

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 3

**ARRESTO REVERSIBILE DELLA PROLIFERAZIONE
CELLULARE INDOTTO DA
DEPRIVAZIONE DI SIERO O INIBIZIONE DA CONTATTO**

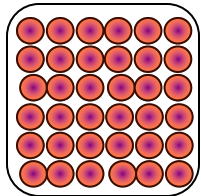
PASSAGGIO DI CELLULE IN CULTURA

**ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE IN
COLTURA**

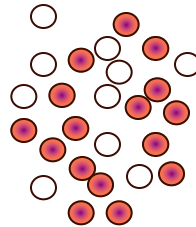
**ARRESTO IRREVERSIBILE DELLA PROLIFERAZIONE
(SENESCENZA)**

ALLESTIMENTO DI UNA COLTURA CELLULARE 2D

da un tessuto



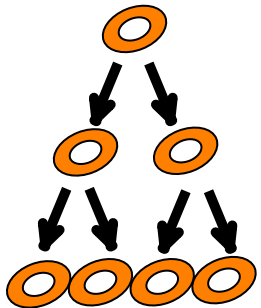
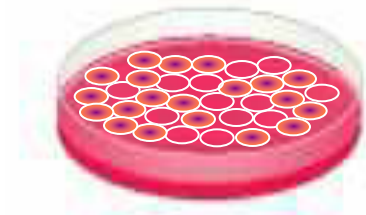
si dissociano singole cellule



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

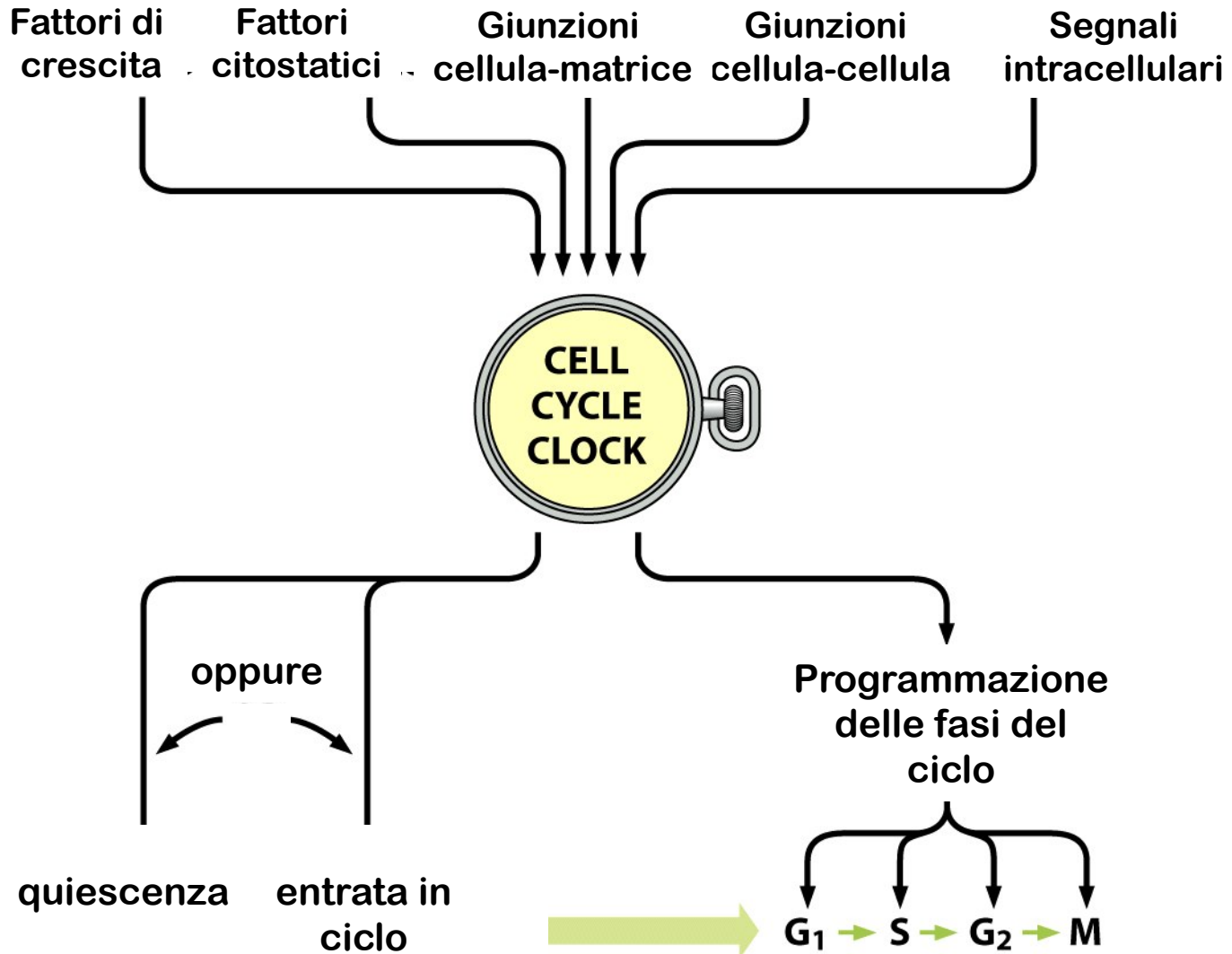
QUIESCENZA

e si seminano in terreno:

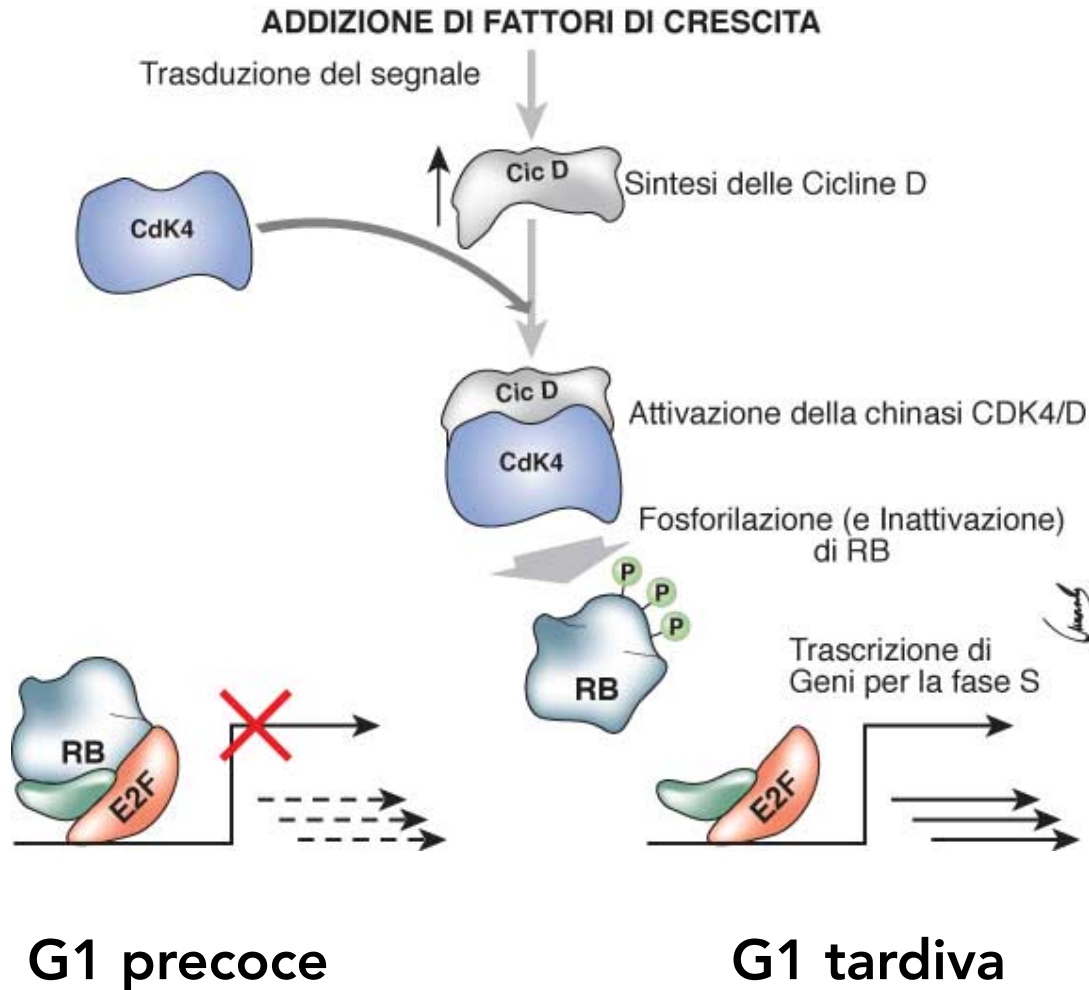


Se **stimolate** con siero, le cellule
proliferano finchè occupano tutta la
superficie del recipiente
(**CONFLUENZA**) poi SMETTONO DI
PROLIFERARE: **QUIESCENZA**

Regolazione della proliferazione da segnali extracellulari

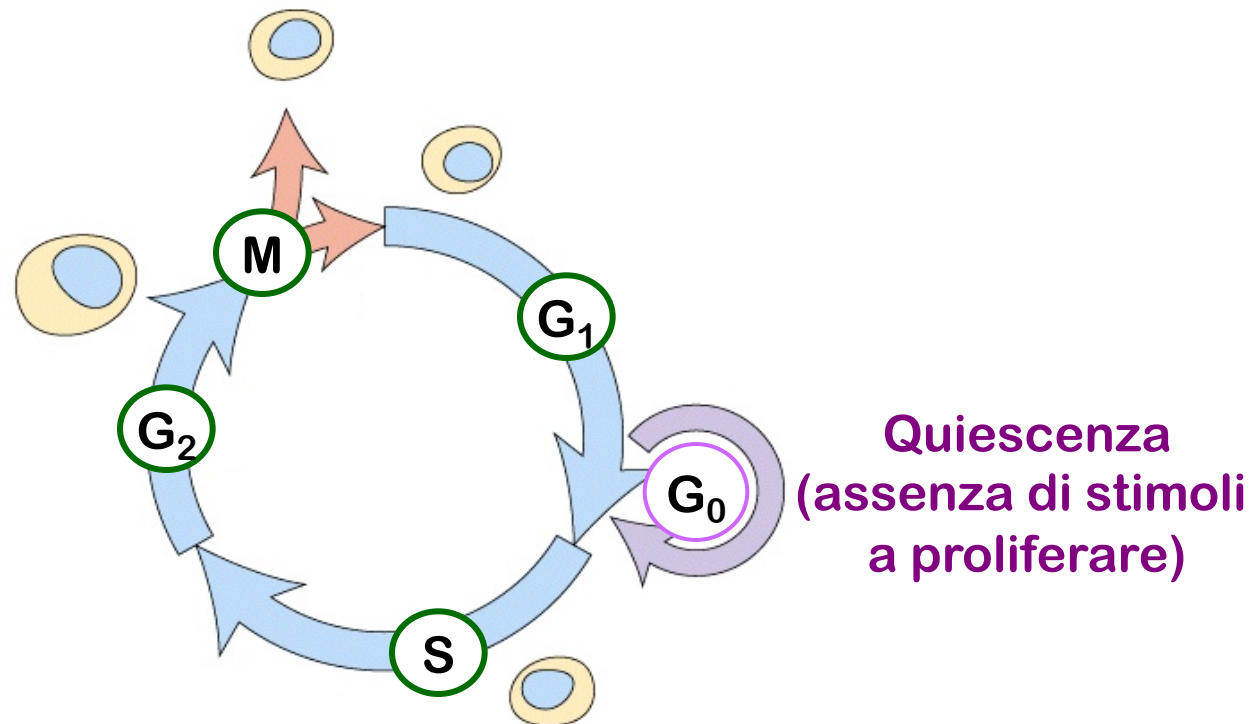


Molecola chiave della transizione G1/S (o G0/S) è la proteina Rb (retinoblastoma)



ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN CULTURA (1): QUIESCENZA

In assenza di fattori di crescita = deprivazione da siero
le cellule non proliferano

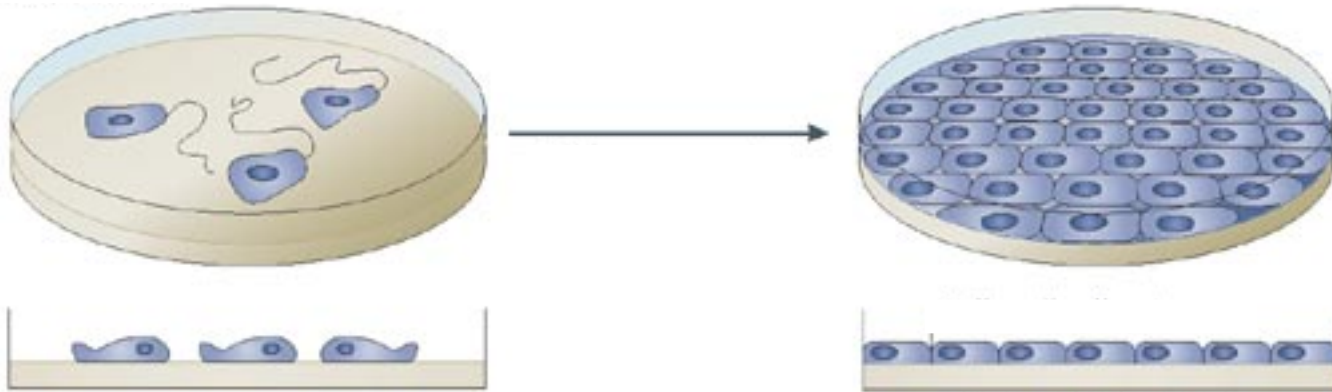


Le cellule quiescenti sono **arrestate reversibilmente** alla fase G₀ del ciclo cellulare

Rientrano in ciclo dopo stimolazione con fattori mitogeni (= siero)

ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN CULTURA (2): INIBIZIONE DA CONTATTO

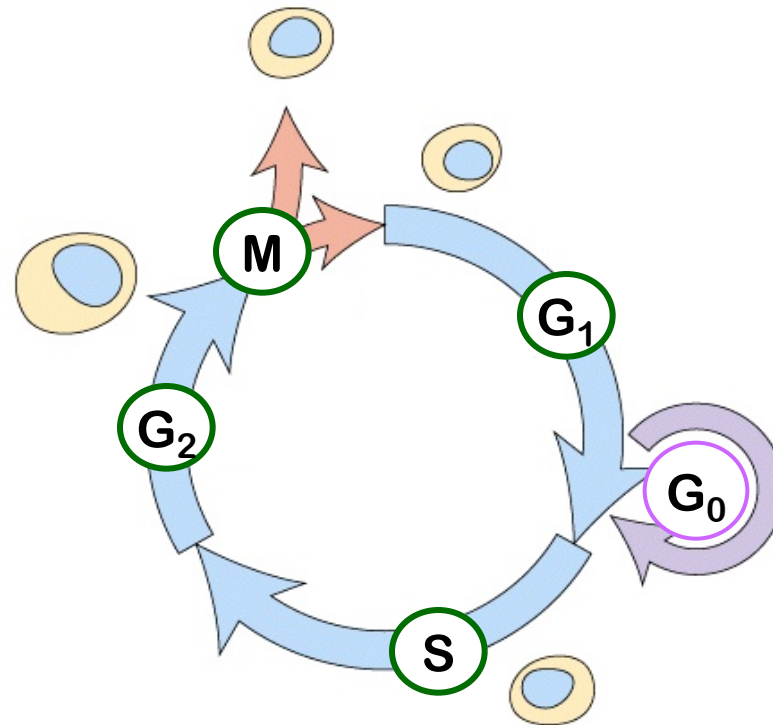
Le cellule proliferano fino ad occupare tutta la superficie del recipiente = raggiungono la **CONFLUENZA**



Quindi smettono di proliferare = **INIBIZIONE DA CONTATTO**.

