Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2020-2021

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 9

RIASSUNTO - ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE: APPLICAZIONI PRINCIPALI

Si possono analizzare diversi parametri:

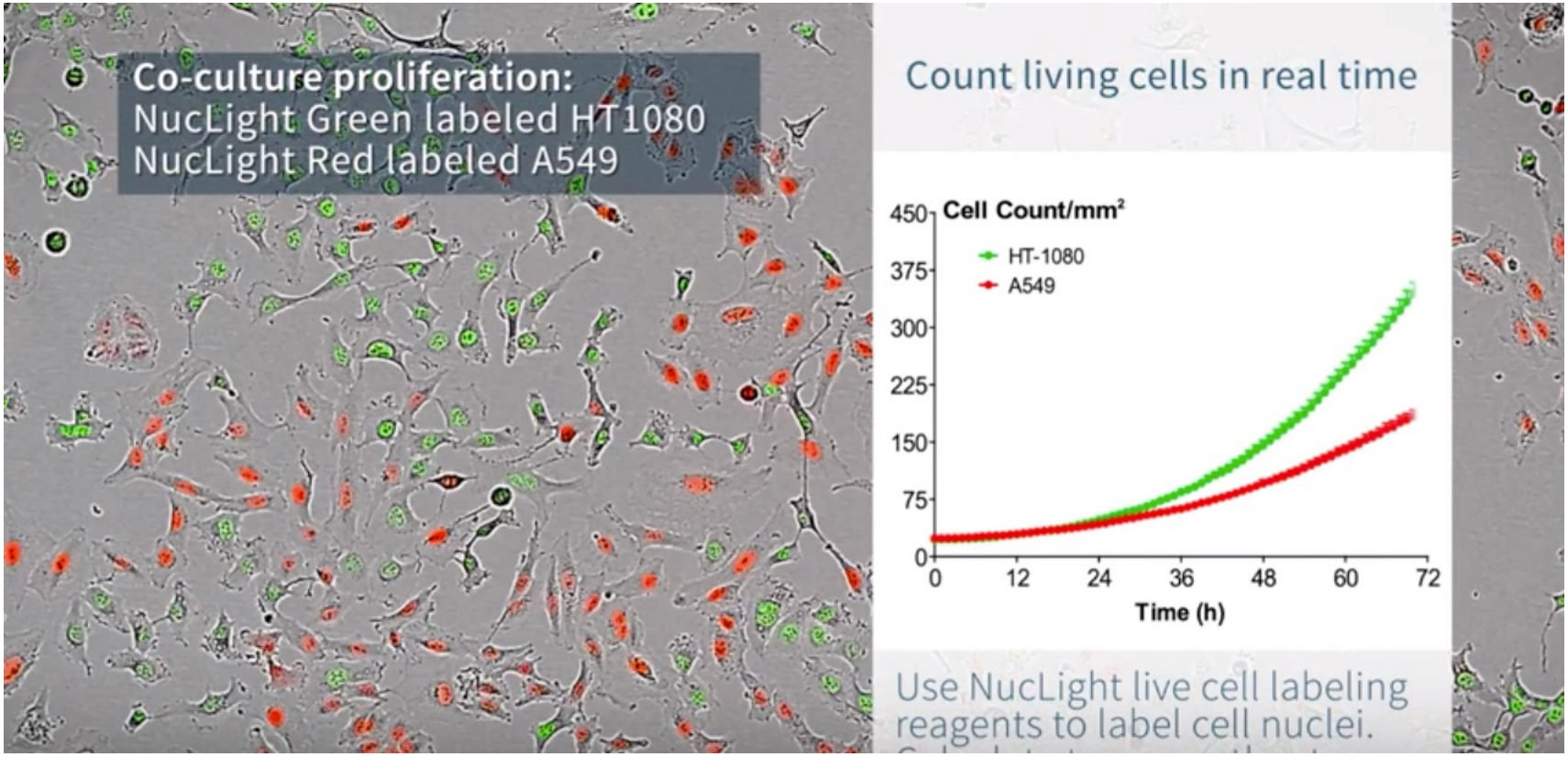
- velocità di proliferazione,
- progressione del ciclo cellulare
- vitalità cellulare

Le tecniche più comunemente utilizzate sono:

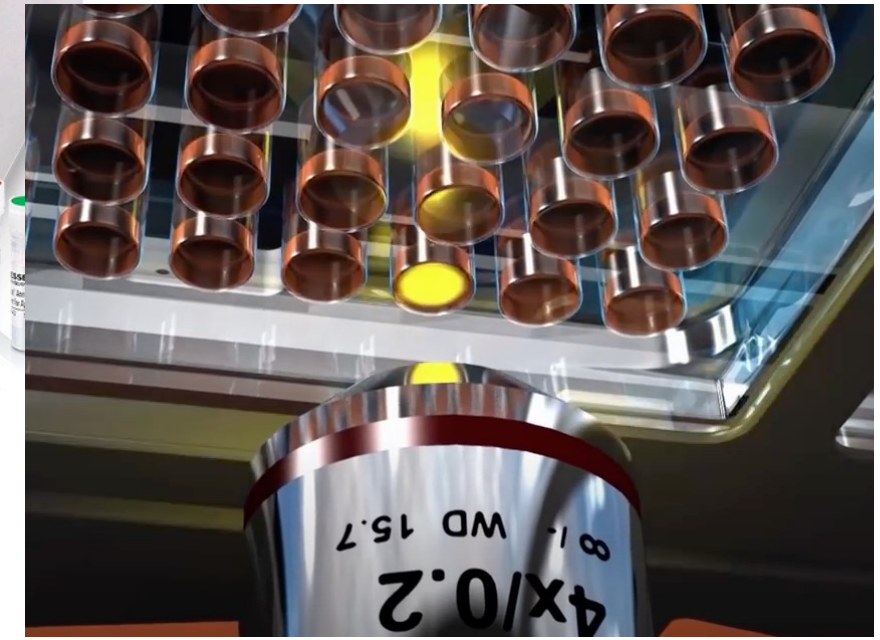
- ❑ Curve di crescita (3T3, live imaging)
- ❑ Saggi di sintesi del DNA (BrdU)
- ❑ Analisi citofluorimetriche del contenuto di DNA
- ❑ Saggi di vitalità cellulare

Valutazione quantitativa di proliferazione mediante live cell labeling

Il lettore realtime permette di effettuare saggi di proliferazione, vitalità e morte 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 co-coltura, quindi ne viene misurata la proliferazione in realtime (conta del numero di cellule nel tempo).

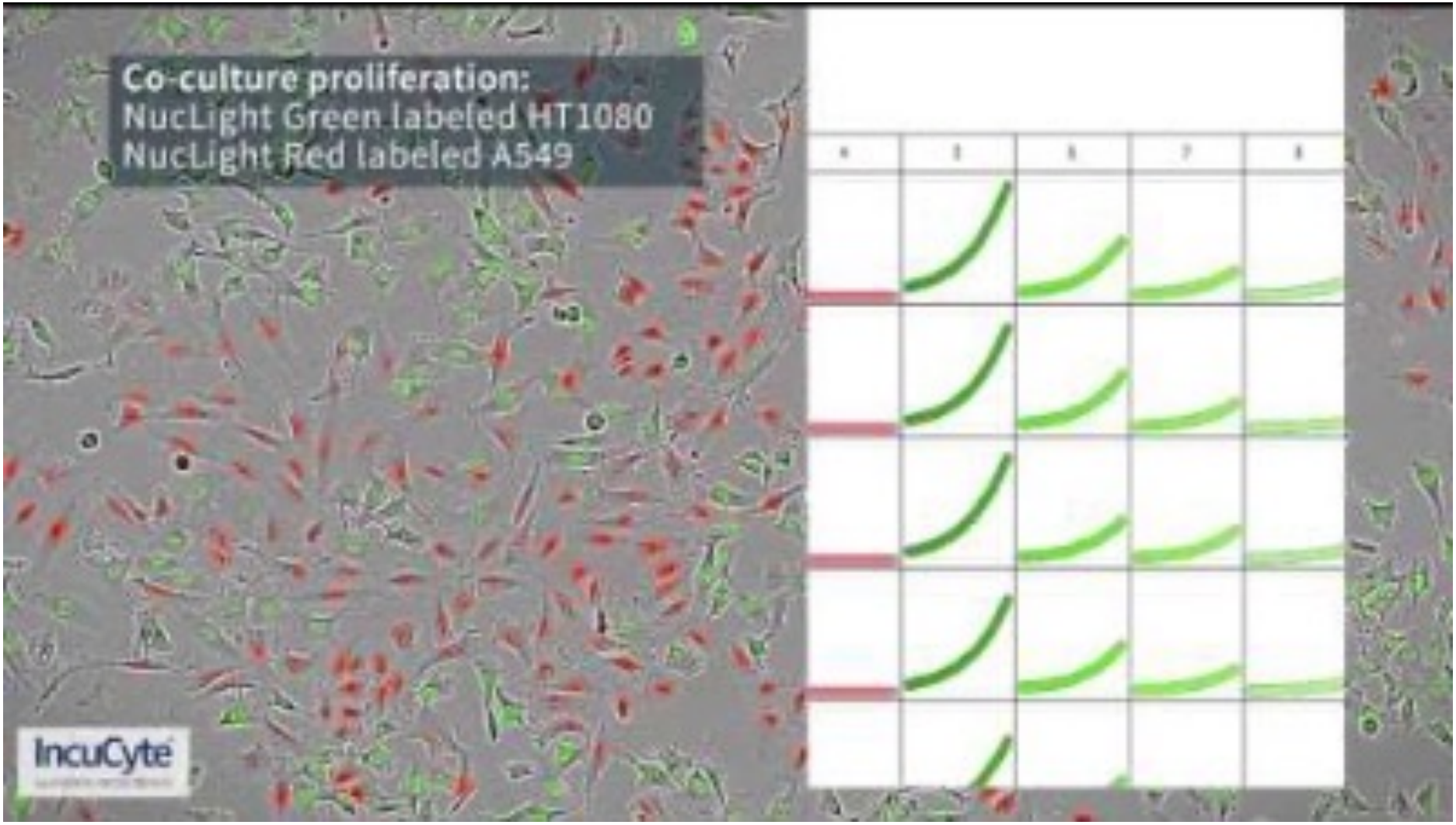


Valutazione quantitativa di proliferazione mediante live cell labeling



IncuCyte® live-cell analysis system

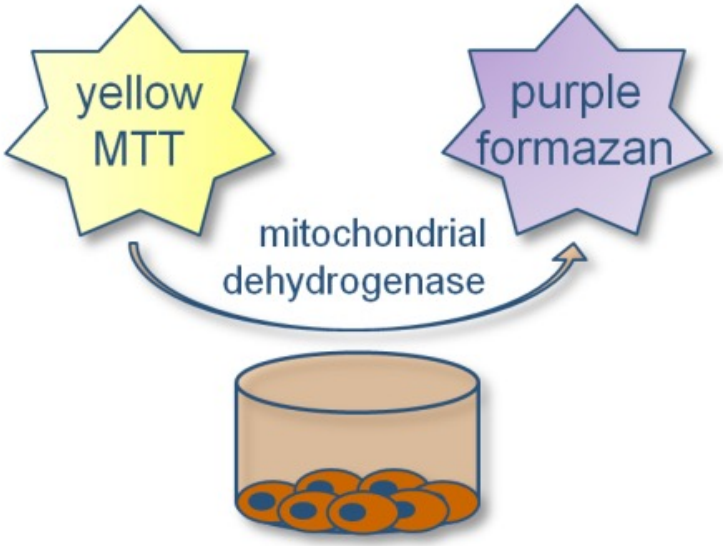
Valutazione quantitativa di proliferazione mediante live cell labeling



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.

Saggi di vitalità cellulare



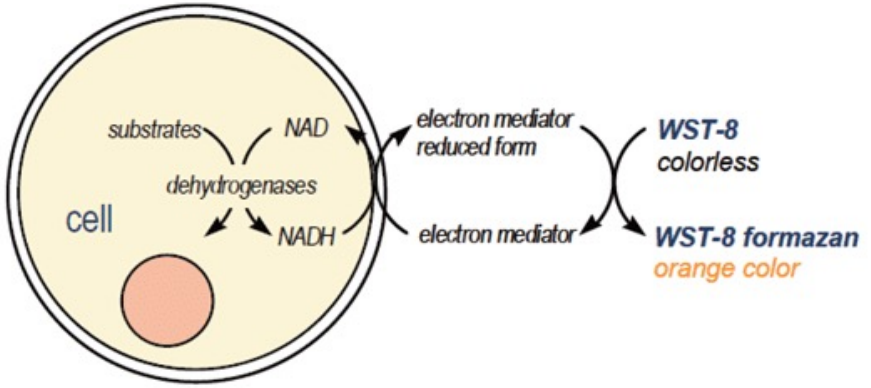


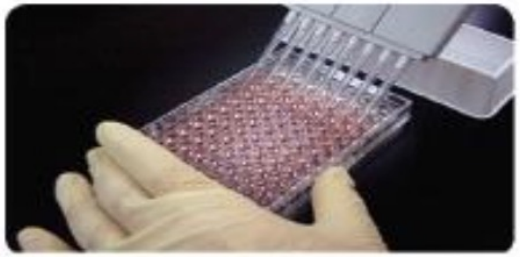
Figure 2. Principle of the cell viability detection with Cell Counting Kit-8.

Saggi colorimetrici che misurano attività metaboliche associate alla vitalità cellulare.

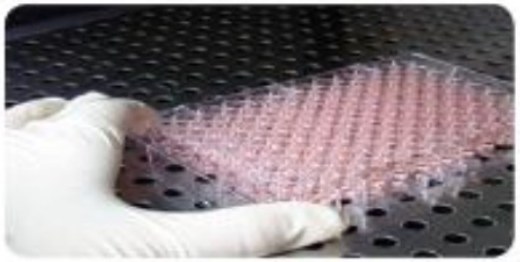
Il substrato viene convertito in un prodotto colorato (sali di tetrazolio, formazan) a seguito del trasferimento di elettroni causato dall'attività di deigrogenasi mitocondriali.

L'assorbanza misurata (con un lettore multipiastra) è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali.

