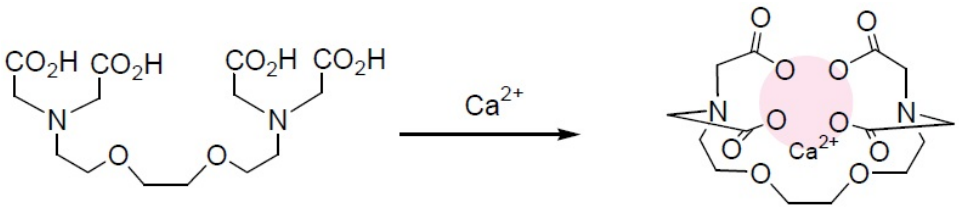
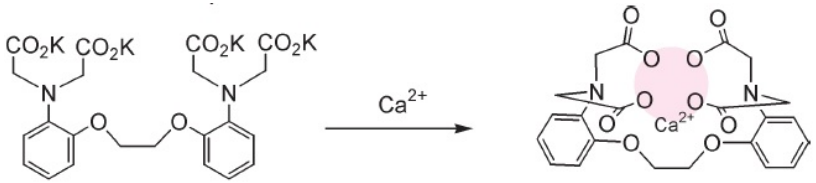
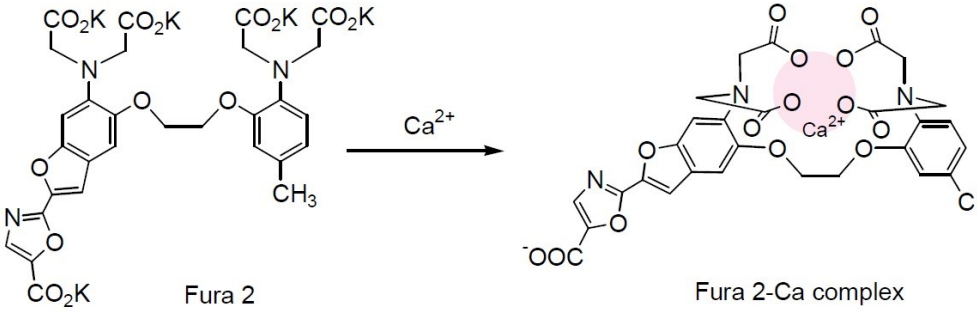
indicatori fluorescenti per Ca^{2+}

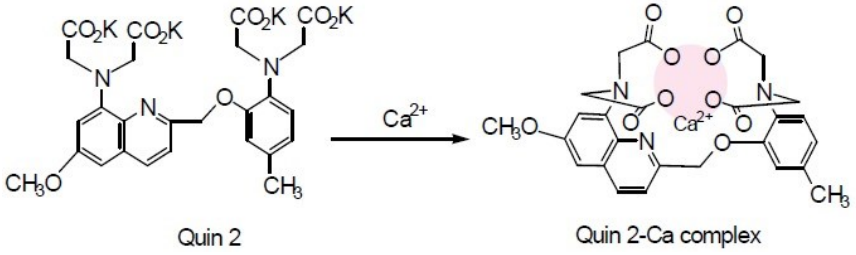


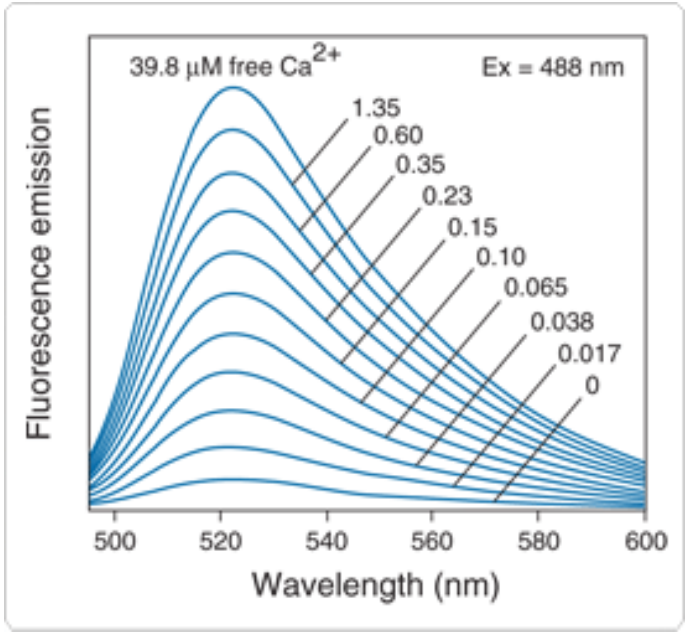
EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid)

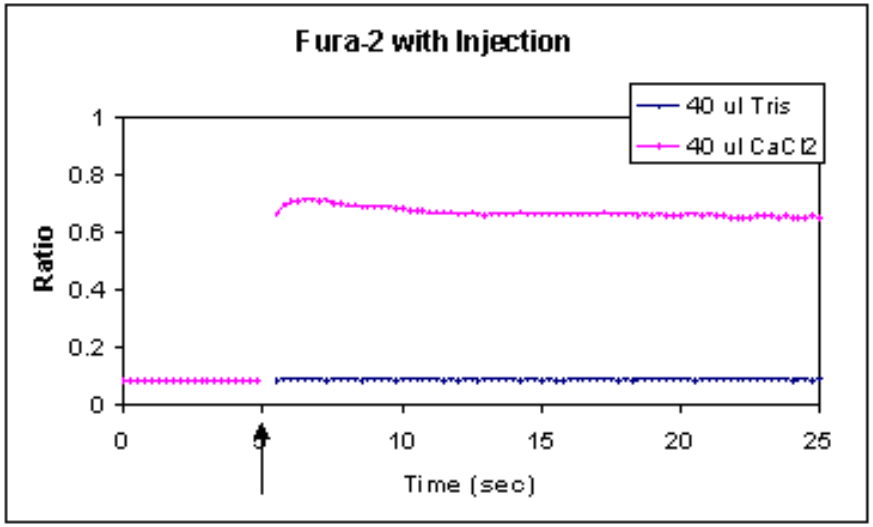


BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)





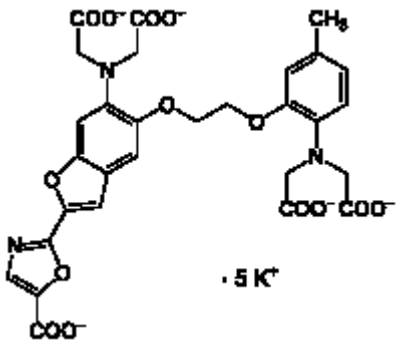




Criteri per la selezione degli indicatori del calcio intracellulare

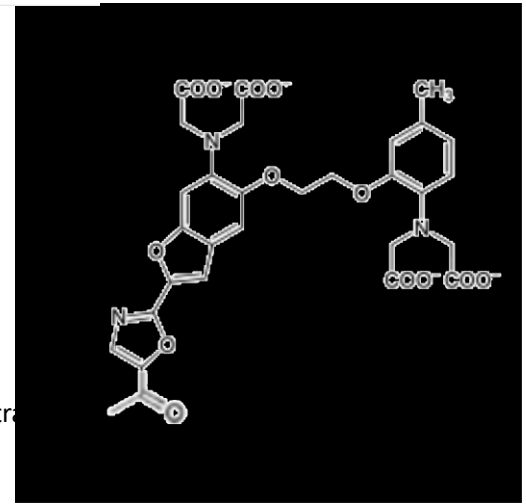
- Affinità per il Ca^{2+} (K_D) - 0.1 a 10 volte la [Ca] da misurare
  - più basso per calcio citoplasmatico (0.2 – 5 μM nella cellula)
- Caratteristiche spettroscopiche (λ eccitazione, emissione, intensità)
- Caratteristiche chimico-fisiche
  - sonde saline o coniugate a destrano (idrofiliche) devono essere introdotte nella cellula (micro-iniezione, eletroporazione ecc.)
  - sonde idrofobiche penetrano la membrana (alcossimetilesteri rimossi da esterasi intracellulari).

