



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.**

Laurea di primo livello in Biologia Molecolare

Elaborato di Laurea

**Analisi e sincronizzazione del ciclo cellulare in cellule di
mammifero**

**Tutor: Prof. Vera Bianchi
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Cristina Miazzi

**Anno Accademico
2006/2007**

INDICE

ABSTRACT	pag. 1
INTRODUZIONE	3
1.1 Descrizione e regolazione del ciclo cellulare	3
1.2 Colture cellulari <i>in vitro</i>	5
1.3 Sincronizzazione del ciclo cellulare	6
MATERIALI E METODI	7
2.1 Linee cellulari	7
2.2 Metodi di sincronizzazione	8
2.2.1 Sincronizzazione di cellule 3T3 mediante deprivazione di siero	8
2.2.2 Sincronizzazione di cellule CHO mediante privazione di isoleucina	9
2.3 Come rilevare il grado di sincronizzazione	10
2.3.1 Analisi mediante incorporazione di BrdU e immunofluorescenza	10
2.3.2 Analisi citofluorimetrica	11
RISULTATI E DISCUSSIONE	13
3.1 Curva di crescita delle cellule 3T3	13
3.2 Sincronizzazione delle cellule 3T3	14
3.3 Prova di sincronizzazione delle cellule CHO	18
3.4 Esperimento di sincronizzazione con cellule CHO	19
BIBLIOGRAFIA	21

ABSTRACT

Nel corso del ciclo cellulare si susseguono eventi distinti, caratteristici di ogni fase e qualora si desideri studiarne uno in particolare è molto utile avere a disposizione una popolazione cellulare sincronizzata nella fase corrispondente. A seconda della linea cellulare utilizzata, è necessario mettere a punto un metodo specifico di sincronizzazione che garantisca un' elevata efficienza e possibilmente non influisca sulla vitalità cellulare.

Sono stati testati due metodi: il primo prevede di ridurre la concentrazione di siero, e quindi la concentrazione di fattori di proliferazione disponibili, ottenendo l' arresto in G_0 ; il secondo consiste nel privare le cellule di un amminoacido essenziale bloccandole a livello del punto di restrizione, il cui passaggio richiede la sintesi di specifiche cicline.

Per le cellule 3T3 sono stati valutati gli effetti dello 0.1% e 0.6% di siero sulla capacità di sincronizzazione in G_0 e sulla conseguente entrata in fase S, concludendo che con cellule cresciute su vetrini rivestiti di fibronectina allo 0.1% di siero si raggiungono risultati soddisfacenti. Per quanto riguarda le cellule CHO, il trattamento con privazione di isoleucina a cui sono state sottoposte nelle condizioni sperimentali adottate si è rivelato piuttosto tossico e non ha mostrato un rapido ingresso in fase S.

INTRODUZIONE

1.1 Descrizione e regolazione del ciclo cellulare

Le cellule di mammifero proliferanti attraversano in maniera ciclica e ordinata una serie di eventi che si possono raggruppare in quattro fasi principali (figura 1): la fase G_1 , caratterizzata dalla sintesi di mRNA e proteine responsabili della crescita cellulare e che in parte entreranno in azione nelle successive fasi; la fase S, durante la quale avviene la replicazione del DNA; la fase G_2 , che separa la fase S dalla successiva; la fase M, durante la quale i cromosomi segregano e il citoplasma si divide per dare origine a due cellule figlie. Negli organismi pluricellulari è richiesto un controllo preciso del ciclo cellulare durante lo sviluppo e la crescita affinché ogni tessuto, organo o struttura possa acquisire la forma corretta e raggiungere la giusta dimensione. La proliferazione cellulare è controllata da una complessa rete di vie di segnalazione che integra segnali extracellulari circa l'identità e il numero delle cellule circostanti e segnali intracellulari circa la dimensione della cellula e il programma di sviluppo.

La progressione lungo il ciclo cellulare richiede la presenza di fattori di proliferazione inviati come segnale dalle cellule circostanti in concentrazione tale e per un tempo sufficientemente lungo da permettere alla cellula di oltrepassare il punto di restrizione situato in tarda fase G_1 . Questo evento forza la cellula a proseguire attraverso le successive fasi del ciclo cellulare, anche nel caso in cui si trovi poi a non essere più esposta a tali fattori di proliferazione.

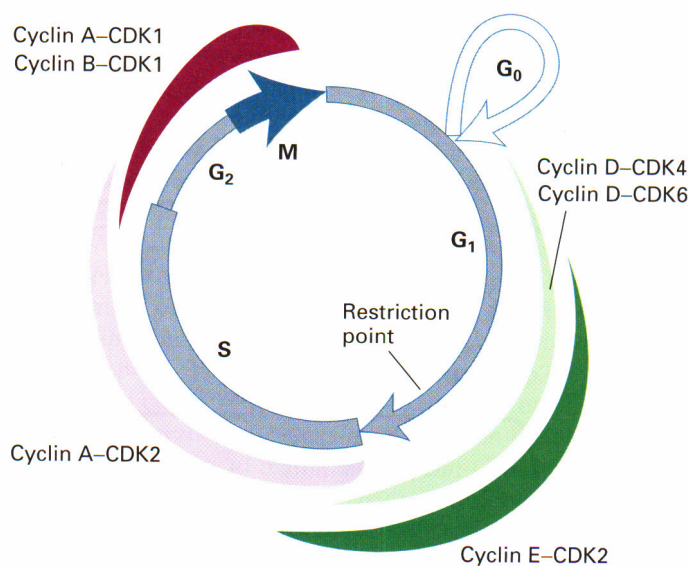


Fig.1
Rappresentazione schematica delle fasi che si susseguono lungo il ciclo cellulare con i relativi complessi ciclina-CDK in cellule di mammifero (da Lodish et al., *Molecular Cell Biology*, 5° ed., W.H. Freeman and Company)

L'avanzamento lungo il ciclo cellulare è regolato da eventi di fosforilazione di proteine, che, essendo reversibili, ben si prestano a svolgere tale funzione regolatrice. L'aggiunta di un gruppo carico negativamente ha pesanti effetti sulla struttura terziaria delle proteine, con la conseguente attivazione o inattivazione della proteina bersaglio. La fosforilazione può anche facilitare o meno l'interazione con altre proteine, a seconda del sito in cui si verifica; inoltre, all'interno di particolari sequenze consenso può rappresentare un segnale di poliubiquitinazione, destinando la proteina alla degradazione da parte del proteasoma. Gli eventi principali di fosforilazione sono mediati da complessi ciclina-CDK (cyclin-dependent kinase), dove la CDK possiede attività catalitica, mentre la ciclina svolge una funzione regolatrice e conferisce specificità di substrato alla chinasi.

Nelle cellule di mammifero esistono diverse cicline e diverse CDK, che si combinano a formare numerosi complessi, ognuno dei quali è caratteristico di una certa fase del ciclo cellulare, ha una propria specificità di substrato e innesca eventi distinti.

Subito dopo la mitosi, in fase G_1 precoce, non sono presenti complessi ciclina-CDK; la loro sintesi inizia in risposta all'arrivo di fattori di proliferazione: le vie di trasduzione del segnale portano all'attivazione di fattori di trascrizione già presenti nel citosol o nel nucleo, ma in forma inattiva. Essi consentono l'espressione delle cicline D ed E e delle CDK 4, 6 e 2, che si associano a formare i complessi ciclina-CDK di fase G_1 . Se i fattori di proliferazione permangono per un tempo sufficientemente lungo, sono in grado di promuovere il raggiungimento di una concentrazione soglia di tali complessi, in modo da attivare un gruppo di fattori di trascrizione (E2F), i quali innescano l'espressione dei geni che codificano per la ciclina A e per proteine necessarie alla replicazione del DNA. Si assembla, così, il complesso ciclina-CDK di fase S e la cellula ha a disposizione gli enzimi e i precursori (dNTP) indispensabili alla sintesi del DNA per procedere lungo il ciclo cellulare.