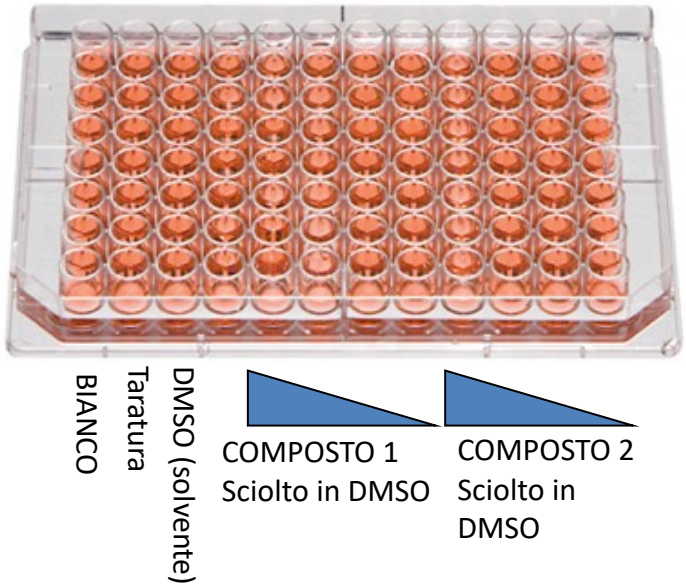
1. Add CCK-8 solution

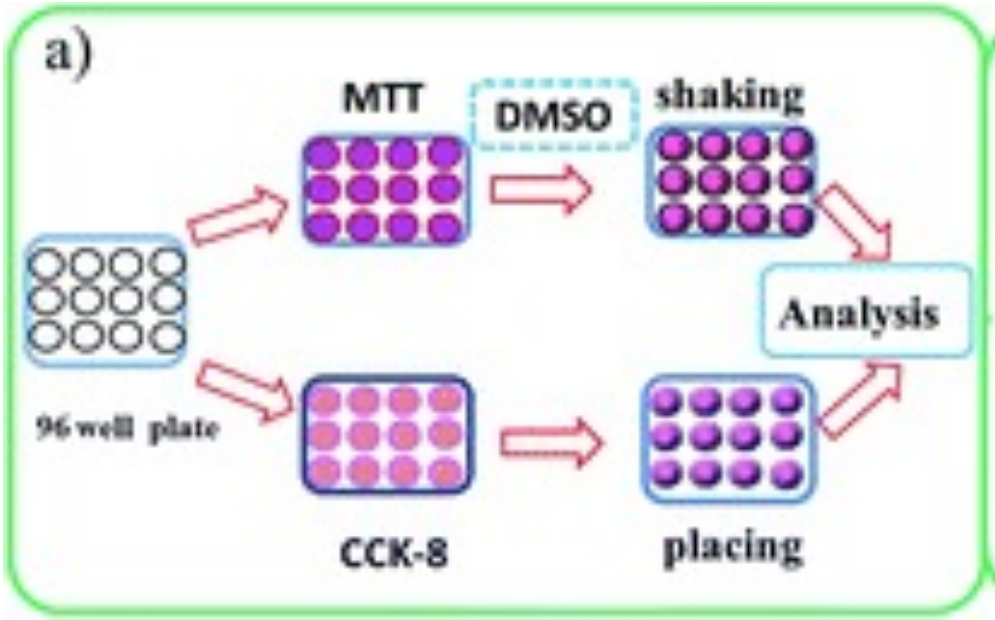


2. Incubate for 1-4 hours



3. Measure O.D. at 450 nm

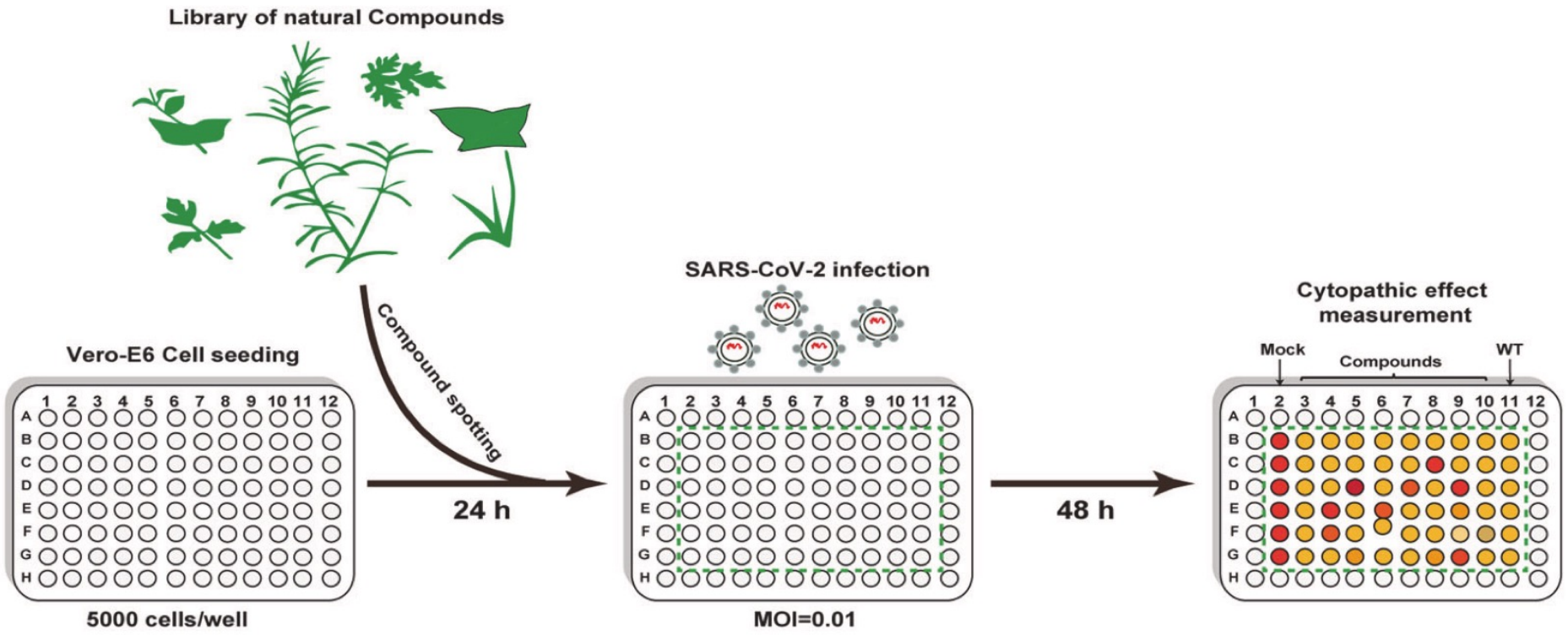




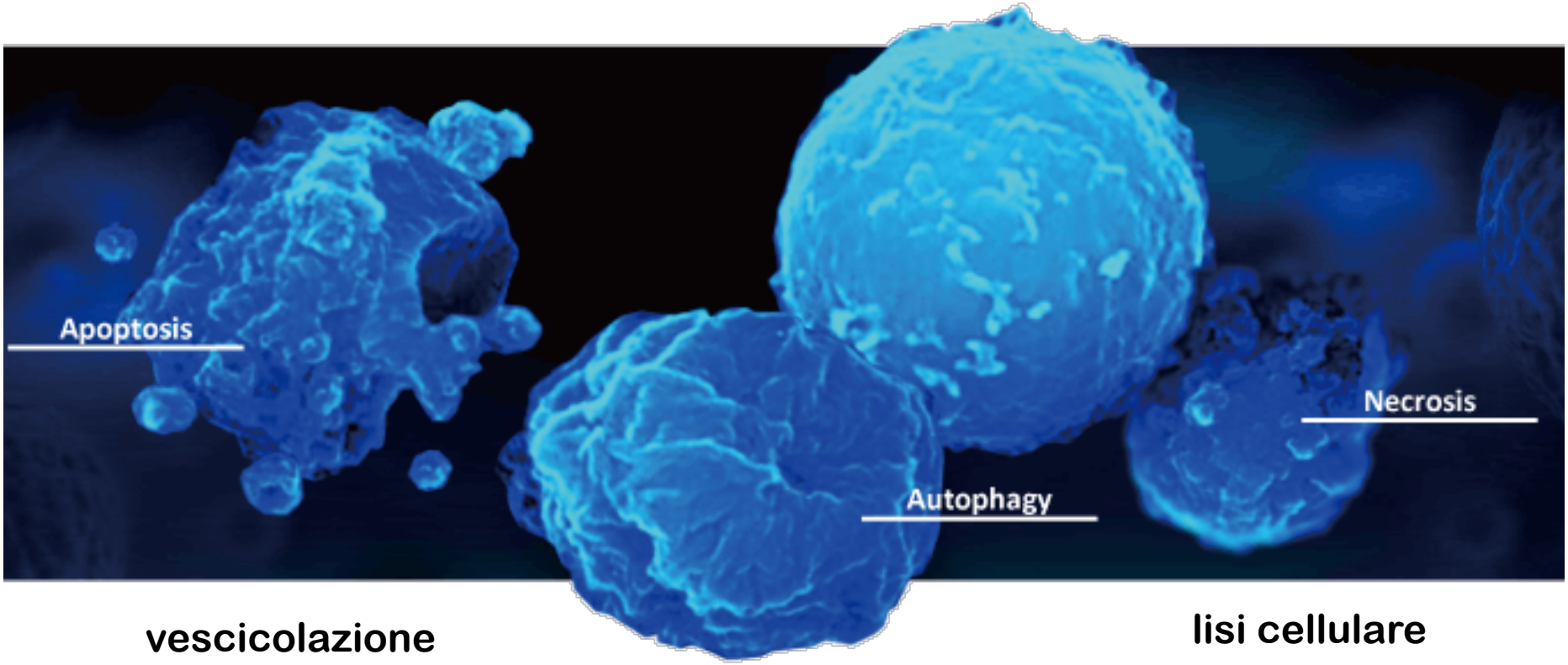
LETTER OPEN

A cell-based large-scale screening of natural compounds for inhibitors of SARS-CoV-2

Signal Transduction and Targeted Therapy (2020)5:218 ; https://doi.org/10.1038/s41392-020-00343-z



