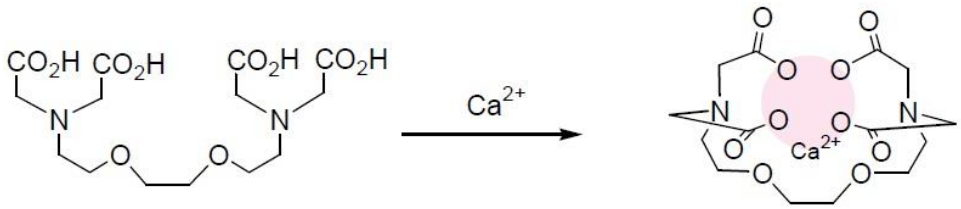
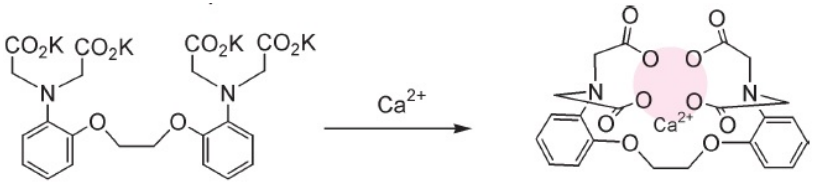
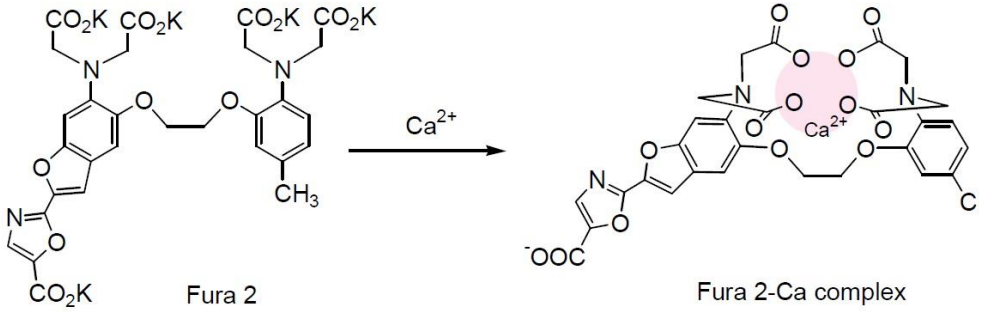
# indicatori fluorescenti per $Ca^{2+}$

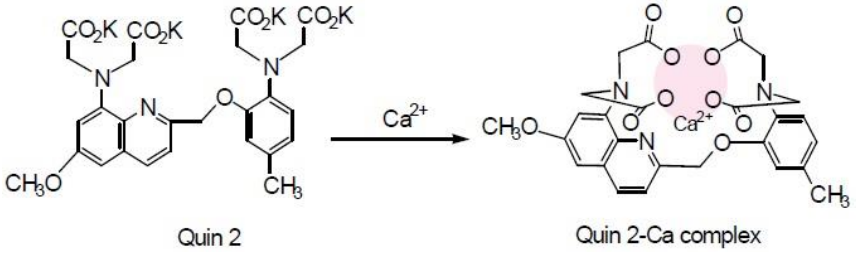


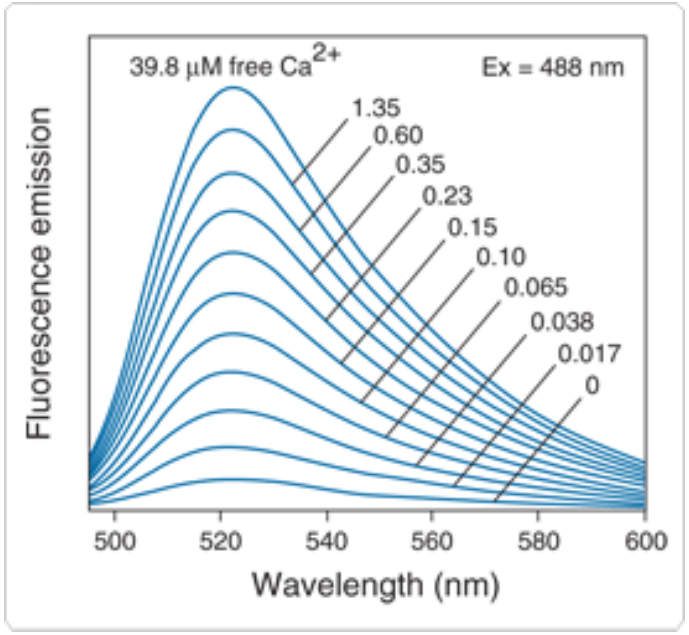

**EGTA** (ethylene glycol tetraacetic acid)

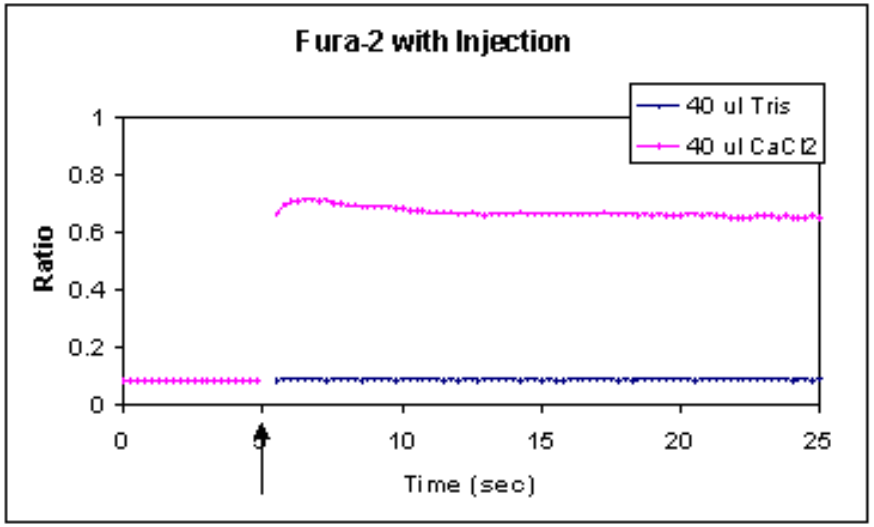



**BAPTA** (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)



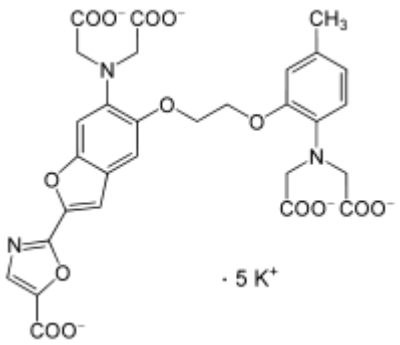



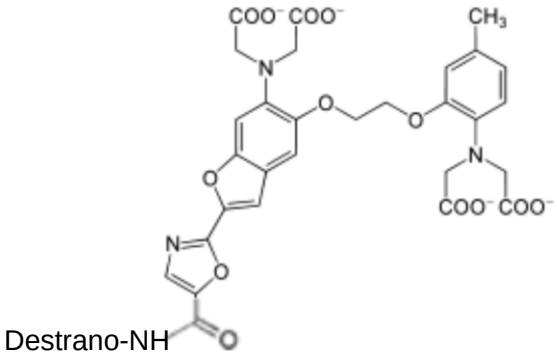



# Criteri per la selezione degli indicatori del calcio intracellulare

- Affinità per il $Ca^{2+}$ ($K_D$) - 0.1 a 10 volte la [Ca] da misurare
  - più basso per calcio citoplasmatico
- Caratteristiche spettroscopiche (eccitazione, emissione, intensità)
- Caratteristiche chimico-fisiche
  - sonde saline o coniugate a destrano (idrofiliche)
  - devono essere introdotte nella cellula (micro-iniezione, eletroporazione ecc.)
  - sonde idrofobiche che penetrano la membrana (alcossimetilesteri poi rimossi da esterasi intracellulari).

