

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Parte applicata

Lezione 1

Analisi dell' effetto di un gene X sulla proliferazione cellulare

Domanda scientifica:

il gene X ha un effetto sulla proliferazione cellulare?

Analisi dell' effetto di un gene X sulla proliferazione cellulare

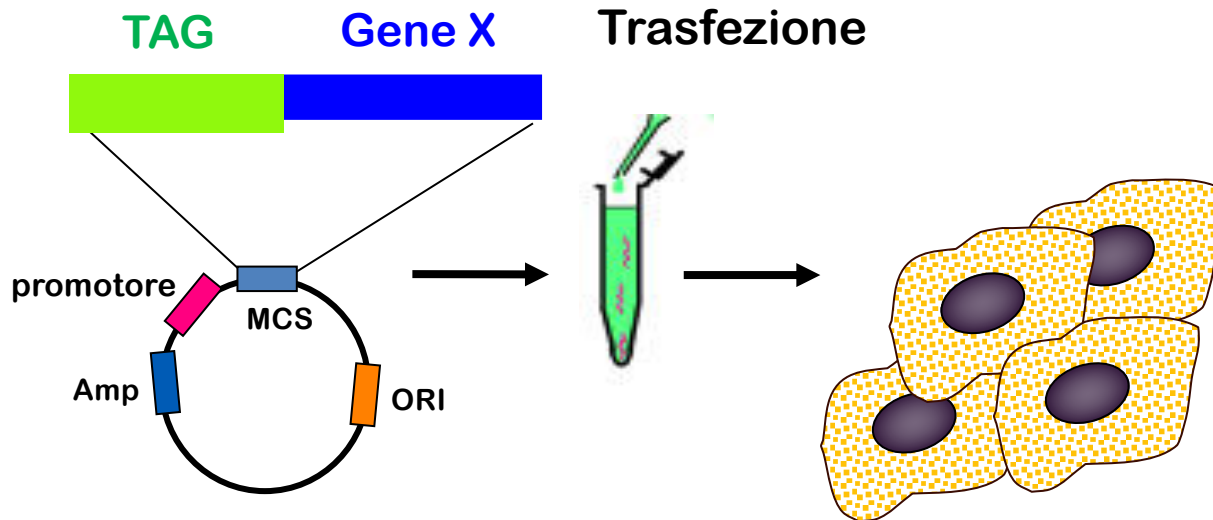
Strategia sperimentale

1. È necessario scegliere un Sistema cellulare modello
2. È necessario modulare l'espressione di X – es SOVRA-ESPRIMERE nelle cellule scelte
3. È necessario predisporre un esperimento di CONTROLLO
4. È necessario DISTINGUERE le cellule trasfettate
5. Analizzare la differenza tra le due popolazioni cellulari in termini di proliferazione mediante un opportuno SAGGIO

Strategia sperimentale

Step 1

Clonaggio del cDNA X in un vettore di espressione (in frame con un TAG)



Step 2

Identificazione di un opportuno modello cellulare, progettazione dell'esperimento (includendo gli opportuni controlli) e trasfezione delle cellule (transiente o stabile) con il vettore generato

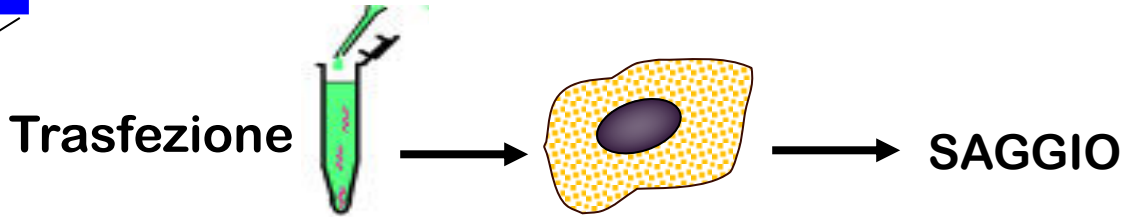
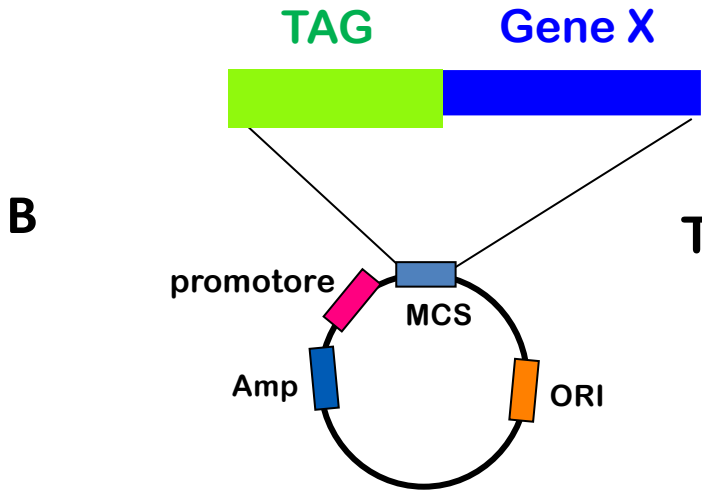
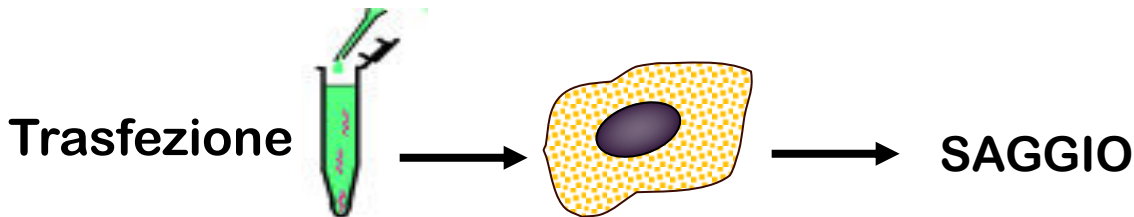
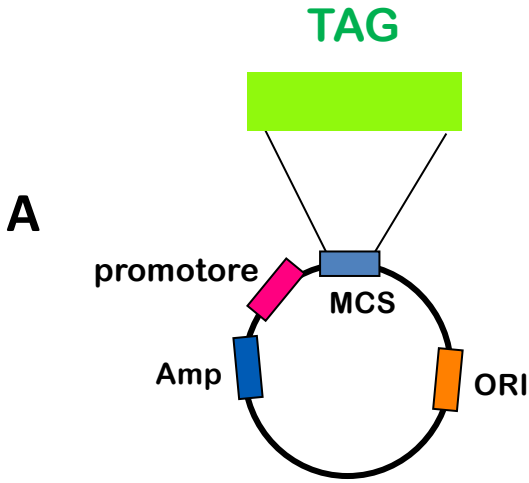
Progettazione dell'esperimento

