



Seminari divulgativi



FAST - Servizio Tecnico Scientifico Grandi Strumentazioni e Core Facilities



*Microscopia confocale a
scansione laser:
i sorprendenti colori
dell'invisibile*

*Dr Serena Cecchetti, PhD
Confocal Microscopy Unit*

3 maggio 2017

Microscopia ottica

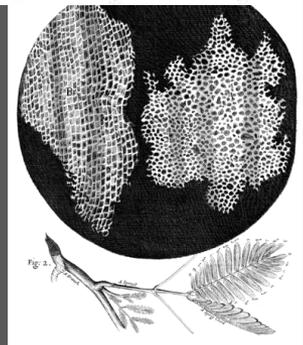
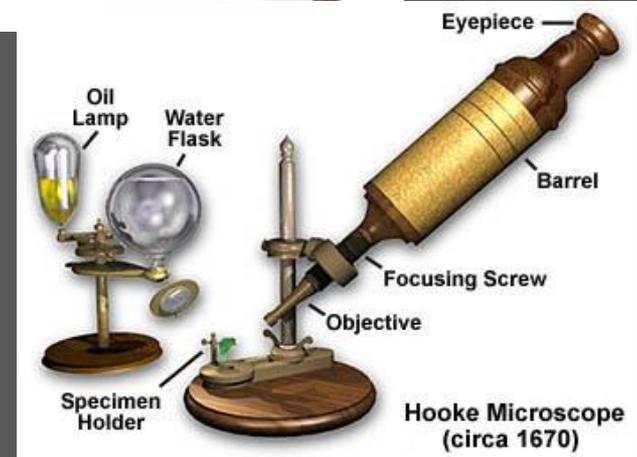
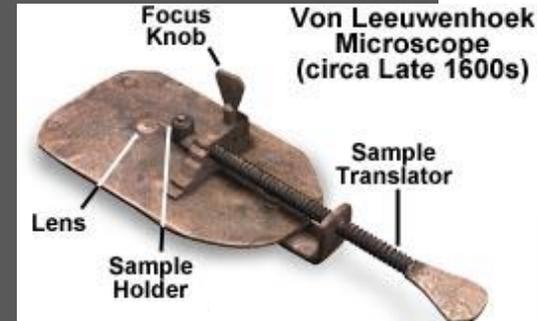
Il microscopio ottico è uno strumento progettato e costruito per ingrandire le immagini
Il più semplice è costituito da un tubo porta ottiche che sorregge due lenti convesse allineate in serie: l'obiettivo e l'oculare

I primi esempi di ingrandimento ottico risalgono alle **civiltà mesopotamiche**

1610 Galileo Galilei sviluppò un microscopio composto da una lente convessa ed una concava

1648 Anton van Leeuwenhoek osservò e descrisse numerosi microorganismi, utilizzando un microscopio semplice, ma in grado di raggiungere elevati ingrandimenti (400x)

1665 Robert Hooke, utilizzò una forma molto rudimentale di microscopio ottico composto



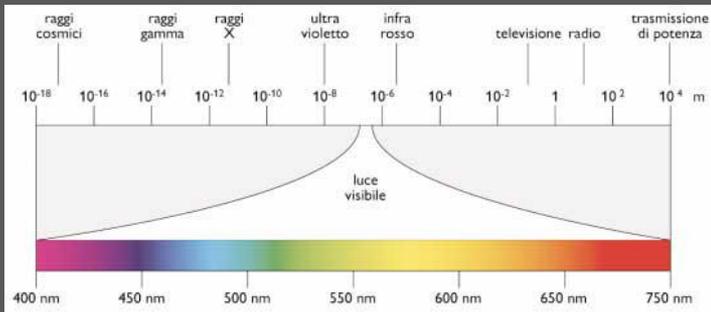
Microscopio ottico

Caratteristiche principali di un microscopio ottico sono:

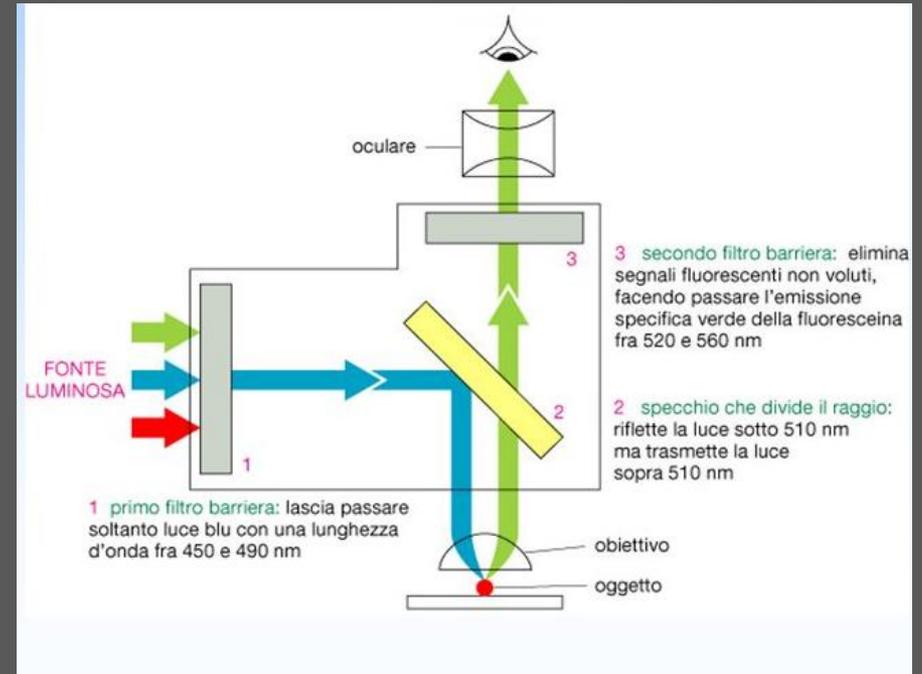
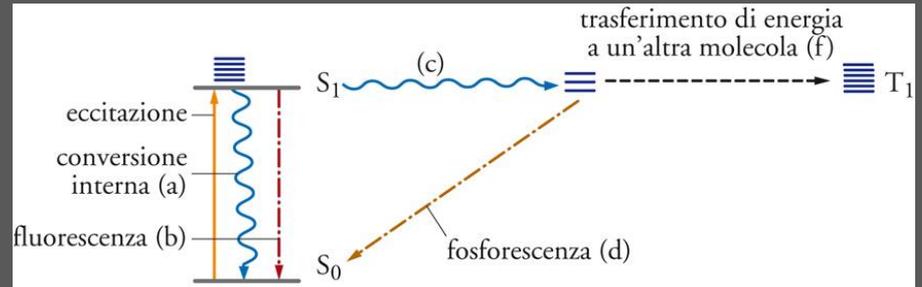
- ✓ **Il potere di ingrandimento** è il rapporto fra le dimensioni dell'immagine e quelle dell'oggetto e dipende dal prodotto degli ingrandimenti forniti dall'oculare e dall'obiettivo
- ✓ **Il potere di risoluzione** è un indice della ricchezza di particolari che si possono osservare nella struttura di un'immagine, si aggira normalmente sui 0,2 micron

Microscopia a fluorescenza

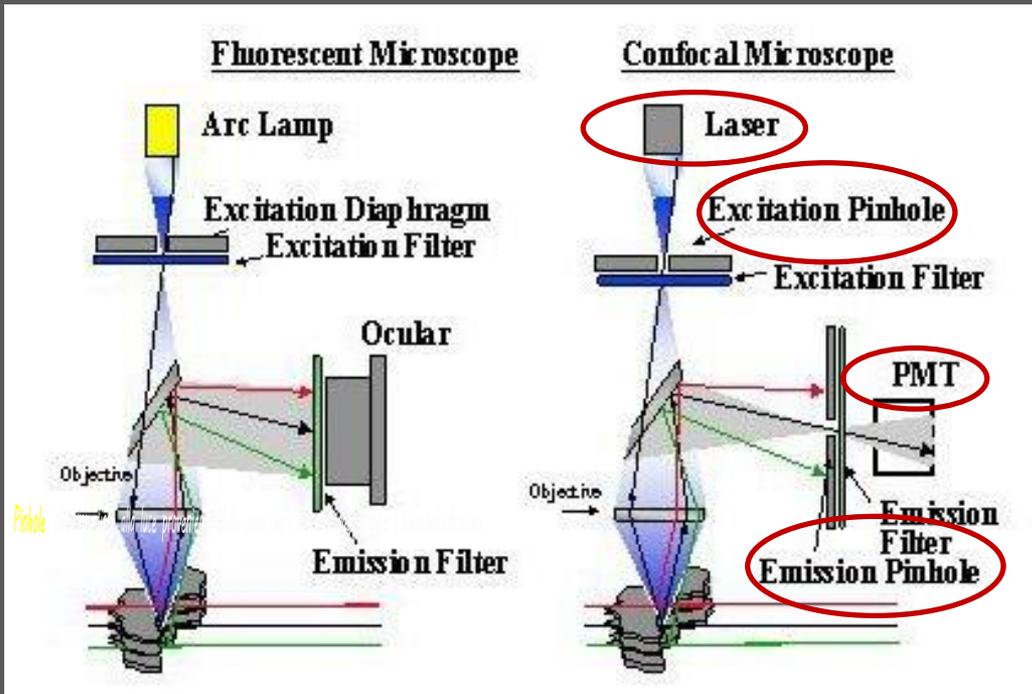
La fluorescenza è la proprietà di alcune sostanze di riemettere le radiazioni incidenti ricevute (nella maggior parte dei casi l'emissione ha una lunghezza d'onda maggiore all'interno dello spettro del visibile)



Lo spettro del visibile comprende solo una piccola parte delle radiazioni luminose tra 400 nm e 750 nm



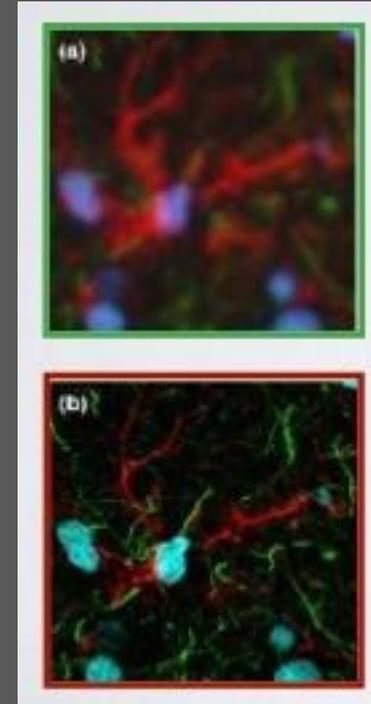
Microscopia Confocale a Scansione Laser



Laser: sorgente luminosa puntiforme molto intensa

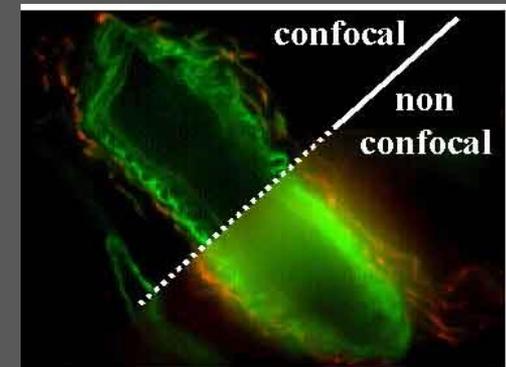
Fotomoltiplicatore: trasforma l'intensità luminosa in un segnale elettrico di intensità proporzionale

Pinhole: che impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco di raggiungere il fotomoltiplicatore