Il ciclo può essere attraversato in un'unica direzione dal momento che punti critici quali il passaggio da G_1 a S, da metafase ad anafase, da anafase a telofase e citochinesi sono irreversibili perché dovuti a degradazione regolata di proteine chiave. Infatti, nel passaggio da fase G_1 a fase S si verifica la degradazione di un inibitore del complesso ciclina-CDK di fase S; la transizione da metafase ad anafase è promossa dalla degradazione dell'inibitore (securina) di una proteasi (separasi) la quale agisce a livello dei complessi proteici che tengono uniti i cromatidi fratelli; il passaggio da anafase a telofase e citochinesi è segnato dalla degradazione della ciclina mitotica e conseguente spegnimento dell'attività della CDK.

In assenza di fattori di proliferazione, le cellule non sintetizzano né cicline né CDK e, non potendo proseguire lungo il ciclo cellulare, escono in corrispondenza della fase G_1 , entrando in una fase di quiescenza (G_0). In questo stato, le cellule possono reagire ancora ai fattori di proliferazione;

esempi sono i fibroblasti e i linfociti, che, se stimolati, possono rientrare nel ciclo e proliferare. Tuttavia, in un organismo pluricellulare la maggior parte delle cellule in fase G_0 si trova in uno stato differenziato, nel quale non sono più sensibili ai fattori di proliferazione e pertanto non sono più in grado di rientrare in ciclo e dividersi.

1.2 Colture cellulari *in vitro*

Per mantenere cellule *in vitro* è necessario cercare di riprodurre condizioni simili a quelle *in vivo*.

Normalmente *in vivo* le cellule si trovano in un ambiente isotonico e nel mezzo extracellulare sono disciolti i nutrienti che esse richiedono. La maggior parte delle cellule cresce ancorata ad un substrato e le cellule circostanti, grazie alle molecole segnale che producono, solubili o di membrana, ne garantiscono la sopravvivenza e ne regolano la proliferazione.

Per questo nel mezzo di coltura dovranno essere presenti amminoacidi essenziali, vitamine, molecole che fungano da fonti di energia, come il glucosio, e sali, per garantire l'osmolarità del mezzo, affinché le membrane cellulari non siano sottoposte a stress osmotici. Un ruolo essenziale riveste il siero, in quanto contiene fattori di sopravvivenza e fattori di proliferazione, molti dei quali sono presenti in concentrazione dell'ordine dei ng/ml o subng/ml e quindi difficili da caratterizzare. Il siero favorisce anche l'adesione al substrato stimolando la formazione di una biomatrice e, cosa altrettanto importante, permette di correggere problemi quantitativi nella composizione basale del mezzo: contiene, infatti, dei trasportatori e delle proteine che funzionano da deposito, le quali legano reversibilmente quelle sostanze che potrebbero avere un'azione inibitoria se fossero presenti a livelli eccessivi, rendendole disponibili in maniera non tossica.

È chiaro, quindi, che la composizione del terreno di coltura è importante per la normale proliferazione.

Ogni linea cellulare ha, poi, particolari richieste in termini di quantità di glucosio, percentuale di siero ed eventuali amminoacidi non essenziali, ma per tutte vale il fatto che la proliferazione continua finché ci sono nutrienti e spazio a disposizione: quando le cellule arrivano a confluenza, per inibizione da contatto si ha un progressivo rallentamento o arresto della crescita.

Nella crescita di una popolazione cellulare in coltura si possono individuare quattro fasi: la fase di latenza (fase lag) che segue immediatamente l'inoculo e durante la quale il numero di cellule non aumenta, anzi talvolta può diminuire; la fase di crescita esponenziale (fase log), durante la quale le cellule si moltiplicano alla velocità ottimale relativamente alle condizioni in cui si trovano; la fase stazionaria, in cui il numero di cellule rimane costante; la fase di decadimento e morte cellulare.

1.3 Sincronizzazione del ciclo cellulare

In una popolazione in crescita esponenziale le cellule sono distribuite in maniera asincrona lungo tutte le fasi del ciclo cellulare. Tuttavia, se si desidera studiare eventi specifici di singole fasi del ciclo cellulare, poter disporre di popolazioni sincronizzate non soltanto è utile, ma quasi necessario, dal momento che durante le diverse fasi del ciclo si verificano processi metabolici distinti. In linea di principio, una popolazione cellulare potrebbe essere sincronizzata in qualsiasi fase del ciclo, inclusa la fase G_0 . Tuttavia, il blocco avviene più comunemente in G_1 , G_0 o M; è invece difficile arrestare la popolazione in G_2 , e il blocco in S è molto spesso letale. Un metodo di sincronizzazione tende a soddisfare tre criteri: la popolazione cellulare dovrebbe essere perfettamente sincronizzata in un punto preciso del ciclo; la procedura utilizzata dovrebbe avere debolissimi effetti, o nulli, sui processi metabolici di tali cellule; il metodo dovrebbe permettere di ottenere cellule sincronizzate in grande quantità, specialmente se per scopi di tipo biochimico. Naturalmente, i metodi sviluppati non hanno un'efficienza del 100%, motivo per cui di solito si parla di popolazioni arricchite in una certa fase del ciclo cellulare; inoltre, la sincronizzazione acquisita permane per un tempo limitato e, man mano che proseguono lungo il ciclo, le cellule tendono a perdere questa proprietà.

I metodi sviluppati per raggiungere tale scopo si dividono in due gruppi principali: metodi fisici, che si basano sulle dimensioni e sul volume cellulare, e metodi chimici, che consistono nel modificare la composizione base del mezzo di coltura. In parallelo ai metodi di sincronizzazione sono stati sviluppati metodi per rilevare il grado di sincronizzazione: si può, ad esempio, seguire l'entrata in fase S monitorando l'incorporazione nel DNA di un precursore radioattivo mediante autoradiografia o conta in liquido di scintillazione, oppure mediante immunofluorescenza, nel caso in cui si utilizzino anticorpi specifici contro il precursore usato coniugati ad una molecola fluorescente; in alternativa, si può eseguire un'analisi al citofluorimetro, uno strumento che, in base all'intensità di fluorescenza emessa da un fluoroforo legato al DNA, la quale è direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente all'interno della cellula, restituisce la distribuzione di una popolazione cellulare lungo il ciclo.

Non esiste un metodo di sincronizzazione universalmente valido per ogni linea cellulare, per cui è necessaria una lunga fase di sperimentazione e numerosi tentativi con la possibilità di apportare modifiche al protocollo di base per aumentarne l'efficienza. In questo lavoro si sono sperimentati due diversi metodi di sincronizzazione con due diverse linee cellulari, operando in condizioni di bassa concentrazione di siero, in un caso, e in assenza di un amminoacido essenziale, nell'altro.

MATERIALI E METODI

2.1 Linee cellulari

3T3:

fibroblasti di topo; crescono in DMEM con 4500 mg/l di glucosio, 10% di siero fetale bovino, amminoacidi non essenziali (Cys, Gln, Tyr) e Hapes

CHO:

fibroblasti di ovario di criceto (chinese hamster ovary); crescono in α MEM con 7% di siero fetale bovino. Le cellule utilizzate in questi esperimenti sono mutanti per l'enzima deossicitidina chinasi (dCK-)

Il terreno di coltura di ogni linea cellulare contiene anche antibiotici (penicillina e streptomina).