Se però vengono diluite (**PASSAGGIO IN CULTURA**)
in modo da fornire loro nuovo spazio, ricominceranno a proliferare.

ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN CULTURA (2): INIBIZIONE DA CONTATTO



Quiescenza =
Segnali citostatici es.
inibizione da contatto

Le cellule che subiscono **l'inibizione da contatto** sono arrestate **reversibilmente** alla **fase G₀** del ciclo cellulare (= **quiescenza**)
Rientrano in ciclo dopo diluizione.

L'arresto del ciclo cellulare può avvenire in risposta a diversi stimoli e di conseguenza le cellule arrestate possono subire destini diversi. Possono uscire dal ciclo di divisione in maniera transitoria o comunque reversibile, oppure arrestare il ciclo cellulare in maniera permanente ed irreversibile. Questi fenomeni che si osservano in vitro, cioè in coltura, rispecchiano ciò che avviene in vivo, cioè nell'organismo di origine.

Quando ad esempio mancano gli **stimoli a dividersi**, le cellule entrano in una fase di **quiescenza, detta G₀**, dalla quale possono rientrare nella fase S se opportunamente stimolate con fattori di crescita (il siero in coltura, i fattori secreti da altre cellule in vivo). Una situazione diversa è data **dall'inibizione a dividersi** esercitata dal contatto con altre cellule (**inibizione da contatto**), che avviene anche se lo stimolo da siero è presente. Anche in questo caso le cellule sono arrestate reversibilmente alla fase **G₀** del ciclo cellulare. La rimozione dell'inibizione (ad esempio dopo diluizione mediante **passaggio in coltura**) permette alle cellule di riprendere la proliferazione.

In alcuni casi le cellule smettono di dividersi perché vanno incontro a differenziamento terminale, oppure a causa di danni al DNA. In questo caso vi sarà un arresto (reversibile oppure irreversibile) nel quale il ciclo cellulare si ferma **permanentemente** nella fase G₁ (oppure G₂).

Ad esempio cellule di una coltura primaria possono andare incontro al processo di **senescenza a causa dell'accorciamento dei telomeri (vedi più avanti)**.

PASSAGGIO DI CELLULE IN COLTURA

SCOPO:

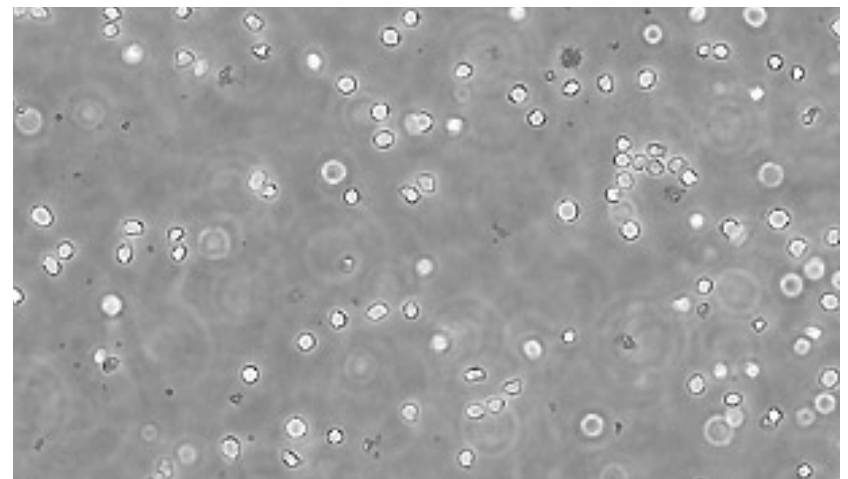
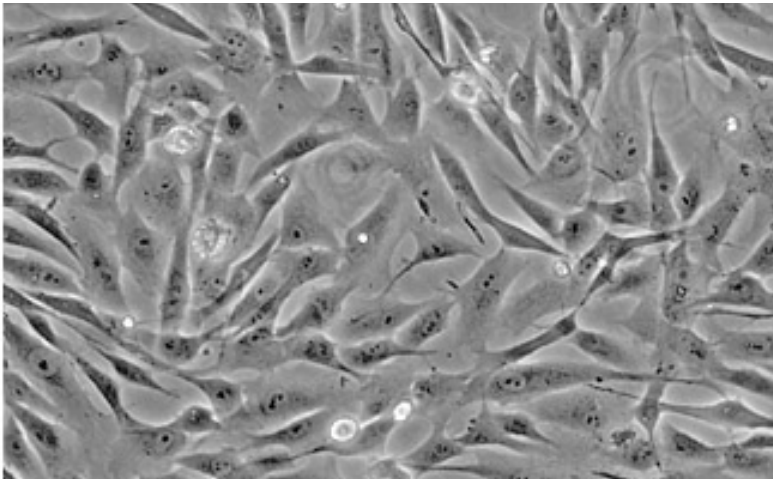
**diluire una coltura di cellule che crescono in adesione
ed hanno raggiunto una elevata confluenza
in modo da consentirne la proliferazione
e mantenerle in coltura per l'osservazione successiva**

Dopo aver ascoltato la teoria, si consiglia di visionare i seguenti video:

Passaggio cellule in coltura <https://www.youtube.com/watch?v=CMRKKI9XSDU>

Conta cellule all'emocitometro <https://www.youtube.com/watch?v=pP0xERLUhyc>

- 1 Prendere la flask contenente le cellule dall'incubatore, chiudere il tappo ed **osservare** il grado di **confluenza** delle cellule al microscopio
- 2 Sotto la cappa a flusso laminare, rimuovere il terreno e mettere nella flask 5 ml di **PBS (SOLUZIONE FISIOLÓGICA)** sterile per **lavare** via il terreno che contiene inibitori della tripsina.
- 3 Aspirare il PBS e mettere nella flask **1 ml** di **tripsina/EDTA**. Rimettere la flask nell'incubatore e attendere 5 minuti che la tripsina agisca.
- 4 Sbattere leggermente la flask per **staccare** bene le cellule dal fondo, **osservare** al microscopio: le cellule appariranno **TONDEGGIANTI E GALLEGGIANTI**.



- Mettere nella flask 4 ml di terreno completo
- 5 in modo da **neutralizzare** la tripsina.
Risospendere bene le cellule spipettando.

 - 6 Trasferire la sospensione cellulare in provetta Falcon da 15 ml
Centrifugare 5 minuti a 1000 rpm.

 - 7 Aspirare il terreno + tripsina, **risospendere** DELICATAMENTE il pellet. Mettere nella provetta 5 ml di terreno e risospendere spipettando.

 - 8 Si dovranno **diluire** le cellule ad una concentrazione stabilita, pertanto andranno prima **contate**.

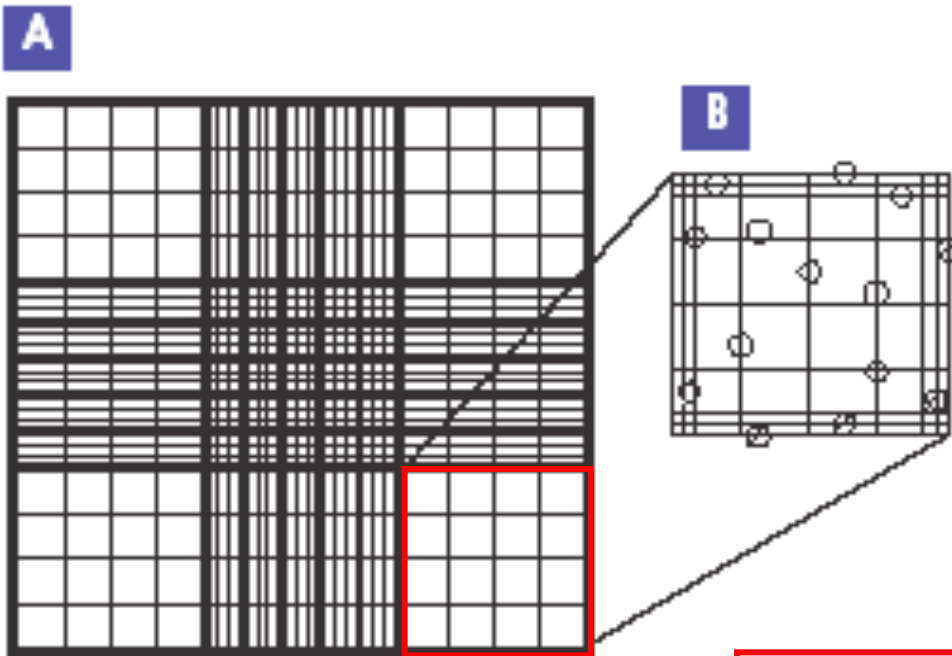
LINK A VIDEO DIDATTICI

Passaggio cellule in coltura

<https://www.youtube.com/watch?v=CMRKKI9XSDU>

Conta delle cellule all' emocitometro (cameretta di Neubauer)

Un emocitometro contiene 2 camere (A), ciascuna divisa in 9 quadrati (B) principali del volume di $0.1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ ml}$ ciascuno



La **concentrazione** delle cellule (n di cellule in 1 ml di sospensione) viene ricavata contando il **numero** di cellule in un'area definita di **volume** noto.

Quindi:

n° di cellule in 1 ml di sospensione
= n° di cellule in un quadrato (B)
(di vol $1 \times 10^{-4} \text{ ml}$)
moltiplicato per 10^4

8 Con la micropipetta (p200), trasferire una goccia della sospensione cellulare nell'**emocitometro**

9 Procedere alla **conta** delle cellule al **microscopio** ricordando:

$$\begin{aligned} \text{n}^\circ \text{ di cellule in 1 ml di sospensione} &= \\ \text{n}^\circ \text{ di cellule in un quadrato grande} &\times 10^4 \end{aligned}$$

10 •Decidere la **CONCENTRAZIONE finale** (= **numero** di cellule per ml di terreno), ad es. $5 \times 10^4/\text{ml}$.

•Decidere il **volume finale** della coltura, in questo caso **5 ml** in 1 capsula Petri da 60 mm di diametro

•Procedere quindi alla **diluizione** della sospensione madre

11 Controllare le cellule al **microscopio** ed infine mettere la capsula Petri (**SCRIVERE NOME E DATA**) **nell'incubatore**.

PROBLEMA: LA DILUIZIONE

Se ho una sospensione contenente 2×10^5 cellule/ml
quanti ml dovrò usarne per preparare 5 ml
di una sospensione con 2×10^4 cellule/ml?

Se ho una sospensione
contenente 2×10^5 cellule/ml (**concentrazione INIZIALE**),
quanti ml (volume INIZIALE = X) dovrò usarne
per preparare 5 ml (**volume FINALE**)
di una sospensione con 2×10^4 cellule/ml (**concentrazione FINALE**)?

SOLUZIONE:

$$V_f \times C_f = V_i \times C_i$$

$$X \text{ ml} \times 20 \times 10^4 \text{ cellule/ml} = 5 \text{ ml} \times 2 \times 10^4 \text{ cellule/ml}$$

$$X = \frac{10 \times 10^4 \text{ cellule}}{20 \times 10^4 \text{ cellule/ml}} = 0,5 \text{ ml}$$

LINK A VIDEO DIDATTICI

Conta delle cellule all'emocitometro

<https://www.youtube.com/watch?v=pP0xERLUhyc>

ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

Colture cellulari diverse, oppure la stessa coltura in condizioni diverse, mostrano un diverso andamento della proliferazione nel tempo.

