

CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Docenti:

**Fiamma Mantovani
Alessandra Rustighi**

fmantovani@units.it

STRUTTURA DEL CORSO

24 ORE LEZIONE FRONTALE (Prof. Mantovani): erogate inizialmente in forma telematica

36 ORE LEZIONE IN LABORATORIO: (Proff. Mantovani, Rustighi, dr. Capaci)
erogate in presenza

Sito MOODLE2 del corso Laboratorio di Biologia Cellulare

Le lezioni teoriche saranno erogate mediante combinazione di lezioni video/audioregistrate corredate da files PDF/ppt (per le prime lezioni introduttive) e lezioni in live streaming mediante la piattaforma MS-Teams (sessioni di domande e risposte).

I files delle lezioni saranno forniti su Moodle, o in alternativa saranno forniti links a risorse online scaricabili.

La calendarizzazione di lezioni in live streaming mediante la piattaforma MS-Teams <https://www.units.it/personale/docente/attivita-lavorativa/didattica-a-distanza> avverrà tramite Moodle.

Il blog di Moodle sarà per domande/risposte e approfondimenti degli argomenti trattati a lezione, si consiglia di sfruttare questo strumento per una partecipazione attiva al corso.

NON SONO UTILIZZATI LIBRI DI TESTO

OBIETTIVI FORMATIVI

1. Acquisire **conoscenze teoriche** sulle tecniche di biologia cellulare utilizzate nella ricerca biomedica, in diagnostica e in terapia
2. Effettuare **esercitazioni pratiche** per familiarizzare con le tecniche di coltura cellulare in vitro e applicarle allo studio di processi cellulari quali trascrizione, proliferazione, migrazione...
3. Imparare ad applicare il **metodo scientifico**.
4. Raccogliere ed interpretare i **dati sperimentali** rilevanti.
5. **Pianificare una strategia sperimentale** scegliendo i controlli sperimentali adeguati.

PREREQUISITI

Gli studenti devono aver frequentato il corso di Biologia Molecolare e Cellulare e aver appreso argomenti quali:

Struttura e funzione delle membrane e degli organelli cellulari;
regolazione della trascrizione;
proliferazione cellulare e duplicazione del DNA;
morte cellulare;
trasformazione neoplastica.

ESAMI DI PROFITTO

L'esame del corso consta di **2 parti, un colloquio orale e un compito scritto. Il voto finale risulta dalla media pesata delle due valutazioni.**

Colloquio orale al termine del corso. Peso: 20%

Gli studenti, divisi in gruppi, dovranno organizzare una breve presentazione per rispondere a un quesito sperimentale fornito in anticipo dal docente, applicando le tecniche apprese durante il corso, e discuterla con i docenti. Durante il corso gli studenti apprenderanno come organizzare una strategia sperimentale includendo gli opportuni controlli.

Esame scritto. Peso: 80%

Costituito da domande aperte su tutti gli argomenti del corso, della durata di 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 all'esame.

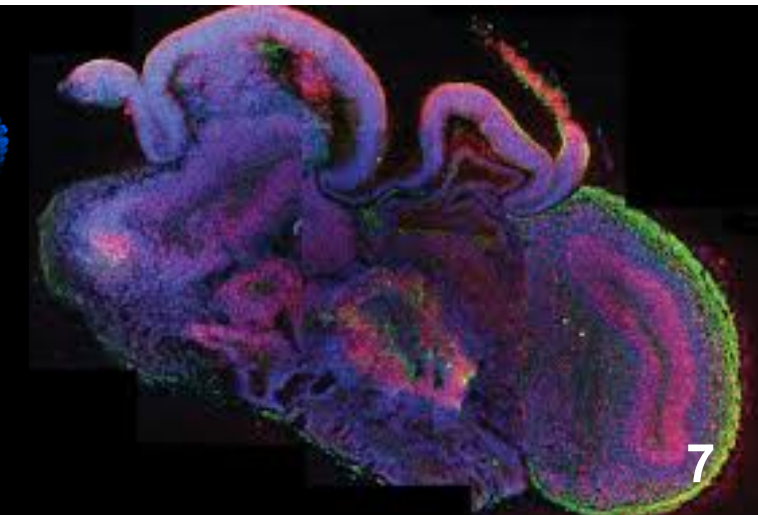
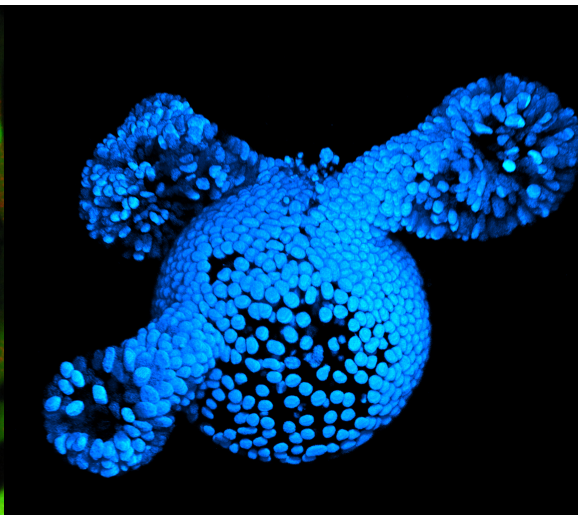
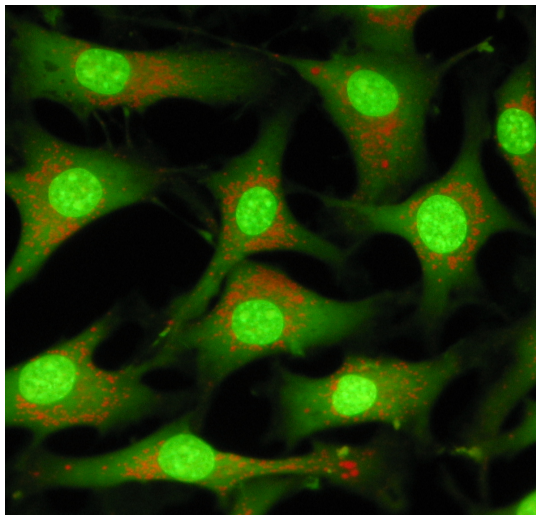
TECNICHE DI COLTURA CELLULARE IN VITRO

COLTURE CELLULARI

cellule estratte dall'organismo di origine
(nel nostro caso mammiferi)

possono essere cresciute e propagate in vitro

- in adesione, in sospensione, in matrice
- libere o organizzate (colture 2D - colture 3D - organoidi – tessuti etc.)



