

**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

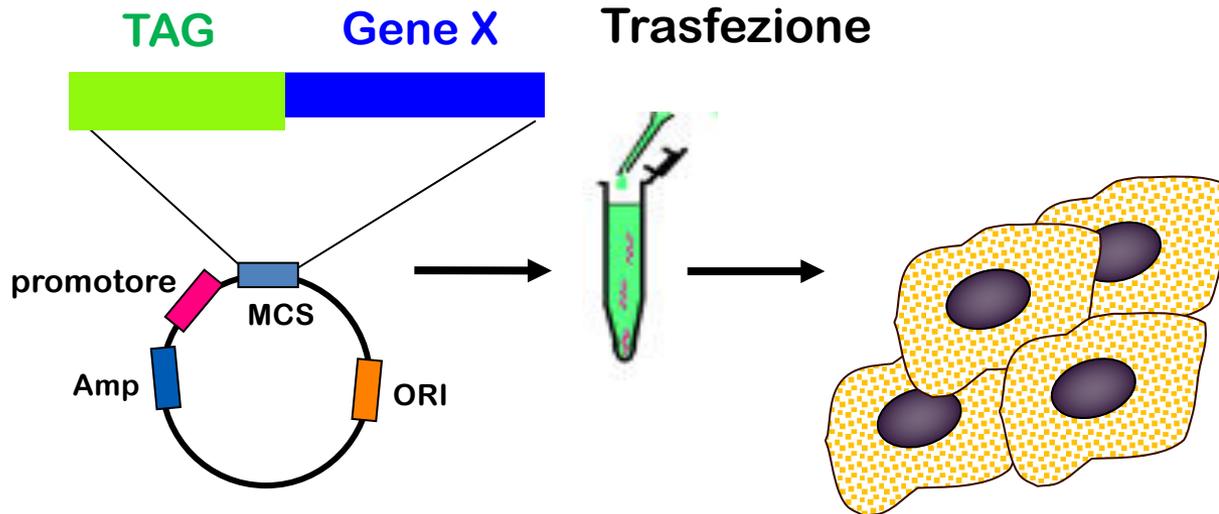
## Strategia sperimentale

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 (incluso gli opportuni controlli) e trasfezione delle cellule (transiente o stabile) con il vettore generato

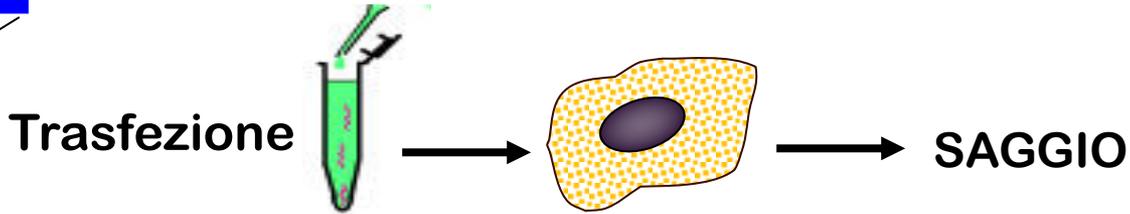
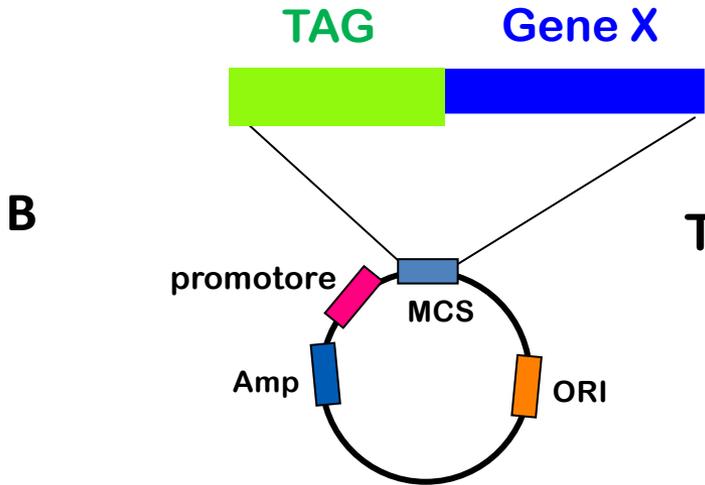
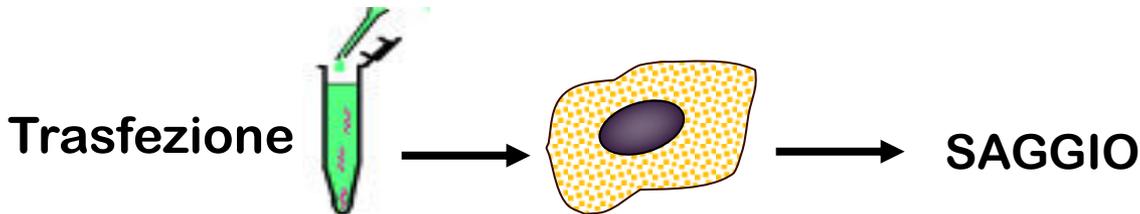
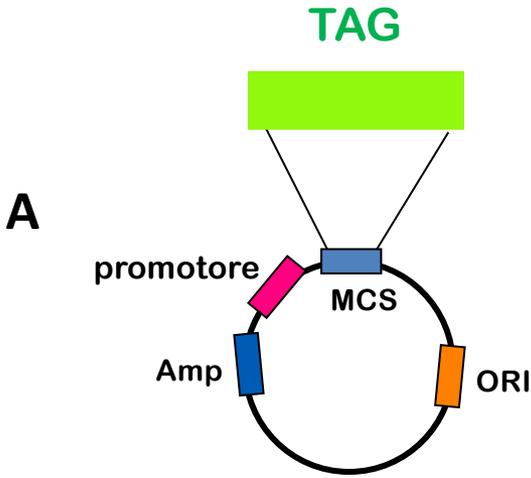
# Progettazione dell'esperimento