In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano di fuoco viene registrato e utilizzato nella formazione dell'immagine finale. Il risultato è un'immagine poco disturbata dalla diffusione della luce delle zone non a fuoco

Focalizzare con estrema precisione un laser sul preparato, aumentando notevolmente la risoluzione e la profondità di campo

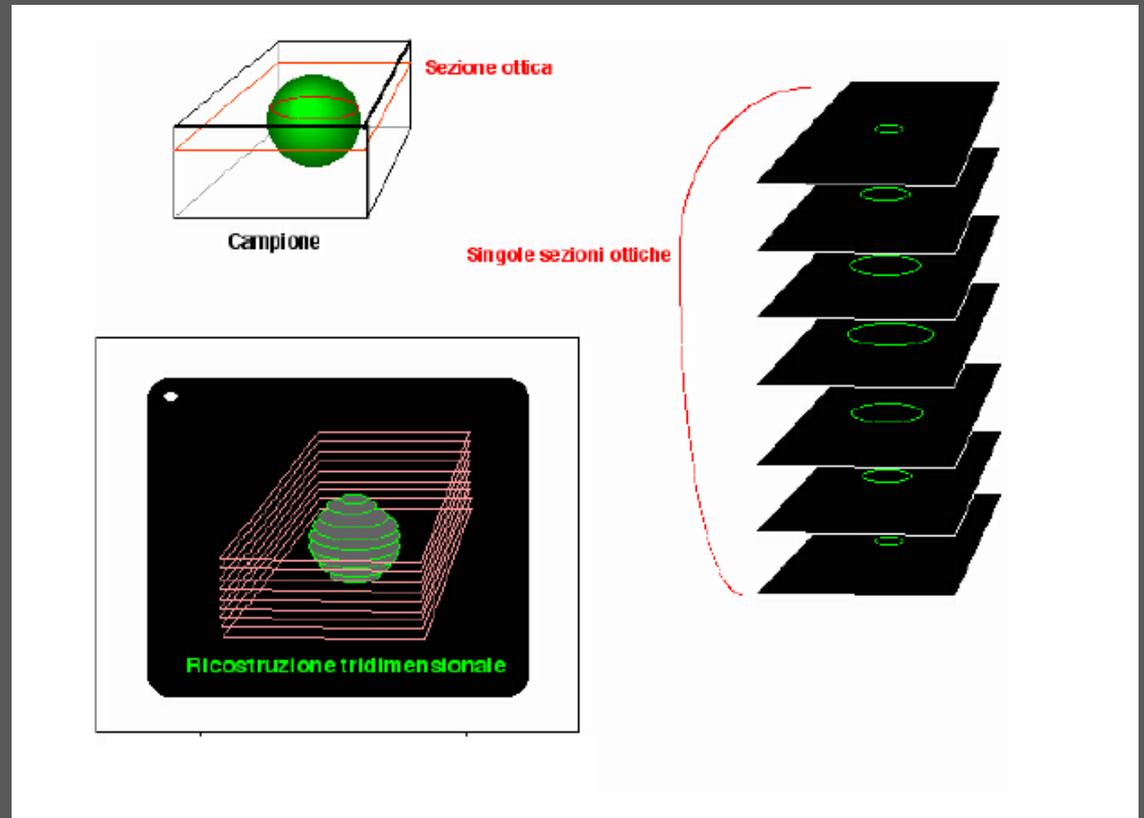


Microscopia Confocale a Scansione Laser

Ricostruzioni tridimensionali con risoluzione submicrometrica di una grande varietà di campioni, biologici e non (anche per la caratterizzazione di materiali, microstrutture e dispositivi)

Anche la luce di *eccitazione* ha un *pinhole*, in modo da illuminare solo una porzione microscopica del campione. Per ottenere la rappresentazione del campione, si muove il fascio di luce di punto in punto, in modo che tutto il piano situato alla profondità voluta venga illuminato dal fascio di luce secondo una precisa sequenza.

Spostando il campione *lungo l'asse z* dopo ogni scansione, è possibile eseguire una serie di scansioni successive corrispondenti ai piani focali via via più profondi all'interno del campione. Queste scansioni prendono il nome di *sezioni ottiche* e la loro sovrapposizione ordinata, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scandito, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco.



Leica TCS SP2 (2002)

Laser diodo UV 405 nm

Laser Ar/Kr 488 nm

Laser He/Ne 543/594 nm

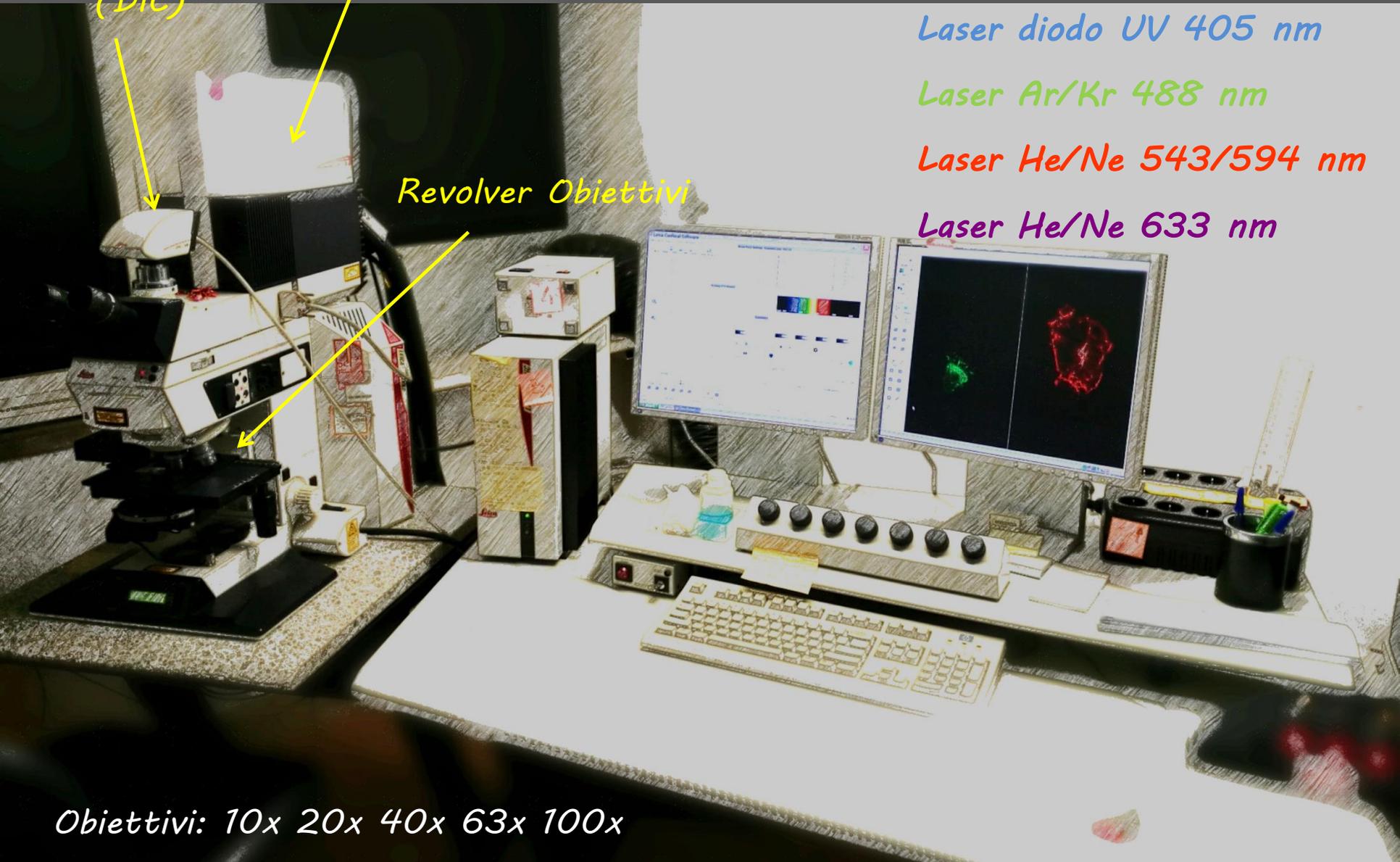
Laser He/Ne 633 nm

Camera Digitale
(DIC)

