

Retta 2

giovedì 18 febbraio 2021 12:30

Metodi di trasfezione cellulare

Noi veicoliamo il DNA ricombinate all'interno di cellule ospiti per vari scopi: si può voler produrre la proteina ricombinante ad elevati livelli per poterla purificare e utilizzarla per specifiche applicazioni, oppure si può veicolare il costrutto codificante la nostra proteina di interesse proprio per studiare le funzioni in un contesto cellulare scelto appositamente.

Per poter produrre una proteina in un sistema di espressione sia con lo scopo della produzione di per sé, sia per studiarne le funzioni, dobbiamo veicolare il DNA codificante la proteina di interesse all'interno della cellula. Si fa procedendo attraverso metodi di **trasfezione**, se le cellule ospiti sono procariotiche o di lievito, e di **trasfezione** per le cellule eucariotiche.

METODI DI TRASFEZIONE:

- **Chimici:** Le metodiche chimiche sono quelle più semplici perché hanno un basso costo, facile applicazione, non richiedono una strumentazione complicata e costosa come invece avviene nel caso delle metodiche fisiche, le metodiche chimiche si basano sull'uso di reagenti chimici di facile disponibilità.

Le metodiche chimiche più utilizzate sono quelle basate sul **calcio fosfato** → La tecnica consiste nella formazione di un precipitato di fosfato di calcio e DNA che si chiama coprecipitato, perché nel momento in cui precipitano dei cristalli di fosfato di calcio, se questa precipitazione avviene in presenza del DNA, il DNA può coprecipitare. Quindi si formano dei coprecipitati di fosfato di calcio e DNA che poi possono essere veicolati alle cellule, che li introdurranno al loro interno attraverso un processo di **endocitosi**. Si preparano due soluzioni, una di cloruro di calcio e una di fosfato di sodio. Queste due soluzioni si mescolano in appositi rapporti, questa viene fatta in una provetta eppendorf. Una volta che si formano questi precipitati, si risospendono con la pipetta e vengono distribuiti sulle cellule. Quindi si forma un precipitato di fosfato di calcio che ingloba il DNA plasmidico che poi può essere distribuito nel mezzo di coltura dove sono presenti le nostre cellule e questi precipitati si depositeranno e verranno internalizzati dalle cellule ospiti, internalizzando il DNA plasmidico. Anche in questo caso ci può essere un effetto tossico perché la quantità di precipitati deve essere appropriata e anche di dimensioni appropriate, le più piccole possibili. Infatti questa miscela di fosfato di sodio e cloruro di calcio in assenza di DNA, viene fatta mantenendo in agitazione la provetta in modo che i precipitati siano tanto più piccoli possibili perché in questo modo risulteranno più facilmente internalizzabili da parte delle cellule e meno tossici. **Vantaggi:** i vantaggi di questa tecnica sono un basso costo, una facile applicazione, una efficienza di trasfezione soddisfacente, non si raggiunge, infatti, il 100% di trasfezione con queste tecniche, quindi non tutte le cellule con questo trattamento internalizzeranno il DNA, però può essere sufficiente per gli scopi prefissati. Considerando che se vogliamo poi ottenere una trasfezione stabile, la percentuale di cellule che sarà stata trasfettata, poi può essere sottoposta ad una selezione che ne consenta l'isolamento e la propagazione, quindi otterremo dei cloni cellulari che avranno integrato il DNA esogeno e potranno esprimerlo in modo stabile. La selezione di cellule trasfettate stabilmente viene effettuata sfruttando il marker di selezione che era presente nel costrutto ricombinante. Quindi questi marker servono per selezionare solo le cellule che hanno ricevuto il DNA esogeno perché tutte le altre moriranno non essendo resistenti per esempio ad un determinato antibiotico o composto al quale saranno invece resistenti le cellule che portano il gene codificante la resistenza a quel determinato antibiotico e quindi sopravvivranno. Quindi questa è una procedura che permette di selezionare cellule stabilmente trasfettate. Se volessimo fare una trasfezione transiente, ovviamente la procedura è analoga, solo che io non sottopongo le cellule a selezione perché devo analizzare le proteine di interesse in un range temporale breve. **Vantaggi:** non tutte le celle per esempio possono essere sottoposte a questo metodo di trasfezione, per esempio i linfociti.