A- CONTROLLO

vettore vuoto pcDNA3-TAG

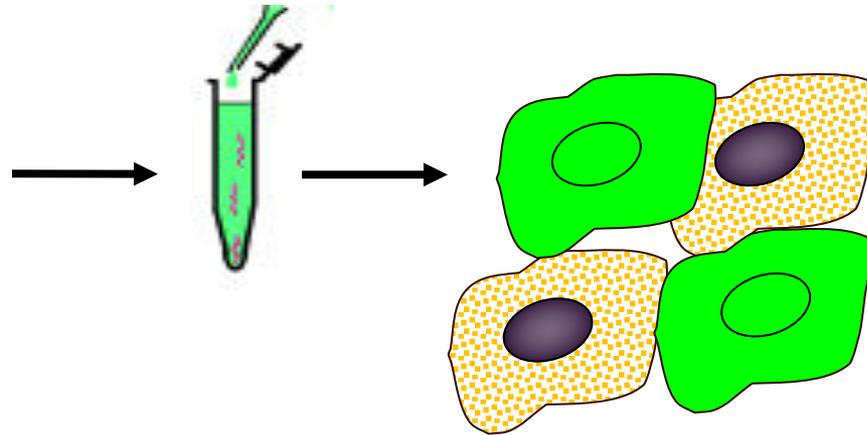
B- SOVRAESPRESSIONE cDNA X

vettore pcDNA3-X-TAG



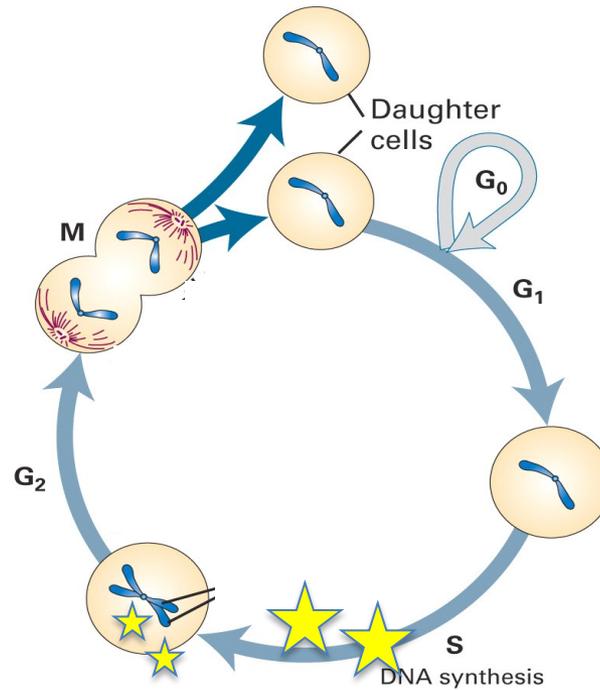
# Esperimento: analisi dell'effetto del gene/proteina X sulla proliferazione cellulare

Trasfezione



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

## SAGGIO DI PROLIFERAZIONE: visualizzazione della neosintesi di DNA



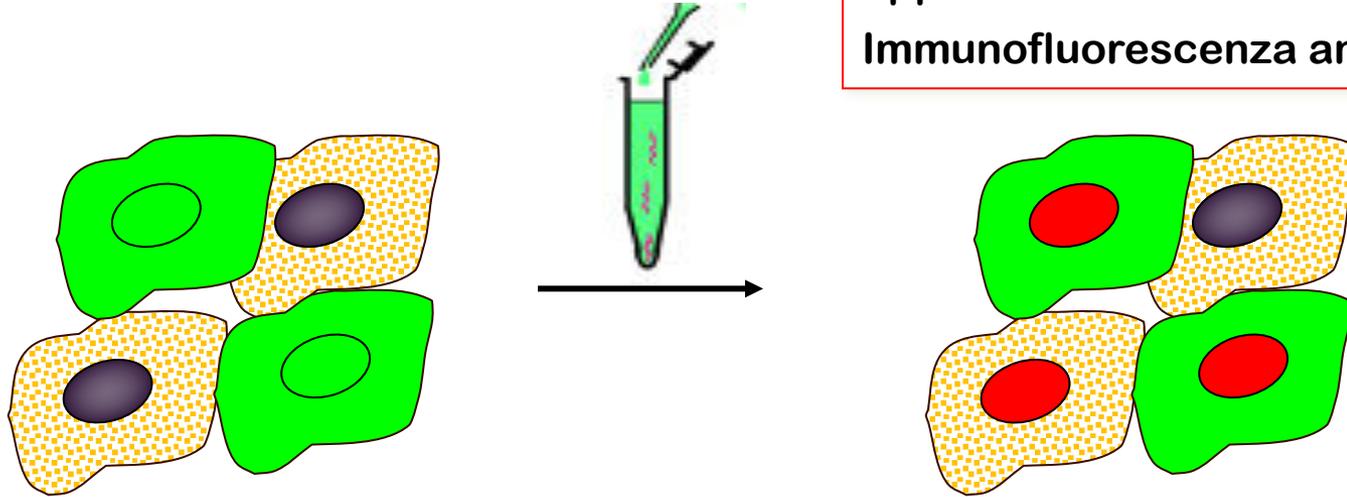
Le cellule in FASE S possono essere MARCATE aggiungendo al mezzo di coltura un **analogo della timidina: BrdU = 5-bromo desossiuridina**

