

**CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche**

**AA 2020-2021**

**Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare**

**Docenti:**

**Fiamma Mantovani**

**Valeria Capaci**

**Tutor:**

**Devis Pascut**

**[fmantovani@units.it](mailto:fmantovani@units.it)**

## **STRUTTURA DEL CORSO**

**24 ORE LEZIONE FRONTALE** (Prof. Mantovani)

**24 ORE LEZIONE IN LABORATORIO:** (Prof. Mantovani, dr. Capaci, dr. Pascut)

## **Sito MOODLE2 del corso Laboratorio di Biologia Cellulare 2020**

Non sono previsti libri di testo.

Le lezioni registrate in Teams saranno disponibili su stream.

I files delle lezioni saranno forniti su Moodle assieme a links a risorse scaricabili e video didattici.

È consigliata la partecipazione attiva al corso.

Si consiglia di sfruttare sia le lezioni in presenza che il blog di Moodle per domande/risposte e approfondimenti degli argomenti trattati a lezione.

## OBIETTIVI FORMATIVI

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

**regolazione della trascrizione;**

**proliferazione cellulare;**

**morte cellulare;**

**trasformazione neoplastica.**

## ESAMI DI PROFITTO

L'esame del corso consta di **un compito scritto (o colloquio orale in caso di esami telematici)**. La durata è di 90 minuti per lo scritto, 30 minuti per l'orale. L'esame è costituito da **domande aperte** su tutti gli argomenti del corso.

Durante il corso gli studenti apprenderanno come organizzare una strategia sperimentale includendo gli opportuni modelli, tecniche sperimentali e controlli.

**All'esame sarà richiesto agli studenti di rispondere a un quesito sperimentale, applicando le tecniche apprese durante il corso.**

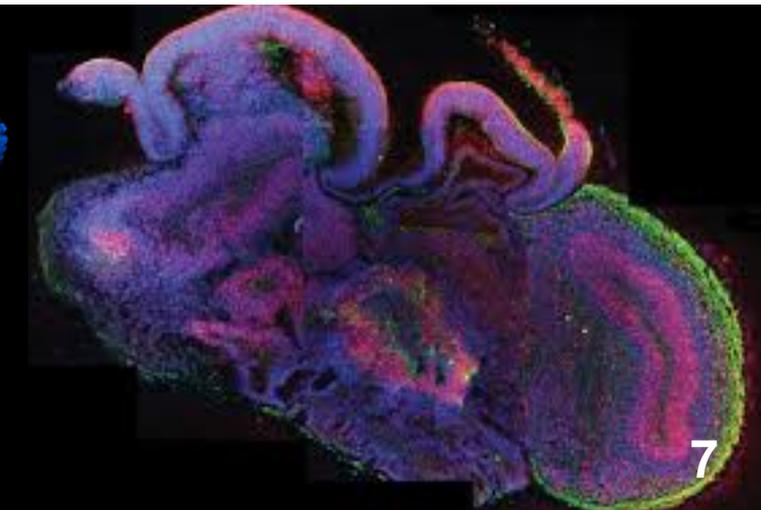
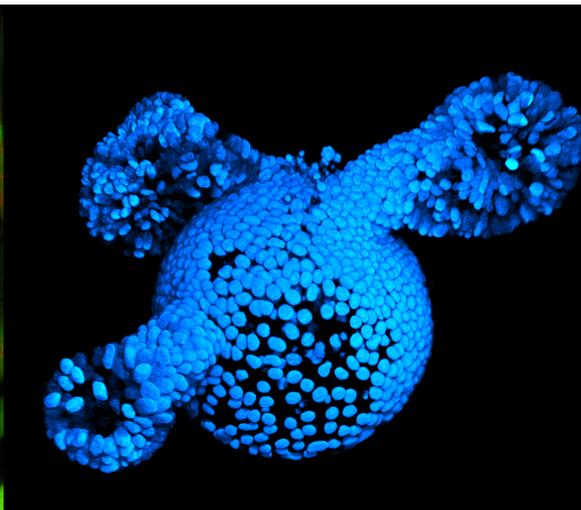
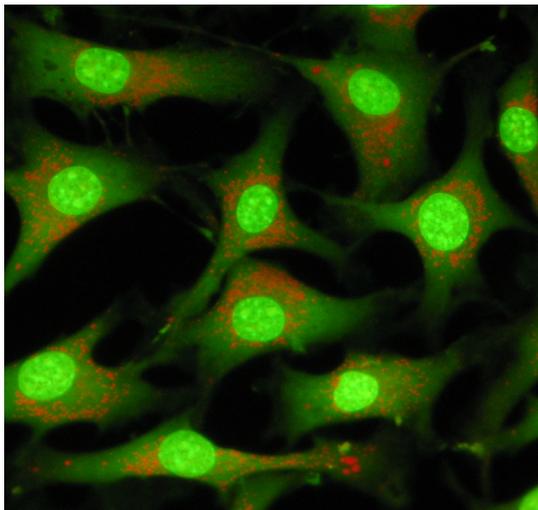
Durante il corso verrà spiegato agli studenti come analizzare correttamente il testo delle domande per organizzare risposte puntuali. Tramite il sito Moodle del corso verranno inoltre forniti agli studenti test di **autovalutazione** per la preparazione all'esame.

# TECNICHE DI COLTURA CELLULARE IN VITRO

## COLTURE CELLULARI

**cellule** estratte dall'organismo di origine  
cresciute e propagate in vitro

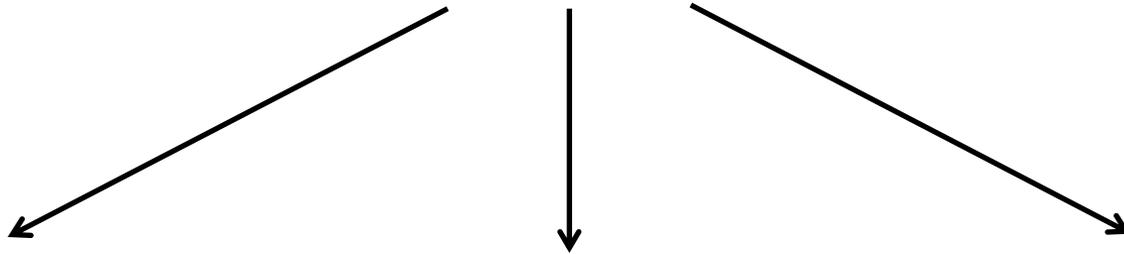
- in adesione, in sospensione, in matrice
- libere o organizzate (colture 2D - colture 3D - colture organotipiche)



