

Nicoletta Plotegher

Dalla microscopia in fluorescenza alla nanoscopia nello studio quantitativo di processi biologici in cellule

ABSTRACT: Fluorescence microscopy is one of the major tools utilized to investigate key processes in cells and organisms and to answer key biological questions. It is based on the availability of fluorescent sensors and dyes that allows to detect organelles, intracellular structures and proteins within the cellular environment. Sensors able to measure changes in the local concentration of ions or of other molecules relevant for the cellular functions also exist. These fluorescent molecules stain the target of interest and can be visualized through fluorescence microscopes. The quality of the images and the possibility of resolving structures that are in the range of nanometers-micrometers are determined by the features of the instruments and by the physical laws that describe the behaviour of the light in optical systems. To overcome these limitations and to have better chances to investigate nanoscopic structures responsible for key cellular processes, novel microscopes were designed and lead to the foundation of the 'nanoscopy' field.

KEY WORDS: Fluorescence microscopy, dyes, resolution, superresolution methods, STED, fluorescent sensors

RIASSUNTO: La microscopia in fluorescenza è uno degli strumenti maggiormente utilizzati per studiare processi chiave nel funzionamento di cellule e organismi e per rispondere a domande biologiche fondamentali. È basata sulla disponibilità di sensori e molecole fluorescenti che permettono di visualizzare organelli, strutture intracellulari e proteine all'interno dell'ambiente cellulare. Esistono anche sensori capaci di misurare i cambiamenti nella concentrazione locale di ioni o di altre molecole all'interno della cellula rilevanti per il suo funzionamento. Queste molecole fluorescenti permettono di identificare il target di interesse, che può quindi essere visualizzato attraverso un microscopio a fluorescenza. La qualità delle immagini e la possibilità di visualizzare strutture che sono nell'ordine di grandezza dei nanometri o dei micrometri sono determinate dalle caratteristiche degli strumenti utilizzati e dalle leggi fisiche che descrivono il comportamento della luce nei sistemi ottici. Per superare queste limitazioni e per avere maggiori possibilità di studiare strutture nanoscopiche responsabili di processi intracellulari fondamentali, sono stati ideati nuovi microscopi che hanno dato vita alla 'nanoscopia'.

PAROLE CHIAVE: Microscopia in fluorescenza, molecole fluorescenti, sensori fluorescenti, risoluzione, metodi di super-risoluzione, STED

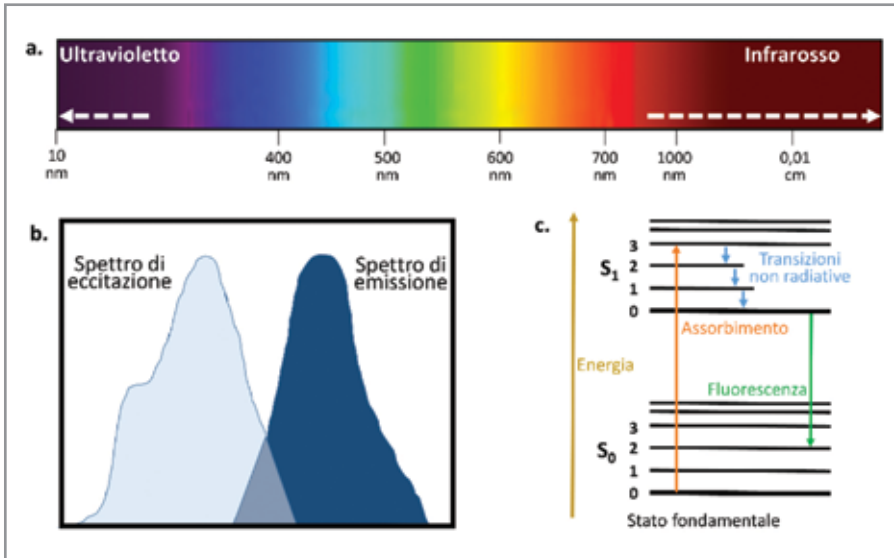
Nicoletta Plotegher, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova, Via U. Bassi 58b, 35131 Padova (Italia), email: nicoletta.plotegher@unipd.it.

La microscopia di fluorescenza

Le cellule di mammifero hanno tipicamente dimensioni di alcune decine di micrometri, a seconda del tipo di cellula e della sua funzione. Lo spazio intracellulare è occupato da tutte quelle strutture necessarie al suo corretto funzionamento, che sono naturalmente ancora più piccole. Questo significa che, per studiare le dinamiche e i meccanismi intracellulari che regolano le funzioni delle cellule (e quindi, nel caso delle patologie, quelle che causano delle disfunzioni), è necessario sfruttare dei metodi di indagine adeguati, che permettano di raggiungere livelli di ingrandimento e risoluzione tali da osservare strutture subcellulari o, con gli avanzamenti più recenti, anche strutture costituite da poche molecole.

Una delle tecniche maggiormente utilizzate è la microscopia di fluorescenza. Questo metodo si basa sull'utilizzo di sonde o indicatori fluorescenti che possono "colorare" specifiche molecole od organelli intracellulari, o che possano rispondere con una variazione della fluorescenza alla presenza di ioni o altre molecole (funzionando quindi come sensori). Queste sonde vengono visualizzate tramite microscopi che, nel corso degli ultimi 25 anni, hanno visto un miglioramento quasi esponenziale delle loro prestazioni e applicazioni.