Indicator	Excitation (nm)	Emission (nm)	K_d (nM)
Fura-2	340/380	505	145
Indo-1	346	475/405	230
Fluo-4	488	520	345
Fluo-8	490	520	390
Fluo-5	494	516	2300
Rhod-2	552	581	570

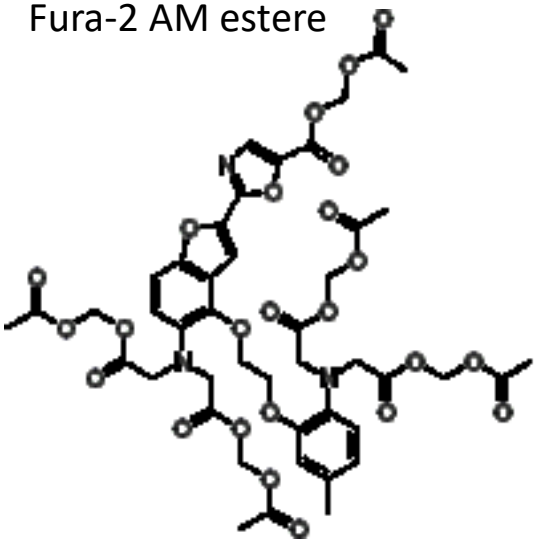


Fura-2 sale potassio

Destra



Fura-2 AM estere



Metodi per analizzare la fluorescenza intracellulare

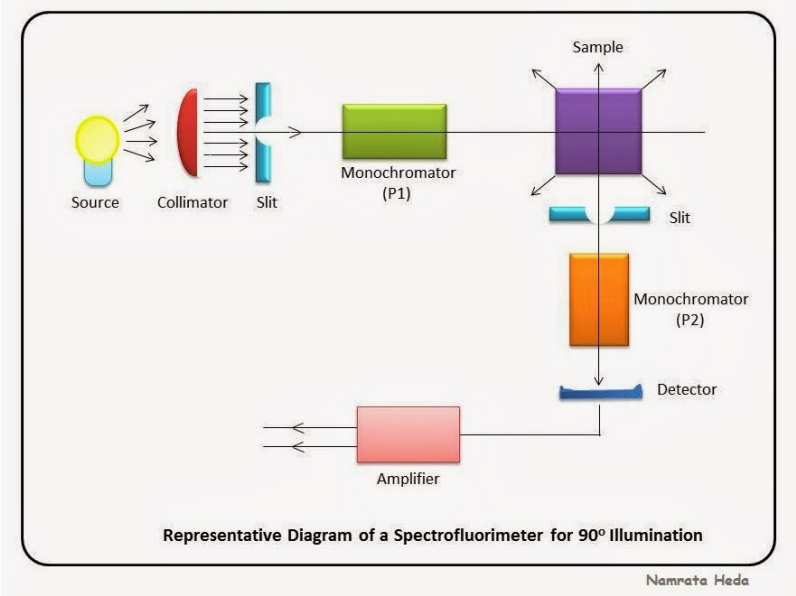
- **La spettrofluorimetria**

Vantaggi

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

Svantaggi

1) *adatta solo alle cellule in sospensione*
2) *media dei singoli eventi (si visualizza una popolazioni di cellule)*
3) *poco sensibile - necessità di usare molte cellule*



- **La videomicroscopia o videoimaging)**

Vantaggi

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

Svantaggi

1) *luce laser → 'photobleaching' e danno alla cellula*
2) *legata alla 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

cawave.mpg

Sea Urchin Fertilization - YouTube.mp4

Microscopia elettronica - Metodo classico immunochimico: immunogold labelling

Necessità di fissare e permeabilizzare la cellula (metodo distruttivo)

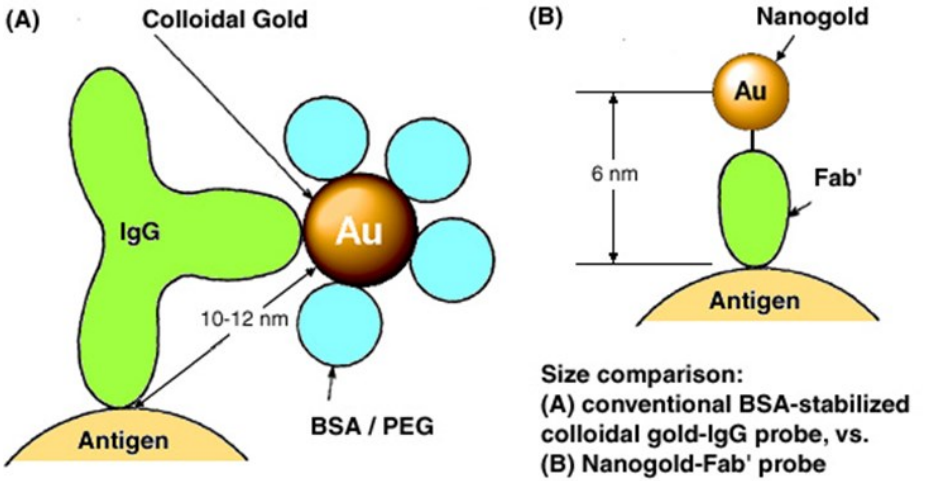
1. **fissazione/crosslinking (blocca le proteine sul posto e cellule sul vetrino)**
- trattare vetrini con poli-lisina (migliora adesione)
- aderire le cellule
- 4% paraformaldeide (crosslinking proteine)
- lavaggio con tampone PBS (+ 1% BSA)

