Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

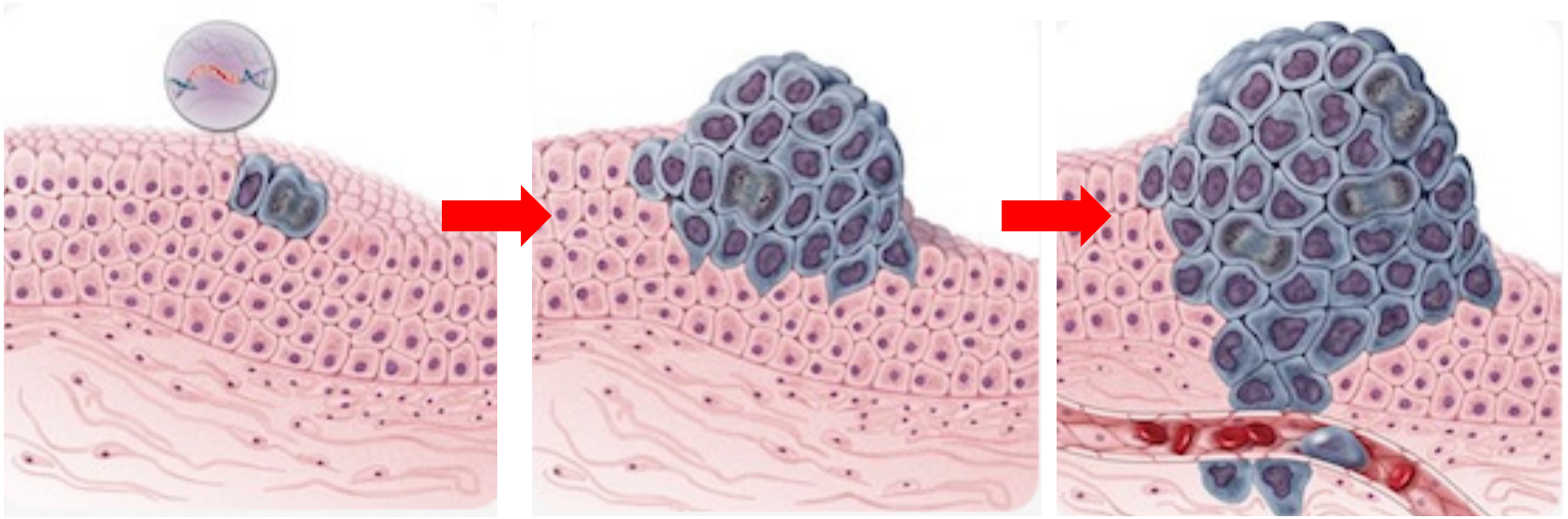
AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 6

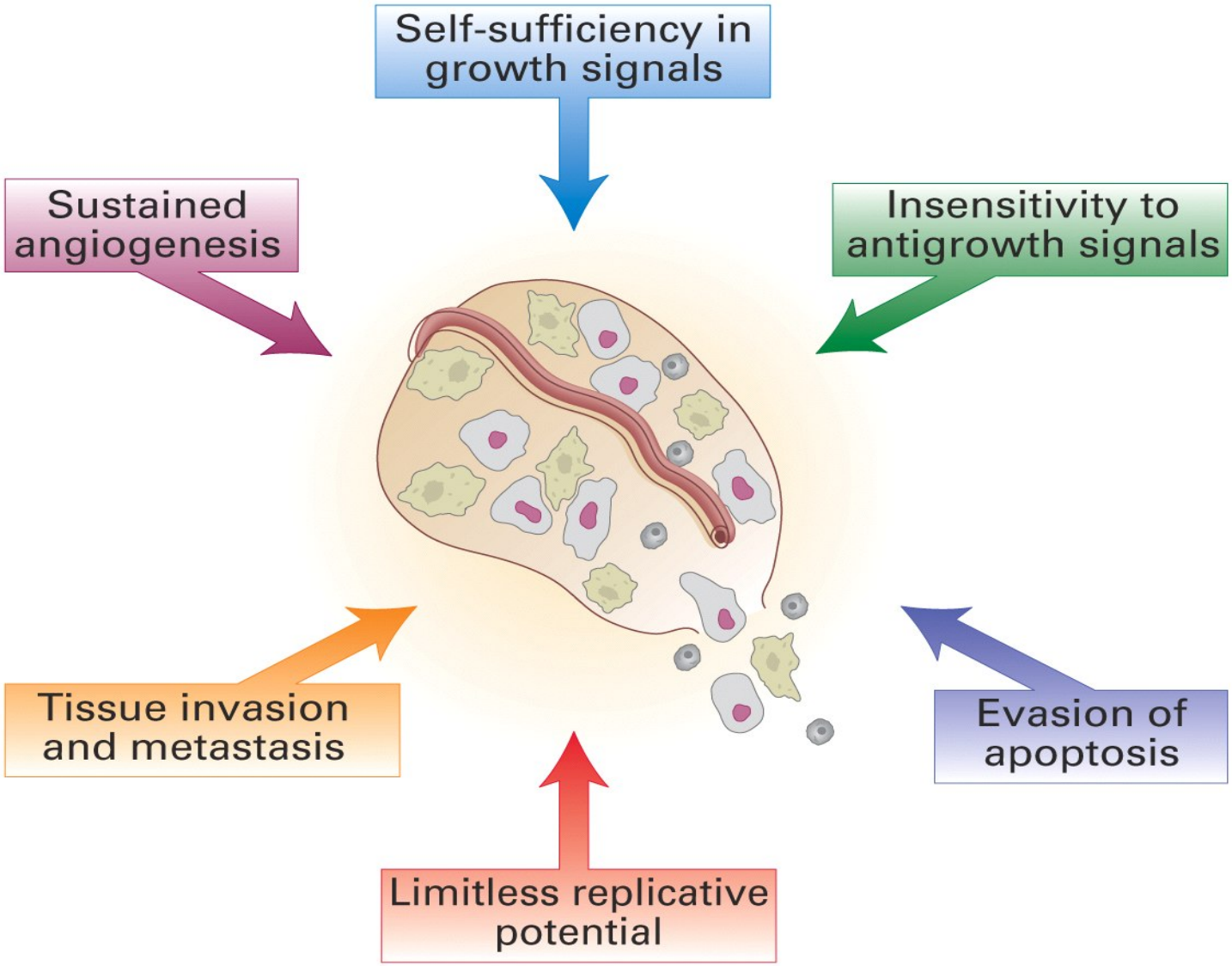
LO STUDIO DELLA TRASFORMAZIONE NEOPLASTICA

IL CANCRO



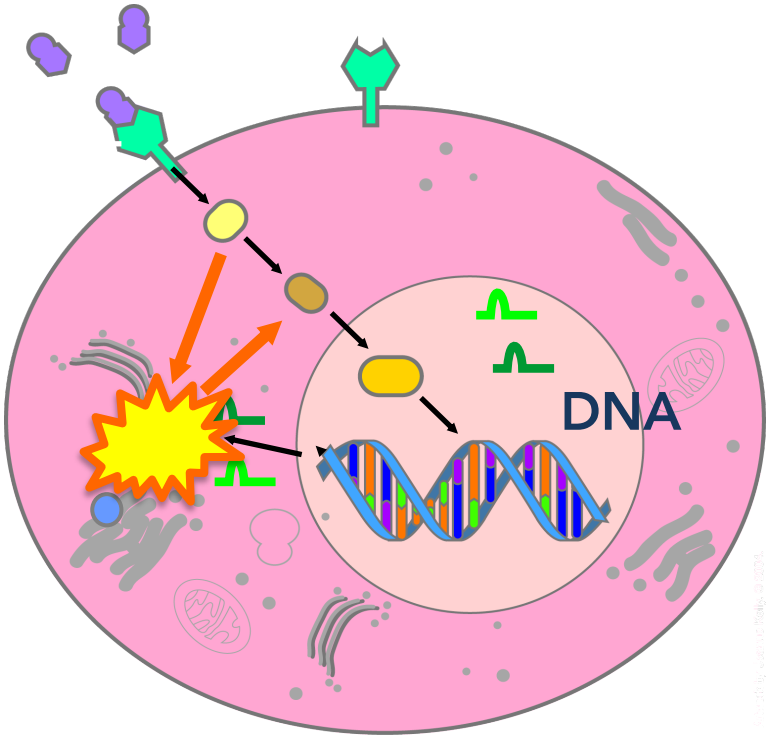
Il cancro è una patologia nella quale le cellule crescono e proliferano senza controllo, invadono e colonizzano i tessuti normali.

