

Atti

DELLA ACCADEMIA ROVERETANA DEGLI AGIATI

ser. X, vol. III, B

Classe di Scienze matematiche, fisiche e naturali



CCLXXI ANNO ACCADEMICO
2021

Atti

DELLA ACCADEMIA ROVERETANA DEGLI AGIATI

CCLXXI ANNO ACCADEMICO

2021 ser. X, vol. III, B

Classe di Scienze matematiche, fisiche e naturali



SCRIPTA EDIZIONI

Nicoletta Plotegher

Il tempo di vita della fluorescenza come metodo per studiare la dinamica dei processi biologici in cellule vive

ABSTRACT: Fluorescence microscopy is applied to biophysical and biological research to investigate function and localization of proteins, of molecules and of intracellular structures. It is based on the use of highly specialized microscopes and of fluorophores that are able to stain proteins, organelles or structures within the cells to gain cell images and information on the biological processes that are under investigation. Once excited through light of a certain wavelength, fluorophores emit light characterized by a higher wavelength compared to the excitation light and of a certain intensity. Intrinsic properties of these fluorophores determine the quality of the images that can be collected, but also the possibility of applying more sophisticated methods to further study the dynamics of the processes that occur in live cells. Among these properties, of high relevance is fluorescence lifetime. This is a characteristic feature of each fluorophore, which is also affected by its local environment, and describe the time it takes a fluorophore after being excited to its excited state, to emit light and be back on the ground state. Since it is affected by its chemical surrounding and by its binding partners, by monitoring changes in the fluorescence lifetime of a fluorophore, we can infer dynamic properties of the fluorophore and of the system. Fluorescence lifetime analysis is performed by exponential decay fitting or by phasor approach analysis, and can applied to many types of fluorophores. Among the most interesting, we will discuss NADH in solution, in cells and in tissues.

KEY WORDS: Fluorescence, fluorescence lifetime, NADH, phasors.

RIASSUNTO: La microscopia in fluorescenza viene applicata alla ricerca in biofisica e biologia per studiare la funzione e la localizzazione di proteine, di molecole e di strutture intracellulari. Essa è basata sull'utilizzo di microscopi specializzati e su fluorofori che sono in grado di marcare proteine, organelli o strutture intracellulari per ottenere immagini e informazioni relative ai processi biologici che si stanno studiando. Quando vengono illuminati da luce di una certa lunghezza d'onda, i fluorofori emettono luce caratterizzata da una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella di eccitazione e da una certa intensità. Le proprietà intrinseche di questi fluorofori determinano la qualità delle immagini che si possono raccogliere, ma anche la possibilità di applicare metodi più sofisticati per studiare le dinamiche dei processi biologici che avvengono in cellule vive. Tra le varie proprietà di interesse, di particolare rilevanza è il tempo di vita della fluorescenza. Questa è una caratteristica

tipica di ogni fluoroforo, che è anche influenzata dall'ambiente in cui esso si trova, e descrive il tempo che impiega un fluoroforo, dopo essere stato portato al primo stato eccitato, a emettere luce e tornare allo stato fondamentale. Dato che il tempo di vita di un fluoroforo è influenzato anche dal suo intorno chimico e dai suoi interattori e ligandi, monitorando i cambiamenti nel tempo di vita di un fluoroforo, possiamo ricavare informazioni sulle proprietà dinamiche del fluoroforo stesso e del sistema. L'analisi dei tempi di vita viene effettuata tramite il fit esponenziale dei decadimenti misurati o tramite l'analisi dei fasori, e può essere applicata a molti tipi di fluorofori. Tra i più interessanti, discuteremo il caso della molecola NADH in soluzione, in cellule e in tessuti.

PAROLE CHIAVE: fluorescenza, tempo di vita della fluorescenza, NADH, fasori.

