

Servizio colture primarie

Istruzioni per l'uso di cellule epiteliali bronchiali umane



Istituto Giannina Gaslini

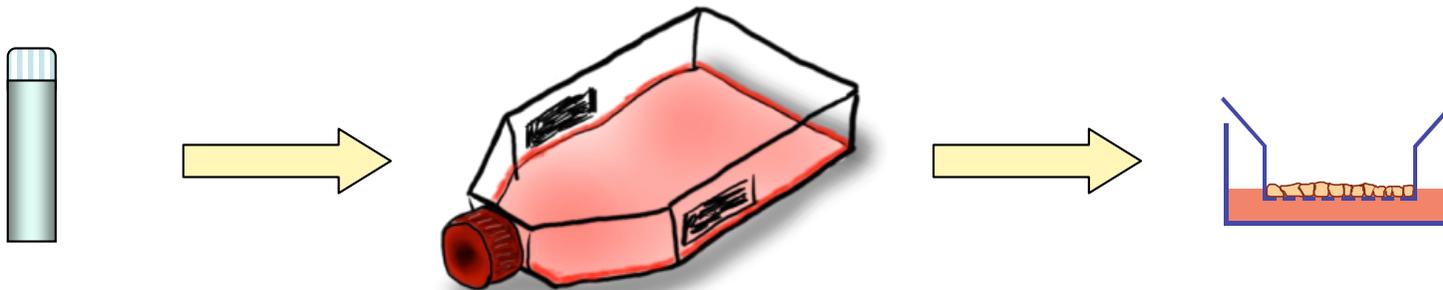


*fondazione per la ricerca
sulla fibrosi cistica - onlus
italian cystic fibrosis research foundation*

Riassunto del procedimento

Il metodo di coltura è basato su due fasi distinte:

- 1) Espansione del numero di cellule: si usa un terreno LHC9/RPMI 1640 (1:1) privo di siero. Da una fiala congelata, attraverso due passaggi su fiasca, si ottengono circa 15-20 milioni di cellule.
- 2) Differenziamento: le cellule vengono seminate su supporto poroso per formare un epitelio polarizzato. Per questo scopo si usa un terreno DMEM/F12 (1:1) con siero e una condizione di “*air liquid interface*”.



Fattori importanti

Il terreno di coltura senza siero permette di espandere il numero iniziale di cellule mantenendole in uno stato indifferenziato. La densità delle cellule in questa fase deve essere controllata attentamente. Una densità alta e prolungata nel tempo induce un differenziamento squamoso delle cellule, dovuto probabilmente a rilascio di TGF-beta da parte delle cellule stesse (Sacco et al. *J Clin Invest* 90:1379-85, 1992). In questo stato le cellule non saranno più in grado di generare un epitelio con le caratteristiche desiderate.

La fase di differenziamento su supporto poroso permette alle cellule di differenziare in senso mucociliare con formazione di giunzioni serrate, cilia, CFTR, ENaC, mucine ed altri marcatori dell'epitelio bronchiale. Per questo scopo il terreno privo di siero viene sostituito, dopo 24 ore dalla semina ad alta densità, da un terreno con siero. Il differenziamento viene ulteriormente indotto dall'uso di una condizione di "air liquid interface" (cioè terreno aggiunto solo dal lato basolaterale).

Componenti forniti dal servizio

Fiala di cellule epiteliali bronchiali congelate

Terreno LHC9/RPMI 1640 (congelato in aliquote da 40 ml)

