Corso integrato: BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI E CELLULARI

Coordinatore: Prof.ssa Rossella Menghini

DOCENTI: PROTEOMICA E CHIMICA DELLE FERMENTAZIONI: Prof.ssa Rossella Menghini (4 CFU)**, IMMUNOTECNOLOGIA** Prof. Carmine Stolfi (2 CFU), **BIOLOGIA APPLICATA:** Prof.ssa Silvia Anna Ciafrè (2 CFU)

RECAPITI e-mail: menghini@med.uniroma2.it; carmine.stolfi@uniroma2.it; ciafre@uniroma2.it

LUOGO E ORARIO DI RICEVIMENTO: Facoltà di Medicina, F sud, stanza 241. su appuntamento (Prof.ssa R. Menghini); stanza F102, Edificio F sud, I° piano, su appuntamento (Prof. C. Stolfi); stanza E60, edificio E nord, piano 0, su appuntamento (Prof.ssa S. A. Ciafrè)

SSD: BIOS-09/A , CHEM-07/C, BIOS-10/A

CFU: 8

ANNO DI CORSO: I anno

PROPEDEUTICITÀ: nessuna

MODALITÀ DI FREQUENZA: Fortemente raccomandata.

OBIETTIVI FORMATIVI:

CONOSCENZA E CAPACITÀ DI COMPRENSIONE

Il corso prepara gli studenti alla comprensione teorica e pratica delle principali tecnologie che riguardano la produzione di anticorpi ricombinanti e frammenti anticorpali ad attività diagnostica e terapeutica e le tecniche di separazione in alta risoluzione di proteine da miscele complesse e le loro applicazioni in campo medico. Inoltre il corso mira all'apprendimento di alcuni aspetti di biochimica, biologia molecolare, microbiologia e chimica delle fermentazioni e delle principali metodologie e strategie utilizzate nello sviluppo di processi industriali di interesse biotecnologico e alla conoscenza delle diverse metodologie di spettrometria di massa (MS) e delle loro applicazioni. Gli studenti dovranno infine aver compreso i concetti principali della biosintesi e della modalità di azione dei microRNA, oltre che l'importanza di questi ultimi in fisiologia e nella patologia.

CAPACITÀ DI APPLICARE CONOSCENZA E COMPRENSIONE

Le conoscenze apprese si dovranno tradurre nella comprensione di come si possa intervenire biotecnologicamente per misurare i microRNA come marcatori biologici o per modularli come bersagli terapeutici; per comprendere il meccanismo molecolare di produzione e funzione di

alcuni anticorpi ricombinati più utilizzati in clinica sia per uso diagnostico che terapeutico; per comprendere ed utilizzare in campo medico le tecniche di separazione in alta risoluzione di proteine da miscele complesse; per delineare strategie di utilizzo e manipolazione di microrganismi nella produzione industriale, con particolare interesse alo sviluppo di prodotti farmaceutici; per interpretare spettri MS e protocolli analitici e risolvere eventuali problematiche legate alla natura della MS.

AUTONOMIA DI GIUDIZIO

Durante il corso delle lezioni si favorirà l'acquisizione di autonomia di giudizio stimolando domande e discussioni in aula sugli argomenti inerenti la produzione di repertori molecolari e la funzione degli anticorpi ricombinanti in biomedicina e le tecniche di separazione in alta risoluzione di proteine da miscele complesse. Gli studenti dovranno essere in grado di giudicare autonomamente l'applicabilità delle conoscenze apprese in ambito biotecnologico e descrivere strategie volte allo sviluppo di processi di fermentazione industriale e allo sviluppo di metodi di MS con analisi dettagliata dei parametri critici e delle risoluzioni di eventuali problematiche.

CAPACITÀ DI APPRENDIMENTO

La capacità di apprendere e di comunicare degli studenti sarà verificata attraverso continue interazioni tra docente e studenti in aula e promuovendo discussioni e domande. Gli studenti dovranno essere in grado di spiegare ad altri ciò che hanno appreso e come impiegherebbero le conoscenze acquisite per esempio per la scelta, utilizzo e manipolazione di microrganismi nella produzione industriale di prodotti biologici e proteine eterologhe di interesse clinico e farmacologico. Il livello di apprendimento degli studenti sarà verificato tramite un elaborato scritto e un colloquio orale, in cui le nuove conoscenze acquisite verranno inserite in un contesto più ampio di conoscenze di biochimica, biologia molecolare, microbiologia e chimica delle fermentazioni e dei meccanismi molecolari delle immunotecnologie.