Si possono analizzare diversi parametri:

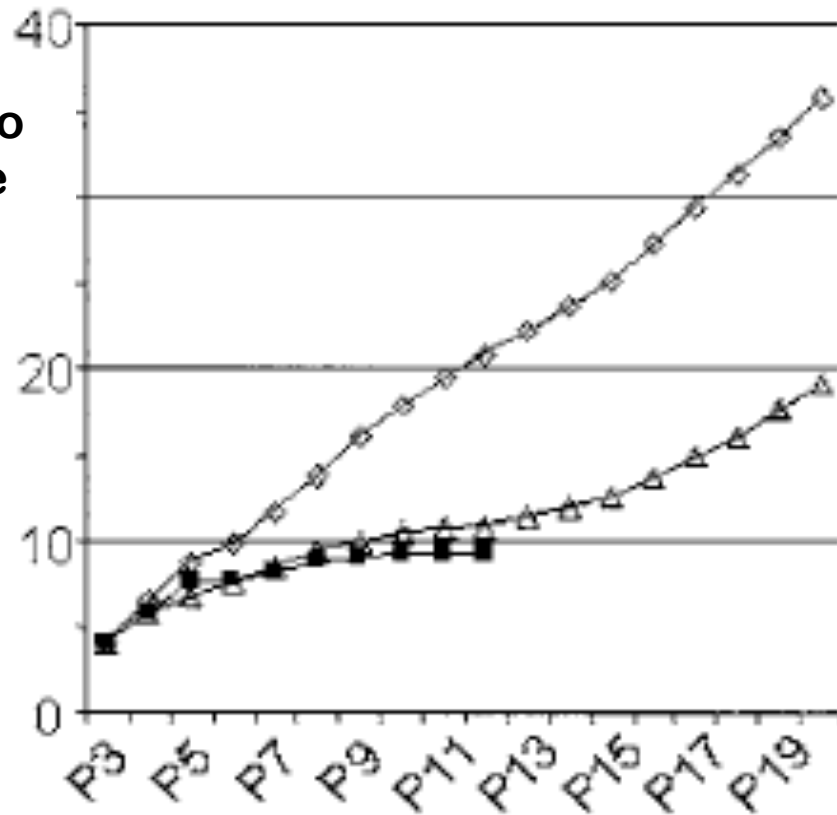
- velocità di proliferazione,
- progressione del ciclo cellulare
- Vitalità cellulare/citotossicità di composti

Le tecniche più comunemente utilizzate sono:

- Curve di crescita
- Saggi di sintesi del DNA (BrdU)
- Analisi citofluorimetriche
- Saggi di vitalità cellulare (es. MTT)

CURVE DI CRESCITA DI CELLULE IN COLTURA

Aumento numerico
della popolazione
cellulare



Tempo

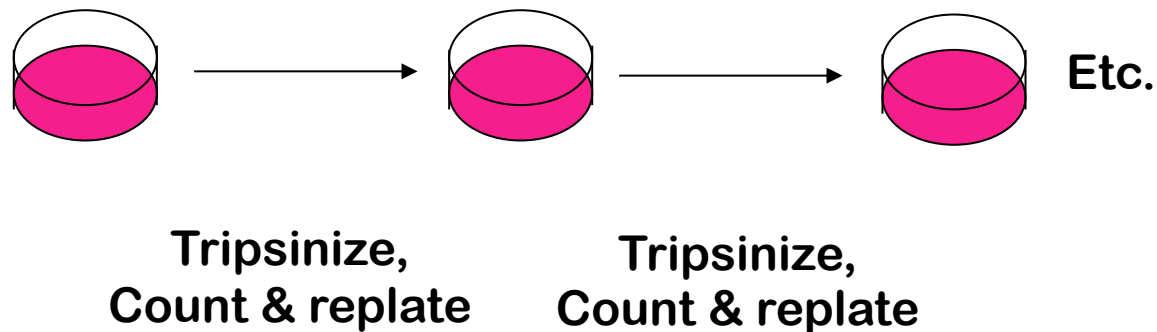
CURVE DI CRESCITA DI COLTURE PRIMARIE

Metodo 3T3 (o 3T9): (Todaro & Green, 1963)

Metodo messo a punto inizialmente per fibroblasti embrionali murini (MEF)

Vengono seminate inizialmente (N_0) 9×10^5 cellule/piatto 100mm
Dopo 3 giorni le cellule vengono tripsinizzate e contate, quindi si seminano nuovamente 9×10^5 cellule/piatto 100mm

infine si riportano i numeri di cellule (totali) ottenuti in un grafico



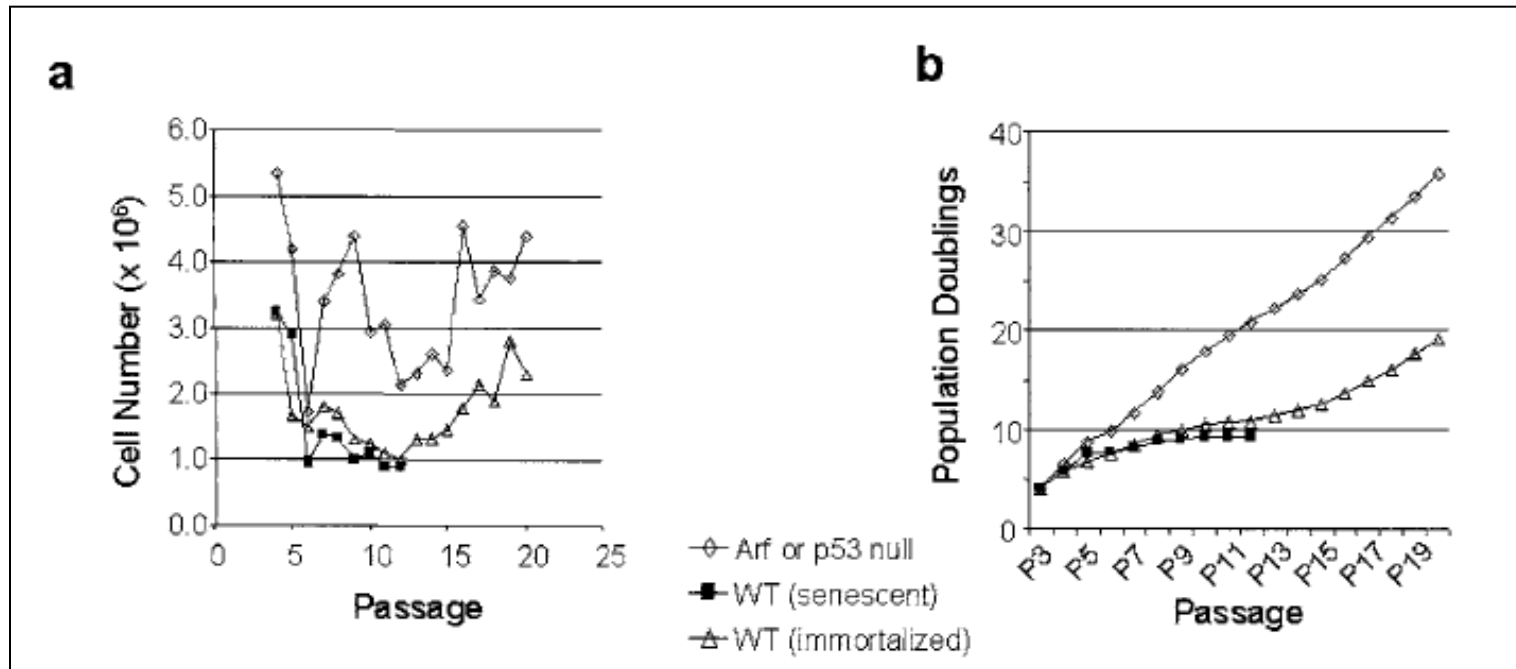
CURVE DI CRESCITA DI COLTURE PRIMARIE

Metodo 3T3 (o 3T9): (Todaro & Green, 1963)

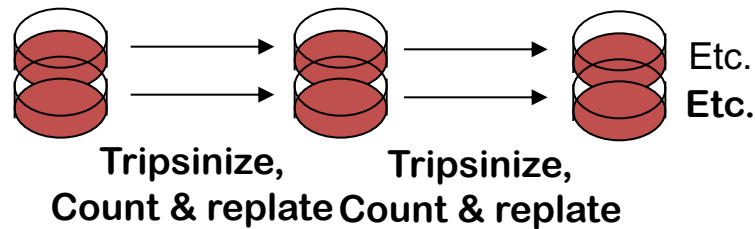
I dati di crescita cellulare sono riportati in

a) come numero di cellule ad ogni passaggio;

b) come raddoppio della popolazione ad ogni passaggio



Come calcolare il valore di population doubling (PD)



$$PD = \log_2 (N_f/N_0)$$

N_f = n° di cellule contate alla fine dei 3 gg in coltura

N_0 = n° di cellule seminate (= 9×10^5)

Passaggio 1: semino 9×10^5 cellule (N_0) e conto dopo 3 giorni (N_f) > **calcolo il PD**

Passaggio 2: idem, Etc.

Per disegnare la curva dei PD, ad ogni successivo passaggio **riporto la somma dei PD**:

Si inizia la curva a P3

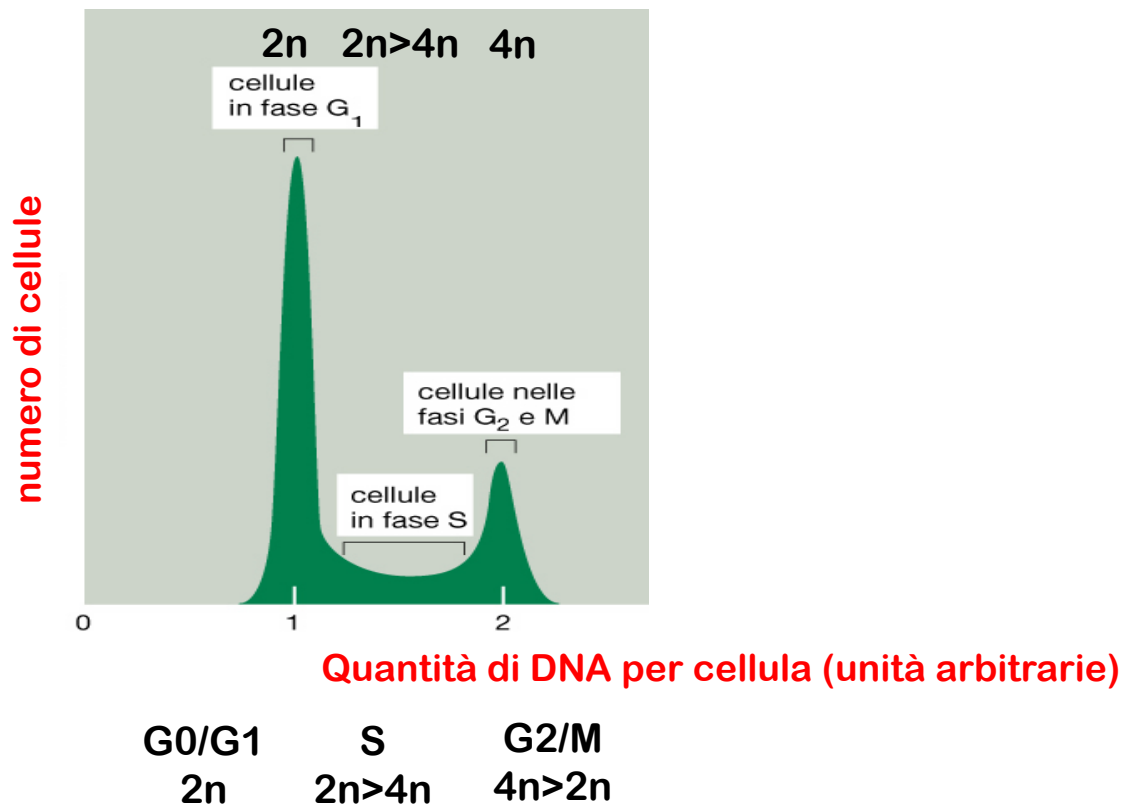
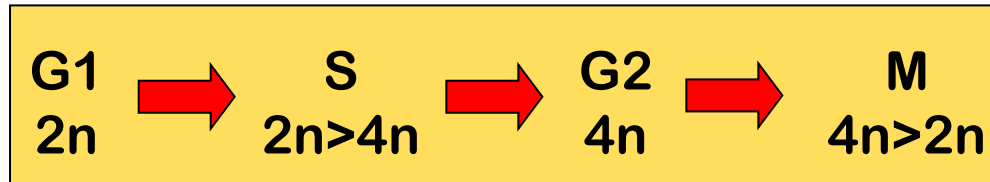
Se osservo che continuo a raccogliere meno di 9×10^5 cellule per **più di due passaggi consecutivi** significa che la popolazione non aumenta più.

**ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE
MEDIANTE UTILIZZO del CITOFLUORIMETRO:
FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER (FACS)**

Per l'analisi del CONTENUTO DI DNA delle cellule

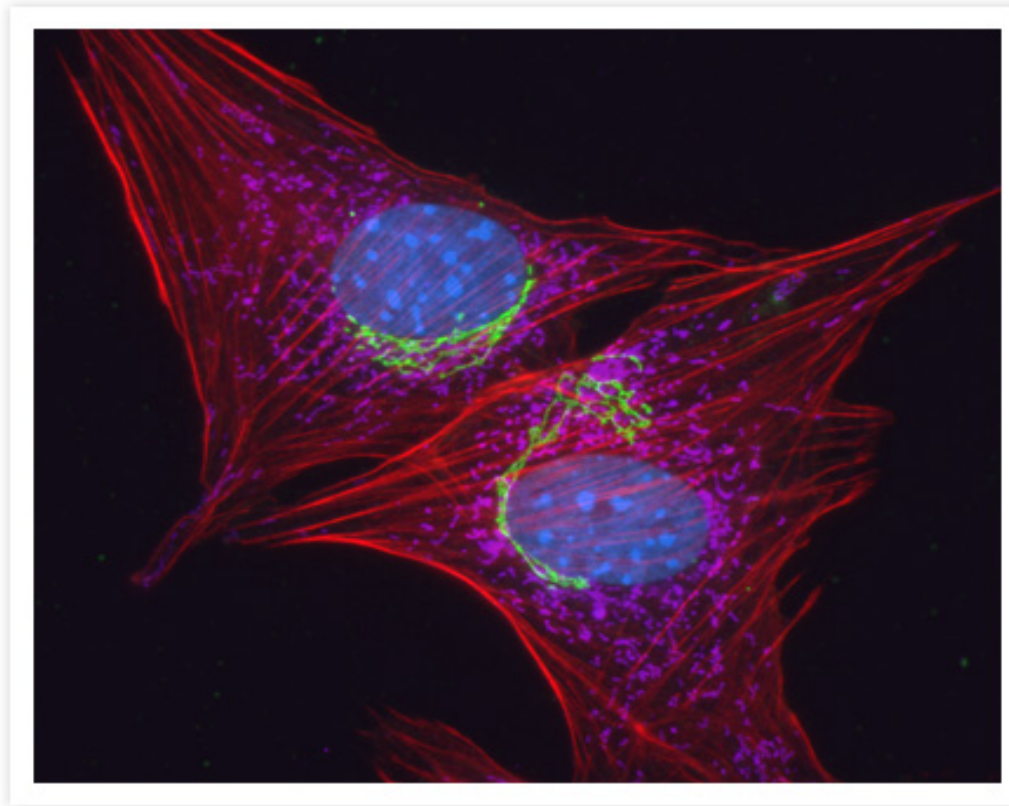
Il CONTENUTO di DNA di ciascuna cellula varia durante la progressione del ciclo cellulare

mediante citofluorimetria è possibile analizzare singole cellule di una popolazione valutandone il contenuto di DNA



COME POSSIAMO MISURARE IL CONTENUTO DI DNA?

