

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

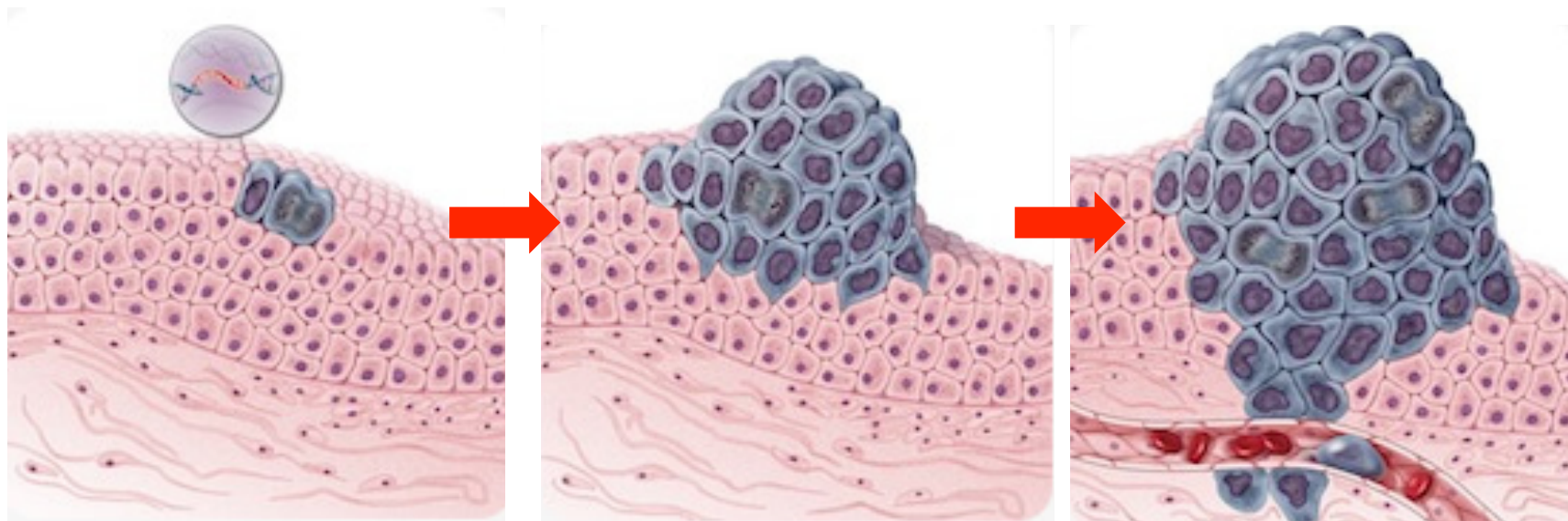
AA 2018-2019

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 12

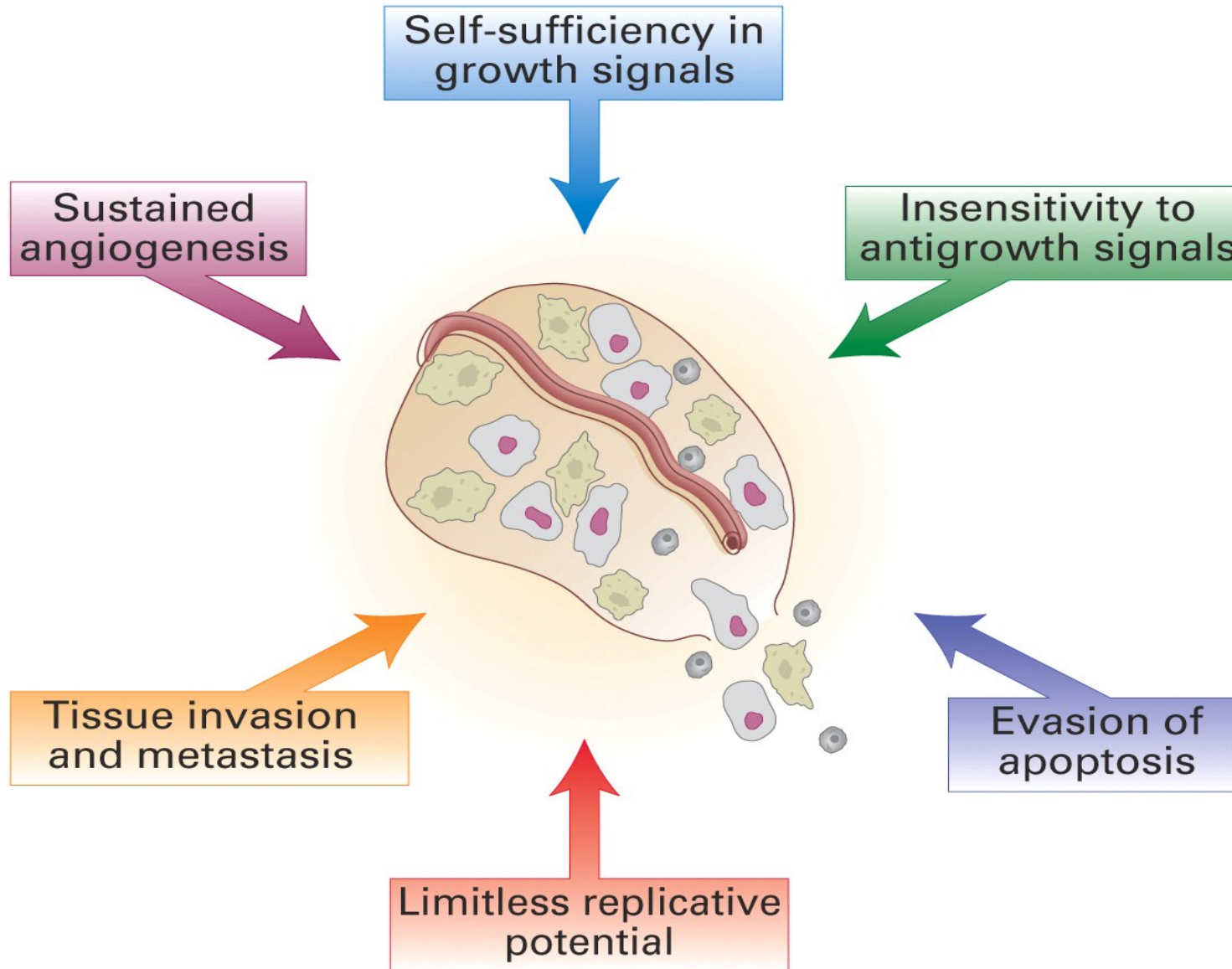
**LO STUDIO DELLA TRASFORMAZIONE
NEOPLASTICA**

IL CANCRO



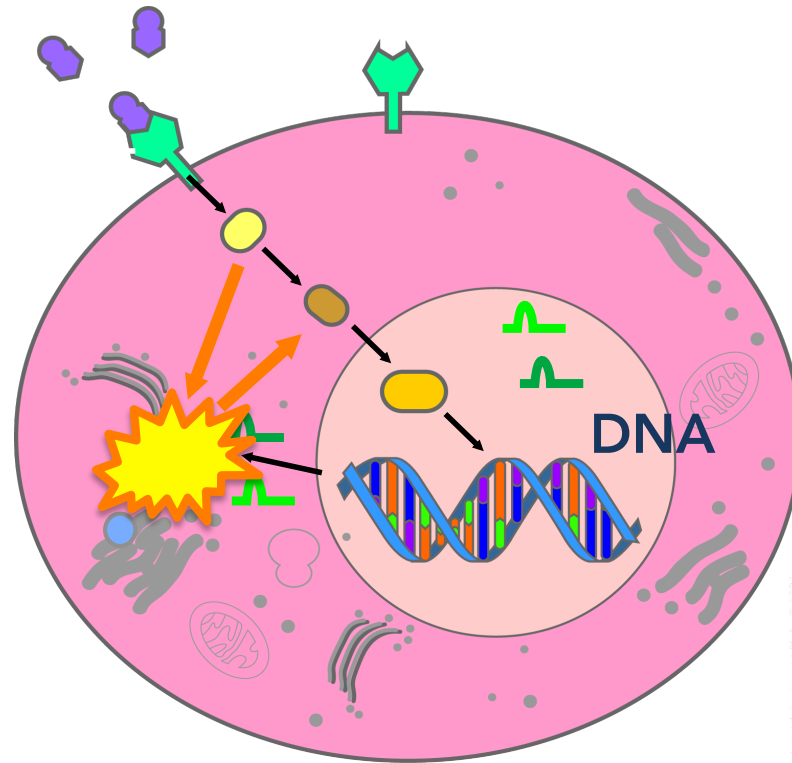
Il cancro è una patologia nella quale le cellule crescono e proliferano senza controllo, invadono e colonizzano i tessuti normali.

