

**Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche**

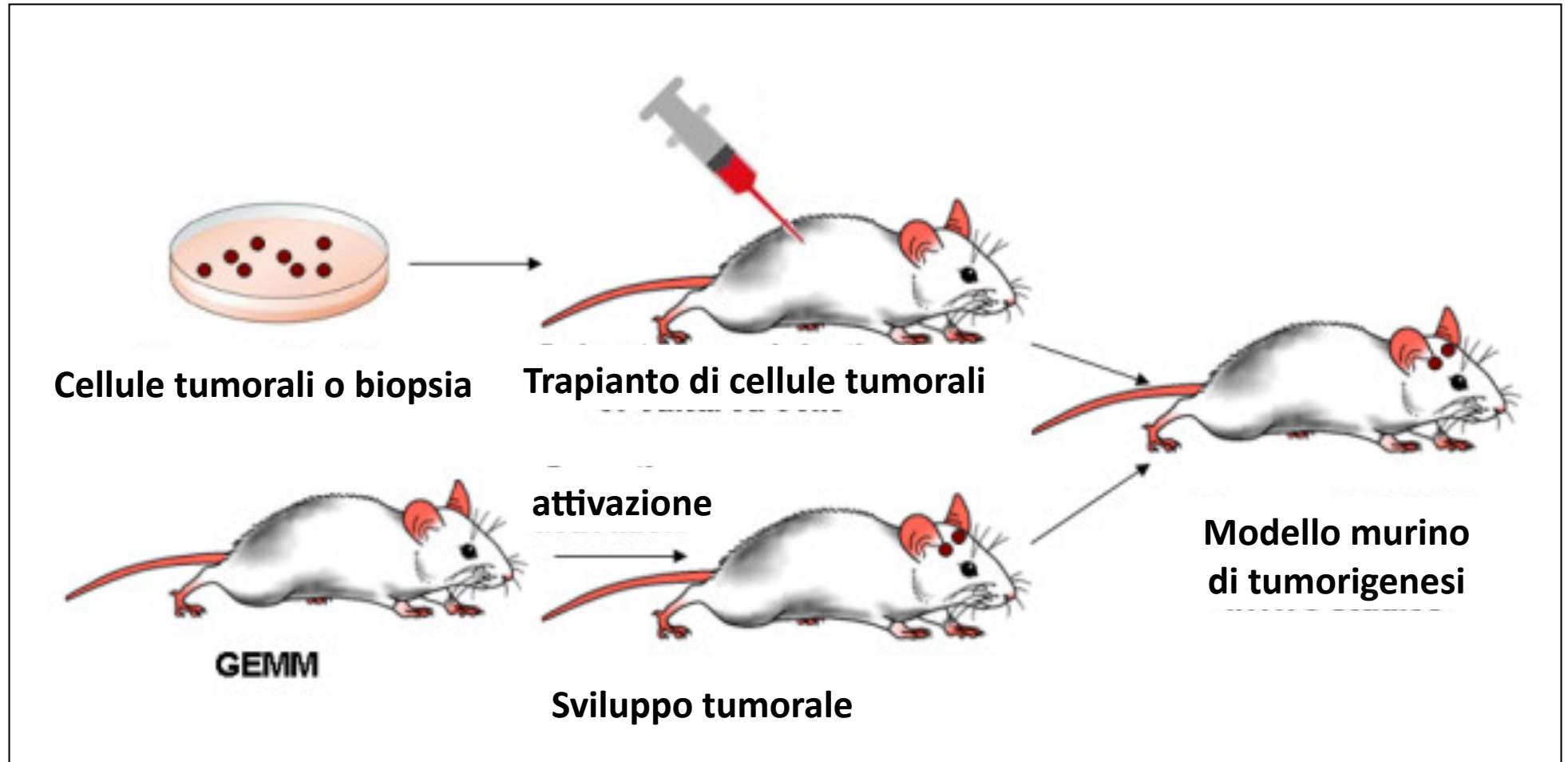
**AA 2018-2019**

**Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare**

**Lezione 12**

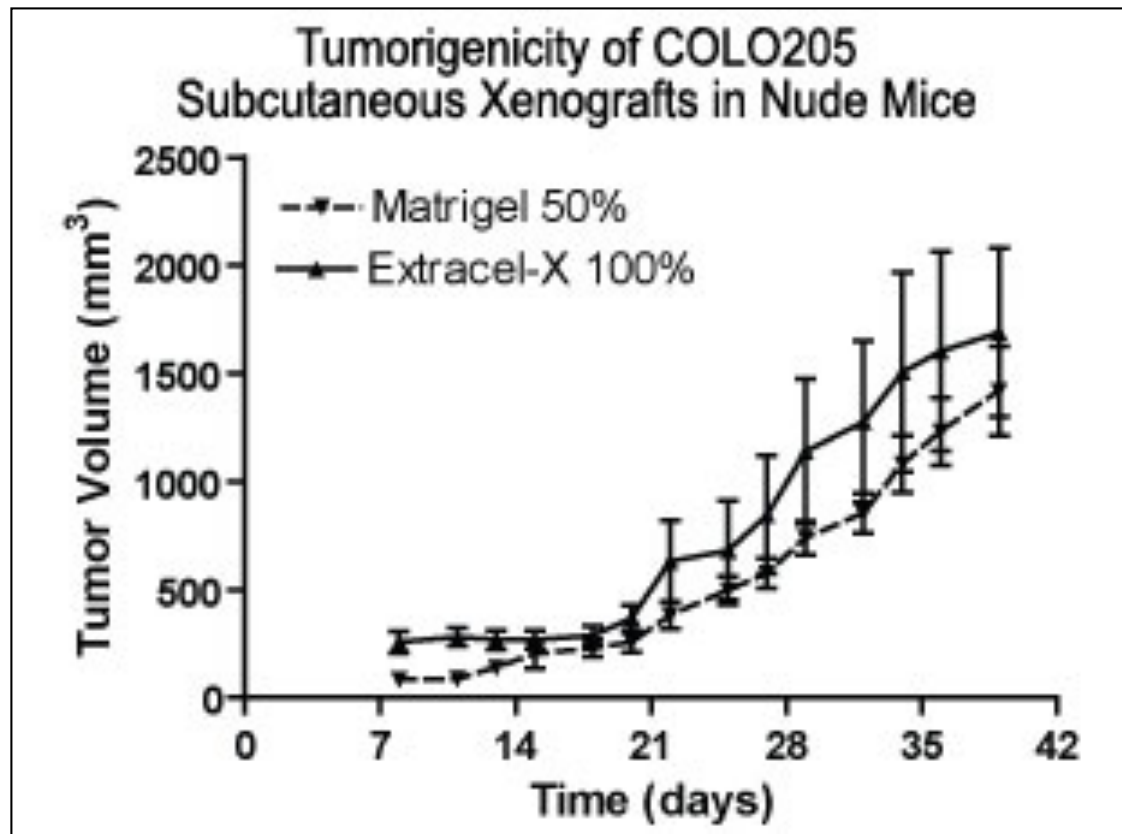
**APPLICAZIONI IN MEDICINA  
MOLECOLARE**

## Saggi di tumorigenicità in vivo



## Saggi di tumorigenicità in vivo

- Saggi di tumorigenicità
- Saggi di disseminazione e colonizzazione metastatica
- Studi molecolari e farmacologici



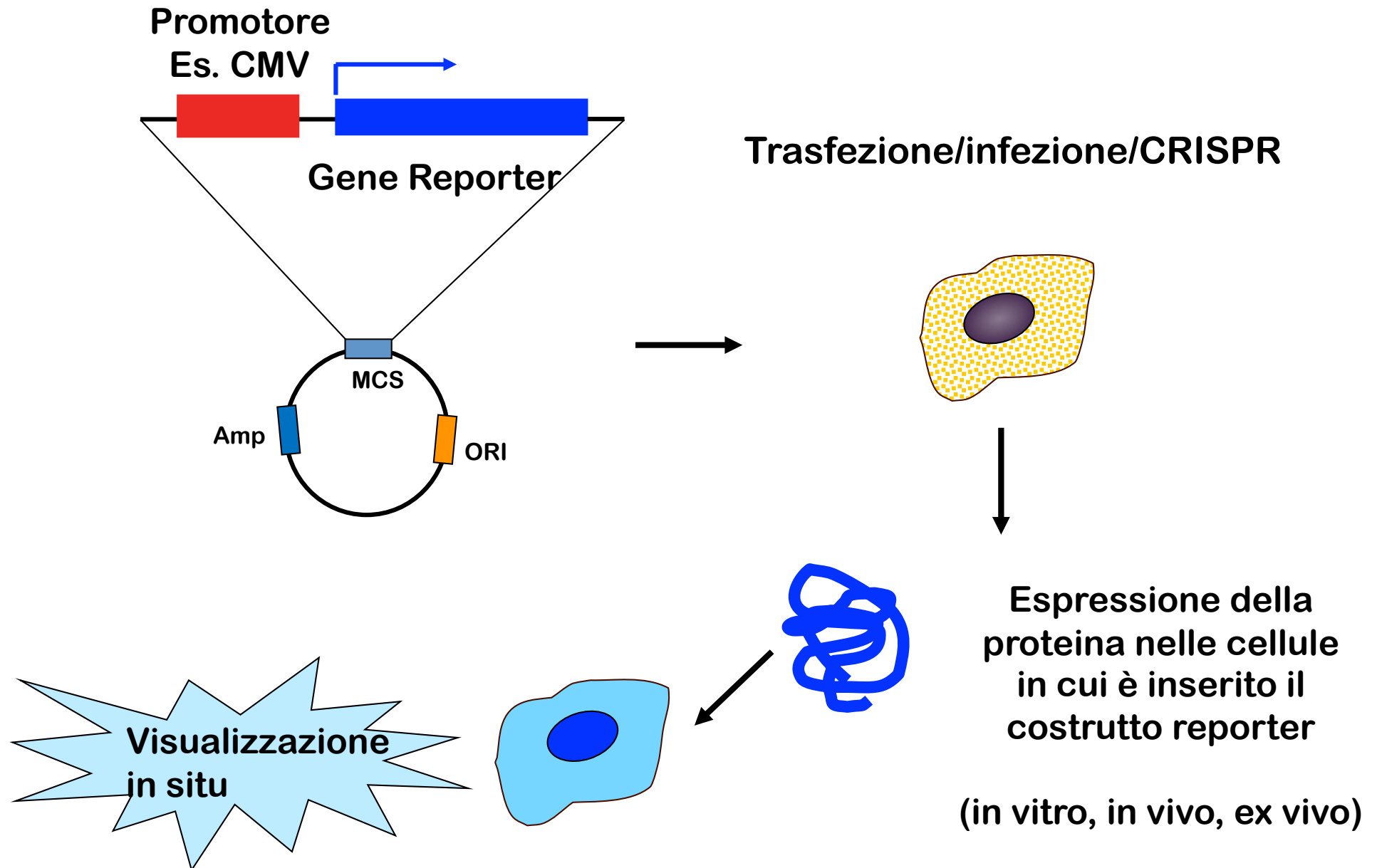
**Problema:**  
visualizzare cellule *in vivo*.