Testa Confocale

Revolver Obiettivi

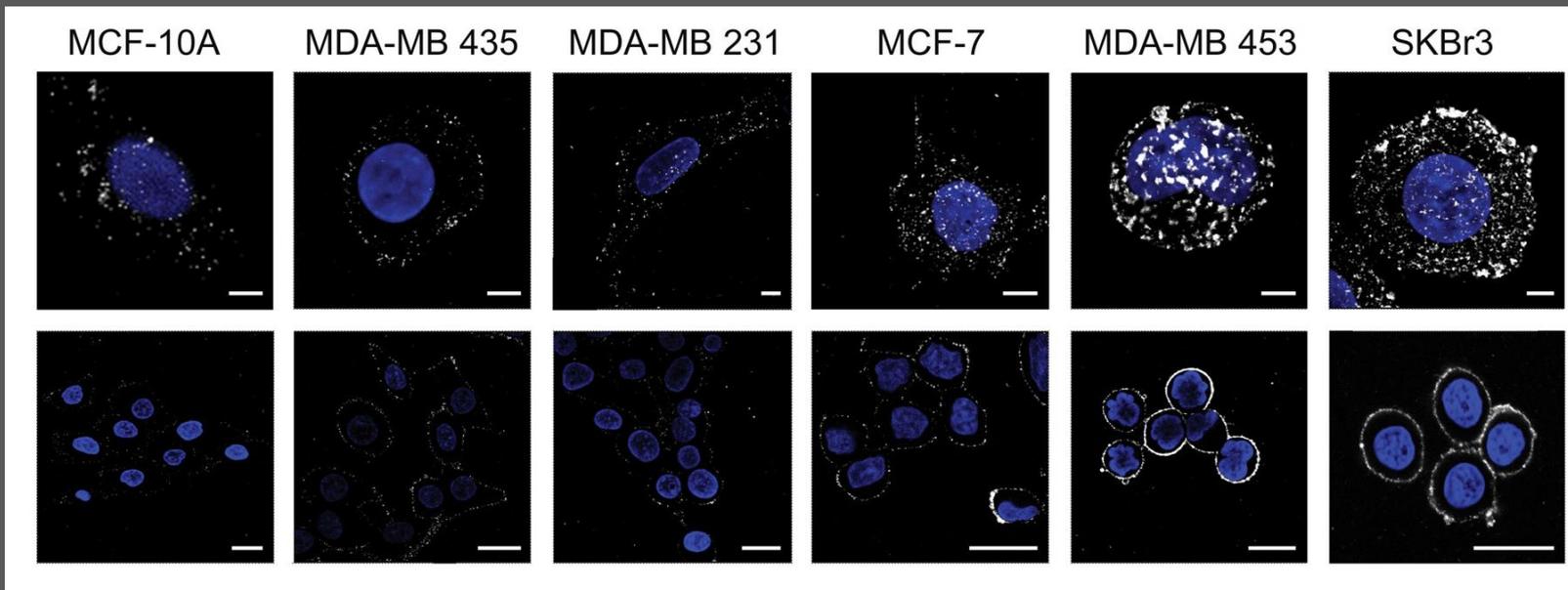
Obiettivi: 10x 20x 40x 63x 100x



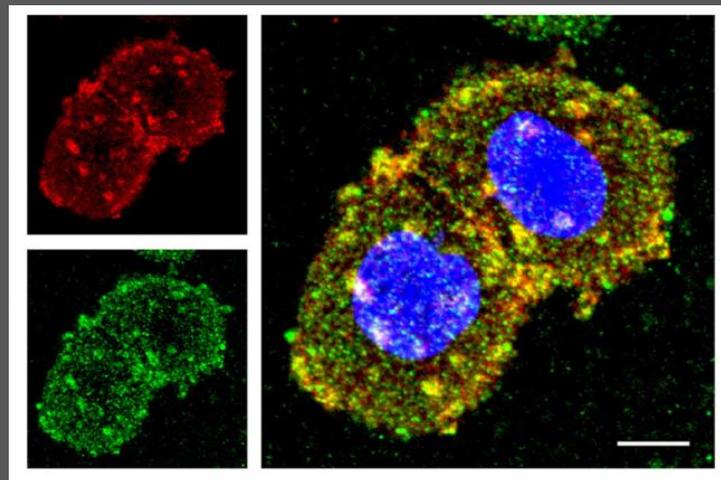
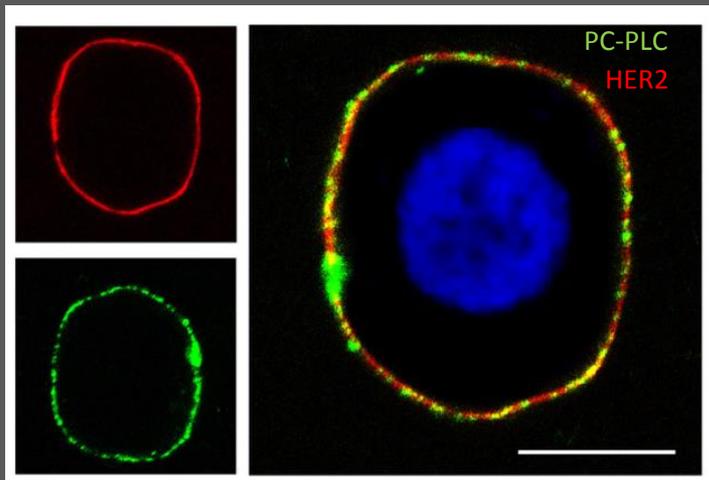


*Applicazioni della microscopia confocale
a scansione laser*

Espressione della PC-PLC nel carcinoma mammario

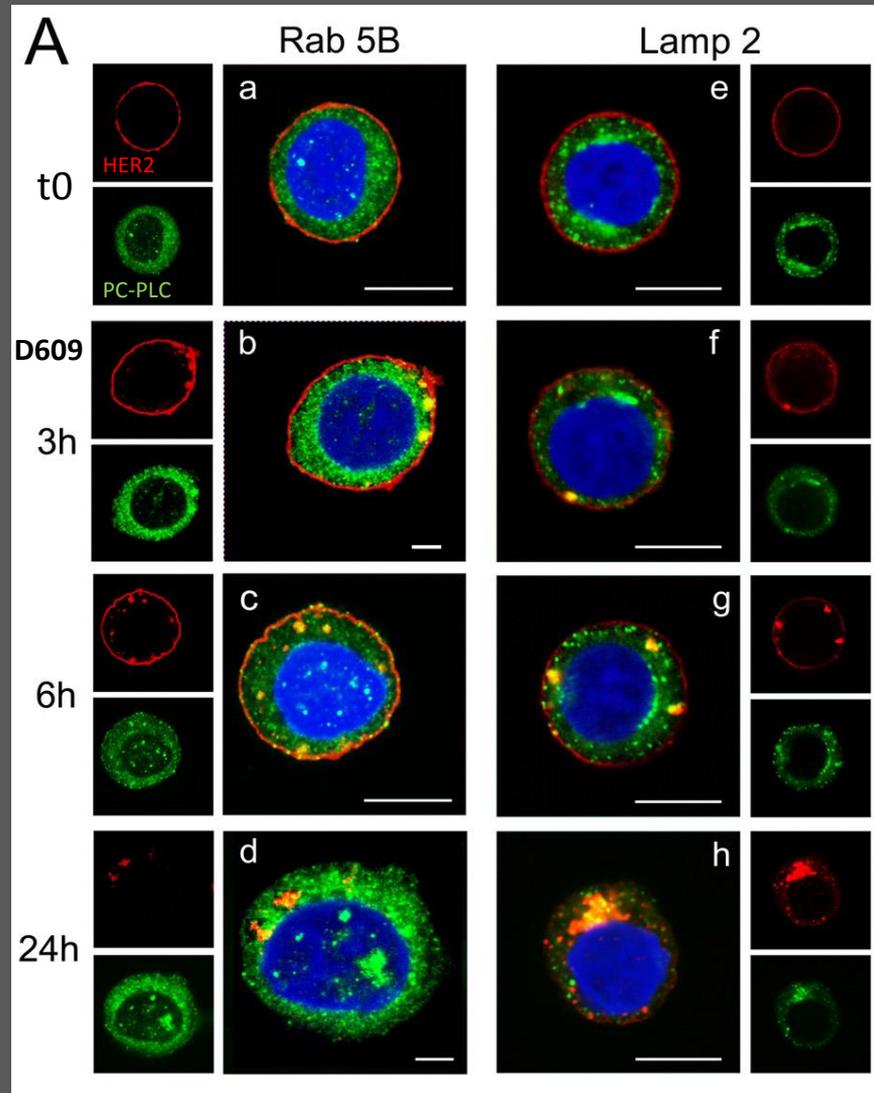


Singola
sezione
ottica

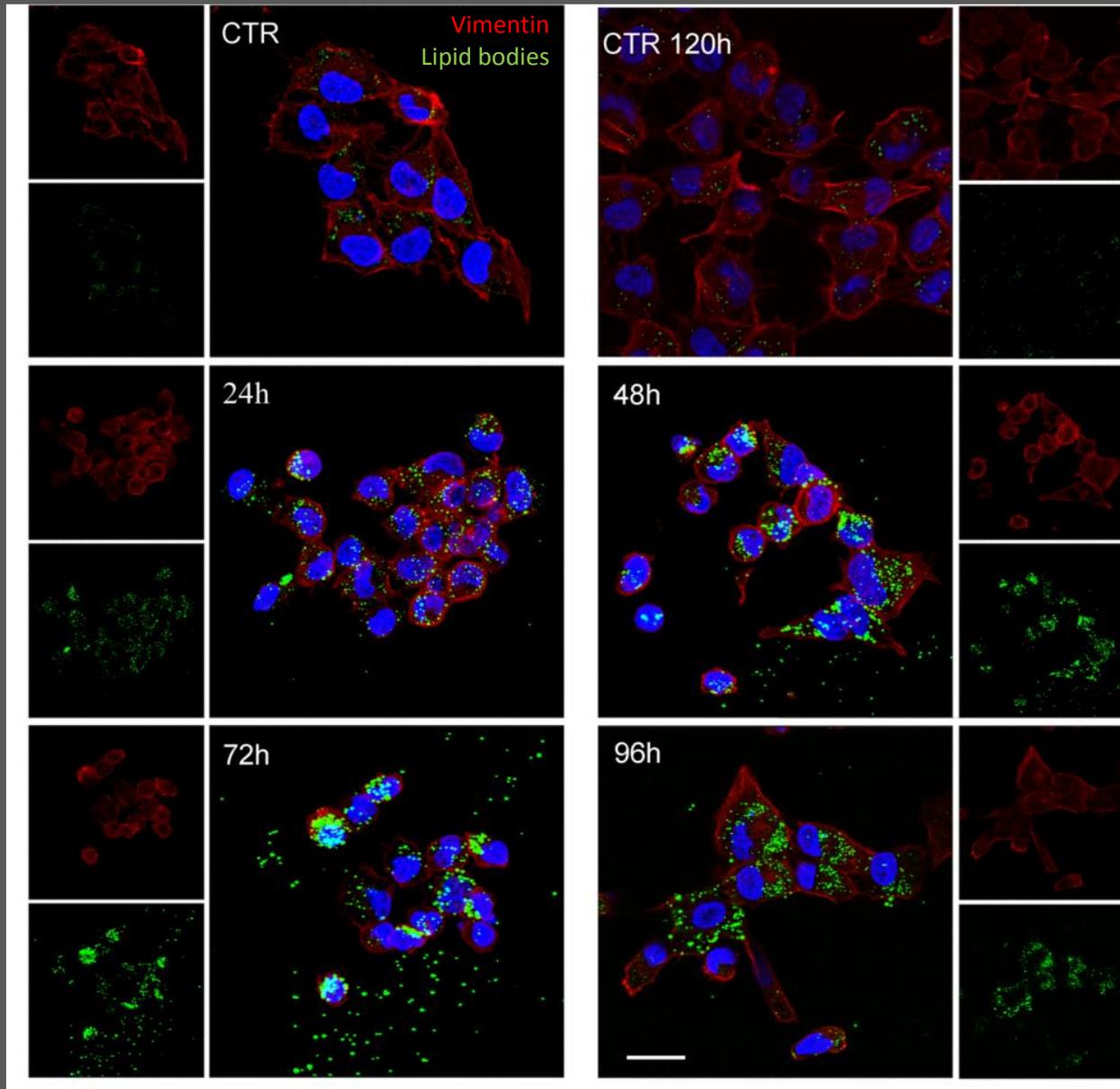


Ricostruzione
3D

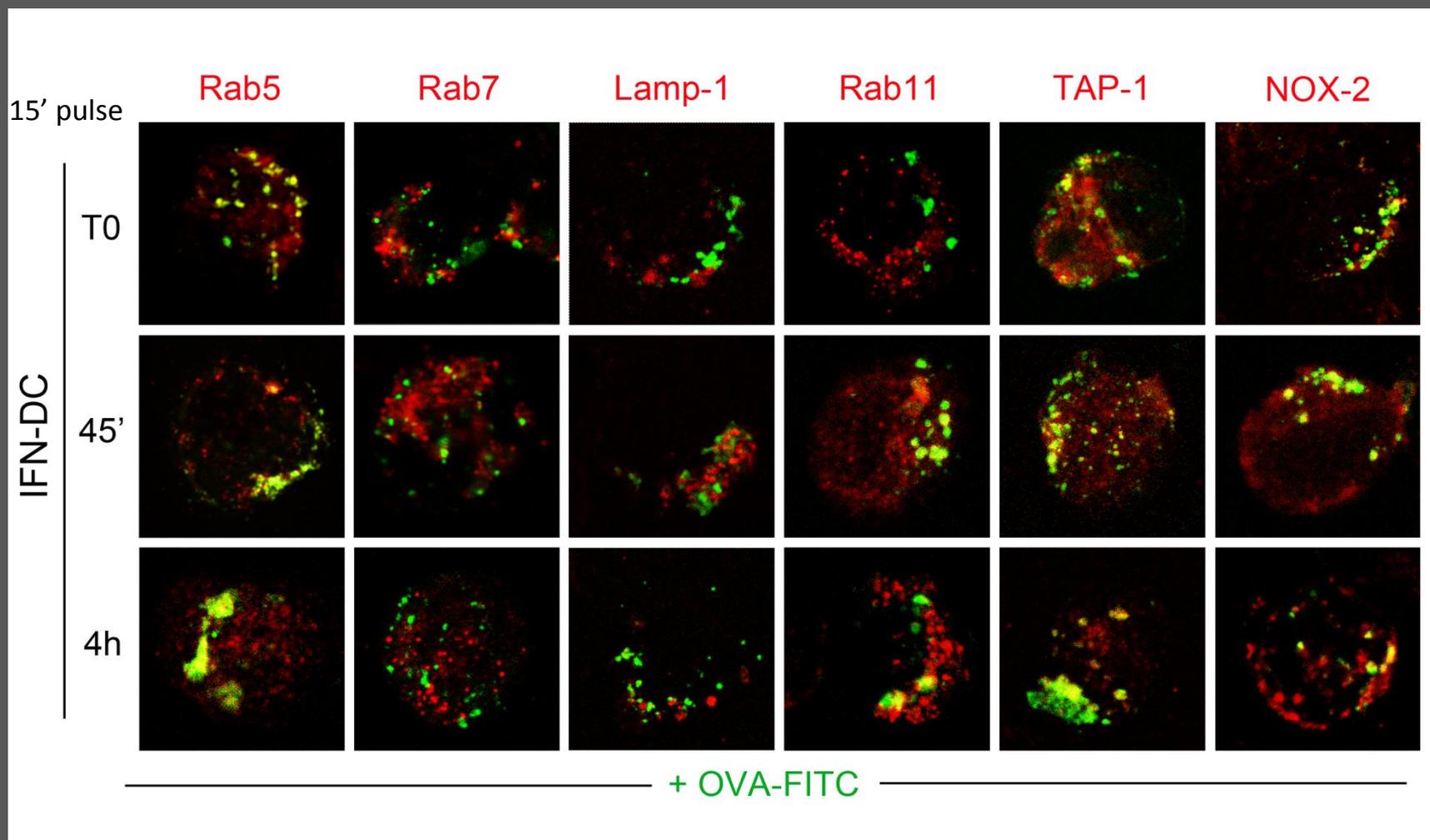
Traffico intracellulare della PC-PLC nel carcinoma mammario



