

### **Colture cellulari**

Un organismo è un sistema molto complesso, costituito da organi, che a loro volta sono costituiti da diversi tessuti, e in questo organismo avvengono contemporaneamente numerosi processi biochimici e fisiologici, crescita, differenziamento, risposte a sollecitazioni ecc.

Le colture cellulari sono un sistema sperimentale più semplice, possono essere mantenute in condizioni controllate, possono essere facilmente manipolate, possono essere osservate direttamente al microscopio ecc.; costituiscono quindi un sistema modello, che può aiutare la comprensione di molti processi cellulari.

Per le loro caratteristiche, le colture cellulari sono molto utilizzate sia per studi di base che per studi di interesse applicativo.

Studi di base sulla fisiologia cellulare, biochimica, comunicazione fra cellule, regolazione della divisione cellulare, ricerca della funzione di geni e proteine, differenziamento cellulare, sono molto più facilmente affrontabili disponendo di colture di cellule singole. Così pure le colture cellulari costituiscono un sistema importante per lo studio della cancerogenesi, per un primo screening dell'effetto di farmaci, per la rigenerazione di tessuti in vitro.

Problemi fondamentali nell'allestimento e mantenimento delle colture in vitro sono la sterilità, la sicurezza e il terreno adatto.

Per quanto riguarda la sterilità, tutti i passaggi vengono fatti in stanze o sotto cappe sterili (in cui l'aria viene filtrata attraverso filtri che impediscono il passaggio di particelle  $>0.3 \mu\text{m}$  di diametro) e tutti i materiali e i terreni vengono sterilizzati.

I mezzi di coltura vanno messi a punto per ciascuna linea cellulare, ma fondamentalmente contengono: sali, glucosio come fonte di energia e di carbonio, amminoacidi, vitamine, altri nutrienti organici, fattori di crescita.

Per iniziare una coltura si fa un ESPIANTO, cioè si preleva del tessuto, lo si suddivide in piccoli pezzi e lo si mette in una piastra sterile col terreno di coltura. Le cellule si dividono e in parte si staccano dal tessuto iniziale. Le cellule possono crescere adese al substrato o, più raramente, in sospensione. Man mano che si dividono, le cellule consumano i nutrienti e occupano lo spazio a disposizione. Quando i nutrienti sono esauriti e/o tutto lo spazio a disposizione è occupato, la crescita cessa, e bisogna trasferire le cellule in terreno fresco. Per staccare le cellule dal substrato si fa un breve trattamento con tripsina, un enzima che digerisce le proteine che contribuiscono all'adesione delle cellule al fondo della piastra: le cellule si staccano dal fondo e possono essere recuperate con il terreno, contaminate, diluite opportunamente e trasferite in una nuova piastra con terreno fresco per iniziare un nuovo ciclo di coltura.

Una tipica curva di crescita è costituita da tre fasi: nella fase iniziale (lag fase, o fase di latenza) non si ha aumento del numero di cellule, ma adattamento alle nuove condizioni e preparazione alla crescita, si innescano cioè le condizioni necessarie per la ripresa della divisione cellulare; la seconda fase è la fase di crescita esponenziale, in cui le cellule si dividono rapidamente; quando i nutrienti cominciano ad esaurirsi o le cellule occupano lo spazio a disposizione la crescita rallenta fino a cessare (fase stazionaria).

### **Metodi citoanalitici**

Abbiamo visto precedentemente diversi metodi per evidenziare al microscopio, mediante colorazione, immunofluorescenza o ibridazione in situ, la presenza di specifiche sostanze all'interno della cellula.

E' possibile, oltre che vedere la presenza di certe sostanze, anche quantificarla? E a quale scopo quantificarla?

Una misurazione, se fatta correttamente, fornisce una valutazione più oggettiva del risultato, della sua ripetibilità, e permette di confrontare l'effetto di diversi trattamenti o diversi esperimenti. E' importante soprattutto perché le cellule difficilmente rispondono tutte esattamente nello stesso modo, e quindi bisogna tener conto della variabilità biologica e dei possibili errori sperimentali.

In linea di principio, se una certa sostanza è evidenziata mediante colorazione o fluorescenza, se si può misurare l'assorbimento della luce o la fluorescenza emessa da ogni singola cellula, è

possibile misurare (in senso relativo, cioè in unità arbitrarie) la sostanza in questione e confrontare diverse cellule o diversi campioni.

