

Analisi della Partizione Asimmetrica e del Ciclo Cellulare in Linee Cellulari di Jurkat

Elisabetta Agnello

matricola: 2015276

Corso di Laboratorio di Biosistemi II

Anno Accademico 2024/2025

Sommario

L'eterogeneità non genetica, guidata da processi stocastici come la divisione cellulare e da meccanismi di controllo della dimensione, è un fattore chiave nell'evoluzione del cancro e nello sviluppo di resistenza ai farmaci. Questo studio utilizza un approccio integrato di citometria a flusso quantitativa e modellizzazione computazionale per analizzare il partizionamento citoplasmatico, la progressione del ciclo cellulare e l'omeostasi dimensionale nella linea cellulare di linfoma T umano Jurkat. La proliferazione cellulare è stata tracciata mediante diluizione del colorante per citoplasma CellTrace Yellow, con l'identificazione delle generazioni cellulari tramite un modello di Gaussian Mixture (GMM). Il grado di simmetria della divisione è stato quantificato applicando un modello di partizionamento binomiale asimmetrico, mentre il ciclo cellulare è stato analizzato tramite marcatura del DNA con DAPI e il modello di Watson-Pragmatic. La dimensione cellulare è stata approssimata tramite il segnale di Forward Scatter (FSC).

L'analisi ha rivelato un partizionamento del citoplasma totale stocasticamente simmetrico (parametro di asimmetria $p \approx 0.5$). L'indagine sulla dinamica dimensionale, condotta attraverso un'analisi della taglia aggiunta ($\Delta = S_{G2} - S_{G1}$), ha dimostrato che le cellule Jurkat seguono una strategia di controllo di tipo Adder-like. Questo è evidenziato dalla pendenza della regressione tra la taglia aggiunta e la taglia alla nascita, risultata costantemente prossima a zero ($m \approx 0.2$) attraverso multiple generazioni e replicati sperimentali. Tale risultato indica che le cellule tendono ad accrescere la propria massa di una quantità relativamente costante a ogni ciclo, un meccanismo attivo che compensa e corregge la variabilità dimensionale.

Lo studio fornisce un quadro quantitativo della biologia delle cellule Jurkat, dimostrando che la loro eterogeneità fenotipica deriva dalla coesistenza di processi di partizionamento passivi e simmetrici con robusti meccanismi attivi di controllo dimensionale. La precisione di questo controllo, tuttavia, è risultata fortemente influenzata dalle condizioni di coltura, come dimostra la significativa variabilità osservata tra le repliche biologiche.

1. Introduzione

L'eterogeneità è una caratteristica fondamentale e pervasiva delle popolazioni di cellule tumorali e rappresenta una grande sfida nel trattamento del cancro. Oltre alla nota eterogeneità genetica, che deriva dall'accumulo di mutazioni, l'eterogeneità non genetica (o fenotipica) sta emergendo come un fattore cruciale che guida l'evoluzione del tumore, la plasticità cellulare e lo sviluppo di resistenza ai farmaci [1, 2]. Questa variabilità intrinseca fa sì che, all'interno di una popolazione omogenea, le singole cellule possano esibire un'ampia gamma di comportamenti. Tale diversità permette a specifiche sottopopolazioni di sopravvivere a stress ambientali, come l'esposizione a terapie citotossiche, causando la sopravvivenza di parte delle cellule tumorali e la successiva ricaduta clinica [3].

Tra le varie cause che contribuiscono a questa eterogeneità, la dimensione cellulare è di particolare interesse. Studi hanno dimostrato che la dimensione influenza processi biologici chiave come il metabolismo, la trascrizione, la traduzione e l'organizzazione del citoscheletro [4–6]. Di conseguenza, la perdita dell'omeostasi dimensionale - definita come la capacità di una popolazione di mantenere una distribuzione stabile delle dimensioni - è frequentemente osservata in numerose patologie, incluso il cancro [19].

Per mantenere l'omeostasi, le cellule devono coordinare strettamente la loro crescita con la progressione del ciclo cellulare. Il ciclo cellulare è convenzionalmente suddiviso in due stadi principali: l'interfase, periodo di crescita e preparazione, e la fase M (mitosi), in cui avviene la divisione vera e propria. L'interfase a sua volta comprende tre fasi distinte:

- La fase G1 è il primo intervallo di crescita. Durante questa fase, la cellula aumenta di dimensioni, sintetizza RNA e proteine e si prepara per la replicazione del DNA.
- La fase S è la fase in cui avviene la replicazione del DNA. La cellula duplica il suo intero genoma.
- La fase G2 è il secondo periodo di crescita, che segue la replicazione del DNA. La cellula continua ad aumentare di volume e sintetizza le proteine necessarie per la mitosi.

La natura della coordinazione tra queste fasi e la crescita cellulare dipende criticamente dalla modalità di crescita. Una crescita esponenziale, dove il tasso di aumento della massa è proporzionale alla massa stessa (le cellule più grandi crescono più velocemente), è intrinsecamente instabile e tende ad amplificare le differenze di dimensione. Per contrastare questa tendenza, sono necessari meccanismi di controllo attivi. Al contrario, una crescita lineare, dove le cellule crescono di una quantità fissa per unità di tempo, è più stabile. Il modo in cui le cellule gestiscono queste diverse dinamiche di crescita è al centro dei tre modelli fenomenologici proposti per descrivere il controllo dimensionale [9, 20]:

- Il modello *Timer* prevede che la divisione avvenga dopo un tempo fisso. Questo modello è compatibile con l'omeostasi solo in caso di crescita lineare.
- Il modello *Sizer* postula che le cellule debbano raggiungere una dimensione critica prima di dividersi. Questo implica l'esistenza di meccanismi di *size sensing* che possono attivamente correggere le deviazioni, rendendolo un candidato ideale per controllare una crescita di tipo esponenziale.
- Il modello *Adder* suggerisce che le cellule aggiungano un incremento di volume costante ad ogni ciclo, un meccanismo robusto che fa convergere la popolazione verso una dimensione media stabile.

È ormai chiaro che questi modelli non sono mutuamente esclusivi. Evidenze recenti suggeriscono che le cellule di mammifero possono adottare strategie ibride, comportandosi come *sizer* quando sono piccole (per garantire il raggiungimento di una dimensione minima vitale) e come *adder* a dimensioni maggiori [27].

Alla base dell'eterogeneità cellulare e delle fluttuazioni di dimensione vi è la natura intrinsecamente stocastica dei processi biologici. La divisione cellulare è un esempio paradigmatico. Durante la mitosi,

il contenuto della cellula madre – organelli, proteine, RNA – viene partizionato tra le due cellule figlie. Questo partizionamento non è sempre perfettamente equo. Si parla di divisione simmetrica quando le figlie sono fenotipicamente identiche, e asimmetrica quando differiscono per dimensione o contenuto molecolare. L’asimmetria nel partizionamento è una fonte primaria di variabilità e gioca un ruolo cruciale in molti contesti biologici. Ad esempio, la ripartizione asimmetrica dei mitocondri nelle cellule staminali epiteliali permette di segregare i mitocondri danneggiati in una sola cellula figlia, proteggendo la progenie dall’invecchiamento cellulare [10–12]. Nel contesto del cancro, la divisione asimmetrica è stata associata a meccanismi di resistenza ai farmaci, evasione dalla senescenza e aumento della plasticità [13].

Per quantificare rigorosamente il processo di partizionamento cellulare, il modello binomiale asimmetrico descrive la divisione di m_i componenti tra due figlie con probabilità p e $q = 1 - p$. Un partizionamento perfettamente simmetrico corrisponde a $p = 0.5$, mentre $p \neq 0.5$ indica una divisione asimmetrica (*biased*), che può essere misurata sperimentalmente [7].

La verifica sperimentale dei modelli di crescita e divisione, tuttavia, comporta notevoli difficoltà tecniche. Metodi tradizionali come la microscopia time-lapse, pur essendo molto informativi, sono spesso laboriosi e a basso rendimento. Per superare questi limiti metodologici, in questo studio sono state applicate le metodologie quantitative della citometria a flusso e l’analisi computazionale per investigare la dinamica di proliferazione della linea cellulare di linfoma T umano, Jurkat.

L’analisi eseguita si è preposta l’obiettivo di:

- Quantificare il grado di asimmetria nel partizionamento del citoplasma, utilizzando il marcatore fluorescente CellTrace Yellow e il modello binomiale asimmetrico.
- Validare la compatibilità tra le misure su cellule vive e quelle fissate per l’analisi del ciclo cellulare con il marcatore del DNA DAPI.
- Analizzare la dinamica della dimensione cellulare e del ciclo cellulare, usando il Forward Scatter (FSC) come proxy della taglia.
- Integrare questi dati per costruire un quadro completo della coordinazione tra crescita, divisione e partizionamento, discutendo i risultati nel contesto dei modelli teorici di riferimento.

2. Metodi Sperimentali

2.1. Coltura Cellulare e Protocolli di Laboratorio

Linea Cellulare e Condizioni di Coltura

Per questo studio sono state utilizzate cellule della linea cellulare di linfoma T umano Jurkat, un modello ampiamente utilizzato e validato per studi sulla proliferazione [14]. Questa linea cellulare è particolarmente adatta per esperimenti di marcatura con coloranti, in quanto mostra un’elevata efficienza di marcatura e una bassa risposta tossica ai fluorofori.

Inizialmente era previsto l’utilizzo anche della linea monocitica THP-1, ma queste cellule hanno mostrato una scarsa vitalità e salute della popolazione dopo lo scongelamento e non sono state quindi incluse nell’analisi finale.

Protocollo di Scongellamento

Le cellule Jurkat, crioconservate a -80°C in un terreno contenente un crioprotettore come il dimetilsolfossido (DMSO), sono state scongelate seguendo un protocollo standard per massimizzare la vitalità [15]. La criovial è stata prelevata dal congelatore e immersa rapidamente in un bagnetto termostato a 37°C fino a quando il ghiaccio non si è sciolto quasi completamente. Questo scongelamento rapido è cruciale per minimizzare la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari e la tossicità del DMSO a

temperature più elevate. Sotto cappa a flusso laminare sterile, il contenuto della vial (circa 1 ml) è stato trasferito in una provetta conica sterile. Per diluire gradualmente il DMSO e ridurre lo shock osmotico, sono stati aggiunti lentamente 9 ml di terreno di coltura completo freddo (prelevato dal frigorifero) alla sospensione cellulare nella provetta. La sospensione è stata quindi centrifugata a bassa velocità (circa 1400 rpm per 7 minuti) per ottenere un pellet cellulare. Il surnatante, contenente il DMSO, è stato accuratamente aspirato. Infine, il pellet è stato risospeso delicatamente in 20 ml di terreno di coltura completo preriscaldato a 37°C e trasferito in una fiasca da coltura T-75.

Mantenimento in Coltura

Le cellule sono state mantenute in terreno di coltura completo RPMI-1640, supplementato con 10% di Siero Fetale Bovino (FBS), 1% di Penicillina/Streptomicina e 1% di L-Glutammina. Per garantire la massima coerenza sperimentale, il terreno di coltura utilizzato per l'intera settimana è stato preparato in un unico lotto.

Le cellule sono state mantenute in un incubatore a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO_2 . Il tappo della fiasca è stato mantenuto leggermente svitato per consentire un adeguato scambio gassoso, essenziale per il mantenimento del corretto pH del terreno tamponato con bicarbonato.

Protocollo di Raccolta

Al momento della raccolta per l'esperimento, le cellule provenienti da 8 fiasche di coltura sono state risospese. Per ottenere una sospensione cellulare omogenea e prevenire la formazione di aggregati che avrebbero potuto alterare i risultati, il contenuto di ciascuna fiasca è stato accuratamente risospeso tramite pipettaggio prima della raccolta. Al fine di massimizzare il recupero cellulare e non perdere le cellule adese alle pareti delle fiasche, ogni fiasca è stata lavata con 6 mL di una soluzione di PBS privo di sali. Il liquido di lavaggio è stato poi unito alla sospensione cellulare principale, e le fiasche originali sono state scartate. La sospensione cellulare totale è stata quindi sottoposta a una centrifugazione di 7 minuti per concentrare le cellule in un pellet.

Una volta ottenuto il pellet, il surnatante è stato rimosso e il pellet è stato delicatamente risospeso tramite leggeri colpetti sul fondo della provetta. Per assicurare il completo recupero di tutte le cellule, è stata eseguita una procedura di doppio lavaggio "da tubo a tubo", consolidando progressivamente l'intera popolazione cellulare in un'unica provetta finale. In quest'ultima, il volume è stato portato a 40 mL con PBS e si è proceduto a una centrifugazione finale. Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet cellulare definitivo è stato risospeso in un volume di 4 mL di PBS, ottenendo così una sospensione concentrata e pronta per il conteggio.