• **DIETILAmminoEtili destrano**, detto anche **DEAE destrano** → basato su una molecola composta dal destrano, un carboidrato polimerico, e dal DiEtilAmminoEtili. Questo composto viene utilizzato per formare dei complessi DEAE destrano-DNA che poi vengono endocitati dalle cellule. Quindi il principio è simile a quello basato sul calcio fosfato in quanto si formano coprecipitati ma in questo caso sono formati dal DEAE destrano-DNA che poi vengono endocitati dalla cellula e questa può esprimere la proteina di interesse. Anche qui ci sono delle procedure specifiche da eseguire per esempio viene suggerito di coltivare un certo numero di cellule per piastra con un terreno completo, poi si procede per trasfettare in questo modo: si toglie il terreno, si lava il monostrato, si aggiunge la soluzione di DEAE destrano-DNA e così via. In questo modo si esegue una procedura sperimentale ben specifica che consente di veicolare il DNA esogeno all'interno di cellule ospiti. Viene utilizzato per esempio per trasfettare le cellule Cos, fibroblasti di scimmia molto utilizzati per certe applicazioni perché, per esempio, sono caratterizzate da un abbondante citoplasma e quindi consentono di fare degli studi di localizzazione subcellulare che sono molto più precisi rispetto ad altre cellule con un citoplasma meno abbondante.

• **liposomi** → I liposomi non sono altro che vescicole sferiche fatte da lipidi e fosfolipidi generalmente che vanno a mimare la struttura delle membrane biologiche che formano doppio strato e possono essere di tipo anionico o di tipo cationico e così possono incorporare e legare il DNA che poi viene veicolato attraverso queste vescicole alle cellule ospiti. Queste vescicole essendo rivestite da una membrana lipidica simile a quella delle membrane biologiche, si fonderanno con esse e quindi riverseranno all'interno il proprio contenuto. Il processo è un processo di endocitosi basata sulla fusione di queste vescicole con la membrana e queste vescicole possono essere endocitate in modo integrale oppure può avvenire una fusione della membrana delle vescicole con la membrana della cellula con il conseguente riversamento all'interno del contenuto.

Ci sono dei sistemi basati sull'uso di liposomi magnetici che si possono utilizzare appunto per applicazioni specifiche, ci sono dei magneti che possono selezionare le cellule trasfettate. Quindi se io veicolo all'interno di cellule dei liposomi magnetici che veicolano il DNA di interesse all'interno di queste cellule, io posso poi selezionare le cellule con un magnete. Bisogna immaginare le cellule all'interno di una provetta e sottoposte a trasfezione con liposomi magnetici. Con un magnete posto alla base, sul fondo, della provetta io posso tirare sulla base le cellule trasfettate e lavare il precipitato eliminando tutte le altre cellule che non presentano al loro interno i liposomi magnetici. È un metodo di selezione rapido.

Fisiche:

• **L'elettroporazione** → è una metodica fisica che si basa sulla generazione di un campo elettrico da parte di uno strumento che si chiama elettroporatore, che non fa altro che generare un campo elettrico. Se noi sottoponiamo le nostre cellule ad un campo elettrico, questo può alterare il potenziale di membrana determinando l'apertura di pori di membrana e questa apertura è transiente, cioè le nostre cellule, sottoposte a questo campo elettrico in una soluzione contenente il DNA di interesse, ne permettono l'ingresso attraverso questi pori che poi si chiudono una volta cessato il campo elettrico. Quindi si usa un elettroporatore e le cellule sono posizionate su una cuvetta di elettroporazione che presenta due elettrodi ai lati e sottoposte a questo campo elettrico che consente l'apertura transiente dei pori di membrana attraverso i quali può entrare il DNA. Ovviamente la procedura può comportare morte cellulare, alcune cellule possono morire in seguito a questo stress generato dal campo elettrico, però quelle che vivono possono esprimere il costrutto ricombinante di interesse e poi possono addirittura integrarlo. E quindi anche con questa metodica posso ottenere una trasfezione transiente o stabile. Altri fattori che influenzano l'efficienza dell'elettroporazione sono specifici al metodo considerato, quindi l'intensità del campo elettrico perché se questa è molto elevata può comportare una elevata morte cellulare, invece se troppo basso i pori di membrana non si aprono in modo adeguato e quindi la trasfezione può non risultare efficiente. Anche la durata del campo elettrico è importante, la temperatura, la conformazione della concentrazione del DNA, la composizione ionica del terreno.

Esistono dei metodi di **elettroporazione anche per la trasfezione di tessuti**, quindi oltre alla cellula possono essere trasfettati direttamente anche i tessuti. Ci sono micro-ago o micro-piastre che possono generare campi elettrici a cui possono essere sottoposti non solo cellule ma anche tessuti, ai fini per esempio della trasfezione in vivo. Ci possono essere delle tecniche di elettroporazione applicate anche per la terapia genica.

• **la microiniezione** → si tratta di fare letteralmente una puntura alla cellula con un microago iniettando all'interno della cellula per esempio il DNA ricombinante esogeno che noi abbiamo preparato. Con questa tecnica è possibile microiniettare all'interno delle cellule ospiti non solo DNA esogeno, ma anche proteine. Per esempio, potremmo aver prodotto una proteina in un sistema procariotico e averla prodotta in grandi quantità e poi con la microiniezione possiamo inserirla, dopo averla purificata ovviamente, all'interno di cellule ospiti, in questo mod bypassiamo il flusso dell'informazione genetica e quindi non è necessario veicolare il DNA codificante per quella proteina di interesse se riusciamo a microiniettarla direttamente. E ovvio che le applicazioni saranno specifiche, io posso veicolare una proteina di interesse per vedere se le cellule rispondono a questa proteina in un determinato modo o in tempi rapidi senza aspettare che venga prodotta attraverso il sistema di espressione classico basato su DNA codificante che viene trascritto e poi tradotto sotto forma di proteina.

