



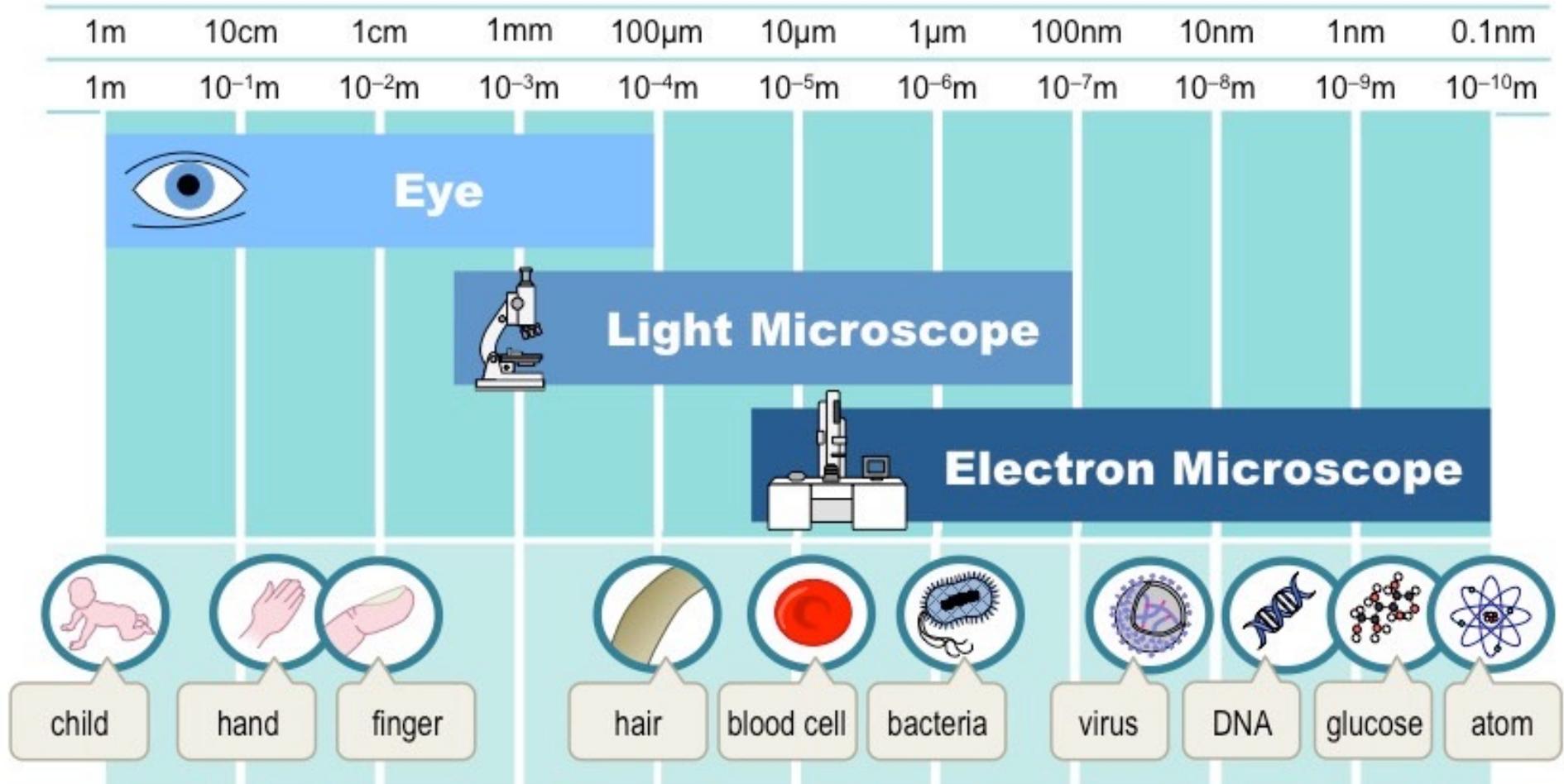
Università degli studi di Brescia
Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale

Valigia del Ricercatore

**MICROSCOPIA OTTICA
E
IN FLUORESCENZA**

Cosetta Ravelli, PhD
Piattaforma Imaging
cosetta.ravelli@unibs.it

CAPACITÀ DI RISOLUZIONE DELLA MICROSCOPIA OTTICA



In microscopia ottica la fonte di eccitazione del campione è la luce. Essa permette una capacità di risoluzione di strutture fino a 100 nm di dimensione. Questo significa che si possono osservare batteri ma non virus.

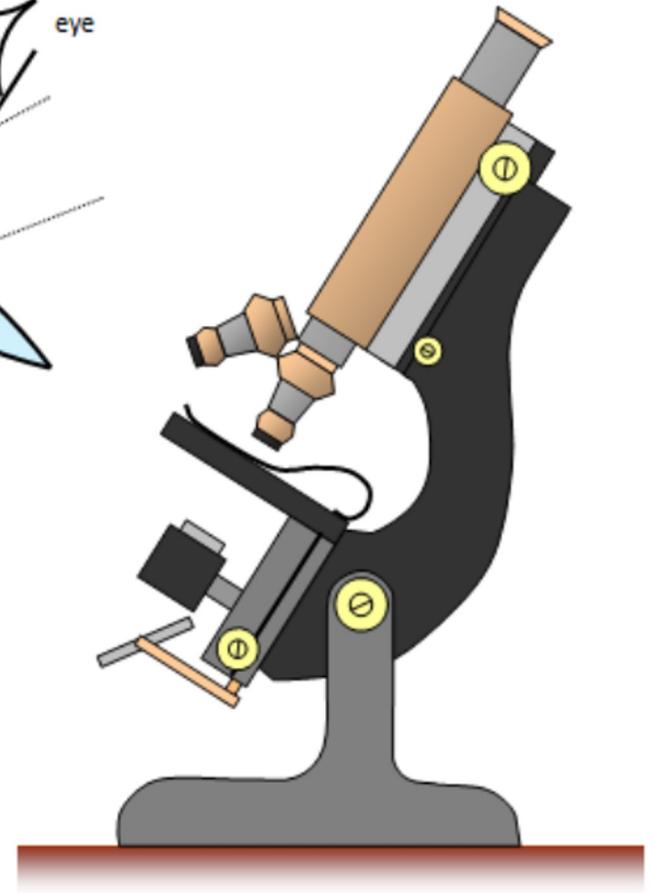
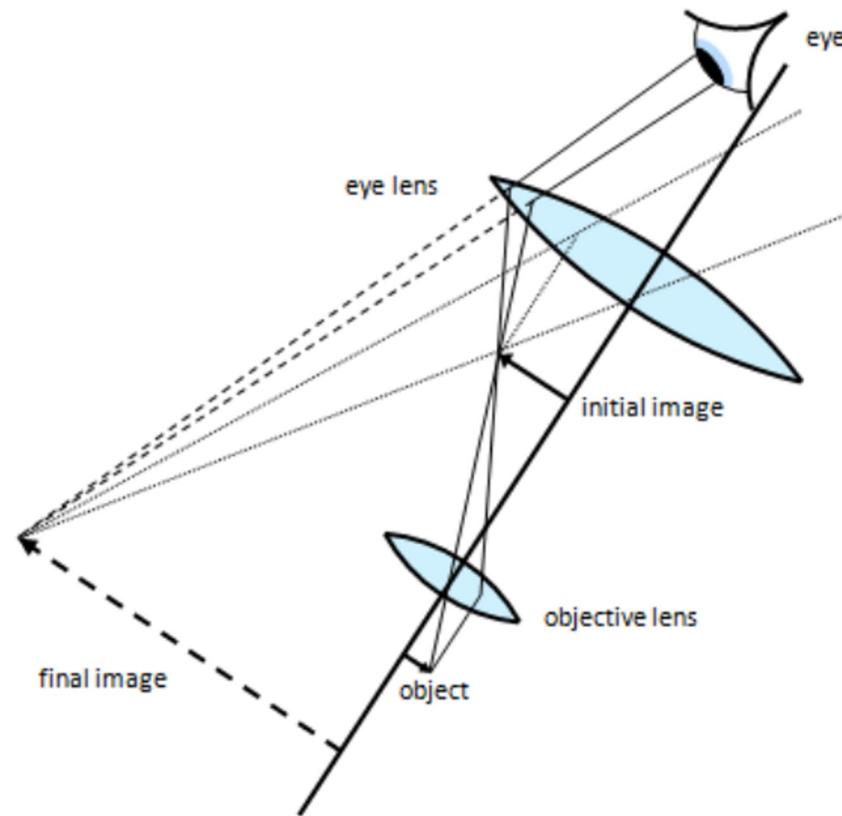
IL MICROSCOPIO OTTICO COMPOSTO

$$m = m_1 \times m_2$$

m = magnification

m_1 = Linear magnification of the objective lens

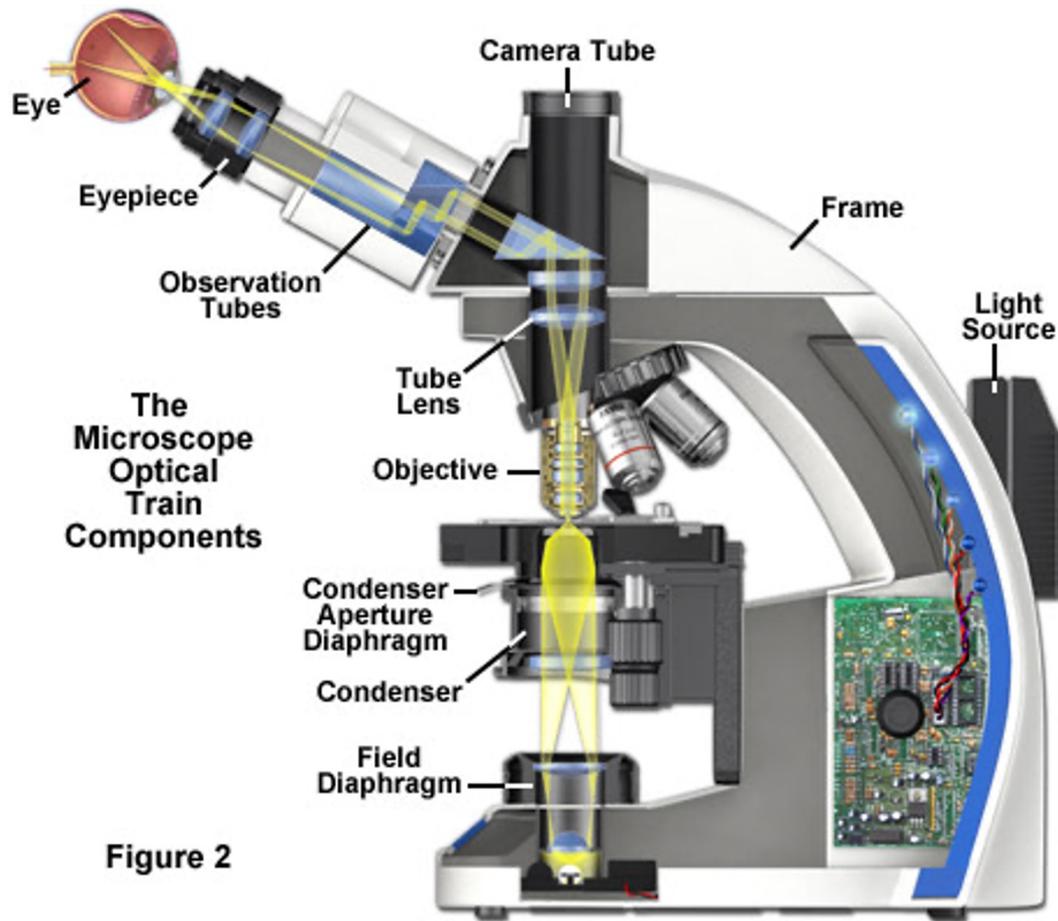
m_2 = Linear magnification of the eyepiece



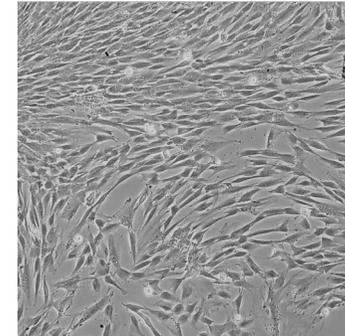
Nella sua forma più semplice, il microscopio ottico composto è costituito da due lenti sottili e convesse, una grande (**oculare**), ed una piccola (**obiettivo**) in asse tra loro. L'obiettivo, più vicino al campione, compie il primo step di ingrandimento e crea un'immagine che sarà ulteriormente ingrandita dall'oculare.

L'ingrandimento totale del sistema è dato dalla combinazione dei due fattori di ingrandimento.