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?**

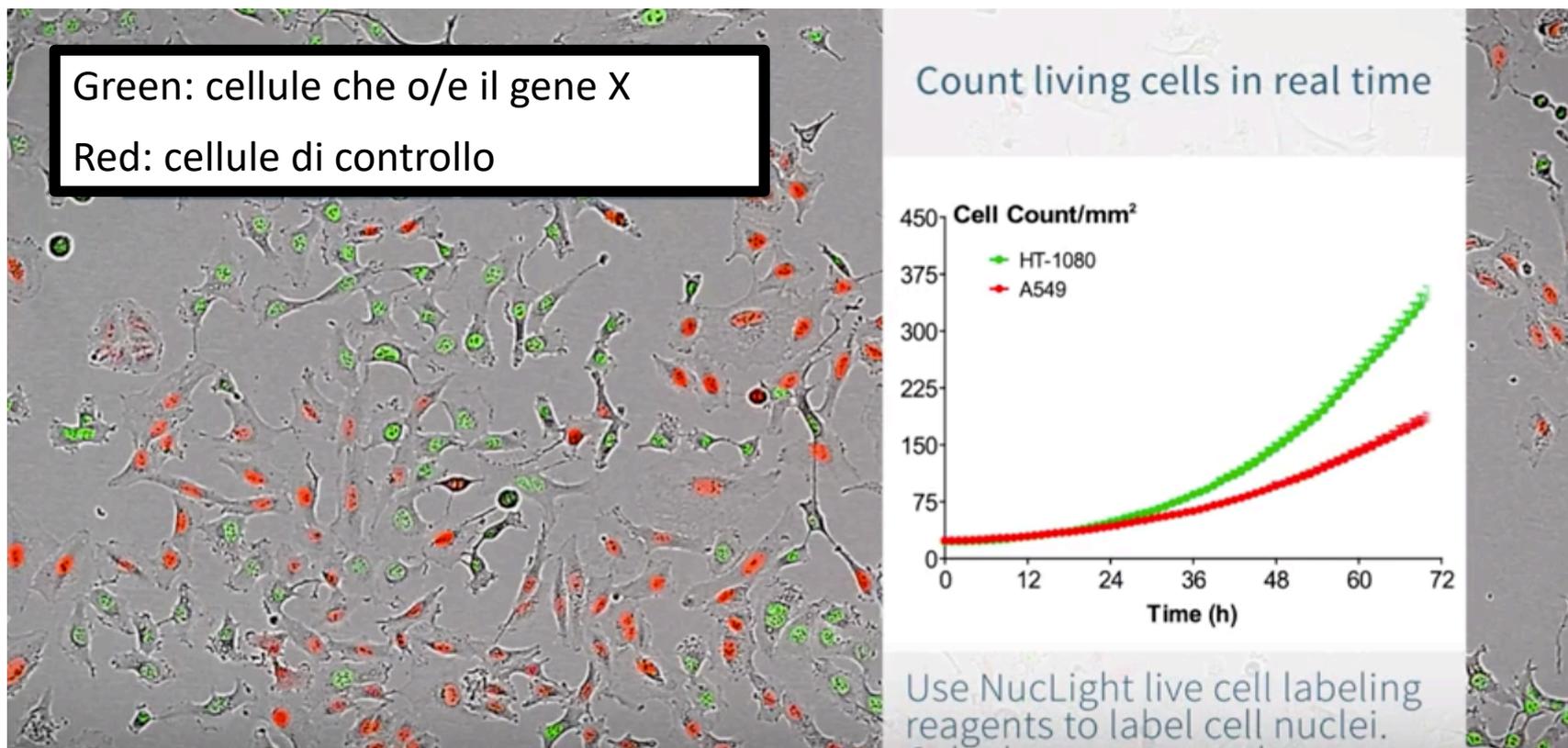
# **Analisi dell' effetto di un gene X sulla proliferazione cellulare**

## **Strategia sperimentale #2**

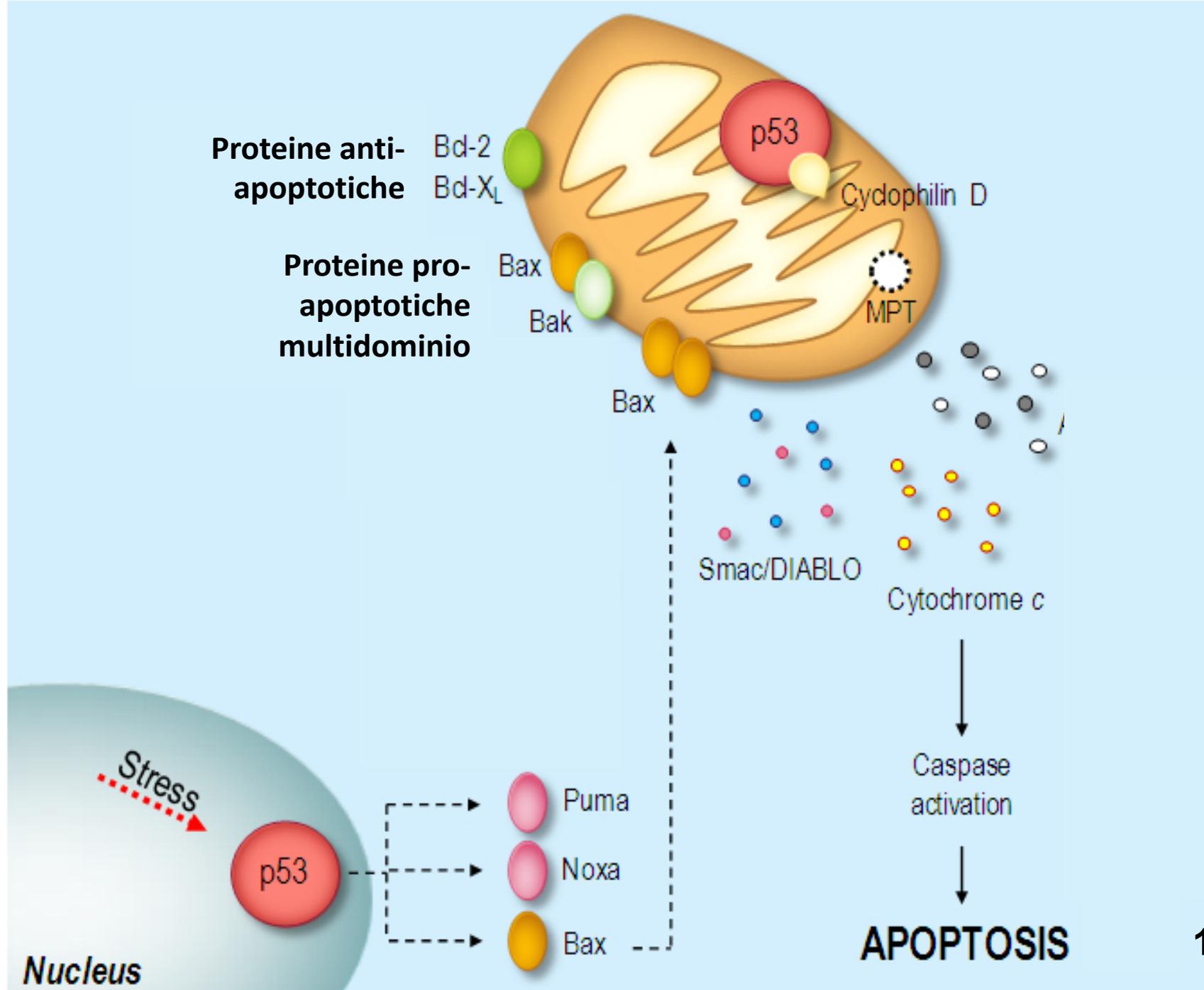
- 1. Generare una linea cellulare che sovraesprime stabilmente il gene X (oppure nella quale il gene è inibito) e una linea di controllo**
- 2. Analizzare la differenza tra le due popolazioni cellulari in termini di proliferazione mediante curve di crescita**

