

Colture cellulari e localizzazione di proteine

di

Giulia Pittorru e Maya Pradhan

Progetto CNR SPERIMESTATE 2019

La Lamina A

La lamina A, una delle proteine filamentose, lamine, che costituiscono la lamina nucleare, la struttura proteica a rete aderente alla membrana nucleare interna.

Specifiche mutazioni sul gene della lamina A sono state scoperte. Esse sono causa di patologia a carico di un singolo tessuto, muscolo, osso o tessuto adiposo, o di più tessuti.

La grande eterogeneità di patologie causate da mutazioni diverse tutte su un singolo gene ha incuriosito i ricercatori inducendo a indagare sul ruolo della lamina A e sulle vere cause funzionali di queste patologie.

Prelamina A e mutazioni

La lamina A assume la sua definitiva struttura solo alla fine di un lungo processo di maturazione, ma la sua prima forma, quella nascente, si presenta diversa, e si chiama **“prelamina A”**.

Gli step di maturazione sono :

aggiunta di un gruppo farnesile

taglio degli ultimi 3 aminoacidi

aggiunta di un gruppo metile

taglio degli ultimi 15 aminoacidi nella coda COOH-terminale per azione dell'enzima Zmpste24

Alcune specifiche **mutazioni del suo gene**, es. quella che coinvolge il sito di attacco di Zmpste24 all'aminoacido in posizione 15 della prelamina A, comporta il mancato attacco e taglio della proteina. Quindi si ha un'alterazione del suo processo di maturazione, e un accumulo di una forma immatura di Lamina A nelle cellule del paziente.

Le più note Laminopatie

- **Progeria o Sindrome di Hutchinson-Gilford:** provoca l'invecchiamento precoce dopo i primi anni di vita. Il quadro patologico è quello di un grave invecchiamento in giovane età: alopecia, osteolisi, assenza di tessuto adiposo, problemi vascolari con aterosclerosi, cardiopatia;
- **Lipodistrofia mandibulo-acrale:** provoca un'anomala distribuzione del tessuto adiposo, in eccesso in alcune zone e carente in altre, diabete e invecchiamento accelerato;
- **Distrofia muscolare di Emery-Dreifuss:** provoca debolezza dei tendini, parziale lipodistrofia, danneggiamento del tessuto muscolare, cardiopatia.

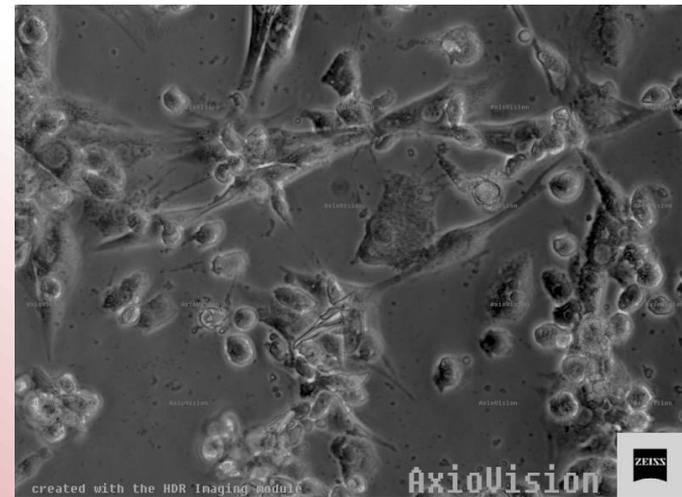
Le funzioni della Lamina A

Ad oggi si sa che la lamina A è coinvolta in questi processi

- **Differenziamento delle cellule mesenchimali.** Infatti le cellule staminali mesenchimali, possono potenzialmente svilupparsi in cellule ossee, muscolari, adipose. I tessuti costituiti da queste cellule sono infatti colpiti nelle laminopatie
- **Espressione genica.** La lamina A definisce l'ordine tridimensionale dei geni all'interno del nucleo, un ordine che modifica la loro espressione. Questo ordine può indurre l'attività o il silenziamento dei geni, cioè una condizione di attività o di paralisi nella produzione di proteine. Infatti nelle laminopatie si riscontra una diversa disposizione del DNA nucleare.

