

CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2025-2026

Corso di Biotecnologie Cellulari

Docenti:

Prof. Fiamma Mantovani

Dr. Alessandra Rustighi

Dr. Beatrice Anfuso

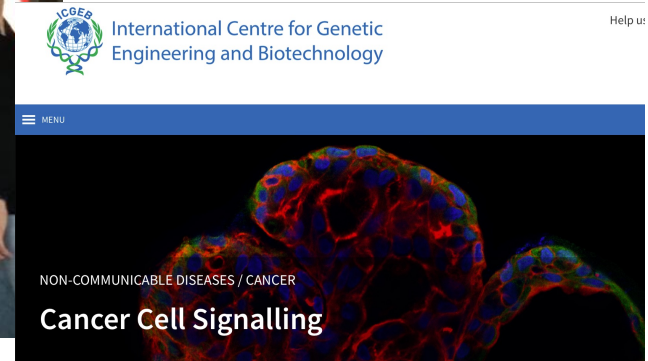
Fiamma Mantovani

Prof. Associato DSV – Biologia Cellulare e Applicata

Ed. C11 st. 248 fmantovani@units.it

DOCENZA:

- *LT in Scienze e tecnologie Biologiche – Cdl Biotecnologie Cellulari*
- *LM in Genomica funzionale – Cdl Biologia del cancro con laboratorio*

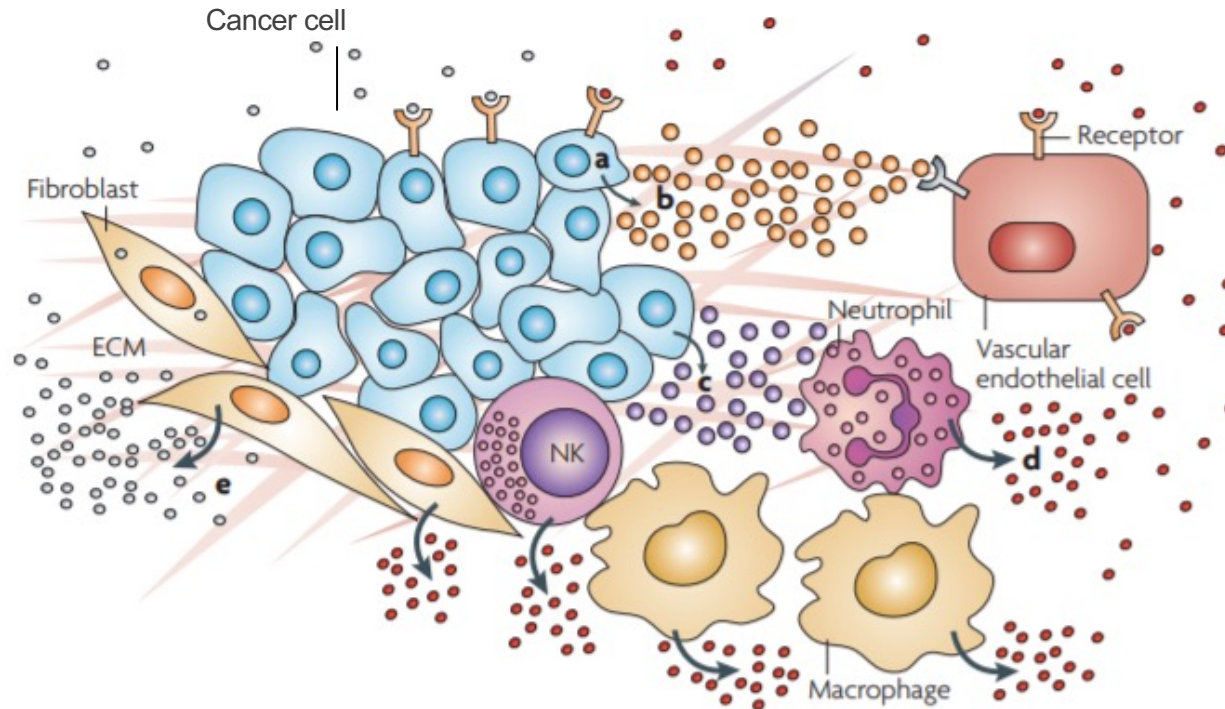


RICERCA:

Cancer cell signaling group ICGEB Area Science Park

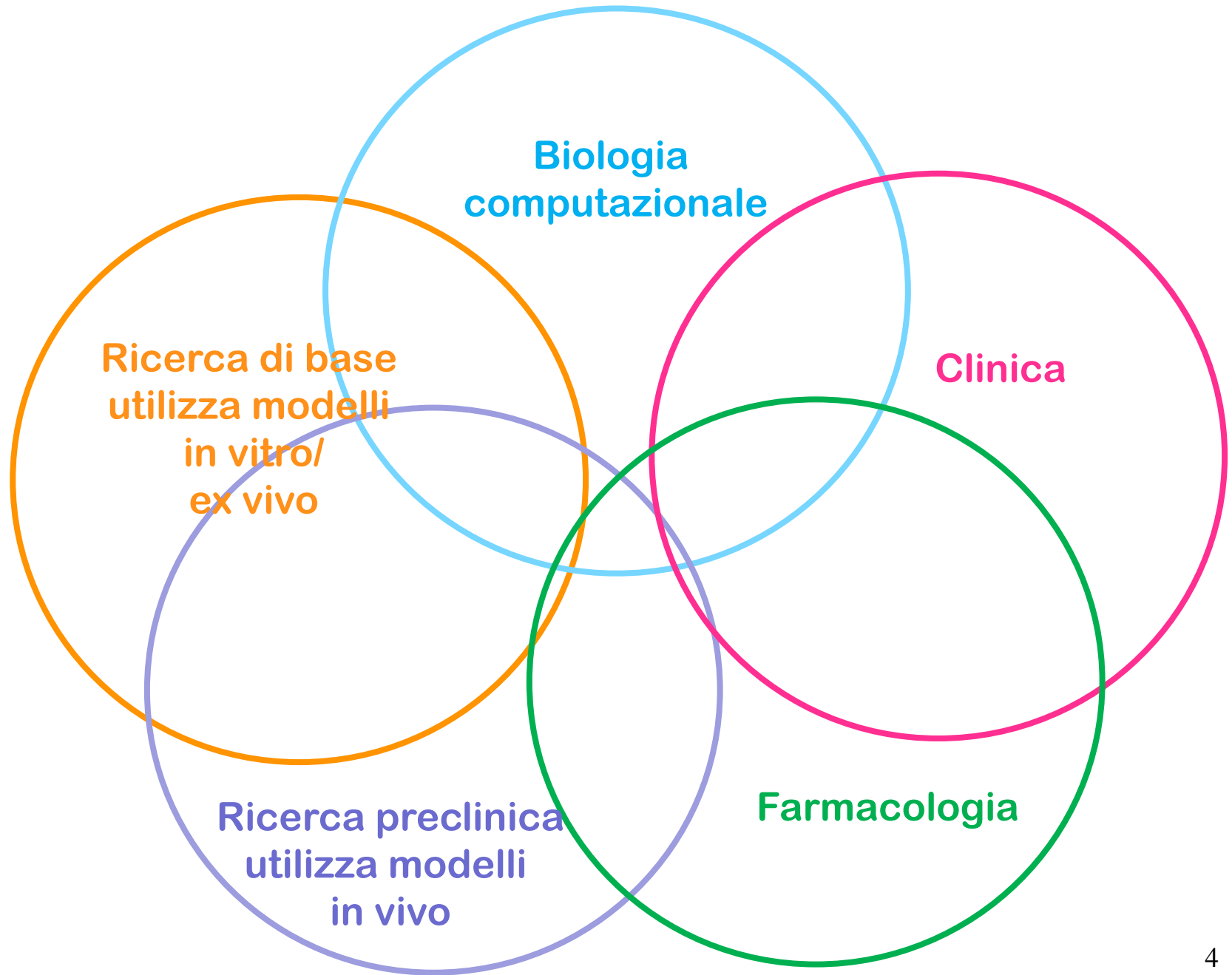
TEMATICA DI RICERCA

Comprendere la complessità dell'ecosistema tumorale

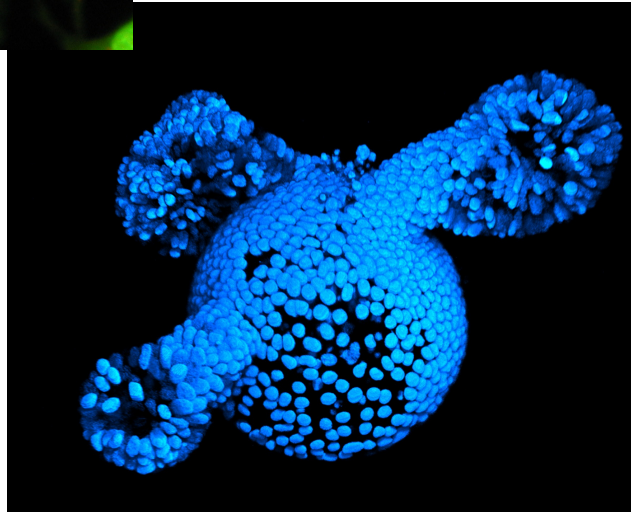
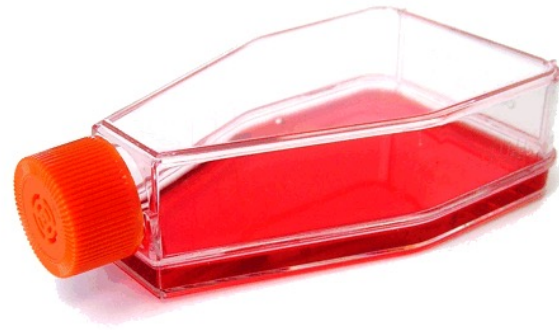
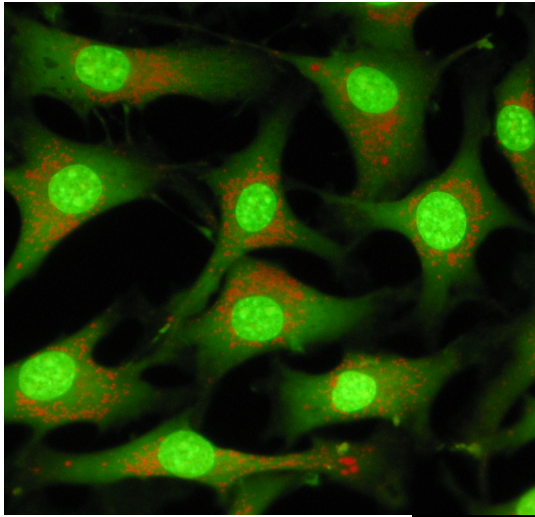


*per contrastare metastasi, evasione dal sistema immunitario
e resistenza alle terapie*

La ricerca biomedica necessita di **APPROCCI INTEGRATI**



Utilizzare le BIOTECNOLOGIE CELLULARI per la ricerca biomedica



L'utilizzo delle BIOTECNOLOGIE CELLULARI

consente di **identificare e modificare**

geni, proteine e processi biochimici

responsabili

di patologie

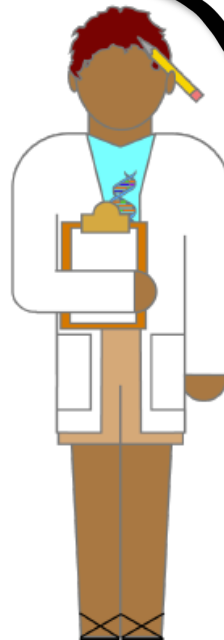


Diagnosi



Terapia

*Il corso di biotecnologie
cellulari come introduzione
alla ricerca biomedica*



OBIETTIVO PRINCIPALE DEL CORSO

acquisire

le basi teoriche e le competenze pratiche

per eseguire

diverse fasi di un piano sperimentale

che risponde a specifiche domande scientifiche

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

OBIETTIVI FORMATIVI

SAPERE:

Acquisire **conoscenze** aggiornate di tipo **teorico e pratico** sulle tecnologie cellulari impiegate nella ricerca biomedica.

SAPER FARE:

Familiarizzare con le tecnologie cellulari, imparare a **scegliere** le tecniche sperimentali appropriate e i **controlli** adeguati per affrontare specifici problemi scientifici.

Applicare il **metodo scientifico**:

- strutturare **domande** scientifiche e argomentare **ipotesi**.
- **pianificare** una strategia sperimentale per **verificare** un'ipotesi
- raccogliere **dati** sperimentali rilevanti e interpretarli

STRUTTURA DEL CORSO

24 ORE LEZIONE FRONTALE

36 ORE ATTIVITA' PRATICA IN LABORATORIO

- 1 parte manipolazione cellule
- 2 parte piano sperimentale

METODI DIDATTICI

- lezioni frontali convenzionali in aula;
- attività di laboratorio individuali e di gruppo in laboratorio didattico

**È raccomandata
la partecipazione attiva
a TUTTE le lezioni del corso**

Supporti: lezioni registrate disponibili in Teams
Files pdf, links a risorse scaricabili e video didattici
disponibili sulla piattaforma Moodle

Non sono previsti libri di testo!

PRE-REQUISITI

- **conoscenze di biologia molecolare e cellulare**
 - **struttura e funzione degli organelli cellulari/via secretoria;**
 - **proliferazione e morte cellulare;**
- **conoscenze di biochimica/laboratorio di biochimica**
- **alcune conoscenze di fisica (es. fluorescenza)**

VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

ARGOMENTI:

Durante il corso gli studenti apprenderanno come organizzare una **strategia** sperimentale per verificare un'**ipotesi** impiegando opportuni **modelli** e **tecniche** sperimentali e includendo gli opportuni **controlli**.