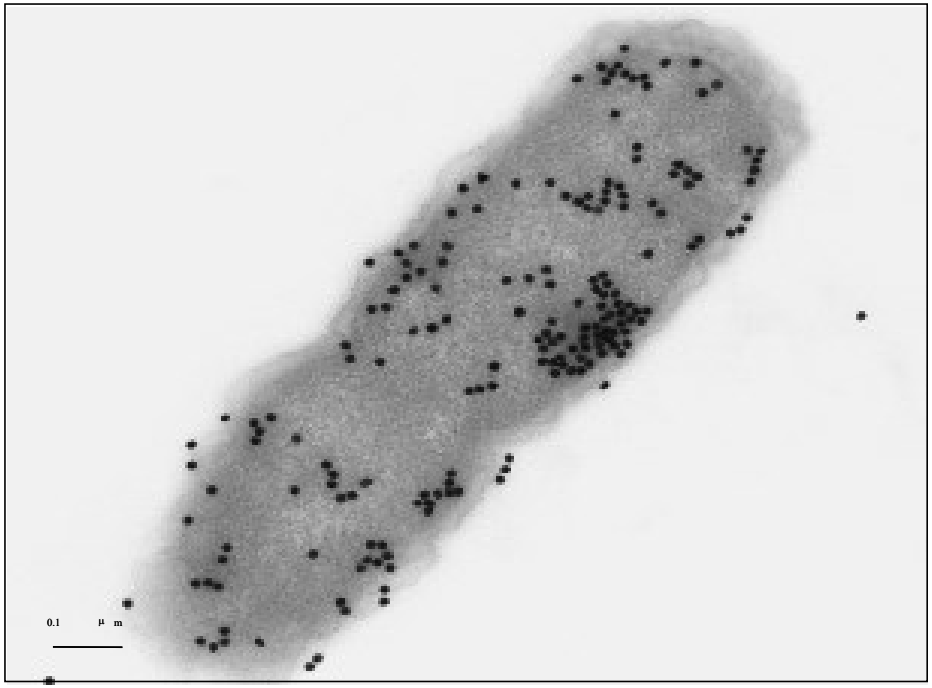
2. **fissazione/permeabilizzazione con etanolo (rende accessibili le proteine)**
- 95% EtOH, 5% CH_3COOH glaciale
- lavaggio con tampone PBS (+ 1% BSA

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

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

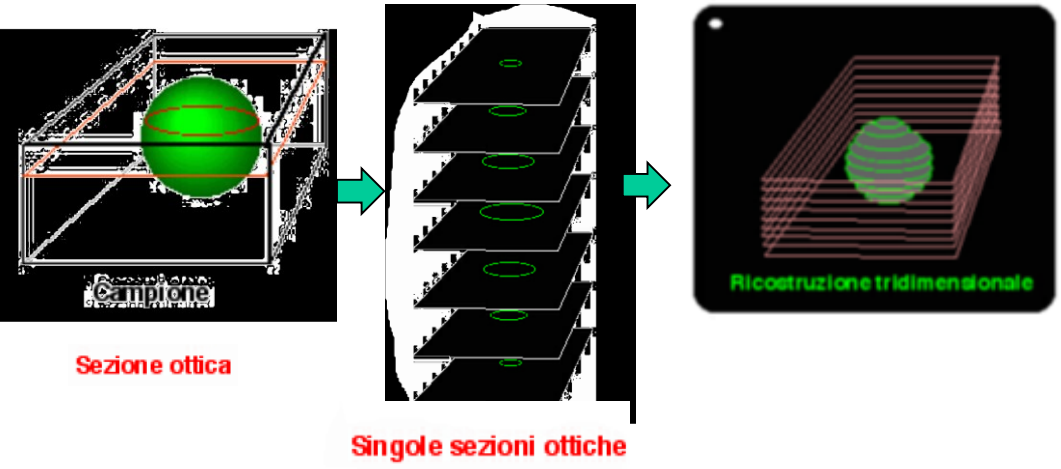
5. **Evidenziare proteine bersaglio con immunogold (usare microscopia elettronica – Au è elettrondenso)**

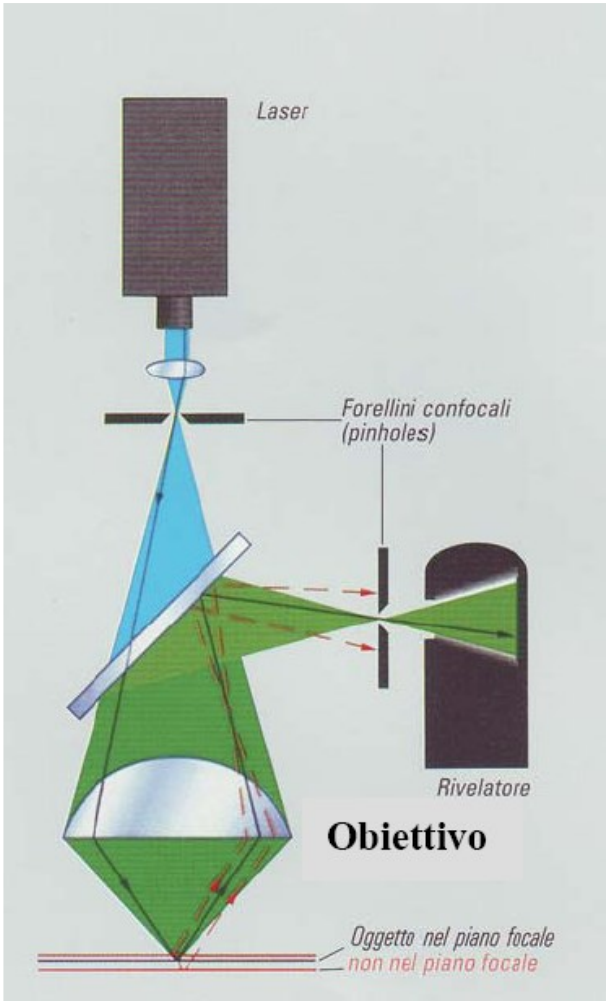


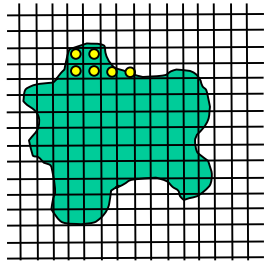


Metodo fluorimetrico: Laser Scanning Confocal Microscopy

- 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 luce laser su **piani (strati) molto fini** del 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**.

