

Metodi per l'analisi morfo-funzionale delle cellule – Prof. Marisa Levi Parte III

Il microscopio non serve solo ad evidenziare particolari strutturali, ma permette anche, con opportune tecniche, di evidenziare la presenza o la localizzazione di molecole specifiche o di studiare la fisiologia della cellula.

“Vedere” i geni e la loro espressione

Il DNA contiene l'informazione genetica della cellula, che viene **trascritta** in RNA e **tradotta** in proteine. Mentre il **Genoma** è l'informazione genetica complessiva di un organismo, il **gene** è una sequenza di DNA che codifica per una molecola funzionale di RNA, che (a parte il caso di RNA ribosomiale e di RNA transfert) viene tradotta in una proteina.

Tutta l'informazione genetica di un organismo è presente nelle diverse cellule sotto forma di DNA, ma non tutti i geni devono essere utilizzati contemporaneamente: per assicurare un corretto sviluppo e funzionamento dell'organismo, in ogni cellula devono essere attivi i geni giusti al momento giusto. Molte proteine (ad esempio: enzimi della glicolisi, proteine ribosomali, RNA polimerasi) sono presenti in tutte le cellule; altre (ad es. emoglobina) sono specifiche di certi tessuti; altre sono prodotte o attivate solo in risposta a certi stimoli.

L'espressione dei geni può essere regolata in più punti; semplificando: a livello di trascrizione (produzione o meno dell'RNA) o a livello di traduzione (produzione di proteina)

Mentre la presenza di una certa sequenza di DNA indica **la presenza del gene**, la presenza della corrispondente sequenza di RNA indica **l'espressione** precoce del gene, e la corrispondente proteina è il prodotto finale dell'espressione del gene.

Per evidenziare la presenza e la localizzazione di specifiche sequenze di DNA, RNA o proteine in una cellula, si possono utilizzare molecole che si possano legare specificamente a ciascuna di esse, e “marcarle” in modo da renderle visibili al microscopio.

Nel caso di DNA o RNA si utilizzeranno sequenze complementari di nucleotidi; nel caso delle proteine, il riconoscimento specifico da parte di anticorpi.

Immunocitochimica

L'immunocitochimica sfrutta la capacità degli anticorpi di legarsi con grande specificità al rispettivo antigene per evidenziare la presenza e la localizzazione di una sostanza.

Gli anticorpi sono delle glicoproteine presenti come recettori sulle membrane dei linfociti B e sono responsabili della risposta immunitaria umorale. In un organismo esistono milioni di tipi diversi di linfociti B, ciascuno caratterizzato dalla presenza sulla membrana di un tipo di anticorpi, con uno specifico sito di legame a un antigene (è chiamata antigene qualsiasi sostanza capace di stimolare una risposta immunitaria).

Quando uno specifico antigene viene riconosciuto e legato dagli anticorpi presenti sulla membrana del linfocita, si ha la stimolazione della proliferazione del linfocita e la maturazione di cloni che secernono l'anticorpo contro quell'antigene: si produce quindi un siero arricchito di anticorpi contro quell'antigene (anti-siero). Gli anticorpi possono essere diretti contro diverse zone (epitopi) della molecola dell'antigene (per esempio 4-8 aminoacidi di una proteina), per cui ci possono essere più anticorpi diversi contro lo stesso antigene.

Il riconoscimento antigene-anticorpo è molto specifico, perciò anticorpi specifici contro una certa molecola possono essere utilizzati per riconoscere la presenza di quella molecola in un preparato microscopico. Per questo è necessario immunizzare un animale con la sostanza da identificare per ottenere l'anti-siero e “marcare” gli anticorpi in modo da poter identificare dove si sono legati.

Preparazione degli anticorpi

L'animale (in genere topo o coniglio) viene immunizzato con la molecola (o parte di molecola) che si vuole ricercare sul preparato. La molecola funge da antigene e scatena la reazione immunitaria e la produzione di anticorpi specifici, che vengono secreti nel siero dell'animale. Dopo qualche settimana si preleva il siero, che conterrà diversi tipi di Ac contro l'immunogeno ma anche altri anticorpi di quell'individuo, e andrà quindi purificato. La purificazione può essere fatta per esempio facendolo passare attraverso una colonna fatta di particelle solide sulle quali è legato l'antigene: gli anticorpi specifici saranno trattiene nella colonna, mentre tutte le altre molecole usciranno; gli anticorpi specifici vengono poi staccati dalla colonna e raccolti.