Mantenimento in coltura

Le cellule sono mantenute in incubatore in condizioni costanti di temperatura (37°C), umidità e pH (7.4 unità). La stabilità del pH, che tenderebbe ad acidificare per effetto del metabolismo cellulare, è garantita dalla pressione parziale di CO₂ al 5% nell'incubatore e dalla presenza di bicarbonato di sodio nel terreno di coltura, in maniera tale da stabilire un equilibrio tra la CO₂ in fase gassosa e quella disciolta nel mezzo; alcune linee cellulari richiedono anche il sistema tampone acido N-2-idrossietilpiperazine-N-2-etansolfonico (Hapes).

Affinché le cellule restino proliferanti, è necessario trapiantarle periodicamente per evitare che raggiungano la confluenza con conseguente inibizione da contatto: per allestire una subcultura si elimina il terreno e si lava il monostrato con una soluzione salina isotonica contenente EDTA, un chelante di cationi bivalenti; sequestrando gli ioni Ca⁺⁺ si indeboliscono i legami tra le cellule e il supporto, facilitando l'azione della tripsina che, durante un'incubazione di 5 minuti a 37°C, media il distacco delle cellule digerendo elementi del glicocalice. L'azione proteolitica viene poi bloccata dall'aggiunta di terreno di coltura che contiene inibitori di proteasi forniti dal siero. Un'operazione molto frequente è la conta delle cellule, che può essere svolta mediante un contatore automatico. Prima è necessario risospendere bene le cellule per non andare incontro ad eventuale sottostima. Si prelevano 50 μ l di sospensione cellulare e si trasferiscono in 20 ml di soluzione isotonica. Il numero di cellule presenti in 1 ml si ottiene moltiplicando il valore restituito dal contatore per 800, perché si tiene conto del fattore di diluizione (400) e del fatto che lo strumento aspira 0.5 ml per la conta.

2.2 Metodi di sincronizzazione

2.2.1 Sincronizzazione di cellule 3T3 mediante deprivazione di siero

Questo metodo prevede di lasciare le cellule a bassa concentrazione di siero (0.1-0.6%) per 48 ore, scadute le quali si procede sostituendo tale mezzo con uno ad alta percentuale di siero (20%) e a tempi successivi si prelevano le cellule per l'analisi del grado di sincronizzazione.

Preparazione delle capsule con vetrino

Dal momento che l'analisi del grado di sincronizzazione è stata condotta mediante incorporazione di BrdU (5-Bromo-2'-deossi-uridina) e immunofluorescenza, è stato necessario seminare le cellule in capsule con vetrino.

Da esperimenti precedenti si è notato che su vetrini rivestiti di fibronectina le cellule aderiscono meglio e mantengono una forma più naturale rispetto a vetrini rivestiti di collagene o poli-lisina. Si è proceduto quindi con la preparazione di tale supporto.

La fibronectina è presente alla concentrazione di 5µg/ml in una soluzione contenente H₂O sterile con gelatina allo 0.02%. Capsule di 3.5 cm di diametro con vetrino contenenti 1.5 ml di tale soluzione vengono poste a 37°C per tutta la notte. Prima dell'uso è necessario togliere l'eccesso di liquido; in questo stato le capsule possono essere conservate a -20°C.

Procedura

In ogni capsula con vetrino del diametro di 3.5 cm preventivamente trattata con fibronectina sono state seminate 0.2×10^6 cellule. Il giorno successivo il terreno normalmente utilizzato per il mantenimento in coltura di questa linea cellulare è stato sostituito da un mezzo a bassa concentrazione di siero (0.6%), nel quale le cellule sono rimaste per 48 ore. Utilizzando un terreno a bassa concentrazione di siero, si espongono le cellule a una bassa quantità di fattori di proliferazione, non sufficiente a consentire il passaggio del punto di restrizione. Per questo cellule che si trovino in fase G₁ precoce vi rimarranno bloccate, mentre cellule che abbiano già oltrepassato il punto di restrizione continueranno lungo il ciclo, fino a dividersi, ma non potranno intraprenderne uno nuovo. Più precisamente, una concentrazione così bassa di fattori di proliferazione fa uscire le cellule dal ciclo cellulare e le fa entrare in una fase di quiescenza. Quando il mezzo a bassa concentrazione di siero dopo 48 ore viene sostituito da un terreno ad alta concentrazione di siero (20%), i fattori di proliferazione, forniti in concentrazione superiore a quella presente nel normale terreno utilizzato (al 10% di siero), stimolano le cellule quiescenti a rientrare nel ciclo e a proseguire verso la fase S. La popolazione cellulare dovrebbe quindi muoversi in maniera sincronizzata e si può determinare il grado di sincronizzazione seguendo l'ondata di entrata in fase S.

I terreni allo 0.6% e 20% di siero presentano la stessa composizione del terreno utilizzato per il mantenimento di questa linea cellulare in coltura; ne differiscono soltanto per la percentuale di siero che contengono.

Durante l'intera procedura si utilizzano terreni preriscaldati e si lavora in una stanza calda mantenuta a 37°C, allo scopo di limitare eventuali effetti di uno shock termico sulla sincronizzazione delle cellule.

2.2.2 Sincronizzazione di cellule CHO mediante privazione di isoleucina

Questo metodo prevede di lasciare le cellule in un mezzo privo dell'amminoacido essenziale isoleucina per un tempo di 48 ore, stabilito in base a precedenti prove eseguite sulle medesime cellule. Si procede, poi, sostituendo tale terreno con uno completo contenente isoleucina, e a tempi regolari le cellule vengono raccolte per l'analisi del grado di sincronizzazione.

Procedura

Sono state seminate 1×10^6 cellule in capsule del diametro di 10 cm. Il giorno successivo il terreno normalmente utilizzato per il mantenimento in coltura di questa linea cellulare è stato sostituito con un mezzo privo di isoleucina, nel quale le cellule sono rimaste per 48 ore. La mancanza di un amminoacido essenziale blocca la sintesi proteica; ci si può, dunque, aspettare che le cellule si arrestino in quel punto del ciclo cellulare in cui è richiesta un'intensa attività di sintesi proteica. Il blocco dovrebbe avvenire verso la fine della fase G₁, a livello del punto di restrizione, il cui passaggio prevede la sintesi di numerose proteine, necessarie per la progressione lungo il ciclo cellulare e coinvolte principalmente nella replicazione del DNA. Quindi, cellule che abbiano già oltrepassato il punto di restrizione proseguiranno lungo il ciclo fino a dividersi ma si bloccheranno nella successiva fase G₁, prima del punto di restrizione seguente.

Quando, dopo 48 ore, tale amminoacido essenziale viene fornito nuovamente, la sintesi proteica riparte e si dovrebbe osservare una rapida entrata in fase S. La raccolta per l'analisi del grado di sincronizzazione viene fatta entro 10-12 ore.

Il terreno privo di isoleucina contiene siero dializzato per evitare che il siero fetale normalmente utilizzato possa essere fonte di tale amminoacido, che rimarrebbe dunque disponibile alle cellule.

Anche in questo caso si lavora con terreni preriscaldati in una stanza calda mantenuta a 37°C.

2.3 Come rilevare il grado di sincronizzazione

2.3.1 Analisi mediante incorporazione di BrdU e immunofluorescenza

Questo metodo è stato utilizzato per rilevare il grado di sincronizzazione delle cellule 3T3 trattate con bassa concentrazione di siero. L'entrata in fase S è stata seguita mediante incorporazione nel DNA di un precursore modificato (BrdU). Utilizzando un anticorpo specifico anti-BrdU e un anticorpo coniugato ad un fluoroforo, è stato possibile visualizzare i risultati al microscopio a fluorescenza.