CONTENUTI DEL CORSO

BIOLOGIA APPLICATA (16 ore/ 2 CFU)

Rilevanza degli RNA non codificanti nella complessità fenotipica eucariotica. MicroRNA: la storia della loro scoperta; biogenesi, processamento e loro regolazione; ruolo come regolatori fini dell'espressione genica eucariotica; modalità di riconoscimento dei target e modalità di azione. MicroRNA e cancro: ruolo come oncogeni e oncosoppressori; esempi specifici e meccanismi che portano ad espressione aberrante di specifici microRNA nei tumori; microRNA e processo di metastatizzazione: esempi specifici. Interazioni tra microRNA e RNA non codificanti: il caso dei ceRNA (competing endogenous RNA). Applicazioni biotecnologiche dei microRNA: utilizzo di siti target per microRNA per indirizzare l'espressione di transgeni in maniera tessuto-specifica; metodi per inibire l'espressione di microRNA endogeni o per reintegrare l'espressione di microRNA persa in condizioni patologiche. MicroRNA nei liquidi biologici: origine e utilizzo come marcatori di patologie; metodi per la rilevazione e misurazione; esempi specifici. Classi di piccole molecole di RNA non codificanti che possono essere impiegati

in biotecnologia per inibire o modificare l'espressione di geni endogeni: siRNA, antisenso, oligonucleotidi che inibiscono la traduzione, oligonucleotidi che modificano lo splicing ecc. I sistemi CRISPR-Cas: basi molecolari e impiego in biotecnologie.

IMMUNOTECNOLOGIA (16 ore/ 2 CFU)

Le immunotecnologie verso un sistema immunitario artificiale. Anticorpi policlonali, monoclonali e ricombinanti. Dagli anticorpi monoclonali alle librerie fagiche: metodi di produzione e selezione di frammenti anticorpali in vitro. Il sistema del fago filamentoso M13 e la selezione degli anticorpi dalle librerie fagiche. Diversi tipi di immunità: immunità attiva e passiva. Applicazione degli anticorpi ricombinanti in clinica. Farmacocinetica degli anticorpi e dei frammenti anticorpali. Anticorpi terapeutici nelle patologie umane: terapie anti-virali, in oncologia (esempi tipo il Trasduzumab/Herceptin) e nelle malattie neurodegenerative. Gli anticorpi intracellulari: indirizzamento di anticorpi ricombinanti in differenti compartimenti intracellulari e loro modalità d'azione. Esempi di applicazioni. Immunotossine e immunoconiugati.

PROTEOMICA (16 ore/ 2 CFU)

Introduzione alle scienze omiche. Purificazione e Tecniche di separazione in alta risoluzione di proteine da miscele complesse. Elettroforesi bidimensionale. Spettrometria di Massa, principi di base, sorgenti, analizzatori e rivelatori. Concetti base della tandem mass spectrometry. CID – Collision induced dissociation. ETD ed ECD. Spettrometria di Massa LC-MS e MS/MS di proteine e peptidi, analizzatori ibridi Q-TOF, triplo quadrupolo e trappole ioniche. Utilizzo della tandem massa nel monitoraggio della terapia farmacologica. Sequenziamento delle proteine mediante MS. Peptide Mass Fingerprinting. Interpretazione dei dati di MS e MS/MS per sequenze proteiche. Proteomica quantitativa (SILAC, ICAT, TMT, ITRAQ, etc). Metabolomica

CHIMICA DELLE FERMENTAZIONI (16 ore/ 2 CFU)

Sviluppo di processi di fermentazione industriale. Produzione di enzimi. Produzione di acidi organici. Produzione di amminoacidi. Produzione di vitamine. Produzione di antibiotici. Produzione di probiotici. Produzione di farmaci biotecnologici.

METODI DIDATTICI

Lezioni frontali

MODALITÀ DI VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

Prova scritta con domande a risposta aperta seguita da colloquio orale. La prova di esame sarà valutata secondo i seguenti criteri:

Non idoneo: importanti carenze e/o inaccuratezza nella conoscenza e comprensione degli argomenti; limitate capacità di analisi e sintesi, frequenti generalizzazioni.

18-20: conoscenza e comprensione degli argomenti appena sufficiente con possibili imperfezioni; capacità di analisi sintesi e autonomia di giudizio sufficienti.

21-23: Conoscenza e comprensione degli argomenti routinaria; Capacità di analisi e sintesi corrette con argomentazione logica coerente.

24-26: Discreta conoscenza e comprensione degli argomenti; buone capacità di analisi e sintesi con argomentazioni espresse in modo rigoroso.

