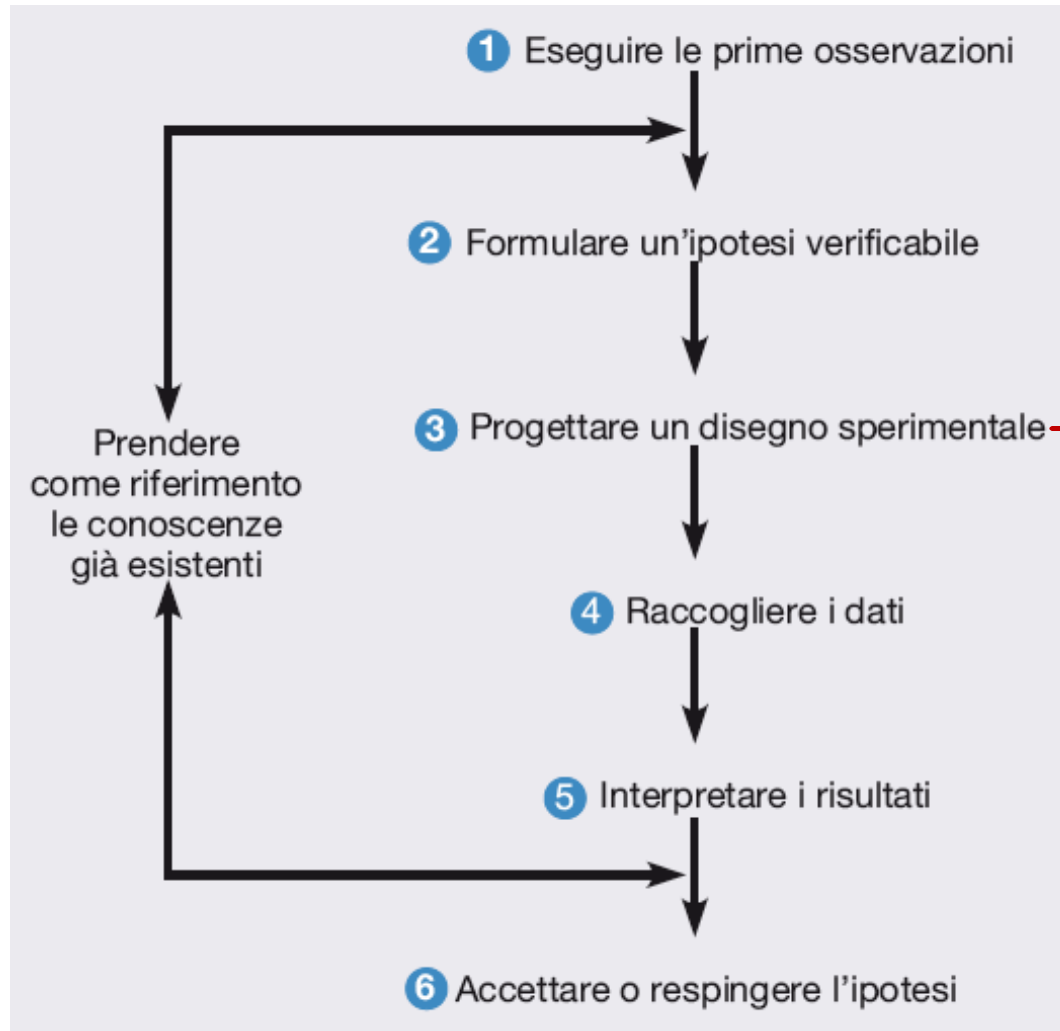


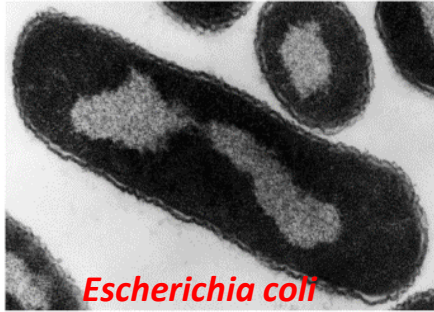
Il metodo scientifico nello studio della cellula



- Quale modello sperimentale?
- Quale approccio sperimentale?

Gli organismi “modello” più utilizzati

Gli scienziati interessati a diversi aspetti biologici si sono accordati per studiare un numero limitato di specie per condividerne le conoscenze e arrivare a informazioni generalizzabili senza disperdere gli sforzi su troppe specie



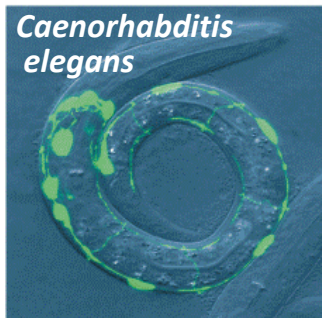
**Biologia molecolare della cellula
(replicazione del DNA,
trascrizione, traduzione)**



**È l'organismo eucariota più
semplice, molte proteine
omologhe a quelle di
mammifero. Uso di mutanti per
identificare geni, numerosi studi
sul ciclo cellulare**



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



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



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



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



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

Quali approcci sperimentali sono stati usati finora per studiare la cellula?