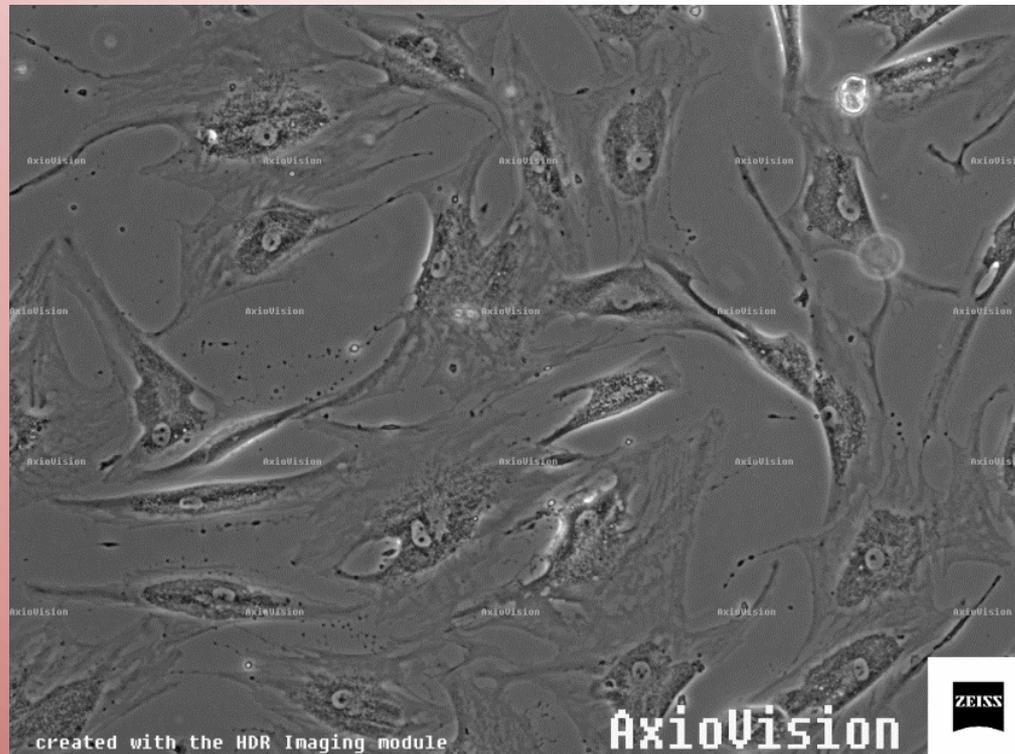
Riparazione dei danni al DNA. Rotture in tratti di DNA, sono prodotte da stimoli ambientali quali raggi X, UV, radicali liberi del metabolismo, agenti chimici. Normalmente questi danni sono costantemente riparati da enzimi antiossidanti e riparativi.

In situazioni di scarso funzionamento di questi enzimi riparativi dei danni, la cellula accumulerebbe mutazioni multiple, perciò attiva uno di questi due meccanismi di soppressione del danno: l'apoptosi (il suicidio cellulare) oppure la senescenza (il blocco della divisione cellulare).



Apoptosi in cellule sane colpite da un agente chimico forte

- **Senescenza:** la cellula che non ripara il danno diventa senescente, cioè non fa effettua più cicli cellulari, si appiattisce su se stessa, accumula vacuoli , è viva ma non è attiva in tutti i processi cellulari.



