

COLTURE CELLULARI - IBRIDI SOMATICI

(da una tesi di laurea)

INTRODUZIONE

Osservazioni sulla fusione di cellule somatiche furono riportate già nel secolo scorso: cellule binucleate furono osservate da J. MULLER (1838) in tumori, ed in seguito da Robin nel midollo e da Virchow sia in tessuti normali che in lesioni infiammatorie e neoplastiche. Il concetto che alcune di queste cellule potessero essere prodotte dalla fusione di cellule mononucleate derivò dal lavoro di de Bary (1859), il quale osservò che il ciclo vitale di alcuni mixomiceti coinvolgeva la fusione di cellule singole per formare plasmodi multinucleati.

In seguito all'introduzione di metodi di coltura di tessuti, si sono moltiplicate le osservazioni sulla fusione cellulare in colture di tessuto animale.

Enders e Peebles (1954) scoprirono che il virus del morbillo in coltura cellulare induceva le cellule a fondersi per formare sincizi multinucleati; Okada (1958) ha dimostrato che cellule tumorali animali in sospensione potrebbero fondersi rapidamente per formare cellule giganti multinucleate usando alte concentrazioni di virus HVJ, un virus parainfluenzale.

Nel 1960 Barski ha identificato cellule generate dalla fusione spontanea in una coltura mista di due linee cellulari tumorali di topo diverse ma correlate. Queste cellule contenevano i complementi cromosomici di entrambe le cellule parentali in un singolo nucleo. Questo fenomeno è stato poi esaminato da Ephrussi e collaboratori (), i quali hanno concluso che anche differenze genetiche più grandi non escludono la fusione cellulare spontanea.

Comunque ben presto divenne chiaro che la frequenza della fusione cellulare spontanea era molto bassa e che molti tipi cellulari non si fondono spontaneamente. Per scopi di ricerca, però, la frequenza di fusione deve in qualche modo essere aumentata.

Harris e Watkins (1965) hanno trovato il modo di accelerare la fusione di varie cellule mediante l'uso del virus Sendai inattivato agli UV. Essi dimostrarono altresì che la fusione può essere indotta tra cellule provenienti da specie molto diverse e che le cellule fuse sono vitali. Con questo lavoro è cominciato l'uso esteso del metodo della fusione cellulare in varie branche della biologia cellulare.

IBRIDI SOMATICI

L'informazione genetica contenuta in cellule di diversa origine può essere combinata in un singolo nucleo attraverso la fusione cellulare. La fusione cellulare richiede che delle cellule entrino in contatto e include una breve distruzione delle membrane cellulari usando agenti chimici. Quando avviene la ricostituzione delle membrane, le cellule adiacenti possono riformare insieme le loro membrane producendo una singola cellula ibrida.

Inizialmente la cellula derivata da fusione contiene due nuclei (eterocarionte binucleato), ma dopo la divisione cellulare i corredi cromosomici delle due cellule si vengono a trovare dentro un singolo nucleo (sincarionte).

È possibile eseguire la fusione sia su due tipi di cellule che appartengono alla stessa specie (si parla in questo caso di ibridi interspecifici). Nel primo caso la cellula ibrida è una cellula che conserva l'intero assetto cromosomico delle due cellule di partenza, mentre nel secondo caso la cellula fusa tende ad eliminare i cromosomi appartenenti a un tipo di cellula.

Gli ibridi cellulari hanno trovato un largo impiego nelle strategie di mappatura.

La maggior parte degli ibridi somatici usati per il mappaggio di geni umani sono creati fondendo cellule umane e di topo o cellule umane e di hamster.

Per ragioni che non sono interamente chiare, questi ibridi tendono a perdere molti dei cromosomi umani ma trattengono l'intero assetto cromosomico murino.

I cromosomi umani sono trattenuti interamente a caso, con la eccezione del cromosoma che porti il fattore di selezione (vedi capitolo successivo). È però possibile creare un pannello di tali ibridi, dove ogni linea ibrida contiene un gruppo differente di cromosomi umani.

Perché questo pannello sia utile, è essenziale per l'utilizzatore sapere quali cromosomi umani sono presenti in ciascun ibrido.

Per identificare i cromosomi si utilizzano tecniche citogenetiche, avvantaggiate dal fatto che esistono delle differenze sufficienti tra i cromosomi umani e quelli murini da permettere una facile identificazione.

Una volta che un tale pannello di ibridi è stato generato, può essere usato nelle varie strategie di mappatura.

STRATEGIE DI SELEZIONE

La prima tecnica di fusione cellulare che è stata messa a punto prevedeva l'utilizzazione del virus Sendai inattivato ai raggi UV. Essendo tale metodo piuttosto complesso, è stato ben presto abbandonato e sostituito da un metodo più facile e più veloce che utilizza il PEG (glicole polietilenico).

Si parte da cellule umane (in genere fibroblasti o linfociti) che vengono poste a contatto con cellule di topo.

