

Principali informazioni sull'insegnamento	CORSI DI STUDIO DI BIOTECNOLOGIE
Denominazione insegnamento	Ingegneria Cellulare e Tissutale
Corso di studio (classe)	Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Mediche e Medicina Molecolare (LM-9)
Crediti formativi	6
Denominazione inglese	Tissue and Cell Engineering
Obbligo di frequenza	SI
Lingua di erogazione	Italiano
Anno Accademico	2019-2020

Docente responsabile		
Nome e Cognome	Serena Milano	
indirizzo email	serena.milano@uniba.it	
numero di telefono	0805442454	
Luogo e orario di ricevimento	Lunedì ore 10-12 presso il Dip. Di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica IV piano Dipartimenti Biologici, Campus	
Dettaglio insegnamento	SSD	tipologia attività
	BIO/09	Caratterizzante

Periodo di erogazione	Anno di corso		Semestre	
	I		II	
Organizzazione della didattica	Lezioni frontali	Laboratori	Esercitazioni	Totale
CFU	4	2		6
Ore totali	100	50		150
Ore di didattica assistita	32	24		56
Ore di studio individuale	68	26		94

Syllabus	
Prerequisiti	
Risultati di apprendimento attesi (declinare rispetto ai Descrittori di Dublino)	
Conoscenza e capacità di comprensione	Acquisizione di conoscenze di base sugli approcci biotecnologici finalizzati alla ingegnerizzazione di cellule al fine di produrre proteine di interesse biotecnologico e alla ingegnerizzazione di cellule per ottenere tessuti umani utili per la sperimentazione in vitro o utilizzabili nell'ambito della Medicina rigenerativa.
Conoscenza e capacità di comprensione applicate	Lo studente deve essere in grado di applicare le basi teoriche allo sviluppo di opportune strategie mirate alla ingegnerizzazione di cellule, tessuti ed organismi interi.
Autonomia di giudizio	Gli studenti del corso acquisiranno la capacità di valutare in maniera autonoma quale sia l'approccio più vantaggioso in termini di costi e risultati per ripristinare un difetto funzionale a livello cellulare e

	tissutale.
Abilità comunicative	Gli studenti del Corso acquisiranno un linguaggio tecnico e potranno discutere con patologi e clinici l'approccio biotecnologico più idoneo per produrre proteine e tessuti utilizzabili in ambito medico.
Capacità di apprendere	Gli studenti del corso svilupperanno capacità di apprendimento ed approfondimento di altre competenze mediante consultazione di materiale bibliografico. Saranno in grado di valutare criticamente gli obiettivi, i costi, le difficoltà tecniche e l'applicabilità della ingegneria cellulare in ambito medico.
Programma	
Contenuti di insegnamento	<p>Parte I°</p> <p>INGEGNERIA CELLULARE:</p> <p>Definizioni di DNA ricombinante, Ingegneria genetica, Biotecnologie, Ingegneria cellulare.</p> <p>Applicazioni delle proteine ricombinanti.</p> <p>Espressione di proteine ricombinanti in cellule procariotiche ed eucariotiche.</p> <p>Plasmidi di espressione in sistemi procariotici ed eucariotici.</p> <p>Proteine di fusione: (MBP e GST). Strategie di produzione e purificazione da sistemi batterici.</p> <p>Sistemi di espressione basati sull'Epitopo FLAG e His-tagging e purificazione su colonna Ni- Nitroacetic Acid (NTA).</p> <p>Utilizzo di promotori regolabili batterici e fagici in biotecnologia.</p> <p>Proteine di interesse terapeutico prodotte in procarioti: Vantaggi e svantaggi Esempi: insulina umana ricombinante, ormone della crescita umano, Vaccino per l'epatite B in lievito, attivatore plasminogeno tissutale, interferone Beta-1a. Siti di clivaggio per la purificazione di proteine ricombinanti.</p> <p>Produzione di proteine ricombinanti in cellule di lievito.</p> <p>Produzione di proteine ricombinanti in cellule di insetto in coltura ed infezione con baculovirus.</p> <p>Produzione di proteine ricombinanti in cellule di mammifero.</p> <hr/> <p>Sistemi di trasferimento genico: trasformazione, trasfezione, infezione</p> <p>. Trasformazione batterica e metodi di selezione Trasferimento genico in cellule eucariotiche: infezione virale, trasfezione,</p>

microiniezione.

