**Lezione I**

**Fondamenti di ottica. Microscopio a fluorescenza. Molecole fluorescenti.**

**L’utilizzo delle molecole fluorescenti nella ricerca.**

Sono stati ideati sensori per visualizzare la fase del ciclo cellulare. Durante il ciclo, le cicline sono sottoposte ad eventi di sintesi e degradazione, legati alle fasi. Il sensore Geminin-GFP viene sintetizzato solo in G2/S e degradato in fase M: la cellule cessa di essere verde. In G1, viene prodotta CDT-RFP (ovvero fusa al fluoroforo RFP, rosso); al termine della G1 viene sintetizzata Geminin-GFP: dall’*overlap* si ha fluorescenza gialla. Questo permette di identificare con precisione la fase del ciclo cellulare. In studi di biologia dello sviluppo, le nicchie di staminalità possono essere identificate in questo modo. Le cellule differenziate che non si dividono più saranno rosse. In *Drosophila* s’agisce similmente con il sensore Fucci.

La fluorescenza è applicata in modo spinto nella ricerca sul cancro. In topi GFP, che esprimono la proteina fluorescente in tutti i tessuti, viene impiantata una massa di melanoma, le cui cellule tumorali esprimono una proteina fluorescente rossa. Il tumore rilascia fattori neoangiogenetici, i quali, in seguito all’impianto sottocute, inducono l’ospite a produrre vasi sanguigni, che per l’appunto vediamo verdi. Questa strategia ci permette di monitorare la neoangiogenesi in vivo nel corso della progressione tumorale.

*Clarity* è una tecnica di *imaging all-brain* che permette di analizzare segnali fluorescenti in un’intelaiatura 3D, dopo aver reso trasparente il cervello (clarizzazione). Osservando al microscopio ottico confocale, si possono studiare i singoli neuroni, analizzandone i processi singolari, nell’intelaiatura tridimensionale invece che in sezioni e successive ricostruzioni. Grazie a plasmidi ricombinanti soggetti a vari tipi di ricombinazione, diversi neuroni possono essere colorati con colori diversi, trattamento spesso associato al *Clarity* e noto come *Brainbow*, che ci offre un *imaging* a risoluzione straordinaria.

L’analisi dei cromosomi condensati viene svolta utilizzando il propidio, molecola fluorescente che si intercala negli acidi nucleici e dà fluorescenza rossa quando eccitata da opportune lunghezze d’onda.

Il *live tracking* consente di osservare fenomeni dinamici, come il moto d’un virus in una cellula. Il virione di HIV entra dal citoplasma nel nucleo e da lì cerca un sito d’integrazione adeguato. Dopodiché, il virione nel genoma si comporta come un qualunque gene dell’ospite e non è estraibile: si punta ad evitarne l’ingresso nel nucleo. Le traiettorie delle particelle possono essere tracciate nel tempo. Questo ci aiuta a studiare i movimenti delle stesse: diffusione o trasporto attivo? Quali molecole sono coinvolte? In caso di trasporto attivo sul citoscheletro, come può realizzarsi? Ad esempio, se un virione si muove su chinesina, si punterà a sviluppare efficienti inibitori di tale molecola.

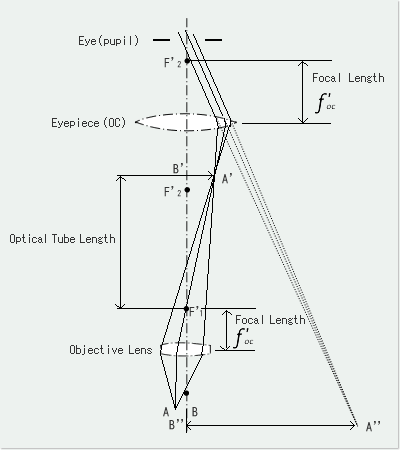
La fluorescenza è affetta da problemi: può scomparire (in gergo, *bleacha*), cioè viene degradata perché troppo colpita o va fuori fuoco, determinando la perdita del segnale.

Sensori basati sulla fluorescenza possono monitorare la concentrazione ionica in certi comparti, ad esempio quelle di H+ e Cl-. Nei fenomeni di epilessia, i cambiamenti di concentrazione di Cl- hanno una certa rilevanza. Per quanto riguarda il pH, si usa in genere un fluoroforo specifico.

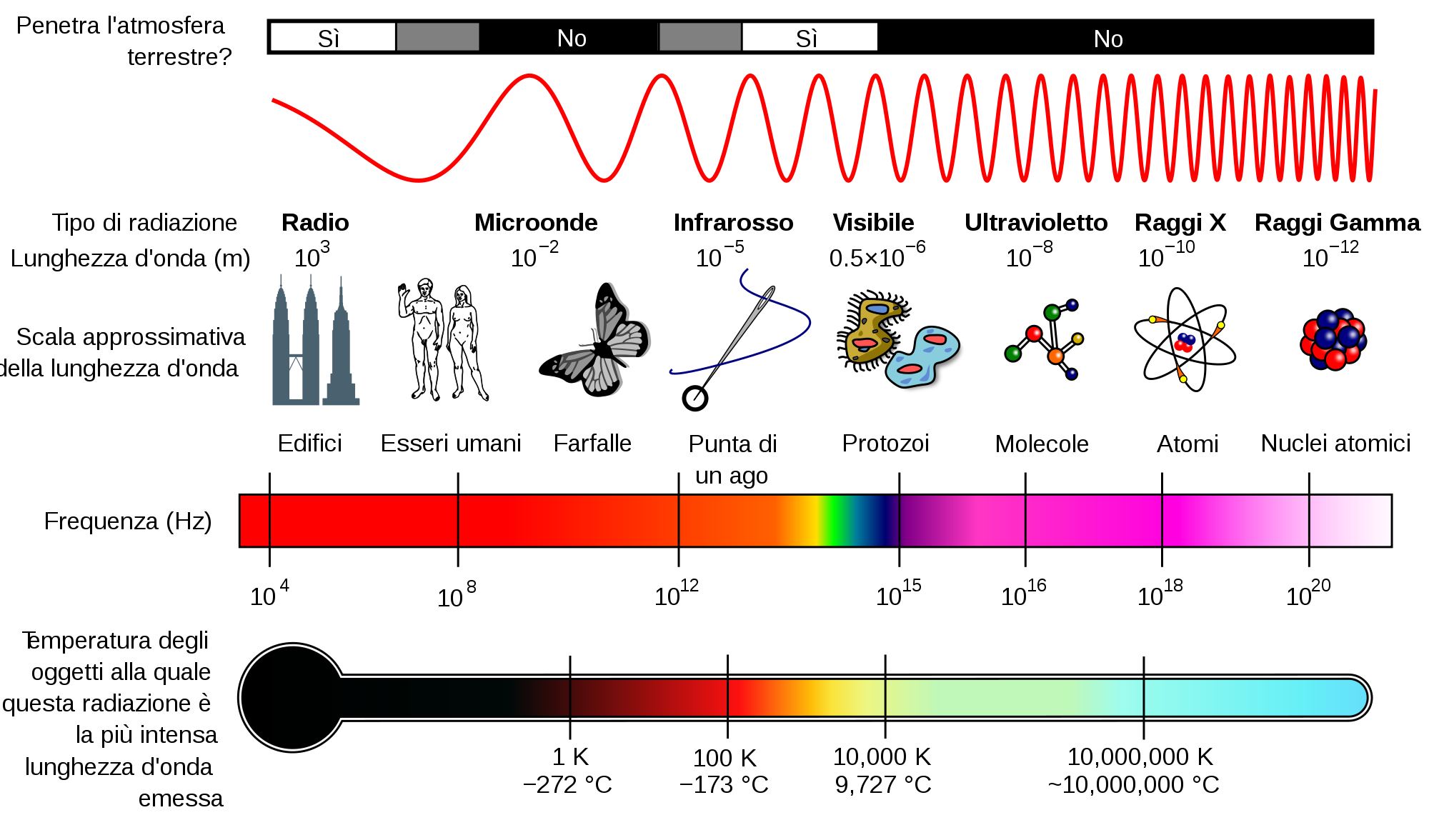
**Il microscopio ottico.**

L’occhio umano ha una risoluzione di circa 2 mm, il microscopio ottico di circa 20 micrometri (diametro della cellula, di cui vediamo membrana, nucleo, zone più o meno compatte e mitocondri, di circa 0.5 micrometri in realtà). Per il microscopio elettronico, invece, la risoluzione arriva all’atomo, fino a circa 0.2 nm.

Il microscopio ottico è l’evoluzione del telescopio galileiano. Si basa sull’utilizzo di due lenti. Può essere semplice (una lente circolare spessa, che ingrandisce 100/150x, utilizzato una volta dai mercanti di tessuti per l’analisi della qualità) oppure composto (con obiettivo ed oculare. L’obiettivo è vicino all’oggetto, l’oculare all’occhio, ai margini del tubo ottico, chiuso, che nel microscopio è il cammino ottico, non lineare). L’obiettivo rende un’immagine reale, capovolta ed ingrandita, che cade in un punto specifico del cammino ottico, il fuoco dell’oculare, che ingrandisce e restituisce un’immagine virtuale, ingrandita e capovolta. Il tavolino è detto stativo e vi appoggiamo il campione, che può essere fissato (cellula immobilizzata) o cellule vive in piastra di coltura. Il microscopio diritto utilizza un obiettivo sopra il campione e viene sfruttato per l’*imaging* di campioni fissati sul vetrino, mentre il microscopio invertito pone l’obiettivo sotto il campione: possiamo osservare cellule vive mettendo una piastra sullo stativo. Guardare cellule vive con un microscopio diritto si può fare una volta sola e le cellule vengono buttate, poiché la sterilità viene persa.



Il microscopio ottico utilizza come sorgente la luce visibile, piccola finestra dello spettro elettromagnetico, tra 400 e 750-80 nm, ovvero tra UV e infrarosso.



La risoluzione dipende dall’intensità luminosa. Il picco di giorno è attorno a 550 nm, giallo-verde, mentre di sera la massima sensibilità è spostata verso il blu, 507 nm. La luce è costituita da un treno di onde che possono interagire fra loro dando luogo a fenomeni d’interferenza. Se due onde sono in fase, l’interferenza è costruttiva, con la sommazione picchi-picchi e cavi-cavi. Treni d’onde fuori fase possono, invece, subire anche fenomeni d’interferenza d’altro tipo, ad esempio distruttiva (cavi-picchi).

L’energia dei fotoni di luce è proporzionale alla frequenza, quindi al reciproco della lunghezza d’onda. **E = hf**. Verso gli UV, maggior frequenza, maggior energia. Gli UV sono usati dal confocale. Verso l’infrarosso, ad energia più moderata, che non degrada i tessuti vivi, si possono svolgere analisi multifotone su cavie vive. Il limite di risoluzione di un microscopio è stabilito dalla lunghezza d’onda della luce che esso utilizza. Il limite pratico di risoluzione di un microscopio ottico è 400 nm.

L’**ingrandimento** è dato dal prodotto di ingrandimento dell’oculare ed ingrandimento dell’obiettivo, e corrisponde al rapporto dimensionale fra immagine e oggetto reale.

Il **potere risolutivo** fa riferimento alla distanza minima fra due punti che lo strumento può rivelare come distinti, cioè risolverli: il limite di risoluzione. Oggetti distanti più di tale limite non li possiamo percepire come distinti.

La **diffrazione** consiste in un fenomeno fisico d’interferenza che avviene quando un’onda incontra un ostacolo od una fenditura. L’onda, nello spazio oltre l’ostacolo, si propaga in direzione diversa da quella dell’onda incidente. L’obiettivo lavora da fenditura. Le onde deviate si possono sovrapporre dopo aver percorso cammini ottici diversi, originando figure di diffrazione. **Θ** è la distanza angolare tra il picco massimo centrale ed un generico punto P dello schermo. *Point-spread functions* individuano il massimo luminoso e le distanze fra minimi, che sono di un certo tipo. Indica quanto è più rilevante il fenomeno della diffrazione. **Θ=1.22 λ/d**, dove d è il diametro della fenditura utilizzata. L’effetto è tanto più rilevante quanto più prossime sono le dimensioni dell’ostacolo/fenditura e della lunghezza d’onda della luce incidente. La diffrazione è la causa del *blurring*, effetto che confonde il segnale, dando immagini non risolte. Se vogliamo identificare due oggetti S1 e S2 posti a distanza angolare α, le due *point spread functions* non devono avere una sovrapposizione fra i massimi, caso in cui S1 e S2 appaiono un oggetto solo. Per α=2 **Θ**, le sorgenti sono ben distinte; per α= **Θ**, vi è parziale sovrapposizione, mentre per α=**Θ**/2 non riesco a risolvere e mi inganno, ad esempio credendo che un fascio di microtubuli siano un singolo microtubulo. Il **criterio di Rayleigh** afferma che due sorgenti sono risolte quando il massimo della figura di diffrazione dell’una cade almeno nel primo minimo dell’altra: α>= **Θ**. Definiamo la risoluzione R secondo la **legge di Abbe**, in cui n è l’indice di rifrazione e 0.61 un parametro di normalizzazione. **R=0.61\* λ/(n\*sin)**. NA=n\*sinα è l’**apertura numerica**, parametro caratterizzante ciascun obiettivo. Misura la larghezza di entrata del microscopio in rapporto con la sua distanza dall’oggetto. Α è l’angolo sotteso dalla distanza di lavoro dal campione. Alta apertura numerica significa **buona risoluzione (R piccolo).** Tuttavia, aumentare la distanza di lavoro causa il fatto che l’*imaging* si faccia su poche cellule alla volta: la panoramica è ristretta, progettando un esperimento di *imaging* occorre fare scelte. Per una buona risoluzione si può anche abbassare **λ**, oppure alzare n, immergendo un preparato di cellule morte e fissate in un olio d’opportuna composizione e immergendo anche l’obiettivo (setup assai limitante). Per *slice* di tessuti vivi si usano obiettivi ad aria od ad acqua. Per microscopi invertiti ed osservazione di cellule vive in piastra, possiamo mettere olio tra la piastra e la lente, così la piastra di plastica non rifrange. Il disco di Airy è una rappresentazione 3D di una funzione, i cui picchi affilati corrispondono alle porzioni ben risolte, ad un *imaging* più puntuale.