# 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

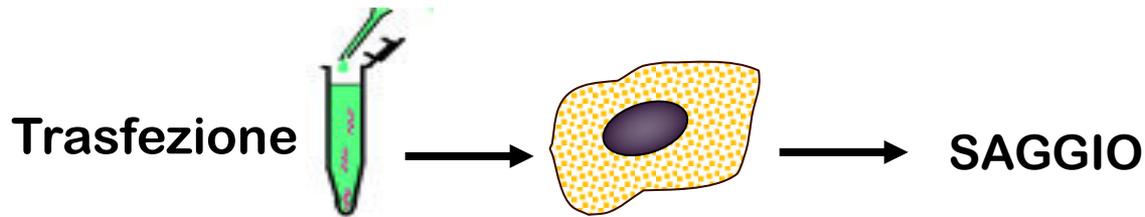
vettore vuoto pcDNA3-GFP

B- SOVRAESPRESSIONE cDNA p53

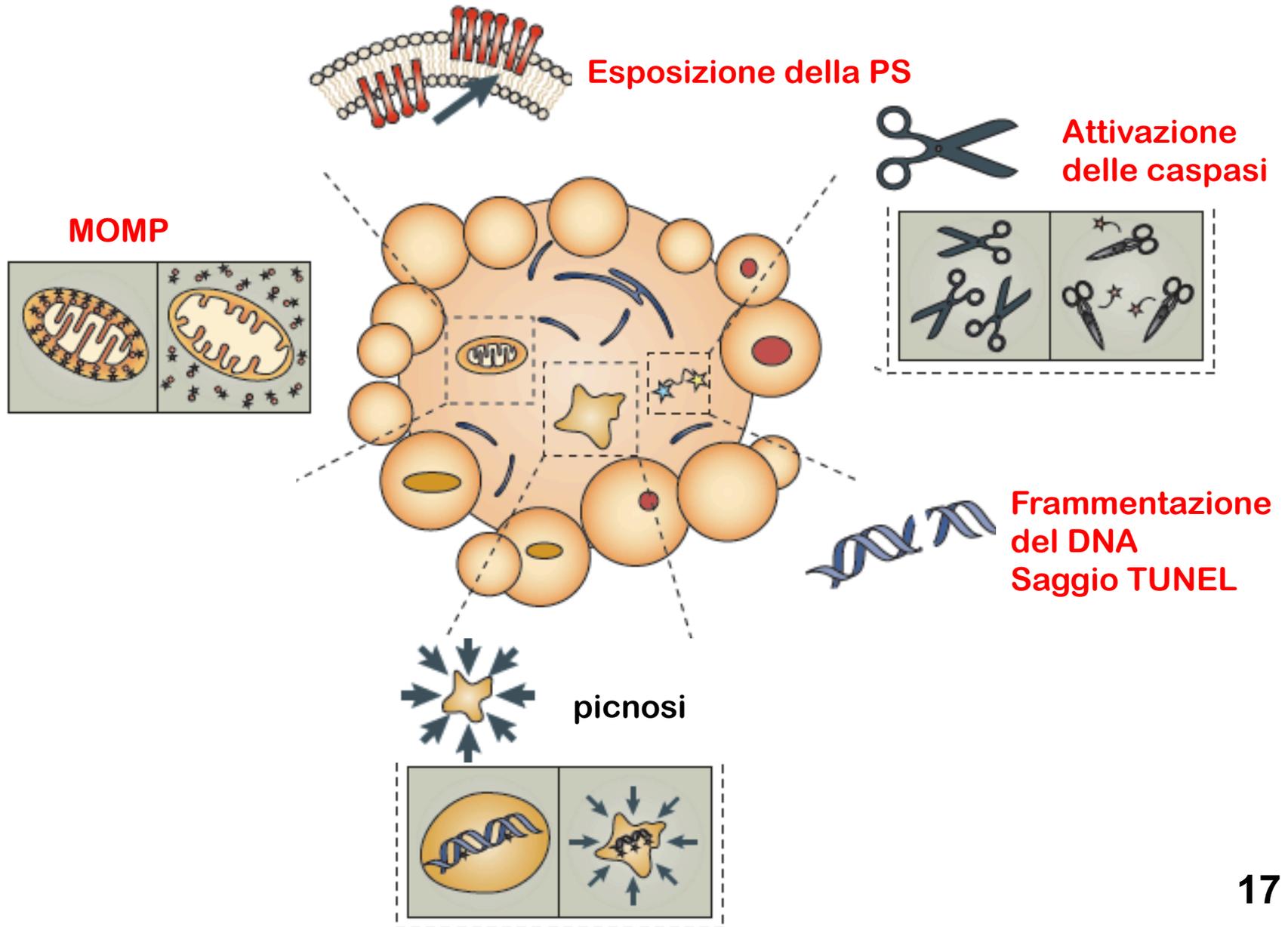
vettore pcDNA3-GFP- p53

C- SOVRAESPRESSIONE cDNA p53  
+ inibizione di PUMA

