

# COME SI STUDIANO LE CELLULE

Dimensioni delle cellule

Microscopio ottico

Microscopio a fluorescenza

Microscopio elettronico

**MICROSCOPIA**



**CELLULE**

Colture cellulari

FACS

Centrifuga

Frazionamento subcellulare

Centrifugazione in gradiente di densità

Southern

Northern

**ACIDI NUCLEICI**

**PROTEINE**

Western

SDS page

Immunoistochimica

# Le cellule come modelli sperimentali

Alcuni **tipi cellulari ed organismi**, in base alle loro peculiarità, sono utilizzati più frequentemente come **modelli sperimentali** per studiare:

biologia cellulare / biologia molecolare / biochimica / genetica molecolare

Procarioti



*E. coli*

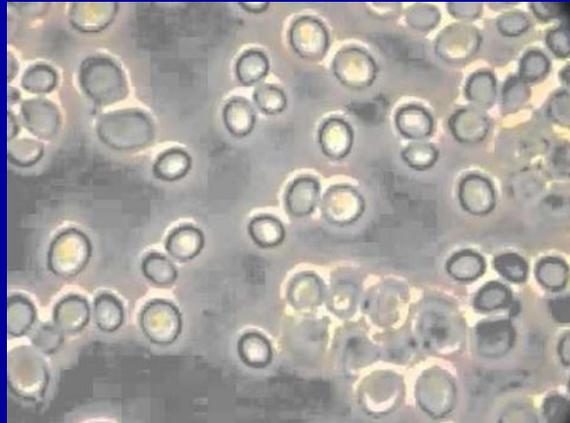
Eucarioti



*S. cerevisiae*

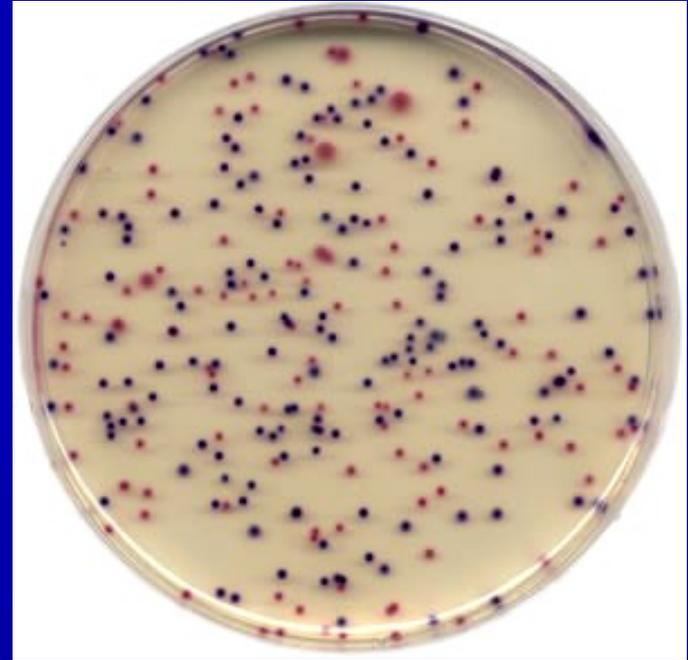


*H. sapiens*



# Le cellule come modelli sperimentali

Per la loro semplicità le cellule **procariotiche** sono modelli ideali per studiare alcuni aspetti fondamentali della biochimica e della biologia molecolare. In particolare, ***Escherichia coli***, è la specie batterica più studiata.



***E. coli***. La maggior parte delle nostre conoscenze di biologia molecolare derivano infatti da studi condotti su questo batterio:

Replicazione, codice genetico, trascrizione, sintesi proteica

# Le cellule come modelli sperimentali

## *E. coli*



**Genoma** a doppio filamento, circolare, lungo 4,6 milioni di pb (completamente sequenziato nel 1997), 4000 **geni espressi**.

**Cresce** rapidamente (ogni 20' si divide) e in modo clonale (da una cellula iniziale si ottiene una popolazione di cellule tutte identiche) permettendo l'isolamento di **colonie** su terreno solido contenente agar

# Le cellule come modelli sperimentali

## Cellule eucariotiche

### Lieviti

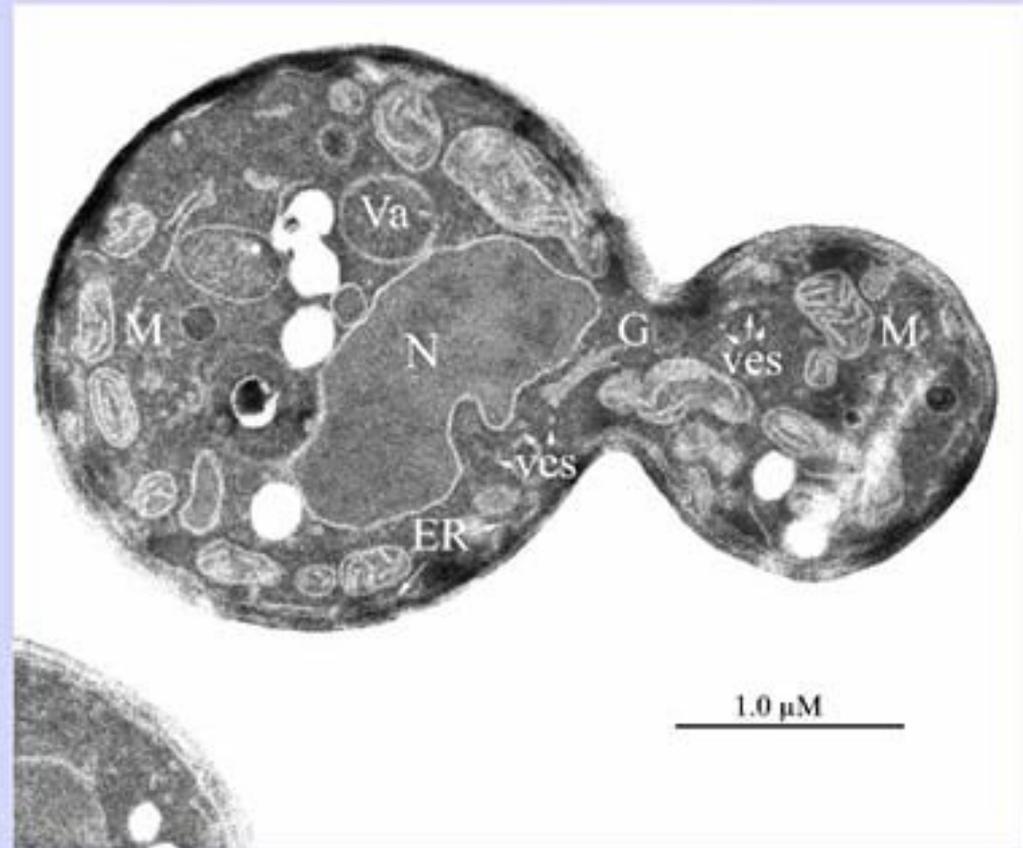
i più semplici eucarioti, unicellulari

Utilizzati per studiare gli aspetti riguardanti la struttura cellulare interna e quelle funzioni che sono uniche delle **cellule eucariotiche** (biologia cellulare e molecolare).

**Genoma**, 12 milioni di pb;  
6000 circa **geni espressi**;  
16 **cromosomi** lineari

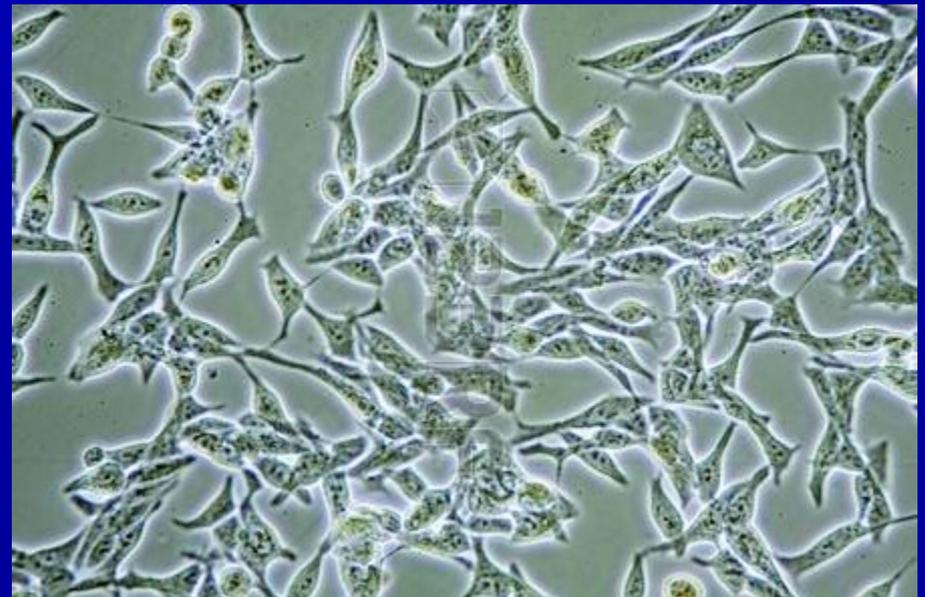
Si coltiva facilmente,  
si divide ogni due ore  
e può essere coltivato in maniera  
clonale.

*Saccharomyces cerevisiae*



# Le cellule come modelli sperimentali

Cellule eucariotiche di organismi pluricellulari

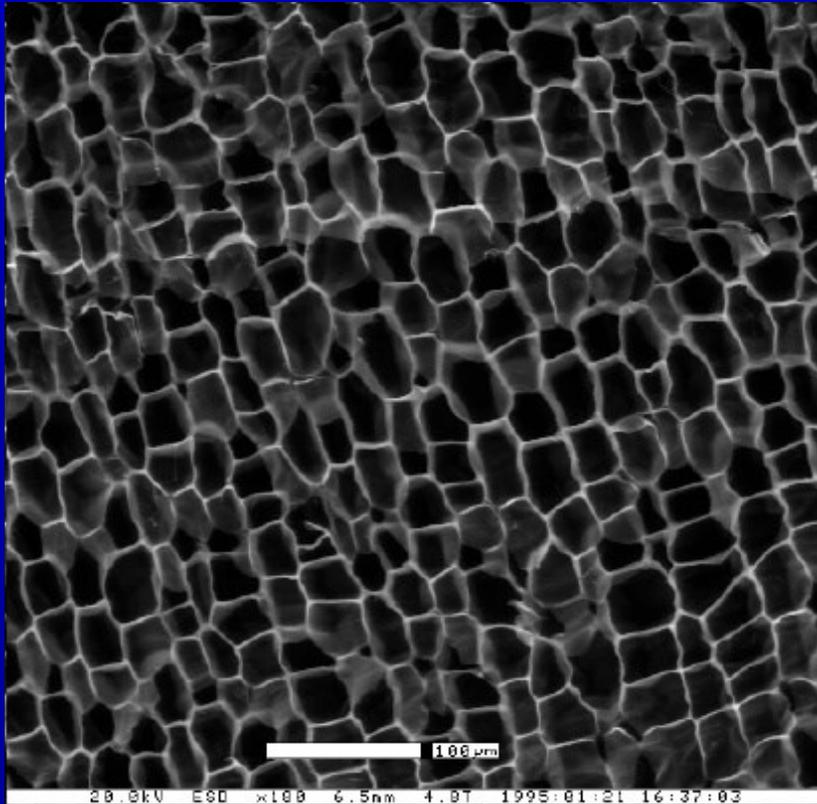


# Gli strumenti della biologia cellulare

La biologia cellulare e molecolare dipende in maniera sostanziale dalle **metodologie** e dalle **strumentazioni** utilizzabili per studiare le cellule sia dal punto di vista strutturale che funzionale.

Poiché la maggior parte delle cellule **non** sono visibili ad occhio nudo, lo studio delle cellule è ampiamente basato sull'uso della

## Microscopia ottica



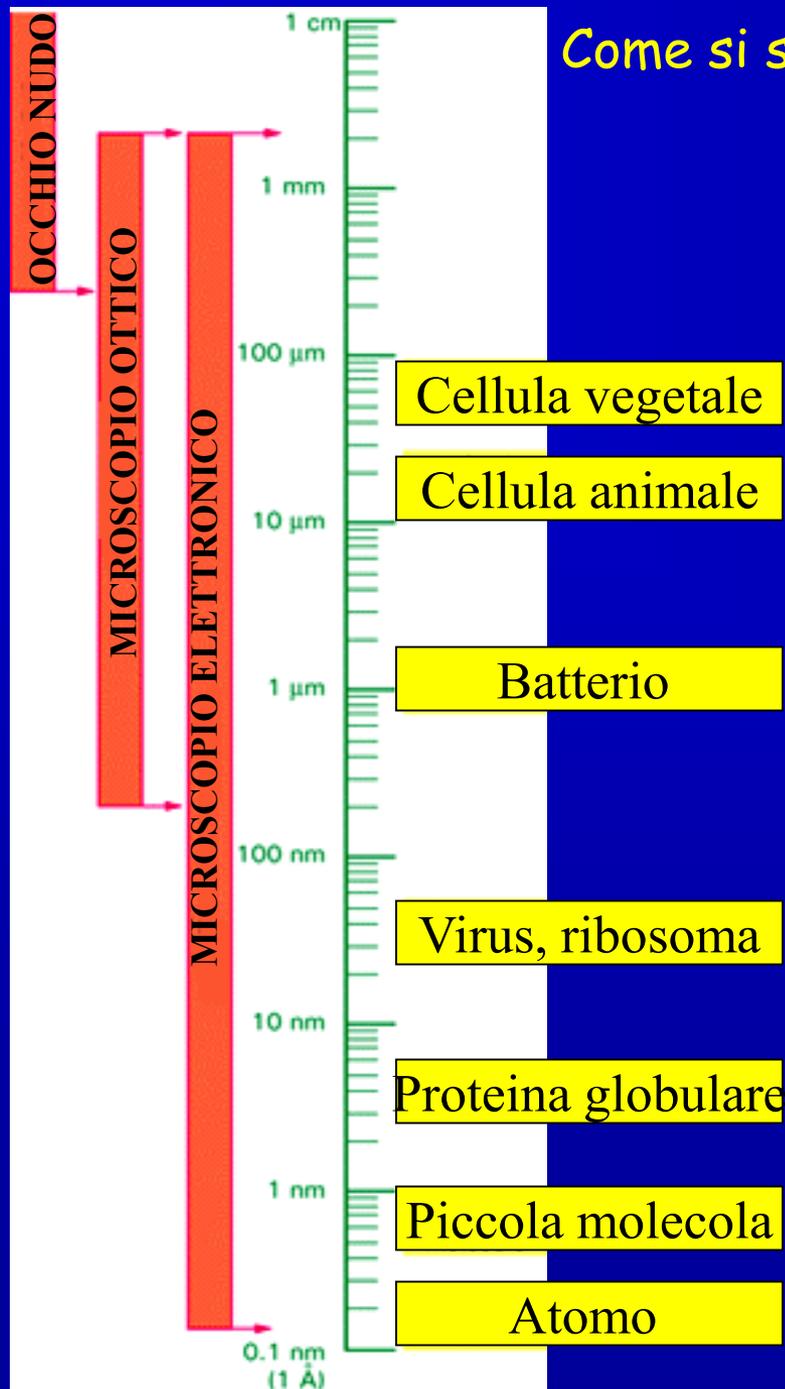
Si può dire che la reale scoperta della cellula è associabile allo

