

CELLULE IN COLTURA E LOCALIZZAZIONE DI PROTEINE

**di GIADA FERRARI, classe IV E Liceo Scientifico
E. Fermi Bologna**

SPERIMESTATE 2018 Stage 018

**Lo stage è stato realizzato con ANNA MANTELLINI, classe
IV D Liceo Scientifico L. da Vinci Casalecchio di Reno,
che ha collaborato attivamente agli esperimenti**

L'EREDITA' TRASMESSA IN MITOSI

Quando una cellula si riproduce per mitosi trasmette alla cellula figlia un patrimonio genetico uguale alla cellula di partenza, intendiamo dire che il suo DNA ha la stessa composizione e successione di basi azotate del DNA della cellula madre.

Ma questa non è l'unica eredità trasmessa.

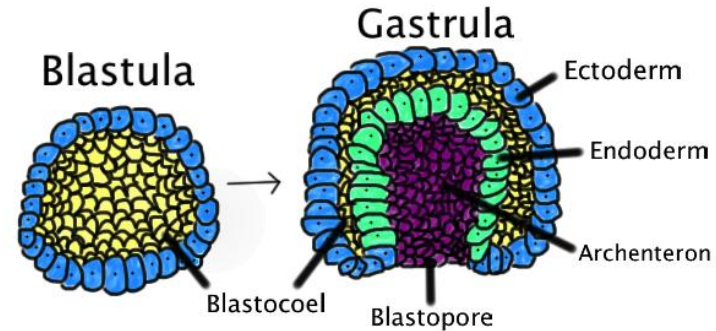
Un'altra informazione viene ereditata, quella racchiusa in piccole molecole, che sono in grado di decidere l'attività dei geni, in rapporto alle sollecitazioni dello ambiente . Questa eredità comanda sul patrimonio genetico, poiché è in grado di indurre la produzione di proteine o no.



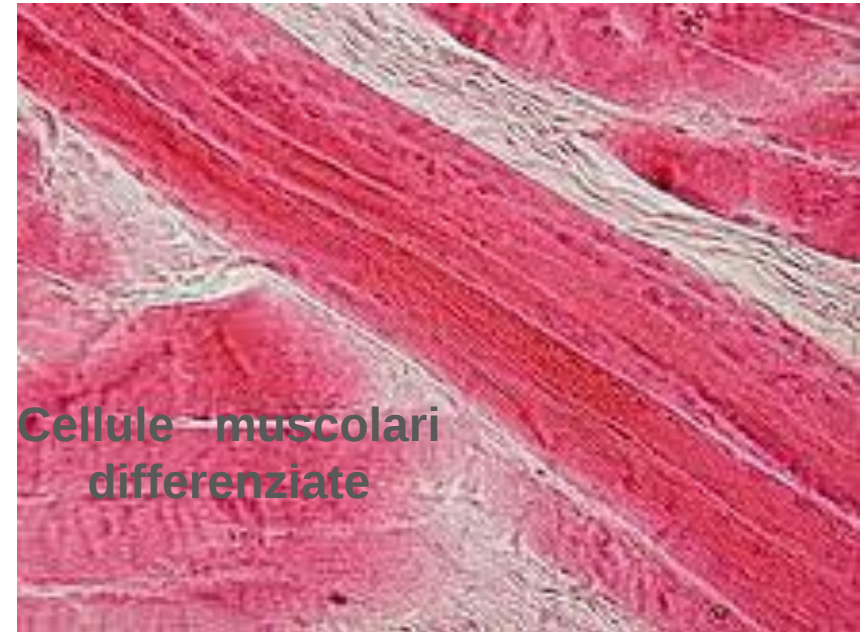
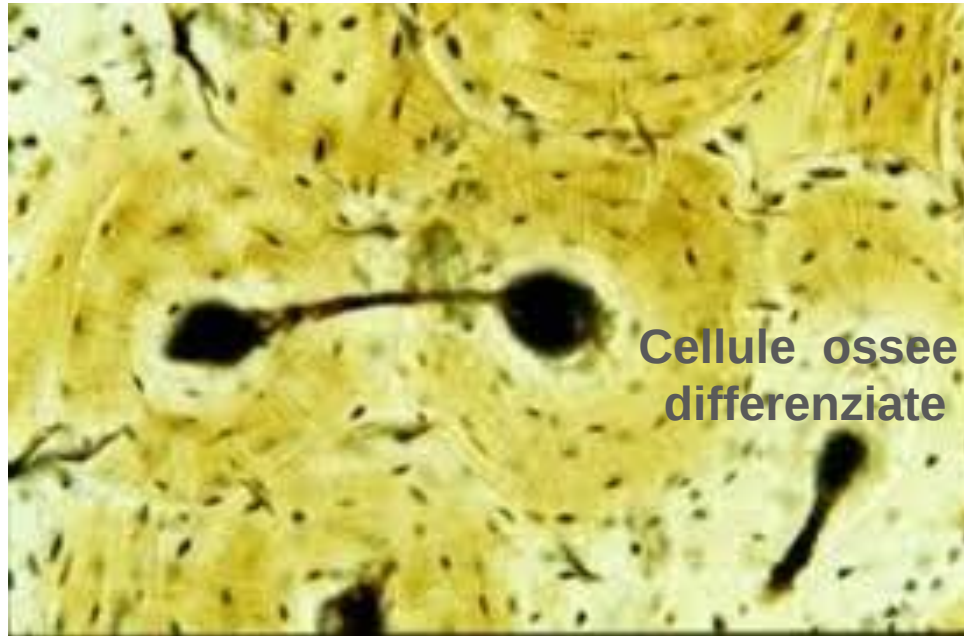
Differenza tra cellule

Le differenze fra tipi cellulari diversi nelle cellule somatiche del nostro corpo, riguardano forma e funzione. Non dipendono dalla sequenza di basi del DNA, poiché questa è uguale in tutte le cellule.

Da cellule staminali, cioè da cellule senza specializzazione, , si formano popolazioni di cellule diverse tra loro, con la stessa composizione di DNA.



Le differenze si sviluppano in base ai geni che sono accesi o spenti, cioè ai geni funzionanti o no, che ovviamente non sono gli stessi. Il processo di specializzazione si chiama **DIFFERENZIAMENTO CELLULARE** e le cellule ottenute alla fine del processo sono differenziate.



