



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
Dipartimento di Scienze Biomediche

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE (CLASSE L-13)

**MESSA A PUNTO DI TECNICHE PER LO STUDIO
DELLA BIOLOGIA CELLULARE DI T-LINFOCITI UMANI
IN CONDIZIONI DI MICROGRAVITÀ SIMULATA**

Relatore:

Prof. Proto Pippia

Correlatore:

Prof. Gianluigi Sciola

Elaborato finale di:

Monica Serra

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

1. SCOPO DEL LAVORO SVOLTO DURANTE L'ATTIVITA' DI TIROCINIO	4
2. INTRODUZIONE	4
2.1 <u>La microgravità</u>	4
2.2 <u>Effetti della microgravità sul corpo umano</u>	5
2.3 <u>Effetti della microgravità sui T-linfociti</u>	6
3. MATERIALI E METODI	7
3.1 <u>Colture cellulari di cellule Jurkat</u>	8
3.1.1 Metodica di piastrazione delle cellule Jurkat	8
3.2 <u>Separazione di T-linfociti da buffy-coat</u>	8
3.2.1 Metodica di separazione di PBLs da buffy-coat	9
3.2.2 Metodica di separazione di T-linfociti da PBLs mediante colonnine	9
3.3 <u>Attivazione linfocitaria con anti-CD3 e anti-CD28</u>	10
3.4 <u>Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide</u>	10
3.4.1 Metodica per l'elettroforesi di campioni	11
3.5 <u>Western Blot</u>	11
3.5.1 Metodica del Western Blot	12
4. RISULTATI E CONCLUSIONI	13
5. BIBLIOGRAFIA	14

1. SCOPO DEL LAVORO SVOLTO DURANTE L'ATTIVITA' DI TIROCINIO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di descrivere le varie metodiche utilizzate per lo studio di alcuni aspetti della biologia cellulare dei T-linfociti umani sottoposti a microgravità simulata. L'acquisizione di tali metodiche permette di analizzare le modifiche post-traduzionali in tirosina della frazione proteica totale di T-linfociti umani purificati da soggetti volontari sani e sottoposti a microgravità. Tali proteine presentano residui di tirosina fosforilati che potrebbero essere coinvolti nelle fasi iniziali di attivazione e di trasduzione del segnale cellulare. Lo studio di queste proteine ha previsto differenti passaggi: inizialmente sono state isolate le cellule e sottoposte a condizioni di microgravità simulata. Successivamente, l'utilizzo di anticorpi specifici ha consentito di mettere in evidenza la presenza di proteine fosforilate e di verificare le differenze rispetto ai campioni che non venivano sottoposti alla microgravità simulata.

Al fine di studiare tali modificazioni sono state messe a punto differenti metodiche, quali colture cellulari, separazione di T-linfociti umani da sangue ricostituito, attivazione *in vitro* dei T-linfociti, elettroforesi monodimensionale e Western Blot. Grazie all'utilizzo di queste ultime si è potuto riscontrare che nei T-linfociti purificati e nelle cellule Jurkat sottoposti a condizioni di microgravità aumenta l'attività fosforilativa nei residui di tirosina.

2. INTRODUZIONE

Nel corso dei millenni la vita si è svolta sulla Terra in un ambiente che ha subito profonde modificazioni, date da variazioni climatiche, cataclismi naturali, radiazioni cosmiche e attività vulcaniche, che hanno influenzato notevolmente lo sviluppo degli esseri viventi e il loro adattamento. Tuttavia un fattore ambientale che è rimasto costante nel corso degli anni è la forza di gravità. Di conseguenza è ovvio pensare che un cambiamento dell'ambiente gravitazionale, che varia da un valore pari a 1g normale a un valore pari a 0g, possa provocare effetti notevoli sulle cellule sia *in vivo* che *in vitro*. La microgravità è una frontiera che ha sempre stimolato la ricerca scientifica, ed è stato abbondantemente dimostrato che produce numerosi effetti sulle funzioni fisiologiche (1).

