Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

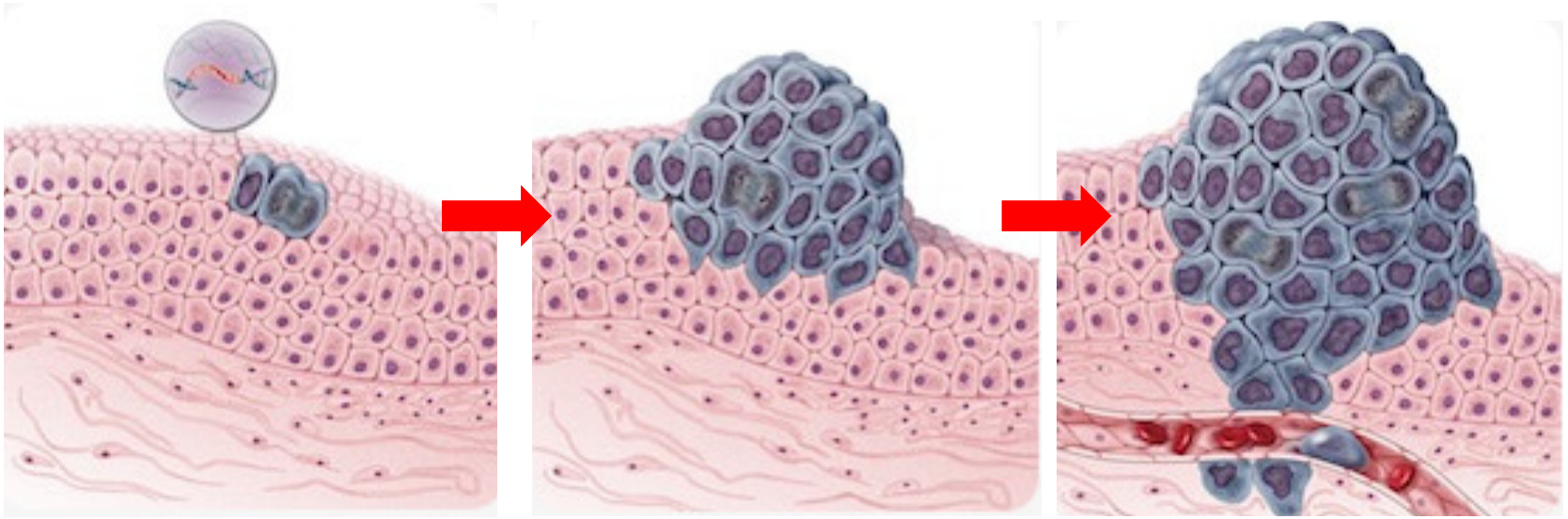
AA 2020-2021

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 10

LO STUDIO DELLA TRASFORMAZIONE NEOPLASTICA

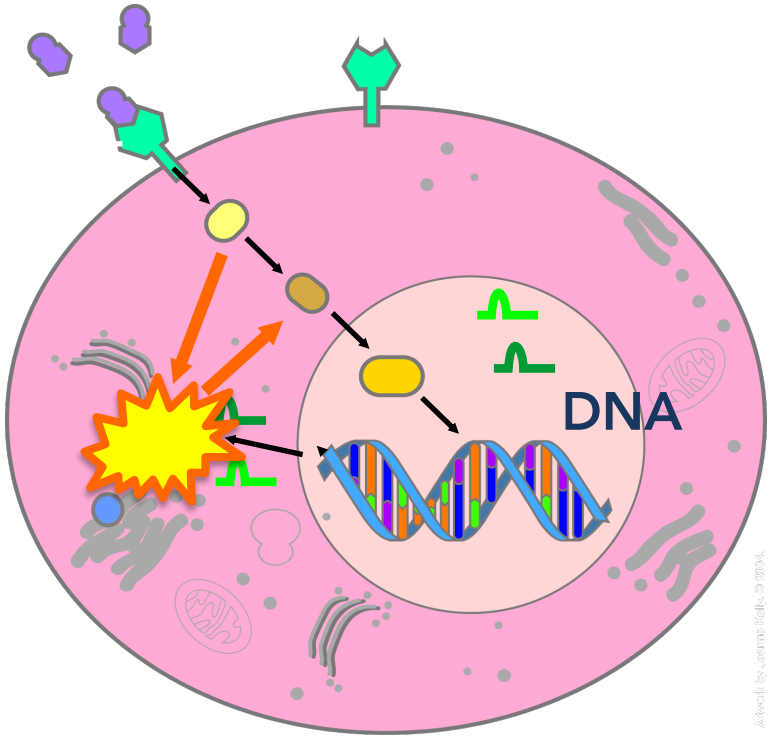
IL CANCRO



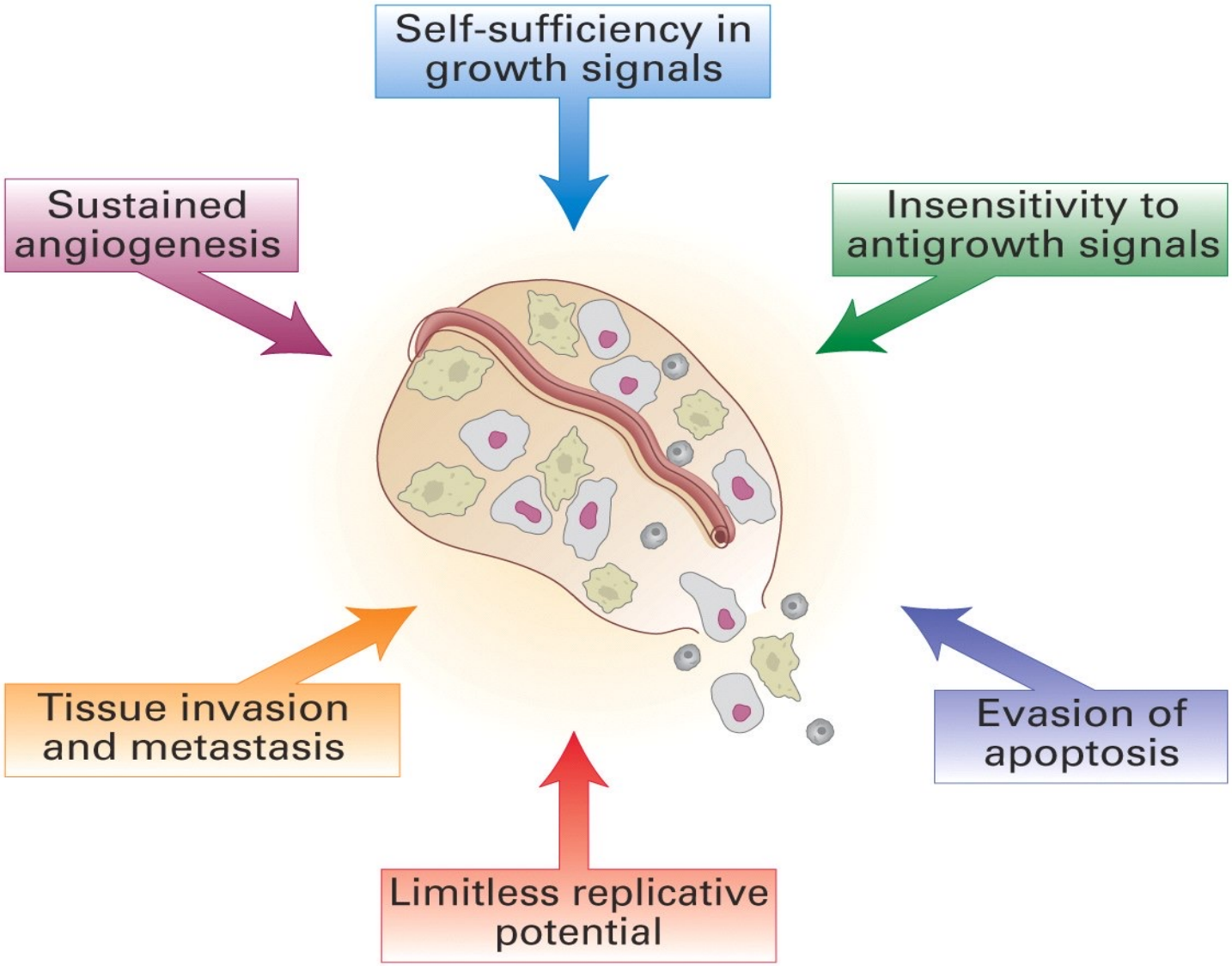
Il cancro è una patologia nella quale le cellule crescono e proliferano senza controllo, invadono e colonizzano i tessuti normali.

Le cause della trasformazione neoplastica

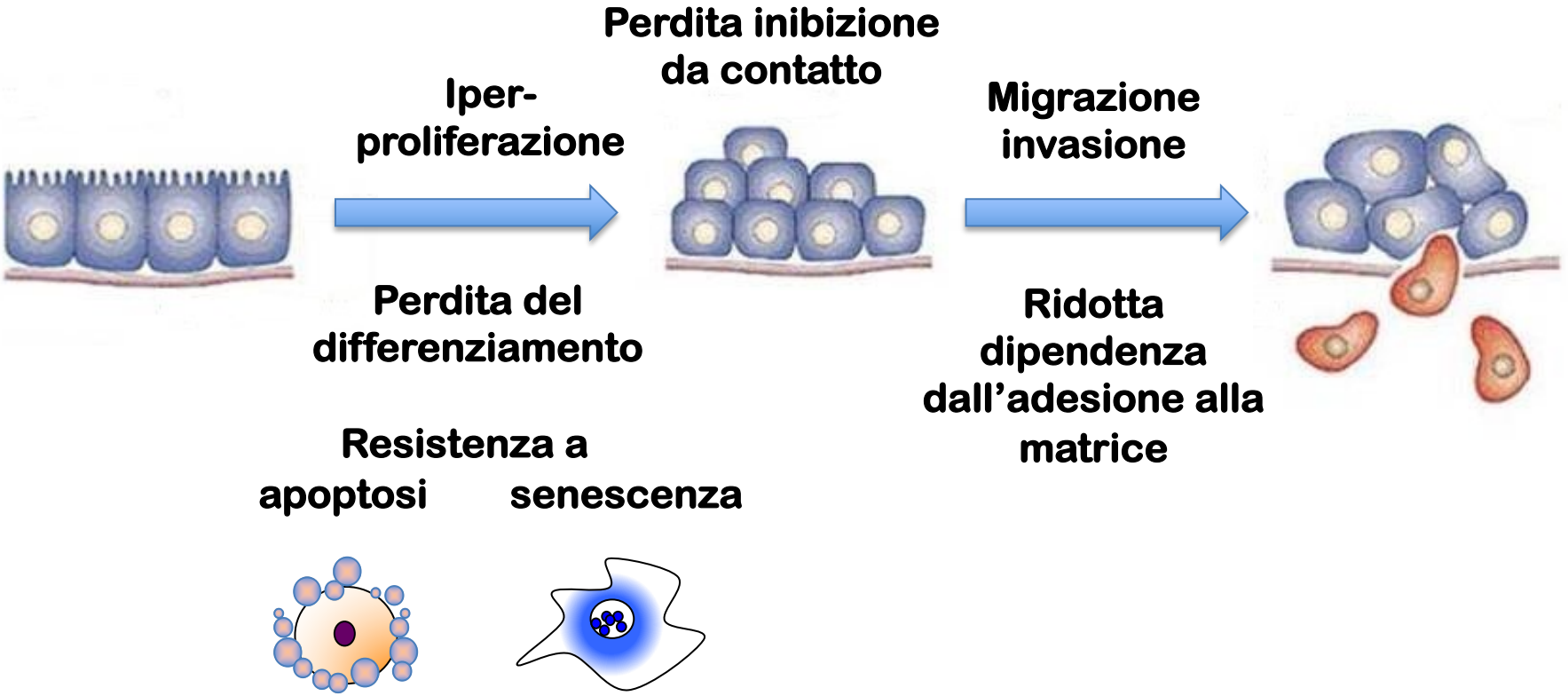
Alterazioni genetiche ed epigenetiche causano alterazioni nelle vie di segnalazione e nei checkpoint che regolano comportamenti cellulari fondamentali