STUDIO DELLA MORTE CELLULARE

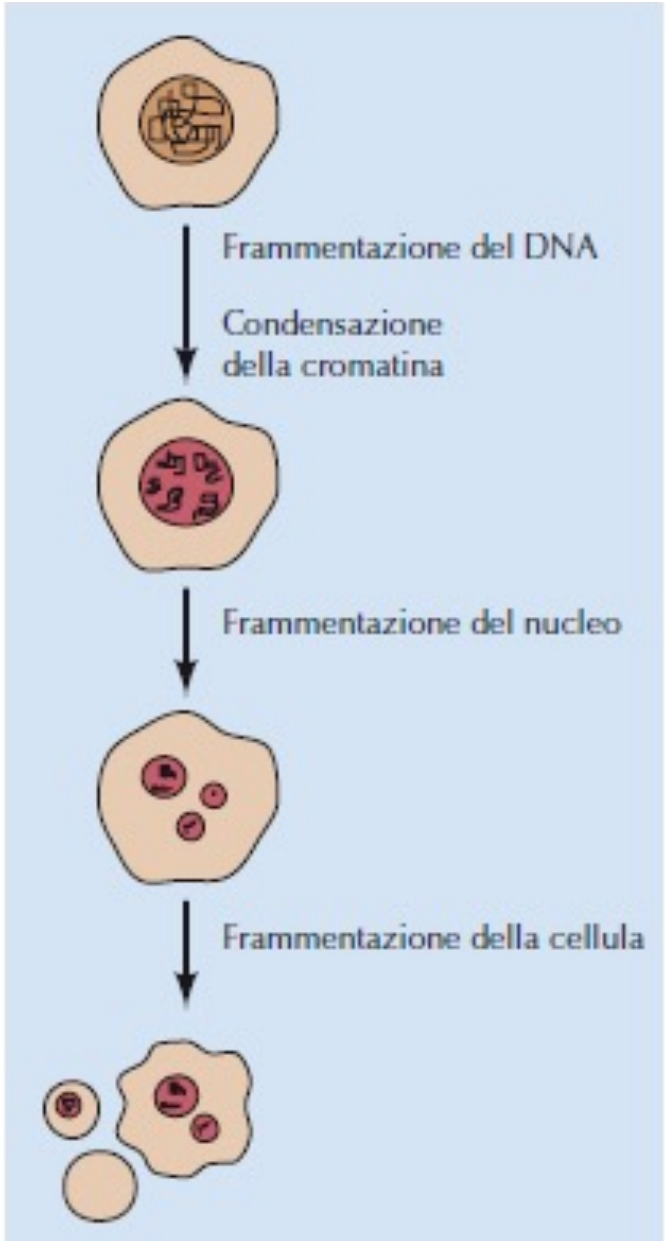


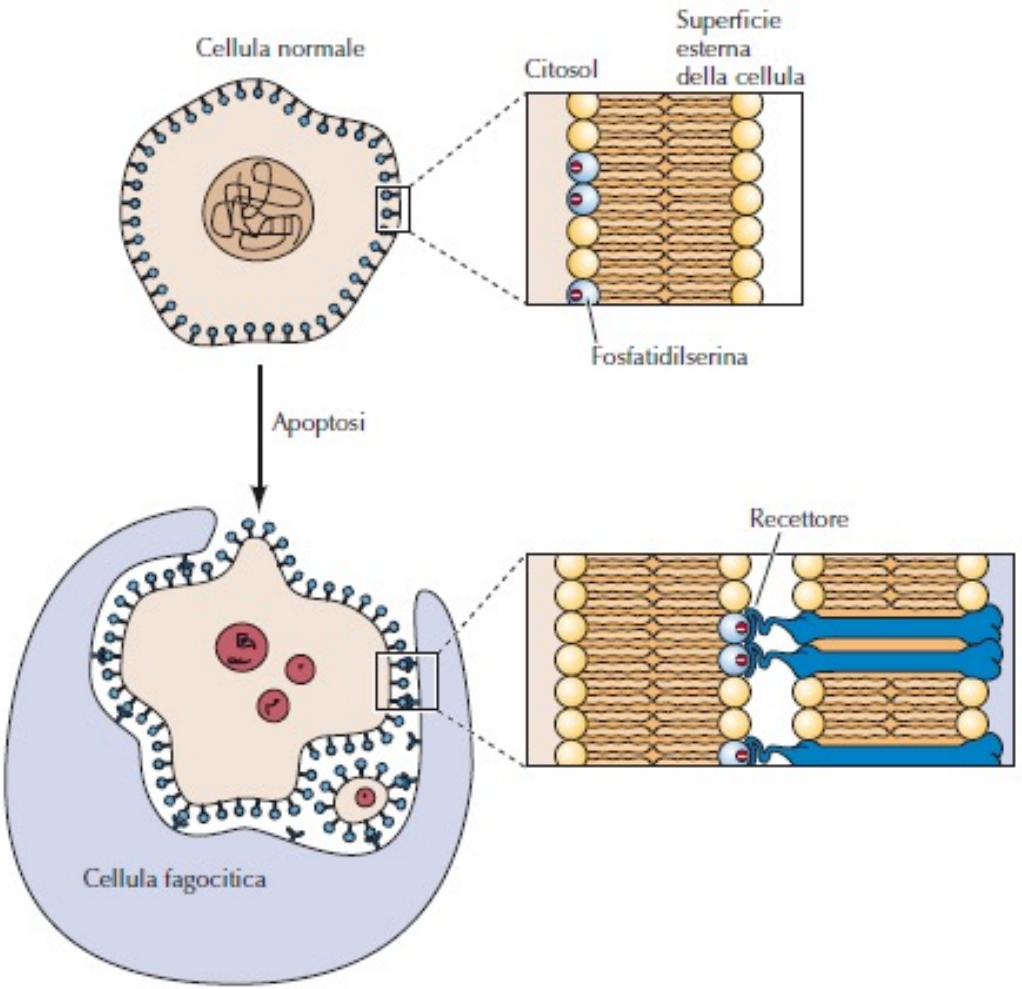
vescicolazione

formazione
di autofagosomi

lisi cellulare

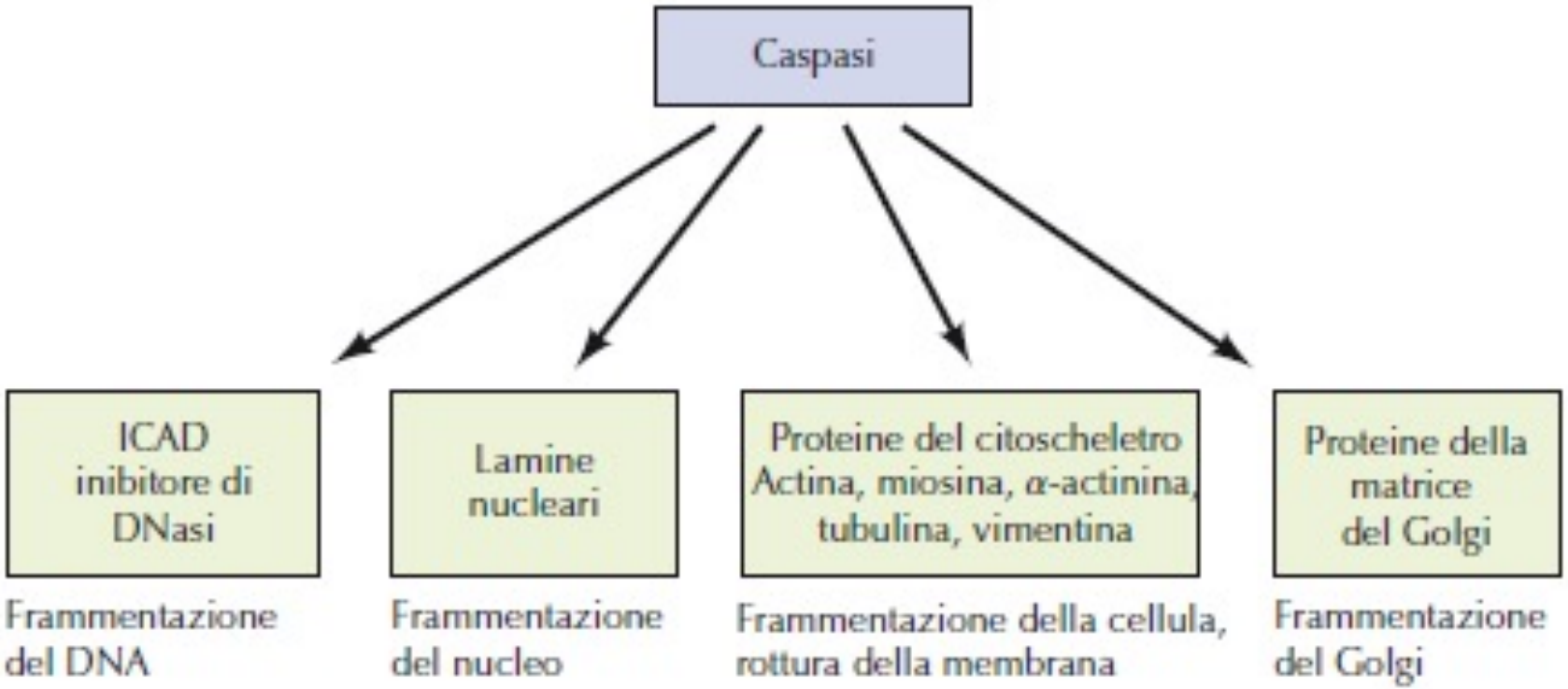
Sequenza di eventi dell'apoptosi





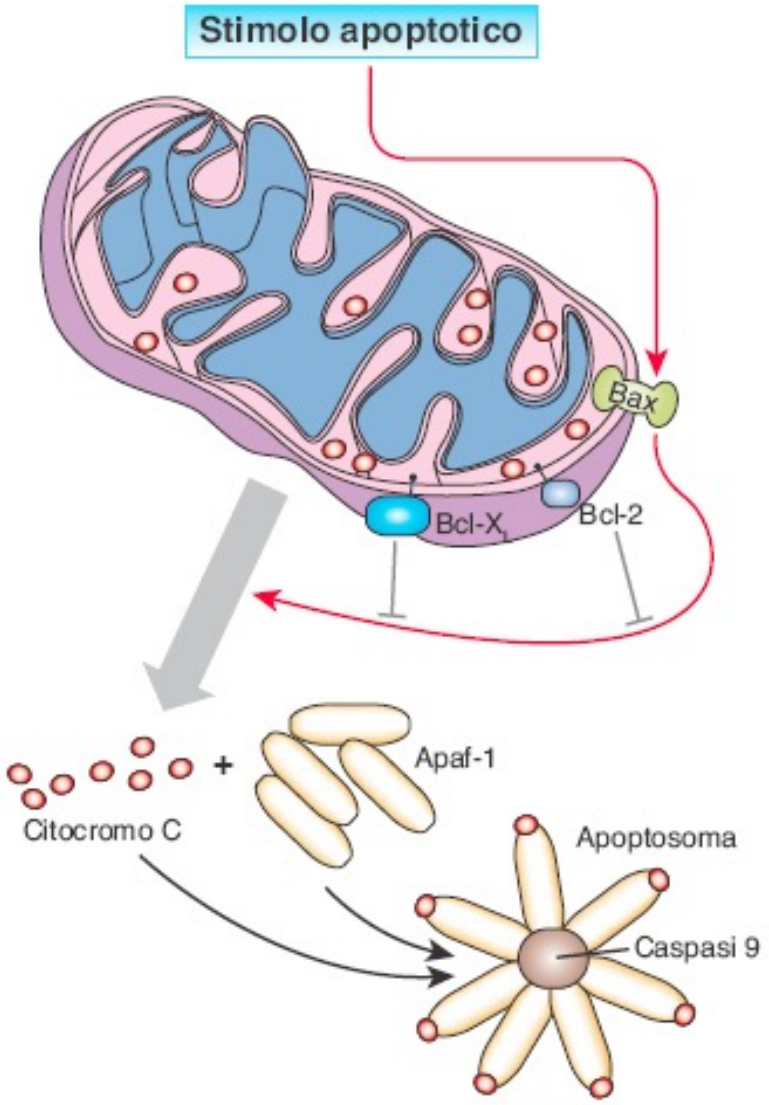
Le caspasi: enzimi effettori dell'apoptosi

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

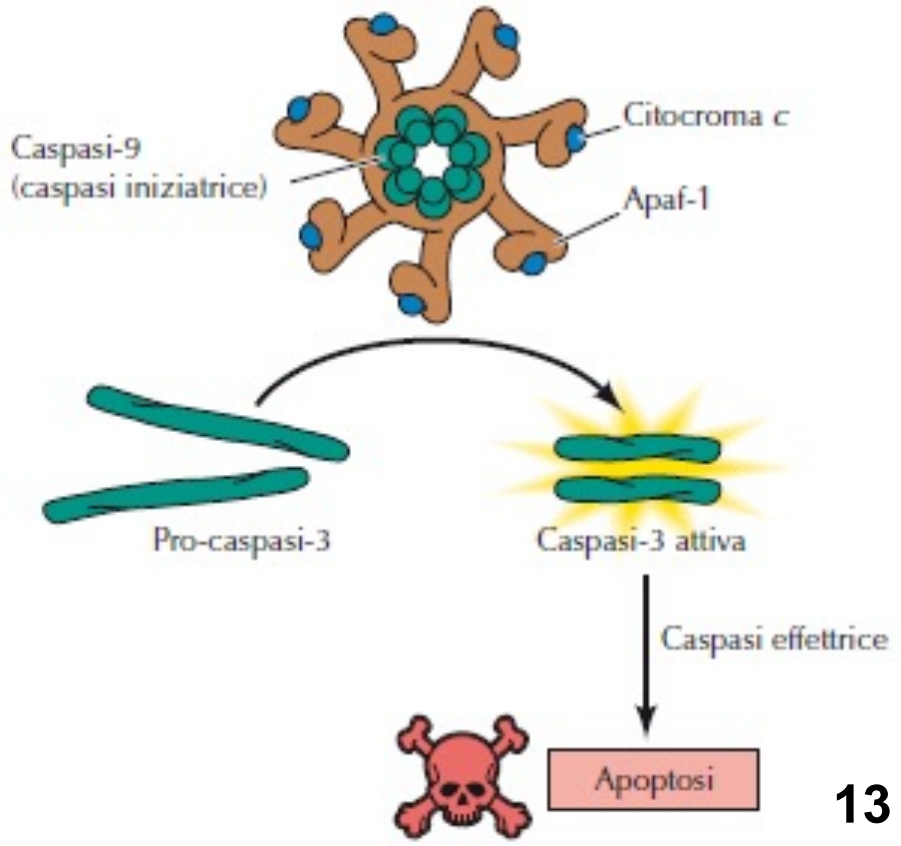


Apoptosi (via intrinseca) sequenza di eventi

Permeabilizzazione mitocondriale → **Attivazione delle caspasi**



apoptosoma

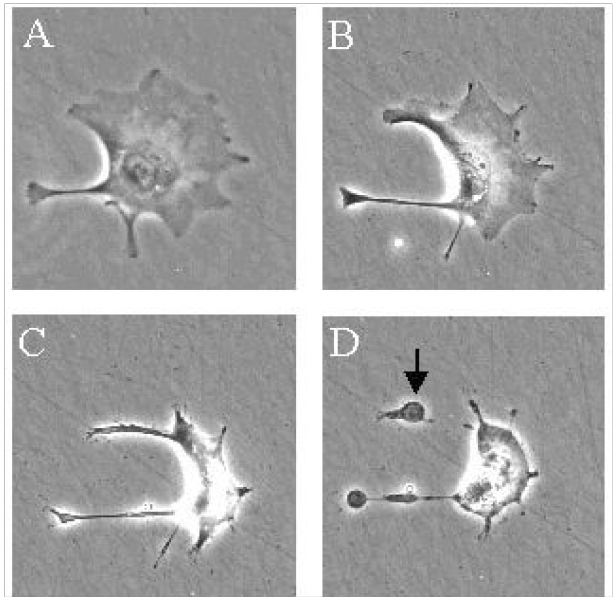


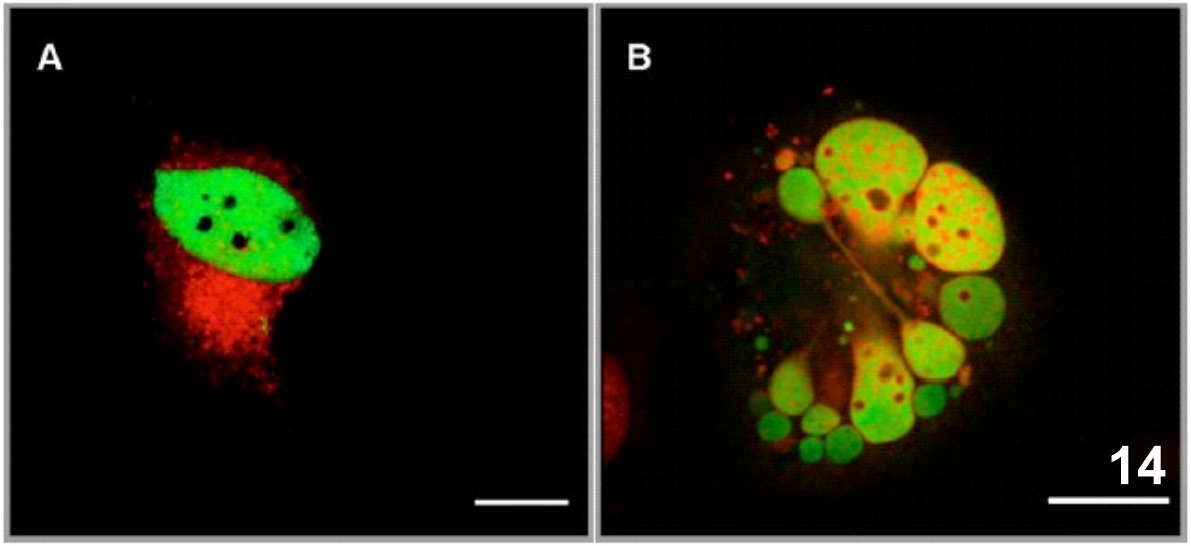
Saggi di apoptosi

Il processo di apoptosi è accompagnato da specifici cambiamenti:

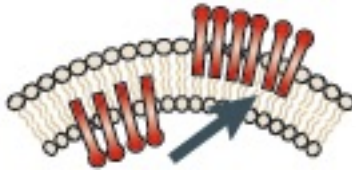
- depolarizzazione e permeabilizzazione mitocondriale (via intrinseca)
- Attivazione di caspasi
- alterazioni della membrana plasmatica
- frammentazione del DNA
- vescicolazione (bubbling)

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





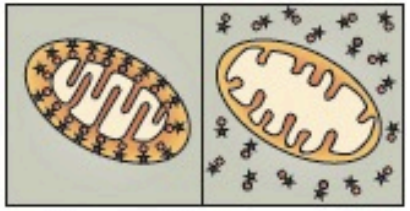
APOPTOSI: visualizzazione in cellule

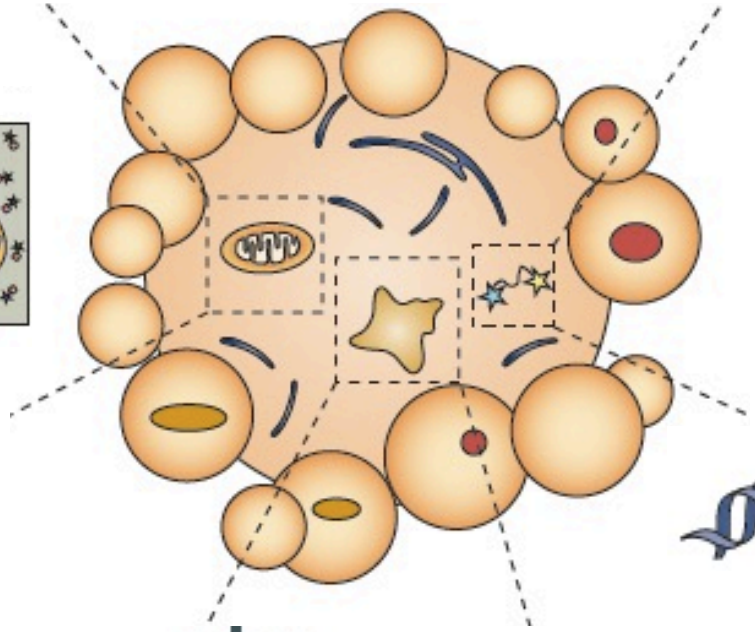


Esposizione della PS

Attivazione
delle caspasi

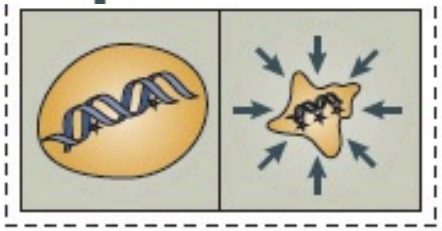
MOMP





Frammentazione
del DNA
Saggio TUNEL

picnosi



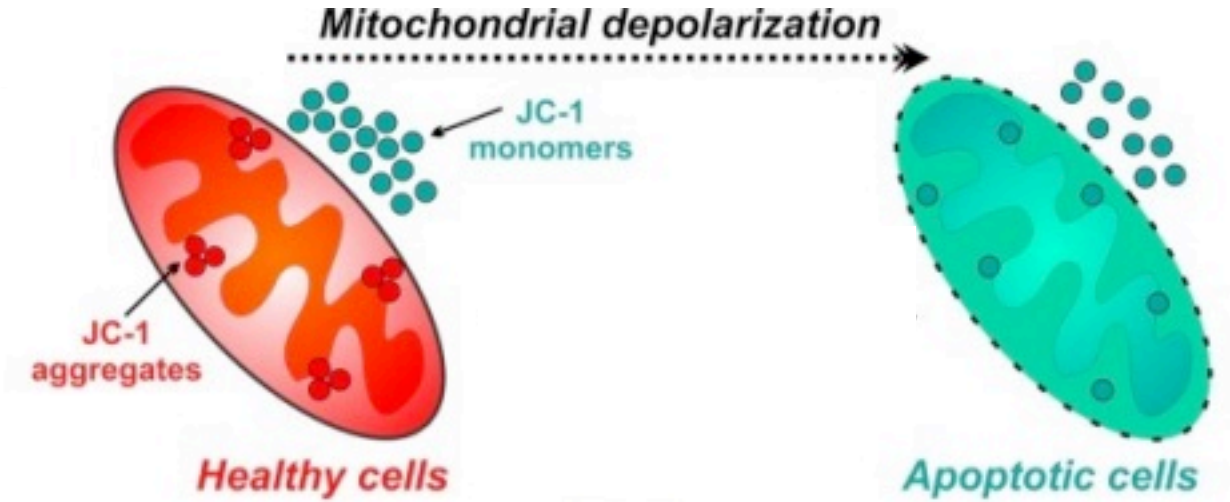
Diverse modalità di indagine:

- **Microscopia a fluorescenza (live o fixed)**
- **Lettura di fluorescenza realtime**
- **Citofluorimetria (live o fixed)**

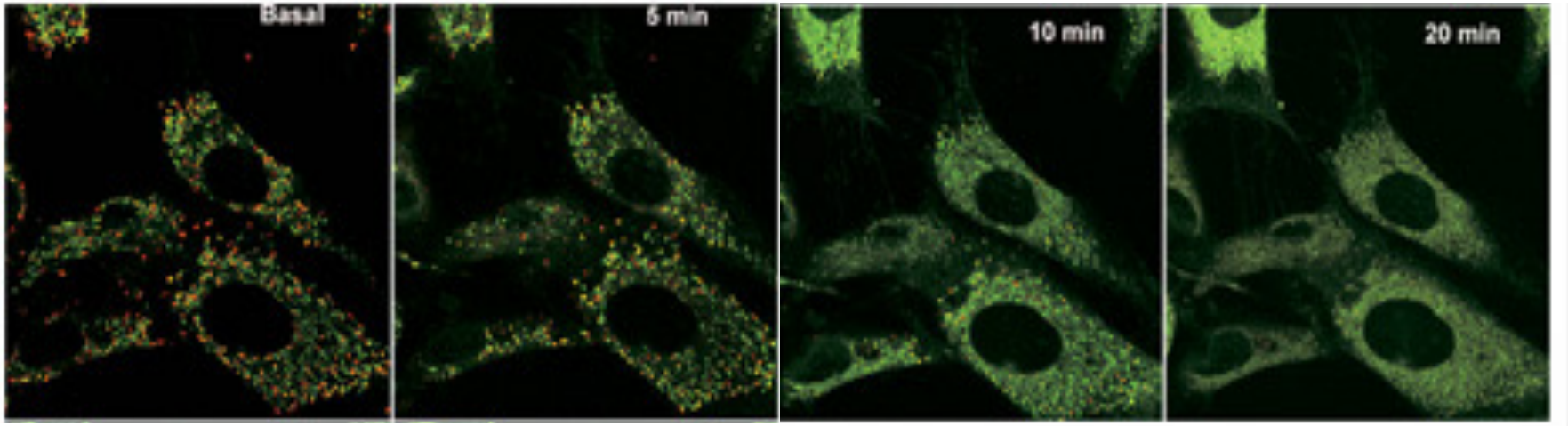
Saggi di permeabilizzazione mitocondriale (live)

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

rosso (aggregato) - verde (monomero)



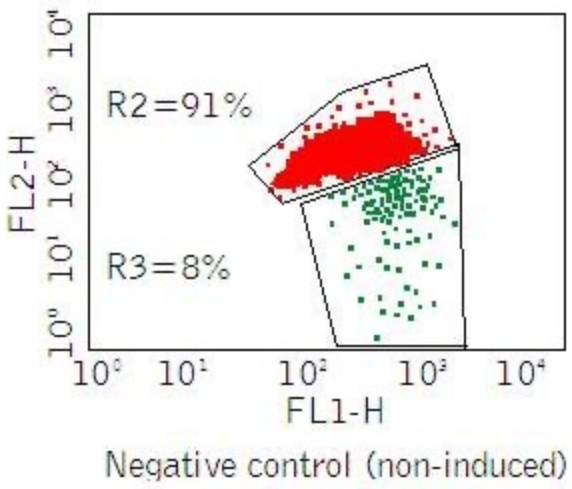
Saggi di permeabilizzazione mitocondriale (live)

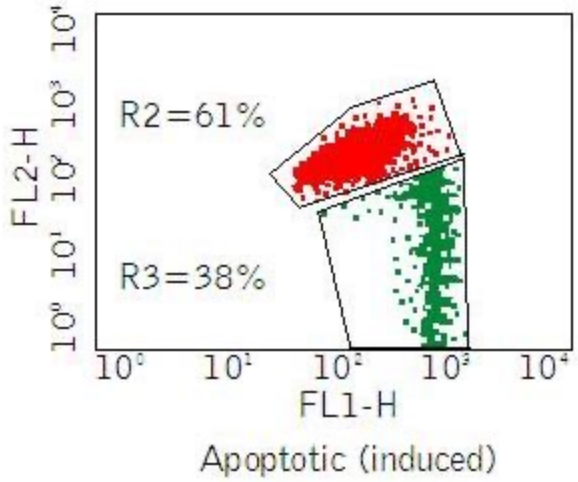


Permeabilizzazione mitocondriale:

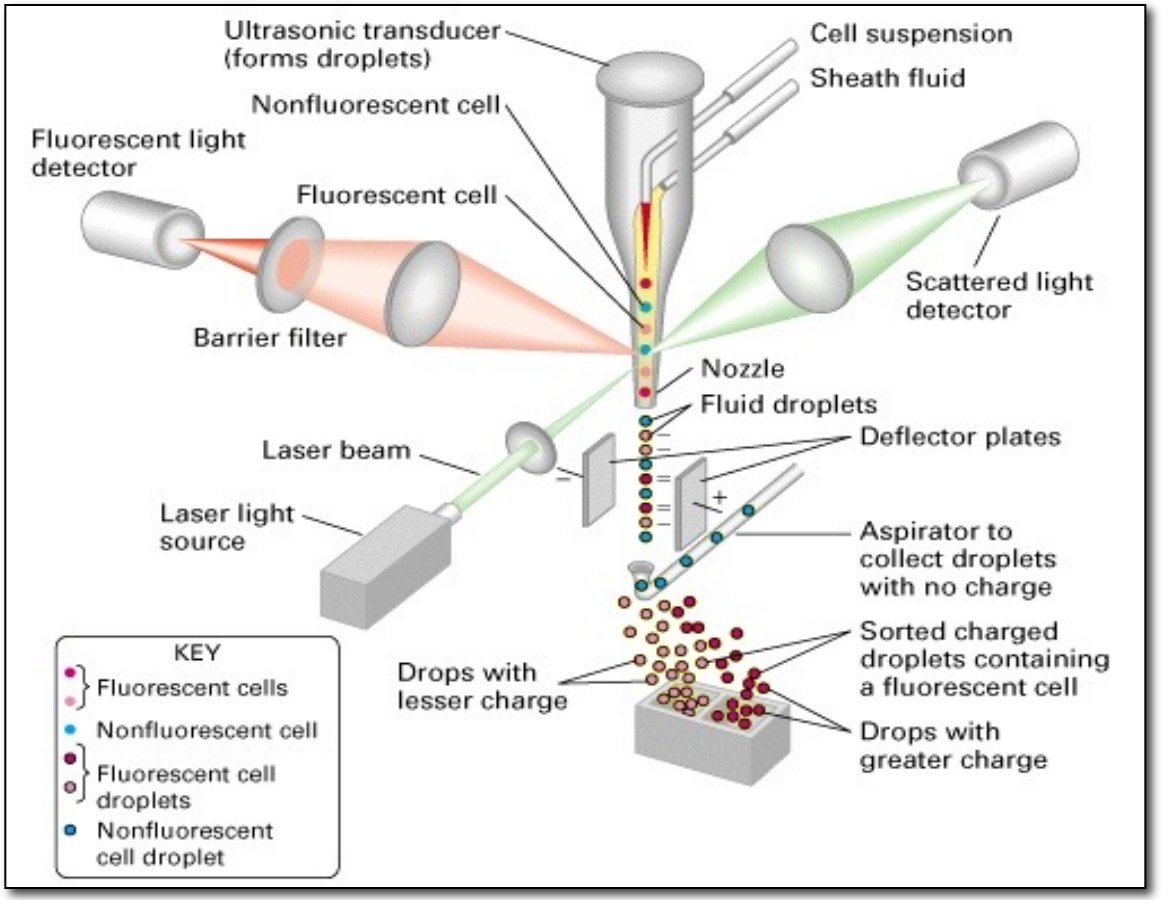
colorazione vitale con molecole indicatrici la cui fluorescenza cambia da:

rosso (aggregato mitocondriale) - verde (monomero)





Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria



Si può effettuare una colorazione con sostanze fluorescenti (es. JC1) e conta delle cellule rosse/verdi

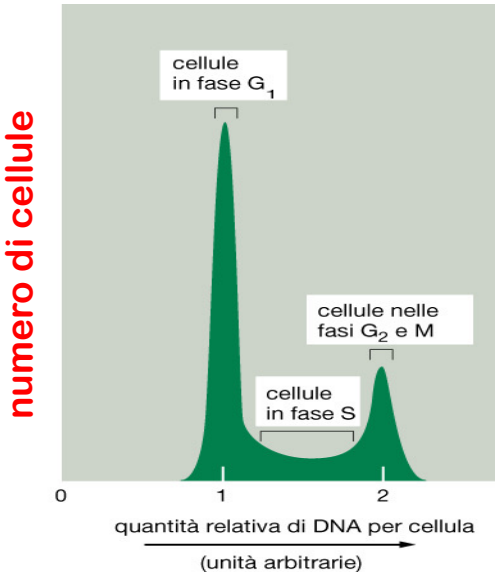
Analisi del contenuto di DNA di singole cellule mediante colorazione con PI e citofluorimetria (cellule fissate)

