



# UNIVERSITÀ DI PISA

---

## CORSO AVANZATO DI BIOLOGIA CELLULARE

**MICHELA ORI**

Anno accademico **2023/24**  
CdS **BIOLOGIA MOLECOLARE E  
CELLULARE**  
Codice **294EE**  
CFU **6**

Moduli CORSO AVANZATO DI BIOLOGIA CELLULARE	Settore/i BIO/06	Tipo LEZIONI	Ore 48	Docente/i MICHELA ORI
---	---------------------	-----------------	-----------	--------------------------

### Obiettivi di apprendimento

#### *Conoscenze*

Il corso si prefigge di approfondire a livello molecolare i meccanismi chiave che regolano la biologia cellulare come proliferazione e check points, apoptosi, necrosi, necrosi regolata, interazione cellula-matrice, autofagia, senescenza/invecchiamento e differenziamento. In ogni lezione verranno anche spiegate le attuali tecniche in uso per la biologia cellulare dai saggi di proliferazione ai lineage tracing o knock out inducibili. Gli studenti apprenderanno inoltre a leggere e interpretare i lavori scientifici pubblicati sulle più importanti riviste internazionali nel campo.

#### *Modalità di verifica delle conoscenze*

Non sono previste prove in itinere o pre-esame

#### *Capacità*

Al termine del corso lo studente avrà le basi per intraprendere un percorso scientifico in moltissimi aspetti della biologia cellulare, della biomedicina e delle neuroscienze. Sarà in grado di analizzare in maniera autonoma e critica la letteratura internazionale nel campo.

#### *Modalità di verifica delle capacità*

Lo studente affronterà un esame finale in cui saranno discussi vari aspetti esaminati durante il corso con anche discussione degli articoli scientifici presentati a lezione.

#### *Comportamenti*

Lo studente potrà acquisire e/o sviluppare sensibilità alle problematiche della biologia cellulare e della biomedicina

Lo studente saprà come si legge e come è costruito un manoscritto scientifico pubblicato

Saranno acquisite, almeno in maniera teorica, le metodologie necessarie per affrontare uno studio in biologia cellulare.

Agli studenti sarà data la possibilità durante il corso di portare a lezione lavori pubblicati inerenti gli argomenti trattati a lezione e, solo su base volontaria, di illustrarli brevemente ai loro colleghi in modalità journal club. Questo aiuta a sviluppare capacità critiche, di comunicazione e di discussione degli argomenti alla luce delle più recenti scoperte.

#### *Modalità di verifica dei comportamenti*

Lo studente affronterà un esame finale in cui saranno discussi vari aspetti esaminati durante il corso con anche discussione degli articoli scientifici presentati a lezione.

#### *Prerequisiti (conoscenze iniziali)*

Al fine di una migliore fruizione del corso è consigliabile avere un'idea chiara di come è fatta una cellula (citologia) e dei meccanismi di base della biologia molecolare (trascrizione, traduzione, replicazione del DNA etc...)

#### *Indicazioni metodologiche*

lezioni frontali, con ausilio di slide, filmati, etc.

sito di elearning del corso per scaricamento materiali didattici e comunicazioni docente-studenti

gli studenti possono contattare il docente per commenti, chiarimenti o quant'altro in qualsiasi momento via email, al termine di ogni lezione o in



Programma (contenuti dell'insegnamento)

