

Le colture cellulari

Sono sistemi artificiali in cui cellule isolate dal loro ambiente e messe in condizioni di vivere all'interno di un sistema definito, continuano a svolgere le loro funzioni specifiche e si accrescono per un tempo limitato oppure indefinitamente.

Vengono realizzate **perché**:

- Modello di studio
- Ridotto utilizzo degli animali
- Applicazioni in molti campi scientifici

Vantaggi:

1. Materiale di studio abbondante ed omogeneo
2. Possibilità di congelarle e recuperarle a distanza anche di anni
3. Evitano/riducono il sacrificio di animali
4. Controllo delle condizioni di utilizzo come pH, T, gas, nutrienti
5. Economicità e rapidità della risposta
6. Esposizione a concentrazioni note e basse di reagenti attivi

Svantaggi:

1. Sistemi semplificati rispetto ad un organismo integrato
2. Differenze con la situazione in vivo
3. Natura delle linee continue rispetto alle cellule in vivo
4. Possibile contaminazione con altri tipi cellulari o con batteri

Fonti di cellule

1. **Animali/uomo**: separazione da fluidi biologici come il sangue o asportazione (espianto/ biopsia) di un organo o tessuto e successiva dissociazione dei frammenti multicellulari che sono ridotti ad una popolazione di singole cellule. La sospensione cellulare così ottenuta viene messa in coltura, cioè trasferita in contenitori appositi contenenti miscele di sostanze inorganiche ed organiche necessarie al sostentamento delle cellule
2. **Banche cellulari** dove le colture vengono stabilizzate, studiate, mantenute e distribuite commercialmente ai laboratori interessati con tutte le informazioni necessarie per il loro mantenimento. Es. ATCC American Type Culture Collection, USA

Colture cellulari primarie

Una coltura primaria viene generata isolando le cellule direttamente a partire da tessuti od organi. Ha le stesse attività biochimiche delle cellule in vivo ma vita limitata.

Si distinguono in:

- A. **Colture d'organo**: colture a breve termine, da alcuni giorni a poche settimane, utilizzate soprattutto per studi di morfologia, differenziamento embrionale e fisiologia di organi in cui la struttura del tessuto ha una particolare importanza. Mantengono inalterato il rapporto tra le diverse cellule presenti nell'organo ma le dimensioni dell'espianto devono essere ridotte e si può verificare la necrosi di cellule più interne non raggiunte dai nutrienti e dall'ossigeno. Il frammento d'organo selezionato accuratamente viene posto su uno strato sottile di mezzo di coltura liquido o semisolido con un sufficiente spazio d'aria e l'atmosfera deve essere satura di vapore e condizionata con CO₂ al 5% per mantenere il pH costante
- B. **Colture di frammenti di tessuto**: permettono di ottenere cellule isolate senza effettuare trattamenti di disaggregazione del tessuto, con un metodo semplice che trasforma un espianto di tessuto di dimensioni minime posto in coltura in un monostrato di cellule originate dal tessuto
- C. **Colture di cellule disperse**: possono essere ottenute da diversi tessuti: endotelio dei vasi sanguigni, tessuto connettivo, sangue, tessuto nervoso, tessuto epatico e midollo osseo. Solo le cellule in grado di sopravvivere all'espianto, di aderire al substrato e di crescere, daranno origine alla coltura primaria

Ottenimento cellule primarie

1. Prelievo di un tessuto
2. Disaggregazione meccanica

3. Disgregazione enzimatica con un enzima capace di degradare la matrice extracellulare Es. Tripsina per separare le cellule
4. Inibitore per bloccare la digestione enzimatica
5. Separazione dei vari tipi cellulari
6. Le cellule possono essere messe in coltura

Per la disgregazione enzimatica il grasso e il tessuto necrotico vanno eliminati, gli enzimi usati devono essere inibiti ed eliminati e bisogna usare un terreno ricco.

La separazione dei vari tipi cellulari può essere effettuata:

1. Separando le cellule in base alle loro dimensioni (centrifugazione a bassa velocità in gradiente)
2. Sfruttando la diversa attitudine ad aderire a diversi substrati
3. Marcando le cellule con anticorpi fluorescenti specifici e separandole con FACS (fluorescence activated cell sorting)
4. Utilizzando terreni di crescita selettivi che favoriscono la crescita solo di alcuni tipi cellulari

Evoluzione di una coltura cellulare primaria

Le colture primarie possono essere propagate inalterate per un limitato numero di generazioni. Poi possono smettere di dividersi (senescenza) e morire o divenire una linea cellulare continua. La vita finita di una linea cellulare non è in relazione al tempo cronologico di coltura ma dipende dal numero di duplicazioni cellulari.

Le linee cellulari primarie sono le colture propagate in vitro a partire dalla coltura primaria quando, giunta a confluenza, bisogna provvedere ad una **subcoltura** in un nuovo recipiente e con terreno fresco.

Colture a breve termine

Hanno caratteristiche funzionali riscontrabili in vivo e corredo cromosomico diploide e la maggior parte della popolazione cellulare ha lo stesso cariotipo. Non continuano a dividersi indefinitamente ma sono in grado di compiere un numero limitato di cicli cellulari. Il numero dei cicli di replicazione è inversamente proporzionale all'età dell'animale da cui sono stati prelevati i tessuti. Svantaggi: numero limitato di cellule e isolamento da effettuare ogni qualvolta si ha bisogno della coltura cellulare.

Linee cellulari continue

Formazione casuale di una linea cellulare a vita indefinita o linea cellulare continua ma a partire da un'unica cellula ed è quindi inizialmente un clone. Hanno crescita rapida e incontrollata.

Sono **cellule immortalizzate** che hanno crescita infinita ma si tratta di modelli di studi utili non sempre fedeli alla realtà.

Metodi di immortalizzazione:

1. **Spontanea:** cellule provenienti da tessuti tumorali
2. **Chimica/fisica:** mediante radiazioni UV
3. **Trasformazione virale:** alcuni geni virali possono essere utilizzati per immortalizzare cellule di mammifero come SV40 o EBV. I geni virali immortalizzano inattivando i **tumor suppressor genes** come p53 e Rb: l'attivazione della p53 in seguito a danni al DNA porta all'arresto del ciclo cellulare in G1 e all'induzione dei geni che riparano il DNA. Se il danno non viene riparato, la cellula va in apoptosi e l'antigene T lega e sequestra p53 che non è quindi funzionale. Rb invece blocca E2F, impedendo la trascrizione di geni necessari per la progressione nella fase S. Rb fosforilato si stacca da E2F che diventa attivo per trascrizione e l'antigene T lega Rb impedendogli di legare E2F che risulta quindi sempre attivo
4. **hTERT** (Human telomerase reverse transcriptase): diverse cellule sono sensibili alla lunghezza dei telomeri e l'espressione esogena della telomerasi consente alle cellule di evitare la senescenza

Ibridomi

Tecnica che consente di ottenere cellule immortalizzate da: cellule differenziate con tasso di duplicazione basso o nullo e cellule tumorali. Gli ibridomi più frequenti sono stati realizzati tra:

- Cellula tumorale di topo + cellula differenziata di topo

- Cellula tumorale di topo + cellula differenziata umana

Le cellule ibride topo-topo sono generalmente più stabili di quelle topo-umano.

Processo di formazione: fusione dei nuclei di 2 cellule in una singola cellula ibrida, combinazione dei cromosomi delle due cellule madri e i caratteri della cellula figlia sono quelli presenti nelle 2 cellule di partenza amalgamati.

Metodi di coltura cellulare

Le cellule in coltura possono dare luogo a:

- **Colture in sospensione** in cui le cellule crescono senza aderire ad un substrato in un terreno liquido in sospensione. Es. cellule del sangue. Necessitano di volumi di terreno di coltura e superfici elevati per avere gas sufficiente alla crescita e vengono mantenute in agitazione su piastre magnetiche o su flask rotanti
- **Colture in adesione** in cui le cellule sono ancoraggio-dipendenti e necessitano di un substrato per aderire e crescere. Richiedono l'interazione tra i recettori di membrana (integrine) e le proteine adesive sulla superficie da coltura

Substrati per colture cellulari

- **Vetro** con le cellule che non aderiscono spontaneamente ma richiedono l'utilizzo di sostanze come collagene e laminina
- **Matrigel** utilizzato soprattutto per colture di cellule staminali e si tratta di una matrice biologica estratta da cellule di sarcoma di topo, un tumore ricco in proteine della matrice extracellulare. È costituito da: laminina 60%, collagene 30%, entactina 8% e fattori di crescita 2%
- **Plastica** di 2 tipi: **trattata** per colture in adesione e **non trattata** per colture in sospensione. Le piastre per colture cellulari aderenti sono in polistirene e trattate per renderle idrofile e cariche negativamente in modo che il polistirene leghi stabilmente la fibronectina presente nel siero che permette l'adesione di diversi tipi di cellule

Cellule staminali

Cellule primitive non specializzate in grado di generare cellule figlie sia identiche alla cellula madre, sia differenziate lungo una o più linee cellulari. Per poter essere definita staminale una cellula deve soddisfare 2 proprietà:

1. **Autorinnovamento** cioè capacità di compiere un numero illimitato di cicli replicativi mantenendo il medesimo stadio differenziativo
2. **Potenza** cioè capacità di dare origine a una o più specie cellulari

In base alla potenza:

1. **Totipotenti**, possono generare tutti i tipi cellulari, svilupparsi in un intero organismo e persino in tessuti extra-embryonali
2. **Pluripotenti**, possono generare più tipi cellulari e specializzarsi in tutti i tipi di cellule di un individuo adulto, ma non in cellule che compongono i tessuti extra-embryonali
3. **Multipotenti**, possono differenziarsi solamente in alcuni tipi di cellule
4. **Unipotenti**, possono generare solamente un tipo di cellula specializzata

In base alla fonte:

1. Staminali **embrionali**, dalle cellule interne di una blastocisti
2. Staminali **fetali**, (multipotenti), presenti nell'utero nel corso dello sviluppo fetale e ottenute da feti abortiti spontaneamente o da interruzioni di gravidanza
3. Staminali **amniotiche**, presenti nel liquido amniotico che circonda il feto durante la gestazione
4. Staminali **adulte** reperibili tra cellule specializzate di un tessuto specifico

Le cellule staminali embrionali e fetali servono alla formazione dell'organismo invece le cellule staminali adulte servono ad assicurare il ricambio cellulare e anche ad intervenire in caso di danno a livelli di organi durante l'omeostasi.

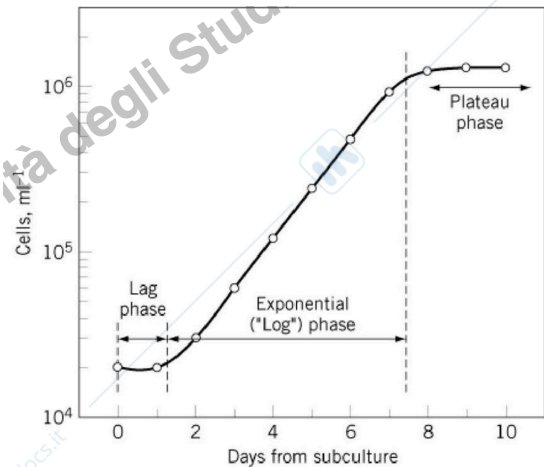
Mantenimento di una coltura cellulare

Ciclo di crescita

La coltura cellulare segue un ciclo di crescita che determina la densità di semina, il tempo di crescita, la durata di un esperimento, il momento adatto per il prelievo del campione e il metabolismo cellulare.

È diviso in 3 fasi:

1. **Fase Lag:** tempo immediatamente successivo alla semina in cui il numero di cellule che si divide è minimo. Si tratta di un periodo di adattamento dove le cellule ripristinano gli elementi persi durante il distacco dal substrato precedente e si attaccano al substrato nuovo con riassetto del citoscheletro e sintesi del DNA e di proteine strutturali
2. **Fase Log:** è il periodo d'aumento numerico esponenziale. La durata di questa fase è direttamente proporzionale alla densità di semina, il numero di cellule in divisione è molto alto (90%) ed è il momento ottimale per raccogliere campioni sia per la riproducibilità che per la vitalità cellulare
3. **Plateau:** in cui le cellule diventano confluenti e occupano tutta la superficie disponibile e la crescita si riduce fino a cessare



Il ciclo di crescita può essere bloccato in 2 modi:

- **Inibizione da contatto** che si riferisce alle cellule e al loro ancoraggio e smettono di crescere quelle a cui viene a mancare l'ancoraggio con il substrato. Molte cellule raggiunta la confluenza possono continuare a proliferare formando multistrati
- **Inibizione da densità:** molte cellule raggiunta la confluenza possono continuare a proliferare formando multistrati e smettono di crescere solo per mancanza di nutrienti

Subcoltura

Una **subcoltura** è:

- La rimozione del terreno consumato
- Il distacco delle cellule nel caso di una coltura in adesione
- Il trasferimento di un'aliquota di cellule da una coltura precedente in una nuova con terreno di crescita fresco e nuovo substrato

Le cellule vanno sub-colturate quando si trovano in fase log, prima che raggiungano la confluenza o quando si osserva un rapido abbassamento del pH, in presenza di un aumento della concentrazione cellulare.

Nel caso di cellule in sospensione bisogna:

- Mescolare la coltura
- Prelevare un'aliquota della coltura, lavare con eccesso di terreno fresco e contare
- Risospendere in terreno fresco e seminare la sospensione in nuovi contenitori per coltura cellulare alla concentrazione opportuna

Quando si effettua una subcoltura di cellule in monostrato bisogna:

- Assicurarsi che tutte le cellule si siano staccate dal substrato di crescita
- Trasferire le cellule staccate in una provetta per il tempo necessario alla conta cellulare
- Distribuire le cellule uniformemente nel nuovo supporto

La **tripsina** è un enzima proteolitico che rompe i legami peptidici delle proteine extracellulari.

La sua temperatura ottimale è 37 °C, viene inattivata da proteine del siero e viene ottenuta dal pancreas bovino. Solitamente è addizionata di **EDTA**, chelante del calcio, che facilita il distacco delle cellule dal substrato mentre la tripsina agisce enzimaticamente.

In alternativa esiste l'**accutase**, un'enzima di origine marina utilizzato per il distacco delle colture primarie e delle cellule staminali, è meno aggressivo della tripsina e non contiene proteine di origine animale o batterica.

Durante la sub-coltura è possibile contare le cellule presenti nella sospensione cellulare (**conta cellulare**) e determinare la concentrazione. L'informazione ottenuta permetterà di effettuare una semina di un preciso numero di cellule.

- **Densità di semina troppo bassa:** è richiesto troppo tempo per arrivare a confluenza
- **Densità di semina troppo elevata:** si arriva a confluenza troppo rapidamente e si hanno risultati sperimentali non riproducibili

I terreni per le colture cellulari

I terreni di coltura devono:

- Fornire tutti i composti necessari alle cellule
- Contenere un sistema tampone per mantenere il pH entro i limiti fisiologici
- Non contenere fattori tossici per le cellule
- Contenere una miscela di antibiotici

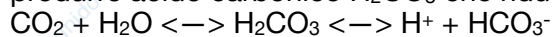
Le cellule di mammifero crescono a 37 °C, sature di umidità e in un mezzo acquoso tamponato a pH = 7.3-7.4.

I terreni sono formati dai seguenti nutrienti:

1. **Acqua:** costituente fondamentale dei terreni di coltura liquida
2. **Amminoacidi:** necessari per la sintesi proteica, le cellule necessitano di 12 aa essenziali tutti in forma L. Inoltre necessitano anche della L-glutammina ossia un amminoacido altamente instabile che nel tempo si converte in una forma non utilizzabile dalle cellule
3. **Vitamine:** agiscono da coenzimi nei processi metabolici cellulari
4. **Ioni organici ed elementi in tracce:** come sodio, potassio, calcio, magnesio, azoto, ferro, zinco e rame che influiscono sulla capacità delle cellule di aderire al substrato, regolano le fluttuazioni del pH dovute a variazioni ambientali, mantengono il potenziale di membrana e regolano l'equilibrio osmotico in quanto le cellule richiedono un ambiente isotonic
5. **Monosaccaridi** in quanto le colture cellulari usano glicolisi aerobica e anaerobica per produrre energia, sono addizionati solitamente da glucosio ad alta o bassa concentrazione
6. **Supplementi organici:** come proteine, peptidi, nucleosidi e lipidi aggiunti solo se la concentrazione del siero è bassa
7. **Ormoni:** richiesti dalle cellule per crescere

pH e sistemi tampone

Il pH ideale per la maggior parte delle cellule è **7.2-7.4**. La principale sostanza che causa variazioni di pH è la CO₂ prodotta con il metabolismo cellulare. CO₂ può reagire con H₂O per produrre acido carbonico H₂CO₃ che riduce il pH secondo la seguente reazione:



Una riduzione di CO₂ sposta l'equilibrio a destra poiché gli ioni H⁺ vengono sequestrati per formare l'acido carbonico. Un accumulo di CO₂ sposta l'equilibrio verso sinistra abbassando il pH.

I medium sintetici sono addizionati con NaHCO₃ per risolvere il problema (soluzione tampone). In soluzione acquosa il bicarbonato si dissocia determinando il rilascio finale di CO₂ nell'atmosfera dell'incubatore e l'aumento di ioni OH⁻ nel terreno di coltura. Per controllare questa reazione si fornisce artificialmente CO₂, aggiungendola nell'atmosfera dell'incubatore, in modo da impedire al gas di formarsi nel terreno e quindi impedire l'aumento di ioni OH⁻ nel mezzo. I terreni sono provvisti dell'indicatore di pH **rosso fenolo** (pH 7.3). Con il proliferare delle cellule il terreno tenderà al giallo (pH 6.8-7.0) a causa dell'acidificazione provocata dal metabolismo cellulare. Il colore viola (pH > 7.6) indica invece che le cellule non sono metabolicamente attive o che la regolazione di CO₂ è errata.

