

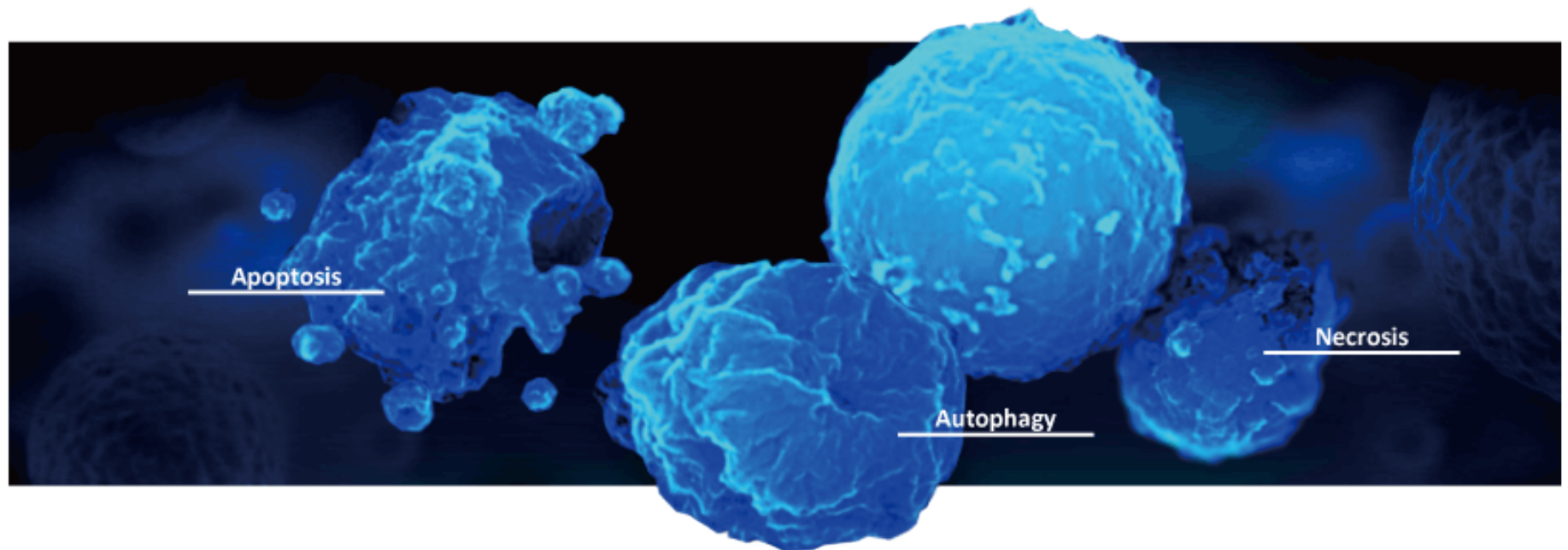
Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

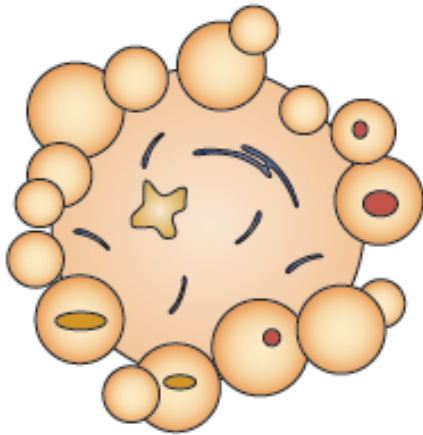
Lezione 5

STUDIO DELLA MORTE CELLULARE



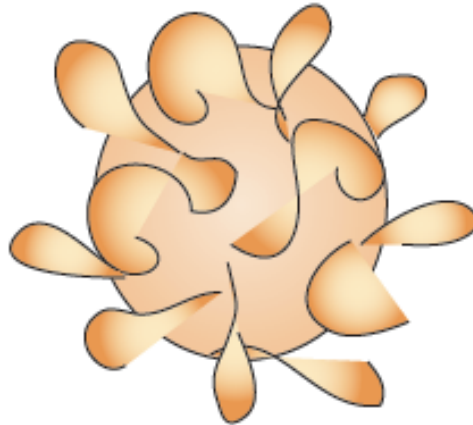
Diversi tipi di morte cellulare

apoptosi



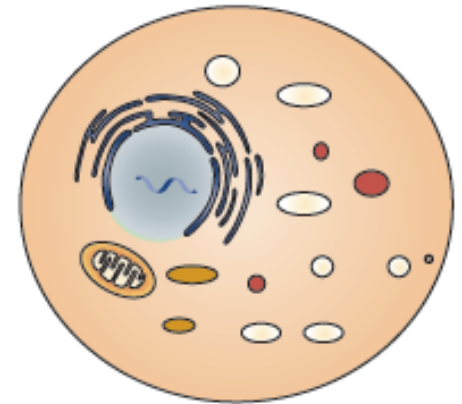
vescicolazione

necrosi



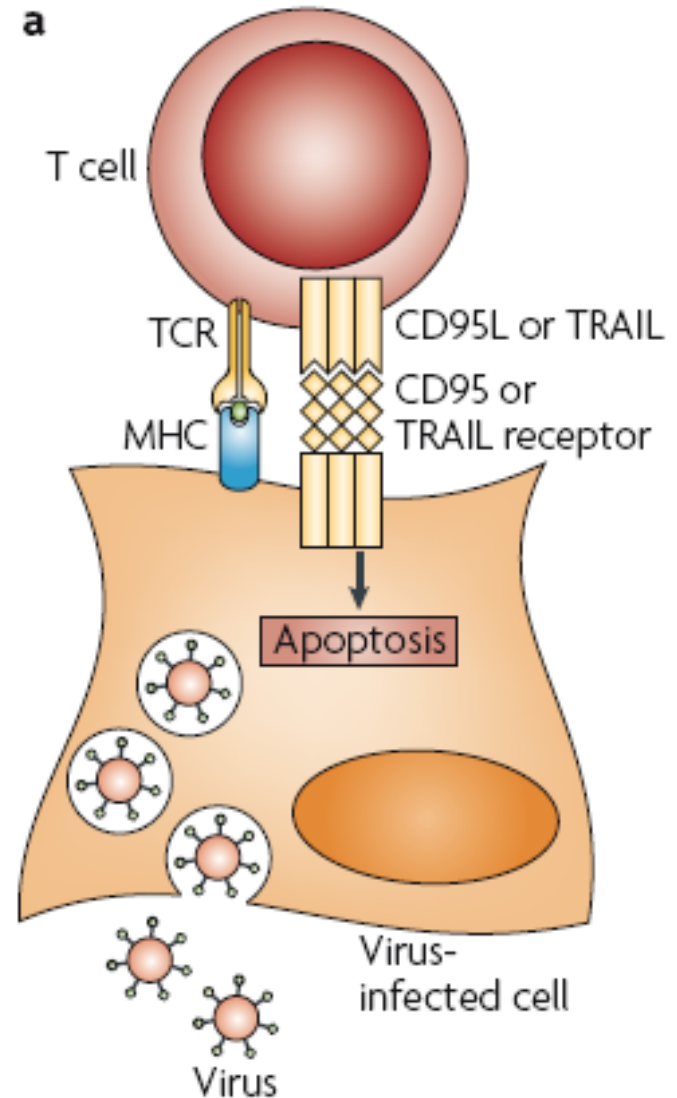
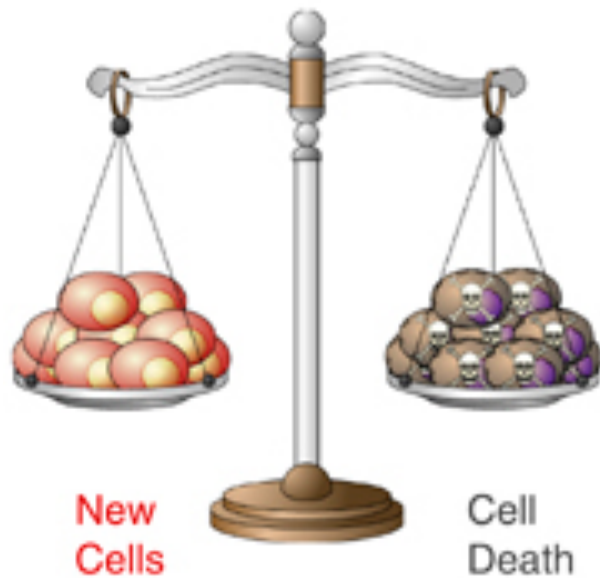
lisi cellulare

