

Testi del Syllabus

Resp. Did.	MANTOVANI FIAMMA	Matricola: 009267
Docente	RUSTIGHI ALESSANDRA	Matricola: 011146
Anno offerta:	2015/2016	
Insegnamento:	221SM - LABORATORIO DI BIOLOGIA CELLULARE	
Corso di studio:	SM51 - SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE	
Anno regolamento:	2013	
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.)	<ol style="list-style-type: none">1. Tecniche di coltura cellulare in vitro2. Osservazione di cellule in coltura mediante tecniche di microscopia3. Arresto proliferativo di cellule in coltura4. Analisi citogenetiche e cenni al mantenimento della stabilità genomica5. Meccanismi e saggi di trasformazione cellulare e di tumorigenicità6. Trasfezione di cellule in coltura7. Tecniche immunocitochimiche8. Geni reporter9. Il metodo scientifico
Testi di riferimento	nessuno
Obiettivi formativi	Acquisizione degli strumenti e delle metodologie per lo studio di processi biologici quali proliferazione, senescenza, apoptosi, trasformazione neoplastica, che vengono presentati nel corso di Biologia Molecolare e Cellulare. Familiarizzazione con le tecniche di coltura cellulare in vitro e con alcune comuni applicazioni di queste nella ricerca sperimentale e in diagnostica. Uso del quaderno di laboratorio per la documentazione degli esperimenti e dei risultati ottenuti. Introduzione al metodo scientifico.
Prerequisiti	nessuno
Metodi didattici	lezione frontale; esercitazioni pratiche in laboratorio
Altre informazioni	MATERIALE DIDATTICO DI SUPPORTO Gli studenti avranno accesso alle diapositive mostrate a lezione

Modalità di verifica dell'apprendimento

quaderno di laboratorio,
esame scritto su tutti gli argomenti del corso

Programma esteso

1. Introduzione alle tecniche di coltura cellulare in vitro: strumenti, metodi, reagenti, sterilità. Allestimento e mantenimento di colture cellulari primarie.
Esercitazione: 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. Arresto proliferativo di cellule in coltura: quiescenza, inibizione da contatto, senescenza. Capacità replicativa di cellule in coltura: senescenza cellulare. Meccanismi ed effetti sull'organismo. Immortalizzazione cellulare.
Esercitazione: saggio di senescenza
Gli studenti verificano in laboratorio i processi di senescenza ed immortalizzazione, attraverso l'esecuzione di saggi di senescenza su colture cellulari primarie a diverso numero di divisioni in coltura e su linee cellulari immortalizzate.
Esercitazione: isolamento di cloni di cellule immortalizzate allo scopo di generare linee cellulari stabilizzate.
3. Stabilità genomica, mutazioni ed alterazioni cromosomiche numeriche e strutturali. Analisi citogenetiche (cariotipo, FISH, SKY)
Esercitazione: preparazione ed osservazione di piastre metafasiche.
Gli studenti imparano a preparare piastre metafasiche da cellule in coltura e le osservano al microscopio ottico e a epifluorescenza.
4. Trasformazione cellulare: saggi di trasformazione e di tumorigenicità in vitro e in vivo. Saggi di crescita cellulare indipendente dall'adesione al substrato per valutare metastaticità.
Esercitazione: saggio del soft agar
Gli studenti verificano in laboratorio la diminuita dipendenza dall'adesività al substrato di cellule neoplastiche, attraverso l'esecuzione di saggi di soft agar su diverse linee cellulari sia tumorali che normali.
5. Trasfezione di cellule in coltura: vettori, tecniche, trasfezioni transienti e stabili.
Esercitazione: trasfezione di vettori per l'espressione di proteine mediante la tecnica del calcio-fosfato.
Gli studenti ottengono in laboratorio la sovraespressione in cellule in coltura di proteine a diversa localizzazione subcellulare in fusione con HA-tag, per la marcatura dei diversi compartimenti cellulari presentati nel corso di Biologia Cellulare 1.
6. Tecniche immunocitochimiche. Immunofluorescenza, immunopurificazione, citofluorimetria. Applicazioni nei saggi di proliferazione e di apoptosi.
Esercitazione: immunofluorescenza. Gli studenti applicano questa tecnica per il riconoscimento in situ di proteine precedentemente sovra espresse in cellule in coltura.
7. Osservazione di cellule in coltura: microscopio ottico ed elettronico, microscopia a fluorescenza: microscopio confocale e a deconvoluzione.
Esercitazione:
Gli studenti osservano la localizzazione subcellulare delle proteine precedentemente sovra espresse al microscopio a epifluorescenza.
8. Geni reporter: utilizzo di diversi sistemi reporter per analisi di: localizzazione subcellulare, saggi di attività trascrizionale, saggi di tumorigenicità in vivo.
Esercitazione: trasfezione di colture cellulari con costrutti reporter a valle di promotori costitutivi e regolati. Studio dell'attività trascrizionale di due isoforme di un fattore di trascrizione in cellule in coltura mediante doppi sistemi reporter (luciferasi/renilla-luciferasi). Gli studenti imparano a scegliere i controlli appropriati effettuando esperimenti complessi e ad interpretare i risultati ottenuti.
9. Il metodo scientifico.

