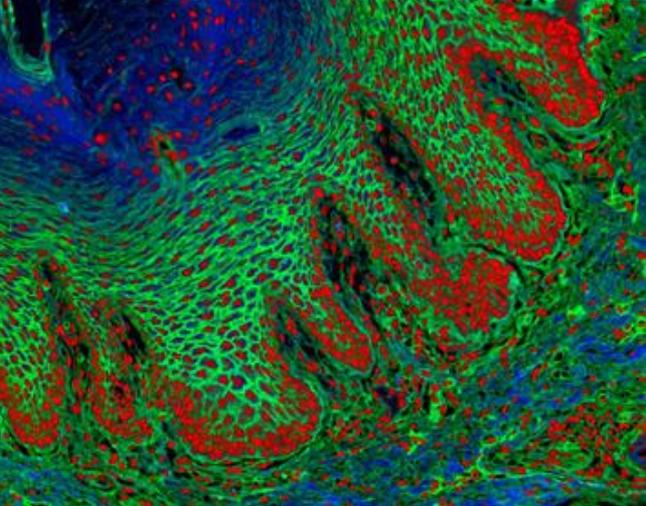
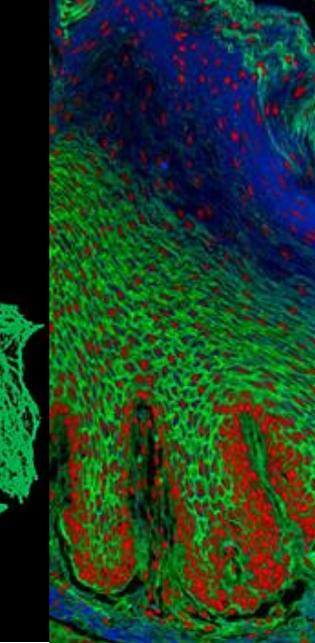
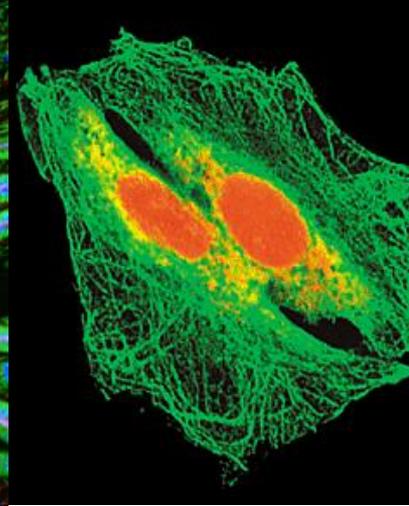
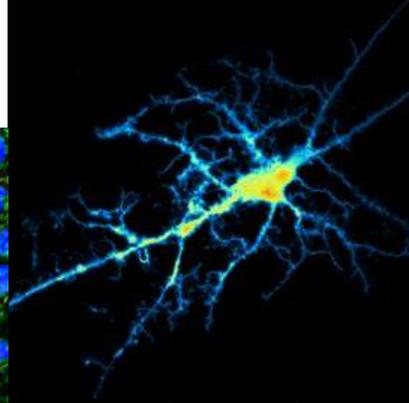
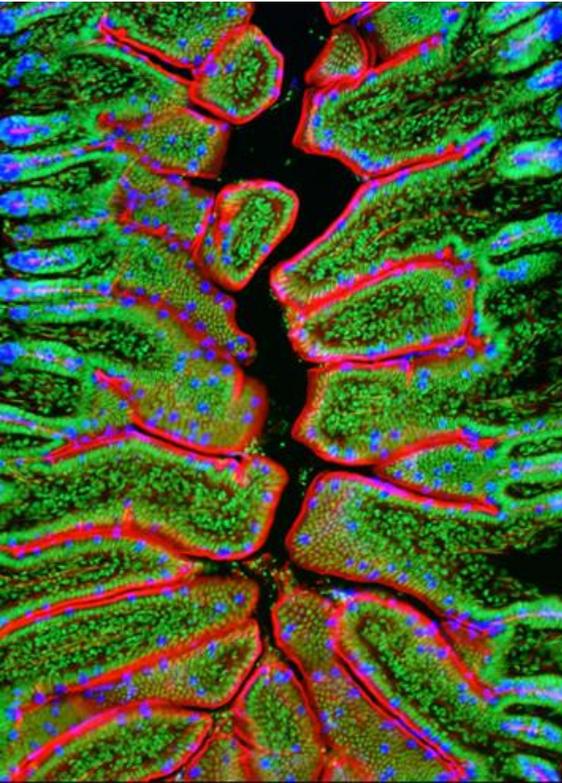
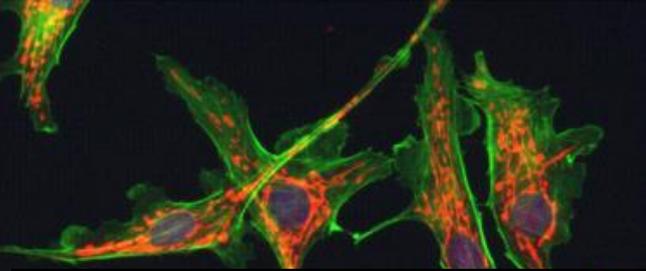
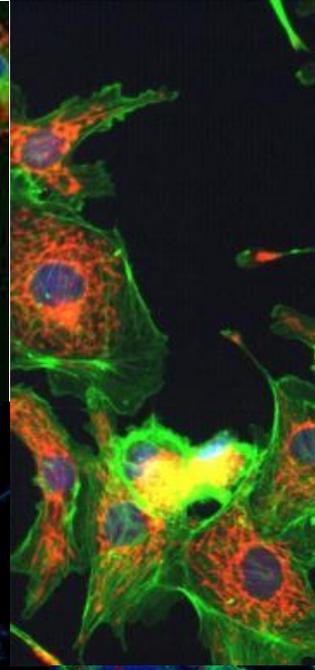
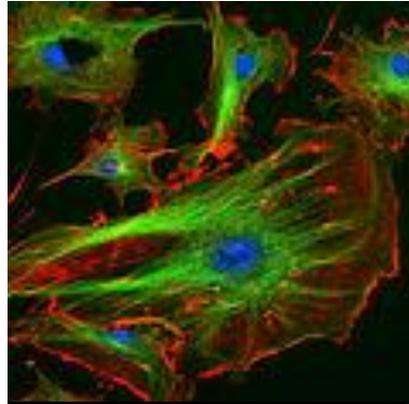
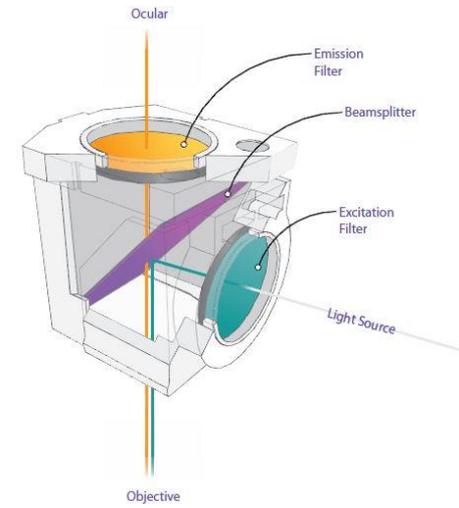
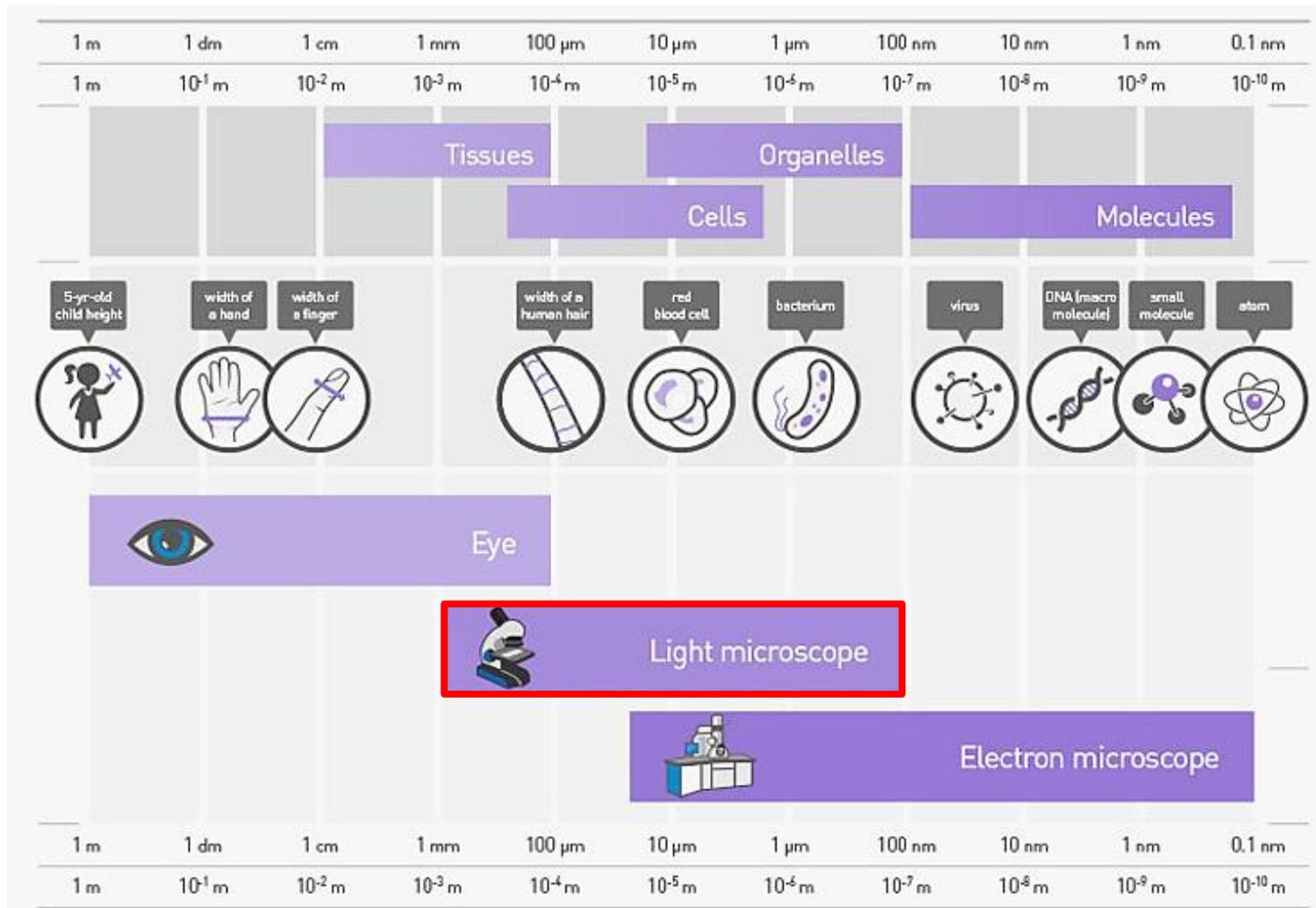