# **APPLICAZIONI DELLE COLTURE CELLULARI IN VITRO IN MEDICINA MOLECOLARE**

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

**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**

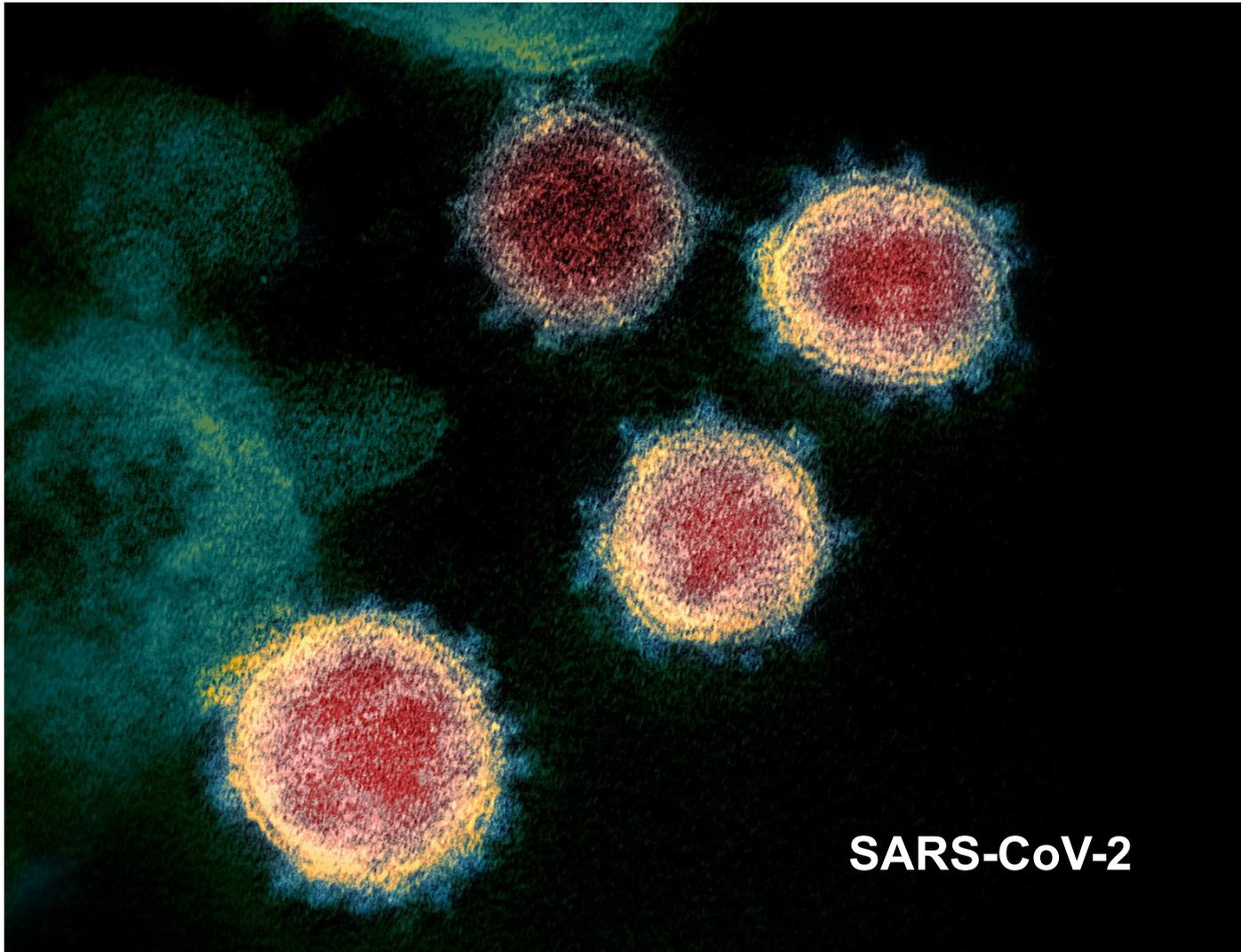


**Nuove terapie  
a bersaglio  
molecolare**

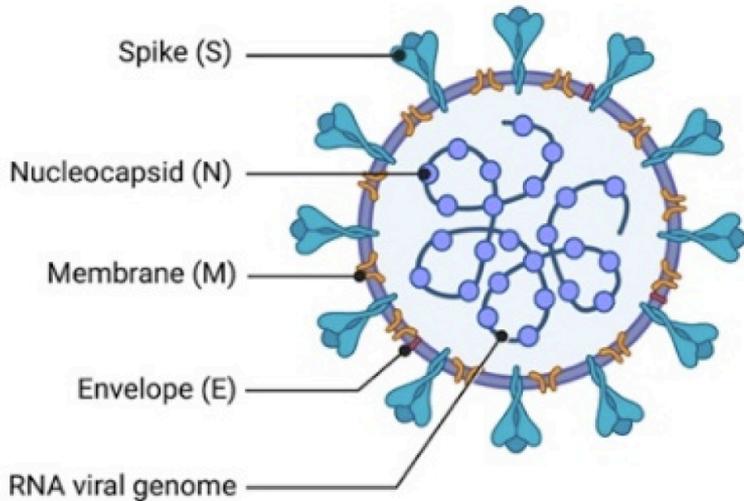
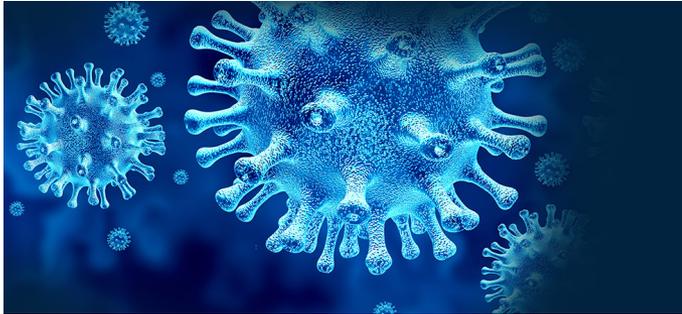
## **ATTIVITA' SVOLTE IN LABORATORIO DIDATTICO**

**Durante il corso gli studenti acquisiranno  
le basi teoriche e le competenze pratiche  
per eseguire le diverse fasi di un piano sperimentale  
mirato a rispondere a specifiche domande scientifiche**

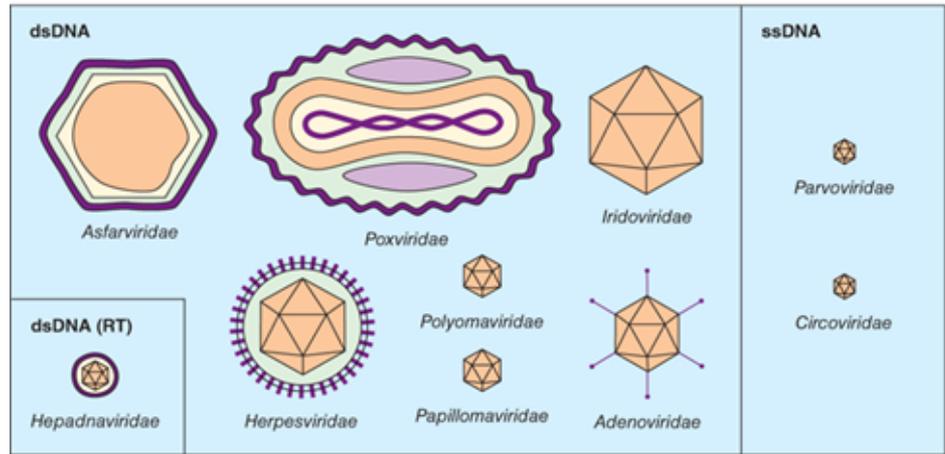
# STUDIO delle basi molecolari di MALATTIE INFETTIVE