Queste cellule vengono mescolate insieme con l'aggiunta del PEG che produce modificazioni a livello della membrana plasmatica, per cui quando le cellule ricostituiscono la loro membrana possono essere in grado di fondersi.

Comunque questo processo di fusione non è specifico: accanto a cellule ibride vere si possono produrre ibridi topo-topo o uomo-uomo così come possono rimanere cellule non fuse, che anzi di solito costituiscono la maggioranza.

E' necessario quindi utilizzare un sistema che permetta di recuperare preferenzialmente gli ibridi cellulari desiderati. Esistono diversi sistemi di selezione.

SISTEMA HAT (ipoxantina-aminopterina-timidina).

Questa tecnica, inizialmente ideata da Seybalsky e colleghi nel 1962 e modificata due anni dopo da Littlefield, consiste nell'applicare condizioni di coltura in cui solo le cellule ibride riescono a sintetizzare il DNA e perciò ad andare incontro a divisioni cellulari.

Le cellule non ibride sono incapaci di sintetizzare DNA e vanno perdute.

La sintesi di DNA è condizionata alla presenza di deossipurin- e pirimidin- trifosfati sintetizzati a partire dai rispettivi monofosfati.

Questi ultimi, a loro volta, si formano in due modi: per sintesi de novo dai precursori più semplici o mediante quelle che sono chiamate vie di salvataggio, in cui gli enzimi riciclano purine e pirimidine prodotte dalla degradazione di DNA o RNA.

L'aminopterina blocca tutte le reazioni dell'enzima diidrofolato reduttasi che è coinvolto nella sintesi de novo di IMP (e di qui tutte le purine) e anche nella metilazione di dUMP a formare dTMP.

Di conseguenza, la cellula diventa completamente dipendente dalla via di salvataggio per produrre i trifosfati purinici e pirimidinici per la sintesi del DNA.

L'ipoxantina può essere usata come una sorgente estranea di purine poichè essa è fosforilata dall'enzima ipoxantina guanina fosforibosil transferasi (HGPRT) a formare IMP che, alternativamente, può essere convertito a AMP e GMP.

Allo stesso modo, la timidina può essere fosforilata da timidina chinasi (TK) per formare TMP.

Le cellule normali possono quindi crescere in HAT; invece le cellule che mancano di HGPRT (HGPRT-) o di TK (TK-) non possono farlo perchè sia il pathway de novo che quello di salvataggio sono bloccati.

E' possibile fondere cellule umane omozigoti per un allele che determina la mancanza di HGPRT, enzima appartenente alla via di recupero delle purine, con cellule di topo che per costituzione genetica mancano di TK ma sono dotate di HGPRT.

Le cellule umane sono invece dotate dell'enzima TK che converte la timidina in timidin monofosfato. Per diverse ragioni nè le cellule umane nè quelle murine possono sopravvivere in presenza di aminopterina, le prime perchè incapaci di sintetizzare purin monofosfati, le seconde pirimidin monofosfati.

Le cellule ibride formate per fusione, invece, sono incapaci di crescere in presenza di aminopterina; grazie ai cromosomi di topo hanno l'HGPRT e possono recuperare le purine per formare purin monofosfati dall'ipoxantina, e grazie ai cromosomi umani hanno TK e possono sintetizzare dalla timidina i pirimidin monofosfati.

Quindi solo queste cellule ibride riescono a crescere e a dividersi in presenza di HAT.

SELEZIONE DELLE CELLULE HGPRT E TK-

La malattia di Lesh-Nyhan, una malattia umana ereditaria, è dovuta all'assenza congenita dell'enzima HGPRT. Più comunemente, comunque, cellule deficienti in HGPRT- possono essere selezionati facendo crescere le cellule in 8-azagnanina o 6- tiognanina.

Questi analoghi sono incorporati negli acidi nucleici attraverso la via dell'HGPRT e uccidono tutte le cellule ad eccezione di quelle che mancano di HGPRT.

La selezione viene fatta utilizzando elevate concentrazioni di queste sostanze (40ug di 8-azagnanina o 10 ug di 6-tiognina per ml). Allo stesso modo, i mutanti TK- possono essere isolati facendo una selezione in bromodeossiridina (BUdR).

Questa sostanza viene incorporata nel DNA tramite l'enzima TK e, specialmente se le cellule sono esposte a luce visibile, risulta letale. Anche in questo caso si utilizzano elevate concentrazioni di tale sostanza (50 ug/ml di BUdR).

I mutanti TK- sono più rari di quelli HGPRT- e sono perciò più difficili da isolare.

La frequenza di entrambi i mutanti può essere aumentata attraverso un trattamento con mutageni.

SELEZIONE CON OUABAINA

L'ouabaina avvelena la pompa sodio-potassio presente nella membrana cellulare ostacolando la normale regolazione intracellulare di questi elettroliti. Le cellule umane sono 100-1000 volte più sensibili all'ouabaina rispetto a quelle di roditore.

gli ibridi uomo-roditore hanno la stessa resistenza delle cellule parentali di roditore, perciò durante la generazione di ibridi cellulari uomo-topo le cellule umane parentali possono essere eliminate anche se non sono deficienti per TK o HGPRT.