APPLICAZIONI DELLE COLTURE CELLULARI IN VITRO IN MEDICINA MOLECOLARE

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

RICERCA BIOMEDICA

Studio delle **basi molecolari** (genetiche e biochimiche) di patologie

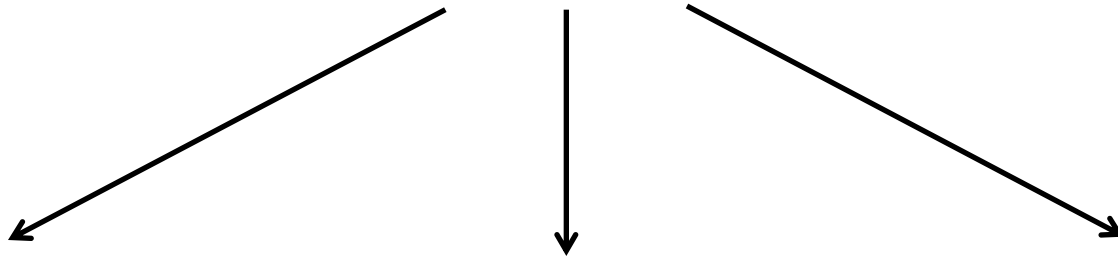
infettive, genetiche, metaboliche, immunologiche, neurologiche, neoplastiche

Identificazione di **marcatori diagnostici/prognostici**

Identificazione di **bersagli terapeutici**

Progettazione e test di **vaccini, strategie terapeutiche** e farmaci

**L'utilizzo di colture cellulari in vitro
consente di identificare
geni, proteine e processi
responsabili
della patogenesi delle malattie**



Diagnosi



**Risposta
alle terapie
in uso**

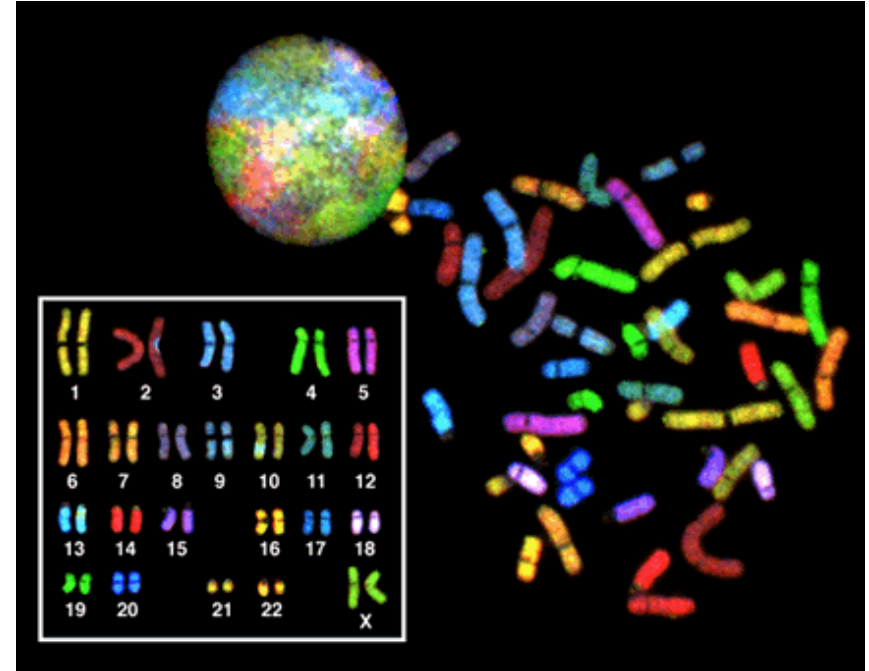
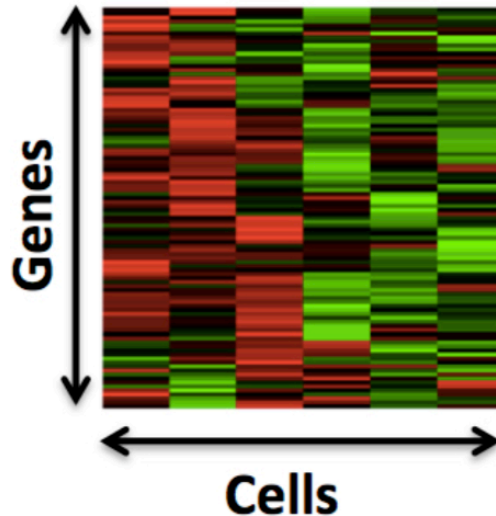


**Nuove terapie
a bersaglio
molecolare**

ANALISI CITOGENETICHE

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

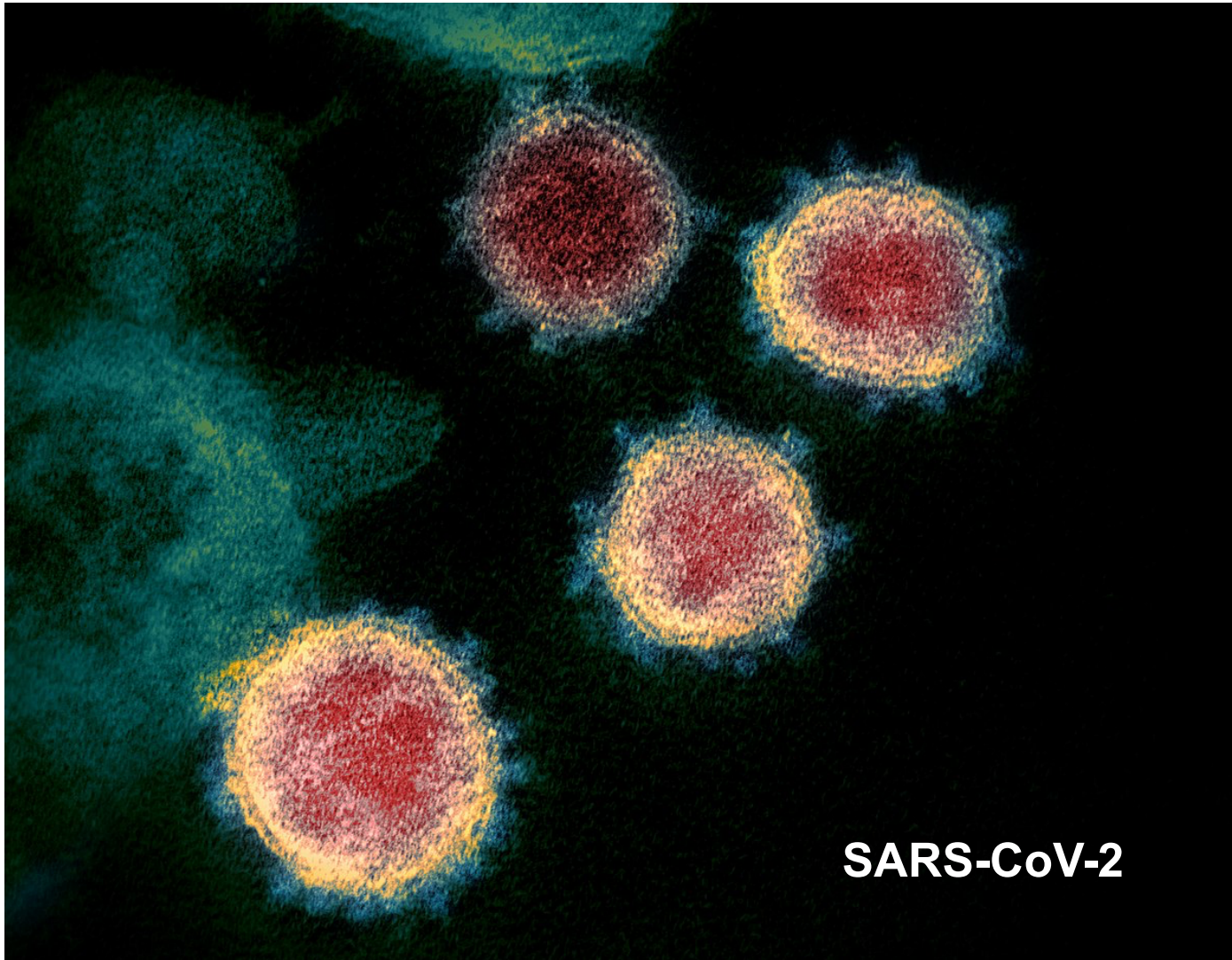
PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA



Diagnosi/prognosi di **specifiche patologie**, in particolare specifici **tumori**

Predizione della risposta a **terapie**

MALATTIE INFETTIVE E VACCINI



SVILUPPO/ RIPOSIZIONAMENTO DI FARMACI

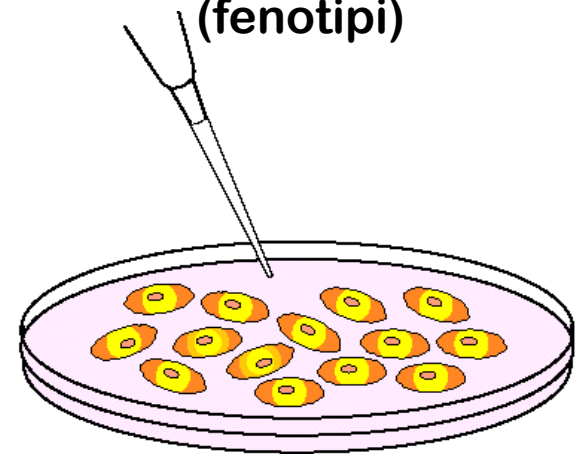
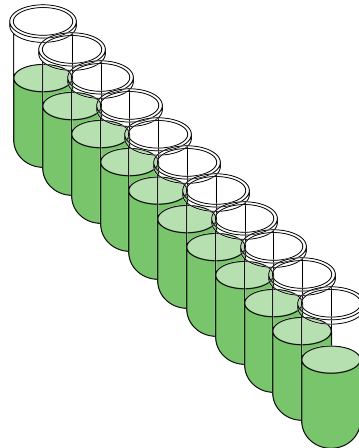
Molecola o
processo bersaglio



Design razionale
Drug Screening



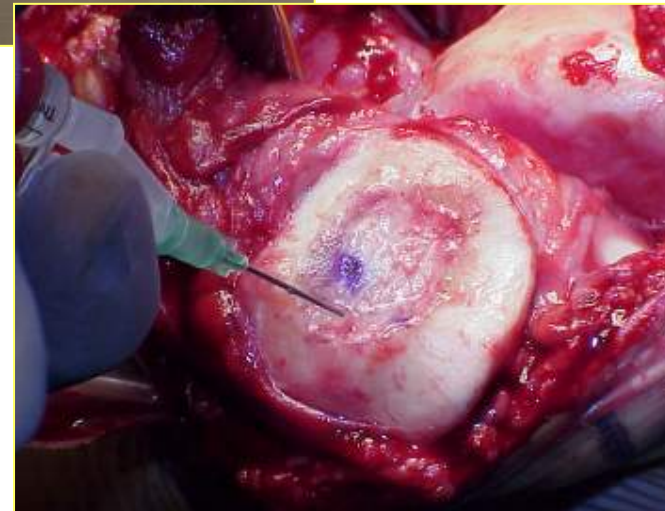
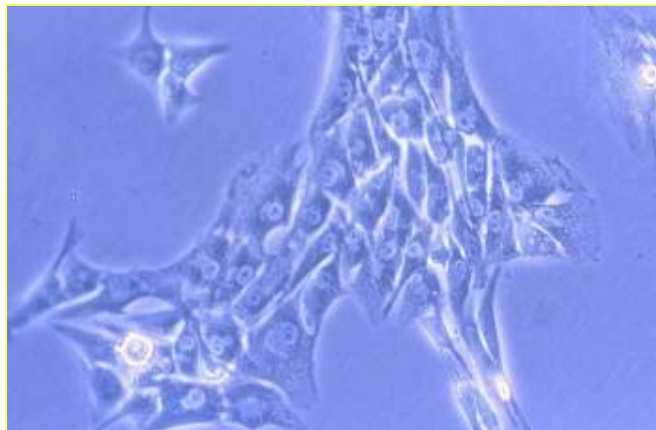
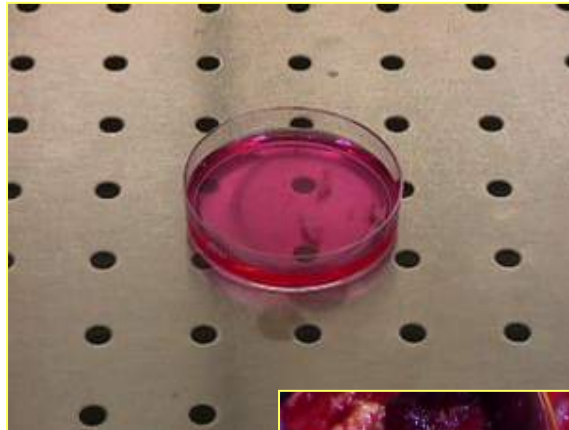
Test che valutano
gli effetti su
specifici
processi biologici
(fenotipi)