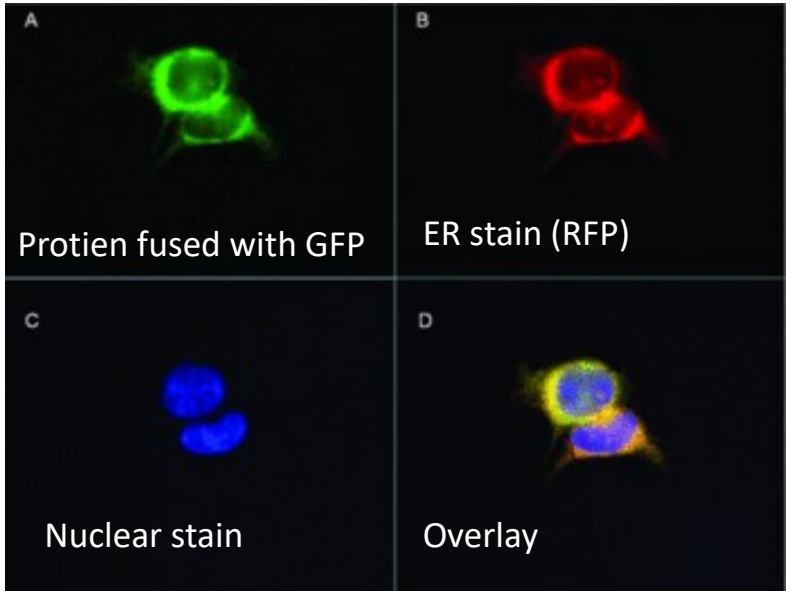


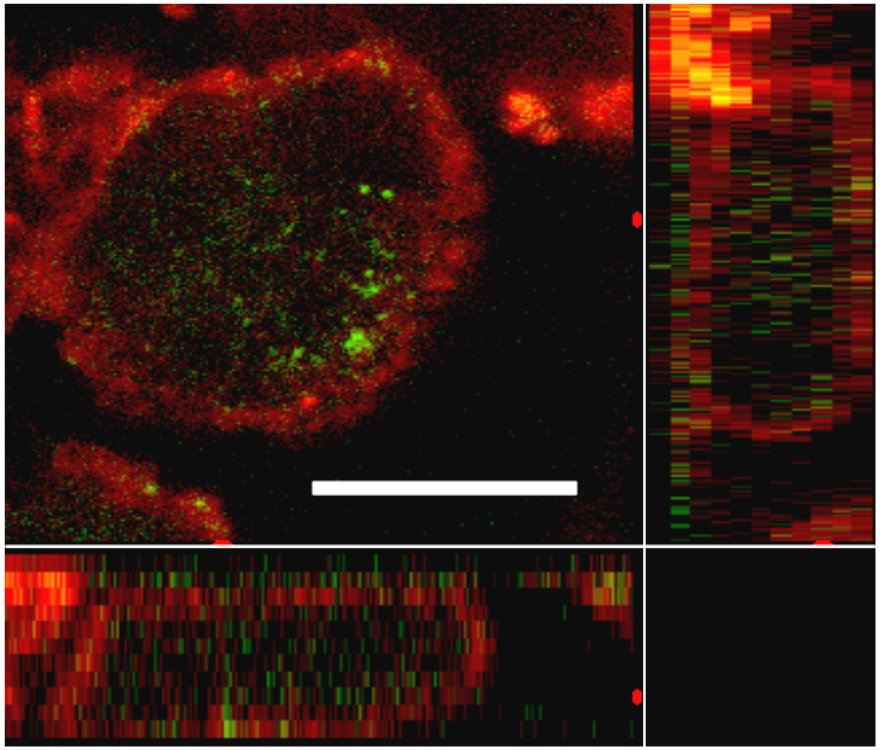




Metodo fluorimetrico: Microscopia confocale

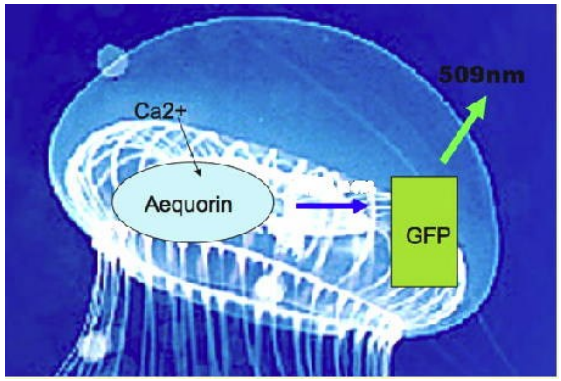
Cellula
- fissata (morta) → staining
- stained viva (adesa o in “time lapse”)

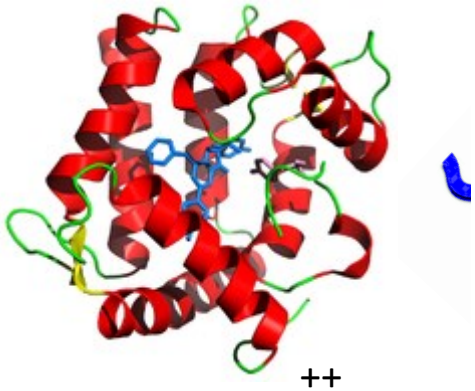




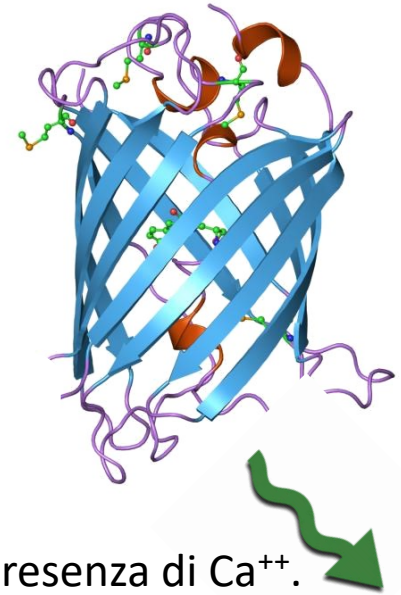
Green fluorescent protein – localizzazione di proteine di fusione