**Strategia:**

**Utilizzo di un gene reporter clonato a valle di un promotore COSTITUTIVO**

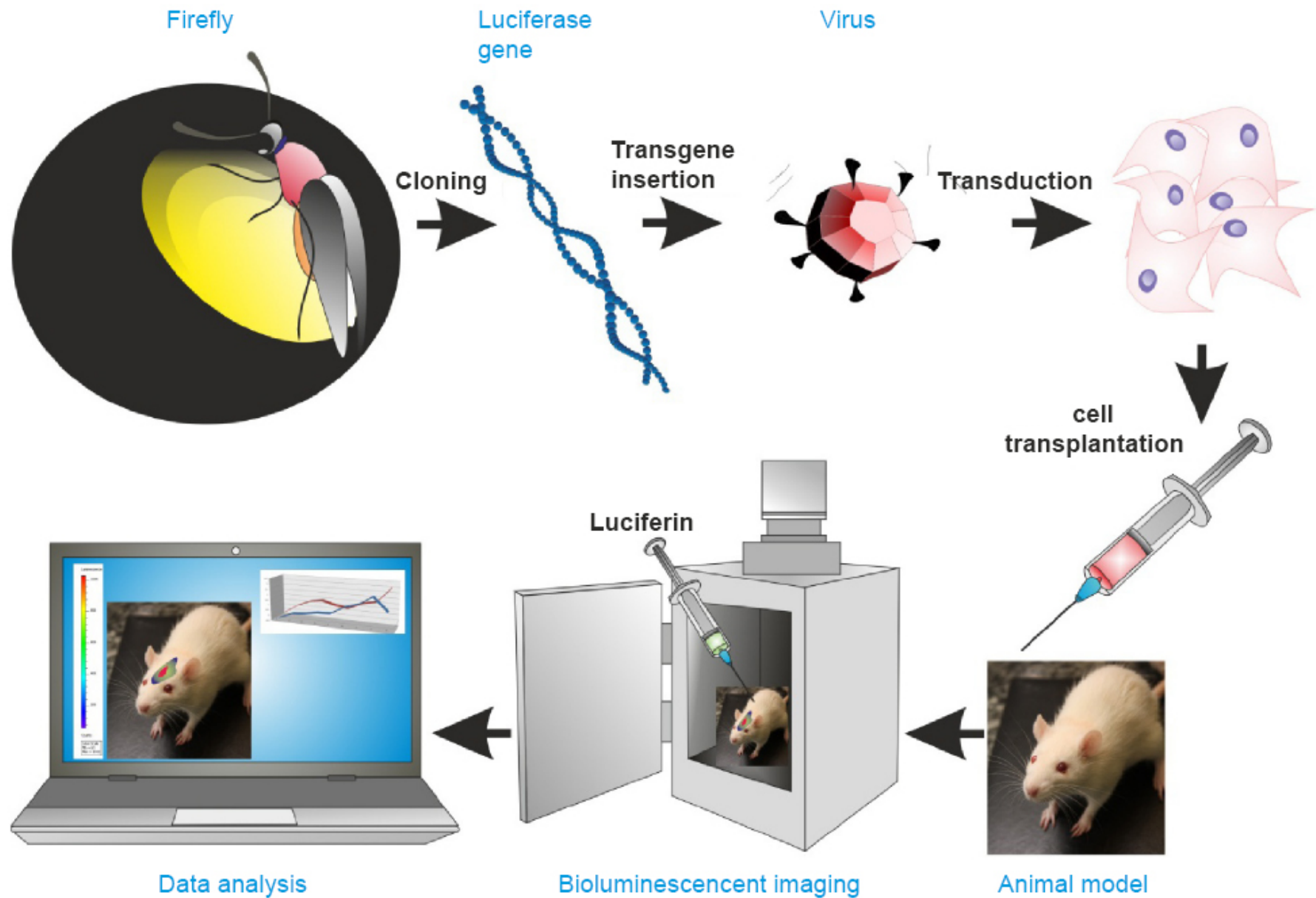


# Gene reporter clonato a valle di un promotore COSTITUTIVO



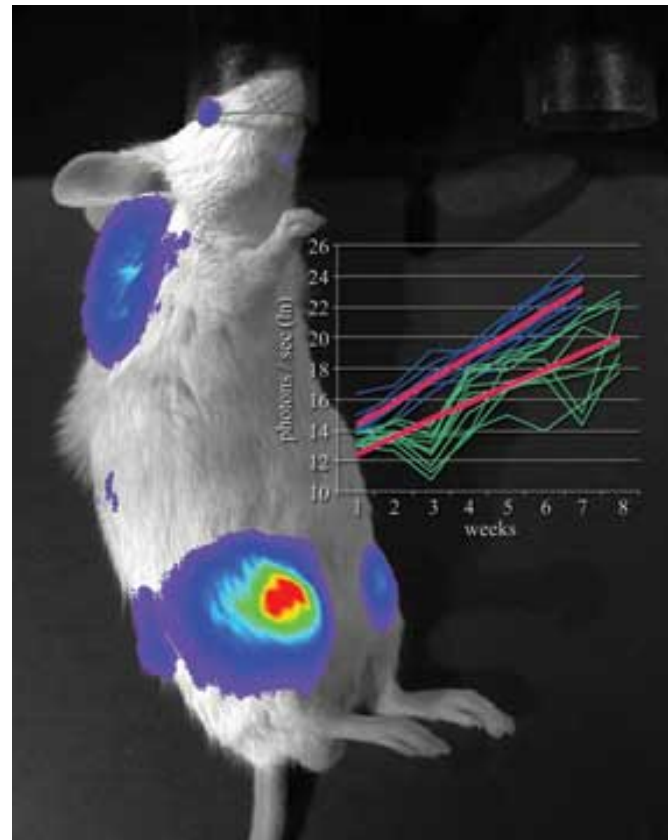
**Imaging in vivo di bioluminescenza (BMI)  
mediante reporter LUCIFERASI:  
analisi NON INVASIVA  
dello sviluppo e progressione tumorale**

# Imaging di bioluminescenza (BMI)



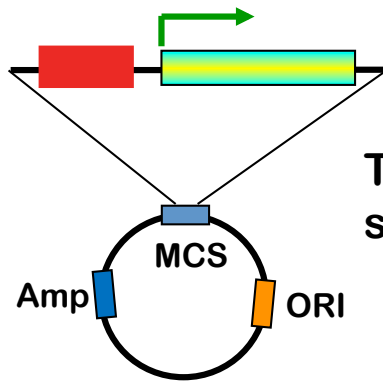
Iniezione/ingestione del substrato, inserimento in dark box e misurazione della luce emessa mediante BMI (CCD camera)

# In vivo imaging di bioluminescenza prodotta da reporter LUC



# Imaging in vivo mediante fotoproteine reporter: analisi dello sviluppo e progressione tumorale mediante microscopia a fluorescenza intravitale

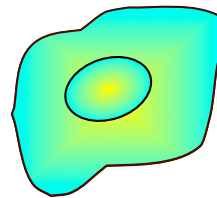
promotore Reporter GFP



Trasfezione  
stabile



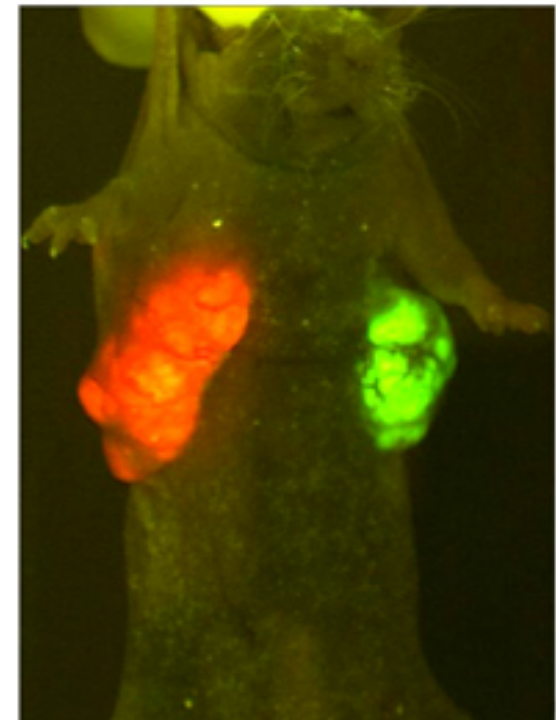
Cellula tumorale

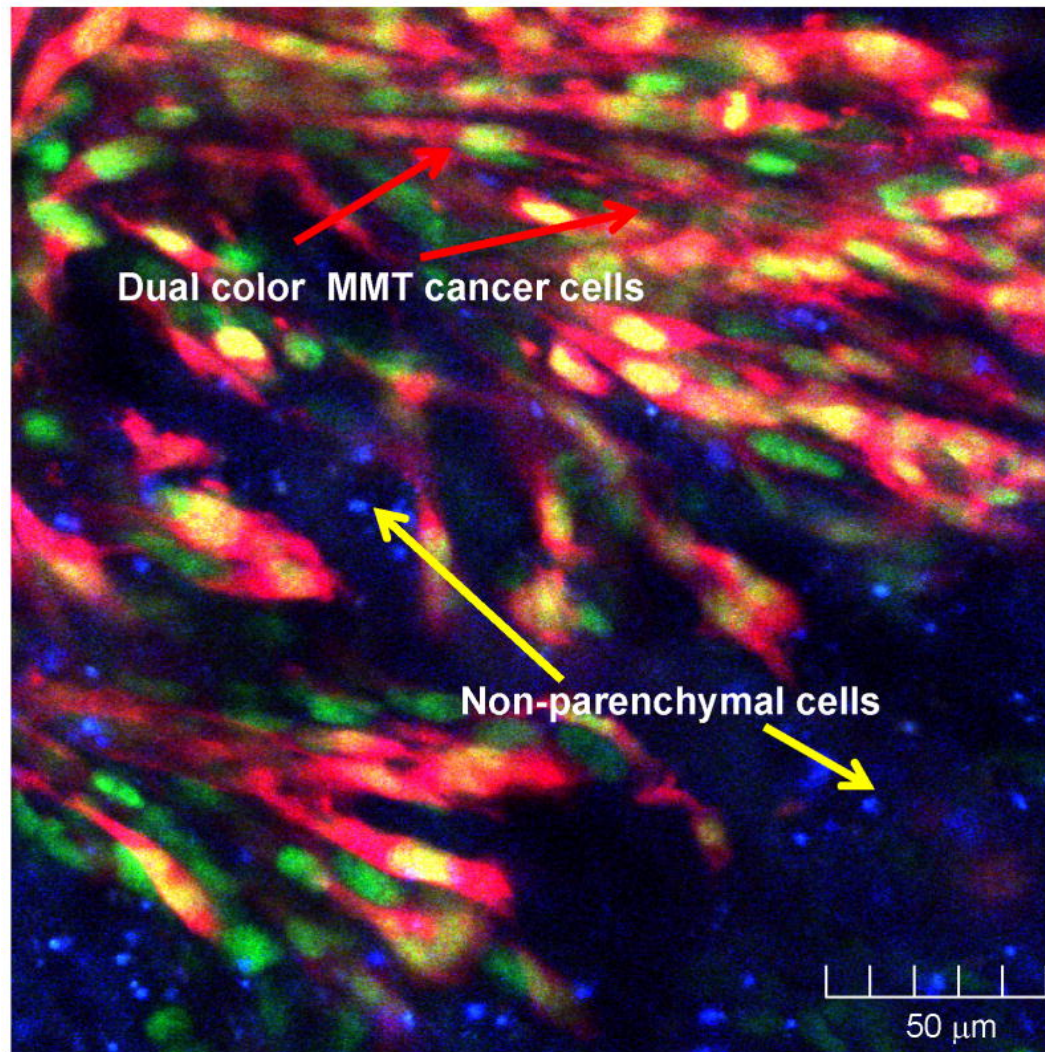


Trapianto



analisi





**Dual-color MMT cells with GFP in the cytoplasm and RFP in the nucleus, growing in the liver of a CFP nude mouse after splenic injection**



**Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche**

**AA 2018-2019**

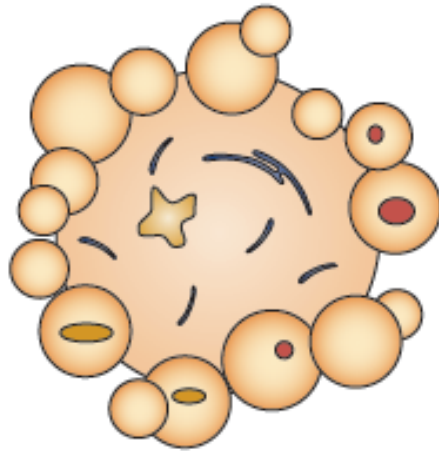
**Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare**