Le cellule si possono trattare con **sostanze fluorescenti** che intercalano il DNA (es. **Hoechst**, **DAPI**, **propidio ioduro**)

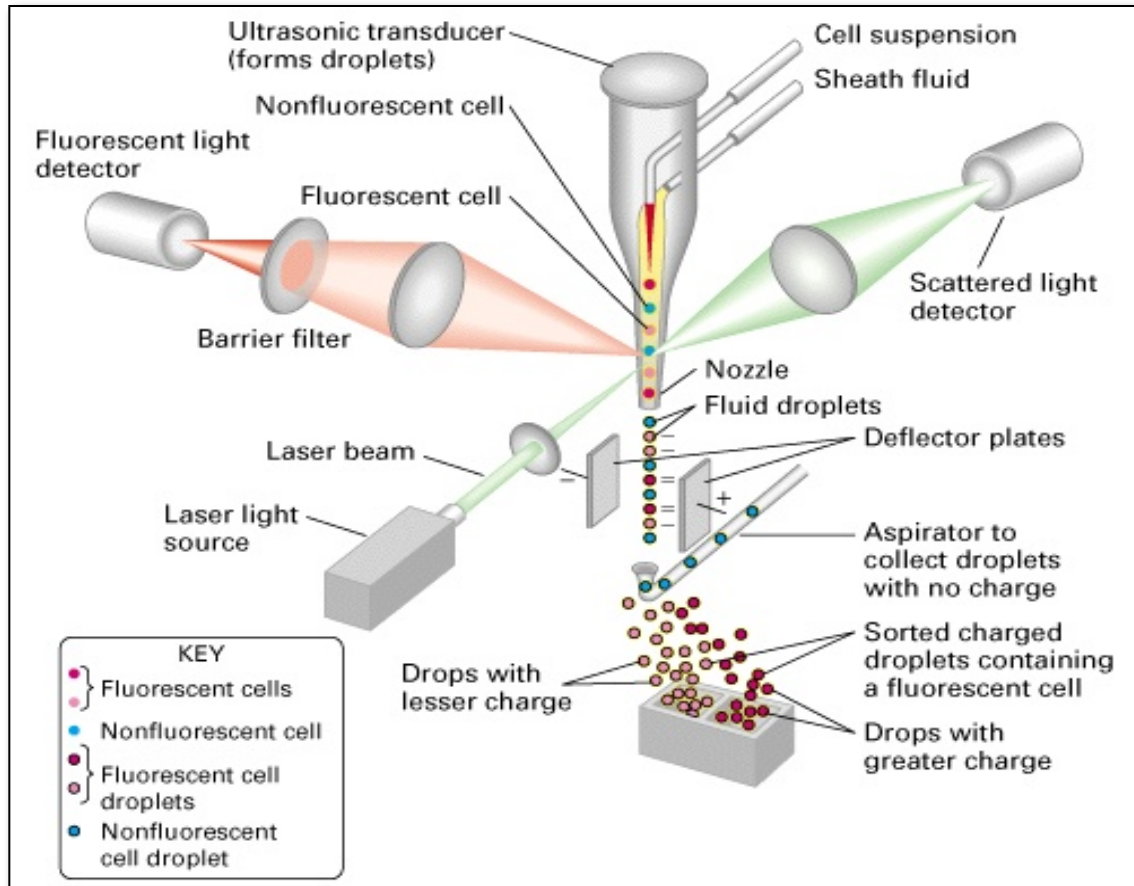


NIH 3T3
linea di
fibroblasti
murini

25

Il colorante si intercala nel DNA ed emette fluorescenza. La quantità di fluorescenza emessa è direttamente proporzionale al contenuto di DNA.

CITOFUORIMETRO: FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER (FACS)



Il citofluorimetro valuta:

- numero di cellule
- forma/superficie delle cellule
- Intensità di fluorescenza

- E' possibile utilizzare **cellule vive** (si colorano molecole di membrana), o cellule fissate e permeabilizzate

- Si può effettuare una **colorazione con :**

sostanze fluorescenti che legano specifici **intercalanti** degli acidi nucleici

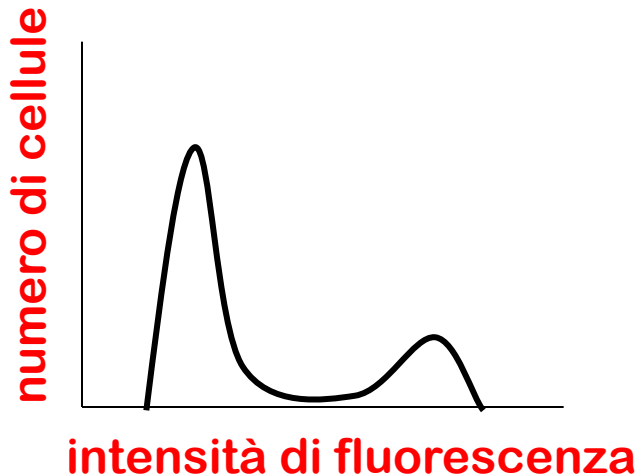
Oppure sostanze fluorescenti che legano altre componenti cellulari (tra cui **anticorpi coniugati con fluorocromi** (vedi lezione dedicata)

Tutorial: <https://www.youtube.com/watch?v=sfWWxFBltPQ>

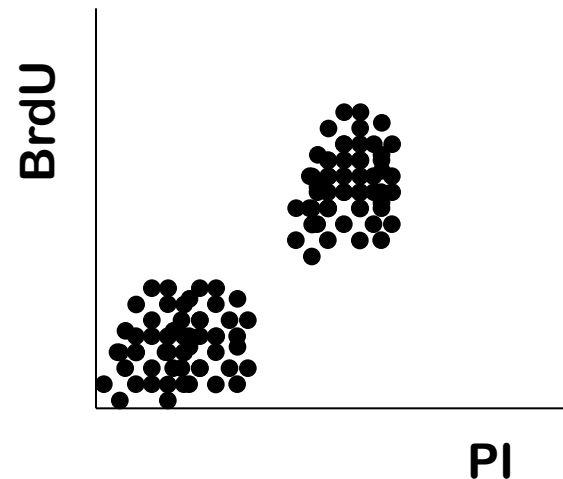
- Lo strumento produce diversi tipi di **output**:

- istogrammi**, in cui l'intensità di fluorescenza è riportata in funzione del numero di cellule
- dot plot**, in cui un parametro è riportato in funzione di un altro (es. fluorescenza **rossa** vs fluorescenza **verde**) e ogni dot rappresenta una cellula

ISTOGRAMMA



DOT PLOT

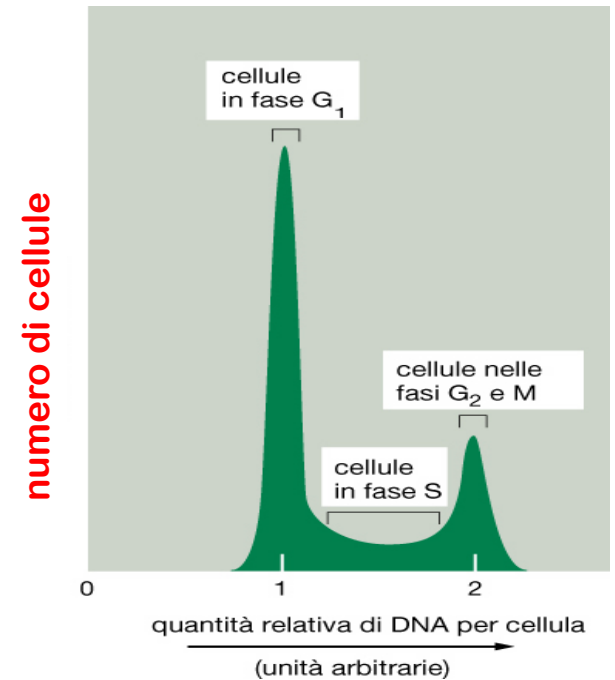
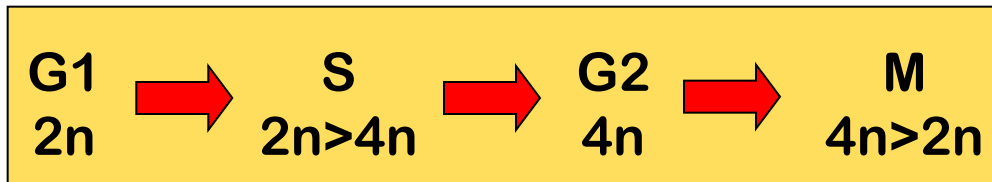


Studio del ciclo cellulare mediante citofluorimetria:

valutazione del contenuto di DNA delle singole cellule di una popolazione

Le cellule vengono tripsinizzate, risospese, permeabilizzate e poi incubate con **PROPIDIO IODURO** per colorare il DNA (**fluorescenza rossa**):

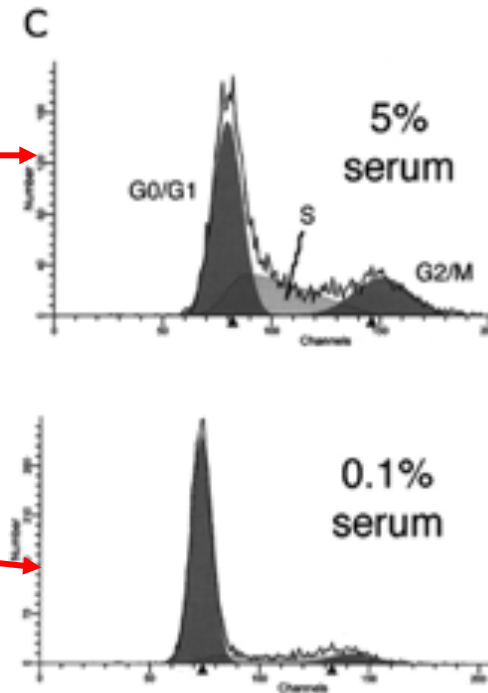
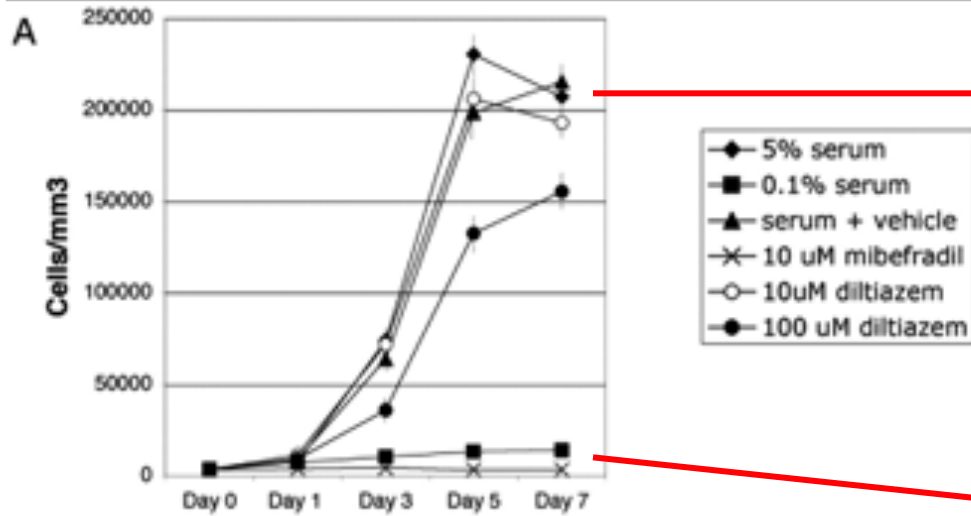
in ciascuna cellula **l'intensità** di fluorescenza è proporzionale alla **quantità** di DNA



G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
2n	2n>4n	4n>2n

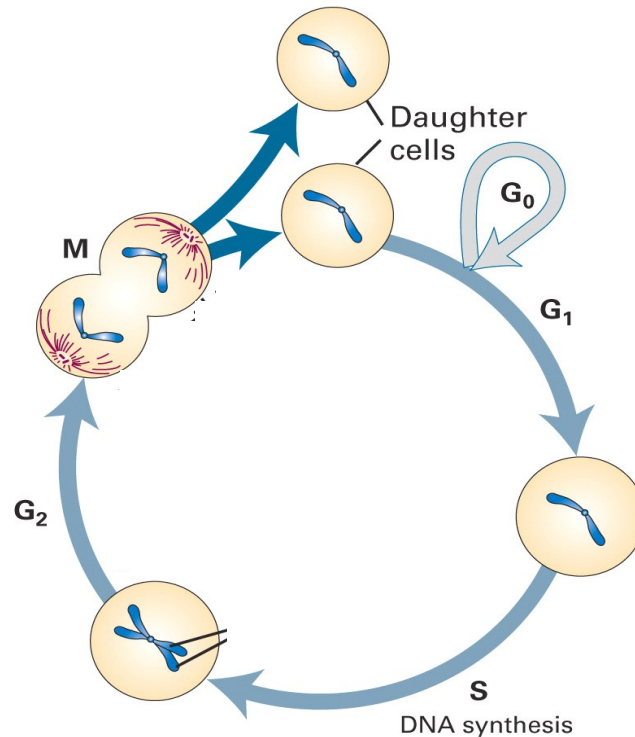
intensità di fluorescenza

ESEMPIO: Effetto del siero sulla proliferazione cellulare



Conferma dell' osservazione fatta
nella curva di crescita

Saggi di proliferazione: quantificazione di cellule in fase S mediante analisi della neo sintesi del DNA



