

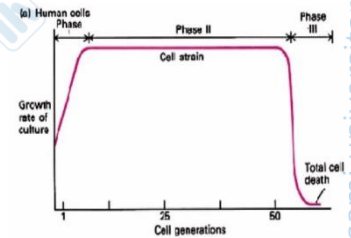
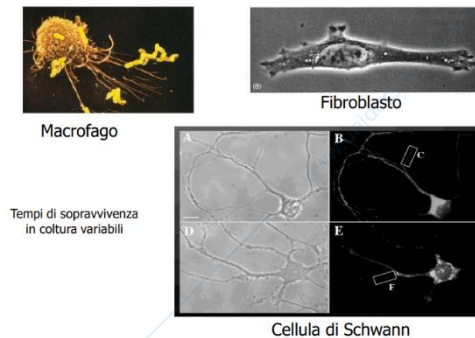
DISPENSE LTA BIOCHIMICHE

COLTURA PRIMARIA: è una coltura originata da cellule o tessuti isolati direttamente dall'organismo e mantenuta per almeno 24 ore. In questo caso le cellule capaci di proliferare, nelle condizioni di coltura utilizzate, aumenteranno, altre cellule saranno capaci di sopravvivere ma non aumenteranno ed altre; invece, non saranno in grado di sopravvivere.

Le linee cellulari primari possono essere propagate inalterate per un numero limitato di generazioni (numero di duplicazioni), superato il quale imboccano a via della senescenza e morte (ciò è dovuto all'accorciamento dei telomeri).

Se prendiamo una cellula embrionale e la coltiviamo in vitro, si può evidenziare un decorso di vita: all'inizio duplica molto rapidamente per aumentare il numero di cellule; duplica con un tempo costante; duplica sempre meno fino alla morte cellulare.

Esempi di cellule mammifere:



Una linea cellulare si ottiene dalla coltura primaria dopo la prima sotto-coltura e può essere finita o continua.

-Finita: alcuni tipi di cellule normali (linfociti, fibroblasti, cheratinociti...) possono essere coltivati in vitro per un periodo di tempo limitato e quindi per un numero totale di divisioni cellulari limitato. Tali colture richiedono in genere l'apporto di opportuni fattori di crescita per stimolare la moltiplicazione cellulare.

-Continua: colture primarie di cellule trasformate in vivo (es. tumori) o in vitro (es. per infezione con virus) possono dare origine a linee cellulari caratterizzate dalla capacità di crescita autonoma e illimitata in coltura. Anche queste cellule possono essere uccise con mezzi fisici, chimici o meccanici.

Una normale cellula ha una capacità di crescita che dopo un certo tempo si riduce, fino alla morte.

IMMORTALIZZAZIONE 3T3

Un gruppo di ricercatori negli Stati Uniti scoprì che, se prendeva delle cellule di embrione e le coltivava con una procedura 3T3 (ogni 3 giorni dividono le cellule di 3 volte) quello che osservarono era che dopo 30 giorni alcune cellule erano capaci di sopravvivere al ciclo cellulare, quindi erano delle cellule **immortalizzate**. Queste cellule immortalizzate si originano **dal processo di delezione del gene P16**, che codifica per la proteina P16 che è coinvolta nell'arresto del ciclo cellulare durante la fase di invecchiamento. La sua assenza favorisce lo sviluppo di cellule immortali. Nell'immortalizzazione è importante anche che nelle cellule sia attiva la telomerasi. Il vantaggio di avere del materiale immortale è il fatto di avere una riserva illimitata di queste cellule.

Mantengono alcune caratteristiche delle colture primarie:

- ➔ dipendenza dall'ancoraggio (preferiscono aderire alle piastre di coltura);
- ➔ dipendenza da siero (richiedono fattori di crescita);
- ➔ inibizione da contatto (fermano la crescita quando sono confluenti in coltura).

Le cellule trasformate invece non hanno inibizione da contatto, quando manca spazio si sviluppano in altezza.

TRASFORMAZIONE

Le cellule trasformate, sono cellule che formano tumori (*tumorigeniche*) quando iniettate in un ospite immunodepleto. Queste cellule non sono necessariamente letali, in origine infatti danno luogo ad accrescimenti che sono tumori benigni. Esse perdono molte delle caratteristiche delle colture primarie: minore dipendenza dall'ancoraggio al substrato, infatti queste cellule sono in grado di migrare e formare

metastasi; minore dipendenza dai fattori di crescita, in quanto le vie di trasduzione del segnale fornito dai fattori di crescita sono iperattivate; perdita dell'inibizione da contatto.

Ad eccezione delle cellule emopoietiche, tutte le linee cellulari crescono e si replicano attivamente sulle superfici plastiche delle piastre da coltura e per questo sono dette **cellule "aderenti"**. Invece, le cellule emopoietiche ed alcuni tipi di cellule tumorali che proliferano senza necessità di ancoraggio alla superficie sono dette **cellule in sospensione**.

In commercio sono disponibili piastre per colture cellulari (*tissue culture plates, TC*) e piastre per batteriologia. Queste ultime, oltre ad essere usate per colture batteriche, possono essere usate anche per colture cellulari in sospensione ma non per colture di cellule aderenti.

I tipi di piastre sono in polistirene, ma la superficie delle piastre per colture di cellule aderenti è trattata chimicamente in modo da *renderla idrofila e carica negativamente (trattamento TC)*. Il polistirene così modificato è in grado di legare stabilmente, anche se non in modo covalente, la fibronectina e la vitronectina presenti nel siero.

Queste proteine verranno a loro volta riconosciute dalle cellule come substrato adesivo: la fibronectina e la vitronectina fungono da ponte tra il substrato e le 3 cellule. La **fibronectina** e la **vitronectina** hanno un'avidità più spiccata rispetto a molte altre proteine per questo tipo di superficie.

Le piastre per colture aderenti si possono distinguere in 3 tipi principali: fiasche, capsule Petri e piastre multiwell.

Le **fiasche**, o flaconi (flask), sono contenitori ad imboccatura stretta chiusi con tappi a vite, particolarmente utili quando si devono preparare cellule da trasportare o spedire fuori dal laboratorio.