PC-PLC nel differenziamento del carcinoma mammario

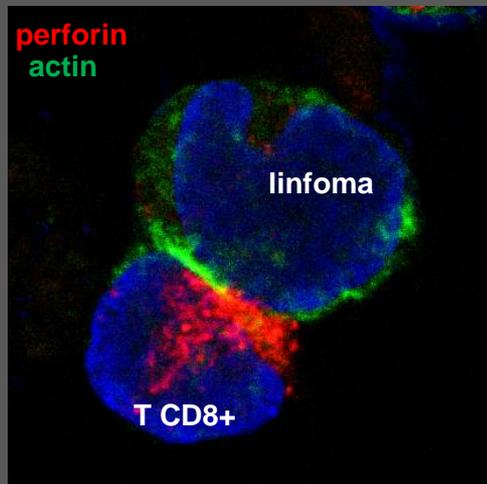
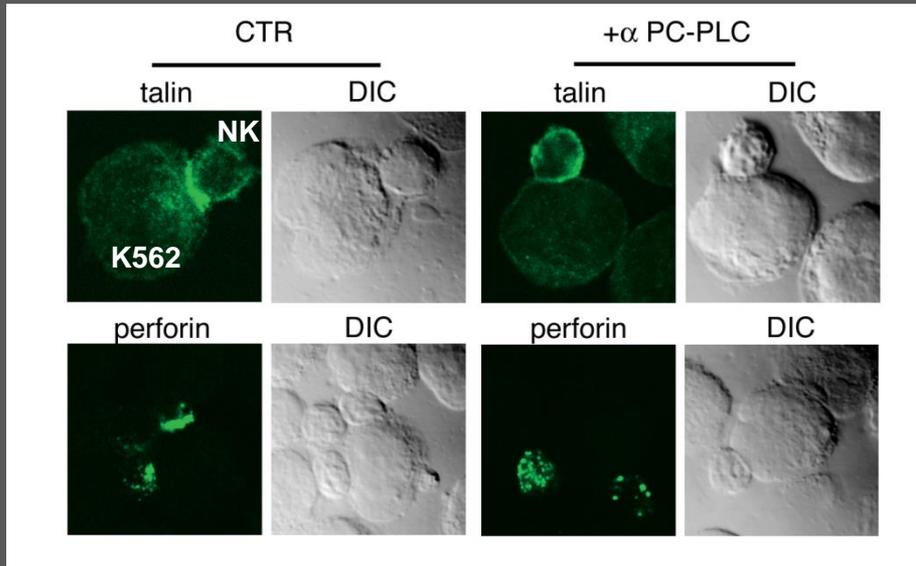


Uptake e traffico intracellulare dell'ovalbumina in cellule dendritiche

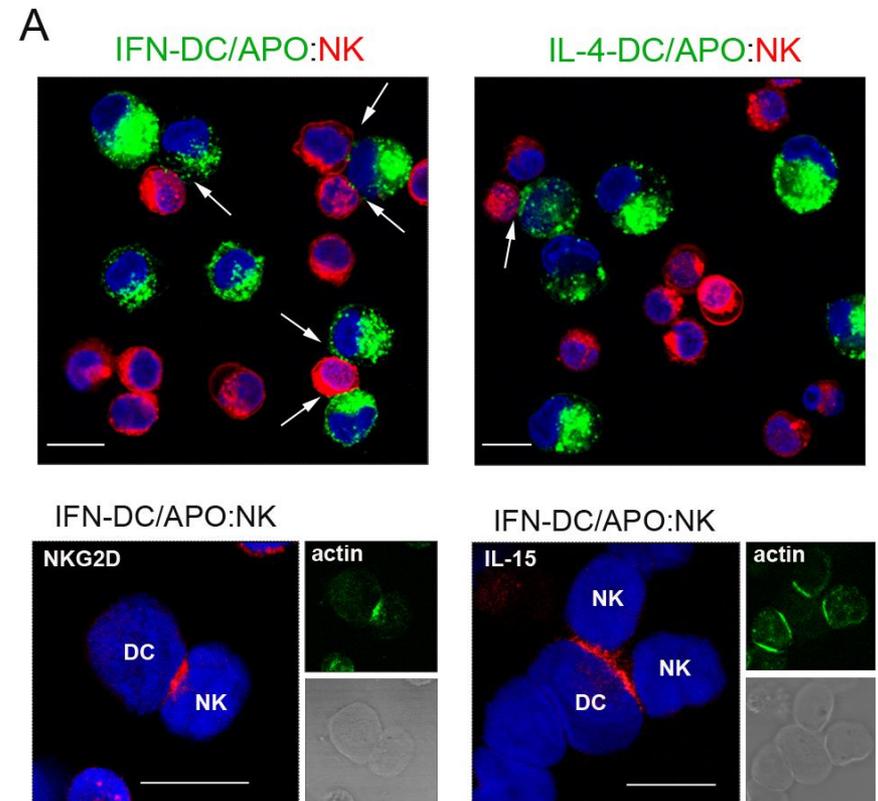


Studio delle sinapsi immunologiche

Sinapsi citolitiche

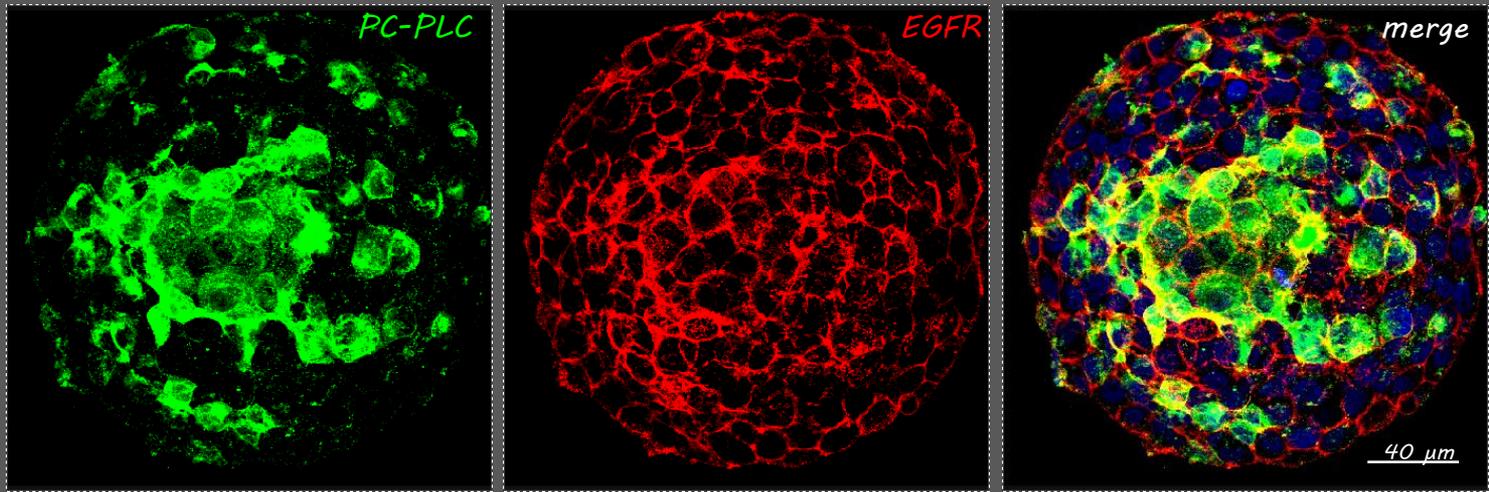


Sinapsi immunoregolatorie



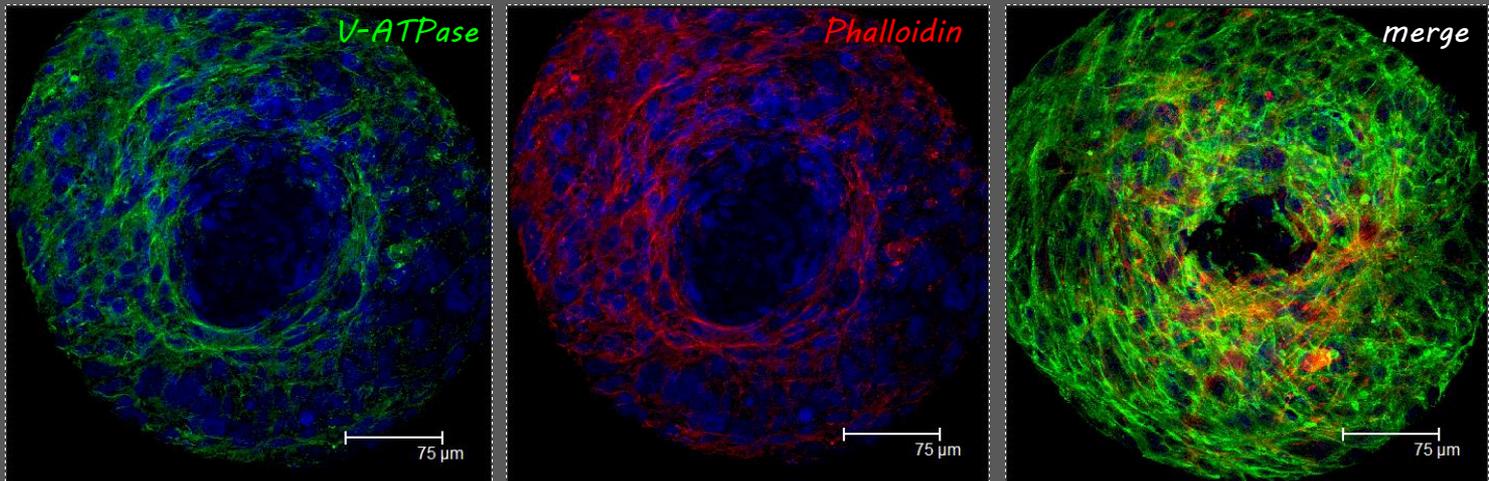
Ricostruzioni tridimensionali di strutture cellulari