Alterazioni dei comportamenti cellulari nel cancro

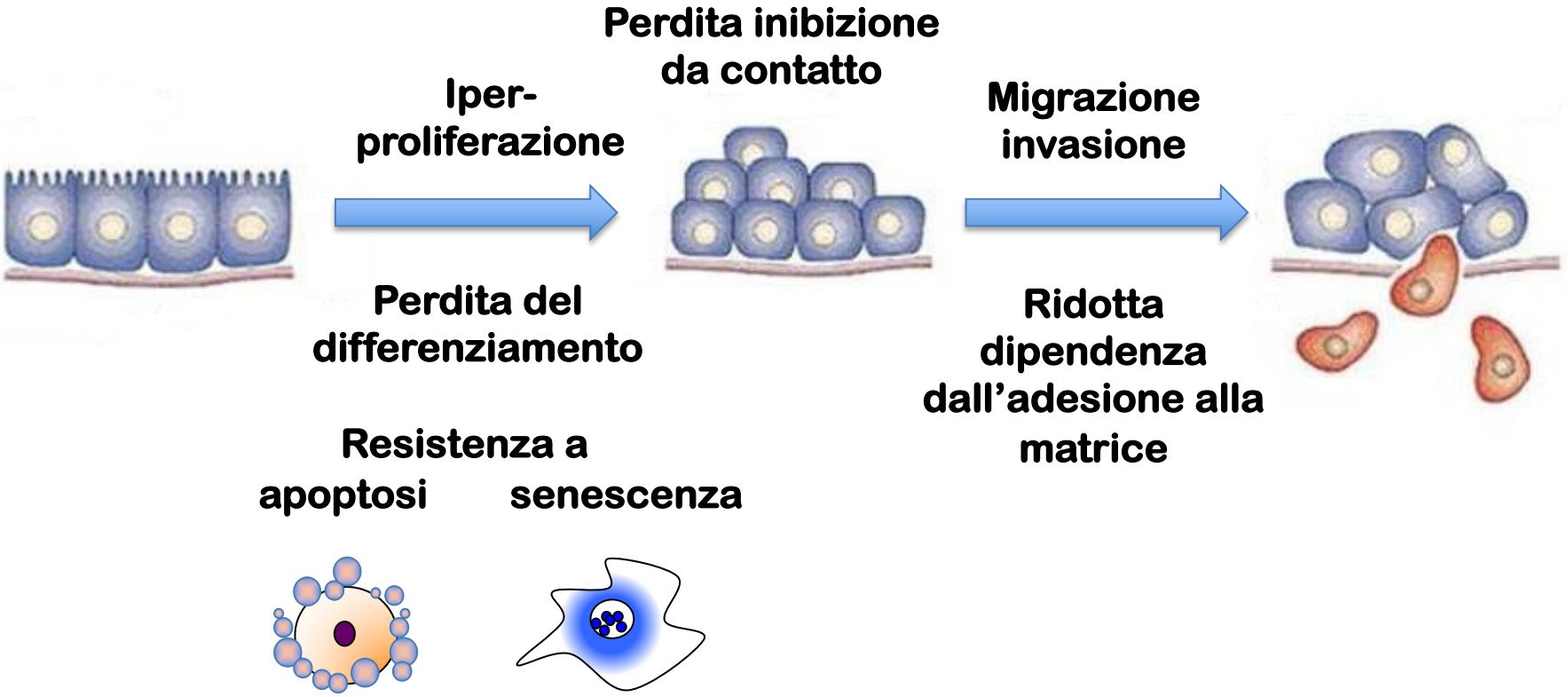


Le cause della trasformazione neoplastica

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



Caratteristiche delle cellule tumorali



LA RICERCA SUL CANCRO

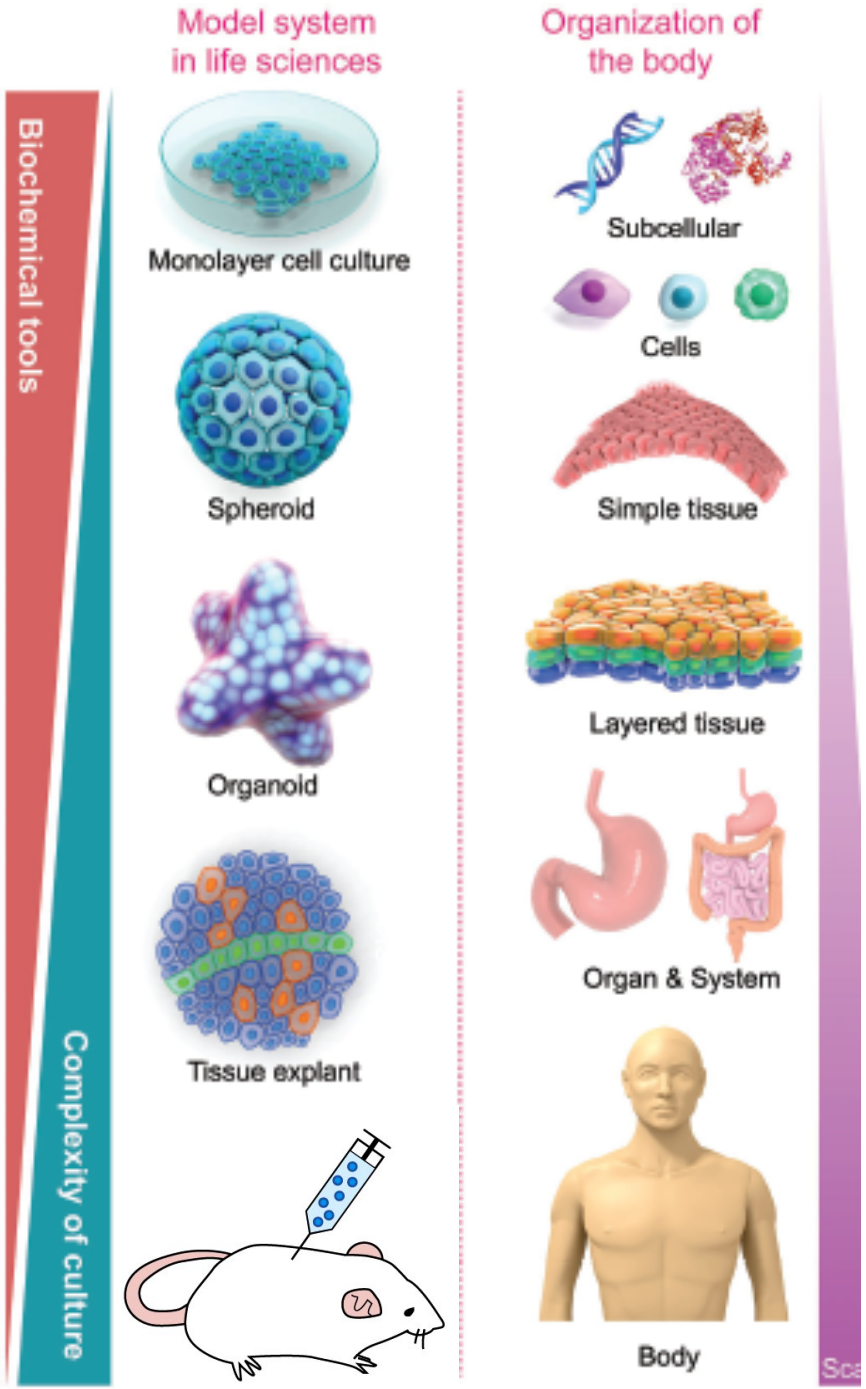
Identificare
geni, proteine e processi
responsabili
dell'insorgenza e
dell'aggressività tumorale

Diagnosi

Risposta
alle terapie già in uso

Nuove
terapie mirate

SISTEMI MODELLO PER LA RICERCA SUL CANCRO



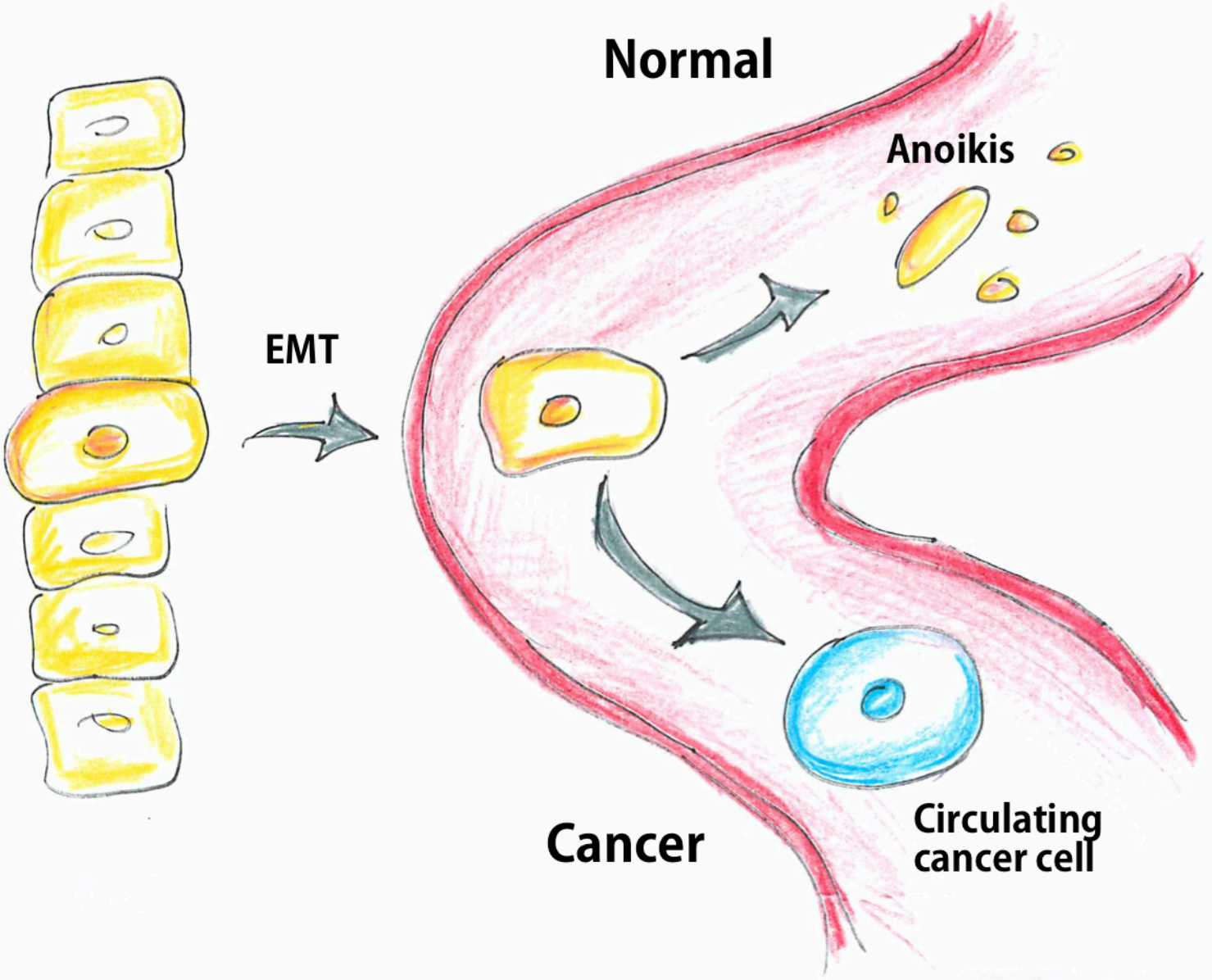
Saggi di trasformazione in vitro

- ✓ 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)

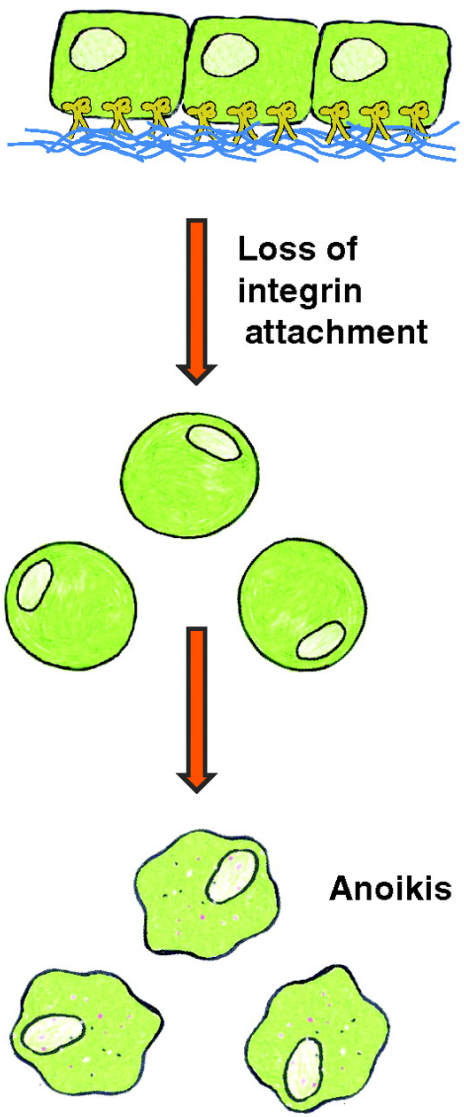
Saggio di crescita indipendente dal substrato
= SAGGIO DEL SOFT AGAR

Indica tumorigenicità/metastaticità

ANOIKIS = morte cellulare indotta dalla perdita di adesione



ANOIKIS

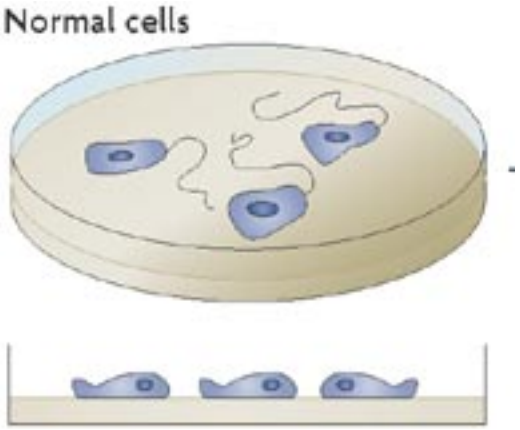


cellule NORMALI dipendono dalla formazione di contatti con la MATRICE EXTRACELLULARE per SOPRAVVIVERE.
In vitro: necessitano di un substrato per la crescita: se seminate in un terreno semisolido vanno incontro a morte

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**

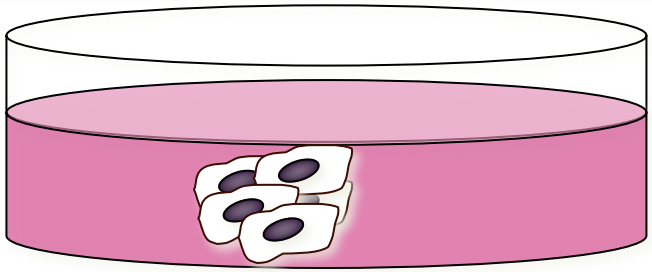
- **Le cellule vengono lasciate nell'incubatore e la crescita di colonie viene osservata dopo 1 o più settimane**

