



# Tecniche d'indagine

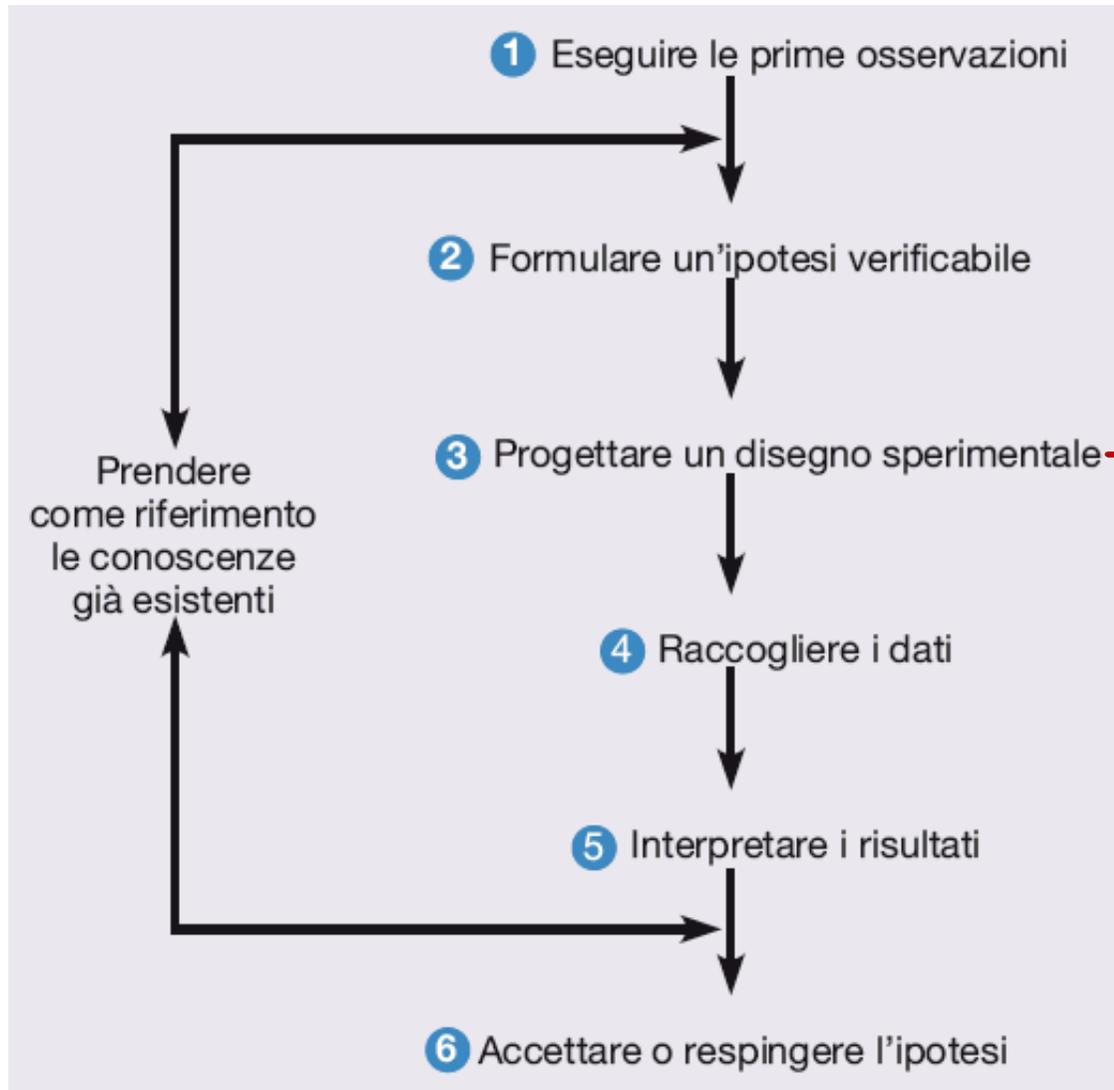
Capitolo 3 libro di testo

# Obiettivi formativi

- Conoscere le diverse tipologie di approcci sperimentali
- Capirne i fondamentali



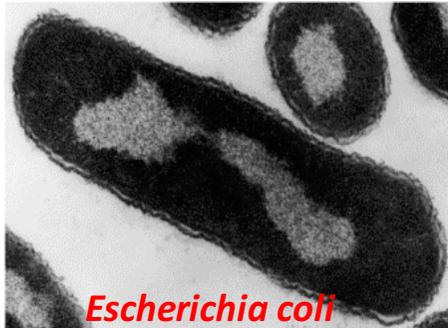
# Il metodo scientifico



- Quale modello sperimentale?  
- Quale approccio sperimentale?

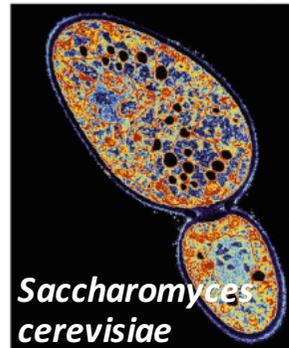
# Organismi modello più utilizzati

## Batteri



*Escherichia coli*  
Biologia molecolare della cellula (replicazione del DNA, trascrizione, traduzione)

## Lievito



*Saccharomyces cerevisiae*  
Organismo eucariota più semplice, molte proteine omologhe a quelle di mammifero. Uso di mutanti per identificare geni, numerosi studi sul ciclo cellulare

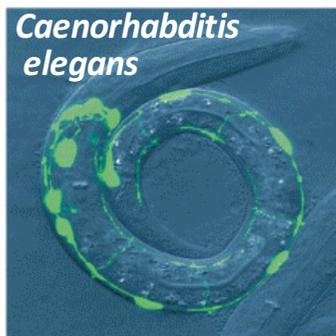
## Piante



*Arabidopsis thaliana*  
Pianta superiore con genoma insolitamente piccolo, riproduzione rapida, piccole dimensioni: Studi di genetica e biologia molecolare

## Invertebrati

## Vertebrati



*Caenorhabditis elegans*  
Nematode microscopico, formato da circa 1000 cellule, parete del corpo trasparente, per cui le cellule si possono facilmente identificare e seguire durante lo sviluppo



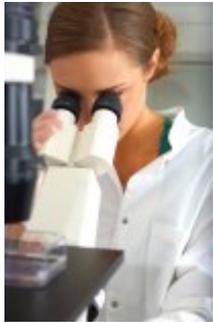
*Drosophila melanogaster*  
L'animale preferito dalla genetica e dalla biologia dello sviluppo. Usato anche in neurobiologia. Molti geni corrispondenti a quelli di mammifero



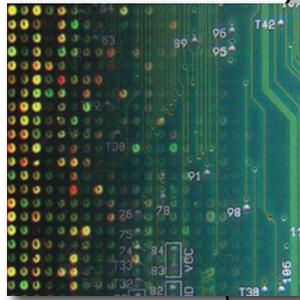
*Danio rerio*  
Si riproduce molto velocemente, adatto a studi genetici, negli embrioni trasparenti si riescono a osservare cellule che si muovono e cambiano durante lo sviluppo



*Mus musculus*  
Quasi tutti i geni umani hanno un corrispondente nel topo, vengono prodotti topi con mutazioni in geni specifici per provare a cosa serve un gene e come funziona



Tecniche morfologiche



bioinformatica



Tecniche biochimiche



Tecniche biomolecolari



Colture cellulari

# Discipline



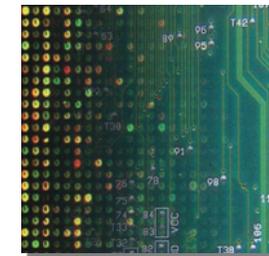
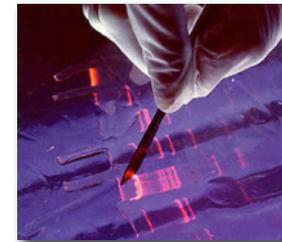
CITOLOGIA/ISTOLOGIA – comincia con l' avvento del MO, lo studio della morfologia cellulare migliora con l' invenzione di nuove e molteplici tipologie di microscopia



BIOCHIMICA – gli sviluppi più importanti si hanno a partire dalla messa a punto di tecniche quali l' ultracentrifugazione, la cromatografia, l' elettroforesi, la spettrometria di massa per la separazione e l' identificazione di componenti cellulari e molecolari



BIOLOGIA MOLECOLARE/BIOINFRMATICA – Comprende lo studio dei genomi e le tecnologie ricombinanti con la produzione di cellule transgeniche e di organismi transgeneci; le tecniche molecolari oggi si accompagnano allo sviluppo della bioinformatica



BIOLOGIA E FISIOLOGIA CELLULARE – Comincia con lo sviluppo delle tecniche di colture cellulari e l' incremento delle linee cellulari a disposizione dei ricercatori. Tecniche ricombinanti e sviluppo di tecniche adatte allo studio di cellule vive sono state fondamentali per indagare funzioni e regolazioni cellulari.





# Tecniche morfologiche

Microscopi

# Obiettivi formativi



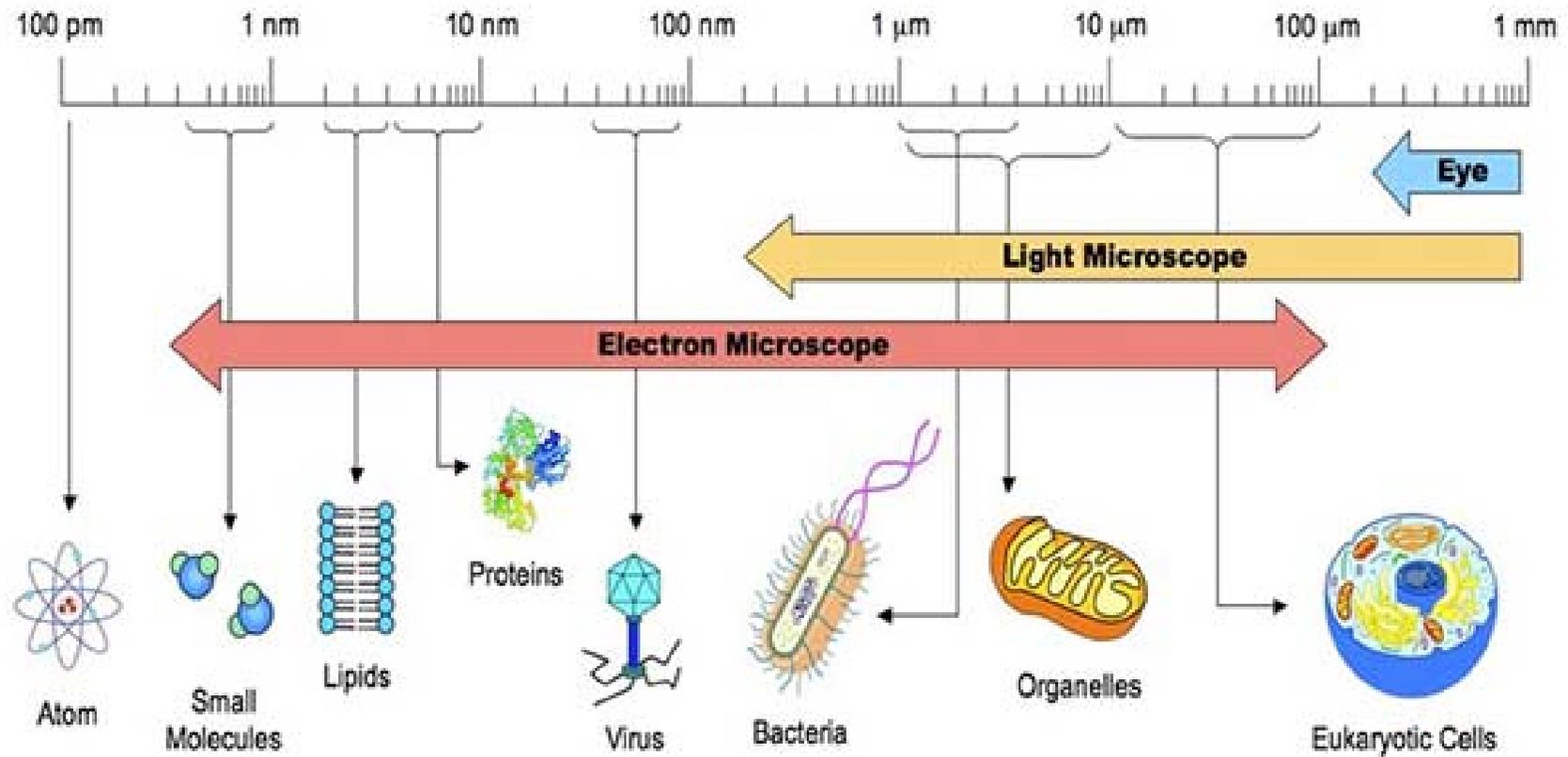
- Conoscere e saper associare le diverse tipologie di tecniche morfologiche e le tipologie microscopi utilizzati
  
- Conoscere I principi fondamentali di
  - Colorazioni istologiche
  - Immunoistochimica
  - Immunogold
  - Ibridazione in situ
  - Colture cellulari
  - FACS
  - Costrutti di fusione fluorescenti: GFP
  - Time-lapse
  - FRET
  - FRAP

# Caratteristiche comune delle tecniche morfologiche



- Conservazione della morfologia.
- Forniscono informazioni sull'organizzazione strutturale dei tessuti e delle cellule
- Possono anche fornire informazioni sulle localizzazioni molecolari
- Richiedono sempre l'utilizzo di un microscopio.
- Si possono applicare a cellule e tessuti morti ma anche vivi

# Microscopia ottica e elettronica



La risoluzione dei microscopi ottico tradizionali era limitata, tra le altre cose, dalla lunghezza d'onda della luce. La microscopia elettronica offre una maggiore risoluzione

# Nobel 2014 per la chimica ai padri della nanoscopia



Microscopia ottica a fuorescenza ad alta risoluzione

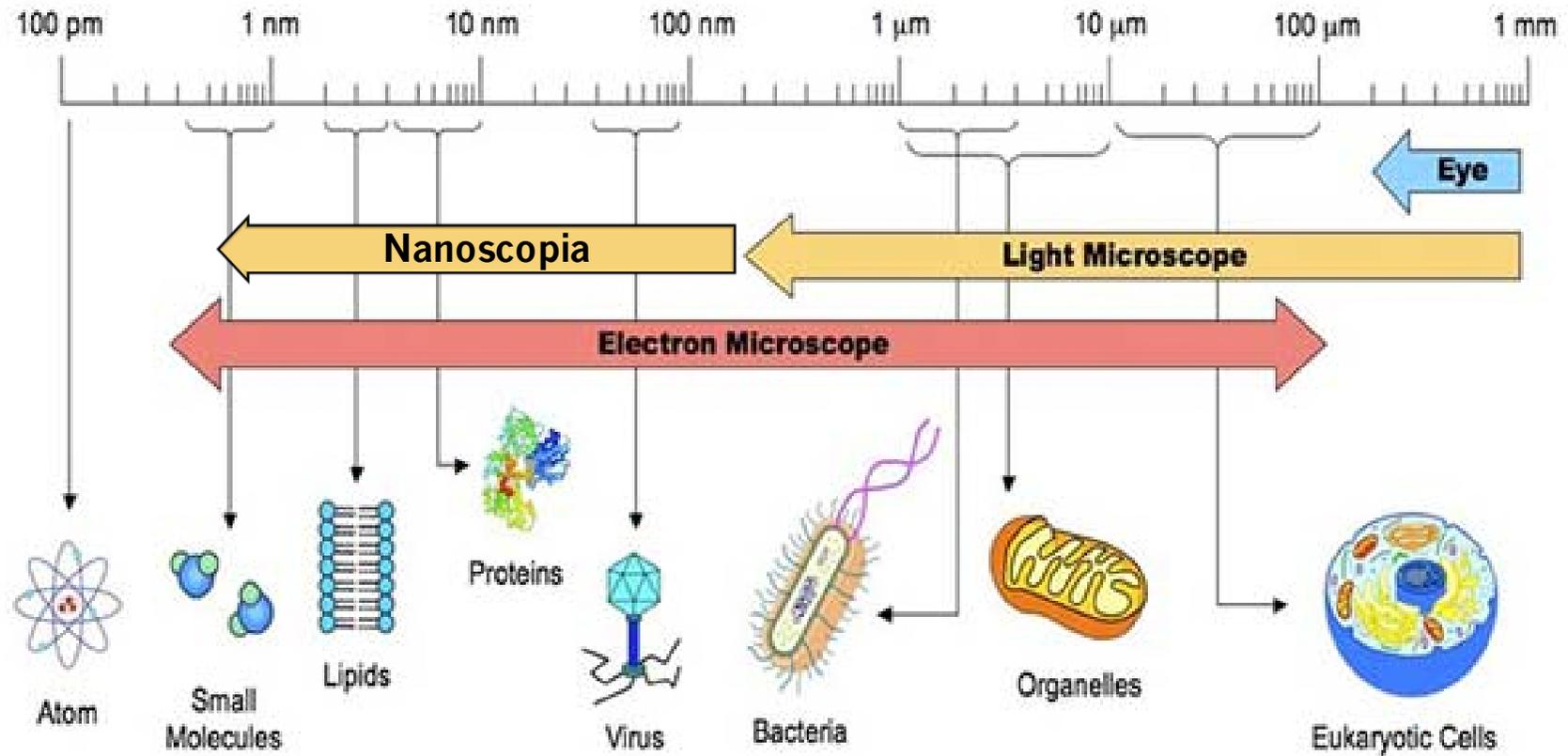


Eric Betzig   Stefan Hell   William Moerner

# La nuova frontiera: nanoscopia

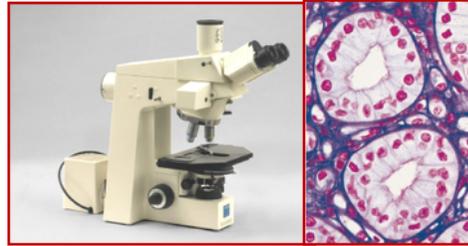


12

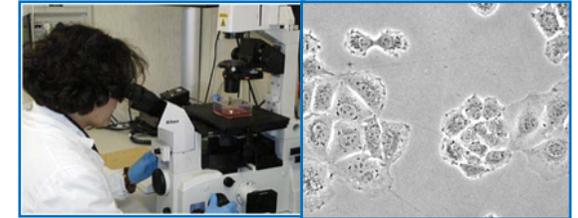


## Microscopio ottico (MO)

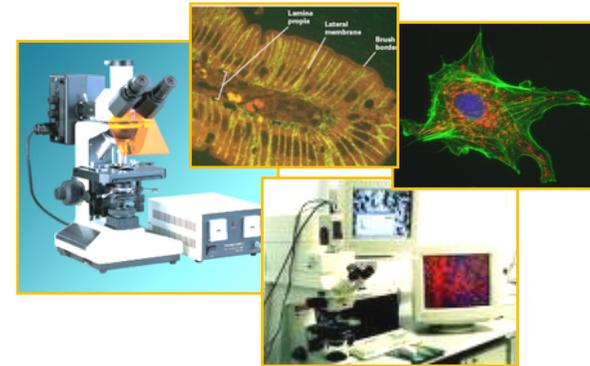
- in campo chiaro



- a contrasto di fase (spesso rovesciato)



- a fluorescenza (classico oppure confocale)

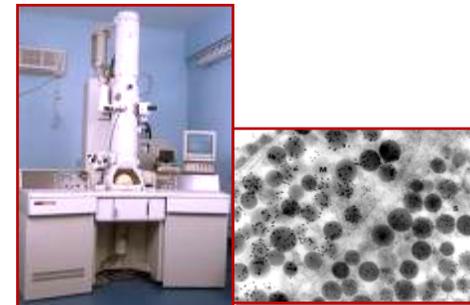


## Microscopio elettronico (ME)

- SEM (a scansione)



- TEM (a trasmissione)

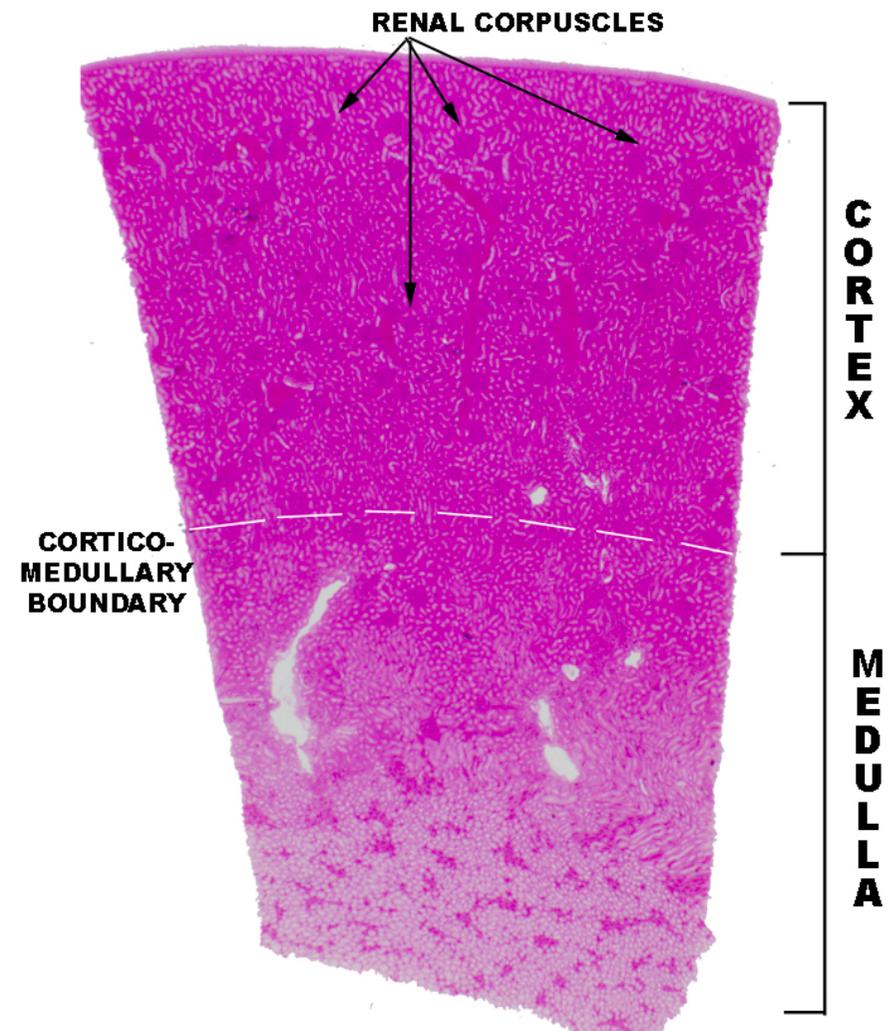


## Colorazioni istologiche

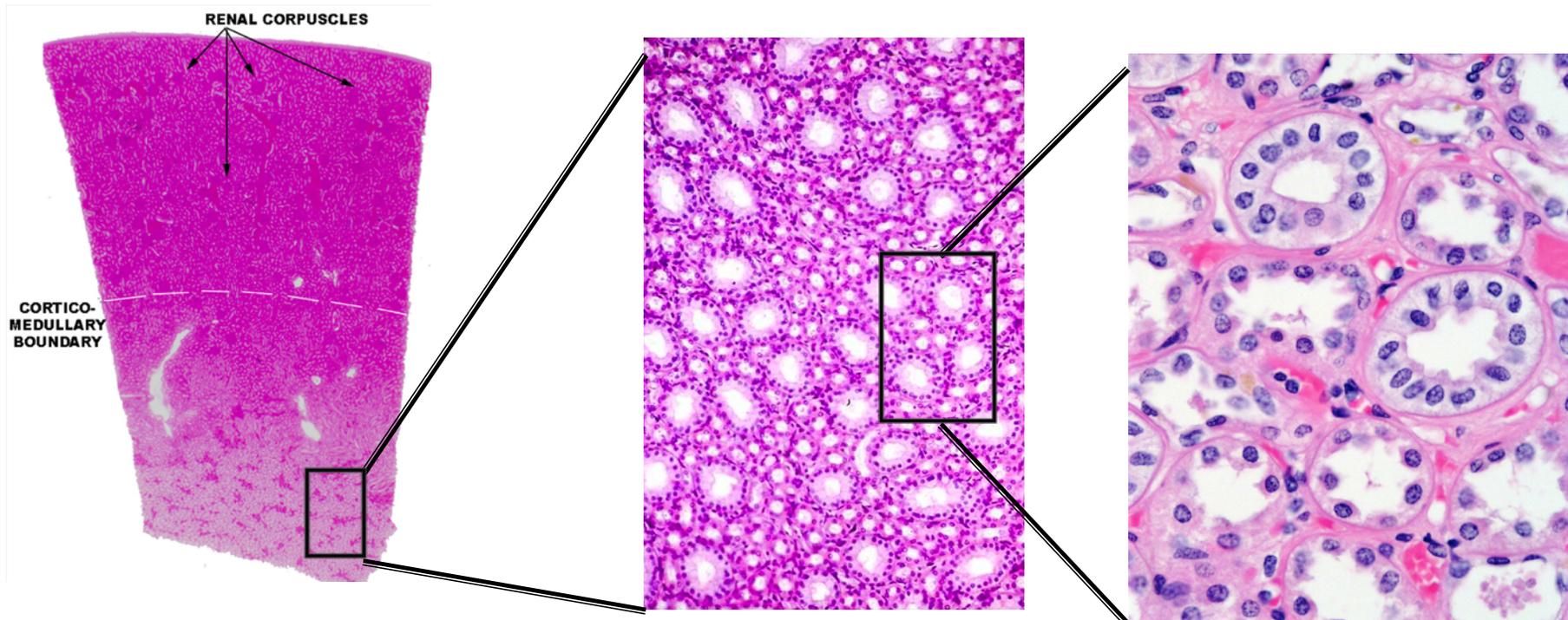
- ❑ Basate su affinità tra molecole del tessuto e coloranti
- ❑ Osservazioni in microscopia ottica a campo chiaro

Questa immagine è stata ottenuta colorando le sezioni di rene con dei coloranti che, legandosi specificamente ad alcune strutture, permettono di evidenziarle

Colorazione istologica emalume-eosina (o ematossilina eosina):



# Microscopia ottica in campo chiaro



Colorazione istologica emalume-eosina

L'emalume colora in blu le molecole caricate negativamente (basofili): acidi nucleici, proteine di membrana

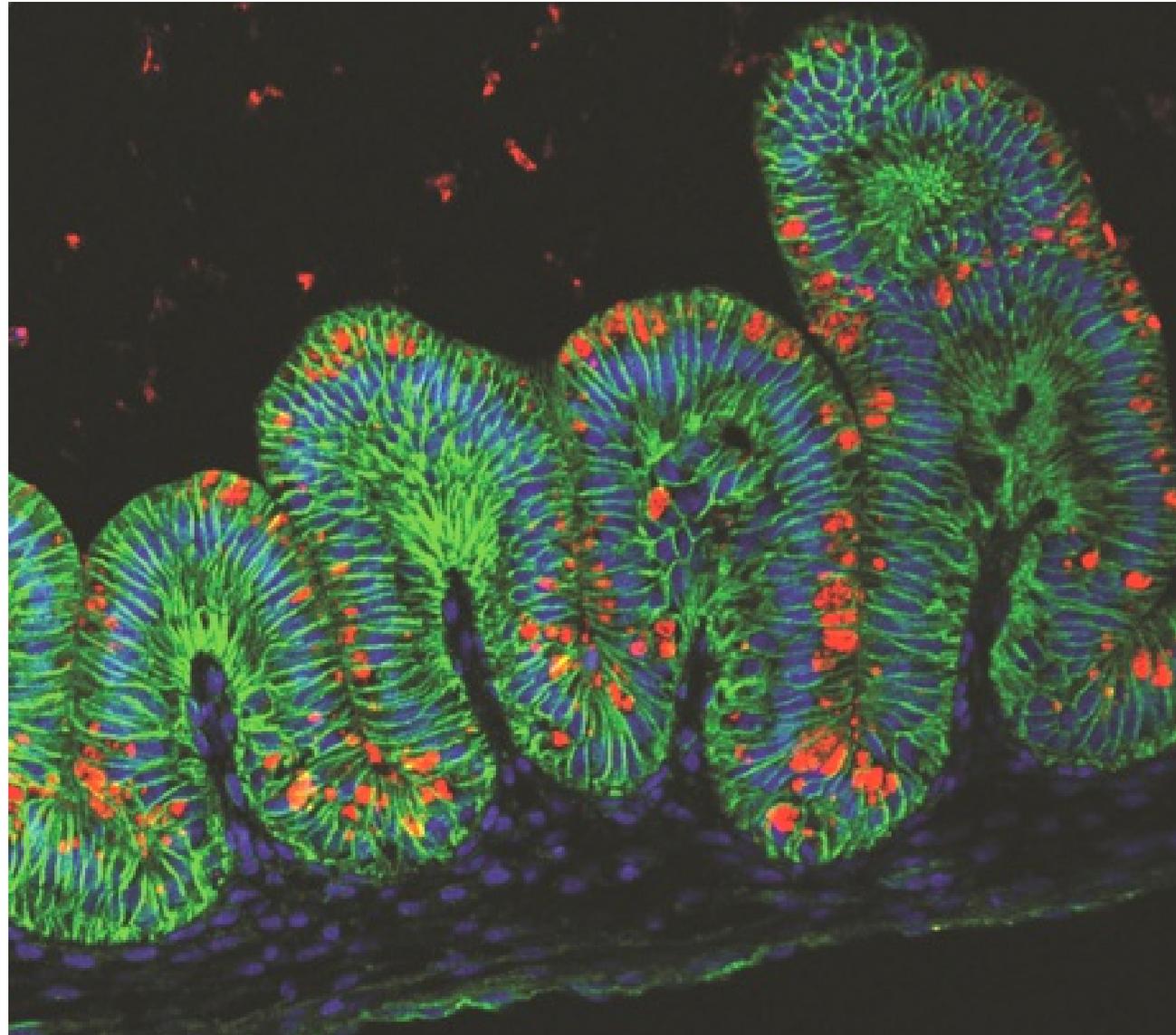
L'eosina colora in rosa le molecole caricate positivamente (acidofili): citoplasma, proteine mitocondriali, collagene della matrice extracellulare