autofagia

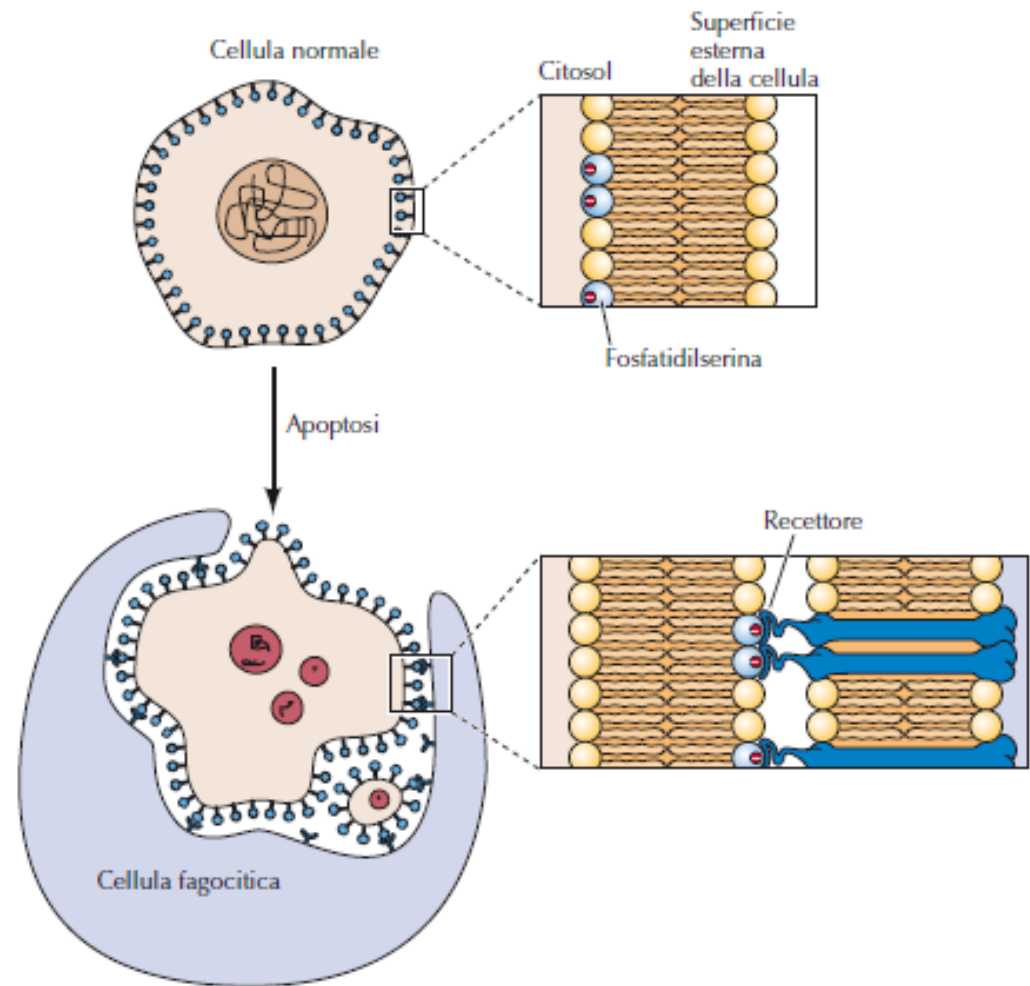
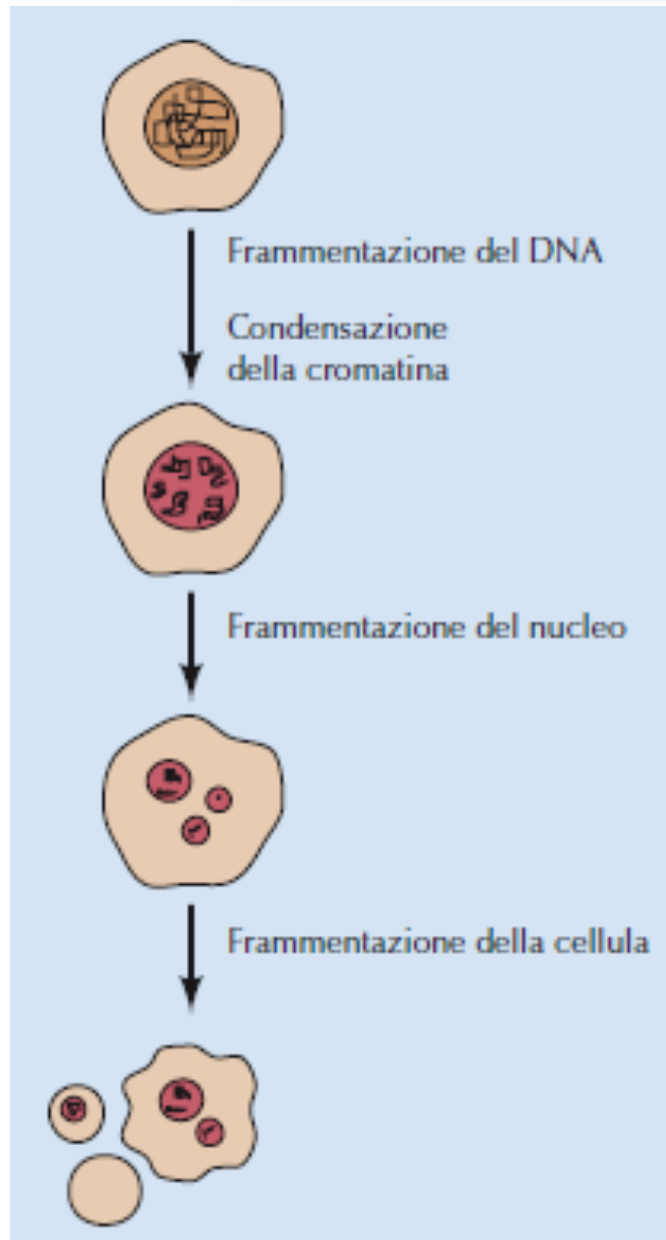


formazione
di autofagosomi

APOPTOSI: ruoli fisiologici e patologici

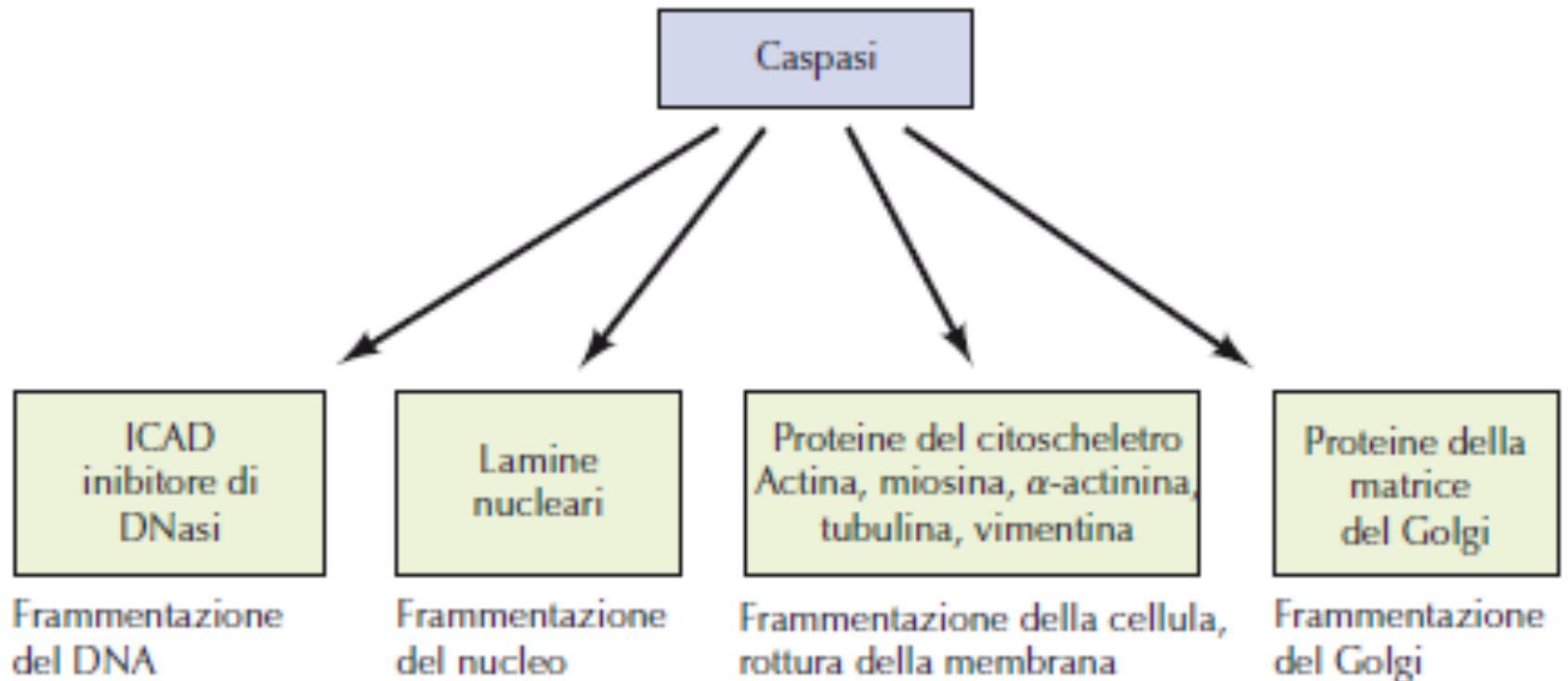


Sequenza di eventi dell'apoptosi



Le caspasi: enzimi effettori dell'apoptosi

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

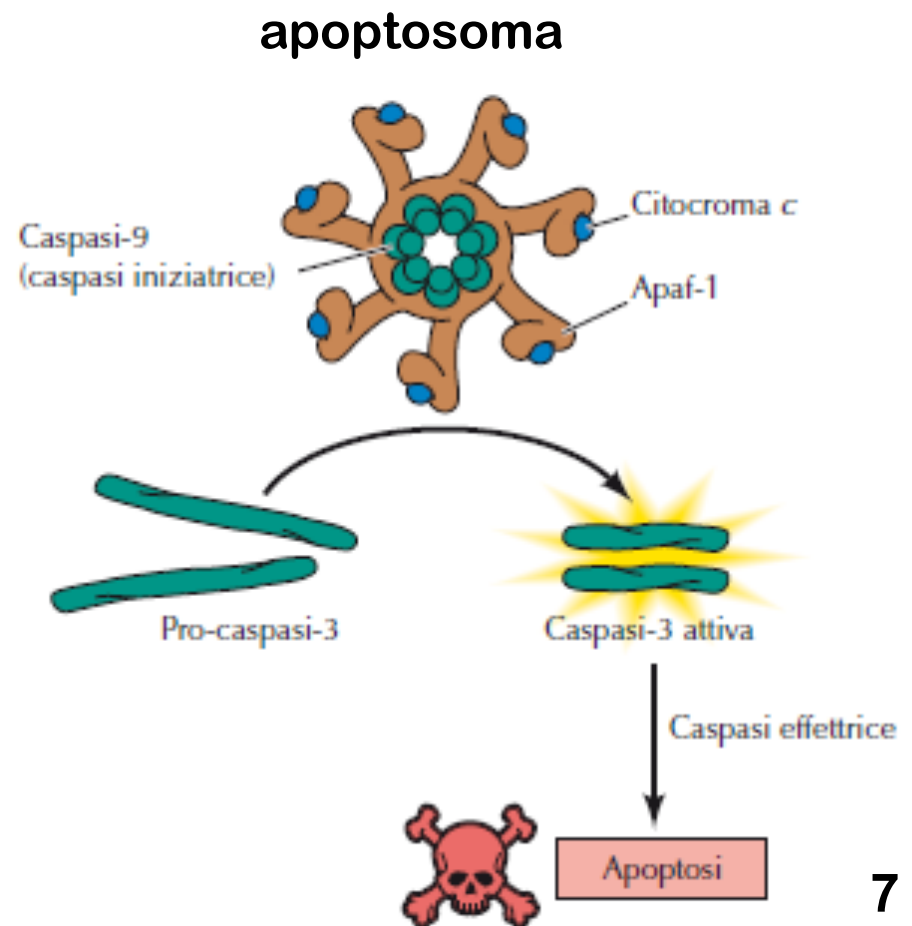
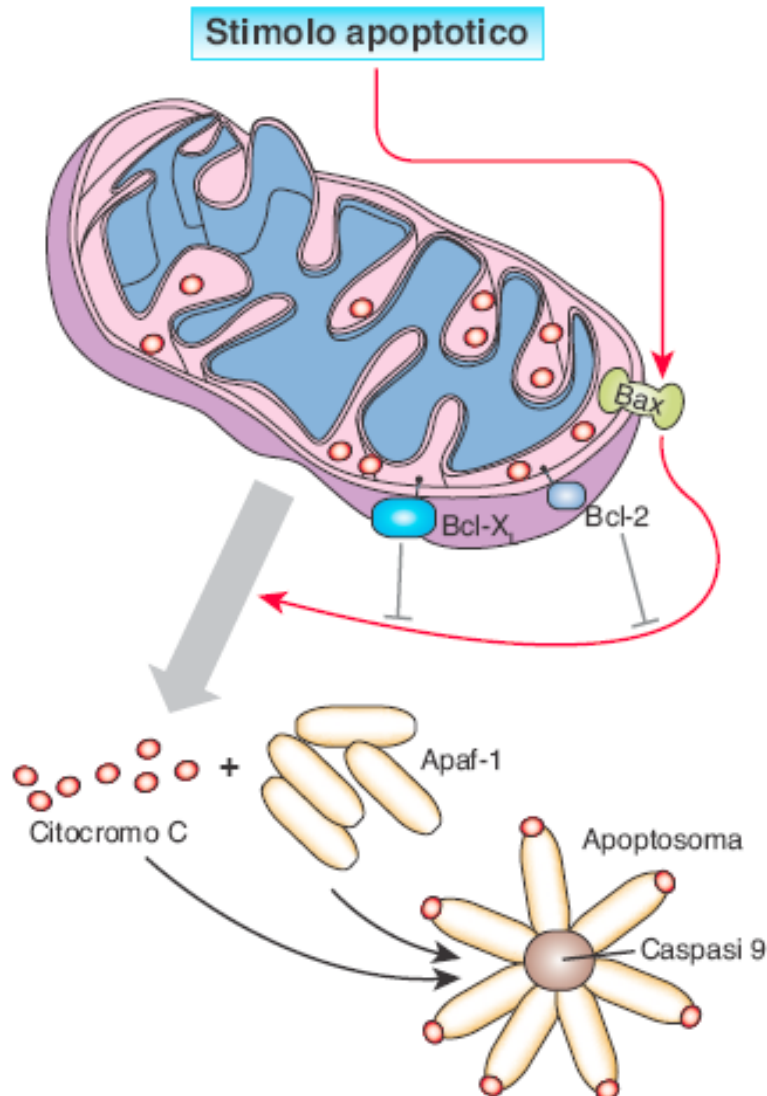