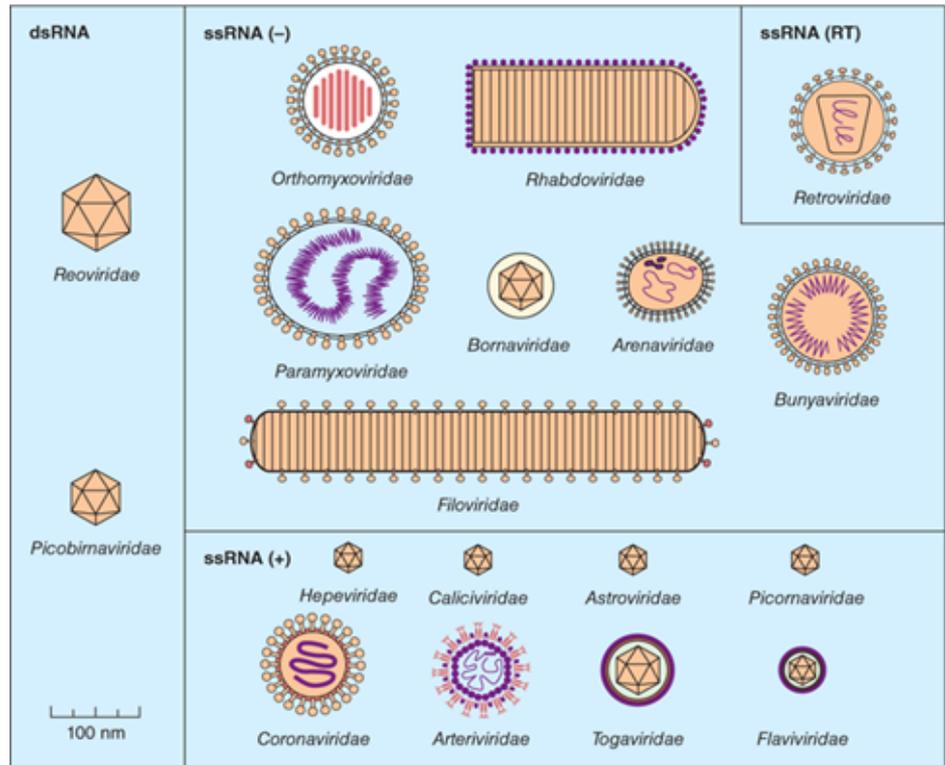
# Coronavirus



## DNA viruses



## RNA viruses



## Domande scientifiche e risposte sperimentali

1. È possibile **individuare processi cellulari chiave per l'infezione virale** seguendo sperimentalmente il comportamento delle proteine virali nelle cellule bersaglio?
2. È possibile **identificare fattori cellulari** importanti per il ciclo vitale del virus, che rappresentino potenziali bersagli terapeutici?
3. Possiamo studiare la **risposta antivirale dell'ospite** al fine di potenziarla?

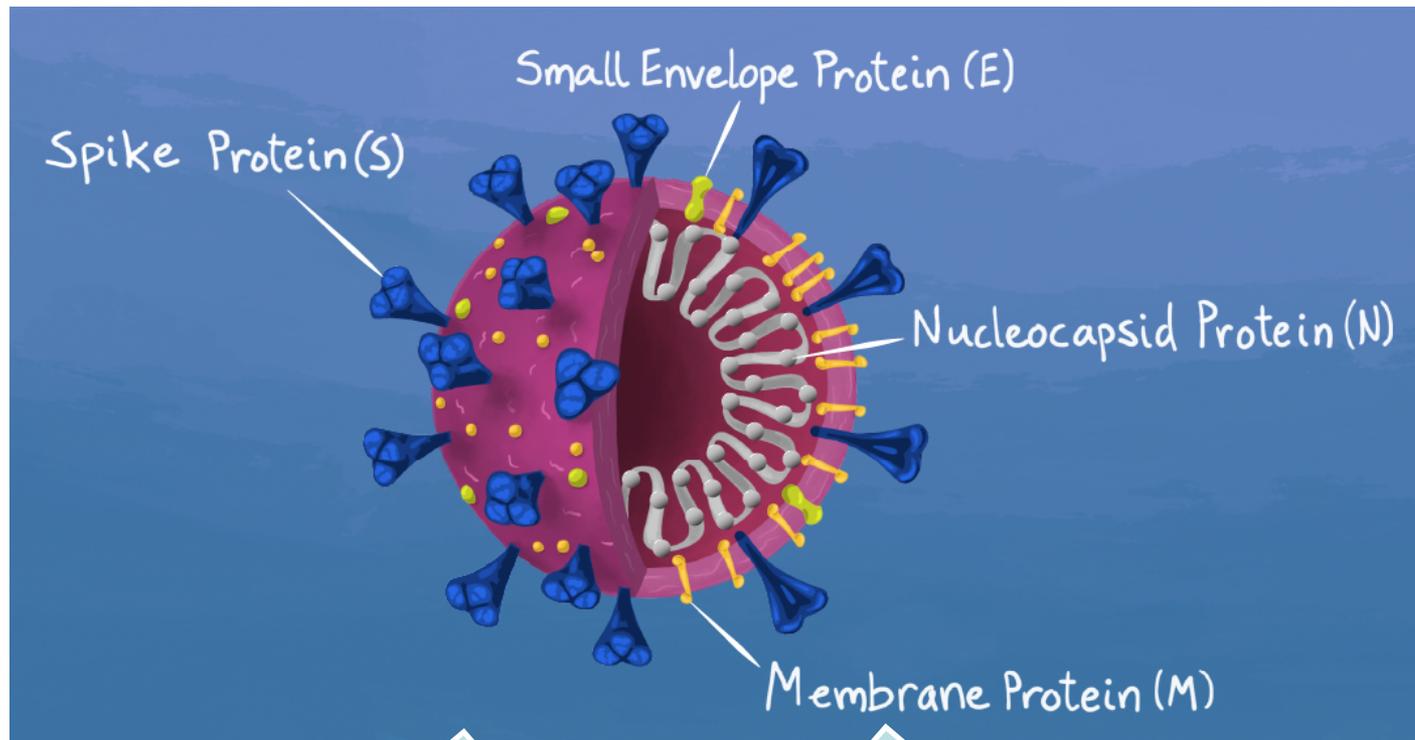
**Per rispondere a queste domande possiamo effettuare esperimenti utilizzando sistemi cellulari in vitro.**

**In particolare, possiamo introdurre nelle cellule opportuni vettori per l'espressione di proteine virali per seguirne il destino e le interazioni con l'ospite.**

**Possiamo inoltre analizzare la risposta antivirale dell'ospite mediante l'impiego di colture di cellule immuni-infiammatorie, saggi fenotipici e sistemi reporter.**