I metodi che consentono di misurare uno o più parametri su un numero significativo di *single cellule* vengono detti metodi CITOANALITICI o CITOMETRICI. Questi metodi possono essere basati su un microscopio tradizionale, in cui si analizza manualmente un preparato su vetrino, o su un CITOMETRO DI FLUSSO, in cui le cellule in sospensione vengono fatte scorrere una ad una davanti al raggio luminoso. Mentre nel primo caso il numero di cellule misurabili è limitato, nella citometria di flusso migliaia di cellule possono essere misurate in pochi minuti.

### Citometro di flusso

Principio: Cellule in sospensione si muovono in un flusso di liquido e passano ad una ad una davanti alla luce incidente; per ogni singola cellula vengono misurati contemporaneamente più parametri, mantenendo la correlazione fra i diversi dati acquisiti per ciascuna cellula.

La citometria di flusso sfrutta le proprietà ottiche del campione, cioè la capacità di deviare la luce (light scattering) o la fluorescenza.

Il sistema ottico è simile a quello di un microscopio a fluorescenza: la sorgente luminosa può essere costituita da una lampada ad arco (che può essere utilizzata per eccitare a diverse lunghezze d'onda) o uno o più laser (ogni laser eccita ad una specifica lunghezza d'onda).

Opportune combinazioni di filtri e lamine dicroiche permettono di separare la luce deviata dal campione o le fluorescenze emesse a diverse lunghezze d'onda, in modo che possano essere misurate indipendentemente.

Le cellule in sospensione vengono immerse a velocità opportuna attraverso un piccolo orificio in una camera di flusso nella quale passa uno "sheath fluid" (acqua o soluzione fisiologica); per la struttura della camera di flusso, il fluido contenente il campione si dispone al centro dello sheath fluid e le particelle si dispongono in fila indiana, passando una per una davanti al raggio emesso dalla sorgente luminosa; un obiettivo raccoglie la luce emessa o deviata da ciascuna cellula: questa luce viene separata dal sistema di filtri nelle sue varie componenti e raccolta da dispositivi elettronici molto sensibili (fotomoltiplicatori); il segnale luminoso genera una corrente elettrica, che viene amplificata; il segnale viene elaborato da dispositivi elettronici e i dati relativi a ciascuna cellula vengono registrati e presentati in tempo reale in forma di grafici di vario tipo. Quando vengono misurati più parametri contemporaneamente, viene conservata la correlazione fra i valori dei diversi parametri acquisiti per ciascuna cellula, in modo da consentire le successive elaborazioni dei dati.

I grafici possono essere presentati sotto forma di istogrammi monoparametrici, in cui l'intensità della fluorescenza per quello specifico parametro è riportata sulle ascisse e il numero di cellule che presentano quel valore di fluorescenza sulle ordinate, o multiparametrici (citogrammi): in questo caso due diversi parametri vengono rappresentati uno sulle ascisse e uno sulle ordinate. Ciascuna cellula è quindi rappresentata sul grafico da un punto. La frequenza delle cellule con la stessa combinazione di valori può essere indicata con una scala di colori.

I parametri che si possono misurare con un citometro di flusso sono light scattering e fluorescenza. Per light scattering si intende la deviazione della luce da parte della particella; l'intensità della luce deviata e l'angolo di deviazione dipendono dalle proprietà della particella (forma, dimensioni, struttura interna, superficie, indice di rifrazione). Il forward angle light scattering (FS, deviazione della luce a piccolo angolo) dipende prevalentemente dalle dimensioni della particella, mentre il side scattering (SS, deviazione della luce a ampio angolo, in genere 90°) dipende soprattutto dalla struttura della particella.

Per quanto riguarda la fluorescenza, in linea teorica è possibile misurare qualsiasi tipo di parametro che possa essere valutato mediante un'intensità di fluorescenza (autofluorescenza, colorazione diretta o indiretta con un fluorocromo, produzione di sostanza fluorescente).