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

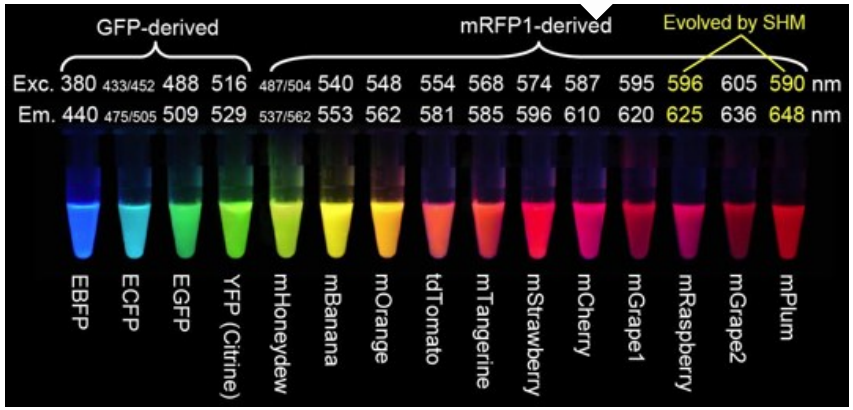




Aequorina + Ca^{++}

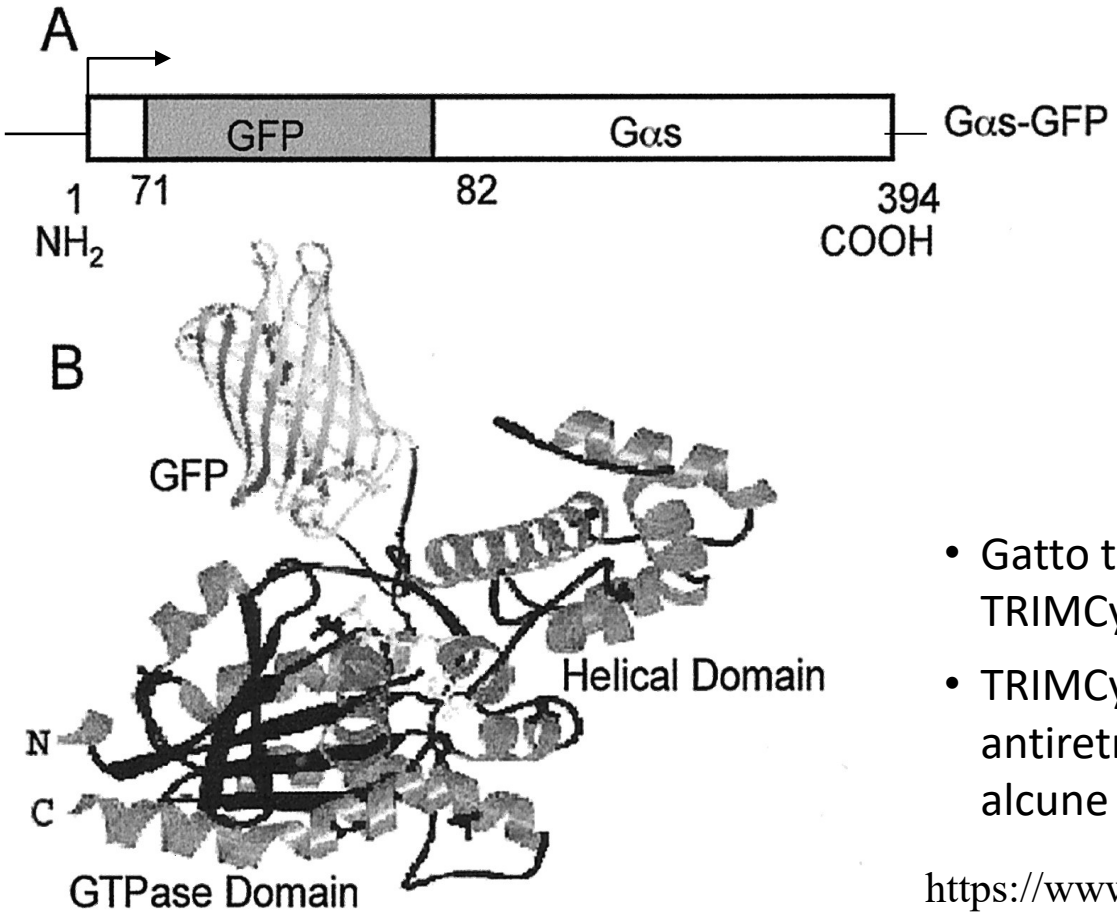


- Nella medusa ***Aequorea victoria***
  la proteina aequorina è luminiscente ed emette luce blu in presenza di Ca^{++}.
  Se è presente GFP, trasferisce l'energia a questa, che emette nel verde
- Le forme di GFP modificate sono in grado di assorbire e emettere nel giallo, blu e turchese. Varianti di altri organismi sono state ingegnerizzate per emettere nel rosso.
- Premio Nobel 2008



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.



- Gatto transgenico che esprime la proteina TRIMCyp in fusione con GFP
- TRIMCyp è un fattore di restrizione antiretrovirale che conferisce resistenza ad alcune scimmie

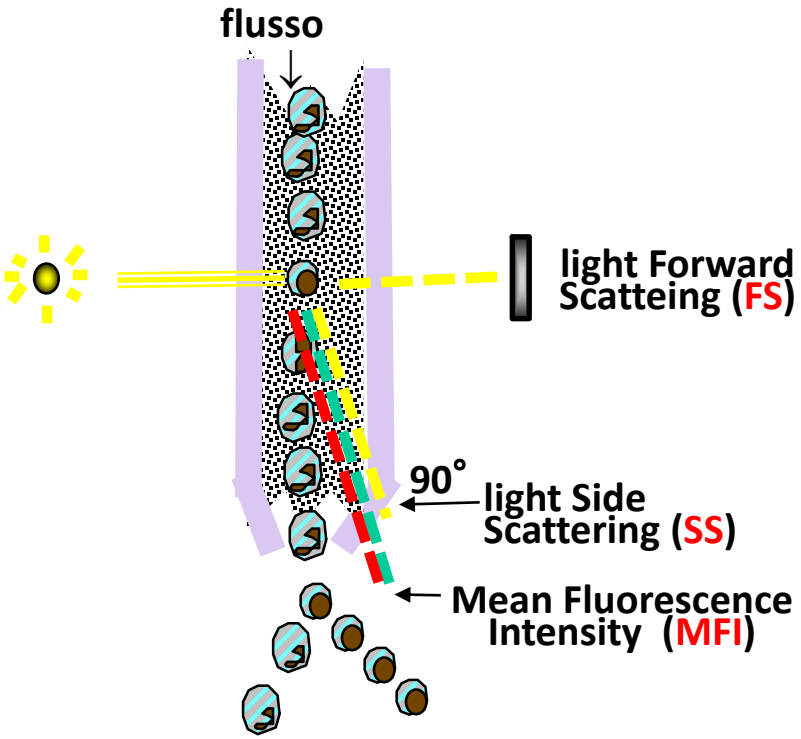
https://www.youtube.com/watch?v=Q3FvqZB2Wmg

Analisi dei recettori *in cellula* - Flow Cytometry

- **Flow Cytometry** _ determina le proprietà di una cellula in un flusso
- **Metodo** - le cellule sono in suspensione

  causando *i)* **scattering** e *ii)* **fluorescenza**

  - scattering e la fluorescenza sono convertiti in segnali digitali

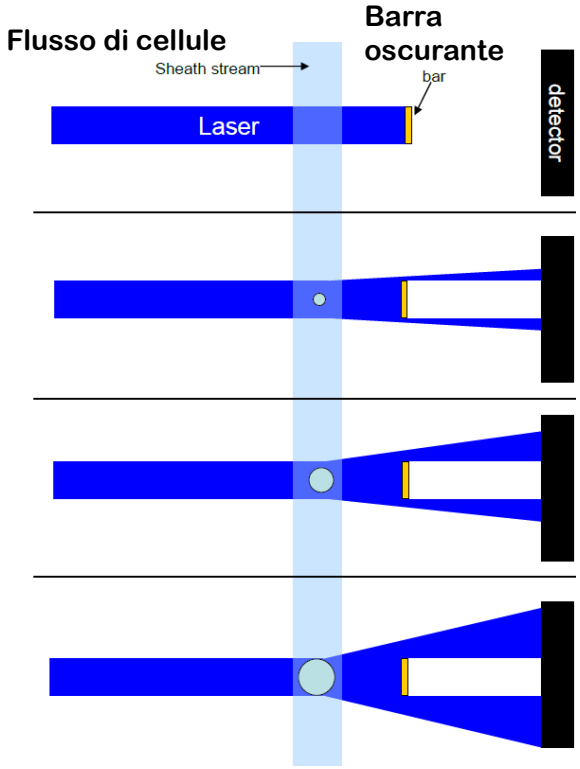


- FS correla con le dimensioni della cellula
- SS dipende dalla complessita interna della particella (forma del nucleo, tipo di granuli citoplasmatici, ruvidità della membrana) poiché la luce è deflessa da queste strutture.
- La fluorescenza (MFI) dipende dalla presenza di interattori per specifiche sonde fluorescenti (es. coloranti specifici, anticorpi marcati, ligandi marcati, GFP ecc.)
- Il metodo può raccogliere FS, SS, e MFI di diverse sonde (colori) contemporaneamente