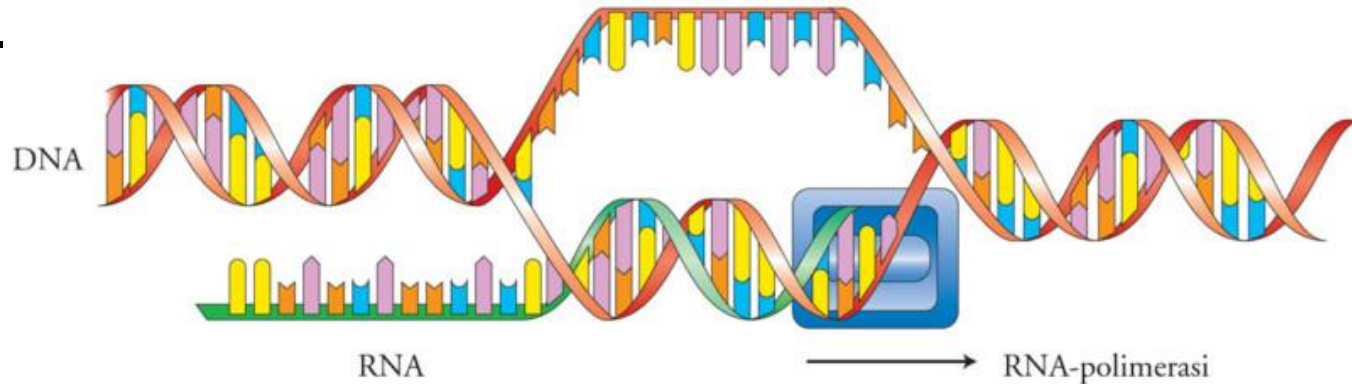
Dal gene alla proteina

La lettura del DNA di un gene, ovvero la decodificazione (trascrizione) e la traduzione in proteina, è molto legata all'accessibilità al sistema di decodificazione.

La accessibilità è strettamente legata allo stato spaziale (o tridimensionale) del DNA, in questo caso è più aperto.

L'assetto spaziale del DNA

Un grado elevato di avvolgimenti e superavvolgimenti rendono il DNA meno accessibile per la trascrizione e traduzione in proteine.



Il nucleo colorato per il DNA con fluorocromo, osservato al microscopio ottico, presenta zone con DNA più avvolto o compatto (con fluorescenza più intensa) e zone con DNA più aperto (meno fluorescenti).

Modifiche sugli istoni del DNA : MODIFICHE EPIGENETICHE

Attivazione di geni, cioè i geni producono la proteina, e inattivazione, caso in cui la proteina non viene prodotta, sono influenzate da modifiche sugli istoni del DNA.

Queste modifiche hanno la capacità di aprire o chiudere la molecola. La definizione di tali modifiche e il loro effetto sull'espressione dei geni, è compito dell'EPIGENETICA.

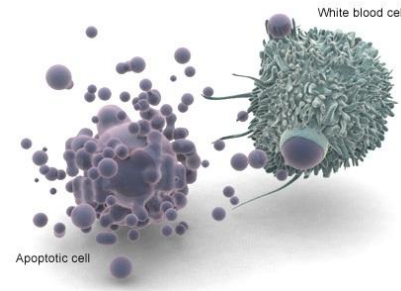
L'acetilazione degli istoni conferisce maggiore attività al gene, la deacetilazione e la metilazione degli istoni, conferisce minore attività.

ALTERAZIONI EPIGENETICHE

Le modifiche epigenetiche sono un controllo sul gene, esercitando esse un comando superiore sulla loro attività, se queste esercitano un comando con effetti negativi patologici, entriamo nel campo delle alterazioni epigenetiche. Una deacetilazione operata su un gene oncosoppressore, può renderlo parzialmente inattivo, da normalmente attivo e ciò si è visto in alcuni casi di tumore.

I geni oncosoppressori producono normalmente una proteina in grado di dare arresto al ciclo cellulare dopo un danno al DNA. Avviene così la riparazione del danno ad opera di enzimi riparatori o avviene l'innescò dell'apoptosi, in caso di non riparazione.

Se l'oncosoppressore è attivo, la cellula a sx innesca il programma di morte cellulare.



MODIFICHE GENETICHE SULLE BASI AZOTATE DEL DNA

Nella sequenza ordinata di basi azotate del **DNA di un gene**, un **errore in una singola base**, può comportare la sintesi di una proteina non funzionante o malfunzionante. Questo cambiamento del DNA si chiama **mutazione**.

La proteina che ne deriva può compromettere importanti funzioni cellulari e comportare l'insorgenza di una malattia, in questo caso la **malattia** è **genetica**, cioè originata da mutazione del DNA.



LAMINOPATIE

E' il caso delle laminopatie, **malattie genetiche rare**, dovute ad una **mutazione su una singola base specifica del gene LMNA**. Produce una proteina difettosa diversa dall'originale lamina A. Queste malattie sono studiate nel laboratorio di Genetica Molecolare del CNR.

Una forma immatura di Lamina A, prelamina A, può essere individuata in alcune cellule sane.

Con prelamina A presente in forte quantità, si hanno variazioni dell'ordinamento spaziale del DNA nucleare rispetto a quelle presenti con Lamina A. In conseguenza di ciò alla Lamina A si attribuisce un ruolo epigenetico.

Qual è il nostro obiettivo?

Coltivare cellule indifferenziate alle quali somministrare un inibitore dell'istone deacetilasi, che terrebbe alta l'acetilazione degli istoni. Esaminare nei nuclei al microscopio ottico la variazione dell'organizzazione spaziale del DNA e la presenza di prelamina A.