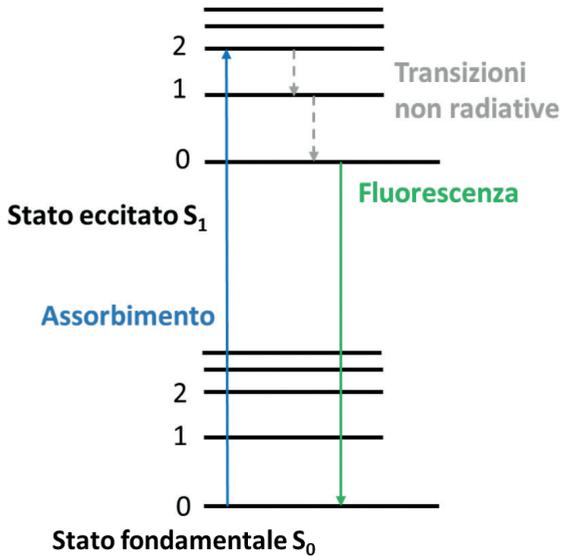
Molecole fluorescenti e proprietà della fluorescenza

Le molecole fluorescenti sono uno strumento fondamentale per la ricerca in ambito biofisico, biochimico e biologico. In questi contesti infatti le sonde, o indicatori fluorescenti, possono essere utilizzati per marcare molecole di interesse e studiarne le caratteristiche, sia in vitro che in modelli cellulari ed animali. Inoltre, possono essere utilizzate come sensori, rilevando quindi le variazioni di concentrazione di certi composti, o come marcatori per identificare specifici compartimenti cellulari.

Come spiegato in un articolo precedente, comparso nel 2020 nella ser. X, vol. II, B degli Atti della Accademia Roveretana degli Agiati (Plotegher, 2020), le molecole fluorescenti hanno la proprietà di assorbire luce ad una certa lunghezza d'onda (quindi di un determinato colore), per poi emettere luce ad una lunghezza d'onda maggiore, secondo un comportamento che è determinato dalle loro proprietà fisico-chimiche. In particolare, gli spettri di assorbimento e di emissione di una molecola descrivono come si comporterà in tal senso: essi rappresentano rispettivamente la frazione della radiazione luminosa assorbita o emessa in funzione della lunghezza d'onda, cioè l'energia che viene assorbita e permette la transizione di un elettrone della molecola fluorescente tra i vari livelli energetici dei suoi orbitali atomici. Il diagramma di Jablonski mostra le transizioni energetiche che si possono verificare più comunemente quando un fluoroforo viene irradiato con luce in grado di favorire la transizione dallo stato fondamentale al primo stato eccitato (Figura 1) (Lakowicz, 2006).

Oltre agli spettri di eccitazione ed emissione, altre proprietà importanti delle molecole fluorescenti sono la resa quantica, che descrive quanti fotoni saranno emessi in rapporto a quelli che sono stati assorbiti, e il tempo di vita della fluorescenza.

Dal punto di vista fisico, questo parametro descrive per quanto tempo in media le molecole fluorescenti popoleranno lo stato eccitato prima di decadere allo stato fondamentale.



1. Il diagramma di Jablonski mostra le transizioni che avvengono tra stato fondamentale e stato eccitato quando un fluoroforo assorbe luce e la emette sotto forma di fluorescenza.

La resa quantica è un parametro fondamentale perché quantifica quanto bene una molecola può essere visualizzata dopo essere stata illuminata con un certo quantitativo di luce. Una buona resa quantica consente quindi di avere delle immagini nitide e ben contrastate, necessarie per l'investigazione di qualunque processo biologico tramite microscopia in fluorescenza. Tuttavia, questa proprietà non può essere sfruttata per ricavare informazioni sulle caratteristiche e le dinamiche del sistema che si sta studiando: in ambito biofisico e biologico, questo si può ottenere utilizzando la microscopia di fluorescenza per studiare il tempo di vita della fluorescenza di un fluoroforo in cellule e tessuti.

Il tempo di vita della fluorescenza

Quando un fluoroforo viene eccitato con fotoni della giusta lunghezza d'onda, un elettrone della molecola viene promosso dallo stato fondamentale allo stato eccitato. L'emissione di luce avviene dallo stato di singoletto, nel quale l'elettrone eccitato ha spin opposto rispetto a quello dello stato fondamentale (Figura 1). Quindi, il ritorno

allo stato fondamentale è una transizione permessa per spin e avviene in concomitanza con l'emissione di un fotone. L'ordine di grandezza dei tempi di emissione della fluorescenza è piuttosto piccolo, nell'ordine dei nanosecondi.

Questi processi di assorbimento ed emissione della luce vengono tipicamente studiati su popolazioni di fluorofori: per valutare le proprietà di una singola molecola ci si basa sullo studio delle proprietà macroscopiche del sistema, cioè valutando il comportamento di un ensemble di molecole.