Conteggio

La determinazione precisa della concentrazione e della vitalità cellulare è stata un passaggio critico. Il conteggio è stato eseguito inizialmente utilizzando una camera di conta e il metodo di esclusione con Trypan Blue per distinguere le cellule vive (che non assorbono il colorante) da quelle morte. Per questa analisi, è stata preparata una diluizione specifica mescolando 10 μL di sospensione cellulare con 90 μL di soluzione di Trypan Blue. Questa procedura ha permesso di calcolare una concentrazione cellulare iniziale di circa 20×10^6 cellule/mL, per un totale di circa 80×10^6 cellule disponibili per l'esperimento.

Per i conteggi successivi, eseguiti giornalmente durante la cinetica di proliferazione, è stato invece utilizzato un contacellule automatizzato *Countess* per monitorare la crescita della popolazione.

2.2. Citofluorimetria a Flusso: Principi e Strumentazione

Per investigare la dinamica di proliferazione della popolazione cellulare è stato implementato un processo sperimentale basato sulla citometria a flusso, una tecnologia che permette di seguire l'evoluzione di migliaia di singole cellule nel tempo.

Il protocollo seguito prevede la marcatura di una popolazione iniziale di cellule Jurkat con un marker fluorescente, l'isolamento di una popolazione omogenea tramite un processo di *sorting* e il successivo monitoraggio della proliferazione della sub-popolazione per diversi giorni, analizzando a intervalli regolari l'intensità del colorante e le variazioni morfologiche.

Principio della Fluorescenza

Il tracciamento delle popolazioni cellulari in questo studio si basa interamente sul principio della fluorescenza. La fluorescenza è un processo fisico-chimico in cui una molecola, detta fluoroforo, assorbe l'energia di un fotone a una specifica lunghezza d'onda di eccitazione. Questa energia promuove un elettrone della molecola a uno stato eccitato a più alta energia. Dopo un brevissimo lasso di tempo (dell'ordine dei nanosecondi), durante il quale una piccola parte dell'energia viene dissipata come calore attraverso rilassamento vibrazionale, l'elettrone ritorna al suo stato fondamentale emettendo un nuovo fotone. A causa della perdita di energia, il fotone emesso ha un'energia inferiore e quindi una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quello assorbito. Questa differenza, nota come *Stokes Shift*, è un concetto fondamentale in citometria a flusso, poiché permette di separare spettralmente la luce di emissione da quella di eccitazione tramite un sistema di specchi dicroici e filtri ottici, garantendo una rilevazione specifica e altamente sensibile del segnale generato da ciascun fluoroforo.

Strumentazione della Citometria a Flusso

La citofluorimetria a flusso è una potente tecnologia che consente l'analisi quantitativa e multiparametrica di singole cellule in sospensione. Il cuore dello strumento è il sistema fluidico, che utilizza un liquido di guaina (sheath fluid) per incanalare le cellule e costringerle a passare, una alla volta, attraverso un punto di interrogazione dove sono focalizzati uno o più raggi laser (messa a fuoco idrodinamica) [17, 22]. L'interazione di ciascuna cellula con il laser genera segnali ottici di due tipi: luce diffusa (scattering) e fluorescenza. La luce diffusa viene misurata da due rivelatori posizionati strategicamente. Il primo, il Forward Scatter (FSC), è posto lungo l'asse del raggio laser e misura la luce diffusa in avanti. L'intensità del segnale FSC è principalmente dovuta alla diffrazione della luce attorno alla cellula ed è correlata alla sua dimensione, in particolare all'area della sua sezione trasversale [16, 24]. È importante notare che la relazione tra FSC e dimensione cellulare non è lineare. Per particelle di dimensioni paragonabili o maggiori della lunghezza d'onda del laser, come le cellule di mammifero, il fenomeno è descritto dalla teoria di Mie [16, 24]. Questa teoria prevede una complessa dipendenza dall'angolo di raccolta, dall'indice di rifrazione della cellula e del mezzo, e dalla dimensione della particella. In questo studio, il FSC è stato utilizzato come proxy del diametro cellulare, tenendo conto della sua natura non lineare.

Il secondo rivelatore, posto a 90° rispetto all'asse del laser, misura il Side Scatter (SSC), ovvero la luce diffusa lateralmente. L'intensità del segnale SSC è generata dalla rifrazione e riflessione della luce da parte delle strutture interne della cellula, come il nucleo, i granuli e altri organelli. L'SSC è quindi un indicatore della complessità interna o "granularità" della cellula [16, 22].

La fluorescenza emessa dalle cellule marcate viene raccolta, separata in base alle diverse lunghezze d'onda tramite specchi dicroici e filtri, e convogliata a specifici rivelatori, i tubi fotomoltiplicatori (PMT), che convertono il segnale luminoso in un impulso elettrico proporzionale [17, 22].

In questo studio sono stati utilizzati due tipi di citometri: l'analizzatore BD LSRFortessa che si limita a misurare queste proprietà per un gran numero di cellule, e il separatore cellulare BD FACSAria, che ha la capacità aggiuntiva di deviare e isolare fisicamente sottopopolazioni di cellule in base alle loro caratteristiche ottiche.

2.3. Marcatura della Popolazione Cellulare

Controllo di Autofluorescenza

Prima di procedere con la marcatura, è stato preparato un campione di controllo essenziale: il campione di autofluorescenza. L'autofluorescenza è la debole fluorescenza intrinseca emessa dalle cellule non

marcate. La misurazione di questo segnale di fondo è indispensabile per la corretta configurazione del citofluorimetro, permettendo di distinguere il segnale specifico del colorante dal rumore di fondo cellulare. A tale scopo, un'aliquota di circa 2×10^6 cellule non marcate è stata messa da parte.

Staining Cellulare

Per analizzare simultaneamente la segregazione di diversi compartimenti cellulari, è stato utilizzato un approccio di marcatura multi-colore in co-incubazione. La procedura di staining ha coinvolto un totale di circa 80×10^6 cellule, a cui è stata aggiunta una miscela di coloranti contenente sia CellTrace Yellow per marcare il citoplasma, sia MitoFarRed per marcare i mitocondri. Il CellTrace Yellow attraversa passivamente la membrana cellulare e lega covalentemente le proteine citoplasmatiche. Ad ogni divisione cellulare, il contenuto citoplasmatico, e quindi la fluorescenza del colorante CT Yellow, viene approssimativamente dimezzato tra le due cellule figlie. Questa proprietà permette di tracciare la proliferazione e identificare le diverse generazioni. Il MitoFarRed si accumula invece nei mitocondri metabolicamente attivi.

Il CellTrace Yellow è stato utilizzato ad una concentrazione finale di 1:1000; mentre per il MitoFarRed è stata dapprima effettuata una diluizione 1:10, ed in seguito una diluizione 1:1000 per ottenere una proporzione complessiva di 1:10000. Le cellule sono state quindi incubate con i coloranti per 20 minuti in un bagnetto termostatico a 37 °C. Per garantire una marcatura uniforme, la sospensione è stata agitata delicatamente ogni 5 minuti. Al termine dell'incubazione, la reazione è stata bloccata aggiungendo 10 mL di terreno di coltura completo RPMI, seguita da un'attesa di 5 minuti e da un lavaggio finale in PBS per rimuovere l'eccesso di colorante non legato.

2.4. Isolamento della Generazione 0 e Monitoraggio della Proliferazione

Sorting Cellulare tramite FACS

Dopo lo staining, è stato fondamentale isolare una popolazione di partenza (Generazione 0) il più omogenea possibile. Questo passaggio è cruciale (come evidenziato in [7]) perché una distribuzione di fluorescenza iniziale stretta (idealmente tendente ad una delta di Dirac, realisticamente costituita da una Gaussiana con varianza molto piccola) massimizza la capacità di risolvere e distinguere i picchi delle generazioni successive, prevenendo che essi si fondano tra loro. Inoltre, ciò garantisce una popolazione di partenza uniforme, poiché la selezione di un intervallo ristretto di fluorescenza indirettamente raggruppa cellule con caratteristiche morfologiche e cicli cellulari più compatibili.

A tale scopo, la sospensione cellulare è stata prima filtrata per eliminare aggregati, detriti e filamenti. Si tratta di un passaggio cruciale per prevenire ostruzioni del capillare di flusso del citofluorimetro. Le cellule sono state quindi risospese in una provetta cilindrica di polipropilene, utilizzando una soluzione di PBS, EDTA¹ e 2% di siero, al posto del terreno di coltura completo. Questa soluzione previene lo stress osmotico che le cellule subirebbero a contatto con il fluido del sorter (tipicamente a base di PBS), mentre la presenza del siero in bassa concentrazione fornisce un minimo di nutrienti senza introdurre troppe proteine. La sospensione è stata adeguatamente diluita; dato l'elevato numero di cellule, una concentrazione troppo elevata avrebbe portato ad un numero eccessivo di eventi al secondo, compromettendo l'accuratezza della separazione e la purezza della popolazione raccolta.

Il sorting è avvenuto (come illustrato in Figura 1) tramite un citofluorimetro BD FACSAria che operava a -4 °C; il raffreddamento induce uno stato di "ibernazione" metabolica che riduce significativamente lo stress cellulare e aiuta a preservare la vitalità e la funzionalità delle cellule durante il processo.

¹L'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) è un acido carbossilico usato nei laboratori per preparare le cellule al sorting. Agisce legando il calcio, riducendo così l'adesione tra le cellule e la formazione di aggregati, il che permette di ottenere una sospensione di cellule singole, perfetta per strumenti come i citofluorimetri.

Utilizzando il campione di autofluorescenza per definire il segnale di fondo, è stato creato un gate di selezione molto stretto per isolare fisicamente solo le cellule che mostravano la massima e più omogenea intensità di fluorescenza colorante. Per stabilire un riferimento di partenza, una volta terminato il processo di sorting, è stata immediatamente eseguita una prima analisi citometrica su un campione, definendo così il Time Zero (T0) dell'osservazione. La restante popolazione purificata della Generazione 0 è stata centrifugata e rimessa in coltura.

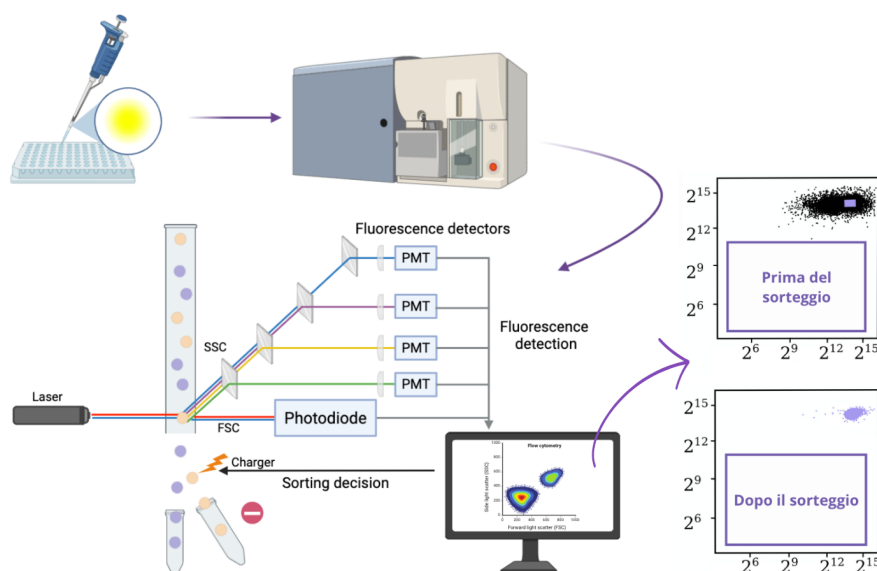


Figura 1: Rappresentazione schematica del funzionamento del Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)². Una provetta con sospensione di cellule, precedentemente marcate con CellTrace Yellow, viene inserita in un citofluorimetro FACS. I segnali generati di scattering (FSC/SSC) e di fluorescenza vengono raccolti e visualizzati su un grafico analogo a quello indicato come "Prima del sorteggio", dove un gate di selezione viene definito attorno alla popolazione con la fluorescenza più omogenea. Il sistema applica quindi una carica elettrica alle goccioline contenenti le cellule selezionate, deviandole tramite un campo elettrico per la raccolta. Il grafico "Dopo il sorteggio" mostra l'analisi della popolazione recuperata, confermando l'isolamento di un campione puro e omogeneo, pronto per la cinetica di proliferazione.

Per monitorare la cinetica di proliferazione, sono stati prelevati campioni per l'analisi citometrica a intervalli regolari per tre giorni. In particolare, i prelievi sono stati effettuati tre volte al giorno (mattina, metà giornata e pomeriggio) per ottenere una risoluzione temporale dettagliata dell'evoluzione della popolazione. Ad ogni prelievo, un'aliquota di cellule è stata analizzata con un citofluorimetro BD LSRFortessa per misurare i parametri FSC, SSC e la fluorescenza del colorante.

2.5. Analisi del Ciclo Cellulare tramite Marcatura DAPI

Parallelamente al monitoraggio della proliferazione, a ogni time point è stata analizzata la distribuzione del ciclo cellulare per quantificare la frazione di cellule in ciascuna fase. Il metodo si basa sulla marcatura del DNA con un colorante fluorescente e sulla successiva misurazione della sua intensità tramite citometria a flusso.