Inoltre al momento dell'uso vengono solitamente completati con Glutammina, antibiotici come Penicillina/Streptomicina e il **siero**:

è un liquido ottenuto dal plasma dopo la coagulazione e la centrifugazione delle componenti cellulari. Può derivare da diversi animali ma generalmente per le colture cellulari si usa quello di **bovino** detto FBS che deriva da taglio cesareo di vitelli appena nati entro le 24h o di vitelli tra i 10 e 30 gg. FBS è il siero di più alta qualità perché il feto bovino non viene esposto all'ambiente esterno ed ha il minor numero di anticorpi.

Il siero è costituito da:

- Proteine che fungono da Carrier per minerali e ormoni, che promuovono l'adesione, che inibiscono la tripsina e che legano il Fe rendendolo meno tossico e più biodisponibile
- Fattori di crescita tra cui PDGF, TGF β , EGF, FGF, IGF
- Ormoni: insulina che facilita l'uptake di glucosio, idrocortisone che consente l'adesione e la proliferazione cellulare
- Nutrienti e minerali
- Inibitori: sostanze inibenti la proliferazione cellulare, tossine batteriche date da contaminazioni del siero e anticorpi presenti nelle globuline del siero

Di solito il siero viene inattivato al calore per 30 minuti a 56 °C per distruggere le molecole del complemento (**decomplementazione**) e le immunoglobuline che possono essere presenti. La cascata di reazioni del complemento porta alla lisi cellulare, e quindi alla morte della coltura.

La conservazione delle cellule in azoto liquido

Le cellule possono essere conservate mediante congelamento e stoccaggio a bassa temperatura in azoto liquido: **crioconservazione**. Le cellule crioconservate:

- Rappresentano una sorgente rinnovabile di cellule
- Mantengono le caratteristiche fisiologiche e biochimiche delle cellule di partenza, caratteristiche che invece tendono a mutare dopo un lungo tempo in coltura

L'azoto liquido è inerte, privo di colore e di odore, e si trova ad una temperatura di -196 °C. Il contatto accidentale con l'azoto liquido o con il gas che si sviluppa può provocare gravi ustioni da freddo e nel caso in cui il contatto sia prolungato le conseguenze possono essere lesioni molto gravi da congelamento dei tessuti, anche a livello profondo.

Vengono principalmente congelate in azoto liquido cellule staminali embrionali e cellule provenienti da linee immortalizzate o linee cellulari ibride. Le cellule vengono riposte in contenitori adeguati, congelate lentamente e poi poste in azoto liquido (-196 °C) dove possono restare anche per anni. Quando queste cellule sono riportate rapidamente a 37 °C e seminate in piastre, aderiscono al substrato, crescono e ricominciano a riprodursi.

Il congelamento se non eseguito correttamente, può provocare alterazioni letali all'interno delle cellule tra cui formazione di grossi cristalli di ghiaccio e cambiamenti del pH e nella concentrazione di elettroliti.

Parametri fondamentali:

- Velocità di raffreddamento:** se il congelamento è troppo lento la cellula è esposta a concentrazioni crescenti di soluti extracellulari. Se il congelamento è troppo veloce si avrà la formazione di nuclei di cristallizzazione sia nella soluzione esterna, sia all'interno della cellula, che si trasformano in grossi cristalli di ghiaccio che spaccano gli organuli subcellulari
- Concentrazione dei **crioprotettori:** sono sostanze a diversa composizione chimica caratterizzate da elevata solubilità in acqua e tossicità dipendente dalla concentrazione di utilizzo. La loro azione protettiva si esplica in vari modi: con un'azione diretta sulla membrana cellulare, si sostituiscono all'acqua e diminuiscono la formazione di cristalli di ghiaccio o abbassano il punto di congelamento della soluzione permettendo una maggiore disidratazione delle cellule durante il congelamento lento (Es. glicerolo, DMSO)

Laboratorio per colture cellulari

Classificazione degli agenti biologici

Gli agenti biologici sono ripartiti in 4 gruppi a seconda del rischio ad essi associato. Il **livello di rischio** viene definito sulla base della capacità di causare danni nell'uomo.

- **Agente biologico del gruppo 1:** poche probabilità di causare malattie in soggetti umani
- **Agente biologico del gruppo 2:** può causare malattie in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori ma è poco probabile che si propaghi nella comunità e sono di norma disponibili efficaci misure terapeutiche (Es. escherichia coli)
- **Agente biologico del gruppo 3:** agente che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori, può propagarsi nella comunità e sono disponibili misure terapeutiche (es. AIDS)
- **Agente biologico del gruppo 4:** può provocare malattie gravi in soggetti umani, costituisce un serio rischio per i lavoratori, può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità e non sono disponibili efficaci misure terapeutiche (Es. virus Ebola)

Attrezzature necessarie:

1. **Cappe sterili di sicurezza biologica:** proteggono operatore, ambiente e materiale di lavoro dall'esposizione a aerosol e schizzi infetti, consentono di creare zone sterili in ambienti non sterili e sono dispositivi di protezione collettiva. Sono cappe a **flusso laminare** ossia un flusso unidirezionale di aria sterile, filtrata attraverso filtri HEPA, con velocità di flusso di 0,5 m/sec. Il flusso laminare trascina i contaminanti lontano dall'area di lavoro ed evita la formazione di vortici. I filtri HEPA prevengono la contaminazione particellare e sono fogli di microfibre di vetro ripiegati più volte per aumentare la superficie filtrante. L'efficienza è la capacità di trattenere particelle di 0,3 µm di diametro e deve essere compresa tra 99,97% e 99,99%

Esistono 3 tipi di cappe di sicurezza biologica a flusso verticale:

- **Classe I:** non protegge il campione da contaminazioni e non garantisce la sterilità ma protegge l'operatore grazie al flusso d'aria diretto dall'esterno all'interno della cappa attraverso l'apertura frontale e protegge l'ambiente grazie alla presenza di un filtro HEPA nel sistema di scarico
- **Classe II:** è una cappa ventilata aperta frontalmente progettata per la protezione dall'operatore, dei prodotti al suo interno e dell'ambiente circostante. Sono caratterizzate da una zona per decontaminazione e 4 filtri: filtro HEPA di espulsione d'aria, filtro a carbone attivo in caso di riciclo nello stesso locale, filtro HEPA dell'aria di ricircolo e filtro HEPA d'ingresso dell'aria. Sono suddivise in cappe di tipo A per agenti biologici con un rischio basso o moderato con 70% di ricircolo di aria all'interno della cabina e il 30% nel locale e di tipo B con il 30% di ricircolo d'aria all'interno della cabina e il 70% all'esterno del locale
- **Classe III:** cappa ventilata totalmente chiusa a tenuta d'aria e a pressione negativa. L'aria in ingresso passa per un filtro HEPA e quella in uscita passa per 2 filtri HEPA posti in serie. Il lavoro viene svolto con guanti a manica in gomma attaccati alla cappa

Una cappa a **flusso orizzontale** protegge solamente il campione e quindi non è un dispositivo di protezione collettiva. Possono essere manipolate cellule non pericolose e possono essere preparate le colture primarie partendo da animali o frammenti di tessuto.

Spesso le cappe sono equipaggiate con **lampade a UV germiche** per la sterilizzazione. Le radiazioni UV sono radiazioni elettromagnetiche prodotte dal bombardamento, con elettroni o con un fascio di raggi catodici, di un bersaglio di metallo pesante. Risultano poco penetranti, agiscono per trasformazione fotochimica delle basi pirimidiniche del DNA cellulare e utilizzate soprattutto nei laboratori scientifici per trattare l'aria ma quando i locali trattati non sono utilizzati perché i raggi UV sono molto irritanti per le mucose.

2. **Incubatori ad atmosfera controllata:** mantengono le condizioni ottimali di crescita per le colture cellulari come temperatura a 37 °C, l'umidità al 95% e la CO₂ al 5%.
3. **Bagno termostato ad acqua:** per riscaldare terreni di crescita o la tripsina a 37 °C
4. **Microscopi:** principalmente rovesciato a contrasto di fase che permette di osservare le cellule vive e di valutare lo stato di proliferazione, lo stato di salute, i parametri morfologici e fisiologici delle colture
5. **Centrifughe:** utilizzate per il mantenimento, il congelamento/scongelamento e il frazionamento subcellulare delle colture cellulari

6. **Plasticheria e vetreria:** sterilizzate con radiazioni gamma ossia fotoni ad elevata energia che trasferiscono la loro energia all'interno della cellula colpita

Sterilizzazione

La **sterilizzazione** consiste nella distruzione o eliminazione di tutte le forme microbiche e delle spore. Invece la **disinfezione** consiste nell'utilizzo di mezzi chimici o fisici che uccidono i microrganismi ma non necessariamente le spore.

È indispensabile la sterilità delle colture cellulari in quanto gli agenti inquinanti possono sottrarre nutrienti dal medium di coltura, acidificare il medium e produrre metaboliti tossici per le cellule in coltura.