# Microscopia ottica in campo scuro (in fluorescenza)



16

- ❑ Immagini colorate
- ❑ Maggiore specificità rispetto alle colorazioni istologiche
- ❑ Risoluzione superiore rispetto alle colorazioni istologiche
- ❑ Compatibile con marcature multiple



microscopio a fluorescenza



# Microscopia elettronica



18

Il fascio di luce può essere sostituito da un fascio elettronico:

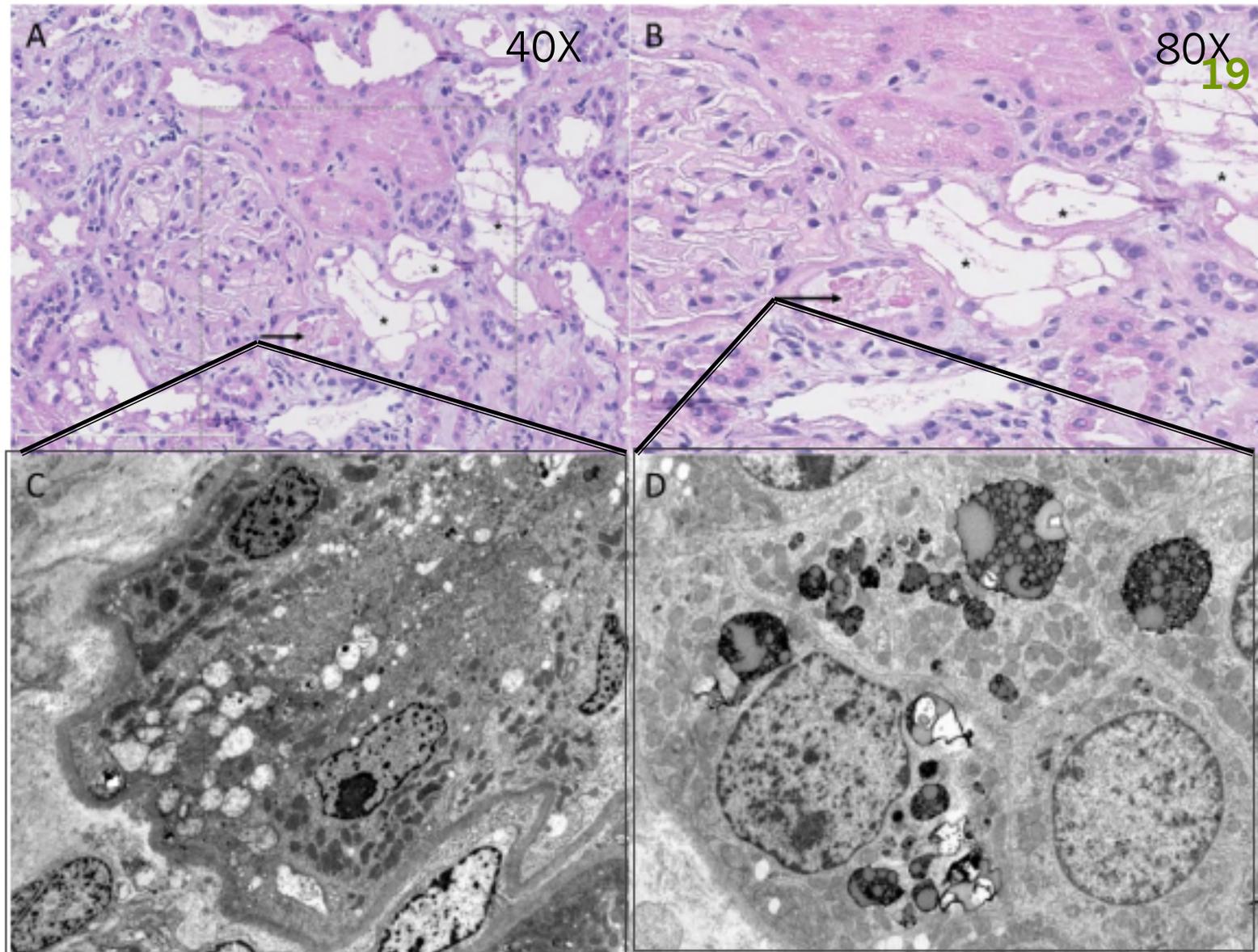
microscopia ottica → microscopia elettronica

*Risoluzione circa 1000 volte superiore*

microscopia  
ottica  
risoluzione  
massima 0.2  
um

microscopia  
elettronica a  
trasmissione  
(TEM)

risoluzione  
massima 0.2  
nm



**Figure 1.** Light micrograph of the renal cortex at original magnification (A)  $\times 40$  and (B)  $\times 80$  and (C, D) electron microscopy detail of proximal tubule cell. (A-B) Approximately 1 cm of kidney cortex with 21 glomeruli was viewed by light microscopy;  $\sim 20\%$  of the tubules showed severe tubular necrosis. (A) One glomerulus in the renal cortex is displayed showing several foci of severe tubular necrosis (\*) with total denudation, vacuolization with loss of cytoplasm, nuclear apoptosis, and eosinophilic epithelial degeneration with shedding into tubular lumina, which contained debris with granular material (arrow). The tubular basal membrane was mostly intact. Glomeruli and vascular architecture showed no abnormalities, and interstitial tissue showed some edema and patchy lymphocytic infiltrates. (B) The tubular necrosis in greater detail. Electron microscopy of tubular cells shows (C) increased endosomes and (D) clear nuclear condensation with increased lysosomes between swollen mitochondria.

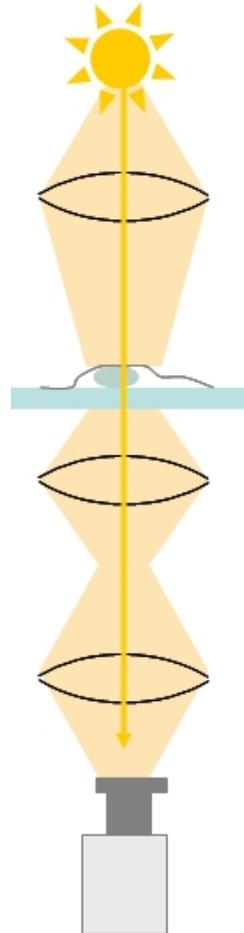
## Microscopia ottica

risoluzione: 0.5 micron



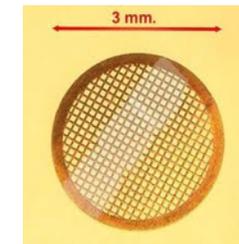
fette di tessuto di 1-10  $\mu\text{m}$   
supporto: vetrino vetro  
colorazione: coloranti organici

Optical



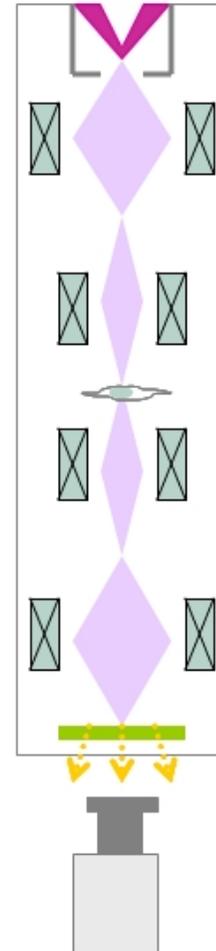
## Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

risoluzione: 0.5 nm

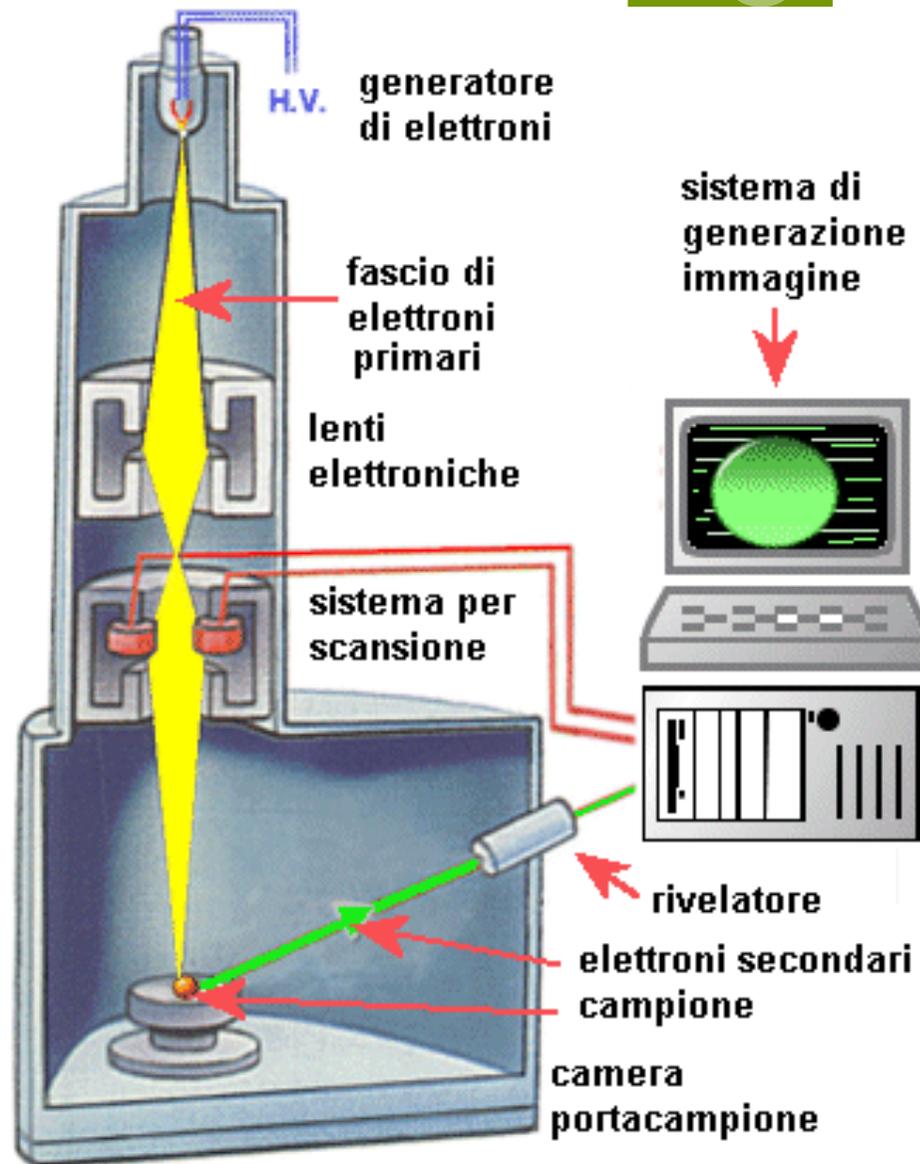
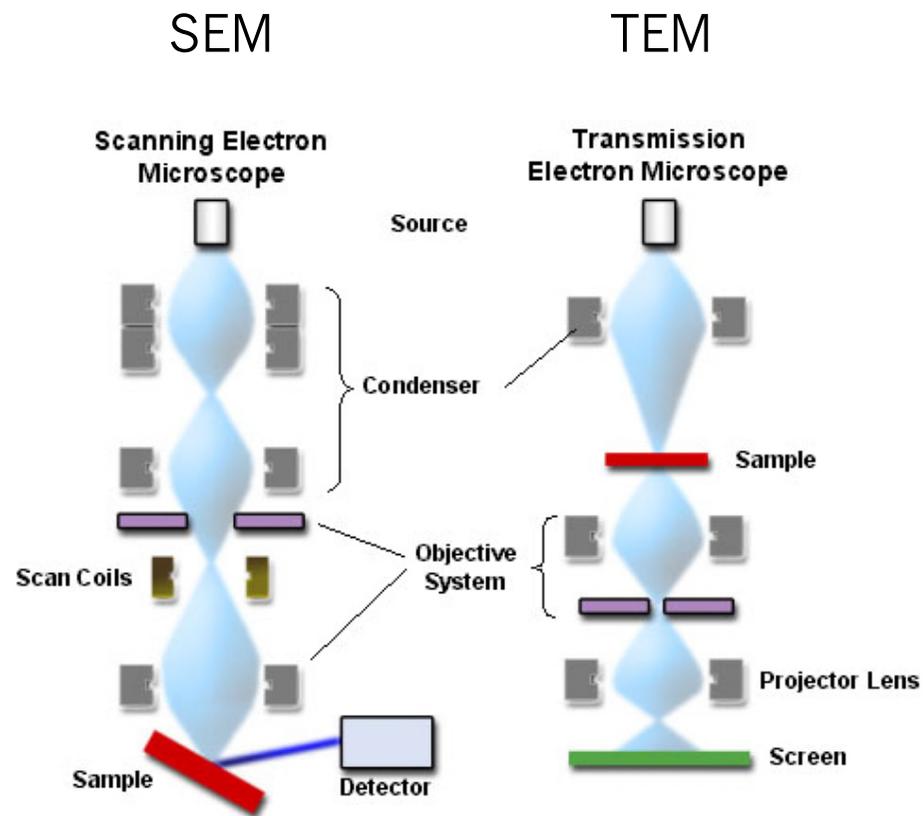


fette di tessuto di 80-100 nm  
supporto: retino di rame  
colorazione: metalli pesanti

TEM



# Microscopia elettronica a scansione (SEM)



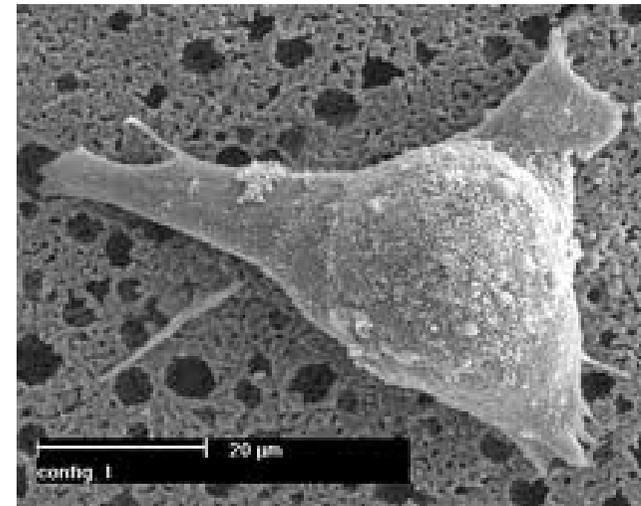
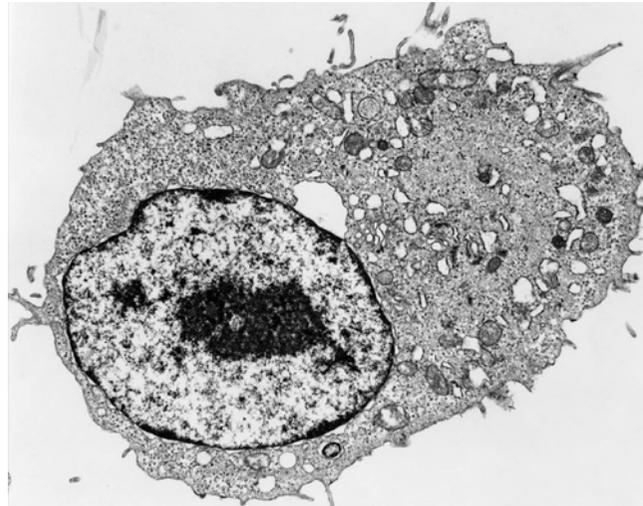
La microscopia a scansione fornisce informazioni morfologiche extracellulari, la microscopia elettronica a trasmissione fornisce informazioni su strutture intracellulari



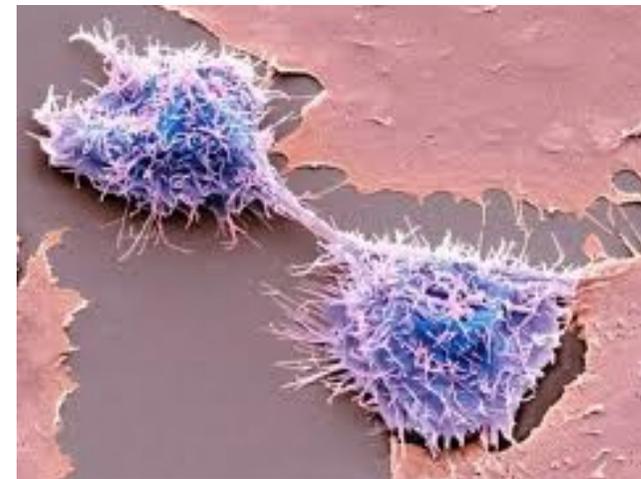
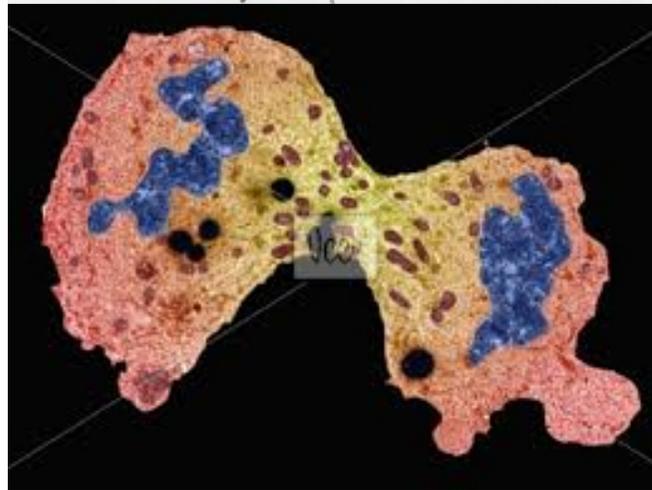
TEM

SEM

Cellula



Cellula in  
divisione

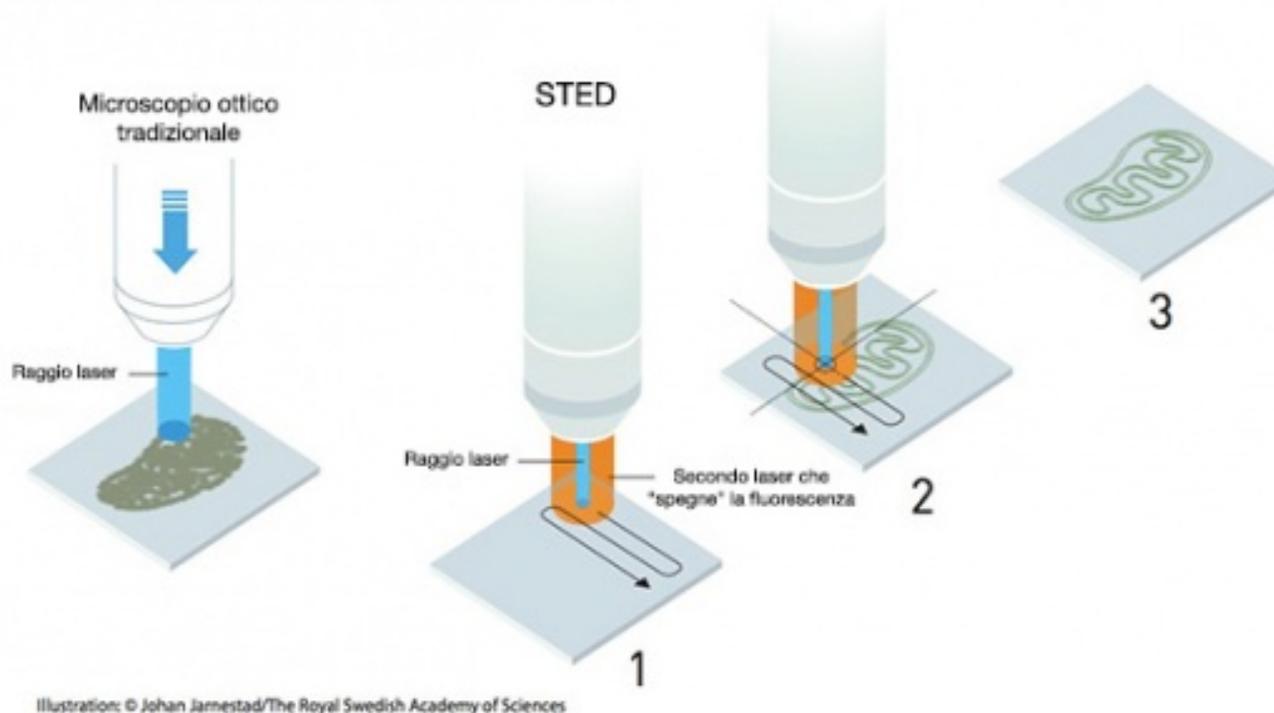


*Nota: le immagini a colori sono ottenute con trattamento dell'immagine in bianco e nero con l'aggiunta di falsi colori*

# Nanoscopia: STED



Come funziona il sistema STED

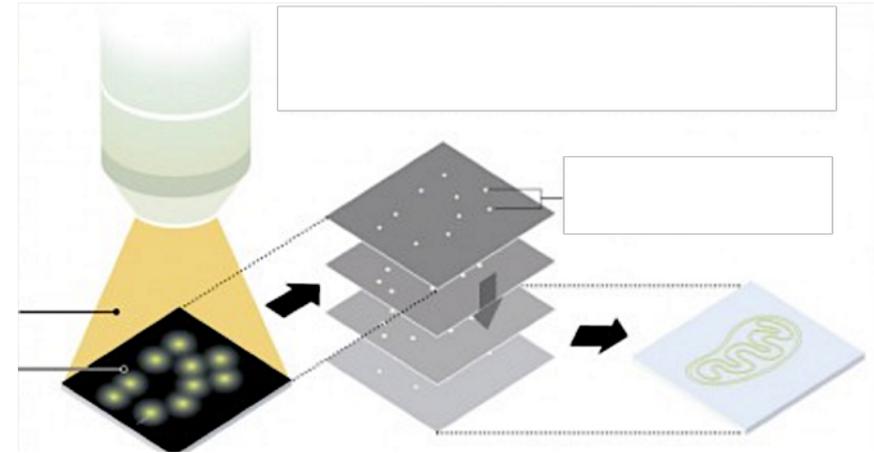


Microscopia STED (stimulated emission depletion), sviluppato da Stefan Hell nel 2000. Questo sistema utilizza due raggi laser: uno per far brillare le molecole fluorescenti disposte sul campione, l'altro per cancellare tutta la fluorescenza emessa in una lunghezza d'onda non compatibile con quella su scala nanometrica.

# Nanoscopia: Microscopia a singola molecola

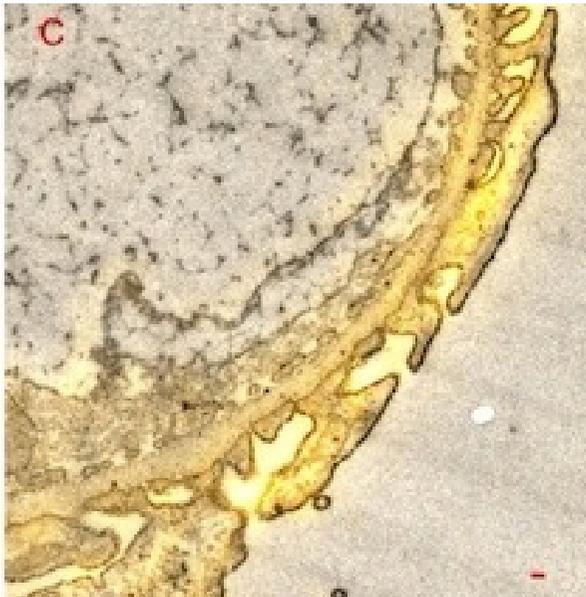


**Microscopia a singola molecola**, ha visto Betzig e Moerner lavorare separatamente per perfezionare lo stesso metodo, che si basa sulla possibilità di attivare e disattivare la fluorescenza delle singole molecole. Visualizzando lo stesso campione più volte viene fatto brillare ogni volta un numero limitato di molecole, e poi le varie immagini vengono sovrapposte in un'unica immagine ad altissima risoluzione su scala nanometrica. Nel 2006 Betzig ha utilizzato questo metodo per la prima volta.

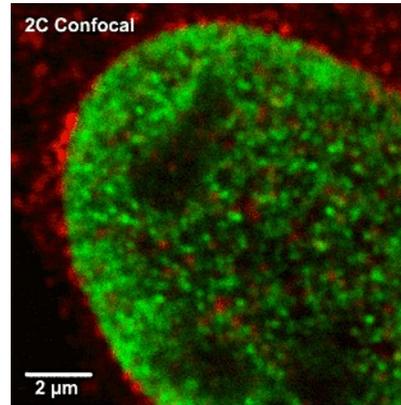


# Nanoscopia

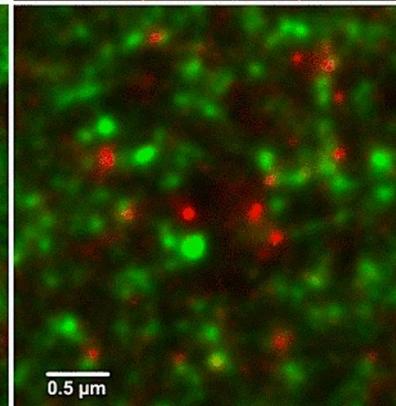
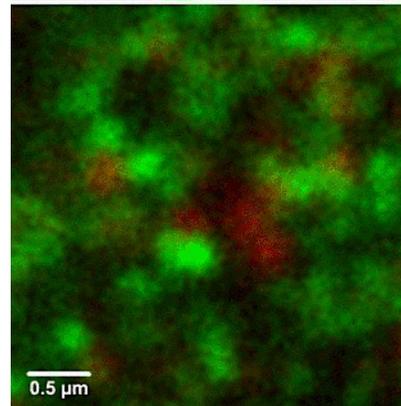
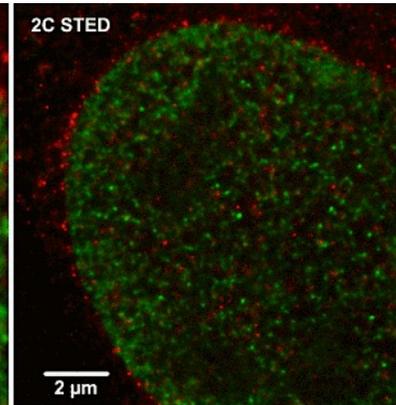
Risoluzione  
equivalente a quella  
della microscopia  
elettronica



microscopia



nanoscopia



25

Risoluzione  
molecolare e  
marcature  
multiple



# Colorazioni istologiche

# Colorazioni istologiche



In queste colorazioni le sezioni devono essere tagliate al microtomo con uno spessore di circa 3-5  $\mu\text{m}$  in modo da poter colorare singoli strati cellulari e non avere piani sovrapposti.

## Colorazione istologica la più utilizzata Ematossilina-Eosina (bicromica)

E' una colorazione bicromica che si basa sul diverso valore di pH dei vari tessuti e dei vari organelli costituenti la cellula. Il **nucleo e i vari componenti acidi del citoplasma** (ribosomi, secreti acidi) vengono colorati in **viola** dall'ematossilina, che è un colorante basico, mentre il **citoplasma e i vari tessuti basici** (muscolare, connettivo, osseo) vengono colorati in **rosa**, più o meno intenso, da una miscela acida di eosina-orange G.