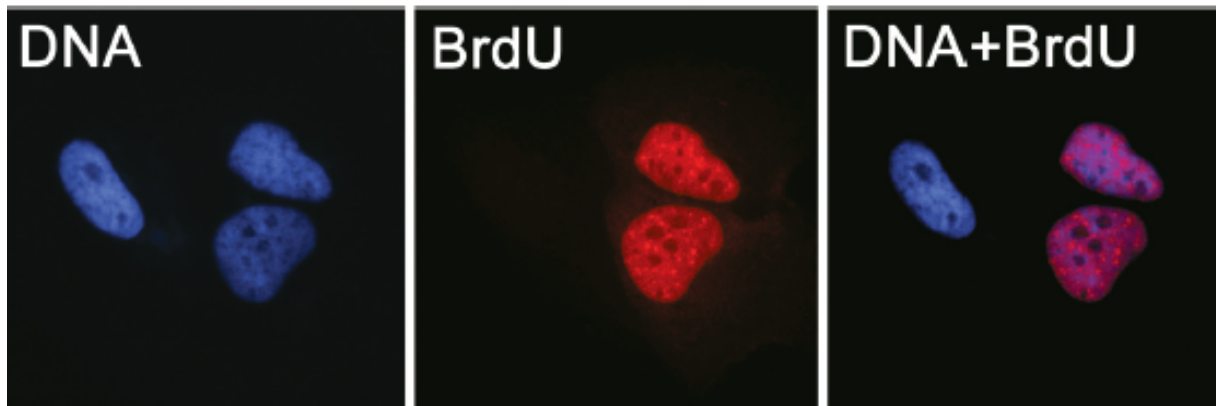
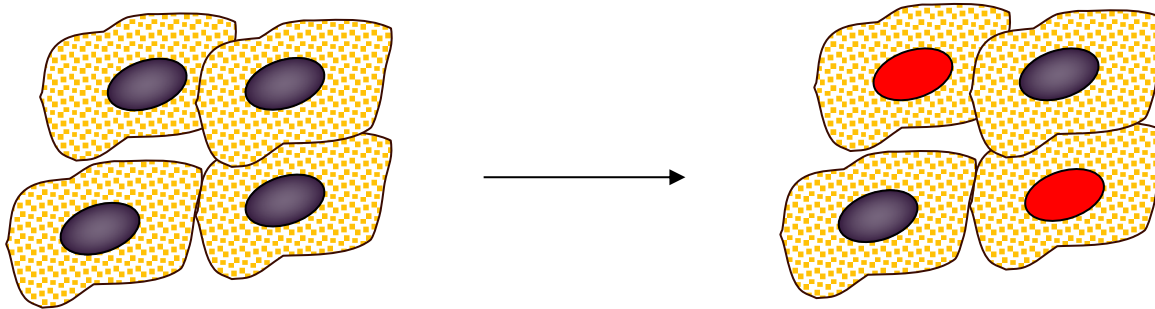
Le cellule in FASE S possono essere MARCATE aggiungendo al mezzo di coltura un **analogo della timidina**: **BrdU = 5-bromo desossiuridina**

Le cellule che hanno incorporato la BrdU (in fase S) possono essere poi **IDENTIFICATE se la BrdU è marcata (ad es. con un fluorocromo)**

Visualizzazione di BrdU in situ mediante microscopia a fluorescenza

BrdU **coniugato ad un fluorocromo (es. RITC - rodamina)**

+ incubazione con **colorante che colora il DNA in TUTTI i nuclei (emette nel blu)**

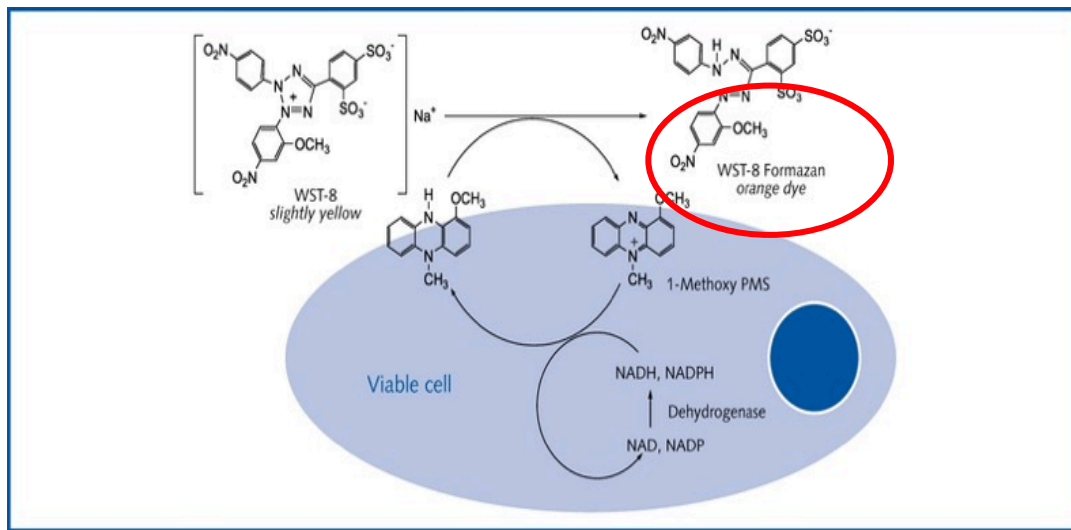


Saggi di vitalità cellulare high-throughput: WST assay

Saggio colorimetrico che misura l'attività mitocondriale o altre attività metaboliche associate alla vitalità e alla proliferazione cellulare.

Il substrato WST viene convertito in **formazan (arancione)**

Quindi **l'assorbanza** misurata **(a 450 nm con lo spettrofotometro)** è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali.



BIANCO
Taratura
DMSO (solvente)
COMPOSTO 1
Sciolto in DMSO
COMPOSTO 2
Sciolto in DMSO

Esperimento:

Aggiunta di reagente 1/10 del terreno

Incubazione per 0.5 - 2 hrs a 37°C

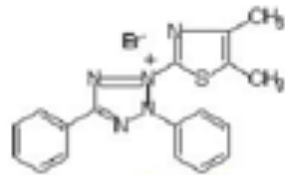
Lettura a 450 nm, lettura del "Bianco" = solo terreno + WST

Saggi di vitalità cellulare high-throughput: MTT assay

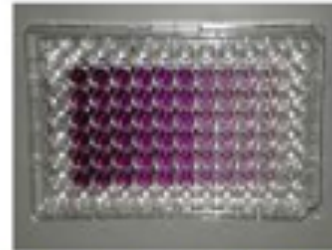
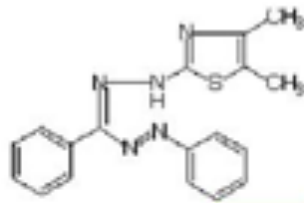
MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

Live cells \rightarrow Mitochondrial reductase present

Absorbance read at 690 nm and subtract background at 570 nm.

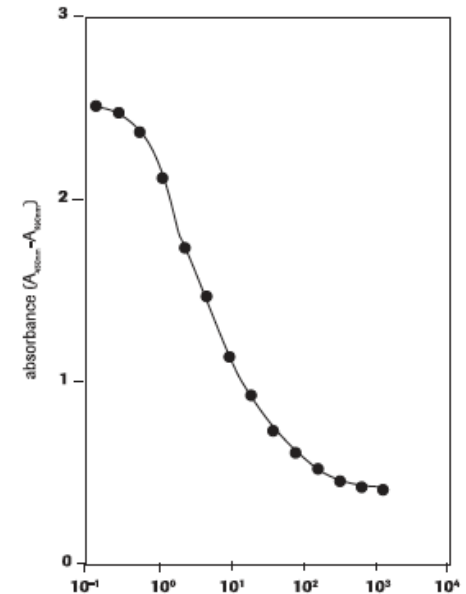


converts



http://en.wikipedia.org/wiki/File:MTT_Plate.jpg

MTT test at different concentrations



Farmaco X

**ANDAMENTO DI UNA COLTURA CELLULARE PRIMARIA:
ARRESTO IRREVERSIBILE DELLA PROLIFERAZIONE
(SENESCENZA)**

LE COLTURE CELLULARI PRIMARIE

Una coltura cellulare PRIMARIA è costituita da cellule che derivano direttamente da un tessuto, senza essere modificate geneticamente (né artificialmente né per mutazione spontanea), ed ha una durata limitata.

Dopo la semina, le cellule proliferano (se al terreno è stato aggiunto siero) fino ad occupare tutta la superficie del recipiente (raggiungono la CONFLUENZA).

A questo punto smettono di dividersi: questo fenomeno è detto INIBIZIONE DA CONTATTO. Se vengono diluite (PASSAGGIO IN COLTURA) in modo da fornire loro nuovo spazio, ricominceranno a proliferare: in questo modo la coltura viene PROPAGATA.

Tuttavia, la CAPACITA' REPLICATIVA di queste cellule (cioè il numero massimo di divisioni che possono compiere) è LIMITATA.

LE COLTURE CELLULARI PRIMARIE

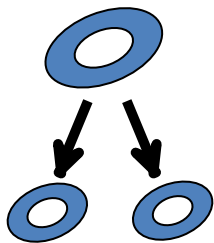
La maggiorparte delle cellule somatiche può essere mantenuta in coltura per un periodo limitato di tempo per poi andare spontaneamente incontro ad un processo comunemente noto come **senescenza**, in cui le cellule cessano di dividersi ed infine muoiono. Il numero massimo di divisioni cellulari in coltura dipende da diversi parametri, inclusa la specie di derivazione e l'età dell'organismo donatore.

La senescenza è un **arresto IRREVERSIBILE della proliferazione**: una volta entrata in senescenza una cellula non ricomincerà più a proliferare. Pur smettendo di dividersi, le cellule senescenti rimangono vive e metabolicamente attive per lunghi periodi, anche per anni all'interno dei tessuti.

Tuttavia, a partire da una coltura primaria, sporadicamente alcune cellule possono sfuggire casualmente al processo di senescenza acquisendo la capacità di proliferare indefinitamente, diventando perciò **IMMORTALIZZATE**. La frequenza dell'immortalizzazione spontanea può essere incrementata attraverso il trattamento con radiazioni o sostanze chimiche **MUTAGENE** (che inducono mutazioni nel genoma cellulare).

LE COLTURE CELLULARI PRIMARIE

COLTURA PRIMARIA



divisioni cellulari



da un **espianto di tessuto**

si dissociano le cellule e si seminano:

Possono smettere di dividersi

REVERSIBILMENTE causa deprivazione da siero o confluenza, se stimolate o diluite, rientrano in ciclo

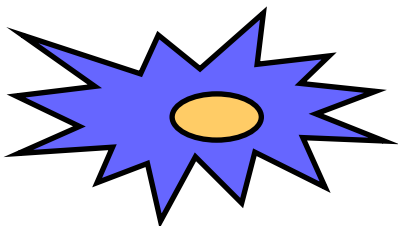
numero limitato di

PASSAGGI IN CULTURA

Le cellule vanno incontro ad un **numero finito** di divisioni (20-50 a seconda della specie) poi la coltura entra in **CRISI** e le cellule **cessano IRREVERSIBILMENTE di dividersi**: **SENESCENZA**

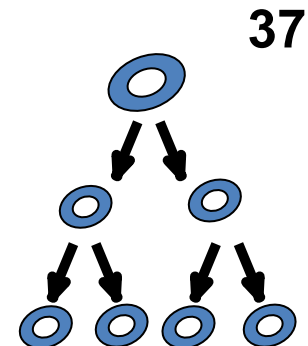
CRISI

SENESCENZA



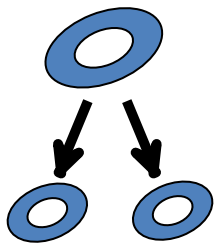
casuale acquisizione della capacità di dividersi indefinitamente

IMMORTALIZZAZIONE SPONTANEA
LINEE CELLULARI STABILIZZATE



ANDAMENTO DI UNA COLTURA CELLULARE PRIMARIA

COLTURA PRIMARIA



divisioni cellulari



numero limitato di

PASSAGGI IN COLTURA



da un **espianto di tessuto**

si dissociano le cellule e si seminano:

Possono smettere di dividersi

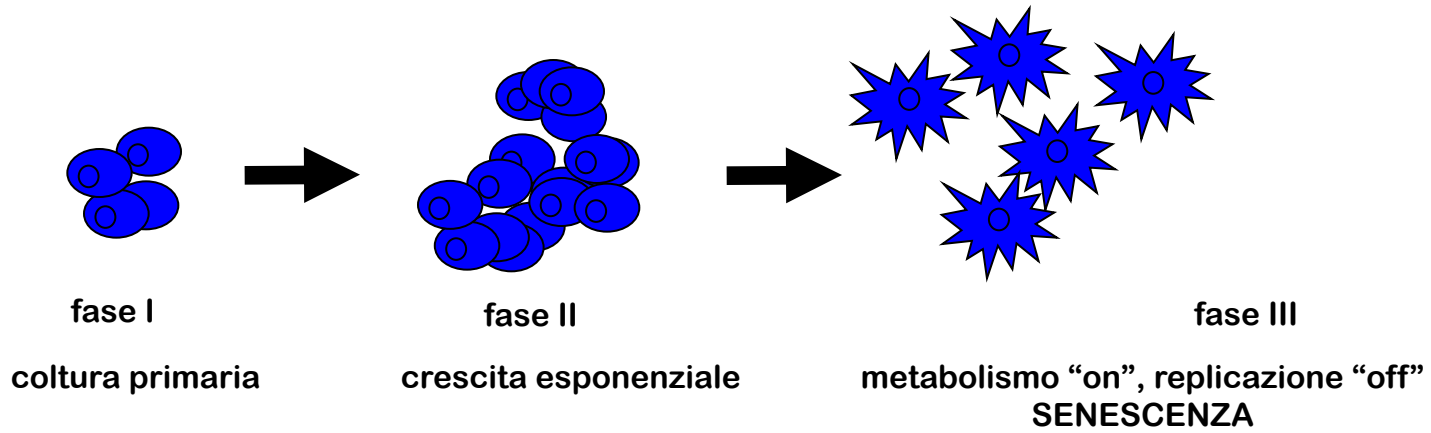
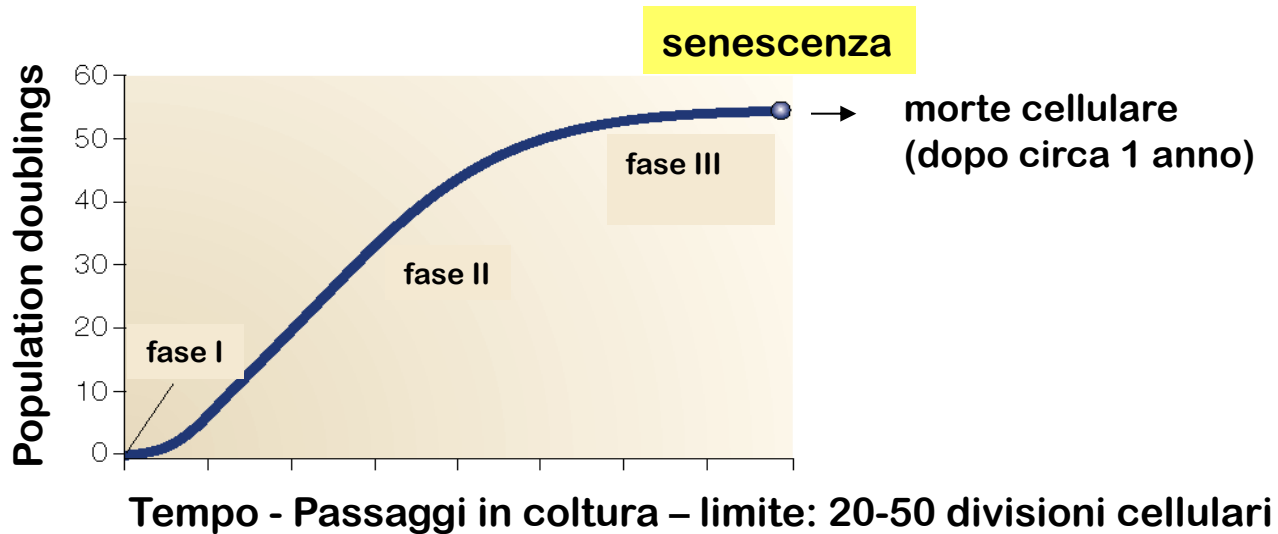
REVERSIBILMENTE causa deprivazione da siero o confluenza, se stimolate o diluite, rientrano in ciclo

Le cellule vanno incontro ad un **numero finito** di divisioni (20-50 a seconda della specie) poi la coltura entra in **CRISI** e le cellule **cessano IRREVERSIBILMENTE** di dividersi



Leonard Hayflick,
1960's

CAPACITÀ REPLICATIVA DI CELLULE UMANE IN COLTURA



Il limite di Hayflick: limite che "tiene conto" del numero di divisioni cellulari

Nel grafico precedente è mostrato l'andamento della capacità proliferativa di una coltura primaria di cellule umane, ad esempio fibroblasti derivati da una biopsia di pelle: **CURVA DI CRESCITA**.