Apoptosi (via intrinseca) sequenza di eventi

Permeabilizzazione mitocondriale



Attivazione delle caspasi

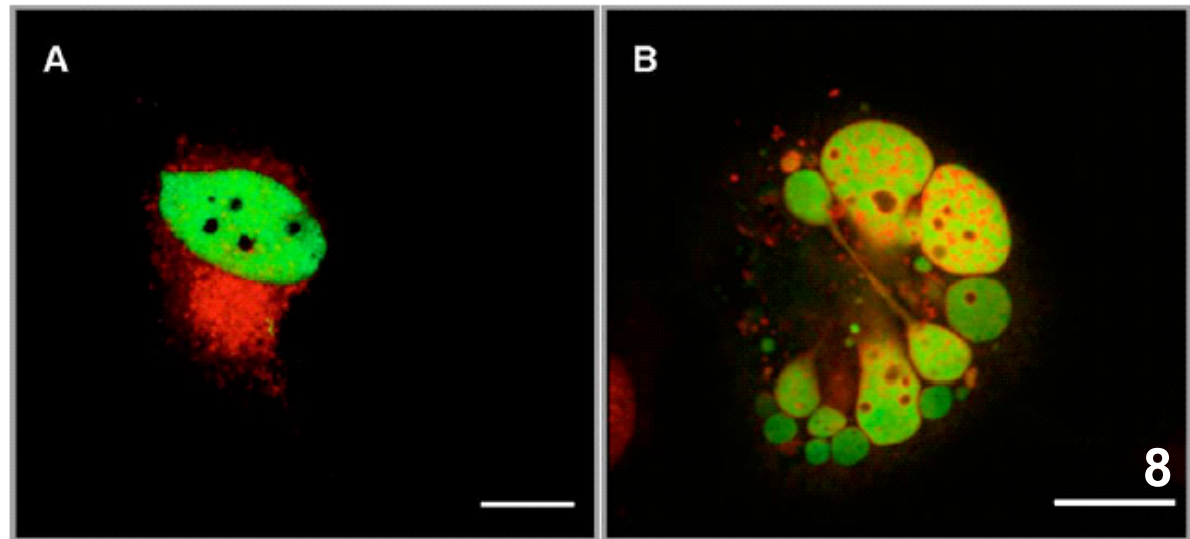
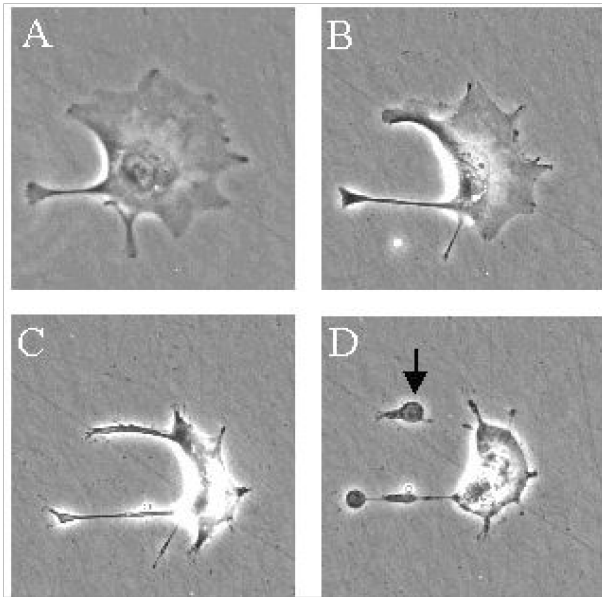


Saggi di apoptosi

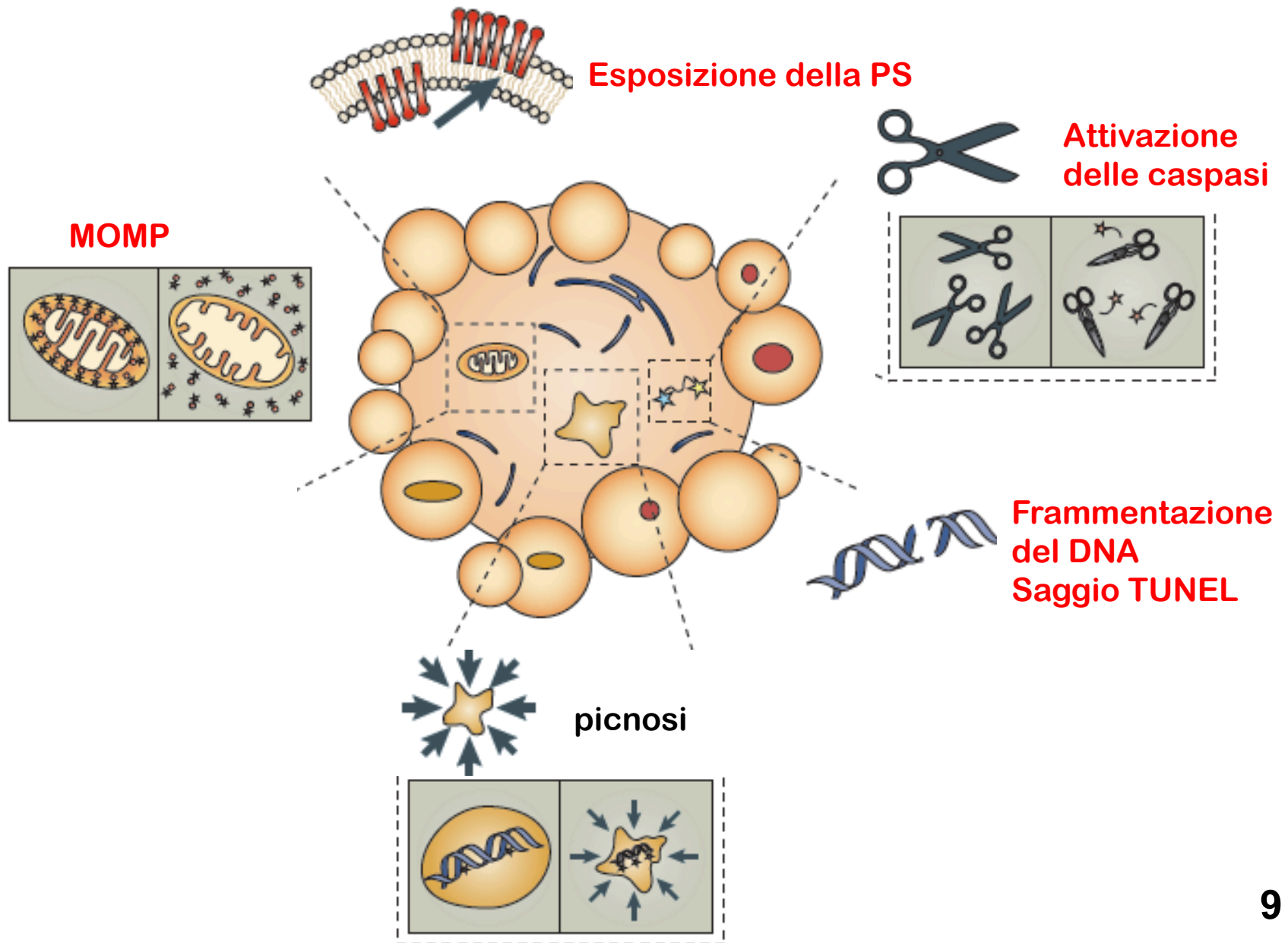
Il processo di apoptosi è accompagnato da specifici cambiamenti:

- 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



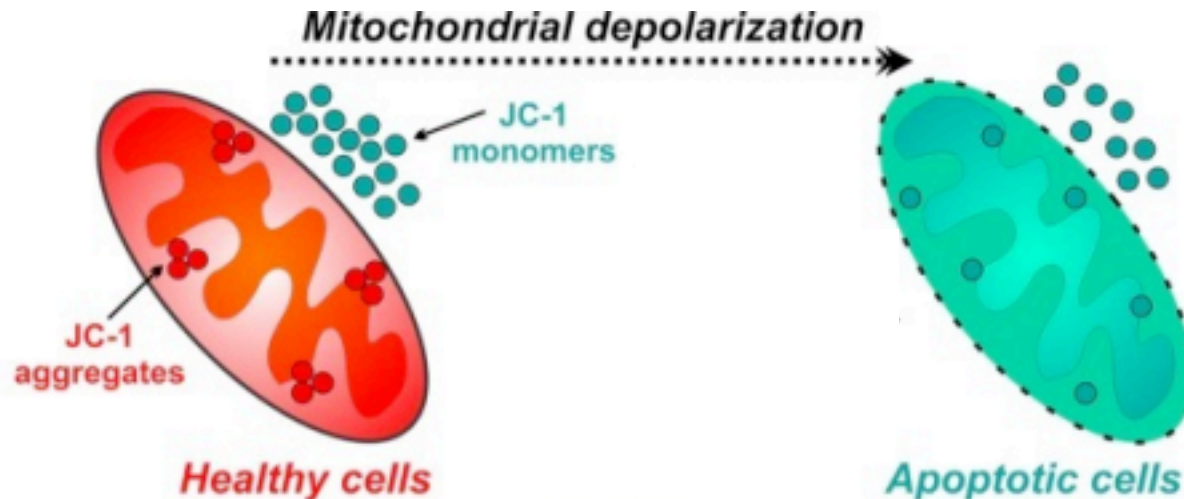
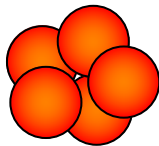
APOPTOSI: visualizzazione in cellule



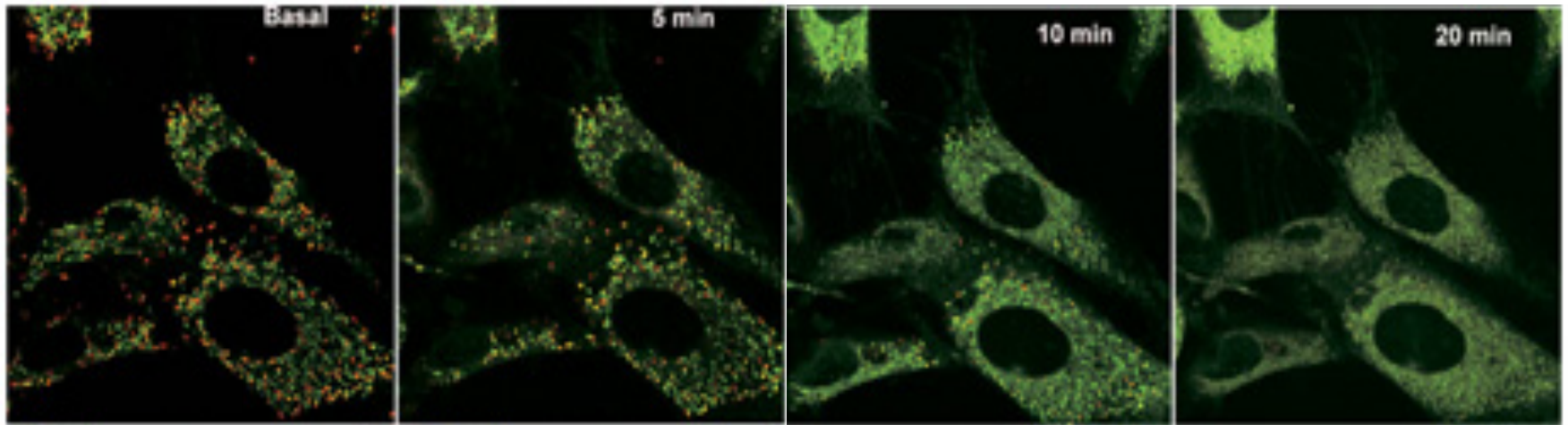
Saggi di permeabilizzazione mitocondriale (cellule non fissate)

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

rosso (aggregato) - verde (monomero)



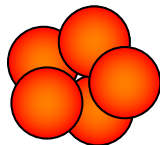
Saggi di permeabilizzazione mitocondriale (cellule non fissate)



Permeabilizzazione mitocondriale:

colorazione vitale con molecole indicatrici la cui fluorescenza cambia da:

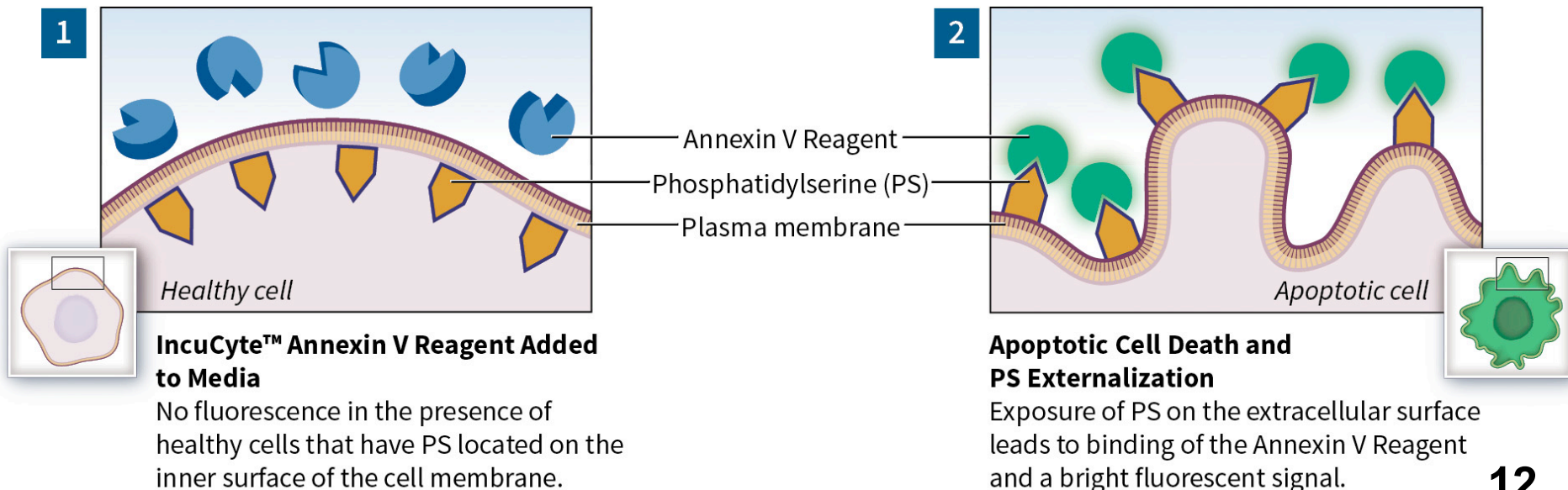
rosso (aggregato mitocondriale) - **verde (monomero citoplasmatico)**



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

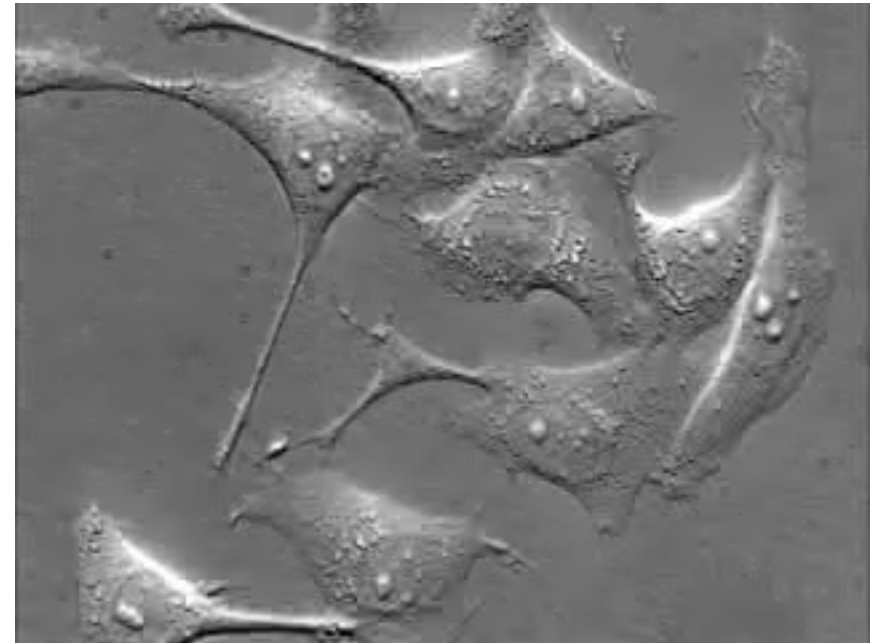
Visualizzazione della PS mediante colorazione con **ANNEXINA V** coniugata a un fluorocromo (qui FITC)



APOPTOSI: visualizzazione “live” in cellule in coltura

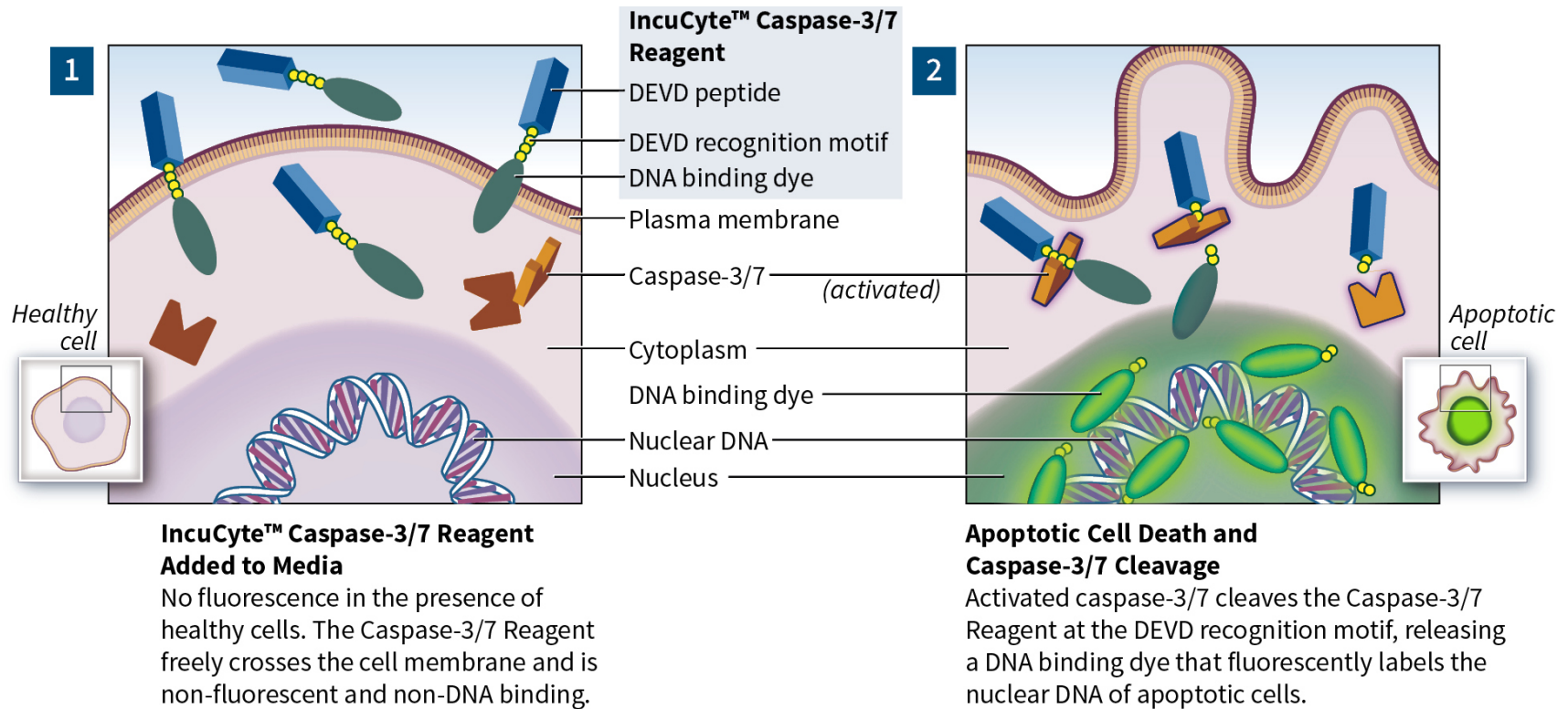
<https://www.youtube.com/watch?v=rs1Je-8Y3Po>