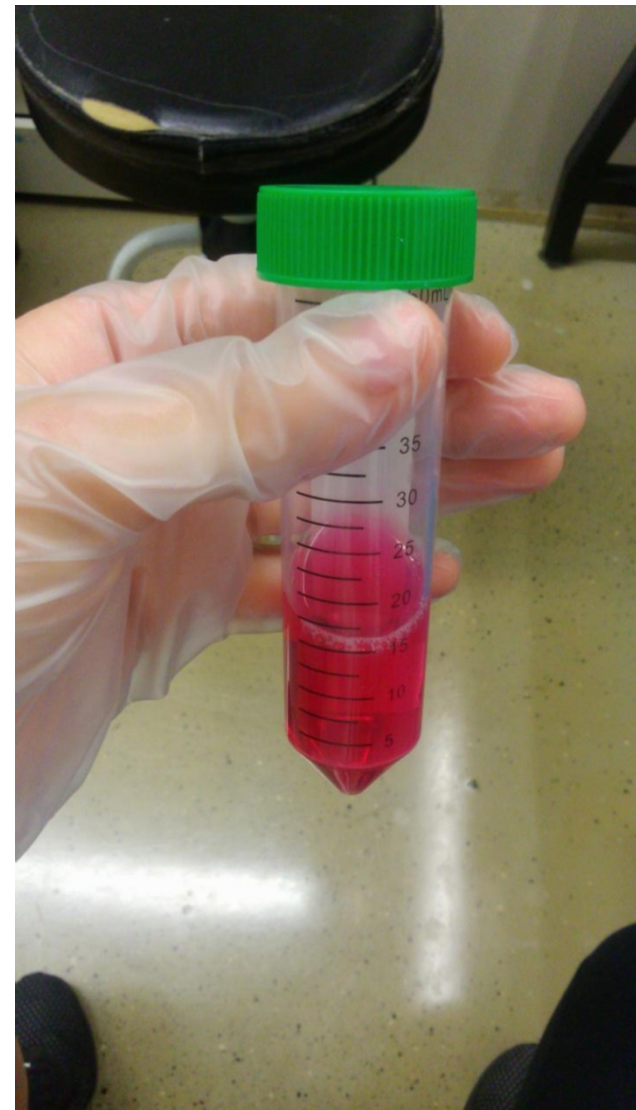
Coltura cellulare

Le cellule coltivate allo scopo sono cellule commerciali che crescono adese ad una superficie, caratteristica che abbiamo sfruttato per farle aderire su vetrino. Abbiamo utilizzato il terreno idoneo che contiene sali minerali, vitamine e amminoacidi. Al momento dell'uso abbiamo aggiunto siero fetale bovino al 10%. Esso contiene i fattori di crescita fondamentali per la riproduzione e la sopravvivenza delle cellule.



Il terreno usato è terreno DMEM (Dulbecco's modified essential medium), di colore rosato. Il colore è dovuto alla presenza di un indicatore di pH.

Quando le cellule crescono, acidificano progressivamente il terreno verso il colore giallo, il terreno tenderà al viola se le cellule soffrono di carenza di CO₂.



Ogni nostra
operazione
sulle
cellule è
stata fatta
in piena
sterilità,
sotto la
cappa a
flusso
laminare e
senza l'uso
di
antibiotici



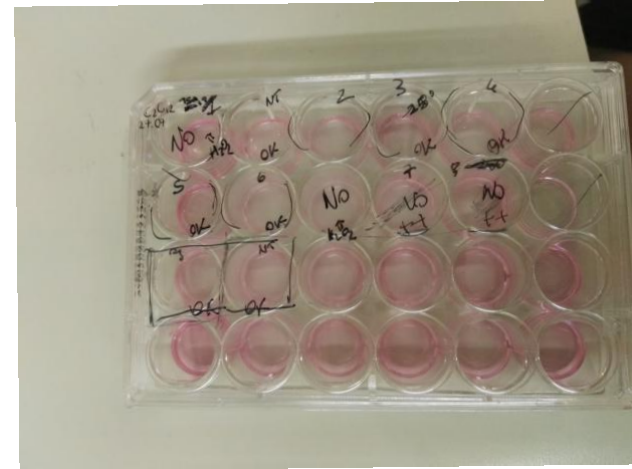
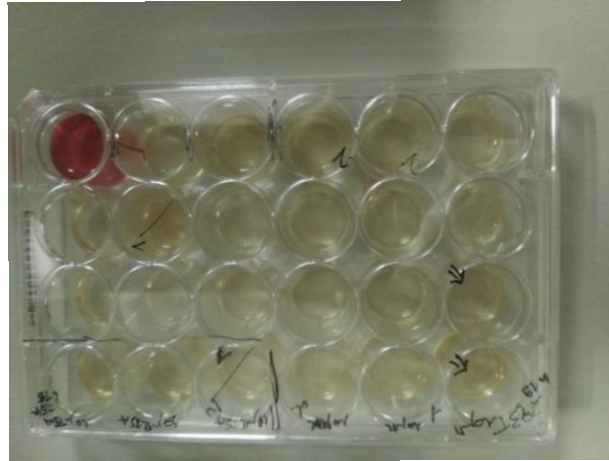
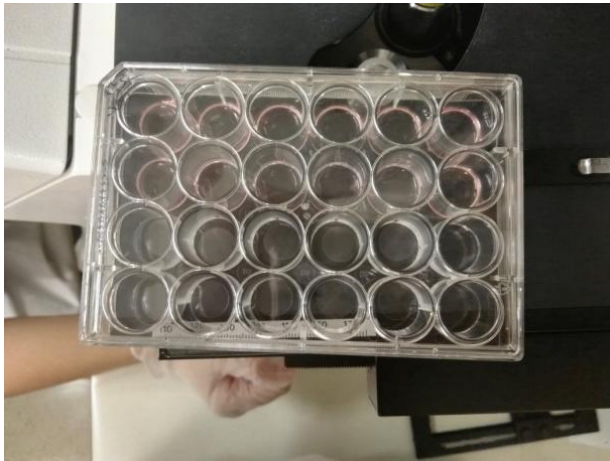
Essendo al
primo
approccio,
non
contami-
nare è
stato
veramen-
te
molto
difficile,
e ci siamo
riuscite !!

