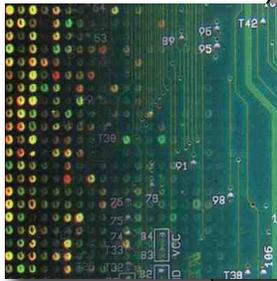
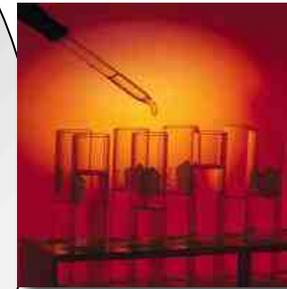




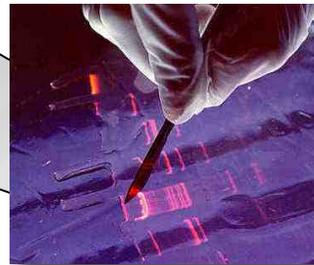
Tecniche morfologiche



bioinformatica



Tecniche biochimiche

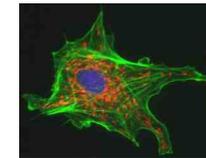
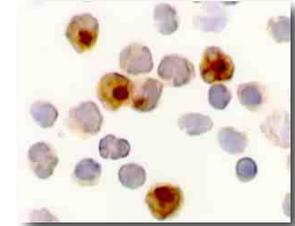


Tecniche biomolecolari



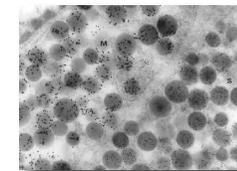
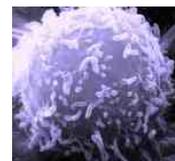
Microscopia ottica (per campioni colorati)

- Campo “chiaro”
- Campo “scuro” (fluorescenza)
 - classico oppure confocale



Microscopia elettronica

- SEM (a scansione)
- TEM (a trasmissione)



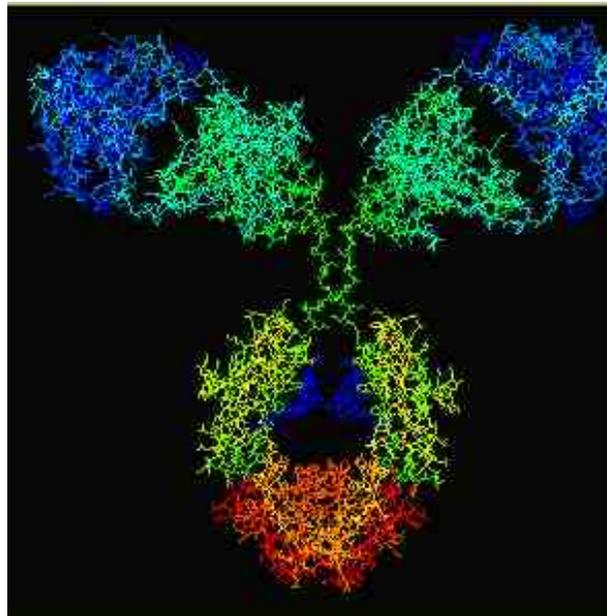
IMMUNOISTOCHEMICA

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

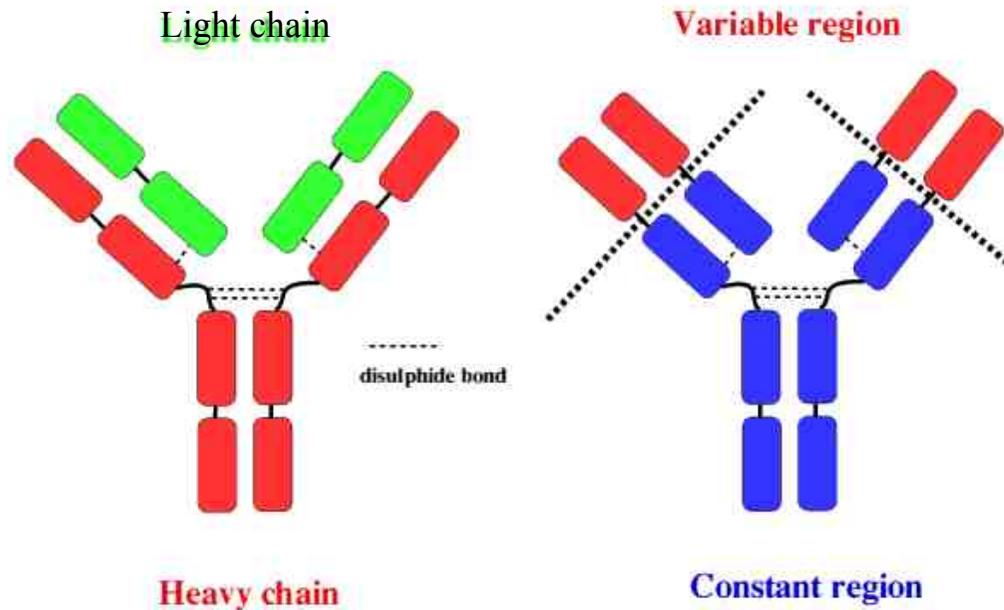
Gli anticorpi sono proteine prodotte dal sistema immunitario come difesa contro sostanze estranee; sono proteine del gruppo delle globuline (*immunoglobuline*).

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

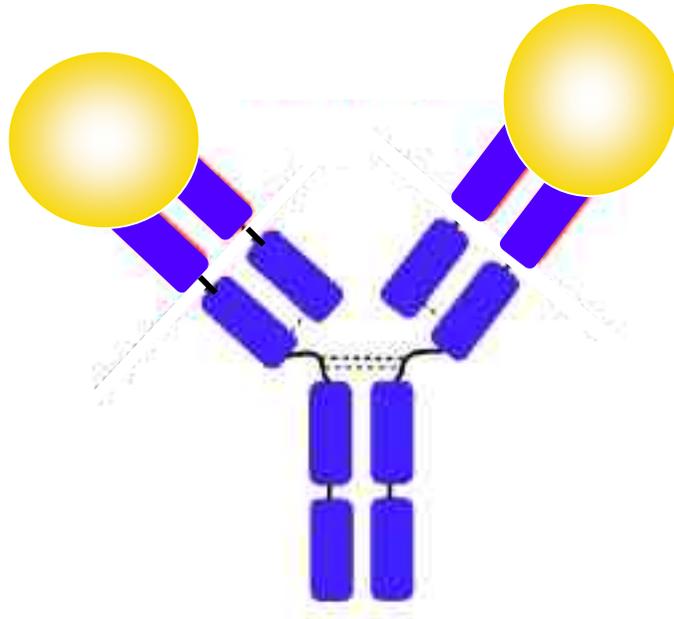
Anticorpi sono proteine formate da 4 catene polipeptidiche legate fra di loro da legami covalenti (ponti di solfuro)



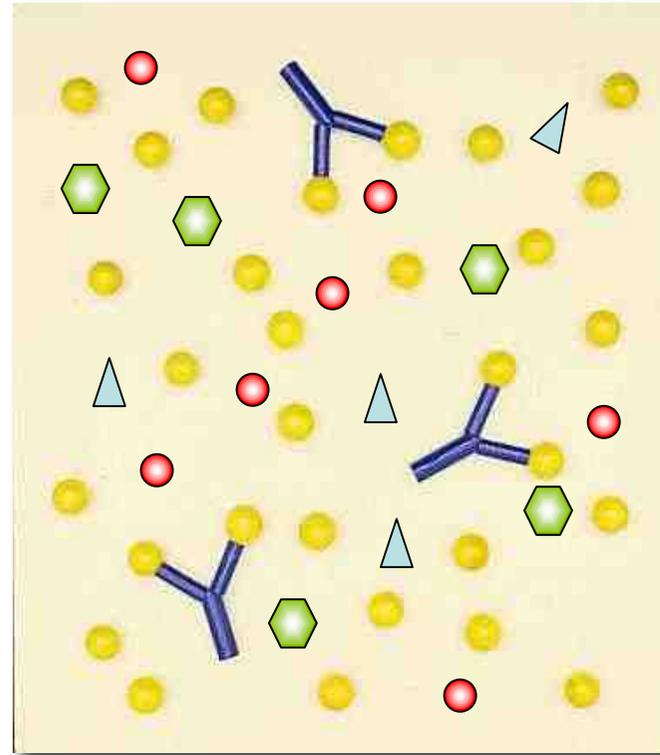
Basic structure of an Antibody



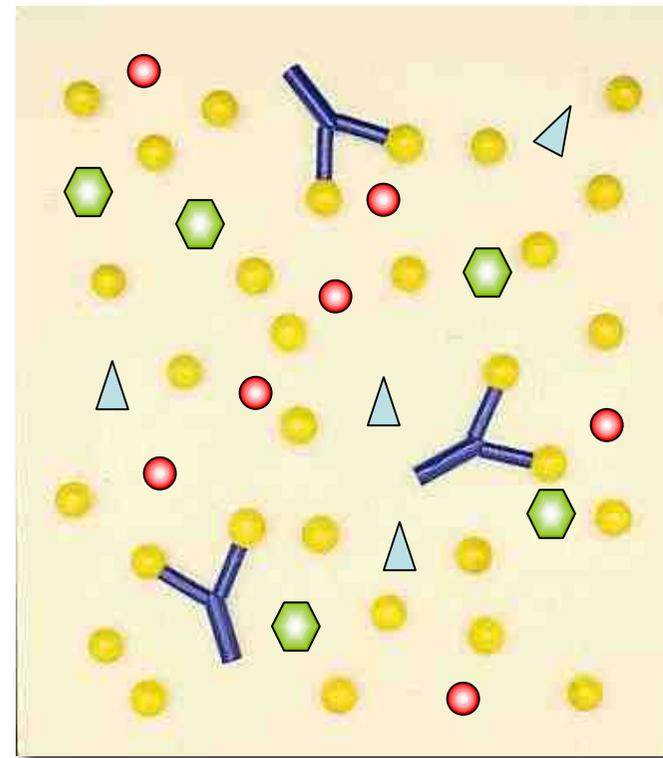
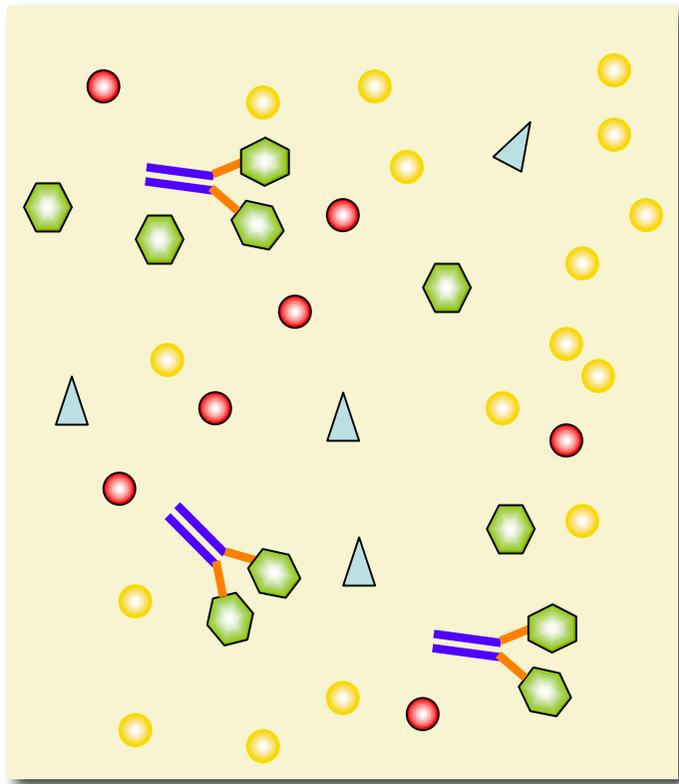
Regioni "variabili"



Regione "costanta"

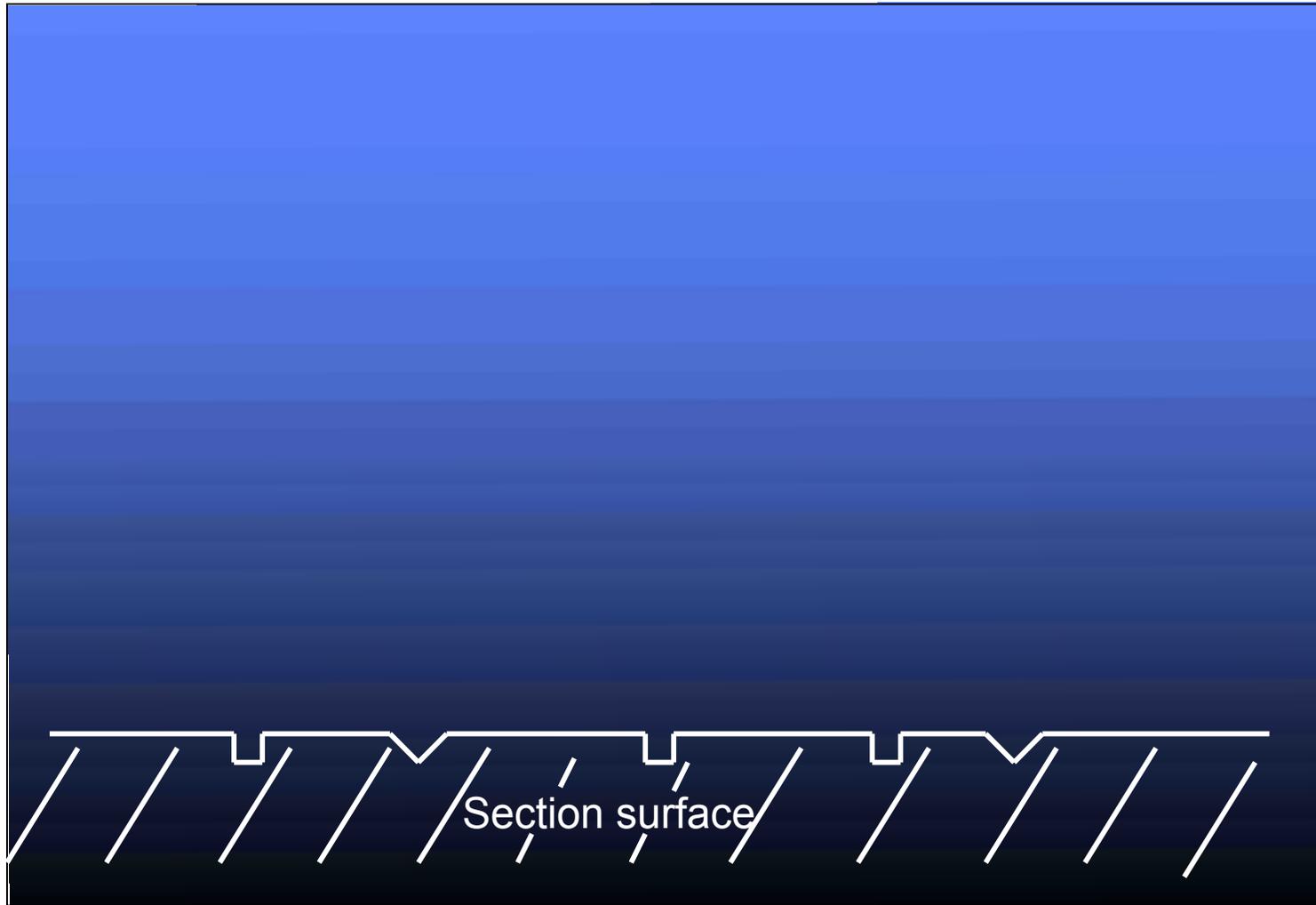


Due anticorpi prodotti nella stessa specie (parte costanti simili) ma diretti verso antigeni diversi (parte variabili diversi)