- 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)



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

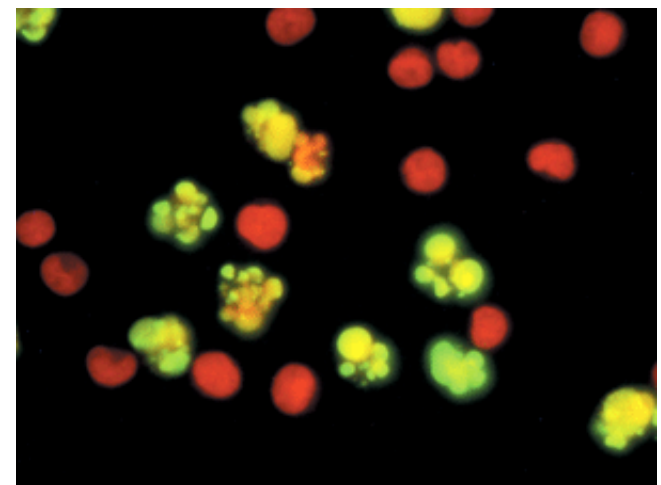
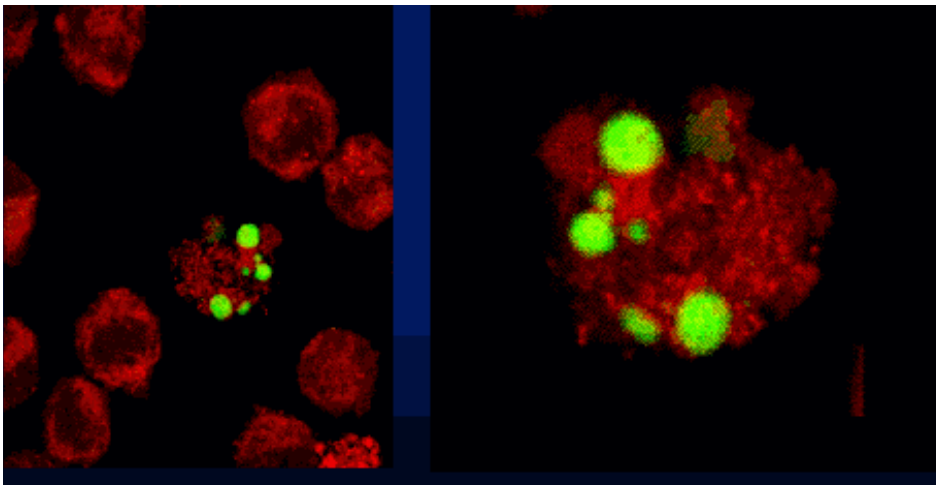
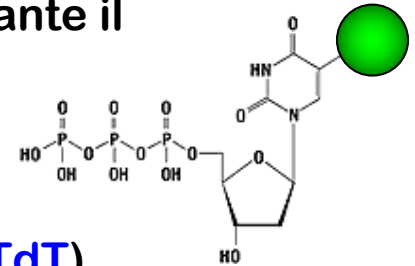
- un **colorante fluorescente che si intercala al DNA**, oppure
- una molecola chemiluminescente
- ...

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 15

Diverse modalità di indagine:

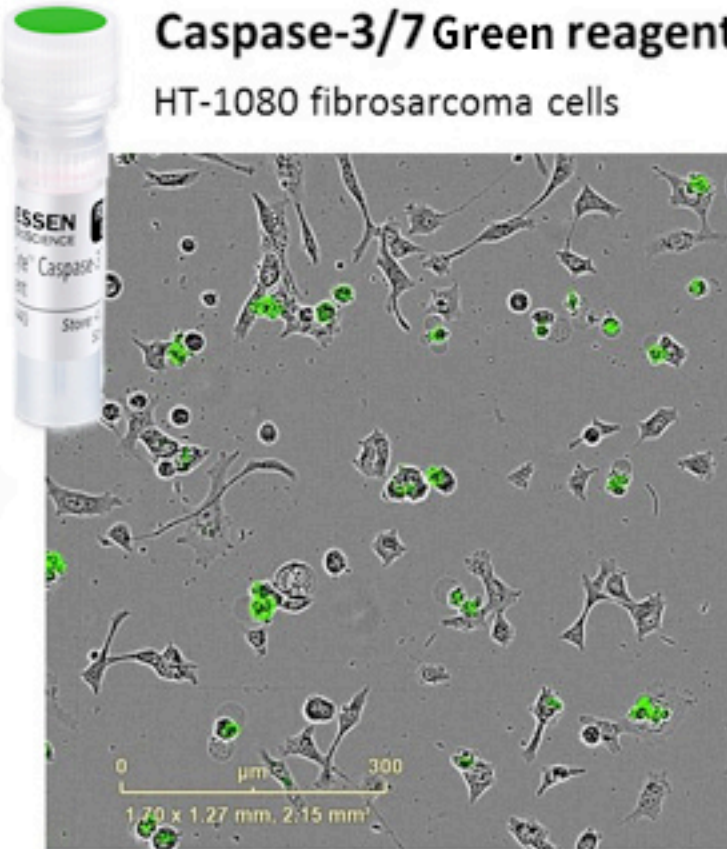
- **Microscopia a fluorescenza**
- **Lettura di fluorescenza realtime**
- **Citofluorimetria**

Valutazione quantitativa di apoptosi mediante lettore realtime

Caspase-3/7 Green reagent

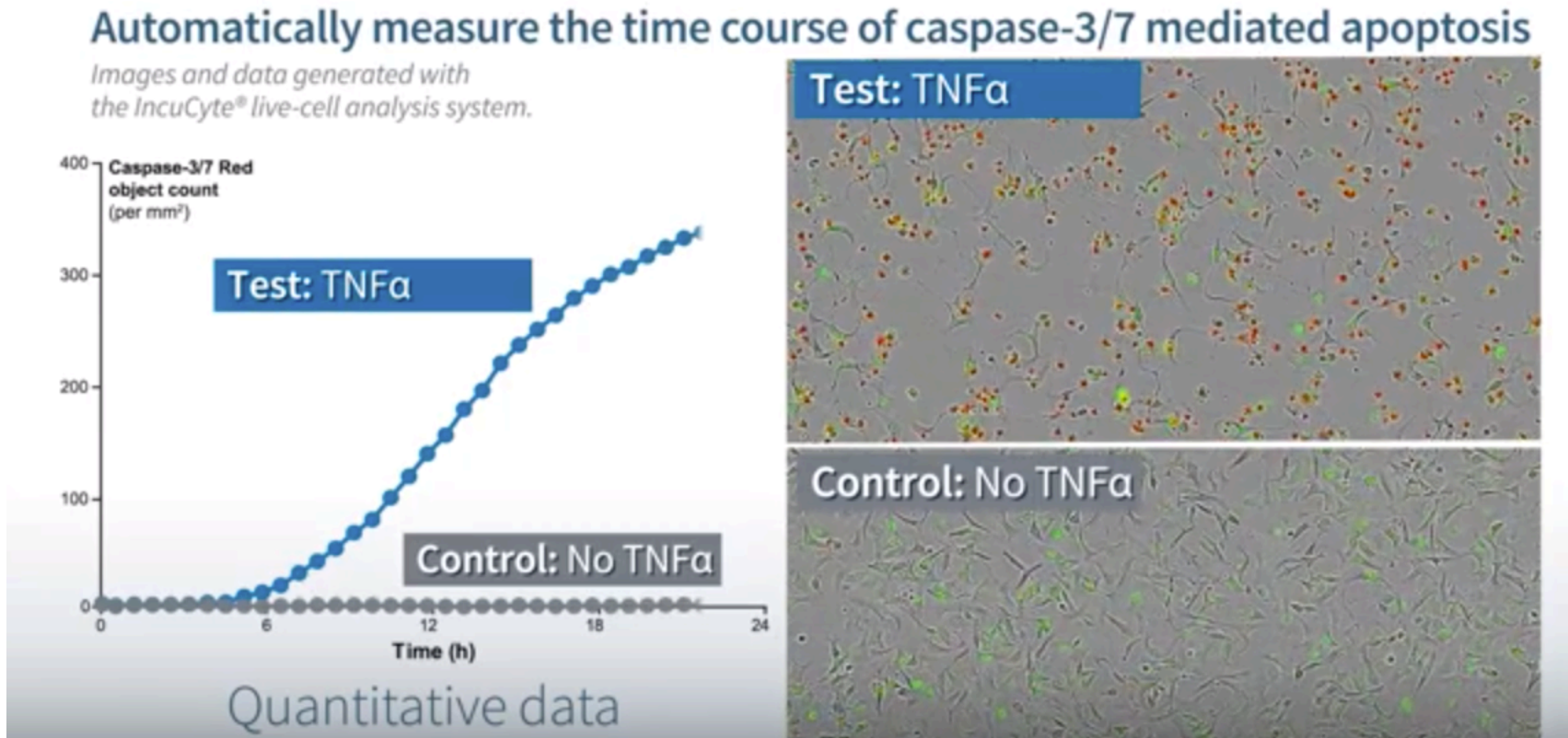
HT-1080 fibrosarcoma cells

Fluorescence



Valutazione quantitativa di apoptosi mediante lettore realtime

<https://www.youtube.com/watch?v=FidPF2EJb0I>



Real-time detection of apoptosis in Green labeled MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells treated with TNF α and cycloheximide.