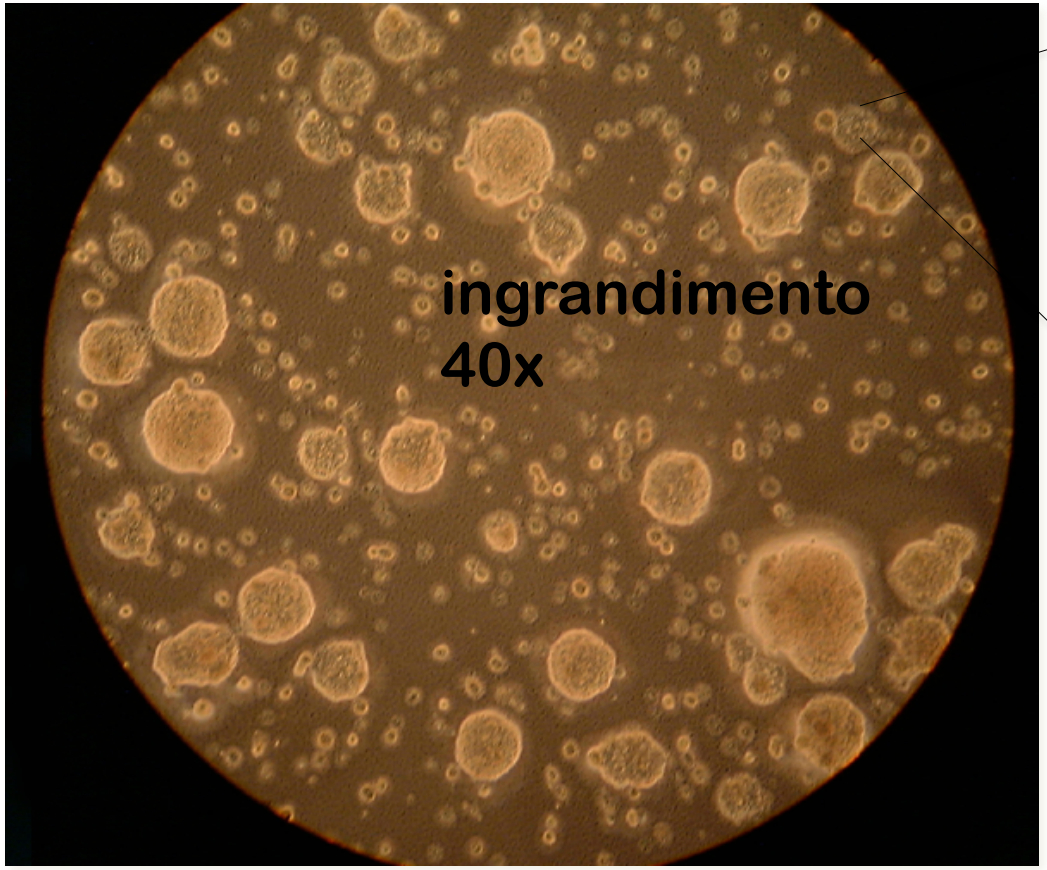
1° strato: terreno con agarosio 1%

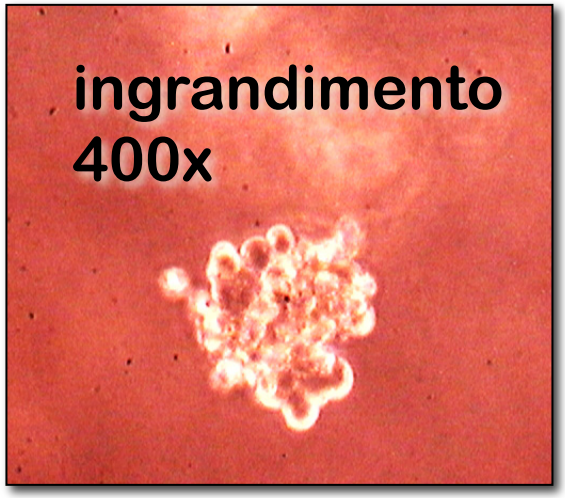
2° strato: cellule in terreno con agarosio 0.5%

…dopo 7 gg

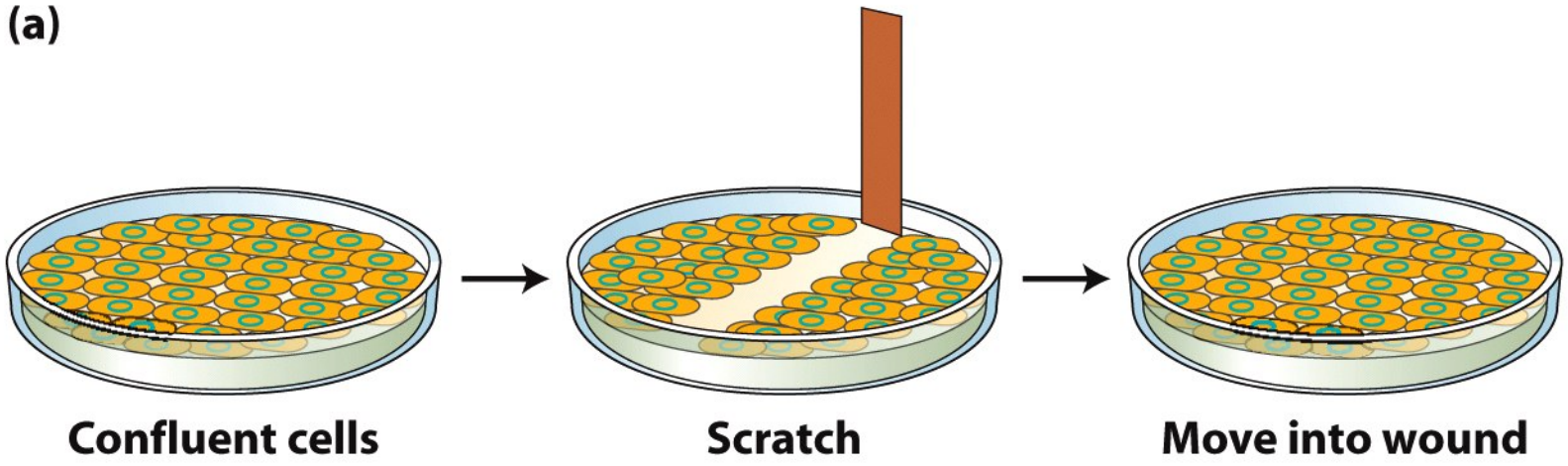
Saggio di crescita indipendente dal substrato

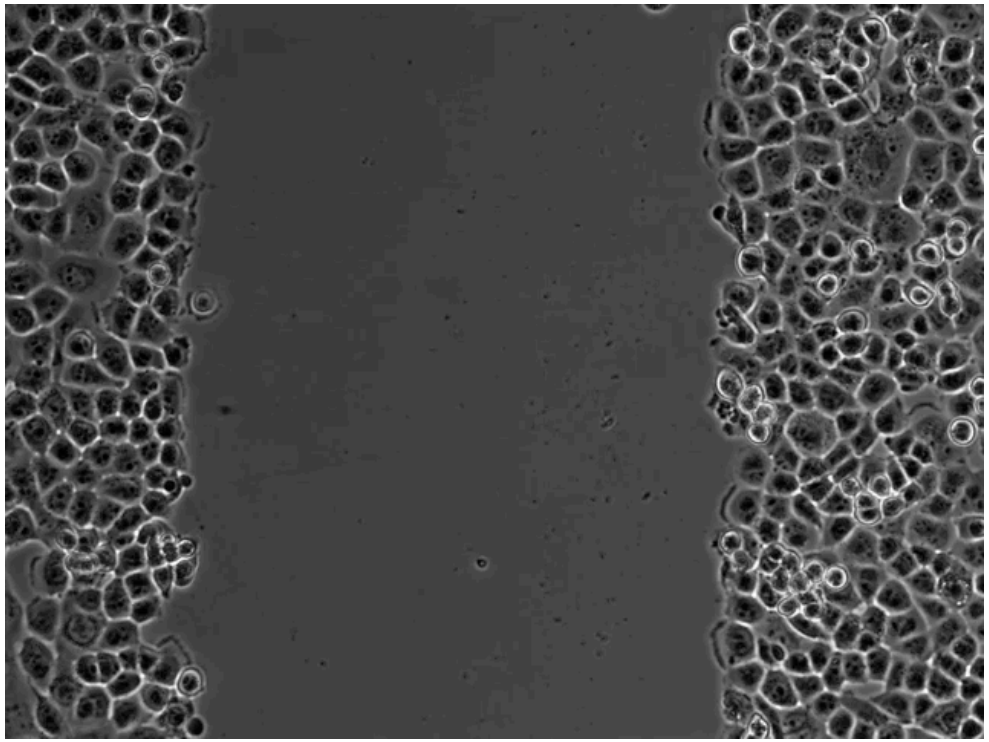






Saggi di motilità cellulare: wound-healing

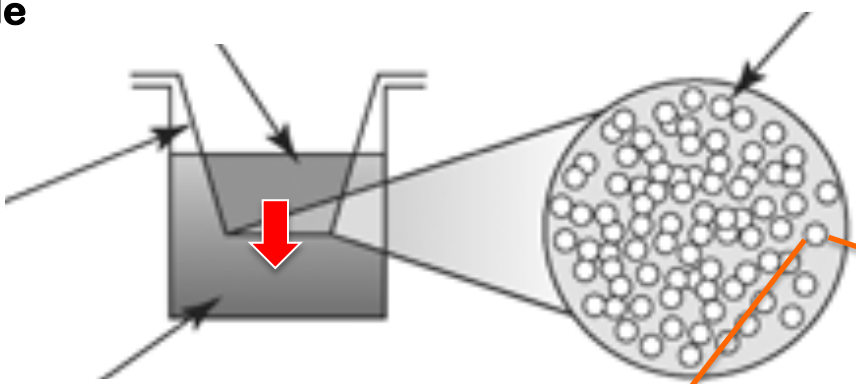




Saggi di migrazione con camera di Boyden (transwelling)

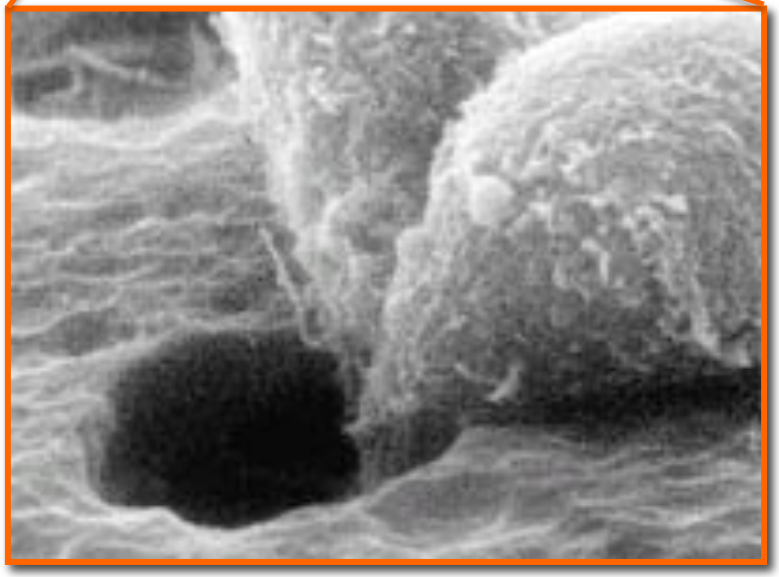
Membrana porosa (8μM)