Alterazioni dei comportamenti cellulari nel cancro

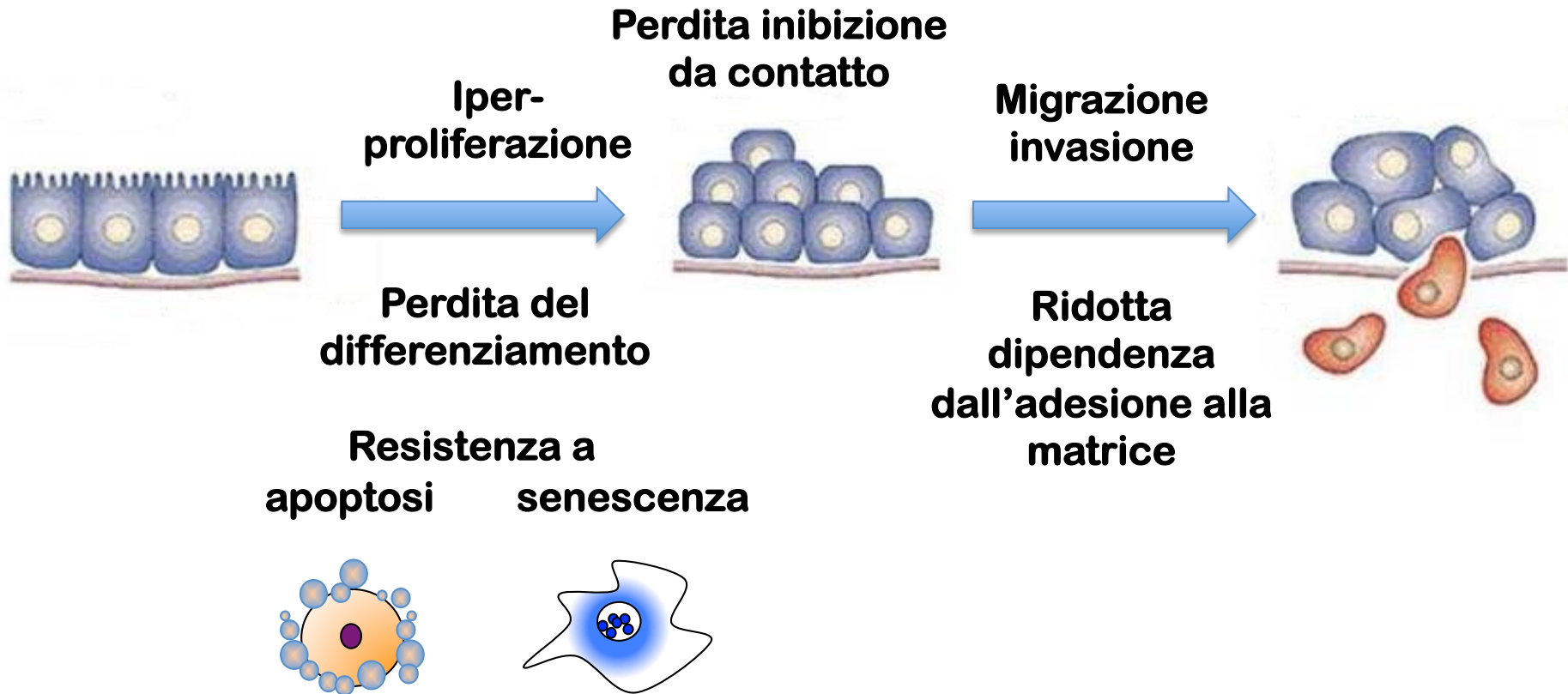


Le cause della trasformazione neoplastica

Alterazioni genetiche ed epigenetiche causano malfunzionamenti nelle vie di segnalazione e nei checkpoint che regolano fondamentali comportamenti cellulari



Caratteristiche delle cellule tumorali



LA RICERCA SUL CANCRO

Identificare
geni, proteine e processi
responsabili
dell'insorgenza e
dell'aggressività tumorale



Diagnosi



**Risposta
alle terapie già in uso**

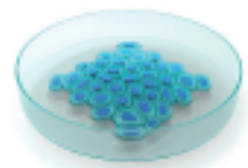


**Nuove
terapie mirate**

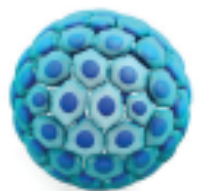
SISTEMI MODELLO PER LA RICERCA SUL CANCRO

Biochemical tools

Model system
in life sciences



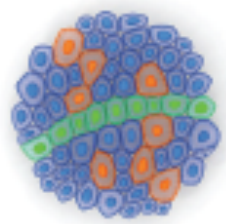
Monolayer cell culture



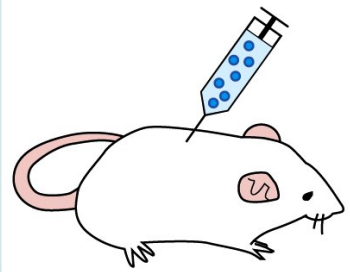
Spheroid



Organoid



Tissue explant



Complexity of culture

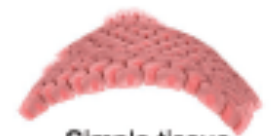
Organization of
the body



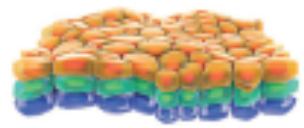
Subcellular



Cells



Simple tissue



Layered tissue



Organ & System



Body

Sci

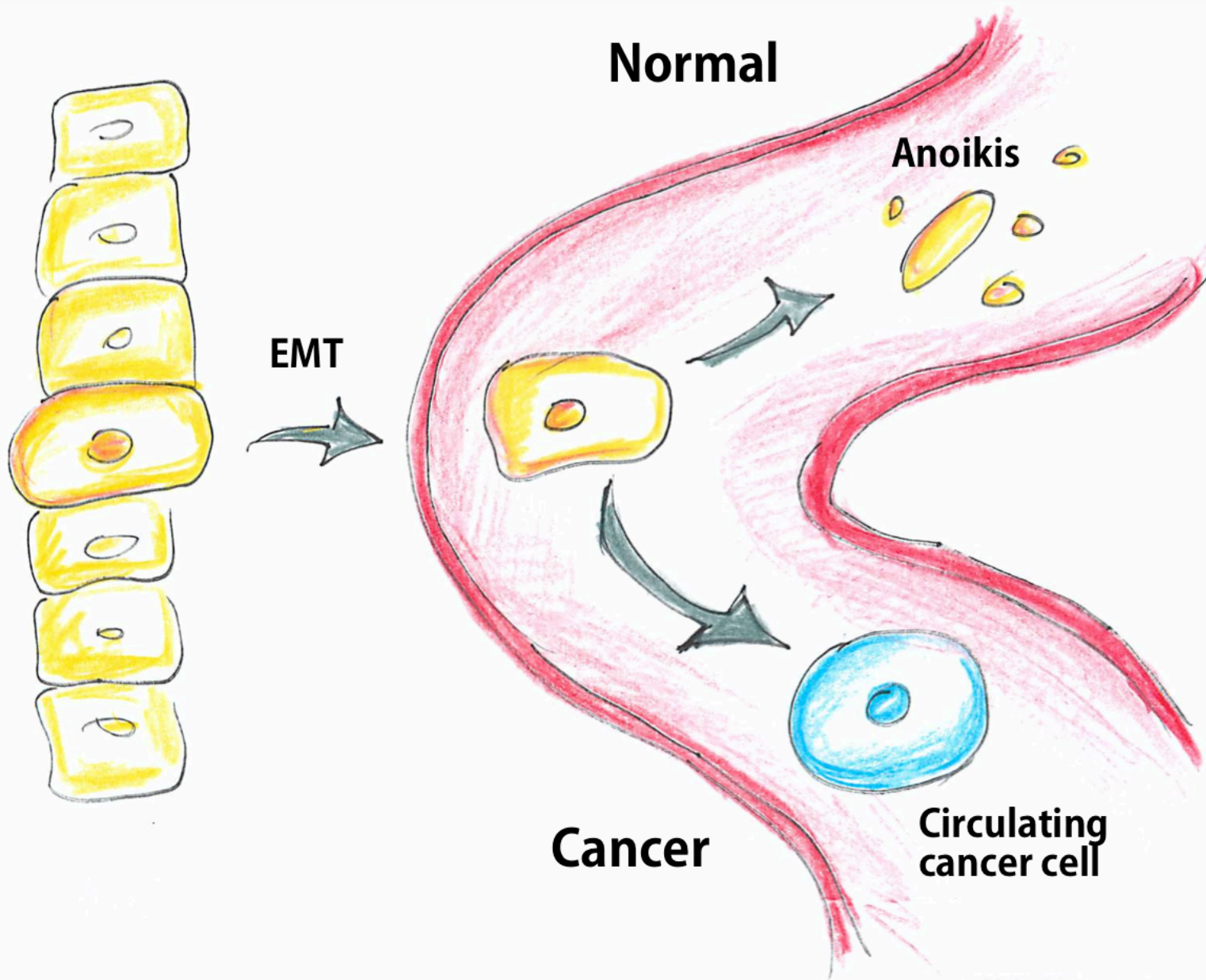
Modelli cellulari in vitro e saggi di trasformazione