**Piano sperimentale:**

**Sovraespressione transiente di proteine del virus SARS-CoV-2 allo scopo di individuare gli organelli cellulari e le proteine cellulari essenziali per l'infezione.**



**Localizzazione subcellulare**

**Interazione con proteine cellulari**

# SCOPO: SVILUPPO/ RIPOSIZIONAMENTO DI FARMACI per la terapia antivirale

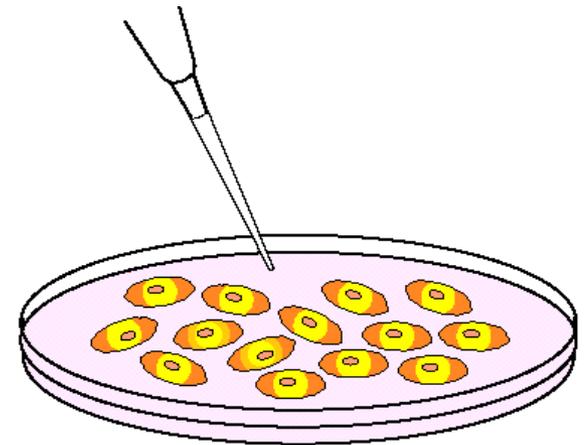
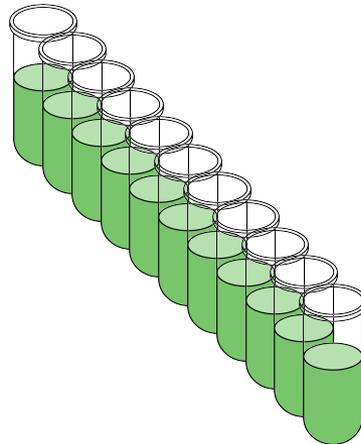
Molecola o  
processo bersaglio