Le cellule scelte per la coltura

RG321 embrionali umane

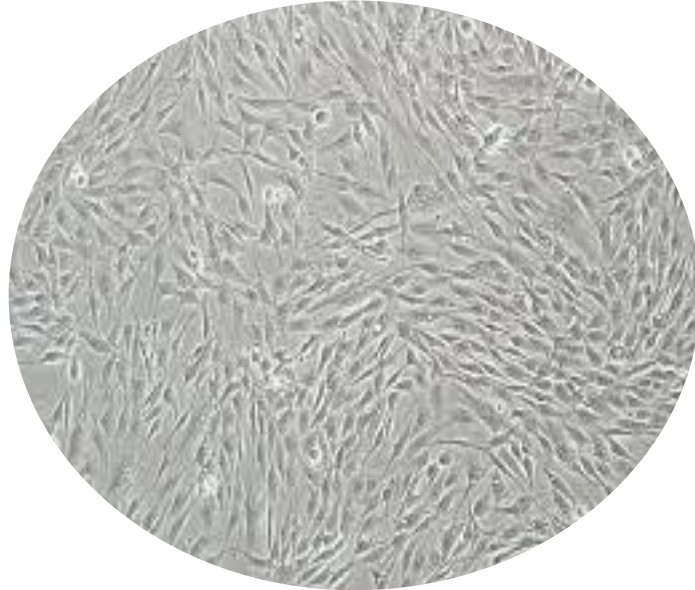
C2C12 staminali adulte premuscolari di topo

293T embrionali umane di rene



In ognuna delle tre piastre Multiwell abbiamo seminato un tipo di cellule

Le cellule sono deposte a gocce su un vetrino circolare nel fondo di ogni pozzetto della piastra multiwell. Dopo la semina si attende una moderata espansione delle cellule per divisione mitotica, fino alla ricopertura di buona parte del vetrino. Ciascuno dei 3 tipi di cellule viene seminato su 6 vetrini. Dopo due giorni le cellule raggiungono una copertura del 40% della superficie e dopo 5 gg ricoprono l'intera superficie.



Trattamento con l'inibitore dell'istone deacetilasi

Durante la crescita, 3 campioni di cellule di ogni gruppo di 6, sono trattati con tricostatina a dosaggio 10 microMolare, per 5 gg. La tricostatina (TSA) è in grado di inibire la deacetilazione degli istoni del DNA, pertanto conserva i gruppi acetile sugli istoni, e questo conferirebbe al DNA una forma più aperta. Gli altri 3 campioni del gruppo di 6 sono usati come controllo, pertanto non sono trattati con TSA.



La proteina da localizzare viene legata all'anticorpo

La proteina da localizzare si comporta da antigene e verrà sottoposta ad una reazione immunologica

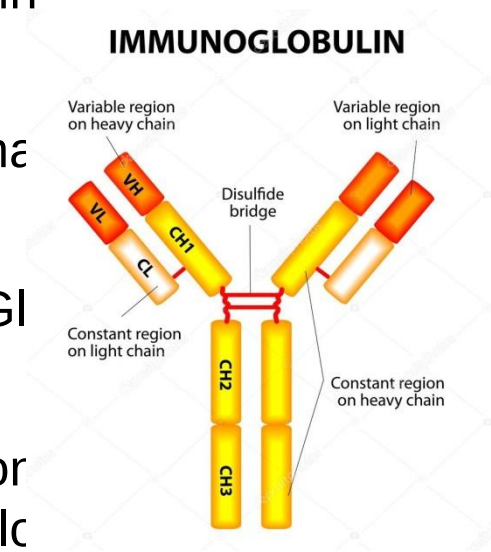
Il legame con l'anticorpo specifico contro di essa, è realizzato in vitro con una incubazione (contatto) tra i due.

L'anticorpo è una immunoglobulina commerciale, e si chiama anticorpo primario,

Gli anticorpi possono essere monoclonali o policlonali. Gli anticorpi monoclonali si legano ad un antigene in un solo epitopo.

L'epitopo è il sito determinante dell'antigene per il legame con l'anticorpo. Gli anticorpi policlonali si legano a più epitopi dello stesso antigene.

La parte rossa che mostra la figura a dx è variabile e dà loro la specificità nei confronti dell'antigene.



Come si localizza la proteina al microscopio ?

Il legame Antigene-anticorpo primario non è ancora visibile, lo diventa usando un anticorpo secondario legato al fluorocromo.

L'anticorpo secondario viene scelto in base all'anticorpo primario usato, cioè viene scelto un anticorpo contro la specie animale da cui è ottenuto l'anticorpo primario.

Con il microscopio a fluorescenza localizziamo il fluorocromo legato all'anticorpo secondario e indirettamente localizziamo la proteina, solo se l'anticorpo primario avrà precedentemente legato la proteina.

Protocollo della reazione immunologica per la proteina

2 brevi lavaggi in PBS fisiologico

Fissazione in paraformaldeide 4% per 10 min a 4°C

(oppure fissazione in metanolo a -20°C per 7 min)

3 Lavaggi in PBS fisiologico di 2 min

Permeabilizzazione con 0.15 % triton/PBS per 10 min a r.t. (solo se fissazione in para)

3 lavaggi in PBS fisiologico di 2 min

Saturazione siti aspecifici con 4%BSA in PBS per 1h R.T.

Breve lavaggio in PBS

[]Incubazione anticorpo primario monoclonale (* tempi e diluizioni consigliate dai dati sperimentali)

Lavaggi in PBS 3x 5 min

Incubazione anticorpo secondario contro la specie animale ospite da cui è stato ottenuto l'anticorpo primario, mouse nel nostro caso, quindi anti-mouseconiugato con fluoro cromo, diluito in pbs/BSA 4% 1:100 per 1 h a R.T.

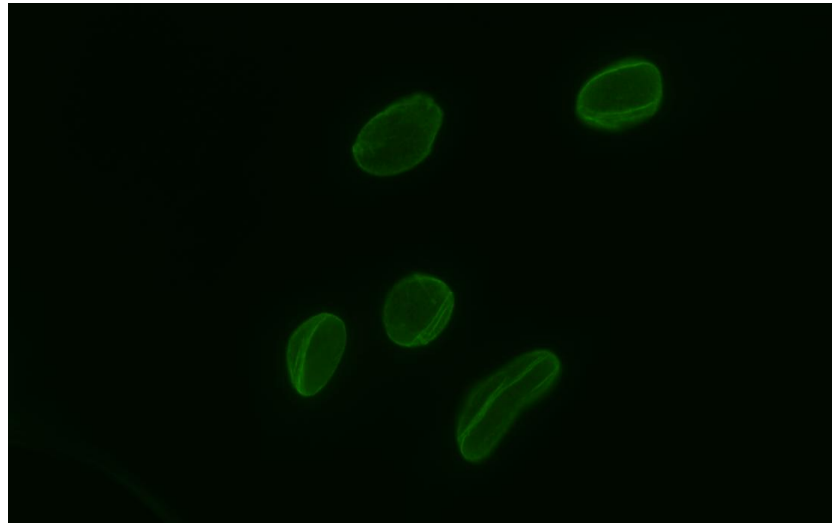
Lavaggi in PBS 3 x 5 min

Colorazione con Hoechst 33258/PBS (1,2 µg/ 10ml) per 5 min

La nostra prima reazione

Reazione contro la lamina A di cellule RG321 con un anticorpo primario monoclonale anti-lamina A.