TERAPIA CELLULARE E TISSUTALE IN CLINICA

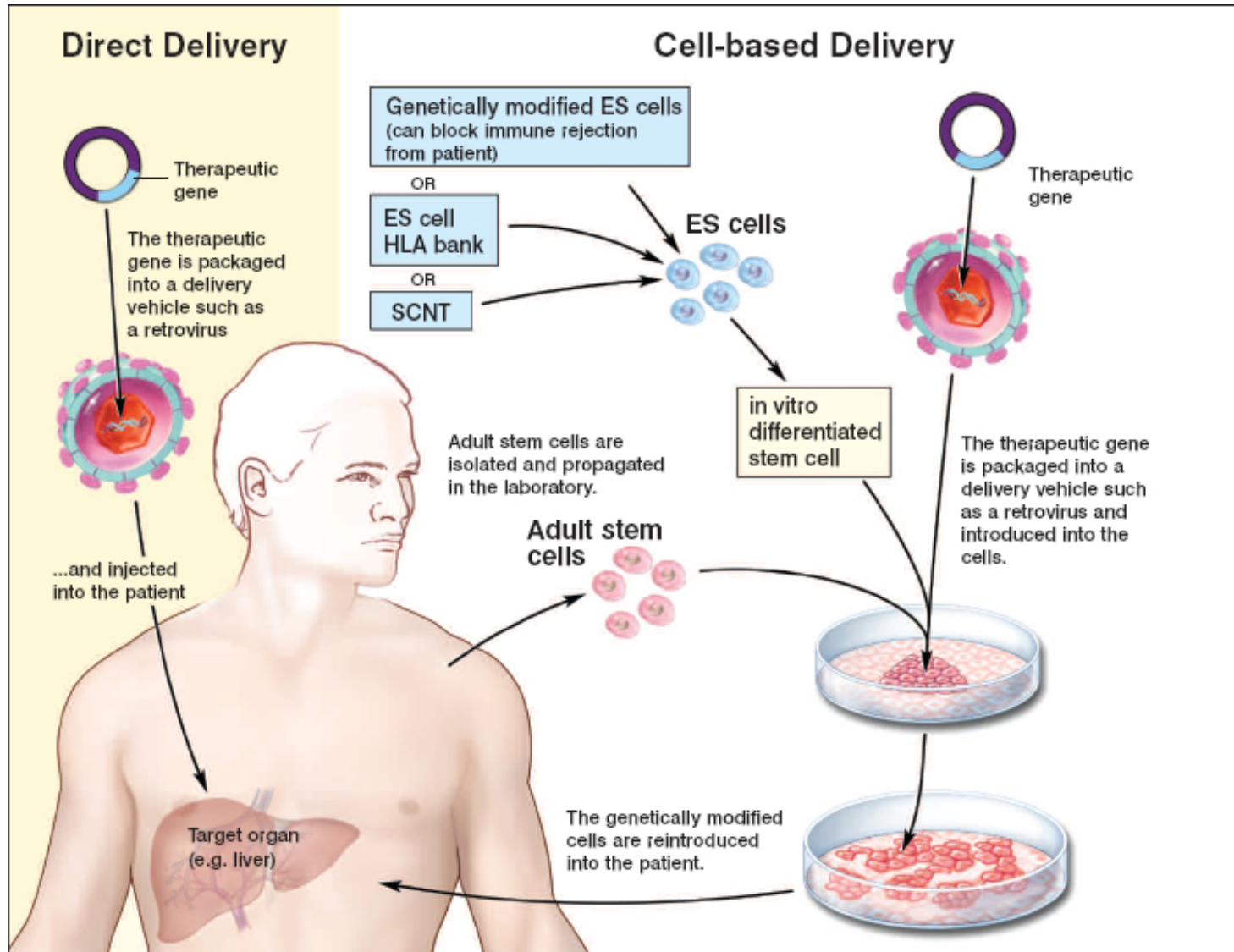
MEDICINA RIGENERATIVA

(trapianto di pelle, cartilagine, midollo osseo, cornea...)



MANIPOLAZIONE CELLULARE E TISSUTALE EX-VIVO

TERAPIA GENICA



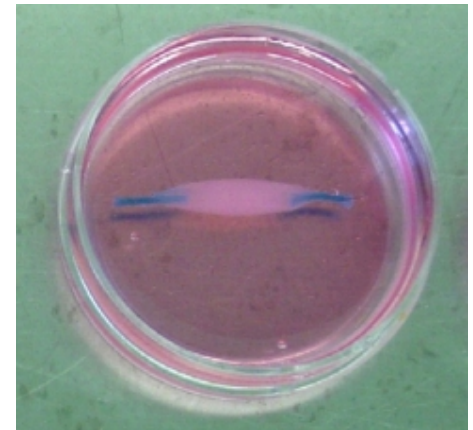
TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA



BIOTECNOLOGIE INDUSTRIALI



- eritropoietina
- Bistecca in provetta



ALTRE APPLICAZIONI ...

- Bio-art



ATTIVITA' SVOLTE IN LABORATORIO DIDATTICO

Durante il corso gli studenti acquisiranno le basi teoriche e le competenze pratiche per eseguire in laboratorio didattico, le diverse fasi di un vero piano sperimentale al fine di rispondere a specifiche domande scientifiche

BACKGROUND: Le cellule necessitano di colesterolo e lipidi per la sintesi delle membrane, per svolgere le normali funzioni e soprattutto quando sono in attiva proliferazione oppure devono migrare. I livelli di colesterolo/lipidi nella cellula regolano la sintesi e l'importo e la sintesi di tali molecole attraverso i fattori di trascrizione della famiglia SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Proteins). I fattori SREBP hanno quindi funzioni importanti nella cellula, ma la devono essere strettamente regolati per non alterare il comportamento cellulare.

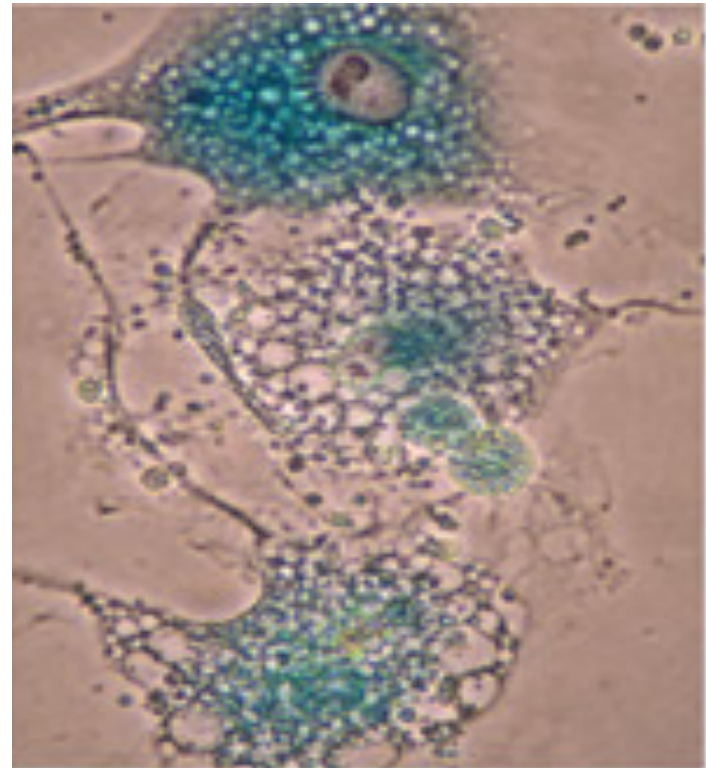
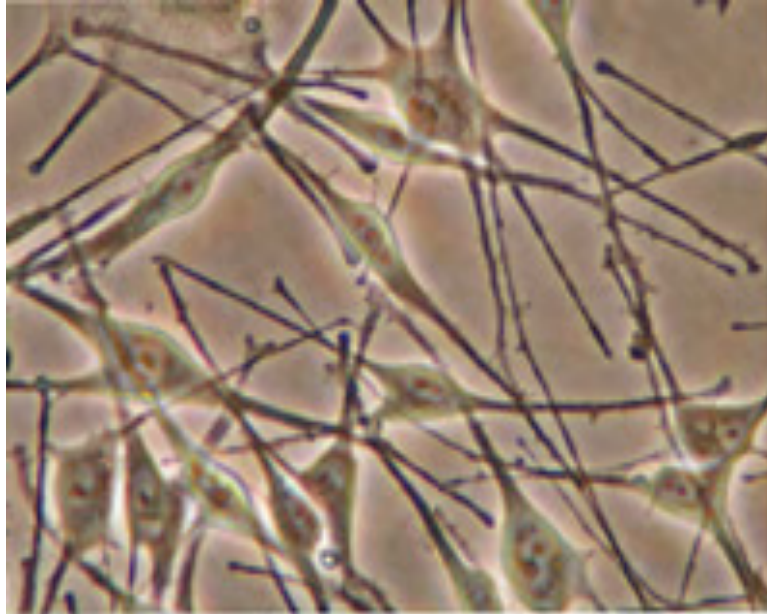
Le domande scientifiche