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

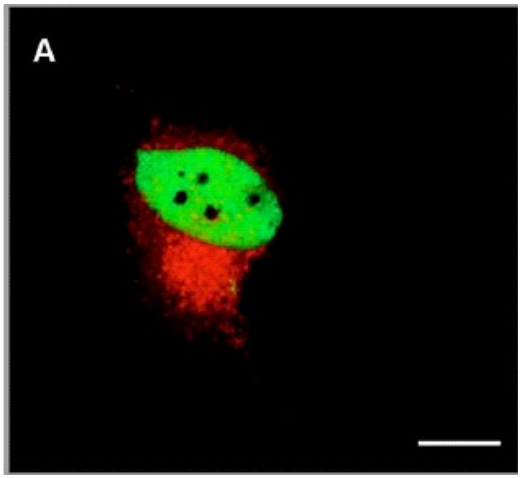
cellule in crescita asincrona

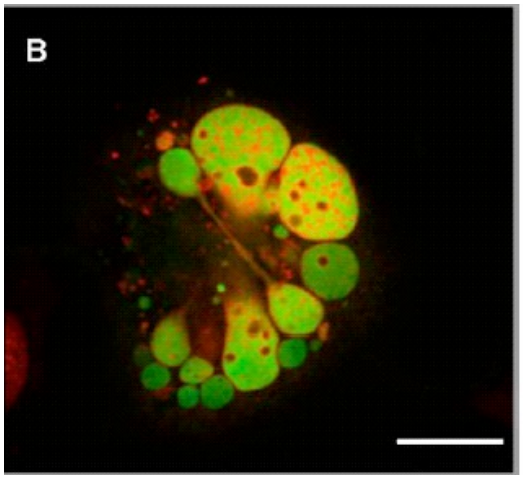


G0/G1	S	G2/M
2n	2n>4n	4n>2n

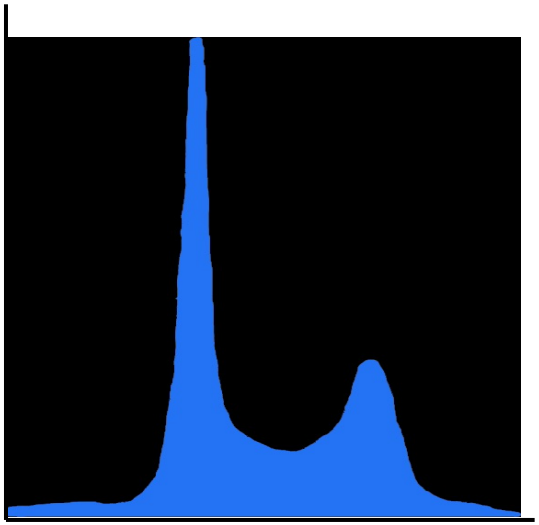
intensità di fluorescenza

I corpi apoptotici hanno contenuto di DNA inferiore a 2n

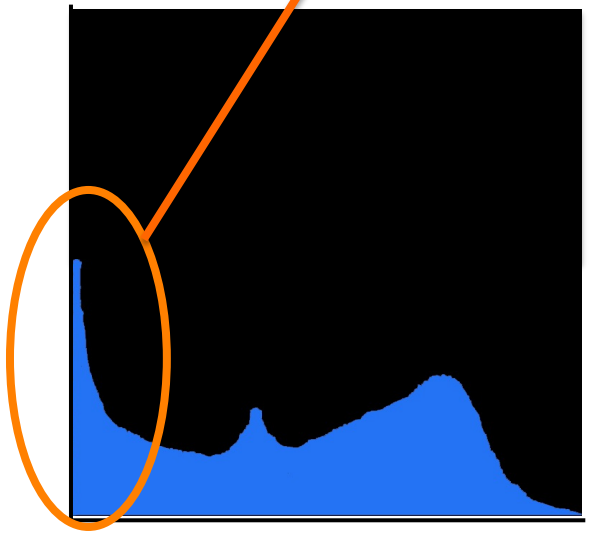




Cellule in crescita asincrona



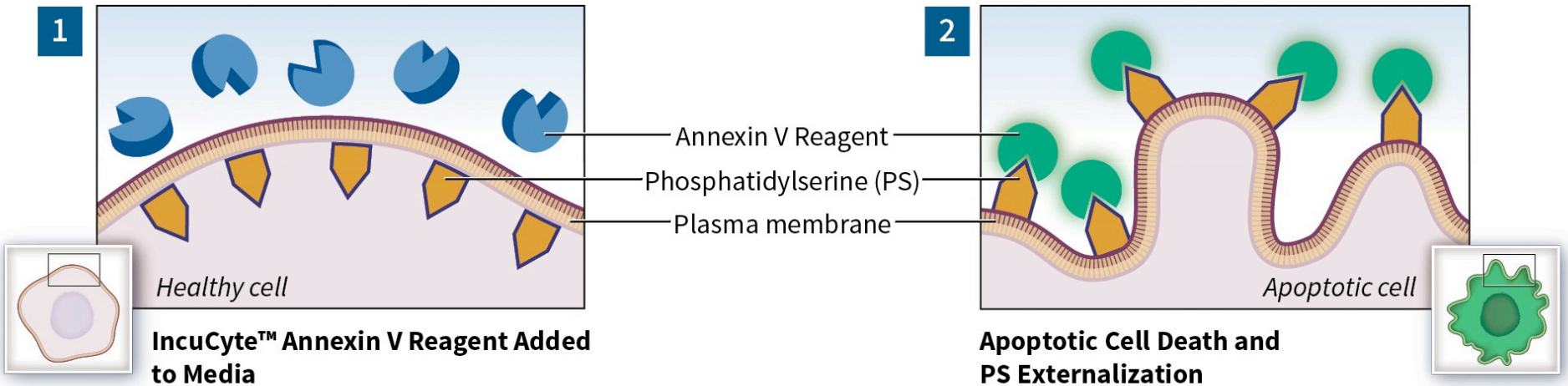
Cellule in apoptosi



Saggi di esposizione di fosfatidilserina: ANNEXINA V (sia cellule vitali che 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)



IncuCyte™ Annexin V Reagent Added to Media
No fluorescence in the presence of healthy cells that have PS located on the inner surface of the cell membrane.

Apoptotic Cell Death and PS Externalization
Exposure of PS on the extracellular surface leads to binding of the Annexin V Reagent and a bright fluorescent signal.

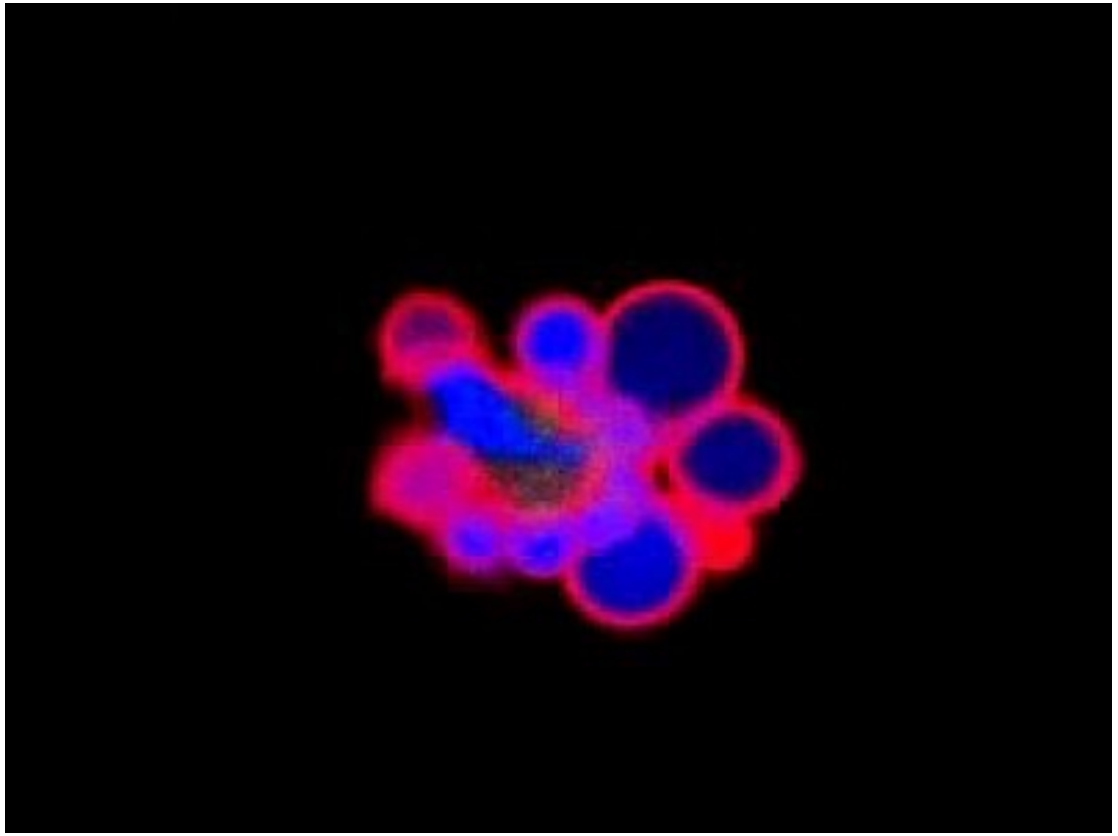
Visualizzazione di apoptosi mediante live cell labeling

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

1) **Permeabilizzazione mitocondriale: (molecola fluorescente verde)**

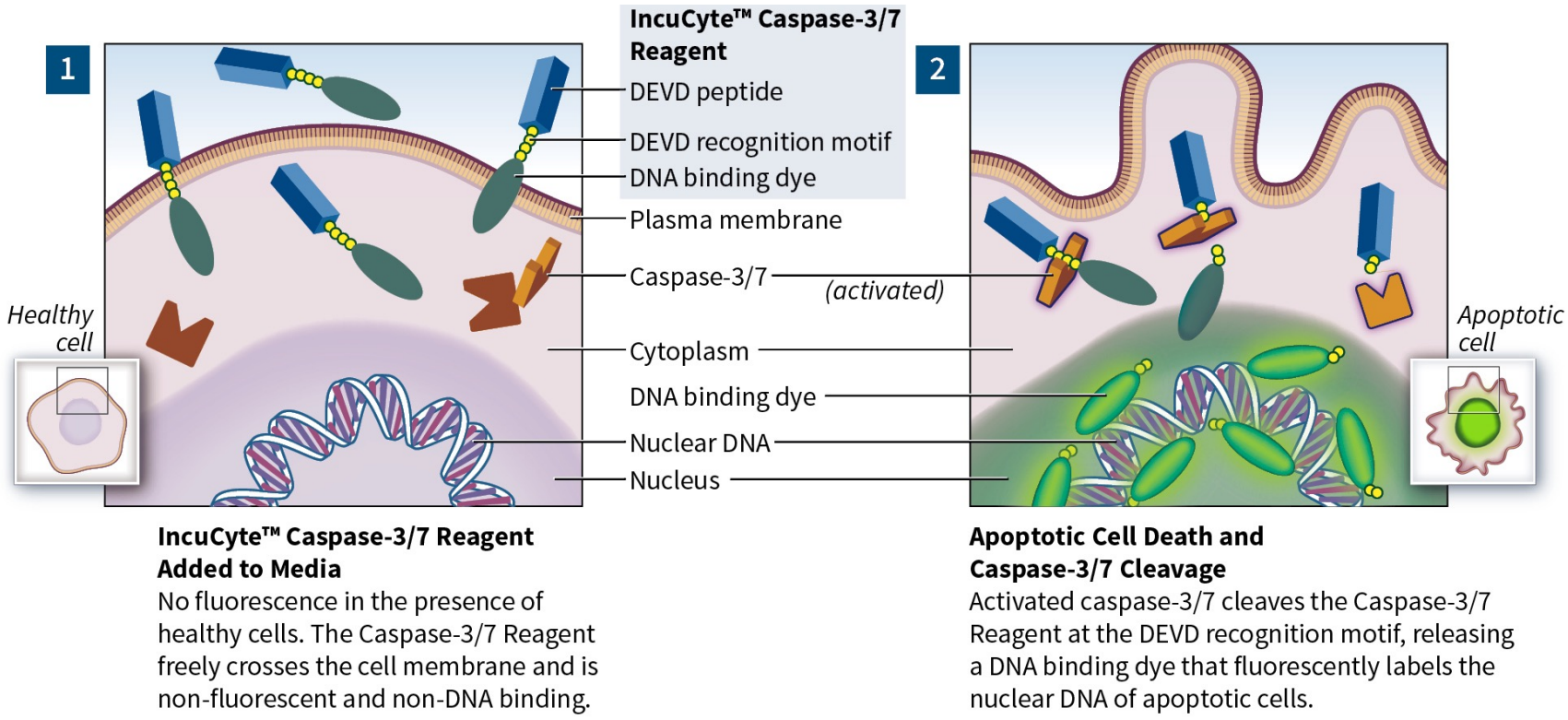
2) **Alterazioni della membrana plasmatica: Esposizione della fosfatidilserina (Annexin-RITC rosso) e vescicolazione**

3) **Frammentazione del nucleo: DNA colorato con DAPI blu**



saggio di attivazione di CASPASI EFFETTRICI

(cellule sia vitali che fissate)