Limitazioni della citometria di flusso rispetto a misurazioni al Microscopio ottico tradizionale sono: è necessario disporre di sospensioni di cellule singole, per cui, a meno che non si parta da colture cellulari, si perde la localizzazione delle cellule nel tessuto; il segnale è molto influenzato dalle condizioni del flusso, che vanno attentamente controllate; lo strumento misura qualsiasi segnale, indipendentemente dal fatto che sia effettivamente dovuto a una cellula, quindi bisogna essere in grado di distinguere a che cosa possono essere dovuti i segnali; l'operatore non vede le cellule che passano e quindi non ha informazioni sulla loro morfologia. Per ovviare a questo

inconveniente, sono stati prodotti degli strumenti in grado di combinare l'analisi citometrica con l'acquisizione dell'immagine delle particelle che vengono misurate.

Ad alcuni tipi di citometro di flusso può essere applicato un dispositivo detto "cell sorter", che permette la separazione fisica di particelle con determinate caratteristiche: con questo dispositivo il flusso continuo viene rotto in gocce, applicando una vibrazione, in modo che ciascuna goccia contenga una sola particella; lo strumento viene impostato in modo che, quando passa una cellula con le caratteristiche volute, alla goccia viene impressa una carica che la fa deviare in un recipiente di raccolta. Le cellule così separate costituiscono una popolazione omogenea per un certo parametro, che può essere studiata o messa in coltura separatamente.

## APPLICAZIONI

### *Light scattering*

L'analisi di FS e SS consente di distinguere popolazioni di cellule che si differenziano per le dimensioni o la struttura interna, e permette non solo di metterne in evidenza la presenza, ma anche di determinare in che percentuale sono rappresentate, anche senza fare alcuna colorazione. Tipicamente questi parametri permettono di distinguere i diversi tipi di leucociti: i linfociti sono di piccole dimensioni e hanno un grosso nucleo uniforme, e quindi hanno basso FS e basso SS; i monociti e i granulociti hanno più o meno le stesse dimensioni, e quindi hanno FS simile, ma i granulociti per la granularità del citoplasma hanno SS più alto.

### *Fluorescenza*

#### Analisi del contenuto di DNA

Si può determinare il contenuto di DNA utilizzando un fluorocromo che si leghi specificamente al DNA, in concentrazione tale che la sua fluorescenza sia proporzionale al contenuto di DNA (cioè che, se il contenuto di DNA è X la fluorescenza sia Y, e se il contenuto di DNA è 2X la fluorescenza sia 2Y) e misurando l'intensità della fluorescenza di ciascuna cellula.

Il contenuto di DNA può essere determinato in senso assoluto (quantità in pg) o relativo.

Il contenuto in pg di DNA di un certo campione può essere determinato in rapporto ad un campione a contenuto di DNA noto. Per esempio, se voglio determinare il contenuto assoluto di DNA di un campione del genere *Musa* (banana), e ho a disposizione cellule di soia di cui so che il contenuto di DNA è 2.50 pg, posso operare così: estraggo i nuclei dai due campioni, li coloro con un fluorocromo specifico per il DNA, analizzo il campione di soia, in modo da identificare qual è il suo valore di fluorescenza. Poi analizzo i due campioni insieme e calcolo il rapporto fra la fluorescenza dei nuclei di soia e quelli di banana. Il rapporto delle fluorescenze equivale al rapporto fra i contenuti di DNA, e quindi dal contenuto di DNA in pg di soia posso calcolare il contenuto di DNA in pg di banana.

In molti casi non interessa tanto quanti pg di DNA ci sono in una cellula, ma piuttosto il rapporto fra contenuto di DNA di diverse cellule (contenuto relativo): cioè mi interessa sapere se una popolazione è aploide, diploide o poliploide, o se le cellule hanno già replicato o meno il DNA.

La determinazione del contenuto relativo del DNA è uno strumento importante per lo studio del CICLO CELLULARE, cioè la serie di eventi che intercorre fra una divisione cellulare e quella successiva.

### *Ciclo cellulare*

La divisione cellulare è alla base della continuità della vita e dello sviluppo degli organismi, e deve essere strettamente controllata. La divisione cellulare deve essere coordinata con la crescita cellulare, in quanto prima di dividersi una cellula deve crescere e raddoppiare DNA, organelli e citoplasma. Le cellule hanno generalmente una vita media molto minore di quella dell'organismo o della popolazione e questa durata è diversa nei diversi tessuti, perciò la divisione deve essere regolata nel corso del differenziamento e coordinata con la morte cellulare; la divisione deve riprendere in caso di lesioni per rigenerare i tessuti.