Alterazioni dei comportamenti cellulari nel cancro



Caratteristiche delle cellule tumorali



LA RICERCA SUL CANCRO

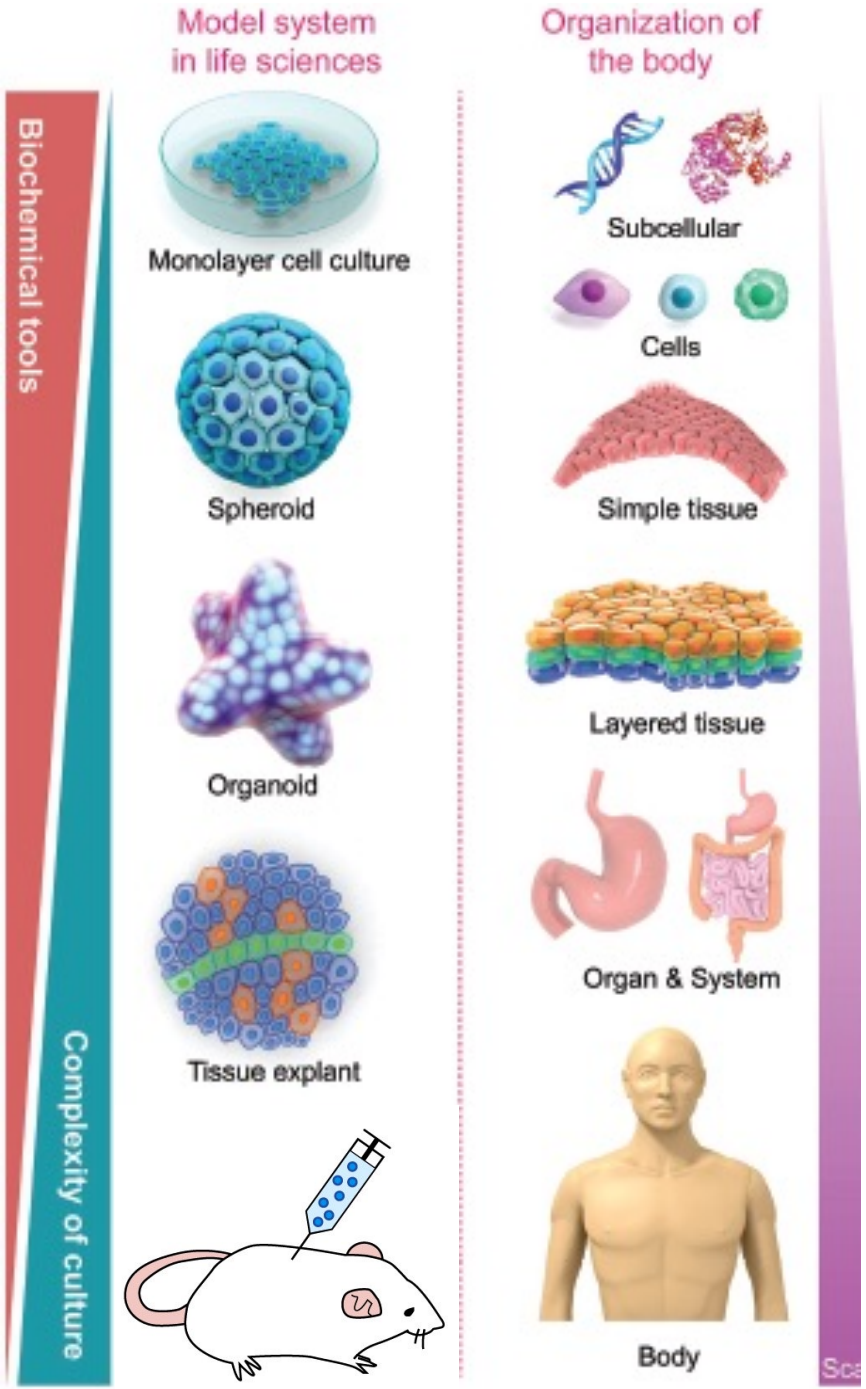
Identificare
geni, proteine e processi
responsabili
dell'insorgenza e
dell'aggressività tumorale

Diagnosi

Risposta
alle terapie già in uso

Nuove
terapie mirate

SISTEMI MODELLO PER LA RICERCA SUL CANCRO



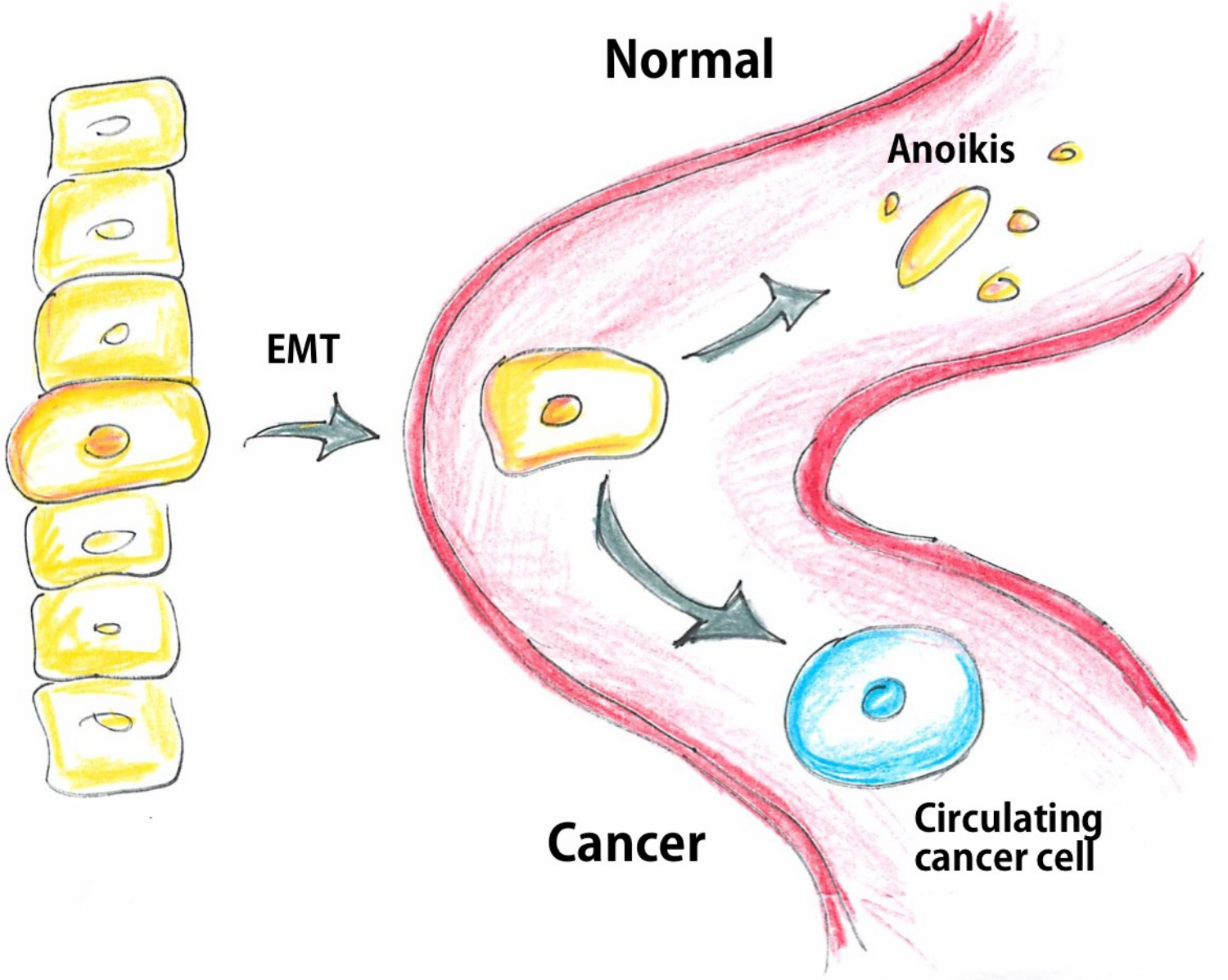
Saggi di trasformazione in vitro

- ✓ 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)

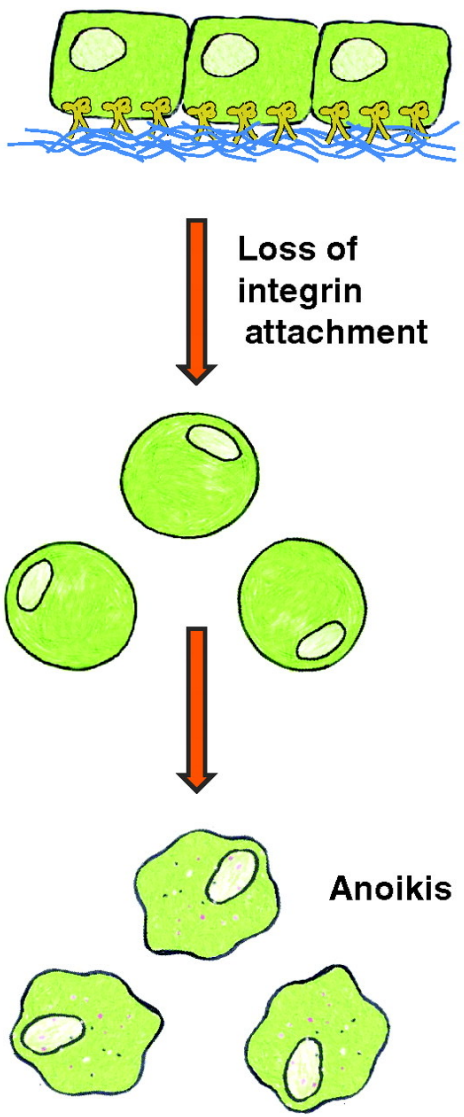
Saggio di crescita indipendente dal substrato
= SAGGIO DEL SOFT AGAR

Indica tumorigenicità/metastaticità

ANOIKIS = morte cellulare indotta dalla perdita di adesione



ANOIKIS

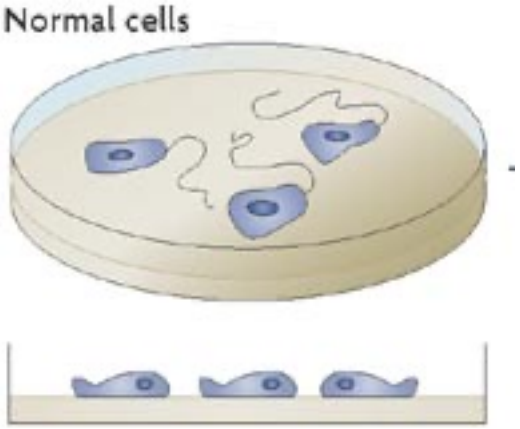


cellule NORMALI dipendono dalla formazione di contatti con la MATRICE EXTRACELLULARE per SOPRAVVIVERE.
In vitro: necessitano di un substrato per la crescita: se seminate in un terreno semisolido vanno incontro a morte

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**

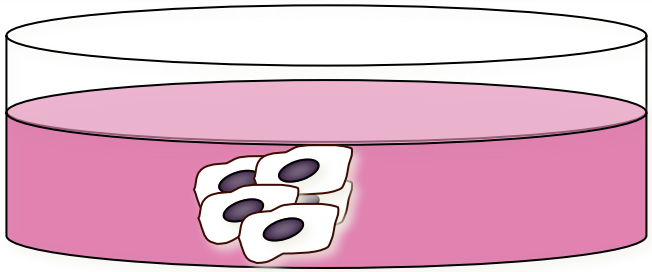
- **Le cellule vengono lasciate nell'incubatore e la crescita di colonie viene osservata dopo 1 o più settimane**

