

Candidato: Tommaso Galgani
Relatore: Marco Capitanio; capitan@lens.unifi.it
Correlatore: Francesco Saverio Pavone; pavone@lens.unifi.it

Microscopia ottica di super-risoluzione tramite localizzazione di singoli cromofori

Nata e sviluppata negli ultimi due decenni, la microscopia in fluorescenza di super-risoluzione ha ampliato i confini dell'imaging biologico, rendendo possibile oltrepassare il limite di risoluzione ottica di un microscopio stabilito da Abbe nel 1873. Per più di 100 anni infatti, egli, elaborando la propria tesi a partire dal principio di Huygens-Fresnel e dalla teoria della diffrazione di Fraunhofer, aveva posto un limite invalicabile alla risoluzione ottenibile con un qualunque sistema di ottiche attestato intorno ai 200 nm per osservazioni nel visibile.

In questo lavoro di tesi ho approcciato il mondo della microscopia in fluorescenza di super-risoluzione, compiendo prima una sostanziosa ricerca in letteratura che mi permettesse di comprendere gli aspetti basilari e le reciproche differenze delle principali tecniche fino ad oggi sviluppate, approfondendo quelle basate sulla localizzazione di molecole fluorescenti ed in particolar modo la STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), e di assimilare concetti quali la risoluzione spaziale e temporale, anche in termini di fattori che contribuiscono ad accrescere l'errore sperimentale. A questo si accompagna una seconda parte più sperimentale in cui ho realizzato misure per la caratterizzazione di un apparato sperimentale per microscopia in fluorescenza di super-risoluzione con metodologia d-STORM (*direct* STORM) 2D, utilizzando un sistema di ottiche già realizzato presso uno dei laboratori del gruppo di biofisica del LENS ed ideato per misurazioni combinate di microscopia di super-risoluzione e *single particle tracking*.

Le misure che ho effettuato sono rivolte a determinare la posizione nel campo visivo del microscopio di molecole fluorescenti opportunamente stimulate da un laser con lunghezza d'onda di 633 nm, poste in soluzione all'interno di un vetrino. In processi di imaging è proprio l'accuratezza con cui si effettua questo tipo di misura a dare la risoluzione dell'immagine ottenuta. In questo tipo di procedimenti, infatti, le acquisizioni vengono ripetute ciclicamente e da ciascuna di queste si ottengono dati sulla posizione di ogni singola molecola fluorescente; l'immagine finale è il risultato di una "sovrapposizione" delle varie acquisizioni e la sua risoluzione coinciderà con la precisione con cui è stato possibile localizzare ogni cromoforo. Nasce allora la necessità di poter attivare, condizione necessaria alla successiva eccitazione, per ogni ciclo di acquisizione un numero di molecole limitato in maniera che risultino separate fra loro di una distanza almeno pari al limite di risoluzione. Per far questo ho inserito nell'apparato, allineandolo con il sistema di ottiche già presenti, un laser con lunghezza d'onda di 405 nm ed ho valutato l'efficienza di attivazione dei cromofori per intensità e tempi di esposizione del laser diversi.

La determinazione della posizione di ciascuna molecola avviene mediante un fit della funzione che descrive il profilo d'intensità della luce emessa per fluorescenza. Dato il suo andamento, si utilizza come modello una curva gaussiana. L'accuratezza con cui è stato possibile localizzare ciascuna molecola fluorescente nel campo visivo, utilizzando la tecnica di microscopia d-STORM 2D, ha permesso di ottenere una super-risoluzione di ~ 10 nm. Questo risultato è in linea con l'attuale stato dell'arte della microscopia in fluorescenza STORM e d-STORM 2D di super-risoluzione, per la quale i migliori riscontri in termini di risoluzione raggiungono valori di poco inferiore ai 10 nm.

La valutazione del rapporto di attivazione, definito come quello fra il numero delle sorgenti emissive in un primo ciclo di eccitazione-emissione e quelle seguenti una successiva attivazione, ha portato risultati in assoluto migliori per intensità del laser più alte (250 W/cm^2) e tempi di esposizione più lunghi: per un'interazione di durata 10 s tale rapporto risulta essere pari al 69 % sulla singola acquisizione. Utilizzando l'apparato per imaging biologico, risulterebbe invece preferibile utilizzare tempi di esposizione più brevi: per un'interazione di durata 0,1 s il rapporto di riattivazione scenderebbe al 52 %, ma senza dilatare troppo i tempi di misura se ne guadagnerebbe in risoluzione temporale per due ordini di grandezza.