Fissazione dei Campioni

Per ogni punto di analisi, un'aliquota di circa 10^6 cellule è stata prelevata dalla coltura. Le cellule sono state preparate tramite una centrifugazione a 500 giri al minuto per 5 minuti a 4° e successivamente lavate due volte con 5 mL di PBS freddo per rimuovere residui del terreno di coltura.

²Immagine creata su <https://BioRender.com>

Il pellet cellulare è stato quindi accuratamente risospeso in 500 μL di PBS, assicurandosi di ottenere una sospensione di cellule singole.

La fase cruciale della fissazione è stata eseguita aggiungendo la sospensione cellulare goccia a goccia in una provetta Falcon contenente 4.5 mL di etanolo al 70% a 4 °C, mantenendo una leggera agitazione (vortex). Questo processo, oltre ad arrestare istantaneamente il ciclo cellulare, disidrata le cellule e permeabilizza le membrane citoplasmatica e nucleare. Questo passaggio è essenziale per rendere il DNA nucleare accessibile al colorante. I campioni sono stati quindi mantenuti a 4 °C per diversi giorni e successivamente analizzati.

Marcatura con DAPI e Principio di Analisi

La mattina del giorno finale della presa dati, le cellule fissate sono state recuperate tramite centrifugazione a 1000 giri al minuto per 5 minuti per rimuovere l'etanolo. Il pellet è stato risospeso in 5 mL di PBS e lasciato reidrattare per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule sono state incubate con una soluzione di marcatura preparata aggiungendo 10 μL di DAPI a 10 mL di PBS contenente lo 0.1% di Triton X-100. L'incubazione è avvenuta per 30 minuti a temperatura ambiente, al riparo dalla luce.

Il DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) è un fluorocromo che si lega stechiometricamente al solco minore del DNA, con una preferenza per le regioni ricche di adenina-timina. Poiché questo legame è proporzionale alla quantità di DNA, l'intensità della fluorescenza emessa da ogni cellula permette di distinguere le principali fasi del ciclo (come si può osservare nell'esempio riportato in Figura 2):

- Fase G1: Le cellule possiedono un contenuto di DNA diploide ($2n$) e formano il primo picco a bassa intensità di fluorescenza.
- Fase S: Le cellule sono in fase di sintesi del DNA, presentano un contenuto di DNA intermedio tra $2n$ e $4n$, e si distribuiscono tra i due picchi principali.
- Fase G2: Le cellule hanno duplicato il loro genoma, possiedono un contenuto di DNA tetraploide ($4n$) e costituiscono il secondo picco, a un'intensità di fluorescenza circa doppia rispetto a G1.

Il Triton X-100, un detergente non ionico, è stato aggiunto alla soluzione di marcatura per garantire una completa permeabilizzazione delle membrane e un accesso ottimale del DAPI al nucleo.

Tutti i campioni precedentemente fissati per l'analisi del ciclo cellulare, dopo esser stati marcati con DAPI, sono stati analizzati in un'unica sessione al citofluorimetro a flusso.

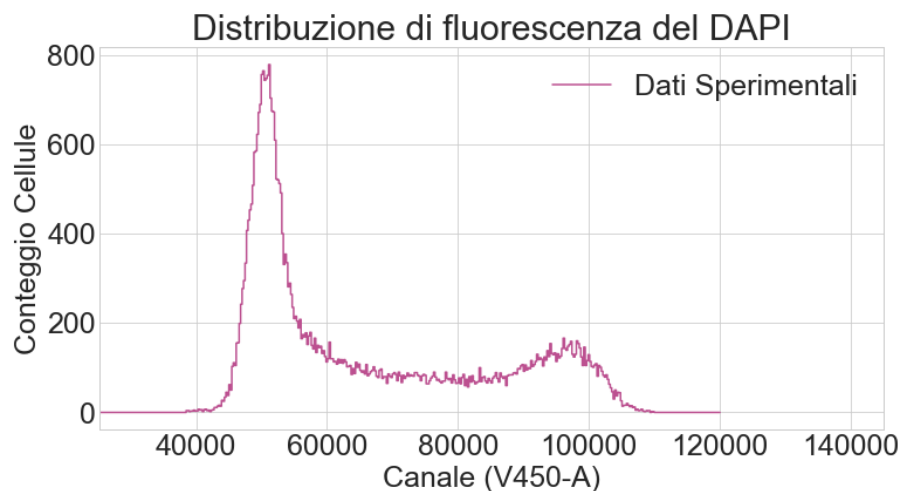


Figura 2: Esempio di distribuzione di intensità di fluorescenza del DAPI. Il primo picco (circa 50.000) corrisponde alla popolazione di cellule in fase G1. Il secondo picco a intensità doppia (circa 100.000) rappresenta le cellule in fase G2. Le cellule con valori intermedi si trovano in fase S.

L'intero protocollo sperimentale, dalla messa in coltura alla cinetica di proliferazione e analisi del ciclo, è stato eseguito in duplicato. La procedura è stata ripetuta per due settimane consecutive su due popolazioni cellulari distinte, ma derivanti dallo stesso stock iniziale. È stata posta la massima attenzione a mantenere le condizioni sperimentali (terreni, concentrazioni di coloranti, tempi di incubazione) il più possibile invariate tra le due repliche biologiche, al fine di garantire la riproducibilità e la robustezza dei risultati ottenuti.

3. Analisi Computazionale dei Dati

L'analisi dei dati di citofluorimetria è stata eseguita tramite una pipeline di codici personalizzati scritti in `Python`, utilizzando librerie standard per la manipolazione dei dati e la realizzazione di fit numerici.

Processo di Gating

Per poter estrarre informazioni quantitative, i dati grezzi contenuti nei file `.fcs` generati dal citofluorimetro sono stati sottoposti a un pre-processamento volto a isolare la popolazione di cellule di interesse. Per ogni campione, è stata applicata una strategia di gating per garantire che l'analisi fosse condotta esclusivamente su una popolazione di cellule singole e morfologicamente omogenee. Inizialmente, tramite un grafico bidimensionale di Forward Scatter (FSC-A) contro Side Scatter (SSC-A), le cellule sono state separate dai detriti e dal rumore elettronico, che occupano tipicamente le regioni a bassi valori di scattering. Successivamente per poter analizzare le cellule fissate e marcate con il DAPI, è stato necessario escludere gli aggregati cellulari e i doppietti, che potrebbero essere erroneamente interpretati come singole cellule più grandi o più fluorescenti. A tal fine, sono stati creati dei widget interattivi, come menù a tendina per selezionare il campione e cursori per modificare i valori numerici dei gate. La funzione collegata a questi widget aggiorna in tempo reale due grafici specifici per la pulizia del dato:

- V450-A vs FSC-A: Questo grafico correla l'area del segnale di fluorescenza del DAPI (V450-A), proporzionale al contenuto di DNA, con la dimensione cellulare (FSC-A). Tramite gli slider, è stata definita una retta con pendenza e intercetta ottimali per escludere gli aggregati e sono state impostate soglie orizzontali per rimuovere il rumore di fondo.
- V450-A vs V450-W: Questo grafico confronta l'area (V450-A) con l'ampiezza (V450-W) del segnale DAPI ed è essenziale per discriminare i doppietti. Questi ultimi, pur avendo un'area simile alle cellule in fase G2, presentano un'ampiezza del segnale maggiore. Gli slider hanno permesso di impostare soglie verticali precise per isolare la popolazione di singoletti, che producono un impulso stretto e simmetrico.

Questo approccio interattivo ha consentito di ottimizzare i gate per ciascun esperimento, garantendo una pulizia del dato robusta e minimizzando la perdita di eventi validi. La procedura, illustrata in Figura 3, è essenziale per l'accuratezza delle analisi a valle e permette di salvare i dati puliti per le elaborazioni successive.

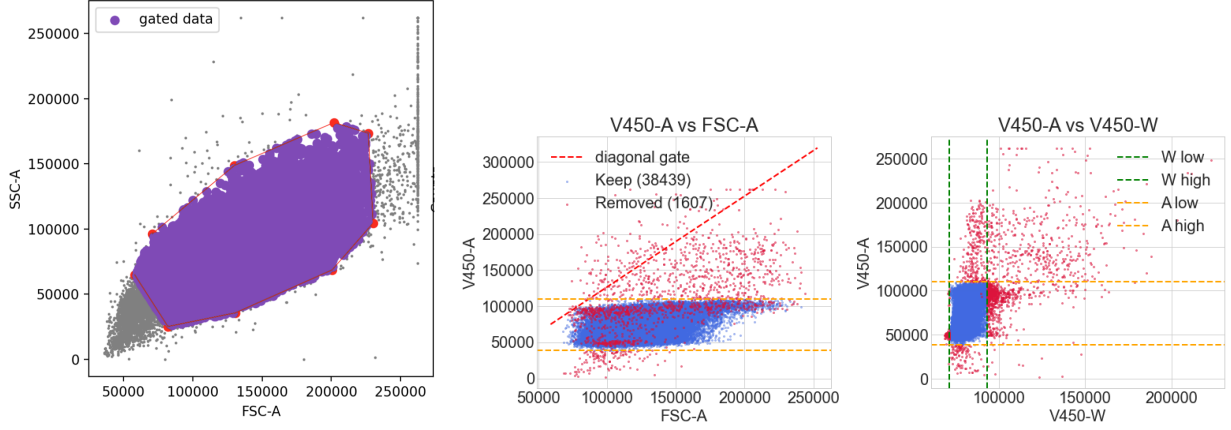


Figura 3: Strategia di Gating. Nel primo grafico è riportato un esempio di gating applicato ai dati grezzi delle cellule vive e fissate, volto all'esclusione dei detriti e del rumore. Nel secondo e nel terzo grafico è riportata la strategia di gating applicata alle cellule fissate per escludere i doppietti.

Deconvoluzione delle Generazioni

Per identificare e quantificare le generazioni cellulari ad ogni time point, è stato applicato un modello a misture gaussiane (*Gaussian Mixture Model*, GMM) alla distribuzione delle intensità di fluorescenza del CT Yellow [7,8]; in Figura 4 ne è riportato un esempio. Poiché la fluorescenza totale della popolazione si conserva e viene ripartita su un numero di cellule che raddoppia ad ogni generazione, l'intensità di fluorescenza per singola cellula risulta dimezzata dopo ogni divisione. Pertanto, la trasformazione logaritmica in base 2 dei dati rende i picchi delle generazioni successive approssimativamente equidistanti di un'unità. In questa scala, si assume che la distribuzione di fluorescenza di ogni singola generazione possa essere ben approssimata da una distribuzione Gaussiana [7]. Il GMM modella la distribuzione totale osservata $P(\log_2 f)$ come una somma pesata di k componenti gaussiane:

$$P(\log_2 f) = \sum_{g=0}^{k-1} \pi_g \mathcal{N}(\log_2 f | \mu_g, \sigma_g) \quad (1)$$

dove \mathcal{N} è la densità di probabilità gaussiana, e π_g , μ_g , e σ_g sono rispettivamente il peso (frazione di popolazione), la media e la deviazione standard della g -esima generazione. I parametri del modello sono stati stimati utilizzando l'algoritmo di Expectation-Maximization (EM), un metodo iterativo che massimizza la verosimiglianza dei dati [18,23]. Questo approccio, implementato tramite un'interfaccia computazionale, permette di calcolare per ogni cellula la probabilità a posteriori di appartenere a ciascuna generazione, consentendo una stratificazione robusta dei dati per analisi successive.

Analisi del Partizionamento

Per interpretare la variabilità osservata nella fluorescenza delle diverse generazioni e per quantificare il grado di simmetria nella divisione cellulare, è stato applicato il modello teorico del partizionamento binomiale asimmetrico. Il modello concettualizza il citoplasma cellulare come un insieme di m_0 "unità fluorescenti" discrete nella Generazione 0. Ad ogni divisione, queste unità vengono ripartite tra le due cellule figlie. Il modello assume che ogni singola unità abbia una probabilità p di essere segregata in una delle due cellule figlie (che per convenzione chiameremo "figlia 1") e una probabilità $q = 1 - p$ di finire nell'altra ("figlia 2"). Se una cellula madre nella generazione $g - 1$ possiede m_{g-1} unità, il numero di unità m_g che la figlia 1 eredita seguirà una distribuzione binomiale $B(m_{g-1}, p)$. Il parametro p , dunque, definisce la natura della divisione: se $p = 0.5$, la divisione è stocasticamente simmetrica e la variabilità osservata è puramente di natura binomiale, se $p \neq 0.5$, la divisione è asimmetrica.

