

## Correlative Microscopy in Life and Materials Sciences

Roma, 6-7 Novembre 2017

Aula Bovet, Istituto Superiore di Sanità

Responsabile Scientifico: Dr.ssa Stefania Meschini

Il Convegno si è svolto presso l'Istituto Superiore di Sanità e co-organizzato con la Società italiana di Scienze Microscopiche (SISM) che si occupa di promuovere e divulgare tutte le attività inerenti alle microscopie sia nel settore biomedico sia in scienze dei materiali (Figure 1 e 2). La SISM è stata inoltre di supporto all'evento sia per la segreteria scientifica sia in quella organizzativa. Le ditte che hanno contribuito al buon esito dell'evento, dando il loro contributo, sono state: Carl Zeiss, FEI-Thermo Fisher, Tescan, Leica Microsystems, Nikon, Jeol, Alfatest, Bruker, Media System Lab, Schaefer, SIAL Group.

Il Convegno ha avuto come scopo principale quello di aggiornare i partecipanti sugli sviluppi tecnologici delle apparecchiature microscopiche di ultima generazione e illustrare le potenzialità applicative della microscopia correlativa.

Negli ultimi anni si è potuto assistere ad un elevato impiego di tecniche microscopiche con lo scopo di analizzare la relazione tra la struttura di una proteina e la sua funzione, seguendo percorsi di specifiche molecole marcate con gruppi fluorescenti all'interno di cellule vitali o fissate, anche mediante l'espressione di proteine specifiche legate geneticamente a residui fluorescenti, come ad esempio, le varianti della *green fluorescent protein* (GFP) (Ren *et al.*, 2003; Svitkina and Borisy, 1998). Queste tecniche hanno dato risultati importanti nell'incremento delle conoscenze in biologia molecolare e cellulare degli organelli, fondamentali per la sopravvivenza cellulare. Una grande quantità di nuove informazioni sulla struttura e la funzione di molti organelli cellulari sono emerse studiando come, dove e quando due o più fattori interagiscono tra loro, o come un particolare fattore si muove da un dominio ad un altro, o la tendenza e la temporalità con la quale alcune molecole proteiche si spostano tra il citoplasma e il nucleoplasma. La nuova frontiera delle tecniche d'indagine microscopica, per riuscire a com-

prendere i meccanismi molecolari responsabili del complesso funzionamento cellulare, è appunto rappresentata dallo sviluppo di metodiche ad elevata risoluzione. La risoluzione è intesa non solo come parametro spaziale (ad esempio nell'intervallo dei  $\mu\text{m}$  o dei  $\text{nm}$ ), ma anche come una maggiore capacità investigativa della relazione tra morfologia e funzione a livello ultrastrutturale.

Al fine di caratterizzare specifiche proteine all'interno dell'ultrastruttura di organuli cellulari, sono stati negli anni ampiamente utilizzati reagenti immunocitochimici marcati con oro, ma definire una localizzazione intracellulare, orientandosi nel ristretto campo microscopico della microscopia elettronica, è molto difficile. L'utilizzo della microscopia correlativa permette di stabilire una connessione tra la mappa nello spazio, ottenuta con immagini in campo allargato (evidenziabili con la microscopia di fluorescenza), e le basi ultrastrutturali fondamentali (evidenziabili con la microscopia elettronica). In questo modo, la microscopia correlativa offre il vantaggio di osservare specifiche caratteristiche strutturali e funzionali, a livello molecolare e *in situ*, all'interno della singola cellula o di una popolazione di cellule (Polishchuk *et al.*, 2000). La microscopia a fluorescenza e la microscopia elettronica possiedono caratteristiche complementari, fondamentali per studi a livello cellulare. Grazie alle moderne tecnologie di fluorescenza è, infatti, possibile ottenere immagini anche di un singolo fluoroforo con un'alta risoluzione temporale, permettendo l'ottenimento di importanti informazioni sulla cinetica di cellule vitali. Questi vantaggi però, presentano un limite importante che è quello di avere una risoluzione spaziale limitata ai 400-500 nm. La microscopia elettronica, invece, permette di ottenere un'elevatissima risoluzione spaziale ma, solo in immagini statiche, quindi non è applicabile a cellule viventi.