Le **capsule Petri** sono di facile utilizzo in tutte le manipolazioni sperimentali anche successive alla coltura (raccolta o preparazione di estratti cellulari) e sono, in genere, molto più economiche delle fiasche. Le Petri per colture cellulari sono in polistirene sterile e sono ventilate. Facilmente utilizzabili al microscopio.

INCUBATORE A CO₂: Mantiene il livello di CO₂ (5%) e la temperatura a 37°C simulando le condizioni in vivo. La CO₂ viene rilasciata nell'atmosfera esterna al terreno di coltura dalle cellule e immessa al 5% per simulare la condizione fisiologica. Il pH rimane stabile a 7.4.

CAPPA A FLUSSO LAMINARE

Serve per lavorare in sterilità con le colture cellulari. Il flusso laminare è un flusso d'aria unidirezionale formato da filetti d'aria sterili paralleli che si muovono alla medesima velocità in tutti i punti, così da creare una corrente d'aria omogenea senza turbolenze. In un ambiente sterile così ottenuto ogni contaminante libero nella zona di lavoro viene trascinato lontano da un fronte di aria sterile. Il flusso d'aria viene filtrato da un filtro.

EMOCITOMETRO

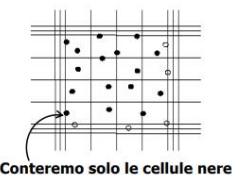
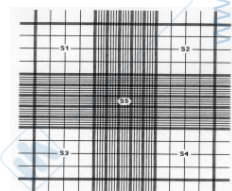
Serve per la conta cellulare. Il primo emocitometro deve il suo nome al suo inventore: **camera di Burker**.

Nella conta delle cellule non si contano tutti e 9 i quadrati, ma soltanto alcuni distanti tra di loro, in modo da tener conto della diversa distribuzione casuale delle cellule sul vetrino. Una volta contato il numero di cellule, è necessario trasformarlo nel:

$$\text{Numero delle cellule/ml} = \frac{\text{cellule contate nei 5 riquadri}}{5} \times \text{diluizione} \times 10^4$$

Serve ad esempio per determinare la concentrazione cellulare e piastrare un determinato numero di cellule.

Il **Coulter Counter** permette la conta delle cellule tramite una macchina automatizzata: le cellule passano attraverso un piccolissimo foro e cambiano un flusso producendo una serie di "pulses" che saranno contati.



Contaremo solo le cellule nere

SOLUZIONI PER COLTURE E CONTAMINAZIONI

È necessario:

- **Mezzo per colture cellulari:** esistono diversi tipi di mezzi e si usano diversamente a seconda del tipo di cellula coltivata;
- **Siero:** viene aggiunto al mezzo come sorgente di nutriente per le cellule;
- **Tamponi:** per mantenere il pH del mezzo di coltura come il bicarbonato di sodio o l'Hepes (quando le cellule vengono mantenute, per alcuni esperimenti di microscopia in vivo, in ambiente dove non c'è la CO₂);
- **Penicillina/Streptomycin:** vengono aggiunti a mezzi per prevenire contaminazioni batteriche;
- **Tripsina/EDTA:** usata per staccare le cellule dalle piastre di coltura;
- **PBS:** usato per lavare e rimuovere l'eccesso di mezzo nelle cellule.

MEZZO PER COLTURE CELLULARI

Nei mezzi di coltura, per simulare l'ambiente in vivo, sono presenti *4 grandi classi di elementi nutritivi (sali, aminoacidi, zuccheri, vitamine)* e una classe più indefinita (gli elementi in tracce) tutte con uno specifico compito nella promozione della crescita cellulare.

Sali inorganici: assicurano il bilanciamento osmotico (potenziale di membrana e osmolarità del terreno). I sali di sodio, magnesio, potassio e calcio sono fondamentali per l'equilibrio osmotico; il calcio inoltre influisce in maniera determinante sulla capacità delle cellule di aderire al substrato.

Aminoacidi, essenziali e non essenziali: soddisfano la richiesta di biosintesi dei vari elementi costitutivi della cellula. Vengono considerati essenziali nei mezzi di coltura 13 aminoacidi. La **glutamina** è l'amminoacido più abbondante, questo riflette il suo importante ruolo anabolico come fonte di atomi di N per la sintesi di aminoacidi, purine e pirimidine, amminozuccheri con N. È meno costoso far sintetizzare gli aminoacidi alla cellula piuttosto che acquistarli tutti.

Zuccheri (glucosio): energia per i processi metabolici, cioè fonte di carbonio per il metabolismo cellulare.

Vitamine: catalizzatori o substrati per il controllo delle funzioni metaboliche.

Elementi in tracce: Fe, Zn, Se...: favoriscono il processo di crescita cellulare. Alcune di queste molecole hanno una funzione importante nella trasduzione del segnale.

Indicatore di pH (in genere rosso fenolo): controlla il cambiamento del pH provocato dal metabolismo cellulare. Il rosso fenolo diventa giallo quando il pH è acido (6.8) e rosso quando il pH è basico (8.2). Quando le cellule sono sovraffollate, esse possono iniziare a fare fermentazione liberando acido lattico che acidifica il medium.

SIERO ANIMALE

La maggior parte delle cellule non sopravvive in coltura, se coltivate anche per brevi periodi, solo con il terreno base. Esse richiedono ulteriore supplementazione del terreno con il siero, *ovvero la componente corpuscolata del sangue*, all'interno del quale ci sono:

- **Fattori di crescita** identificati e testati su cellule in quanto danno la capacità di crescere. Essi sono in grado di legare recettori tirosino-chinasici che attivano processi di stimolo della duplicazione cellulare.
- **Ormoni** (insulina, idrocortisone, ormoni tiroidei);
- **Proteine** (albumina, globuline, transferrina);
- **Lipidi** (acidi grassi, fosfolipidi, colesterolo).

Il siero più comunemente usato è il **siero fetale di bovino FBS**.

Domanda d'esame: Il siero (FBS) si distingue inoltre per il paese e l'animale di provenienza che spesso determina anche il prezzo del prodotto e la sua qualità, i più famosi sono quelli dal Nord e dal Sud America. Il siero fetale bovino viene generato quando le mucche partoriscono oppure altri sieri sono generati quando gli animali vengono macellati. Deve avere concentrazione del 10%.

