

CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2018-2019

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Docenti:

**Fiamma Mantovani
Alessandra Rustighi**

**c/o Laboratorio Nazionale CIB
Area Science Park
040 3756800
fmantovani@units.it**

OBIETTIVI FORMATIVI

Acquisire conoscenze teoriche sulle tecniche di biologia cellulare utilizzate nella ricerca biomedica, in diagnostica e in terapia

Effettuare esercitazioni pratiche per familiarizzare con le tecniche di coltura cellulare in vitro e applicarle allo studio di processi fisiologici e patologici quali proliferazione, morte cellulare e trasformazione neoplastica.

Conoscere e applicare il metodo scientifico.

Raccogliere ed interpretare i dati sperimentali rilevanti.

Pianificare una strategia sperimentale scegliendo i controlli sperimentali adeguati.

CORSO

24 ORE LEZIONE FRONTALE

36 ORE LABORATORIO

TURNI DI LABORATORIO

Giovedì

Venerdì

6 turni per il primo esperimento

2 turni (1,2,3) e (4,5,6) per gli altri

MOODLE

Laboratorio di Biologia Cellulare

ESAME

Esame scritto su tutti gli argomenti del corso, costituito da domande aperte. Durata: 90 minuti. Durante il corso verrà spiegato agli studenti come analizzare correttamente il testo delle domande per organizzare risposte puntuali. Tramite il sito Moodle del corso verranno inoltre forniti agli studenti test di autovalutazione per la preparazione dell'esame.

Oltre al compito scritto, durante le esercitazioni di laboratorio gli studenti dovranno rispondere a specifici quesiti sull'attività svolta.

Infine, vi sarà una valutazione del lavoro di gruppo.

Il voto finale deriva da una media pesata delle tre modalità di valutazione come spiegato agli studenti durante il corso e illustrato nel sito Moodle del corso.

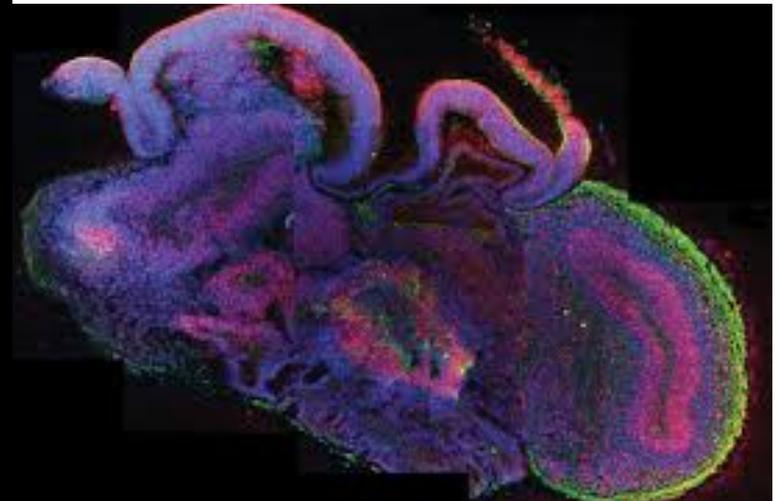
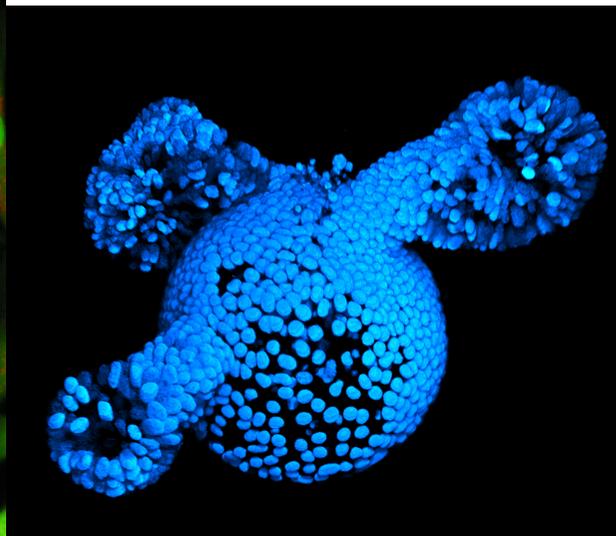
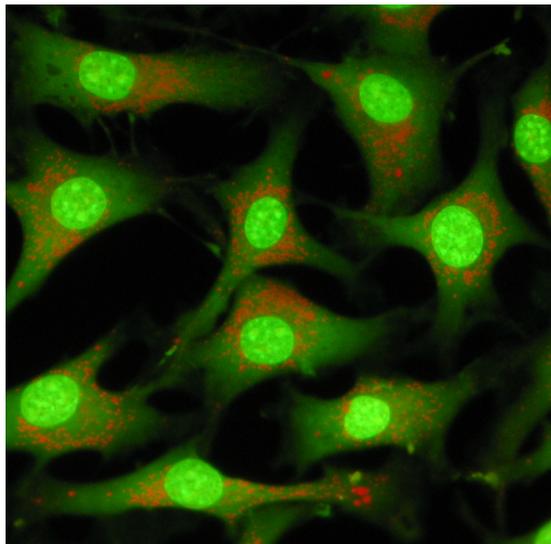
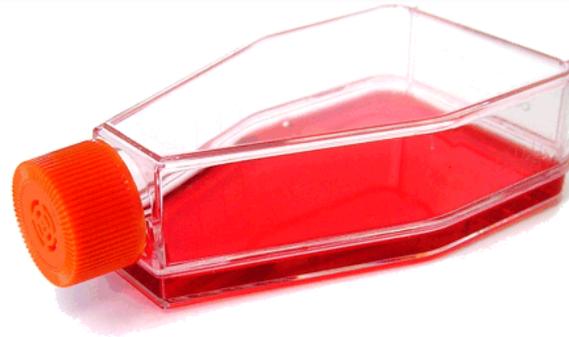
TECNICHE DI COLTURA CELLULARE IN VITRO

COLTURE CELLULARI

sistemi artificiali:

cellule estratte dall'organismo di origine (mammiferi)

libere / organizzate (sospensione - colture 2D - colture 3D –
organoidi – tessuti - organi)



APPLICAZIONI DELLE COLTURE CELLULARI IN VITRO: MEDICINA MOLECOLARE

- **RICERCA BIOMEDICA di BASE e APPLICATA**
- **DIAGNOSTICA**
- **TERAPIA**

RICERCA BIOMEDICA

Basi molecolari (genetiche e biochimiche) di patologie

- **Genetiche**
- **Metaboliche**
- **Patologie del SI**
- **Neurologiche**
- **Tumoriali**
- **Infettive**

Identificazione di marcatori diagnostici/prognostici

Identificazione di bersagli terapeutici e farmaci

**Identificare
geni, proteine e processi
responsabili
della patogenesi delle malattie**



Diagnosi



**Risposta
alle terapie
in uso**



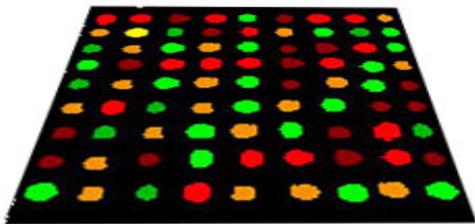
**Nuove terapie
a bersaglio
molecolare**