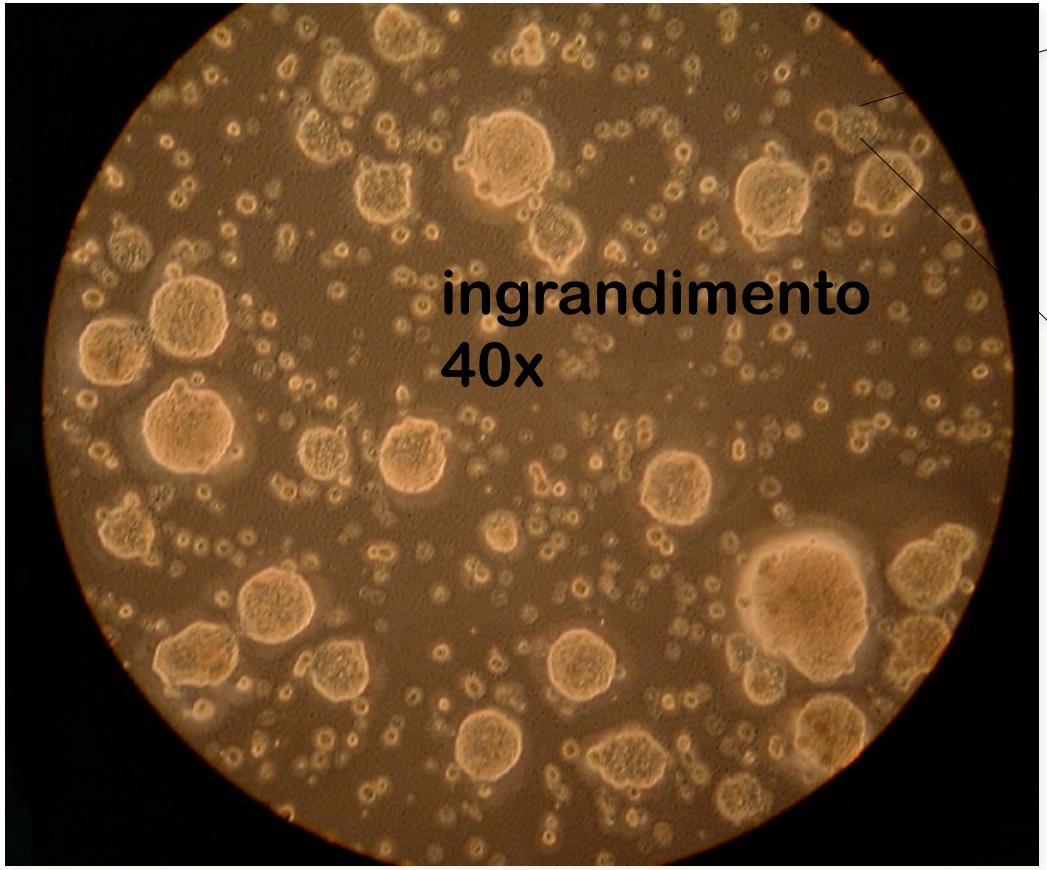
1° strato: terreno con agarosio 1%

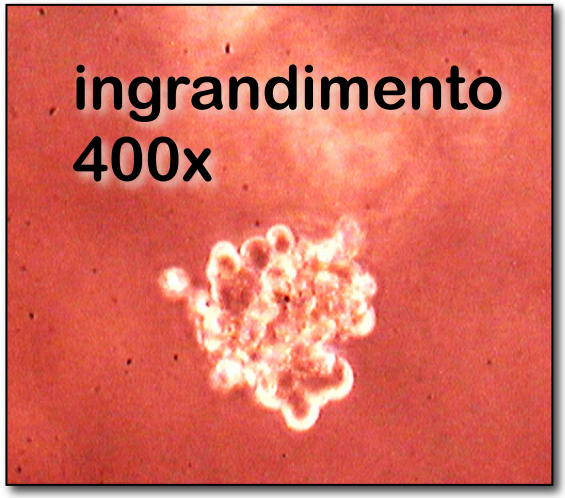
2° strato: cellule in terreno con agarosio 0.5%

…dopo 7 gg

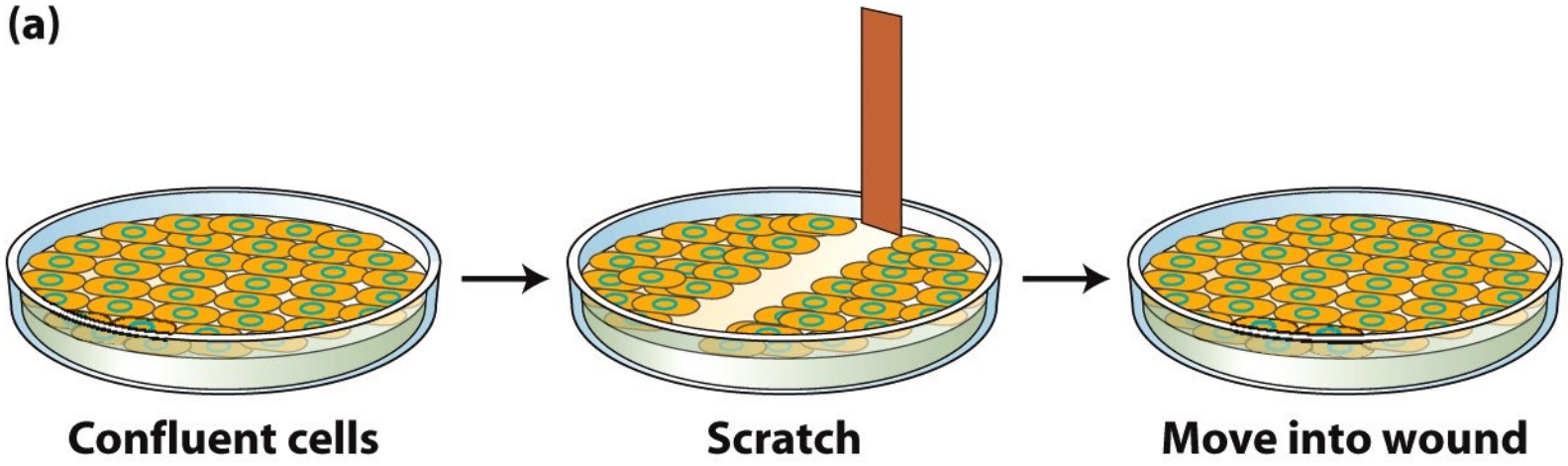
Saggio di crescita indipendente dal substrato

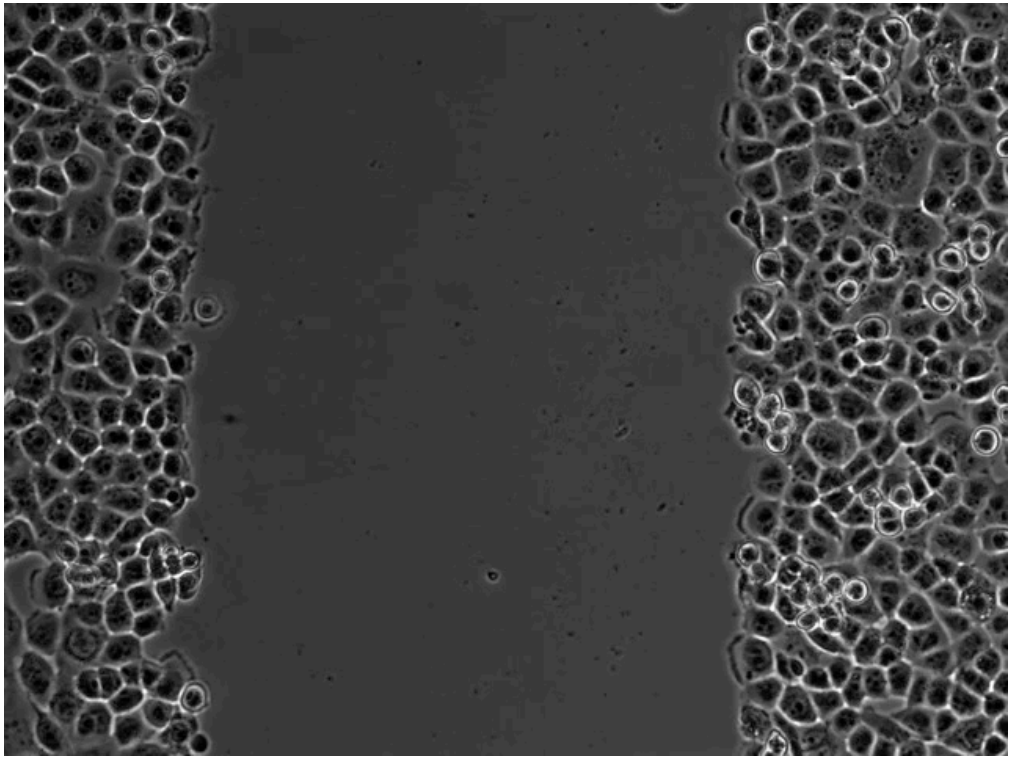






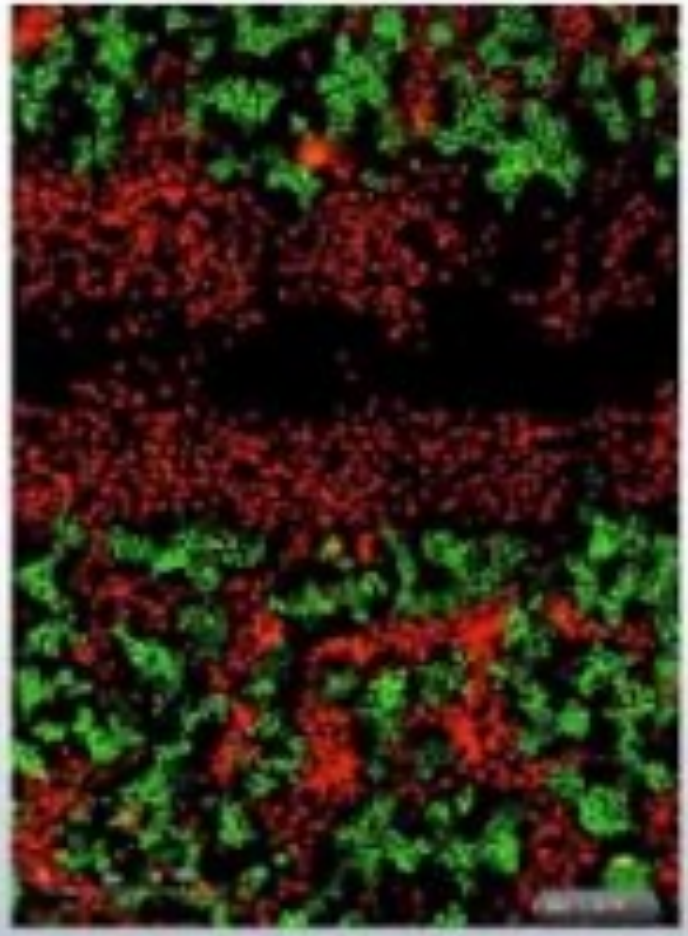
Saggi di motilità cellulare: wound-healing

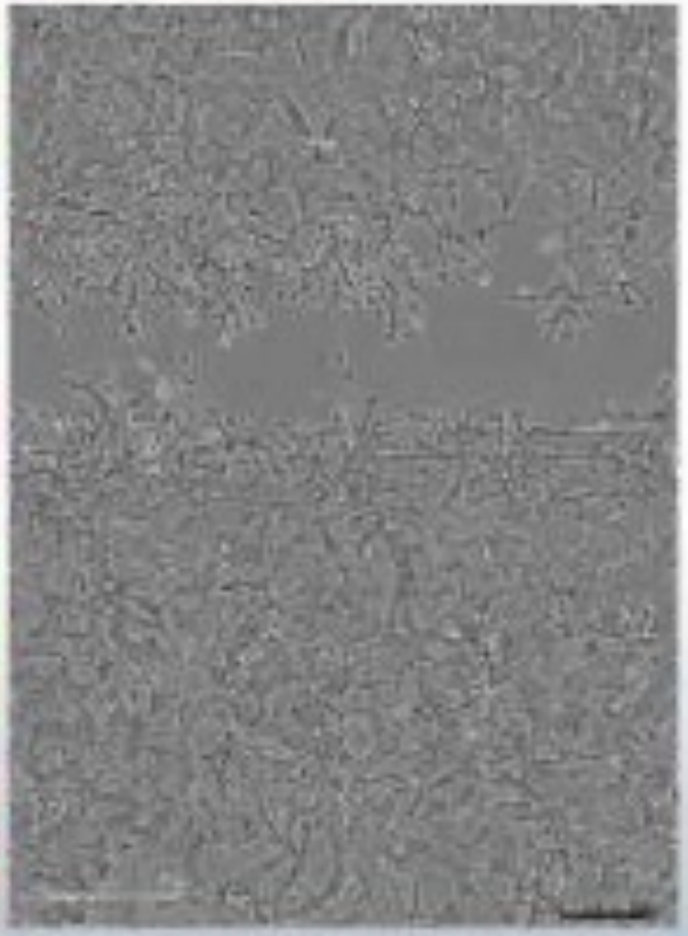




Investigate Migration & Invasion Behavior in Mixed Cultures

Images and data generated with the IncuCyte® ZOOM live-cell analysis system





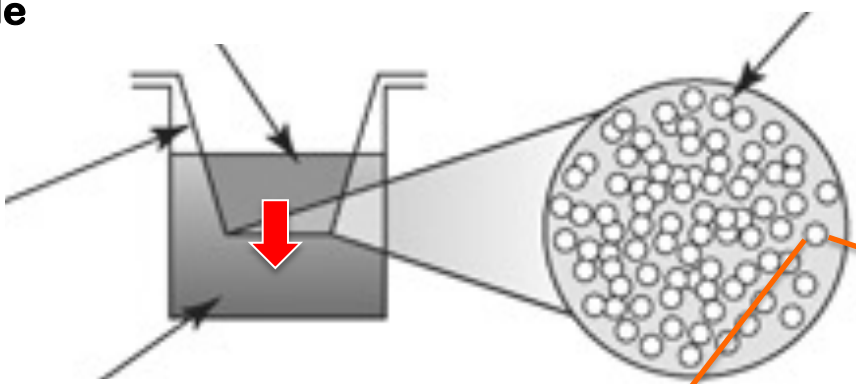
MCF-7 (Green)
non-invasive
+
HT-1080 (Red)
invasive

