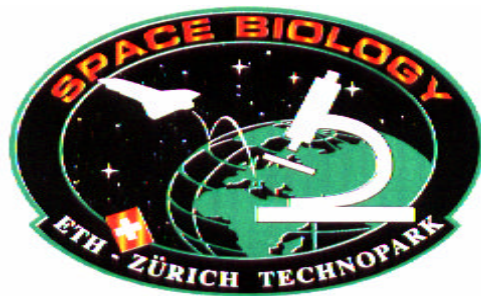


**Diplomarbeit**

**Espressione genetica in linfociti attivati in condizioni di  
gravità alterata**

Gruppe Weltraumbiologie  
Dr. Augusto Cogoli  
ETH Zürich

Betreut von Dr. Isabelle Walther



Fabio Rezzonico  
Abt. XAc  
20 Aprile 1998

Never bring me down to earth again  
Let me blaze a trail of glory across the sky  
Let me traipse across its golden high  
Let me marvel in wonder and unfettered gaze  
At the bigness and implausibility of being

Bob Geldof, *Thinking Voyager 2 Type Things*

## 0. Sommario

<b>0. SOMMARIO</b>	<b>3</b>
<b>1. RIASSUNTO</b>	<b>5</b>
1.1 RIEPILOGO	5
1.2 ZUSAMMENFASSUNG	5
<b>2. INTRODUZIONE</b>	<b>6</b>
2.1 LA BIOLOGIA SPAZIALE	6
2.1.1 <i>Microgravità</i>	6
2.2 IL SISTEMA IMMUNITARIO	7
2.2.1 <i>I macrofagi</i>	7
2.2.2 <i>I linfociti</i>	8
2.3 L'ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI	9
2.3.1 <i>Ruolo dei proto-oncogeni</i>	10
2.4 LA FORZA DI GRAVITÀ ED IL SISTEMA IMMUNITARIO	12
2.5 REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)	12
2.5.1 <i>Ottimizzazione della PCR</i>	13
<b>3. AUFGABESTELLUNG</b>	<b>15</b>
3.1 PROBLEMSTELLUNG	15
3.2 ZIELE	15
3.3 METHODIK	15
<b>4. MATERIALI E METODI</b>	<b>16</b>
4.1 TERRENO DI CULTURA	16
4.2 ISOLAZIONE DEI LINFOCITI DAL SANGUE	16
4.2.1 <i>Determinazione del numero di linfociti</i>	16
4.3 ESPERIMENTI IN MICROGRAVITÀ SIMULATA	17
4.3.1 <i>Esperimenti sul clinostato</i> <sup>13, 14</sup>	17
4.3.2 <i>Esperimenti sulla RPM</i> <sup>15</sup>	17
4.4 ESTRAZIONE DELL'RNA DALLE CELLULE	18
4.4.1 <i>Decontaminazione dalle ribonucleasi</i>	18
4.4.2 <i>Isolazione con RNazol™</i>	19
4.4.3 <i>Isolazione con GITC (metodo modificato)</i>	19
4.4.4 <i>Determinazione della quantità di RNA</i>	21
4.4.4.1 <i>Metodo spettrofotometrico</i>	21
4.4.4.2 <i>Altri metodi</i>	21
4.5 POLYMERASE CHAIN REACTION	21
4.6 QUANTIFICAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENETICA	23
4.6.1 <i>Gel elettroforesi</i>	23
4.6.2 <i>Densitometria</i>	23
<b>5. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>24</b>
5.1 ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA	24
5.1.1 <i>Metodi di estrazione dell'RNA</i>	24
5.1.2 <i>Quantificazione dell'RNA</i>	24
5.2 OTTIMIZZAZIONE DELLA PCR	25

5.2.1	<i>Concentrazione di cloruro di magnesio nella reazione di PCR</i>	25
5.2.2	<i>Concentrazione dei primers nella reazione di PCR</i>	25
5.2.3	<i>Quantità iniziale di RNA</i>	26
5.2.4	<i>Linearità della PCR</i>	26
5.2.4.1	c-fos	27
5.2.4.2	$\beta$ -actina	27
5.2.4.3	c-myc	28
5.2.4.4	IL-2R	29
5.2.4.5	Conclusioni	29
5.3	ESPRESSIONE GENETICA	30
5.3.1	<i>Esperimenti preliminari</i>	30
5.3.2	<i>Attivazione in microgravità simulata nella RPM</i>	32
5.4	DISCUSSIONE	35
5.4.1	<i>Ottimizzazione della RT-PCR</i>	35
5.4.1.1	Quantificazione dell'RNA	35
5.4.1.2	RT-PCR	36
5.4.1.3	Densitometria	36
5.4.1.4	Conclusioni	37
5.4.2	<i>Espressione genetica</i>	37
5.4.2.1	c-fos	37
5.4.2.2	c-myc	38
5.4.2.3	IL-2R	38
5.4.2.4	Conclusioni	38
<b>6.</b>	<b>ABBREVIAZIONI E SIMBOLI</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>LETTERATURA</b>	<b>41</b>
<b>8.</b>	<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>43</b>

# 1. Riassunto

## 1.1 Riepilogo

La trascrizione dell'RNA dei proto-oncogeni *c-fos* e *c-myc* è tra i primi eventi che vengono osservati immediatamente dopo l'attivazione policlonale *in vitro* dei linfociti umani T con concanavalina A e che portano infine le cellule a replicare il loro DNA e a dividersi. Gli esperimenti effettuati nello spazio hanno dimostrato come in condizioni di microgravità questa attivazione sia repressa del 90 % rispetto ai controlli a 1 *xg*, ma senza analizzare se questi effetti si manifestino già al livello dell'espressione dei proto-oncogeni.

In questo lavoro di diploma si è ottimizzato un metodo che tramite la *Polymerase Chain Reaction* permette la determinazione semiquantitativa dell'espressione genetica dell'mRNA dei geni *c-fos*, *c-myc* e *IL-2R* utilizzando la  *$\beta$ -actina*, un gene espresso costitutivamente dalle cellule, per normalizzare i risultati.

Con questo metodo si è poi analizzata l'espressione di questi geni in colture di linfociti attivati con l'aggiunta di concanavalina A in condizioni statiche o di microgravità simulata.

Mentre nessuna differenza è stata rimarcata per *c-myc*, una differente cinetica di espressione di *c-fos* ed una inibizione del normale aumento di *IL-2R* dopo due ore dall'attivazione sono state osservate. Dato che l'espressione di questo ultimo gene, unitamente alla corrispondente linfocina IL-2, è generalmente ritenuta essenziale per indurre i linfociti alla sintesi del DNA si può ipotizzare che le cause della repressione dell'attivazione in microgravità sono probabilmente già da ricercarsi al livello dell'espressione genetica degli *immediate* ed *early genes*. Ulteriori esperimenti sono comunque necessari per confermare questa ipotesi considerando l'esiguo numero di esperimenti effettuati ed il fatto che in microgravità questa espressione potrebbe essere semplicemente ritardata oltre le sei ore in cui la cinetica è stata analizzata.

## 1.2 Zusammenfassung

Die Transkription der Proto-Onkogene *c-fos* und *c-myc* ist eines der ersten Ereignisse, das nach der Aktivierung von T-Lymphozyten mit Concanavalin A beobachtet wird und das am Ende dazu führt, dass die Zellen ihre DNA replizieren und sich teilen. Mehrere Experimente im Weltraum haben gezeigt, dass in Mikrogravitation die *in vitro* Aktivierung von Lymphozyten zu 90 % vermindert ist. Die Rolle der Proto-Onkogene in diesem Prozess wurde aber dabei nicht erforscht.

In dieser Diplomarbeit wurde eine Methode optimiert, die mit Hilfe der *Polymerase Chain Reaction* eine semiquantitative Bestimmung der Expression der Gene *c-fos*, *c-myc* und *IL-2R* erlaubt. Dabei wird die Expression von  *$\beta$ -Actin*, ein Gen das von den Zellen konstitutiv exprimiert wird, dazu benutzt, um die Resultate zu normalisieren.

Mit dieser Methode wurde dann die Expression dieser Gene in Lymphozytenkulturen untersucht, die entweder statisch oder in simulierter Mikrogravitation mit Con A aktiviert worden sind.

Während kein Unterschied in der Expression von *c-myc* beobachtet werden konnte, wurde eine unterschiedliche Kinetik in der Expression von *c-fos* und eine Inhibition der normalerweise nach 2 Stunden erwarteten Zunahme der *IL-2R* mRNA Konzentration festgestellt. Da die Expression des Interleukin-2 Rezeptors, zusammen mit der Expression von Interleukin-2, im allgemeinen als wesentlich für die Induktion der Zellen zur DNA Synthese gilt, kann man davon ausgehen, dass die Ursachen der Repression der Aktivierung in Mikrogravitation bereits auf der Ebene der Expression von *early* and *immediate genes* zu suchen sind. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um diese Hypothese zu bestätigen da diese Expression in Mikrogravitation einfach verspätet sein könnte und zwar nach den 6 Stunden bei denen die Expression in diesen Versuch gemessen wurde.

## 2. Introduzione

### 2.1 La biologia spaziale

La biologia spaziale è una scienza relativamente giovane che si occupa delle reazioni degli organismi viventi alle condizioni normalmente presenti in un volo spaziale, cioè microgravità ed esposizione alla radiazione cosmica.

I primi esperimenti in questo campo avevano come obiettivo principale quello di dimostrare la fattibilità dei voli spaziali abitati: in questa ottica si inseriscono i primi voli parabolici con a bordo delle scimmie alla fine degli anni '40 e il volo orbitale della cagnetta Laika sullo *Sputnik 2* nel 1957. La dimostrazione di come i mammiferi potessero sopportare un volo spaziale di corta durata senza subire danni fisici permanenti aprì la strada al primo volo orbitale umano di Gagarin nel 1961.

I primi voli spaziali, abitati e non, avevano già a bordo dei piccoli esperimenti biologici, prevalentemente culture di batteri o cellule o piccoli animali, ma mancavano dei necessari controlli a 1  $xg$  e della possibilità di fornire al sistema studiato condizioni stabili e riproducibili. Condizioni di sperimentazione accettabili furono raggiunte solo negli anni '70 con i voli *Skylab*. Ma solo negli anni '80 l'insediamento di una stazione spaziale permanentemente abitata come la *MIR* e l'intensificarsi dei voli spaziali grazie all'arrivo dello *Space Shuttle* hanno permesso uno studio sistematico dei fenomeni biologici nello spazio. Le apparecchiature montate su *Spacelab* e *Biorack* hanno fornito la possibilità di regolare entro certi limiti i parametri ambientali, di congelare i campioni prima del rientro per la susseguente analisi a terra e, non meno importante, di effettuare i dovuti esperimenti di controllo a 1  $xg$  anche in volo grazie ad una centrifuga.

I risultati delle sperimentazioni nello spazio e a terra hanno portato a concludere che le cellule sono sensibili alla gravità e reagiscono a cambiamenti del campo gravitazionale:

Tipo di cellule	Funzione cellulare alterata	Letteratura
	<i>Consumo di metaboliti</i>	
Fibroblasti embrionali (WI 38)	Riduzione del 20% nell'assorbimento di glucosio	1
	<i>Biosintesi</i>	
Linfociti	Aumento del 500% nella produzione di $\alpha$ -interferone	2, 3
	<i>Differenziazione</i>	
Linfociti	Riduzione del 90% dell'attivabilità con Con A	4, 5, 6, 7, 8
	<i>Aggregazione</i>	
Eritrociti	Differenti schemi di aggregazione osservati in microgravità e ad 1 $xg$ ed in cellule provenienti da pazienti sani e da pazienti malati	9, 10

**Tabella 1:** effetti della microgravità sulla funzione di alcune cellule umane <sup>11</sup>.

#### 2.1.1 Microgravità

L'uso del termine microgravità è in genere da preferirsi all'espressione "assenza di peso", che si riferisce ad una condizione di totale assenza della forza gravitazionale ed è pertanto impossibile da realizzarsi considerando l'intima relazione che intercorre tra massa e gravitazione (un corpo qualsiasi è soggetto alla gravitazione esercitata dalle proprie parti tra di loro solo per il fatto di possedere una massa).

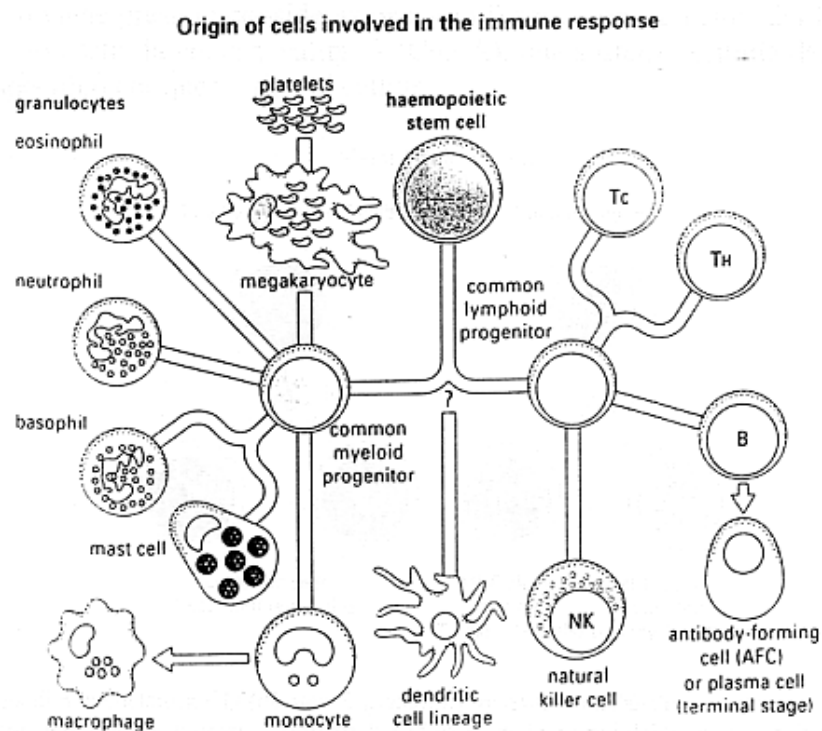
L'idea di assenza di peso è spesso associata con quella della caduta libera e, in generale, si può definire come lo stato di un sistema nella quale la gravitazione non è contrastata da altre forze che non siano le forze inerziali virtuali <sup>12</sup>.

In orbita terrestre è possibile ottenere, per periodi che vanno da alcuni giorni a svariati mesi, delle accelerazioni gravitazionali dell'ordine di  $10^{-5}$ - $10^{-8}$   $xg$  su satelliti senza equipaggio e, a dipendenza delle attività degli astronauti, di  $10^{-2}$ - $10^{-4}$   $xg$  su veicoli abitati. Con razzi sonda suborbitali e voli parabolici su aerei è pure possibile ricreare condizioni di microgravità per un periodo di alcuni minuti ed alcuni secondi rispettivamente.

A terra non è possibile ricreare condizioni di vera e propria microgravità, ma solo di simularla in apparecchiature come il clinostato a rotazione veloce<sup>13,14</sup> o la *Random Positioning Machine* (RPM) che sottopongono il sistema ad una randomizzazione del vettore gravitazionale per cui, idealmente, la sua risultante tende a zero nel corso del tempo<sup>15</sup>. Gli effetti scalari della forza peso, come la formazione di una pressione idrostatica, non sono però eliminabili da queste apparecchiature, per cui i risultati ottenuti in microgravità simulata devono essere considerati con le dovute cautele<sup>16</sup>.

## 2.2 Il sistema immunitario

Lo scopo del sistema immunitario è quello di difendere l'integrità dell'individuo da fattori esterni quali possono essere sostanze estranee o parassiti (virus, batteri, eucarioti monocellulari o pluricellulari). La risposta del sistema immunitario ad un'aggressione è altamente specifica ed è il risultato della collaborazione di cellule diverse che posseggono ciascuna una funzione specifica propria.



**Figura 1:** tutte le cellule del sistema immunitario sono originate da cellule staminali pluripotenti prodotte nel midollo osseo e vengono prodotte secondo due vie principali di differenziazione: una per i leucociti e l'altra per le cellule mieloidi. Le cellule progenitrici della linea linfoide si differenziano ulteriormente a seconda dell'ambiente che le circonda. Nei mammiferi esse generano infatti i linfociti T se si trovano nel timo oppure i linfociti B se lo sviluppo avviene nel midollo osseo<sup>17</sup>.

### 2.2.1 I macrofagi

Queste cellule, facenti parte del gruppo dei fagociti, costituiscono il 2-8% della popolazione dei leucociti e sono originate dalla differenziazione dei monociti. I macrofagi hanno un ruolo di primo piano come *antigen presenting cells* (APC). Riconoscono cellule od organismi estranei per mezzo di recettori superficiali, li fagocitano e li distruggono nelle loro componenti. Queste vengono

dapprima elaborate all'interno della cellula e poi presentate in superficie come antigeni ai linfociti per mezzo di proteine MHC (*major histocompatibility complex*) del tipo II. I frammenti di proteine endogene vengono invece presentati su molecole MHC della classe I.

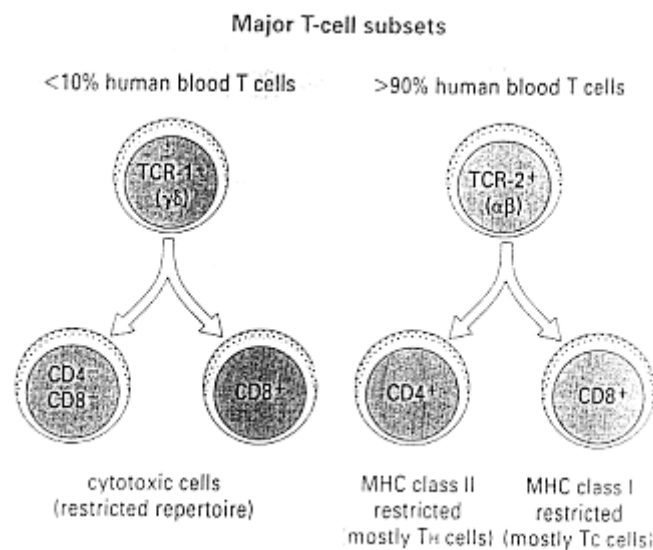
### 2.2.2 I linfociti

I linfociti vengono prodotti negli organi del sistema linfatico primario, cioè timo (i linfociti T) e midollo osseo (i linfociti B), dove si formano a partire da cellule staminali pluripotenti (vedi Figura 1). Alcune di queste cellule migrano attraverso il sistema circolatorio negli organi linfatici secondari quali la milza, i linfonodi, le tonsille ed il tessuto linfatico associato alle mucose (MALT). Un individuo adulto produce mediamente ogni giorno approssimativamente un miliardo di linfociti e possiede in totale circa  $10^{12}$  linfociti che costituiscono circa il 2% del peso corporeo e il 20% della popolazione dei leucociti.

