

BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI (A000208)

1. lingua insegnamento/language

Italiano.

2. contenuti/course contents

Coordinatore/Coordinator: Prof. ARCOVITO ALESSANDRO

Anno di corso/Year Course: I

Semestre/Semester: 1°

CFU/UFC: 9

Moduli e docenti incaricati /Modules and lecturers:

- BIOCHIMICA ANALITICA (A000226) - 3 CFU - SSD BIOS-07/A - Prof. Federica Iavarone, Matteo Bordini, Alessandro Arcovito
- BIOTECNOLOGIE MICROBICHE (A002569) - 2 CFU - SSD MEDS-03/A - Prof. Francesca Bugli
- PROTEINE RICOMBINANTI (A002568) - 2 CFU - SSD BIOS-08/A - Prof. Andrea Urbani, Concetta Santonocito
- TECNICHE DI TRASFERIMENTO GENICO E TERAPIA GENICA (A000228) - 2 CFU - SSD MEDS-01/A - Prof. Giuseppe Marangi

3. testi di riferimento/BIBLIOGRAPHY

BIOCHIMICA ANALITICA

- Metodologie biochimiche e biomolecolari. Strumenti e tecniche per il laboratorio del nuovo millennio. Mauro Maccarrone Zanichelli (2019)

PROTEINE RICOMBINANTI

- Biotecnologie Molecolari principi e tecniche (Terry A. Brown) – Zanichelli 2017

TECNICHE DI TRASFERIMENTO GENICO E TERAPIA GENICA

- Mauro Giacca, Terapia genica Springer 2011

BIOTECNOLOGIE MICROBICHE

- Biotecnologie Microbiche – S. Donadio, G. Marino - Casa Editrice Ambrosiana

Verrà inoltre fornito materiale didattico integrativo, sottoforma di articoli scientifici e fonti telematiche appropriate, per completare, approfondire ed aggiornare i contenuti trattati a lezione.

4. obiettivi formativi/LEARNING OBJECTIVES

Il corso integrato mira ad approfondire la conoscenza specialistica di argomenti attinenti alle moderne biotecnologie molecolari in ambito delle tecniche di biochimica analitica ad elevata processività, delle metodiche di ingegneria genetica e biologia molecolare per la produzione di proteine ricombinanti e le applicazioni di terapia genica.

Al termine del corso integrato lo studente dovrà dimostrare di avere acquisito i seguenti obiettivi:

Conoscenza e capacità di comprensione - dimostrare di conoscere e saper comprendere le

problematiche relative alle moderne Biotecnologie Molecolari necessarie per la caratterizzazione dei profili omici associati alle patologie umane e per lo sviluppo di moderne tecniche di ingegneria genetica, attraverso la comprensione dei meccanismi di ricombinazione genica nei microrganismi ed al loro utilizzo in sistemi biotecnologici

Conoscenza e capacità di comprensione applicate – dimostrare di sapere interpretare e comprendere adeguatamente i risvolti applicativi delle Biotecnologie Molecolari evidenziandone le potenzialità traslazionali in campo diagnostico e terapeutico, attraverso l'identificazione dei determinanti genetici dei processi biologici, con particolare riferimento ai meccanismi di patogenicità microbica, per lo sviluppo di vaccini ricombinanti e la messa a punto di terapia biologiche innovative.

Autonomia di giudizio – sapere integrare le conoscenze e le competenze apprese per identificare le Biotecnologie Molecolari più opportune alla determinazione di profili diagnostici/prognostici di malattia e allo sviluppo di protocolli terapeutici innovativi.

Abilità comunicative – saper comunicare in modo chiaro e privo di ambiguità, utilizzando correttamente il linguaggio tecnico, le proprie conclusioni nonché le conoscenze e la ratio a esse sottese a interlocutori specialisti e non specialisti.

Capacità di apprendere – essere in grado di aggiornarsi e di ampliare le proprie conoscenze attingendo in maniera autonoma a testi, articoli scientifici e piattaforme online e banche dati (NCBI, Ensemble, UniProt, PDB etc). Deve acquisire in maniera graduale la capacità di seguire seminari specialistici, conferenze, master etc.