**sviluppo delle tecniche di  
microscopia ottica**

Il termine "**cellula**" (**cella**) è stato coniato da Robert Hook, nel 1665, in seguito all'osservazione di un pezzo di sughero con un microscopio ottico abbastanza semplice

# Come si studiano le cellule e le macromolecole

## La microscopia



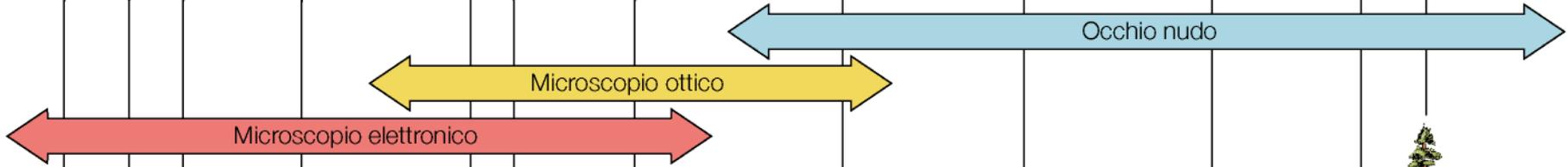
Le dimensioni delle cellule e dei loro componenti su scala logaritmica; si indicano le dimensioni degli oggetti che possono essere facilmente risolti ad occhio nudo, nel microscopio ottico e in quello elettronico. In microscopia si usano comunemente le seguenti unità di lunghezza:

$$\mu\text{m (micrometro)} = 10^{-6} \text{ m}$$

$$\text{nm (nanometro)} = 10^{-9} \text{ m}$$

$$\text{Å (ångström, non più in uso nel S.I.)} = 10^{-10} \text{ m}$$

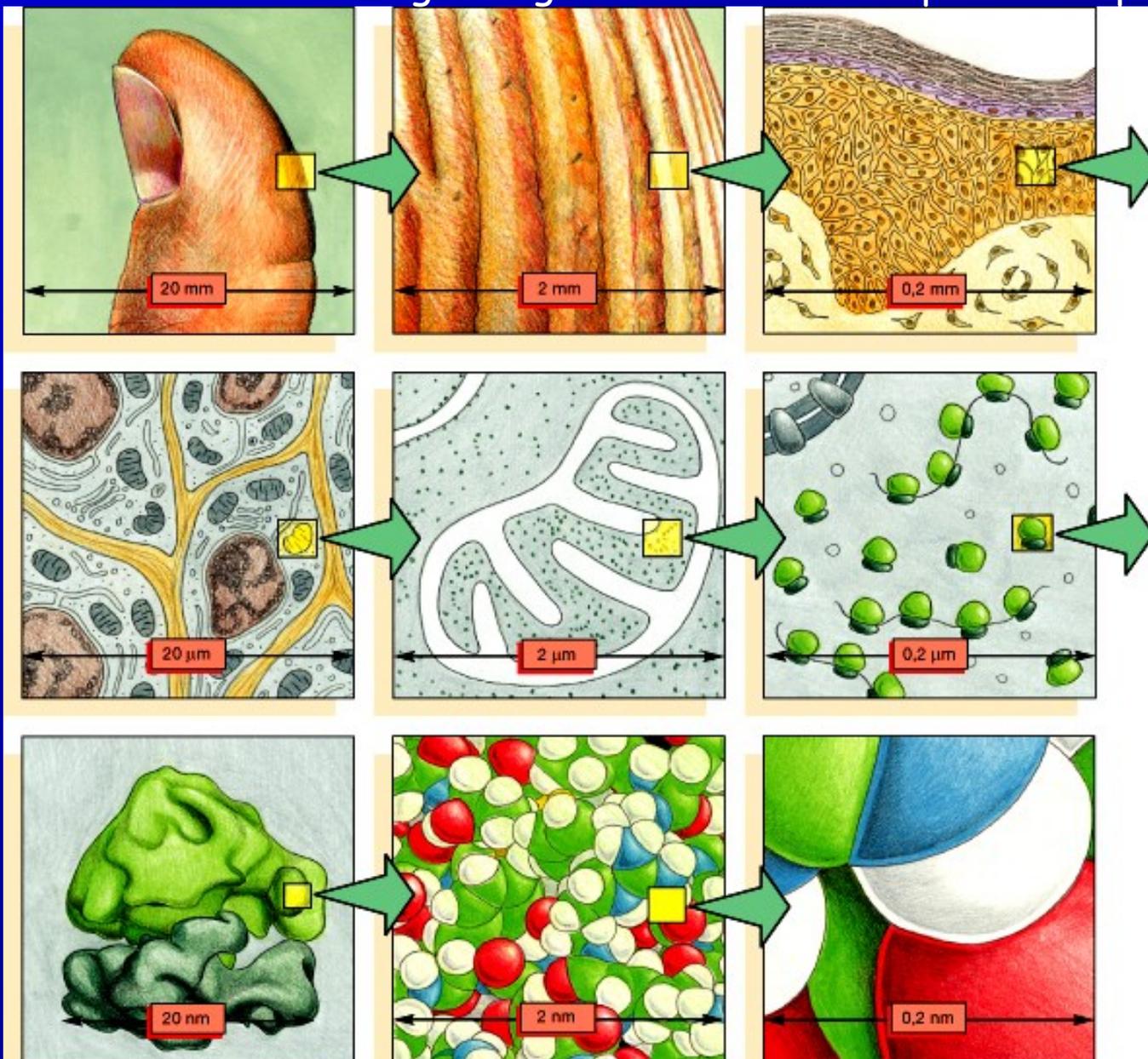
Questa scala è logaritmica; ogni unità è dieci volte maggiore della precedente.



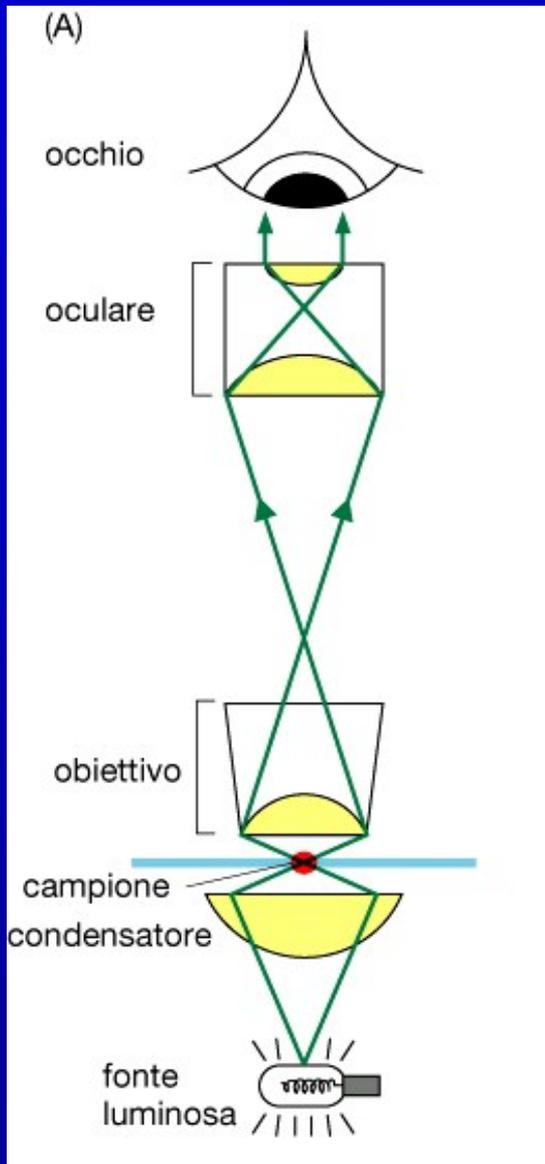
Le dimensioni cellulari si distribuiscono prevalentemente nell'intervallo da 1 a 100 μm.

## Rapporto dimensionale tra cellule ed atomi

Ogni riquadro mostra una immagine ingrandita 10 volte rispetto alla precedente



# Microscopio Ottico



Per guardare le cellule al microscopio ottico servono 3 cose:

1. Concentrare una **luce intensa** sul campione foccheggiandola con la lente del **condensatore**
2. Preparare con cura il **campione** perché la luce possa **attraversarlo**
3. Disporre opportunamente una serie di **lenti (obiettivo e oculare)** per mettere a fuoco sull'occhio un'immagine

# Microscopio Ottico

Permette di ingrandire le cellule fino a **mille volte circa**

**Risoluzione:** capacità di un microscopio di distinguere oggetti separati da piccole distanze

Limite di risoluzione.  **$0,2 \mu\text{m}$** : determinato da 2 fattori:

1. **Lunghezza d'onda** ( $\lambda$ ) della luce visibile
2. Potere di raccogliere la luce della lente del microscopio, **apertura numerica** (NA)



2 oggetti separati da una distanza inferiore a questa appaiono come una immagine singola, invece di essere distinti l'uno dall'altro

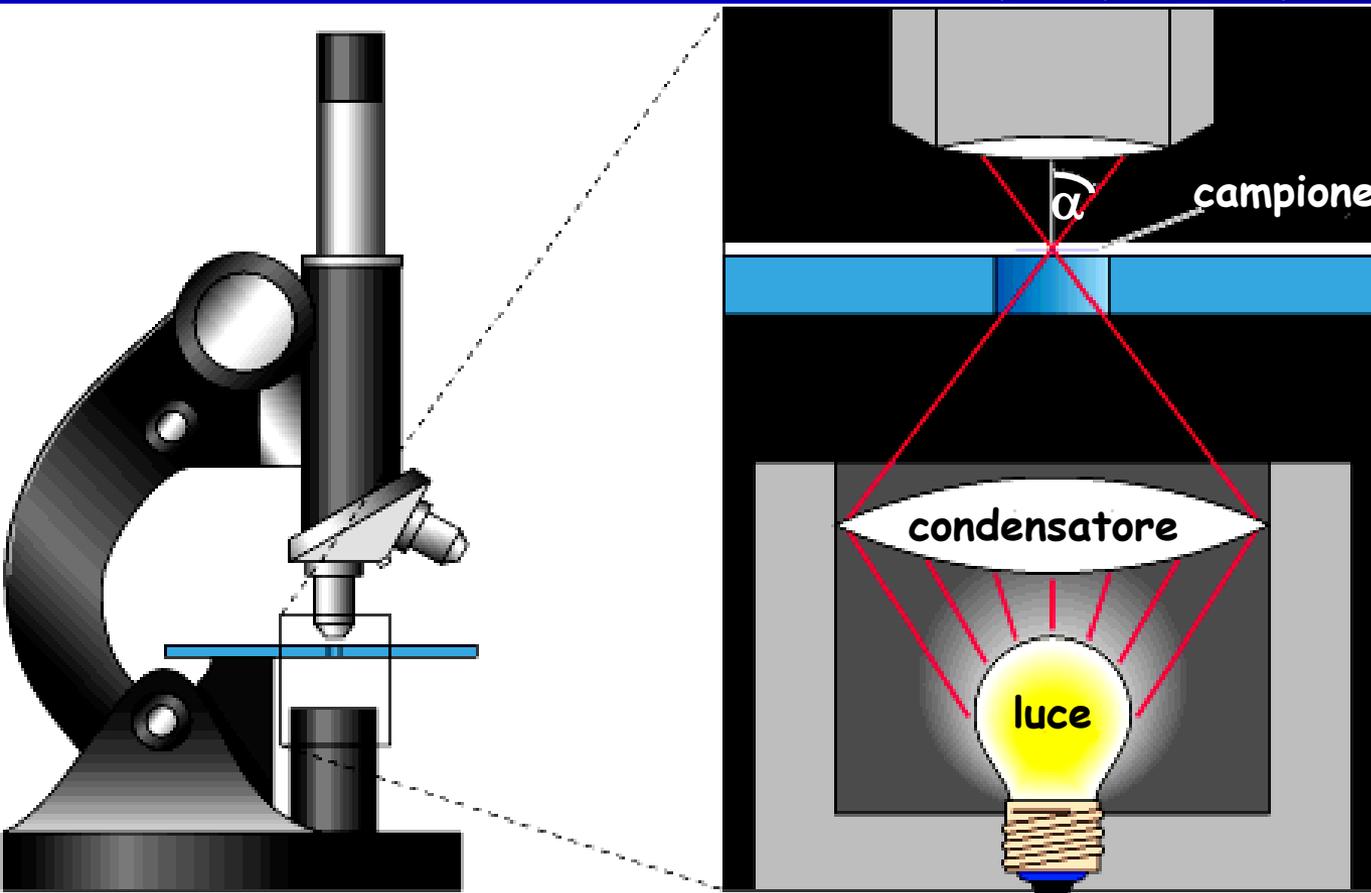
# Come si studiano le cellule e le macromolecole

## Microscopia ottica

Il limite di risoluzione del M.O. è di circa  $0,2 \mu\text{m}$ . Significa che due oggetti separati da una distanza minore di  $0,2 \mu\text{m}$  non sono distinguibili.