Cellule senescenti

**come possiamo
studiare i processi
biologici alterati che
causano le
laminopatie ?**

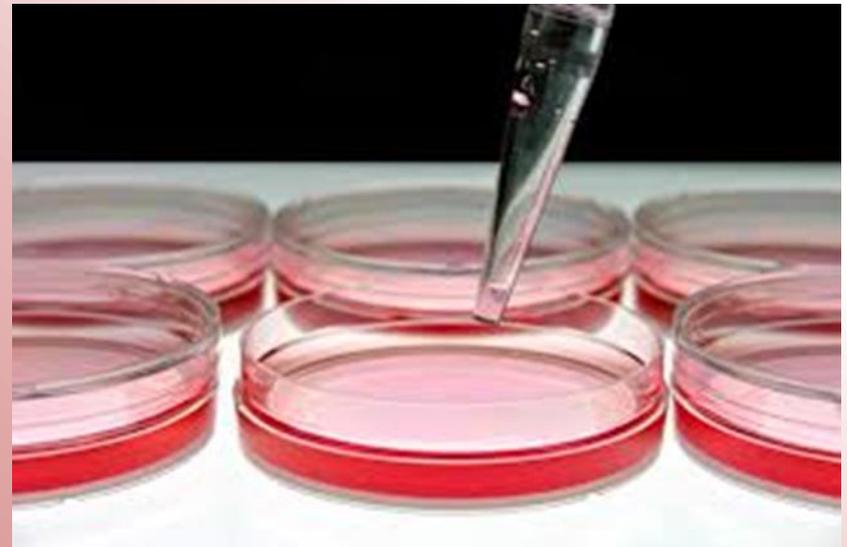
le Colture cellulari

Le colture cellulari offrono un modello di studio per riprodurre in vitro i processi biologici che avvengono in natura, e sono il modello adottato nell'Istituto di Genetica Molecolare .

Le colture cellulari si conducono in sterilità, in condizioni di pH 7,4 e di temperatura 37°C, si evita ogni forma di contaminazione con antibiotici e antifungini, si usano terreni appropriati per ogni tipo di cellula, si rinnova il terreno regolarmente.

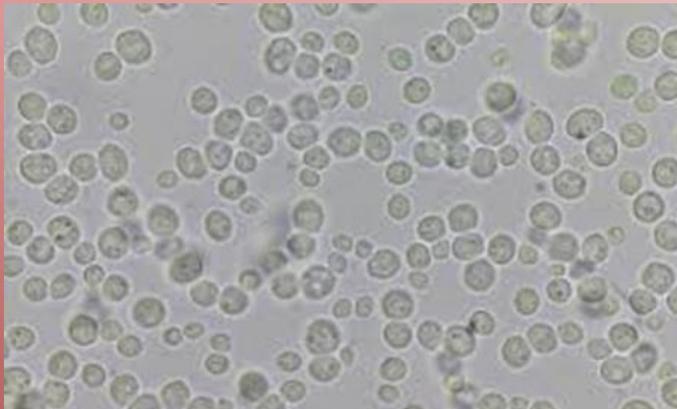


Dopo la crescita le cellule si fermano , perciò vanno trasferite in una superficie maggiore per favorire la loro crescita

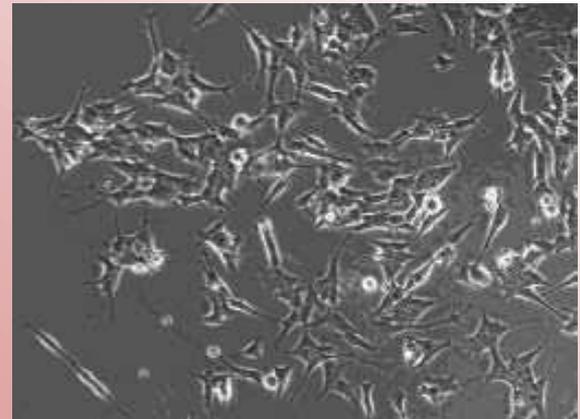


Cellule e programma di senescenza

Esistono cellule primarie, derivanti da biopsia umana, e cellule modificate, linee cellulari. Le cellule primarie sono ottenute espiantandole da un tessuto, compiono un basso numero di cicli cellulari perché hanno il programma genetico della senescenza, cioè invecchiano già alla 7-8 semina in fiasca. Le linee cellulari sono cellule commerciali modificate da una mutazione spontanea o indotta che le rende proliferanti infinitamente, sono cellule che hanno perso il programma della senescenza e non invecchiano.