Sui nuclei di cellule RG321 è presente la Lamina A. La vediamo in verde, dopo aver legato l' anticorpo secondario anti-mouse coniugato con fluorocromo, all'anticorpo primario che si era prima legato ad essa.



La nostra seconda reazione

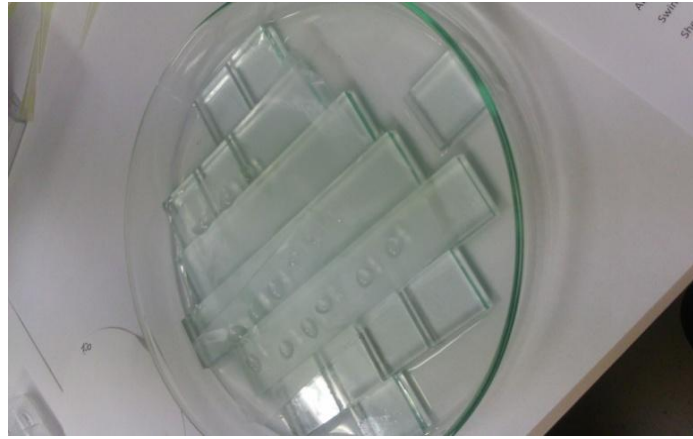
Reazione contro prelamina A su 293T, C2C12 e RG321.

Le 293T tendono a crescere meno aderenti al vetrino e quindi si staccano durante le reazioni per localizzare la proteina, per cui non avevamo abbastanza cellule e la reazione non era significativa,

finchè non abbiamo imparato a usare qualche accorgimento durante le reazioni



1



2



3

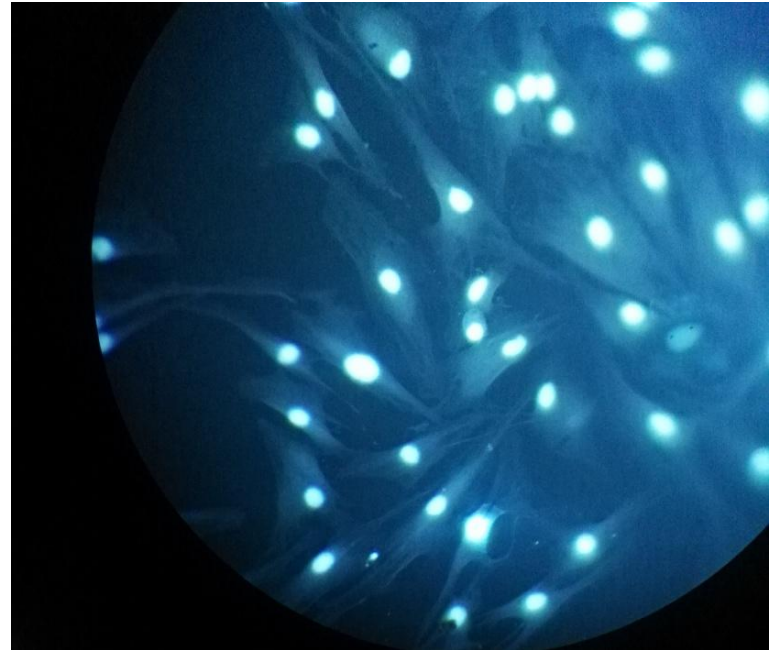
I vetrini con le cellule adese nei pozzetti della piastra (1) sono prelevati dopo la fine dei trattamenti e capovolti su gocce (2), poste in camera umida. Le gocce contengono l'anticorpo per il legame con l'antigene. Dopo la reazione sono trasferiti su un vetrino porta-oggetti rettangolare (3) per l'osservazione al microscopio ottico.

Non sempre tutto va come dovrebbe

Per maneggiare i vetrini con le pinzette serve manualità , buona vista e concentrazione. Complice l'inesperienza, il vetrino è caduto e si è capovolto.

Nel nostro caso le cellule sono andate in disidratazione, ma avevamo comunque speranza di recuperare qualche cellula.

L'osservazione al microscopio del nostro campione ci ha premiati perché bellissima, e l'approccio è stato allegramente battezzato una affascinante “ non reazione “, regolarmente documentata.



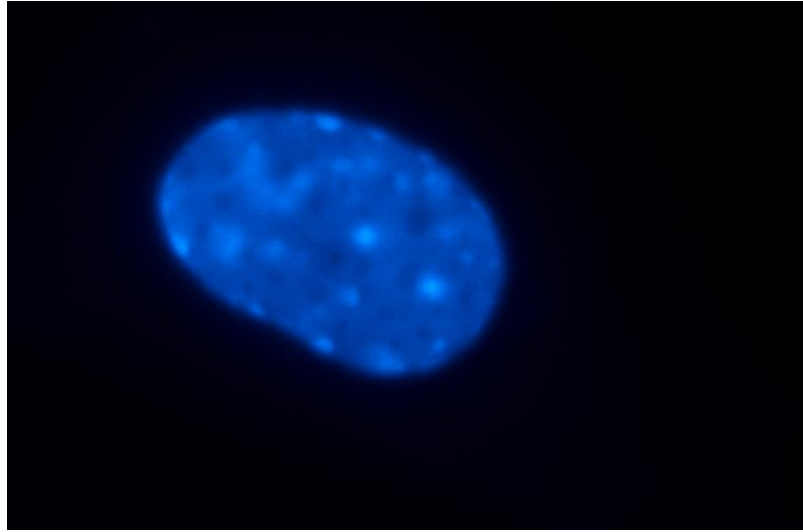
Il nucleo al microscopio ottico

Il DNA nel nucleo è lungo 2 metri e occupa zone in cui è più compatto e altre in cui è più lasso. In ogni zona è contenuto un gran numero di geni.