Spheroids CSCs



Cecchetti S et al, PlosOne 2015

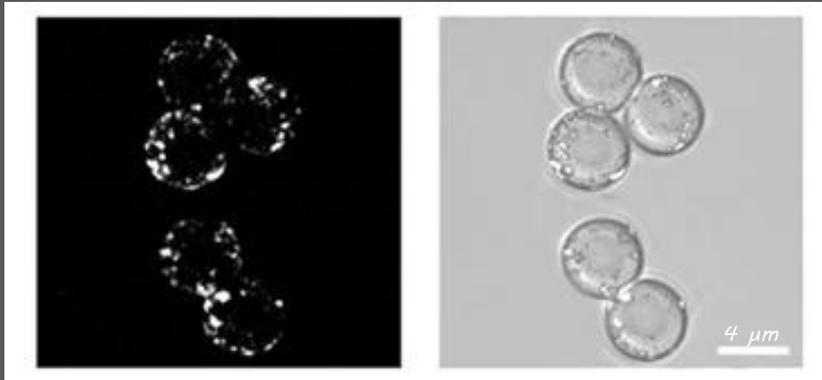
Sphere MSC



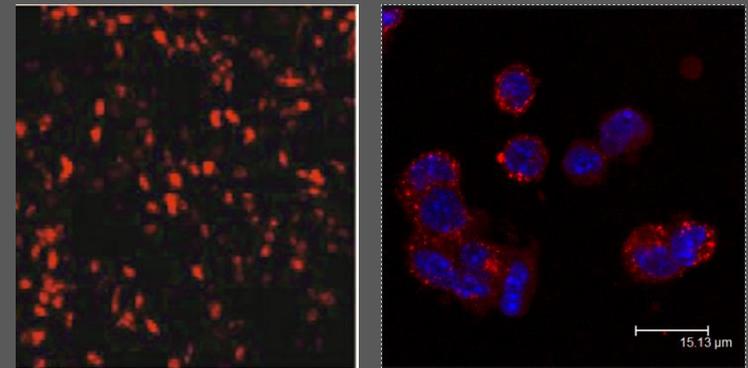
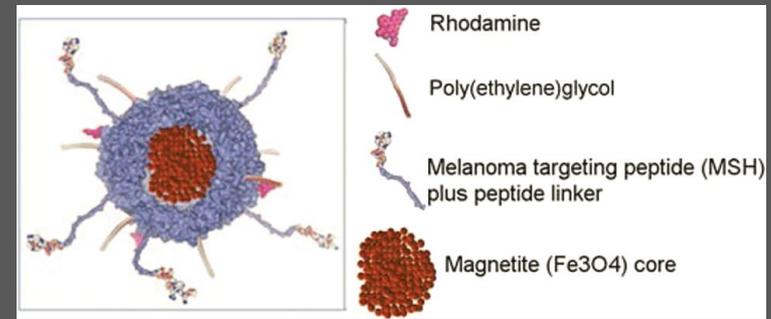
Lugini L et al, Oncotarget 2016

Studio di nanovescicole e nanoparticelle

Exosomi delle Natural Killer

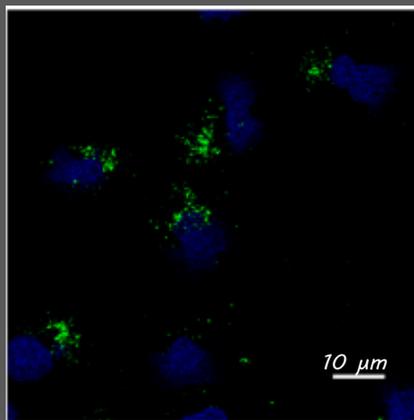


Lugini L, Cecchetti S et al, *J Immunol* 2012



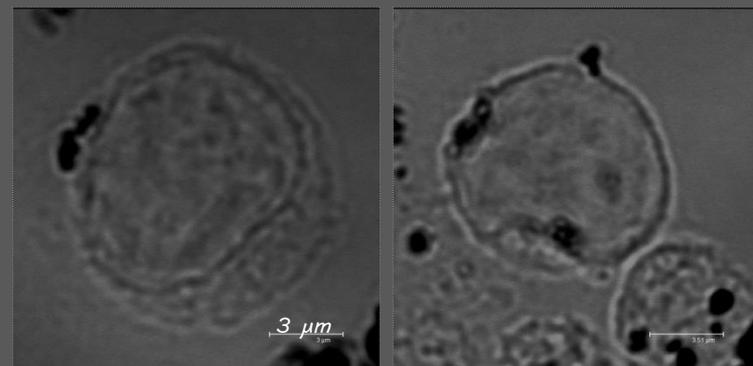
Vannucci L et al, *J Biomed Nanotech* 2015

HIV-1-based Viral Like Particles (VLPs)



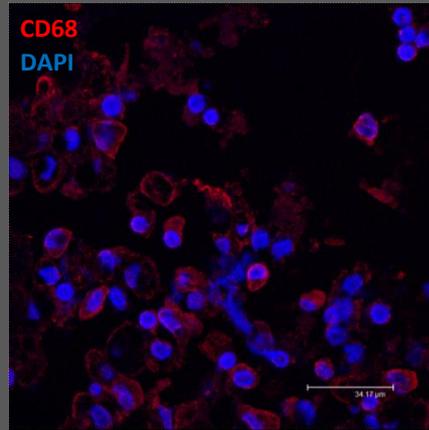
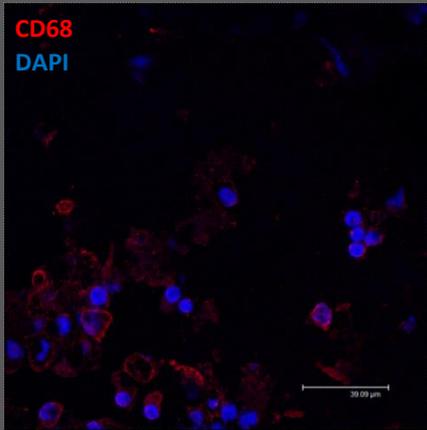
Sabbatucci M et al, *Retrovirology* 2015

Diesel exhaust particles (Euro 4 e 5)

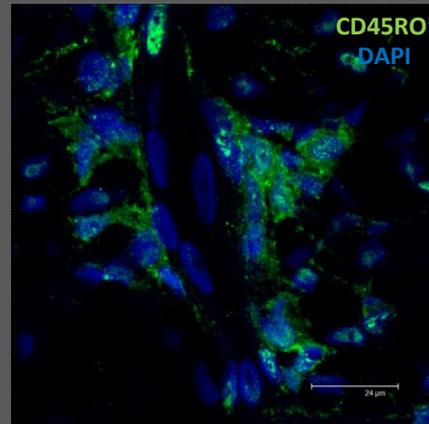
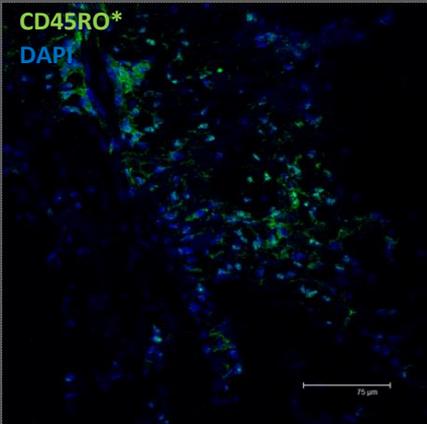
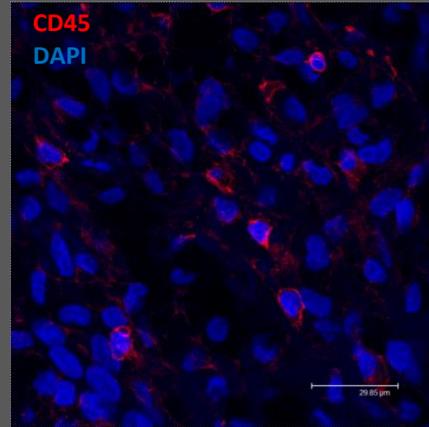
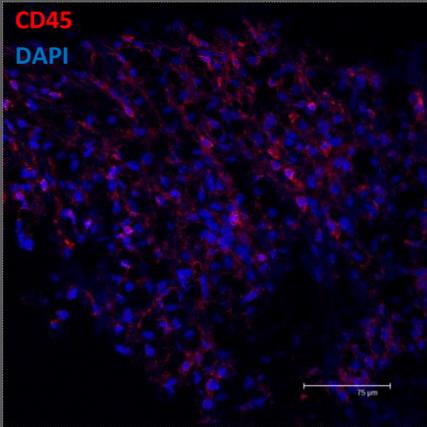