MODALITA' DI VERIFICA:

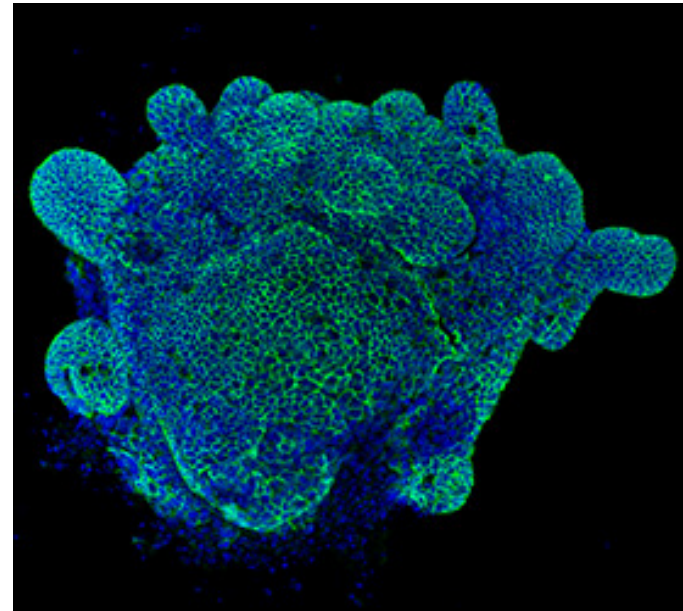
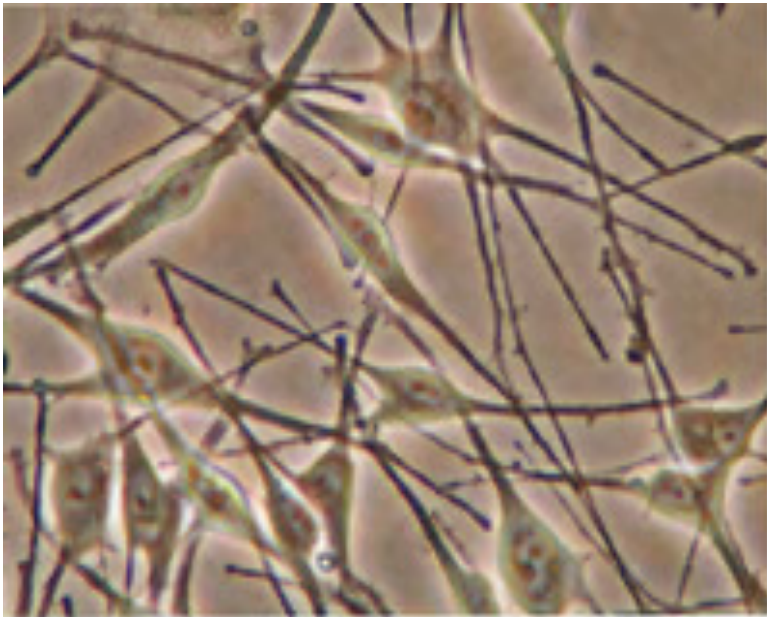
- 1) 9/10 = **COMPITO SCRITTO** della durata di 90 minuti, costituito da min. 3 **domande aperte** su tutti gli argomenti del corso, con lo scopo di verificare il livello di **conoscenza** degli **argomenti** del programma, il livello di padronanza del **linguaggio** specialistico e la capacità di **applicare le conoscenze teoriche a casi concreti**. Nella **LEZIONE CONCLUSIVA** verranno forniti agli studenti **esempi** di domande e test di autovalutazione per la preparazione all'esame.
- 2) 1/10 = forma e contenuti del **QUADERNO di LABORATORIO** **inerente al progetto sperimentale** (spiegazione/modello in seguito) (in alternativa scrittura di un saggio per i non frequentanti)

SVILUPPO DI UN PROGETTO DI RICERCA SPERIMENTALE

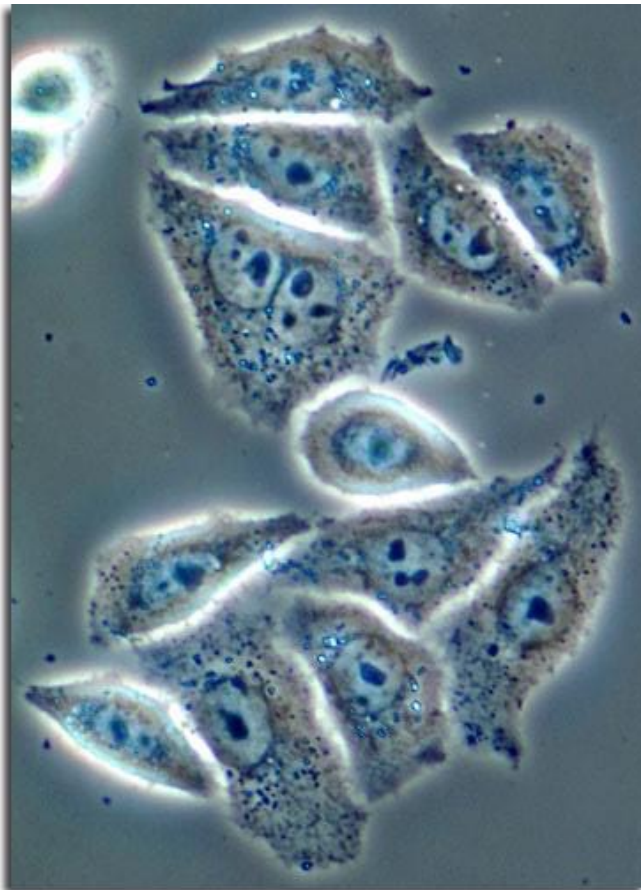
- 1) Stato dell'arte
- 2) Domande aperte
- 3) Ipotesi
- 4) Obiettivi
- 5) Approccio sperimentale = strategia sperimentale, modelli, metodi & tecniche, controlli
- 6) Risultati attesi
- 7) Limiti e rischi e possibili soluzioni

MODELLI, METODI E TECNICHE di COLTURA CELLULARE IN VITRO

**TECNICHE E STRUMENTI PER
GENERAZIONE, MANTENIMENTO
MANIPOLAZIONE ED ANALISI
DI COLTURE CELLULARI in vitro**



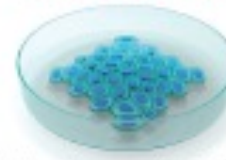
Parte 1: MODELLI CELLULARI IN VITRO



Biochemical tools

Complexity of culture

Model system
in life sciences



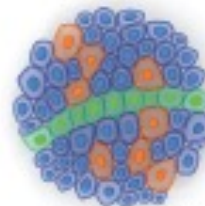
Monolayer cell culture



Spheroid



Organoid



Tissue explant



Multiplexed models
"on-a-chip"

Organization of
the body



Subcellular



Cells



Simple tissue



Layered tissue



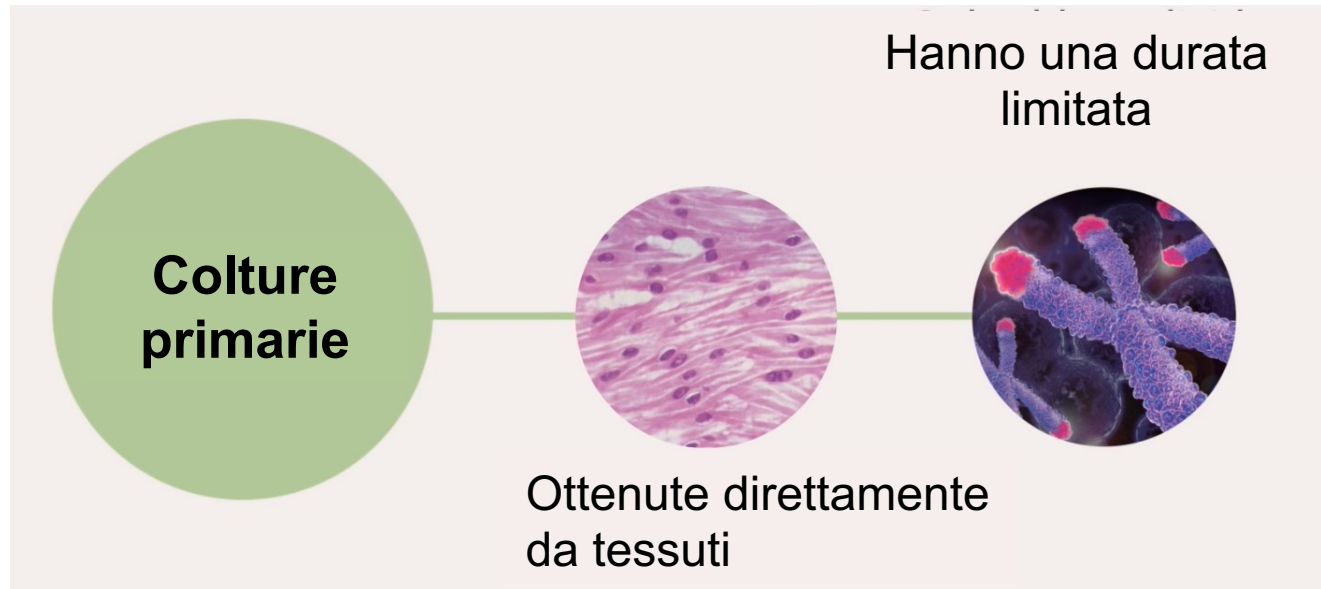
Organ & System



Body

Scale

Colture cellulari primarie ottenute da tessuti



LE COLTURE CELLULARI PRIMARIE

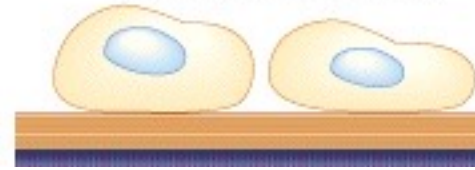
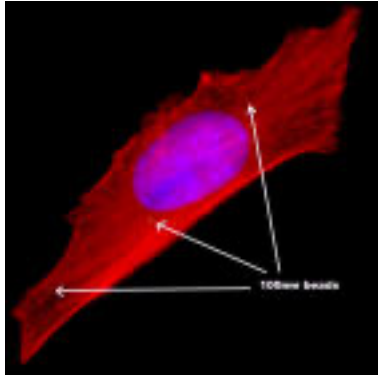
Una coltura cellulare PRIMARIA è costituita da cellule che derivano direttamente da un tessuto, senza essere modificate geneticamente, ed ha una durata limitata.

Dopo la semina, le cellule proliferano (se al terreno è stato aggiunto siero) fino ad occupare tutta la superficie del recipiente (raggiungono la CONFLUENZA).

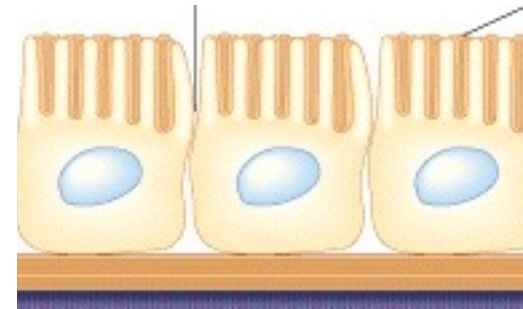
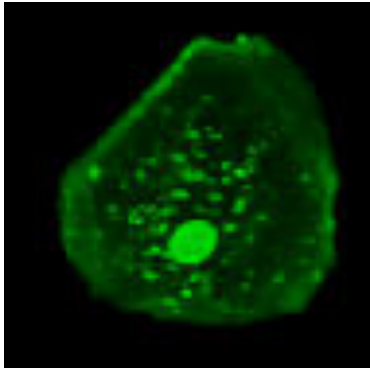
A questo punto smettono di dividersi: questo fenomeno è detto INIBIZIONE DA CONTATTO. Se vengono diluite (PASSAGGIO IN COLTURA) in modo da fornire loro nuovo spazio, ricominceranno a proliferare: in questo modo la coltura viene PROPAGATA.

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

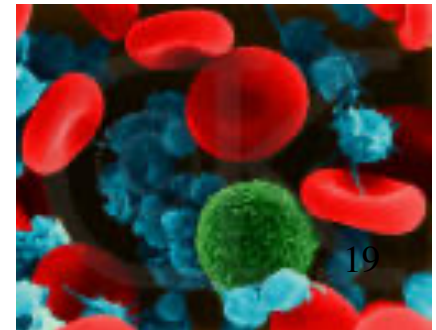
Fibroblasti: cellule derivate dal tessuto connettivo/endotelio
aspetto **fusiforme**
cellule **isolate**



Cheratinociti: cellule **epiteliali**
aspetto **poligonale**
colonie di cellule

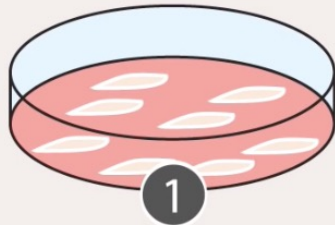


Cellule del sangue/SI:
aspetto **tondeggiante**



Principali condizioni di crescita cellulare

- in adesione 2D
- in sospensione
- colture 3D in matrici semisolide



Monolayers
(Adherent cultures)



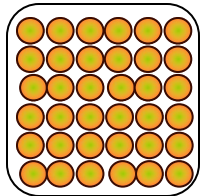
Free-floating
(Suspension cultures)



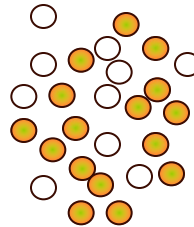
3)- 3D

ALLESTIMENTO DI UNA CULTURA CELLULARE 2D

da un tessuto



si dissociano singole cellule



e si seminano in un
recipiente in un
terreno opportuno



Generazione di una coltura primaria da tessuto

Per allestire colture cellulari o tissutali in vitro si deve partire da un espianto di **tessuto** (una biopsia).

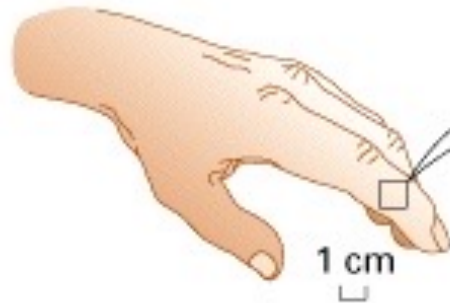
se questo è solido le cellule devono essere **dissociate, cioè isolate le une dalle altre e dalla matrice extracellulare.**

Nei tessuti solidi di tipo **epiteliale** (es. epidermide, colon, polmone, ghiandola mammaria etc.) le cellule sono strettamente **adese** le une alle altre

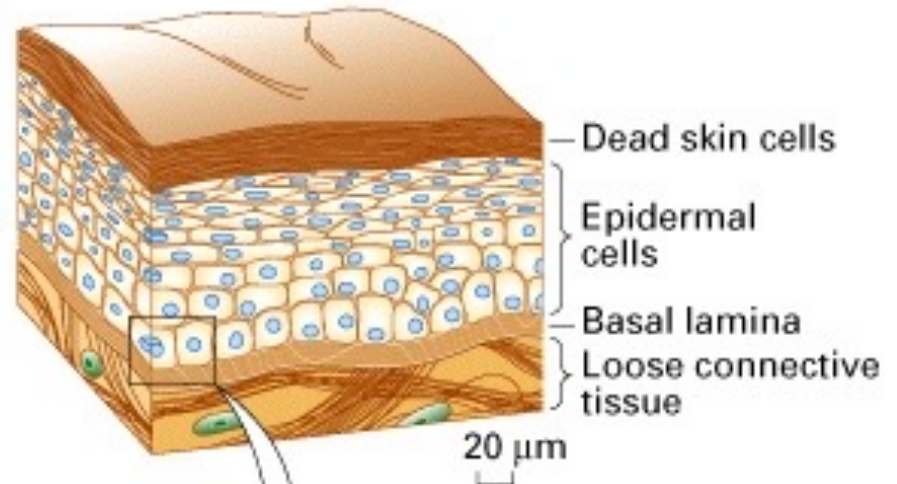
mentre nei tessuti di tipo **mesenchimale** (es. tessuto connettivo, tessuto adiposo, etc.) le cellule sono separate, però sono circondate da abbondante **matrice extracellulare**, che deve essere eliminata prima di porre le cellule in coltura.

ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:

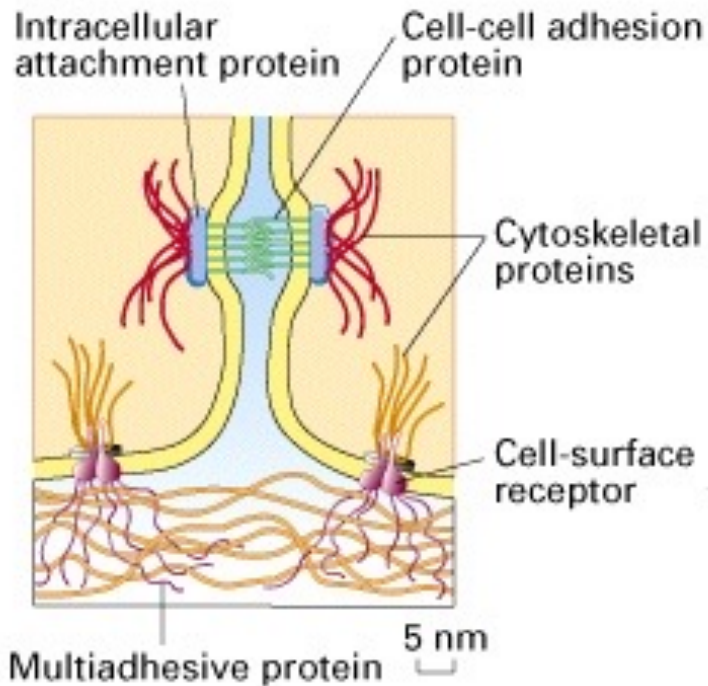
(a)



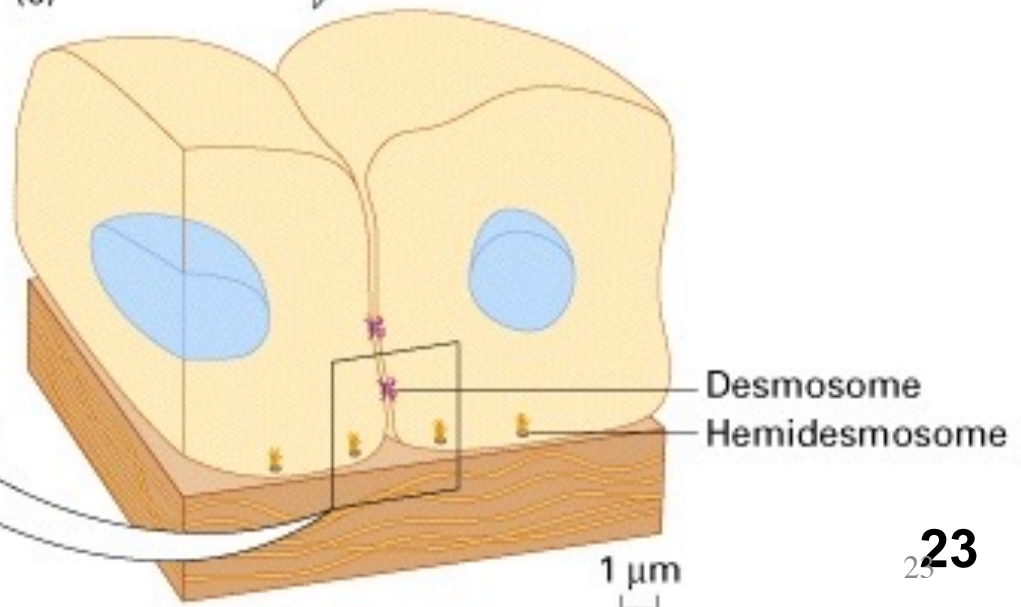
(b)



(d)

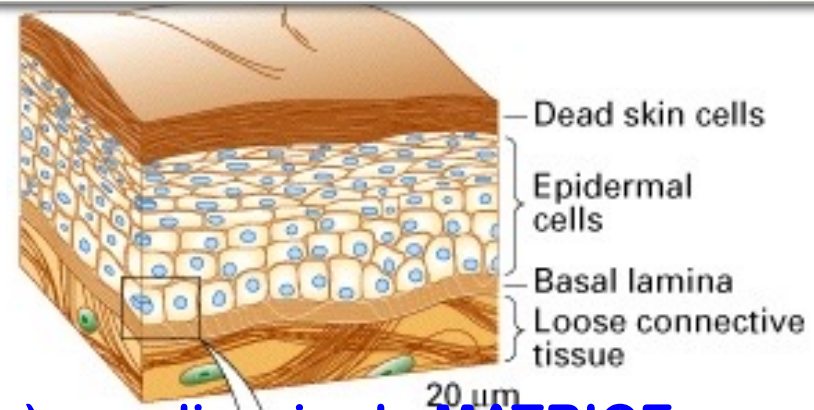


(c)



ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:

DISSOCIAZIONE
di singole **CELLULE**
da un espianto di **TESSUTO**



TECNICHE (usate in combinazione) per digerire la **MATRICE**
extracellulare e dissociare le **GIUNZIONI** intercellulari

Trattamento **meccanico**
bisturi, omogenizzatore
Seguito da (anche nel dissociatore)

Trattamento con **enzimi**
proteolitici (tripsina, collagenasi, elastasi)
glicolitici (ialuronidasi)

Trattamento con **agenti chimici** (EDTA, EGTA)
chelanti dei cationi bivalenti (Ca^{2+}) che stabilizzano le
giunzioni cellulari

DISSOCIATORE cellulare da banco



NORME DI SICUREZZA



Le colture cellulari sono fonti di **potenziale rischio biologico**, in particolare **colture primarie** che derivano direttamente da **tessuti animali /umani**.

Durante il corso verranno utilizzate colture cellulari controllate per l'assenza di patogeni e cDNA codificanti per singole proteine (NON il virus nè il genoma virale)

Tuttavia, è buona norma apprendere subito come lavorare in sicurezza:

- usare SEMPRE i **guanti**
- dopo l'uso gettare SEMPRE tutto il materiale entrato in contatto con le cellule nei **contenitori dei rifiuti biologici per la sterilizzazione**

Il tessuto deve essere perciò dapprima **sminuzzato** e **omogeneizzato** in condizioni di sterilità. Ciò si ottiene tagliuzzando finemente il tessuto con un bisturi; se il tessuto è abbastanza molle e si può disporre di quantità abbastanza abbondante del materiale di partenza, è possibile l'uso di omogenizzatori elettrici. Non ci si deve preoccupare di rompere le cellule, poichè con questi trattamenti si ottengono frammenti di tessuto.

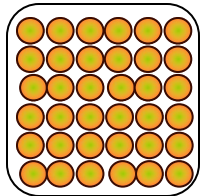
In seguito l'omogeneizzato viene sottoposto a dei trattamenti chimici ed enzimatici, che possono essere effettuati anche utilizzando uno strumento da banco detto dissociatore (slide 7).

Per **eliminare la matrice** che circonda le cellule si usano **enzimi proteolitici**, in grado di digerire il collagene e le altre proteine, ed in aggiunta **enzimi glicolitici** che digeriscono i polimeri dell'acido ialuronico e altri glucosaminoglicani.

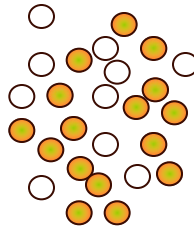
Molti tessuti, ad esempio quelli epiteliali, sono composti da cellule strettamente adese le une alle altre grazie alla presenza di giunzioni intercellulari. Queste vanno dissociate sia mediante l'uso di proteasi che eliminano le proteine di membrana responsabili dell'adesione cellula-cellula sia utilizzando agenti chimici chelanti dei cationi bivalenti (come Ca^{++} e Mg^{++} i quali stabilizzano le giunzioni) quali l'EDTA o l'EGTA.

ALLESTIMENTO DI UNA CULTURA CELLULARE 2D

da un tessuto



si dissociano singole cellule



e si seminano in un
recipiente in un
terreno opportuno



TERRENI DI CULTURA

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** (con CO₂)
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. **Fattori di crescita e differenziamento.**

CONTROLLO DEL pH

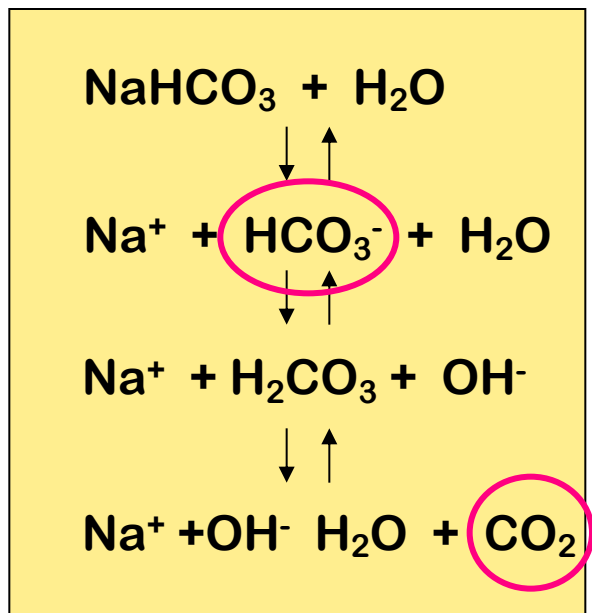
Il pH del terreno è fondamentale per la crescita cellulare:

pH FISIOLÓGICO: ~ 7,4

tende ad **acidificarsi** a causa dei prodotti del **metabolismo** cellulare

SISTEMA TAMPONE BICARBONATO

Bicarbonato di sodio nel terreno in equilibrio con CO₂ atmosferica al **5%**



L'incubatore mantiene
la **pCO₂** al **5%**

FATTORI DI CRESCITA e DIFFERENZIAMENTO

Le cellule necessitano di sostanze che stimolano la crescita e la proliferazione cellulare (**fattori di crescita**) o il differenziamento.

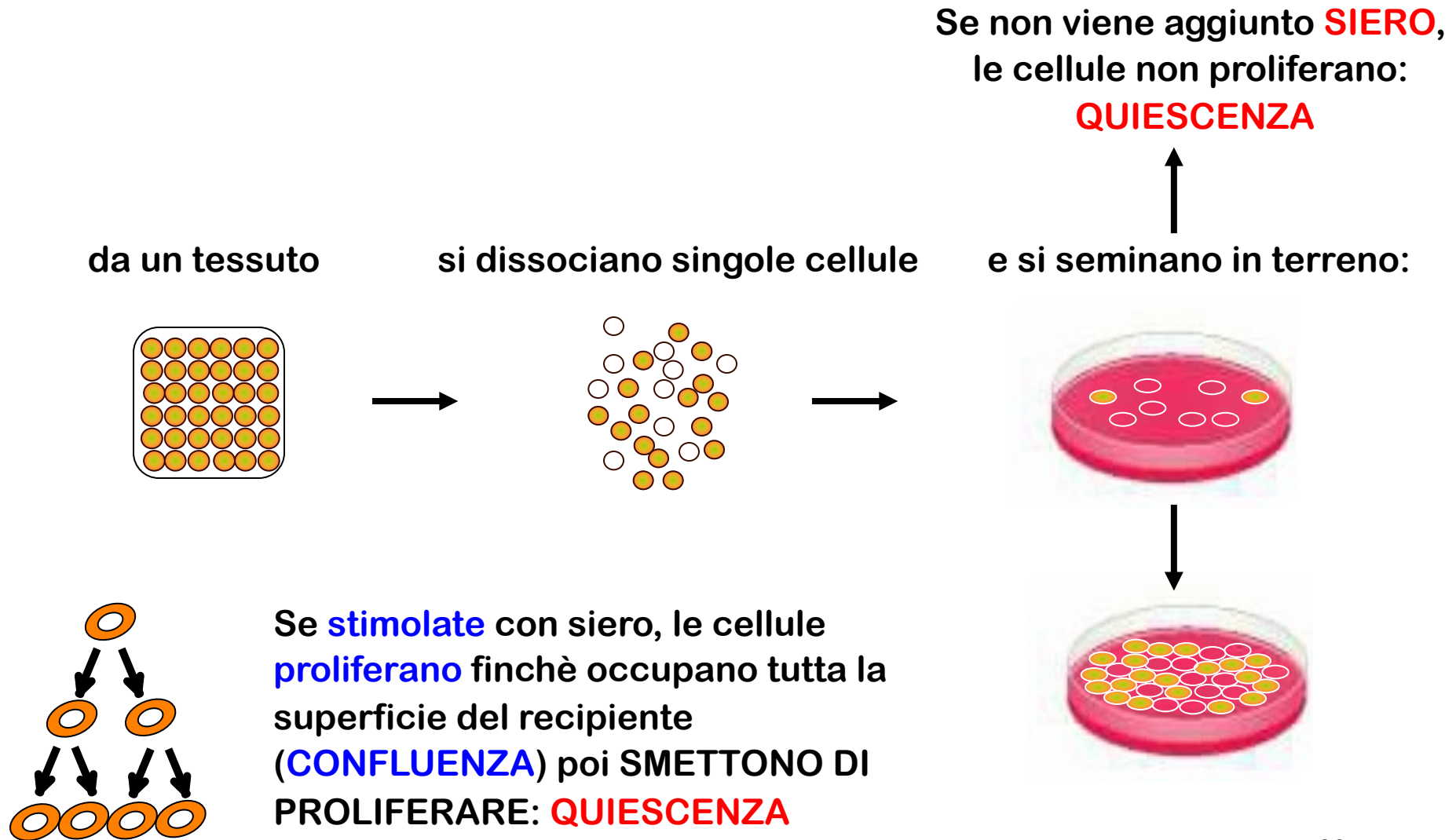
Si possono aggiungere al terreno cocktails di **fattori purificati**, ma nel caso di cellule di derivazione tumorale si usa comunemente il **siero fetale bovino (FCS)**.

In assenza di GF le cellule NON proliferano.

Se il terreno **NON contiene fattori: basale o di mantenimento**

Se il terreno **contiene fattori: completo o di crescita**

ALLESTIMENTO DI UNA CULTURA CELLULARE 2D



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 non** ricapitolano l'ambiente metabolico fisiologico (glucosio, amino acidi e derivati, lipidi, sali inorganici, elementi in tracce, vitamine).

Esistono terreni (es. Plasmax™) che ricapitolano l'ambiente metabolico fisiologico del plasma umano.

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).

CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2025-2026

Corso di Biotecnologie Cellulari

Lezione 2 - Materiali e strumentazione

RECIPIENTI per COLTURE CELLULARI in adesione 2D

- Sterilità
- Garantire scambi gassosi
- Massima superficie di appoggio alle cellule
- Trattamento per la crescita in adesione

Capsule Petri



Bottiglie di Roux (flasks)

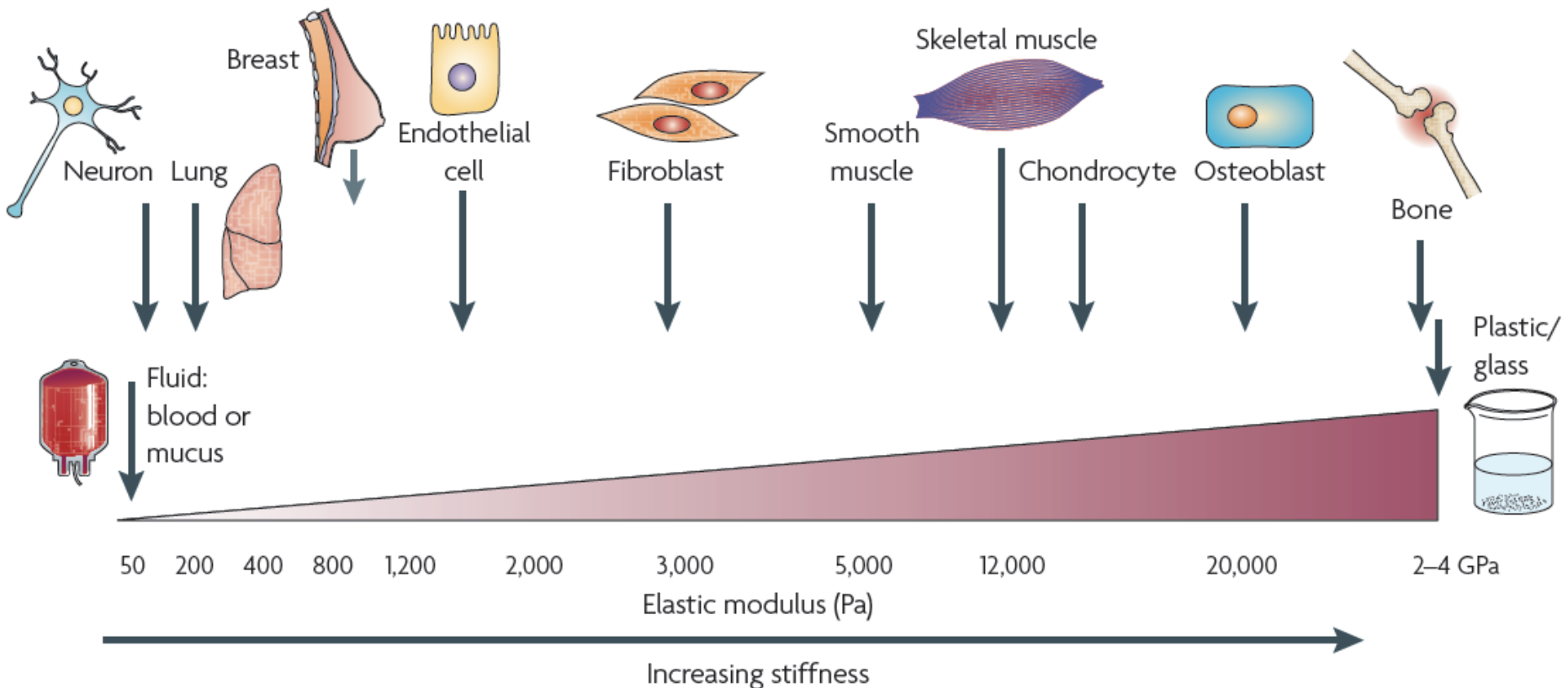


Piastre multipozzetto



**RECIPIENTI per COLTURE CELLULARI 3D:
piastre trattate per inibire l'adesione**

La rigidità del substrato influenza il comportamento cellulare: la plastica è un substrato estremamente rigido = non fisiologico



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 che **riducono l'adesione**.

