

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2020-2021

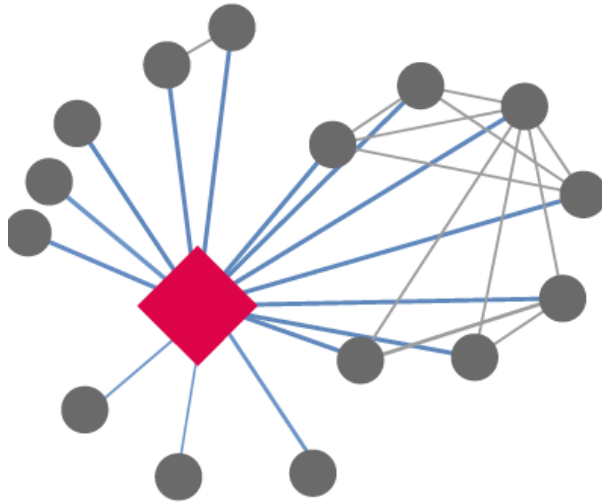
Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 7

A SARS-CoV-2-Human Protein-Protein Interaction Map Reveals Drug Targets and Potential Drug-Repurposing

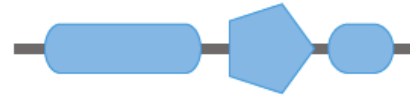
David E. Gordon^{1,2,3,4}, Gwendolyn M. Jang^{1,2,3,4}, Mehdi Bouhaddou^{1,2,3,4}, Jiewei Xu^{1,2,3,4}, Kirsten Obernier^{1,2,3,4},

26 SARS-CoV-2
proteins



332 human proteins

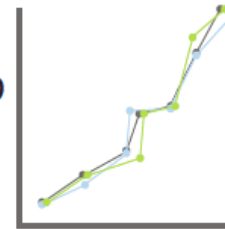
Gene Ontology and Pfam
enrichments



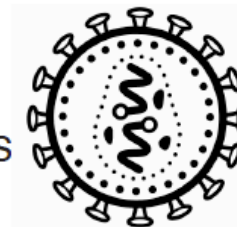
Tissue expression
(Protein & mRNA)

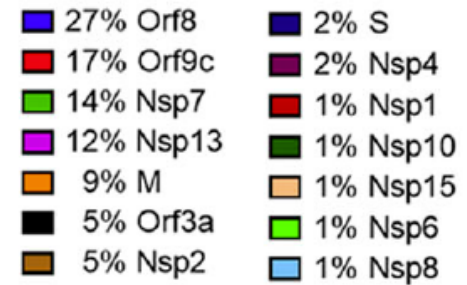
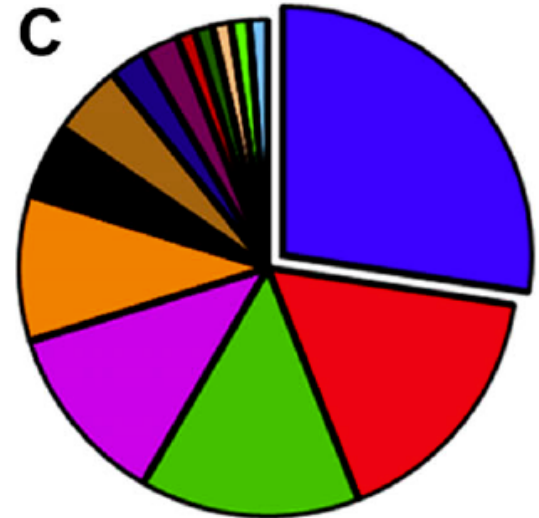
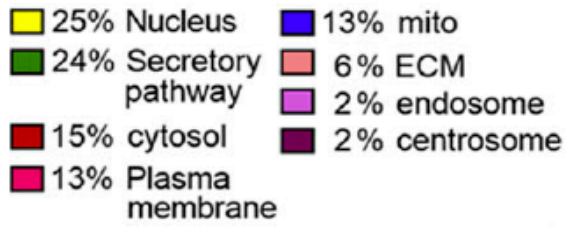


Response to
infection

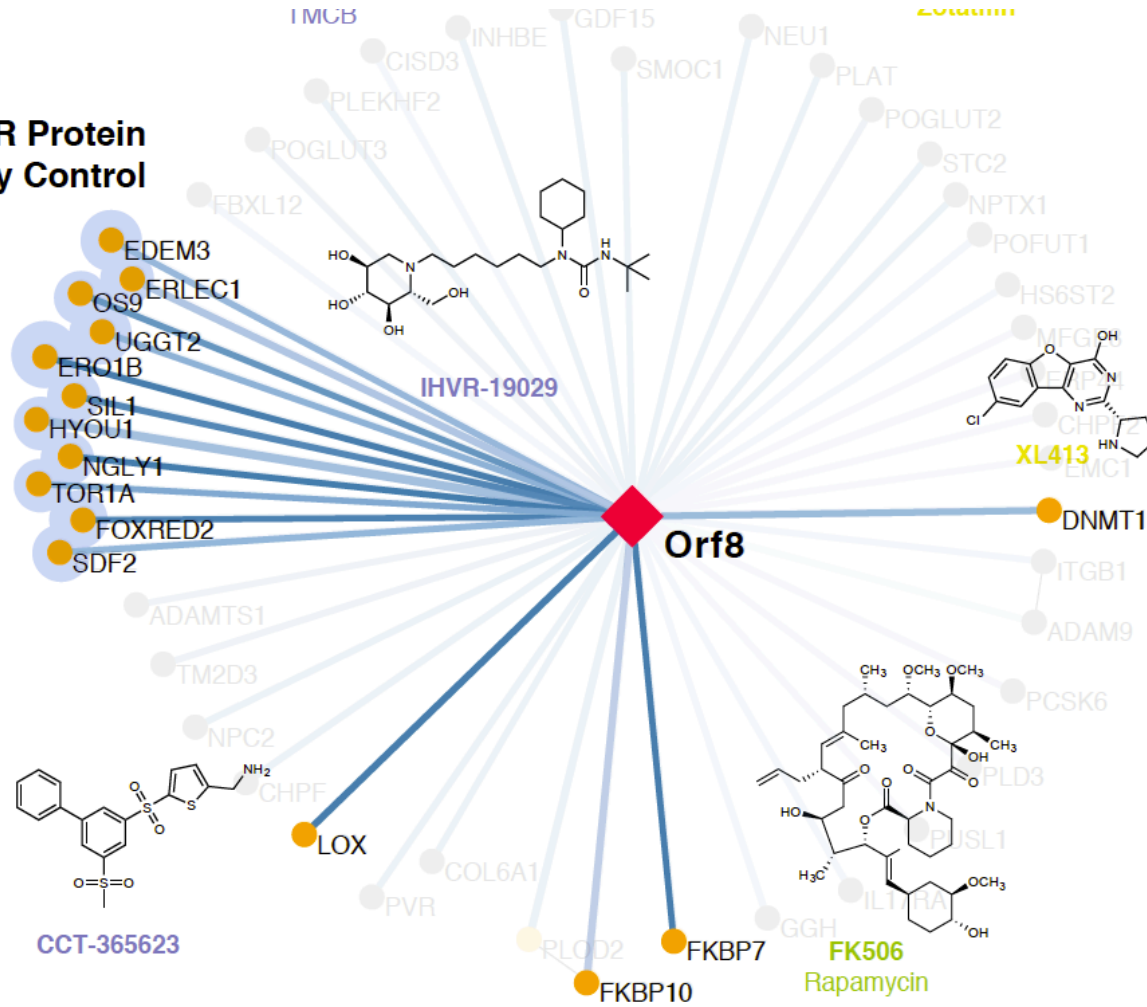


Comparative
viral networks

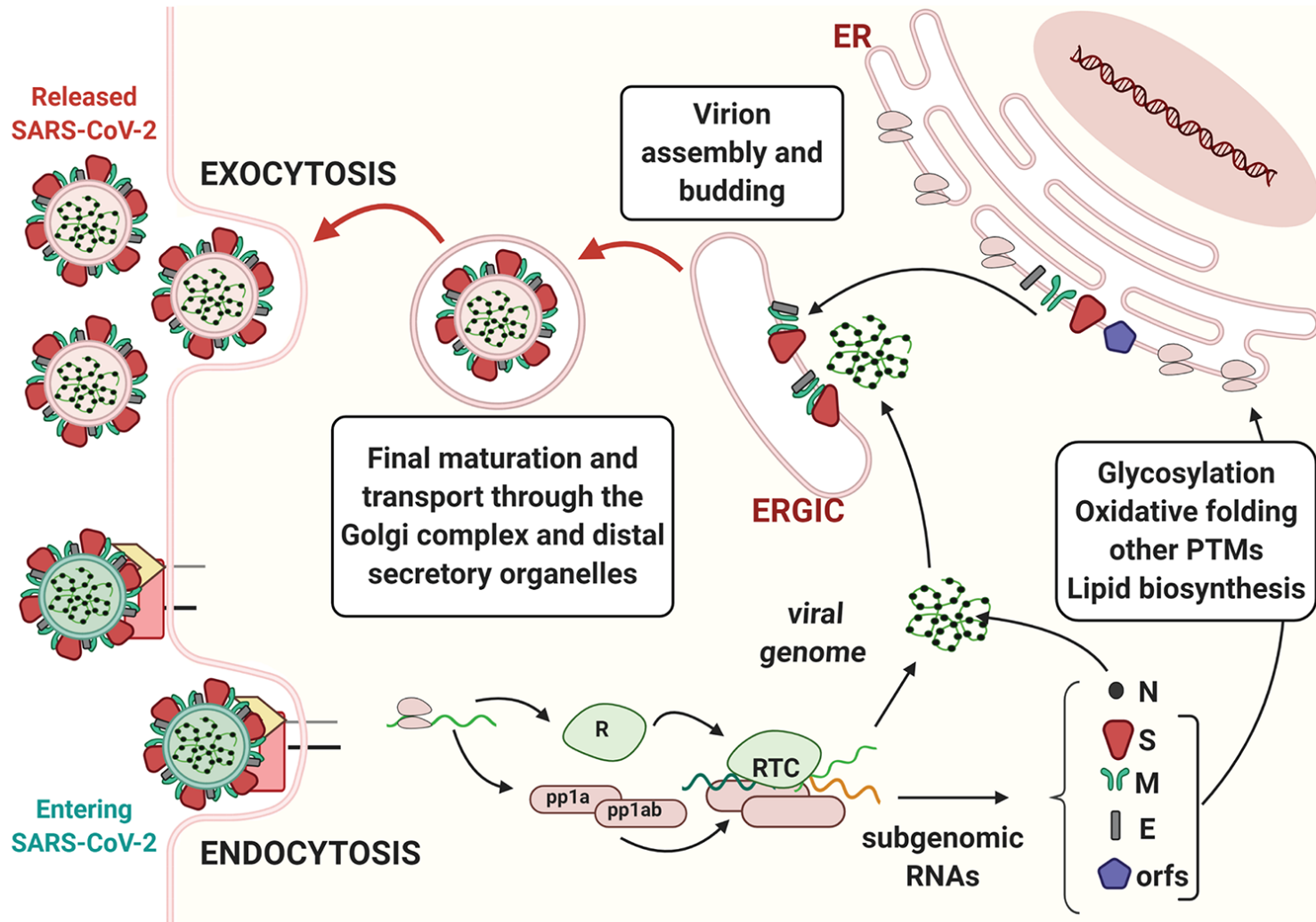




ER Protein Quality Control



Scelta del modello cellulare per effettuare studi funzionali



Modelli cellulari in biomedicina

VANTAGGI:

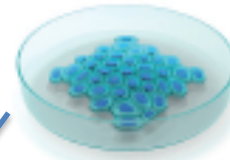
- GRANDE QUANTITA' DI MATERIALE
- ANALISI BIOCHIMICHE
- HIGH THROUGHPUT

LIMITI:

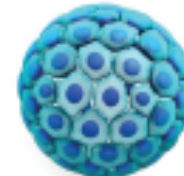
- NON RICAPITOLANO LA COMPLESSITA' TISSUTALE
- CONDIZIONI NON FISILOGICHE (PLASTICA)
- INTERAZIONI CON LA MATRICE LIMITATE

Biochemical tools

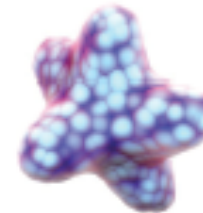
Model system
in life sciences



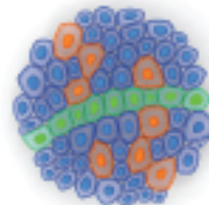
Monolayer cell culture



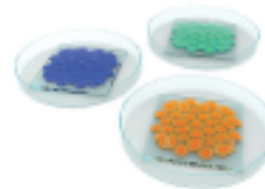
Spheroid



Organoid



Tissue explant



Multiplexed models
"on-a-chip"

Complexity of culture

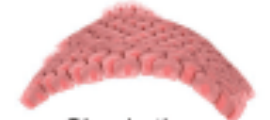
Organization of
the body



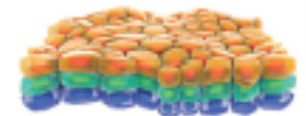
Subcellular



Cells



Simple tissue



Layered tissue



Organ & System



Body

Scale

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).