Pierdominici M et al, *Particle and Fibre Toxicology* 2014

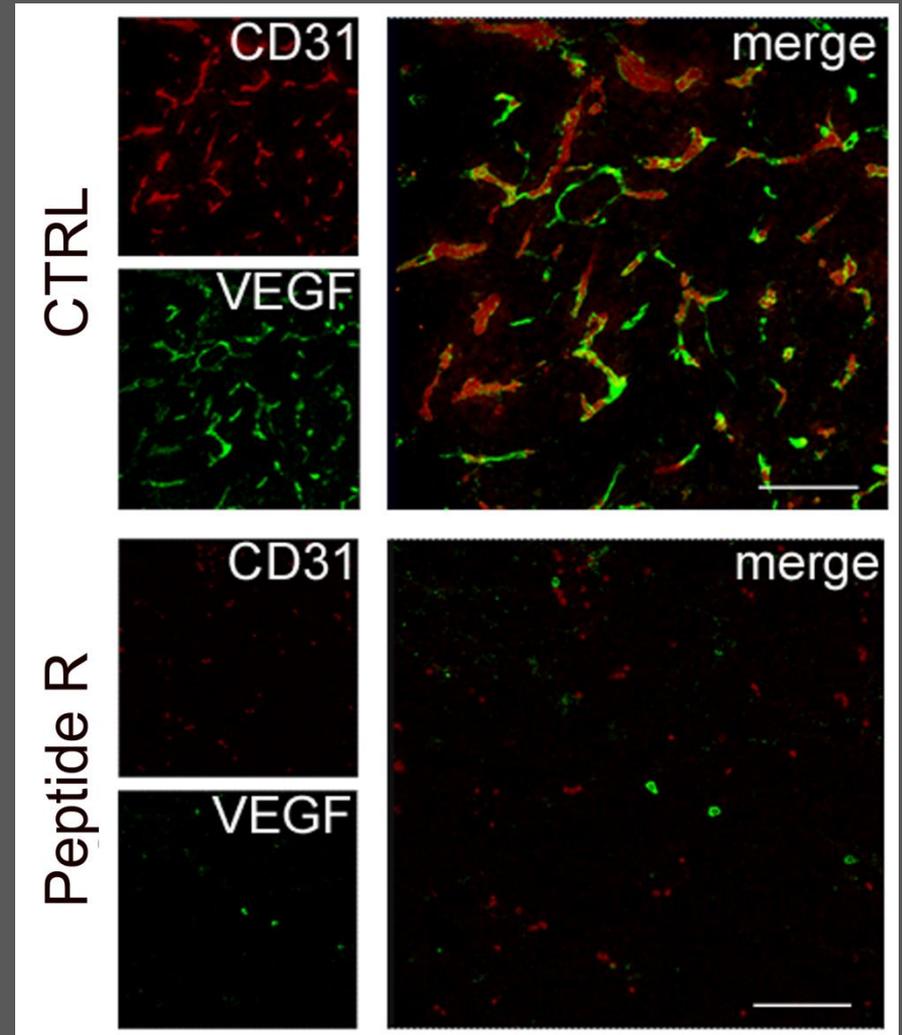
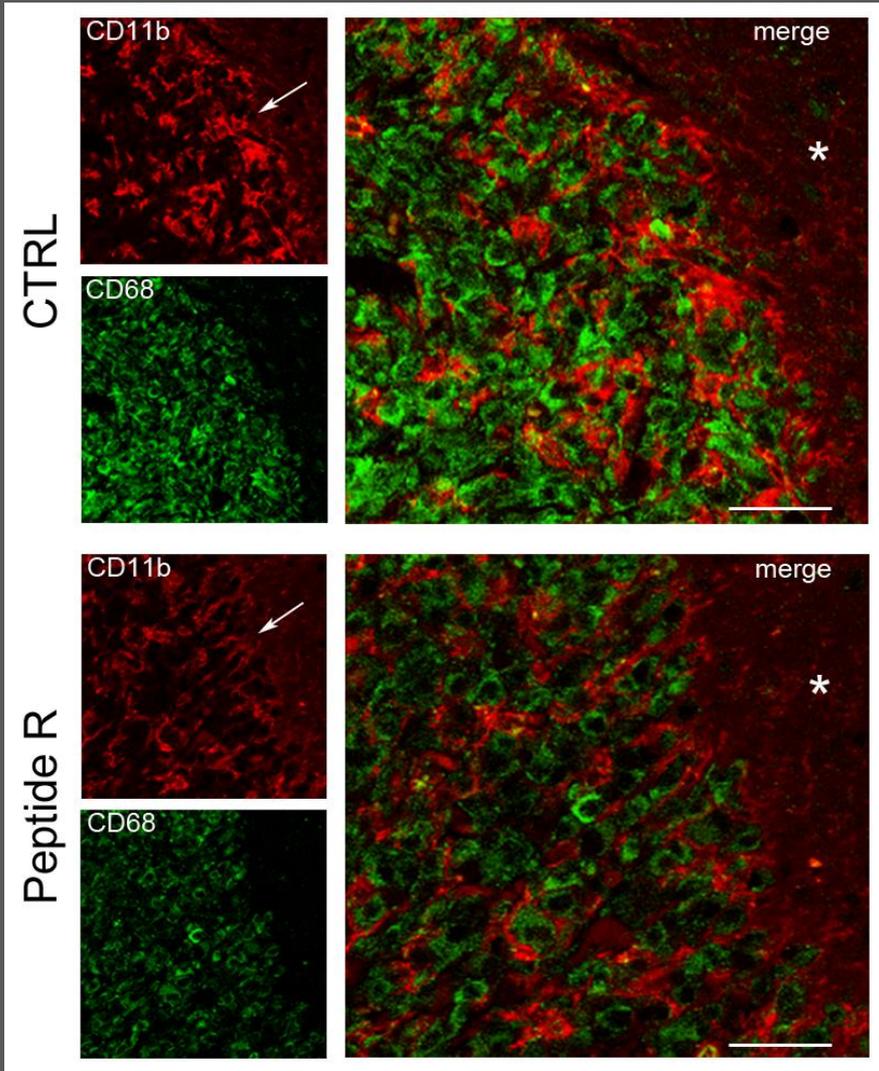
Analisi di tessuti bioptici



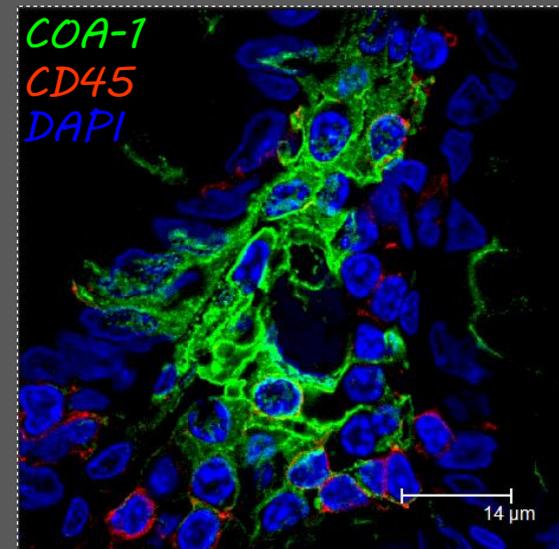
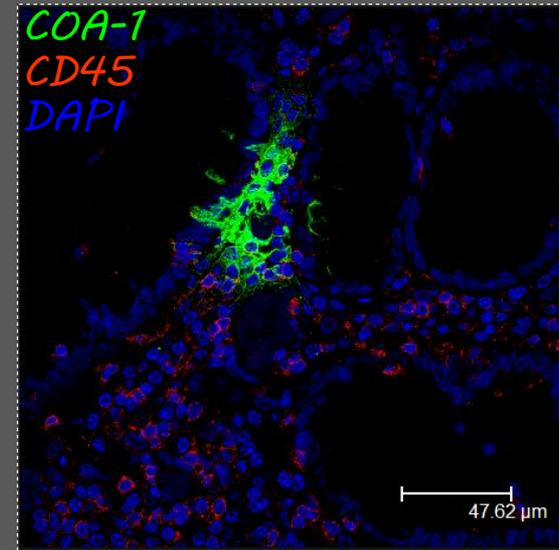
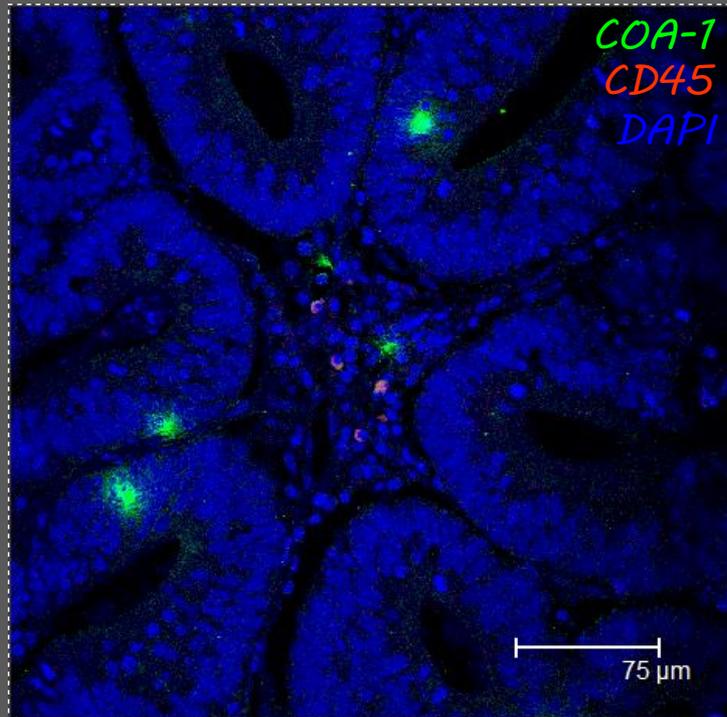
Biopsia (melanoma, 2 linfonodi positivi alla PET, no progressione malattia)



Effetti del Peptide R sul microambiente del glioblastoma



Analisi di Colon Cancer Tissue Array



Sestili P, Moschella F

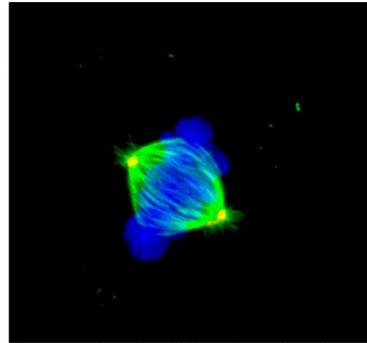
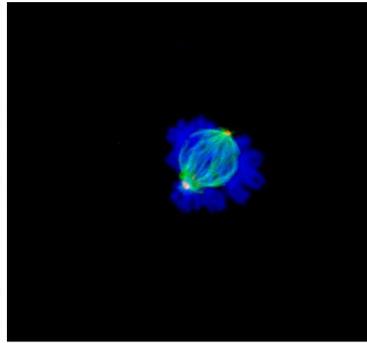
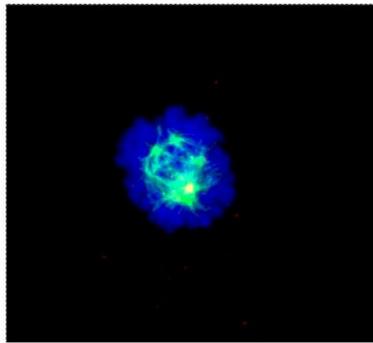
Studio del ciclo cellulare

profase

prometafase

metafase

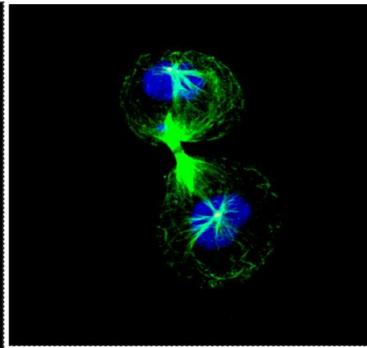
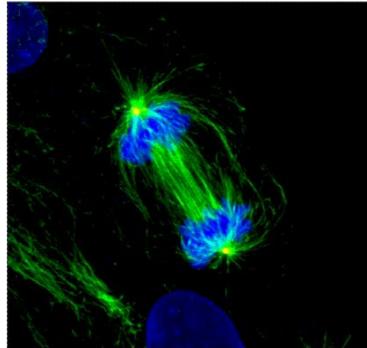
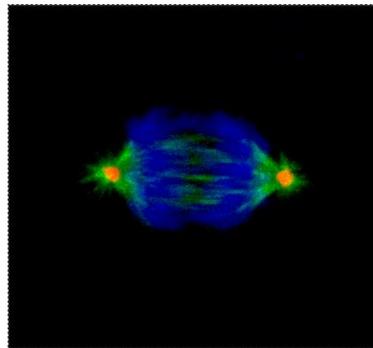
β -tubulin
Pericentrin
DAPI