Basandosi su questa assunzione, il modello deriva leggi analitiche ricorsive che descrivono come la media μ_g e la varianza σ_g^2 della fluorescenza (proporzionali al numero di unità m_g) evolvono attraverso

le generazioni g . In questo contesto è possibile derivare [7] due formule chiave. L'evoluzione della media è descritta da:

$$\mu_g = \mu_0 \left(\frac{1}{2}\right)^g \quad (2)$$

L'evoluzione della varianza è descritta da un'equazione più complessa che dipende dal parametro di asimmetria p :

$$\sigma_g^2 = \alpha \left(\frac{1}{2}\right)^{g-1} \frac{1 - (2\beta)^g}{1 - 2\beta} + \beta^g (\sigma_0^2 + \mu_0^2) - \left(\frac{1}{2}\right)^{2g} \mu_0^2 \quad (3)$$

dove $\alpha = pq\mu_0$ e $\beta = \frac{p^2+q^2}{2}$. Un apposito script computazionale è stato impiegato per eseguire un fit non lineare della varianza sperimentale, fissando i valori di μ_0 e σ_0^2 ai dati della generazione 0, al fine di stimare il parametro p .

Analisi del Ciclo Cellulare e del Tasso di Crescita

L'analisi finale, che integra i dati di dimensione, generazione e ciclo cellulare, è stata condotta tramite un terzo script dedicato. Questo codice esegue due funzioni principali. In primo luogo, analizza le distribuzioni di intensità del DAPI utilizzando l'algoritmo di Watson-Pragmatic per la deconvoluzione del ciclo cellulare [18]. Questo algoritmo, a differenza di altri modelli, assume che solo i picchi G1 e G2 siano gaussiani e calcola la frazione di cellule in fase S per sottrazione, senza fare assunzioni sulla forma della sua distribuzione, rendendolo particolarmente robusto. In secondo luogo, lo script correla le informazioni sulla fase del ciclo cellulare con l'identità generazionale (ricavata dal GMM) e la dimensione cellulare (ricavata dal segnale FSC). Questo ha permesso di analizzare l'evoluzione della media e della varianza del FSC per la popolazione totale e per le singole generazioni, e di stimare il tasso di crescita (*growth rate*) analizzando l'incremento della dimensione media all'interno di una singola generazione attraverso i diversi time points.

4. Risultati

4.1. Dinamica di Proliferazione e Deconvoluzione delle Generazioni

La marcatura con CT Yellow e l'analisi tramite citofluorimetria a flusso hanno permesso di seguire con precisione la progressione delle divisioni cellulari. La distribuzione dell'intensità di fluorescenza del CT Yellow, analizzata in scala logaritmica, ha mostrato una serie di picchi distinti ad ogni time point. L'applicazione del modello a misture gaussiane (GMM) ha permesso di deconvolvere questi picchi, assegnando ciascuno a una specifica generazione cellulare.

Una rappresentazione grafica di questo processo mostra chiaramente l'evoluzione della popolazione: al tempo zero, è presente solo la generazione 0 (popolazione sortata). Nei time points successivi, si osserva la progressiva diminuzione della frazione della generazione 0 e l'emergere sequenziale delle generazioni 1, 2, 3 e successive.

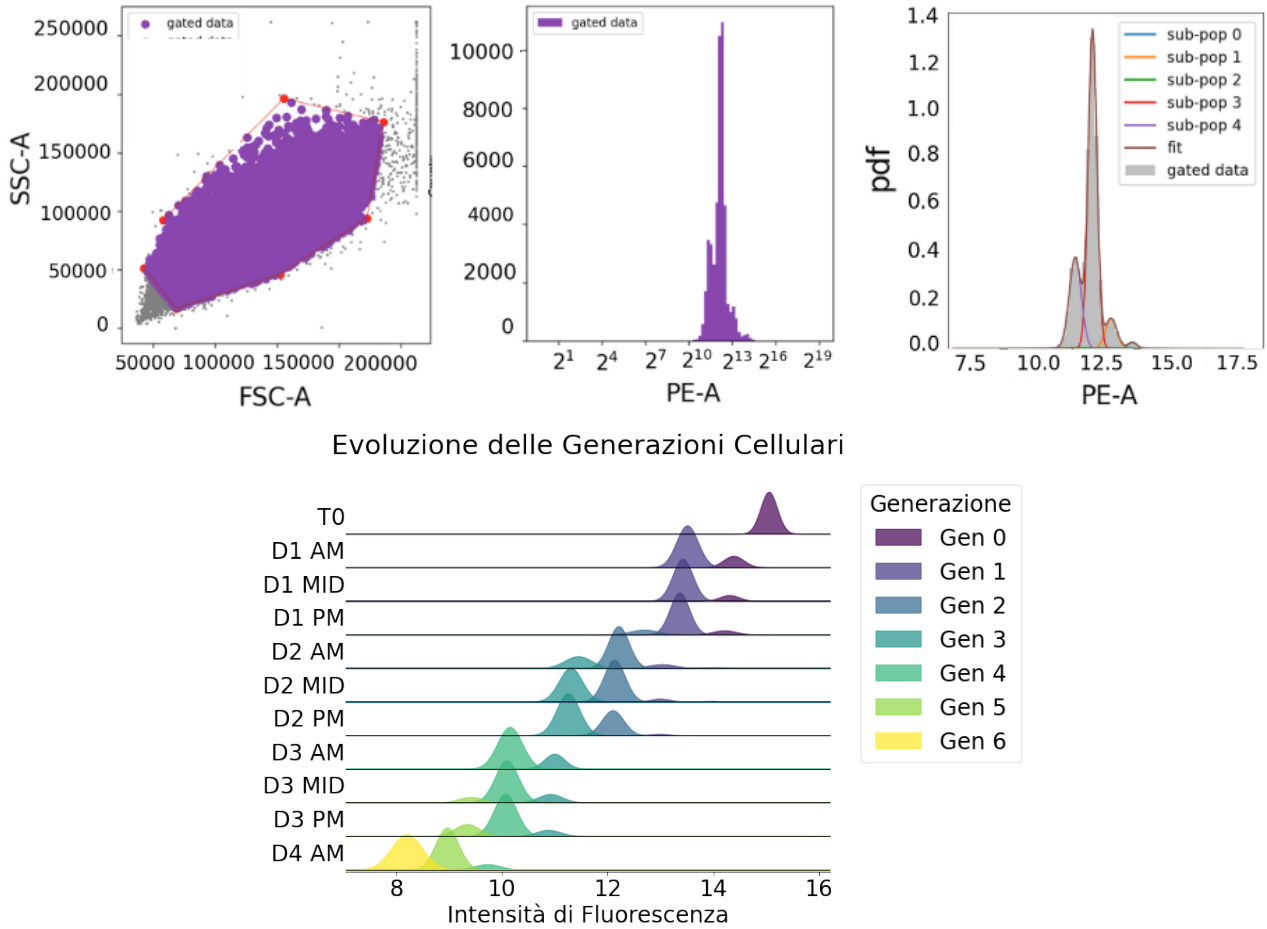


Figura 4: Deconvoluzione delle Generazioni Cellulari. Esempio di analisi di un istogramma di fluorescenza del CellTrace Yellow in seguito all'esecuzione di un gate volto ad escludere i detriti cellulari. Viene riportato a titolo di esempio un fit gaussiano eseguito con il modello GMM all'intera distribuzione. Le diverse curve colorate sono le singole componenti gaussiane identificate dal modello, ciascuna corrispondente a una generazione cellulare (G0, G1, G2, etc.). Questi primi tre grafici sono stati ricavati a partire dalla presa dati eseguita nella mattina del secondo giorno sulla popolazione cellulare analizzata durante la seconda settimana. Infine viene mostrata l'evoluzione temporale della fluorescenza del CT Yellow per ciascuna generazione, a partire dal Time Zero (T0) fino all'ultimo time point eseguito nella mattina del quarto giorno (D4 AM). Anche in questo caso i dati utilizzati sono quelli corrispondenti alla popolazione studiata nella seconda settimana.

4.2. Partizionamento del Citoplasma nelle Cellule Jurkat

Per investigare la simmetria della divisione cellulare, è stato applicato il modello binomiale asimmetrico ai dati di fluorescenza del CT Yellow, analizzando l'evoluzione della media (μ_g) e della varianza (σ_g^2) attraverso le generazioni. L'analisi è stata condotta su due esperimenti indipendenti (Settimana 1 e Settimana 2), sia su cellule vive che su cellule fissate e marcate con DAPI.

L'andamento della media della fluorescenza in funzione della generazione ha mostrato, in tutti gli esperimenti, un'eccellente concordanza con il modello teorico di dimezzamento ad ogni divisione, $\mu_g = \mu_0(0.5)^g$, come confermato da valori di R^2 quasi sempre superiori a 0.99. Questo risultato convalida la robustezza del tracciamento delle generazioni.

L'analisi della varianza ha fornito la stima del parametro di asimmetria p (Tabella 1). I risultati della Settimana 2, sia per le cellule vive che per quelle fissate, mostrano valori di p molto vicini a 0.5. La bontà di questi fit, indicata dai valori di chi-quadrato ridotto (χ^2/dof) molto bassi e p-value

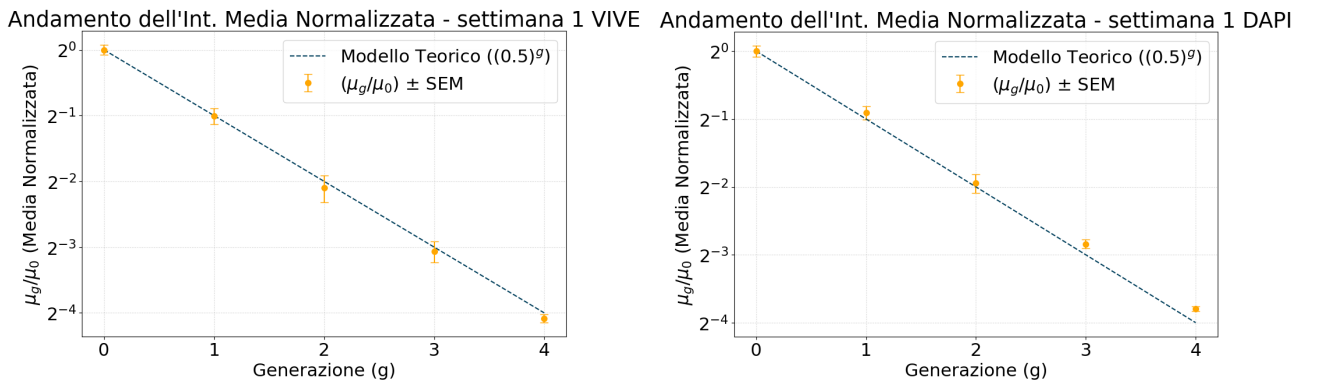
estremamente alti, suggerisce che il modello simmetrico descrive correttamente i dati sperimentali. I dati della Settimana 1 mostrano valori di p leggermente superiori, suggerendo una lieve asimmetria. Tuttavia, mentre il fit per le cellule vive è statisticamente buono, quello per le cellule DAPI della Settimana 1 è problematico, con un p-value basso e un chi-quadrato ridotto elevato, indicando una discrepanza tra il modello e i dati.

Considerando l'elevata qualità statistica dei dati della Settimana 2 e la coerenza tra campioni vivi e fissati in quell'esperimento, il risultato complessivo supporta fortemente la conclusione che il partizionamento del citoplasma nelle cellule Jurkat sia un processo simmetrico, con le leggere deviazioni osservate nella Settimana 1 probabilmente attribuibili a variabilità sperimentale. L'esito di un partizionamento del citoplasma tendenzialmente simmetrico è in accordo con quanto è noto sulla divisione delle cellule Jurkat [7]. Questo risultato per il citoplasma è particolarmente interessante se confrontato con quanto riportato per altri compartimenti cellulari. Infatti, studi [7] hanno dimostrato che componenti come i mitocondri e i lipidi di membrana subiscono un partizionamento marcatamente asimmetrico, suggerendo che la cellula regola in modo differenziale la segregazione delle sue varie componenti durante la mitosi.

Esperimento	Parametro p stimato	χ^2/dof	p-value	R^2
Settimana 1 - Vive	0.545 ± 0.007	1.06	0.38	0.98
Settimana 1 - DAPI	0.548 ± 0.003	2.78	0.03	0.99
Settimana 2 - Vive	0.519 ± 0.004	0.09	0.99	0.99
Settimana 2 - DAPI	0.516 ± 0.005	0.54	0.74	0.99

Tabella 1: Riepilogo dei risultati del fit del modello binomiale asimmetrico per la varianza del segnale CT Yellow. Vengono riportati il parametro di asimmetria p stimato, il chi-quadrato ridotto (χ^2/dof), il p-value e il coefficiente di determinazione (R^2) per i quattro set di dati analizzati.

All'interno di ciascuna replica biologica (Settimana 1 e Settimana 2), i valori del parametro di asimmetria p stimati per i campioni di cellule vive e per quelli fissati sono compatibili. Questo risultato è di cruciale importanza, poiché dimostra che il processo di fissazione non introduce artefatti nell'analisi del partizionamento e che, pertanto, i campioni fissati possono essere considerati pienamente rappresentativi della popolazione viva. Tale compatibilità è un risultato chiave, in quanto giustifica l'utilizzo di questi stessi campioni fissati per la successiva analisi del ciclo cellulare, che per sua natura richiede la permeabilizzazione della cellula e la marcatura del DNA con DAPI.