5. prerequisiti/prerequisites

È necessario che gli studenti abbiano acquisito le conoscenze relative alle discipline di base previste nei corsi di laurea triennale propedeutici a questa classe di laurea, con particolare riferimento a: Biochimica, Biologia Molecolare, Microbiologia e Genetica.

6. metodi didattici/TEACHING METHODS

La metodologia didattica si basa su lezioni frontali erogate fornendo sia gli elementi di base delle varie discipline che le prospettive applicative. Le lezioni si basano su modalità interattive, integrando alla didattica standard attività improntate all'apprendimento attivo, quali: “*problem-based learning*”, “*self-learning*”, e “*case study*”. I metodi didattici utilizzati in questo corso sono disegnati per consentire allo studente di perseguire gli obiettivi formativi, in virtù delle seguenti caratteristiche:

Conoscenza e capacità di comprensione – la didattica frontale tratterà sistematicamente tutti gli argomenti elencati nel programma di seguito dettagliato, soffermandosi sugli aspetti più rilevanti ed imprescindibili, in modo da fornire agli studenti il quadro completo degli argomenti integrati ed il corretto metodo di studio per rafforzare le conoscenze teoriche.

Conoscenza e capacità di comprensione applicate – il ricorso ad esempi pratici, esercitazioni in aula e “*case study*” consente agli studenti di apprendere le potenzialità applicative degli argomenti trattati. In particolare, per il modulo di Biochimica Applicata, saranno proposte agli studenti situazioni nelle quali dovranno decidere quali tecniche analitiche utilizzare per risolvere alcuni quesiti scientifici

Autonomia di giudizio - i metodi di apprendimento attivo implementati in questo corso sono concepiti per consentire allo studente la capacità di formulare concetti ed idee in maniera autonoma.

Abilità comunicative – i metodi di apprendimento attivo e la costante interazione con il docente durante le lezioni frontali saranno condotte in maniera da consentire allo studente la progressiva acquisizione di abilità comunicative mirate all'esposizione di argomenti di chimica e biologia con la corretta terminologia scientifica.

Capacità di apprendere – l'utilizzo di materiale didattico integrativo, anche sotto forma di articoli della letteratura scientifica internazionale, consentiranno allo studente di intraprendere studi successivi con un alto grado di autonomia.

7. altre informazioni/OTHER INFORMATION

Sono disponibili presso i Dipartimenti e le relative Sezioni a cui afferiscono i docenti del corso, delle tesi di laurea sperimentale da svolgersi presso i laboratori di ricerca presenti all'interno dell'Università Cattolica del Sacro Cuore e della Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli – IRCCS.

I docenti ricevono su appuntamento concordato via e-mail.

Prof. Alessandro Arcovito alessandro.arcovito@unicatt.it

Prof. Matteo Bordi matteo.bordi@unicatt.it

Prof.ssa Federica Iavarone federica.iavarone@unicatt.it

Prof. Andrea Urbani andrea.urbani@unicatt.it

Prof. Concetta Santonocito concetta.santonocito@unicatt.it

Prof.ssa Francesca Bugli francesca.bugli@unicatt.it

Prof. Giuseppe Marangi giuseppe.marangi@unicatt.it

8. modalità di verifica dell'apprendimento/METHODS FOR VERIFYING LEARNING AND FOR EVALUATION

La modalità di verifica dell'apprendimento prevederà da parte dei diversi docenti responsabili degli insegnamenti erogati, la realizzazione di prove in itinere, sotto forma di assegnazioni o verifiche con test a risposta multipla o mediante l'ausilio di applicativi quali Labster e JOVE per la realizzazione di laboratori virtuali. Ciascun modulo attribuirà un punteggio in trentesimi per il superamento di tali prove e la prova risulterà sufficiente con un voto minimo di 18/30.