ESSEN BioScience

Saggi di migrazione con camera di Boyden (transwelling)

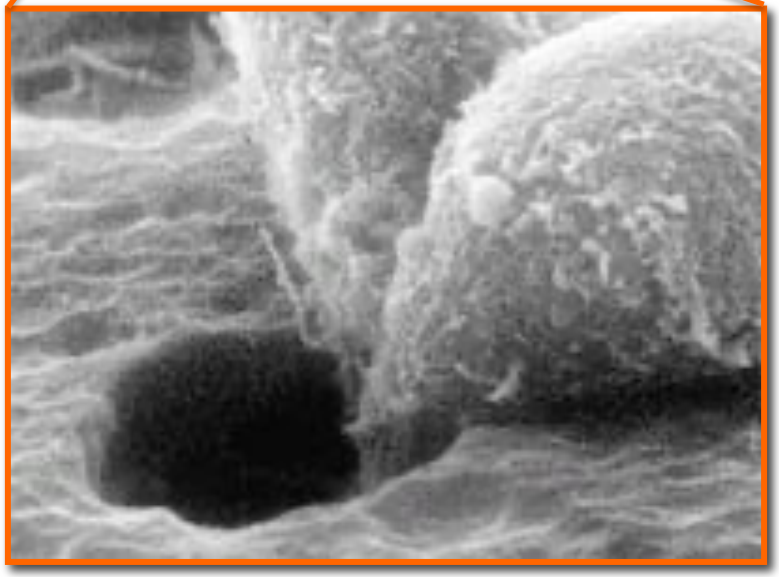
Membrana porosa (8μM)

Pozzetto superiore con cellule

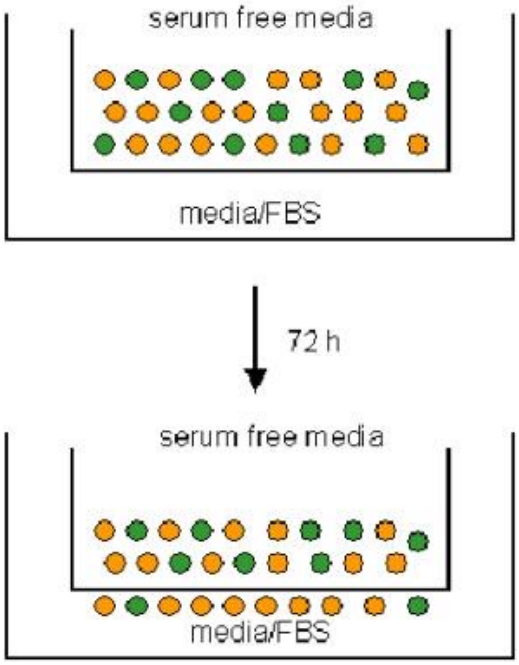


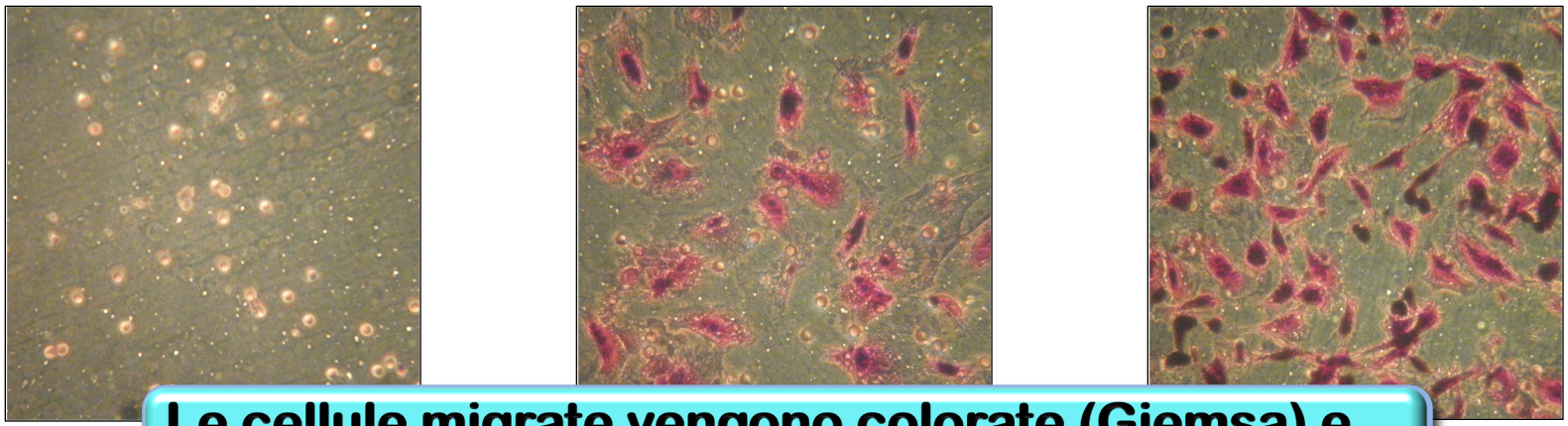
Inserto

Pozzetto inferiore contenente terreno con siero

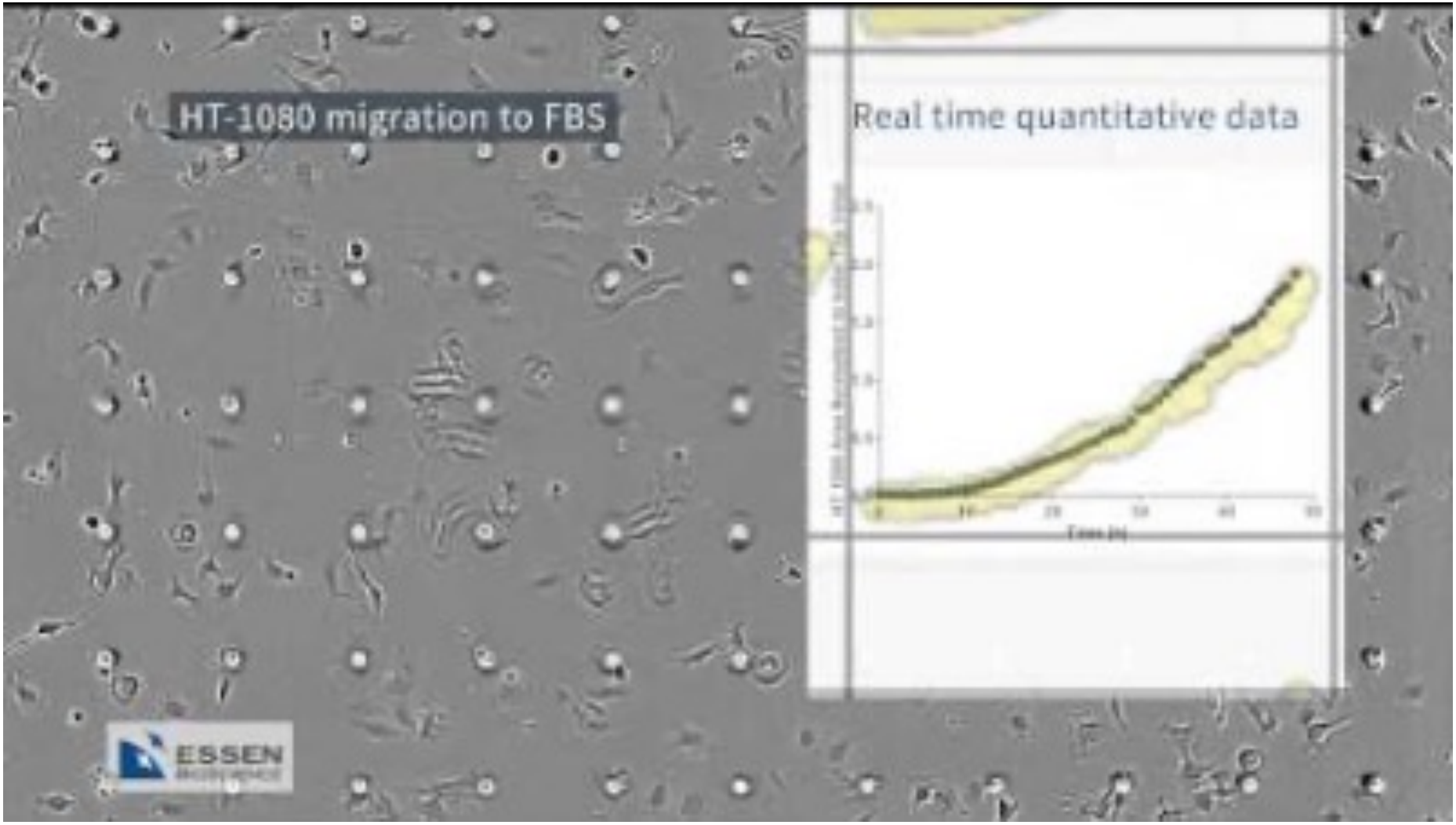


Saggi di migrazione con camera di Boyden

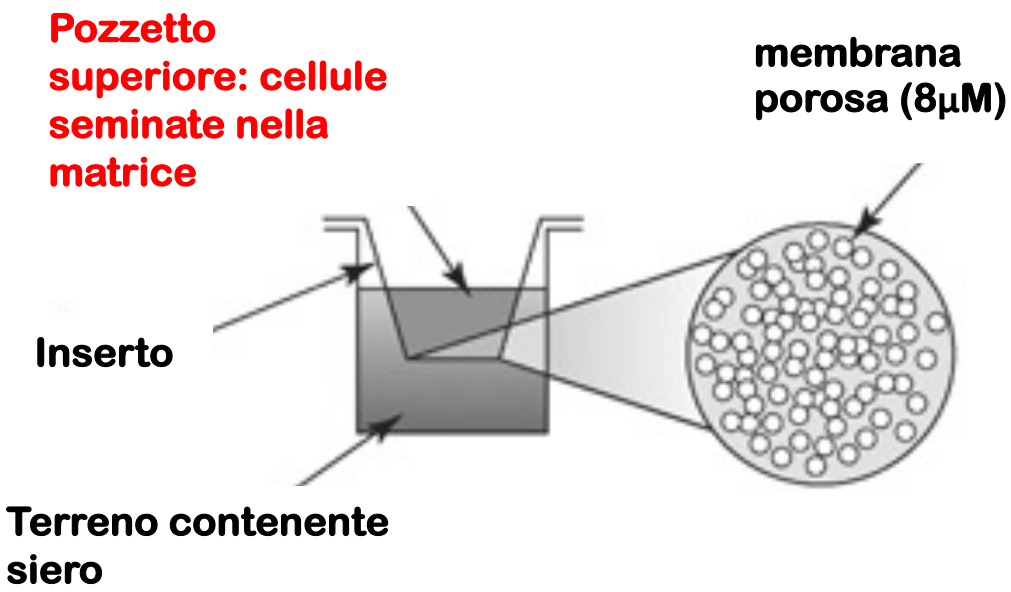




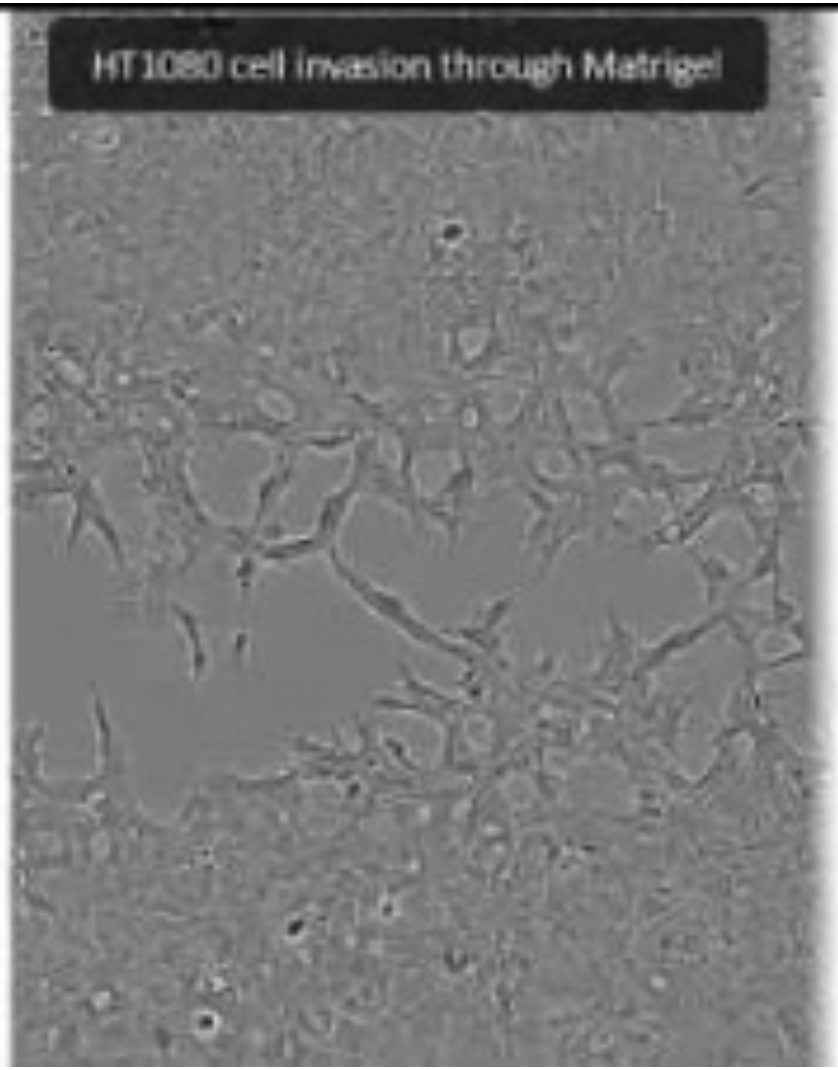
Le cellule migrate vengono colorate (Giemsa) e contate al microscopio ottico