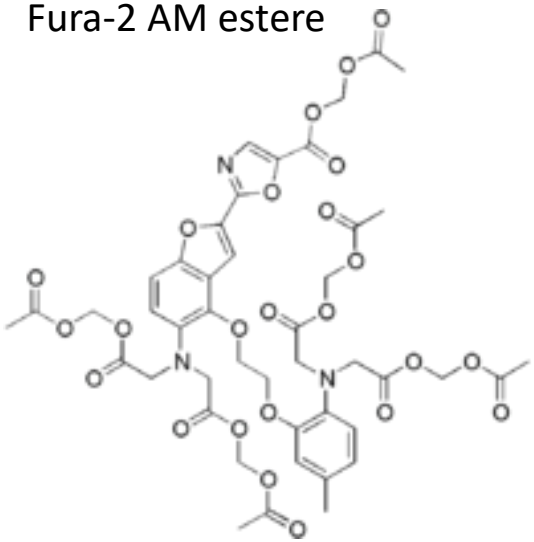



Fura-2 sale potassio




Fura-2 destrano

Fura-2 AM estere



# Metodi per analizzare la fluorescenza intracellulare

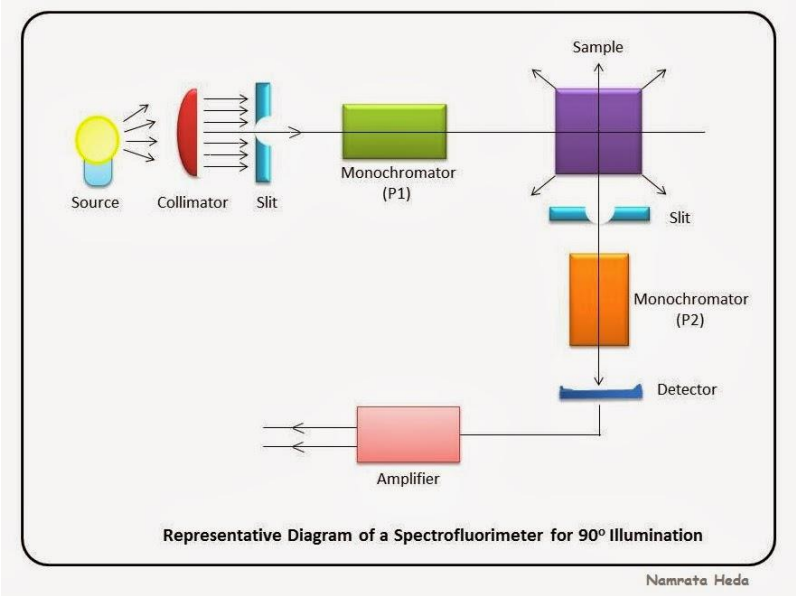
- **La spettrofluorimetria**

***Vantaggi***

1) *facilità di esecuzione*
2) *diffusione della strumentazione*
3) *basso costo*

***Svantaggi***

1) *adatta solo alle cellule in sospensione*
2) *i risultati sono la media dei singoli eventi*
3) *necessità di molte cellule*




- **La videomicroscopia o videoimaging)**

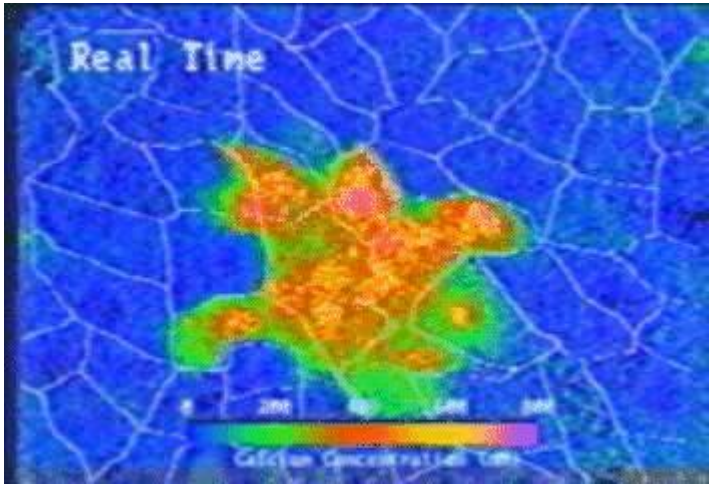
***Vantaggi***

1) *visualizzazione di singole cellule*
2) *ricostruzione tridimensionale*
3) *luce laser (monocromatica ed intensa)*

***Svantaggi***

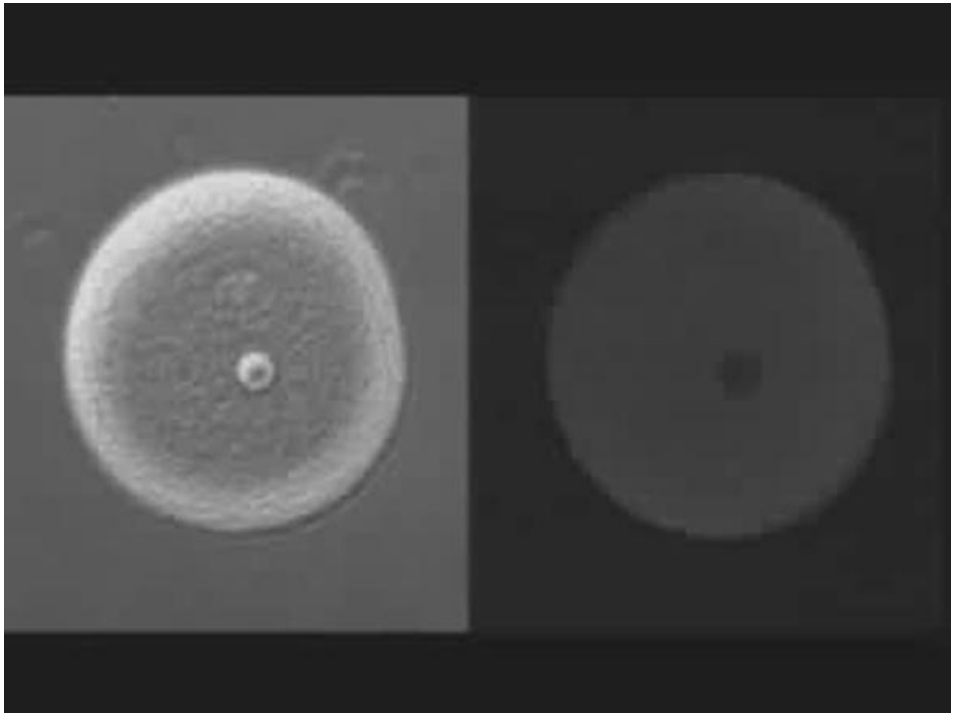
1) *luce laser → 'photobleaching' e danno alla cellula*
2) *legata a disponibilità di indicatori fluorescenti adatti*
3) *costi elevati e minore disponibilità della strumentazione*

