

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Parte applicata

Lezione 3

Turno1

Cognome	Nome
Antonini	Elena
Czapla	Karolina
Gallon	Giulia
Kilin	Vasily
Moro	Giada
Moro	Moira
Piccoli	Giorgia
Salina	Gaia

Turno 2

Cognome	Nome
Azzoni	Caterina
Callegari	Ester
Codotto	Gabriele
Cossio	Enrico
Dalla Santa	Chiara
Guglielmi	Marco
Kersikla	Tena
Lissoi	Irwin Burian
Mio	Luca
Namor	Federica
Pizzioli	Edoardo
Rossi	Viviana
Valcozzena	Irene

TURNO 1			
1 PASSAGGIO DI CELLULE E MATURAZIONE DI SREBP			
ESPERIENZA 1A TURNO 1a 11/6 ORE 14-16 TURNO 1b 11/6 ORE 16-18	ESPERIENZA 1B 12/6 ORE 14-18	ESPERIENZA 1C TURNO 1a 15/6 ORE 10-12 TURNO 1b 15/6 ORE 12-14	
2 ATTIVITA' TRASCRIZIONALE DI SREBP			
ESPERIENZA 2A 18/6 ORE 14-17	ESPERIENZA 2B 19/6 ORE 14-18		
3 EFFETTO DI SREBP SULLA MIGRAZIONE			
ESPERIENZA 3A 25/6 ORE 14-18	ESPERIENZA 3B 26/6 ORE 14-18		



DICHIARAZIONE PER L'ACCESSO ALLE STRUTTURE UNIVERSITARIE

(e alle sedi convenzionate)

La/il sottoscritta/o _____ CF: _____

nata/o il ____ / ____ / ____ a _____ (____)

residente a _____ (____) via _____ n° _____

- Dipendente di questo Ateneo
- Collaboratore di questo Ateneo
- Studente/dottorando di ricerca/assegnista di ricerca di questo Ateneo
- Tirocinante presso sedi convenzionate
- Altro (specificare) studente di questo Ateneo partecipante a laboratori didattici in presenza

con sede presso la struttura edificio C1 laboratorio di Biologia DSV in via

via Valerio 6/1

DICHIARA

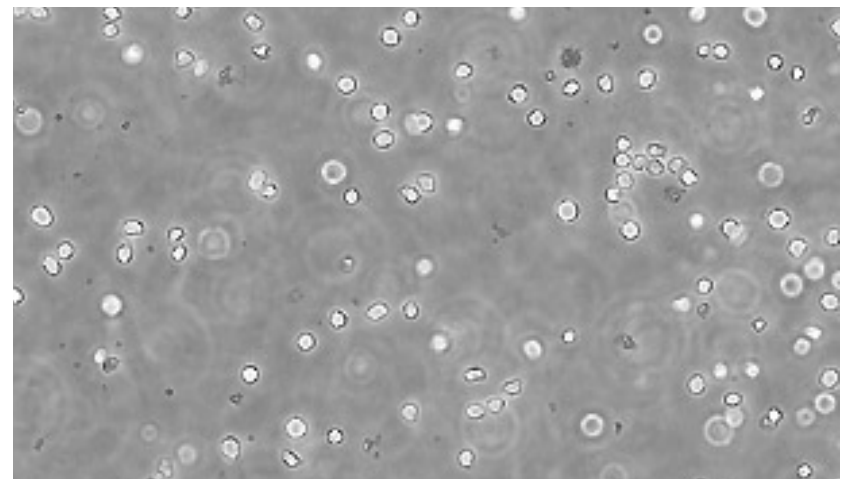
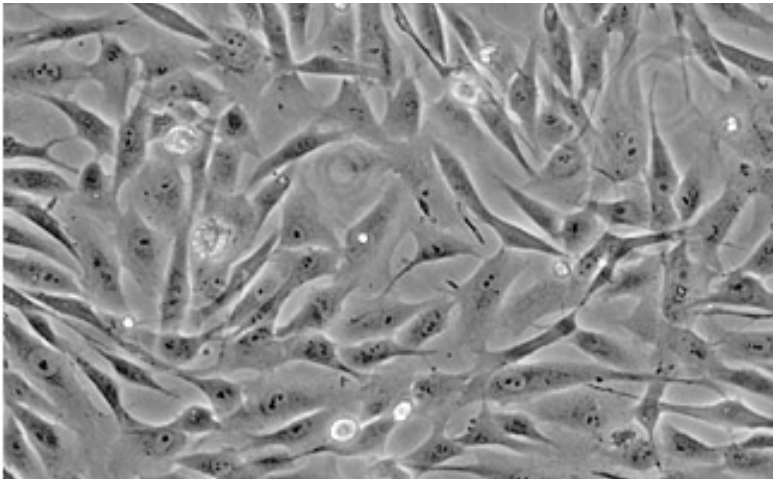
1. di accedere agli spazi universitari (o di sedi convenzionate) in data ____ / ____ / ____ oppure dal ____ / ____ / ____ al ____ / ____ / ____ (e precisamente nei giorni _____) per i seguenti motivi
partecipazione alle esercitazioni di laboratorio del corso di
2. di svolgere durante la permanenza presso le strutture dell'Università di Trieste (o di sede convenzionata – specificare quale) le sue attività esclusivamente nell'edificio C1
piano seminterrato stanza/laboratorio
lab biologia
3. di essere a conoscenza delle misure di contenimento del contagio da COVID-19 ad oggi in vigore, nonché delle relative sanzioni penali, ivi compresa quella per dichiarazioni mendaci;

ESERCITAZIONE #1: PASSAGGIO DI CELLULE IN CULTURA

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**

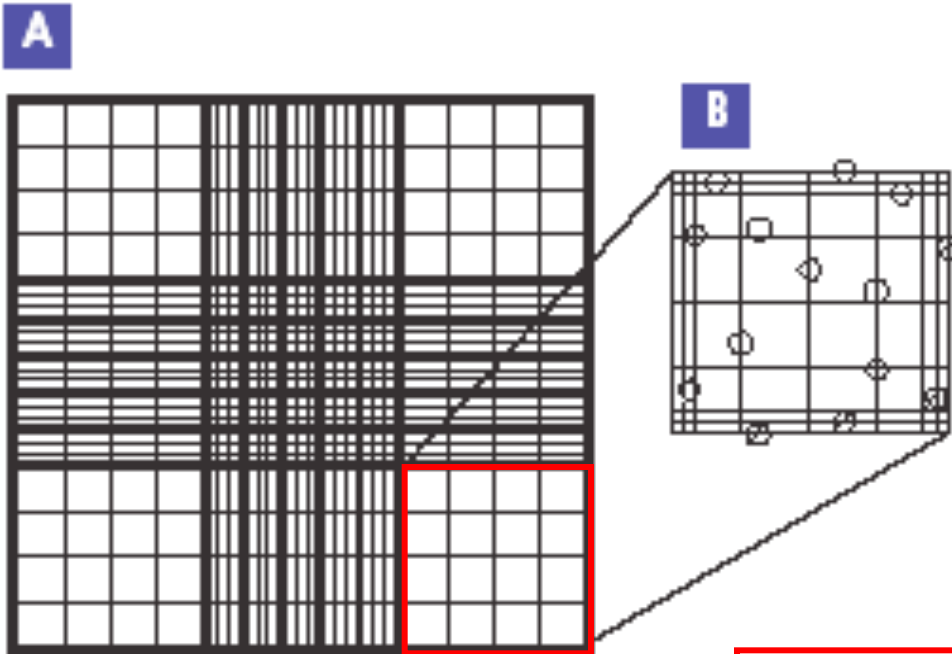
- 1 Prendere la flask contenente le cellule dall'incubatore, chiudere il tappo ed **osservare** il grado di **confluenza** delle cellule al microscopio
- 2 *Sotto la cappa a flusso laminare*, rimuovere il terreno e mettere nella flask 5 ml di **PBS (SOLUZIONE FISIOLÓGICA)** sterile per **lavare** via il terreno che contiene inibitori della tripsina.
- 3 Aspirare il PBS e mettere nella flask **1 ml** di **tripsina/EDTA**. 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**.



- 5 Mettere nella flask 4 ml di terreno completo 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**.

