

POLITECNICO DI MILANO

FACOLTÀ DI INGEGNERIA DEI SISTEMI
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Fisica

**Studio delle dinamiche del Calcio
nell'*Arabidopsis thaliana*
con microscopia SPIM**

Relatore:
Dott. Andrea Bassi

Presentata da:
Lucia Ferrario
matr. 754752

Anno Accademico 2012/2013

Indice

1	Föster Resonant Energy Transfer (FRET)	4
1.1	Principi di fluorescenza	4
1.2	Fluorofori	9
1.3	Tecniche FRET	13
1.4	Misura del Ca^{2+} con FRET	18
1.4.1	Sensori	18
1.4.2	Studi di FRET sul Ca^{2+}	19
2	Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM)	22
2.1	Principio di funzionamento	23
2.2	Confronto con la microscopia confocale	26
2.2.1	Cenni di microscopia confocale	26
2.2.2	Tecniche a confronto	27
2.3	Nuove metodologie di SPIM	29
3	Setup	31
3.1	Sistema di acquisizione	31
3.1.1	Linea di illuminazione di SPIM	32
3.1.2	Linea di illuminazione secondaria	33
3.1.3	Linea di raccolta	34
3.1.4	Portacampione	36
3.2	Software di acquisizione	37
3.3	Preparazione del campione	39
3.4	Messa a punto del setup	41
3.4.1	Ottimizzazione del foglietto	41
3.4.2	Allineamento linea di raccolta	42
3.5	Caratterizzazione del sistema	43
3.5.1	Fattore di conversione pixel-micron	43
3.5.2	Calcolo della Point Spread Function	45
3.6	Correzione delle distorsioni	47

4	Misure e Risultati	50
4.1	Qualità dell'immagine	51
4.2	Risposta di FRET	53
4.2.1	Analisi bidimensionale	53
4.2.2	Analisi tridimensionale	60
4.3	Possibili sviluppi	63
5	Conclusioni	65
	Bibliografia	67

Introduzione

Negli ultimi cinquant'anni, lo studio delle dinamiche della concentrazione intracellulare del Ca^{2+} é aumentato in modo esponenziale, diventando un ambito di ricerca fondamentale della biologia [27]. Infatti, il segnale del Ca^{2+} risulta piú importante rispetto a quello di altre molecole di segnalazione. Per comprendere il ruolo di questi segnali nella fisiopatologia delle cellule, é però necessario avere la possibilità di monitorarne, *in vivo*, gli andamenti temporali [30]. Risulta necessaria inoltre una buona risoluzione spaziale che permetta di distinguere i vari compartimenti all'interno della cellula. Infatti, la concentrazione del Ca^{2+} libero all'interno della cellula non é per niente uniforme: questa passa da valori dell'ordine del micromolare ($10^{-6}M$) nel reticolo endoplasmatico a valori attorno al nanomolare ($10^{-9}M$) nel citoplasma. La concentrazione di Ca^{2+} all'interno dei vari compartimenti può cambiare in risposta a determinati stimoli: questa variazione avviene con un caratteristico profilo spazio-temporale che risulta fondamentale nella comprensione del suo significato.

Date le richieste di risoluzione sia spaziale che temporale che questo tipo di studio richiede, risulta facile capire come la comprensione dei segnali del Ca^{2+} sia fortemente dipendente dallo sviluppo di nuove tecnologie in grado di fornire il supporto adeguato a questo tipo di studi. Una tecnica che é risultata particolarmente adatta a questi scopi é la SPIM (Selective Plane Illumination Microscopy), sviluppata dal gruppo guidato da Ernest H. K. Stelzer [19]. Il suo grande vantaggio infatti é quello di permettere studi *in vivo* senza danneggiare il campione.

Dal punto di vista biologico, risulta di fondamentale importanza la presenza di meccanismi che permettano di rilevare tali dinamiche in modo non invasivo. A tale scopo sono stati sviluppati dei sensori florescenti in grado di creare legami reversibili col Ca^{2+} . Questi sono inoltre stati funzionalizzati in modo che siano in grado di variare la propria emissione di fluorescenza a seconda della presenza o meno del legame col Ca^{2+} . In questo modo quando la concentrazione di Calcio aumenta e i sensori creano i legami e si osserva una variazione nell'emissione di fluorescenza che

rispecchia, quindi, la dinamica seguita dal Calcio. Un sensore particolarmente adatto per lo studio di queste dinamiche é il camaleon [27]. Da questo si possono ottenere informazioni monitorando la sua emissione di fluorescenza relativa a due diverse lunghezze d'onda secondo il principio della FRET (Fluorescence Resonant Energy Transfer).

In questo lavoro abbiamo perciò deciso di utilizzare la SPIM per studiare le dinamiche del Ca^{2+} in campioni marcati con il camaleon. Come campione abbiamo scelto la radice dell'*Arabidopsis thaliana* che, grazie alla sua sua semitrasparenza, ben si adatta alla tecnica scelta [30].

Nel primo capitolo innanzitutto introdurremo i concetti basilari della fluorescenza, mettendo in evidenza le caratteristiche di emissione e le proprietà principali delle molecole interessate da fluorescenza, ossia i fluorofori. Successivamente ci concentreremo sulla FRET, il meccanismo fisico che abbiamo sfruttato nei nostri esperimenti, e sui diversi tipi di sensori che sono in grado di mostrare le dinamiche del Ca^{2+} .

Nel secondo capitolo introdurremo la microscopia di fluorescenza per spiegare come é possibile selezionare la luce di fluorescenza emessa da un particolare fluoroforo. Vedremo in particolare la microscopia SPIM e andremo a descriverla nel dettaglio: partiremo dal principio di funzionamento e vedremo come questa tecnica risulti poco invasiva, quali sono i vantaggi e gli svantaggi che offre e come é possibile migliorarla. Faremo anche un confronto con un'altra microscopia di fluorescenza: la microscopia confocale (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy), mettendo in evidenza pregi e difetti di ognuna.

Nel terzo capitolo descriveremo il sistema che abbiamo effettivamente costruito spiegando quali componenti abbiamo utilizzato e le motivazioni che hanno guidato le nostre scelte. In particolare spiegheremo come siamo riusciti a ottenere il foglietto di luce tipico della SPIM e a ottimizzarlo. Inoltre descriveremo come é stato possibile separare l'emissione di fluorescenza di due fluorofori distinti e come siamo riusciti ad acquisire entrambe le emissioni con una sola telecamera.

Nel quarto capitolo esporremo i risultati che abbiamo ottenuto; vedremo la qualità delle immagini che siamo riusciti a ottenere e le dinamiche del Ca^{2+} in risposta agli stimoli che abbiamo osservato. Metteremo quindi a confronto queste risposte sia rispetto agli stimoli dati sia alle diverse linee transgeniche che abbiamo utilizzato. Infine metteremo in evidenza alcuni miglioramenti che potrebbero essere apportati al sistema per ovviare ai problemi riscontrati e indicheremo in che modo gli studi sulle dinamiche del Ca^{2+} potrebbero essere proseguiti.

Infine, trarremo le conclusioni dal lavoro svolto e indicheremo altre possibili studi che potrebbero essere condotti grazie al setup di SPIM da

noi implementato.

Capitolo 1

Föster Resonant Energy Transfer (FRET)

1.1 Principi di fluorescenza

La fluorescenza é un fenomeno che fa parte di una piú vasta famiglia di processi: la luminescenza. Questa consiste nell'emissione di luce da parte di una sostanza con stati elettronici eccitati creati da meccanismi fisici (come assorbimento di luce), meccanici (per sfregamento) o chimici.

La generazione di luminescenza per assorbimento di fotoni é detta fotoluminescenza, che, formalmente, si divide in *fluorescenza* e *fosforescenza* a seconda della configurazione elettronica dello stato eccitato e del cammino di emissione [5]. Si parla di *fluorescenza* quando l'emissione avviene da uno stato di singoletto, cioè quando l'elettrone nello stato eccitato e quello nel ground state hanno spin opposto. La transizione di diseccitazione é dunque permessa, col risultato che si ha l'emissione di un fotone nel giro di circa $10^{-9}s$. Il fotone emesso, come vedremo, avrà un'energia minore di quella del fotone assorbito e perciò una lunghezza d'onda maggiore. Si parla invece di *fosforescenza* quando l'emissione avviene da uno stato di tripletto, cioè quando l'elettrone nello stato eccitato e quello nel ground state hanno spin con stesso orientamento. La transizione di diseccitazione é quindi vietata per le regole di simmetria e perciò i tempi di vita sono maggiori, tipicamente tra 10^{-3} e 10^0s .

Il processo di assorbimento risulta molto rapido, nell'ordine dei $10^{-15}s$. Di conseguenza lo spettro di assorbimento di una molecola fluorescente, detta fluoroforo, può essere modificato soltanto dalle molecole adiacenti allo stesso; in poche parole lo spettro di assorbimento non é sensibile alla dinamica molecolare. Al contrario l'emissione avviene su un periodo di

tempo piú lungo e nel tempo in cui le molecole rimangono nello stato eccitato possono interagire con altre molecole nella soluzione.

Le informazioni sull'assorbimento e sull'emissione di fluorescenza sono solitamente rappresentate attraverso dei grafici di intensità della luce rispetto alla lunghezza d'onda (nm) o al numero d'onda (cm^{-1}). Questi sono detti rispettivamente *spettro di assorbimento* e *spettro di emissione*. In figura 1.1 se ne possono vedere due esempi.

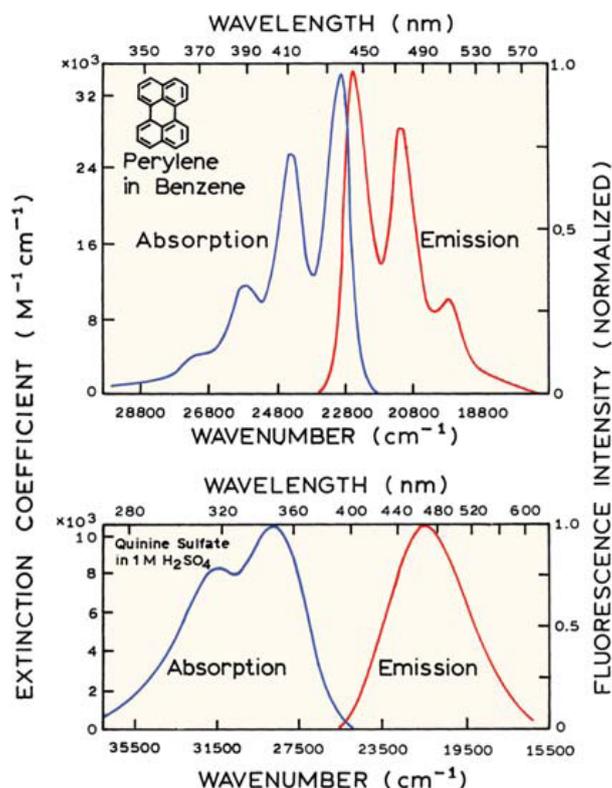


Figura 1.1: Spettri di assorbimento e di emissione di fluorescenza del perilene sopra e della quinina sotto [21]

I vari livelli energetici e i processi coinvolti nell'assorbimento e nell'emissione di luce da parte di un fluoroforo, sono solitamente illustrati attraverso il diagramma di Jablonski (fig. 1.2). Il ground state e i primi due stati eccitati sono denominati rispettivamente S_0 , S_1 e S_2 . Per ognuno di questi stati elettronici, il fluoroforo può esistere in uno svariato numero di livelli vibrazionali indicati con 0, 1, 2... Le transizioni tra i vari livelli energetici sono rappresentate con delle frecce verticali per mostrare la natura istantanea dell'assorbimento di luce [8].

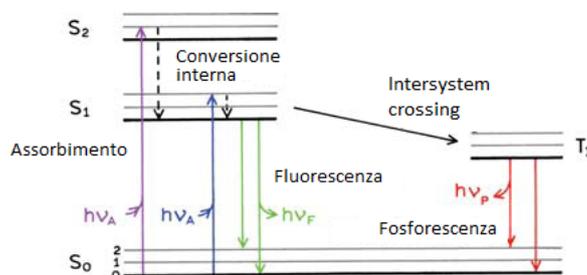


Figura 1.2: Esempio di diagramma di Jablonski che riporta schematicamente i livelli energetici e le transizioni possibili

Queste transizioni avvengono infatti nell'ordine dei $10^{-12}s$, un tempo troppo corto affinché i nuclei si possano spostare in modo rilevante. Questo è il *principio di Franck-Condon*. Dopo l'assorbimento di un fotone, il fluoroforo, oltre a trovarsi in uno stato elettronico eccitato (S_1 o S_2), solitamente si trova anche in un livello vibrazionale eccitato di quello stato. A parte qualche rara eccezione, le molecole in fase condensata passano velocemente al livello vibrazionale più basso di quello stato. Questo processo è detto *conversione interna* e di solito avviene in un tempo nell'ordine di $10^{-12}s$ o anche meno. Dato che il tempo che intercorre prima che avvenga la fluorescenza è tipicamente attorno ai $10^{-8}s$, la conversione interna è in genere si conclude prima che avvenga l'emissione. Quindi l'emissione di fluorescenza risulta avere inizio dallo stato eccitato all'equilibrio termico, cioè dal livello vibrazionale di S_1 con energia minore. A questo punto possono verificarsi diversi processi.

L'emissione può avvenire verso stati vibrazionali eccitati di S_0 : in questo caso si avrà poi una rapida termalizzazione ($10^{-12}s$).

Le molecole nello stato S_1 possono anche andare incontro a conversione di spin verso il primo stato di tripletto T_1 . Questa conversione è chiamata *intersystem crossing*. L'emissione da T_1 verso S_0 è detta *fosforescenza* ed è generalmente spostata verso lunghezze d'onda maggiori rispetto alla fluorescenza. La transizione dallo stato di tripletto al ground state, che è di singoletto, non è permessa per le regole di simmetria e quindi i tassi di emissione sono molto ridotti rispetto a quelli della fluorescenza.

Il fenomeno della fluorescenza presenta alcune caratteristiche tipiche, come descritto in [21].

Guardando attentamente il diagramma di Jablonski (1.2) si può notare infatti come l'energia di emissione sia tipicamente minore di quella di assorbimento, ovvero come la fluorescenza avvenga a lunghezze d'onda

maggiori rispetto a quelle di eccitazione. Si tratta del cosiddetto *spostamento di Stokes*. Alla base di questo fenomeno c'è innanzitutto il rapido decadimento verso il più basso livello vibrazionale di S_1 che avviene in modo non radiativo. In secondo luogo si osserva che i fluorofori generalmente decadono su un livello vibrazionale eccitato di S_0 e non sul livello più basso, il che significa che parte dell'energia totale disponibile resta alla molecola e viene poi dissipata nel processo di termalizzazione del ground state. Infine effetti di solventi, reazioni dello stato eccitato e trasferimenti di energia possono provocare un'ulteriore spostamento di Stokes.

Un'altra proprietà generale della fluorescenza è l'indipendenza dello spettro di emissione dalla lunghezza d'onda usata per l'eccitazione, la cosiddetta *regola di Kasha*. Infatti, anche eccitando un fluoroforo a livelli elettronici e vibrazionali più elevati, si ha una rapida dissipazione di energia che riporta il fluoroforo nello stato vibrazionale più basso di S_1 . Questo rilassamento avviene nell'ordine dei $10^{-12}s$ ed è presumibilmente il risultato di una forte sovrapposizione di numerosi stati con all'incirca la stessa energia. La lunghezza d'onda di emissione risulta quindi solitamente indipendente da quella di eccitazione. Ci sono però delle eccezioni: alcuni fluorofori, infatti, possono esistere in due stati di ionizzazione diversi, che presentano spettri di assorbimento e di emissione differenti. Altra eccezione è rappresentata da alcune molecole che emettono dal livello S_2 , ma questa emissione è rara e generalmente non osservata nelle molecole biologiche.

Altra caratteristica tipica della fluorescenza è la simmetria tra spettro di emissione e di assorbimento; questa è detta *regola dell'immagine speculare*. Per la maggior parte dei fluorofori questo è vero solo per quanto riguarda le transizioni $S_0 \rightarrow S_1$ in assorbimento, ciò significa che l'emissione risulta essere l'immagine speculare dell'assorbimento $S_0 \rightarrow S_1$, e non di tutto lo spettro di assorbimento. Questa simmetria è legata al fatto che le stesse transizioni sono coinvolte sia in assorbimento che in emissione e i livelli di vibrazionali di S_0 e S_1 sono energeticamente simili. Nella maggior parte dei fluorofori, infatti, questi livelli di energia non sono alterati significativamente dalle diverse distribuzioni elettroniche di S_0 e S_1 . Si supponga che lo spettro di assorbimento di un fluoroforo mostri picchi distinti dovuti ai livelli di energia vibrazionale; questi picchi saranno dovuti a transizioni dal più basso dei livelli vibrazionali di S_0 verso livelli vibrazionali elevati dello stato S_1 . Tornando al ground state il fluoroforo potrà raggiungere uno qualsiasi dei livelli vibrazionali. Questi livelli però hanno una spaziatura simile a quelli dello stato S_1 e quindi lo spettro di emissione mostrerà la stessa spaziatura dei livelli vibrazionali dello spettro di assorbimento. Inoltre, in accordo col principio di Franck-Condon, tutte le

transizioni elettroniche sono verticali, cioè avvengono senza spostamento dei nuclei. Di conseguenza se una particolare transizione tra i livelli vibrazionali 0 e 1 è la più probabile in assorbimento, allora la transizione inversa sarà la più probabile anche in emissione.

Tra le caratteristiche più importanti di un fluoroforo si trovano sicuramente la resa quantica (quantum yield) e il tempo di vita. La resa quantica è il numero di volte che viene emesso un fotone per ogni fotone assorbito dal fluoroforo. Il tempo di vita dello stato eccitato è definito come il tempo medio per cui le molecole rimangono nello stato eccitato prima di ritornare al ground state. Il tempo di vita determina perciò il tempo a disposizione del fluoroforo per interagire con l'ambiente o diffondere, e quindi l'informazione disponibile dalla sua emissione. Il significato della resa quantica e del tempo di vita sono ben rappresentati nel diagramma di Jablonski semplificato di figura 1.3.

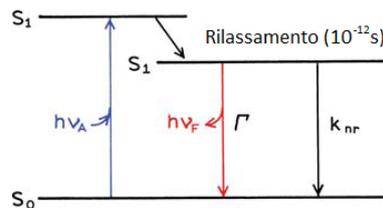


Figura 1.3: Diagramma di Jablonski semplificato che mostra il significato di resa quantica e tempo di vita

Tra il livello più basso dello stato S_1 e S_0 il decadimento può avvenire essenzialmente in modo radiativo o non radiativo. Nel primo caso si parla di *tasso di emissione radiativa* del fluoroforo (Γ), nel secondo di *tasso di emissione non radiativa* (k_{nr}). La resa quantica di fluorescenza Q è data quindi da

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.1)$$

Il tempo di vita dello stato eccitato generalmente è dell'ordine dei $10ns$. Facendo riferimento alla figura 1.3 si può calcolare il tempo di vita come

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.2)$$

Se non sono presenti decadimenti non radiativi, si parla di *tempo di vita intrinseco* che è definito come

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma} \quad (1.3)$$

La fluorescenza tipicamente segue una cinetica del primo ordine, perciò l'andamento della concentrazione delle molecole nello stato eccitato S_1 é di tipo esponenziale:

$$[S_1] = [S_1]_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (1.4)$$

dove $[S_1]$ é la concentrazione di molecole nello stato eccitato al tempo t e $[S_1]_0$ é la concentrazione iniziale.

Bisogna poi sottolineare che i fluorofori possono essere piú facilmente eccitati se il loro momento di transizione é parallelo al vettore elettrico del fotone. Mandando quindi in eccitazione una radiazione polarizzata si puó ottenere un'eccitazione selettiva dei fluorofori. L'emissione dipenderá anch'essa dalla direzione del momento di transizione del fluoroforo che, a sua volta, dipende dall'orientamento fisico della molecola stessa nello spazio. In linea teorica si ottiene quindi un'emissione completamente polarizzata. Nel tempo che intercorre tra eccitazione ed emissione, però, il fluoroforo puó interagire con l'ambiente circostante e andare incontro a rotazioni. La polarizzazione dell'emissione risulta perciò solo parziale. Quantitativamente si puó definire l'*anisotropia di fluorescenza* come

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1.5)$$

dove I_{\parallel} e I_{\perp} sono le intensità di fluorescenza rispettivamente dell'emissione parallela e perpendicolare alla direzione di polarizzazione della luce in eccitazione. Misure di anisotropia possono essere usate per investigare quanto una molecola fluorescente puó muoversi liberamente in un particolare ambiente.

L'intensità della fluorescenza puó essere diminuita da una grande varietà di processi. Queste perdite di intensità sono definite come *quenching* e sono il risultato di diversi meccanismi. Il quenching collisionale avviene quando il fluoroforo, nello stato eccitato, entra in contatto con altre molecole nella soluzione che lo disattivano. Durante questo processo non si ha alcun tipo di alterazione chimica. Altro processo competitivo é la formazione di complessi non fluorescenti con altre molecole in soluzione e l'attenuazione della luce incidente da parte del fluoroforo stesso o di altre specie assorbenti.