DIAGNOSTICA

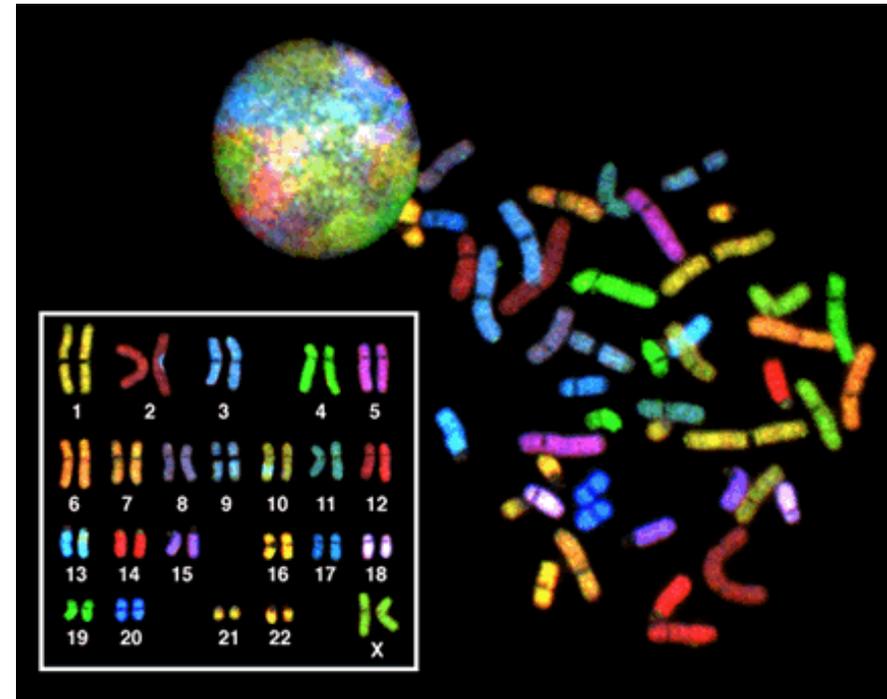
★ ANALISI CITOGENETICHE

Diagnosi di **anomalie genetiche**
(eventualmente associate a
specifiche patologie)

★ PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA



Diagnosi/prognosi di **specifiche
patologie, in particolare specifici tumori**
Predizione della risposta a **terapie**



DIAGNOSTICA

ANALISI di PROTEINE

ANALISI di METABOLITI

ANALISI FENOTIPICHE

SVILUPPO/ RIPOSIZIONAMENTO DI FARMACI

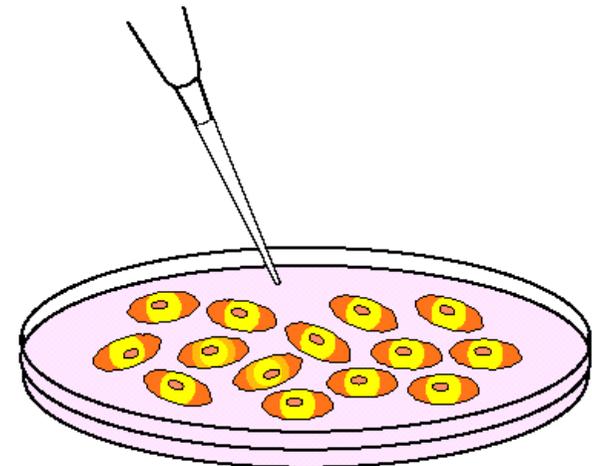
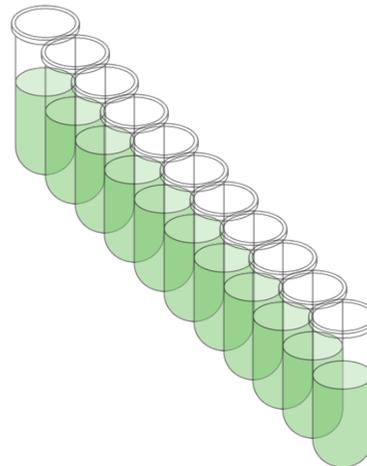
Molecola o
processo bersaglio



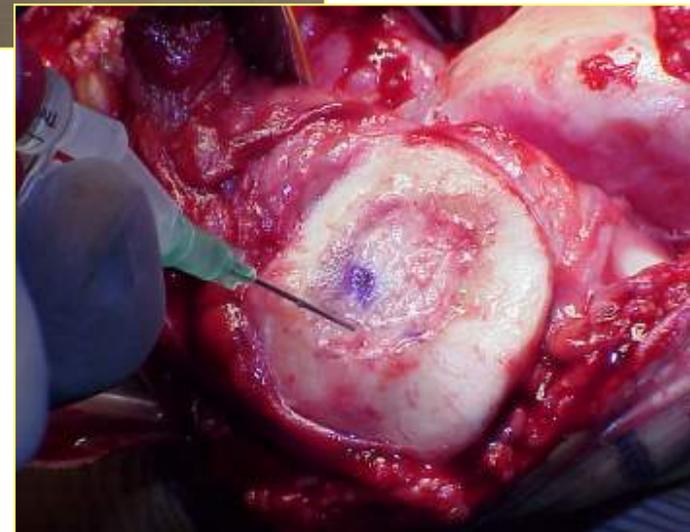
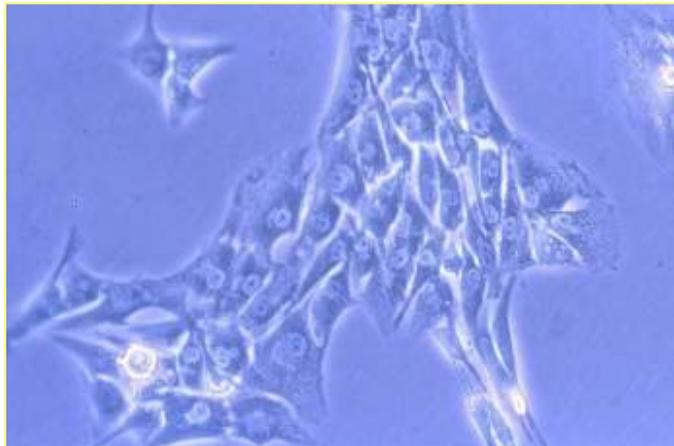
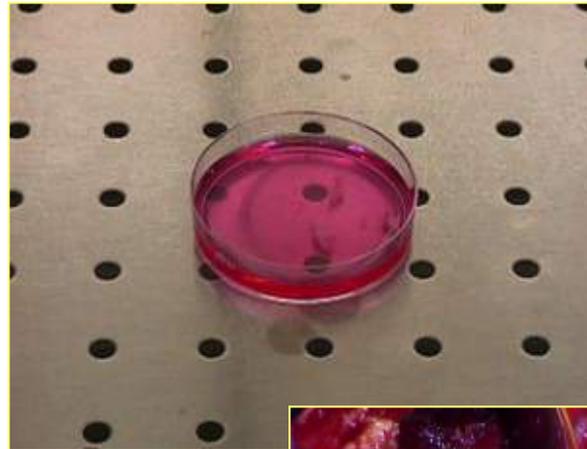
Design razionale
Drug Screening



