

Application Note

Visita microscopica alla centrale elettrica della cellula

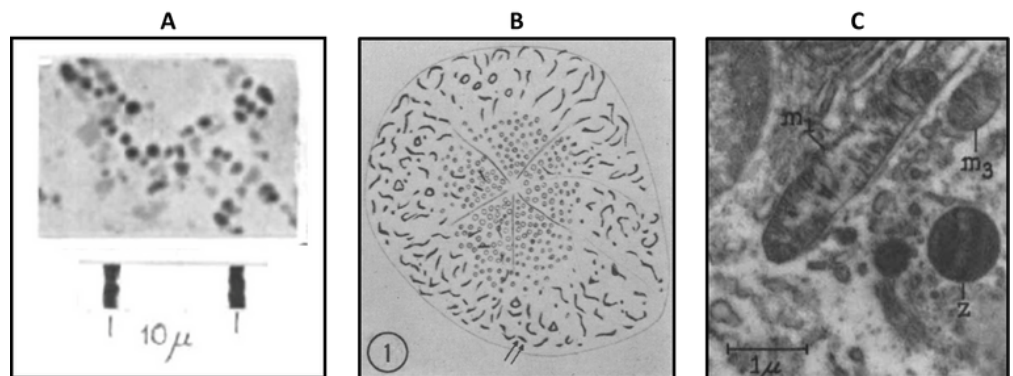


Figura 1: **A.** Mitocondri isolati da tessuto muscolare cardiaco di ratto. Immagine ottenuta dalla pubblicazione di Cleland e Slater del 1953 **(1)**, nella quale i granuli isolati venivano ancora definiti sarcosomi. **B.** Riproduzione di un disegno di Michaelis del 1900 ad opera di George Palade **(2)** Michaelis scoprì che il colorante Janus Green B era in grado di identificare i mitocondri. **C.** Una delle prime immagini di mitocondrio con microscopia elettronica a trasmissione. Nel 1952 infatti George Palade pubblicò la prima collezione di immagini TEM di mitocondri **(3)**.

Introduzione

Tra i vari organelli presenti nella cellula, i mitocondri sono molto probabilmente i più conosciuti. Fin dalle scuole elementari ci viene insegnato che all'interno di ogni cellula c'è un nucleo con affianco una struttura a fagiolo che funge da centrale elettrica per quel piccolo mondo. Caratterizzati da un'intricata membrana interna, i mitocondri sono la sede della respirazione cellulare e sono adibiti alla produzione di adenosin trifosfato (ATP), il combustibile della maggior parte dei processi metabolici.

Tali organelli possono apparire statici e uniformi nei libri di testo, ma, come i ricercatori hanno ben presto compreso, i mitocondri cambiano costantemente posizione e forma. Infatti, i mitocondri sono organelli altamente dinamici in costante movimento all'interno del citoplasma che, attraverso cicli di fusione e fissione, si uniscono e si dividono per formare reti tubolari che si infiltrano in tutta la cellula.

Microscopia a Fluorescenza

La microscopia a fluorescenza è tra le tecniche più utilizzate nel campo della ricerca, grazie alla sua capacità di visualizzare dettagli all'interno di cellule vive o fissate con alta sensibilità e specificità. Lo sviluppo tecnologico, informatico e molecolare ha reso la microscopia a fluorescenza adatta a innumerevoli applicazioni con performance sempre migliori. La microscopia a fluorescenza base, anche detta widefield, utilizza una sorgente a raggi UV e visibile per eccitare il campione fluorescente ottenendo un'immagine ad alta risoluzione nella quale è possibile identificare cellule e componenti subcellulari con elevata specificità distinguendoli dagli elementi non fluorescenti. Negli anni 80 venne inventato il microscopio confocale, evoluzione della microscopia widefield. Tale tecnologia consiste nell'inserimento di un *pinhole* (letteralmente un foro) lungo il *lightpath* (percorso della luce) in grado di bloccare i raggi provenienti dai piani fuori fuoco. In questo modo, la cosiddetta fluorescenza secondaria viene eliminata e la qualità dell'immagine migliorata notevolmente. La qualità è ulteriormente migliorata dall'utilizzo dei laser, resi necessari dall'inserimento del pinhole in quanto in grado di garantire alta intensità luminosa in un singolo punto. Insieme, queste caratteristiche rendono i sistemi confocali perfetti per l'imaging di dettagli subcellulari, con immagini ad altissima risoluzione e ricostruzioni 3D di Z stack.