TAMPONI

I terreni possono essere tamponati:

- *Bicarbonato di sodio* = varia il pH con il variare della CO₂ nell'incubatore;
- *Hepes* (poco tossico) = mantiene il pH costante tra 7,2 e 7,6.

TRIPSINA/EDTA (acido etilendiamminotetracetico) (0,05% / 0,02%) in PBS

Questa soluzione è necessaria per il distacco di cellule aderenti. Le cellule aderenti crescono fino ad occupare l'intera superficie disponibile (stadio della confluenza). Alla confluenza la crescita si arresta e le cellule devono essere trasferite in nuove piastre. Per il trasferimento è necessario staccare le cellule dal fondo della piastra con una soluzione di EDTA e tripsina, che degrada le proteine della matrice che mantengono le cellule aderenti. Una volta ottenuto il distacco delle cellule, l'azione della tripsina e dell'EDTA viene neutralizzata con l'aggiunta di terreno completo.

PBS

Il PBS è sicuramente il buffer più usato in biologia cellulare, per la sua **isomolarità** con la membrana cellulare, questa sua caratteristica ne permette il suo utilizzo in qualsiasi reazione che coinvolga le cellule senza creare nessun danno alla cellula stessa. Utilizzata per lavaggi in maniera da eliminare dalla coltura i residui del mezzo e del siero. Se le cellule non venissero lavate bene, esse potrebbero non staccarsi del tutto, un residuo di siero inibisce la funzione della tripsina.

PENICILLINA/STREPTOMICINA

La contaminazione più plausibile è quella che viene portata direttamente dall'operatore. Moltissime specie di batteri vivono e proliferano nell'uomo, le quali possono contaminare le piastre di coltura. Per prevenire queste contaminazioni, all'interno dei mezzi di coltura vengono aggiunti degli antibiotici:

→ **Ampicillina**: antibiotico di sintesi appartenente alle penicilline attivo sia contro batteri G+ e G- con azione sulla parete batterica.

→ **Streptomicina**: si lega con la subunità del ribosoma interferendo con il sistema di lettura del mRNA portando all'incorporazione di amminoacidi errati sulle nascenti proteine. Le cellule tumorali e immortalizzate non hanno problemi a sopravvivere con questi antibiotici.

(possibile domanda d'esame).

CONTAMINAZIONI

Gli agenti contaminanti che possono infestare una coltura sono generalmente lieviti (unicellulari), funghi (pluricellulari), batteri, micoplasmi. L'individuazione di una contaminazione può essere fatta in 2 diversi modi: o con **un'analisi del mezzo di coltura** (alterazioni del terreno di coltura: intorbidamento, aspetto a sabbia sul monostrati), oppure **con analisi al microscopio**:

- *Batteri*: appaiono come dei granellini neri che si agitano intensamente;

- *Lieviti e Muffe*: i lieviti appaiono come particelle isolate rotondeggianti, le muffe come miceli filamentosi. Le contaminazioni batteriche possono alterare il metabolismo cellulare attivando/ stimolando processi biologici dovuti alla loro presenza. Agiscono in particolare su alcune popolazioni cellulari: cellule del sangue, cellule staminali ma possono contaminare tutte le cellule.

I micoplasmi sono le più semplici cellule viventi. Piccolissimi microrganismi, simili a batteri, che conducono vita parassitaria adesi alle membrane plasmatiche di cellule animali e vegetali.

I micoplasmi sono una delle maggiori fonti di contaminazione nelle colture cellulari perché sono invisibili ad occhio nudo e al microscopio. Hanno una molecola di DNA a doppio filamento, non possiedono parete cellulare e sono delimitati da una membrana cellulare di natura lipidica (colesterolo) che conferisce resistenza agli antibiotici e alla microfiltrazione. Possono essere aerobi o anaerobi.

Sono in grado di proliferare anche in assenza di cellule; quindi, permangono all'interno dei mezzi di coltura, nei sieri e in tutti i materiali che utilizziamo se non sono sterili. La contaminazione da micoplasmi è un vero danno per le colture cellulari e spesso ci si accorge del problema in ritardo sebbene questi batteri possano alterare fortemente il comportamento delle cellule. Tramite la loro presenza possono alterare la crescita delle

cellule e il metabolismo, causare aberrazioni cromosomiche, competere con le cellule per i nutrienti, simulare infezioni virali. Sono molto resistenti.

Il sistema più usato per identificarne la presenza è una PCR specifica del loro genoma.

Per evitare contaminazioni è necessario in primis lavorare sotto **cappa a flusso laminare**.

LA TRASFEZIONE

Lo studio della regolazione e dell'espressione di geni eucarioti ha subito un forte impulso negli ultimi anni grazie allo sviluppo di tecniche che **permettono l'introduzione di acidi nucleici all'interno di cellule di mammifero**, mediante metodiche sia fisiche sia chimiche in un processo definito "**trasfezione**". L'introduzione di acidi nucleici è diventato un mezzo investigativo per la comprensione della struttura e della funzione di numerosi geni e quindi proteine. Ad esempio, è uno strumento efficace per **identificare la localizzazione di una proteina nella cellula**.

Un metodo ideale di trasfezione di geni d'interesse all'interno di cellule eucariotiche dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

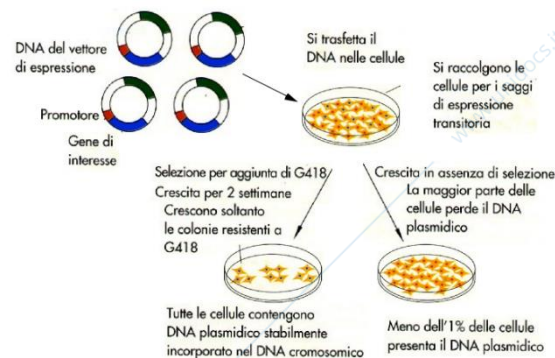
- 1) **alta efficienza di trasferimento**: la maggior parte delle cellule ha introdotto il DNA;
- 2) **bassa tossicità**: i metodi di trasfezione non devono essere mortali per le cellule;
- 3) **riproducibilità in esperimenti in vitro e in vivo**: l'effetto dell'introduzione del gene di interesse nella cellula deve rimanere costante.