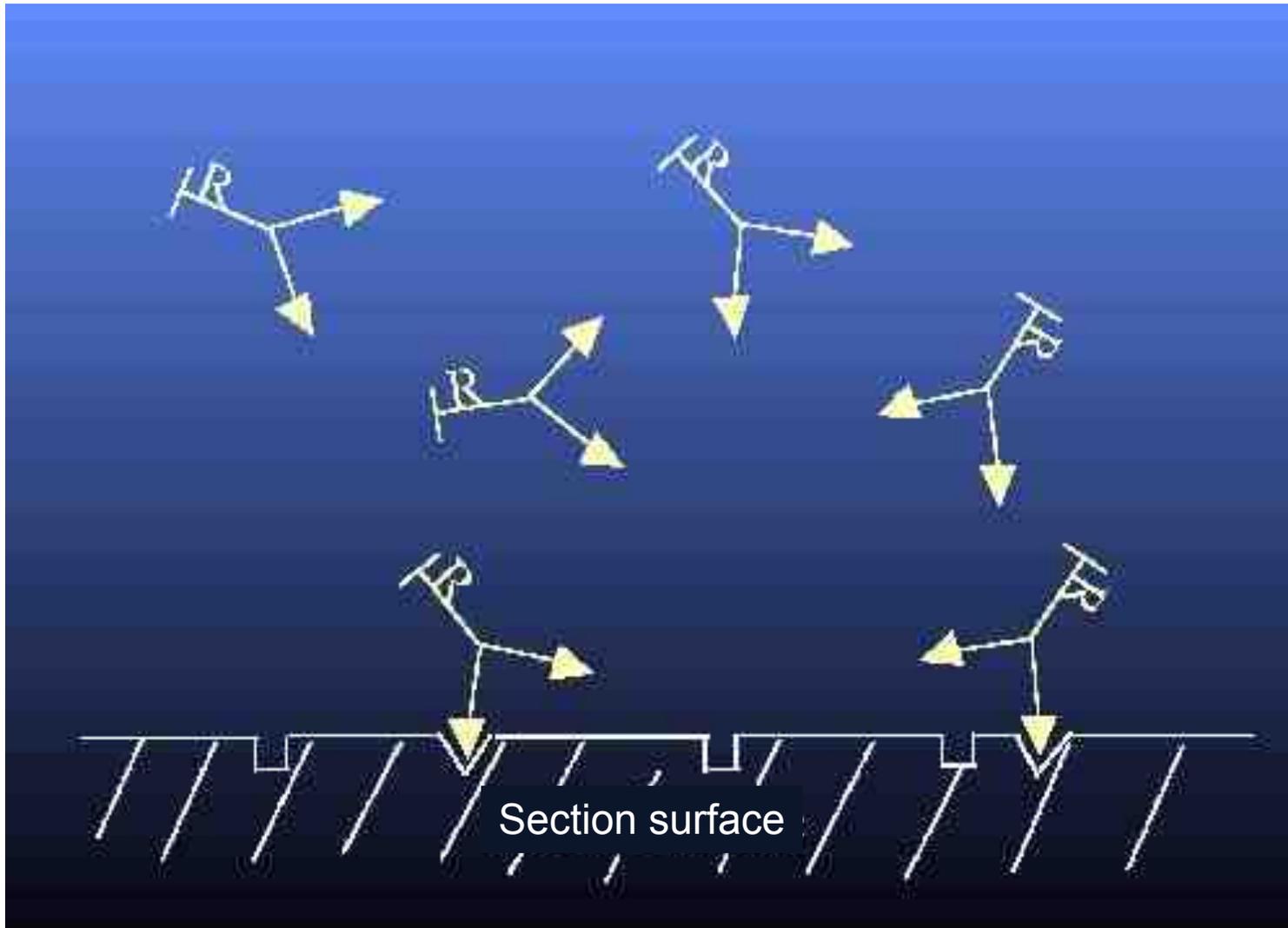


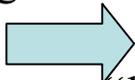
1

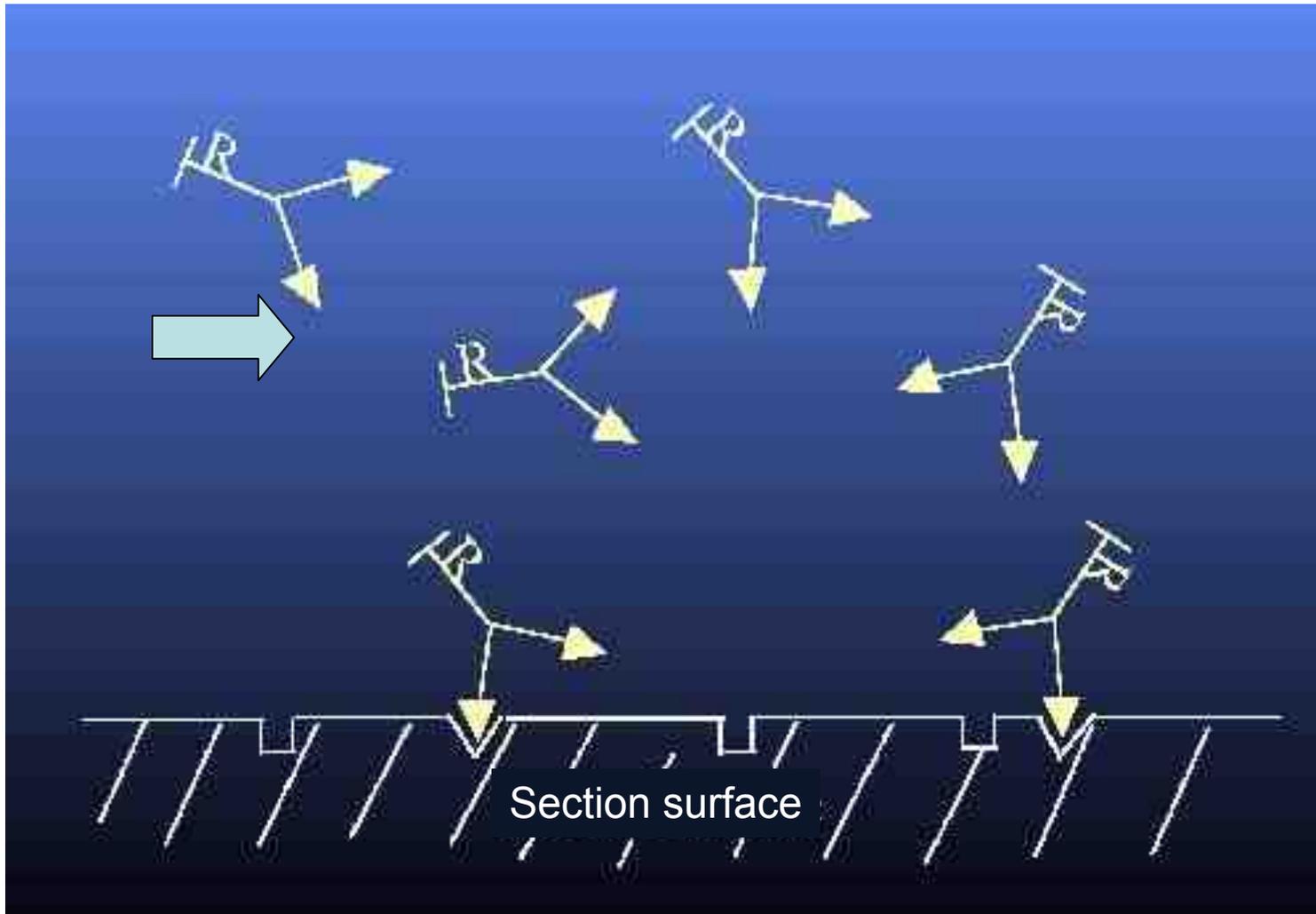
Tessuto (o cellule) fizzato (esempio: paraformaldeide), tagliato (esempio microtomo) e fatto aderire su un porta oggetto



- ② Sezione incubata con una goccia di anticorpo “primario” diretto contro uno specifico “antigene”. Nell’esempio, l’anticorpo è stato prodotto in coniglio (R=rabbit)



- ② Lavaggio via della frazione che non si è legata all'antigene
Nota: nelle diapositive successive lo stesso simbolo  verrà utilizzato per indicare tutte le volte in cui si procede con un "lavaggio" delle molecole che non hanno interagito



per identificare l'interazione “anticorpo-antigene” si possono utilizzare diversi approcci in funzione della tecnica che si intende applicare:

Anticorpo coniugato ad un attività enzimatica:

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

Anticorpo coniugato ad un fluorocroma:

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

Anticorpo coniugato a particelle d'oro:

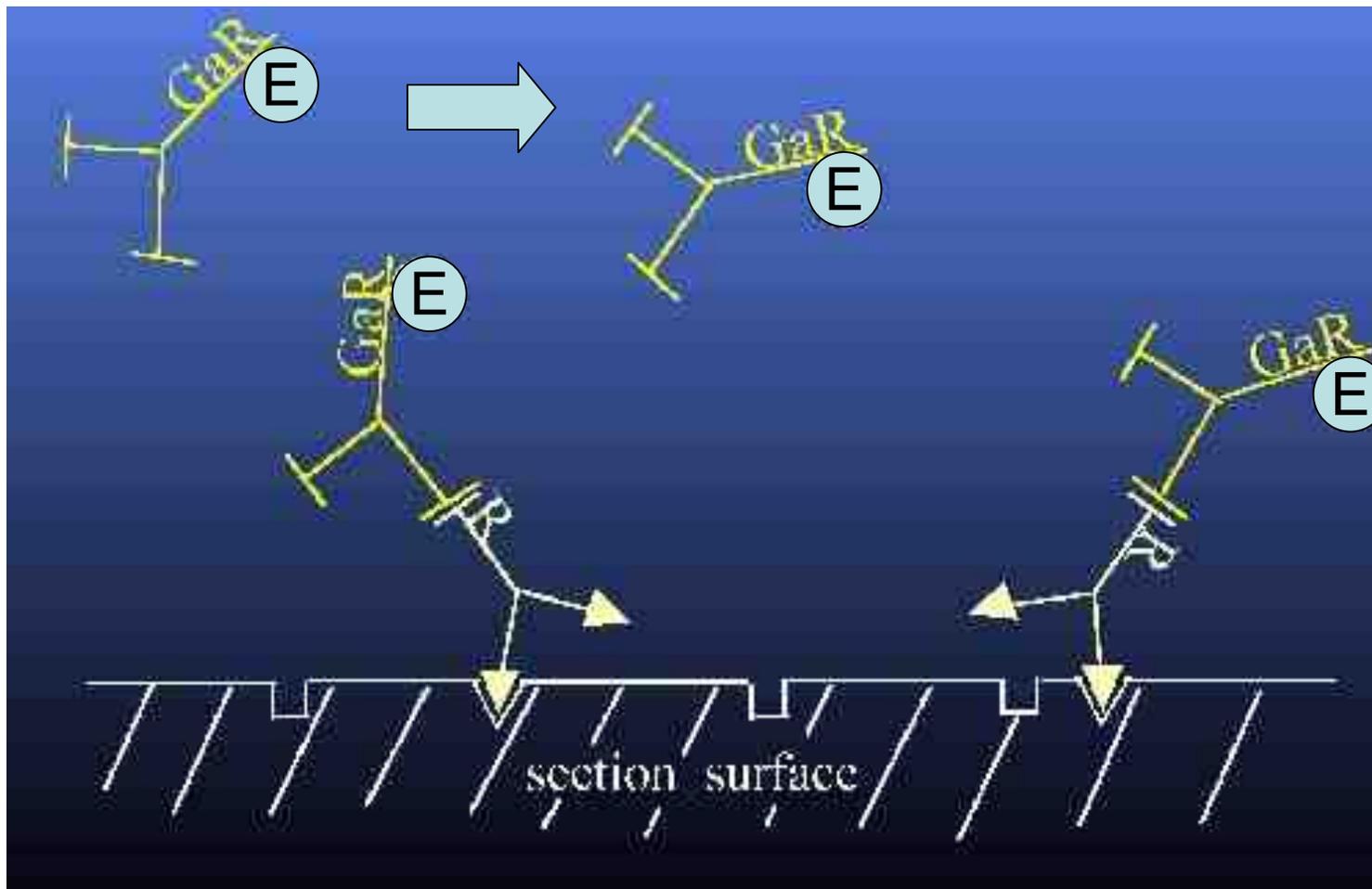
---> Immunogold ---> microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

- := (** Reazione immunoistochimica diretta:
l'anticorpo modificato è quello primario.
Questo approccio non è praticamente mai usato perché poco versatile. Necessità di avere per ciascun anticorpo primario le diverse forme modificate

- :=)** Reazione immunoistochimica indiretta:
Si rivela l'interazione anticorpo primario (non modificato)- antigene d'interesse, attraverso l'uso di un anticorpo secondario prodotto in una diversa specie rispetto all'anticorpo primario e diretto contro la parte costante dell'anticorpo primario. In questo caso è l'anticorpo secondario ad essere modificato.
Questo approccio è quello scelto nel 90% dei casi.