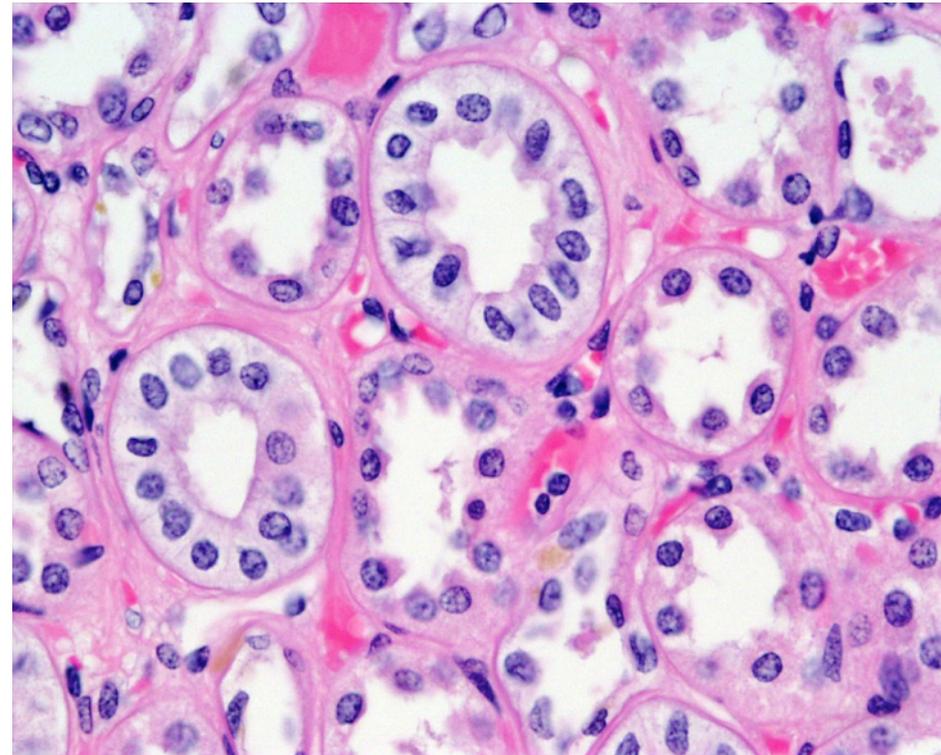
# Colorazione emallume eosina (Em-Eo)



28

Ematossilina (colorante basico)  
→ colora sostanze acide (nucleo,  
ribosomi)

Eosina (colorande acido)  
→ colora sostanze basiche  
(citoplasma)



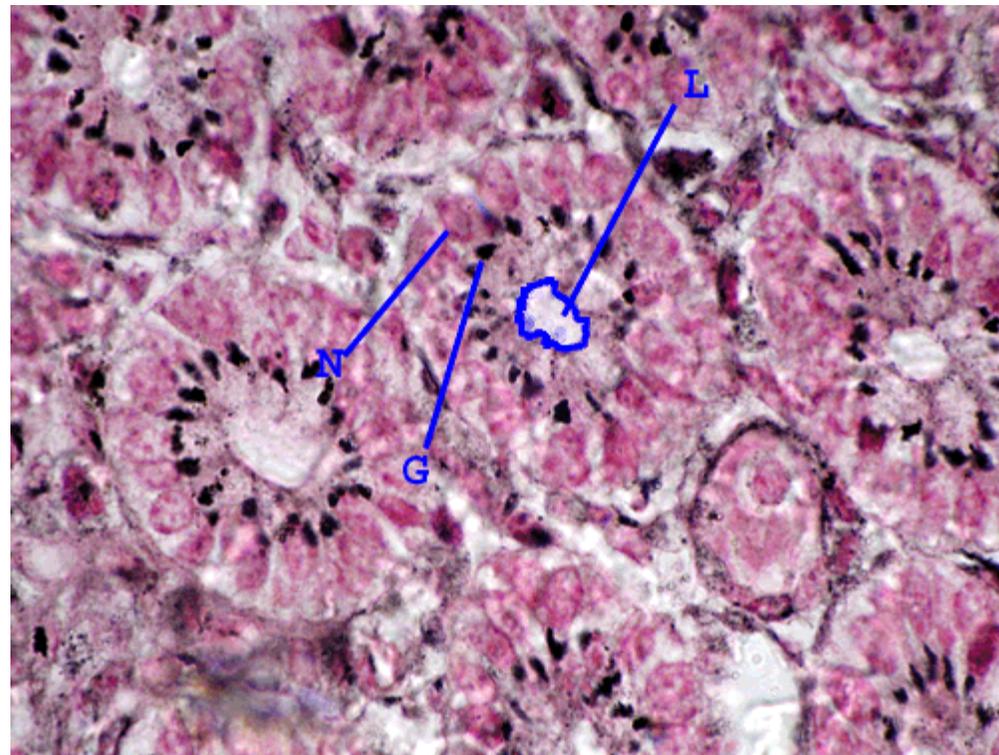
## Colorazioni istologiche elettive



Le colorazioni istologiche elettive sono state sviluppate per identificare specifici tipi cellulari o organelli.

Queste colorazioni hanno il vantaggio di essere molto stabili ma presentano una scarsa risoluzione.

Oggi sono superate dall'immunoistochimica



Si osservi gli enterociti disposti a circondare il lume intestinale (L), i nuclei (N) degli enterociti, l'apparato di Golgi G) in posizione sopranucleare. Colorazione: Da Fano - Corti (nitrato di cobalto e nitrato d'argento).



# Immuno istochimica

Messa in evidenza di specifiche  
proteine

# Immunistochimica (IIC)



31

È una variante dell'istochimica che permette la localizzazione istologica di molecole sfruttando le loro caratteristiche antigeniche. È quindi una reazione tra un antigene e il suo relativo anticorpo.

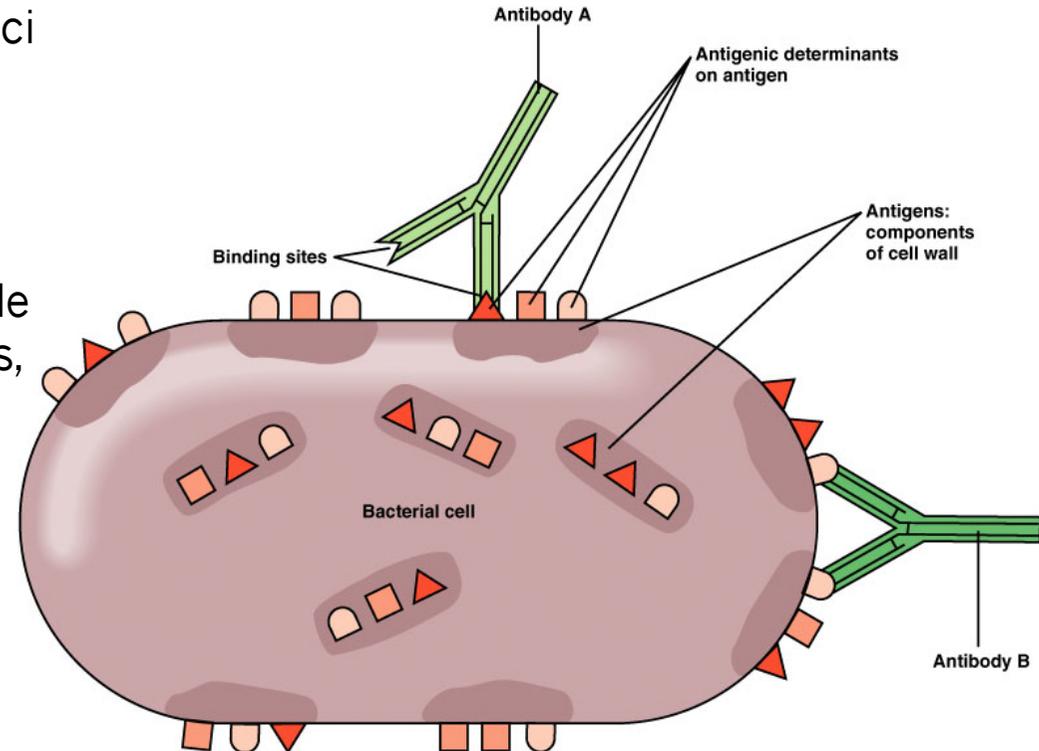
Gli anticorpi sono proteine prodotte dal sistema immunitario come difesa contro sostanze estranee. Sono sostanze del gruppo delle globuline (immunoglobuline).

Sono moltissimi tipi diversi ognuno con un sito di legame diverso che riconosce una specifica molecola bersaglio o antigene

# Le immunoglobuline

Perché il sistema immunitario ci protegge da infezioni? perché produce molecole chiamate “anticorpi” o immunoglobuline, che riconoscono specificatamente le proteine del batterio o del virus, che sono chiamate “antigene”.

Questo fornisce quindi al ricercatore uno strumento per riconoscere specificatamente delle proteine esogene



# IIC, immunofluorescenza, immunogold



33

Per identificare l'interazione "anticorpo-antigene" si possono utilizzare diverse tecniche di rivelazione:

1) Anticorpo coniugato ad un'attività enzimatica:

----> Immunoistochimica in campo chiaro ----> microscopio tradizionale

2) Anticorpo coniugato ad un fluorocroma:

---> Immunofluorescenza (campo scuro) ---> microscopio a fluorescenza tradizionale o confocale

3) Anticorpo coniugato a particelle d'oro:

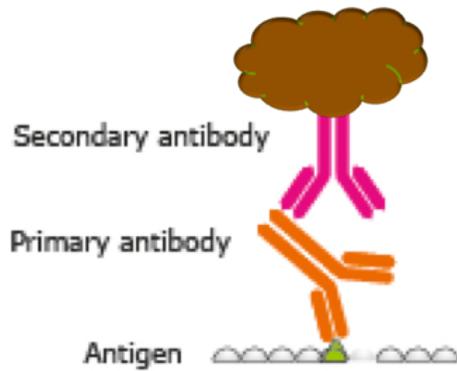
---> Immunogold ---> microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

# IIC, immunofluorescenza, immunogold

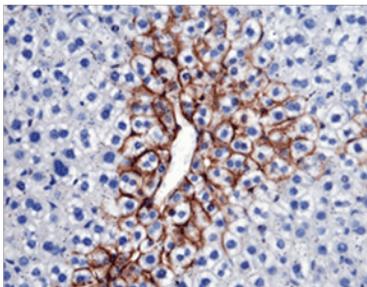


34

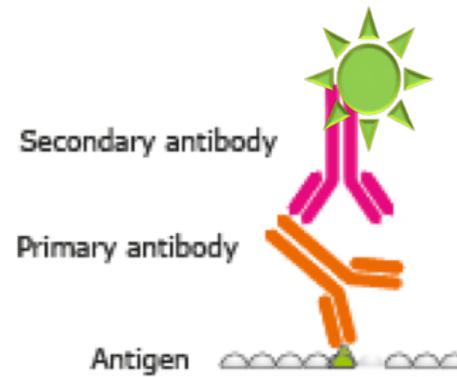
IIC



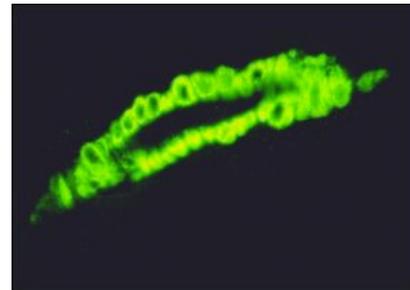
Microscopio ottico  
campo chiaro



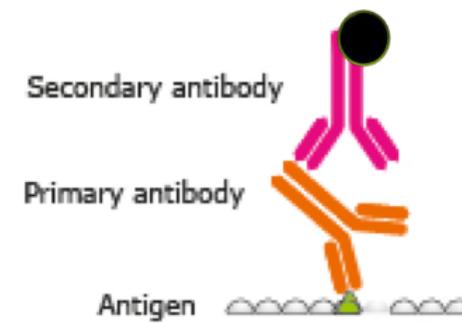
Immunofluorescenza



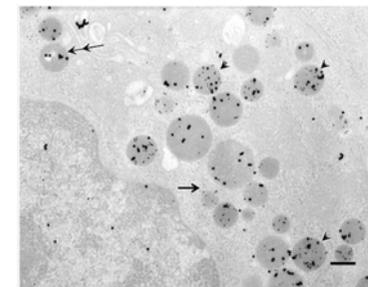
Microscopio ottico campo  
scuro (fluorescenza)



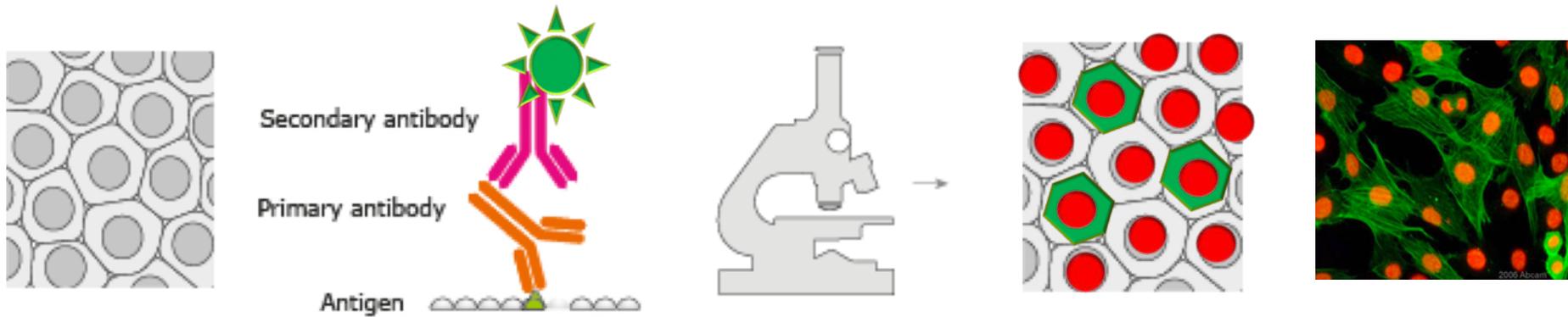
Immunogold



Microscopio elettronico  
trasmissione (TEM)



# Nozione di specificità



- + Anticorpo anti-A
- + anticorpo anti-anticorpo  
fluorescente (verde)
- + marcatore del DNA (rosso)

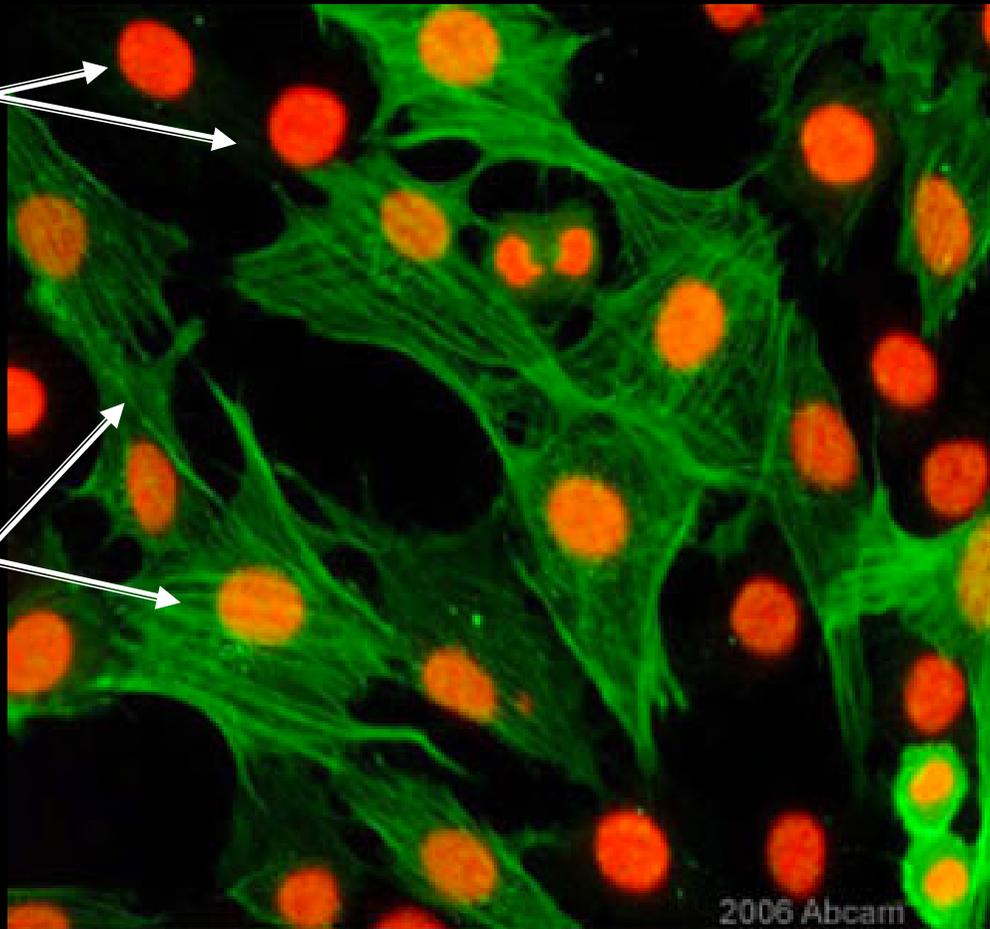
Osservare l'eterogeneità di espressione dell'antigene in una popolazione di cellule per altri aspetti simili



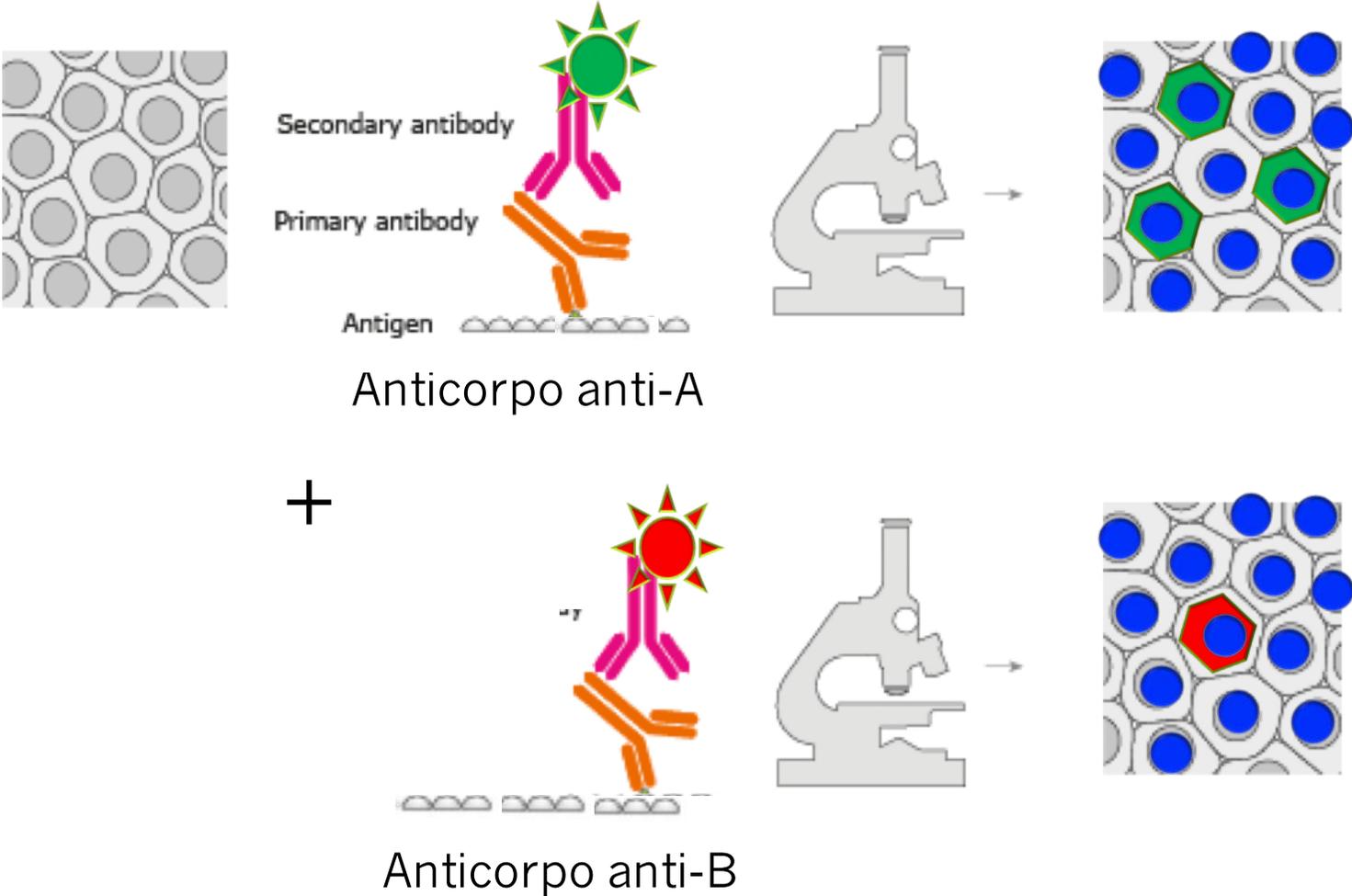
36

Nuclei di cellule che NON contengono l'antigene A

Cellula che contiene l'antigene A, al quale si è legato l'anticorpo anti-A rivelato a sua volta dall'anticorpo secondario fluorescente

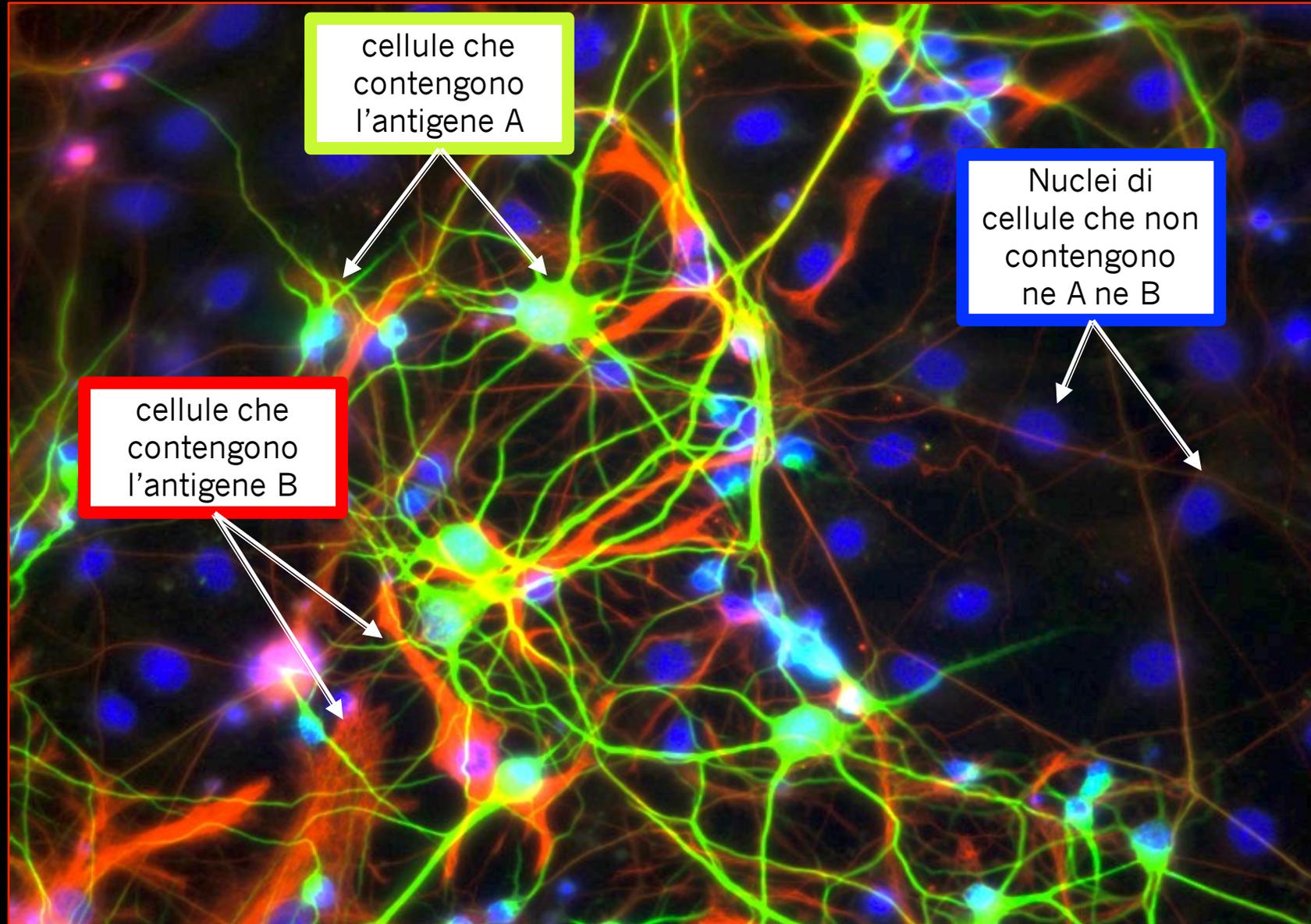


# Immunofluorescenza doppia





# Doppia IF di cellule in coltura



cellule che contengono l'antigene A

cellule che contengono l'antigene B

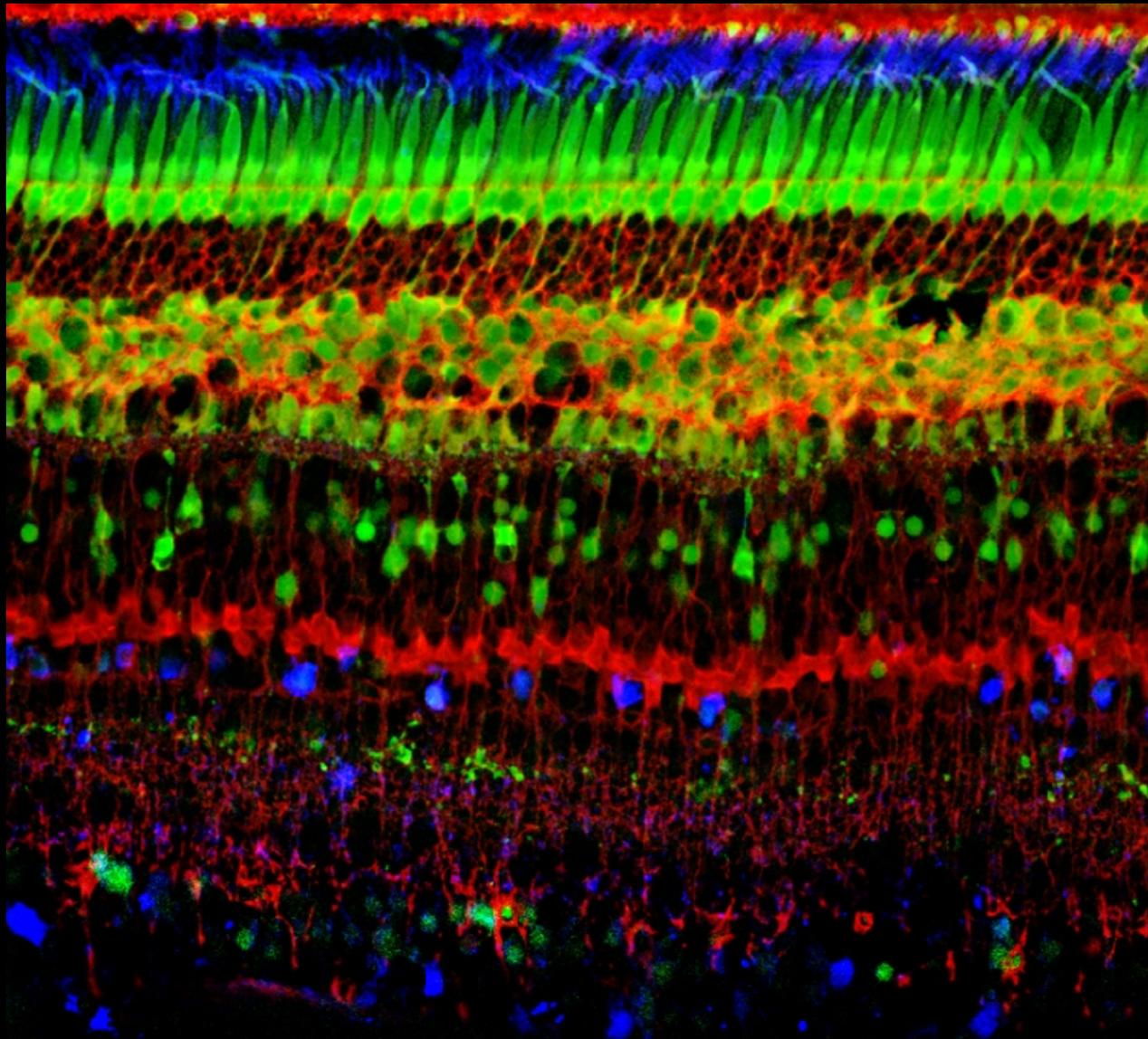
Nuclei di cellule che non contengono ne A ne B

# Doppia IF di tessuti



39

Sezione  
trasversale  
della retina.