27-29: Conoscenza e comprensione degli argomenti completa; notevoli capacità di analisi, sintesi. Buona autonomia di giudizio.

30-30L: Ottimo livello di conoscenza e comprensione degli argomenti. Notevoli capacità di analisi e di sintesi e di autonomia di giudizio. Argomentazioni espresse in modo originale.

TESTI DI RIFERIMENTO

Per seguire il corso è necessario conoscere bene le basi della Biologia Molecolare e Cellulare. Gli argomenti trattati sono descritti in articoli selezionati dalla letteratura scientifica più aggiornata, i cui testi verranno forniti agli studenti dal docente.

Chimica e biotecnologia delle fermentazioni industriali. Autore: Michele M. Bianchi Edizioni Nuova Cultura

Biotecnologie microbiche. Autori: Stefano Donadio, Gennaro Marino Casa Editrice Ambrosiana

Principi di Biotecnologie Mediche e Farmaceutiche. Autori: Francesca Calabrese, Giorgio Racagni. Edra edizioni

MOLECULAR AND CELLULAR BIOTECHNOLOGIES

COORDINATOR: Prof. Rossella Menghini

TEACHERS: PROTEOMICS AND FERMENTATION CHEMISTRY: Prof. Rossella Menghini (4 CFU), **IMMUNOTECHNOLOGY:** Prof. Carmine Stolfi (2 CFU), **APPLIED BIOLOGY:** Prof. Silvia Anna Ciafrè (2 CFU)

E-mail ADDRESS: menghini@med.uniroma2.it; carmine.stolfi@uniroma2.it; ciafre@uniroma2.it

RECEIVING STUDENTS - PLACE AND HOUR: Faculty of Medicine, F south, room 241. By appointment(Prof. R. Menghini); Room F102, Building F south, 1st floor, by appointment (Prof. C. Stolfi); Room E60, Building E north, floor 0, by appointment (Prof. S. A. Ciafrè)

SSD: BIOS-09/A , CHEM-07/C, BIOS-10/A

CFU: 8

YEAR: 1st Year

PRELIMINARY KNOWLEDGES: no previous exam needed.

CLASS ATTENDANCE: highly recommended.

LEARNING OUTCOMES:

KNOWLEDGE AND UNDERSTANDING

The course aims at preparing students for the theoretical and practical understanding of the main technologies concerning the production of recombinant antibodies and antibody fragments for diagnostic and therapeutic activities and the techniques for high resolution separation of proteins from complex mixtures and their applications in the medical field. In addition, the course aims at learning some aspects of biochemistry, molecular biology, microbiology and fermentation chemistry and the main methodologies and strategies used in the development of industrial processes of biotechnological interest and to the knowledge of the different methodologies of mass spectrometry (MS) and their applications. Finally, at the end of the course, students must have understood the main concepts of the biosynthesis and mode of action of microRNAs, as well as the importance of the latter in the physiology and pathology.

APPLYING KNOWLEDGE AND UNDERSTANDING

The new concepts achieved during this course should lead to the comprehension of how biotechnological action can be taken to measure microRNAs as biological markers or to modulate them as therapeutic targets; to understand the molecular mechanism of production and function of some recombinant antibodies most used in the clinic both for diagnostic and therapeutic use to understand and use the high-resolution separation techniques of proteins from complex mixtures in the medical field; to outline strategies for the use and manipulation of

microorganisms in industrial production, with particular interest in the development of pharmaceutical products; to interpret MS spectra and analytical protocols and resolve any issues related to the nature of the MS.

MAKING JUDGEMENTS

During the lessons, the acquisition of independent judgment will be promoted by stimulating questions and discussions in the classroom on topics relating to the production of molecular repertoires and the function of recombinant antibodies in biomedicine and the techniques for high resolution separation of proteins from complex mixtures. Students must be able to independently judge the applicability of the knowledge learned in the biotechnological field and describe strategies aimed at the development of industrial fermentation processes and the development of MS methods with detailed analysis of the critical parameters and resolutions of any problems.

COMUNICATION SKILLS

The students' ability to learn and communicate will be verified through continuous interactions between the teacher and students in the classroom and by promoting discussions and questions. Students must be able to explain to others what they have learned and how they would use the knowledge acquired, for example for the selection, use and manipulation of microorganisms in the industrial production of biological products and heterologous proteins of clinical and pharmacological interest. The students' learning skills will be verified through a written text and an oral interview, in which the new knowledge acquired will be placed in a broader context of knowledge of biochemistry, molecular biology, microbiology and chemistry of fermentations and the molecular mechanisms of immunotechnologies.