- ✓ Saggi di **proliferazione**
- ✓ Saggi di crescita indipendente dal **substrato** (soft agar)
- ✓ Saggi di **motilità** cellulare (wound healing) e saggi di **migrazione** (transwelling)
- ✓ Saggi di **invasione**
- ✓ Saggi di **angiogenesi**
- ✓ Saggi di **chemioresistenza** (formazione di colonie, citotossicità, apoptosi)

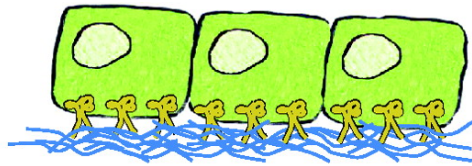
**Saggio di crescita indipendente dal substrato
= SAGGIO DEL SOFT AGAR**

Indica tumorigenicità/metastaticità

ANOIKIS = morte cellulare indotta dalla perdita di adesione

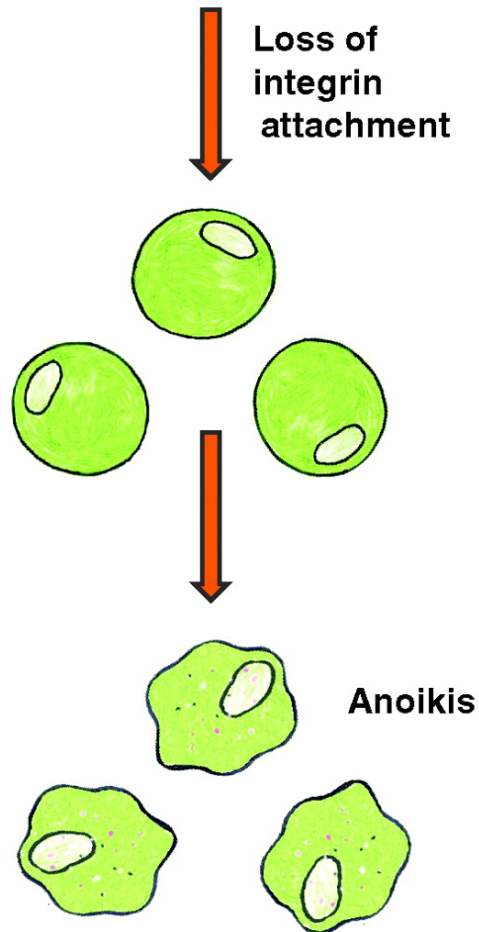


ANOIKIS



cellule NORMALI dipendono dalla formazione di contatti con la **MATRICE EXTRACELLULARE** per **SOPRAVVIVERE**.

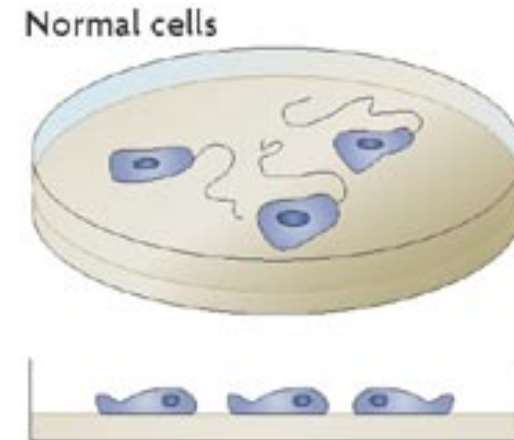
In vitro: necessitano di un substrato per la crescita: se seminate in un terreno semisolido vanno incontro a morte



cellule trasformate acquisiscono la capacità di **proliferare indipendentemente dall'adesione ad un substrato**

Saggio di crescita indipendente dal substrato (SOFT AGAR)

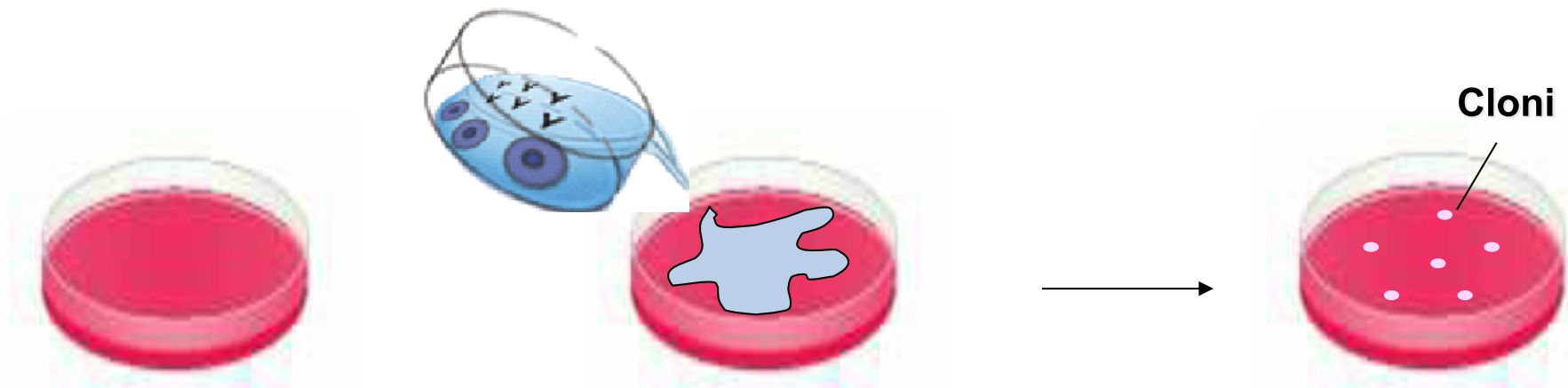
Cellule che crescono in adesione ad un recipiente di plastica secernono componenti della matrice extracellulare alla quale aderiscono mediante le integrine



Nel saggio del SOFT AGAR:

- Le cellule vengono seminate in un **mezzo SEMISOLIDO**, costituito da terreno di crescita contenente **agarosio** allo 0.25-0.5%.
- In questo modo esse **non** riescono a formare contatti con il substrato
- solo le cellule neoplastiche sopravvivono, avendo perso tale dipendenza

- per effettuare il saggio, le cellule vengono seminate in un **mezzo SEMISOLIDO**, costituito da terreno di crescita con agarosio allo 0.5%.
- Le cellule vengono staccate dal recipiente di coltura con tripsina e diluite nella soluzione di terreno/agarosio 0.5%.
- Vengono poi seminate in una capsula Petri
- Le cellule vengono lasciate nell'incubatore e la crescita di colonie viene osservata dopo 1 o più settimane

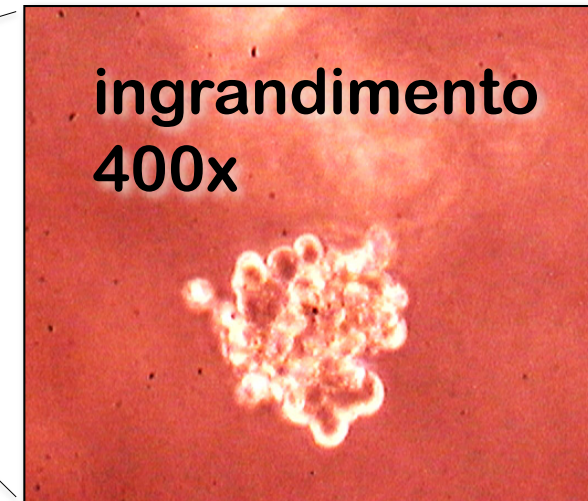
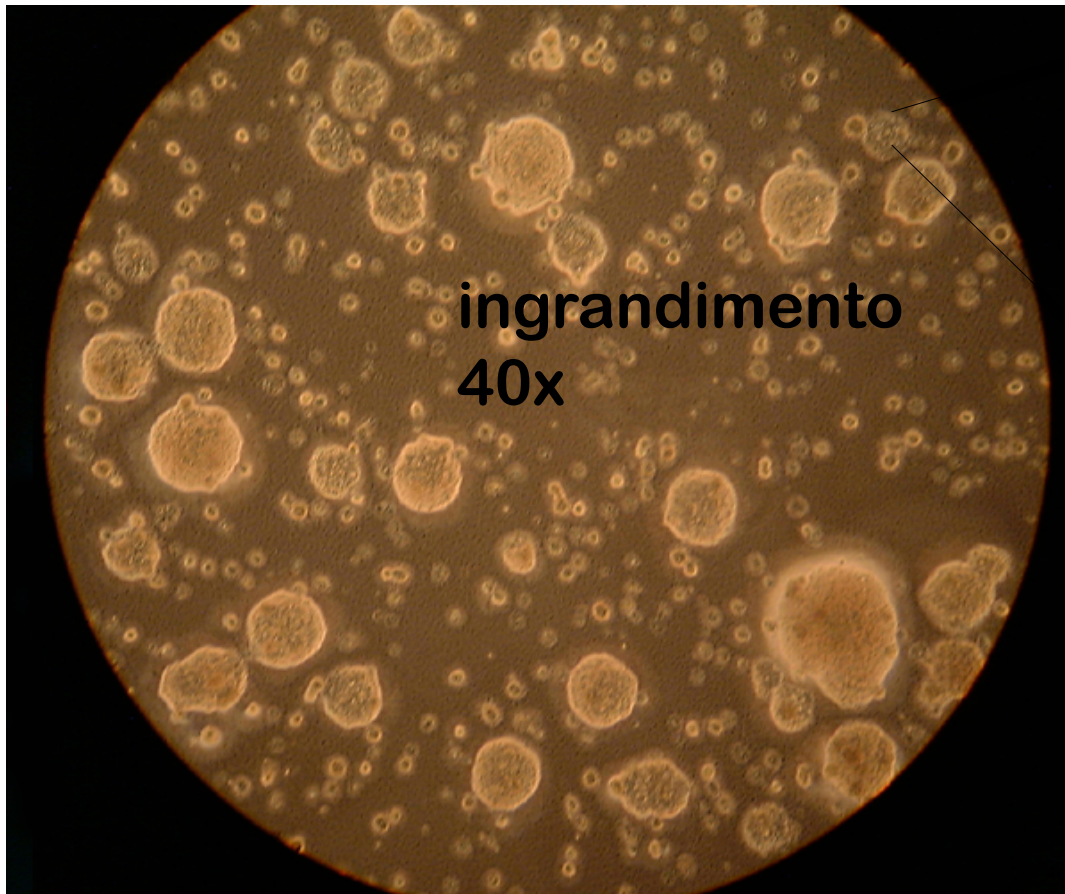
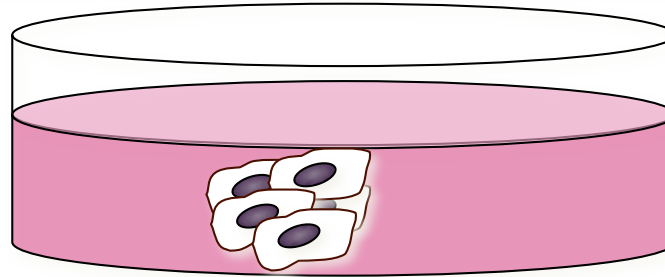