Il comportamento nel tempo di un insieme di fluorofori che popola lo stato eccitato è descritto dalla seguente equazione:

$$\frac{dn(t)}{dt} = -k \cdot n(t)$$

dove n è il numero di molecole che popola lo stato eccitato, t è il tempo e k è il parametro temporale che descrive la cinetica del processo, anche detto costante di diseccitazione.

Calcolando l'integrale si ottiene l'equazione che descrive il numero di molecole che nel tempo occupano lo stato eccitato:

$$n(t) = n(0) \cdot e^{-kt}$$

Il tempo di vita medio della fluorescenza τ è uguale a k^{-1} , quindi l'equazione può essere espressa in questo modo:

$$\frac{n(t)}{n(0)} = e^{-t/\tau}$$

Ne consegue che, quando una popolazione di fluorofori è eccitata, il tempo di vita τ (o *fluorescence lifetime*) è il tempo necessario affinché il numero di molecole presenti nello stato eccitato decada a $1/e$ rispetto al valore iniziale (ovvero circa al 37%).

Il tempo di vita della fluorescenza è un parametro importante perché, sebbene sia caratteristico delle molecole fluorescenti, può anche venire influenzato dall'ambiente in cui si trovano o dal loro legame con altre molecole.

Questo accade perché la costante di diseccitazione k è costituita dalla somma delle costanti di diseccitazione che determinano la transizione da stato eccitato a stato fondamentale: i contributi giungeranno quindi dalla costante di decadimento della fluorescenza e dalle costanti di decadimento di tutti i processi non radiativi.

Il tempo di vita della fluorescenza è importante, inoltre, perché determina anche l'intensità della fluorescenza emessa (perché questa è proporzionale, nel tempo, al numero di fluorofori che popolano lo stato eccitato) ed è proporzionale alla resa quantica.

Vediamo ora come questo parametro per una determinata molecola fluorescente può

essere misurato in un sistema biologico come cellule vive o in tessuti, e quali sono le informazioni che si possono ricavare da tali misure.

Come si misura il tempo di vita della fluorescenza?

Quando si vuole misurare il tempo di vita della fluorescenza di una molecola in un campione biologico, è necessario dotarsi di un microscopio con particolari caratteristiche. Come in una qualunque misura di intensità della fluorescenza, servono delle sorgenti di luce, dei filtri, delle ottiche e un detector adatti al fluoroforo che si sta studiando e al sistema biologico che si deve visualizzare (Plotegher, 2020). Inoltre, è necessario avere una sorgente di luce che possa illuminare il campione e quindi eccitare le molecole fluorescenti con un impulso molto breve al tempo $t=0$, con un *rate* di ripetizione dell'impulso (la frequenza caratteristica del laser) molto veloce. L'intensità del decadimento della fluorescenza si misura con un fotomoltiplicatore in funzione del tempo (rispetto all'impulso di eccitazione): il sistema utilizzato viene definito in inglese *Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC)* e permette di misurare il numero di fotoni emessi ad un dato tempo t_i . L'andamento dell'intensità della fluorescenza nel tempo è un esponenziale che è descritto dalla seguente formula:

$$I(t) = \alpha \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$$

L'andamento del decadimento di fluorescenza reale $I_R(t)$ è il risultato della convoluzione tra il decadimento della fluorescenza nel tempo $I(t)$ e il profilo dell'impulso di eccitazione $P(t)$:

$$I_R(t) = I(t) \otimes P(t)$$

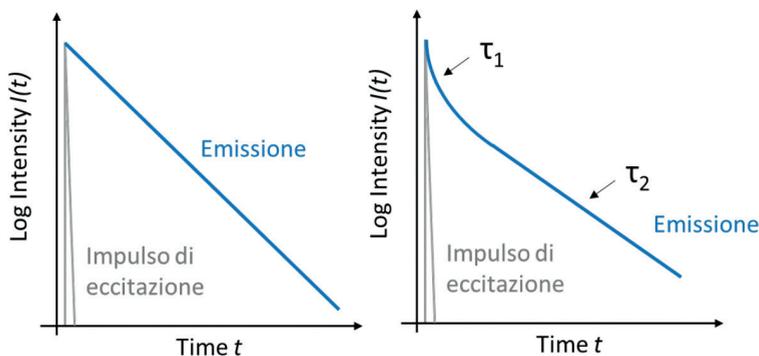
Invece, il decadimento della fluorescenza misurato $I_M(t)$ si definisce come la convoluzione tra il decadimento reale $I_R(t)$ e la risposta dello strumento utilizzato per la misura $R(t)$:

$$I_M(t) = I_R(t) \otimes R(t) = I(t) \otimes P(t) \otimes R(t) = I(t) \otimes i_{REF}(t),$$

dove $i_{REF}(t)$ è la funzione di risposta del rivelatore, cioè la risposta dello strumento all'impulso di eccitazione.

Di conseguenza per quantificare in maniera rigorosa il tempo di vita τ di un fluoroforo misurato si devono combinare un fit non lineare (esponenziale) e una procedura di deconvoluzione:

$$I_M(t) = [\alpha \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}] \otimes i_{REF}(t)$$



2. Rappresentazione in scala logaritmica del decadimento dell'intensità di fluorescenza nel tempo $I(t)$ a seguito di un impulso di eccitazione laser brevissimo. A sinistra si mostra il decadimento nel caso di un fluoroforo in condizioni omogenee, per il quale quindi il decadimento è monoesponenziale; a destra invece abbiamo un decadimento costituito da due esponenziali, una situazione che si verifica nel momento in cui la misura viene effettuata su due fluorofori o su un fluoroforo che si trova in due stati diversi, in grado di influenzare il suo tempo di vita.

In prima approssimazione, la deconvoluzione non si rende necessaria quando l'impulso di eccitazione è molto breve rispetto alla vita media del fluoroforo.

Il tempo di vita dei fluorofori di interesse biologico è dell'ordine dei nanosecondi: i laser pulsati utilizzati per eccitare i fluorofori per esperimenti che ne misurino il tempo di vita dovranno quindi avere la possibilità di emettere impulso di luce di durata inferiore. La fluorescenza di un fluoroforo in un sistema omogeneo è caratterizzata da un decadimento nel tempo che è descrivibile come un decadimento monoesponenziale. Quando abbiamo una molecola fluorescente che si trova in condizioni disomogenee (per esempio legata o non legata ad un interattore) oppure quando essa ha un intorno chimico variabile (come per esempio nel caso di un fluoroforo nell'ambiente intracellulare), il decadimento sarà un multiesponenziale che tiene conto di tutti i contributi al decadimento dovuti al fluoroforo nelle diverse condizioni, oppure, nel caso ci siano diversi fluorofori in soluzione che vengono eccitati con luce alla stessa lunghezza d'onda, il contributo per ciascuno di essi (Figura 2).

Il tempo di vita τ_i di ogni contributo al segnale e la frazione di molecole α_i che sono caratterizzate da quel tempo di vita rispetto al totale, descrivono l'andamento dell'intensità di fluorescenza totale misurata nel tempo come segue:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

Per risalire ai τ_i e alle α_i è necessario fare un fit multiesponenziale del decadimento misurato. Questa procedura è affidabile soltanto se il numero di esponenziali che contribuisce al processo è limitato: con un numero di contributi superiore a tre il fit potrebbe generare degli artefatti. Per questo motivo, soprattutto nel caso di studi condotti su sistemi complessi come cellule vive o tessuti, si applica talvolta un sistema di analisi alternativo che è discusso al paragrafo successivo.

Analisi quantitativa dei tempi di vita in sistemi complessi: i fasori

Nel caso di un sistema complesso come una cellula nella quale si vuole studiare il tempo di vita di un fluoroforo, è necessario raccogliere la fluorescenza per ogni pixel che costituisce l'immagine della cellula stessa.

Per ogni pixel si deve valutare il decadimento della fluorescenza nel tempo $I(t)$, a cui contribuiscono tutte le molecole fluorescenti presenti che vengono eccitate dallo stato fondamentale al primo stato eccitato. Per ricavare informazioni sul tempo di vita del fluoroforo studiato si dovrebbe effettuare un fit esponenziale per ogni pixel dell'immagine di fluorescenza. Questo presenta almeno due problemi: il primo è relativo al fit di una curva multiesponenziale per ogni singolo pixel, che ha i limiti pratici già discussi in precedenza, amplificati dal fatto che l'analisi deve essere fatta per ogni singolo pixel. Il secondo problema, di maggiore entità poiché non si tratta di una questione tecnica ma è legato all'interpretazione dei dati raccolti, riguarda la capacità di dare un significato biologico sullo stato del sistema alle informazioni ottenute.

