



NOTIZIE DA FIRC &lt;&lt;

## IFOM - Istituto FIRC di Oncologia Molecolare

Estratto dal notiziario "Fondamentale" Gennaio 2006

### Nanoesploratori in punta di LASER

di Francesca Noceti

A Genova è attivo il programma di ricerca IFOM che sfrutta la straordinaria potenza dei microscopi ottici di ultimissima generazione per vedere la cellula in tre dimensioni e mentre svolge le sue attività.

Immaginiamo di esplorare una foresta intricatissima. Ci sono ostacoli da spostare sul cammino, ma ci sono anche tantissimi animali e uccelli sugli alberi. Se ci muovessimo 'a colpi di machete', potremmo esplorare la foresta a metà, perché faremmo scappare tutti gli animali e non riusciremmo a vedere com'è la vita normalmente in quell'ambiente. Perciò dobbiamo muoverci senza perturbare la foresta, dobbiamo esplorarla 'in punta di piedi'. Ecco, questo è esattamente quello che fa la microscopia ottica, in particolare la microscopia ottica a due fotoni, con la cellula: la esplora in punta di piedi". A

parlare così è Alberto Diaspro, direttore del programma di ricerca IFOM che si occupa di "microscopia e nanoscopia per inseguimento dinamico di biomolecole in 3D in sistemi cellulari", attivo dal 2004 presso il Dipartimento di fisica dell'università degli Studi di Genova. Con le sue sofisticate tecniche di microscopia, il team di Diaspro raccoglie immagini che vanno dai tessuti alle singole cellule, alle strutture subcellulari fino ad arrivare alle molecole.

"Il nostro obiettivo" spiega Diaspro "è fare una mappa completa di quello che succede dentro una cella, molecola per molecola. Vogliamo capire come funziona l'organizzazione della 'foresta-cellula'. Una volta ottenute queste mappe tridimensionali, che possono essere raccolte nel tempo per seguire l'evolversi temporale delle strutture, si possono realizzare immagini digitali che rappresentano modelli tridimensionali degli oggetti studiati".

Il punto di forza di queste tecniche è proprio la possibilità di aggiungere la dimensione 'tempo' alle tre dimensioni dello spazio. "Il nostro sogno" continua lo scienziato "è arrivare a essere in grado di prevedere, solo guardando le mappe, come una data cellula si può evolvere, se sta facendo le cose giuste o se rischia di diventare una cellula tumorale". Lo strumento fondamentale per questa esplorazione finissima e insieme delicata della vita è appunto il microscopio ottico a due fotoni.



Alberto Diaspro dell'università degli Studi di Genova circondato dal suo team di ricercatori

### >> ENERGIA 'A RATE'

Per fare tutto ciò bisogna partire dal microscopio a fluorescenza. In questo sistema, molto usato in biologia molecolare, la luce (cioè i fotoni) colpisce delle molecole fluorescenti 'attaccate' al campione. Queste molecole sono in grado, se colpite da fotoni di una particolare energia, di emettere a loro volta luce brillante di un particolare colore (un po' come fanno le stelline che attacchiamo al soffitto nella camera dei bambini e che emettono, appena spenta la luce della stanza, una luminosità giallognola). Per avere fasci di luce molto concentrati e tutti della stessa energia (esattamente quella particolare energia che permette l'emissione della fluorescenza), si usano i laser.

Ma c'è un inghippo: i laser, che sono sorgenti di fotoni estremamente potenti, se puntati su una cellula permettono di osservarla, ma per un tempo relativamente breve, perché la possono danneggiare. "Per ovviare a questo problema" spiega Diaspro "si usano laser che, invece di investire il campione con un fascio

di luce fissa, emettono 'pacchetti' di fotoni, cioè luce intermittente, per intervalli sufficienti a far emettere la fluorescenza ma non abbastanza lunghi da danneggiare i campioni biologici".