$0,61 \lambda$  → lunghezza d'onda luce visibile =  $0,5 \mu\text{m}$

**Risoluzione** =  $\frac{0,61 \lambda}{NA}$  → apertura numerica: può essere immaginata come le dimensioni del cono di luce che entra nella lente del microscopio dopo essere passata attraverso il campione



Può essere al max  $90^\circ$   
 $\text{sen}90 = 1$

$$NA = \eta \text{ sen } \alpha$$

Indice di rifrazione:  
Aria = 1  
Olio = 1,4

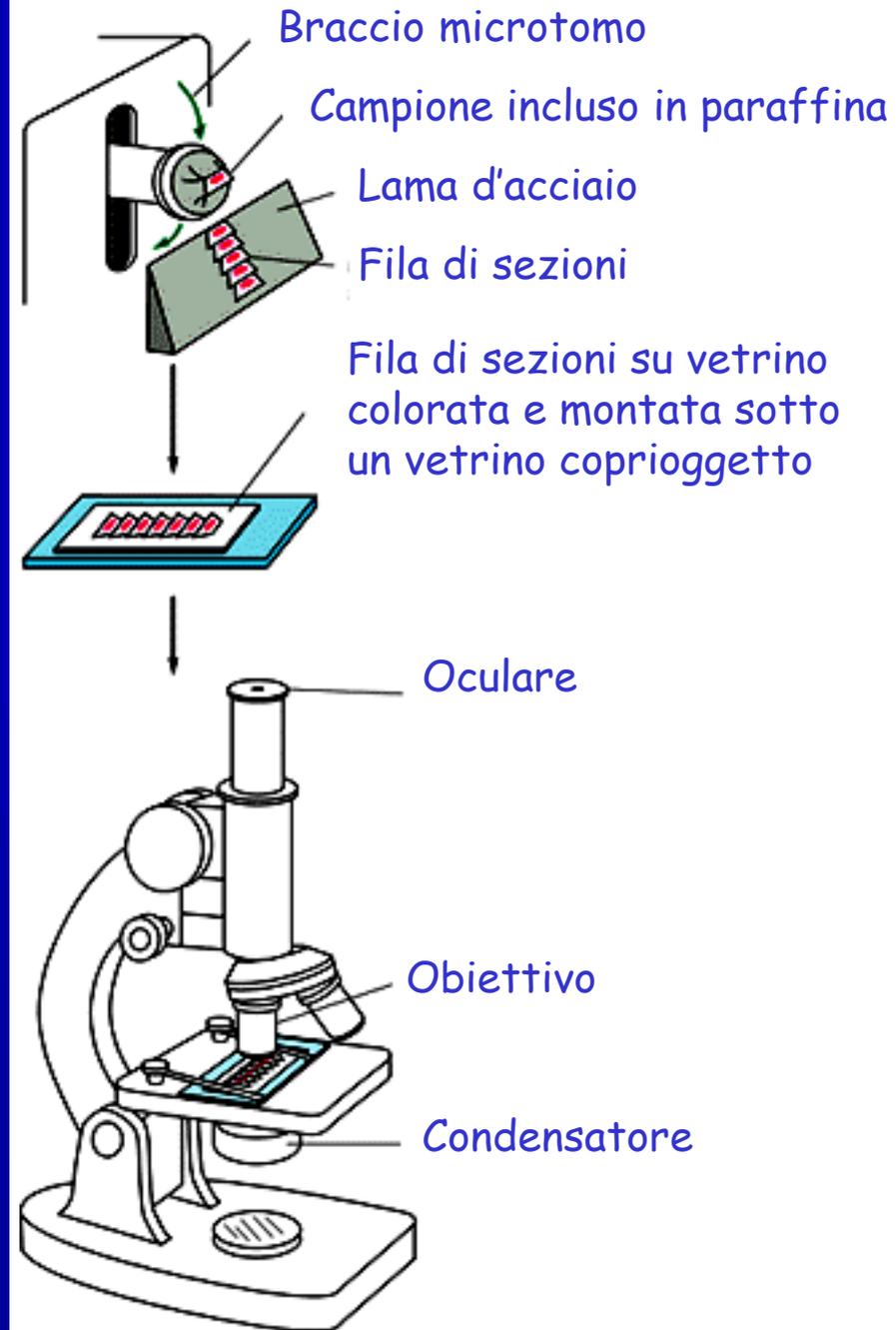
allora

$$\text{Risoluzione} = \frac{0,61 \times 0,5}{1,4} = 0,22 \mu\text{m}$$

## Microscopia in campo chiaro

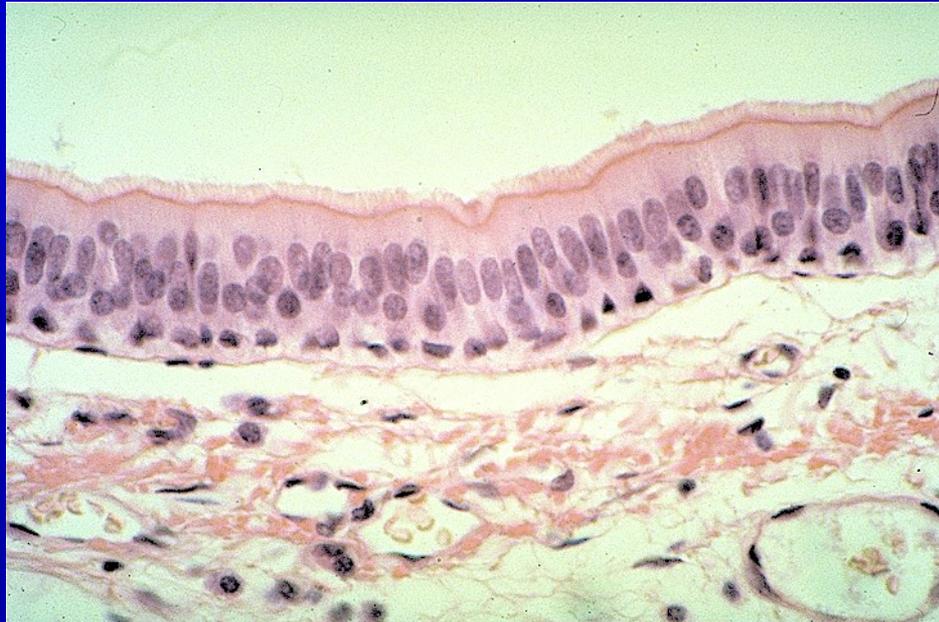
Il tessuto da studiare viene:

1. **Tagliato** al microtomo in fettine sottilissime
2. **Fissato** per stabilizzare e conservare le strutture
3. **Colorato** con sostanze che reagiscono con pt o acidi nucleici per migliorare il contrasto fra parti diverse della cell
4. Studiato al **microscopio in campo chiaro** in cui la luce passa direttamente **attraverso** la cellula



## Microscopia in campo chiaro

È il più semplice: la luce passa direttamente attraverso la cellula.

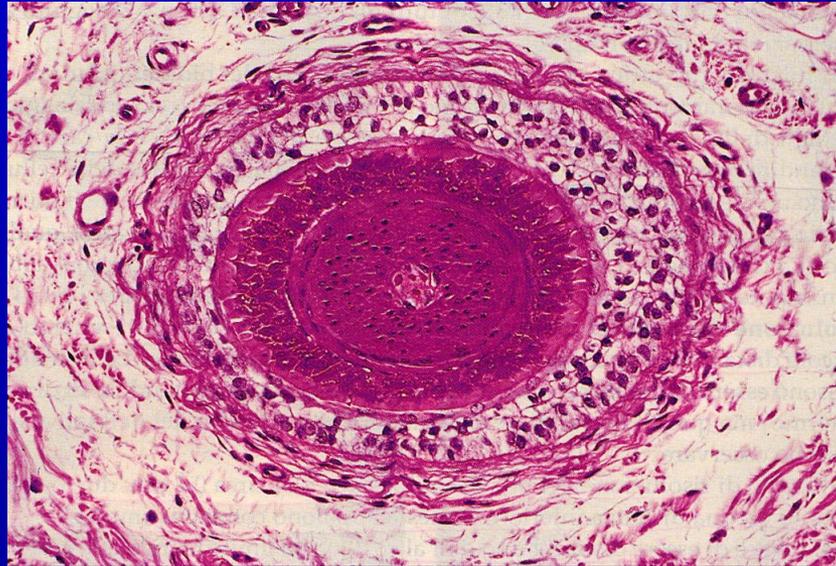


Esempio: Sezione di tessuto epiteliale pseudostratificato colorato con **ematossilina** (colora i nuclei) e **eosina** (colora le proteine del citoplasma).

## Microscopia in campo chiaro

La capacità di distinguere parti diverse della cellula dipende dal **contrasto** che risulta dall'assorbimento della luce visibile da parte dei componenti della cellula

La colorazione aumenta il contrasto

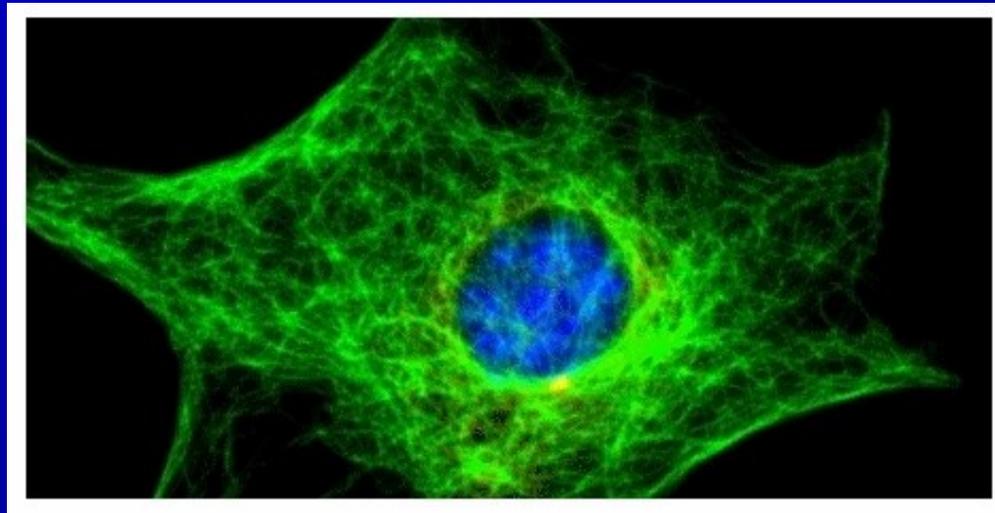


Sezione trasversale di un follicolo pilifero di pelle umana colorato con **ematossilina** (colora i nuclei) e **eosina** (colora le proteine del citoplasma).

# Microscopio a fluorescenza

L'**immunofluorescenza** è uno strumento utile per studiare la distribuzione intracellulare delle molecole.

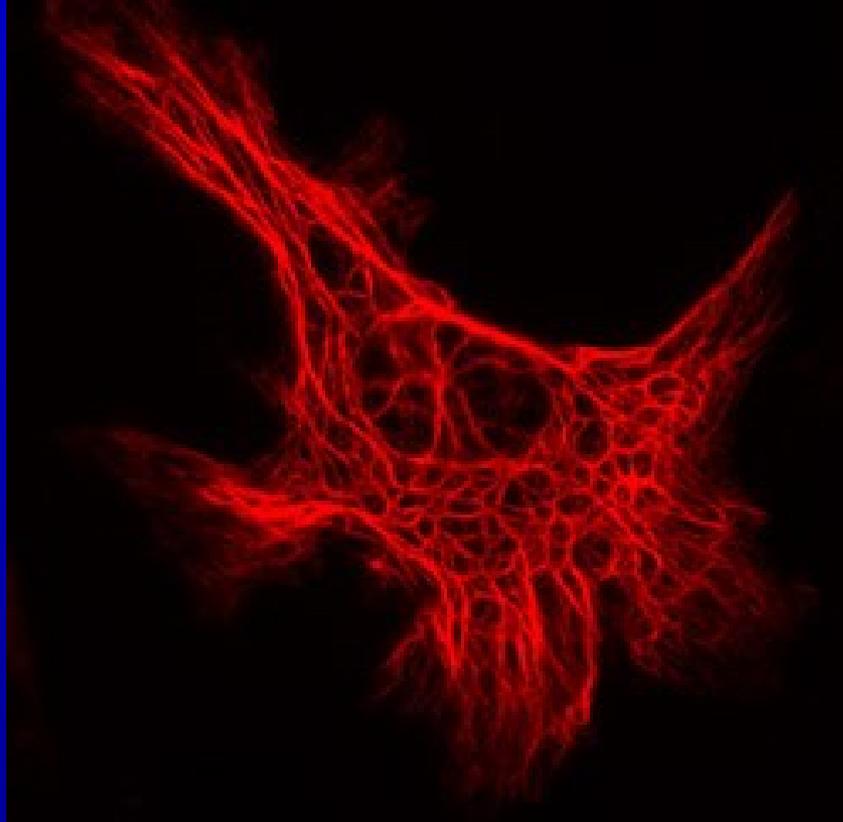
Si usa un composto **fluorescente** per marcare la molecola che interessa, sia in cellule fissate che in cellule vive.