MICROSCOPIA A FLUORESCENZA



POTERE RISOLUTIVO DEI MICROSCOPI



LE ORIGINI DEL MICROSCOPIO

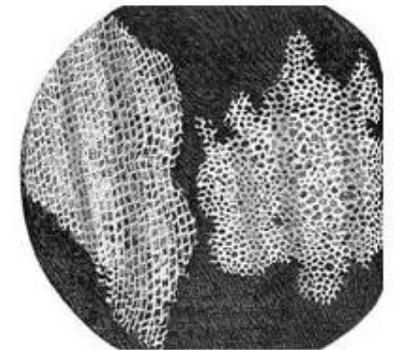


"In the collection of most of which I made use of microscopes and some other glasses and instruments that improve the senses... only to promote the use of mechanical helps for the Senses, both in the surveying the already visible World, and for the discovery of many others hitherto unknown"

- Micrographia, by Robert Hooke (1665)

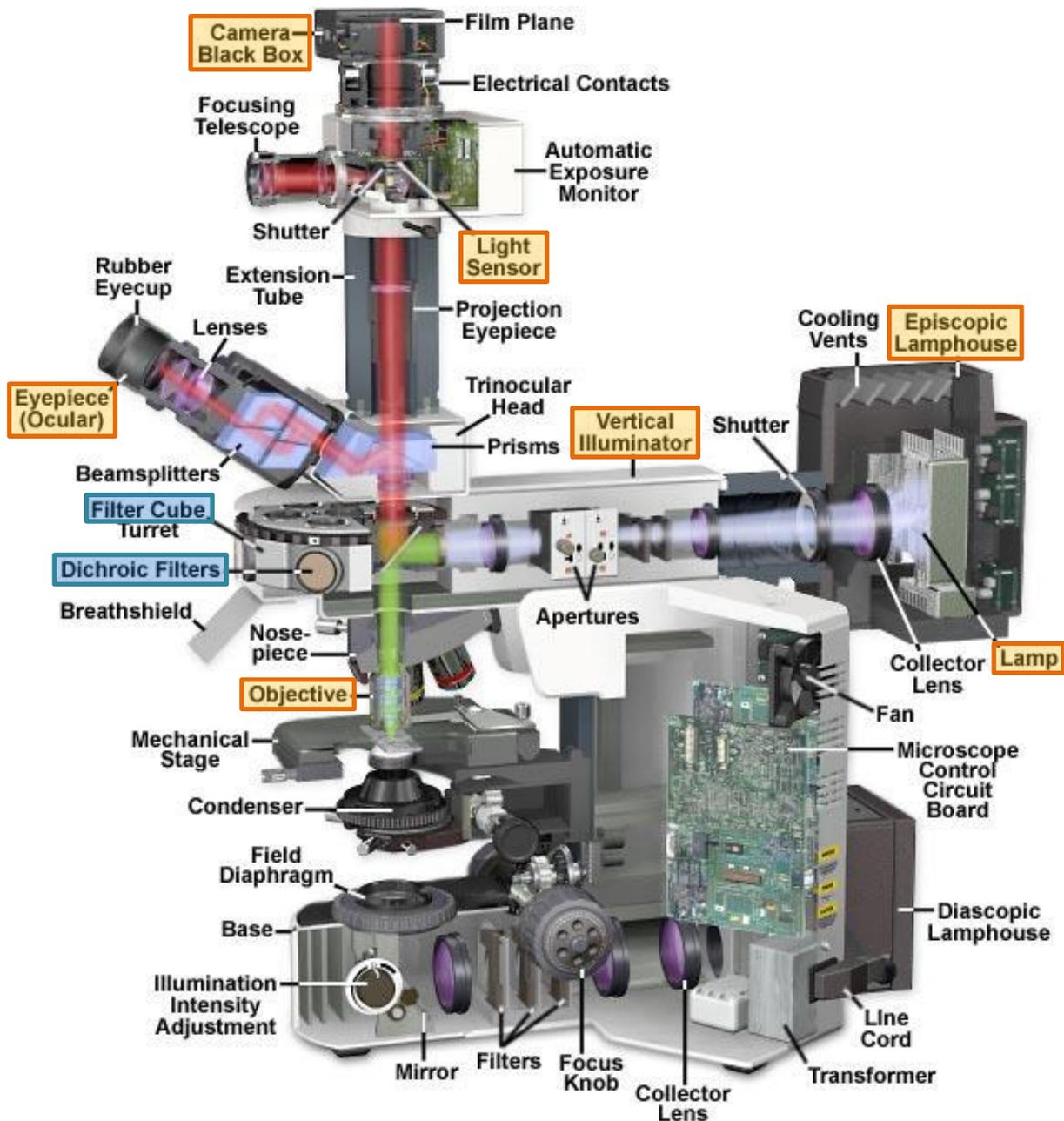


Robert Hooke (1665) – English scientist who looked at thin slices of cork (dead oak tree bark) under a light microscope and noticed tiny “compartments” that he named cells.



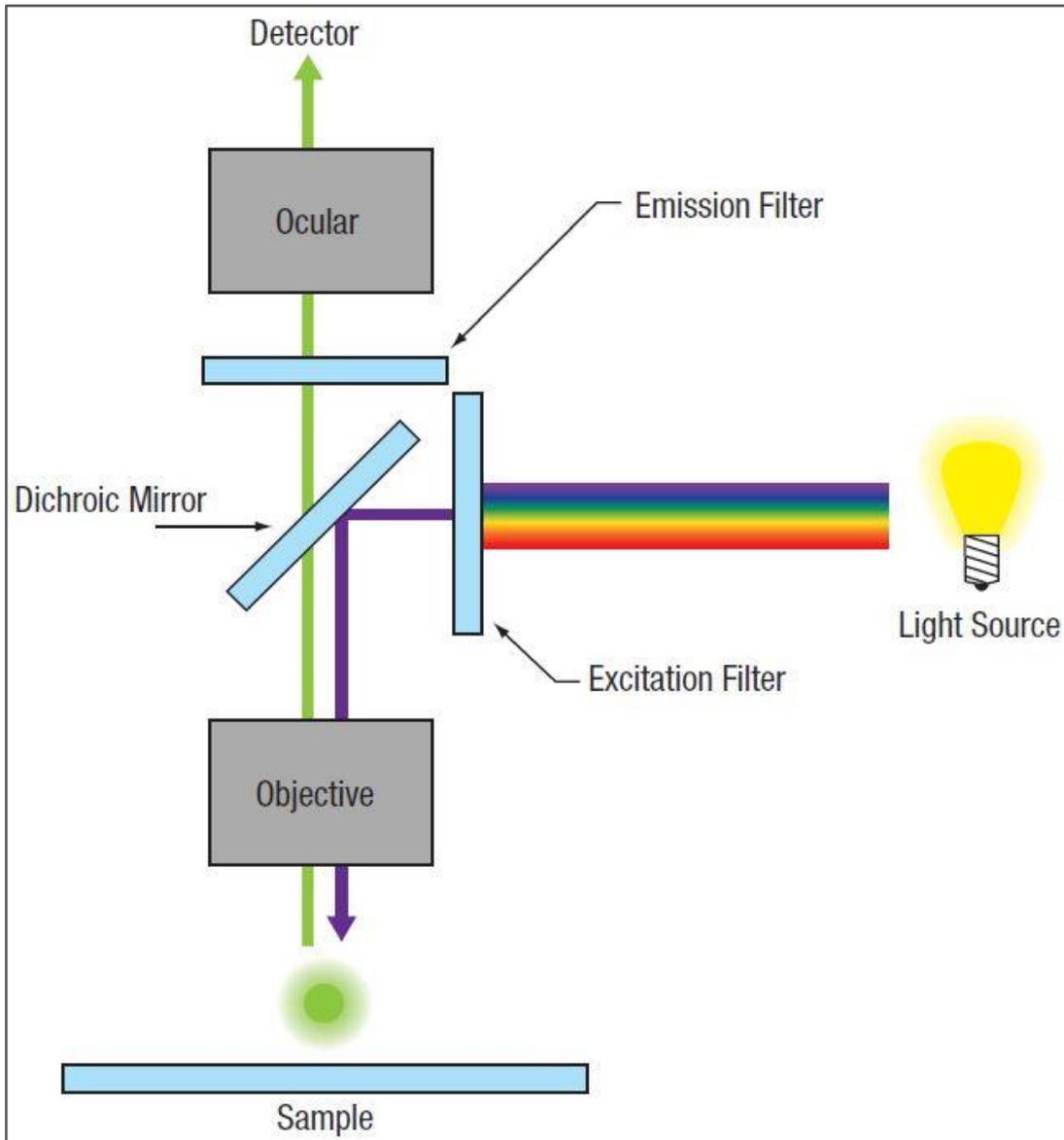
Hooke's original drawing of cork under a microscope.

MICROSCOPIA A FLUORESCENZA - STRUMENTAZIONE



Lo strumento utilizzato è un microscopio ottico **modificato** per rilevare fenomeni di **fluorescenza**.