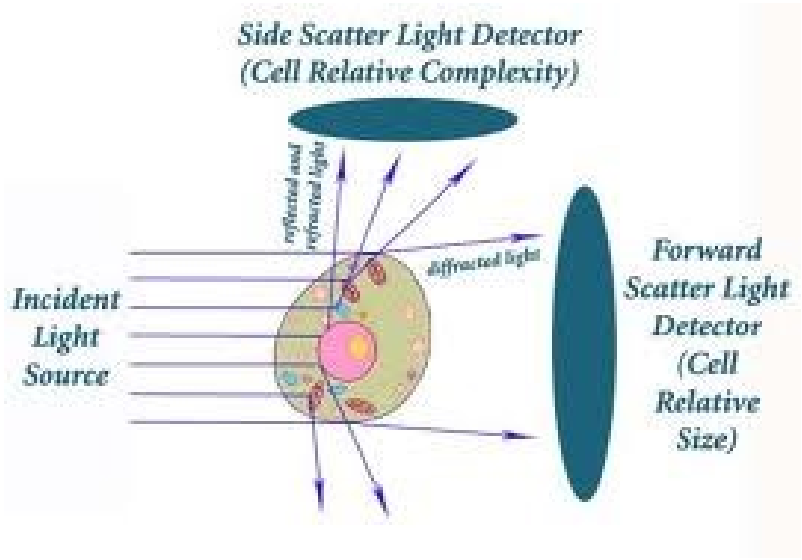
- **Flow Sorting –** saparazione delle cellule in base alle loro proprietà

  (Fluorescence-activated cell sorting or FACS)

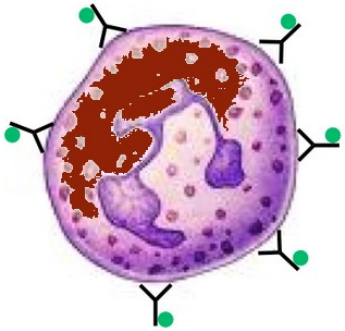
Forward scatter (FS)



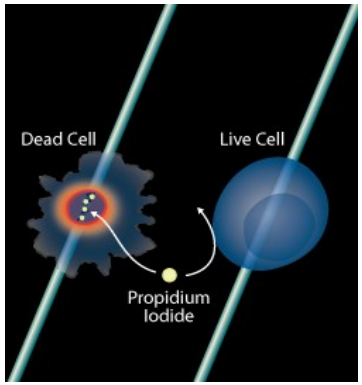
Side scatter (SS)

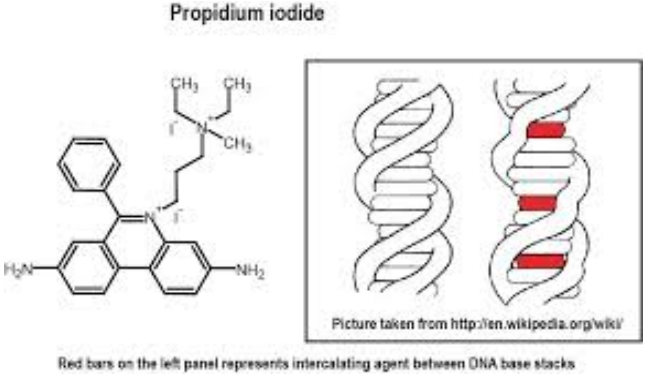


Mean flourescence intensity (MFI)



Live/dead → % Positive Cells (PI+)

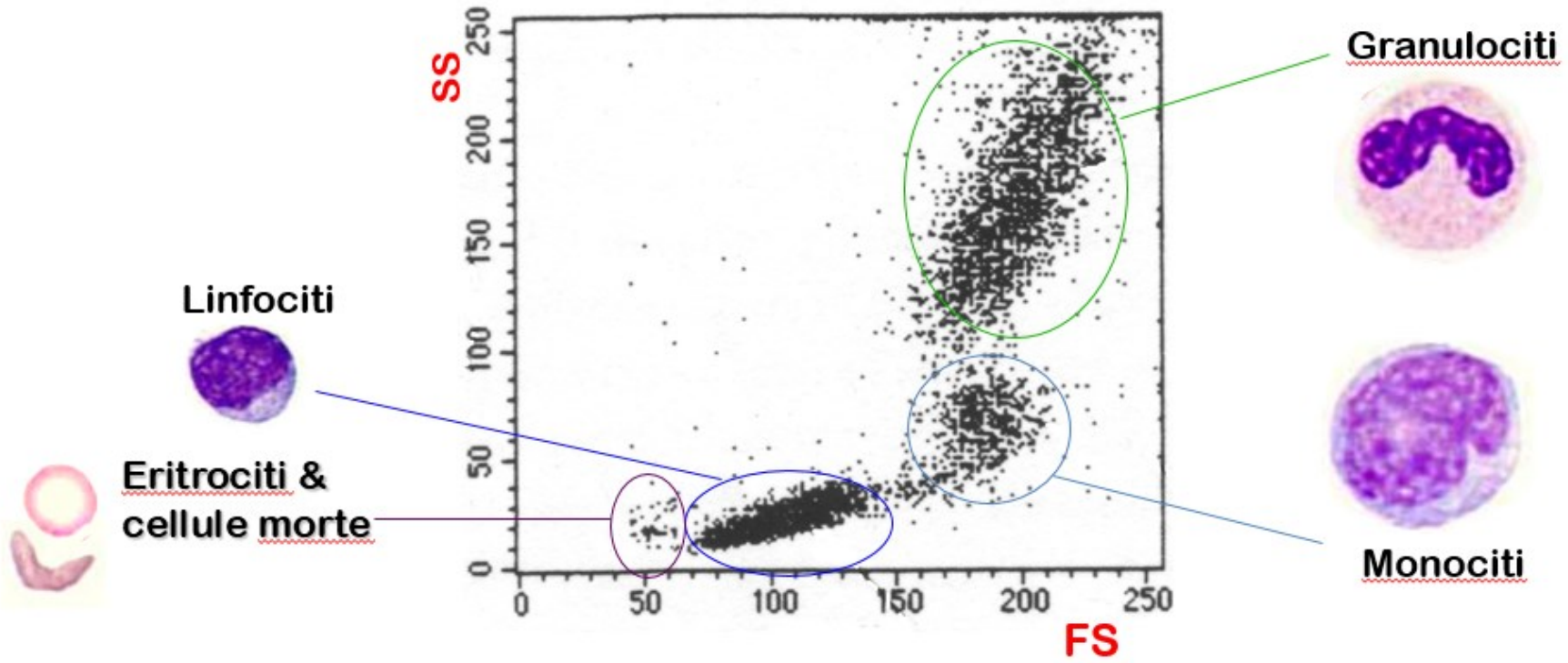




Immunoflourescence (live cell)

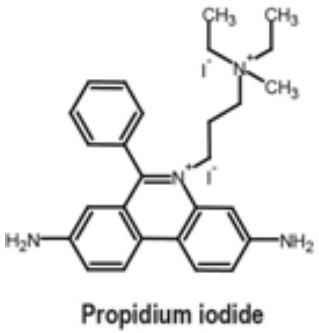
Propidium iodide fluoresescence (damaged cell)

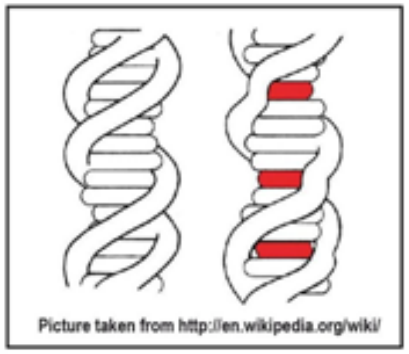
Analisi della morfologia, tipo cellulare e danno alla membrana