1.2 Fluorofori

I fluorofori (o fluorocromi) sono composti chimici fluorescenti che sono in grado di riemettere luce dopo essere stati eccitati da fotoni di energia

maggiore. Tipicamente contengono diversi gruppi aromatici combinati, cioè molecole piane o cicliche formate da numerosi legami π , come descritto in [21]. A volte i fluorofori vengono usati da soli come traccianti nei fluidi, come coloranti per marcare determinate strutture, come substrati di enzimi o come sensori, quando la loro fluorescenza è influenzata dall'ambiente (per esempio polarità o ioni). Più in generale i fluorofori sono legati covalentemente a macromolecole e vengono usati come marcatori per reagenti bioattivi come anticorpi, peptidi e acidi nucleici. I fluorofori sono ampiamente usati per colorare tessuti, cellule o materiali per metodi di analisi come l'imaging fluorescente e la spettroscopia. Per questi scopi sono stati appositamente creati, tramite modificazione genetica, particolari fluorofori per rispondere alle necessità di specifici studi. Per esempio dalla GFP (Green Fluorescence Protein), che è una proteina che emette nel verde, sono state create diverse varianti come la CFP (Cyan Fluorescence Protein) e la YFP (Yellow Fluorescence Protein) che emettono rispettivamente nel blu e nel giallo.

Le principali caratteristiche di un fluoroforo sono cinque e da queste dipendono tutte le altre.

Spettro di assorbimento e di emissione Ogni fluoroforo presenta un proprio *spettro di assorbimento* e un proprio *spettro di emissione*. Questi rappresentano l'intensità relativa al variare della lunghezza d'onda. Lo spettro di assorbimento presenta una banda che può essere molto stretta o larga a seconda del fluoroforo. All'interno di questo intervallo la lunghezza d'onda che massimizza l'intensità assorbita è detta di massima eccitazione. Lo spettro di emissione invece presenta solitamente una banda molto più stretta e traslata verso lunghezze d'onda maggiori, ovvero verso energie minori. La lunghezza d'onda all'interno di questo intervallo che massimizza l'intensità emessa è detta di massima emissione. Queste due lunghezze d'onda tipiche sono i parametri solitamente usati per identificare un dato fluoroforo.

Spostamento di Stokes La differenza tra le lunghezze d'onda caratteristiche dello spettro di assorbimento e dello spettro di emissione è il cosiddetto *spostamento di Stokes*, ovvero la quantità di energia che viene persa nel processo ipotizzando condizioni di massima intensità sia in eccitazione che in emissione. È importante notare come i due spettri si sovrappongano verso la fine dell'assorbimento e l'inizio della curva di emissione.

Coefficiente di estinzione L'efficienza con cui un fluoroforo assorbe la luce di eccitazione é detta *coefficiente di estinzione*. Questo parametro collega la quantità di luce assorbita di una certa lunghezza d'onda con la concentrazione del fluoroforo in una soluzione (si esprime in $Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$). Più grande é il coefficiente di estinzione e maggiori saranno le probabilità che la luce venga assorbita a una particolare lunghezza d'onda.

Tempo di vita Il *tempo di vita* indica tempo medio durante il quale il fluoroforo resta nello stato eccitato prima di ritornare nel suo ground state. Questo solitamente é dell'ordine dei $10^{-12}s$.

Resa quantica L'efficienza con cui la luce assorbita si trasforma in luce di fluorescenza é detta *resa quantica* (quantum yield). Questa equivale al numero di fotoni emessi per ogni fotone assorbito. Quantum yield minori di uno rispecchiano la perdita di energia attraverso forme di emissione non radiative come ad esempio il calore e le reazioni fotochimiche.

Altri fattori andrebbero considerati, come per esempio la polarità del fluoroforo, la sua dimensione, la sua forma, ma anche l'ambiente in cui si trova etc, basti pensare alle reazioni chimiche a cui può andare incontro quando si trova nello stato eccitato, ai legami che può formare e alle rotazioni che possono avvenire. Tutte queste cose influiscono direttamente sull'informazione che la luce emessa porta con sé. Ci sono specifiche condizioni che possono compromettere la riemissione di luce da parte del fluoroforo riducendo così l'intensità della fluorescenza. Questa riduzione, detta fading, raccoglie due fenomeni: il photobleaching e il quenching. I due fenomeni si distinguono per il fatto che il quenching é spesso reversibile mentre il photobleaching non lo é.

Per photobleaching si intende la decomposizione irreversibile delle molecole fluorescenti nello stato eccitato a causa della loro interazione con altre molecole, quali ad esempio l'ossigeno, prima del processo di emissione [29]. Il fluoroforo, cioè, subisce reazioni fotochimiche per cui perde la sua capacità di fluorescere. Dopo una transizione tra stato eccitato di singoletto a uno stato eccitato di tripletto (come possono essere S_1 e T_1), i fluorofori possono interagire con altre molecole che producono modifiche irreversibili ai legami covalenti. Lo stato di tripletto ha un tempo di vita relativamente lungo rispetto allo stato di singoletto, dando un tempo maggiore ai fluorofori di interagire chimicamente con le molecole nell'ambiente. Il numero medio di eccitazioni ed emissioni che avvengono prima che si verifichi il photobleaching per un particolare fluoroforo dipende

fortemente dalla sua struttura molecolare (reattività chimica), dall'ambiente chimico intracellulare, dall'intensità e la lunghezza d'onda della luce di eccitazione. Alcuni fluorofori vanno incontro al bleaching velocemente, mentre altri possono subire migliaia o milioni di cicli prima di incorrere in esso. In alcuni casi, il campione può riprendersi dagli effetti di photobleaching, soprattutto se viene mantenuto a bassa temperatura e in un ambiente buio. Con ragionevole approssimazione si può dire che un fluoroforo sarà distrutto dopo un'esposizione costante in quanto, in un ambiente costante, ogni ciclo di assorbimento ed emissione ha la stessa probabilità di causare il photobleaching. Il photobleaching può essere ridotto abbassando i tempi di esposizione o riducendo l'energia di eccitazione [32]; per questo scopo possono essere inseriti nel percorso della luce dei filtri a densità neutra diminuendo così l'intensità della luce stessa. Tuttavia questi accorgimenti causano la riduzione dell'intensità della luce di fluorescenza. Il fenomeno di fading può anche essere ridotto, in alcuni casi, utilizzando specifiche sostanze antifade, modificando la concentrazione del pH dell'ambiente chimico, aumentando la concentrazione del fluorocromo o utilizzando fluorocromi più appropriati e meno suscettibili al photobleaching.

Un tecnica molto utile per indagare la diffusione e il movimento delle macromolecole biologiche è la FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), una tecnica che si basa sul recupero della fluorescenza dopo il photobleaching [31]. Il meccanismo prevede di far avvenire volutamente il bleaching in una regione ben definita del campione esponendola ad un'intensa luce laser. Successivamente si osserva il recupero della fluorescenza nell'area interessata che avviene grazie alla diffusione di fluorofori dalle zone adiacenti, e se ne studiano tassi e dinamiche. Una tecnica correlata è la FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching), ovvero la perdita di fluorescenza in photobleaching. Questa viene utilizzata per monitorare la diminuzione della fluorescenza in una regione adiacente a quella dove si è verificato il photobleaching e risulta molto utile per lo studio della mobilità molecolare e nelle dinamiche delle cellule viventi [29].

Anche attraverso il quenching si ha una riduzione dell'intensità di fluorescenza; ciò è dovuto a processi concorrenti come la temperatura, alte concentrazioni di ossigeno, e l'aggregazione molecolare in presenza di sali o composti alogeni. Un esempio comune di quenching è quello collisionale: quando un fluorocromo nello stato eccitato urta contro un'altra molecola in soluzione (non fluorescente) si ha la disattivazione del fluorocromo e il ritorno allo stato fondamentale. In gran parte dei casi, nessuna delle molecole viene chimicamente modificata durante questo processo. La maggior parte dei processi di quenching intervengono riducendo la

durata dello stato eccitato e la resa quantica del fluoroforo. A volte il quenching é il risultato di trasferimento di energia ad altre molecole accettori che risiedono fisicamente vicino al fluoroforo eccitato, ovvero si ha il trasferimento risonante di energia (RET). Questo particolare fenomeno é alla base per una tecnica piú recente che permette di misurare distanze molto al di sotto della risoluzione laterale del microscopio ottico.

1.3 Tecniche FRET

Uno dei processi che possono ridurre l'intensità di fluorescenza dei fluorofori é la FRET, Förster Resonant Energy Transfer, ovvero il trasferimento risonante di energia. In questo processo infatti, un fluoroforo nello stato eccitato, detto *donore*, trasferisce la sua energia di eccitazione a una molecola vicina, detta *accettore* [21]. Affinché questo processo possa avvenire lo spettro di emissione del donore deve essere in parte sovrapposto allo spettro di eccitazione dell'accettore. Inoltre le due molecole devono trovarsi a distanza ravvicinata e solo allora il donore potrà trasferire la sua energia di eccitazione all'accettore attraverso un accoppiamento dipolo-dipolo intermolecolare. É importante sottolineare come questo processo avvenga in modo non radiativo: il donore non emette un fotone che viene poi assorbito dall'accettore in quanto l'esistenza del fotone é vietata dalle regole di conservazione dell'energia e della quantità di moto. Come evidenziato in [28], il tasso di energia trasferita dipende dai seguenti fattori:

- grado di sovrapposizione tra lo spettro di emissione del donore e quello di assorbimento dell'accettore
- la resa quantica del donore
- l'orientazione relativa dei dipoli di donore e accettore
- la distanza tra il donore e l'accettore.

La dipendenza della FRET dalla distanza permette di misurare la distanza tra donore e accettore. Il processo può avvenire in presenza di qualsiasi molecola accettore, ma, nel caso in cui questa sia un fluoroforo, tornerà al ground state emettendo un fotone, rilasciando così l'energia ricevuta sotto forma di luce di fluorescenza. Nel diagramma di Jablonski 1.4 viene illustrato in maniera semplificata il processo. Qui il donore (D) é rappresentato a sinistra mentre l'accettore (A) a destra. Gli stati eccitati di entrambi i fluorofori sono distinti da un asterisco. Se i due sono lontani e viene eccitato

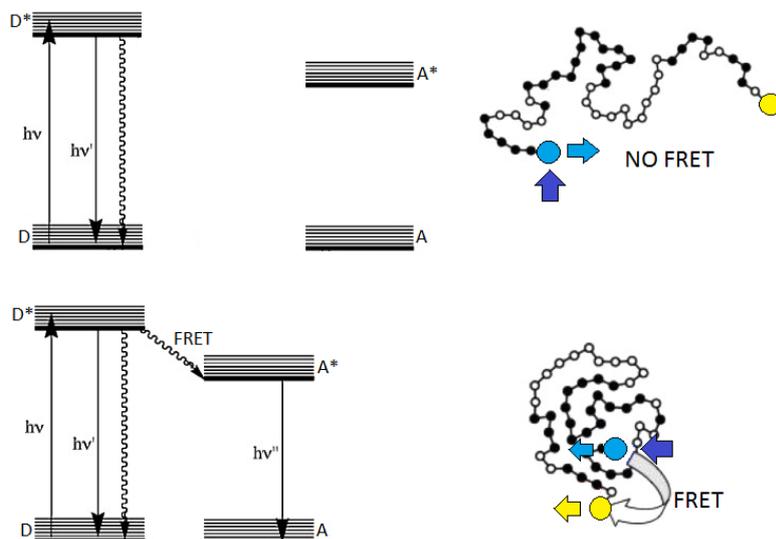


Figura 1.4: Diagramma di Jablonski e visualizzazione pittoristica di due fluorofori in alto in assenza di FRET, in basso in presenza di FRET

il donore ($h\nu$), questo va nello stato eccitato dove perde la sua energia attraverso la fluorescenza ($h\nu'$) o altri meccanismi descritti in precedenza. Se invece i due fluorofori sono abbastanza vicini allora il donore può trasferire l'energia all'accettore che si ritroverà quindi nello stato eccitato da cui potrà emettere luce di fluorescenza ($h\nu''$).

La distanza di Förster R_0 è definita come il raggio di separazione tra donore e accettore per cui si ha un'efficienza di FRET (E) del 50% [6]. A questa distanza metà dell'energia di eccitazione del donore viene trasferita all'accettore attraverso la risonanza di energia, mentre l'altra metà viene dissipata attraverso tutti gli altri canali di diseccitazione possibili, tra cui anche l'emissione di fluorescenza. Tipicamente R_0 è compresa tra i 20 e i 60 Å.

Il tasso di energia trasferita dal donore all'accettore (k_T) è dato da

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (1.6)$$

dove τ_D è il tempo di vita del donore in assenza di trasferimento di energia, R_0 è la distanza di Förster, e r è la distanza tra il donore e l'accettore. Quindi il tasso di trasferimento è uguale al tasso di decadimento del donore ($1/\tau_D$) quando la distanza tra donore e accettore è uguale alla distanza di Förster R_0 e l'efficienza di trasferimento risulta del 50%. È importante sottolineare come il tasso di FRET dipenda fortemente dalla distanza in mo-

do proporzionale a r^{-6} [26]. Distanze di Förster comprese tra i 20 e i 90 Å sono ideali per lo studio di macromolecole. Queste distanze, infatti, sono comparabili sia con le dimensioni delle biomolecole sia con le distanze tra siti diversi sulla stessa proteina. Qualunque variazione di distanza tra donore e accettore causerá quindi la variazione dell'efficienza di FRET da cui é possibile quantificare lo spostamento avvenuto. Misurando il trasferimento di energia tra un donore e un accettore a una distanza fissa tra loro, é possibile calcolare tale distanza e ottenere informazioni strutturali sulle macromolecole.

La FRET inoltre può essere usata come indicatore di vicinanza: se é presente una sovrapposizione degli spettri adeguata, il trasferimento avviene appena donore e accettore si trovano alla caratteristica distanza di Förster. Il valore di R_0 può essere accuratamente predetto dalle proprietà degli spettri di donore e accettore, essendo il processo per gran parte indipendente dalla presenza di solventi o macromolecole. In linea di principio l'orientazione di donori e accettori può impedire il trasferimento di energia a distanze molto ravvicinate, ma questa é un'eventualità che in pratica può essere trascurata, soprattutto negli studi sulle biomolecole.

Al fine di comprendere i principi della FRET, si considera il caso semplificato di un singolo donore e di un singolo accettore separati da una distanza r . Data la complessità alla base di questa teoria, si riportano solo i risultati finali [21]. Il tasso di trasferimento di energia k_T , dopo complesse considerazioni quanto-meccaniche, risulta essere

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \cdot \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N_A n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1.7)$$

dove Q_D é la resa quantica del donore in assenza dell'accettore, N_A é il numero di Avogadro e n é l'indice di rifrazione del mezzo (solitamente 1.4 per molecole in soluzione acquosa). $F_D(\lambda)$ (adimensionale) é l'intensità di fluorescenza corretta del donore nel range di lunghezze d'onda tra λ e $\lambda + \Delta\lambda$ dove l'intensità totale é normalizzata a 1. $\varepsilon_A(\lambda)$ é il coefficiente di estinzione dell'accettore ($M^{-1}cm^{-1}$). Il termine κ^2 é il fattore che descrive l'orientazione relativa dei dipoli di transizione del donore e dell'accettore. Di solito si assume κ^2 pari a 2/3, che risulta essere appropriato come valore medio per un sistema dinamico in cui donore e accettore hanno orientazione casuale. L'integrale di sovrapposizione $J(\lambda)$ esprime il grado di sovrapposizione dello spettro di emissione del donore e dello spettro di assorbimento dell'accettore ed é definito come

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1.8)$$

Per comodit  si riscrive l'equazione 1.7 in funzione della distanza, e per il caso particolare in cui $r = R_0$ si ottiene che $k_t = 1/\tau^{-1}$, quindi

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)Q_D\kappa^2}{128\pi^5 N_A n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (1.9)$$

da cui si pu  ricavare la distanza di Föster a partire dalle propriet  del sistema. Dato che compaiono molte costanti fisiche si pu  riscrivere l'equazione pi  semplicemente come

$$R_0 = 0.211(Q_D\kappa^2 n^{-4} J(\lambda))^{\frac{1}{6}} \quad (1.10)$$

ricordandosi che $F_D(\lambda)$ va espresso in $M^{-1}cm^{-1}nm^4$, la lunghezza d'onda in nm , e che R_0 si ottiene in   . Una volta trovato R_0 il tasso di energia trasferita pu  essere facilmente calcolato grazie all'equazione 1.6. Se il tasso di trasferimento   maggiore del tasso di decadimento, cio  se il tempo di decadimento   maggiore del tempo tipico del processo di trasferimento di energia, allora la FRET sar  efficiente. Se avviene il contrario invece il processo risulta inefficiente. Si pu  definire quindi l'efficienza di FRET (E) come frazione dei fotoni assorbiti dal donore che vengono trasferiti all'accettore. Questo rapporto   dato da

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} \quad (1.11)$$

Ricordando l'equazione 1.6 si ottiene facilmente che

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (1.12)$$

Come si pu  vedere, l'efficienza di trasferimento   fortemente dipendente dalla distanza r tra donore e accettore quando questa   circa pari a R_0 , come risulta chiaro dall'andamento in figura 1.5. L'efficienza cresce rapidamente fino a 1 appena r scende sotto il valore di R_0 , mentre, per r maggiori di R_0 , E va velocemente a zero gi  per valori vicini a $2R_0$. Perci  non   pratico usare la FRET per misurare distanze minori di $0.5R_0$ e maggiori di $2R_0$ [20]. L'efficienza di trasferimento   tipicamente misurata usando l'intensit  di fluorescenza relativa del donore in assenza (F_D) e in presenza (F_{AD}) dell'accettore:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (1.13)$$

Se invece si considerano i tempi di vita nelle rispettive condizioni (τ_D e τ_{AD}) si avr :

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (1.14)$$

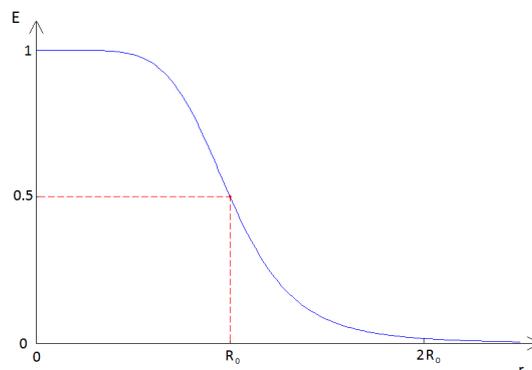


Figura 1.5: Andamento dell'efficienza E di FRET in funzione della distanza r

Bisogna ricordare che queste due equazioni valgono solo sotto l'ipotesi di coppia donore-accettore separati da una distanza fissa.

Per calcolare la distanza r tra donore e accettore é necessario conoscere R_0 che, come già detto, dipende da vari parametri del sistema: κ^2 , n , Q_D e $J(\lambda)$. L'indice di rifrazione é solitamente noto; in alternativa viene preso quello dell'acqua o di piccole molecole organiche (1.33 – 1.39). La resa quantica del donore Q_D é determinata per confronto con i fluorofori standard; si può comunque notare che piccoli errori non portano a grandi variazioni della distanza di Förster in quanto $R_0 \propto \sqrt[6]{Q_D}$. L'integrale di sovrapposizione deve essere valutato per ogni coppia donore-accettore: maggiore é la sovrapposizione degli spettri e piú grande risulterà R_0 . κ^2 , come già detto, é solitamente preso pari a $2/3$.

Nella pratica le misurazioni di FRET vengono complicate da diversi problemi [13]: la differenza di concentrazione tra donore e accettore, il fatto che nella misura dell'intensità di fluorescenza si ha contribuito sia dalla componente di FRET che da quella non-FRET e il *cross talking*. Quest'ultimo é costituito essenzialmente da due fenomeni: da una parte l'accettore, a causa del largo spettro di assorbimento, può essere eccitato direttamente dalla luce utilizzata per eccitare il donore, dall'altra non tutto lo spettro di emissione del donore si sovrappone a quello di assorbimento dell'accettore col risultato che non tutta l'emissione del donore può dar luogo a FRET.

Dalle proprietà dei fluorofori dipendono in modo opposto l'intensità del cross talking e il valore dell'integrale di sovrapposizione $J(\lambda)$. Per questo motivo la scelta della coppia di fluorofori, da utilizzare negli esperimenti, deve essere effettuata in modo accurato per ottenere un buon tasso

di trasferimento di energia.

1.4 Misura del Ca^{2+} con FRET

Al fine di monitorare come varia la concentrazione del Ca^{2+} si utilizzano delle sonde, dette anche sensori, che sono composti da una o piú molecole fluorescenti. Questi sensori possono formare dei composti con gli ioni di Calcio attraverso la creazione di legami selettivi e reversibili. Quando questo processo avviene, i sensori modificano la loro forma e quindi anche le loro caratteristiche di fluorescenza. Grazie alle variazioni nell'emissione di fluorescenza é possibile osservare la variazione di Ca^{2+} nel sistema.

1.4.1 Sensori

I sensori si dividono in due categorie: raziometrici e non raziometrici [27]. Andiamo a vederle nel dettaglio supponendo, senza perdita di generalitá, che questi reagiscano ad esempio con Ca^{2+} .