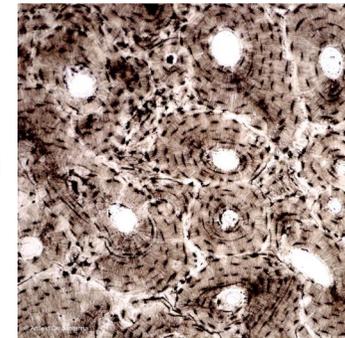
MICROSCOPIA IN CAMPO CHIARO



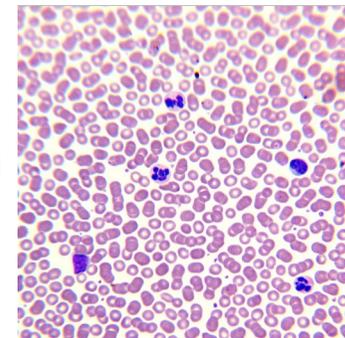
cellule in coltura



tessuti colorati



tessuti colorati

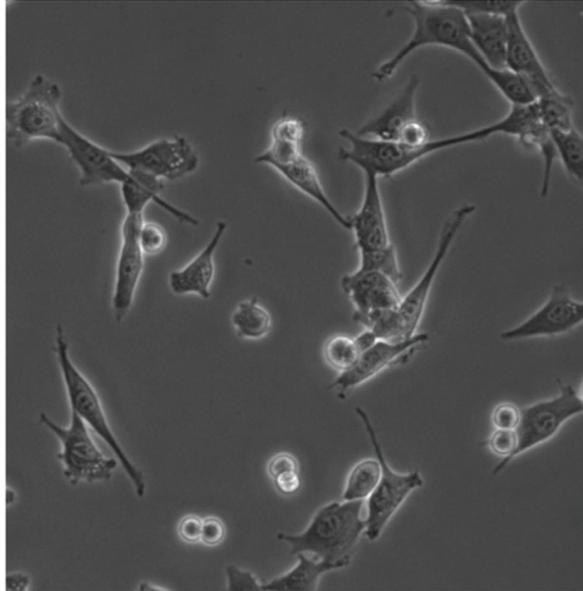


Nella microscopia ottica in campo chiaro il campione è illuminato con luce bianca. La luce è prodotta da una lampada e illumina il campione attraverso il condensatore. L'immagine del campione viene quindi ingrandita dalle lenti e raggiunge il nostro occhio.

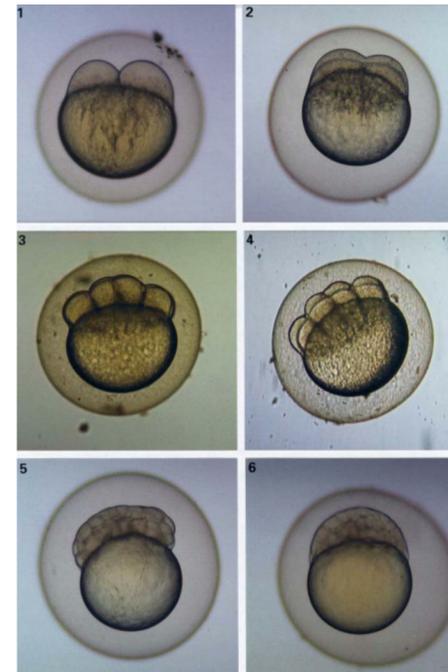
I campioni che possono essere osservati in campo chiaro sono numerosi; sia vivi, sia fissati e colorati.

MICROSCOPIA IN CAMPO CHIARO- ESEMPI

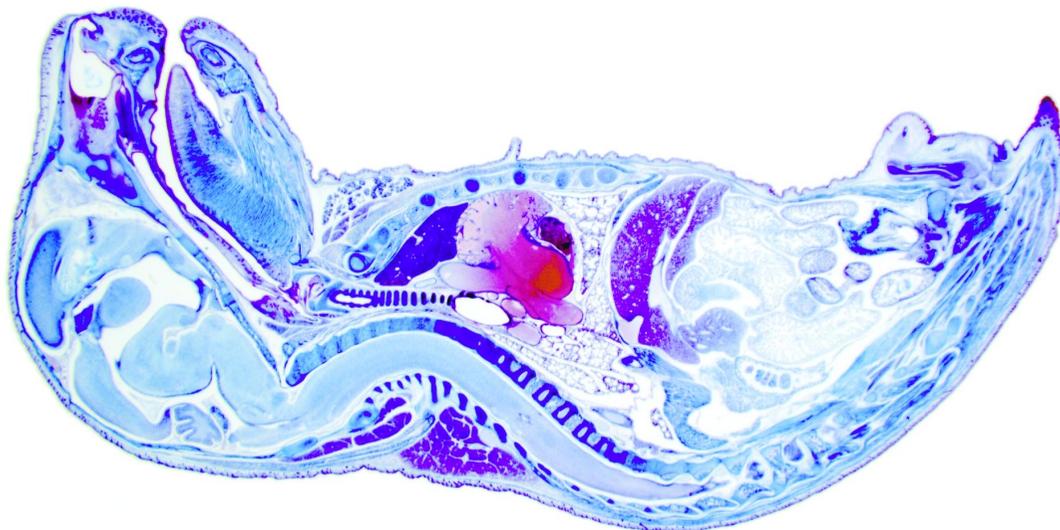
Cellule vive in coltura. Fibroblasti



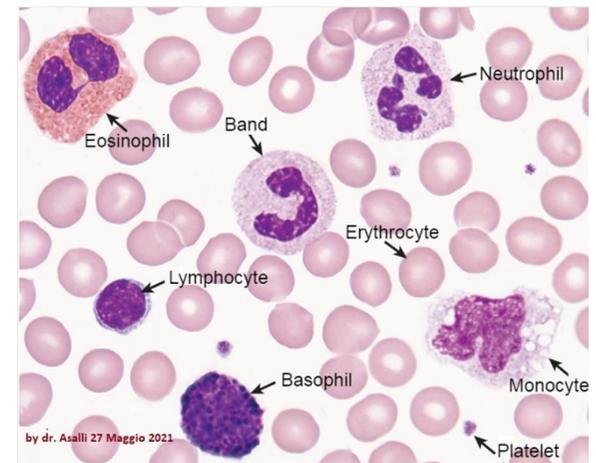
Embrione vivo nelle sue prime fasi di sviluppo: zebrafish



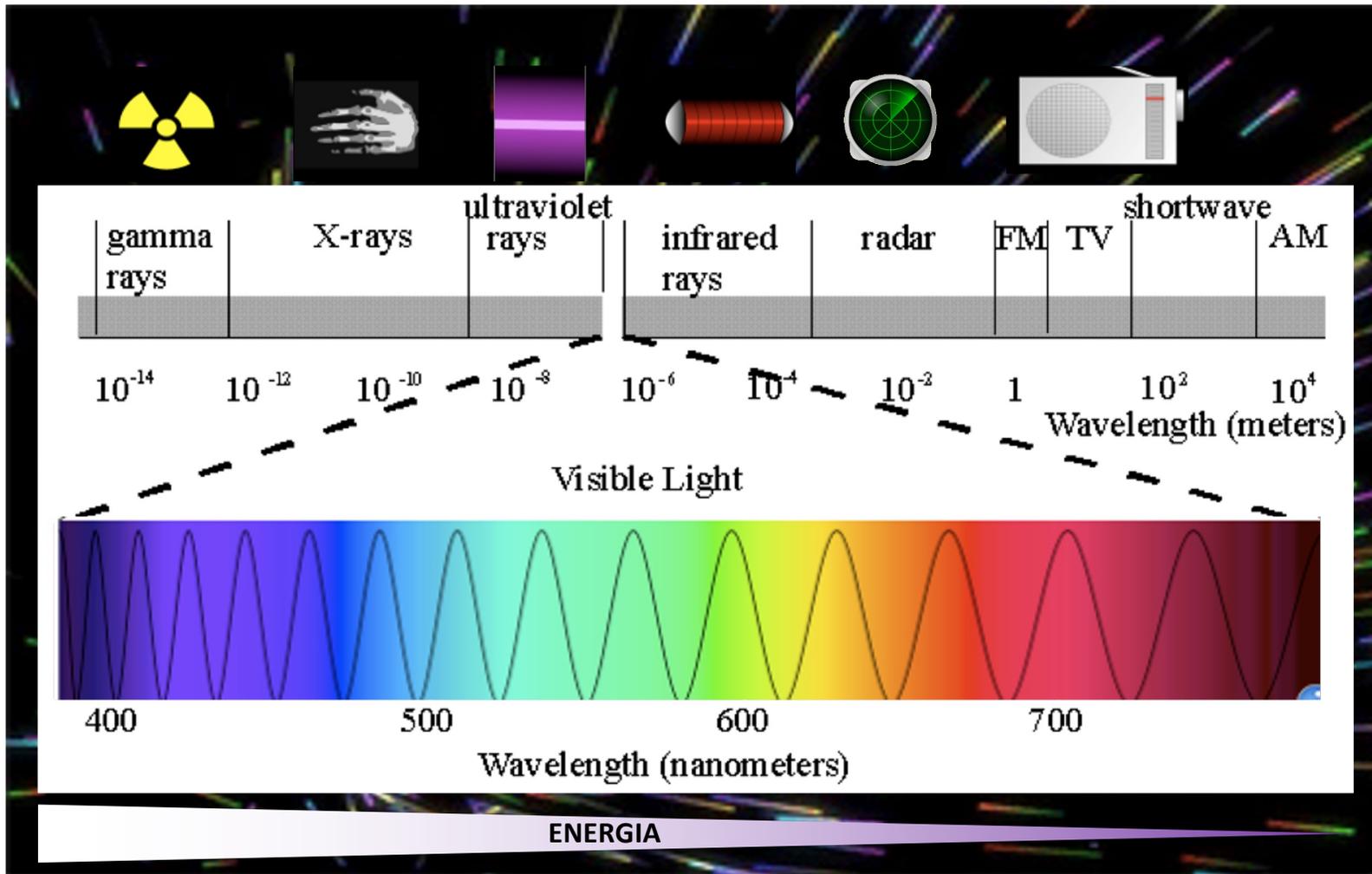
Feto di topo, sezione sagittale



Striscio di sangue



LA LUCE



In microscopia ottica in campo chiaro si utilizza luce bianca, composta cioè da tutte le lunghezze d'onda della radiazione elettromagnetica visibile.

Per lavorare in fluorescenza, su fondo nero, si utilizzano bande di luce in modo da avere più colori visualizzabili nello stesso campione e quindi più marcature, più soggetti, contemporaneamente.

LA LUMINESCENZA

fenomeno fisico di emissione di luce da parte di atomi, molecole o cristalli eccitati elettronicamente



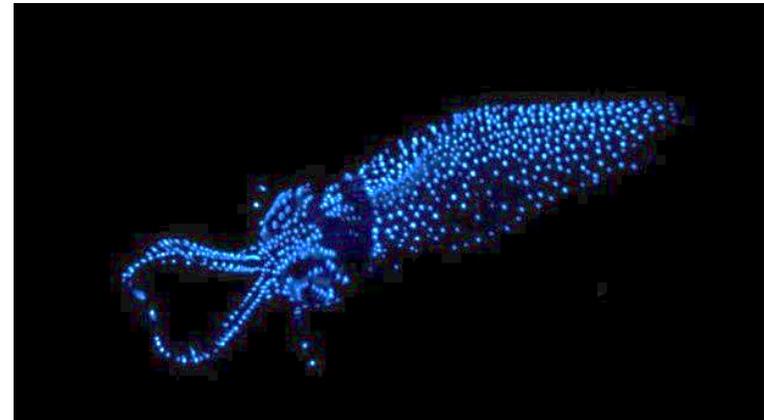
Eccitazione luminosa

Fluorescenza
Fosforescenza



Eccitazione chimica

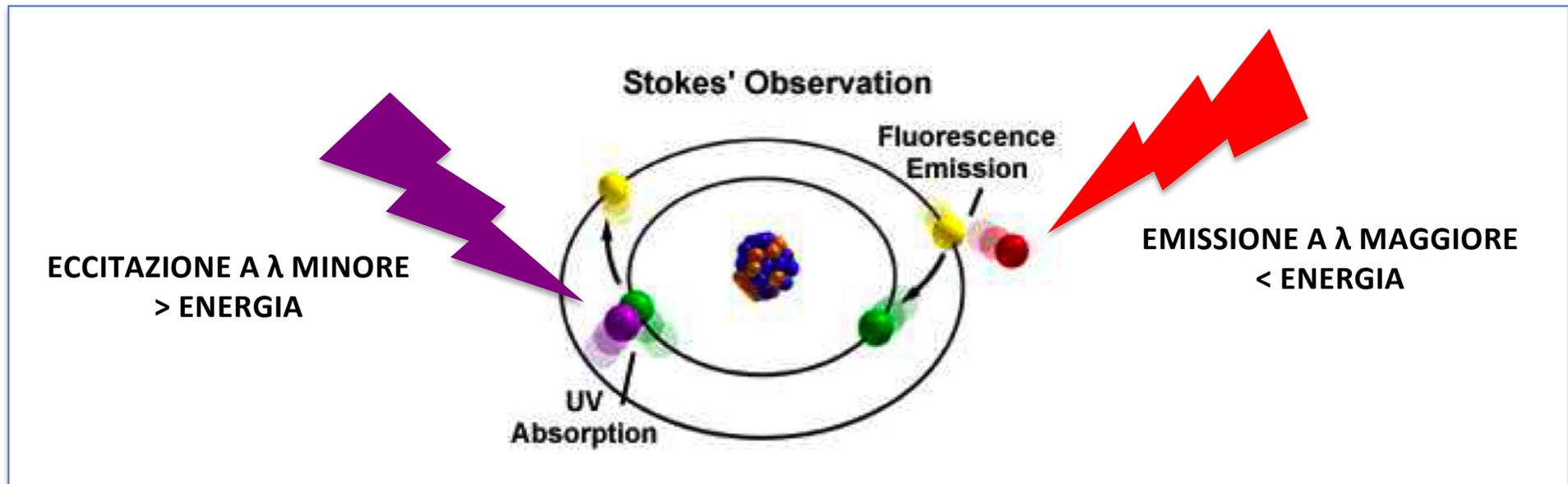
Chemiluminescenza
Bioluminescenza



LA FLUORESCENZA

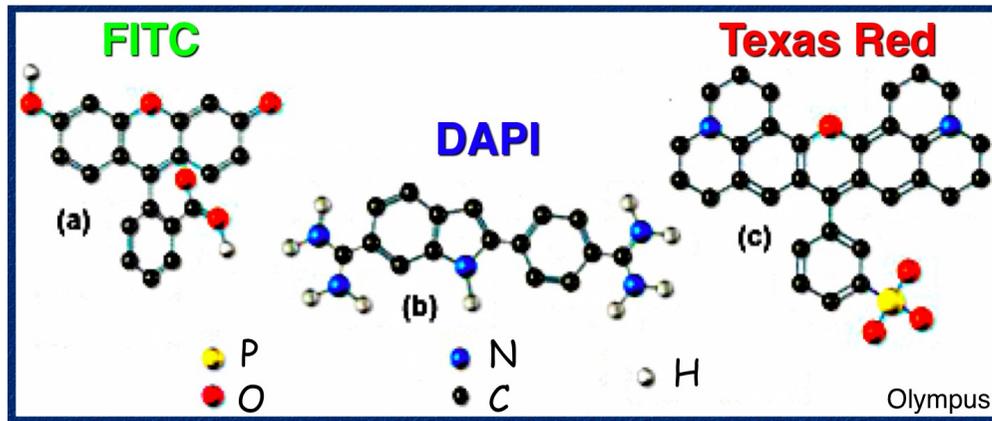
fenomeno per cui una molecola colpita da una radiazione luminosa ad una certa lunghezza d'onda (energia maggiore) ne emette un'altra a lunghezza d'onda superiore (energia minore)