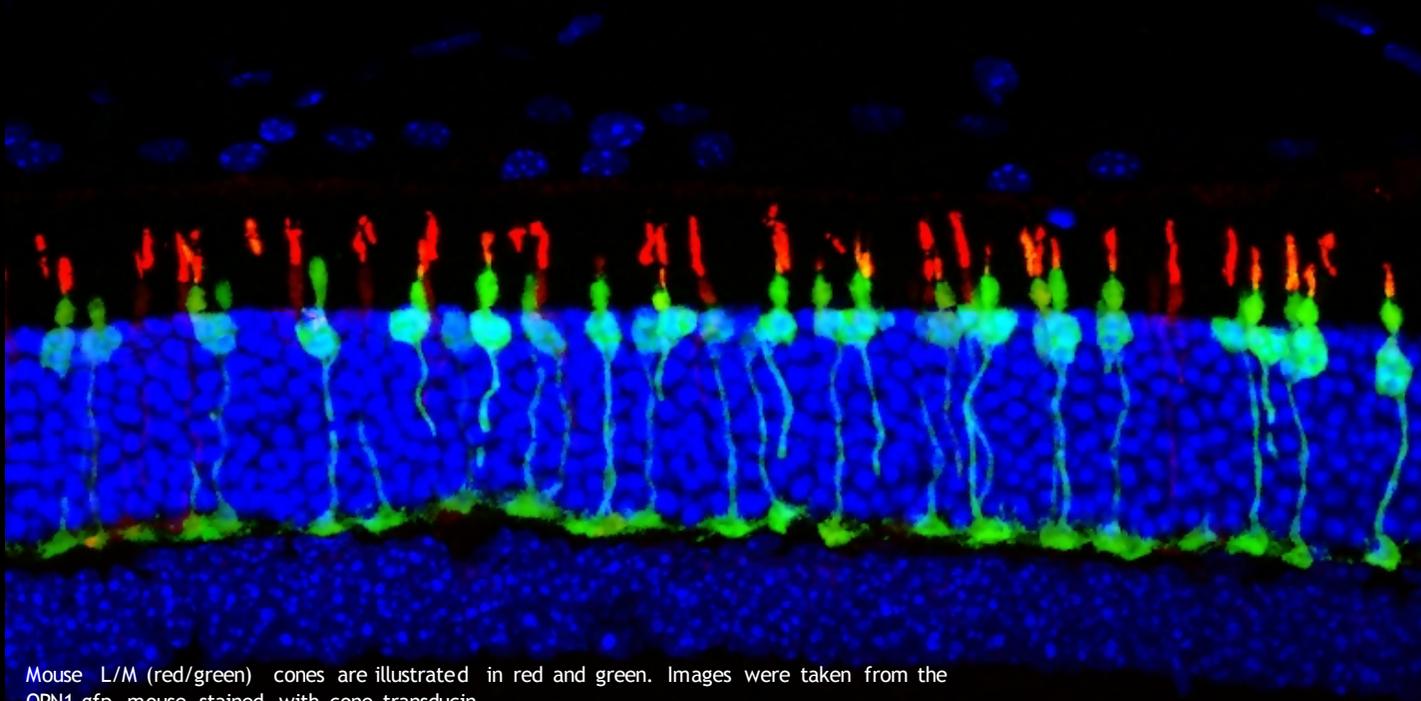


Calcium binding proteins (Calbindin and Calretinin) and CRALBP  
(cellular retinaldehyde binding protein)

# Doppia IF: alta risoluzione



40

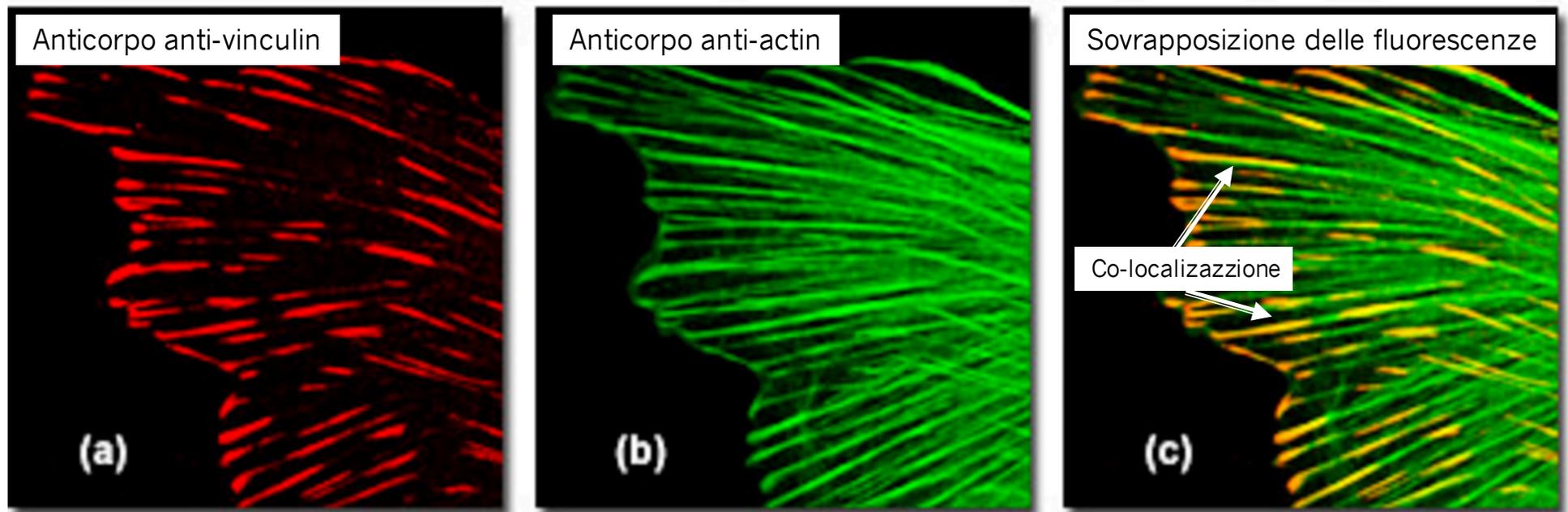


Mouse L/M (red/green) cones are illustrated in red and green. Images were taken from the OPN1.gfp mouse stained with cone transducin.

# Doppia IF: co-localizzazione

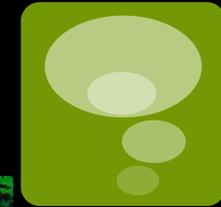


## Colocalization of Actin and Vinculin in Normal Tahr Ovary Cells

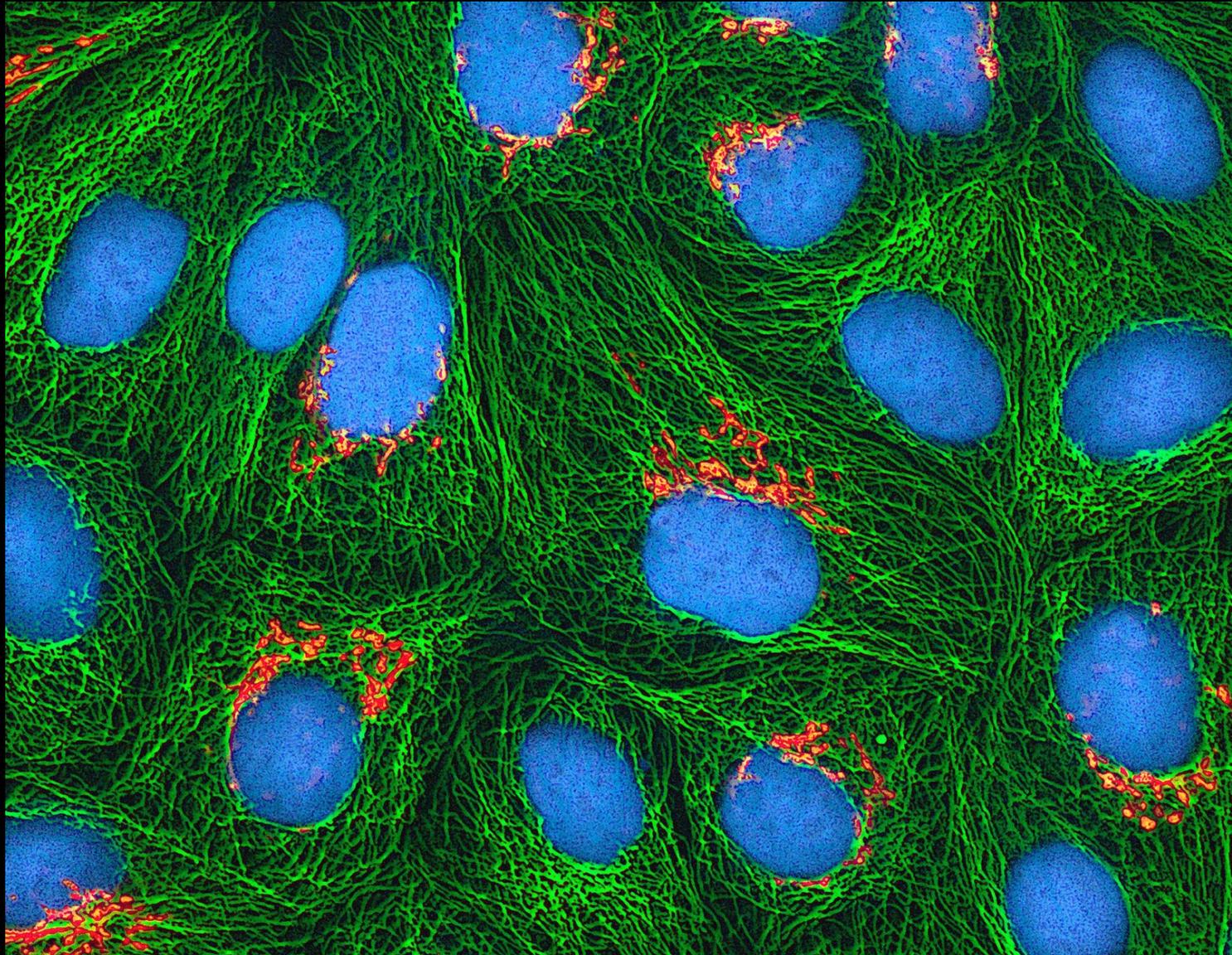


Rosso + verde = giallo

# Doppia IF alta risoluzione



42

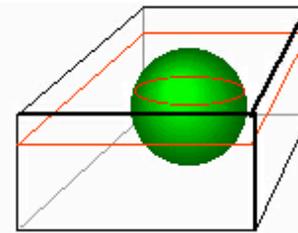


Multiphoton fluorescence image of cultured HeLa cells with a fluorescent protein targeted to the Golgi apparatus (orange), microtubules (green) and counterstained for DNA (cyan).

# Microscopia confocale



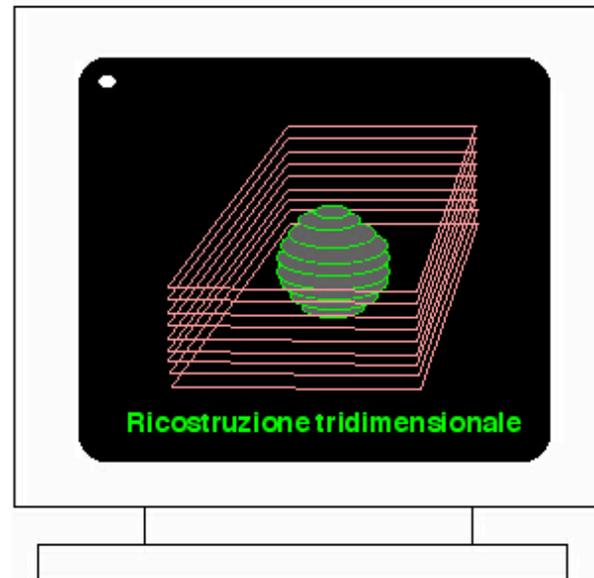
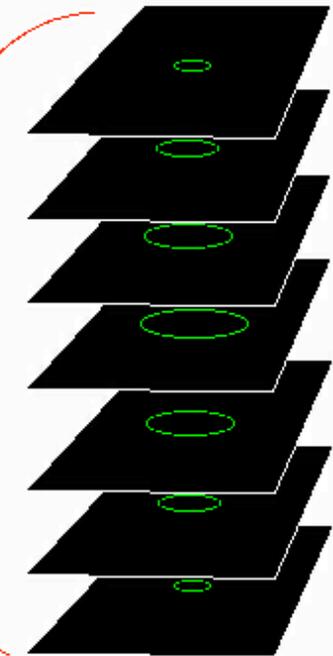
43



Campione

Sezione ottica

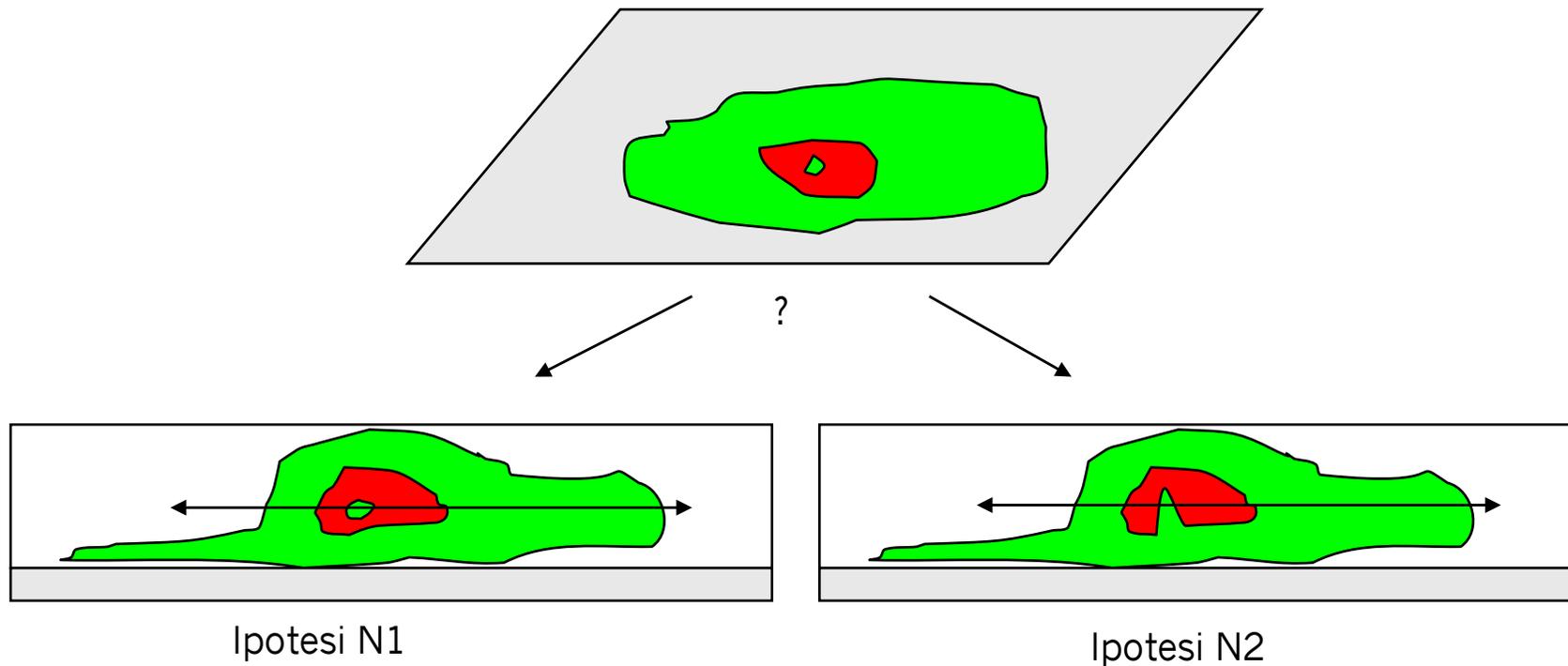
Singole sezioni ottiche



Ricostruzione tridimensionale

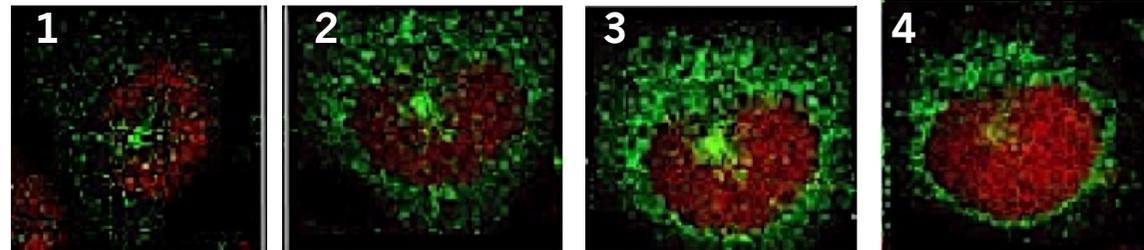
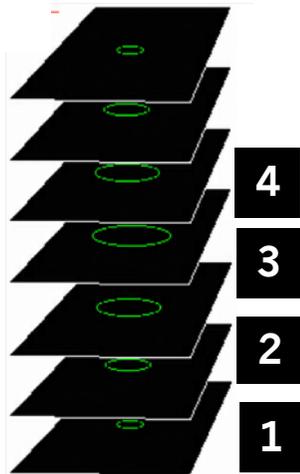
# Deconvoluzione: dal 2D al 3D

La stessa immagine vista da “sopra” può essere il risultato di due situazioni diversi: Una localizzazione nucleare “vera” (ipotesi N.1) oppure una localizzazione nucleare “artefattuale” (ipotesi N.2)

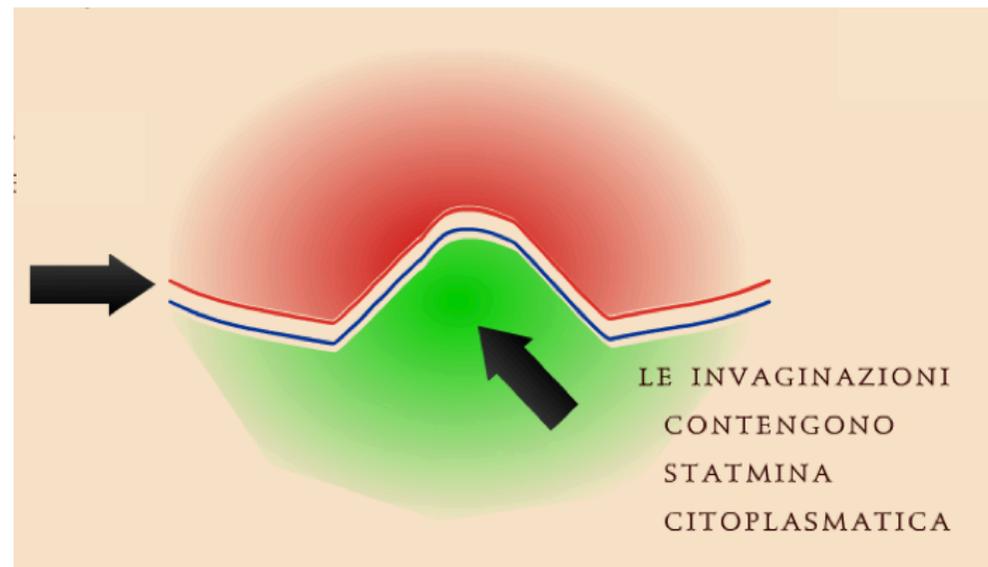


Escludere una delle due ipotesi si deve stata fatta una ricostruzione tridimensionale della morfologia del nucleo basata sull' analisi d' immagine della marcatura rossa per la cromatina.

# Acquisizione d'immagine nell'asse "Z"



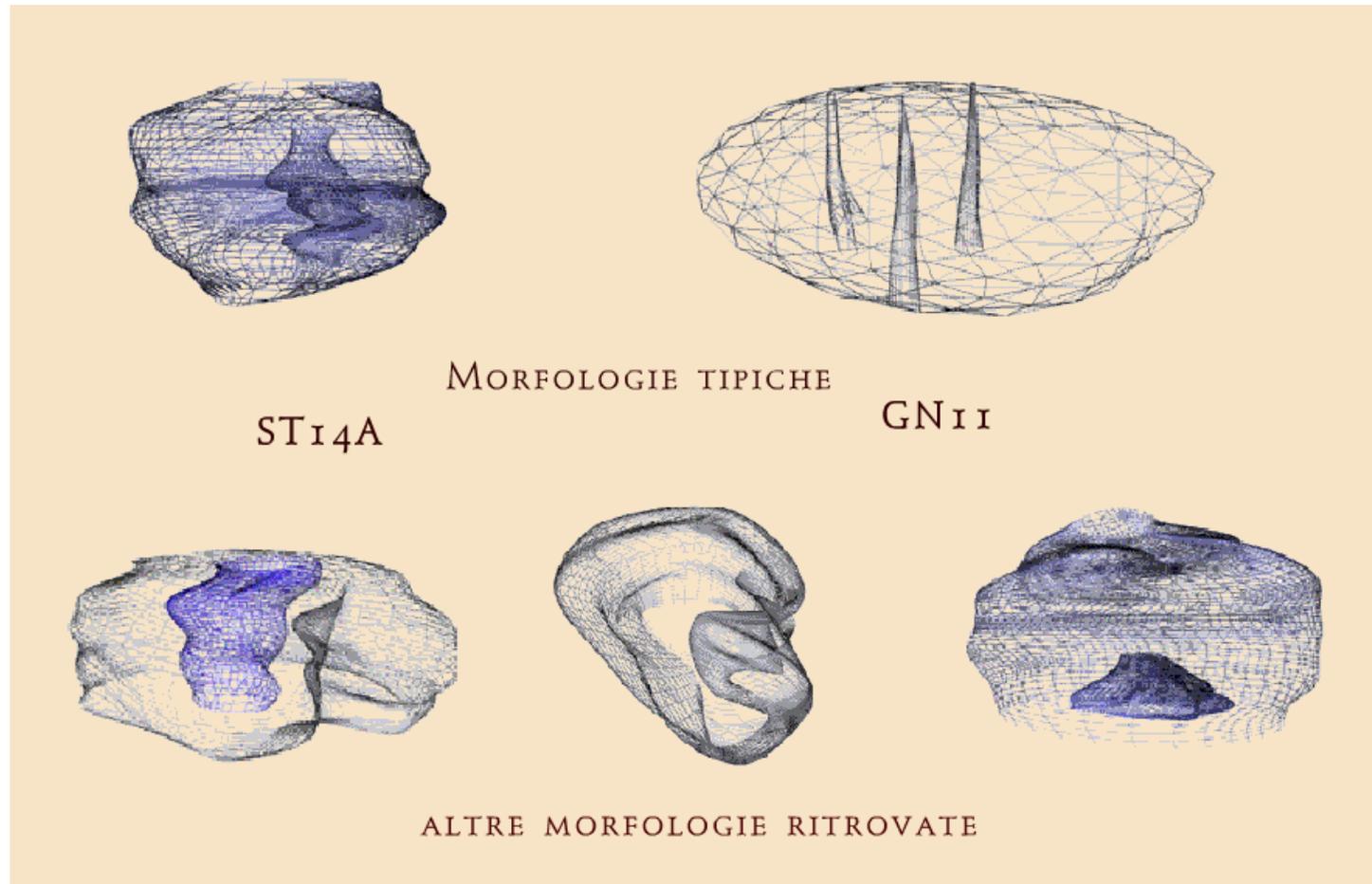
Risposta alla domanda: la marcatura verde non corrisponde ad una vera localizzazione intracellulare della proteina riconosciuta ma ad un artefatto dovuto alla morfologia del nucleo che comprende delle invaginazione dell'involucro nucleare.



# Analisi d'immagine e modellizzazione tridimensionale



Esempio:  
Ricostruzione tridimensionale di nuclei di diverse linee cellulari. Notare le diverse morfologie del nucleo e la presenza di invaginazioni dell'involucro nucleare



# TEM: Immunogold



Osservazione al  
microscopio elettronico a  
trasmissione (TEM) di  
tessuti trattati con  
anticorpi marcati con  
particole d'oro (l'oro è  
opaco agli elettroni)

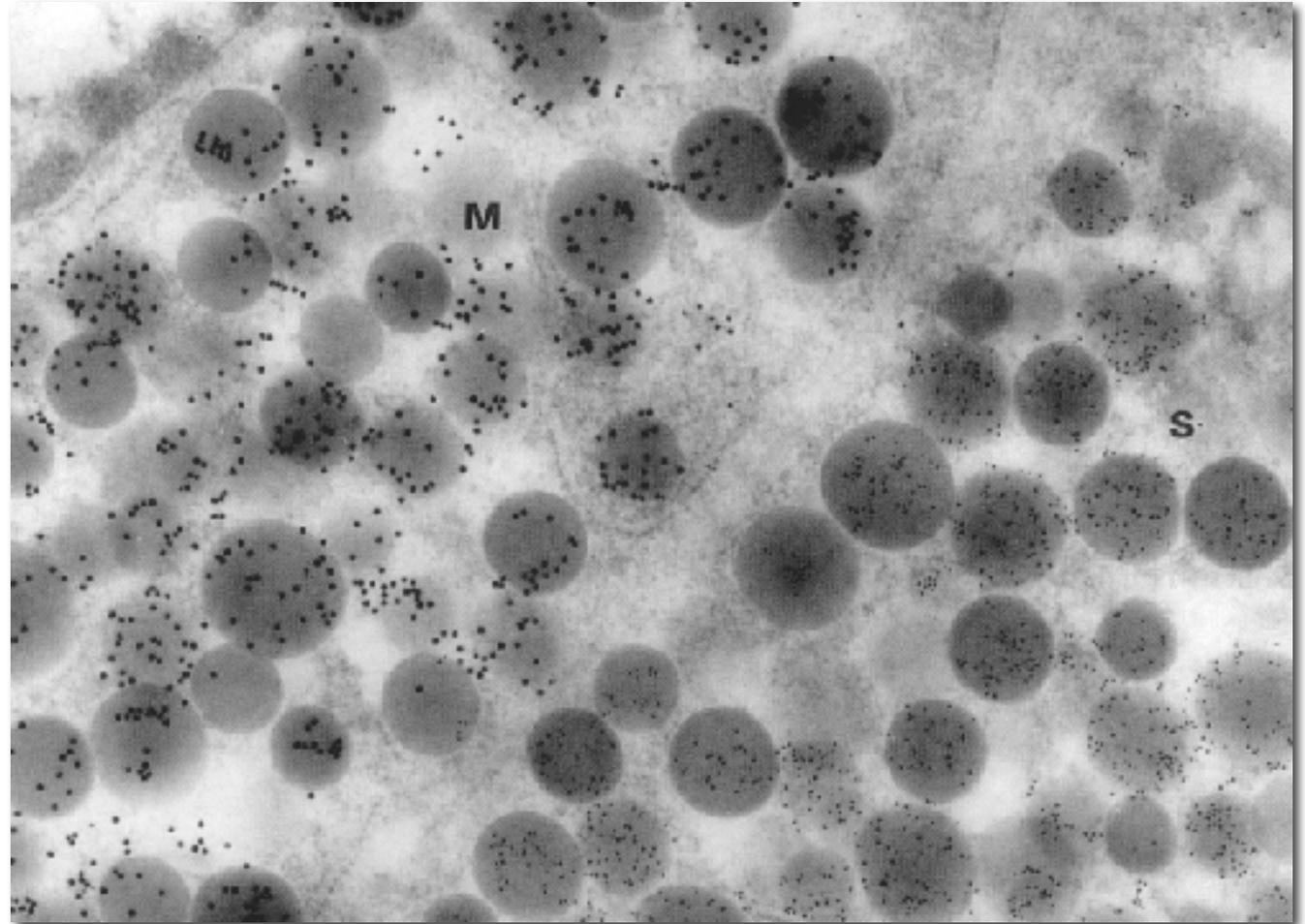


# Esempio di marcatura doppia immunogold esaminata al TEM



48

Sezione di ipofisi analizzata con un anticorpo primario anti-prolattina rivelato con un anticorpo secondario coniugato a particelle d'oro di 20 nm di diametro e con un anticorpo primario anti-ormone di crescita rivelato con un anticorpo secondario coniugato a particelle d'oro di 10 nm di diametro.



A sinistra cellula le cui vescicole di secrezione sono marcate con particelle d'oro di 20 nm di diametro maggiore: questa cellula contiene prolattina: si tratta di una cellula "mammotrofa" (M).  
A sinistra le vescicole sono marcate con particelle d'oro di diametro inferiore (10 nm): si tratta di una cellula "somatotrofa" (S) le cui vescicole di secrezione contengono l'ormone di crescita.



# Ibridazione in situ

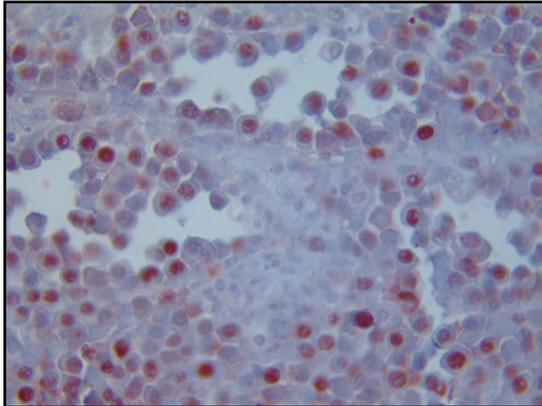
Messa in evidenza di specifiche sequenze di acidi nucleici

# Ibridazione in situ: identificazione di specifiche sequenze di acidi nucleici



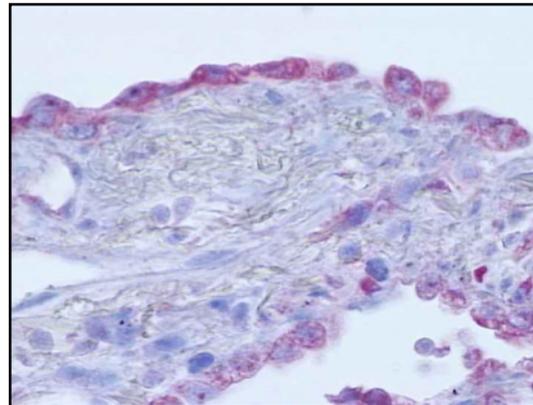
50

Ibridazione in situ (RNA)



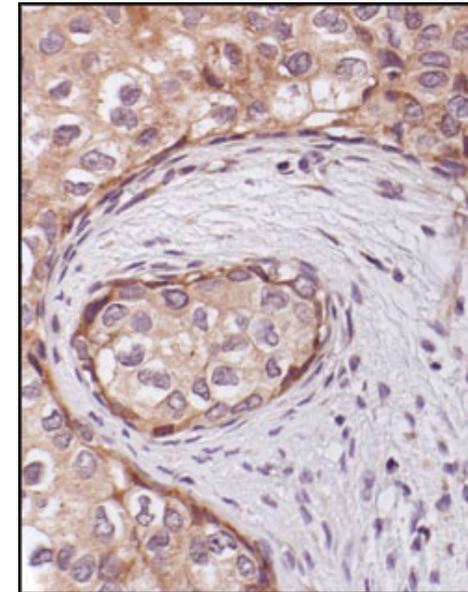
linfoma plasmablastic marcato con sonda che ibridizza con mRNA di un paziente infetto da virus Epstein-Barr. Marcatura marrone dei nuclei delle cellule infette EBER.

