

ALTERNANZA SCUOLA•LAVORO IN ISS

Percorso
BC.17



04-15/02/2019

Messaggeri intracellulari, centraline energetiche, segnali elettrici
Come il sistema nervoso usa l'energia per propagare l'informazione

Studenti:

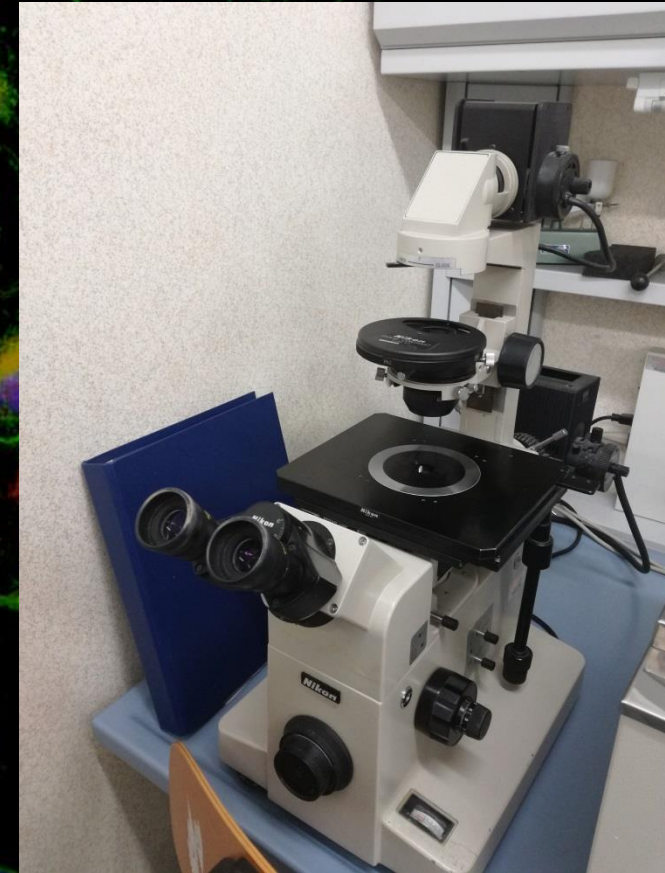
Bianchi Luca – Liceo M. Montessori
D'Errico Matthias – Liceo Pasteur

Tutor:

Sergio Visentin; Marcello Belfiore; Antonietta Bernardo

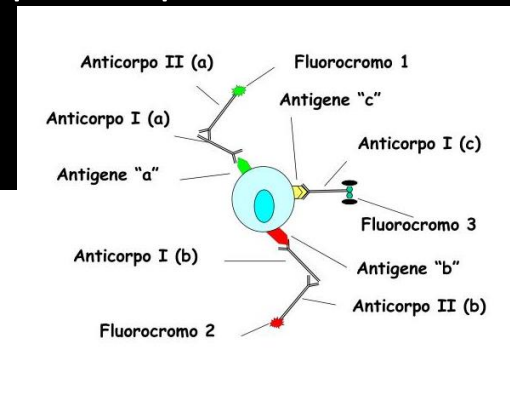
Familiarizzazione con il laboratorio

Obiettivo: familiarizzare con semplici strumenti da laboratorio per poi seguire le procedure necessarie per il mantenimento di colture cellulari



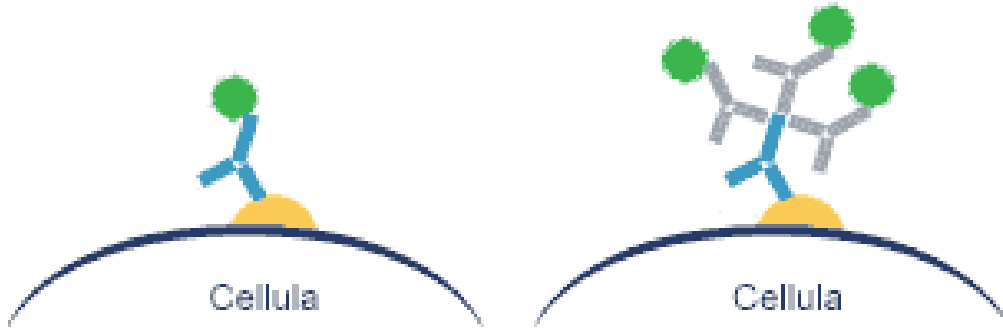
Esperimento di immunofluorescenza indiretta