Sebbene questo approccio venga talvolta utilizzato con successo (Blacker T. et al., 2014), esiste un metodo alternativo: esso si basa su delle trasformazioni matematiche chiamate fasori che vengono applicate al segnale di fluorescenza nel tempo $I(t)$ (Digman M. et al., 2008).

Le equazioni che descrivono i fasori sono le seguenti:

$$g_{i,j}(\omega) = \int_0^{\infty} I_{i,j}(t) \cos(\omega t) dt / \int_0^{\infty} I_{i,j}(t) dt$$

$$s_{i,j}(\omega) = \int_0^{\infty} I_{i,j}(t) \sin(\omega t) dt / \int_0^{\infty} I_{i,j}(t) dt$$

Dove ω è la frequenza angolare di ripetizione degli impulsi laser o la frequenza angolare della modulazione della luce, e gli indici i e j identificano ciascun pixel di un'immagine. Le coordinate g ed s potranno quindi descrivere il comportamento del tempo di vita di un certo decadimento $I(t)$ per ogni pixel e tale $I(t)$ potrà essere un decadimento multiesponenziale complesso, che descrive il comportamento di un fluoroforo in un ambiente eterogeneo.

Se il decadimento è un singolo esponenziale $I(t) = \alpha \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$, le coordinate del fasore si potranno esprimere in questo modo:

$$g_{i,j}(\omega) = \frac{1}{1 + (\omega\tau)^2}$$

$$s_{i,j}(\omega) = \frac{\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2}$$

Nel caso in cui invece ogni pixel i,j che rappresenta l'immagine restituisca un segnale $I(t)$ costituito da molte componenti esponenziali, le coordinate g e s del fasore sono date da:

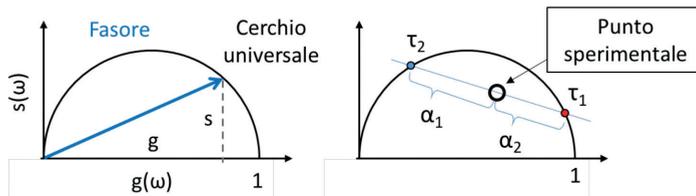
$$g_{i,j}(\omega) = \sum_k \frac{f_k}{1 + (\omega\tau_k)^2}$$

$$s_{i,j}(\omega) = \sum_k \frac{f_k \omega\tau_k}{1 + (\omega\tau_k)^2}$$

Dove f_k è la frazione pesata sull'intensità della componente con tempo di vita τ_k . Secondo le espressioni che descrivono le coordinate del fasore per un singolo decadimento esponenziale è possibile calcolare la relazione che intercorre tra g e s per ogni pixel i,j :

$$s_{i,j}^2 + \left(g_{i,j} - \frac{1}{2}\right)^2 = 1/4$$

Questo implica che tutte le singole componenti esponenziale sono rappresentate da un semicerchio di centro $(1/2,0)$ e raggio $1/2$ nel grafico che viene definito plot dei fasori (o *phasor plot*). Questo semicerchio viene chiamato, dal Prof. Enrico Gratton che ha ideato questo metodo di analisi del tempo di vita dei fluorofori, "cerchio universale" (Figura 3).



3. Rappresentazione grafica del cerchio universale e delle coordinate che descrivono i fasori al suo interno (a sinistra) e rappresentazione di un esempio di analisi di una condizione sperimentale in cui la misura mostra un punto sperimentale che è una combinazione tra due punti caratterizzati da tempi di vita τ_1 e τ_2 .

Su questo semicerchio, un fasore corrispondente ad un tempo di vita molto breve è vicino al punto (1,0), mentre un fasore corrispondente ad un tempo di vita lungo, sarà vicino alle coordinate (0,0).