Quindi la microiniezione è un sistema di trascrizione concettualmente semplice, che però richiede un apposito strumento che consenta di manipolare, dei microaghi, e veicolare il materiale di interesse, il DNA piuttosto che le proteine, all'interno della cellula ospite. Si deve utilizzare uno strumento che si chiama microiniettore. Il vantaggio è che operando sotto il microscopio io vedo letteralmente la cellula microiniettata, però lo svantaggio è che io posso microiniettare una cellula per volta. Quindi se l'obiettivo è per esempio capire qual sia l'effetto mediato dalla presenza della proteina e della sua espressione, allora posso poi analizzare queste cellule che ho microiniettato sempre al microscopio e vederne i cambiamenti morfologici o eventualmente funzionali; posso vedere dove si localizza la proteina e fare anche altri studi. La microiniezione viene utilizzata tantissimo per la creazione di animali transgenici. Se il nostro scopo fosse quello di fare studi biochimici e per esempio analizzare proteine su larga scala, è ovvio che la microiniezione non sarebbe fattibile perché la quantità di proteine prodotte da una sola cellula è praticamente irrilevante dal punto di vista delle analisi biochimiche, dunque se volessi fare elettroforesi per esempio, o studiare interazioni proteina-proteina è ovvio che dobbiamo scegliere un sistema che ci consenta di trasfettare tantissime cellule contemporaneamente in modo da poter avere dei prodotti proteici abbondanti.

• **micro-gun** → dove vengono letteralmente utilizzati dei microproiettili che possono essere le particelle d'oro o di tungsteno che sono rivestiti dal DNA di interesse. Hanno fatto immergere queste microparticelle all'interno di una provetta contenente il DNA e queste si rivestono con esso, dopo di che queste microparticelle con il rivestimento di DNA di nostro interesse vengono letteralmente sparate. Il micro-gun è una pistola che spara queste particelle direttamente su una soluzione contenente le nostre cellule, per cui poi verranno attraversate da questi proiettili, considerando che il citoplasma è viscoso, il DNA verrà appunto rilasciato nel citoplasma e in questo modo avremo veicolato il nostro DNA di interesse nelle cellule ospiti. Questo sistema basato su micro-gun viene utilizzato spesso soprattutto per trasfettare le cellule vegetali, in quanto presentano una parete che rappresenta una complicazione rispetto alle cellule animali, dal punto di vista della trasfezione delle cellule stesse. Questi sistemi basati su micro-gun sono stati utilizzati soprattutto per la veicolazione di DNA esogeno all'interno di cellule vegetali monocotiledoni perché queste specie sono più restie alla trasfezione basata su altri approcci, per esempio quella basata sull'uso di *Agrobacterium tumefaciens*, metodo che viene utilizzato per trasfettare le specie vegetali dicotiledoni.

• **Biologiche:** le metodiche biologiche riguardano essenzialmente l'uso di **vettori virali** e anche qui il costrutto ricombinante può essere preparato a monte ed essere inserito in un sistema di espressione virale e poi attraverso un processo che si chiama trasduzione. In questo caso non parliamo né di trasfezione né di trasfezione, ma parliamo di trasduzione ad opera di vettori virali che infetta le cellule ospiti veicolando al loro interno il costrutto di DNA ricombinante. Ovviamente si tratta di vettori virali modificati appositamente per lo scopo di veicolare il DNA all'interno delle cellule ospiti. Il vantaggio di questa tecnica è che l'efficienza di trasfezione è massima, è possibile trasfettare il 100% di cellule che sottoponiamo alla trasduzione. Quindi in questo caso l'efficienza di trasfezione è del 100%, mentre nei casi precedenti non lo è mai; ciò vuol dire che se io ho 5 milioni di cellule in coltura o in cuvetta che voglio sottoporre a trasfezione, con questo sistema tutti i 5 milioni di cellule saranno trasfettate, mentre con i sistemi precedenti noi abbiamo una efficienza di trasfezione che è una percentuale che non supera generalmente il 50%; questo vuol dire che il 50% delle cellule che sottoponiamo alla trasfezione non riceverà il costrutto ricombinante, quindi noi dovremmo poi effettuare una selezione delle cellule che hanno ricevuto il costrutto rispetto a quelle che non l'hanno ricevuto. Quindi il metodo trasfezione che non consente un'efficienza del 100% implica l'utilizzo di sistemi di selezione successivi.