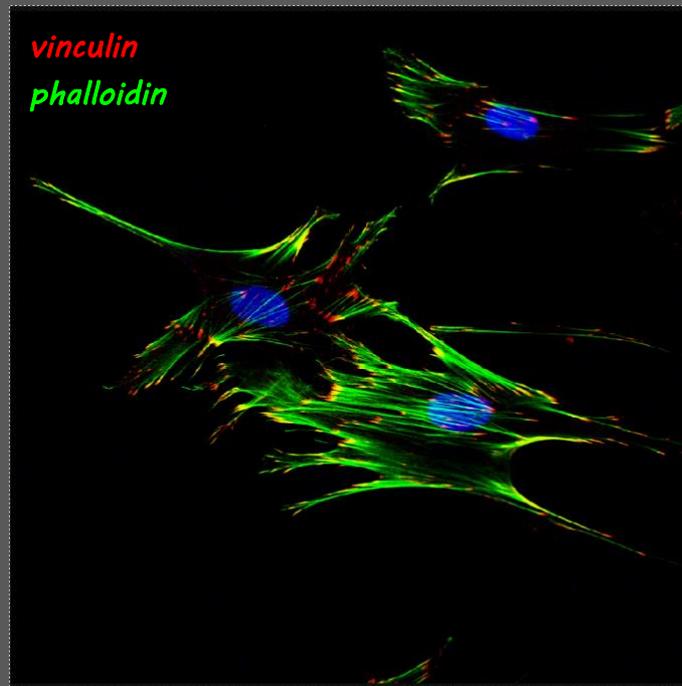
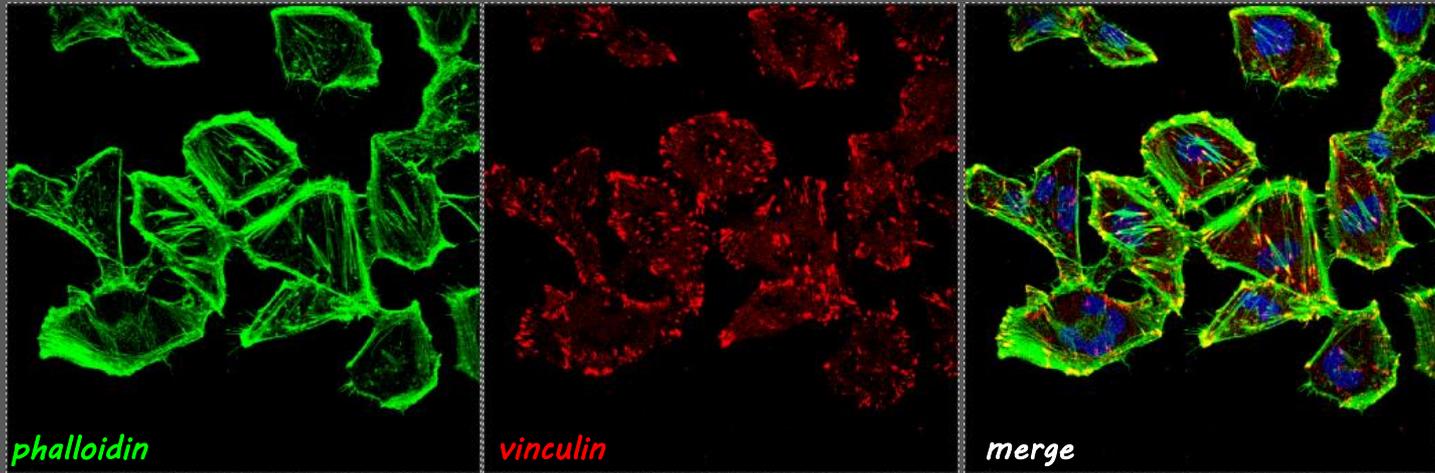
anafase