# Esempi di videoimaging dei variazioni nel calcio intracellulare




https://www.jove.com/video/50443/mechanical-stimulation-induced-calcium-wave-propagation-c

## e l'effetto – fusione di vescicole ed esocitosi



# Microscopia elettronica - Metodo classico immunochimico: immunogold labelling

## Necessità di fissare e permeabilizzare la cellula (metodo distruttivo)

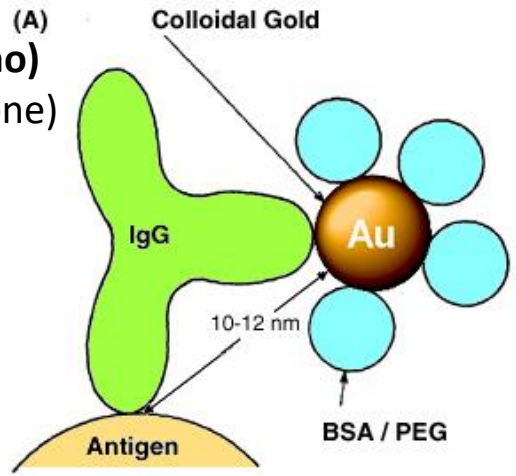
**1. fissazione/crosslinking**
**(blocca le proteine sul posto e cellule sul vetrino)**
- trattare vetrini con poli-lisina (migliora adesione)
- aderire le cellule
- 4% paraformaldeide (crosslinking proteine)
- lavaggio con tampone PBS (+ 1% BSA)

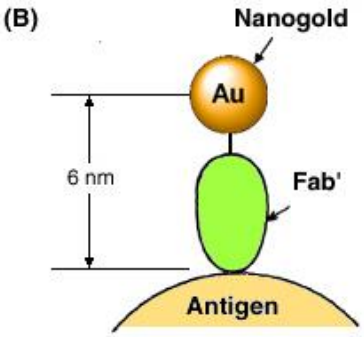
**2. fissazione/permeabilizzazione con etanolo**
**(rende accessibili le proteine)**
- 95% EtOH, 5% $CH_3COOH$ glaciale
- lavaggio con tampone PBS (+ 1% BSA

**3. permeabilizzazione con detergenti**
**(rende accessibili le proteine)**
- methanolo freddo, -20° 10 min.
- lavaggio con tampone PBS (+ 1% BSA)
- detergent (es. 0,1% saponina)

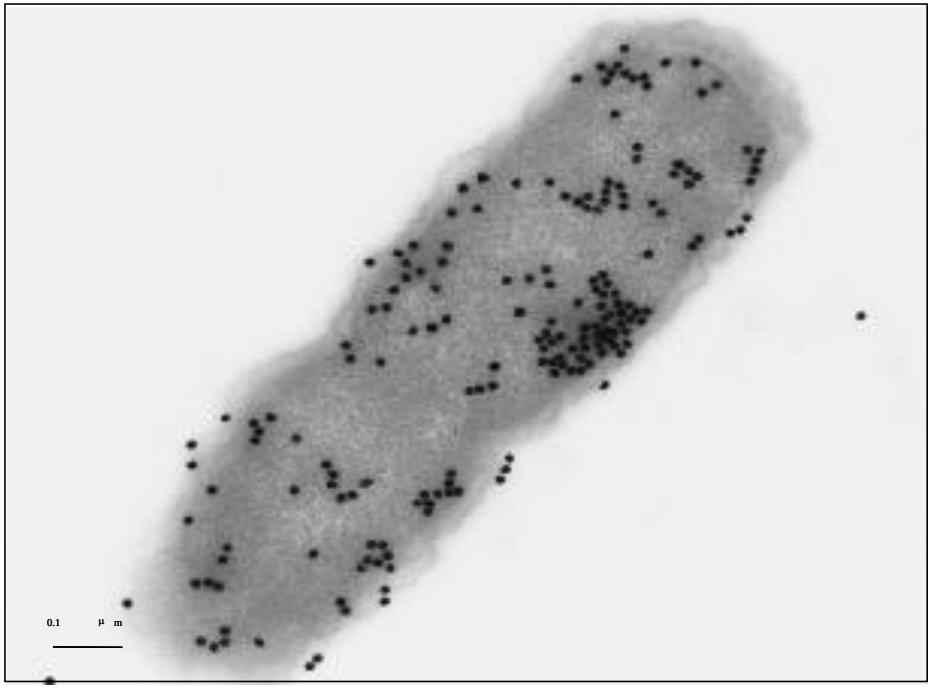
**4. lavaggio con solvente organico**
**(rimuove detergente/lipidi)**
- acetone freddo -20°
- lavaggio con tampone PBS (+ 1% BSA)