In fluorescenza si usa una banda dello spettro visibile per l'eccitazione dei fluorocromi



IL FLUOROFORO

molecola che possiede uno specifico spettro di emissione e che, una volta eccitata è in grado di emettere luce in modo particolarmente efficiente



Molecole organiche fluorescenti

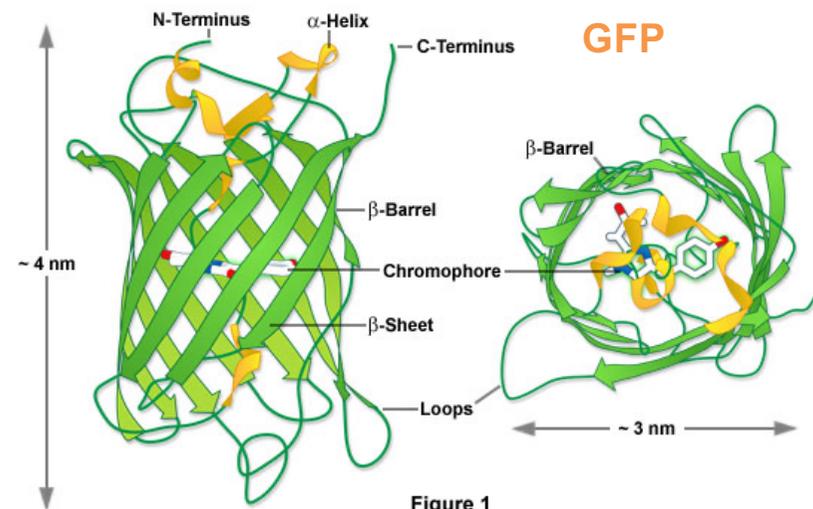
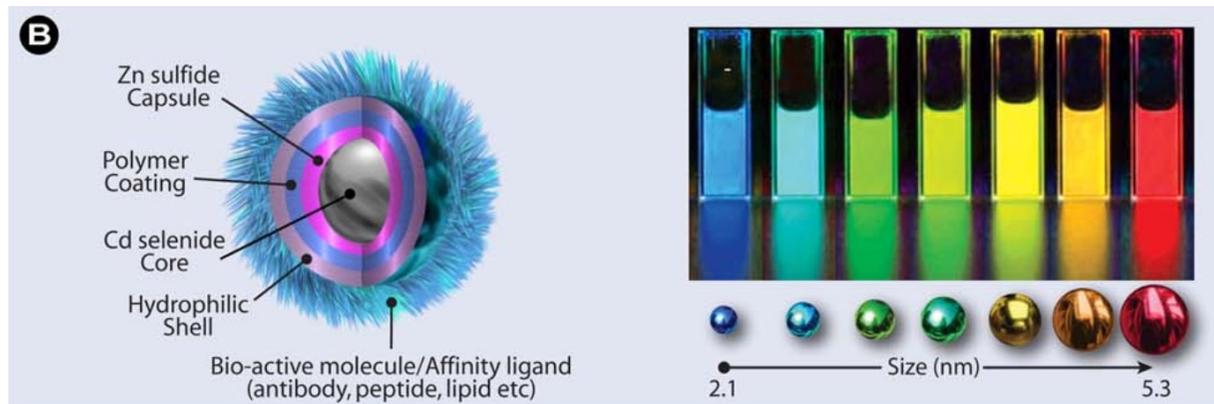


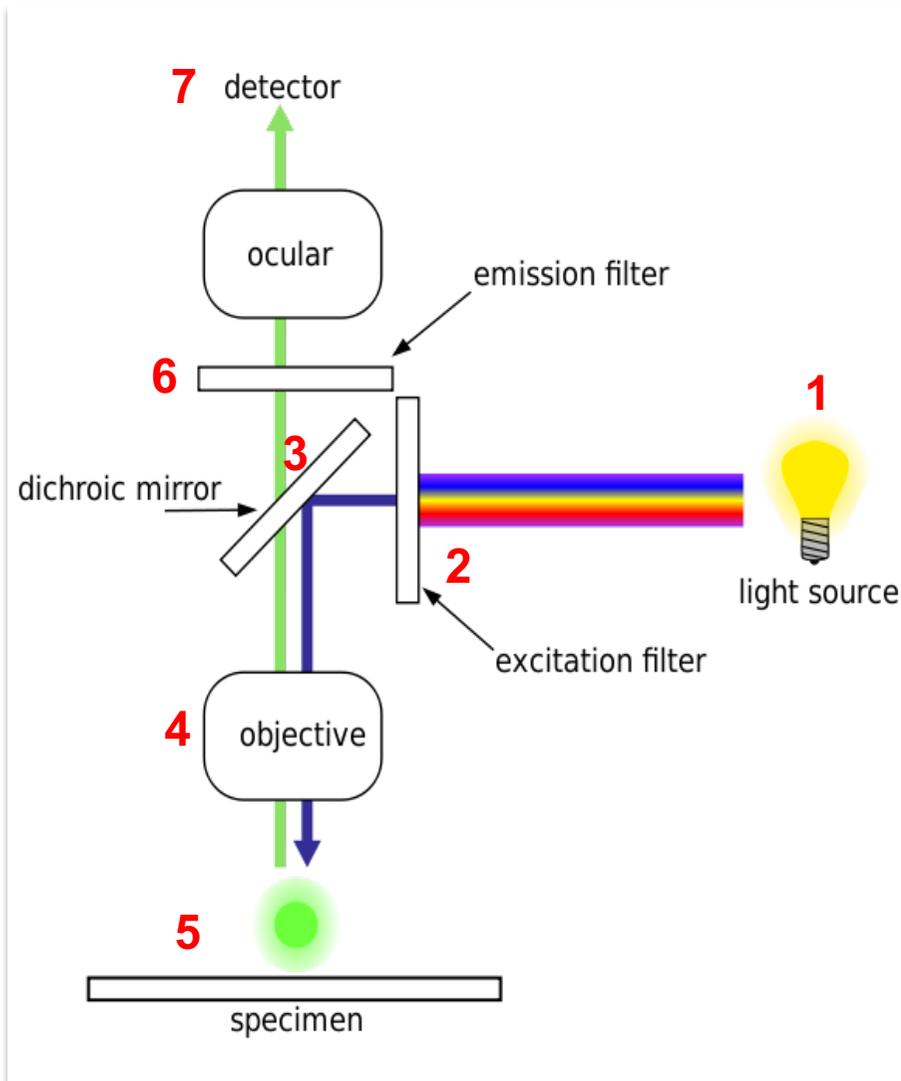
Figure 1

Proteine fluorescenti



Qdot: nanoparticelle fluorescenti

LA MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA



1. Una potente sorgente di luce bianca viene utilizzata illuminare il campione (lampada a mercurio o xenon)

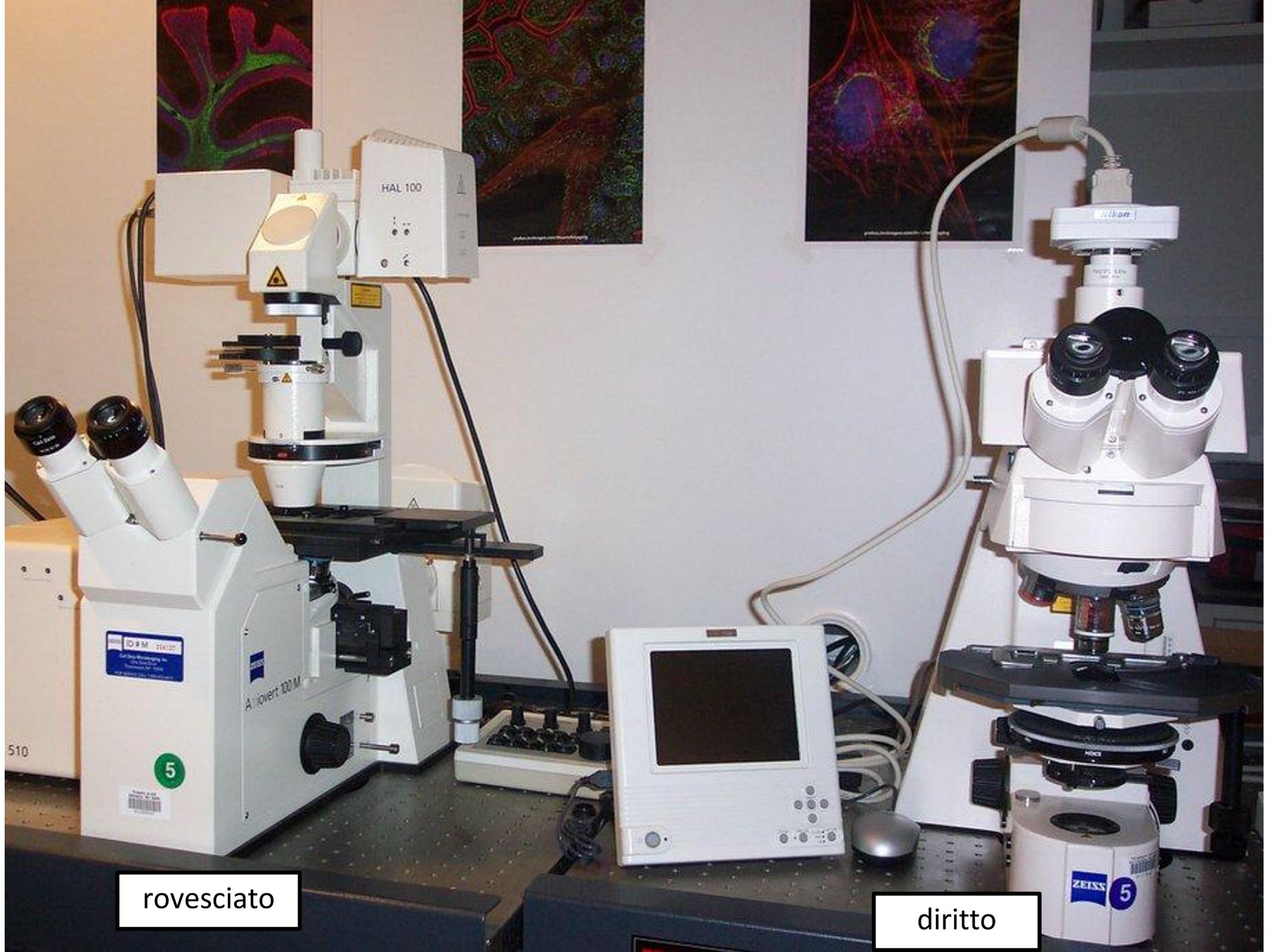
2. La lunghezza d'onda necessaria ad eccitare il fluorocromo d'interesse viene selezionata attraverso un **filtro di eccitazione**

3. Uno **specchio dicroico** riflette raggi con lunghezza d'onda minore (che finiranno sul campione) e lascia passare quelli con lunghezza d'onda maggiore