2.1 La microgravità

La gravità terrestre è la forza di attrazione che la Terra esercita sui corpi. Questa forza dipende dalla massa m ed imprime ai corpi un'accelerazione g , definita accelerazione gravitazionale. Tale forza è influenzata dalle leggi del moto, dalla rivoluzione dei pianeti, dalla convezione termica, dalla spinta e dalla pressione idrostatica, dalla sedimentazione,

dai flussi laminari, dall'osmosi e dalla dinamica dei fluidi. Per *microgravità*, invece, s'intende l'assenza di peso, ovvero una condizione in cui i corpi sono in "caduta libera", una situazione in cui la forza di gravità è compensata mediante una forza di accelerazione.

La microgravità può essere sia reale che simulata: la microgravità reale è quella effettivamente presente nello spazio, mentre quella simulata è quella ottenibile a Terra mediante sofisticate apparecchiature, come ad esempio i clinostati, che sono in grado di riprodurre molto bene una condizione di mancanza di gravità.

Gli esperimenti che vengono condotti in condizioni di microgravità reale possono essere realizzati mediante diversi vettori e per tempi variabili, in dipendenza dal vettore che si decide di utilizzare. La scelta di uno o dell'altro vettore dipende essenzialmente dalla durata dell'esperimento che si vuole condurre in condizioni di microgravità e dai risultati che si vogliono ottenere da quest'ultimo.

Per quanto riguarda la gravità simulata, il clinostato permette di effettuare degli esperimenti a Terra sia sulle colture cellulari che sugli animali, anche se questa apparecchiatura nasce in primo luogo per andare a studiare gli effetti della microgravità su organismi unicellulari, di origine animale o vegetale, di piccole dimensioni. Il clinostato maggiormente affidabile per produrre una condizione di microgravità simulata è quello tridimensionale, definito dall'acronimo RPM (Random Positioning Machine). Il clinostato tridimensionale RPM è costituito da due telai, uno posizionato dentro l'altro, che ruotano indipendentemente in maniera random comandati da due motori indipendenti. Questo apparecchio è in grado di modificare in maniera random la posizione del campione che viene posto al centro del telaio interno, in maniera da ottenere in questo modo l'annullamento del campo gravitazionale. Il software di un PC dirige l'attività dei due motori e consente il suo normale funzionamento.

2.2 Effetti della microgravità sul corpo umano

In generale gli apparati e i sistemi che vengono maggiormente influenzati dalla microgravità sono molteplici. Tra di essi ricordiamo il cardiovascolare, il respiratorio, il muscolo scheletrico, il tessuto osseo, il sistema circolatorio, il sistema neuro-sensoriale, quello neuro-endocrino e quello immunitario.

Per quanto riguarda l'apparato cardiovascolare, dato che in condizioni di assenza di gravità i liquidi corporei tendono a portarsi fisiologicamente verso le parti alte del corpo, anche il sangue tende a fluire verso la testa e il torace, facendo aumentare la pressione venosa centrale. Questo aumento della pressione viene percepito dai recettori che regolano la produzione e la secrezione dell'ormone antidiuretico (ADH), facendolo

diminuire e facendo aumentare in tal modo la escrezione dell'acqua. La redistribuzione dei fluidi verso l'alto provoca anche l'aumento della distensione dell'atrio destro. Ciò comporta la liberazione dell'ormone cardionatrino (ANF), che ha il compito di far aumentare l'escrezione del sodio. L'aumentata escrezione di acqua e sodio non fa altro che diminuire il volume idrico dell'organismo del 10-20%.

Il sistema muscolo scheletrico e il tessuto osseo subiscono delle profonde modificazioni in condizioni di microgravità: il primo va incontro ad atrofia muscolare, in quanto l'astronauta in assenza di gravità non ha la necessità di contrarre i muscoli per mantenersi in posizione eretta; mentre il tessuto osseo subisce una decalcificazione molto simile a quella che si manifesta nel corso della osteoporosi, con conseguente deposizione di sali minerali (1).

Per quanto riguarda il sistema neuro-sensoriale, in assenza di gravità si soffre "il mal di spazio" che comporta nausea, difficoltà di concentrazione, sonnolenza, perdita di appetito e conati di vomito. Tutto ciò è dovuto al fatto che alcuni segnali nervosi, che provengono dall'orecchio medio, non combaciano con quelli provenienti dai circuiti visivi, ovvero ciò che si vede non corrisponde a ciò che l'orecchio percepisce.