Cellule in sospensione



Cellule in adesione

Immunologia in immunofluorescenza

L'Immunofluorescenza è una tecnica utilizzata per identificare o localizzare le proteine. Utilizza due anticorpi: Anticorpo Primario che si lega alla proteina da identificare, Anticorpo Secondario che si lega all'anticorpo primario già legato alla proteina.

La proteina è resa visibile all'anticorpo secondario coniugato al fluorocromo (molecola che produce luce visibile).

Un anticorpo può essere monoclonale o policlonale: monoclonale si lega ad un solo sito, epitopo, dell'antigene, policlonale si lega a più epitopi di uno stesso antigene.

Esperimento

Abbiamo allestito una coltura di cellule di topo, C2C12, cellule premuscolari che crescono aderenti al fondo della fiasca. Abbiamo aggiunto al terreno una quantità di radicali liberi che provoca lesioni sul DNA nucleare.

Abbiamo provato a localizzare due proteine: γ H2AX fosforilato, proteina marker delle lesioni del DNA, e prelamina A, la forma immatura di Lamina A, con una doppia reazione di immunofluorescenza.

Soluzioni preparate:

- Terreno di coltura
- Fissativo per le cellule
- Bloccante dei siti aspecifici

Terreno di coltura

Le C2C12 richiedono terreno DMEM costituito da glucosio, amminoacidi, sali minerali, a cui abbiamo aggiunto al momento dell'uso:

- siero fetale bovino al 10%, (FBS)
- Glutammina diluita all'1%
- Antibiotico diluito all'1%

Fissativo

20 mL di paraformaldeide al 4% in tampone fosfato, pH 7,4 viene così preparato:

- Versare in una provetta 2mL di Tampone fosfato (PBS) pH 7,4 al 10X;
- Aggiungere 10 mL di paraformaldeide in acqua all'8%;
- Portare a 20 mL con 8 mL di acqua

Bloccante dei siti aspecifici

Ovalbumina bovina (BSA), viene sciolta in tampone fosfato pH 7,4 (PBS), per legare siti aspecifici e coprirli all'eventuale legame con l'anticorpo.

Prepariamo 40 mL di PBS con BSA al 4%:

- Pesare 1,6 gr di BSA
- In provetta mettere BSA e 4 mL di PBS 10X
- Portare a 40 mL con acqua

operazioni effettuate in colture cellulari:

Scongelamento di cellule

Semina di cellule in fiasca

Semina di cellule su vetrino

Trattamento di cellule con H₂O₂

scongelamento e semina in fiasca

Le cellule contenute in minivials a $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ con azoto liquido, sono trasferite a temperatura ambiente. Una volta scongelate, sono trasferite in una fiasca T25 contenente 3 ml di terreno di coltura.

Le cellule aderiscono al fondo della fiasca, dopo 4 h di adesione, il terreno è sostituito da nuovo terreno per evitare l'assorbimento di dimetilsolfossido (DMSO), crioprotettore del congelamento.

distacco delle cellule

Al raggiungimento della copertura del 60% della superficie della fiasca :

- Prelievo del terreno dalla fiasca;
- lavaggi con PBS e rimozione;
- aggiunta di tripsina in PBS ed osservazione del distacco delle cellule al microscopio a contrasto di fase;
- rimozione della soluzione di tripsina;
- aggiunta di 2 mL di terreno fresco alle cellule

semina su vetrino

- Versare i 2 mL di terreno più cellule in un tubo sterile (falcon);
- Inserire un vetrino circolare sterile in ognuno dei 24 pozzetti di una piastra (mutiwell 24)
- Seminare 100 μ l dei 2 mL di terreno più cellule in ogni pozzetto della prima fila di 6
- Diluire al doppio la quantità restante di terreno più cellule, seminare 100 μ l di questa quantità sui vetrini di seconda fila. L'operazione è da ripetere per le file successive di pozzetti. Le cellule sono così seminate in numero progressivamente inferiore, e saranno progressivamente più proliferanti rispetto alle file precedenti.

Trattamento delle cellule con H₂O₂

Dopo 48 h, aggiungiamo alle cellule l'acqua ossigenata, H₂O₂, fonte di radicali liberi, in quantità finale 500 µM.