A- CONTROLLO

vettore vuoto pcDNA3-TAG

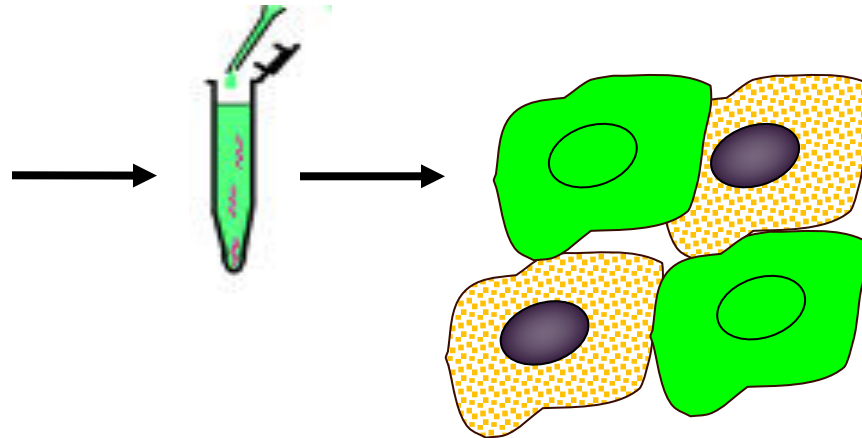
B- SOVRAESPRESSIONE cDNA X

vettore pcDNA3-X-TAG



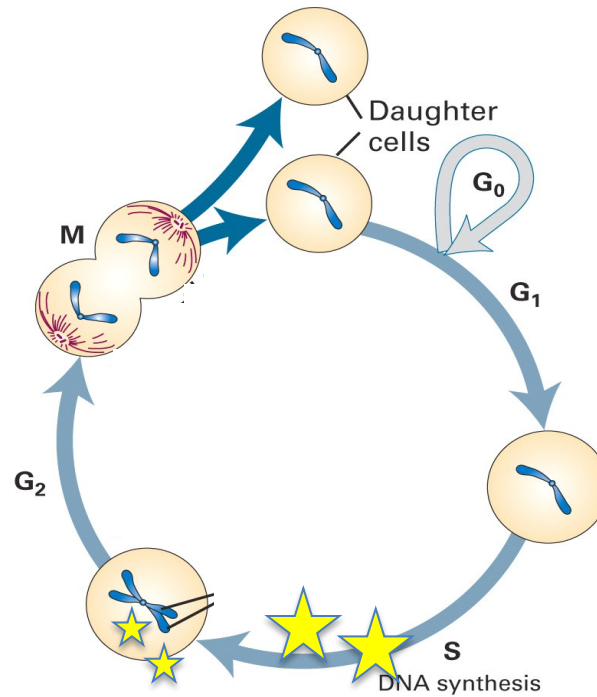
Esperimento: analisi dell'effetto del gene/proteina X sulla proliferazione cellulare

Trasfezione



Il TAG GFP permette di identificare e quantificare facilmente il numero di cellule trasfettate

SAGGIO DI PROLIFERAZIONE: visualizzazione della neosintesi di DNA



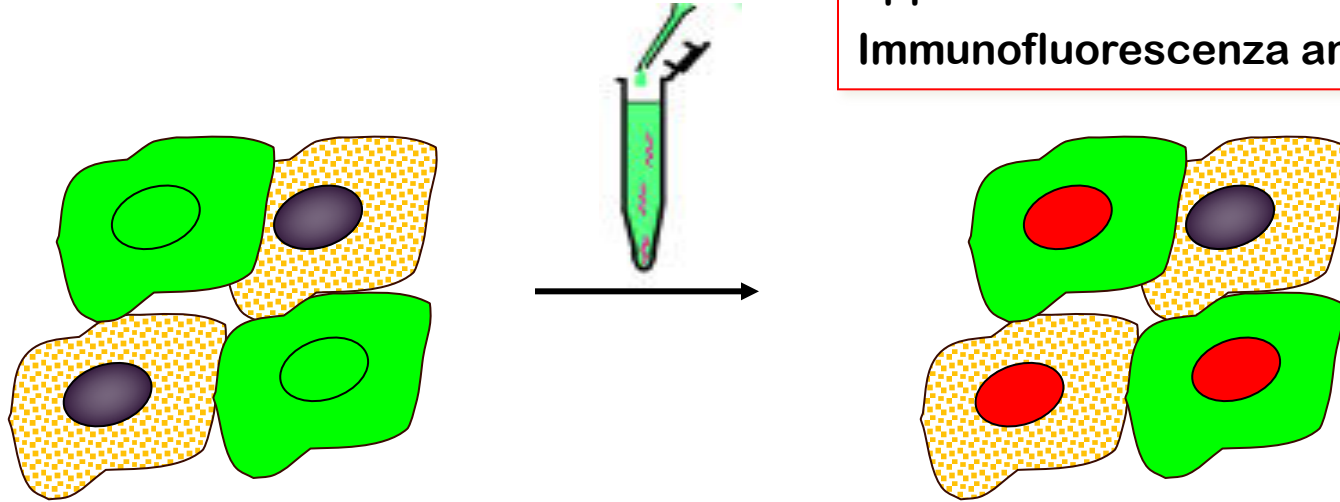
Le cellule in FASE S possono essere MARCATE aggiungendo al mezzo di coltura un **analogo della timidina: BrdU = 5-bromo desossiuridina**

Le cellule che hanno incorporato la BrdU (in fase S) possono essere poi IDENTIFICATE mediante **immunofluorescenza** con un **anticorpo anti-BrdU** e ed un anticorpo **secondario coniugato ad un fluorocromo (es. FITC)**

Incubazione di tutte le cellule con BrdU

Riconoscimento BrdU

(marcatura diretta con fluorocromo
oppure
Immunofluorescenza anti-BrdU)



% cellule
che sovra-esprimono X =
in FASE S:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ cellule verdi positive a BrdU (nuclei rossi)}}{\text{n}^{\circ} \text{ cellule che esprimono X (cellule verdi)}} \times 100$$

Confronto con le cellule di controllo (che NON sovra-esprimono X)

Quali altri approcci avreste potuto scegliere?