**5. Evidenziare proteine bersaglio con immunogold**
**(usare microscopia elettronica – Au è elettrodenso)**



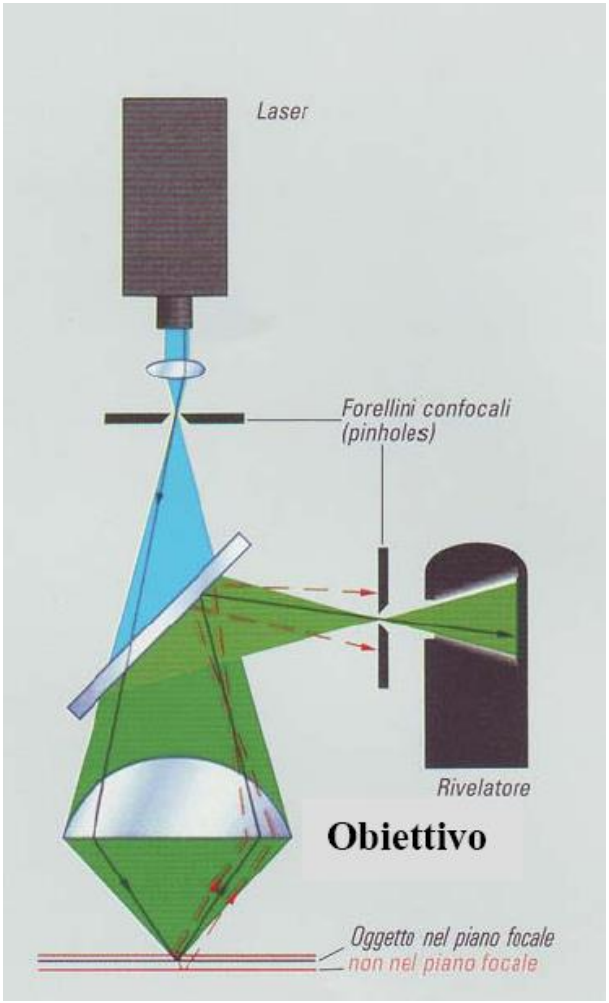



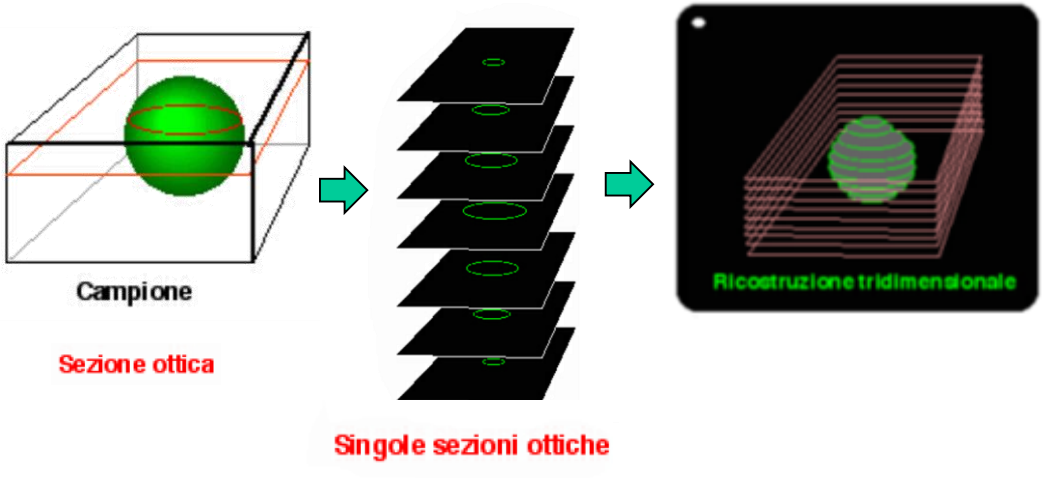

Size comparison:
(A) conventional BSA-stabilized colloidal gold-IgG probe, vs.
(B) Nanogold-Fab' probe

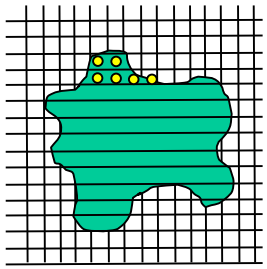


# Metodo fluorimetrico: Laser Scanning Confocal Microscopy

- Il **Microscopio confocale** è uno strumento che accresce la risoluzione spaziale del campione, eliminando gli aloni dovuti alla luce diffusa dai piani fuori fuoco del preparato.
- Il tipo più diffuso è il *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM), un microscopio a fluorescenza che permette di focalizzare con estrema precisione un laser sul preparato.
- Lo strumento è costituito da un normale microscopio a trasmissione che rileva l'immagine di un campione illuminato con una scansione punto a punto.

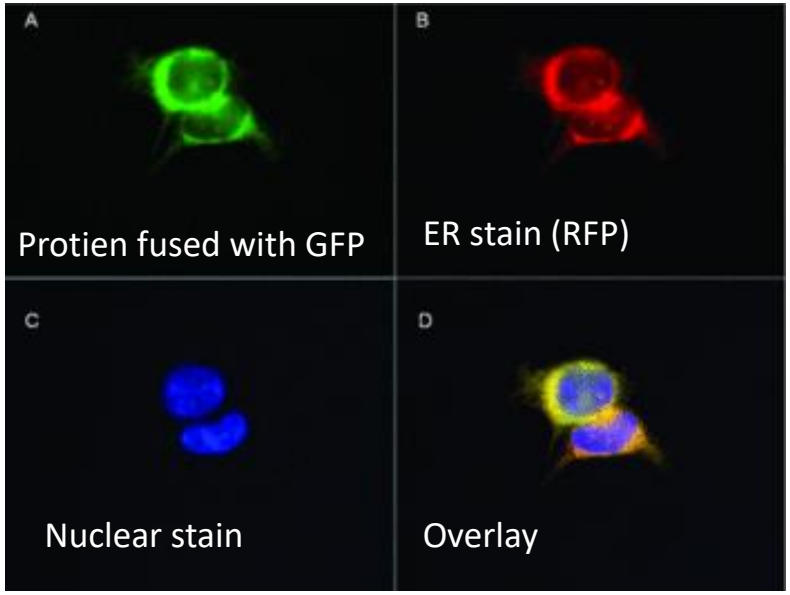


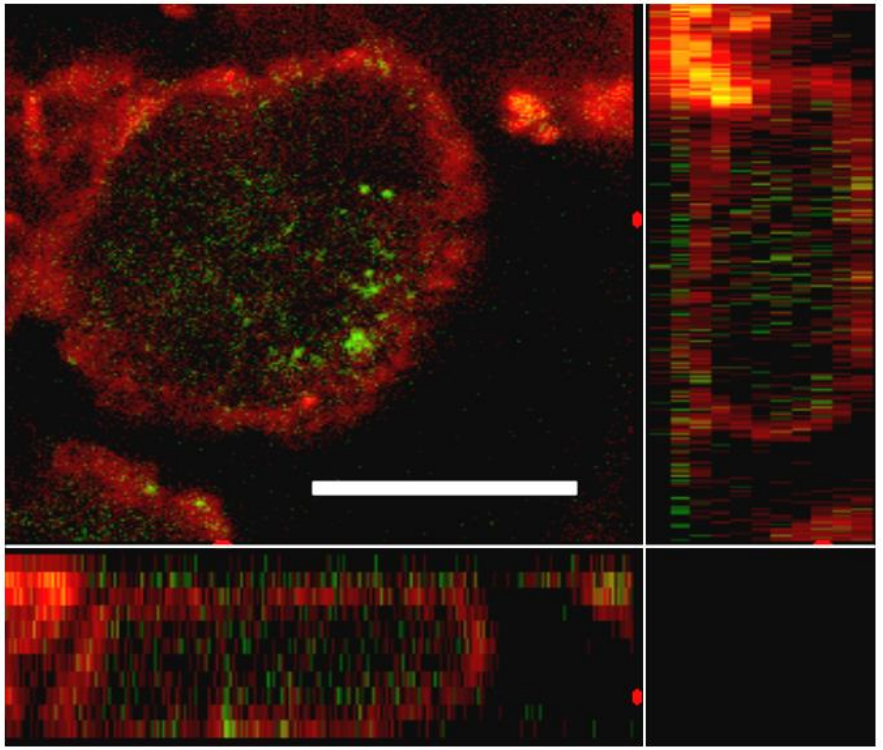



# Metodo fluorimetrico: Microscopia confocale

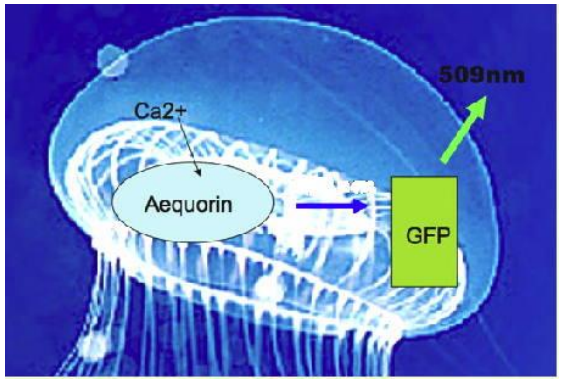
Cellula
- fissata (morta) → staining
- viva (adesa o "time lapse" ) → stain