Soluzione di collagene

Ultroser G

Componenti da reperire in loco

Dulbecco's MEM ad alto glucosio (Sigma-Aldrich cod. D5671) *

Ham's F12 (EuroClone cod. ECB7502L) *

Siero fetale bovino (Sigma-Aldrich cod. F7524) *

Tripsina 0.05%/EDTA 0.02% in PBS (Euroclone cod. ECB3052D) *

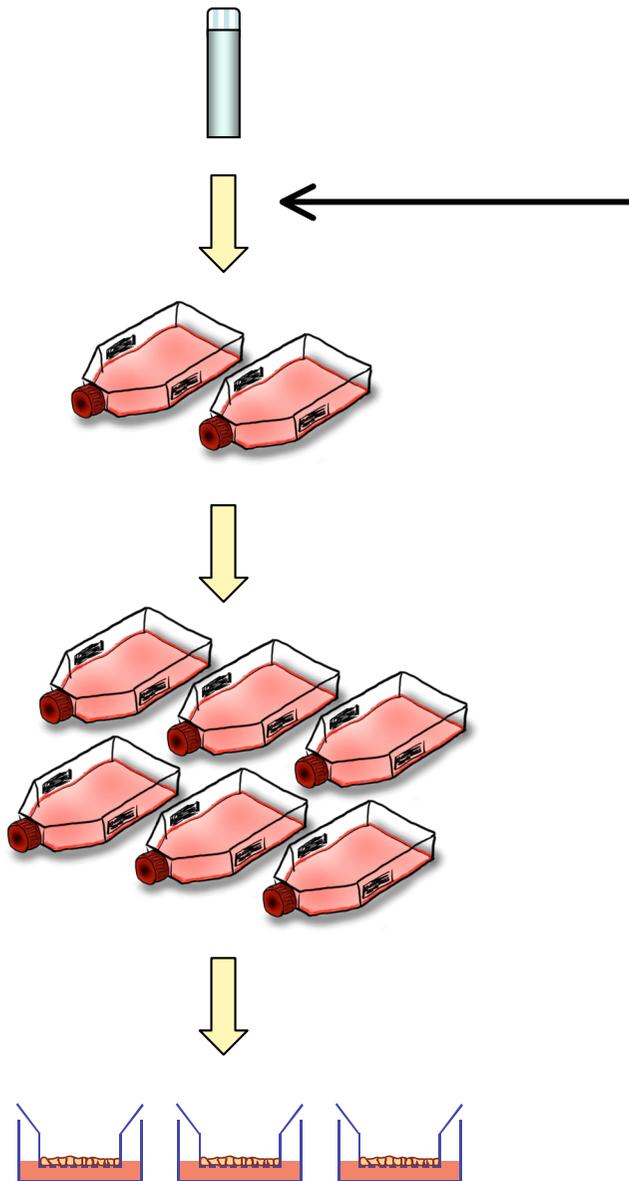
PBS con 0 Ca²⁺/0 Mg²⁺ (MP Biomedicals cod. 092810305) *

Supporti Snapwell cod. 3801 o Transwell cod. 3450 (Corning Costar) **

* Prodotti suggeriti. E' possibile utilizzare prodotti con le stesse caratteristiche ma forniti da altre compagnie.

** E' possibile che altri supporti con membrana porosa (es. Millicell, Millipore) permettano la formazione di epiteli.

Schema generale

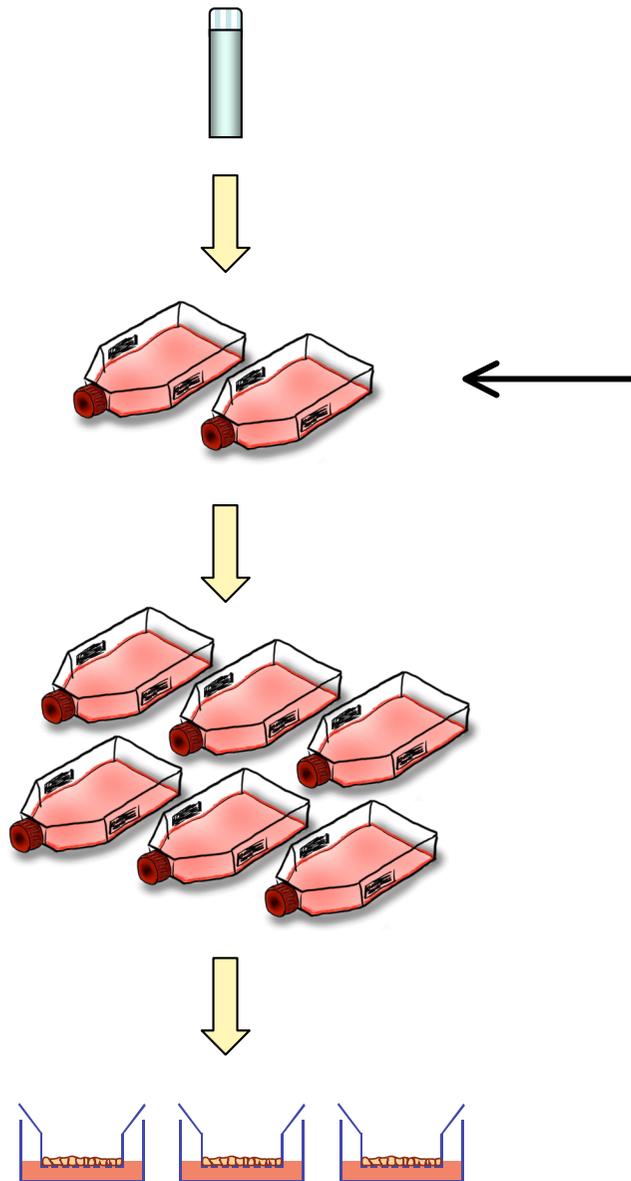


1) **Scongelamento:** le cellule vengono scongelate rapidamente a 37 °C e risospese in terreno privo di siero (10-12 ml), centrifugate a 1000 rpm per 5 min, il sovrnatante eliminato e il pellet di cellule risospeso nel terreno privo di siero (24 ml). Le cellule vengono seminate in due fiasche T75 precedentemente trattate con collagene.