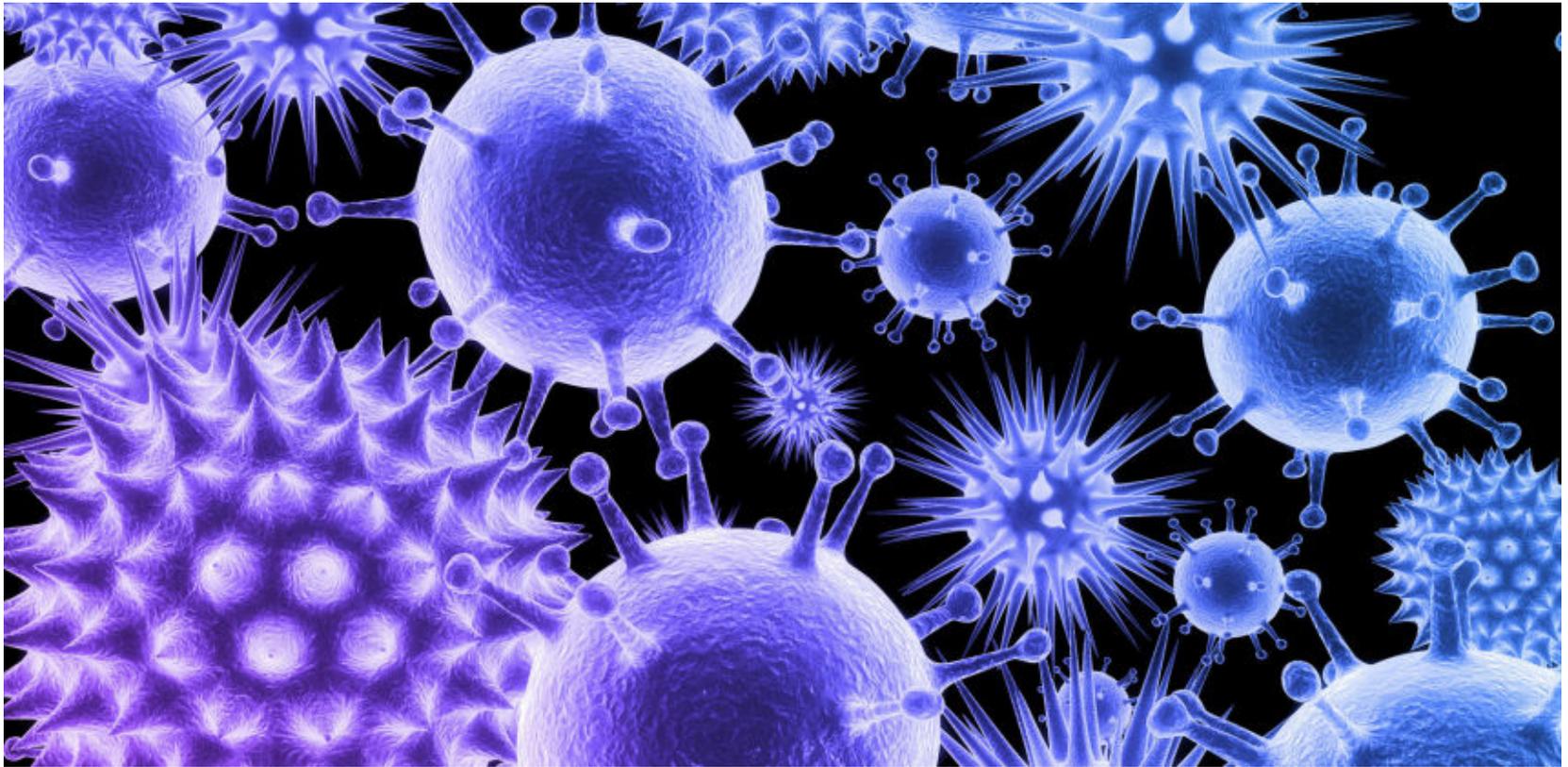
Design razionale  
o  
Drug Screening

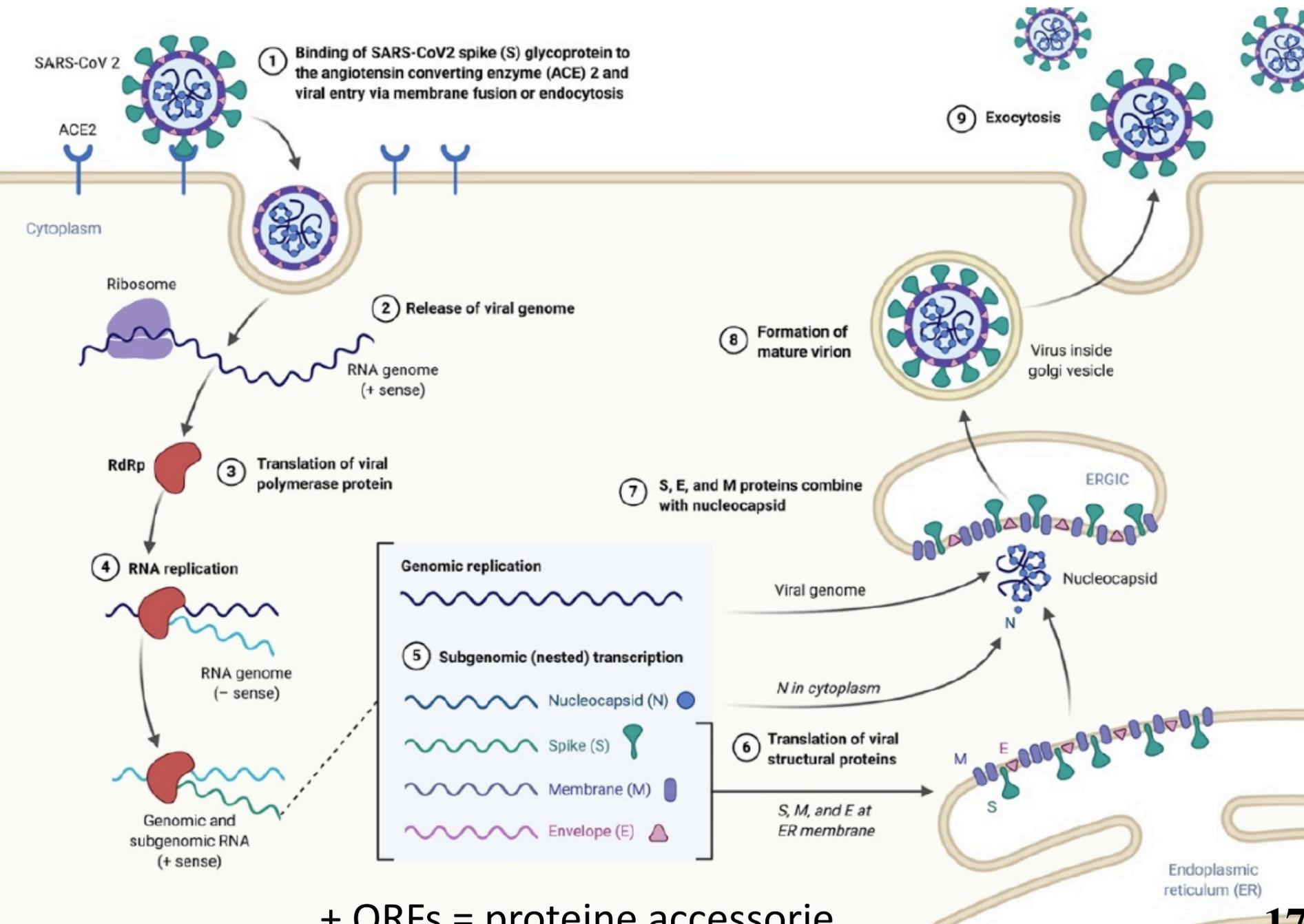


Test che valutano  
gli effetti su  
specifici  
processi biologici



**Inizieremo osservando l'interno della cellula dal punto di vista del coronavirus SaRS-CoV-2**

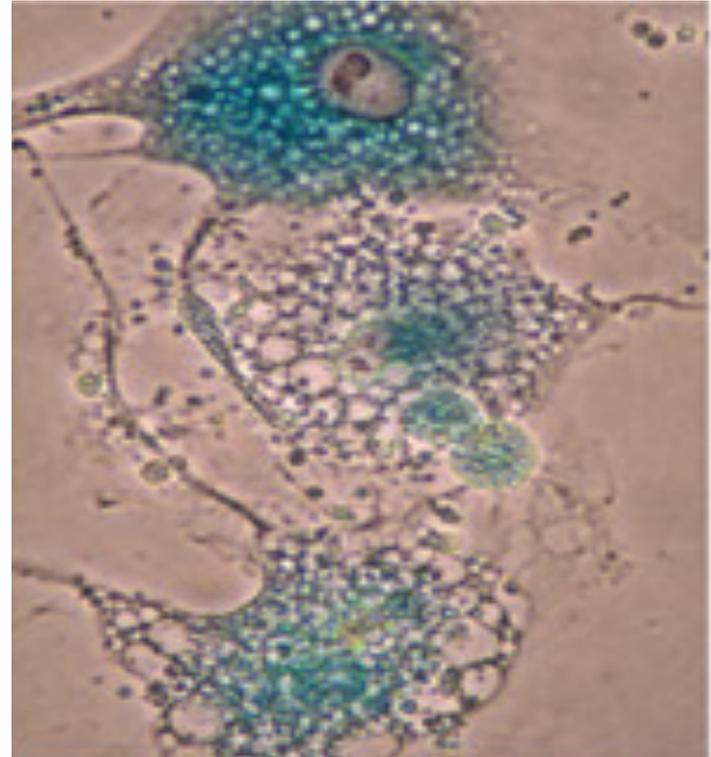
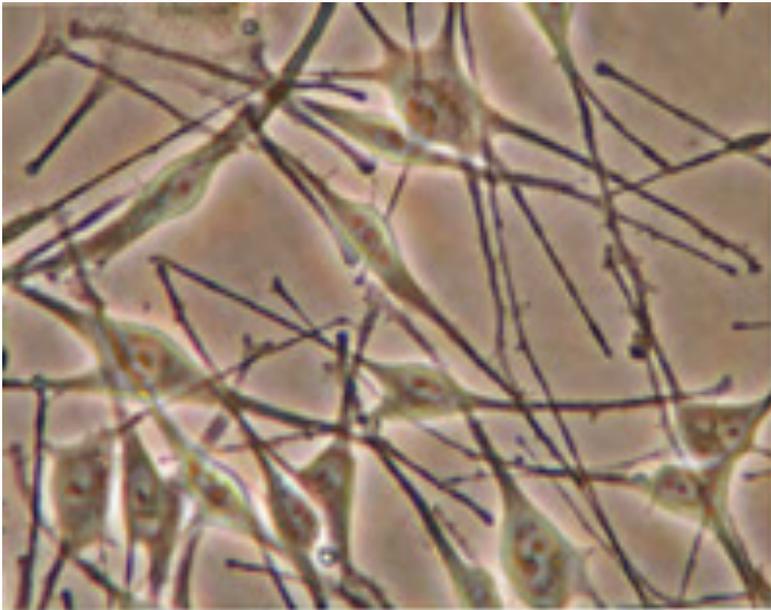