CONTENTS OF THE COURSE

APPLIED BIOLOGY (16 hours/2CFU)

Relevance of non-coding RNAs in eukaryotic phenotypic complexity. MicroRNAs: the story of their discovery, biogenesis, processing and their regulation; role as fine regulators of eukaryotic gene expression; target recognition methods and modes of action. MicroRNAs and cancer: role as oncogenes and tumor suppressor genes, specific examples and mechanisms that lead to aberrant expression of specific microRNAs in tumors; microRNAs and metastasis processes: specific examples. Interactions between miRNAs and non-coding RNAs: the case of ceRNAs (competing endogenous RNAs). Biotechnological applications of microRNAs: use of target sites for microRNAs to target the expression of transgenes in a tissue-specific manner; methods to inhibit the expression of endogenous microRNAs or for the restoration of the expression of microRNA lost in pathological conditions. MicroRNAs in biological fluids: origin and use as markers of disease; methods for the detection and measurement; specific examples. Classes of small non-coding RNA molecules that can be employed in biotechnology to inhibit or modify the expression of endogenous genes: siRNAs, antisense oligonucleotides that inhibit translation, oligonucleotides that change the splicing etc. CRISPR-Cas systems: molecular basis and use in biotechnology.

IMMUNOTECHNOLOGY (16 hours/2CFU)

The immunotechnology toward an artificial immune system. Polyclonal, monoclonal and recombinant antibodies. From monoclonal antibodies to phage libraries: methods for in vitro production and selection of antibody fragments. The phage display system. Different types of immunity: active and passive. Application of recombinant antibodies in therapy. Pharmacokinetic of antibodies and antibody fragments. Examples of therapeutic use of antibodies in different pathologies: Infectious, tumors and neurodegenerative diseases. The intracellular antibodies: recombinant antibody targeting to different intracellular compartments; their mode of action and examples of applications. Immunotoxins and immunoconjugates.

PROTEOMICS (16 hours/2CFU)

Introduction to omics sciences. Purification and high resolution separation techniques of proteins from complex mixtures. Two-dimensional electrophoresis. Mass spectrometry, basic principles, sources, analyzers and detectors. Basic concepts of tandem mass spectrometry. CID - Collision induced dissociation. ETD and ECD. Mass Spectrometry LC-MS and MS / MS of proteins and peptides, Q-TOF hybrid analyzers, triple quadrupole and ion traps. Use of tandem mass in drug monitoring. Protein sequencing by MS. Peptide Mass Fingerprinting. Interpretation of MS and MS / MS data for protein sequences. Quantitative proteomics (SILAC, ICAT, TMT, ITRAQ, etc). Metabolomics.

FERMENTATION CHEMISTRY (16 hours/2CFU)

Development of industrial fermentation processes. Enzyme production. Production of organic acids. Production of amino acids. Vitamin production. Production of antibiotics. Probiotic production. Production of biotechnological drugs.

TEACHING METHODS

The course includes lectures.

LEARNING ASSESSMENT

Written and oral exams. The exam will be assessed according to the following criteria: Not suitable: important deficiencies and / or inaccuracies in knowledge and understanding of the topics; limited capacity for analysis and synthesis, frequent generalizations.

18-20: knowledge and understanding of the topics just sufficient with possible imperfections; sufficient capacity for synthesis analysis and autonomy of judgment.

21-23: Routine knowledge and understanding of topics; Ability to correct analysis and synthesis with coherent logical argumentation.

24-26: Fair knowledge and understanding of the topics; good analysis and synthesis skills with rigorously expressed arguments.

27-29: Complete knowledge and understanding of the topics; remarkable skills of analysis, synthesis. Good autonomy of judgment.

30-30L: Excellent level of knowledge and understanding of the topics. Remarkable capacity for analysis and synthesis and autonomy of judgment. Arguments expressed in an original way.

BIBLIOGRAPHY

To attend the course, it is necessary to know well the basics of Molecular and Cellular Biology. The topics of the lectures are described in articles selected from the most updated scientific literature, the texts of which will be provided to students by the teacher.

Chimica e biotecnologia delle fermentazioni industriali. Autore: Michele M. Bianchi Edizioni Nuova Cultura

Biotecnologie microbiche. Autori: Stefano Donadio, Gennaro Marino Casa Editrice Ambrosiana

Principi di Biotecnologie Mediche e Farmaceutiche. Autori: Francesca Calabrese, Giorgio Racagni. Edra edizioni