Quattro tipi di microscopio ottico vengono utilizzati. In stanza cellule, per occhiate rapide, si utilizza la microscopia su campo chiaro (***Brightfield***), la cui immagine non ha però una risoluzione elevata, ma consente semplicemente di dare un occhio rapido alla morfologia (i.e. stato differenziativo e di salute) della cellula. Una lampada a luce bianca spara tutte le lunghezze d’onda nel visibile e questa tecnica ci permette di vedere non più di membrana, citoplasma e nucleo. Sempre per occhiate rapide, la microscopia su campo scuro (***Darkfield***) pone uno schermo nero fra condensatore ed oggetto: la luce non colpisce l’occhio, ma aggira lo schermo nero e colpendo di lato il campione entra nel cammino ottico. La cellule riflette la luce alle sue estremità, le quali appaiono ben profilate sul campo nero. Più sofisticata è la **microscopia ad interferenza** o contrasto di fase. Il citoplasma appare un gel sottile, allungato sulla plastica, il nucleo sferoidale ha una viscosità superiore suggerita dall’immagine stessa. La luce passa attraverso comparti cellulari con n diverso (maggiore nel nucleo che nel citoplasma); il ritardo accumulato dalla luce che viaggia nel nucleo viene rilevato ed elaborato matematicamente: l’immagine ottenuta è già un’elaborazione. Ad ogni modo, l’ottica non ci permette di vedere molecole, ma ci offre soltanto studi superficiali. Per gli studi su dinamica delle proteine, *trafficking*, modificazioni del citoscheletro nel ciclo cellulare e via dicendo, utilizziamo il microscopio a fluorescenza.

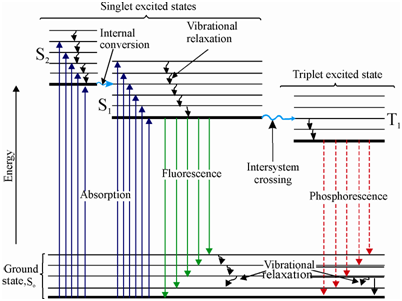
**La fluorescenza**

La fluorescenza è un segnale puntiforme, molto luminoso, duraturo e preciso. Si tratta di un fenomeno fisico proprio soltanto di alcune molecole, come etidio bromuro, fluoresceina, coloranti ***Alexa Fluor***.

*Alexa Fluor secondary antibody selection table*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | [Alexa Fluor 350](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+350) |  | [Alexa Fluor 546](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+546) |  | [Alexa Fluor 647](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+647) |
|  | [Alexa Fluor 405](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+405) |  | [Alexa Fluor 555](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+555) |  | [Alexa Fluor 660](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+660) |
|  | [Alexa Fluor 430](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+430) |  | [Alexa Fluor 568](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+568) |  | [Alexa Fluor 680](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+680) |
|  | [Alexa Fluor 488](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+488) |  | [Alexa Fluor 594](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+594) |  | [Alexa Fluor 700](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+700) |
|  | [Alexa Fluor 514](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+514) |  | [Alexa Fluor 633](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+633) |  | [Alexa Fluor 750](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+750) |
|  | [Alexa Fluor 532](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+532) |  | [Alexa Fluor 635](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+635) |  | [Alexa Fluor 790](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/antibody/sub-type/antibody_secondary/keyword/alexa+790) |

Si ha fluorescenza quando un oggetto suscettibile assorbe determinate lunghezze d’onda e passa da uno stato basale ad uno eccitato, che dura 10-15/10-9 s. Durante la permanenza in tale stato, la molecola perde energia (vibrazione, calore), poi ricade allo stato basale ed emette luce (fluorescenza). Ogni molecola assorbe ad una lunghezza d’onda specifica e riemette ad un’altra lunghezza d’onda specifica, diversa dalla prima. Il processo di assorbimento ed emissione è descritto dal **diagramma di Jablonski**.



L’emissione avviene a lunghezza d’onda superiore alla captazione perché una quota energetica è andata perduta. Ad esempio, eccito GFP a 488 nm e raccolgo a 520 nm; eccito FITC a 500 nm e raccolgo a 530 nm, eccito DAPI a 380 nm (UV) e raccolgo a 460 nm. Un’illuminazione troppo intensa e/o prolungata distrugge i fluorofori (***Photobleaching***). Ci sono applicazioni nelle quali questo fenomeno viene anzi sfruttato: ad esempio, marcando l’actina con un fluoroforo verde si illumina a 488 nm e si raccoglie a 512 nm un buon segnale; se si illumina con un’intensità luminosa elevata per 20 s di seguito, il fluoroforo si degrada e bleacha.

Ciascun fluoroforo ha due tipicità: lambda di eccitazione (**λecc**) e lambda di emissione (**λem**), per le quali si ha il massimo dell’intensità luminosa; in realtà, i fluorofori sono caratterizzati da spettri continui di eccitazione ed emissione, in genere con forma di campana. Per avere il massimo di eccitazione o di emissione conviene puntare al picco dello spettro. La scelta dei fluorofori dev’essere ovviamente meditata: mentre *Alexa Fluor* e luciferasi hanno spettri ben distinti, la ficoeritrina ha picchi vicini e si rischia il *cross-talk*, ovvero la raccolta di segnali aspecifici. Quando si usano fluorofori multipli, li stessi si scelgono in modo da evitare sovrapposizioni fra picchi.

**Il microscopio a fluorescenza**

Prendiamo, ad esempio, un vetrino con cellule esprimenti FITC (fluoresceina). Si eccita a 490 nm e si raccoglie a 530 nm. Il microscopio a fluorescenza usa una lampada bianca che emette tutte le lunghezze d’onda nel visibile, e frappone fra il cammino ottico e tale fonte luminosa il primo filtro barriera, il quale lascia passare solo la luce blu che va da 450 nm a 490 nm, restringendo il *range* di molecole eccitabili a quello che ci interessa. Convogliato sull’obiettivo, il fascio luminoso eccita FITC; la luce emessa entra nel cammino ottico ed incontra un sistema di specchi dicromici, che serve per splittare i raggi. Raccogliamo a 530 nm, deducendo che la luce sotto i 500 nm è rumore di fondo; gli specchi vengono inclinati in modo da riflettere tale rumore. Le lunghezze d’onda superiori passano attraverso l’oculare. Il secondo filtro barriera permette di settare il *range* di lunghezze d’onda da rendere osservabili, ad esempio 520-60 nm, al cui interno di trova il picco d’emissione. Le lampade al mercurio sono costituite da due elettrodi in un tubo di vetro, con vapori di mercurio; la luce viene prodotta dove il mercurio viene ionizzato. Emettono tutte le lunghezze d’onda del visibile. Possiamo utilizzare filtri, come vetri colorati, o più sofisticati. Essi selezionano range di lambda, rimuovendo quelle inutili che degradano e sfuocano l’immagine. Ad esempio, marcando di verde la tubulina e di rosso l’actina, si eccitano i due fluorofori e si tengono solo le lunghezze d’onda fra 510 e 620 nm, entro cui sono contenuti i picchi, grazie a filtri passa-banda.

Con un microscopio a fluorescenza semplice si possono usare un massimo di quattro fluorofori contestualmente (sovrapposizione picchi, *cross-talk*, sapere utilizzare adeguatamente il filtro passa-banda, …). DAPI per il nucleo, eccitato con UV. Per motivi sperimentali, spesso si è legati a certi fluorofori. Per attività più sofisticate, si usa il confocale, che eccita con un laser su una lunghezza d’onda unica, con elevata precisione.

Curiosità: spesso si usano le *Hela* come primo step sperimentale, poiché hanno grande quantità di organelli ecc interni, ad esempio un numero enorme di microtubuli sui quali lasciar scorrere vescicole fluorescenti prima di testarle in un neurone per valutare la fattibilità dell’approccio sperimentale.

**Lezione II**

**Sonde fluorescenti. Tecniche di microscopia avanzata. FPs.**

Tra le molecole fluorescenti, si annoverano sonde a RNA, a DNA, anticorpi coniugati, nanoparticelle fluorescenti, proteine fluorescenti.

**DNA e RNA**.

Il design delle *probes* prevede il rispetto di regole precise. Le sonde di DNA per visualizzare geni hanno lunghezze tipiche di 500-1000 bp (classicamente 500), che ibridano alla *coding region* del gene da identificare. Questa lunghezza della sonda garantisce un'elevata specificità. Per visualizzare sequenze più corte, come mRNA, invece, si sfruttano *probes* oligonucleotidiche di 18-30 bp. La seconda regola fa riferimento al contenuto in GC, che di solito varia in un range fra 40% e 50%. La cellula viene trattata, la membrana risulta permeabilizzata, grazie a *buffer* contenenti tamponi con precise molarità e forza ionica, grazie a cui la sonda può penetrare nella cellula e viaggiare fino al *target*. A temperature alte, l'appaiamento è specifico, mentre a temperature basse la sonda è meno rilassata e si lega più aspecificamente. Con un contenuto in GC pari a circa il 50% possiamo usare una temperatura di 56 °C. La sonda viene messa nel tampone, il tampone è portato a temperatura d'ibridizzazione e le cellule vengono immesse. L'ibridazione dura da due a sedici ore (*overnight*). Successivamente si lava con un adeguato *buffer*, n molecole di sonda sono entrate nella cellula e si devono rimuovere quelle non appaiate o non appaiate correttamente. Si lavora ancora a temperatura elevata e rimane attaccata la sonda solo nel punto corretto. In passato, la marcatura veniva svolta con **isotopi** **radioattivi**, ad esempio di fosfato, zolfo e iodio, seguita da autoradiografia. Il vetrino con cellule ibridate veniva spostato su una lastra autoradiografica e dopo un'*overnight* si otteneva un'immagine buona. Oggi, per sicurezza, si preferisce evitare il radioattivo e si sfruttano maggiormente **chemioluminescenza** e **fluorescenza**. Nel caso della chemioluminescenza, si uniscono alla sonda enzimi in grado di catalizzare una reazione che libera prodotti luminosi e rilevabili. Si lavora similmente anche con enzimi che liberano prodotti non luminosi, ma evidenziabili. Tra gli enzimi, HRP (perossidasi alcalina), DIG, biotina. HRP rilascia Pi nel punto in cui la sonda a cui è legato si annila al *target* e l'accumulo di Pi è rilevabile mediante coloranti. Tuttavia, il rilascio non è puntiforme, ma il Pi si diffonde attorno al probe: visualizziamo il gene, ma la risoluzione non è elevata. Se vogliamo identificare una coppia di geni vicini, la risoluzione non è adeguata. Questo non accade con la fluorescenza. L'ibridazione può avvenire su diversi substrati: immobilizzando le sequenze di DNA o RNA su substrati solidi come silicio o silicone o *beads* metalliche o piastre di nitrocellulosa. Le *probes* sono nel *buffer* di soluzione. Questo viene aggiunto sulla membrana od il supporto, seguono step di lavaggio e *detection* con il microscopio a fluorescenza. Esempio sono i *microarray*. Le operazioni possono altrimenti venir svolte in soluzione. La sequenza di DNA si trova in soluzione in un *eppendorf*, i lavaggi si effettuano grazie a vari step con centrifugazioni con le quali la sonda rimane ibridata al *target* nel *pellet* (si elimina sequenzialmente il surnatante). In questi casi, rileviamo presenza/mancanza del *target* d'ibridazione. Negli esperimenti in situ, invece, vediamo la localizzazione. In questi esperimenti, le sonde vengono ottimizzate per tentativi, secondo %GC diverse, specificità diversa, e cambiando T, concentrazione della sonda, forza ionica del *buffer*, fino alla soluzione ottimale in cui siamo certi del riconoscimento. In un embrione di *Drosophila* vengono aggiunte quattro sonde di colori diversi. La marcatura fluorescente permette di risolvere bene anche segnali vicini. Si visualizzano trascritti nascenti distanti 20 Kbp con buona risoluzione. Si possono usare sonde multiple per lo stesso gene con ibridazioni sequenziali, ibridando in punti diversi dello stesso gene, o tutte assieme in un unico tampone. Grazie all'uso di **bersagli diversi nella *coding region*** di un dato gene, possiamo ottenere con certezza la sua localizzazione cromosomica. Per evitare appaiamenti aspecifici, nel tampone si mettono anche sequenze (sperma di salmone diluito al mix, che fluidifica, va a mascherare gli appaiamenti aspecifici perché ingombra). Si analizzano con una **FISH** **cellule normali e cellule tumorali**. Si ottengono segnali di tipo diverso: in alcune cellule i segnali rosso e verde sono separati, in altre colocalizzano, dando un segnale bianco e molto luminoso. In cellule normali, i geni marcati distano infatti poche kb e vengono colocalizzati. Nelle cellule tumorali, invece, una traslocazione cromosomica sposta uno dei due geni sul braccio d'un cromosoma diverso, cosicché i segnali appaiono splittati. Questo aiuta la *detection* di cellule tumorali. Con DNA *probes* possiamo anche localizzare sequenze *non-coding*, eterocromatina, promotori: i *buffer* portano via una parte degli istoni e possiamo risolvere anche le aree estremamente compattate, come le STR.

