

Combinazione di manipolazione ottica e microscopia in fluorescenza per lo studio della meccanotrasduzione al livello di singola molecola.

L'intera vita cellulare e il suo corretto funzionamento sono influenzati dagli stimoli che l'ambiente circostante opera su di essa. Se molto si conosce degli effetti che interazioni biochimiche hanno sulla cellula, sono ancora ampiamente sconosciuti quei processi così detti di meccanotrasduzione, nei quali, a seguito di impulsi meccanici recepiti dalla cellula attraverso recettori di membrana mecano-sensibili, si originano segnali elettrochimici che, propagandosi all'interno della cellula, ne governano la vita e il destino cellulare.

È in questo contesto che si inserisce il mio lavoro di tesi. Ho, infatti, progettato, realizzato e caratterizzato un apparato sperimentale che combina pinzette ottiche (*optical tweezers*) e microscopia, per la manipolazione meccanica e imaging di cellule viventi. La parte di imaging consiste in un microscopio ottico che permette di rivelare singole molecole fluorescenti e localizzarle con accuratezza nanometrica. Inserendo tre diodi laser a differenti lunghezze d'onda (488 nm, 552 nm, 640 nm), ho realizzato il microscopio in modo tale che sia possibile variare, in maniera automatica e altamente riproducibile, l'allineamento di specifiche ottiche. Questo permette di combinare varie tecniche di microscopia ad alto rapporto segnale-rumore, quali: la microscopia TIRF, che eccita il campione attraverso l'onda evanescente originata nel processo di riflessione totale interna, e la microscopia HILO, che causa la fluorescenza dei cromofori attraverso un foglio di luce altamente inclinato. Inoltre, ho implementato sul microscopio un sistema di pinzette ottiche, basato su un laser a diodo infrarosso a 808 nm, che, intrappolando otticamente microsferie dielettriche legate a specifici recettori della membrana cellulare, ne permette la manipolazione, dando la possibilità di applicare e misurare forze dell'ordine dei piconewton.

Per caratterizzare il sistema di imaging ho effettuato analisi volte a determinare la precisione di localizzazione di singole molecole fluorescenti. La localizzazione di ciascun cromoforo avviene mediante un fit gaussiano bidimensionale della *Point Spread Function* (algoritmo FIONA). Con questo metodo, dato un rapporto segnale-rumore sufficientemente alto, è possibile determinare con accuratezza nanometrica la posizione della molecola fluorescente. Ho caratterizzato l'imaging di singole molecole fluorescenti nelle tre possibili configurazioni ottiche: wide-field, HILO e TIRF. Ho comparato queste tre diverse tecniche anche attraverso l'analisi del loro rapporto segnale-rumore, dimostrando come questo incrementi sensibilmente utilizzando tecniche che riducono il volume di eccitazione del campione. Con la calibrazione della trappola ottica ho determinato come la sua costante elastica e la sensibilità del fotodiodo a quadranti, utilizzato come sensore di posizione, dipendano dalla potenza del laser di intrappolamento. Le misure sono state realizzate tramite l'analisi dello spettro di frequenza del segnale di posizione del fotodiodo. Per caratterizzare la dipendenza della trappola dalle caratteristiche delle microsferie utilizzate, ho ripetuto le misure utilizzandone due tipi di sfere di diverso raggio e indice di rifrazione. Questi due parametri influenzano infatti le forze di scattering e di gradiente, che determinano la capacità di intrappolamento degli *optical tweezers*.

Infine, ho testato la manipolazione di integrine (recettori di membrana meccanosensibili) su cellule viventi, nonché l'imaging di un gene coinvolto nella crescita cellulare, il c-fos, la cui espressione è probabilmente regolata da segnali meccanici applicati alle integrine stesse.