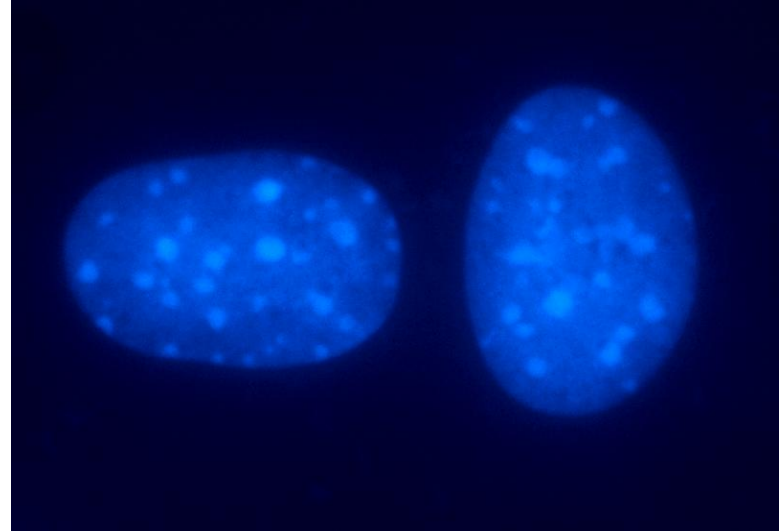
Il colorante fluorescente del DNA, Hoechst 33258, è un suo intercalante e ci permette di distinguere le zone di DNA più compatto e più lasso, per rispettiva maggiore e minore intensità di fluorescenza.

Con la tricostatina (TSA), inibitore di deacetilasi istonica, preserviamo l'acetilazione degli istoni e ci aspettiamo perciò un cambiamento della disposizione nucleare del DNA.

Nei nuclei trattati e non trattati

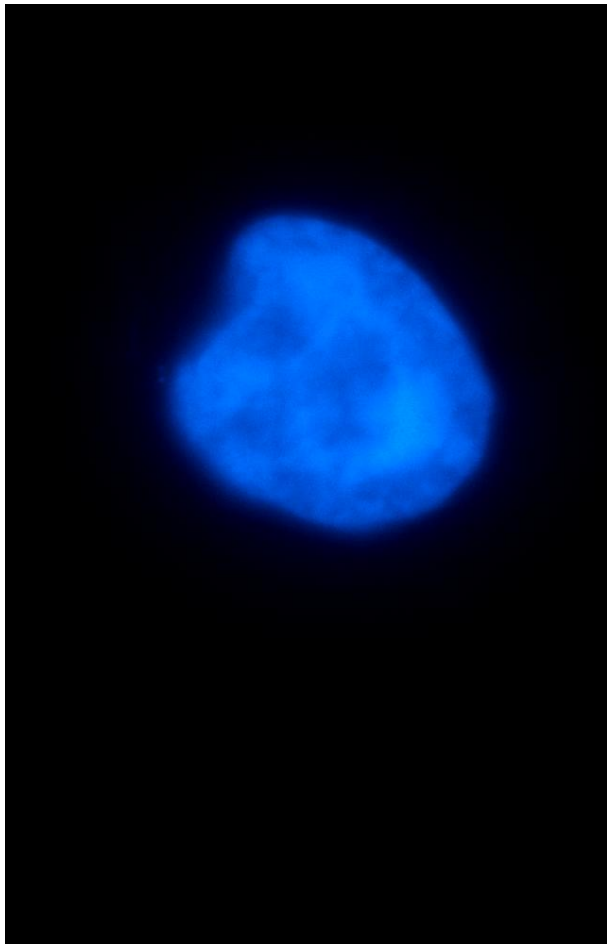


Nuclei di C2C12 trattate con TSA

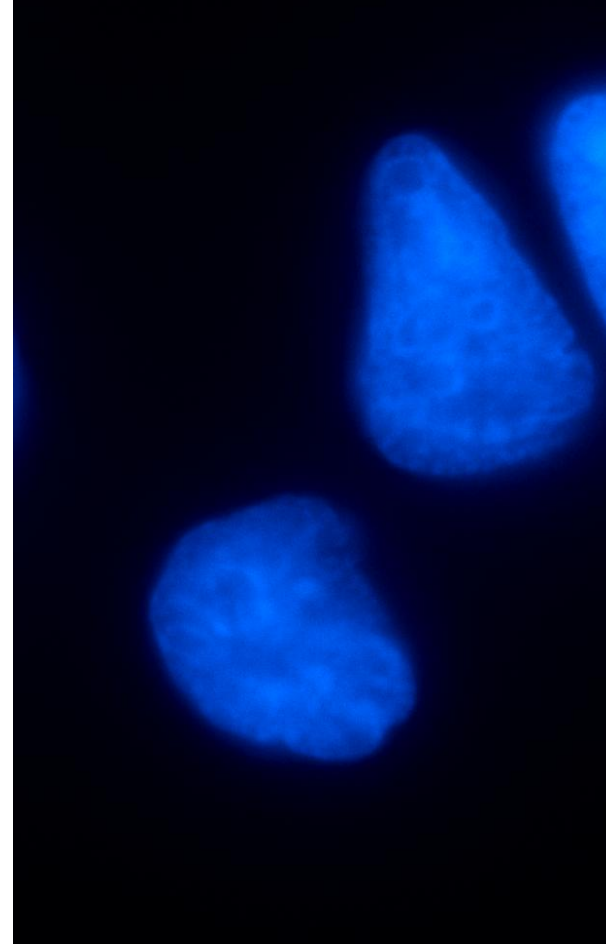


Nuclei di C2C12 non trattate

vediamo una diminuzione del numero di spots , le zone di DNA più compatto, nella foto a sx.