Questi microscopi sfruttano la proprietà di alcune molecole di emettere, in particolari condizioni, luce colorata. Esse sono infatti in grado di assorbire fotoni ad una certa energia (quindi luce di un certo colore) ed emettere poi fotoni ad energia minore (cioè luce di un altro colore). Nello spettro della luce visibile riportato in Figura 1a è mostrata la relazione tra colore e lunghezza d'onda λ , che a sua volta corrisponde ad una determinata energia secondo la formula $E = hc/\lambda$, dove h è la costante di Planck e c la velocità della luce nel vuoto. Ogni fluoroforo è caratterizzato da uno spettro di eccitazione e uno spettro di emissione (Figura 1b): il primo rappresenta la frazione di radiazione luminosa assorbita a ciascuna lunghezza d'onda considerata (cioè l'energia assorbita che permette la transizione di un elettrone del fluoroforo in questione tra i vari livelli energetici dei suoi orbitali atomici), mentre il secondo è la frazione di luce emessa in funzione della lunghezza d'onda a seguito della transizione da uno stato eccitato (dopo aver quindi assorbito un certo quanto di energia) allo stato fondamentale. In Figura 1c, i processi di eccitazione ed emissione di fluorescenza sono rappresentati in una forma semplificata del diagramma di Jablonski, al fine di mostrare soltanto le transizioni energetiche tra stato fondamentale e stato eccitato per una molecola fluorescente di interesse in questa discussione.



1. (a) Spettro della luce visibile. Lunghezze d'onda e colori corrispondenti.
- (b) Esempio di spettro di eccitazione e spettro di emissione di una molecola fluorescente.
- (c) Diagramma di Jablonski semplificato che illustra le transizioni energetiche di una molecola che assorbe energia e la riemette sotto forma di fluorescenza.

Un campione biologico, che al suo interno contenga delle molecole fluorescenti in maniera naturale o tramite una precisa preparazione che renda fluorescenti determinati oggetti microscopici, può quindi essere visualizzato tramite un microscopio a fluorescenza. Il microscopio illuminerà il campione con luce di un certo colore, utilizzando una lampada o un laser e dei filtri in grado di selezionare al meglio la lunghezza d'onda necessaria. Il campione assorbirà la luce per poi emetterne a sua volta; un ulteriore sistema di filtri permetterà di selezionare la luce emessa ad una certa lunghezza d'onda ed eliminare eventuale luce derivante dalla sorgente di eccitazione. Il detector registrerà quindi la luce emessa e selezionata, rendendo possibile l'identificazione delle strutture o molecole di interesse e la ricostruzione di un'immagine più o meno buona dell'oggetto che si vuole studiare.

La qualità dell'immagine, e quindi dell'informazione che si sta cercando di ottenere, dipende dal tipo di microscopio che si sta utilizzando, dalle strutture che si stanno studiando e dalla preparazione del campione biologico (Lakowicz, 2006).

Quali sonde fluorescenti sono disponibili e cosa permettono di osservare?

Ad oggi esistono marcatori fluorescenti che permettono l'identificazione di una moltitudine di strutture o di molecole all'interno della cellula. Ciascuno di questi fluorofori è caratterizzato non soltanto da uno spettro di eccitazione e di emissione (come spiegato nel paragrafo precedente), ma anche da una certa resa quantica. La resa quantica Q di un fluoroforo è un parametro che quantifica la proporzione tra i fotoni che vengono assorbiti e quelli vengono emessi (con due energie diverse):

$$Q = \frac{\# \text{ fotoni emessi}}{\# \text{ fotoni assorbiti}}$$

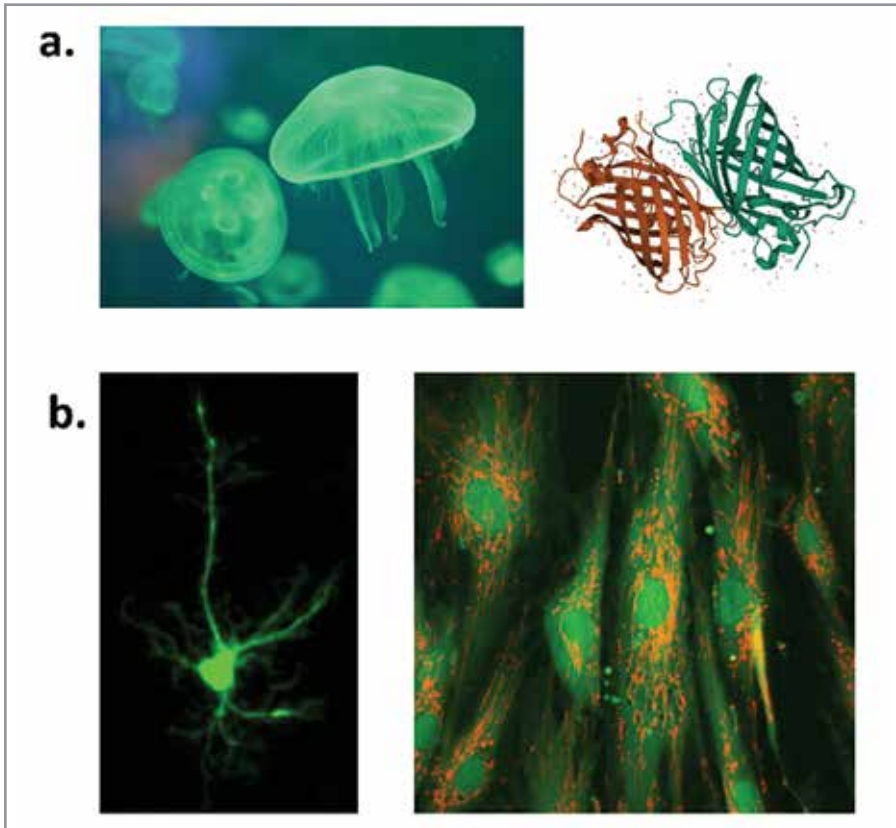
Tanto più vicina sarà a $Q = 1$ tanto migliore sarà la performance di un fluoroforo e la possibilità quindi di impiegarlo con successo per studiare determinati processi biologici.