***Quantum dots****.*

Sono *cluster* di atomi, dell'ordine di 103, con caratteristiche peculiari: un *core* centrale ed uno *shell* esterno. Sono semiconduttori. Il *core* è in genere di cadmio o selenide, lo *shell* di nanometalli semiconduttori. I QD non sono idrosolubili, perciò vengono rivestiti da un *coating* che li rende meno idrofobici ed a cui vengono unite molecole funzionali, ad esempio per la visualizzazione con la microscopia a fluorescenza. I QD possono diventare in sé fluorescenti, ma possiamo anche associarli a biotina e streptavidina, che interagiranno tenacemente fra loro in presenza ad esempio delle proteina d'interesse. I QD hanno dimensioni di 10-20 nm, simile a GFP, e sono associabili a proteine. Sono molto più piccoli d'un virus. La scelta della modalità di *imaging* va meditata: ad esempio, per l'*imaging* di un enzima un QD è troppo grosso: avendo dimensioni comparabili, esso potrebbe inficiare le caratteristiche catalitiche dell'enzima. Se l'oggetto da ricercare è invece molto più grande o ha un terminale poco attivi, posso associarvi un QD per l'*imaging*. I QD emettono luce a diversa lunghezza d'onda a seconda delle loro dimensioni quando eccitati con UV. I più voluminosi emettono nel rosso, quelli più piccoli nel blu-verde. Lo spettro di assorbimento è il medesimo per tutti, cambia quello di emissione in base alle dimensioni del cluster di atomi. Gli UV hanno alta energia. Usiamo QD quando sappiamo che l'eccitazione con gli UV non è troppo citotossica. In genere si usano per campioni fissati, per il *live tracking* a scansioni non frequenti. I QD non sono proteine ricombinanti, ma vanno forniti dall'esterno della cellula e si deve riuscire a far loro attraversare la membrana plasmatica. Si attaccano perciò allo *shell* delle sequenze aminoacidiche idrofiliche, come antennapedia o *tactil-heaven*(?) di HIV, che sono *penetrating peptides* e si portano dietro i QD. L'interiorizzazione deve interessare un numero sufficiente di QD. Sui fissati è relativamente più facile, permeabilizzando la membrana con *buffer*. Il vantaggio dei QD rispetto ai fluorofori sta nel fatto che difficilmente *bleachano*. Alexa 488 che marca un nucleo *bleacha* in 120 secondi, a fronte dei quali i microtubuli marcati di rosso con QD sono ancora luminosissimi. I QD hanno numerosi pro: il controllo della lunghezza d'onda emessa, l'*imaging* a più colori con QD di dimensioni diverse, tutti vengono eccitati con la stessa lunghezza d'onda e basta una sola lampada UV, sono molto fotostabili e molto luminosi. I contro includono il fatto che non sono prodotti dalla cellula ma devono essere fatti entrare con un *delivery* non immediato, il loro tempo di vita è lungo, non si biodegradano: al termine dell'acquisizione il campione è compromesso e va buttato.

**Anticorpi coniugati.**

Possono essere primari, ovvero riconoscono il proprio antigene, ad esempio immobilizzato su supporto solido, e sono già essi stessi fluorescenti. Con lavaggi e ibridazioni, l'*imaging* è diretto. Sono Abs molto costosi, dell'ordine di migliaia di euro. Si preferisce perciò un'immunofluorescenza indiretta a due passaggi: *primary* Ab non fluorescente, viene lavato per eliminare il non legato, si usa un *secondary* Ab che lega le regioni costanti di qualsiasi *primary* Ab e più si legano più c'è segnale. Per più antigeni, si possono somministrare anticorpi primari per il primo antigene (es. *Anti-rabbit*), lavare e somministrare secondari con fluorofori rossi, ad esempio. Si lava di nuovo, si somministra l'anticorpo per il secondo antigene, ad esempio un *Anti-mouse*, le cui regioni costanti sono riconosciute da anticorpi secondari con fluorofori verdi. Infatti, le regioni costanti sono specie-specifiche.

**Sistema bi-arsenico.**

Si basa sull'affinità dell'arsenico per oli. Molecole FLAsH e RAsH. Contengono molecole di arsenico, che divengono fluorescenti quando l'arsenico va a complessare quattro cisteine della sequenza Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys nella proteina d'interesse. La coordinazione determina un cambiamento conformazionale che scatena la fluorescenza. La sequenza è rara e le proteine possono essere identificate in cellule ricombinanti grazie all'aggiunta del *tag* sopra descritto al C o all'N-terminale. *Recombination & ligation* permettono di preparare costrutti ricombinanti con la *coding region* per la proteina con aggiunto il *tag*. L'identificazione è dunque riservata a proteine non endogene, bensì ingegnerizzate. Si può comunque svolgere sulle proteine di cui sia noto il gene codificante per semplice clonaggio, ad esempio per monitorare la localizzazione subcellulare d'una proteina pre e post trattamento con inibitori e droghe varie. Se la sequenza non è nota, è invece opportuno usare anticorpi primari per la proteina con secondari marcati, trovando la localizzazione de novo. Il sistema bi-arsenico è molto utilizzato perché costituito da molecole piccole e dalle quali la membrana è permeabile, quindi è sfruttato per il *live* *imaging*, ad esempio del moto di un virus in una cellula.

**Tecniche di *imaging* avanzate.**

Per campioni di cellule adese su vetrino o *slice* di tessuti tagliate al microtomo, che non sono mai più sottili di 5 micrometri, lo spessore del campione altera la visualizzazione: eccitiamo tutte le molecole fluorescenti e riceviamo luce fuori fuoco, indesiderata, che sporca l'immagine finale. Il problema viene risolto con la manipolazione a posteriori o l'approccio ottico. A posteriori ci si affida alla manipolazione computazionale con ***software* di deconvoluzione**. Acquisiamo immagini sfuocate, con tanta luce da piani fuori fuoco. Gli algoritmi identificano i *pixel* più fluorescenti, selezionandoli come segnale vero, mentre quelli meno luminosi sono considerati rumore. L'algoritmo è reiterato per centinaia di volte fino ad un'immagine nitida. La luce fuori fuoco proviene dagli strati sottostanti, ma non solo: in una cellula, la luce illumina un cono e non solo il piano di fuoco con il fluoroforo d'interesse. Dunque, la luce colpisce anche i fluorofori su piani sovrastanti o sottostanti. Si usano questi software quando non si ha a disposizione un microscopio confocale.

Il **microscopio confocale** non raccoglie la luce fuori fuoco, in virtù di due grandi differenze rispetto all'ottico: al posto di una lampada a luce bianca, il confocale usa un laser, che emette un fascio di luce coerente ad una lunghezza d'onda ben determinata. Questo permette di restringere il numero di oggetti eccitati nel campione. Il microscopio ottico, inoltre, emette la luce attraverso un condensatore e questa colpisce tutti i fluorofori nel cono di luce, su piani diversi; nel confocale, invece, la luce passa attraverso un forellino, che limita la quantità di fotoni nel cammino ottico. Eccitati i fluorofori, la luce emessa dal campione non può raggiungere l'oculare in ogni direzione, ma solo lungo quella dei fluorofori del piano di fuoco, perché tra campione ed oculare si trova un *pinhole* che è allineato all'altro forellino: solo la luce dei fluorofori del piano di fuoco attraversa il *pinhole* e raggiunge l'oculare per formare l'immagine. La luce è quindi manipolata prima dell'acquisizione e la qualità è elevata. Il confocale ricostruisce l'immagine punto a punto con un software, che esplora punto a punto il campione e lo ricostruisce. In alternativa, alcuni confocali lavorano per linea al posto che per punto, con una ricostruzione più rapida ma leggermente meno risolta. La scelta dipende dell'esperimento: se è dinamico, con eventi cellulari in millisecondi, la lettura rapida a linee è conveniente. Se gli eventi sono rapidissimi, come l'internalizzazione di Ca2+ a livello delle spine neurali, si preferisce la lettura rapida del microscopio a fluorescenza, seguita da deconvoluzione.   
Un'ulteriore evoluzione del confocale consiste nell'inserimento di uno *spinning disk* posto poco prima della lente, con un *array* di *pinholes* che ruota sul disco velocemente e raccoglie luce da ogni singolo *hole*: l'immagine è raccolta in modo molto rapido, potendo seguire cinetiche cellulari molto veloci. Costa molto: un microscopio a fluorescenza sta su 10-30.000 euro, un confocale buono senza troppi accessori su 200-300.000 euro, uno con *detector* sensibili su 500-600.000 euro. Le sorgenti sono laser di vario tipo a seconda della lunghezza d'onda. Gli argon laser hanno a disposizione righe tra 400 e 500 nm. Elio-neon laser hanno righe verso il rosso (543-633 nm). L'*imaging* contestuale di più fluorofori è possibile senza particolare *crosstalk* in eccitazione. Acquisizioni sequenziali e ricostruzione dell'immagine debellano il problema.   
Il confocale esplora il campione e ricostruisce la sezione ottica. Sono possibili anche acquisizioni in z, cioè in profondità. Analizza varie sezioni ottiche, le impila fra loro (*z-stack*) e, assemblando tutte le *z-stack*, ottiene l'immagine con risoluzione ottima. La deconvoluzione matematica di un microscopio ottico copre al massimo 40 micrometri in z, cioè una o due cellule. Il confocale ricostruisce invece l'immagine in z fino alla profondità di 150 micrometri, comunque ancora piccola.

L'evoluzione del confocale è il **microscopio multifotone**, o a due fotoni. Questa tecnica ci consente un *imaging* di un tessuto spesso fino a 0,5 millimetri e permette l'*imaging* su cavie vive. Nel microscopio a due fotoni cambia il momento dell'eccitazione, il primo fotone a bassa energia colpisce il fluoroforo e lo porta al primo livello di eccitazione virtuale; per passare allo stato eccitato, il fluoroforo dev'essere colpito da un secondo fotone, altrimenti decade allo stato fondamentale senza emettere fluorescenza. Esistono anche sistemi a tre fotoni che lavorano similmente. Il primo fotone colpisce il fluoroforo sul piano di fuoco e può colpire erroneamente anche oggetti fuori dal piano di fuoco. Il secondo fotone è anch'esso diretto sul piano di fuoco. È assai improbabile che un fluoroforo non sul piano di fuoco venga colpito da ben due fotoni accidentalmente ed emetta fluorescenza, mentre è probabile che ciò avvenga per i fluorofori sul piano di fuoco. L'energia è bassa: si usano fotoni con lunghezza d'onda tra 700 e 1000 nm, in genere 780 nm, nell'infrarosso. Un laser titanio zaffiro con frequenza bassa, 70-100 MHz è comunemente scelto. I vantaggi sono molteplici: *background* di rumore molto ridotto, ridotto *photobleaching* perché l'energia è bassa e per lo stesso motivo bassa citotossicità, che permettono *imaging* di ampia durata, al fianco di grande penetrazione nel campione, fino a 0,5 mm. Il multifotone ha uno stativo che può ospitare piastre o tessuti. Per l'*imaging* in vivo con la cavia, lo stage ospita supporti appositi, che controllano i parametri vitali della cavia, come ossigenazione e movimenti. La cavia dev'essere precedentemente preparata mediante intervento chirurgico applicando **finestre croniche**, che scoperchiano la zona interessante, come l'orecchio del coniglio o lo scalpo del topo, che si sigillano ermeticamente con una finestra cronica di vetro con bordi particolari che mantengono sterilità, pressione ed ossigenazione. L'animale può convivere con queste strutture per diversi mesi, consentendoci, ad esempio, di monitorare il decorso d'una patologia a livello di singole cellule. Per patologie come quelle al fegato ovviamente non si può mettere una finestra cronica e la cavia dev'essere operata. Con il multifotone e le finestre croniche possiamo fare il live *imaging* del calcio nelle spine dendritiche di una cavia trattata. La cavia viene stimolata facendole vedere oggetti, come semplici righe. Le sinapsi vengono attivate e si registra la presenza di calcio a livello delle spine dendritiche. Sensori per il calcio come calmodulina-derivati o certi *dye* emettono fluorescenza quando il calcio è presente, dato che il calcio funge da effettore allosterico. Il rilevatore può essere inserito con adenovirus o con l'alimentazione se adeguato e non c'è bisogno di cavie transgeniche.

L'**illuminazione strutturata** combina manipolazione ottica e computazionale. La luce fuori fuoco è usata dal sistema per pulire l'immagine. In acquisizione, una griglia viene utilizzata; la stessa è ruotata in una seconda rotazione di 2pi/3 e di altri 2pi/3 per la terza rilevazione. A posteriori avviene la sovrapposizione ed un software misura la somma dei contenuti e la luce fuori fuoco viene sottratta dal campione. La rotazione è un compromesso di rapidità di acquisizione e pulizia dell'immagine.

Condurre esperimenti su cavie è complicato a causa della legge. Il progetto, lo scopo, la motivazione per condurre esperimenti in vivo, il livello di sofferenza per l'animale, il numero di cavie sperimentali devono essere comunicati a priori in una proposta, che può venir respinta. Gli operatori devono avere una formazione adeguata.