1° strato: terreno
con agarosio 1%

2° strato: cellule in
terreno con agarosio 0.5%

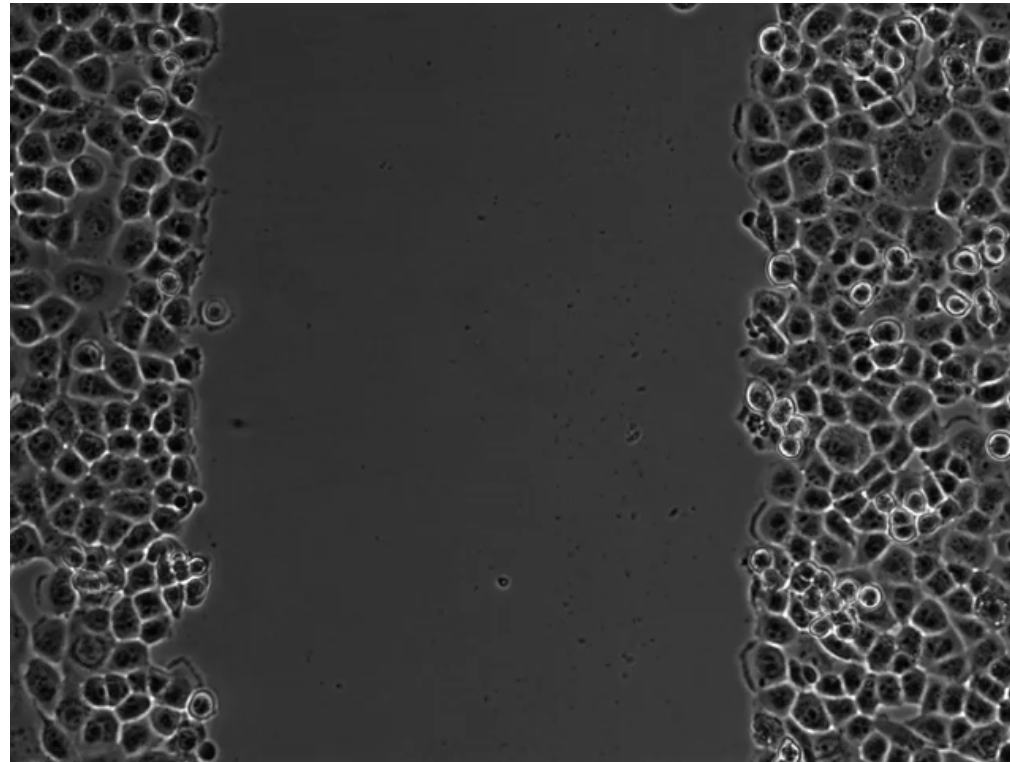
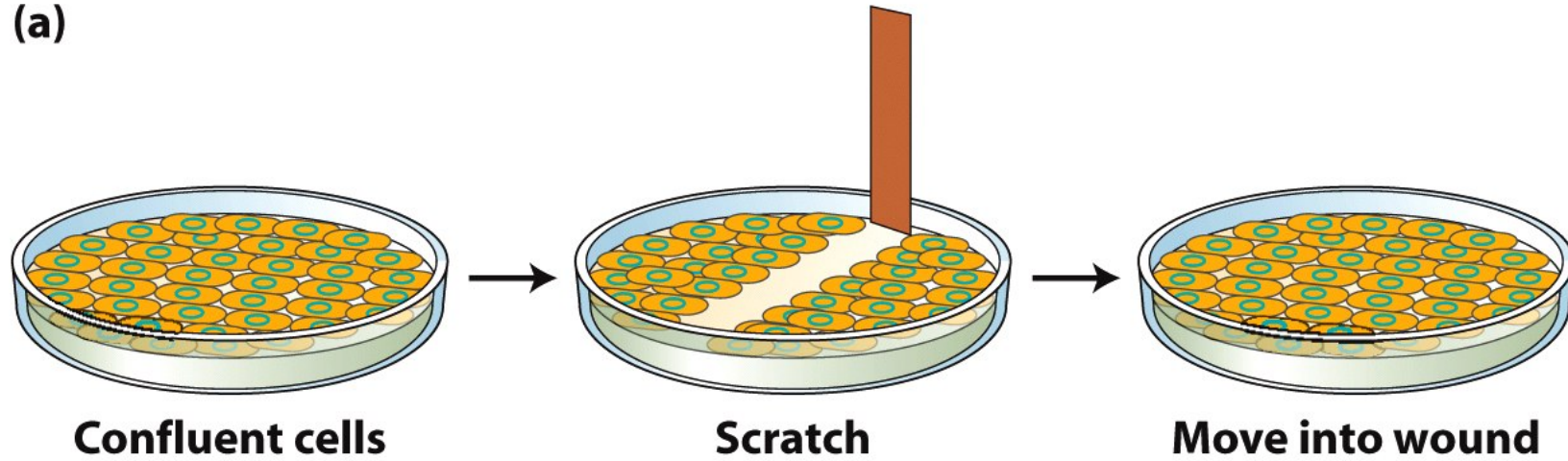
...dopo 7 gg