1. Batteri: acidificazione del terreno
2. Lieviti/Muffe/Funghi: torbidità e solidificazione del terreno
3. **Micoplasma:** piccolissimi batteri, privi di parete cellulare appartenenti alla classe dei Mollicutes. Hanno dimensioni tra 0.2 e 0.3 μm in diametro quindi la filtrazione non li elimina. Sono gli essere viventi più piccoli del regno animale capaci di auto-replicazione e sono gli agenti contaminanti più prevalenti e pericolosi dei sistemi cellulari di laboratorio. Possono virtualmente alterare le proprietà delle cellule, determinano dei problemi di qualità nei prodotti bio-farmaceutici come i vaccini e creano problemi nella validazione/riproducibilità degli esperimenti. Il micoplasma può essere rilevato per colorazione diretta del DNA con un intercalante fluorescente o per PCR

La sterilizzazione delle soluzioni può essere fatta mediante calore o filtrazione, utilizzando appositi filtri con pori del diametro di 0.2 μm . La sterilizzazione del materiale solido è fatta mediante **calore** che può essere **secco** o **umido** causando la denaturazione irreversibile degli enzimi e delle strutture proteiche. La sensibilità al calore varia in rapporto al loro contenuto in H_2O : più questo è alto, più sensibili sono i microrganismi al calore.

- **Incenerimento** (sulla fiamma del Bunsen) per strumenti di laboratorio metallici, pipette di vetro per aspirare il medium dalle piastre
- **Calore secco** (stufe): richiede tempi e temperature maggiori (140-170 °C) rispetto all'autoclave perché l'aria è un cattivo conduttore del calore. Usato per vetreria, ferri chirurgici, materiale termoresistente
- **Vapore sotto pressione** (autoclave): alla pressione di 1 atm, il vapore raggiunge una T di 121 °C alla quale le più resistenti spore batteriche vengono distrutte in 5-10 min. Usato per materiale di vetro, materiale in gomma o plastica, ferri chirurgici, soluzioni acquose

Saggi su colture cellulari

Un parametro importante da valutare in una coltura cellulare è la **vitalità**, cioè la % di cellule vive sulla popolazione totale di cellule. Una prima valutazione della vitalità cellulare può essere effettuata attraverso analisi morfologica della coltura cellulare al microscopio ottico.

- Cellule danneggiate: diminuzione del volume cellulare
 - Cellule necrotiche: rigonfiamento cellulare
 - Cellule apoptotiche: restringimento cellulare, condensazione nucleare e frammentazione del nucleo
1. Saggi basati sull'integrità di membrana:
 - **Colorazione con Trypan Blue:** è un colorante che colora selettivamente le cellule morte mentre non è assorbito dalle cellule vive: non permea la membrana cellulare integra. Le cellule morte assorbono il trypan blue e al microscopio si vedono blu. La conta delle cellule blu è un test di mortalità mentre la conta delle cellule non blu è un test di vitalità
 - **Colorazione con calceina-AM:** derivato non fluorescente della calceina che può essere trasportato attraverso la membrana cellulare con il gruppo acetossimetilico che maschera la parte della molecola che chela gli ioni Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} . Quando entra nella cellula, le esterasi intracellulari rimuovono il gruppo AM e la molecola resta intrappolata nella cellula. La calceina libera può legare ioni Ca^{2+} emettendo fluorescenza verde. Solo le cellule vive hanno esterasi attive: cellule fluorescenti sono cellule vive (test di vitalità)

- **Colorazione con ioduro di propidio:** è un agente intercalante fluorescente che si intercala agli acidi nucleici. Come trypan blue non permea la membrana cellulare integra ma colora solo le cellule morte. Al microscopio a fluorescenza: cellule rosse sono cellule morte (test di mortalità). Quest'ultime due tecniche possono essere attuate contemporaneamente in modo da vedere sia le cellule vive (verdi) che quelle morte (rosse) al microscopio a fluorescenza
- **Rilascio della LDH:** misura il rilascio dell'enzima citosolico **Lattato-deidrogenasi** nel medium di coltura delle cellule. Si basa sull'accoppiamento di 2 reazioni enzimatiche che portano alla riduzione del sale di tetrazolio (giallo) a Formazano (blu/violetto), in presenza di LDH, Lattato, NAD⁺ e dell'enzima Diaforasi.

Se nel terreno è presente l'enzima LDH:

- Lattato e NAD⁺ coinvolti nella 1° reazione = piruvato + NADH
- Diaforasi, sale di tetrazolio (INT) e NADH coinvolti nella 2° reazione = NAD⁺ + Formazano

La misurazione dell'assorbanza del formazano prodotto a 490 nm è direttamente proporzionale al numero di cellule morte (test di mortalità).

2. Saggi basati sul potenziale redox:

- **Alamar-Blue:** è un saggio di vitalità cellulare basato sull'utilizzo del composto resazurrina (non tossico, blu/viola e poco fluorescente). La resazurrina è usata come indicatore redox: in presenza di elevato metabolismo cellulare, viene ridotta a resorufina, composto rosa altamente fluorescente

3. Saggi basati sulla funzionalità mitocondriale:

- **Saggio MTT:** è un saggio colorimetrico che sfrutta la capacità delle **deidrogenasi mitocondriali** di scindere l'anello tetrazolico del sale di tetrazolio di colore giallo per dare, a livello mitocondriale, un sale di formazano blu/violetto. La quantità di formazano prodotta:
 - Dipende dal numero di cellule presenti in coltura e dall'attività metabolica mitocondriale che, in condizioni normali, rispecchia lo stato di salute generale della cellula
 - Viene misurata con un test colorimetrico (assorbanza a 490-500 nm), dopo aver lisato le cellule con isopropanolo
- **Test dell'ATP:** consente di determinare la quantità di cellule vitali presenti in coltura basandosi sulla quantificazione indiretta dell'ATP presente. Saggio di luminescenza che sfrutta la capacità dell'enzima luciferasi di ossidare, in presenza di ATP, la luciferina generando luce. Maggiore è il contenuto di ATP maggiore è la quantità di luce emessa

Cancro

Crescita anormale del tessuto in cui le cellule si dividono in modo incontrollato e autonomo, portando ad un aumento progressivo del numero di cellule in divisione. La massa risultante di tessuto in crescita è detta tumore.

Progressione metastasica: crescita cellulare di un tumore benigno a livello epiteliale, rottura della lamina basale, invasione del capillare, aderenza all'endotelio del vaso sanguigno, fuoriuscita dal vaso attraverso la membrana basale, proliferazione e formazione della metastasi.

Essenziali per la migrazione cellulare sono:

- Degradazione della Matrice Extracellulare
- Polarizzazione della cellula
- Segnali ambientali chimico-fisici

La rottura dei legami proteici delle molecole che costituiscono la matrice extracellulare avviene ad opera di enzimi proteolitici sintetizzati e secreti nella ECM dalle cellule stesse in forma attiva (zimogeni) e attivati successivamente (Mtealoproteasi MMPs, Serino proteasi uPA).

Necessaria polarizzazione iniziale della cellula per farla avviare verso una direzione specifica: esistono diversi segnali di stop e di via che influenzano il movimento di una cellula.

- **Chemotassi:** movimento in direzione di un gradiente di concentrazione di un composto chimico-fisico diffusibile
- **Aptotassi:** movimento in direzione di un composto chimico-fisico non diffusibile presente a livello della ECM o della superficie di altre cellule

Metastasi sperimentale

Il processo metastasico può essere riprodotto sperimentalmente così da studiare i diversi momenti dell'invasione metastasica riducendo le possibili variabili.

- **Test di invasione con aggregati in Matrigel™**: facciamo una sospensione di cellule che mettiamo nel matrigel. La sospensione viene seminata su un vetrino con le cellule che tendono a formare aggregati: alcune di queste riescono a migrare fuoriuscendo dal matrigel mentre altre non sono in grado
- **Scratch assay**: si basa sulla creazione di uno scratch in un monostrato di cellule confluenti e sulla valutazione della capacità delle cellule rimaste di ri-occupare la superficie libera
- **Test di adesione cellulare**: sfrutta la capacità delle cellule di aderire ad un determinato substrato. Si utilizzano delle piastre a pozzetto trattate con composti differenti per verificare la diversa adesione cellulare; aspettiamo un tempo non troppo lungo e aspiriamo la sospensione cellulare così da rimuovere le cellule che non si sono adese. Vengono poi aggiunti coloranti che colorano il citoplasma come eosina e infine misuriamo l'assorbanza

Colture 3D

Microambienti artificiali in cui le cellule possono crescere in tutte e 3 le dimensioni, mimando una condizione più simile a quella fisiologica. Nelle colture 3D le cellule crescono formando strutture sferoidali in sospensione o all'interno di una matrice biologica o sintetica il più possibile biocompatibile. Tali strutture, dette **sferoidi**, sono caratterizzate da diverse zone di crescita che possono mimare diverse condizioni fisiologiche: le cellule più esterne proliferano e ricevono facilmente i nutrienti e l'ossigeno, mentre più si va verso l'interno le cellule possono morire in quanto ricevono meno nutrienti.