Nella scelta di un fluoroforo bisogna quindi tenere conto dei suoi spettri di eccitazione ed emissione, e della sua resa quantica, ma anche della sua capacità di resistere alle sollecitazioni luminose. Alcuni fluorofori più di altri subiscono un fenomeno detto "photobleaching", un danno derivato dall'illuminazione che causa la perdita della capacità di emettere fotoni quando eccitati con una sorgente luminosa.

Inoltre, un'altra caratteristica interessante di alcune di queste molecole è che, grazie alle loro proprietà chimiche, sono in grado di localizzarsi in specifici tessuti, comparti cellulari o di legarsi a determinate strutture, rendendole quindi utili in maniera differente per rispondere a domande biologiche diverse.

Cerchiamo ora di ricapitolare brevemente che cosa si può osservare utilizzando queste molecole, in che modo e per quali scopi.

Una prima classe di molecole fluorescenti che vengono largamente impiegate nella ricerca biologica e biomedica sono le proteine fluorescenti. La capostipite di questa classe di proteine è la 'Green Fluorescent Protein' (GFP), una proteina che viene naturalmente espressa dalla medusa *Aequorea victoria*, e che è stata scoperta nel 1961 (Figura 2a). L'ingresso della GFP nella ricerca biologica e biomedica è stata una vera e propria svolta: tramite tecniche di biologia molecolare è infatti possibile esprimere questa proteina in cellule e organismi viventi, e osservare successivamente, tramite microscopi a fluorescenza, le strutture intracellulari o gli specifici tipi cellulari verso cui la proteina è stata indirizzata (Giepmans et al., 2006). Tramite la biologia molecolare



2. (a) Fotografia di una medusa che esprime naturalmente una proteina fluorescente 'Green fluorescent protein' (a sinistra) e struttura molecolare 3D della proteina stessa come studiata tramite metodi cristallografici (PDB 1GFL_1, Yang et al., 1996).
- (b) Esempio di neurone in cui la proteina GFP è stata sovraespressa utilizzando metodi di biologia molecolare e cellulare.
- (c) Fibroblasti umani colorati tramite un marcatore generico per l'ambiente intracellulare (calceina, in verde) e con un marcatore per i mitocondri (TMRM, in rosso).

è anche possibile far sì che le cellule esprimano questa proteina fusa con una proteina di interesse, rendendola quindi identificabile all'interno della cellula o del tessuto studiato con un microscopio.

Queste proteine fluorescenti sono anche state ingegnerizzate in modo tale da assorbire ed emettere fotoni in regioni diverse dello spettro rispetto alla GFP originaria. Si sono quindi ottenute proteine fluorescenti che emettono luce che spazia dal blu al rosso, permettendo quindi di effettuare imaging in

fluorescenza multicolore. Inoltre, è stato possibile modificare questa proteina per permetterle di funzionare come un sensore specifico (per gli ioni calcio, per il pH, etc etc). In questo caso la proteina emetterà una quantità di luce proporzionale alla quantità di queste molecole presenti nella cellula. Questo approccio permette anche di monitorare una loro variazione in risposta a stimoli fisiologici a cui una cellula è sottoposta, oppure di valutare come la risposta a questi stimoli sia diversa, per esempio, in cellule donate da pazienti affetti da determinate patologie.

Oltre a queste proteine fluorescenti ottenute a partire dalla capostipite GFP, esistono fluorofori che vengono sintetizzati chimicamente e hanno anch'essi precise caratteristiche a livello di lunghezze d'onda della luce assorbita ed emessa, localizzazione intracellulare e oggetti verso cui hanno una particolare affinità e che quindi tenderanno a colorare (o 'marcare', come spesso si dice in microscopia). Si tratta di solito di molecole molto piccole rispetto alle proteine fluorescenti (qualche centinaio di Dalton per le molecole in confronto a circa 25000-30000 Da nel caso delle proteine) e che quindi hanno dei vantaggi, ma non sono adatte nella maggior parte dei casi a identificare specifiche proteine.

Come nel caso delle proteine fluorescenti, ciascuna di queste molecole è stata specificamente disegnata o selezionata per la sua capacità di emettere luce ad una certa lunghezza d'onda, di localizzarsi in un certo comparto od organello intracellulare (mitocondri, membrane cellulari, lisosomi, e così via). In figura 2c è riportato un esempio di fibroblasti umani la cui colorazione verde deriva da un marcatore dell'ambiente intracellulare (la calceina), che permette di visualizzare la forma e i contorni, mentre quella rossa è dovuta ad una molecola in grado di immagazzinarsi nei mitocondri, in maniera proporzionale al loro potenziale di membrana (che è una delle loro proprietà fondamentali), per studiare il comportamento di questi organelli intracellulari in cellule vive.

Un altro possibile sviluppo negli utilizzi di queste sonde è legato alla capacità di alcune di esse di rispondere alle variazioni intracellulari di molecole di rilevanza fisiologica (calcio, ATP etc). Per esempio, cellule neuronali rispondono al neurotrasmettitore glutammato con un aumento di Ca^{2+} intracellulare che può essere studiato tramite alcuni di questi coloranti (ad esempio Fura2-AM oppure Fluo4-AM): aggiungendo il glutammato alla coltura neuronale e monitorando con un microscopio la variazione della luce emessa da questi fluorofori nel tempo si potrà stabilire come varia la concentrazione di ioni Ca^{2+} nel neurone in funzione del tempo.