Marcatura degli anticorpi

Lo scopo della marcatura è quello di rendere visibile al microscopio le molecole di anticorpo che si legano al preparato.

I marcatori più utilizzati sono: fluorocromi, enzimi, oro colloidale

- I fluorocromi utilizzati sono molecole fluorescenti che si possono legare covalentemente alle proteine (ad es. FITC). Si possono utilizzare contemporaneamente anticorpi contro diverse sostanze, coniugati ciascuno con un fluorocromo con fluorescenza diversa

- Marcatura con enzimi: All'anticorpo viene legato un enzima che catalizza la trasformazione di un substrato cromogeno in un prodotto colorato (o opaco agli elettroni nel caso del microscopio elettronico) insolubile, che precipita nella zona in cui l'anticorpo si è legato. Il metodo ha una elevata sensibilità, cioè è in grado di mettere in evidenza anche molecole non molto abbondanti, ma bassa risoluzione. Uno degli enzimi più utilizzati è la fosfatasi alcalina. Questo tipo di marcatura è molto usato in anatomia patologica, perchè permette la conservazione dei preparati e l'identificazione delle cellule marcate all'interno del tessuto.

- Marcatura con oro colloidale: L'oro, trattato con sostanze riducenti, dà particelle di dimensioni omogenee, ma tipiche per ciascun tipo di riducente usato. Queste particelle, cariche negativamente, possono essere coniugate agli anticorpi. Le particelle d'oro sono opache agli elettroni, e quindi al microscopio elettronico sono visibili anche particelle di piccole dimensioni. E' anche possibile fare una doppia marcatura, utilizzando contro una sostanza anticorpi coniugati con particelle più piccole e contro l'altra anticorpi coniugati con particelle più grandi. Al microscopio ottico le particelle di piccole dimensioni sono visibili con il *silver enhancement*, che consiste nel far precipitare strati di argento metallico intorno alla particella d'oro; il complesso è poi visibile per riflessione. Il silver enhancement può essere utile anche in microscopia elettronica, per rendere più visibile il segnale dato da anticorpi coniugati con particelle d'oro molto piccole (1-2 nm), che vengono preferite perchè penetrano più facilmente nel tessuto.

Preparazione del tessuto

Tutti i passaggi di preparazione (fissazione, lavaggi, inclusione) devono essere compatibili con il legame dell'anticorpo all'antigene presente nel preparato. Se i vari trattamenti estraggono, distruggono o modificano la molecola ricercata, la reazione con gli anticorpi sarà negativa anche se nel tessuto l'antigene è o era presente. Ad esempio, se qualcuno dei reagenti si lega a un epitopo della molecola cercata, può impedire l'attacco dell'anticorpo. Anche una modificazione della conformazione della proteina cercata potrebbe impedire il riconoscimento, e dare quindi dei "falsi negativi". Viceversa, le modificazioni potrebbero rendere altre molecole riconoscibili dall'anticorpo, generando "falsi positivi".

Trattamento del preparato con l'anticorpo

Il metodo DIRETTO utilizza un anticorpo direttamente marcato.

Il metodo INDIRETTO utilizza un anticorpo primario non marcato e un anticorpo secondario marcato, diretto contro l'anticorpo primario (ad esempio anticorpo primario di topo non marcato, e anticorpo secondario di capra diretto contro gli anticorpi di topo). In questo caso il segnale viene amplificato, perchè più molecole di anticorpo secondario si legano ad una molecola di anticorpo primario. Altri vantaggi del metodo indiretto: l'anticorpo primario può essere utilizzato a concentrazione minore; un solo tipo di anticorpi secondari può essere utilizzato contro tutti i vari anticorpi primari della stessa specie. Esistono poi metodi più complessi di amplificazione del segnale, che si basano sul principio di costruire intorno alla molecola da localizzare un "castello" di molecole marcate, per aumentare la sensibilità del metodo (ad esempio complessi biotina-streptavidina con streptavidina marcata, uso di più anticorpi secondari fluorescenti ecc.).

Per verificare che il risultato positivo non sia dovuto ad attacchi aspecifici, è necessario allestire una serie di controlli negativi, per esempio omettendo l'anticorpo primario e eseguendo tutta la serie di trattamenti anche con siero non immune, cioè privo degli anticorpi per la sostanza cercata, o miscelando l'anticorpo primario con l'antigene prima di trattare il tessuto: se l'anticorpo già legato all'antigene è in grado di legarsi al tessuto, vuol dire che l'attacco è aspecifico.