Metodi di coltura in 3D:

- Liquid overlay culture**: la superficie per la coltura è coperta da un sottile film di substrati o plastiche inerti. Viene sfavorita l'adesione e favorita la formazione di sferoidi che si possono sviluppare nel mezzo liquido di coltura. È semplice e poco costosa ma è difficile monitorare gli sferoidi che si formano
- Hanging drops**: la tecnica della goccia sospesa si basa su 2 principi fisici ossia la tensione superficiale dei liquidi e la forza di gravità. Un piccolo volume di sospensione cellulare (15-30 uL) viene seminato sul coperchio di una piastra, formando tante piccole gocce. Il coperchio viene poi invertito e grazie alla tensione superficiale le aliquote di cellule restano sospese come gocce. Le cellule per gravità si accumulano sulla punta inferiore della goccia, si aggregano e proliferano fino alla formazione degli sferoidi. È semplice, poco costosa e gli sferoidi sono molto simili ma hanno volumi ridotti
- Hydrogels**: si basa sull'utilizzo di gel composti da polimeri idrofilici con alto contenuto d'acqua in cui vengono iniettate le cellule. I gel mostrano una rigidità simile a quella dei tessuti molli per assomigliare all'ECM naturale. La struttura è simile al vivo ma i composti rilasciati dal gel potrebbero influenzare negativamente la crescita cellulare
- Scaffolds**: strutture sintetiche 3D costituite da una vasta gamma di materiali tra cui collagene, gelatina e seta. Possiedono diversa porosità, permeabilità, caratteristiche chimiche. Sono progettate per mimare la matrice extracellulare, sono biocompatibili e forniscono appropriati microambienti di crescita
- Bioreattori**: una sospensione cellulare viene posta in una camera e sottoposta ad un'agitazione continua. I bioreattori sono dotati di sistemi di flusso dei terreni per fornire la circolazione dei nutrienti, l'espulsione dei rifiuti metabolici e l'omogeneità dei fattori fisici e chimici. Vengono usati per produzione su larga scala ma difficoltà nel controllo dei singoli sferoidi
- Stampanti 3D**: tale tecnica è una tecnologia di recente sviluppo con cui ci si riferisce alla costruzione di strutture 3D personalizzate sotto controllo computazionale da utilizzare come supporti di crescita e per l'inserimento delle cellule.

Ingegneria cellulare

Trasfezione

Inserimento di DNA/RNA esogeno in cellule eucariotiche per:

- Esprimere/sovraesprimere un gene: pDNA (nucleo)
 - Silenziare un gene: ASO (citoplasma) o RNAi
1. **pDNA**: il DNA che voglio inserire viene clonato all'interno di un plasmide. Plasmide è DNA: circolare, extra-cromosomiale e autoreplicante. La replicazione può richiedere la produzione di proteine specifiche da parte del plasmide o utilizzare quelle batteriche dell'ospite. Tutti i plasmidi utilizzati in biologia molecolare sono sintetici e posseggono almeno 3 proprietà in comune (**vettori plasmidici**):
 1. **Origine di replicazione batterica**: è una sequenza di DNA che contiene il sito di inizio della replicazione (ori); comprende anche i geni che codificano tutti gli mRNA e le proteine necessarie alla replicazione
 2. **Un marker selettivo**: è un gene dominante che codifica per alcuni enzimi in grado di degradare antibiotici specifici
 - **Resistenza alla ampicillina**: alcuni batteri posseggono, oltre alla membrana cellulare, una parete cellulare esterna rigida che previene la rottura osmotica nei medium ipotonici. La parete cellulare batterica deve allargarsi e duplicarsi nel corso della crescita e divisione cellulare. I derivati della **penicillina** agiscono inibendo la biosintesi ex novo della parete batterica rendendo il batterio vulnerabile alla rottura osmotica. Lo stafilococco aureus produce **penicillasi** che rompono le penicilline inattivandole e causano resistenza agli antibiotici. Tutte le cellule che codificano per delle penicillasi distruggono l'ampicillina e possono formare la parete cellulare
 - **Resistenza alla tetraciclina e kanamicina**: azione a livello di un ribosoma 70S costituito da 2 subunità (30S e 50S). La **tetraciclina** bersaglia la subunità 30S inibendo il legame dell'amminoacil-tRNA al sito A del ribosoma mentre la **kanamicina** bersaglia sempre la subunità 30S inibendo il legame del primo amminoacido al complesso di iniziazione
 3. **Sito di clonaggio**: è un sito di taglio per un enzima di restrizione specifico che può essere utilizzato per inserire DNA esterno, senza interferire con le funzioni basali del plasmide. Nei plasmidi è presente una regione chiamata **multiple cloning site (MCS)** o **polylinker** in cui sono presenti dei siti di taglio unici per diversi enzimi di restrizione non presenti in altre regioni del plasmide

Oltre a questi elementi, per l'espressione di proteine in cellule di mammifero da parte di un plasmide sono necessari:

1. **Promotore**: corte sequenze nucleotidiche che danno inizio alla trascrizione
2. **Sequenza di terminazione**: sito di poliadenilazione trascritto dalla RNAPol II che rimuove parte della porzione 3' e l'RNA poliadenilato. Per una corretta poliadenilazione sono necessari: sequenze di 6 nucleotidi AAUAAA upstream il sito di poliadenilazione e sequenze ricche di GU o U downstream il sito di poliadenilazione
2. **Oligonucleotidi anti-senso (ASO)**: sono polimeri sintetici i cui monomeri sono desossiribonucleotidi o ribonucleotidi, hanno lunghezza compresa tra 15-20 nucleotidi e la loro sequenza (3' → 5') è antisenso, cioè complementare alle sequenze del mRNA di interesse.

Gli ASO funzionano legando l'mRNA che codifica per una proteina specifica.

Il legame tra i due può:

- interferire con la corretta maturazione di mRNA
- bloccare fisicamente la capacità dei ribosomi di muoversi lungo l'mRNA messaggero impedendo la sintesi della proteina;
- accelerare la velocità con cui l'mRNA viene degradato nel citosol;

Gli oligonucleotidi antisenso devono:

- essere in grado di entrare nelle cellule bersaglio;

- evitare la digestione da parte delle nucleasi;
- non causare effetti tossici.

Per raggiungere questi obiettivi, gli oligonucleotidi antisenso sono generalmente **modificati chimicamente**.

- Prima generazione: modificazioni a livello della catena laterale
 - Seconda generazione: modificazioni a livello della base azotata e dello zucchero
 - Terza generazione: modifiche dell'anello del nucleotide:
 - **PNA**: un analogo non carico del nucleotide che può ibridare con maggiore affinità e specificità, non è substrato per nucleasi e agisce per ingombro sterico
 - **PMO**: lo zucchero ribosio è sostituito da un anello morfolino a sei membri che non è substrato per nucleasi, agisce per ingombro sterico e ha dimostrato un'efficacia antisenso in modelli animali in vivo e in studi clinici
3. **RNA interference** (RNAi): è un processo post-trascrizionale mediante il quale un mRNA è destinato alla degradazione mediante l'introduzione di RNA a doppio filamento (dsRNA) con un filamento complementare a un frammento di tale mRNA. Ci sono 2 vie principali di RNAi:
1. **Small interfering RNAs** (siRNAs) generati attraverso il processamento di **dsRNA più lunghi** che si legano perfettamente all'mRNA target negli animali
 2. **Micro RNAs** (miRNAs) generati attraverso il processamento di precursori **stem loop** che si appaiano imperfettamente.

Ci sono 3 componenti principali per la generazione di siRNA:

1. **Dicer**: RNasi III responsabile del processamento di dsRNA in siRNA
2. **siRNA**: dsRNA di 21-23 nucleotidi derivante dal processamento e complementare ad una specifica sequenza di mRNA bersaglio per la degradazione
3. **RNA-Induced Silencing Complex** (RISC): complesso nucleasico formato sia da proteine che di RNA che distrugge l'mRNA endogeno complementare al siRNA

Tecnologie di genome editing

Le tecnologie di genome-editing permettono di introdurre modifiche sequenza-specifiche nei genomi di un ampio spettro di cellule e organismi grazie a rotture mirate del doppio filamento di DNA. Queste rotture guidano poi l'attivazione delle vie di riparo del DNA cellulare e facilitano l'introduzione di modifiche sito-specifiche.

1. **ZFNs**: funzionano come dimeri che riconoscono triplette di DNA ma non riescono a creare domini in grado di riconoscere efficacemente tutte le triplette di DNA
2. **TALEN**: sono proteine modulari composte da unità multiple, di solito 12-20, che riconoscono un solo nucleotide
3. **CRISPR/Cas9**: in numerosi batteri sono presenti sequenze ripetute associate a sequenze spaziatrici di origine extracromosomiale dette CRISPR che sono associate ad una nucleasi denominata Cas
 - **Fase di acquisizione**: il DNA estraneo viene incorporato nel genoma batterico in corrispondenza dei CRISPR loci
 - **crRNA biogenesi**: i CRISPR loci vengono trascritti e processati a crRNA che si legano ai tracrRNA
 - **Interferenza**: il crRNA maturo lega l'enzima endonucleasico Cas9, che scansiona tutto il DNA per trovare il suo bersaglio. La Cas9 taglia il DNA esogeno che contiene una sequenza di 20 nucleotidi complementare al crRNA adiacente ad una sequenza PAM

L'accuratezza del bersaglio è aumentata dalla presenza della sequenza PAM che impedisce alla nucleasi di tagliare il proprio cromosoma. Se la sequenza PAM non è presente, Cas9 non funziona. Quando invece viene individuata, la proteina e il doppio filamento di DNA subiscono un cambiamento conformazionale che assicura un taglio corretto da parte della proteina Cas9. Esistono 2 siti catalitici:

- **HNH**: che taglia il DNA legato a 3 nucleotidi di RNA a monte della PAM

- **RuvC**: taglia il filamento non complementare

Ingegneria genetica

Vettori

Veicoli per l'introduzione e l'espressione di DNA/RNA esogeno in cellule.