I linfociti vengono suddivisi in due grandi gruppi: i linfociti B ed i linfociti T, questi ultimi caratterizzati dalla presenza di molecole TCR (*T-cell antigen receptor*) sulla superficie cellulare.

Un terzo tipo di linfociti è costituito dalle cosiddette cellule della terza popolazione (*3<sup>rd</sup> population cells*), dette anche *natural killer cells* (NK). La loro funzione è quella di riconoscere e distruggere cellule infettate da virus o certe cellule tumorali. Esse sono anche in grado di legarsi a cellule bersaglio ricoperte da anticorpi IgG e di distruggerle.

In questo lavoro viene presa in considerazione solo l'espressione genetica dei linfociti T, in quanto l'agente mitogeno usato, la concanavalina A (Con A), una sostanza estratta dalla pianta *Canavalia ensiformis*, è specifico per questo tipo di cellule.



**Figura 2:** il sistema di nomenclatura CD (*cluster designation*), derivante dall'analisi di anticorpi monoclonali prodotti nei topi contro gli antigeni dei leucociti umani, permette la suddivisione in gruppi dei timociti attraverso i recettori antigenici TCR 1 e TCR 2 e gli antigeni di superficie CD4 e CD8 <sup>17</sup>.

Cellule T<sub>H</sub> (*T-Helper cells*): portano l'antigene CD4 (e sono pertanto denotate come CD4<sup>+</sup>) in qualità di *marker* e riconoscono gli antigeni presentati in combinazione con molecole MHC della classe II. Inoltre attivano clonalmente i linfociti B durante la risposta immunitaria umorale grazie alla secrezione di linfocine quali l'interleuchina.

Cellule T<sub>C</sub> (*T-Cytotoxic cells*): sono cellule CD8<sup>+</sup> che riconoscono ed eliminano le cellule ospiti infettate da virus o da altri patogeni intracellulari.

### 2.3 L'attivazione dei linfociti

I linfociti B e T normalmente presenti nel corpo umano si trovano in una fase di stasi del ciclo cellulare, la cosiddetta fase G<sub>0</sub>, nella quale non si ha né replicazione del DNA né, di conseguenza, alcuna divisione cellulare.

Essi vengono però attivati clonalmente dal contatto con il loro antigene specifico alla presenza di cellule T<sub>H</sub>. Questo significa che solo le cellule che reagiscono contro l'antigene estraneo proliferano, fatto che permette al sistema immunitario di rispondere con alta specificità e senza dispendio di risorse ad ogni aggressione.

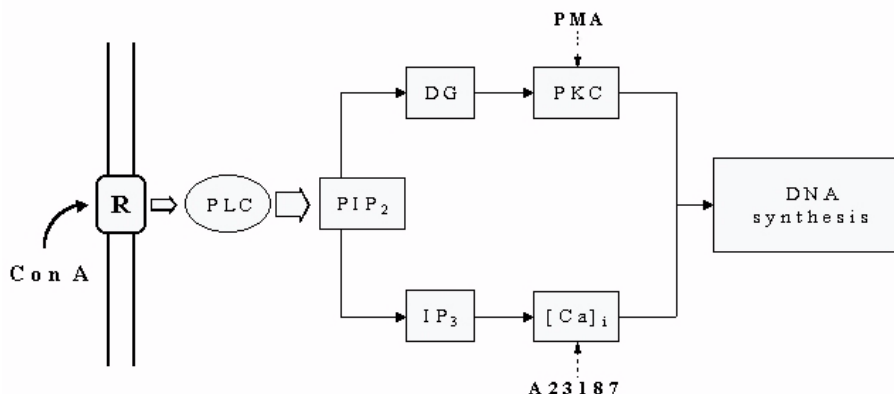
Oltre a questa attivazione monoclonale è possibile attivare i linfociti T in maniera non specifica grazie a delle lecitine (glicoproteine) vegetali che fungono da segnale di attivazione primario. Le più adoperate sono la concanavalina A (usata per attivare le cellule in tutti gli esperimenti di questo lavoro) o la fitoemoagglutina (PHA) proveniente da *Phaseolus vulgaris*, la comune pianta di fagiolo.

La concanavalina A si lega specificamente agli α-D-glucopiranosidi e agli α-D-mannopiranosidi delle glicoproteine e dei polisaccaridi sulla superficie dei linfociti. Questo legame ai recettori della membrana provoca una rete di legami intra- ed intercellulari tra le proteine della membrana che porta infine all'attivazione dei linfociti.

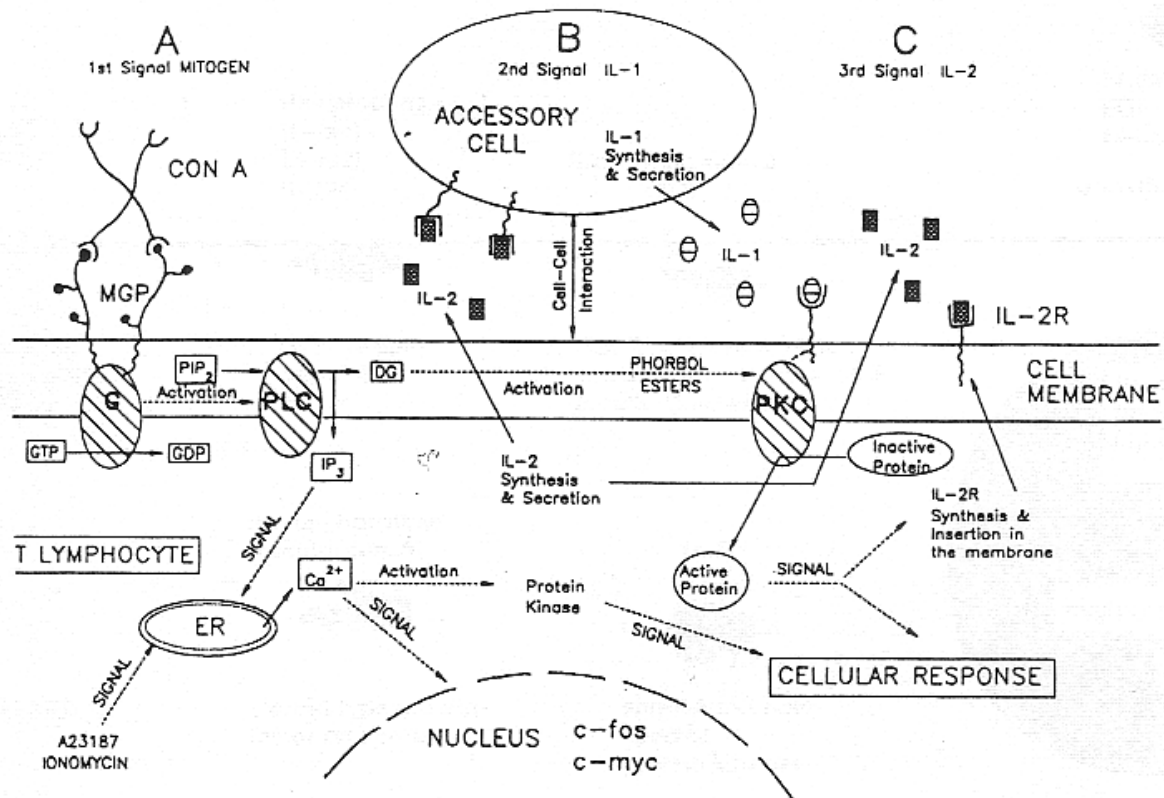
I principali eventi che si verificano nei primi minuti dopo l'aggiunta di Con A nei timociti di topo sono sommarizzati dalla tabella sottostante e mostrati schematicamente nelle Figure 3 e 4:

Risposta all'aggiunta di Con A	Rilevata dopo
Aumento della concentrazione intracellulare di Ca <sup>2+</sup>	
Rilascio di IP <sub>3</sub>	
Aumento del pH intracellulare	0-5 minuti
Sintesi di PIP <sub>2</sub> e PIP	
Aumento dell'mRNA di c-fos	
Aumento dell'mRNA di c-myc	
Stimolazione della glicolisi	5-50 minuti
Aumento dell'assorbimento di metaboliti	
Aumento dell'incorporazione di inositolo in PtdIns	
Aumento generalizzato nella sintesi di RNA	Dopo 300 minuti
Aumento generalizzato della sintesi proteica	

**Tabella 2:** sequenza approssimativa degli eventi osservati nei linfociti T di topo nei primi minuti dopo l'attivazione con Con A<sup>18</sup>.



**Figura 3:** schema semplificato dell'attivazione dei linfociti da parte del mitogeno Con A attraverso l'idrolisi di PIP<sub>2</sub> (ipotesi del doppio segnale). Sia presenza di IP<sub>3</sub> che quella di DG sono necessarie affinché si arrivi alla sintesi del DNA e quindi alla divisione cellulare. Il rilascio di ioni calcio può essere stimolato da sostanze come lo ionoforo A23187 (Ionomicina) mentre la PKC viene attivata esteri forbolici quali il PMA. Queste due sostanze da sole non sono in grado di provocare l'attivazione dei linfociti, mentre lo possono fare agendo in combinazione. R: recettore<sup>18</sup>.



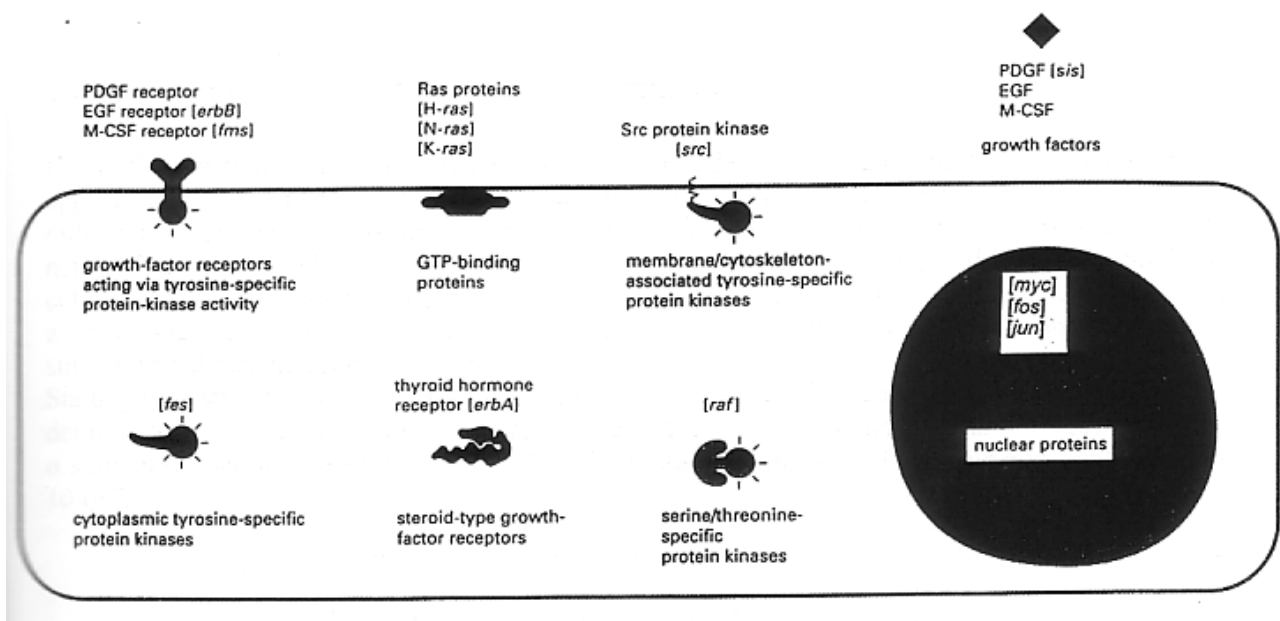
**Figura 4:** trasmissione del segnale di attivazione nei linfociti. Con A si lega alle glicoproteine della membrana (MGP) attivando una GTPasi (proteina G) che a sua volta attiva la fosfolipasi C (PLC) che idrolizza  $PIP_2$ .  $IP_3$ , uno dei prodotti dell'idrolisi viene liberato nel citoplasma dove provoca la liberazione di ioni calcio dal reticolo endoplasmatico. L'aumentata concentrazione di calcio attiva tra l'altro una proteinchinasi citoplasmatica che prende parte alla trasduzione del segnale di attivazione nel nucleo. DG, l'altro prodotto dell'idrolisi di  $PIP_2$ , è in grado, con la collaborazione di IL-1 e quella di interazioni cellulari con dei monociti, di attivare la proteinchinasi C (PKC). Una proteina citoplasmatica viene attivata da PKC tramite fosforilazione e funge così da segnale per la produzione del recettore dell'interleuchina-2

(IL-2R). Il legame tra IL-2 e IL-2R provoca l'attivazione completa dei linfociti. Le cellule cominciano a dividersi e due popolazioni vengono generate, le cellule della memoria e le *effector cells* <sup>19</sup>.

### 2.3.1 Ruolo dei proto-oncogeni

Si definiscono proto-oncogeni quei geni normalmente presenti nella cellula i cui prodotti, quando si trovano nello stato attivato, stimolano la proliferazione cellulare. Essi sono da distinguere dai *tumor suppressor genes* (geni soppressori di tumore) i quali invece esercitano un controllo negativo sulla proliferazione impedendo con la presenza dei loro prodotti la divisione cellulare. Praticamente tutti i proto-oncogeni codificano per proteine che prendono parte alla trasduzione di un segnale dall'esterno della cellula al nucleo dove avviene la replicazione del DNA.

Una o più mutazioni nella sequenza di un proto-oncogene possono trasformarlo in un oncogene. Il prodotto di questo gene può per esempio essere una proteina che si trova permanentemente nello stato attivato e che non risponde più agli stimoli esterni. Il risultato è una proliferazione incontrollata che trasforma una cellula normale in una cellula tumorale.



**Figura 5:** localizzazione e funzione dei prodotti delle principali classi di proto-oncogeni conosciuti. Tra parentesi sono indicati alcuni membri di ciascuna classe<sup>20</sup>.

Come visto in precedenza (Figura 4) il contatto di antigeni o mitogeni con i recettori dei linfociti T attiva tutta una serie di eventi di trascrizione che portano dopo circa 24 ore la cellula ad entrare nella fase S del ciclo cellulare nella quale avviene la sintesi del DNA<sup>21,22</sup>.

Alcuni di questi eventi di trascrizione si caratterizzano per il fatto di avvenire in tempi molto brevi dopo l'attivazione, con cinetiche molto veloci e indipendentemente dalla sintesi di proteine (*immediate genes*)<sup>23</sup>. Tra questi mRNA vi sono anche quelli dei proto-oncogeni *c-myc* e *c-fos*, dalla cui traslazione vengono prodotte delle proteine che, interagendo a loro volta con il DNA, regolano la trascrizione di altri geni coinvolti nell'attivazione dei timociti (*early genes*).

Nome	Espresso dopo	Luogo dell'espressione	Aumento relativo	Tipo del gene
<i>c-fos</i>	15 minuti	nucleo	>100	<i>immediate gene</i>
<i>c-myc</i>	30 minuti	nucleo	20	<i>immediate gene</i>
<i>IL-2</i>	45 minuti	secreto	>1000	<i>early gene</i>
<i>IL-2R</i>	2 ore	membrana	>50	<i>early gene</i>

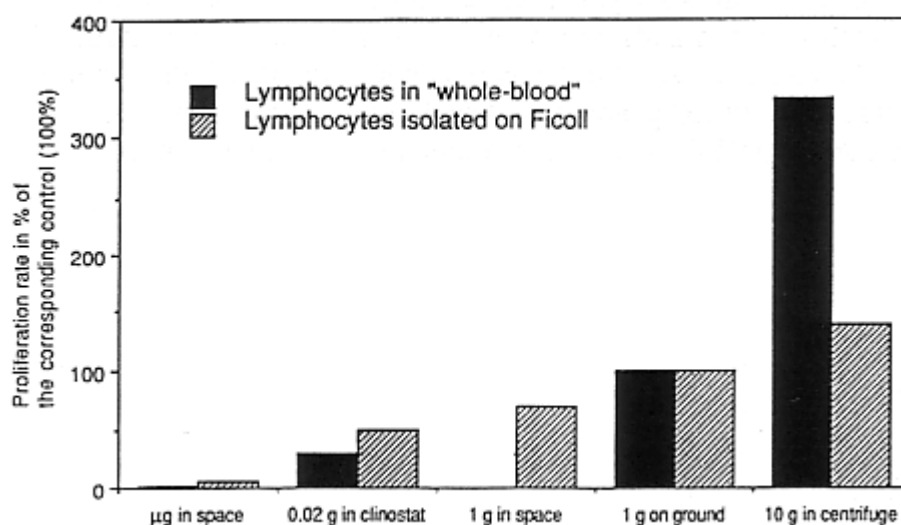
**Tabella 3:** espressione di *c-fos*, *c-myc*, dell'interleuchina-2 e del suo recettore nei linfociti T dopo l'inizio dell'attivazione. Il tempo di espressione si riferisce al primo momento nel quale la molecola o un aumento della sua concentrazione sono rilevati. L'aumento relativo è espresso come il rapporto tra il livello rilevato in cellule non attivate e quello rilevato in cellule attivate<sup>24</sup>.

La massima sintesi di DNA è ottenibile con un'esposizione minima di due ore delle cellule a Con A, fatto che indica come gli eventi che avvengono in questo lasso di tempo (tra zero e due ore) siano condizione sufficiente per indurre la proliferazione ma solo se presi nella loro globalità. La sola presenza di *c-fos* e *c-myc* non basta infatti per indurre i linfociti nella fase S del ciclo cellulare<sup>25</sup>. Visto che dopo le prime due ore la stimolazione mitogenica non è più necessaria deve avvenire un evento a questo tempo che obbliga la cellula a continuare il processo di attivazione fino alla divisione cellulare e questo è probabilmente l'espressione dell'interleuchina-2 e del suo recettore (ipotesi del *commitment*)<sup>24</sup>.

## 2.4 La forza di gravità ed il sistema immunitario

Nel 1973 scienziati sovietici scoprirono come i linfociti dei cosmonauti, estratti da sangue prelevato appena dopo l'atterraggio, mostrassero una diminuita reattività all'attivazione da parte di agenti mitogeni <sup>26</sup>. Questa osservazione, assieme a quelle effettuate sugli astronauti dello *Skylab* <sup>27</sup>, portò nel 1983 ai primi studi durante i quali fu osservata direttamente l'azione della microgravità su culture di linfociti durante la missione *Spacelab 1* <sup>4</sup>. Nel frattempo già nel 1977 cominciarono studi a terra dove i linfociti venivano sottoposti a un'accelerazione di 10  $xg$  o coltivati in microgravità simulata su clinostati a rotazione veloce.