Saggio di crescita indipendente dal substrato

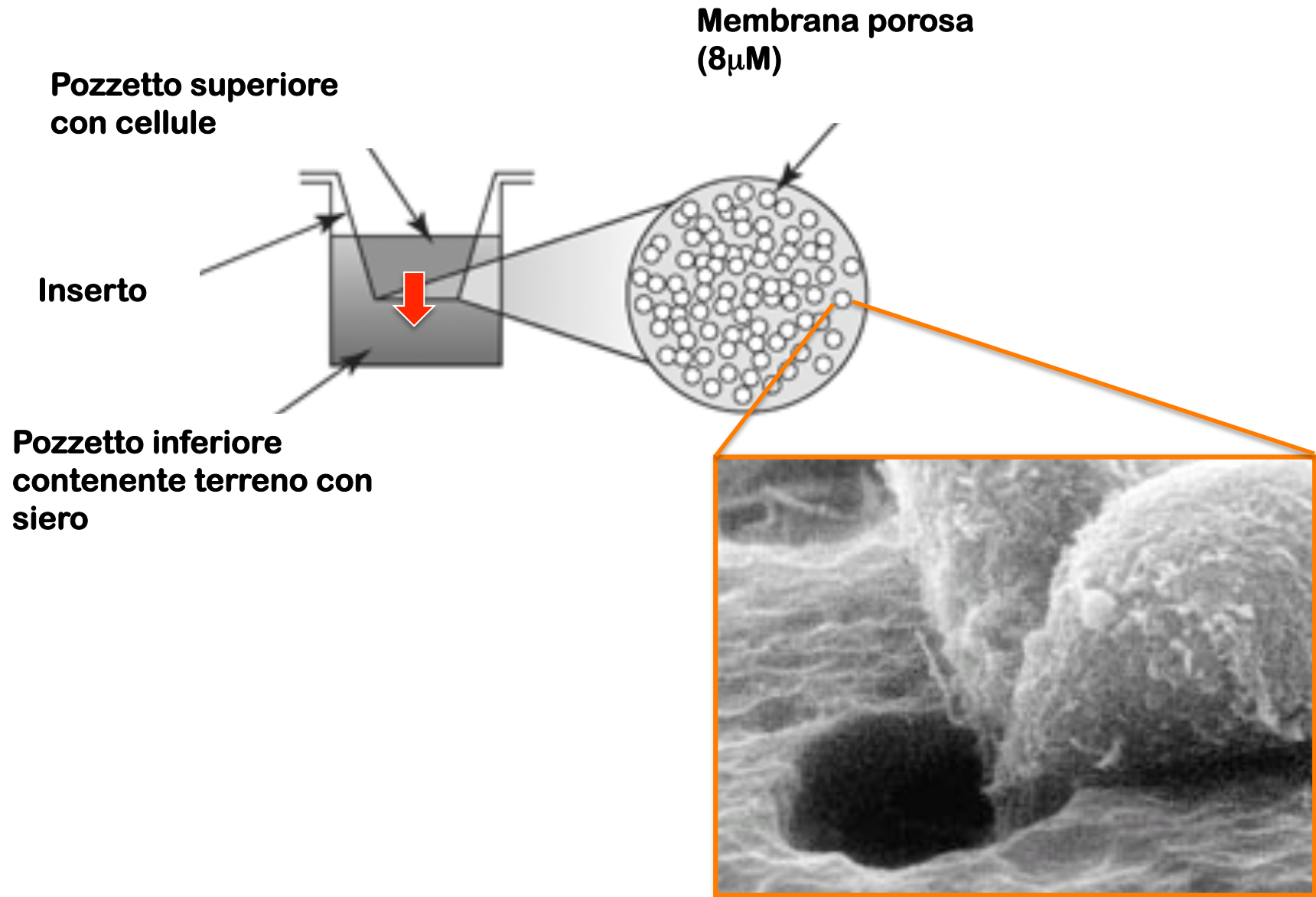


Saggi di motilità cellulare: wound-healing

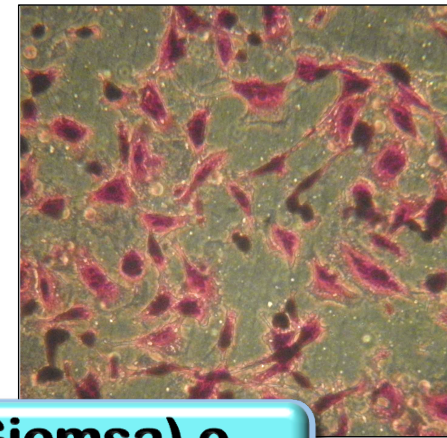
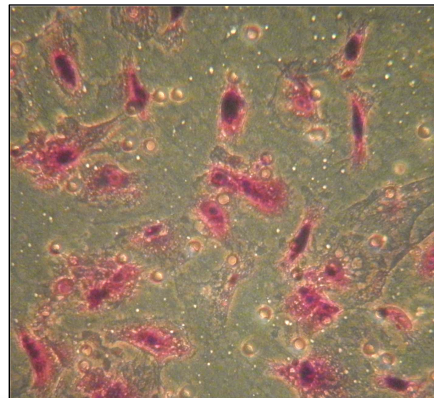
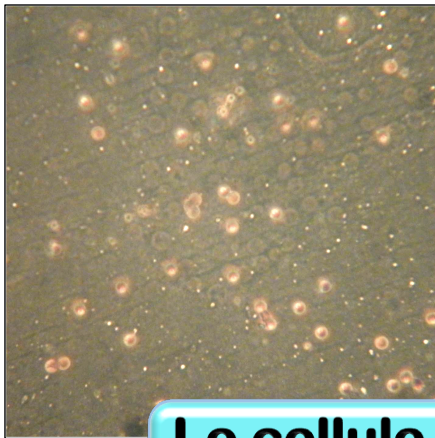
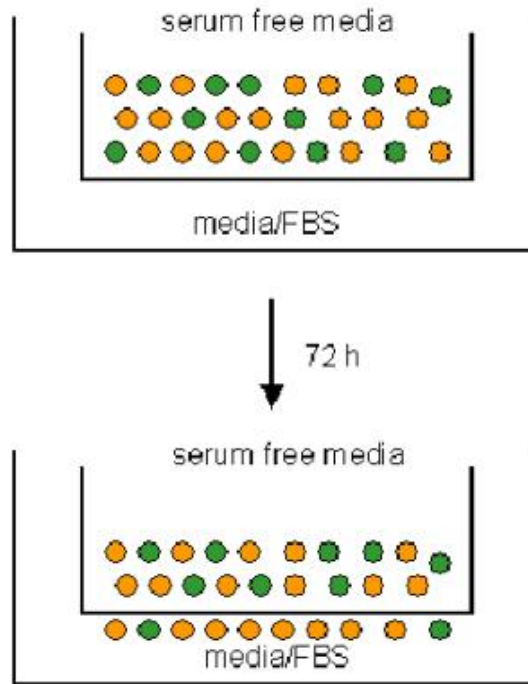
(a)



Saggi di migrazione con camera di Boyden (transwelling)

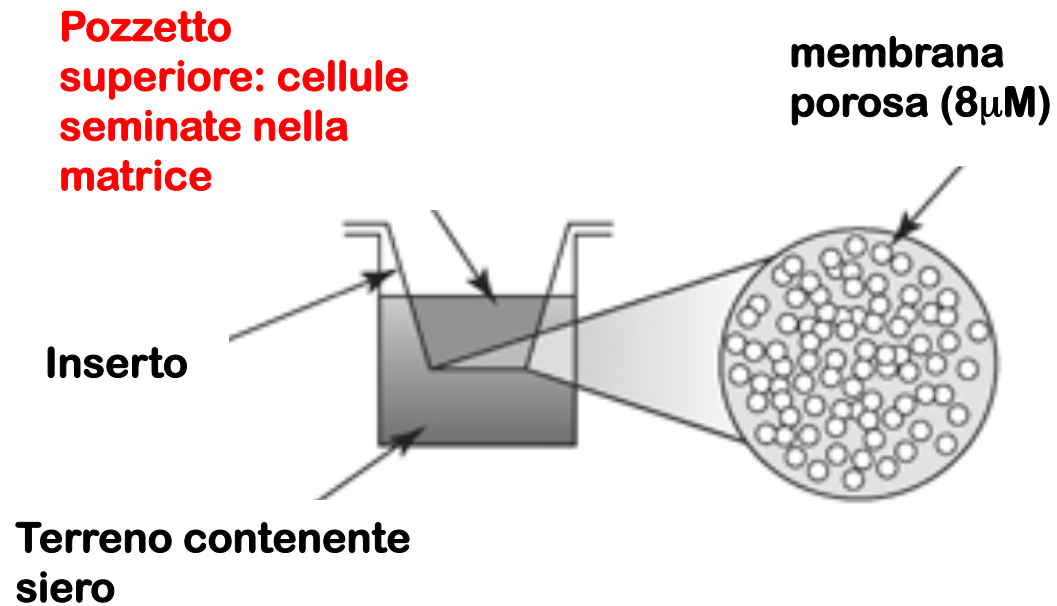


Saggi di migrazione con camera di Boyden



Le cellule migrate vengono colorate (Giemsa) e contate al microscopio ottico

Saggi di invasione

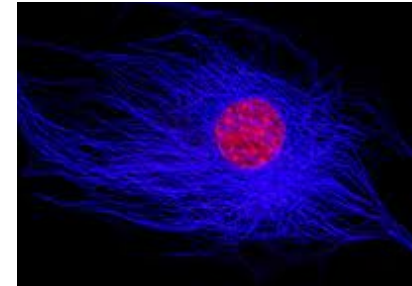


Si misura la capacità delle cellule di migrare attraverso un gel di collagene o Matrigel (che simula la **matrice extracellulare**) polimerizzato su un filtro poroso

Saggi di angiogenesi in vitro

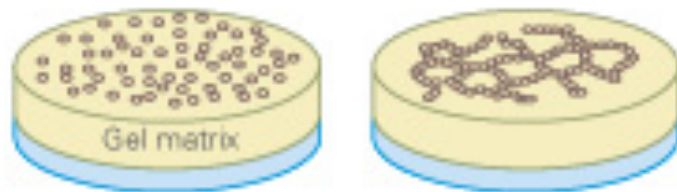
Si utilizzano comunemente **cellule endoteliali** umane derivate da cordone ombelicale

Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC



Si misura l'effetto di un terreno condizionato nell'indurre la formazione di vasi, oltre che proliferazione e migrazione, oppure permeabilizzazione