Metodi di trasfezione:

1. **Metodi chimici**: prevedono l'utilizzo di **molecole Carrier** per poter superare la barriera costituita dalla membrana cellulare. Il principio consiste nell'interazione tra gli acidi nucleici carichi negativamente con molecole cariche positivamente, come polimeri o lipidi. Queste molecole permettono agli acidi nucleici di entrare in contatto con le componenti della membrana cariche negativamente e quindi di poter essere incorporati nel citoplasma della cellula mediante endocitosi.

DEAE-dextran: si basa sull'utilizzo di **Destrano**, polisaccaride costituito da unità di D-glucosio legate mediante legami di tipo alfa 1→4 o alfa 1→6. Quando viene associato a gruppi carichi positivamente, DEAE è in grado di legare il DNA e di mediarne l'ingresso attraverso le membrane.

Per aumentare l'efficienza di trasfezione si può pretrattare le cellule con: glicerolo e DMSO che possono modificare la permeabilità della membrana o cloroquina che si lega al DNA e inibisce la sua degradazione lisosomiale.

Calcio-Fosfato: Principio:

- Il DNA viene mischiato direttamente con una soluzione concentrata di CaCl_2
- Poi viene aggiunto goccia a goccia un buffer fosfato per formare un fine precipitato
- Uptake probabilmente per endocitosi con distruzione del precipitato e rilascio del plasmide all'interno della cellula

Lipofezione: si basa sull'utilizzo di lipidi cationici formati da una testa carica positivamente (ammina), un gruppo linker come un estere o un etere e 2 o più code idrofobiche. I lipidi cationici in acqua formano strutture chiamate **liposomi** che complessano il DNA grazie alla testa cationica. I liposomi sono un misto di lipidi policationici, che permettono la formazione di vescicole liposomiali unilamellari che portano una carica netta positiva. La testa cationica del composto lipidico si associa ai gruppi P negativi dell'acido nucleico. I complessi lipidi-DNA si fondono con le membrane cellulari e rilasciano spontaneamente il loro contenuto nelle cellule o vengono internalizzati per endocitosi.

Es. **Transferrina**. La transferrina viene aggiunta al mix liposoma-DNA dove funziona da agente direzionante in quanto, grazie alla sua affinità con recettori di membrana, facilita l'interazione e l'ingresso del complesso.

2. **Metodi fisici**: permettono di trasferire direttamente nel citosol o nel nucleo gli acidi nucleici, senza l'utilizzo di sostanze chimiche.

Microiniezione: metodo usato principalmente per la manipolazione di singole cellule. Si basa sull'inserimento di DNA o RNA nella cellula (nel citoplasma o nel nucleo) attraverso un capillare di vetro, con un sistema a pressione controllata. Date le ridotte dimensioni delle cellule la microiniezione richiede l'utilizzo di un microscopio, un micromanipolatore e un iniettore.

Metodi balistici: il DNA viene coattato su particelle di oro o tungsteno. Le particelle sono accelerate applicando un alto voltaggio o attraverso una pressione esercitata da un gas e penetrano nella cellula attraverso pori nella membrana plasmatica o nella parete cellulare.

- **Sistema della camera a vuoto**: sistema che accelera microproiettili d'oro o di tungsteno rivestiti di DNA su un bersaglio posto in una camera sottovuoto
- **Gene Gun**: lo sparo è ottenuto con un'onda supersonica di elio, che passando all'interno della cartuccia, proietta fuori il contenuto

Elettroporazione: con le cellule che vengono poste in una soluzione contenente DNA ed esposte ad un breve impulso elettrico che produce dei pori nelle loro membrane.

Prima dell'impulso la membrana cellulare introduce geni e farmaci; durante l'impulso il campo elettrico induce una tensione attraverso la membrana cellulare mentre dopo l'impulso la cellula guarisce grazie ai geni e farmaci all'interno.

La trasfezione

Fattori che influenzano la trasfezione:

- **Stato di salute delle cellule:** le cellule devono essere coltivate in un medium di crescita appropriato e in condizione di temperatura e umidità corrette, devono essere prive di contaminazioni e devono essere mantenute nella fase log di crescita
- **Confluenza e fase di crescita della coltura:** la densità ottimale di crescita per la trasfezione è linea cellulare e metodo dipendente tra il 40% e 80%. In caso di densità **troppo bassa** i reagenti di trasfezione possono risultare troppo concentrati e tossici e le cellule crescono troppo poco; in caso di densità **troppo alta** le cellule hanno inibizione da contatto e si riduce la superficie di membrana disponibile all'ingresso del DNA. Le cellule in attiva divisione si trasfettano meglio delle cellule quiescenti in quanto la rottura della membrana nucleare durante la mitosi favorisce l'ingresso del DNA esogeno nel nucleo
- **Qualità e quantità del DNA:** è necessario utilizzare plasmidi di alta-qualità, privi di contaminanti proteici, di RNA e di sostanze chimiche usate per la purificazione. La quantità ideale di DNA da trasfettare dipende dal tipo cellulare e dal metodo di trasfezione e va quindi determinata sperimentalmente

La trasfezione può essere:

1. **Transiente:** per esperimenti a breve termine, le cellule sono normalmente raccolte 48-72 h dopo la trasfezione e la popolazione cellulare risulta disomogenea e caratterizzata da poche cellule con molto plasmide
 2. **Stabile:** per esperimenti a lungo termine, si basa sull'integrazione del gene di interesse nel genoma delle cellule trasfettate. Durante le prime 48 ore della trasfezione, fino al 50% delle cellule contengono DNA esogeno in forma **episomale**. In seguito, a causa della degradazione e della diluizione, le cellule che non hanno integrato tale DNA nel loro genoma lo perdono. Per poter selezionare quali cellule hanno integrato il transgene, si accoppia l'espressione del transgene a quella di un gene che codifica per una resistenza ad un antibiotico detto **marker selettivo**. Il marker può essere presente sullo stesso plasmide del gene di interesse oppure co-trasfettato con un secondo plasmide.
- **Aminoglicoside fosfotransferasi (Neo):** conferisce resistenza agli antibiotici aminoglicosidici
 - **Igromicina B fosfotransferasi:** conferisce resistenza all'igromicina (Hyg)

Questi antibiotici tendono a non essere tossici a piccole dosi mentre a dosi elevate possono danneggiare anche le cellule trasfettate ed è quindi necessario determinare la dose appropriata. Per farlo si utilizza la **Killing curve**:

- Seminare le cellule in cui si vuole effettuare la trasfezione
- Trattare con concentrazioni crescenti dell'antibiotico scelto per la selezione
- Seguire la coltura per una settimana cambiando il terreno e il trattamento ogni 2-3 giorni

Dopo una settimana si potranno determinare:

- La **dose bassa** cioè la concentrazione di antibiotico alla quale è evidente una tossicità visiva minima dopo 7 giorni di selezione antibiotica
- La **dose ottimale** cioè la più bassa concentrazione di antibiotico alla quale tutte le cellule sono morte dopo una settimana di selezione antibiotica
- La **dose alta** cioè la concentrazione di antibiotico alla quale la tossicità visiva è evidente entro i primi 2-3 giorni di selezione antibiotica

Sistemi stabili-inducibili

Permettono di regolare l'espressione di un gene e di studiare l'espressione di geni tossici così da ottenere linee cellulari trasfettate stabilmente col gene da studiare che viene:

- **Mantenuto spento** durante la selezione clonale e durante la normale propagazione della linea
- **Acceso** al momento dell'esperimento

Es. **Tet system**: sistemi regolati dalla tetraciclina (Tc) o da suoi analoghi come la doxyciclina (Dox).

- **Tet-On**: l'aggiunta di Tc o Dox accende l'espressione del gene di interesse
- **Tet-Off**: l'aggiunta di Tc o Dox mantiene spento il gene

Sono sistemi che sfruttano le proteine di E.coli coinvolte nella resistenza alle tetracicline come **Tet R** che regola negativamente l'espressione dei geni coinvolti nella resistenza. In assenza di Tc, Tet R si lega alla sequenza **Tet O** e blocca la trascrizione. Per gli esperimenti in cellule di mammifero Tet R è stata modificata:

- **tTA** = Tc-controlled trans activator che diventa attivatore trascrizionale in assenza di Dox
- **rtTA** = reverse tTA che diventa attivatore trascrizionale in presenza di Dox

Il gene da regolare deve essere inserito a valle di una sequenza chiamata **TRE** = Tc responsive elements che contiene sequenza Tet O.