4. La luce passa attraverso l'obiettivo, colpisce il preparato eccitando il fluorocromo

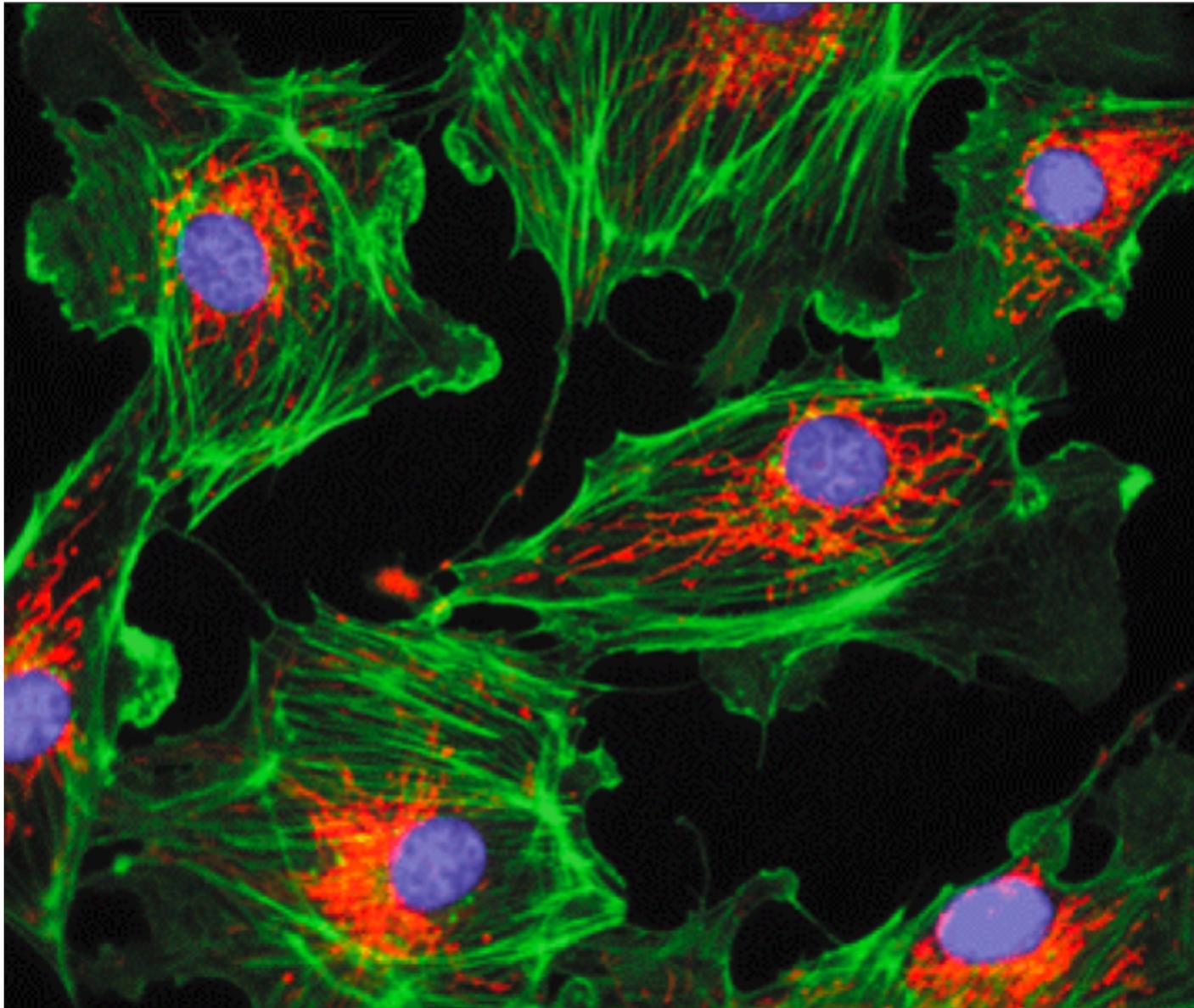
5. Il fluorocromo emette luce ad una lunghezza d'onda maggiore che passa attraverso l'obiettivo e lo specchio dicroico

6. Il raggio passa attraverso un **filtro di emissione** prima di raggiungere gli oculari e il detector



rovesciato

diritto

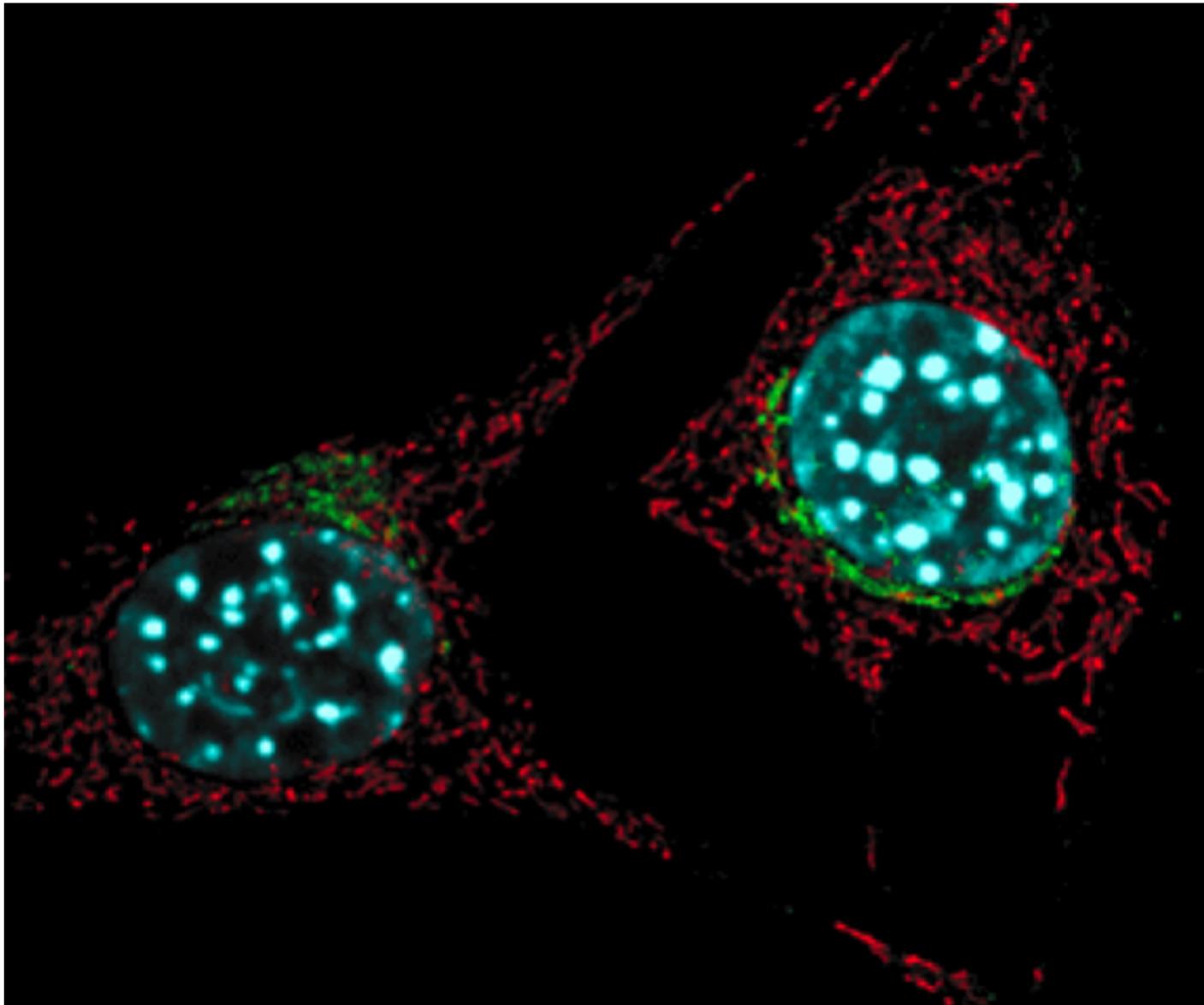


Marcatura:

nucleo

mitochondri

citoscheletro (actina)

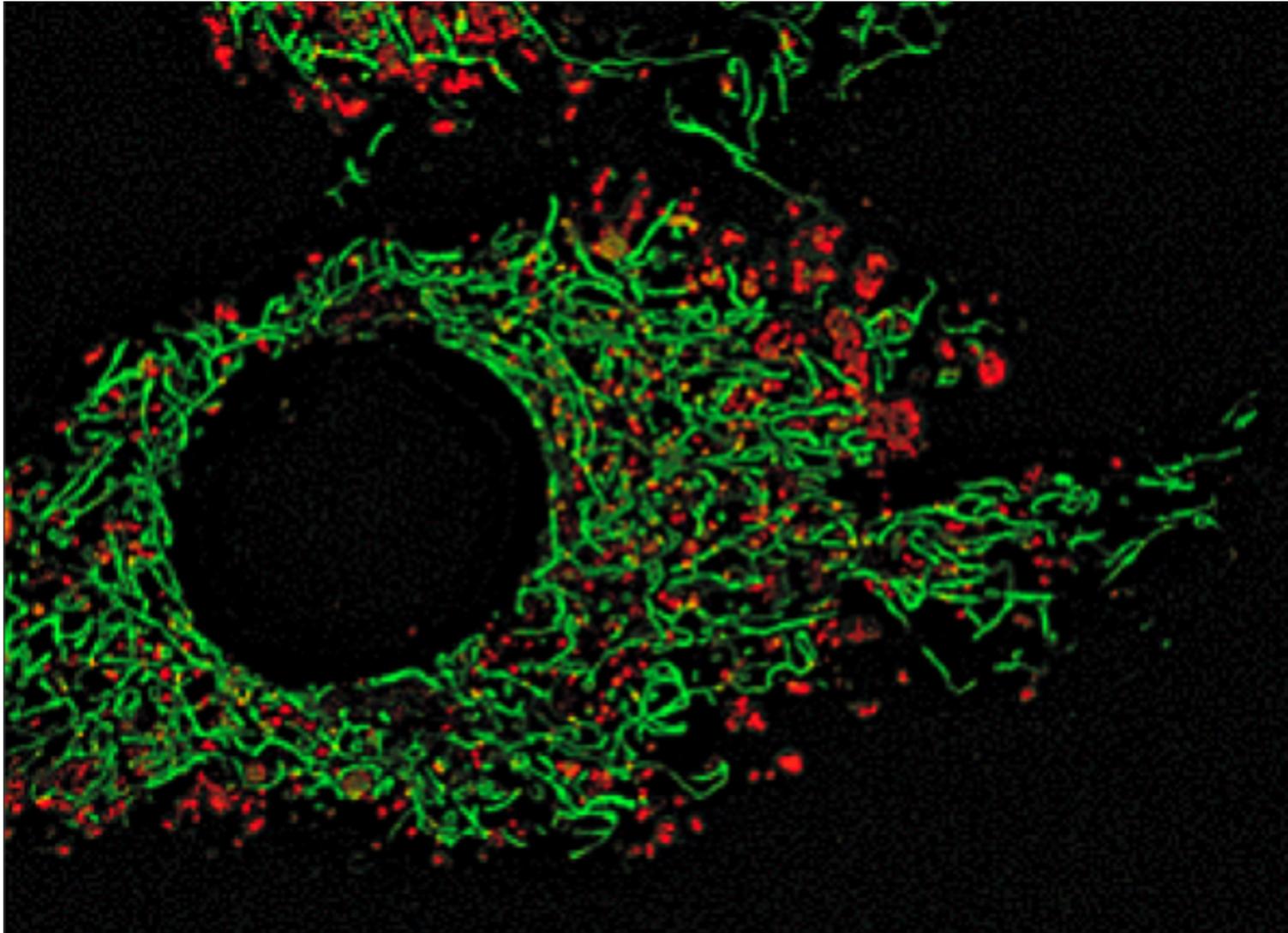


Marcatura:

nucleo

mitochondri

apparato di Golgi



Marcatura:
lisosomi
mitocondri

Per saperne di più:



LA GREEN FLUORESCENCE PROTEIN - GFP

Isolata dalla medusa *Aequorea victoria* nel 1955 da **Osamu Shimomura**

Piccola proteina composta da 238 aa (26.9 kDa)

Non è un enzima e non necessita di altre proteine per emettere fluorescenza

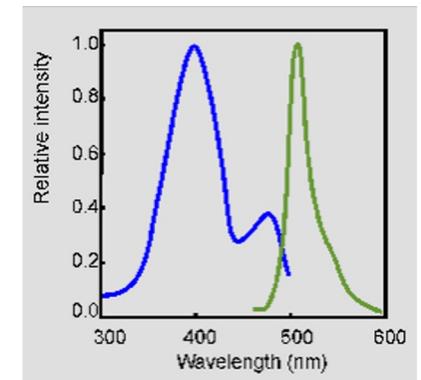
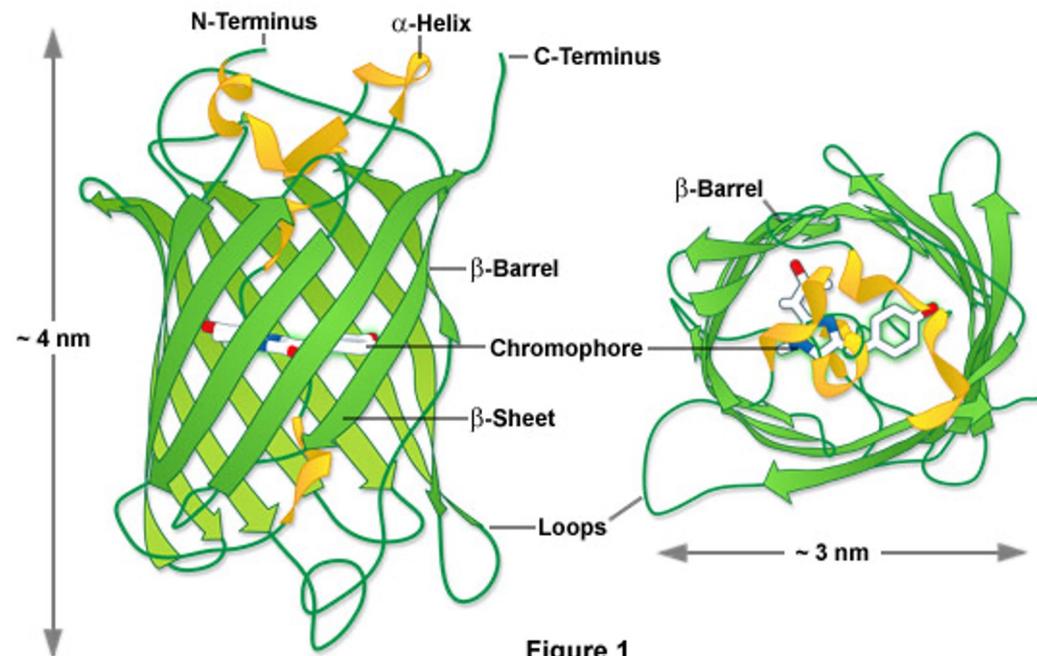
La sua struttura è composta da un β -barrel composto da 11 β -strand