Un altro possibile approccio, definito immunofluorescenza, prevede l'utilizzo di anticorpi specifici contro la/le proteina/e oggetto di studio (anticorpi definiti 'primari'), che permettono di identificarla/e nelle cellule e nei tessuti

di interesse. Questi anticorpi primari possono poi essere identificati tramite altri anticorpi designati appositamente (definiti in questo caso anticorpi ‘secondari’), che vengono coniugati con un fluoroforo. Gli anticorpi hanno una grande specificità e permettono lo studio delle proteine verso cui sono diretti ed eventualmente delle strutture intracellulari dove esse risiedono, ma nella maggior parte dei casi impediscono la loro caratterizzazione in cellule vive o animali. La grande varietà di anticorpi e di fluorofori esistenti garantisce (al netto delle limitazioni tecniche date dal microscopio in termini di lunghezze d’onda investigabili) di effettuare microscopia in fluorescenza multicolore e di studiare strutture intracellulari e proteine senza dover esprimere in maniera esogena, cioè da fuori, una proteina come la GFP che non è normalmente presente nelle nostre cellule o tessuti di interesse.

Come spesso accade in questi casi, la scelta da effettuare è sempre un compromesso che deve considerare almeno due aspetti.

- (1) Il primo è la domanda scientifica che si sta investigando: per esempio, in alcuni casi è assolutamente da evitare l’utilizzo di proteine esogene (‘sovraesprese’) per evitare artefatti nello studio che si sta effettuando, ed è quindi necessario affidarsi all’immunofluorescenza; in altri casi invece, non esiste un buon anticorpo da utilizzare per identificare una certa proteina, e allora si deve esprimerla in maniera esogena e preferibilmente già coniugata ad un fluoroforo.
- (2) Il secondo è la tecnologia disponibile in termini di microscopio (quindi le lunghezze d’onda di eccitazione utilizzabili e quelle di emissioni che è possibile misurare – che non sono sempre e tutte disponibili su ogni microscopio in commercio) e in termini di fluorofori o proteine fluorescenti da osservare (che potrebbero non essere adatte a determinati modelli sperimentali o per certe specifiche tecniche di microscopia di cui parleremo nei paragrafi successivi).

Passiamo ora a descrivere di quali parti è costituito e come funziona un microscopio.

Il microscopio generalizzato e l’avvento del microscopio confocale

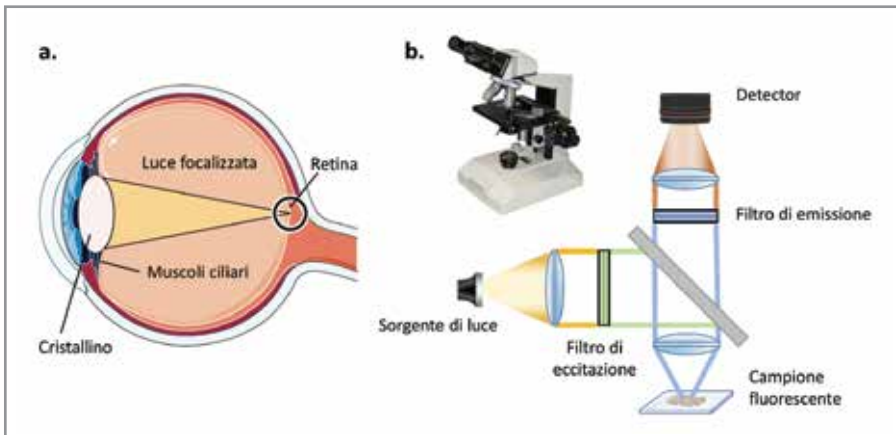
Leonardo Da Vinci fu uno dei primi a descrivere, nel Codice Atlantico del 1515, i principi di funzionamento di una camera oscura, che lui chiamò *Oculus Artificialis*. In realtà questa descrizione si basa su osservazioni che erano state fatte già da Aristotele (IV secolo A.C.) e, nel XI secolo, dallo scienziato arabo Alhazen Ibn Al-Haitham.

I principi di ottica alla base del funzionamento di una camera oscura sono gli stessi alla base del funzionamento del microscopio ottico. Ma fu soltanto nel Seicento, pare grazie al lavoro di Galileo Galilei, che venne ideato un vero e proprio ‘microscopio’ (al netto di rivendicazioni successive di altri scienziati dello stesso periodo). Sebbene la costruzione sia da attribuire a Giuseppe Campani, il prototipo inventato da Galileo e conservato all’Istituto e Museo di Storia della Scienza di Firenze, diede il via alla costruzione di vari microscopi in tutta Europa, attività che ovviamente continua tutt’oggi. I primi microscopi di questo genere erano costituiti, similmente al cannocchiale, di una lente concava e una convessa, montate su un cilindro rigido e permisero per la prima volta di osservare il ‘molto piccolo’.

Nelle sue prime forme più semplici, e in generale ancora oggi, il funzionamento del microscopio è largamente confrontabile con quello dell’occhio, con dettagli molto simili sia a livello anatomico che a livello fisiologico. Anche l’occhio infatti è costituito da un sistema ottico composto: la luce che permette la ricostruzione di un’immagine da parte del nostro cervello passa infatti attraverso una fenditura circolare, la pupilla, che adatta la quantità di luce che raggiunge il fondo dell’occhio allargandosi o restringendosi. I raggi luminosi vengono quindi focalizzati sulla retina, che è posizionata sul fondo dell’occhio, tramite il cristallino. Questo è una vera e propria lente che grazie ai muscoli ciliari cambia la sua forma, permettendo di mettere a fuoco oggetti a distanze diverse (Figura 3a). Quando i fotoni raggiungono la retina, che funziona come un detector, agiscono su speciali cellule fotorecettoriali, i coni e i bastoncelli, che trasformano il segnale luminoso in un segnale elettrico. Quest’ultimo, attraverso un sistema di neuroni appartenenti a varie tipologie, viene pre-processato e trasferito al cervello tramite il nervo ottico (Silverthorn, 2018).