Nel **sistema Tet-Off** è necessario aggiungere Tc o Dox nel medium per mantenere lo stato inattivo. Nel **sistema Tet-On** è necessario aggiungere Dox nel medium per attivare la trascrizione. Il sistema Tet-On è responsivo solo alla Dox mentre Tet-Off è sensibile ad entrambi.

I vettori virali

Un **virus** è un parassita intracellulare obbligato, hanno dimensioni di 10-100 nm e struttura formata da un genoma fatto da acidi nucleici, un capsido proteico e alcuni hanno un envelope lipidico. Si sono evoluti per trasferire il loro DNA/RNA nelle cellule in maniera efficiente e selettiva e per questo vengono utilizzati per infettare cellule di mammifero.

Principio:

1. Inserire il gene di interesse nel genoma del virus, sotto il controllo di un promotore forte
2. Modificare il genoma virale in modo da rendere il virus incapace di riprodursi in maniera autonoma (**virus difettivo**). Questo è importante per evitare la diffusione di virus ricombinanti
3. Amplificare le particelle virali in una linea cellulare geneticamente modificata: **cellule di packaging** che complementano in trans i difetti del genoma virale
4. Purificazione e titolazione delle particelle virali
5. Infezione del tipo di cellula di interesse

Vantaggi dei vettori non virali:

- Impossibile la generazione di nuovi virus patogeni
- Riduzione del rischio di reazione immunitaria
- Possono trasferire molti tipi diversi di molecole, e permettono di trasdurre molecole di DNA anche grandi
- Possibilità di produzione in grandi quantità a basso costo

Svantaggi dei vettori non virali:

- Scarsa efficienza sia di trasfezione che di integrazione
- Se integrati possono a loro volta dare mutagenesi inserzionale

Vantaggi dei vettori virali:

- Alta efficienza di trasduzione

Svantaggi dei vettori virali:

- Possibilità di generare nuovi virus patogeni per ricombinazione con eventuali virus presenti nell'ospite
- Mutagenesi inserzionale per quelli che si integrano in maniera casuale nel genoma
- Molecole di DNA di dimensioni limitate
- Reazioni immunitarie
- Costi elevati

Virus difettivi: possono essere prodotti solo in particolari linee cellulari capaci di complementare i difetti del virus. La loro preparazione deve seguire queste fasi obbligate:

1. Costruzione del genoma ricombinante: genoma a DNA o RNA, ss o ds, promotore forte + origine di replicazione (TR), sequenze per proteine strutturali (S) e sequenza di packaging riconosciuta dalle proteine del capsido. Il genoma viene modificato rimuovendo alcune delle sequenze S rendendo così il virus incapace di infettare
2. Trasfezione del genoma modificato in una linea cellulare capace di produrre le particelle virali dette cellule di packaging: sono linee cellulari trasfettate con geni virali codificanti per proteine strutturali del virus, necessarie per l'assemblaggio dei virioni. La loro trasfezione transiente con il DNA-vettore determina l'impacchettamento del costrutto nel virione maturo. In questo modo si ottiene un vettore virale completo e pronto per l'infezione
3. Raccolta, titolazione e analisi del virus

Principali tipi di vettori virali

- **Retrovirus** divisi in **retrovirus murini** non capaci di provocare malattie nell'uomo, sono inattivati dal complemento umano e possiedono un envelope lipidico e non resistono al disseccamento; i **lentivirus** (HIV) invece sono patogeni umani del torrente ematico.

I retrovirus con envelope hanno genoma di 10 Kb costituito da una molecola di RNA_{ss} che dopo l'infezione viene retrotrascritto a DNA_{ds} e si integra nel genoma dell'ospite. Il genoma è caratterizzato da 5 tipi di sequenze: **gag** che codifica per le proteine del core, **pol** che codifica per la trascrittasi inversa, **env** che codifica per le proteine dell'envelope, **LTR** (long terminal repeat) che comprendono promotore/enhancers e sequenze necessarie per l'integrazione e **sequenze per il packaging**.

La replicazione, l'integrazione e il packaging dei retro/lentivirus sono mediati in parte da sequenze di RNA o DNA cis che non codificano proteine. Gli elementi cis come le LTR e i segnali di packaging sono essenziali nella progettazione di vettori virali ricombinanti e sono generalmente inclusi nel plasmide di trasferimento. I geni virali gag, pol ed env sono sostituiti con il cDNA del gene di interesse. Il vettore che si ottiene non è in grado di produrre le proteine virali necessarie per un altro ciclo di infezione. Vengono mantenute la regione essenziale che comprende i 2 LTR e la sequenza di packaging. Le proteine virali eliminate vengono fornite in trans da cellule di packaging o virus helper che complementa in trans il virus di partenza rimuovendo la sequenza di packaging.

I retrovirus murini non provocano malattie umane, inducono scarsa risposta immunitaria nell'ospite, capacità di infettare efficientemente una vasta gamma di tipi cellulari, integrazione del materiale genetico recato dal vettore nel genoma delle cellule bersaglio e alta efficienza di trasduzione ma potenziale oncogeno perché si integrano nel genoma dell'ospite in molteplici siti, infettano solo cellule in attiva divisione e sono difficili da coltivare.

Il genoma dei lentivirus presenta 2 ulteriori sequenze chiamate **Tat** che codifica i transattivatori critici per l'attivazione della trascrizione virale e **Rev** che codifica una proteina che regola lo splicing e l'esportazione dei trascritti virali.

Poiché i vettori lentivirali sono derivati dal virus patogenico HIV-1, la biosicurezza nella loro produzione è importantissima. Durante il processo di utilizzo di virus difettivi per la replicazione, c'è la possibilità di generare accidentalmente **RRC** (revertanti replicazione competenti) tramite ricombinazioni tra gli elementi virali forniti e quelli endogeni nelle cellule produttrici. Per ridurre le possibilità di ricombinazione, il genoma virale detto split-genome viene suddiviso in 4 plasmidi: cDNA, VSV-G envelope, gag e pol, rev.

I lentivirus possono essere somministrati in vivo, non sono inattivati dal complemento, infettano sia cellule in divisione che quiescenti e integrazione del materiale genetico recato dal vettore nel genoma delle cellule bersaglio ma potenziale oncogeno perché si integrano nel genoma dell'ospite in molteplici siti, possono provocare malattia nell'uomo e sono difficili da coltivare.

- **Adenovirus**: ha genoma a DNA a doppio filamento di 30-40 kb e non ha envelope. Il genoma è fiancheggiato da sequenze **ITR** (inverted terminal repeats) che servono come origine di replicazione, dopo l'infezione il virus entra nel nucleo della cellula ospite e viene replicato, non si integra nel genoma dell'ospite (resta episomale), infetta sia cellule in divisione che non ed è dotato di ampio tropismo.

Il genoma presenta la sequenza di packaging, ITR ossia una sequenza ad ogni estremità del genoma che contiene tutti gli elementi cis necessari per la replicazione e il packaging, **E1A** gene coinvolto nell'attivazione della trascrizione e nella promozione dell'entrata della cellula ospite in fase S che lega Rb inducendo il rilascio del fattore di trascrizione E2F, **E1B** gene che blocca l'azione di p53 evitando l'entrata della cellula in apoptosi e **L1-5** geni coinvolti nella produzione e nell'assemblaggio delle proteine del capsido.

I vettori adenovirali **di prima generazione** vengono generati sostituendo i geni E1a e E1b con il transgene di interesse, posto sotto il controllo di un elemento enhancer e di un promotore. Il vettore così ottenuto è replicazione-difettivo e le funzioni replicative vengono fornite in trans dalle cellule di packaging HEK293 trasfettate stabilmente con i geni che codificano per le proteine virali E1a e E1b. Nonostante l'eliminazione dei geni E1, il virus si esprime a bassi livelli nelle cellule infettate causando tossicità e l'attivazione della risposta immunitaria.

Quelli **di seconda generazione** vengono generati eliminando anche gli altri early genes riducendo l'attivazione della risposta immunitaria e aumentando la persistenza di espressione del vettore e la dimensione del transgene che si può clonare.

I vettori adenovirali **gutless/helper-dipendenti di nuova generazione** sono vettori ad alta capacità che sfruttano il fatto che tutte le proteine adenovirali possono essere complementate in trans, quindi quasi tutta la sequenza codificante può essere sostituita dal transgene che può avere dimensioni comprese tra 100b e i 36 Kb. Le uniche sequenze essenziali in cis sono le ITRs e la sequenza di packaging. Produzione:

1. Genoma virale: contiene solo sequenze ITRs e packaging + la cassetta di espressione del transgene
2. Cellule di packaging che esprimono il gene E1
3. Virus helper: E1 e E3 deleto, privo di sequenza di packaging, fornisce tutti gli altri elementi strutturali

Sono sicuri, facilmente manipolabili, stabili, si ottengono alti titoli, ampio tropismo, infettano anche cellule quiescenti e possono veicolare inserti di grosse dimensioni ma espressione transiente e alta risposta immunitaria.

