

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Tecniche morfologiche

Microscopia ottica (per campioni colorati)

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

Microscopia elettronica

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

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

IMMUNOISTOCHIMICA

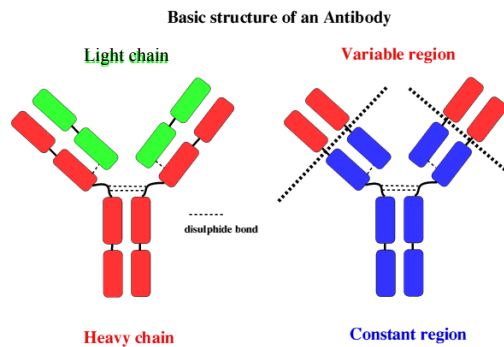
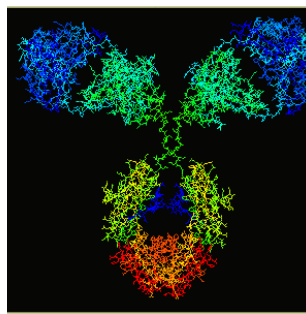
E' una variante dell'istochimica che permette la localizzazione istologica di molecole sfruttando le loro caratteristiche antigeniche. E' quindi una reazione tra un *antigene e il suo relativo anticorpo*.

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*.

3

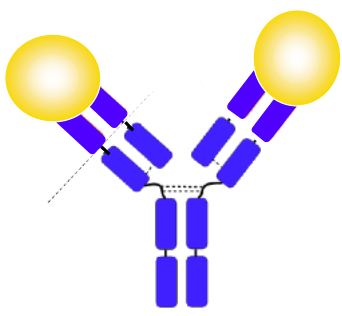
Anticorpi sono proteine formate da 4 catene polipeptidiche legate fra di loro da legami covalenti (ponti di solfuro)



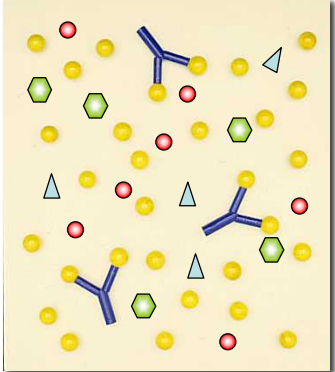
4

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Tecniche immunocitochimiche

Regioni "variabili"



Regione "costante"



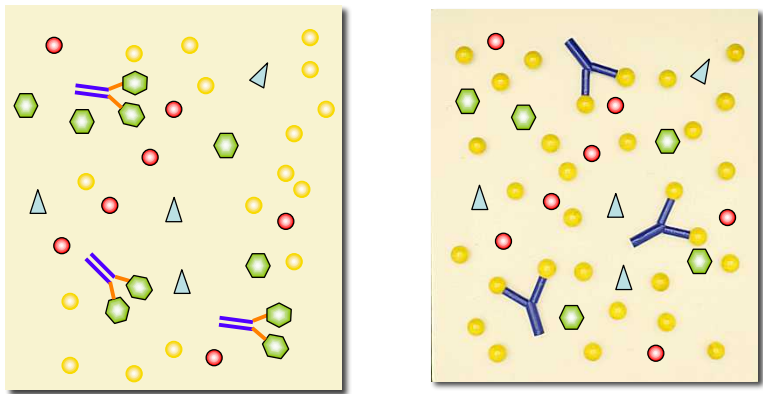
5

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Detailed description: This slide illustrates the structure of an antibody. On the left, a schematic diagram shows a Y-shaped molecule with two yellow spheres at the tips of the arms, labeled 'Regioni "variabili"', and a blue stem labeled 'Regione "costante"'. On the right, a microscopic image shows several blue Y-shaped antibodies bound to various antigens represented by yellow circles, red circles, green hexagons, and blue triangles.