La linea cellulare di topo, comunque, dovrebbe essere sensibile all' HAT. Seguendo la procedura standard di fusione, il mezzo di coltura dovrebbe contenere sia HAT che ouabaina in concentrazioni appropriate. E' necessario, comunque, determinare la sensibilità relativa all'ouabaina delle due linee percentuali prima di effettuare la fusione.

SISTEMA ALANOSINA - ADENINA

Tale sistema e' analogo al sistema HAT. L'alanosina blocca la conversione dell'IMP in AMP rendendo le cellule dipendenti da fonti esogene di adenina, che viene incorporata attraverso la via che richiede l'enzima adenina fosforibosil transferasi (APRT).

Un terreno di coltura contenente alanosina - adenina permette la crescita di cellule normali ma non di cellule che mancano di APRT, le quali possono essere selezionate in presenza di 2 - fluoroadenina.

Poiche' ci sono vie alternative per la sintesi di IMP, questo metodo risulta poco efficiente.

SELEZIONE CON G418

Questo sistema di selezione utilizza cellule umane donatrici che sono state rese resistenti all'azione della neomicina, un antibiotico, tramite integrazione cromosomica di plasmidi che contenevano il gene neo.

Tali cellule vengono poi fuse con cellule di topo riceventi mediante la procedura classica.

E' importante determinare prima della fusione la sensibilità delle cellule parentali al G418.

Le sensibilità variano tra 200-1000 ug/ml e sono necessarie circa tre settimane per uccidere le cellule.

Facendo crescere le cellule ad alte densità, a causa di scambi di nutrienti, l'effetto del G418 è molto piu' lento.

IBRIDI MONOCROMOSOMICI

E' possibile limitare la quantita' di materiale umano che viene trasferito in una cellula di ricevente roditore, attraverso la tecnica della fusione con microcellule.

Le cellule donatrici vengono sottoposte per un certo periodo all'azione del colcemid, un inibitore della formazione del fuso mitotico. Grazie a questo trattamento, il nucleo delle cellule si frammenta in micronuclei, contenuti ognuno uno o pochi cromosomi.

Mediante una centrifugazione in presenza di citocalasina B (inibitore del fuso mitotico) si ha la formazione delle microcellule che contengono all'interno un micronucleo.

Le microcellule cosi' ottenute vengono fuse con cellule riceventi allo stesso modo delle cellule donatrici normali. Gli ibridi che si ottengono, contengono pochi cromosomi o un unico cromosoma del donatore (ibridi monocromosomici).

Attualmente sono disponibili linee cellulari di ibridi uomo-roditore monocromosomici per ciascuno dei cromosomi umani.

IBRIDI DA RADIAZIONE

Gli ibridi cellulari somatici uomo-topo rappresentano uno strumento importante per il mappaggio dei geni umani. Tuttavia tale metodo presenta un grosso limite, quello di non poter ottenere una localizzazione subcromosomica precisa a meno che non si ricorra a ibridi particolari che vengono creati partendo da linfociti presi da individui con determinati riarrangiamenti strutturali oppure con la tecnica chiamata IFGT (trasferimento genico mediante irradiazione e fusione).

Tale tecnica si basa sul fatto che cellule sottoposte a radiazioni letali ionizzanti vengono recuperate per mezzo di una fusione con adatte cellule riceventi. Inizialmente questa tecnica è stata utilizzata partendo da linfociti di sangue periferico irradiati e fusi; per i nostri scopi, invece, e' piu' utile partire da ibridi contenenti un solo cromosoma umano che vengono irradiati e poi fusi. La tappa di irradiazione ha due funzioni fondamentali.

Primo, la dose letale di radiazione è necessaria per assicurare la morte di tutte le cellule donatrici, generalmente dosi maggiori di 1500 rad sono sufficienti per uccidere la maggior parte dei vari tipi di cellule.

Secondo, l'irradiazione causa rotture a livello del DNA e quindi determina la frammentazione dei cromosomi; aumentando la dose di radiazione aumenta la frequenza di rotture cromosomiche.

Dopo l'irradiazione, le cellule donatrici vengono fuse con cellule di topo riceventi utilizzando il PEG.

La linea cellulare ricevente deve essere deficiente per qualche marker che permetta poi la selezione a favore dell'ibrido.

Si possono utilizzare cellule riceventi che siano HGPRT- e quindi in tal caso si fa uso di HAT per la selezione.

Molto spesso il cromosoma umano di partenza viene reso resistente all'antibiotico G418 mediante integrazione del gene neo in diverse copie del cromosoma umano, per cui le cellule che possiedono materiale umano sono resistenti al G418.

Gli ibridi che si ottengono contengono in genere frammenti umani inseriti nei cromosomi di roditore. Il DNA estratto da questi ibridi viene amplificato tramite una Alu-PCR (le sequenze Alu si trovano solo nel DNA umano ogni 4-5Kb circa); i prodotti sono quindi utilizzati come sonde in esperimenti di FISH su metafasi umane normali per un accurata caratterizzazione citogenetica di materiale umano ritenuto in ogni ibrido.