Trasfezione di cellule in coltura: trasfezione transiente, trasfezione stabilizzata. Uso di geni "reporter" per monitorare l'efficienza di trasfezione. Principali tecniche di trasfezioni per cellule in coltura: DEAE-Destrano, precipitazione del DNA con fosfato di calcio, Elettroporazione, microiniezione, lipidi cationici. Metodi per l'analisi di espressione di proteine eterologhe (tecniche immunochimiche, GFP, RT-PCR).

Principi di base della microscopia confocale per l'analisi dell'espressione di proteine eterologhe.

Cellule staminali:

Definizione di rigenerazione e riparazione. Definizione e classificazione in totipotenti, pluripotenti, multipotenti. Tipi di cellule staminali: Embrionali, fetali, cellule staminali del cordone e della placenta, cellule staminali adulte. Derivazione delle cellule staminali embrionali

Clonaggio terapeutico e riproduttivo:

Strategie di clonaggio terapeutico e riproduttivo: Tecnica del trasferimento nucleare. Vantaggi ed ostacoli all'uso di cellule staminali embrionali. Cellule staminali adulte: principali caratteristiche e comportamento proliferativo. Esempi di cellule staminali adulte: epidermide, cellule staminali del midollo osseo (emopoietiche e mesenchimali).

Metodi di isolamento di cellule staminali del midollo osseo: isolamento su gradiente di percoll, espansione in coltura. Differenziamento delle cellule staminali del midollo in senso mesenchimale. Potenziale utilizzo delle cellule staminali nella medicina rigenerativa:

Silenziamento genico:

Definizione del meccanismo di RNA interference. Enzimi intracellulari coinvolti nel processo: DICER, complesso multiproteico RISC (RNA-Induced Silencing Complex).

Lunghezza e scelta della posizione degli siRNA.

Vettori di espressione per la produzione di siRNA: strategie, shRNA, vettori plasmidici e virali.

Espressione in vitro ed in vivo.

Disegno sperimentale dell'utilizzo

Parte II°

INGEGNERIA TISSUTALE E MEDICINA RIGENERATIVA

Obiettivi dell'ingegneria tissutale: Invecchiamento tessuti, patologie, test in vitro.

Terapie impiantabili ed extracorporee.

Definizione di impalcature (scaffold). Caratteristiche dello scaffold Principali molecole utilizzate come scaffold: polimeri sintetici, biopolimeri (collagene, acido ialuronico, poliidrossialcanoato). Scaffolds per tessuti duri: Ceramiche, materiali compositi.

L'utilizzo delle cellule staminali in ingegneria tissutale e medicina rigenerativa.

Pelle Ingegnerizzata:

Alcuni esempi di pelle ingegnerizzata: Dermagraft: fibroblasti umani su scaffold biodegradabile di acido polilattico. Integra: Dermal regeneration template. Apligraf: epidermide pluristratificata (derma, epidermide, strato corneo)

OrCel: fibroblasti e cheratinociti umani con una matrice di collagene bovino Controlli di sicurezza, vantaggio della cocultura fibroblasti/cheratinociti Limiti della pelle ingegnerizzata.

Cartilagine ingegnerizzata:

Danni alla cartilagine e terapie convenzionali. Esempi di cartilagine ingegnerizzata: Impianto di condrociti autologhi senza scaffold. Tecniche per la rigenerazione della cartilagine articolare.