I sensori raziometrici vanno incontro a un cambiamento nello spettro di eccitazione (o di emissione) in accordo alla concentrazione di Ca^{2+} libero. Questa é misurata come rapporto tra i due valori di intensitá di fluorescenza registrati a due lunghezze d'onda diverse, λ_1 e λ_2 (fig. 1.6). Si puó quindi calcolare la $[Ca^{2+}]$ come

$$[Ca^{2+}] = k_D \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{Sf2}{Sb2} \quad (1.15)$$

dove k_D é la costante di dissociazione, R é il rapporto tra le due lunghezze d'onda, R_{max} e R_{min} sono rispettivamente i valori di R alla concentrazione di saturazione e alla concentrazione nulla del Ca^{2+} , $Sb2$ é il valore per la λ_2 quando si ha concentrazione di saturazione del Ca^{2+} e $Sf2$ é il valore per la λ_2 quando la $[Ca^{2+}]$ é nulla. Dato che l'informazione deriva da un rapporto, essa risulta abbastanza indipendente da alcuni fattori che potrebbero invece alterare una misura assoluta dei due segnali. Questa infatti viene influenzata dalla diversa concentrazione dei due fluorofori, dal photobleaching e dallo spostamento del piano focale. Il concetto puó essere meglio illustrato con un piccolo esempio: in presenza di due cellule, A e B, che hanno la stessa concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , ma una diversa concentrazione del sensore, il rapporto tra le intensitá alle due lunghezze d'onda renderá evidente che le due concentrazioni sono identiche. Per ottenere la stessa informazione con un indicatore che cambia

solamente la sua intensità in funzione della $[Ca^{2+}]$ servirebbe invece una complessa procedura di calibrazione.

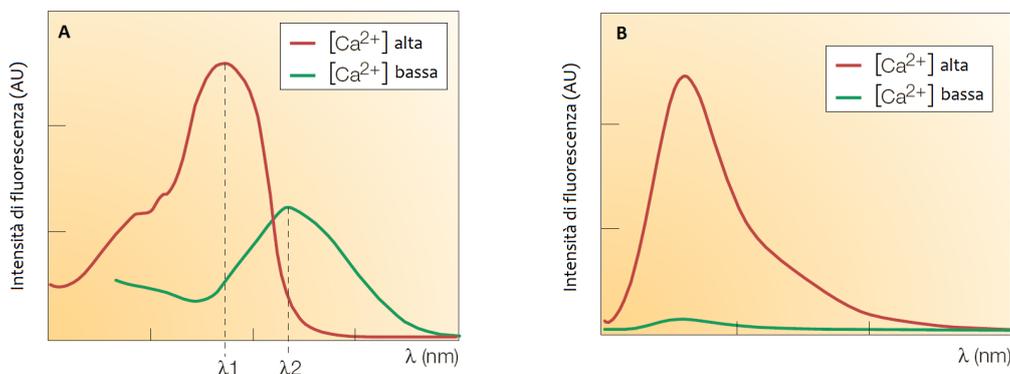


Figura 1.6: Andamento dell'intensità di fluorescenza in sensori raziometrici (A) e non raziometrici (B). Immagine tratta da [27]

Per quanto riguarda i sensori non raziometrici, la concentrazione di Ca^{2+} è determinata solamente dall'aumento relativo dell'intensità di fluorescenza di tale sensore all'aumentare della concentrazione di Ca^{2+} , come mostrato in figura 1.6. Infatti

$$[Ca^{2+}] = k_D \cdot \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \quad (1.16)$$

dove F è l'intensità di fluorescenza, F_{max} è la F alla concentrazione di saturazione del Ca^{2+} e F_{min} è la F a $[Ca^{2+}]$ nulla. La singola eccitazione consente una strumentazione più semplice o un'osservazione simultanea di altri parametri. Questi sensori operano principalmente nel visibile.

Bisogna evidenziare il fatto che la concentrazione di Ca^{2+} libero non viene misurata direttamente, ma che l'indicatore monitora la quantità del sensore libero e complessato. La concentrazione di Ca^{2+} viene quindi calcolata sulla base dell'effettiva costante di dissociazione del sensore a seconda del caso specifico, come si evince nelle equazioni 1.15 e 1.16. Un altro concetto basilare è che tutti i sensori di Ca^{2+} attenuano la $[Ca^{2+}]$ perché si legano allo ione, perciò l'uso dei sensori porta a una diminuzione della concentrazione di Ca^{2+} .

1.4.2 Studi di FRET sul Ca^{2+}

L'interesse biologico si è dunque spostato sulla ricerca di sensori in grado di evidenziare la presenza e le dinamiche del Ca^{2+} . Inizialmente

venne scoperta l'equorina, una fotoproteina della medusa che presenta emissione di luce blu in presenza di Calcio. La quantità di fotoni emessi per singola cellula risulta però molto bassa rendendo così necessario integrare il segnale per tempi più lunghi a discapito della risoluzione temporale del sistema. Studi successivi hanno portato a isolare un'altra proteina: la GFP (Green Fluorescence Protein), che assorbe la luce blu e la emette nel verde. Questa, a differenza dell'equorina, presenta una fluorescenza forte e duratura che permette di ottenere informazioni sulle dinamiche del Ca^{2+} con risoluzione spazio-temporale notevolmente maggiori. Dato le buone caratteristiche di questa proteina, essa è stata oggetto di molti studi e ne è stato isolato il gene. Attraverso le dovute manipolazioni è quindi stato possibile far esprimere la proteina in determinati compartimenti delle cellule in modo da ricavare informazioni sulle dinamiche del Ca^{2+} in modo selettivo. Numerose varianti della GFP sono state create in modo da ottenere gli

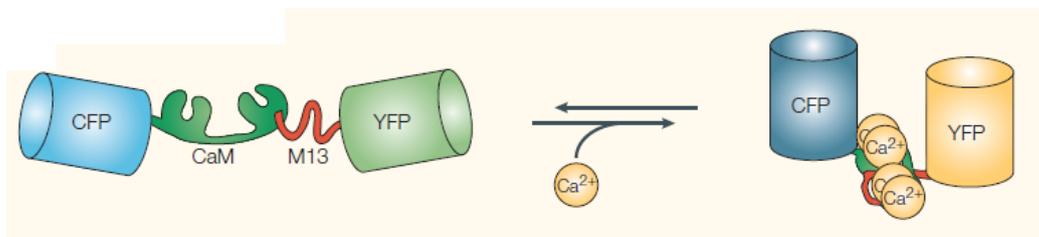


Figura 1.7: Cambio di conformazione del camaleone in presenza di Ca^{2+} , tratto da [27]

spettri di assorbimento e di emissione più consoni allo studio in esame. Di particolare importanza risultano essere le varianti nel ciano (CFP) e nel giallo (YFP): queste due infatti costituiscono una coppia di fluorofori in cui l'efficienza di FRET è particolarmente alta. Al momento esistono tre principali tipi del sensore ottenuti dall'ingegnerizzazione della GFP: camaleons, cangaroos e pericams [27]. Tutti questi sensori si basano sulla calmodulina (CaM), che è una proteina particolarmente importante nei processi di segnalazione intracellulare in quanto lega ioni Ca^{2+} con alta affinità. Il sensore che ci interessa maggiormente è il camaleone che fa parte della famiglia dei sensori raziometrici. Questo è composto, come si può vedere in figura 1.7, dalla calmodulina, dal peptide di legame M13 e dai due fluorofori CFP e YFP alle estremità. Quando uno o più ioni di Calcio si legano al camaleone, la calmodulina si piega, si ha un avvicinamento dei fluorofori e quindi un cambiamento nell'efficienza di FRET. La dinamica del Ca^{2+} è quindi osservabile grazie alla variazione che avviene nell'emissione di fluorescenza. È importante ricordare che i risultati che si

ottengono sono una misura quantitativa delle variazioni di concentrazione del Ca^{2+} [22] e non un valore assoluto di tale concentrazione.

Capitolo 2

Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM)

La microscopia di fluorescenza rappresenta un ottimo metodo per studiare materiali che fluorescono in modo naturale o che possono essere resi fluorescenti con trattamenti chimici o manipolazioni [3]. Nel primo caso si parla di fluorescenza primaria, detta anche autofluorescenza, nel secondo di fluorescenza secondaria.

La peculiarità dei microscopi di fluorescenza è quella di permettere alla luce di eccitazione di irradiare il campione per poi separare la debole luce emessa per fluorescenza da quella di eccitazione. Così solo la luce di fluorescenza raggiunge il rivelatore, tipicamente una telecamera, e risulta in aree molto luminose su un background scuro con contrasto sufficiente a permettere il rilevamento.

La microscopia di fluorescenza può essere usata sia su materiali inorganici che su campioni biologici [7]. L'autofluorescenza è un fenomeno presente principalmente in molti tessuti animali e vegetali. Questo fenomeno naturale è risultato utile per studi di petrografia e petrologia, ma spesso, come accade nei tessuti animali, si presenta di così poca intensità e di così bassa specificità da risultare inutile. La microscopia di fluorescenza ha iniziato ad assumere un ruolo decisamente più importante, in particolar modo nel campo della biologia cellulare, quando si è scoperta la possibilità di marcare, attraverso dei fluorofori, determinati componenti specifici di tessuti, batteri e altri patogeni che non mostravano autofluorescenza. L'utilizzo dei fluorofori, infatti, ha reso possibile identificare cellule, componenti cellulari sub-micrometrici ed altre entità con un alto grado di specificità nel mezzo materiale non fluorescente. In un dato campione, attraverso l'uso di colorazione multipla, sonde differenti rivelano la presenza di singole molecole bersaglio. La presenza di molecole fluorescenti

su scale inferiori a quelle dovute ai limiti di diffrazione è resa comunque visibile, sebbene il microscopio a fluorescenza non possa avere risoluzione spaziale al di sotto di tale limite. La biologia molecolare attraverso l'uso di proteine fluorescenti come la GFP (green fluorescent protein) ha reso possibile studiare processi intracellulari *in vivo*, cellule intere, i loro movimenti e processi tridimensionali senza effettuare sezionamenti fisici dell'organismo vivente. Grazie alla possibilità di compiere studi *in vivo* si possono monitorare direttamente nelle cellule viventi la rapida evoluzione dei valori del pH e delle concentrazioni fisiologiche di ioni come il Calcio e il Magnesio [7]. Oggi quindi la microscopia di fluorescenza rappresenta uno strumento ormai indispensabile.

La microscopia di fluorescenza convenzionale, però, presenta alcuni limiti. Il principale è dato dal fatto che una risoluzione eccellente può essere ottenuta solo nel piano del vetrino del microscopio. Ma lo sviluppo della biologia richiedeva la possibilità di compiere analisi in strutture tridimensionali per osservare processi biologicamente rilevanti. Per raggiungere questo scopo però serve un metodo di osservazione e esame non invasivo [1]. In risposta a questi problemi è stata sviluppata la SPIM, una tecnica promettente per questo tipo di studi biologici.

2.1 Principio di funzionamento

Una tecnica in grado di offrire una visione tridimensionale del campione è la SPIM (Selective Plane Illumination Microscopy). Questa, messa a punto dal gruppo guidato dal Dr. Stelzer [19], è infatti molto veloce, permettendo di monitorare le dinamiche cellulari, e al tempo stesso non danneggia il campione che può quindi essere studiato in condizioni più fisiologiche.

La SPIM si basa fondamentalmente sulla selettività di illuminazione del campione: la luce mandata in eccitazione infatti non viene fatta incidere sull'intero campione ma attraverso una lente cilindrica viene creato un sottile foglietto di luce in grado di illuminare soltanto un piano del campione. In questo modo si ottiene fluorescenza e quindi informazione solo dal piano illuminato; si parla di sezionamento ottico. L'obiettivo di raccolta dovrà essere posto perpendicolarmente all'asse di illuminazione in modo che il piano focale dell'obiettivo coincida con il piano illuminato del campione nella zona in cui il foglietto si stringe maggiormente. Alla fine della linea di rivelazione le immagini vengono acquisite attraverso una telecamera.

Per illuminare il campione si utilizza solitamente un fascio laser la cui lunghezza d'onda viene scelta in modo da corrispondere al picco di assorbimento del fluoroforo da eccitare. Questo fascio risulta quindi collimato nella direzione y e, attraverso l'uso di una lente cilindrica, viene focalizzato lungo z (fig. 2.1). L'altezza del foglietto ω_y viene scelta in modo tale da riempire il campo di vista (dimensioni $d_x \times d_y$) e non irraggiare inutilmente il campione fuori dalla zona di studio. Per ottimizzare le performance del sistema lo spessore $\omega_{z,0}$ del foglietto nel centro, che di solito è dell'ordine dei micrometri, viene adattato all'ottica presente, o viceversa. Idealmente l'apertura numerica della linea di illuminazione deve essere tale da creare un foglietto di spessore abbastanza uniforme all'interno del campo di vista (si considera come spessore limite $\sqrt{2} \cdot \omega_{z,0}$). L'esposizione alla luce del campione nella SPIM è dunque drasticamente ridotta e questo è chiaramente un grande vantaggio di questa tecnica che, oltre a essere selettiva, presenta un photobleaching molto basso.

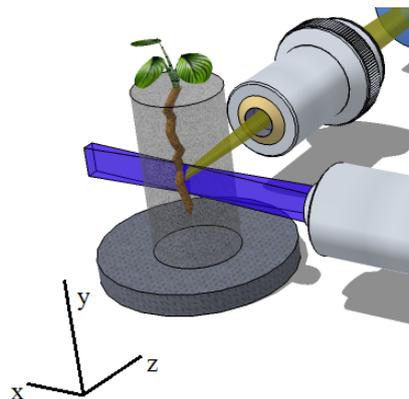


Figura 2.1: Schema del foglietto di luce

Quando la luce entra nel campione va incontro ad assorbimento e scattering per la natura stessa del campione. Nelle zone in cui esso è più denso si riscontra infatti un forte assorbimento di luce. Dal momento che l'illuminazione avviene solo lateralmente, l'effetto di questo assorbimento è la formazione di zone d'ombra all'interno del campione. Di conseguenza si creano delle linee nere nelle immagini acquisite che ne peggiorano la qualità (fig.2.2).

In ogni caso, la luce di eccitazione in ingresso viene assorbita man mano che penetra in profondità nel campione: questo comporta la riduzione della luce di eccitazione e quindi anche della fluorescenza nella parte lontana del campione. La presenza dello scattering lungo z provoca inoltre

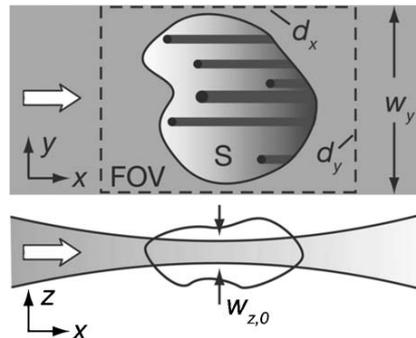


Figura 2.2: Linee d'ombra create dall'assorbimento, tratto da [18]

un allargamento del foglietto di luce e quindi un peggioramento della selettività del piano e della risoluzione. Perciò le immagini di tessuti scatteranti mostrano una progressiva degradazione nella qualità lungo l'asse x a partire dal punto in cui il foglietto entra nel campione. La risoluzione assiale del sistema sarà dunque determinata dallo spessore del foglietto, mentre lateralmente sarà limitata soltanto dall'apertura numerica dell'obiettivo di raccolta o dalla dimensione del pixel nella telecamera. Una delle possibilità offerta dalla SPIM è quella di ottenere una ricostruzione tridimensionale del campione semplicemente trasladandolo lungo l'asse z , prendendo ogni volta l'immagine del piano corrispondente e poi elaborando tramite software. Bisogna però sottolineare che, a causa dell'assorbimento della luce emessa per fluorescenza all'interno del campione, si ha un progressivo peggioramento della qualità dell'immagine con l'avvicinarsi del campione all'obiettivo di raccolta. Questo accade perché la luce emessa deve attraversare uno spessore di campione sempre maggiore andando incontro a scattering [18].

Una volta raggiunto l'obiettivo di raccolta la luce viene fatta passare attraverso un filtro e focalizzata sul sensore di una telecamera. Questo filtro risulta estremamente importante in quanto dovrà permettere il passaggio soltanto della luce emessa per fluorescenza. Per far questo bisogna quindi usare dei filtri a banda stretta centrati sul picco dello spettro di emissione del fluoroforo impiegato oppure un long pass che tagli la lunghezza d'onda utilizzata per l'eccitazione.

La SPIM dunque risulta molto vantaggiosa grazie all'alta selettività della zona irraggiata che permette di ridurre al minimo gli effetti di photobleaching e di danneggiamento del campione. Per questo motivo è possibile studiare campioni biologici *in vivo* molto più a lungo che con altre tecniche, il che rende la SPIM indicata per i nostri esperimenti. Il campione

puó essere mosso nelle tre direzioni e ruotato attorno all'asse y in modo da permettere l'eccitazione del piano desiderato. La possibilitá di muovere il campione ne permette poi una ricostruzione tridimensionale attraverso l'acquisizione di diversi piani consecutivi. Inoltre bisogna sottolineare che durante l'esperimento il campione é tenuto in condizioni fisiologiche cosí da non alterare i normali processi che la tecnica si pone di studiare. I campioni possono essere spessi fino a diversi millimetri e sono tipicamente immersi in un liquido con un indice di rifrazione simile a quello del campione stesso, in modo da evitare effetti di diffrazione che andrebbero a degradare la qualità del foglietto di luce riducendo quindi la risoluzione finale [19].

Fino ad oggi la SPIM é stata utilizzata sia per lo studio dello sviluppo di embrioni come ad esempio di *Danio rerio* (zebrafish) [19] e di *Drosophila melanogaster*, sia per studi sullo sviluppo [30], [23] e sulle dinamiche del Ca^{2+} dell'*Arabidopsis thaliana* [22].

2.2 Confronto con la microscopia confocale

2.2.1 Cenni di microscopia confocale

Per apprezzare appieno le potenzialitá della SPIM é utile confrontarla con un'altra microscopia di fluorescenza oggi molto diffusa nei laboratori: la microscopia confocale (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy). Questa tecnica, come anche la SPIM, si basa sul principio di sezionamento ottico del campione, ovvero sulla capacitá di acquisire immagini a fuoco di un piano alla profonditá scelta. Le immagini vengono acquisite punto per punto e elaborate tramite computer permettendo cosí ricostruzioni topologiche tridimensionali con alta risoluzione. Per campioni non opachi, ovvero per tessuti biologici, le strutture interne possono essere ricostruite senza che le informazioni di piani diversi vengano sovrapposte. La risoluzione é data dal fatto che nel microscopio, prima del detector, esiste una piccola apertura che lascia passare soltanto la luce proveniente dal piano a fuoco come si puó vedere in figura 2.3.

La luce di eccitazione proveniente da un laser passa attraverso una piccola fenditura (pinhole) e viene riflessa da un dicroico verso il campione. Essa viene quindi focalizzata tramite un obiettivo in un piccolo punto del campione stesso. Quando eccitato questo inizia a emettere luce in direzione casuale. Una frazione dei fotoni emessi viene raccolta dallo stesso obiettivo usato in eccitazione e mandata verso il detector. La luce di fluorescenza non viene deviata dal dicroico e arriverá al pinhole pos-

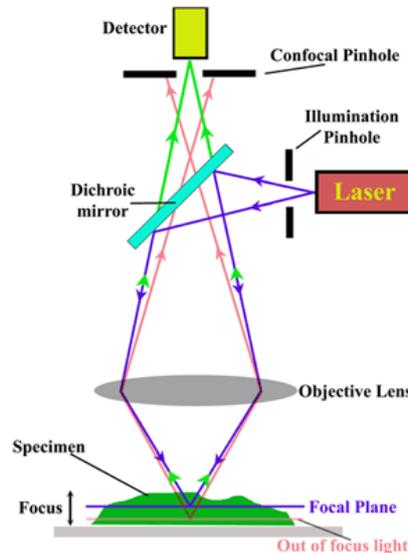


Figura 2.3: Schema di funzionamento di un microscopio confocale, tratta da [2]

to prima del detector che impedisce il passaggio di gran parte della luce proveniente da piani fuori fuoco. A questo scopo il pinhole confocale (fig. 2.3) deve essere posto su un piano che sia coniugato sia con il piano del pinhole di eccitazione sia con il piano focale dell'obiettivo. Questo è quello che viene definito sezionamento ottico. Per ottenere una ricostruzione del campione è dunque necessario compiere una specie di scansione che solitamente avviene tenendo fermo il campione e muovendo il fascio laser per evitare di ottenere immagini sfocate a causa del movimento del campione durante l'acquisizione (si tenga presente che gran parte dei campioni utilizzati sono costituiti da materiale biologico) [35].

2.2.2 Tecniche a confronto

Come si è visto, con la microscopia confocale si ha l'illuminazione di una vasta parte del campione che poi viene selezionata in fase di raccolta. Nella SPIM, al contrario, viene illuminata soltanto la porzione di interesse del campione durante l'acquisizione di una singola immagine [10]. Questo riduce sensibilmente il tempo di esposizione del campione e i danni che ne conseguono, come ad esempio il photobleaching. La figura 2.4 mette a confronto le parti di campione irraggiate con i due diversi metodi.