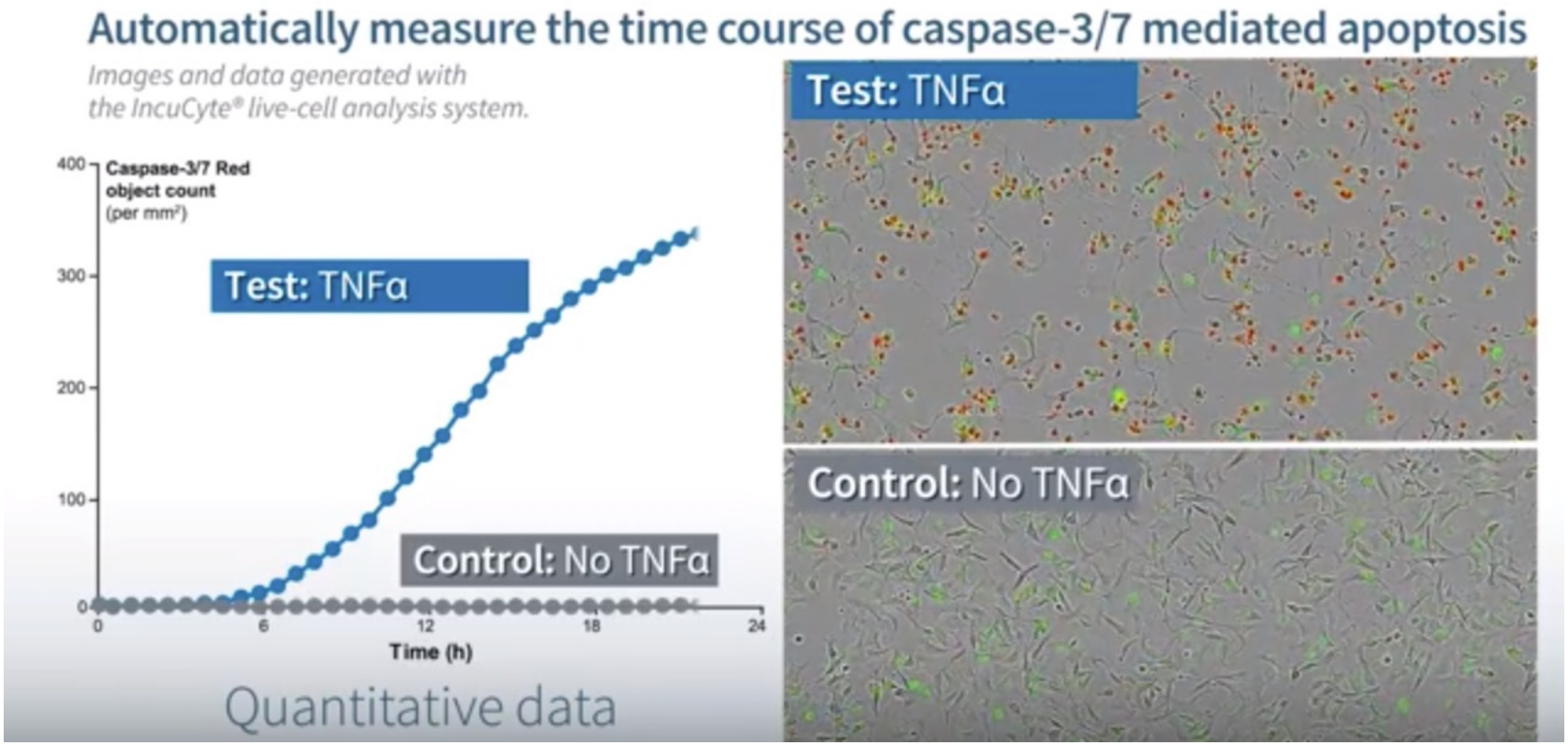


Molecola con sito di taglio per le caspasi 3/7, il taglio libera:

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

Valutazione quantitativa di apoptosi mediante live labeling

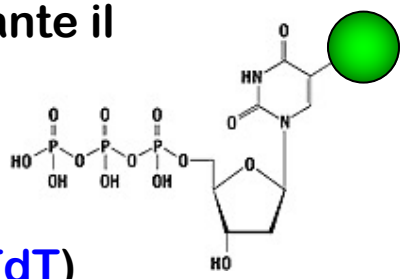
https://www.youtube.com/watch?v=FidPF2EJb0I



Real-time detection of apoptosis in Green labeled MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells treated with TNFα 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.

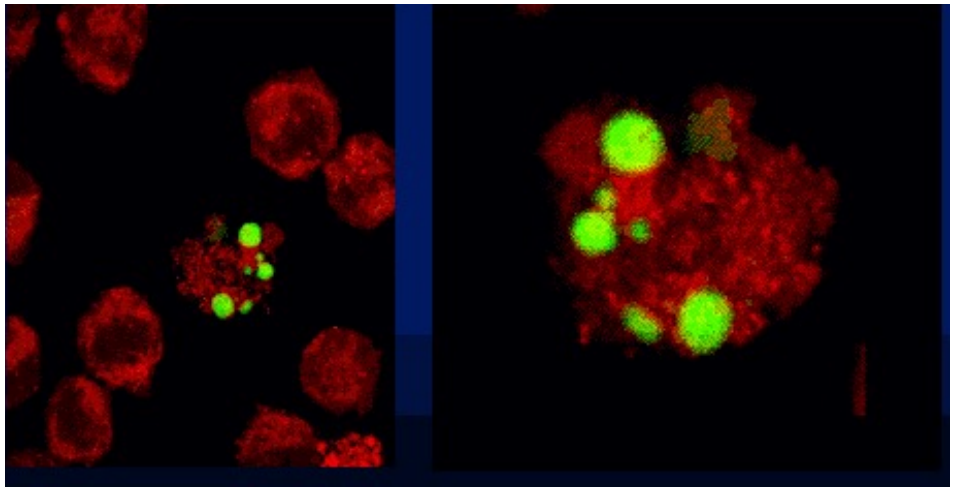
SAGGIO TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labelling) (cellule/tessuti fissati); microscopia/FACS

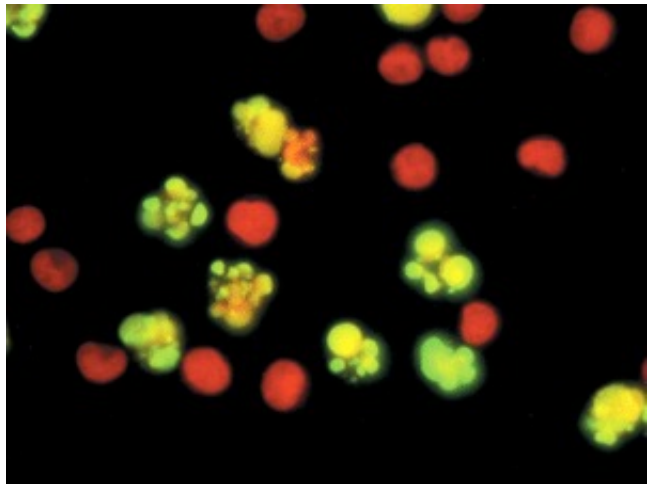
Marcatura delle estremità dei frammenti di DNA generati durante il processo apoptotico con dUTP coniugato ad un fluorocromo (ad es. FLUORESCEINA verde = FITC).



Viene fornito l'enzima terminal desossinucleotidil transferasi (TdT)

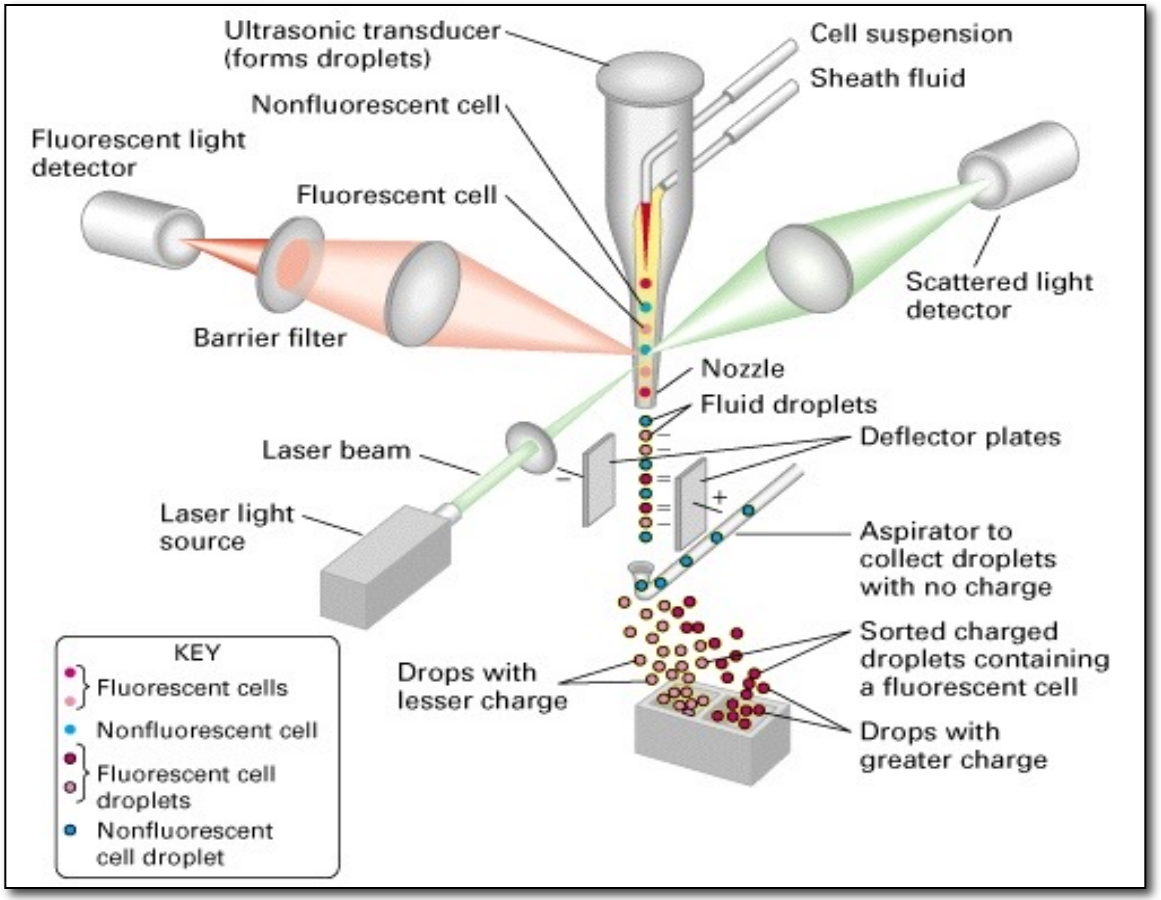
La fluorescenza può poi essere visualizzata al microscopio, oppure mediante lettore o FACS





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

Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria

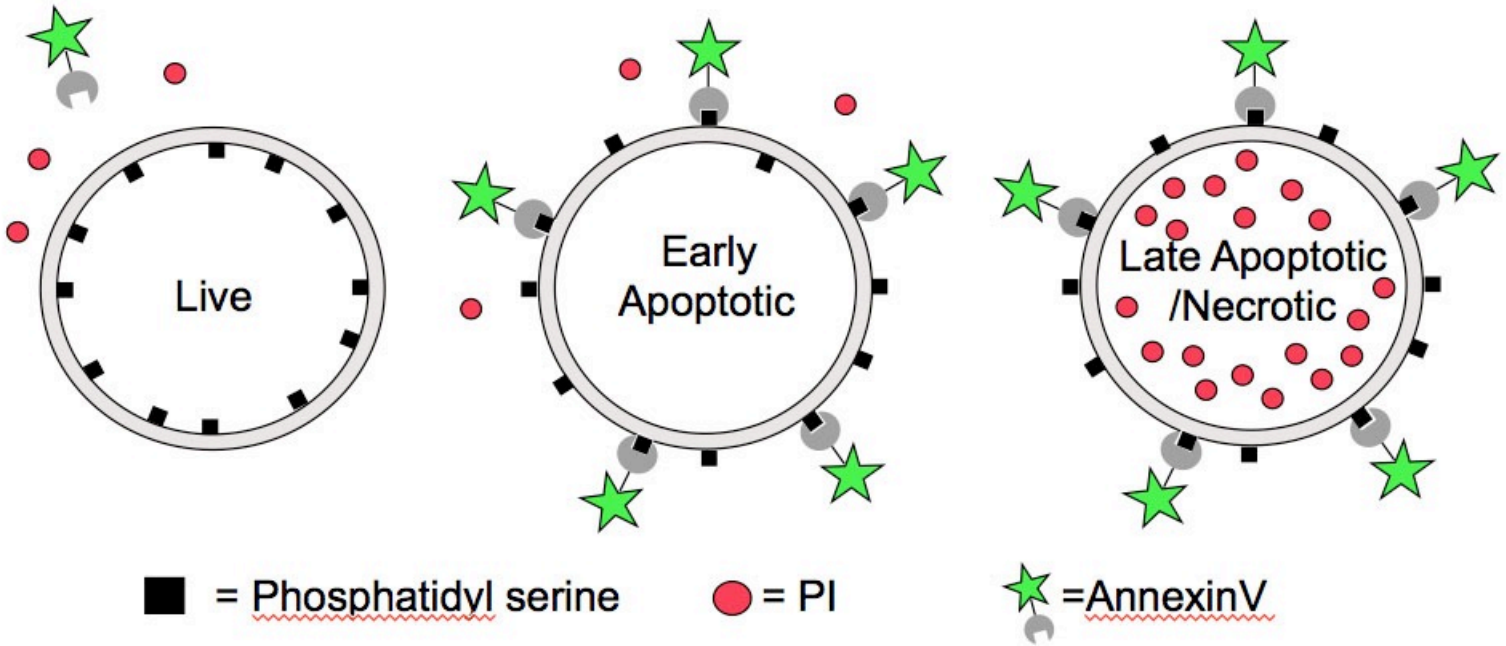


- **Si può effettuare una colorazione con :**

1. **sostanze fluorescenti (es. Annexina V, JC1)**
2. **substrati fluorescenti per le caspasi**
3. **intercalanti fluorescenti degli acidi nucleici (PROPIDIO IODURO)**