**Fibroblasti embrionali di topo 3T3.**  
Colorazione della tubulina del  
citoscheletro con fluoresceina.

# Microscopio a fluorescenza

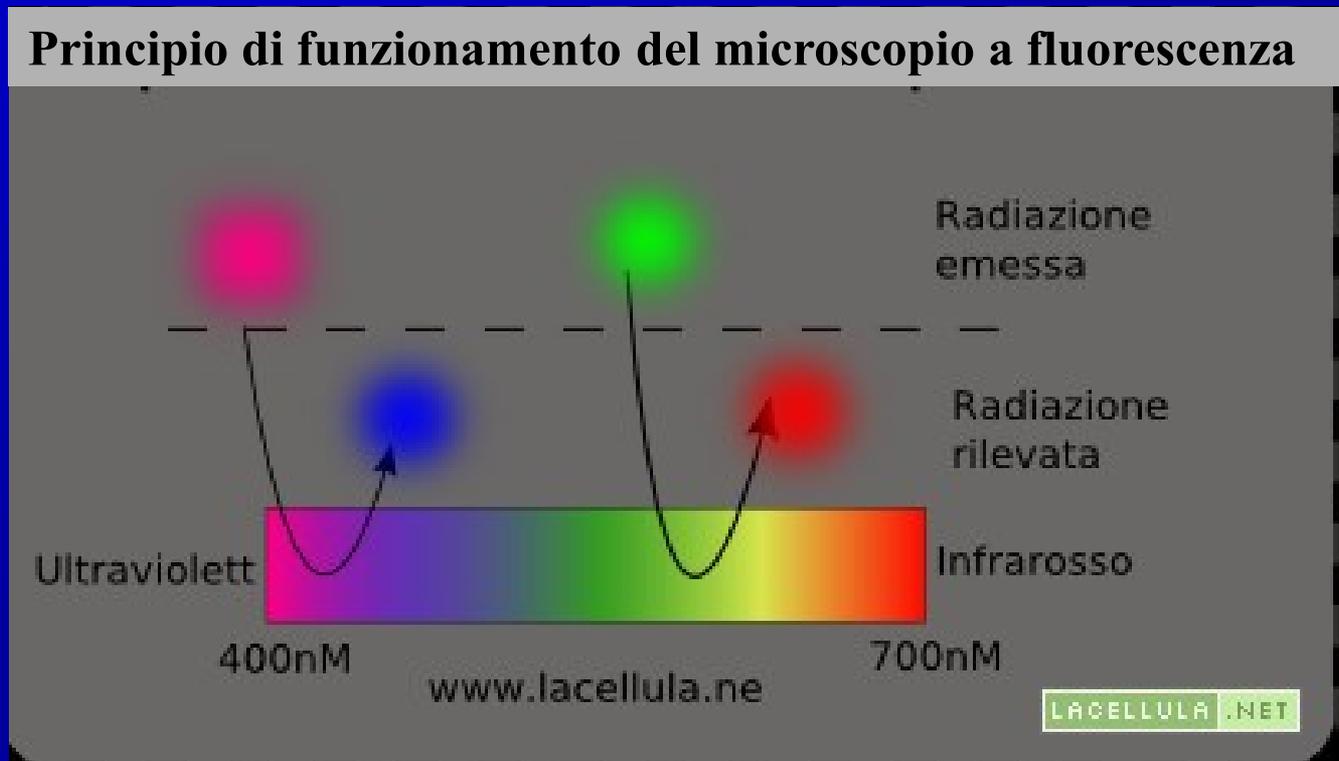
La **sostanza fluorescente** è una molecola che assorbe la luce ad una lunghezza d'onda ed emette luce ad un'altra lunghezza d'onda.



**Cellula epiteliale timica umana.**  
Colorazione delle citocheratine del  
citoscheletro con rodamina.

# Microscopio a fluorescenza

La fluorescenza viene rivelata illuminando il campione con una luce di **lunghezza d'onda** tale che **eccita il composto fluorescente** e, usando filtri appropriati, si rivela la lunghezza d'onda specifica della **luce emessa** dalla sostanza.



# Come si studiano le cellule e le macromolecole

## La microscopia elettronica

Tecnica sviluppata negli **anni '30**  
Applicata in camp. biologico: anni '40-'50

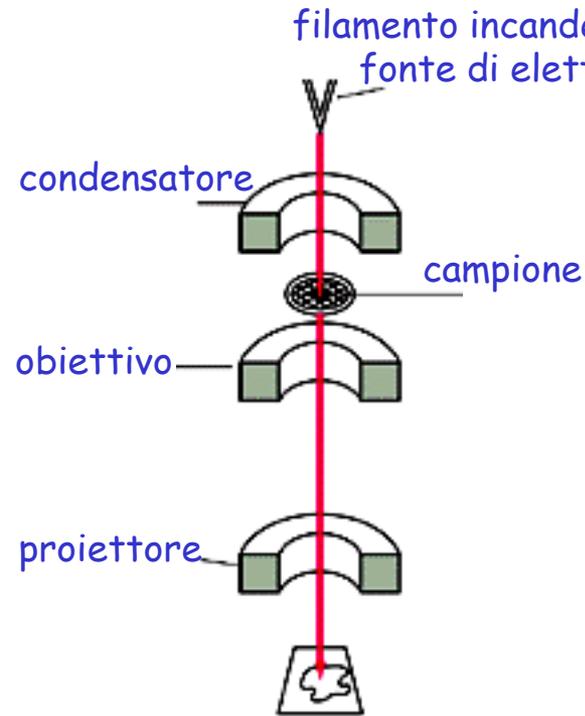
La luce visibile viene sostituita da un **fascio di elettroni** che attraversano il campione in esame  
Le lenti sono **elettromagnetiche**

In condizioni ottimali il potere di risoluzione del M.E. è di **0,2 nm**; di fatto è di **1-2 nm**

Il potere di risoluzione aumenta perché la lunghezza d'onda degli  $e^-$  è minore della lunghezza d'onda della luce (0,004 nm)



# La microscopia elettronica: microscopio elettronico a trasmissione



M. E.  
A TRASMISSIONE

TEM:

assomiglia ad un microscopio ottico, che si serve di:

**fascio di elettroni** anziché di un raggio di luce

e

**avvolgimenti elettromagnetici** anziché di lenti di vetro

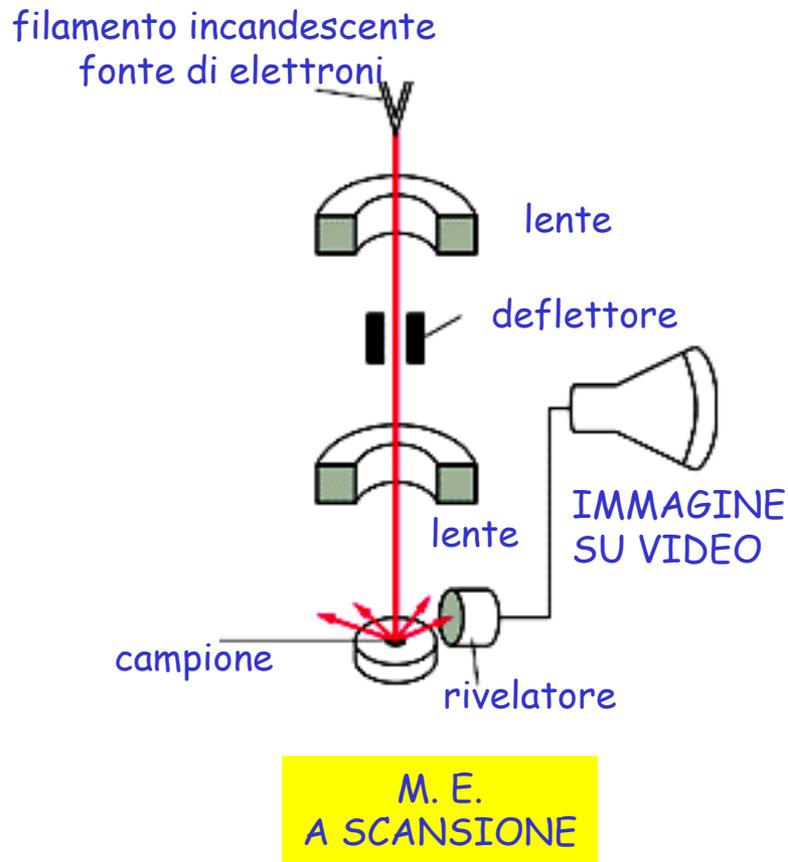
Il campione va posto nel **vuoto** e deve essere sottilissimo. Il **contrasto** si ottiene generalmente con **coloranti a base di metalli pesanti densi agli elettroni**, che li assorbono o li diffondono localmente, sottraendoli al fascio che attraversa il campione

Ingrandimento di un milione di volte

Risoluzione di circa **2 nm**

# La microscopia elettronica: microscopio elettronico a scansione

## SEM:

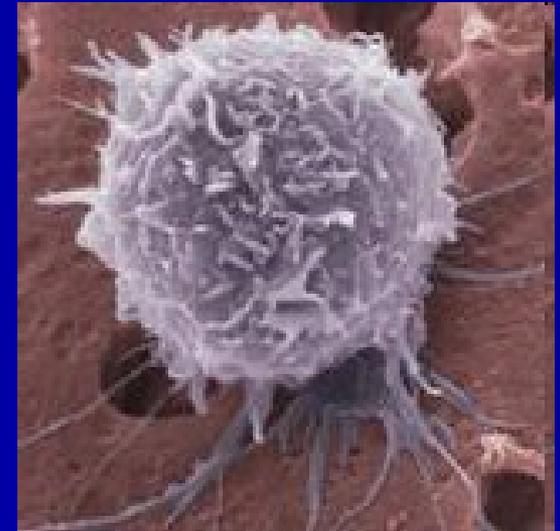
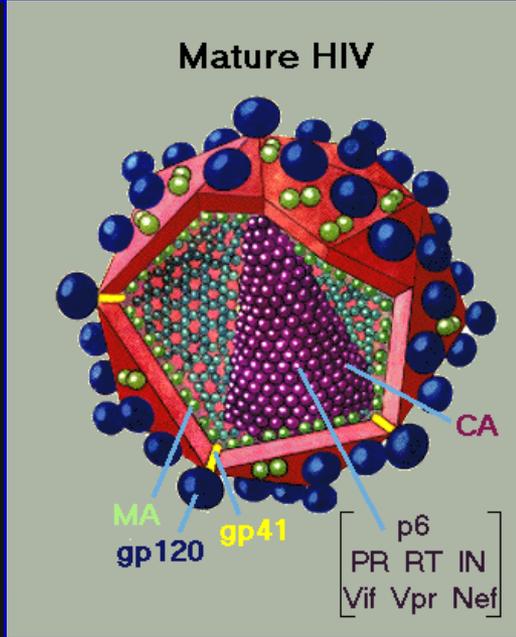
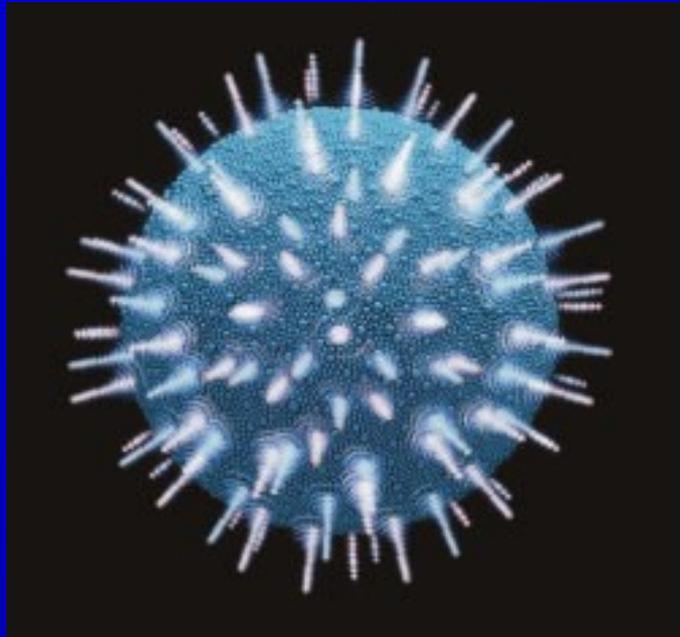


il **campione rivestito** di un velo sottilissimo di un metallo pesante, viene **esplorato (scansione)** da un **pennello di elettroni** foccheggiato da elettromagneti (che fungono da lenti nei microscopi elettronici)

La quantità di **elettroni diffusi o emessi** man mano che il pennello colpisce ogni punto successivo sulla superficie del campione viene misurata da un **rivelatore**, che regola l'intensità di un altro raggio deputato a visualizzare i punti corrispondenti su uno **schermo**, dove si forma l'immagine.