- 1,5 µl di acqua ossigenata 100 mM sono aggiunti ad ognuno dei primi tre pozzetti di ciascuna fila. Ogni pozzetto contiene 300 µL di terreno, quindi soluzione finale di H₂O₂ 500 µM
- Dopo 24 h sono prelevati il primo vetrino della 1 fila e il 1 vetrino dell'ultima fila, rispettivamente di cellule confluenti e di cellule proliferanti
- Allo stesso tempo sono prelevati il 4° vetrino della 1 fila e il 4° dell'ultima fila, due vetrini delle stesse cellule non trattate

Prima reazione di immunofluorescenza

Nei pozzetti si elimina il PBS e si versano 250 μ l di fissativo, si fa riposare in frigo per 10 min, si fanno 3 lavaggi in PBS.

- Si sostituisce il PBS con 250 μ l di PBS-1% triton. Questa soluzione apre i legami per l'attacco degli anticorpi, aspettare 8 min e lavare tre volte con PBS
- Si bloccano i siti aspecifici con 250 μ l di PBS-BSA 4% per 1h, e lavare 3 volte in PBS
- In camera umida, su una striscia di parafilm si depongono 4 gocce da 100 μ l di anticorpo primario γ -H2AX policlonale fosforilato ottenuto nel coniglio, 1% in PBS-BSA. Su di esse si capovolgono i 4 vetrini per 1 h;
- 3 lavaggi dei vetrini in PBS
- su 4 gocce da 100 μ l di 1% di anticorpo secondario anti-rabbit coniugato al fluorocromo FITC (verde) in PBS-BSA, si capovolgono i 4 vetrini per 1 h al buio
- 3 lavaggi dei vetrini in PBS

Seconda reazione

Per vedere la prelamina in rapporto alla presenza di lesioni sul DNA, effettuiamo la seconda reazione sullo stesso vetrino.

- Su 4 gocce da 100 μ l di anticorpo primario anti-prelamina A , policlonale ottenuto da capra, 1% in PBS-BSA, capovolgere i 4 vetrini utilizzati nella prima reazione per 1 h;
- Eseguire 3 lavaggi in PBS;
- Su 4 gocce da 100 μ l di anticorpo secondario anti-goat, 1% in PBS-BSA, capovolgere i 4 vetrini per 1 h
- Lavare 3 volte con PBS per togliere l'anticorpo secondario in eccesso

- Colorare i nuclei delle cellule al buio per 10 min con fluorocromo Hoechst (azzurro) concentrato 1 μg per 10000 μl di PBS
- Eseguire tre lavaggi in PBS;
- Aggiungere antifade DABCO al vetrino per evitare il decadimento della fluorescenza sotto il fascio luminoso del microscopio
- Utilizzare un vetro porta-oggetto per capovolgere su di esso il vetrino e osservare le cellule interposte tra i due vetri

Osservazioni al microscopio

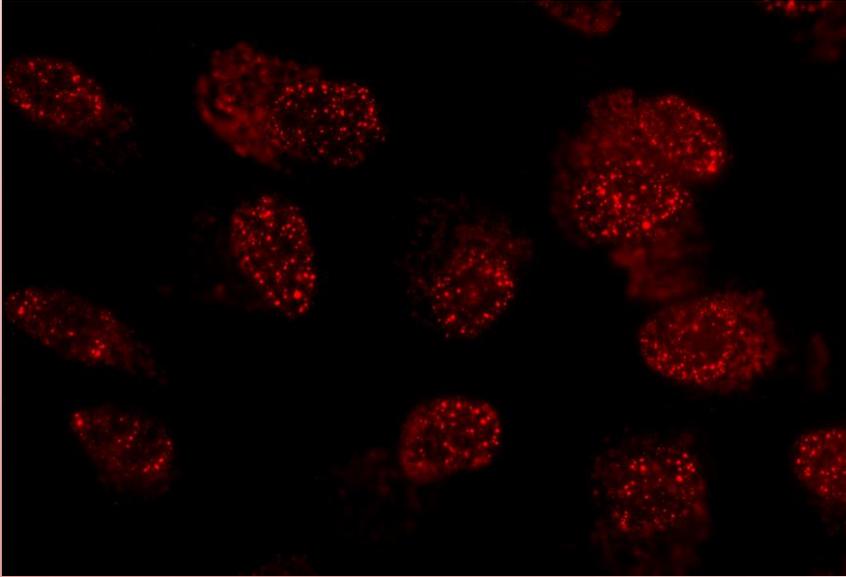
Con obiettivo 100X vediamo in rosso la prima proteina , γ -H2AX fosforilato, marker dei siti di rottura del DNA, in verde la prelamina A