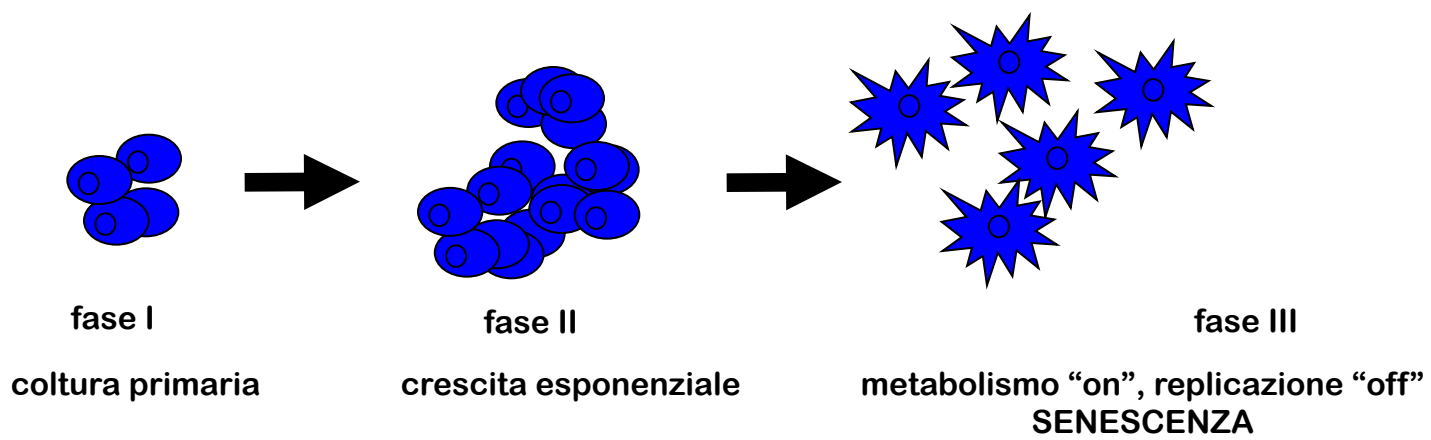
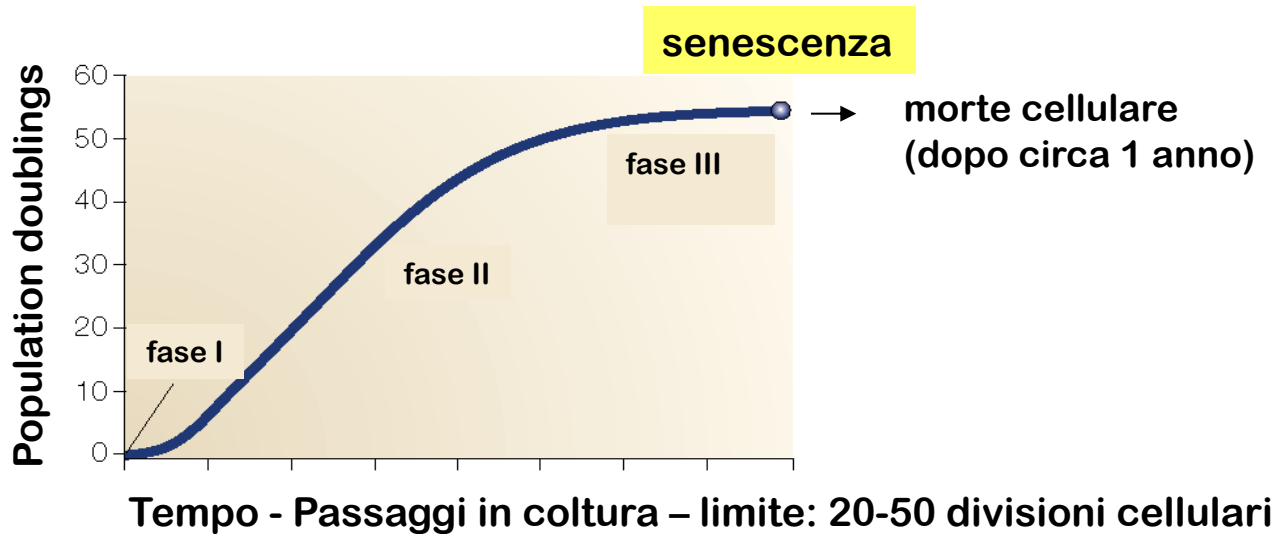
A questo punto smettono di dividersi: questo fenomeno è detto INIBIZIONE DA CONTATTO. Se vengono diluite (PASSAGGIO IN COLTURA) in modo da fornire loro nuovo spazio, ricominceranno a proliferare: in questo modo la coltura viene PROPAGATA.

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



Leonard Hayflick, 1960's

CAPACITÀ REPLICATIVA DI CELLULE UMANE IN COLTURA



Il limite di Hayflick è una funzione del numero di divisioni cellulari

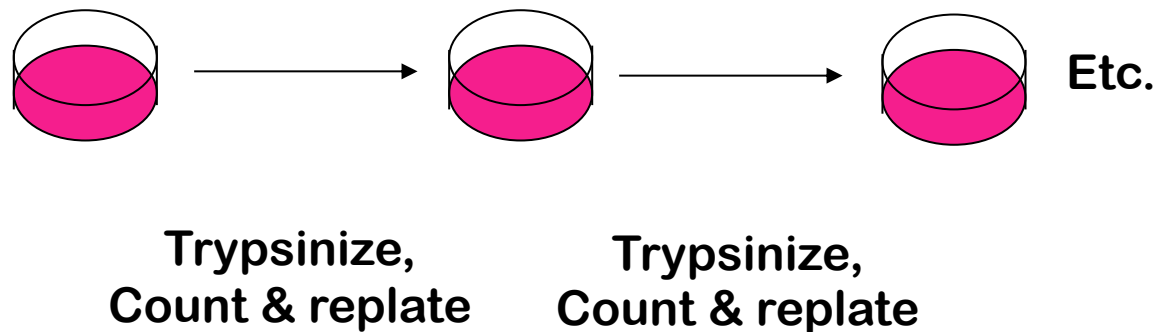
CURVE DI CRESCITA DI COLTURE PRIMARIE

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

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

Vengono seminate inizialmente (N0) 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



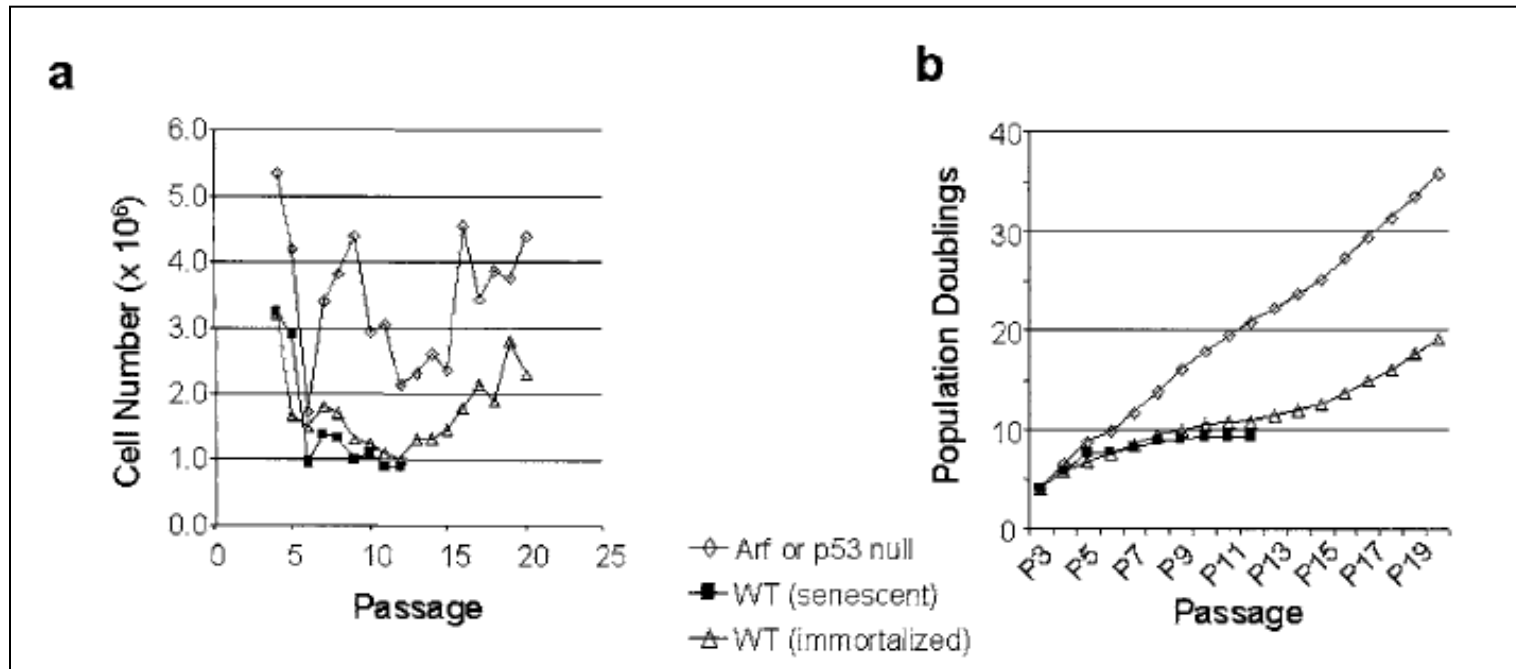
CURVE DI CRESCITA DI COLTURE PRIMARIE

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

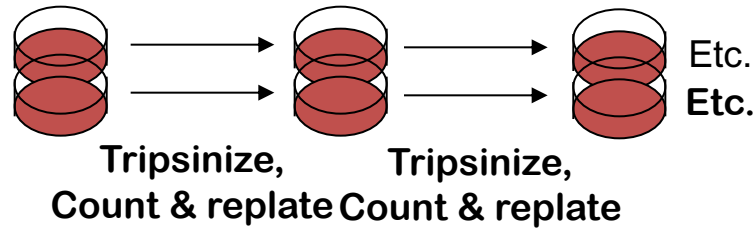
I dati di crescita cellulare sono riportati in

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.

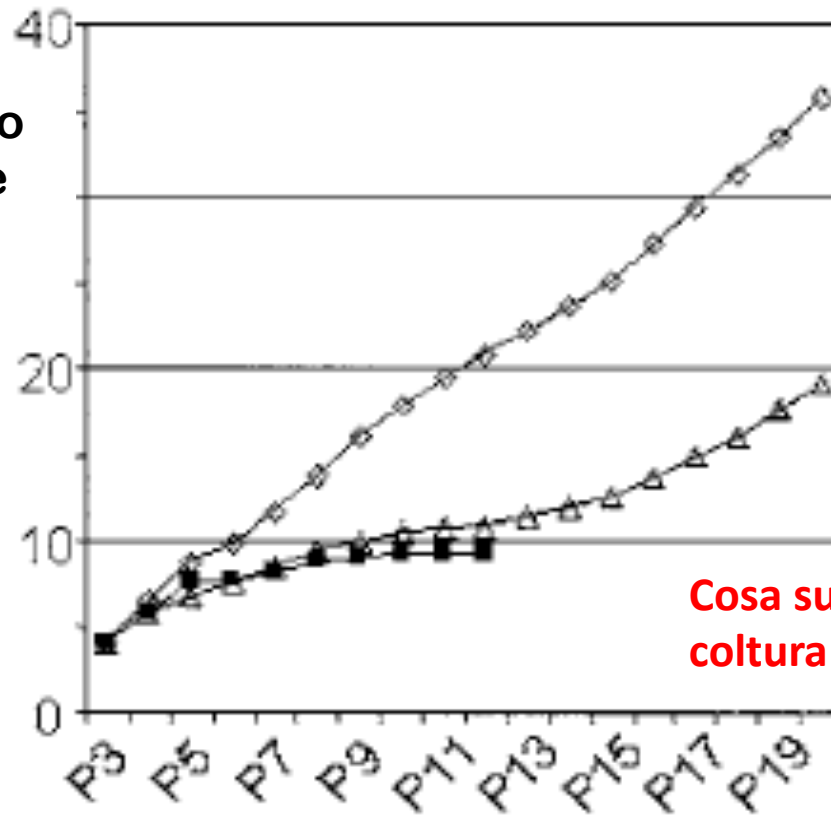
Per disegnare la curva dei PD, ad ogni successivo passaggio **riporto la somma dei PD**:

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.

CURVE DI CRESCITA DI CELLULE IN COLTURA

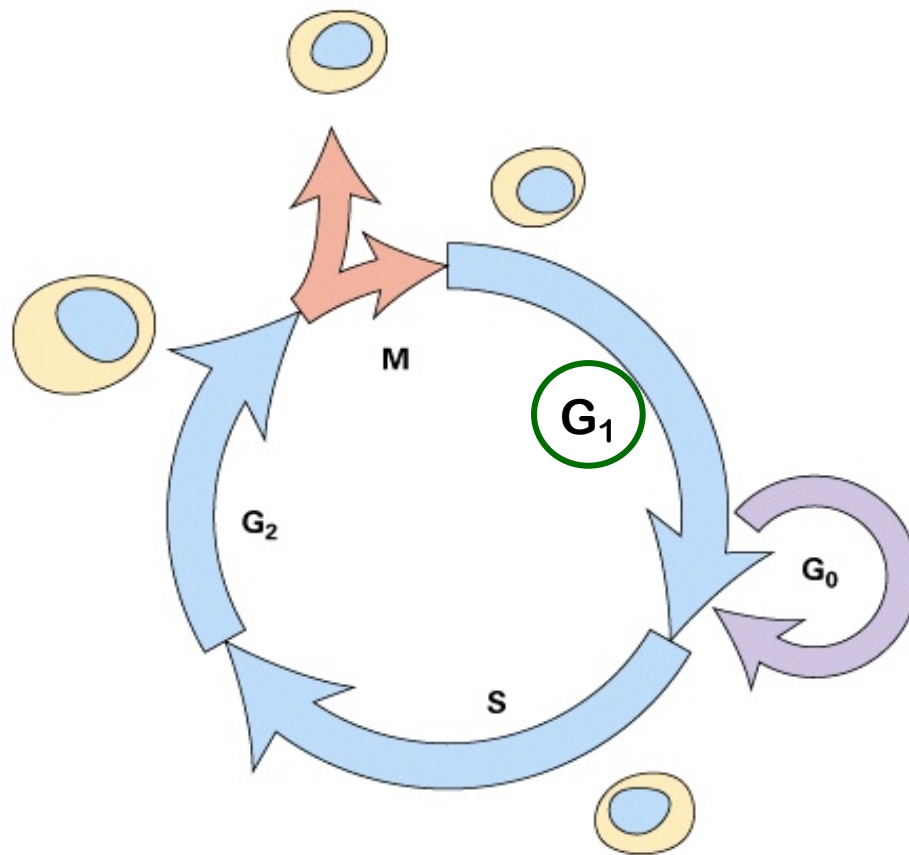
Aumento numerico
della popolazione
cellulare



Cosa succede alla
coltura primaria?