Tali ibridi rappresentano uno strumento importante per la caratterizzazione di riarrangiamenti cromosomici in citogenetica clinica o citogenetica tumorale e nello studio dell'evoluzione dei primati.

STRATEGIE DI MAPPATURA

Una meta primaria per incominciare a comprendere l'organizzazione del genoma è di ottenere una serie di diagrammi di mappa descrittivi di ciascun cromosoma umano a una risoluzione sempre piu' fine.

Per costruire una mappa genomica è necessario aver a disposizione frammenti di DNA, precedentemente isolati e inseriti in vettori di clonaggio.

I cloni ricombinanti sono successivamente ordinati nelle loro rispettive localizzazioni sul cromosoma. Dopo il completamento della mappatura, il passaggio successivo è quello di determinare la sequenza di basi di ciascun frammento ordinato.

Le mappe possono essere divise in genetiche e fisiche a seconda dei metodi usati per ricostruirle e della unità di misura adoperata per valutare la distanza tra due marcatori.

MAPPE GENETICHE PER LINKAGE

Le mappe genetiche per linkage sono mappe costruite mediante associazione genetica, determinando la frequenza con cui due marcatori sintenici (ossia associati e quindi localizzati sullo stesso cromosoma) sono ereditati insieme.

Maggiore è la distanza tra i geni associati, maggiore è la probabilità che si verifichi uno scambio nella regione compresa tra le due coppie e quindi maggiore è la percentuale di meiosi nelle quali si verifica uno scambio in questa zona. Quindi, misurando la frequenza di ricombinazione si può ottenere una misura della distanza di mappa tra coppie di geni.

La distanza tra due geni viene misurata in cM (in onore al genetista americano Thomas Hunt Morgan).

Un cM, o unità di mappa genetica, è definito come la distanza tra due geni per i quali un prodotto della meiosi su cento è ricombinante.

Ponendo in un grafico la distanza tra due loci, misurata in cM, in funzione della frequenza di ricombinazione, si osserva una deviazione della proporzionalità diretta, per distanze tra due loci maggiori di 40-50 cM.

Infatti più distanti sono due loci e maggiore è la probabilità che si verifichino crossing-over multipli. Un altro fattore che contribuisce alla relazione non lineare tra frequenza di ricombinazione e distanza di mappa genetica è l'interferenza.

L'interferenza positiva indica l'effetto per cui un crossing-over può ridurre la probabilità di un secondo crossing-over nelle sue vicinanze.

Affinché un marker possa essere utilizzato per la costruzione di mappe genetiche, esso deve essere polimorfico.

Un marker polimorfico è una regione di DNA esprimibile o un segmento di DNA anonimo ereditato nella progenie, che differisce tra gli individui di una popolazione e che abbia una frequenza superiore all'1%.

Nel passato, le proteine polimorfiche rappresentavano i principali marker utilizzati negli studi di linkage.

Queste includevano i numerosi alleli per molecole MHC di classe I e II, gli antigeni del gruppo sanguigno ABO e una varietà di enzimi o proteine strutturali.

Comunque, marker proteici polimorfici sono rari in quanto fanno parte di una piccola frazione del genoma umano (la regione codificante) che tende ad essere conservata.

La maggior parte dei marker invece definisce un polimorfismo neutrale, ossia variazioni all'interno della regione non codificante del genoma umano.

Appartengono a questa categoria i VNTR basati sugli RFLPs.

I VNTR (variable number of tandem repeats) sono sequenze nucleotidiche note ripetute in tandem un numero variabile di volte, precedute e seguite da sequenze di DNA a singola copia.

Digerendo il DNA genomico di diversi individui con enzimi di restrizione che tagliano all'interno delle sequenze uniche che fiancheggiano un locus VNTR, si evidenzieranno dopo corsa elettroforetica del prodotto di digestione, frammenti di lunghezza diversi a seconda del numero di ripetizioni.

Polimorfismi di lunghezza degli enzimi di restrizione, che sono alla base degli RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), possono essere dovuti anche alla presenza/assenza nel genoma di un individuo di siti di taglio per enzimi di restrizione.

Mutazioni puntiformi all'interno della sequenza riconosciuta da un enzima di restrizione hanno spesso come unico effetto la mancata digestione del DNA da parte di quell'enzima.

Queste variazioni tra gli individui possono essere usate come marcatori per costruire mappe genetiche di linkage.

La distanza media tra i markers è di 2.9 cM, ma il 56% è ad una distanza di 1 cM.

Oggi ci sono tecniche che permettono di isolare markers DNA cromosoma specifici partendo da libraries cromosoma-specifiche che possono essere realizzate mediante l'uso di uno strumento, chiamato FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter).