Conta delle cellule: 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 è determinata 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:

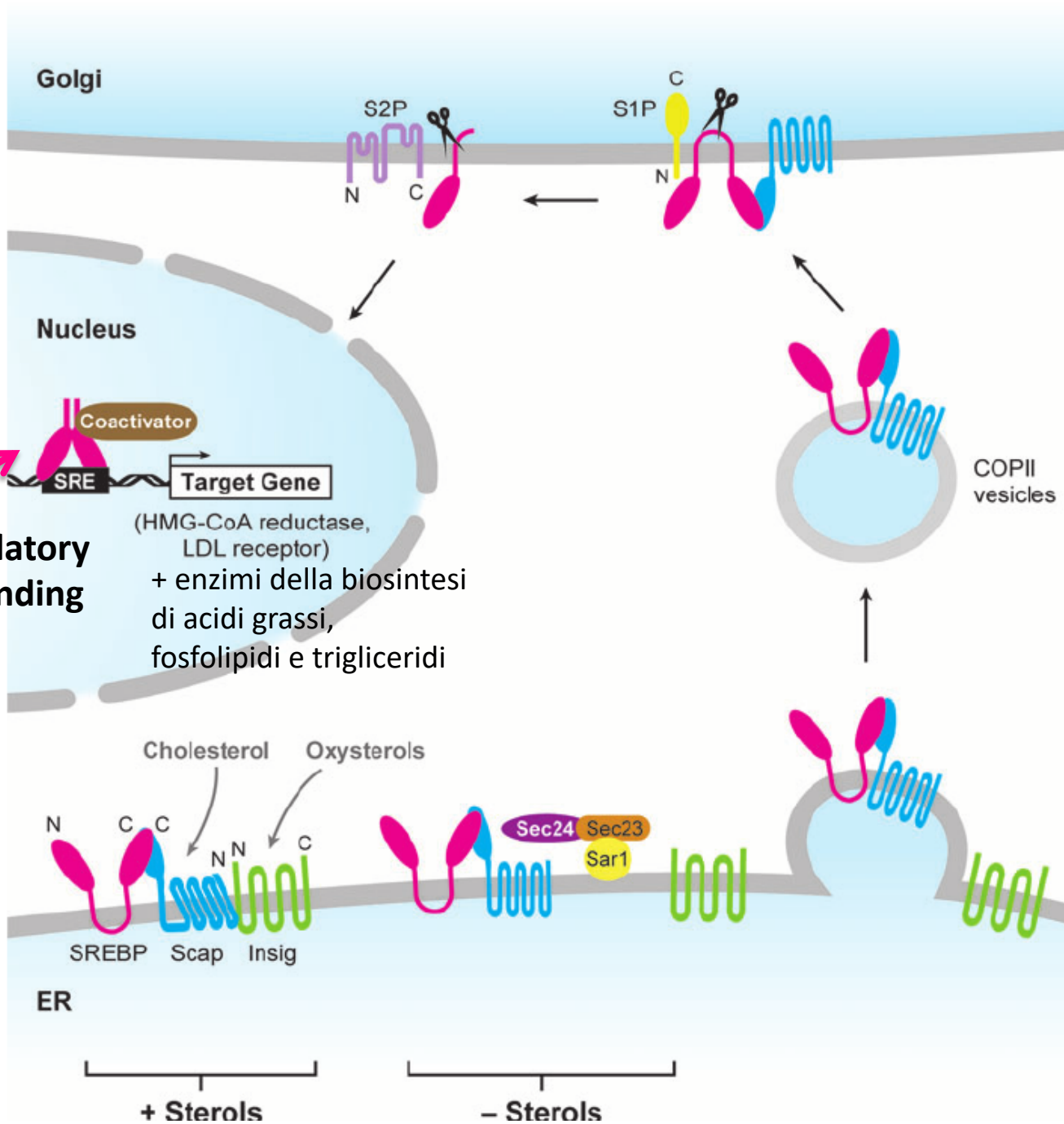
$$V_f \times C_f = V_i \times C_i$$

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

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

**PROGETTO DI RICERCA SPERIMENTALE
(ARTICOLATO IN 3 ESPERIMENTI)
PER LO STUDIO DELLA REGOLAZIONE, DELL'
ATTIVITA' E DELLA FUNZIONE BIOLOGICA
DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE SREBP1a**

Sterol regulatory element Binding Protein



Domande:

- 1. Come possiamo seguire sperimentalmente i cambiamenti nella localizzazione subcellulare delle proteine SREBP?**
- 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 e dei geni da essi regolati alla proliferazione e alla migrazione cellulare?**

Esperimento 1:

Visualizzare i cambiamenti nella localizzazione subcellulare della proteina SREBP1a

Step 1: clonaggio del cDNA di SREBP1a nel vettore di espressione pcDNA3 in fusione con il TAG HA (N-ter e C-ter)

**Step 2: mutagenesi del NLS di SREBP1a:
generazione del vettore di espressione SREBP1a Δ NLS**

Step 3:

trasfezione dei vettori di espressione in cellule in coltura e incubazione con terreni diversi



terreno Optimem

+ DNA
vettore di espressione

+ PEI
(polietilenimmina,
polimero cationico))

Vortex

10 min a TA

formazione
complessi
DNA



Aggiungere
i complessi
alle cellule

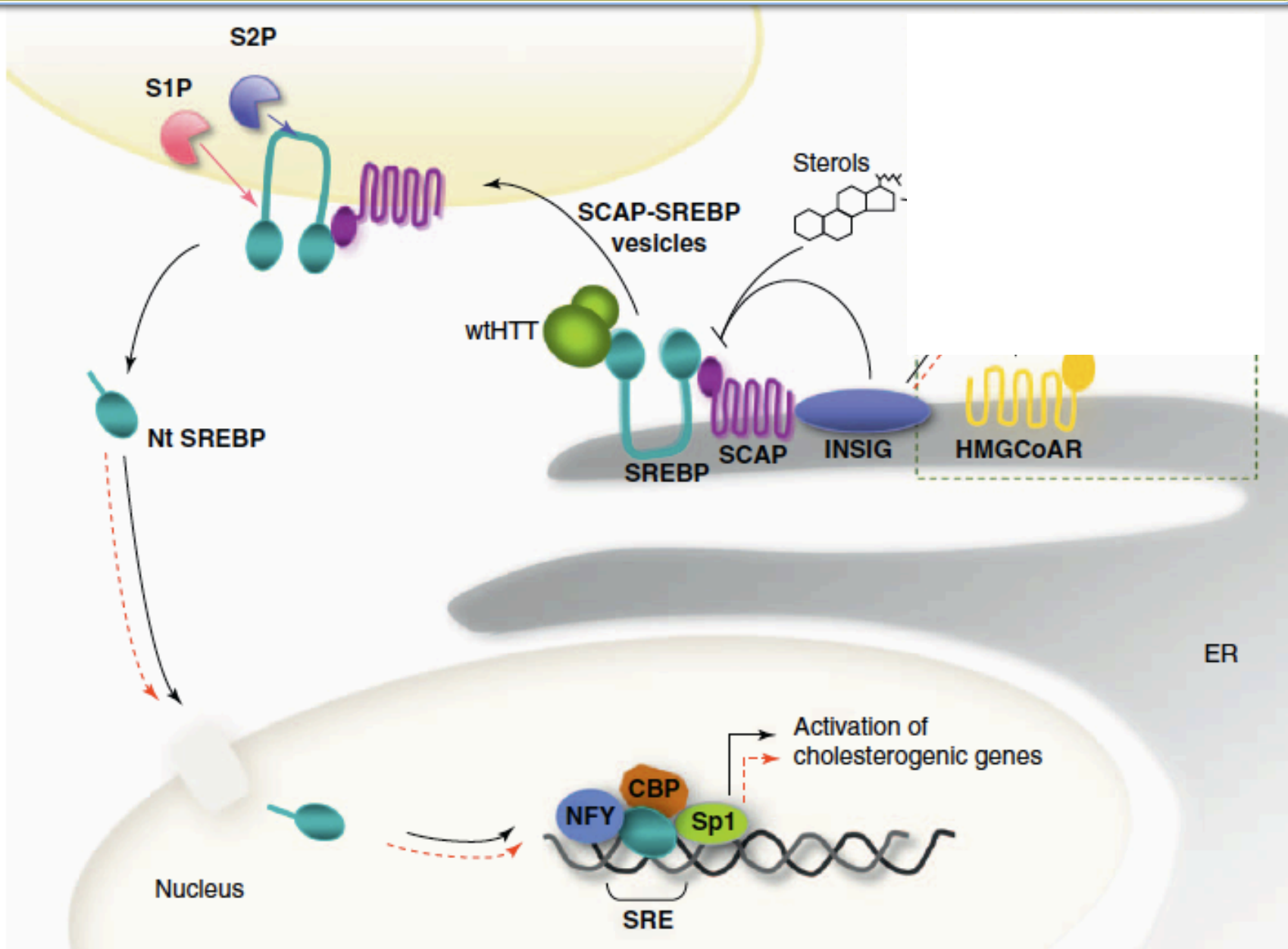
**Step 4: analisi mediante immunofluorescenza
(utilizzando un Ab primario specifico per il TAG HA)
della localizzazione di:**