Lo studente che durante il semestre partecipasse con successo a tutte le prove, otterrebbe un voto che è la media delle prove suddette. Se la media delle prove è maggiore o uguale a 30/30, la commissione potrà attribuire la votazione di 30 e lode su parere unanime dei docenti del corso. Nel caso che lo studente o la studentessa non partecipasse a una delle prove in itinere di uno dei moduli del corso, o nel caso in cui il risultato fosse insufficiente o non soddisfacente per lo studente o la studentessa, egli/ella dovrà sostenere una prova di esame orale secondo le regole riportate di seguito su tutti i moduli:

La prova d'esame consiste di prova orale, che verterà sui contenuti dei moduli del corso ed a cui verrà attribuito un punteggio risultante dalla media ponderata del risultato ottenuto in ogni modulo. Il punteggio finale massimo (30/30 e lode) verrà attribuito solo in presenza di unanimità di giudizio

da parte della Commissione.

L'obiettivo della prova d'esame così organizzata consiste nel valutare l'acquisizione da parte dello studente delle seguenti capacità e conoscenze:

Conoscenza e capacità di comprensione- dell'appropriato livello di conoscenza degli argomenti previsti dal programma e la comprensione del ruolo delle diverse tecniche molecolari studiate;

Conoscenza e capacità di comprensione applicate - dell'abilità nel collegare concetti teorici di microbiologia, biochimica e biologia molecolare all'ambito diagnostico e terapeutico

Autonomia di giudizio - della capacità di effettuare collegamenti trasversali sugli argomenti trattati;

Abilità comunicativa - dell'adeguata padronanza e proprietà di linguaggio e terminologia tecnico/scientifica corretta;

Abilità di apprendere - delle capacità di approfondire tematiche di interesse biotecnologico molecolare in maniera autonoma e di utilizzare ragionamento critico.

9. programma esteso/program

Biochimica analitica

Tecniche cromatografiche: principi generali, risoluzione e piatti teorici. Cromatografia su colonna. Cromatografia di adsorbimento e ripartizione. Cenni sulla TLC: cromatografia bidimensionale. Cromatografia a scambio ionico di proteine. Cromatografia ad esclusione (gel filtrazione). Cromatografia di affinità. Immunoaffinità. HPLC. Tecniche di spettrometria di massa: Introduzione alla spettrometria di massa e principi generali; Sorgenti di ioni: tecniche di ionizzazione hard e soft Analizzatori di massa: quadrupolo, trappola ionica, tempo di volo, settore magnetico ed elettromagnetico. Spettrometria di massa a trasformata di Fourier: analizzatore Orbitrap e a risonanza ionica ciclotronica. Strumenti ibridi. Rivelatori e acquisizione dati Accoppiamento della spettrometria di massa con tecniche cromatografiche, gassose e liquide. Introduzione alla spettroscopia di assorbimento e fluorescenza. Tecniche elettroforetiche: principi generali, fattori che influenzano la mobilità elettroforetica. Elettroforesi in fase libera. Elettroforesi zonale su acetato di cellulosa; proteine seriche. Elettroforesi su gel: PAGE, PAGE-SDS, Agarosio. Metodi di rivelazione e valutazioni quantitative. Blotting - Western blotting nello studio delle proteine: applicazioni biochimiche e diagnostiche. Focalizzazione isoelettrica (IEF). Elettroforesi capillare Elettroforesi bidimensionale. Tecniche spettroscopiche per la determinazione dell'affinità di legame: risonanza plasmonica di superficie e stopped flow. Tecniche immunochimiche. Cenni di struttura degli anticorpi e di reazione antigene-anticorpo Metodi di analisi: reazione di immunoprecipitazione in fase libera ed in gel, immunodiffusione; metodi radioimmunologici: RIA; dosaggi immunoenzimatici, ELISA. Aspetti generali dei test di laboratorio: caratteristiche analitiche e diagnostiche (ad es., variabilità biologica, valori di riferimento, valori desiderabili e livelli decisionali) tipologia dei diversi campioni biologici e delle relative modalità di campionamento (preparazione del paziente al prelievo; fattori che influenzano i parametri analitici). Variabilità analitica e post-analitica. Criteri di attendibilità del dato. Precisione e accuratezza. Tipi di errore e loro cause. Ripetibilità e riproducibilità. Deviazione standard e coefficiente di variazione (CV), LOQ, LOD. Precisione e accuratezza; Specificità e sensibilità

analitiche e diagnostiche. Valori predittivi. Prevalenza ed incidenza. Valutazione di una metodica analitica. Curva operativa caratteristica (ROC).