Tube Formation Assay



Homogeneous cell seeding

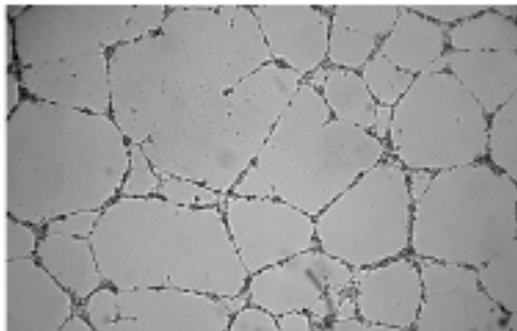
Tube formation

Sprouting Spheroid



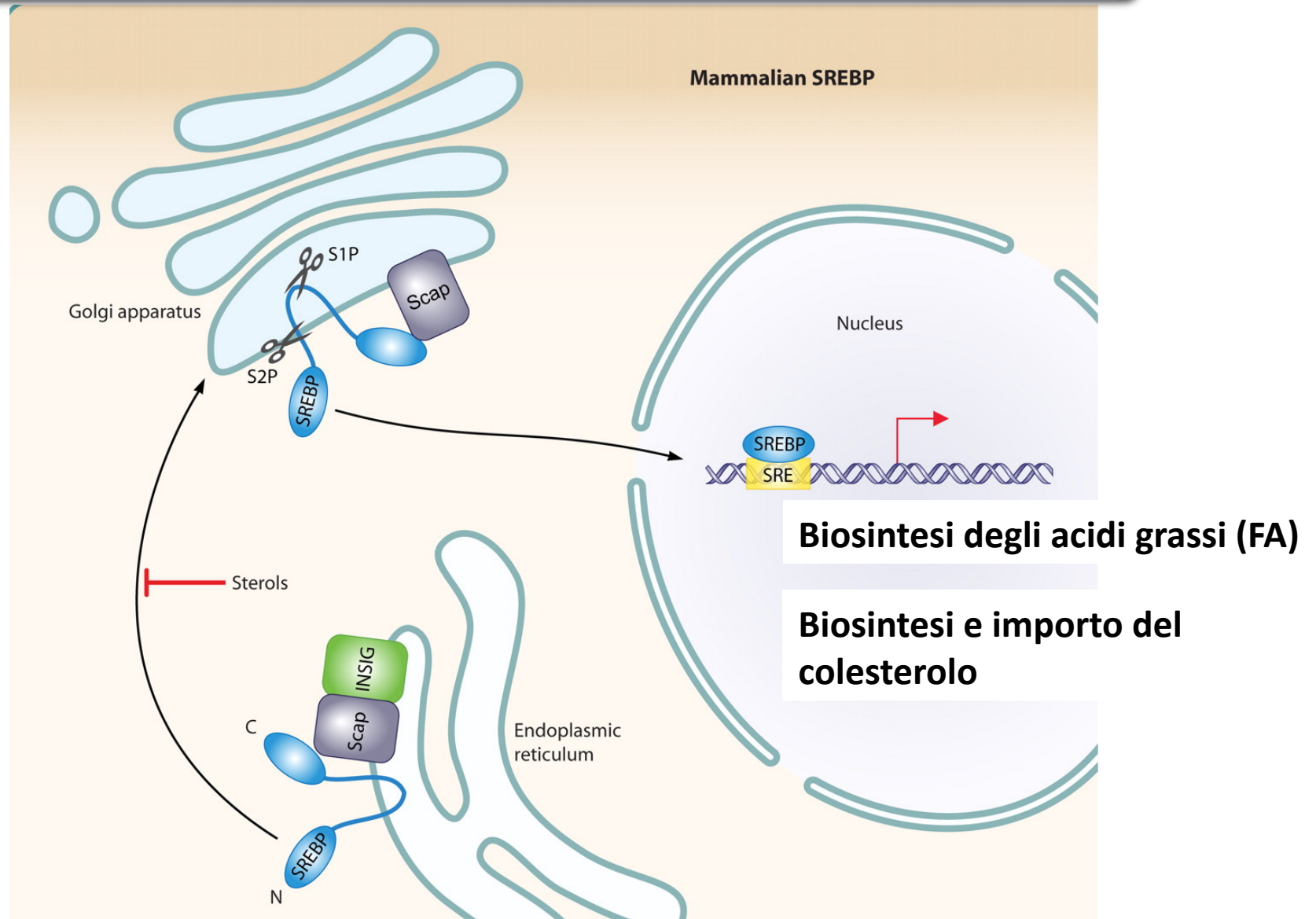
Cell spheroid

Sprouting



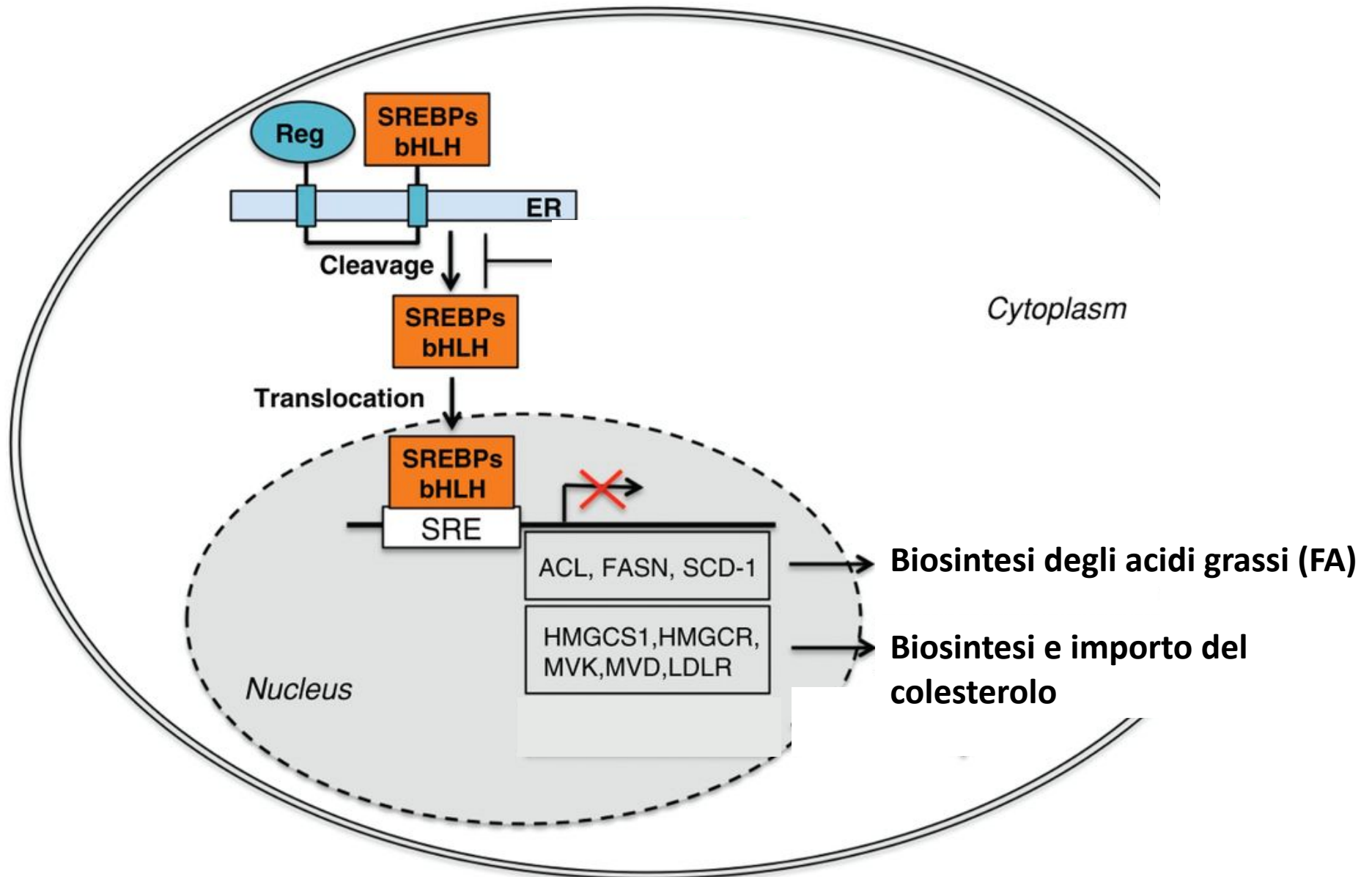
**Esperimento: ruolo del gene bersaglio di SREBP
SCD1 nella trasformazione cellulare**