- 1) SREBP1a-HA-NT in terreno completo
- 2) SREBP1a-HA-NT in terreno deprivato da lipidi
- 3) SREBP1a-HA-CT in terreno deprivato da lipidi
- 4) SREBP1a Δ NLS-HA in terreno deprivato da lipidi
- 5) COPB1
- 6) *Succinato deidrogenasi*

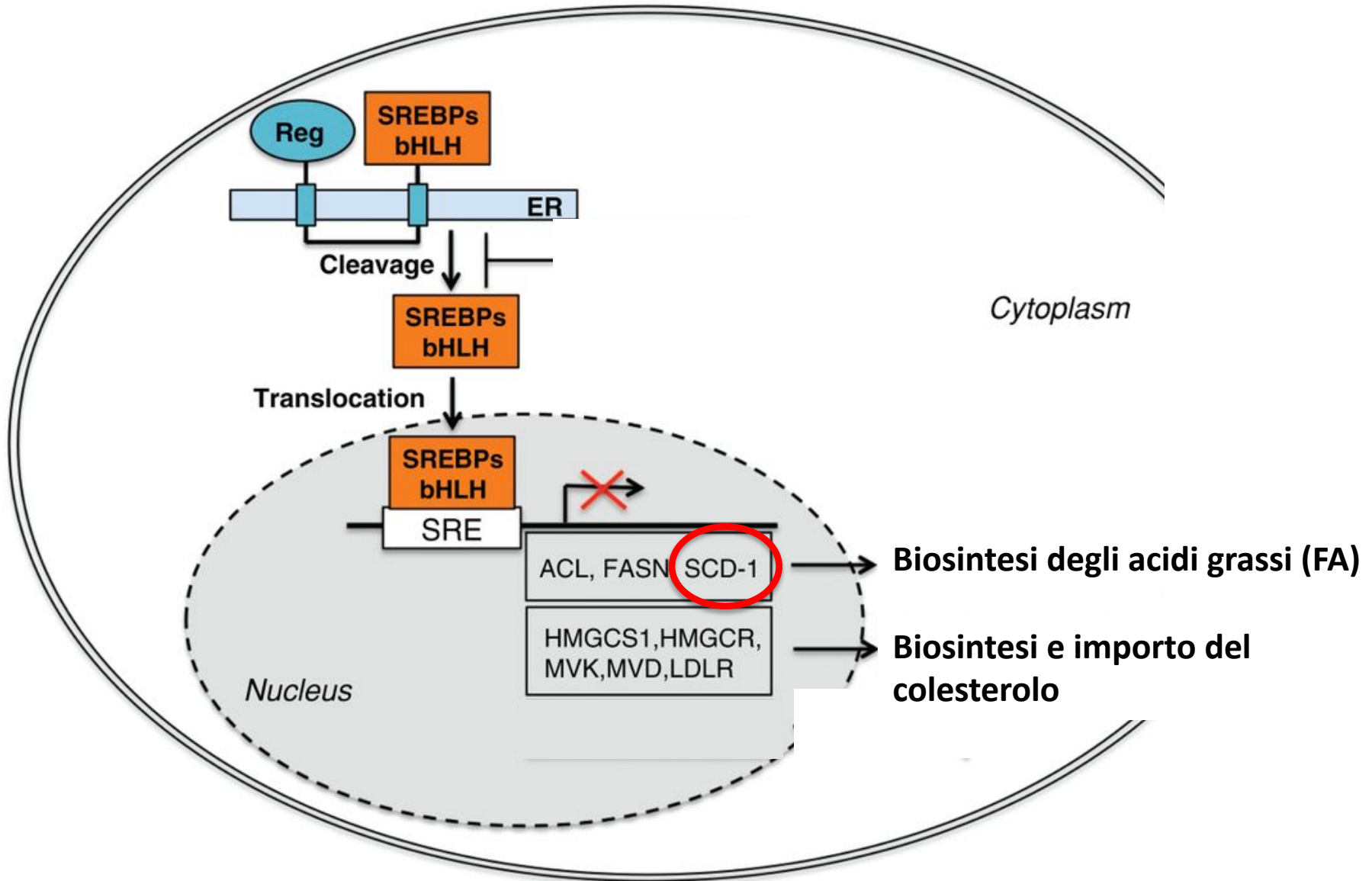
Esperimento 2:

**Studio del ruolo del coattivatore trascrizionale NF-Y
nell'induzione dei geni bersaglio di SREBP**

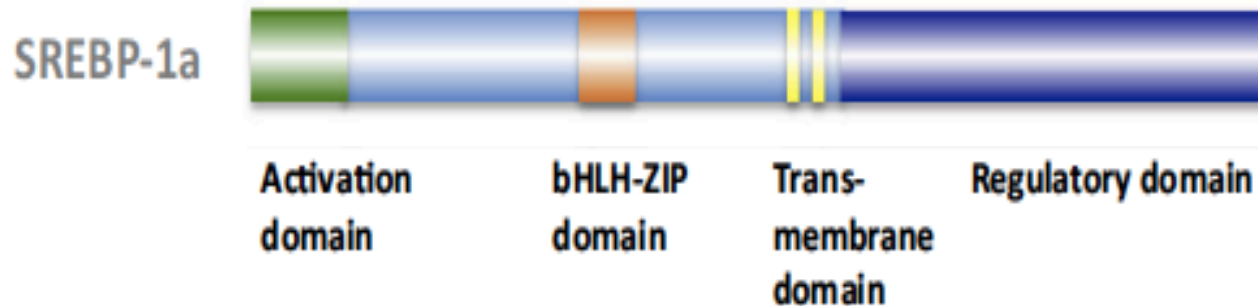
Ruolo del coattivatore NFY nell'induzione dei geni bersaglio di SREBP



Ruolo di SREBP nel metabolismo lipidico



Il fattore di trascrizione SREBP1a = sterol regulatory element binding protein 1a



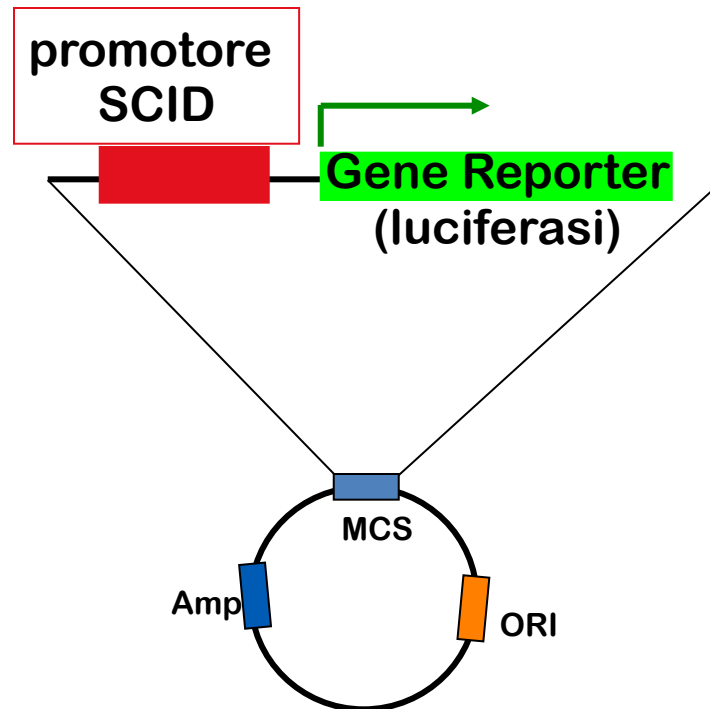
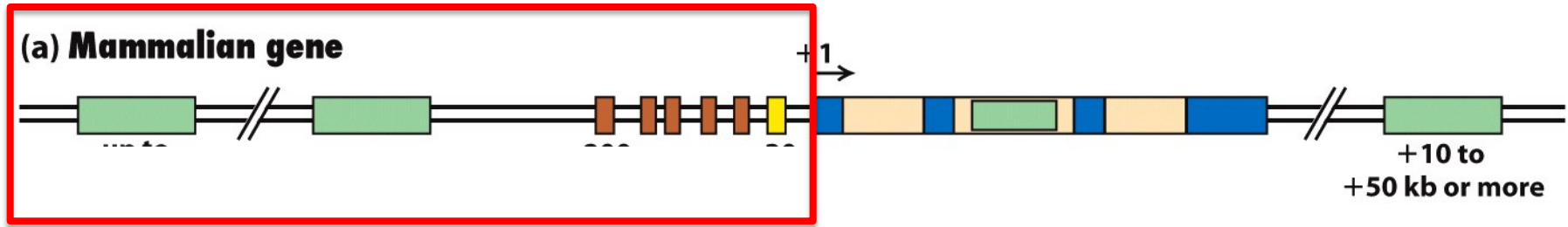
dominio di
attivazione
trascrizionale

dominio
di legame
al DNA

TRENDS in Pharmacological Sciences

- dominio di *legame al DNA* (sequenza-specifico)
- dominio di *trans-attivazione*
- *altri* domini (e.g. interazione proteina-proteina, interazione con ligandi, regolazione, etc.)