Abbiamo seguito le procedure (distacco e cambio di terreno) necessarie al mantenimento delle colture cellulari (Astrocitomi) perché potessimo sperimentare l'Immunofluorescenza, metodo con il quale è possibile marcare precisi antigeni tramite fluorescenza.



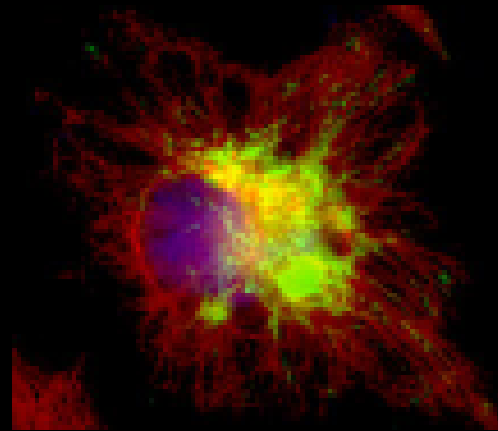
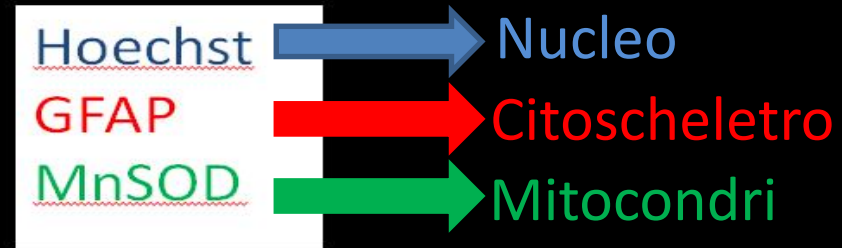
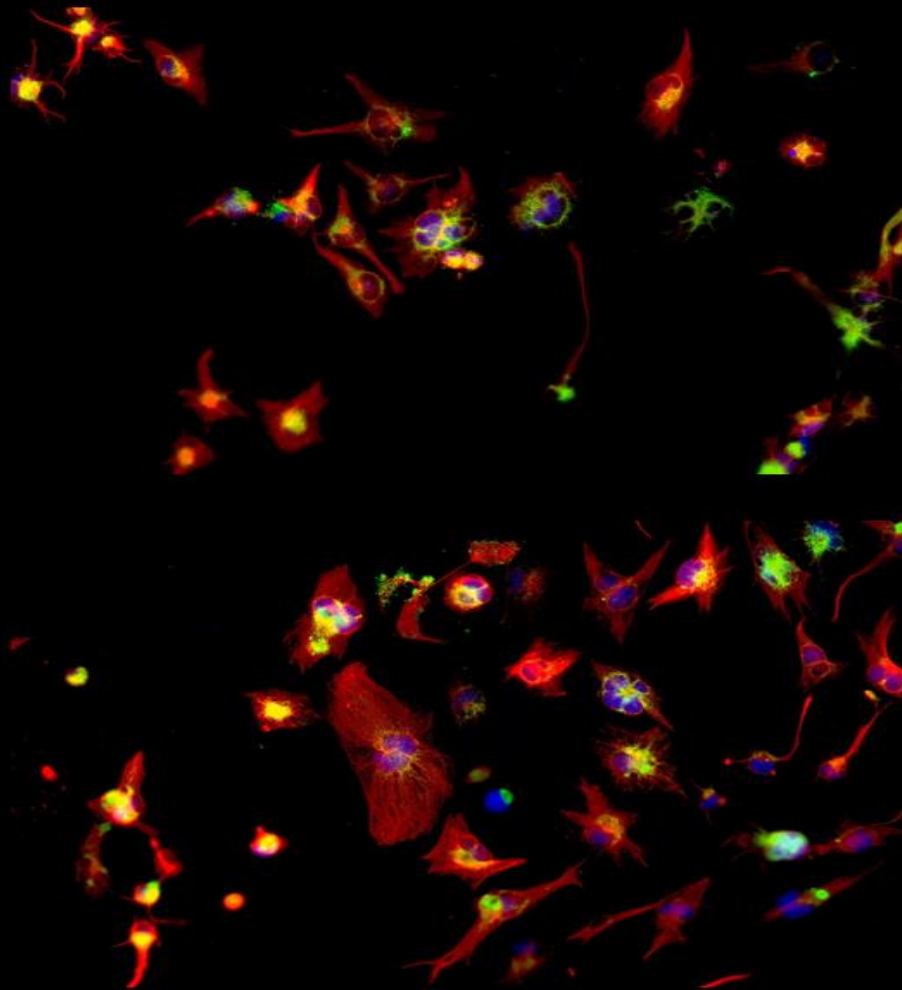
Diretto