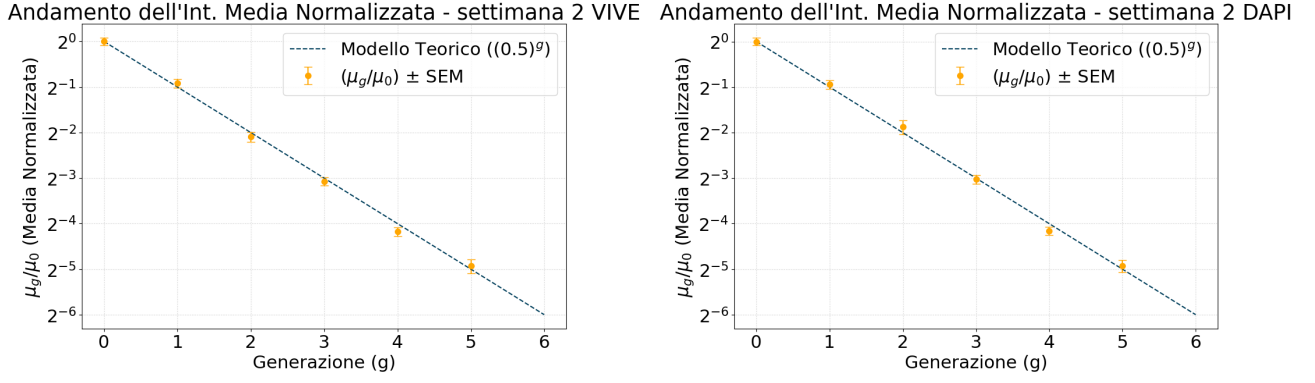


Figura 5: Fit del Modello di Partizionamento Binomiale Asimmetrico. Nei grafici è riportato (per ogni condizione sperimentale) l'andamento dell'intensità media del marcatore Cell Trace Yellow in funzione della generazione, normalizzata rispetto all'intensità media della popolazione iniziale. La linea tratteggiata è la soluzione corrispondente all'Equazione 2.

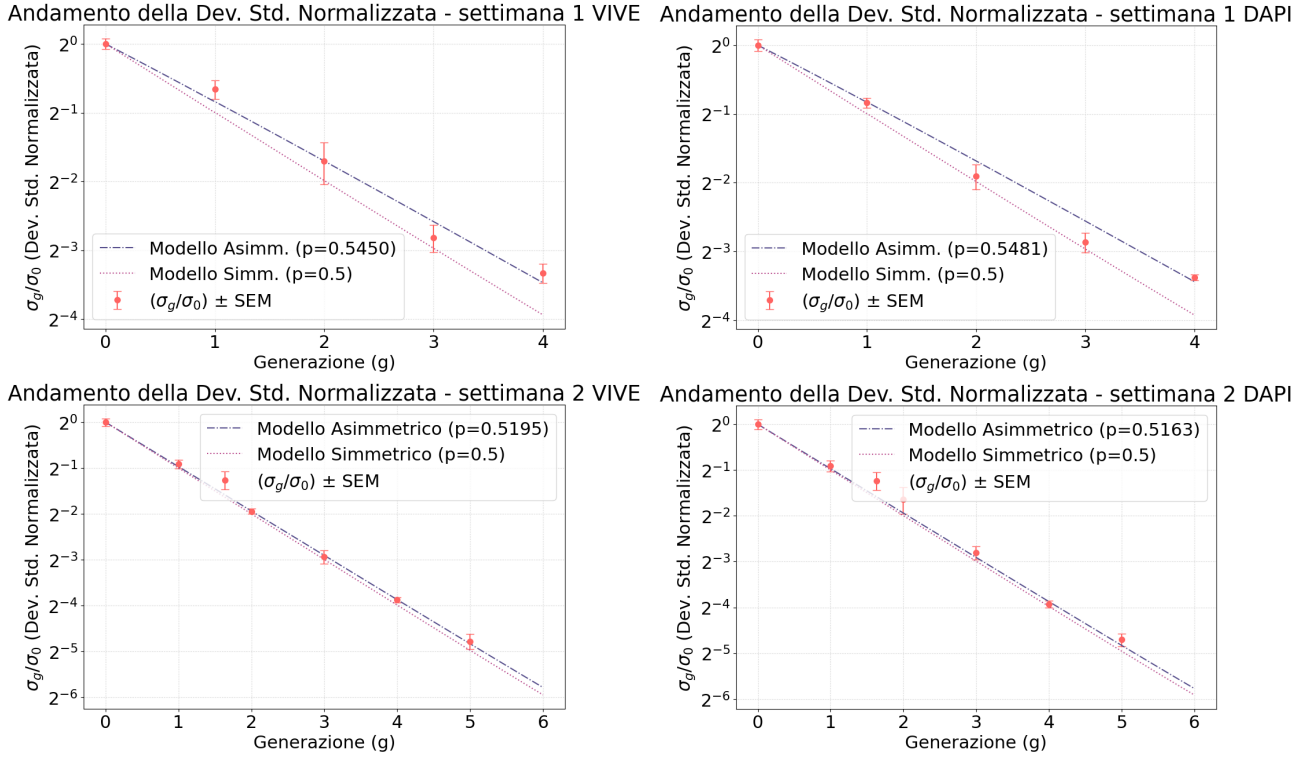


Figura 6: Fit del Modello di Partizionamento Binomiale Asimmetrico. Nei grafici è riportato (per ogni condizione sperimentale) l'andamento della varianza media dell'intensità del marcatore Cell Trace Yellow in funzione della generazione, normalizzata rispetto alla varianza media della popolazione iniziale. Le previsioni teoriche sono ottenute sia nel caso simmetrico sia in quello asimmetrico a partire dall'Equazione 3.

4.3. Analisi del Ciclo Cellulare con il Modello di Watson-Pragmatic

La distribuzione del contenuto di DNA della popolazione cellulare, rappresentata dall'istogramma dei valori di V450-A (fluorescenza del DAPI), è stata analizzata per quantificare le frazioni di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare (G1, S, G2). A tale scopo, è stato impiegato il modello di Watson-Pragmatic. Il modello di Watson è un approccio algoritmico che deconvolve l'istogramma del DNA in tre componenti principali. L'assunto di base del modello è che le popolazioni di cellule in fase G1 e G2

abbiano una distribuzione del contenuto di DNA approssimabile a una gaussiana. La fase S, invece, che rappresenta la sintesi continua di DNA, viene modellata matematicamente per rappresentare la transizione tra i due picchi principali.

L'analisi computazionale implementata segue una pipeline logica:

1. L'algoritmo identifica automaticamente la posizione dei picchi G1 e G2. Il picco G1 è identificato come il punto con il maggior numero di cellule, mentre il picco G2 viene cercato in una regione pari a circa il doppio dell'intensità del picco G1.
2. Utilizzando le funzioni di ottimizzazione della libreria `scipy`, viene eseguito il fit di un modello matematico composito sull'istogramma. Questo modello è la somma di due funzioni gaussiane (per i picchi G1 e G2) e di una funzione polinomiale (per la fase S).
3. Una volta che il modello è stato fittato con successo, il codice calcola l'area sottesa da ciascuna delle tre curve componenti (G1, S e G2) per ottenere la percentuale di cellule in quella specifica fase del ciclo.

Infine, il codice genera un grafico (come quelli riportati in Figura 7) di visualizzazione che sovrappone all'istogramma dei dati sperimentali le tre curve fittate, permettendo una valutazione visiva della bontà del fit.

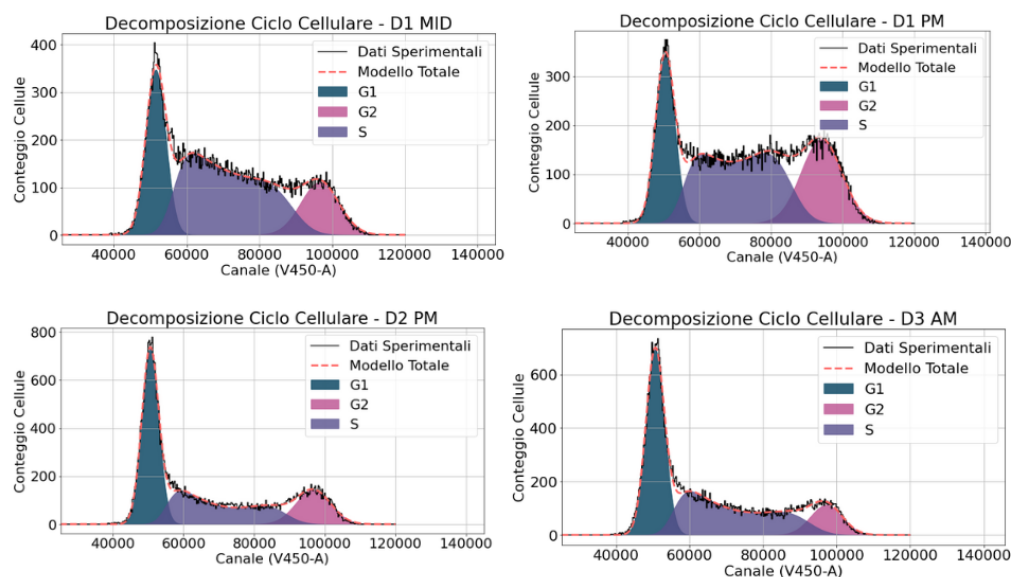


Figura 7: Esempio di deconvoluzione dell'istogramma del DAPI utilizzando il modello di Watson-Pragmatic. La linea nera rappresenta i dati sperimentali. Le aree colorate mostrano le componenti fittate corrispondenti alle fasi G1, S e G2. La linea tratteggiata rossa è la somma delle tre distribuzioni identificate.

4.4. Analisi della Dimensione Cellulare

Una volta che ad ogni cellula è stata assegnata una fase del ciclo attraverso il modello di Watson-Pragmatic, l'analisi si è concentrata sulla caratterizzazione della dinamica di popolazione e sull'evoluzione della dimensione cellulare nel tempo.

Dinamica Complessiva della Proliferazione della Popolazione

Per poter interpretare correttamente i meccanismi di controllo dimensionale, è indispensabile innanzitutto verificare che la popolazione cellulare si trovi in uno stato di crescita bilanciata. La Figura 8 fornisce il contesto fondamentale, visualizzando la dinamica proliferativa della popolazione nell'arco delle 90 ore di esperimento per la Settimana 2, e 72 ore per Settimana 1.

Il grafico mostra l'evoluzione temporale della frazione di cellule appartenenti a ciascuna generazione. Come atteso, la popolazione iniziale al Time Zero (T0) è composta interamente da cellule della Generazione 0. Con il passare del tempo, si osserva una diminuzione progressiva della loro frazione, accompagnata dall'emergere sequenziale delle generazioni successive. Queste "curve" di divisione rappresentano l'andamento classico di una coltura cellulare che si divide a un ritmo costante e prevedibile. A questa evidenza si aggiunge l'osservazione (che verrà discussa in dettaglio nella Figura 13) che il rapporto dimensionale tra le cellule in fase G2 e G1 rimane notevolmente costante nel tempo. La combinazione di una progressione generazionale prevedibile e di un controllo dimensionale stabile costituisce la prova complessiva che la popolazione si trova in uno stato di crescita omeostatica. Questa condizione di equilibrio è la premessa indispensabile per le analisi successive, poiché implica che i meccanismi di controllo intrinseci operino in condizioni stabili.

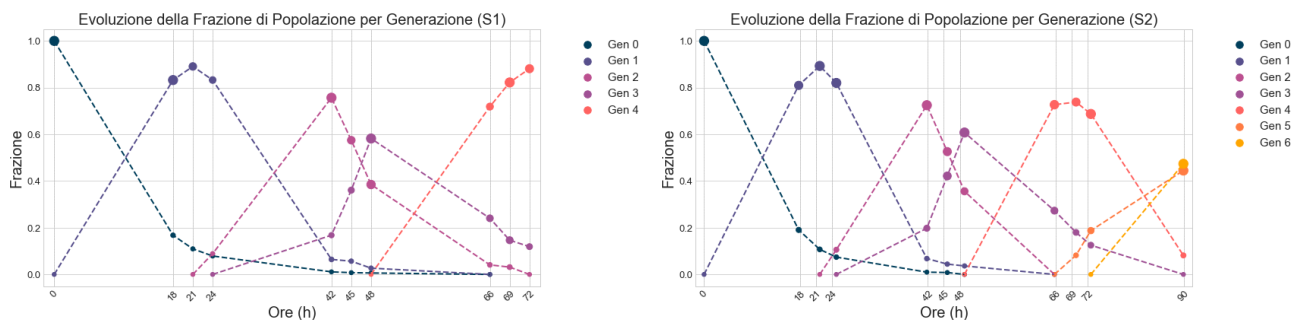


Figura 8: Evoluzione della Frazione di Popolazione per Generazione. Il grafico mostra la frazione di popolazione per ciascuna generazione in funzione del tempo, per le due repliche. La dimensione dei punti è proporzionale al numero assoluto di cellule contate per quella generazione a quel dato punto temporale.