Effetti su specifici
processi biologici

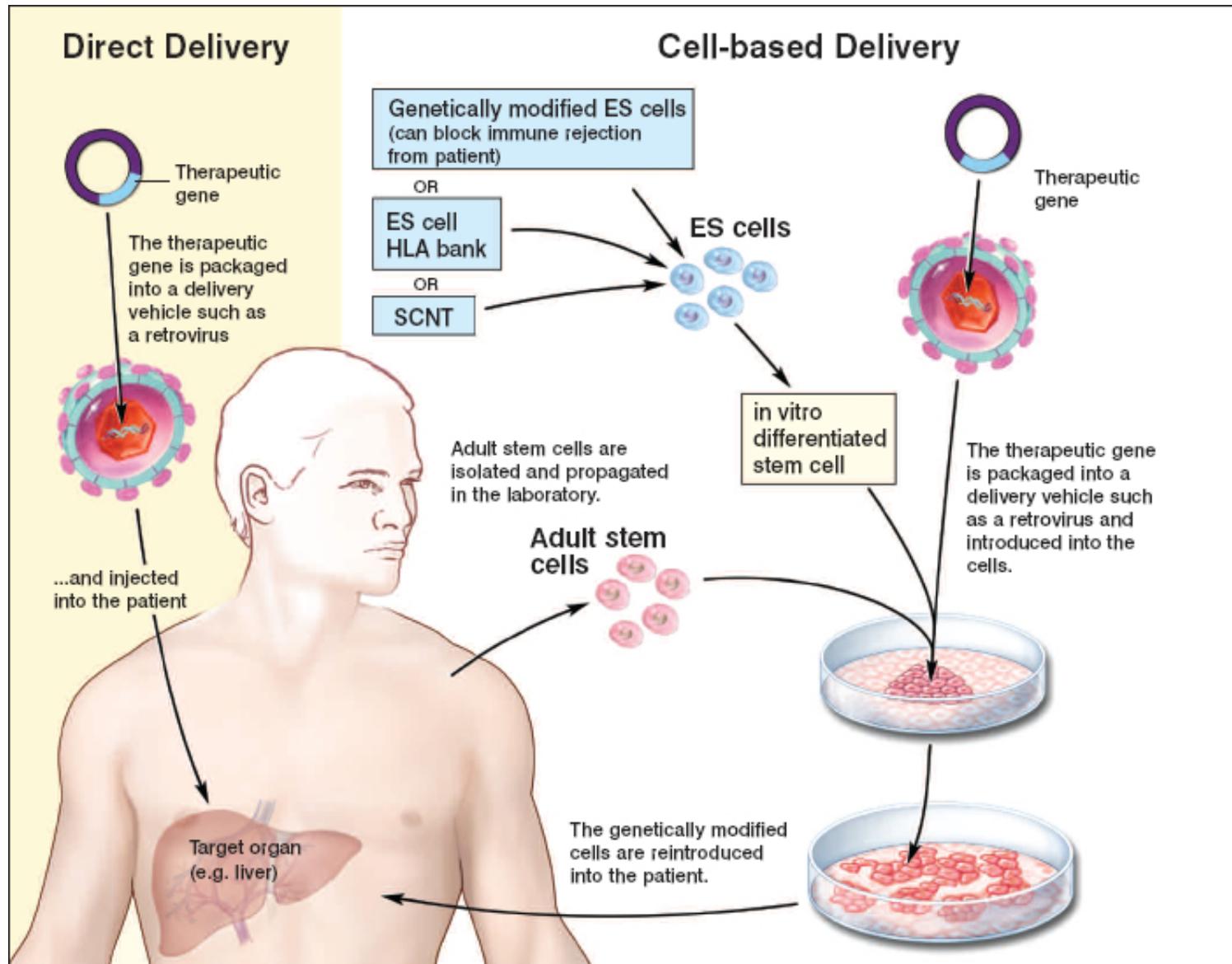


TERAPIA CELLULARE E TISSUTALE IN CLINICA
MEDICINA RIGENERATIVA
(trapianto di pelle, cartilagine, midollo osseo...)



MANIPOLAZIONE CELLULARE E TISSUTALE EX-VIVO o IN VITRO

TERAPIA GENICA



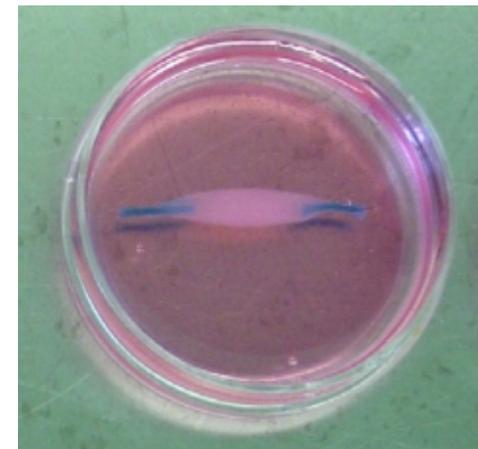
TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA



BIOTECNOLOGIE INDUSTRIALI

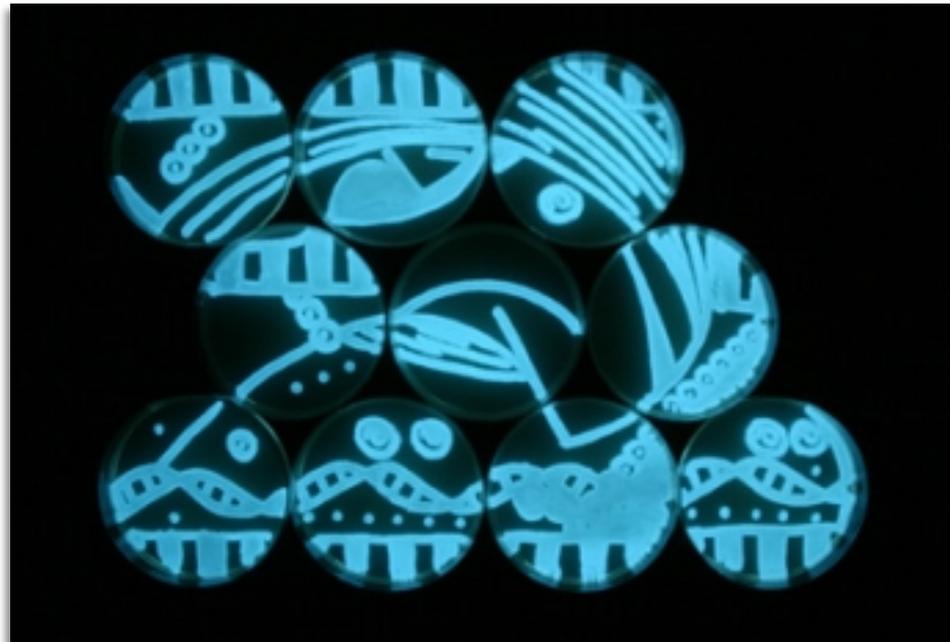


- eritropoietina
- Bistecca in provetta



ALTRE APPLICAZIONI ...

- Bio-art



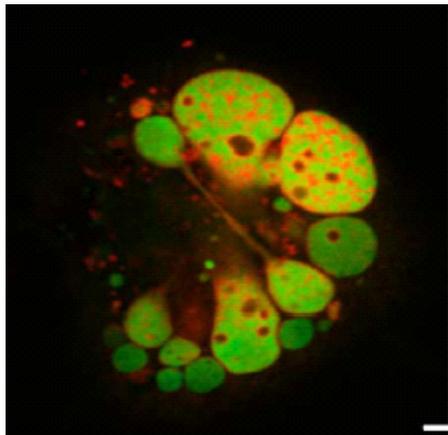
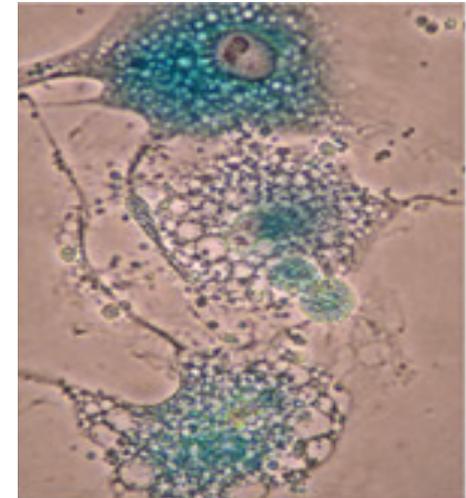
**Programma del corso:
Attività in laboratorio
didattico**

GENERAZIONE, MANTENIMENTO ED ANALISI DI COLTURE CELLULARI



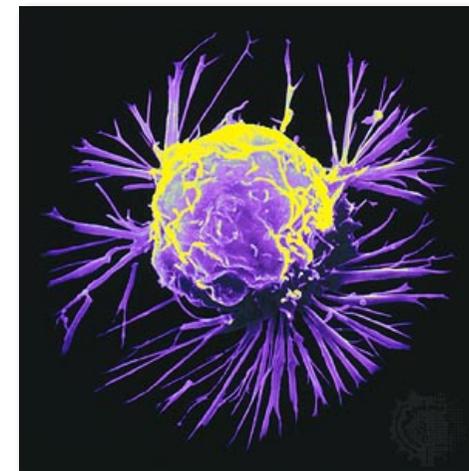
Passaggio di cellule in coltura

**Proliferazione, senescenza e
immortalizzazione**

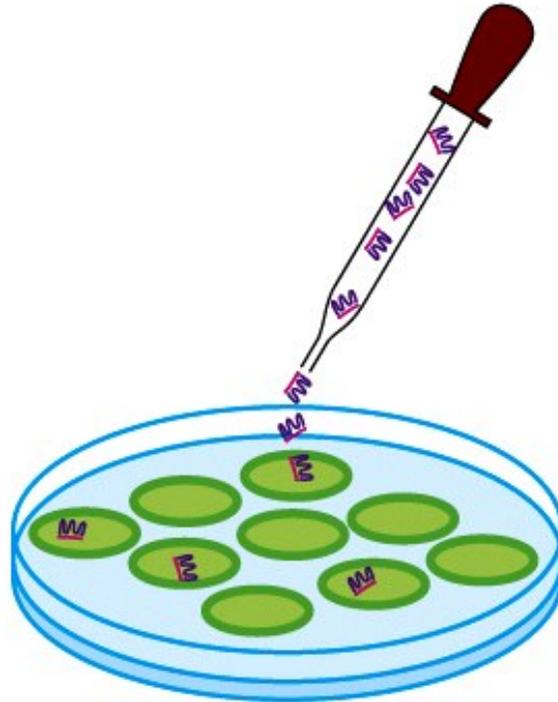


Analisi di proteine

Trasformazione neoplastica



MANIPOLAZIONE DI CELLULE IN COLTURA



- ★ Tecniche di trasfezione
- ★ Utilizzo di geni reporter per lo studio di processi biologici