Cellule Proliferanti

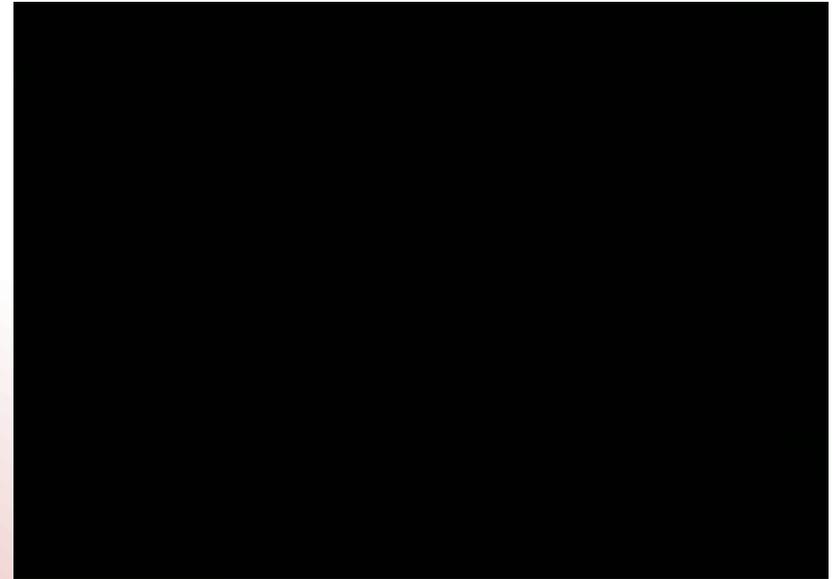
Tutte le cellule risultano positive al marker γ -H2AX poiché in tutte identifichiamo spots sui punti di rottura del DNA, in numero elevato e particolarmente brillanti.

Le cellule sono negative per la prelamina A.