Ibridazione in situ (RNA)



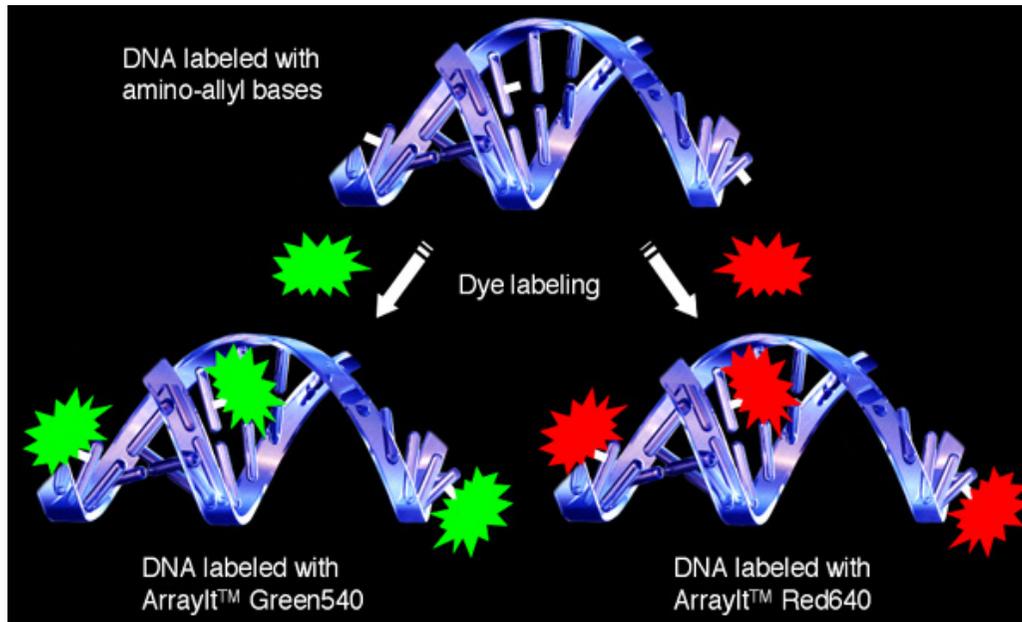
Sezione di adenoma polmonare marcata con sonda che ibridizza con mRNA che codifica per una proteina tumorale (marcatore tumorale)

Immunohistochimica



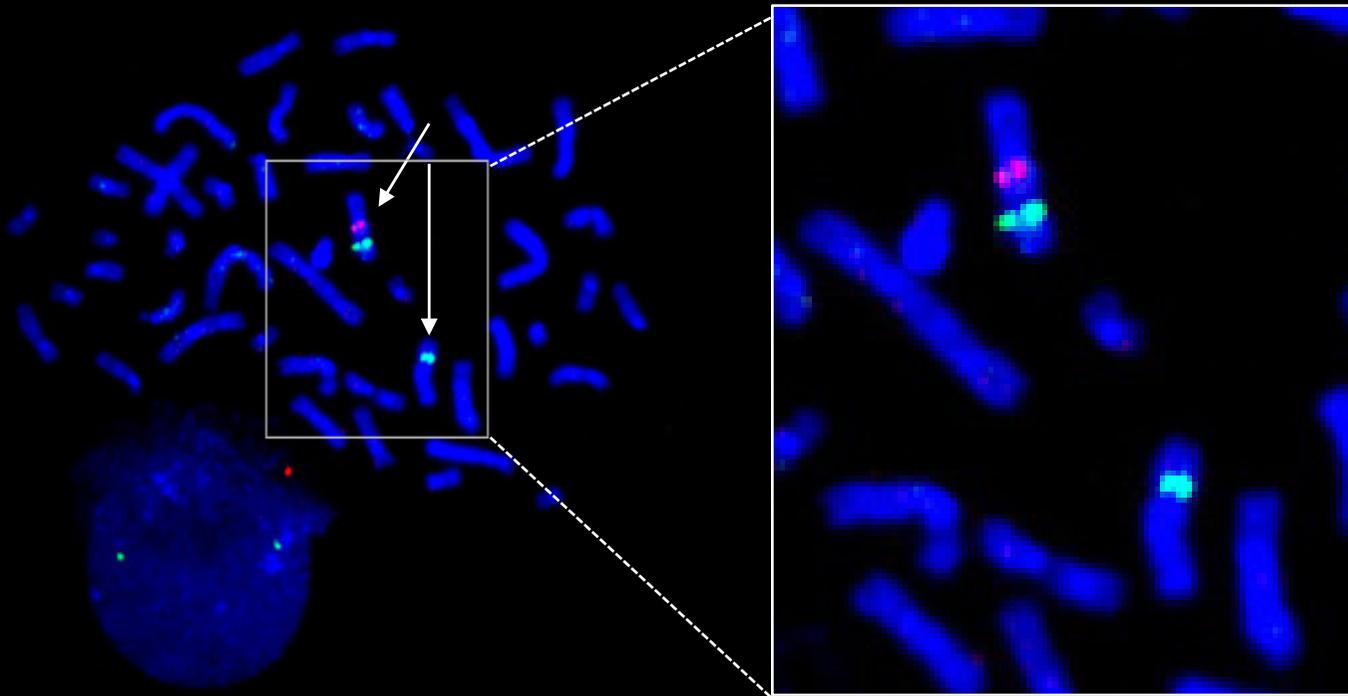
Sezioni di carcinoma mammario marcate con anticorpo che riconosce una proteina tumorale (marcatore tumorale)

# Ibridazione in situ fluorescente



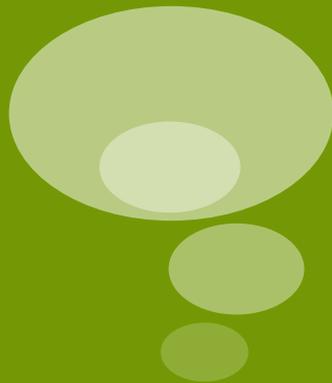
Detezione di acidi nucleici (DNA o RNA) per ibridazione di una sequenza complementare marcata con un fluorocromo.

# Ibridazione in situ fluorescente



Ibridazione della sonda su 2 cromosomi metafasici omologhi.  
Identificazione di sequenze specifiche di DNA

Questa tecnica si chiama FISH (fluorescence in situ hybridization)  
ed è utilizzata per studi di citogenetica



# Tecniche morfologiche con cellule vive

Colture cellulari

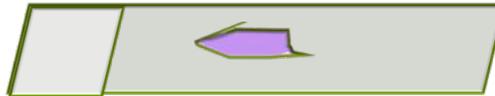
# Microscopio rovesciato



microscopio diritto

microscopio rovesciato

Revolver Obiettivi



Tessuto o cellule fissati (morti)  
Colorati (colorazione istologica  
o immunofluorescenza)

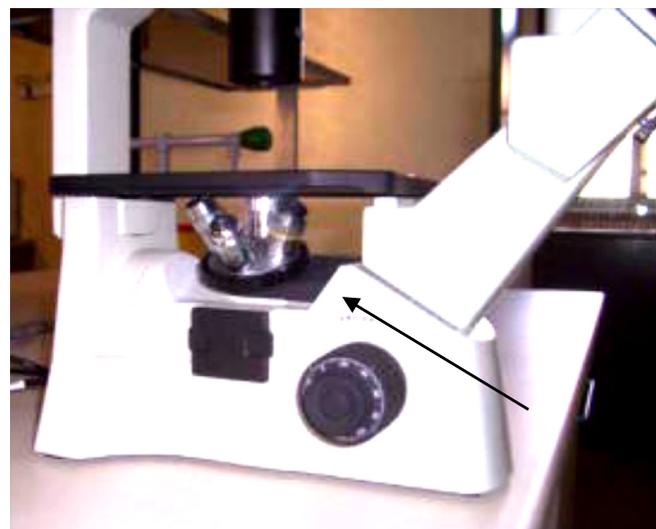
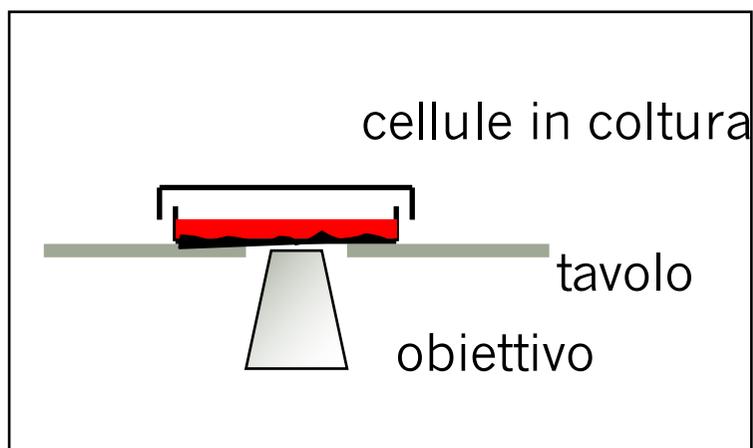


Cellule vive  
Non colorate

# Microscopio rovesciato



55

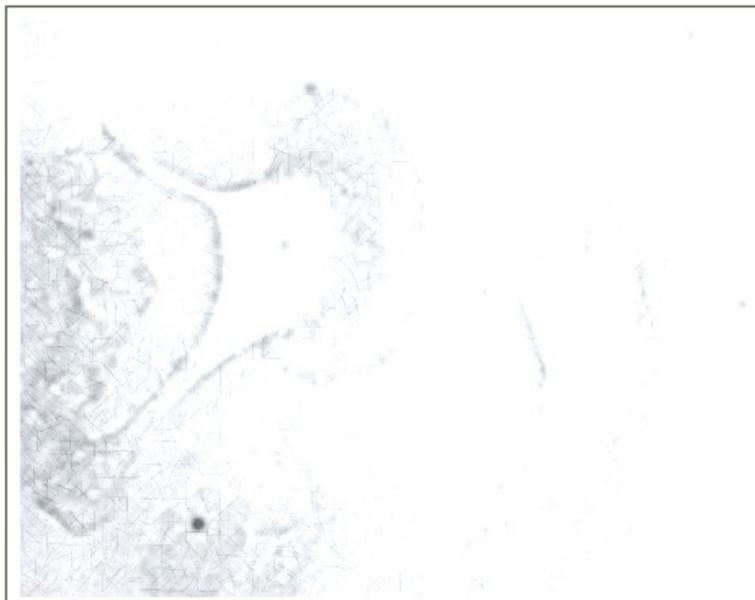


# Contrasto di fase



56

Campo chiaro (*bright field*)



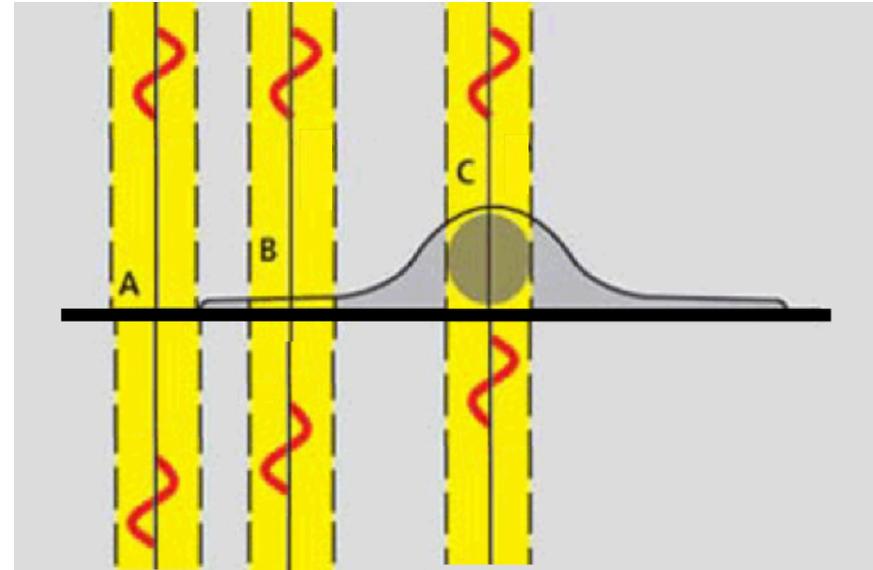
Contrasto di fase



Il campo chiaro richiede la colorazione del materiale osservato non è quindi adatto all'osservazione di cellule vive mentre il contrasto di fase permette l'osservazione delle cellule vive non colorate

## Contrasto di fase

Le onde luminose, durante il loro passaggio attraverso i nuclei delle cellule, il citoplasma o l'acqua, vengono leggermente sfasate, perchè questi mezzi hanno indici di rifrazione leggermente diversi.



Quanto maggiore è l'indice di rifrazione di un mezzo, tanto minore è la velocità della luce nel mezzo stesso. Come conseguenza, un'onda luminosa passata attraverso un nucleo di una cellula è in ritardo rispetto alle onde luminose che sono passate solamente attraverso l'acqua. L'importo di questo "ritardo" viene definito differenza di fase. Prima di entrare nel preparato le onde luminose sono ancora "in fase", ma non più dopo essere passate attraverso i diversi materiali.

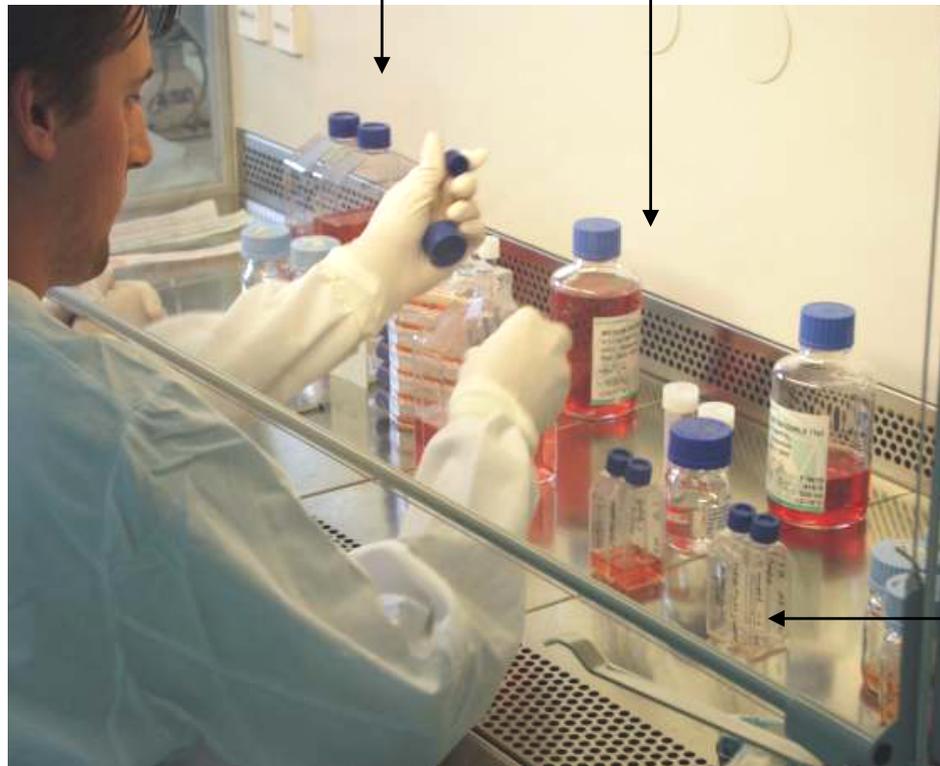
# Colture cellulari



58

Provette, pipette e reagenti sterili

Mezzo di coltura (rosso perché con indicatore di pH)



Fiasche e piastre idonei alle colture cellulari

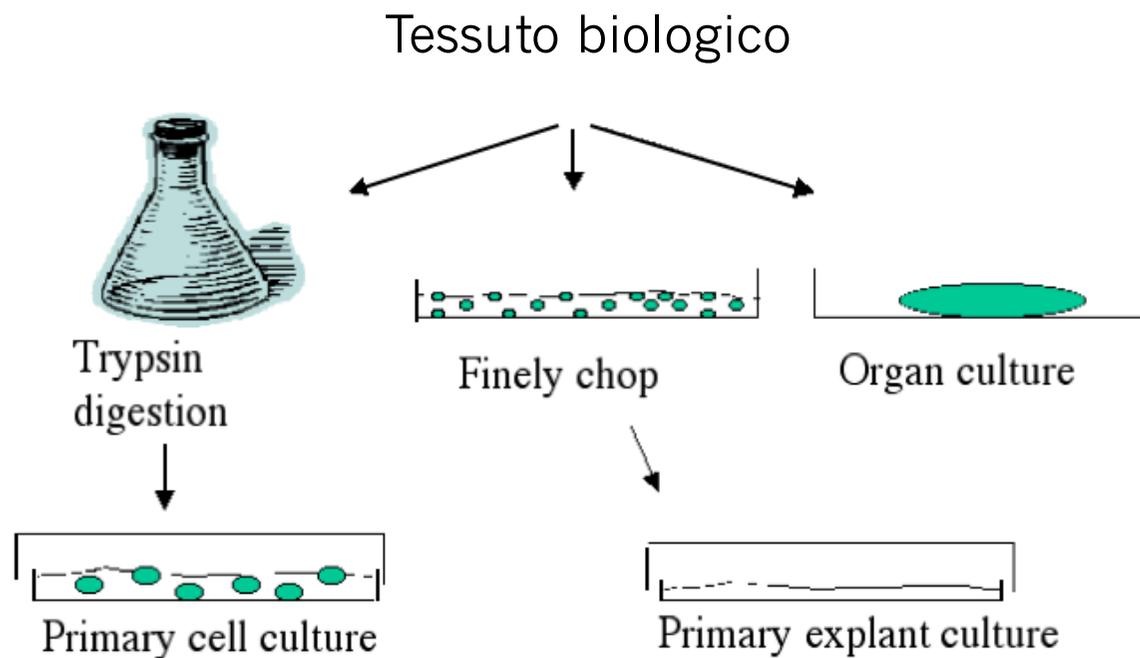
Manipolazioni in condizioni di sterilità (sotto cappa)

# Colture primarie



Il tessuto di partenza può essere "sano" oppure una biopsia di tessuto ammalato, ad esempio da un tumore

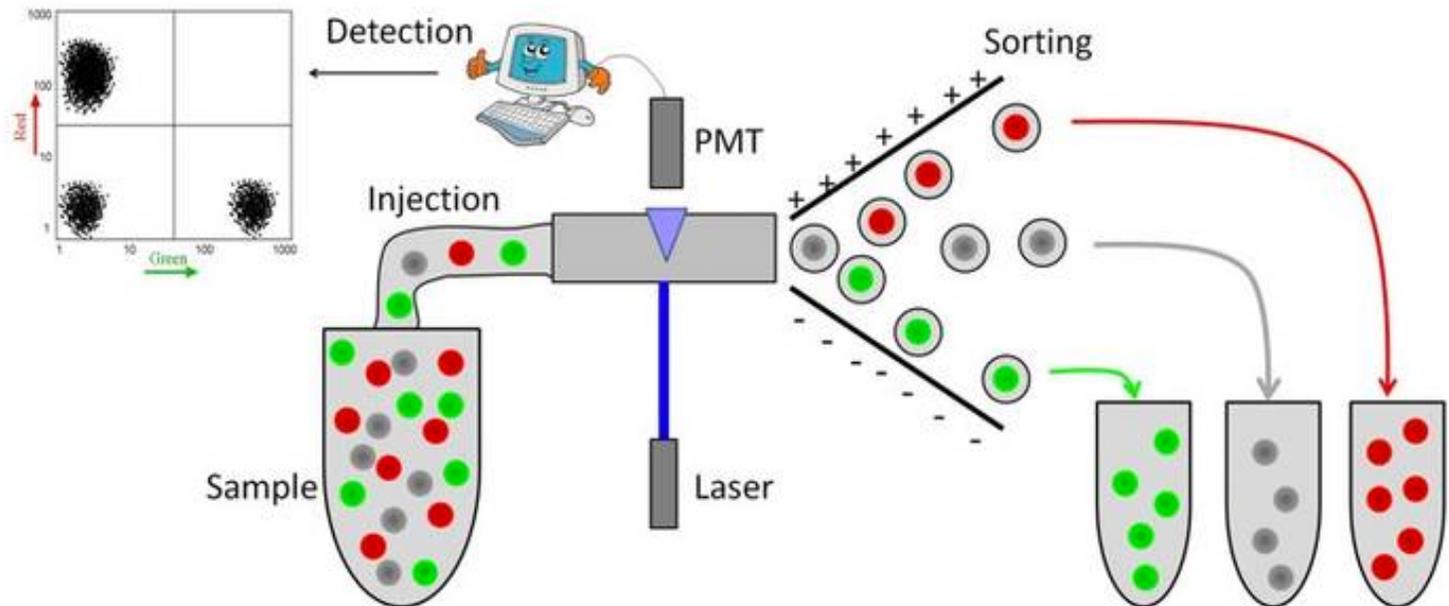
Si possono mettere in coltura cellule dissociate (isolate) oppure frammenti di tessuti (organoculture)



# Citofluorimetria di flusso (FACS o Fluorescent activated cell sorter)

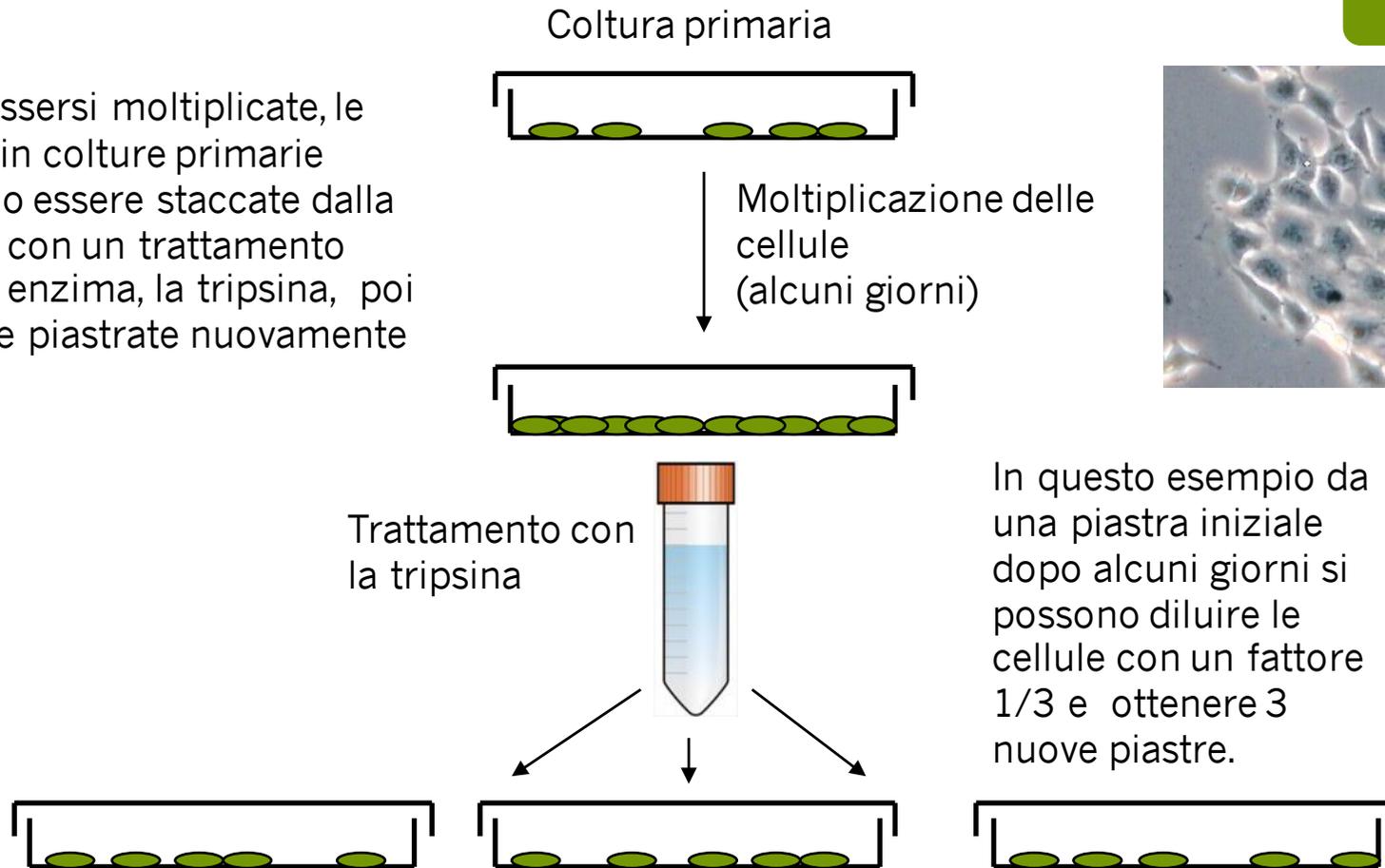


Dopo essere isolate, cellule di diverse tipologie possono essere separate utilizzando anticorpi fluorescenti che legano antigeni di superficie utilizzando il FACS.



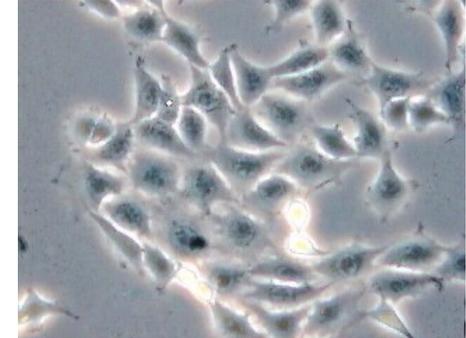
# Subculture: linea cellulare primaria

Dopo essersi moltiplicate, le cellule in colture primarie possono essere staccate dalla piastra con un trattamento con un enzima, la tripsina, poi diluite e piastrate nuovamente



dopo alcuni giorni ciascuna di queste 3 piastre potrà dare luogo a 3 nuove piastre (dunque 9 in tutto)...etc.

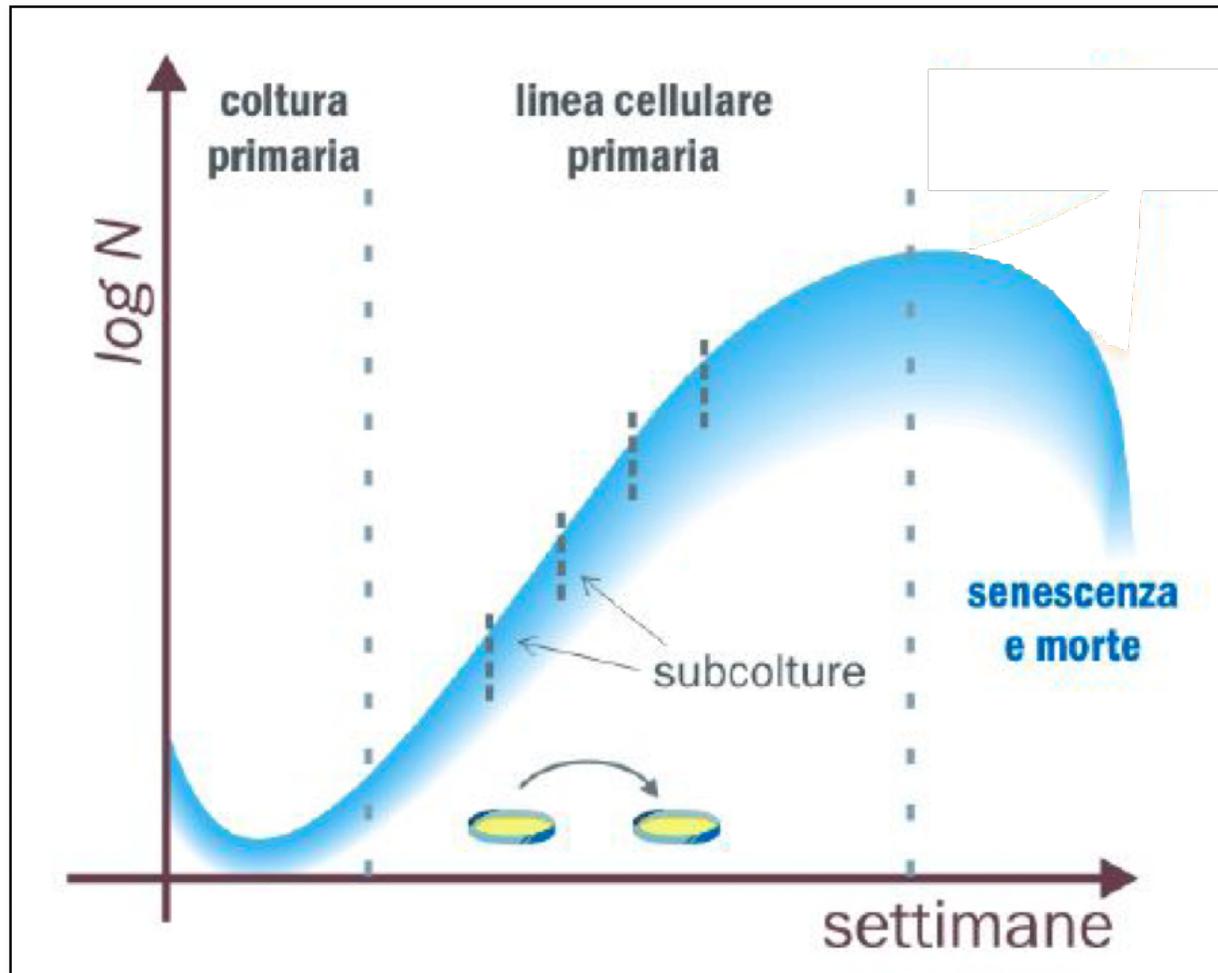
In questa fase la crescita cellulare è esponenziale



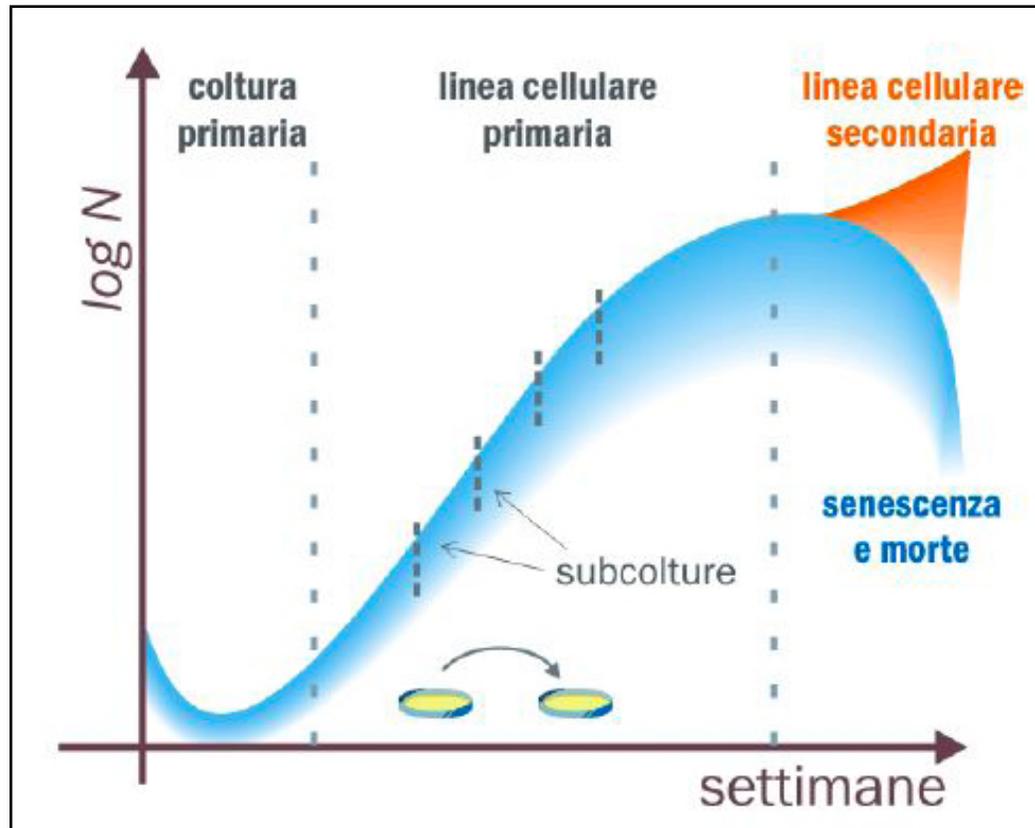
Le cellule "normali" in coltura hanno una vita finita e vanno incontro a senescenza e morte.