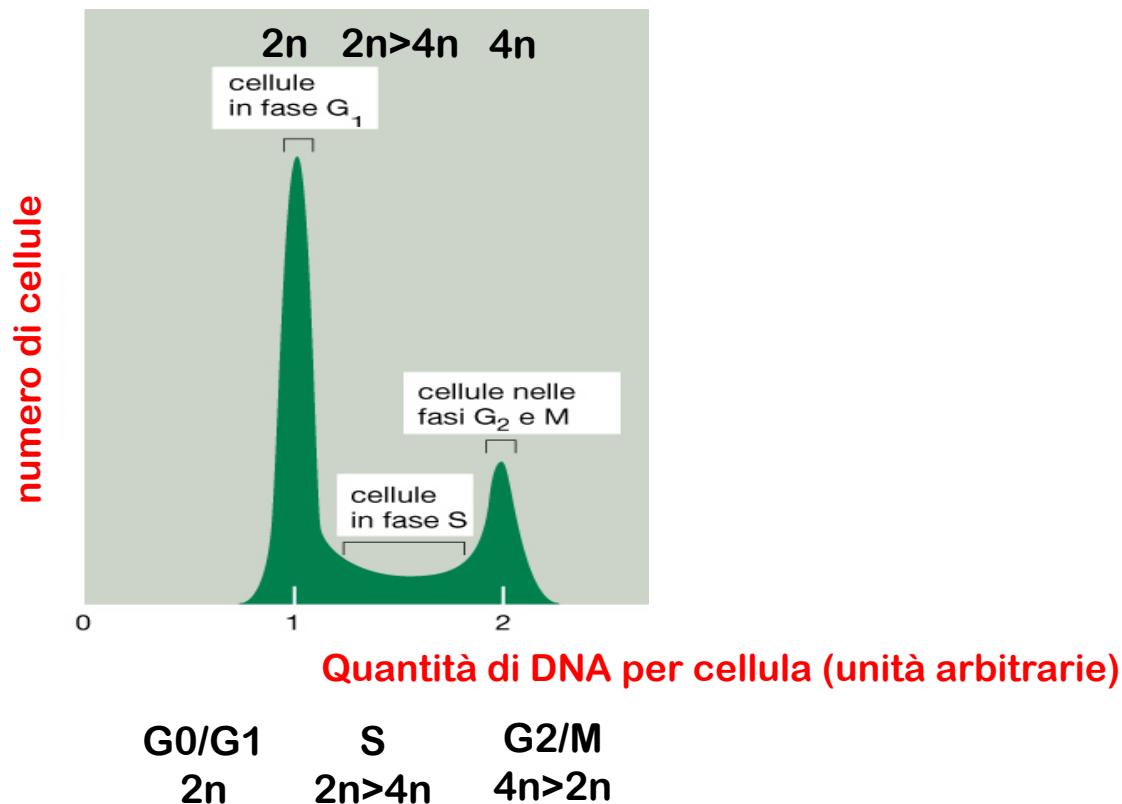
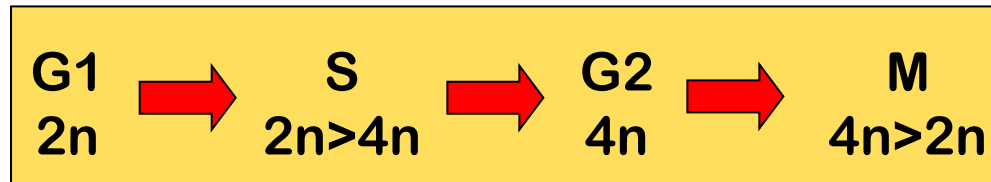
Tempo

**ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE
MEDIANTE ANALISI del CONTENUTO DI DNA delle
cellule utilizzando il CITOFLUORIMETRO**



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

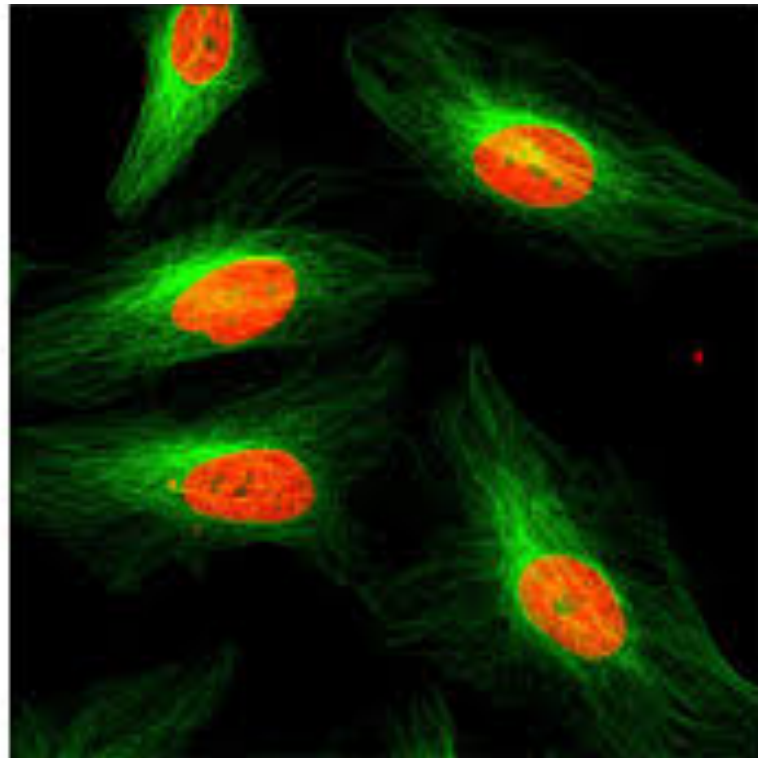
mediante citofluorimetria è possibile analizzare singole cellule di una popolazione valutandone il contenuto di DNA



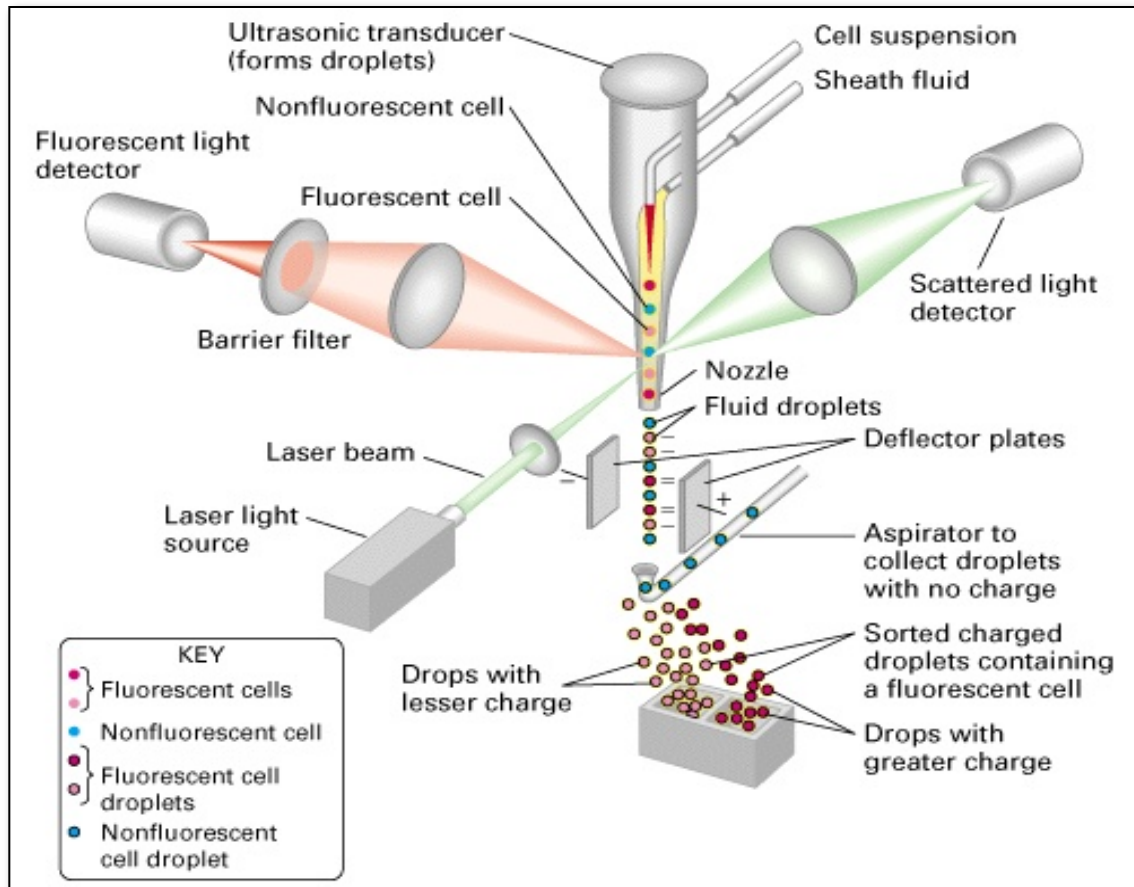
COME POSSIAMO MISURARE IL CONTENUTO DI DNA?

Si incubano le cellule con **sostanze fluorescenti** che intercalano il DNA (es. **propidio ioduro**).

La quantità di fluorescenza emessa da ciascuna cellula è **direttamente proporzionale al contenuto di DNA**.



CITOFUORIMETRO:



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

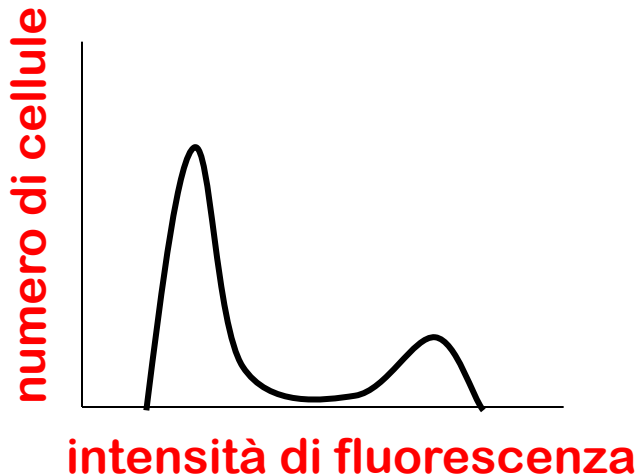
Oppure sostanze fluorescenti che legano altre componenti cellulari (tra cui **anticorpi coniugati con fluorocromi** (vedi)

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

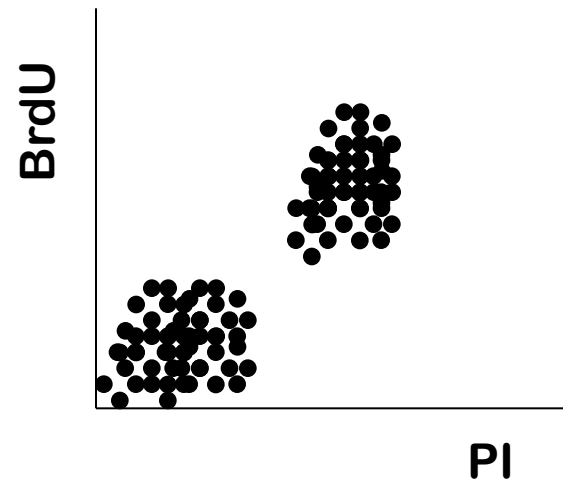
- Lo strumento produce diversi tipi di **output**:

- 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

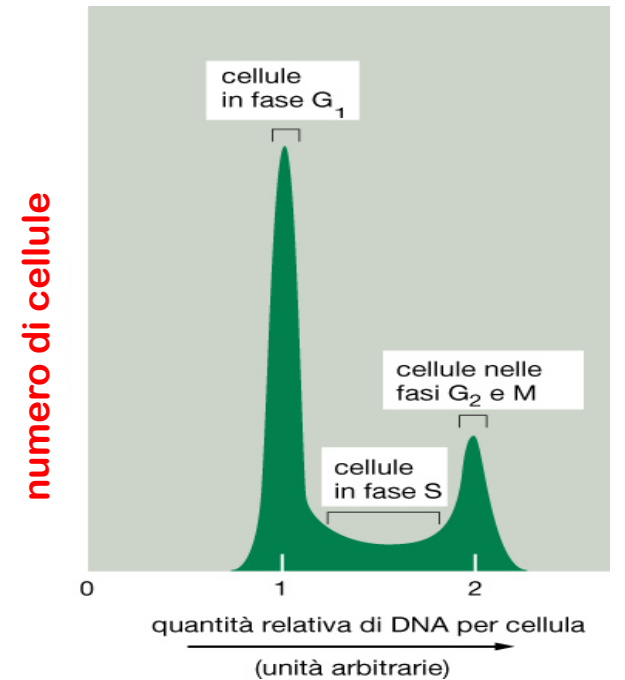
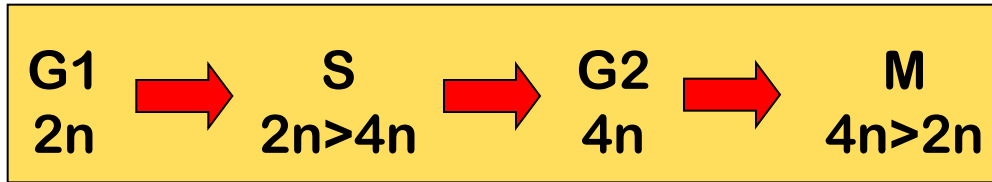