Pozzetto superiore con cellule

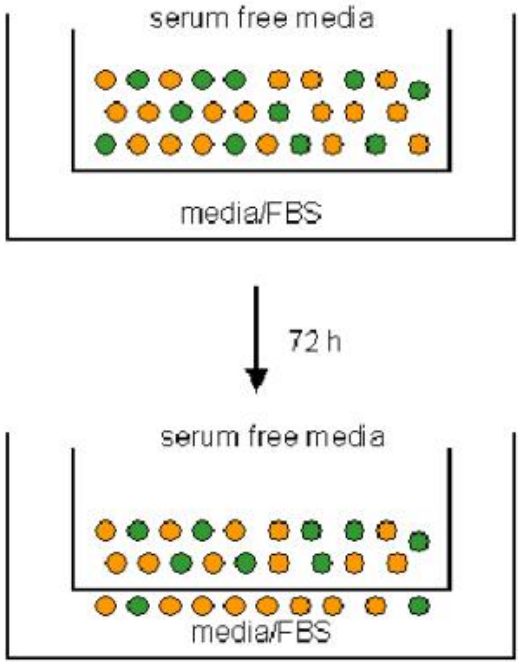


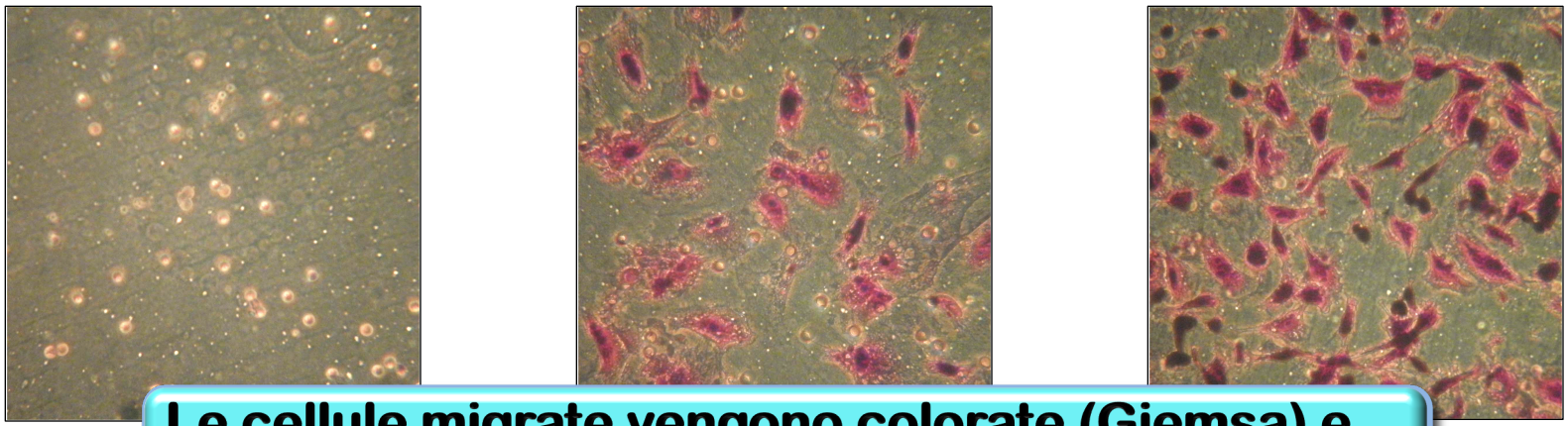
Inserto

Pozzetto inferiore contenente terreno con siero



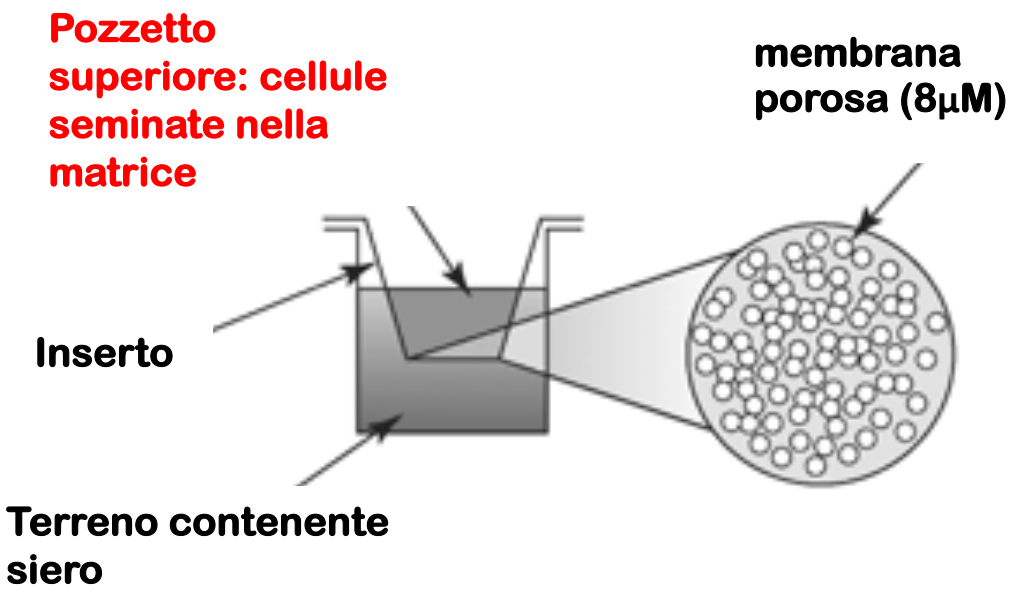
Saggi di migrazione con camera di Boyden





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

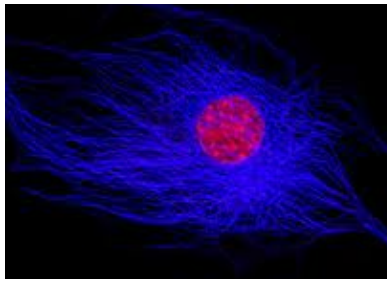
Saggi di invasione



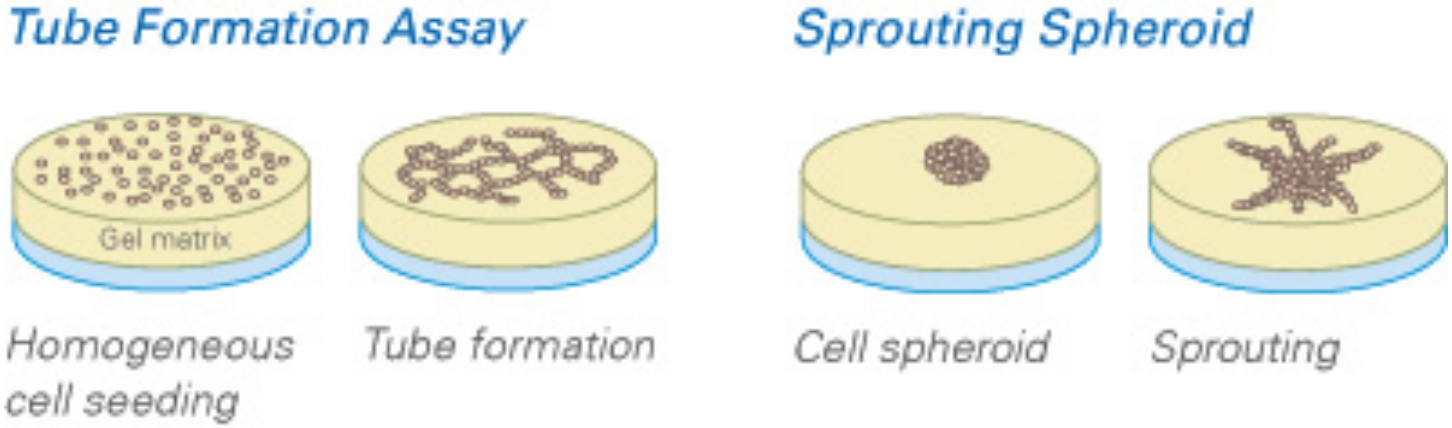
Si misura la capacità delle cellule di migrare attraverso un gel di collagene o Matrigel (che simula la matrice extracellulare) polimerizzato su un filtro poroso

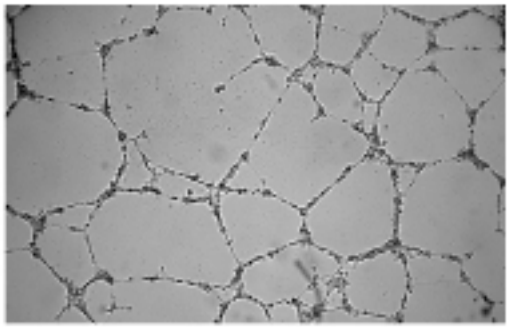
Saggi di angiogenesi in vitro

Si utilizzano comunemente cellule endoteliali umane derivate da cordone ombelicale
Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC



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





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

LA RICERCA SUL CANCRO

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

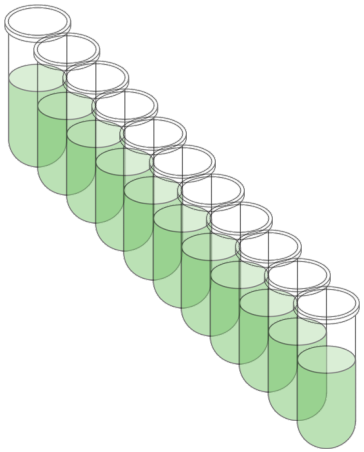
Diagnosi

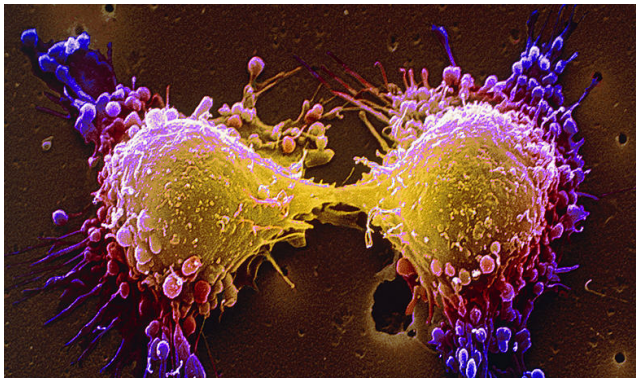
Risposta
alle terapie già in uso

Nuove
terapie mirate

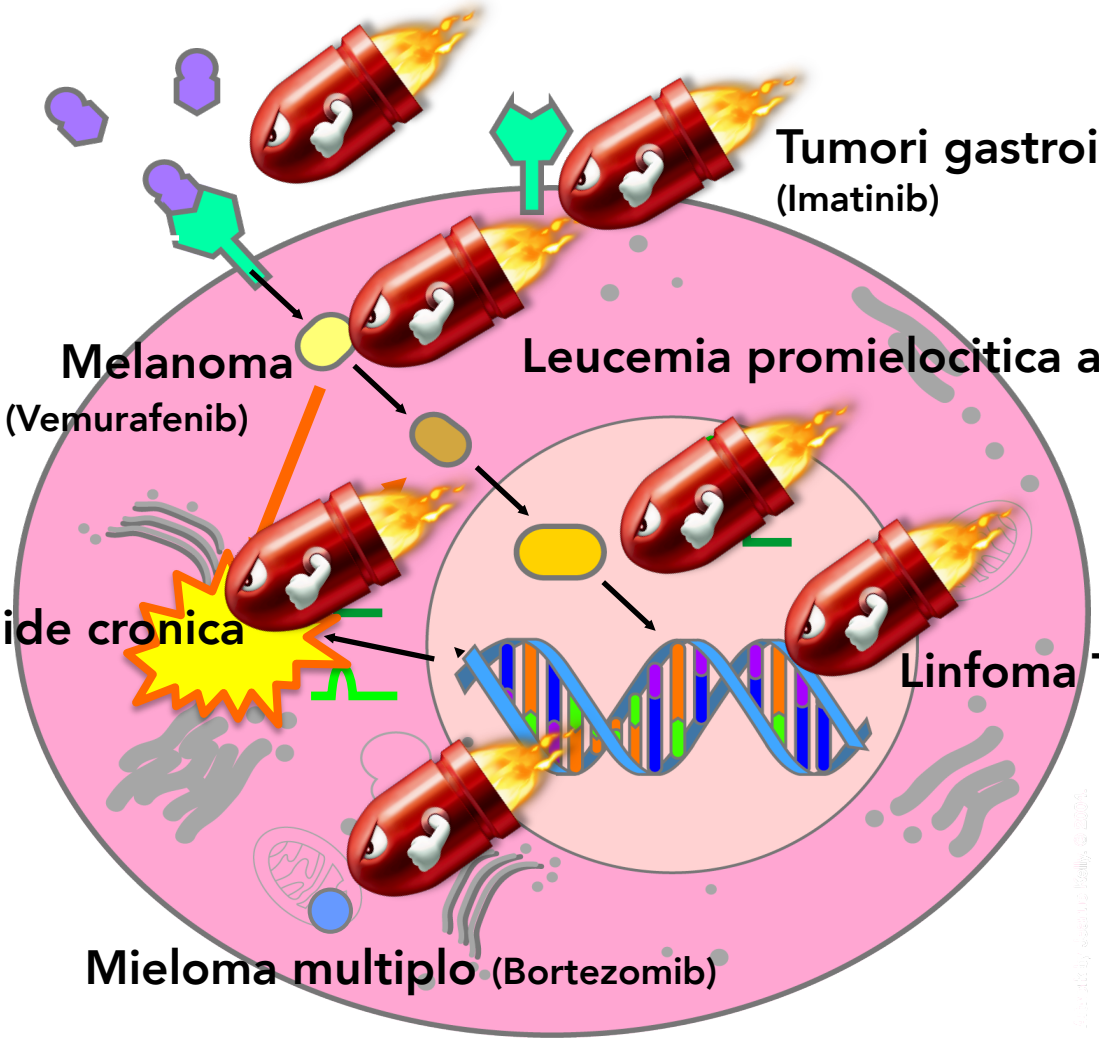
LA MEDICINA DI PRECISIONE

Molecola o processo bersaglio → Selezione o disegno di farmaci a bersaglio molecolare → Effetti su specifici processi biologici alterati





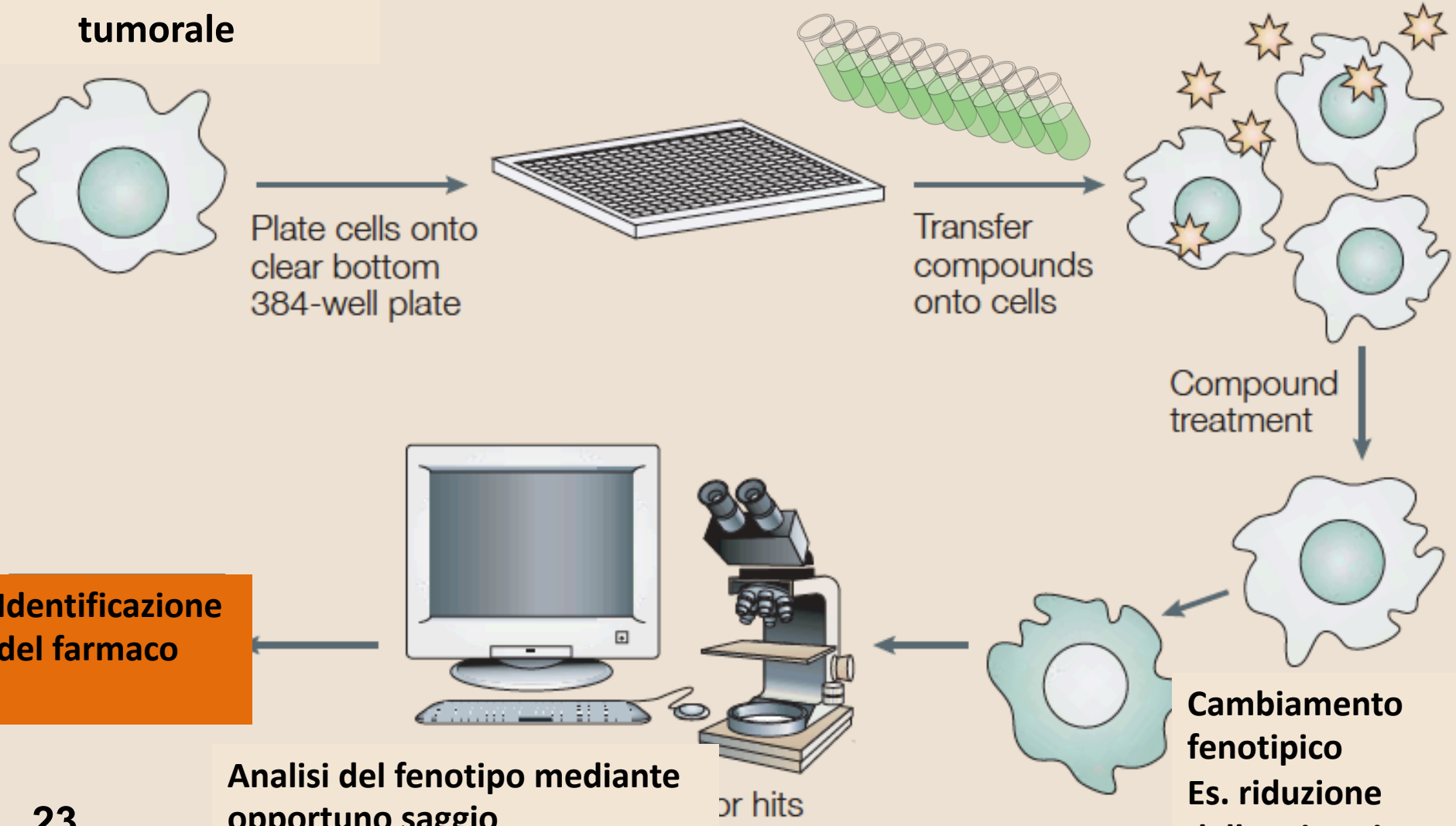
FARMACI DI PRECISIONE nelle terapie antitumorali