Step 1: clonaggio del promotore SCD1 a monte del gene reporter luciferasi



Schema dell'esperimento

1- livello BASALE

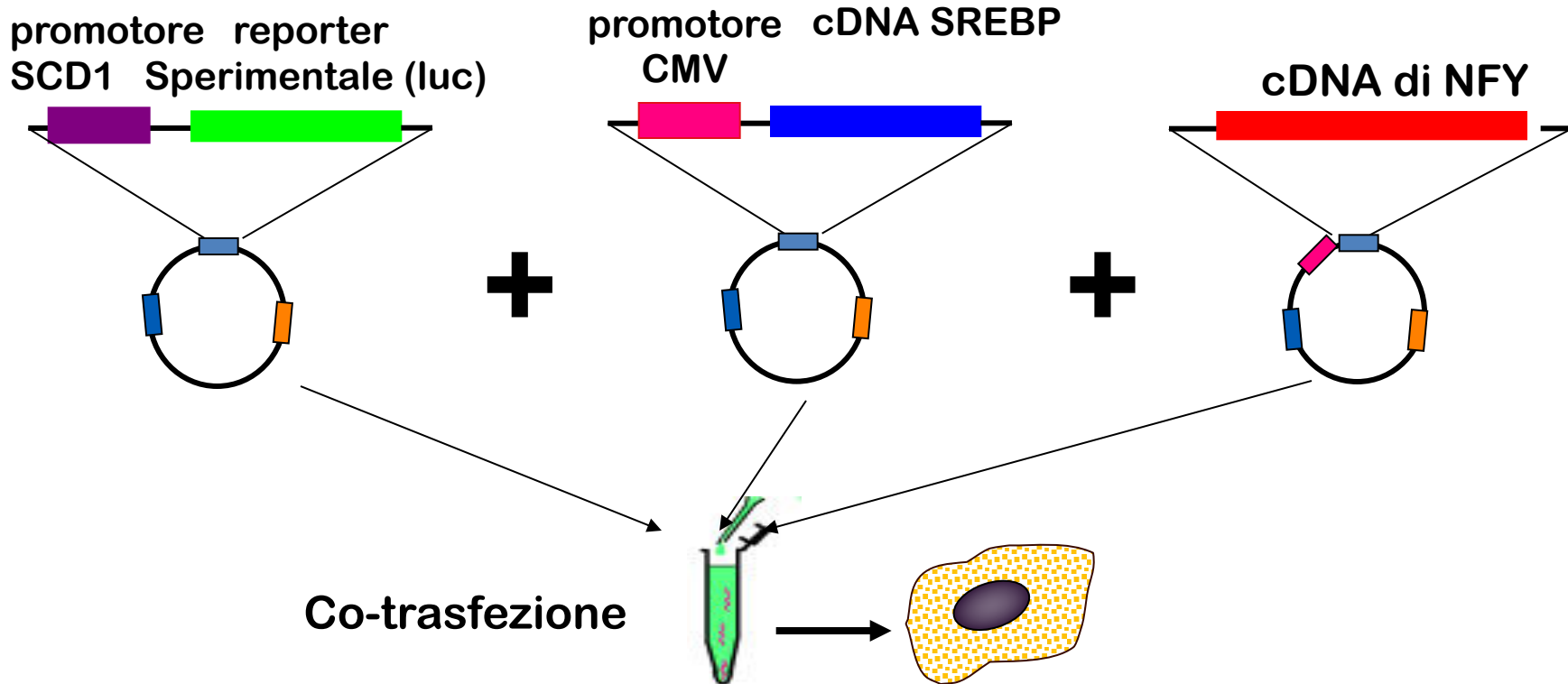
reporter pPROM-luc + vettore vuoto pcDNA3

2- effetto di SREBP1

reporter pPROM-luc + vettore pcDNA3-SREBP

3- contributo di NFY

reporter + pcDNA3-SREBP+ vettore pcDNA3-NFY



Step 2: clonaggio del cDNA di SREBP1a nel vettore di espressione pcDNA3 in fusione con il TAG HA

Step 3: clonaggio del cDNA di NFY nel vettore di espressione pcDNA3

Step 4: co-trasfezione dei vettori di espressione in cellule in coltura mediante lipofezione

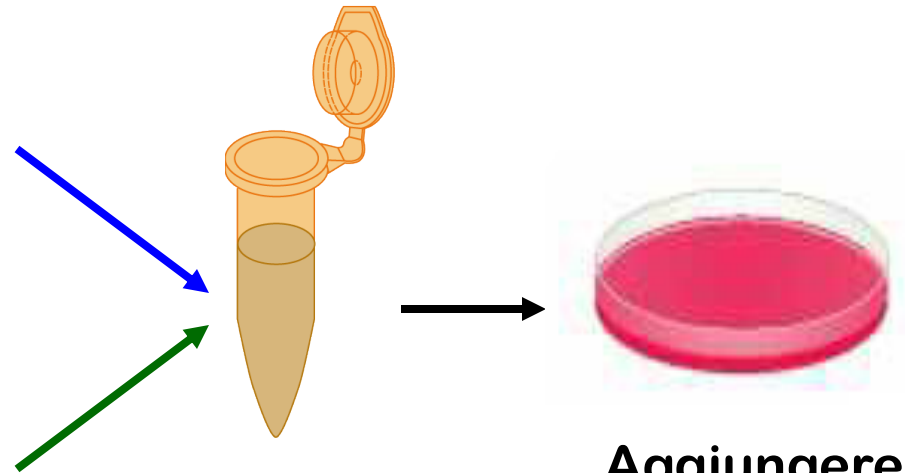
L: 10 min a TA

150 μ l terreno Optimem
+
2 μ l Lipofectamina



D: 10 min a TA

150 μ l terreno Optimem
+
DNA
= **reporter A (pPROMLuc)**
+ **reporter B (pCONRLuc)**
+ **vettori di espressione**