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2018-2019

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 1

Generazione e manipolazione

di colture cellulari 2D in vitro

ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:

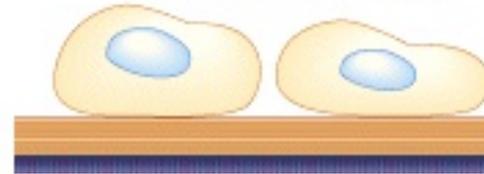
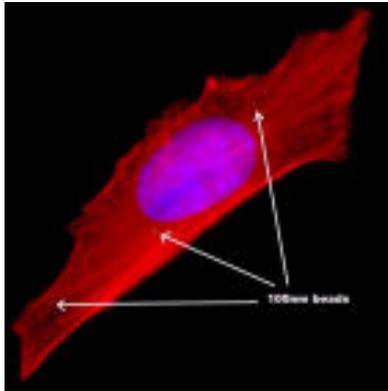
FONTI DEL MATERIALE DA COLTURA

Tessuti con **elevata capacità proliferativa**
tessuti normali con elevato contenuto di cellule staminali/
progenitrici (tessuto ematopoietico, gastro-intestinale, epitelio
mammario, fegato,...)

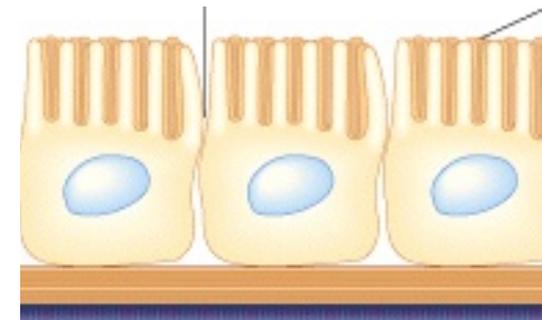
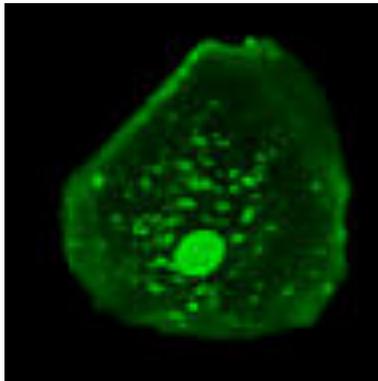
Tessuti tumorali

Tessuti con **scarsa attività proliferativa**
connettivali, ghiandolari-rene, pancreas, ovario, testicolo,
linfonodi, ...

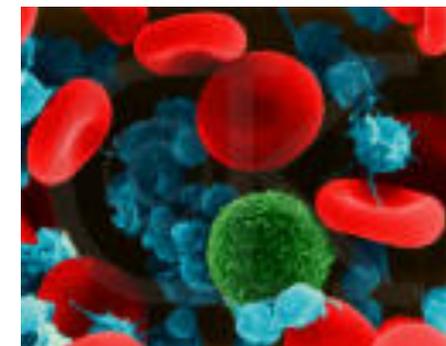
Fibroblasti: cellule derivate dal tessuto connettivo/endotelio
aspetto **fusiforme**
crescita in **adesione**
cellule **isolate**



Cheratinociti: cellule **epiteliali**
aspetto **poligonale/tondeggiante**
crescita in **adesione**
colonie di cellule

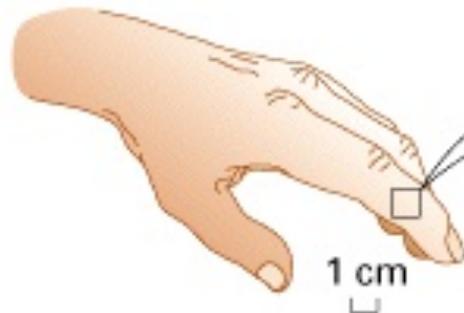


Cellule del sangue/SI/organismi ematopoietici:
aspetto **tondeggiante**
crescita in **sospensione**

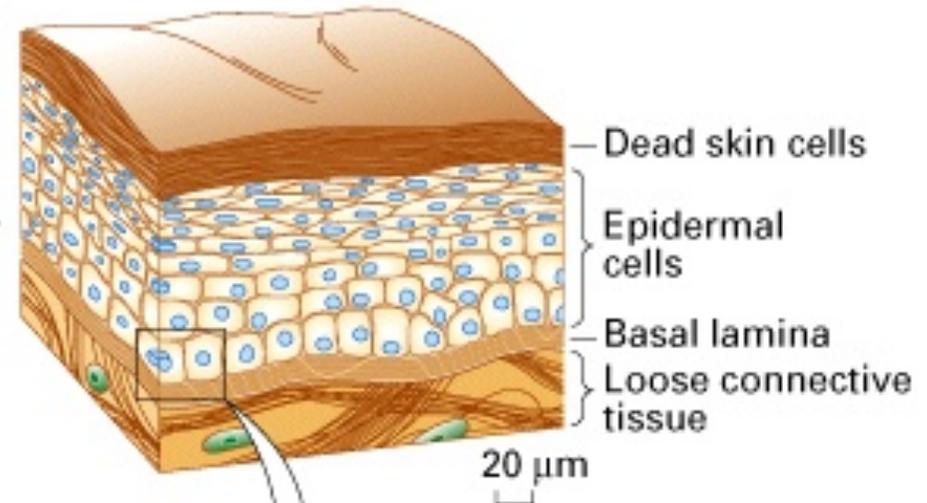


ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:

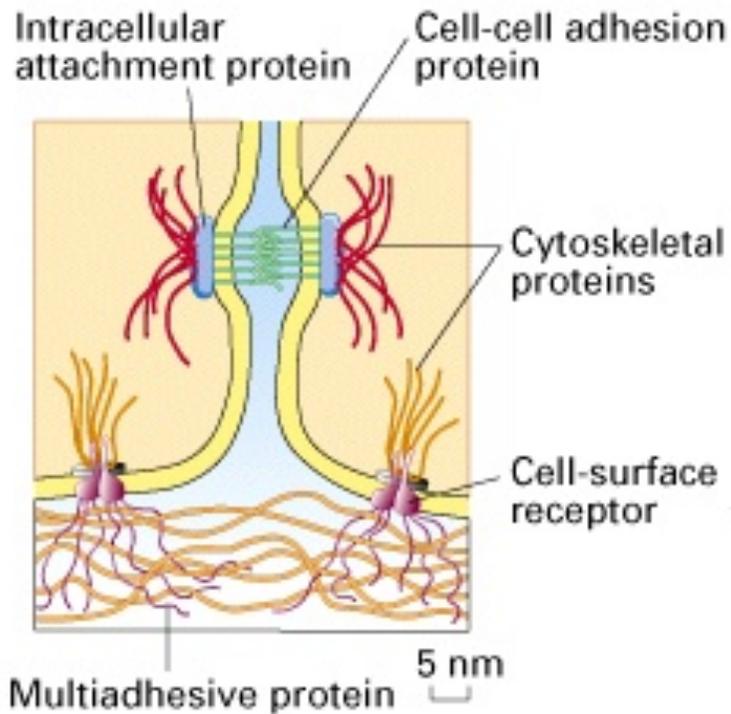
(a)