**Lezione 12**

**STUDIO DELLA MORTE CELLULARE**

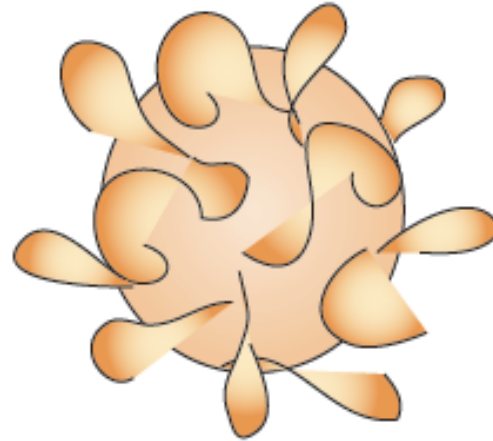
## diversi tipi di morte cellulare

apoptosi



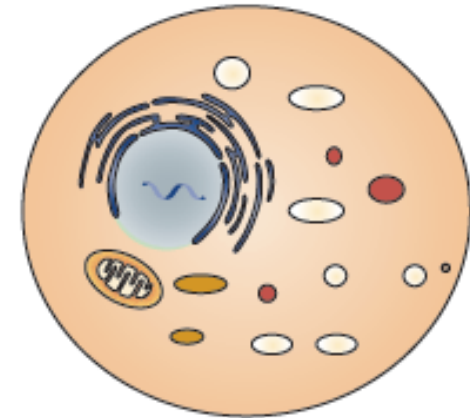
vescicolazione

necrosi



lisi cellulare

autofagia



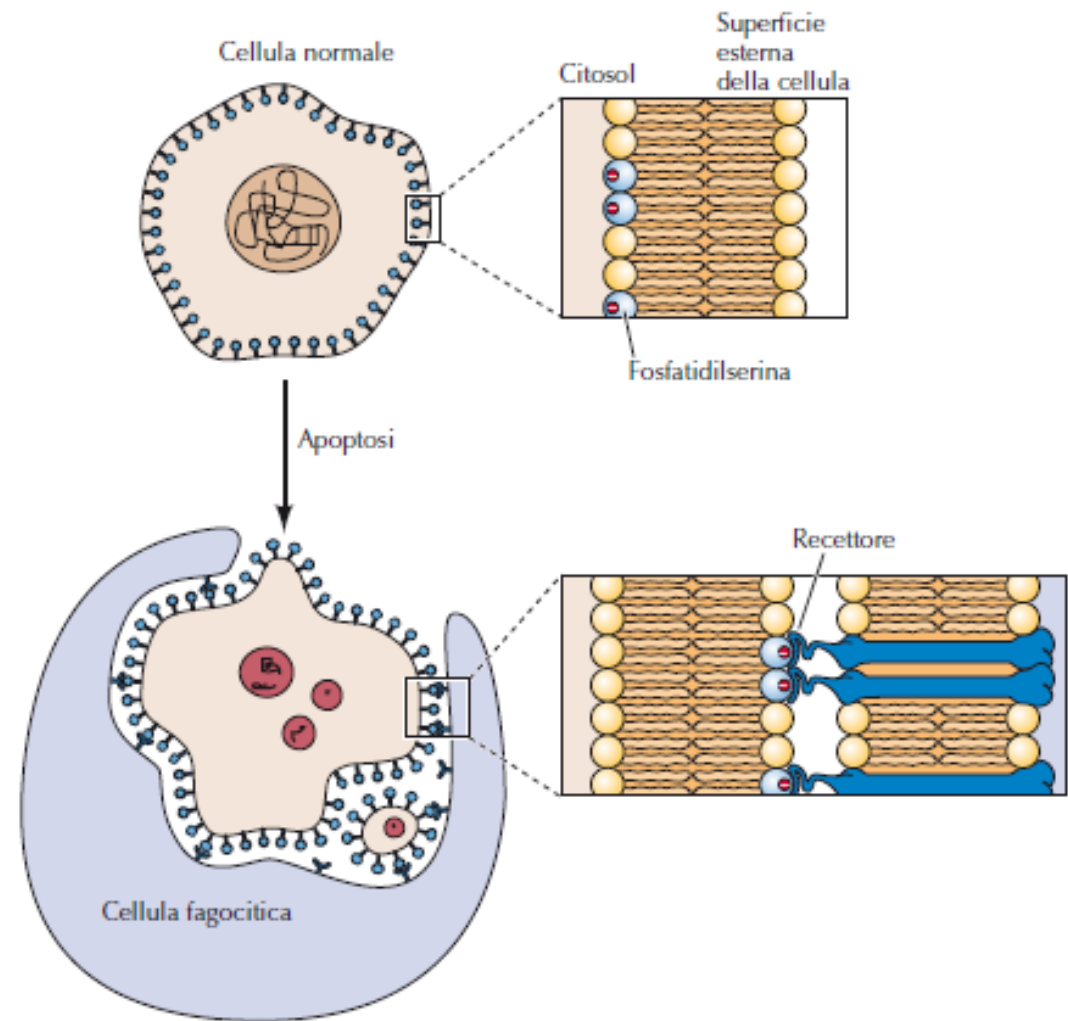
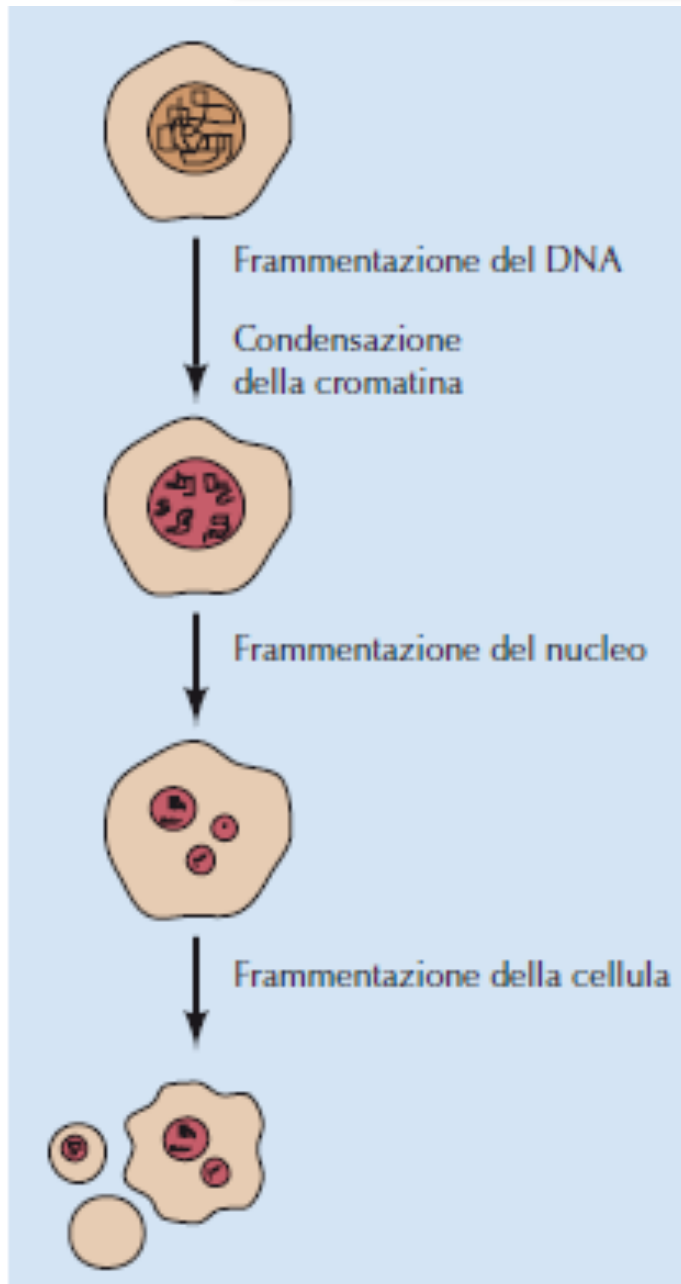
formazione  
di autofagosomi



## Necrosi e apoptosi

Necrosi	Apoptosi
Perdita dell'integrità della membrana plasmatica	La membrana plasmatica forma vescicolazioni, ma rimane intatta
Rigonfiamento cellulare e lisi cellulare	Condensazione cellulare senza lisi
Disintegrazione degli organelli	Gli organelli rimangono intatti
Flocculazione della cromatina	Condensazione della cromatina e aggregazione alla membrana nucleare (marginazione della cromatina)
Lisi completa senza formazione di vescicole	Formazione di vescicole rivestite da membrane (corpi apoptotici)
Processo passivo	Processo attivo (in genere richiede sintesi proteica)
Frammentazione aspecifica del DNA	Frammentazione del DNA ai siti internucleosomici
Processo non regolato geneticamente	Processo regolato geneticamente
Morte di gruppi cellulari	Morte di una singola cellula
Indotta da stimoli non fisiologici	Indotta da stimoli non fisiologici
Evoca infiammazione	Non evoca infiammazione

# Sequenza di eventi dell'apoptosi

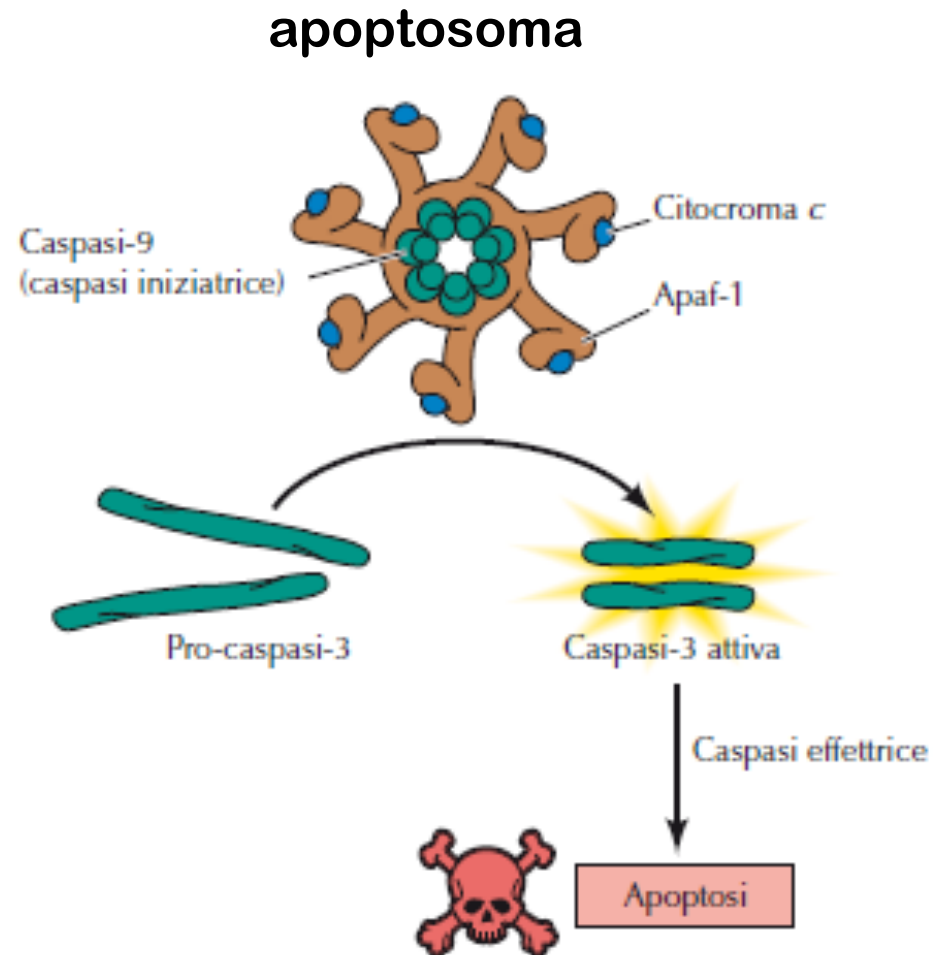
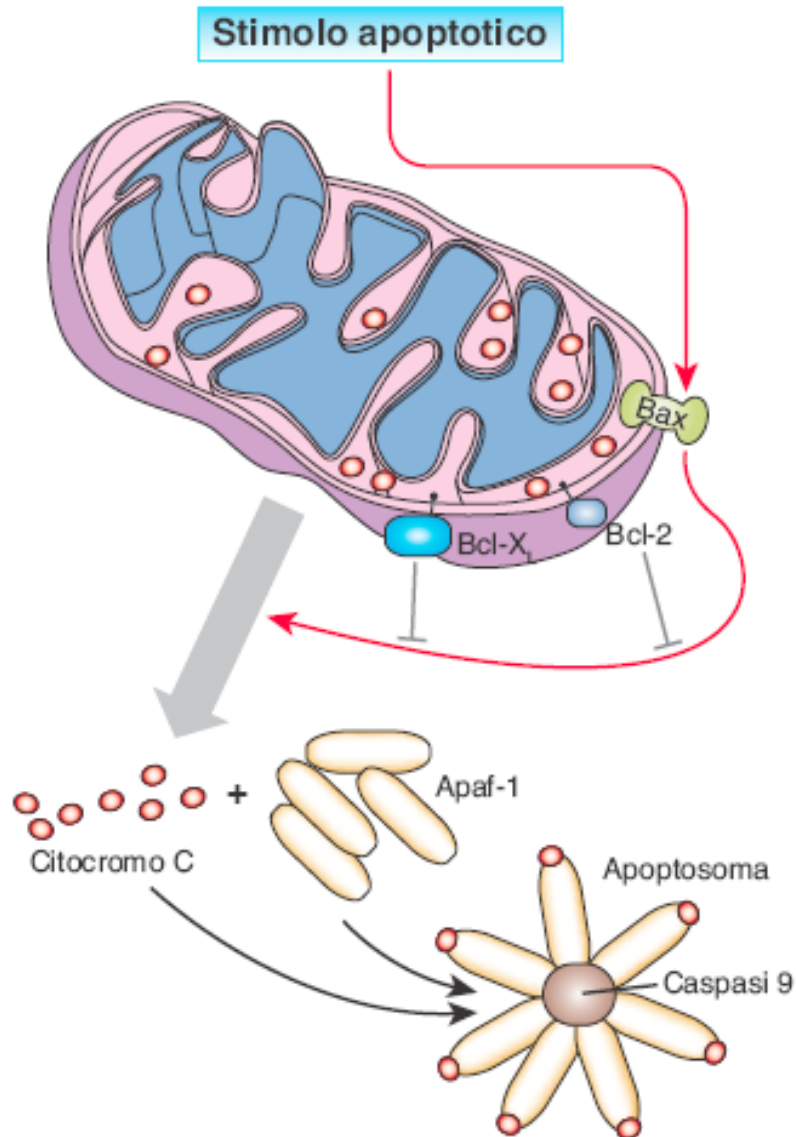