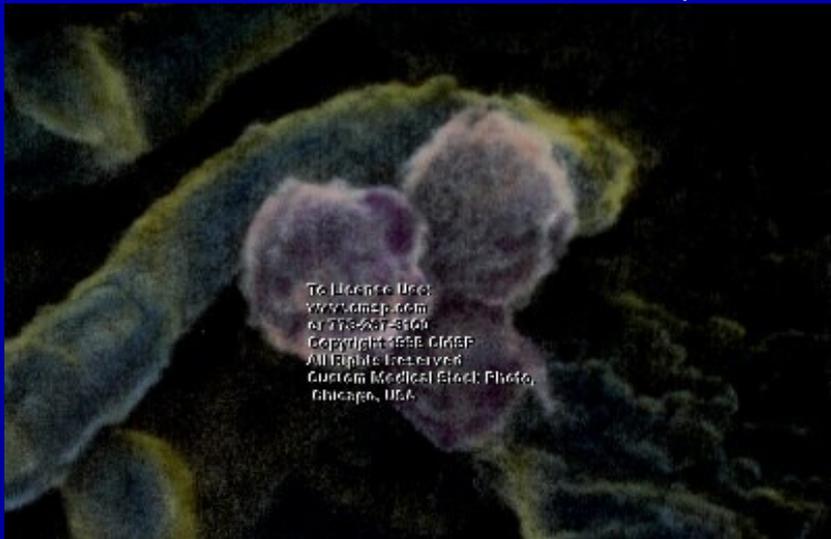
Il microscopio produce **immagini stupefacenti di oggetti tridimensionali** con grande profondità di campo e una risoluzione compresa tra 3 e 20 nm

# La microscopia elettronica

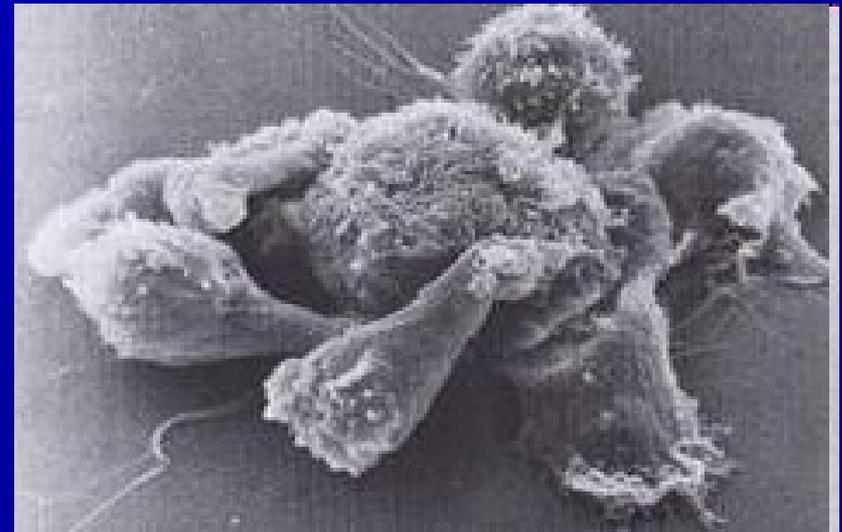


**Cellula staminale del midollo osseo**

**HIV (human immunodeficiency virus)**



**M.E.S. Il virus HIV su una cellula T**



**Cellula cancerogena aggredita da un gruppo di linfociti**

# COME SI STUDIANO LE CELLULE

Dimensioni delle cellule

Microscopio ottico

Microscopio a fluorescenza

Microscopio elettronico

**MICROSCOPIA**



**CELLULE**

Colture cellulari

FACS

Centrifuga

Frazionamento subcellulare

Centrifugazione in gradiente di densità

Southern

Northern

**ACIDI NUCLEICI**

Western

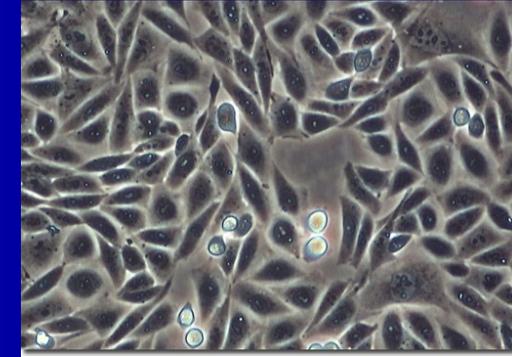
SDS page

**PROTEINE**

Immunoistochimica

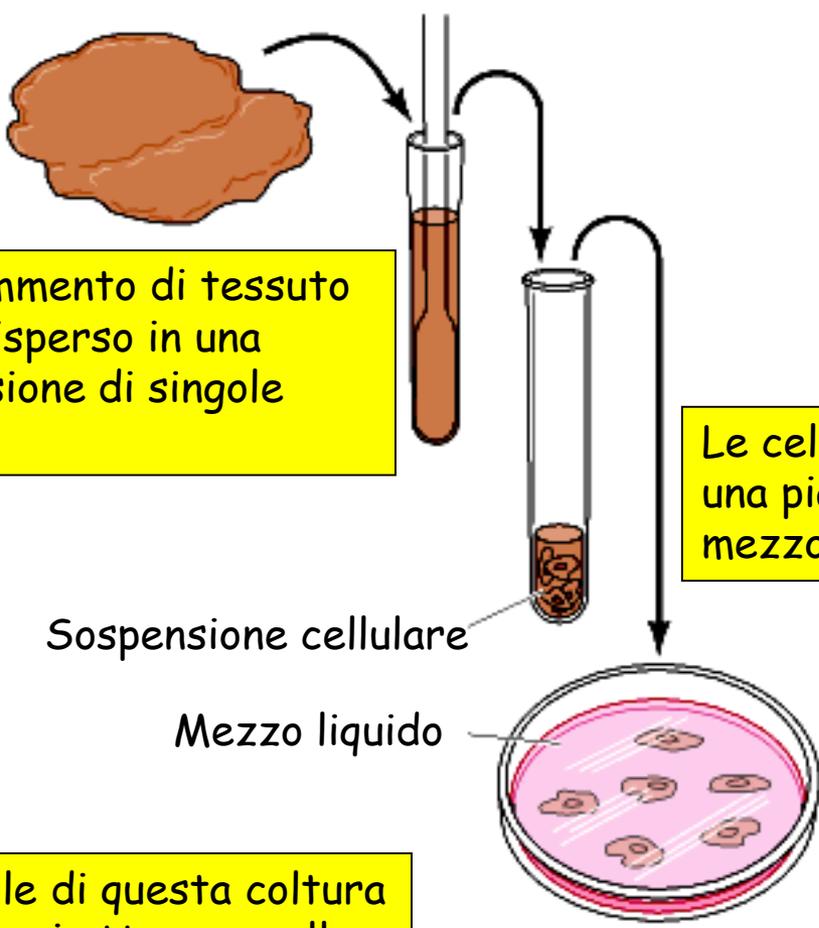
# Come si studiano le cellule e le macromolecole

## Crescita di cellule animali in coltura



Cellule di ovaio di criceto

Tessuto

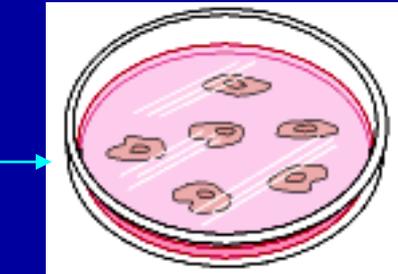
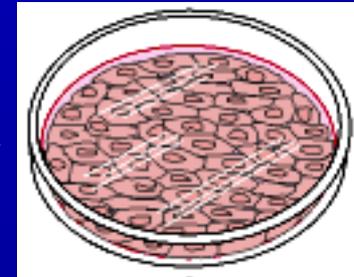


Un frammento di tessuto viene disperso in una sospensione di singole cellule.

Le cellule sono piastrate in una piastra di coltura in un mezzo nutriente

Coltura primaria

Le cellule di questa coltura primaria si attaccano alla piastra e crescono fino a coprirne la superficie.



Coltura secondaria

Le cellule possono quindi essere rimosse dalla piastra di coltura e ripiastrate a densità minore per formare una coltura secondaria.

# Come si studiano le cellule e le macromolecole

## Crescita di cellule animali in coltura

**Composizione di un tipico terreno adatto alla coltivazione di cellule di mammifero:**

<b>Amminoacidi</b>	<b>Vitamine</b>	<b>Sali</b>	<b>Vari</b>	<b>Proteine</b> (necessarie nei mezzi privi di siero chimicamente definiti)
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosio	Insulina
Cisteina	Colina	KCl	Penicillina	Transferrina
Fenilalanina	Folato	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Streptomicina	Fattori di crescita specifici
Glutammina	Nicotinammide	NaHCO <sub>3</sub>	Rosso fenolo	
Isoleucina	Panotenato	CaCl <sub>2</sub>	Siero intero	
Leucina	Piridossale	MgCl <sub>2</sub>		
Leucina	Riboflavina			
Lisina	Tiamina			
Metionina				
Tirosina				
Treonina				
Triptofano				
Valina				

Come si studiano le cellule e le macromolecole

Crescita di cellule animali in coltura



Incubatore a CO<sub>2</sub>



Cappa a flusso laminare

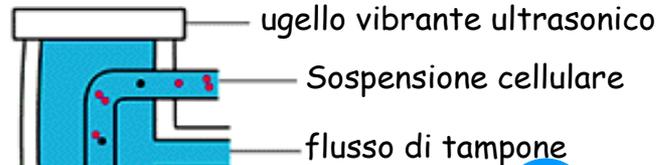
# Isolamento e crescita in coltura delle cellule

## Separatore cellulare attivato dalla fluorescenza (fluorescence activated cell sorter, **FACS**)

Si dissocia il tessuto in singole cellule vitali tramite l'utilizzo di enzimi proteolitici  
Si fanno reagire le cellule con un anticorpo coniugato con un fluoroforo  
e tramite FACS si separano i diversi tipi cellulari da una sospensione cellulare mista

1

Quando una cellula passa attraverso il raggio laser, la sua fluorescenza viene controllata.



3

Le goccioline sono poi deflesse da un campo elettrico in provette diverse secondo la loro carica.

gocce contenenti  
singole cellule **fluorescenti**  
vengono caricate **negativamente**

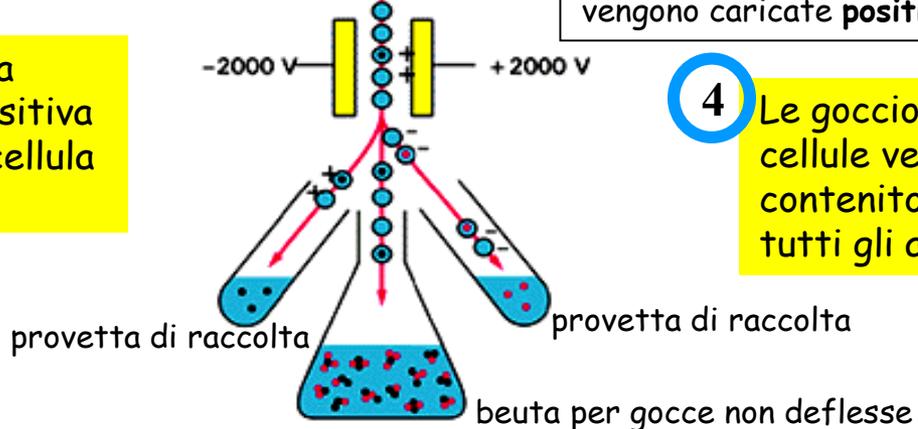
gocce contenenti  
singole cellule **non fluorescenti**  
vengono caricate **positivamente**

2

Goccioline contenenti una sola cellula ricevono una carica positiva o negativa, a seconda che la cellula sia fluorescente o no.

4

Le goccioline che non contengono cellule vengono deviate in un contenitore separato insieme a tutti gli aggregati di cellule

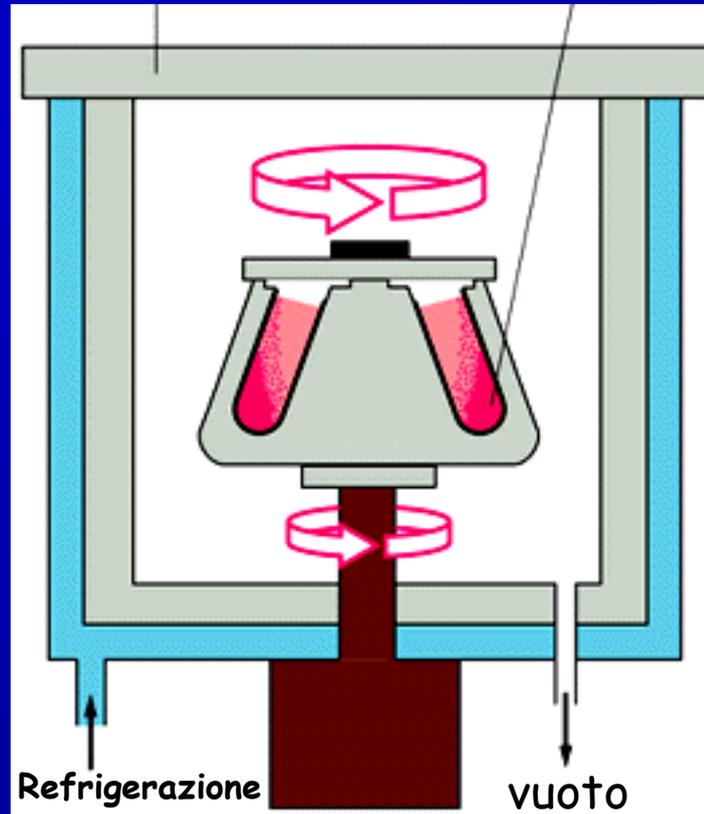


# Come si studiano le cellule: Frazionamento subcellulare L'ultracentrifuga preparativa

camera corazzata      materiale che sedimenta



La centrifuga è rivestita da una grossa armatura, perchè un rotore mal equilibrato può sganciarsi e causare una fuoriuscita esplosiva di energia.



La centrifugazione è il metodo più usato per separare l'omogenato nei suoi componenti, o frazioni. Le ultracentrifughe moderne raggiungono velocità di 100 000 giri al minuto e generano forze enormi, anche pari a 600 000 volte la forza di gravità.