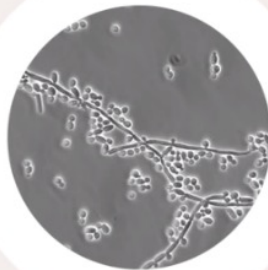
Mantenimento della STERILITÀ

assenza di microorganismi inquinanti = batteri, lieviti, muffe, micoplasmi (archibatteri endocellulari), virus e protozoi.

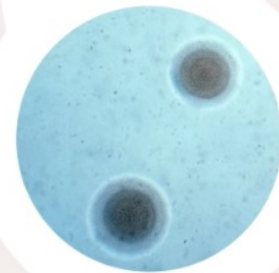
Microbial Contamination



Bacteria



Fungi



Mycoplasma

Mantenimento della STERILITÀ

assenza di microorganismi inquinanti

Trattamenti di materiale, strumentazione e reagenti:

- ✓ materiale sterile monouso
- ✓ calore per plastiche e vetreria (autoclave, stufa a secco)
- ✓ irraggiamento con lampade germicide (UV - cappa, gamma)
- ✓ ultrafiltrazione di soluzioni (membrane 0.4-0.2 μm)
- ✓ operare in atmosfera sterile: cappe a flusso laminare
- ✓ disinfettanti per superfici, pipette etc.
- ✓ uso di guanti
- ✓ aggiunta di antibiotici nel terreno di coltura
- ✓ BUONE PRATICHE

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}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).

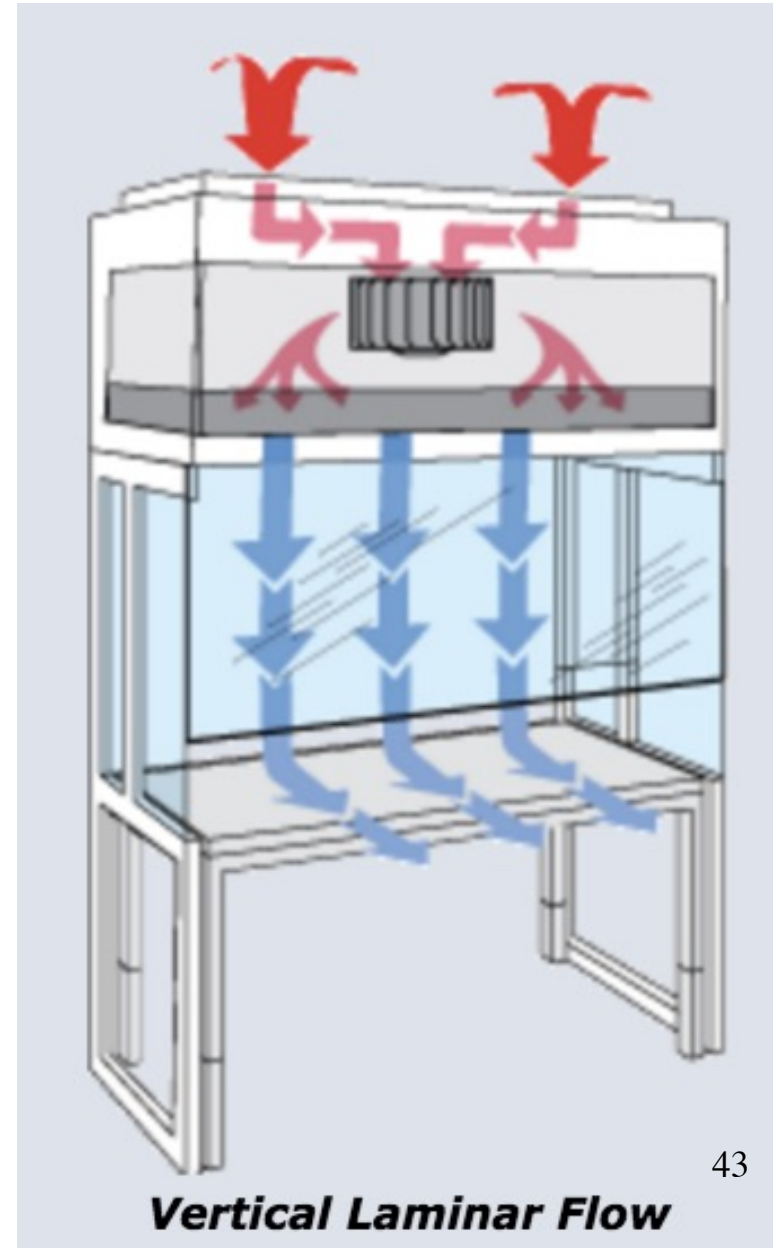
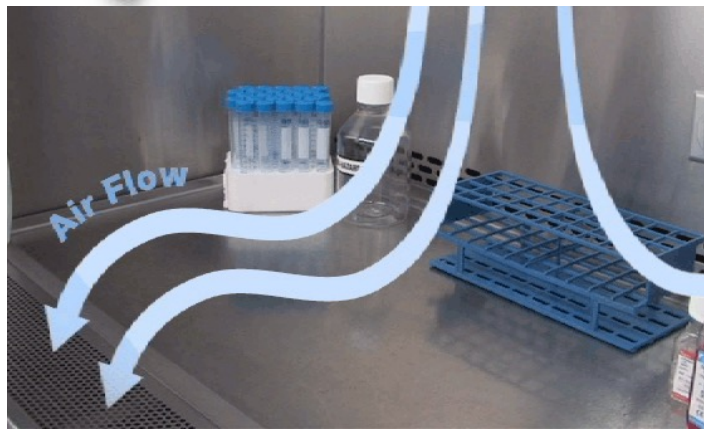
3) FILTRAZIONE

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)

Le cappe per colture cellulari



INCUBATORI per colture cellulari



INCUBATORI per colture cellulari

Crescita in condizioni controllate:

temperatura	37° C
pH = 7.4	5% CO ₂
umidità	saturazione H ₂ O

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

L'incubatore è collegato a una bombola di CO₂

pO₂ atmosferica = elevato stress ossidativo –
bombola di azoto per colture in ipossia

CRIOCONSERVAZIONE

Le cellule possono essere CONGELATE in AZOTO LIQUIDO
(77K: -196 ° C)
in appositi CONTENITORI detti DEWAR



LINK A VIDEO DIDATTICI

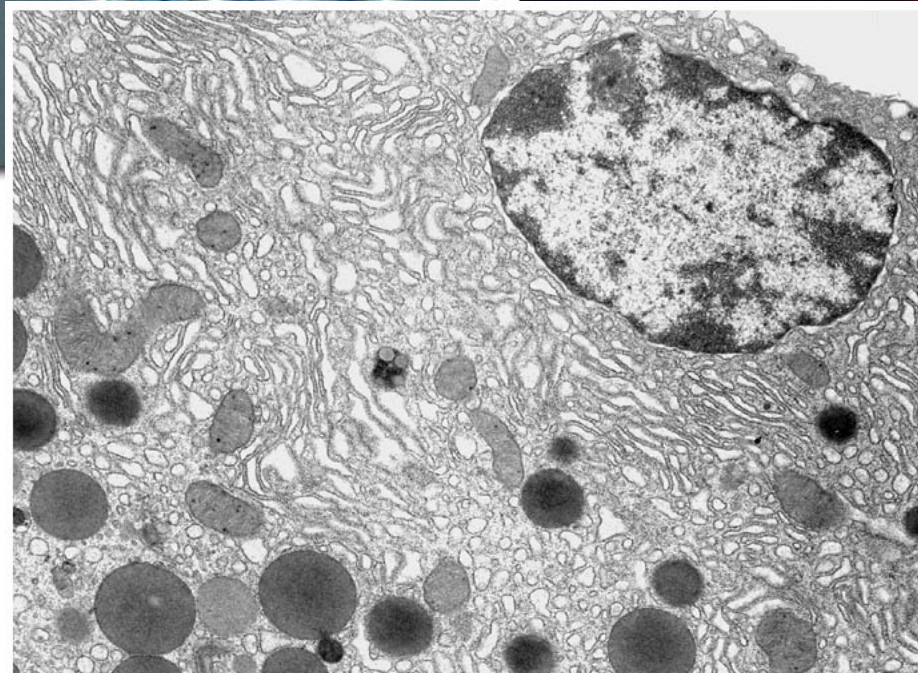
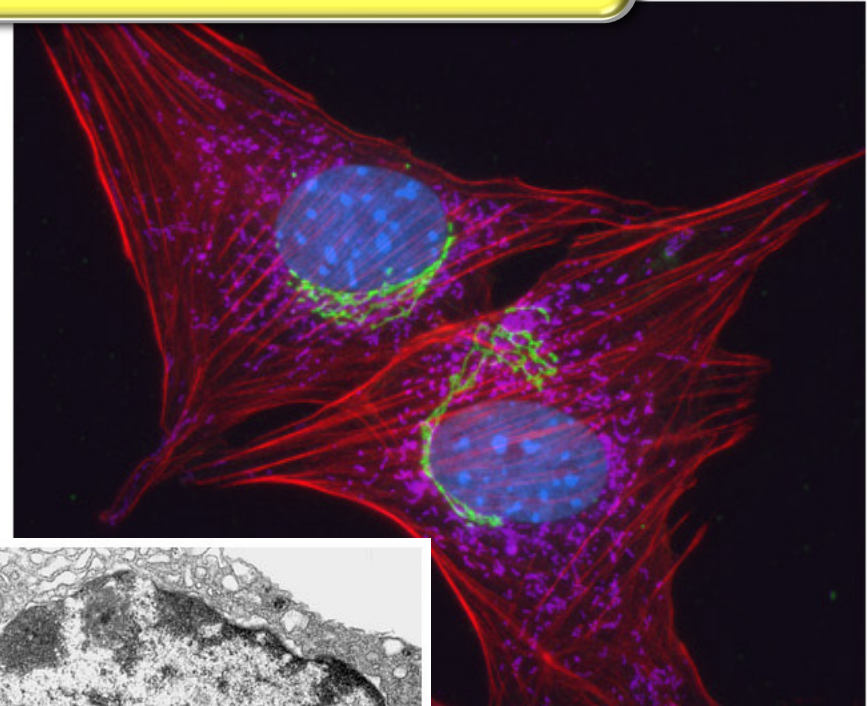
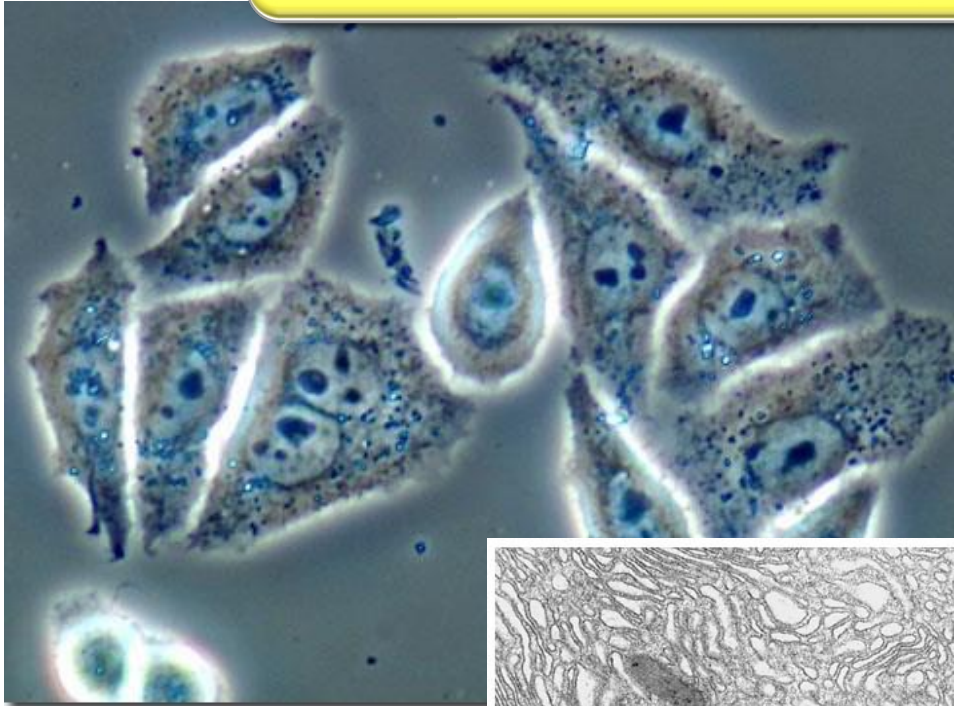
Introduction to cell culture

<https://www.youtube.com/watch?v=RpDke-Sadzo>

Best practice for cell culture sterility

https://www.youtube.com/watch?v=nr1tV_LuqJk

OSSERVAZIONE DI CELLULE IN COLTURA: DIVERSI TIPI DI MICROSCOPIA



cellule di
mammifero:
10-100 micron

OSSERVAZIONE DI CELLULE IN COLTURA: MICROSCOPI

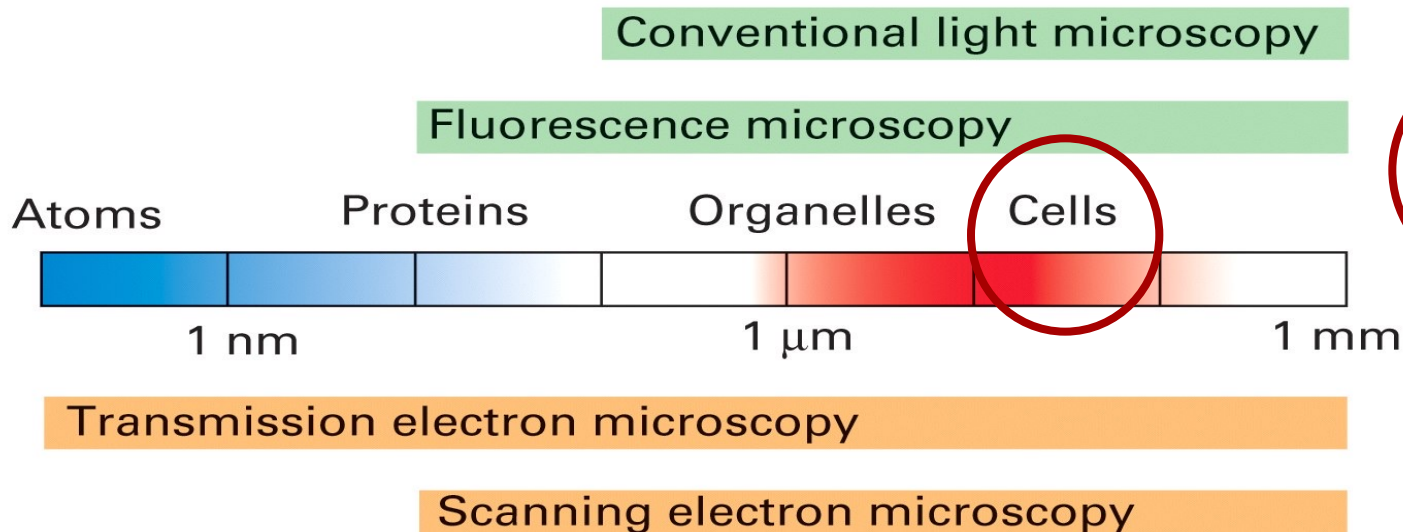


INGRANDIMENTO: prodotto dell'ingrandimento delle singole lenti utilizzate nel percorso ottico (obiettivo x oculare)

POTERE di RISOLUZIONE: capacità di distinguere 2 punti vicini

INVERSAMENTE proporzionale alla **lunghezza d'onda della luce** utilizzata =
LIMITE di risoluzione del microscopio!