62



## Linee cellulari secondari



Alcune cellule possono sopravvivere e dare luogo ad una linea cellulare secondaria.

La linea cellulare secondaria è costituita da cellule che hanno la capacità di dividersi all'infinito e per questo motivo la linea cellulare secondaria viene considerata come immortalizzata.

Colture primarie preparate a partire da biopsie tumorali producono più facilmente linee cellulari secondari. Queste linee secondarie possono essere costituite da cellule immortalizzate ma non tumorali oppure da cellule a loro volta tumorali (in grado di produrre un tumore in vivo).

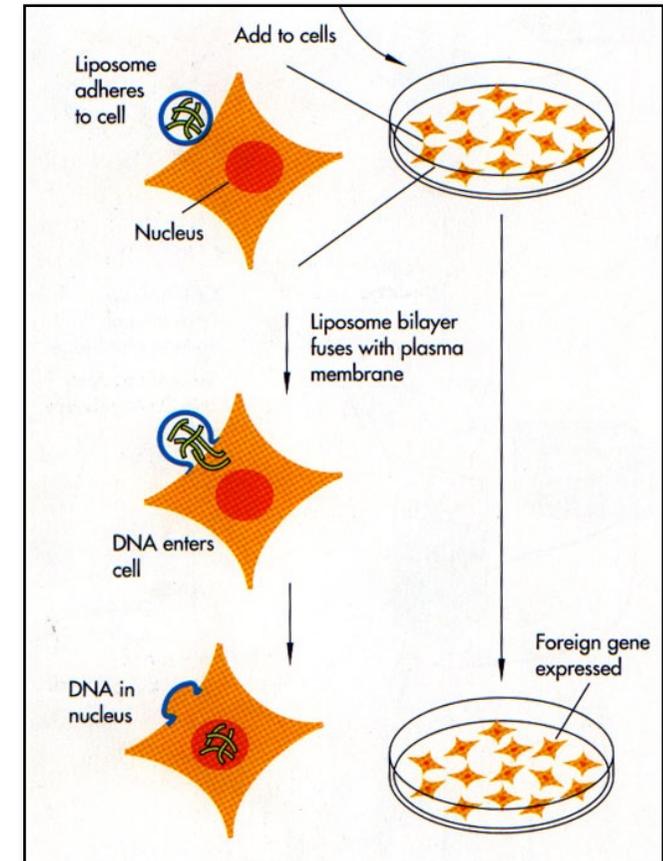
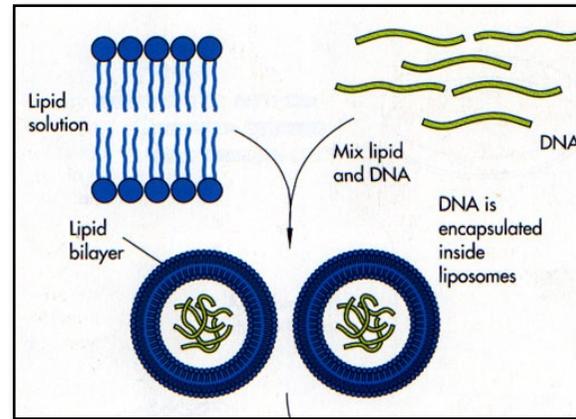
# Colture cellulari e trasfezioni

Le colture cellulari rappresentano un modello di studio di tutte le funzioni cellulari (fisiologiche o patologiche): differenziamento cellulare (cellule staminali), proliferazione, migrazione, organizzazione tridimensionali, morte cellulare, interazioni cellulari, metabolismo, studio e sviluppo di farmaci, di biomateriali.....

Le **cellule in coltura** possono anche essere **modificate geneticamente** tramite l'inserimento, in forma transiente o nel genoma della cellula ospite, di informazione genetica esogena. I metodi che permettono di fare entrare il DNA esogeno nelle cellule ospite si chiamano: "Trasfezioni"

# Trasfezioni (tecniche DNA ricombinante)

Esistono diversi metodi per fare entrare (trasfettare) un DNA esogeno nelle cellule, uno dei quali è la lipofezione: miscele di fosfolipidi e DNA si fondono con le membrane plasmatiche rilasciando all'interno delle cellule questo DNA esogeno.



# Fluorescenza in vivo



colture cellulari

Colorazioni istologiche  
Immunoistochimica  
Immunofluorescenza

Tecniche che richiedono la  
fissazione del preparato  
(cellule in colture o sezioni di  
tessuto)  
= materiale morto

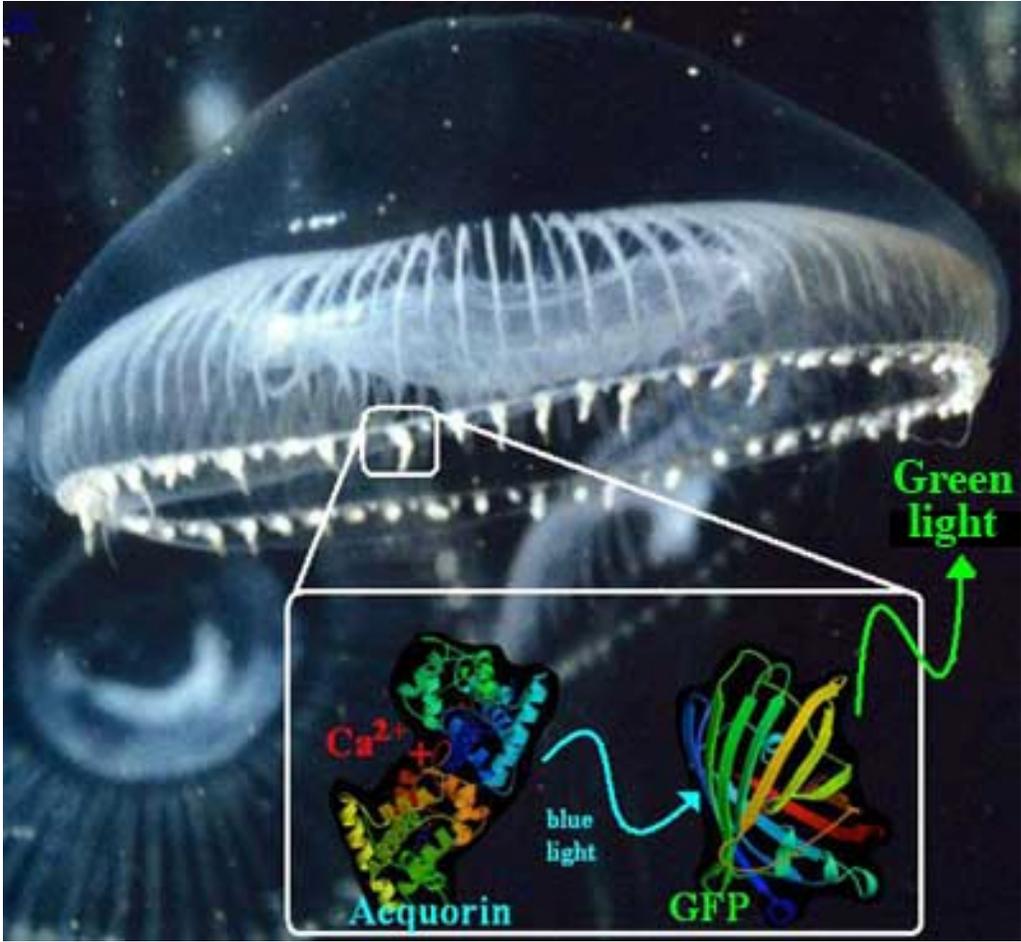
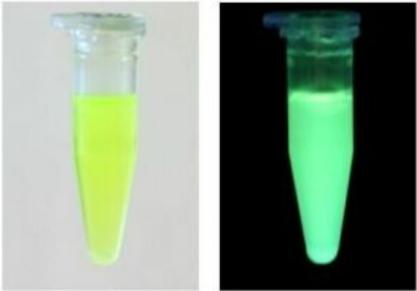
tecniche ricombinanti di biologia  
molecolare con espressione di  
costruzioni di fusione tra proteina  
di interesse e “lampadina”:  
Green Fluorescent Protein (GFP)

Tecniche compatibili con  
cellule o tessuti vivi

# Green Fluorescent Protein



GFP



# Sintesi proteica



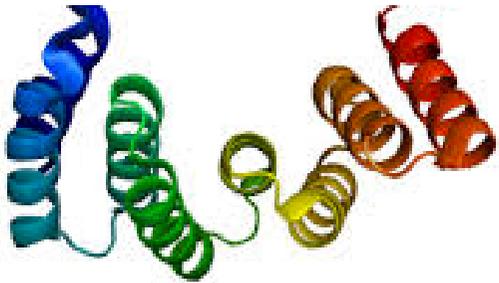
DNA



mRNA



proteina

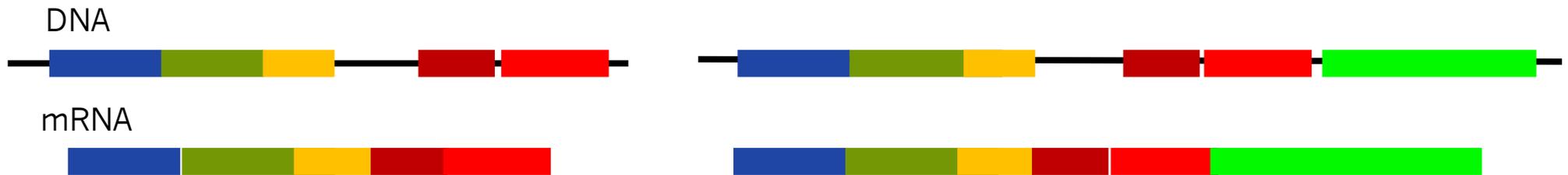


Le proteine di norma non sono fluorescenti e non si vedono in campo scuro.

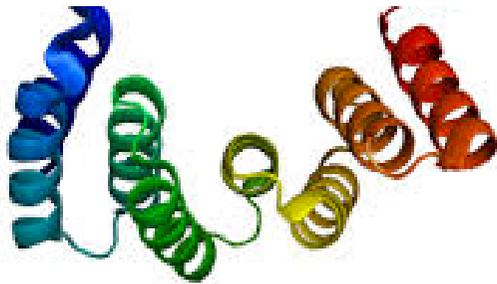


69

# Sintesi di una Proteina di fusione con GFP

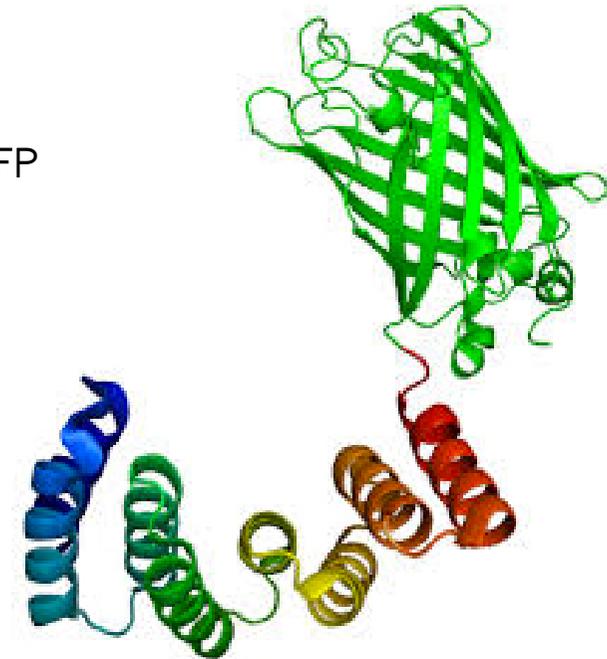


proteina



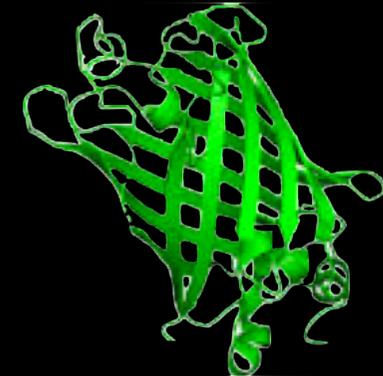
La proteina è espressa dalla cellula viva

proteina-GFP



La proteina di fusione è espressa dalla cellula viva

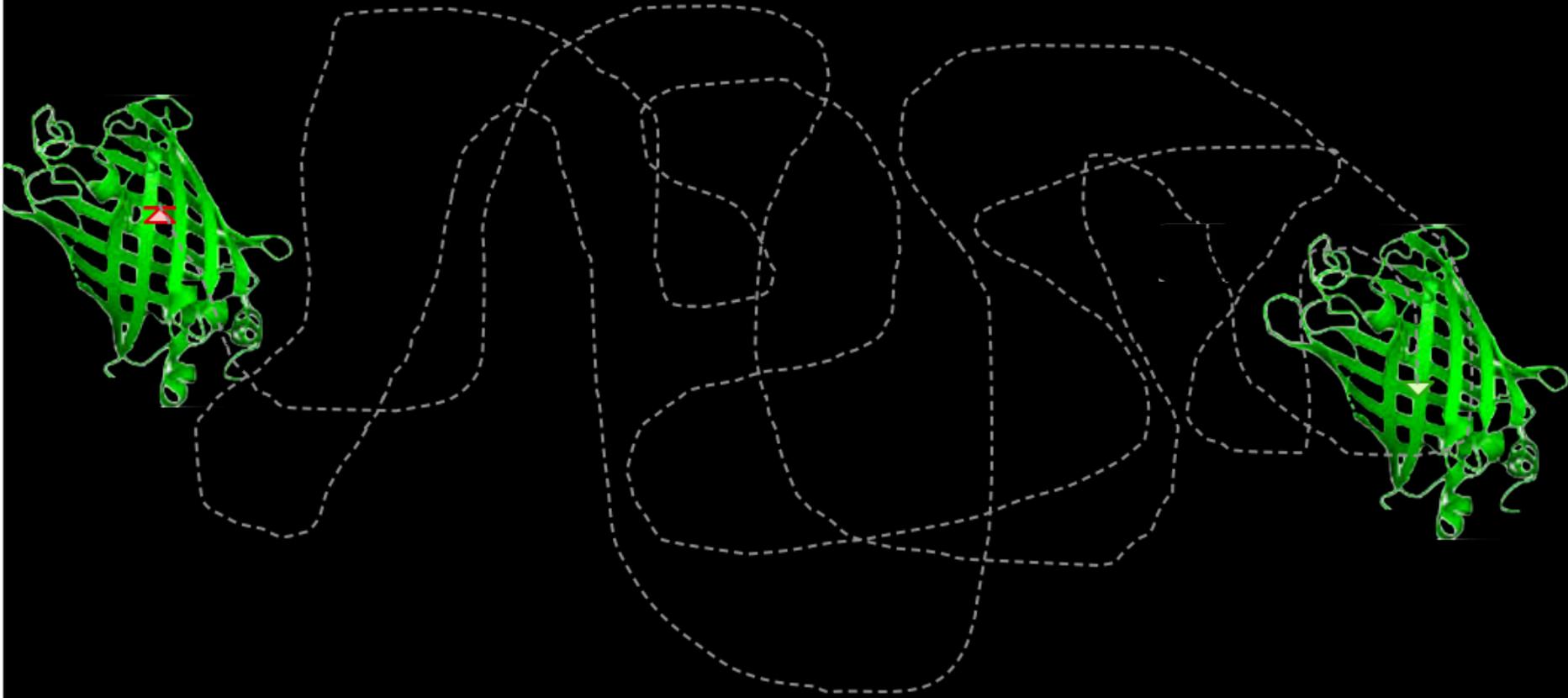
La proteina di fusione con GFP è espressa dalla cellula viva e la fluorescenza permette di seguirne gli spostamenti



La proteina di fusione con GFP è espressa dalla cellula viva e la fluorescenza permette di studiarne gli spostamenti



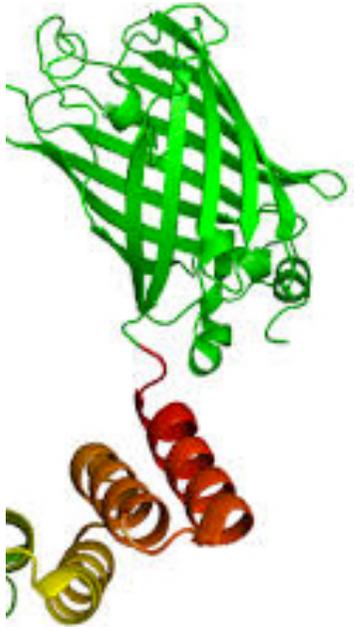
72



La proteina di fusione GFP permette di studiare la localizzazione della proteina in cellule vive



73

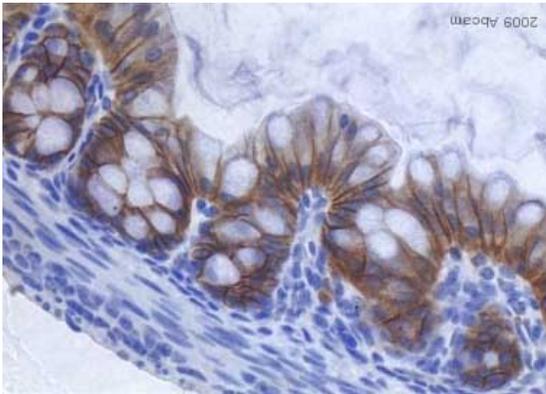


# Stessa proteina messa in evidenza con 3 tecniche diverse:

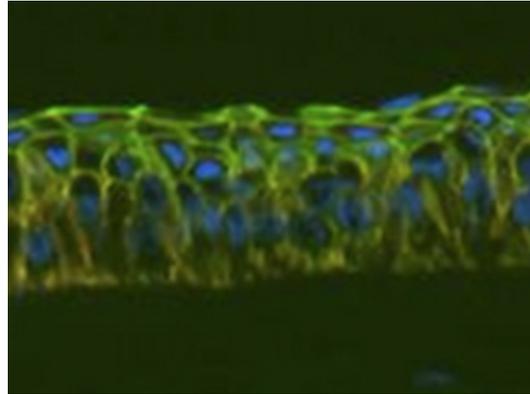


74

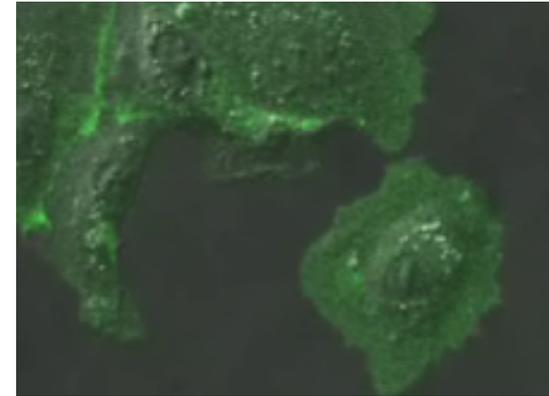
immunoistochimica



immunofluorescenza



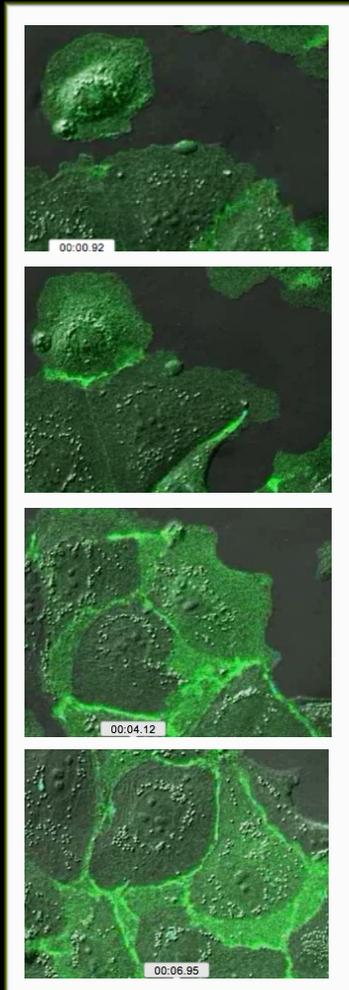
costrutto di fusione con GFP



Tessuto morto

Cellule vive

# Time-lapse: video microscopia (12 ore)



Esempio:  
Time lapse della  
proteina di fusione  
GFP-caderina in  
cellule epiteliali in  
coltura.



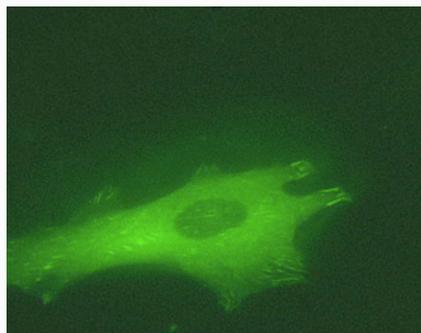
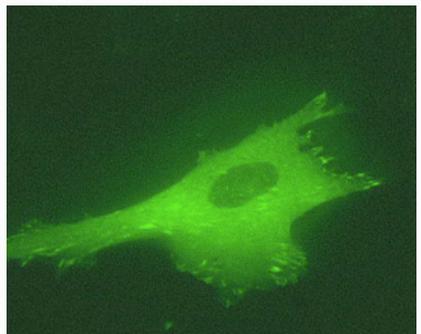
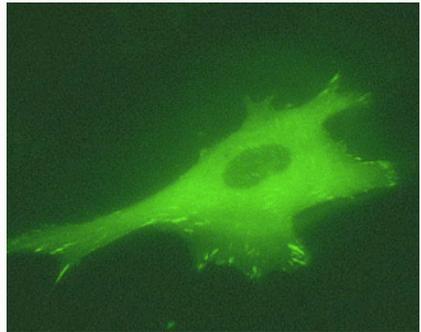
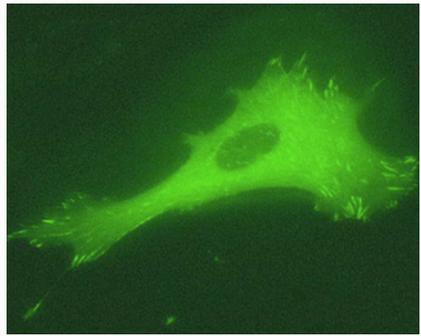
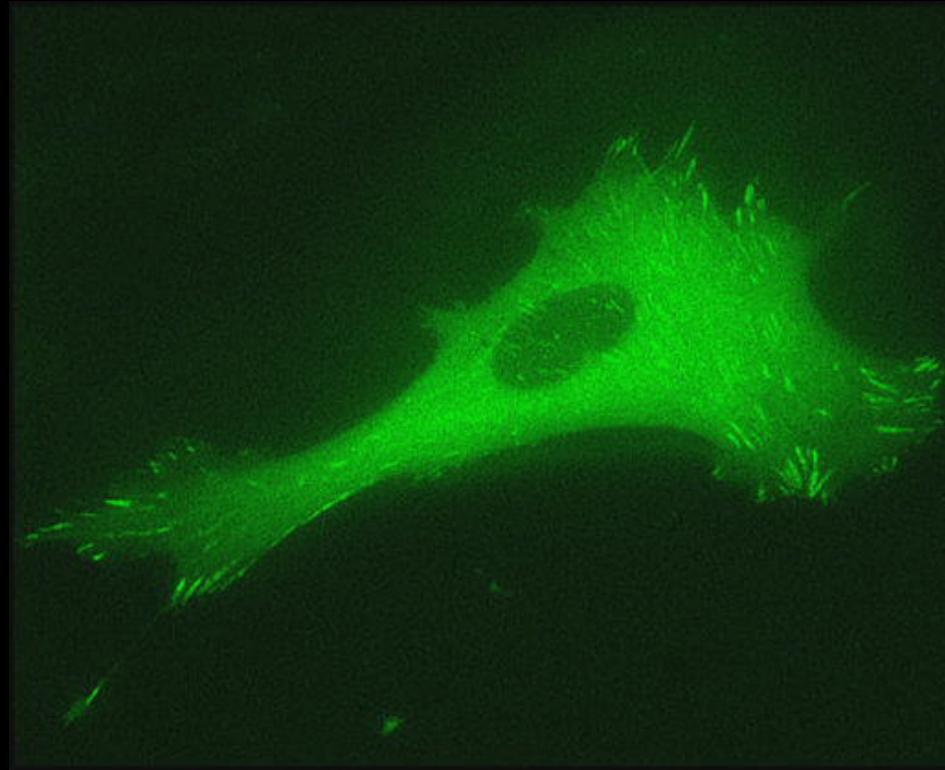
Notare la dinamica di realizzazione  
dell'adesione tra le cellule

Notare la localizzazione diffusa della fluorescenza nella cellula isolata: la  
proteina di fusione è localizzata sulla membrana plasmatica.

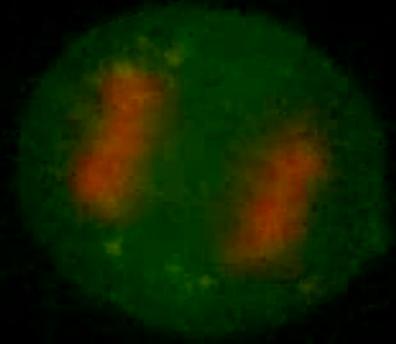
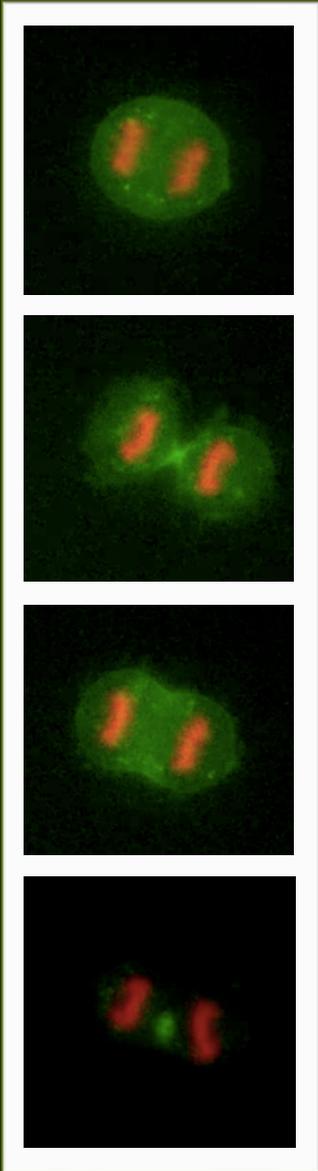
Osservare la redistribuzione della proteina di fusione e la sua  
concentrazione dei punti di interazione tra le cellule.



76



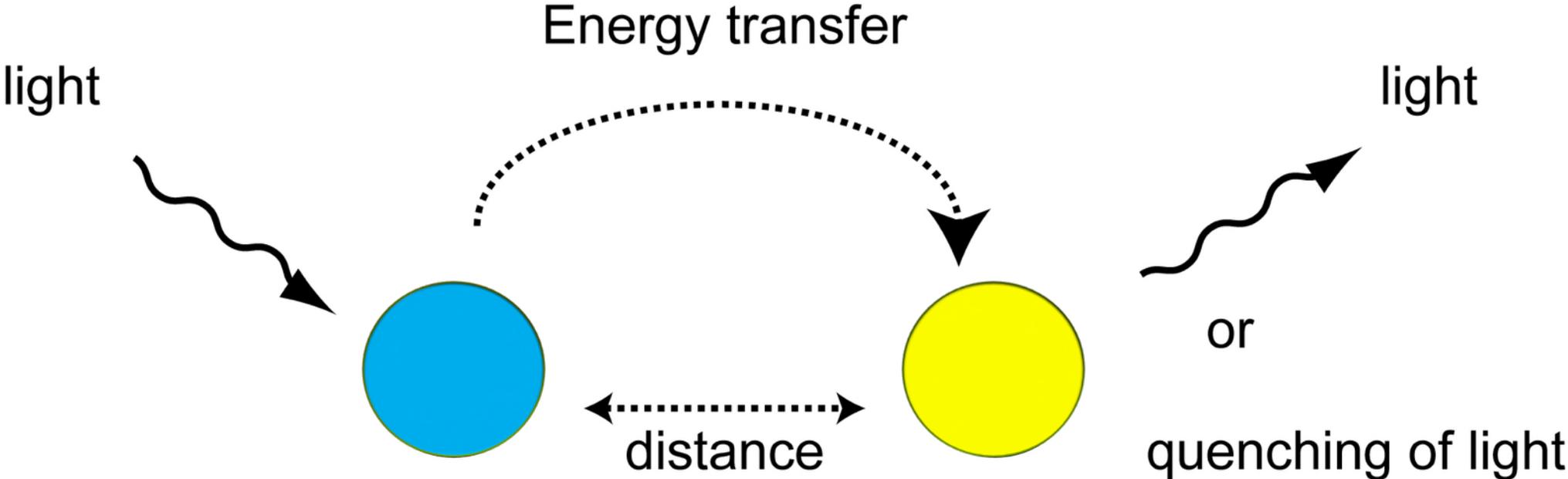
Messa in evidenza dell'adesione della cellula con la piastra di coltura e della migrazione cellulare: *notare l'aspetto dinamico dei punti di adesione alla piastra di coltura (tratti verdi più intensi)* .



notare la distribuzione di questa altra proteina di fusione (verde) che si concentra al punto di separazione delle due cellule figlie prima di essere completamente eliminata (scompare la fluorescenza verde). In rosso il DNA.