Refrigerazione

vuoto

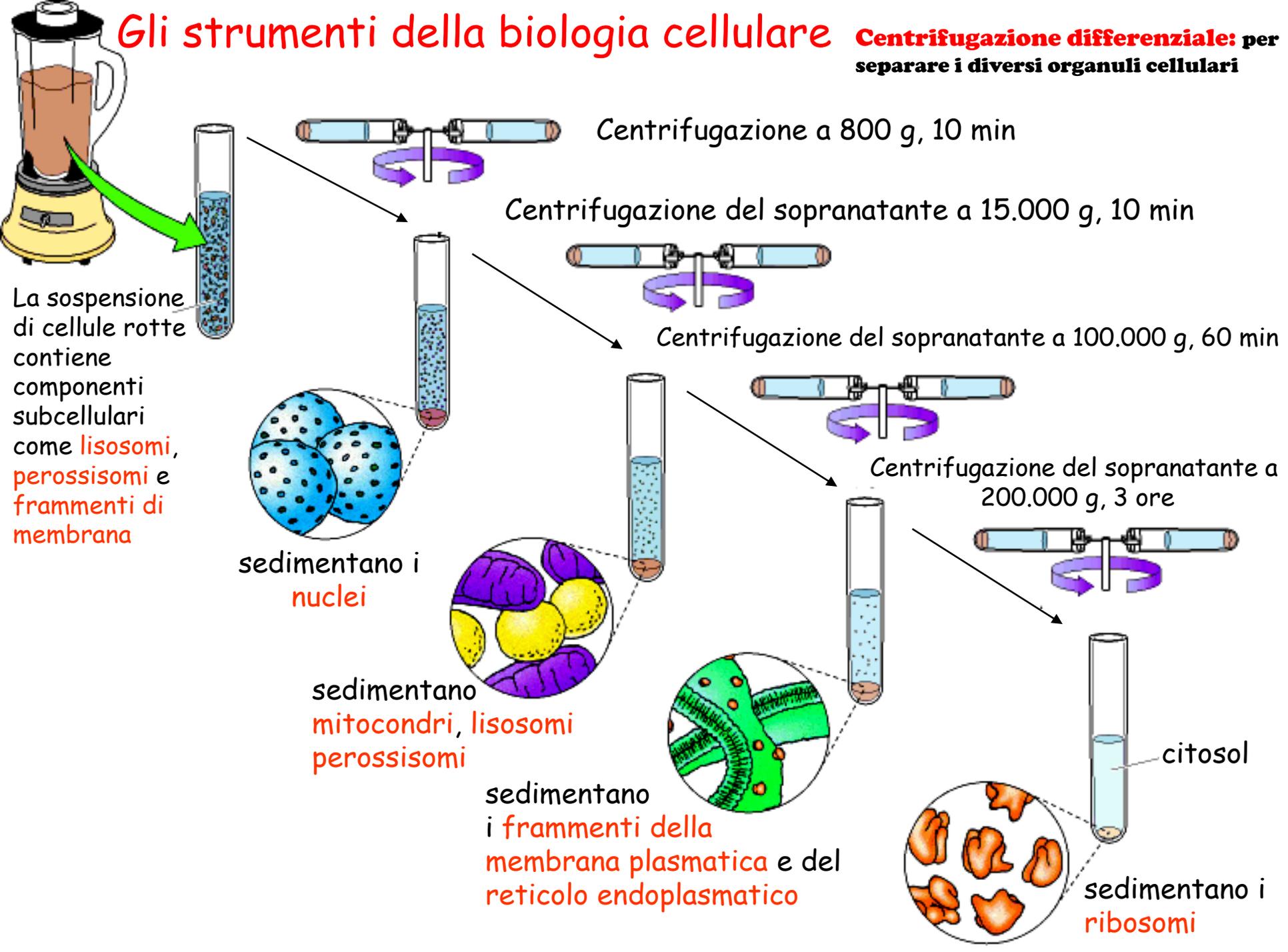
motore



A queste velocità le camere centrifughe devono essere raffreddate e svuotate dall'aria, in modo che l'attrito non scaldi l'omogenato.

# Gli strumenti della biologia cellulare

**Centrifugazione differenziale:** per separare i diversi organuli cellulari



# COME SI STUDIANO LE CELLULE

Dimensioni delle cellule

Microscopio ottico

Microscopio a fluorescenza

Microscopio elettronico

**MICROSCOPIA**

**CELLULE**

Colture cellulari

FACS

Centrifuga

Frazionamento subcellulare

Centrifugazione in gradiente di densità

Southern

Northern

**ACIDI NUCLEICI**

Western

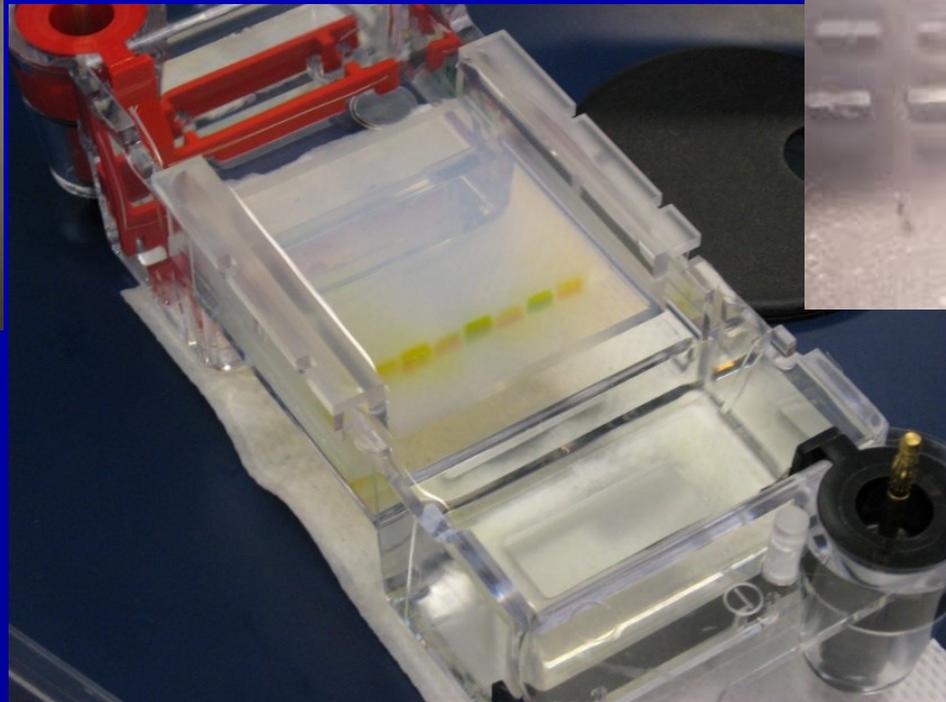
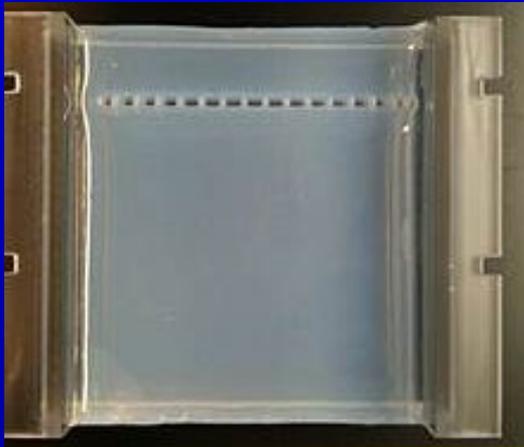
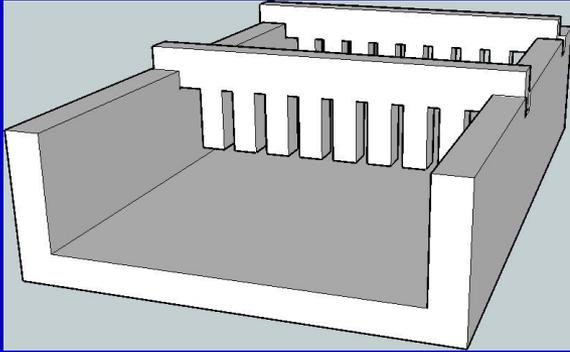
SDS page

Immunoistochimica

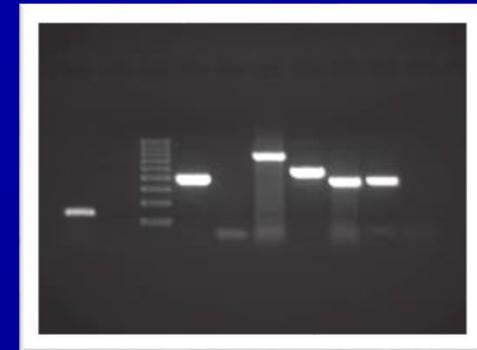
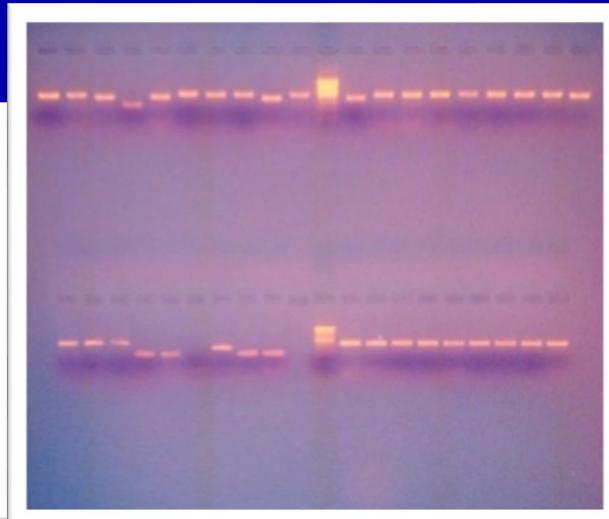
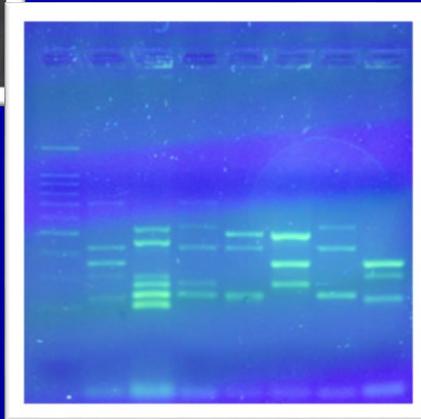
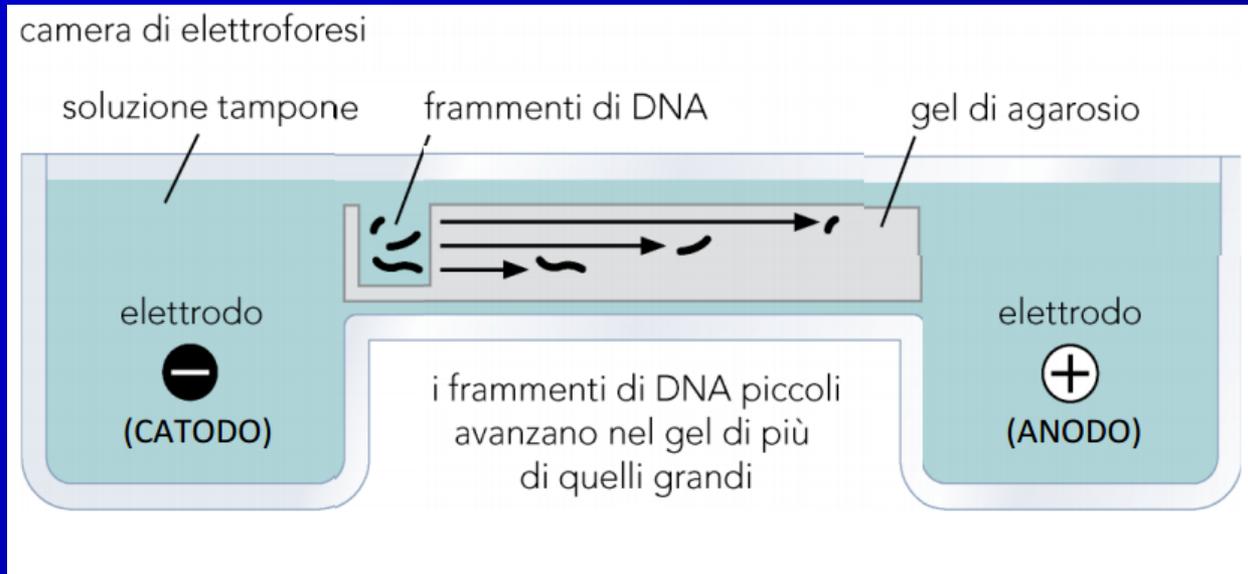
**PROTEINE**



# Elettroforesi su gel d'agarosio

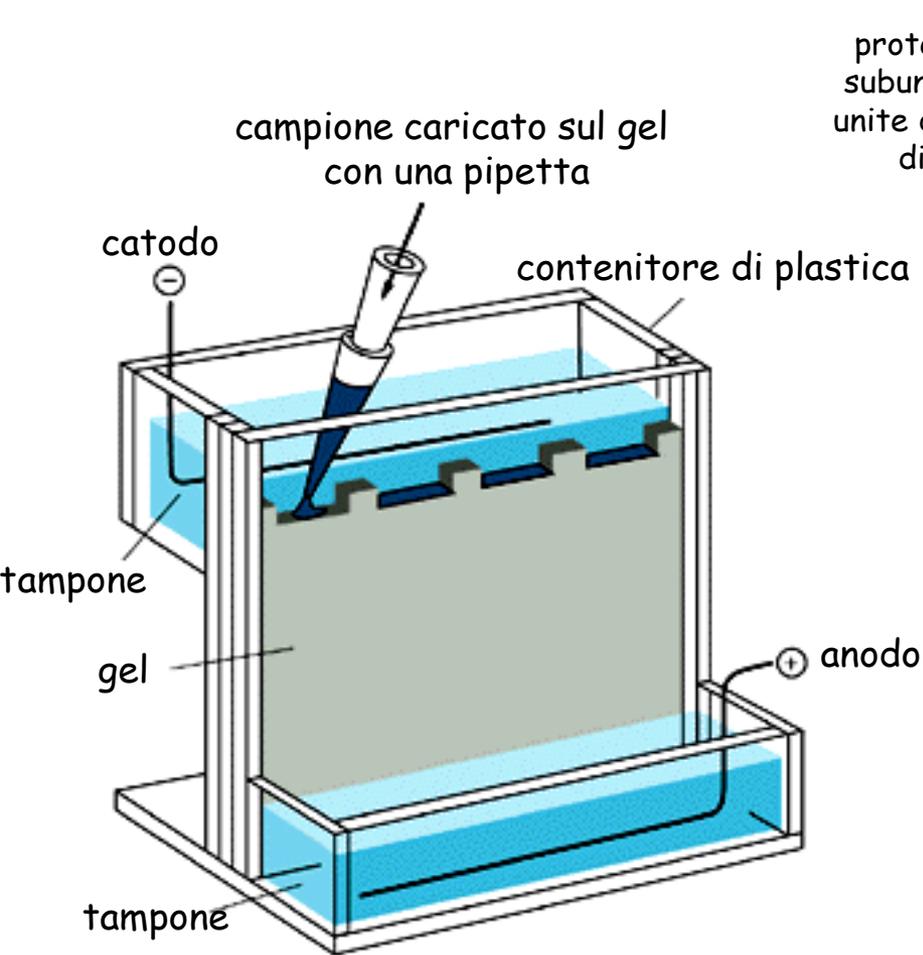


# Elettroforesi su gel d'agarosio

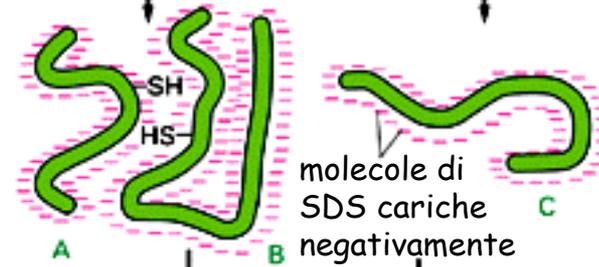


# Come si studiano le macromolecole: le proteine

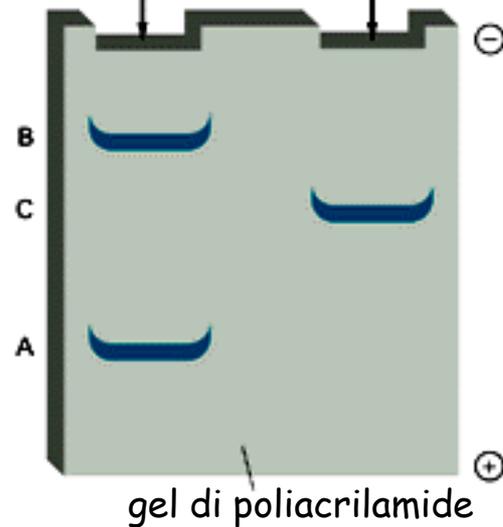
Le dimensioni e la composizione in subunità di una proteina possono essere determinate mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS (SDS-PAGE)