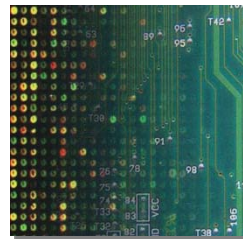
CITOLOGIA – comincia con l'avvento del MO, lo studio della morfologia cellulare migliora con l'invenzione di nuove e **molteplici tipologie di microscopia**



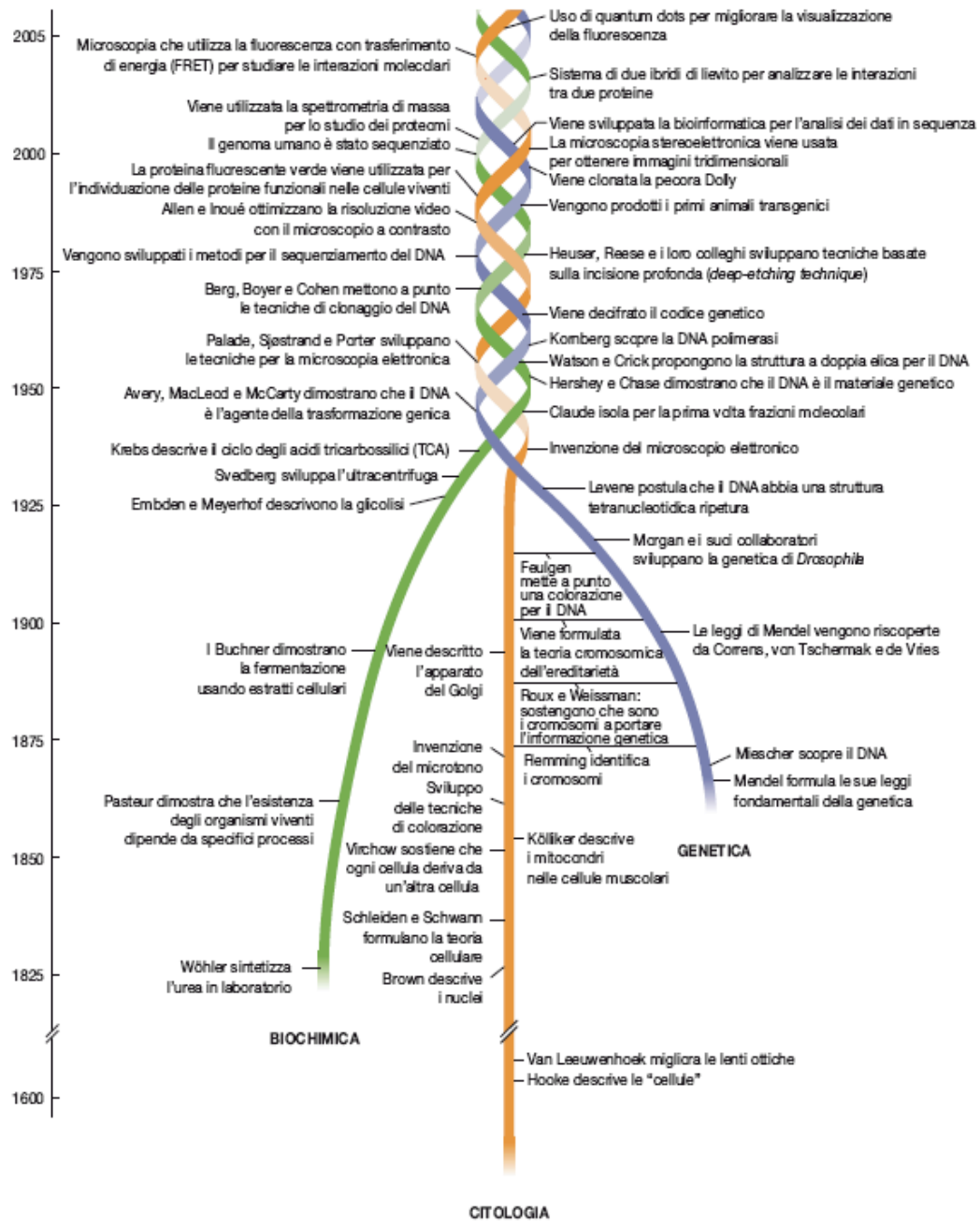
BIOCHIMICA – gli sviluppi più importanti si hanno a partire dalla messa a punto di tecniche quali l'**ultracentrifugazione**, la cromatografia, l'**elettroforesi**, la spettrometria di massa per la separazione e l'identificazione di componenti cellulari e molecolari



GENETICA/Biol Molecolare – i primi contributi significativi risalgono a Mendel, i progressi recenti includono il sequenziamento di interi genomi e la produzione di organismi transgenici; le tecniche genetico-molecolari oggi si accompagnano allo sviluppo della bioinformatica

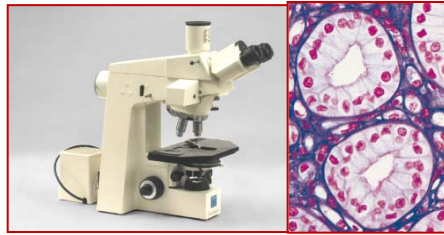


BIOLOGIA CELLULARE

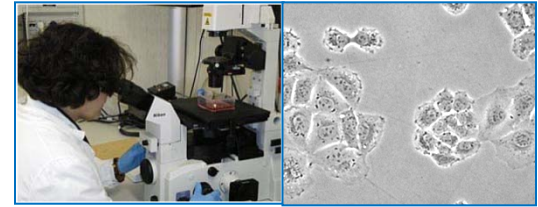


Microscopio ottico (MO)