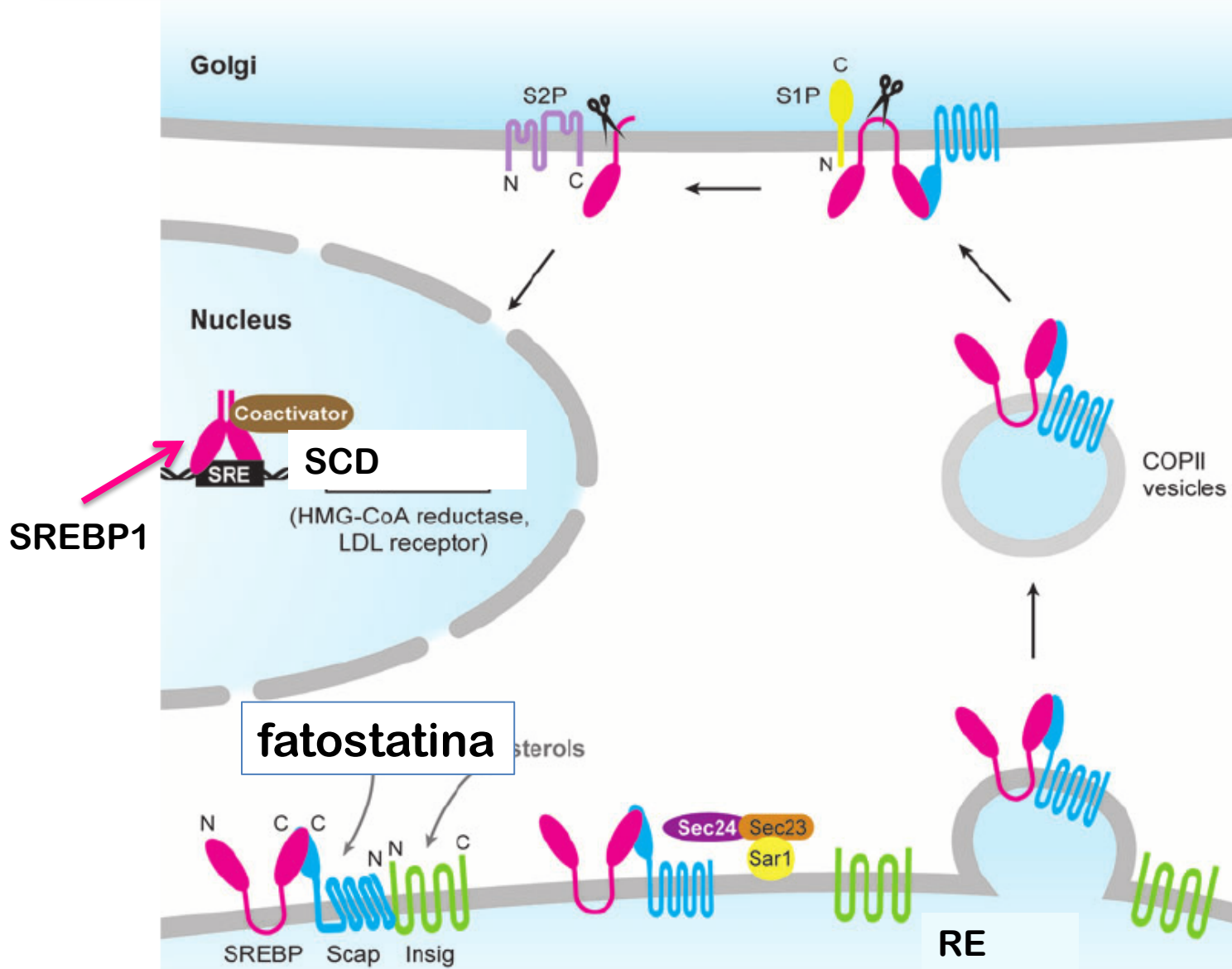


Mix L+D:
20 min a TA

formazione
complessi
LIPIDE-DNA

Aggiungere
i complessi
alle cellule

Step 5: controllo = trattamento con fatostatina (inibitore della traslocazione di SREBP1 al Golgi)



Step 6: utilizzo di un reporter di controllo per il confronto di diversi punti sperimentali

Saggi di transattivazione: confronto di TF1 e TF2

1- LIVELLO BASALE

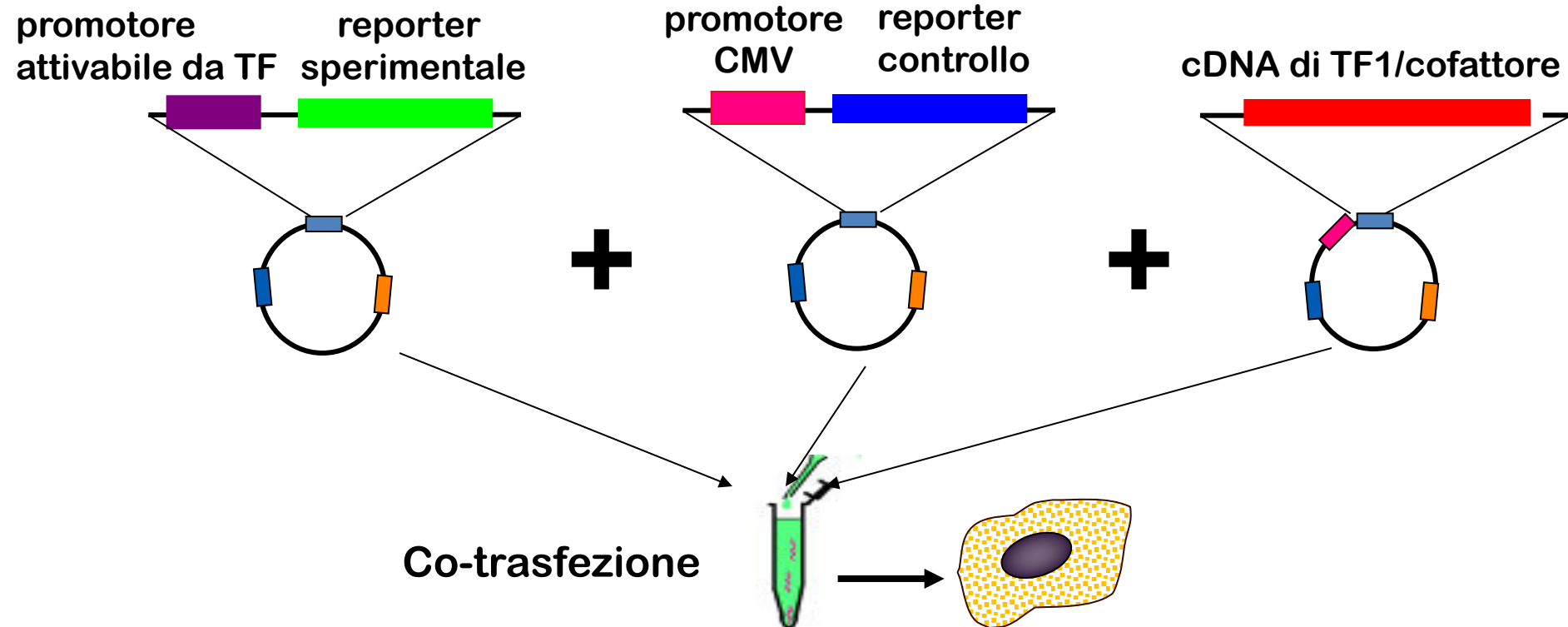
reporter sper.+ reporter controllo + vettore vuoto
(pPROM-luc) (pCON-Rluc) (pcDNA3)

2- effetto SREBP

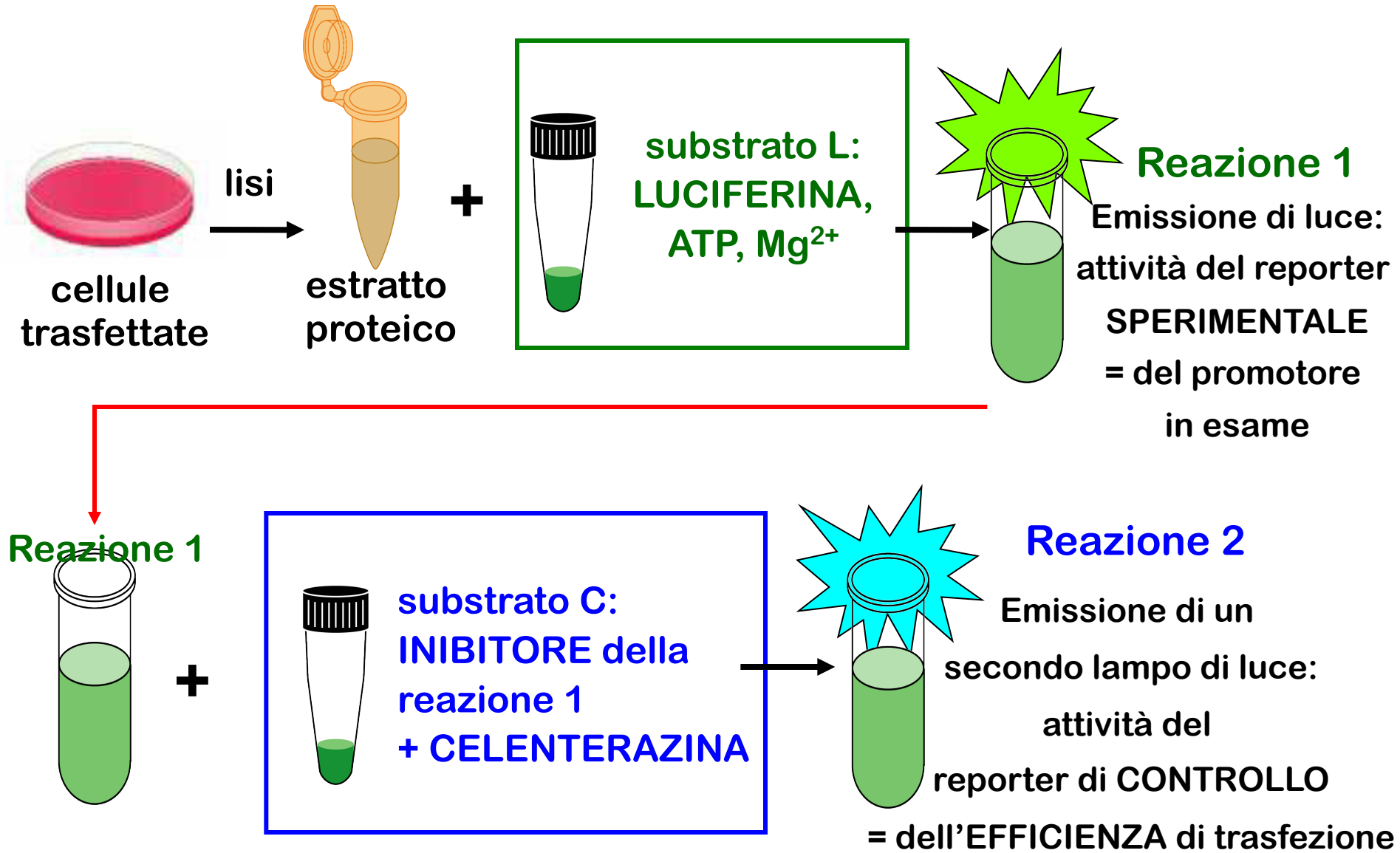
reporter sper.+ reporter controllo + vettore per SREBP