RISCALDAMENTO CON SDS E MERCAPTOETANOLO



ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMIDE



# Marcatura di DNA, RNA, proteine

Gene P

DNA



Il DNA viene tagliato con enzimi di restrizione



RNAm del gene P



RNA totale

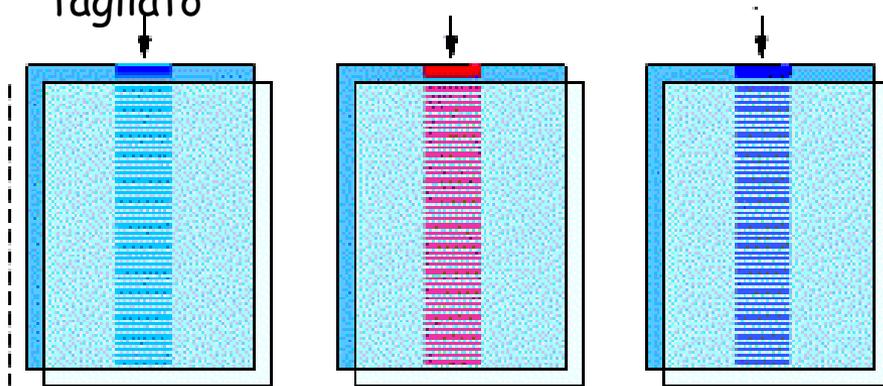
Proteina del gene P



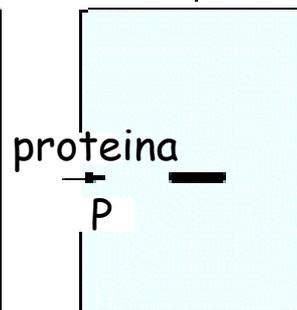
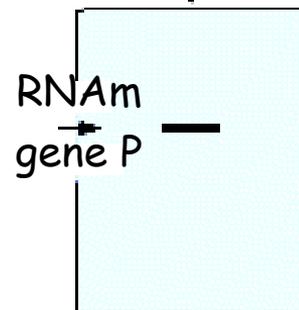
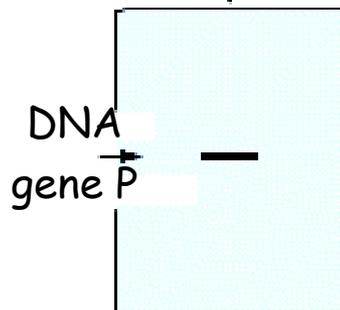
Proteine totali

elettroforesi

frazionamento



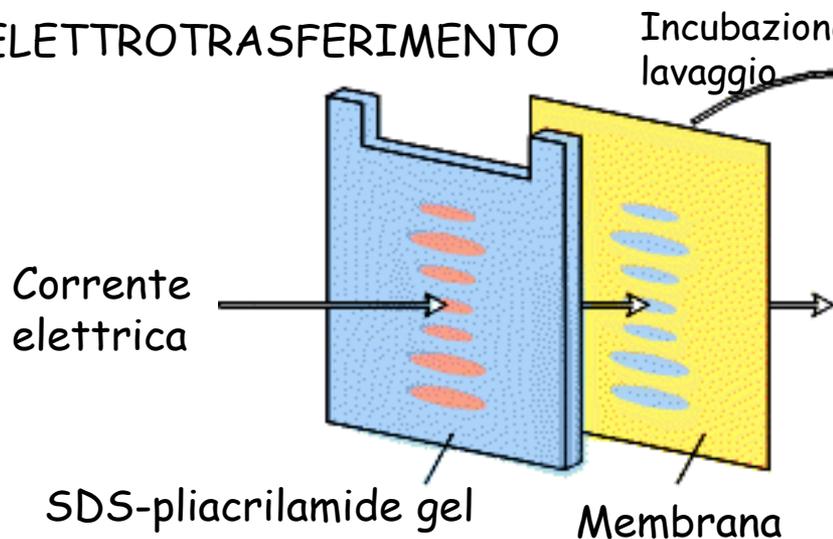
Southern blot Northern blot Western blot



# Come si studiano le macromolecole: le proteine

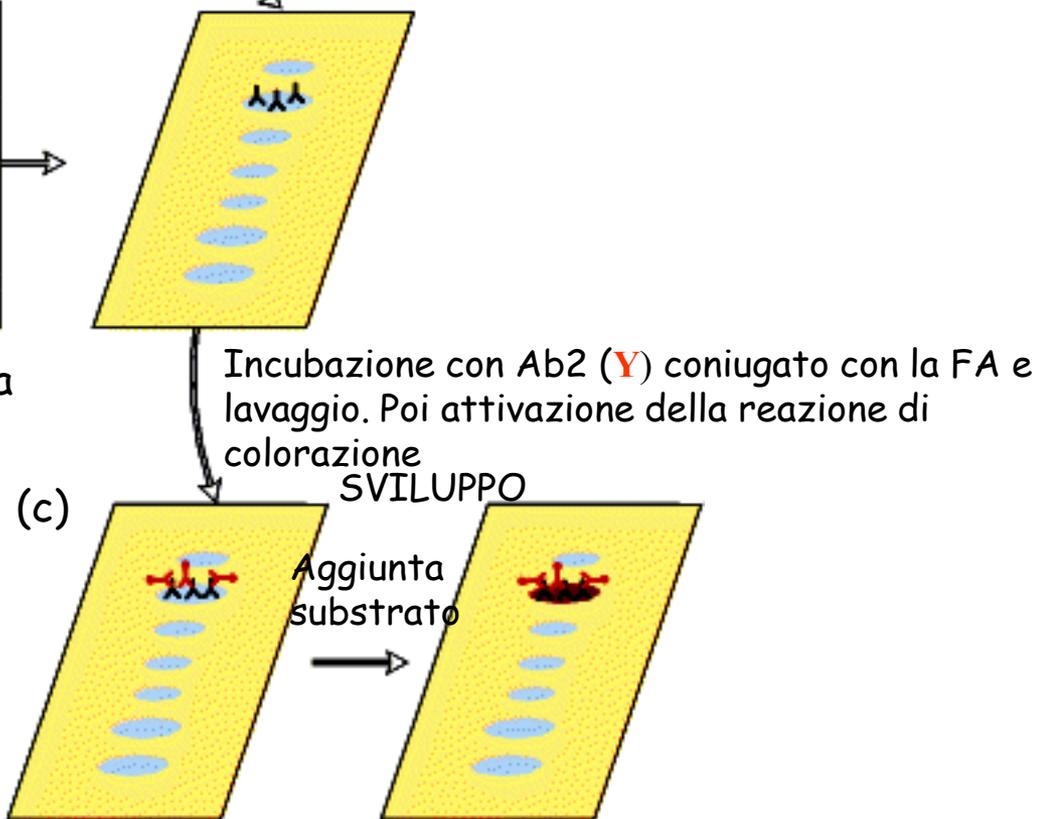
Per identificare una particolare proteina in una miscela totale di proteine si ricorre all'utilizzo della corsa elettroforetica su gel, di un anticorpo specifico primario e di uno secondario coniugato con un enzima che rivela un segnale colorimetrico. Questa tecnica prende il nome di **Western blotting o immunoblotting**.