Studio del ciclo cellulare mediante citofluorimetria:

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**):

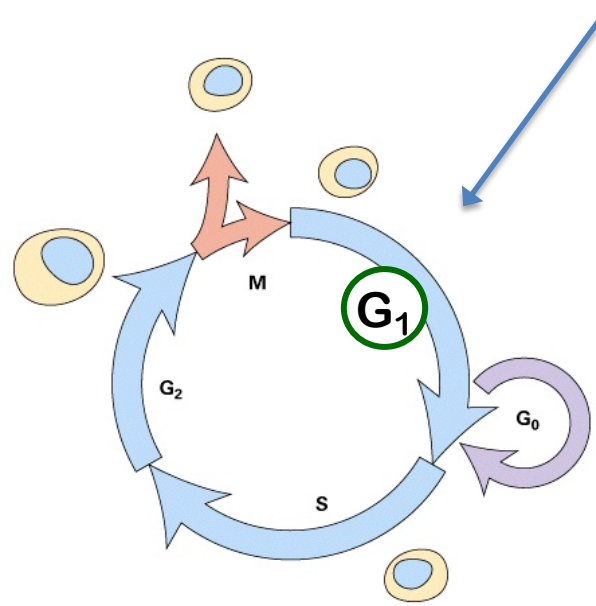
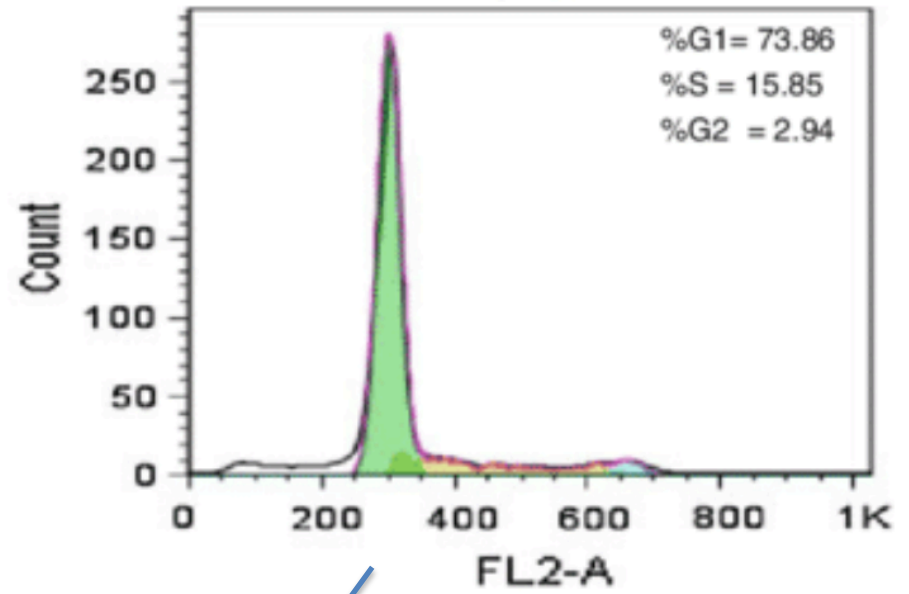
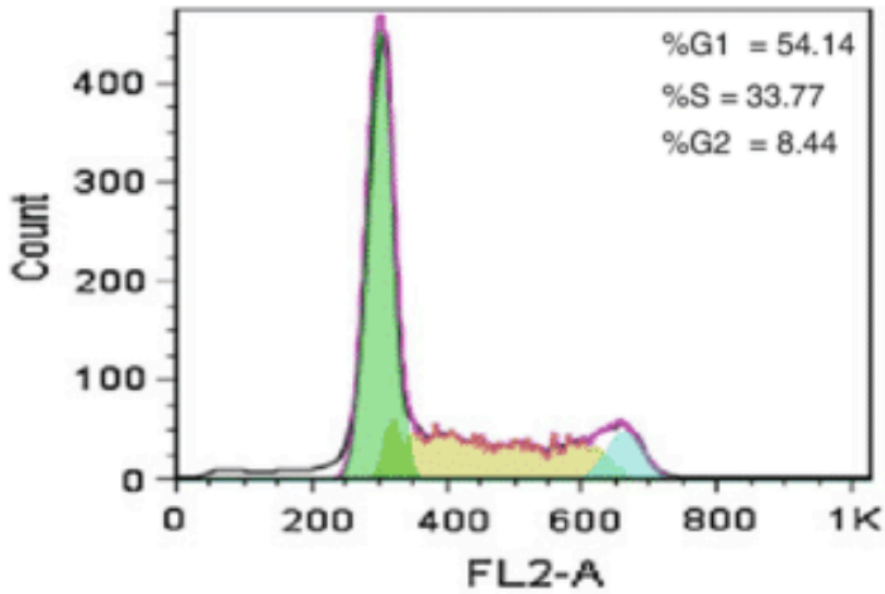
in ciascuna cellula **l'intensità** di fluorescenza è proporzionale alla **quantità** di DNA



G0/G1	S	G2/M
2n	2n>4n	4n>2n

intensità di fluorescenza

ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN COLTURA



LE COLTURE CELLULARI PRIMARIE

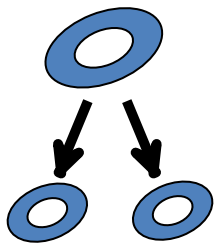
La maggiorparte delle cellule somatiche può essere mantenuta in coltura per un periodo limitato di tempo per poi andare spontaneamente incontro ad un processo comunemente noto come **senescenza**, in cui le cellule cessano di dividersi ed infine muoiono. Il numero massimo di divisioni cellulari in coltura 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).

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

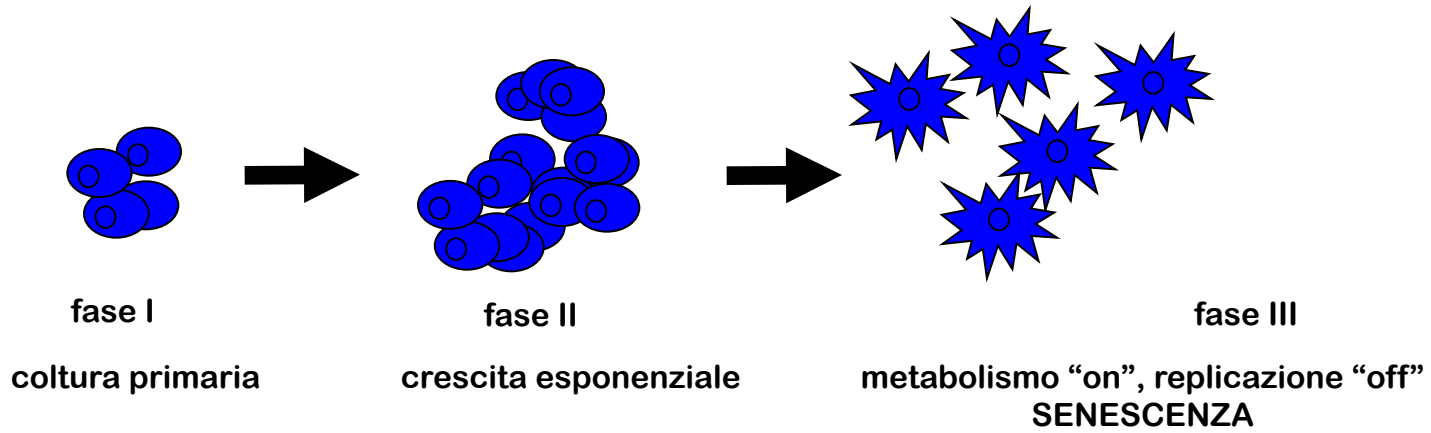
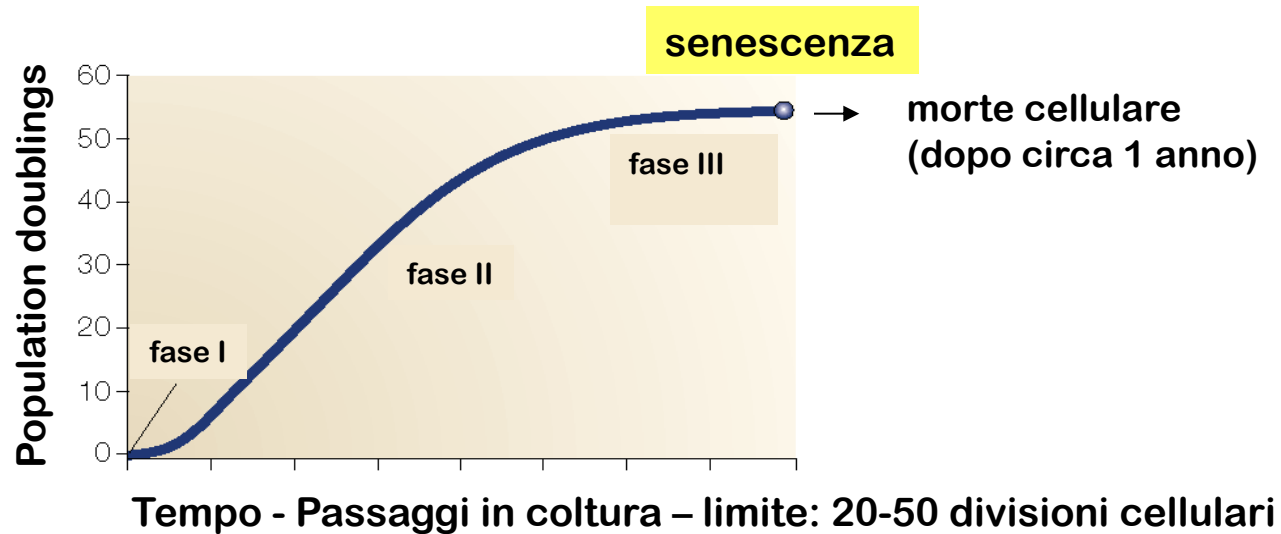
REVERSIBILMENTE causa deprivazione da siero o confluenza, se stimolate o diluite, rientrano in ciclo

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**

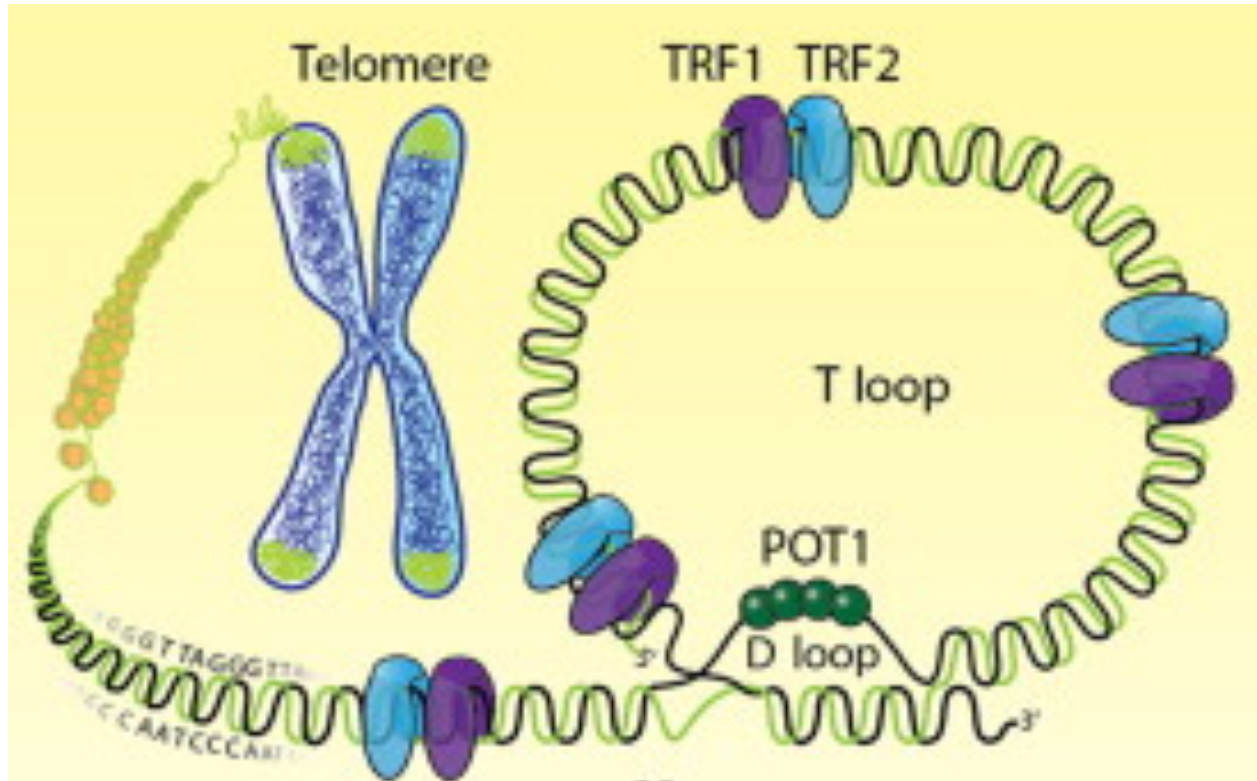
ECCEZIONI :

