-based per la ricerca di base e per il drug discovery.

11. Applicazione del metodo scientifico alla formulazione di ipotesi scientifiche e alla stesura di un piano di ricerca sperimentale.

Esercitazioni in laboratorio:

- 1) passaggio di cellule in coltura.
- 2) trasfezione di vettori di espressione.
- 3) immunofluorescenza e microscopia a epifluorescenza.
- 4) studio della regolazione trascrizionale mediante sistemi reporter in vitro.
- 5) saggi di migrazione cellulare in vitro.
- 6) Elaborazione e discussione di gruppo di un progetto di ricerca sperimentale.

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

In accordo con i principi "Descrittori di Dublino" per i Corsi di Laurea, il corso ha l'obiettivo di consentire agli Studenti di dimostrare:

Conoscenza e comprensione.

Acquisire conoscenze avanzate e aggiornate sulle principali tecniche di biologia cellulare utilizzate nella ricerca biomedica.

Capacità di applicare conoscenza e comprensione.

Effettuare esercitazioni pratiche per familiarizzare con alcune tecniche di biologia cellulare in vitro e applicarle allo studio di processi fisiologici e patologici quali proliferazione cellulare, regolazione dell'espressione genica e trasformazione neoplastica. Imparare a compilare correttamente un quaderno di laboratorio per la documentazione degli esperimenti e la conservazione e discussione dei dati sperimentali. Conoscere e applicare correttamente il metodo scientifico.

Autonomia di giudizio.

Alla fine del corso gli studenti sapranno indicare le tecniche sperimentali più appropriate e vantaggiose per affrontare specifici problemi scientifici, scegliendo i controlli sperimentali adeguati. Gli studenti sapranno altresì raccogliere i dati sperimentali rilevanti e interpretarli, comprendendo il concetto di significatività statistica.

Questi obiettivi saranno raggiunti anche tramite la proposta di un lavoro di gruppo finalizzato alla pianificazione di una strategia sperimentale mirata alla verifica di un'ipotesi originale.

Abilità comunicative.

Durante le lezioni e le attività di laboratorio gli studenti sono incentivati a interagire tra loro e con i docenti al fine di migliorare il lessico scientifico, imparare a strutturare domande e argomentare le proprie tesi. Gli studenti impareranno a realizzare un lavoro di gruppo per elaborare una strategia sperimentale originale, che dovranno quindi proporre mediante una presentazione orale da discutere con il docente e l'intera classe.

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. Non sono previste propedeuticità per lo svolgimento dell'esame di profitto.
Metodi didattici	Lezioni frontali con l'ausilio di presentazioni Power Point; esperienze pratiche di laboratorio individuali e di gruppo, svolte in laboratorio didattico con la supervisione del docente. Discussione e correzione individuale del quaderno di laboratorio. Discussione collettiva dei dati sperimentali, elaborazione di ipotesi scientifiche e di proposte di ricerca sperimentale guidate dal docente.
Altre informazioni	Sul sito Moodle del corso sono disponibili: il programma dettagliato, le slides delle lezioni frontali, i protocolli delle esercitazioni in laboratorio, link a siti utili e altro materiale didattico, correzioni e valutazioni del quaderno di laboratorio e test di autovalutazione per la preparazione dell'esame (solo per studenti iscritti).
Modalità di verifica dell'apprendimento	<p>L'esame del corso consta di 2 parti, un colloquio orale e un compito scritto. Il voto finale risulta dalla media pesata delle due valutazioni. La valutazione, espressa in trentesimi, tiene conto del livello di conoscenza e di approfondimento degli argomenti trattati e del livello dell'esposizione.</p> <p>Colloquio orale al termine del corso. Peso: 20% Gli studenti, divisi in gruppi, dovranno organizzare una breve presentazione per rispondere a un quesito sperimentale fornito in anticipo dal docente, applicando le tecniche apprese durante il corso, e discuterla con i docenti. Durante il corso verrà insegnato agli studenti come organizzare una strategia sperimentale includendo gli opportuni controlli.</p> <p>Esame scritto. Peso: 80% Costituito da domande aperte su tutti gli argomenti del corso, della durata di 90 minuti. Durante il corso verrà spiegato agli studenti come analizzare correttamente il testo delle domande per organizzare risposte puntuali. Tramite il sito Moodle del corso verranno inoltre forniti agli studenti test di autovalutazione per la preparazione all'esame. Eventuali cambiamenti alle modalità qui descritte, che si rendessero necessari per garantire l'applicazione dei protocolli di sicurezza legati all'emergenza COVID19, saranno comunicati nel sito web di Dipartimento, del Corso di Studio e dell'insegnamento.</p>
Programma esteso	<ol style="list-style-type: none"> 1. Allestimento e mantenimento di colture cellulari in vitro e applicazioni. Strumenti, metodi, reagenti, sterilità, conservazione. 2. Osservazione di cellule e tessuti. Tecniche di microscopia ottica, a epifluorescenza, confocale e a deconvoluzione, intravitale. 3. Analisi della proliferazione cellulare: capacità replicativa, senescenza e immortalizzazione cellulare. 4. Trasferimento di acidi nucleici in cellule in coltura e in vivo. Vettori di espressione plasmidici. Promotori, indirizzamento subcellulare, espressione transiente e stabile, inducibile. Tecniche di trasfezione chimiche, fisiche e biologiche (vettori retro- e lenti-virali, trasposoni). 5. Tecniche immunochimiche. Cenni alla risposta immune adattativa. Tecniche per la produzione di anticorpi specifici. Tecniche immunochimiche per la rilevazione e il dosaggio di antigeni: ELISA, Western blot, far-western blot, immunoprecipitazione, immunofluorescenza, immunoistochimica, immunopurificazione, citofluorimetria. Applicazioni in saggi biologici. 6. Analisi dell'interazione proteina-proteina. Pull-down, co-immunoprecipitazione, far-western blot, in situ proximity ligation assay, FRET, FRAP, FLIP. 7. Sistemi reporter per l'analisi della localizzazione subcellulare e per