Esistono 3 metodiche di biologia molecolare per introdurre DNA in cellule di mammifero:

1. CHIMICO: lipofezione e calcio fosfato;
2. FISICO: elettroporazione;
3. VETTORI VIRALI: adenovirus e retrovirus.

Le trasfezioni possono essere suddivise in 2 categorie:

1. ESPRESSIONE TRANSIENTE: espressione temporanea (1-4 giorni) ma ad alti livelli per geni esogeni. Il DNA esogeno non si integra nelle cellule trasfettate.
2. ESPRESSIONE STABILE: metodo usato per l'espressione stabile di DNA esogeno in linee cellulari. Il DNA si integra in poche cellule, che sono selezionate per la loro acquisita capacità di crescere in presenza di antibiotico. Metodo meno efficiente.

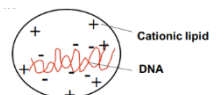


Per eseguire una trasfezione è necessario un plasmide che al suo interno ha: un **promotore** generalmente di origine virale; il **gene di interesse**; **siti multipli di clonaggio**, ovvero siti bersaglio di enzimi di restrizione che permettono di inserire il DNA di interesse nel plasmide; **resistenza all'antibiotico** → le cellule che non hanno il plasmide muoiono con gli antibiotici.

LIPOFEZIONE

Il DNA (carico negativamente) è inglobato all'interno di liposomi (carichi positivamente), che interagiscono direttamente con la membrana cellulare e si fondono con essa. Alternativamente, entra nella cellula per endocitosi. Il DNA si sposta dagli endosomi al citoplasma e poi al nucleo.

La trasfezione funziona molto meglio in cellule che crescono rapidamente e si dividono (cellule in attiva proliferazione) perché non c'è la membrana nucleare da penetrare; quindi, entra direttamente a far parte del genoma della cellula.



Se non si integra con il DNA della cellula, il plasmide integrato viene perso dopo qualche mitosi (circa 4 giorni). Utilizzo dell'antibiotico per selezione. Alta efficienza ma costosa e tossica per le cellule.

CALCIO FOSFATO

Il DNA è introdotto nella cellula come co-precipitato con il calcio fosfato: le cariche positive del Ca^{2+} vanno a legare le cariche negative del DNA formando il precipitato, che viene fagocitato dalle cellule.

Le cellule possono fagocitare i precipitati e il DNA si libera nel citoplasma, da dove va nel nucleo: nelle cellule in attiva proliferazione, infatti, viene persa la membrana nucleare; quindi, il DNA introdotto può andare ad unirsi a quello endogeno e replicarsi sfruttando l'apparato enzimatico della cellula ospite.

Economico ma meno efficiente però i cristalli di calcio fosfato possono essere molto tossici per le cellule (mutazioni).

Lipofezione e calcio fosfato sono più funzionali nelle cellule adese.

ELETTROPORAZIONE

L'esperimento viene fatto in una cuvetta in cui c'è una soluzione contenente cellule. Le cellule sono quindi esposte a carica elettrica che crea dei pori sulla membrana, che facilita l'ingresso del DNA nella soluzione. Passata la scossa elettrica, le cellule richiudono i loro pori mantenendo all'interno il DNA. Rapido e semplice, funziona su quasi tutte le cellule, ma: richiede uno strumento particolare per indurre la carica elettrica alle cellule (**elettroporatore**). È molto tossico perché la scossa elettrica uccide circa il 70-80% delle cellule, ma il restante 20% incorpora molto bene il DNA.

MICRO-INIEZIONE

Permette di iniettare direttamente, attraverso degli aghi sottilissimi (micro-iniettore), il DNA all'interno del nucleo nel citoplasma di una cellula. Efficienza 100%.

VETTORI VIRALI

La tecnica sfrutta la capacità di virus di infettare le cellule. Si sta studiando come terapia in malattie geniche. Altissima efficienza, si parla di **trasduzione**. Tuttavia, c'è la possibilità che possano formare dei nuovi virus patogeni per ricombinazione con eventuali virus presenti all'interno dell'ospite.

EFFICIENZA DI TRASFEZIONE

Si introduce il DNA esogeno in due linee cellulari. Per essere però certi che in entrambe le linee cellulari ci sia stata un'uguale efficienza di trasfezione, e quindi sia espressa la stessa quantità di proteina, e che quindi le differenze siano dovute ad un fenomeno biologico, si trasfettano dei **geni reporter (GFP o β -gal)** → concentrazione 5-10 volte più bassa rispetto al plasmide.

Se si analizza la trasfezione e si osserva l'espressione del gene reporter, allora statisticamente si può concludere che anche il gene è stato trasfettato: se infatti una cellula è stata capace di incorporare il plasmide reporter che in soluzione è presente a bassa concentrazione, allora molto probabilmente sarà stata capace anche di incorporare il plasmide con il gene di interesse.

La **green fluorescent protein (GFP)** è una proteina isolata da una medusa. La GFP è una proteina piccola molto stabile, che quando eccitata emette una luce di colore verde. Dopo una trasfezione con un plasmide che esprime questa proteina, si possono osservare *cellule fluorescenti al microscopio a fluorescenza*. La GFP è autofluorescente e non serve alcun substrato per far emettere la fluorescenza. Non c'è GFP endogena nelle cellule di mammifero, quindi tutta la GFP che si osserva in una proteina è esogena.

Non è molto sensibile in tutte le linee cellulari e dev'essere espressa ad alti livelli.

La GFP è usata spesso per valutare la localizzazione di un'altra proteina, ad essa fusa → adiacenti alla sequenza codificante del gene che esprime la proteina di interesse. la proteina quindi si muoverà nella cellula e grazie alla GFP i suoi movimenti possono essere tracciati.

CICLO CELLULARE E CURVA DI PROLIFERAZIONE

Un importante esperimento è spesso quello di paragonare due linee cellulari: una **linea cellulare immortalizzata (NIH3T3)** con una **linea cellulare trasformata**, ottenuta mediante la trasfezione di una linea NIH3T3 che sovra-esprime un oncogene (**K-RAS**, solitamente gli oncogeni intervengono nello sviluppo

tumorale e aumentano le possibilità che lo sviluppo (proliferazione e differenziamento) di una cellula si diriga in senso tumorale) che quando è mutato è capace di indurre massa tumorale. K-RAS è uno degli oncogeni maggiormente presenti nei tumori; infatti, circa il 30% dei tumori esprime questa proteina mutata che la rende costitutivamente attiva. Essendo una proteina coinvolta nella regolazione della proliferazione, la sua attivazione costitutiva fa sì che lo stimolo proliferativo venga sempre attivato, in maniera quasi del tutto indipendente dai fattori di crescita che arrivano alla cellula.