- 1. Come possiamo seguire sperimentalmente i cambiamenti nella localizzazione subcellulare delle proteine SREBP in risposta alla disponibilità di colesterolo?**
- 2. Come possiamo comprendere i meccanismi attraverso cui i fattori SREBP regolano la trascrizione dei propri geni bersaglio?**
- 3. Come possiamo comprendere il contributo dei fattori SREBP alla proliferazione e alla migrazione cellulare?**

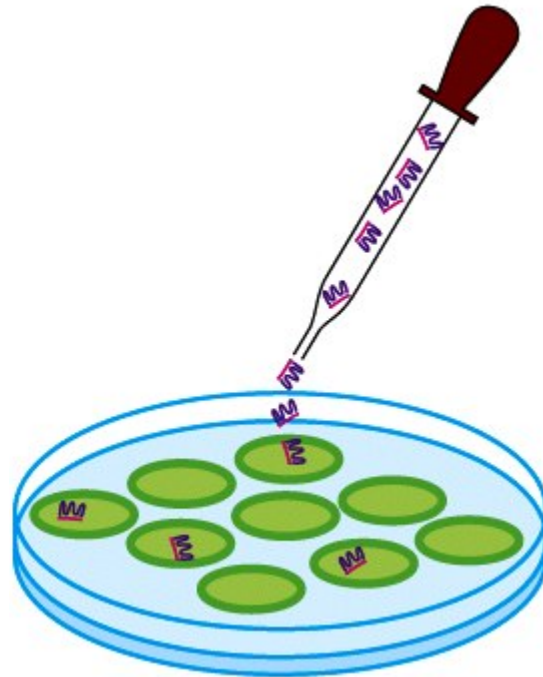
Per rispondere a queste domande possiamo effettuare esperimenti utilizzando le colture cellulari, introducendo nelle cellule opportuni vettori per l'espressione dei fattori SREBP (ed altri geni "reporter") e quindi analizzando l'effetto della variazione delle condizioni sperimentali.

1. GENERAZIONE, MANTENIMENTO ED ANALISI DI COLTURE CELLULARI

Mantenimento e Passaggio di cellule in coltura



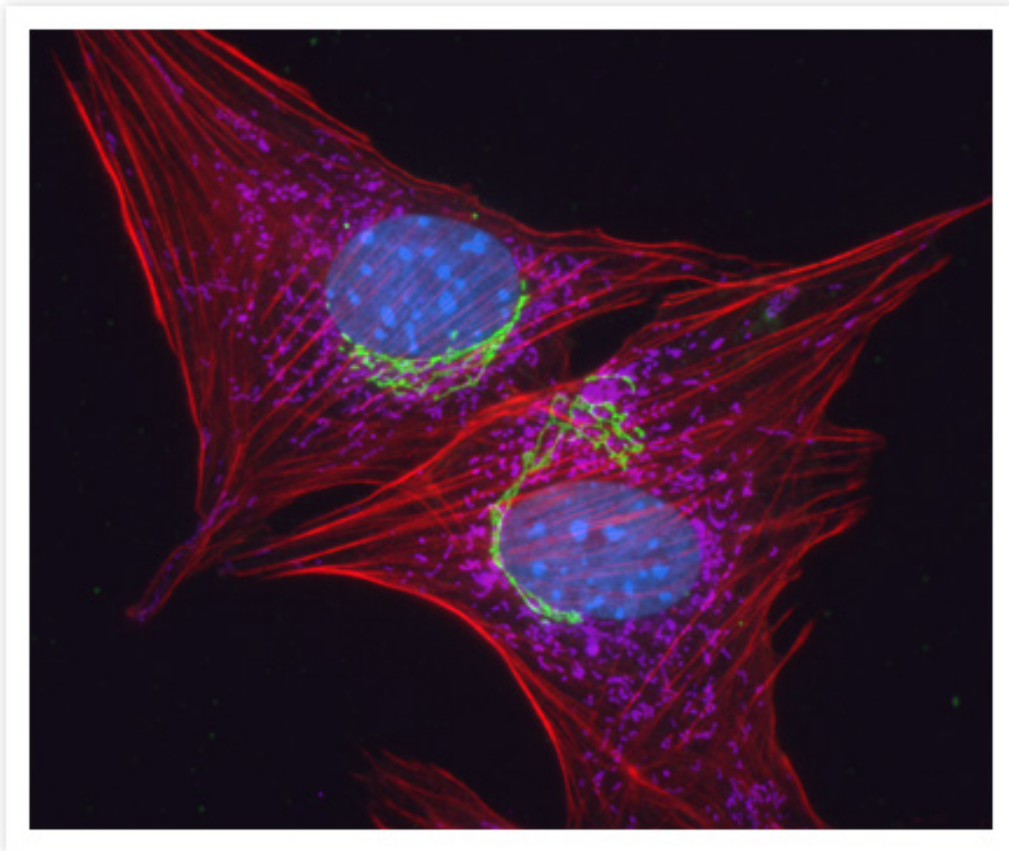
2. MANIPOLAZIONE DI CELLULE IN COLTURA



Tecniche di trasfezione per l'inserimento di acidi nucleici in cellule in coltura

3. ANALISI FENOTIPICHE E BIOCHIMICHE

1. **Analisi della localizzazione subcellulare di proteine**
2. **Utilizzo di sistemi reporter per analisi trascrizionali**
3. **Analisi di fenotipi cellulari (es. migrazione in vitro)**



Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 1

Introduzione alle colture cellulari in vitro

ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:

FONTI DEL MATERIALE DA COLTURA

Tessuti con **elevata capacità proliferativa**

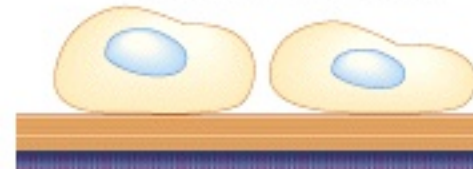
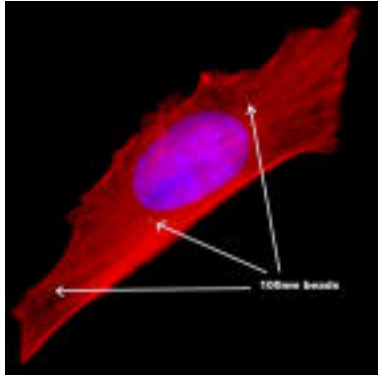
tessuti normali con elevato contenuto di cellule staminali/progenitrici (tessuto ematopoietico, gastro-intestinale, epitelio mammario, fegato,...)