- **Virus adeno-associati (AAVs)**: virus a DNAss con polarità + o - e capsido icosaedrico. Il genoma è fiancheggiato da sequenze ITRs che contengono la sequenza di packaging e solo 2 tipi di geni detti **cap** (proteine del capsido) e **rep** (proteine necessarie per la replicazione e l'integrazione). Per replicare necessita della presenza di un adenovirus o di un herpes simplex virus (virus helper), in assenza di AV o HSV i virus AAV integrano stabilmente nel genoma della cellula ospite con un'alta frequenza in una regione precisa del cromosoma 19 mentre una successiva superinfezione con AV o HSV attiva la replicazione del virus integrato.

I vettori AAVs vengono generati grazie alla sostituzione di cap e rep con il transgene e le cellule di packaging vengono trasfettate con un plasmide contenente i geni cap e rep e successivamente infettate con un adenovirus helper difettivo per E1.

Non sono patogeni per l'uomo, sono stabili, vengono ottenuti con alti titoli, alta efficienza di trasferimento genico, ampio tropismo, infettano sia cellule in divisione che non e integrazione del transgene ma dimensioni ridotte del transgene e vettore ricombinante che non ha integrazione sito specifica e talvolta resta episomale.

Produzione di vettori virali

Tre fattori determinano l'efficienza di produzione di un vettore virale:

1. La natura del vettore
2. La linea cellulare di packaging: modificazioni del ciclo cellulare al fine di favorire le fasi di replicazione virale e inibizione dell'apoptosi
3. Le condizioni di coltura: temperatura di crescita, concentrazione del siero, tempo di infezione, confluenza cellulare al tempo dell'infezione...

La resa di produzione di un vettore virale è fortemente influenzata dall'alto grado di purezza richiesto. Una volta ottenuti i virioni di interesse, prima di poterli utilizzare è necessario valutare 2 parametri:

1. Il titolo della sospensione di virioni (numero di virioni per mL di soluzione) ottenuto tramite **plaque assay** fatto nelle cellule di packaging. Il titolo si esprime come **unità formanti placca** (PFU) in media tra 59×10^5 e 4.5×10^6
2. L'assenza di revertanti replicazione competenti sempre tramite test di placca ma su cellule

Tecniche di microscopia a fluorescenza

Fluorescenza

L'energia della luce assorbita da un oggetto qualsiasi viene generalmente dissipata sotto forma di calore. Alcune sostanze invece liberano parte dell'energia assorbita attraverso l'emissione di luce di un colore diverso da quella assorbita (fluorescenza).

La fluorescenza è un'emissione di radiazione da parte di una molecola eccitata. Il nome deriva dalla fluorite, minerale di calcio e fluoro, in cui è stato osservato per la prima volta il fenomeno. La fluorescenza è il risultato di un processo a 3 step che accade in molecole chiamati

fluorofori.

Sono fluorescenti le molecole con sistemi ad elevata coniugazione, strutture con molti elettroni pigreco coniugati e strutture planari con anelli aromatici. Es. flavine, cianine, porfirine

Energia di un fotone: $E = hv = hc / \lambda$

h = costante di Planck (6.62×10^{-34} J x s)

c = velocità della luce (3×10^8 m/s)

E = energia di 1 fotone [$J = 1.6 \times 10^{-19}$ eV]

λ = lunghezza d'onda della radiazione [m]

ν = frequenza della radiazione [Hz]

- Step 1 **eccitazione**: un fotone di energia $h\nu_{ex}$ viene fornito da una fonte esterna come una lampada incandescente o un laser, e viene assorbito dal fluoroforo
- Step 2: il fluoroforo va incontro a cambiamenti conformazionali ed è soggetto ad una serie di interazioni con l'ambiente molecolare. L'energia S_1' viene parzialmente dissipata portando ad uno stato eccitato S_1
- Step 3 **stato di emissione**: un fotone di energia $h\nu_{em}$ viene emesso ed il fluoroforo torna nello stato iniziale S_0 . A causa dell'energia di dissipazione, l'energia del fotone è minore e la sua lunghezza d'onda è maggiore di quelle d'eccitazione

La differenza di energia o lunghezza d'onda ($h\nu_{ex} - h\nu_{em}$) è chiamata **spostamento di Stoke**.

Proteine fluorescenti

La **GFP** (Green Fluorescent Protein) è una proteina di 238 aa isolata da una medusa. Il suo gene è stato clonato ed è disponibile commercialmente in diversi vettori plasmidici.

Introducendo mutazioni nel gene della GFP sono state prodotte varianti di questa proteina con caratteristici spettri di assorbimento ed emissione: **BFP** di colore blu, **YFP** di colore giallo e **CFP** di colore ciano.

Microscopio a fluorescenza

A differenza di un microscopio normale presenta:

- Una **lampada** ad alta energia a vapori di mercurio o allo xenon
- I **filtri** attraverso i quali passa la luce e selezionano la lunghezza d'onda desiderata. Il **primo filtro barriera** lascia passare soltanto la luce blu con una lunghezza d'onda fra 450 e 490 nm, lo **specchio che divide il raggio** riflette la luce sotto 510 nm mentre trasmette quella sopra 510 nm e infine il **secondo filtro barriera** elimina i segnali fluorescenti non voluti facendo passare l'emissione specifica verde della fluoresceina fra 520 e 560 nm

Applicazioni della proteina GFP nell'analisi cellulare

L'espressione del cDNA codificante per GFP è posta sotto il controllo di un promotore regolato in modo particolare.

Es. Embrione transgenico, vivo, di Drosophila: l'espressione di GFP è stata messa sotto il controllo di un promotore attivo solo in una serie specializzata di neuroni posizionati appena sotto la superficie dell'animale, che consentono di percepire l'ambiente circostante e che fanno contatti con altri neuroni non fluorescenti e quindi invisibili. La fusione di GFP con un

promotore che ne induce l'espressione in modo ubiquitario ha consentito di ottenere una *Drosophila* transgenica, viva e fluorescente.

Il cDNA codificante per GFP è fuso con un cDNA che codifica per un peptide segnale che ne indirizza la localizzazione in un compartimento particolare. Isolata GFP è diffusa in tutta la cellula, legata al segnale NES (nuclear export Signal) (GFP-NES) viene esclusa dal nucleo mentre legata al segnale NLS (nuclear localization Signal) (dsRED-NLS) è localizzata nel nucleo.

Immunofluorescenza

Utilizzo di anticorpi fluorescenti per riconoscere e marcare una proteina su cellule morte.

- **Diretta:** l'anticorpo primario è coniugato ad un cromoforo
- **Indiretta:** l'anticorpo secondario è coniugato ad un cromoforo

1. Fissazione:

- **Aldeidi:** agenti cross-linkanti che creano legami crociati tra gruppi amminici liberi presenti nelle catene laterali degli amminoacidi che costituiscono una struttura polipeptidica e preservano meglio la citoarchitettura della cellula
- **Sostanze organiche** come metanolo, acetone, Rimuovono i lipidi e fanno precipitare le proteine sull'architettura cellulare. Permeabilizzano la cellula ma preservano meno la citoarchitettura

2. **Permeabilizzazione:** serve per permettere all'anticorpo di entrare nella cellula tramite l'utilizzo di detergenti non-ionici come Tween 20, Saponin

3. **Saturazione dei siti aspecifici:** siti liberi sulla superficie di crescita delle cellule che vengono bloccati rivestendo la superficie con una miscela di proteine non specifiche. Questo evita il legame non specifico dell'anticorpo primario su tali siti.

- **BSA** (sieroalbumina bovina) al 3% in PBS: satura i siti di legame aspecifici determinati da interazioni di carica elettrica

4. Incubazione con anticorpo primario

5. **Incubazione con anticorpo secondario** coniugato a fluoroforo

6. **Colorazione dei nuclei** per mezzo di intercalanti del DNA come **DAPI, PI**

7. Montaggio

La marcatura può essere:

- **Singola:** Es. 1 anticorpo primario contro la tubulina coniugato con fluorocromo verde + DAPI;
- **Multiplo:** consente la visualizzazione di 2 o più molecole nello stesso campione. Le combinazioni più comuni sono: coloranti e Abs, 2 o più Abs contemporaneamente, espressione di GFP e Abs

Fluorescence resonance energy transfer (FRET): viene utilizzata per studiare l'interazione molecolare in vivo. È un processo in cui viene trasferita dell'energia da un donatore ad un accettore. FRET avviene solo se vi è un'interazione fisica tra donatore e accettore e se la distanza tra le due molecole è inferiore a 10 nm.

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP): è la diminuzione della fluorescenza di un campione dovuta alla degradazione del fluoroforo. È un processo irreversibile e viene utilizzato per studiare il movimento di molecole e proteine, la compartimentalizzazione e lo spostamento da un compartimento intracellulare all'altro e la velocità di scambio di molecole e proteine tra i compartimenti.

1. Definizione della regione cellulare da sbiancare
2. Acquisizione di immagini di controllo per misurare l'intensità prima dello sbiancamento
3. Sbiancamento che consiste in una breve illuminazione della regione selezionata con un'intensità laser molto elevata
4. Registrazione dell'avanzamento del recupero della fluorescenza nell'area sbiancata con alta risoluzione temporale
5. I cambiamenti di intensità nella regione sbiancata rappresentano la somma di tutti i movimenti delle molecole di fluorescenza, sia passive che attive