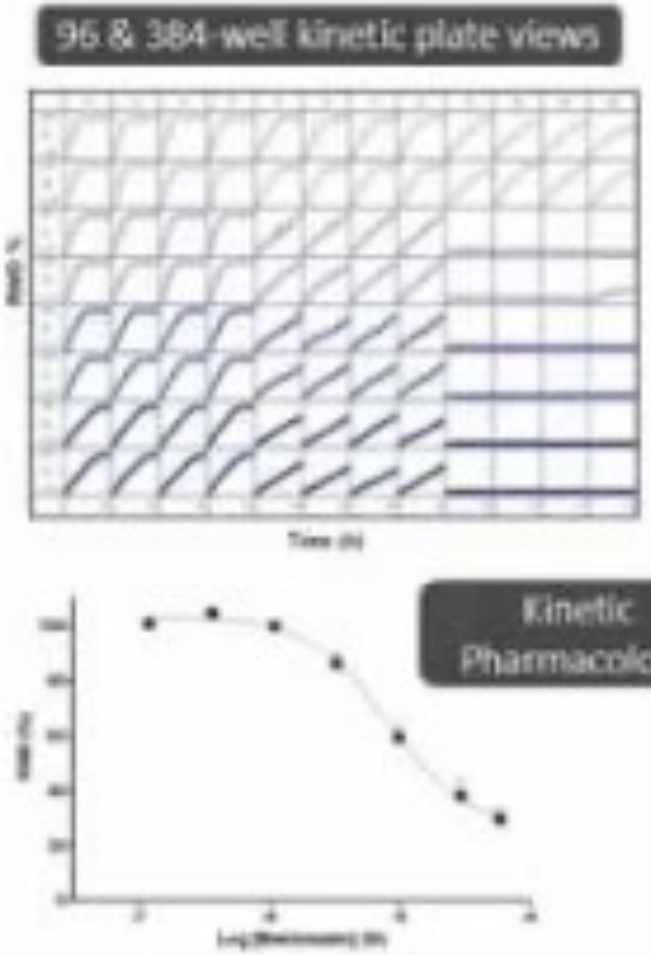

HT-1080 migration to FBS
Real time quantitative data
ESSEN

Saggi di invasione



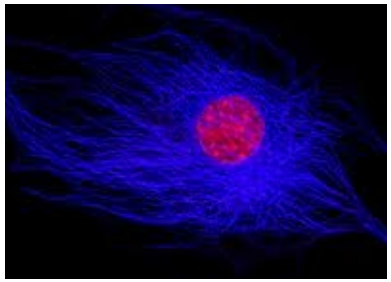
Si misura la capacità delle cellule di migrare attraverso un gel di collagene o Matrigel (che simula la matrice extracellulare) polimerizzato su un filtro poroso


HT1080 cell invasion through Matrigel

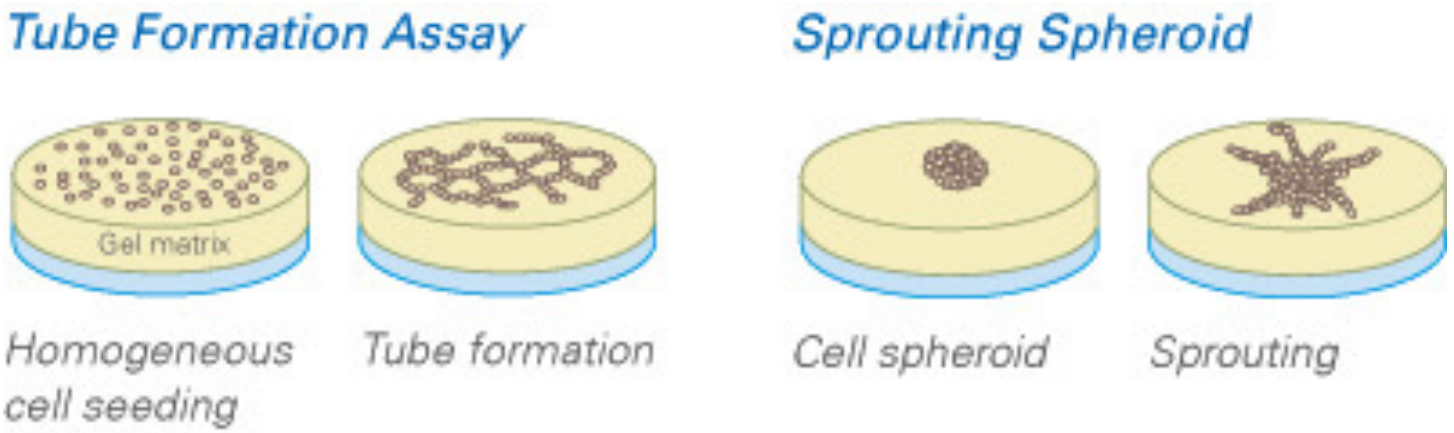

96 & 384-well kinetic plate views
Kinetic Pharmacology

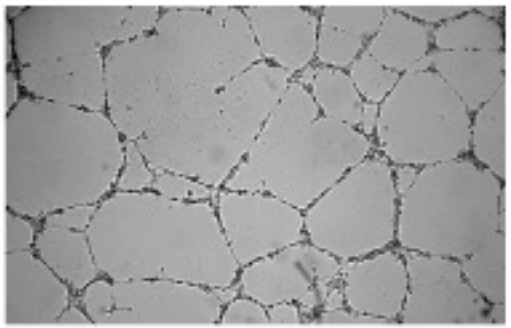
Saggi di angiogenesi in vitro

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

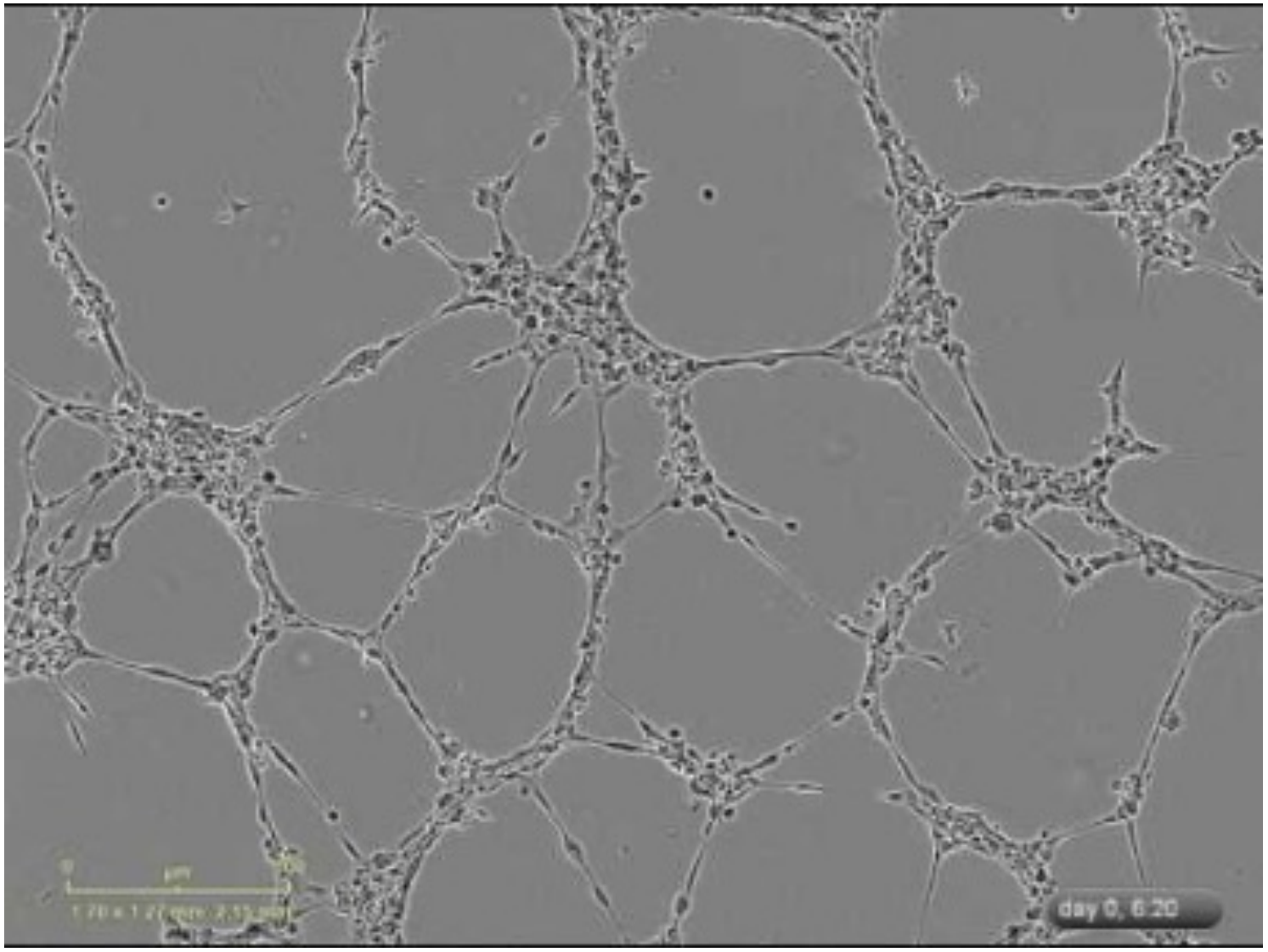


Si misura l'effetto di un terreno condizionato
Da cellula tumorali nell'indurre la fomazione di vasi, oltre che proliferazione e migrazione, oppure permeabilizzazione





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


day 0, 6:20

LA RICERCA BIOMEDICA

Identificare
fattori e processi
responsabili
dell'insorgenza e della prognosi
delle patologie

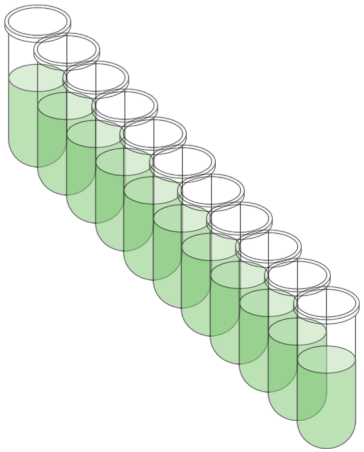
Diagnosi

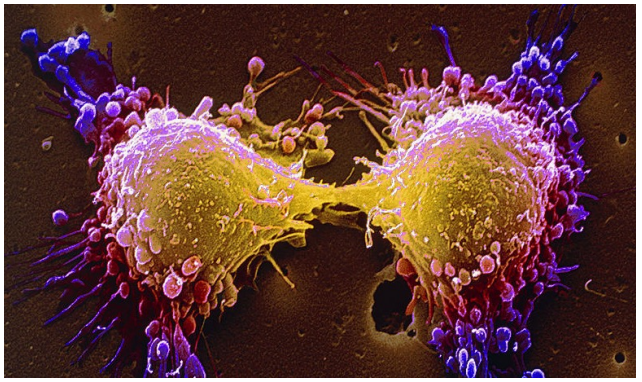
Risposta
alle terapie già in uso

Nuove
terapie mirate

IL PROCESSO DI DRUG DISCOVERY

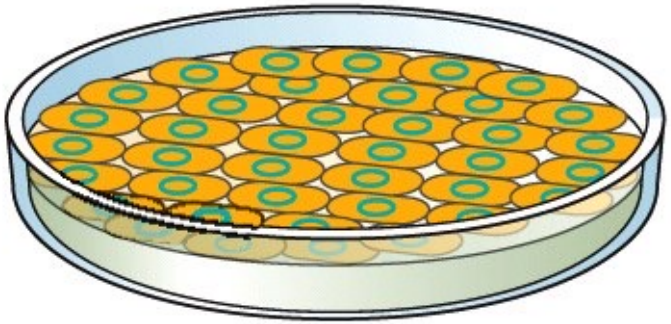
Molecola o processo bersaglio → Selezione o disegno di farmaci a bersaglio molecolare → Effetti su specifici processi biologici alterati