Andamento della Dimensione Cellulare: Media Semplice e Pesata

Per investigare la coordinazione tra crescita e divisione, è stata analizzata l'evoluzione della dimensione cellulare, approssimata dal parametro FSC-A (Forward Scatter Area). Prima di esaminare l'andamento della dimensione media, le distribuzioni del FSC-A sono state stratificate per generazione e per fase del ciclo cellulare, come illustrato in Figura 9.

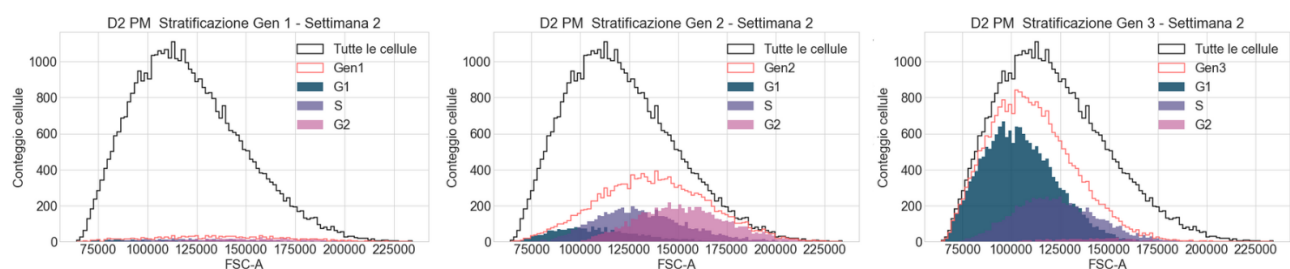


Figura 9: Esempio della Stratificazione della Distribuzione di FSC-A. Il grafico presenta la stratificazione dettagliata della distribuzione di FSC-A relativa al terzo Time Point della sessione di acquisizione dati del secondo giorno (D2 PM) della seconda settimana. L'analisi ha permesso di identificare tre generazioni cellulari distinte, ciascuna rappresentata da una propria curva di distribuzione. Per ciascuna di queste generazioni, la distribuzione di FSC-A è stata ulteriormente stratificata in base alle fasi del ciclo cellulare, evidenziando le variazioni di dimensione che le cellule subiscono mentre progrediscono attraverso il ciclo di divisione.

È stato, poi, generato un grafico compatto (mostrato in Figura 10) che riassume l'andamento della dimensione media in funzione del tempo (riportato in ore), stratificato sia per fase del ciclo che per generazione. Il codice raggruppa i dati per fase (G1, S, G2) e, all'interno di ogni fase, calcola la dimensione media (FSC-A medio) per ogni generazione a ciascun punto temporale.

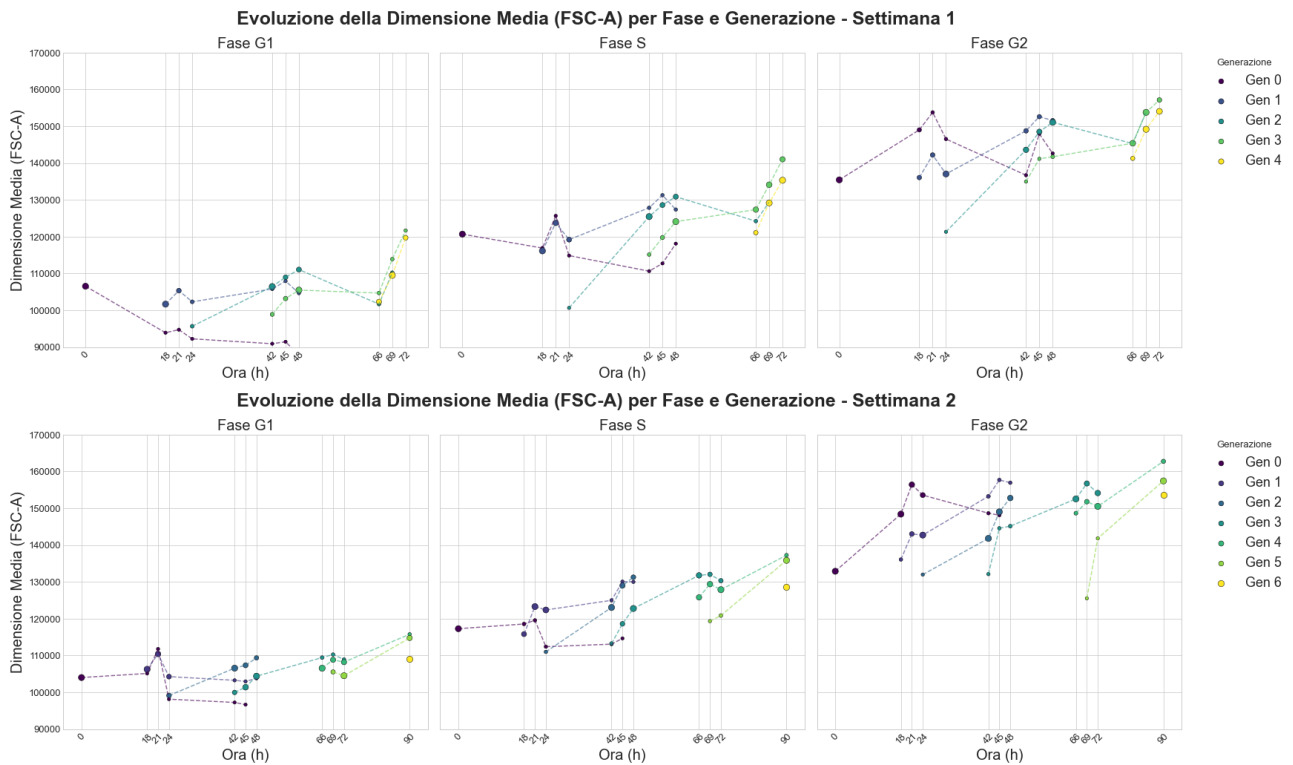


Figura 10: Evoluzione della dimensione media (FSC-A) per fase e generazione. Sono riportati i grafici per le entrambe repliche. La dimensione di ogni punto sul grafico è proporzionale al numero di cellule totali contate per quella generazione in quel punto temporale. Questo fornisce un'indicazione visiva immediata della robustezza statistica di ciascun dato: punti più grandi rappresentano popolazioni più numerose e quindi stime più affidabili.

Per superare l'eterogeneità interna di ogni generazione e ottenere un indicatore più robusto, è stato generato un secondo grafico (Figura 11) che mostra l'andamento della media pesata della dimensione. In questo calcolo, il contributo di ogni cellula è ponderato in base alla frequenza della sua fase all'interno della popolazione di riferimento. Questo approccio produce un singolo valore che rappresenta la taglia tipica di un'intera generazione in un dato momento, tenendo conto del suo stato proliferativo complessivo. Il risultato è una visione più sintetica che smorza le fluttuazioni dovute alla progressione nel ciclo e permette un confronto più diretto dell'evoluzione globale della dimensione tra le generazioni.

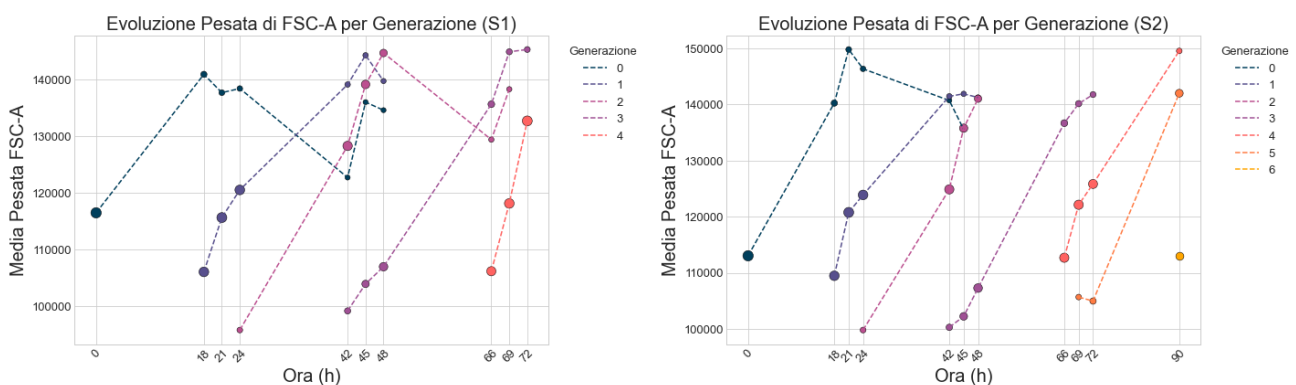


Figura 11: Evoluzione della dimensione media pesata per ogni generazione. Anche in questo caso sono riportati i grafici per entrambe le condizioni sperimentali (Settimana 1 e Settimana 2) e la dimensione di ogni punto è proporzionale al numero di cellule.

Come atteso biologicamente, dai grafici in Figura 10 e 11 si osserva una robusta correlazione tra la

dimensione cellulare e la fase del ciclo. Come evidente dal grafico in Figura 10, all'interno di qualsiasi generazione e a qualsiasi punto temporale, le cellule in Fase G1 sono le più piccole, quelle in Fase S hanno una dimensione intermedia, e quelle in Fase G2 sono le più grandi. Questo conferma che le cellule aumentano progressivamente di dimensione man mano che sintetizzano DNA e si preparano per la mitosi. La dimensione in G2 è marcatamente superiore a quella in G1, riflettendo la crescita cellulare che avviene parallelamente alla progressione del ciclo. Inoltre si osserva che, a parità di punto temporale, le cellule appartenenti a generazioni successive (e quindi più giovani) tendono a essere più piccole rispetto a quelle delle generazioni precedenti. Questo trend si ripete nella maggior parte dei punti temporali, suggerendo che la storia proliferativa influenzi la dimensione cellulare. È opportuno notare, tuttavia, che esistono specifiche eccezioni a questo andamento. Queste deviazioni non invalidano il trend generale, ma possono essere imputate a una combinazione di fattori sperimentali e artefatti di misurazione, tra cui:

- Variazioni nel microambiente della coltura: fluttuazioni locali nella disponibilità di nutrienti o un incremento della densità cellulare possono indurre una risposta di stress nelle cellule che può temporaneamente disaccoppiare la crescita dalla divisione, risultando in una generazione figlia che, in media, è più grande di quanto ci si aspetterebbe.
- Contaminazione residua da multipletti: sebbene la strategia di gating sia progettata per escludere gli aggregati cellulari, la sua efficacia non è mai assoluta al 100%. È possibile che una piccola percentuale di multipletti, non esclusa dal gate, contaminino l'analisi. Poiché un doppietto viene erroneamente misurato come un singolo evento con un valore di FSC-A molto più alto, una contaminazione anche minima può gonfiare artificialmente la dimensione media calcolata per una specifica popolazione.

Indagine sul Meccanismo di Controllo Dimensionale

Per investigare quantitativamente il meccanismo di controllo della taglia cellulare, è stata condotta un'analisi basata sulla taglia aggiunta. Questo approccio, ampiamente validato in letteratura per la sua robustezza e chiarezza interpretativa [25], si fonda sullo studio della relazione tra la dimensione che una cellula aggiunge durante il suo ciclo vitale ($\Delta = S_{G2} - S_{G1}$) e la sua dimensione al momento della nascita (S_{G1}).

La relazione tra queste due variabili può essere descritta da un modello lineare:

$$\Delta = m \cdot S_{G1} + q \quad (4)$$

In questo quadro, il coefficiente angolare m assume un'interpretazione biologica precisa, agendo come un discriminante diretto per i principali modelli di crescita:

- Un modello Sizer puro, in cui le cellule crescono fino a una dimensione critica predefinita, impone una forte correzione: le cellule nate più piccole devono aggiungere molta più massa rispetto a quelle nate più grandi. Questo si traduce in una correlazione negativa con pendenza $m = -1$.
- Un modello Timer puro, in cui il tempo di crescita è fisso, implica che cellule più grandi crescano di più in termini assoluti, non essendoci alcun meccanismo di correzione. Questo genera una correlazione positiva, con una pendenza $m > 0$.
- Un modello Adder puro postula che ogni cellula, indipendentemente dalla sua dimensione di partenza, aggiunga una quantità di massa costante. In questo scenario, non vi è correlazione tra la massa aggiunta e la massa iniziale, risultando in una linea orizzontale con pendenza nulla, $m = 0$.