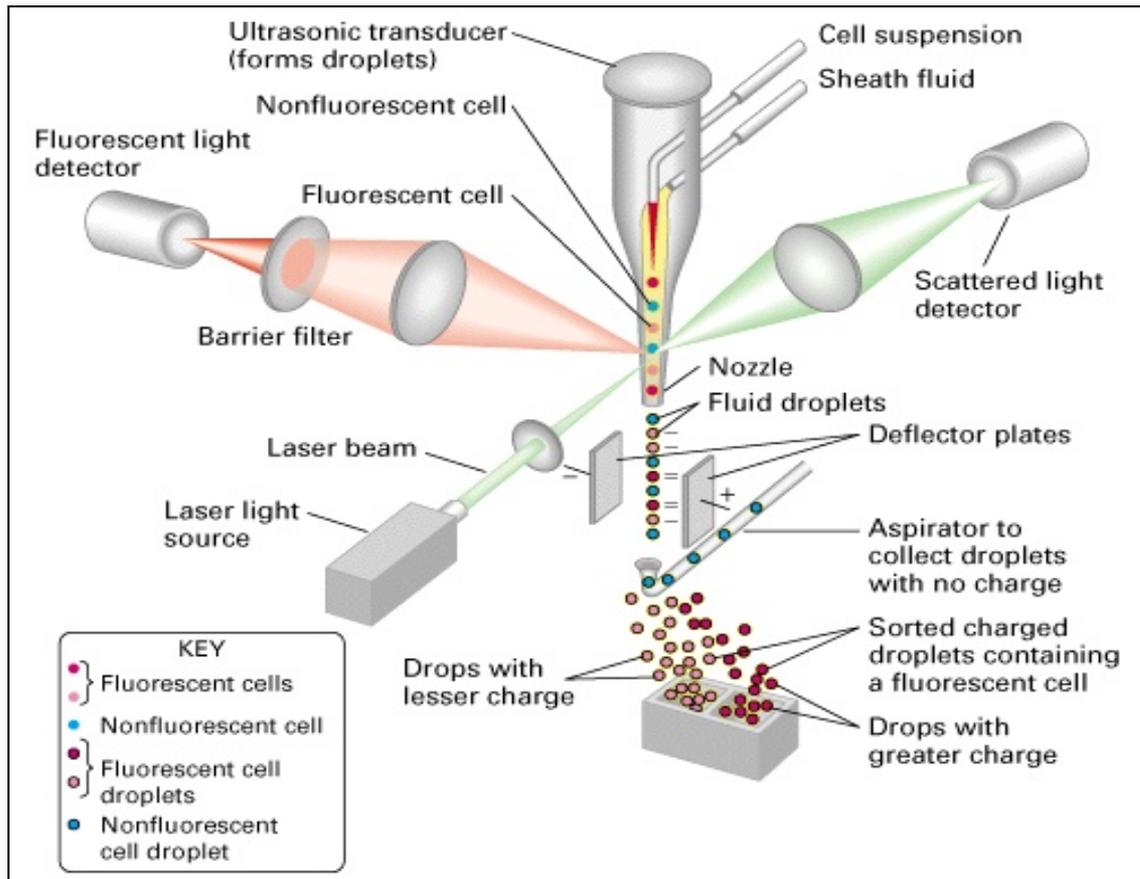
vettore pcDNA3-GFP- p53 + siRNA PUMA



# APOPTOSI: visualizzazione in cellule



# Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria

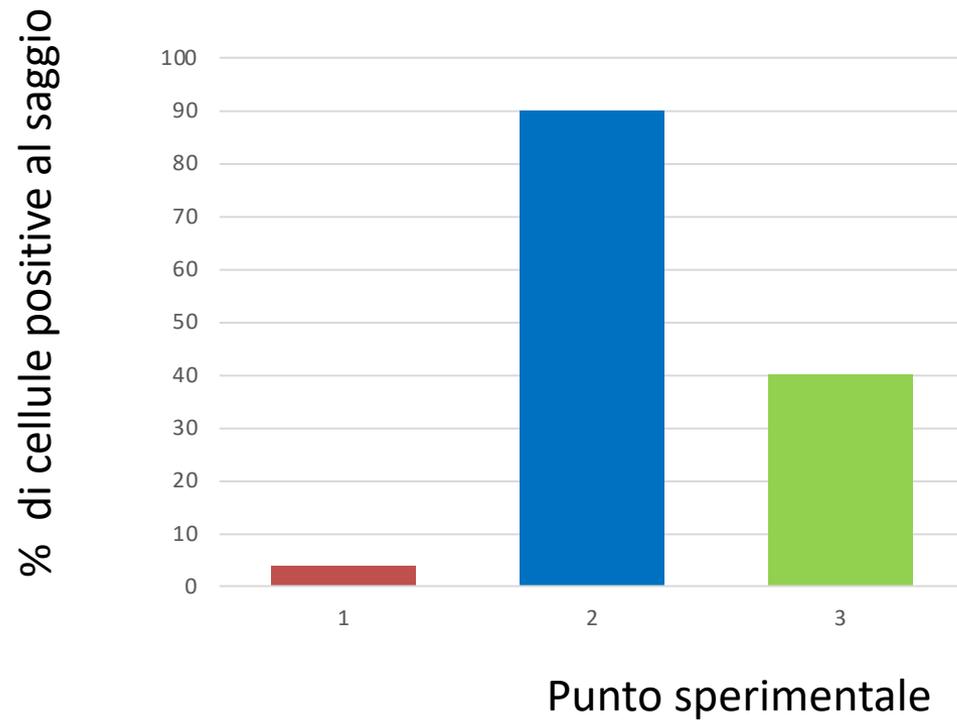


Sorting delle cellule trasfettate (GFP)