E non basta, perché fin qui si possono ottenere immagini di buona qualità e anche quadridimensionali (le tre dimensioni dello spazio e il tempo) usando i cosiddetti microscopi confocali, che fanno una serie di scansioni complete del campione in lunghezza, larghezza e profondità, e poi le ricompongono in specie di animazioni 3D. Ma queste immagini non sono ancora abbastanza precise per cogliere tutti i dettagli molecolari del funzionamento delle cellule, né riescono ad arrivare molto in profondità. "La vera 'epifania' è rappresentata dalla tecnica di eccitazione a due fotoni, che invia sui campioni energia a rate" continua Diaspro. "Supponiamo di avere delle molecole fluorescenti in grado di emettere se colpite da fotoni di energia 10. Noi possiamo mandare sul campione due rate di energia 5, cioè due fotoni di energia 5, ma così ravvicinate l'una all'altra che il campione crede di averne ricevuta una sola ed emette la sua fluorescenza. Naturalmente abbiamo bisogno di sorgenti laser ultraveloci e molto potenti, in grado di mandare sul campione un gran numero di fotoni per ogni 'pacchetto', perché altrimenti l'eccitazione a due fotoni, che è un fenomeno in natura rarissimo, non si vedrebbe praticamente mai".

Si usano dunque energie più basse che, oltre a danneggiare ancora meno le cellule, provocano meno 'disturbi' nell'immagine, che risulta estremamente nitida del punto di fuoco del microscopio. Non solo. "Le energie più basse diffondono meno" spiega ancora Diaspro "cioè si 'perdono meno per strada' e così arriva più luce più in profondità".

#### **>> FOTONI PER CAPIRE IL CANCRO**

Con questi potentissimi eppure delicatissimi strumenti, il team di Diaspro, in collaborazione con il gruppo di imaging attivo presso il Campus IFOM-IEO di Milano e diretto da Mario Faretta, sta studiando dettagli della struttura e della funzione cellulare importanti per capire i meccanismi molecolari della trasformazione tumorale. "Osserviamo" afferma Diaspro "tutte le strutture cellulari, cioè il nucleo, il citoscheletro e la membrana in cellule normali e tumorali. Osserviamo il cosiddetto 'traffico' molecolare, cioè i movimenti delle molecole all'interno delle strutture subcellulari per capire se è possibile fare delle previsioni sull'evoluzione delle cellule e, nel caso di cellule tumorali, per seguire l'effetto delle terapie".

Per esempio, proprio in collaborazione con Faretta, Diaspro sta portando avanti uno studio per caratterizzare i meccanismi di trasformazione della cromatina del nucleo (la cromatina è una sostanza costituita da DNA e proteine, ed è quella che conferisce la forma ai cromosomi) durante la divisione cellulare. "Usiamo" spiega Diaspro "delle proteine fluorescenti che sono naturalmente presenti nelle cellule, ma non nel nucleo. Con tecniche di ingegneria genetica facciamo in modo che le cellule producano queste proteine legate alla cromatina del nucleo. Poi 'accendiamo' le proteine fotoattivabili con l'eccitazione a due fotoni e lasciamo che la cellula si evolva. E riusciamo a ottenere immagini precise in volumi straordinariamente piccoli, dell'ordine del centesimo di femtolitro". Straordinariamente piccoli davvero, se pensiamo che un femtolitro è già un milionesimo di miliardesimo di litro. Con la stessa tecnica di osservazione, Diaspro e colleghi studiano anche l'effetto dei farmaci sulle cellule tumorali, per valutarne l'efficacia e l'eventuale tossicità.

#### **>> L'IDROLITINA DELLA RICERCA**

Il connubio tra ricerca in microscopia e oncologia molecolare è, dice Diaspro, "come la vecchia idrolitina del cavalier Gazzoni. Vi ricordate che ci volevano due bustine, quella rossa e quella blu, per avere l'acqua frizzante? Ebbene, la microscopia è la bustina rossa e l'oncologia molecolare è la bustina blu, e unendo le forze si possono raggiungere grandi risultati". L'interesse di Diaspro, laureato a Genova in ingegneria elettronica, è sempre stato orientato verso lo sviluppo della microscopia, e avrebbe voluto da tempo applicare le sue conoscenze ai sistemi biologici. "Volevo che il mio lavoro potesse essere veramente utile" racconta lo scienziato "e il campo dell'oncologia è oggi così vicino a tutti noi che mi sembrava la strada giusta da percorrere. IFOM ha riconosciuto le potenzialità di questo connubio e così è nato il mio programma di ricerca".