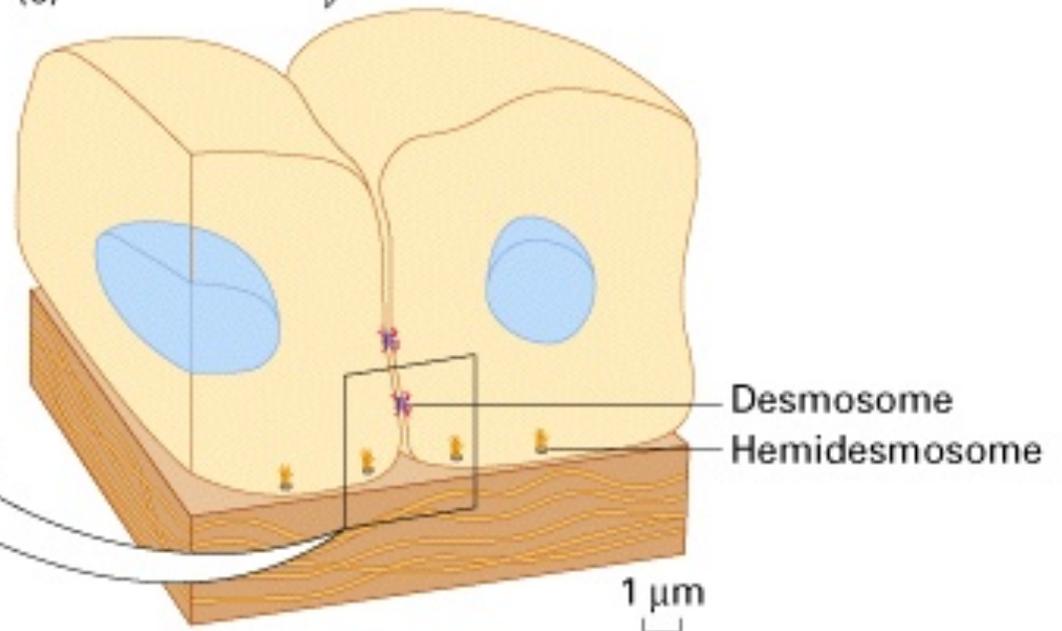
(b)



(d)



(c)



Per allestire colture di cellule isolate, a meno che il tessuto di origine non sia sangue, siero o midollo osseo, si deve partire da un espianto di tessuto, cioè una biopsia, e quindi le cellule si devono dissociare.

Nei tessuti solidi di tipo epiteliale le cellule sono adese le une alle altre, mentre in quelli di tipo mesenchimale-connettivale le cellule sono separate, ma si trovano circondate dalla matrice extracellulare che deve essere eliminata.

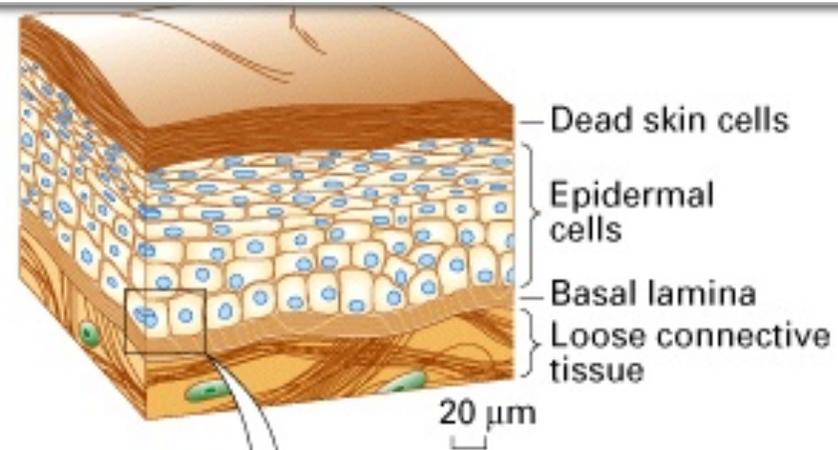
Il tessuto deve essere sminuzzato e omogeneizzato in condizioni di sterilità. Di solito ciò si ottiene tagliuzzando finemente il tessuto con un bisturi. Se il tessuto è abbastanza molle e si può disporre di quantità abbastanza abbondanti del materiale di partenza, è comodo l'uso di omogenizzatori elettrici. Non ci si deve preoccupare di rompere le cellule, poichè con questi trattamenti non si ottengono cellule singole, ma piccoli frammenti di tessuto.

Per eliminare la matrice che intrappola al suo interno le cellule si usano enzimi proteolitici che sono in grado di lisare il collagene e degradare le proteine, ed in aggiunta enzimi glicolitici che digeriscono i polimeri dell'acido ialuronico.

Molti tessuti, ad esempio quelli epiteliali, sono composti da cellule strettamente adese le une alle altre grazie alla presenza di giunzioni intercellulari. Queste vanno dissociate sia mediante l'uso di proteasi che eliminano le proteine di membrana responsabili dell'adesione cellula-cellula sia utilizzando agenti chimici quali l'EDTA, che va a chelare i cationi bivalenti come Ca^{++} e Mg^{++} i quali stabilizzano le giunzioni.

ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:

DISSOCIAZIONE
di singole **CELLULE**
da un espianto di **TESSUTO**



TECNICHE (usate in combinazione) per digerire la **MATRICE** extracellulare e dissociare le **GIUNZIONI** intercellulari

Trattamento **meccanico**
omogenizzatore - dissociatore

Trattamento con **enzimi**
proteolitici (tripsina, collagenasi, elastasi)
glicolitici (ialuronidasi)

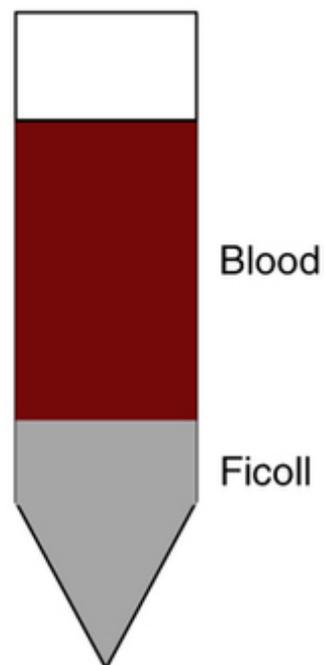
Trattamento con **agenti chimici** (EDTA, EGTA)
chelanti dei cationi bivalenti (Ca^{2+}) che stabilizzano le
giunzioni cellulari



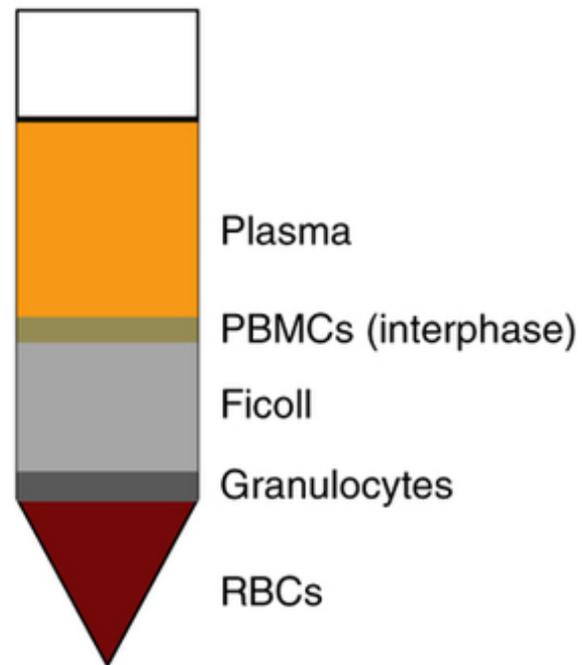
SEPARAZIONE cellulare:



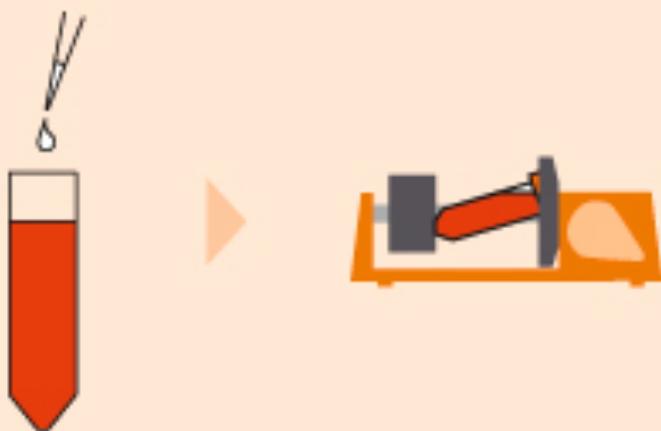
Layers before Ficoll spin



Layers after Ficoll spin



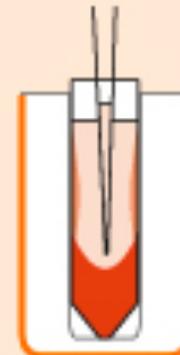
Magnetic labeling and incubation



Magnetic separation



Collection of unlabeled target cells



TERRENI DI COLTURA

Solitamente **SINTETICI**

devono:

- ✓ Fornire tutti i **composti necessari** alle cellule
elementi per la **biosintesi**
substrati per il **metabolismo**
vitamine, minerali, ioni inorganici
- ✓ Mantenere **pH e osmolarità** entro limiti **fisiologici**

Il terreno deve avere un'osmolarità controllata, per evitare avvenga la lisi delle cellule in un ambiente ipotonico (le cellule richiamano acqua per osmosi e si gonfiano fino a scoppiare.) Al contrario se l'osmolarità del terreno è troppo elevata, l'acqua fuoriesce e la cellula si disidrata. Inoltre il mantenimento del pH fisiologico è essenziale per lo svolgimento di tutti i processi cellulari. Servono inoltre nutrienti e componenti per la biosintesi.

Ciascun tipo cellulare ha necessità particolari per la crescita e quindi la scelta di un terreno di crescita ottimale è critica per la buona riuscita degli esperimenti. In commercio esistono vari tipi di terreni sintetici che sono raccomandati per la coltura di determinati tipi cellulari.

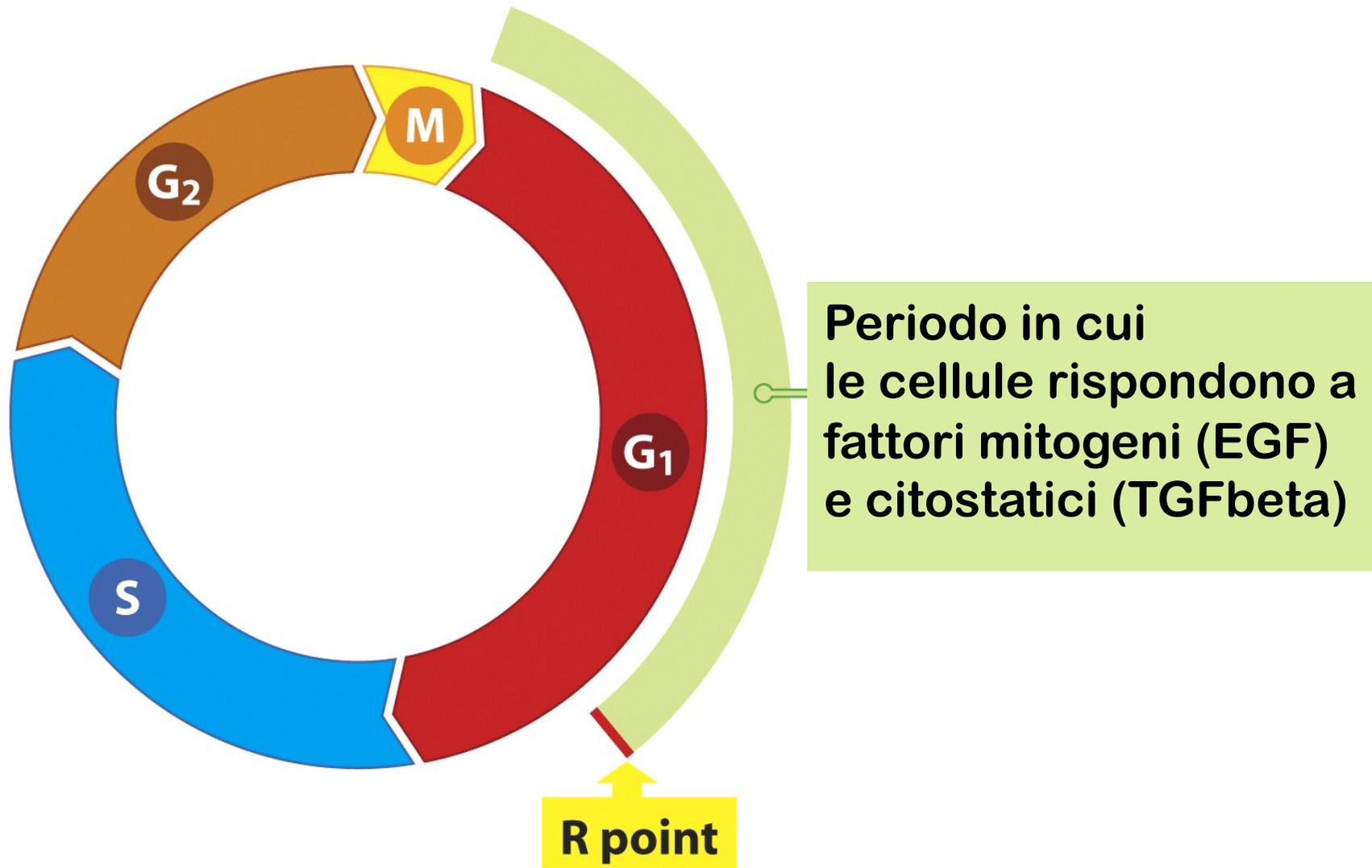
Il siero è un materiale la cui composizione è solo parzialmente nota; contiene fattori che stimolano la crescita e l'adesione cellulare. Il siero più usato è quello ottenuto da feti bovini (FCS = Fetal Calf Serum).

La plastiche per colture cellulari è trattata in modo da favorire l'adesione cellulare. La plastica esibisce cariche negative alla superficie. Le cellule secernono collagene e altri componenti della matrice, che aderiscono alla superficie carica negativamente e fanno da ponte tra questa e la cellula.

TERRENI PER CELLULE DI MAMMIFERO

1. **Acqua** bidistillata
2. **Ioni** per mantenere potenziali di membrana e la pressione osmotica, **bicarbonato** per mantenimento sistemi **TAMPONE** (in equilibrio con CO_2)
3. **Carboidrati**: 1 zucchero a 6 atomi di carbonio (glucosio)
4. **Aminoacidi**: 13 essenziali - spesso forniti 20
5. **Vitamine** come precursori di coenzimi
6. **Fosfocolina e inositolo**
7. **Elementi in tracce** (Ferro, Zinco, Selenio...)
8. **Antibiotici**
9. **Indicatori di pH** (**rosso fenolo**: rosso a pH=7, **giallo** a pH acido, **viola** a pH basico)
10. **Proteine del siero**.

Fattori di crescita nella regolazione della proliferazione



SIERO

Le cellule necessitano di sostanze che stimolano la crescita e proliferazione cellulare (**fattori di crescita**).

Spesso (nei nostri esperimenti) non si aggiungono al terreno fattori purificati, si usa comunemente il **siero fetale bovino (FCS)**.