Questo dualismo tra fisiologia dell’occhio e microscopia ottica rimane vero, almeno in parte e in taluni casi, anche per i microscopi più recenti ed evoluti, se non dal punto di vista tecnologico, almeno dal punto di vista teorico.

Infatti, un microscopio è in generale costituito da una fonte di luce (una lampada o un laser) in grado di eccitare i fluorofori presenti nel campione; da un sistema ottico costituito da lenti, obiettivi e filtri in grado di selezionare la luce a determinate lunghezze d’onda, di collimarla sul campione stesso e di raccogliere poi la luce emessa; da un detector che traduca quella luce emessa e raccolta in un segnale elettrico proporzionale all’intensità della luce, che possa essere registrato da un computer e successivamente analizzato (Figura 3b). Altri elementi più sofisticati sono stati introdotti in seguito per migliorare le prestazioni degli strumenti, la qualità delle immagini e quindi le informazioni ottenute con un esperimento basato su questa tecnologia. In particolare, la svolta è



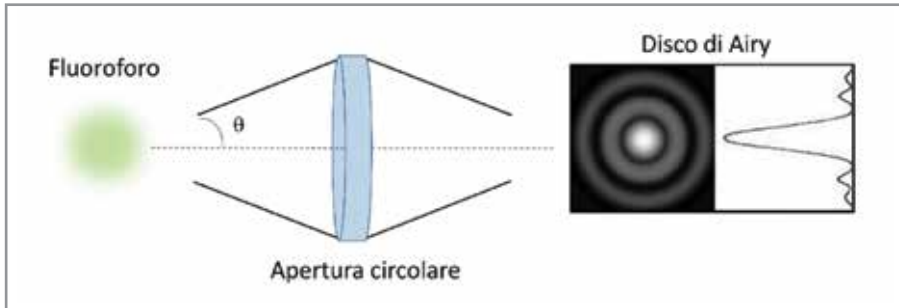
3. (a) Struttura semplificata dell'occhio come sistema ottico (Immagine adattata da Servier Medical Art).
 (b) Fotografia di un microscopio e schema ottico generalizzato relativo al suo funzionamento.

avvenuta con il passaggio alla microscopia confocale, possibile grazie all'utilizzo di un sistema definito 'pinhole' (che in inglese significa 'piccolo foro'). Questo permette di selezionare i raggi di luce che vanno a colpire il campione e quelli che vengono emessi dal campione stesso, in modo da registrare soltanto quella frazione di essi che giunge da un unico piano focale, cioè da una fetta sottile (quanto sottile è un compromesso tra tecnologia a disposizione e leggi della fisica) di campione. Questo permette di migliorare la qualità delle immagini ottenute, riducendo il contributo della luce emessa da fluorofori che si trovano al di fuori del piano focale di interesse (e cioè fuori fuoco) (Sheppard, 2002).

Nel corso del tempo, ulteriori avanzamenti tecnologici delle componenti ottiche e dei detector dei microscopi hanno permesso di migliorare ulteriormente la qualità delle immagini ottenute, ma sempre nei limiti imposti dalle leggi fisiche della diffrazione.

Limiti di diffrazione, risoluzione e contrasto

Trattandosi di un sistema ottico, il microscopio è soggetto alle leggi fisiche dell'ottica che ne determinano e limitano il funzionamento. In particolar modo, è la legge di Fraunhofer che descrive il comportamento di un'onda luminosa che attraversa una fenditura. Il pattern ottenuto dalla diffrazione



4. Figura di diffrazione, detta disco di Airy, ottenuta da una fenditura circolare, quale l'obiettivo di un microscopio, e relativa proiezione in due dimensioni.

della luce da parte di un'apertura circolare (quale quella dell'obiettivo di un microscopio) è non uniforme e costituito da una regione centrale in cui la luce è più intensa e una serie di anelli concentrici ad intensità via via decrescente (il cosiddetto 'disco di Airy', Figura 4). Il profilo di intensità della luce diffratta dipende in questo caso dalle funzioni di Bessel, che risultano dalla risoluzione dell'integrale di Fresnel-Kirchoff in coordinate polari, per via della forma circolare della fenditura, e che descrive matematicamente il comportamento della luce diffratta.

Una proiezione in due dimensioni del disco di Airy (come si vede in Figura 4, a destra) mostra una funzione che ha un andamento costituito da un picco massimo centrale e da una serie di minimi molto meno intensi.

La risoluzione, che è un parametro fondamentale per ogni microscopista, è la capacità di separare due oggetti luminosi puntiformi quando li si osserva tramite un microscopio.

Il criterio di Rayleigh stabilisce quando si possono distinguere due oggetti luminosi puntiformi in questo contesto: è possibile quando il centro del disco di Airy relativo al primo oggetto si trova in corrispondenza del primo minimo del disco di Airy del secondo. Il criterio di Rayleigh impone quindi, considerando la risoluzione matematica della figura di diffrazione ottenuta per una fenditura circolare, che la minima distanza risolvibile (risoluzione laterale) sia espressa come:

$$\Delta r = 0.61\lambda / n \cdot \sin \theta = 0.61\lambda / NA,$$

dove λ è la lunghezza d'onda della luce incidente, n l'indice di rifrazione del mezzo in cui opera l'obiettivo, θ il semiangolo di incidenza della luce che

arriva sull'ottica (come in Figura 4). Questi ultimi sono parametri che in un microscopio dipendono da come viene costruita la sua ottica, per cui il parametro $n \cdot$ è definito come NA, e cioè l'apertura numerica dell'obiettivo.