3- effetto SREBP + cofattore

reporter sper.+ reporter controllo + vettore per il cofattore



Doppio sistema reporter F-luc/R-luc: saggi di attività dei reporter



NORMALIZZAZIONE:

Se ho più campioni con efficienze diverse,
divido il valore misurato di ciascun campione
per la propria **efficienza** di trasfezione
(oppure per il valore letto per il reporter enzimatico)



Val. misurato 1 = 10/ efficienza 0,5

Val. corretto= 20



“ “ 2 = 20/ “ 0,5

Val. corretto= 40 (2x)



“ “ 3 = 20/ “ 0,25

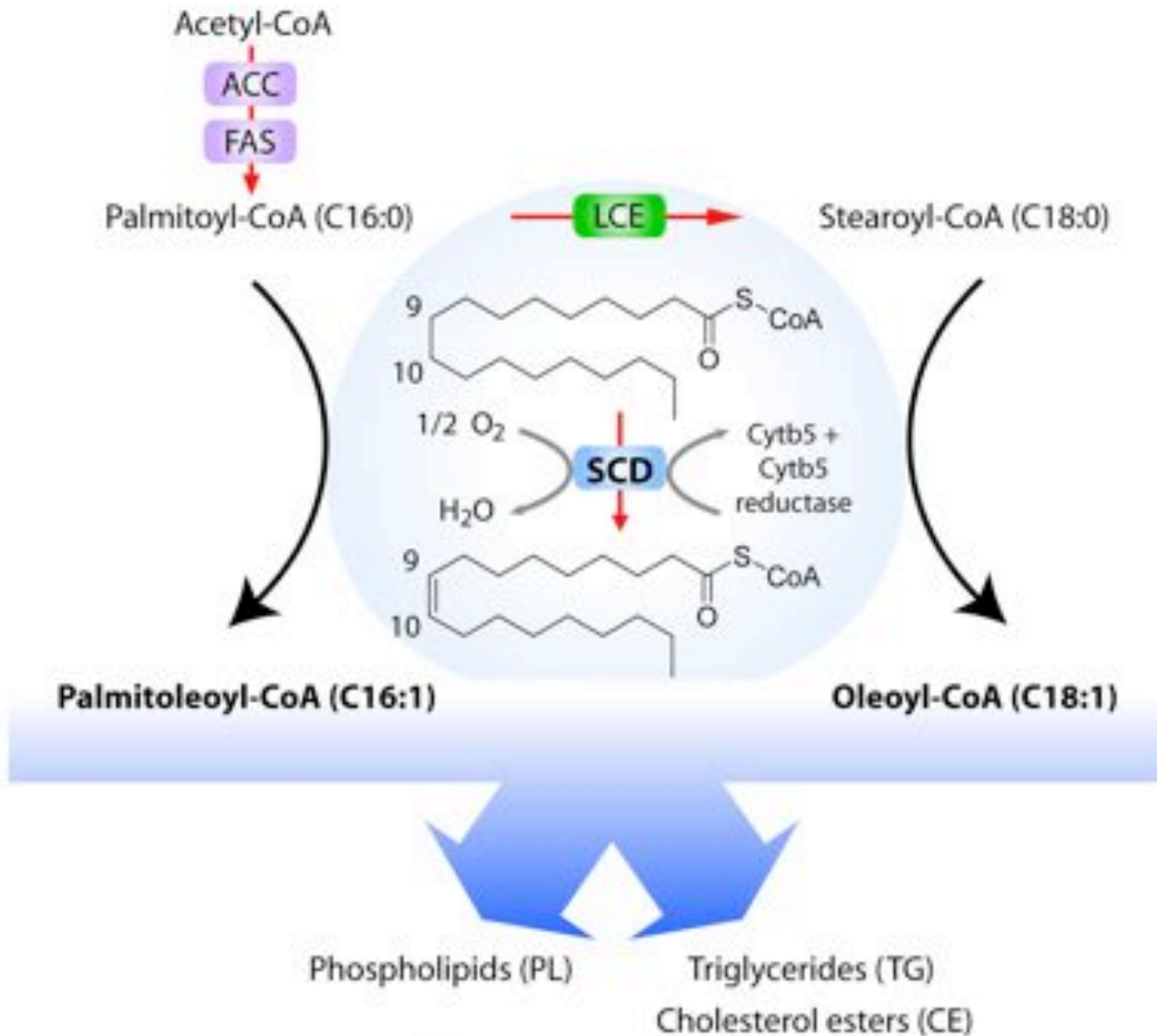
Val. corretto= 80 (4x)

Risultato: **TF1** attiva il promotore, aumentando la trascrizione
del reporter di **2 volte**

l'aggiunta del **cofattore** ha un'attività trascrizionale superiore, poichè
aumenta la trascrizione del reporter di **4 volte**.

Esperimento 3:
ruolo del gene bersaglio di SREBP
SCD1 nella migrazione cellulare

SCD1 è una desaturasi degli acidi grassi



La desaturasi SCD1 genera acidi grassi monoinsaturi (MUFA)