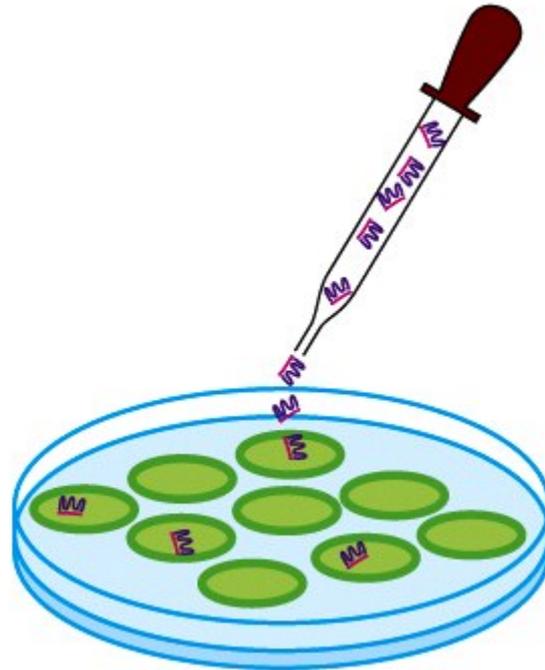
+ ORFs = proteine accessorie

# 1. UTILIZZARE LE COLTURE CELLULARI IN VITRO

## TECNICHE PER LA GENERAZIONE, MANTENIMENTO ED ANALISI DI CELLULE IN CULTURA



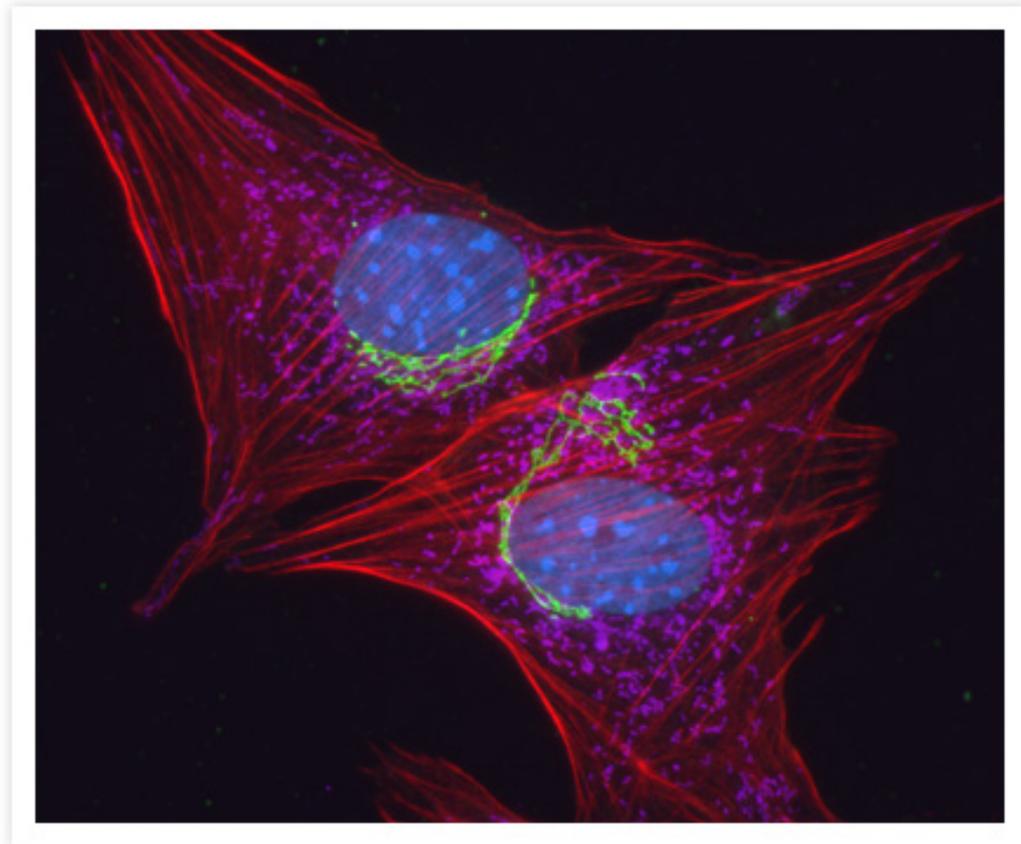
## 2. MANIPOLARE LE CELLULE IN COLTURA



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

### 3. ANALISI FENOTIPICHE E BIOCHIMICHE

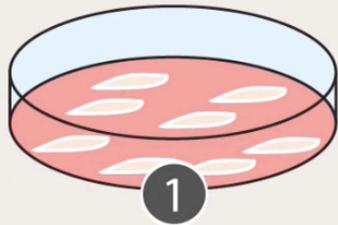
1. **Analisi della localizzazione subcellulare di proteine**
2. **Analisi di fenotipi cellulari (es. chemiotassi)**
3. **Utilizzo di sistemi reporter per analisi di meccanismi molecolari**



**Lezione 1:**  
**ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:**

## Principali condizioni di crescita di cellule isolate

- in adesione 2D (monolayer)
- in sospensione (substrato liquido)
- colture 3D in matrici semisolide

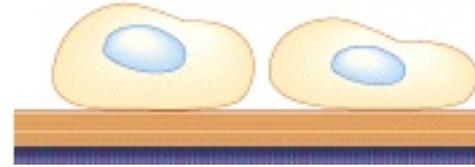
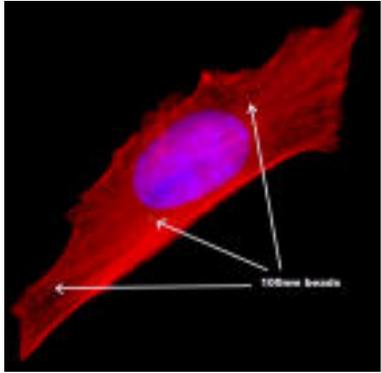


Monolayers  
(Adherent cultures)

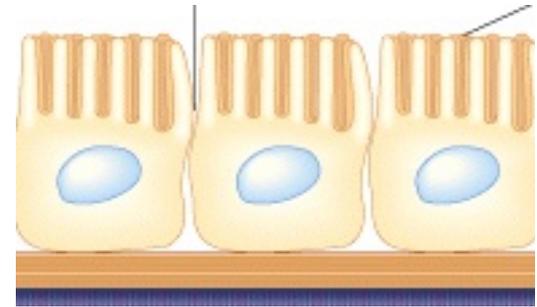
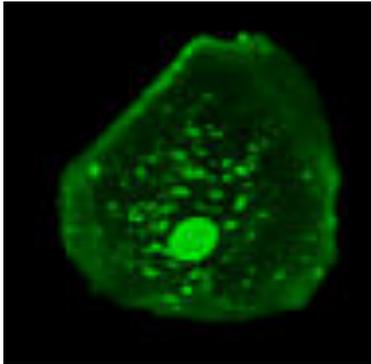


Free-floating  
(Suspension cultures)

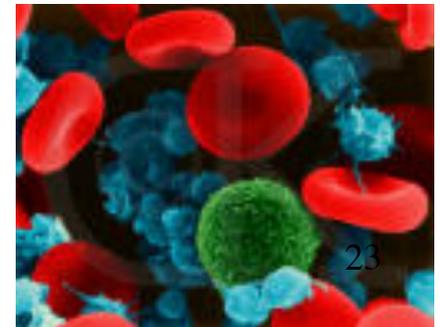
**Fibroblasti:** cellule derivate dal tessuto connettivo/endotelio  
aspetto **fusiforme**  
crescita in **adesione**  
cellule **isolate**