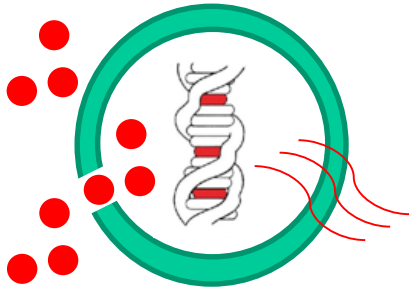


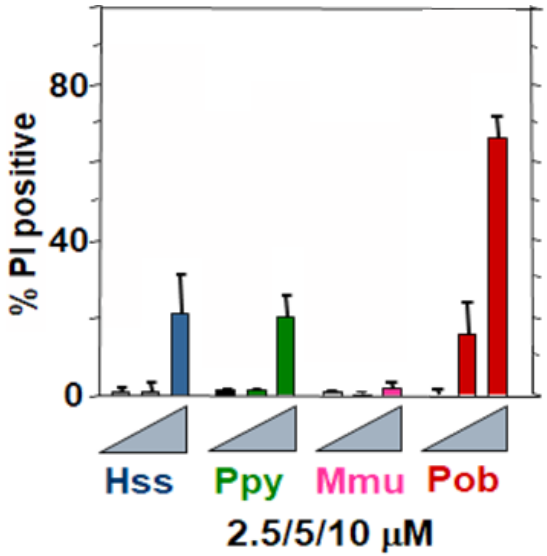
Analisi del danno alla membrana cellulare