studi di regolazione trascrizionale.

8. Modelli cellulari complessi nella ricerca biomedica. Colture 3D, sferoidi e colture organotipiche. Manipolazioni genetiche e manipolazioni della matrice extracellulare. Organ-on-chip e human-on-chip. Cenni di regolamentazione della sperimentazione animale. Tecniche di imaging in vivo.

9. Lo studio della morte cellulare. Metodiche per l'analisi qualitativa e quantitativa di apoptosi, necrosi e autofagia.

10. Lo studio della trasformazione neoplastica. Saggi di trasformazione in vitro: saggi di crescita indipendente dal substrato, motilità e migrazione cellulare, invasività, angiogenesi, morfogenesi, chemioresistenza. La medicina oncologica personalizzata. Design e selezione di farmaci oncologici. Screening high-throughput. Saggi di tumorigenicità ex vivo, in vivo.

11. Il metodo scientifico. Elaborazione e discussione di ipotesi scientifiche formulate sulla base di conoscenze scientifiche e di dati sperimentali. Stesura di un progetto di ricerca e di un piano sperimentale.

Esercitazioni pratiche in laboratorio didattico:

1) passaggio di cellule in coltura. Utilizzo di microscopio ottico rovesciato e cappa a flusso laminare. Esecuzione individuale del passaggio in coltura, e analisi qualitative della proliferazione cellulare.

2) Sovraespressione di costrutti di espressione proteica in cellule e analisi della localizzazione subcellulare. Gli studenti effettuano esercitazioni pratiche per studiare la maturazione dei fattori di trascrizione SREBP in base alla presenza di colesterolo. Eseguono individualmente la trasfezione mediante la tecnica del calcio-fosfato. In seguito eseguono un esperimento di immunofluorescenza per il riconoscimento in situ delle proteine sovra-esprese e ne analizzano il risultato al microscopio a epifluorescenza.

3) Studio della regolazione trascrizionale. Gli studenti analizzano l'attività trascrizionale del fattore SREBP in cellule in coltura mediante doppi sistemi reporter (Luciferasi/renilla-luciferasi) e imparano a scegliere i controlli appropriati e ad interpretare i risultati ottenuti.

4) Analisi dell'effetto dei processi regolati da SREBP sulla migrazione cellulare. Gli studenti studiano l'effetto di un gene bersaglio di SREBP sulla migrazione mediante saggi con camera di Boyden, e eseguono l'analisi statistica dei risultati.

5) Il metodo scientifico.