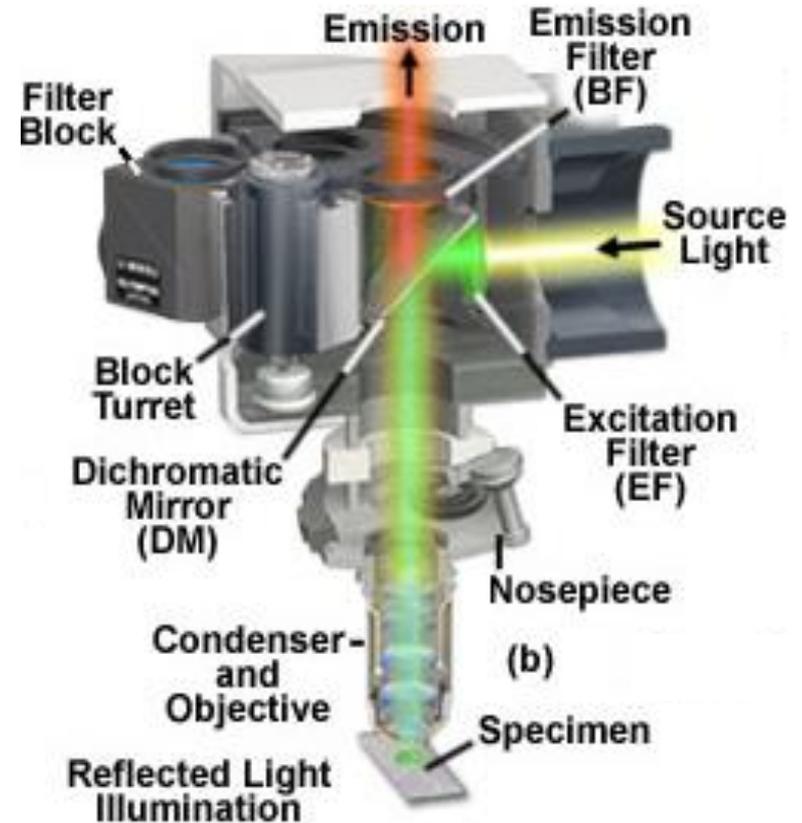
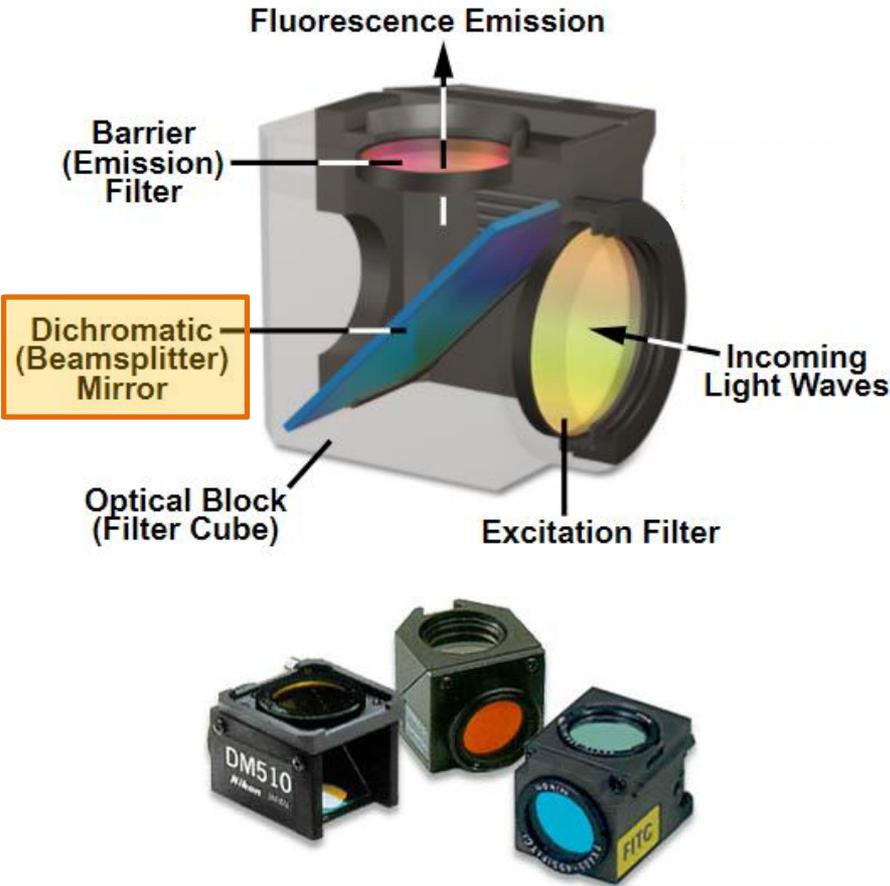
SCHEMA STRUTTURALE DI UN MICROSCOPIO A FLUORESCENZA



La **sorgente** è posizionata tra l'oculare e l'obiettivo e dirige la luce sul campione usando l'obiettivo come un condensatore, **sfruttando poi lo stesso obiettivo per catturare la fluorescenza emessa.**

BLOCCO OTTICO (o CUBO o FILTER CUBE)

Filtro di eccitazione + **specchio dicroico** + filtro di emissione

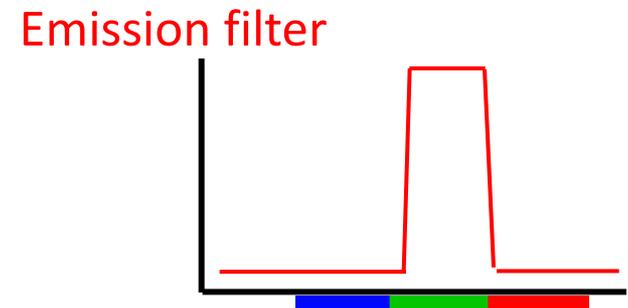
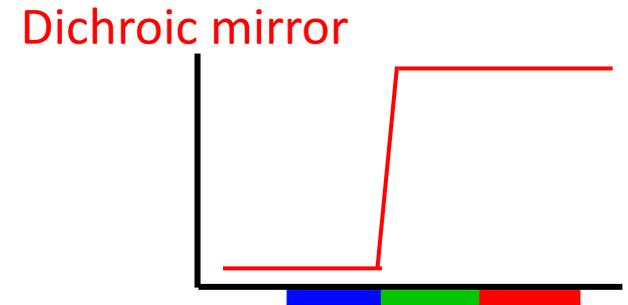
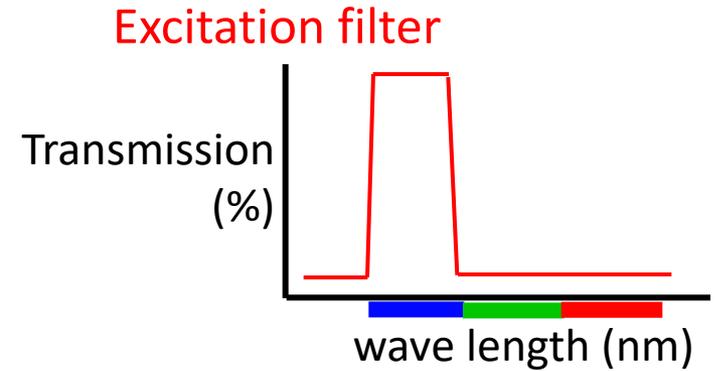
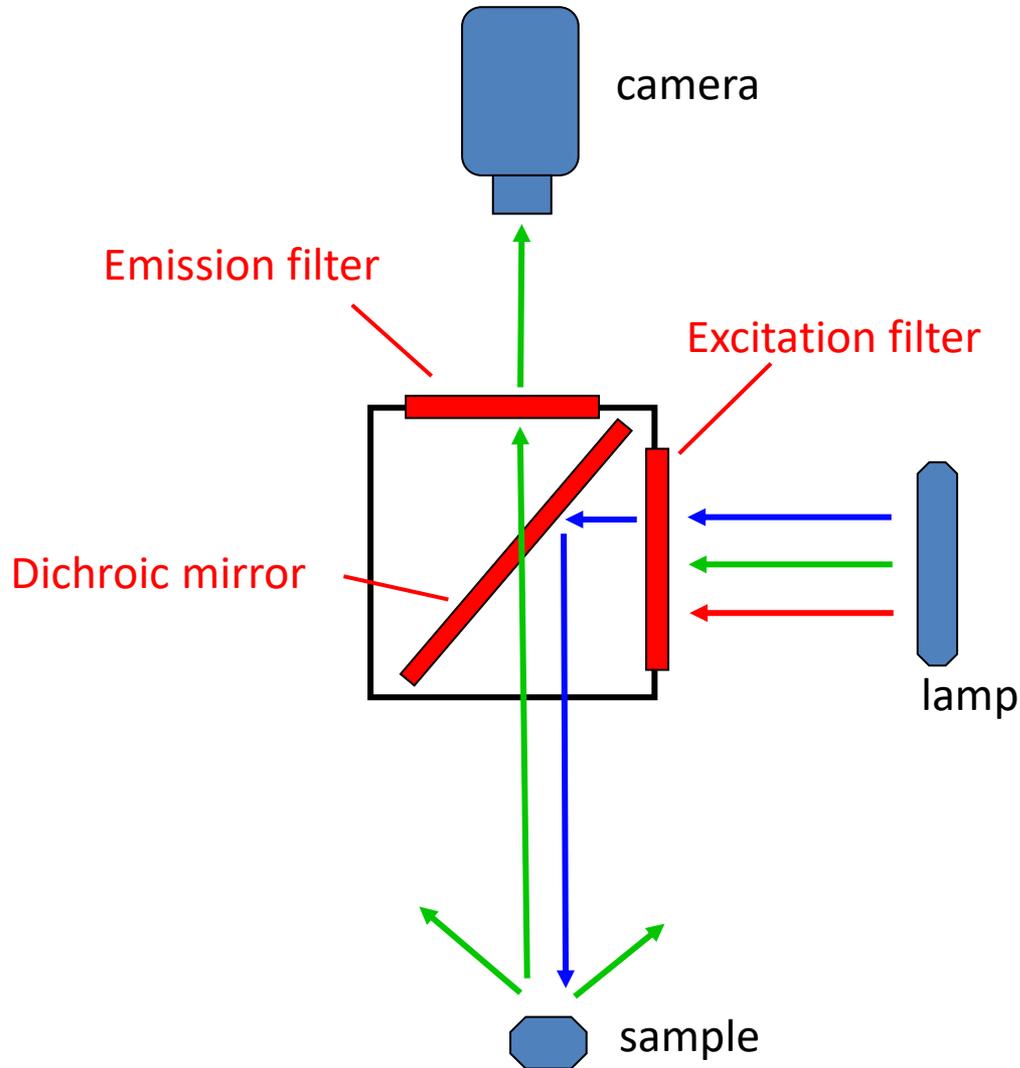


Possono essere presenti diversi **intercambiabili**.

Riflette o **lascia passare** la luce a seconda della **lunghezza d'onda**

BLOCCO OTTICO (o CUBO o FILTER CUBE)

Grazie a diversi **filtri** è possibile separare le diverse **lunghezze d'onda**



RILEVAZIONE DELLA FLUORESCENZA

Grazie a diversi **filtri** è possibile separare le diverse **lunghezze d'onda**

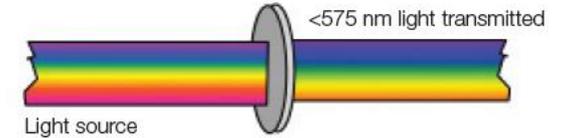
La **specificità** della **rilevazione** è controllata da **filtri ottici** che bloccano alcune lunghezze d'onda lasciandone passare altre.