Sia negli esperimenti effettuati a terra che in quelli compiuti nello spazio si trovò che l'attivazione dei linfociti esposti alla concanavalina A diminuiva fortemente in condizioni di microgravità (reale o simulata), mentre aumentava quando le cellule erano sottoposte ad accelerazioni dell'ordine di 10  $xg$  <sup>6</sup>.



**Figura 6:** riassunto degli effetti gravitazionali nell'attivazione di linfociti purificati con Ficoll (istogrammi semipieni) e in sangue intero diluito ("whole blood", istogrammi neri). I risultati sono espressi in percentuale del controllo a 1  $xg$  a terra. Il valore del controllo in volo a 1  $xg$  in sangue intero diluito non è disponibile in quanto il sangue è stato prelevato direttamente agli astronauti in orbita <sup>11</sup>.

I risultati delle missioni *Spacelab 1* e *Spacelab-D1* dimostrarono poi come l'attivazione *in vitro* dei linfociti con Con A fosse inibita di più del 90% rispetto ai controlli a 1  $xg$  <sup>7</sup>.

Anche negli astronauti si è rilevato un indebolimento della risposta immunitaria attivando *ex vivo* i linfociti prelevati prima, durante e dopo un volo spaziale: questo effetto è però di entità diversa e non è da confondersi con quello riscontrato *in vitro*, perché nel primo caso entrano in gioco, oltre alla microgravità, anche fattori quei stress normalmente associati al volo spaziale come per esempio la permanenza forzata con lo stesso gruppo di persone in uno spazio ristretto per un periodo prolungato <sup>5</sup>.

## 2.5 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

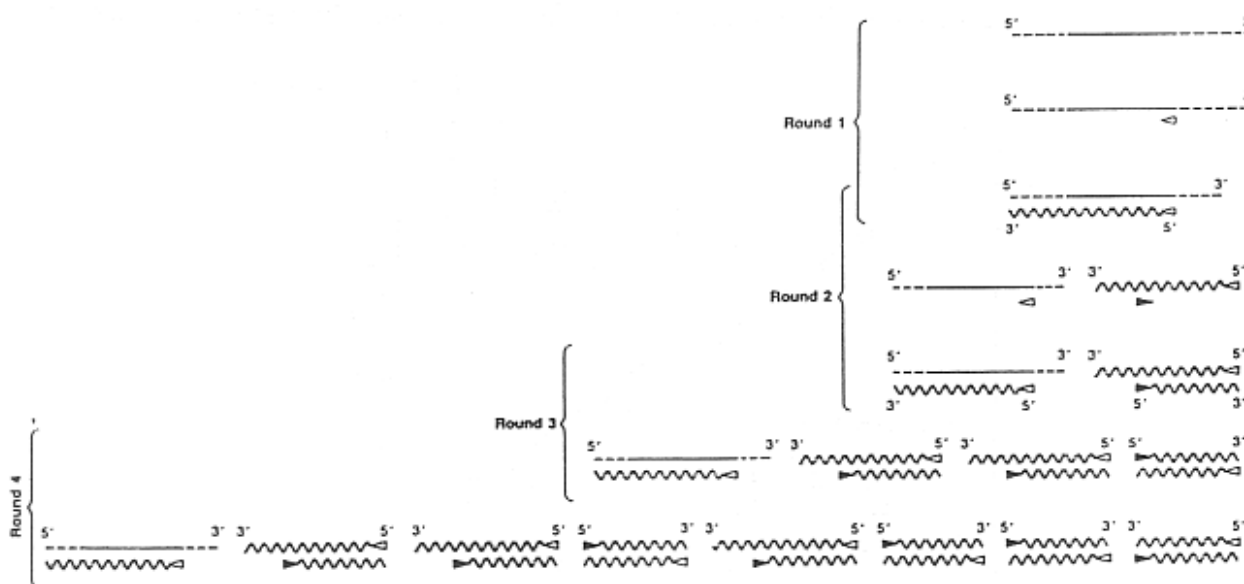
La quantificazione dell'espressione genetica nei linfociti risulta difficoltosa con i metodi tradizionali quali il *Northern blot* oppure l'ibridizzazione *in situ*, in quanto questi hanno una sensibilità che richiede quantità di RNA molto più elevate di quelle che è normalmente possibile ottenere da questo tipo di cellule <sup>28, 29</sup>. Se si aggiunge a questo che spesso, negli esperimenti di biologia spaziale, la grandezza dell'esperimento è soggetta a limitazioni di peso e volume a causa dei costi necessari per spedire dei carichi utili in orbita o su traiettorie paraboliche, allora diviene palese

l'utilità di un metodo come la *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) che permette di analizzare e quantificare anche quantità di RNA minute.

La PCR è uno dei nuovi metodi della biologia molecolare. Dalla sua scoperta nel 1986 da parte di Mullis e collaboratori <sup>30</sup> ha acquistato vieppiù importanza grazie alle possibilità che offre di studiare quantità anche piccolissime di acidi nucleici. Oltre che nella quantificazione dell'espressione genetica la PCR è oggi impiegata, per esempio, per analizzare e sequenziare il genoma, identificare i geni responsabili di malattie o in medicina legale nelle cosiddette prove del DNA.

La RT-PCR è un'estensione della PCR che permette l'analisi dell'RNA. Essa consiste fondamentalmente in due reazioni distinte: una reazione di retrotrascrizione (RT), in cui l'RNA estratto dai campioni da analizzare viene copiato in DNA complementare (cDNA) da una retrotrascrittasi, seguita da una reazione di amplificazione (PCR) del cDNA prodotto mediante una DNA-polimerasi termostabile, di solito la polimerasi di *Thermus aquaticus* (Taq).

L'unico requisito necessario per poter utilizzare questo metodo è la conoscenza di almeno parte della sequenza del gene che si vuole esaminare. Due sequenze di 20-30 nucleotidi (*primers*) complementari agli estremi della sequenza che si vuole amplificare, sono infatti necessarie perché la DNA-polimerasi possa sintetizzare una nuova molecola di DNA a partire dalla matrice. La nuova molecola sintetizzata può a sua volta venire utilizzata nei cicli seguenti come matrice, dando vita a una vera e propria reazione a catena in cui il numero di molecole di DNA cresce esponenzialmente col numero di cicli.



**Figura 7:** i primi cicli di una reazione di PCR. La molecola di partenza che funge da matrice è DNA a catena singola (in alto: linea dritta). I due *primers* sono rappresentati dal triangolino bianco e quello nero. I prodotti dei primi cicli di amplificazione sono alquanto eterogenei nelle dimensioni. Il segmento di DNA tra i due *primers* viene comunque amplificato preferenzialmente e diventa presto la specie dominante nella reazione. Se il DNA di partenza è a catena doppia le stesse reazioni si verificheranno anche per la catena di DNA complementare <sup>31</sup>.

### 2.5.1 Ottimizzazione della PCR

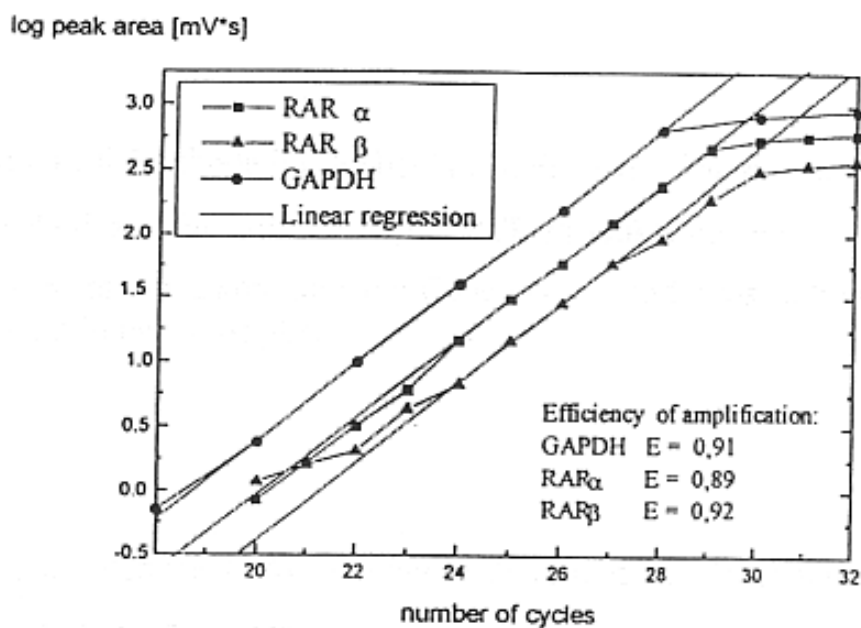
Per ottimizzare un processo di PCR in modo da renderlo utilizzabile per quantificare l'espressione genetica è necessario stabilire quali sono i valori di tutta una serie di parametri della reazione affinché dopo la separazione dei vari frammenti mediante elettroforesi si ottengano delle bande chiare e ben distinte di un'intensità proporzionale alla quantità iniziale di mRNA del gene in esame. Questi parametri comprendono le concentrazioni iniziali di tutti i componenti della reazione, il tempo di ciascuna fase del ciclo di amplificazione e il numero di cicli. Siccome questi parametri dipendono da fattori come la quantità di RNA messaggero specifico presente dalla lunghezza e

sequenza del segmento da amplificare, questo processo di ottimizzazione è necessario per ogni coppia di *primers* usati, anche se essi sono intesi ad amplificare segmenti diversi dello stesso gene. Condizione indispensabile perché si possa usare la RT-PCR per quantificare l'espressione genetica è che la reazione si trovi ancora nella sua fase esponenziale, nella quale il numero di molecole prodotte è descritto dall'equazione:

$$N = N_0 \cdot (1 + E)^n$$

- N = Numero di molecole amplificate
- $N_0$  = Numero iniziale di molecole
- n = Numero di cicli
- E = Efficienza dell'amplificazione

Il problema di ottimizzare le condizioni per utilizzare una RT-PCR affinché dia risultati quantitativi o semiquantitativi risiede nel fatto che la reazione rimane nella sua fase esponenziale solo per un certo numero di cicli, dopodiché la sua efficienza tende a diminuire a causa di alcune componenti che divengono limitanti come la perdita di attività da parte della polimerasi o la scarsità dei nucleotidi dovuti al consumo durante la reazione. In questa fase cosiddetta di *plateau* il numero di molecole non aumenta più esponenzialmente con il numero di cicli, impedendo così la possibilità di stabilire la quantità iniziale  $N_0$  di molecole conoscendo il numero di cicli n e la quantità finale di molecole N (stabilita mediante gel elettroforesi e susseguente densitometria).



**Figura 8:** esame dell'efficienza dell'amplificazione di tre diversi geni mediante analisi HPLC dei frammenti ottenuti con la PCR. La fase esponenziale della reazione termina tra i 28 e i 30 cicli a seconda del gene preso in considerazione. Il valore dell'efficienza E della reazione può venire calcolato dalla pendenza delle rette ottenute dopo aver effettuato una regressione lineare dei dati <sup>32</sup>.

### 3. Aufgabestellung \*

#### Espressione genetica in linfociti attivati in condizioni di gravità alterata

##### 3.1 Problemstellung

Mehrere Experimente im Weltraum haben gezeigt, dass unter Mikrogravitation die *in vitro* Aktivierung von Lymphozyten zu 90% vermindert ist. Die Expression von verschiedenen Genen wird untersucht, um herauszufinden bei welcher Stelle die Mikrogravitation die Aktivierung beeinflusst. Die Proto-Onkogene *c-fos* und *c-myc* spielen eine Rolle sehr früh in der Aktivierung. Gemäss Literaturangaben sind diese Gene in einer normalen Aktivierung schon nach 10, beziehungsweise 30 Minuten mehrfach induziert.

In einem Experiment am Bord einer Höhenforschungsrakete (voraussichtlich 2000) wird die Expression von *c-fos* untersucht. Die Lymphozyten werden in einer speziell entwickelten Kulturkammer in Mikrogravitation aktiviert und nach etwa 6 Minuten mittels einer Lösung lysiert. Nach dem Flug wird die RNA isoliert und die genetische Expression von *c-fos* mit Hilfe der RT-PCR Methode untersucht. Um die Bedingungen dieser und weiterer Untersuchungen optimieren zu können, muss die Expression von diesen Genen genauer untersucht werden.

##### 3.2 Ziele

- Optimierung der RT-PCR Methode für die benützten Primers (*β-actin*, *c-myc*, *c-fos*)
- Ausarbeiten der Technik zur Quantifizierung der PCR-Produkte im Gel
- Untersuchung der genetischen Expression der Genen *c-myc* und *c-fos* während der Aktivierung bei 1 g und bei simulierter Schwerelosigkeit.

##### 3.3 Methodik

- Isolierung von Lymphozyten aus *Buffy-coat* und Aktivierung mit Concanavalin A
- Isolierung von RNA aus Lymphozyten (verschiedene Methoden)
- RT-PCR
- Gelelektrophorese
- Analyse von den PCR-Produkten mit einem Densitometer

---

\* Originalfassung von Dr. Isabelle Walther (Aufgabestellung der Diplomarbeit)

## 4. Materiali e metodi

### 4.1 Terreno di cultura

I linfociti isolati secondo il metodo descritto nel Capitolo 4.2 sono stati coltivati nel terreno di cultura RPMI-1640 modificato:

RPMI 1640 in polvere (*Sigma*, R-6504)

HEPES ( <i>Sigma</i> , H-9136)	40 mM
Bicarbonato di sodio ( <i>Merck</i> , 6329)	5 mM
Gentamicina ( <i>GibcoBRL</i> , 4682)	50 mg·l <sup>-1</sup>
Siero fetale bovino (FCS, <i>Gibco</i> , 011-06290 M)	10 %

pH: 7.3, calibrato con l'aggiunta di 1N NaOH (*Titrisol*, *Merck*)

### 4.2 Isolazione dei linfociti dal sangue

I linfociti sono stati isolati a partire da *buffy coat*, un sottoprodotto della lavorazione del sangue, ottenuto presso il centro trasfusionale della Croce Rossa Svizzera di Zurigo, addizionato di citrato di sodio in qualità di anticoagulante. Il gruppo sanguigno del donatore non è stato preso in considerazione come criterio per la scelta del preparato. Per contro l'estrazione dei linfociti è sempre stata effettuata il giorno seguente il prelievo dal donatore e la conservazione del preparato così come l'intera procedura di isolazione sono avvenute a temperatura ambiente.

La separazione dei linfociti è stata effettuata diluendo dapprima 10 volte il *buffy coat* con HBSS pH 7.3 (Hank's balanced salt solution, *Sigma*, H-4891) e poi posando, in un tubo Falcon da 50 ml, 20 ml della diluizione su un cuscino di 25 ml di Ficoll (densità: 1.077 g·l<sup>-1</sup>, *Seromed*, L-6115). Dopo la prima centrifugazione di 20 minuti a 740 *xg* i linfociti formano un anello bianco-giallastro chiaramente visibile all'interfaccia tra Ficoll e siero e possono così venire rimossi con una pipetta Pasteur sterile e posti in un secondo tubo Falcon contenente 10 ml di HBSS.

Una volta trasferiti tutti i linfociti nel nuovo Falcon, il volume totale viene portato, se necessario, a 50 ml con HBSS e una seconda centrifugazione viene effettuata, questa volta per 10 minuti e a 360 *xg*. Il supernatante viene eliminato e le cellule vengono risospese in 5 ml RPMI con 10% di FCS, dopodichè il volume viene nuovamente portato a 50 ml con RPMI-10% FCS. Segue una terza centrifugazione, questa volta per 10 minuti a 185 *xg*: il supernatante viene nuovamente eliminato e le cellule risospese in 5 ml RPMI-10% FCS. Il volume della sospensione viene da ultimo portato a 20 ml e la concentrazione delle cellule determinata per mezzo di un emocitometro.

#### 4.2.1 Determinazione del numero di linfociti

La quantità di linfociti ottenuti dalla separazione è stata determinata contando al microscopio ottico le cellule presenti in un volume noto di sospensione tramite un emocitometro (*Neubauer counting chamber*, *Brand*, Deutschland). La procedura usata è stata la seguente: 20 µl della sospensione di linfociti, diluita 5 volte nel mezzo di cultura (RPMI-10% FCS), sono stati incubati al buio per 10 minuti con un ugual volume di soluzione di FDA allo 0.01% in PBS sterile preparata a partire da uno stock di FDA (*Sigma*, F-7378) allo 0.1 % in acetone, ottenendo così una diluizione totale delle cellule di 10 volte. Il conteggio delle cellule è poi avvenuto al microscopio ottico con una

combinazione di luce normale e ultravioletta. La FDA è un substrato della lipasi che viene trasformato da questo enzima, presente solo nelle cellule metabolicamente attive, in un prodotto fluorescente<sup>33</sup> la qual cosa permette di discriminare le cellule ancora vive da quelle morte.

### 4.3 Esperimenti in microgravità simulata

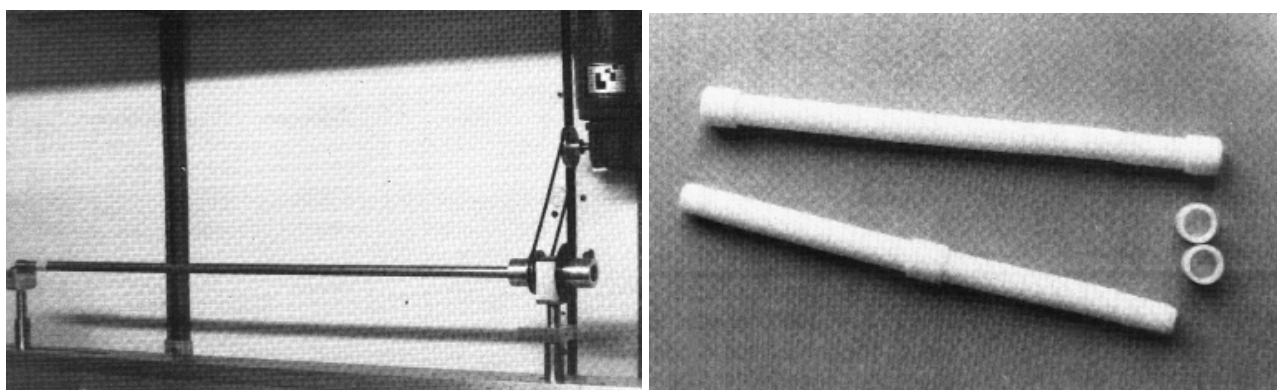
Le apparecchiature per gli esperimenti in microgravità simulata, cioè RPM (*Random Positioning Machine*) e clinostato, erano situate entrambe in una camera climatizzata la cui temperatura è stata tenuta ad una temperatura costante di 37 °C.