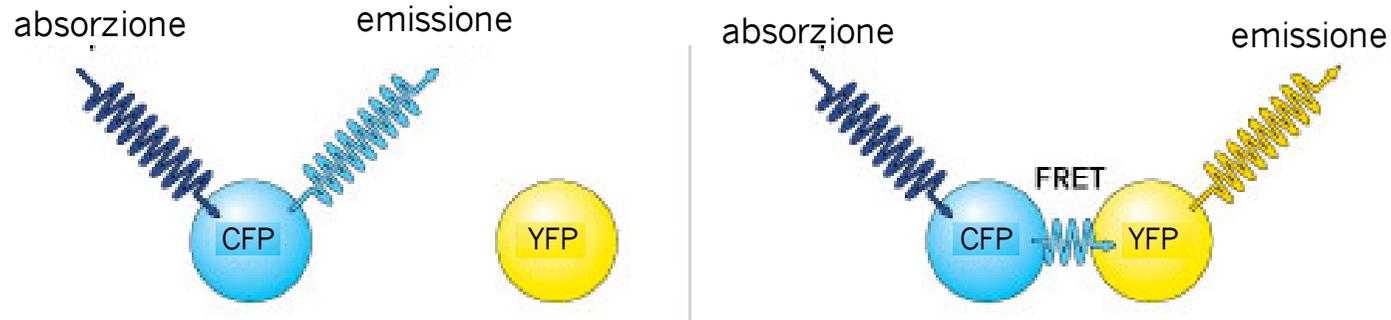


# FRET: Fluorescence energy transfer

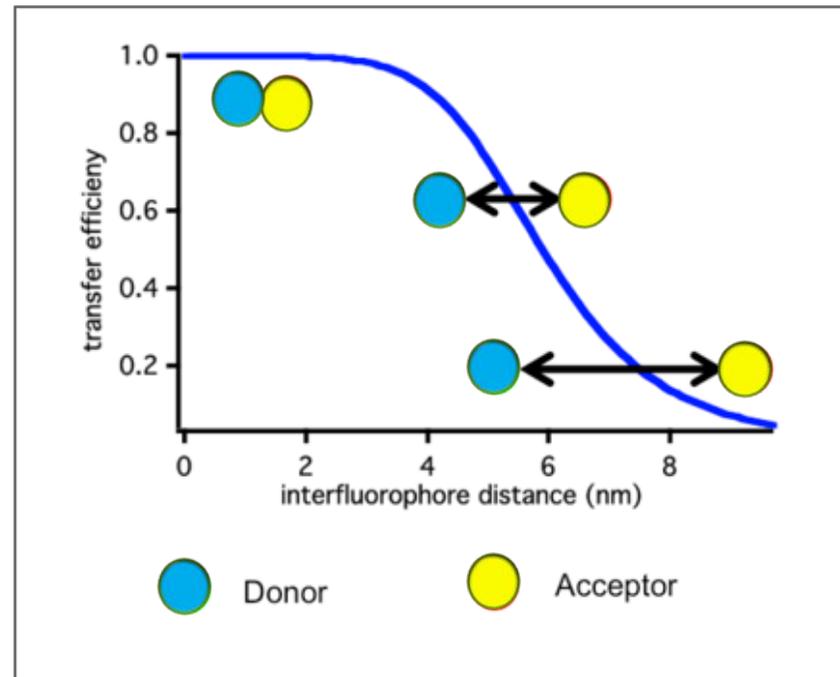


L'effetto FRET per distanze inferiori a 10 nm

# FRET: Fluorescence energy transfer



CFP e YFP sono due varianti della GFP che emettono luce blue (cyan) e gialla (yellow)

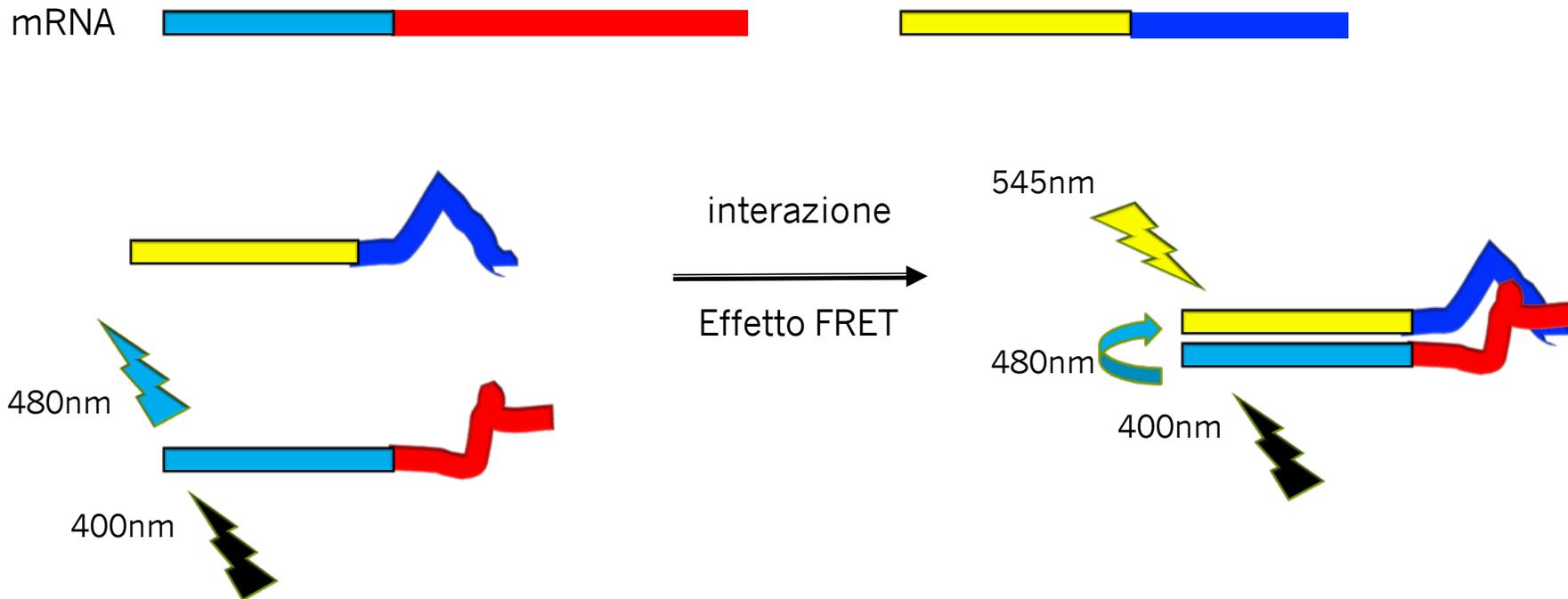


# Cosa si studia con la FRET? Interazioni tra le proteine



## Interazione tra due proteine

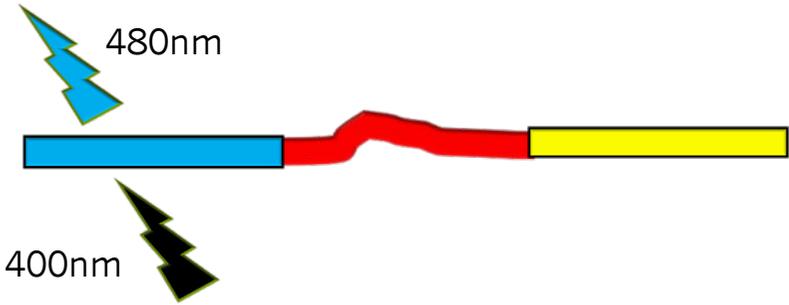
Due proteine di fusione fuse con due varianti della GFP: CFP (cyan) e YFP (yellow)



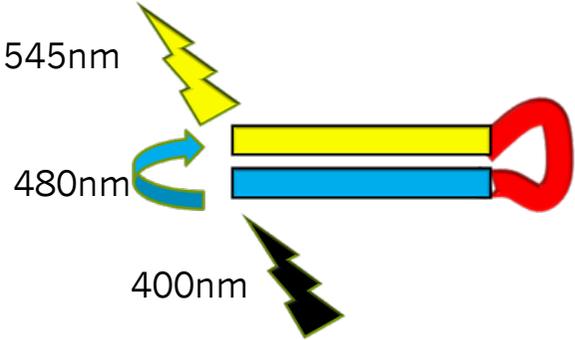
# Cosa si studia con la FRET? Cambi strutturali delle proteine



proteina ricombinante (rossa) fusa  
con due varianti della GFP:  
CFP (cyan) e YFP (yellow)



Cambio strutturale  
—————>  
Effetto FRET

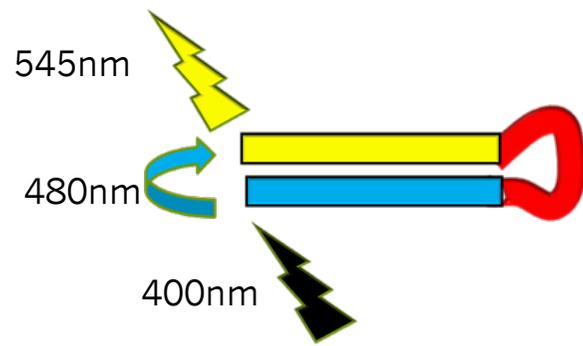


# Cosa si studia con la FRET?

## Taglio proteolitico di una proteina



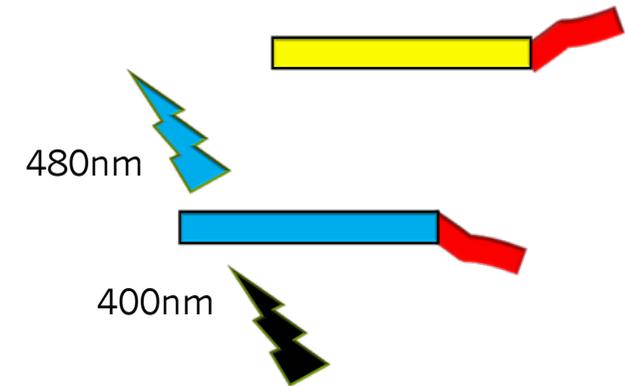
proteina ricombinante (rossa) fusa  
con due varianti della GFP:  
CFP (cyan) e YFP (yellow)



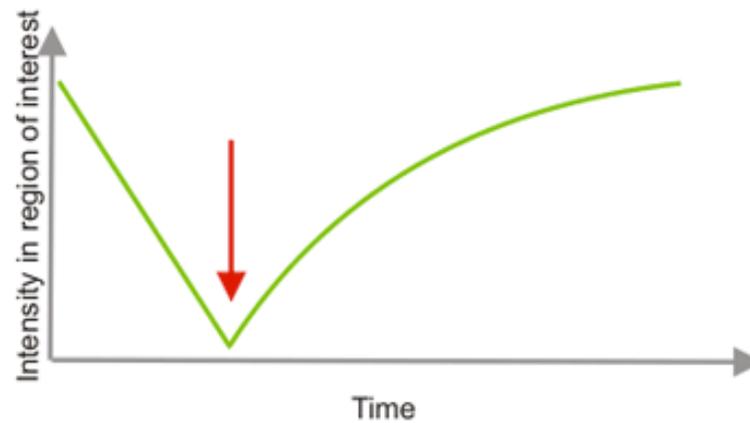
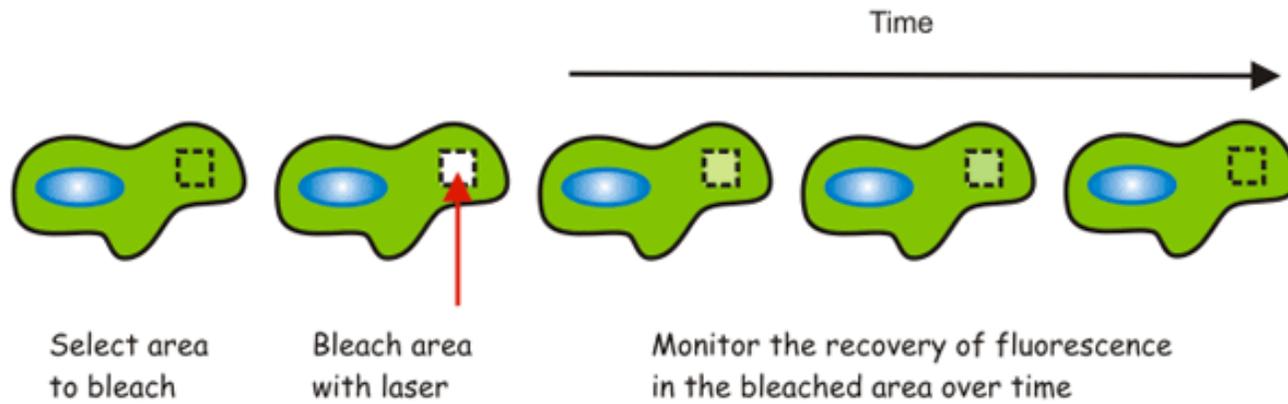
Taglio proteolitico



Perdita di FRET

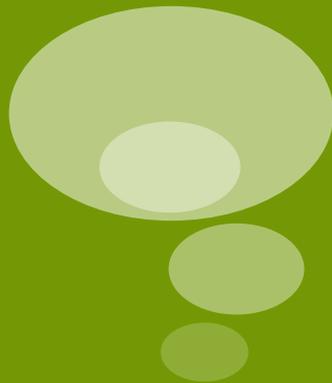


# FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching



# FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching





# Tecniche biochimiche e molecolari

Informazioni complementari a quelle  
morfologiche

## Obiettivi formativi

- Conoscere le fasi delle tecniche discusse a lezione.
- Saper associare la tecnica alla tipologia di molecole d'interesse (Western, Northern, Southern blotting).
- Approcci bioinformatici



86



# Western, Northern e Southern blot

tecniche biochimiche-molecolari comunemente utilizzate da chi studia la biologia delle cellule e dei tessuti

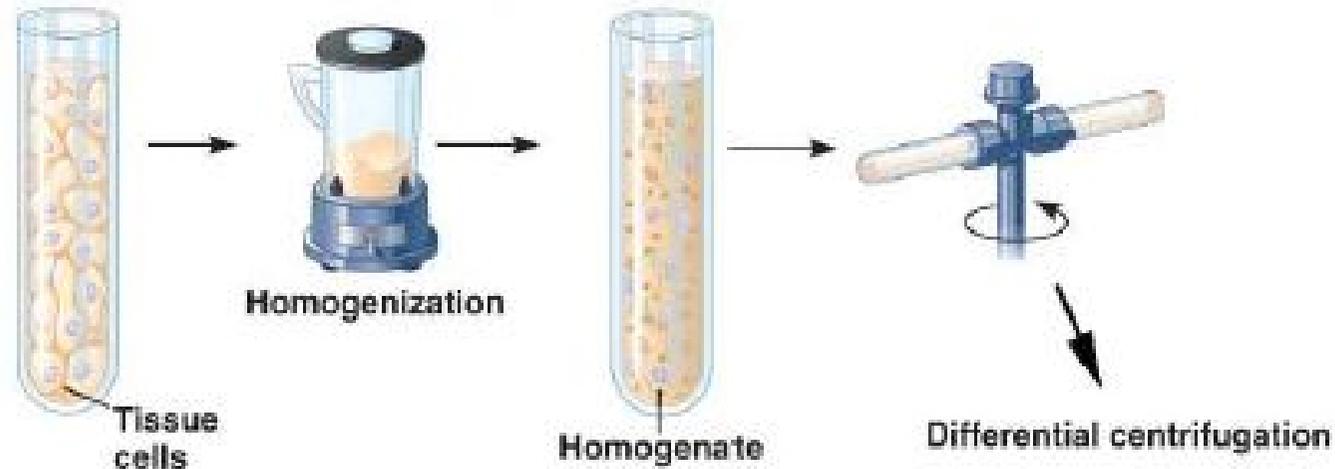
<b>Tecnica</b>	<b>Estrazione</b>	<b>Modalità di riconoscimento</b>
Western blotting	Proteine	Antigene-anticorpo
Northern blotting	mRNA	Ibridazione di acidi nucleici
Southern blotting	DNA	Ibridazione di acidi nucleici

# Principali fasi:



- 1) Estrazione (proteine, RNA o DNA)
- 2) Separazione per centrifugazione
- 3) Separazione per elettroforesi
- 4) Trasferimento (blotting)
- 5) Rilevazione (anticorpi, sonde di acidi nucleici)

# 1) Estrazione

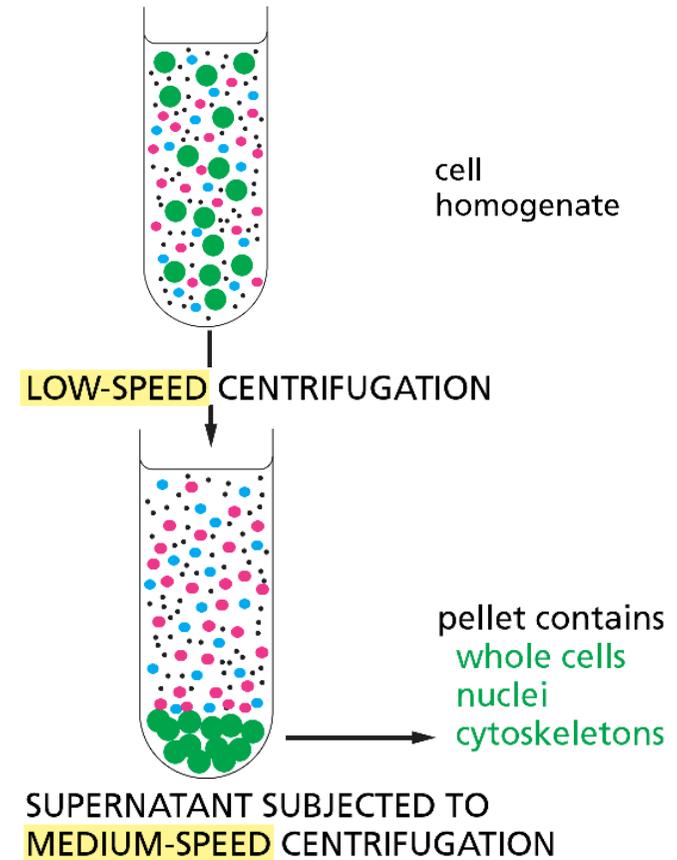


Proteine, DNA o RNA di frammenti di tessuto o biopsie oppure cellule prelevate da piastre da colture sono poste in presenza di un idoneo tampone di estrazione. Dopo rottura meccanica delle strutture cellulari (blender) o trattamento con ultrasuoni, l'estratto è filtrato e sottoposto a ulteriore centrifugazione

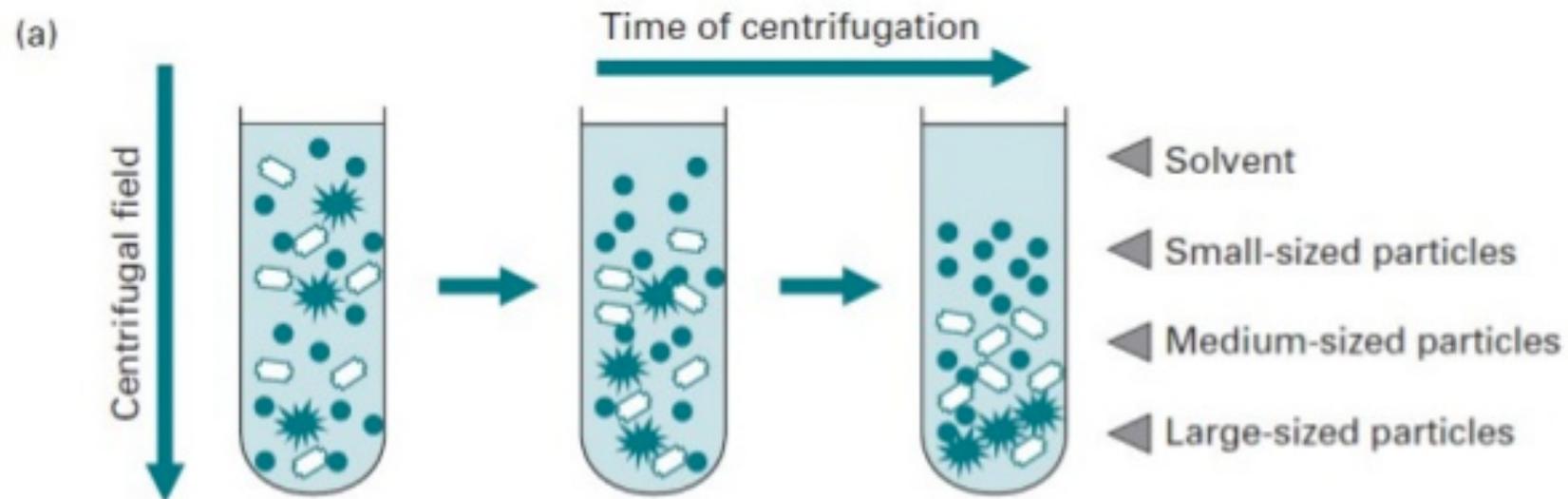
# 1) Omogeneizzazione e centrifugazione



Ultrasuoni



## 2) Centrifugazione differenziale



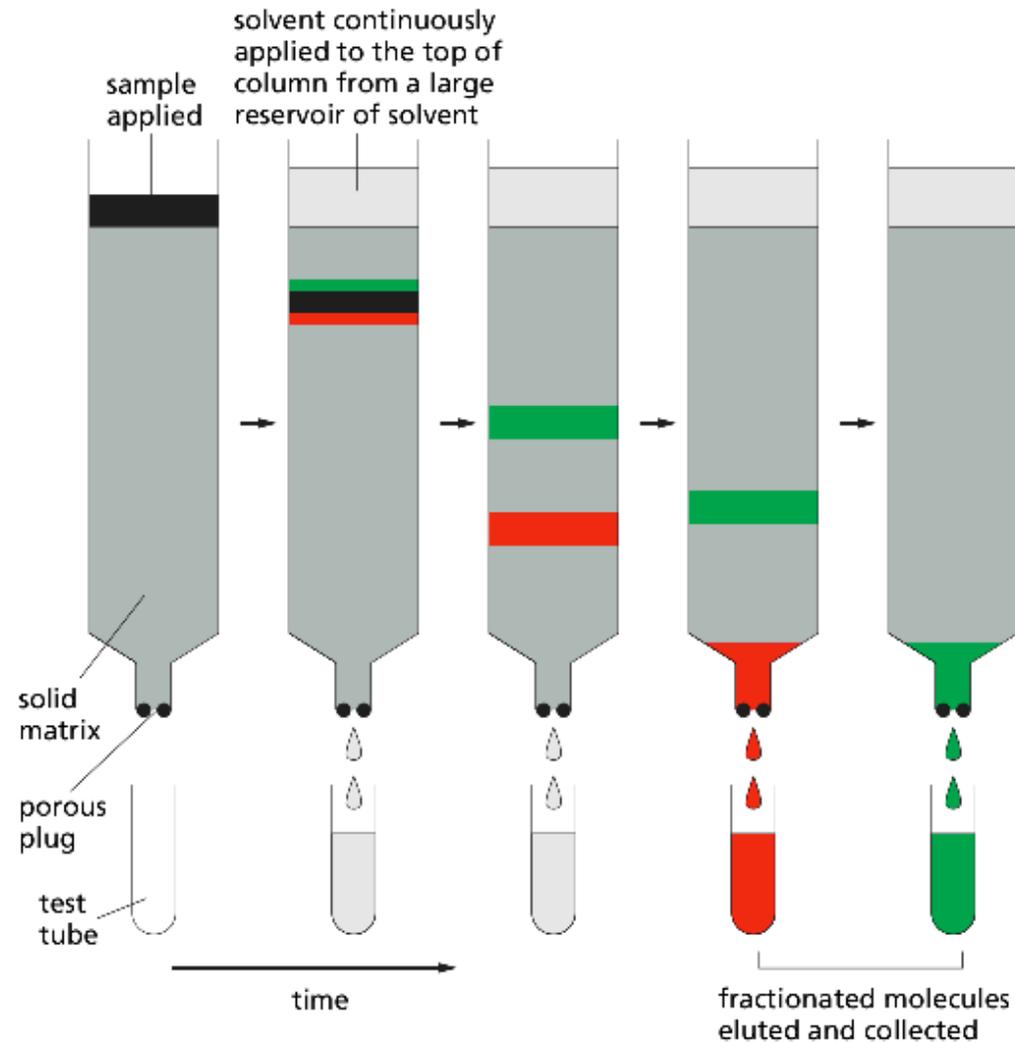
La centrifugazione può essere semplice o differenziale in quest'ultimo caso la sedimentazione avviene secondo un gradiente con particole più leggere in alto e quelle più pesanti in fondo alla provetta

# Cromatografia d'affinità



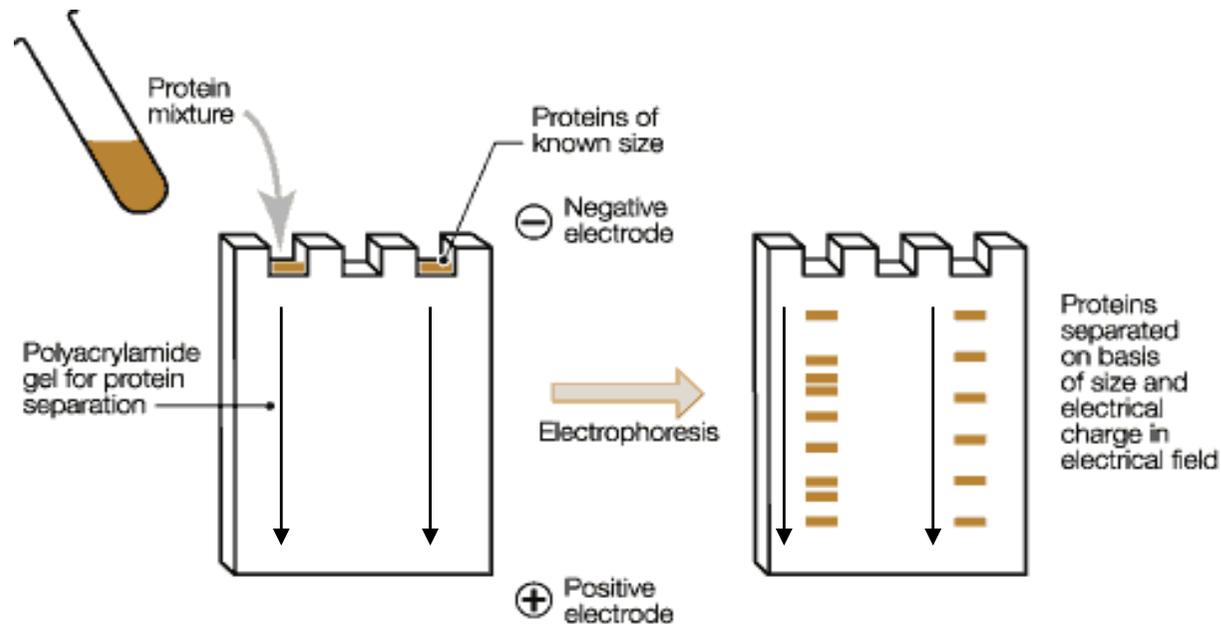
Cromatografia d'affinità:  
separazione delle  
proteine in  
funzione della loro  
affinità per un  
supporto

Cromatografia  
su colonna

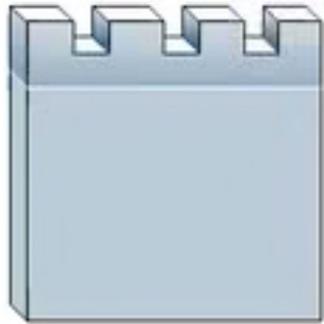


### 3) Separazione elettroforetica

1. Estrazione delle proteine (esempio riferito a WB)
2. Separazione delle proteine mediante corsa elettroforetica su gel



Le proteine dell'estratto, tutte caricate negativamente durante l'estrazione, sono depositate nel pozzetto. Dopo applicazione della corrente elettrica migrano dunque verso il polo positivo. La separazione avviene in funzione del peso molecolare di ciascuna proteina. Quelle più piccole, di più basso peso molecolare, migrano più rapidamente all'interno delle "maglie" del gel verso il polo positivo.