Tipi di filtri:

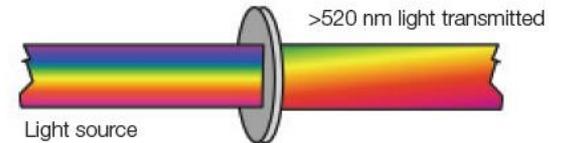
- **short-pass filters**: lasciano passare lunghezze d'onda sotto una certa soglia;
- **long-pass filters**: lasciano passare lunghezze d'onda sopra una certa soglia;
- **band pas filters**: lasciano passare lunghezze d'onda entro piccoli intervalli.
- **Dichroic mirrors**

Questi filtri possono quindi lasciare passare o bloccare alcune lunghezze d'onda.

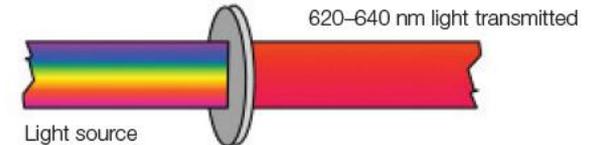
575 nm Short Pass Filter



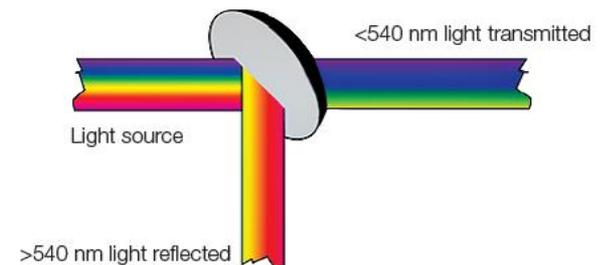
520 nm Long Pass Filter



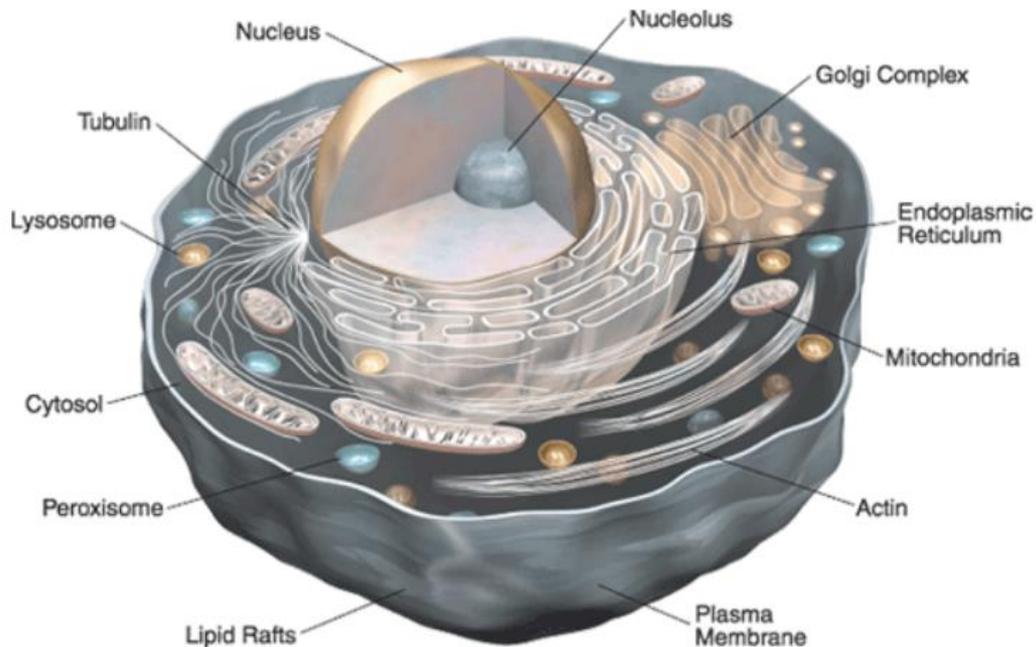
630/20 nm Band Pass Filter



540 nm Dichroic Short Pass Mirror



METODI PER STUDIARE LA CELLULA: COLORANTI FLUORESCENTI E ANTICORPI



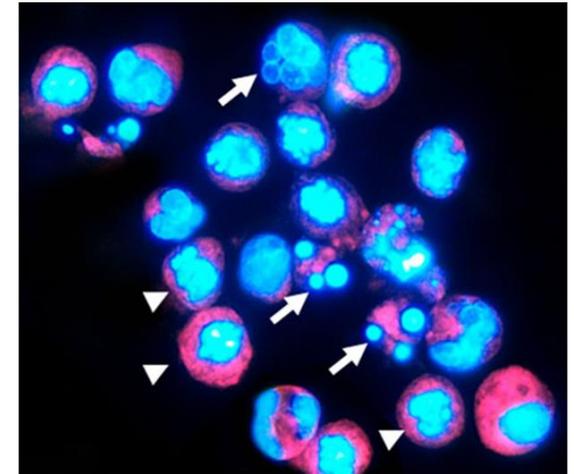
- [Adiposomes](#)
- [Cytoplasm](#)
- [Cytoskeleton](#)
- [Endoplasmic reticulum](#)
- [Golgi complex](#)
- [Intracellular membranes](#)
- [Lysosomes](#)
- [Membrane trafficking](#)
- [Mitochondria](#)
- [Nuclear envelope](#)
- [Nucleoli](#)
- [Nucleus](#)
- [Peroxisomes](#)
- [Plasma membrane](#)
- [Whole-cell stains for image segmentation in HCS applications](#)

Es. DAPI

(4',6-diamidino-2-phenylindole)

legame con il DNA

→ visualizzazione del nucleo



Apoptotic nuclei stained with **DAPI** show intense fluorescence corresponding to chromatin condensation (arrow heads) and fragmentation (arrows).
Wainer Zoli et al. Breast Cancer Res. 2005;7(5):R681-R689.

STUDI DI LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE / IMMUNOFLUORESCENZA

Immunofluorescenza: mediante **anticorpi** è possibile studiare l'espressione e localizzazione cellulare di proteine specifiche → **studi di co-localizzazione**

Anticorpi

- **primari**, che riconoscono l'**antigene** ricercato
- **secondari**, coniugati ad un **fluorocromo**
(riconoscono e legano i complessi antigene-anticorpo)

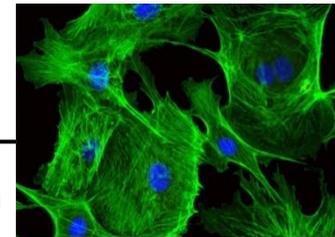
Negli studi di localizzazione o co-localizzazione è necessario avere riferimenti per "mappare" le regioni della cellula che si stanno osservando

Utilizzo di marcatori per specifiche regioni o organelli

Si possono usare coloranti, **tracker** (o "probes") intracellulari o **anticorpi**

Cellule vive (live-cell imaging)	ER	ER-tracker
	Mitocondri	Mitotracker
	Lisosomi	Lysotracker

es. Phalloidin + DAPI

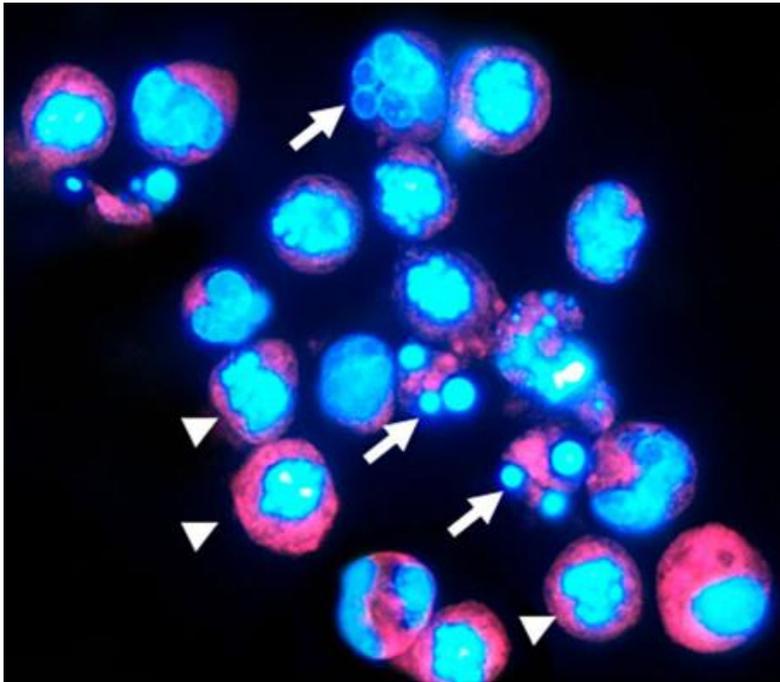


Cellule fissate	Citoplasma	Phalloidin (legame con F-actina)
	Nucleo	DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (legame con il DNA)
	Marker proteici	Organello-specifici, riconosciuti da anticorpi

COLORAZIONI FLUORESCENTI

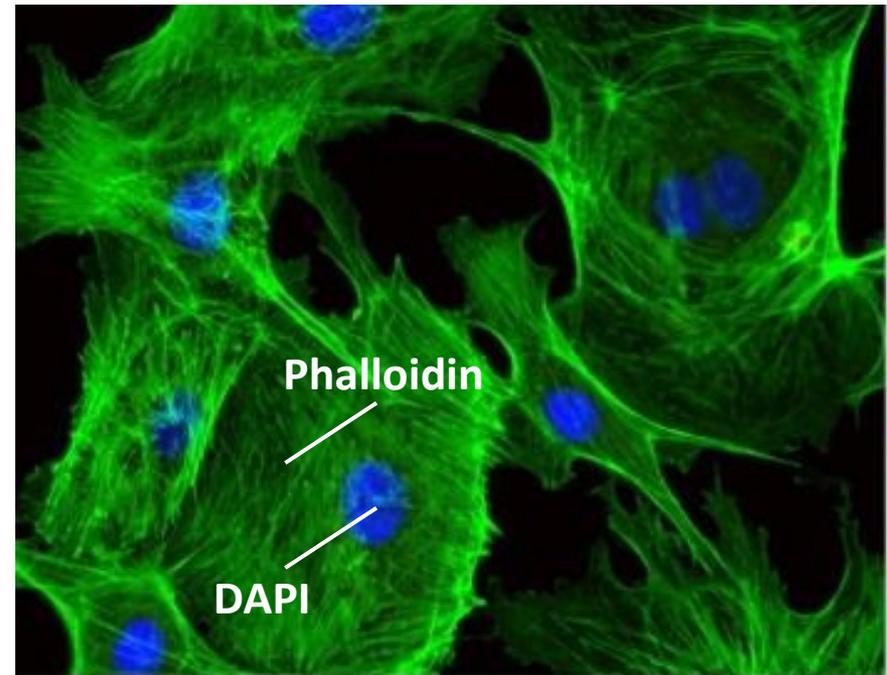
Identificare cellule specifiche all'interno dei tessuti, o **regioni/organelli** specifici all'interno delle cellule, grazie a colorazioni multiple.