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



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



## **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.

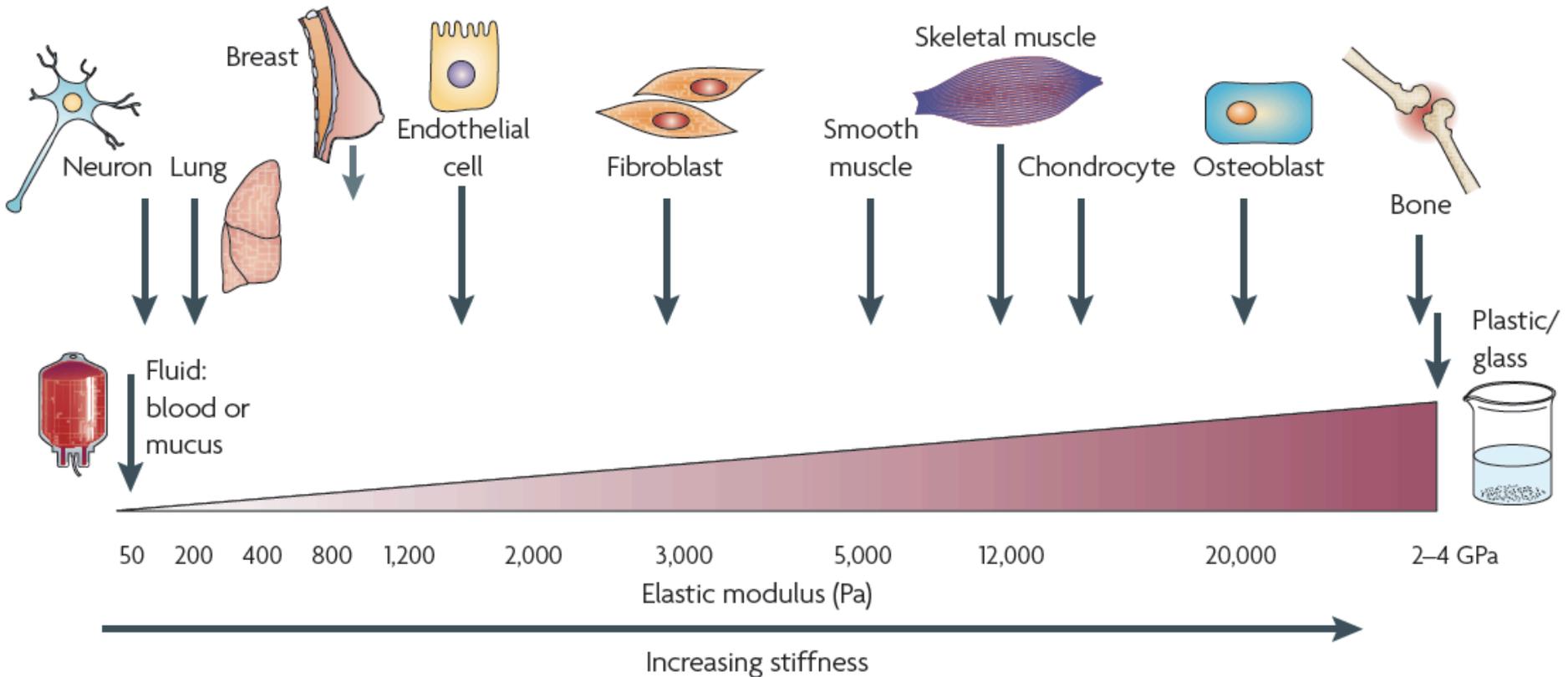
Altre invece possono/devono crescere in sospensione.

## 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.

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



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

## INCUBATORI per colture cellulari



# INCUBATORI per colture cellulari

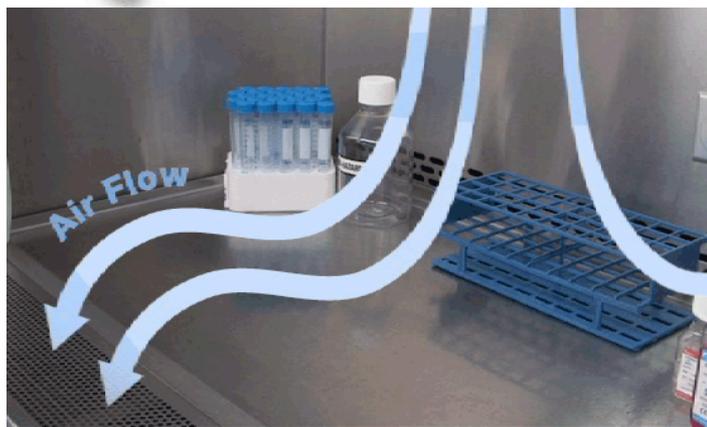
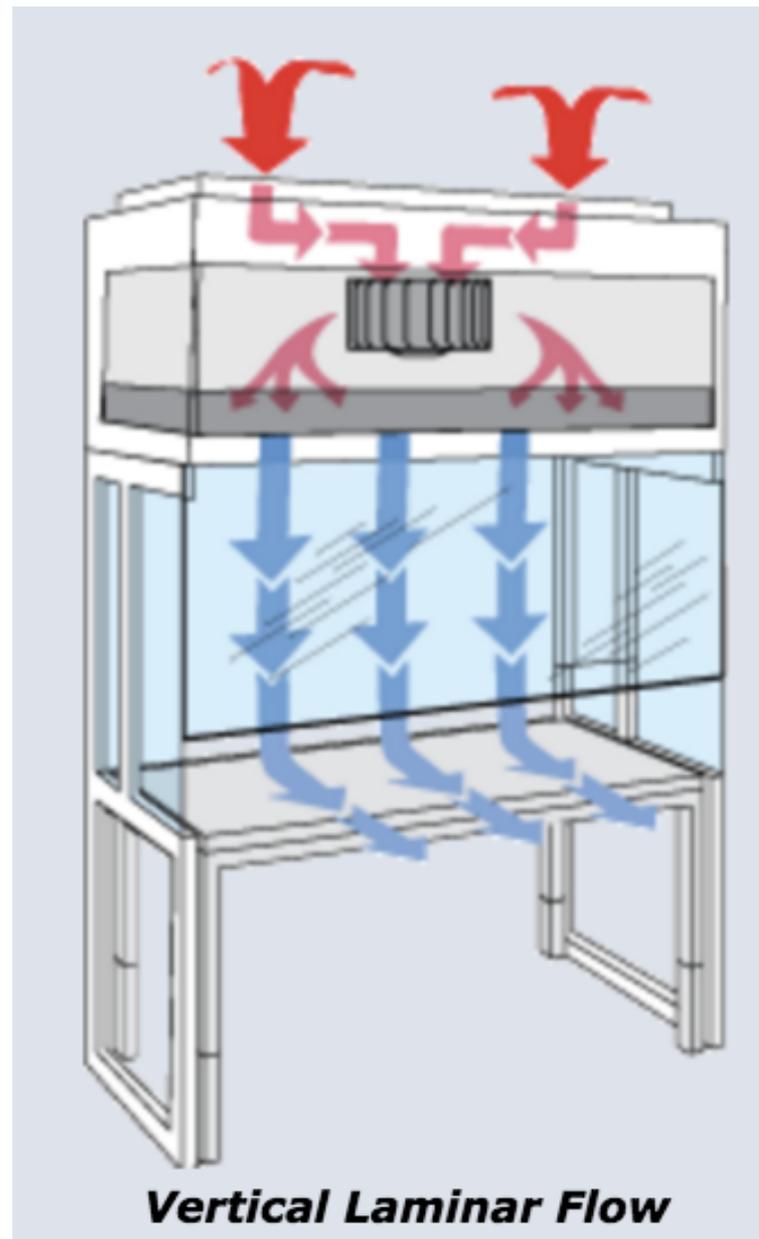
Crescita in condizioni controllate:

temperatura	37° C
pH = 7.4	5% CO <sub>2</sub>
umidità	saturazione H <sub>2</sub> O

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

pO<sub>2</sub> 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 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 CO<sub>2</sub>)**
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.**

## 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)

NB: questi terreni sono ottimizzati per favorire la proliferazione cellulare, sono quindi molto ricchi ma poco fisiologici;

Esistono terreni (es. Plasmex™) che ricapitolano l'ambiente metabolico fisiologico del plasma umano (glucosio, amino acidi e derivati, lipidi, sali inorganici, elementi in tracce, vitamine).

