

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Applicazioni di complessi tra ipericina e apomioglobina alla
microscopia a super-risoluzione STED**

Candidato

Giulio Maestrini

Relatore

Prof. Cristiano Viappiani

Correlatori

Prof.ssa Stefania Abbruzzetti

Prof. Paolo Foggi

Desidero ringraziare Pietro Delcanale per il tempo che mi ha dedicato e per la collaborazione nello svolgimento delle misure.

Questo lavoro è stato possibile grazie alla disponibilità del gruppo di spettroscopia ultraveloce del LENS di Firenze, in particolare il prof. Paolo Foggi, Alessandro Iagatti, Laura Bussotti, Barbara Patrizi e Sandra Doria.

Indice

Introduzione	1
1 Il complesso ipericina-apomioglobina	3
1.1 L'ipericina	3
1.1.1 Proprietà chimiche	4
1.1.2 Proprietà spettroscopiche	5
1.1.3 L'ipericina come fotosensibilizzatore	7
1.2 L'apomioglobina	9
1.3 Il complesso ipericina-apomioglobina	11
1.3.1 Titolazione del complesso	13
1.4 Tentativi con aponeuroglobina e apocitoglobina	18
2 Microscopia a super-risoluzione	21
2.1 Il limite della diffrazione nell'ottica	21
2.1.1 Tecniche di super-risoluzione	24
2.2 La microscopia STED	26
2.2.1 Caratteristiche spettroscopiche dei fluorofori	30
2.2.2 Potere risolutivo della STED	31
2.2.3 Il <i>bleaching</i> dei fluorofori	32
2.2.4 Altre implementazioni della STED	35
3 Spettroscopia <i>pump-probe</i> ultraveloce	37
3.1 Spettroscopia di assorbimento transiente	37
3.1.1 Principio di un esperimento <i>pump-probe</i>	38
3.2 Apparato sperimentale e misura	41
3.2.1 Misura della trasmittanza transiente	44
3.2.2 Funzione di risposta strumentale	45
3.2.3 Dispersione del continuo	45
3.2.4 Allargamento della funzione strumentale dovuto alla dispersione	47
3.2.5 Preparazione del campione e del <i>setup</i>	49
3.3 Misure e analisi dei dati	51
3.3.1 Analisi globale con GLOTARAN	51

3.4	Misure di assorbimento transiente	54
3.4.1	Ipericina in DMSO	56
3.4.2	Ipericina in complesso con apoMb	58
3.4.3	Ipericina in tampone a pH 10	60
4	Applicazioni alla microscopia STED	73
4.1	Apparato sperimentale	73
4.2	Curva di <i>depletion</i> del complesso hyp-apoMb	75
4.3	Immagini a super-risoluzione di cellule in vita	76
4.3.1	Distribuzione dell'ipericina e fotosensibilizzazione	76
	Conclusioni	82
A	Campioni e strumentazione	85
A.1	Materiali	85
A.1.1	Preparazione dell'apomioglobina	85
A.2	Spettri di stato stazionario	86
A.3	<i>Laser Flash Photolysis</i>	86
	Bibliografia	89

Introduzione

L'impiego di materiali nanostutturati in campo biomedico costituisce l'oggetto della *nanomedicina*, un campo di ricerca interdisciplinare di crescente interesse che ha prodotto i primi risultati disponibili per applicazioni mediche verso gli anni '90. Composti nanostrutturati possono essere usati come vettori di principi attivi terapeutici o diagnostici al fine di migliorarne la biodisponibilità e la selettività: le dimensioni nanometriche permettono di ingegnerizzare composti che abbiano ad esempio particolari caratteristiche di diffusione attraverso barriere biologiche o di selettività verso certi tessuti. A questo scopo la ricerca biotecnologica si è indirizzata verso lo sviluppo di composti basati su liposomi (vescicole lipidiche a doppio strato), micelle (vescicole lipidiche a singolo strato), nanoparticelle, anticorpi e biopolimeri come proteine.

Da qualche anno nel campo della nanomedicina è comparsa una branca di ricerca che va sotto il nome di *teranostica* (*theranostic*), dalla contrazione delle parole *terapia* e *diagnostica*, che indica la combinazione in un solo farmaco di proprietà sia terapeutiche che diagnostiche [1]. L'opportunità di seguire la cinetica di un farmaco, dalla localizzazione nei tessuti, al rilascio dei principi attivi, all'efficacia della terapia, ha infatti la massima importanza nel contesto della nanomedicina e si può ottenere integrando nel farmaco nanostrutturato un mezzo di contrasto per una tecnica di *imaging*. Le informazioni che si ricavano possono contribuire allo sviluppo del farmaco, alla comprensione del suo funzionamento e non da ultimo a fini diagnostici nella pratica medica.

La teranostica ha già applicazione concreta in alcuni tipi di chemioterapia per la cura del cancro: per fare un esempio si può citare il tracciamento della distribuzione nell'organismo di nanofarmaci marcati con radioisotopi (es. iodio 131) rivelati mediante scintigrafia (2D) o SPECT (3D), oppure lo studio del rilascio di principi attivi a livello cellulare attraverso *imaging* di risonanza magnetica (MRI) usando gadolinio o manganese come *markers* sensibili ai diversi compartimenti cellulari.

Tra le tecniche di *imaging* per lo studio della localizzazione cellulare la microscopia di fluorescenza ricopre da sempre un ruolo di inestimabile valore per versatilità, semplicità e minima invasività, permettendo di risolvere dettagli dell'ordine di grandezza degli organelli cellulari in campioni *vivi*.