I tubi in teflon usati per le culture sono stati riempiti con una sospensione di  $8.3 \cdot 10^6$  cellule·ml<sup>-1</sup> (corrispondenti a 10 milioni di cellule per campione di 1.2 ml) con l'aiuto di una pipetta pasteur sterile e prestando particolare attenzione ad evitare che bolle d'aria rimanessero intrappolate nel contenitore. I linfociti sono poi stati attivati con l'iniezione di Con A attraverso un setto di gomma alla concentrazione finale di 10 µg·ml<sup>-1</sup>, usando uno stock a 707 µg·ml<sup>-1</sup> (*Kantonsapotheke Zürich*, 090392), e posti su una delle due apparecchiature a seconda dell'esperimento. I tubi di controllo ad 1 xg sono stati attivati allo stesso modo ma incubati staticamente.

#### 4.3.1 Esperimenti sul clinostato<sup>13, 14</sup>

Il clinostato usato per la simulazione della microgravità è una costruzione delle officine dell'ETH. La velocità di rotazione definita (90 rpm) e un diametro massimo dei tubi in teflon di 4.5 mm permettono una compensazione bidimensionale del vettore gravitazionale cosicché una microgravità simulata corrispondente a 0.02 xg può essere ottenuta. Questo valore è determinato dalla forza centrifuga alla parete del contenitore dovuta alla rotazione.

I cilindri di cultura sono stati inseriti dopo l'attivazione nel tubo del clinostato e l'apparecchio è stato attivato. Il clinostato è stato poi fermato di volta in volta solo per il minimo tempo necessario al prelievo dei campioni.



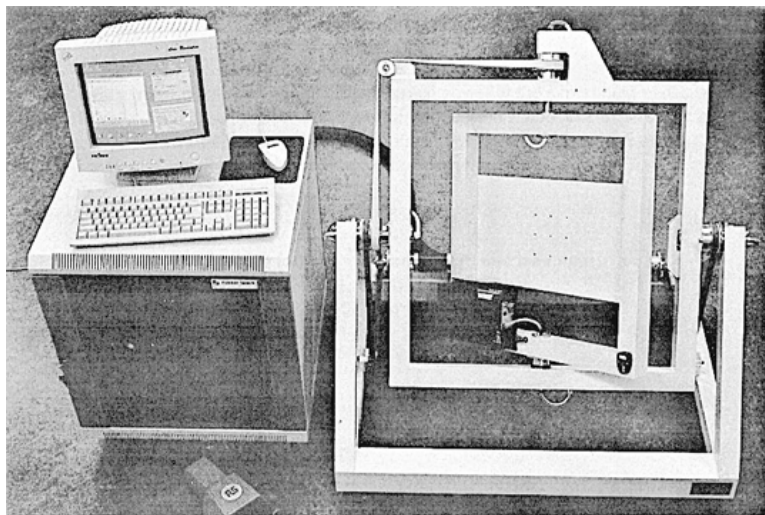
**Figura 9:** il clinostato a rotazione veloce usato per gli esperimenti in microgravità simulata (a sinistra) e tubi di teflon simili a quelli usati per coltivare le cellule (a destra). I tubi mostrati in figura hanno una capienza di 2 ml, mentre quelli usati negli esperimenti sono più corti e hanno una capienza di soli 1.2 ml<sup>11</sup>.

#### 4.3.2 Esperimenti sulla RPM<sup>15</sup>

Come alternativa al clinostato per la simulazione della microgravità è stata usata la *Random Positioning Machine*. Questa apparecchiatura, costruita da *Fokker Space* (Leiden, Olanda), consiste di due telai motorizzati che permettono di ruotare un campione fissato al più interno di essi in tutte e tre le direzioni dello spazio, fatto che permette una randomizzazione tridimensionale del vettore

gravitazionale. Attraverso un computer e l'apposito *software* è possibile regolare la velocità di rotazione dei telai e visualizzare l'orientamento momentaneo del vettore gravitazionale come pure la sua risultante nel tempo a partire da un momento stabilito (di solito l'avvio dell'esperimento). Quest'ultima può raggiungere un valore di circa  $0.01 \text{ } xg$  dopo circa 30 minuti di marcia ad una velocità angolare massima di  $140^\circ \text{ sec}^{-1}$ .

I cilindri di cultura sono stati fissati dopo l'attivazione sulla RPM e l'esperimento è stato messo in marcia. La RPM è stata poi fermata solo per il tempo minimo necessario al prelievo dei campioni. Durante il prelievo è stato annotato il valore medio del vettore gravitazionale fornito dal *software*.



**Figura 10:** la *Random Positioning Machine* utilizzata per gli esperimenti in microgravità simulata. L'unità di controllo visibile a sinistra permette di controllare il movimento dei due telai concentrici motorizzati al centro dei quali vengono fissati i campioni.

## **4.4 Estrazione dell'RNA dalle cellule**

### **4.4.1 Decontaminazione dalle ribonucleasi**

Uno degli aspetti cruciali di ogni procedura di isolamento dell'RNA è la protezione del campione dalla contaminazione con le ribonucleasi (RNasi). Questi enzimi, presenti in tutte le cellule, sono particolarmente stabili e generalmente non hanno bisogno di cofattori per il loro funzionamento. Autoclavare le soluzioni e contenitori non è sufficiente per inattivare completamente questi enzimi che devono essere quindi neutralizzati chimicamente.

Tutta la vetreria e tubi Eppendorf sono perciò stati trattati prima dell'utilizzo con una soluzione allo 0.1% di dietilpirocarbonato (DEPC, *Sigma*, D-5758) in etanolo tecnico per circa 4 ore. L'etanolo è poi stato eliminato e i contenitori sono stati dapprima autoclavati (40 min,  $121^\circ\text{C}$ , 1 atm) al fine di inattivare il DEPC e messi a seccare in un forno ad aria calda ad  $80^\circ\text{C}$ .

Per la preparazione di tutte le soluzioni necessarie per l'estrazione e l'utilizzo successivo dell'RNA è stata usata acqua bidistillata ed ultrafiltrata a  $0.2 \mu\text{m}$  (resistività maggiore di  $17 \text{ M}\Omega$ ) anch'essa trattata con l'aggiunta dello 0.1 % di DEPC e autoclavata.

#### 4.4.2 Isolazione con RNAzol™

I linfociti precedentemente separati dal mezzo di cultura mediante centrifugazione sono stati risospesi e lisati usando 0.2 ml RNAzol™ per milione di cellule. Dopo l'aggiunta di 0.1 ml di cloroformio per ogni millilitro di sospensione il campione è stato agitato per 15 secondi affinché le due fasi formatesi fossero ben mescolate. Durante questa operazione e 5 min di separazione a 4 °C l'RNA si discioglie nella fase acquosa. La sospensione è stata centrifugata (15 min, 12000 rpm, 4 °C) in una centrifuga (Labofuge 400R, Heraeus, Svizzera). Dopo questa centrifugazione si separano chiaramente due fasi: una fase acquosa incolore in superficie che contiene l'RNA e una fase organica blu. DNA e proteine si trovano in questa fase e all'interfase. La fase acquosa è stata rimossa con una pipetta e ad essa sono stati aggiunti un ugual volume di isopropanolo (*Fluka*, 59300) e 10 µg di tRNA (*Sigma*) o 1 µl di glicogeno (20 mg·ml<sup>-1</sup>, *Boehringer Mannheim*, 901393) per facilitare la precipitazione dell'RNA. L'RNA è stato lasciato precipitare per alcune ore (di solito nel corso della notte) a -20 °C. I campioni sono stati centrifugati (15 min, 12000 rpm, 4 °C). L'RNA forma un precipitato translucido (*pellet*) visibile in fondo al tubo di reazione. Il supernatante è stato eliminato con l'aiuto di una pipetta e il *pellet* risospeso in 1 ml etanolo al 75 % in acqua trattata con DEPC e lasciato riposare sul ghiaccio per 5 minuti. Questa operazione permette di eliminare i sali in eccesso senza disciogliere gli acidi nucleici. Il *pellet* è stato fatto riprecipitare con una centrifugazione (8 min, 7500 rpm, 4 °C) e l'etanolo eliminato invertendo i tubi e lasciando evaporare il residuo.

#### 4.4.3 Isolazione con GITC (metodo modificato)

Per ovvi motivi di spazio e di tempo non è per lo più possibile, in un esperimento che si svolge in orbita, compiere tutte quelle procedure biochimiche che portano all'ottenimento immediato di dati interpretabili. È quindi necessario “congelare” in qualche modo il sistema su cui si stanno compiendo degli studi immediatamente dopo l'esperimento, di modo che i campioni possano venire riportati a terra per essere esaminati nello stato in cui si trovavano immediatamente dopo la fine dello stesso.

Volendo esaminare l'espressione genetica dei linfociti attraverso la misurazione della quantità di acidi ribonucleici prodotti è dunque necessario avere un metodo che permetta di bloccare le cellule nello stato in cui si trovano ad un predeterminato tempo dopo l'attivazione. Questo metodo deve assicurare principalmente due cose: le cellule del campione non devono più produrre RNA e l'RNA già prodotto deve rimanere intatto.

La seguente procedura è stata sviluppata da Millie Hughes-Fulford (comunicazione personale) e si basa sulla lisi del campione di cellule in una soluzione stabilizzante di tiocianato di guanidina (GITC), sostanza che inattiva le nucleasi (RNasi e DNasi) distruggendo i legami ponte-zolfo essenziali al funzionamento di questi enzimi. La conservazione degli acidi nucleici in una tale soluzione è dunque possibile per un periodo prolungato di tempo.

#### Soluzioni necessarie

Citrato di sodio (750 mM, pH 7):

Citrato di sodio ( <i>Acros</i> , 42425)	44.1	g
Acqua ultrafiltrata fino a	200	ml

pH: 7, equilibrato con acido cloridrico 1N (*Titrisol*, *Merck*).

La soluzione ottenuta è stata trattata con DEPC e infine autoclavata per 40 min.

### Tiocianato di guanidina (4 M):

Soluzione di citrato di sodio	1	ml
Tiocianato di guanidina ( <i>Sigma</i> , G-9277)	4.72	g
N-Lauroylsarcosine ( <i>Sigma</i> , L-5125)	0.05	g
$\beta$ -mercaptoetanololo ( <i>Fluka</i> , 63690)	0.25	ml

Il volume è stato portato a 10 ml con acqua ultrafiltrata.

### Acetato di sodio (2 M, pH 4):

Acetato di sodio ( <i>Acros</i> , 22713)	32.8	g
Acqua ultrafiltrata fino a	200	ml

pH: 4, equilibrato con acido cloridrico 1N (*Titrisol*, *Merck*).

La soluzione ottenuta è stata trattata con DEPC e infine autoclavata per 40 min

### Fenolo-cloroformio-alcool isoamilico 125:24:1:

Fenolo ( <i>Fluka</i> , 77610) saturato con acqua	25	ml
Cloroformio ( <i>Fluka</i> , 25691)	4.8	ml
Alcool isoamilico ( <i>Sigma</i> , I-9392)	200	$\mu$ l

La conservazione della soluzione è avvenuta a 4 °C.

## **Procedura**

Le cellule del campione sono state separate dal mezzo di cultura per mezzo di una centrifugazione di 20 secondi a 2400 rpm. Nello spazio questa centrifugazione non sarà necessaria in quanto sarà possibile sostituire il mezzo di cultura direttamente con la soluzione di tiocianato.

Il supernatante è stato eliminato per aspirazione e le cellule lisate in 1 volume, solitamente 800  $\mu$ l, di soluzione di tiocianato di guanidina facendo passare più volte il pellet attraverso la punta di una pipetta da 1 ml. Gli acidi nucleici sono relativamente stabili in questa soluzione e quindi a questo punto che la procedura può venire interrotta e il campione conservato a -20 °C per essere analizzato successivamente.

Il campione scongelato o appena risospeso è stato riscaldato a 60 °C per 25 minuti e subito addizionato di 0.1 volumi di soluzione di acetato di sodio ed 1.2 volumi di soluzione di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico. Immediatamente dopo l'addizione dei reagenti il campione è stato posto su un vortex per circa 20 secondi in modo da mescolare bene le due fasi. I tubi con i campioni sono stati fatti riposare per 15 minuti sul ghiaccio e poi centrifugati (20 min, 12000 rpm, 4 °C). Al termine di questa procedura erano chiaramente visibili nel tubo due fasi: una inferiore organica e una superiore acquosa nella quale si trovava disciolto l'RNA. La fase superiore acquosa è stata prelevata con una pipetta e trasferita in un nuovo tubo da 1.5 ml. Particolare attenzione è stata prestata in questo frangente a non prelevare inavvertitamente materiale dall'interfase o dalla fase organica contenente DNA e proteine. La precipitazione dell'RNA è avvenuta aggiungendo alla fase acquosa un ugual volume di alcool isopropilico e 2  $\mu$ l di glicogeno (20 mg·ml<sup>-1</sup>) e precipitando l'RNA durante la notte a -20 °C oppure per un paio di ore a -80 °C.

Terminata la precipitazione i campioni sono stati centrifugati per (20 min, 12000 rpm, 4 °C). Il supernatante è stato eliminato con l'aiuto di una pipetta e il *pellet* risospeso in 1 ml etanolo al 75 % in acqua trattata con DEPC e lasciato riposare sul ghiaccio per 5 minuti. Il *pellet* è stato fatto

riprecipitare con una centrifugazione (12 min, 10000 rpm, 4 °C) e l'etanolo eliminato invertendo i tubi e lasciando evaporare il residuo.

#### 4.4.4 Determinazione della quantità di RNA

##### 4.4.4.1 Metodo spettrofotometrico

L'RNA ottenuto dai metodi descritti in 4.4.2 e 4.4.3 è stato risospeso in un piccolo volume di acqua trattata con DEPC (solitamente 20 µl) e la concentrazione determinata misurando l'assorbimento a 260 nm in uno spettrofotometro (*Shimadzu UV-160 A*, Japan): un'unità di assorbimento a 260 nm corrisponde ad una concentrazione di 40 µg·ml<sup>-1</sup> di RNA. Il rapporto tra l'assorbimento a 260 nm e quello a 280 nm fornisce inoltre preziose informazioni sulla purezza dell'RNA: un rapporto inferiore a 1.7 indica per lo più una contaminazione proteica.

##### 4.4.4.2 Altri metodi

Altri procedimenti utilizzati per la determinazione dell'RNA sono stati il *kit* commerciale DNA Dipstick™ (*Invitrogen*, 45-0066), utilizzato secondo le istruzioni del produttore, e il metodo fluorometrico con *ethidiumbromid*. In questa seconda procedura 1 µl della soluzione di RNA viene posta in una capsula di Petri contenente 1 mg·ml<sup>-1</sup> di *ethidiumbromid* in agarosio all' 1 % e la fluorescenza della macchia che si forma dopo 10 minuti di incubazione al buio viene confrontata a quella di una serie di diluizioni di RNA di concentrazione nota sotto illuminazione ultravioletta.

#### 4.5 Polymerase Chain Reaction

La RT-PCR è stata effettuata utilizzando il *GeneAmp® RNA PCR kit* (*Perkin Elmer*, N808-0143). Il *kit* contiene tutti i reagenti necessari alla RT-PCR tranne i *primers* e l'RNA da amplificare. Le reazioni sono state dapprima effettuate utilizzando le concentrazioni raccomandate dal produttore del *kit* e le temperature e i tempi dei vari passi del ciclo di amplificazione raccomandati dal produttore dei *primers*.

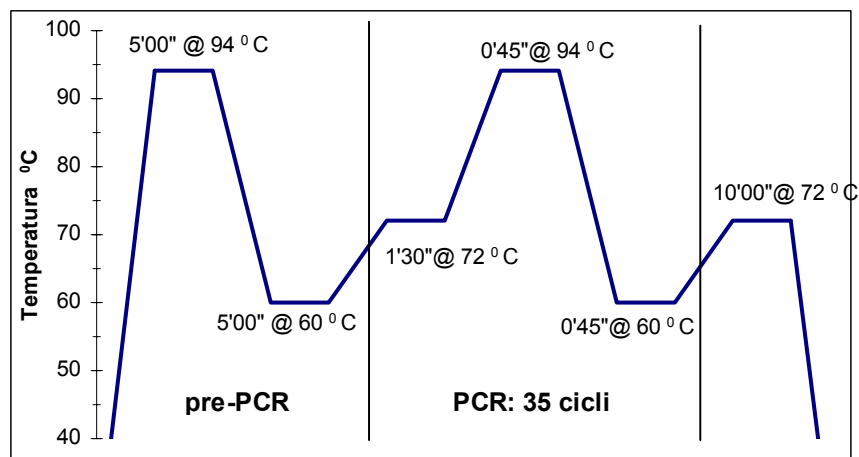
Al fine di minimizzare differenze tra reazione e reazione dovute ad errori di pipettaggio si è fatto ricorso, ove possibile, ai cosiddetti *master mixes*: le reazioni sono cioè state effettuate tutte a partire dalla stessa miscela di reagenti tranne per l'elemento la cui variazione era presa in analisi.

Componente	Volume (µl)	Concentrazione finale
Soluzione di MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4	5 mM
PCR Buffer II (10x conc.)	2	1 x
dATP	2	1 mM
dCTP	2	1 mM
dGTP	2	1 mM
dTTP	2	1 mM
Inibitore della ribonucleasi	1	1 U·µl <sup>-1</sup>
MuLV trascrittasi inversa	1	2.5 U·µl <sup>-1</sup>
Esanucleotidi casuali	1	2.5 µM
RNA da esaminare	3	max. 1 µg
Totale	20	-

**Tabella 4:** composizione della reazione per la retrotrascrizione con le concentrazioni dei reagenti raccomandate.

Componente	Volume ( $\mu$ l)	Concentrazione finale
Soluzione di $MgCl_2$ (25 mM)	4	2 mM
PCR Buffer II (10x conc.)	8	1 x
Acqua	65.5	-
AmpliTaq <sup>®</sup> DNA polimerasi	0.5	25 U·ml <sup>-1</sup>
Primer specifico	2	0.5 $\mu$ M
Reazione RT	20	-
Totale	100	-

**Tabella 5:** composizione del reazione per la PCR con le concentrazioni dei reagenti raccomandate.



**Figura 11:** profilo termico raccomandato della PCR per i quattro *primers* indicati nella Tabella 6. Ad una denaturazione di 5 minuti a 94 °C e un ibridizzazione a 60 °C pure di 5 minuti fanno seguito 35 cicli composti da un'elongazione di 90 secondi a 72 °C, una denaturazione di 45 secondi a 94 °C e un'ibridizzazione di 45 secondi a 60 °C con un'estensione finale di 10 minuti a 72 °C.