MICROSCOPIO OTTICO (luce visibile) < MICROSCOPIO UV < MICROSCOPIO ELETTRONICO

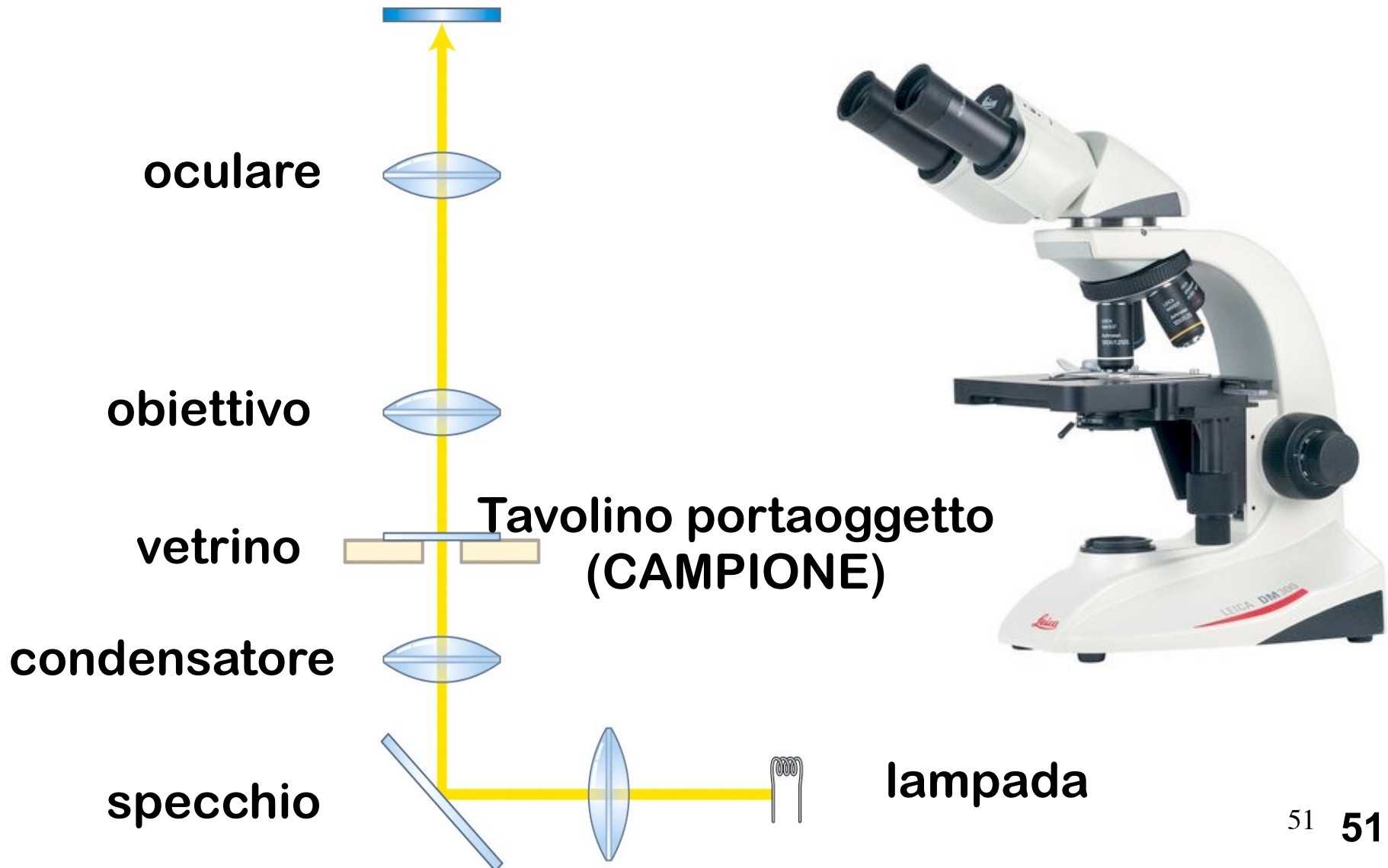


cellule di
mammifero:
10-100 micron

MICROSCOPIO OTTICO

- Utilizza la **LUCE VISIBILE** per illuminare il campione.
- Il **potere di risoluzione massimo** ottenibile e' di **0,2 micron**
- il preparato e' posto su un **TAVOLINO** mobile ed e' illuminato da un fascio di luce incidente che, dopo aver attraversato il campione, passa attraverso **due sistemi di lenti** di ingrandimento, l'**OBIETTIVO** e l'**OCULARE**.
- Normalmente, l'**oculare** e' a ingrandimento fisso (10x), mentre l'**obiettivo** e' a ingrandimento variabile (4-10-20-40x)
- La **messa a fuoco** si ottiene spostando il sistema obiettivo/oculare rispetto all'oggetto

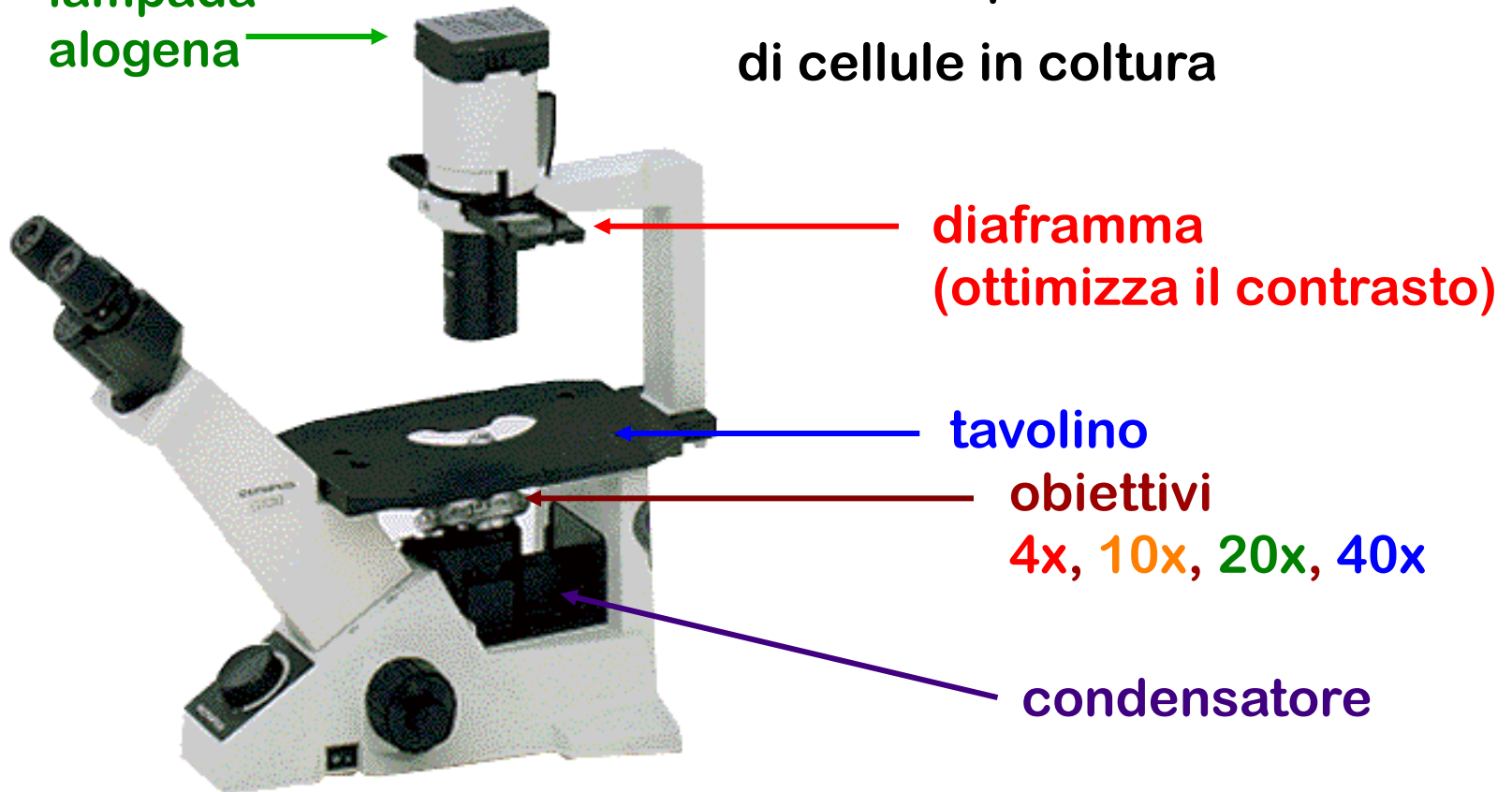
MICROSCOPIO OTTICO DIRITTO - upright (microscopio da istologia)



MICROSCOPIO OTTICO ROVESCiato - inverted

lampada
alogeno

Utilizzato per l'osservazione
di cellule in coltura



in cui l'**illuminazione** proviene dall'**alto**
e gli **obiettivi** sono posti al di **sotto del tavolino** portaoggetto

OSSERVAZIONE:

- **a fresco** (cellule vive, in terreno di coltura)

la capacità di osservazione è limitata dalle piccole differenze tra gli **indici di rifrazione** dei diversi componenti cellulari

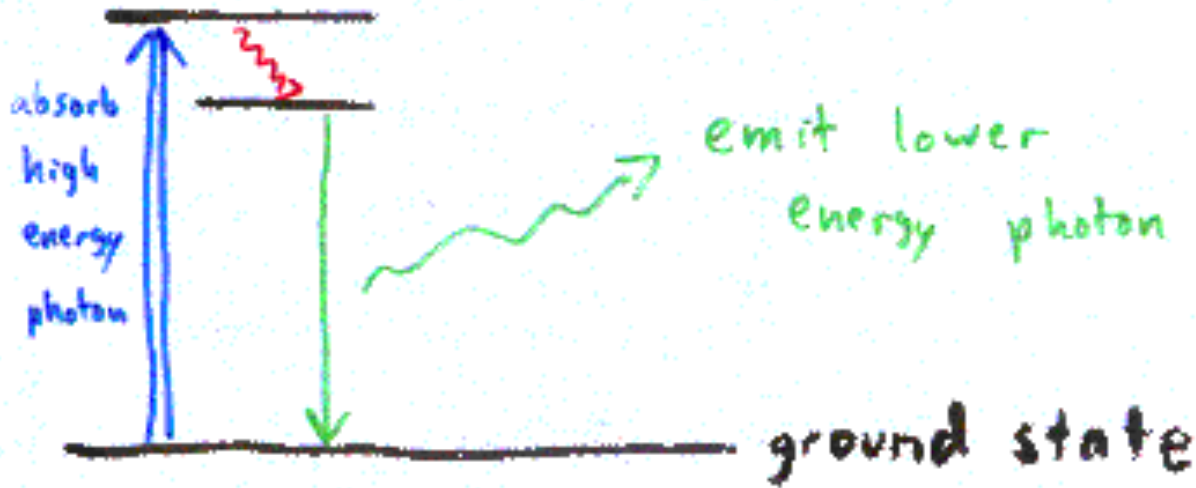
- **dopo fissazione e colorazione**

le cellule si disidratano con **alcoli** (metanolo-acetone)

o si usano **aldeidi** (paraformaldeide, glutaraldeide) per formare legami covalenti tra le proteine e gli acidi nucleici e disidratare il campione

Per aumentare il contrasto tra le diverse parti del preparato o i diversi organelli cellulari si possono utilizzare dei coloranti (**es. Ematossilina/Eosina, Giemsa, crystal violet etc.**)

MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

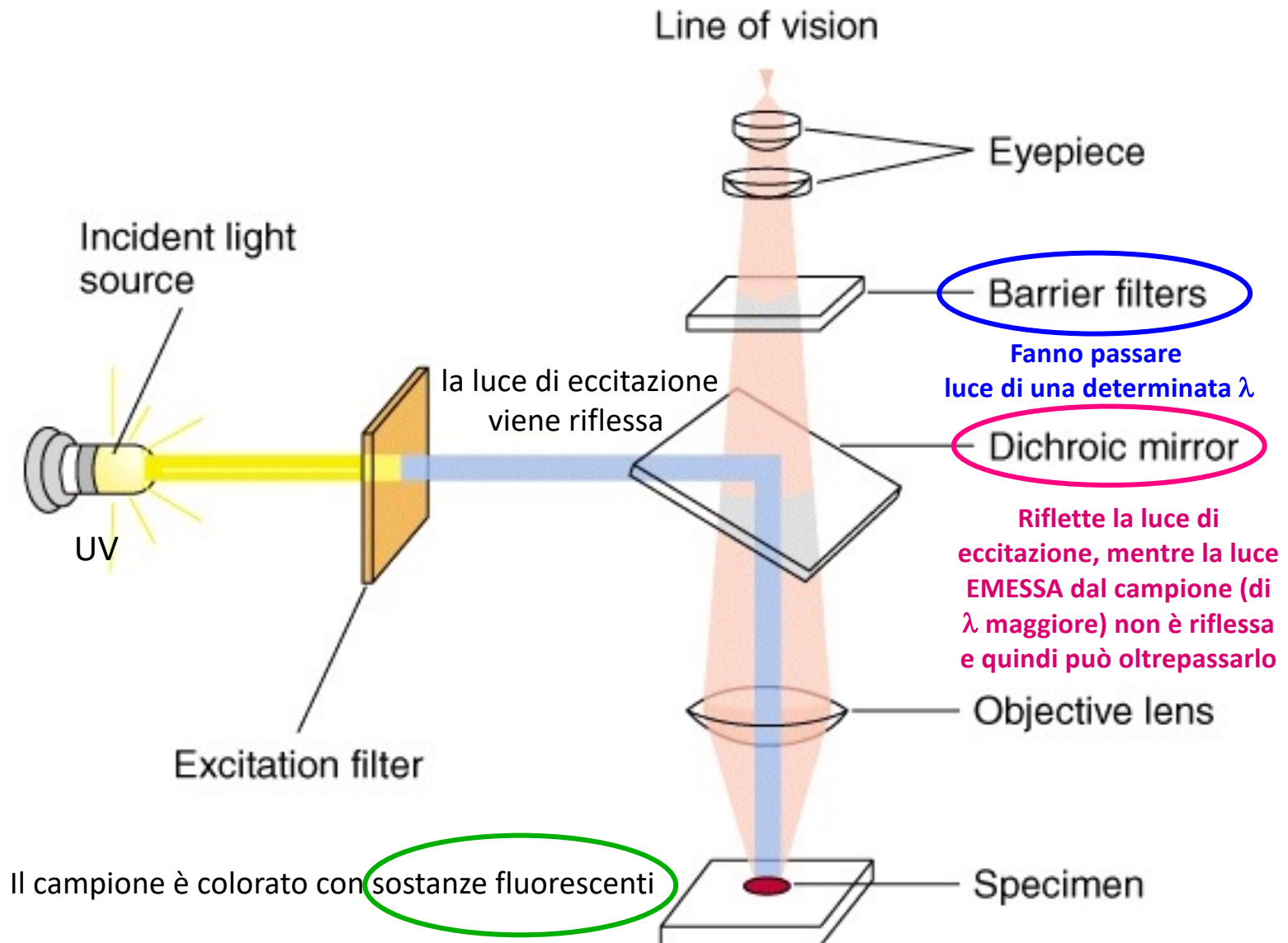


Per la visualizzazione della fluorescenza serve uno **strumento** in grado di **eccitare il fluoroforo** alla lunghezza d'onda **di eccitazione**
E di acquisire la luce **emessa** = luce di **fluorescenza**