**Le *fluorescent proteins*.**

**GFP.** Scoperta pochi anni fa, nella medusa *Aequorea victoria*. È fluorescente in conseguenza alla sua architettura. Ha un beta barile di undici *beta strands* con forma di lattina, al cui interno si trova un cromoforo che la rende fluorescente. Il cromoforo è costituito da tre aminoacidi (Ser65, Tyr96, Gly67) protetti dal *beta barrel*. Un mutato *beta barrel* non protegge più i tre aminoacidi interni e la molecola non fluoresce più. La proteina pesa 27kDa, è abbastanza piccola (230 aa), ed è interessante da fondere a proteine da monitorare. Appena tradotta non è fluorescente, ma lo diventa dopo qualche ora in seguito alla maturazione del cromoforo: attacco nucleofilo di Gly su Ser, ciclizzazione, perdita di una molecola d'acqua, ossidazione della glicina. La maturazione è un processo spontaneo e lento.   
Nella medusa, la maturazione avviene a 25-28 °C ed inoltre tra gli organismi si registra una certa variabilità nella prevalenza di certi codoni su altri sinonimi, rispecchiata dall'abbondanza differenziale di tRNA. Quindi, la sequenza di GFP dev'essere notevolmente moddata per garantirne l'espressione adeguata in cellule di umani. La sequenza è modificata anche per farla fluorescere a lunghezze d'onda comode, farla maturare rapidamente, conferirle proprietà nuove. Per gli studi su GFP, è stato assegnato un Nobel, a Shimonura, Chalfie, Tsien, nel 2008. Shimomura ha identificato GFP e la sua *coding region*. Chalfie ha condotto i primi studi su batteri, in *E. coli*. Tsien ha svolto un sofisticato lavoro di mutagenesi, producendo varianti variopinte di GFP e migliorandone le peculiarità. Le varianti sono note come FPs e vanno dal blu al rosso. Le FPs hanno un fluoroforo che matura spontaneamente e molto stabile a pH e temperature decentemente variabili, con fluorescenza molto intensa. Le sequenze sono ben caratterizzate, sappiamo quali punti mutare e quali no, riusciamo ad esprimerle in eucarioti e procarioti. Una mutazione puntiforme shifta la maturazione da 28 °C a 37 °C (Phe63 -> Leu). I codoni sono stati ottimizzati per i tRNA di mammifero. 190 mutazioni silenti hanno migliorato la luminosità. La sequenza di Kozak è stata introdotta al sito d'inizio della traduzione per migliorarla e migliorare il legame al ribosoma. Una mutazione puntiforme ha shiftato il picco d'eccitazione da 400 a 488 nm, così non usiamo UV. Alcuni difetti comunque permangono: la proteina è ancora abbastanza ingombrante, sensibile al pH (eg. Lisosomi: si spegne perché l'elevata concentrazione di H+ modifica la conformazione del beta barile, che non protegge più bene), tende ad oligomerizzare, sparando troppa luce. L’utilizzo delle **FPs in cellule vive** consente lo studio dell’espressione genica, la localizzazione delle proteine, **lo studio del** ***folding*** e della degradazione, e la costruzione di sensori. Per quanto riguarda lo studio dell’espressione genica, possiamo capire se un promotore è costitutivo o attivabile analizzando il pattern d’espressione di una FP posta sotto il suo controllo. Topi GFP, come accennato alla lezione I, permettono lo studio dei melanomi e della neoangiogenesi. Le FPs permettono anche lo studio della traslocazione delle proteine; ad esempio, marcando il RE ne possiamo visualizzare i movimenti. Anche gli aspetti metabolici e la fissione dei mitocondri possono venire studiati similmente. GFP è spesso usata come ***reporter*** per proteine d’interesse, ad esempio l’istone H2B, che appare brillante e possiamo localizzare l’eterocromatina. In questo caso, l’ingombro sterico di GFP non ha conseguenze per la cellula. Gli studi di CDC20 e delle proteine della lamina nucleare sfruttano GFP. Il costrutto proteina X/GFP dev’essere ben studiato prima di condurre le analisi: deve mantenere tutte le funzioni della proteina X, il *folding*, le interazioni con cofattori, non deve ingombrare stericamente certe porzioni. Spesso si provano due costrutti, uno con GFP al C-terminale ed uno con GFP all’N-terminale. La proteina X/GFP ha un *linker* di aminoacidi flessibile fra proteina X e GFP. Per lo studio del *folding*, si vuole risalire alla chaperonina che folda la proteina X: il costrutto X/GFP viene espresso in cellule che esprimono chaperonine diverse; solo quella con la chaperonina giusta completa il *folding* e fluoresce. Similmente si costruiscono *reporter* di degradazione proteica. L’approccio di perdita/riacquisto è molto usato, vedi Neurospora e la ricrescita in terreni arricchiti con l’aminoacido che non è in grado di sintetizzare (Beadle).

**Esperimento di analisi della degradazione della proteina ornitina decarbossilasi**. Si costruiscono due plasmidi, uno che esprime solo GFP e l'altro con costrutto di fusione ornitina/GFP. I plasmidi vengono offerti alle cellule; viene aggiunta cicloesamide, substrato che attiva l'ornitina decarbossilasi. La cicloesamide viene aggiunta anche nella coltura di controllo, a cui è stato aggiunto il plasmide con la sola GFP. Nel campione con ornitina/GFP si rileva una scomparsa nel tempo del segnale dato da GFP, poiché l'ornitina viene degradata, e con essa GFP è avviata alla degradazione. Nel campione con GFP, invece, il livello di fluorescenza è pressoché costante nel tempo. Un esperimento biochimico di controllo si rende necessario, l'*imaging* non ci basta. I profili molecolari di GFP e ornitina/GFP sono diversi; viene svolto un Western Blot. Questo aiuta a vedere se il *linker* ornitina/GFP non è clivato. Se lo è, troviamo GFP nel secondo campione, che avrà un segnale di fluorescenza anch'esso costante ed ingannevole, poiché di fatto la porzione di ornitina viene degradata, anche se "invisibilmente". Si può analizzare l'estratto proteico cellulare anche con una spettrofotometria di massa; per stimare se la funzione del costrutto di fusione è la medesima dell'ornitina wt, si ricorre alla strategia per perdita e recupero di funzione: viene silenziata l'ornitina endogena e si analizzano i prodotti biochimici in presenza della proteina ornitina/GFP, cercando parametri di comparazione con il wt, e stimando in questo modo se la presenza di GFP inficia in qualche misura l'attività dell'enzima. Per testare le condizioni e le funzioni base, spesso si ricorre a sistemi più semplici, quali batteri, se possibile, e lieviti. Per stimare la localizzazione della proteina, si può marcarla radioattivamente o effettuare la procedura a tagli sequenziali fino al segnale di localizzazione, associata a marcatura a fluorescenza.

**Lezione III**

**Versioni mutate di GFP**

Molto utilizzata è la sfGFP (*Superfolded GFP*), fino a 50 volte più brillante (emette luce di maggiore intensità), presenta una più elevata resistenza alla denaturazione, ha una cinetica di maturazione del cromoforo più rapida, può essere usata in ambienti estremi. Un uso comune è lo studio delle proteine di organismi estremofili, ad esempio *T. termophilus* a 80 °C, condizione in cui GFP non sarebbe utilizzabile poiché si denaturerebbe. Per la scelta del fluoroforo da utilizzare, dobbiamo tenere conto dell’esperimento e scegliere valutando i seguenti parametri: eccitazione, emissione, lucentezza, fotostabilità, pKa, possibile oligomerizzazione. Si acquistano nella forma di plasmidi con la cassetta per la proteina fluorescente.

***Brainbow***

In animali transgenici, i neuroni presentano proteine fluorescenti diverse, ciascun neurone esprime un solo tipo di proteina fluorescente. Il cervello intero è studiabile in vivo con la microscopia a due fotoni. Per costruire un organismo transgenico di questo tipo, si ricorre alla strategia con la **recombinasi Cre**. Cre riconosce sequenze specifiche nel genoma, dette **LoxP**. Vengono inserite due LoxP identiche nel genoma, una a monte e l’altra a valle di un certo gene d’interesse. Se le LoxP sono speculari, la recombinasi Cre catalizza l’inversione della cassetta fra di esse: un 5’->3’ va in 3’->5’. Se le LoxP sono su cromosomi diversi, Cre catalizza una traslocazione: ad esempio, una porzione del cromosoma 3 viene spostata a valle di LoxP sul cromosoma 6, (). Se le LoxP sono equamente orientate sul medesimo cromosoma, Cre deleta i nucleotidi interposti fra esse. Per il *Brainbow* più semplice, in staminali di topo si integra il seguente costrutto: promotore CMV (forte) + sequenza LoxP\_1 + sequenza LoxP\_2 + *coding* *region* per RFP + STOP + sequenza LoxP\_1 + *coding region* per YFP + STOP + sequenza LoxP\_2 + *coding* *region* per CFP. Nelle cellule con il costrutto è espressa solo RFP, poiché seguita dal codone di STOP. Se attiviamo la recombinasi Cre, possono avvenire due tipi di ricombinazione per delezione: può essere escissa la *coding region* per RFP, portando a valle del promotore la YFP, espressa, od essere escissa anche la *coding region* per la YFP assieme a quella per la RFP, portando a valle del promotore (e quindi ad espressione) la CFP. I due casi sono equiprobabili: facendo esprimere la Cre, si possono ottenere tre tipi differenti di cellule, con l’attività di Cre che è stocastica, ad esempio dipendente dall’accessibilità della cromatina nei pressi delle LoxP nelle varie cellule. Si può migliorare l’esperimento, ad esempio, aggiungendo un quarto fluoroforo esprimibile, come OFP: sempre utilizzando LoxP equamente orientate, i possibili *outcome* sono 4. In vivo sono state usate anche ricombinazioni di altri tipi, ad esempio con LoxP con orientamento opposto: cassetta per RFP 5’->3’ con a valle CFP con orientamento opposto. Se viene espressa Cre, l’inversione porta all’espressione di CFP al posto che di RFP. Si utilizzano anche costrutti con due cassette fra LoxP invertite: GFP-STOP-STOP-YFP e RFP-STOP-STOP-CFP. Sono possibili a questo punto tre eventi di ricombinazione: da GFP (standard) invertire ed esprimere YFP, perdere la prima cassetta ed esprimere la seconda (RFP), perdere la prima ed esprimere la seconda invertita (CFP). La dicitura M-CFP, ad esempio, indica che CFP è monomerica. Si può pensare di utilizzare più costrutti come questi in un solo esperimento per esprimere in ogni cellula un mix di proteine fluorescenti che darebbe luogo a colorazioni differenti nelle varie cellule per l’indipendenza e la stocasticità dei vari eventi ricombinativi. Già con quattro colori, comunque, dal momento che le cellule esprimono concentrazioni diverse delle FPs, si vede un *range* di colori che aiuta a vedere i confini e l’organizzazione delle cellule.

***Split-GFP***

Il problema principale connesso a GFP sta nel fatto che, pur essendo una proteina piccola, ha una certo volume: quando fusa alla proteina d’interesse X ha un ingombro non trascurabile, che può potenzialmente interagire con *folding*, cofattori, proprietà enzimatiche. Si usano, in genere, dei *linker* di 5-8 aa per evitare tali fenomeni. La soluzione più brillante ed utilizzata è *splitGFP*. La *coding region* per GFP viene divisa fra due plasmidi. La ***strand11GFP*** viene espressa connessamente al *linker* ed alla proteina X, ma da sola non fluoresce. Separatamente, vengono espresse le *strands* 1-10 di GFP (*detector*). Quando il detector lega la *strand11GFP*, il *refolding* implica la maturazione del cromoforo, GFP si accende e viene detectata fluorescenza. Tra i vantaggi, il *tag* piccolo (in genere, 16 aa) lavora sia in vivo che in vitro; la refoldata dà un segnale di fluorescenza piuttosto intenso; la cinetica di fusione (aggancio) è veloce, circa 15min-1h.; non richiede che siano forniti reagenti e substrati dall’esterno con conseguente stress, specie sulle membrane. Tra gli svantaggi, non è detto che tutti refoldino correttamente, può esserci un problema di tempo (es. degradazione), la fusione può interferire con la normale attività biologica.

Tra le applicazioni:

1. **Studio delle *protein-protein interactions***: verificare che la proteina A interagisce con la proteina B: si clona la piccola *strand* su una ed il *detector* sull’altra. Se A e B interagiscono, le porzioni di GFP sono avvicinate e possono interagire, ricostituendo GFP. Possibili artefatti se A e B si trovano vicine a sufficienza pur senza interagire.
2. ***Protein folding & solubility assay***: il detector viene fatto esprimere costitutivamente dalla cellula. La proteina X porta la *strand11GFP*, che viene esposta soltanto se X è correttamente foldata, altrimenti risulta nascosta. In caso di *folding* corretto si accende quindi il segnale fluorescente. Se a tamponi a diverso pH o forza ionica il *folding* è scorretto, *strand11GFP* non può interagire con il *detector*. Possiamo così valutare le caratteristiche delle soluzioni in cui il *folding* ha luogo correttamente.
3. ***In vivo protein labeling***: ad esempio, per la localizzazione delle proteine nucleari: facendo esprimere MBD2 fusa a *strand11GFP* possiamo verificare se viene importata nel nucleo, dove viene fatto esprimere costituzionalmente il *detector*. La fluorescenza si rileva quando MBD2 è nel nucleo.
4. ***In vitro complementation assay***: Tau è una IDP che decora i microtubuli, con 4 domini di legame. Consente il corretto trasporto assonale di vescicole. In caso di patologia, essa subisce modifiche posttraduzionali, come una pesante fosforilazione che la solubilizza, processo al quale segue l’aggregazione in voluminosi aggregati citotossici. Per visualizzare Tau monomerica, possiamo clonarla in un plasmide con al C-terminale la *strand11GFP*; le cellule devono esprimere separatamente il *detector*. Nei neuroni sani, viene ricostruita GFP, che fluoresce; in caso di compattazione a livello dei *microtubule binding domains*, la *strandGFP11* non è più disponibile per il detector. La mancanza di fluorescenza è indice di patologia.