Si eccita con luce blu (395 nm); emette luce verde (509 nm)

Il fluoroforo è composto dalle catene laterali degli aminoacidi 65-66-67 (Ser-Tyr-Gly)



Aequorea victoria

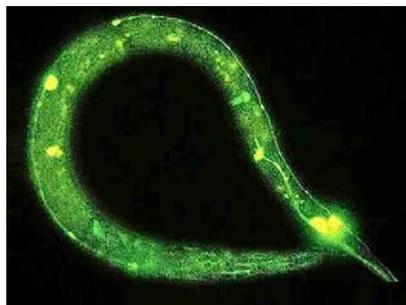
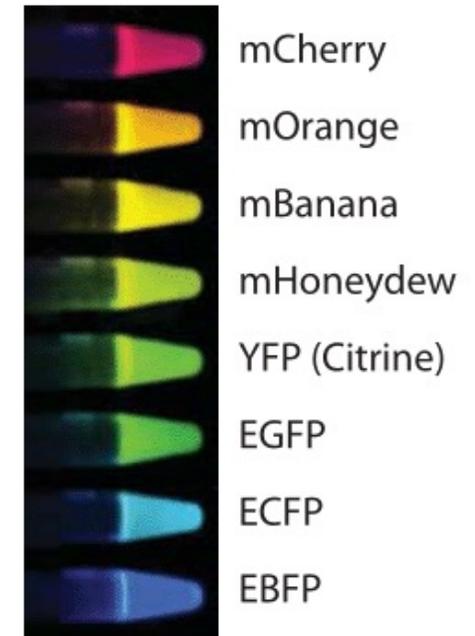
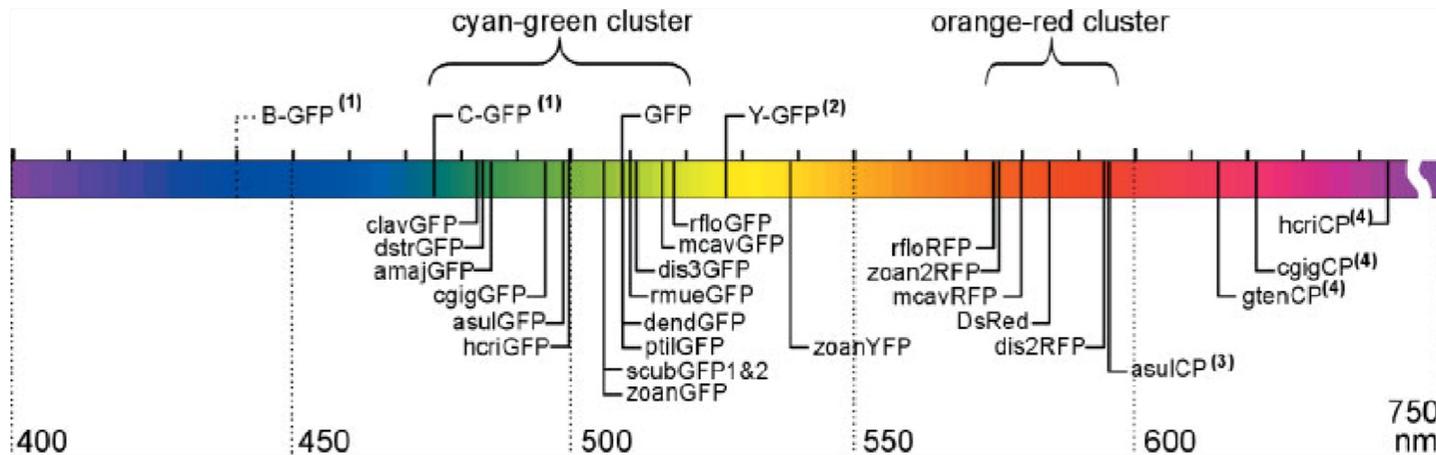


LE PROTEINE FLUORESCENTI

GFP è stata modificata in numerose varianti per ottenere numerosi colori, più stabilità e più brillantezza (**Roger Tsien**)

Identificate nuove proteine in altri organismi viventi: DsRed da discosoma, Kaede FP da anemone

Utilizzata per la prima volta come reporter cellulare *in vivo* da **Martin Chalfie** in neuroni meccanocettori di *C. elegans*



C. Elegans con GFP espressa dai neuroni meccanocettori

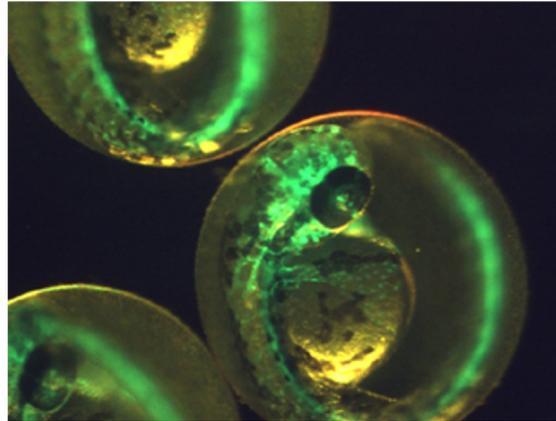


Batteri con proteine fluorescenti in piastra di Petri

LE PROTEINE FLUORESCENTI COME GENI REPORTER

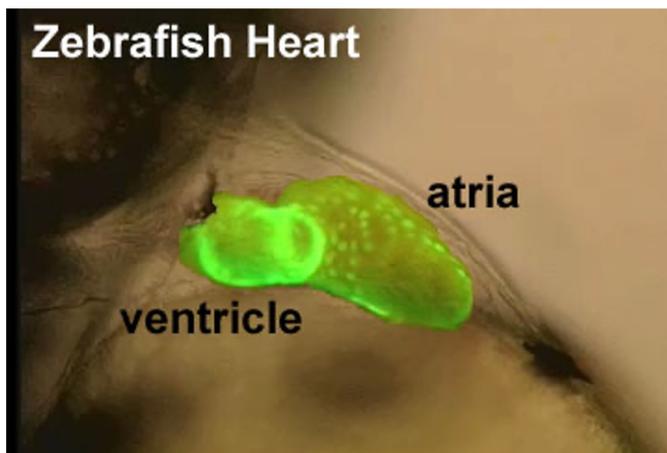
Attraverso la transgenesi, generando organismi geneticamente modificati, si possono esprimere proteine fluorescenti in organismi. Questo permette di osservare specifici tessuti o tipologie cellulari all'interno di interi organismi, vivi e in tutte le fasi del loro sviluppo.

embrioni di zebrafish

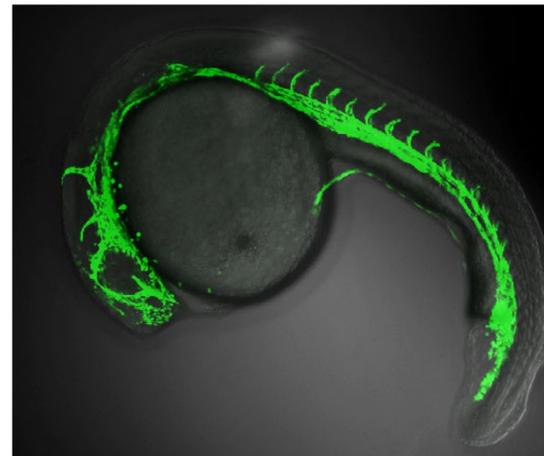


zebrafish adulto

GFP espresso nel cuore di zebrafish



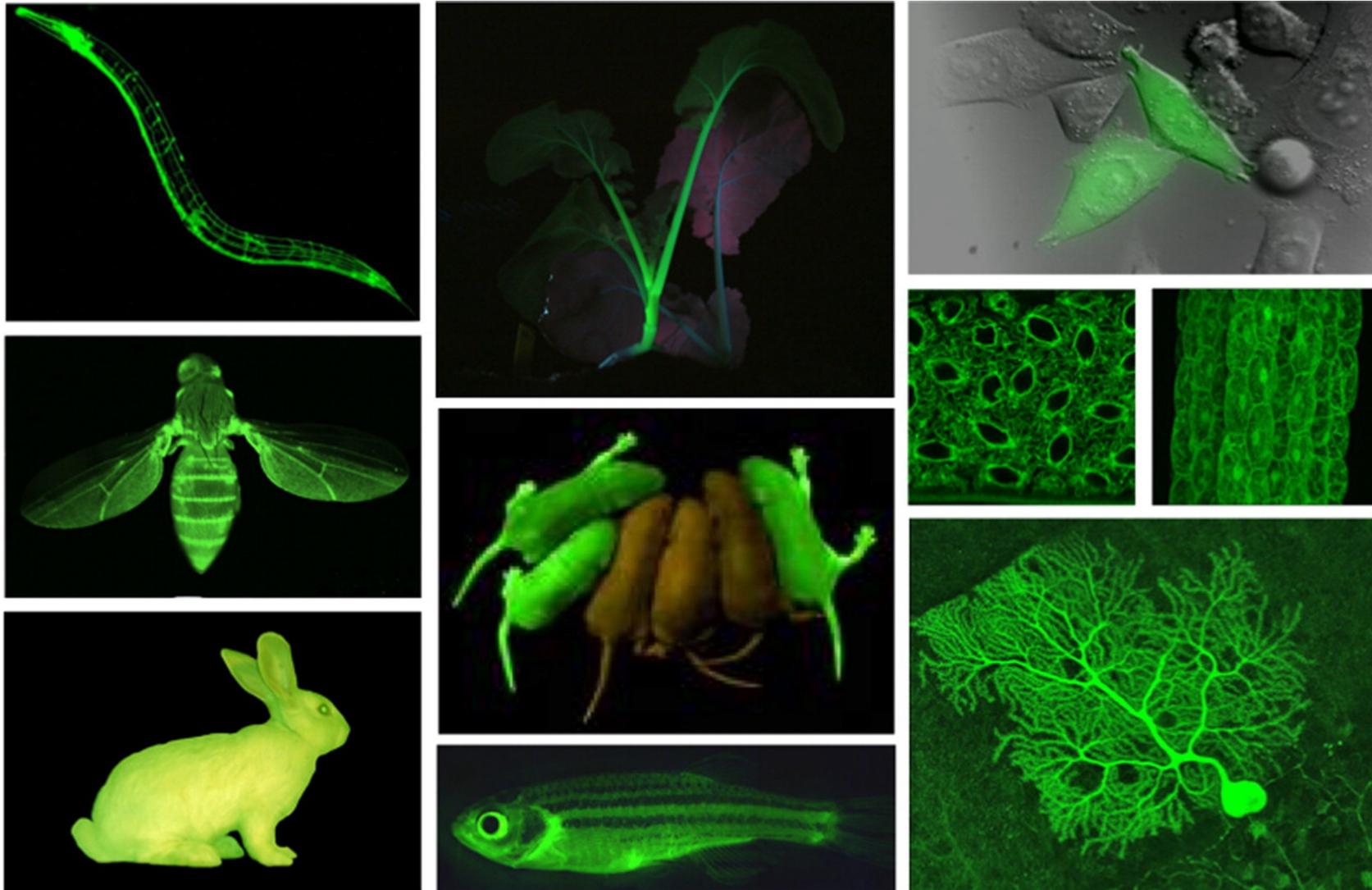
GFP espresso nel apparato vascolare di zebrafish



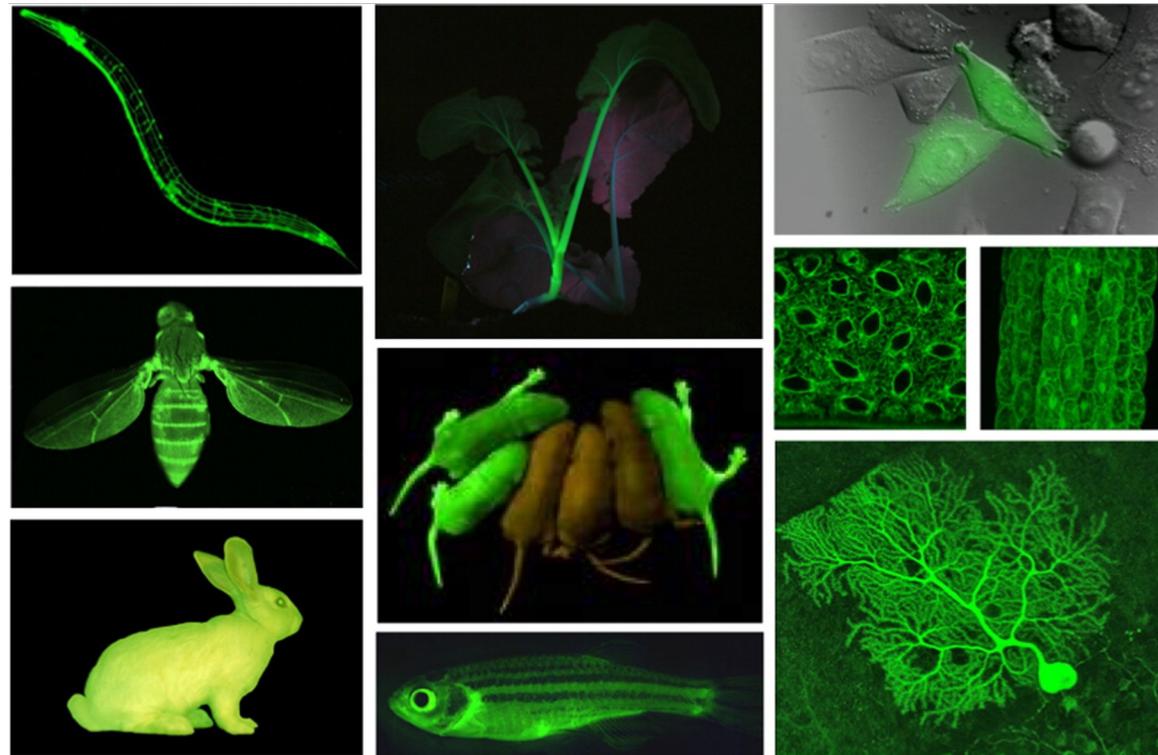
LE PROTEINE FLUORESCENTI COME GENI REPORTER

Osservazione di cellule vive, tracciamento del destino di una proteina o di un compartimento subcellulare in tempo reale