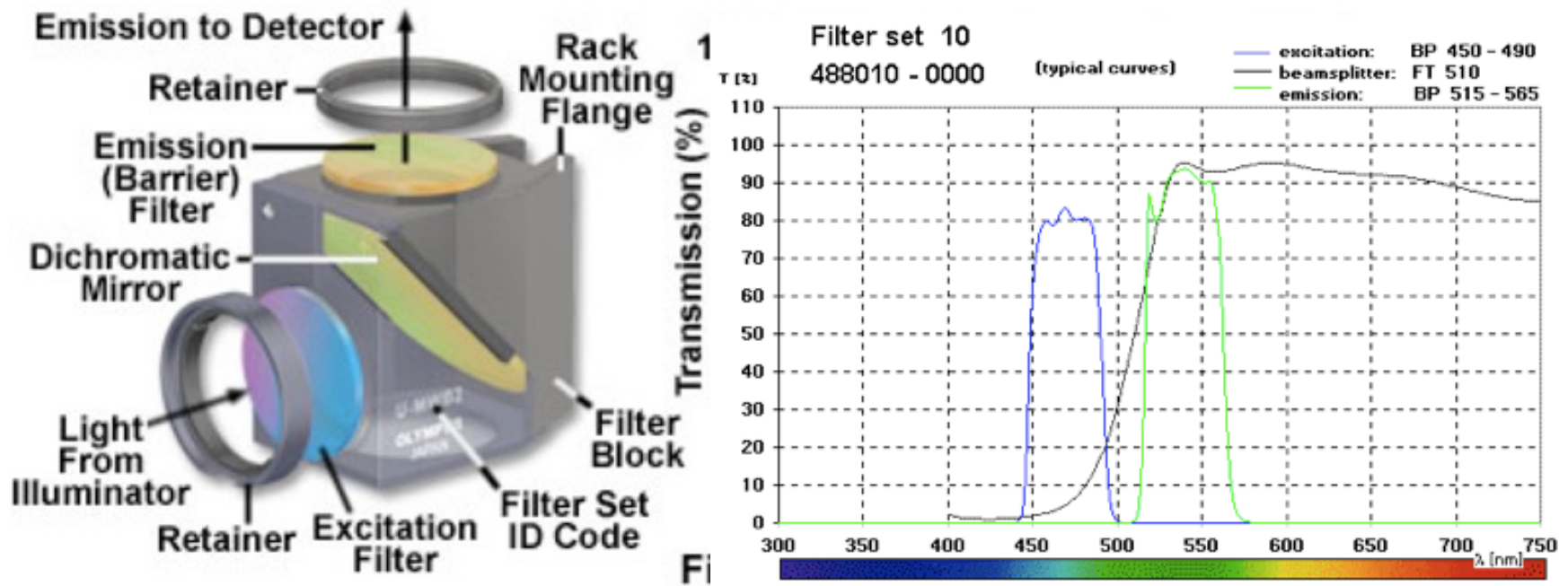
MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA

- visualizza **LUCE DI FLUORESCENZA EMESSA** dal campione dopo l'eccitazione
- la **luce di eccitazione e' solitamente UV – visibile (può essere IR)**
- il **potere di risoluzione è di 10 nm**
- **l'ingrandimento massimo è 1000 x**
(normalmente 10X per l'oculare e fino a 100X per l'obiettivo)

MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA



Fluorescence Filter Cube (Block) and Associated Spectra



Combinazione A:

filtro d'eccitazione 340-380/ lamina dicromatica 400/ filtro di sbarramento 430

Combinazione I3:

filtro d'eccitazione 450-490/ lamina dicromatica 510 / filtro di sbarramento 515

Combinazione N2.1:

filtro d'eccitazione 515-560/ lamina dicromatica 580/ filtro di sbarramento 590

Coloranti fluorescenti per il DNA comunemente utilizzati in microscopia cellulare



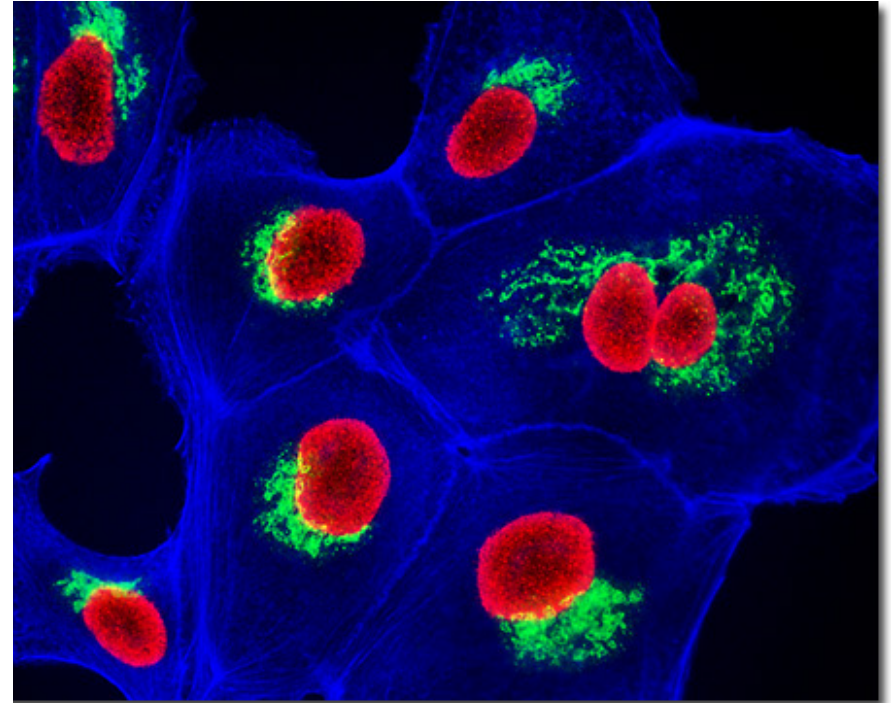
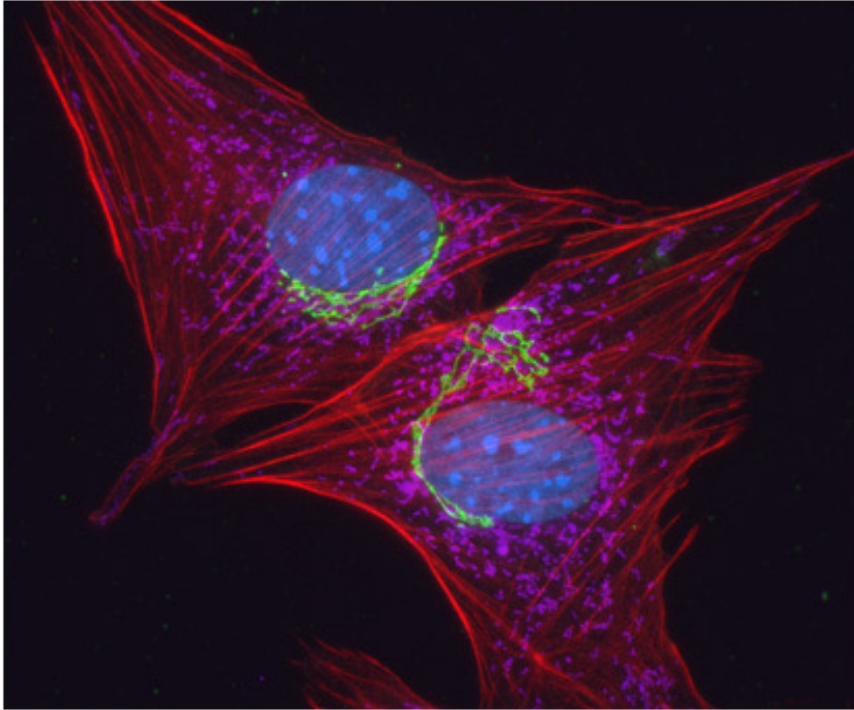
Description	MW	Excitation (nm)	Emission (nm)	Purpose
Certified Blank™				reference
Acridine Orange	265	500	526	DNA/RNA
Alexa Fluor® 488	643	499	519	conjugate
Alexa Fluor® 647	1300	652	668	conjugate
Allophycocyanine (APC)	104k	650	660	conjugate
APC-Cy™7	104k	650	767	conjugate
Chlorophyll (<i>a + b</i>)	8014 (a) 907 (b)	430,453	642,662	plant pigment
Cy™5	792	649	666	conjugate
DAPI	277	350	470	DNA (A-T)
Far-Out Red	-	475,590	663	reference
Fluorescein	389	495	519	conjugate
Hoechst 33342	616	346	375,390	dsDNA
Pacific Blue™	339	410	455	conjugate
PE (R-Phycoerythrin)	240k	480, 565	578	conjugate
PE-Cy™5	240k	480,565,650	670	conjugate
PE-Cy™7	240k	480	767	conjugate
PE-TR	240k	480,565,650	670	conjugate
Propidium Iodide	668	536	617	DNA intercalator
T.M. Rhodamine (TRITC, TAMRA)	430	557	576	conjugate
Texas Red® (Sulforhodamine)	625	589	615	conjugate
Violet Laser (Glacial Blue)	-	360	450	reference

Fluorofori comunemente utilizzati in microscopia cellulare



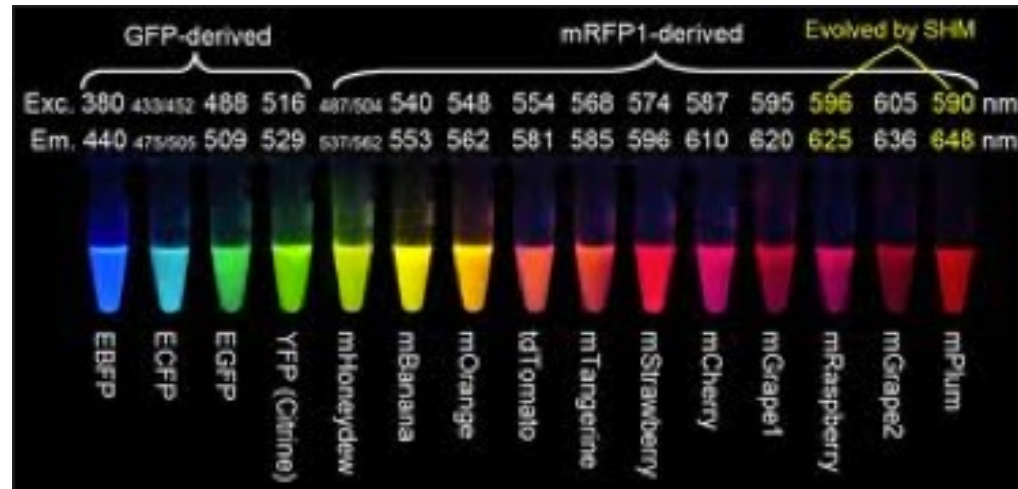
Description	MW	Excitation (nm)	Emission (nm)	Purpose
Certified Blank™				reference
Acridine Orange	265	500	526	DNA/RNA
Alexa Fluor® 488	643	499	519	conjugate
Alexa Fluor® 647	1300	652	668	conjugate
Allophycocyanine (APC)	104k	650	660	conjugate
APC-Cy™7	104k	650	767	conjugate
Chlorophyll (<i>a + b</i>)	8014 (a) 907 (b)	430,453	642,662	plant pigment
Cy™5	792	649	666	conjugate
DAPI	277	350	470	DNA (A-T)
Far-Out Red	-	475,590	663	reference
Fluorescein	389	495	519	conjugate
Hoechst 33342	616	346	375,390	dsDNA
Pacific Blue™	339	410	455	conjugate
PE (R-Phycoerythrin)	240k	480, 565	578	conjugate
PE-Cy™5	240k	480,565,650	670	conjugate
PE-Cy™7	240k	480	767	conjugate
PE-TR	240k	480,565,650	670	conjugate
Propidium Iodide	668	536	617	DNA intercalator
T.M. Rhodamine (TRITC, TAMRA)	430	557	576	conjugate
Texas Red® (Sulforhodamine)	625	589	615	conjugate
Violet Laser (Glacial Blue)	-	360	450	reference

Coniugazione del fluorocromo con molecole che legano specifiche componenti cellulari

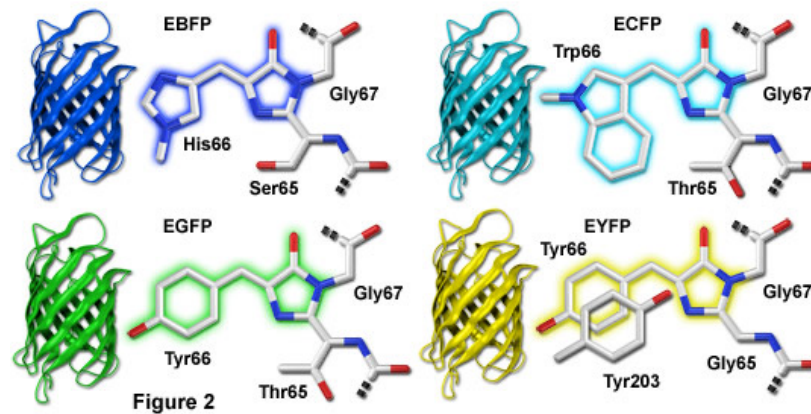


La combinazione di diversi canali permette di analizzare
–separatamente– diversi fluorofori nello stesso
campione