Anticorpo coniugato ad un attività enzimatica:

- 3 Nell'esempio la sezione della reazione precedente è stata incubata con un anticorpo secondario prodotto in capra (goat) diretto contro la parte costante delle immunoglobuline di coniglio (goat-anti rabbit= GaR) e coniugato con un attività enzimatica (E)



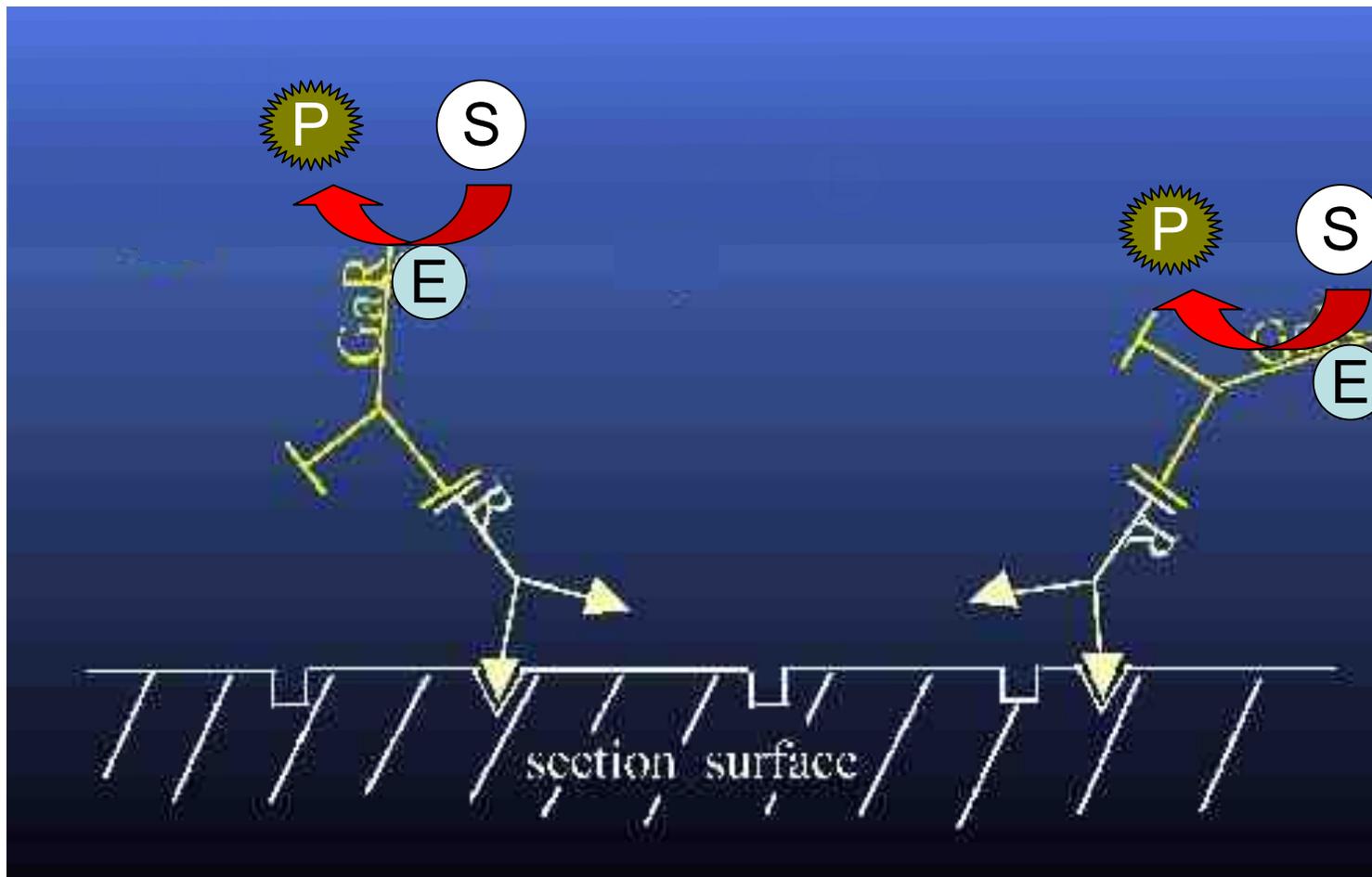
Sezione incubata in presenza del substrato dell'enzima

4

E = enzima (perossidasi)

S = substrato (DAB)

P = prodotto della
reazione
enzimatica



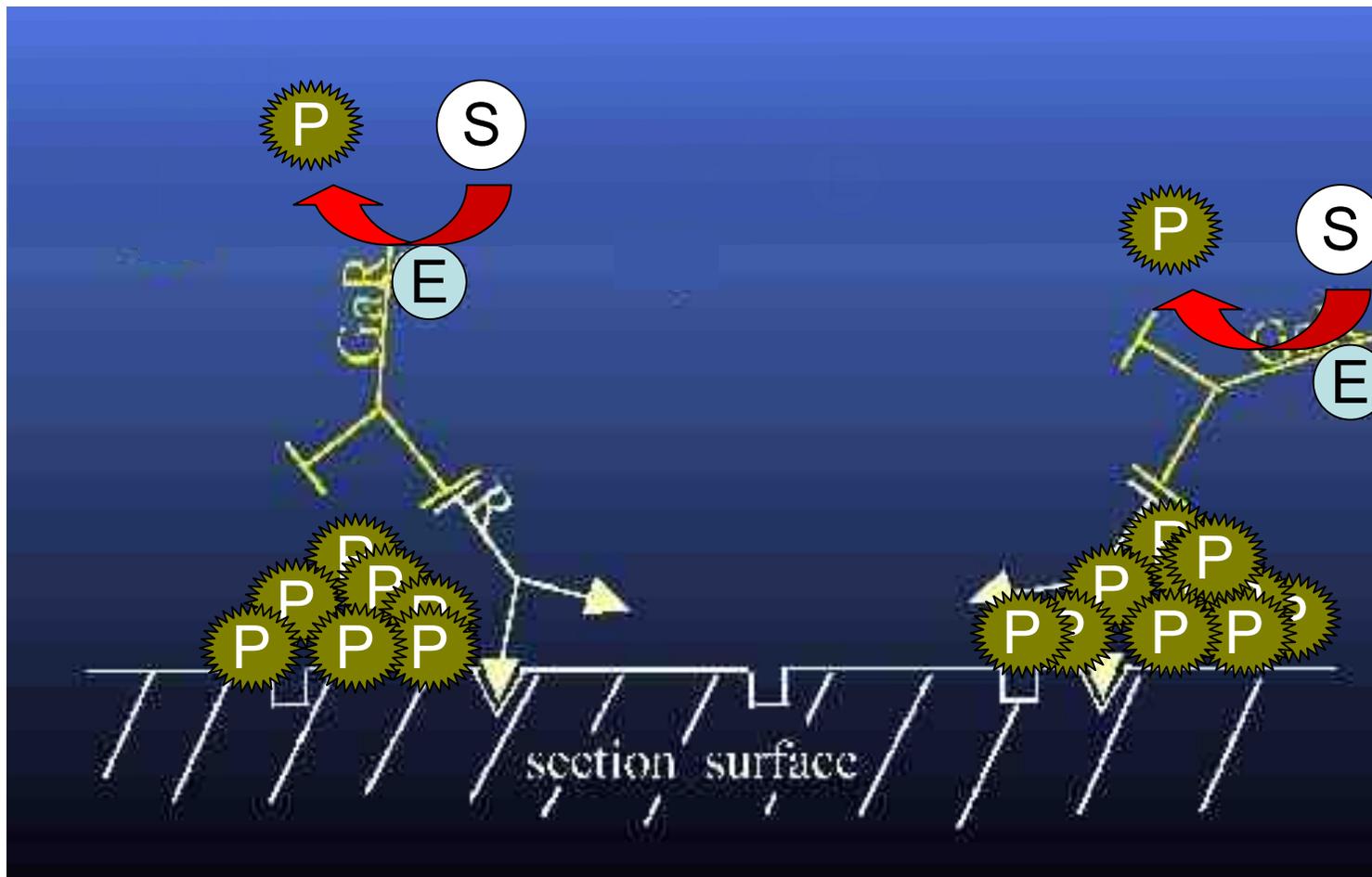
Il prodotto della reazione enzimatica precipita in corrispondenza dell'interazione antigene-anticorpo primario

5

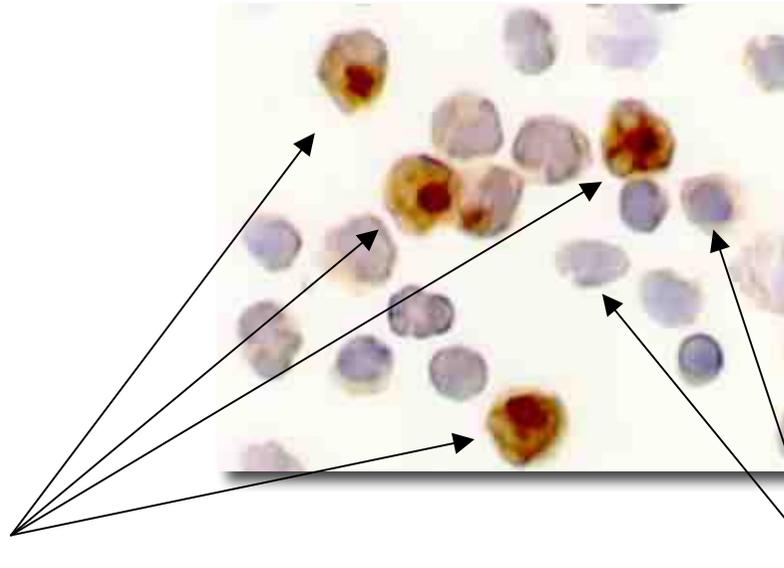
E = enzima (perossidasi)

S = substrato (DAB)

P = prodotto della reazione enzimatica



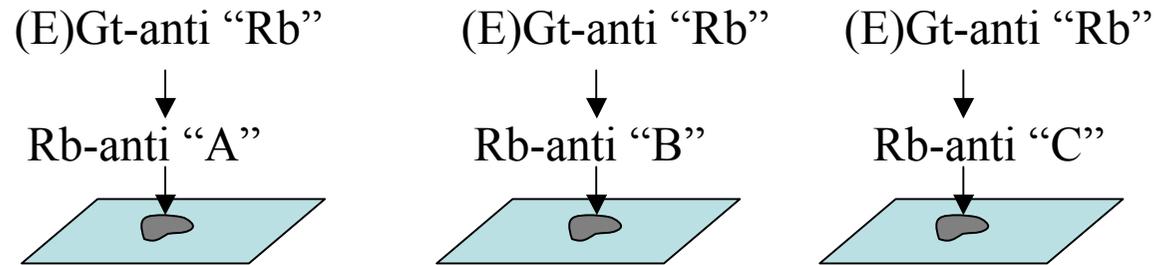
Ad esempio, ecco il risultato dell'osservazione di cellule mononucleate del sangue sottoposte a reazione immunoenzimatica con un anticorpo primario diretto contro la molecola "IL-6" (=antigene)



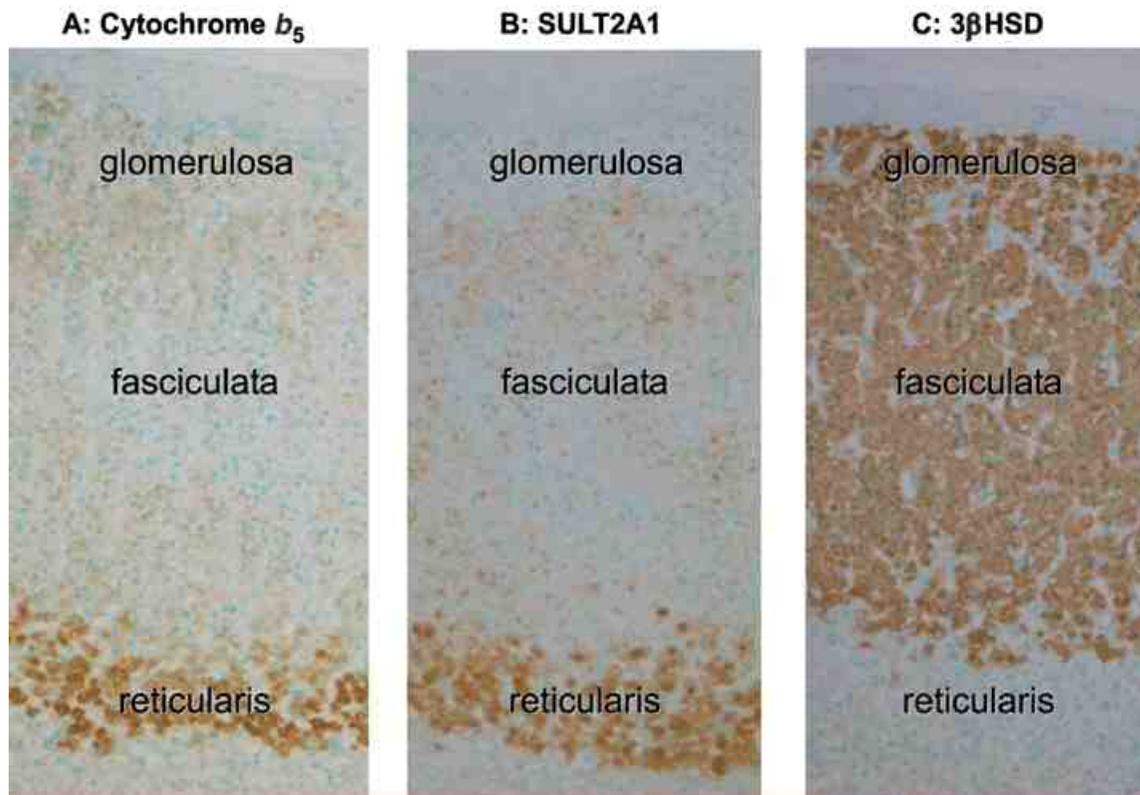
In questo campo, 4 cellule sono "positive all'IL-6" (la colorazione rivela la presenza di IL-6)

Le altre cellule, nonostante le similitudini morfologiche sono "negative all'IL-6"

Altro esempio: sezioni seriali di tessuto sottoposte a reazioni contro 3 antigeni diversi:



Immunohistochemistry of Adrenal Cortex In Early Adrenarche



Risultato dell'osservazione: "A" e "B" sono entrambi presenti nello strato reticularis ma non identificati negli altri due strati)

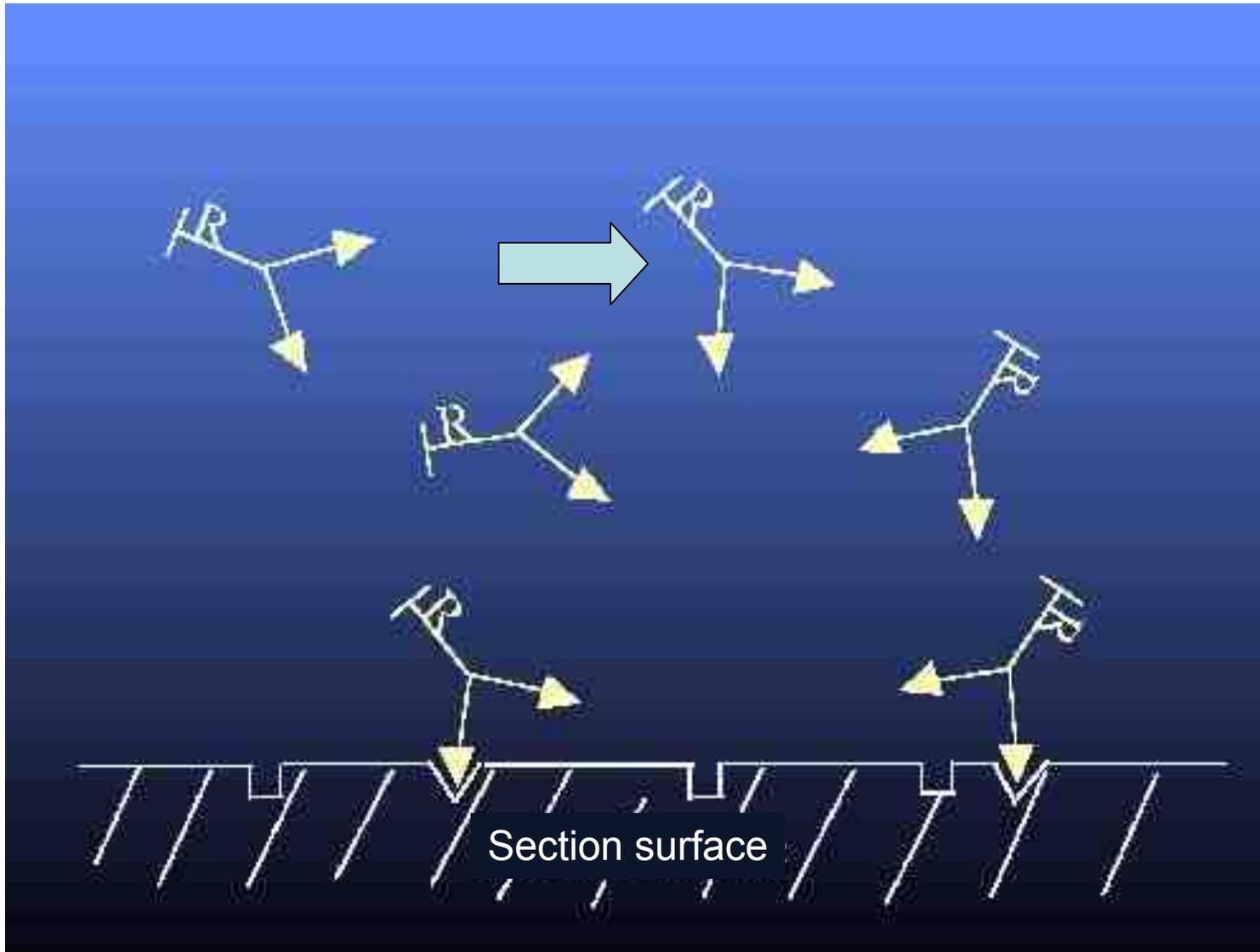
Risultato dell'osservazione: "C" è espresso da cellule dello strato "glomerulosa e dallo strato "fasciculata". Questa reazione accomuna i 2 strati (non sono indistinguibili). "C" non è espresso dallo strato reticularis.

“A” e “B” sono stati identificati nello stesso strato cellulare ma le reazioni immunoenzimatiche non permettono di risolvere se queste due molecole sono espresse dalle stesse cellule o da cellule diverse che appartengono al medesimo strato.

L'immunofluorescenza permette 1) di avere una maggiore risoluzione dell'informazione rispetto alla precipitazione di un cromoforo (reazione enzimatica) e 2) di realizzare più facilmente delle “doppie” marcature.

Immunofluorescenza

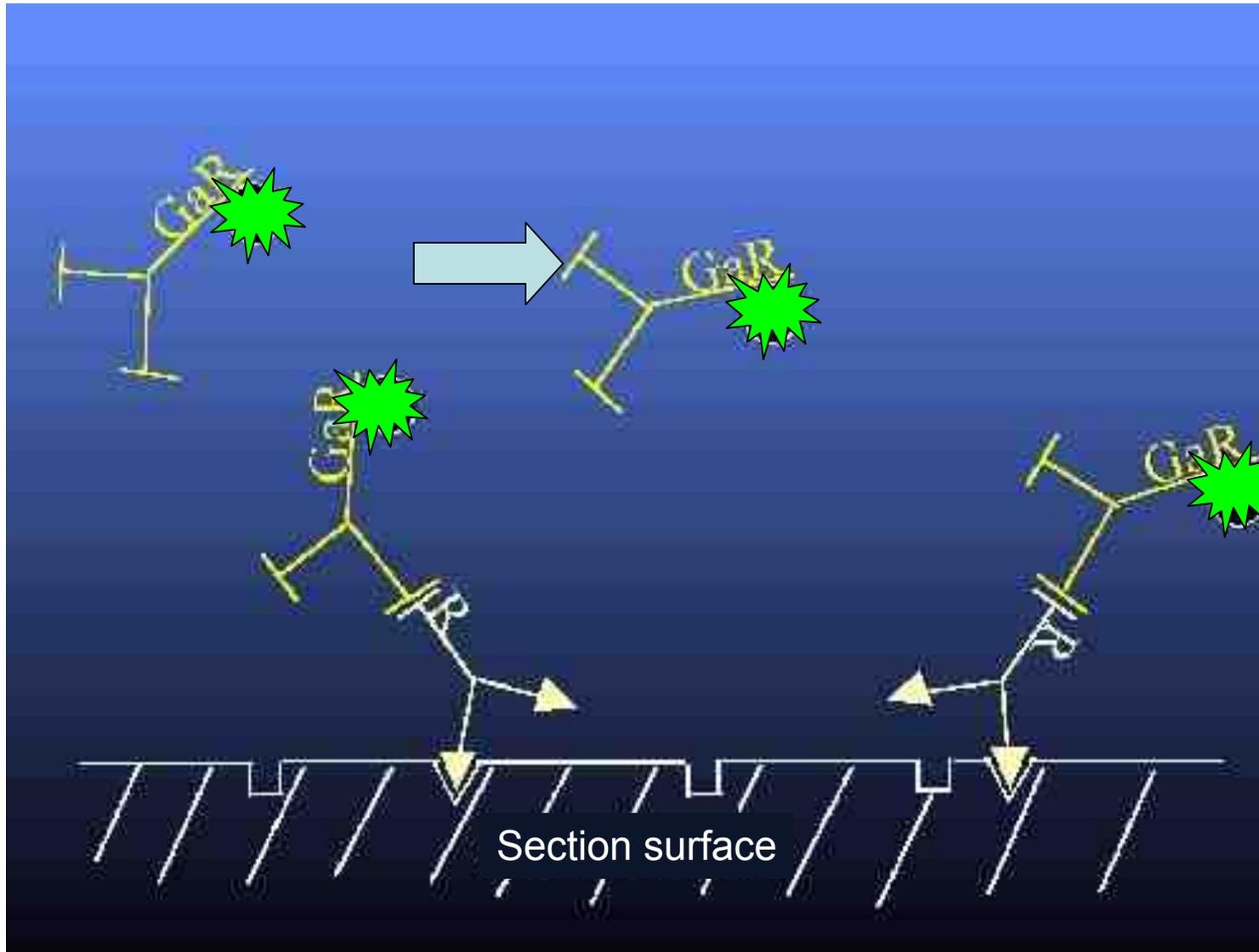
- 1 Incubazione con l'anticorpo primario



2

Anticorpo secondario (GaR) coniugato a un fluorocromo:

 Fluorescein isothiocyanate (FITC)



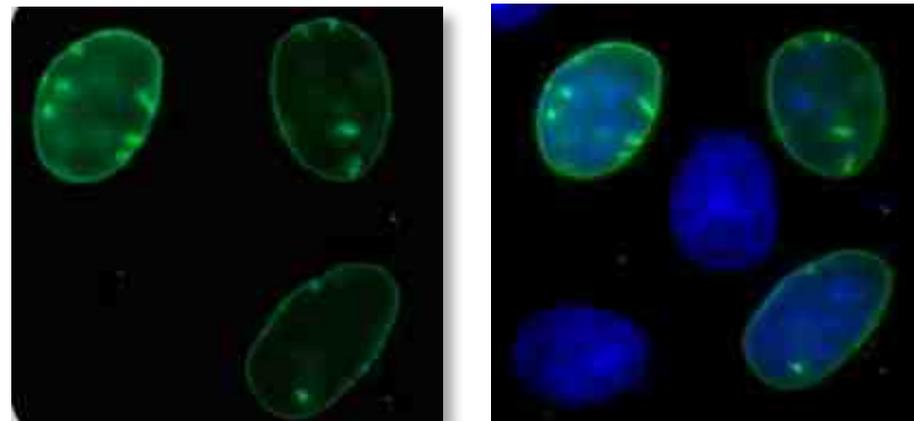
Osservazione al microscopio a fluorescenza (campo scuro)

Esempio di reazione di cellule sottoposte a reazione di immunofluorescenza contro una lamina nucleare B1.



Lamin-B1 (verde) e marcatura generica per il DNA (Hoechst 33342 , blue.

Osservazione con il microscopio a fluorescenza (“campo scuro”: sfondo nero)



Osservazione: Il campo comprende 5 cellule (visibili 5 nuclei) di cui 3 sono immuno positive per la lamina (3/5 cellule con marcatura verde). La localizzazione della lamina B1 segue il perimetro del nucleo e indica una localizzazione intranuclare associata all’involucro nucleare. Da questa osservazione non si conosce la morfologia della cellula (non è visibile il perimetro della cellula).

“Doppia” immunofluorescenza

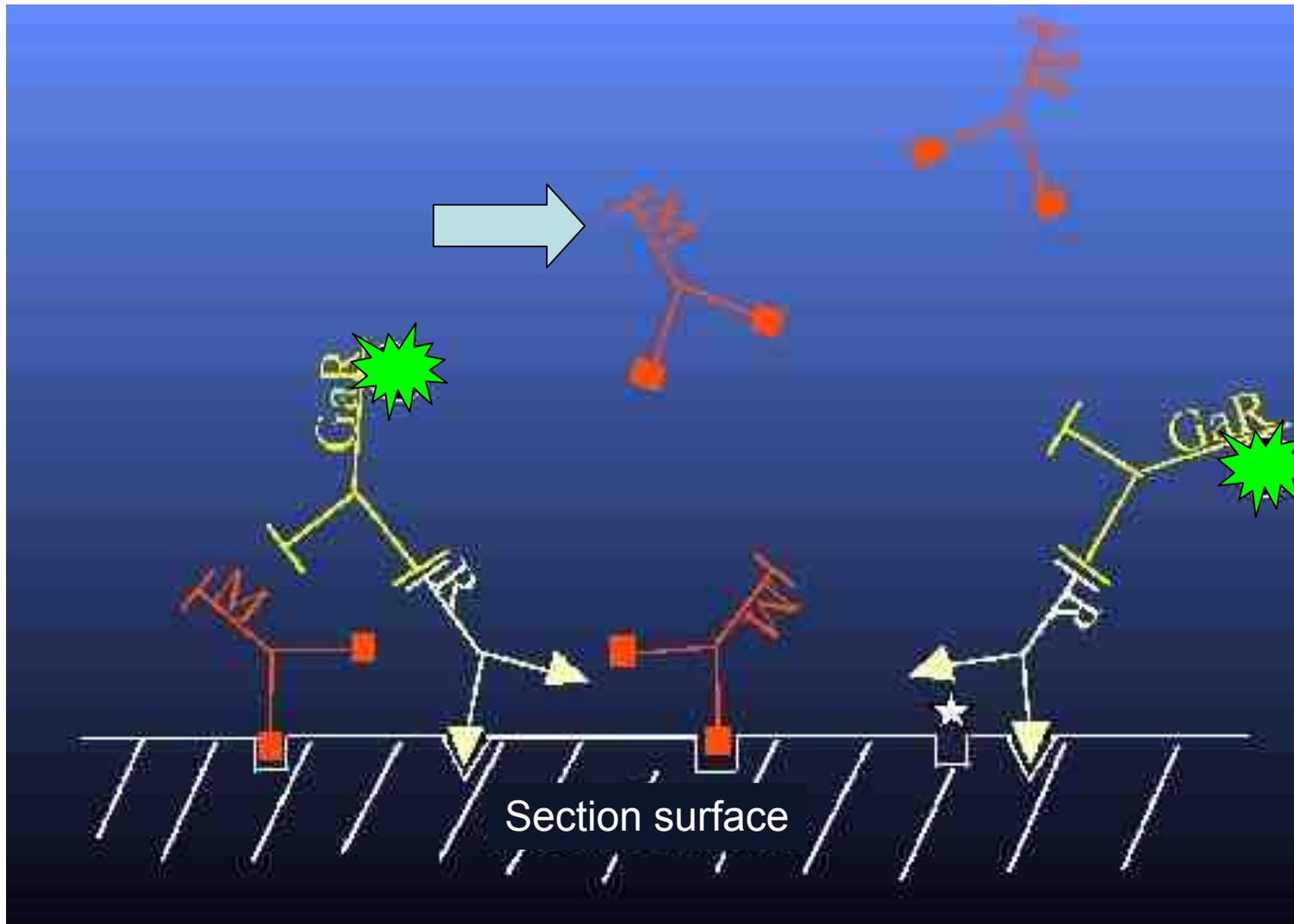
= Doppia marcatura = due reazioni svolte sulla stessa sezione (non su sezioni consecutive).