Tessuto osseo:

Danni all'osso e terapie convenzionali. Scaffolds utilizzati per osso ingegnerizzato. Therics

Vasi sanguigni, struttura e funzione:

Requisiti dei vasi sanguigni ingegnerizzati Esempi di vasi sanguigni ingegnerizzati: Electrospun collagen, scaffold biodegradabile, vasi ingegnerizzati con componente cellulare (fibroblasti e cellule endoteliali) autologa per shunt artero-venosi in emodialisi.

Pancreas ingegnerizzato:

Terapie correnti. Parametri per la progettazione di pancreas ingegnerizzato Esempio: pancreas microincapsulato in foglietti.

Epiteli ingegnerizzati per prove tossicologiche in vitro:

Culture tissutali organotipiche. Test di tossicità su colture cellulari umane.

Fegato bioartificiale:

Dispositivi di fegato Bio-artificiale.
Principi di funzionamento ed esempi.

Valvole cardiache ingegnerizzate:

Valvole meccaniche e valvole tissutali: vantaggi e svantaggi Valvole cardiache tissutali: approcci di progettazione (rigenerazione/ripopolazione).

Vescica urinaria ingegnerizzata:

Patologie che compromettono la funzionalità della vescica. Vescica urinaria ingegnerizzata: protocolli e trials.

ANIMALI TRANSGENICI:

Tecniche per ottenere animali transgenici come modello di patologie umane:

Microiniezione nel pronucleo maschile; Metodo delle cellule staminali embrionali ingegnerizzate (trasfezione e selezione positiva e negativa);
Animali knockout condizionali.

	<p>Il sistema della recombinasi Cre-Lox.</p> <p>Animali transgenici ottenuti mediante tecnologie di “Gene Editing”: Il sistema CRISPR/Cas9</p> <p>LABORATORI:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Produzione e purificazione di proteine di fusione in Escherichia Coli. Utilizzo in campo biotecnologico. - Mantenimento di colture cellulari stabilizzate - Metodiche di trasfezione per cellule eucariotiche: lipidi cationici ed elettroporazione. - Analisi di proteine ricombinanti eterologhe. - Genotipizzazione di animali knockout condizionali ottenuti con la tecnologia CRE-Lox.
Testi di riferimento	<p>Biotecnologia Molecolare Autori: Glick e Pasternak, Zanichelli editore</p> <p>Fondamenti Di Ingegneria Dei Tessuti Per La Medicina Rigenerativa, Autori mantero, Remuzzi, Raimondi, Ahluwalia, Pàtron Editore</p>
Note ai testi di riferimento	
Metodi didattici	<p>Lezioni effettuate con l’ausilio di proiezione di schemi e tabelle forniti al docente insieme al testo di riferimento e contenuti multimediali (video e pubblicazioni scientifiche di approfondimento). Verrà inoltre analizzato il materiale divulgativo multimediale fornito da Company italiane ed estere coinvolte nella progettazione, produzione e distribuzione reagenti e tecnologie per l’ingegneria cellulare e tessuti ingegnerizzati.</p>
Metodi di valutazione (scritto, orale, prove in itinere)	Esame orale
Criteri di valutazione (per ogni risultato di apprendimento atteso su indicato, descrivere cosa ci si aspetta lo studente conosca o sia in grado di fare e a quale livello al fine di dimostrare che un risultato di apprendimento è stato	<p>Attraverso il colloquio orale previsto ci si aspetta che lo studente sia in grado di discutere criticamente, con metodo scientifico e con linguaggi tecnico:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Il tipo di microorganismo più idoneo per produrre proteine di interesse biotecnologico - L’approccio più vantaggioso, sicuro e rapido per produrre tali proteine - Le difficoltà tecniche prevedibili e l’approccio per aggirarle - I protocolli tecnici e le strategie di marketing utilizzate da

raggiunto e a quale livello)	company Biotech impegnate nella produzione di tessuti ingegnerizzati. - La valutazione critica dei limiti di alcuni tessuti ingegnerizzati presenti sul mercato e gli obiettivi della ricerca futura per superarli.
Altro	