Il paragone di queste due linee cellulari viene effettuato con **curve di proliferazione**, ovvero si va a studiare nel tempo come le cellule duplicano: avendo un T0 in cui si piastra un certo numero di cellule, si vanno a contare le cellule (dopo distacco dalla superficie) dopo 24h, 48h e 72h. In questo modo si misura il tempo necessario ad una cellula a duplicarsi, questo è regolato dal **ciclo cellulare**, che nelle cellule di mammifero dura circa 24h.

FATTORI DI CRESCITA

All'interno del siero animale aggiunto alle colture cellulari ci sono dei **fattori di crescita**, che sono delle proteine ligando che, legando dei recettori sulla membrana delle cellule, attivano la proliferazione o il differenziamento cellulare. Il legame recettore-ligando stimola la produzione di un segnale all'interno del citoplasma che porta all'attivazione di geni coinvolti nella sintesi proteica, nel ciclo cellulare e nella replicazione.

Andando a studiare le cellule trasformate, si osserva che gli oncogeni, che normalmente si attivano solo in seguito a stimolo da parte di fattori di crescita, in questo caso sono costitutivamente attivi indipendentemente dalla presenza del ligando riconosciuto dal recettore. L'effetto è quindi una proliferazione più rapida.

Tra i fattori di crescita più noti, ce ne sono alcuni molto specifici, come l'**epidermal growth factor (EGF)** che stimola la crescita delle cellule epiteliali ma non dei fibroblasti. Viceversa, il **fibroblast growth factor (FGF)** è in grado di stimolare i fibroblasti ma non le cellule epiteliali.

Le cellule trasformate, rispetto a quelle immortalizzate, non sono più così dipendenti dai fattori di crescita, per questo le due linee cellulari possono essere distinte piastando lo stesso numero di cellule, con la stessa tipologia di terreno, variando la concentrazione di siero (e di conseguenza la concentrazione dei fattori di crescita).

Se si paragona la crescita in **condizioni ottimali (10% siero)** di una cellula immortalizzata con quella di una cellula trasformata, si osserva nei primi 3-4 giorni una curva di crescita molto simile. Nei giorni successivi però si osservano le maggiori differenze:

- Le cellule immortalizzate tendono a riempire tutta la piastra e si arrestano per inibizione da contatto.
- Le cellule trasformate, che non presentano più questa caratteristica, continueranno a crescere, quindi si osserverà la crescita impilata delle cellule, anche sopra la superficie della piastra.

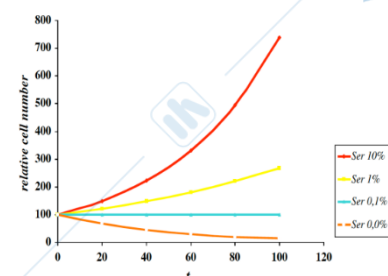
Abbassando la concentrazione di siero (0,1%), si osserva che:

- Le cellule immortalizzate non sono in grado di crescere come quando sono in una condizione ottimale;
- Le cellule trasformate sono in grado di crescere abbastanza bene, come avviene nelle condizioni ottimali.

In assenza di siero le cellule immortalizzate sono del tutto ferme, mentre quelle trasformate presentano comunque un livello di crescita.

LISI CELLULARE

Il Western Blot è un esperimento che permette di evidenziare la presenza di una proteina all'interno di un estratto proteico. Ad esempio dopo aver trasfettato la GFP, mediante il Western Blot si può osservare se l'espressione della GFP fosse dipendente dalla quantità di DNA trasfettato. La GFP è una proteina che si esprime nel citoplasma, quindi bisogna procedere con la **lisi cellulare**, per ottenere l'estratto proteico.



Le procedure utilizzate per ottenere un estratto proteico grezzo sono estremamente semplici, dipendono dal tipo cellulare (animale, vegetale, microorganismi) e possono essere effettuate mediante *digestione enzimatica, shock osmotico, cicli di congelamento/scongelamento, stress meccanici*.

Una cellula normalmente contiene al suo interno sali e molecole cariche come il DNA, fosfolipidi e proteine. Questo fa sì che la cellula abbia una **forza ionica**, ovvero una misura della concentrazione totale degli ioni, che per il citoplasma corrisponde a 0,15-0,20 M, in queste condizioni le proteine sono solubili. Se la forza ionica scende, le proteine, soprattutto quelle basiche, rimangono intrappolate nella parte insolubile e quindi perse in seguito alla centrifugazione. *Per assicurarci che le proteine rimangano solubili, si aggiungono i sali che servono a mantenere un pH ottimale* (tampone Tris-HCl) per la maggior parte delle proteine e la forza ionica (NaCl) simile a quella di una cellula.

Uno del buffer di lisi più utilizzati è il JS. Centrifugando si ottiene un surnatante contenente le proteine e un pellet contenente ad esempio DNA e proteine di membrana.

I **detergenti** (Triton X-100, NP-40, SDS) rompono il doppio strato lipidico della membrana cellulare → vanno a circondare le proteine trans-membranarie che hanno delle porzioni idrofobiche che le permettono di attraversare il doppio strato fosfolipidico, facendo sì che si formino dei pori sulla membrana. **Triton X-100 è un detergente non ionico.**

Al buffer si aggiunge **DTT (ditiotreitolo)**, un agente riducente. Durante la lisi, le cisteine possono andare incontro ad ossidazione e quindi potrebbero formare tra di loro ponti disolfuro che danno luogo ad aggregati proteici. Il DTT riduce le cisteine in modo da prevenire la formazione dei ponti di solfuro.

Un altro componente del buffer è il **glicerolo**, un crio-protettore che forma dei cuscinetti utili per la conservazione a -20°C e -80°C. Il glicerolo, infatti, determina il congelamento molto più lento.

La lisi coinvolge anche i perossisomi e i lisosomi, che quindi liberano proteasi che possono andare a degradare le proteine: si aggiungono al buffer quindi degli **inibitori delle proteasi**.