Proteine ricombinanti

Produzione di proteine ricombinanti: Introduzione alla produzione di proteine ricombinanti; Tecniche di clonaggio e vettori di espressione; Sistemi "cell free" per l'espressione di proteine; Espressione in sistemi procariotici (Gram negativi e Gram positivi); Espressione in E. coli; Fermentazione di E. coli: ottimizzazione del processo con strumenti genetici e fisiologici.; Strategie per aumentare l'espressione delle proteine solubili: procedure da adottare per minimizzare la formazione di corpi di inclusione; Espressione in sistemi eucariotici: Pichia, Saccharomyces; Espressione in sistemi eucariotici: cellule di insetto e di mammifero. Purificazione: Preparazione del campione. Estrazione e chiarificazione. Metodi di rottura delle cellule e produzione degli estratti grezzi iniziali. Metodi di solubilizzazione delle proteine. Tamponi salini. Tecniche di frazionamento e precipitazione. Filtrazione, dialisi, concentrazione del campione. Conservazione della proteina purificata. Ingegneria Proteica: rational design de novo protein design (di strutture e funzioni): metodi ed esempi Rational design: teoria e metodi sperimentali. Esempi Molecular docking: teoria ed esempi Ingegnerizzazione della stabilità delle proteine: teoria, metodi ed esempi

Tecniche di trasferimento genico e terapia genica

- Introduzione: Generalità, definizioni, breve storia della terapia genica.
- Principali applicazioni di terapia genica delle malattie ereditarie (malattie delle cellule staminali ematopoietiche, fibrosi cistica, emofilia, distrofia muscolare, talassemia).
- Terapia genica dei tumori: aspetti specifici della terapia genica dei tumori. Trasduzione di cellule normali e cellule tumorali. Vettori per cellule proliferanti. Efficienza della trasduzione ed effetto bystander. Terapia genica del fenotipo trasformato. Geni iperespressi nelle cellule tumorali. Terapia genica della neoangiogenesi tumorale. Immunoterapia genica dei tumori.
- Terapia genica per le malattie neurodegenerative: Morbo di Parkinson, morbo di Alzheimer, ALS, corea di Huntington

Biotecnologie Microbiche

Meccanismi di ricombinazione genica nei batteri e variabilità genetica. Il genoma batterico: caratteristiche e generalità. Plasticità del genoma batterico. Genomica, genomica comparativa e funzionale.

Epidemiologica molecolare: principi ed applicazioni. Ricombinazione e Recombineering. Basi molecolari della ricombinazione sito-specifica ed omologa. Il sistema Lambda Red e sue applicazioni: allelic exchange; gene knock-out; epitope- tagging. Transposon mutagenesis. Signature-tagged mutagenesis. CRISPR. Gene reporter technology: IVET, RIVET. Principi, sistemi ed applicazioni. Meccanismi di patogenicità microbica. Regolazione dei geni di virulenza. Sistemi di secrezione. Identificazione di fattori di virulenza. Vettori eucariotici. Vaccinazione a DNA: principi, meccanismo d'azione, metodologie, applicazioni. Vettori replicativi. Gli alphavirus come vettori; I plasmidi replicativi. I Vaccini Vivi ed attenuati: I sistemi virali come strumenti per lo sviluppo di nuovi vaccini; principi, metodologie applicazioni. I Vaccini Vivi ed attenuati: Salmonelle, Shigelle, Vibrio, BCG; principi, metodologie ed applicazioni. I vaccini a subunità: cenni storici,

principi, metodologie ed applicazioni. Reverse vaccinology: principi ed applicazioni. Gli esempi di *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus agalactiae*. Piante transgeniche: principi ed applicazioni. Fagi e terapia fagica.