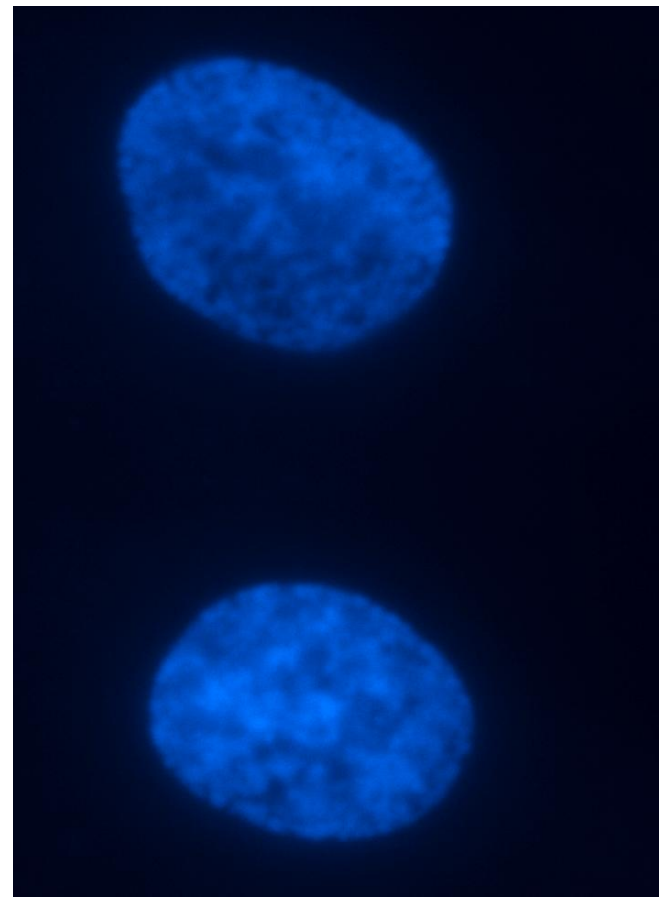
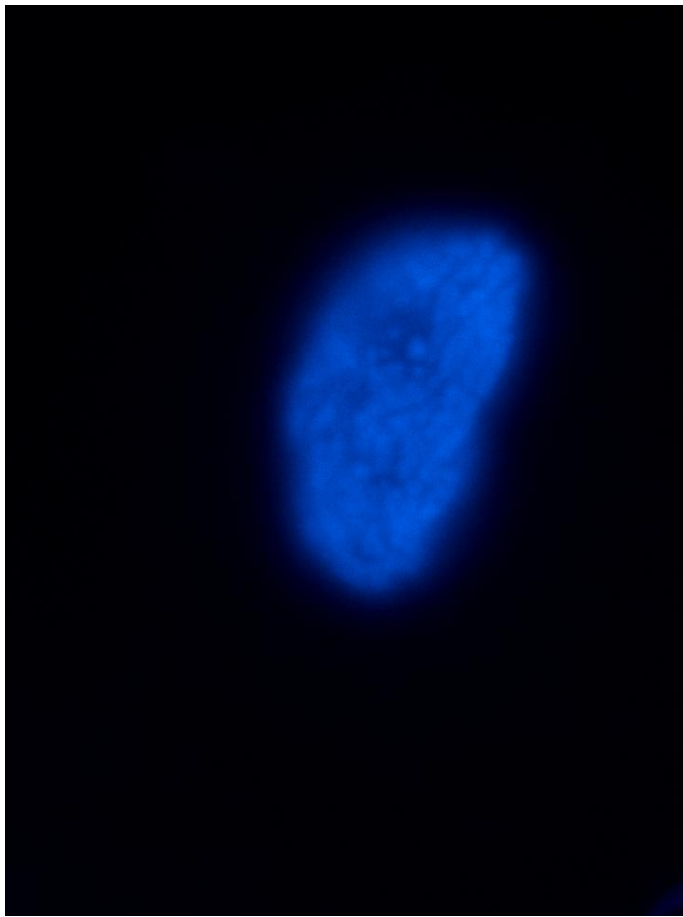


Nuclei di 293T trattate con TSA



Nuclei di 293T non trattate con TSA

il DNA ha più intensa colorazione e occupa una maggiore superficie dello spazio nucleare , dopo il trattamento con TSA

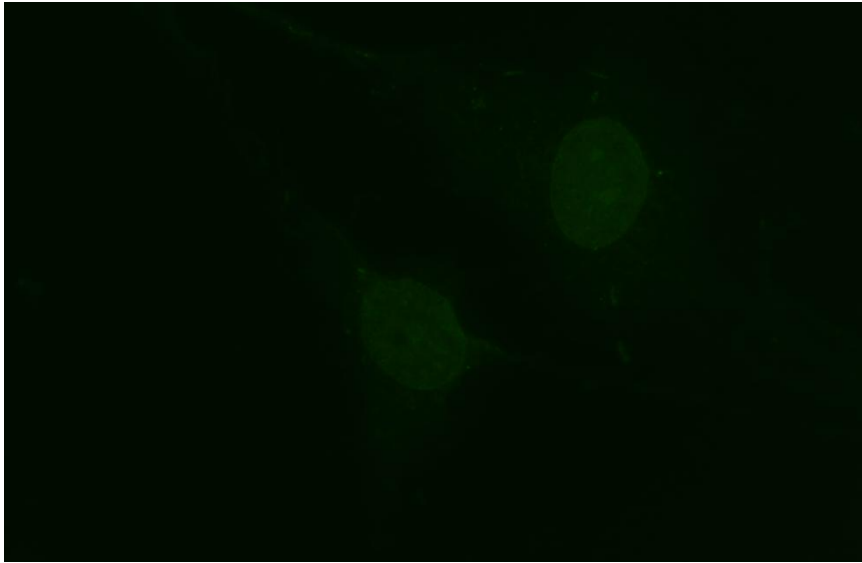


Nuclei di RG321 trattate con TSA Nuclei di RG321 non trattate con TSA

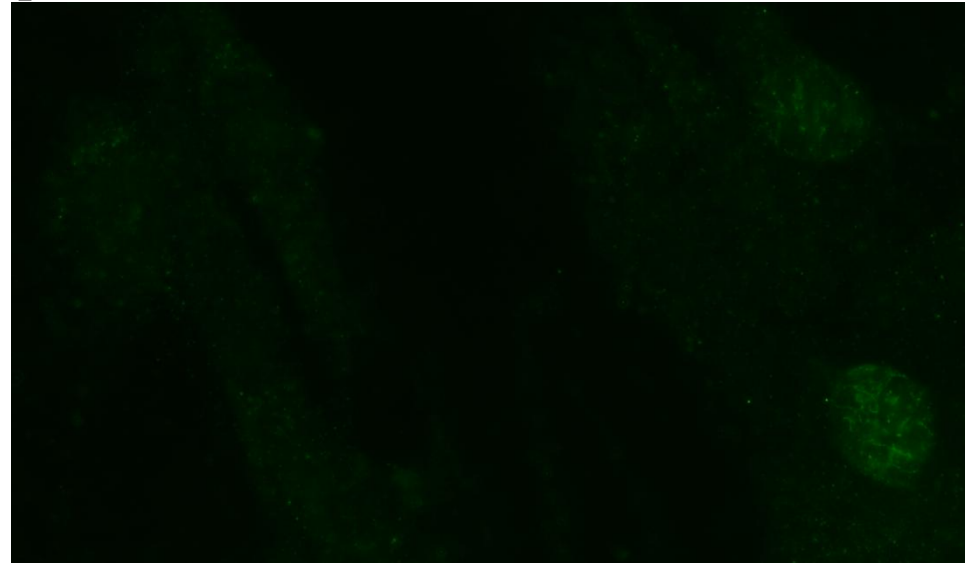
il nucleo delle cellule trattate ha meno spazi di DNA
meno compatto, la colorazione più intensa è diffusa.