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

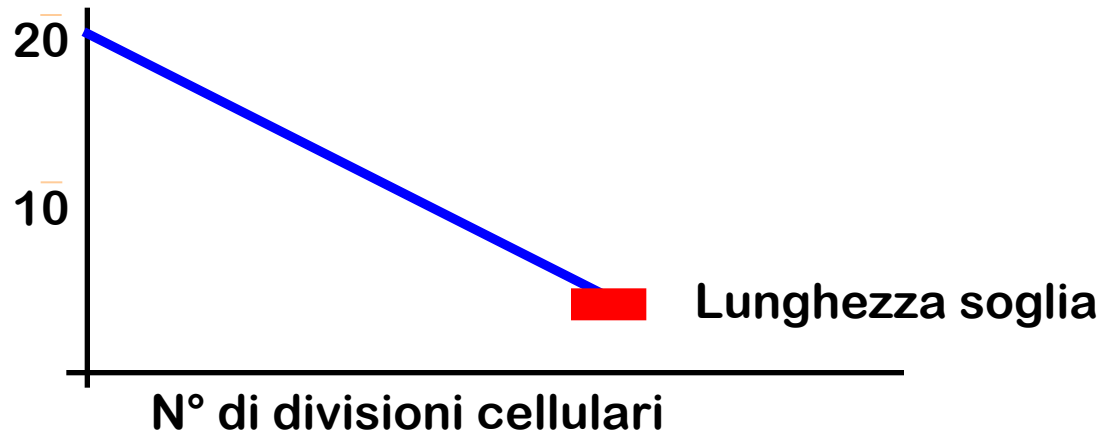
Vertebrates



TTAGGG

human 10 kb
mouse 40 kb

Lunghezza
dei telomeri
in Kb
(nell'uomo)



L'accorciamento dei telomeri può causare alterazioni cromosomiche strutturali

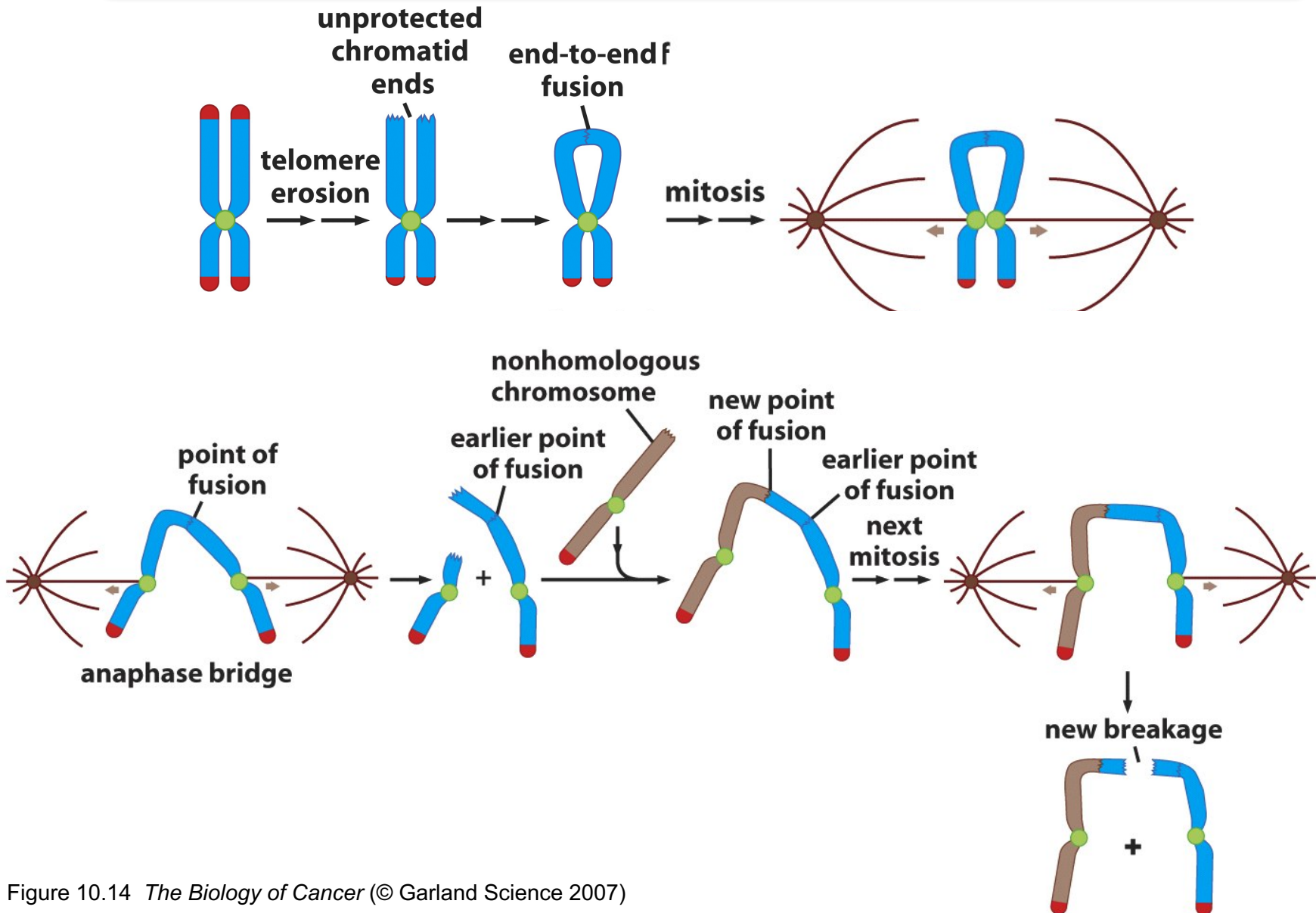
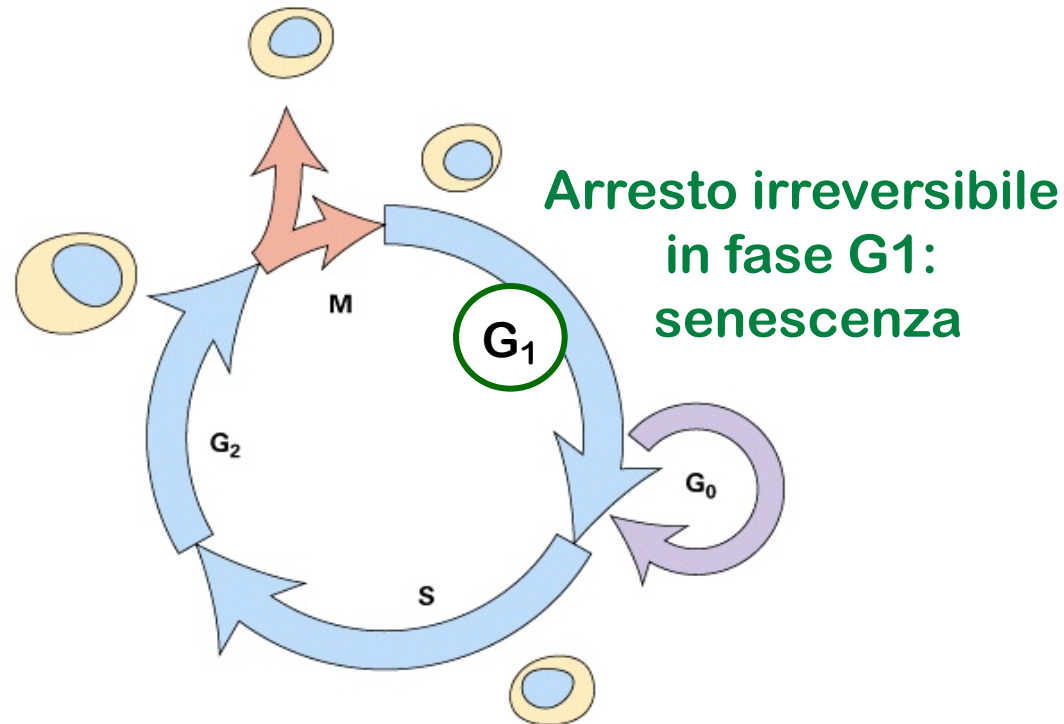


Figure 10.14 *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007)

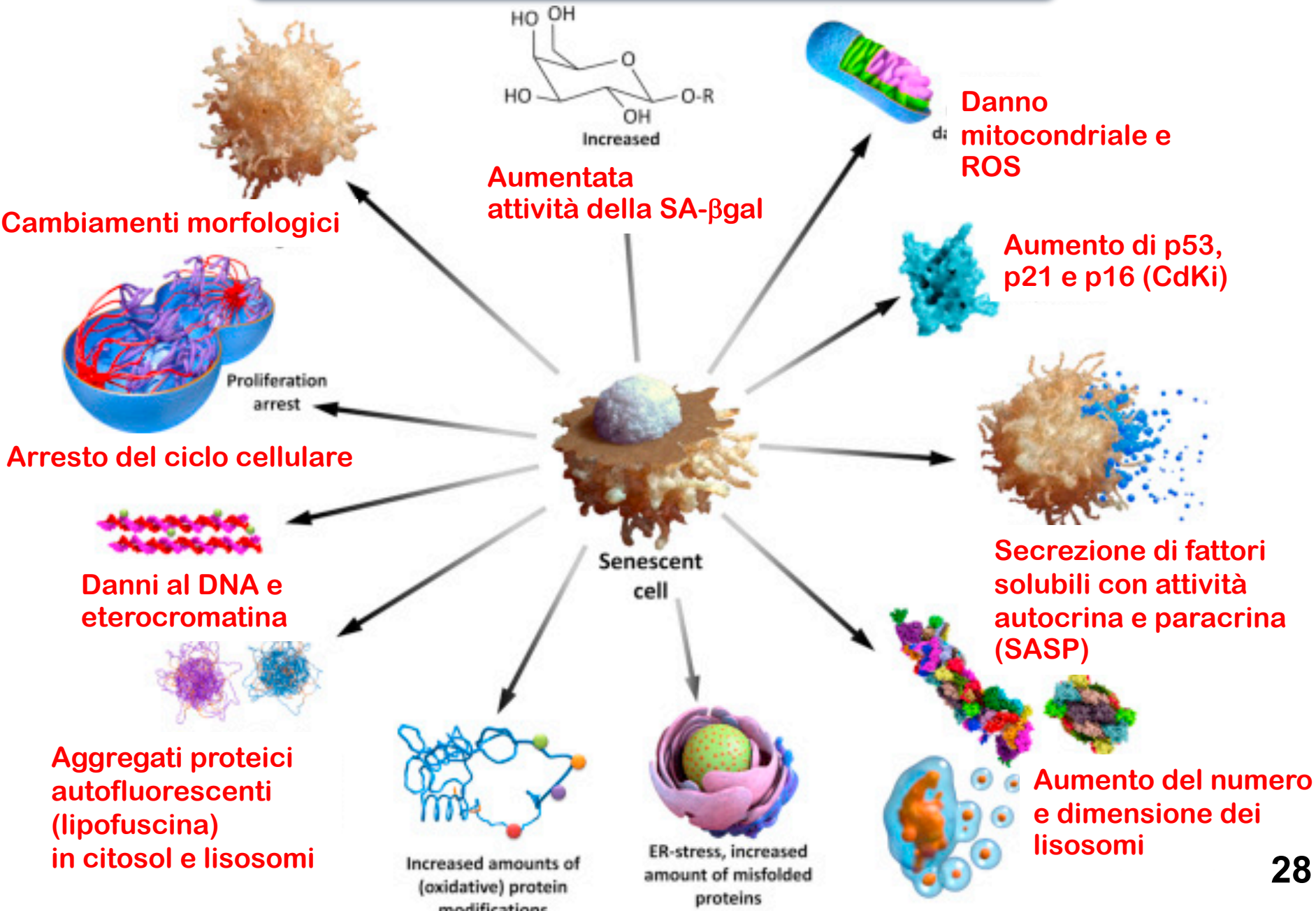
SENESCENZA REPLICATIVA DI CELLULE IN COLTURA



Le cellule senescenti:

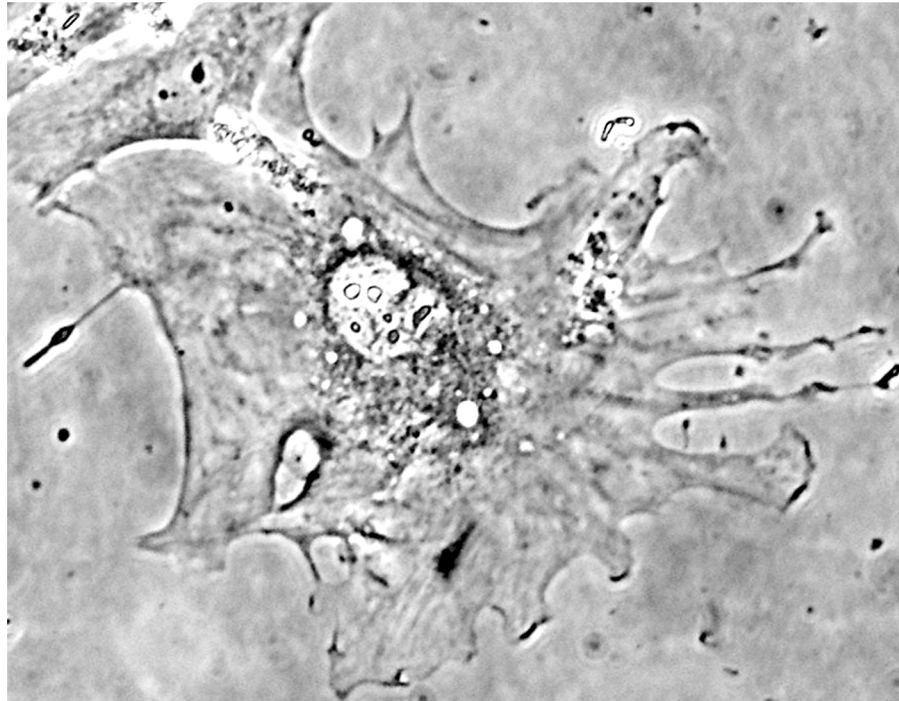
- sono **permanentemente arrestate** alla **fase G₁** del ciclo cell
- **non rientrano in ciclo** dopo stimolazione con mitogeni né dopo diluizione
- rimangono **metabolicamente attive** per lunghi periodi

Caratteristiche delle cellule senescenti



IDENTIFICAZIONE DI CELLULE SENESCENTI in coltura:

Al microscopio ottico: morfologia appiattita e ramificata

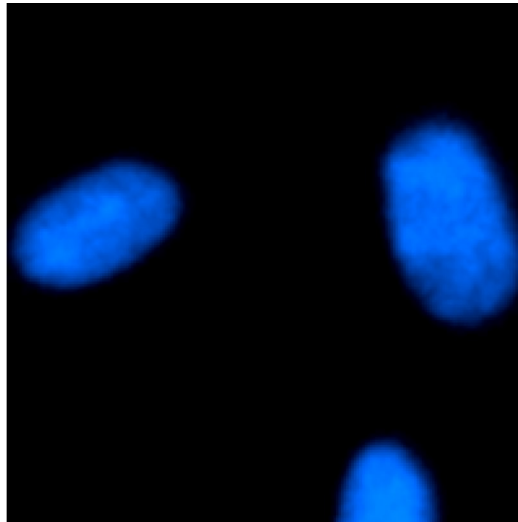


IDENTIFICAZIONE DI CELLULE SENESCENTI in coltura:

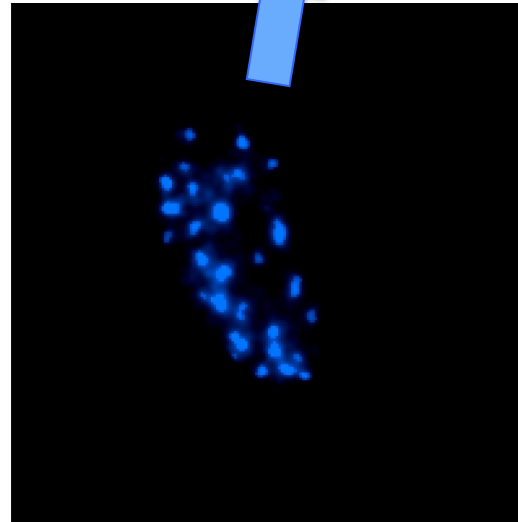
Foci di eterocromatina (SAHF)

Colorazione del DNA
con la molecola
fluorescente DAPI

Repressione di geni che
inducono la progressione del
ciclo cellulare:
istoni, cicline A e B, PCNA



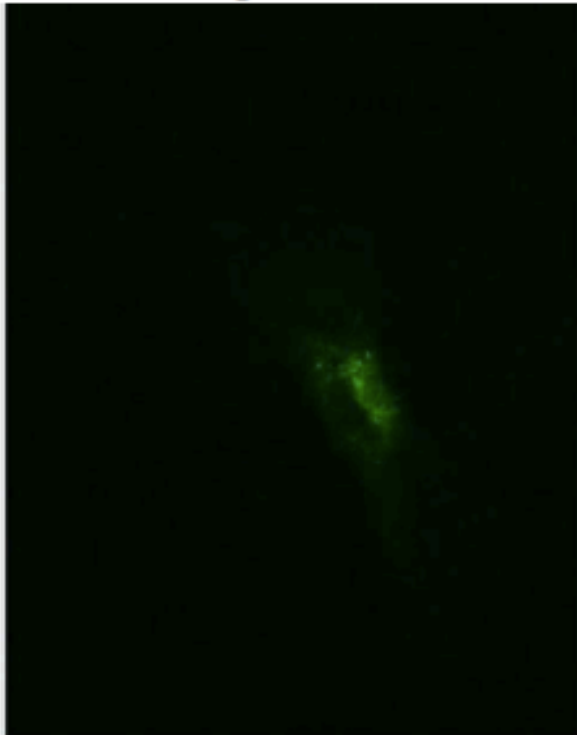
Cellule proliferanti



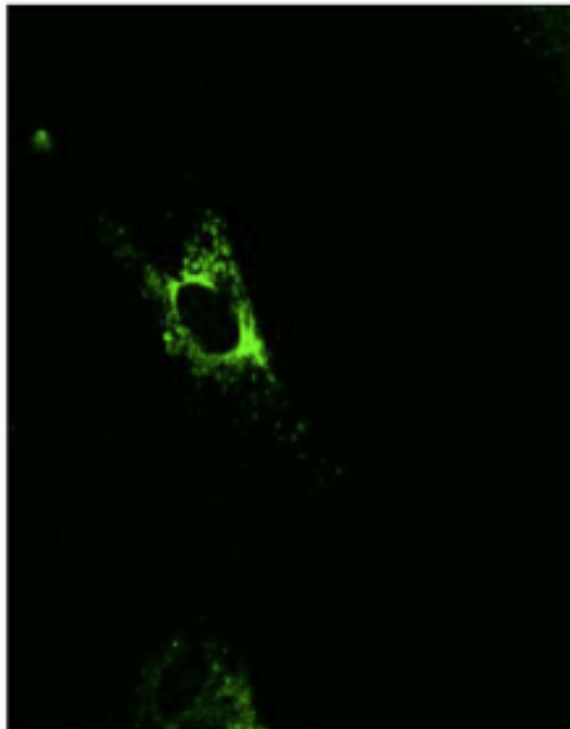
Cellule senescenti

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

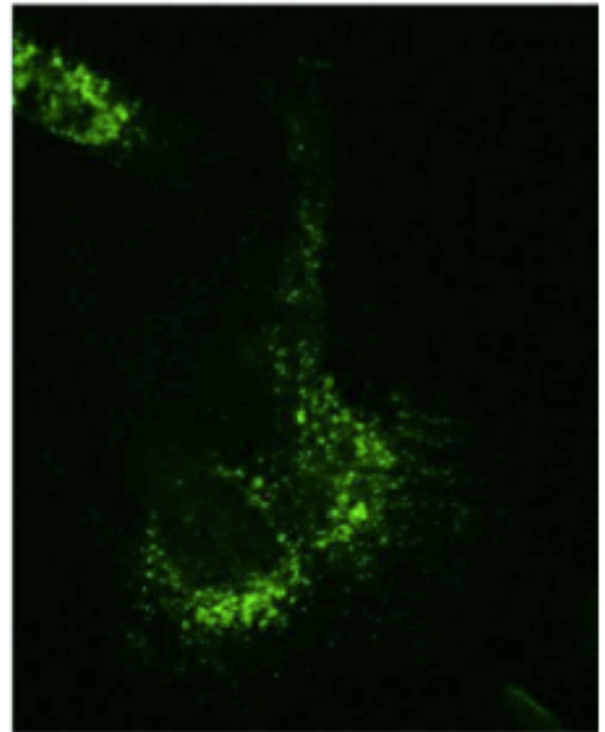
A. Young fibroblast



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

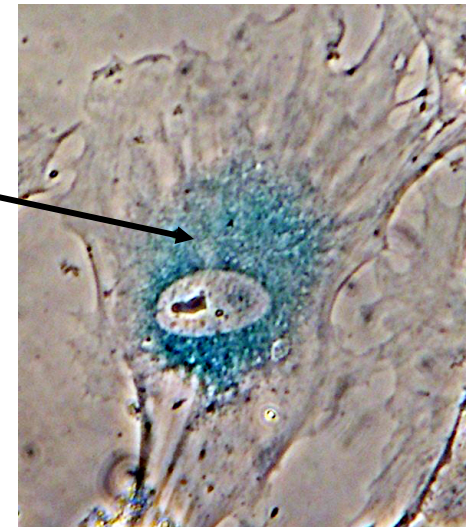
SA pH=6

32

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.

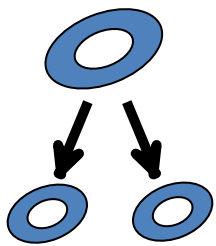
L'attività dell'enzima beta galattosidasi può essere identificata con una varietà di substrati che hanno il galattosio legato ad un altro gruppo chimico tramite un legame beta-D-glicosidico. Il composto può avere proprietà che divengono visibili oppure variano dopo la sua idrolisi dal galattosio. Molti 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.

LE COLTURE CELLULARI PRIMARIE

COLTURA PRIMARIA



divisioni cellulari

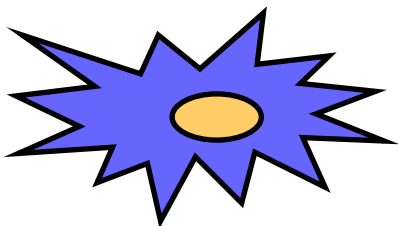


numero limitato di
PASSAGGI IN CULTURA

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**

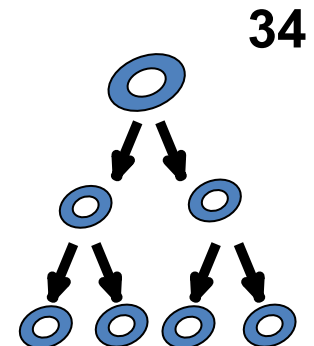


SENESCENZA

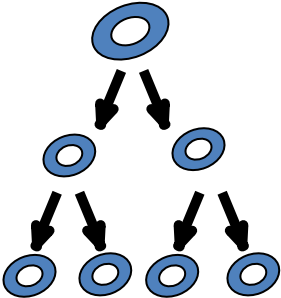
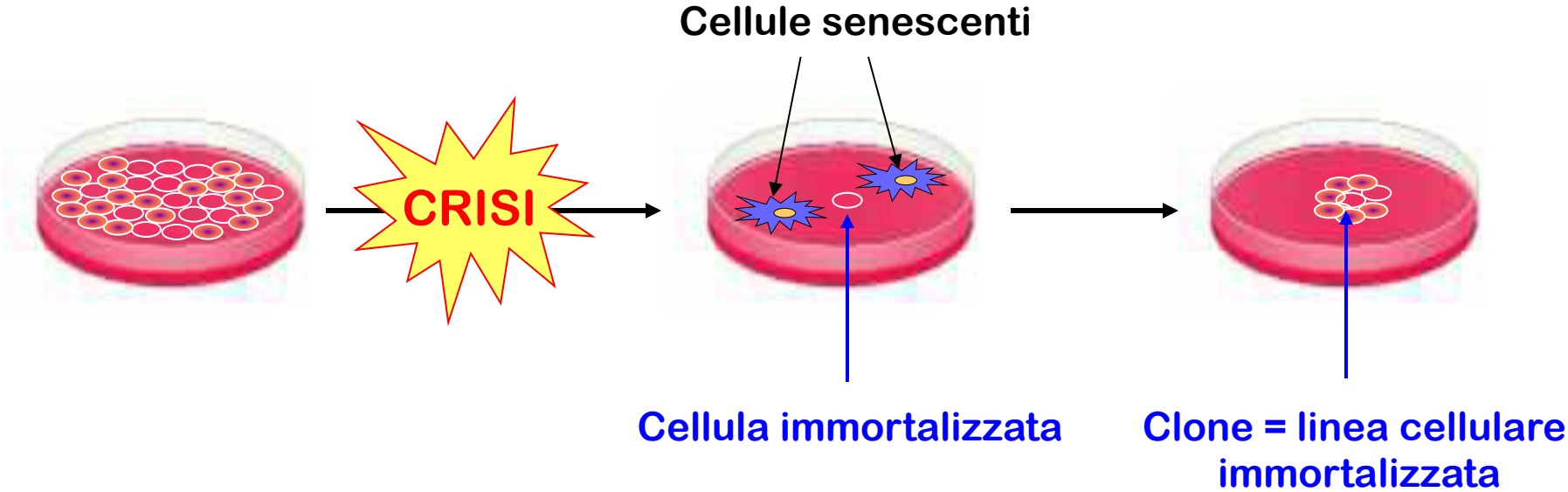