Esiste poi la risoluzione assiale, che si riferisce alla possibilità di distinguere due punti non nel piano x-y, ma lungo l'asse z, cioè lungo lo spessore del campione:

$$\Delta z = 1.5n\lambda/NA^2.$$

Non sfuggirà che, per quanto in questo caso si stia discutendo di microscopia ottica in fluorescenza, il concetto di risoluzione può essere esteso anche ad altri tipi di microscopia, nei quali viene utilizzato un altro tipo di particella per investigare il sistema biologico (o non biologico) di interesse. È il caso del microscopio elettronico a trasmissione: in questo esempio il campione oggetto di studio, dopo un'opportuna preparazione, viene illuminato con un fascio di elettroni che permettono di ottenere un'immagine delle strutture intracellulari che sono diventate elettrone-dense grazie alla colorazione effettuata durante la preparazione del campione (nella maggior parte dei casi ottenuta tramite acetato di uranile o, più di recente, tramite congelamento controllato). Il principio di dualità particella-onda (De Broglie, 1924) garantisce che gli elettroni si comportino non solo come particelle ma anche come onde, rispondendo quindi alle leggi della diffrazione. Tuttavia, avendo gli elettroni una lunghezza d'onda molto più piccola della luce visibile, la risoluzione risulta decisamente più elevata. I limiti della tecnica sono in questo caso quindi legati maggiormente alla necessità di preparare il campione in un certo modo, come spiegato in precedenza, e di non potersi avvalere di fluorofori in grado di selezionare quello che si andrà ad osservare.

Un altro parametro importantissimo in microscopia in fluorescenza (ma più in generale in microscopia) è il contrasto. Il contrasto è definito come:

$$C = (I_{\text{campione}} - I_{\text{rumore}})/I_{\text{rumore}}$$

Dove I_{campione} è l'intensità della luce emessa dal fluoroforo, mentre I_{rumore} è quella che viene misurata nelle regioni in cui il fluoroforo non c'è, ma che a causa di effetti di background viene comunque rilevata.

Il contrasto, tanto quanto la risoluzione, è fondamentale per ottenere immagini di buona qualità e per distinguere due punti: se il contrasto C non è sufficiente, non basterà tutta la risoluzione del mondo a restituire una buona immagine da poter analizzare.

Come superare i limiti della diffrazione: i metodi di super-risoluzione

Come abbiamo discusso nel paragrafo precedente, la microscopia ottica in fluorescenza applicata a problemi biologici si scontra con i limiti dalle leggi fisiche della diffrazione. Queste determinano la possibilità di studiare e osservare strutture intracellulari o macromolecole che hanno dimensioni di pochi micrometri o persino decine di nanometri. La legge di Rayleigh garantisce che si possano distinguere due punti tramite microscopia ottica soltanto in determinate condizioni di luce e obiettivi utilizzati, come spiegato in precedenza. Considerando per esempio una lunghezza d'onda della luce di eccitazione per un determinato fluoroforo di 488 nm (verde) e un'apertura numerica dell'obiettivo $NA = 1.4$, si avrà una risoluzione laterale, come definita in precedenza, di circa 210 nm. Sebbene si tratti già di un buon risultato, che permette di ottenere immagini abbastanza risolte per molte strutture di interesse biologico, spesso questo non permette di caratterizzare i dettagli di organelli che svolgono funzioni fondamentali nelle cellule, come per esempio i lisosomi. Questi sono organelli tondeggianti, di diametro compreso tipicamente tra 250-500 nm e sono le centrali di riciclo della cellula: si occupano cioè di degradare strutture intracellulari e macromolecole che non servono più. Per capirne a fondo il funzionamento e la regolazione, sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche, una risoluzione limitata dalle leggi della diffrazione non è detto che sia sufficiente. A maggior ragione quindi, utilizzando un microscopio confocale standard, non è possibile studiare eventi ascrivibili a singole molecole.

Da qui la necessità di sviluppare una sorta di nuova disciplina, la 'nanoscopia'. Negli ultimi 25 anni molto è stato fatto per sviluppare tecnologie che permettano di 'rompere' i limiti della diffrazione, e andare oltre. Dal punto di vista teorico, il premio Nobel Stefan Hell teorizzò la possibilità di oltrepassare i limiti della diffrazione già nel 1994 quando pubblicò un articolo sulla rivista *Optics Letter* (Hell and Wichmann, 1994) in cui, assieme a Wichmann, proponeva l'utilizzo di un sistema di emissione stimolata in grado di riportare dallo stato eccitato a quello fondamentale una frazione di fluorofori che si trovavano al di fuori del punto da osservare. Dalla teoria alla pratica non ci è poi voluto molto: nel 1999 Stefan Hell portò la prova sperimentale di quello che aveva proposto solo pochi anni prima, dando inizio all'era della super-risoluzione (Klar and Hell, 1999).