Tessuti tumorali

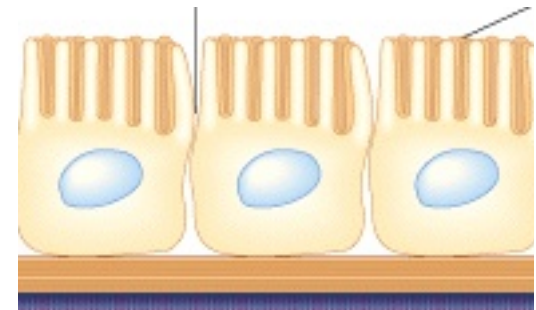
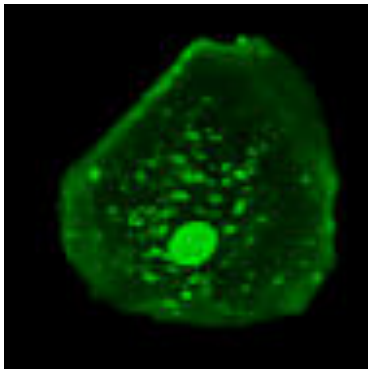
Tessuti con **scarsa attività proliferativa**

connettivali, ghiandolari-rene, pancreas, ovario, testicolo, linfonodi, ...

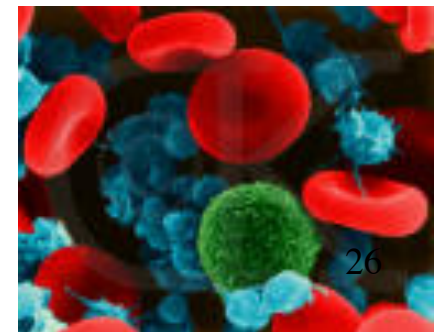
Fibroblasti: cellule derivate dal tessuto connettivo/endotelio
aspetto **fusiforme**
crescita in **adesione**
cellule **isolate**



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



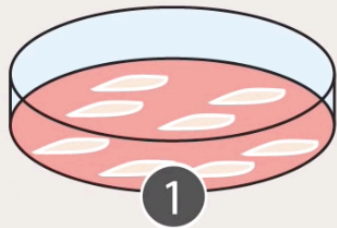
Cellule del sangue/SI/organismi ematopoietici:
aspetto **tondeggiante**
crescita in **sospensione**



Principali condizioni di crescita di cellule isolate

- in adesione (monolayer)
- in sospensione

Esistono anche colture 3D (vedi più avanti)



Monolayers
(Adherent cultures)



Free-floating
(Suspension cultures)

Materiali e strumentazione:

RECIPIENTI per COLTURE CELLULARI in 2D

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

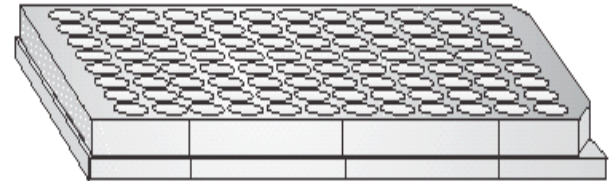
Capsule Petri



Bottiglie di Roux (flasks)



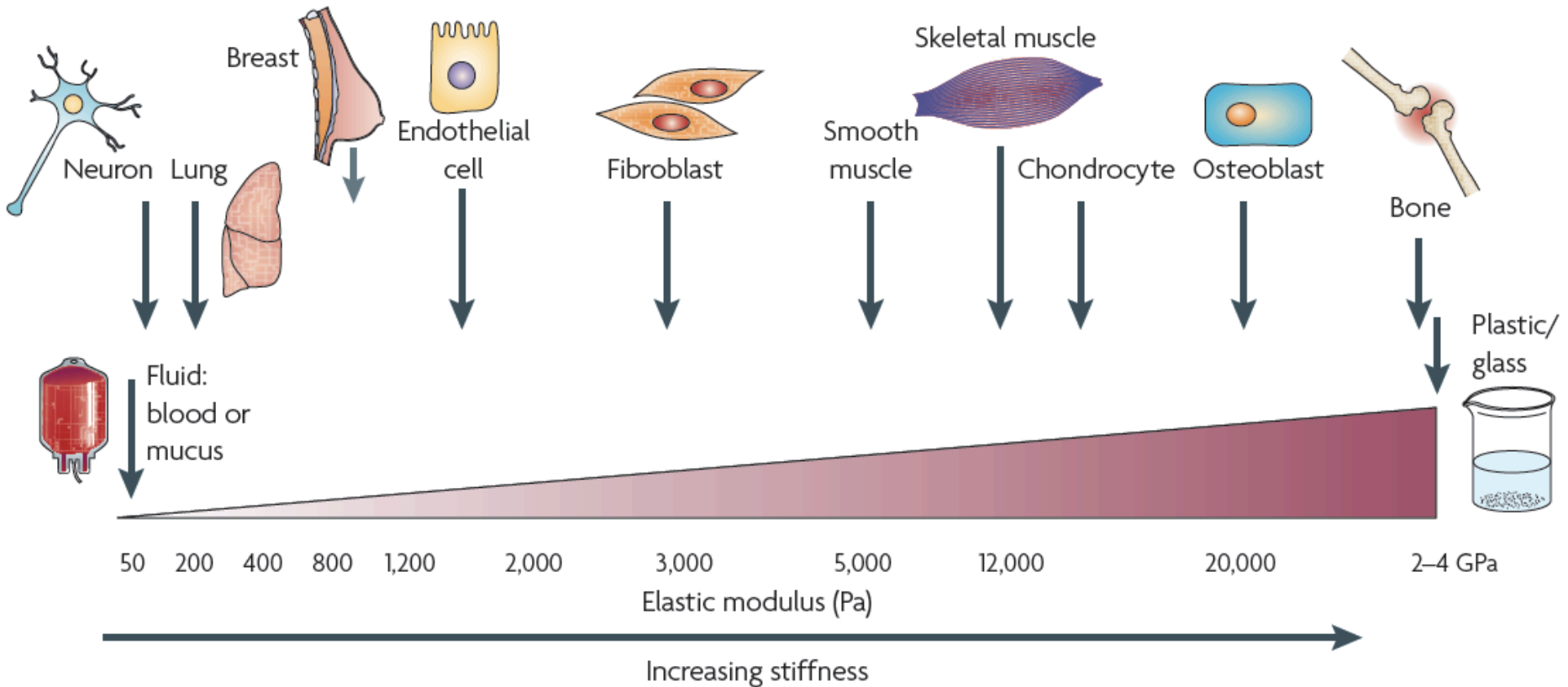
Piastre multipozzetto



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

Altre invece possono/devono crescere in sospensione.