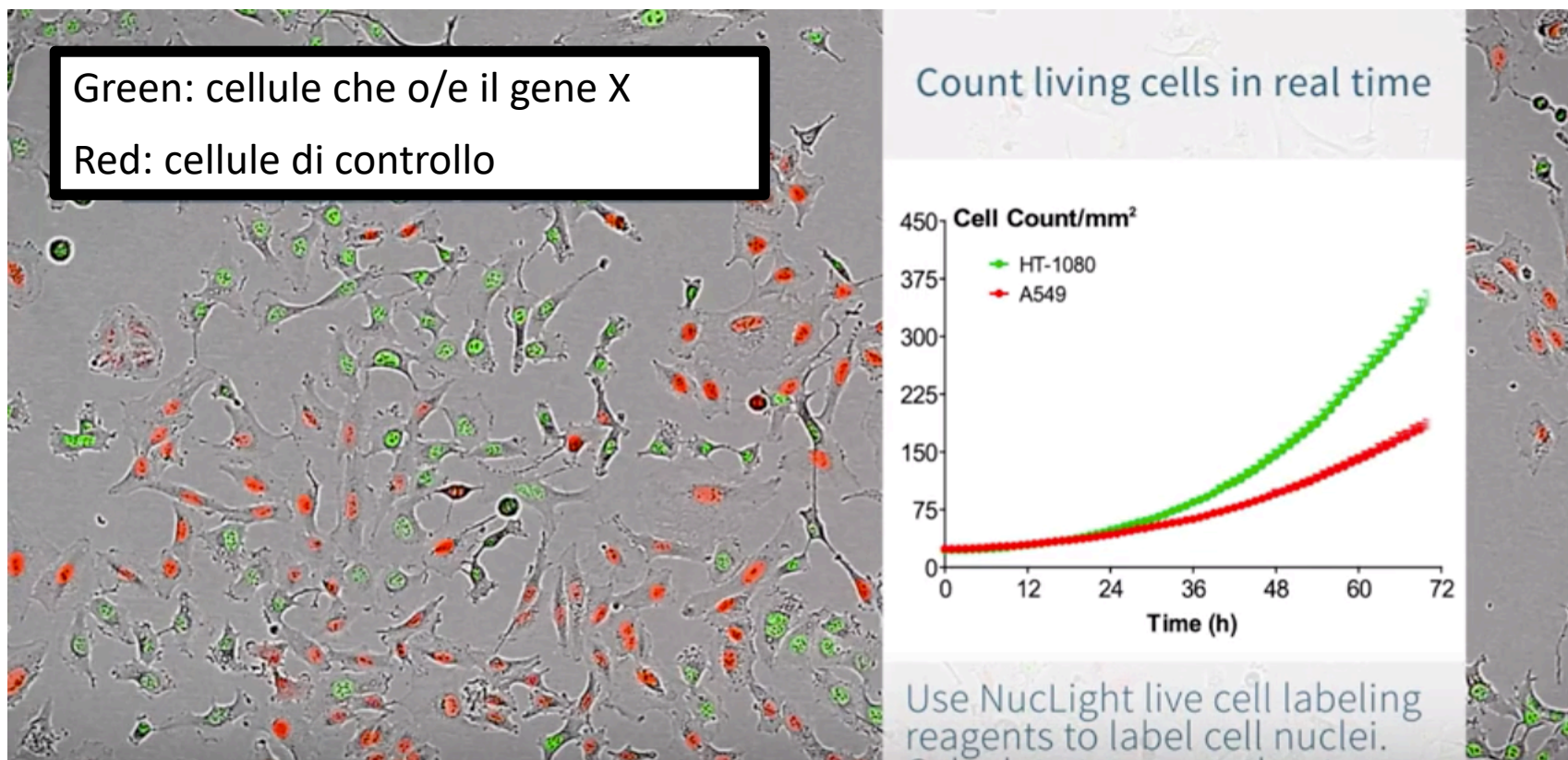
Analisi dell' effetto di un gene X sulla proliferazione cellulare

Strategia sperimentale #2

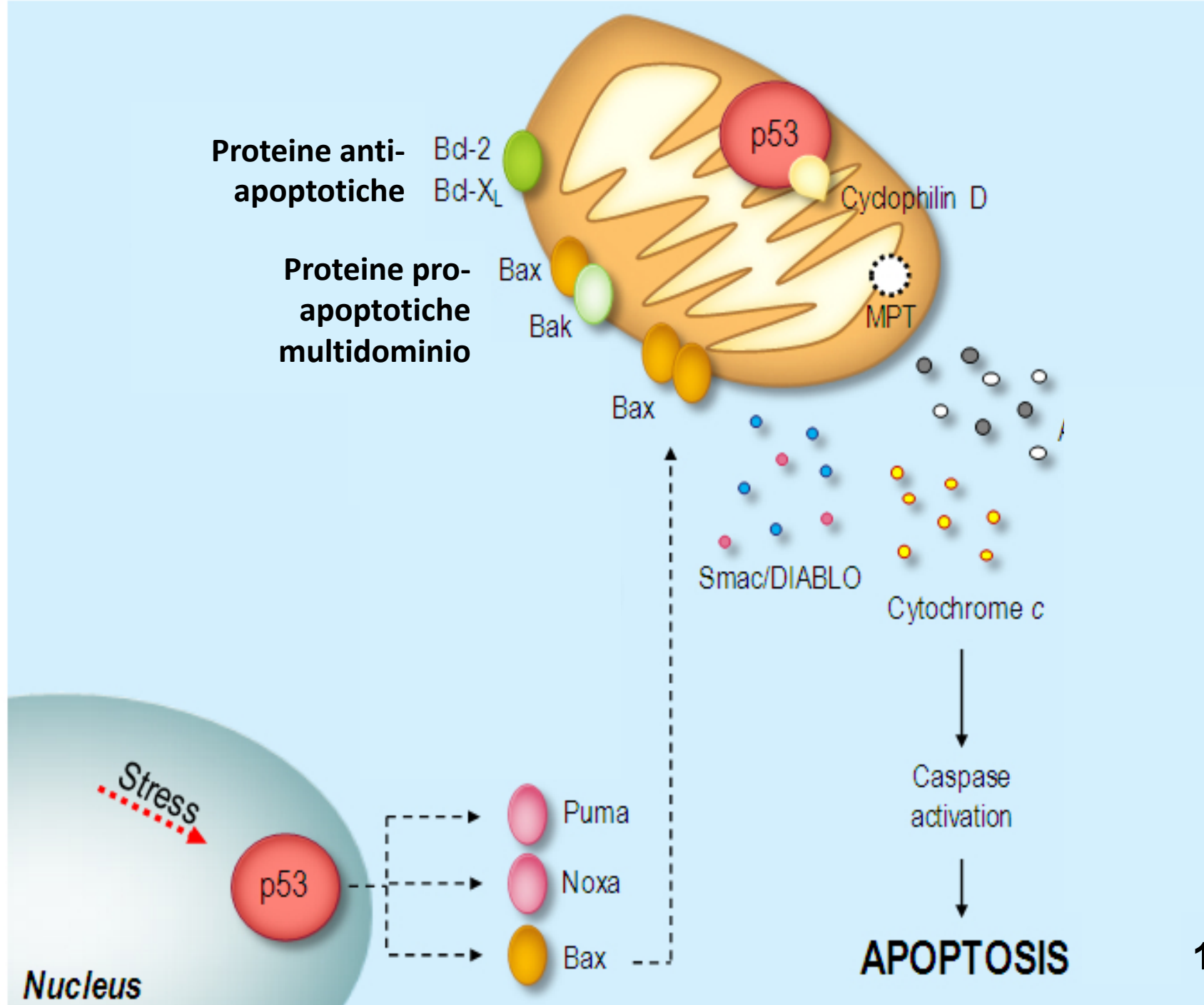
- 1. Generare una linea cellulare che sovraesprime stabilmente il gene X (oppure nella quale il gene è inibito) e una linea di controllo**
- 2. Analizzare la differenza tra le due popolazioni cellulari in termini di proliferazione mediante curve di crescita**