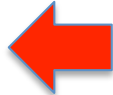
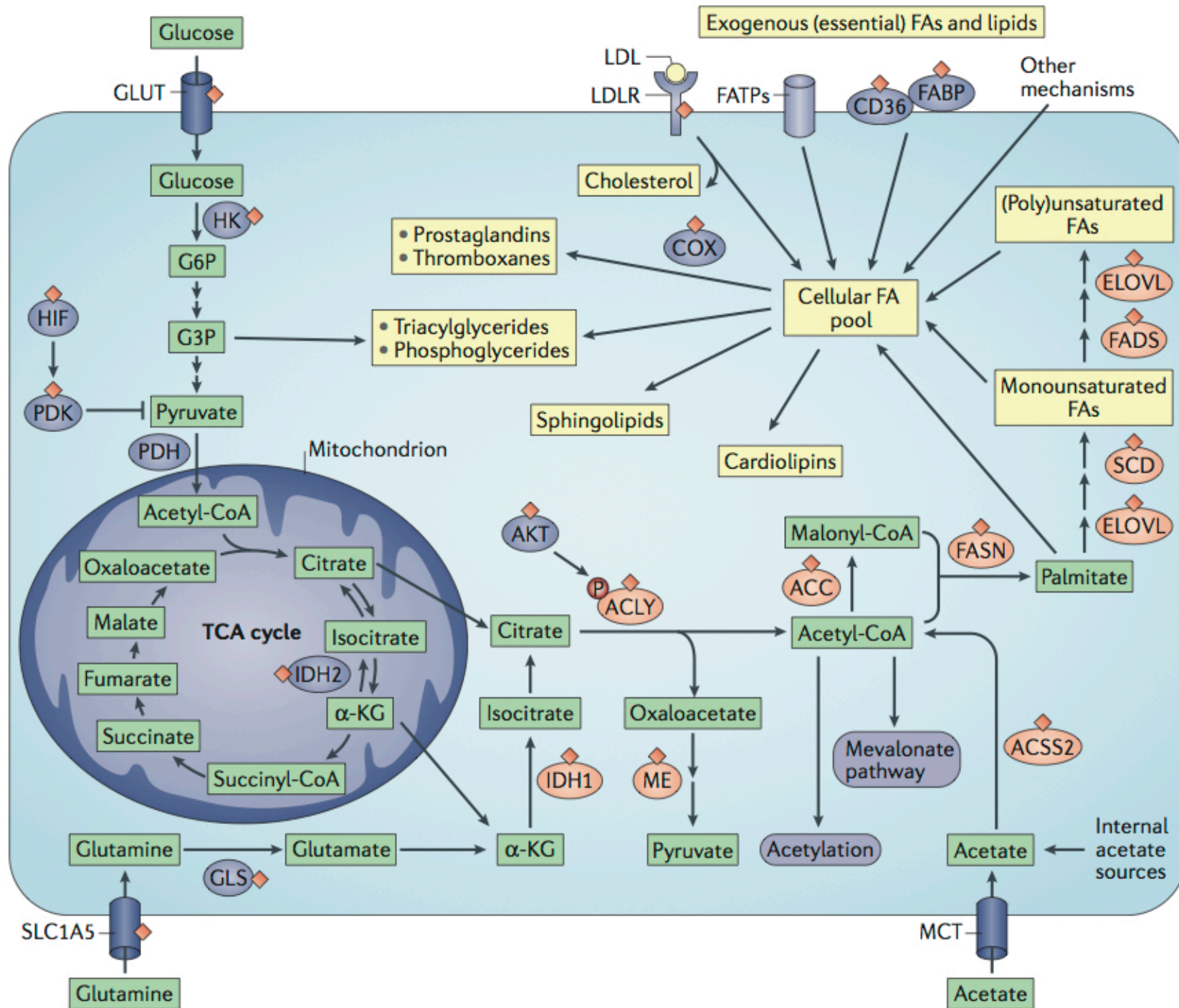
Ruolo di SREBP nel metabolismo lipidico



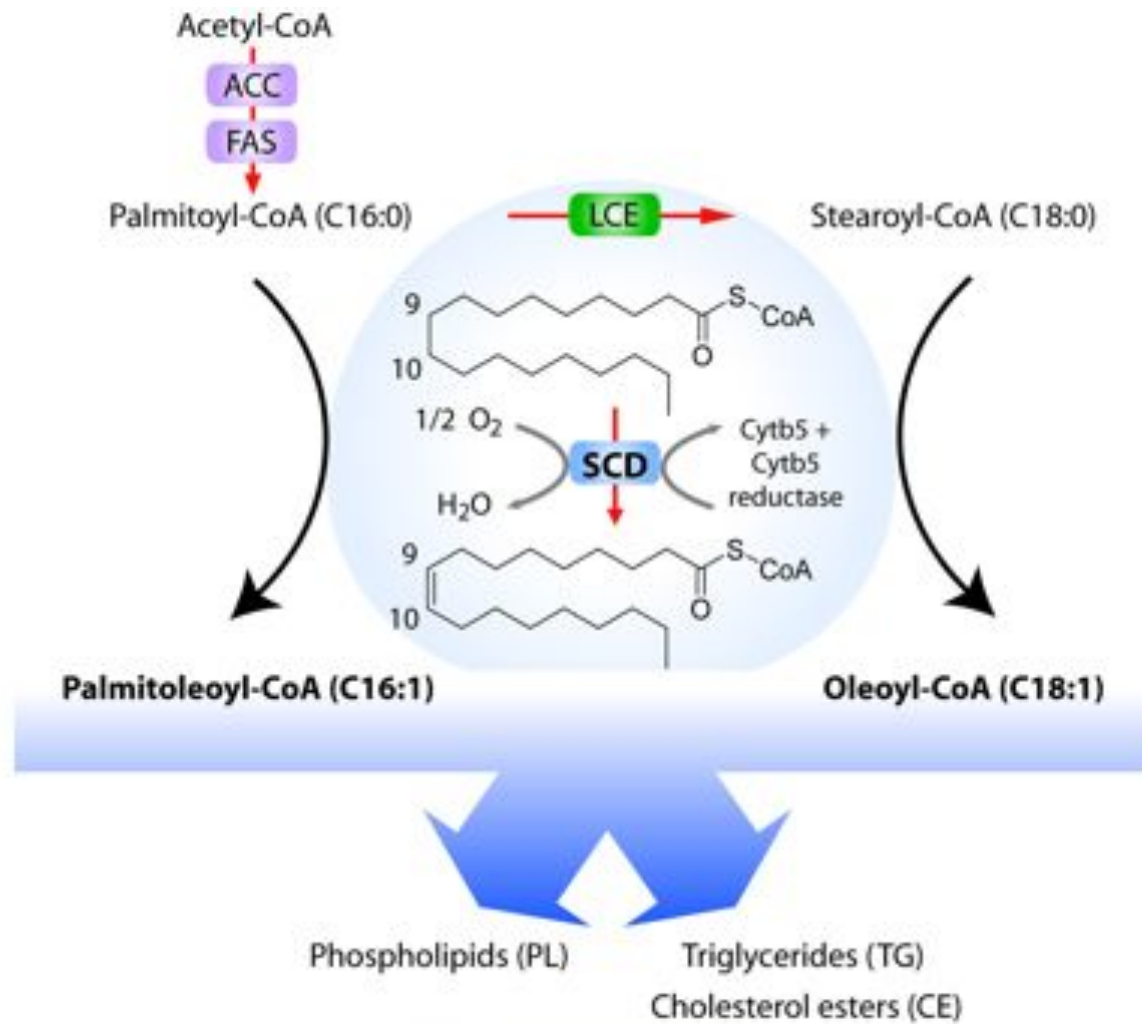
Clara M. Bien, and Peter J. Espenshade *Eukaryotic Cell*
2010; doi:10.1128/EC.00358-09

Ruolo di SREBP nel metabolismo lipidico





SCD1 è una desaturasi degli acidi grassi



La desaturasi SCD1 genera acidi grassi monoinsaturi (MUFA)