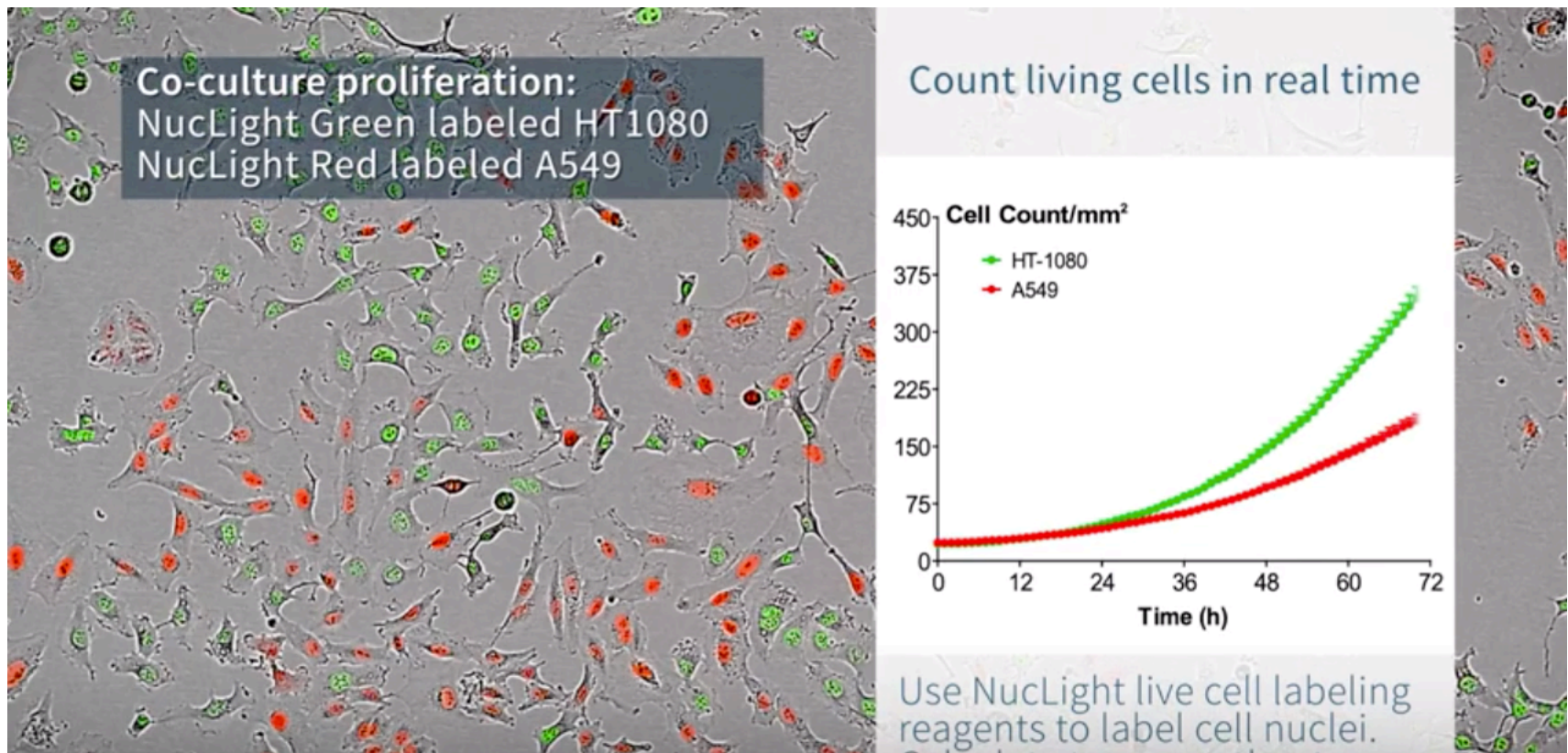
Apoptotic cells are labeled red using Caspase-3/7 Red Reagent. Apoptotic cells are quantified in real time using the IncuCyte Live-Cell Analysis System.

Valutazione quantitativa di proliferazione mediante lettore realtime

NB: il lettore realtime permette di effettuare anche saggi di proliferazione e di vitalità cellulare, tra gli altri.

Qui: https://www.youtube.com/watch?v=WaFp5_cArdk

2 diversi tipi cellulari sono colorati con specifici coloranti nucleari fluorescenti e cresciuti in cocoltura, quindi ne viene misurata la proliferazione in realtime (conta del numero di cellule nel tempo).



Slide 19: Time-lapse movie of co-culture cell proliferation.

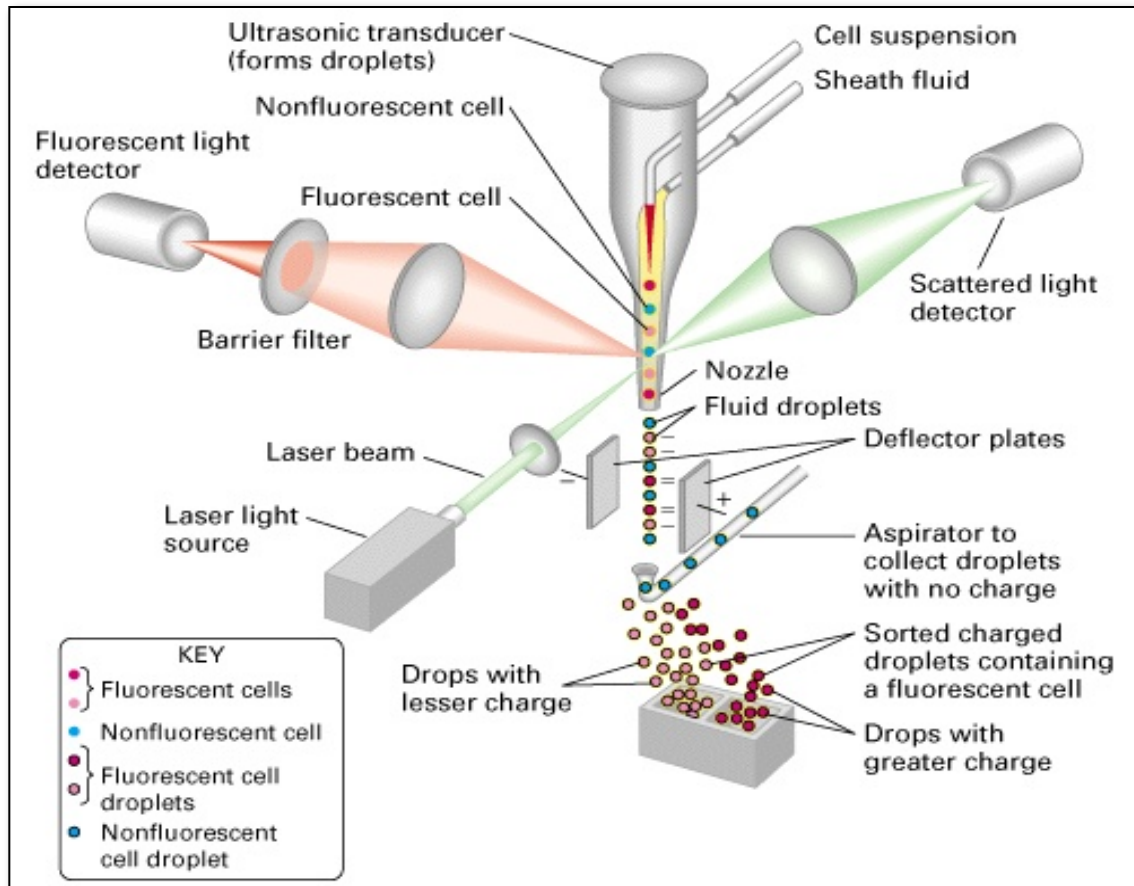
Live cell labeling reagents enable efficient, non-perturbing, nuclear labeling of living cells and were used to label cell nuclei and accurately count cell sub-populations in real time using the IncuCyte® live-cell analysis system.

Green labeled HT-1080 fibrosarcoma cells were grown in co-culture with Red labeled A549 lung carcinoma cells.

Note the different doubling times of the two cell types which can be derived from the time vs. cell count plot (doubling times; HT-1080, 16 hours; A549, 20 hours).

Automated detection of fluorescent nuclei using this live-cell analysis system enables real-time, live-cell counting with 96 or 384-well throughput within a standard cell culture incubator.

Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria



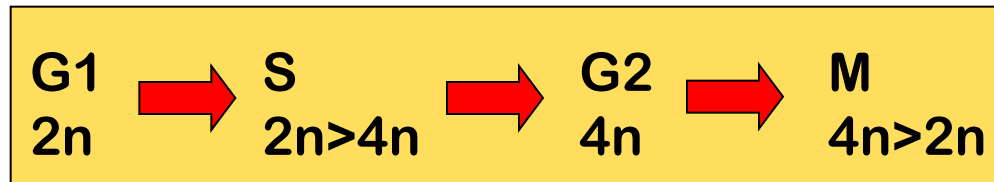
- Si può effettuare una **colorazione con** :
 1. **sostanze fluorescenti** che legano specifiche molecole cellulari (**es. Annexina V**)
 2. **substrati fluorescenti** per le caspasi
 3. **intercalanti fluorescenti** degli acidi nucleici (**PROPIDIO IODURO**)
 4. opportuni **anticorpi** (vedi **lezione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

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

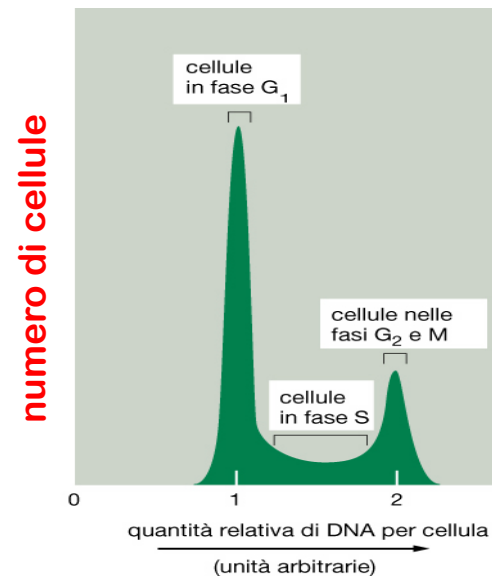
Le cellule vengono risospese, fissate e **permeabilizzate** e poi incubate con **PROPIDIO IODURO** per colorare il DNA (fluorescenza rossa):