Indiretto



- Antigene
- Anticorpo primario
- Anticorpo secondario
- Fluoroforo

Immunofluorescenza

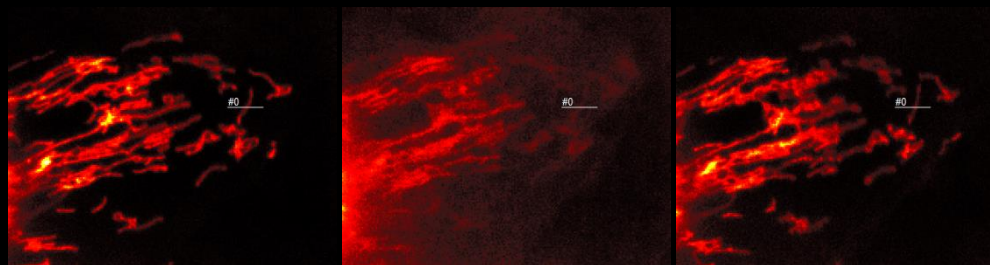
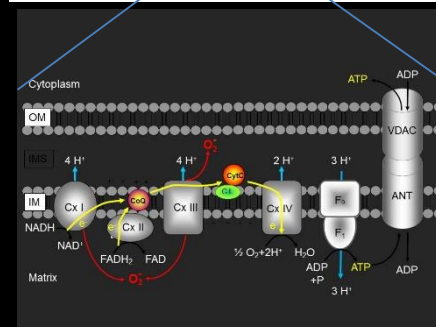
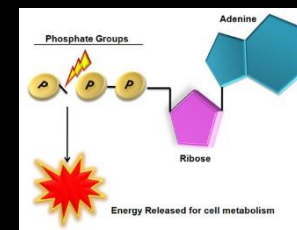
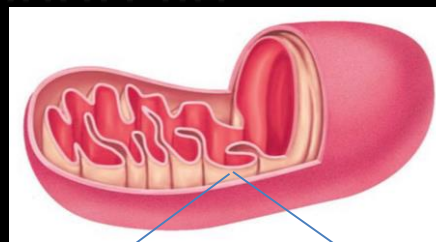


Esperimento di registrazione del potenziale di membrana mitocondriale

Scopo

Misurazione del potenziale di membrana mitocondriale in un esperimento di video-fluorescenza