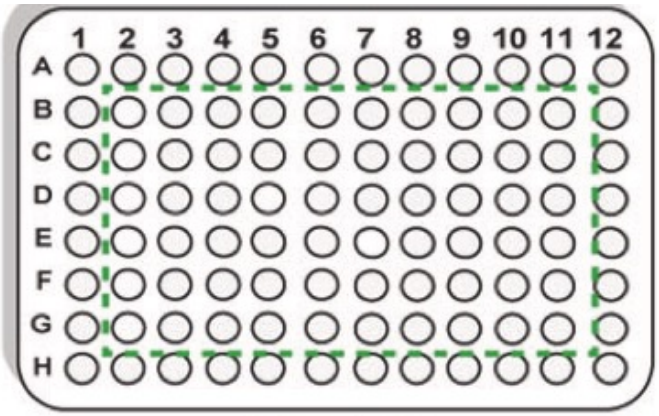


Screening FUNZIONALI per farmaci

Libreria di farmaci

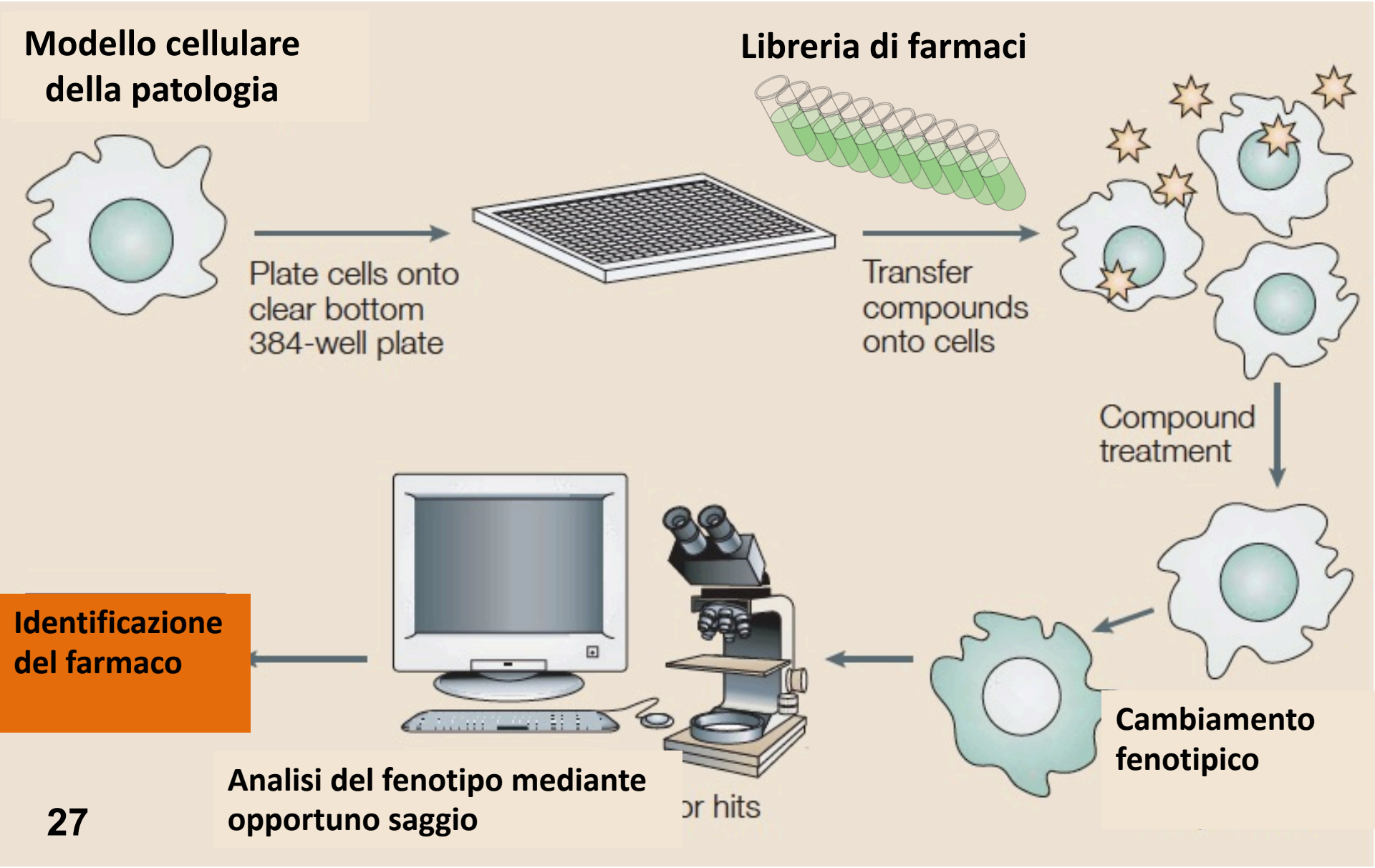


Modello cellulare della patologia dipendente dal bersaglio

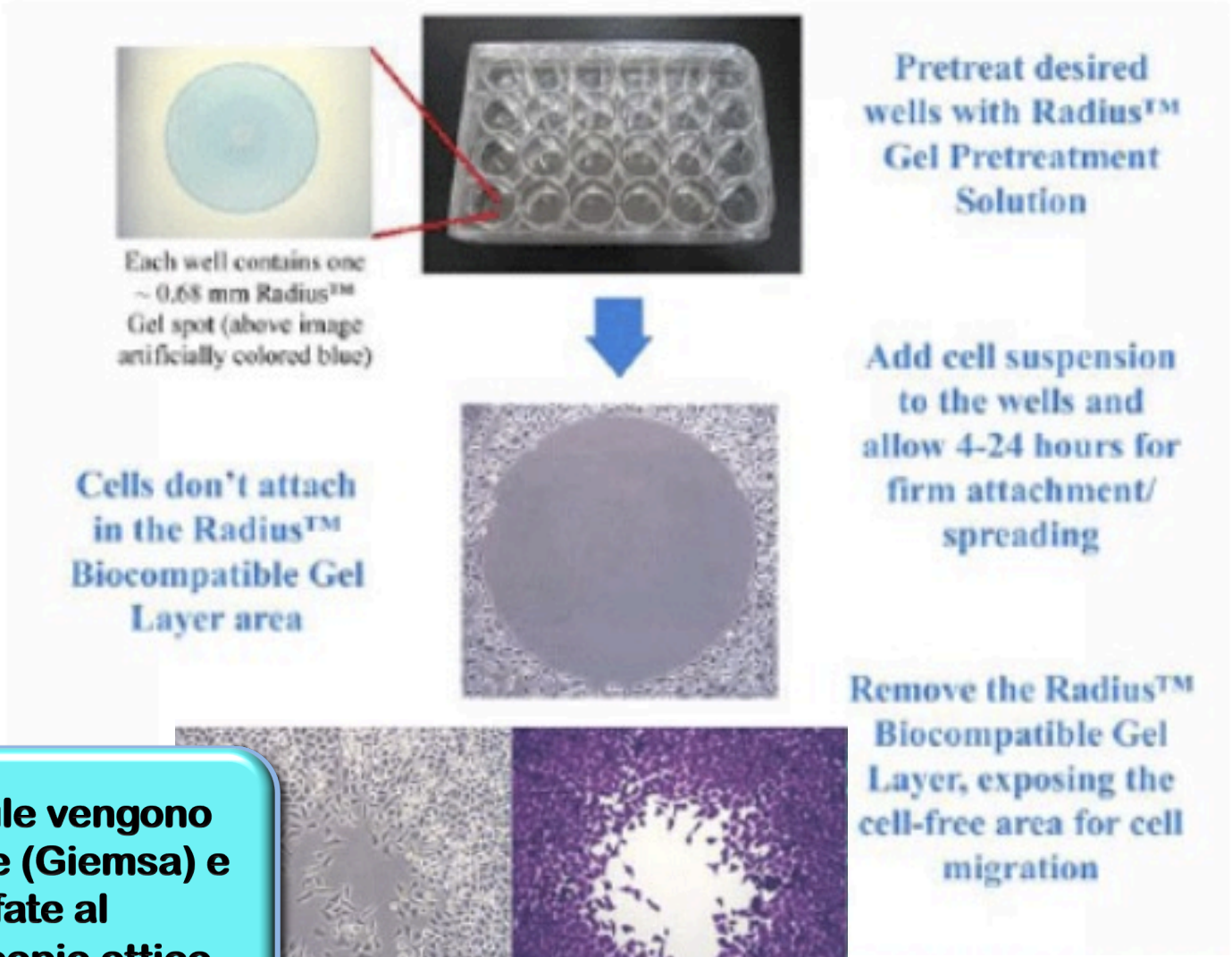


Saggio morfologico/funzionale

Screening FUNZIONALI per farmaci

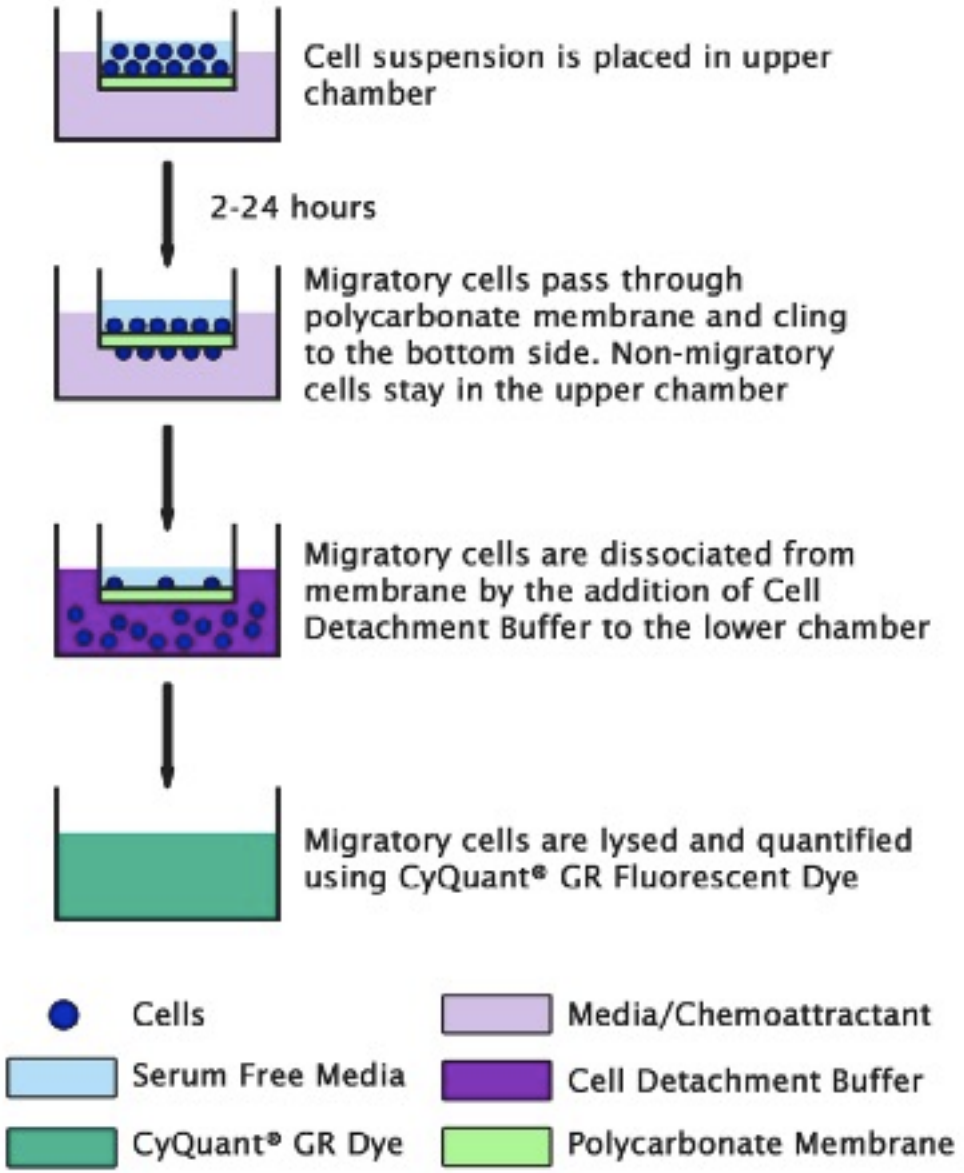


Saggi di migrazione in piastra multipozzetto con lettura automatizzata al microscopio ottico/plate reader