**GFP fotoattivabile (PA-GFP)**

Una mutazione puntiforme di GFP le conferisce la fotoattivibilità (PA-GFP). Con una prima eccitazione, il fluoroforo shifta lambda d’emissione. Ad esempio, strategia comune consiste nel far esprimere a cellule X-PA-GFP. Si seleziona una zona d’interesse. PA-GFP è sensibile agli UV; eccitando in quella regione con 405 nm, la GFP fotoattivabile viene attivata ed a quel punto può essere eccitata a 488 nm ed emette una fluorescenza più brillante nel suo spettro d’emissione. La fotoattivazione ha luogo in una piccola regione: solo una **piccola percentuale della proteina X viene attivata e seguita**, consentendo la discriminazione del movimento di singole proteine. Le immagini vengono acquisite nel tempo; possiamo analizzare la colonizzazione di queste proteine dello spazio *dark*. Lo *spreading* della fluorescenza dà indicazioni sulle caratteristiche fisiche del moto. Le fotoattivabili presentano vari colori e varie caratteristiche. Gli UV inducono la decarbossilazione del glutammato 222, con conseguente fotoattivazione del cromoforo. La fotoattivazione di PA-GFP è irreversibile. Altre fotoattivabili sono invece reversibilmente fotoattivabili e possono essere accese e spente più volte nel corso di un singolo *imaging*, come KFP1, fotoattivabile rossa, attivata a 488 nm. È interessante da utilizzare per il *live* *tracking*, ad esempio di organelli, per seguire dinamiche come fusione e fissione dei mitocondri in condizioni fisiologiche e patologiche. Nel *dark* *state*, il cromoforo è maturo ma non fluoresce; la luce determina fotoattivazione per isomerizzazione.

**Proteine fluorescenti fotoconvertibili**

Prima dell’irradiazione, queste proteine emettono con una certa lunghezza d’onda. La fotoconversione le induce ad emettere a lunghezza d’onda diversa. Ad esempio, **KAEDE** in forma normale ha uno spettro d’emissione nel verde (a 520 nm); la fotoconversione con UV o luce violetta induce uno *shift* del picco d’emissione nel rosso, verso 600 nm (a destra nello spettro). Queste proteine fluorescenti fotoconvertibili sono spesso usate per osservare lo *spreading* di proteine d’interesse. Ad esempio, si vuole analizzare la mobilità di una proteina nel citoplasma: la proteina viene espressa dovunque non fotoconvertita (KAEDE emette perciò nel verde), nella regione d’interesse si avvia la fotoconversione, vengono riprese immagini nel tempo. La fluorescenza rossa della KAEDE fotoconvertita va ad occupare, nel nostro esempio, tutto il citoplasma. Da questo è possibile ricavare il coefficiente di diffusione e capire se la proteina X è confinata in certe regioni o meno. Il vantaggio rispetto alle fotoattivabili sta nel fatto che le non convertite sono comunque fluorescenti, ma hanno un colore diverso. La fotoconversione di KAEDE è irreversibile e viene persa una molecola di H2O. La strategia è utile per *imaging* protratti nel tempo. Un *imaging* sequenziale e non troppo aggressivo, cioè non troppo fitto nel tempo: è ottima per dinamiche proteiche lente.

***Dronpa*** non è basata su GFP, ma su una proteina fluorescente di corallo, e permette esperimenti non possibili con le altre FPs. Infatti, essa può essere *bleachata* e riattivata continuamente con la luce. In uno stesso esperimento, cicli di fluorescenza, fotoattivazione e *photobleaching*, virtualmente con acquisizioni all’infinito sulla stessa cellula. A livello del cromoforo, la luce fotoattiva per isomerizzazione trans->cis (405 nm); per l’*imaging* si eccita a 488 nm; per spegnere si ricorre ancora ad un laser a 488 nm, ma ad alta intensità, che determina l’isomerizzazione cis->trans. È possibile effettuare *tracking* di buona durata temporale.

Esperimenti di *photobleaching* possono essere svolti, ad esempio, per studiare la mobilità di proteine del RE. Vengono fuse a GFP, fatte esprimere e visualizzate al tempo 0 nel RE. Con un laser ad alta intensità, esse possono *bleachare*: la regione d’interesse (ROI) viene spenta. Acquisizioni nel tempo ci portano a notare che il RE viene ripopolato con nuove proteine che ripristinano lo stato di fluorescenza. Questo vuol dire che la proteina ha una certa mobilità, velocità stimabile dal tempo occorrente per ripopolare il RE, per controllo, si monitora a fianco una cellula non *bleachata*, che è ancora viva nonostante lo stress dovuto al laser, ad indicare che le condizioni sono buone. In tale cellula, il RE è sempre fluorescente. Possiamo anche dedurre da questo esperimento un ricambio delle proteine del RE.

***Particle tracking: construction of HIV-IN-EGFP through Mediated Trans-Incorporation System***

HIV ha due genomi a RNA, inclusi fra due LTR (promotori), codificanti per proteine funzionali e strutturali, tra cui l’integrasi. Il PIC (*Pre-Integration Complex*) viaggia nel citoplasma sui microtubuli, arriva al poro nucleare e nel nucleoplasma viaggia fino a trovare il sito d’integrazione. L’integrasi taglia il genoma umano; inserito il genoma di HIV, la ligazione completa l’integrazione. Inizia la fase dell’infezione produttiva, in cui il genoma virale è di fatto indistinguibile da un gene dell’ospite. Le terapie devono dunque agire prima dell’ingresso nel nucleo; ad esempio, la terapia ART blocca l’integrasi ed è ad oggi molto promettente. Si è visto che fondere GFP nel genoma virale determina la perdita dell’infettività del virus. Si fonde perciò GFP all’integrasi in un vettore a parte con proteina Vpr, integrasi e GFP. Il virus non è fluorescente. L’integrasi virale viene mutata in modo da renderla inattiva. Si osserva trans-incorporazione: le particelle virali *packaging* sono fluorescenti poiché includono selettivamente l’integrasi-GFP. Si trattano linfociti umani con una sospensione virale per un paio d’ore. Le particelle virali svolgono l’*entry* citoplasmatico; si forma un PIC del virus fluorescente, di cui si osserva il viaggio nel citoplasma, poiché l’integrasi si complessa con il retrotrascritto e si dirige al nucleo. Non tutti i PIC riescono ad entrare nel nucleo; ne basta uno affinché la cellula sia infettata, ma generalmente più di un PIC entra nel nucleo ed integra il genoma virale in quello dell’ospite. I PIC che giungono al nucleo possono anche aggregarsi in grumi e rimbalzare sulla membrana nucleare (in questo caso non entrano). Piccola parentesi, è interessante studiare i siti d’integrazione. Il sistema con l’operone LAC (spiegato di seguito) si è mostrato inefficacie poiché rende il virus non infettivo. Si procede allora aggiungendo al genoma virale una sequenza a 40 bp specifica per l’enzima di restrizione del lievito, che apre un DSB, a cui si associa un *foci*. La rottura del DNA è segnalata dalla abbondante fosforilazione del C-terminale dell’istone H2AX, che risulta in questo modo rilevabile da Abs, a cui possiamo legare *dye* o fluorofori. Un *foci* è definito come *“local accumulations or modifications of DNA damage response proteins that form at the sites of DNA double-strand breaks and can be visualized through microscopic imaging following immunocyto- or -histochemical detection or fluorescent protein tagging”*. Si nota che HIV può integrarsi in più siti, fino a 50/cellula. L’integrazione ha luogo principalmente nella parte esterna, a ridosso della membrana nucleare. Nel tempo, HIV mostra la tendenza ad integrarsi più verso l’interno e verso porzioni eterocromatiniche (latenza, a cui può seguire una nuova fase proliferativa ad anni di distanza se la cromatina si rilassa). Dunque, HIV non mostra sequenze nucleotidiche preferenziali attorno alle quali integrarsi, bensì predilige alcune regioni in base alla posizione subnucleare ed allo stato di compattazione della cromatina. Tutti i ceppi di HIV non hanno alcuna preferenza per i promotori. Al contrario, il virus MIV della leucemia della scimmia si integra sempre nelle regioni d’inizio della trascrizione. Che HIV sia in una fase evolutiva, di virus giovane qual è?

Esperimento: si intende descrivere il moto del PIC nel nucleo. Viene marcato di verde, mentre l’istone H2B viene marcato di rosso. Attraverso una serie di immagini tratte dal microscopio confocale, software specifici sono in grado di ottenere un video di *tracking*, dal quale, mediante un’adeguata analisi, è possibile estrapolare informazioni sul moto: attivo o passivo, rapporto con eu-/eterocromatina, come si integra il virus nel genoma, cinetica? Il software svolge la deconvoluzione di tutte le *stack* del video in tutti i tempi (impiega giorni). Software per il *tracking* tridimensionale sono in grado di ricostruire i percorsi dei PIC nello spazio 3D in base all’intensità del segnale. I movimenti dei PIC nel nucleo vengono riportati dal software come nastri colorati, la cui colorazione varia dallo scuro verso il bianco con lo scorrere del tempo, fatto che permette di risalire agevolmente ad una fase d’interesse del video. Le singole traiettorie possono essere estrapolate e descritte matematicamente. Grazie a ciò, è possibile caratterizzare il moto, ovvero stabilire se si tratti di diffusione passiva o di moto attivo. I movimenti in volumi piccoli sono di diffusione, a casaccio, mentre movimenti diritti più lunghi, a scatti, sono tipici di complessi molecolari portati da cargo motori su actina o tubulina. Dall’analisi del moto, sembra che i PIC si muovano di moto attivo in alcune fasi del loro spostamento nel nucleo. Supponiamo che il moto sia attivo, dobbiamo trovare conferma. Mutare i motori proteici non è una grande idea perché ciò ostacolerebbe il moto di tante altre componenti cellulari, rendendo le condizioni poco fisiologiche. Si ricorre dunque all’uso di droghe che inibiscono i motori quando il PIC è già nel nucleo (latrunculina, che inibisce il moto attivo, e sodio azide, che depleta la cellula di ATP). Un’idea è anche quella di analizzare il moto del PIC nel citoplasma, supponendo che nel nucleo debba essere simile. In questo caso, si fanno fluorescere microtubuli e microfilamenti e si osserva se il PIC vi si muove ordinatamente sopra. Ogni approccio modifica in una certa maniera le condizioni dell’ambiente cellulare, ma l’integrazione dei vari può fornirci utili indicazioni. Inibendo i motori proteici nel nucleo, a tutti gli effetti, il PIC inizia a muoversi con un moto caotico e disordinato, tracciando una traiettoria tipica dei moti di diffusione. La conclusione è che nel nucleo vi è trasporto attivo per il *displacement* e diffusione per il moto confinato. Si può dunque lavorare a molecole che interferiscano selettivamente con il moto attivo di HIV nel nucleo, con riferimento all’integrasi di HIV, di modo da non interferire con gli altri moti.

**Descrizione dell’attività di un gene**

Si utilizza il seguente costrutto 5’->3’: LAC operator (257 *repeats*) + elemento responsivo alla tetraciclina (96 *repeats*) + CMV promoter + CFP + sequenza MS2 (24 *repeats*) + *coding region* + sequenza di poliadenilazione. Il repressore LAC fuso a CFP lega l’operatore LAC (tanti: amplificazione) e fa fluorescere il sito d’integrazione del gene. Il costrutto non viene trascritto poiché è sensibile alla tetraciclina; la somministrazione di doxociclina attiva il promotore. L’mRNA sintetizzato include i *repeats* di MS2, che formano *loops* con una struttura ad *hairpin* (forcina), che può interagire con la proteina MS2-YFP (che può essere fatta esprimere o fornita dall’esterno). Dopo un certo numero di ore, con la traduzione si accende la fluorescenza blu del prodotto proteico.