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

in ciascuna cellula



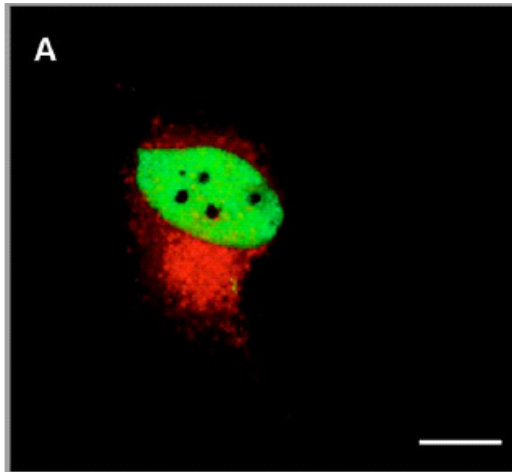
cellule in crescita asincrona



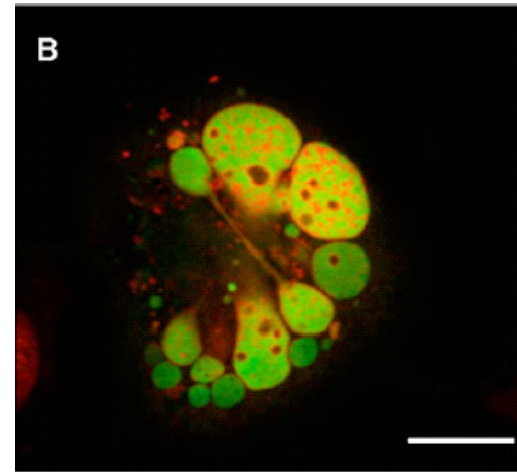
G0/G1	S	G2/M
2n	2n > 4n	4n > 2n

intensità di fluorescenza

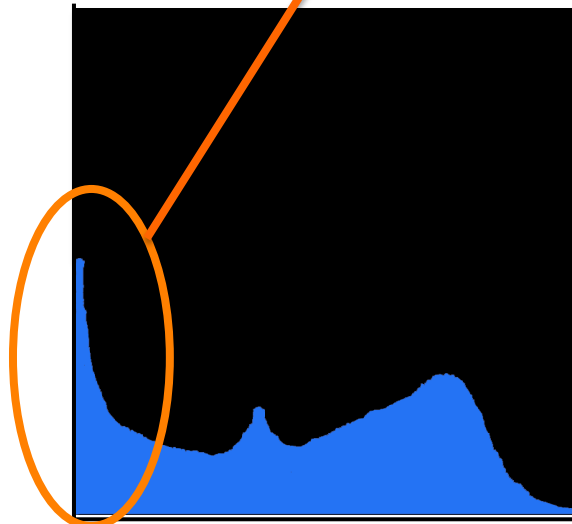
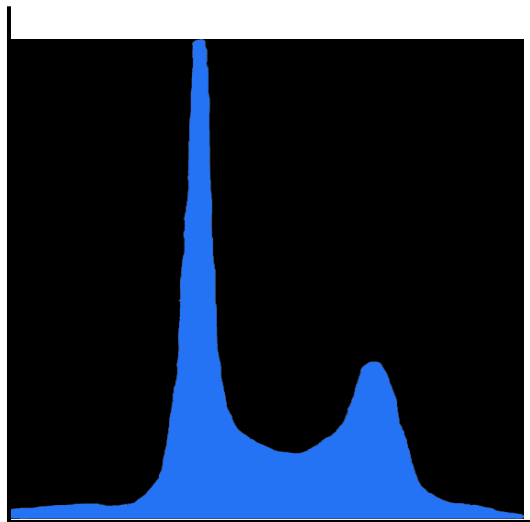
I **corpi apoptotici** hanno contenuto di DNA inferiore a $2n$



Cellule in crescita asincrona

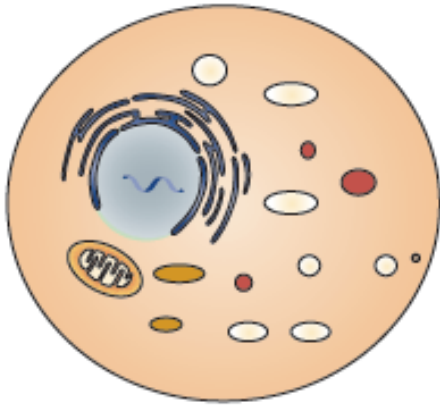


Cellule in apoptosi



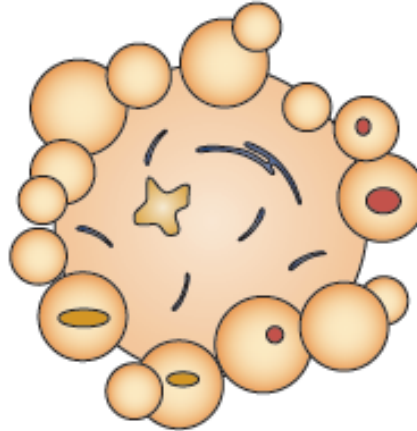
diversi tipi di morte cellulare

autofagia



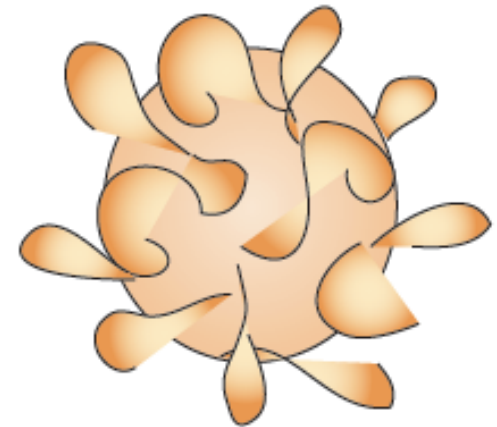
formazione
di autofagosomi

apoptosi



vescicolazione

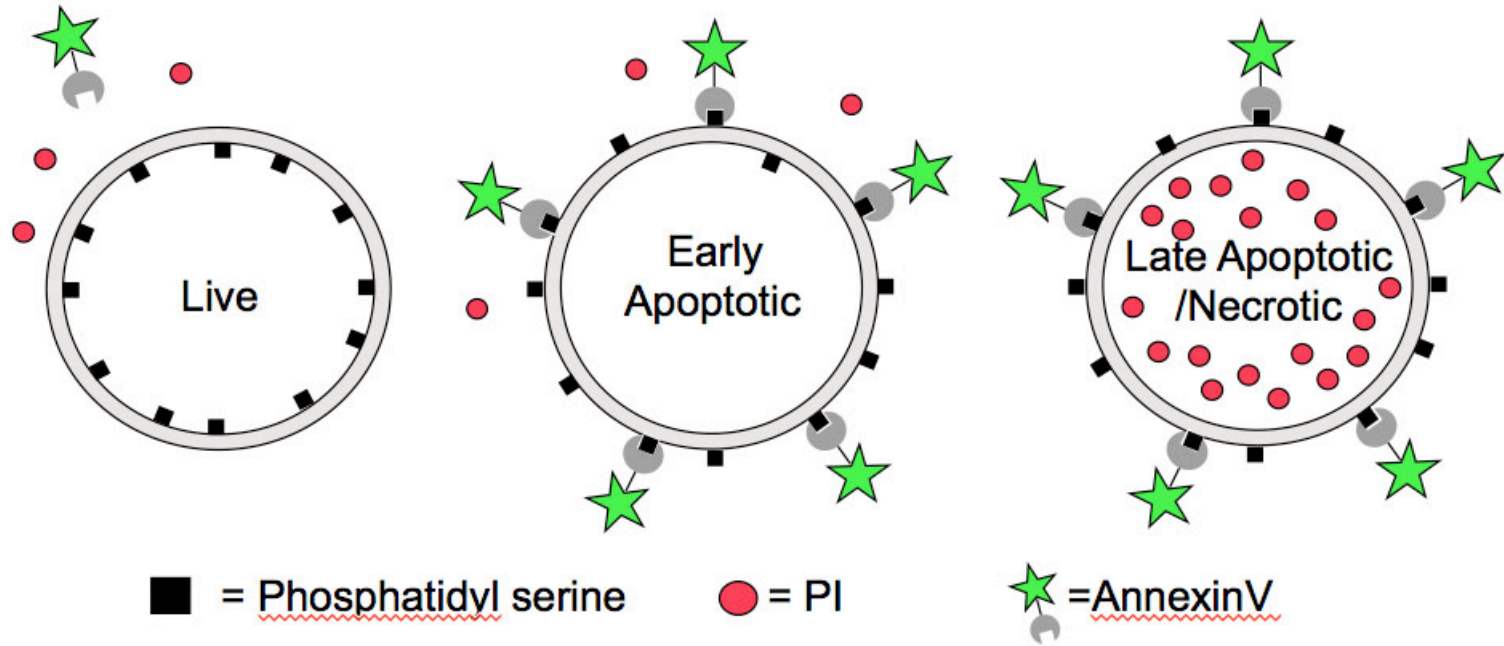
necrosi



lisi

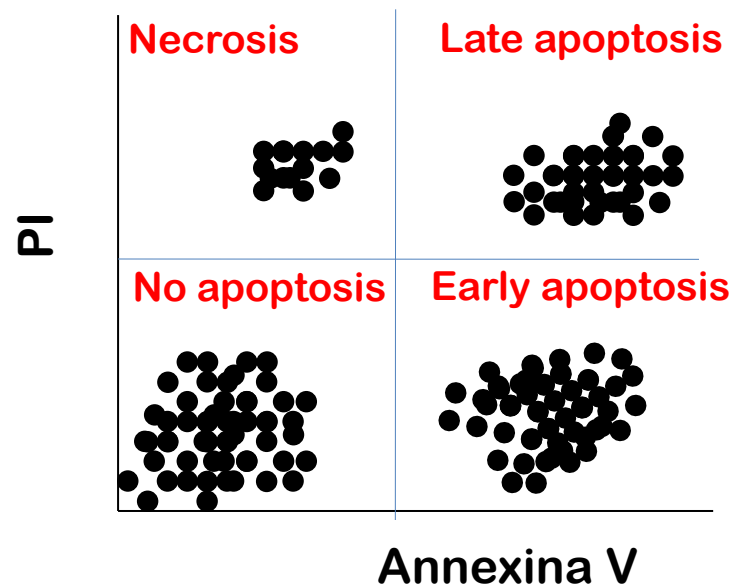
Distinzione del tipo di morte cellulare mediante CF in cellule NON permeabilizzate: Annexina + Propidio Ioduro