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Tecniche immunocitochimiche

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



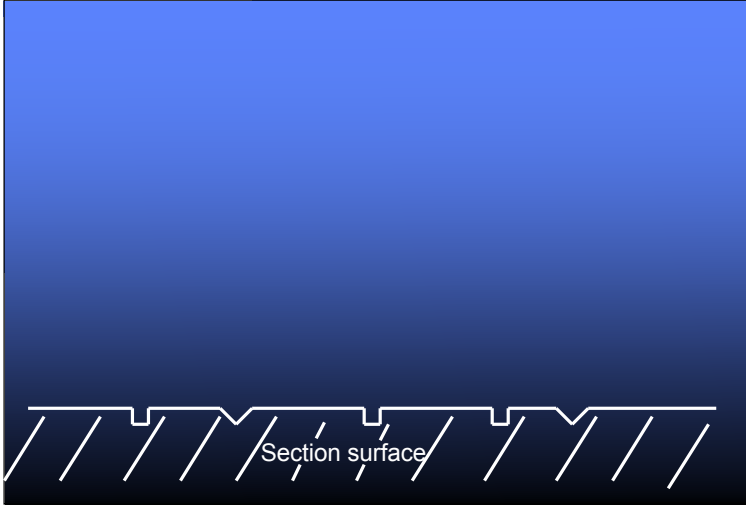
6

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Detailed description: This slide compares two microscopic images. The left image shows blue Y-shaped antibodies binding to green hexagonal antigens. The right image shows the same blue Y-shaped antibodies binding to yellow circular antigens. This demonstrates that antibodies with similar constant regions can bind to different antigens if their variable regions are compatible.

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

① Tessuto (o cellule) fizzato (esempio: paraformaldeide), tagliato (esempio microtomo) e fatto aderire su un porta oggetto

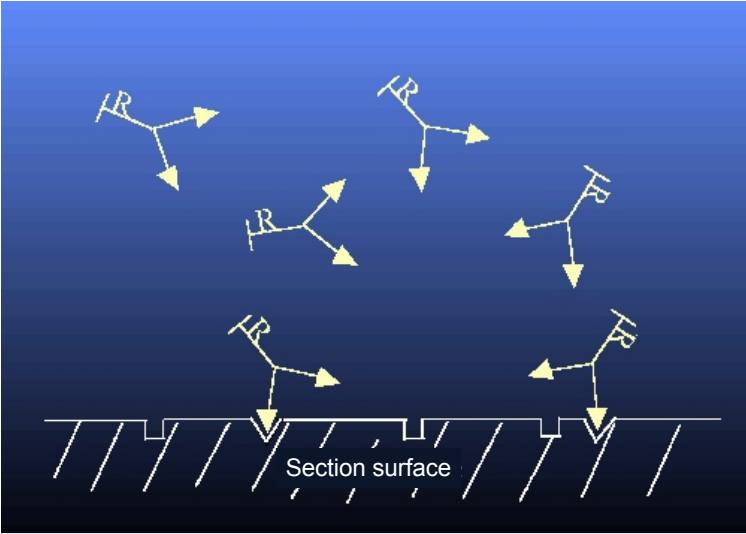


The diagram shows a blue rectangular area representing a tissue section. At the bottom, a white line indicates the 'Section surface' on a slide, with diagonal hatching below it. The number 7 is in the bottom right corner.

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques


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)

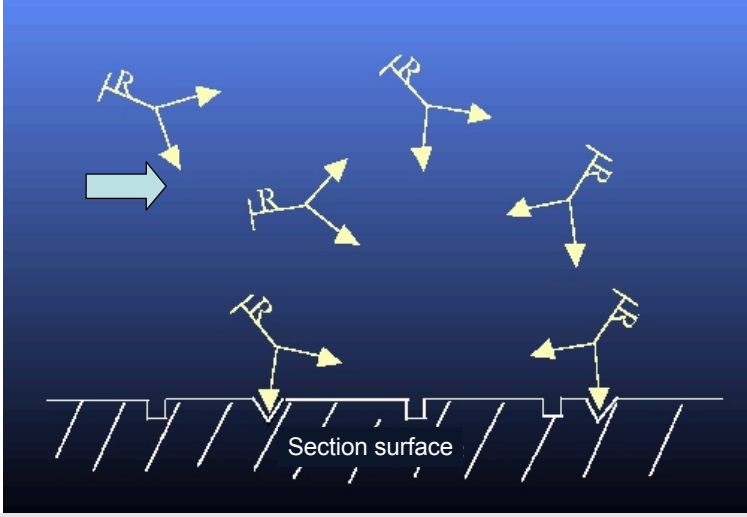


The diagram shows the same blue rectangular area as in slide 7. Yellow Y-shaped structures, representing primary antibodies, are shown binding to the tissue section. Each antibody has 'R' labels and arrows indicating its structure. The 'Section surface' label is at the bottom. The number 8 is in the bottom right corner.