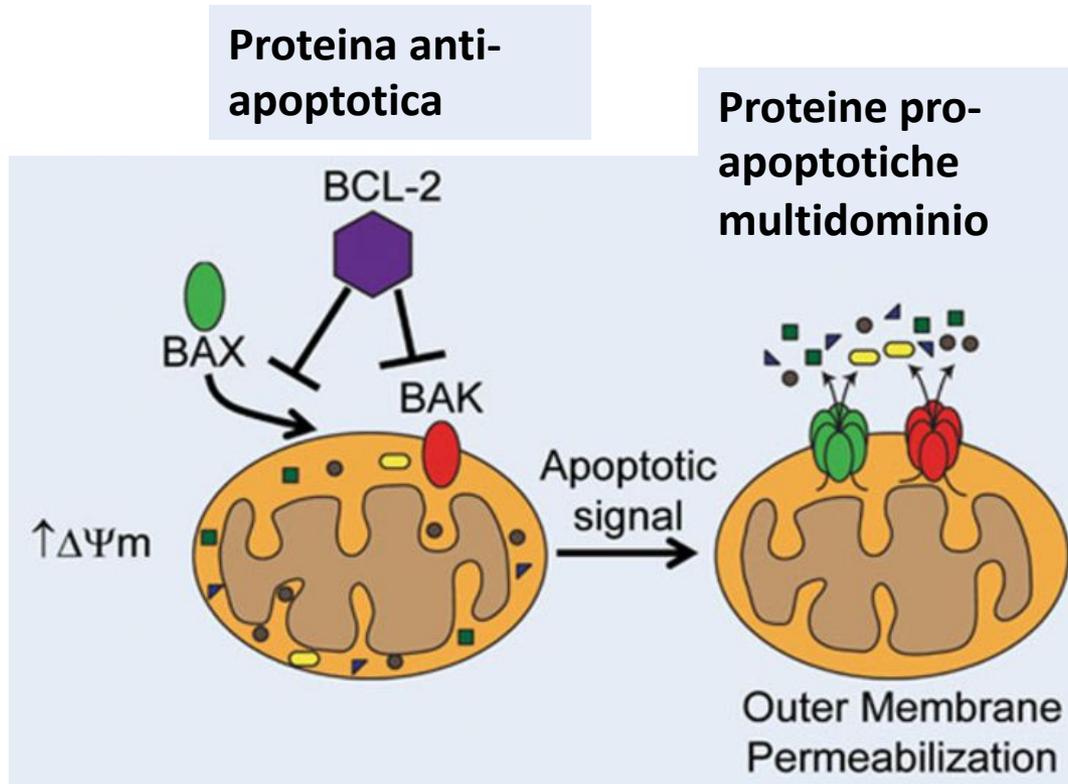
colorazione con :