2.3 Effetti della microgravità sui T-linfociti

La microgravità ha un'influenza notevole anche sul sistema immunologico e in particolare sui T-linfociti. Normalmente i T-linfociti, che rappresentano una delle componenti cellulari del sistema immunitario, si trovano in condizioni di resting, ovvero sono inattivi. Quando vengono attivati, sia *in vivo* che *in vitro*, vanno incontro al processo che porta alla loro conseguente divisione e proliferazione. L'attivazione dei T-linfociti è subordinata a tre differenti segnali, che coinvolgono la cellula:

- il primo segnale consiste nel riconoscimento dell'antigene da parte dei T-linfociti. Questo segnale è innescato dalla formazione del complesso TCR/CD3 con l'antigene o con l'anti-CD3. Il recettore per l'antigene presente sulla membrana plasmatica del T-linfocita, definito CD3, si va a legare con l'antigene o con l'anti-CD3.
- Il medesimo segnale innesca all'interno della cellula una serie di reazioni che portano il T-linfocita ad esporre sulla sua superficie un altro recettore di membrana, chiamato CD28, che interagisce con una molecola molto importante presente sulla superficie dei monociti, ovvero la molecola B7. Il recettore CD28 può anche interagire con l'anticorpo anti-CD28. Quindi l'interazione CD28/B7 o anti-CD28 rappresenta il secondo segnale di attivazione.

- L'interazione CD28/B7 o CD28/anti-CD28 comporta la produzione all'interno della cellula linfocitaria di interleuchina-2 e del suo recettore di membrana. Una volta che viene prodotta l'interleuchina-2, questa viene secreta all'esterno della cellula, mentre il suo recettore viene esposto sulla membrana. L'interazione IL-2/IL-2R rappresenta il terzo ed ultimo segnale per l'attivazione completa del linfocita.

Con successivi esperimenti in microgravità simulata e in microgravità reale si è venuti a conoscenza delle notevoli influenze che questa condizione ambientale ha su diverse funzioni cellulari dei T-linfociti (2). In maniera significativa la microgravità ha tre effetti importanti su questo tipo di cellule:

- la struttura del citoscheletro subisce importanti modificazioni, che determinano una difficile aggregazione dei ligandi per la trasduzione del segnale e la conseguente attivazione cellulare (3);
- la produzione di interleuchina-2 (IL-2) e del suo recettore (IL-2-R) viene inibita sensibilmente (4);
- più precisamente viene inibita l'espressione genica della subunità- α del recettore dell'interleuchina-2.

L'influenza della microgravità porta quindi ad una quasi totale perdita di attivazione dei linfociti umani, sia in condizioni di microgravità simulata sia durante le missioni spaziali (5). Questo è dovuto in particolar modo al fatto che la microgravità va a inibire quello che risulta essere il terzo ed ultimo segnale per l'attivazione dei linfociti, ovvero la produzione di interleuchina-2 e del suo recettore (IL2-R-alfa).

Recentemente è stato inoltre dimostrato, con un esperimento realizzato sulla Stazione Spaziale Internazionale, che la microgravità inibisce la via metabolica Rel/NFkB e la trascrizione dei geni precoci immediati coinvolti nel processo di attivazione dei T-linfociti umani. Parallele ricerche compiute in condizioni di microgravità simulata con il clinostato tridimensionale RPM hanno inoltre avvalorato che il fattore di necrosi tumorale TNF è uno dei principali responsabili del processo inibito dalla microgravità. Dal momento che il TNF è una importante citochina pro-infiammatoria, è possibile ipotizzare che le risposte infiammatorie a valle del processo saranno significativamente ridotte in condizioni di microgravità (6,7).

3. MATERIALI E METODI

Nel corso del tirocinio svolto nei laboratori di Fisiologia Generale del Dipartimento di Scienze Biomediche sono state messe a punto e apprese differenti metodiche per lo

studio della biologia cellulare dei T-linfociti umani in condizioni di microgravità simulata. Tali metodiche sono essenzialmente le seguenti:

- allestimento di colture cellulari di cellule Jurkat;
- separazione di T-linfociti da sangue umano ricostituito;
- attivazione di T-linfociti con anti-CD3 e anti-CD28;
- elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide;
- Western Blot.