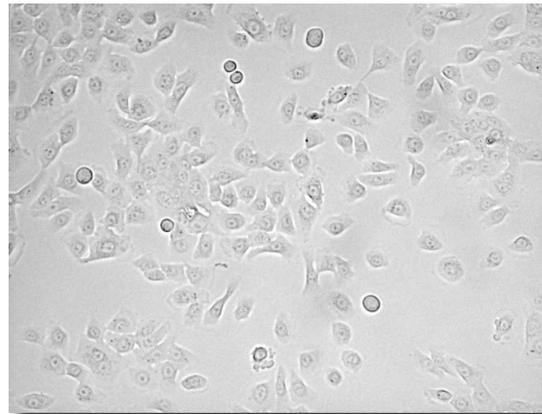
Per il rivestimento con collagene, diluire il collagene di coda di ratto (fornito) 1:100 (v:v) in acqua sterile (non da fiale di plastica di acqua iniettabile) e aggiungere 10 ml della soluzione in ciascuna fiasca T75 facendo coprendo tutta la superficie. Incubare a 37 °C per 30 min - 2 ore. Prima della semina delle cellule, rimuovere completamente la soluzione di collagene.

La preparazione concentrata di collagene va tenuta sempre a 4 °C. La diluizione usata per il rivestimento delle fiasche va usata al momento.

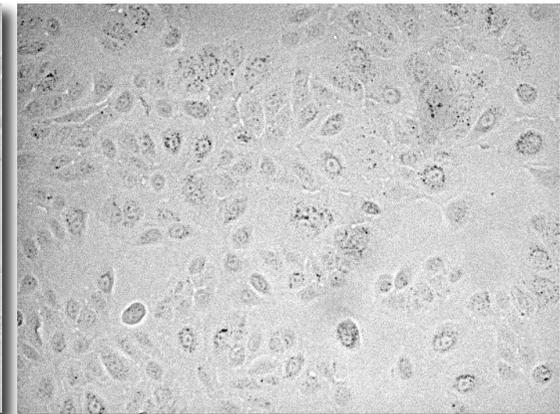
Schema generale



2) **Primo passaggio:** durante questa prima fase cellule vanno controllate attentamente. E' bene tripsinizzare le cellule prima che raggiungano il 70% di confluenza (circa). Una densità maggiore potrebbe limitare (v. foto) la crescita cellulare e rendere le cellule incapaci di differenziare correttamente. Controllare la densità della fiasca ogni giorno e cambiare il terreno ogni due giorni.

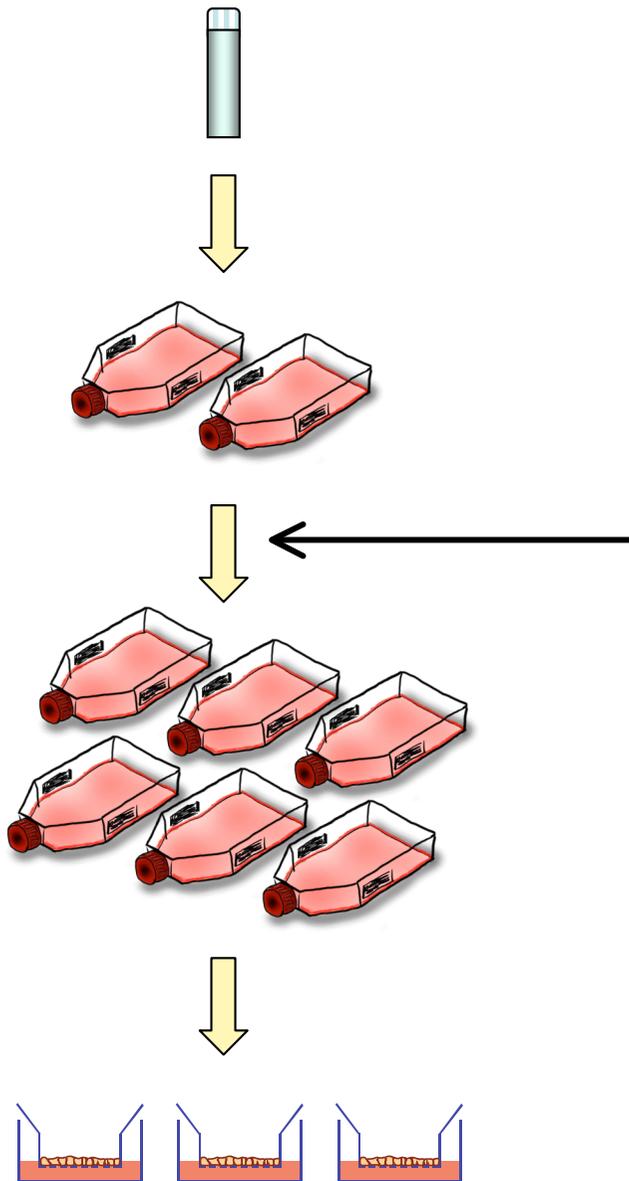


Esempio di cellule a media densità con un buon aspetto (cellule piccole e rotondeggianti; presenza di cellule in divisione)