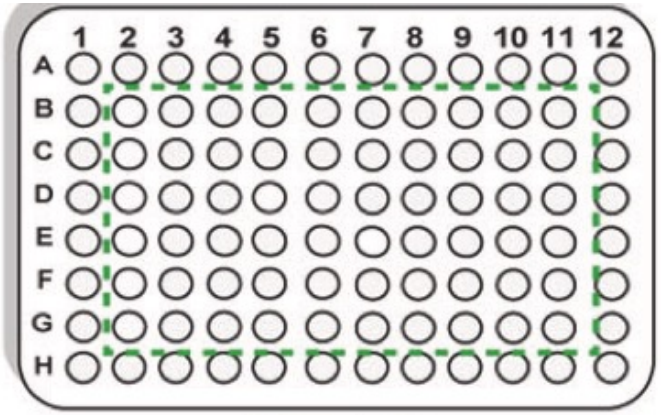
Le cellule vengono colorate (Giemsa) e fotografate al microscopio ottico

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

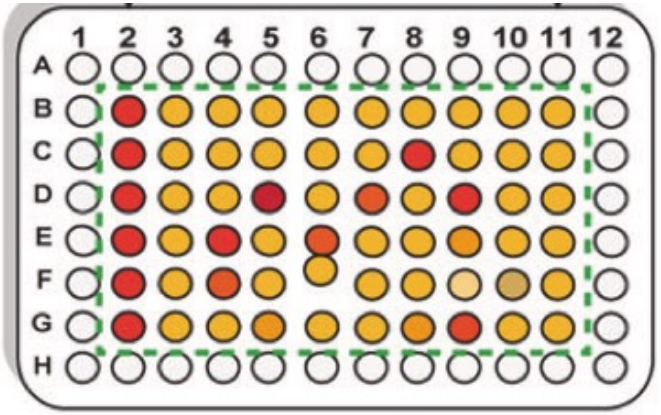


Saggi di citotossicità

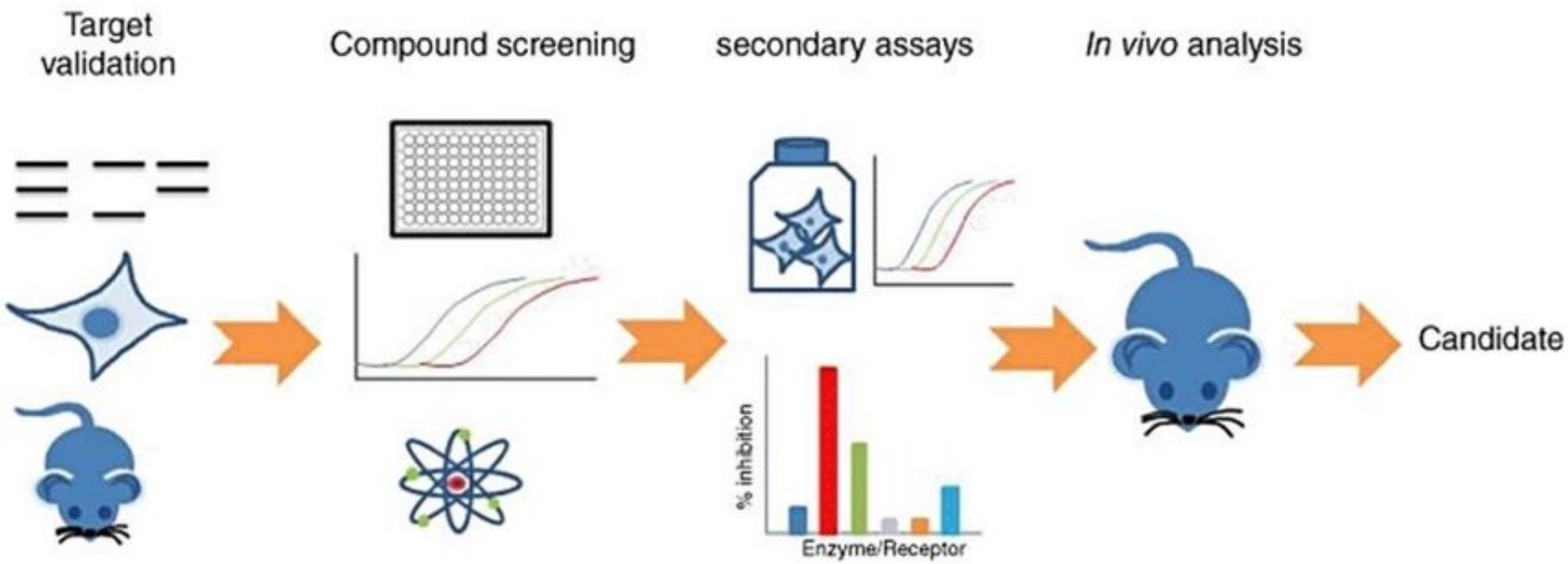
Libreria di farmaci



Saggio MTT o WST



IL PROCESSO DI DRUG DISCOVERY



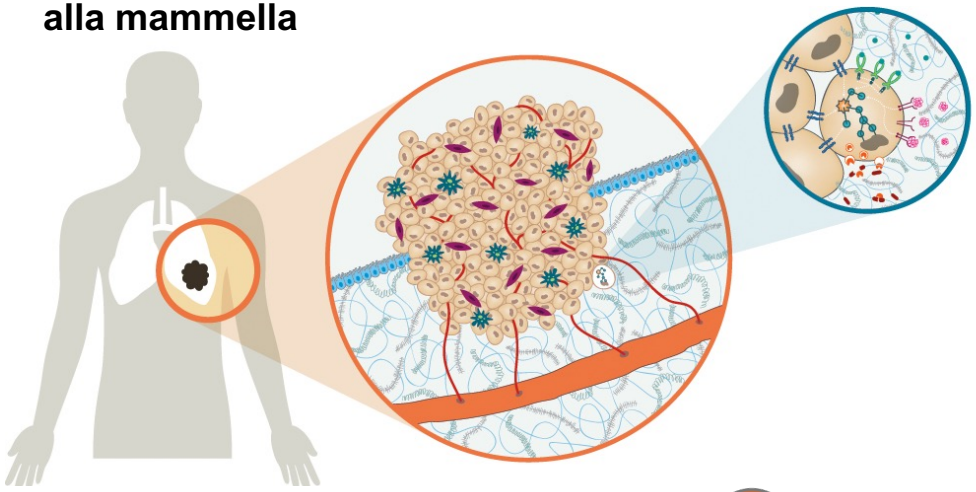
- Genetic, cellular and *in vivo* experimental models to identify and validate target
- HTS & selective library screens; structure based design
- Reiterative directed compound synthesis to improve compound properties
- *in vitro* & *ex vivo* secondary assays (mechanistic)
- Selectivity & liability assays
- Compound pharmacology
- Disease efficacy models
- Early safety & toxicity studies
- Preclinical safety & toxicity package

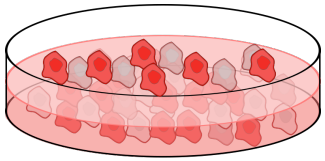
Il riposizionamento dei farmaci

Farmaci approvati
da EMA/FDA
per qualsiasi malattia

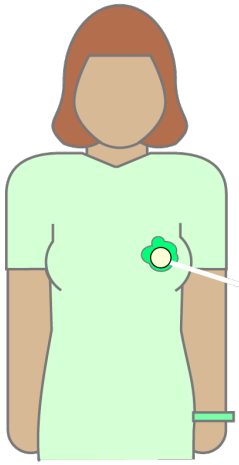
Saggiare in vitro
l'efficacia antitumorale
dei farmaci

Paziente con tumore
alla mammella



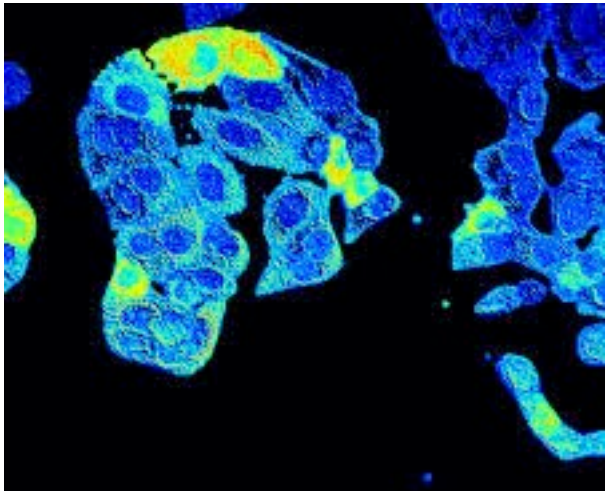


Es. Identificazione delle statine
(anticolesterolemici) come
potenziali farmaci antitumorali



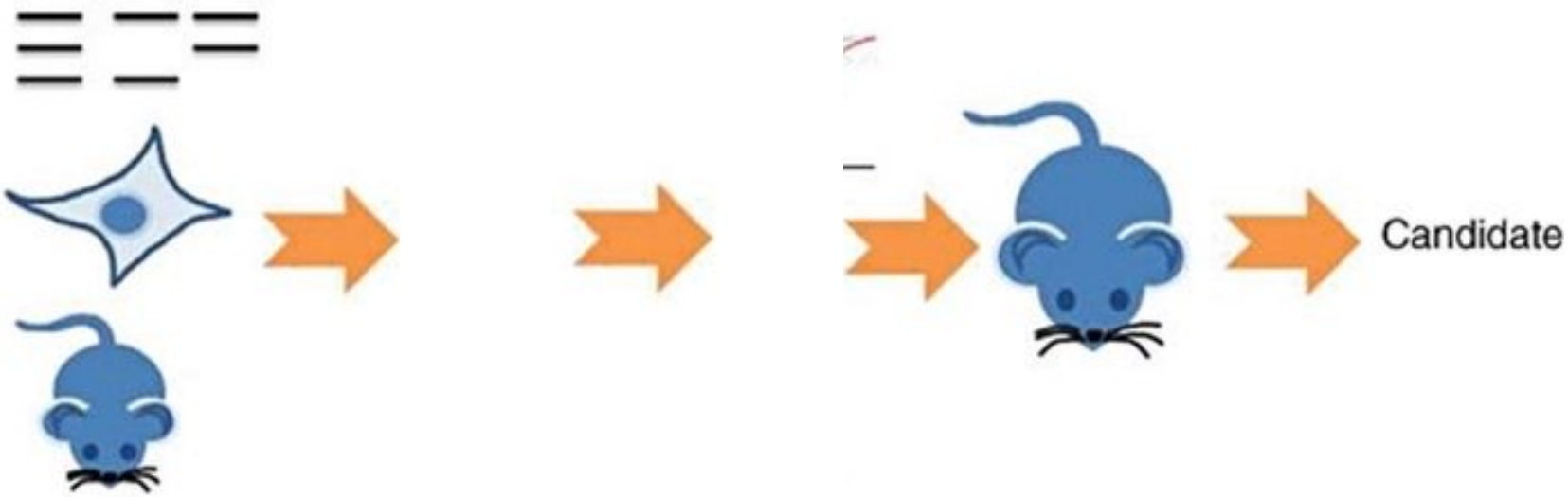
Trial clinico per l'efficacia delle
statine in pazienti con tumore al
seno in combinazione con le
terapie standard

High content screening systems



Next generation confocal high content/high trhoughput 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



•Genetic, cellular and *in vivo* experimental models to identify and validate target