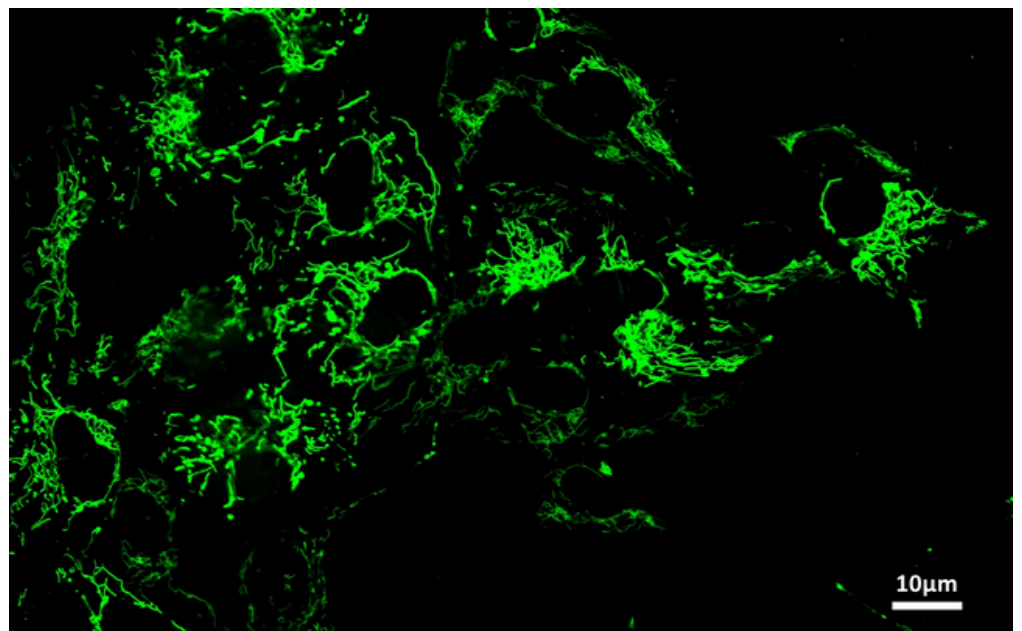


Figura 4: MitoTracker *Staining* su cellule *in vitro*. Il network mitocondriale si estende in tutto il citoplasma e attorno al nucleo. I singoli mitocondri appaiono filamentosi e intrecciati gli uni agli altri. Immagini gentilmente concesse dal Prof. D'Angelo dell'Università dell'Aquila.

I principali limiti dei microscopi confocali *laser-scanning* sono legati allo spessore del campione e alla velocità di acquisizione. Sebbene i moderni *laser-scanning* siano migliorati molto su questi aspetti, l'utilizzo di laser nel campo del visibile non garantisce un alto potere penetrante pertanto solamente campioni sotto un certo spessore possono essere visualizzati. Inoltre, la presenza di un unico foro implica l'acquisizione dell'immagine punto per punto compiendo una serpentina (da qui il nome *laser-scanning*) rallentando notevolmente il processo di acquisizione. Nel caso dei mitocondri, dove eventi e movimenti avvengono nell'ordine di secondi, è essenziale un'elevata velocità di acquisizione. Tale ostacolo fu risolto con la creazione dei sistemi *spinning disk* caratterizzati da un disco rotante sul quale sono distribuiti numerosi *pinhole*. Ruotando, lo *spinning disk* permette l'acquisizione di più punti simultaneamente aumentando dunque la velocità. Un'ulteriore evoluzione di questi sistemi arriva da Aurox, particolari *spinning disk* caratterizzati da una griglia in sostituzione dei *pinhole* e che utilizzano sorgenti LED. Questi strumenti si adattano perfettamente allo studio dei mitocondri in quanto, grazie ai LED, garantiscono una ridotta fototossicità e velocità di acquisizione. Un esempio di *imaging* con strumenti Aurox è riportato in **figura 4**, nella quale è possibile apprezzare il network mitocondriale di più cellule *in vitro*. Inoltre, l'implementazione di sistemi LED e l'integrazione di un *Top-Stage Incubator* rendono Aurox Unity un microscopio *spinning disk* adatto al *live imaging*. A riprova di quanto appena affermato, in **figura 5** è riportato un esperimento in *time-lapse* ottenuto con Aurox Unity, nel quale è possibile notare l'alterazione di potenziale di membrana mitocondriale in seguito ad un trattamento con acqua ossigenata.