**Annexina V – RITC**

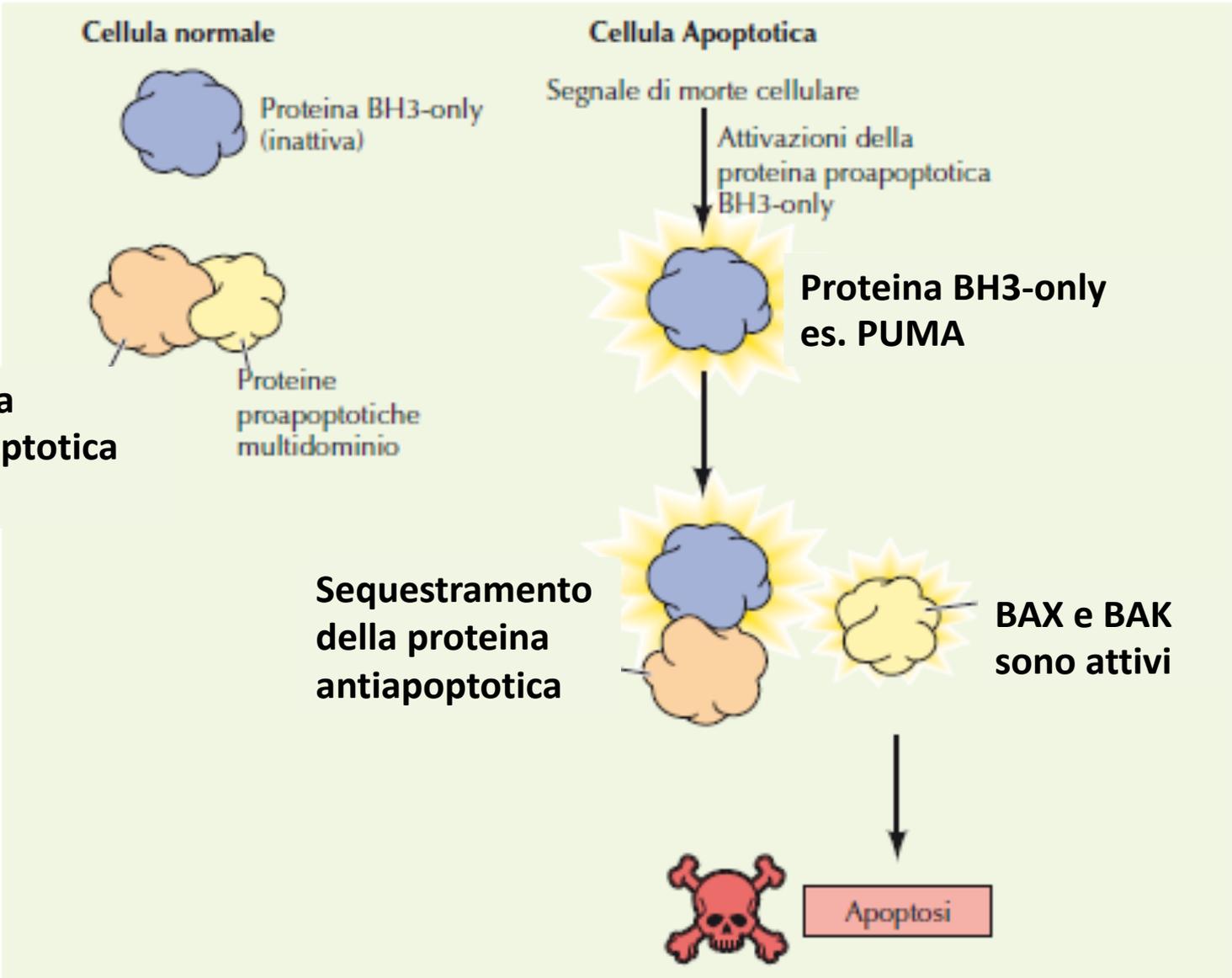
# Analisi dei risultati e conclusione



# 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**

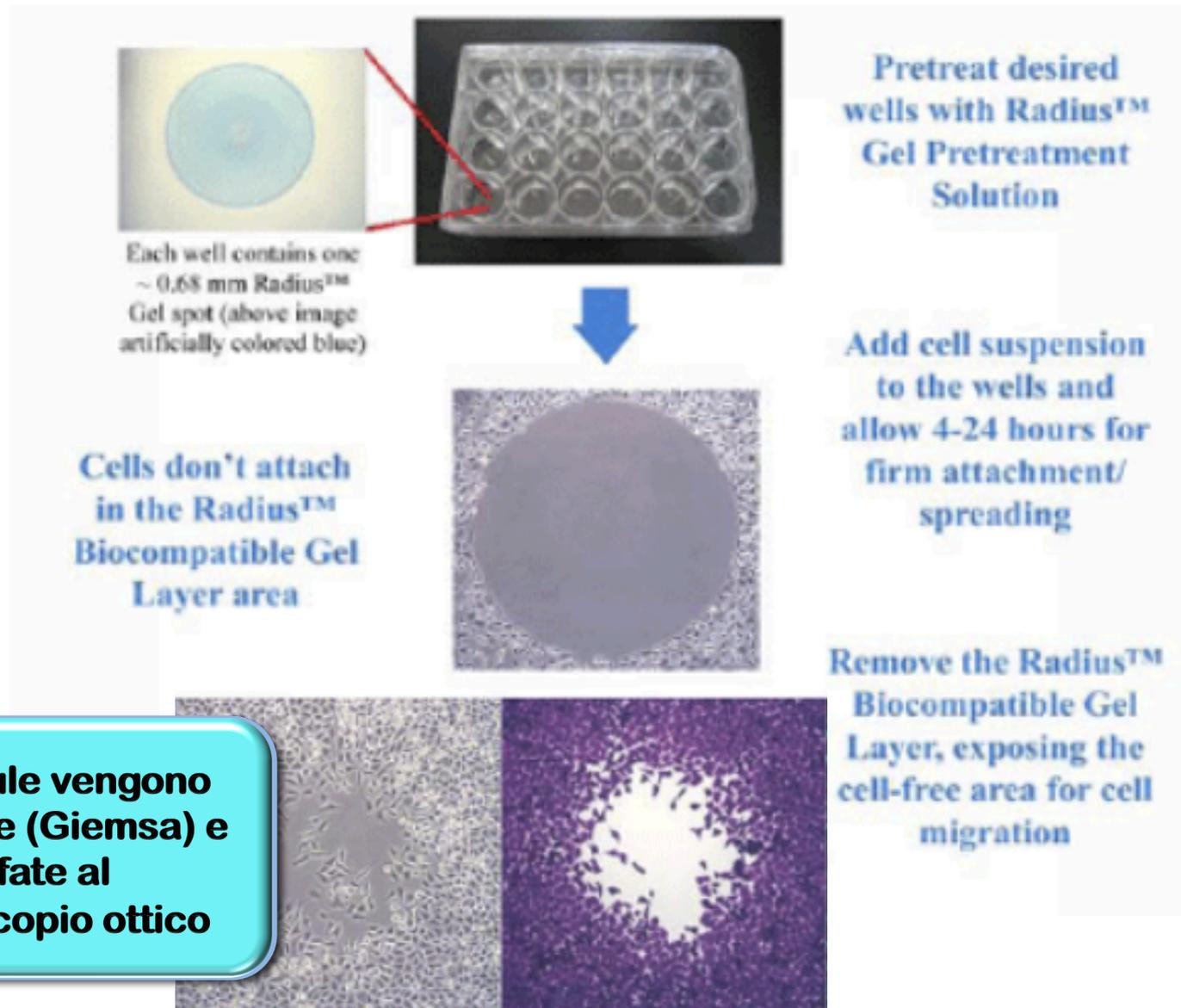
## Screening high-throughput

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

# Strategia sperimentale

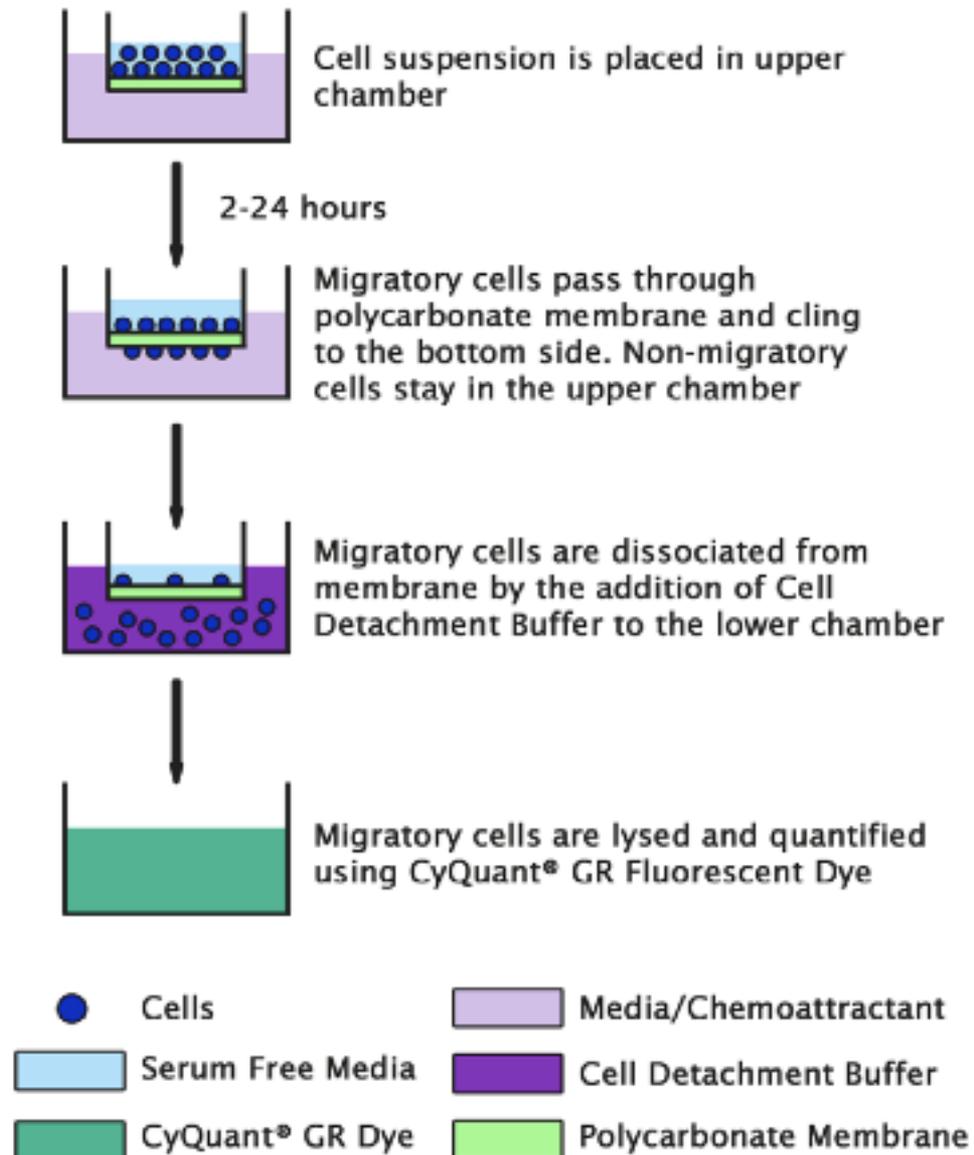
1. È necessario scegliere un opportuno sistema cellulare: es. Linea cellulare tumorale dotata di capacità di migrazione
2. È necessario scegliere un opportuno saggio di migrazione che permetta la valutazione high-throughput