3.1 Colture cellulari di cellule Jurkat

Le colture cellulari in sospensione Jurkat sono costituite da linfociti umani provenienti da soggetto affetto da Leucemia Linfoide Acuta. Tali colture sono state piastrate ogni 3-4 giorni in terreno RPMI1640 addizionato con Siero Bovino Fetale al 10% e antibiotici e mantenute in temperatura di 37°C con concentrazione di CO₂ al 5% e concentrazione di O₂ al 95% (8).

3.1.1 Metodica di piastrazione delle cellule Jurkat

Sono stati seguiti i seguenti passaggi secondo protocollo:

- centrifugare a 800 rpm per 10 minuti le cellule in sospensione con il terreno di coltura;
- prelevare il terreno di coltura e inserire una aliquota di terreno fresco, per riportare in soluzione il pellet di cellule formatosi durante la centrifugazione;
- effettuare la conta cellulare mediante camera di Burker;
- prelevare una aliquota di sospensione cellulare tale da piastare in ogni nuova fiasca una concentrazione pari a 15×10^6 di cellule/fiasca da 75ml/25ml terreno di coltura.

In ogni fiasca T75 vengono inizialmente piastrate 15×10^6 di cellule in quanto le colture Jurkat riescono a sopravvivere e a moltiplicarsi ad una densità cellulare pari a $5-6 \times 10^5$ /ml.

3.2 Separazione di T-linfociti da buffy-coat

La separazione di T-linfociti umani da buffy-coat consiste in una metodica che consta di diversi passaggi che permettono di ottenere colture cellulari di differenti tipologie, quali T-linfociti e monociti. Il buffy-coat consiste nel sangue privato della componente piastrinica e della maggior parte di quella plasmatica. Esso viene successivamente integrato con una soluzione di Sali di Hank's. L'aggiunta di questa soluzione salina va a ricostituire il volume iniziale del sangue prelevato dal paziente, che di solito si aggira intorno a 450 ml.

Con la separazione e successiva purificazione in colonna si ottengono delle colture cellulari di T-linfociti in condizioni di resting.

3.2.1 Metodica di separazione di PBLs da buffy-coat

Sono stati seguiti i seguenti passaggi secondo protocollo:

- ricostituire il buffy-coat con Sali di Hank's con una concentrazione 1:9, ovvero il 10% della soluzione totale sarà costituita da sangue e il 90% da soluzione salina;
- dividere la soluzione totale secondo una ratio 1:1 con Histopaque 1077. L'Histopaque è una soluzione che permette un gradiente di separazione che viene utilizzato per dividere le diverse componenti del sangue;
- centrifugare per 30 minuti a 1350 rpm;
- a fine centrifugazione, in soluzione sono presenti tre diversi strati, dal basso in alto: il pellet di globuli rossi rimanenti, il gradiente di separazione e al centro di questo un anello bianco di consistenza fluida contenente i leucociti polimorfonucleati (PBLs);
- estrarre l'anello di PBLs e unire due anelli provenienti da due differenti provettoni in un'unica provetta;
- lavare due volte per 10 minuti a 1150 rpm in sali di Hank's;
- incubare il pellet di PBLs per 10 minuti al buio con ACT (Ammonium Chloride Tris) al fine di lisare i globuli rossi;
- centrifugare per 10 minuti a 1150 rpm;
- lavare due volte per 10 minuti a 1150 rpm in sali di Hank's;
- eseguire la conta cellulare con Trypan bleu di tutti i campioni di PBLs, in modo da sapere quante cellule sono state ottenute.

3.2.2 Metodica di separazione di T-linfociti da PBLs mediante colonnine

Al fine di purificare i T-linfociti dalla soluzione di PBLs sono state utilizzate colonne per l'arricchimento di linfociti T (CD4+). Il principio utilizzato dalle colonne (R&D Technologies) è quello della immunoselezione: all'interno delle colonne sono presenti biglie di vetro rivestite da anticorpi specifici per linfociti B e monociti. L'eluato della colonna sarà pertanto una soluzione ad alta concentrazione di linfociti T.

Ogni colonna ha una capacità massima di 300×10^6 di cellule PBLs.