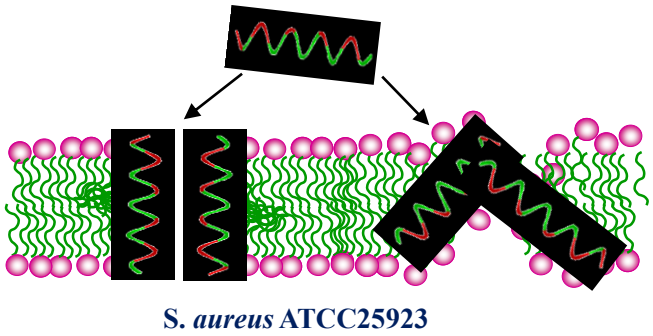
Propidio ioduro come sonda fluorescente

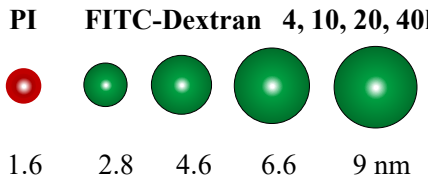


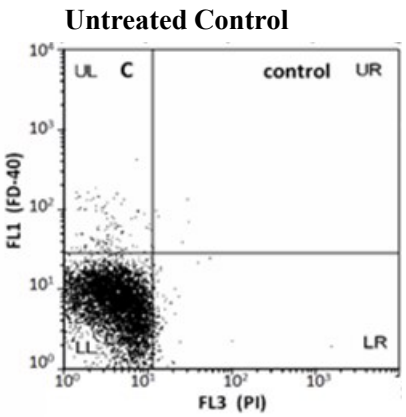


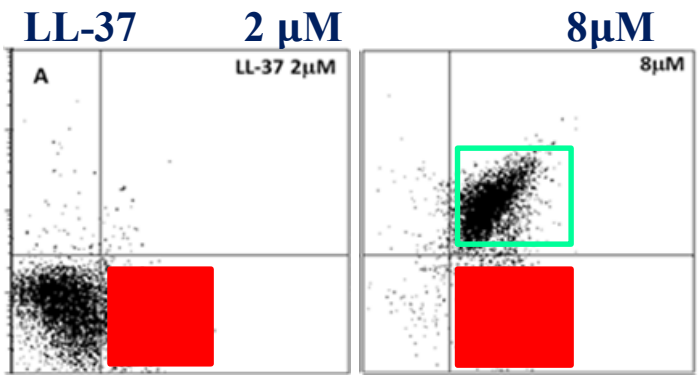






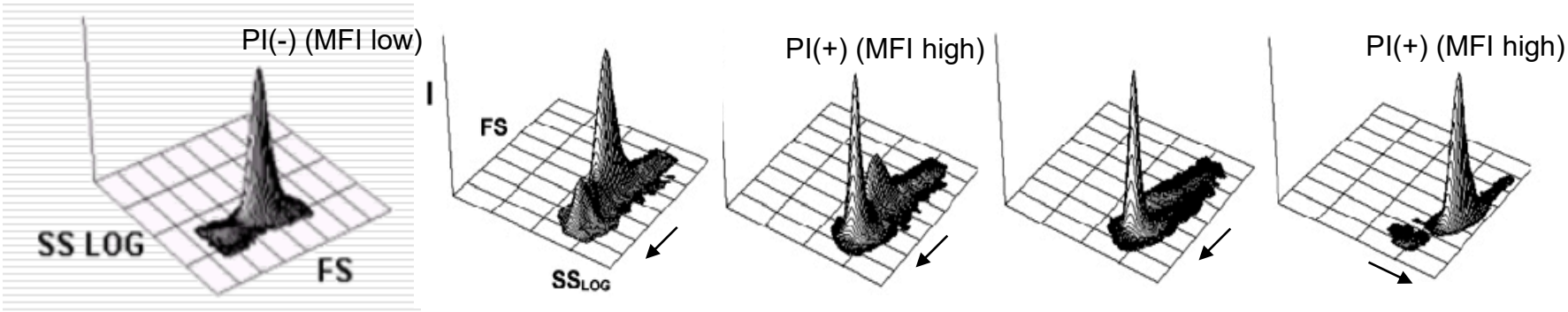




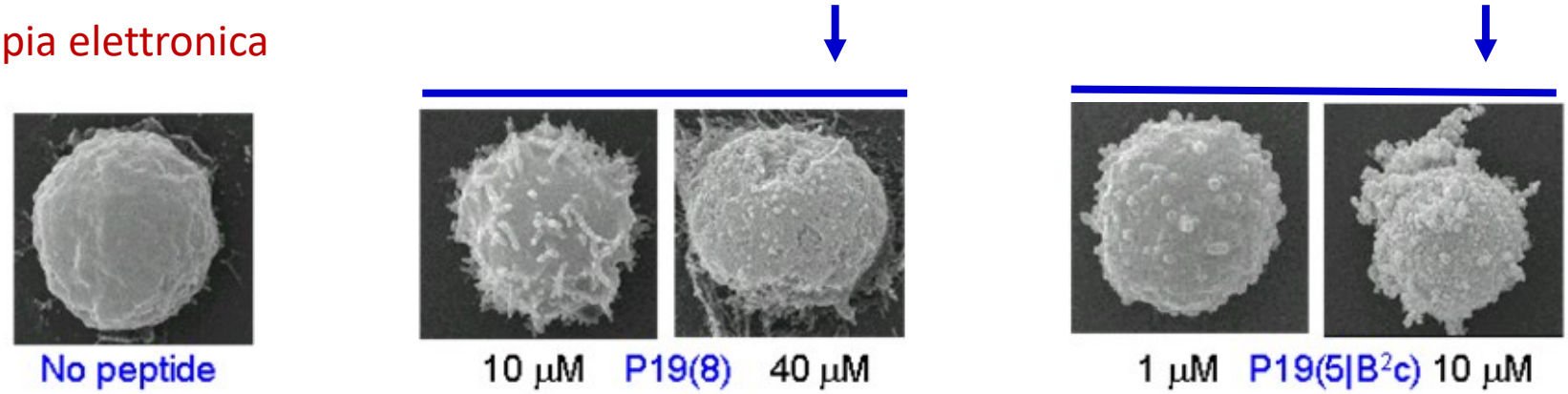


Analisi del danno alla membrana cellulare effetti morfologici

Citometria con PI – analisi biparametrica

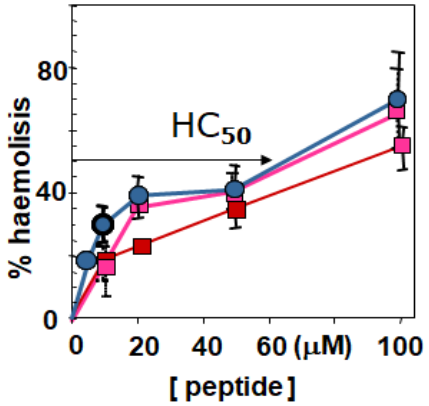


Microscopia elettronica

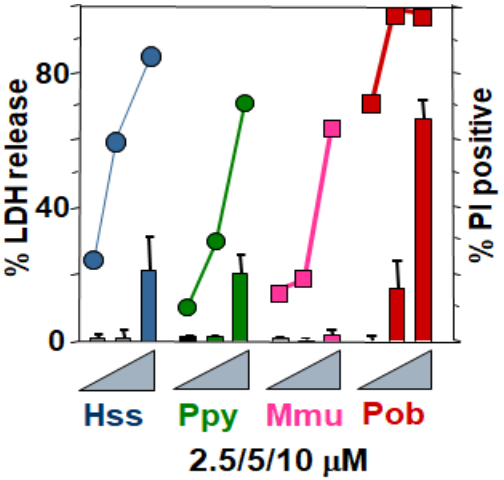


Cytotoxicity assays on host cells

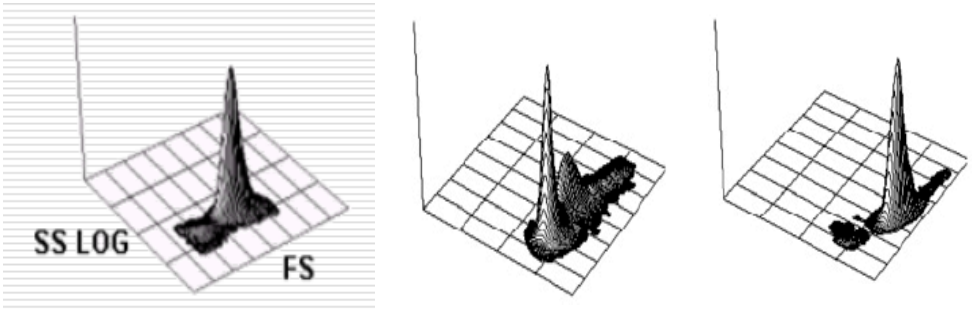
- haemolysis assay
  - not very precise – condition dependent



- permeabilization of host cells
  - most commonly use propidium iodide (PI)
  - any cells in suspension can be used



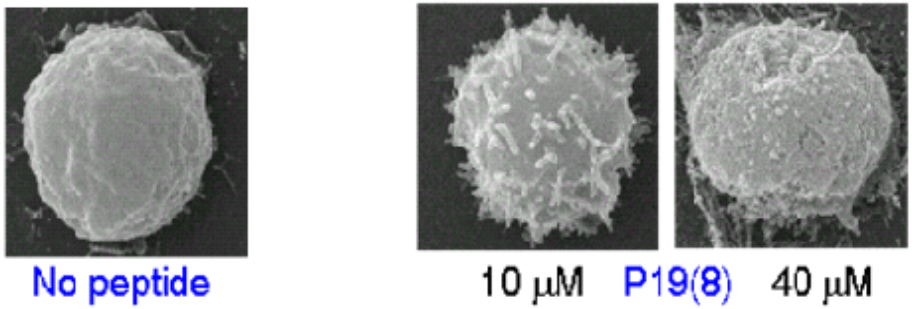
- flow cytometric analysis of morphology

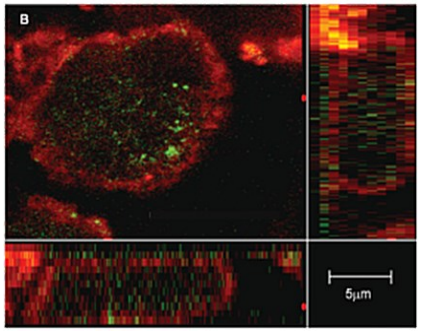


- microscopy

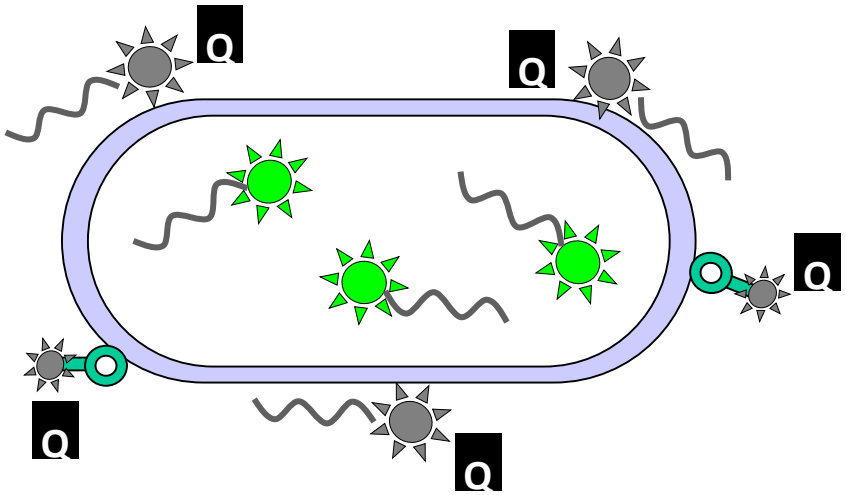
EM

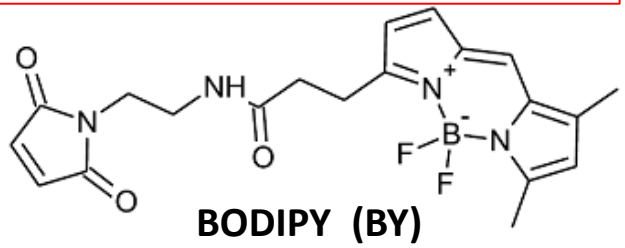
confocal





Analisi della penetrazione in cellule batteriche





BODIPY (BY)

= BODIPY-labelled peptide

Q = quencher (trypan blue)

= *BODIPY-labelled polymyxin B)*