Questi parametri sono poi stati modificati negli esperimenti successivi in modo da ottenere una amplificazione che fosse più specifica possibile (cioè bande più nette sul gel).

Una volta stabilite concentrazioni, temperature e tempi è stato preso in considerazione il numero di cicli per determinare in quale intervallo la reazione fosse nella sua fase esponenziale e quindi utilizzabile quale metodo quantitativo (vedi Capitolo 2.5).

Quattro diverse coppie di *primers*, una per ogni gene, sono state prese in considerazione durante questo lavoro di diploma per essere ottimizzate per l'analisi dell'espressione genetica.

Primer	Lunghezza prodotto (bp)	Sequenza del primer (5'-3')
<i><math>\beta</math>-actina</i> (Stratagene, 302010)	661	1038 TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCATCTA 1067 1876 CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG 1905
<i>c-fos</i> (Stratagene, 302059)	431	314 CTACGAGGCGTCATCCTCCCG 334 1954 AGCTCCCTCCTCCGGTTGCGGCAT 1931
<i>c-myc</i> (Stratagene, 302058)	345	238 CCAGCAGCGACTCTGAGG 256 566 CAAAGACGTTGTGTGTTC 583
<i>IL-2R, p55 <math>\alpha</math> Chain</i> (Stratagene, 302041)	391	253 GACGATGACCCGCCACAGATCCCA 276 620 CCTGGACGCACTGATAATAAACCA 643

**Tabella 6:** *primers* utilizzati nella PCR. La prima sequenza si riferisce al *primer* complementare al segmento codificante del DNA (*coding strand*, quello con sequenza uguale al RNA messaggero) mentre la seconda a quello complementare al segmento non codificante (*non-coding strand*, quello che funge da matrice durante la trascrizione). Le sequenze di entrambi gli oligonucleotidi sono date in direzione 5'-3'.

## 4.6 Quantificazione dell'espressione genetica

### 4.6.1 Gel elettroforesi

Il cDNA ottenuto mediante PCR è stato analizzato mediante elettroforesi in un gel di agarosio al 1.5% in una soluzione tampone di tris-acetato (TAE-Buffer) con l'aggiunta di  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  di *ethidiumbromid* (GibcoBRL, 15582-018), ricavato da uno stock a  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , quale colorante per evidenziare il DNA:

#### Soluzione di lavoro

Tris-acetato	0.04	M
EDTA	0.001	M

#### 50x stock

Tris base	242	g
Acido acetico glaciale	57.1	ml
EDTA 0.5 M pH 8	100	ml

Per ciascun campione 15  $\mu\text{l}$  della reazione di PCR sono stati mescolati con 3  $\mu\text{l}$  di *loading buffer* e caricati sul gel. Il *loading buffer* facilita il caricamento del gel rendendo visibile il campione e la sua migrazione ed aumentando la densità della soluzione.

#### Loading buffer <sup>31</sup>

Blu di bromofenolo	0.25	%
Saccarosio in acqua	40	%

Il gel è poi stato lasciato correre per 80 minuti a 70 V e la fluorescenza fotografata su film Polaroid 665 o 667 sotto illuminazione ultravioletta.

### 4.6.2 Densitometria

Le foto dei gel sono state digitalizzate con un densitometro *Imaging Densitometer GS-700* (Biorad) e l'intensità delle bande ottenute analizzata con il programma *Molecular Analyst* versione 2.1.1 (Biorad).

Il numero ideale di cicli per ogni *primer* è stato stabilito cercando un intervallo nel quale il segnale analizzato sul gel mostrasse un aumento lineare con il numero di cicli di PCR effettuati.

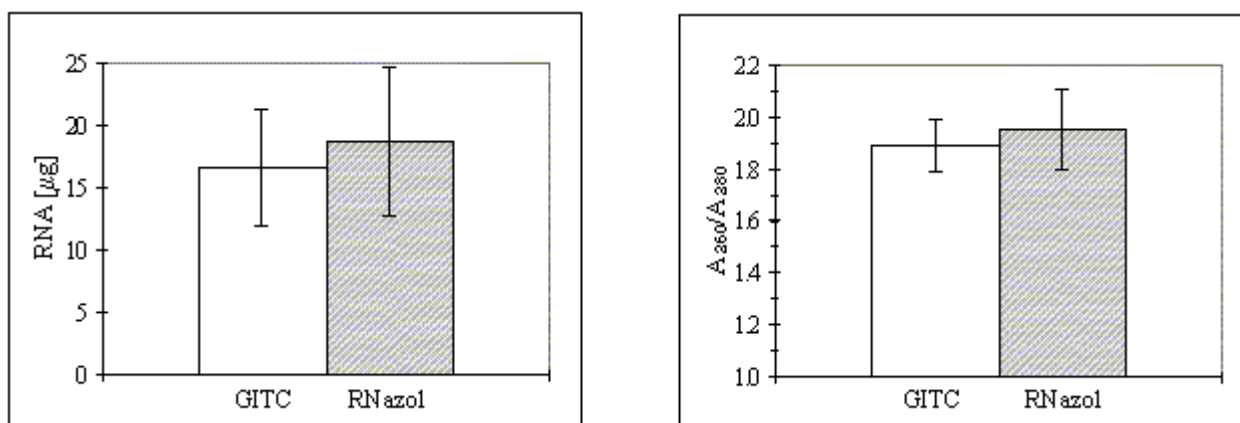
La cinetica di espressione di *c-myc*, *c-fos* e di *IL-2R* è stata stabilita analizzando il segnale ottenuto dalla PCR ottimizzata (cioè effettuata con un numero di cicli che rientrasse nell'intervallo di linearità) e normalizzando il segnale ottenuto rispetto a quello della  $\beta$ -actina. Questo gene viene espresso costitutivamente dalle cellule, cioè indipendentemente dall'attivazione e dal ciclo cellulare, ed è quindi utilizzabile come controllo interno, dipendendo l'intensità del segnale solo dalla quantità iniziale di RNA totale.

## 5. Risultati e discussione

### 5.1 Estrazione e quantificazione dell'RNA

#### 5.1.1 Metodi di estrazione dell'RNA

I due metodi di estrazione dell'RNA testati hanno dimostrato un'efficacità simile sia per quanto riguarda l'aspetto quantitativo che per quello qualitativo degli acidi nucleici prodotti.

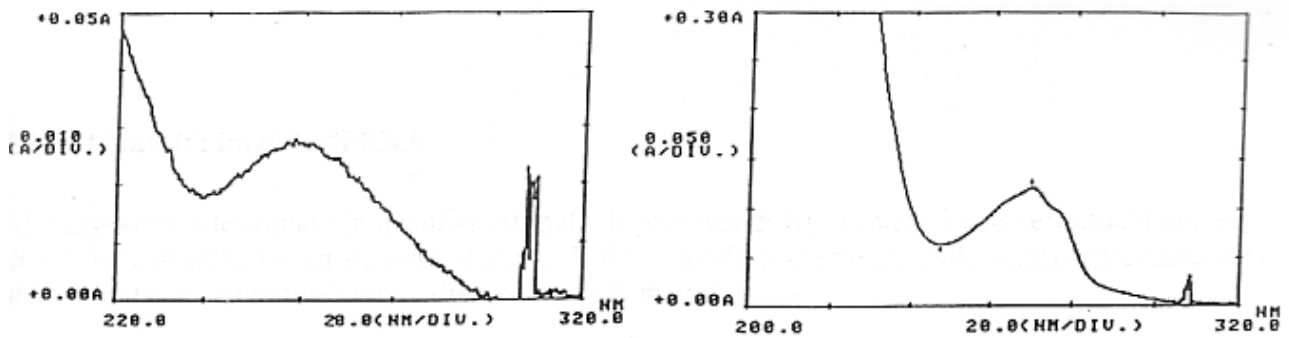


**Figura 12:** paragone della quantità totale di RNA ottenuto (**a sinistra**) e del rapporto tra l'assorbimento a 260 nm e quello a 280 nm (**a destra**) per l'estrazione con il metodo RNazol B™ (colonne chiare, 4 campioni differenti) e quella con il metodo GITC modificato (colonne scure, 6 campioni differenti). L'RNA è stato estratto a partire da campioni contenenti ciascuno 15 milioni di cellule e provenienti dallo stesso donatore.

Per tutti gli esperimenti effettuati in questo lavoro di diploma si è dunque adoperato, salvo dove indicato altrimenti, il metodo di estrazione con la soluzione stabilizzante di GITC, anche in considerazione del fatto che sarà probabilmente questo procedimento a essere utilizzato sull'esperimento previsto sul razzo sonda.

#### 5.1.2 Quantificazione dell'RNA

Il metodo spettrofotometrico si è dimostrato il più affidabile per la determinazione della quantità di RNA. Non solo esso permette una quantificazione precisa e riproducibile della quantità di RNA anche a diluizioni della quantità iniziale di 200 volte (permettendo così utilizzare solo una frazione minima del campione da analizzare), ma permette pure di stabilire la purezza del campione rilevando la presenza eventuale di contaminanti quali proteine o fenolo che possono in seguito interferire con la reazione di PCR. La co-precipitazione dell'RNA mediante glicogeno in luogo del tRNA si è dimostrata requisito indispensabile dato che quest'ultimo interferisce con la misurazione spettrofotometrica. Il *kit* commerciale DNA Dipstick™ ed il metodo basato sulla colorazione degli acidi nucleici mediante agarosio contenente *ethidiumbromid* sono stati scartati in quanto permettevano solo un'analisi semi-quantitativa e non davano la possibilità di controllare la qualità dell'RNA ottenuto. Inoltre le quantità di RNA differivano tra di loro notevolmente a dipendenza se misurate con l'uno o con l'altro metodo.



**Figura 13:** lo spettro di un campione di RNA con  $A_{260}/A_{280}=1.93$  e un assorbimento massimo a  $\lambda_{\max}=260.2$  nm indicano la purezza della preparazione e l'assenza di proteine (**a sinistra**), mentre il picco spostato ( $\lambda_{\max}=269.4$  nm) e il rapporto  $A_{260}/A_{280} < 1.70$  di un altro campione (**a destra**) sono interpretabili ammettendo la presenza di residui proteici ( $\lambda_{\max}=280$  nm) e di fenolo ( $\lambda_{\max}=269.4$  nm) nella soluzione.

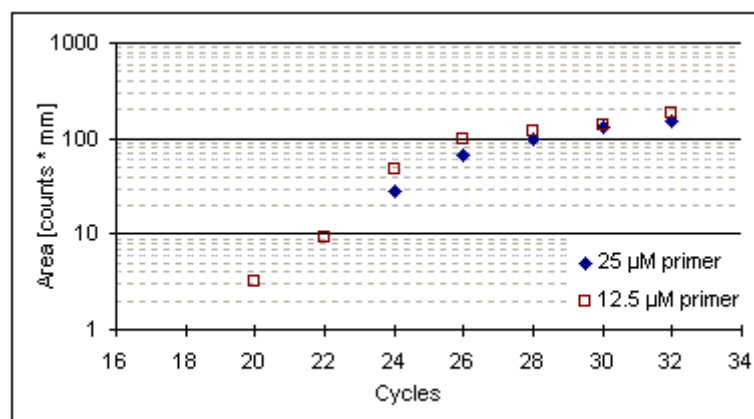
## 5.2 Ottimizzazione della PCR

### 5.2.1 Concentrazione di cloruro di magnesio nella reazione di PCR

La concentrazione raccomandata di cloruro di magnesio di 2 mM per la reazione di PCR è stata sostituita da una concentrazione di 4 mM nel corso dei vari esperimenti in quanto questa concentrazione più alta, seppur diminuendo teoricamente la specificità della reazione, si è dimostrata più efficace nell'amplificazione dei prodotti desiderati.

### 5.2.2 Concentrazione dei primers nella reazione di PCR

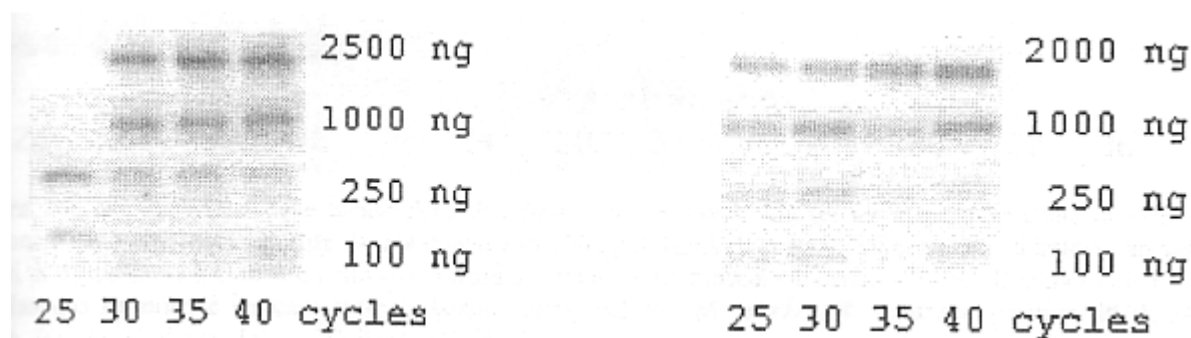
La concentrazione finale raccomandata dei primers di 0.5  $\mu\text{M}$  è stata rimpiazzata in tutti gli esperimenti descritti qui di seguito, tranne dove esplicitamente indicato, da una concentrazione di 0.25  $\mu\text{M}$  che, oltre a permettere un risparmio di materiale, non ha dimostrato avere influenze sensibili sull'efficacità dell'amplificazione.



**Figura 14:** paragone tra l'amplificazione di un campione di RNA mediante RT-PCR con due diverse concentrazioni del primer specifico per *IL-2R  $\alpha$ -chain*. La fonte dell'RNA è un campione di linfociti attivato con 6 ore di esposizione a Con A e coltivato in maniera statica in un tubo di clinostato a 37  $^{\circ}\text{C}$ . L'amplificazione a 20 e 22 cicli per la reazione con il primer alla concentrazione di 25  $\mu\text{M}$  non è stata misurata.

### 5.2.3 Quantità iniziale di RNA

Allo scopo di determinare la quantità ottimale di partenza di RNA totale è stata effettuata una serie di reazioni di PCR in cui quantità diverse di RNA totale provenienti dallo stesso campione sono state amplificate ciascuna con un diverso numero di cicli.



**Figura 15:** segnale della  $\beta$ -actina (a sinistra) e di *c-fos* (a destra) con diverso numero di cicli di amplificazione e differenti quantità di partenza di RNA totale. Concentrazione della coppia di *primers*: 0.5  $\mu$ M. L'RNA di partenza proviene da un campione di linfociti non attivato coltivato in una fiaschetta di cultura (Falcon, 3024F) posta in un incubatore a 37 °C in un atmosfera contenente il 5 % di biossido di carbonio. Nessun segnale è stato ottenuto dalla  $\beta$ -actina a 25 cicli di amplificazione con quantità di partenza di 1000 ng e 2500 ng di RNA e da *c-fos* a 35 cicli con 100 ng di RNA.

Pur non essendo chiaramente visibile per tutte le quantità iniziali di RNA totale un chiaro aumento dell'amplificazione dei segmenti di cDNA con l'aumento del numero di cicli risulta evidente come una quantità di partenza di 250 ng di RNA totale per reazione di PCR è sia sufficiente per rendere visibile l'espressione sia dell'mRNA della  $\beta$ -actina che di quello di *c-fos*. Questa quantità di partenza di RNA è stata quindi utilizzata sia negli esperimenti per la determinazione dell'intervallo di linearità che in seguito in quelli per la determinazione della cinetica dell'espressione dei vari geni.

### 5.2.4 Linearità della PCR

L'intervallo nelle quale il segmento di RNA compreso tra la coppia di *primers* prescelti mostrasse un'amplificazione proporzionale al numero di cicli di PCR è stato determinato amplificando lo stesso campione di cDNA iniziale in una serie di reazioni di PCR identiche tranne che per il diverso numero di cicli di amplificazione.

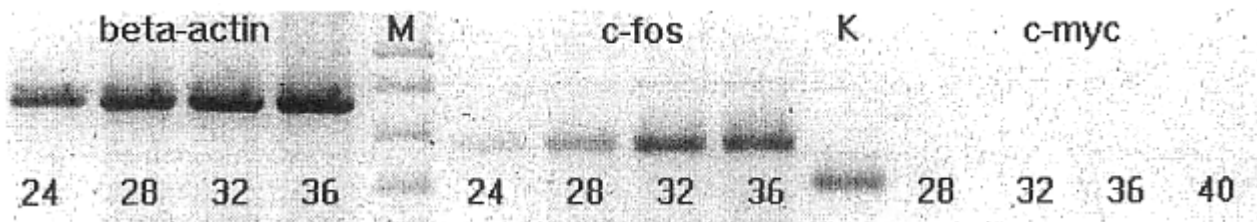
Per ciascun *primer* è stata effettuata una reazione singola di retrotrascrizione (composizione vedi Capitolo 4.5) con una quantità di RNA totale di 250 ng per ogni reazione di PCR prevista al fine di minimizzare possibili variazioni tra le varie reazioni di PCR dovute a quantità iniziali differenti di cDNA.

La lunghezza e la temperatura di ciascuna fase del ciclo di PCR sono state modificate, dove necessario, in ogni esperimento susseguente al fine di ottenere un'amplificazione ottimale.

In tutti i casi qui esposti l'elongazione finale a 72 °C ha avuto una durata di 10 minuti e si è utilizzata una pre-PCR composta da una denaturazione di 5 minuti a 95 °C e da un'ibridizzazione pure di 5 minuti a 60 °C. Da notare come i parametri utilizzati nella pre-PCR siano più stringenti di quelli utilizzati nei primi esperimenti di questo lavoro di diploma che non erano riusciti ad evidenziare alcuna amplificazione (denaturazione 5' 94 °C, ibridizzazione 5' 60 °C) e permettono una più grande specificità della reazione.

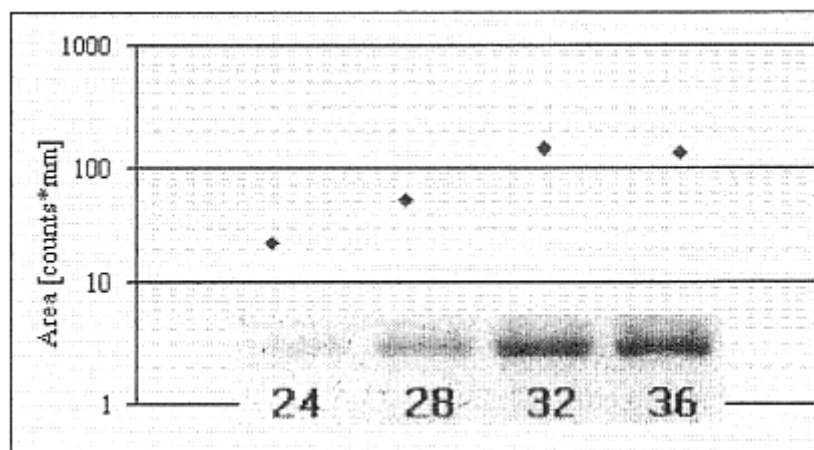
### 5.2.4.1 *c-fos*

In un primo esperimento la PCR è stata effettuata con i *primers* di *c-fos*, *c-myc* e della  $\beta$ -*actina* usando i tempi e le temperature raccomandati dal produttore (vedi Capitolo 4.5).