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

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



Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

9

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

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)

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

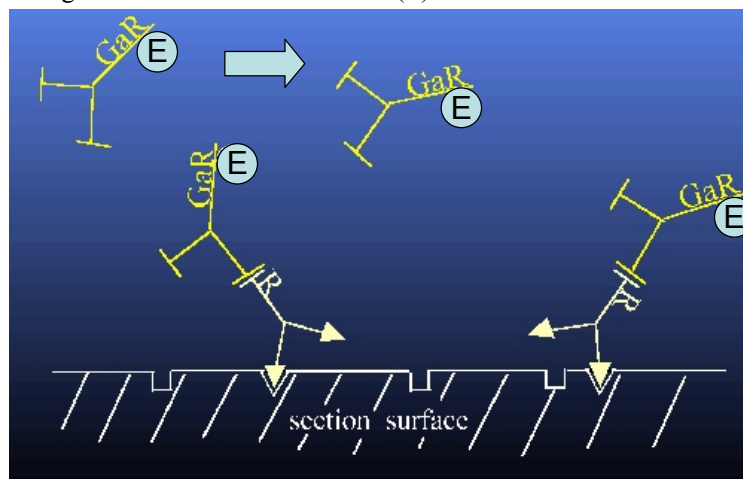
10

- :=) 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.

11

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)



12

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

Sezione incubata in presenza del substrato dell'enzima

④ **E** = enzima (perossidasi) **S** = substrato (DAB) **P** = prodotto della reazione enzimatica

13

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

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

14

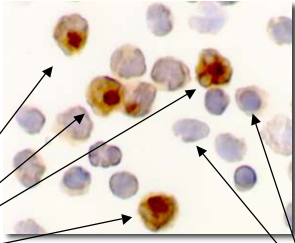
Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

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)



Optical microscope



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"

15

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

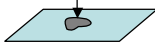
MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

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

(E)Gt-anti "Rb"

↓

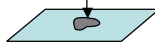
Rb-anti "A"



(E)Gt-anti "Rb"

↓

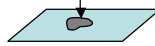
Rb-anti "B"



(E)Gt-anti "Rb"


↓

Rb-anti "C"




Immunohistochemistry of Adrenal Cortex In Early Adrenarche

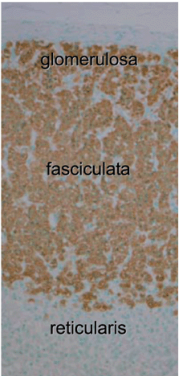
A: Cytochrome b_5



B: SULT2A1



C: 3βHSD



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.

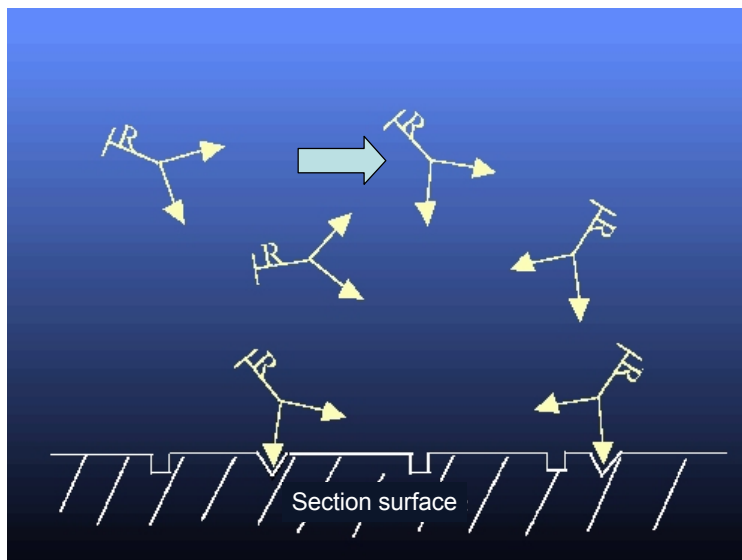
Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

“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.

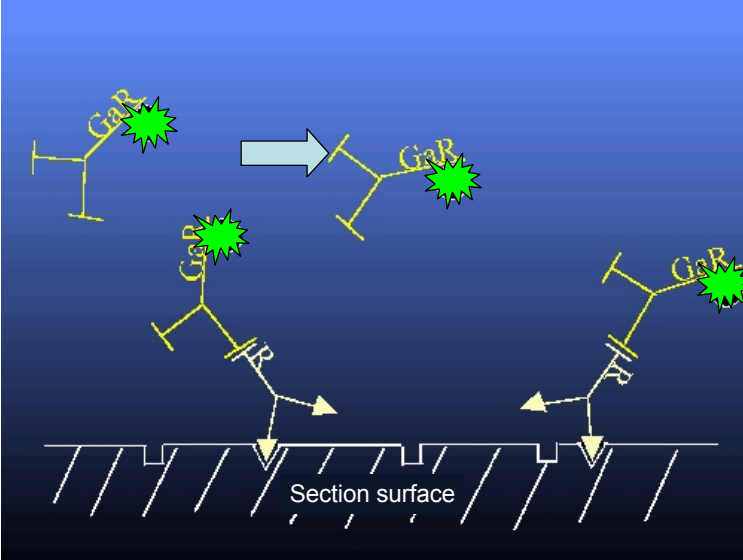
Immunofluorescenza

① Incubazione con l'anticorpo primario



MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

② Anticorpo secondario (GaR) coniugato a un fluorocromo:
 Fluorescein isothiocyanate (FITC)



Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

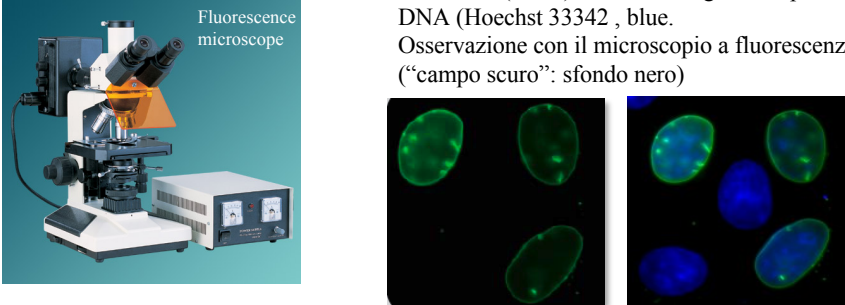
19

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

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 intranucleare associata all'involucro nucleare. Da questa osservazione non si conosce la morfologia della cellula (non è visibile il perimetro della cellula).

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

20

“Doppia” immunofluorescenza

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

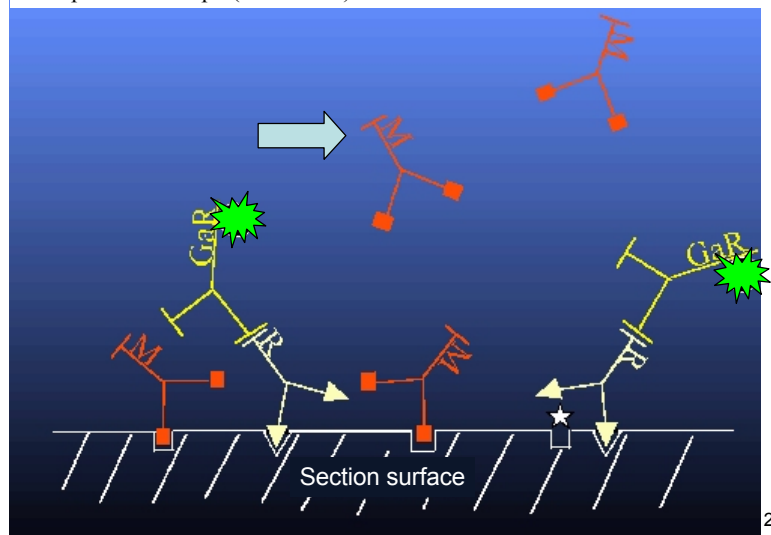
Come principio generale, le doppie marcature sfruttano la possibilità di utilizzare due anticorpi primari specifici di due antigeni diversi e prodotti in specie diverse.

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

21

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).

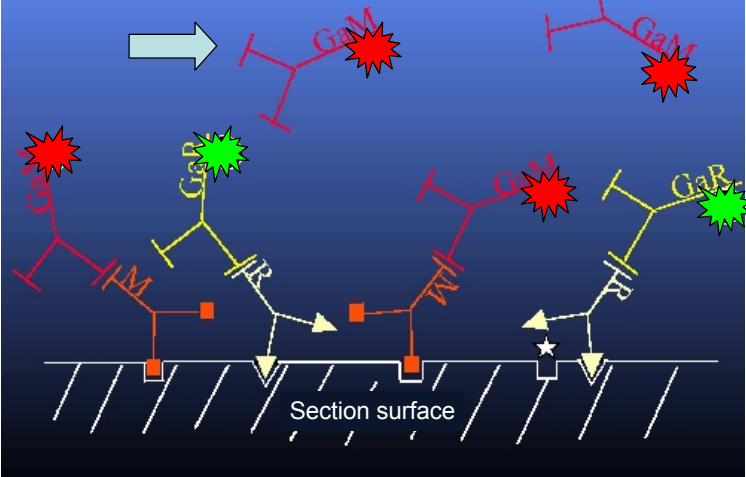


22

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

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)