***Protein-protein interaction: investigation***

1. La visualizzazione mediante *imaging* è molto utile, ma non dà la certezza che due proteine abbiano interagito: risolve fino a 200 nm, ma le proteine potrebbero essere vicine appena 50 nm ma non interagire, dando luogo ad un artefatto.
2. **Co-IP** (*Coimmunoprecipitation*): sfrutta Abs specifici ed è dunque necessario conoscere la struttura di una delle due proteine che interagiscono ed avere a disposizione Abs per i suoi epitopi. Quali proteine X interagiscono con la proteina A? Si fa esprimere la proteina A nelle cellule, le si tripsinizzano, si prepara un lisato cellulare con detergenti adeguati. All’interno del lisato, la proteina A è ancora legata a cofattori, se le condizioni utilizzate preservano le interazioni fra le proteine. Il lisato proteico totale viene incubato con l’Ab anti-A, che riconosce e cattura la proteina A, con ciò che essa si porta dietro. Gli anticorpi possono essere legati a *beads* purificabili per centrifugazione e lavaggio (moderati, tali da non distruggere i complessi proteici). Alla fine delle operazioni, le proteine non legate saranno state allontanate. Vengono allora separati Ab, proteina A e cofattori. Un *Western Blot* permette di confermare la presenza della proteina A nel campione. Con opportuni anticorpi, possiamo evidenziare la presenza di cofattori sospetti. Se si rilevano bande corrispondenti a pesi molecolari diversi da quelli dei cofattori noti, le proteine di quelle bande possono essere estrapolate ed analizzate per spettrometria di massa.
3. ***Pull-down:* approccio *bait & prey***. Se si suppone che la proteina A interagisca con la proteina B, A viene clonata in un vettore esca (*bait*) e B in un vettore preda (*prey*). A viene fusa ad una codina. Il vettore di espressione con A viene offerto a batteri che ne producono una buona quantità; la codina permette di purificare con una cromatografia su colonna la proteina A. La codina spesso consiste in GFP, attaccabile ad una colonnina di glutatione. La proteina A, prodotta da procarioti, viene foldata in un buffer adeguato; si può testarne l’attività catalitica con saggi in vitro. La proteina B viene fatta esprimere nelle cellule d’interesse; il lisato proteico viene fatto passare sulla colonna: se B interagisce con A, allora rimane attaccata alla colonna. Seguono lavaggi per allontanare il materiale aspecifico rimasto impigliato ed un ultimo ad un pH particolare per rompere l’eventuale legame fra A e B. Si prosegue con l’eluizione delle proteine che interagiscono con A e sul mix ottenuto si svolgono le operazioni svolte per la Co-IP. Gli approcci descritti finora richiedono clonaggi e molto tempo.
4. ***Crosslinking Protein Interaction Analysis***: molto utilizzata per lo studio di interazioni deboli fra proteine, ad esempio per l’analisi dei complessi di trascrizione, le cui componenti si montano in modo dinamico ed interagiscono in maniera lieve. Formaldeide e glutaraldeide consentono di costruire una maglia attorno ai complessi, fissandoli. Si procede esponendo per un’ora il campione al tampone; le aldeidi vengono rimosse; si prepara un lisato cellulare; i complessi, tra cui quelli di trascrizione, rimangono compattamente legati; usando Abs è possibile la purificazione. Il *crosslink* covalente viene revertito ad elevate temperature, come 65/100 °C. Le proteine perdono la struttura 3D.
5. ***Co-localization imaging***: si fondono entrambe le proteine da analizzare con fluorofori, ad esempio actina-GFP e vinculina-RFP e viene svolto un *imaging* sequenziale; operazioni di *merge* permettono di rilevare in *false colour* le regioni di sovrapposizione, indice di colocalizzazione entro il volume di risoluzione del microscopio utilizzato. Si deve evitare di trarre conclusioni affrettate, la tecnica si presta bene ad artefatti, ad esempio: marcate le proteine del poro nucleare, FG e gp210. L’*imaging* confocale dà colocalizzazione, ma lo STED (ad alta risoluzione, fino a 20 nm) evidenzia che le due proteine non interagiscono affatto, ma sono solo vicine nella struttura del poro nucleare.
6. **FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)**: per risolvere il grande problema della diffrazione, strategie fotofisiche permettono, con un confocale, di superare la limitazione di 200 nm di risoluzione, portandola fino a 50 Å. Se si ipotizza che la proteina A interagisca con la proteina B, A viene legata con un donore e B con un accettore. Donori ed accettori costituiscono coppie FRET, ad esempio, CFP/YFP. Se A e B sono distanti e si eccita con la lunghezza d’onda d’eccitazione di CFP, si raccoglie in corrispondenza della lunghezza d’onda d’emissione di CFP (*ground state*, assorbiti fotoni, stato eccitato, spostamento di Stokes, ricade, fluoresce). Se invece A e B sono molto vicine fra loro, avviene il trasferimento energetico per risonanza: CFP trasferisce l’energia ricevuta (fotoni) a YFP, in modo non radiativo (CFP non emette luce) e YFP passa allo stato eccitato, perde una piccola quota di energia per vibrazioni e ricade nel proprio stato fondamentale, emettendo luce gialla. Dunque, se A e B interagiscono, in linea di massima, eccitando CFP si riceverà emissione da YFP. L’efficienza dipende da almeno tre fattori:
7. **La distanza fra i due fluorofori**: per capire da che distanza fra essi la FRET funziona, si separano con n glicine, rilevando l’andamento dell’efficienza in funzione della distanza fra i due fluorofori (efficienza che decade). Ciascuna coppia FRET presenta una distanza tipica, o distanza di Foster, corrispondente all’efficienza di FRET del 50% (cioè altissima). Per CFP/YFP, la distanza di Foster è 50 Å.
8. **Orientamento dei dipoli elettrici**, cioè dei fluorofori: il trasferimento energetico è massimo quando il dipolo oscillante e quello ricevente sono equamente orientati. Se i dipoli risultano perpendicolari non c’è segnale di FRET (il trasferimento energetico dipende dal coseno dell’angolo fra gli assi dei dipoli). Il rischio di artefatti è evidente. Solitamente, si provano più *linker* fra le proteine d’interesse ed i fluorofori per cercare di ottimizzare il *setting*.
9. **Sovrapposizione degli spettri**: il trasferimento di energia avviene solo se vi è sovrapposizione fra lo spettro d’emissione del donore e quello di assorbimento dell’accettore.

Varie coppe FRET sono di uso comune: FITC/TRITC, Cy3/Cy5, EGFP/YFP. La scelta dipende anche da microscopio e laser a disposizione. Oltre al rischio di artefatti, anche la FRET presenta alcune limitazioni intrinseche: la distanza fra le proteine che interagiscono deve essere piccola, ovvero la tecnica è poco utile per le interazioni nei complessi o multiproteina. Il segnale può risultare positivo se una delle due proteine, o entrambe, sono overespresse, poiché la concentrazione così elevata rende probabile l’incontro e l’avvicinamento con il partner. Si lavora allora sui promotori e sulle quantità di plasmidi trasfettate. Il *detecting* utilizza il microscopio confocale; per controllo, si preparano due piastre, una trasfettata con il solo plasmide per X-donore e l’altra con quello per Y-accettore. Ad esempio, in X-BFP eccito e raccolgo in BFP, in Y-GFP eccito e raccolgo in GFP, in X-BFP/Y-GFP, se X e Y si trovano vicine, eccito in BFP ma rilevo in GFP. Su FRET si possono costruire sensori intramolecolari, oltre che intermolecolari. Un approccio intramolecolare è il sensore basato su FRET per il segnale del calcio. La calmodulina lega all’N-terminale la CFP ed al C-terminale la YFP. In mancanza di calcio, la conformazione della calmodulina è lineare, i fluorofori distanti e non si verifica trasferimento energetico per risonanza. Il cambiamento conformazionale dettato da Ca2+ avvicina i fluorofori, che interagiscono. Nei neuroni, ad esempio, si usa questo sensore per analizzare le correnti di calcio. Per visualizzare l’effetto nel nucleo, si può fondere al sensore un NLS, per il RE un KDEL o altri segnali, come quello per la porzione del RE per proteine sfoldate. Questo aiuta a stimare la presenza di una sostanza. Limitazione è il rischio di *crosslink* donore/accettore; si usano piastre di controllo e promotori controllati che non overesprimano.

**Lezione IV**

**Altre note sulla FRET**

Per evitare casini vari, si ricorre a tentativi con costrutti di fusione diversi, legando GFP al C-terminale o all’’N-terminale, provando vari linker. Quando si progetta un esperimento di FRET, si deve stare attenti che la luce che eccita il donore non ecciti anche l’accettore. Una serie di coppie FRET sono ormai ben collaudate; la più diffusa è CFP/YFP, il cui segnale è piuttosto marcato. La FRET è un “trucco”, che permette di analizzare interazioni e prossimità molecolare oltre il limite di risoluzione del microscopio. Tra le limitazioni: le interazioni in complessi multiproteici non sono detectabili, se A e B non interagiscono direttamente ma mediante un ponte molecolare la strategia è poco utile. Inoltre, quando costruiamo una proteina di fusione, non è possibile prevedere a priori l’orientamento dei dipoli e la struttura tridimensionale ripiegata. Gli esperimenti di FRET soffrono anche di falsi positivi nel caso di overespressione della proteina d’interesse, il cui accumulo determina avvicinamento forzato dei fluorofori. Si devono quindi scegliere con cura i promotori.

1. ***Sensitized Emission***: abbiamo bisogno di controlli per evitare falsi positivi e falsi negativi – si preparano tre piastre, una trasfettata col donore, una con l’accettore, una cotrasfettata. In genere si trasfetta transiente, nel caso di trasfezione definitiva per la selezione è conveniente optare per due antibiotici differenti per i due plasmidi. Le cellule fluorescenti sono tuttavia meglio separate per citometria, metodo più pulito e che causa meno stress ed interferenze con le attività cellulari. Sulle piastre uno e due, si settano i parametri di FRET e si aggiustano i canali sui quali eseguire la rilevazione. Canale A: si eccita il donore e si raccoglie dal donore (monitoriamo il livello d’espressione della proteina di fusione, la sua localizzazione, che non sia saturo il segnale, quindi che non ci sia overespressione. Canale B: idem per l’accettore. Canale C o di FRET: si eccita sul picco d’assorbimento del donore e si riceve nello spettro dell’accettore. Il segnale di FRET risulta positivo solo nei compartimenti nei quali le proteine interagiscono. Vari biosensori basati su FRET permettono di studiare diversificate attività biologiche d’interesse, come il sensore intramolecolare per il calcio basato sul cambiamento conformazionale della calmodulina dettato dal legame con tale ligando, utile per esempio nei neuroni. I sensori vengono opportunamente localizzati aggiungendo nei plasmidi le cassette per segnali di localizzazione come NLS; KDEL e K7CRsig (per il sottocomparto del reticolo endoplasmatico dove vanno le proteine sfoldate, che a differenza degli altri non va al C ma all’N-terminale). Limitazioni della Sensitized Emission includono *crosstalk*, evitabile settando i parametri e con i controlli, servono tre piastre (più cellule, trasfezioni, tempo, operatori, costi), possibile segnale aspecifico se c’è sovrapposizione. Una buona norma è lavorare su un sottopool di cellule che presenta un livello d’espressione della proteina d’interesse compatibile con l’esperimento.
2. ***Acceptor Photobleaching***: si utilizza su preparati fissati. Si utilizza il *de-quenching* del donore in presenza dell’accettore: bleachando l’accettore, la fluorescenza del donore aumenta, poiché cessa il trasferimento energetico non radiativo per risonanza verso l’accettore e quindi emette con maggiore intensità. Se l’accettore non era presente, allora anche bleachando (presumendone erroneamente la presenza) la fluorescenza del donore non subisce nette variazioni d’intensità. Viene selezionata una ROI e si svolge un imaging, eccitando donore ed accettore e raccogliendo nelle rispettive emissioni***.*** Bleachamo totalmente l’accettore applicando un laser ad alta potenza sulla ROI e si rileva la mancanza di emissione nella sua lunghezza d’onda. Viene misurata l’intensità di fluorescenza del donore. Se c’era FRET, l’intensità sarà aumentata. Questa procedura è limitata a campioni fissari, poiché quelli vivi presentano movimenti interni. Basta un solo campione, non servono più piastre. L’efficienza di FRET è E= (Dpost – Dpre)/Dpost dove D è l’intensità d’onda della fluorescenza emessa dal donore. Se Dpost > Dpre, il segnale di FRET si considera positivo. Uno dei problemi complessi all’acceptor photobleaching sta nel fatto che potremmo malamente bleachare pure il donore. Inoltre possono essere presenti difficoltà nel bleachare totalmente l’accettore, condizione necessaria per la procedura sperimentale e, come detto, su campioni vivi non si può fare. Infine, alcuni fluorofori necessitano di potenze di laser decisamente elevate per il photobleaching.

**Misura della fosforilazione del recettore ErbB-1.** Il recettore è sensibile all’EGF: in mancanza di tale ligando, il recettore ha una conformazione più lassa; l’evento di legame innesca la fosforilazione del recettore, a cui segue un cambiamento conformazionale che porta ad una forma più chiusa. ErbB-1 viene chimerizzato con GFP; si usa un Ab legato a CY3, che fa coppia FRET con GFP. In mancanza di EGF, il recettore non è fosforilato, l’anticorpo non binda poiché l’epitopo non viene riconosciuto fin quando la fosforilazione innescata da EGF non ha luogo, evento che scatena il legame dell’Ab e con ciò se tutto va bene, il segnale di FRET.

Biosensori basati su FRET possono essere usati anche per l’analisi di fenomeni come la clusterizzazione dei recettori, per le catane trasduttorie, per lo studio dell’affinità tra enzima e substrato (uno dei partner FRET legato al *sensory domain* dell’enzima e l’altro al substrato, sempre che ciò non implichi alterazioni nell’attività funzionale), per lo studio dei cambiamenti conformazionali dettati da ligando, per il *cleavage*: tale fenomeno, se ha effettivamente luogo, determina la perdita del segnale di FRET.

**Studio dell’attivazione del recettore adrenergico α2A**, ingegnerizzato in modo da avere YFP tra i domini transmembrana e CFP all’N-ter. In condizioni native, si rileva un segnale di FRET positivo, mentre in presenza dell’agonista, la norepinefrina, un cambiamento conformazionale determina l’avvicinamento delle eliche transmembrana, l’allontanamento della coppia FRET e la perdita di segnale.