**Figura 16:** amplificazione delle bande della  $\beta$ -*actina*, *c-fos* e *c-myc* con un numero variabile di cicli. Ciascuna reazione è stata effettuata a partire da una quantità di 250 ng di RNA ricavata da un campione di linfociti attivato con 30 minuti di esposizione a Con A e coltivato in maniera statica in un tubo di clinostato a 37 °C. Il numero di cicli effettuati per ciascuna reazione è indicato sotto la banda corrispondente. M: *marker*, K: controllo positivo. PCR: 24-40 cicli (elong. 90" 72 °C, denat. 45" 94 °C, ibrid. 45" 56 °C).

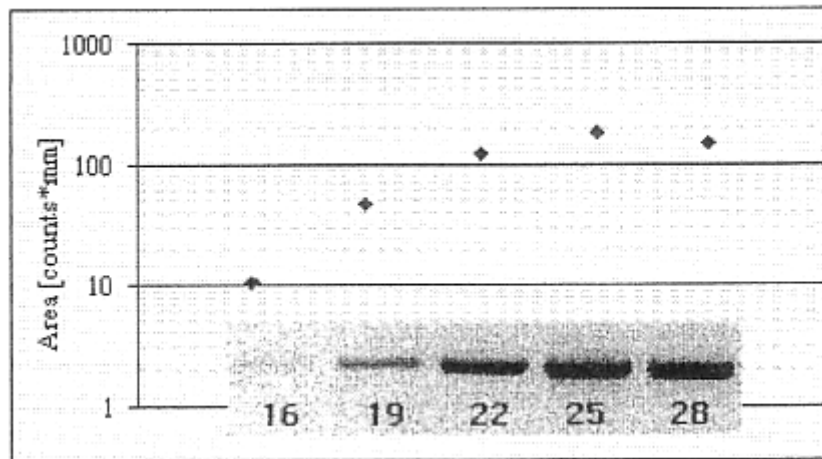
Dalla Figura 16 si nota come non sia stato possibile rilevare alcuna amplificazione di *c-myc*, mentre la  $\beta$ -*actina* mostra una saturazione della reazione già dopo i 28 cicli (nessun aumento dell'intensità della banda con l'aumento del numero di cicli). Solo per *c-fos* è riscontrabile un aumento lineare dell'amplificazione con il numero di cicli come mostrato dal grafico seguente.



**Figura 17:** dipendenza del segnale di *c-fos* dal numero di cicli di PCR effettuati.

### 5.2.4.2 $\beta$ -*actina*

La PCR dell'esperimento descritto nel Capitolo 5.2.4.1 è stata ripetuto per i *primers* della  $\beta$ -*actina* nelle stesse condizioni di temperatura, concentrazioni e tempi delle varie fasi dei cicli, ma utilizzando un numero di cicli di amplificazione inferiore.

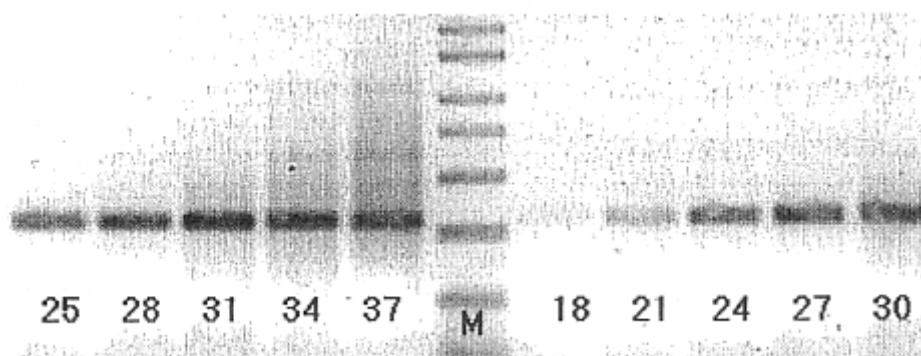


**Figura 18:** dipendenza del segnale della  $\beta$ -actina dal numero di cicli di PCR effettuati. L'RNA utilizzato proviene da un campione di linfociti non attivato coltivato in maniera statica in un tubo di clinostato a 37 °C. PCR: 16-28 cicli (elong. 90" 72 °C, denat. 45" 94 °C, ibrid. 45" 56 °C).

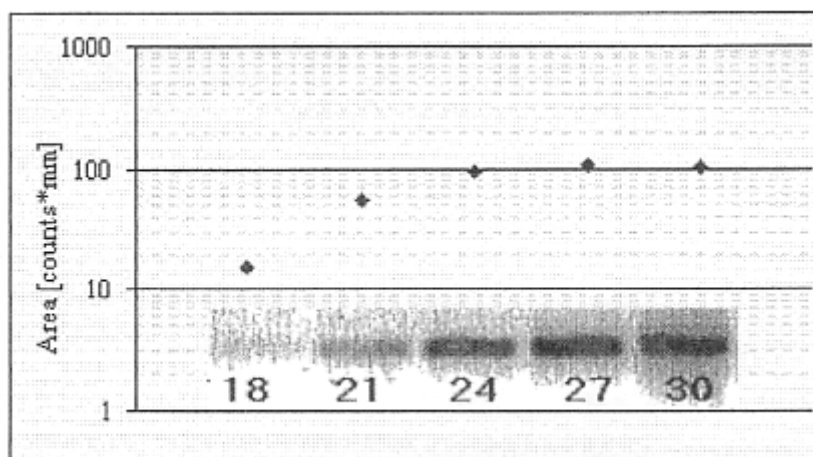
### 5.2.4.3 *c-myc*

Siccome i risultati ottenuti nell'esperimento descritto nel Capitolo 5.2.4.1 non mostravano alcuna amplificazione di *c-myc* si è dapprima ritenuto che la quantità iniziale di mRNA non fosse sufficiente a ottenere un segnale visibile sul gel con il numero di cicli usato. Un semplice aumento del numero di cicli non si è comunque dimostrato sufficiente ad ottenere un segnale dell'espressione, così come neppure un aumento della concentrazione iniziale di RNA totale fino a 750 ng ha portato dei risultati positivi in questo senso.

Condizioni ottimali di amplificazione sono state ottenute solo dopo aver effettuato svariate reazioni effettuate provando campioni di RNA di linfociti provenienti da diversi donatori e con tempi di attivazione diversi. È stato necessario rendere più stringenti le condizioni della reazione di PCR con un aumento dalla temperatura di ibridizzazione dei *primers*, combinato con un accorciamento del tempo di elongazione degli stessi ed una denaturazione più intensa e prolungata. Una quantità di RNA totale pari a 250 ng per ogni RT-PCR si è dimostrata sufficiente per rendere visibili le bande.



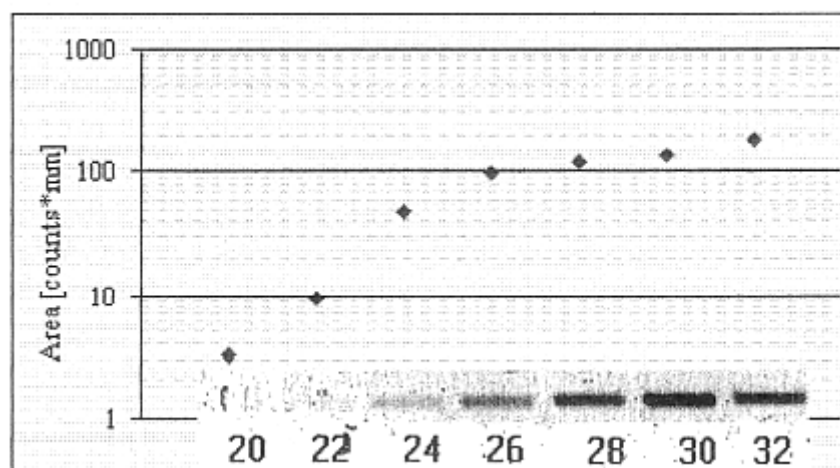
**Figura 19:** due serie di amplificazione dell'mRNA di *c-myc* con un numero variabile di cicli di PCR. L'RNA utilizzato proviene da un campione di linfociti attivato con due ore di esposizione a Con A e coltivato in maniera statica in un tubo di clinostato a 37 °C. Con un numero elevato di cicli (a sinistra del *marker*) si ha una saturazione e una perdita di specificità della reazione che si manifesta con l'assenza di un aumento di densità della banda sul gel accompagnata da un'amplificazione non specifica di frammenti di DNA di varia grandezza visibile come una macchia sul gel (*smear*).



**Figura 20:** dipendenza del segnale di *c-myc* dal numero di cicli di PCR effettuati. PCR: 18-30 cicli (elong. 60'' 72 °C, denat. 75'' 94.5 °C, ibrid. 45'' 60 °C).

#### 5.2.4.4 *IL-2R*

Le stesse condizioni di reazione usate per evidenziare l'espressione di *c-myc* sono state utilizzate per la RT-PCR con il *primer* di *IL-2R*.



**Figura 21:** dipendenza del segnale di *IL-2R* dal numero di cicli di PCR effettuati. L'RNA di partenza proviene da un campione di linfociti attivato con 6 ore di esposizione a Con A e coltivato in maniera statica in un tubo di clinostato a 37 °C. PCR: 20-32 cicli (elong. 60'' 72 °C, denat. 75'' 94.5 °C, ibrid. 45'' 60 °C).

#### 5.2.4.5 *Conclusioni*

Sulla base degli esperimenti effettuati e dei risultati esposti nei Capitoli 5.2.4.1-5.2.4.4 si è potuto ricavare l'intervallo di linearità della PCR per una quantità di RNA iniziale di 250 ng per reazione ed una concentrazione del *primer* di 12.5 µM. Per la *β-actina* la reazione di PCR rimane nella sua fase lineare fino a 25 cicli di amplificazione, per *c-fos* fino a 32 cicli, per *c-myc* fino a 24 cicli e per *IL-2R* fino a 26 cicli.

Sulla base di questi dati sono state prescelte per l'analisi dell'espressione genetica le condizioni di reazione elencate nella Tabella 7.

Primer	Pre-PCR		P C R				
	Denat.	Ibrid.	Cicli	Elong.	Denat.	Ibrid.	Elong.
<i>β-actina</i>	5' 95 °C	5' 60 °C	23	90" 72 °C	45" 94 °C	45" 56 °C	10' 72 °C
<i>c-fos</i>	5' 95 °C	5' 60 °C	27	90" 72 °C	45" 94 °C	45" 56 °C	10' 72 °C
<i>c-myc</i>	5' 95 °C	5' 60 °C	22	60" 72 °C	75" 94.5 °C	45" 60 °C	10' 72 °C
<i>IL-2R</i> <i>α-chain</i>	5' 95 °C	5' 60 °C	26	60" 72 °C	75" 94.5 °C	45" 60 °C	10' 72 °C

Tabella 7: condizioni di reazione per i differenti *primers* ottimizzate per l'analisi dell'espressione dei rispettivi geni.

### 5.3 Espressione genetica

#### 5.3.1 Esperimenti preliminari

Alcuni esperimenti preliminari volti a testare il metodo utilizzato in una determinata fase dell'ottimizzazione sono stati effettuati prima che questa fosse completata. In tutti questi esperimenti non è stato ancora possibile ottenere un'amplificazione specifica di *c-myc* presentandosi il DNA prodotto dalla PCR come una macchia sul gel. L'amplificazione di *c-fos* e della *β-actina* è invece avvenuta con un numero leggermente superiore di cicli di quello utilizzato poi nella reazione ottimizzata. L'espressione di *IL-2R* non è invece stata presa in considerazione.

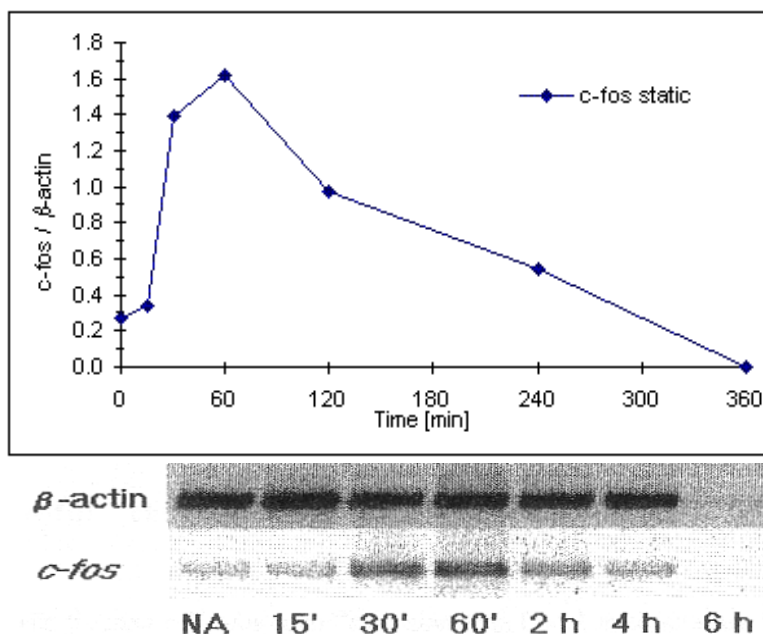
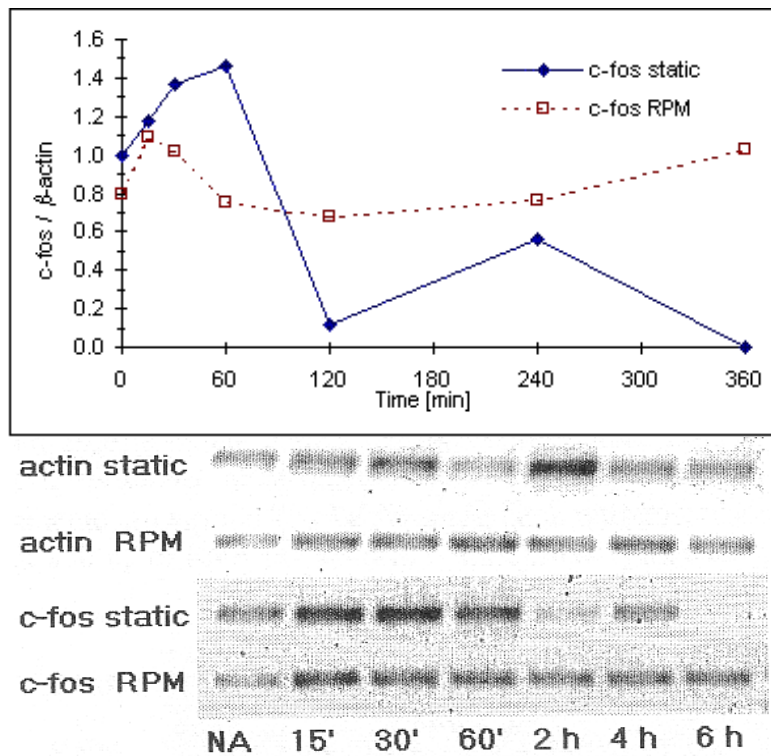
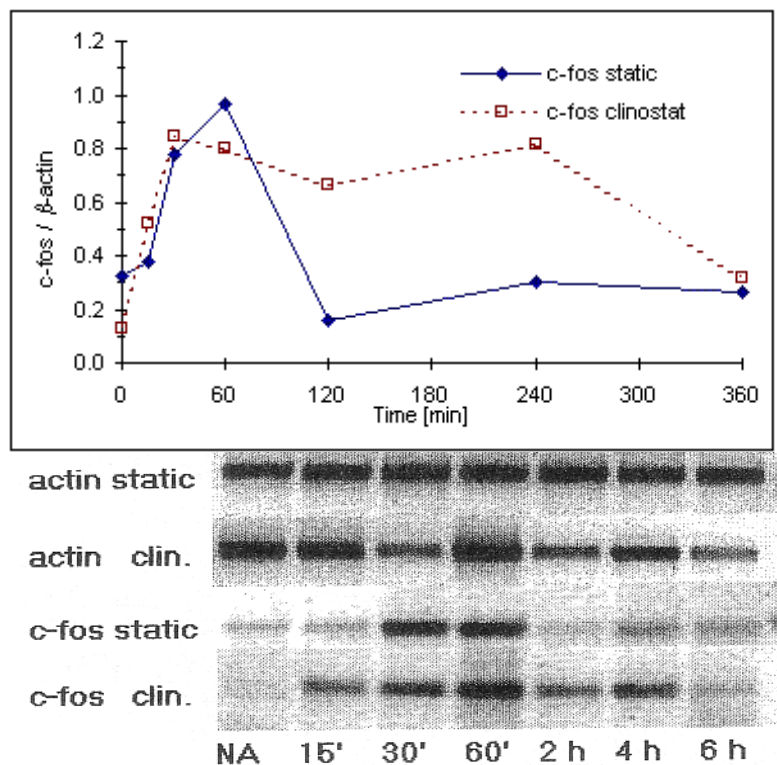


Figura 22: espressione della *β-actina* e di *c-fos* dopo l'attivazione con Con A in campioni di 10 milioni di cellule attivati staticamente. I valori normalizzati dell'espressione di *c-fos* sono mostrati nel grafico. È stata effettuata una singola reazione di retrotrascrizione con una quantità di 250 ng di RNA totale per campione e per *primer*. PCR: *β-actina* 24 cicli, *c-fos* 28 cicli (elong. 90" 72 °C, denat. 45" 94 °C, ibrid. 45" 56 °C).



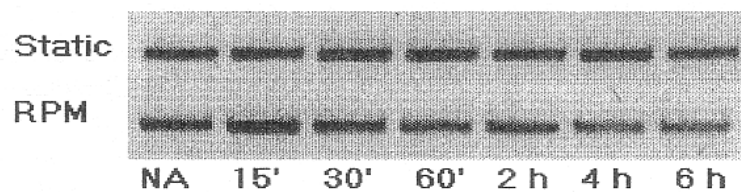
**Figura 23:** espressione della  $\beta$ -actina e di *c-fos* dopo l'attivazione con Con A in campioni di 10 milioni di cellule attivati staticamente o sulla RPM. La quantità di RNA e le condizioni della PCR sono uguali a quelle mostrate nella Figura 22.