1. Presentazione del Corso e illustrazione degli argomenti che saranno presentati. Testi consigliati. Come si cerca un articolo scientifico. Come è costruito un articolo scientifico e come si legge.
2. Introduzione al ciclo cellulare: da Flemming alla microscopia confocale. Metodologie per visualizzare cellule in proliferazione: dall'incorporazione di timidina triziata alla BrdU e la EdU. Descrizioni delle fasi del ciclo cellulare. Entrata in mitosi: l'MPF (mitosis promoting factor). Identità molecolare dell'MPF. Le cicline. I lieviti come modello per lo studio del ciclo cellulare. Mutanti cdc e temperatura sensibili nel lievito.
3. Fasi della mitosi. Il complesso APF per l'uscita dalla mitosi. Meccanismo di degradazione delle cicline. Coesine, securina e separasi. Check point in G1. Come viene regolato a livello molecolare il passaggio G1/S. Restriction point e fattori di crescita. La via di Ras. Geni di risposta precoce e tardiva. Ruolo del complesso ciclinaD/cdk4/6. Retinoblastoma: funzioni nella cellula normale e nei tumori. Il complesso ciclinaE/cdk2.
4. Fase S e ciclina A. Inibitori del ciclo cellulare. Knock out p27 e p57. Famiglia inibitori INK4 (p16). Ruolo degli inibitori del ciclo cellulare durante lo sviluppo, nella cellula adulta e nella tumorigenesi. Dagli studi in vitro agli studi in vivo: esempio del knockout della cdk2. La sovraespressione di DYRK1A (dual specific tyrosin y regulated kinase1) è associata a sindrome di Down. Come è stato studiato il suo ruolo? Elettroporazione nella spinal cord di pollo, elettroporazione in utero nel telencefalo di topo e cellule in coltura. DYRK1A è necessario e sufficiente a promuovere espressione di p27 e quindi a spingere i neuroblasti ad uscire precocemente dal ciclo cellulare. Il ruolo di Notch e Delta nel differenziamento neuronale.
5. Ruolo di DYRK1A nel differenziamento neuronale. (vedi lavori forniti come materiale didattico). Checkpoints del ciclo cellulare: check point del danno al DNA e checkpoint del fuso mitotico. Struttura di p53. Segnali che attivano p53. p53 e blocco del ciclo in G1-G2. Nelle cellule normali p53 è mantenuto inattivo: ruolo di MDM2 e attività ubiquitina -ligasi. P53 e MDM2 formano un ciclo di autoregolazione a feedback. Stabilizzazione di p53 mediante fosforilazione.
6. Come fa p53 a "sentire" un danno al DNA? ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) ed ATR sono due chinasi che sono rapidamente attivate in seguito ad un danno al DNA. Il riconoscimento ed il riparo di rotture sul DNA coinvolge la partecipazione di diversi gruppi di proteine. Il complesso MRE11. BRCA1 e BRCA2 sono coinvolti nel riparo di rotture sulla doppia elica del DNA. Mutazioni in questi geni danno predisposizione ereditaria per il tumore al seno. p53 può indurre sia arresto del ciclo che apoptosi. La scelta dipende dal grado di acetilazione di p53: ruolo di MYST.
7. Trangenesi binaria. Strategie di knockout tessuto specifico e tempo inducibile. Il sistema cre-loxp e cre-ER. p53 come target terapeutico. Strategia genetica per lo spegnimento e la riaccensione di p53: il sistema CRE-loxP inducibile. In linfoma ed osteosarcomi la riaccensione di p53 fa regredire il tumore ma con un meccanismo diverso in base al tumore. p53 e cellule staminali. le cellule staminali cancerose. Strategia per definire l'origine cellulare di tumori alla pelle dell' intestino, del polmone della prostata della mammella in modelli di topo: Genetic Lineage-tracing Strategy (lavori inclusi nel materiale didattico).