Gli studenti imparano a formulare ipotesi per spiegare i risultati osservati e discutono con i colleghi e il docente linee sperimentali per confermare le ipotesi.



Testi in inglese

Italian

1. Introduction to in vitro cell culture: methods, instruments and applications.

2. Microscopy techniques for cell observation.

3. Analysis of cell proliferation: methods and applications. Cell senescence and immortalization.

4. Techniques for transferring nucleic acids in mammalian cells.
5. Immunochemistry techniques. Methods of antibody production. Applications for research, diagnostics and therapy.
6. Analysis of protein-protein interactions.
7. Reporter systems for the study of transcriptional regulation.
8. Complex cell systems in biomedical research. 2D e 3D cell cultures, organotypic cultures (organoids). Preclinical analyses ex-vivo and in-vivo.
9. Analysis of cell death.
10. Cell biology techniques in cancer research. Precision cancer therapy: the processes of drug discovery and preclinical validation.
11. The scientific method. How to write a research proposal.

Lab experiences:

- 1) in vitro cell passaging.
- 2) transfection of expression vectors in cultured cells.
- 3) immunofluorescence experiments and analysis by epifluorescence microscopy.
- 4) analysis of transcription regulation by luciferase reporter assays.
- 5) in vitro cell migration assays.
- 6) group work: building an experimental research plan

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.

In keeping with the Dublin Descriptors, the aim of Course is to provide a basis or opportunity to demonstrate (by Students):

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.

The exam consists of 2 parts.

The final score will be based on the knowledge acquired by the student and his/her ability of elaboration, expression and communication.

Oral exam (at the end of the course). Students (in small groups) are requested to prepare and discuss briefly with an oral presentation an experimental strategy to answer a scientific question, applying the techniques learned during the course. Weight: 20%.

Written exam on the whole program, consisting of open-answer questions. Duration: 90 minutes. Weight: 80%.

Any changes to these indications, which may become necessary to ensure the application of safety protocols related to the COVID19 emergency, will be communicated on the Department's and Degree Course websites and Lecture course Moodle page.

1. Introducing in vitro cell culture: instruments, reagents, methods, sterility, applications. Establishing and maintaining primary cell cultures.

2. Principles of microscopy: optical and epifluorescence, confocal and deconvolution microscopes.

3. Analysis of cell proliferation and of cell growth arrest; cellular senescence and immortalization.

4. Cell transfection: expression vectors, transfection techniques, retroviral and lentiviral vectors, transient and stable assays, systems for inducible expression.

5. Immunochemistry techniques.

Adaptive immune response. Techniques for antibody production. Techniques for antigen detection, dosage, purification: western blot, ELISA, immunoprecipitation, immunofluorescence, immunohistochemistry, cytofluorimetry, antibody-based cell purification. Applications for cell-based assays.

6. Analysis of protein-protein interactions: pull-down, co-IP, far-western, protein arrays, in situ proximity ligase assay, FRET, FRAP, FLIP.

7. Reporter genes: reporter systems used to study protein localization and transcriptional regulation, reporters for in vivo assays (e.g. tumorigenicity assays).

8. Complex cell systems in biomedical research.

2D e 3D cell cultures, spheroids, organotypic cultures (organoids). Genetic manipulations and use of synthetic extracellular matrices. Organ-on-chip and human-on-chip methods.

9. Study of cell death..

10. Cell biology techniques for 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.

11. The scientific method. Developing hypotheses based on scientific knowledge and preliminary data. Developing an experimental plan to validate scientific hypotheses.

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) Study of the maturation and subcellular localization of SREBP transcription factors through over-expression of HA-tagged proteins and analysis of their subcellular localization. Students perform calcium-phosphate transfection of protein-expression vectors. Subsequently, they perform immunofluorescence experiments and analyze their experiments by epifluorescence microscopy.

3) Study of gene regulation. Students analyze the transcriptional activity of the SREBP transcription factor by using the firefly/renilla-luciferase reporter assays. Students learn how to choose correct experimental controls and to normalize data. They subsequently perform statistical analysis of their results.

4) Students evaluate the effect of a SREBP-target gene on cell migration by Boyden chamber assays. They subsequently perform statistical analysis of their results.

5) Applying the scientific method.

Upon analyzing the results of the previous experiences, 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.