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



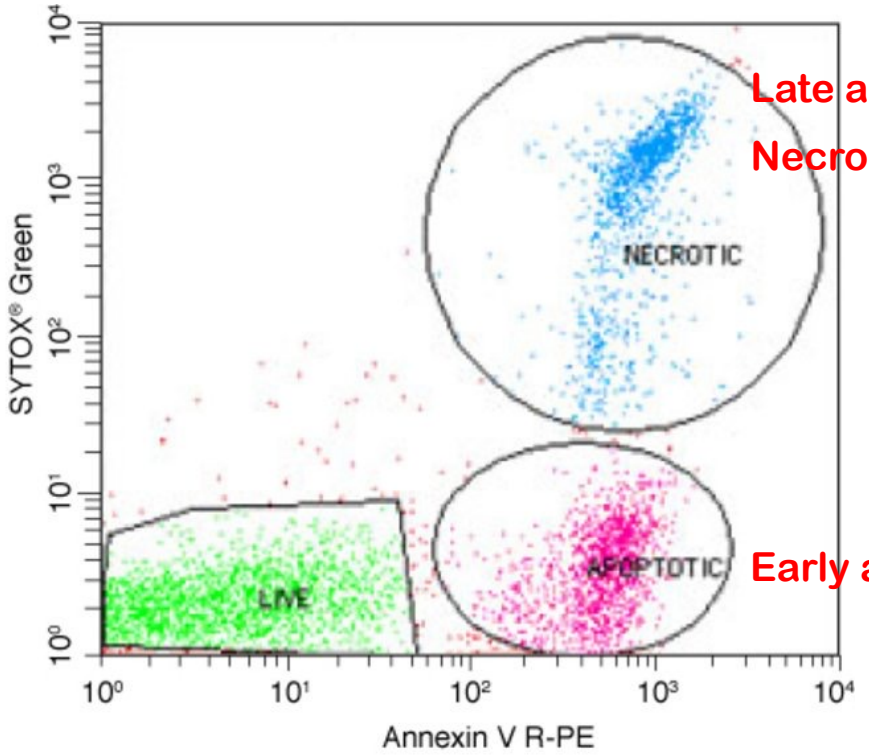
L'integrità della membrana plasmatica viene persa durante il processo di necrosi e negli stadi finali del processo di apoptosis: il PI può penetrare solo in tali cellule

Distinzione apoptosi/necrosi mediante citofluorimetria:

incubazione con Annexina V e Propidio Ioduro

(su cellule NON permeabilizzate)