Screening FUNZIONALI per nuovi farmaci

Modello cellulare tumorale

Libreria di farmaci

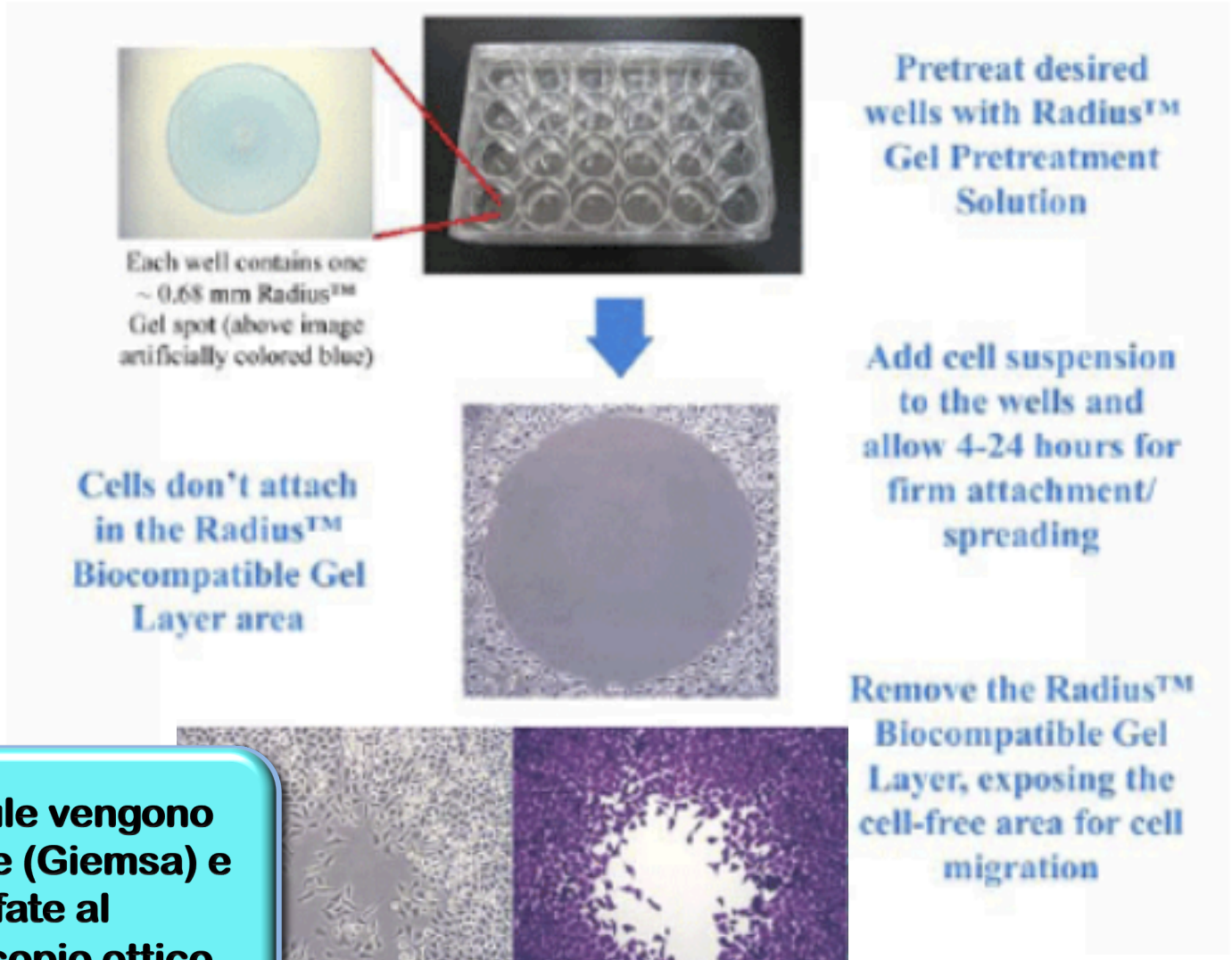


Identificazione del farmaco

Analisi del fenotipo mediante opportuno saggio

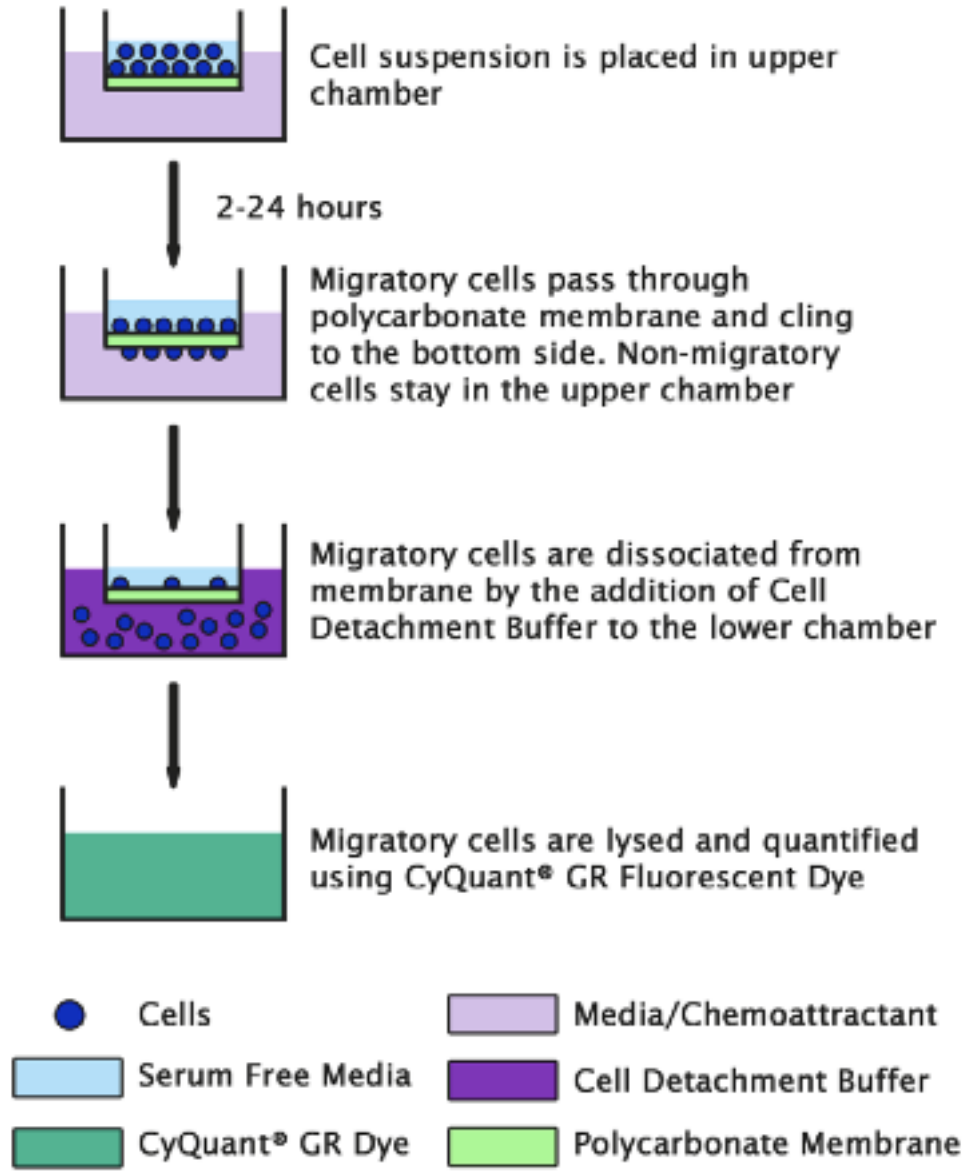
Cambiamento fenotipico Es. riduzione della migrazione

Saggi di migrazione in piastra multipozzetto con lettura automatizzata al microscopio ottico/plate reader



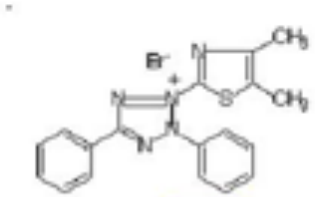
Le cellule vengono colorate (Giemsa) e fotografate al microscopio ottico

Saggi di transwelling (Boyden) in piastra multipozzetto con lettura fluorimetrica



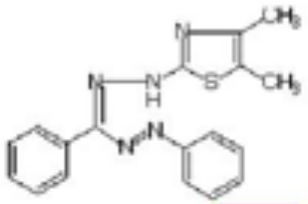
Saggi di vitalità cellulare (MTT assay)

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



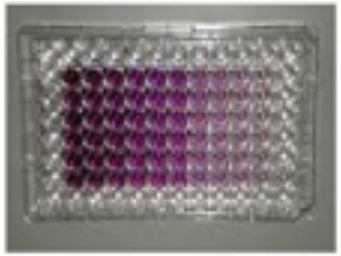
MTT **yellow**

Live cells → Mitochondrial reductase present → converts



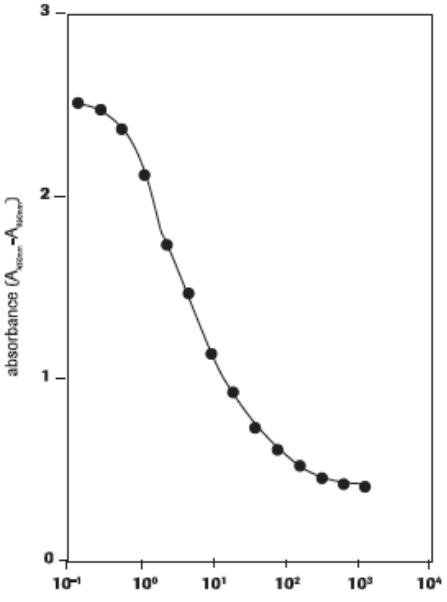
MTT formazan **violet**

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



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

MTT test at different concentrations

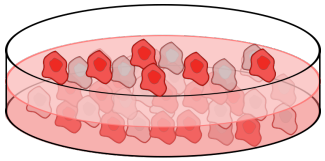


Farmaco X

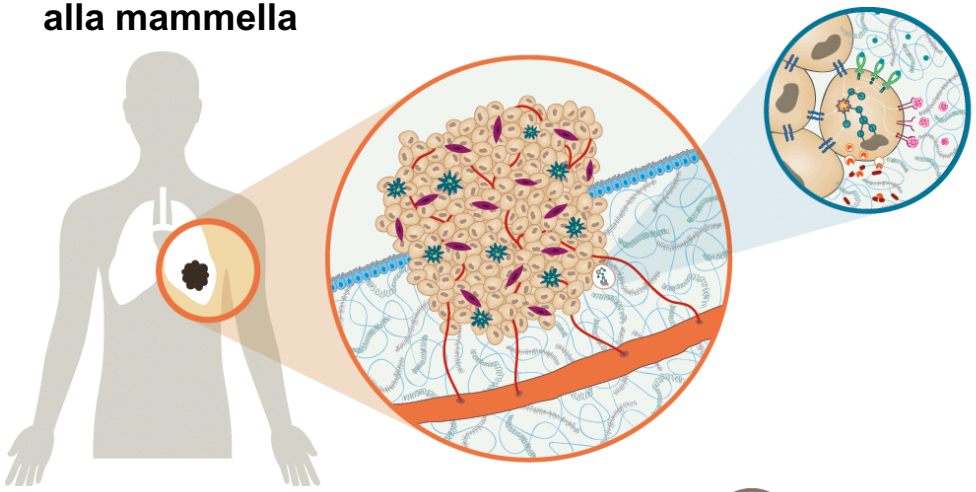
Il riposizionamento dei farmaci

Farmaci approvati da EMA/FDA e commercializzati per qualsiasi malattia

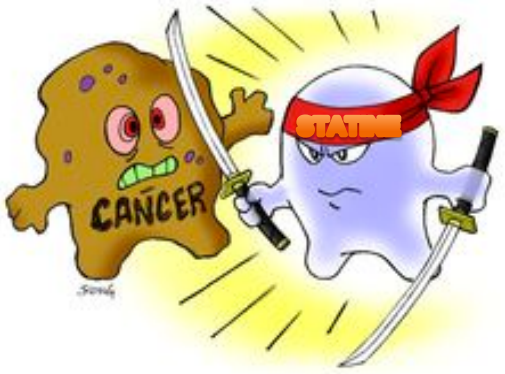
Testare in vitro l'efficacia antitumorale dei farmaci



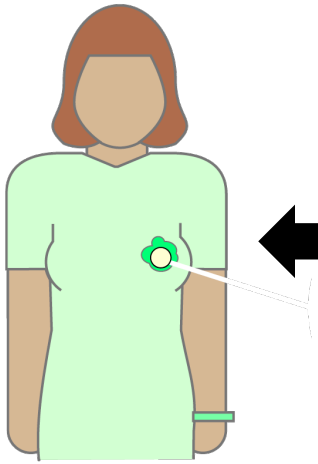
Paziente con tumore alla mammella



Es. Identificazione delle statine (anticolesterolemici) come potenziali farmaci antitumorali



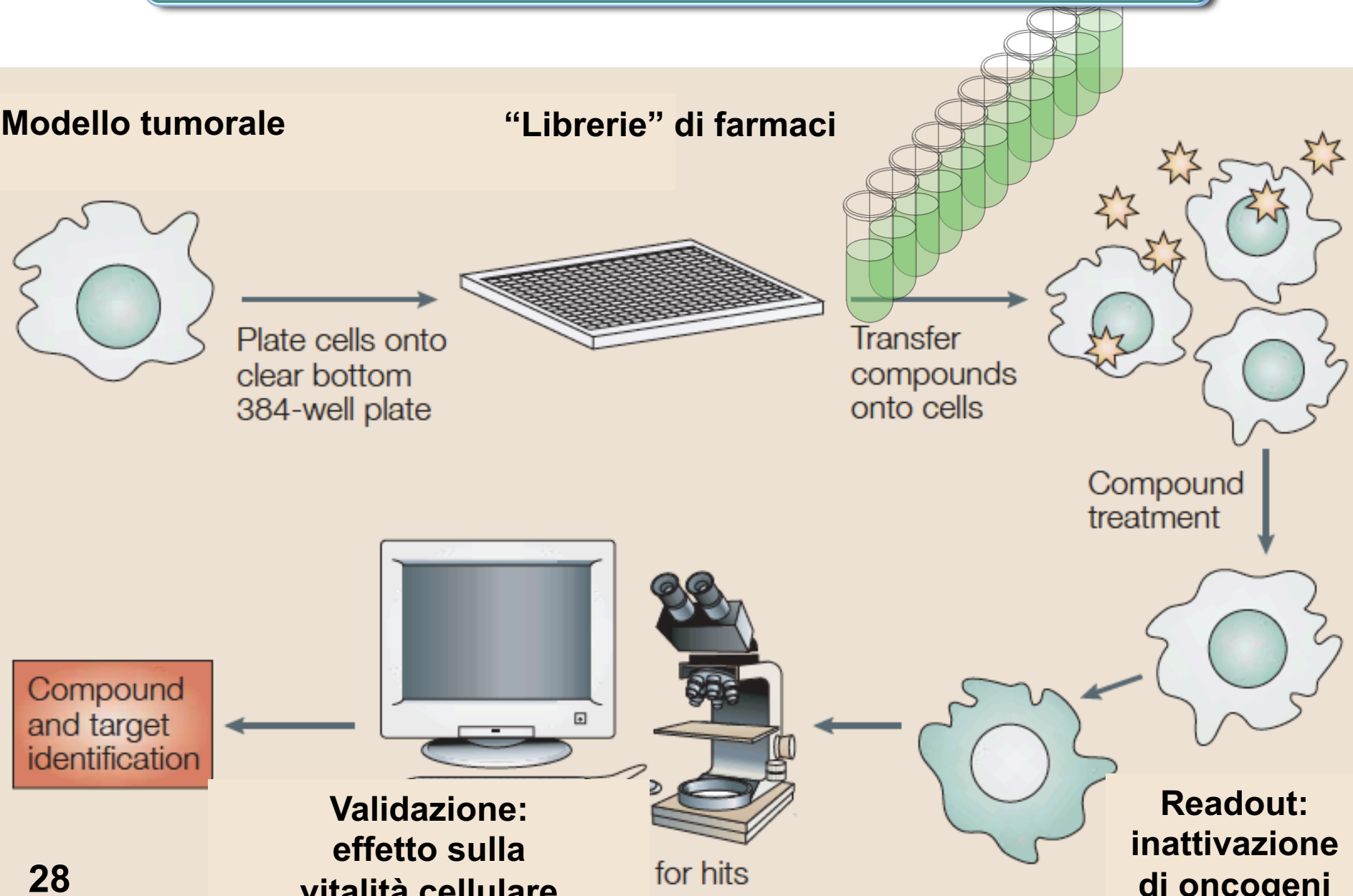
Trial clinico per l'efficacia delle statine in pazienti con tumore al seno in combinazione con le terapie standard