Sono stati seguiti i seguenti passaggi secondo protocollo:

- disinfettare esternamente la colonnina e togliere da questa il tappo inferiore, in modo tale che si svuoti dal tampone contenuto al suo interno;

- procedere con tre lavaggi della colonnina con 8 ml di washing buffer 1X: sia il tampone contenuto nella colonnina che il washing buffer utilizzato per i lavaggi devono essere raccolti all'interno di un contenitore per poi essere eliminati;
- dopo i lavaggi, mettere sotto l'apertura inferiore della colonnina una provetta FALCON da 15 ml e caricare sulla colonnina 2 ml di cellule sospese in washing buffer;
- una volta che i 2 ml di cellule sono scesi all'interno della colonnina, lasciando vuota la porzione che conteneva il tappo superiore, incubare per 10 minuti;
- successivamente, fare quattro lavaggi con 2 ml di washing buffer per volta, in modo da lavare totalmente la colonnina dai T-linfociti;
- portare a volume la falcon da 15 ml con washing buffer;
- centrifugare per 5 minuti a 780 rpm;
- dopo la centrifugazione, eliminare il surnatante e sospendere il pellet di T-linfociti in 10 ml di terreno fresco;
- eseguire conta cellulare con Trypan bleu;
- piastrare i T-linfociti in fase di resting con terreno fresco.

3.3 Attivazione linfocitaria con anti-CD3 e anti-CD28

Come detto in precedenza, i T-linfociti purificati da sangue di pazienti sani si trovano normalmente in condizioni di resting, ovvero sono inattivi. Questi per essere attivati *in vitro* hanno la necessità di entrare a contatto con due differenti sostanze mitogene: l'anti-CD3 e l'anti-CD28, che hanno il compito di produrre i primi due segnali per l'attivazione dei linfociti. I due attivatori vengono inseriti in soluzione di cellule con una concentrazione di 20 $\mu\text{l/ml}$, ovvero sono necessari 20 μl di ogni attivatore per ogni ml di soluzione cellulare.

3.4 Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide

Il termine elettroforesi descrive la migrazione di particelle cariche sotto l'influenza di un campo elettrico, infatti questa è la metodologia che viene utilizzata per la separazione di proteine in base al loro peso molecolare e per l'analisi qualitativa di miscele di queste ultime. L'apparecchiatura richiesta per l'elettroforesi è costituita fondamentalmente da due parti: un alimentatore e una cella elettroforetica. La cella elettroforetica che viene utilizzata per elettroforesi di proteine funziona con sistemi su gel verticali. Il gel per l'elettroforesi viene preparato tra due lastre di vetro, tenute separate da supporti in plastica o in vetro; le sue dimensioni sono solitamente 8.5 di larghezza, 5.0 di

altezza e 0.5-1.0 di spessore. Nella parte superiore del gel, prima che questo polimerizzi, attraverso dei pettini, vengono formati dei pozzetti, all'interno dei quali vengono caricati i campioni. Successivamente, una volta che i gel hanno polimerizzato, vengono posti all'interno della cella elettroforetica, totalmente ricoperti da una soluzione tampone (9).

3.4.1 Metodica per l'elettroforesi di campioni

Sono stati seguiti i seguenti passaggi secondo protocollo:

- pulire accuratamente e allineare le due lastre di vetro all'interno del supporto per la preparazione del gel;
- tra i due vetrini inserire sulla sinistra in basso un segno distintivo per evidenziare il lato su cui verrà inserito il marker;
- preparare il Running Gel. Il Running Gel è il gel di separazione che viene inserito per primo tra i due vetrini; questo è costituito da H₂O, Acrylamide mix al 30%, Tris 1.5 M (pH 8.8), SDS al 10%, APS al 10% e TEMED. APS e TEMED devono essere inserite per ultime nella preparazione e in contemporanea e fungono da catalizzatori per far polimerizzare il gel. Subito dopo l'aggiunta di queste due sostanze, il running deve essere rapidamente caricato tra i due vetrini;
- dopo l'inserimento del running, prima che questo sia polimerizzato, aggiungere pochi microlitri di isopropanolo al fine di allineare il gel ed allontanare eventuali bolle;
- una volta che il gel ha polimerizzato, eliminare l'isopropanolo;
- preparare lo Stacking Gel. Questo presenta le stesse componenti del running, ad eccezione del Tris, in quanto nello stacking viene utilizzato Tris 1.0 M (pH 6.8). Anche lo stacking deve essere caricato immediatamente dopo l'aggiunta di APS e TEMED;
- inserire nello stacking non ancora polimerizzato il pettine per formare i pozzetti;
- dopo la polimerizzazione del gel, inserire quest'ultimo nella camera elettroforetica;
- riempire la camera con il tampone di corsa;
- togliere il pettine e caricare i campioni: nel primo pozzetto del lato sinistro deve essere sempre caricato il marker;
- azionare l'alimentatore per 30 minuti a 50 volt e, successivamente, fino al raggiungimento del fronte a 120 volt.