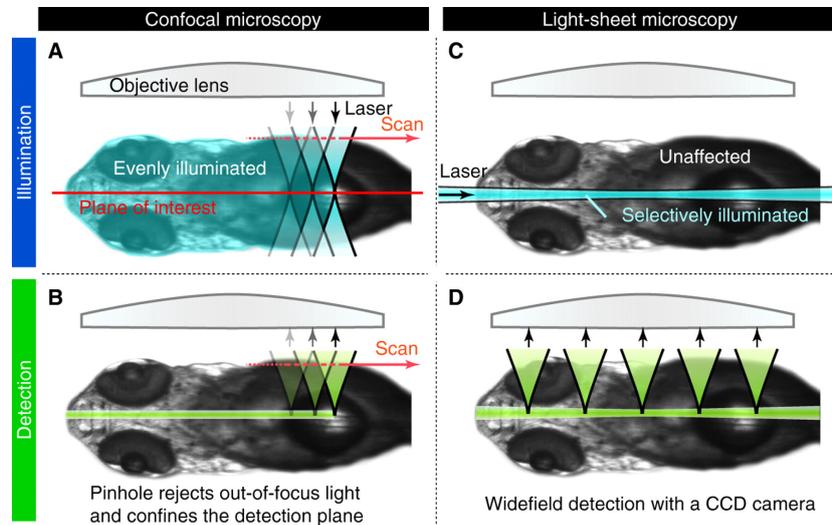


Figura 2.4: Confronto tra microscopia confocale e SPIM per quanto riguarda l'illuminazione del campione, tratta da [10]

Si noti come con la SPIM si riesce ad ottenere un maggiore contrasto, avendo quindi la possibilità di rilevare anche strutture molto fini. Al contrario, con la microscopia confocale, l'immagine risente della luce emessa dai piani immediatamente adiacenti a quello a fuoco, nonostante il limite teorico della risoluzione assiale sia dato dalla diffrazione.

D'altra parte bisogna però sottolineare che la risoluzione assiale della SPIM è inferiore a quella confocale, ma soprattutto non è uniforme su tutta la sezione a causa della dipendenza dallo spessore del foglietto, che diverge verso i bordi del campione.

Nella microscopia confocale, con l'aumentare della profondità all'interno del campione si ha una notevole diminuzione della luminosità, in quanto sia la luce in eccitazione che quella in fluorescenza devono attraversare una porzione sempre maggiore di campione, che è assorbente e scatterante in ogni direzione. Lo spessore accessibile alla tecnica è molto limitato (tipicamente attorno ai $100\mu m$) precludendo così la possibilità di fare imaging sulle strutture interne di campioni interi. Questo è dovuto al fatto che risulta limitata la distanza di lavoro delle lenti dell'obiettivo, caratterizzate da una grande apertura numerica che è tuttavia necessaria per avere immagini ad alta risoluzione [19]. Nella microscopia a foglietto di luce, invece, questo problema è ridotto dal fatto che l'illuminazione avviene lateralmente e lo scattering della luce incidente, che degrada l'immagine, è soltanto quello che avviene in direzione z allargando il foglietto. Inoltre le piccole aperture numeriche utilizzate garantiscono che le aber-

razioni nel processo di illuminazione siano minime. Altro vantaggio della SPIM risiede nella possibilità di studiare rapidi processi dinamici grazie alla capacità di acquisire l'immagine di un intero piano in una sola volta anziché effettuare una scansione punto per punto del piano desiderato, come nel caso confocale (fig 2.4). Nella CLSM per ogni pixel la fluorescenza viene raccolta per $1 - 10\mu s$ mentre nella SPIM può essere utilizzata una telecamera CCD in raccolta che integra il segnale per $0.1 - 1s$ perciò è possibile abbassare l'intensità del laser riducendo l'effetto di saturazione dei fluorofori che si può verificare col microscopio confocale.

2.3 Nuove metodologie di SPIM

In risposta ai vari problemi nella qualità delle immagini presentati dalla SPIM, sono state sviluppate alcune varianti volte a eliminare proprio tali problematiche.

Per ridurre l'effetto degli artefatti indotti dallo scattering e dall'assorbimento nelle parti più dense del tessuto biologico, nel 2007 è stata sviluppata da J. Huisken [18] la SPIM multidirezionale (mSPIM).

L'assorbimento si manifesta come linee d'ombra lungo x , dal momento che la luce di eccitazione arriva lateralmente al campione. Queste righe rendono difficile analizzare le immagini generate con questa tecnica. Nella mSPIM questi artefatti vengono notevolmente ridotti inserendo uno specchio risonante nella linea di illuminazione. Questo viene fatto velocemente oscillare in modo che il foglietto di luce nel campione si inclini a formare un angolo rispetto all'asse x nel piano xy come mostrato in figura 2.5. Per velocità di oscillazione sufficientemente elevate (frequenze dell'ordine dei kH), si ottiene una buona riduzione delle ombre nell'immagine, in quanto il tempo di esposizione utilizzato è molto più alto, tipicamente tra i 10 e i 100ms.

Per quanto riguarda l'attenuazione del foglietto di luce, si può compensare illuminando simultaneamente il campione da due parti opposte. Nei tessuti biologici, comunque, ogni fascio viene scatterato con conseguente allargamento del foglietto nella parte più lontana del campione. Per questo motivo la sovrapposizione dei due fasci contropropaganti dá un sezionamento ottico che è molto più spesso rispetto a quello di un singolo foglietto appena entrato nel tessuto. Per ovviare al problema il foglietto di luce orientabile viene fatto incidere sul campione alternando tra loro le due linee di illuminazione di direzioni opposte (fig. 2.6).

In entrambe le immagini ottenute, il bordo del campione dal lato dell'illuminazione è uniformemente illuminato e ben sezionato. Queste due

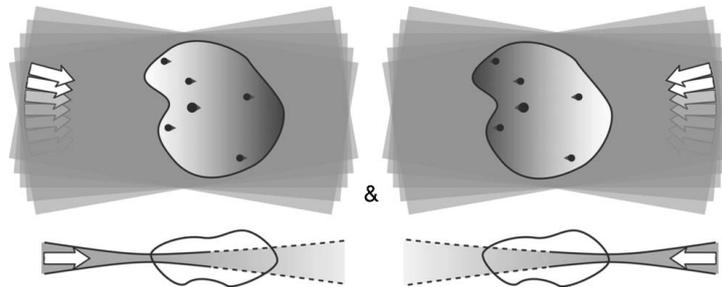


Figura 2.5: Effetto della mSPIM sulle ombre e posizione del foglietto all'interno del campione, tratto da [18]

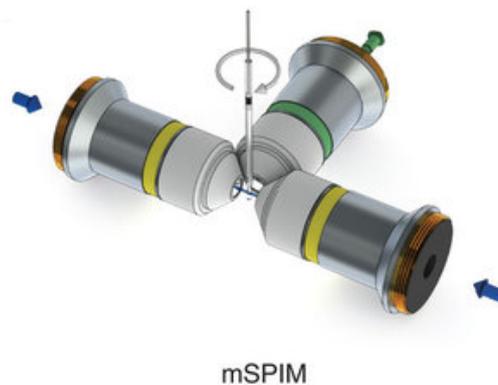


Figura 2.6: Schema di disposizione degli obiettivi nella mSPIM, tratta da [34]

immagini, rappresentando lo stesso piano, possono essere combinate con tecniche di fusione d'immagini in modo da avere un risultato di qualità notevolmente migliore. In molti casi la fusione può essere fatta in modo efficiente semplicemente unendo le metà meglio illuminate di ogni immagine. Ragionando in questo modo, risulta una scelta ottimale quella di dimezzare il campo di vista lungo x in modo che la parte più stretta del foglietto venga centrata nella prima metà illuminata del campione e non al suo centro aumentando così il sezionamento ottico e la risoluzione assiale (fig 2.5).

Grazie a questi vantaggi la mSPIM risulta essere una tecnica di grande interesse biologico in quanto permette lo studio di campioni più spessi rispetto alla normale SPIM, come ad esempio interi embrioni di zebrafish [18].

Capitolo 3

Setup

In questo capitolo verrà presentato il sistema di SPIM che abbiamo sviluppato per le acquisizioni di FRET dell'*Arabidopsis thaliana*. Vedremo nel dettaglio la configurazione finale che abbiamo scelto per il setup spiegando i motivi che ci hanno portato a tali scelte, tutte le procedure che abbiamo messo a punto e seguito sia in fase di preparazione del campione che di messa a punto del setup. Porremo particolare attenzione a come abbiamo effettuato l'allineamento del sistema e spiegheremo come lo abbiamo caratterizzato. Inoltre indicheremo i software che abbiamo utilizzato per controllare la strumentazione in fase di acquisizione e quelli di cui ci siamo serviti per elaborare le immagini.

3.1 Sistema di acquisizione

Il sistema di SPIM implementato nei laboratori del Politecnico di Milano durante l'esperienza di laboratorio, è una versione modificata del progetto di OpenSPIM [25]. Scopo della serie di esperimenti è stato principalmente lo studio delle dinamiche del Ca^{2+} nelle radici dell'*Arabidopsis thaliana* in risposta a vari stimoli forniti attraverso il meccanismo della FRET.

Il setup, come si può vedere in figura 3.1, è costituito da un solo braccio di illuminazione di eccitazione (linea di SPIM) e da una linea di raccolta in grado di separare due canali sullo stesso sensore. Notiamo inoltre la presenza di un secondo ramo di illuminazione (linea del LED) che però ha soltanto la funzione di facilitare il corretto posizionamento del campione. L'intero sistema si trova alla stessa altezza, ovvero è allineato orizzontalmente su un tavolo ottico. Particolarità del setup è la cameretta a immersione dove vengono inseriti sia il campione che gli obiettivi di illu-

minazione e raccolta, che devono quindi essere obiettivi ad immersione. Vediamo ora nel dettaglio le parti che costituiscono il sistema.

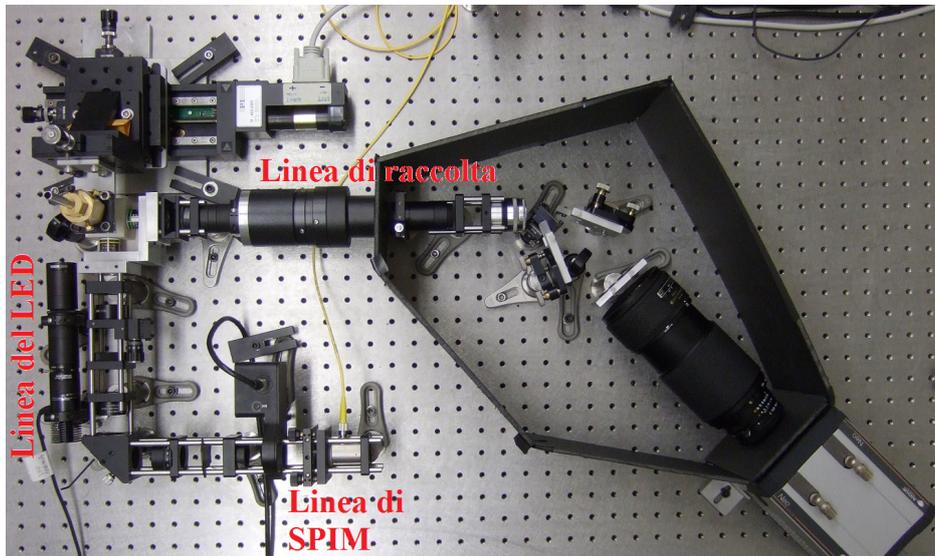


Figura 3.1: Fotografia del setup implementato

3.1.1 Linea di illuminazione di SPIM

La linea di illuminazione é costituita da un laser a 442nm che viene portato tramite fibra monomodo e collimato grazie a un collimatore in riflessione. Tale laser é stato scelto appositamente per eccitare la fluorescenza della CFP; infatti la sua lunghezza d'onda coincide col picco dello spettro di assorbimento della CFP, come si può vedere in figura ???. Vi é poi uno shutter automatico (SC10, Thorlabs) che permette o impedisce il passaggio del fascio laser attraverso il controllo da computer. A valle é presente un neutral density: dato che il laser non presenta regolazione in potenza, la presenza dell'attenuatore diventa di fondamentale importanza. Esso si trova perciò in una posizione dove può essere facilmente sostituito. A questo punto il fascio laser incontra una lente cilindrica di focale 50mm che focalizza il fascio lungo la direzione verticale y . A una distanza pari alla focale della lente cilindrica é posto uno specchio che riflette il fascio verso l'obiettivo a immersione 10x (UMPLFLN 10XW, Olympus), dopo averlo fatto passare attraverso un telescopio 1:1 formato da due lenti di focale 50mm. Le distanze tra i vari componenti ottici sono tali da garantire che il piano sullo specchio sia coniugato col back focal plane dell'obiettivo. Da

notare infine la presenza di un iride al centro del telescopio, dove il fascio risulta focalizzato in direzione z .

A causa della presenza della lente cilindrica, l'andamento del fascio segue profili diversi se osservato dall'alto o lateralmente, come risulta chiaro dalla figura 3.2

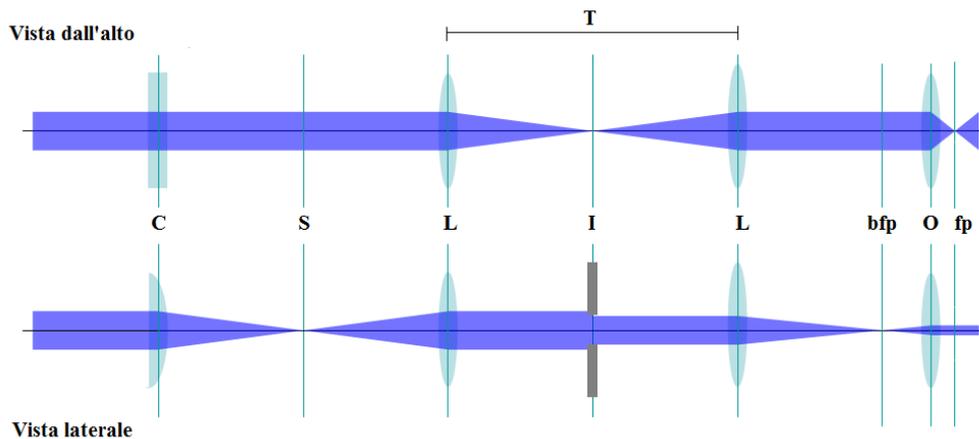


Figura 3.2: Schema dell'andamento del fascio: C é la lente cilindrica, S lo specchio, L le lenti del telescopio T (1:1), I l'iride, bfp il back focal plane dell'obiettivo O e fp il piano focale dell'obiettivo. I piani in corrispondenza di S e di bfp sono coniugati

Nella visione dall'alto il fascio rimane collimato fino a quando raggiunge il telescopio che, senza variarne le dimensioni, lo riporta fino all'obiettivo. Quest'ultimo focalizza quindi il fascio nel suo piano focale formando cosí il foglietto di luce. Diversamente, nella visione laterale, si nota come il fascio venga focalizzato dalla lente cilindrica per poi attraversare in maniera collimata l'interno del telescopio. Rifocalizzato nel back focal plane dell'obiettivo, il fascio viene collimato dall'obiettivo stesso e si propaga verso il campione.

L'altezza del fascio in uscita puó essere regolata grazie all'iride presente al centro del telescopio e risulta molto utile per evitare di illuminare il campione al di fuori del campo di vista.

3.1.2 Linea di illuminazione secondaria

Sulla sinistra del setup (fig. 3.1) é presente una linea di illuminazione ausiliaria. Essa é costituita da un led bianco che viene fatto passare prima attraverso dei diffusori e successivamente attraverso un iride. Una lente

focalizza quindi la luce bianca nello stesso piano del foglietto di luce della SPIM passando attraverso un neutral density che funge da obló della cameretta. Il campione é perciò illuminato da dietro dalla luce del led, che risulta essere in asse con la linea di raccolta. La funzione di questa linea é semplicemente quella di supporto al corretto posizionamento del campione, ma comunque si rivela di grande utilitá.

3.1.3 Linea di raccolta

La linea é composta innanzitutto da un obiettivo di raccolta a immersione 20x (UMPLFLN 20XW, Olympus) il cui asse é perpendicolare rispetto all'asse di illuminazione. A una distanza ottimale dall'obiettivo é posizionata una lente di tubo ($f = 200mm$), che focalizza il fascio della luce di fluorescenza raccolta dall'obiettivo stesso. Nel piano focale di tale lente (punto immagine) é posta una fenditura verticale che permette di tagliare l'immagine selezionandone soltanto la parte centrale. La luce continua quindi il suo percorso fino ad arrivare a un obiettivo (di focale 105mm) da cui esce quasi collimata (vedi paragrafo 3.5). A questo punto il fascio viene diviso da un dicroico posto a 45° rispetto all'asse di propagazione come mostrato in figura 3.3.

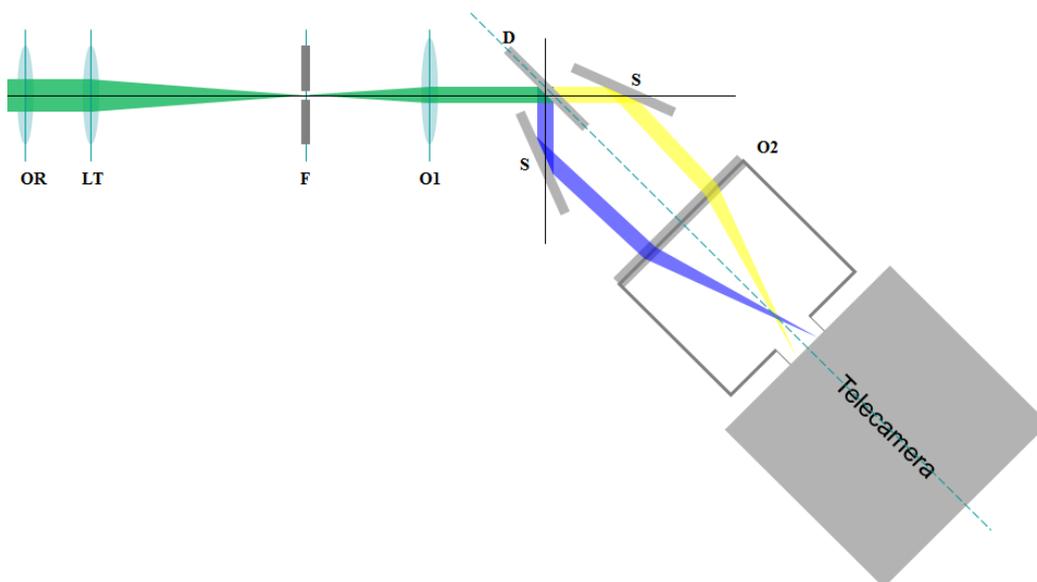


Figura 3.3: Schema andamento della luce di fluorescenza nella linea di raccolta: OR é l'obiettivo di raccolta, LT la lente di tubo, F la fenditura, O1 e O2 sono obiettivi, D il dicroico e S gli specchi

I due fasci incidono in modo simmetrico su altrettanti specchi con un angolo di 22.5° riavvicinando i fasci che, prima di arrivare sull'ultimo obiettivo, passano ognuno attraverso un filtro di emissione a banda molto stretta. Il dichroico (MD515, Thorlabs) riflette lunghezze d'onda comprese tra i 490 e i 510nm e lascia propagare inalterata quella oltre i 520nm . In questo modo la luce blu dovuta all'emissione della CFP viene deviata e separata così dall'emissione dovuta alla YFP. Lungo il cammino percorso dalla fluorescenza della CFP è posta una lente di focale molto elevata ($f=5000\text{mm}$) a correzione delle aberrazioni cromatiche. Come si può vedere in figura 3.4, il filtro di emissione utilizzato per selezionare la fluorescenza dovuta alla CFP è centrato a 479nm e presenta una banda di 40nm (MF479-40, Thorlabs), mentre per quanto riguarda la YFP la lunghezza d'onda centrale è 535nm con una larghezza di banda di 22nm (MF535-22, Thorlabs).

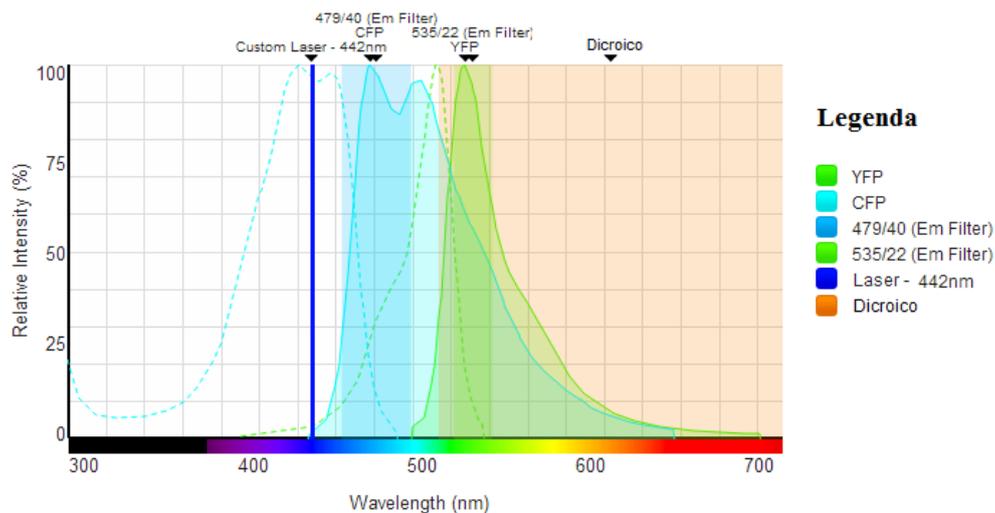


Figura 3.4: Spettri di assorbimento (linea tratteggiata) e di emissione (linea continua) dei due fluorofori utilizzati (CFP e YFP), bande ideali dei filtri e del dichroico utilizzati nel setup

Una volta raggiunto l'ultimo obiettivo, di focale 200mm , i due fasci si incrociano al suo interno e vengono focalizzati ciascuno su una metà del sensore della telecamera (CMOS, Andor Neo). Grazie a questo sistema di splitting è possibile acquisire contemporaneamente e con una sola telecamera due diversi canali dello stesso campione.