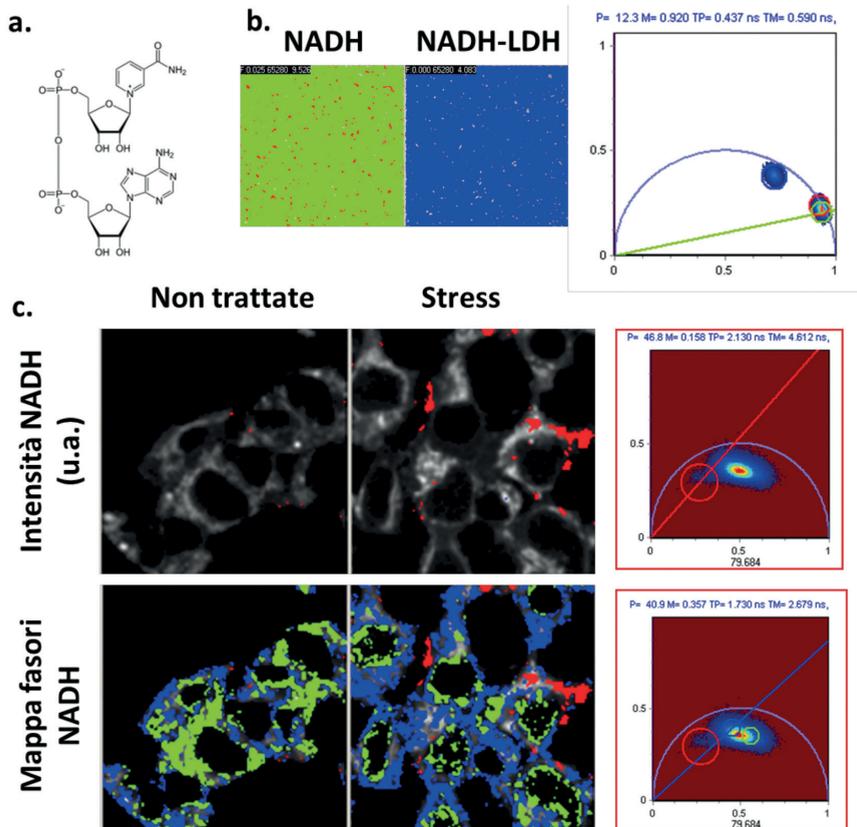
Nel caso si abbiano svariate componenti che contribuiscono al tempo di vita (quindi un fluoroforo in diverse condizioni che ne alterano il tempo di vita, oppure vari fluorofori con tempi di vita diversi), le coordinate g e s saranno posizionate in un punto all'interno del semicerchio che rappresenta la combinazione dei vari contributi al segnale. Nel caso di un fasore a due componenti, si può risolvere graficamente la frazione di contributo relativa a ciascuno dei due tempi di vita misurati. Infatti, tutti i fasori corrispondenti ad una combinazione delle due componenti saranno posizionati su un segmento i cui estremi corrispondono ai fasori delle due componenti isolate. Spesso, la posizione delle due componenti singole è nota, perché corrispondente a due singole specie note, il cui tempo di vita specifico è già stato analizzato con il metodo dei fasori, ma anche con una semplice analisi del decadimento monoesponenziale che lo descrive. La posizione delle singole componenti si colloca sul "cerchio universale" e il segmento che le congiunge permette di esplorare le frazioni α_1 e α_2 dei fluorofori rispetto al totale che contribuiscono al tempo di vita rilevato τ_1 e τ_2 , rispettivamente, in ciascun pixel. Dato che per ogni pixel viene calcolata e rappresentata una coppia di coordinate g e s sul "cerchio universale", è poi possibile risalire al punto nell'immagine (e quindi nella cellula, se è quello l'oggetto di studio) ad esse corrispondenti.

La potenza di questo metodo risiede principalmente nella possibilità di evitare i fit multiesponenziali ma al contempo poter analizzare situazioni complesse, come quelle di fluorofori all'interno delle cellule e tessuti.

Il caso interessante dello studio del tempo di vita del NADH

Il nicotinamide adenina dinucleotide NAD⁺ (nella sua forma ossidata) o NADH (nella sua forma ridotta) è una molecola che partecipa nelle reazioni di ossidoriduzione all'interno della cellula, permettendo il trasferimento di elettroni (Figura 4a).