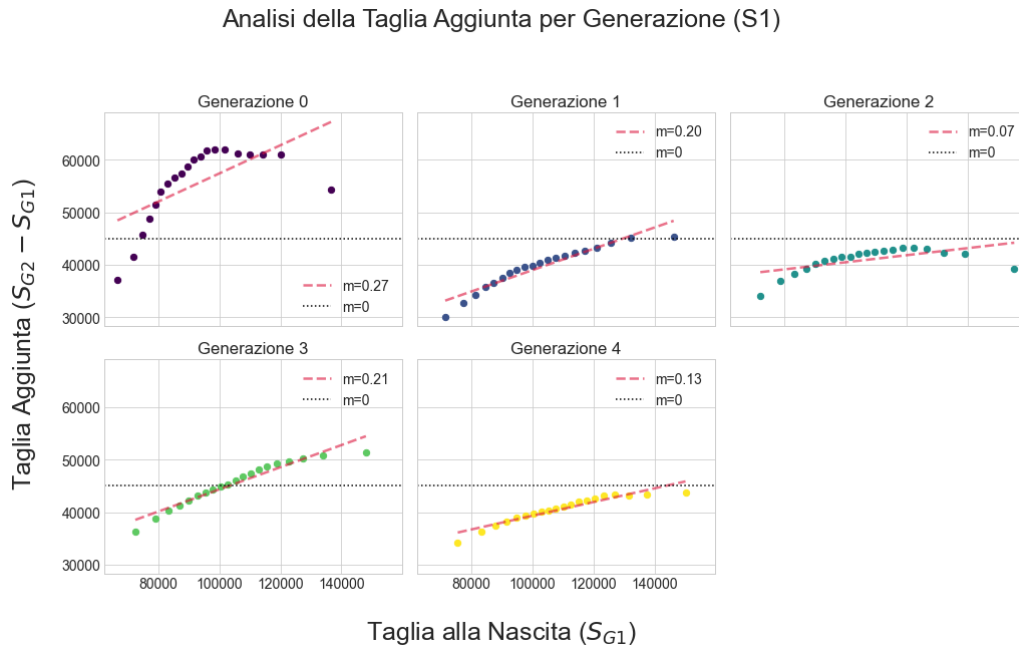
Per stimare la pendenza m e al contempo ridurre il rumore sperimentale, è stata adottata una tecnica di *binning per quantili*. All'interno di ogni generazione, le cellule in fase G1 sono state prima ordinate per dimensione crescente alla nascita (S_{G1}) e successivamente suddivise in un numero fisso di bin,

popolati in modo consecutivo dalle cellule più piccole a quelle più grandi. Questo ordinamento è un prerequisito essenziale per poter valutare l'effetto della taglia iniziale sulla crescita. Ogni bin è stato definito in modo da contenere un identico numero di cellule, assicurando così che ogni sottogruppo dimensionale avesse lo stesso peso statistico. Per ciascun bin è stata quindi calcolata la taglia media alla nascita ($S_{G1,mean}$) e alla divisione ($S_{G2,mean}$), permettendo di derivare la taglia aggiunta media, $\Delta_{mean} = S_{G2,mean} - S_{G1,mean}$. La pendenza m è stata infine determinata tramite una regressione lineare eseguita sull'insieme dei punti medi ($S_{G1,mean}, \Delta_{mean}$).

I risultati, riassunti in Tabella 2 e visualizzati in Figura 12, mostrano una notevole coerenza. I dati in tabella evidenziano come, per entrambi i replicati sperimentali e attraverso tutte le generazioni analizzate, le pendenze m ottenute siano costantemente dei valori piccoli e positivi, marcatamente vicini allo zero previsto dal modello adder.

Questi risultati sono in linea con quanto osservato in altri tipi cellulari eucariotici in proliferazione [25,26], e concordano con studi recenti [27,28] che descrivono le Jurkat come cellule caratterizzate da una strategia di controllo dimensionale prevalentemente di tipo sizer-like con una componente adder imperfetta. Questa combinazione di meccanismi, in cui un controllo sizer incompleto è modulato da un comportamento adder prevalente, garantisce un'efficace correzione degli scostamenti dimensionali e contribuisce al mantenimento dell'omeostasi della taglia all'interno della popolazione cellulare.

Figura 12: Analisi della taglia aggiunta per i due replicati sperimentali. Grafico della taglia aggiunta ($\Delta = S_{G2} - S_{G1}$) in funzione della taglia alla nascita (S_{G1}) per la Settimana 1 e la Settimana 2. Ogni pannello mostra l'analisi indipendente per una singola generazione cellulare, eseguita sui dati aggregati della fase omeostatica. La linea tratteggiata rappresenta la regressione lineare, mentre la linea punteggiata indica il comportamento di un Adder perfetto ($m = 0$).



Analisi della Taglia Aggiunta per Generazione (S2)

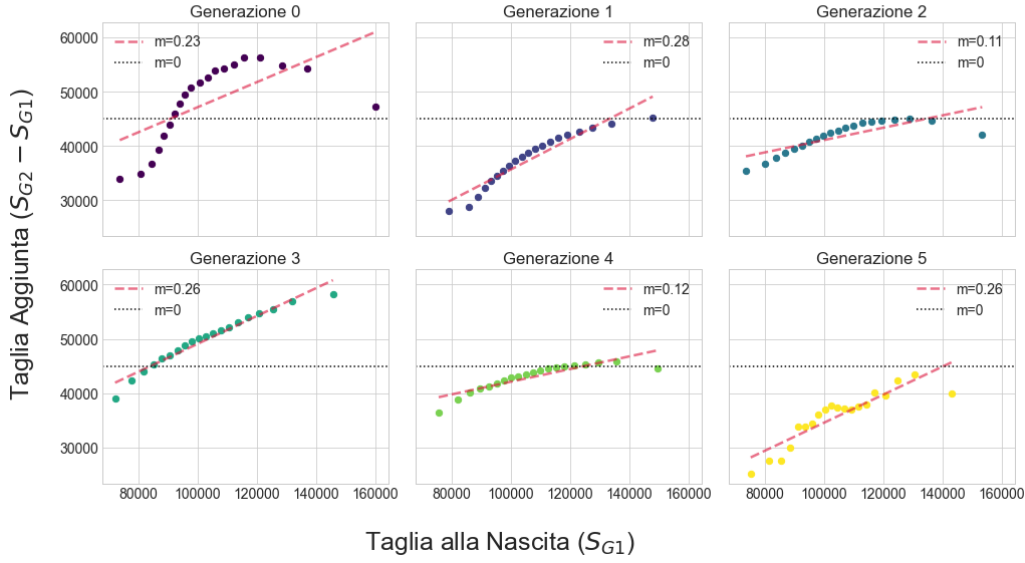


Tabella 2: Riepilogo dei parametri ottenuti dall'analisi della taglia aggiunta per ciascuna generazione nei due replicati sperimentali.

Generazione	Settimana 1		Settimana 2	
	m	R^2	m	R^2
0	0.27	0.43	0.23	0.43
1	0.20	0.91	0.28	0.90
2	0.07	0.36	0.11	0.63
3	0.21	0.93	0.26	0.96
4	0.13	0.90	0.12	0.78
5	—	—	0.26	0.81

Stima del Fattore di Crescita Logaritmico

Si vuole ora stimare un parametro quantitativo che descriva l'entità della crescita cellulare durante il ciclo. A tal fine, la Figura 13 analizza il rapporto tra la dimensione media delle cellule nella fase G2 (S_{G2}) e quella nella fase G1 (S_{G1}), per i dati acquisiti nella Settimana 1 e nella Settimana 2.

L'asse y del grafico rappresenta $\log_2(S_{G2}/S_{G1})$. Questo approccio è particolarmente significativo poiché, in un modello ideale di crescita cellulare bilanciata, ci si aspetterebbe che una cellula raddoppi la propria dimensione tra l'inizio della fase G1 e la fine della fase G2, prima di dividersi. Pertanto, un valore di $\log_2(S_{G2}/S_{G1}) = 1$ indicherebbe un raddoppio esatto della dimensione. L'asse y è quindi interpretabile direttamente come il fattore di crescita logaritmico in base 2.

La media pesata di tutti i punti ha prodotto un valore pari a $\alpha_1 = 1.45 \pm 0.02$ per la Settimana 1 e $\alpha_2 = 1.53 \pm 0.03$ per la Settimana 2. È interessante notare come entrambi i valori siano significativamente maggiori di 1. Questo indica che, in media, le cellule Jurkat aumentano la loro dimensione di un fattore maggiore di 2 tra G1 e G2, anziché raddoppiarla esattamente. Nonostante questo scostamento da un raddoppio esatto, l'assenza di una tendenza sistematicamente variabile nel tempo per questo parametro indica che il programma di crescita cellulare è notevolmente stabile e omeostatico. La coerenza di questo parametro quantitativo tra due esperimenti indipendenti rafforza ulteriormente la conclusione che il sistema di controllo dimensionale delle cellule Jurkat è robusto.

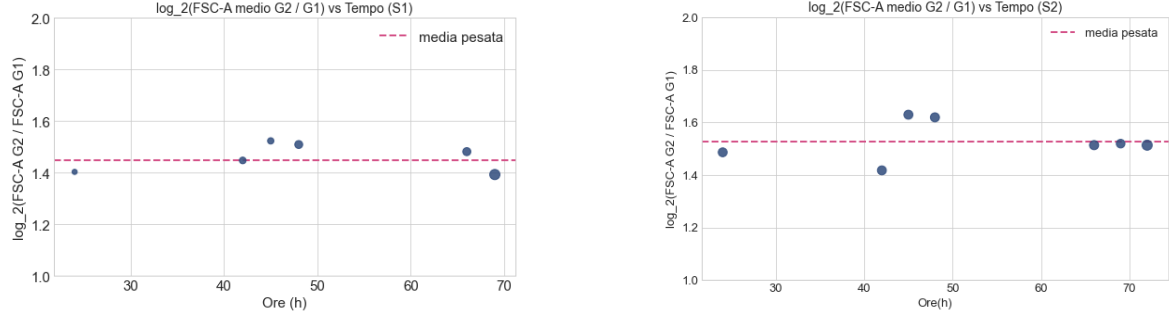


Figura 13: Rapporto logaritmico della dimensione G2/G1 in funzione del tempo. Il grafico mostra il logaritmo in base 2 del rapporto tra la dimensione media (FSC-A) delle cellule in G2 e G1 per diversi punti temporali. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta la media pesata di questi valori.

Linearizzazione della Dimensione e Stima dei Tassi di Crescita

Per stimare i tassi di crescita in ciascuna fase del ciclo, è stata applicata una regressione lineare ai dati di dimensione. Poiché la crescita cellulare è un processo intrinsecamente esponenziale, il segnale FSC-A è stato prima trasformato in una dimensione linearizzata, D . Questa trasformazione è stata ottenuta tramite una funzione di potenza basata sui fattori α calcolati per ciascun esperimento. Nello specifico, la dimensione linearizzata D è definita come:

$$D = (\text{FSC-A})^{\frac{1}{\alpha}} \quad (5)$$

Lo scopo di questa operazione è linearizzare le curve di crescita esponenziale, ottenendo una nuova variabile D che in un modello ideale aumenta in modo lineare nel tempo. Questo permette di stimare i tassi di crescita tramite una semplice regressione lineare:

$$D(t) = \beta \cdot t + D_0 \quad (6)$$

In questo modello, il coefficiente angolare β rappresenta il tasso di crescita della dimensione linearizzata D , quantificando la velocità di accumulo di massa in ciascuna fase del ciclo.

Le Figure 14 e 15 mostrano l'andamento di questa dimensione linearizzata e le relative rette di regressione. I parametri ottenuti dalle regressioni per entrambi gli esperimenti sono riassunti nella Tabella 3.

Fase del ciclo	Settimana 1		Settimana 2	
	Tasso di Crescita (β)	R ²	Tasso di Crescita (β)	R ²
G1	1.75	0.15	1.30	0.70
S	2.05	0.23	1.47	0.81
G2	2.11	0.20	2.05	0.62

Tabella 3: Parametri della regressione lineare dei due esperimenti.