Dopo una fase iniziale di crescita esponenziale le cellule assumono un ritmo di divisione costante formando un ceppo. Dopo un numero **FINITO** di divisioni (e quindi di passaggi in coltura) la coltura entra in una fase di **CRISI**, in cui il numero di cellule non aumenta più a causa della massiccia senescenza (**PARTICOLARE ARRESTO DELLA PROLIFERAZIONE**), il ritmo di proliferazione quindi decresce fino alla morte di tutte le cellule della coltura.

Le cellule somatiche normali hanno MEMORIA

**possono effettuare un numero limitato di passaggi in coltura prima di andare incontro ad ARRESTO PERMANENTE DELLA PROLIFERAZIONE
= SENESCENZA REPLICATIVA**

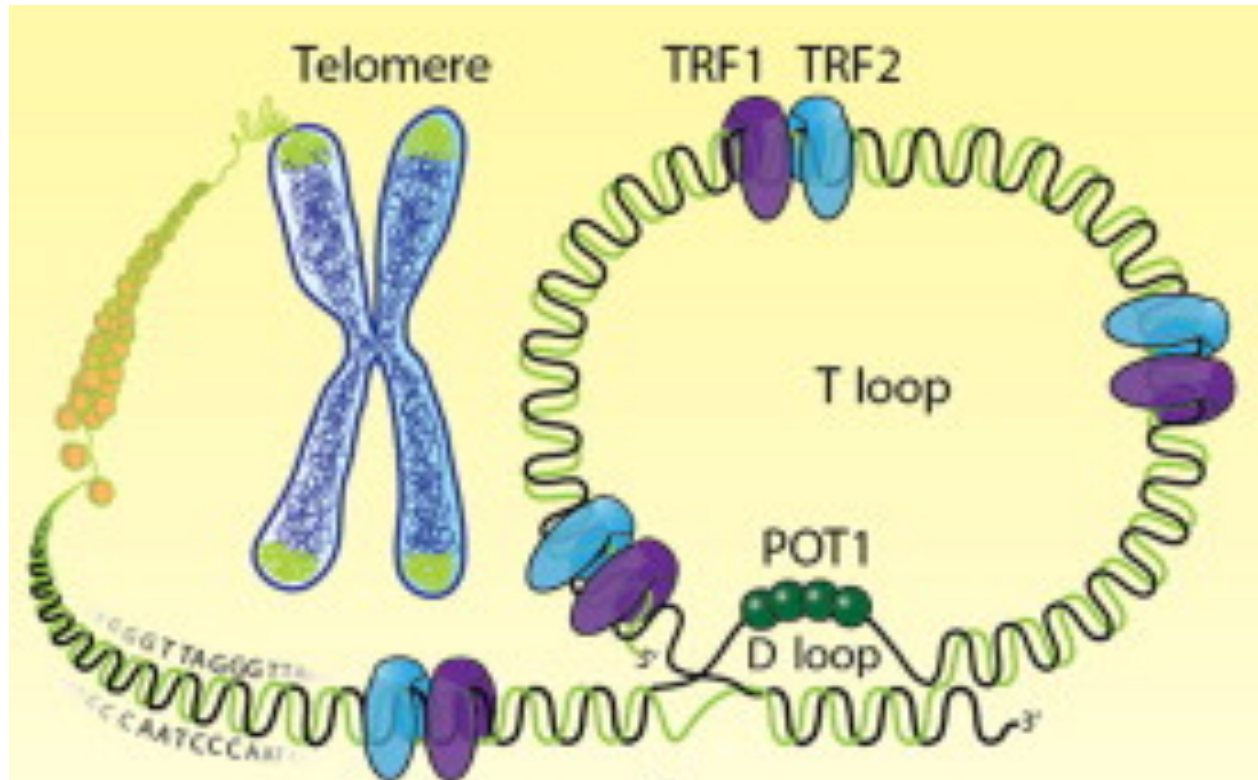
ECCEZIONI :

Linea germinale

Cellule staminali embrionali

Cellule tumorali

Le cellule somatiche hanno una limitata capacità proliferativa a causa dell'erosione dei telomeri



SENESCENZA REPLICATIVA: "MEMORIA" del numero di replicazioni del DNA (effettuate a ogni divisione cellulare)

Le estremità dei telomeri consistono di ripetizioni tandem

sequence

length

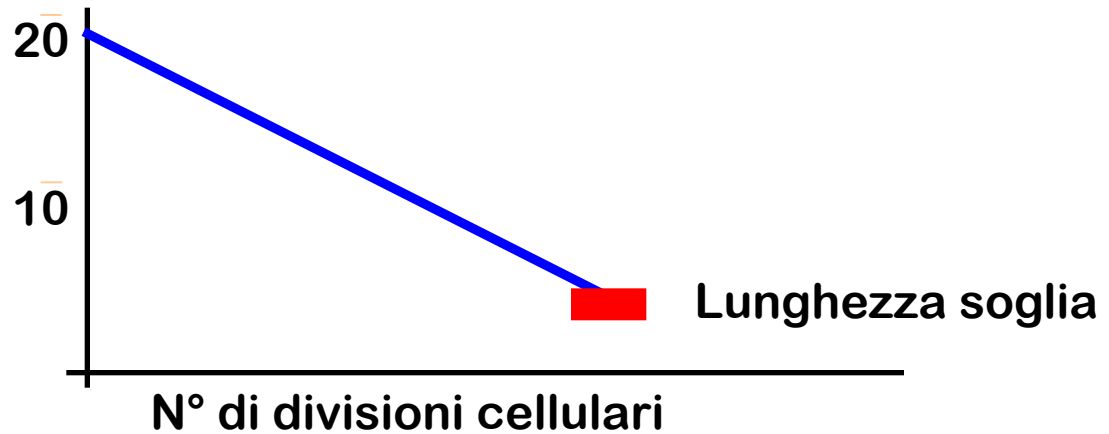
Vertebrates



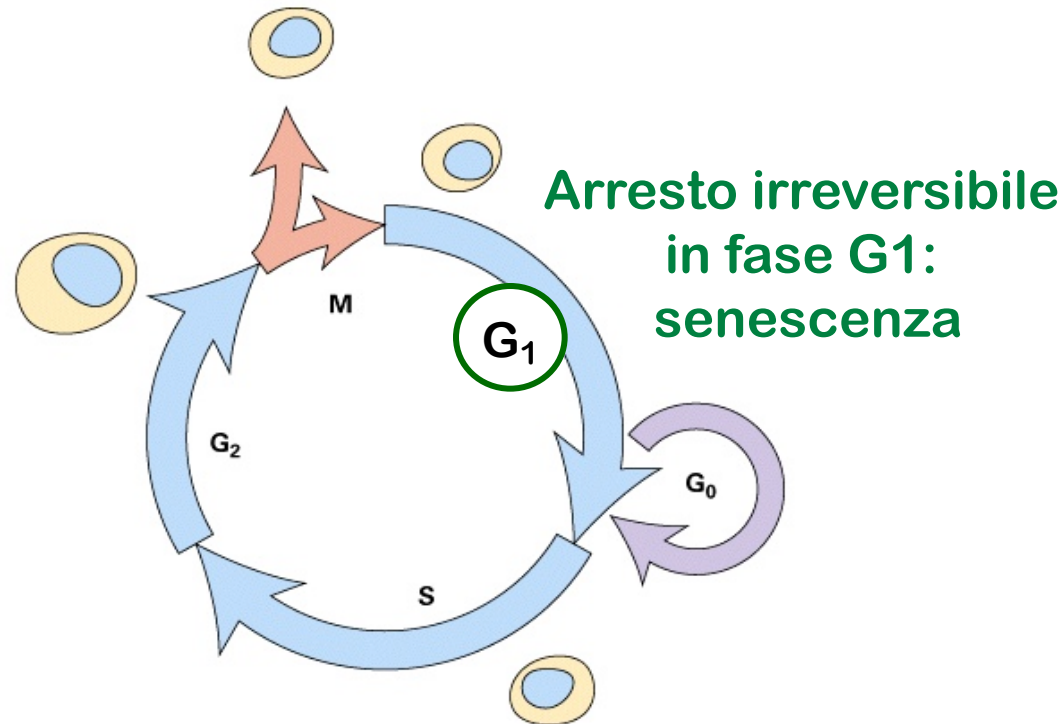
TTAGGG

human 10 kb
mouse 40 kb

Lunghezza
dei telomeri
in Kb
(nell'uomo)



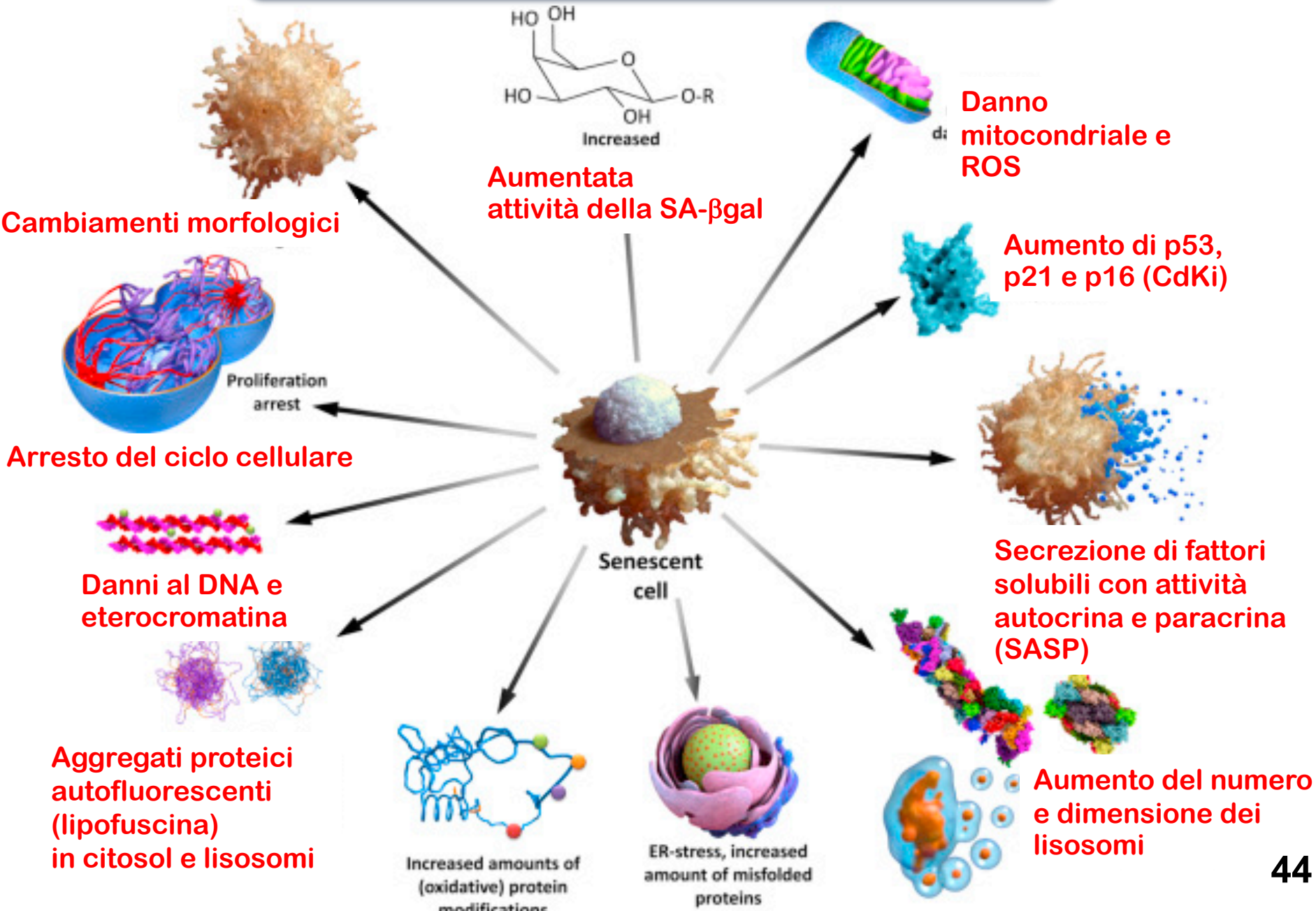
SENESCENZA REPLICATIVA DI CELLULE IN COLTURA



Le cellule senescenti:

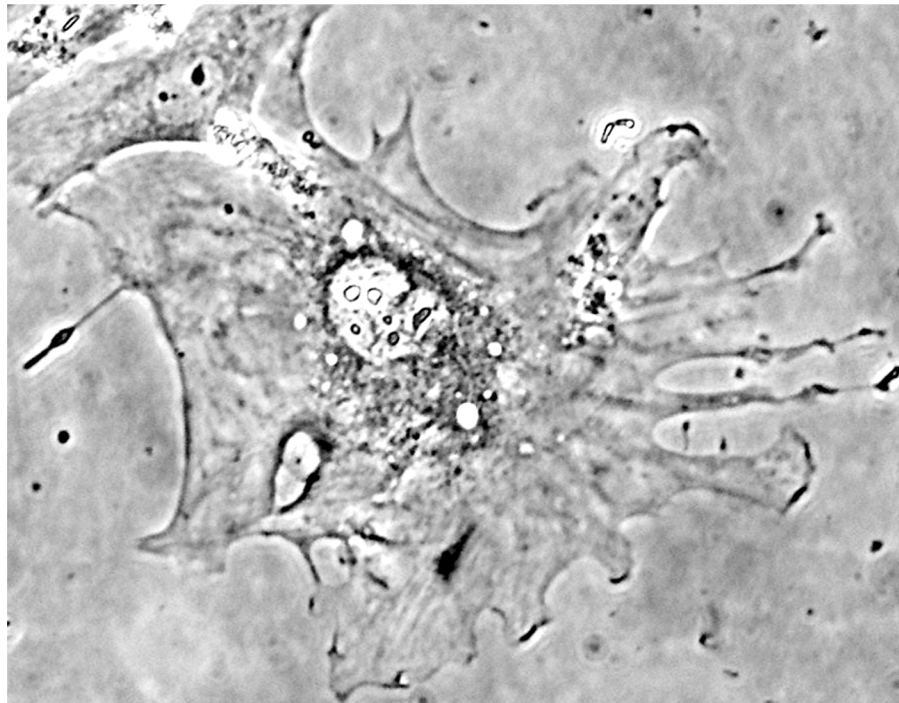
- sono **permanentemente arrestate** alla **fase G₁** del ciclo cell
- **non rientrano in ciclo** dopo stimolazione con mitogeni né dopo diluizione
- rimangono **metabolicamente attive** per lunghi periodi

Caratteristiche delle cellule senescenti



IDENTIFICAZIONE DI CELLULE SENESCENTI in coltura:

Al microscopio ottico: morfologia appiattita e ramificata

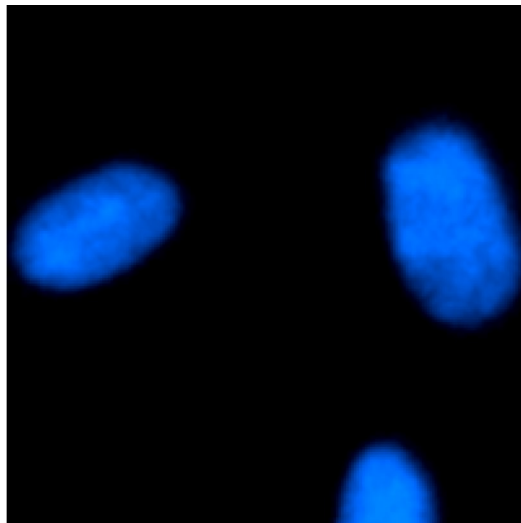


IDENTIFICAZIONE DI CELLULE SENESCENTI in coltura:

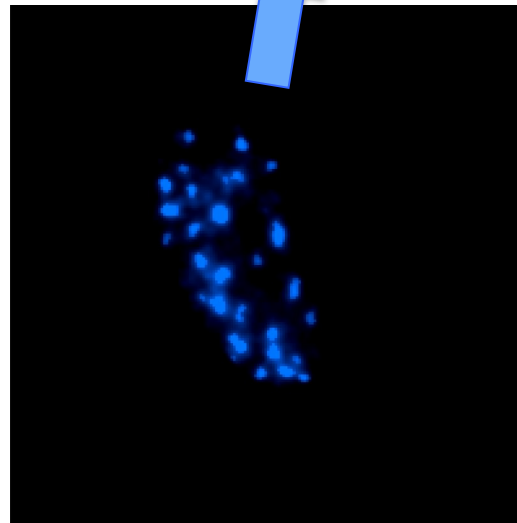
Foci di eterocromatina (SAHF)

Colorazione del DNA
con la molecola
fluorescente DAPI

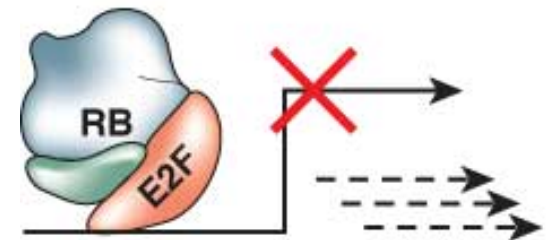
Repressione di geni che inducono la
progressione del ciclo cellulare:
istoni, cicline A e B, PCNA
(geni bersaglio di E2F e repressi da pRB)



Cellule proliferanti

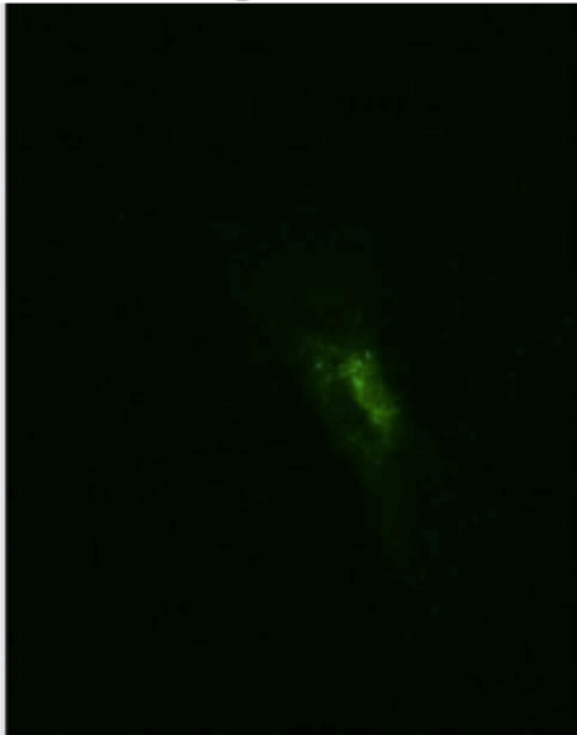


Cellule senescenti

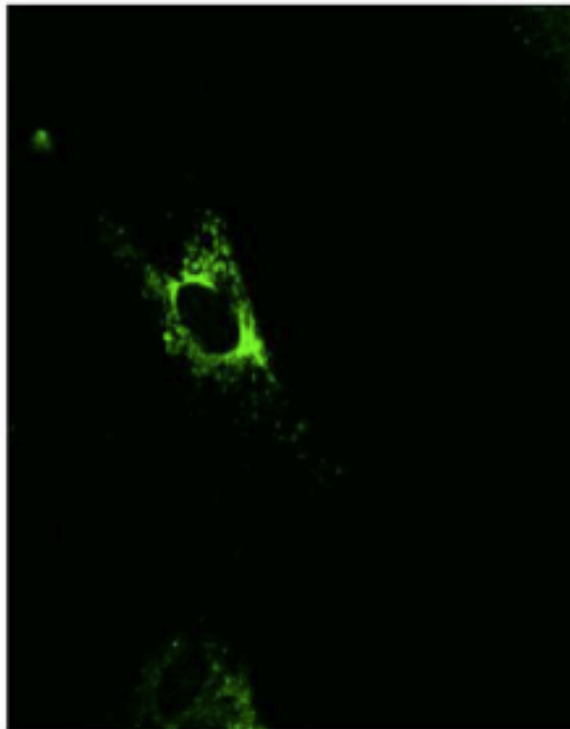


**Accumulo di aggregati proteici e lipidici iper-ossidati
(lipofuscina)**

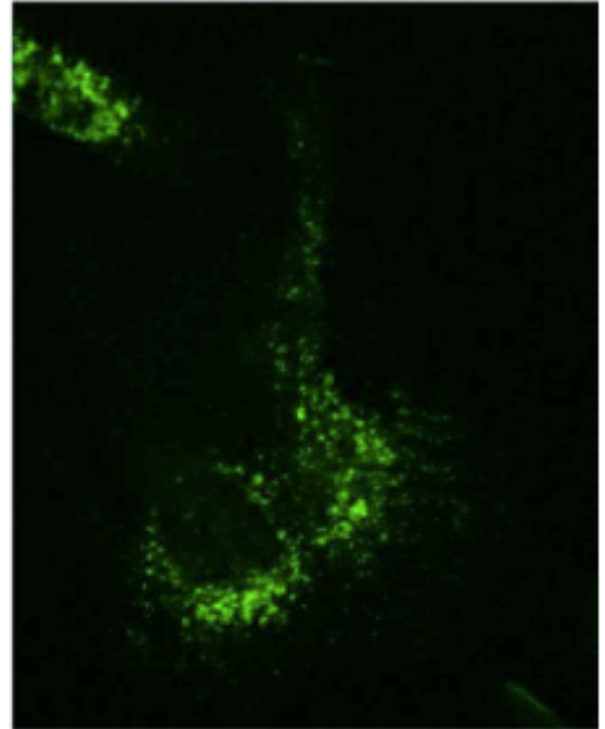
A. Young fibroblast



B. Aged fibroblast



C. SIPS fibroblast



Gli aggregati di lipofuscina sono visibili in quanto autofluorescenti

IDENTIFICAZIONE DI CELLULE SENESCENTI

= Saggio di attività dell'enzima SA β -galattosidasi a pH=6

β -galattosidasi

(enzima
Mg-dipendente)

lisosomiale pH<5

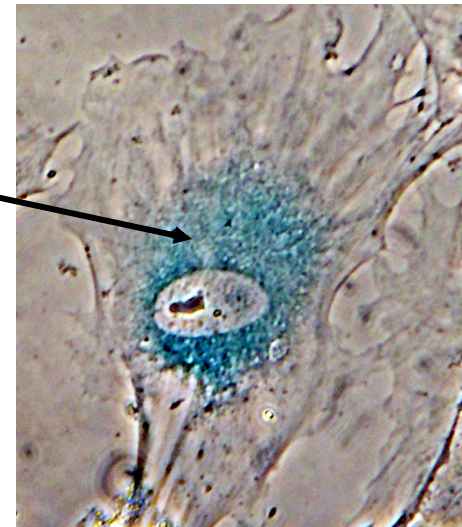
SA pH=6

48

Saggio di attività in situ: idrolisi del substrato cromogeno X-gal
5-bromo,4-cloro-3-indolil-beta-D-galattopiranoside
che dà un precipitato colorato (blu)



Si evidenzia una
colorazione perinucleare



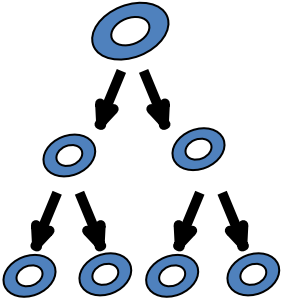
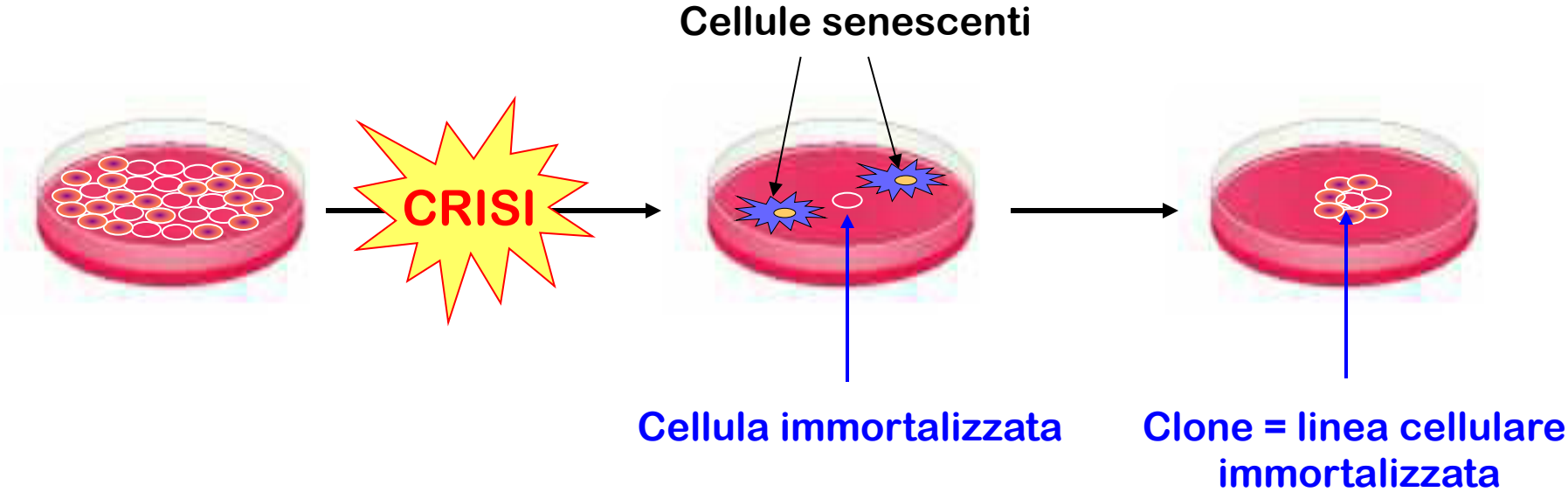
L'attività della SA-betagal può essere identificata perchè è osservabile a pH 6, condizione in cui la beta-galattosidasi presente nei lisosomi di cellule proliferanti non è rilevabile. Tutte le cellule mostrano infatti attività beta-galattosidasica lisosomiale a pH 5.

L'attività dell'enzima beta galattosidasi può essere identificata con una varietà di substrati che hanno il galattosio legato ad un altro gruppo chimico tramite un legame beta-D-glicosidico. Il composto può avere proprietà che divengono visibili oppure variano dopo la sua idrolisi dal galattosio. Molti substrati danno prodotti solubili colorati o fluorescenti, ma per la visualizzazione in situ è ideale un prodotto che dia un precipitato colorato che rimane all'interno della cellula e permette di identificarla. Ad esempio il substrato sintetico detto X-gal.

Nel saggio in situ, le cellule vengono fissate con glutaraldeide, che forma legami covalenti tra le proteine e tra le proteine e gli acidi nucleici, e poi vengono idratate con una soluzione a pH=6.