Il metodo ideato da Hell, chiamato microscopia 'stimulated emission depletion' (STED), o in italiano microscopia a 'deplezione tramite emissione stimolata' si basa sull'utilizzo di un secondo laser il cui fascio, collimato con

quello del laser di eccitazione, deve avere una grande potenza (Figura 5a). La forma del fascio di questo secondo laser è ‘a ciambella’ e questo permette, assieme all’intensità del fascio, di ‘spegnere’ quei fluorofori al di fuori del punto che si vuole misurare in un dato momento (Figura 5b). Quel che accade è che quei fluorofori, grazie all’impulso dato dal secondo laser, vengono riportati allo stato fondamentale prima di poter emettere fluorescenza. Questo permette di migliorare la risoluzione di un fattore che dipende dalle caratteristiche del laser di deplezione:

$$\Delta r_{STED} = \frac{\Delta r}{\sqrt{1 + I_{MAX}/I_{STED}}}$$

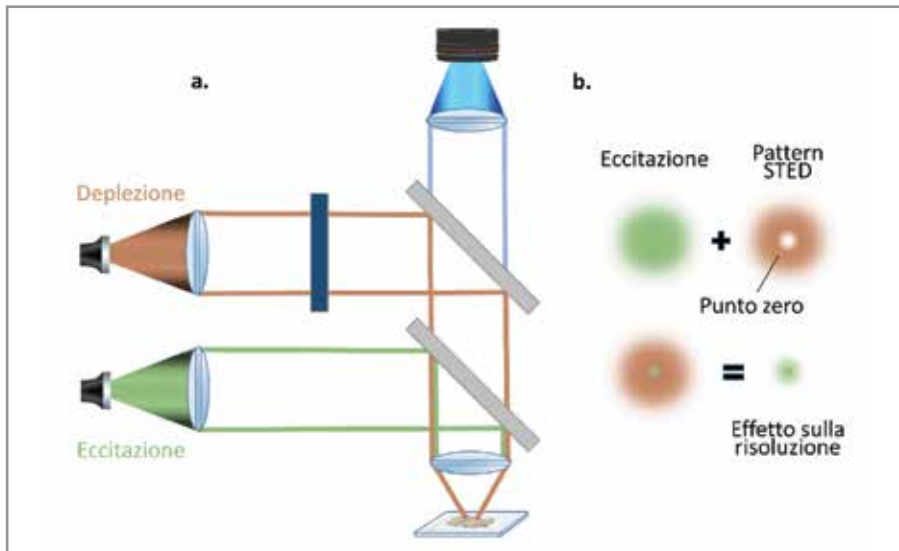
Dove I_{MAX} è l’intensità massima del laser STED e I_{STED} è l’intensità necessaria ad ottenere la deplezione massima delle molecole sullo stato eccitato.

Facendo una scansione del campione di interesse in ogni punto utilizzando entrambi i laser è quindi possibile ricostruire un’immagine più risolta rispetto a quella ottenuta con un microscopio confocale normale. La risoluzione che si riesce ad ottenere tipicamente in un campione biologico è di 20-30 nm.

A seguito di questo sviluppo, numerosissimi contributi si sono susseguiti sulla microscopia STED, sia a livello di miglioramento tecnologico o di ulteriori variazioni del metodo, sia a livello di applicazione a domande biologiche per le quali l’aumento della risoluzione è stato determinante (per qualche esempio si veda: Berning et al., 2012; Chojnacki et al., 2012; Göttfert et al., 2013; Hofmann et al., 2005). Se in un primo momento l’alta energia del fascio di deplezione e l’utilizzo di fluorofori specifici e di una preparazione specifica del campione, oltre che la necessità di un microscopio ‘homemade’, hanno reso l’uso dello STED più limitato ad alcuni gruppi di ricerca, oggi la situazione è molto cambiata e l’utilizzo di questa tecnica o tecniche simili è piuttosto diffuso.

Altri metodi di super-risoluzione basati sulla localizzazione delle singole molecole sono stati implementati grazie a fluorofori o proteine fluorescenti che possano essere ‘accese’ o ‘spente’ all’occorrenza (e per questo dette in inglese ‘photoswitchable’) tramite l’utilizzo di un ulteriore laser oltre quello di eccitazione. Con queste tecniche, come STORM e PALM, viene raggiunta una risoluzione confrontabile con quella ottenuta tramite STED o metodi simili (Hess et al., 2006; Rust et al., 2006).

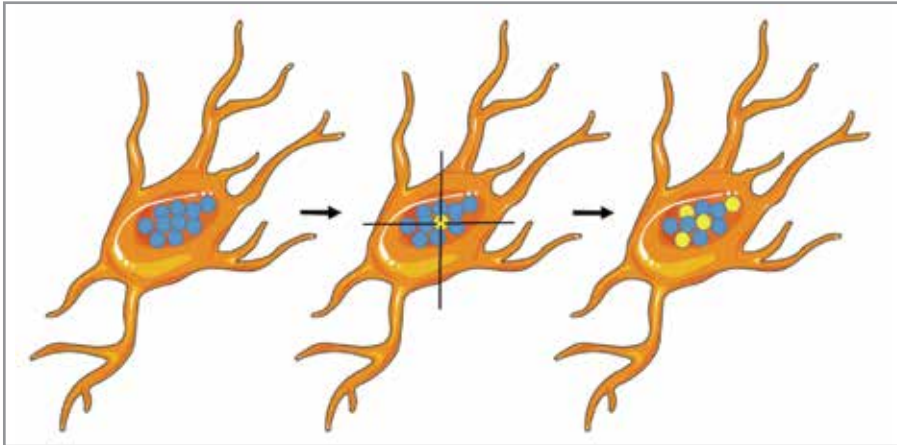
In Figura 6 è mostrato in modo schematico come funzionano generalmente questi metodi. Un campione biologico, in questo caso una cellula, in cui è presente un fluoroforo ‘photoswitchable’, è inizialmente in una condizione in



5. (a) Schema di un sistema di microscopia ottica STED.
 (b) Effetti del pattern di luce pulsata emessa dal laser per la deplezione sulla risoluzione.

cui tutti i fluorofori presenti si trovano in uno stato spento, in cui quindi non fluorescono. Illuminando il fluoroforo o la proteina fluorescente con luce ad una precisa lunghezza d'onda, si ottiene che alcune molecole ritornino in uno stato 'acceso' (in un processo che sarà stocastico) e quindi si potrà nuovamente eccitarle con una luce ad una lunghezza d'onda appropriata al loro spettro di eccitazione. I fluorofori che erano stati portati in uno stato 'acceso' verranno poi 'spenti' nuovamente, con metodi diversi a seconda della tecnica che si sta utilizzando. Ripetendo questo procedimento molte volte, si avrà un gran numero di immagini in cui si sono visualizzate solo poche molecole per volta. Utilizzando metodi matematici sarà quindi possibile ricostruire con estrema precisione la posizione di queste poche molecole, evitando il fattore confondente dovuto all'emissione di luce da parte di tanti fluorofori allo stesso tempo che si ottiene in un'immagine di microscopia confocale convenzionale. Combinando poi il set di immagini ottenuto, che aveva originariamente una risoluzione limitata dalla diffrazione, si otterrà quindi un'immagine che supera tali limiti.