Nel caso in cui si voglia studiare una proteina in forma fosforilata, al buffer di lisi si aggiungono **inibitori delle fosfatasi**, in quanto una volta che la cellula è stata lisata, probabilmente degli enzimi diventano in grado di raggiungere il loro substrato.

Regole generali:

- 1) generalmente si utilizzano 2-3 volumi di buffer rispetto al volume occupato dal pellet cellulare. Infatti, dopo la lisi e la centrifugazione, si elimina il pellet insolubile. Quest'ultimo trattiene parte della fase liquida e quindi trattiene anche parte delle proteine. Maggiore è il volume di buffer usato minore sarà la perdita di proteine nel pellet insolubile.
- 2) Nei processi di purificazione delle proteine, a differenza di quanto avviene per gli acidi nucleici, soprattutto l'RNA, non occorre prestare attenzione alla sterilità ma bisogna evitare la denaturazione delle proteine. Quindi ogni lisi cellulare deve essere messa a punto.
- 3) L'estrazione delle proteine deve avvenire rapidamente e a 4°C per evitare i processi degradativi.

MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

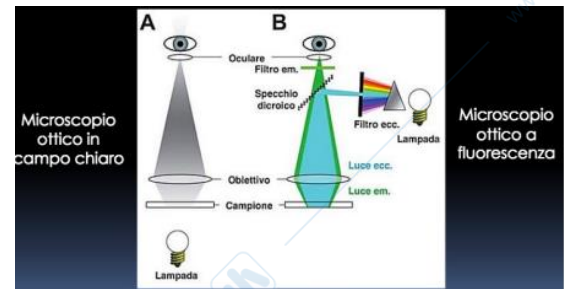
La fluorescenza è quel fenomeno fisico per cui una molecola, colpita da una radiazione elettromagnetica di una certa lunghezza d'onda (**λ di eccitazione**), emette un'altra radiazione di lunghezza d'onda superiore (**λ di emissione**) → serve per vedere GFP.

Per quanto riguarda la lunghezza d'onda della radiazione emessa in fluorescenza, questa è descritta dalla **Legge di Stokes**. In base a questa legge, la radiazione di fluorescenza ha quasi sempre lunghezza d'onda maggiore (o al massimo uguale) di quella della radiazione eccitatrice.

Quando gli UV colpiscono una molecola, si osserva che gli atomi assorbono parte dell'energia delle onde elettromagnetiche, che sposta i loro elettroni a livelli energetici superiori (dura miliardesimi di secondo), dopo di che ritornano al livello originario liberando l'energia assorbita sotto forma di radiazione elettromagnetica.

Il **microscopio a fluorescenza** permette di vedere l'emissione di fluorescenza: presenta una lampada a scarica ad arco corto, che fornisce una forte intensità di luce UV in una superficie molto piccola. I raggi ultravioletti generati da questa lampada passano attraverso un **filtro di eccitazione**, che seleziona la lunghezza d'onda

adatta all'eccitazione del campione in analisi. Nel caso della GFP vanno selezionate le bande con luce di colore blu. Nella fluorescenza la luce illumina indirettamente il campione attraverso **lo specchio dicroico**, che riflette la luce passata attraverso il filtro di eccitazione e la indirizza verso il campione. Questo specchio riflette la luce di lunghezze d'onda più basse nella direzione del campione, e lascia passare la luce di lunghezze d'onde più lunghe, che derivano dall'emissione del campione, e che devono essere convogliate verso il filtro di emissione e quindi verso l'osservatore.



Lo stesso campione può essere osservato con diversi **fluorocromi**.

Il **fluorimetro** è uno strumento che permette di misurare la concentrazione di una determinata sostanza presente in un campione attraverso misure di fluorescenza.

SAGGIO BRADFORD E SPETTROFOTOMETRIA

Trasfezione dei plasmidi GFP e β -gal: entrambi questi plasmidi servono per normalizzare la trasfezione, ovvero vedere se a differenti dosi di DNA c'è un effetto proporzionale di espressione della proteina di interesse. Nel caso della GFP, essa può essere dosata con western blot, per fare questo però i campioni devono essere normalizzati: i campioni devono avere la stessa quantità di proteine \rightarrow *dosaggio proteico con metodo Bradford*. Il reattivo di Bradford contiene **Blue di Coomassie brilliant blue**. In soluzione, questo reattivo ha una forma cationica rossa che assorbe a 470 nm, legato alle proteine ha una forma anionica blu che assorbe a 595 nm. Per leggere l'assorbanza del campione, si utilizza uno **spettrofotometro**, che può essere usato per determinare gli spettri di assorbimento di una sostanza, o anche per misurare le concentrazioni di sostanze in soluzione. Misura la quantità di energia luminosa che viene trasmessa da una sostanza colpita da radiazioni luminose di diversa lunghezza d'onda.

Lo spettrofotometro genera una luce che colpisce la soluzione nella cuvetta, parte di questa luce sarà assorbita dalla soluzione e parte invece passerà attraverso il campione.

L'energia luminosa trasmessa si può misurare come **trasmittanza** (scala lineare da 0 a 100%), che è il rapporto tra l'energia della luce trasmessa (I) e della luce incidente (I_0).

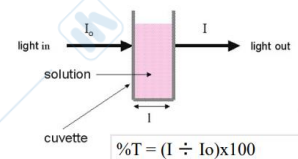
$$\%T = (I / I_0) \times 100.$$

La trasmittanza non è proporzionale alla concentrazione di soluto e per questo viene convertita in **assorbanza** (scala logaritmica da 0 a infinito), proporzionale alla concentrazione di soluto.