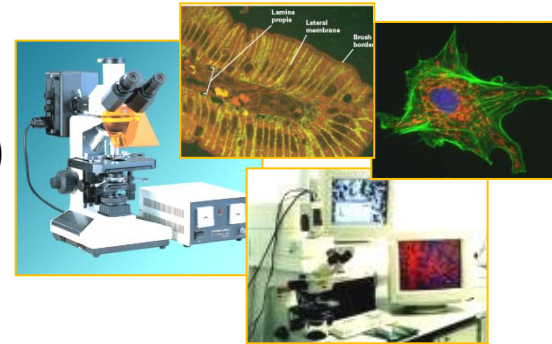
- in campo chiaro



- a contrasto di fase (spesso rovesciato)

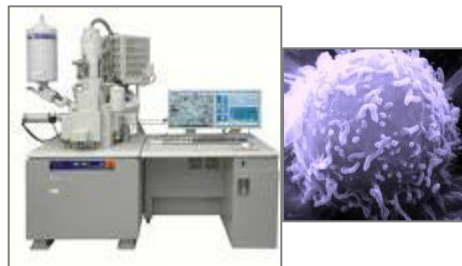


- a fluorescenza (classico oppure confocale)

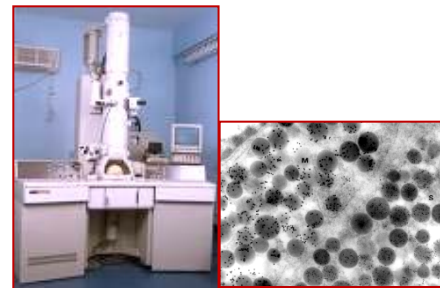


Microscopio elettronico (ME)

- SEM (a scansione)

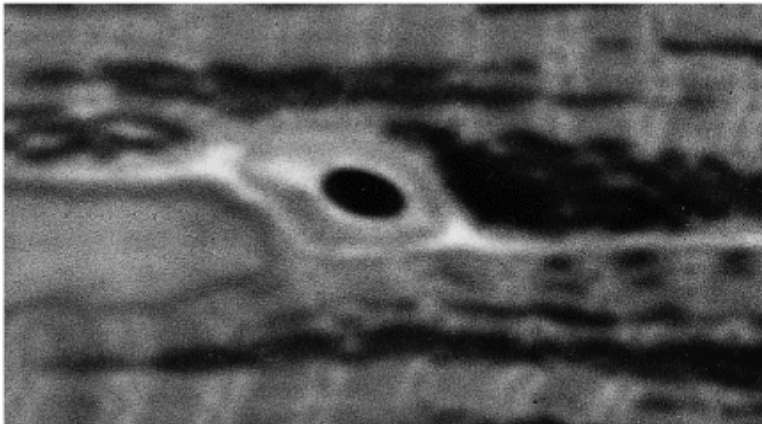


- TEM (a trasmissione)



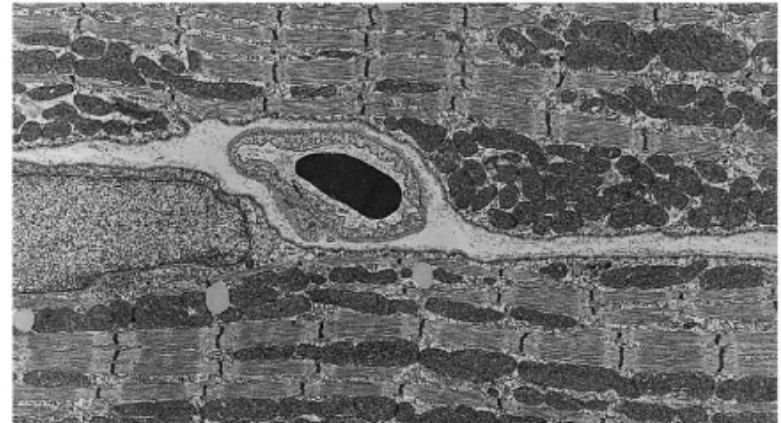
A cosa si ricorre quando è necessario ingrandire molto l'immagine per vedere strutture molto piccole (es., la struttura dei mitocondri)?

MO



(a)

ME



(b)