Osservazione di interi organismi, vivi e in tutte le fasi del loro sviluppo

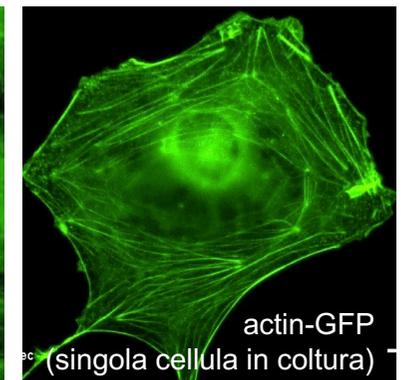
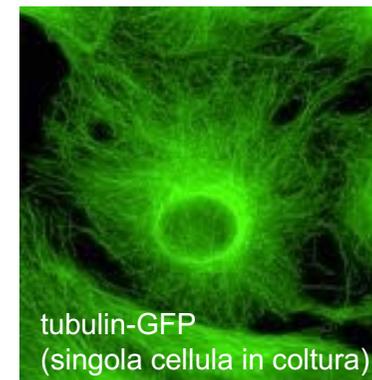
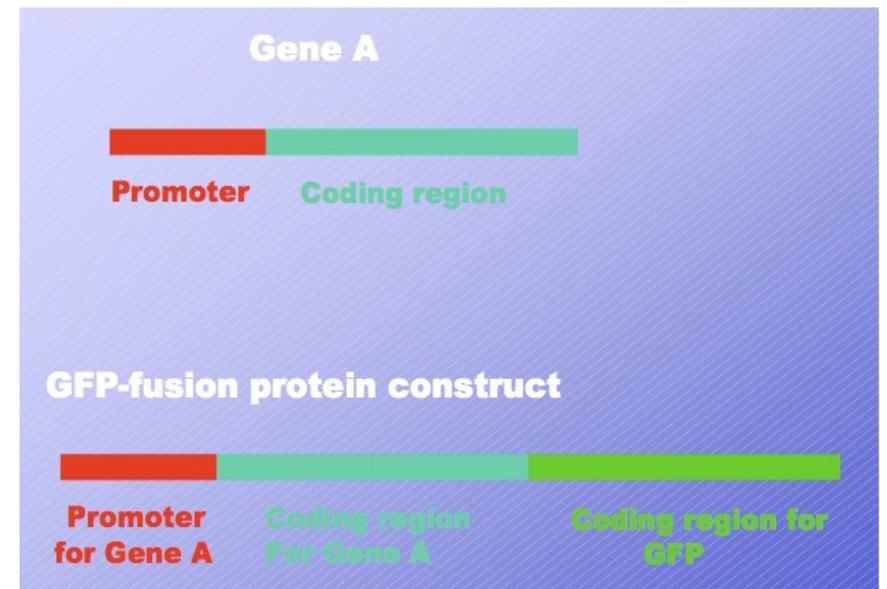
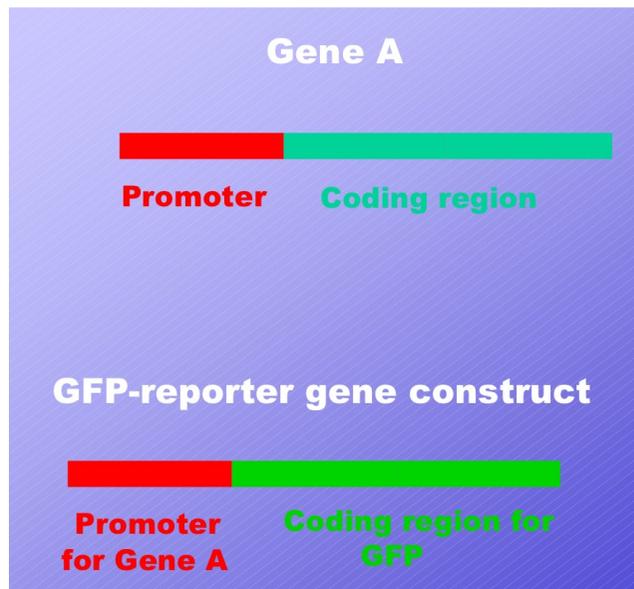


LE PROTEINE FLUORESCENTI COME GENI REPORTER



Una galleria di immagini di organismi esprimenti GFP: Crediti fotografici per colonne da sinistra a destra: *Caenorhabditis elegans* (J. Kratz, Columbia University), *Drosophila* (A. Klebes, Freie Universitet, Berlino), Alba il coniglietto GFP (E. Kac), pianta di colza [M. Halfhill (St. Ambrose University, Davenport, IA) e H. Richards, R. Millwood e C. Stewart (Università del Tennessee, Nashville)], topi (R. Brinster, Università della Pennsylvania, Philadelphia), zebrafish (B. Weinstein, National Institutes of Health, Bethesda), cellule HeLa coltivate (J. Kaplan e M. Vaughn, Università dello Utah, Salt Lake City), cellule embrionali di *Drosophila* (J. Lippincott-Schwartz, National Institutes of Health), cellule di ipocotile di *Arabidopsis thaliana* (D. Ehrhardt, Carnegie Institution di Washington, Stanford, CA) e neurone di Purkinje di topo (National Center for Microscopy and Imaging Research, Università della California, San Diego).

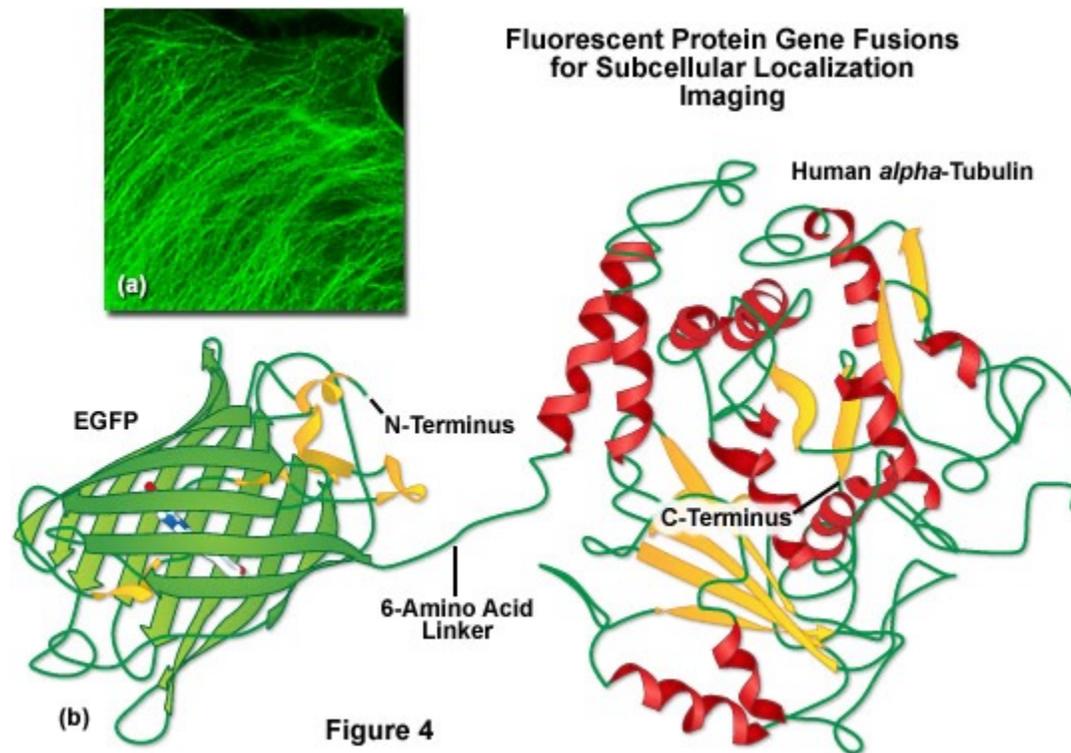
LE PROTEINE FLUORESCENTI COME ETICHETTE



I ricercatori hanno a disposizione diverse opzioni di ingegneria genetica:

- Espressione ubiquitaria attraverso l'utilizzo di promotori forti come il promotore del citomegalovirus
 - Espressione sotto controllo di promotori tessuto-specifici come avvenuto nei neuroni meccanocettori di *C. elegans*
- Oppure, le proteine fluorescenti sono utilizzate per seguire l'espressione e la localizzazione di una particolare proteina creando una proteina di fusione; anche in questo caso l'espressione può essere
- Espressione ubiquitaria attraverso l'utilizzo di promotori forti come il promotore del citomegalovirus
 - Espressione sotto controllo del promotore specifico del gene della proteina di interesse

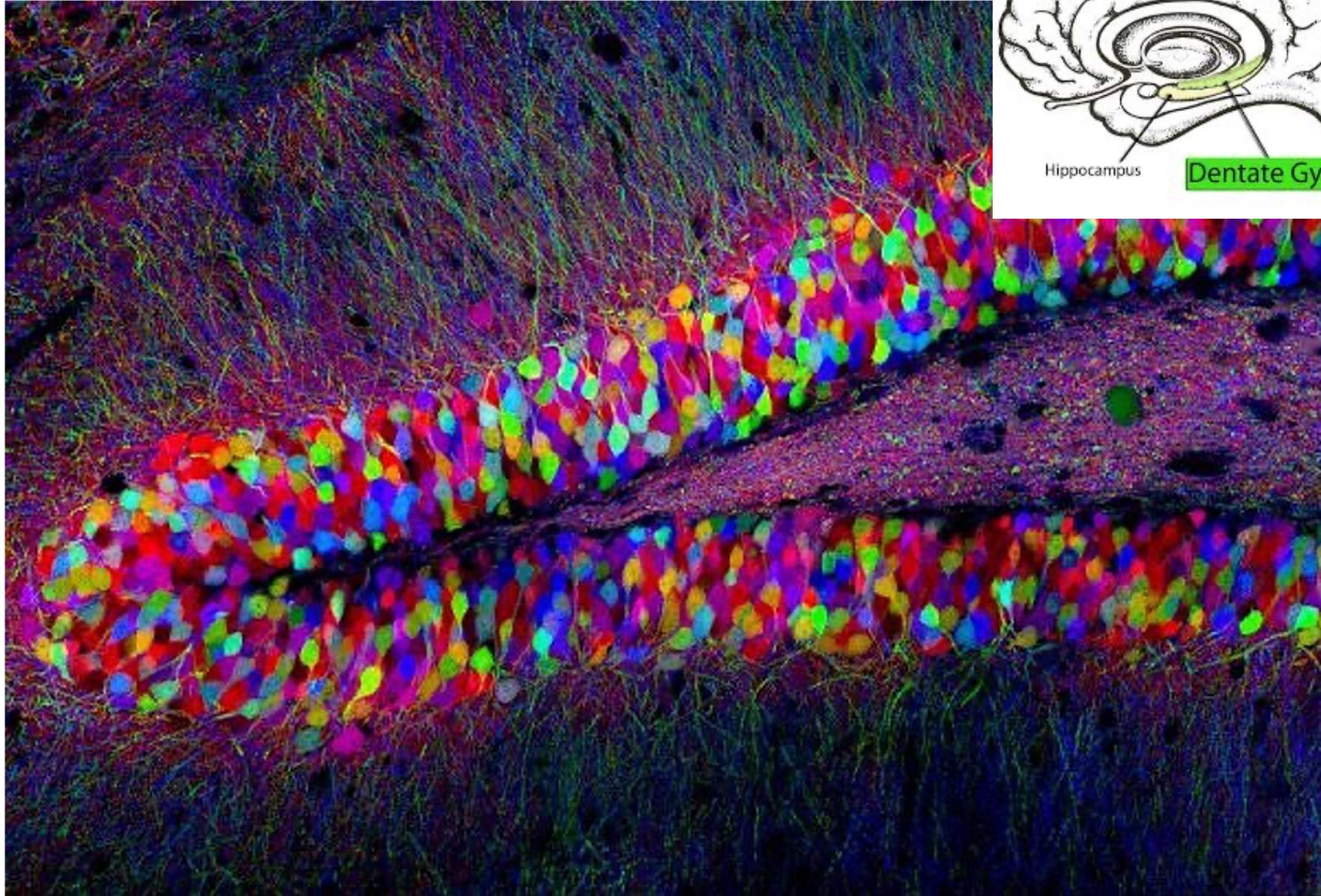
LE PROTEINE FLUORESCENTI COME ETICHETTE



Utilizzata come etichetta per localizzare la posizione subcellulare delle proteine. Quando una proteina viene scoperta è importante sapere dove si localizza perché la sua localizzazione è correlata alla sua funzione. L'utilizzo di proteine fluorescenti come etichette permette la visualizzazione in tempo reale della proteina di interesse nelle singole cellule, nei tessuti o negli organismi interi. Per essere certi della localizzazione nella cellula si possono fare esperimenti di colocalizzazione. Questa tecnica prevede l'utilizzo di sonde, in altri colori, specifiche per l'organello target e la generazione di immagini in cui vi segnali vengono sovrapposti; se i due fluorofori colocalizzano esattamente negli stessi punti della cellula si ha un colore intermedio che prova l'effettiva localizzazione della proteina.