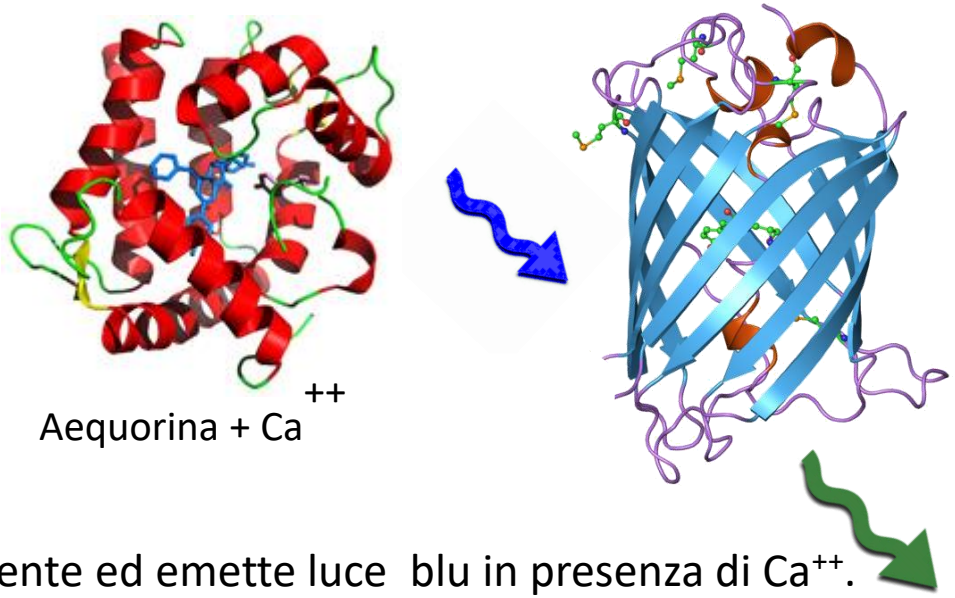


# Green fluorescent protein – localizzazione di proteine di fusione

- La **GFP** è una proteina espressa in una medusa bioluminiscente .
- Emette fluorescenza di colore verde acceso, è di modeste dimensioni, ed è possibile modificare entro certi limiti le caratteristiche spettroscopiche.

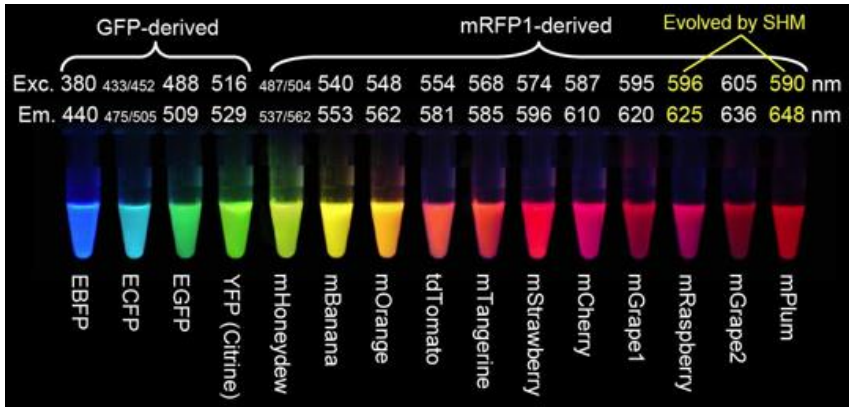


Aequorina + $Ca^{++}$

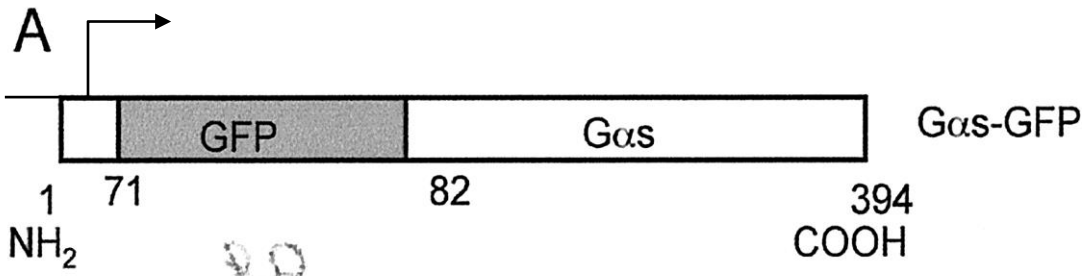
- Nella medusa ***Aequorea victoria***
  la proteina aequorina è luminiscente ed emette luce blu in presenza di $Ca^{++}$.
  Se è presente GFP, trasferisce l'energia a questa, che emette nel verde

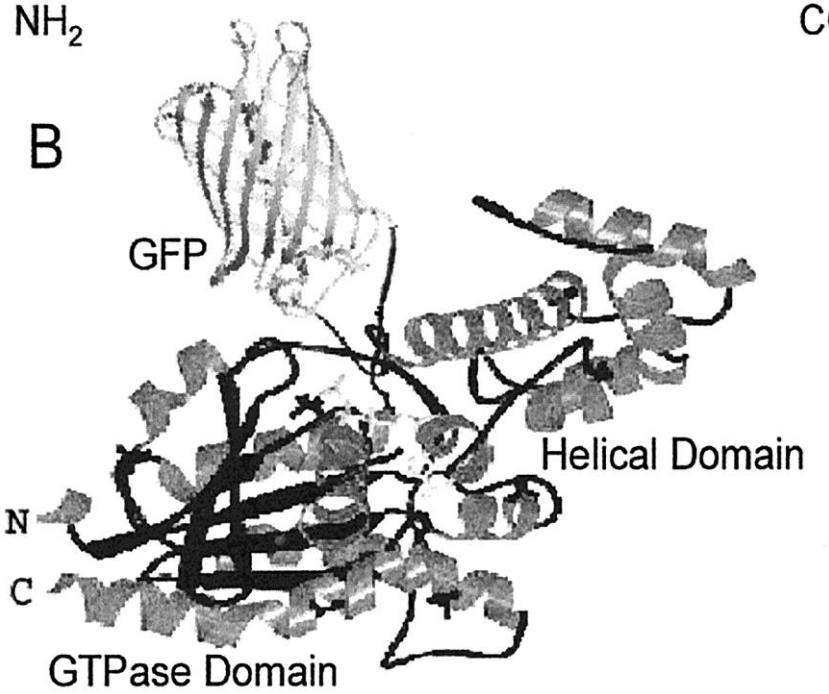
- Le forme di GFP modificate sono in grado di assorbire e emettere nel giallo, blu e turchese. Varianti di altri organismi sono state ingegnerizzate per emettere nel rosso.



# GFP – fluorescent protein tag

- GFP è usata in biologia molecolare per verificare l'espressione di geni, anche in animali transgenici
- Se fusa ad una proteina di interesse, e trasfettata in una cellula, può aiutare a determinare dove la proteina di fusione si localizza nella cellula.