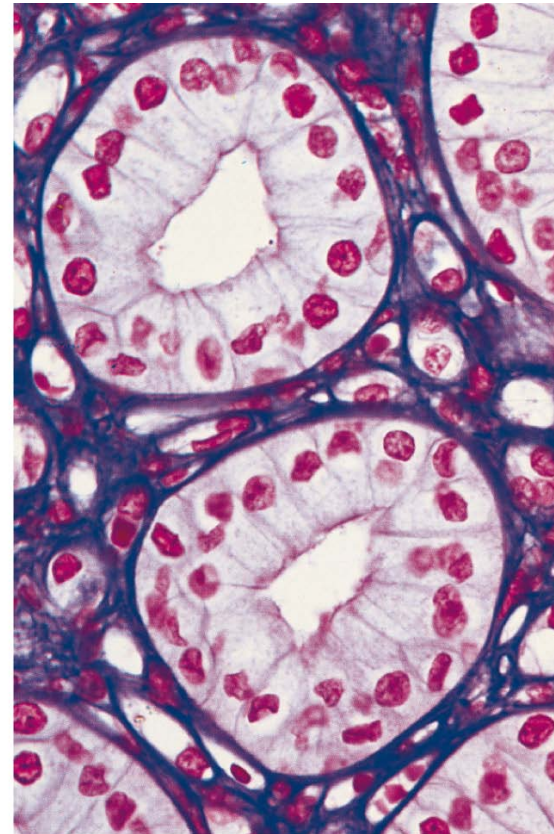
FIGURA 18.11 Un confronto fra l'informazione contenuta in immagini al microscopio ottico ed elettronico a un ingrandimento comparabile di 4500 volte. (a) Una foto di tessuto muscolare scheletrico che è stato incluso in resina, sezionato a $1\ \mu\text{m}$, e fotografato al microscopio ottico con un obiettivo ad immersione in olio. (b) Una sezione adiacente a quella utilizzata in *a* tagliata a $0,025\ \mu\text{m}$ ed esaminata al microscopio elettronico ad un ingrandimento comparabile con *a*. L'immagine risultante mostra un aumento di risoluzione da 100 a 200

volte. Notate la differenza nei dettagli delle miofibrille, dei mitocondri e dei globuli rossi contenuti nei capillari. Mentre il microscopio ottico non può fornire informazioni migliori di quelle mostrate in *a*, il microscopio elettronico può fornire ancora molte informazioni producendo immagini, per esempio, delle strutture delle singole membrane in una piccola porzione di uno dei mitocondri (vedi Figura 5.21). (PER GENT. CONC. DI DOUGLAS E. KELLY E M. A. CAHILL).

Con il microscopio ottico in campo chiaro....

... è difficile vedere la struttura interna di una cellula, non solo perché le sue parti sono piccole (il microscopio ha lo scopo di ingrandirle), ma anche perché in genere sono **incolori e trasparenti**

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

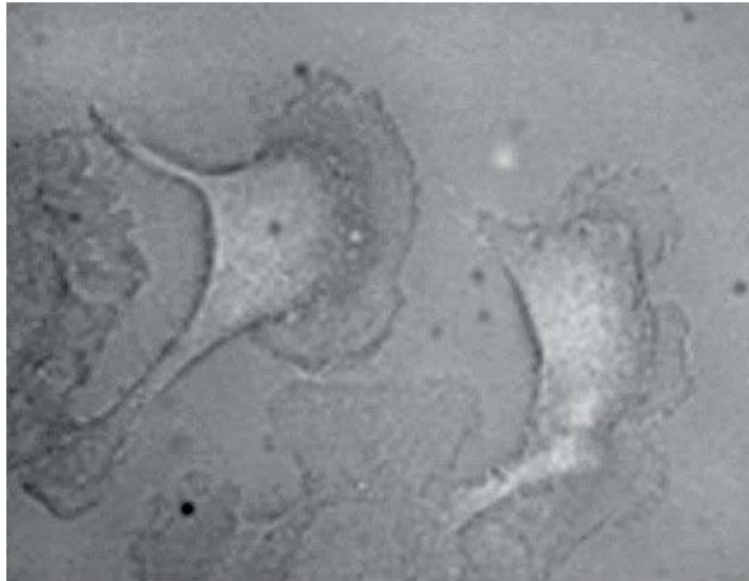


(B)

50 μm

Come faccio a visualizzare cellule vive senza fissarle e colorarle?

Campo chiaro (*bright field*)



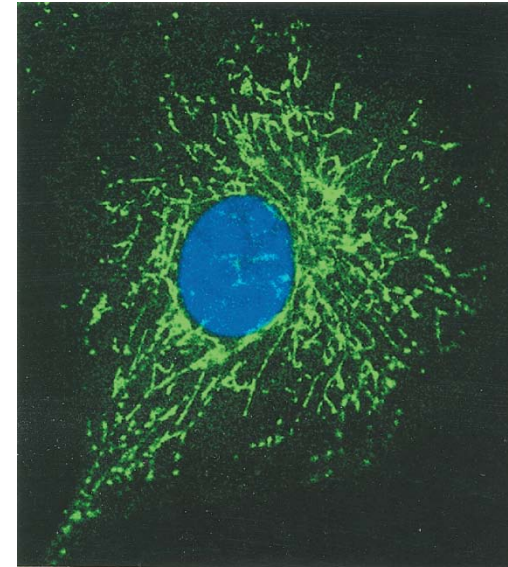
Contrasto di fase



cellule macrofagiche coltivate *in vitro*

Come posso evidenziare selettivamente organelli o molecole specifiche senza ricorrere al ME?

In molti casi si ricorre a **coloranti fluorescenti** che, legandosi a molecole specifiche, ne permettono la evidenziazione selettiva quando il preparato viene illuminato ad una lunghezza d'onda opportuna.