Questo fa sì che sia coinvolta in una serie di funzioni fondamentali per le cellule, tra cui la respirazione mitocondriale e il metabolismo cellulare. Il suo studio all'interno delle cellule è quindi di particolare interesse perché permette di caratterizzarne il metabolismo. Dal punto di vista della microscopia in fluorescenza questa molecola è interessante perché nella sua forma ridotta (NADH) è autofluorescente: questo significa che emette fluorescenza in maniera naturale, senza bisogno di ingegnerizzazioni, con lunghezze d'onda di eccitazione nel range di 320-380 nm e di emissione nel range di 420-480 nm. Sebbene l'autofluorescenza del NADH sia particolarmente interes-



4. Esempio di studio del tempo di vita del NADH utilizzando il metodo dei fasori.
- Il NADH è una molecola che presenta autofluorescenza e il suo tempo di vita è influenzato dalle molecole e proteine a cui è legato e dal suo intorno chimico.
 - Rappresentazione grafica del tempo di vita del NADH tramite il metodo dei fasori per il cofattore in soluzione libero (cursore verde/rosso) o legato alla lattato deidrogenasi (LDH) (cursore blu).
 - Autofluorescenza del NADH in cellule 'non trattate' o in condizioni di 'stress' (in scala di grigi) e relativa mappa dei fasori: il plot dei fasori (a destra) individua popolazioni di pixel che presentano molecole di NADH all'interno della cellula con un tempo di vita medio più breve (in verde) o più lungo (in blu o rosso).

te, la sua resa quantica è relativamente bassa e cambia quando il NADH, nell'espletare la sua funzione, si lega ad enzimi, come per esempio la lattatodeidrogenasi (LDH). Un'altra proprietà del NADH che cambia in funzione del suo legame ad enzimi o del suo intorno chimico è il tempo di vita. Questo parametro può quindi essere misurato per studiare il legame del NADH con proteine o il contesto in cui si trova ad operare, ed è un parametro quantitativo che permette di essere molto più rigorosi rispetto al semplice studio delle variazioni dell'intensità di fluorescenza del NADH in un certo sistema.

Se da un lato è possibile studiare il tempo di vita del NADH utilizzando il metodo dei fit esponenziali anche in sistemi complessi, come cellule e tessuti, il metodo dei fasori è in questo caso molto più semplice, di immediata e facile interpretazione.

In Figura 4b riportiamo le coordinate del fasore sul "cerchio universale" in una misura del NADH in soluzione libero da legami (cursore verde/rosso) o legato alla lattatodeidrogenasi (cursore blu). Ogni punto rappresenta un pixel che è poi colorato dello stesso colore del cursore nell'immagine acquisita al microscopio (che in questo caso è banale trattandosi soltanto di una soluzione tampone in cui è stato sciolto il cofattore NADH con o senza l'enzima di interesse). Vediamo bene come, in questo caso, il fasore corrispondente ai due campioni sia approssimativamente posizionato sul "cerchio universale" trattandosi di soluzioni omogenee (la cui misura di intensità nel tempo dovrebbe fornire un decadimento monoesponenziale). Il metodo funziona piuttosto bene, ma è nella sua applicazione al contesto cellulare che se ne ricavano le maggiori soddisfazioni. In Figura 4c vengono mostrate, in scala di grigi, due immagini corrispondenti all'intensità di fluorescenza del NADH di cellule in condizioni normali ('non trattate') o in condizioni di stress proteotossico, legato all'aggregazione di proteine o a stress ossidativo ('stress'). L'intensità è assente nel nucleo della cellula, mentre si presenta in varie gradazioni di grigio nel citoplasma, dove una distribuzione disomogenea di molecole di NADH è presente.

Come si vede, l'intensità nel citoplasma non mostra marcate differenze nelle due condizioni, suggerendo in prima istanza che non ci siano variazioni nelle condizioni del NADH nei due casi. Analizzando il tempo di vita della fluorescenza del NADH tramite il sistema dei fasori, si ottiene una distribuzione di punti nel "cerchio universale" corrispondente ai pixel dell'immagine, che suggerisce ci sia una distribuzione disomogenea di tempi di vita, corrispondente probabilmente a NADH libero o legato (come visto al paragrafo precedente). Selezionando gruppi di pixel con il cursore verde (più vicino alla regione del semicerchio in cui dovremmo vedere il NADH libero) o con il cursore blu (regione più vicina al NADH legato), si vede che nelle due condizioni le cellule presentano diverse porzioni di pixel caratterizzati da un tempo di vita breve o lungo. Inoltre, nelle condizioni di stress, le cellule presentano un'ulteriore popolazione di pixel, evidenziati dal cursore rosso, in cui il tempo di