Esempio di cellule dall'aspetto poco promettente (presenza di cellule grosse e molto piatte)

Schema generale



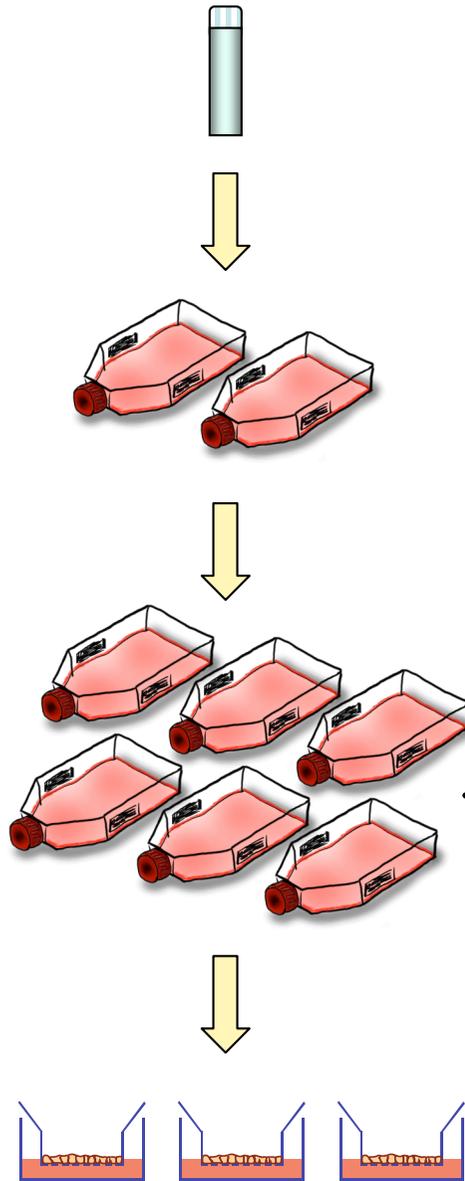
3) **Tripsinizzazione:** aspirare il terreno di coltura e aggiungere a ciascuna fiasca 8 ml di PBS senza ioni divalenti ($0 \text{ Ca}^{2+}/0 \text{ Mg}^{2+}$) incubando per 5-10 minuti a 37°C . Aspirare il PBS e aggiungere 1.5 ml di tripsina/EDTA per fiasca. Incubare a 37°C per 5-10 minuti controllando di tanto in tanto al microscopio che la tripsina stia agendo.

Raccogliere le cellule in 10 ml di PBS ($0 \text{ Ca}^{2+}/0 \text{ Mg}^{2+}$) per fiasca mettendole in tubo Falcon da 50 ml contenente 5 ml di terreno (es. DMEM/F12) con siero al 10% *. Risospendere bene le cellule provenienti dalle due fiasche prelevando poi una piccola aliquota prima di centrifugare a 1000 rpm per 5 min.

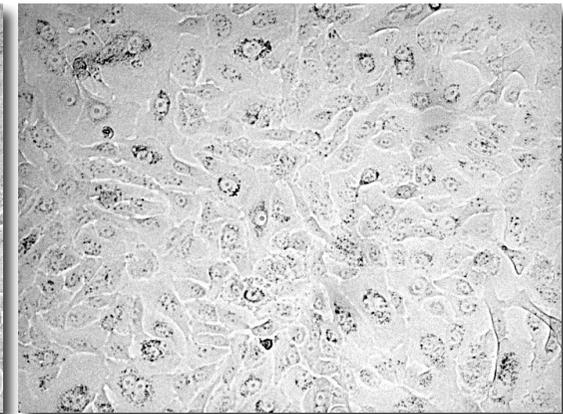
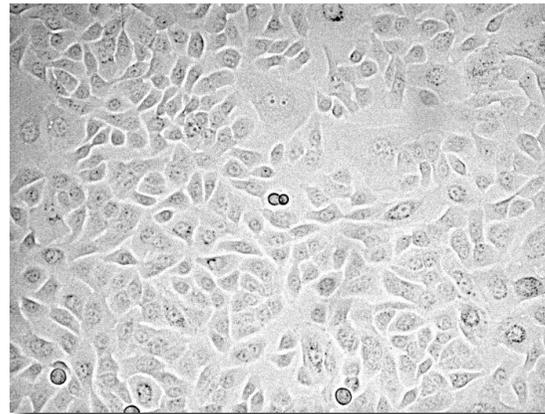
Il pellet di cellule viene risospeso in terreno LHC9/RPMI 1640 in un volume totale tale da seminare 750.000 cellule per fiasca T75 (12 ml per fiasca). Generalmente dalle due prime fiasche si ottiene un numero di cellule sufficiente per 4-8 fiasche. Le fiasche devono essere preventivamente trattate con collagene come descritto in precedenza.