3.1.4 Portacampione

Le tre linee si ricongiungono all'interno della cameretta riempita di soluzione salina dove viene posto il campione, tenuto saldamente da un holder costruito appositamente per lo scopo (fig. 3.5). Questo é costituito da un'asta cilindrica cava con dei fori passanti perpendicolari al suo asse vicino all'estremitá, dove si trova un sistema di aggancio ad incastro per il supporto del campione. La posizione verticale della pianta e la presenza di questi fori, che garantiscono il passaggio di aria e luce verso il campione, fanno in modo di mantenere condizioni fisiologiche anche durante la misura.

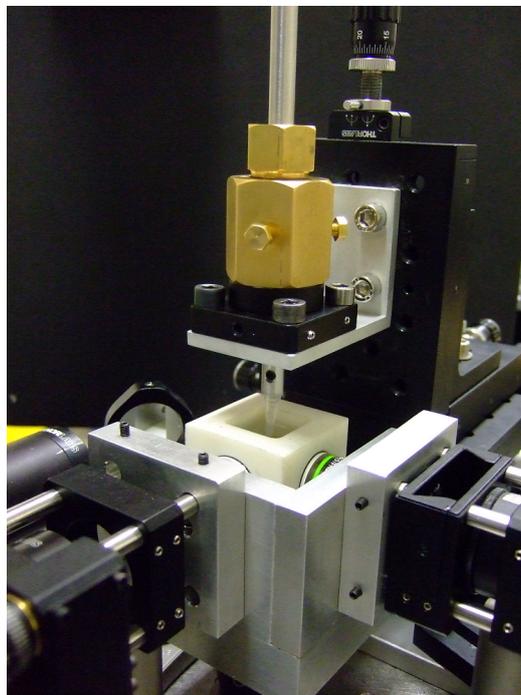


Figura 3.5: Fotografia dell'holder

Il portacampione é fissato a un sistema di movimentazione composto da tre traslatori manuali, uno per ogni dimensione spaziale, che servono a posizionare il campione in modo che il foglietto di luce incida sulla parte di campione da analizzare. Infine, il tutto é montato su un traslatore elettronico (PI M403.4DG) controllabile da computer attraverso un motorino (PI-C863.11). Questo traslatore, di precisione submicrometrica, é posto lungo la direzione z in modo da poter controllare la distanza tra i vari piani durante la scansione del campione.

3.2 Software di acquisizione

Il software scelto per effettuare gli esperimenti é μ Manager (Micro-Manager), un programma open source per il controllo di microscopi automatizzati [15]. Il programma é particolarmente indicato per i nostri scopi perché consente di gestire attraverso un'unica interfaccia grafica tutti i dispositivi necessari negli esperimenti di microscopia, anche se di marche differenti. Innanzitutto é possibile configurare i diversi hardware direttamente dal programma mediante degli adattatori di dispositivo. Una volta caricati gli hardware, é possibile modificare, in modo semplice dalla schermata principale del software, i parametri di ogni dispositivo, come ad esempio il tempo di esposizione della telecamera o la posizione del traslatore.

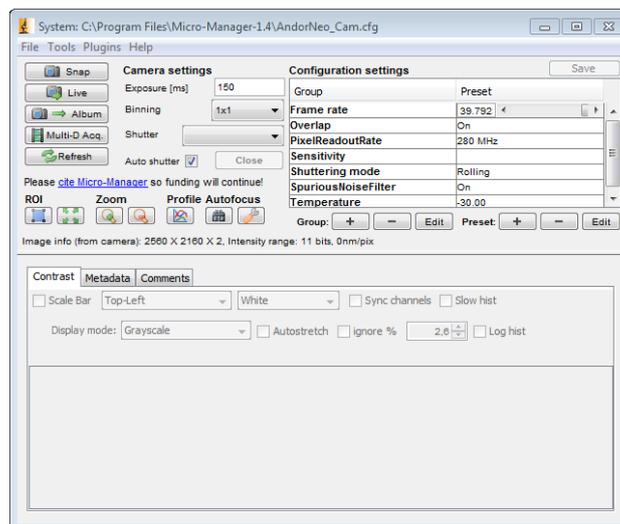


Figura 3.6: Schermata principale

Nel nostro caso é stato possibile controllare il funzionamento dello shutter, del traslatore e della telecamera. La configurazione dei vari dispositivi risulta abbastanza semplice grazie all'interfaccia grafica: é sufficiente creare una nuova configurazione hardware in cui si selezionano, tra i dispositivi disponibili, quelli di interesse e gli si dá un nome. Il programma alla fine salva l'esatta configurazione del sistema, comprese le porte di uscita dei vari dispositivi, in modo tale da permettere un veloce e semplice ricaricamento del sistema per le volte successive.

Una volta caricata la configurazione e settati i parametri, cliccando su Snap nella schermata principale (3.6), é possibile acquisire una singola immagine; questa può essere salvata e si può ottenere il profilo di intensità di una

qualunque ROI selezionata. Attraverso il tasto Live si può guardare in tempo reale l'immagine del campione: in questo caso appare, in basso nella finestra principale, il profilo di intensità dell'immagine (3.7). Qui si può regolare sia la luminosità che il contrasto e a lato ne vengono visualizzati i valori di minimo, massimo e media.

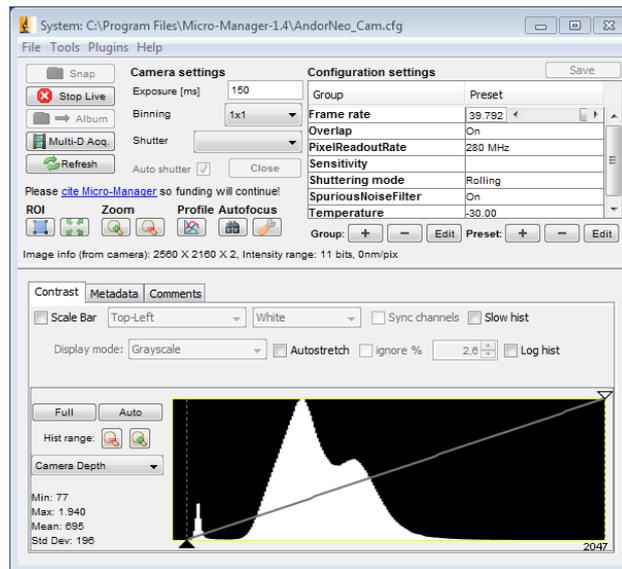


Figura 3.7: Schermata durante la visualizzazione live

Attraverso la Multi-Dimensional Acquisition (fig. 3.8) si possono eseguire diversi tipi di acquisizioni: time-lapse, imaging multi-canale, scansioni lungo z e combinazioni di queste. Per i nostri scopi sono stati utilizzati soltanto acquisizioni con modalità time-lapse, scansioni lungo z e loro combinazioni.

Nel time-lapse è possibile impostare il numero di immagini che si vogliono acquisire e a distanza di quanto tempo l'una dall'altra. Qui lo shutter, se impostato su automatico, si aprirà solo per il tempo strettamente necessario ad acquisire una singola immagine per poi richiudersi fino all'acquisizione successiva. Questa modalità risulta molto utile quando si vogliono compiere studi su tempi molto lunghi, come ad esempio per lo studio della crescita di alcune piante o per lo sviluppo di embrioni. Nel caso della SPIM si rivela inoltre molto comodo per lo studio di dinamiche molto veloci: si sceglie un singolo piano e si cerca di acquisire l'immagine il più velocemente possibile.

Le scansioni lungo z possono essere impostate sia su scala assoluta che relativa. In entrambi i casi bisogna indicare punto di inizio e di fine della

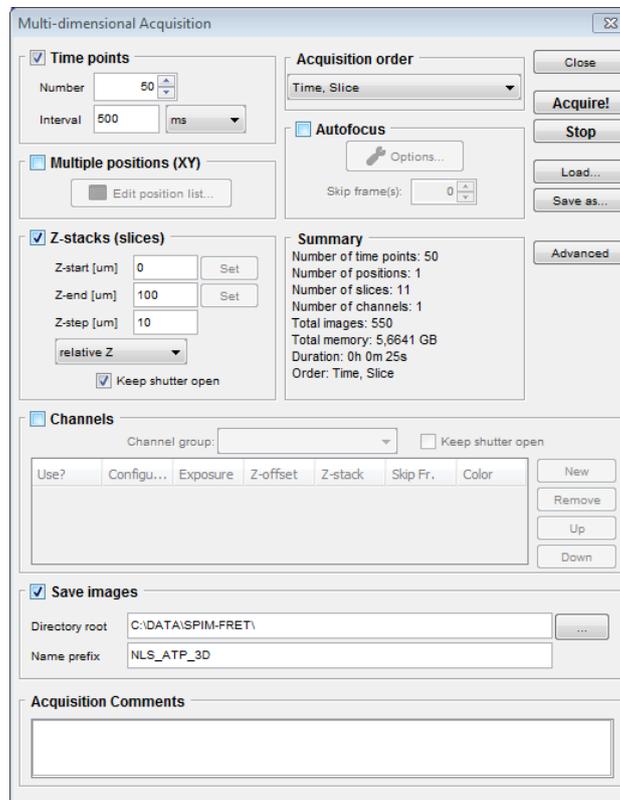


Figura 3.8: Schermata per effettuare un'acquisizione multidimensionale

scansione e il passo, ossia la distanza a cui vengono prese due immagini successive. Qui si può scegliere se tenere aperto o meno lo shutter durante tutta la scansione. Questa è la tipica configurazione per ricostruzioni tridimensionali nella SPIM.

Combinando queste due modalità possiamo ottenere andamenti temporali di campioni interamente monitorati.

3.3 Preparazione del campione

I campioni che sono stati studiati sono piantine di *Arabidopsis thaliana* di circa 10 giorni di vita. Queste piante sono state geneticamente modificate in modo da esprimere la proteina Cameleon YC3.6 [24] soltanto in determinati compartimenti delle cellule. I semi delle piante sono stati sterilizzati in superficie e messi con delle pinzette in pipette di plastica da $10\mu\text{l}$ riempite di agarosio. Questi supporti vengono quindi trasferite in una scatola trasparente riempita di soluzione idroponica (fig. 3.9) e posta nella

camera di crescita tenuta a $22^{\circ}C$. Il sistema idroponico permette alle radici delle piantine di crescere, seguendo il normale gravitropismo, prima nell'agar e successivamente nella soluzione idroponica, quando raggiungono l'apertura finale del supporto. Una volta che le radici sono uscite dalla plastica del supporto, i campioni sono pronti per essere analizzati col sistema di SPIM-FRET.

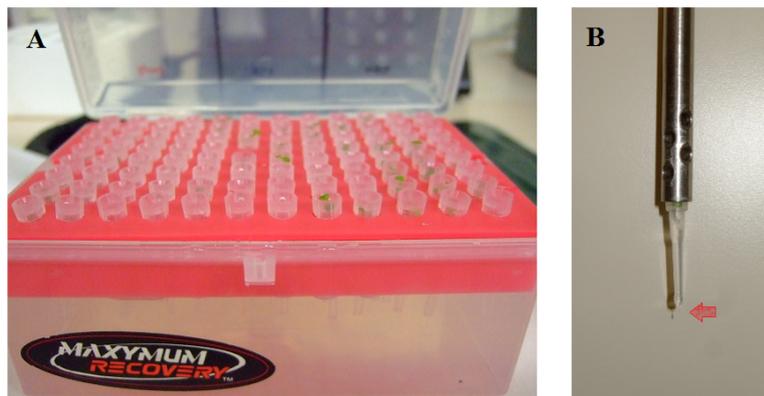


Figura 3.9: Piantine nella vaschetta dove sono cresciute (A), piantina montata sull'holder (B). La freccia evidenzia la presenza della radice uscita dal supporto

L'inserimento del campione nel sistema di rilevazione avviene attraverso una procedura abbastanza delicata. Innanzitutto bisogna riempire la cameretta con una soluzione a base d'acqua che assicura da un lato che la radice non si disidrati e dall'altro che nella cameretta non vi siano particelle di grandi dimensioni, che potrebbero interferire con la misura. Successivamente il supporto della piantina viene incastrato nell'asta portacampione (holder) che viene rapidamente inserita dall'alto nell'esagono dorato, chiaramente visibile in figura 3.5. Nel fare questo bisogna assicurarsi che la radice risulti completamente immersa nella soluzione salina, dopodiché l'asta viene bloccata. Tramite i tre traslatori azionati manualmente, il campione viene, infine, posizionato all'incrocio tra l'asse di illuminazione di SPIM e quello di raccolta. Durante quest'operazione la radice viene illuminata da dietro per mezzo della linea di illuminazione secondaria (tramite led). In questo modo l'individuazione del campione risulta piú semplice e inoltre si evita il photobleaching causato dall'utilizzo del laser in modo continuo.

3.4 Messa a punto del setup

Prima di procedere con le acquisizioni é necessario mettere a punto il setup in ogni sua parte, per garantire la massima qualità possibile delle immagini. Prima di tutto bisogna inserire e posizionare correttamente un campione di prova. Grazie a questo si procede quindi all'ottimizzazione della qualità del foglietto da cui dipende la capacità di sezionamento ottico del sistema e la selezione del piano studiato, che deve trovarsi alla distanza di lavoro dell'obiettivo di raccolta. Infine é necessario fare una regolazione precisa della linea di raccolta per assicurarsi che le immagini dei due canali siano il piú possibile simmetriche.

3.4.1 Ottimizzazione del foglietto

Per allineare al meglio il foglietto di luce é necessario che il fascio laser sia in asse con l'obiettivo di illuminazione e che i vari elementi ottici siano alle distanze corrette gli uni dagli altri. Per far questo é necessario togliere tutte le lenti e accendere il sistema avendo cura di inserire nella cameretta un campione fluorescente di prova. A questo punto, aprendo lo shutter in modo da far passare il fascio laser, bisogna:

- centrare il fascio laser su un mirino posto appena dopo lo specchio usando i tilt di regolazione del supporto su cui é montato il collimatore
- spostare il mirino appena prima dell'obiettivo di illuminazione e centrare su di esso il fascio laser usando i tilt di regolazione dello specchio.

Questa procedura deve essere ripetuta in modo iterativo fino al raggiungimento di un buon allineamento per entrambe le posizioni del mirino. Questo fa in modo che il fascio sia centrato nell'asse ottico del sistema.

A questo punto, avendo cura di interrompere momentaneamente il fascio, bisogna montare le due lenti del telescopio. La seconda lente deve essere traslata avanti o indietro lungo l'asse ottico fino a quando, a schermo, si ottiene l'immagine di un fascio simmetrico rispetto alla verticale.

Per andare incontro ad eventuali imperfezioni nel posizionamento dell'obiettivo di raccolta rispetto a quello di illuminazione, é necessario mettere a fuoco il fascio inclinando orizzontalmente lo specchio. Nel fare questa operazione si nota che il fascio nell'immagine si assottiglia.

Si puó ora montare la lente cilindrica avendo sempre cura di interrompere momentaneamente il fascio laser. Questa va ruotata finché a schermo non

risulta una chiara linea orizzontale. Per creare il foglietto, a questo punto, basta ruotare la lente cilindrata di 90° . Per ottimizzare la posizione dell'iride è sufficiente traslarlo lungo l'asse ottico dopo averlo chiuso e scegliere la posizione per cui nell'immagine i suoi contorni risultano piú netti.

Prima di partire con qualsiasi misura risulta però molto utile una messa a punto piú precisa che deve essere fatta su uno dei campioni da analizzare in modo da ottimizzare il sistema per il particolare tipo di campione. A tal fine si può ritoccare il fuoco del foglietto inclinando orizzontalmente lo specchio. Si noti che, facendo questa operazione, il campione verrà sezionato in punti diversi e quindi le strutture visualizzate non saranno sempre le stesse. La soluzione migliore sarebbe quella di cercare di illuminare sempre lo stesso piano compensando lo spostamento del foglietto con una traslazione del campione lungo l'asse z grazie alla regolazione fine del sistema di movimentazione del campione. Se si riesce a fare questo si può ottenere un'ottima messa a fuoco. Un'altra operazione possibile è quella di regolare la posizione della seconda lente del telescopio in modo fine grazie al piccolo traslatore su cui è montata. In questo modo si riesce a ottenere una qualità migliore delle immagini.

Al termine della procedura si può controllare la bontà dell'allineamento guardando se le caratteristiche ombre del sistema di SPIM risultano nette come dovrebbero.

3.4.2 Allineamento linea di raccolta

La linea di raccolta può essere ottimizzata attraverso la regolazione sia dell'apertura della fenditura, che dell'inclinazione verticale e orizzontale dei due specchi e del dicroico. Bisogna perciò cominciare lavorando sul fascio che non viene deviato dallo splitter, ovvero quello giallo. Servendosi del tilt orizzontale dello specchio bisogna traslare l'immagine fino al bordo del sensore, cioè fino al bordo del campo di vista. A questo punto bisogna inclinare verticalmente lo specchio fino a quando il bordo della fenditura risulta perfettamente verticale. Dopodiché si passa all'altro fascio e, con un processo iterativo, si cerca sia di rendere verticale il bordo della fenditura sia di sistemare l'altezza dell'immagine in modo che risulti speculare all'altra. Per far questo è necessario regolare l'inclinazione verticale dello specchio e del dicroico in maniera combinata. A questo punto si apre la fenditura in modo che ogni immagine occupi metà della larghezza del sensore e inclinando orizzontalmente gli specchi si centra ciascuna delle due immagini nella propria metà del sensore.

Un ulteriore miglioramento di questa condizione può essere raggiunto con l'ausilio di un software di sovrapposizione sviluppato con Labview. Il suo funzionamento è il seguente: prima di tutto l'immagine acquisita viene divisa verticalmente a metà, poi viene assegnato un colore diverso a ognuna delle due immagini ottenute (per poterle distinguere) e infine una delle due viene ribaltata (per poterle sovrapporre). In questo modo le due immagini sono rese di fatto sovrapponibili e al tempo stesso distinguibili (fig.3.10).

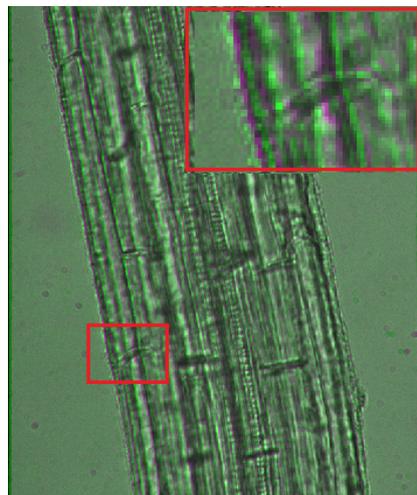


Figura 3.10: Immagine ottenuta in fase di allineamento in modalità overlap

L'allineamento degli specchi può quindi essere ritoccato facilmente in modo da garantire la migliore sovrapposizione possibile.

3.5 Caratterizzazione del sistema

Il sistema di acquisizione è stato caratterizzato attraverso due diverse attività:

- la quantificazione del valore di un pixel
- la risposta del sistema a un punto luminoso

3.5.1 Fattore di conversione pixel-micron

Per il nostro sistema è stato possibile stabilire il fattore di conversione da pixel a μm grazie a un target graduato. Per far questo è stata presa

un'immagine del target illuminato con bright field ed analizzata come di seguito.