8. Il check point del fuso mitotico. Separazione cromatidi fratelli: Amfitelica, monotelica, sintelica, merotelica. Il centrosoma. Formazione e organizzazione del fuso mitotico. Cinetocore e microtubuli. I cinetocori attivano il SAC: Spindle Assembly Checkpoint. La proteina Mad2 si accumula ai cinetocori non attaccati ed è la molecola chiave del checkpoint. Mad2 ha due stadi conformazionali: il "Mad2 template model". L' attacco non corretto dei cinetocori (sintelico e merotelico) può essere corretto: la chinasi Aurora B. Mutazioni nei geni del checkpoint del fuso possono causare aneuploidie e instabilità cromosomica, caratteristiche di molti tumori umani.
9. Tipi di morte cellulare: apoptosi, necrosi e necrosi regolata. Esempi di apoptosi fisiologica durante sviluppo embrionale e morphogenesi. Metodi per visualizzare apoptosi: DNA ladder e tecnica TUNEL. Identificazione dei pathways apoptotici da c. elegans ai vertebrati. Pathway intrinseco dell'apoptosi. Apoptosoma e caspasi iniziatrici ed effettrici. La famiglia BCL2. Ruolo di Bax, BaK, BH3 only e citocromo c. Proteine XIAP e Smac/Diablo
10. Fenotipo Knock out per Apaf-1 e caspasi. Fattori neurotrofici e sopravvivenza neuronale. La terza via apoptotica: lo stress al reticolo endoplasmatico. Via estrinseca dell'apoptosi: i recettori di morte e loro ligandi. Formazione del complesso DISC. Bid mette in comunicazione via estrinseca ed intrinseca dell'apoptosi. cFLIP e vFLIP. I recettori "Decoy" modulano il segnale di morte TRAIL. Progettazione di farmaci che siano in grado di modulare (indurre o bloccare) apoptosi a fini terapeutici.
11. Necrosi regolata. Necrostatine. Identificazione del pathway molecolare della necroptosis: Proteine RIP 1 e RIP3 e MLKL. Necrosi indotta da alterata permeabilità mitocondriale (MPT). Ciclofilina D. Necrosi mediata da PARP1 (Parthanatos). Necrosi dipendente dal ferro (Ferroptosis). Autofagia: introduzione e cenni generali. Tipi di autofagia e loro ruolo.
12. Geni implicati nell'autofagia: autophagy-related genes (ATG). Il processo autofagico mediato dai lisosomi degrada proteine solubili e proteine organizzate in forma aggregata. Autofagia e degradazione di organelli e microorganismi. Microautofagia, macroautofagia e autofagia mediata da chaperone. Processi fisiologici e patologici in cui è implicata autofagia. Regolazione dei processi autofagici da parte dell'insulina. Formazione degli autofagosomi. La chinasi TOR. La rapamicina. Mitofagia: ruolo di Pink e Parkin. Invecchiamento cellulare. L'invecchiamento è regolato da specifiche vie di trasduzione del segnale e da fattori di trascrizione. Mutanti daf2 in c. elegans. Invecchiamento e restrizione calorica. Invecchiamento e autofagia. Cellule senescenti mostrano un declino funzionale dei mitocondri. Ruolo delle sirtuine. Proprietà del resveratrolo. Progeria come paradigma per la medicina traslazionale.
13. Hippo pathway. Scoperta di mutanti in Drosophila e fenotipo associato alla crescita incontrollata dei tessuti. Componenti del pathway (Hippo, salvador, watsr, yorky etc) e loro orologi nei vertebrati fino all'uomo. Knock out tessuto specifico di Mst1/2. Vie di regolazione dell'Hippo pathway: polarità apico-basale, meccano-trasduzione, Rho-GTPases, wnt signaling. Ricerca di farmaci capaci di agire selettivamente su Yap and Taz. (MICHELA ORI)
14. Transizione epitelio-mesenchimatica: caratteristiche morfologiche e molecolari nello sviluppo embrionale e nella progressione tumorale Collegamento tra regolazione EMT e Hippo pathway: ruolo di Zeb1 e YAP nella progressione del tumore al seno (vedi articolo Nature 2016 allegato materiale didattico). Introduzione ai componenti principali e alle funzioni della matrice extracellulare.
15. Aggrecano e versicano: Ruoli nello sviluppo e nella vita adulta. Versicano e rigenerazione assonale. Lavoro condroitinasi ABC. Proteoglicani e medicina rigenerativa. Approfondimento:lavoro su Nature 2015 "Modulation of the proteoglycan PTPdelta promotes