* il siero serve per neutralizzare la tripsina

Schema generale



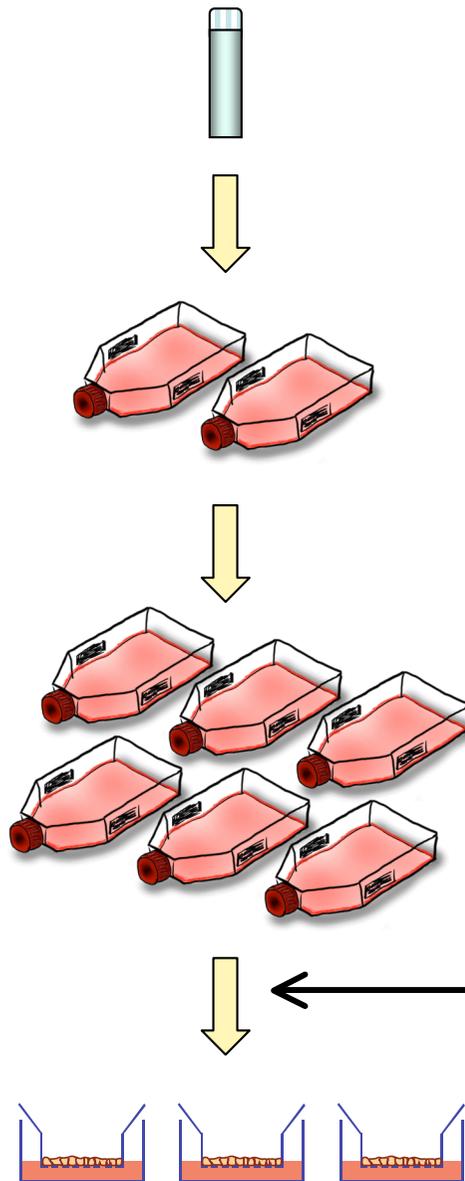
4) **Secondo passaggio:** durante questa fase le cellule possono essere spinte ad una densità maggiore rispetto a quella della prima fase. Bisogna comunque evitare che le cellule rimangano a lungo in uno stato di totale confluenza.



Esempio di cellule dopo il secondo passaggio ad alta densità subito prima della tripsinizzazione

Esempio di coltura deteriorata con gran numero di cellule piatte e squamose

Schema generale



5) **Semina su supporti porosi:** si tripsinizzano come descritto in precedenza. Le cellule vengono raccolte in PBS e la tripsina neutralizzata con terreno con siero (volume pari a quello totale della tripsina utilizzata). La sospensione di cellule viene contata e centrifugata. Il pellet di cellule viene risospeso in terreno LHC9/RPMI 1640.

Le cellule vengono seminate sul lato apicale di supporti porosi:

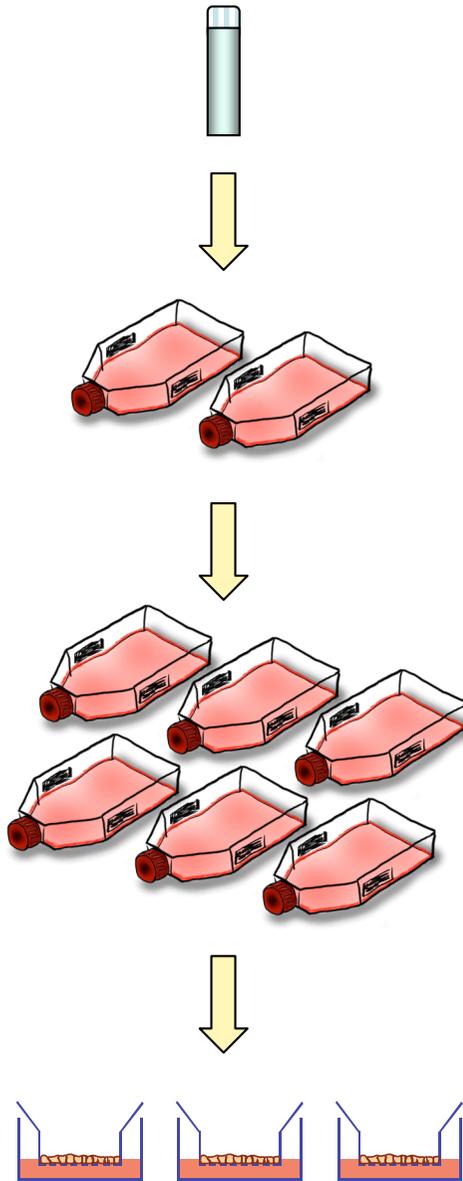
Snapwell 3801 (~ 1 cm²): 500.000 (in 0.5 ml)