Screening per il riposizionamento di farmaci

Modello tumorale

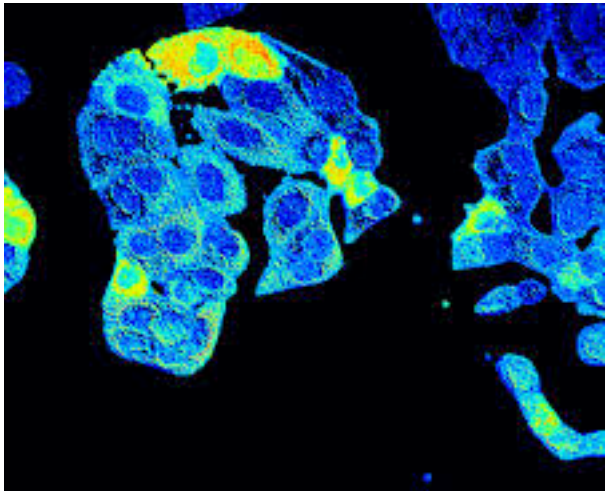
“Librerie” di farmaci



Validazione: effetto sulla vitalità cellulare

Readout: inattivazione di oncogeni

High content screening systems



Next generation confocal high content screening system, designed to reliably discriminate phenotypes of complex cellular models, such as primary cells and 3D microtissue, **integrated with automated microplate loader and liquid handling robot station** for automated transfection of cells in 96- and 384-well microplates and assay preparation

Saggi di tumorigenicità in vivo

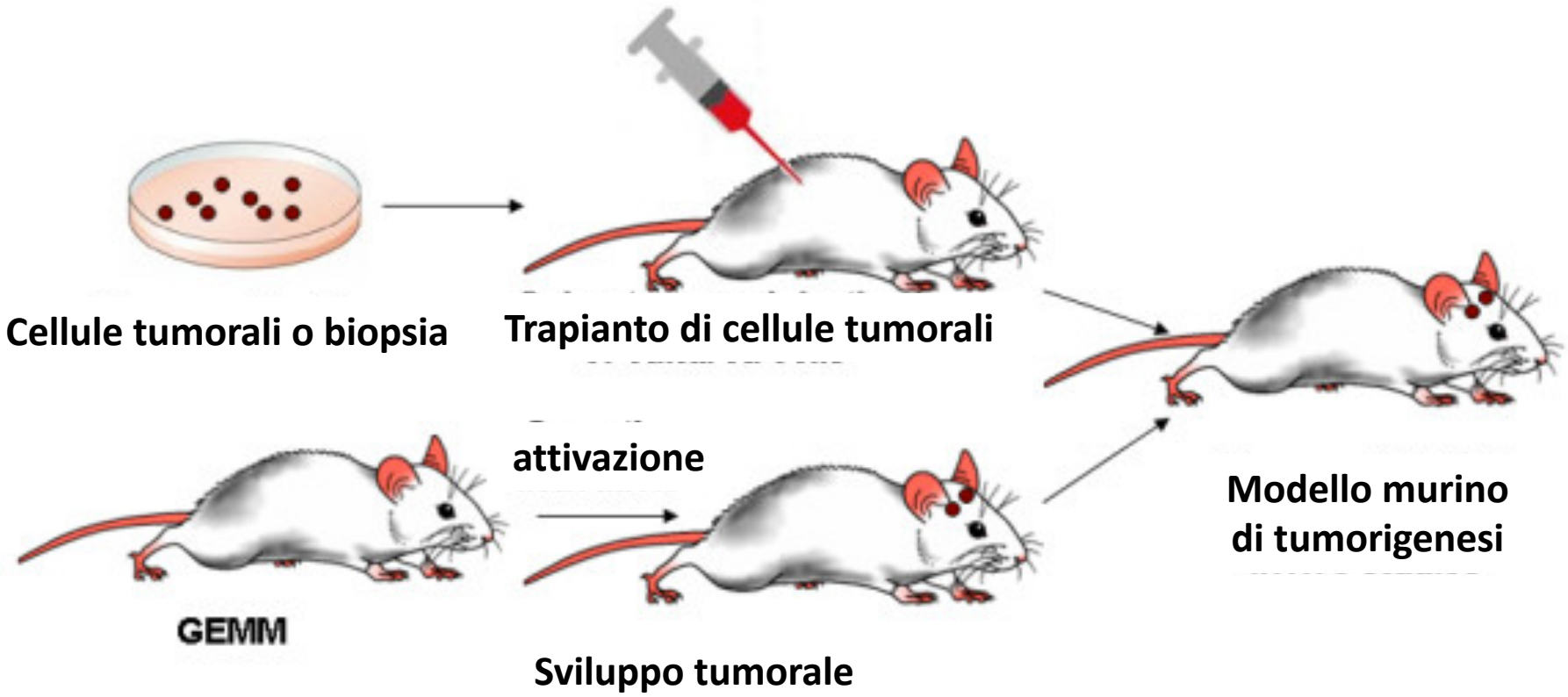
Scopi:

i. **Comprendere il contributo di un gene/processo/condizione alla progressione tumorale nel contesto di un organismo complesso**

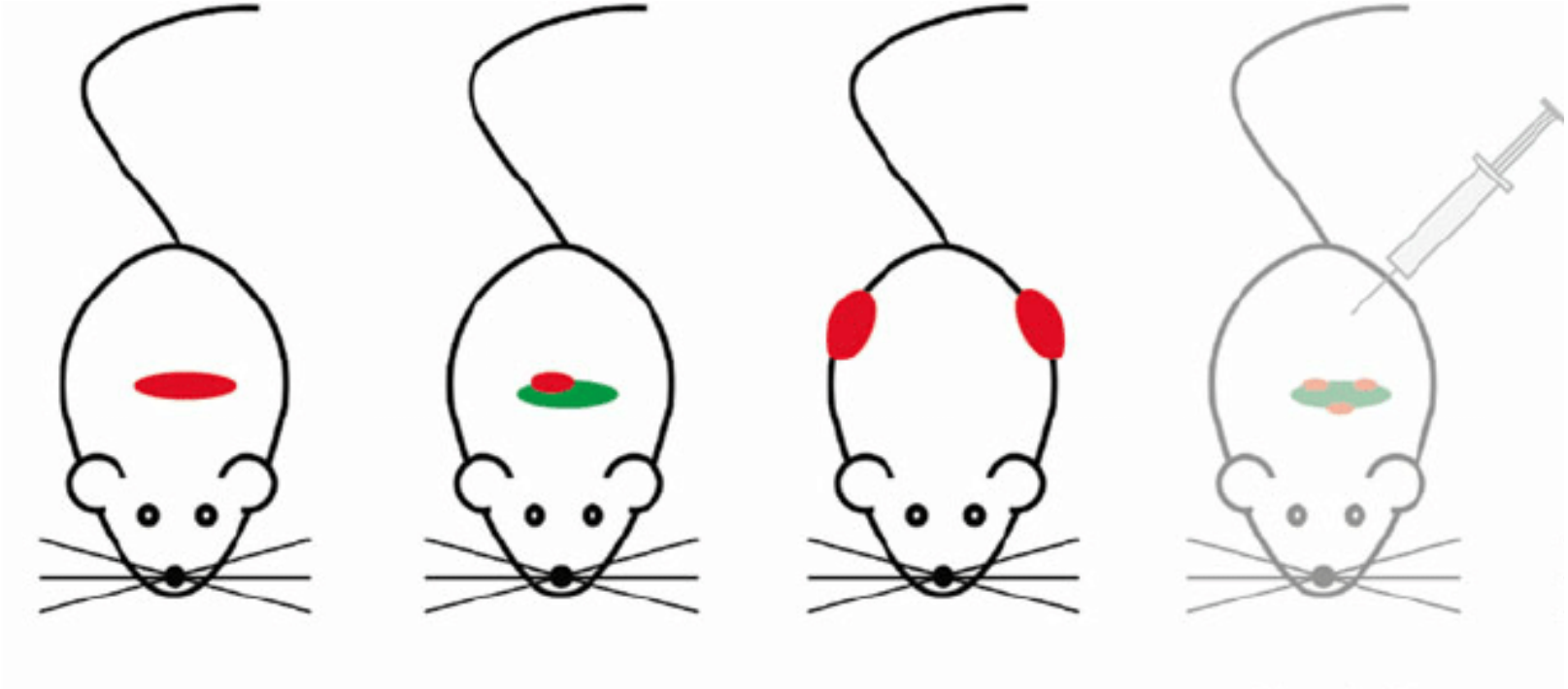
ii. **Verificare l'efficacia di una terapia in vivo in diversi stadi dell'evoluzione tumorale (bersaglio- farmaco)**

iii. **Sperimentazione preclinica di farmaci:**
- **tossicità,**
- **formulazione-somministrazione,**
- **immunogenicità,**
- **farmacocinetica (assorbimento, biodistribuzione, metabolismo),**
- **farmacodinamica (curve dose-risposta farmacologica),**
- **scaling interspecie.**

Saggi di tumorigenicità in vivo



Modelli murini di tumorigenesi



Genetic Engineered Mouse (GEM)

Orthotopic

Subcutaneous

Trapianto di cellule/biopsie tumorali

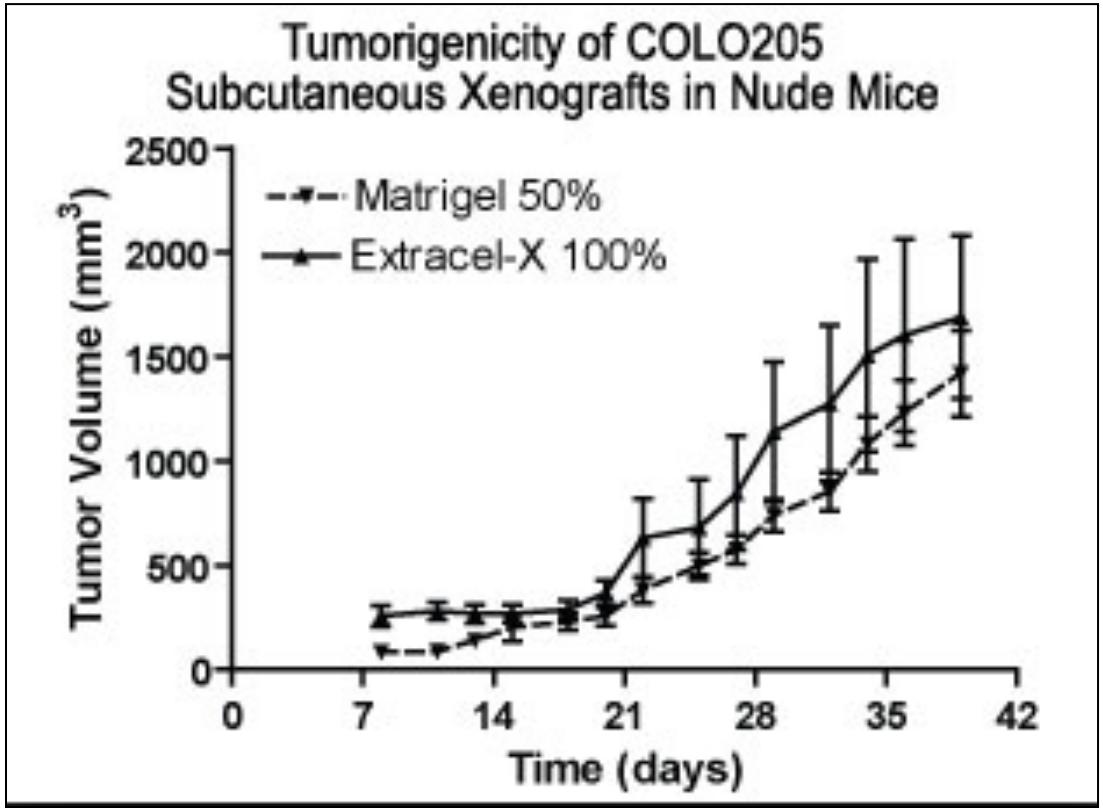
Disseminazione metastatica
Iniezione iv

Saggi di tumorigenicità in vivo

-Saggi di tumorigenicità

-Saggi di disseminazione e colonizzazione metastatica

-Studi molecolari e farmacologici



Regolamentazione della sperimentazione animale

1) È effettuata **solo quando** rappresenta il modello più appropriato per **confermare** ipotesi formulate in base a sperimentazioni in vitro/ex vivo.