Valutazione quantitativa di proliferazione mediante lettore realtime

Le 2 linee cellulari in esame sono colorate con 2 coloranti nucleari diversi e cresciute in cocoltura, quindi ne viene misurata la proliferazione in realtime (conta del numero di cellule nel tempo).



Analisi dell' effetto del fattore di trascrizione p53 sulla morte cellulare



Domanda scientifica:

Qual è il ruolo del gene PUMA nell'induzione di apoptosi da parte di p53?

Strategia sperimentale

1. È necessario creare un sistema sperimentale in cui la morte cellulare è indotta dall'espressione/attività di p53 (in tale sistema, p53 induce l'espressione del gene PUMA)
2. In tale sistema possiamo inibire l'espressione del gene bersaglio PUMA (es. siRNA)
3. Predisporre gli opportuni **CONTROLLI**
4. Analizzare l'effetto in termini di induzione di apoptosi mediante un opportuno **SAGGIO**

Progettazione dell'esperimento

A- CONTROLLO

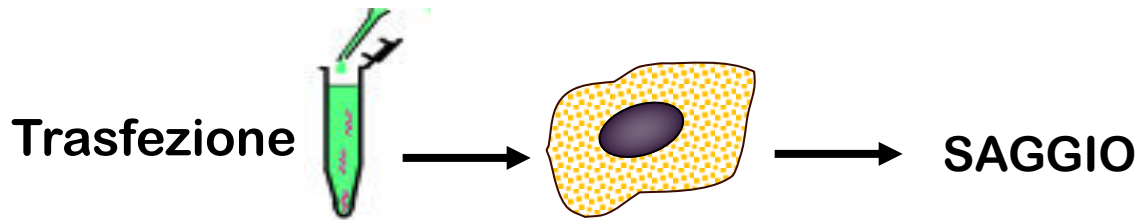
vettore vuoto pcDNA3-GFP

B- SOVRAESPRESSIONE cDNA p53

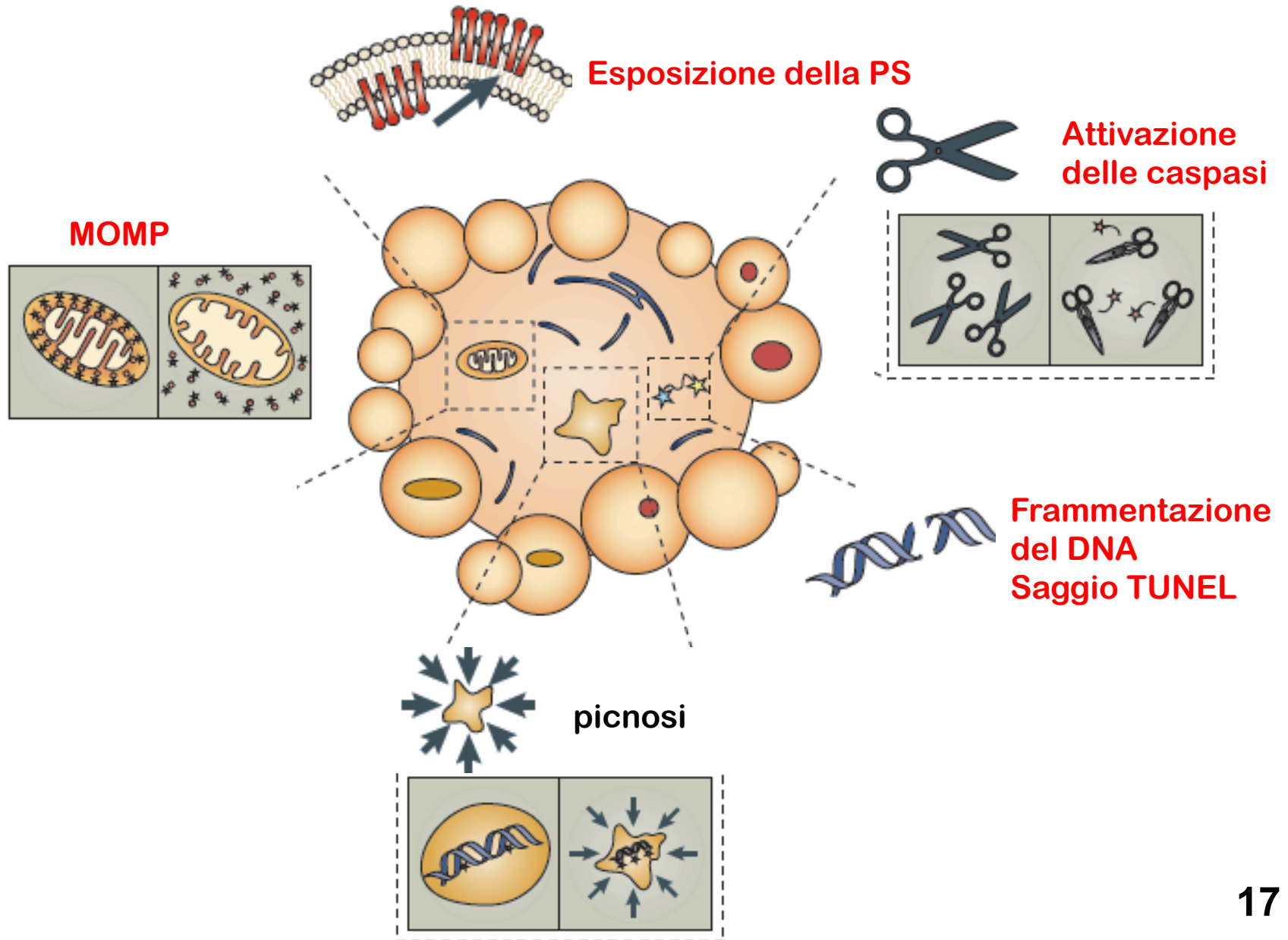
vettore pcDNA3-GFP- p53

C- SOVRAESPRESSIONE cDNA p53
+ inibizione di PUMA

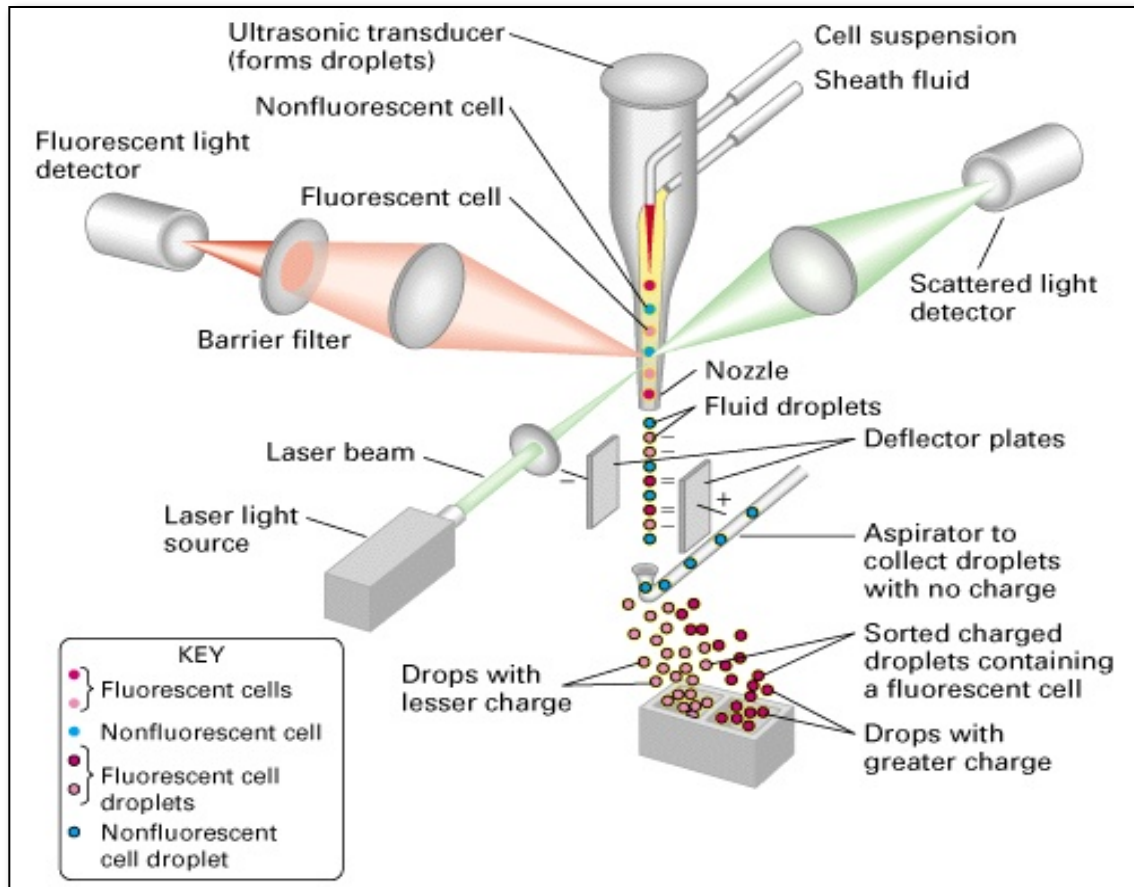
vettore pcDNA3-GFP- p53 + siRNA PUMA



APOPTOSI: visualizzazione in cellule



Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria

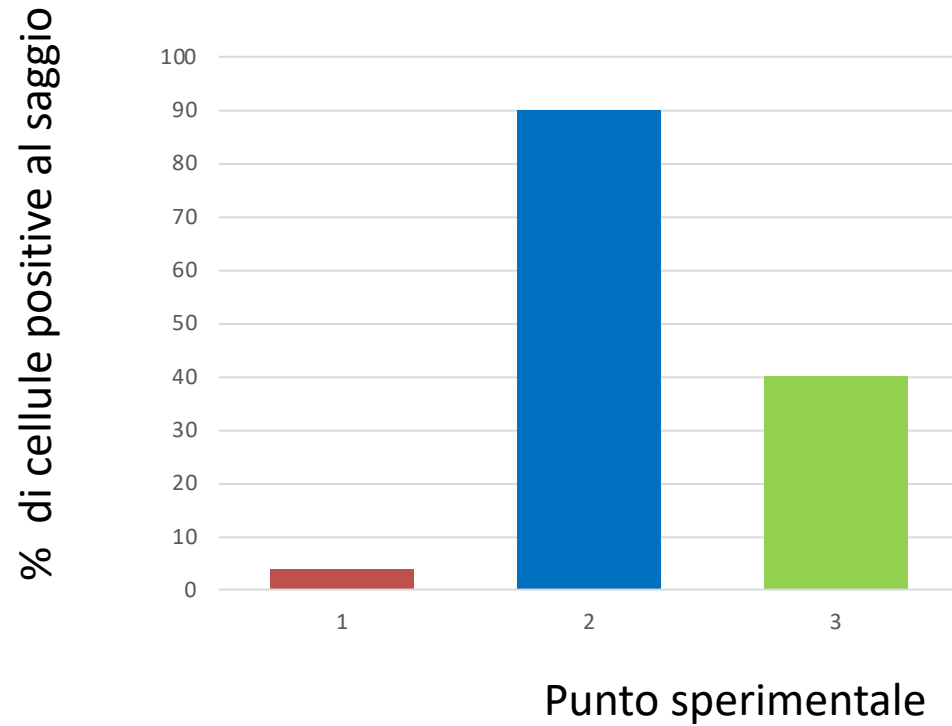


Sorting delle cellule trasfettate (GFP)