Nell'immagine sopra: GFP fusa con la proteina tubulina per visualizzare i microtubuli della cellula.

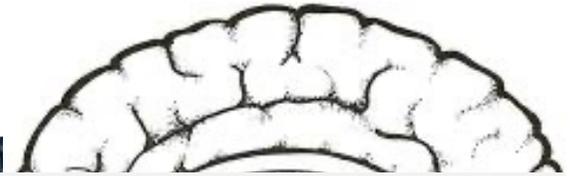
IL PROGETTO BRAINBOW – modello murino



Giro dentato dell'ippocampo

the brainbow
Livet et al., Nature (2007)

IL PROGETTO BRAINBOW – modello murino



Mai prima d'ora un cervello è stato così bello.

Jeff Lichtman e Joshua Sanes, ricercatori dell'Harvard Brain Center, hanno creato topi transgenici con neuroni fluorescenti multicolori. Le fotografie dei cervelli di topo sono apparse nel numero del 1 novembre 2007 della rivista scientifica internazionale Nature.

Ma non è il loro splendore colorato che rende questi topi geneticamente modificati così sorprendenti. I topi creati da una strategia genetica chiamata »Brainbow" avranno un effetto simile sulle neuroscienze come Google Earth ha avuto sulla cartografia. Utilizzando un arcobaleno di colori, i ricercatori possono mappare i circuiti neurali del cervello. I neuroni colorati individualmente aiuteranno a definire il complesso groviglio di neuroni che compongono il cervello e il sistema nervoso. Creando uno schema elettrico del cervello, i ricercatori sperano di aiutare a identificare il cablaggio difettoso riscontrato nelle malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson. Nei topi Brainbow, i ricercatori di Harvard hanno introdotto un macchinario genetico che mescola casualmente proteine fluorescenti verdi, ciano e gialle nei singoli neuroni, creando così una tavolozza di novanta tonalità e colori distintivi.

"La tecnica spinge la cellula ad attivare i geni delle proteine fluorescenti nei neuroni più o meno a caso", ha affermato Jean Livet, il ricercatore post-dottorato responsabile della maggior parte del lavoro di laboratorio che ha portato ai topi Brainbow. "Si può pensare a Brainbow quasi come a una slot machine nella sua generazione di risultati casuali". Non vedo l'ora di avere un atlante tridimensionale multicolore del cervello o un sito Google Brain tanto bello quanto utile.

Giro dentato dell'ippocampo

the brainbow

Livet et al., Nature (2007)

IL PROGETTO BRAINBOW – modello zebrafish

Per approfondire:



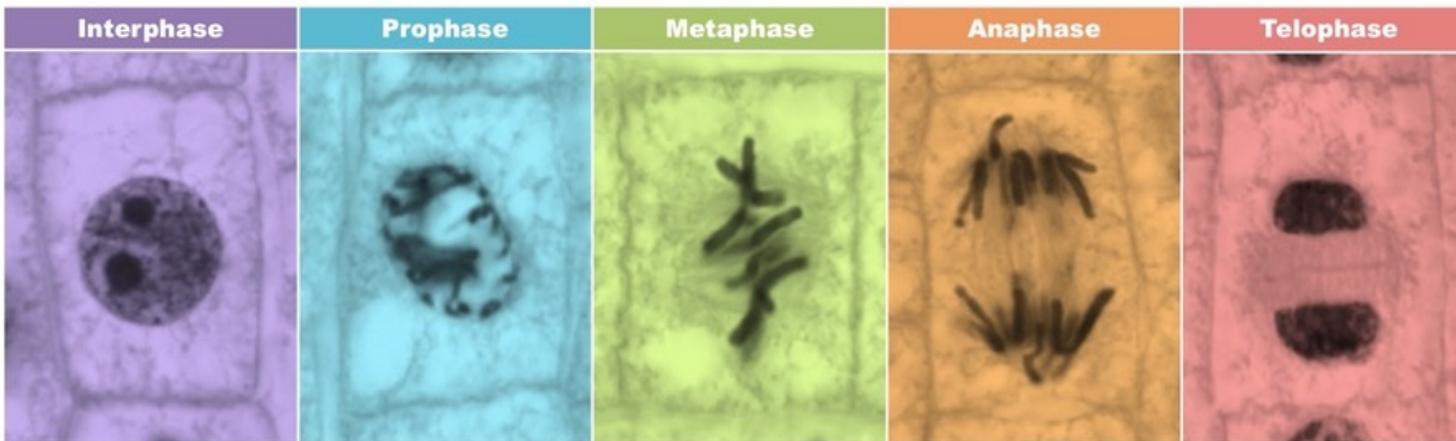
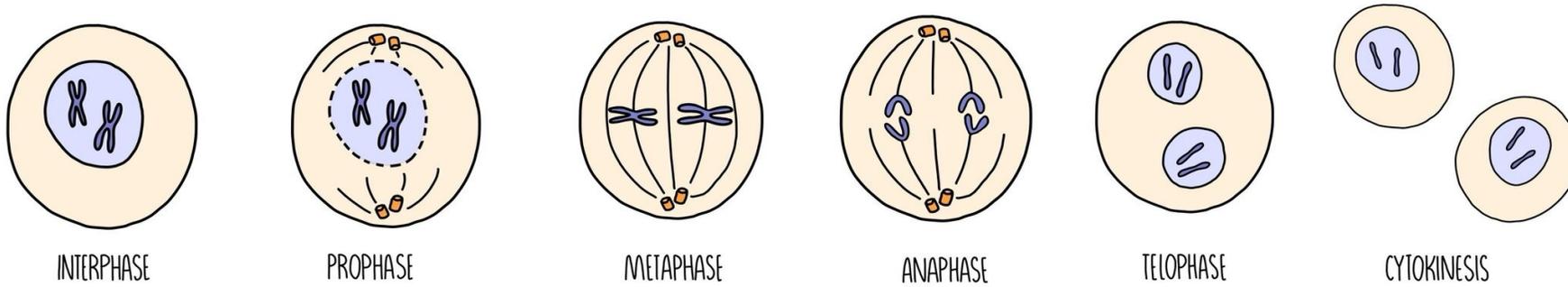
Encefalo, tronco encefalico e colonna vertebrale di zebrafish visti dall'alto



Ogni linea di colore uniforme e che si estende verticalmente include neuroni provenienti dalla stessa cellula madre. L'immagine all'estrema sinistra fornisce una vista del corpo di un pesce da sopra la colonna vertebrale.



LA MITOSI



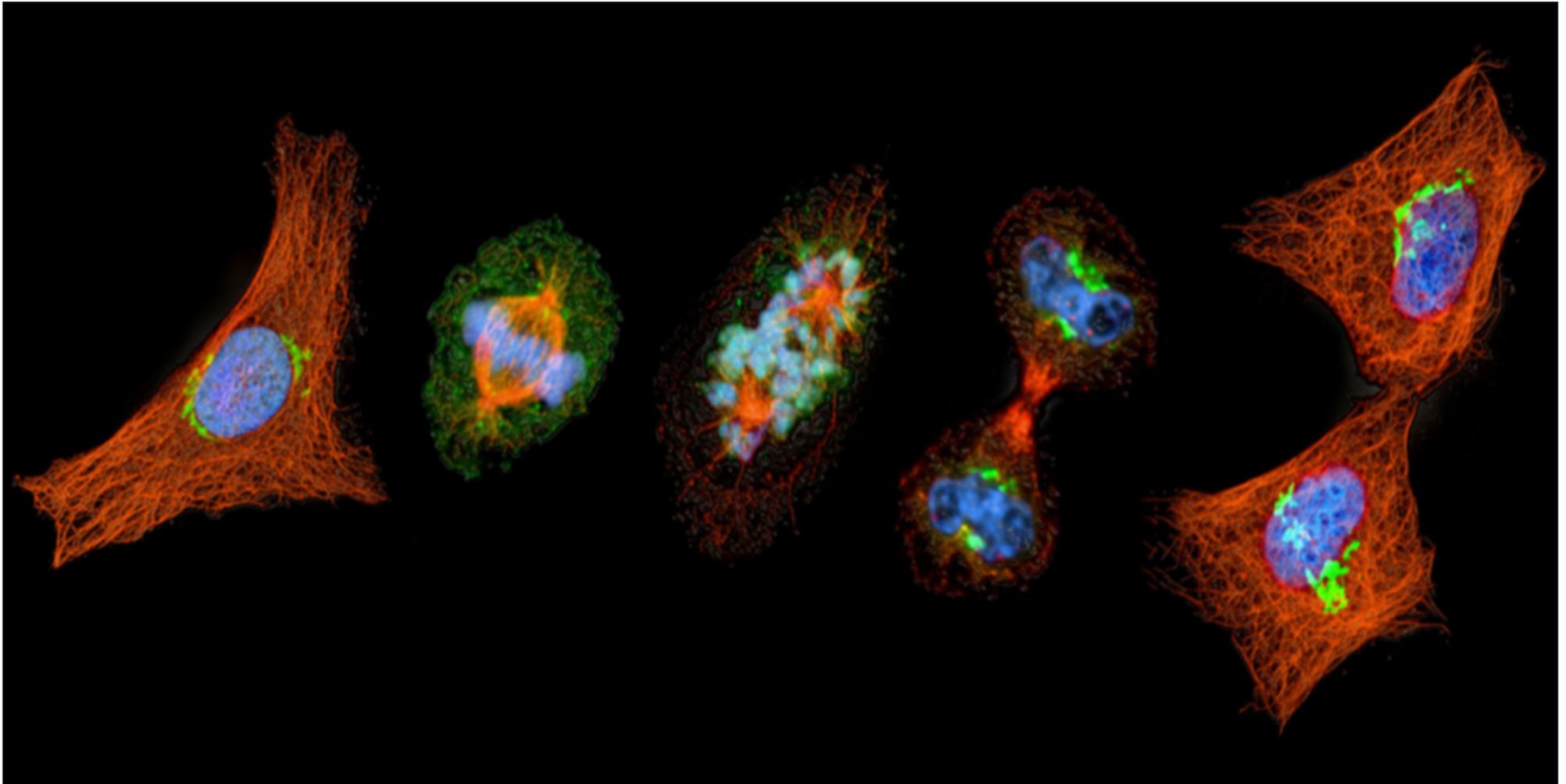
Sopra: rappresentazione delle fasi della mitosi cellulare.
Sotto: fotografie al microscopio di queste fasi in una sezione di radice di cipolla colorata per la visualizzazione del DNA.

Radice di cipolla – colorazione con ematossilina ferrica



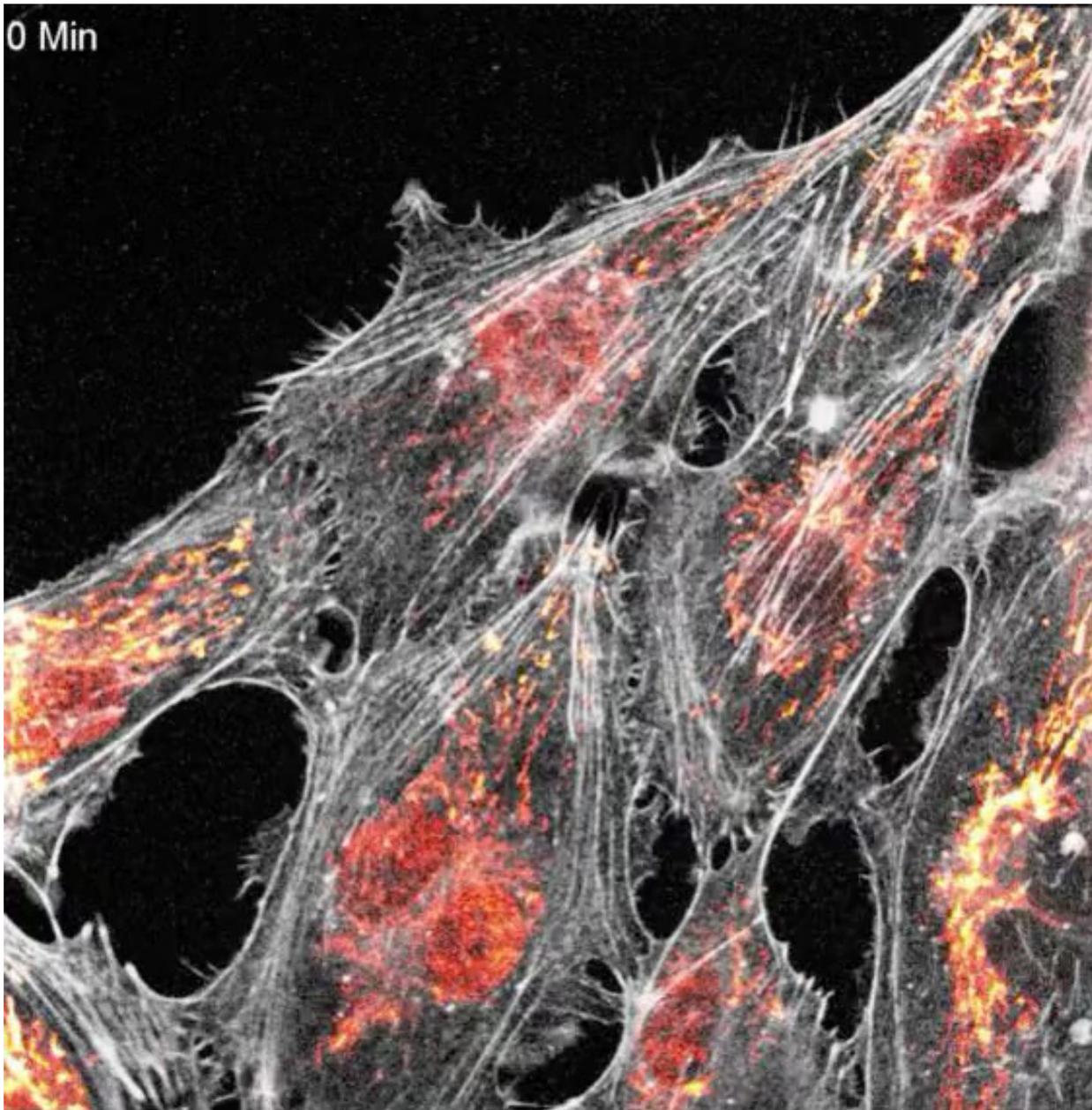
LA MITOSI

citoscheletro (tubulina, rosso)
apparato di Golgi (verde)
Nucleo (DNA, blu)