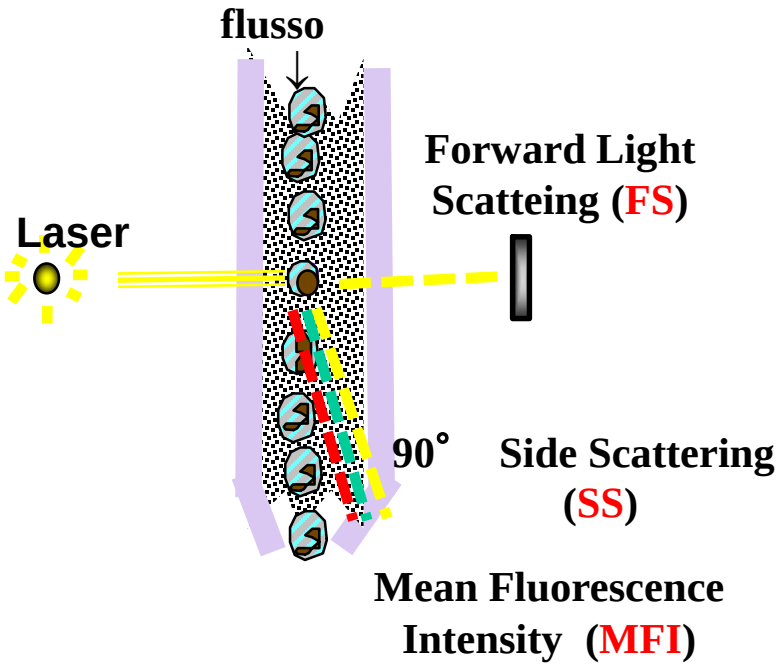



https://www.youtube.com/watch?v=Q3FvqZB2Wmg

# Analisi dei recettori *in cellula* - Flow Cytometry

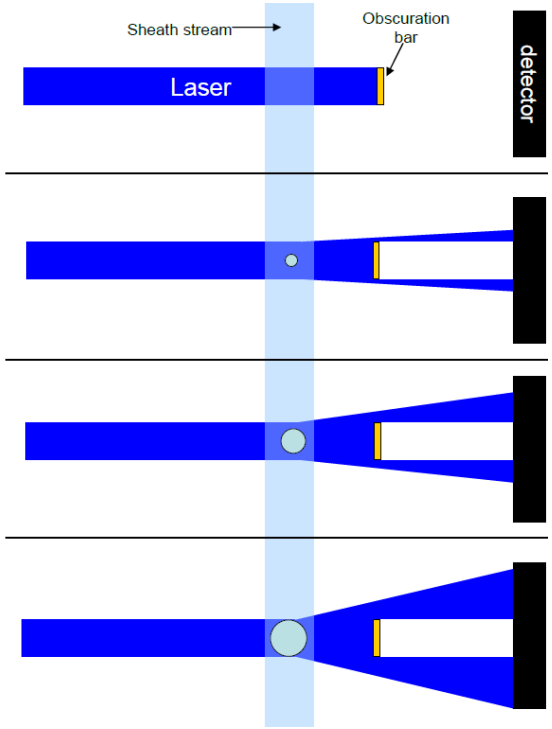
- **Flow Cytometry** _ determina le proprietà di una cellula in un flusso
- **Metodo** - le cellule sono in suspensione
  - fluiscono in sequenza per un volume illuminato, dove vanno incontro a *i)* **scattering** e *ii)* **fluorescenza**
  - lo scattering e la fluorescenza sono convertiti in segnali digitali



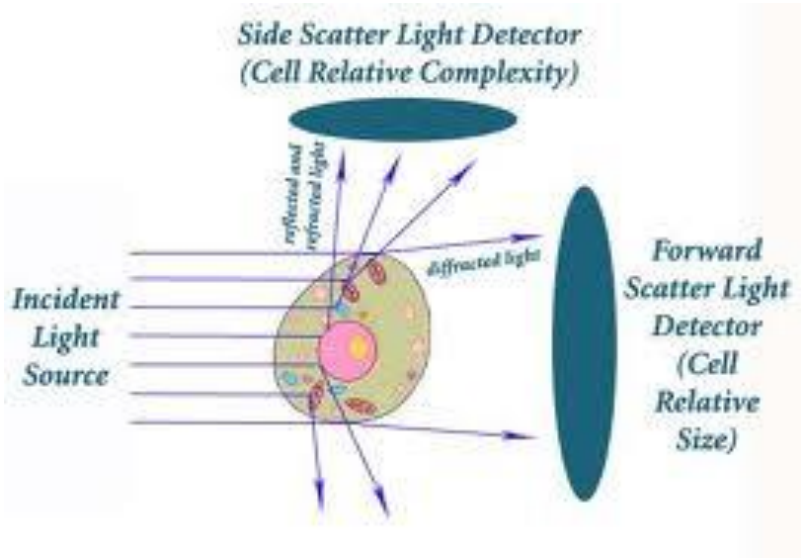

- FS correla con il volume cellulare
- SS dipende dalla complessita interna della particella (forma del nucleo, tipo di granuli citoplasmatici, ruvidità della membrana) poichè la luce è deflessa da queste strutture.
- La fluorescenza (MFI) dipende dalla presenza di interattori specific per le sonde fluorescenti utilizzate (es. coloranti specifici, anticorpi marcati, ligandi marcati, ecc.)

- **Flow Sorting –** saparazione delle cellule in base alle loro proprietà (Fluorescence-activated cell sorting or FACS)