vita del NADH è ancora più lungo, che è presente quasi unicamente nelle cellule in condizione di stress. Da letteratura, quest'allungamento del tempo di vita del NADH potrebbe essere riconducibile ad un'alterazione metabolica (Ranjit et al., 2019) o all'aggregazione di alcune proteine rilevanti nelle malattie neurodegenerative (Plotegher et al., 2015). Ai fini di questo articolo comunque, con questo semplice esempio, abbiamo mostrato come lo studio del tempo di vita del NADH tramite il metodo dei fasori possa fornire in maniera semplice ed immediata informazioni sulle condizioni metaboliche di una cellula, che potrebbe magari essere un modello di studio per una condizione patologica. Infatti, questo metodo di analisi è stato utilizzato per valutare il metabolismo di cellule e tessuti in condizioni fisiologiche (Stringari et al., 2015) e in condizioni patologiche (Ranjit et al., 2020; Trinh et al., 2017; Dong et al., 2019).

Conclusioni

In questo articolo abbiamo discusso di come il tempo di vita della fluorescenza, una proprietà tipica delle molecole fluorescenti e del loro intorno chimico, possa essere studiata per ricavare informazioni sullo stato di sistemi biologici complessi, come cellule e tessuti. In particolare, tramite analisi specifiche (fit o calcolo dei fasori) si può mettere in relazione questo parametro con le dinamiche intracellulari. Nell'esempio del NADH, le informazioni ricavate dal tempo di vita della sua fluorescenza permettono di comprendere meglio il metabolismo cellulare. Tuttavia, il metodo può essere utilizzato in vari altri modi per studiare le proprietà dinamiche di cellule vive, applicandolo per esempio a biosensori intracellulari o proteine fluorescenti (van der Linden et al., 2021). Questo suggerisce che questi metodi avanzati, per quanto più sofisticati della microscopia in fluorescenza convenzionale, sia a livello di strumentazione necessaria per l'esecuzione dell'esperimento sia in termini di analisi dei dati, possano fornire informazioni fondamentali per la comprensione di meccanismi biologici di base.

Bibliografia

- Blacker T. et al., 2014, *Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM*, "Nature Communications", 5, 00. 3936
- Digman M., et al., 2008, *The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis*, "Biophysical Journal", 94, 2, pp. L14
- Dong Y., et al., 2019, *Reversibility of Age-related Oxidized Free NADH Redox States in Alzheimer's Disease Neurons by Imposed External Cys/CySS Redox Shifts*, "Scientific Reports", 9, 1, pp 11274

- Lakowicz J. R., 2006, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* Springer Nature
- Plotegher et al., 2015 *NADH fluorescence lifetime is an endogenous reporter of α -synuclein aggregation in live cells*, "FASEB Journal", 29, 6, pp. 2484
- Plotegher N., 2020, *Dalla microscopia in fluorescenza alla nanoscopia nello studio quantitativo di processi biologici in cellule*, "Atti della Accademia Roveretana degli Agiati", ser. X, vol. II, B
- Ranjit S., et al., 2019 *Determination of the metabolic index using the fluorescence lifetime of free and bound nicotinamide adenine dinucleotide using the phasor approach*, "Journal of Biophotonics", 12, 11, pp 1.
- imaging of intracellular calcium*, "Nature Communications", 12, pp. 7159
- Ranjit S., et al., 2020, *Phasor approach to autofluorescence lifetime imaging FLIM can be a quantitative biomarker of chronic renal parenchymal injury*, "Kidney International", 98, 5, pp. 1341
- Stringari C. et al., 2015, *In vivo single-cell detection of metabolic oscillations in stem cells*, "Cell Report", 6, 10, pp. 1
- Trinh A. L., 2017, *Tracking Functional Tumor Cell Subpopulations of Malignant Glioma by Phasor Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy of NADH*, "Cancers" 9, 12, pp. 168
- Van der Linden F., et al. 2021, *A turquoise fluorescence lifetime-based biosensor for quantitative*.