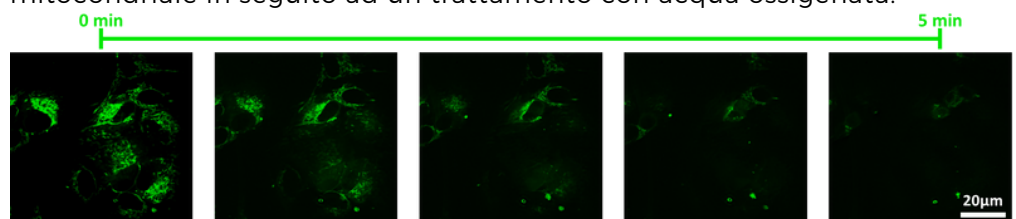


Figura 5: *Time-lapse* con cellule HeLa trattate con acqua ossigenata. Grazie all'utilizzo di un indicatore di potenziale di membrana mitocondriale è possibile seguirne l'andamento in seguito al trattamento. Immagini gentilmente concesse dal Prof. D'Angelo dell'Università dell'Aquila.

I microscopi confocali *laser scanning* e *spinning disk* continuano a giocare un ruolo essenziale in biologia. Purtroppo però, la risoluzione spaziale di questi sistemi è limitata dalla diffrazione della luce, dunque non maggiore della metà della lunghezza d'onda utilizzata (tipicamente attorno ai 250nm). Considerando che lo spessore di un singolo mitocondrio oscilla dai 250 ai 500nm, la risoluzione dei sistemi confocali risulta sufficiente per la loro visualizzazione, ma insufficiente per lo studio di proteine submitocondriali. Fortunatamente, negli ultimi decenni è stato superato questo limite di risoluzione grazie a svariate tecniche, dette *Super-Resolution Microscopy*. Dallo STED (*stimulated emission depletion microscopy*) alla SIM (*structured illumination microscopy*), dal PALM (*photo-activated localization microscopy*) allo STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*), numerose tecnologie a super risoluzione hanno aperto nuovi orizzonti sperimentali nel campo dei mitocondri. Data la vastità di applicazioni e la complicatezza dei vari sistemi, non tratteremo questa categoria di strumenti che è però riassunta nella completa review di Stefan Jakobs and Christian Wurm (4).

L'Olotomografia di Nanolive

Uno degli strumenti più rivoluzionari nella ricerca è senza dubbio il 3D Cell Explorer di Nanolive, primo microscopio olotomografico al mondo in grado di visualizzare cellule vive in 3D e in timelapse senza l'utilizzo di marcatori fluorescenti. L'assenza di fluorescenza elimina totalmente tutti i problemi legati alla fototossicità, rendendo Nanolive un microscopio perfettamente adatto ad esperimenti di live-imaging con ogni tipo di coltura cellulare. Nonostante l'assenza di marcatori, Nanolive genera immagini ad alta risoluzione (200nm di risoluzione laterale) permettendo l'imaging anche di dettagli subcellulari, come i mitocondri. L'alta risoluzione, assieme al live-imaging senza limiti, rendono l'olotomografia di Nanolive l'approccio perfetto per l'osservazione unbiased delle dinamiche mitocondriali *in vitro*.

A conferma di quanto affermato, in **figura 6** sono documentati eventi di fusione e fissione mitocondriale. Il video, ottenuto con Nanolive da cellule embrionali di topo, riprende una doppia mitosi di due cellule staminali (video intero a questo link [\[2\]](https://www.nanolive.ch/applications/overview/stem-cells/)). Effettuando uno zoom su determinati frames però, è possibile notare due eventi di fissione (divisione mitocondriale, freccia gialla) e uno di fusione (unione mitocondriale, freccia blu). Da questo esempio, non solo è apprezzabile l'alta risoluzione spaziale, ma pure l'alta risoluzione temporale. Infatti, gli eventi registrati avvengono in una finestra temporale di soli 45 secondi.