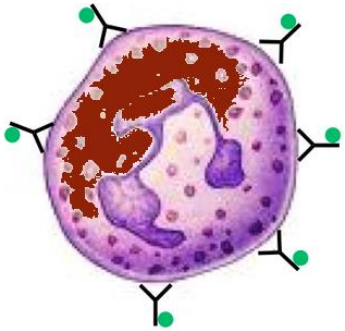
## Forward scatter



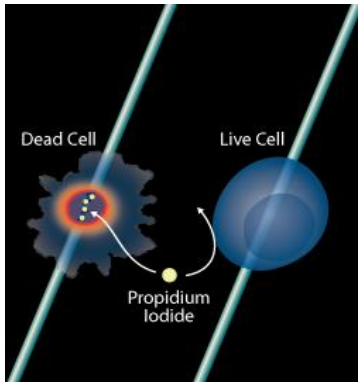

## Side scatter

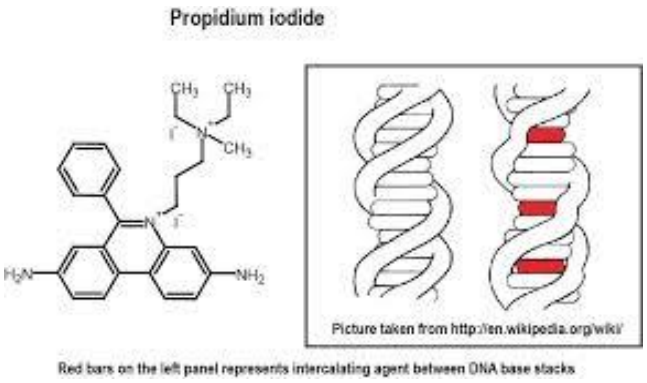



## Mean flourescence intensity (MFI)



**Immunoflourescence (live cell)**

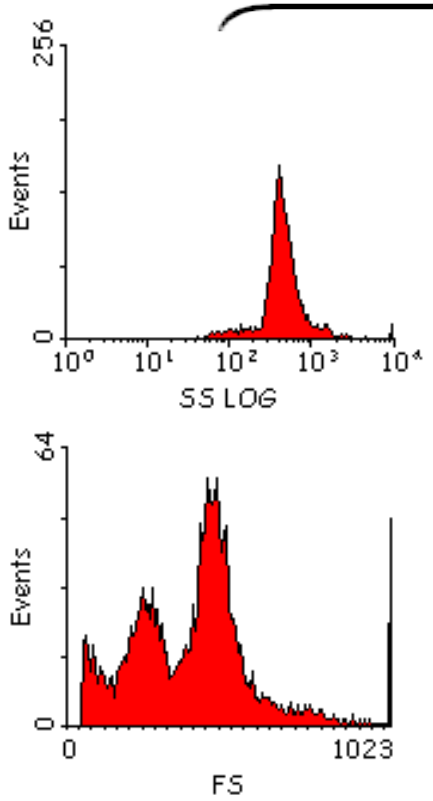


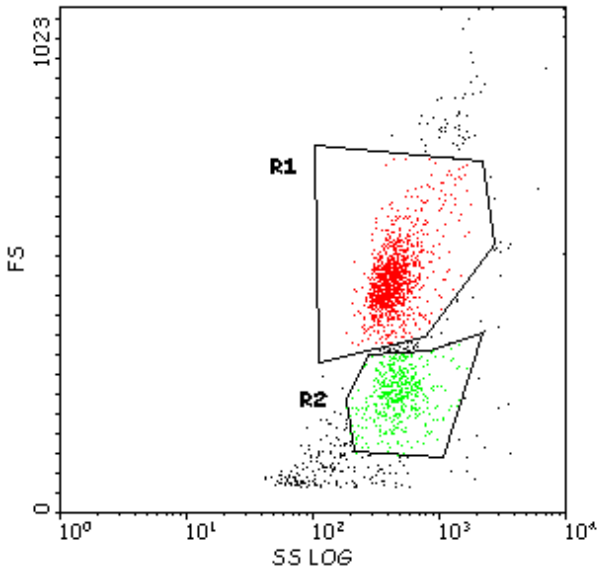




**Propidium iodide fluoresescence (damaged cell)**

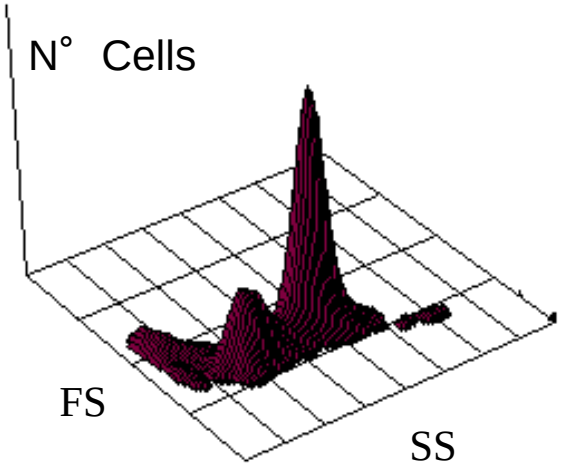
# Analisi della morfologia e tipo cellulare

**morfologia**




**morfologia & caratteristiche**

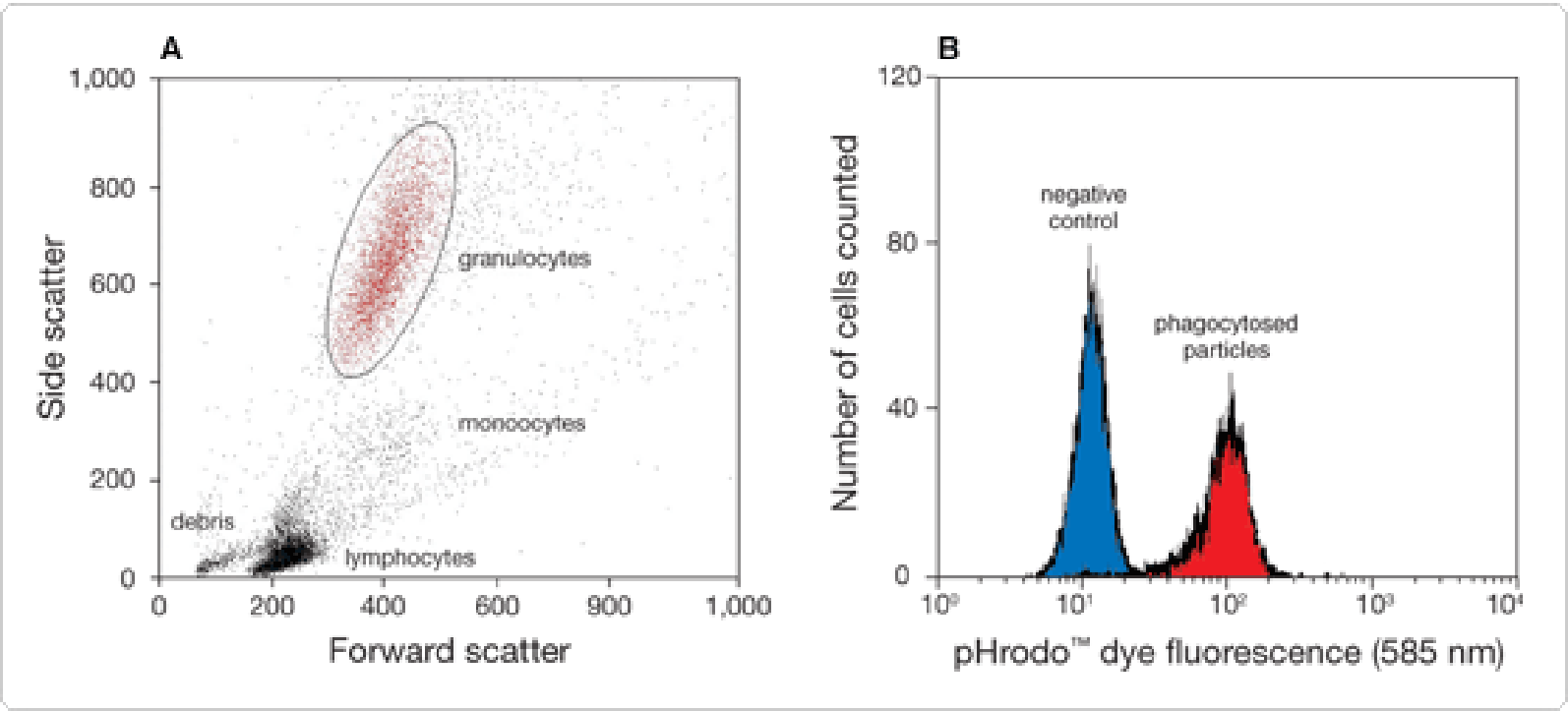



**Segnale monoparametrico**

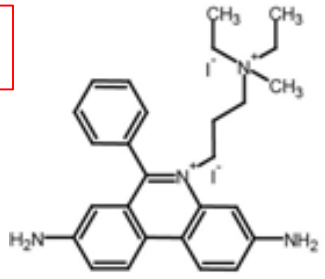
**Segnale biparametrico**

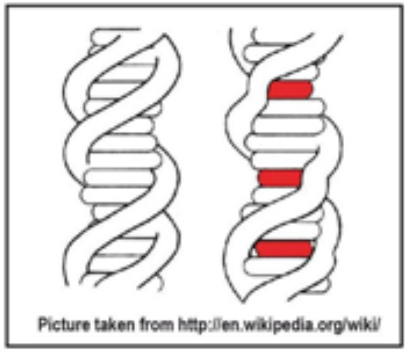
**Segnale triparametrico**

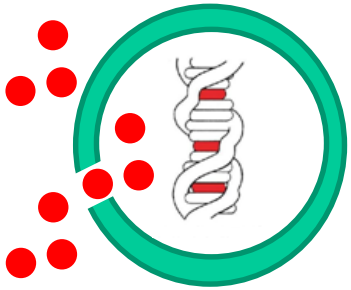
# Analisi della morfologia e tipo cellulare



