



## UNIVERSITÀ DI PISA

# MICROSCOPIA DI FLUORESCENZA PER L'ANALISI DI SISTEMI BIOLOGICI ALLA NANOSCALA

### RANIERI BIZZARRI

Anno accademico	2022/23
CdS	BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI
Codice	555EE
CFU	3

Moduli	Settore/i	Tipo	Ore	Docente/i
MICROSCOPIA DI FLUORESCENZA PER L'ANALISI DI SISTEMI BIOLOGICI ALLA NANOSCALA	BIO/10	LEZIONI	32	RANIERI BIZZARRI

#### Obiettivi di apprendimento

##### *Conoscenze*

Il corso ha come obiettivo quello di fornire principi ed esperienze pratiche sulle principali tecniche di microscopia di fluorescenza per l'analisi di processi biologici che avvengono alla scala nanometrica. Particolare enfasi sarà rivolta all'utilizzo della microscopia a super-risoluzione per lo studio di complessi molecolari (es: protein binding), delle fasi nanocondensate (es: topological associating domains sulla cromatina, lipid rafts in membrana) e dei processi di internalizzazione cellulare di sistemi esogeni (es: virus). Parte delle conoscenze (16h) saranno acquisite mediante lezioni di tipo frontale. Tali conoscenze saranno poi integrate da conoscenze ottenute in attività di laboratorio (16h), siano esse di tipo diretto (acquisizioni di immagini al microscopio) o di analisi dati.

##### *Modalità di verifica delle conoscenze*

La verifica delle conoscenze avverrà nella forma dell'esame orale, oltre che attraverso gli incontri docente-studenti e il ricevimento.

##### *Capacità*

Al termine del corso lo studente avrà acquisito conoscenze, teoriche e pratiche, per condurre esperimenti di imaging ottico su campioni biologici (cellule, tessuti) con risoluzione nanometrica. Tali conoscenze risultano rilevanti per capire e razionalizzare il meccanismo di svariati processi biologici cellulari e si integrano con analisi "omics".

##### *Modalità di verifica delle capacità*

Saranno proposti piccoli test informali, in particolare nell'ambito dell'analisi dati, per verificare l'acquisizione di conoscenze su particolari temi.

##### *Comportamenti*

Sarà acquisita sensibilità nell'ambito della raccolta e analisi di dati sperimentali relativamente a processi intracellulari ottenuti mediante imaging ottico ad alta/super-risoluzione.

##### *Modalità di verifica dei comportamenti*

Saranno proposti piccoli test informali, in particolare nell'ambito dell'analisi dati, per verificare l'acquisizione di sensibilità su particolari temi (e.s.: imaging su cellule in condizioni vitali).

##### *Prerequisiti (conoscenze iniziali)*

Non è richiesto nessun specifico prerequisito, se non curiosità riguardo alla comprensione analitica dei meccanismi cellulari e sensibilità verso i metodi quantitativi di ricerca. Durante il corso verrà presentata una breve descrizione dei concetti fondamentali dell'ottica geometrica per colmare eventuali lacune.

##### *Corequisiti*

E' consigliabile, ma non necessario, integrare il corso con uno dei due corsi seguenti, a seconda della provenienza e del background culturale:

- Biofisica Cellulare, 386BB WBO-LM



## UNIVERSITÀ DI PISA

• Tecniche di microscopia e live imaging applicate ai microrganismi, 479EE WBO-LM

### Prerequisiti per studi successivi

N.A.

### Indicazioni metodologiche

Le lezioni saranno svolte in modalità frontale con l'ausilio di slides e filmati.

Il materiale didattico (slides, eventuali articoli) sarà reso disponibile sul sito di elearning e su eventuali altri siti web.

Il docente è disponibile per il ricevimento secondo le modalità riportate sul sito unimap.

Non sono previste prove in itinere.

### Programma (contenuti dell'insegnamento)

Di seguito sono riportati i principali argomenti trattati nel programma. Si noti che per ogni tecnica descritta saranno riportati esempi di imaging cellulare relativi alle applicazioni della super-risoluzione allo studio di processi biologici. Tali esempi sono tratti anche dall'esperienza diretta del docente nell'ambito del suo campo di ricerca.

#### LEZIONI FRONTALI

##### A – Basi di microscopia ottica (~2 ore)

- Cenni di ottica geometrica
- Come è fatto un microscopio?
- Il primo parametro rilevante: il contrasto
- Microscopia a campo chiaro e a contrasto di fase

##### B – La microscopia di fluorescenza limitata dalla diffrazione (~4 ore)

- Cosa è la fluorescenza?
- Il microscopio a fluorescenza *wide field*
- Il secondo parametro rilevante: la risoluzione spaziale e la teoria di Abbe
- Risoluzione, sezionamento e contrasto: il microscopio confocale
- Microscopia su campioni fissati e su campioni vitali: immunofluorescenza sonde geneticamente codificate

##### C – La microscopia di fluorescenza a super risoluzione (~8 ore)

- Teoria della super-risoluzione
- Forster Resonance Energy Transfer: il primo esempio di super-risoluzione
- Image Scanning Microscopy
- Microscopia STED e RESOLFT
- Single Molecule Localization Microscopy: STORM e F-PALM
- Super-resolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI)
- Structured Illumination Microscopy (SIM)

##### D – Dinamica della diffusione di singole molecole (~2 ore)

- Spettroscopia di correlazione
- Single particle tracking

#### LABORATORIO

##### A – Esperimenti di super-risoluzione mediante Imaging Scanning Microscopy (~8 ore)

- Gli studenti parteciperanno, a gruppi, a esperimenti di imaging su cellule e tessuti mediante microscopia ISM Airyscan. Se possibile sarà prevista una parte di laboratorio relativa alla preparazione del campione

##### B – Analisi di immagini da super-risoluzione (~8 ore)

- Cluster analysis
- Colocalizzazione
- Analisi di processi diffusivi
- Deconvoluzione

### Bibliografia e materiale didattico

Oltre alle slides del corso (che saranno messe a disposizione di tutti gli studenti al termine di ogni lezione), alcuni argomenti sono trattati dai seguenti libri:

- Ann Wheeler and Ricardo Henriques "Standard and Super?Resolution Bioimaging Data Analysis: A Primer", John Wiley & Sons, Hoboken (NJ), 2018
- Barry R. Masters "Superresolution Optical Microscopy", Springer Series in Optical Sciences, Springer Nature Switzerland 2020

### Indicazioni per non frequentanti



## UNIVERSITÀ DI PISA

---

N.A.

### Modalità d'esame

La prova orale consiste in un colloquio tra il candidato e il docente. Il colloquio inizia con la descrizione di un articolo che descrive -in maniera generale- un tema di imaging ottico su scala nanometrica applicato a processi cellulare (es: imaging dei processi di binding tramite FRET). L'articolo viene preventivamente scelto dallo studente in un gruppo pre-selezionato dal docente o proposto dallo studente stesso e approvato dal docente. A partire dall'articolo, la prova si allarga a temi collegati presentati all'interno del corso. La durata del colloquio è di circa 30-40 minuti.

### Stage e tirocini

N.A.

### Altri riferimenti web

N.A.

### Note

N.A.

*Ultimo aggiornamento 01/02/2023 17:02*