Se il terreno **NON** contiene FCS: **basale o di mantenimento**

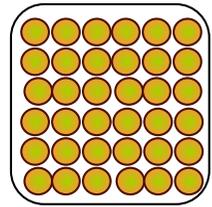
Se il terreno **contiene FCS**: **completo o di crescita**

Alcune colture cellulari hanno però bisogno di particolari **fattori** che vengono aggiunti in forma **purificata**:

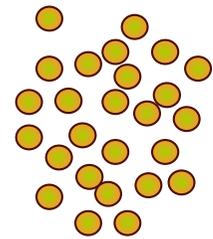
- Fattori di adesione (fibronectina, collagene)
- Ormoni
- Fattori di differenziamento
- Fattori di staminalità

ALLESTIMENTO DI UNA COLTURA CELLULARE

da un tessuto



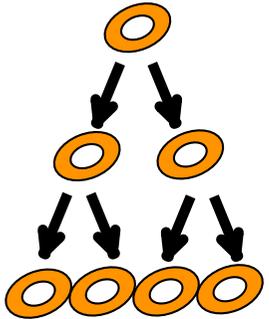
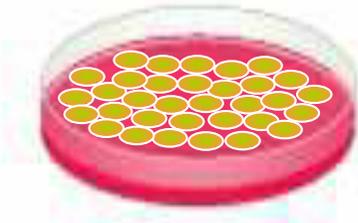
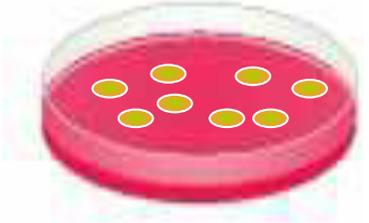
si dissociano singole cellule



Se non viene aggiunto **SIERO**,
le cellule non proliferano:

QUIESCENZA

e si seminano in terreno:



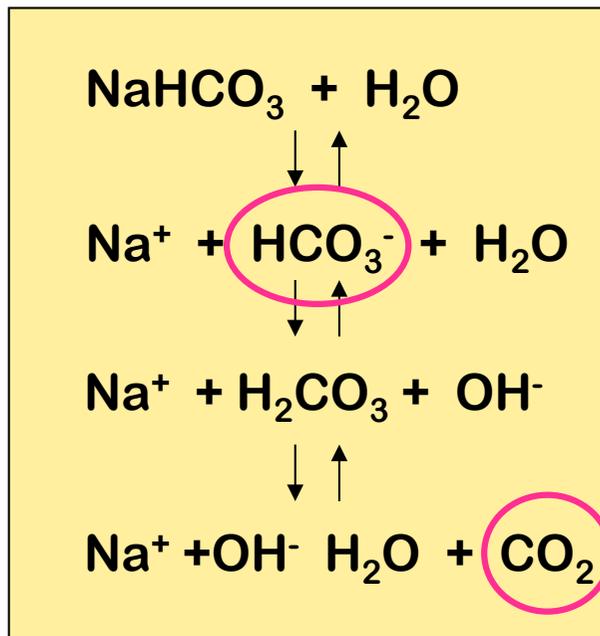
Se **stimolate** con siero, le cellule
proliferano finchè occupano tutta la
superficie del recipiente
(**CONFLUENZA**)

CONTROLLO DEL pH

Il pH del terreno è fondamentale per la crescita cellulare, e tende ad **acidificarsi** a causa dei prodotti del **metabolismo** cellulare
pH FISIOLÓGICO: ~ 7,4 (varia a seconda del tipo cellulare)

SISTEMA TAMPONE BICARBONATO

Bicarbonato di sodio nel terreno in equilibrio con CO₂ atmosferica



L'aumento della pCO₂ comporta un'acidificazione del terreno e viceversa: l'incubatore è collegato ad una bombola di CO₂: l'immissione è controllata da una valvola e la pCO₂ mantenuta a 5%

INCUBATORI

Crescita in condizioni controllate:

temperatura	37°C
pH	5% CO ₂
umidità	saturazione H ₂ O

Condizioni ottimali per la maggiorparte delle cellule umane, ma possono variare a seconda del tessuto e dell'organismo!

pO₂ atmosferica = elevato stress ossidativo

RECIPIENTI per COLTURE CELLULARI in 2D

- Sterilità
- Garantire scambi gassosi
- Massima superficie di appoggio alle cellule
- Trattamento per la crescita in adesione

Capsule Petri



Bottiglie di Roux (flasks)



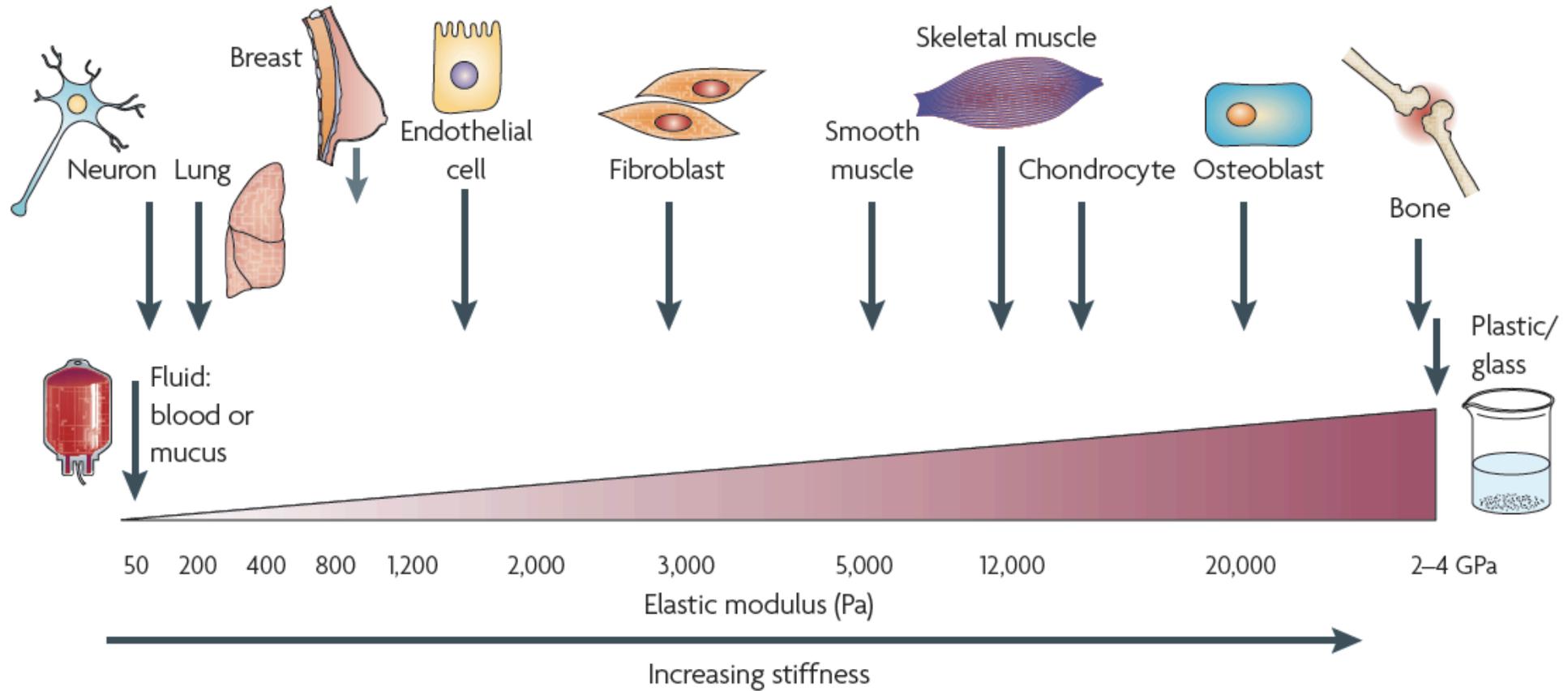
Piastre multipozzetto



NB: molti tipi di cellule dipendono dall'adesione al substrato per la sopravvivenza e la crescita.

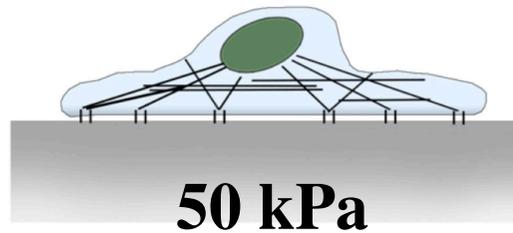
Altre invece possono/devono crescere in sospensione.