Perché una cellula possa dividersi correttamente ci sono due processi critici che si susseguono e che devono essere strettamente controllati: l'esatta replicazione del patrimonio genetico (il DNA si deve replicare tutto, una sola volta e fedelmente prima della divisione cellulare e quindi la divisione

deve avvenire solo dopo che il DNA si è replicato) e l'esatta ripartizione del patrimonio genetico nelle cellule figlie (ogni cellula figlia deve ricevere una copia esatta dell'intero patrimonio genetico). Il controllo della divisione cellulare è molto importante per l'armonica crescita di un organismo e la divisione deve avvenire nel luogo giusto, in modo corretto e nel momento giusto, altrimenti la perdita di controllo sulla proliferazione può portare a anomalie dello sviluppo e/o a una crescita tumorale. Per questo la divisione, la crescita e la vitalità di una cellula sono sotto il controllo di segnali che provengono da cellule vicine.

Il ciclo cellulare può essere distinto in 4 fasi: G1 (presintesi), S (fase di replicazione del DNA), G2 (post sintesi) e M (mitosi e separazione delle cellule figlie). G1, S e G2 formano l'interfase. Una cellula in mitosi si distingue al microscopio perchè sono visibili i cromosomi, mentre le varie fasi dell'interfase presentano il nucleo integro e sono morfologicamente simili. Possono però essere distinte sulla base del contenuto di DNA.

Il contenuto di DNA di una cellula aploide (che è suddiviso in  $n$  cromosomi) viene detto  $C$ . Una normale cellula diploide, che ha  $2n$  cromosomi, in G1 ha quindi un contenuto di DNA pari a  $2C$ . Durante la fase S il DNA si replica, e quindi il contenuto di DNA passa gradualmente da  $2C$  a  $4C$ , e in G2 è  $4C$ , cioè è doppio rispetto a G1. Potrà quindi distinguere le cellule in G1, S o G2 determinando col citometro di flusso il contenuto relativo di DNA delle cellule.

Un grafico tipico per una popolazione di cellule in proliferazione, distribuite nelle diverse fasi del ciclo, presenta due picchi con valori di fluorescenza uno doppio dell'altro, e una zona continua con fluorescenza intermedia fra i due picchi. Il primo picco è costituito dalle cellule in G1, il secondo picco (a fluorescenza doppia) è costituito dalle cellule in G2+M, e la zona intermedia è costituita dalle cellule in S, con contenuto di DNA variabile fra  $2C$  e  $4C$ .

La percentuale delle cellule nelle diverse fasi sarà caratteristica del tipo di cellule o delle condizioni di coltura, o dell'effetto di specifici trattamenti. In condizioni normali, la proporzione resterà pressochè costante, perchè progressivamente le cellule in G1 entrano in S, ma le cellule già in S arrivano in G2 e le cellule già in G2 si dividono e rimpiazzano le cellule uscite da G1. Ma se per esempio si somministra una sostanza che blocca il ciclo cellulare nella fase G1, dopo la somministrazione della sostanza le cellule in G1 resteranno bloccate con un contenuto  $2C$  di DNA, le cellule in S continueranno la replicazione del DNA, arriveranno in G2 e si divideranno e poi si bloccheranno in G1. Le cellule in G2 si divideranno e si bloccheranno in G1; perciò progressivamente le cellule in S diminuiranno e aumenteranno le cellule in G1. In questo modo si può seguire la dinamica del ciclo cellulare in seguito a diversi trattamenti e comprendere i fattori che regolano il ciclo.

Il corretto sviluppo di una popolazione o di un organismo richiede un coordinamento fra divisione cellulare e morte cellulare. La morte cellulare può avvenire fondamentalmente in due modi: la necrosi e l'apoptosi.

La necrosi è la morte da danno acuto, che è in genere accompagnata da scoppio della cellula: nell'organismo il rilascio del contenuto cellulare provoca una risposta infiammatoria.