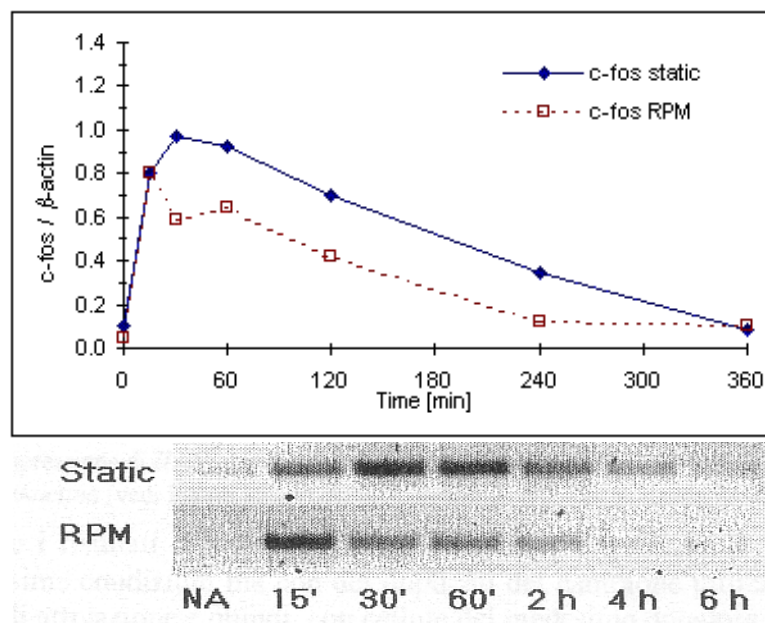
**Figura 24:** espressione della  $\beta$ -actina e di *c-fos* dopo l'attivazione con Con A in campioni di 10 milioni di cellule attivati staticamente o sul clinostato. La quantità di RNA e le condizioni della PCR sono uguali a quelle mostrate nella Figura 22.

### 5.3.2 Attivazione in microgravità simulata nella RPM

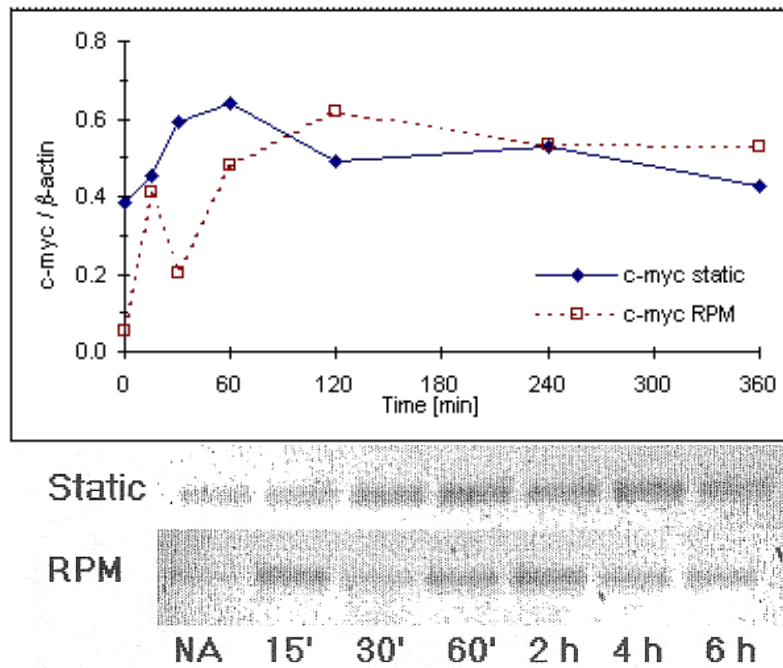
Una volta determinate le condizioni ideali della reazione di PCR gli effetti della microgravità simulata sull'espressione genetica dei linfociti sono stati analizzati utilizzando dei campioni (10 milioni di cellule, isolati dal sangue il giorno precedente) posti sulla *Random Positioning Machine* nella camera climatizzata a 37 °C dopo essere stati attivati singolarmente mediante l'iniezione di Con A. L'esperimento di controllo è stato effettuato con cellule attivate analogamente ma coltivate in maniera statica. L'estrazione dell'RNA è avvenuta utilizzando il metodo modificato con la soluzione stabilizzante di tiocianato di guanadina (vedi Capitolo 4.4.3). Come materiale di partenza per la RT-PCR si è utilizzata una quantità di RNA totale di 1 µg per ogni campione. Questo RNA è stato amplificato in una singola reazione di retrotrascrizione di 80 µl di volume allo scopo di minimizzare le differenze nella quantità iniziale di cDNA tra le varie reazioni di PCR effettuate poi separatamente utilizzando 20 µl della reazione di retrotrascrizione (equivalenti ad una quantità di partenza di 250 ng di RNA per *primer*) e utilizzando condizioni di reazione specifiche per ciascun gene.



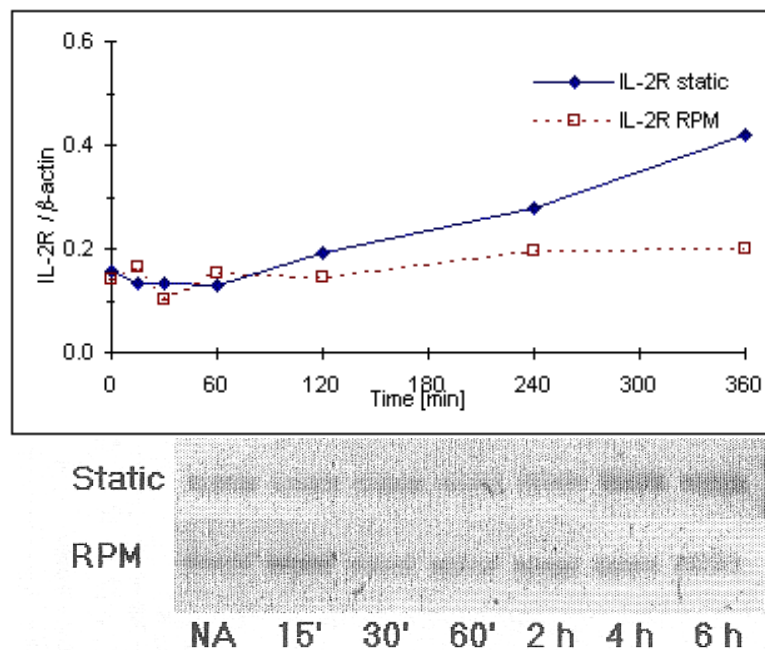
**Figura 25:** il segnale della  $\beta$ -actina è stato utilizzato per normalizzare i valori ottenuti dall'amplificazione dell'mRNA di *c-fos*, *c-myc* e *IL-2R*. PCR: 23 cicli (elong. 90" 72 °C, denat. 45" 94 °C, ibrid. 45" 56 °C). Il tempo trascorso dall'attivazione è segnalato sotto le bande. Il primo campione (NA) non è stato attivato ed è stato prelevato contemporaneamente al campione di 6 ore.



**Figura 26:** cinetica di espressione di *c-fos* dopo l'attivazione con Con A. I valori mostrati dal grafico sono normalizzati rispetto al segnale della  $\beta$ -actina (vedi Figura 25). PCR: 27 cicli (elong. 90" 72 °C, denat. 45" 94 °C, ibrid. 45" 56 °C).

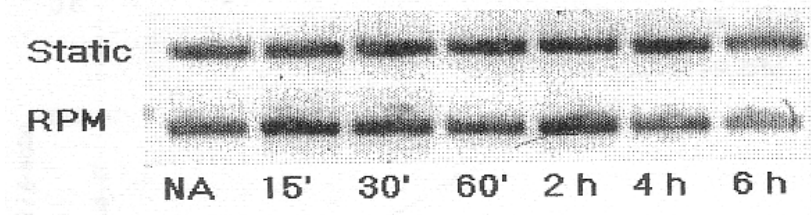


**Figura 27:** cinetica di espressione di *c-myc* dopo l'attivazione con Con A. I valori mostrati dal grafico sono normalizzati rispetto al segnale della  $\beta$ -actina (vedi Figura 25). PCR: 22 cicli (elong. 60" 72 °C, denat. 75" 94.5 °C, ibrid. 45" 60 °C).

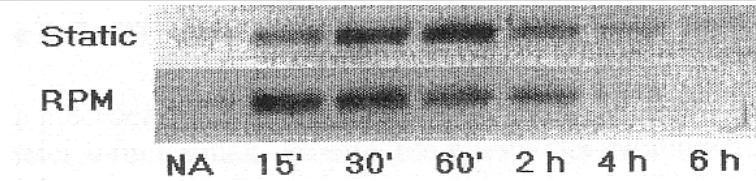
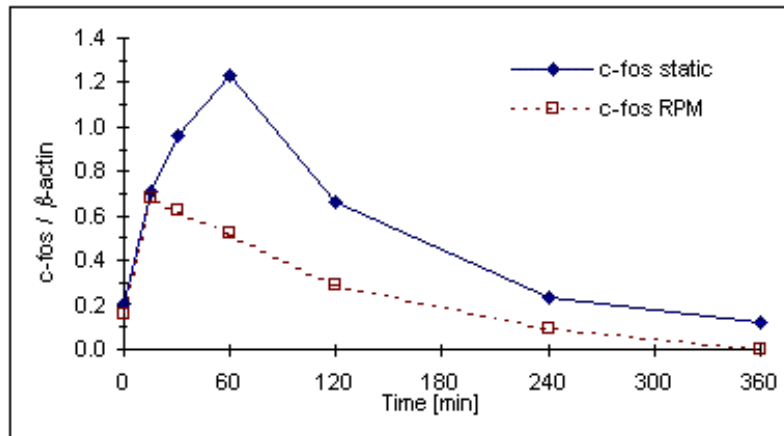


**Figura 28:** cinetica di espressione di *IL-2R* dopo l'attivazione con Con A. I valori mostrati dal grafico sono normalizzati rispetto al segnale della  $\beta$ -actina (vedi Figura 25). PCR: 26 cicli (elong. 60" 72 °C, denat. 75" 94.5 °C, ibrid. 45" 60 °C).

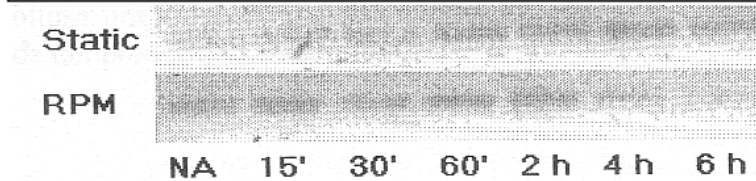
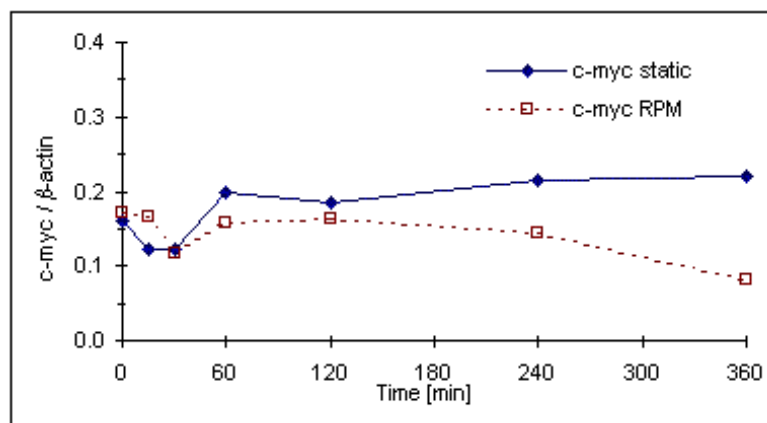
Al fine di verificare i risultati di questo primo esperimento la reazione di PCR è stata ripetuta utilizzando le medesime condizioni ma con dei duplicati del campione utilizzato provenienti dallo stesso esperimento di attivazione e quindi con cellule del medesimo donatore.



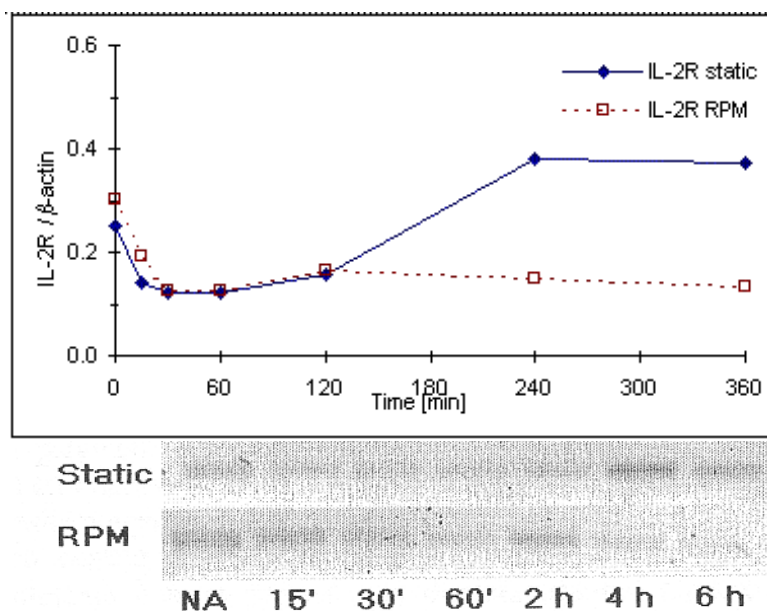
**Figura 29:** il segnale della  $\beta$ -actina utilizzato per normalizzare i valori ottenuti dall'amplificazione dell'mRNA di *c-fos*, *c-myc* e *IL-2R*. PCR: 23 cicli (elong. 90" 72 °C, denat. 45" 94 °C, ibrid. 45" 56 °C). Il tempo trascorso dall'attivazione è segnalato sotto le bande. Il primo campione (NA) non è stato attivato ed è stato prelevato contemporaneamente al campione di 6 ore.



**Figura 30:** cinetica di espressione di *c-fos* dopo l'attivazione con Con A. I valori mostrati dal grafico sono normalizzati rispetto al segnale della  $\beta$ -actina (vedi Figura 29). PCR: 27 cicli (elong. 90" 72 °C, denat. 45" 94 °C, ibrid. 45" 56 °C).



**Figura 31:** cinetica di espressione di *c-myc* dopo l'attivazione con Con A. I valori mostrati dal grafico sono normalizzati rispetto al segnale della  $\beta$ -actina (vedi Figura 29). PCR: 22 cicli (elong. 60" 72 °C, denat. 75" 94.5 °C, ibrid. 45" 60 °C).



**Figura 32:** cinetica di espressione di *IL-2R* dopo l'attivazione con Con A. I valori mostrati dal grafico sono normalizzati rispetto al segnale della  $\beta$ -actina (vedi Figura 29). PCR: 26 cicli (elong. 60" 72 °C, denat. 75" 94.5 °C, ibrid. 45" 60 °C).

## 5.4 Discussione

### 5.4.1 Ottimizzazione della RT-PCR

Come già accennato in precedenza la PCR è un metodo molto sensibile che permette di amplificare quantità di acidi nucleici infinitesimali. Proprio per questa sua caratteristica, oltre a permettere analisi molto precise è in pure grado di evidenziare errori anche piccoli presenti nel procedimento. La minimizzazione di questi errori è quindi un prerequisito indispensabile se si vogliono ottenere dei risultati affidabili e riproducibili e richiede tutta una serie di accorgimenti che hanno dovuto dunque essere presi in considerazione durante questo lavoro di diploma.

#### 5.4.1.1 Quantificazione dell'RNA

La misurazione degli acidi nucleici attraverso un metodo accurato come quello spettrofometrico permette, oltre a rilevare eventuali impurità presenti, di utilizzare la medesima quantità di partenza di RNA totale per tutti i campioni presi in considerazione. Ciò non possibile utilizzando semplicemente lo stesso numero di cellule per ogni campione, in quanto questo non permetterebbe di evidenziare possibili differenze nella quantità di RNA ottenuta dall'estrazione che si sono dimostrate in alcuni casi anche considerevoli.

Questa determinazione si è comunque rilevata possibile solo se, durante il processo di isolamento, l'RNA viene co-precipitato con glicogeno. Una co-precipitazione utilizzando tRNA, seppur efficace, rende difficoltosa una misurazione quantitativa in quanto il co-precipitante assorbe alla stessa lunghezza d'onda del prodotto da misurare.

### 5.4.1.2 RT-PCR

L'utilizzo della medesima quantità iniziale di RNA (250 ng) per tutti i *primers* nelle varie reazioni di RT-PCR fa sì che per ogni campione sia possibile effettuare una singola reazione di retrotrascrizione, minimizzando in questo modo le differenze nella quantità di iniziale di cDNA utilizzata per la PCR e dovute a variazioni dell'efficienza della prima reazione in *Eppendorf* separati.

Un'amplificazione di due o più *primers* contemporaneamente nella stessa reazione di PCR, che avrebbe permesso di eliminare totalmente anche variazioni nella quantità iniziale di cDNA tra le diverse reazioni di PCR del medesimo campione, non si è dimostrata fattibile. Questo è da ricondursi al fatto che l'amplificazione dei diversi geni con i rispettivi *primers* richiede condizioni di reazioni diverse per i diversi *primers*. Anche nel caso della  $\beta$ -actina e di *c-fos*, in cui le reazioni sono avvenute con i medesimi parametri per ciascun passo della reazione, la differenza nel numero di cicli utilizzato non permette di visualizzare i due geni contemporaneamente. L'amplificazione di *c-fos* risulta debolmente visibile solo partendo da 25 cicli di PCR, un valore per il la reazione della  $\beta$ -actina è già saturata.

L'ottimizzazione dei parametri della reazione di PCR si è dimostrata ostica, soprattutto per le difficoltà incontrate nell'ottenere un'amplificazione di *c-myc*: gli esperimenti compiuti all'inizio di questo lavoro di diploma non erano riusciti a mettere in evidenza alcuna espressione di questo gene nonostante il numero elevato di cicli (fino a 60) utilizzato e le condizioni di reazione poco restrittive. Paradossalmente è stato proprio una diminuzione del numero di cicli abbinato a temperature e tempi più stringenti, ma combinate con un innalzamento della temperatura di denaturazione di 0.5 °C, a rendere possibile la visualizzazione dell'espressione di *c-myc*. Come è rilevabile dalla Figura 19 a Pagina 28 la fine della linearità della reazione di PCR per il *primer* di *c-myc* non si manifesta esclusivamente con la saturazione della banda specifica, come è il caso degli altri *primers*, ma pure con la formazione di uno *smear* che indica una diminuzione della specificità della reazione. Visto che questi sintomi non si sono presentati nelle reazioni effettuate con gli altri *primers* è improbabile che questo evento sia dovuto a una diminuzione di processività della Taq-polimerasi (tra l'altro vi è un'amplificazione non specifica anche di segmenti più grandi di quello atteso a 345 bp), oppure ad una concentrazione troppo alta dell'enzima stesso o ancora ad una concentrazione troppo bassa di nucleotidi, che sono cause comuni di questo fenomeno nella PCR. L'ipotesi restante, cioè che la concentrazione di cDNA iniziale fosse troppo alta per il numero di cicli presi in considerazione, non è in contrasto con il fatto che nei primi esperimenti non si sia potuta ottenere alcuna amplificazione, se si suppone che la temperatura di denaturazione usata in un primo tempo (94 °C) fosse troppo bassa per permettere una separazione completa della matrice impedendo quindi la successiva ibridizzazione del *primer*.