Marcatura con BrdU

La marcatura, e quindi la rilevazione del grado di sincronizzazione, è stata effettuata al tempo 0, cioè al termine delle 48 ore a basso siero, e a 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 ore dall'aggiunta del terreno al 20% di siero.

Il terreno con cui le cellule erano a contatto è stato sostituito con 2 ml di terreno con BrdU 30 μ M; per il tempo 0 si è partiti da terreno allo 0.6% di siero, per tutti gli altri tempi da terreno al 20% di siero. Le cellule sono state incubate a 37°C per 30 minuti. La scelta del tempo di incubazione è il risultato di un compromesso tra la necessità di dare tempo alla cellula di assumere il precursore dal mezzo di coltura e incorporarlo nel DNA e la necessità di conoscere quante siano le cellule in fase S in un momento preciso; infatti, durante un'esposizione prolungata, cellule che all'inizio non si trovavano in fase S hanno il tempo di entrarvi, mentre altre hanno il tempo di uscirne.

Anche in questo caso, l'operazione viene svolta in stanza calda a 37°C con terreno preriscaldato.

Fissazione e colorazione dei vetrini

Scaduti i 30 minuti di marcatura, si elimina il terreno e si lava 5 volte con PBS freddo. Prima di procedere con la fissazione delle cellule, è conveniente trasferire il vetrino in una nuova capsula del diametro di 3.5 cm, in modo da concentrarsi solo sulle cellule cresciute su di esso e non su quelle che rivestono il fondo della capsula.

La fissazione avviene mediante una soluzione contenente per il 70% etanolo e per il restante 30% glicina a pH=2, tenuta a -20°C. Le cellule rimangono in 2 ml di tale soluzione per almeno 20 minuti a -20°C. L'etanolo contribuisce a disidratare le cellule, eliminando in questo modo anche l'eccesso di precursore rimasto nel citoplasma che potrebbe originare un forte segnale di fondo legando l'anticorpo specifico anti-BrdU; il pH acido denatura il DNA in doppia elica, esponendo la BrdU eventualmente incorporata e facilitandone il riconoscimento da parte dell'anticorpo specifico.

Una volta fissate le cellule, si toglie il fissativo e si lava 3 volte con PBS freddo. Si prepara una cameretta umida, in modo tale da mantenere le

cellule in un ambiente umido durante le successive incubazioni, rivestendo il fondo e il coperchio di una capsula con carta assorbente imbevuta di acqua distillata. Si preparano, per ogni vetrino, 30 μ l di anticorpo primario monoclonale di topo anti-BrdU diluito 1:15 in incubation buffer. Le cellule vengono incubate con l' anticorpo, facendo attenzione a scolare bene il vetrino per non diluirlo, per 30 minuti a 37°C. Terminata l' incubazione, si lava con PBS freddo in agitazione per 3 volte per la durata di 5 minuti ognuna. Le cellule vengono poi incubate con 30 μ l di anticorpo secondario anti-mouse diluito 1:20 in PBS per 30 minuti a 37°C, sempre in una cameretta umida. Dal momento che questo secondo anticorpo è coniugato ad un fluoroforo (fluoresceina), ed è pertanto fotosensibile, è consigliabile lavorare al buio. Al termine dell' incubazione si lava per 3 volte con PBS freddo, come prima. Infine, si lava il vetrino in acqua distillata per evitare la formazione di cristalli, lo si asciuga e lo si capovolge sopra una goccia (11 μ l) di mezzo di montaggio contenente DAPI in concentrazione pari a 2 μ g/ml. Il DAPI è una molecola fluorescente che lega il DNA; essendo anch' esso fotosensibile, bisogna svolgere queste ultime operazioni al buio.

2.3.2 Analisi citofluorimetrica

L' analisi citofluorimetrica consente di conoscere la distribuzione di una popolazione cellulare lungo il ciclo. Lo strumento, eccitando una molecola fluorescente legata al DNA, ne rileva la fluorescenza, la cui intensità è proporzionale alla quantità di tale molecola fluorescente legata al DNA, che, a sua volta, sarà proporzionale alla quantità di DNA presente all' interno della cellula: cellule in fase G₂ e M hanno una quantità doppia di DNA rispetto a cellule in fase G₁, mentre cellule in fase S hanno una quantità intermedia di DNA perché in fase di replicazione. Questo tipo di analisi è stato impiegato per rilevare il grado di sincronizzazione in cellule CHO trattate con terreno privo di isoleucina.

Fissazione dei campioni

Per avere un risultato significativo dal punto di vista statistico, è conveniente partire da almeno 1×10^6 cellule. Dopo aver tripsinizzato, risospeso e raccolto una quantità sufficiente di cellule, si centrifuga e si elimina il terreno; si lava il pellet 2 volte con PBS, centrifugando ad ogni lavaggio. Infine, si risospende il pellet in 1 ml di PBS, a cui si aggiungono, goccia a goccia e vorticando piano, 2 ml di etanolo assoluto tenuto a -20°C.

I campioni possono essere conservati a 4°C fino al momento della colorazione.

Colorazione con ioduro di propidio

Prima di procedere con la colorazione, i campioni vengono lavati con acqua distillata per eliminare eventuali cristalli che si siano formati. Dopo

aver centrifugato, si risospende il pellet in 1 ml di soluzione contenente 990 μl di ioduro di propidio, alla concentrazione di 50 $\mu\text{g/ml}$ in PBS, e 10 μl di RNAsi, alla concentrazione di 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; i campioni vengono, infine, incubati per 1 ora a 37°C. Dal momento che lo ioduro di propidio è in grado di legare anche le molecole di RNA, il trattamento con RNAsi serve proprio a degradare queste ultime e ad ottenere un segnale specifico proveniente unicamente dal DNA. Essendo anche lo ioduro di propidio una molecola fotosensibile, le operazioni devono essere svolte al buio.

Meccanismo di funzionamento del citofluorimetro

Il campione colorato con il fluoroforo viene caricato sullo strumento. La sospensione cellulare fuoriesce come un getto continuo, il cui diametro dovrebbe essere tale da far passare le cellule una dietro l'altra, e viene illuminata da una luce eccitatrice (raggio laser) la cui lunghezza d'onda deve avvicinarsi il più possibile al massimo di assorbimento della sonda fluorescente, per poter poi ottenere un buon segnale di fluorescenza; il massimo di assorbimento dello ioduro di propidio legato al DNA è attorno a 535 nm. È necessario quindi che il diametro del getto sia sufficientemente piccolo, perché altrimenti alcune cellule potrebbero venire illuminate meno intensamente di altre e la distribuzione dell'intensità di fluorescenza risulterebbe alterata. La fluorescenza viene raccolta e convogliata verso un filtro ottico che trasmette la luce di lunghezze d'onda superiori a quella che illumina le cellule, allo scopo di rimuovere la luce laser diffusa che può essere diversi ordini di grandezza più intensa della fluorescenza stessa. La luce viene poi inviata ad un fotomoltiplicatore e amplificatore che produce un impulso elettrico, la cui ampiezza è proporzionale all'intensità di fluorescenza. L'ampiezza dell'impulso elettrico costituisce il criterio per il cell sorting: le gocce contenenti le cellule che si vogliono selezionare assumono carica elettrica quando si separano dal getto continuo e possono essere separate dalle altre non cariche per mezzo di un campo elettrico (figura 2).