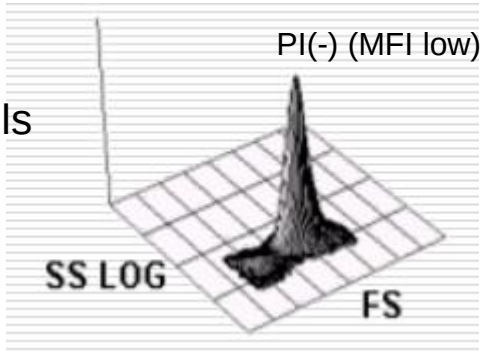
# Analisi della citotossicità

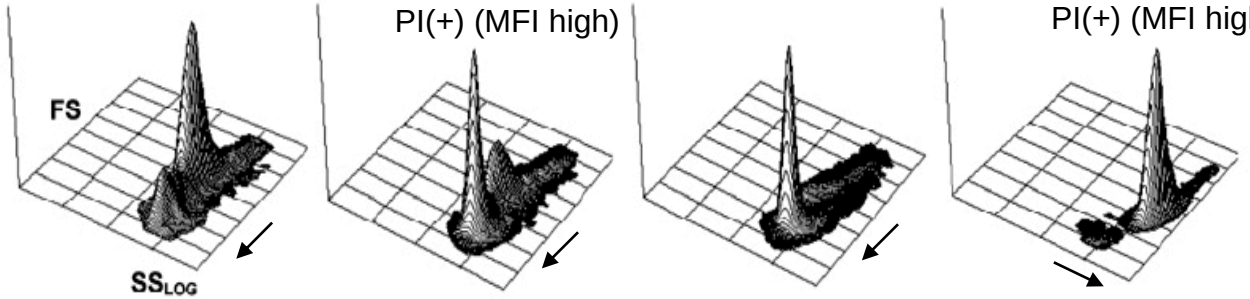


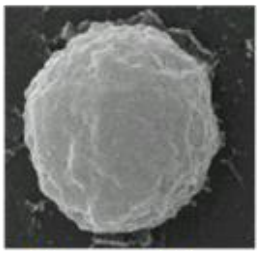



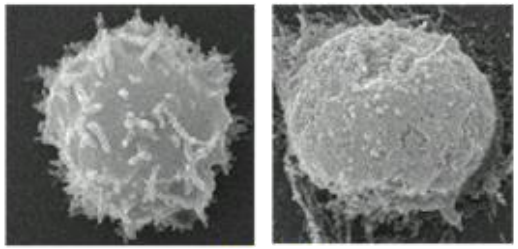
T cells



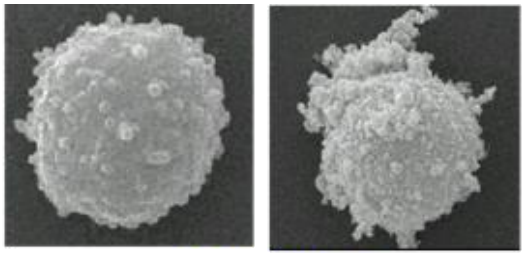



No peptide

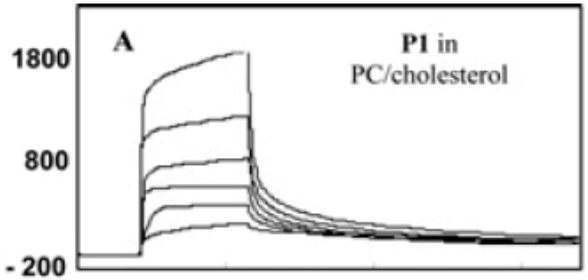


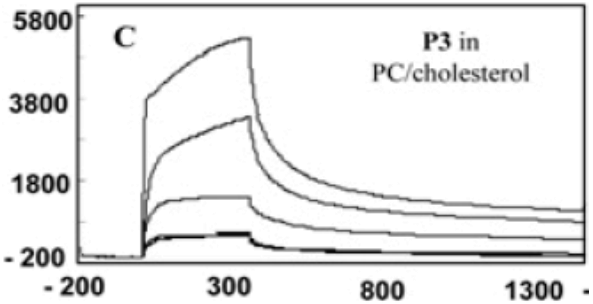
10 μM P19(8) 40 μM



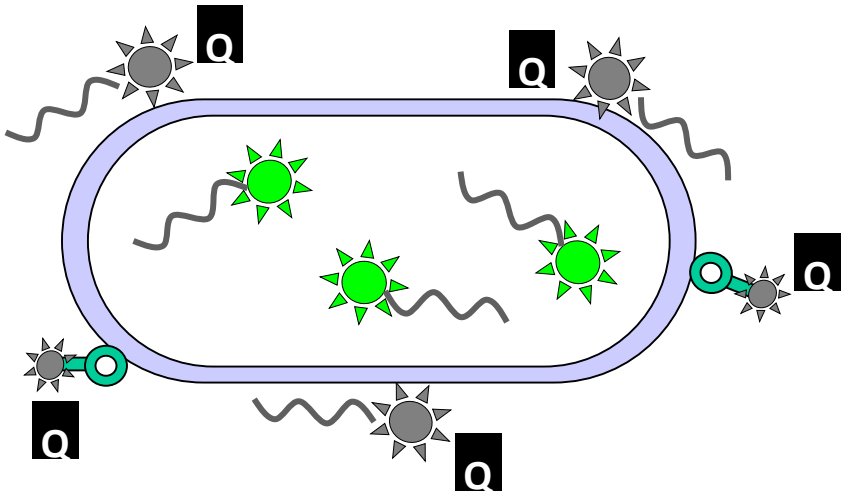
1 μM P19(5|B²c) 10 μM

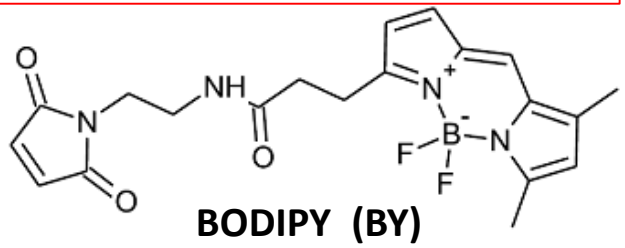
PC/cholesterol membrane



# Analisi della penetrazione in cellule batteriche




BODIPY (BY)

= BODIPY-labelled peptide

Q = quencher (trypan blue)

= *BODIPY-labelled polymyxin B)*