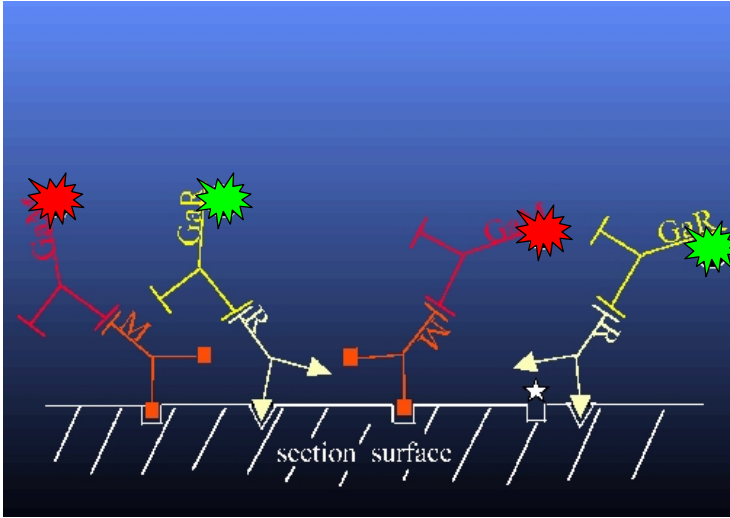
Section surface

23

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

5 Risultato finale osservato al microscopio a fluorescenza tradizionale oppure confocal



section surface

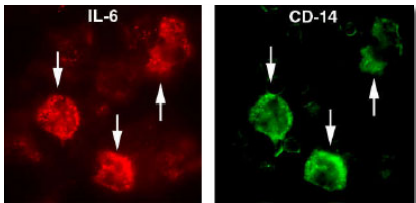
24

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

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-6 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

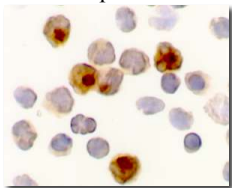
25

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

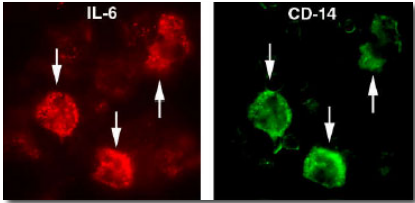
MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

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.

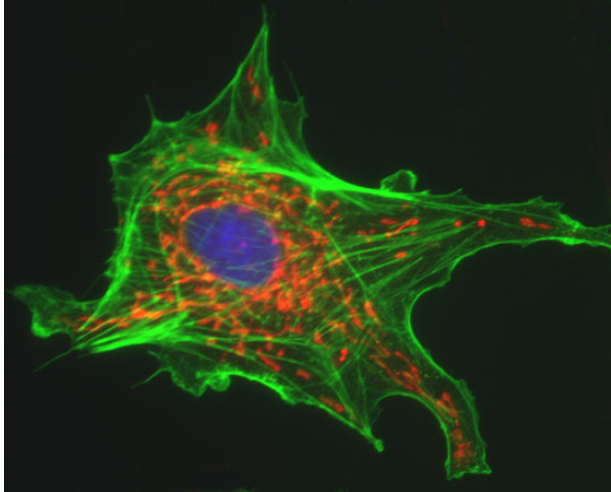
Risultato della doppia immunofluorescenza: Tra le cellule mononucleate del sangue umano i monociti esprimono IL-6

26

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

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

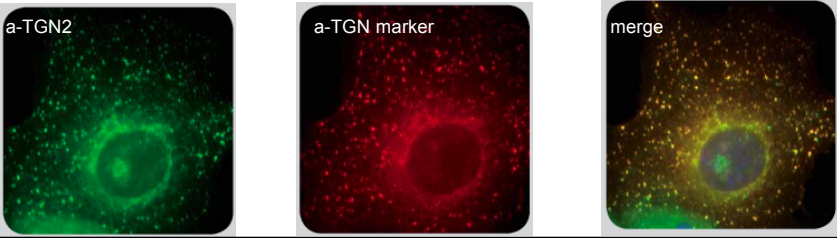


27

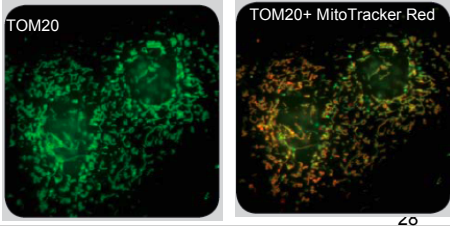
Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Techniques

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



40

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