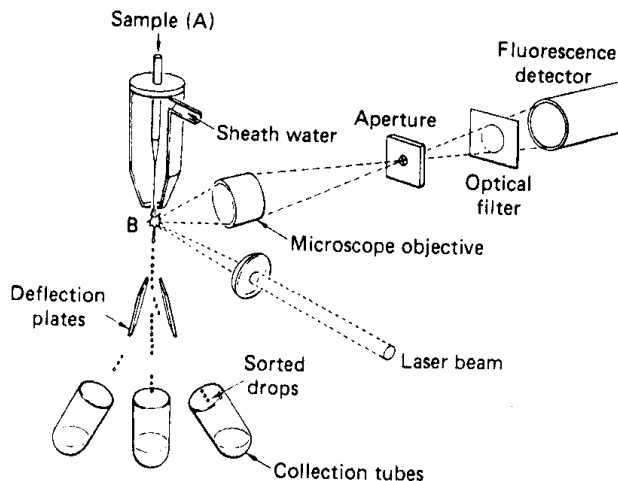


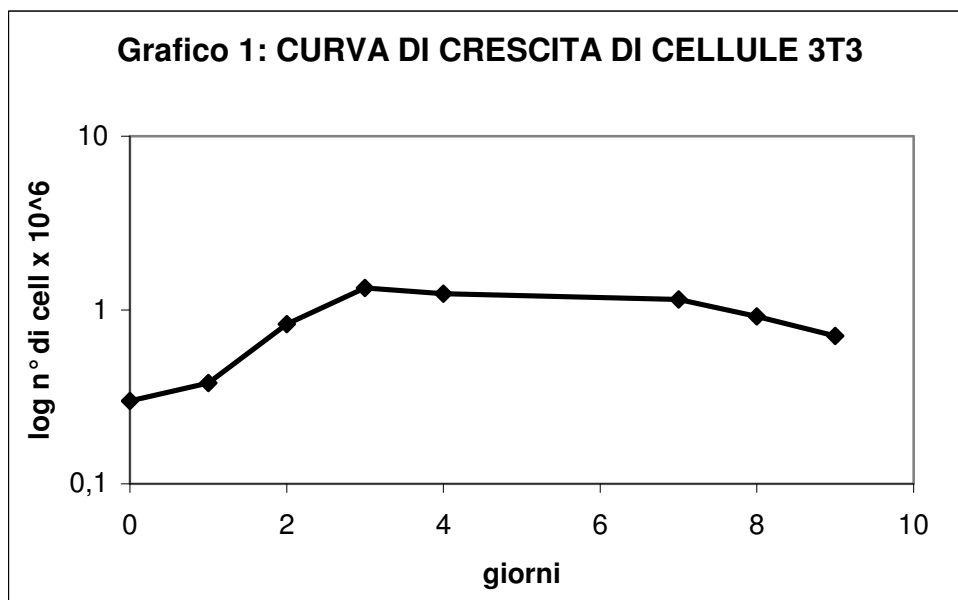
Fig 2 Rappresentazione schematica di un citofluorimetro e meccanismo di funzionamento (da Colowick, Kaplan, *Methods in enzymology*, Academic Press, Vol LVIII, cap. 19)

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Curva di crescita delle cellule 3T3

Prima di procedere con l' esperimento di sincronizzazione si è voluto definire la curva di crescita di queste cellule e la loro distribuzione lungo il ciclo cellulare nel tempo. Le colture sono state inoculate con 0.3×10^6 cellule per piastra e la conta e l' analisi al citofluorimetro sono state effettuate nei successivi 9 giorni (tabella 1).

giorno	n° cell x 10 ⁶	%G1	%S	%G2/M	%apoptosi
0	0.3				
1	0.38	16	57	27	n.d.
2	0.83	69	17	14	n.d.
3	1.34	82	12	6	n.d.
4	1.24	92	8	0	n.d.
7	1.15	90	9	1	0
8	0.92	90	9	2	3
9	0.71	94	6	0	26



Nel grafico 1 si possono individuare le 4 fasi tipiche di una curva di crescita: la fase di latenza entro le prime 24 ore, la fase di crescita esponenziale fino al giorno 3, la fase stazionaria che si protrae fino al giorno 7 e infine la fase di decadimento e morte cellulare.

Considerando due punti della fase logaritmica e ponendo N_t =numero di cellule presenti al tempo t , N_0 =numero di cellule presenti al tempo immediatamente precedente, si può determinare il numero di generazioni, secondo questa relazione:

$$\ln(N_t/N_0)/\ln 2$$

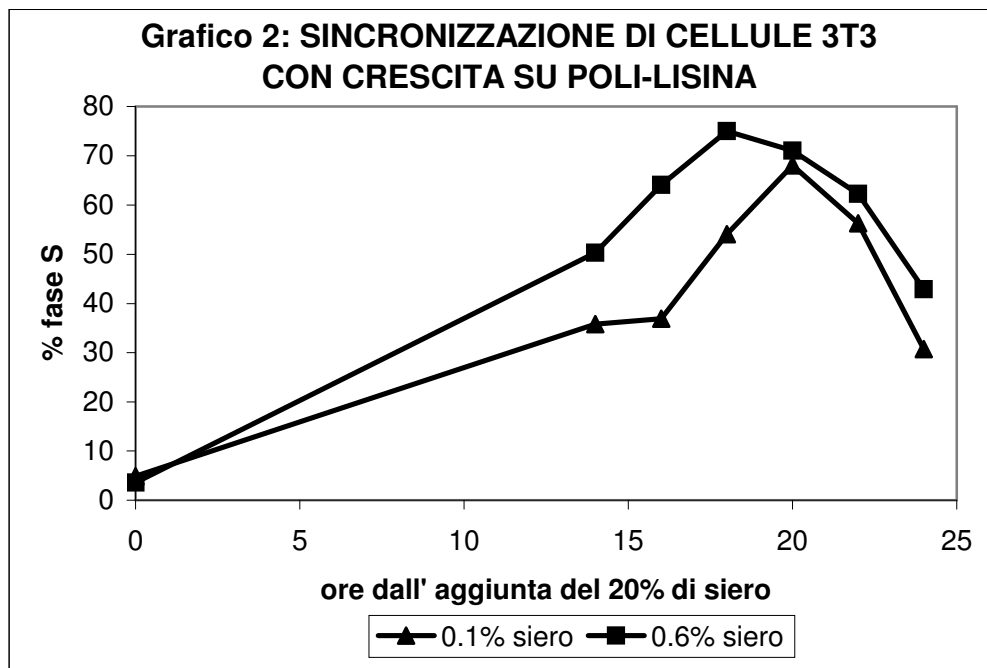
In questo caso si può attribuire a N_t il numero di cellule presenti al giorno 2 (0.83×10^6), a N_0 il numero di cellule presenti al giorno 1 (0.38×10^6), ricavando che nel giro di 24 ore si compiono 1.13 generazioni. Da questo dato è possibile risalire alla durata del ciclo cellulare calcolando il tempo di duplicazione, che è pari a 21 ore.

L'analisi citofluorimetrica mostra come al giorno 1 sia presente un'elevata percentuale di cellule in fase S e G_2/M , che porta ad un rapido incremento del numero di cellule il giorno successivo. Al passare del tempo si osserva una progressiva diminuzione di questi valori e un graduale aumento della percentuale di cellule in G_1 . Inoltre, al termine della fase stazionaria, nella quale la crescita cellulare, per inibizione da contatto, si arresta, si osserva un progressivo aumento della percentuale di cellule in apoptosi, che si accompagna ad una diminuzione del numero di cellule.