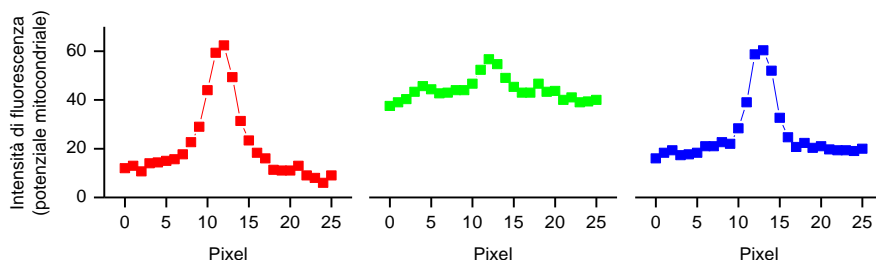
Visualizzazione dell'effetto di un agente che depolarizza i mitocondri (disaccoppiante mitocondriale chiamato FCCP).



Disegno sperimentale

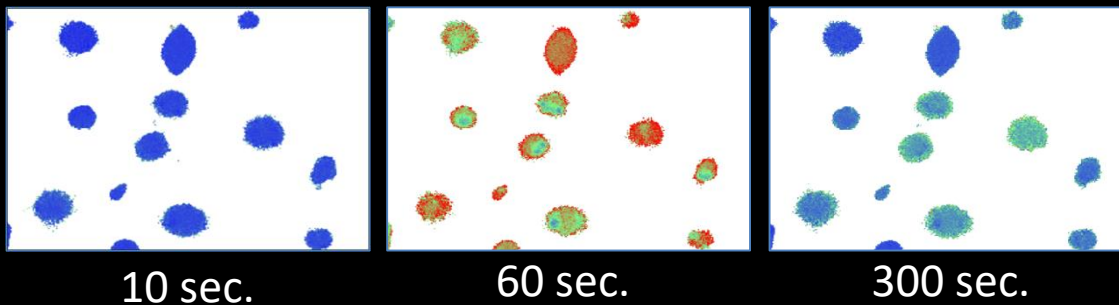
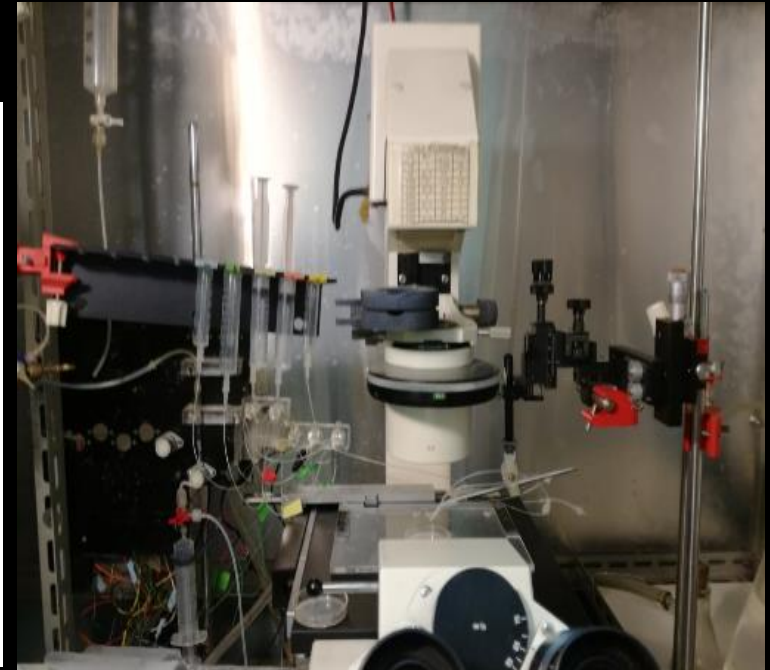
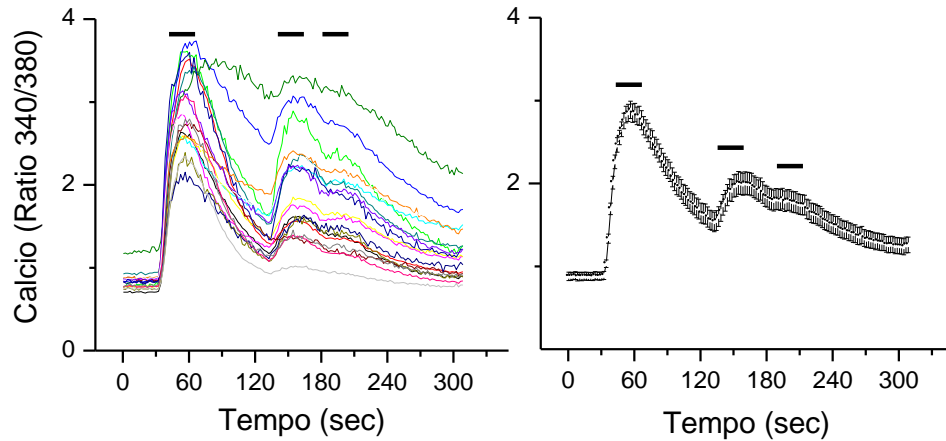
Si è utilizzata una sonda denominata TMRE per la misurazione del potenziale di membrana mitocondriale (mMP) in un esperimento di video-fluorescenza;