La microscopia correlativa rappresenta, quindi, il meto-

do più efficace per riuscire a combinare i vantaggi di queste due tecniche e collegare strutture e dinamiche cellulari (Ren *et al.*, 2003). Grazie all'applicazione di questa tecnologia è stato possibile determinare l'esatta struttura e dimensione di organelli e vacuoli intracellulari, e analizzare le loro caratteristiche dinamiche, cruciali per molte funzioni cellulari (Svitkina and Borisy, 1998). Vista la crescente importanza di questo tipo di metodologia, negli ultimi anni vi è stato un notevole aumento nella ricerca di sonde tali da permettere una più semplice ed efficace applicazione della microscopia correlativa (Polishchuk *et al.*, 2000). Questi studi hanno fornito preziosi contributi in molte aree di ricerca. Molti ricercatori del Servizio Sanitario Nazionale utilizzano le potenzialità applicative dei metodi morfologici e ultrastrutturali in modelli sperimentali per lo svolgimento delle proprie ricerche e/o cure mediche.

La conoscenza di tecniche innovative microscopiche ad alta risoluzione si sta dimostrando un modello sperimentale importante nel settore scientifico, sia in quello dei materiali sia nell'individuazione di marcatori con promettente attività farmacologica.

L'organizzazione del Convegno ha previsto la presenza di quattro "keynote lecture" all'inizio di ogni sessione.

Nella prima sessione del primo giorno, "Correlative microscopy: principles and application potential", il Dott. Bruno M. Humbel dell'Electron Microscopy Facility, University of Lausanne, Switzerland, ha spiegato i vantaggi e i metodi ottimali di preparazione dei campioni per la microscopia correlativa, combinando le potenzialità ed i vantaggi della microscopia luce e della microscopia elettronica, come strumento importante per la ricerca biomedica (Schwarz and Humbel, 2014).

Nella seconda sessione del primo giorno, "Correlative microscopy applications in Materials Sciences", il Prof. Edoardo Bemporad del Dipartimento di Ingegneria dell'Università Roma Tre di Roma, ha chiarito le potenzialità della microscopia correlativa per valutare le caratteristiche strutturali, composizionali e funzionali dei materiali. Il comportamento di materiali complessi può essere valutato con diverse tecniche di imaging (SEM, TEM, EDS) per ottenere indagini "correlate" ed avere informazioni di alta precisione sulla loro composizione chimica e meccanica (Loussert Fonta *et al.*, 2015).

Nella prima sessione del secondo giorno, "Correlative microscopy applications in Life Sciences", il Prof. Alberto Luini dell'Istituto di Biochimica delle Proteine, Microelettronica e Microsistemi, CNR, Napoli, ha evidenziato gli aspetti tecnologici sviluppatasi negli ultimi dieci anni nel settore della microscopia correlativa dei sistemi proteici. In particolare, lo sviluppo di sonde fluorescenti che consentono il rilevamento delle interazioni proteina-proteina, abbinate a un sistema automatizzato che può ampliare la

conoscenza nella diagnostica clinica (Polishchuk *et al.*, 2000).

Nella seconda sessione dello stesso giorno, il Prof. Alberto Diaspro del Dipartimento di Fisica, Università di Genova, Istituto Italiano di Tecnologia, Genova, ha esposto e chiarito le straordinarie informazioni che si possono ottenere mediante l'utilizzo combinato della microscopia a fluorescenza/confocale ed elettronica a scansione nella comprensione delle proprietà dei nanomateriali utilizzabili in



**Figura 1.** La Dott.ssa Stefania Meschini, responsabile scientifico del convegno (a sinistra), la Dott.ssa Patrizia Popoli, Direttore del Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione preclinica e clinica dei Farmaci (al centro) e la Prof.ssa Elisabetta Falcieri, Presidente della SISM (a destra) durante l'inaugurazione dell'evento.



**Figura 2.** I partecipanti intenti ad ascoltare l'intervento del Prof. Bruno Humbel.

nanomedicina (Cortese *et al.*, 2013).

Gli abstract dell'evento sono stati pubblicati sulla rivista internazionale *European Journal of Histochemistry*, vol. 61/supplement 4, 2017.

---

## References

- Cortese K, Vicidomini G, Gagliani MC, Boccacci P, Diaspro A, Tacchetti C. High data output method for 3-D correlative light-electron microscopy using ultrathin cryosections. *Methods Mol Biol* 2013;950:417-37.
- Loussert Fonta C, Humbel BM. Correlative microscopy. *Arch Biochem Biophys* 2015; 58198-110.
- Polishchuk RS, Polishchuk EV, Marra P, Alberti S, Buccione R, Luini A, Mironov AA. Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J Cell Biol* 2000;148:45-58.
- Ren Y, Kruhlak MJ, Bazett-Jones DP. Same serial section correlative light and energy-filtered transmission electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 2003;51:605-12.
- Schwarz H, Humbel BM. Correlative light-electron microscopy using immunolabeled sections. *Methods Mol Biol* 2014;1117:559-92.
- Svitkina TM, Borisy G. Correlative light and electron microscopy of the cytoskeleton. *Methods Enzymol* 1998;298: 570-92.