casuale acquisizione della
capacità di dividersi indefinitamente

IMMORTALIZZAZIONE SPONTANEA
LINEE CELLULARI STABILIZZATE

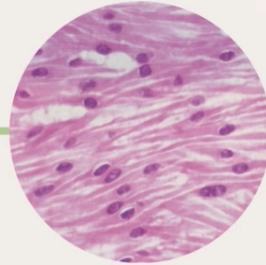


IMMORTALIZZAZIONE SPONTANEA DI CELLULE IN CULTURA

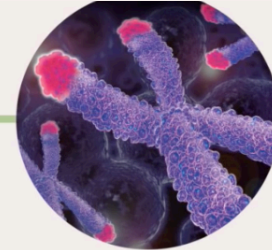


Colture primarie e linee cellulari stabilizzate

Colture primarie

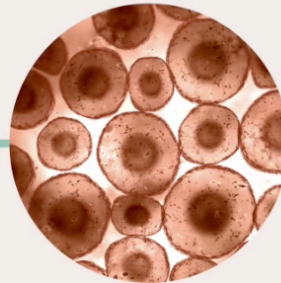


Possono dividersi un numero limitato di volte



Ottenute direttamente da tessuti

Linee cellulari

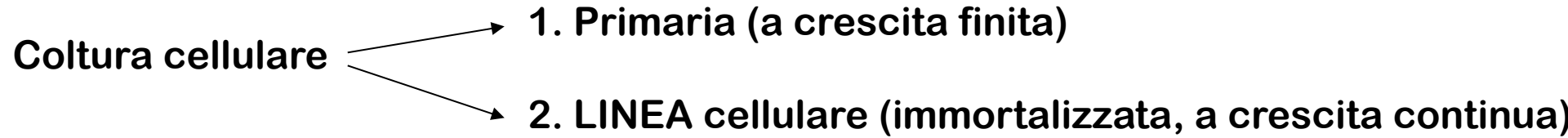


Utili per la ricerca a lungo termine



Si dividono indefinitamente

Colture primarie e linee cellulari stabilizzate

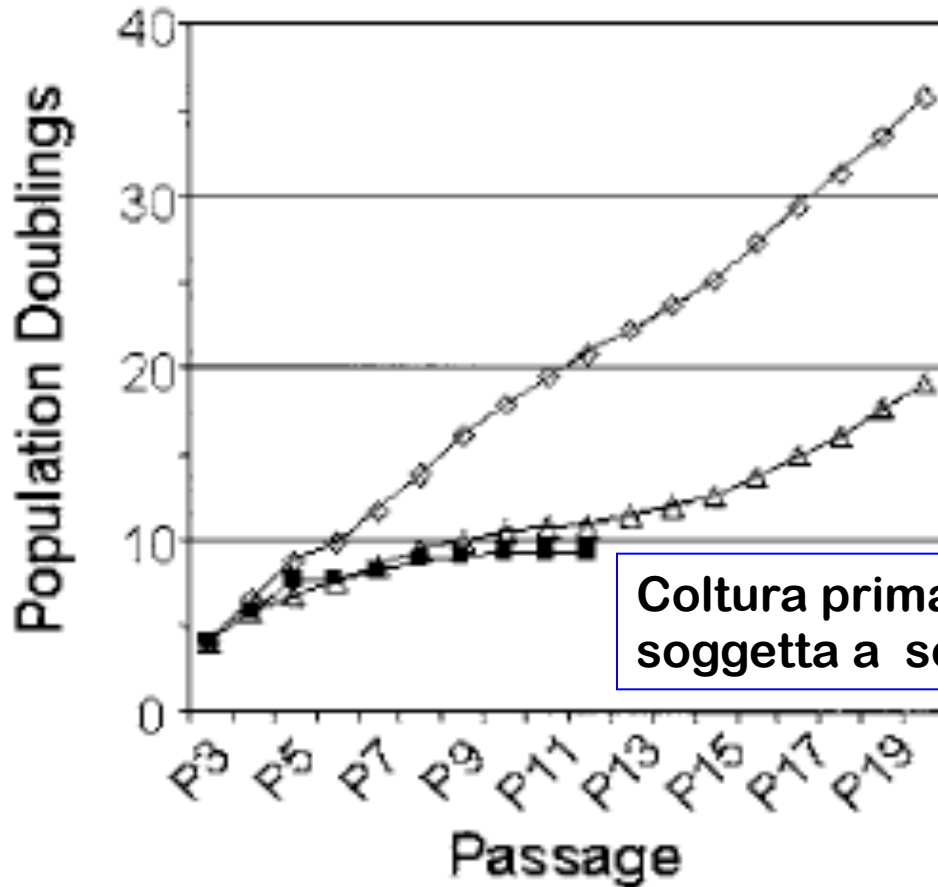


1. Costituita da cellule coltivate in vitro per un periodo di tempo e per un numero di divisioni limitati.
2. Costituita da cellule a crescita illimitata.

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

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

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.

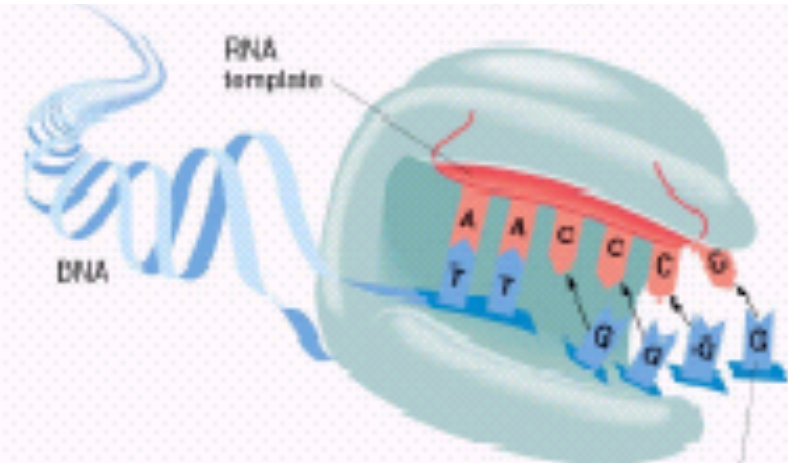
Di conseguenza, si può INDURRE l'immortalizzazione alterando selettivamente i geni coinvolti nella senescenza.

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.

L'enzima TELOMERASI

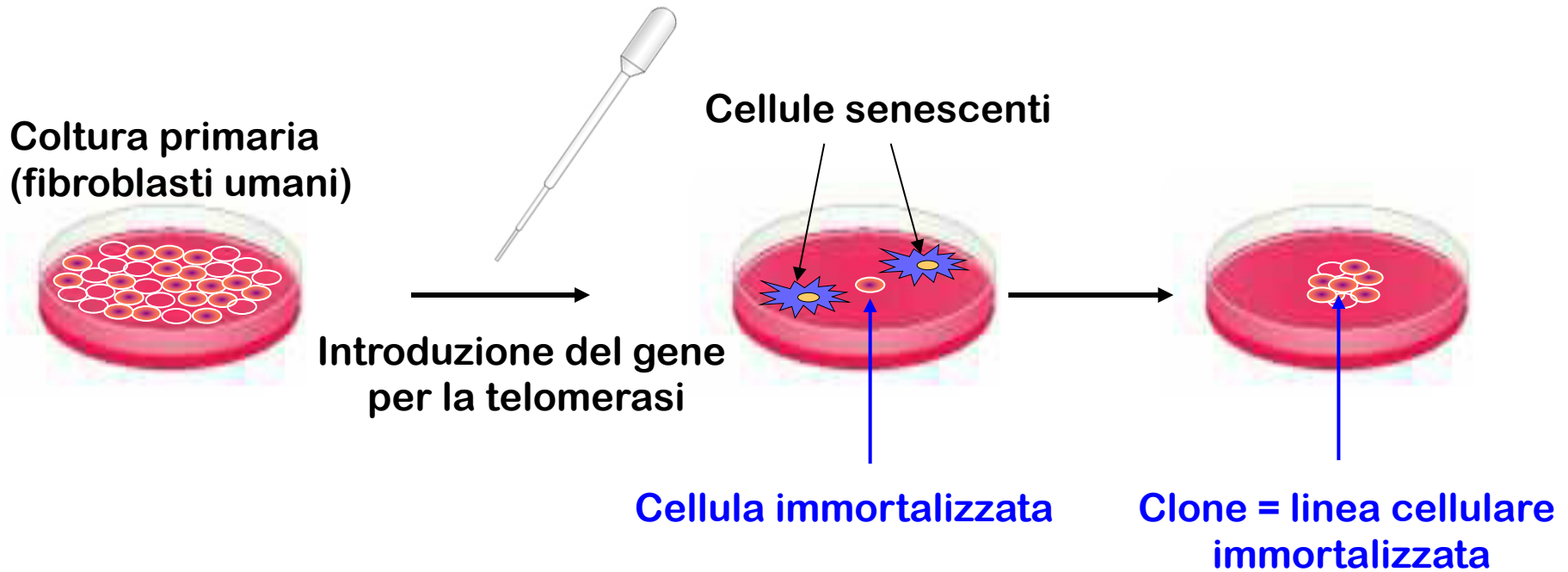


Attiva in cellule

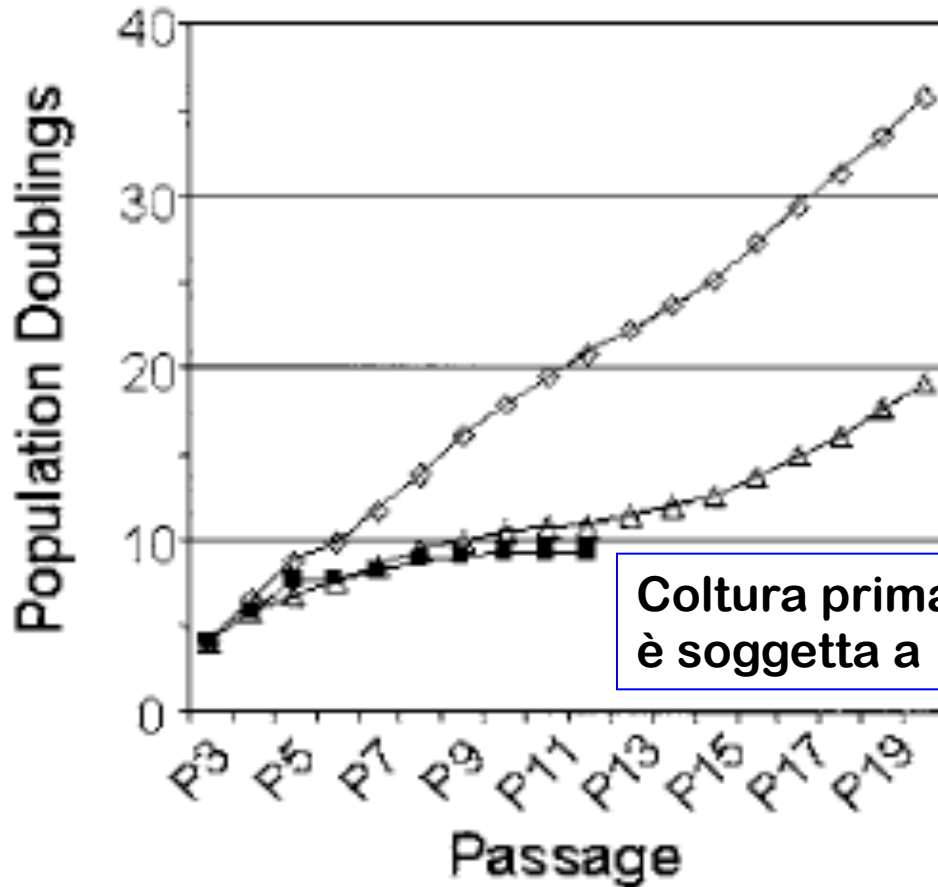
- staminali e germinali
- tumorali (80-90%)

Assente in cellule somatiche normali

Immortalizzazione di cellule in coltura mediante espressione del gene per la telomerasi (RTase) hTERT



Immortalizzazione di cellule in coltura mediante espressione del gene per la telomerasi (Rtase) hTERT