Cos'è il TMRE: sonda fluorescente cationica (carica +) che si localizza nei mitocondri tanto più il loro potenziale di membrana è negativo.



Esperimento di registrazione del Ca^{+2} intracellulare

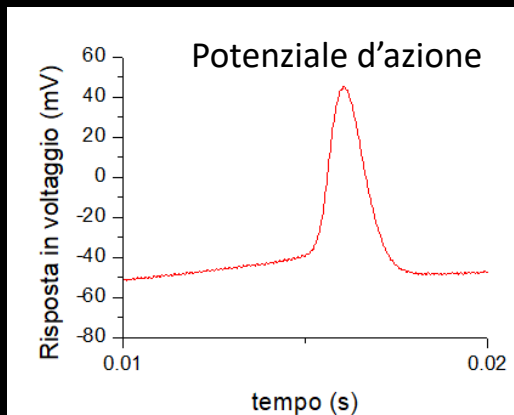
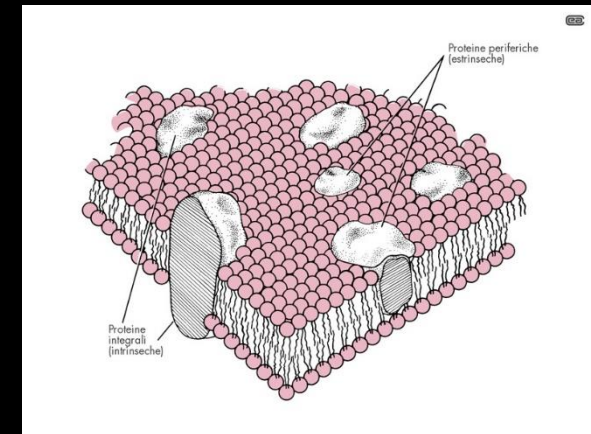
- **Introduzione:** Lo ione Ca^{+2} è utilizzato dall'organismo come messaggero intracellulare. Mantenuto dalla cellula a bassa concentrazione nel citoplasma, questa varia in risposta a certi stimoli.
- **Scopo:** Valutare l'effetto sulla cellula di una sostanza, la ionomicina, che provoca un aumento della concentrazione di ioni Calcio nel citoplasma.