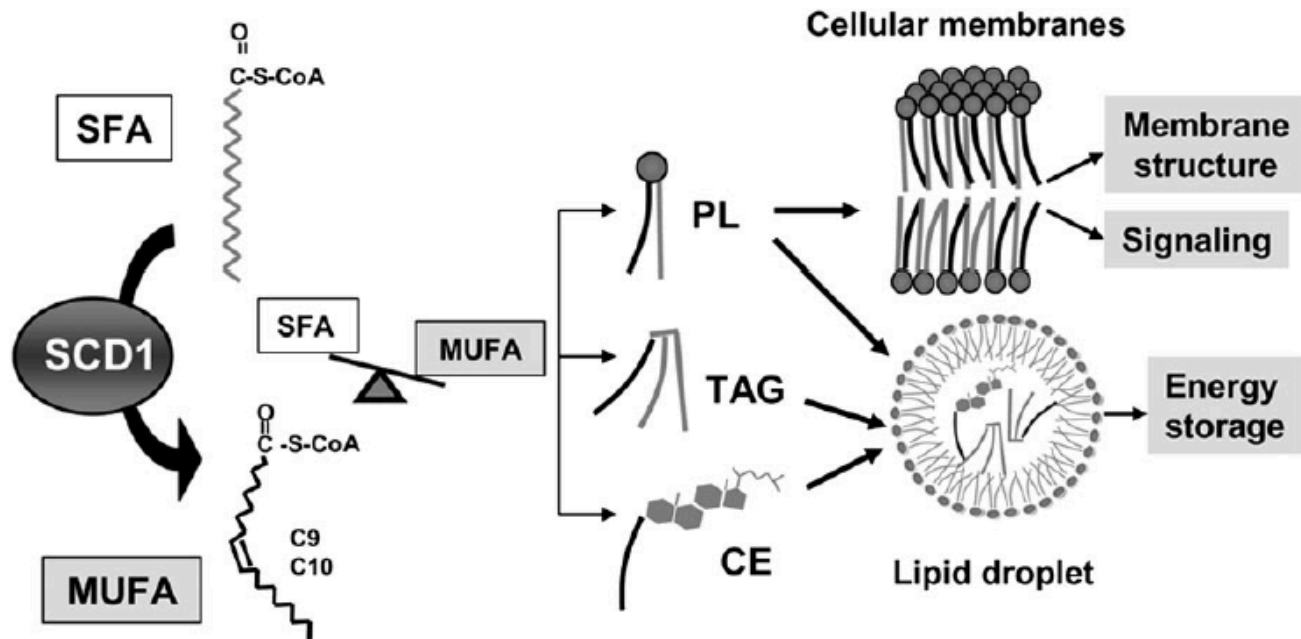
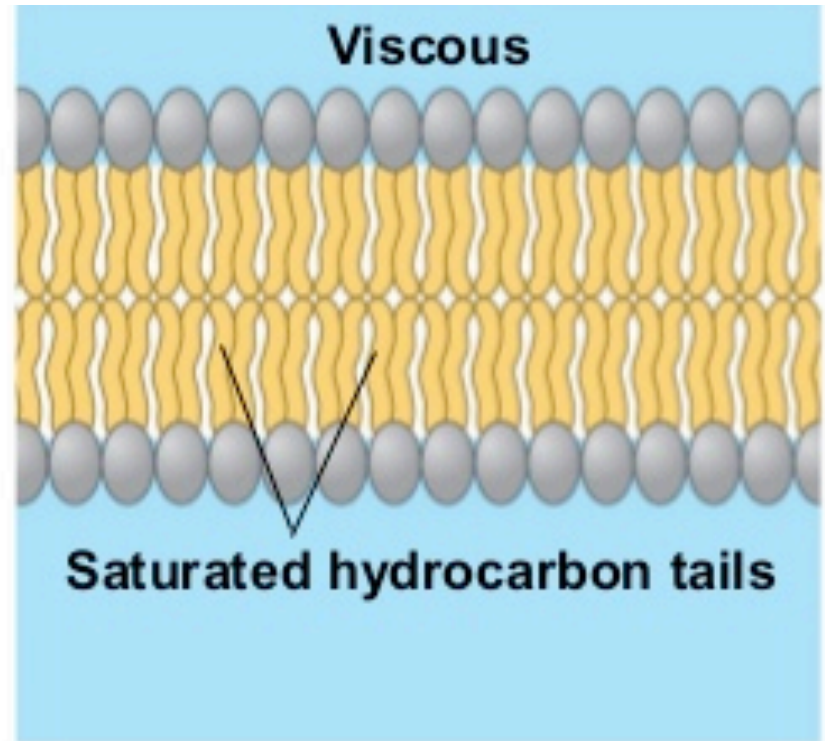
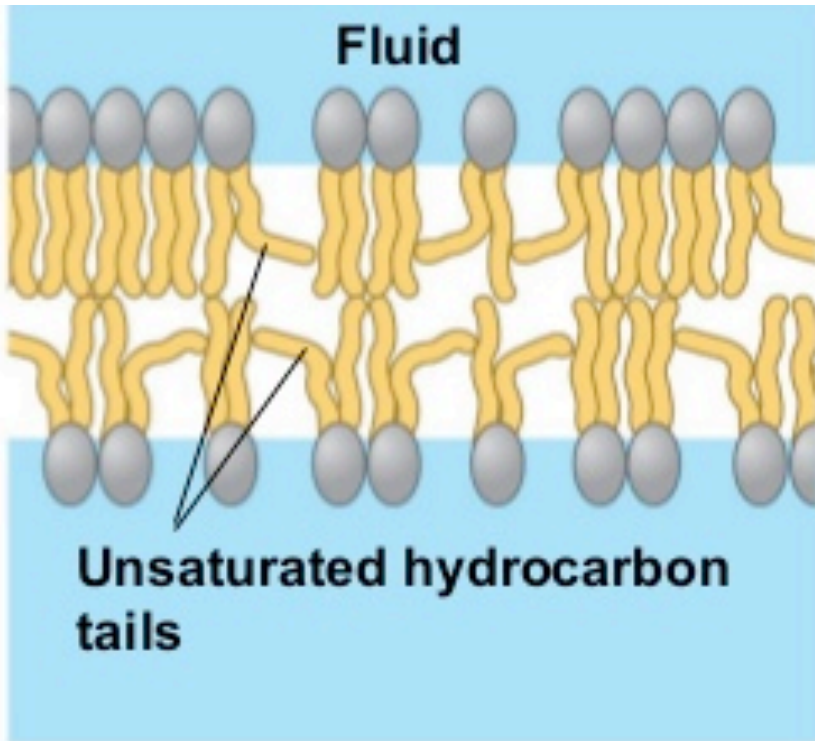


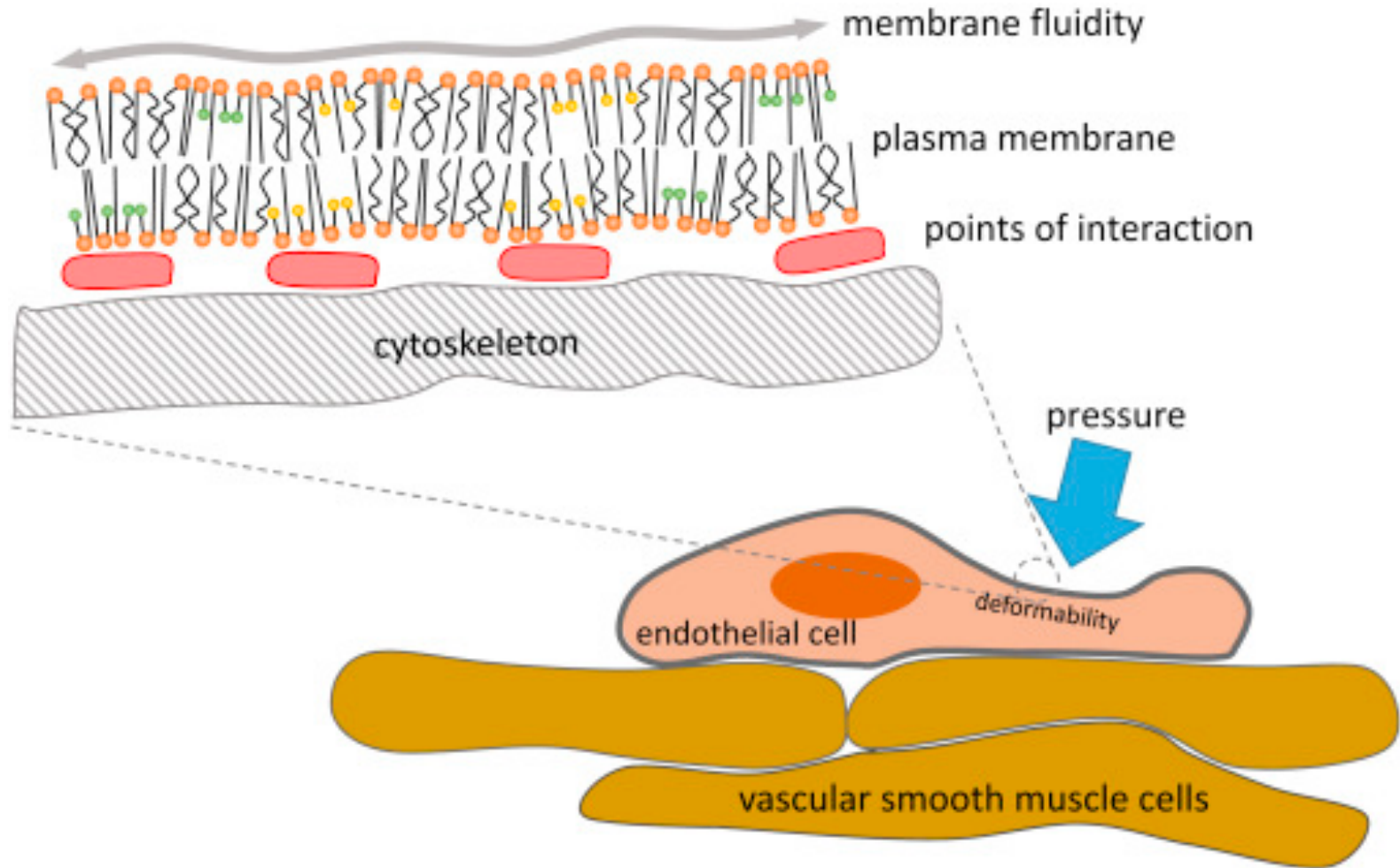
Fig. 1. Regulation of MUFA/SFA balance in mammalian cell lipids by SCD1. CE, cholesterol esters; PL, phospholipids; TAG, triacylglycerols.