La beta galattosidasi in queste condizioni mantiene la propria attività enzimatica e può catalizzare l'idrolisi dell'X-gal. Una volta idrolizzato, l'indolo si ossida, dimerizza, precipita ed assume un colore blu.

IMMORTALIZZAZIONE SPONTANEA DI CELLULE IN CULTURA



IMMORTALIZZAZIONE DI CELLULE IN COLTURA

In coltura (ed anche in vivo) può accadere che alcune cellule SFUGGANO CASUALMENTE AL PROCESSO DI SENESCENZA ed acquisiscano pertanto la CAPACITÀ DI DIVIDERSI INDEFINITAMENTE. La frequenza di tali eventi può essere aumentata mediante irraggiamento o trattamento con agenti mutageni.

Le cellule immortalizzate dividendosi formano dei CLONI cellulari, in cui le cellule figlie sono tutte derivate dalla stessa cellula di partenza.

Il bypass della senescenza all'origine dell'immortalizzazione è dovuto all'insorgenza di MUTAZIONI SPONTANEE in alcuni geni importanti per il processo di senescenza.

Di conseguenza, si può INDURRE l'immortalizzazione alterando selettivamente i geni coinvolti nella senescenza.

Fin dai primi studi sulla senescenza, è stato osservato che la frequenza degli eventi di immortalizzazione spontanea in coltura è specie-dipendente. È infatti un evento estremamente improbabile in cellule normali di derivazione umana, mentre è più frequente in cellule di roditore.

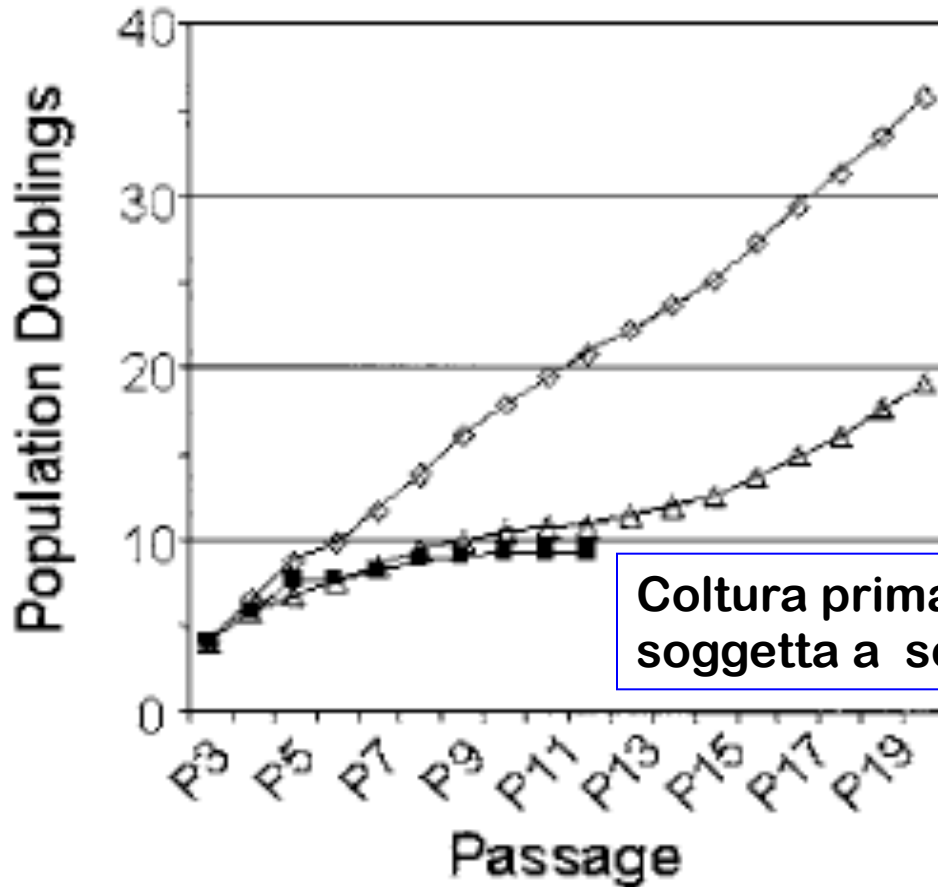
Tali cellule possiedono infatti telomeri molto più lunghi delle cellule umane. Inoltre, la senescenza nei roditori è sottoposta a minori controlli rispetto alle cellule umane: in pratica è sufficiente un singolo evento mutazionale per inattivarla. Questo spiega la frequenza di immortalizzazione in coltura.

Le cellule tumorali sono solitamente immortali, spesso mostrano attività telomerasica, il che suggerisce che potrebbero essere derivate da cellule staminali.

IMMORTALIZZAZIONE SPONTANEA di cellule IN COLTURA

Linea cellulare immortalizzata:
ha capacità proliferativa costante

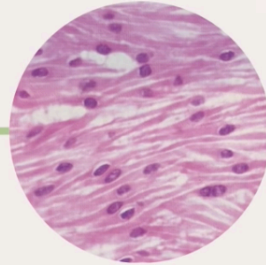
Immortalizzazione spontanea:
emerge un clone cellulare
a crescita indefinita



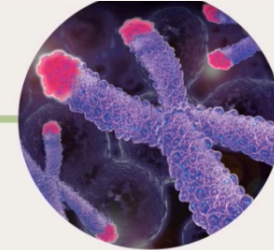
Coltura primaria:
soggetta a senescenza

Colture primarie e linee cellulari stabilizzate

Colture primarie

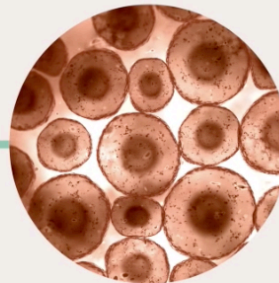


Possono dividersi un numero limitato di volte



Ottenute direttamente da tessuti

Linee cellulari

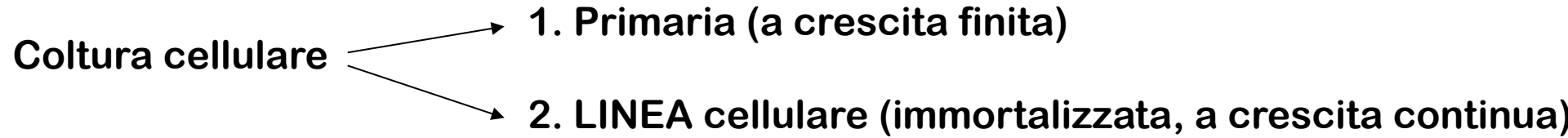


Utili per la ricerca a lungo termine



Si dividono indefinitamente

Colture primarie e linee cellulari stabilizzate



1. Costituita da cellule coltivate in vitro per un periodo di tempo e per un numero di divisioni limitati.
2. Costituita da cellule a crescita illimitata.

LINEE CELLULARI IMMORTALIZZATE (STABILIZZATE)

Cloni derivati da **un'unica cellula sfuggita al processo di senescenza** (mutazioni in geni della senescenza, espressione della telomerasi)

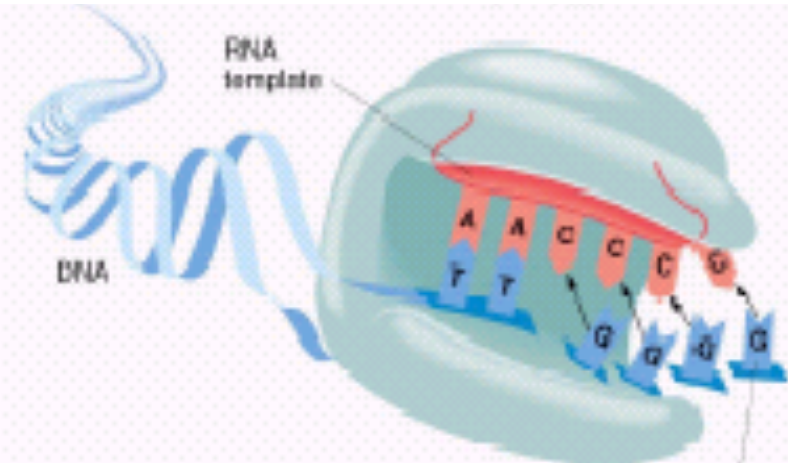
Capaci di **dividersi indefinitamente**

Spesso hanno **aberrazioni cromosomiche** (rotture e riarrangiamenti, perdita o duplicazione)

Non sono necessariamente **tumorigeniche**

L'immortalizzazione è **una tappa** della progressione neoplastica questa avviene grazie all'**accumulo** di alterazioni genetiche

L'enzima TELOMERASI

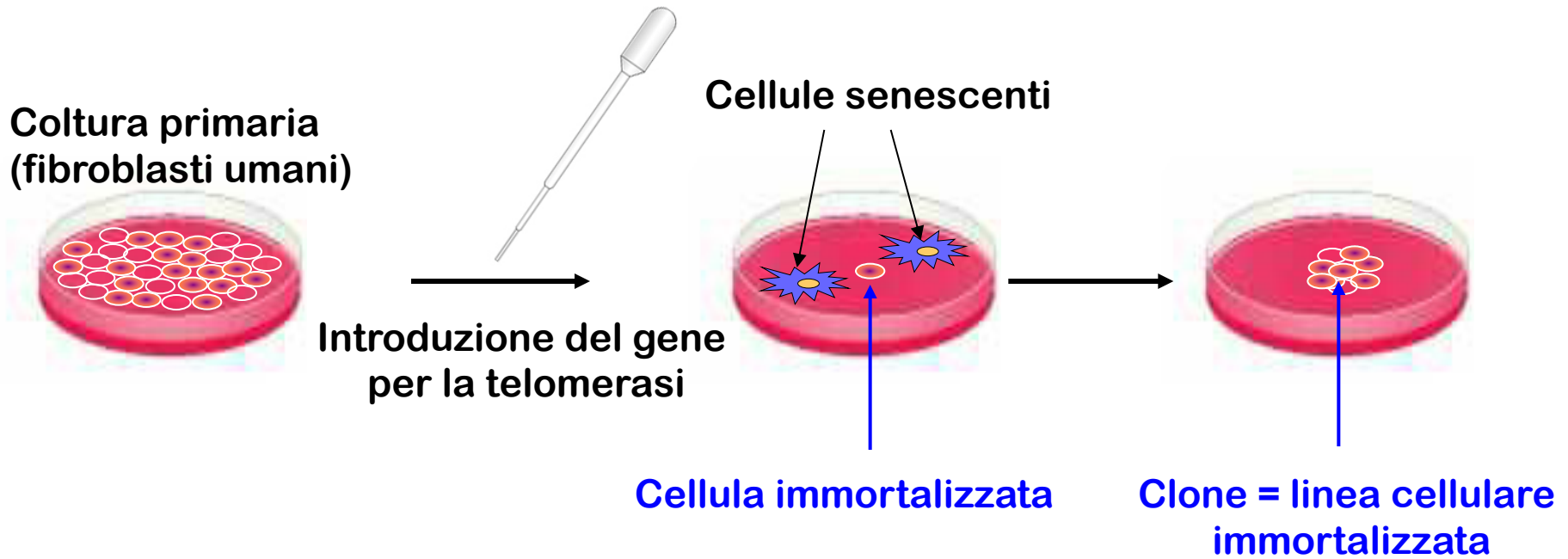


Attiva in cellule

- staminali e germinali
- tumorali (80-90%)

Assente in cellule somatiche normali

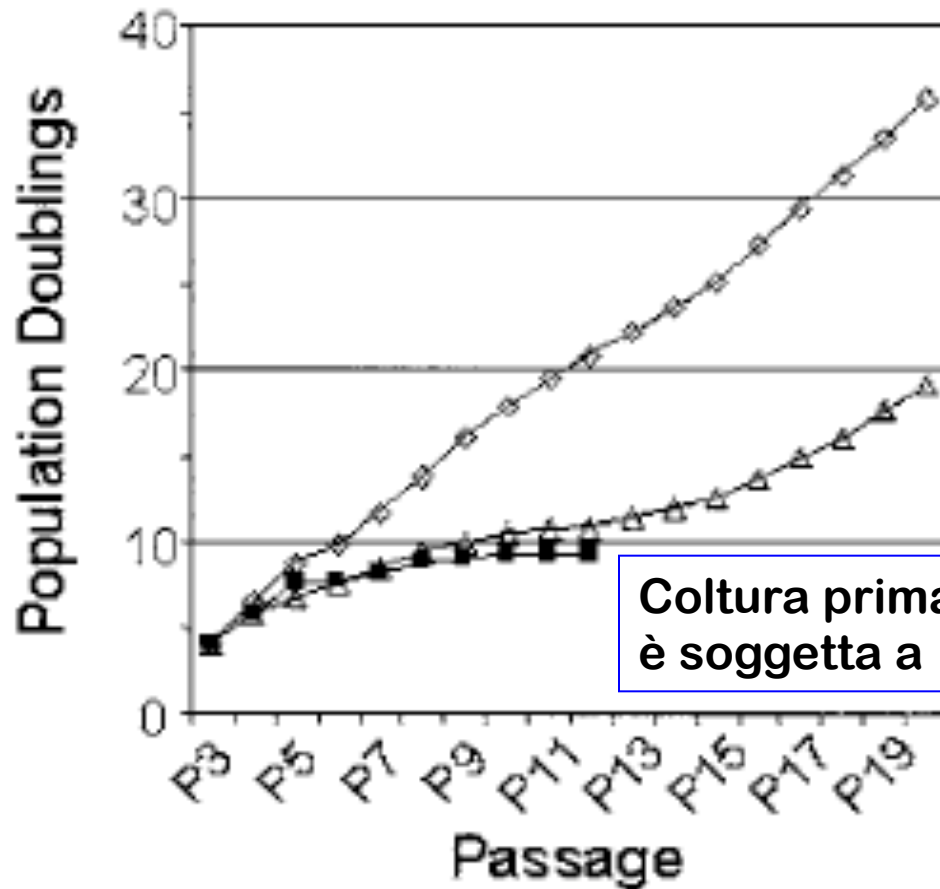
Immortalizzazione di cellule in coltura



Cellule somatiche e cellule staminali

Cellule ES
hanno capacità proliferativa
costante

Introduzione della telomerasi:
si induce la proliferazione
indefinita



Coltura primaria:
è soggetta a senescenza