# Apoptosi (via intrinseca) sequenza di eventi

Permeabilizzazione mitocondriale

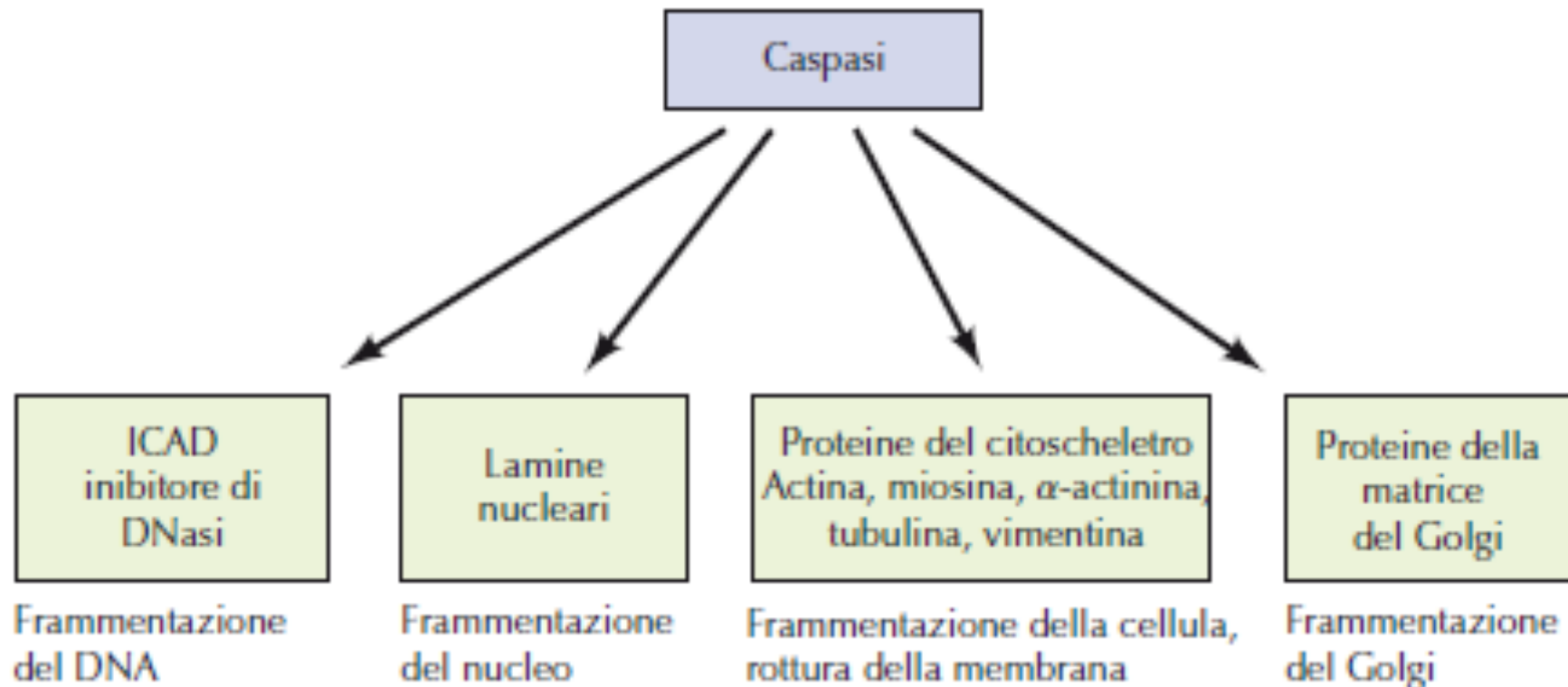


Attivazione delle caspasi



## Le caspasi: enzimi effettori dell'apoptosi

Cistein-proteasi che tagliano a monte di un residuo di Asp

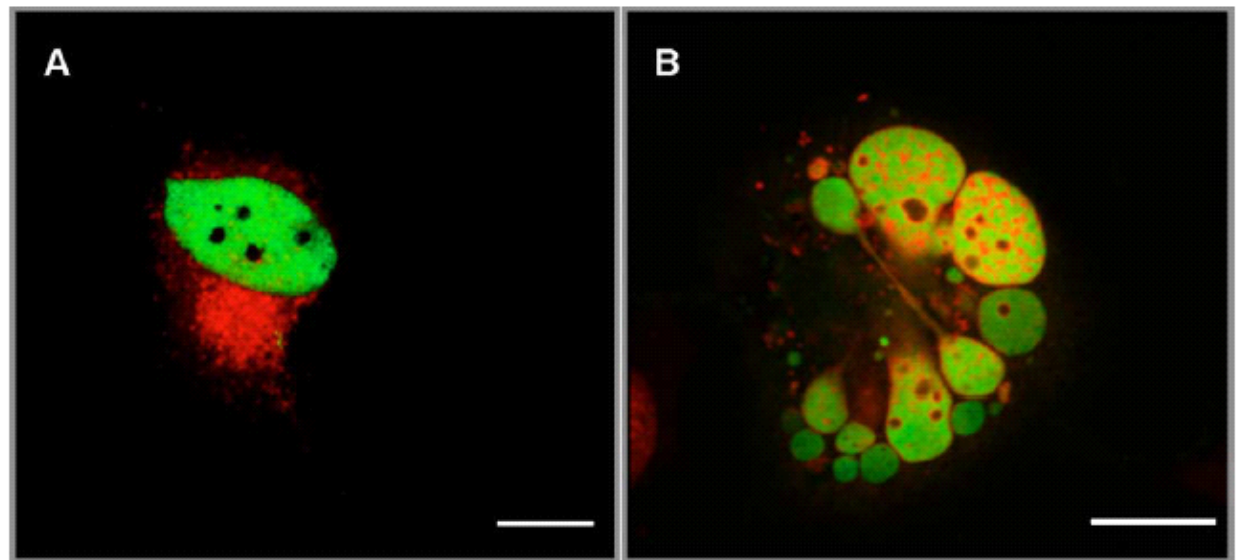
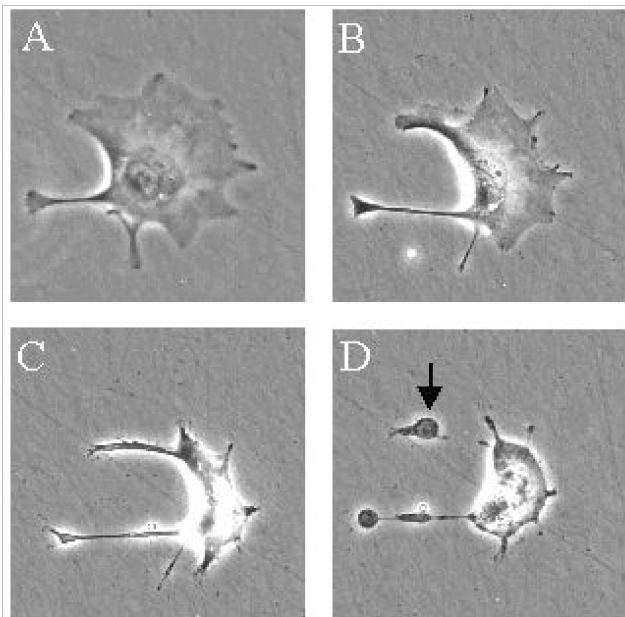


# Saggi di apoptosi

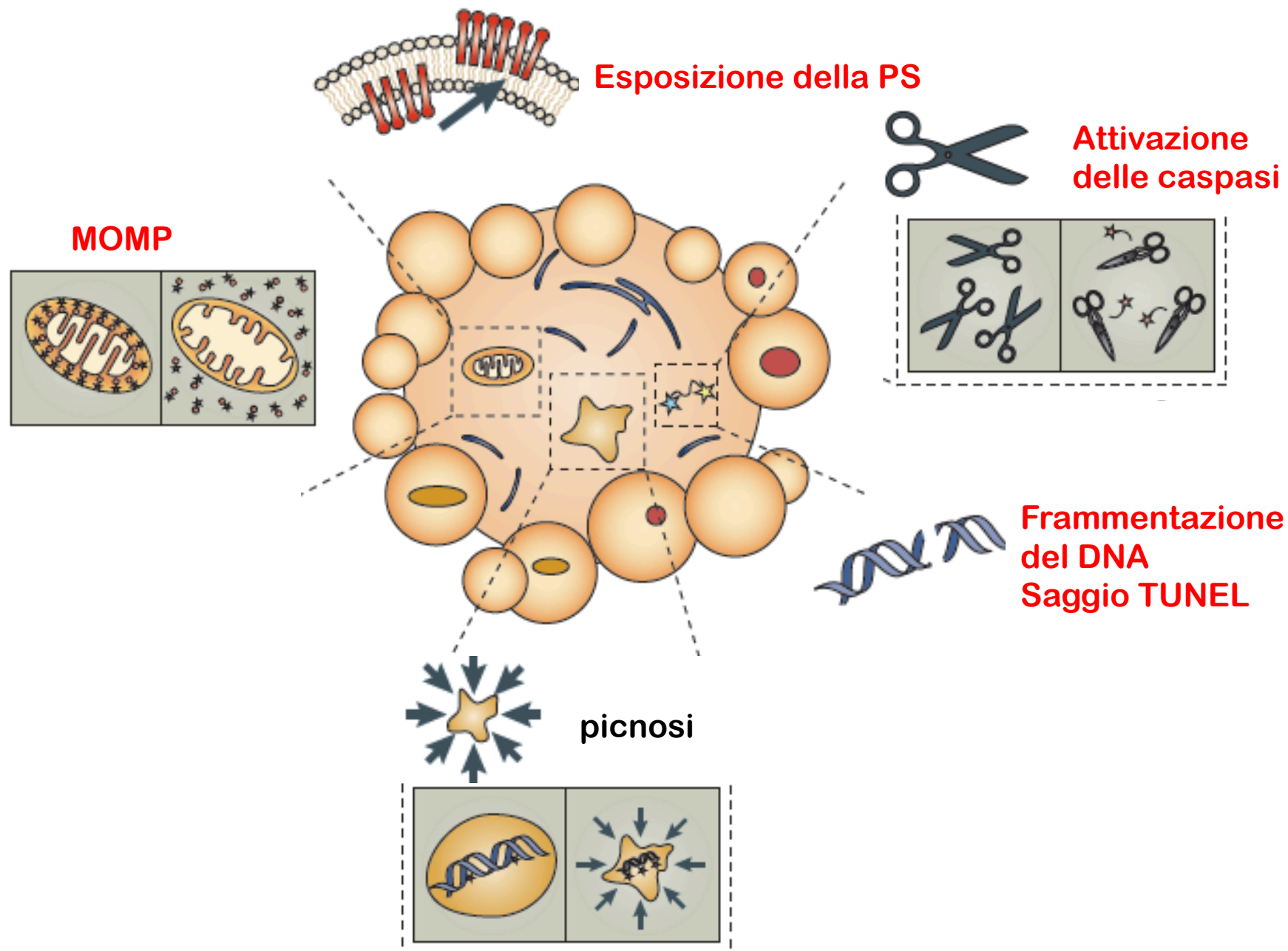
Il processo di apoptosi è accompagnato da specifici cambiamenti:

- depolarizzazione e **permeabilizzazione mitocondriale (via intrinseca)**
- **Attivazione di caspasi**
- alterazioni della **membrana plasmatica**
- **frammentazione del DNA**
- **vescicolazione (bubbling)**

Pertanto è possibile identificare le cellule apoptotiche (e le diverse fasi del processo) mediante reazioni specifiche



# APOPTOSI: visualizzazione in cellule

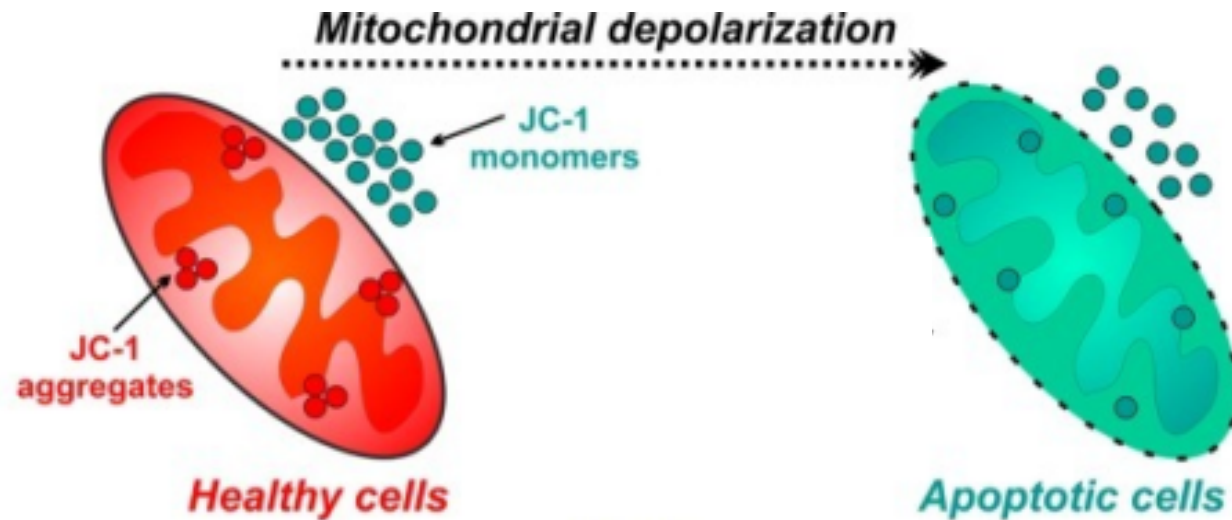
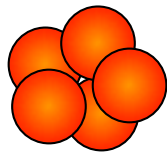




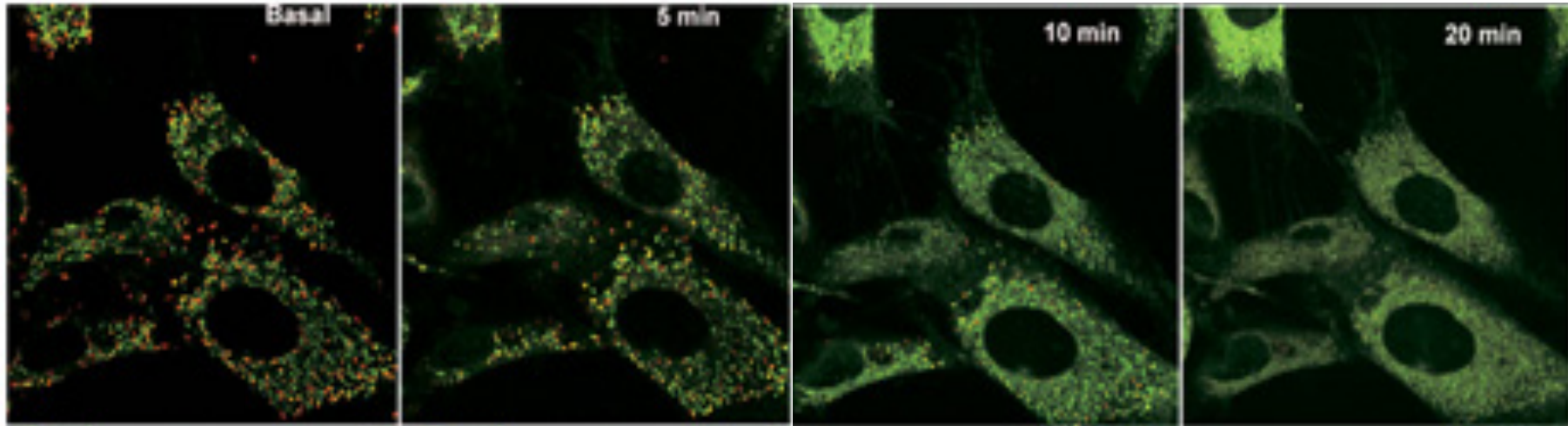
## Saggi di permeabilizzazione mitocondriale (cellule non fissate)

colorazione vitale con molecole indicatrici (colorante cationico JC-1) la cui fluorescenza cambia da:

**rosso (aggregato)** - **verde (monomero)**



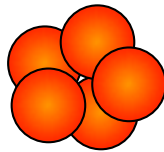
## Saggi di permeabilizzazione mitocondriale (cellule non fissate)



Permeabilizzazione mitocondriale:

colorazione vitale con molecole indicatrici la cui fluorescenza cambia da:

**rosso (aggregato mitocondriale)** - **verde (monomero citoplasmatico)**

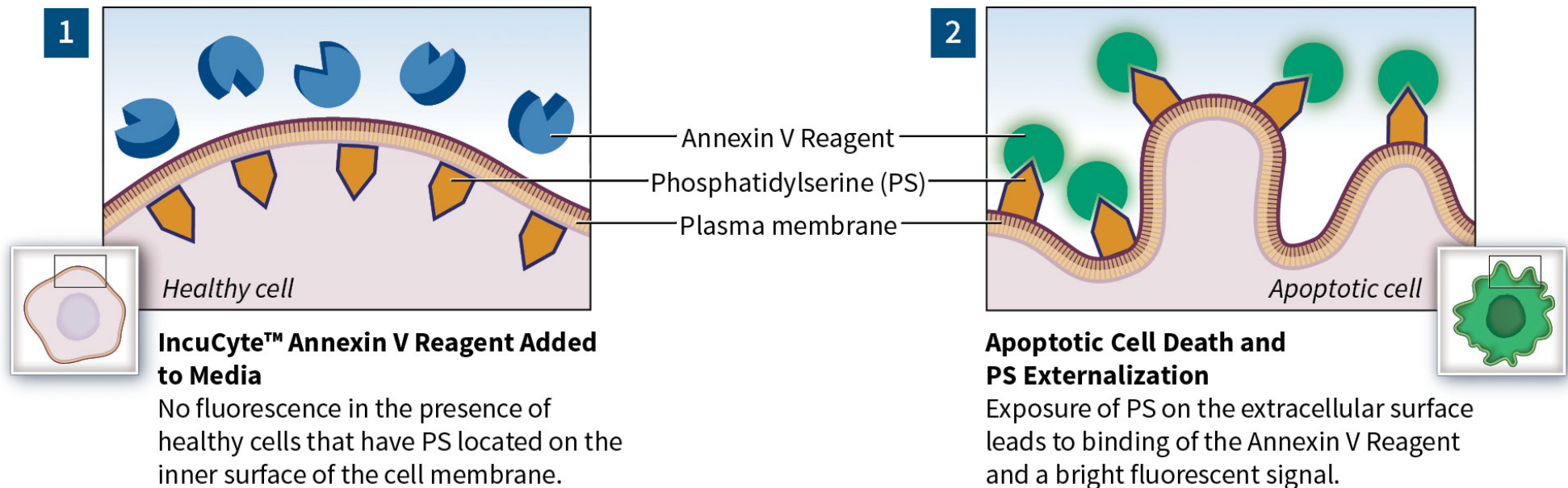




## Saggi di esposizione di fosfatidilserina: ANNEXINA V (cellule vitali o fissate)

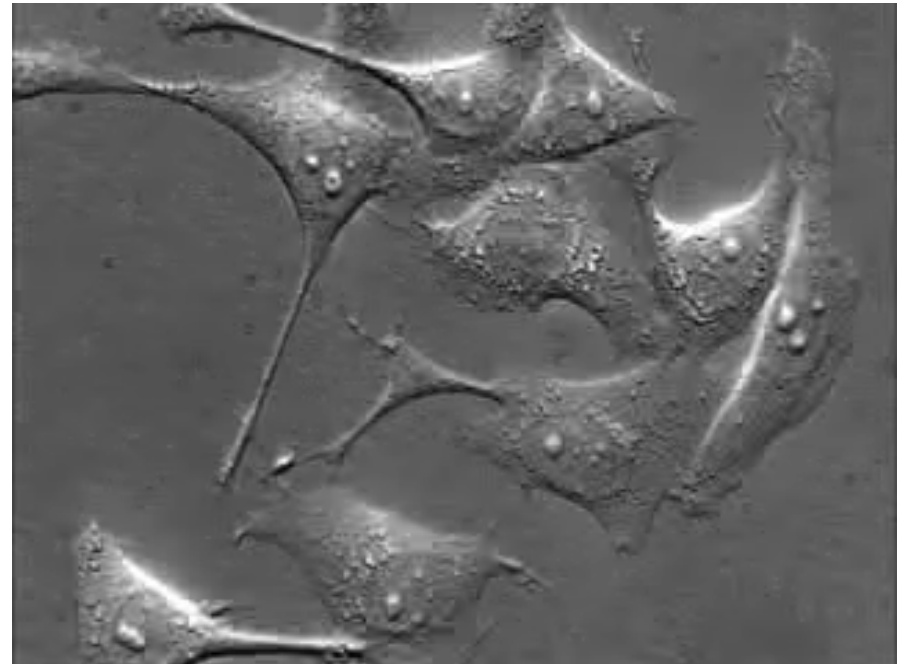
Le cellule apoptotiche espongono **fosfatidilserina** (PS) sul foglietto esterno della membrana plasmatica. L'**annexina V** lega la PS

Visualizzazione della PS mediante colorazione con **ANNEXINA V coniugata a FITC**



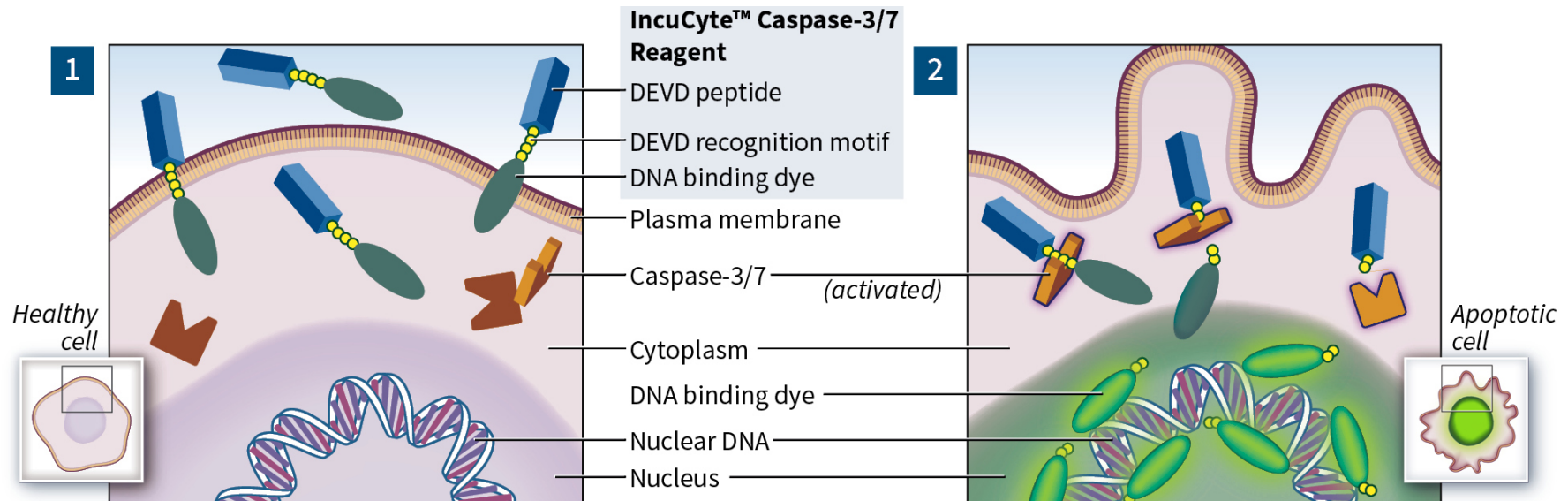
## APOPTOSI: visualizzazione “live” in cellule in coltura

- 1) Permeabilizzazione mitocondriale:  
(molecola fluorescente verde)
- 2) Alterazioni della membrana plasmatica:  
Esposizione della fosfatidilserina  
(Annexin-RITC rosso)  
e vescicolazione
- 3) Frammentazione del nucleo:  
DNA colorato con DAPI blu



# saggio di attivazione di CASPASI EFFETTRICI

(cellule vitali o fissate)



## IncuCyte™ Caspase-3/7 Reagent Added to Media

No fluorescence in the presence of healthy cells. The Caspase-3/7 Reagent freely crosses the cell membrane and is non-fluorescent and non-DNA binding.

## Apoptotic Cell Death and Caspase-3/7 Cleavage

Activated caspase-3/7 cleaves the Caspase-3/7 Reagent at the DEVD recognition motif, releasing a DNA binding dye that fluorescently labels the nuclear DNA of apoptotic cells.

**Molecola con sito di taglio per le caspasi 3/7, il taglio libera:**

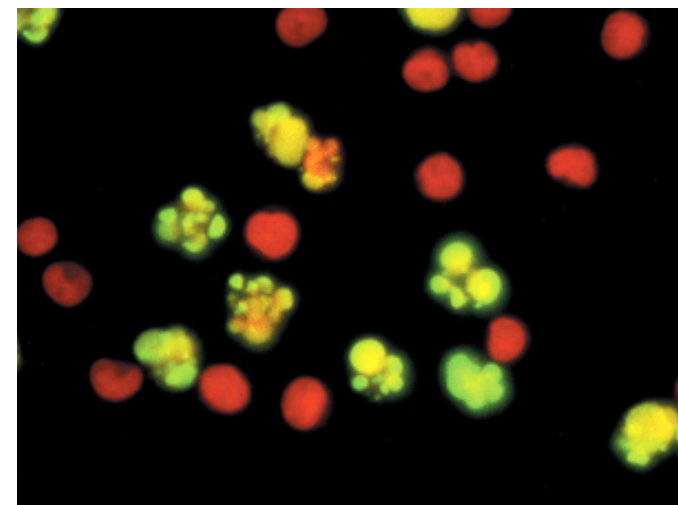
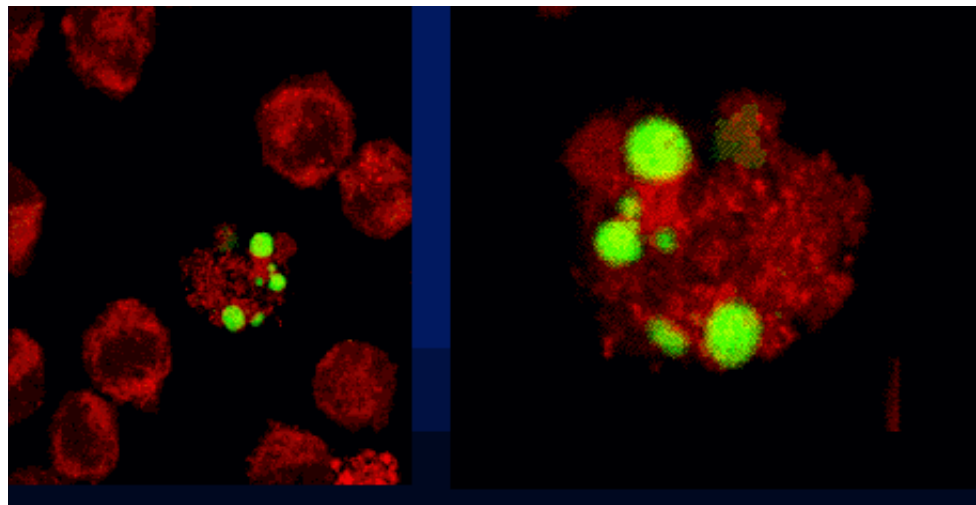
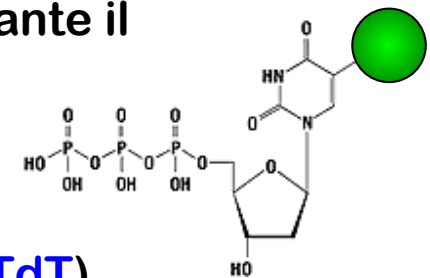
- un **colorante fluorescente che si intercala al DNA**, oppure
- una molecola chemiluminescente
- ...

# SAGGIO TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labelling) (cellule fissate)

Marcatura delle **estremità dei frammenti di DNA** generati durante il processo apoptotico con **dUTP** coniugato ad un **fluorocromo** (ad es. **FLUORESCEINA verde = FITC**).

Viene fornito l'**enzima terminal desossinucleotidil transferasi (TdT)**

La fluorescenza può poi essere visualizzata al **microscopio**,  
oppure mediante lettore o **FACS**



Il **DNA** è contro-colorato con **Propidio Ioduro (rosso)** per visualizzare tutti i nuclei

## **Diverse modalità di indagine:**

- **Microscopia a fluorescenza**
- **Lettura di fluorescenza realtime**
- **Citofluorimetria**



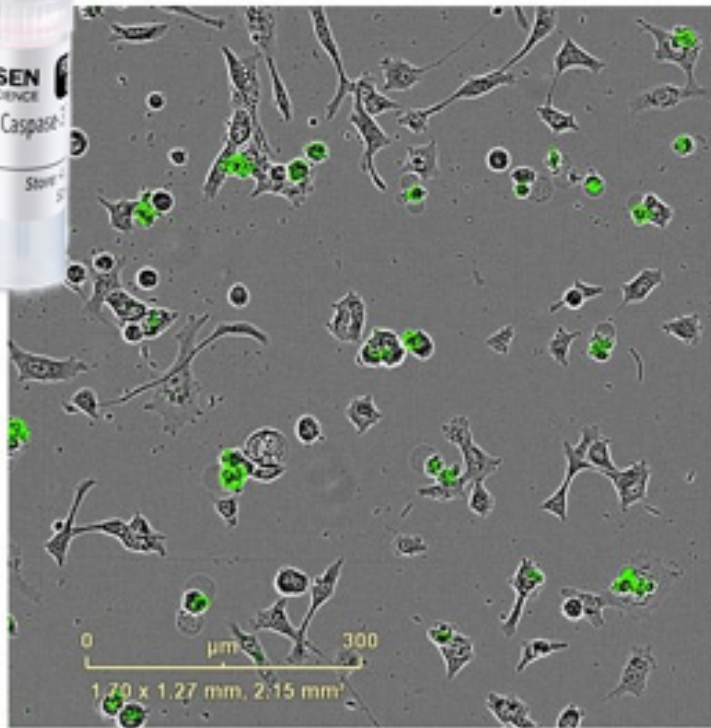
# Valutazione quantitativa di apoptosi mediante lettore realtime