3.5 Western Blot

Il Western Blot è una metodica che segue l'utilizzo dell'elettroforesi in quanto consiste nel trasferimento delle proteine, che si sono separate durante la corsa

elettroforetica, dal gel di poliacrilammide a una membrana di nitrocellulosa o di polivinilidenefluoruro (PVDF). Questo consente di analizzare più approfonditamente tali proteine. Il trasferimento avviene grazie al passaggio in direzione perpendicolare al gel di corrente, che provoca la migrazione elettroforetica delle proteine verso la membrana.

Durante il tirocinio è stata utilizzato uno strumento per il Western Blot chiamato "Turbo Trans-Blot" (Biorad, USA), che permette il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana in 7 minuti. Questa metodica prevede sia l'utilizzo di kit di materiali già pronti per l'uso oppure la preparazione del tradizionale sandwich di carta 3M e membrana imbevute in Trasfer Buffer e Metanolo. Dopo che è avvenuto il trasferimento, la membrana viene messa "in blocking" per un'ora in una soluzione di PBS Tween 0,1%. Questo passaggio permette di saturare i siti di legame presenti nella membrana.

Successivamente la membrana può essere ulteriormente analizzata dal punto di vista qualitativo. Questa può quindi essere incubata con anticorpi primari e successivi anticorpi secondari. Gli anticorpi secondari servono per rilevare gli anticorpi primari specifici per l'identificazione di una determinata proteina (9).

3.5.1 Metodica del Western Blot

Sono stati seguiti i seguenti passaggi secondo protocollo:

- dopo la corsa elettroforetica, lavare accuratamente il gel in acqua milliQ;
- posizionare il gel tra le due componenti del kit, in maniera tale che da un lato sia direttamente a contatto con la spugna e dall'altro con la membrana;
- avviare lo strumento;
- dopo il trasferimento delle proteine, mettere la membrana in "blocking" per un'ora con PBS Tween 0.1%;
- procedere con l'incubazione dell'anticorpo primario: preparare una soluzione di anticorpo primario anti-fosfotirosina (Santa Cruz Biotechnology, CA) ad una concentrazione di 1:2000 e di PBS Tween 0.1%;
- lasciare la membrana in incubazione con l'anticorpo primario per una notte a 4°C;
- effettuare cinque lavaggi con PBS Tween 0,1% della membrana di 10 minuti;
- incubare per un'ora l'anticorpo secondario: preparare una soluzione di anticorpi secondari ad una concentrazione di 1:25000 in PBS Tween 0,1% coniugati a coloranti fluorescenti eccitabili nell'infrarosso a 800 nm (IRDye 800CW, Li-COR-USA);
- successivamente procedere con altri cinque lavaggi con PBS Tween 0.1%.

La membrana è stata visualizzata utilizzando uno strumento a 700/800 nm laser scanner (Odyssey, Li-COR-USA).

4. RISULTATI E CONCLUSIONI

Il Western Blot delle proteine totali di T-linfociti umani purificati sviluppato con anti-fosfotirosina (Santa Cruz, Biotechnology CA) evidenzia in figura **1A** un notevole aumento della risposta fosforilativa dei campioni sottoposti a condizioni di microgravità. Rispetto al controllo si mostra infatti un incremento del segnale nei primi 30 minuti di esposizione a microgravità per poi mantenersi costante fino alle 2 ore, anche se con un lieve decremento.

La stessa procedura è stata effettuata nella linea cellulare Jurkat (Leucemia Linfoide Acuta). In questo caso, avendo maggiore disponibilità di campione, le cellule sono state sottoposte a microgravità fino alle 3 ore. Come mostrato in Figura **1B** si può riscontrare un forte aumento delle fosforilazione in tirosina già dai primi 15 minuti. Tale segnale rimane costante sino all'ora per poi decrescere gradualmente alle 3 ore.