telofase

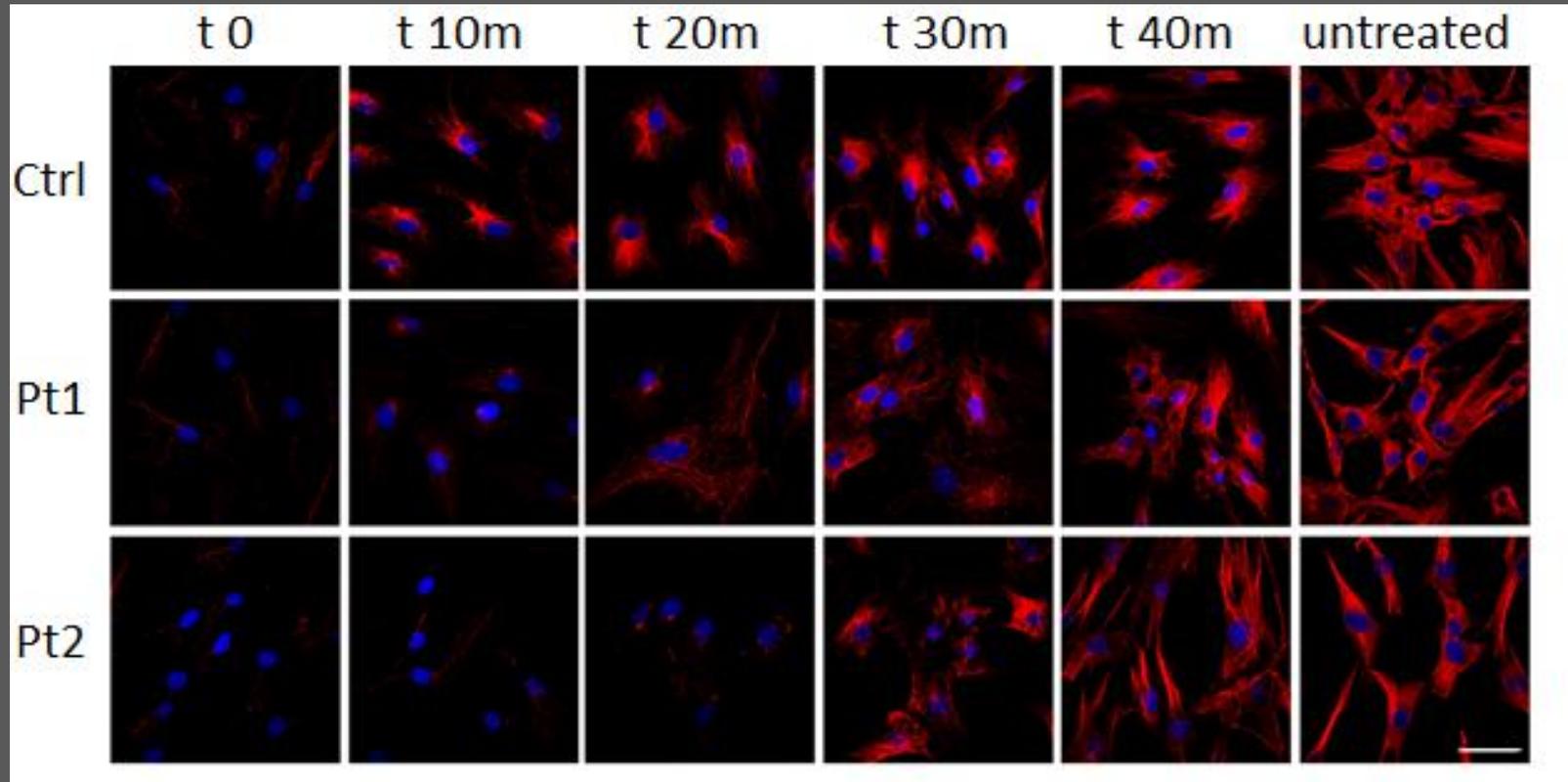
tarda telofase



Analisi dei componenti del citoscheletro



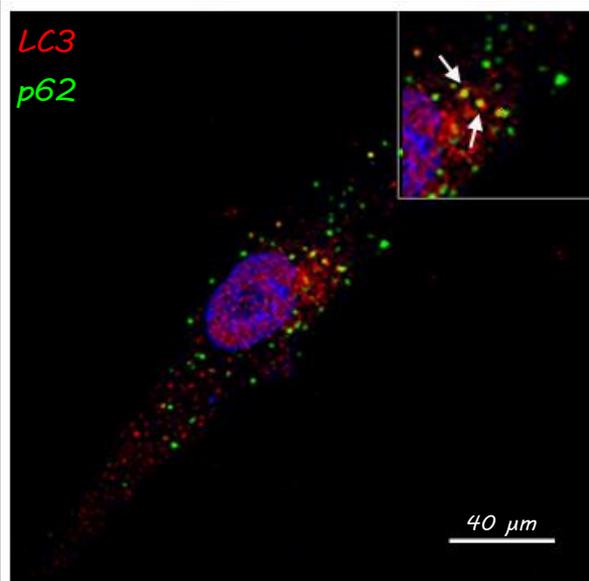
Ripolimerizzazione della α -tubulina



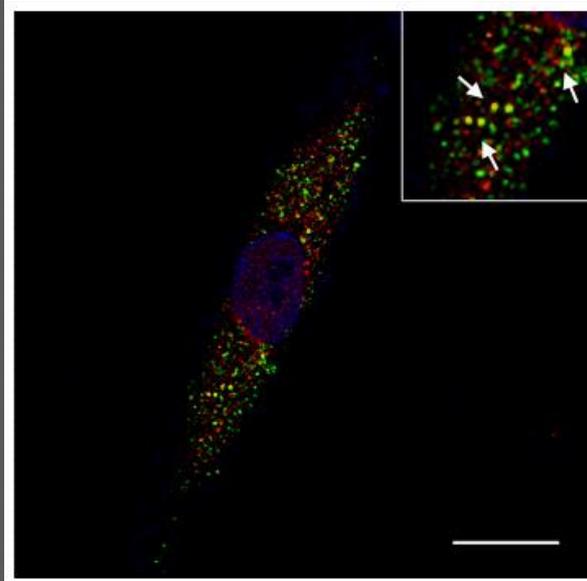
Sferra A et al, Am J Hum Genet 2016

Analisi di co-localizzazioni

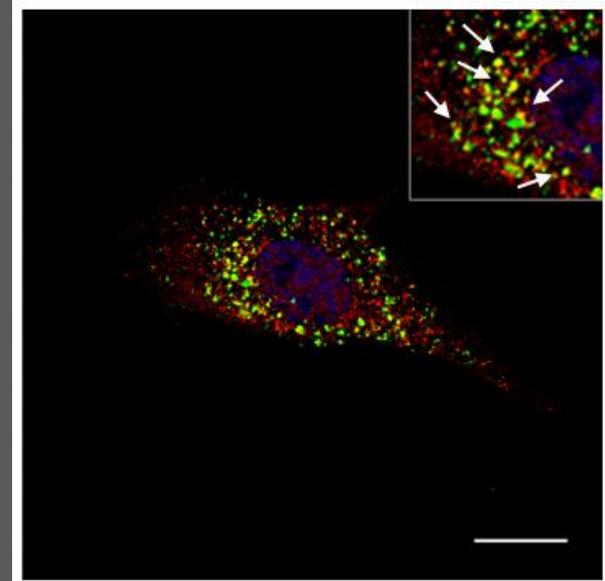
CTR



bafilomycin



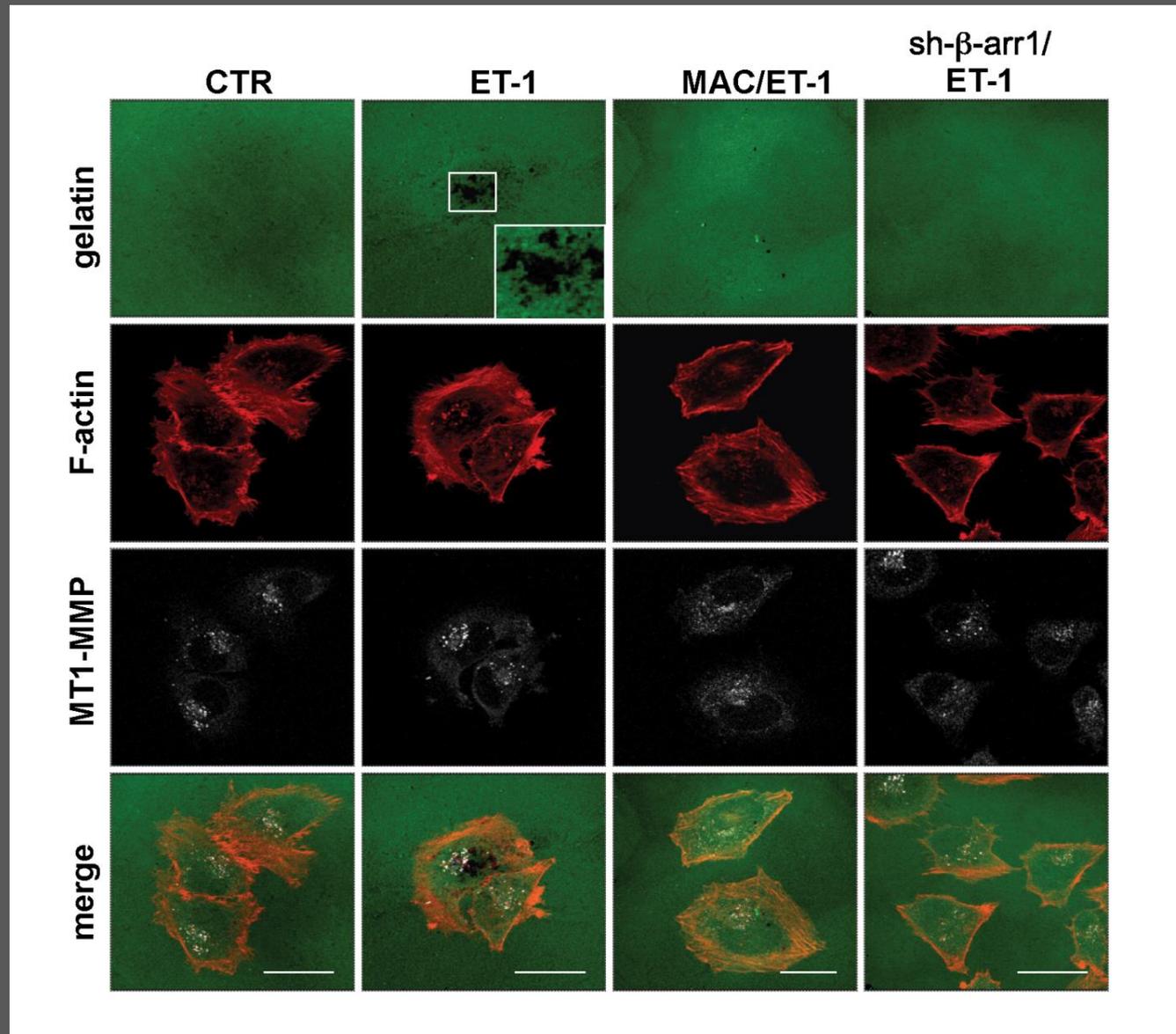
MG132 + bafilomycin



Muto V, Tartaglia M

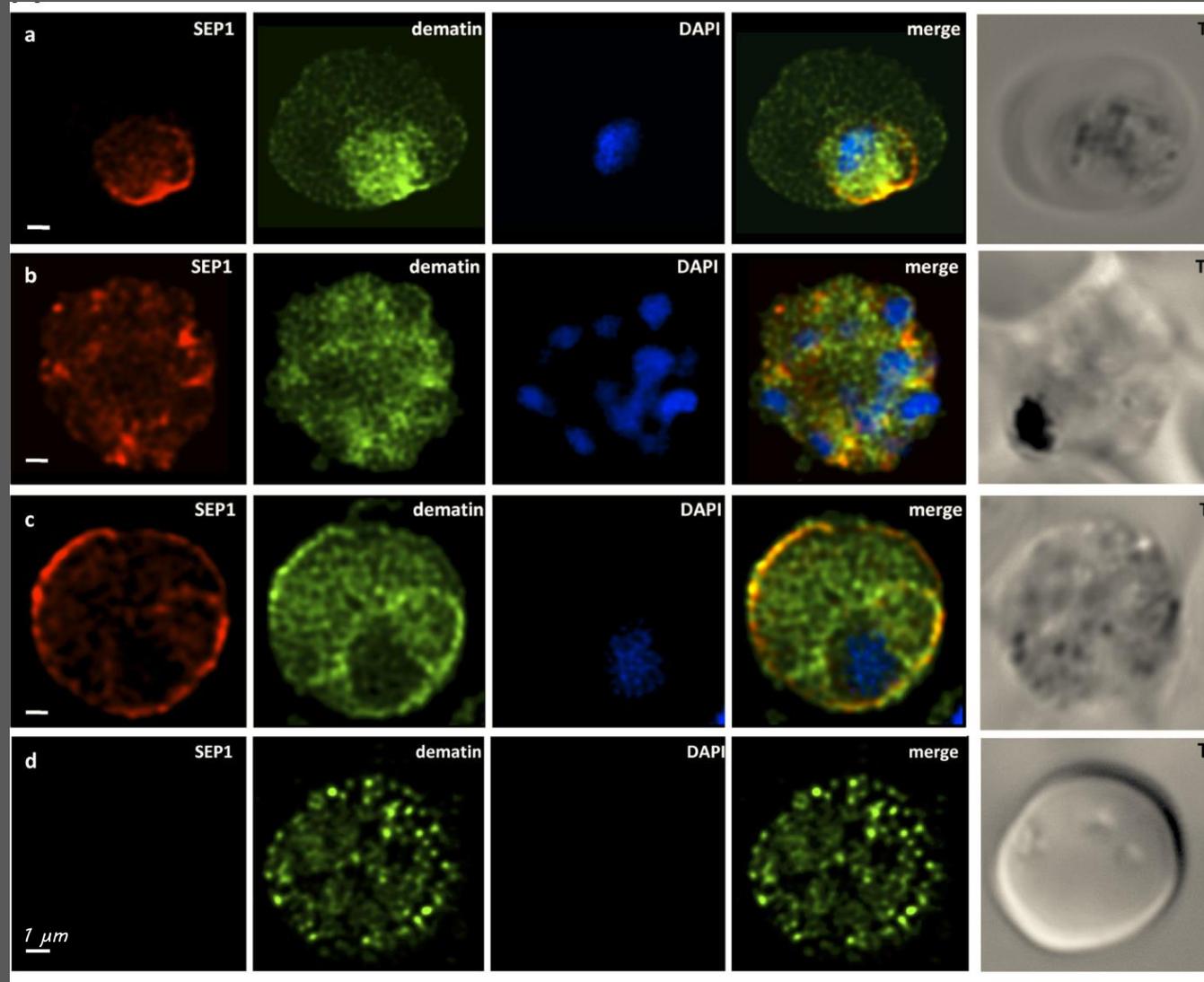
→ software

Degradazione della matrice extracellulare



Studio di microorganismi unicellulari (protozoi parassiti)

Plasmodio berghei

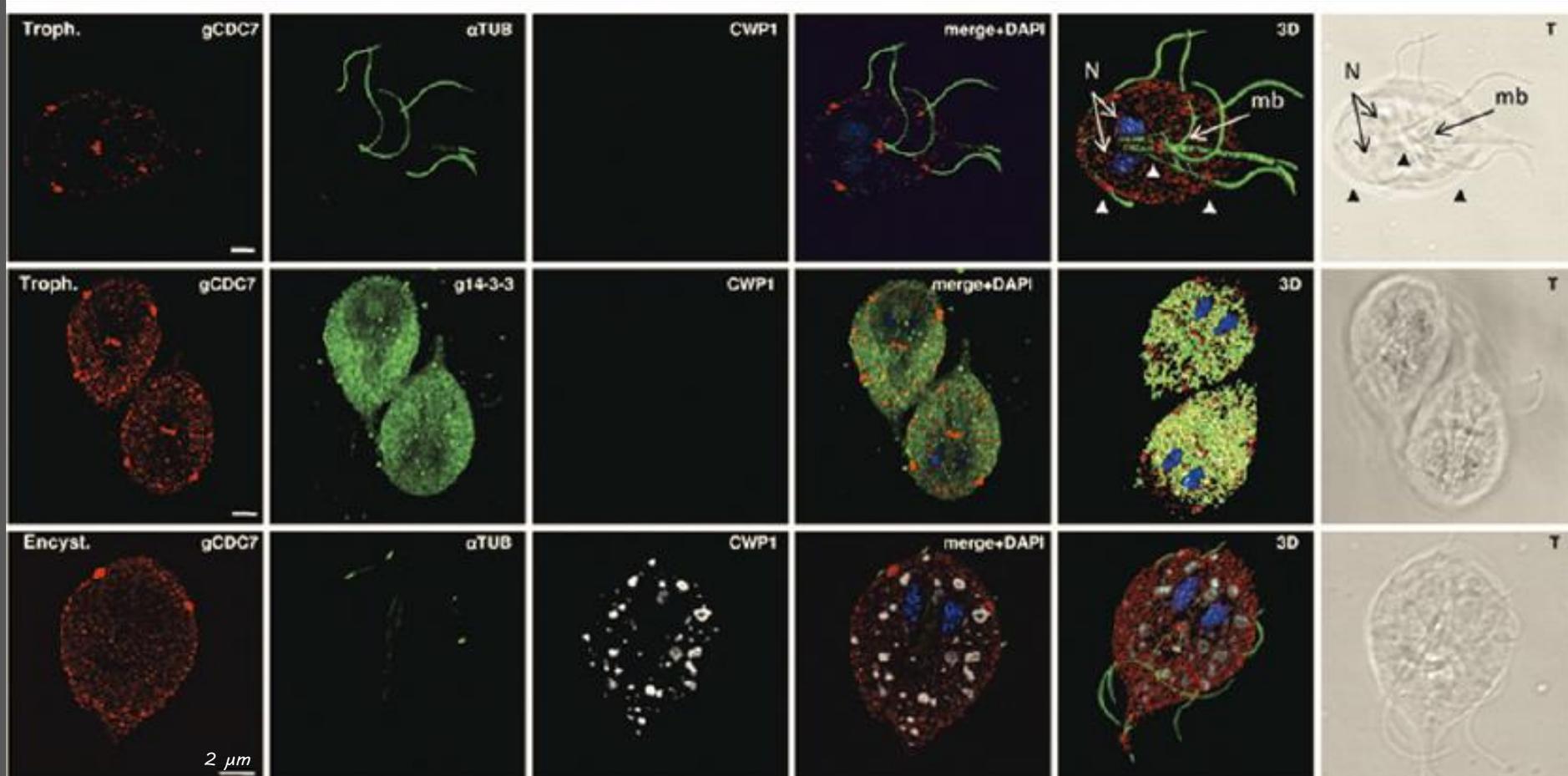


Dematina
componente
citoscheletro
degli eritrociti
viene
internalizzata
dal parassita

SEP1 proteina
vacuolo
parassitoforo

Studio di microorganismi unicellulari (protozoi parassiti)

Giardia duodenalis



Ringraziamenti

Francesca Spadaro

Dipartimento EOMM

Elisabetta Flex
Viviana Cordeddu
Emilia Stellacci
Valentina Muto
Marco Tartaglia
Caterina Lapenta
Stefano Santini
Simona Donati
Stefania Parlato
Giovanna Schiavoni
Fabrizio Mattei
Laura Bracci
Lucia Gabriele
Laura Fantuzzi
Federica Moschella
Paola Sestili
Federica Felicetti
Alessandra Carè
Sandra Gessani
Katia Fecchi
Massimo Sargiacomo
Maria Ferrantini
Enrico Proietti
Filippo Belardelli

Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI)

Maria Cristina Failla

Dipartimento BCN

Marina Pierdominici
Angela Maselli
Elena Ortona
Luisa Minghetti

Istituto Nazionale Tumori Milano

Ileana Bortolomai
Silvana Canevari
Silvia Miotti

CNR Roma

Veronica Morea
Pierpaolo Ceci

Azienda Ospedaliera Sant'Andrea

Maria Christina Cox

Reparto di Imaging Molecolare e Cellulare

Carlo Ramoni
Franca Podo
Luisa Paris
Laura Mercurio
Laura Abalsamo
Giulia Carpinelli
Rossella Canese
Egidio Iorio

Dipartimento MIPI

Marco Lalle
Marta Ponzi
Furio Spano
Fabio Tosini
Silvia Vendetti

Dipartimento Farmaco

Luana Lugini
Stefano Fais
Maria Giovanna Quaranta

Istituto Nazionale Tumori "G Pascale" Napoli

Stefania Scala
Luigi Portella

Università Sapienza Dipartimento di Biologia e Biotecnologie

Loretta Tuosto
Nicla Porciello
Paola Del Porto

Istituto Nazionale Tumori Regina Elena

Laura Rosanò



Grazie per l'attenzione!!!