Tale strumento permette di separare i cromosomi di una sospensione, colorata con fluorocromi, in base alla intensità di fluorescenza che a sua volta dipende in gran parte dalla quantità di DNA e, quindi dalle dimensioni del cromosoma.

Sempre per ottenere markers per una regione subcromosomica specifica si può usare la tecnica della microdissezione che utilizza un micromanipolatore in grado di tagliare una particolare regione da un preparato metafase osservato al microscopio. La regione di interesse è così isolata e clonata mediante PCR.

MAPPE FISICHE

Le mappe fisiche descrivono l'ordine e la distanza tra due marcatori misurata in numero di nucleotidi.

I metodi utilizzati nella mappatura fisica si possono dividere in due categorie:

- metodi a bassa risoluzione
- metodi ad alta risoluzione

MAPPA FISICA A BASSA RISOLUZIONE

I sistemi di mappatura più usati utilizzano gli ibridi cellulari e la tecnica della ibridazione in situ.

MAPPATURA MEDIANTE IBRIDI CELLULARI

Gli ibridi cellulari sono stati utilizzati inizialmente per mappare i geni di cui si conosceva il prodotto (proteine enzimatiche o strutturali).

Sugli estratti proteici delle cellule ibride si esegue una corsa elettroforetica su gel. Il gel si usa in seguito o per far avvenire una reazione enzimatica catalizzata dall'enzima il cui gene si vuole mappare, in presenza di un cromogeno, o per far avvenire una reazione di precipitazione usando anticorpi contro la proteina stessa. Se la cellula ibrida non ha ritenuto il cromosoma su cui mappa il gene codificante, non si avrà reazione colorimetrica o di precipitazione.

Oggi, grazie all'avvento delle di DNA ricombinante, è possibile mappare qualsiasi segmento clonato indipendentemente dalla sua espressione. Digerendo il DNA estratto dai cloni ibridi con enzimi di restrizione, eseguendo un blotting e ibridando con la sonda a disposizione, è possibile localizzarla su un dato cromosoma.

Usando un enzima in grado di discriminare tra la banda di ibridazione umana e murina, si può riconoscere l'eventuale segnale di ibridazione proveniente dalle cellule di roditore.

Per definire la posizione subcromosomica si utilizzano ibridi che contengono frammenti di un dato cromosoma.

IBRIDAZIONE IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

L'ibridazione in situ fluorescente permette di localizzare direttamente una sonda su cromosomi in metafase preparati su un vetrino da microscopio poiché produce un segnale visivo diretto.

La sonda di DNA viene marcata con una vitamina chiamata biotina, ibridizzata alla preparazione di cromosomi, e quindi la sonda è visualizzata con metodi fluorescenti.

La risoluzione massima della FISH è di circa 10 Mb, la misura di una tipica banda vista su un cromosoma.

Tecniche ad alta risoluzione, che permettono di ottenere cromosomi in prometafase, possono però permettere risoluzioni di 1 Mb.

MAPPA FISICA AD ALTA RISOLUZIONE

Ci sono delle tecniche che permettono di mappare sequenze di DNA con una risoluzione da 1pb a molte Mb. Le mappe fisiche ad alta risoluzione sono fondamentalmente basate su due approcci:

- assemblaggio di contigui di cloni (serie di cloni sovrapposti che coprono una intera regione cromosomica) che permette la costruzione di una mappa fisica di cui si conosce la sequenza nucleotidica completa.

- analisi di frammenti di DNA ottenuti mediante digestione con enzimi che tagliano poco frequentemente (i cosiddetti enzimi "rare cutter") producendo macroframmenti. I prodotti di digestione vengono separati utilizzando la tecnica dell'elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE-pulsed field gel electrophoresis) che riesce a suddividere efficacemente in base alle dimensioni frammenti di DNA lunghi fino a diverse megabasi.

Il principio su cui si basa tale tecnica è quello di far ruotare le molecole di DNA all'interno del gel in modo che anche molecole molto lunghe possano passare tra le maglie della matrice semisolidi e migrare più o meno velocemente secondo la loro lunghezza. Si possono così separare frammenti di DNA lunghi da 50Kb a qualche Mb.

Questo approccio produce mappe con maggiore continuità e pochi gaps tra i frammenti rispetto alle mappe costruite usando contigui, anche se la risoluzione è più bassa.

Esistono diversi vettori per il clonaggio molecolare come i plasmidi, in grado di contenere frammenti fino a 10Kb, fagi, che possono contenere frammenti fino a 40Kb, e cosmidi in grado di contenere frammenti fino a 40Kb.

Per la mappatura fisica è necessario utilizzare contigui che coprano estese regioni cromosomiche, ciò è più facilmente ottenibile utilizzando frammenti clonati più grandi.

Un notevole contributo alla soluzione di questo problema è derivato dall'uso dei cromosomi artificiali di lievito (YACs), mediante i quali è possibile clonare larghe regioni di DNA (da 100Kb a più di 1500Kb).