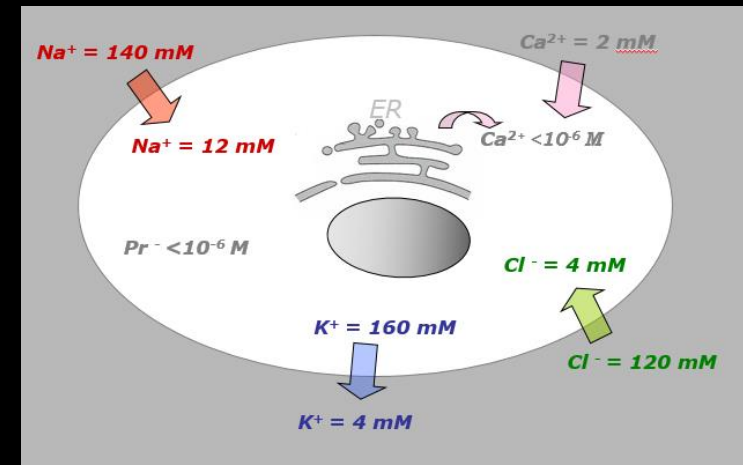
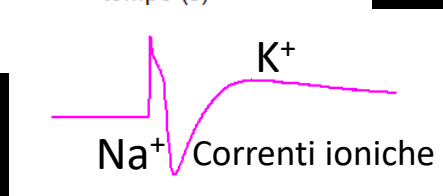
Esperimento di elettrofisiologia con la tecnica del patch-clamp

L'elettrofisiologia studia le proprietà elettriche delle cellule: potenziale di membrana, correnti ioniche.

Il potenziale di membrana è dovuto alla diversa distribuzione degli ioni dentro e fuori la cellula, a loro volta dovuti a meccanismi che consumano energia, quindi dipendenti dai mitocondri.



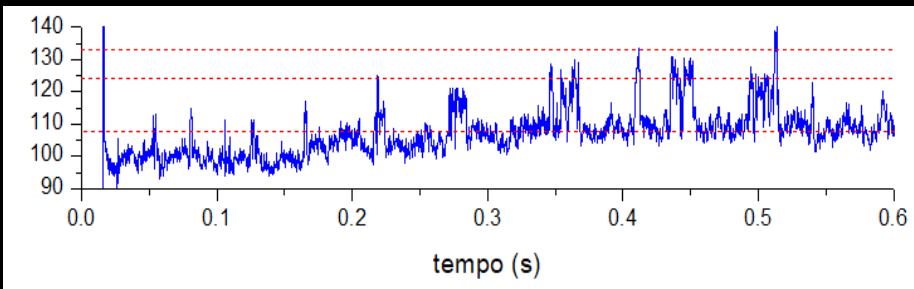
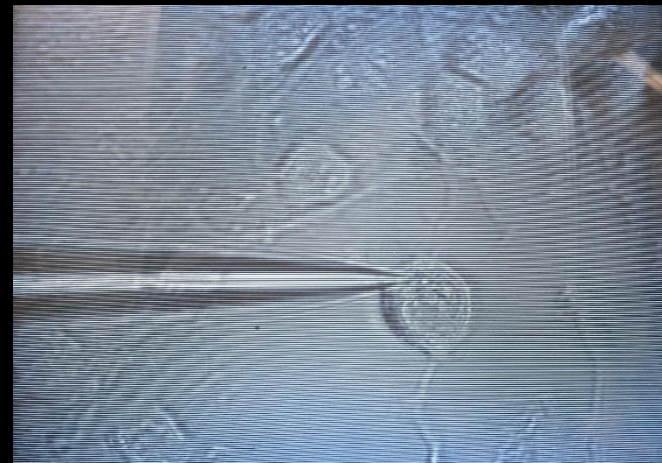
Nelle cellule eccitabili il potenziale d'azione è una variazione di potenziale che si propaga come un'onda lungo l'assone.



Scopo: registrazione di potenziali d'azioni, di corrente complessiva cellulare e da singolo canale

Esperimento di elettrofisiologia

Esperimento: si costruiscono gli elettrodi di vetro a punta molto piccola e lo si riempie di salina.
 Al microscopio e con l'uso di un micromanipolatore si avvicina la punta dell'elettrodo alla cellula.
 Si applica una suzione per migliorare l'adesione elettrodo/membrana (cell-attach), se sei fortunato trovi un canale e ne registri l'attività:



Canali ionici singoli

Applichi altra suzione fino a rompere la membrana dentro la bocca dell'elettrodo (whole-cell)