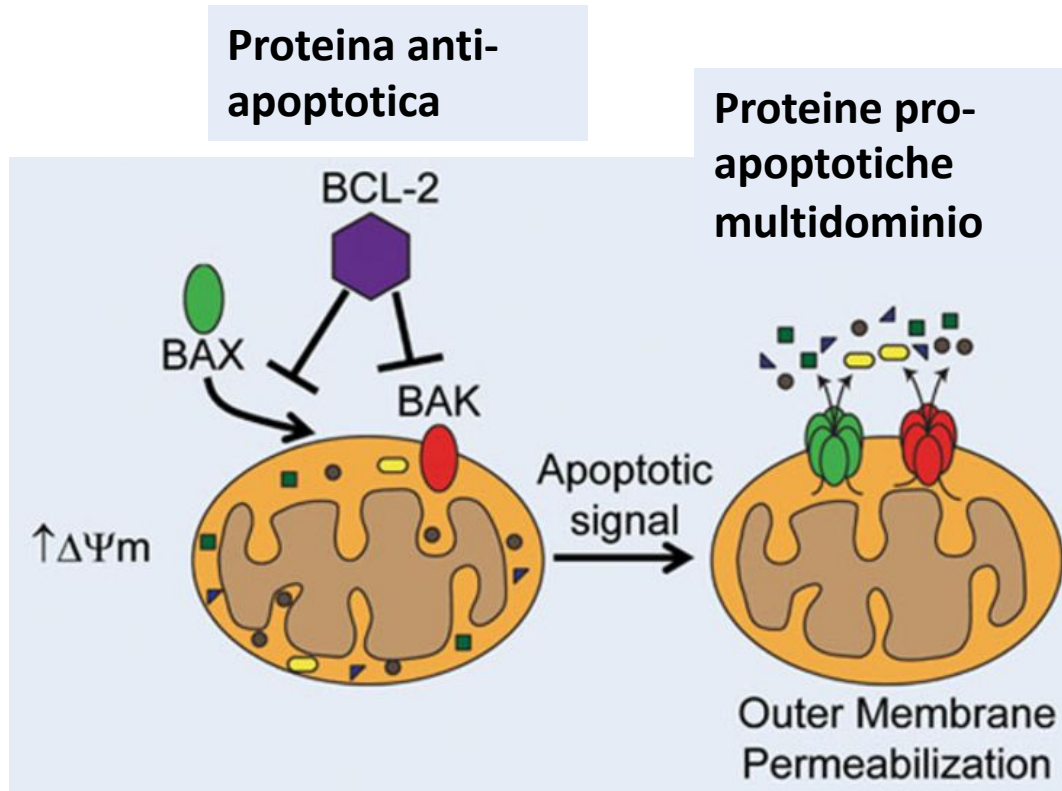
colorazione con :

