

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

FACOLTA' DI **SCIENZE MM.FF.NN.**
CORSO DI LAUREA IN **BIOTECNOLOGIE**
RELAZIONE DELLE LEZIONI DI :

Metodi analitici per l'identificazione e caratterizzazione delle cellule staminali tumorali

IMPARTITE DAL PROF. **Giambra Vincenzo**

ANNO ACCADEMICO: **2012-2013**

Corso compatto o esteso: ***corso compatto***

Numero delle lezioni che dovevano impartirsi secondo il calendario **3 CFU;**

Numero delle lezioni effettivamente impartite: **18 ore totali**

Numero delle esercitazioni: **6 di 2 ore (12 ore totali)**

**Il corso è compatto se le lezioni sono impartite nell'arco di metà a.a., è esteso se le lezioni sono impartite durante l'a.a.*

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

ANNO ACCADEMICO 2012-2013
PROGRAMMA DEL CORSO UFFICIALE

di Biotecnologie.

tenuto dal Prof. Giambra Vincenzo.

TITOLO DEL CORSO

**Metodi analitici per l'identificazione e caratterizzazione delle cellule
staminali tumorali**

:

Ore settimanali di lezione 10 dalle ore 11:00 alle ore 13:00

Ore settimanali delle esercitazioni 10 dalle ore 11:00 alle ore 13:00 o dalle ore 15:00 alle ore 17:00

nei giorni di Lunedì, Martedì, Mercoledì, Giovedì e Venerdì.

Le lezioni dei “Metodi analitici per l’identificazione e caratterizzazione delle cellule staminali tumorali” sono state tenute dal Prof. Vincenzo Giambra a seguito del progetto dei “Messaggeri della Conoscenza” (decreto direttoriale del 21 settembre 2012 n.567) e sono state parte integrante del corso di Laurea Triennale e Magistrale in Biotecnologie della Facoltà di Scienze MM.FF.NN di Palermo. L’attività didattica é stata della durata complessiva di trenta ore ed é stata svolta dal 21/5/2013 al 7/6/2013 presso le aule e i laboratori del Dipartimento STEBICEF dell’Università degli studi di Palermo. L’intero corso é stato suddiviso in tre parti: 1) dieci ore di lezioni in forma seminariale e frontale; 2) otto ore di attività progettuale e d’analisi a seguito della lettura di un articolo scientifico rilevante nel campo delle cellule staminali tumorali e 3) dodici ore d’attività pratica di laboratorio.

La prima lezione frontale é stata svolta il 21/5/2013 dalle ore 11:00 alle ore 12:00. Erano presenti quindici studenti. Durante questa lezione é stato introdotto il corso, spiegate le finalità del progetto dei “Messaggeri della Conoscenza” ed illustrato il programma inerente al ciclo delle lezioni. Il 22/5/2013 dalle ore 11:00 alle ore 13:00 sono state tenute due ore di lezioni frontali in presenza di dieci studenti. L’argomento della lezione riguardava la definizione di cellula staminale e cellula staminale tumorale con alcuni riferimenti alle proprietà di potenza (o “*potency*”) e di auto-rinnovamento (o “*self-renewal*”) tipiche di queste popolazioni cellulari. Sono state anche descritte alcune tecniche comunemente utilizzate per lo studio dell’attività di “*self-renewal*” quali la “*Limiting Dilution Analysis (LDA)*”, “*Cloning Forming Assay (CFC)*”, “*Matrigel and Mammosphere Assays*”. Nella lezione del 23/5/2013 (dalle 11:00 alle 13:00), in presenza di otto studenti sono stati affrontati alcuni problemi biologici irrisolti riguardanti il modello delle cellule staminali. In particolar modo sono stati definiti i processi di “*engraftment*” ed “*homing*”. Nella stessa lezione sono state descritte alcune tecniche impiegate per lo studio delle interazioni tra DNA e proteina come la “*Chromatin Immunoprecipitation*” (ChIP) e DNA-DNA come la “*Chromosome Conformation Capture Analysis*”. Il 24/5/2013 dalle ore 11:00 alle ore 13:00 in presenza di sette studenti sono stati illustrati alcuni pathway molecolari coinvolti nella regolazione dell’attività di “*self-renewal*” in alcune popolazioni di cellule staminali tumorali. In particolar modo sono stati descritti i pathway biologici di BCR-ABL, MLL-AF9, WNT/ β -Catenin e NOTCH. Nella seconda parte di questa lezione sono stati descritti i principali elementi dei vettori virali, comunemente utilizzati nella manipolazione genetica di cellule tumorali. Il 27/5/2013 in presenza di sette studenti sono state tenute una lezione frontale (dalle 11:00 alle 13:00) ed un’esercitazione di laboratorio bioinformatico (dalle 15:00 alle 17:00). L’argomento della lezione frontale riguardava la descrizione delle tecniche utilizzate per lo