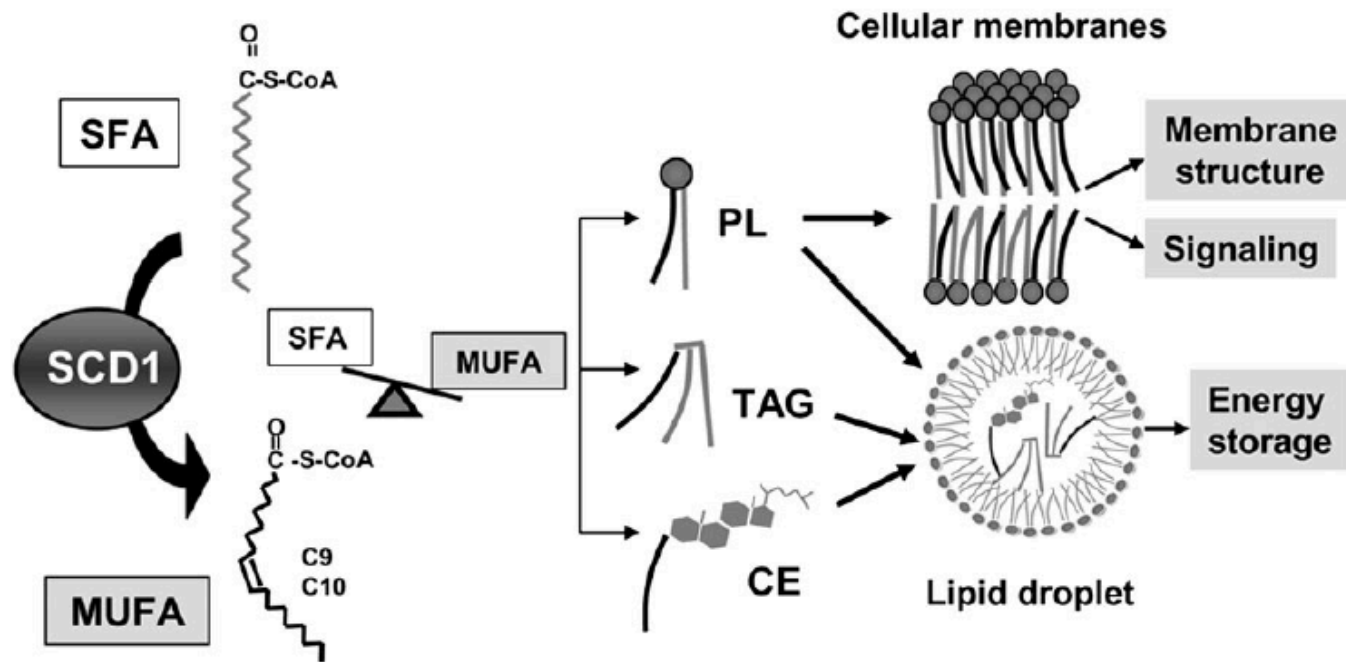
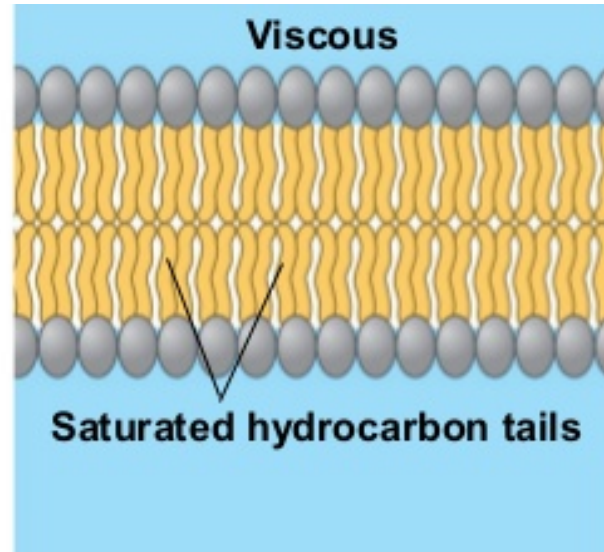
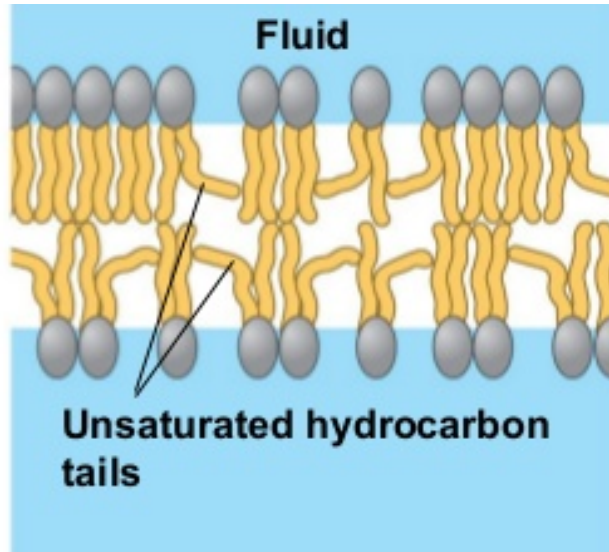


Fig. 1. Regulation of MUFA/SFA balance in mammalian cell lipids by SCD1. CE, cholesterol esters; PL, phospholipids; TAG, triacylglycerols.

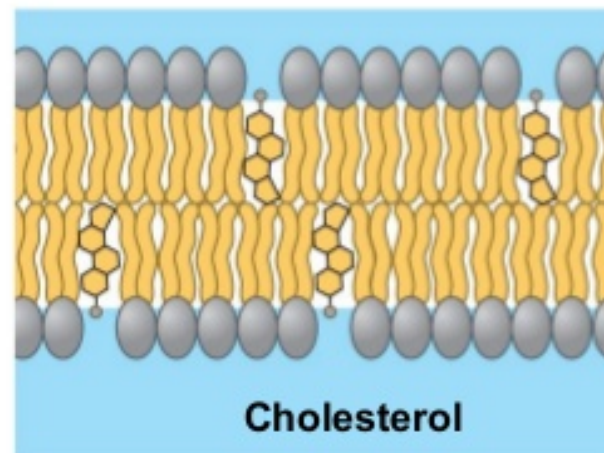
**Gli acidi grassi sono fondamentali per:
proliferazione cellulare (sintesi delle membrane),
segnalazione cellulare (secondi messaggeri),
riserva di energia (lipid droplets)**

L'insaturazione degli acidi grassi aumenta la fluidità della membrana

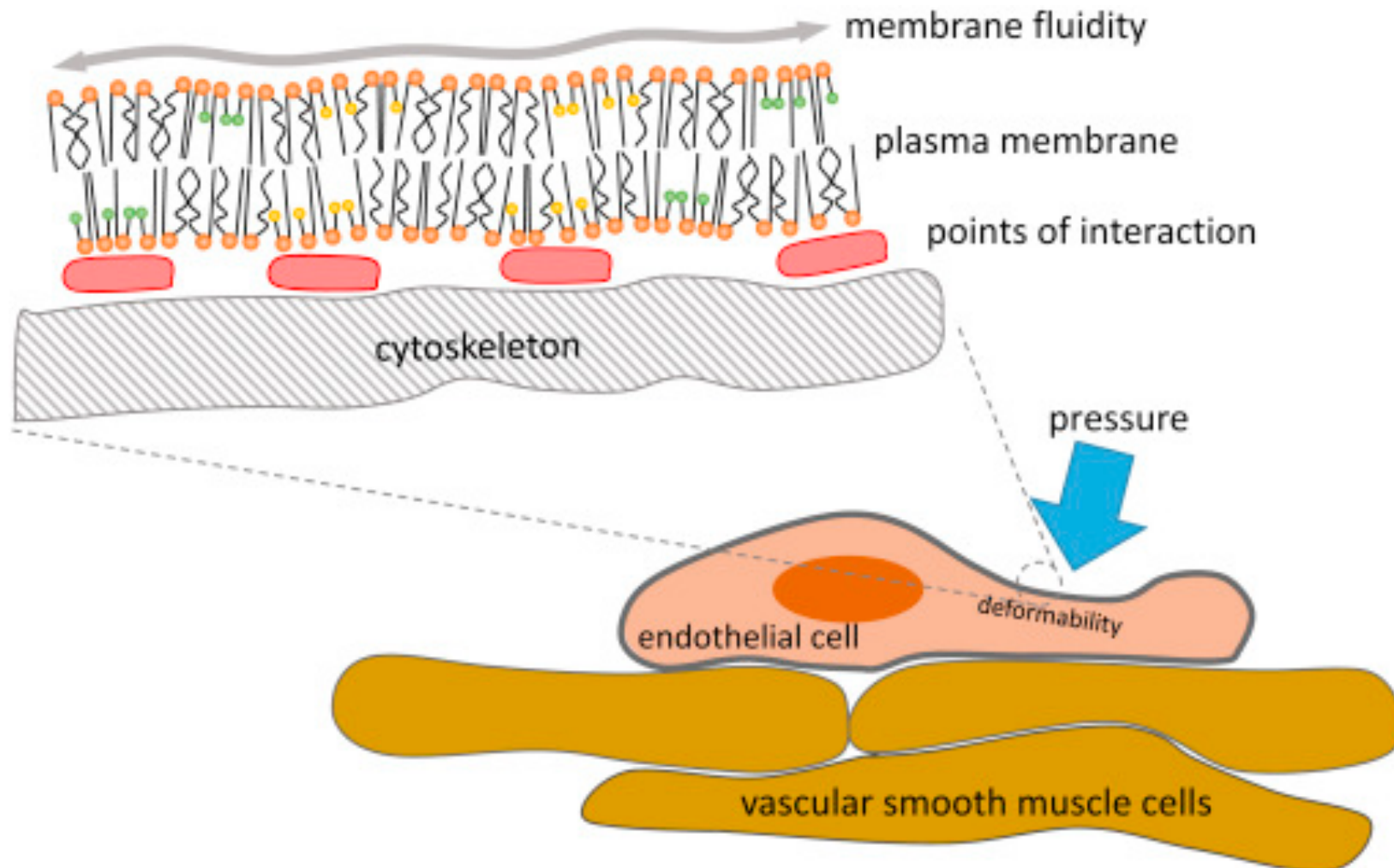


(a) Unsaturated versus saturated hydrocarbon tails

(b) Cholesterol within the animal cell membrane



La fluidità della membrana promuove la migrazione cellulare



Domanda:

La pathway SREBP/SCD-1 ha un ruolo nella migrazione cellulare?

**Esperimento: analisi del ruolo della pathway
SREBP/SCD-1 nella migrazione cellulare**

**Strategia sperimentale:
Saggio di migrazione cellulare
con camera di Boyden**

- 1) Cellule trasfettate con vettore di controllo
- 2) Cellule trasfettate con vettore di espressione di SREBP1A (induce espressione di SCD-1 e MUFA)
- 3) Come 2) ma con inibitore specifico di SCD1 MF-438



Analisi in camera di Boyden