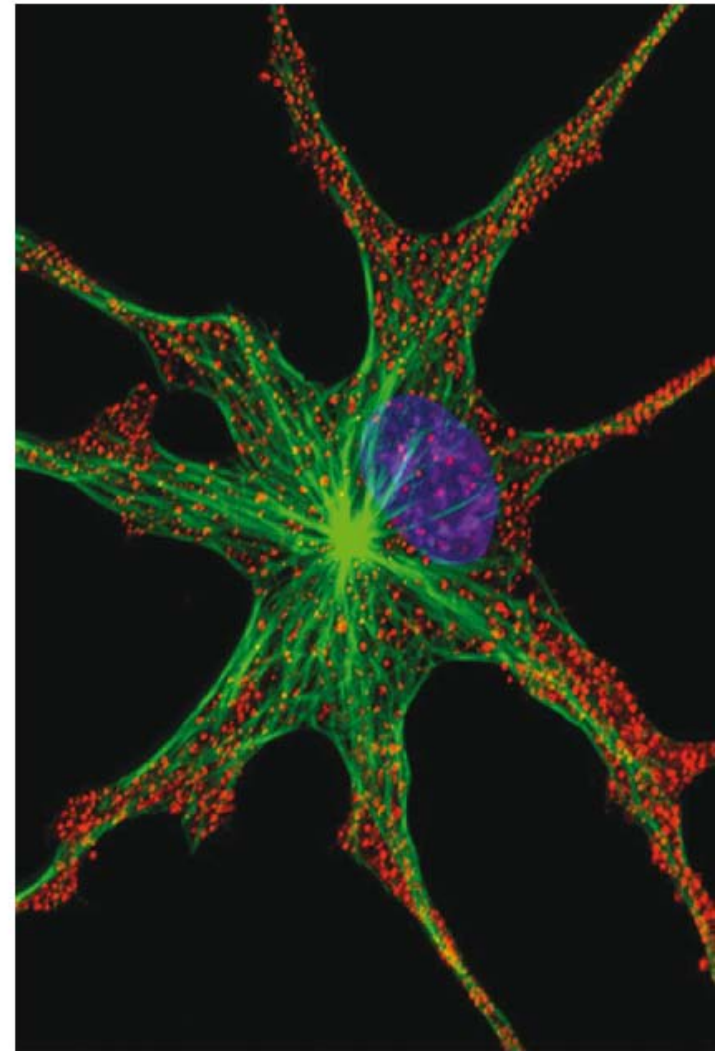


10 μm

*Cellula di mammifero in coltura, ripresa al microscopio a fluorescenza. Un marcatore fluorescente verde mette in evidenza **i mitocondri**. L'organello colorato in blu è **il nucleo***

Più organelli possono essere visti contemporaneamente nella stessa cellula utilizzando **marcatori fluorescenti diversi**, ciascuno specifico per un particolare organello

*Cellula pigmentata di rana, osservata al microscopio confocale. Il **nucleo** appare viola, i **granuli di pigmento** appaiono rossi, e i **microtuboli** (filamenti citoscheletrici) appaiono verdi*



(B)

10 μm

Fluorescent tagging and staining techniques using different fluorescent molecules reveal the cytoskeletal proteins α -**tubulin** (green) and **actin** (red), **DNA** (blue), the **Golgi complex** (yellow), and **mitochondria** (purple). The images along the top are false-colored images of each structure stained individually. The larger image merges these separate images to depict the full cell. Scale bars, 20 μm .