**Caspase-3/7 Green reagent**

HT-1080 fibrosarcoma cells

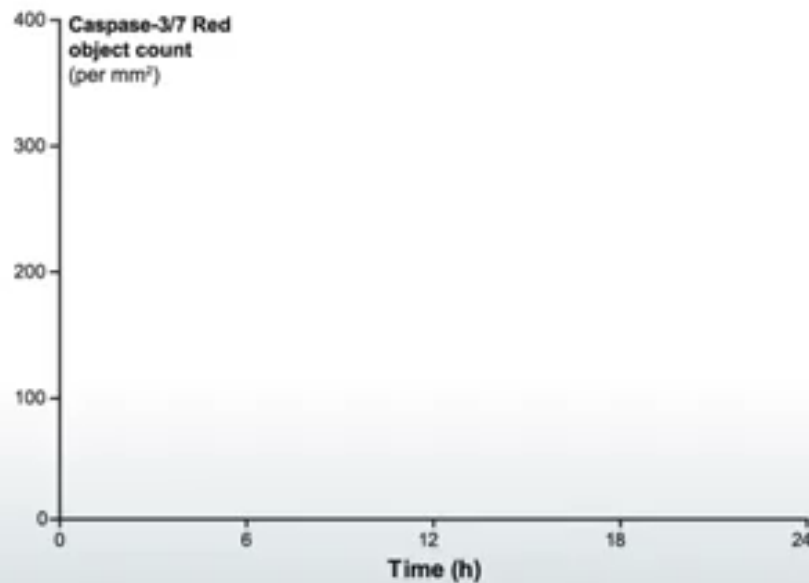
**Fluorescence**



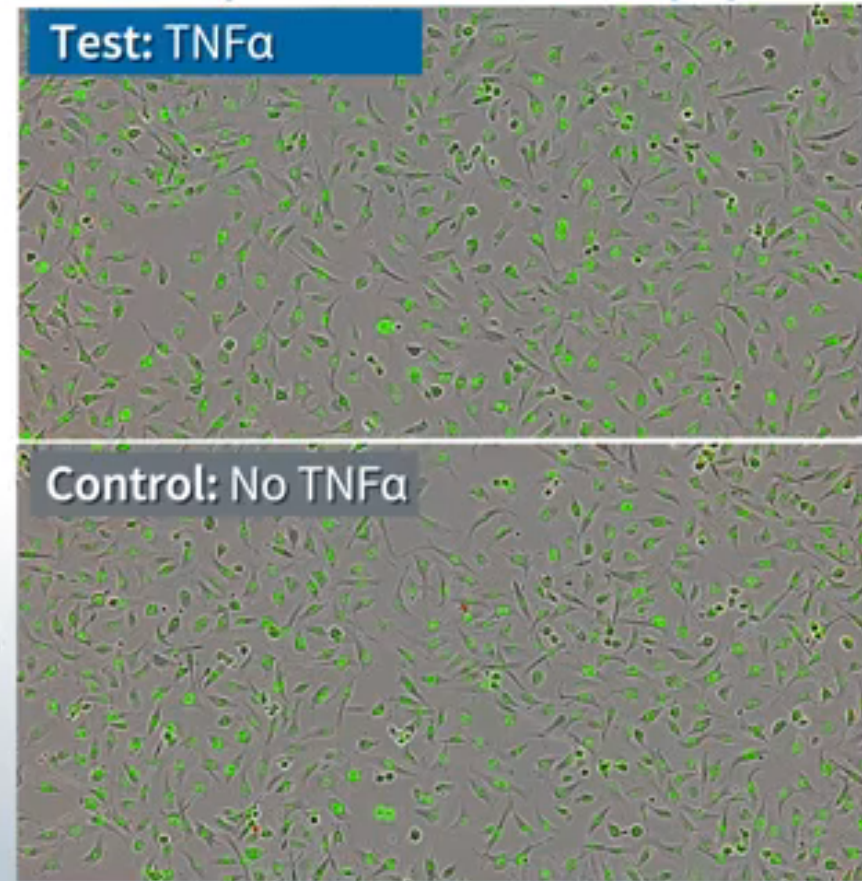
# Valutazione quantitativa di apoptosi mediante lettore realtime

## Automatically measure the time course of caspase-3/7 mediated apoptosis

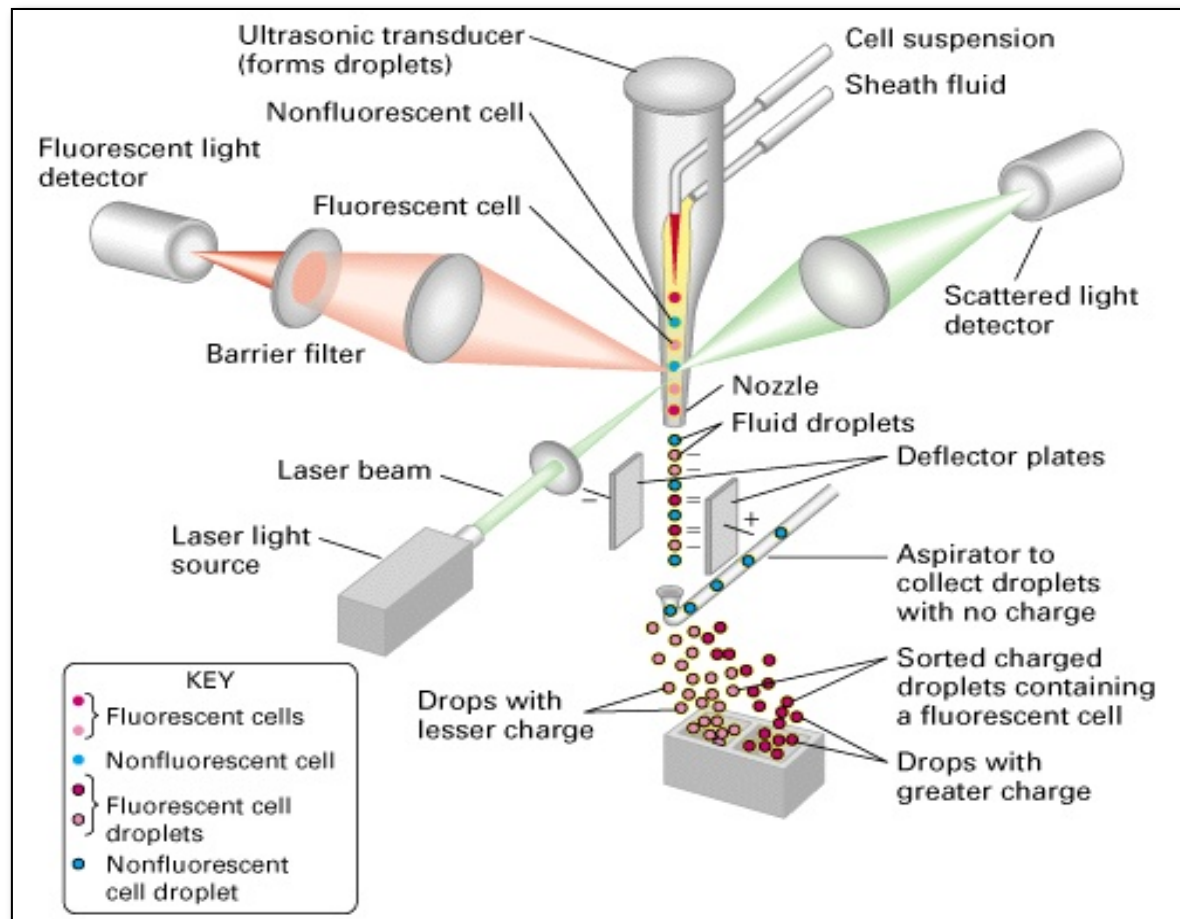
Images and data generated with the IncuCyte® live-cell analysis system.



IncuCyte®  
by ESSEN BIOSCIENCE



# Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria



- Si può effettuare una colorazione con :
  1. opportuni anticorpi primario e secondario (coniugato con fluorocromo)
  2. sostanze fluorescenti che legano specifiche molecole cellulari (es. Annexina V)
  3. Substrati fluorescenti per le caspasi
  4. intercalanti degli acidi nucleici (PROPIDIO IODURO )

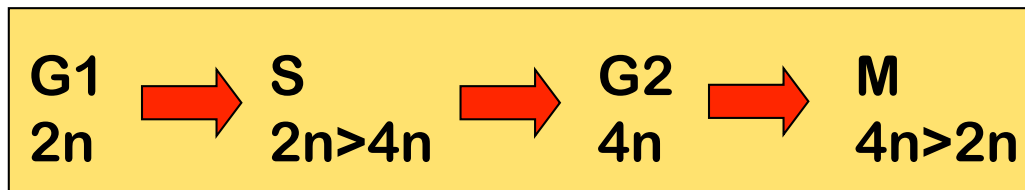


# Analisi del contenuto di DNA di singole cellule mediante colorazione con PI e citofluorimetria (cellule fissate)

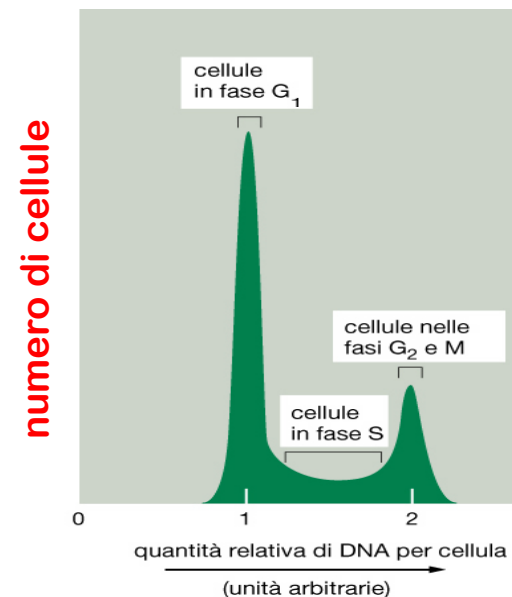
Le cellule vengono risospese, fissate e **permeabilizzate** e poi incubate con **PROPIDIO IODURO** per colorare il DNA (fluorescenza rossa):

**l'intensità** di fluorescenza è proporzionale alla **quantità** di DNA

in ciascuna cellula



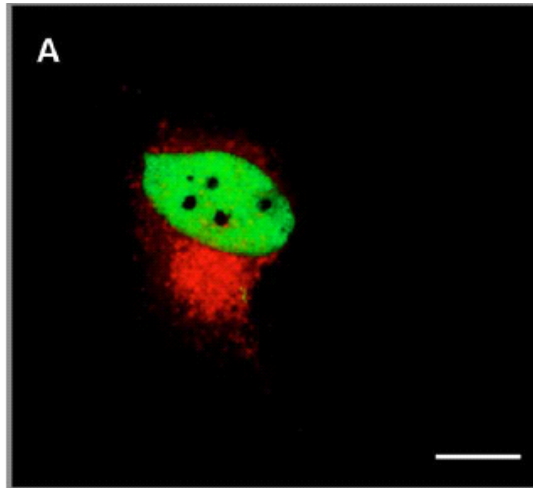
cellule in crescita asincrona



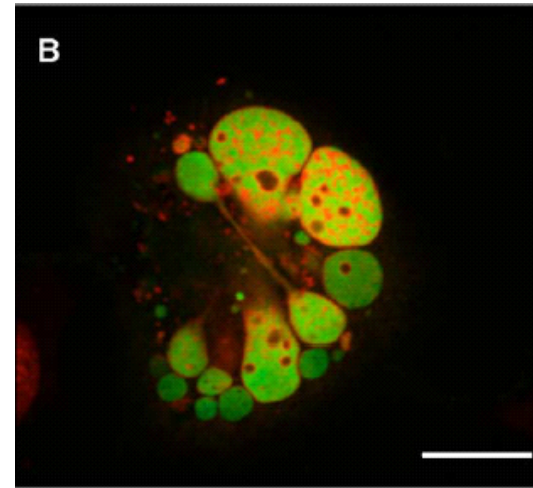
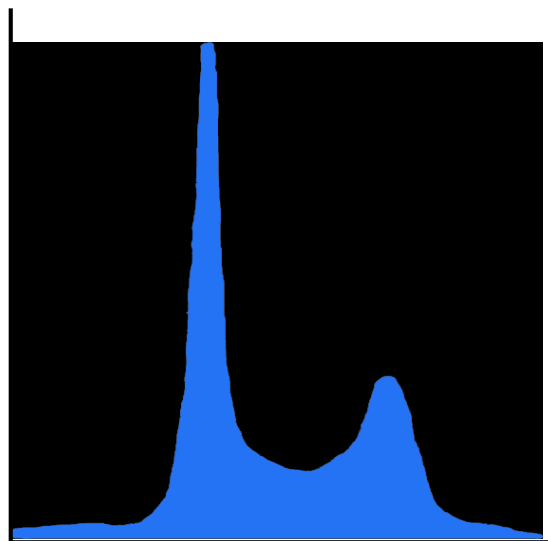
G0/G1	S	G2/M
2n	2n>4n	4n>2n

**intensità di fluorescenza**

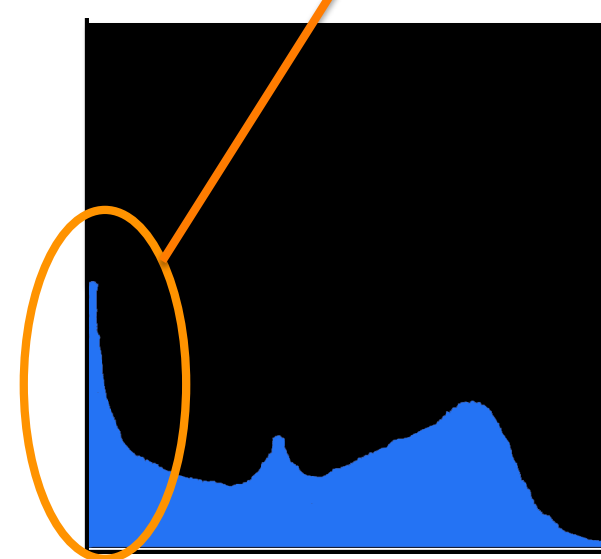
I **corpi apoptotici** hanno contenuto di DNA inferiore a  $2n$