Transwell 3450 (~ 2.5 cm²): 2.5 milioni (in 1.5 ml)

Sul lato basolaterale si pipettano 2 ml (Snapwell) o 2.5 ml (Transwell).

Dopo 24 ore dalla semina, il terreno LCH9/RPMI 1640 viene sostituito con DMEM/F12 con 2% di Ultroser G (+ 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina), stessi volumi usati per la semina delle cellule.

Schema generale



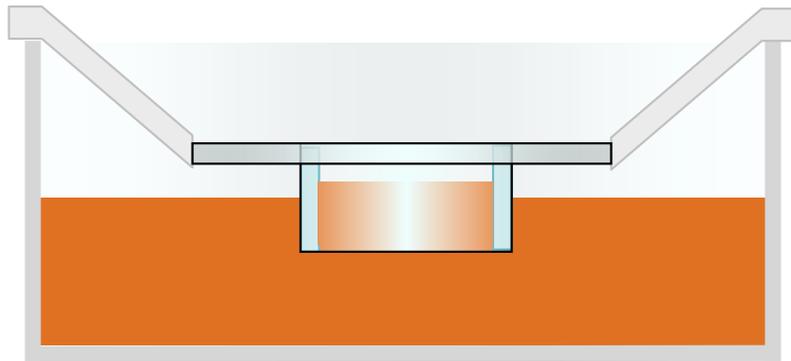
6) **Differenziamento su supporti porosi:** il terreno viene cambiato ogni 24 ore, fine settimana compresi. Al giorno 4-5 dopo la semina, il terreno apicale non viene più riaggiunto mentre si sostituisce solo quello basolaterale. In questa situazione le cellule sono in una condizione di “*air-liquid interface*” (ALI). Se le cellule generano un epitelio ad alta resistenza, la superficie apicale rimarrà “asciutta” senza neanche un menisco di liquido lungo i bordi. La formazione dell’epitelio può essere controllata direttamente misurando la resistenza elettrica transepiteliale.

Dopo 2-4 settimane in ALI, le cellule dovrebbero mostrare un marcato differenziamento mucociliare che può essere controllato in immunofluorescenza usando anticorpi contro ZO-1 (giunzioni serrate), tubulina acetilata (cilia), MUC5AC (cellule caliciformi).

Applicazioni delle colture di cellule epiteliali bronchiali

Le cellule differenziate su supporti porosi possono essere utilizzate per:

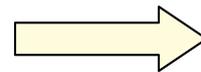
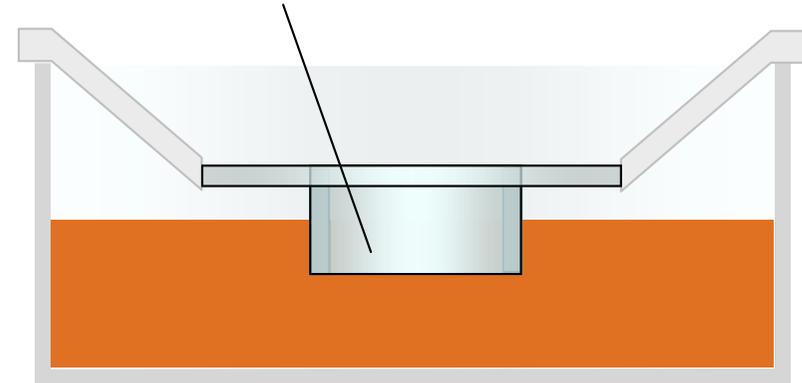
- studiare il trasporto ionico transepiteliale e l'attività di CFTR e altri canali/trasportatori mediante camera di Ussing o sistemi analoghi
- studiare l'espressione di proteine mediante immunofluorescenza o western blot (in questo caso si possono usare i Transwell per la maggiore quantità di cellule)
- studiare l'espressione genica mediante estrazione di RNA seguita da RT-PCR o analisi con microarray/macroarray
- valutare l'efficacia di manovre di "gene delivery"
- studiare l'effetto di interazioni tra batteri e cellule epiteliali