studio e l'isolamento di popolazioni cellulari. In particolar modo sono stati illustrati i principi base della citofluorimetria di flusso, "sorting" e massacitometria. Nella seconda parte di questa lezione sono state anche descritte le principali metodologie impiegate per il sequenziamento del DNA (dalla tecnica di Sanger a quelle di terza e quarta generazione). L'argomento dell'esercitazione di laboratorio bioinformatico ha riguardato la descrizione del software dChip e del database GEO per l'analisi di dati microarray per la creazione di profili d'espressione genica. Sono stati analizzati i dati microarray riportati in Winter SS et al. *Blood* 2007. Il 28/5/2013 in presenza di sette studenti sono state svolte una lezione frontale (dalle 11:00 alle 12:00) ed un'attività progettuale (dalle 15:00 alle 17:00). Nella lezione frontale sono stati illustrati alcuni meccanismi biologici che caratterizzano il funzionamento delle cellule staminali tumorali nelle leucemie di tipo T durante la crescita tramite la produzione di fattori di crescita. Nella fase progettuale due studenti del corso hanno presentato una proposta di ricerca innovativa dopo la lettura dei seguenti lavori: Diehn M. et al., *Nature*, 2009 e Zhao C. et al., *Nature*, 2009. Il 29/5/2013 dalle 11:00 alle 13:00 si è svolta un'altra attività progettuale in presenza di sette studenti. Le proposte di ricerca presentate da due studenti del corso si basavano sui seguenti articoli: Klinakis A. et al., *Nature*, 2011 e Cicalese A. et al., *Cell*, 2009. Il 30/5/2013 dalle 11:00 alle 13:00 in presenza di sette studenti si è tenuta un'altra attività progettuale. Gli articoli presi in esame sono stati Lagadinou E.D. et al., *Cell Stem Cell*, 2013 e Shimono Y. et al., *Cell*, 2009. L'ultima attività progettuale si è svolta il 31/5/2013 dalle 11:00 alle 13:00 in presenza di sette studenti. Gli articoli letti e analizzati sono stati Colmone A. et al., *Science*, 2008; Ding L. Et al., *Nature*, 2012 e Kreso A. et al., *Science*, 2013. Il 3/6/2013 dalle 11:00 alle 13:00 in presenza di sette studenti si è svolta la seconda attività di laboratorio bioinformatico. Durante questa esercitazione è stato descritto il software FlowJo per l'analisi di dati citofluorimetrici e illustrato come fare una compensazione per fluorofori quali FITC e PE e come analizzare popolazioni cellulari attraverso "gates" a struttura gerarchica. L'attività di laboratorio del 4/6/2013 (dalle 11:00 alle 13:00 con sette studenti) ha previsto l'amplificazione di quattro esoni del gene NOTCH attraverso una reazione di polimerizzazione a catena (PCR) per l'identificazione delle principali mutazioni correlate a questo gene nelle leucemie di tipo T. Il 5/6/2013 (dalle 11:00 alle 13:00) si è svolta un'altra attività pratica di laboratorio con sette studenti. Questa ha riguardato la transfezione di cellule aderenti (i fibroblasti PAF3) con vettori d'espressione modificati utilizzando il procedimento per precipitazione salina con calcio fosfato. Il 6/6/2013 dalle 11:00 alle 13:00 si è tenuta la penultima esercitazione pratica di laboratorio durante la quale è stato

mostrato come eseguire una marcatura di linee cellulari leucemiche (quali JURKAT e RAJI) per recettori di membrana con anticorpi coniugati a fluorescenza per un'analisi citofluorimetrica. Gli anticorpi utilizzati sono stati CD7-FITC e CD19-APC per distinguere le cellule tumorali di tipo T da quelle di tipo B. Durante questa esercitazione é stato anche mostrato il citofluorimetro FACsCanto™ (BD Biosciences).L'ultima attività di laboratorio si é svolta il 7/6/2013 dalle 11:00 alle 13:00 in presenza di sette studente. Questa ha riguardato la marcatura di fibroblasti PAF3 tenuti in coltura con o senza siero per un giorno per l'analisi citofluorimetrica di marcatori intracellulari di proliferazione quali Ki67 e Propidio Ioduro (PI). Durante il corso di quest'attività sono stati analizzati tramite FlowJo dati citofluorimetrici già acquisiti di proliferazione di popolazioni cellulari sottoposte a trattamenti farmacologici diversi.