Annexina V – RITC

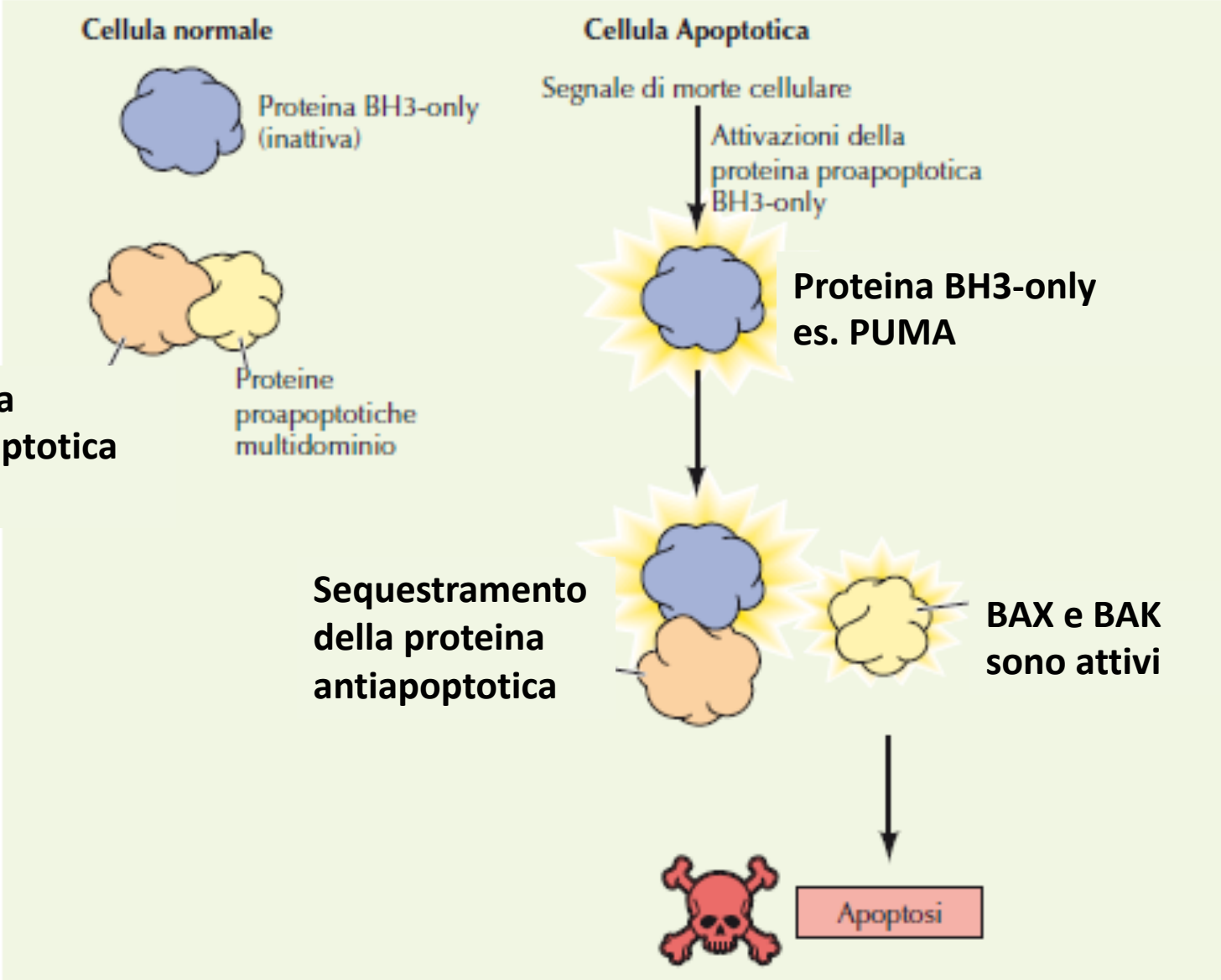
Analisi dei risultati e conclusione



Interazioni regolatorie tra i membri della famiglia di Bcl-2



Interazioni regolatorie tra i membri della famiglia di Bcl-2



Quali altri approcci avreste potuto scegliere?

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Parte applicata

Lezione 2

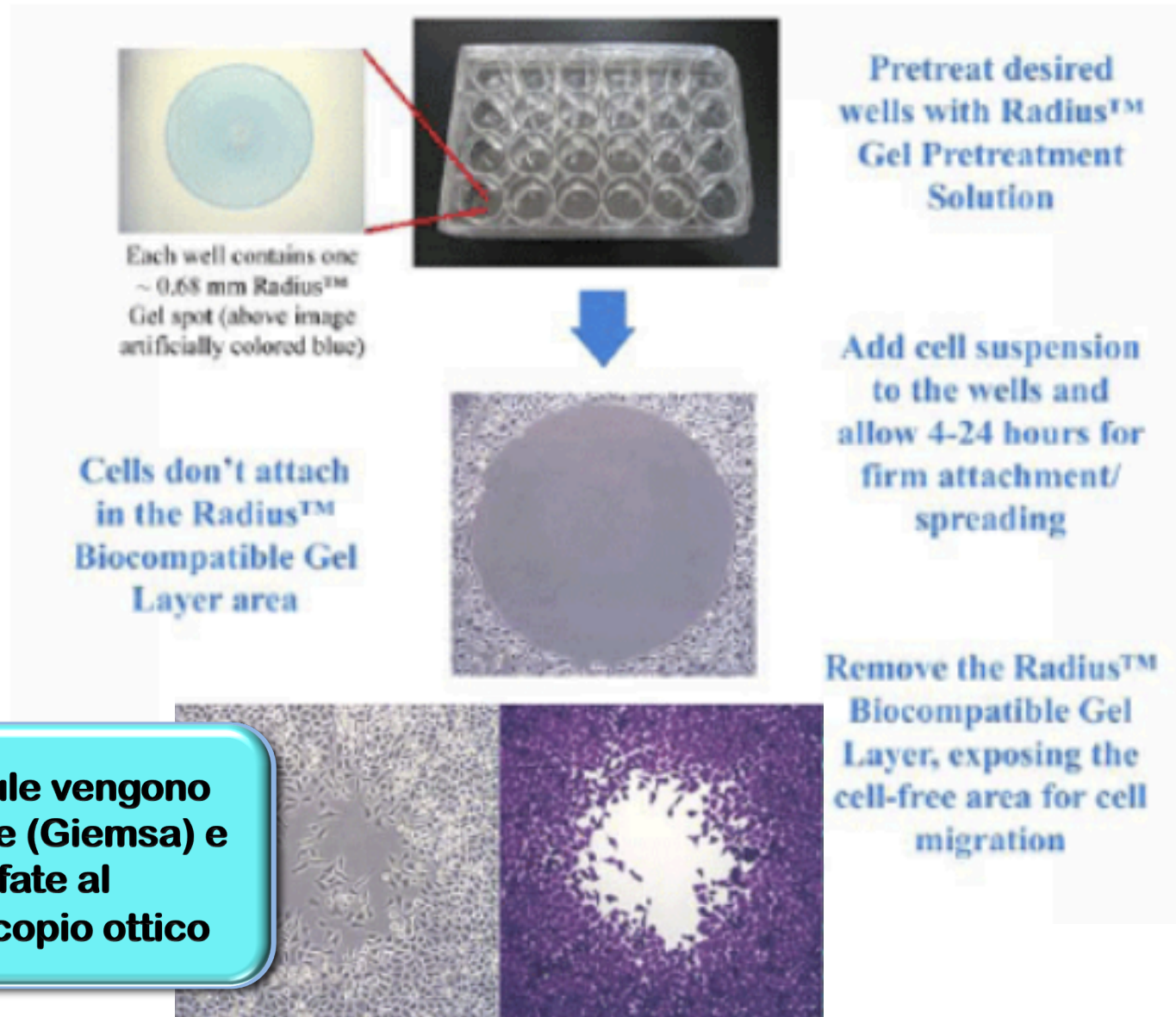
Screening high-throughput

**Volete effettuare uno screening in vitro di molecole bioattive
per identificare farmaci che inibiscono la migrazione di cellule tumorali.**