La plastica è un substrato estremamente rigido = non fisiologico

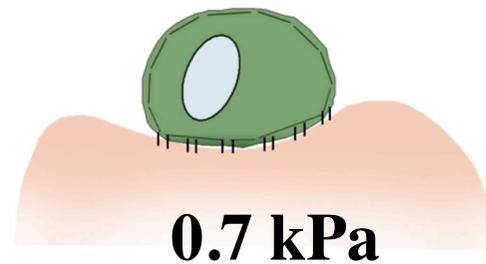


La rigidità della matrice/supporto influenza il comportamento cellulare

Stiff ECM
Cell spreading



Soft ECM
Confined adhesion



CRIOCONSERVAZIONE

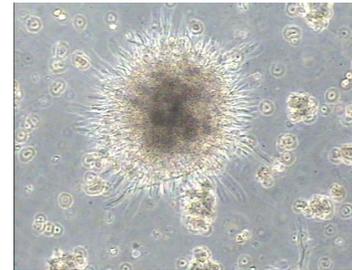
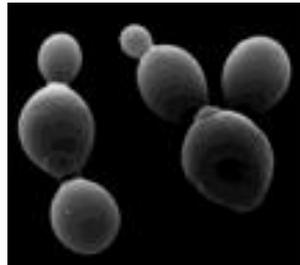
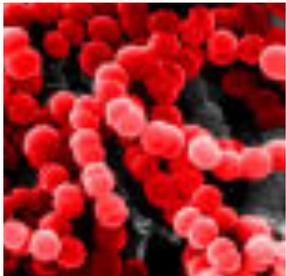
Le cellule vengono **RISOSPESE** in **TERRENO DI CONGELAMENTO** contenente **10% DMSO** e **90% FCS**,

CONGELATE e **CONSERVATE** in **AZOTO LIQUIDO** (77K: -196°C)
In appositi **CONTENITORI**



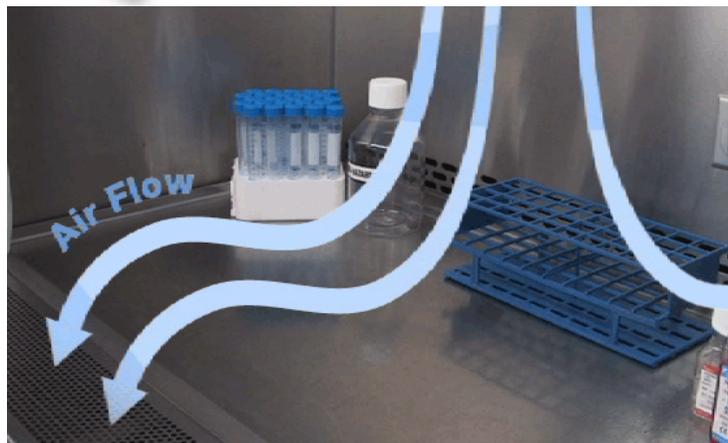
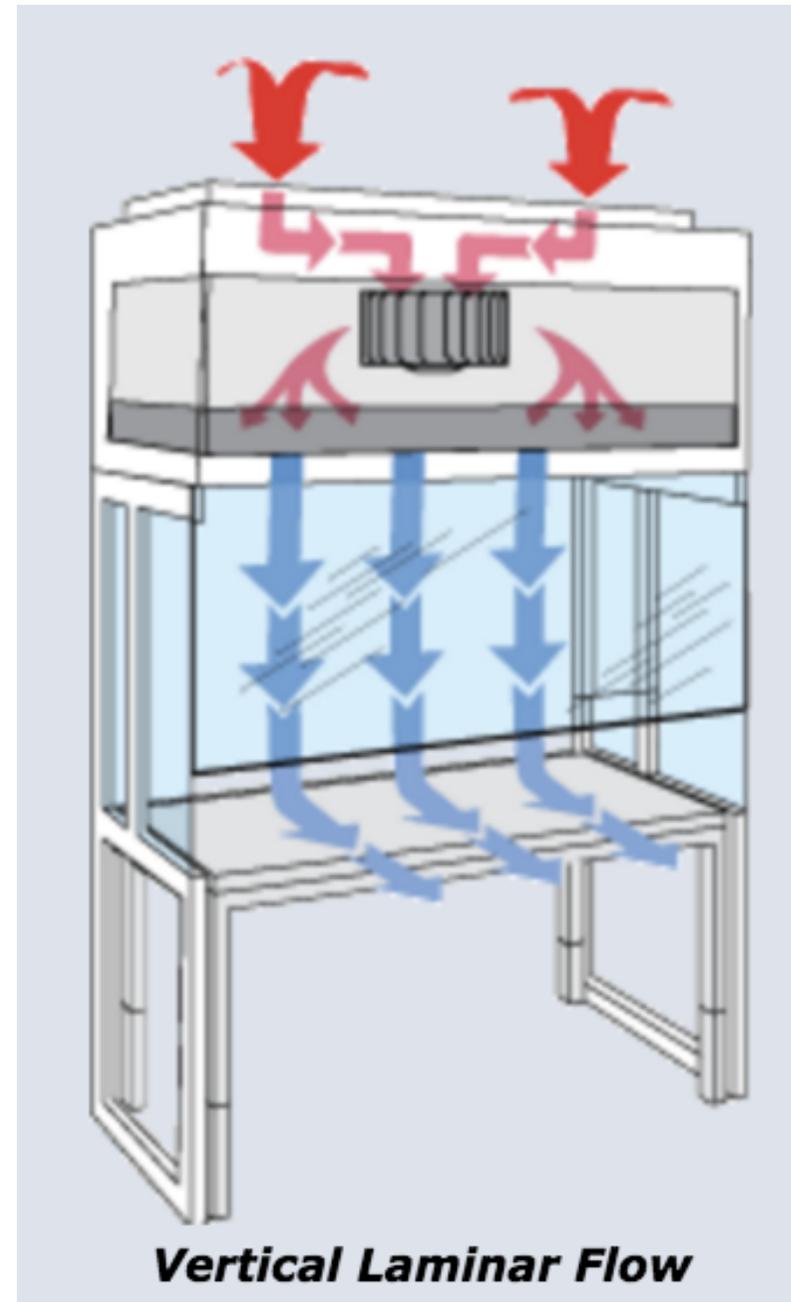
STERILITÀ

assenza di microorganismi inquinanti = batteri, lieviti, muffe, micoplasmi (archibatteri endocellulari), virus e protozoi.



Trattamenti:

- ✓ calore (autoclave, stufa a secco)
- ✓ irraggiamento con lampade germicide (UV, gamma)
- ✓ ultrafiltrazione (membrane a porosità calibrata: 0.4-0.2 μm)
- ✓ manipolazione in atmosfera sterile: cappe a flusso laminare
- ✓ disinfettanti per superfici
- ✓ uso di guanti
- ✓ antibiotici nel terreno di coltura



TECNICHE DI STERILIZZAZIONE:

1) CALORE:

- vapore sotto pressione (autoclave). Il vapore è un ottimo conduttore di calore. Alla pressione di 1 atm il vapore raggiunge la T di 121 °C alla quale le più resistenti spore batteriche vengono distrutte in 5-10 min. impieghi: soluzioni, plastiche, oggetti metallici.
- calore secco (stufe) richiede tempi e T maggiori rispetto all'autoclave, non essendo l'aria un buon conduttore del calore. Impieghi: vetreria, materiali anidri che possono essere alterati dal contatto col vapore.

2) RADIAZIONI

- UV: Lampade germicide: azione germicida legata alla capacità dei raggi UV di determinare mutazioni del DNA. L'efficacia è però limitata alle superfici esposte (radiazioni non penetranti)
Impieghi = sterilizzazione dell'aria e delle superfici (es. cappa a flusso, intera stanza di coltura)
- Radiazioni ionizzanti (raggi gamma da ^{60}Co) determinano rotture e mutazioni negli acidi nucleici sia direttamente che attraverso radicali dell'O che si producono dalla scissione dell'acqua.
L'efficacia è ottima (radiazioni penetranti) ma il costo è elevato
Impieghi = derrate alimentari, strumentario in plastica (siringhe, cateteri, piastre, pipette di produzione industriale).

3) FILTRAZIONE

Filtri con pori di diametro inferiore a quello dei più piccoli batteri. molti virus per le loro piccole dimensioni passano attraverso i filtri sterilizzanti.
cellulosa Millipore (diametro = 0,22 micron)
polimeri sintetici Sartorius (diametro = 0,22 micron)

SICUREZZA



Le colture cellulari sono fonti di **potenziale rischio biologico** (in particolare per la potenziale presenza di patogeni – es. virus). È necessario operare con cautela, in particolare con **colture primarie** che derivano direttamente da **tessuti animali** (specialmente **umani**).

Durante il corso verranno utilizzate solo linee cellulari provenienti da banche e certificate per l'assenza di patogeni.

Tuttavia, è buona norma apprendere subito come lavorare in sicurezza:

- usare SEMPRE i **guanti**
- dopo l'uso gettare SEMPRE tutto il materiale entrato in contatto con le cellule nei **contenitori dei rifiuti biologici per la sterilizzazione**