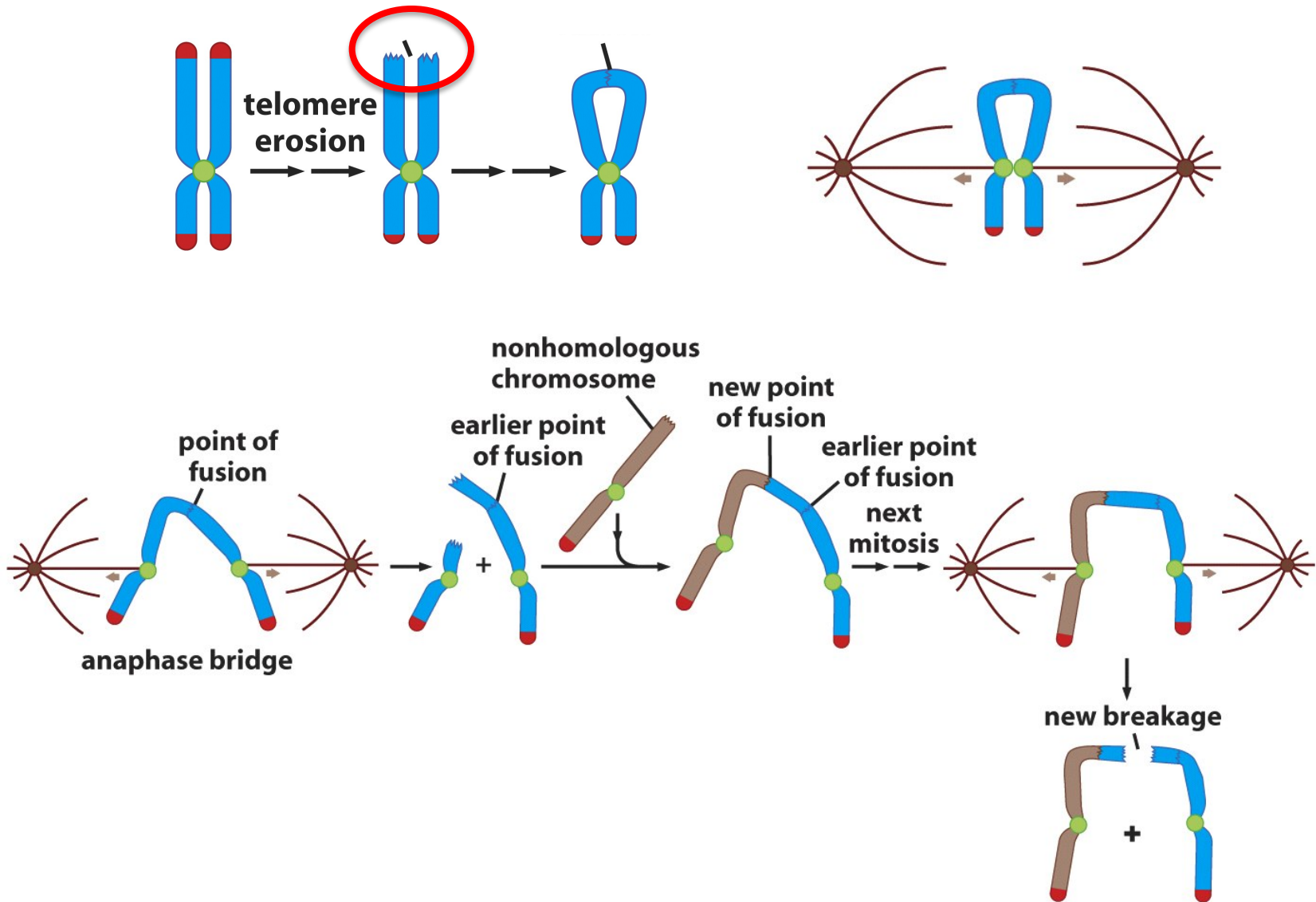


Introduzione di hTERT:
si induce la proliferazione
indefinita

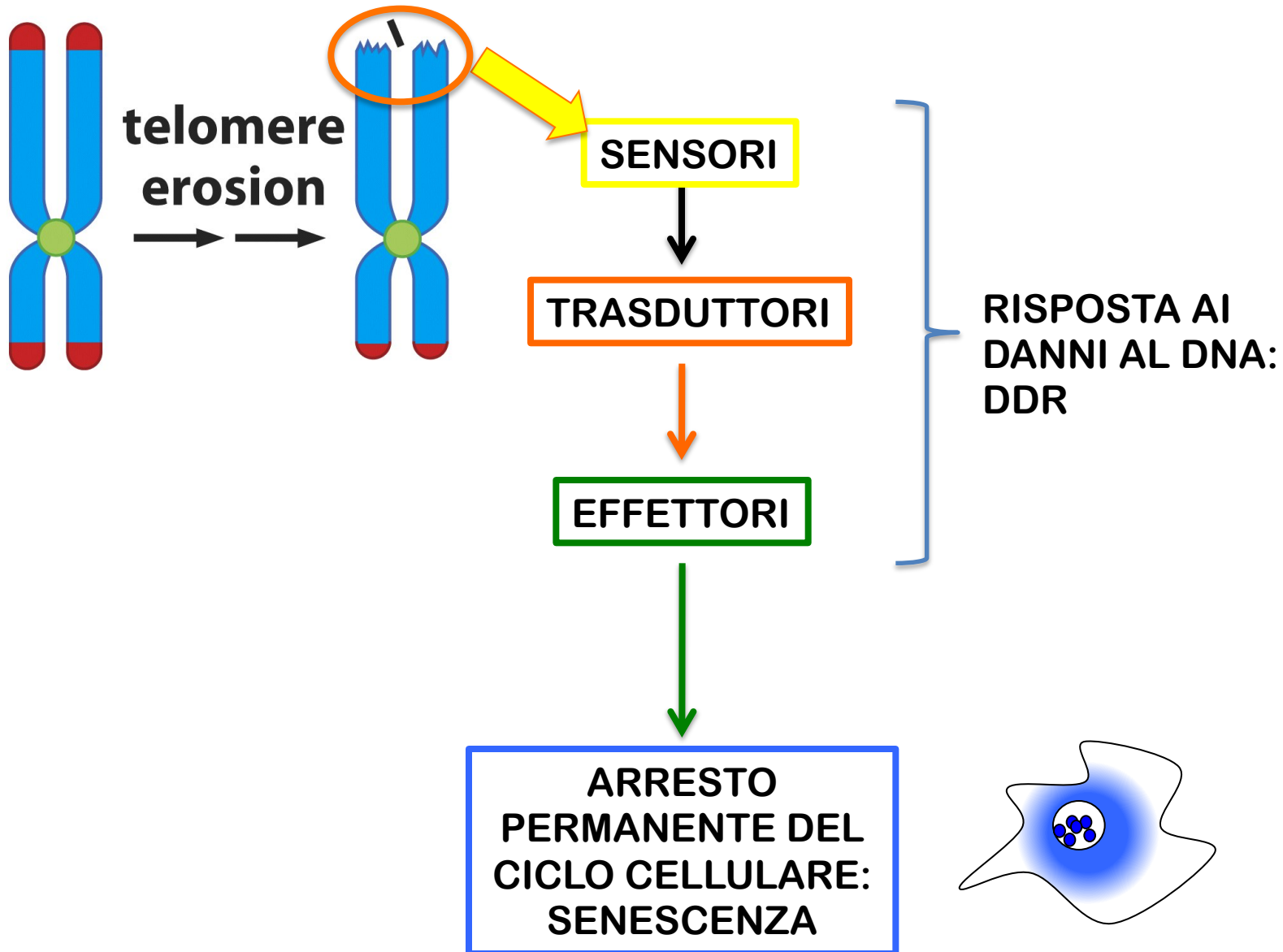
Coltura primaria:
è soggetta a senescenza

**APPROFONDIMENTO (fuori programma):
le pathways della senescenza**

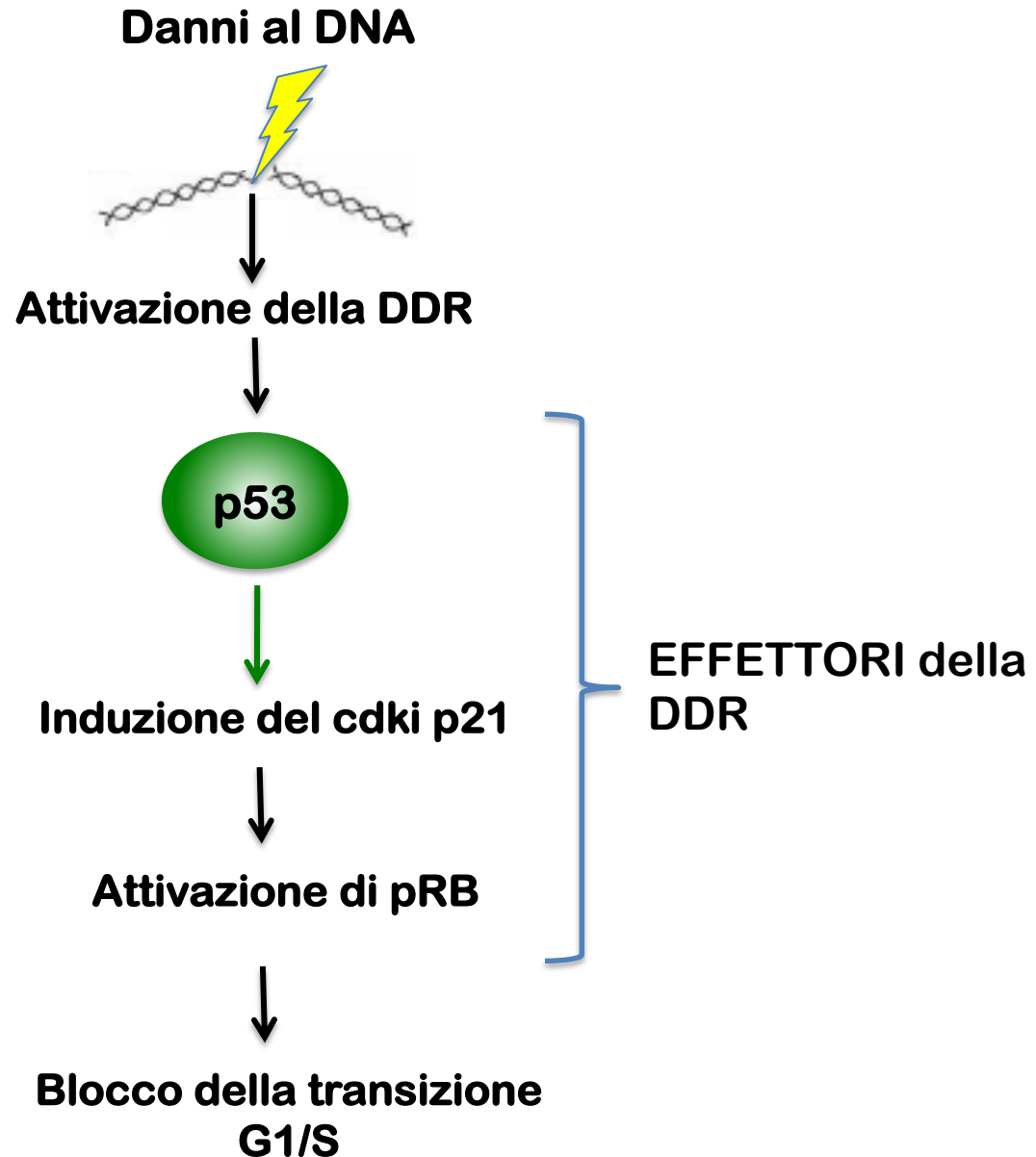
L'accorciamento dei telomeri causa DANNI AL DNA che possono portare a cicli di fusione-rottura causando instabilità genomica



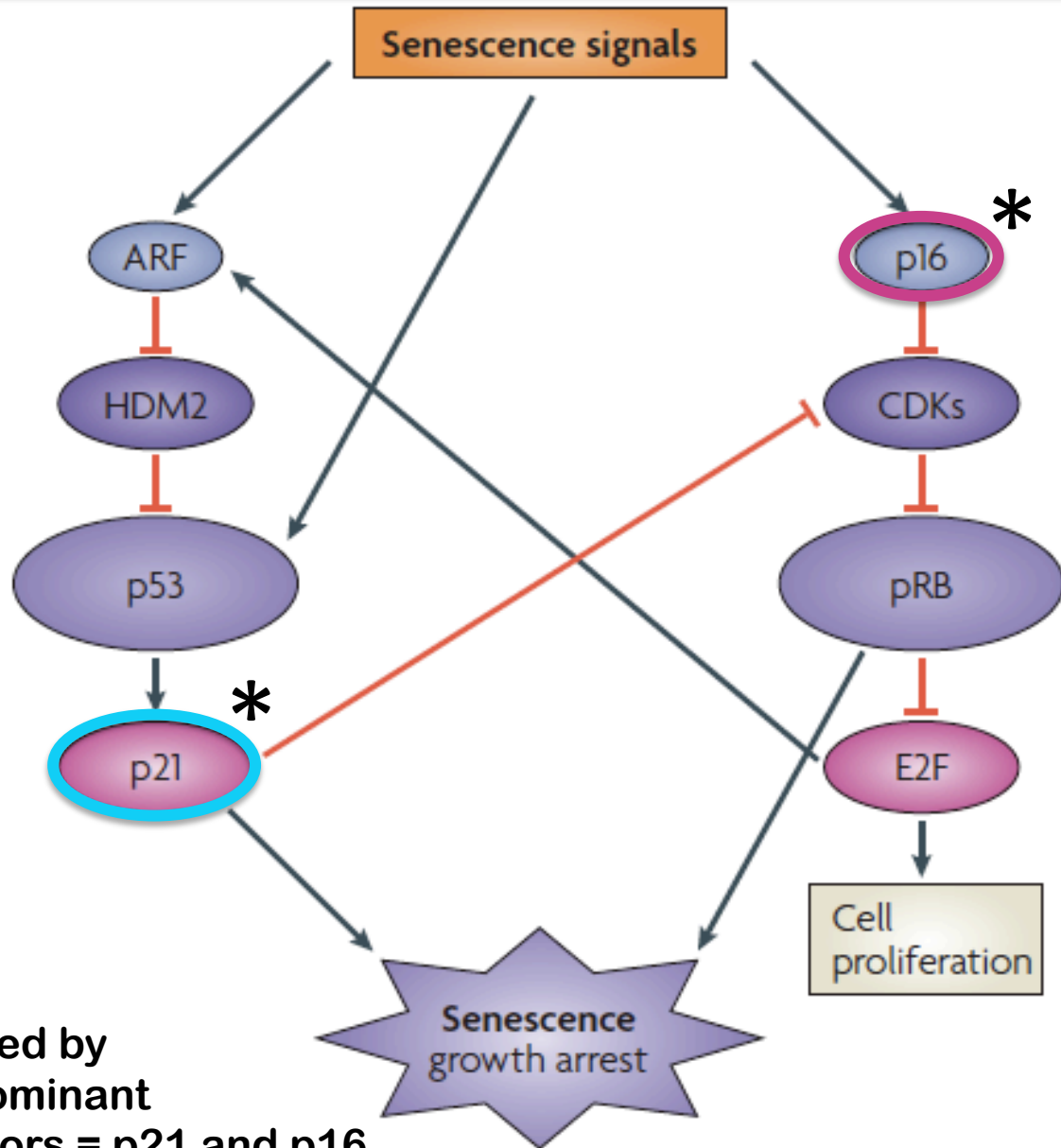
L'erosione dei telomeri è percepita come una rottura del DNA



L'attivazione della DDR causa l'arresto del ciclo cellulare associato alla senescenza



Pathways che mediano l'induzione della senescenza



* ARREST is caused by expression of dominant cell-cycle inhibitors = p21 and p16