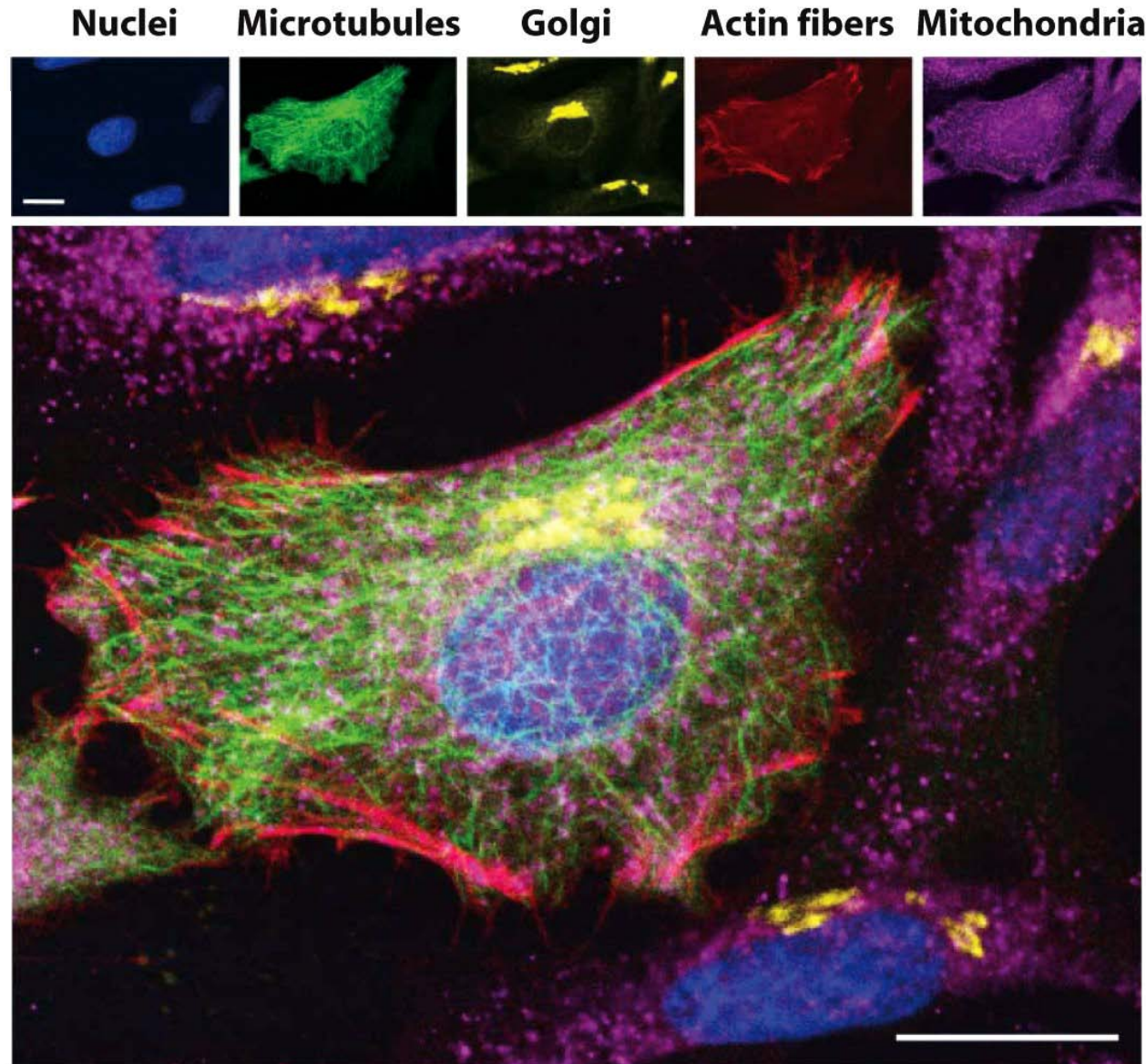
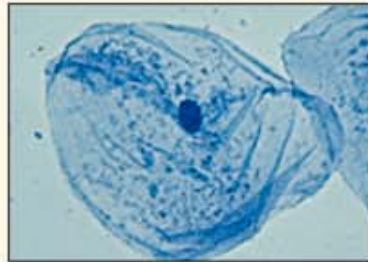


TABELLA 1.1**Diversi tipi di microscopia ottica: un confronto****Tipo di microscopia****Fotografie al microscopio ottico di cellule dell'epitelio facciale umano****Tipo di microscopia**

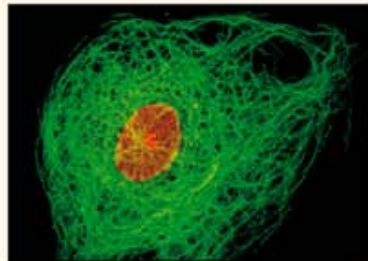
In campo luminoso (campione non colorato): la luce passa direttamente attraverso il campione; a meno che la cellula non sia pigmentata naturalmente o colorata artificialmente, l'immagine presenta uno scarso contrasto.



In campo luminoso (campione colorato): la colorazione con varie sostanze intensifica il contrasto, ma quasi tutte le procedure di colorazione richiedono che le cellule siano fissate (preservate).

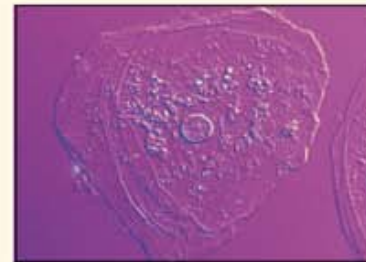


A fluorescenza: Mostra la localizzazione di specifiche molecole all'interno della cellula. Le sostanze fluorescenti assorbono le radiazioni ultraviolette ed emettono luce visibile. Le molecole fluorescenti possono essere presenti naturalmente nel campione, ma più spesso si generano marcando le molecole di interesse con coloranti o anticorpi fluorescenti.

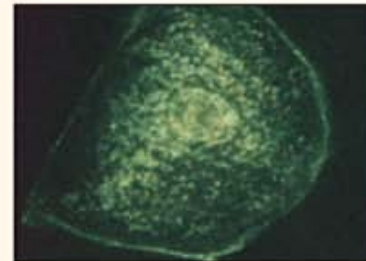


Contrasto di fase: intensifica il contrasto nelle cellule non colorate amplificando le differenze dell'indice di rifrazione all'interno del campione; particolarmente utile per l'osservazione di cellule viventi non pigmentate.

Contrasto interferenziale: utilizza anche modifiche ottiche per esasperare le differenze dell'indice di rifrazione.



Confocale: utilizza laser e sistemi ottici particolari per focalizzare il fascio di illuminazione su un unico piano all'interno del campione. Si ottengono soltanto le immagini delle regioni all'interno di un ristretto intervallo di profondità rispetto al piano focalizzato. Le regioni al di sopra e al di sotto del piano selezionato appaiono scure.