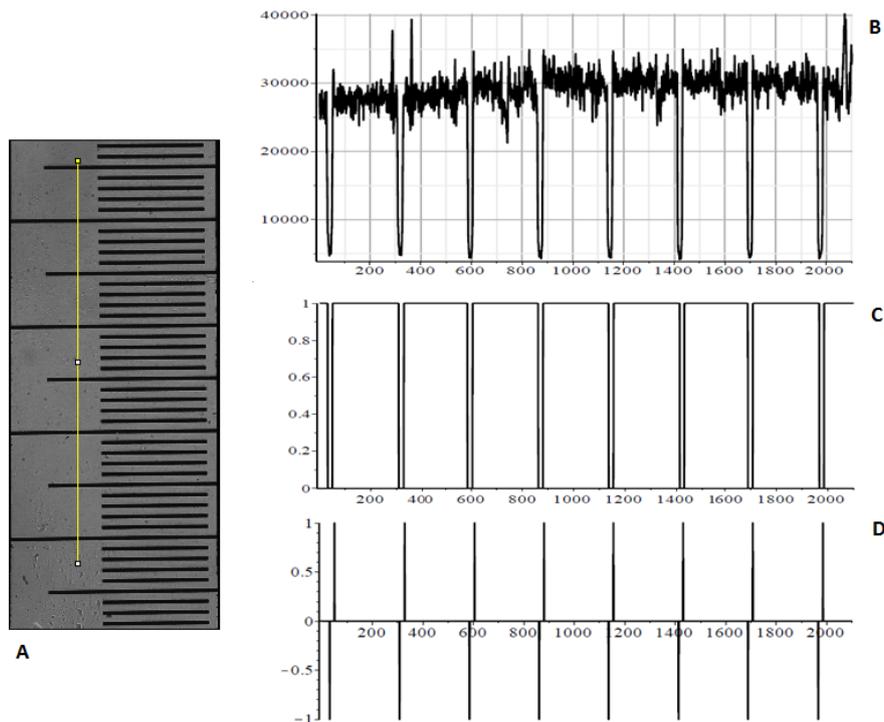


Figura 3.11: In A immagine del target e zona dello studio, in B profilo di intensità, in C squadratura, in D derivata numerica

Dall'immagine é stato estratto il profilo di intensità lungo una linea verticale (linea gialla in figura 3.11A, andamento riportato in 3.11), dove si trova una tacchetta ogni $50\mu m$. Mettendo una soglia a metà altezza si ricava una funzione squadrata (fig. 3.11C). Per facilitare l'individuazione dei fronti di salita e di discesa, é stata inoltre calcolata la derivata numerica (fig. 3.11D). Grazie a queste informazioni é stato possibile determinare le distanze in pixel tra i fronti di salita e ottenere il valore di $1935pixel$ come distanza tra 8 fronti successivi. Considerando 8 tacche distanziate di $50\mu m$, per un totale di $7 \times 50 = 350\mu m$, si ha che

$$1pixel = \frac{350}{1935} = 0.18\mu m \quad (3.1)$$

Si ottiene quindi un campo di vista per ogni singolo canale pari a circa $195\mu m$ di larghezza per $460\mu m$ di altezza.

3.5.2 Calcolo della Point Spread Function

Al fine di calcolare la point spread function (PSF) del sistema é stata utilizzata nuovamente l'immagine del target illuminato con bright field. In questo caso, però, si é preso in considerazione il profilo di intensità di una linea verticale che intercetta la taratura piú fine, quella ogni $10\mu m$, come mostrato in figura 3.12.

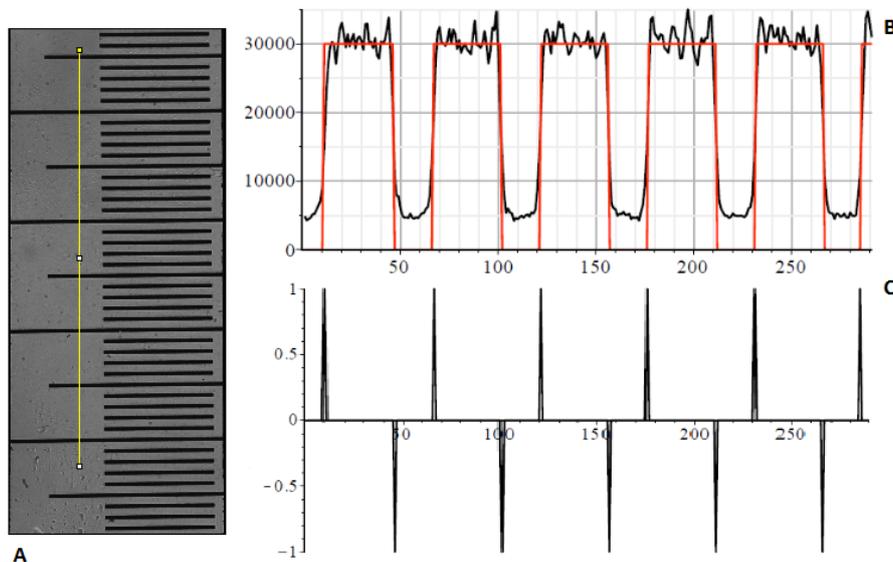


Figura 3.12: In A immagine del target e zona dello studio, in B profilo di intensità e squadratura, in C derivata numerica

Come nel caso precedente, é stata messa una soglia per squadrare l'immagine e trovare la posizione dei fronti di salita e di discesa ed é stata poi calcolata la derivata numerica (3.12). Dopo aver trovato i fronti di salita e di discesa, é stato scelto un particolare fronte di salita (il quinto) che é stato approssimato con una error function (erf). Sono quindi stati calcolati i parametri della erf che meglio si adattavano al profilo reale: in figura 3.13 é mostrato in rosso l'andamento reale e in blu la erf che la approssima.

L'error function rappresenta dunque la risposta del nostro sistema alla funzione di Heaviside (risposta al gradino), ossia

$$erf = sca(x) * h(x) \quad (3.2)$$

dove $h(x)$ é la risposta all'impulso del sistema.

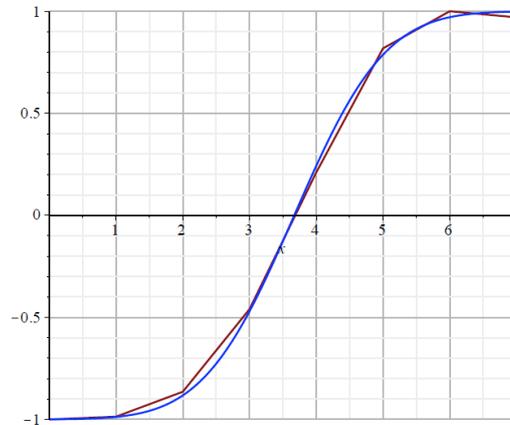


Figura 3.13: In rosso fronte di salita reale, in blu erf con cui é stato approssimato

Passando ora alle trasformate di Laplace otteniamo

$$\mathcal{L}[erf] = \frac{1}{s} \cdot H(s) \quad (3.3)$$

per cui risulta

$$H(s) = s \cdot \mathcal{L}[erf]. \quad (3.4)$$

Attraverso la trasformata inversa

$$h(x) = \mathcal{L}^{-1}[s \cdot \mathcal{L}(erf)] \quad (3.5)$$

é stato possibile ricavare la $h(x)$ che é la point spread function del nostro sistema, ovvero la sua risposta all'impulso. Il grafico in figura 3.14 mostra la funzione sia su scala in pixel che su scala in μm .

Infine, attraverso il criterio di Rayleigh, é stata calcolata la minima distanza di due punti luminosi che possono essere risolti dal sistema. Per far questo é stata ricavata la FWHM della point spread function appena trovata, che é risultata pari a $0.45\mu m$. Una simulazione grafica é riportata in figura 3.15.

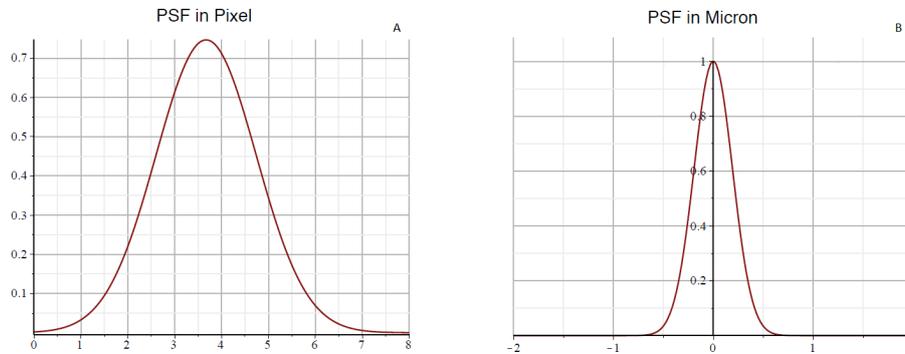


Figura 3.14: Point spread function del sistema in pixel (A) e in μm (B)

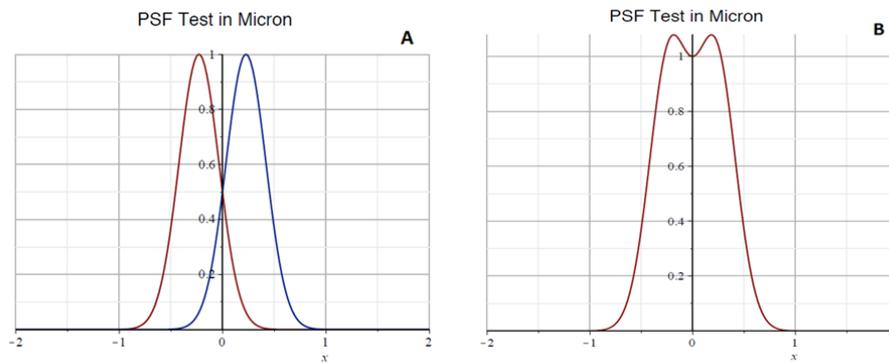


Figura 3.15: Simulazione della presenza di due punti luminosi al limite della distinguibilità: scala in pixel (A) e in μm (B)

3.6 Correzione delle distorsioni

Nonostante tutti gli sforzi per rendere identiche le immagini provenienti dai due diversi canali si ottiene sempre qualche piccola deformazione: in particolare una delle due immagini risulta lievemente piú piccola dell'altra. Per ovviare a questo problema e alle altre possibili aberrazioni, si interviene in un secondo momento tramite elaborazione delle immagini acquisite attraverso il computer. Questo passaggio risulta necessario perché le informazioni che ci prefiggiamo di trarre da queste immagini si ottengono essenzialmente dal rapporto punto a punto delle due immagini. Per questo motivo esse devono essere fatte coincidere l'una sull'altra. La scelta che é stata fatta é quella di tenere come riferimento l'immagine proveniente dall'emissione della YFP in quanto é quella che nel suo cammino verso la telecamera viene meno distorta, come precedentemente

illustrato (vedi paragrafo 3.5). Al fine di compensare errori di traslazione (lungo x e y), di rotazione e di magnificazione, si é deciso di usare un plugin di Fiji: bUnwarpJ [11]. Questo plugin modifica l'immagine attraverso una deformazione elastica in modo da soddisfare un criterio di consistenza. Il funzionamento consiste nella simultanea registrazione di due immagini, A e B. L'immagine A viene elasticamente deformata in modo da assomigliare il piú possibile a B e, allo stesso tempo, viene calcolata la trasformazione inversa (da B a A) cosí da garantire una pseudo invertibilitá della deformazione finale. In uscita abbiamo dunque la versione modificata di entrambe le immagini. Date le nostre premesse, ci interesserá conservare la versione modificata dell'immagine CFP (fig. 3.16).

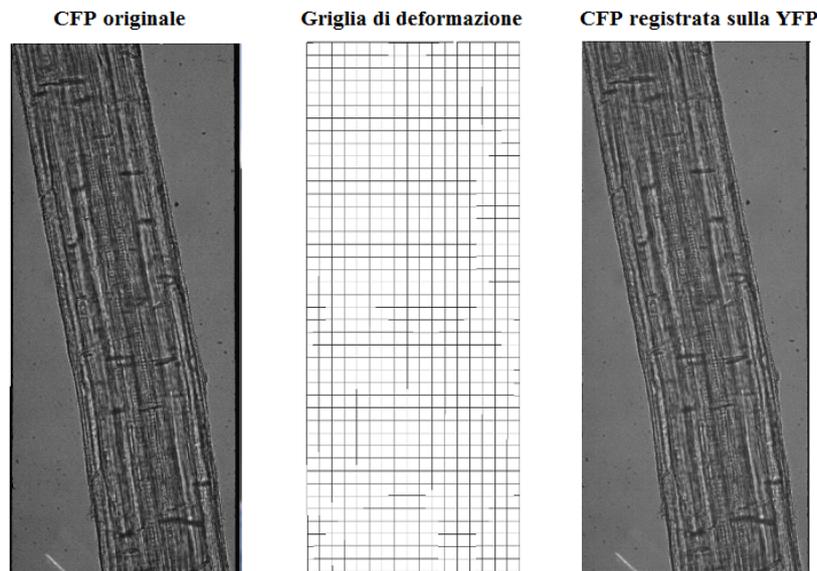


Figura 3.16: Registrazione di un'immagine della CFP

L'algoritmo di registrazione si basa sulla minimizzazione di un funzionale di energia che include:

- la diversitá tra le due immagini in entrambe le direzioni E_{img}
- i punti di riferimento fissati E_{μ}
- un termine di regolarizzazione $E_{div} + E_{rot}$
- un termine E_{cons} che tiene conto della consistenza geometrica tra le deformazioni elastiche in entrambe le direzioni.

Il funzionale dell'energia é quindi dato da

$$E = w_i E_{img} + w_\mu E_\mu + (w_d E_{div} + w_r E_{rot}) + w_c E_{cons} \quad (3.6)$$

dove i pesi di ogni termine possono essere impostati dall'utente nella finestra di interfaccia del plugin.

Nel nostro caso il calcolo delle matrici di deformazione é stato fatto su un'immagine presa in bright field per ovviare in parte a problemi di differenza di intensitá dei due canali. Si é cercato di prendere immagini con un buon numero di particolari in modo che la trasformazione calcolata fosse il piú accurata possibile. A questo punto la trasformazione é stata applicata a tutte le immagini prese con lo stesso allineamento, riducendo tra l'altro i tempi di elaborazione.

Capitolo 4

Misure e Risultati

Gli esperimenti che abbiamo condotto hanno avuto come oggetto le radici dell'*Arabidopsis thaliana* (di diametro tra i 100 e i 150 μm), una pianta che ben si adatta alle condizioni richieste dal setup di SPIM grazie al suo alto tasso di trasparenza. Abbiamo acquisito le immagini in parti diverse della pianta a dimostrazione delle potenzialità della tecnica, e poi abbiamo spostato la nostra attenzione sulla punta principale della radice (tip primario). Abbiamo fatto questa scelta perché le dinamiche del Ca^{2+} sono più accentuate in questa regione della pianta. Per questo tipo di misura è stato quindi necessario dare degli stimoli alla pianta: abbiamo scelto di utilizzare l'ATP e il glutammato. Abbiamo deciso di osservare le dinamiche del Ca^{2+} , grazie al trasferimento risonante di energia, in piante che esprimevano il sensore CY3.6 in compartimenti cellulari diversi: nucleo, citosol. Per mostrare queste dinamiche, oltre alle immagini originali dei due canali di CFP e cpVenus (variante della YFP), mostreremo anche l'immagine del rapporto tra i due, ovvero del ratio. Nel calcolo del ratio R abbiamo tenuto conto del rumore di fondo delle immagini in questo modo:

$$R = \frac{I_Y - B_Y}{I_C - B_C} \quad (4.1)$$

dove I_Y e I_C sono le intensità dei canali YFP e CFP, mentre B_Y e B_C sono le intensità del background dei rispettivi canali. Quello che però più ci interessa è la variazione del ratio, ovvero

$$\frac{\Delta R}{R_0} = \frac{R_t - R_0}{R_0} \quad (4.2)$$

dove R_t è il ratio al tempo t e R_0 è il ratio al tempo zero, ossia in assenza di stimoli. Vediamo quindi i principali risultati che abbiamo ottenuto.

4.1 Qualit  dell'immagine

Prima di procedere con lo studio delle dinamiche del Ca^{2+} sono state fatte alcune misurazioni volte a mostrare le potenzialit  e i limiti del sistema appena descritto. A tal fine sono state fatte delle scansioni tridimensionali di tre diverse zone della radice della piantina: la punta principale, un'emergenza di radice secondaria e una zona centrale. In figura 4.1 sono riportate le maximum projection delle corrispondenti ricostruzioni tridimensionali in tre canali distinti: la CFP, la cpVenus (o YFP) e il ratio R (riportato in falsi colori). Come si pu  notare la piantina utilizzata esprimeva il sensore nei nuclei.

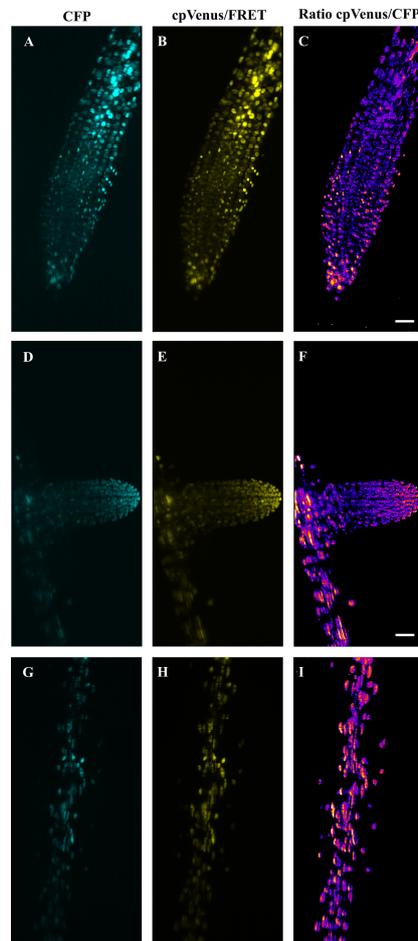


Figura 4.1: Maximum projection delle ricostruzioni tridimensionali della punta principale (A,B,C), di una radice secondaria (D,E,F) e di una zona matura della radice (G,H,I)

Notiamo che si possono distinguere i singoli nuclei non solo nella zona centrale nella pianta, ma anche nelle punte dove le cellule si stanno ancora formando e non sono ancora differenziate.

Nelle scansioni tridimensionali effettuate si nota una riduzione della qualit  dell'immagine man mano che il campione viene spostato lungo z verso l'obiettivo di raccolta. La luce di fluorescenza emessa, infatti, si trova costretta ad attraversare gran parte del campione prima di raggiungere l'obiettivo; questo si traduce in una maggiore possibilit  di scattering e di assorbimento con conseguente perdita di risoluzione nell'immagine. Perci  la parte della radice pi  vicina all'obiettivo di raccolta   decisamente pi  nitida rispetto alla parte opposta del campione come si pu  notare in figura 4.2.

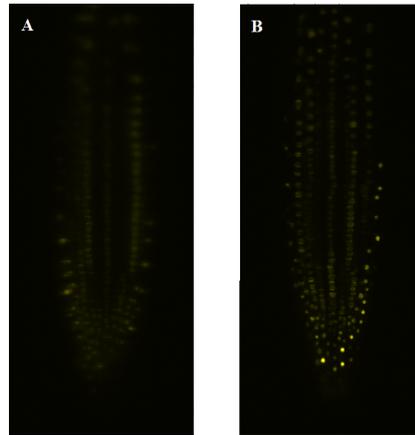


Figura 4.2: Due diverse immagini (cpVenus) dello stesso campione prese una in profondit  (A) e l'altra vicino alla superficie (B)

Nonostante la presenza del forte scattering e dell'assorbimento, anche nelle parti in profondit  del campione si possono vedere dettagli di dimensione inferiore a quella della singola cellula. In figura 4.2B si possono inoltre notare le caratteristiche linee d'ombra orizzontali della SPIM. Queste, come abbiamo detto, sono dovute all'assorbimento da parte del campione e quindi peggiorano la qualit  dell'immagine soprattutto nel lato del campione opposto a quello di ingresso del foglietto.

4.2 Risposta di FRET

Durante questi esperimenti é stato monitorato l'andamento della concentrazione di Ca^{2+} nella punta della radice in risposta a due diversi stimoli: l'ATP e il glutammato (GLU). Questi presentano delle reazioni su scale temporali diverse quindi, per permettere di seguire adeguatamente entrambe le dinamiche, é stato necessario procedere attraverso due diversi tipi di esperimenti. La prima tipologia prevede l'analisi di un singolo piano accuratamente selezionato (acquisizione bidimensionale) per poter acquisire immagini il piú velocemente possibile. La seconda tipologia, invece, prevede l'osservazione delle dinamiche del Ca^{2+} su piani diversi (acquisizione tridimensionale) a discapito, almeno in parte, della risoluzione temporale.

4.2.1 Analisi bidimensionale

Per questa analisi sono state utilizzate piantine con espresso il sensore nei nuclei e nel citosl. La modalitá di acquisizione é stata la stessa per entrambe le linee transgeniche: essenzialmente, dopo aver selezionato il piano di interesse, é stata fatta partire la misura prendendo un'immagine ogni $500ms$. Dopo alcuni secondi é stato aggiunto lo stimolo, $0.1mM$ di ATP o $1mM$ di Glu, e la risposta é stata monitorata per circa un minuto. Entrambe le linee sono state sottoposte a entrambi gli stimoli.

Analisi sui nuclei

In figura 4.3 é possibile vedere dal ratio la risposta dei nuclei a uno stimolo di $1mM$ di glutammato aggiunto alla soluzione salina della cameretta. Risulta chiaro che lo stimolo induce un transiente di Ca^{2+} a gradino che interessa tutta la zona monitorata. Grazie alla capacitá di risoluzione offerta dalla SPIM, é stato possibile effettuare anche un'analisi piú approfondita. Sono stati infatti individuati e analizzati singoli nuclei in sequenza come mostrato in figura 4.3 in basso. Ne risulta che non solo tutti i nuclei in esame reagiscono allo stimolo, ma anche che i primi a reagire sono quelli sulla punta della radice e che poi il segnale si propaga verso la zona piú matura della pianta. Questo é visibile anche se si tratta di una dinamica temporale molto veloce e la propagazione risulta piú chiara dai grafici in figura 4.4, in cui sono riportati a sinistra gli andamenti della variazione di ratio dei singoli nuclei e a destra la risposta media dei sei nuclei evidenziati. Quest'ultima é stata inserita per simulare il risultato che si sarebbe ottenuto con un sistema a bassa risoluzione.