Come principio generale, le doppie marcature sfruttano la possibilità di utilizzare due anticorpi primari specifici di due antigeni diversi e prodotti in specie diverse.

La prima parte della reazione di doppia marcatura è identica a quella della singola marcatura delle diapositive precedenti.

Doppia immunofluorescenza

- 3 Dopo la prima reazione di immunofluorescenza la sezione è incubata con il secondo anticorpo primario. Nell'esempio il secondo anticorpo primario è stato prodotto in topo (M= mouse).

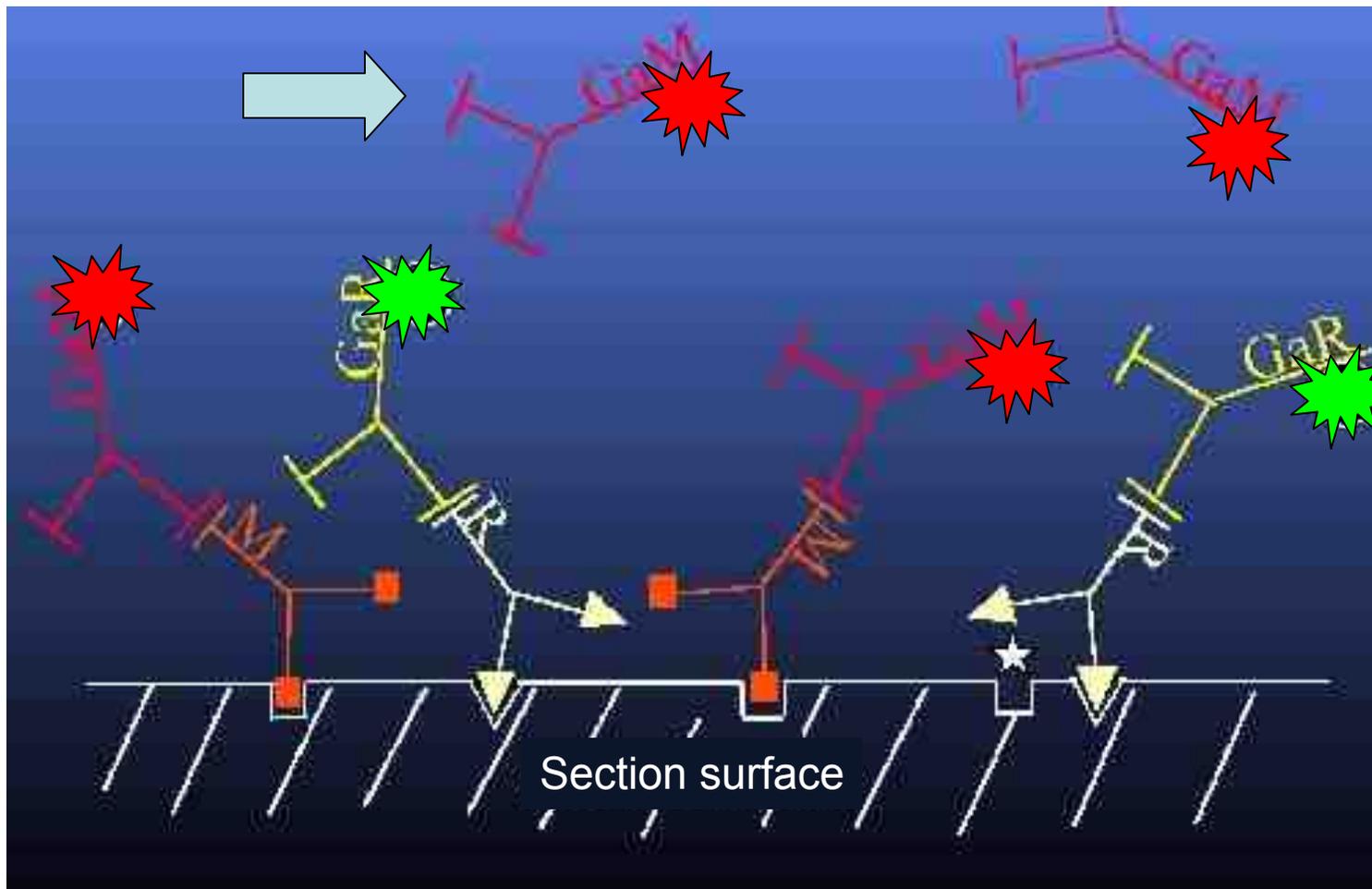


Doppia immunofluorescenza

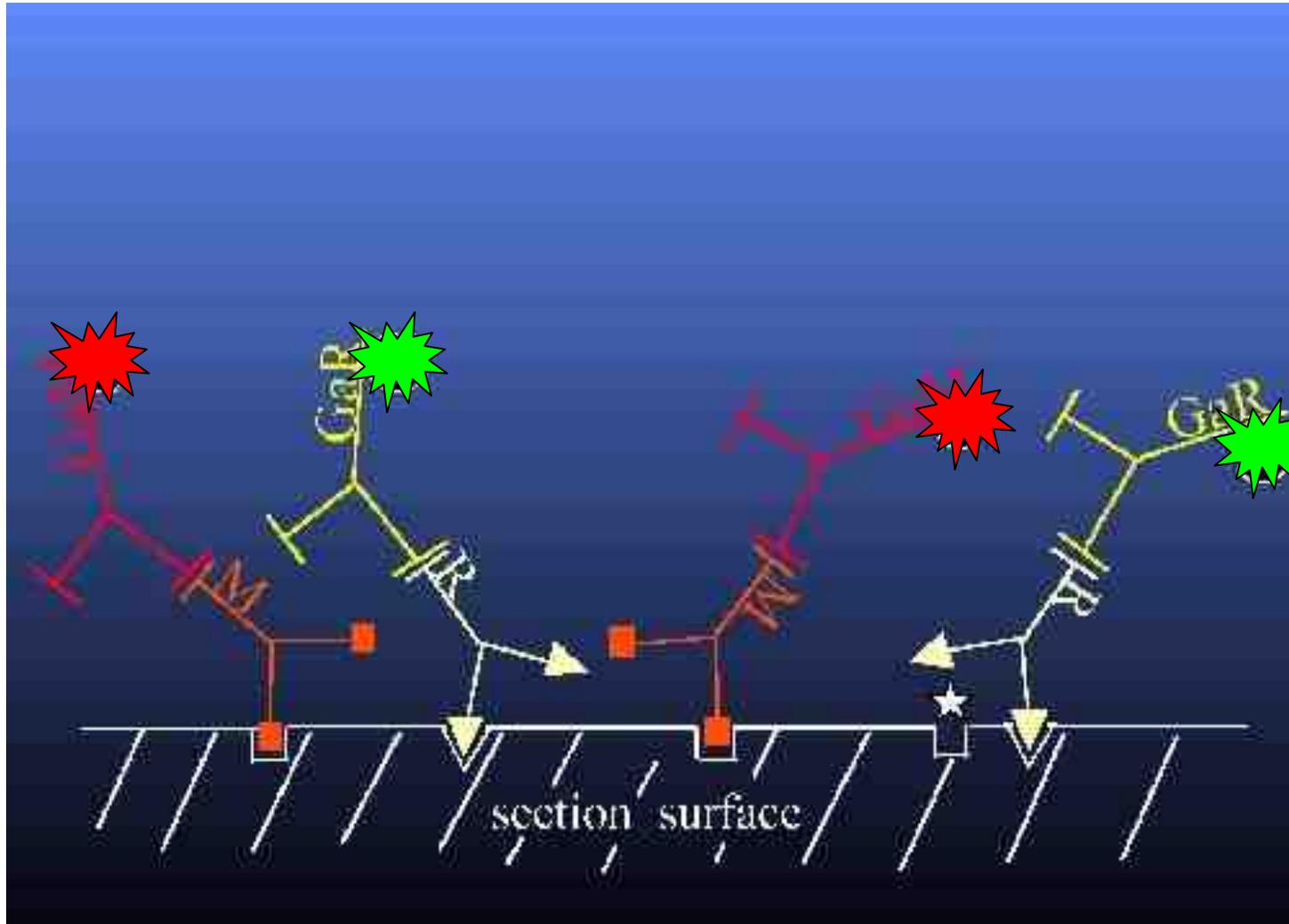
4

Segue l'incubazione con il 2° anticorpo secondario prodotto anche lui in capra in goat, ma diretto contro le immunoglobuline di topo (GaM) e coniugato ad un fluorocromo rosso.

 isothiocyanate (TRITC)

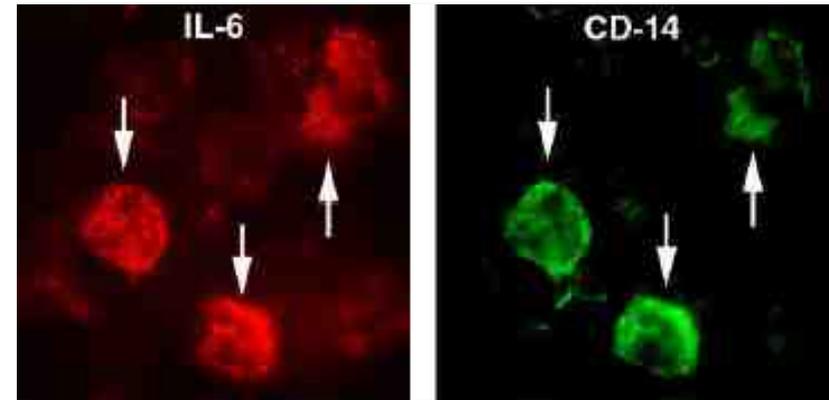


- 5 Risultato finale osservato al microscopio a fluorescenza tradizionale oppure confocal



Esempio di risultato di doppia immunofluorescenza. Lo stesso preparato è osservato ad una certa lunghezza d'onda per osservare la fluorescenza rossa e poi ad un'altra lunghezza d'onde per osservare la fluorescenza verde. Le due immagini sono dello stesso campo in due condizioni diverse di illuminazione.

Cellule mononucleate del sangue periferico di uomo sono state 1) incubate con un anticorpo primario anti-IL-6 prodotto in topo e rivelato con un anticorpo secondario coniugato al TRIC (rosso) e 2) con un anticorpo primario anti-CD14 prodotto in coniglio e rivelato con un anticorpo secondario coniugato alla FITC (verde).



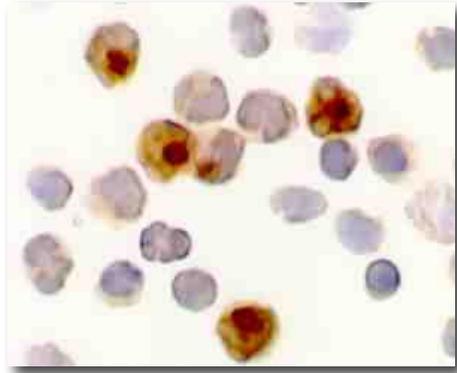
Il CD-14 è una molecola nota per essere espressa dai monociti.

Osservazione: La corrispondenza delle marcature (flecce bianche) indica che le stesse cellule esprimono IL-4 e CD-14. Il risultato permette di concludere che i monociti esprimono IL-6.

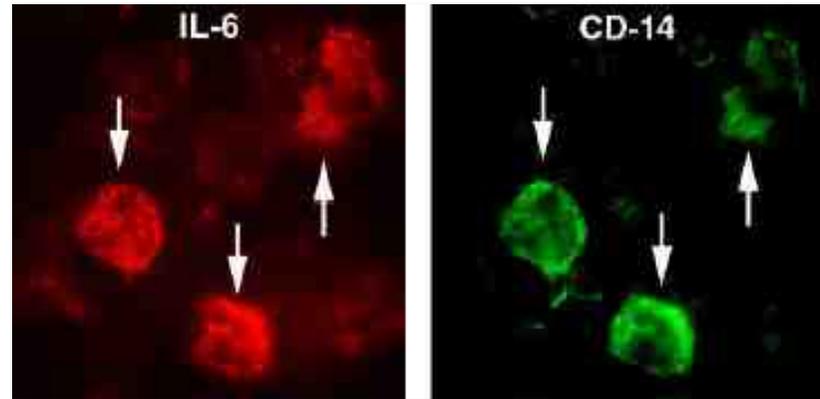
Nota: Nella foto di destra notare in sotto fondo una marcatura rossa meno intensa che sta ad indicare che nel campo sono presenti altre cellule mononucleate non positive per l'IL-6

Risultati a confronto:

Reazione immunoenzimatica
precedente per IL-6:



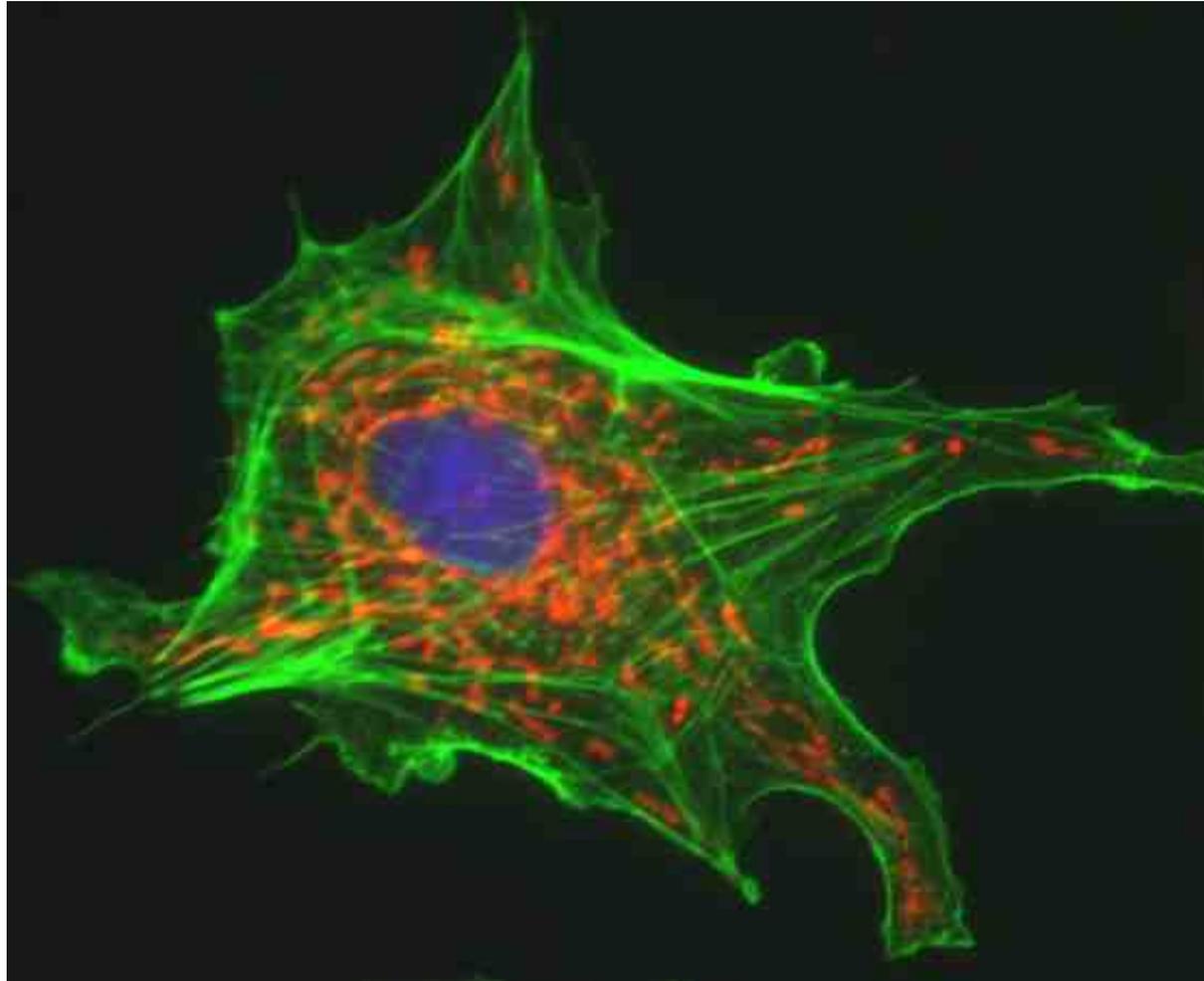
Doppia immunofluorescenza per IL-6 e CD-14



Risultato della reazione immunoenzimatica: alcune cellule mononucleate del sangue umano analizzate contengono IL-6.

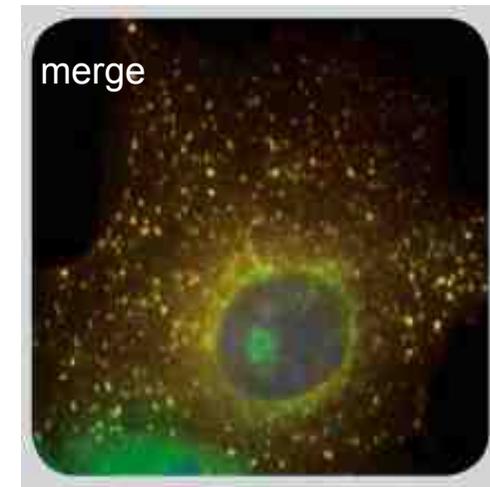
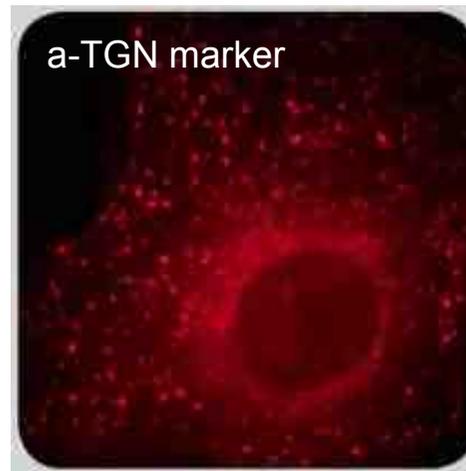
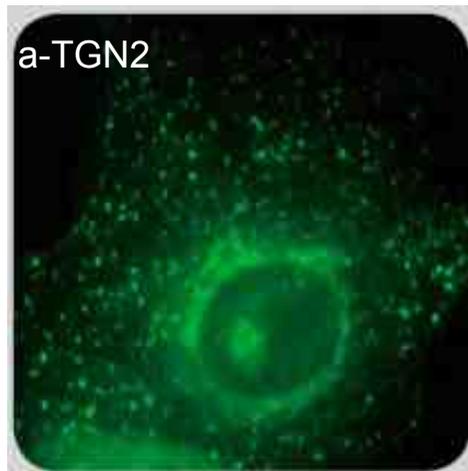
Risultato della doppia immunofluorescenza: Tra le cellule mononucleate del sangue umano i monociti esprimono IL-6

A mammalian epithelial tissue culture cell with mitochondria labeled red, actin labeled green and DNA labeled blue.



The trans-Golgi integral network membrane protein 2:

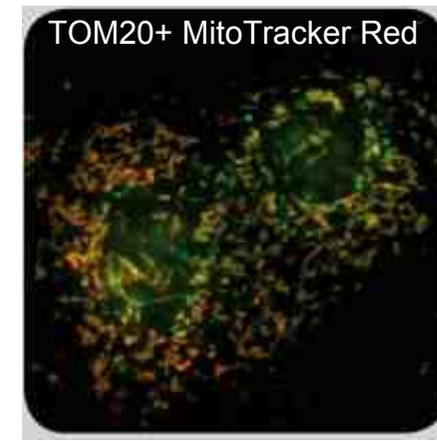
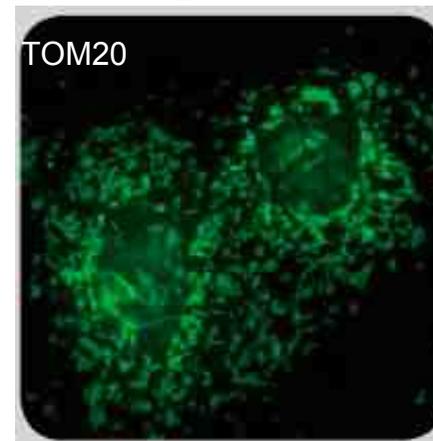
This protein is thought to be involved in the morphology of the TGN as well as in the formation of secretory vesicles.



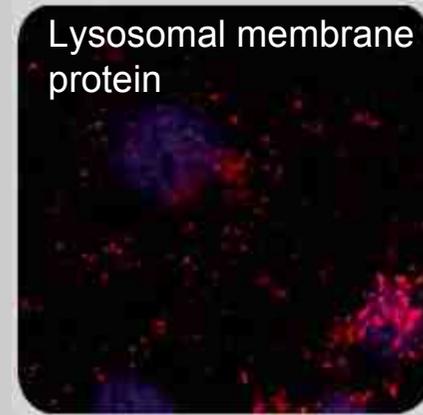
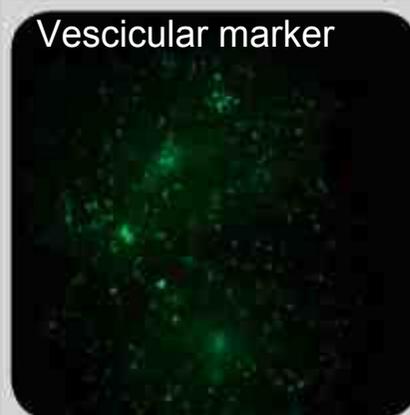
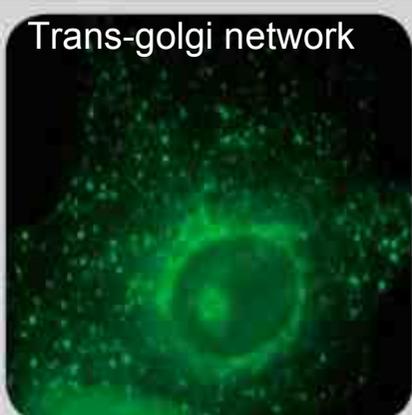
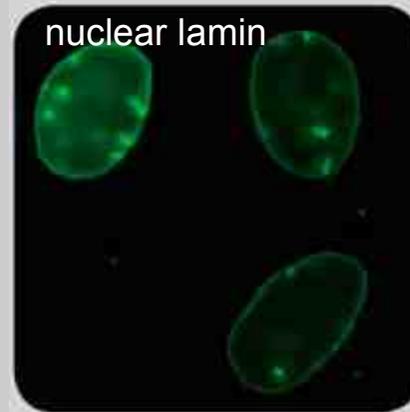
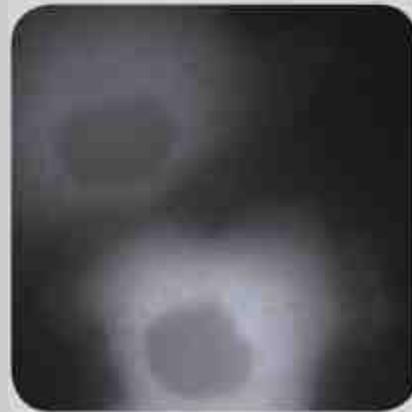
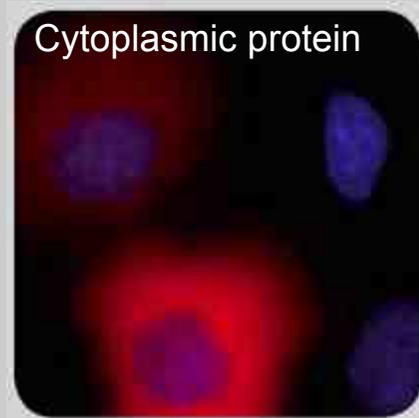
The mitochondrial import receptor subunit TOM20

TOM 20 is an outer mitochondrial membrane protein that functions as a major receptor of the import receptor complex for cytoplasmically synthesized mitochondrial pre-proteins.

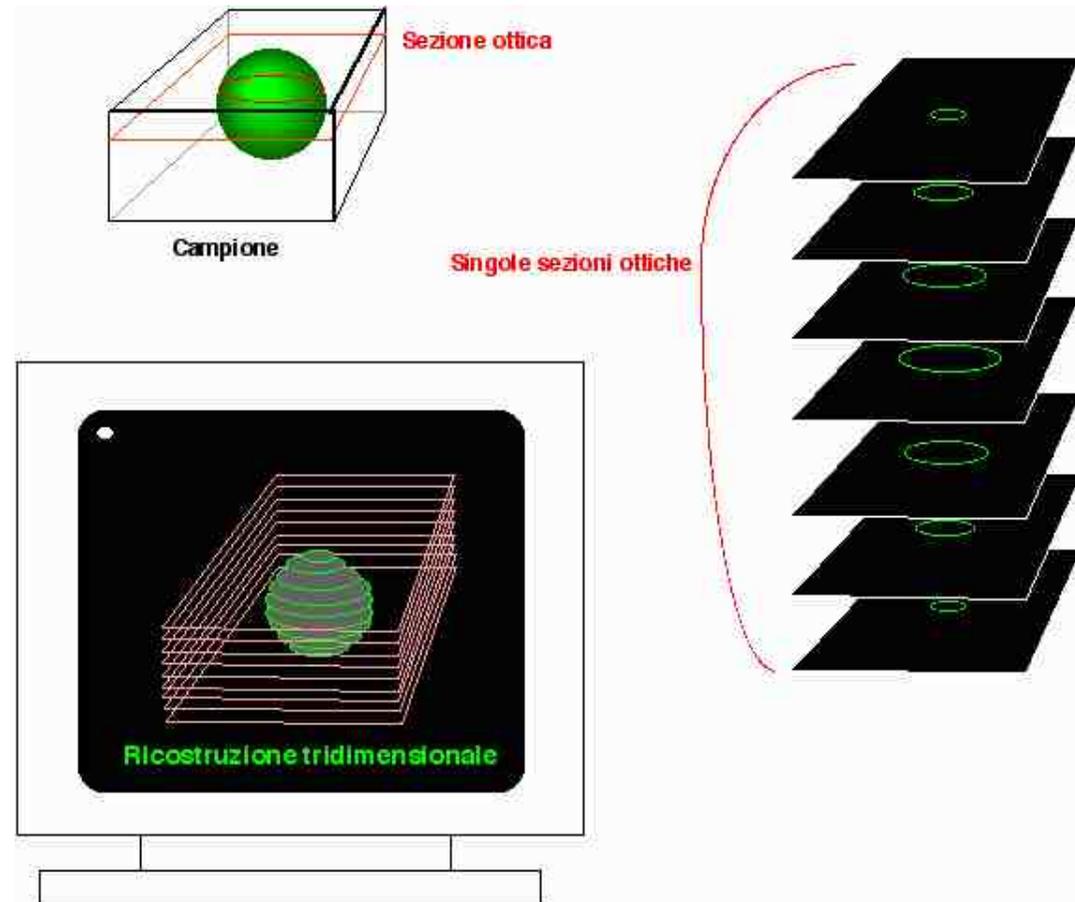
TOM20 colocalizes with MitoTracker Red, thus demonstrating its correct mitochondrial distribution