Crescita su supporti di plastica o materiali più soffici.
La plastica è un substrato estremamente rigido = non fisiologico



Le cellule possono essere coltivate su o immerse in matrici a rigidità controllata: le caratteristiche meccaniche del supporto influenzano il comportamento cellulare

Trattamenti dei recipienti in plastica

La plastiche per colture cellulari può essere trattata in modo da **favorire l'adesione cellulare**. La plastica in questo caso 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.

Al contrario, per crescita in sospensione di cellule che possono aderire, vi sono trattamenti di tipo diverso.

INCUBATORI per colture cellulari



INCUBATORI per colture cellulari

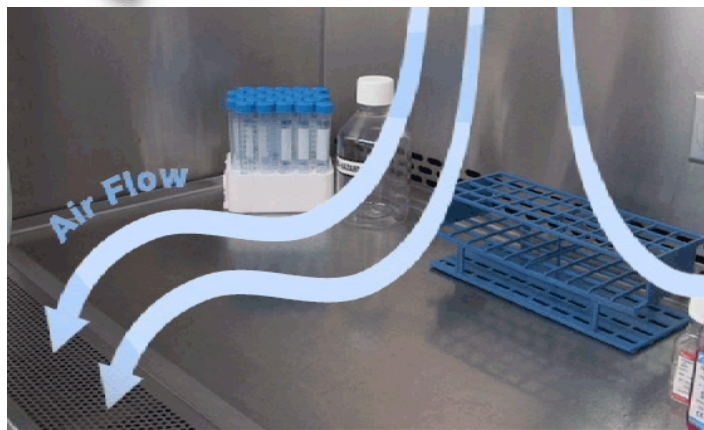
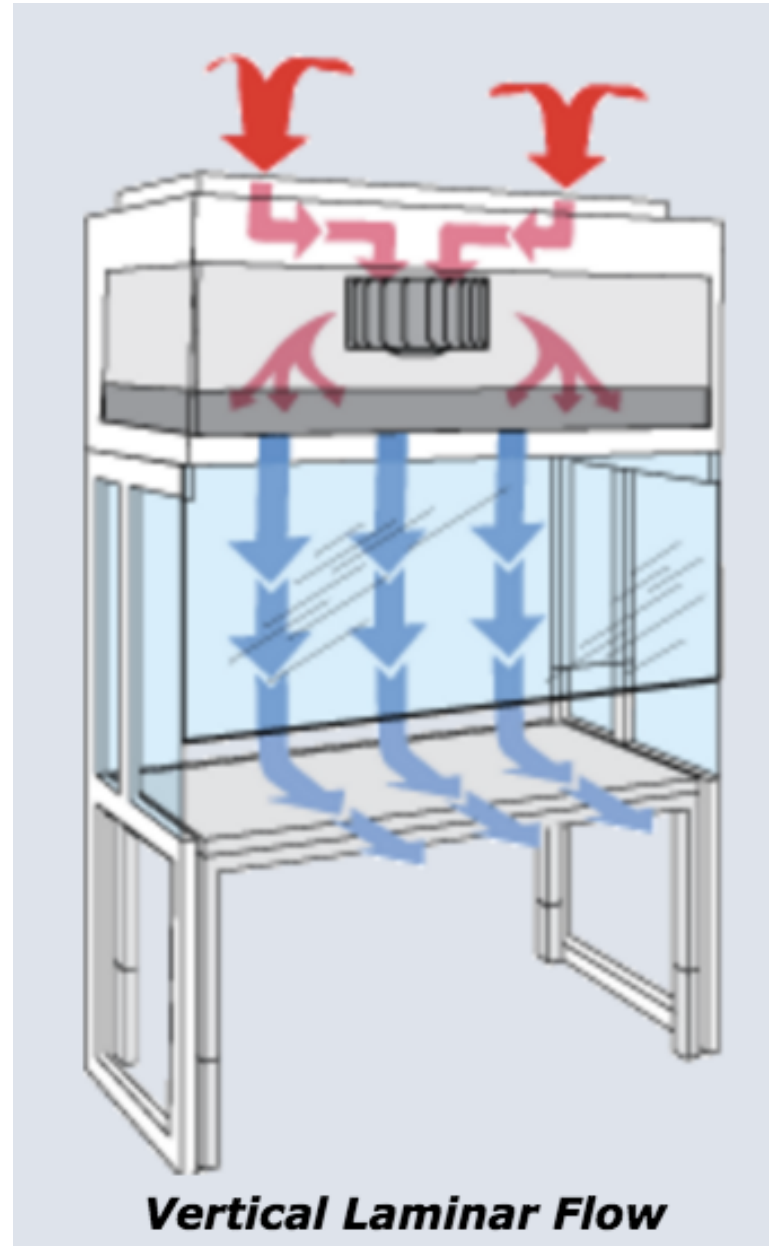
Crescita in condizioni controllate:

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

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

pO₂ atmosferica = elevato stress ossidativo

Le cappe per colture cellulari



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**

TERRENI DI COLTURA di comune utilizzo

- 1 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- 2 Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI)
- 3 Ham's F12 Nutrient Mixture (F12)

I terreni per colture cellulari devono avere un'**osmolarità controllata** (l'osmolarità è la pressione osmotica generata dai soluti presenti in 1 L di soluzione), per evitare che un ambiente **ipotonico** causi la lisi delle cellule (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.

Sono necessari **nutrienti** e componenti per la **biosintesi**.

Ciascun tipo cellulare ha necessità specifiche per la crescita e quindi la scelta del 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 parzialmente indefinita; contiene fattori che stimolano la crescita e l'adesione cellulare.

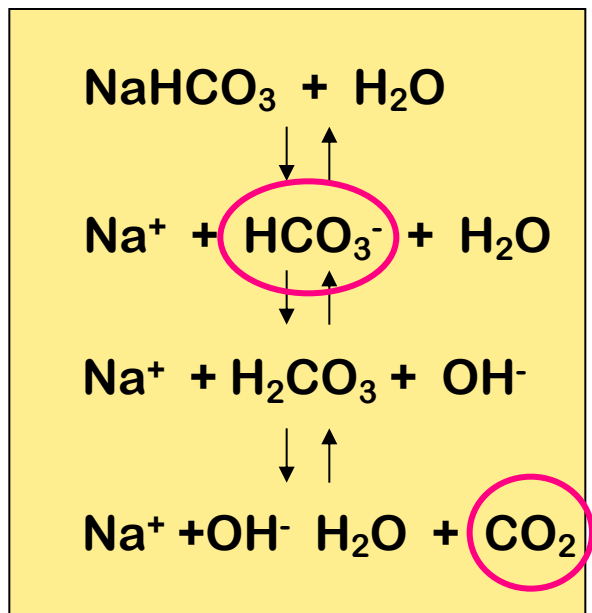
Il siero più utilizzato è quello ottenuto da feti bovini (FCS = Fetal Calf Serum).