3.2 Sincronizzazione delle cellule 3T3

L'esperimento descritto in questo lavoro è stato messo a punto tenendo in considerazione i risultati ottenuti da una prima prova di sincronizzazione, condotta su cellule seminate su vetrini rivestiti di poli-lisina e coltivate in presenza di due diverse percentuali di siero, 0.1% e 0.6%. Il protocollo originale prevedeva di lasciare le cellule in un mezzo a bassa concentrazione di siero per 72 ore, ma in seguito all'osservazione al microscopio si è deciso di bloccare tale trattamento dopo 48 ore, perché le cellule sembravano piuttosto sofferenti e molto probabilmente non avrebbero sopportato tale condizione per ulteriori 24 ore. Si è proceduto quindi con la marcatura con BrdU al tempo 0, cioè al termine delle 48 ore di deprivazione di siero, e dopo 14, 16, 18, 20, 22, 24 ore dall'aggiunta di un mezzo al 20% di siero.

Dal grafico 2 si può notare come in presenza dello 0.1% di siero le cellule entrino in fase S in maniera rallentata, raggiungendo il picco di fase S dopo 20 ore dall'aggiunta del terreno al 20% di siero, mentre le cellule tenute allo 0.6% di siero raggiungono un picco di fase S più elevato rispetto alle prime e più precocemente (dopo 18 ore).



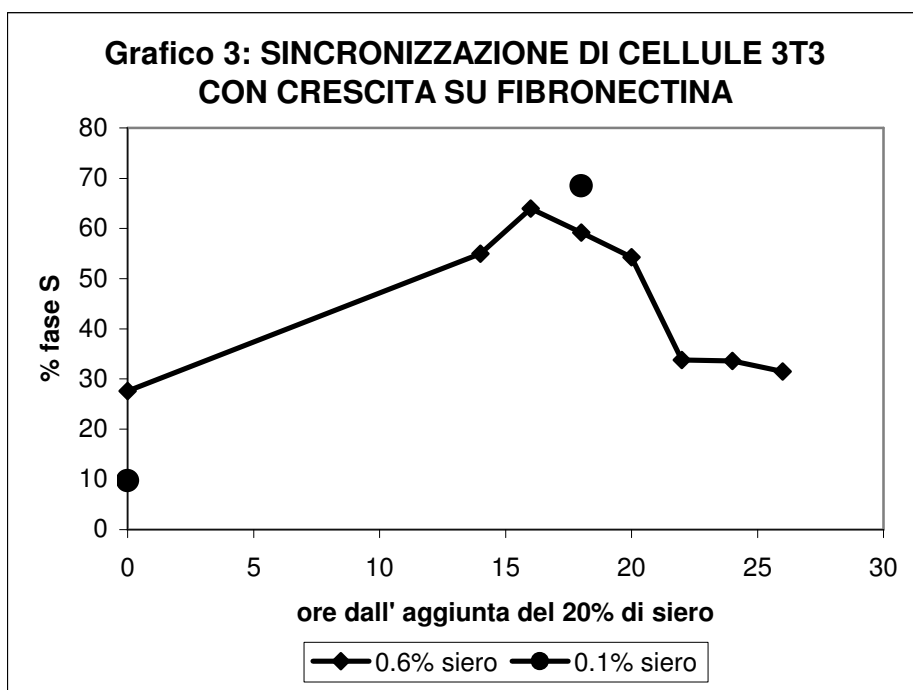
In base a questa prima prova si è deciso, dunque, di eseguirne una seconda, esponendo le cellule allo 0.6% di siero per 48 ore. In questo caso, però, le cellule sono state seminate su un supporto diverso, utilizzando vetrini rivestiti di fibronectina. Si è deciso, inoltre, di prolungare l'analisi del grado di sincronizzazione oltre le 24 ore per verificare se la percentuale di cellule in fase S si abbassasse ulteriormente o rimanesse costante. I dati raccolti sono riportati in tabella 2.

Tabella 2	
ore	% fase S
0	28
14	55
16	64
18	59
20	54
22	34
24	34
26	31

Si avvertono subito alcune differenze rispetto all' esperimento precedente: al tempo 0 si registra una percentuale di fase S notevolmente più elevata; il picco di fase S si registra dopo 16 ore e si ritorna ad una percentuale di fase S vicina a quella di partenza dopo 26 ore.

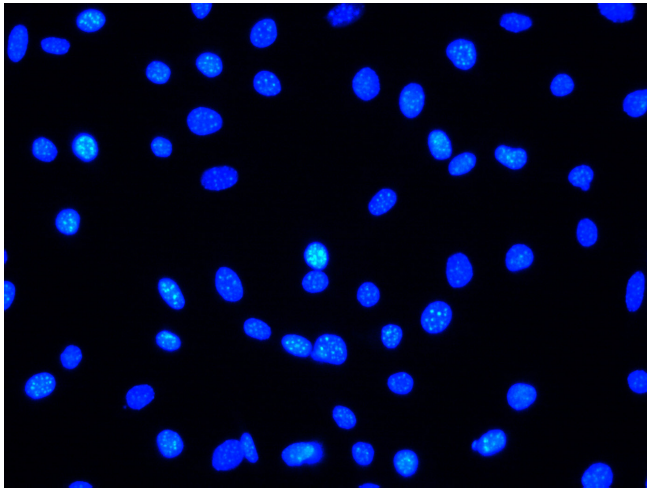
Apparentemente l' utilizzo di un supporto diverso ha influito sensibilmente sui risultati: si era già notato che su vetrini rivestiti di fibronectina le cellule aderiscono meglio e mantengono una forma più naturale rispetto a vetrini rivestiti di poli-lisina o collagene; inoltre, all' osservazione al microscopio

dopo 48 ore di deprivazione di siero le cellule apparivano in uno stato migliore di quanto non sembrasse nel primo esperimento. Si può concludere che, mentre nelle condizioni in cui era stato svolto il primo esperimento lo 0.6% di siero sembrava sufficiente a sincronizzare le cellule e dava dei risultati soddisfacenti, nelle nuove condizioni in cui è stato condotto questo secondo esperimento la stessa percentuale di siero non sembra sufficiente a bloccare in maniera significativa le cellule in G_0 . Per questo si è deciso di eseguire un'ulteriore prova esponendo cellule cresciute su vetrini rivestiti di fibronectina a una percentuale inferiore di siero (0.1%) per un tempo di 48 ore. La rilevazione del grado di sincronizzazione è stata limitata a due tempi significativi: al termine delle 48 ore di deprivazione di siero, ottenendo il 10% di fase S, e alle 18 ore dall'aggiunta del terreno al 20% di siero, rilevando il 68% di fase S. Nel grafico 3 sono raccolti i risultati delle ultime due prove:



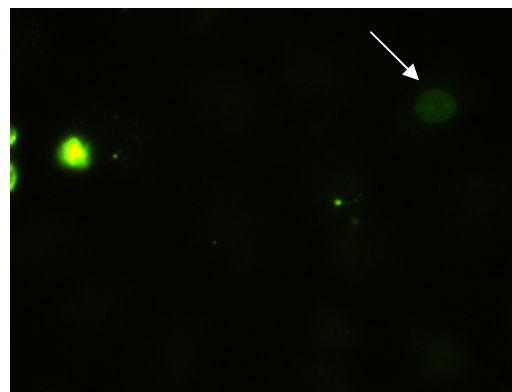
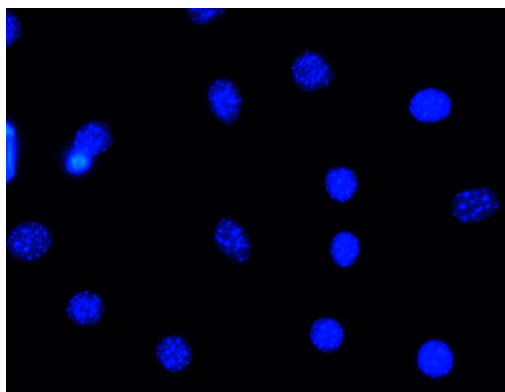
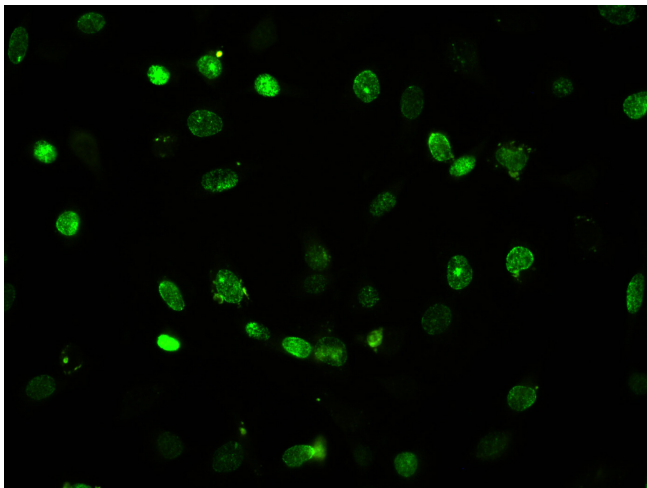
La scelta del $T=18$ ore è stata fatta in base ai risultati ottenuti nel primo esperimento, da cui emergeva un ritardo di 2 ore nel picco di fase S di cellule tenute allo 0.1% di siero rispetto a cellule tenute allo 0.6%: se, lavorando con vetrini rivestiti di fibronectina, con lo 0.6% di siero il picco di fase S si era verificato dopo 16 ore dall'aggiunta del 20% di siero, con lo 0.1% di siero ci si aspettava di avere il picco di fase S dopo 18 ore. In figura 3 e 4 sono riportate le immagini del $T=18$ e del $T=0$, rispettivamente, allo 0.1% di siero. In quest'ultima prova, la percentuale di fase S dopo 48 ore di trattamento si è abbassata considerevolmente, anche se non ai livelli del primo esperimento (quando era circa 4%). Molto probabilmente il tipo di supporto ha influito e la bassa percentuale di fase S registrata al

tempo 0 nel primo esperimento è da attribuirsi in buona parte alla condizione in cui le cellule si trovavano.



◀ **Fig 3 T=18 ore**

L'immagine posta in alto è stata ottenuta eccitando la molecola fluorescente DAPI che lega il DNA in tutti i nuclei, ottenendo così il numero totale di cellule presenti in questo campo. Il range di eccitazione del DAPI è compreso tra 340-380 nm. L'immagine sottostante rappresenta lo stesso campo, illuminato con una lunghezza d'onda diversa, compresa tra 450-490 nm, che rappresenta il range di eccitazione della fluoresceina. L'anticorpo secondario coniugato alla fluoresceina riconosce l'anticorpo primario specifico contro il precursore BrdU, che viene incorporato unicamente da quelle cellule che si trovano in fase di sintesi del DNA. Si può così ottenere la percentuale di fase S dividendo il numero di cellule in S per il numero totale di cellule.



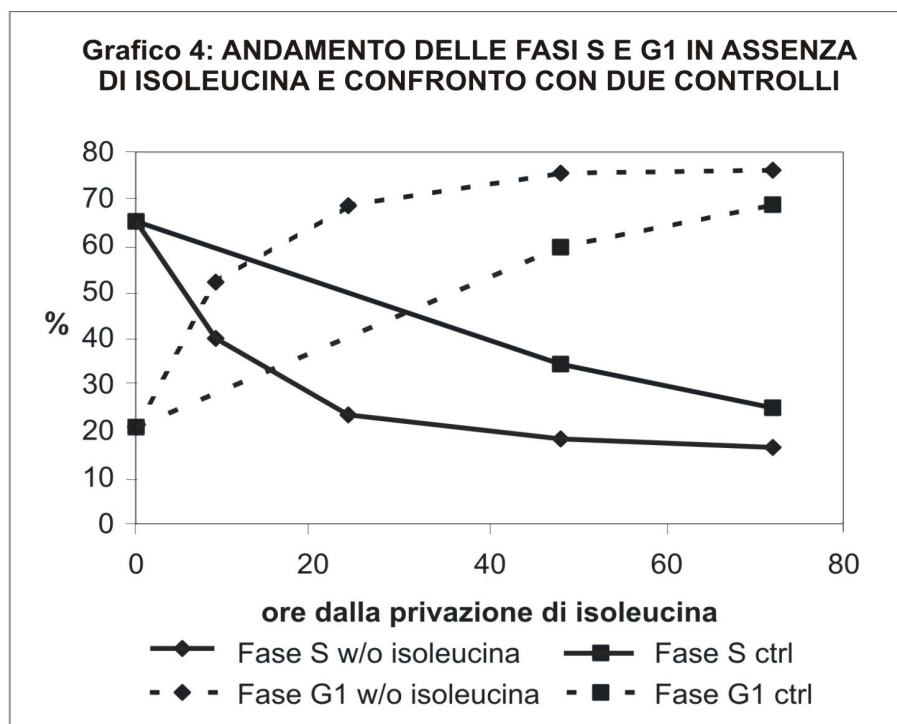
↑ **Fig 4 T=0 ore** Nell'immagine di destra la freccia indica l'unica cellula in fase S presente.

Questi tre esperimenti mostrano come diverse condizioni sperimentali possano influire sul grado di sincronizzazione e sottolineano l'importanza di verificare l'efficienza del metodo prescelto ogniqualvolta si esegua un esperimento di sincronizzazione.

3.3 Prova di sincronizzazione delle cellule CHO

Per quanto riguarda le cellule CHO, non erano mai state eseguite precedentemente prove di sincronizzazione, per cui non si conosceva il comportamento di questa linea cellulare in risposta alla privazione di un aminoacido essenziale. Partendo da 1×10^6 cellule per piastra, a tempi successivi di crescita in terreno privo di isoleucina è stata effettuata la conta e l'analisi al citofluorimetro; sono stati raccolti anche i dati di due controlli (cellule cresciute in terreno completo) per poter effettuare un confronto (tabella 3).

Tabella 3					
tempo	n° cell x 10 ⁶	%G1	%S	%G2/M	% debris
0	1				
24h	1.86	21	65	14	4
9h -Ile	1.97	52	40	8	2
24h -Ile	2.57	69	23	8	55
48h -Ile	2.2	76	18	6	31
CTRL	5.7	60	34	6	8
72h -Ile	2.79	76	17	7	14
CTRL	8	69	25	6	8



Nel grafico 4 il tempo 0 rappresenta il momento in cui le cellule sono state private dell' aminoacido essenziale, che coincide con il tempo=24h riportato in tabella 3.

I dati raccolti indicano come il trattamento influisca sulla crescita cellulare che si arresta attorno a $2-3 \times 10^6$ cellule per capsula, mentre nel controllo prosegue fino a raggiungere 8×10^6 cellule per piastra. La privazione di

isoleucina determina realmente una calo di fase S e un aumento di fase G₁, almeno fin dopo 48 ore di trattamento, dove si può effettuare un confronto con il controllo. Tuttavia, un' esposizione di 24 e 48 ore in assenza di isoleucina sembra avere un effetto tossico per le cellule, perché la percentuale di cellule in apoptosi (compresa all' interno del parametro "debris") è piuttosto elevata. Prolungando il trattamento fino a 72 ore, non si osserva un ulteriore calo di fase S e aumento di fase G₁, anzi, le cellule cresciute in terreno completo sembrano raggiungere valori simili.