I fenomeni descritti potrebbero essere dovuti ad un meccanismo cellulare atto a difendere la cellula da condizioni di stress quali la microgravità.

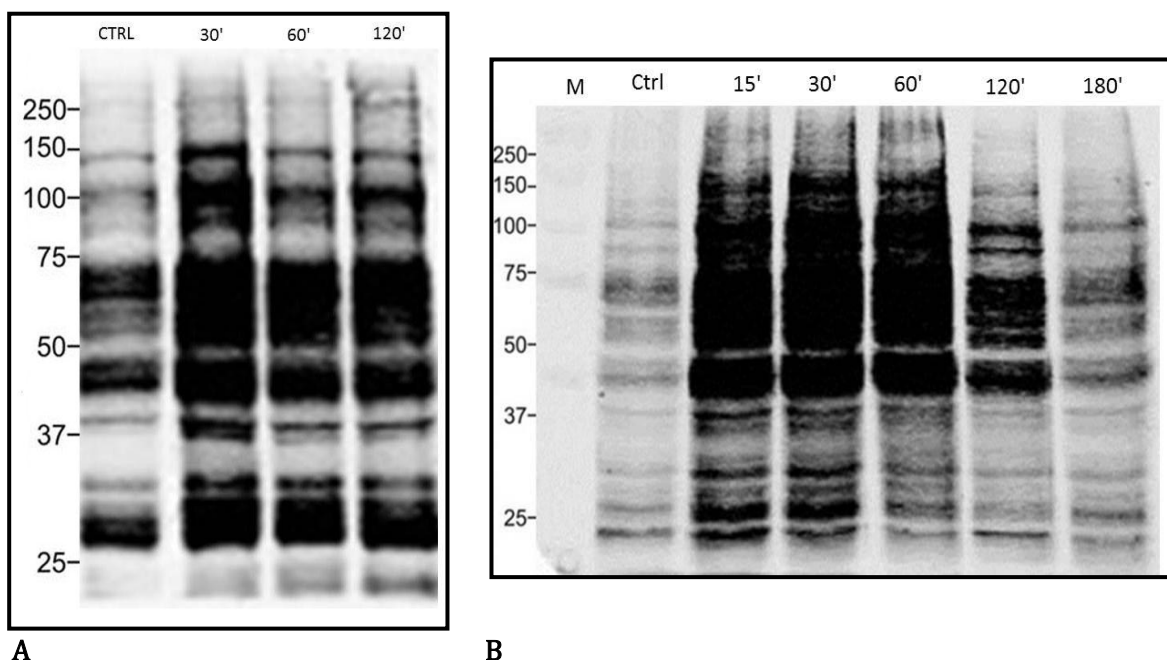


Figura 1

Western Blots delle proteine totali di T-linfociti umani purificati (A) e cellule Jurkat (B) sottoposti a condizioni di microgravità ed incubati con anti-pTYR (1:2000).

5. BIBLIOGRAFIA

1. Hughes-Fulford, M., (2011), To infinity ... and beyond! Human spaceflight and life science. *FASEB J.* (9):2858-64.
2. Cogoli, A., Moore, D. (1996), Gravitational and Space Biology at the Cellular Level. In: *Biological and Medical Research in Space*, pp. 1-105, Springer.
3. Meloni, M.A. et al., (2011), Space flight affects motility and cytoskeletal structures in human monocyte cell line J-111., *68(2):125-37.*
4. Walther, I., et al., (1998) Simulated microgravity inhibits the genetic expression of interleukin-2 and its receptor in mitogen-activated T lymphocytes. *FEBS Lett* 436, 115-8.
5. Cogoli, A., et al., (1984), Cell sensitivity to gravity. *Science* 225(4658):228-30.
6. Chang T.T. et al (2012). The Rel/NFkB Pathway and Transcription of Immediate Early Genes in T Cell Activation are Inhibited by Microgravity. *J Leukoc Biol.*
7. Boonyaratanakornkit, J.B., et al., (2005) Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *Faseb J* 19, 2020-2.
8. Defilippi, Tarone (1993). *Colture cellulari, Tecniche di base.* Proprietà letteraria riservata.
9. Wilson, K., Walker, J. (2006). *Biochimica e biologia molecolare, principi e tecniche.* Raffaello Cortina Editore.