In questo caso i limiti riguardano principalmente la necessità di utilizzare fluorofori che possano essere accesi e spenti e di ottenere un gran numero di immagini che vanno combinate assieme e, non ultimo, l'applicazione di metodi di calcolo e algoritmi sofisticati per l'analisi dei dati ottenuti.



6. Rappresentazione schematica di un esperimento di microscopia di super-risoluzione basato sui metodi di localizzazione, come STORM e PALM.

Per confermare ulteriormente, se ce ne fosse bisogno, l'impatto di queste tecniche sulla scienza moderna, nel 2014 è stato conferito a Stefan Hell, Eric Betzig e William Moerner il premio Nobel per la chimica per lo sviluppo delle tecnologie per la microscopia ottica a fluorescenza a super-risoluzione. Più di recente, lo stesso Stefan Hell ha introdotto un nuovo metodo, chiamato MINFLUX, prima sviluppato su microscopi 'homemade' (Balzarotti et al., 2017) e ora invece provato anche in microscopi a fluorescenza standard, che permette di colmare il limite tra i metodi di super-risoluzione descritti fino a questo momento (20-30nm) e le dimensioni delle singole molecole di interesse biologico (1-3nm) (Schmidt et al., 2021).

Per vedere come questo impatterà sulla ricerca biologica di base e sulla ricerca biomedica dovremo aspettare ancora qualche anno, ma certamente il salto di qualità è davvero straordinario.

Conclusioni

Le modalità di utilizzo della microscopia di fluorescenza descritte in questo articolo si basano sulla misurazione, pixel per pixel, dell'intensità di fluorescenza emessa da un fluoroforo presente in una struttura di interesse, localizzata in una cellula o in un tessuto. La risoluzione ottenuta dipende dal microscopio utilizzato e dalle caratteristiche fisiche del fluoroforo che è oggetto di studio.

L'informazione ottenuta permette di ricostruire la forma e/o le dimensioni (nei limiti imposti dal metodo utilizzato in termini di risoluzione) oppure la quantità di una certa proteina o molecola presenti nel sistema (a patto di poter effettuare una calibrazione), oppure ancora le variazioni di un certo parametro, come il pH. Volendo confrontare due (o più) condizioni fisiologiche o patologiche, è necessario quindi quantificare l'intensità della fluorescenza del nostro fluoroforo per quantificare eventuali differenze. Questo richiede l'utilizzo di software e algoritmi sviluppati per tenere conto di eventuali artefatti e del rumore di fondo, e per quantificare la fluorescenza in maniera appropriata. Sebbene esistano anche altri metodi per sfruttare la microscopia in fluorescenza per capire quello che sta accadendo in un sistema biologico e che si basano sullo studio della fluorescenza in funzione del tempo per studiare la dinamica di proteine o molecole, i principi e i metodi descritti in questo articolo sono una buona base di partenza per la comprensione di come questa tecnica sia fondamentale nelle scienze biologiche e biomediche.

Bibliografia

- Balzarotti F., et al., 2017 *Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes* "Science", 355, 6325, pp 606
- Berning S., et al., 2012, *Nanoscopy in a Living Mouse Brain*, "Science" 335, 6068, pp 551
- Chojnacki J., et al., 2012 *Maturation-Dependent HIV-1 Surface Protein Redistribution Revealed by Fluorescence Nanoscopy*, "Science" 338, 6106, pp 524
- Giepmans B. N., et al., 2006, *The fluorescent toolbox for assessing protein location and function* "Science" 312, 5771, pp 217
- Göttfert F., et al., 2013, *Coaligned dual-channel STED nanoscopy and molecular diffusion analysis at 20 nm resolution*, "Biophysical Journal" 105, 1, pp L01
- Hell S. W. and Wichmann J., 1994, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*, "Optics Letters" 19, 11, pp 780
- Hess S. T., et al., 2006, *Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy*, "Biophysical Journal" 91, 11, pp 4258
- Hofmann M., et al., 2005, *Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins* "Proceedings of the National Academy of Sciences." USA 102, 49, pp 17565
- Klar T. A. and Hell S. W., 1999, *Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy*, "Optics Letters" 24, 14, pp 954
- Lakowicz J. R., 2006 *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Nature
- Rust M. J., et al., 2006, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*, "Nature Methods" 3, pp 793

- Schmidt R., et al., 2021, *MINFLUX nanometer-scale 3D imaging and microsecond-range tracking on a common fluorescence microscope*, "Nature Communication, 12, 1478
- Sheppard C. J. R., 2002, *Confocal and Two-Photon Microscopy: Foundations, Applications, and Advances, Chapter 1: The Generalized microscope*, Wiley-Liss
- Silverthorn D. U., 2018, *Human Physiology: An Integrated Approach*, Pearson College Div
- Yang F., et al., 1996, *The molecular structure of green fluorescent protein* "Nature Biotechnology" 14, 10, pp 1246