
Testi del Syllabus

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

Docente **MANTOVANI FIAMMA, 3 CFU**

Anno offerta: **2018/2019**

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

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

Anno regolamento: **2016**

CFU: **6**

Settore: **BIO/13**

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

Anno corso: **3**

Periodo: **Secondo Semestre**



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

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.

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 dovranno realizzare un lavoro di gruppo per elaborare una strategia sperimentale originale, quindi proporla e discuterla 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.

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

Esame scritto su tutti gli argomenti del corso, costituito da domande aperte. Durata: 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 dell'esame. Oltre al compito scritto, durante le esercitazioni di laboratorio gli studenti dovranno rispondere a specifici quesiti sull'attività svolta. Infine, vi sarà una valutazione del lavoro di gruppo.

Il voto finale deriva da una media pesata delle tre modalità di valutazione come spiegato agli studenti durante il corso e illustrato nel sito Moodle del corso.

Programma esteso

1. Tecniche di coltura cellulare in vitro. Applicazioni, strumenti, metodi, reagenti, sterilità, conservazione. Allestimento di colture cellulari primarie.

2. Osservazione di cellule e tessuti. Tecniche di microscopia ottica e microscopia a epifluorescenza. Microscopia confocale e a deconvoluzione.

3. Analisi della proliferazione cellulare, della capacità replicativa di cellule in coltura e della senescenza cellulare. Immortalizzazione cellulare.

4. Modelli cellulari complessi nella ricerca biomedica. Colture 2D e 3D, sferoidi e colture organotipiche. Manipolazioni genetiche delle cellule e della matrice extracellulare. Metodiche di analisi preclinica ex-vivo e in vivo. Organ-on-chip e human-on-chip. Cenni di regolamentazione della sperimentazione animale.

5. Trasferimento di acidi nucleici in cellule in coltura e in vivo. Vettori di espressione plasmidici. Promotori, indirizzamento subcellulare, espressione transiente e stabile, espressione inducibile. Tecniche di trasfezione chimiche, fisiche e biologiche: vettori retro- e lenti-virali, vettori derivati da trasposoni.

6. Tecniche immunochimiche. Tecniche per la produzione di anticorpi specifici. Tecniche per la rilevazione e il dosaggio di antigeni: ELISA, Western blot, far-western blot, protein arrays, immunoprecipitazione, immunofluorescenza e immunoistochimica, immunopurificazione, tecniche di citofluorimetria. Applicazioni in saggi biologici.

7. Analisi dell'interazione proteina-proteina. Pull-down, co-immunoprecipitazione, far-western blot, ELISA, protein arrays, in situ proximity ligation assay.

8. Studio della regolazione genica. Analisi dell'interazione di proteine con DNA/RNA: ELISA, DNA footprinting, chromatin IP, ChIP-seq, RNA-IP.

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

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

11. Sistemi reporter, tecniche di imaging in vivo.

12. 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:

1) passaggio di cellule in coltura. Utilizzo del microscopio ottico rovesciato e della cappa a flusso laminare.

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, seguita da un esperimento di immunofluorescenza per il riconoscimento in situ delle proteine sovra-esprese e analisi al microscopio a epifluorescenza.

3) Saggio di migrazione cellulare. Gli studenti studiano l'effetto di fattori solubili sulla migrazione cellulare mediante saggi con camera di Boyden. In seguito effettuano un'analisi statistica dei risultati ottenuti.

4) Studio della regolazione trascrizionale. Gli studenti analizzano e confrontano l'attività trascrizionale di fattori di trascrizione in cellule in coltura mediante doppi sistemi reporter (Luciferasi/renilla-luciferasi) 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; quindi propongono e discutono con i colleghi e i docenti delle linee sperimentali per confermare le ipotesi formulate.



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. Complex cell systems in biomedical research. 2D e 3D cell cultures, organotypic cultures (organoids).

5. Techniques for transferring nucleic acids in mammalian cells.

6. Immunochemistry techniques. Methods of antibody production. Applications for research, diagnostics and therapy.

7. Analysis of protein-protein interactions.

8. Techniques for analysis of protein-DNA/RNA interaction. Study of transcriptional regulation.

9. Analysis of cell death.

10. Cell biology techniques in cancer research. Precision cancer therapy: the processes of drug discovery and preclinical validation.

11. Reporter systems. In vivo imaging techniques.

12. 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) in vitro cell migration assays.
- 5) analysis of transcription regulation by luciferase reporter 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.

Knowledge and understanding.

To learn 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, consisting of open-answer questions. Duration: 90 minutes.

Questions during lab experiences. Evaluation of group work. The final evaluation takes into account all three components, as explained in the Moodle site.

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. 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.

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

6. 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 (e.g. proliferation and apoptosis assays).

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

8. Study of transcriptional regulation. Techniques for analysis of protein-DNA/RNA interactions: ELISA, DNA footprinting, chromatin IP, ChIP-seq, RNA-IP.

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. Reporter genes: reporter systems used to study transcriptional activity, reporters for in vivo assays (e.g. tumorigenicity assays).

12. 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) 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. They subsequently perform statistical analysis of their results.

5) Applying the 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.