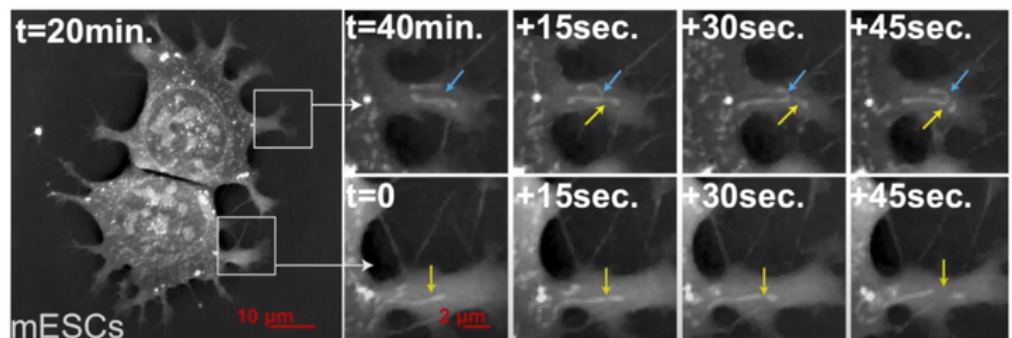


Figura 6: Zoom su citoplasma di cellule embrionali di topo. Nei riquadri è possibile seguire due eventi di fissione (divisione mitocondriale, freccia gialla) e un evento di fusione (unione mitocondriale, freccia blu). I tre eventi avvengono in un periodo di 45 secondi e grazie alla tecnologia Nanolive il campione viene visualizzato ad alta frequenza d'acquisizione senza venire alterato.

È dunque evidente che le potenzialità di Nanolive, almeno *in vitro*, sono infinite: con l'olotomografia è possibile visualizzare qualsiasi tipologia cellulare in maniera *unbiased* senza perdere alcun dettaglio e dinamica subcellulare e di popolazione. Una prova definitiva di come Nanolive sia uno strumento adatto all'analisi mitocondriale è riassunta in un nostro precedente articolo che troverete a questo link [\[3\]](https://www.linkedin.com/pulse/visualizzare-i-mitocondri-senza-intermediari-fluorescenti-/?trackingId=AM02tZERTKiFitKJIGAy8A%3D%3D). In tale articolo, esponiamo brevemente un esperimento condotto da Nanolive, nel quale colture cellulari vengono visualizzate con l'olotomografia in presenza o meno di MitoTracker e fluorescenza. Il risultato mostra chiaramente i danni da fototossicità indotti dall'irradiazione del campione, ma anche i danni (più lievi) della sola presenza del marcatore. Infatti, la presenza di MitoTracker comporta una certa mortalità cellulare anche in assenza di fluorescenza, indicando che l'accumulo del composto all'interno del mitocondrio risulta dannoso e dunque non completamente affidabile.

[2] <https://www.nanolive.ch/applications/overview/stem-cells/>

[3] <https://www.linkedin.com/pulse/visualizzare-i-mitocondri-senza-intermediari-fluorescenti-/?trackingId=AM02tZERTKiFitKJIGAy8A%3D%3D>

Conclusione

L'evoluzione della microscopia dalla seconda metà dell'800 ad oggi ha permesso ai ricercatori di visualizzare i mitocondri con approcci totalmente differenti e sempre più performanti. Le varie tecniche disponibili attualmente consentono di investigare la natura del mitocondrio in modalità anche opposte, ma che nell'insieme forniscono informazioni essenziali su più aspetti di questo speciale organello.

(1) K. Cleland and E. C. Slater. The Sarcosomes of Heart Muscle: Their Isolation, Structure, and Behaviour under various Conditions. *Journal of Cell Science*. 1953 Sept.

(2) George E. Palade. THE ORGANIZATION OF LIVING MATTER. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964 Aug;52(2):613-34. doi: 10.1073/pnas.52.2.613.

(3) George E. Palade. THE FINE STRUCTURE OF MITOCHONDRIA. *Anat Rec*. 1952 Nov;114(3):427-51. doi: 10.1002/ar.1091140304.

(4) Stefan Jakobs and Christian A Wurm. Super-resolution microscopy of mitochondria. *Curr Opin Chem Biol*. 2014 Jun;20:9-15. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.03.019..



**MEDIA SYSTEM
LAB**

MEDIA System Lab srl

Via Visconti di Modrone, 31 - 20846 Macherio (MB)

Via delle Zigherane, 4/A - BeFactory - 38068 Rovereto (TN)

Office: +39.351.5694492 info@m-s.it www.m-s.it