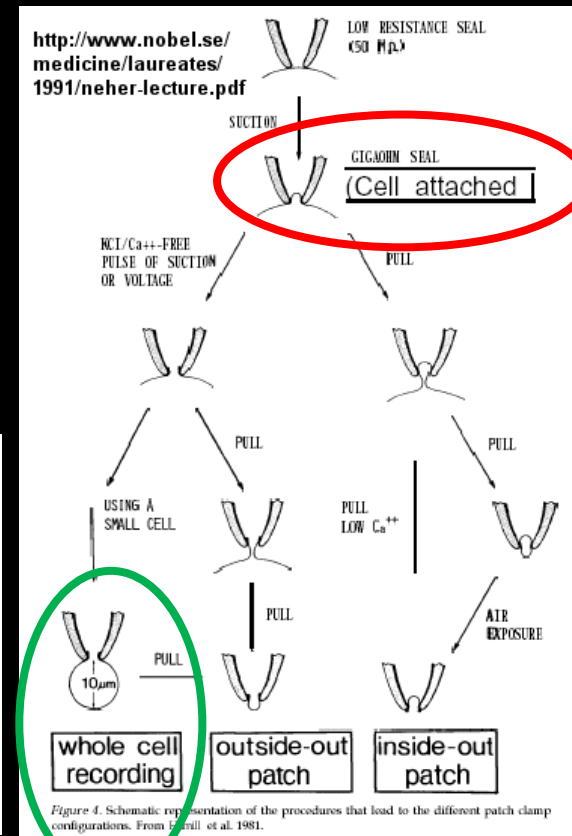
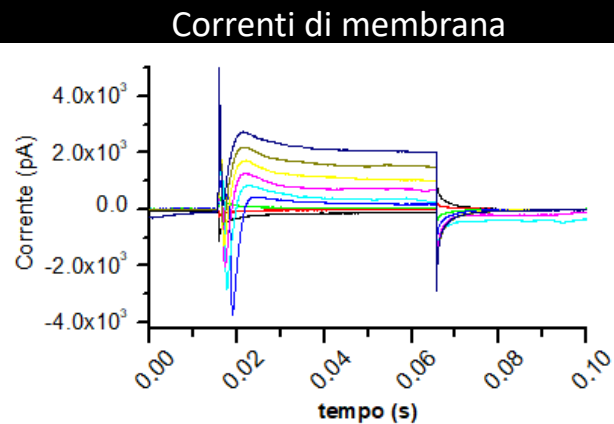
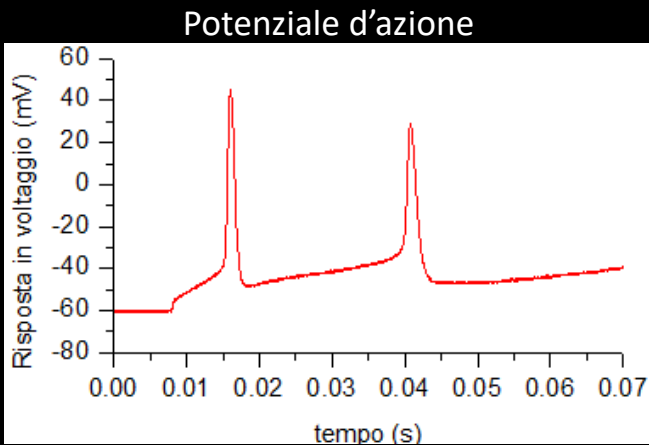



Figure 4. Schematic representation of the procedures that lead to the different patch clamp configurations. From Hamill et al. 1981.



Il gruppo che ci ha ospitato utilizza queste tecniche per l'identificazione di farmaci che, agendo sulla biogenesi e protezione mitocondriale, siano capaci di promuovere:

- l'attività astrocitaria,
- la mielinizzazione
- l'attività neuronale.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Ringraziamo l'ISS per averci fornito gli strumenti per la nostra esperienza, e i tutor che, grazie alla loro formazione, ci hanno trasmesso la passione per queste attività