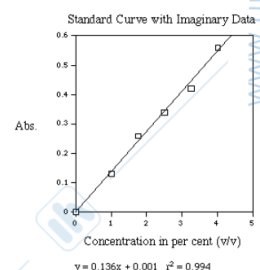
$$\text{Abs.} = \log_{10}(100 / \%T)$$

La legge che determina l'assorbanza è la legge di Lambert e Beer: **Abs. = $\epsilon \cdot I \cdot C$**

Per determinare la concentrazione di un campione a titolo incognito si utilizza una **retta di taratura** costruita appositamente. L'allestimento di una curva di calibrazione per una soluzione (nel nostro caso BSA) si ottiene misurando la assorbanza di differenti, note concentrazioni della soluzione. Si disegna quindi un grafico in cui sull'asse delle X sono posti i valori di concentrazione e sull'asse delle Y i valori di assorbanza. Per determinarne la concentrazione si legge l'assorbanza della soluzione a concentrazione incognita e si verifica a quale valore di concentrazione la curva di regressione lineare permette di associare il valore di assorbanza.



$$\%T = (I / I_0) \times 100$$



SDS PAGE E WESTERN BLOT

Una volta che è stata determinata la concentrazione delle proteine, bisogna caricare i campioni su un SDS page per poi effettuare un Western Blot. La preparazione dei campioni prevede l'utilizzo di un **sample buffer**, che generalmente si prepara 4-5X. Il sample buffer contiene:

- **Blu di bromofenolo**, un colorante che permette di seguire l'andamento della corsa elettroforetica;
- **Glicerolo**, per appesantire il campione rendendone possibile l'iniezione nel pozzetto di caricamento della camera elettroforetica;

- **β -mercaptoetanol**, per ridurre i ponti disolfuro eventualmente presenti in una stessa proteina o tra proteine diverse;
- **SDS (sodio dodecilsolfato)**, detergente anionico che si lega alle proteine denaturandole, in modo da annullare la struttura terziaria e quaternaria delle proteine, rendendole sostanzialmente delle molecole lineari. È presente anche nel tampone del gel e nel tampone di corsa. L'SDS, oltre alla denaturazione, serve anche a conferire una carica negativa alle proteine: il numero di molecole di SDS che si lega alla proteina è proporzionale al numero dei suoi amminoacidi (1 SDS lega 2 aa). Dopo il trattamento con SDS risultano caratterizzate dallo stesso rapporto massa/carica e la loro elettroforesi permette quindi la separazione in funzione della sola massa molecolare.

Le proteine vengono fatte correre sul gel di poliaccrilammide, avviene una separazione a seconda del peso molecolare: proteine più grandi e quindi più pesanti migreranno lentamente e saranno osservabili nella parte alta del gel, mentre proteine più piccole e quindi più leggere migreranno velocemente e saranno osservabili nella parte bassa del gel. Si può stimare il peso molecolare delle proteine.

L'SDS page è diviso in due parti, entrambe composte da acrilammide e SDS 10%, presentano poi delle differenze:

- **stacking gel (o gel di compattamento)**, il pH è 6.8.
- **running gel (o gel di risoluzione)**, il pH è 8.8-9.

Gel discontinui consentono una più netta separazione delle componenti del campione. Nella porzione dello stacking gel, le proteine non vengono trattenute dal reticolo del gel, quindi si ritrovano "impaccate" in una striscia sottile al fronte di separazione dei due gel. Da questa linea in poi, le proteine invece si separeranno a seconda del loro peso molecolare.

Il gel è un polimero formato da catene di acrilammide, che polimerizzando formano la poliaccrilammide, e di bis-acrilammide, che interconnette le catene di poliaccrilammide. La bis-acrilammide determina la dimensione dei pori del gel:

- *stacking gel*: i pori sono molto lassi, per permettere il passaggio anche di proteine più grandi;
- *running gel*: la dimensione dipende dal peso molecolare della proteina da analizzare: se la proteina è ad alto peso molecolare, il gel è preferibile che sia lasso (4-6% acrilammide-bisacrilammide), in modo da riuscire a separare molto bene le proteine ad alto peso molecolare, mentre verranno perse le proteine a basso peso molecolare perché correranno troppo in fondo uscendo dal gel. Se la proteina è a basso peso molecolare, il gel è preferibile che sia più fitto (10-15% acrilammide-bisacrilammide), in questo modo le proteine a basso peso molecolare vengono separate in modo ottimale mentre le proteine più grandi verranno trattenute nella parte alta del gel.

La polimerizzazione dell'acrilammide e che si formino dei legami crociati tra le catene di acrilammide, è necessario un iniziatore **ammonio persolfato (APS)** e un **catalizzatore (Temed)**. Il Temed catalizza una decomposizione dello ione persolfato presente nell'APS con formazione di un radicale libero, una specie altamente reattiva che condivide il suo elettrone spaiato con gli elettroni presenti sui monomeri di acrilammide e bisacrilammide, facendo avvenire la reazione di polimerizzazione.

All'inizio dell'elettroforesi con SDS page discontinuo, **gli anioni Cl^- sono presenti nello stacking e nel running gel e gli ioni glicinato invece sono presenti solo nella camera elettroforetica**: i vetri fanno sì che la soluzione buffer della camera elettroforetica non entri in contatto con il gel.

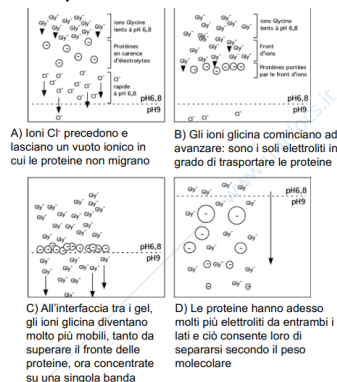
La concentrazione degli ioni Cl^- nello stacking gel è maggiore della concentrazione delle proteine, la quale è molto maggiore degli ioni glicinato, che infatti si trovano all'esterno e sono separati dal gel per mezzo dei vetri.

Quando si applica la corrente, gli ioni Cl^- più leggeri, iniziano a muoversi rapidamente oltrepassando il confine tra stacking e running gel, senza trasportare alcuna proteina. La glicina ha un punto isoelettrico che è circa 6, nello stacking gel, il cui pH è 6.8, risulta essere poco carica e quindi è la componente che migra molto più lentamente. Al procedere della corsa, gli ioni glicina cominciano ad aumentare, perché dal buffer (dove sono

cariche -) migrano nel gel per allontanarsi dall'anodo (-). Gli ioni glicina carichi - che si dirigono verso il polo +, iniziano a trasportare con sé anche le proteine.

All'inizio della corsa, quindi, sono gli ioni Cl^- e le proteine che mantengono la corrente elettrica nell'apparato elettroforetico. Le proteine, dunque, giungono e si allineano all'interfaccia dei due gel, dove cambia la densità dei pori e quindi la corsa delle proteine non è più facilitata: questo è fondamentale perché fa sì che tutte le proteine siano impaccate in una linea sottili. All'interfaccia tra i gel, gli ioni glicina diventano molto più mobili a causa del cambio di $\text{pH}=9$. La loro carica quindi permette di contribuire al mantenimento del circuito elettrico. Essendo più piccoli delle proteine però, riescono a migrare più velocemente superandole.