**Sensore FRET per la *detection* delle fasi iniziali delle taupatie.** Tau, una MAP e IDP, normalmente si trova nel citoplasma a stabilizzare i microtubuli, agendo da collante. Quando Tau è iperfosforilata, essa si distacca dai microtubuli, che risultano così molto più fragili, diviene citosolubile ed aggrega in maniera citotossica, determinando la patologia, fra l’altro, in genere, trasmissbile alle cellule adiacenti. L’obiettivo della ricerca della Prof.ssa Di Primio et al. è lo sviluppo di una tecnica diagnostica precoce, dato che ad oggi l’accertamento di malattie come l’Alzheimer è di fatto possibile solo con analisi *post-mortem*. Il sensore FRET è ECFP-Tau-EYFP, chiamato CST (*Conformational Sensitive Tau*). I primi esperimenti sono di controllo: Tau ingegnerizzata deve comportarsi come la wt. La trasfezione delle cellule è seguita da un *imaging* al confocale mirato a detectare la proteina sia nel canale del donore che in quello dell’accettore, fatto che ci indica che nessuno dei due viene normalmente clivato da proteasi cellulari. Segue un’analisi della localizzazione per colocalizzazione mediante fusione di un fluoroforo ai microtubuli. Il *merge* conferma che la Tau ingegnerizzata si comporta esattamente come la wt. Una CoIP conferma i risultati della colocalizzazione. Gli *step* sono svolti su Hela e su cellule di neuroblastoma o neuroni primari di cavie. Il sensore sviluppato permette di studiare la conformazione di Tau quando essa lega i microtubuli, conformazione che può essere rilassata o ad *hairpin*. Facendo esprimere questo sensore, una *Sensitize Emission*, dopo avere verificato l’espressione di donore ed accettore, misura il segnale di FRET sul microtubulo, restituendo in scala colorimetrica con i massimi attorno al bianco e i minimi di colore scuro. L’efficienza di FRET è alta solo sul microtubulo e non nel citoplasma, ma Tau è presente anche nel citoplasma. A questo punto, ci si può domandare se il trasferimento energetico per risonanza che determina il segnale di FRET abbia luogo testa coda fra Tau successivamente disposte sul microtubulo (intermolecolare) oppure per avvicinamento dei due fluorofori della singola molecola di Tau (intramolecolare). Basta ingegnerizzare con due Tau diverse, una con CFP e l’altra con YFP. Con questa cotrasfezione di Tau *monolabelled* l’efficienza di FRET è bassa: è plausibile allora che il FRET sia intramolecolare. Il sensore permette di distinguere i monomeri di Tau legati da quelli sciolti nel citoplasma. L’induzione di un evento degenerativo in lab. induce un cambiamento conformazionale, con perdita della conformazione a *loop* e del segnale di FRET. Questo *setting* è troppa roba per poter testare nuove droghe in ambienti simili a quelli degli stadi patologici iniziali ed altamente monitorabili. La formazione degli aggregati di Tau citotossici è così monitorabile real-time. Se aggiungiamo nel terreno di coltura una droga che compete con Tau per decorare il citoscheletro, essa scalza Tau dal microtubulo, il segnale di fluorescenza diffonde nel citoplasma e va ad estinguersi. Dove la quantità di monomero solubile cresce nel citoplasma, tende anche ad aggregare. Il biosensore viene applicato su *Zebrafish* transgenico, che porta il biosensore a valle di un promotore attivato specificamente nei neuroni. *Zebrafish* costituisce una piattaforma di *screening* assai figa: è trasparente e può essere studiato *in vivo* in presenza come in assenza di patologia. Vari individui vengono piazzati in pozzetti in cui si sperimentano droghe diverse. La droga evita l’aggregazione del sensore ed il distacco dal citoscheletro?? Il biosensore è stato anche applicato a modelli murini, per capire in quale zona del cervello si origini la taupatia e come si estenda nelle altre, fino ad invadere tutta la corteccia. Una microiniezione nei cervelli di topi neonati è seguita dallo studio *in vivo* mediante l’applicazione di finestre croniche ed il multifotone. Uno studio *whole-brain* ha luogo invece *post-mortem* grazie alla potente clarizzazione.

**FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*)**

Utile per l’analisi della mobilità di una proteina, si fonda sulla fusione della proteina d’interesse con un fluoroforo. Nella cellula si seleziona una ROI, la si bleacha, essa diventa *dark* e viene (o meno) ripopolata nel tempo dalla proteina connessa al fluoroforo (le *dark* abbandonano la ROI, le vicine non *dark* entrano, si ha diffusione e omogeneizzazione della cosa in mancanza di comparti). L’*imaging* per acquisizioni ripetute permette di stimare la rapidità del movimento di una proteina: se si tratta di diffusione libera è rapido, se è presente un’associazione a complessi multiproteici è lento, se è presente una compartimentalizzazione manca il ripopolamento. Un grafico FRAP riporta in ascissa il tempo ed in ordinata l’intensità d’onda della fluorescenza. Se la proteina è molto mobile si ha un recupero quasi totale, corrispondente ad un asintoto a intensità pari a quella iniziale; in caso di ridotta mobilità il recupero è solo parziale e non si ritorna mai all’intensità di fluorescenza iniziale. Possiamo estrapolare dalla curva il coefficiente di diffusione, la compartimentalizzazione, la connessione tra comparti, ad esempio per capire se in una determinata linea cellulare il reticolo ed il GA sono connessi. Le applicazioni sono numerose: studiare l’effetto di una mutazione sulla proteina d’interesse, che può alterare le interazioni e perciò la mobilità. Esempio: miosina-GFP, selezionata la ROI, il segnale di fluorescenza in tale regione cresce e altrove decresce, per effetto della redistribuzione che porta ad un’omogeneizzazione, entropicamente favorita. Il software deve essere tarato per tenere conto di questo. Se la ROI è scelta più grande, serve più tempo per le rilevazioni. La frazione mobile corrisponde all’ordinata del grafico di FRAP dell’asintoto orizzontale, la frazione immobile è la differenza fra l’intensità iniziale e la frazione mobile. La tecnica presenta limitazioni: le cellule vive sono infami che si muovono e servono algoritmi a posteriori per centrare la cellula per svolgere le analisi. Comunque, in esperimenti brevi non c’è pericolo di perdere eccessivamente il campo. Un problema è la perdita di fluorofori nel tempo. In tempi lunghi la sintesi proteica può alterare il numero di proteine presenti, ma in esperimenti di questo tipo generalmente gli effetti di sintesi/degradazione risultano mediamente trascurabili. Un problemino è che si lavora in 3D ed il bleaching può interessare anche piani diversi da quello di fuoco, disagio contenibile grazie ad obiettivi con alta NA.

Richiamandoci alla ricerca su Tau della Prof.ssa, anche la FRAP è risultato utile. L’acquisizione di Tau con il microtubulo è dinamica. Nel tempo si acquisisce un recupero decente di fluorescenza sui microtubuli della ROI, ma la frazione immobile è importante: il recupero è del 50% circa, ad indicare che lo scambio non è eccessivamente rapido, c’è sempre una consistente percentuale di molecole meno dinamiche, che interagiscono con la tubulina in modo più importante. Versioni di Tau con mutazioni puntiformi su *Microtubule Binding Domains* si associano meno strettamente ai microtubuli e presentano una curva di recupero con frazione mobile assai più alta. Colchicina e nocodazolo agiscono sui micotubuli […]. Si ha disassemblaggio del citoscheletro la tubulina diffonde e con essa anche il sensore, con la FRAP che mostra una mobilità elevata e recupero del 100% se non associata ai microtubuli. La curva di recupero di FRAP su aggregati indotti da droghe è bassa, il che potrebbe suggerire che l’aggregato viene circondato da strutture che lo contengono ed evitano l’associazione di nuove molecole fluorescenti o la struttura stessa dell’aggregato ostacola l’aggregazione di altre molecole.

***Inverse* FRAP**

In una cellula che esprime il fluoroforo legato alla proteina X si bleacha tutto quanto eccetto una ROI. Acquisizioni nel tempo ci permettono di detectare la velocità con la quale le proteine lasciano la ROI, indicata dalla perdita di fluorescenza in tale zona. Il grafico ci aiuta a studiare la cinetica con cui le zone circostanti vengono ripopolate. Poche molecole fluorescenti si muovono su background dark. Il laser è ad alta intensità, cui segue il problema della citotossicità. Inoltre serve molto tempo per bleachare l’intera cellula e quindi se la cinetica è veloce l’approccio è inadatto. L’IFRAP viene sfruttata per lo studio delle molecole associate agli *speckles* di mRNA nel nucleo.

**FLIP (*Fluorescence Loss in Photobleaching*)**

Si tratta di una FRAP con due ROI. Una viene bleachata, nell’altra si analizza l’intensità della fluorescenza. A differenza di FRAP e IFRAP, il *bleaching* è ripetuto nel tempo, fino a tutta la cellula: l’esperimento è lungo e decisamente citotossico. La ROI distante è fluorescente all’inizio e via via perde la fluorescenza. Sono deducibili parametri di mobilità delle proteine; si possono studiare le connessioni fra comparti subcellulari. Ad esempio, la tecnica è stata impiegata per studiare la continuità dell’ER con il citoplasma circostante in *COS-7 cells*. La proteina nel RE porta GFP. Mediante ripetuti *photobleaching* si perde tutta la fluorescenza nell’ER, ovvero tutte le membrane dell’ER sono continue. Si possono combinare FRAP e FLIP, ad esempio per confrontare la mobilità d’una coppia di proteine d’interesse. Due proteine a livello nucleolare, una ribosomale ed una che fa da *shuttle* fra nucleolo e nucleoplasma. B23 e S5 vengono studiate con una FLIP e con una FRAP, i cui risultati sono nella stessa direzione: B23 è più mobile, è uno *shuttle* più rapido.

**FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*)**

La *fluorescence lifetime* è un parametro tipico di ogni lambda, fa riferimento al tempo che intercorre tra assorbimento/eccitazione del fluoroforo e momento in cui torna allo stato fondamentale emettendo fluorescenza. Questo intervallo di tempo è identificativo. La *lifetime* si misura in nanosecondi. Si può dedurre se sono presenti certi fluorofori, poiché il parametro è tipico d’ognuno di essi. La misura è diretta, più precisa, alternativa e complementare alla FRET. La *fluorescence* *lifetime* è modulata da parametri come concentrazioni ioniche, pH, presenza di ossigeno. In presenza di trasferimento energetico per risonanza (FRET), la *fluorescence lifetime* diminuisce in virtù del trasferimento di energia: il donore torna allo stato fondamentale più rapidamente. Una FLIM map rende l’intensità su scala colorimetrica con corrispondenza ai valori di *lifetime* del fluoroforo. Ad esempio, in un esperimento FLIM-FRET, il costrutto CFP-oligonucleotide-YFP è lineare e si ripiega in presenza di magnesio, avvicinando i fluorofori e dando FRET. La FRET può tuttavia verificarsi anche se il trasferimento avviene tra due oligo marcati che si trovano adiacenti. La scala FLIM va in questo caso da 0 a 3 ns. La misura della *lifetime* è più che inequivocabile.

**Lezione V**

**Il problema del *crosstalk***

Il *crosstalk* consiste nella sovrapposizione di due segnali di fluorescenza quando si effettua un *imaging* con due fluorofori contestualmente. Un esempio concreto: una coltura esprime FITC-actina e mitocondri marcati con *MitoRed*. Si utilizza un confocale; si deve innanzitutto settare lo strumento (laser per eccitare, fotomoltiplicatori per la ricezione e la raccolta…). Si setta generalmente la slitta di raccolta non sul solo picco d’emissione, ma anche sulle lunghezze d’onda contigue: la specificità è conseguenza diretta dell’ampiezza della slitta, più è larga, meno specifica è la lettura. Nell’esempio proposto, si è malamente usata una slitta per la raccolta del segnale nel rosso parzialmente sovrapposta a quella per la raccolta del segnale nel verde, ottenendo l’orrendo artefatto che mostra colocalizzazione dei mitocondri con l’actina: ciò che si accende nel rosso è in realtà ciò che si è già raccolto nel verde, per via della slitta troppo larga e sovrapposta. Come rimediare? Si spegne il laser che eccita sul rosso: se c’è *crosstalk* si continua a vedere rosso (perché il rosso raccolto corrisponde in realtà al verde, che viene ancora eccitato); si abbassa il laser sul verde, fino a quando sul canale di raccolta per il rosso non si vede più nulla. Infine, si ritorna ad eccitare il fluoroforo rosso, facendo un *imaging* ben separato. Quando gli effetti del *crosstalk* sono inevitabili, si ricorre ad acquisizioni sequenziali, dalle quali il *setup* del software ricava il *merge*.

**Microscopia a super risoluzione**

Il microscopio ottico ha una risoluzione di 400 nm assiale e 150 nm laterale. In condizioni ideali, per l’*imaging* d’una GFP avremo al meglio 500 nm di risoluzione assiale e 200 nm laterale. Non è una grande risoluzione. Il problema può essere aggirato con due approcci: manipolazione dei fluorofori (STED, PALM, TIRF) oppure utilizzando lunghezze d’onda più piccole (TEM, SEM) o con tecniche alternative (AFM).

**STED (*Stimulated Emission Depletion*)**

La STED, valsa il Premio Nobel per la Chimica a Stefan W. Hell nel 2014, sfrutta considerazioni quantistiche. In termini semplici, una molecola può ritornare al suo stato fondamentale senza emettere fluorescenza: guardando il diagramma di Jablonski, dopo lo *shift* l’applicazione di fotoni di pari energia della molecola allo stato eccitato porta al *bleaching* della stessa. Il microscopio STED utilizza a tal proposito una coppia di laser: uno d’eccitazione, formato da un fascio di luce collimato (raggi paralleli, fronte d’onda planare) diretto sulla molecola di cui si vuole fare l’*imaging* e settabile come lunghezza d’onda; il secondo è un laser di deplezione. Il laser di deplezione “ha forma di ciambella”, con un picco di emissione che circonda il laser di eccitazione e via via va a diminuire. Un normale *imaging* eccita il fluoroforo d’interesse, ma anche qualcosa sui piani appena sopra e sotto e adiacentemente al fluoroforo *target*. Con il laser di deplezione vengono bleachati tutti i fluorofori eccitati che si trovano attorno al punto di fuoco. L’applicazione contestuale dei due laser produce una *point spread function* ridotta al punto di fuoco: la risoluzione è decisamente elevata. Possiamo controllare spazialmente il belaching dei fluorofori; si raggiunge la risoluzione di 20 nm in laterale e 40 nm in assiale. Un esempio di *imaging* assai preciso e puntuale ottenuto mediante STED è quello delle NUPs dei pori nucleari.