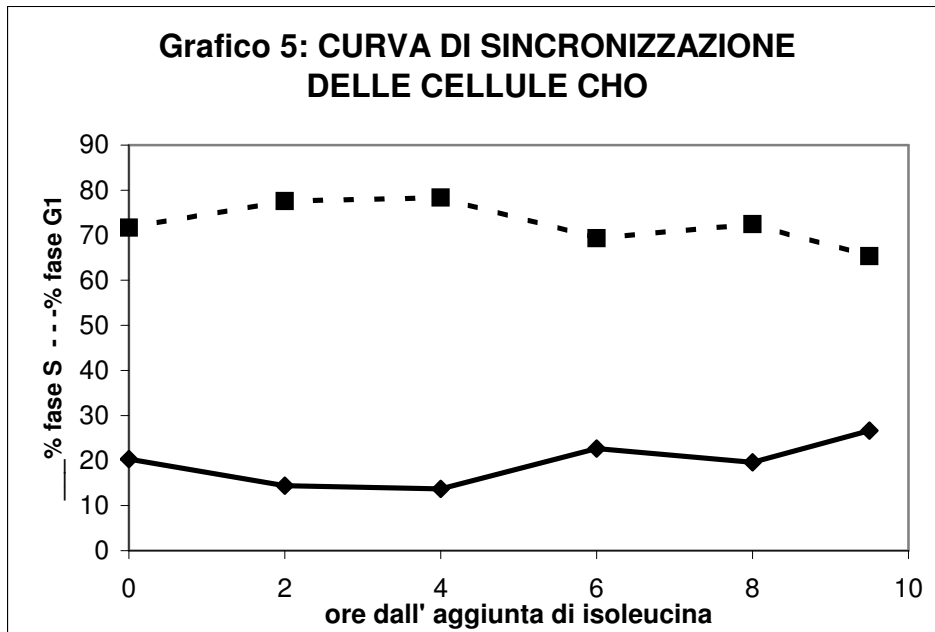
È stata eseguita anche una prova di sincronizzazione in cui alla privazione di isoleucina si è aggiunta una bassa percentuale di siero (0.1%) e dopo 48 ore di esposizione le cellule sono state trasferite in terreno completo, monitorando la situazione dopo 4 ore. Tuttavia, le cellule non hanno risposto in maniera positiva a questo trattamento, mostrando un certo livello di mortalità senza che la fase S diminuisse e la fase G₁ aumentasse in maniera significativa. I dati ottenuti sono riportati di seguito (tabella 4), sebbene le distribuzioni restituite dal citofluorimetro fossero di difficile interpretazione.

Tabella 4					
tempo	n°cell x 10 ⁶	%G1	%S	%G2	% debris
0	1				
24h	1.68	32	47	21	3
24h -Ile 0.1% siero	1.62	73	19	8	9
48h -Ile 0.1 siero	1.04	66	29	5	36
4h +Ile +siero	1,3	69	20	11	24

3.4 Esperimento di sincronizzazione con cellule CHO

In base ai risultati ottenuti nella precedente prova, si è deciso di privare le cellule di isoleucina per 48 ore. La raccolta per la conta e l' analisi citofluorimetrica è stata effettuata a tempi ravvicinati entro 10 ore dall' aggiunta di isoleucina, ottenendo i risultati riportati in tabella 5.

Tabella 5				
tempo	n° cell x 10 ⁶	%G1	%S	%G2
0	1			
24h	1.68	32	47	21
48h -Ile	2.13	72	20	8
2h +Ile	2.09	78	14	8
4h +Ile	2.18	78	14	8
6h +Ile	2.15	69	23	8
8h +Ile	2.58	72	20	8
9h 30' +Ile	2.18	65	27	8



Il tempo 0 del grafico 5 coincide con le 48 ore di privazione di isoleucina. La procedura utilizzata in questo esperimento si attiene al protocollo originario messo a punto appositamente per questa linea cellulare (1), nel quale si osservava che, dopo l'aggiunta di isoleucina, le cellule entravano rapidamente in fase S, le prime dopo soltanto un'ora, le ultime entro 12 ore. Per questo la raccolta e l'analisi sono state effettuate entro 10 ore, ma i risultati ottenuti non mostrano un rapido ingresso in fase S; anzi, nelle prime 4 ore dopo l'aggiunta di isoleucina la percentuale di fase S continua a diminuire e corrispondentemente la percentuale di fase G₁ continua ad aumentare; soltanto dopo 6 ore si osserva una lenta ripresa del ciclo cellulare.

Mentre il protocollo originario prevedeva di utilizzare cellule in sospensione, l'esperimento descritto in questo lavoro è stato condotto con cellule CHO mutanti, che crescono sia adese al substrato sia in sospensione. Il fatto di aver lavorato in condizioni sperimentali diverse (cellule mutanti che crescono in monostrato) ha probabilmente influito sui risultati che si sono inaspettatamente ottenuti. Per verificare se il metodo consenta un grado di sincronizzazione soddisfacente sarà necessario eseguire ulteriori esperimenti, protraendo, innanzitutto, l'analisi del grado di sincronizzazione oltre le 10 ore dall'aggiunta di isoleucina e possibilmente effettuare prove su cellule in sospensione. Per ottenere colture cellulari in sospensione si potrebbero utilizzare capsule non trattate, non dotate di cariche positive che facilitino l'adesione al substrato.

In letteratura sono descritti diversi esperimenti di sincronizzazione mediante privazione di isoleucina in diverse linee cellulari: cellule tumorali coltivate in sospensione cominciano ad entrare in fase S già dopo 1 ora di

esposizione all' isoleucina (2); cellule staminali ematopoietiche raggiungono il picco di fase S dopo 12 ore dall' aggiunta di isoleucina (3); anche nel caso di cheratinociti il metodo produce risultati soddisfacenti, ma le cellule sono state prima staccate e in seguito riseminate in terreno completo e il picco di fase S è stato registrato dopo 21-24 ore (4).

Per questi tipi cellulari e per cellule CHO selvatiche è stato verificato che il trattamento non fosse tossico e non compromettesse la vitalità cellulare o la capacità di sintesi proteica; lo stesso tipo di analisi si potrebbe eseguire sulle cellule CHO mutanti.

BIBLIOGRAFIA

1. Ley and Tobey, J. Cell Biol. 47, 453 (1970).
2. O. Garatun-Tjeldsto, I.F. Pryme, J.K. Weltman, R.M. Dowben, J. Cell Biol. 68, 232-239 (1976).
3. Reddy et al., Blood 90, 2293-2299 (1997).
- 4.T. Kobayashi et al., J. of Dermatol. Sci. 17, 108-114 (1998).

Testi consultati:

- Lodish et al., *Molecular Cell Biology*, 5° ed., W.H. Freeman and Company (2004).
- F. Zucco, V. Bianchi, *Nozioni di colture cellulari*, Lombardo Editore (2000).
- S.P. Colowick, N.O. Kaplan, *Methods in enzymology*, Academic Press, Vol LVIII, cap. 19-20 (1979).

Ringrazio innanzitutto la Professoressa Vera Bianchi che mi ha accolto nel suo laboratorio

Grazie mille a Paola che mi ha seguito con tanta pazienza, a Gigi che mi ha aiutato per la parte grafica e a tutti quanti, Chiara, Elisa, Giovanna, Miriam, per la grande disponibilità.

Grazie mille alla mia famiglia: al papà perché ogni mattina con tanta pazienza mi sveglia; alla mamma perché mi sopporta anche quando sono di cattivo umore e non mi fa mai mancare niente; ad entrambi per il supporto e per quei buonissimi pasticcini al cioccolato che mi regalano quando sono giù di morale!

Un grazie speciale alla nonna Dea che mi ricorda sempre nelle sue preghierine!

E un grandissimo grazie alla Lori, alla Claudia, alla Pil e tutti gli amici del mio piccolo paesino che mi vogliono bene e mi sono sempre vicini!