Cellule in crescita asincrona

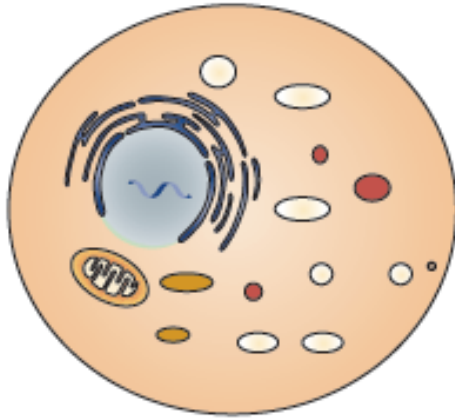


Cellule in apoptosi



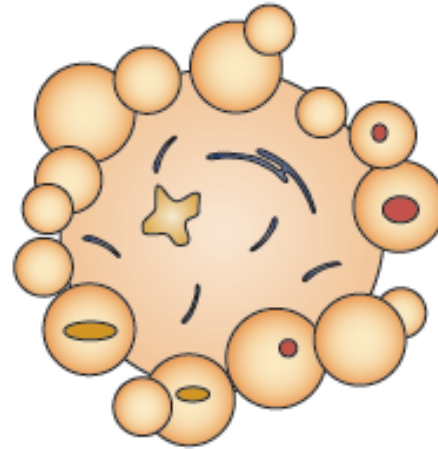
## diversi tipi di morte cellulare

autofagia



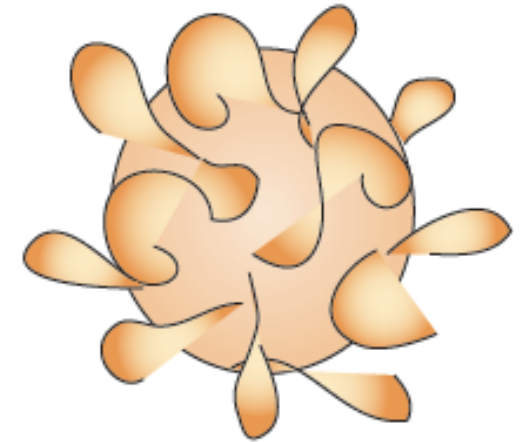
formazione  
di autofagosomi

apoptosi



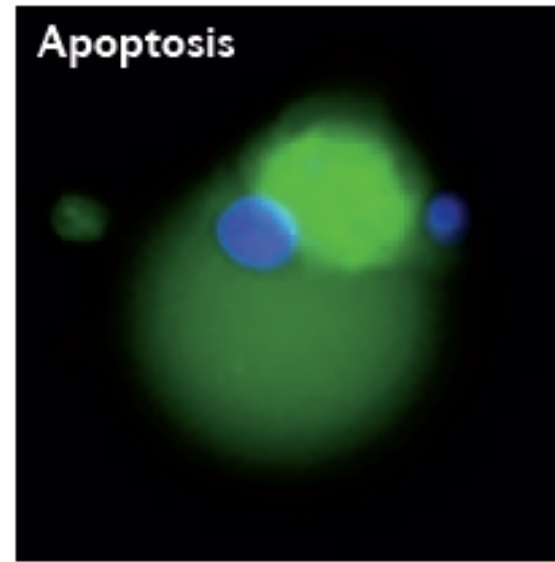
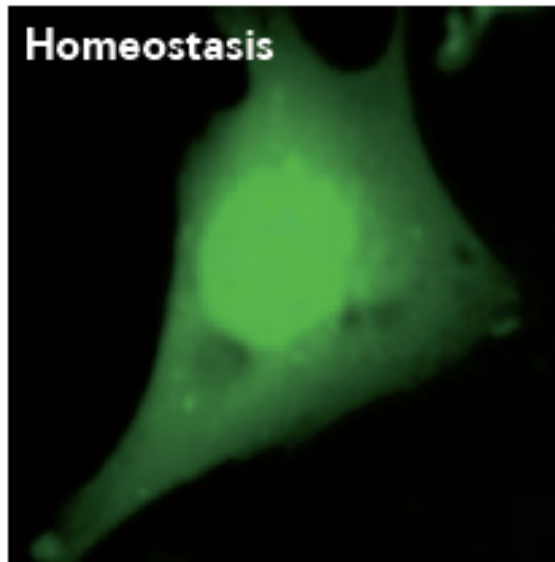
vescicolazione

necrosi

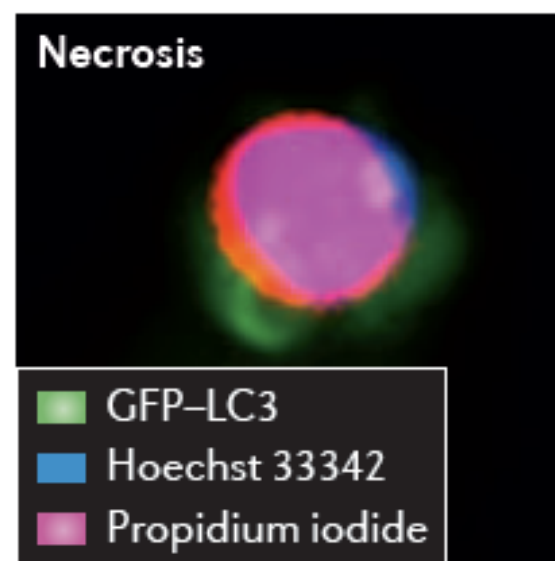
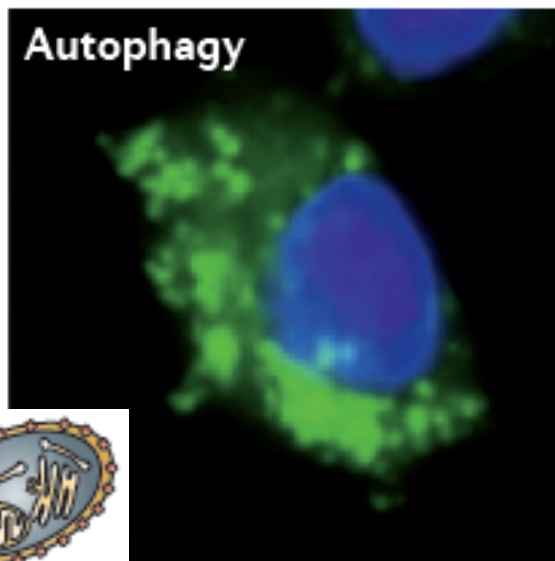


lisi

## Distinzione del tipo di morte cellulare in cellule non permeabilizzate: Hoechst + Propidio Ioduro

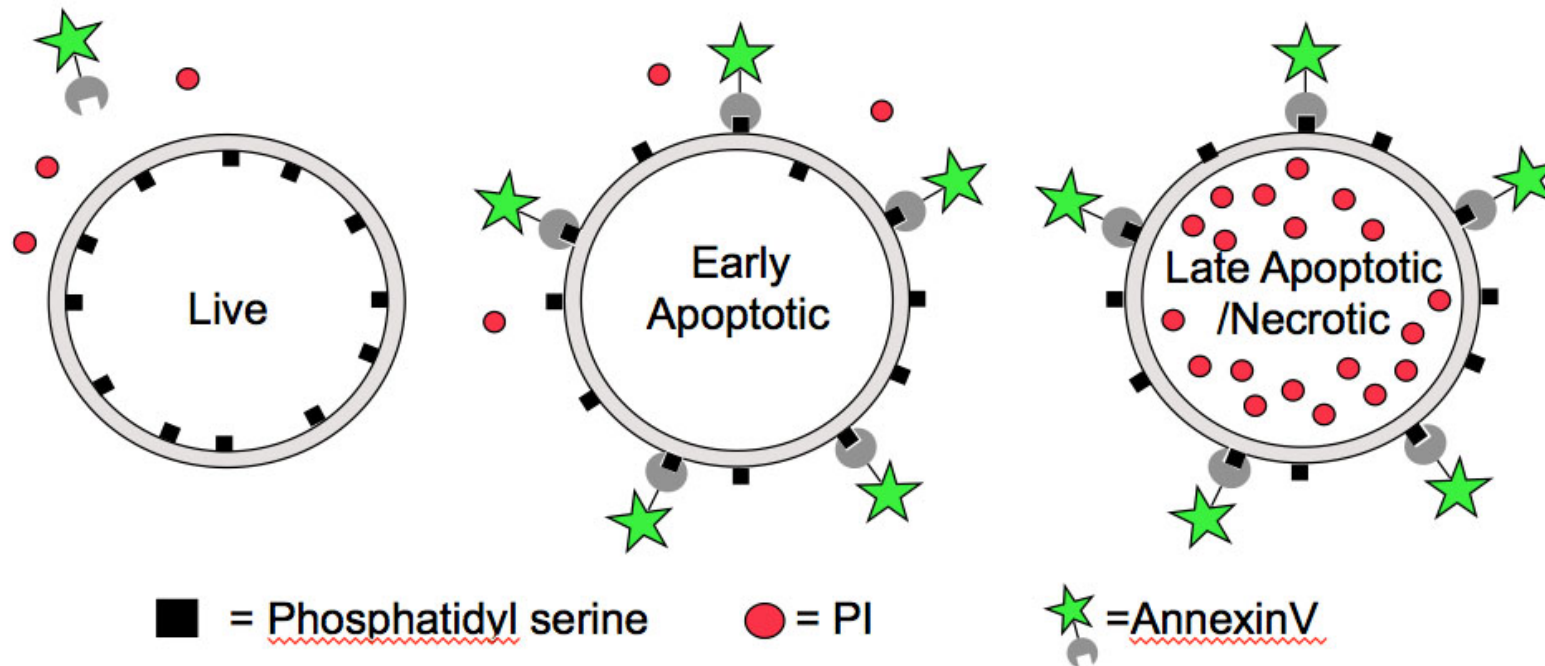


Al contrario dell'Hoechst il PI entra solo se la membrana plasmatica non è integra

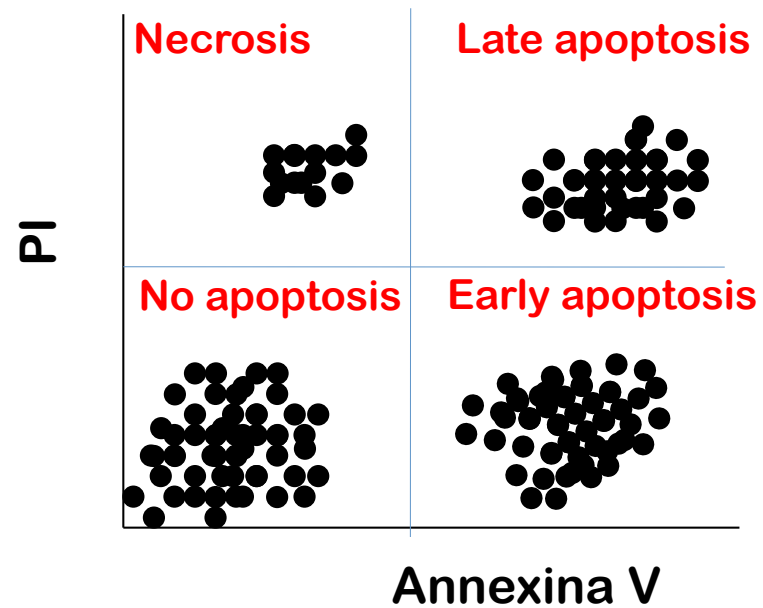


- GFP-LC3
- Hoechst 33342
- Propidium iodide

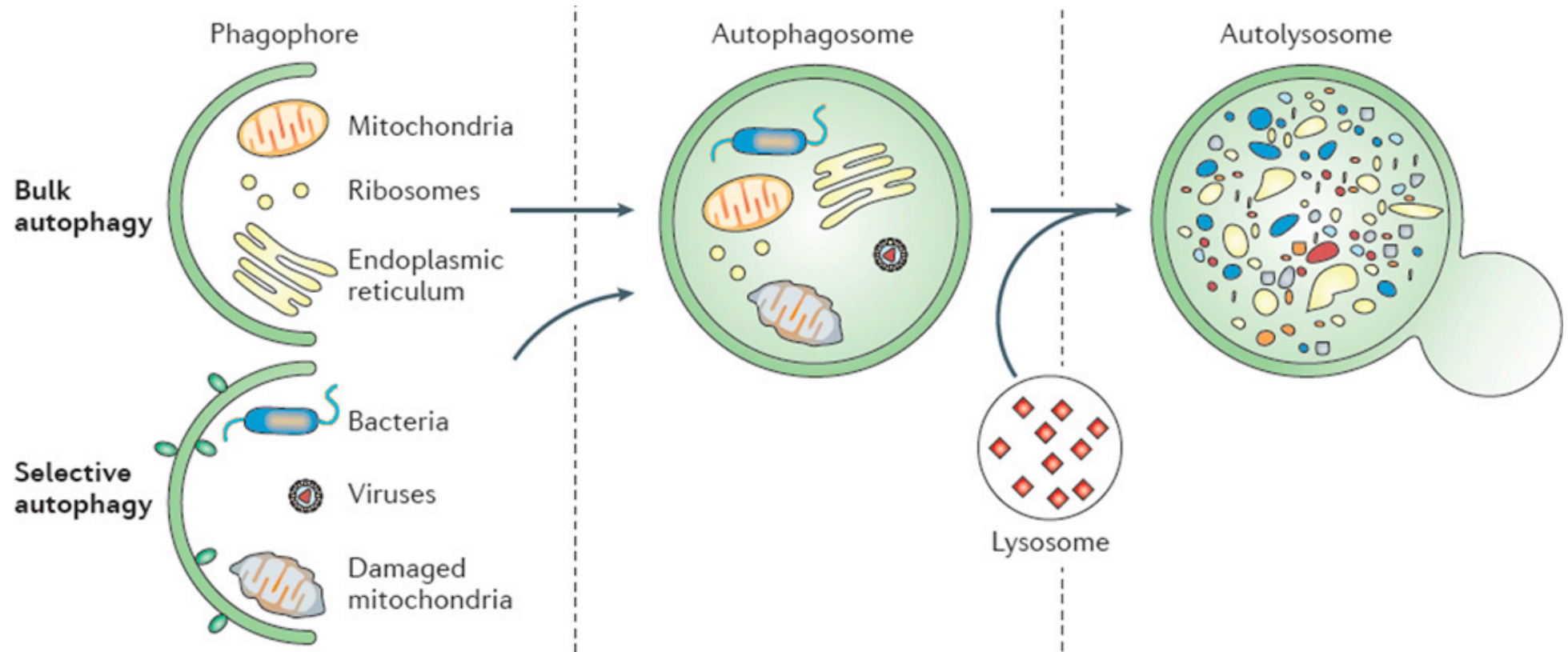
**L'integrità della membrana plasmatica viene persa durante il processo di necrosi e negli stadi finali del processo di apoptosi**