**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



La fluidità della membrana favorisce la migrazione cellulare



Domanda:

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

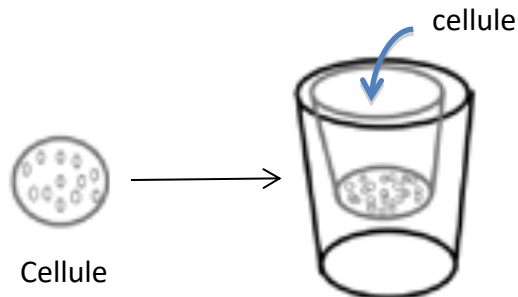
**Esperimento: analisi del ruolo della pathway
SREBP/SCD-1 nella migrazione cellulare**

Strategia sperimentale: Saggio di migrazione cellulare con camera di Boyden

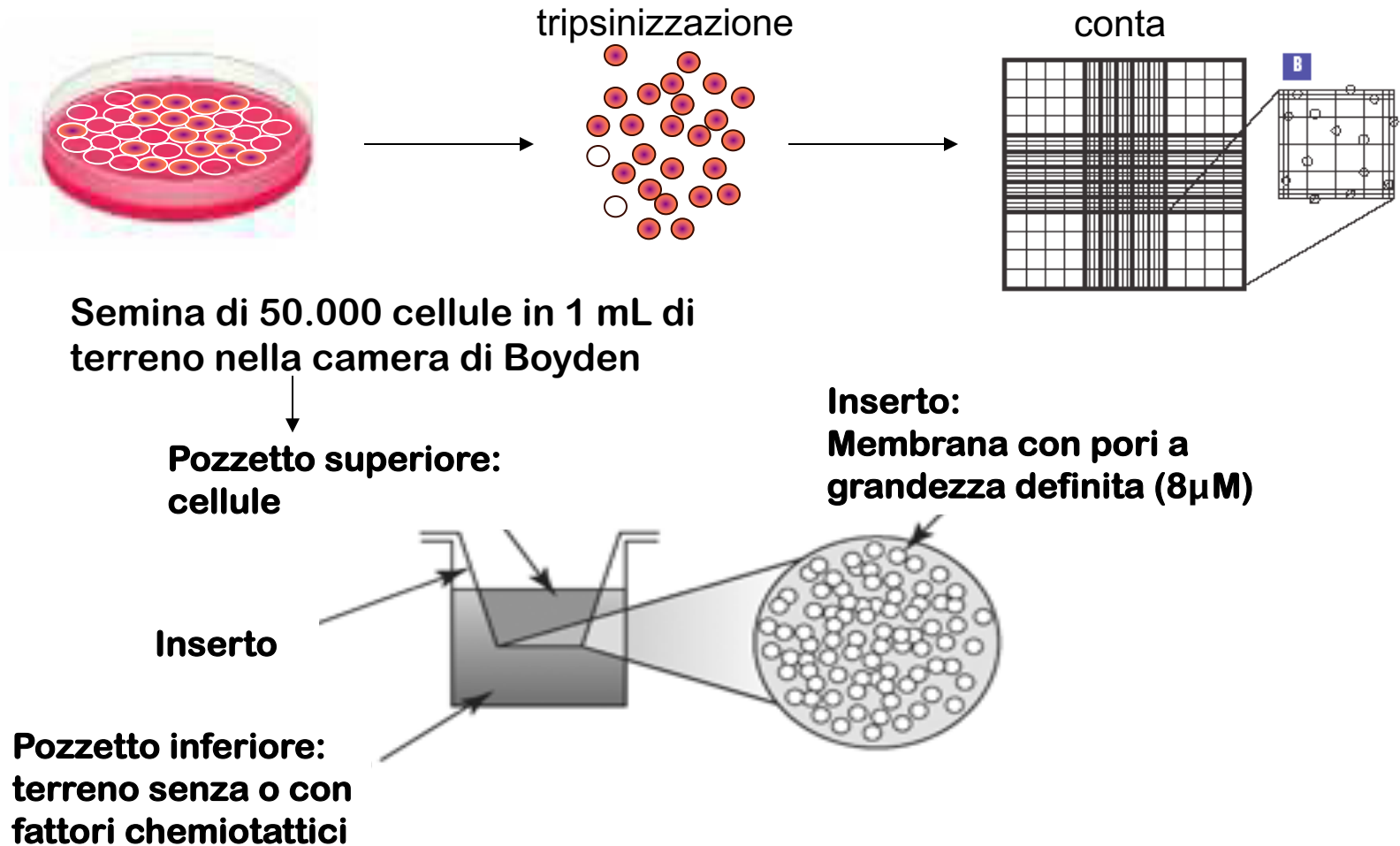
- 1) Cellule trasfettate con vettore di controllo
- 2) Cellule trasfettate con vettore di espressione di SREBP1A
(induce espressione di SCD-1 e MUFA)
- 3) Come 2) ma con inibitore specifico di SCD1 MF-438



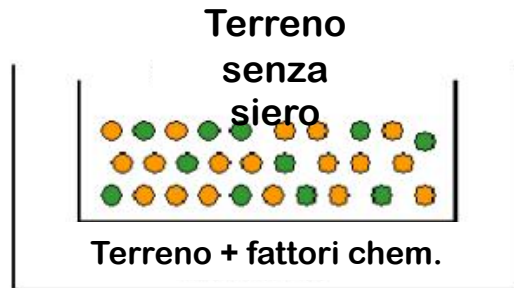
Analisi in camera di Boyden



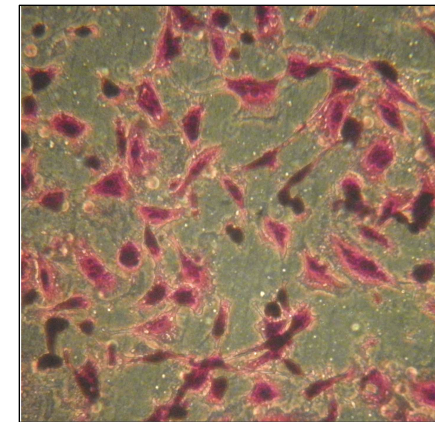
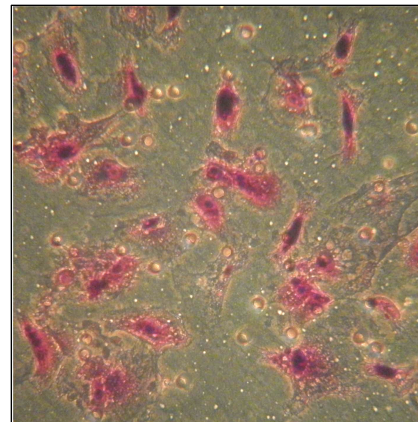
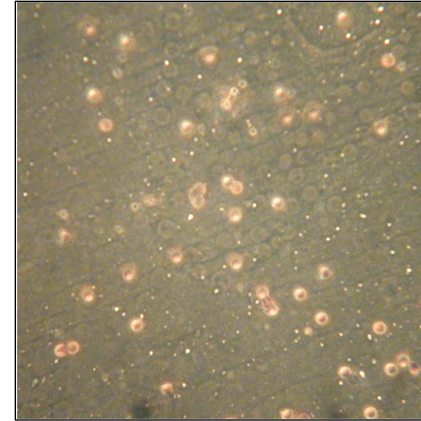
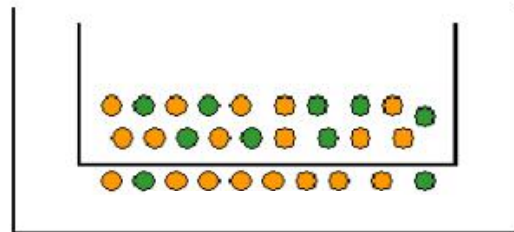
Saggi di migrazione con camera di Boyden



Saggi di migrazione con camera di Boyden



↓ 24 ore



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