Esempio 1



Apoptotic nuclei stained with **DAPI** show intense fluorescence corresponding to chromatin condensation (arrow heads) and fragmentation (arrows).
Wainer Zoli et al. Breast Cancer Res. 2005;7(5):R681-R689.

Esempio 2



Phalloidin = citoplasma (F-actina)
DAPI = nuclei (DNA)

Identificare regioni cellulari, processi o fasi di questi.

ESEMPIO DI PROTOCOLLO DI IMMUNOFLUORESCENZA

Cell Preparation

1. Culture cells on a glass coverslip in a 24-well plate. Cells may be stable clones or cells transfected directly on the coverslip.
2. Fix cells using PBS + 4% paraformaldehyde (PFA; 10 min at room temperature). Wash cells 3 times with PBS.

Cell Permeabilization

1. Incubate fixed cells in in PBS + 0.1% Triton X-100 (10 min at room temperature).
2. Wash cells 3 times with PBS.

Immunofluorescent Staining

1. Incubate cells with a blocking solution (e.g. 5% w/v milk) to minimize nonspecific binding sites
2. Incubate cells with a primary (polyclonal or monoclonal) antibody specific for the protein of interest.
3. Incubate cells with a secondary (fluorescently-labelled) antibody.

ESEMPIO REALE DI STUDIO DI LOCALIZZAZIONE CELLULARE

Sistema sperimentale: cellule ad espressione stabile di fattore IX **wt e mutato**



Fissazione (4% PFA)

Permeabilizzazione (0.1% Triton X-100)

Blocking (PBS + 5% w/v milk)

Anticorpi primari e fluorescenze associate (anticorpi secondari)



Factor IX

Proteina di interesse

Riferimenti



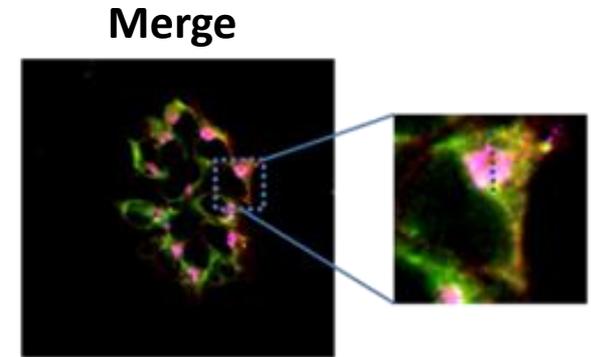
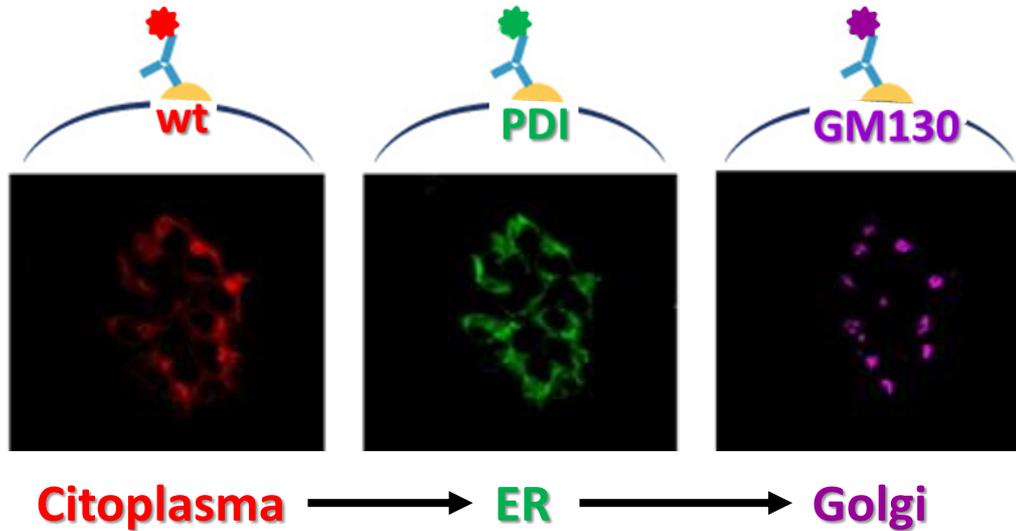
PDI (Protein disulphide isomerase) ----- Marker per **ER**



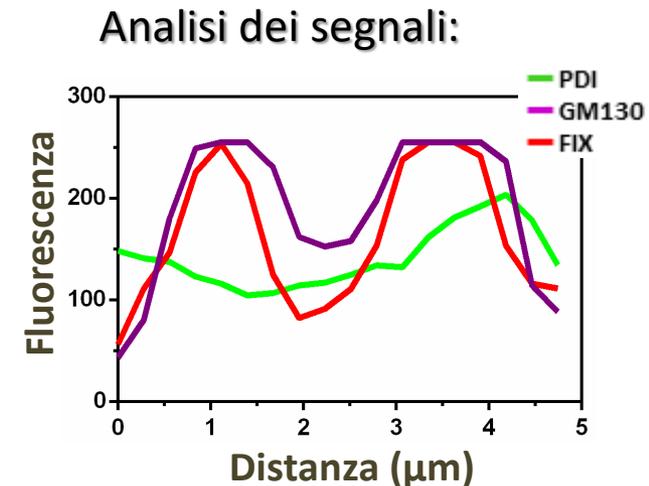
GM130 (Golgi matrix protein 130) ----- Marker per apparato del **Golgi**

ESEMPIO REALE DI STUDIO DI LOCALIZZAZIONE CELLULARE

Sistema sperimentale: cellule ad espressione stabile di fattore IX **wt e mutato**

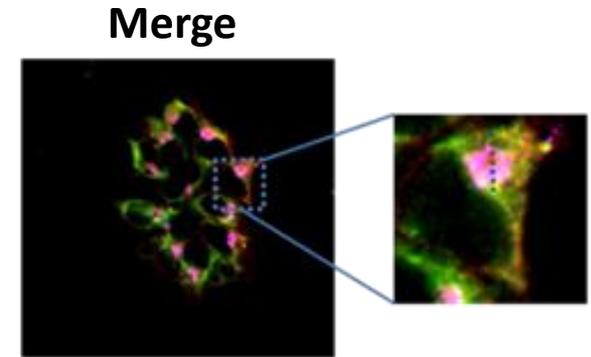
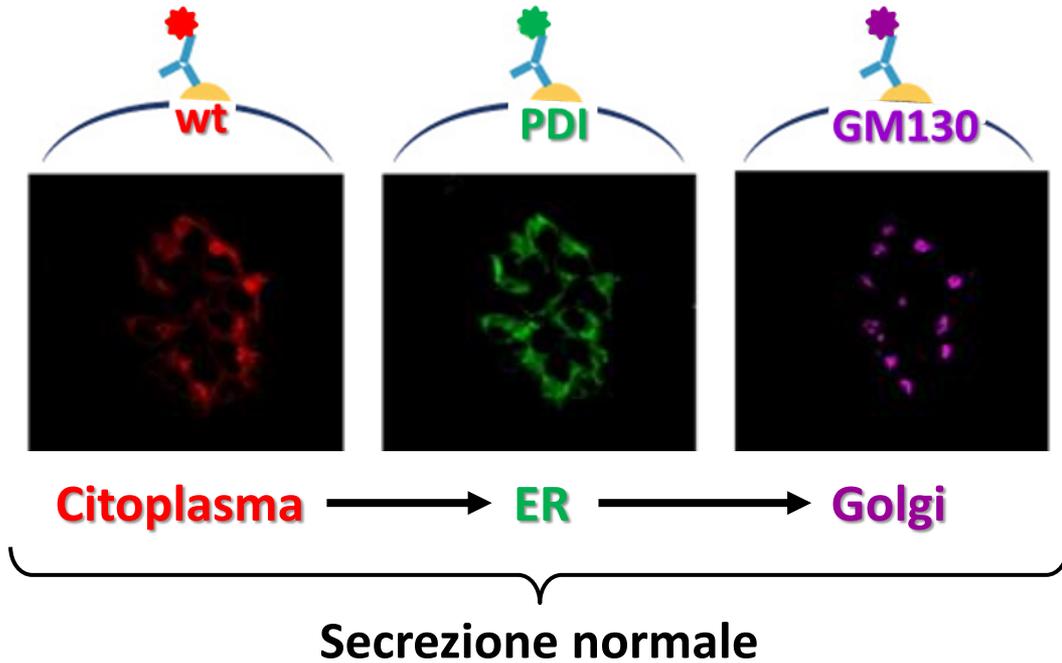


Il segnale di fluorescenza rilevato per la proteina **wild-type** è parallelo al segnale relativo al marker per l'apparato del **Golgi**



ESEMPIO REALE DI STUDIO DI LOCALIZZAZIONE CELLULARE

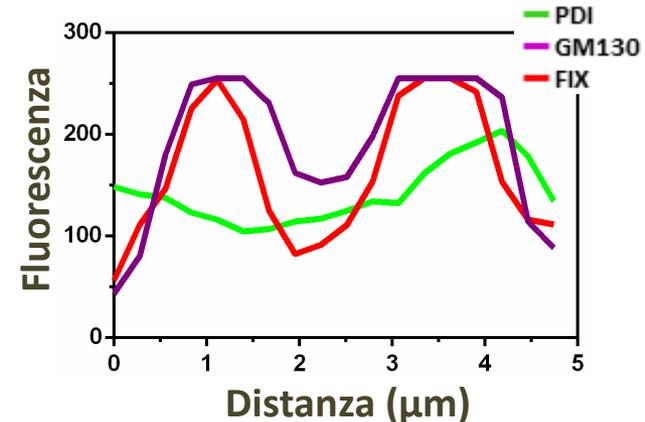
Sistema sperimentale: cellule ad espressione stabile di fattore IX **wt e mutato**



Normale co-localizzazione:

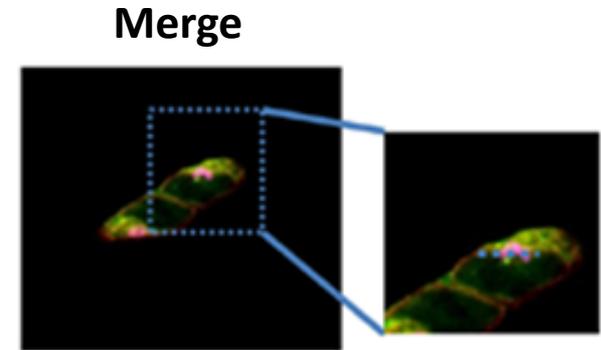
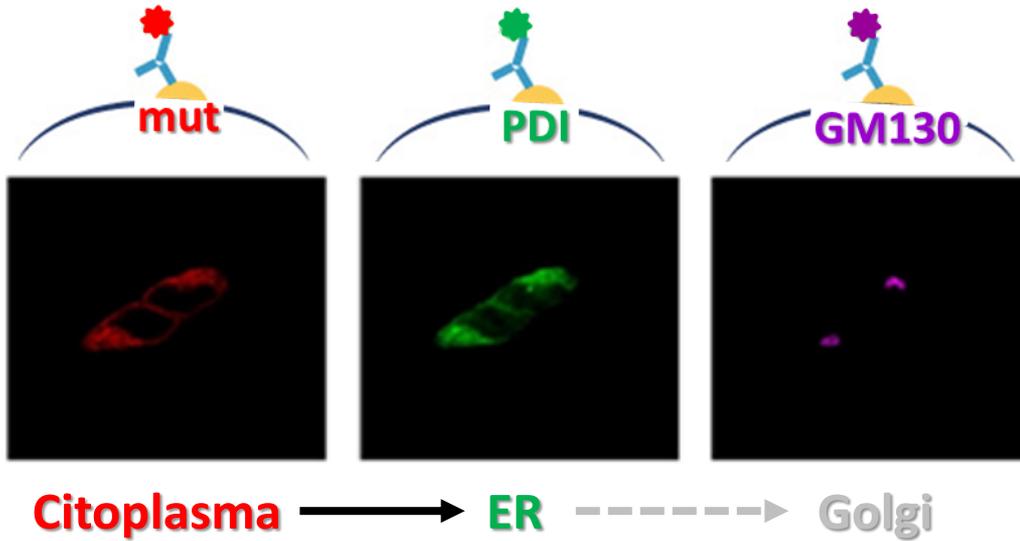
L'analisi dei segnali relativi alla proteina **wild-type** indica una co-localizzazione **prevalente** a livello dell'apparato del **Golgi** e **bassa** a livello del **ER**

Analisi dei segnali:

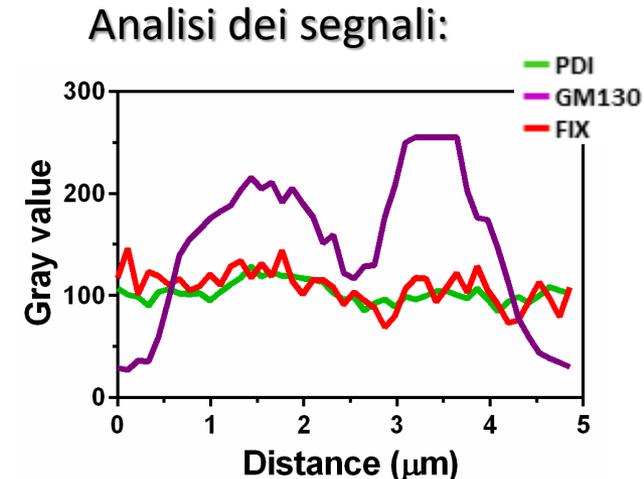


ESEMPIO REALE DI STUDIO DI LOCALIZZAZIONE CELLULARE

Sistema sperimentale: cellule ad espressione stabile di fattore IX **wt e mutato**

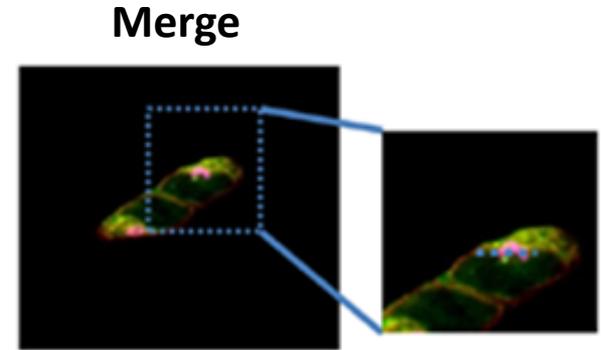
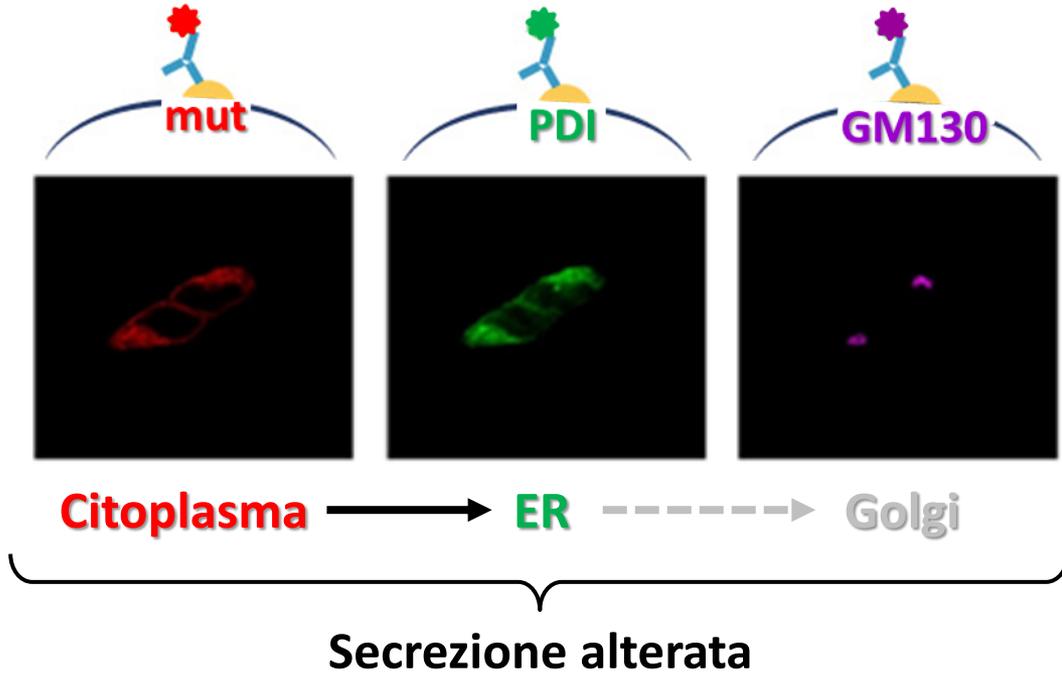


Il segnale di fluorescenza rilevato per la proteina **mutata** è parallelo al segnale relativo al marker per l'**ER**



ESEMPIO REALE DI STUDIO DI LOCALIZZAZIONE CELLULARE

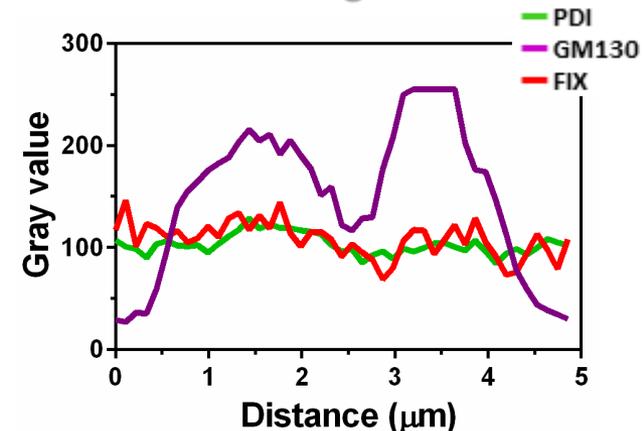
Sistema sperimentale: cellule ad espressione stabile di fattore IX **wt e mutato**



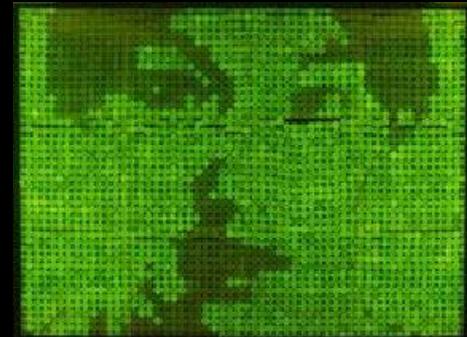
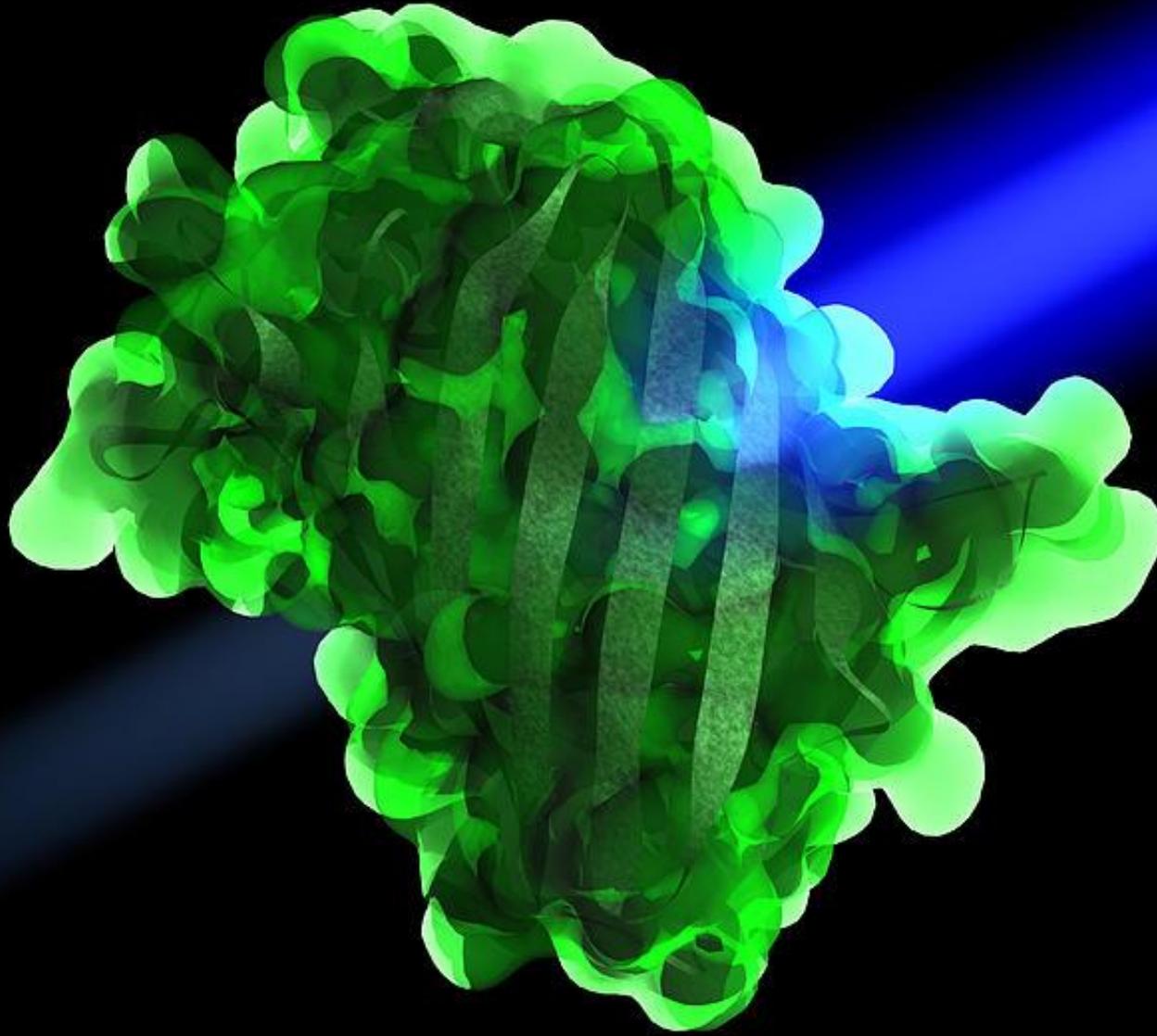
L'analisi dei segnali relativi alla proteina **mutata** indica una co-localizzazione **prevalente** a livello del **ER** e **bassa** a livello dell'apparato del **Golgi**