## UNIVERSITÀ DI PISA

recovery after spinal cord injury" (fornito nel materiale didattico). Matrice extracellulare e cancro.

16. Cellule staminali e cellule staminali neurali. Cellule staminali nella corteccia cerebrale in sviluppo. Cellule staminali neuroepiteliali (NES). Single-cell RNA-sequencing per studiare la complessità cellulare. Modeling della microcefalia indotta da infezione da Zika virus. Zika virus, ciclo cellulare, centrosomi e microcefalia. Screening per farmaci usando cellule NES.
17. Rimodellamento della matrice extracellulare: le metalloproteasi e gli inibitori (TIMP) delle metalloproteasi. Discussione del lavoro "Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice" Nature 2017. Rimodellamento matrice nella progressione tumorale, nell'infiammazione e rigenerazione tissutale. Discussione del lavoro "Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration" Neuron 2014.
18. Sviluppo e neurogenesi nella corteccia cerebrale. Cellule staminali nella corteccia cerebrale in sviluppo. Divisioni simmetriche e asimmetriche. Specificazione del destino cellulare. Migrazione neuronale negli strati corticali. Maturazione, sinaptogenesi. Cellule staminali embrionali come sorgente di neuroni in vitro. Derivazione di neuroni corticali da cellule staminali pluripotenti. Differenziamento di neuroni corticali precoci e tardivi. Analisi trascrizionale dei neuroni generati in vitro. Maturazione funzionale dei neuroni corticali. Esempio di trapianto
19. Concetti base sul differenziamento cellulare. Concetto di totipotenza, multipotenza e precursori. Divisioni simmetriche e asimmetriche. I tre foglietti embrionali. Esempio di differenziamento in vitro: le cellule beta del pancreas. Basi su struttura e sviluppo embrionale del pancreas. Determinazione dei precursori pancreatici multipotenti: ruolo di Pdx1 e neurogenina3. Discussione del lavoro "Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro" Cell 2014 e "Generation of stem cell-derived  $\beta$ -cells from patients with type 1 diabetes" Nat. Communication 2016.
20. Approcci di terapia cellulare in malattie neurodegenerative. Storia del trapianto cellulare nei pazienti Parkinson e Huntington. Degenerazione dei neuroni dopaminergici nella malattia di Parkinson. Il trapianto con cellule fetali nel Parkinson. Generazione di neuroni dopaminergici da cellule staminali embrionali umane. Protocollo, caratterizzazione molecolare e funzionale. Trapianto nei modelli di Parkinson murini e di primati non umani. Corea di Huntington e degenerazione dei neuroni striatali. Derivazione di neuroni striatali da cellule staminali embrionali umane e iPS. Caratterizzazione molecolare e funzionale e trapianto in modello murino di Huntington.
21. Differenziamento della cellula muscolare: Ruolo di MyoD, Myf5 e geni Pax. Studio del ruolo del gene Six1 durante la miogenesi nel topo. Miogenesi nell'adulto: cellule satelliti. Differenziamento delle cellule endoteliali: determinazione della tip cell. Meccanismi di inibizione laterale: il signaling notch-delta. Sistemi di chemoattrazione e chemorepulsione per la navigazione dei nuovi capillari.
22. Meccanismi cellulari della retinogenesi. Cenni su istologia e diversità neuronale nella retina. Cenni su sviluppo dell'occhio e della retina. Multipotenza delle cellule staminali retiniche. Timing retinogenetico. Fattori intrinseci ed estrinseci influenzano il destino dei retinoblasti. Accoppiamento tra ciclo cellulare e differenziamento. Generazione in vitro di una retina 3D da cellule staminali embrionali murine. Validazione molecolare e studio della morfogenesi. Esempi di applicazioni cliniche nelle retinopatie.
23. Approfondimento segnali di comunicazione cellula-cellula per la compartimentalizzazione di specifici territori: esempio segregazione arterio-venosa, le efrine. Conclusioni del corso, riassunto dei punti salienti fondamentali per gli esami. Modalità di esame e appelli.

### Bibliografia e materiale didattico

*Libro: "Biologia molecolare della cellula"* di Bruce *Alberts*. Gli articoli scientifici e le review usate per integrare il corso sono inserite nel materiale didattico del corso su elearning.

### Indicazioni per non frequentanti

Gli studenti non frequentanti potranno acquisire tutto il materiale necessario per superare brillantemente l'esame nel materiale didattico su elearning.

### Modalità d'esame

L'esame prevede una prova orale ma può essere fatto in forma scritta su richiesta dello studente.

### Stage e tirocini

Studenti di questo corso potranno chiedere di svolgere il loro internato di tesi presso il Laboratorio di Neurobiologia dello Sviluppo gestito dalla Prof.ssa Ori presso l'unità di biologia Cellulare e dello Sviluppo del Dipartimento di Biologia.

### Note

Commissione di Esame:

Prof.ssa Michela Ori, Prof. Marco Onorati, Dott.ssa Martina Orefice (cultore della materia)

Membri supplenti:

Prof. Ugo Borello, Dott.ssa Silvia Savoli (cultore della materia), Dott.ssa Giulia Salamone (cultore della Materia)

Ultimo aggiornamento 28/11/2023 10:55