Dopo l'analisi dei risultati ottenuti alla precedente esercitazione, gli studenti imparano a formulare nuove ipotesi volte a giustificare i dati osservati; passano quindi a proporre delle linee sperimentali volte a confermare le ipotesi formulate, ed a discuterle tra loro e con l'insegnante



Testi in inglese

Lingua insegnamento	Italian
Contenuti (Dipl.Sup.)	<ol style="list-style-type: none"> 1. in vitro cell culture methods 2. Microscopy techniques for cell observation 3. Cell proliferation arrest 4. Cytogenetic analyses and genomic stability 5. Mechanisms of cell transformation/tumorigenicity and in vitro/in vivo assays 6. Cell transfection 7. Immunocitochemical techniques 8. Reporter genes 9. The scientific method
Testi di riferimento	none
Obiettivi formativi	<p>The students learn commonly applied methodologies used to study biological processes including cell proliferation, senescence, neoplastic transformation etc. Students will also become familiar with in vitro cell culture methods and with common applications of these protocols in experimental cell biology research and diagnosis. The importance and the use of the laboratory notebook will be explained. The scientific method will be explained and applied throughout the lab experiences.</p>
Prerequisiti	none
Metodi didattici	lectures; lab experiences
Altre informazioni	<p>SUPPORT MATERIAL</p> <p>Students will obtain the lectures' slides</p>
Modalità di verifica dell'apprendimento	laboratory notebook, written test on entire program
Programma esteso	<ol style="list-style-type: none"> 1. Introducing in vitro cell culture: instruments, reagents, methods, sterility. Establishing and maintaining primary cell cultures. Experience: in vitro cell passaging. Students learn to observe growing cells by optical microscope and to work under laminar flow hood. 2. Cell growth arrest: quiescence, contact inhibition, Hayflick replicative limit, senescence and immortalization. Experience: senescence assay on primary cell cultures and immortalized cell lines; isolation of immortalized cell clones. 3. Origins of genomic instability, structural mutations and aneuploidy. Karyotype, FISH and SKY analyses. Experience: preparation and observation of metaphase spreads by fluorescence microscope. 4. Cell transformation and tumorigenicity assays. Substrate-independent

cell growth assays evaluate metastatic potential of transformed cells.

Experience: soft agar assay to verify loss of substrate dependence of transformed cells as compared to normal cells.

5. Cell transfection: expression constructs, transfection techniques, transient and stable assays.

Experience: Calcium-phosphate transfection of expression vectors encoding HA-tagged proteins. Students overexpress proteins with different subcellular localization to be subsequently observed.

6. Immunofluorescence, cytofluorimetry, antibody-based cell purification. Applications for proliferation and apoptosis assays.

Experience: immunofluorescence (IF). Students will perform IF with anti-HA antibody to highlight the subcellular localization of the proteins previously expressed.

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

Experience: students observe the results of their immunofluorescence experiments.

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

Experience: Students compare the transcriptional activity of 2 isoforms of a TF differing for their C-terminal regions, by using the firefly/renilla-luciferase reporters. Students learn how to choose correct experimental controls and to normalize data.

9. The scientific method.

Upon analyzing the results of the previous experience, students learn to generate an hypothesis to explain their observations. Subsequently, they propose an experimental strategy to validate their hypothesis, discussing it with their colleagues and with teachers.