↳ **Bassi livelli di secrezione**

Analisi dei segnali:



GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)



GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)

Proteina fluorescente presente naturalmente nella medusa *Aequorea victoria*

Alcune note storiche:

- Scoperta nel 1962 da Osamu Shimomura;
- Clonata per la prima volta nel 1994;
- Premio Nobel per la chimica nel 2008.

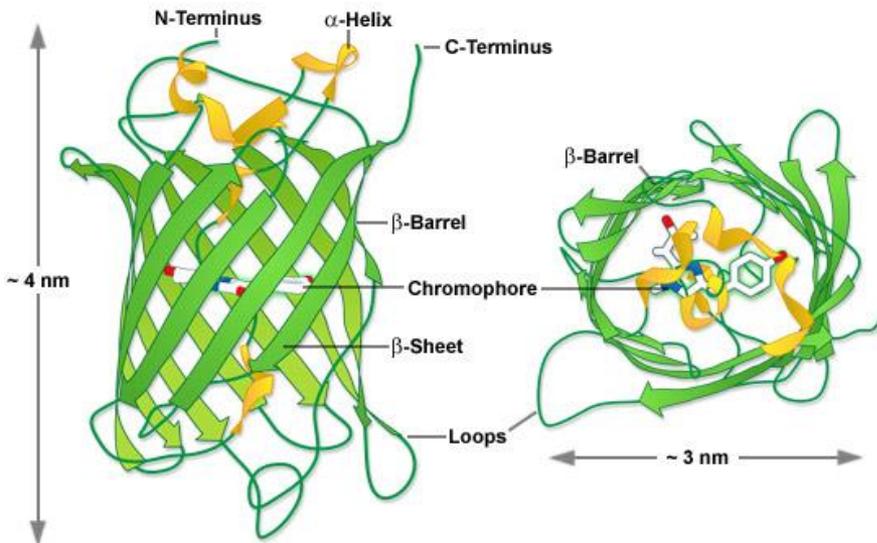


2008



Chimica

Architecture of *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein

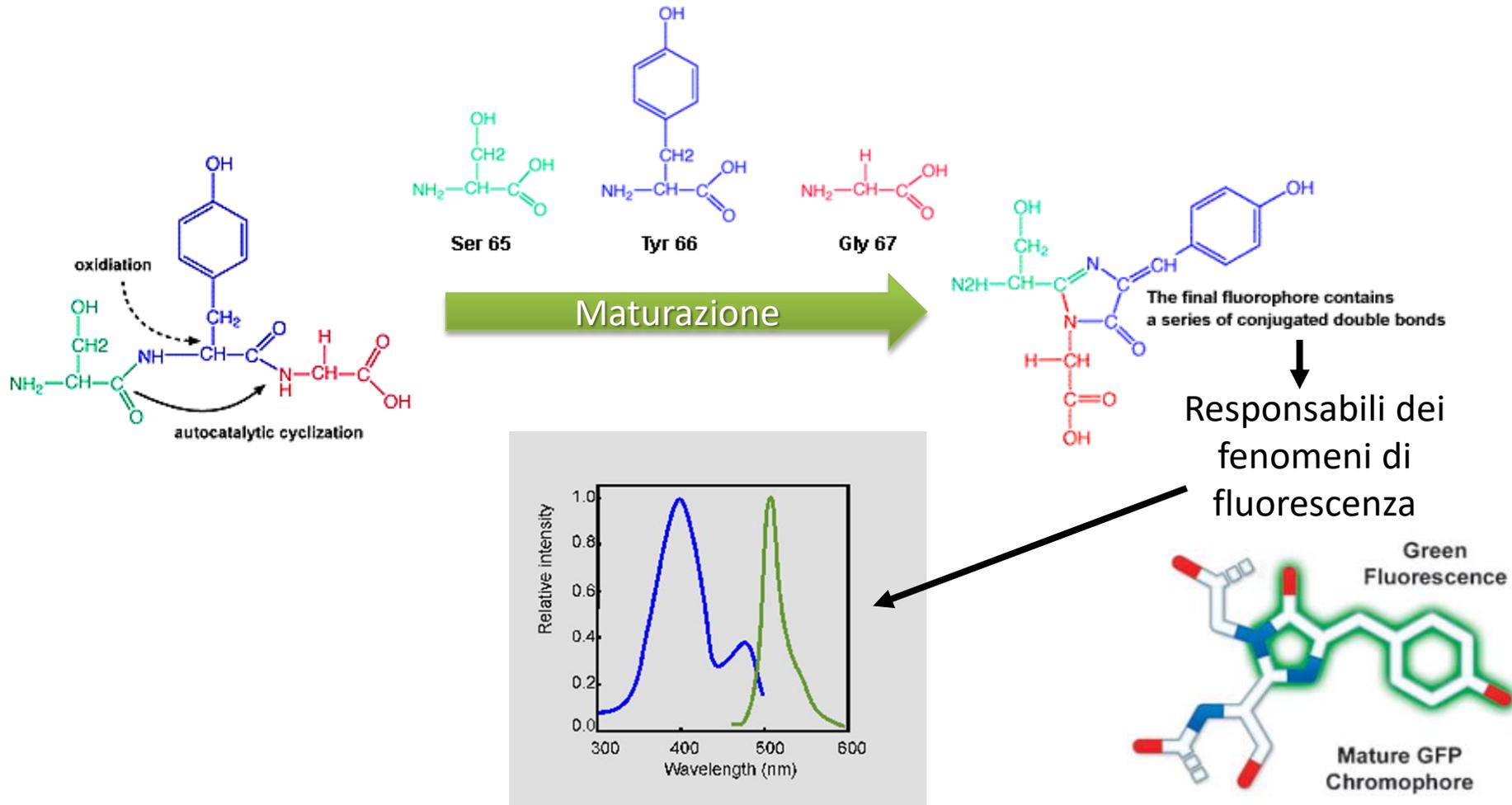


Day et al. 2009

- Proteina di 238 amino acidi (26.9 kDa)
- Conformazione a β -barrel con al centro il cromoforo responsabile della fluorescenza
- Usata come partner di fusione
- Utilizzata in esperimenti di live-cell imaging o come gene reporter

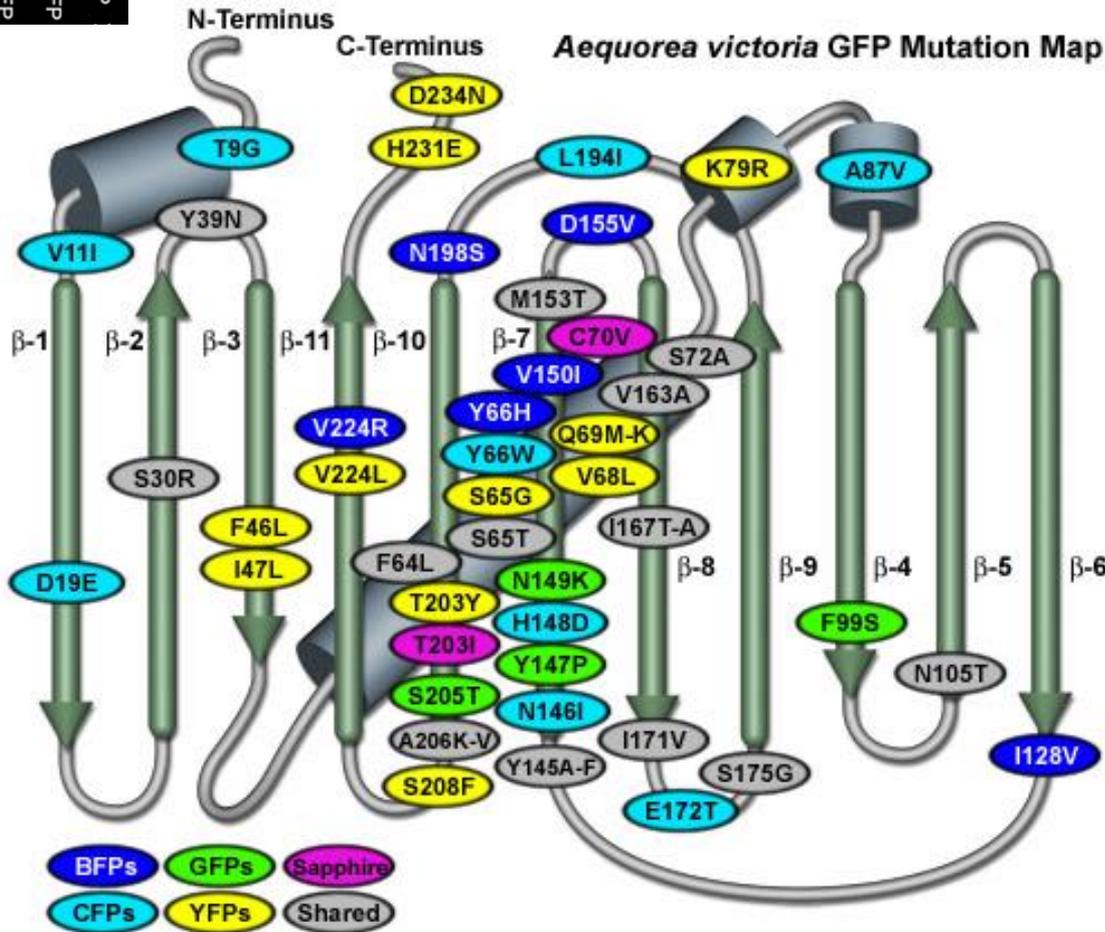
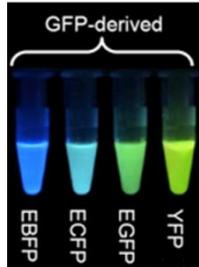
GFP - CARATTERISTICHE DEL CROMOFORO