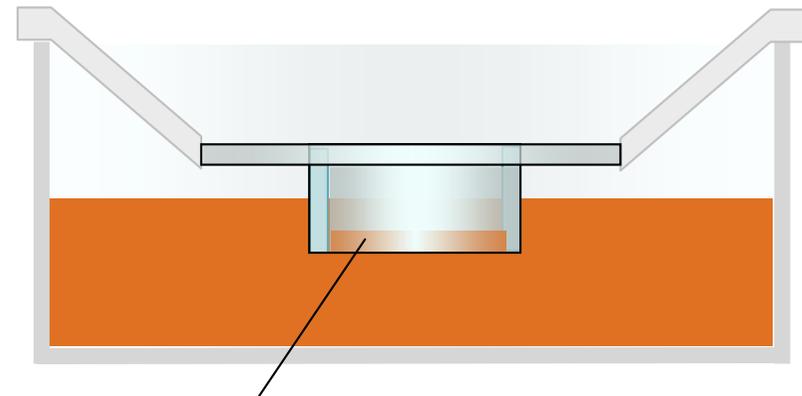
coltura sommersa

0.5/1.5 ml AP (Snapwell/Transwell)
2.0/2.5 ml BL (Snapwell/Transwell)

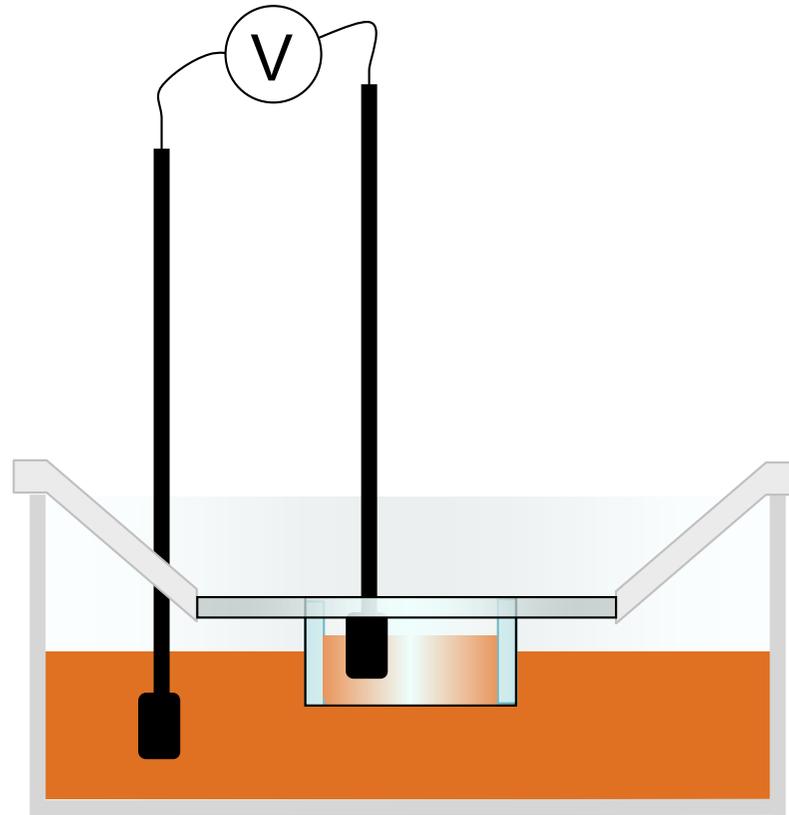
epiteli differenziati ("tight epithelia")
con alta resistenza manterranno la
superficie apicale asciutta