### 5.4.1.3 Densitometria

La misurazione effettuata direttamente sul gel dei prodotti della PCR evidenziati con *ethidiumbromid* non è stata possibile in quanto il densitometro a disposizione non era in grado di metterne in risalto la fluorescenza lavorando esclusivamente nell'intervallo visibile della luce. D'altro canto due metodi di evidenziazione del DNA testati con coloranti visibili direttamente sul gel, *Nile Blue* (*Sigma*, N-5632) e *Silver Staining* (*Biorad*, 161-0449-EDU), non hanno dato risultati soddisfacenti (I.Walther, comunicazione personale). Si è quindi dovuto fotografare i gel sotto luce ultravioletta e digitalizzare poi le fotografie. Per ottenere risultati riproducibili è però necessario che le fotografie vengano prese sullo stesso tipo di film con i medesimi tempi di esposizione e con la medesima apertura del diaframma. A questo scopo i film Polaroid 667 (solo bianco e nero) si sono

dimostrati più adatti dei Polaroid 665 (bianco e nero con negativo). Questi ultimi, essendo meno sensibili, richiedono tempi di esposizione dell'ordine di diversi secondi, non ottenibili se non impostando l'apparecchio fotografico utilizzato sullo scatto manuale ('B'), fatto che da naturalmente vita a delle differenze di esposizione tra le foto scattate.

Il maggior problema incontrato nella quantificazione delle bande sulla fotografia si è rivelato quello dell'eliminazione del *background* di *ethidiumbromid*, la cui distribuzione nel gel, per quanto apparentemente uniforme a occhio nudo, non si è rilevata tale nelle sensibili immagini digitalizzate, per cui non è stato possibile eliminarlo automaticamente per tutte le bande con l'aiuto del *software*, ma ha dovuto essere rimosso per ogni singola banda in modo manuale. Questa operazione deve essere effettuata in modo molto prudente al fine di evitare errori che si manifestano soprattutto per le bande più deboli.

#### 5.4.1.4 Conclusioni

Il metodo così sviluppato permette una determinazione semiquantitativa dell'espressione genetica e cioè permette di visualizzare le variazioni nell'espressione di un gene rispetto all'espressione di uno standard interno, nel nostro caso la  $\beta$ -actina. Lo standard interno consente, come detto, di eliminare le differenze nella quantità iniziale di RNA dovute a differenze nell'estrazione dello stesso dalle cellule permettendo così un confronto diretto tra i vari campioni.

L'aggiunta a ciascun campione prima della reazione di retrotrascrizione di uno standard esterno di RNA in quantità predefinita e la sua amplificazione con un *primer* specifico rappresenterebbero un ulteriore miglioramento di questo metodo, permettendo anche di effettuare analisi totalmente quantitative e determinare così anche il numero di copie di mRNA espresso per ciascun gene.

### 5.4.2 Espressione genetica

#### 5.4.2.1 *c-fos*

Tutti gli esperimenti effettuati hanno dimostrato che nei linfociti attivati in una cultura statica vi è un forte aumento nell'espressione genetica di *c-fos* che avviene immediatamente nei primi 15 minuti dopo l'aggiunta di Con A (il primo tempo misurato) e raggiunge velocemente il suo massimo dopo circa 60 minuti. Nei campioni attivati in microgravità simulata si riscontra un'aumento nei primi 15 minuti, ma l'espressione raggiunge il suo apice già tra questo tempo e i 30 minuti senza aumentare ulteriormente. Il livello di mRNA di *c-fos* nella cellula ritorna poi dopo circa 4 ore ai livelli riscontrati nel campione non attivato in tutti i campioni statici e nei due campioni sulla RPM del Capitolo 5.3.2, mentre nei campioni in microgravità simulata del Capitolo 5.3.1 il livello di espressione, pur calando, rimane a livelli relativamente alti. Da notare comunque che la PCR è stata effettuata negli esperimenti preliminari in condizioni che non corrispondono a quelle ottimali, in particolare perché i 24 cicli di amplificazione della  $\beta$ -actina sono al limite dell'intervallo di linearità per questo *primer*. I risultati così ottenuti non sono dunque direttamente comparabili con quelli conseguiti con la procedura ottimizzata.

Si può dunque concludere che la microgravità simulata non abbia alcun effetto negativo sull'espressione di *c-fos* fino a circa 15-30 minuti dopo l'attivazione con Con A, ma che dopo questo tempo subentri un evento nella cellula che blocchi un'ulteriore trascrizione di questo gene.

#### 5.4.2.2 *c-myc*

Come già fatto notare in precedenza gli esperimenti con *c-myc* sono stati costellati da difficoltà dovute all'incapacità di mettere in evidenza questo gene mediante la PCR, cosicché negli esperimenti preliminari non si è riusciti ad ottenere dati validi riguardanti la sua espressione. Negli esperimenti presentati nel Capitolo 5.3.2 un aumento è visibile dell'espressione di questo gene che culmina in un'espressione massima dopo 60 minuti rimanendo grosso modo costante fino alle 6 ore (ultimo tempo misurato). Nessuna differenza degna di nota ha potuto però essere evidenziata tra l'espressione nei campioni coltivati in maniera statica e quelli coltivati in microgravità simulata.

#### 5.4.2.3 *IL-2R*

Essendo stato preso questo gene in considerazione solo in un secondo tempo non sono stati effettuati esperimenti preliminari sulla cinetica della sua espressione e quindi gli unici risultati disponibili sono quelli mostrati nel Capitolo 5.3.2. Un aumento dell'espressione del recettore dell'interleuchina-2 è riscontrabile in maniera sensibile nei campioni coltivati in maniera statica a partire dalle 4 ore, mentre questo aumento non è rilevabile nei campioni coltivati in microgravità simulata almeno fino alle 6 ore che è il tempo massimo che è stato preso in considerazione.

Inaspettatamente alcuni campioni non attivati hanno mostrato un segnale di PCR relativamente forte con tutti e tre i *primers* la cui cinetica è stata analizzata.

La possibilità che questi segnali siano provocati dall'espressione genetica indotta da fattori di stress quali la centrifugazione avvenuta durante la separazione delle cellule dal sangue è da escludersi: in tutti gli esperimenti qui presentati i linfociti sono stati attivati il giorno dopo l'estrazione proprio per eliminare la possibilità di una simile eventualità. Inoltre, anche se la procedura di estrazione avesse indotto questa espressione, essa avrebbe dovuto tornare entro il giorno seguente a livelli molto bassi almeno per geni come *c-fos* o *c-myc* che hanno una cinetica molto rapida.

È possibile che questa espressione sia dovuta all'attivazione da parte delle componenti proteiche presenti nel siero bovino che fungerebbero da antigeni attivando un certo numero di linfociti (attivazione monoclonale). In questo caso resterebbe da spiegare come mai in alcuni casi dopo l'espressione dovuta all'attivazione con Con A il livello di mRNA specifico scenda a livelli più bassi di quelli riscontrati nel campione non attivato.

#### 5.4.2.4 *Conclusioni*

I dati ottenuti suggeriscono come le cause dell'inibizione dell'attivazione dei linfociti riscontrata in microgravità possano già essere ricercate nei primi eventi di espressione genetica che avvengono nella cellula. L'espressione dei geni dell'interleuchina-2 e del suo recettore sono i due eventi comunemente ritenuti essere decisivi per la proliferazione dei linfociti <sup>21, 22, 24</sup>: se l'iniziazione della progressione delle cellule nel ciclo cellulare dipende dalla presenza di antigeni o mitogeni in combinazione con la presenza di IL-1, per la transizione nella fase S del ciclo cellulare è necessaria un'interazione del recettore dell'interleuchina-2 con IL-2. Solo questo evento determinerebbe da ultimo il fato delle cellule (ipotesi del *commitment*, vedi Capitolo 2.3.1) <sup>24</sup>. Il fatto che in microgravità simulata non si sia potuto osservare alcun aumento dell'espressione di *IL-2R* nei tempi previsti dalla letteratura (2 ore) <sup>24</sup> potrebbe dunque fornire una spiegazione alla repressione dell'attivazione in queste condizioni. Visto l'esiguo numero di esperimenti effettuati queste osservazioni andrebbero comunque confermate utilizzando per ulteriori indagini dei linfociti

provenienti da più donatori e misurando la cinetica di espressione su tempi più lunghi, in quanto in queste condizioni l'espressione di *IL-2R* potrebbe essere semplicemente ritardata.

Visto che l'espressione di *c-fos* è uno degli eventi che collaborano nelle prime due ore dall'inizio dell'attivazione a preparare le cellule per la transizione nella fase di sintesi del DNA, è possibile, ma non obbligatorio, che la differenza riscontrata nella sua cinetica di espressione abbia un effetto diretto, da sola o in sinergia con altri fattori, sull'espressione di *IL-2R* e quindi sull'inibizione dell'attivazione nei linfociti.

## 6. Abbreviazioni e simboli

APC	Antigen Presenting Cells
atm	Atmosfera (1 atm = $1.013 \cdot 10^5$ Pa)
CD	Cluster Designation
Con A	Concanavalina A
DEPC	Dietilpirocarbonato
DG	Diacylglycerol
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	Siero Fetale Bovino
FDA	Fluorescein diacetate
GITC	Tiocianato di guanidina
GTP	Guanosine Triphosphate
HBSS	Hank's balanced salt solution (HANKS)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-n-ethansulfonsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
Ig	Immunoglobulin
IL-1	Interleuchina-1
IL-2	Interleuchina-2
IL-2R	Recettore dell'interleuchina-2
IP <sub>3</sub>	Inosit triphosphate
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MALT	Mucose Associated Lymphoid Tissue
MGP	Membrane Glycoproteins
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK	Natural Killer cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PHA	Fitoemagglutina
PIP	Phosphatidylinositphosphate
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinosit-4,5-diphosphate
PKC	Fosfochinasi C
PLC	Fosfolipasi C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PtdIns	vedi PIP
RPM	Random Positioning Machine
rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
TAE	Tris Acetato EDTA
T <sub>C</sub>	T killer cell
TCR	T-Cell antigen Receptor
T <sub>H</sub>	T helper cell
xg	Multipli dell'accelerazione gravitazionale (1 xg = $9.805 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ )

## 7. Letteratura

- <sup>1</sup> Montgomery, P.O.B., Cook, J.E., Reynolds, R.C., Paul, J.S., Hayflick, L., Stock, D., Schulz, W.W., Kimsey, S., Thirolf, R.G., Rogers, T., Campell, D. The Response of Single Human Cells to Zero Gravity. *In vitro*, **14**: 165-173 (1978)
- <sup>2</sup> Batkai, L., Talas, M., Stöger, I., Nagy, K., Hiros, L., Kostantinova, I., Rykova, M., Mozgovaya, I., Guseva, O., Kozharinov, V. In Vitro Interferon Production by Human Lymphocytes during Spaceflight. *The Physiologist*, **31**: S50-S51 (1988)
- <sup>3</sup> Talas, M., Batkai, L., Stöger, I., Nagy, K., Hiros, L., Kostantinova, I., Rykova, M., Mozgovaya, I., Guseva, O., Kozharinov, V. Results of Space Experiment Program 'Interferon'. *Acta Microbiologica Hungarica*, **30**: 53-61 (1983)
- <sup>4</sup> Cogoli, A., Tschopp, A., Fuchs-Bislin, P. Cell Sensivity to Gravity. *Science*, **225**: 228-230 (1984)
- <sup>5</sup> Cogoli, A., Tschopp, A. Lymphocyte Reactivity during Spaceflight. *Immunology Today*, **6**: 1-4 (1985)
- <sup>6</sup> Bechler B., Cogoli A., Mesland D. Lymphozyten sind Schwerkraftempfindlich. *Naturwissenschaften*, **73**: 400-403 (1986)
- <sup>7</sup> Cogoli, A., Bechler, B., Müller, O., Hunzinger, E. Effect of Microgravity on Lymphocyte Activation. In: *Biorack on Spacelab D1*, ESA SP-1091 (N. Longdon and V. David, eds.), pp. 89-100. ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, The Netherlands (1988)
- <sup>8</sup> Cogoli, A., Bechler, B., Lorenzi, G. Response of Cells to Microgravity. In: *Fundamentals of Space Biology* (N. Asashima and G.M. Malacinski, eds.), pp. 97-111. Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1990)
- <sup>9</sup> Dintenfass, L., Osman, P., Maguire, B., Jedrzejczyk, H. Experiment on Aggregation of Red Cells under Microgravity on STS 51-C. *Advances in Space Research*, **6**: 29-34 (1986)
- <sup>10</sup> Dintenfass, L. Effect of Zero Gravity on Blood Cells and Viscosity. *Lancet*, **335**: 239-240 (1990)
- <sup>11</sup> Cogoli, A., Gmünder, F.K. Gravity effects on single cells: techniques, findings and theory. In: *Advances in Space Biology and Medicine*, **2**: 183-248, JAI Press Inc. (1991)
- <sup>12</sup> Albrecht-Buehler, G. The Simulation of Microgravity Conditions on the Ground. *ASGSB Bulletin*, **5**: 3-10 (1992)
- <sup>13</sup> Briegleb, W. The Clinostat- A Tool for Analysing the Influence of Acceleration on Solid-Liquid Systems. *Proceedings of a Workshop on Space Biology*, Cologne, Germany, 9-11 March 1983, ESA SP-206 (1983)
- <sup>14</sup> Silver, I.L. The Dynamics of a Discrete Geotropic Sensor Subject to Rotation-Induced Gravity Compensation. *Journal of theoretical biology*, **61**: 353-362 (1976)
- <sup>15</sup> Hoson, T., Kamisaka, S., Masuda, Y., Yamashita, M., Buchen, B. Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta*, **203**: S187-S197 (1997)
- <sup>16</sup> Schatz, A. Problems of 0g-Simulation with the Fast Running Clinostat. *Proceedings of a Workshop on Space Biology*, Cologne, Germany, 9-11 March 1983, ESA SP-206 (1983)
- <sup>17</sup> Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. *Immunology*, 4th Edition, Mosby (1996)
- <sup>18</sup> Metcalfe, J.C., Smith, G.A., Moore, J.P., Hesketh, R. The Early Mitogenic Pathway in Mouse Thymocytes: an Analysis of the Dual Signal Hypothesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **213**: 29-44 (1987)
- <sup>19</sup> Cogoli, A., Moore, D. Gravitational and Space Biology at the Cellular Level. In: *Biological and Medical Research in Space*, pp. 1-105, Springer (1996)
- <sup>20</sup> Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd Edition, Garland Publishing Inc. (1994)
- <sup>21</sup> Cantrell, D.A., Smith, K.A. The Interleukin-2 T-Cell System: a New Cell Growth Model. *Science*, **224**: 1312-1316 (1984)

- 
- <sup>22</sup> Greene, W.C., Warren, L.J. The Human Interleukin-2 Receptor. *Ann. Rev. Immunol.*, **4**: 69-95 (1986)
- <sup>23</sup> Kronke, M., Leonard, W.J., Depper, J.M., Greene, W.C. Sequential Expression of Genes Involved in Human T Lymphocyte Growth and Differentiation. *J. Exp. Med.*, **161**: 1593 (1985)
- <sup>24</sup> Crabtree, G.R. Contingent Genetic Regulatory Events in T Lymphocyte Activation. *Science*, **243**: 355-361 (1989)
- <sup>25</sup> Efrat, S., Pilo, S., Kaempfer, R. Kinetics of Induction and Molecular Size of mRNAs Encoding Human IL-2 and Interferon. *Nature*, **297**: 236 (1982)
- <sup>26</sup> Kostantinova, I.V., Antropova, Y.N., Legen'kov, V.I., Zazhirey, V.D. Study of Reactivity of Blood Lymphoid Cells in Crew Members of the *Soyuz 6, 7, and 8* Space Ships before and after Flight. *Space Biol. Med.* **7**: 45-55 (1973)
- <sup>27</sup> Kimzey, S.L. In: *Biomedical Results from Skylab* (Johnsohn, R.S., Dietlein, L.F. editors), NASA SP-377, 249 (1977)
- <sup>28</sup> Bouaboula M., Legoux, P., Pessegues, B., Delpech, B., Dumont, X., Piechaczyk, M., Casellas, P., Shire, D. Standardisation of mRNA titration using PCR method involving co-amplification with a multispecific internal control. *J Biol Chem.*, **267**: 21830-21838 (1992)
- <sup>29</sup> Scheuermann R.H., Bauer S.R. PCR-based mRNA quantification using an internal standard: Analysis of oncogene expression. *Methods Enzymol.*, **218**: 446-473 (1993)
- <sup>30</sup> Mullis K.B., Faloona, F.A. Specific Synthesis of DNA *in vitro* via Polymerase-catalysed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*, **155**: 335-350 (1987)
- <sup>31</sup> Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- <sup>32</sup> Köhler, T., Lassner, D., Rost, A.-K., Thamm, B., Pustowoit, B., Remke, H. *Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction*, 1st Edition, Springer Verlag (1995)
- <sup>33</sup> Guillbault, G.G., Kramer, D. N. Fluorometric Determination of Lipase, Acylase,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Chymotrypsin and Inhibitors of these Enzymes, *Anal. Chem.*, **36**: 409 (1964)

## 8. Ringraziamenti

Un sentito grazie va alle seguenti persone che, in un modo o nell'altro, mi hanno aiutato nel corso di questo lavoro di diploma:

- In primo luogo ad Augusto, per avermi permesso di effettuare questo lavoro diploma, e precedentemente il lavoro di semestre, in un campo affascinante come quello della biologia spaziale.
- A Isabelle, per il supporto morale e materiale concessomi durante questi sei mesi, per il suo contributo a questo lavoro e per la pazienza dimostrata nel sopportare le mie moleste domande.
- A Marianne, per la correzione degli strafalcioni da me commessi nelle parti in lingua tedesca di questo rapporto.
- A Monika, per la pazienza dimostrata nel sopportare la mia molesta presenza in laboratorio.
- A Moira, alla quale va tutto il mio amore e che per cinque mesi ha dovuto subire le mie geremiadi sul "Oh, come mi va tutto male in laboratorio!".