**PALM (*Photo-Activated Localization Microscopy*)**

La PALM non usa i convenzionali fluorofori (eg, GFP), ma proteine fotoattivabili, che vengono attivate in piccolo numero alla volta. Il campione conterrà molte proteine fotoattivabili, ma se ne attivano poche alla volta e si ricorre ad acquisizioni sequenziali. Due laser: il primo attiva, il secondo eccita chi è attivato. La tecnica è inadatta per proteine con alta mobilità: si potrebbe tornare a fotografare sempre le stesse. L’immagine resa dal PALM è ricostruita ed ad alta risoluzione.

**TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence-microscopy*)**

La tecnica è utile per lo studio di fenomeni che si svolgono nei pressi della membrana plasmatica, ad esempio lo studio dei canali ionici e del citoscheletro associato alla membrana. Si parla di *evanescent-wave* *microscopy*: si forma un’onda evanescente che permette di eccitare i soli fluorofori nei pressi della membrana plasmatica. La geometria del sistema fa sì che il raggio incidente venga totalmente riflesso: a livello del punto d’incidenza si forma un’onda evanescente, una nuvola d’attivazione che coinvolge i fluorofori a massimo 100 nm dalla membrana. Un esempio d’applicazione di questa tecnica è lo studio della clusterizzazione dei recettori di membrana per le neurotrofine in presenza di uno stimolo. Si possono anche fare *tracking*. La risoluzione è di 50/100 nm ed un vantaggio consiste nel fatto che si possono utilizzare fluorofori comuni, come GFP. Infatti, è l’architettura del microscopio il punto forte: essa consente di canalizzare la luce sul punto giusto con estrema precisione.

**AFM (*Atomic Force Microscopy*)**

Una punta in silicio molto sensibile, detta *cantilever*, è legata ad un braccio mobile. Un *detector* permette di rilevare gli angoli di riflessione della luce che colpisce il *cantilever*: se il *cantilever* si muove, il laser segnala e quantifica i movimenti. La punta in silicio può prendere contatto con qualsiasi superficie. Il *cantilever* esplora il campione e ne rileva le asperità. In genere, la tecnica si utilizza per lo studio dei materiali e delle superfici, dei metalli, ma anche per campioni biologici. Un’applicazione è lo **studio dell’energia richiesta per sfoldare una proteina**. Si fa produrre la titina, proteina grossa di 8 domini e dalle importanti capacità elastiche, presente nei muscoli, nei batteri. L’AFM permette di rilevare la forza necessaria per svolgere ciascun dominio. Si purifica la proteina dai batteri, si attaccano un’estremità ad un supporto del microscopio e l’altra al *cantilever*. L’applicazione di una forza verso l’alto sfolda la titina. La deflessione del laser che segnala il movimento del *cantilever* permette di quantificare la forza necessaria per svolgere la proteina.

**Microscopia elettronica**

La microscopia elettronica, valsa metà Premio Nobel per la Fisica a Ernst Ruska nel 1986, può portare la risoluzione al livello atomico, a 1 nm (teorica di 0,004 nm). La risoluzione dipende dalla velocità degli elettroni, accelerati da un voltaggio, in genere, fino a 100.000 V. Un fascio di elettroni collimato viene diretto sull’oggetto studiato. Si possono verificare due situazioni: *scattering* elastico oppure anelastico.

**TEM (*Transmission Electron Microscopy*)**

Lo *scattering* è elastico: gli elettroni cambiano traiettoria, vengono deflessi, anche se energia e velocità non variano. La tecnica viene sfruttata per lo studio di cellule o sezioni di cellule. Si analizzano strutture subcellulari. La TEM lavora su sezioni di 500 nm: servono strumenti adeguati per ottenerle. La risoluzione è di 1 nm.

**SEM (*Scanning Electron Microscopy*)**

L’urto degli elettroni incidenti con l’oggetto di cui si effettua l’*imaging* è anelastico; la collisione causa il *displacement* degli elettroni dell’oggetto studiato. La tecnica è utilizzata per *slice* di tessuti e organismi piccoli come giovani *Zebrafish*, insetti e larve, ad esempio quella di *Xenopus*. La risoluzione è di circa 10 nm. Il microscopio porta una colonna di due metri, cammino ottico richiesto per portare la velocità degli elettroni a valori decisamente elevati. Per acquistare velocità, il fascio deve attraversare il vuoto (assenza di attriti). Di conseguenza, anche il *sample* dev’essere “sotto vuoto” e la tecnica non si presta a campioni vivi, ma solo a fissati adeguatamente preparati. La preparazione segue questi *step*: fissazione con *Karnovsky*, che contiene paraformaldeide e glutaraldeide; disidratazione secondo protocollo, con una scala di alcoli che aumenta gradualmente la [EtOH] da 30% a 100%: l’acqua viene completamente sostituita dall’alcol. La tecnica del punto critico prevede ora di porre il campione in una cella metallica chiusa nella quale sgorga CO2 liquida a temperatura estremamente bassa. La CO2 sostituisce l’alcol permeando il campione. Si alza dunque di botto la temperatura a 45°C: la CO2 evapora ed il campione risulta disidratato. Il campione è molto fragile e soggetto a rotture, utili per l’osservazione al SEM delle strutture interne. Le *slice* sono poste su un supporto a retino e ricoperte di un sottile strato di metallo, in genere oro. La superficie colpita dal fascio di elettroni emette elettroni secondari che sono rilevati dal *detector*.

**Rilevazione di una proteina X con la microscopia elettronica.** I campioni biologici sono composti da atomi a basso pm; si ricorre spesso, perciò, alla coniugazione con atomi come Au che hanno elettroni estraibili dai sottolivelli. Il campione può essere infiltrato con metalli pesanti oppure si legano *beads* ad Abs. I campioni sono preparati così: fissazione con tetrossido d’osmio e glutaraldeide, impregnazione con uracil acetato, deidratazione come descritto sopra, immersione in una resina liquida di metacrilato. Fatti seccare, i campioni sono in blocchetti sezionabili all’ultramicrotomo, da cui si ottengono sezioni di 50-100 micrometri di spessore. Seguono passaggi di ibridazione con *buffer* con Abs primari specifici per la proteina d’interesse e Abs secondari coniugati a *immunogold* *beads*. È possibile effettuare ibridazioni multiple con *beads* dorate di dimensioni diverse. È possibile stabilire la colocalizzazione entro spazi piccolissimi, dove la microscopia a fluorescenza non arriva. Attenzione: non vediamo le proteine, ma le *beads*.

**Inserire oligonucleotidi e costrutti di vario tipo nelle cellule**

**Microiniezione di DNA plasmidico o RNA**

Si tratta di un trasferimento meccanico del materiale, mediante l’uso di finissime micropipette di vetro contenenti la mix di trasfezione con il *buffer* a composizione nota. La punta va da 0,5 a 20 micrometri di diametro; l’operazione viene svolta al microscopio, prestando attenzione a bucare la membrana senza eccessivo vigore. L’ago penetra nella cellula e si può giungere persino alla membrana nucleare, rilasciando il materiale direttamente nel nucleo. Il metodo è brutale perché rompe le membrane; la percentuale di cellule che sopravvivono è perciò bassa ed il costo è elevato. La tecnica viene sfruttata per marcare proteine in embrioni, fare esprimere DNA plasmidico in embrioni di *Xenopus*, *Zebrafish* e amici vari, così da monitorare l’espressione tissutale delle proteine nelle prime fasi dello sviluppo ontogenetico. Lavori similari su embrioni permettono anche di produrre animali transgenici.

**Elettroporazione**

Cellule in sospensione in un buffer di elettroporazione con la mix di RNA/DNA in una cuvetta sono sottoposte ad una scarica disruptiva che ne buca in più punti le membrane, aprendo pori transitori, lasciando entrare quel che deve. L’elettroporatore è un piccolo strumento dotato di due elettrodi. Segue qualche ora di attesa, di recupero, in cui la cellula ripara le rotture sulla membrana. La tecnica spacca anche sui procarioti. Le limitazioni sono una mortalità prossima all’80% e la necessità di seguire protocolli diversi per cellule batteriche e di mammifero (queste ultime, più sensibili, vanno sollecitate con voltaggi più bassi). L’elettroporazione viene anche sfruttata per la somministrazione di vaccini: una siringa porta due piccoli elettrodi e buca la membrana delle cellule più superficiali, vengono reclutati linfociti, il vaccino può essere efficientemente processato dalle cellule del tessuto.

**Trasfezione lipidica**

Reagenti lipidici possono essere associati al DNA d’interesse, mescolando il reagente con il plasmide e dando tempo secondo il protocollo scelto. Si formano micelle che inglobano DNA. Poste nel terreno di coltura, le micelle possono fondersi con i plasmalemmi delle cellule e rilasciare il materiale all’interno. Al buffer si deve comunque offrire un *enhancer* che favorisca la formazione delle micelle. Solitamente, già 24h post trasfezione è rilevabile l’espressione della proteina d’interesse.

**Agenti chimici vari**

Un’alternativa mica male sono gli agenti cationici, che si associano al DNA e ne favoriscono l’ingresso (calciofosfato, destrani, lipidi cationici). Questi agenti si complessano con gli acidi nucleici, mascherandone la carica negativa: il complesso, apolare, attraversa sciallo al membrana e raggiunge il citoplasma. Attenzione: l’agente deve portare un ligando per il quale la cellula possa effettuare il riconoscimento.

***Gene gun***

L’idea è: “Sparare il DNA nel tessuto d’interesse!”. Il DNA è associato ad una pallina d’oro, che conferisce il peso necessario per lo sparo mediante *gene gun*. L’oro è inerte ed entrato nella cellula non dà problemi di citotossicità. Le particelle vengono sparate ad alta velocità. La tecnica è molto usata per l’ingegnerizzazione di tessuti vegetali, ma viene usata anche per cellule animali in coltura. Il design discende dal tipo di tessuto da trattare (eg, i tessuti vegetali sono più tenaci, resistenti. Il proiettile contenente le palline con il DNA ha dei fori laterali per consentire la fuoriuscita del gas elio, che altrimenti farebbe pressione sulla cellula, con effetto citotossico. Il trattamento, ad ogni modo, è rude, perché le palline veloci rompono ciò che contattano, i.e. membrane, citoscheletro, macchine proteiche, involucro nucleare e via dicendo: la mortalità cellulare è elevata. Il *gene gun* è usato per trasferire materiale genetico in cavie, come per alcuni tipi di vaccino.

***Delivery* mediante vettori virali**

La scelta dipende strettamente dalle finalità sperimentali. Innanzitutto, la capacità di packaging dei virus è assai variabile: gli adenoassociati portano attorno alle 4.000 bps, mentre lentivirus e retrovirus fino a 100.000 bps. Un costrutto come promotore + gene tessuto-specifico + GFP va già a 700/1000+2000+1500 bps, troppe per un adenoassociato. Da tenere conto che i retrovirus infettano soltanto cellule in attiva divisione, i lentivirus anche quelle definitivamente differenziate. Questo perché il lentivirus esce attraverso il poro nucleare, mentre il retrovirus attende la dissoluzione prometafasica dell’involucro. Servono colture cellulari per produrre i virioni ricombinanti. Per salvaguardare la *safety* dell’operatore, le particelle virali vengono codificate in più di un plasmide ed i plasmidi vengono cotrasfettati. Ad esempio, il genoma virale di HIV è LTR – gag – pol – env – LTR. Se si aggiunge materiale ricombinante, si possono avere ancora HIV in coltura ed è richiesto un livello di *biosafety* di 3 (per cui possono essere usati HIV, ebola e altri virus estremamente pericolosi, per pochissimi laboratori). Si ricorre allora alla frammentazione del genoma di HIV in plasmidi che vengono offerti alle cellule. Ora siamo alle generazioni 2/3. Per ottenere la particella si trasfetta la coltura con tre DNA: un plasmide transfer LTR – psi (*packaging*) – X – LTR, un plasmide *envelope* (env), un plasmide *packaging* (tutte le proteine funzionali e strutturali: integrasi, trascrittasi inversa ecc.). La cellula che li acquista tutti e tre sa produrre particelle virali complete, nelle quali incapsula il materiale per la ricombinazione in sicurezza, senza il pericolo che tutte le sequenze determinanti il fenotipo patogeno si riuniscano. Nella terza generazione, inoltre, la proteina rev di HIV si trova in un quarto plasmide al posto che in quello di packaging. Questa proteina regola importo ed esporto dal nucleo ed il suo controllo migliora il livello di sicurezza per l’operatore. Le particelle virali prodotte dalla coltura si trovano nel supernatante, che viene raccolto e può essere fornito direttamente alle cellule da trasfettare oppure purificato (ultracentrifugazione) e concentrato (risospensione in un volume inferiore), eliminando con ciò lo schifo che si trova nel medium di una coltura di cellule. I lentivirus portano CD4 e contattano le membrane dei linfociti. BSVG al posto di env di HIV aumenta il tropismo, cioè la capacità della particella di infettare qualunque tipo cellulare, come Hela, muscolari, neuronali, adipociti ecc. il virus entra nel citoplasma, trascrizione inversa, PIC, nucleo, espressione. Per adenovirus, il recettore è il CAR, da cui dipende l’endocitosi, da cui dipende l’endocitosi. Segue l’*escaping* dall’endosoma ed il trasferimento al nucleo.