Per identificare YACs di una data regione cromosomica in modo da costruire un contiguo, si possono usare delle sequenze nucleotidiche note, lunghe da 200 a 500 pb, distribuite su tutta una regione genomica o su tutto il genoma dette STS (Sequence Tagged Site). È stata costruita una mappa mostrando l'ordine e la distanza degli STS. La mappa con gli STS può essere rappresentata elettronicamente e conservata in una banca dati facilmente accessibile. Un STS identifica in maniera univoca un qualsiasi tratto di DNA e pertanto un laboratorio che voglia clonare uno specifico frammento genomico, dovrà semplicemente consultare un computer per conoscere le due sequenze STS che delimitano questo frammento. Usando due primers corrispondenti alle due sequenze STS, si potrà amplificare mediante PCR il frammento.

Poiché nella reazione di amplificazione l'enzima usato (Taq polimerasi) non amplifica efficacemente frammenti superiori a 1-2000 pb, i primers scelti, corrispondenti alle due sequenze STS che delimitano il frammento da clonare, non devono distare più di mille pb.

Poichè ogni elemento mappato (cloni, contiguo, sequenza) è definito da un unico STS, le mappe con gli STS sono molto utili per identificare e combinare dati di mappatura ottenuti da differenti strategie.

RELAZIONE TRA MAPPA GENETICA E MAPPA FISICA

La distanza della mappa genetica per le 3000Mb del genoma umano è di circa 3700 cM e pertanto 1 cM corrisponde approssimativamente a una distanza di mappa fisica di 0.8 Mb.

In realtà il rapporto delle distanze di mappa genetica e fisica sui segmenti cromosomici spesso deviano da questo valore medio a causa della localizzazione non casuale dei chiasmi. I segmenti cromosomici contenenti gli "hot spots" di ricombinazione mostrano una più alta frequenza di ricombinazione e pertanto markers localizzati in questa zona sembrano più distanti del reale. In generale c'è una frequenza di crossing-over più alta in corrispondenza delle regioni subtelomeriche rispetto a quelle centromeriche. Fino al 1990 più di 6000 loci, tra cui 2300 geni, ossia circa il 2% dei geni stimati sul genoma umano, sono stati mappati su cromosomi umani.

SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di generare pannelli di ibridi da radiazione, specifici per i cromosomi umani 2, 4, 5, 17. Gli ibridi ottenuti dovrebbero contenere un singolo frammento o pochi frammenti del cromosoma in questione, di grandezza appropriata per essere poi usati come painting library o per scopi di mappatura subregionale. La caratterizzazione sarà effettuata essenzialmente in due modi:

- per Reverse-FISH
- con un pannello di STS, di mappatura nota, distribuiti lungo il cromosoma.

APPROCCIO SPERIMENTALE

FUSIONE CELLULARE

L'ibrido somatico monocromosomico viene fatto crescere in fiasche da 75 cm²; una volta che è stata raggiunta la confluenza la fiasca viene irradiata con raggi g. Oltre all'ibrido monocromosomico, viene tenuta in coltura l'altra linea parentale rappresentata dalla linea cellulare di hamster B14-150 (TK⁻). L'ibrido irradiato e la linea di hamster vengono tripsinizzati e trasferiti in due provette da 10 ml che vengono subito centrifugate. A questo punto i due pellet sono riuniti in un'unica provetta e lavati per tre volte con terreno senza siero.

Al termine del terzo lavaggio il sovrantante viene eliminato e al pellet viene aggiunta qualche goccia di PEG. Il PEG deve rimanere a contatto con le cellule soltanto per 60 secondi, dopodichè la sua azione viene fermata dall'aggiunta di terreno complementato con il siero. La sospensione cellulare ottenuta viene distribuita in piastre di Petri che contengono 10 ml di terreno complementato. 24 h dopo la fusione, il terreno viene cambiato e si aggiunge HAT per la selezione. Questa operazione viene ripetuta ogni giorno fino a quando non si incominciano a prelevare i cloni.

RACCOLTA DEI CLONI

Dopo una decina di giorni dalla fusione cellulare cominciano a comparire i primi cloni che sono facilmente riconoscibili rispetto al tappeto di cellule parentali che comunque cominciano gradatamente a morire dopo pochi giorni dalla aggiunta dell'HAT.

Tutti i cloni che compaiono vengono cerchiati, dal di sotto della piastra, con un pennarello mentre la piastra di Petri viene osservata al microscopio ottico. Quando i cloni hanno raggiunto una certa dimensione (1-3mm), essi vengono raccolti mediante cilindretti di metallo del diametro di 1/2 cm. Ogni cilindretto, reso sterile, viene poggiato in una piastra contenente del silicone e successivamente posizionato là dove è segnato il clone. Grazie alla presenza del silicone, il cilindretto aderisce al fondo della piastra di Petri, permettendo così di svolgere tutte le operazioni di tripsinizzazione del clone all'interno del singolo cilindretto. Il clone tripsinizzato viene passato in un pozzetto (diametro 1.5cm circa) di una piastra da 24 pozzetti. L'isolamento ha lo scopo di non contaminare gli altri cloni e di non essere contaminato da essi.