la Prelamina A nelle C2C12

La prelamina A e' visibile in verde con anticorpo secondario anti- goat con iugato con fluorocromo FITC. Appare solo in alcuni nuclei di cellule C2C12 non trattate , diminuisce ulteriormente dopo il trattamento

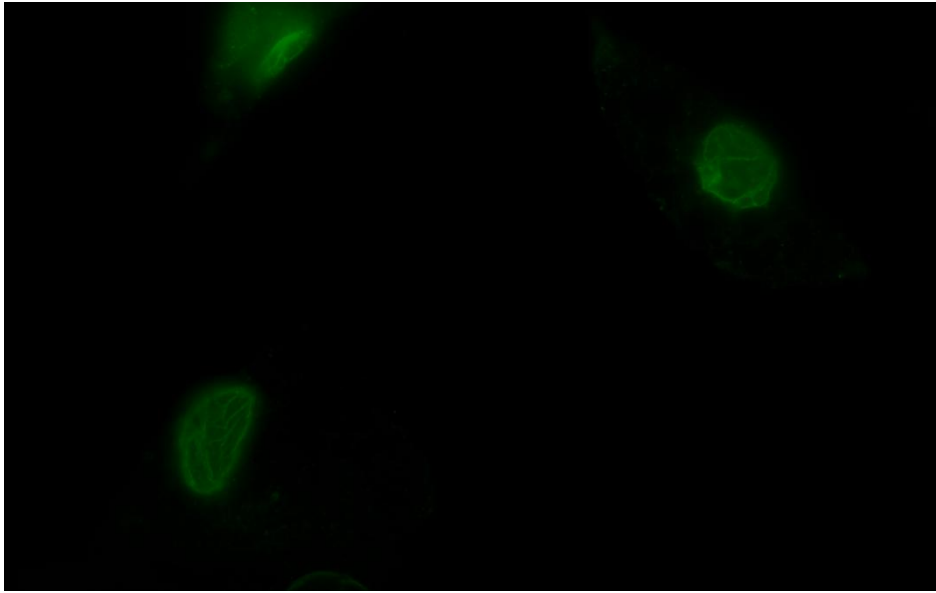


Nuclei di C2C12 trattate con TSA

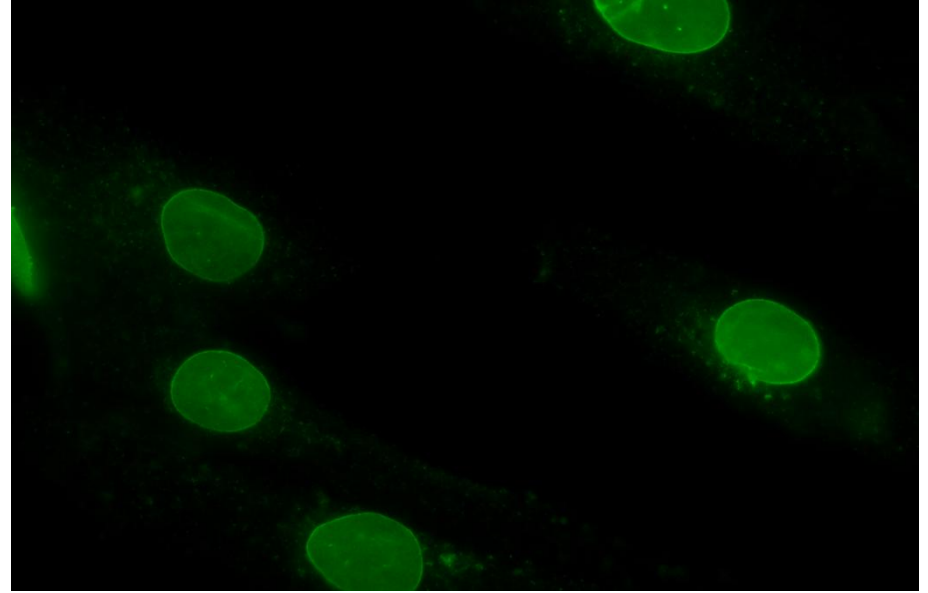


nuclei di C2C12 non trattate con TSA

la Prelamina A nelle RG321



RG321 trattate con TSA



RG321 non trattate con TSA

In questo caso i nuclei trattati con TSA sono meno ricchi di prelamina A e inoltre hanno una forma irregolare rispetto ai nuclei circolari non trattati

Secondo trattamento

Alcune cellule , soprattutto le 293 T, dal terzo giorno di trattamento danno segni di sofferenza, perciò abbiamo preparato nuovi campioni di cellule alle quali abbiamo somministrato dosi ridotte di TSA: 1micromolare per 5 gg, cambiando ogni giorno il terreno col farmaco.

La prelamina A è comunque assente nei nuclei di 293T. Nei nuclei di C2C12 e RG321 si ripresenta il quadro prima ottenuto e con l'uso di tricostatina, si ha una diminuzione di prelamina A.

CONSIDERAZIONI

Ho curato molto nello stage la parte tecnica che ho descritto.

Tutto è stato molto divertente.

Sapere come funziona la lamina A può aiutarci a capire meglio le malattie genetiche che derivano dalle mutazioni del suo gene, e sapere ciò, potrà aiutare a **curarle**.

Si sente parlare di ricerca e di difficoltà a finanziarla, si sente parlare dell'idea di finalizzarla molto di più.

Sento di dire dopo questa esperienza, che bisogna escludere scelte che limitino il campo della conoscenza e la possibilità di nuove scoperte.