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

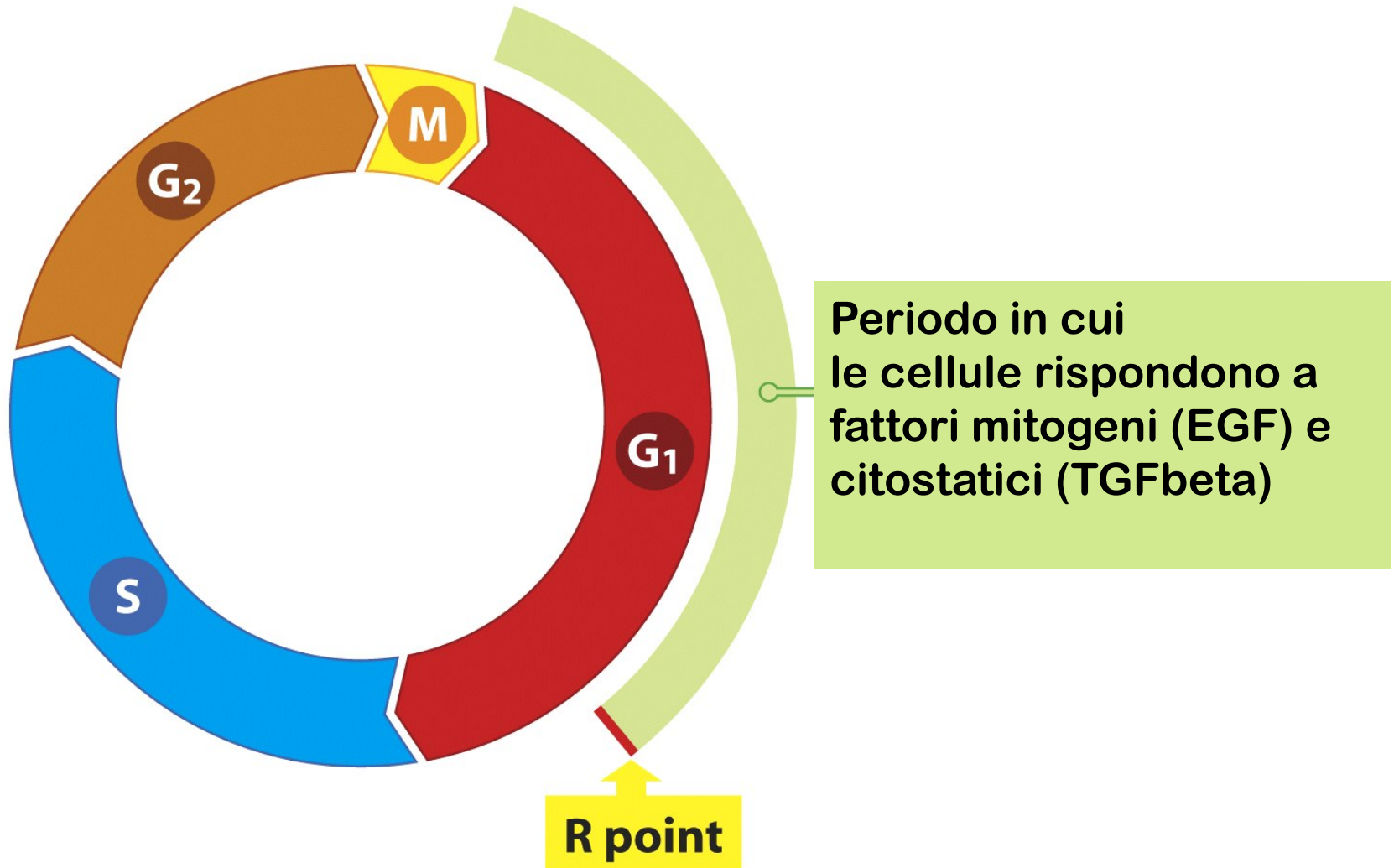


L'aumento della pCO₂ comporta un'acidificazione del terreno e viceversa: l'incubatore è collegato ad una bombola di CO₂: l'immissione è controllata da una valvola e la pCO₂ mantenuta a 5%

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 CO₂)**
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** (penicillina, streptomina)
9. **Indicatori di pH** (**rosso fenolo:**
rosso a pH=7, giallo a pH acido, viola a pH basico)
10. **Proteine del siero.**

I fattori di crescita sono necessari per la proliferazione



FATTORI DI CRESCITA, DIFFERENZIAMENTO ETC.

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

In assenza di questi le cellule NON proliferano.

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 particolari hanno però bisogno di specifici **fattori** che vengono aggiunti in forma **purificata**:

- Fattori di adesione (proteine della matrice: fibronectina, collagene)
- Ormoni
- Fattori di differenziamento
- Fattori di staminalità

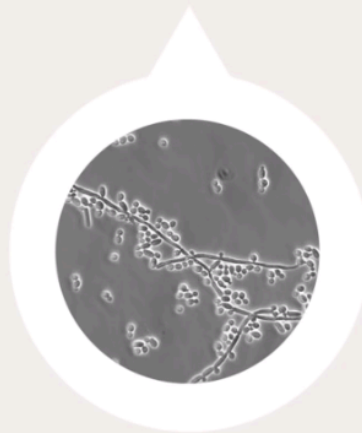
Mantenimento della STERILITÀ

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

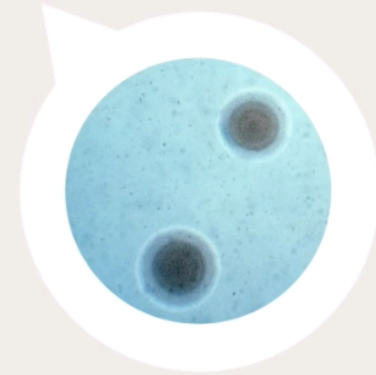
Microbial Contamination



Bacteria



Fungi

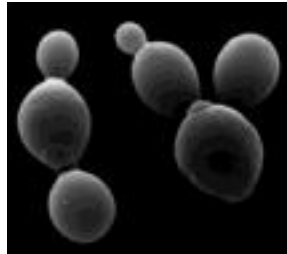


Mycoplasma

Mantenimento della STERILITÀ

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

Lieviti



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 (diametro = 0,22 micron)
 - polimeri sintetici (diametro = 0,22 micron)

LINK A VIDEO DIDATTICI

Introduction to cell culture

<https://www.youtube.com/watch?v=RpDke-Sadzo>

Best practice for cell culture sterility

https://www.youtube.com/watch?v=nr1tV_LuqJk