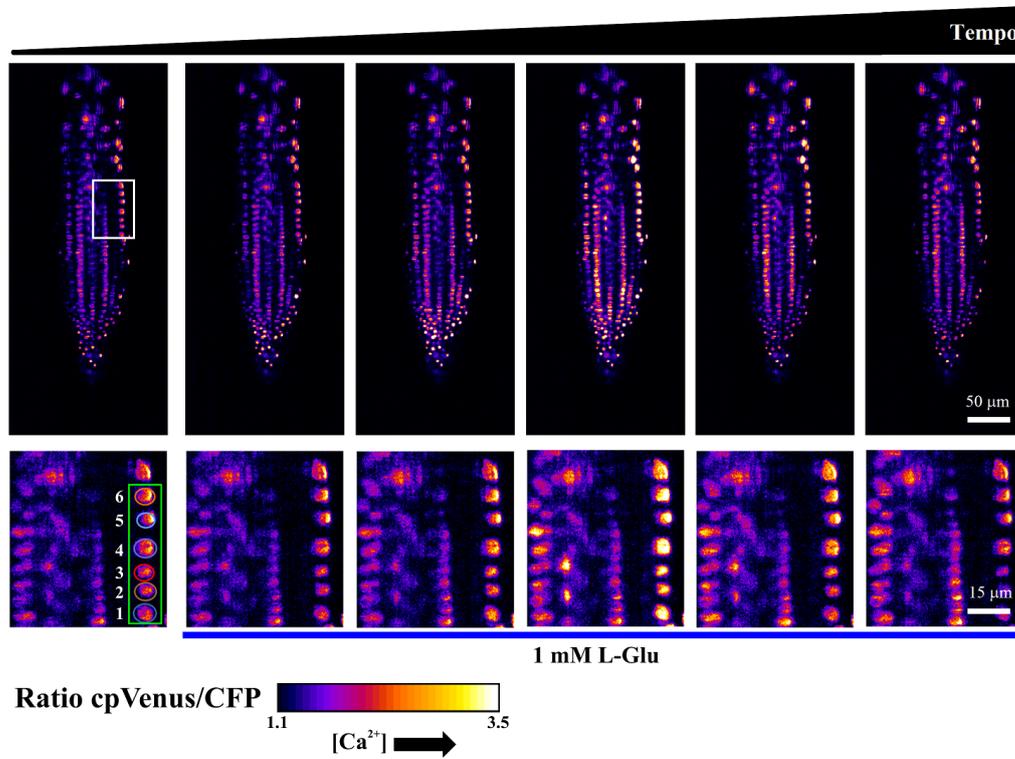


Figura 4.3: Immagini nel tempo del ratio nei nuclei in risposta al glutammato (singolo piano)

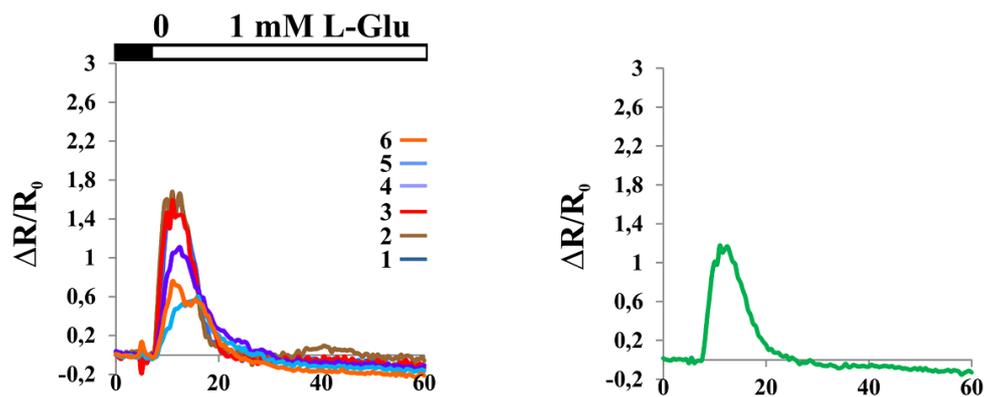


Figura 4.4: Grafico dell'andamento nel tempo del ratio nei nuclei in risposta al glutammato: a sinistra risposta dei singoli nuclei, a destra risposta media dei nuclei

Dopo aver trattato la punta della pianta con il glutammato, la stessa radice é stata sottoposta a uno stimolo di 0.1mM di ATP (fig. 4.3), ma a distanza di qualche minuto, per lasciare alla pianta il tempo di recuperare. É stato possibile osservare lo stesso piano selezionato durante lo stimolo precedente e monitorare la risposta degli stessi nuclei. Si é cosí riusciti a fare un confronto delle diverse risposte degli stessi nuclei.

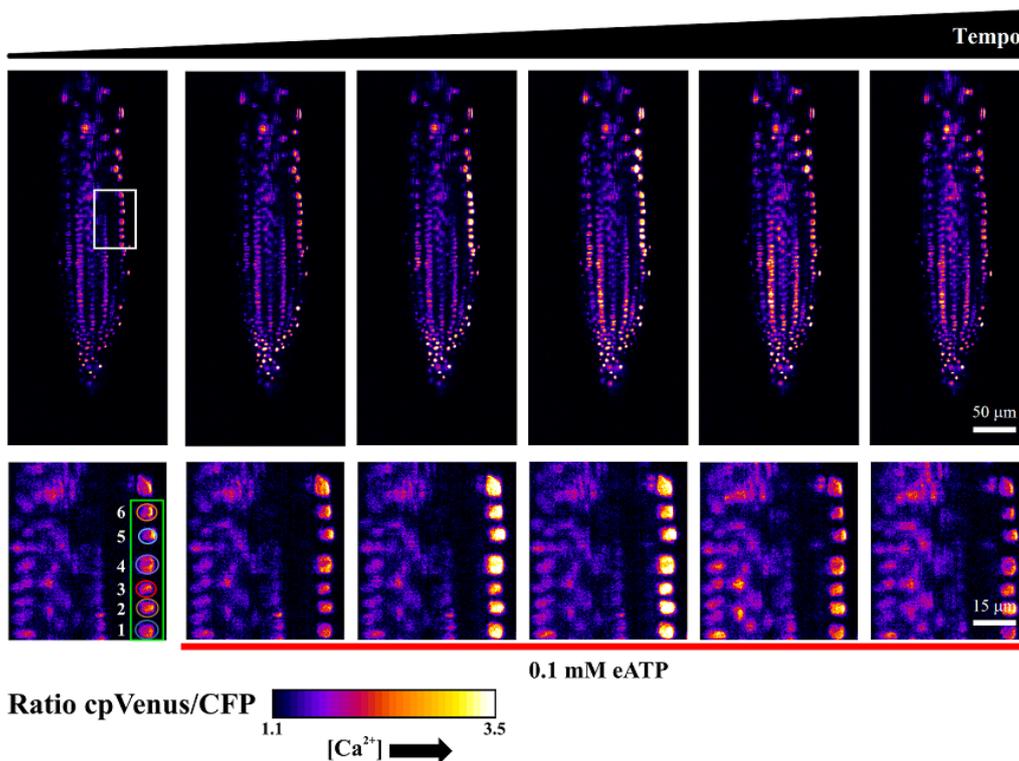


Figura 4.5: Immagini nel tempo del ratio nei nuclei in risposta all'ATP (singolo piano)

Anche in questo caso é stato osservato un transiente di Ca^{2+} che risulta però essere decisamente piú marcato rispetto al caso precedente. Dalle analisi effettuate sui singoli nuclei (a sinistra in fig. 4.6) si puó vedere, dal confronto col caso precedente, la differenza nell'ampiezza dei picchi della variazione di ratio e i tempi in cui essi vengono registrati.

Concentrandoci ora sui sei nuclei evidenziati in figura 4.5 possiamo affermare che mentre nella risposta al glutammato si ha un singolo picco di intensità per ogni nucleo preso in esame, nel caso della risposta all'ATP invece si hanno due picchi chiaramente visibili nella finestra temporale scelta. Inoltre possiamo notare come i picchi dei vari nuclei si presentano

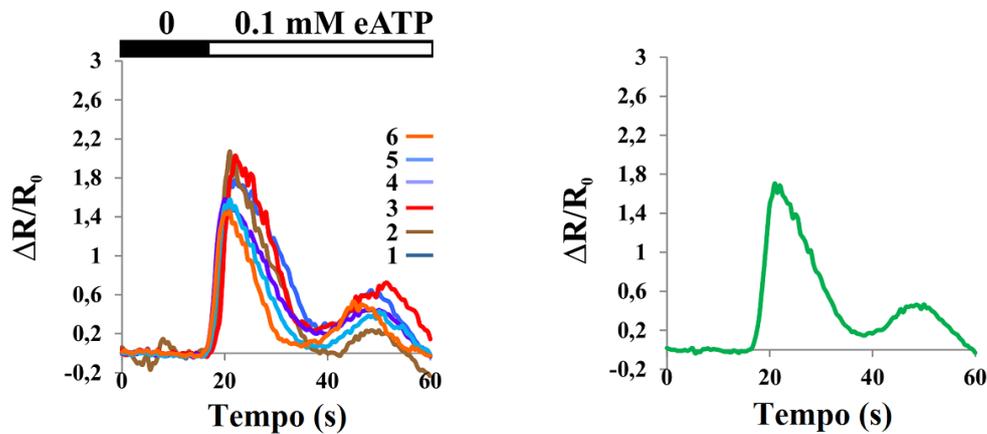


Figura 4.6: Grafico dell'andamento nel tempo del ratio nei nuclei in risposta all'ATP: a sinistra risposta dei singoli nuclei, a destra risposta media dei nuclei

molto piú distanziati tra loro nel caso di risposta all'ATP. Queste due osservazioni evidenziano l'esistenza di due diversi meccanismi nella generazione dei transienti di Ca^{2+} osservati attraverso i due diversi stimoli.

Il confronto fra i due stimoli mostra chiaramente che la SPIM non solo offre la possibilità di avere uno sguardo d'insieme su una zona del campione sufficientemente ampia, ma lo fa con una risoluzione sia spaziale sia temporale sufficiente a monitorarne la risposta delle singole cellule. In realtà lo studio a singola cellula effettuato é stato facilitato dal fatto che i nuclei appaiono nell'immagine come punti luminosi ben definiti. Quindi, per validare il nostro sistema di acquisizione, l'esperimento é stato ripetuto su una piantina col sensore espresso nel citosol che é piú difficile da rilevare con una buona risoluzione.

Analisi sul citosol

Dalle acquisizioni effettuate utilizzando come stimolo il glutammato, sono state estratte le immagini in figura 4.7 dove, nel dettaglio ingrandito, sono evidenziate due diverse cellule che sono state oggetto di analisi. Si nota immediatamente che l'emissione di fluorescenza in questo caso é molto piú uniforme rispetto all'analisi precedente in cui si osservavano dei centri luminosi relativi ai nuclei. Questo fenomeno é facilmente comprensibile se si ricorda che il citosol é un liquido intracellulare, che viene separato in compartimenti dalle membrane.

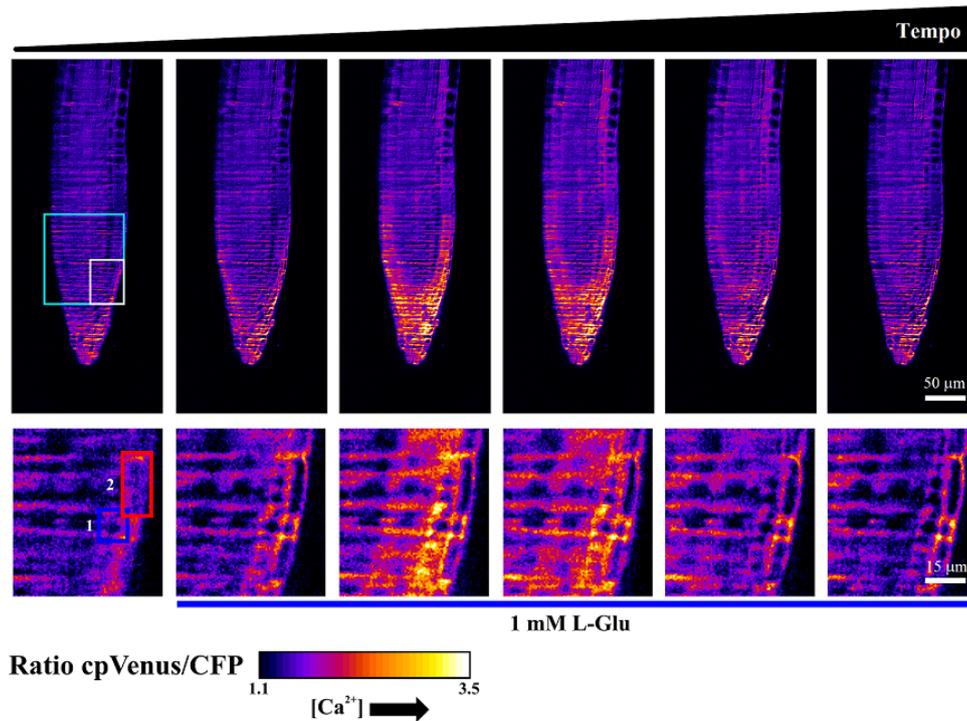


Figura 4.7: Immagini nel tempo del ratio nel citosol in risposta al glutammato (singolo piano)

Come nell'analisi precedente, anche in questo caso é stato rappresentato l'andamento della variazione del ratio nei due grafici mostrati in figura 4.8. A sinistra si puó osservare l'andamento medio di tutta la zona evidenziata dal rettangolo azzurro in figura 4.7. A destra invece si puó osservare la risposta di due singole cellule, quelle riquadrate in blu e in rosso nell'ingrandimento di figura 4.7.

Dopo alcuni minuti é stata effettuata una seconda acquisizione aggiungendo alla soluzione nella cameretta $0.1mM$ di ATP. Le immagini ottenute sono riportate in figura 4.9.

Sono state quindi analizzate le stesse regioni prese in considerazione nel precedente stimolo ottenendo i grafici in figura 4.10.

Con entrambi gli stimoli é evidente che la risposta ha inizio dalle cellule sulla punta della radice per poi propagarsi verso la zona piú matura della pianta, ovvero verso l'alto in figura, e allo stesso tempo si ha una propagazione anche verso l'interno della radice. Questo risulta in accordo con quanto ottenuto nella risposta dei nuclei. Confrontando la risposta media dei due stimoli possiamo osservare che le dinamiche di rispos-

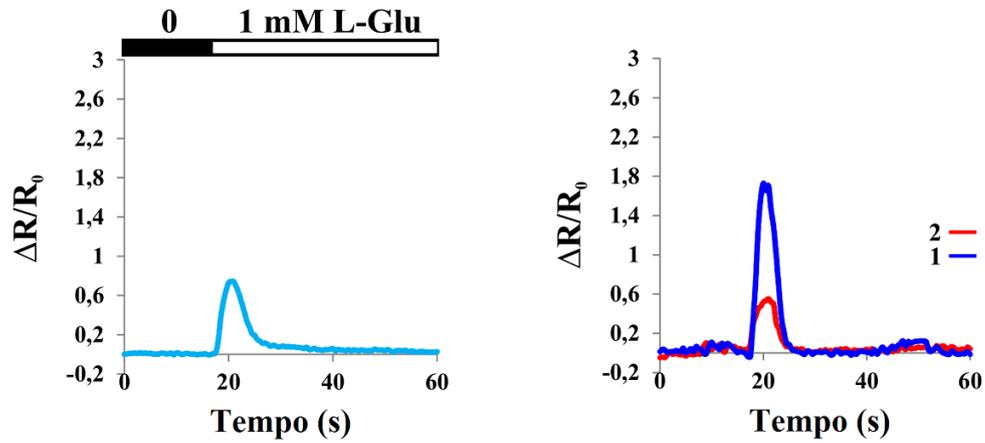


Figura 4.8: Grafico dell'andamento nel tempo del ratio nel citosol in risposta al glutammato: a sinistra risposta media, a destra risposta delle singole cellule

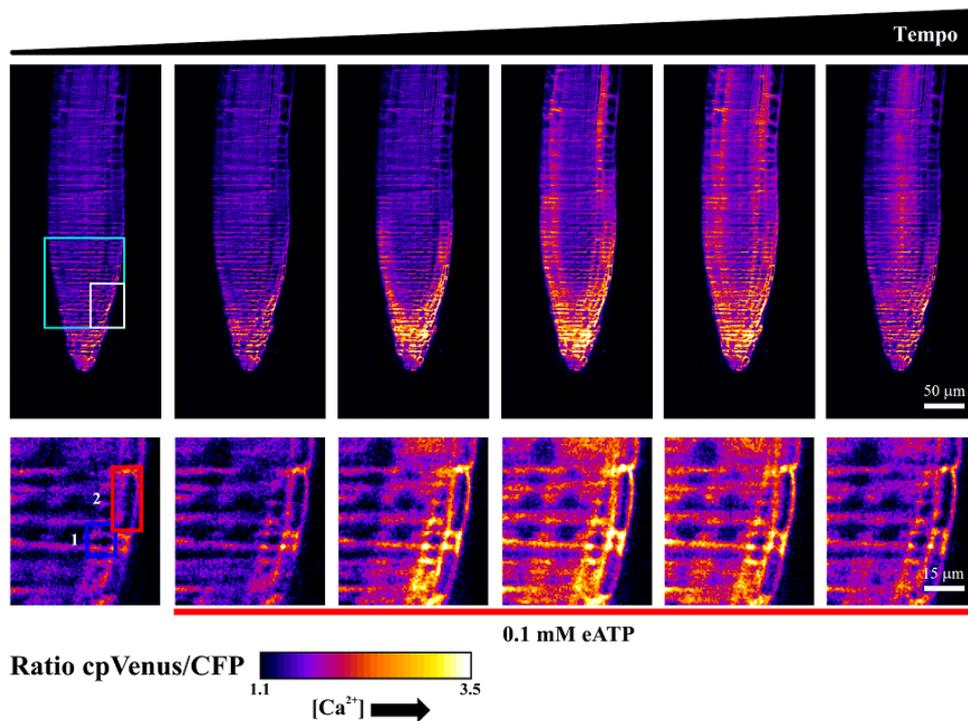


Figura 4.9: Immagini nel tempo del ratio nel citosol in risposta all'ATP (singolo piano)

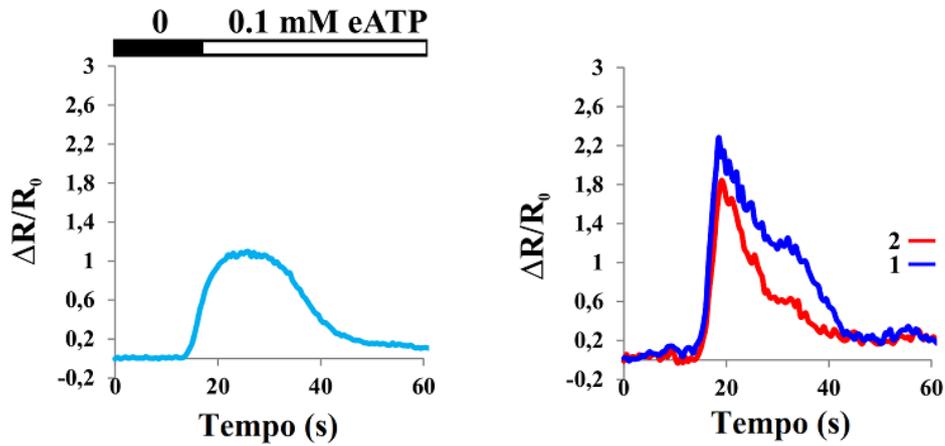


Figura 4.10: Grafico dell'andamento nel tempo del ratio nel citosol in risposta all'ATP: a sinistra risposta media, a destra risposta delle singole cellule

ta sono differenti: l'ATP, infatti, induce una risposta piú sostenuta e piú duratura nel tempo che coinvolge una zona piú grande della radice.

Sulla base dei risultati ottenuti risulta chiaro che le analisi cinetiche di una risposta media non riflettono necessariamente la risposta di una singola cellula. Per questo motivo, sfruttando la risoluzione offerta dalla SPIM, é stata condotta un'analisi su due cellule differenti (evidenziate da un rettangolo rosso e da uno blu nelle figure 4.7 e 4.9). Dai grafici della variazione di ratio nel tempo (fig.4.8 e 4.10 a destra) si vede chiaramente che la dinamica del Ca^{2+} in risposta al glutammato presenta dei picchi molto piú ravvicinati rispetto a quelli in risposta all'ATP. Dal confronto delle dinamiche del Ca^{2+} nelle due diverse cellule si puó notare come, nel caso dei risposta al glutammato, i picchi presentino ampiezze notevolmente differenti ma dinamica temporale simile. Nel caso di risposta all'ATP, invece, si nota una certa somiglianza nell'ampiezza dei picchi ma una diversa dinamica temporale.