L'apoptosi è detta anche morte cellulare programmata, in quanto è regolata e prevista nel piano di sviluppo dell'organismo. E' mediata da enzimi proteolitici, comporta raggrinzimento e vacuolizzazione della cellula, condensazione della cromatina e frammentazione del DNA, rottura dell'involucro nucleare, alterazione della membrana mitocondriale; anche la superficie cellulare si altera in modo da attirare i fagociti che distruggono la cellula apoptotica, per cui non si hanno fenomeni infiammatori. Perciò quando si vogliono distruggere selettivamente certi tipi di cellule (per esempio in chemioterapia si vogliono distruggere le cellule cancerose), si cercano sostanze che inducano apoptosi e non necrosi.

L'apoptosi modella lo sviluppo degli organismi, eliminando le strutture non più necessarie (ad esempio le membrane fra le dita che sono presenti all'inizio dello sviluppo dell'arto, o la coda dei girini nella trasformazione in rana) e controllando il numero delle cellule per uno sviluppo armonico dei diversi tessuti. L'apoptosi è programmata e viene inibita da fattori di sopravvivenza prodotti da altre cellule: per esempio, il numero delle cellule nervose è bilanciato con il numero delle cellule bersaglio, perchè i fattori di sopravvivenza prodotti dalle cellule bersaglio sono sufficienti ad evitare l'apoptosi solo in un determinato numero di cellule.

Come si può determinare la vitalità cellulare e riconoscere le cellule che vanno in apoptosi?

Uno dei modi per determinare la vitalità cellulare è quello di valutare l'integrità del plasmalemma, verificando se questo lascia passare o meno sostanze colorate o fluorescenti.

Uno di questi metodi utilizza sostanze colorate che entrano solo in cellule con la membrana danneggiata (esempio: ioduro di propidio); queste sostanze non coloreranno le cellule vive, ma solo quelle morte.

Un altro metodo consiste nel somministrare una sostanza non fluorescente, che può penetrare anche attraverso il plasmalemma integro e penetra quindi in tutte le cellule (vive e morte), ma viene metabolizzata a un prodotto fluorescente (per es. fluorescente nel verde) e impermeabile al plasmalemma, che non può quindi attraversare il plasmalemma integro e quindi è trattenuto solo dalle cellule vive, che saranno fluorescenti, al contrario delle cellule morte.

Combinando questi due metodi, si può determinare al citometro la percentuale di cellule morte: le cellule morte avranno la fluorescenza rossa dello ioduro di propidio e non la fluorescenza verde dell'altro fluorocromo; le cellule vive non avranno fluorescenza rossa, ma fluorescenza verde.

E' possibile distinguere le cellule morte per necrosi da quelle in apoptosi?

L'apoptosi può essere messa in evidenza con la citometria di flusso in diversi modi. Per esempio

1. analizzando il contenuto di DNA: poichè durante l'apoptosi il DNA si frammenta, analizzando il contenuto di DNA, le cellule apoptotiche possono essere messe in evidenza se compare un picco con fluorescenza minore di quella delle cellule in G1

2. mettendo in evidenza la presenza di "marcatori" dell'apoptosi. Per esempio, durante l'apoptosi la superficie cellulare si altera, e uno dei primi marcatori dell'apoptosi è la capacità di legare una proteina (l'annexina V) sulla membrana. Trattando le cellule con annexina coniugata con FITC, le cellule in apoptosi precoce mostrano fluorescenza nel verde, mentre le cellule di controllo non sono fluorescenti. Se a questa colorazione si aggiunge una colorazione con ioduro di propidio, le cellule sane resteranno non fluorescenti, le cellule apoptotiche ancora vitali avranno solo fluorescenza verde, le cellule morte per apoptosi o per necrosi avranno fluorescenza sia rossa che verde. In questo modo si può studiare l'effetto di diversi potenziali chemioterapici, verificando la loro capacità di indurre apoptosi o necrosi.

### *Immunofluorescenza*

Anche la quantità relativa di una o più proteine, messe in evidenza con immunofluorescenza, può venire quantificata. Questo permette non solo di verificare l'effetto di diversi trattamenti, ma anche di seguire il differenziamento delle cellule, in quanto la differenziazione fra i tessuti comporta anche l'espressione di geni diversi e quindi la sintesi di proteine specifiche e caratteristiche.

La contemporanea determinazione di SS e FS permette di distinguere diverse popolazioni di cellule (per esempio nel caso dei leucociti, v. sopra) e verificare poi quali di queste esprimono un certo marcatore.