PRIMO SCREENING

Quando i cloni portati nella piastra a 24 pozzetti hanno raggiunto la confluenza, questi vengono tripsinizzati; una parte delle cellule viene prelevata e seminata nella chamber-slide costituita da un vetrino su cui è montata una camera in plastica divisa in otto pozzetti in maniera tale da avere otto differenti cloni su un'unico vetrino. Le cellule rimanenti restano nelle piastre da 24 pozzetti. Il giorno dopo, le camere in plastica vengono rimosse e il vetrino, con le cellule degli otto cloni adese alla superficie, viene trattato con ipotonica (KCL 0,56%) e fissativo (costituito da metanolo e acido acetico in un rapporto di 3:1). Dopo una notte a 37° C, il vetrino viene ibridato *in situ* con DNA umano totale marcato con biotina. Il DNA umano ibridato viene rilevato dall'avidina coniugata al Cy3. L'uso della FISH *in situ* fornisce informazioni sulla presenza di materiale umano, sulla sua dimensione e, in particolare, sulla omogeneità del clone. Cloni in cui il frammento umano è presente in meno del 50% delle cellule sono generalmente scartati.

CARATTERIZZAZIONE DELL'IBRIDO

Tutti i cloni positivi al primo screening vengono allargati fino ad ottenere 2 fiasche da 75 cmq. Il contenuto di una fiasca viene congelato in azoto liquido, tutto il resto viene utilizzato per l'estrazione di DNA. Il DNA estratto da ogni ibrido viene sottoposto alla Alu-PCR che permette di amplificare tutto il materiale umano contenuto nel clone ibrido. Talvolta accade che alcuni cloni, pur essendo risultati positivi al primo screening, non risultano amplificati con la Alu-PCR, questo stà a significare che probabilmente il contributo umano presente nell'ibrido non contiene sequenze Alu al suo interno (forse perchè troppo piccolo). I prodotti della PCR, quindi, sono marcati con la biotina tramite la nick-translation e usati come sonda per esperimenti di FISH su metafasi umane normali. I vetrini umani sono ottenuti da una coltura di linfociti di sangue periferico stimolati con la fitoemagglutina (PHA). Mediante osservazione dei vetrini al microscopio a fluorescenza, è possibile determinare il numero e la localizzazione dei frammenti cromosomici trattenuti in ciascun ibrido.

MATERIALI

- TERRENO DI COLTURA

Tutti i terreni di coltura devono contenere una miscela di sali inorganici detta soluzione salina bilanciata (BSS). La funzione di questa soluzione salina è quella di mantenere costante il ph e la pressione osmotica nel terreno e anche di fornire un'adeguata concentrazione di ioni inorganici essenziali. Tutti i terreni di coltura contengono anche una miscela completa di aminoacidi, un supplemento di vitamine e, in alcuni casi, componenti extra come coenzimi e intermedi metabolici; inoltre è richiesta l'aggiunta di siero per permettere la crescita di linee cellulari primarie.

Il tutto viene poi equilibrato con il 5% di CO₂ che porta il ph intorno a 7, 2 - 7, 4. Il terreno di coltura da me utilizzato è l'RPMI 1640 ottenuto sciogliendo in acqua il preparato in polvere a cui successivamente vengono aggiunti Fetal Calf Serum (FCS 10%), streptomycin-penicillina (antibiotici) e glutammina.

- SISTEMA DI SELEZIONE

Il sistema di selezione utilizzato è il sistema HAT.

HAT è una sigla che sta ad indicare i componenti del sistema che sono: ipoxantina, aminopterina e timidina.

Le soluzioni madri di HAT (500x e 100x) vengono conservate a -20°C. L'HAT in uso è aliquotato in provette da 10ml (con concentrazione 100x) conservate a 4°C. Da queste soluzioni vengono prelevati 100ul e aggiunti a 10ml di terreno di coltura.

Preparazione della soluzione madre

concentrazione finale preparazione dello stock

(mg/100ml)

Ipxantina 13, 6 ug/ml 136, 1

Aminopterina 0, 17 ug/ml 1, 76

Timidina 3, 87 ug/ml 38, 7

- IBRIDI CELLULARI

Quattro ibridi somatici monocromosomici: GM10826B, GM10115A, GM10114, GM10498A sono stati utilizzati per la costruzione di pannelli di ibridi da radiazione, specifici per un determinato cromosoma umano.

GM10826B è un ibrido che contiene come unico contributo umano il cromosoma 2, GM10115A contiene il cromosoma 4, GM10114 contiene il cromosoma 5 mentre GM10498A contiene il solo cromosoma 17.

Sono tutti ibridi ottenuti mediante una fusione di cellule uomo-hamster.

Questi ibridi sono stati forniti dal Corriel Institute Cell Repository, Camden, New Jersey.

La linea parentale di hamster utilizzata per le fusioni è la B14-150 deficiente per l'enzima timidina chinasi.