Utilizzo di fotoproteine come reporters fluorescenti



Chromophore Structural Motifs of Green Fluorescent Protein Variants



<http://www.olympusconfocal.com/applications/fpcolorpalette.html>

Invitrogen™

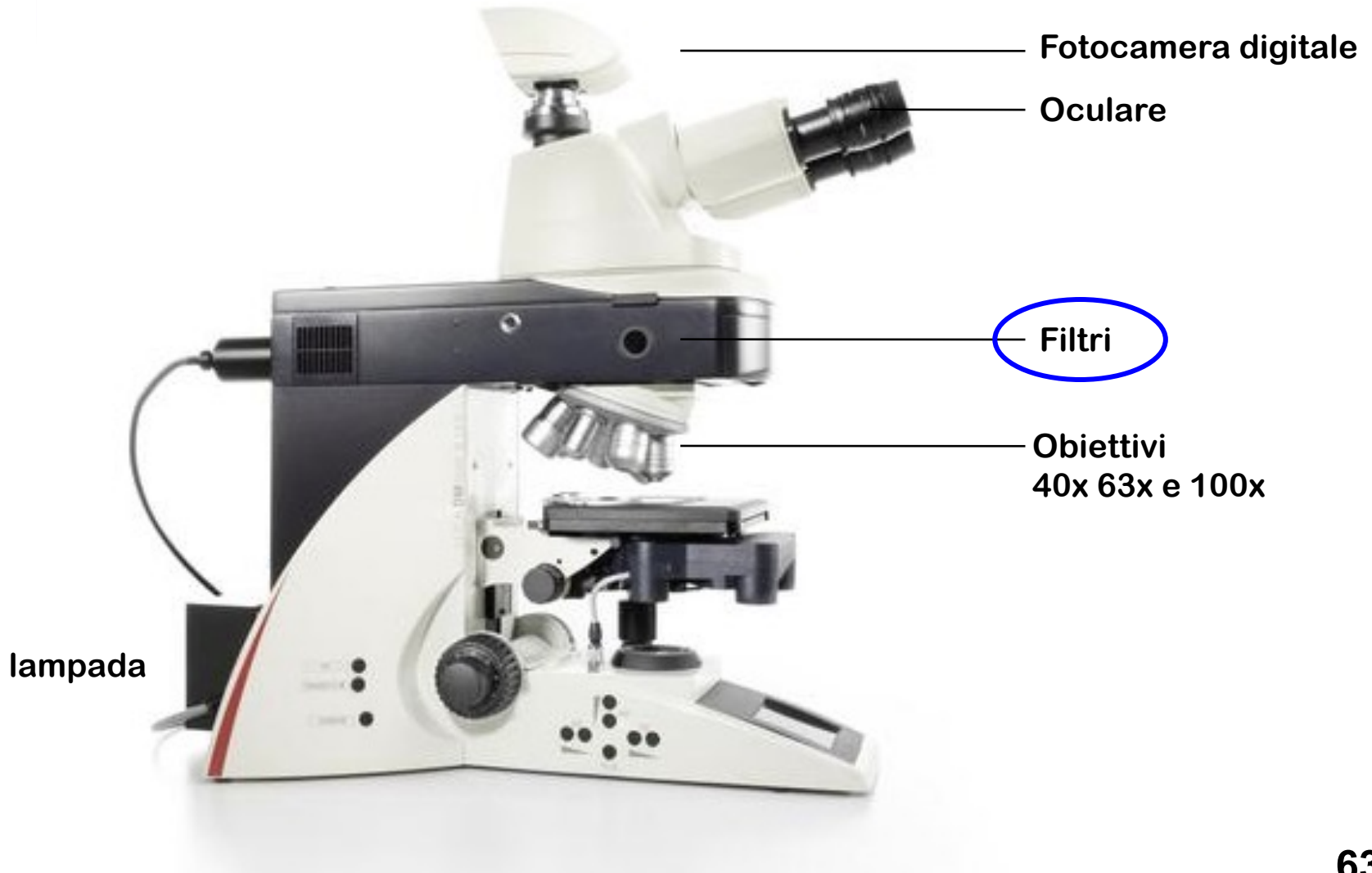
EVOS™ M5000 Imaging System

Microscopio campo chiaro/ fluorescenza rovesciato
Fino a 4 canali



Obiettivi
4x, 10x, 20x e 40x

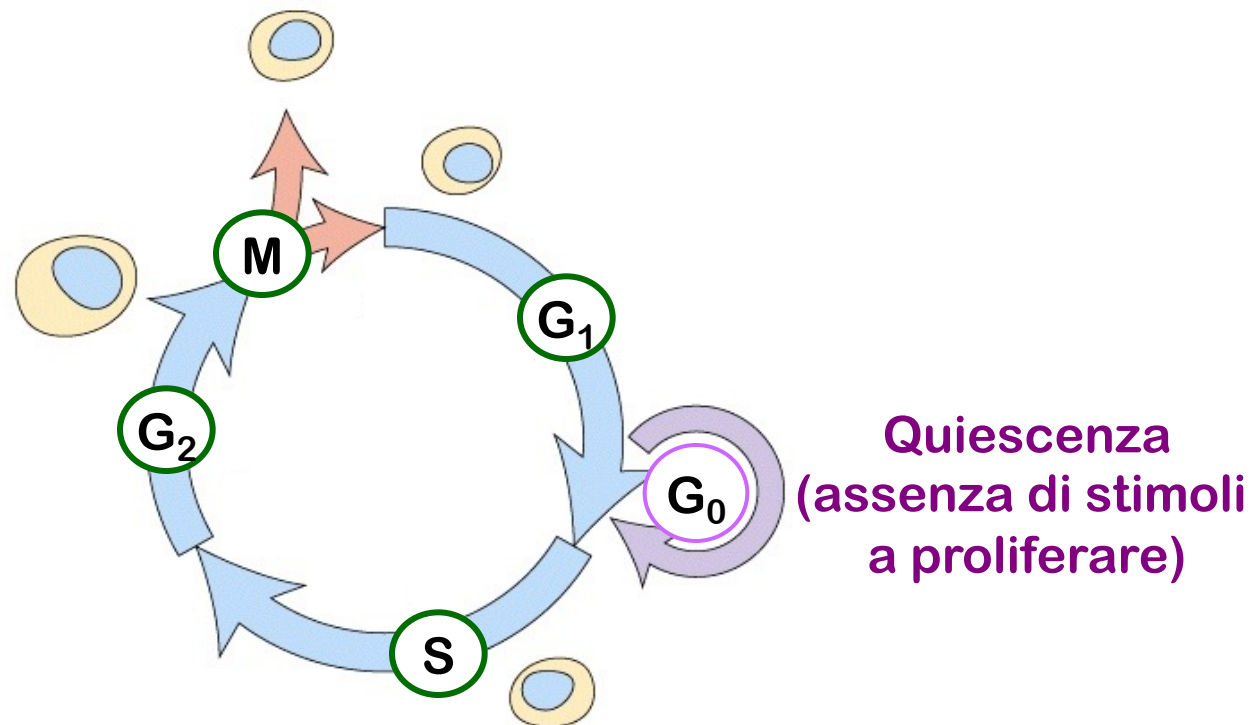
Microscopio a luce trasmessa/epifluorescenza widefield upright Leica DM4000



MANTENIMENTO DI CELLULE IN CULTURA

ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN COLTURA (1): QUIESCENZA

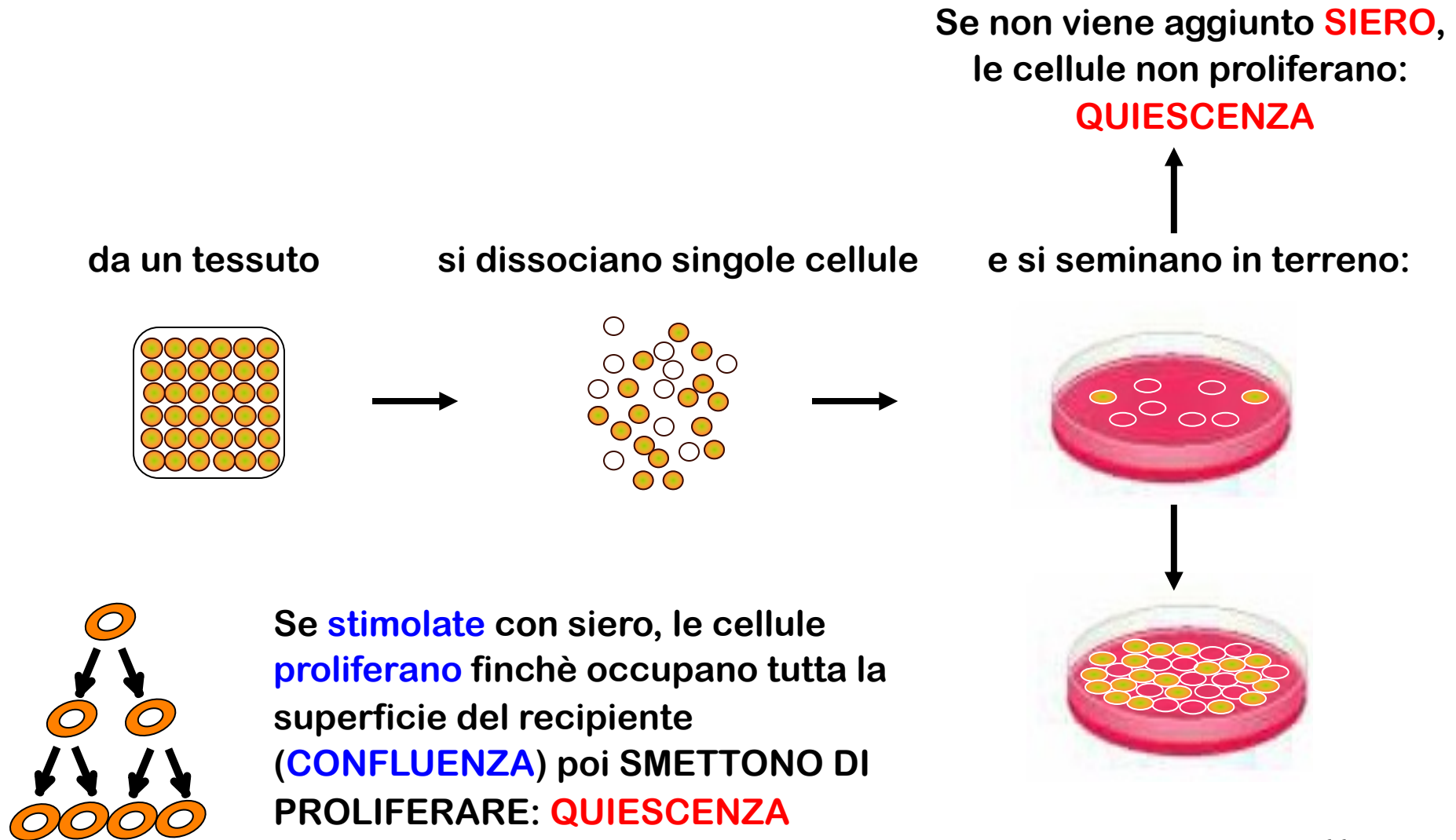
In assenza di fattori di crescita le cellule non proliferano
= deprivazione da siero



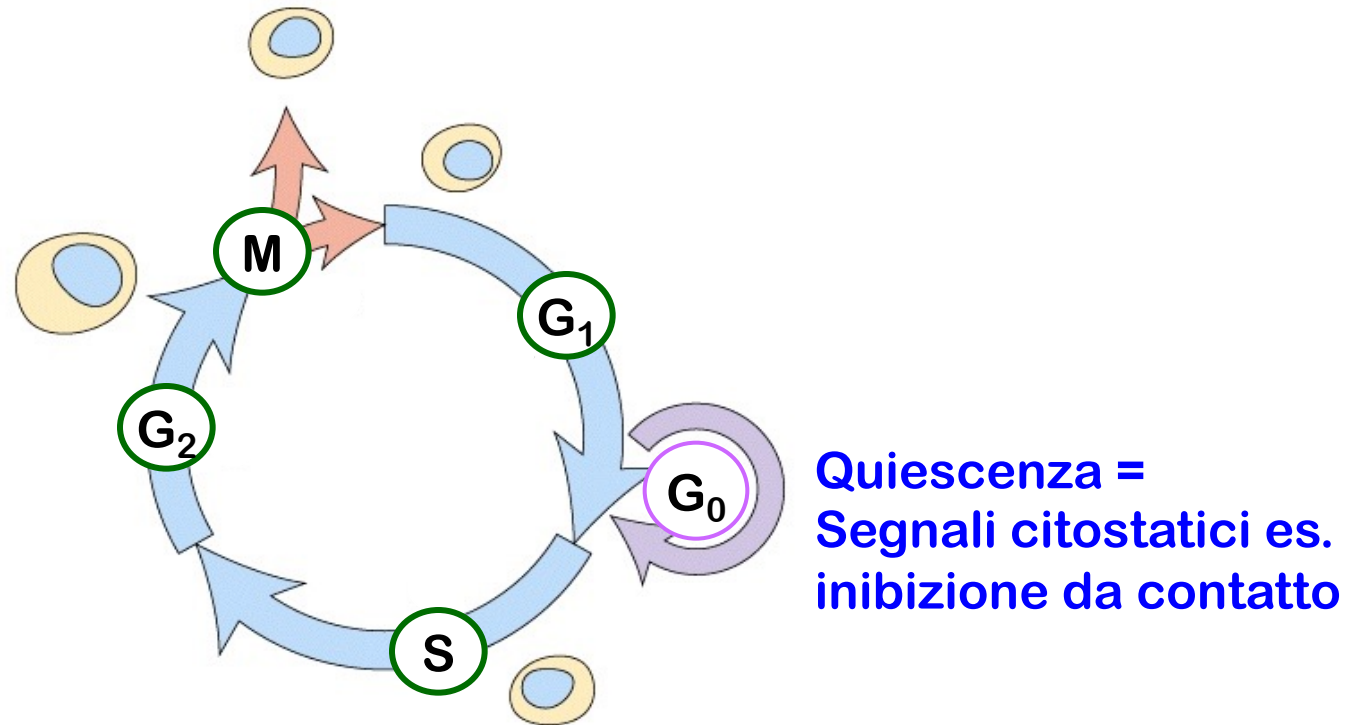
Le cellule quiescenti sono **arrestate reversibilmente** alla **fase G₀** del ciclo cellulare

Rientrano in ciclo dopo stimolazione con fattori mitogeni (= siero)

ALLESTIMENTO DI UNA CULTURA CELLULARE 2D



ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN COLTURA (2): INIBIZIONE DA CONTATTO



Le cellule che subiscono **l'inibizione da contatto** sono arrestate **reversibilmente** alla **fase G₀** del ciclo cellulare (= **quiescenza**)
Rientrano in ciclo dopo diluizione.

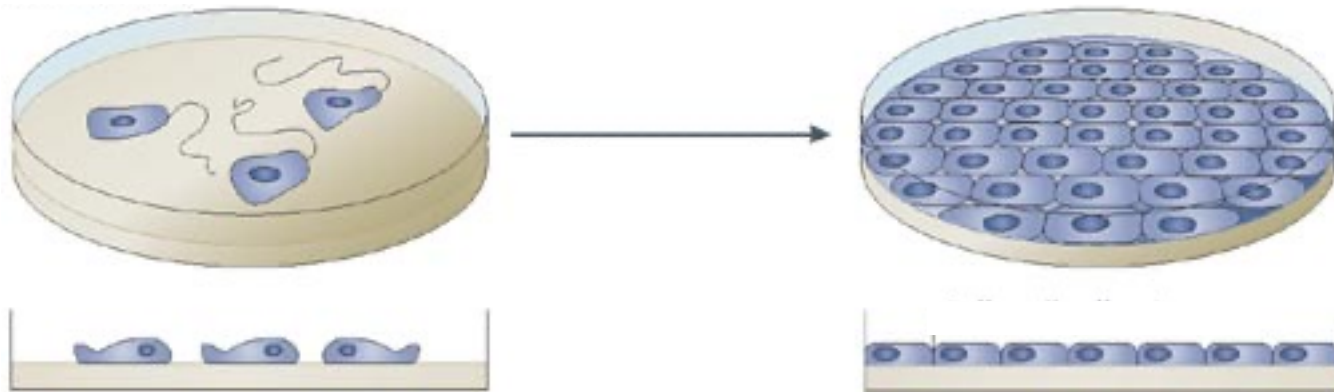
L'arresto del ciclo cellulare può avvenire in risposta a diversi stimoli e di conseguenza le cellule arrestate possono subire destini diversi. Possono uscire dal ciclo di divisione in maniera transitoria o comunque reversibile, oppure arrestare il ciclo cellulare in maniera permanente ed irreversibile. Questi fenomeni che si osservano in vitro, cioè in coltura, rispecchiano ciò che avviene in vivo, cioè nell'organismo di origine.

Quando ad esempio mancano gli **stimoli a dividersi**, le cellule entrano in una fase di **quiescenza, detta G₀**, dalla quale possono rientrare nella fase S se opportunamente stimulate con fattori di crescita (il siero in coltura, i fattori secreti da altre cellule in vivo). Una situazione diversa è data **dall'inibizione a dividersi** esercitata dal contatto con altre cellule (**inibizione da contatto**), che avviene anche se lo stimolo da siero è presente. Anche in questo caso le cellule sono arrestate reversibilmente alla fase **G₀** del ciclo cellulare. La rimozione dell'inibizione (ad esempio dopo diluizione mediante **passaggio in coltura**) permette alle cellule di riprendere la proliferazione.

In alcuni casi le cellule smettono di dividersi perché vanno incontro a differenziamento terminale, oppure a causa di danni al DNA. In questo caso vi sarà un arresto (reversibile oppure irreversibile) nel quale il ciclo cellulare si ferma **permanentemente** nella fase G₁ (oppure G₂).

Ad esempio cellule di una coltura primaria possono andare incontro al processo di **senescenza a causa dell'accorciamento dei telomeri (vedi più avanti)**.