Strategia sperimentale

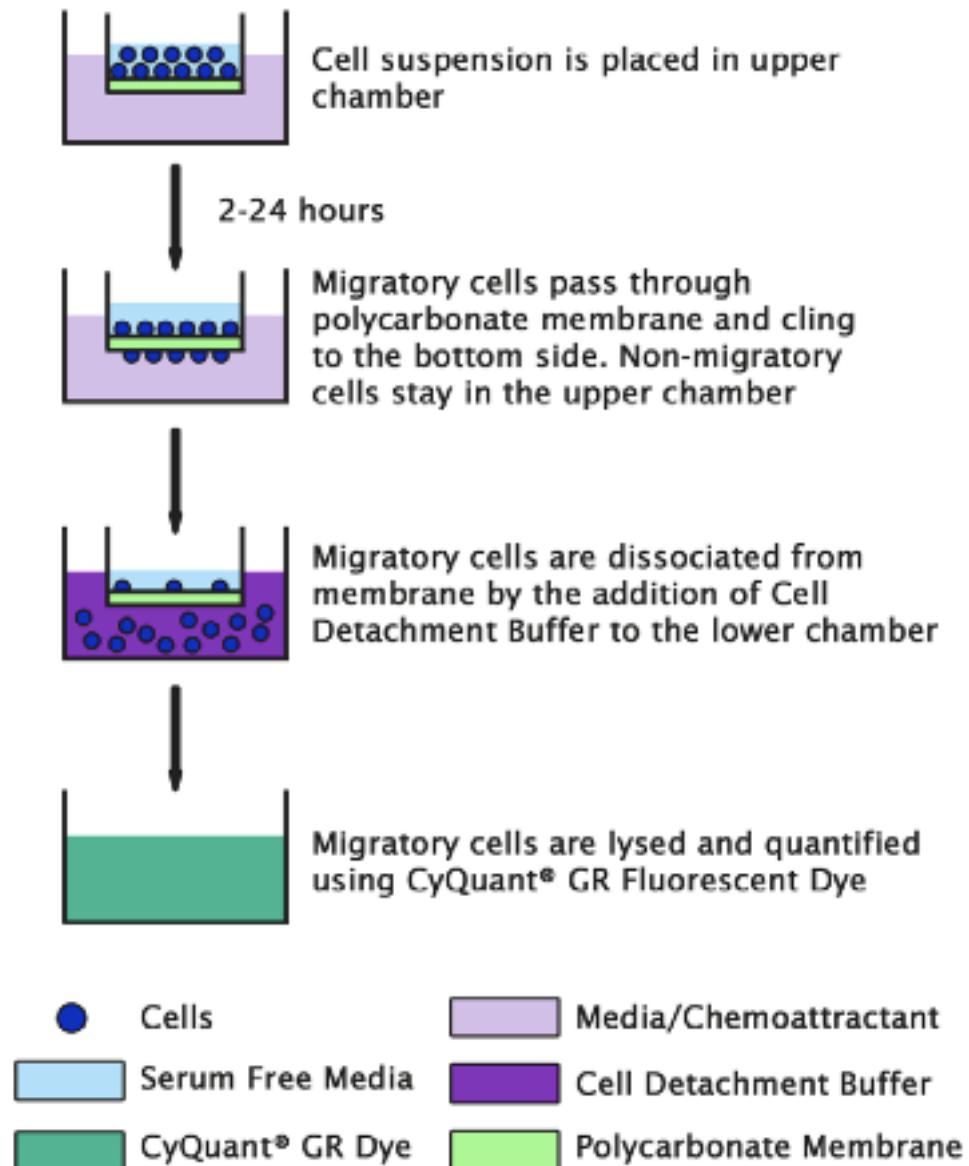
1. È necessario scegliere un opportuno sistema cellulare: es. Linea cellulare tumorale dotata di capacità di migrazione
2. È necessario scegliere un opportuno saggio di migrazione che permetta la valutazione high-throughput
3. In tale sistema possiamo effettuare uno screening di una libreria di molecole bioattive
4. Predisporre gli opportuni CONTROLLI
5. Analizzare l'effetto delle molecole in termini di riduzione della capacità di migrazione

Saggi di migrazione in piastra multipozzetto con lettura automatizzata al microscopio ottico/plate reader



Le cellule vengono colorate (Giemsa) e fotografate al microscopio ottico

Saggi di transwelling (Boyden) in piastra multipozzetto con lettura fluorimetrica



Screening FUNZIONALI per nuovi farmaci

Modello cellulare tumorale

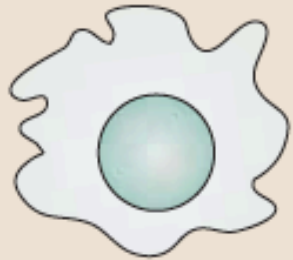
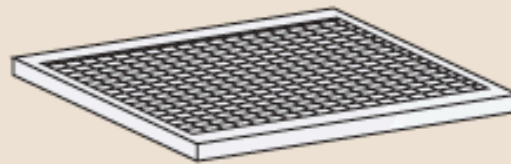
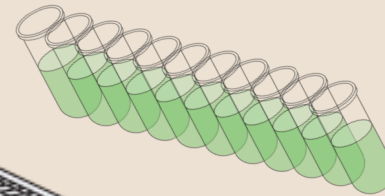


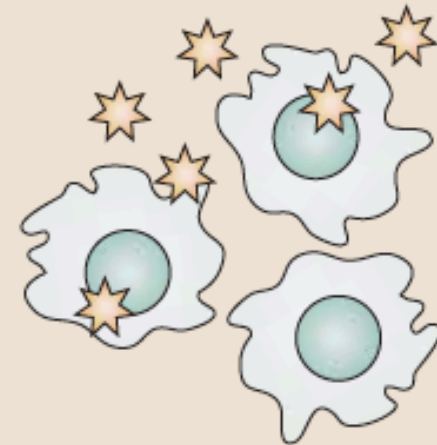
Plate cells onto clear bottom 384-well plate



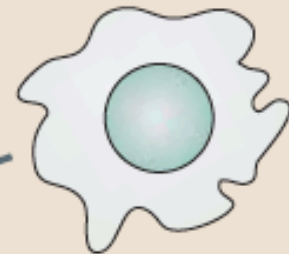
Libreria di molecole



Transfer compounds onto cells

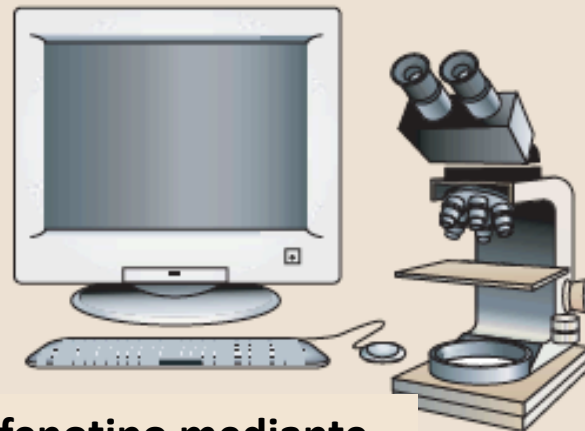


Compound treatment



riduzione della migrazione

Identificazione del farmaco



Analisi del fenotipo mediante opportuno saggio

or hits