50 μm

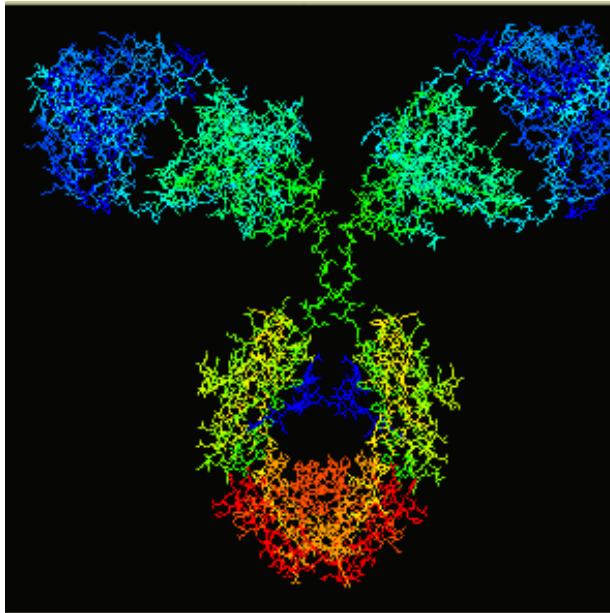
IMMUNOISTOCHIMICA

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*.

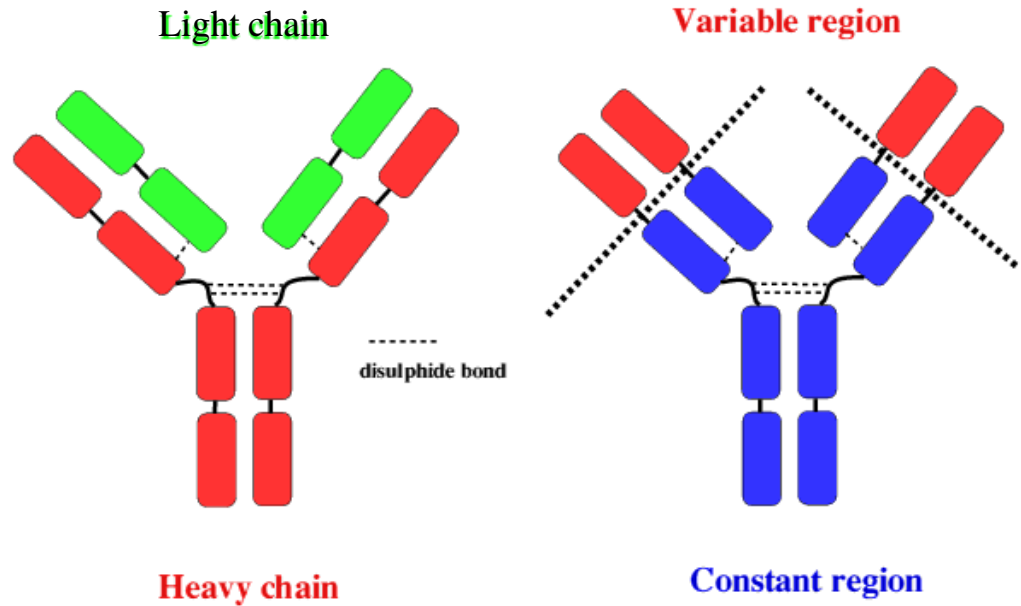
Gli anticorpi sono proteine prodotte dal sistema immunitario come difesa contro sostanze estranee; sono proteine del gruppo delle globuline (*immunoglobuline*).

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

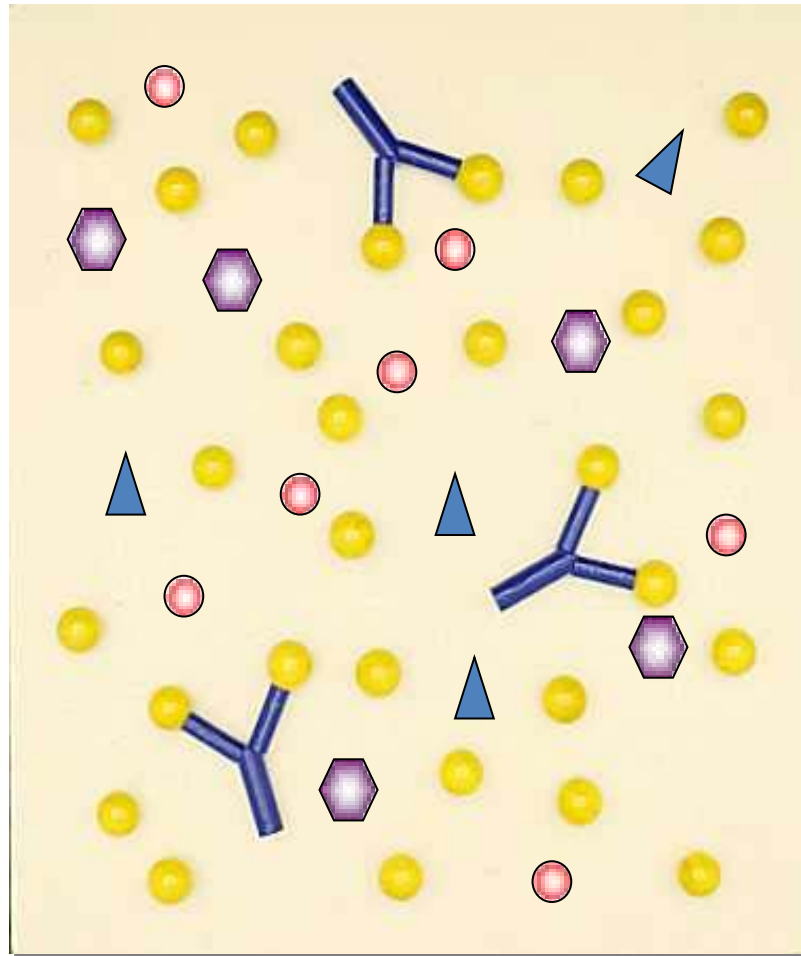
Gli **anticorpi** sono proteine formate da 4 catene polipeptidiche legate fra di loro da legami covalenti (ponti di solfuro)