•Compound pharmacology
•Disease efficacy models
•Early safety & toxicity studies

•Preclinical safety & toxicity package

Saggi di tumorigenicità in vivo

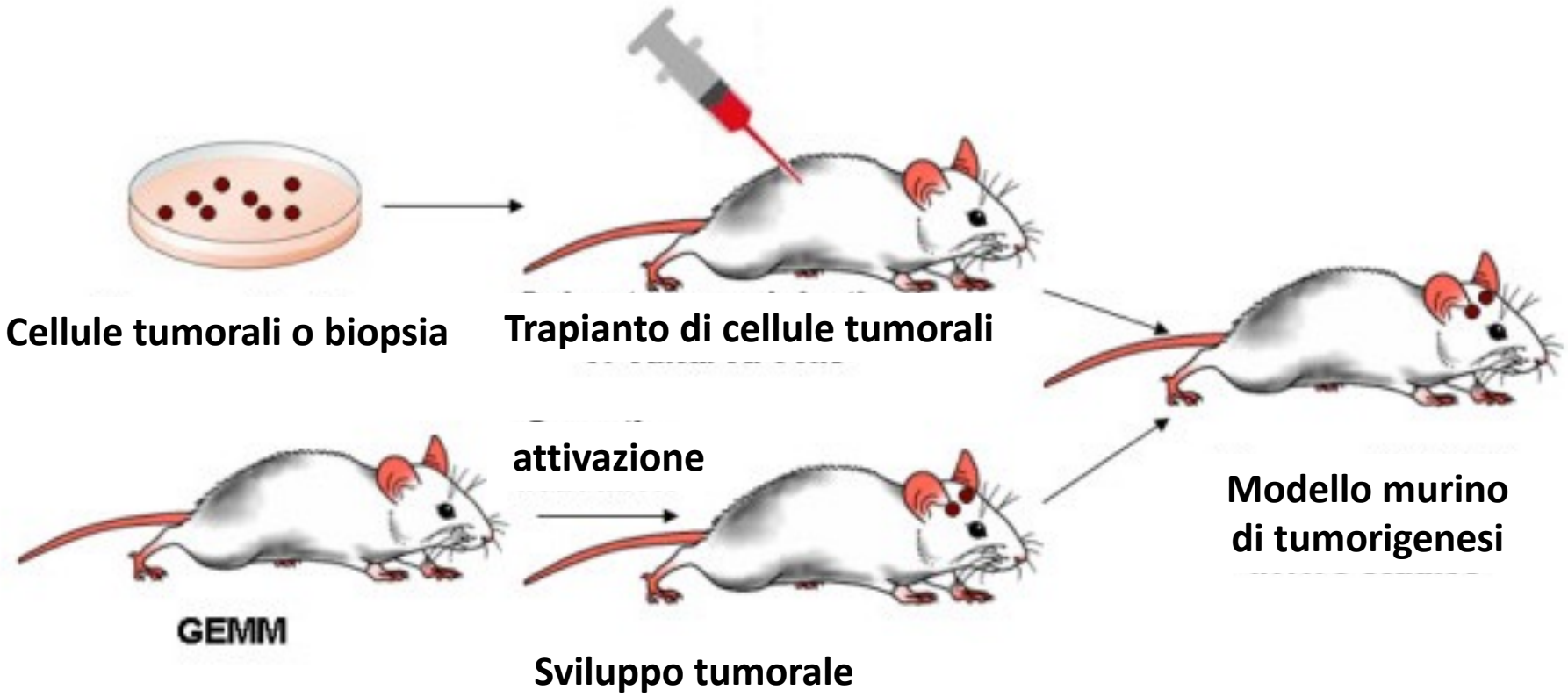
Scopi:

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

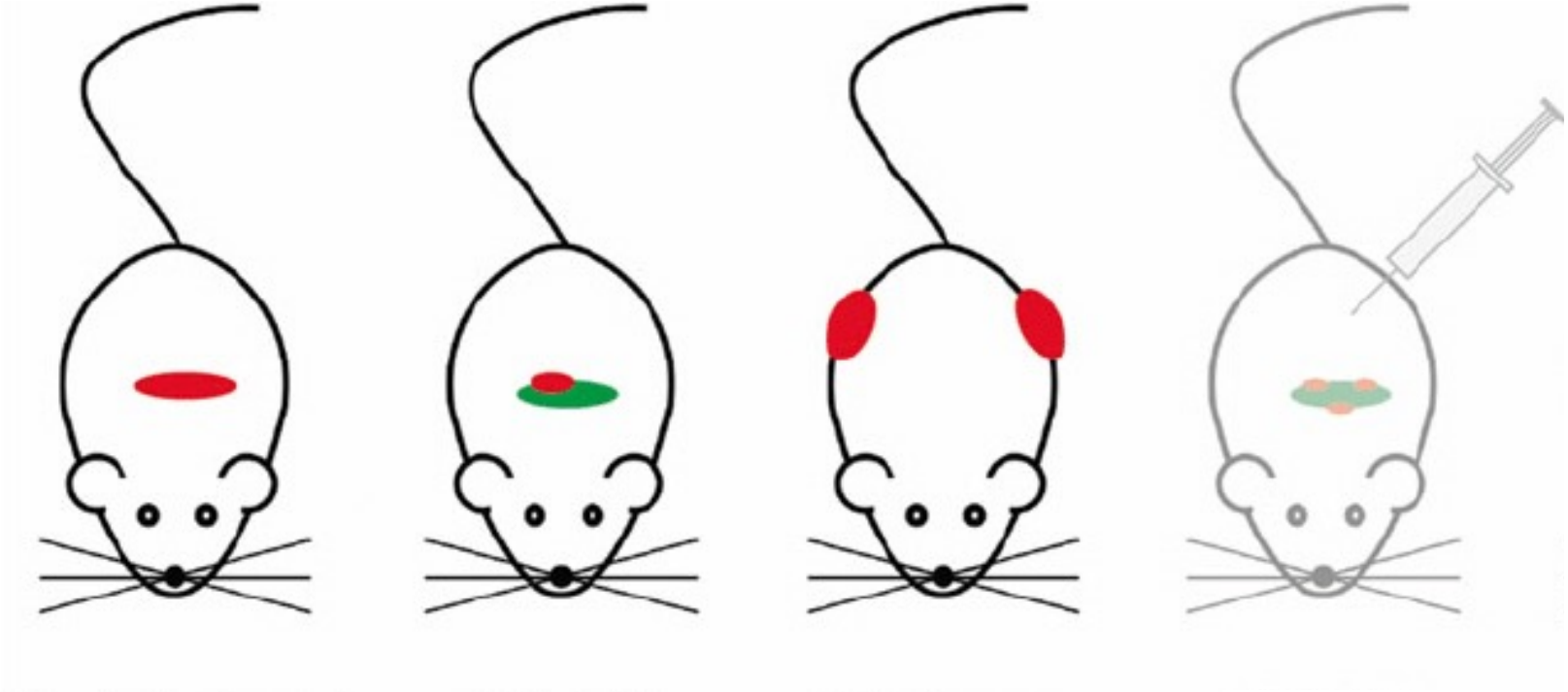
ii. Verificare l'efficacia di una terapia in vivo in diversi stadi dell'evoluzione tumorale (bersaglio- farmaco)

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



Trapianto di cellule/biopsie tumorali

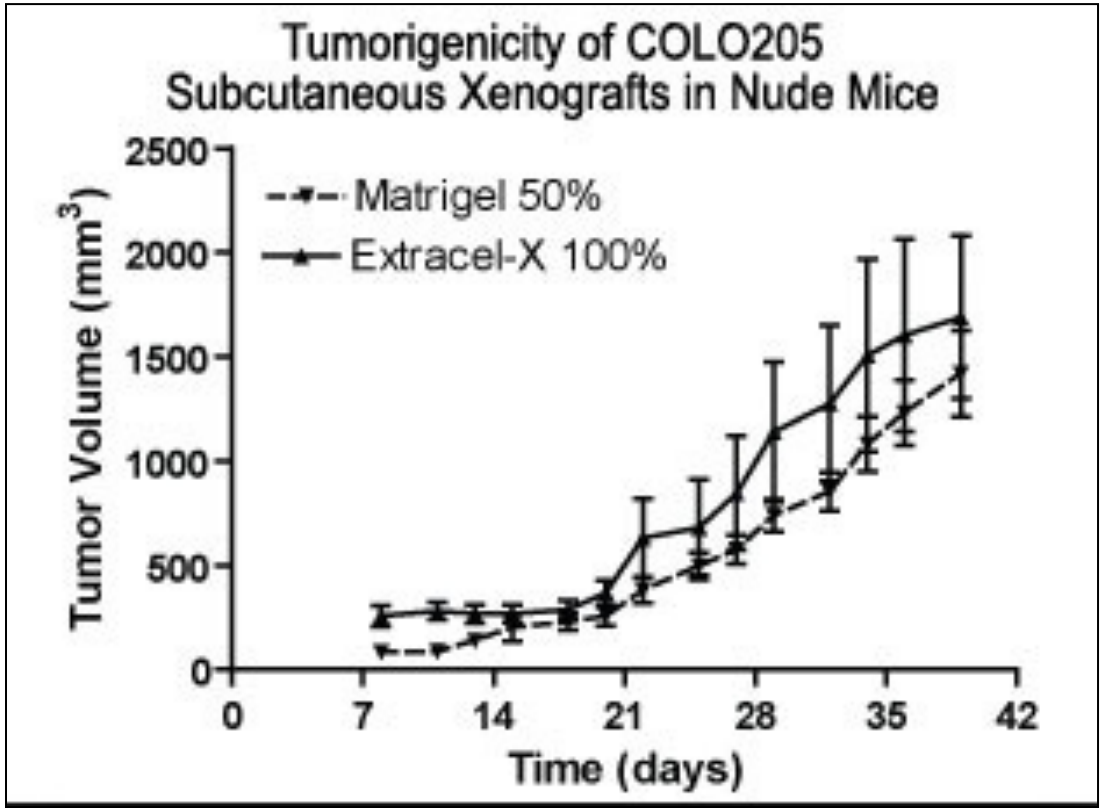
Disseminazione metastatica
Iniezione iv

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

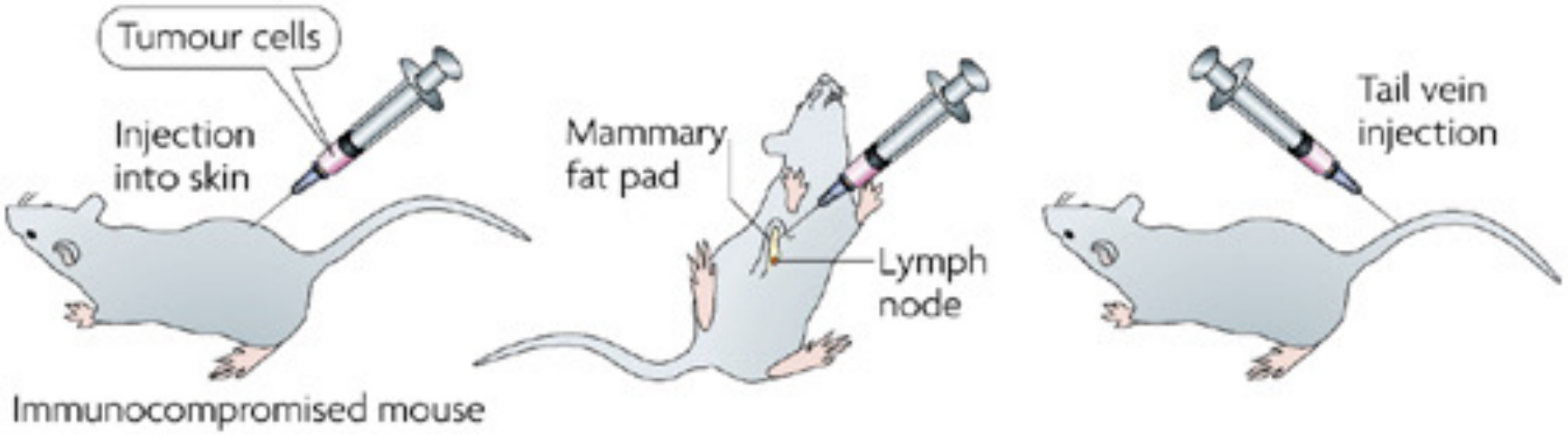
Replacement:
ove possibile, la sperimentazione animale va **sostituita** con la sperimentazione in vitro (colture cellulari), ex-vivo (es. organoidi) o al limite in vivo su altra specie meno complessa.

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).

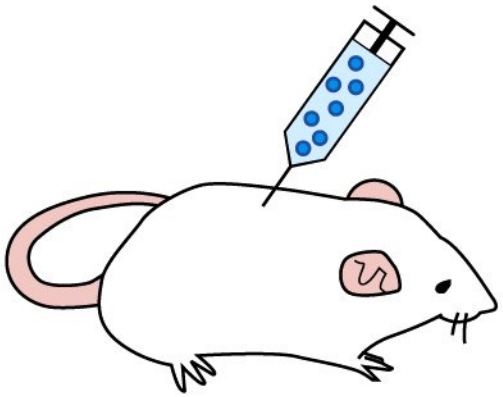
Xenotrapianti di cellule tumorali (xenografts, PDX)

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

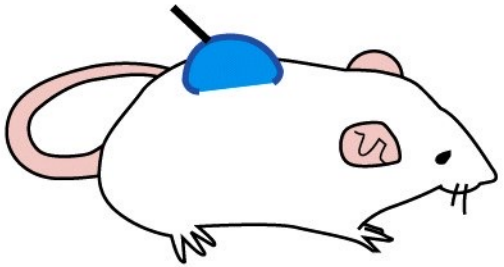


Possono essere trapiantati sia cellule che frammenti di tessuto, tumori sperimentali o da pazienti (PDX: patient-derived xenografts).

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.