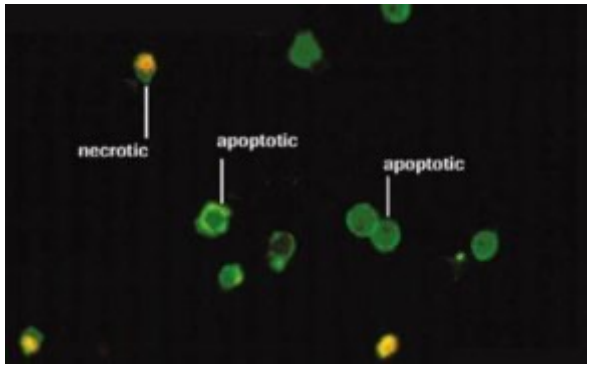
PI



Late apoptosis

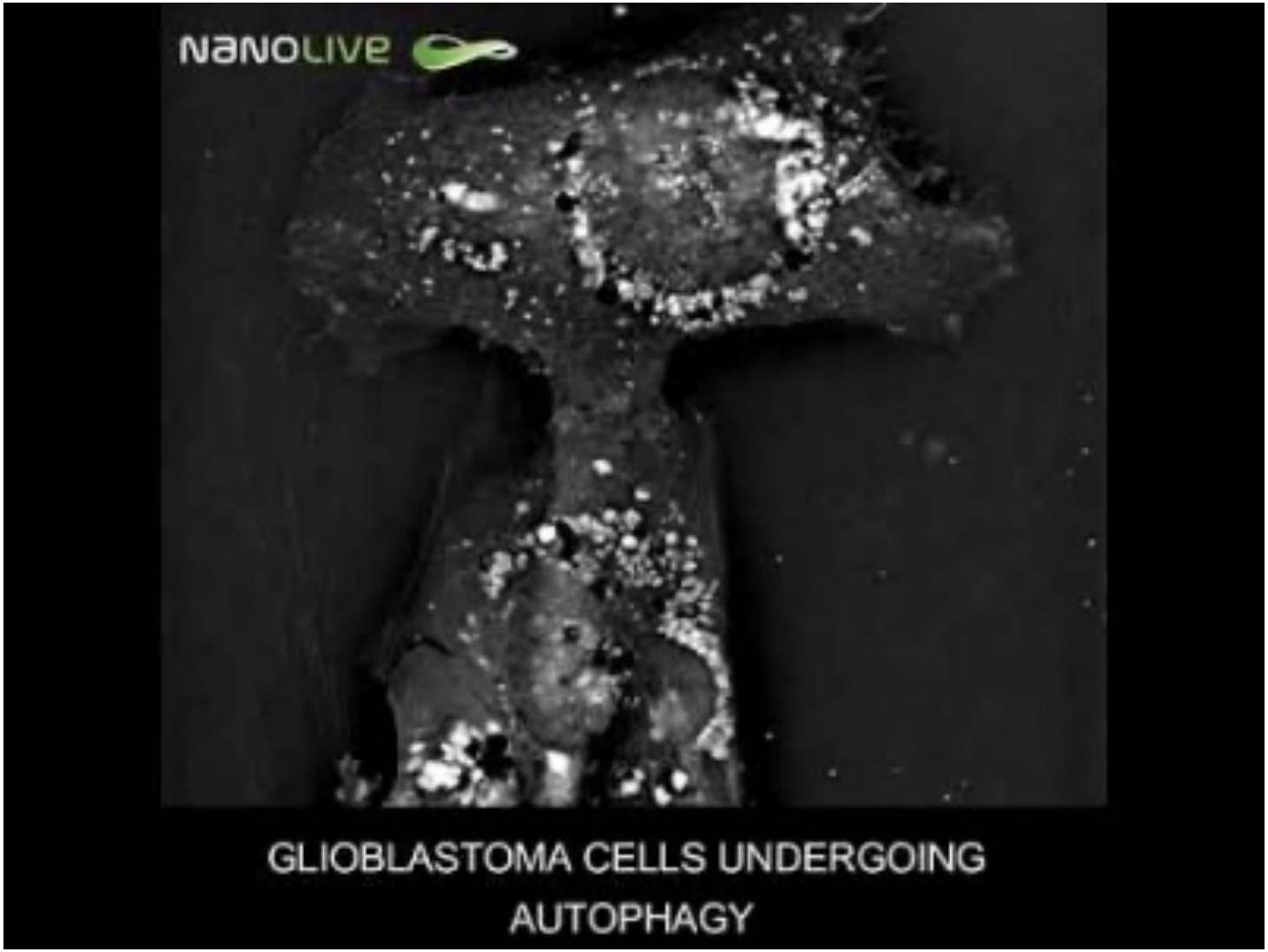
Necrosis

Early apoptosis

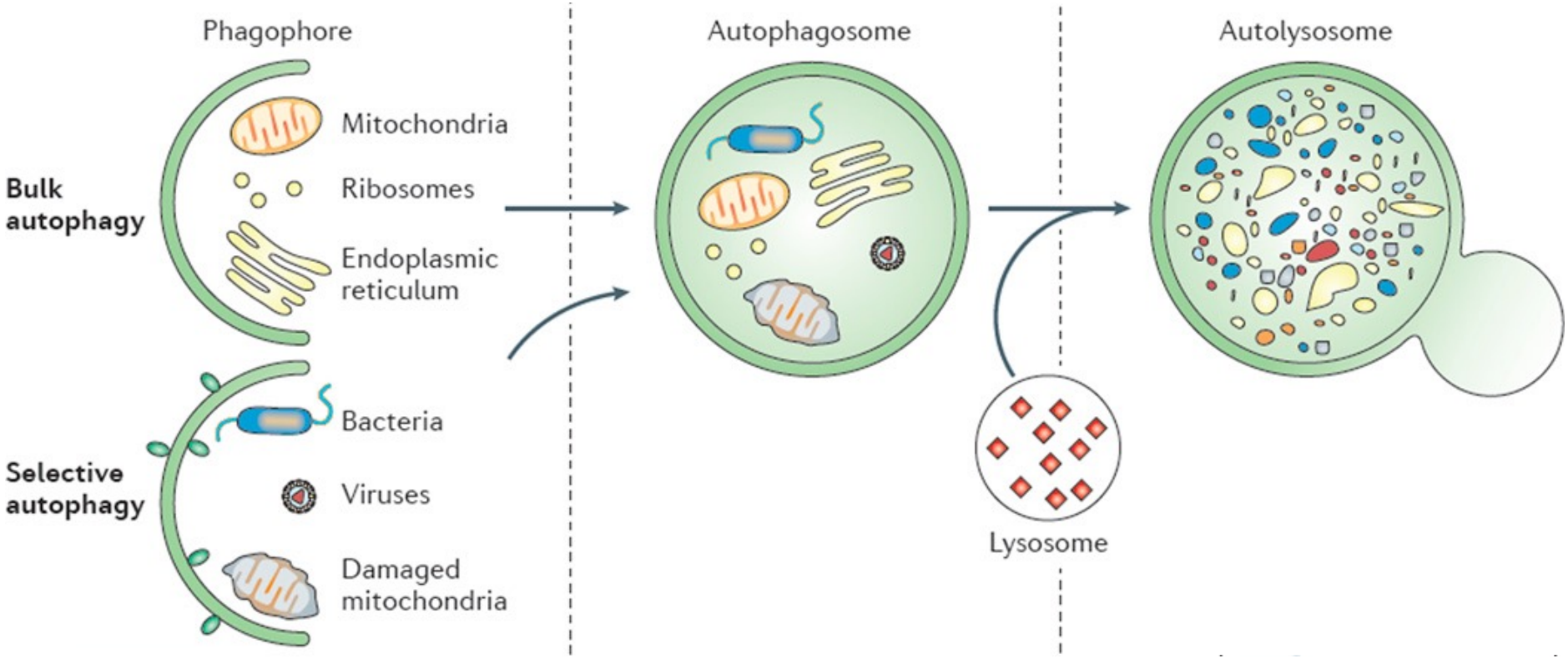


Annexina V

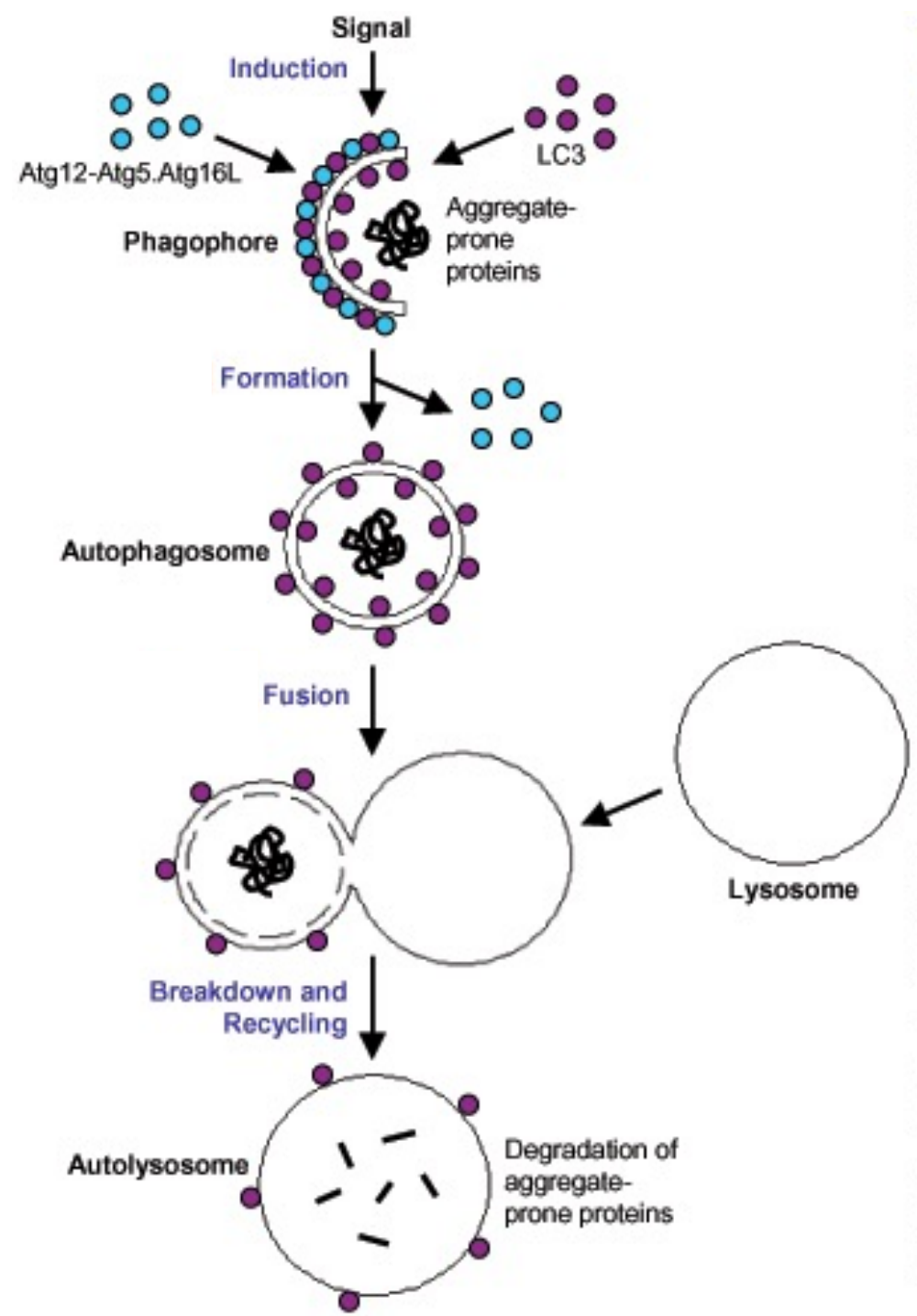
Studio dell'autofagia

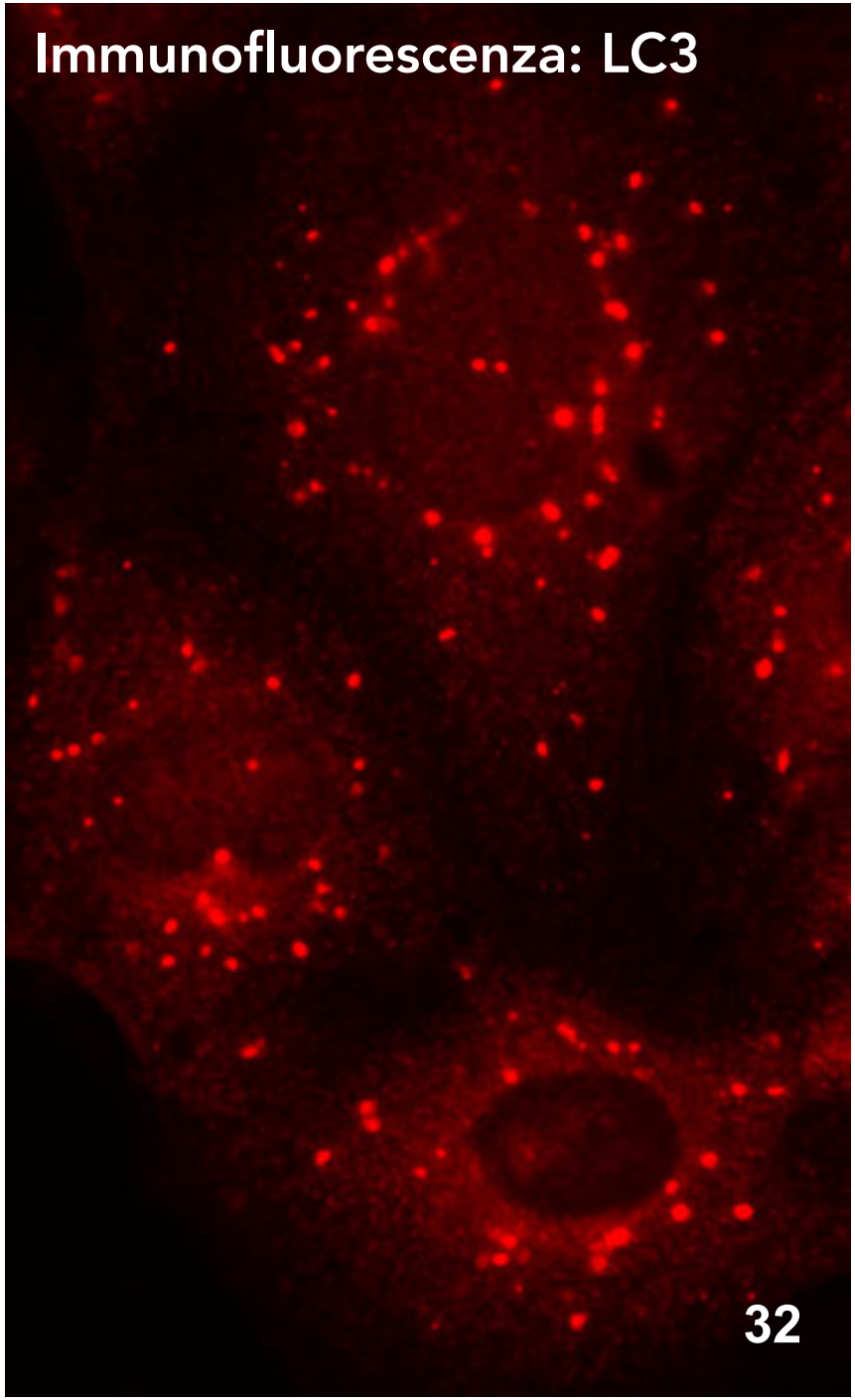


Studio dell'autofagia

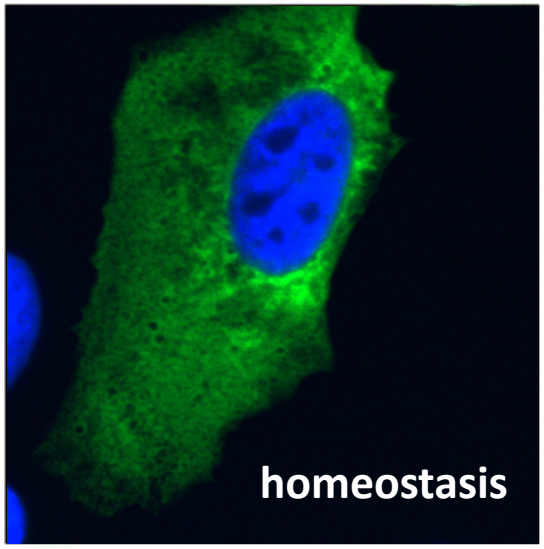


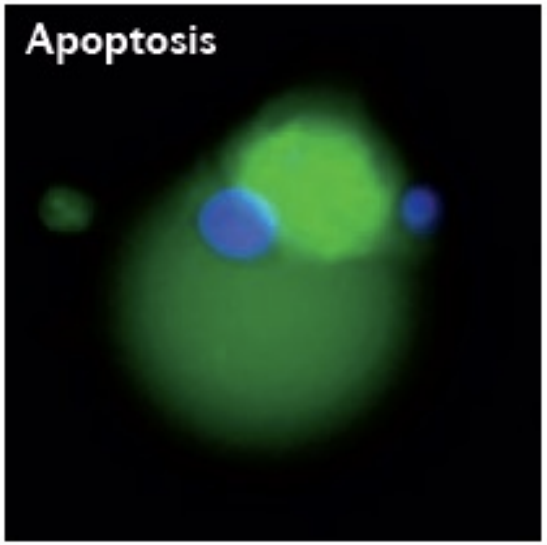
LC3

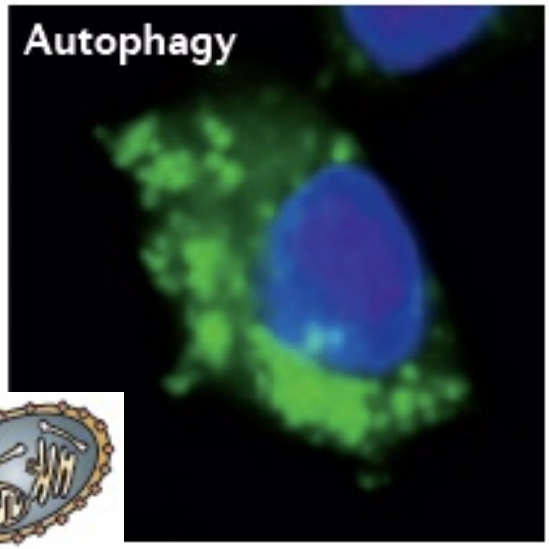

Signal
Induction
Atg12-Atg5.Atg16L
LC3
Phagophore
Aggregate-prone proteins
Formation
Autophagosome
Fusion
Lysosome
Breakdown and Recycling
Autolysosome
Degradation of aggregate-prone proteins

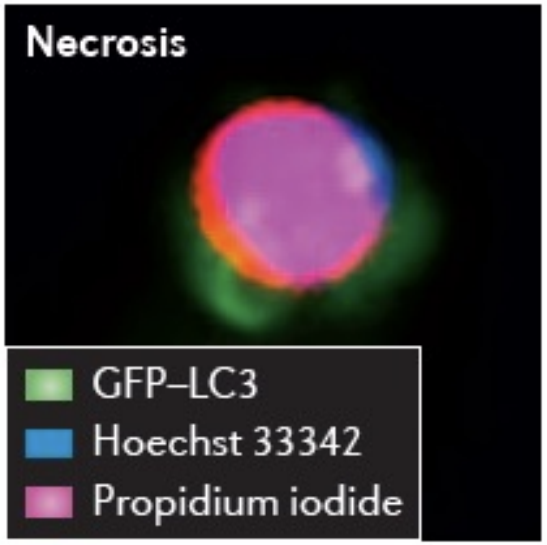

Immunofluorescenza: LC3

Visualizzazione di diversi tipi di morte mediante sistemi reporter e live cell labeling



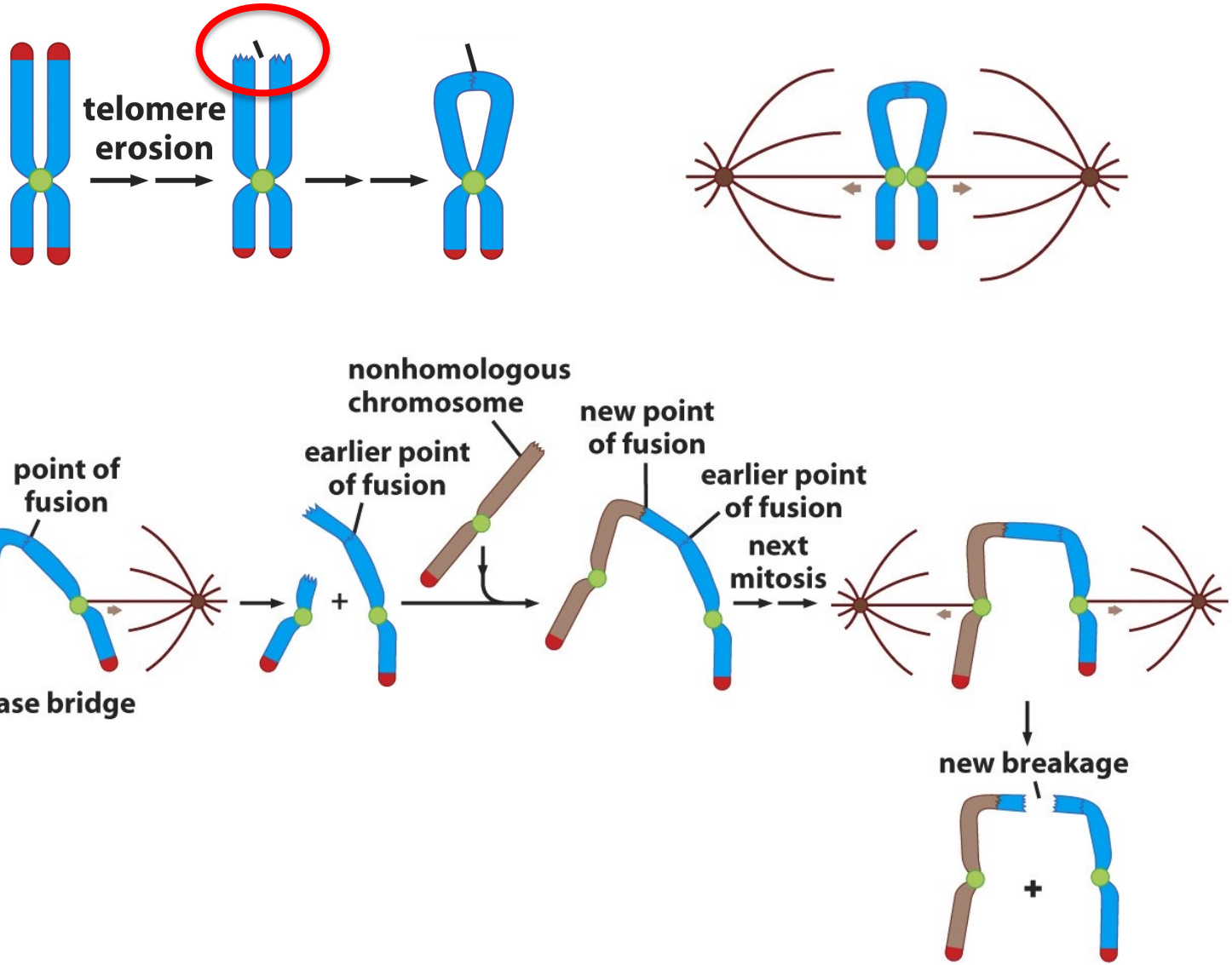




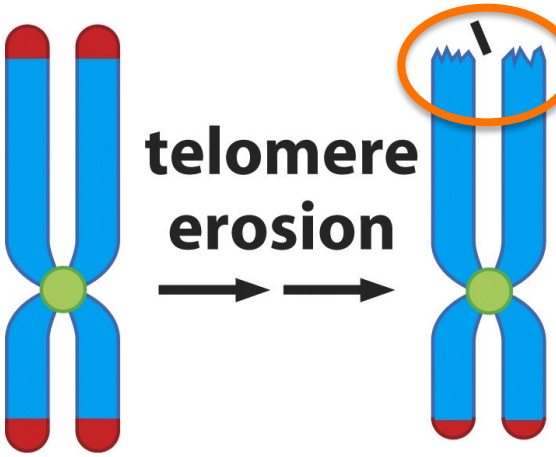


APPROFONDIMENTO (fuori programma): le pathways della senescenza

L'accorciamento dei telomeri causa DANNI AL DNA che possono portare a cicli di fusione-rottura causando instabilità genomica



L'erosione dei telomeri è percepita come una rottura del DNA



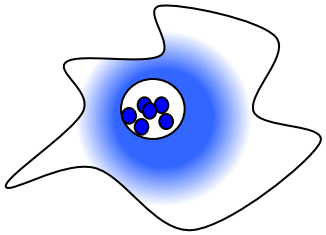
SENSORI

TRASDUTTORI

EFFETTORI

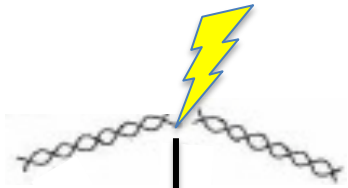
RISPOSTA AI DANNI AL DNA: DDR

ARRESTO PERMANENTE DEL CICLO CELLULARE: SENESCENZA



L'attivazione della DDR causa l'arresto del ciclo cellulare associato alla senescenza

Accorciamento dei telomeri/ Danni estesi al DNA



Attivazione della DDR

p53

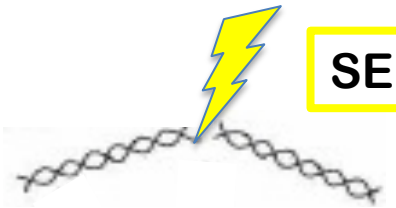
Induzione del cdki p21

Attivazione di pRB

EFFETTORI della DDR

Blocco della transizione G1/S

La risposta ai DANNI AL DNA e l'attivazione dei sistemi checkpoint



SENSORI

TRASDUTTORI

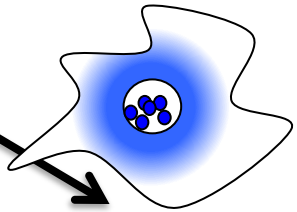
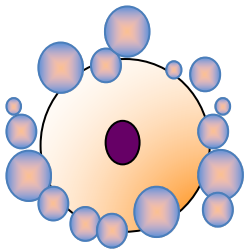
EFFETTORI

RIPARAZIONE DEL DANNO

ARRESTO DEL CICLO

MORTE CELLULARE PROGRAMMATA (APOPTOSI)

TRANSITORIO REVERSIBILE



PERMANENTE (SENESCENZA)