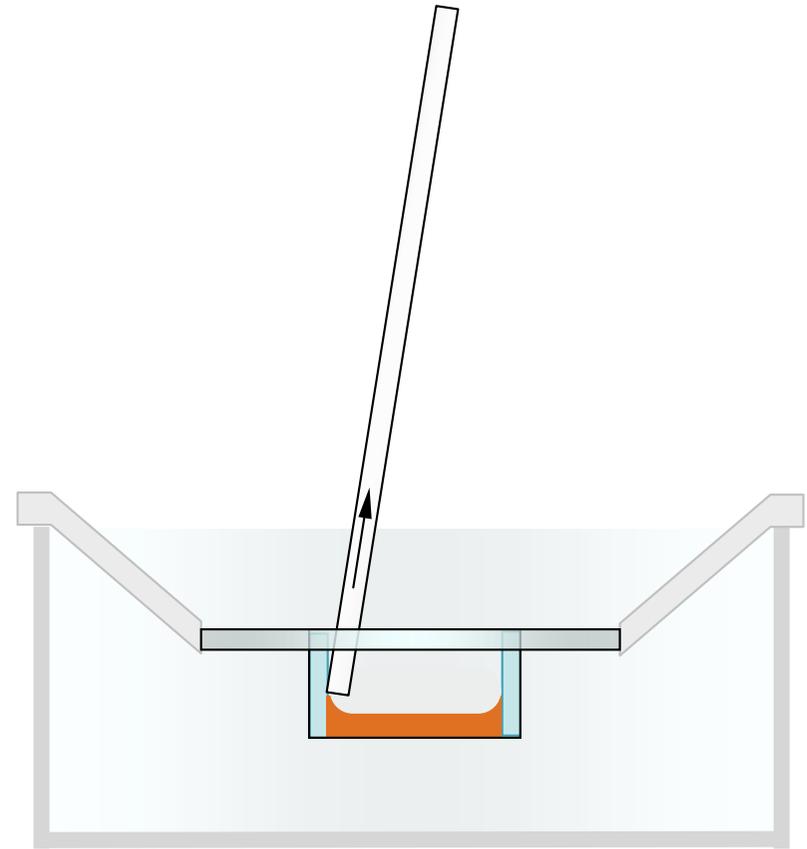
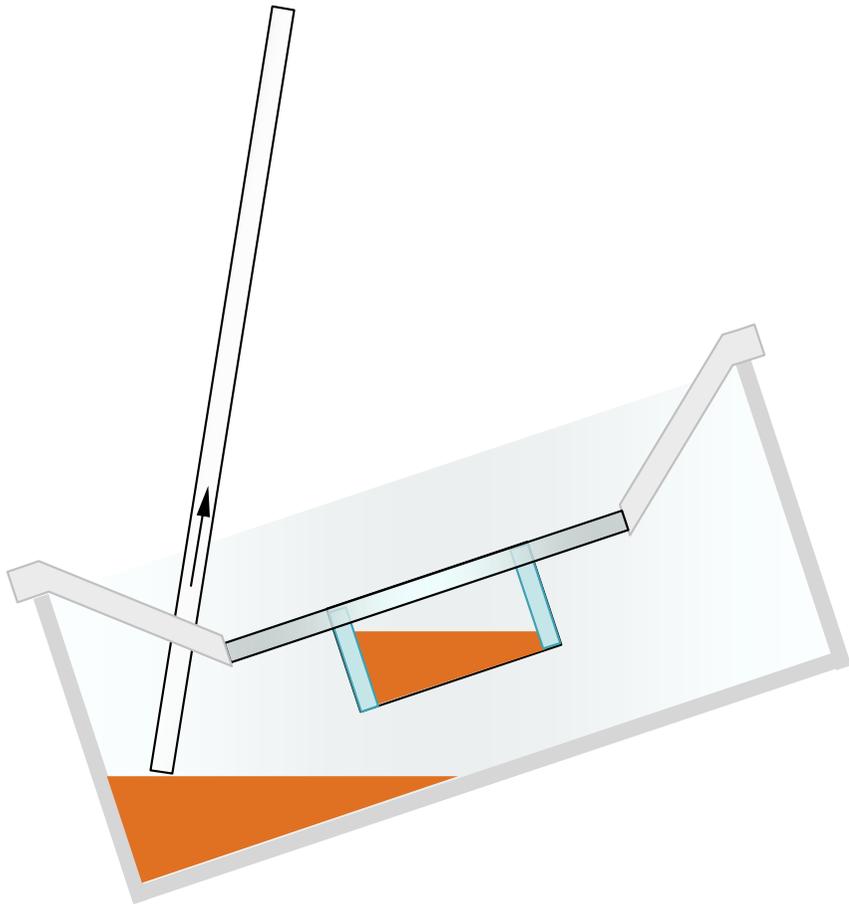
air liquid interface
(terreno apicale rimosso)



epiteli non differenziati mostreranno, dopo 24
ore, riaccumulo di liquido dopo aspirazione
del terreno apicale



Il differenziamento di un epitelio può essere monitorato in coltura mediante l'uso di un voltmetro epiteliale (se disponibile) che misura sia la differenza di potenziale sia la resistenza elettrica transepiteliale. Un epitelio ben differenziato ha in genere una resistenza di almeno $400\text{-}500 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ e una differenza di potenziale di almeno $20\text{-}30 \text{ mV}$. Per la misura il lato apicale deve ovviamente contenere terreno o una soluzione salina. In assenza di un voltmetro si può valutare lo sviluppo dell'epitelio controllando la capacità di mantenere la superficie apicale asciutta dopo rimozione del terreno apicale.



L'aspirazione del terreno nei supporti porosi richiede una particolare attenzione. Il terreno dal lato basolaterale può essere aspirato inclinando la piastra. Il terreno dal lato apicale deve essere aspirato senza toccare lo strato di cellule. Questo può essere effettuato abbassando lentamente la pipetta di aspirazione sul bordo dell'insero e sfruttando il menisco del liquido.