Le proteine circondate da elettroliti potranno separarsi soltanto in funzione del peso molecolare, in quanto l'SDS continua a fornire loro la carica negativa. Durante lo stacking la corsa viene fatta ad un voltaggio più basso, per dare il tempo alle proteine di allinearsi all'interfaccia, mentre durante la corsa nel running gel il voltaggio viene aumentato per velocizzare il procedimento.



Una volta ottenuta la corsa elettroforetica, le proteine possono essere detectate con:

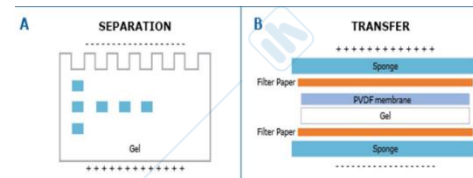
- **colorazione diretta:** Le proteine possono essere colorate direttamente sul gel o sul filtro di nitrocellulosa o di polifluoruro di vinilidene (PVDF) in cui sono state trasferite. La colorazione sul gel si esegue con **blu di coomassie** e con **nitrato d'argento**. Questa ultima tecnica si basa sulla riduzione, facilitata dalla presenza di proteine, di sali d'argento in argento metallico (che precipita). Invece per colorare il filtro si usa il **ponceau S** che lega aminoacidi carichi positivamente e regioni non polari delle proteine. Anche in questo caso non tutte le proteine si colorano allo stesso modo: le proteine più abbondanti sono colorate in maniera più intensa.
- **Anticorpi (western blot).**

L'identificazione della proteina di interesse viene fatta attraverso un esperimento di **western blot**. Ad esempio, nel caso della GFP, esiste uno specifico anticorpo monoclonale in grado di riconoscere tale proteina, dopo la corsa SDS page, trasferita su una membrana. La tecnica del western blot consente di trasferire le proteine da un gel di poliacrilammide a una membrana di nitrocellulosa.

Per trasferire le proteine che erano nel gel su una membrana, si costruisce un "sandwich": **spugna - carta da filtro - membrana - gel - carta da filtro - spugna**. Questo "sandwich" viene posto all'interno di una camera che consente il trasferimento di tali proteine: il gel deve essere posto rivolto verso carica -, mentre la membrana deve essere rivolta verso la carica +, in modo che una volta applicato il campo elettrico, le proteine migrino verso polo + trasferendosi sulla membrana. Il trasferimento dura un'ora o tutta la notte.

Anche il marker viene trasferito fedelmente sul filtro, in modo da poter confrontare i pesi molecolari noti direttamente con quelli del campione in analisi.

Una volta su filtro, le proteine possono essere rilevate con anticorpi specifici (**immunodecorazione** o western blot vero e proprio). Questo consente di stimare peso e quantità relativa di proteine di interesse.



L'anticorpo che riconosce la proteina di interesse può essere utilizzato in combinazione con un anticorpo **normalizzatore**, ovvero un anticorpo che riconosce una proteina sempre presente più o meno nella stessa quantità in tutti i campioni.

L'immunodecorazione prevede una serie di passaggi:

- **Saturazione** per saturare con proteine aspecifiche (ad esempio le proteine del latte o la BSA) tutti i siti della membrana non occupati da proteine. Questo impedisce che l'anticorpo si leghi aspecificamente alla membrana.
- **Anticorpo primario (Ab I)** che riconosce la proteina di interesse.
- **Lavaggi** per eliminare l'anticorpo legatosi in maniera aspecifica.
- **Anticorpo secondario (Ab II)** che riconosce la porzione costante dell'Ab I.
- **Lavaggi** per eliminare l'anticorpo legatosi in maniera aspecifica.

L'anticorpo secondario è legato covalentemente con un enzima, la perossidasi di rafano, in grado di ossidare, in presenza di H_2O_2 , un substrato, il **luminolo**, in una reazione che emette luce.

Il segnale ottenuto sarà proporzionale alla quantità di anticorpo presente sulla membrana, che a sua volta dipenderà dalla quantità di proteina presente. Ci sono infatti dei programmi informatici che sulla base dei pixel della banda è in grado di quantificare la proteina. Quindi il western blot è una tecnica quali-quantitativa, che consente di valutare l'espressione relativa di una proteina tra condizioni diverse (Es. GFP).

ATTIVITA' β -GALATTOSIDASICA

Dopo trasfezione di cellule con un vettore codificante per la β -galattosidasi, esso può essere riconosciuto tramite un **saggio enzimatico**. L'attività della β -galattosidasi, da noi usata come reporter per valutare l'efficienza di trasfezione, può essere misurata con un semplice saggio allo spettrofotometro. Questo enzima è normalmente coinvolto nell'idrolisi di lattosio in galattosio e glucosio.

La β -galattosidasi, in questo caso libera O-nitrofenolo, un composto giallo che può essere facilmente rilevato allo spettrofotometro misurando l'assorbanza a 420 nm. Più intensa è la colorazione, più unità di enzima saranno presenti nel lisato. Come controllo si utilizza un estratto proveniente da cellule trasfettate con un plasmide vuoto, che quindi contiene 0U di β -galattosidasi. All'aumentare della quantità di DNA trasfettato dovrebbero aumentare anche le unità di enzima.

MTT TEST

Metodo indiretto per valutare la crescita e la proliferazione cellulare mediante l'attività metabolica cellulare. Si basa sulla capacità dei mitocondri di ridurre la soluzione di MTT, dando un prodotto finale di colore blu-violetto.

Questo è un saggio colorimetrico che misura la riduzione del 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT) di colore giallo da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi. L'MTT entra nelle cellule e passa nei mitocondri dove è ridotto ad un prodotto insolubile e colorato (viola scuro), il **formazano**. Le cellule sono poi solubilizzate con un solvente organico ed il rilascio del reagente formazano solubilizzato viene misurato allo spettrofotometricamente. Poiché la riduzione del MTT può avvenire solo in cellule metabolicamente attive, il livello di attività è una misura della vitalità delle cellule.