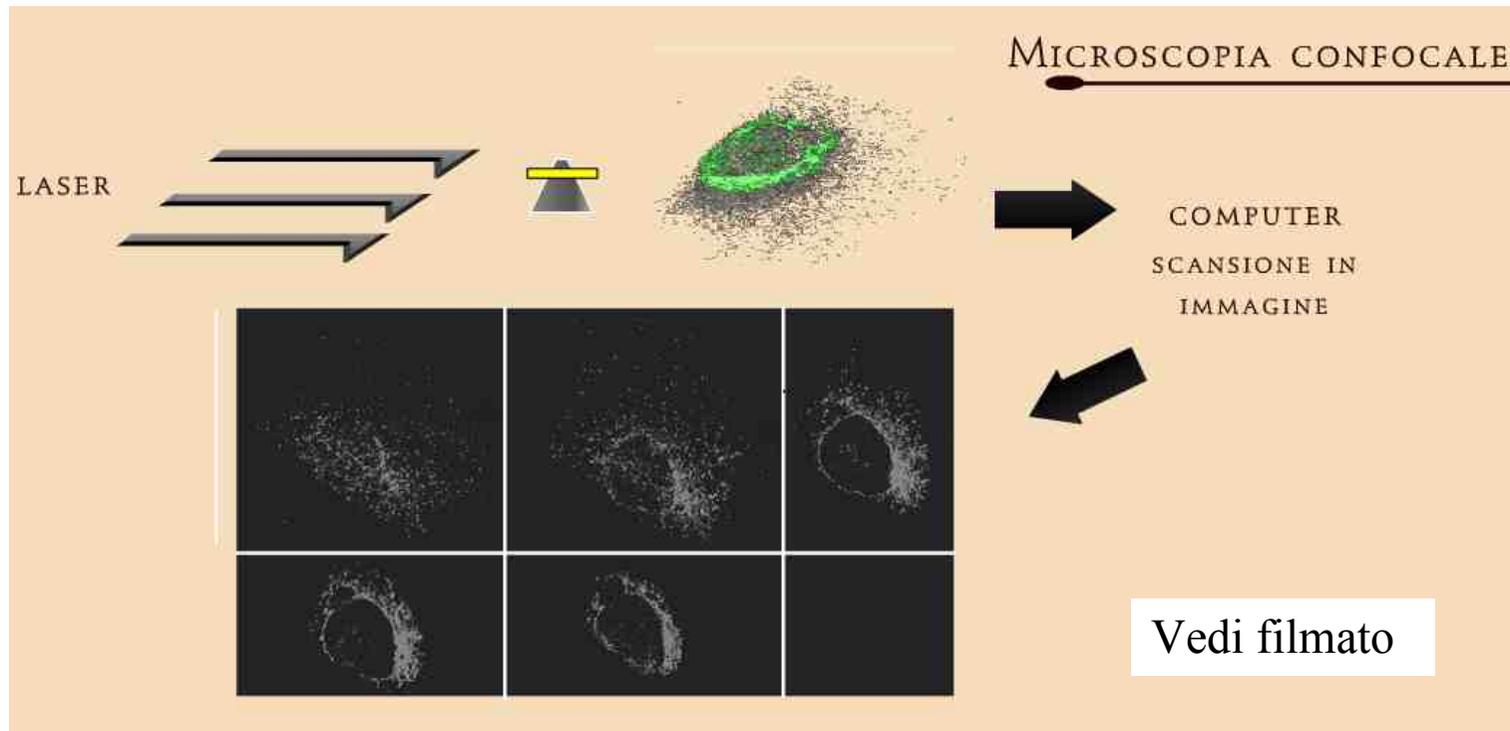
Immunohistochemistry



Microscopia confocale

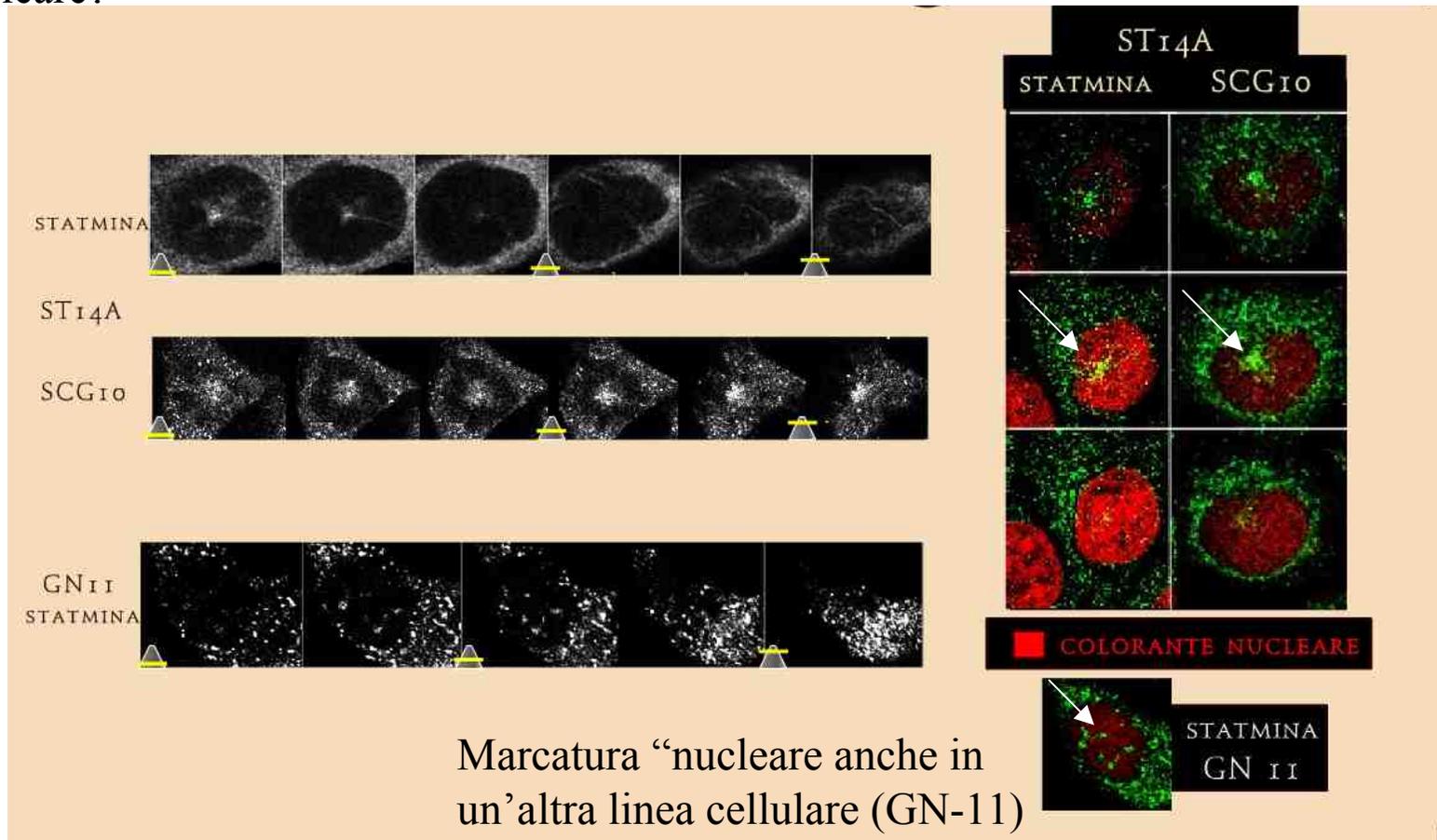


Esempio di analisi con focale: vedi il filmato corrispondente



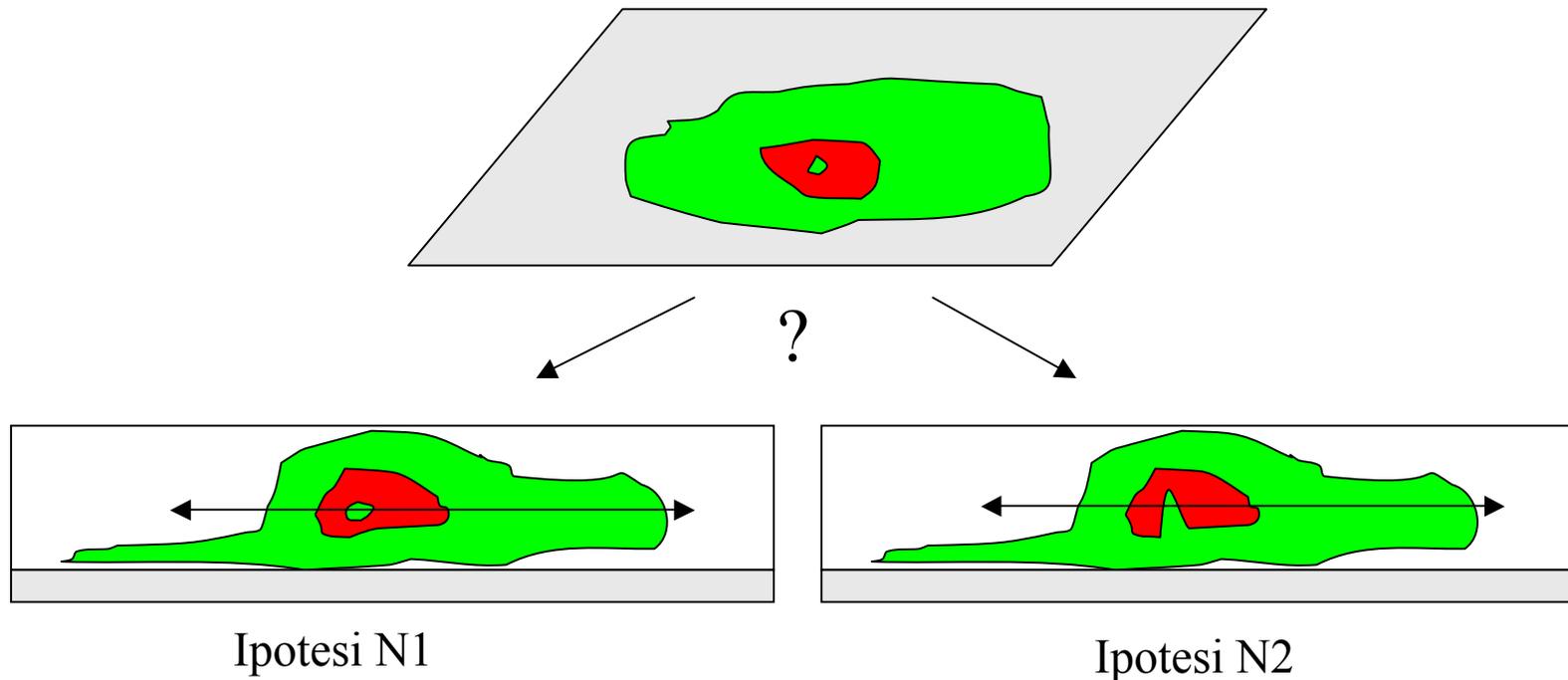
Studio di caso:

Dalla figura sottostante si vede che l'immunofluorescenza verde per le proteine "statmina" e "SCG10" nelle cellule ST14 è essenzialmente citoplasmatica. Si nota però anche dell'immunofluorescenza in mezzo al rosso della marcatura nucleare. Le due proteine in questione oltre alla loro localizzazione citoplasmatica hanno anche una localizzazione nucleare?



Marcatura "nucleare" anche in un'altra linea cellulare (GN-11)

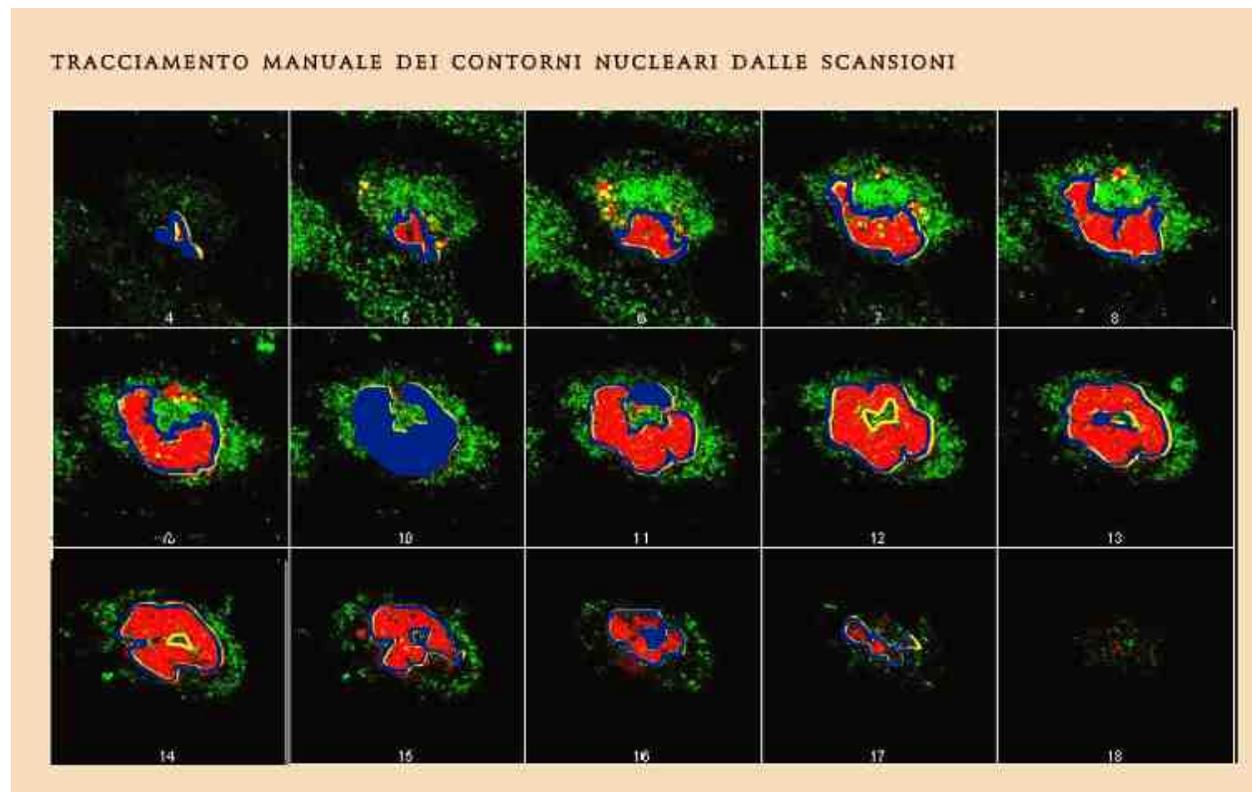
La stessa immagine vista da “sopra” (anche se al microscopio confocale può risultare da due situazioni diversi: Una localizzazione nucleare “vera” (ipotesi N.1) oppure una localizzazione nucleare “artefattuale”(ipotesi N.2)