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.

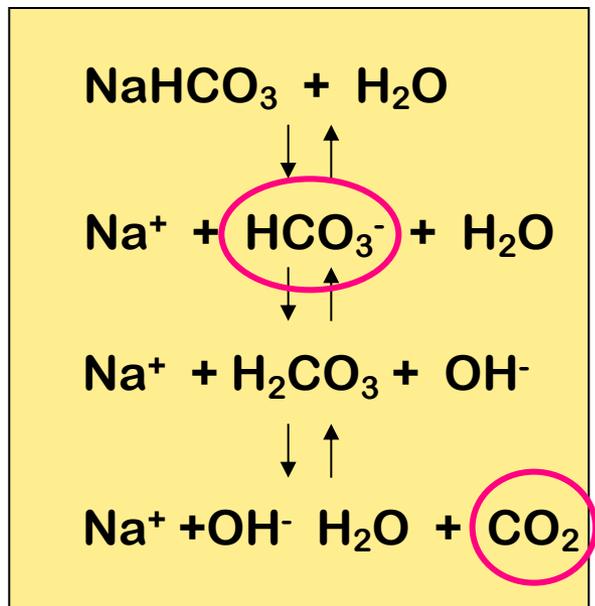
Il siero più utilizzato è quello ottenuto da feti bovini (FCS = Fetal Calf Serum).

# 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)

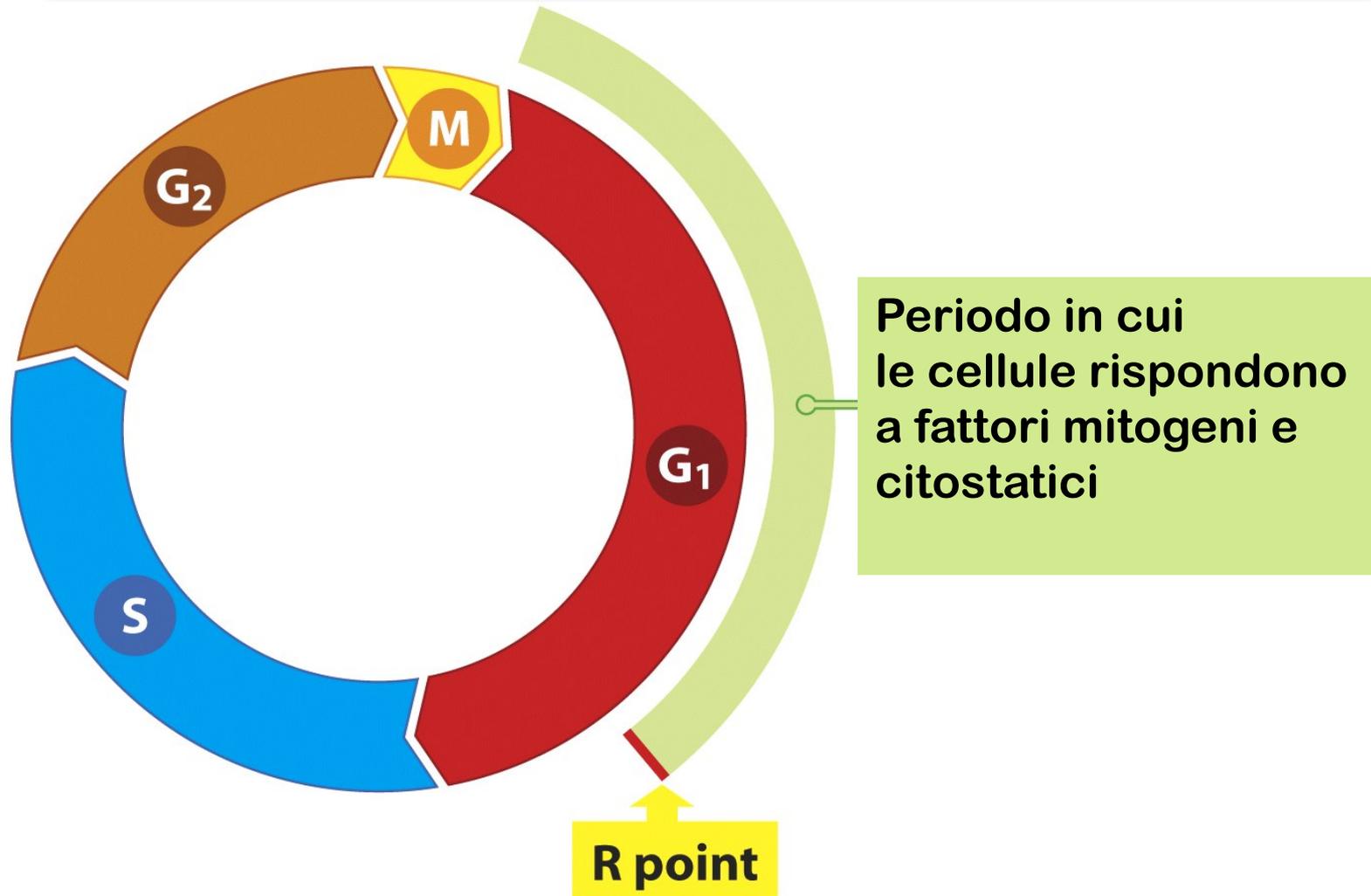
## SISTEMA TAMPONE BICARBONATO

Bicarbonato di sodio nel terreno in equilibrio con CO<sub>2</sub> atmosferica



L'aumento della pCO<sub>2</sub> comporta un'acidificazione del terreno e viceversa: l'incubatore è collegato ad una bombola di CO<sub>2</sub>: l'immissione è controllata da una valvola e la pCO<sub>2</sub> mantenuta a 5%

**I fattori di crescita contenuti nel siero 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

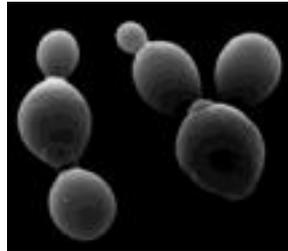


Mycoplasma

# 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  $\mu\text{m}$ )
- ✓ 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  $^{60}\text{Co}$ ) 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](https://www.youtube.com/watch?v=nr1tV_LuqJk)