3. In tale sistema possiamo effettuare uno screening di una libreria di molecole 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**

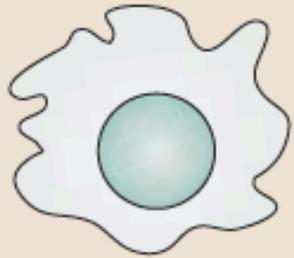
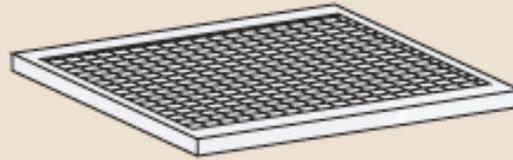
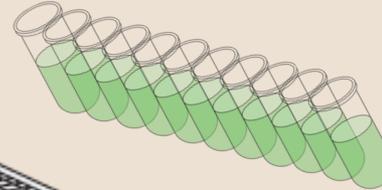


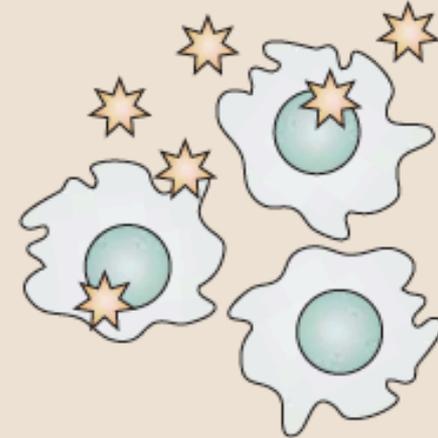
Plate cells onto clear bottom 384-well plate



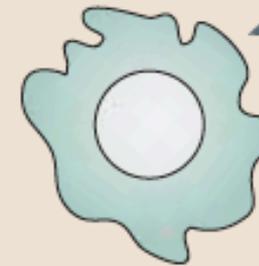
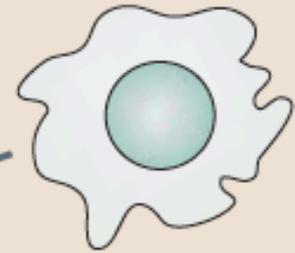
**Libreria di molecole**



Transfer compounds onto cells

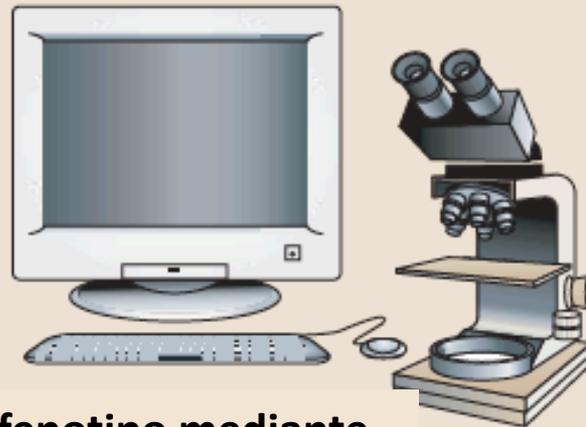


Compound treatment



**riduzione della migrazione**

**Identificazione del farmaco**



**Analisi del fenotipo mediante opportuno saggio**

or hits