2) Lo stesso modello potrà essere utilizzato successivamente per testare **terapie** basate sui risultati ottenuti.

Legislazione EU

Declaration:

I have obtained the **clearance from the Ministry of Health** to carry out the described animal experimentation.

All experiments with mice will be conducted in accordance with **laws and regulations that control experiments and procedures in Italy,** following the Directive 2010/63/EU actualized by the Italian EU member state starting from the Italian DL 26/2014.

The experiments described in the proposal will be performed following the **guidelines** described in: Wolfensohn S, Lloyd M: 'Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 4th Edition' (Wiley-Blackwell, 2013)

Il principio delle 3R

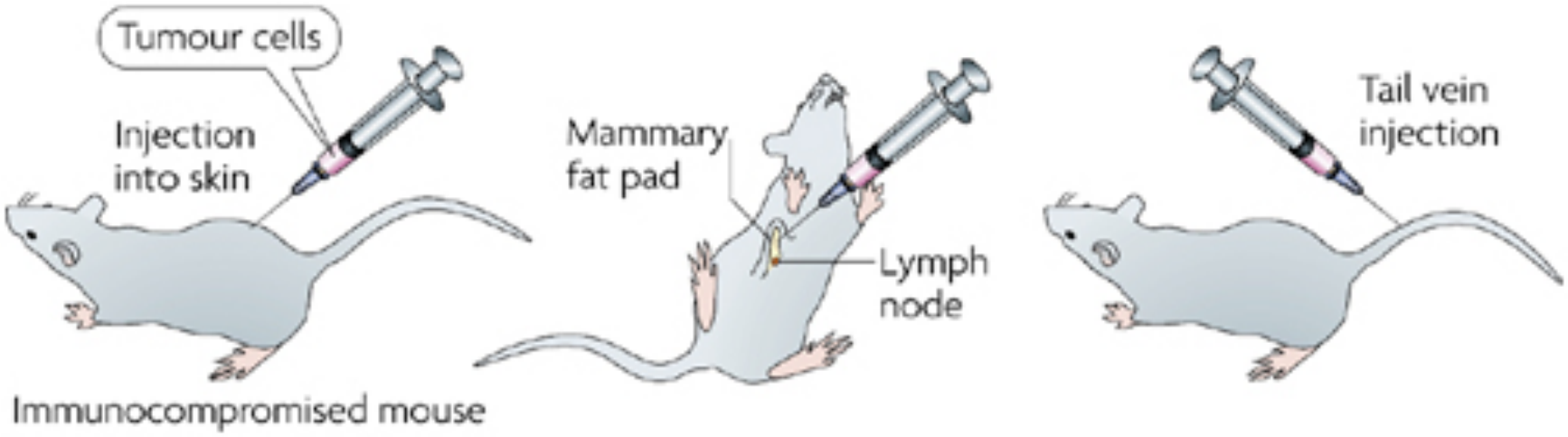
Replacement:
ove possibile, la sperimentazione animale va **sostituita** con la sperimentazione in vitro (colture cellulari), ex-vivo (es. organoidi) o al limite in vivo su altra specie con SN meno complesso.

Reduction:
mediante un uso accurato della statistica, si mira a **ridurre** il numero di **soggetti** utilizzati in un determinato protocollo sperimentale in modo da ottenere dati significativi evitando ripetizioni non necessarie.

Refinement:
gli animali vanno manipolati da personale esperto sotto controllo veterinario e devono essere attuate tutte le procedure che possono migliorare il **benessere animale** e ridurre la sofferenza (anestesia, analgesia, eutanasia).

Xenotrapianti di cellule tumorali (xenografts, PDX)

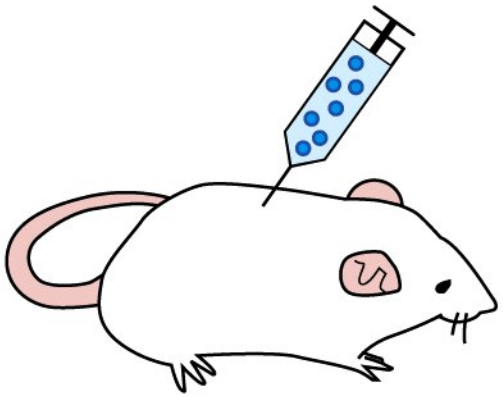
Trapianto sottocutaneo **Trapianto ortotopico** **Iniezione iv**



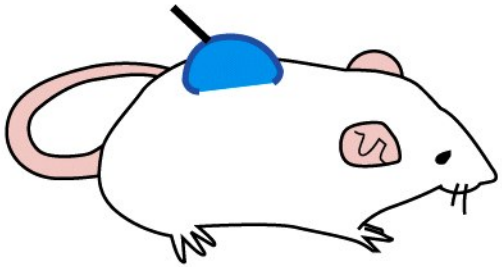
Nature Reviews | Cancer

Possono essere trapiantati sia cellule che frammenti di tessuto, tumori sperimentali o da pazienti (PDX: patient-derived xenografts).

Xenotrapianti di cellule tumorali (xenografts, PDX)



Formazione di un tumore



Modelli per il trapianto:

- animali immunodeficienti

- animali singenici

Ceppi murini immunodeficienti

I ceppi murini immunodeficienti appartengono a 4 categorie principali:

- "Nude" mice
- "Scid" mice
- "Rag-deficient" mice
- "Higher-order, multigenic" immunodeficient mice

Nude mice: topi atimici = T-cell deficient

“nude” mice are homozygous for the Foxn1nu, or “nude,” mutation. Foxn1 encodes a transcription factor required for both hair follicle and thymic development. In its absence, mice are both hairless and **athymic**.
Because the thymus fails to form, there is no place for CD4+ and CD8+ T cells to differentiate and mature, making nude homozygotes **T cell-deficient.**

SCID e RAG-deficient mice: mancano della maturazione dei linfociti B e T

"Scid" mice are homozygous for the Prkdcscid mutation. The gene Prkdc encodes the catalytic subunit of **DNA-dependent protein kinase** that is required for DNA repair and for sealing the double-stranded DNA breaks that occur during somatic recombination of **T cell receptor (TCR) and immunoglobulin (Ig) genes**. In the absence of Prkdc protein, TCR and Ig genes **cannot rearrange**, resulting in mice that are **both T and B cell deficient**.

"Rag-deficient" mice are mice that fail to express functional Rag1 or Rag2 proteins. Like the Prkdc gene, both Rag1 and Rag2 are required for somatic recombination of TCR and Ig genes, and the absence of either gene results in **T and B cell deficiency**.

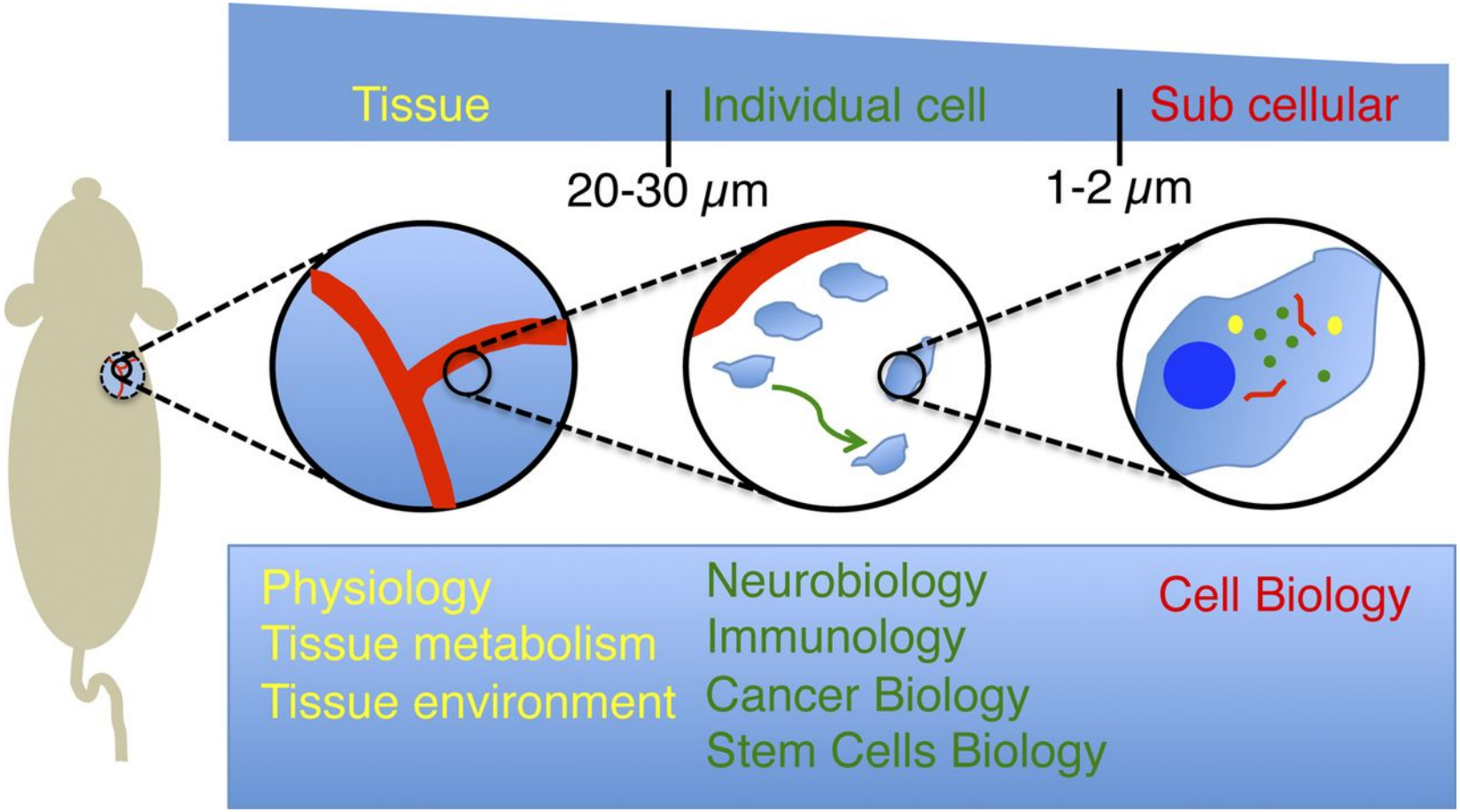
Finally, "higher-order, multigenic" immunodeficient mice are constructed from either Prkdcscid or Rag-deficient mice, and carry **additional** immunodeficiency-enhancing mutations. These mice are **B, T and NK cell deficient**. Additionally, they are hemolytic **complement-deficient** and carry alleles that adversely affect **macrophage and dendritic cell** functions.

analisi NON INVASIVA
dello sviluppo e progressione tumorale

Imaging in vivo mediante microscopia a fluorescenza intravitale

Imaging in vivo di bioluminescenza (BMI) mediante reporter

Imaging in vivo mediante microscopia a fluorescenza intravitale



Roberto Weigert et al. J Cell Biol 2013;201:969-979

Spatial resolution and current applications of intravital microscopy.

IVM provides the opportunity to image several biological processes in live animals at **different levels of resolution**.

Low-magnification **objectives (5–10 ×) enable visualizing tissues** and their components under physiological conditions and **measuring their response** under pathological conditions. Particularly, **the dynamics of the vasculature** have been one of topic most extensively studied by IVM.

Objectives with **higher magnification (20–30 ×)** have enabled imaging the **behavior of individual cells over long periods of time**. This has led to major breakthroughs in fields such as neurobiology, immunology, cancer biology, and stem cell research.

Finally, the recent developments of strategies to minimize the motion artifacts caused by the heartbeat and respiration combined with high power **lenses (60–100 ×)** have opened the door to image subcellular structures and to study cell biology in live animals.