L'unicità della **GFP** è data dal fatto che il **cromoforo** responsabile della sua fluorescenza non è un gruppo prostetico separato ma è composto di **amminoacidi modificati (Ser65, Tyr66 e Gly67)** che vengono sottoposti a ciclizzazione e ossidazione durante il processo di maturazione del cromoforo

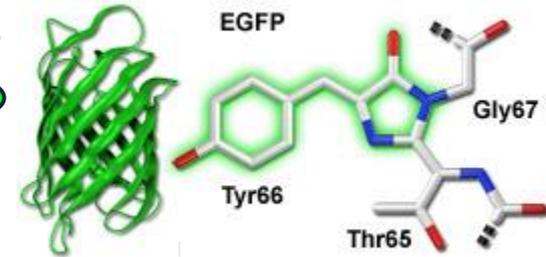


PROTEINE FLUORESCENTI DERIVATE DA GFP

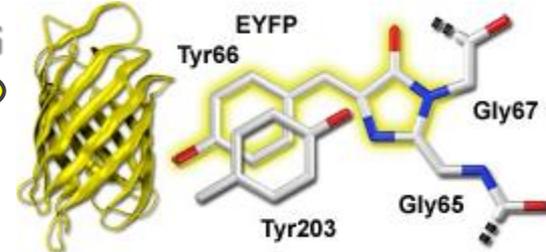
Sviluppo di varianti della GFP come risultato di mutagenesi sito-specifica



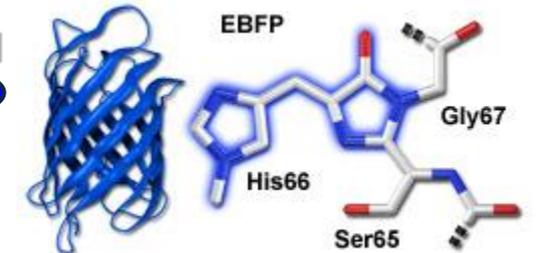
S65T



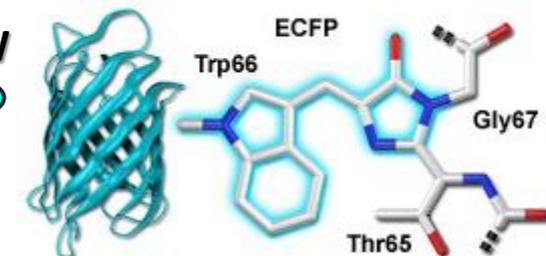
S65G



Y66H

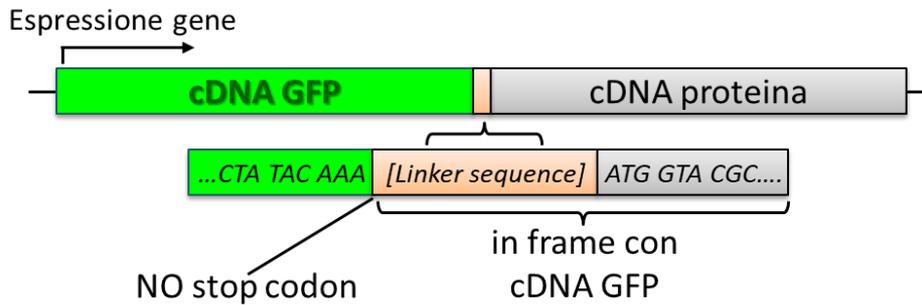


Y66W

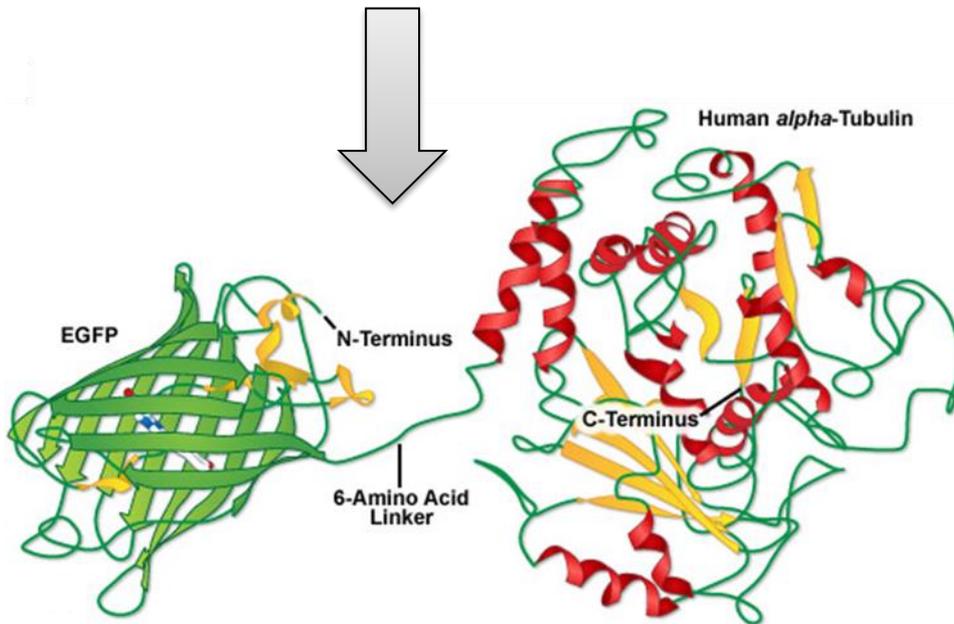
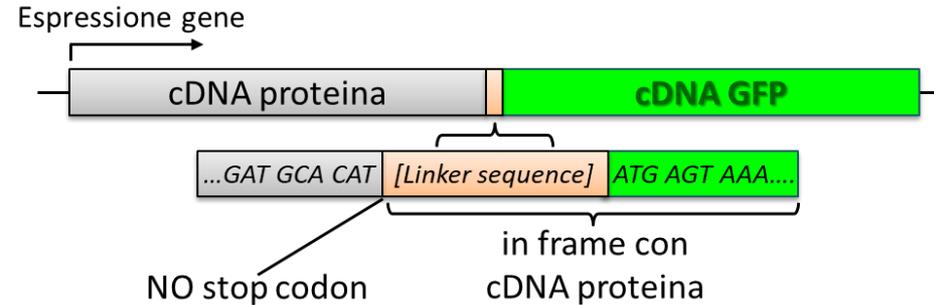


USO DELLA GFP COME PARTNER DI FUSIONE

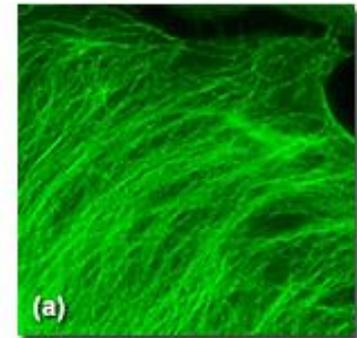
Metodo di fusione N-terminale



Metodo di fusione C-terminale

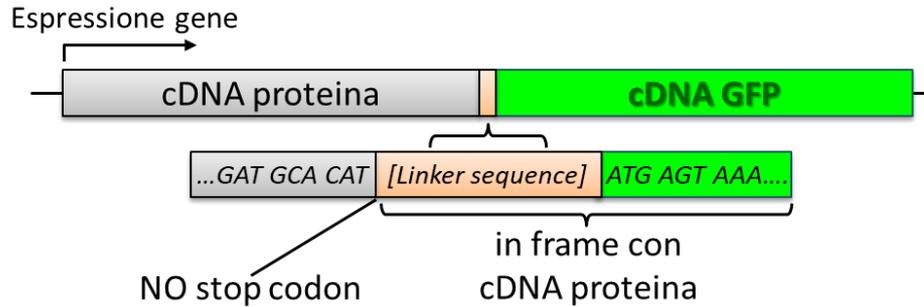


Fluorescent Protein Gene Fusions for Subcellular Localization Imaging

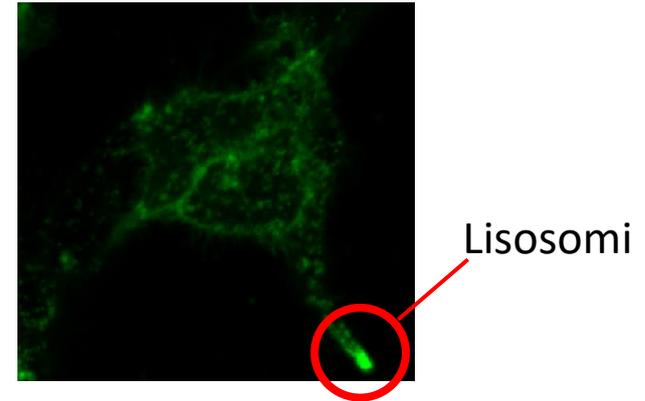


La fusione della GFP ad una proteina di interesse consente di visualizzarne la localizzazione cellulare

ESEMPIO REALE DI FUSIONE DI PROTEINE CON GFP

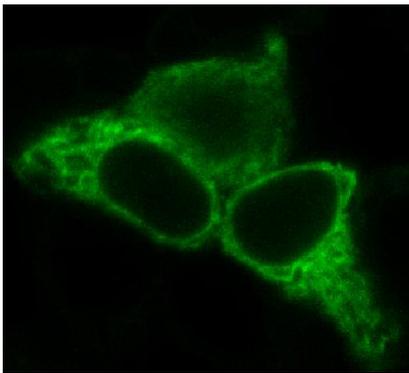


Proteina wt fusa con EGFP

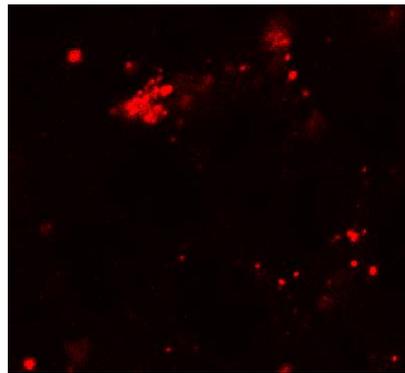


Fusione di una proteina lisosomiale con GFP e studio di localizzazione della proteina wild-type e di una variante con una mutazione

Proteina mut-EGFP



Lysotracker



Merged channels



La localizzazione della proteina lisosomiale è alterata dalla mutazione