GeneEd

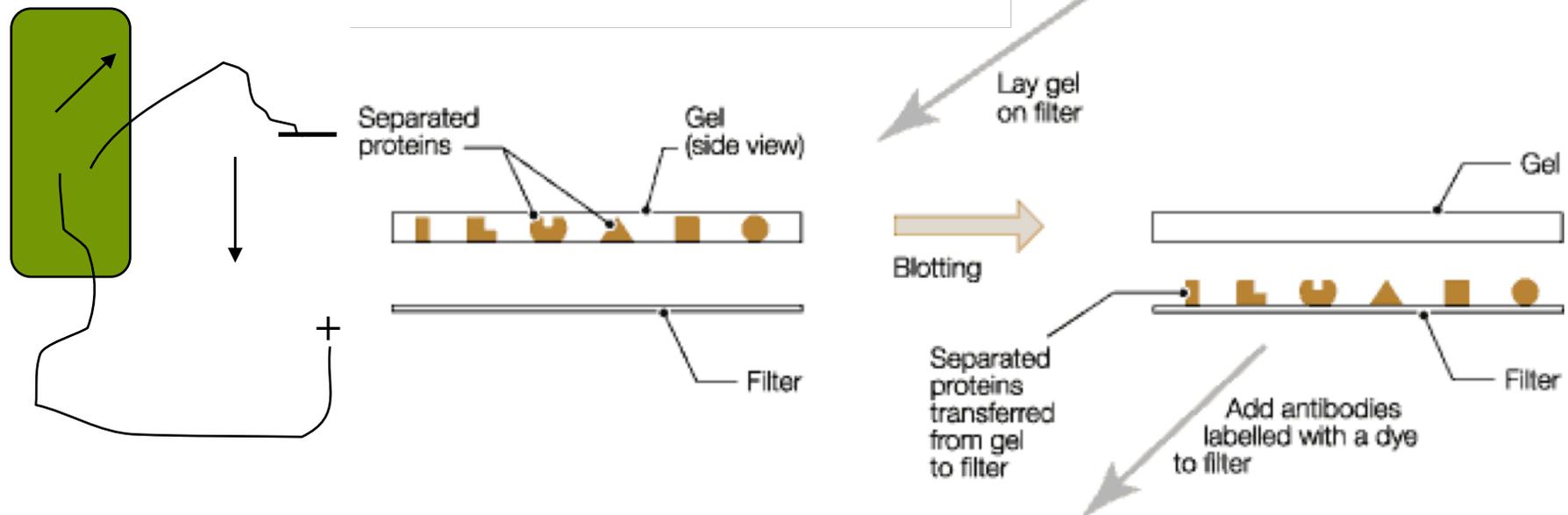


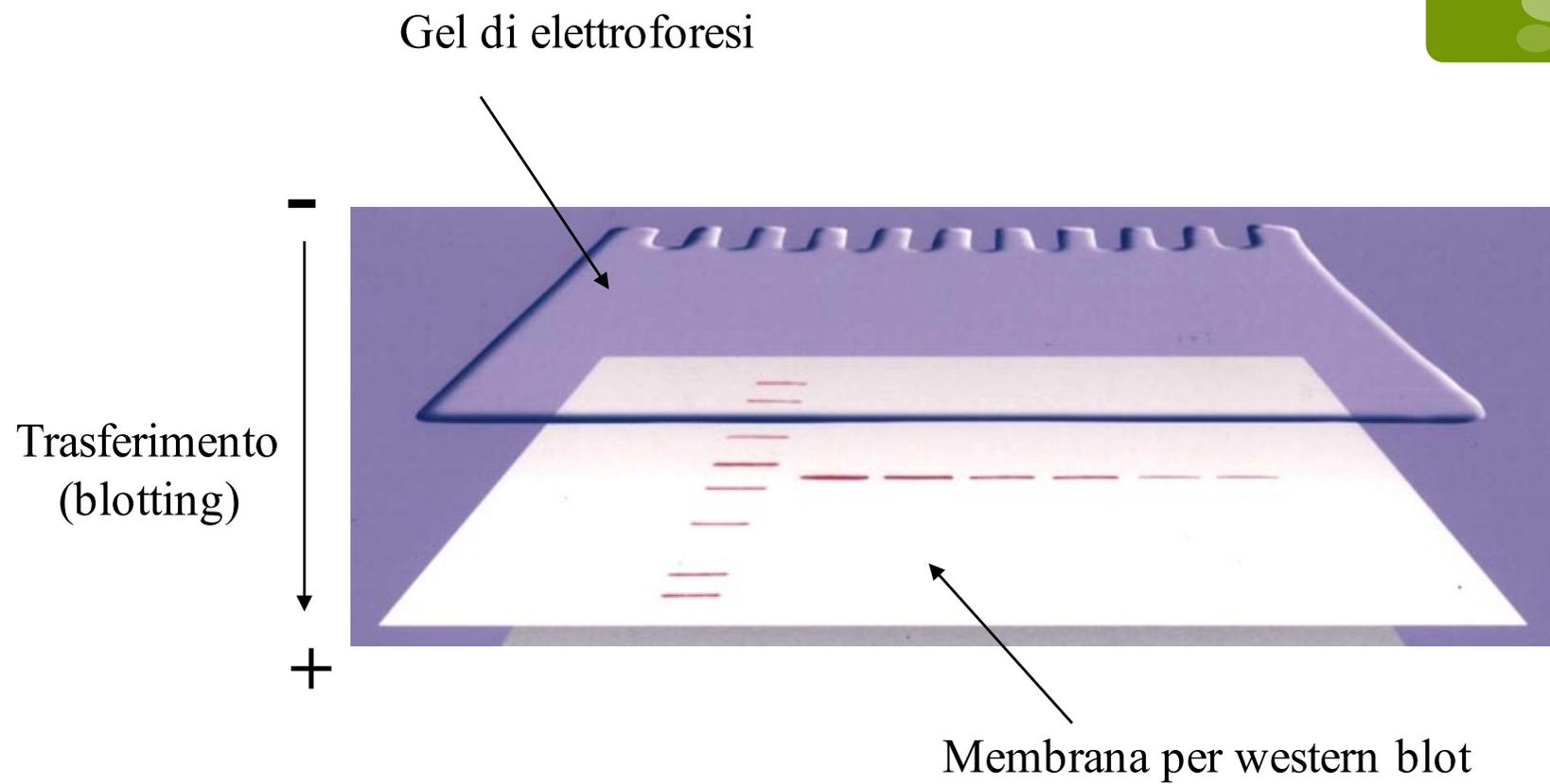


## 4) Trasferimento o blotting (esempio WB)



Al termine dell'elettroforesi, si procede con il "blotting", cioè il trasferimento dal gel di elettroforesi ad un supporto più maneggevole ed idoneo all'incubazioni con gli anticorpi: il filtro (assomiglia ad un foglio di carta della dimensione del gel)

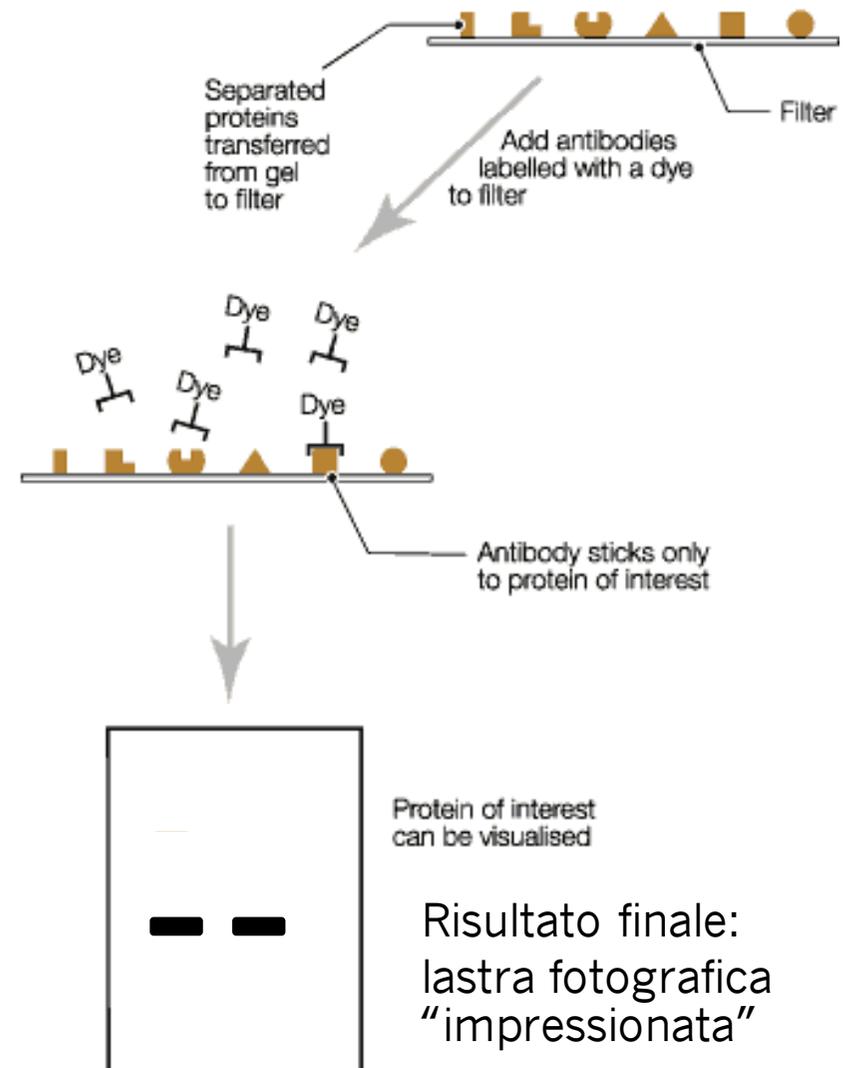
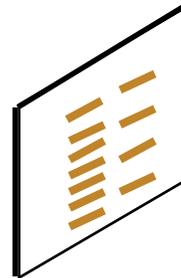
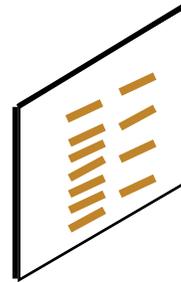




## 5) Incubazione del filtro con anticorpi e rivelazione

98

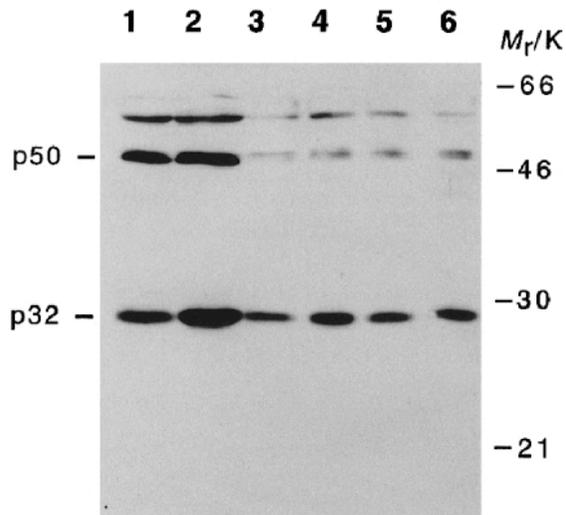
Il filtro è poi incubato in presenza dell'anticorpo primario, lavato, incubato in presenza di anticorpo secondario coniugato ad un enzima che permette una reazione luminescente. La rivelazione avviene ponendo una lastra fotografica sul filtro, la luminescenza impressiona la lastra. Dopo sviluppo fotografico della lastra, le "macchie" nere corrispondono alla presenza della proteina d'interesse (antigene).



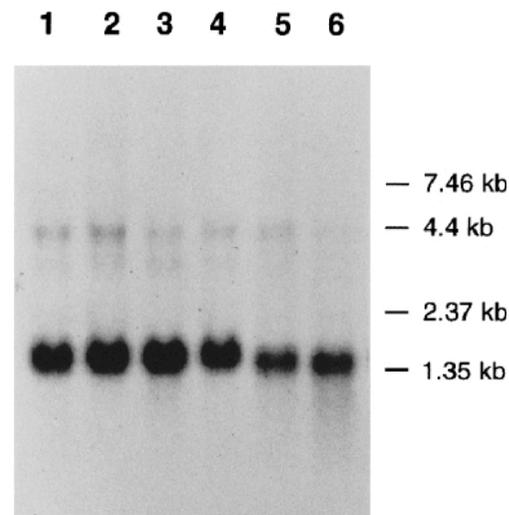
# Apparenze simili: necessità di leggere e capire le legende delle figure per saper interpretare i risultati



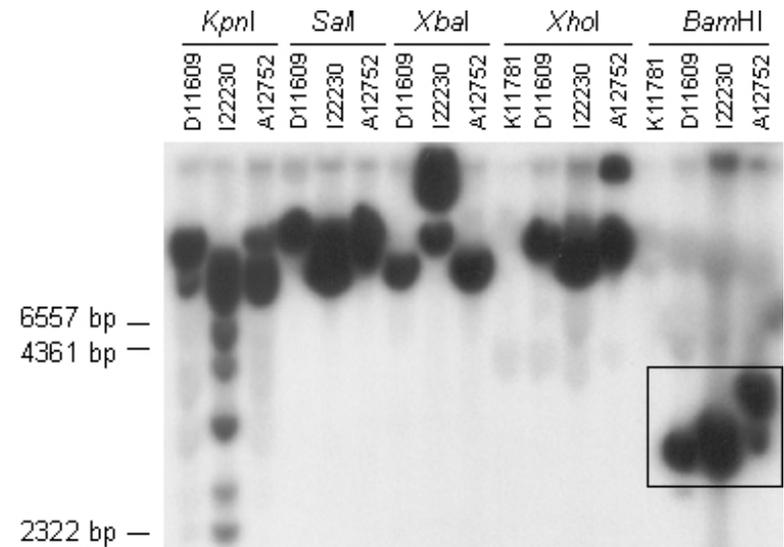
Western blotting (protein)



Northern blotting (mRNA)



Southern blotting (DNA)

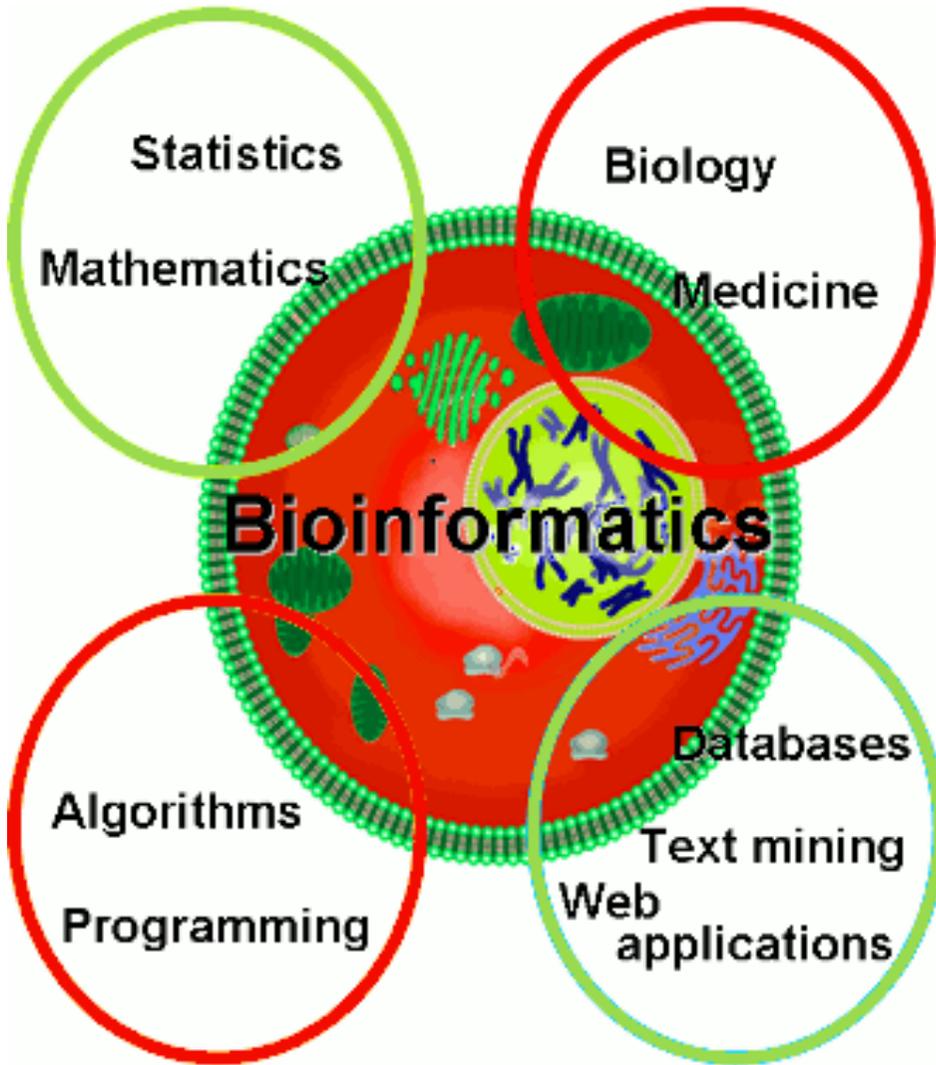


Queste due tecniche mi permettono di rispondere a domande correlate fra di loro: espressione di proteine e espressione di mRNA. (per semplificare: legame tra trascrizione e traduzione)

Questa tecnica mi permette di rispondere ad altri tipi di domande: mutazioni, delezioni, amplificazioni, polimorfismi (biologia forense)



# Bioinformatica

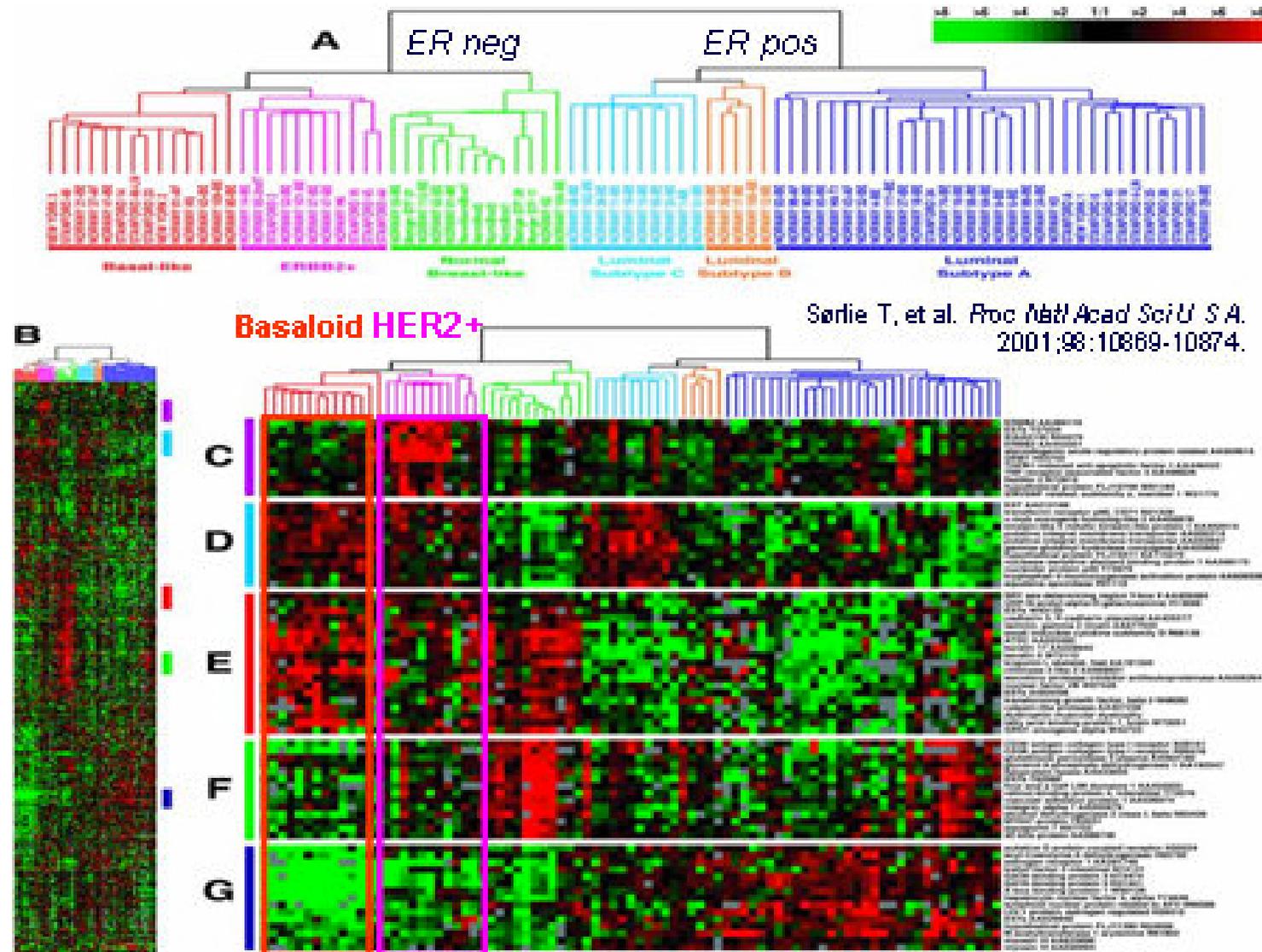


Bioinformatic cluster

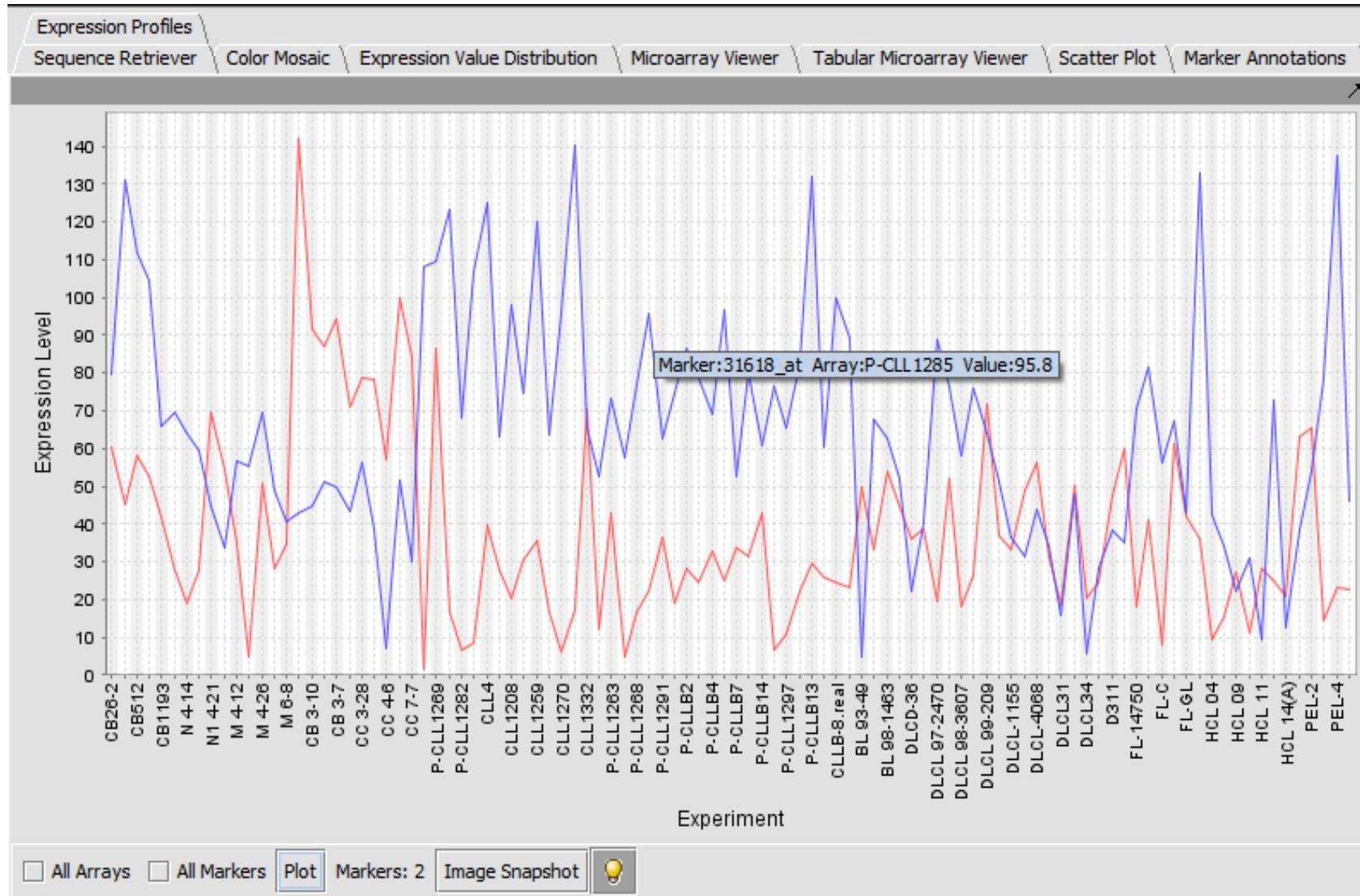




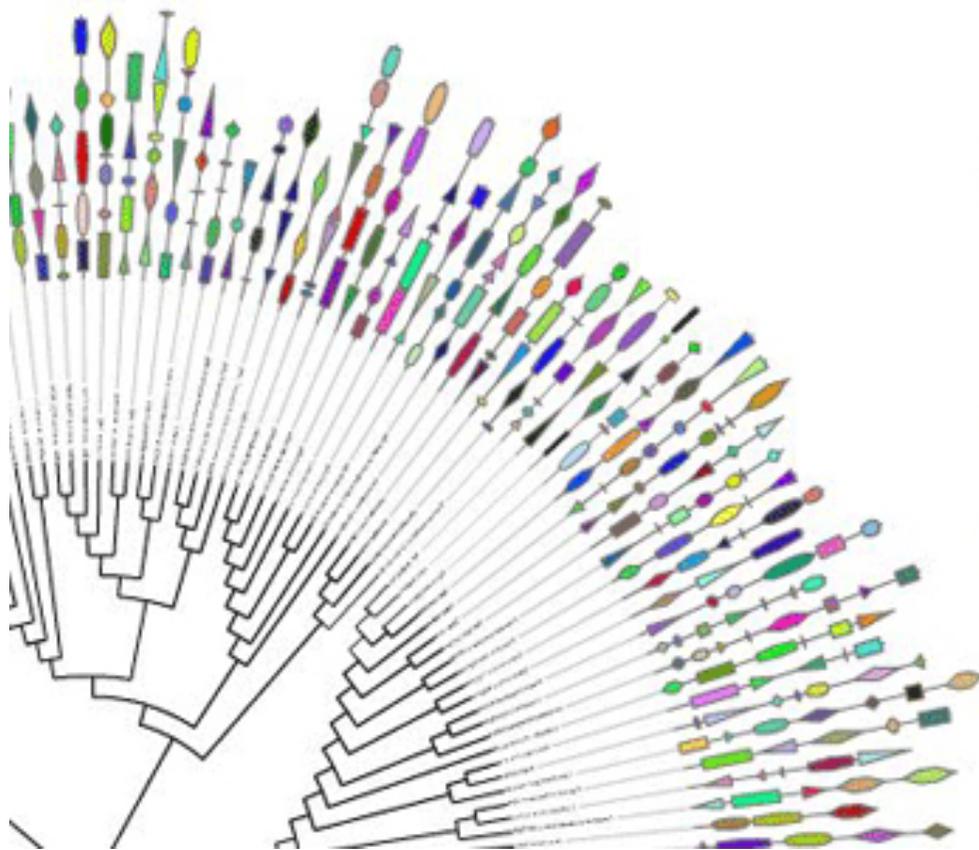
# Profili genici



# Profili genici



# Biologia evolutiva



L	G	W	L	N	G	F	W	I	F	W	K	D	G	W	N	I	L	N	F	
L	L	G	W	L	N	G	F	W	I	F	W	K	D	G	W	N	I	L	N	F
L	M	K	V	Y	V	D	P	I	T	Y	W	K	D	G	Y	N	I	L	D	V
S	M	K	V	Y	V	D	P	I	N	Y	W	K	N	G	Y	N	L	L	D	V
L	L	K	I	I	A	L	G	L	S	Y	F	F	D	F	W	N	N	L	D	F
V	L	K	L	I	A	L	G	L	E	Y	F	Y	D	P	W	N	N	L	D	F

L	Q	L	L	R	I	C	R	V	L	R	S	L	K	L	L	A	Q	F	R	O	
L	Q	L	L	R	I	C	R	V	L	R	S	L	K	L	L	A	Q	F	R	O	
L	Q	L	L	R	V	C	R	V	L	R	S	L	K	L	L	F	A	R	F	R	O
V	A	I	T	Y	F	L	R	A	L	R	L	V	H	V	C	M	A	V	E	P	
P	S	I	N	Y	T	L	R	A	L	R	L	V	H	V	C	M	A	V	E	P	
L	H	F	A	D	G	I	O	S	L	R	I	L	K	L	I	S	Y	S	R	G	
L	Y	I	A	D	G	M	O	S	L	R	I	L	K	L	I	S	Y	S	R	G	
F	K	S	L	R	A	L	R	A	I	R	V	L	R	R	L	S	F	L	T	S	
F	K	S	M	R	A	L	R	A	I	R	V	L	R	R	L	S	F	L	T	S	

V	Y	V	F	S	E	Y	T	R	S	P	R	O	D	L	E	Y	H	V	F	F
V	Y	V	F	S	E	Y	T	R	S	P	R	O	D	L	E	Y	H	V	F	F
V	Y	V	F	S	E	Y	T	R	S	P	R	O	D	L	E	Y	H	V	F	F
V	Y	F	F	R	E	Y	S	R	S	T	I	E	G	L	E	Y	N	M	F	F

# interactome



**GENOME**



**PROTEOME**



**“INTERACTOME”**