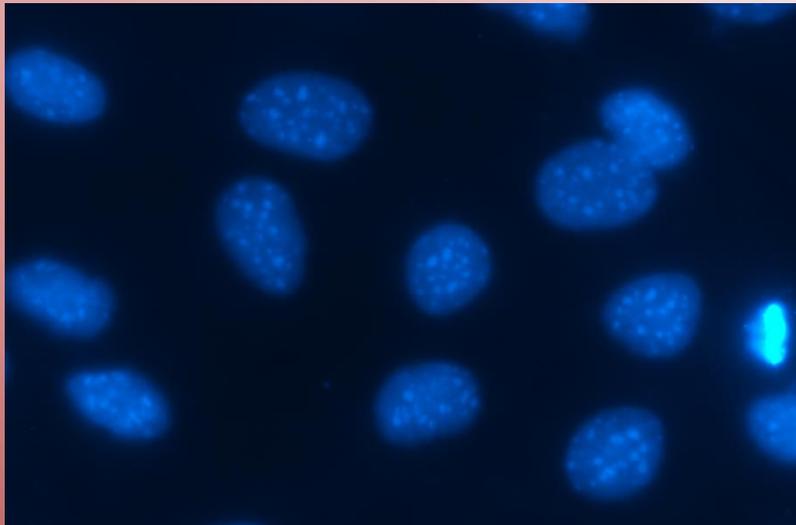
Cellule Proliferanti



Spots di γ -H2AX fosforilato

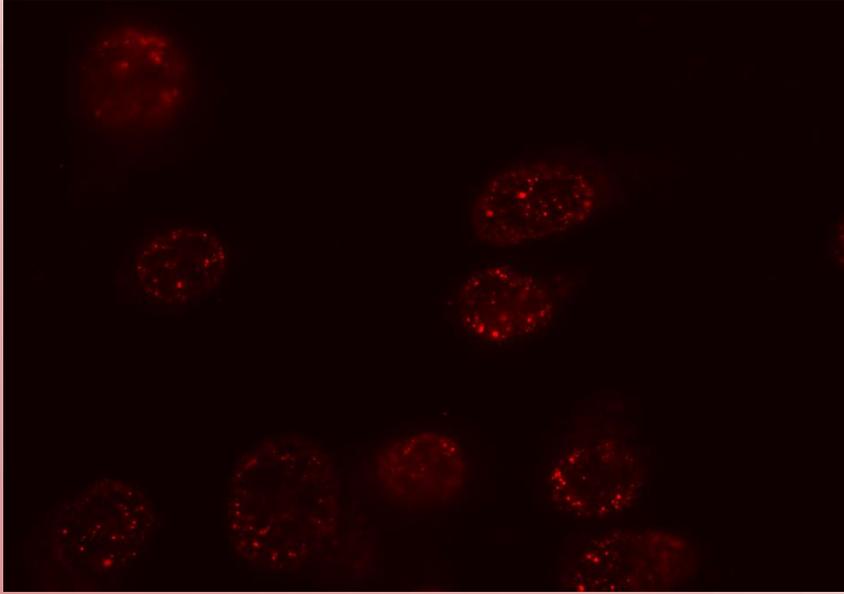


Prelamina A assente

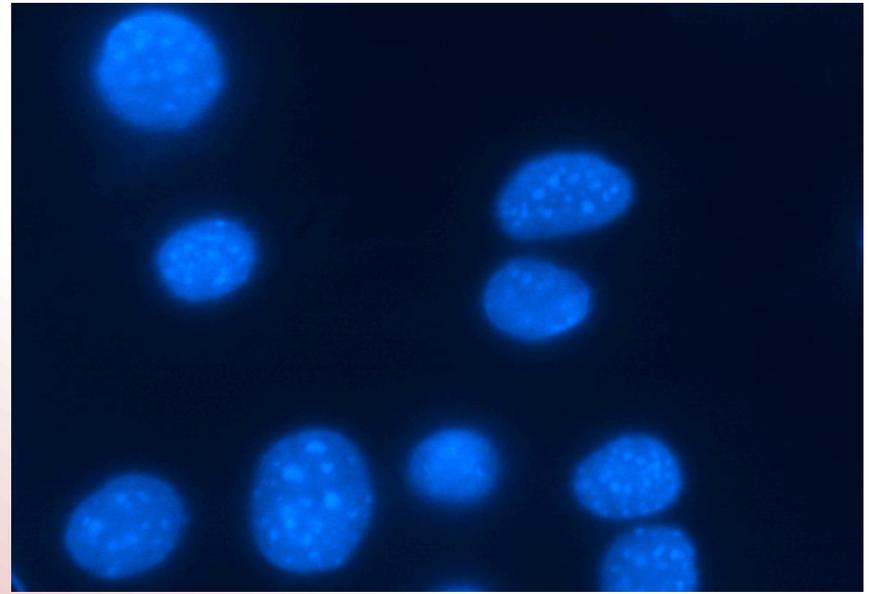


In
azzurro
è
colorato
tutto il
DNA
nucleare

Cellule confluenti



Spots di γ -H2AX fosforilato



Nuclei delle cellule C2C12

Le cellule confluenti hanno un minor numero di spots nucleari di γ -H2AX rispetto alle proliferanti, appaiono quindi meno suscettibili al danno prodotto dai radicali liberi. La Prelamina A è anche qui assente (foto non inserita).

Le condizioni da noi qui sperimentate sono ancora insufficienti per escludere relazioni tra la comparsa delle lesioni sul DNA (spots di γ -H2AX fosforilato) e la presenza di prelamina A, bisogna provare altre condizioni sperimentali.