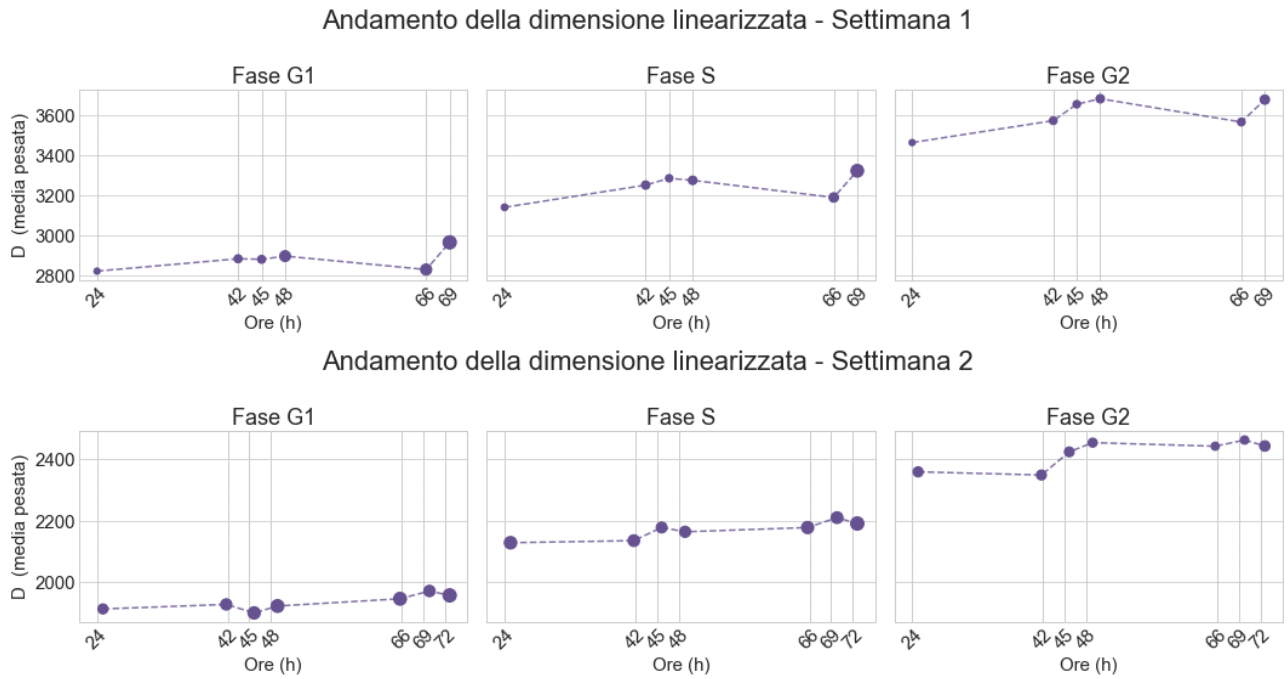


Figura 14: Andamento della dimensione linearizzata per fase del ciclo. I tre pannelli mostrano l'evoluzione della dimensione trasformata D in funzione del tempo per le cellule in fase G1, S e G2.

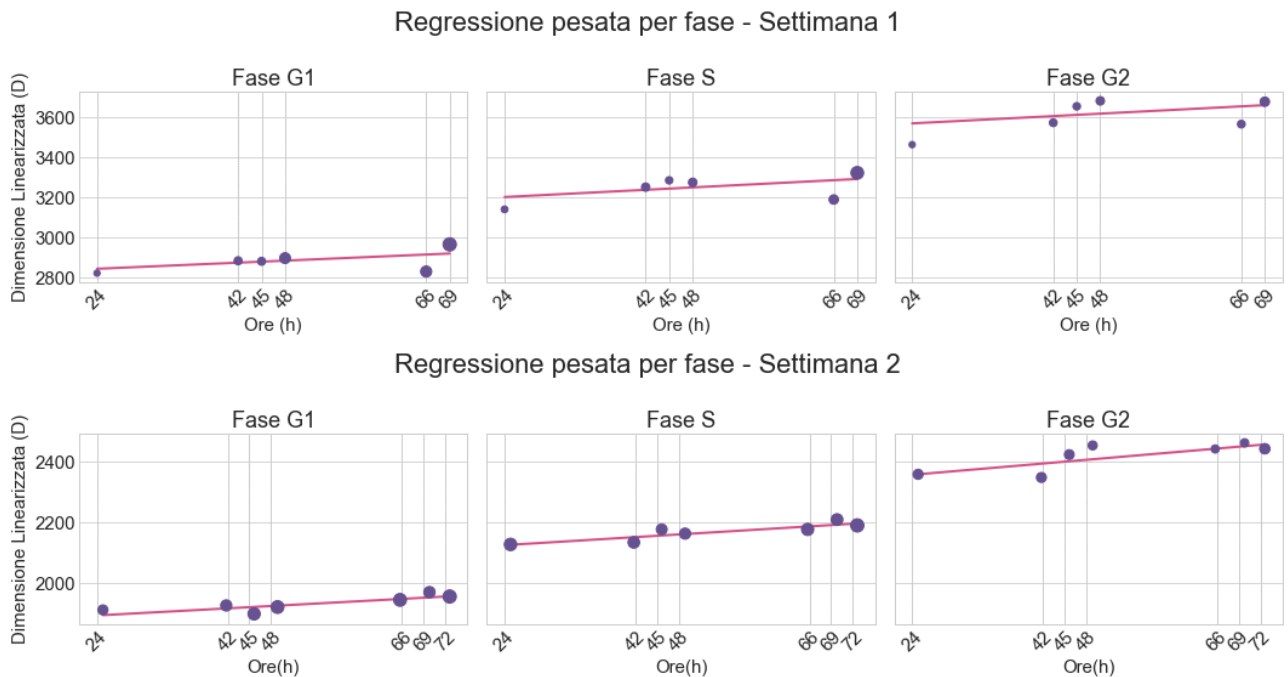


Figura 15: Regressione lineare pesata della crescita per fase del ciclo. I pannelli mostrano gli stessi dati della Figura 14, ma con l'aggiunta di una retta di regressione lineare pesata.

Dall'analisi comparativa emergono due osservazioni principali. La prima riguarda la qualità del fit: i coefficienti di determinazione R^2 per la Settimana 2 sono notevolmente più alti rispetto a quelli della Settimana 1. Questo indica che il modello di crescita linearizzata descrive in modo più accurato i dati del secondo esperimento, che possono quindi essere considerati più robusti dal punto di vista statistico.

La seconda e più significativa osservazione riguarda l'andamento dei tassi di crescita. In entrambe le settimane si osserva una chiara e progressiva accelerazione della crescita: $\beta_{G1} < \beta_S < \beta_{G2}$. La velocità con cui le cellule accumulano dimensione aumenta man mano che avanzano nel ciclo.

Questo risultato, consistente tra le due repliche biologiche, rafforza l'ipotesi che la crescita non avvenga a un tasso costante, ma sia modulata con un'accelerazione continua attraverso le fasi del ciclo. La coerenza tra i due esperimenti, pur a fronte di una diversa qualità del fit, convalida il modello di crescita proposto e suggerisce che l'accelerazione progressiva sia una caratteristica intrinseca del ciclo cellulare analizzato.

5. Conclusioni

Questo studio ha fornito un quadro quantitativo dei meccanismi che governano la proliferazione delle cellule Jurkat, portando alla luce due risultati principali e complementari.

In primo luogo, è stato dimostrato che il partizionamento del citoplasma totale è un processo stocasticamente simmetrico. I risultati della Settimana 2, statisticamente più robusti, hanno restituito un parametro di asimmetria p di 0.519 ± 0.004 (cellule vive) e 0.516 ± 0.005 (cellule fissate), valori che indicano una divisione quasi perfettamente simmetrica. Stabilire che il citoplasma si divide in modo passivo ed equo porta ad una conclusione importante: la ben documentata segregazione asimmetrica di organelli specifici, come i mitocondri, non può essere un evento casuale [9, 21]. Al contrario, deve necessariamente implicare meccanismi attivi e regolati. L'esito trovato in questo studio sulla simmetria citoplasmatica, rafforza indirettamente l'ipotesi che l'asimmetria degli organelli sia un processo biologicamente deliberato, fondamentale per generare l'eterogeneità fenotipica e per il mantenimento di sottopopolazioni con caratteristiche di staminalità tumorale [10, 22].

In secondo luogo, è stato stabilito che il controllo dimensionale segue un meccanismo di tipo Adder-like. Questa conclusione si basa sull'analisi della taglia aggiunta, dove la pendenza della regressione tra la dimensione aggiunta e la dimensione alla nascita è risultata costantemente prossima a zero ($m \approx 0.2$) per entrambe le repliche sperimentali e attraverso multiple generazioni. Le cellule, dunque, adottano una strategia compensatoria in cui aggiungono un incremento di massa relativamente costante a ogni ciclo. Questo meccanismo è fondamentale per mantenere l'omeostasi dimensionale.

Infine, è fondamentale riconoscere i limiti di questo lavoro, che sono di natura sia metodologica sia sperimentale. Il limite metodologico principale risiede nell'uso del Forward Scatter (FSC) come proxy della dimensione cellulare. Sebbene correlato, l'FSC non è una misura diretta del volume; la sua intensità, governata dalla complessa teoria di Mie, dipende anche da parametri come l'indice di rifrazione interno della cellula, che può variare durante il ciclo cellulare [22]. A causa dell'incertezza intrinseca, le stime quantitative dei tassi di crescita devono essere interpretate come indicatori di una tendenza dinamica, piuttosto che come valori assoluti e definitivi. A ciò si aggiungono limiti di natura prettamente sperimentale: il numero di punti temporali analizzati è necessariamente ristretto, poiché ogni misurazione richiede il prelievo di una frazione significativa della coltura (circa un milione di cellule), e le risorse cellulari non sono illimitate.

Riferimenti bibliografici

- [1] Kussell, E. & Leibler, S. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* 309, 2075–2078 (2005).
- [2] McGranahan, N. & Swanton, C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell* 168, 613–628 (2017).
- [3] Korolev, K. S., Xavier, J. B. & Gore, J. Turning ecology and evolution against cancer. *Nat. Rev. Cancer* 14, 371–380 (2014).

- [4] O. Padovan-Merhar, G.P. Nair, A.G. Biaesch, A. Mayer, S. Scarfone, S.W. Foley, A.R. Wu, L.S. Churchman, A. Singh, A. Raj, Single mammalian cells compensate for differences in cellular volume and DNA copy number through independent global transcriptional mechanisms, *Mol. Cell* **58** (2015) 339–352.
- [5] T.P. Miettinen, H.K.J. Pessa, M.J. Caldez, T. Fuhrer, M.K. Diril, U. Sauer, P. Kaldis, M. Björklund, Identification of transcriptional and metabolic programs related to mammalian cell size, *Curr. Biol.* **24** (2014) 598–608.
- [6] S. Marguerat, A. Schmidt, S. Codlin, W. Chen, R. Aebersold, J. Bähler, Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes in proliferating and quiescent cells, *Cell* **151** (2012) 671–683.
- [7] Peruzzi, G., Miotto, M., Maggio, R., Ruocco, G. & Gosti, G. Asymmetric binomial statistics explains organelle partitioning variance in cancer cell proliferation. *Commun. Phys.* **4**, 188 (2021).
- [8] Miotto, M. et al. A size-dependent division strategy accounts for leukemia cell size heterogeneity. *Commun. Phys.* **7**, 248 (2024).
- [9] Björklund, M. Cell size homeostasis: Metabolic control of growth and cell division. *BBA - Molecular Cell Research* **1866**, 409–417 (2019).
- [10] Katajisto, P. et al. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science* **348**, 340–343 (2015).
- [11] Dalton, C. M. & Carroll, J. Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J. Cell Sci.* **126**, 2955–2964 (2013).
- [12] Pernice, W. M., Swayne, T. C., Boldogh, I. R. & Pon, L. A. Mitochondrial tethers and their impact on lifespan in budding yeast. *Front. Cell Develop. Biol.* **5**, 120 (2018).
- [13] Tripathi, S., Chakraborty, P., Levine, H. & Jolly, M. K. A mechanism for epithelial-mesenchymal heterogeneity in a population of cancer cells. *PLOS Comput. Biol.* **16**, e1007619 (2020).
- [14] Begum, J. et al. A method for evaluating the use of fluorescent dyes to track proliferation in cell lines by dye dilution. *Cytometry Part A* **83**, 1085–1095 (2013).
- [15] R. Ian Freshney. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 7th ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2015.
- [16] Givan, A.L. *Flow Cytometry: First Principles*. 2nd ed., Wiley-Liss, 2001.
- [17] BD Biosciences. *BD Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. Becton, Dickinson and Company.
- [18] Watson, J. V., Chambers, S. H. & Smith, P. J. A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* **8**, 1–8 (1987).
- [19] Ginzberg, M. B., Kafri, R. & Kirschner, M. On being the right (cell) size. *Science* **348**, 1245075 (2015).
- [20] Tzur, A., Kafri, R., LeBleu, V. S., Lahav, G. & Kirschner, M. W. Cell growth and size homeostasis in proliferating animal cells. *Science* **325**, 167–171 (2009).
- [21] McKinnon, K. M. *Multiparameter Conventional Flow Cytometry* (Springer, 2018).
- [22] Shapiro, H. M. *Practical Flow Cytometry* (Wiley-Liss, 2003).

- [23] Dempster, A. P., Laird, N. M. & Rubin, D. B. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J. R. Stat. Soc. Series B* **39**, 1–38 (1977).
- [24] Bohren, C. F. & Huffman, D. R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (Wiley, 1983).
- [25] C. Cadart, S. Zlotek-Zlotkiewicz, G. Venkova, A. Thouvenin, L. Huet, F. C. Morin, N. Minc, and M. Piel. "Size control in mammalian cells involves modulation of both growth rate and cell cycle duration." *Nature Communications* **9**, 3275 (2018).
- [26] A. A. Amodeo and J. M. Skotheim. "Cell-Size Control." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **8**, a019083 (2015).
- [27] Varsano, G., Wang, Y. & Wu, M. Probing mammalian cell size homeostasis by channel-assisted cell reshaping. *Cell Rep.* **20**, 397–410 (2017).
- [28] C. A. Vargas-García, M. Soltani, and A. Singh. "Size control mechanisms in human cells: theoretical analysis of experimental data." *Scientific Reports* **10**, 15720 (2020).