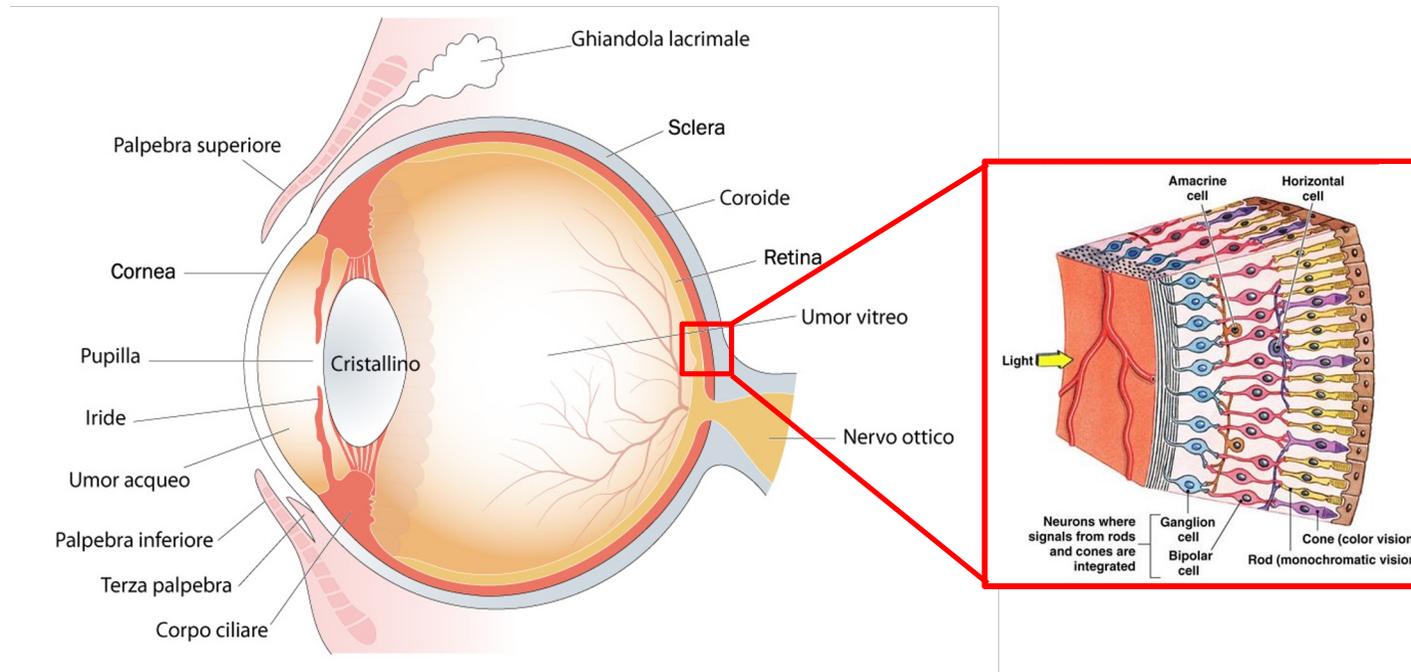
Visualizzazione in fluorescenza di tutte le principali fasi di una mitosi cellulare. Mentre nella diapositiva precedente era possibile apprezzare solo i cromosomi e la parete cellulare (cellule di cipolla), in queste immagini si osserva contemporaneamente il destino di DNA, microtubuli e apparato di Golgi.

LA MITOSI



citochesletro (actina, bianco)
mitochondri (rosso)

L'OCCHIO



SCLERA e CORNEA: rivestimento esterno del bulbo oculare

COROIDE: rivestimento interno scuro e denso di vasi

IRIDE: Epitelio pigmentato che funge da diaframma

La muscolatura allarga e restringe la **PUPILLA** per modulare la quantità di luce che raggiunge la retina

CRISTALLINO: lente dell'occhio, proietta le immagini sulla retina

UMOR VITREO: gel trasparente che riempie la cavità dell'occhio

RETINA: tessuto che costituisce la parete posteriore dell'occhio

Il centro dell'immagine si forma sulla FOVEA che è la parte centrale della MACULA

La retina contiene 125 milioni di fotocettori che trasformano l'energia luminosa in segnale elettrico che raggiunge il cervello attraverso il NERVO OTTICO

BASTONCELLI: (110 milioni) sono sensibili a tutte le lunghezze d'onda della luce ma percepiscono diversi livelli di intensità (rhodopsin)

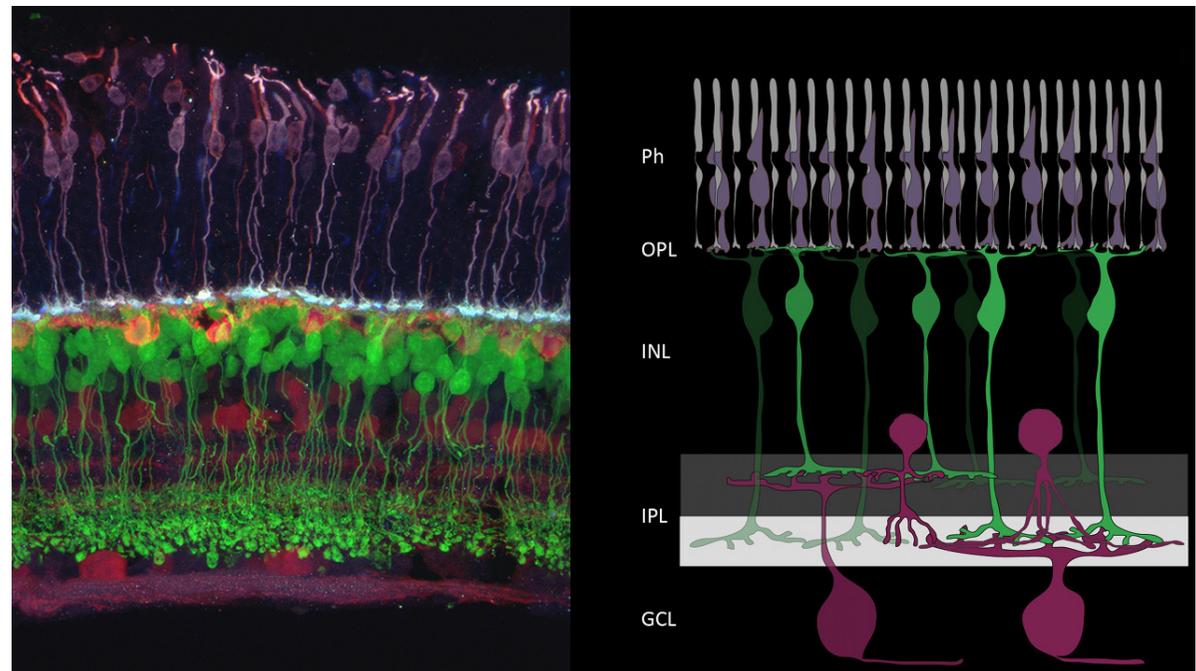
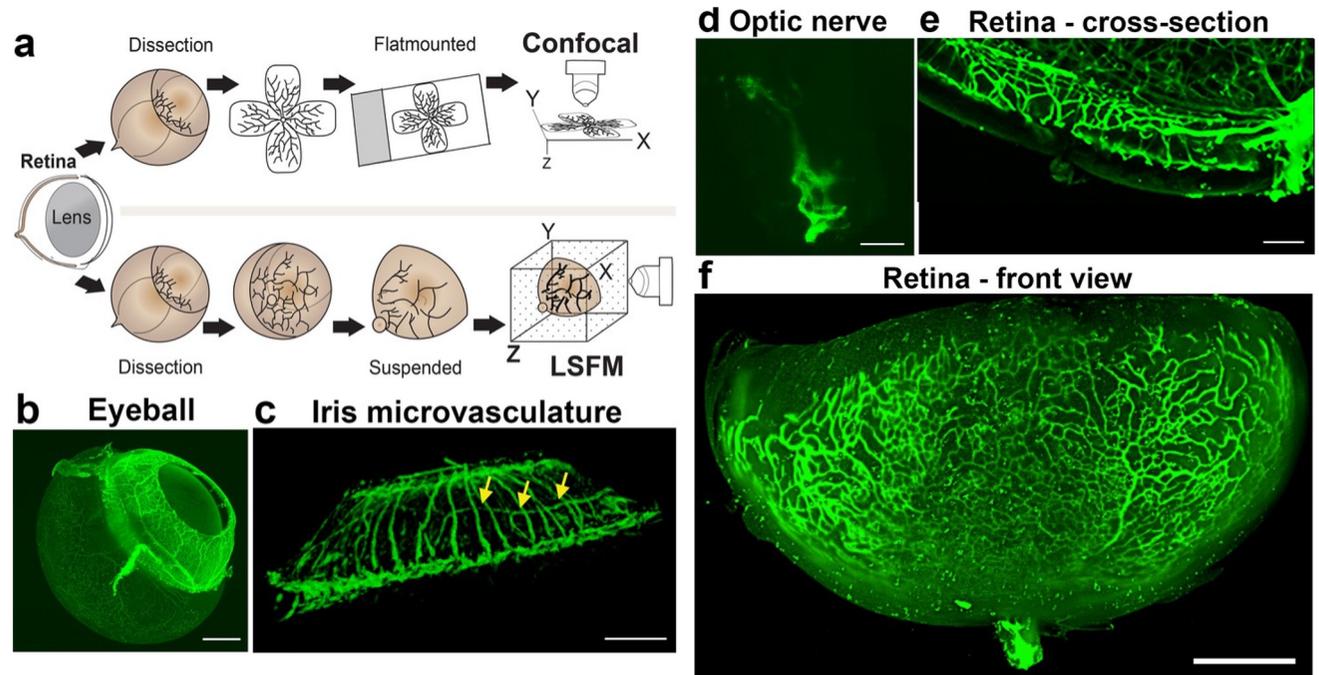
CONI: (6 milioni) sono sensibili alle diverse lunghezze d'onda; di tre tipi diversi (blue:green:red 1:4:8)

L'OCCHIO

Esempi di applicazione delle proteine fluorescenti per lo studio dell'occhio. **Sopra:** la vascolatura sanguigna viene visualizzata nelle varie parti dell'occhio: iride, nervo ottico e retina (in sezione e in visualizzazione posteriore).

Sotto: le varie tipologie di neuroni che compongono la retina sono visualizzate in diversi colori.

Questi modelli sono molto utili per lo studio dello sviluppo dell'occhio ma anche per lo studio di patologie associate all'occhio. Alcuni esempi di patologie dell'occhio sono: melanoma uveale, retinopatia diabetica, maculopatie e glaucomi. Sono inoltre utilizzati per valutare eventuali effetti di patologie note sull'occhio e la vista. Ad esempio nelle malattie neurodegenerative come morbo di Alzheimer o di Parkinson.



RETINOPATIA DIABETICA – DANNO VASCOLARE E PERDITA DI GLIA

In questo articolo scientifico, pubblicato su una rivista del gruppo editoriale di Nature, i ricercatori hanno dimostrato come il danno alla retina passi anche attraverso la perdita di cellule della glia e attraverso il danno vascolare.

In verde si può apprezzare come nei topi diabetici (DM, diabetic mice) il numero di astrociti diminuisca notevolmente. Tale diminuzione comporta il mancato rivestimento (coverage) da parte dei loro processi dei vasi sanguigni (in rosso).

La mancanza di questa «barriera astrocitaria» porta all'indebolimento dei vasi sanguigni e all'aumento della permeabilità vascolare con la formazione di aneurismi (rigonfiamenti dei vasi) e sanguinamenti.

Il mancato apporto di ossigeno e di nutrienti porta, in ultima analisi alla perdita dei neuroni della retina e della vista.

OPEN

Citation: Cell Death and Disease (2016) 7, e2101; doi:10.1038/cddis.2015.347
© 2016 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/16
www.nature.com/cddis

Angiopoietin 2 induces astrocyte apoptosis via $\alpha v\beta 5$ -integrin signaling in diabetic retinopathy

J-H Yun^{1,2,7}, SW Park^{3,4,7}, JH Kim⁴, Y-J Park⁵, C-H Cho^{*,1,2} and JH Kim^{*,3,4,6}