## (a) ELETTROTRASFERIMENTO



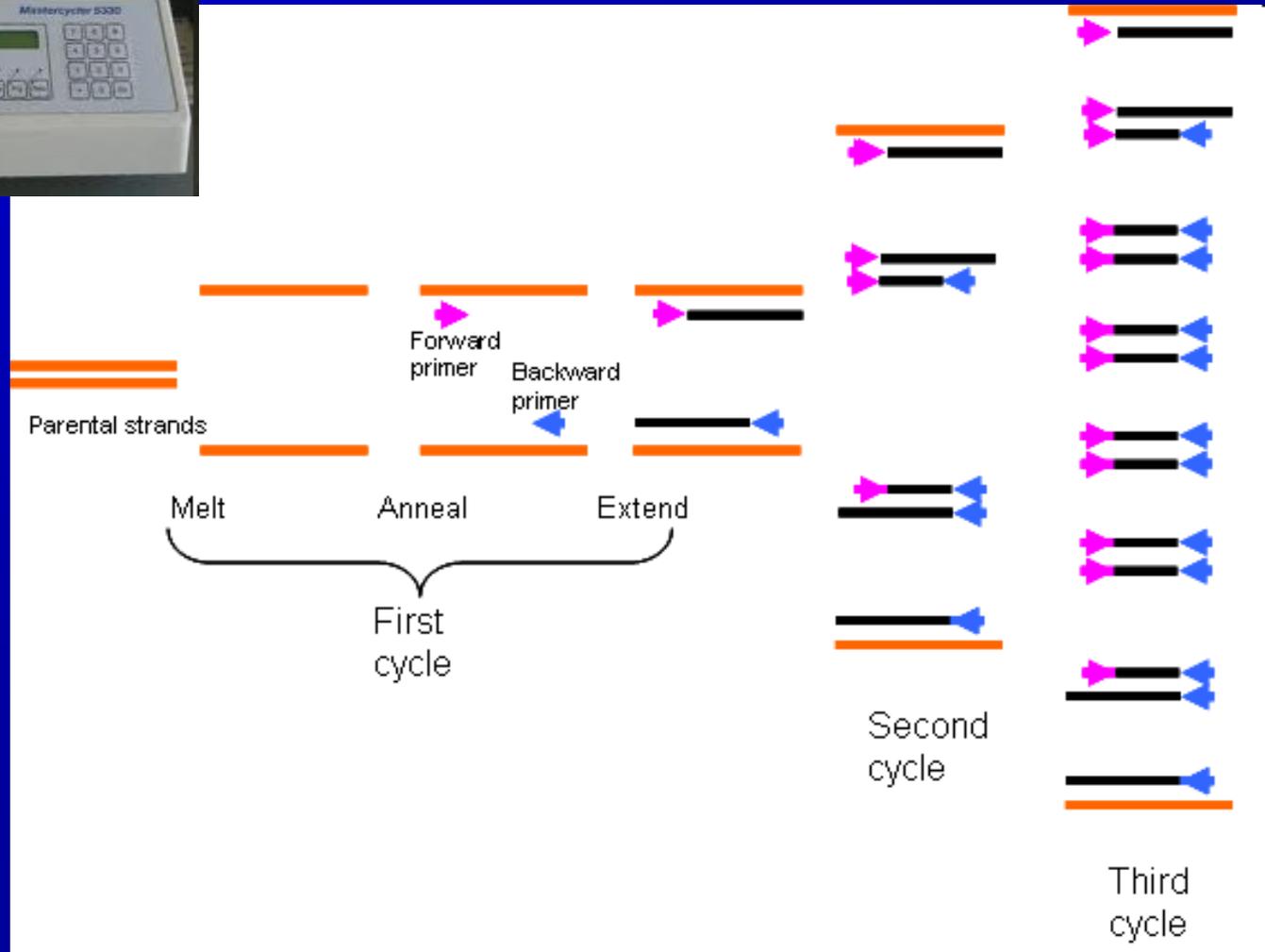
Incubazione con Ab1 (Y) e lavaggio

## (b) LEGAME ANTICORPO ANTIGENE

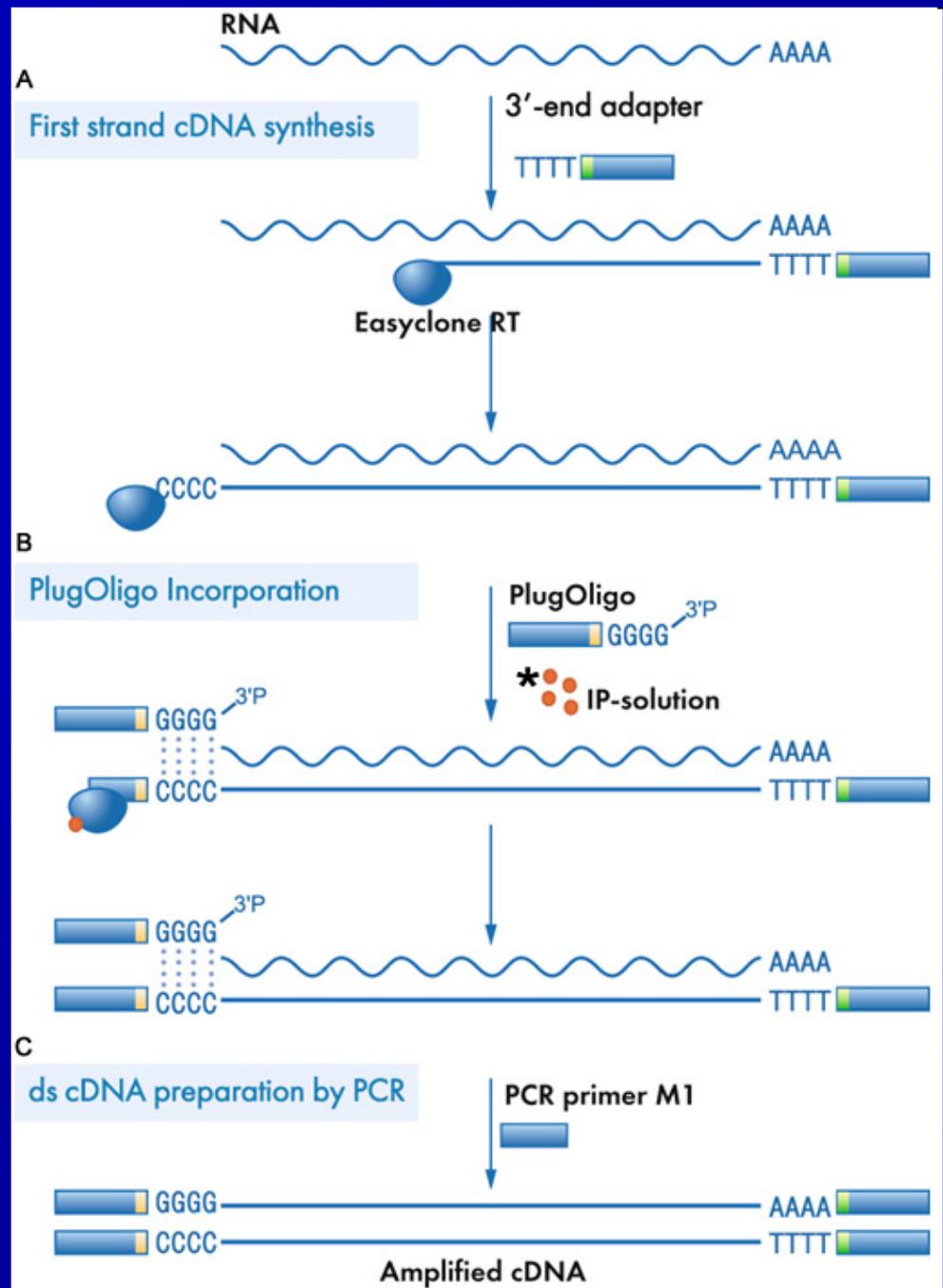


- Le proteine totali vengono fatte migrare su un gel di poliacrilamide-SDS e trasferite su una membrana.
- La membrana viene incubata con un anticorpo specifico (Ab1) che riconosce un epitopo specifico della proteina di interesse. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario la membrana viene lavata per togliere l'anticorpo in eccesso.
- La membrana viene incubata con un anticorpo secondario (Ab2) che si lega al primario. L'Ab2 è covalentemente legato all'enzima fosfatasi alcalina (FA) che catalizza una reazione cromogenica in presenza di un adeguato substrato. In questo modo si forma un precipitato scuro che permette di visualizzare la proteina desiderata.

# PCR

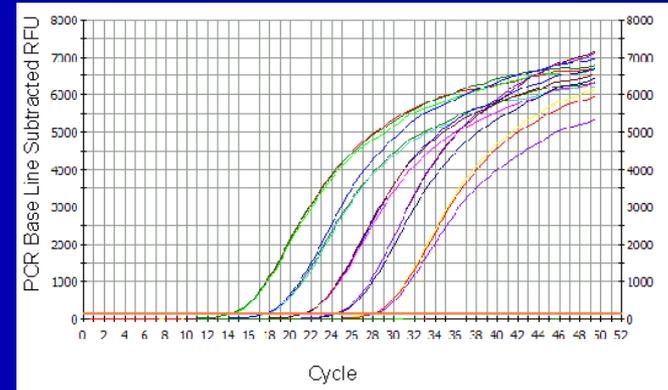


# RT-PCR (retrotrascrizione)



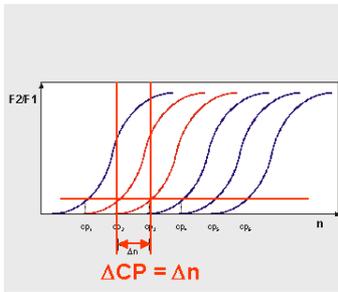
# Real-time PCR

(seconda generazione della PCR)



## Calculation of real-time PCR efficiency

$$E = 10^{-1/\text{slope}} \Rightarrow E = 10^{-1/3.337} \Rightarrow E = 10^{0.299} \Rightarrow E = 1.99$$



$$N_2 = N_{02} \times E^{n_2} \quad N_3 = N_{03} \times E^{n_3}$$

$$\text{For } N_2 = N_3:$$

$$N_{02} / N_{03} = E^{n_3 - n_2} = E^{\Delta n}$$

$$\text{For } N_{02} = 10 \times N_{03} \text{ (10-fold dilutions):}$$

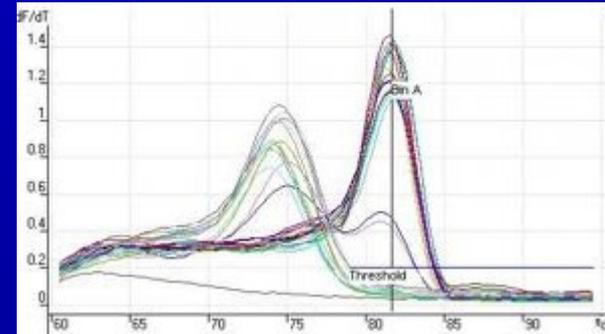
$$\Delta n = 1 / \log E \quad E = 10^{-1/\text{slope}}$$

e.g.  $E = 2.0 \quad \Delta n = 3.32$   
 $E = 1.9 \quad \Delta n = 3.58$   
 $E = 1.8 \quad \Delta n = 3.91$

Roche Diagnostics, LC rel. Quantification software, March 2001

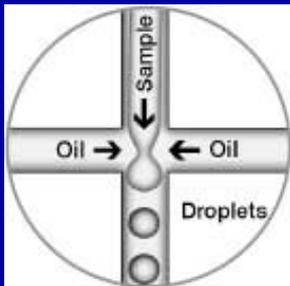
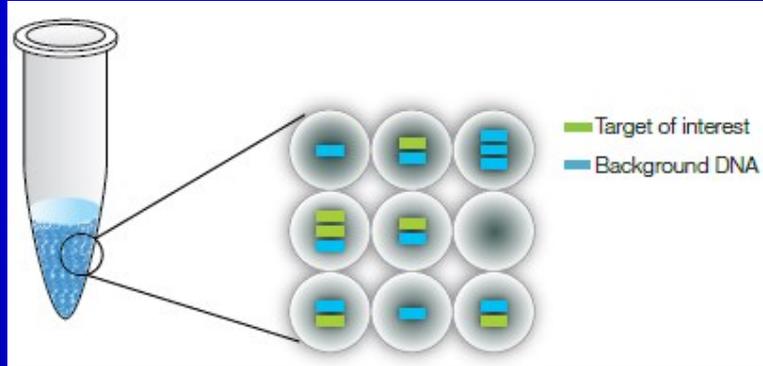
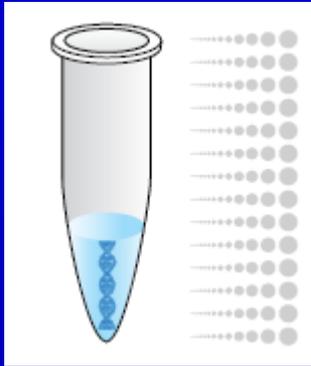
Rasmussen, R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, eds.

Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications Springer Press, Heidelberg, page 21-34

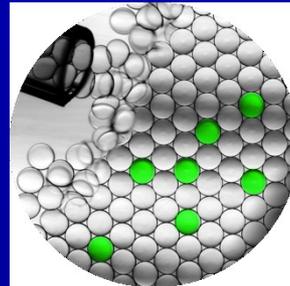


# Digital-PCR

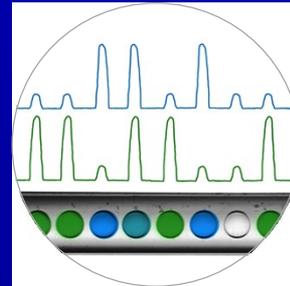
(terza generazione della PCR)



**Make Droplets**



**PCR Droplets**



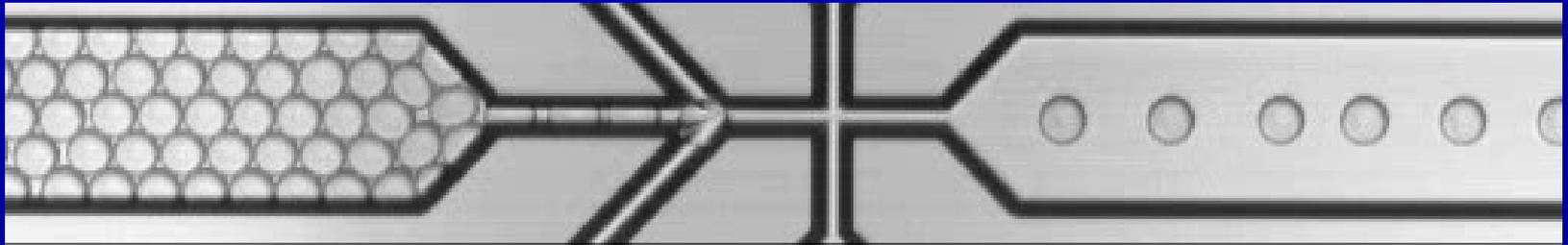
**Read Droplets**



**Results**

# Digital-PCR

(terza generazione della PCR)



10/11/2010 001284 25680.0 ms 25.680000 s

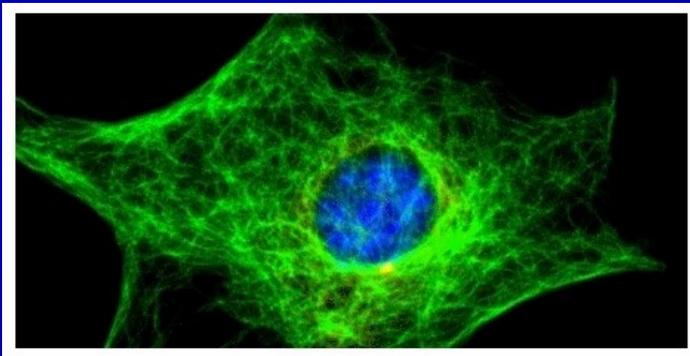
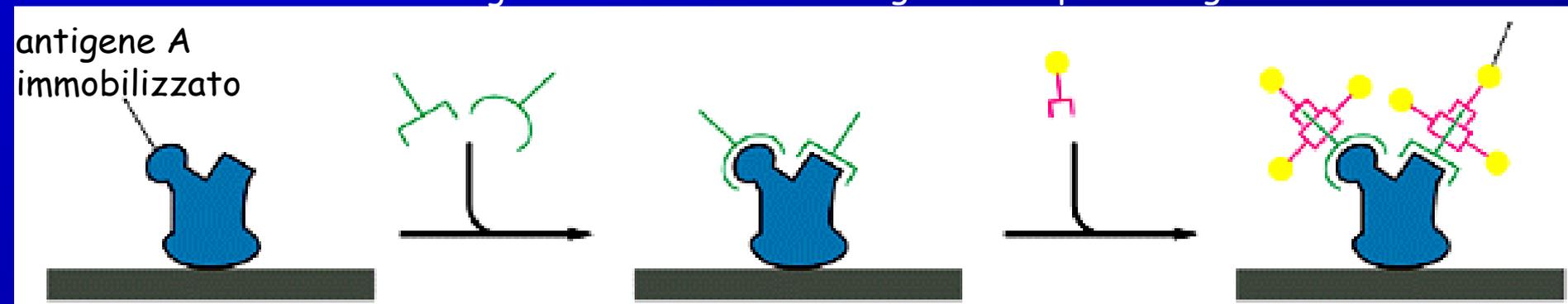
# Identificazione e studio delle molecole all'interno delle cellule

## Immunoistochimica

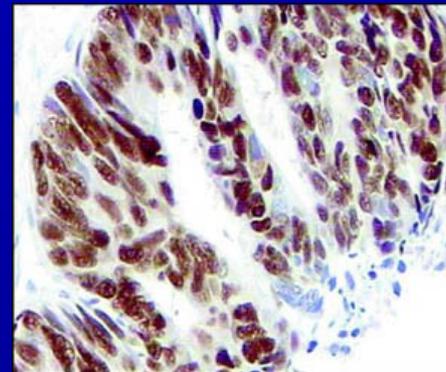
**anticorpi primari:**  
anticorpi di coniglio  
diretti contro  
l'antigene A

**anticorpi secondari:**  
anticorpi accoppiati ad un  
marcatore diretti contro  
gli anticorpi di coniglio

marcatore



**Immunofluorescenza:**  
Fibroblasti embrionali di topo T3T;  
tubulina in verde e DNA in blu



**Immunoistochimica:**  
Sovraespressione di p53 mutata in cellule  
metastatiche epatiche provenienti da un tumore  
colonrettale umano.

Estrazione acidi nucleici

Estrazione proteine

Enzimi di restrizione

Clonaggio di geni

*fine*