Questi risultati provano quindi che la risoluzione offerta dalla SPIM ben si adatta allo studio di singola cellula in un campione complesso. É possibile quindi affermare che la SPIM costituisce una valida alternativa alla microscopia confocale, se l'intento é quello di studiare un singolo piano. Grazie alla velocità con cui é stato possibile acquisire le immagini di un singolo piano della radice, si puó inoltre affermare che la SPIM rappresenta uno strumento utile per lo studio dettagliato di come il segnale di Ca^{2+} si propaga all'interno della pianta.

4.2.2 Analisi tridimensionale

In questa serie di esperimenti si andranno a studiare le dinamiche del Ca^{2+} su piani diversi. Questo di fatto prevede la combinazione delle due tecniche di scansione: quella tridimensionale e quella di time lapse. L'introduzione della scansione lungo z ha rallentato notevolmente il processo di acquisizione, considerata la velocità limitata del traslatore utilizzato. Si è deciso quindi di utilizzare solamente l'ATP come stimolo; questa scelta è stata guidata dal fatto che, come sottolineato prima, l'ATP presenta una dinamica di risposta più lenta. Per dinamiche troppo veloci, ci sarebbe stato il rischio di non riuscire a rilevarla. Durante le acquisizioni sono quindi stati selezionati 9 piani a distanza di $5\mu m$ l'uno dall'altro e la scansione è avvenuta ogni 10 secondi per un tempo totale di misura di 5 minuti.

Come nel caso precedente sono state utilizzate le due linee transgeniche di piantine marcate nei nuclei e nel citosol, i cui risultati sono riportati rispettivamente in figura 4.11 e 4.12. Muovendosi in direzione verticale nelle due figure si vedono piani diversi della pianta nello stesso istante di tempo. Muovendosi invece in orizzontale si vede l'evoluzione dello stesso piano a tempi differenti. Alla fine di ogni riga è riportato il grafico della variazione del ratio ottenuto mediando su tutta l'immagine. Da questi è possibile vedere che, sia nel caso del citosol, sia nel caso dei nuclei, la risposta all'ATP nei diversi piani è differente per ampiezza dei picchi e per dinamica. È poi interessante notare come la dinamica del Ca^{2+} nel citosol risulti più oscillante di quella dei nuclei. Grazie alle acquisizioni effettuate è possibile ottenere anche una ricostruzione tridimensionale della risposta allo stimolo tramite software. In questo modo si è potuta visualizzare l'intera morfologia della punta della radice permettendo di apprezzare allo stesso tempo la risposta generale e i dettagli della punta della radice.

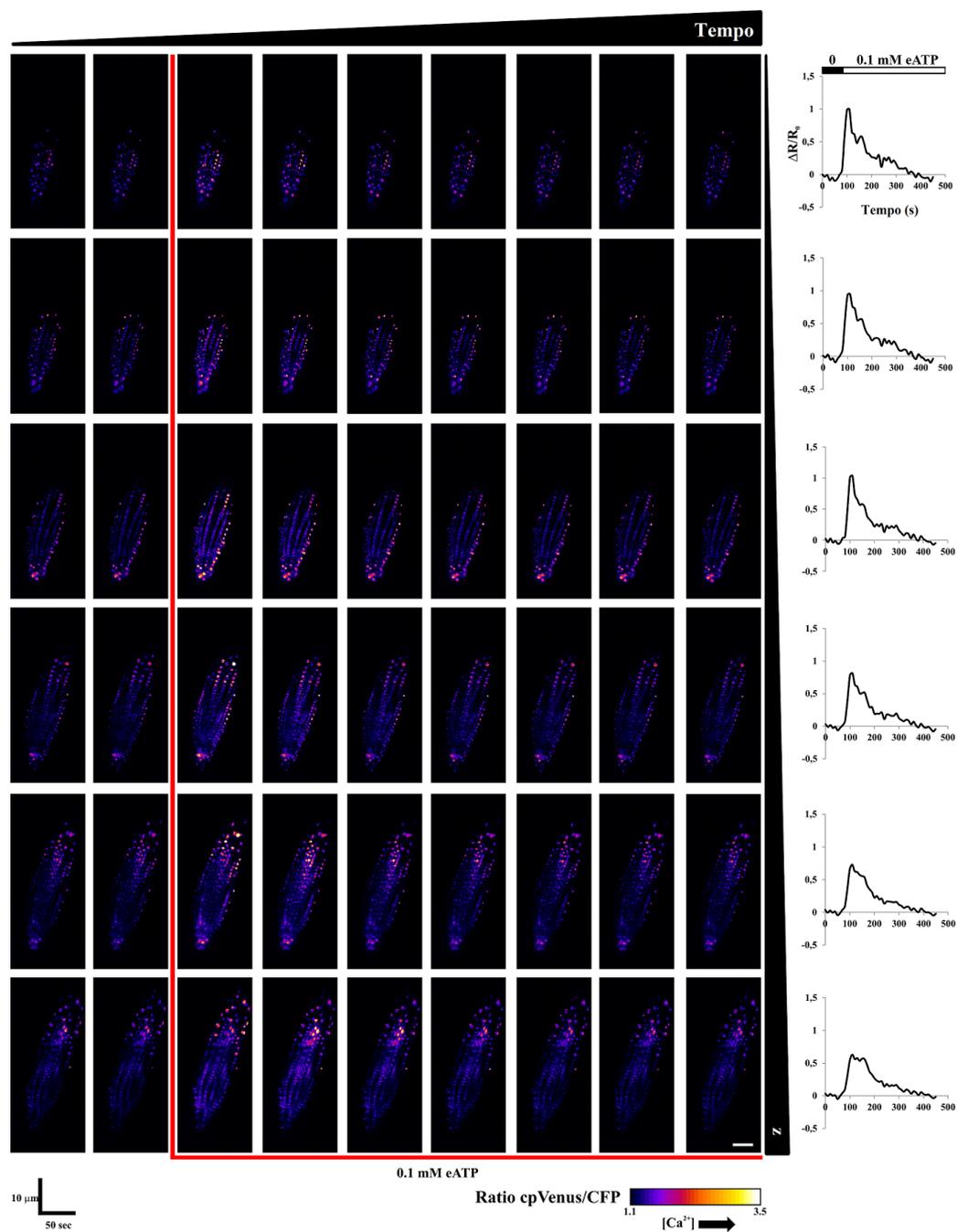


Figura 4.11: Immagini e grafici nel tempo del ratio nei nuclei in risposta al glutammato (piú piani selezionati)

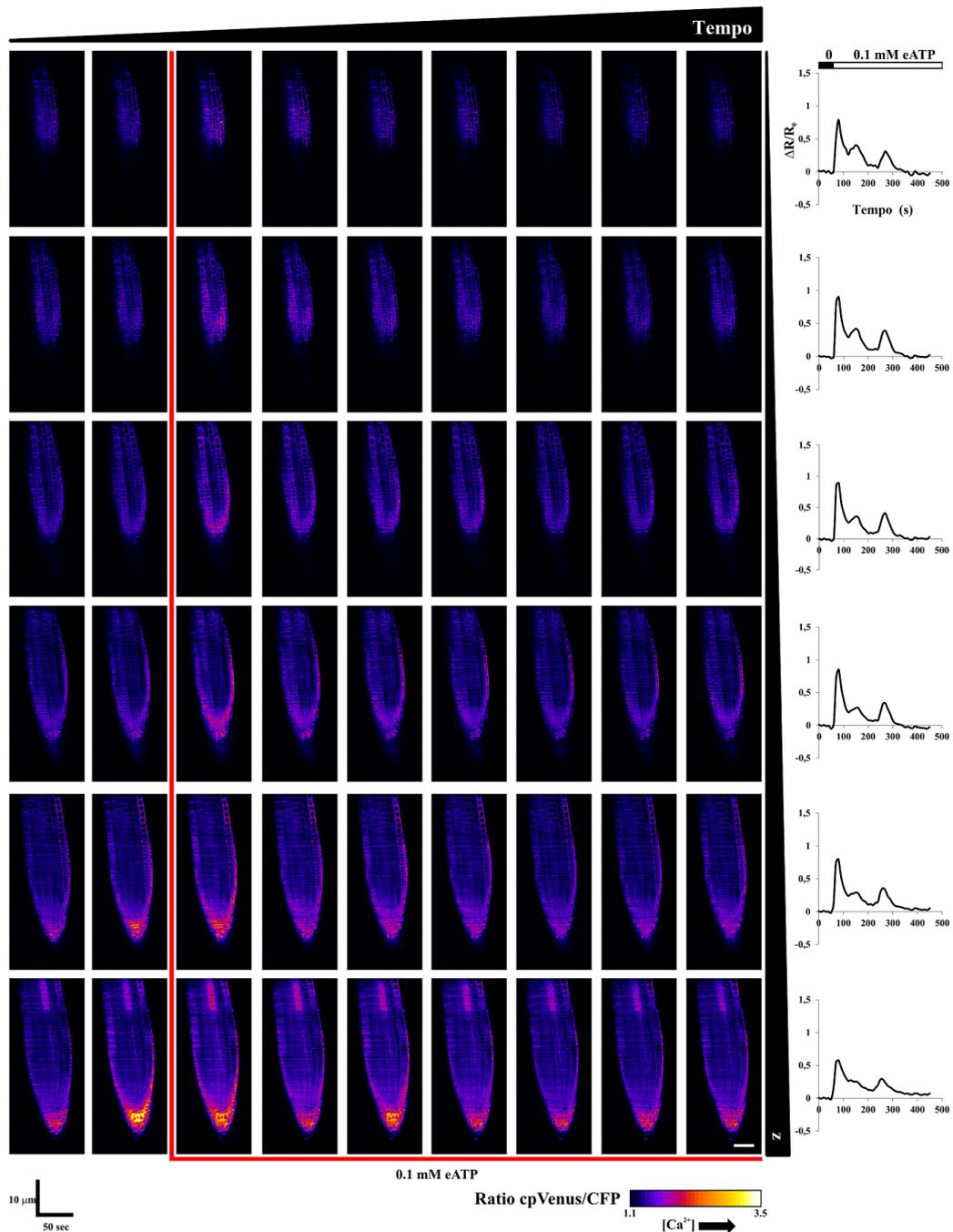


Figura 4.12: Immagini e grafici nel tempo del ratio nel citosol in risposta all'ATP (più piani selezionati)

4.3 Possibili sviluppi

Nonostante i buoni risultati ottenuti, il sistema di SPIM presenta ancora alcune problematiche che andrebbero risolte.

Per quanto riguarda la qualità dell'immagine, i maggiori limiti del sistema sono la presenza delle ombre, dovuta all'assorbimento, e il degrado progressivo nell'immagine dovuto allo scattering del tessuto del campione. Per eliminare le linee d'ombra si potrebbe integrare nella linea di illuminazione della SPIM uno specchio risonante in modo da far inclinare verticalmente il foglietto di luce (vedi paragrafo 2.3). Questo andrebbe posizionato tra lo shutter e la lente cilindrica ad una distanza da quest'ultima pari alla sua focale. In questo modo le ombre verrebbero notevolmente ridotte migliorando la qualità dell'immagine. In merito ai problemi di assorbimento, invece, si potrebbe implementare un sistema multidirezionale come spiegato in [18]. Verrebbero utilizzate due linee di illuminazione con due foglietti di luce che entrano nel campione da parti opposte (vedi paragrafo 2.3). Questo però non risolverebbe il problema nell'imaging di parti in profondità del campione. Sarebbe perciò preferibile aggiungere al sistema di movimentazione del campione un rotatore, in modo da poter acquisire immagini del campione stesso da ogni suo lato. In questo caso basterebbe una sola linea di illuminazione e si ricorrerebbe in un secondo momento a una fusione delle immagini tramite elaborazione software. Il foglietto si troverebbe però sempre a metà dello spessore del campione rendendo inevitabile un po' di scattering e il bleaching della zona centrale del campione. Altra miglioria che potrebbe essere apportata al sistema esistente è la sostituzione dell'attuale traslatore con uno più veloce in modo da poter seguire in modo più accurato anche dinamiche temporali più rapide nelle acquisizioni tridimensionali.

Dal punto di vista biologico il sistema si è dimostrato particolarmente adatto a mantenere le piantine in condizioni fisiologiche grazie alla possibilità di mantenere la pianta in posizione verticale, in presenza di luce e aria nella parte aerea della stessa e per la bassa potenza del laser utilizzata (dell'ordine dei μW) che ha permesso di non danneggiare il campione. La tecnica si è dimostrata valida per lo studio delle dinamiche del Ca^{2+} e si potrebbe quindi pensare di estendere gli esperimenti ad altre linee transgeniche, magari utilizzando anche nuovi stimoli, per ottenere un quadro più completo di tali dinamiche all'interno della pianta.

In futuro potrebbe essere interessante introdurre anche un sistema di perfusione in modo che gli stimoli possano essere dati in modo più uniforme. La perfusione, permettendo un ricambio continuo della soluzione salina, permetterebbe di fare esperimenti di time-lapse anche su tempi lunghi.

Si potrebbero così studiare processi di divisione cellulare, dinamiche cinetiche dei nuclei e, per tempi ancora più lunghi, anche la dinamica di crescita della radice.

Capitolo 5

Conclusioni

In questo lavoro abbiamo descritto come siamo riusciti a realizzare un sistema di SPIM-FRET volto allo studio delle dinamiche del Ca^{2+} in piante trasgeniche di *Arabidopsis thaliana*

Innanzitutto sono stati chiariti i concetti teorici: da una parte abbiamo illustrato la FRET, che é stato il meccanismo grazie al quale abbiamo potuto rivelare i transienti del Ca^{2+} nelle radici delle piante, e dall'altra é stato chiarito il principio alla base della SPIM. É stato poi descritto il setup che abbiamo prima assemblato e poi utilizzato per le acquisizioni. Abbiamo quindi ricavato la scala delle immagini e calcolato la point spread function del sistema. Abbiamo illustrato, con anche degli schemi, il cammino ottico percorso dal fascio laser e dalla luce di fluorescenza in ogni punto del sistema mettendo in evidenza in che modo abbiamo ottenuto la divisione dei due canali in raccolta. Abbiamo quindi spiegato nel dettaglio la procedura che abbiamo studiato per allineare il fascio laser a formare il foglietto di luce e quella per rendere simmetriche le immagini dei due canali di fluorescenza. Abbiamo illustrato i software grazie ai quali abbiamo fatto le acquisizioni e quelli di cui ci siamo serviti per elaborare le immagini ottenute. Infine abbiamo utilizzato il nostro sistema per fare ricostruzioni tridimensionali di radici dell'*Arabidopsis thaliana* geneticamente modificata e per studiarne le dinamiche del Ca^{2+} *in vivo*. Le due linee usate sono state quelle con marcatura nel nucleo e nel citosol. Entrambe sono state sottoposte a due diversi stimoli: glutammato e ATP. Abbiamo quindi messo a confronto le risposte ai diversi stimoli per ogni linea e successivamente abbiamo confrontato le linee tra loro in risposta ai rispettivi stimoli.

I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti grazie alla buona qualità delle immagini (risoluzione a singola cellula), al basso photobleaching e al fatto che le piante sono state tenute in condizioni fisiologiche per tutta la durata delle acquisizioni. La SPIM si é dimostrata in grado di penetrare

in profondità nel campione e di visualizzarne una porzione abbastanza estesa nonostante la sua semplicità e il suo basso costo.

Sebbene i risultati ottenuti siano buoni, il sistema presenta ancora dei problemi dovuti allo scattering e all'assorbimento di luce all'interno del campione. Per migliorare la qualità delle immagini si potrebbe pensare di aggiungere una seconda linea di illuminazione laser (mSPIM, vedi paragrafo 2.3) o di aggiungere un rotatore al sistema di movimentazione del campione in modo da poter acquisire immagini del campione stesso da ogni suo lato.

Dal punto di vista biologico la SPIM può dimostrarsi utile nello studio di altri compartimenti cellulari e delle dinamiche del Ca^{2+} in risposta ad altri stimoli. Inoltre può essere utilizzata anche per la mappatura tridimensionale di altri campioni biologici semitrasparenti e di eventuali altre dinamiche di Ca^{2+} .

Bibliografia

- [1] Biotechnology and life sciences in baden-württemberg.
www.bio-pro.de/magazin/thema/00180/index.html?lang=en&artikelid=/artikel/03227/index.html.
Microscopy resource center website.
- [2] Confocal microscopy. [http://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5\\$_\\$8.htm](http://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5$_$8.htm). John Innes Center.
- [3] Fluorescence. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/fluorescencehome.html>. Molecular Expressions website.
- [4] Fluorescence filter spectra. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorointrohome.html>. Molecular Expressions website.
- [5] Fluorescence microscopy. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>. Molecular Expressions website.
- [6] Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fret/fretintro.html>. Microscopy resource center website.
- [7] Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. <http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/fluorointroduction.html>. Microscopy resource center website.
- [8] Jablonski energy diagram. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/lightandcolor/index.html>. Molecular Expressions website.

- [9] Overview of excitation and emission fundamentals. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/excitation.html>. Molecular Expressions website.
- [10] Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. <http://dev.biologists.org/content/136/12/1963/F2.expansion.html>. Development.
- [11] Ignacio Arganda-Carreras, Carlos Oscar Sánchez Sorzano, Roberto Marabini, José María Carazo, Carlos Ortiz-de Solorzano, and Jan Kybic. Consistent and elastic registration of histological sections using vector-spline regularization, May 2006.
- [12] Pilippe I.H. Bastiaens and Rainer Pepperkok. Observing proteins in their natural habitat: the living cell. *Trends in Biochemical Sciences*, 25:631–636, 2000.
- [13] Claude Berney and Gaudenz Danuser. FRET or no FRET: A quantitative comparison. *Biophysical Journal*, 84:3992–4010, 2003.
- [14] Ye Chen, James D. Mills, and Periasamy Ammasi. Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM. *International Society of Differentiation*, 71:528–541, 2003.
- [15] Arthur Edelstein, Nenad Amodaj, Karl Hoover, Ron Vale, and Nico Stuurman. *Computer Control of Microscopes Using μ Manager*. John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- [16] Wolf B. Frommer, Michael W. Davidson, and Robert E. Campbell. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Published online*, 2009.
- [17] Gerald W. Gordon, Gail Berry, Xiao Huan Liang, Beth Levine, and Brian Herman. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 74(5):2702–2713, 1998.
- [18] Jan Huisken and Didier YR Stainier. Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM). *Optics letters*, 32(17):2608–2610, 2007.

- [19] Jan Huisken, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst HK Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686):1007–1009, 2004.
- [20] Anne K. Kenworthy. Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods*, 24(3):289–296, 2001.
- [21] Joseph R Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, 2009.
- [22] Giovanna Loro, Ilaria Drago, Tullio Pozzan, Fiorella Lo Sciavo, Michela Zottini, and Alex Costa. Targeting of cameleons to various subcellular compartments reveals a strict cytoplasmic/mitochondrial Ca^{2+} handling relationship in plant cells. *The Plant Journal*, 71:1–13, 2012.
- [23] Alexis Maizel, Daniel von Wangenheim, Fernán Federici, Jim Haseloff, and Ernst H.K. Stelzer. High-resolution live imaging of plant growth in near physiological bright conditions using light sheet fluorescence microscopy. *The plant journal*, 68:377–385, 2011.
- [24] Takeharu Nagai, Shuichi Yamada, Takashi Tominaga, Michinori Ichikawa, and Atsushi Miyawaki. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(29):10554–10559, 2004.
- [25] Peter Gabriel Pitrone Kevin Eliceiri Johannes Schindelin Luke Stuyvenberg Pavel Tomancak, Jan Huisken. The openspim wiki. <http://www.openspim.org>. Openspim.
- [26] David W Piston and Gert-Jan Kremers. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in biochemical sciences*, 32(9):407–414, 2007.
- [27] Rudolf Rüdering, Marco Mongillo, Rosario Rizzuto, and Tullio Pozzan. Looking forward to seeing calcium. *Nature reviews | Molecular cell biology*, 4:579–585, 2003.
- [28] Harekrushna Sahoo. Förster resonance energy transfer—a spectroscopic nanoruler: Principle and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12(1):20–30, 2011.

- [29] Augusto Sciarra. Fading, quenching e photobleaching. [http://www.fluorescencemicroscopy.it/il\\$\\$_\\$fading.html](http://www.fluorescencemicroscopy.it/il$$_$fading.html). Fluorescence Microscopy.
- [30] Giovanni Sena, Zak Frentz, Kennet D. Birnbaum, and Stanislas Leibler. Quantitation of cellular dynamics in growing arabidopsis roots with light sheet microscopy. *PLoS ONE*, 6(6), 2011. e21303.
- [31] SR Swift and L Trinkle-Mulcahy. Basic principles of FRAP, FLIM and FRET. In *Proceedings of the Royal Microscopical Society*, volume 39, pages 3–11. London: Royal Microscopical Society,[1966]-c2004., 2004.
- [32] RY Tsien and A. Waggoner. Fluorophores for confocal microscopy. pages 267–274, 1995. New York: Plenum Press.
- [33] Horst Wallrabe and Ammasi Periasamy. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(1):19–27, 2005.
- [34] Michael Weber and Jan Huisken. Omnidirectional microscopy. *Nature Methods*, 9(7):656–657, 2012.
- [35] P.D. Zoon. Single molecule spectroscopy with confocal microscopy. [http://staff.science.uva.nl/~\\$zoon/sms/SMS.html](http://staff.science.uva.nl/~$zoon/sms/SMS.html). University of Amsterdam.