- VETRINI

In questo lavoro sono stati usati, per esperimenti di ibridazione in situ fluorescente, vetrini con preparati cromosomici umani, a partire da sangue periferico di individui normali, per mappare e ordinare i frammenti cromosomici contenuti negli ibridi da radiazione.

- DNA estratto dagli ibridi cellulari caratterizzato mediante

Alu-PCR.

TRIPSINIZZAZIONE

-Quando la coltura cellulare, che cresce su monostrato, giunge a confluenza, viene eliminato il terreno.

-Si lava con 3-4ml di PBS Ca e Mg free EDTA 0.02% per eliminare completamente il siero contenuto nel terreno di coltura che altrimenti bloccherebbe l'effetto della tripsina.

-Si introducono 0.5-1ml di soluzione di tripsina. Si lascia agire scuotendo la fiasca per favorire il distacco delle cellule dal fondo.

-Si risospende in terreno RPMI + 10% FCS per bloccare l'effetto della tripsina e si allarga la coltura distribuendo le cellule in più fiasche oppure si procede con il congelamento.

NOTA: La soluzione madre di tripsina è allo 0.25%, la work-solution è allo 0.05%, diluita con PBS-EDTA 0.02%.

CONGELAMENTO

- Per congelare le cellule, viene preparata una soluzione congelante (che deve essere consumata in meno di un mese) così fatta:
terreno RPMI + 10% FCS
dimetilsolfossido 10% DMSO
 - Le cellule sono recuperate e risospese in un volume totale di circa 1.5 ml nel criotubo.
 - I tubi sono poi messi a -80°C per un minimo di 3 ore in una scatola di polistirolo.
- Si trasferiscono poi molto velocemente in azoto liquido.
- NOTA: La concentrazione finale di DMSO non deve essere inferiore al 5%.

SCONGELAMENTO

- La provettina contenente le cellule conservate in azoto liquido viene messa in acqua tiepida per lo scongelamento.
- Dopo aver asciugato la provettina, si centrifuga la sospensione a 1500 rpm per 7 min.
- Si elimina il sovranatante, il pellet viene risospeso con del terreno pipettando all'interno della stessa provettina e viene trasferito in fiasca (da 25 o 75 ml).
- La coltura si lascia in termostato a 37°C.

PREPARATI CROMOSOMICI IN SITU

- A questo scopo si usano le chamber slides costituite da una camera in plastica divisa in 8 pozzetti incollata su un vetrino.
- Si aggiunge in ogni pozzetto qualche goccia di terreno e 1-2 gocce di sospensione cellulare.
 - La chamber slide è messa in termostato a 37°C.
 - Processamento delle chamber slides:
- 1) Si elimina il medium di crescita e si aggiunge una soluzione ipotonica di KCl (0.025M, ovvero 0.56%), e la si lascia a contatto con le cellule per 10 minuti.
 - 2) Per i prefissaggio delle cellule, si procede con una soluzione alcool metilico- acido acetico 3:1(fissativo): si aggiungono lentamente 1-2 gocce di fissativo in ogni pozzetto e si lascia agire per qualche minuto.
 - 3) Si rimuove la soluzione da ogni pozzetto e si aggiunge lentamente un volume adeguato di fissativo; si lascia agire per 5 minuti.
 - 4) Si elimina il fissativo e si procede con un rapido lavaggio del vetrino, immergendolo per pochi secondi in una soluzione fresca di fissativo.
 - 5) La camera in plastica viene staccata e il vetrino si lascia asciugare all'aria.
- Il vetrino è così pronto per essere utilizzato.

COLTURE DI SANGUE PERIFERICO

- Semina:
- L'allestimento della coltura viene effettuata in fiasche piccole da 25ml nel modo seguente: si aggiungono a 10 ml di medium di crescita RPMI 1640 complementato con FCS (conc. finale 10%) 0.3-0.6 ml di sangue e 150 ul di fitoemagglutinina PHA.
- Si incuba in termostato a 37°C per 72-96 h.
- Processamento:
- Si aggiunge una goccia di colchicina per fiasca e si lascia agire per circa 20-30 min. in termostato a 37°C.
 - Si trasferisce la sospensione cellulare in una provetta da 10 ml e si centrifuga per 6-7 min. a 1500 rpm.
 - Si elimina il sovranatante e si risospende il pellet in 8 ml di soluzione ipotonica (KCl 0.56%)e si incuba per 10min. a 37°C.
 - Si aggiunge fissativo fino a raggiungere un volume finale di 10 ml e si centrifuga a 1500 rpm per 7 min.
 - Si elimina il sovranatante e si risospende il pellet in 10 ml di fissativo. Si lascia la sospensione a 4°C per almeno 30 min, dopodiché si centrifuga a 1500 rpm per 7 min e si risospende il pellet in fissativo. Ripetere altre due volte il lavaggio con il fissativo.
 - Il sovranatante viene poi eliminato ed il pellet risospeso in un adeguato volume di fissativo.
- A questo punto si allestiscono i preparati metafasici secondo la seguente procedura.