Le cellule proliferano fino ad occupare tutta la superficie del recipiente = raggiungono la **CONFLUENZA**



Quindi smettono di proliferare = **INIBIZIONE DA CONTATTO**.

Se però vengono **diluite** in modo da fornire loro spazio,
ricominceranno a proliferare
(operazione di **PASSAGGIO IN CULTURA**)

Si consiglia la visione dei seguenti video:

Passaggio cellule in coltura

<https://www.youtube.com/watch?v=CMRKKI9XSDU>

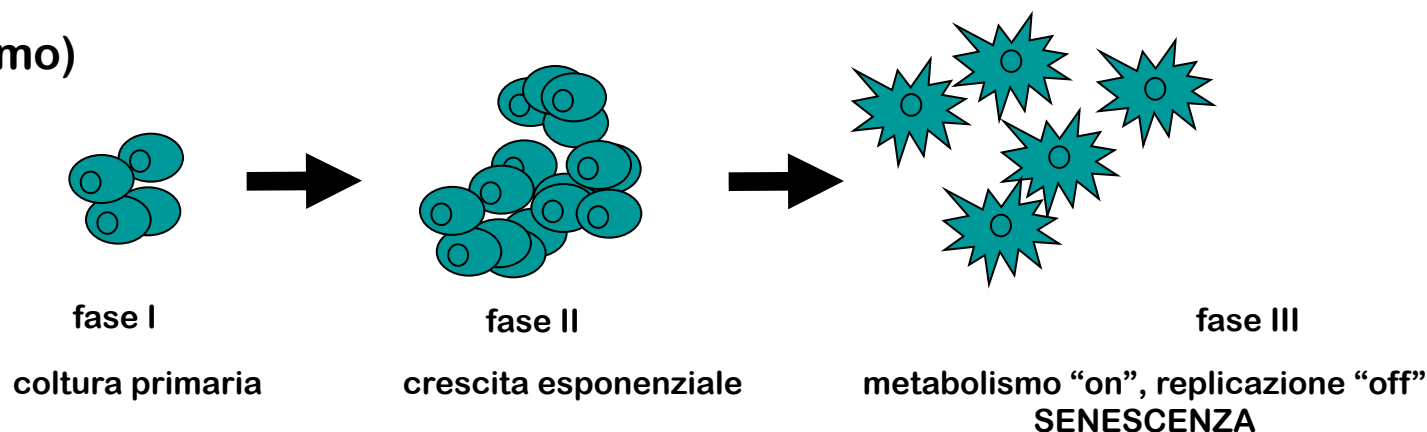
Conta cellule all'emocitometro

<https://www.youtube.com/watch?v=pP0xERLUhyc>

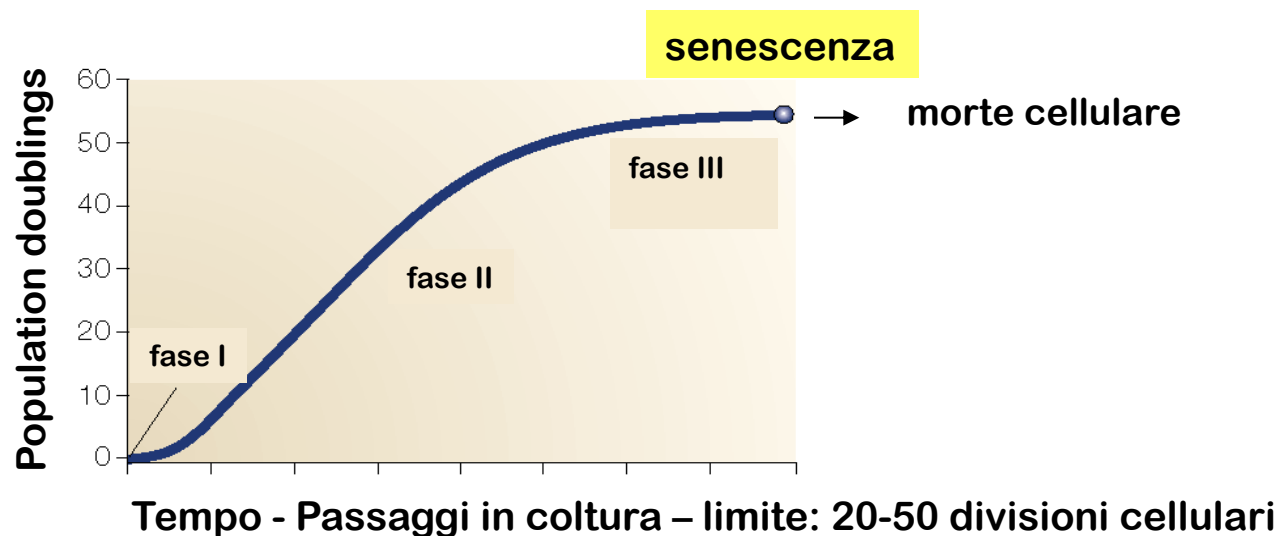


Leonard Hayflick,
1960's

Le cellule vanno incontro ad un **numero finito** di divisioni (20-50 a seconda della specie ed età dell'organismo)



CAPACITÀ REPLICATIVA DI CELLULE UMANE IN CULTURA



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

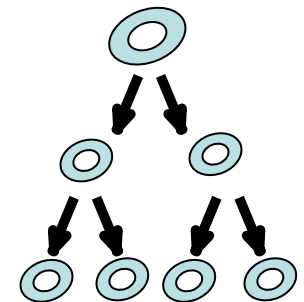
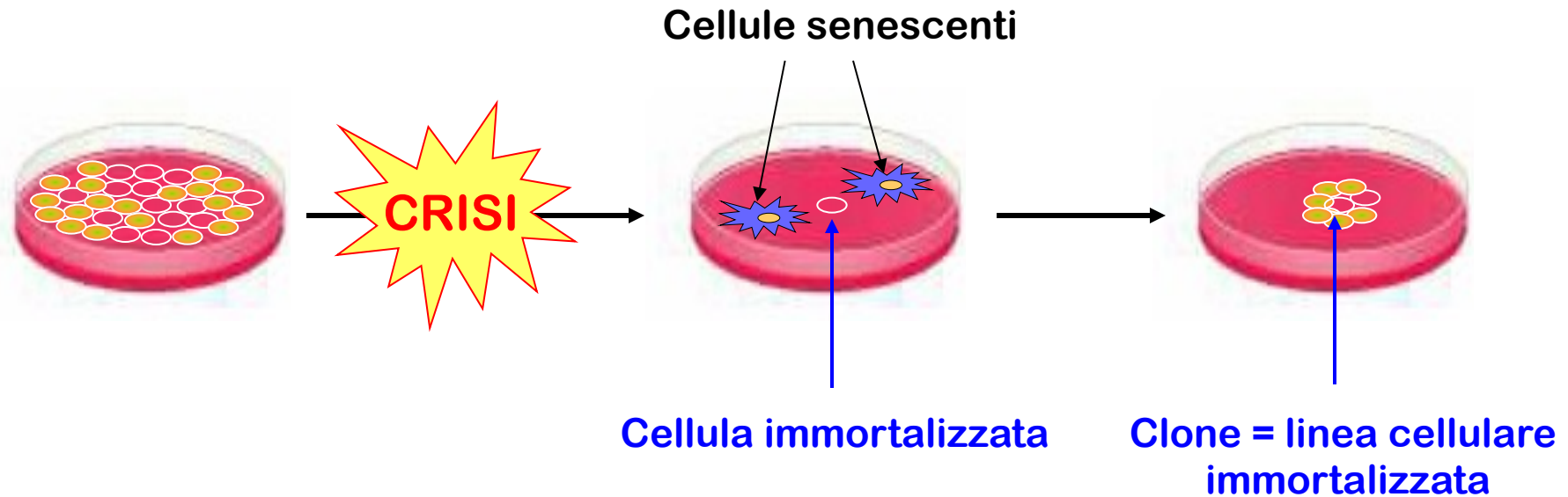
Nel grafico precedente è mostrato l'andamento della capacità proliferativa di una coltura primaria di cellule umane, ad esempio fibroblasti derivati da una biopsia di pelle: CURVA DI CRESCITA.

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.

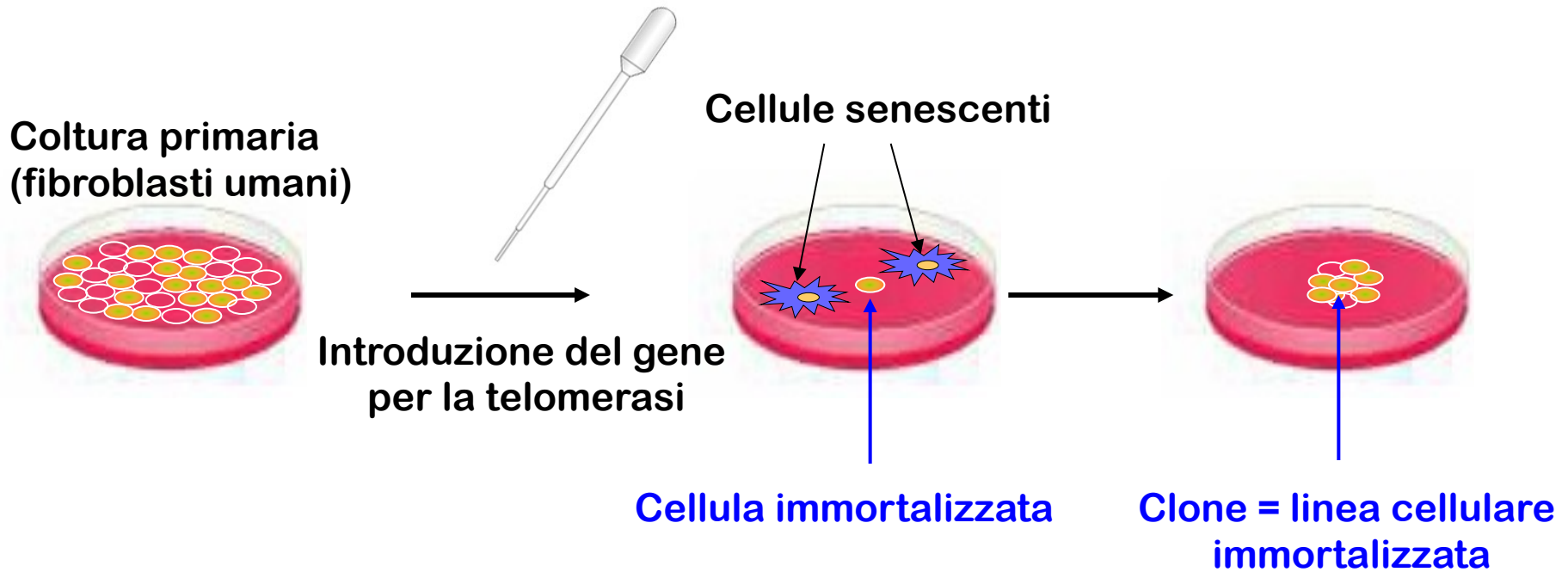
**Le cellule somatiche normali hanno MEMORIA
possono effettuare un numero limitato di passaggi in coltura prima di
andare incontro ad ARRESTO PERMANENTE DELLA PROLIFERAZIONE
= SENESCENZA REPLICATIVA**

**ECCEZIONI :
Linea germinale
Cellule staminali embrionali
Cellule tumorali**

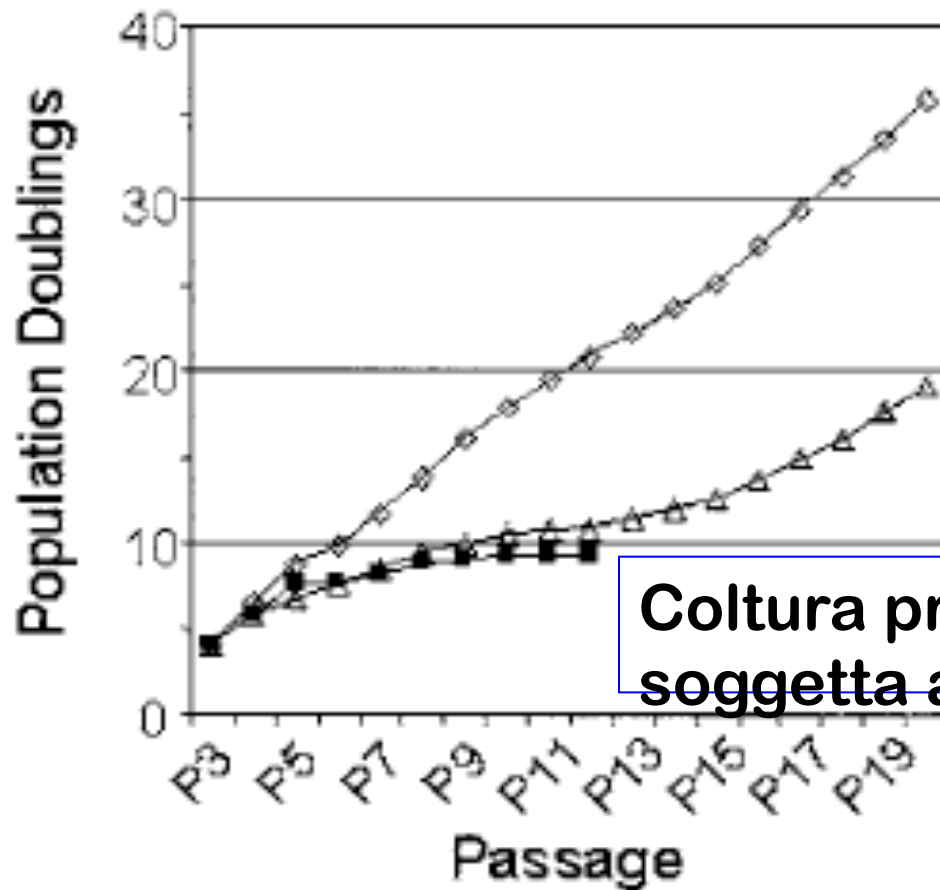
IMMORTALIZZAZIONE SPONTANEA DI CELLULE IN CULTURA



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:
proliferazione
indefinita

Coltura primaria:
soggetta a senescenza

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.

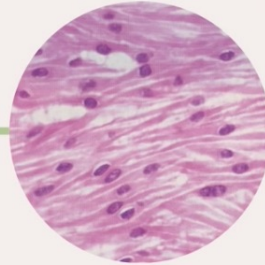
Tali cellule possiedono infatti telomeri molto più lunghi delle cellule umane. Inoltre, la senescenza nei roditori è sottoposta a minori controlli rispetto alle cellule umane: in pratica è sufficiente un singolo evento mutazionale per inattivarla. Questo spiega la frequenza di immortalizzazione in coltura.

Le cellule tumorali sono solitamente immortali, spesso mostrano attività telomerasica, il che suggerisce che potrebbero essere derivate da cellule staminali.

Colture primarie e linee cellulari stabilizzate

Colture primarie

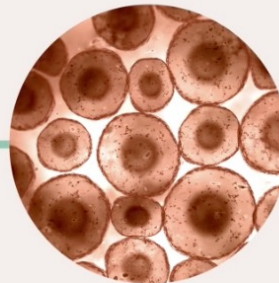
Possono dividersi un numero limitato di volte



Ottenute direttamente da tessuti

Linee cellulari

Utili per la ricerca a lungo termine



Si dividono indefinitamente

ESPERIENZA #1

OSSERVAZIONE DI CELLULE IN CULTURA

COLTURA PRIMARIA DI FIBROBLASTI DI TOPO

COLTURA PRIMARIA DI CARDIOMIOCITI DI TOPO

MCF10.DCIS.COM = LINEA CELLULARE derivata da CARCINOMA DUTTALE MAMMARIO IN SITU umano

HEK 293T = LINEA CELLULARE derivata da RENE embrionale umano esprimente Adenovirus E1A/SV40 LT

THP-1 = LINEA CELLULARE MONOCITARIA umana