Basic structure of an Antibody



L'immunoistochimica
si basa sulla capacità
degli anticorpi di legare
molecole specifiche (=
antigeni specifici)
presenti in un preparato



Per visualizzare l'interazione "anticorpo-antigene" si può coniugare l'anticorpo con diversi "marcatori" in funzione del microscopio che si intende impiegare e del risultato che si vuole ottenere :

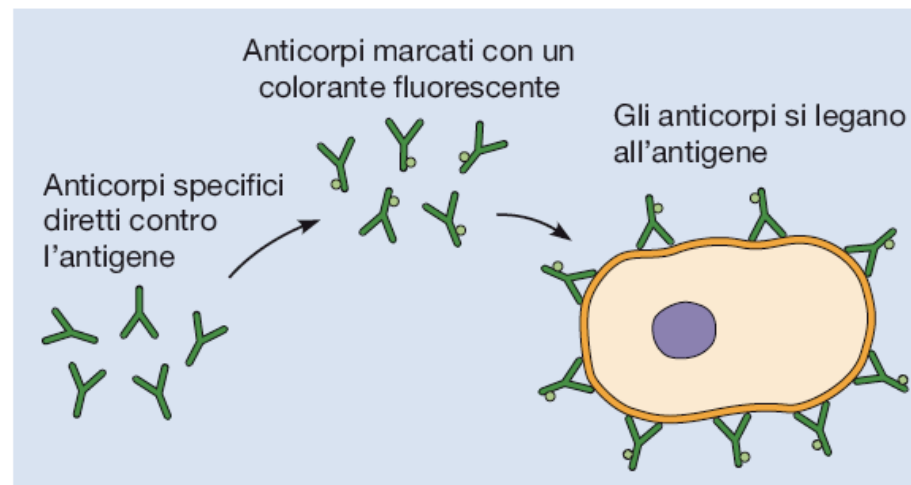
- Anticorpo coniugato ad un **fluorocromo**:
Immunofluorescenza ---> microscopio a fluorescenza tradizionale o confocale
- Anticorpo coniugato ad un **attività enzimatica**:
Immunoistochimica in campo chiaro ----> microscopio tradizionale
- Anticorpo coniugato a **particelle d'oro**:
Immunogold ---> microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

Reazione immunoistochimica diretta: l'anticorpo modificato è quello primario.

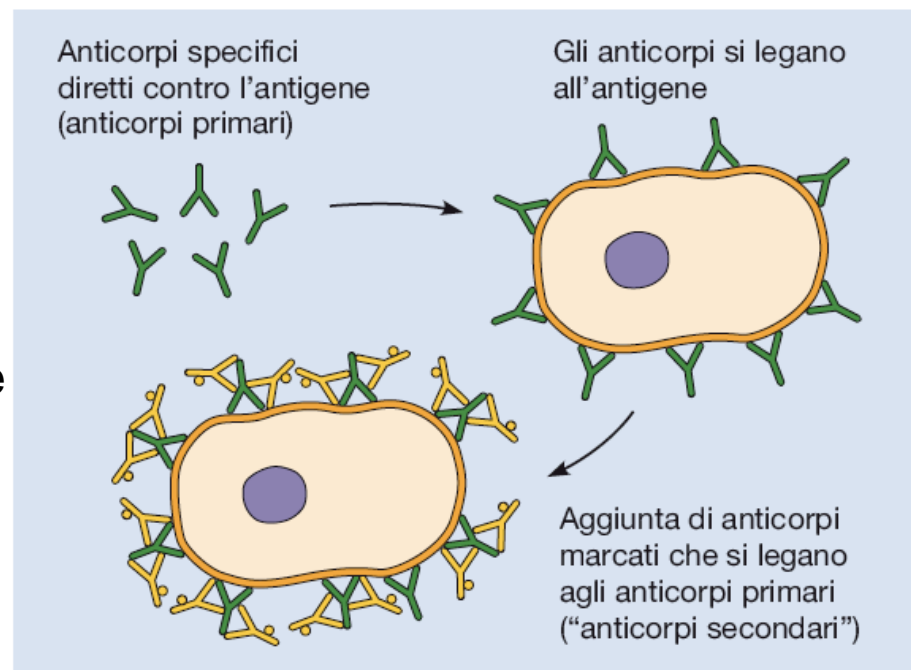
Questo approccio non è praticamente mai usato perché poco versatile. Necessita la marcatura di ciascun anticorpo primario

Reazione immunoistochimica indiretta: Si rivela l'interazione anticorpo primario (non modificato)- antigene d'interesse, attraverso l'uso di un anticorpo secondario prodotto in una specie diversa 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 scelto nel 90% dei casi.



(a) Immunofluorescenza



(b) Immunofluorescenza indiretta