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

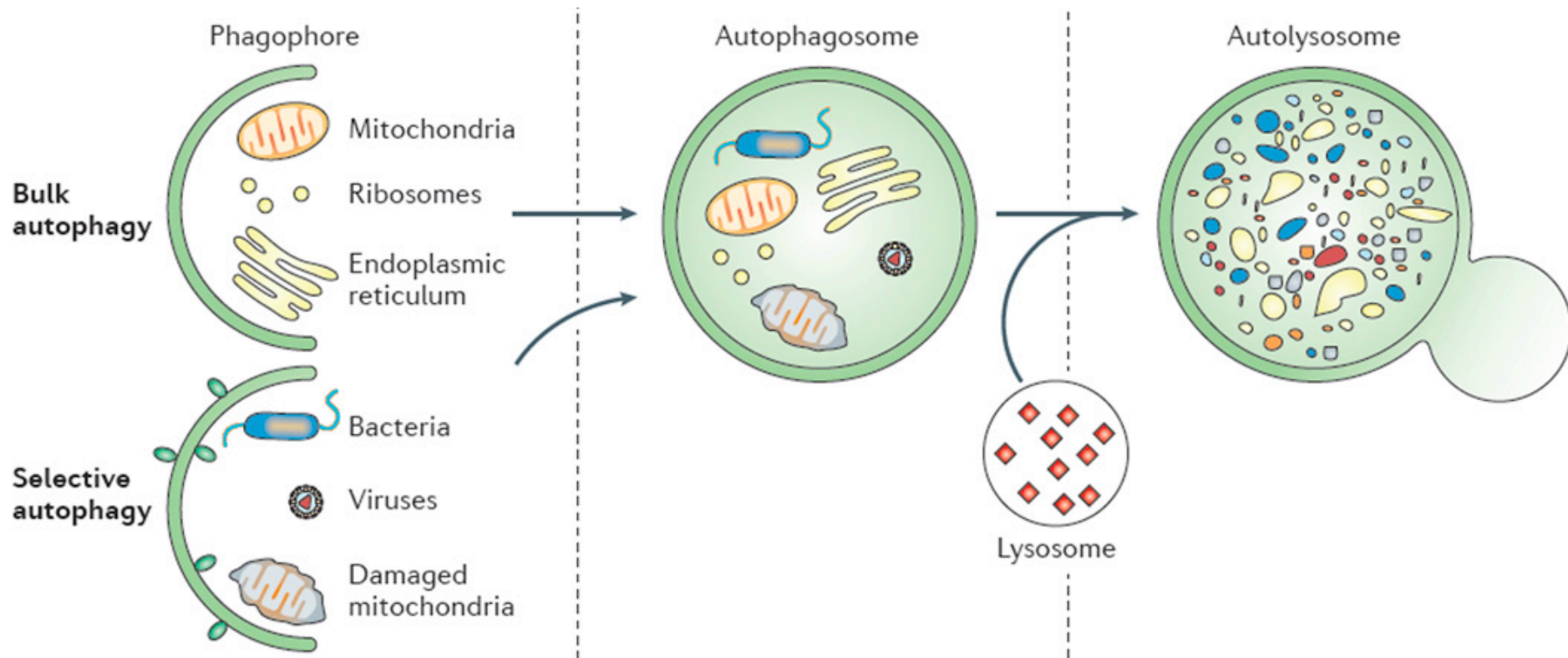


L'integrità della membrana plasmatica viene persa durante il processo di necrosi e negli stadi finali del processo di apoptosis: il PI può penetrare solo in tali cellule

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

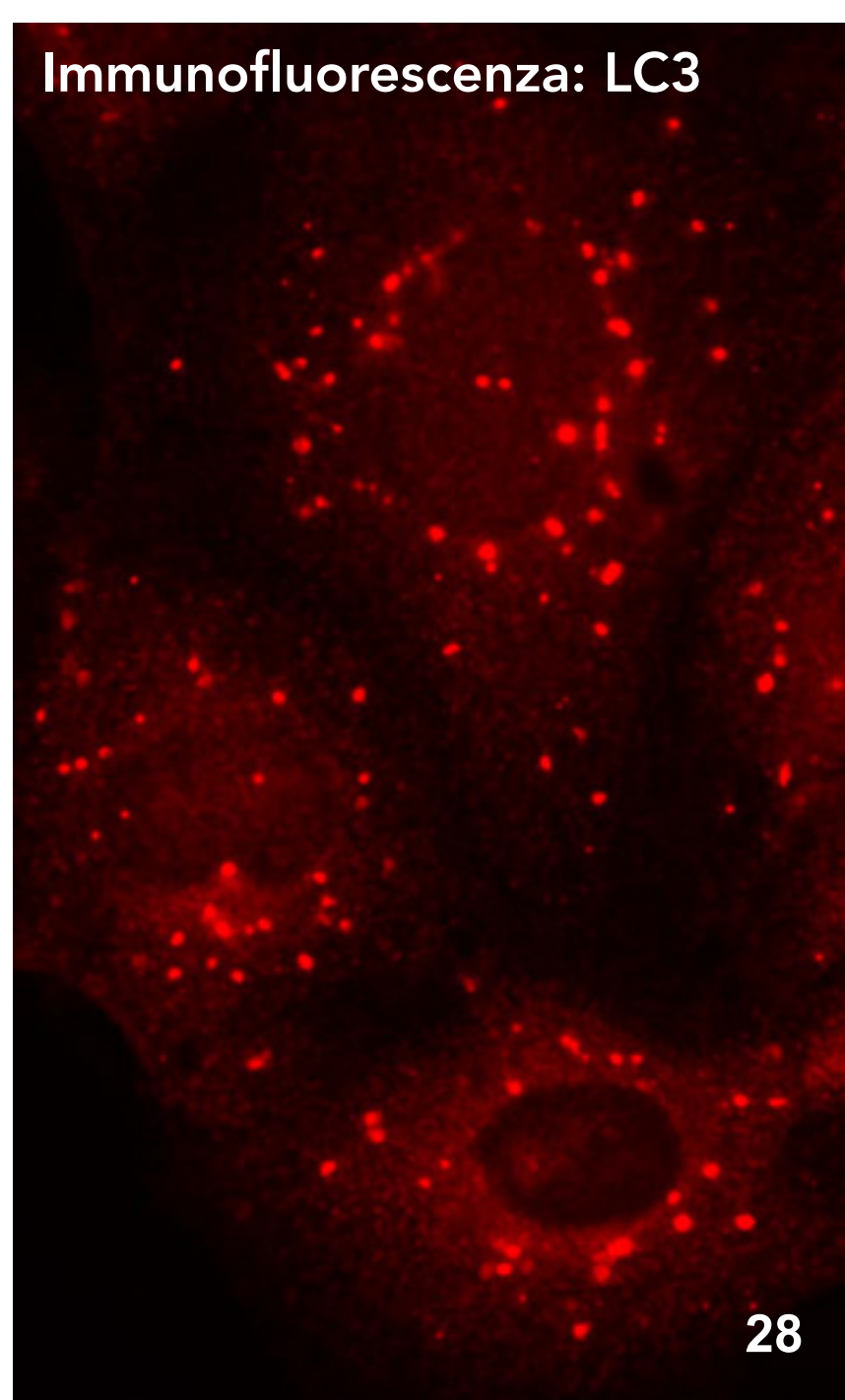
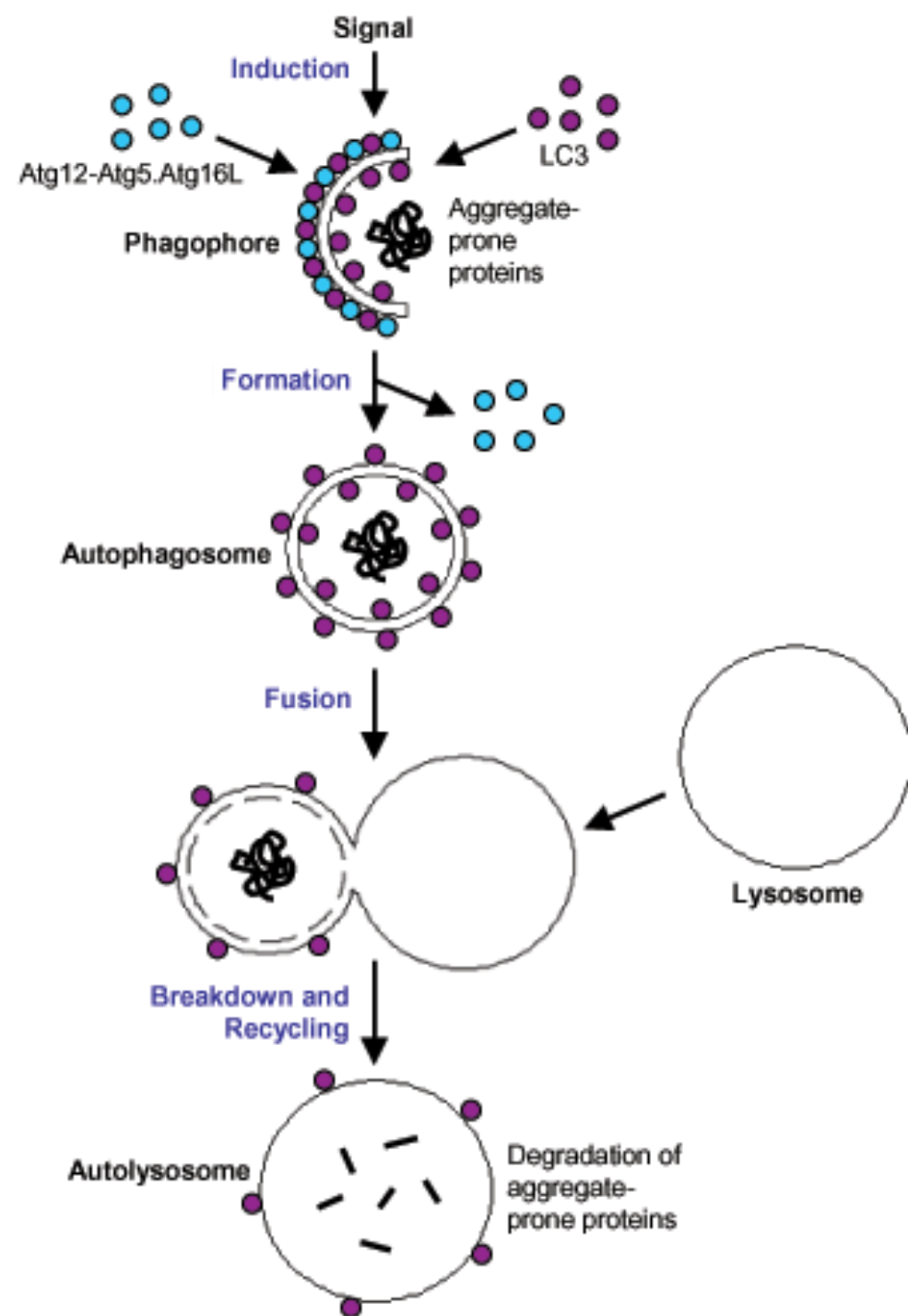


Valutazione dell'autofagia



LC3

Immunofluorescenza: LC3



Visualizzazione dei fagosomi mediante GFP-LC3