**Distinzione apoptosi/necrosi mediante citofluorimetria:  
incubazione con Annexina V e Propidio Ioduro  
(su cellule NON permeabilizzate)**

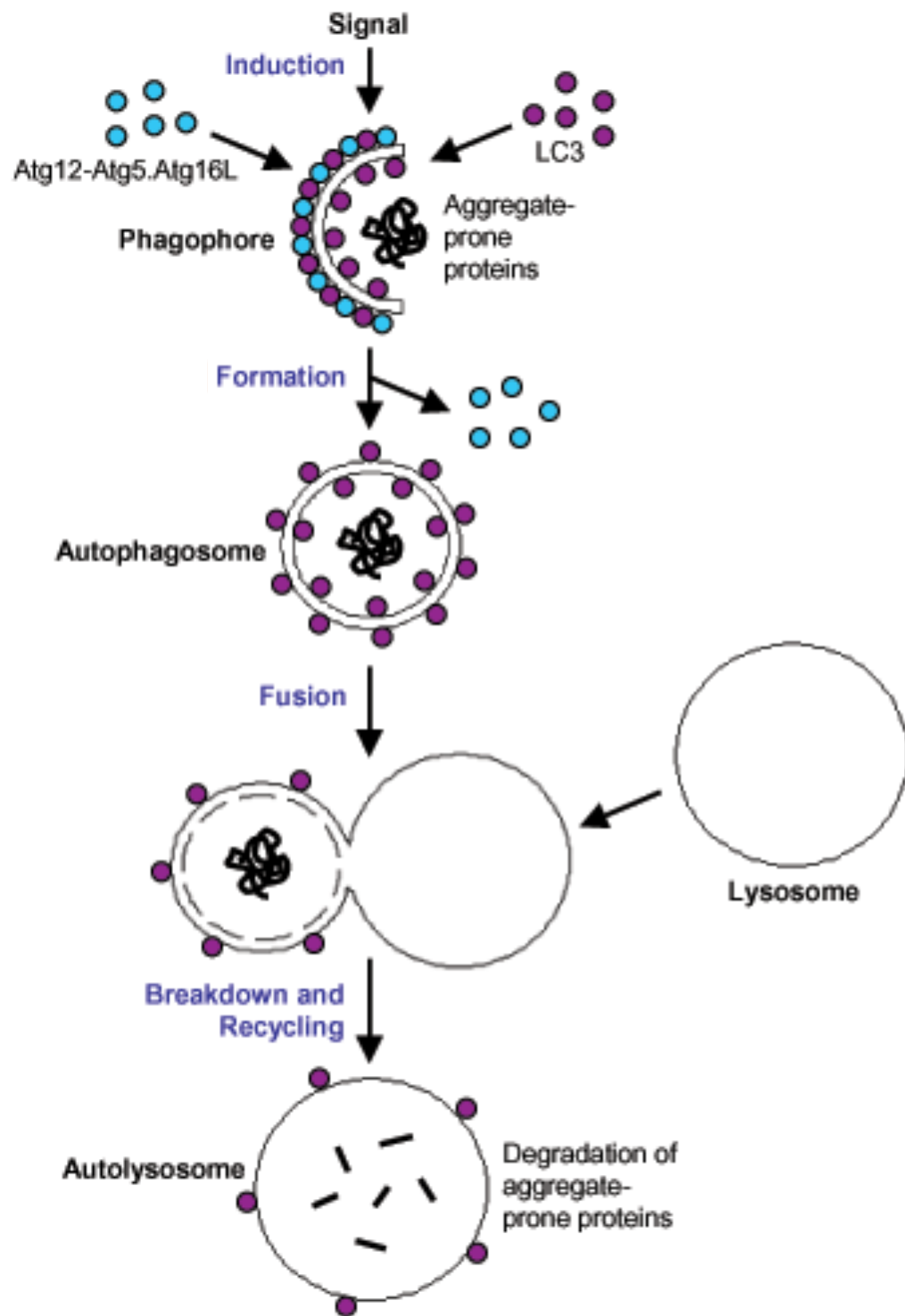


# Valutazione dell'autofagia

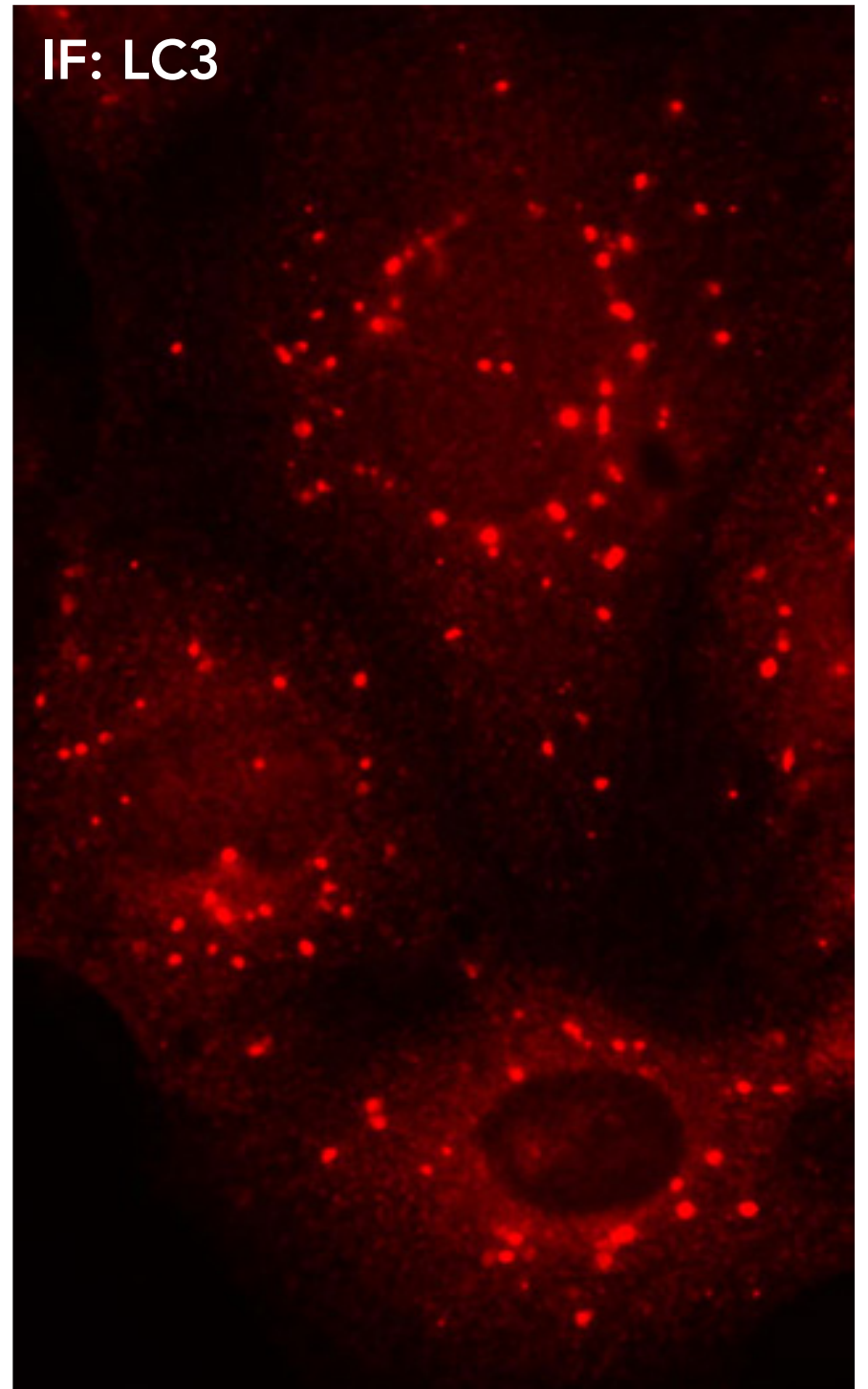


**LC3**



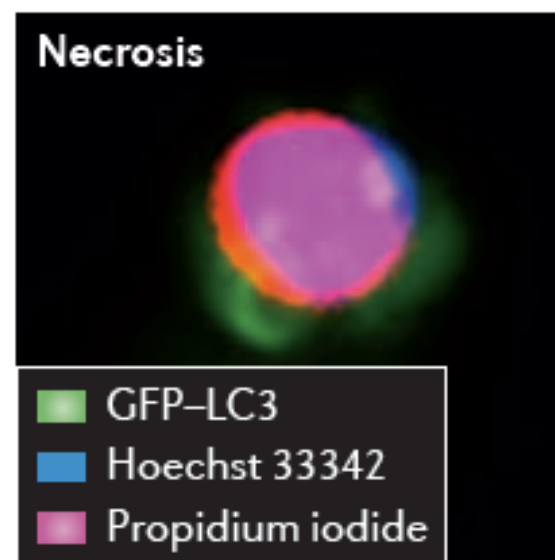
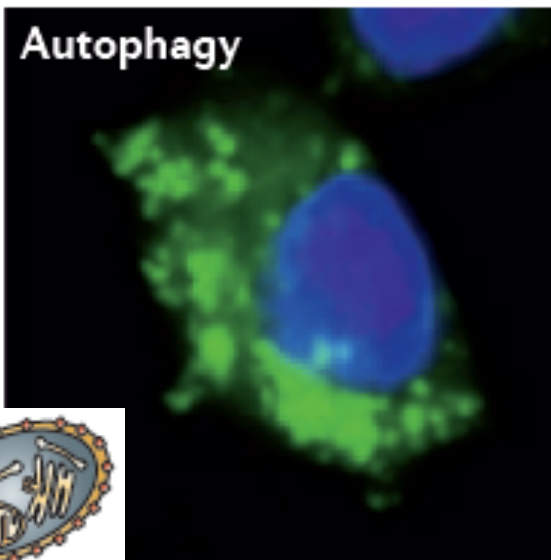
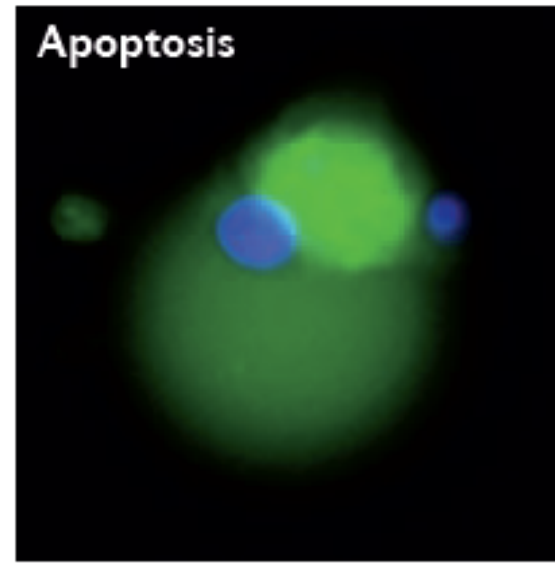
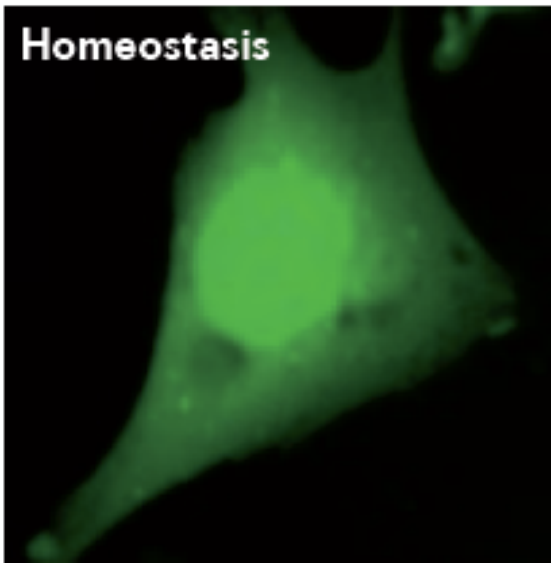


IF: LC3





## Visualizzazione dei fagosomi mediante GFP-LC3



## Analisi dell' effetto di una proteina X sulla morte cellulare

1. È necessario **SOVRA-ESPRIMERE** la proteina X
2. È necessario predisporre un esperimento di **CONTROLLO**
3. Analizzare la differenza tra le due popolazioni cellulari in termini di apoptosi

Clonaggio del cDNA X in un vettore di espressione  
Trasfezione delle cellule (transiente o stabile)