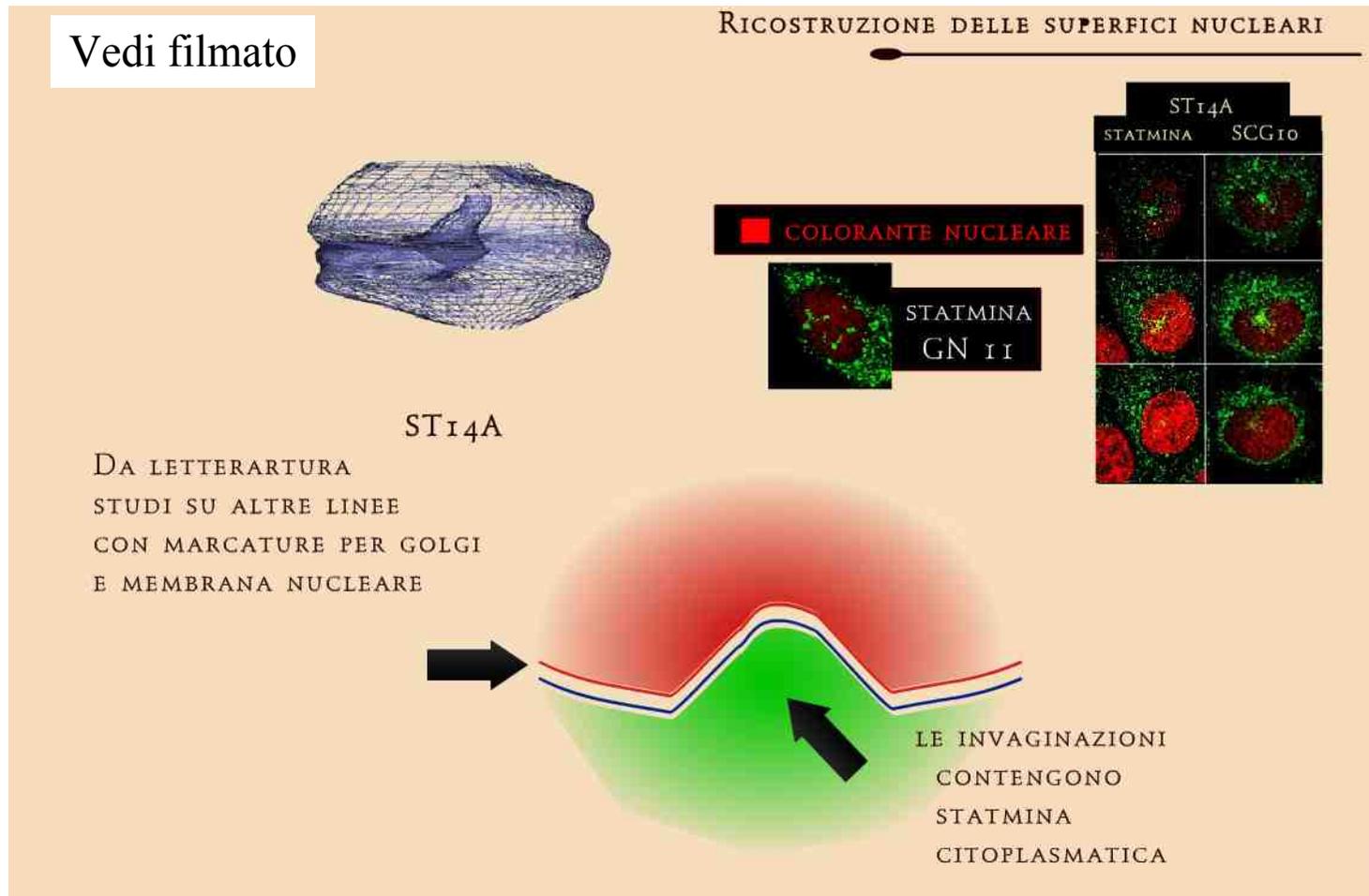
Per rispondere alla domanda: “quale delle due ipotesi si applica alla localizzazione di statmina e SCG10?”, è stata fatta una ricostruzione tridimensionale della morfologia del nucleo basata sull’analisi d’immagine della marcatura rossa per la cromatina.

--->

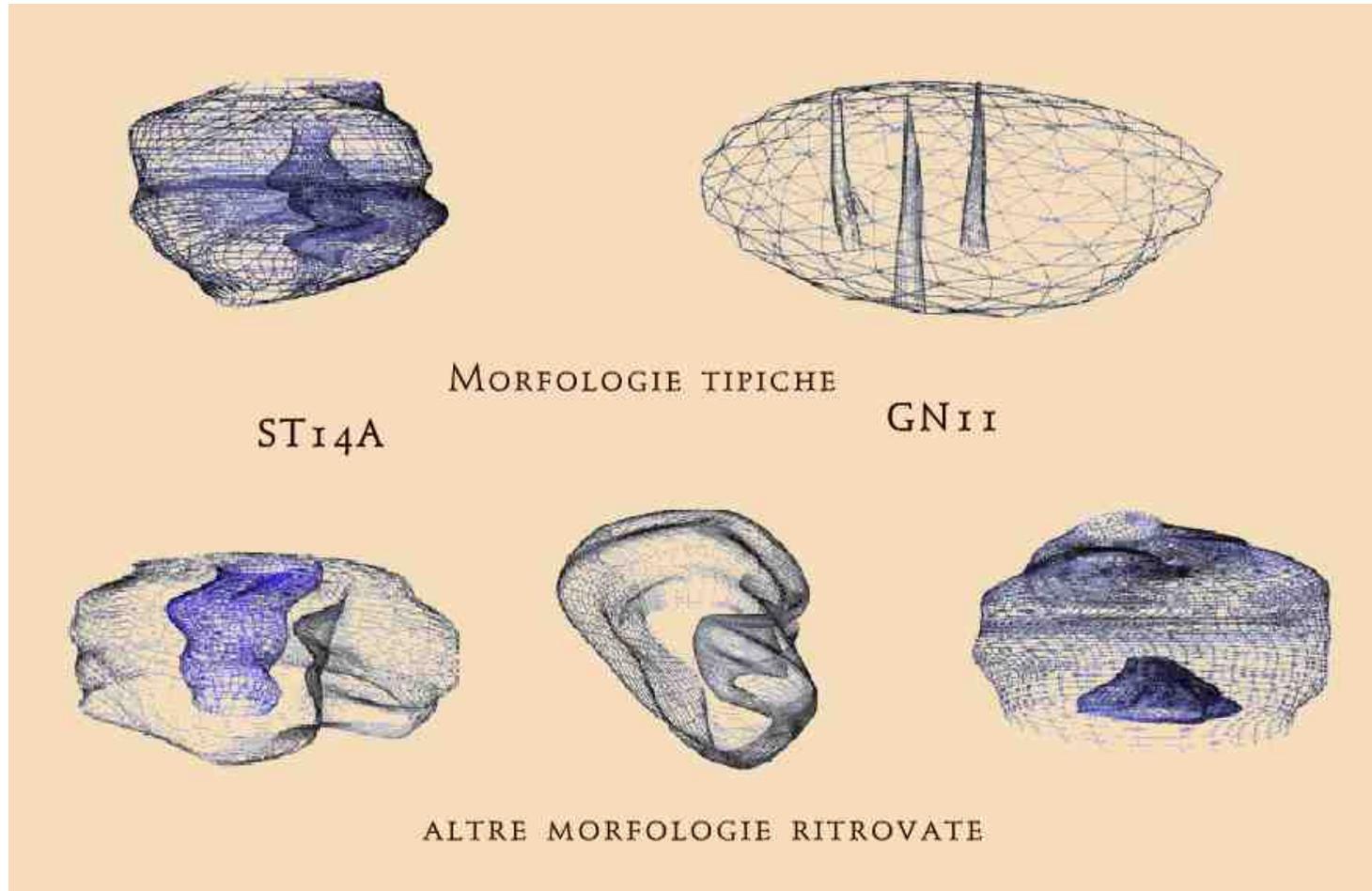
vedi il filmato della ricostruzione tridimensionale.



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



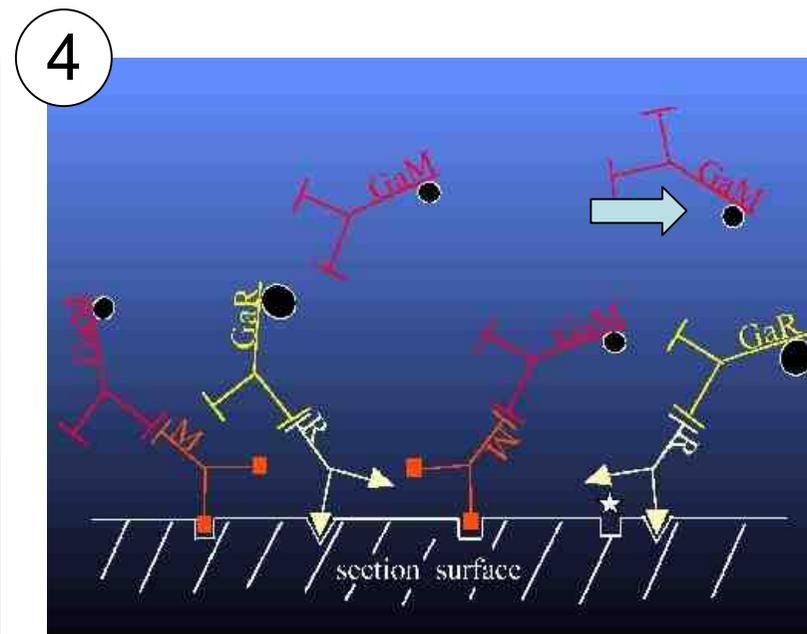
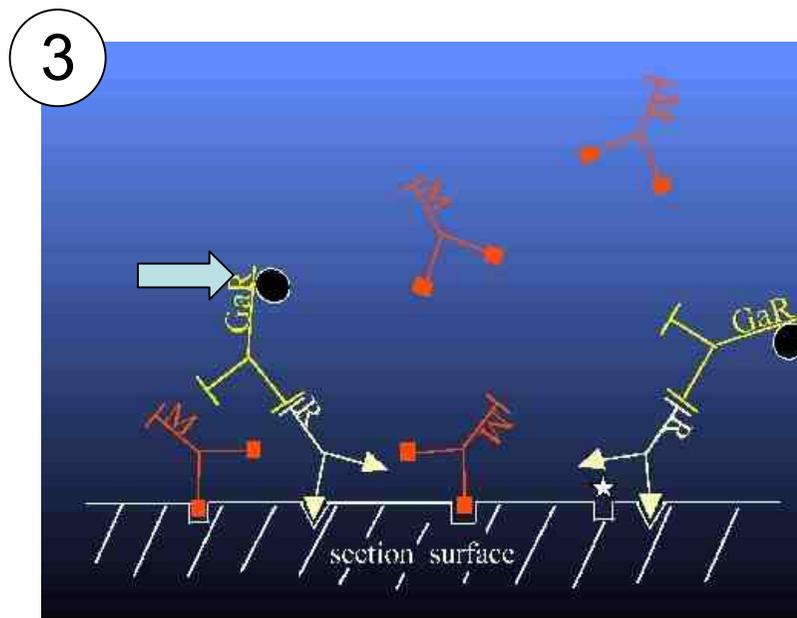
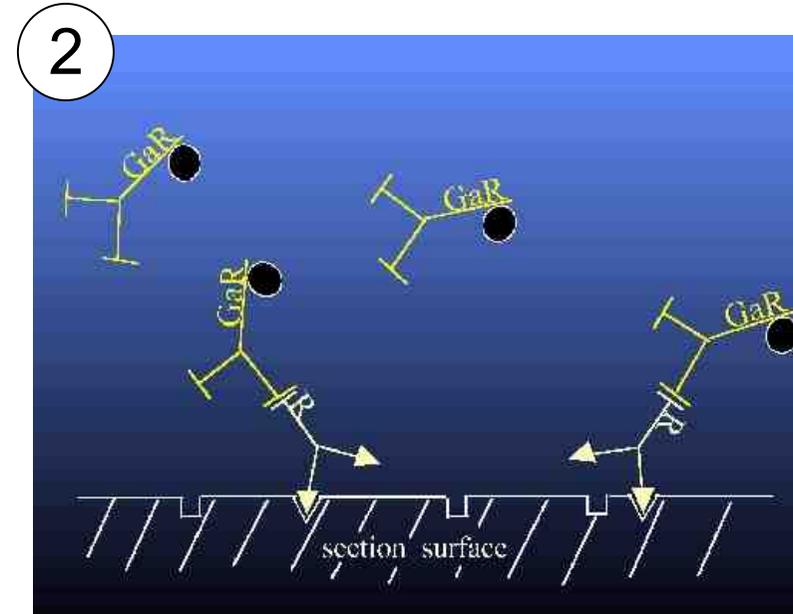
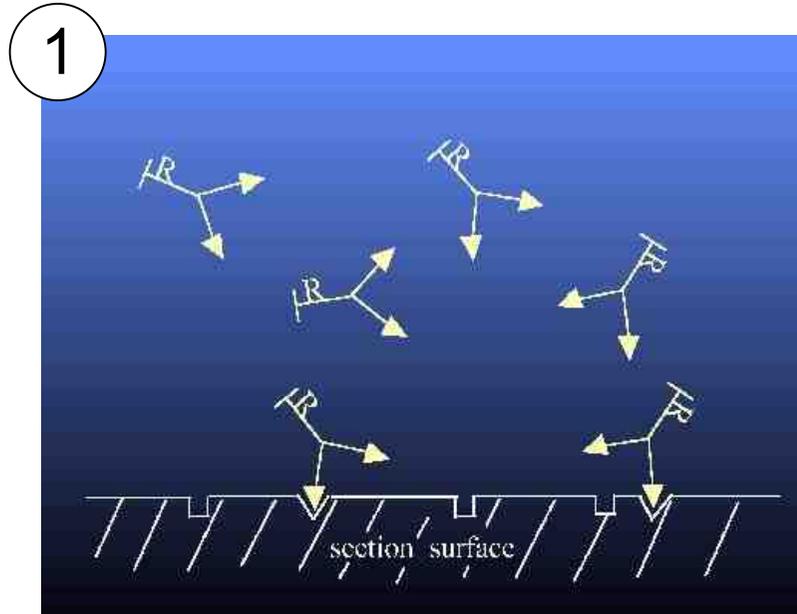
Ricostruzione tridimensionale di nuclei di altre linee cellulari che presentano anche loro delle invaginazioni dell'involucro nucleare



Microscopia elettronica

Immunogold: marcature singole o doppie analizzate al microscopio elettronica a trasmissione (TEM)

Incubazioni con anticorpi primari e anticorpi secondari come nel caso dell'immunofluorescenza ma in questo caso gli anticorpi secondari sono coniugati con particelle d'oro (opache agli elettroni) di diametro diverso



Osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM)



Esempio marcatura doppia immunogold esaminata al TEM.

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

A sinistra cellula le cui vescicole di secrezione sono marcate con particelle d'oro di 20 nm di diametro maggiore: questa cellula contiene prolattina: si tratta di una cellula “mammotrofa” (M).

A sinistra le vescicole sono marcate con particelle d'oro di diametro inferiore (10 nm): si tratta di una cellula “somatotrofa” (S) le cui vescicole di secrezione contengono l'ormone di crescita.

