

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	2018-2019

Docente responsabile		
Nome e Cognome	Pisani Francesco	
indirizzo email	francesco.pisani@uniba.it	
numero di telefono	080 544 2673	
Luogo e orario di ricevimento	Lunedì ore 9:30 presso il Dipartimento di Bioscienze Biotecnologie e Biofarmaceutica, IV piano, Nuovo Palazzo dei Dip. 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	Lo studente deve essere in grado di comprendere le basi teoriche della ingegneria cellulare e tissutale
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 e organismi interi.
Autonomia di giudizio	
Abilità comunicative	
Capacità di apprendere	

Programma

<p>Contenuti di insegnamento</p>	<p><u>INGEGNERIA CELLULARE</u></p> <p>Introduzione all'ingegneria cellulare Definizione, Obiettivi, Definizione di DNA ricombinante e proteine ricombinanti</p> <p>Strategie per l'espressione di proteine ricombinanti Progettare efficacemente un processo di espressione di proteine ricombinanti. Ospiti procariotici ed eucariotici</p> <p>Espressione in <i>E.coli</i> Quando esprimere in <i>E.coli</i>. Vantaggi e svantaggi. Controllo della espressione in <i>E.coli</i>: Operone Lac, Sistema T7RNAPol/IPTG, Promotori Pl e regolazione termica. Stabilità della proteina ricombinante: Modificazioni N terminali, Ceppi carenti in proteasi, Mutanti per RNaseE, Secrezione della proteina. Stabilità del costrutto di espressione: Intergrazione per ricombinazione nel DNA genomico. Attenuazione del carico metabolico: sistema ALS. Corpi di inclusione e strategia relative. Esempi di produzione di materiali commerciali mediante microorganismi modificati.</p> <p>Espressione in Lieviti Identificazione di marcatori auxotrofici: LEU2. Vettori di espressione: vettori integrativi, YEP, YRP, YCP, YAC. Complessità genomica e ricombinazione omologa. Gene-targeting e transplacement. Espressione della superossidodismutasi (SOD). <i>Pichia Pastoris</i>: vettori di espressione e regolazione metilotrofica.</p> <p>Espressione in cellule di insetto Baculovirus: ciclo biologico, costrutti di espressione. Generazione di baculovirus ricombinanti. Diverse strategie per l'espressione in cellule di insetto</p> <p>Espressione in ovociti di <i>Xenopus laevis</i> Vantaggi. Sviluppo di un vettore di espressione opportuno. Trascrizione in vitro. Iniezione del cRNA. Misure funzionali in ovociti</p> <p>Espressione in cellule di mammifero Linee cellulari primarie e secondarie. Marcatori genetici dominanti per cellule di mammifero. Resistenza ad antibiotici tossici. Costrutti di espressione e strategie alternative Espressione in monolayer e in sospensione per la produzione su larga scala. Espressione indotta: Tetracycline (Tet) Inducible Expression system</p> <p>Tecniche di trasferimento genico in procarioti ed eucarioti</p> <p>Trasformazione batterica Trattamento con fostato di calcio e cellule chemiocompetenti, shock termico.</p> <p>Trasferimento genico in cellule di mammifero Polimeri carichi, Optoperforazione, Complessi Lipidici carichi, Elettroporazione, Microiniezione, Infezione virale</p>
----------------------------------	--

Struttura dei retrovirus ricombinanti. Trasfezione transiente e stabile: uso dei marcatori genetici dominanti. Geni reporter per monitorare l'efficienza di trasfezione.

Rivelare e saggiare la proteina di interesse

Identificare il trascritto: RT-PCR quantitativa (qPCR), Northern blot, Ibridazione in situ.

Identificare la proteina: Western Blot, ELISA, Immunofluorescenza (cenni di microscopia super-resolution)

Analisi di una popolazione cellulare: Identificare e isolare le cellule esprimenti in una popolazione mista mediante Citometria di flusso e FACS.

Saggi funzionali: migrazione cellulare, invasività.

Cellule staminali

Definizioni. Totipotenza, pluripotenza, multipotenza. Tecniche di isolamento di cellule staminali embrionali. Segnali di differenziamento. Accenni di legislatura europea. Isolamento di staminali adulte (FACS). Metodologie di identificazione. Metodologie di ingegnerizzazione e riprogrammazione (induced pluripotency stem cells, IPS cells)

SILENZIAMENTO GENICO

Meccanismo di RNA interference (RNAi). Complessi enzimatici 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. RNAi in vitro ed in vivo: strategie sperimentali

Generazione di animali transgenici

Generazione animali transgenici. Uso di cellule ES trasfettate. Microiniezione nel pronucleo maschile. Strategie per creare topi KO e KI costitutivi e condizionali. CRISPR/Cas System

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

	<p>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.</p> <p>Cartilagine ingegnerizzata:</p> <p>Danni alla cartilagine e terapie convenzionali. Esempi di cartilagine ingegnerizzata: Impianto di condrociti autologhi senza scaffold. Tecniche per la rigenerazione della cartilagine articolare.</p> <p>Tessuto osseo:</p> <p>Danni all'osso e terapie convenzionali. Scaffolds utilizzati per osso ingegnerizzato. Therics</p> <p>Vasi sanguigni, struttura e funzione:</p> <p>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.</p> <p>Pancreas ingegnerizzato:</p> <p>Terapie correnti. Parametri per la progettazione di pancreas ingegnerizzato Esempio: pancreas microincapsulato in foglietti.</p> <p>Epiteli ingegnerizzati per prove tossicologiche in vitro: Colture tissutali organotipiche. Test di tossicità su colture cellulari umane.</p> <p>Fegato bioartificiale:</p> <p>Dispositivi di fegato Bio-artificiale. Principi di funzionamento ed esempi.</p> <p>Valvole cardiache ingegnerizzate:</p> <p>Valvole meccaniche e valvole tissutali: vantaggi e svantaggi Valvole cardiache tissutali: approcci di progettazione (rigenerazione/ripopolazione).</p> <p>Vescica urinaria ingegnerizzata:</p> <p>Patologie che compromettono la funzionalità della vescica. Vescica urinaria ingegnerizzata: protocolli e trials.</p>
Testi di riferimento	Materiale didattico: diapositive e dispense autorizzate e fornite dal docente
Note ai testi di riferimento	
Metodi didattici	
Metodi di valutazione	PROVA ORALE

(scritto, orale, prove in itinere)	
Criteria 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 raggiunto e a quale livello)	
Altro	