Recentemente la microscopia di fluorescenza è entrata a far parte delle tecniche a *super-risoluzione*, cioè non limitate dalla diffrazione della luce, grazie all'invenzione di metodi come la STED (*STimulated Emission Depletion microscopy*), descritta nel capitolo 2, che permettono di migliorare il potere risolutivo della microscopia ottica in campo lontano di circa un ordine di grandezza, consentendo la risoluzione di dettagli e strutture sub-cellulari.

In questo lavoro si discute la possibilità di applicazioni teranostiche di un composto nanostrutturato dell'*ipericina* in complesso con la matrice proteica della mioglobina (apomioglobina) impiegata come *carrier* per facilitarne la diffusione in ambienti acquosi.

L'*ipericina* è un noto fotosensibilizzatore di origine naturale impiegato da tempo nella terapia fotodinamica dei tumori (PDT): una volta penetrata all'interno delle cellule se opportunamente eccitata da luce visibile produce specie citotossiche (nella fattispecie ossigeno singoletto) capaci di indurre la morte cellulare per apoptosi o necrosi. Contemporaneamente all'azione terapeutica l'*ipericina* può essere impiegata come fluoroforo in microscopia di fluorescenza, consentendo l'individuazione delle cellule bersaglio, la sua localizzazione all'interno dei compartimenti cellulari e l'indagine degli effetti della fotosensibilizzazione. La mioglobina, proteina abbondante nei muscoli di tutti i vertebrati, è un vettore che non presenta nessuno dei problemi di biocompatibilità che spesso incontrano le nanostrutture artificiali e grazie alla formazione spontanea di un complesso 1:1 con l'*ipericina* ne preserva le proprietà di fluorescenza e fotosensibilizzazione impedendone l'aggregazione in ambienti acquosi.

Le proprietà fotosensibilizzatrici del complesso sono state stabilite in studi precedenti [2], [3]: questo lavoro è principalmente volto alla caratterizzazione del complesso nelle applicazioni di *imaging* di fluorescenza a super-risoluzione tramite la microscopia STED.

Nel capitolo 1 si presentano le proprietà chimiche e spettroscopiche dell'*ipericina* e del suo complesso con l'apomioglobina. Il capitolo 2 tratta della microscopia a super-risoluzione, in particolare dei principi della microscopia STED e delle sue principali varianti. La caratterizzazione spettroscopica transiente dell'*ipericina* e del complesso, necessaria ad appurarne l'applicazione come fluoroforo per la STED è invece riportata nel capitolo 3. Nel capitolo 4 si riportano infine le applicazioni del complesso alla microscopia STED di batteri e cellule tumorali.

Capitolo 1

Il complesso ipericina-apomioglobina

1.1 L'ipericina

Le piante del genere iperico (*Hypericum*) sono note fin dall'antichità per le proprietà farmaceutiche: diffuse su gran parte della superficie terrestre e in particolare nel bacino del Mediterraneo, sono citate nei trattati di medicina classici come rimedio per le intossicazioni, cura delle ferite e antidepressivo. Ancora oggi gli estratti di iperico sono impiegati come blando antidepressivo, proprietà per cui probabilmente in antichità l'erba di san Giovanni (*Hypericum perforatum*) era nota come *fuga daemonium* [4].

Tra le proprietà dell'iperico conosciute fin dall'antichità si annoverano anche quelle *fitodinamiche*, cioè dipendenti dall'illuminazione [5]: i pastori del Salento sapevano che gli armenti dal manto chiaro che si nutrivano di grandi quantità di iperico mostravano irritazioni diffuse e ingravescenti con l'esposizione al sole che potevano anche causare la morte degli animali. Gli arabi proteggevano i loro cavalli colorando le parti chiare della criniera con estratti di henna o di tabacco. All'inizio del '900 queste manifestazioni furono messe in relazione all'ingestione dell'iperico e furono indicate come sindromi da *ipericismo*. L'agente responsabile della fotosensibilizzazione fu isolato dall'*Hypericum perforatum* nel 1939 da Brockmann, il quale ne stabilì la formula bruta ($C_{30}H_{16}O_8$) e successivamente la struttura, identificandolo con l'*ipericina* che era stata isolata per la prima volta da Cerny nel 1911. A Brockmann stesso si deve anche la prima sintesi totale del composto, ottenuta per la prima volta nel 1957.

In natura le piante di iperico sono la fonte di ipericina più abbondante, essendo il pigmento presente in numerosissimi granuli sparsi sulla corolla e sul calice dei fiori, contenenti un liquido composto da ipericina per circa lo 0.05% che ha lo scopo di proteggere le foglie della pianta dall'ingestio-

ne da parte di animaliⁱ. Nel regno animale l'ipericina è stata rintracciata nell'insetto *Dermocybe austroveneta* mentre nei funghi della specie *Dermocybe austroveneta* ne sono stati trovati precursori chimici; in entrambi i casi tuttavia non ne è chiara la funzione.

In tempi moderni l'ipericina è tornata ad essere oggetto di crescente interesse farmaceutico e medico dopo la scoperta di proprietà virucide, anti-retrovirali e antibatteriche *in vitro* che ne hanno fatto sperare un impiego ad esempio nella terapia dell'HIV o dell'epatite C [7]. Gli esperimenti condotti su pazienti vivi hanno tuttavia ridimensionato le speranze iniziali, mettendo in evidenza la natura principalmente fotodinamica delle suddette proprietà che ne rende difficile l'applicazione a livello sistemico. Per converso la possibilità di produrre una risposta localizzata nei tessuti illuminati selettivamente ha reso l'ipericina un ottimo candidato per la terapia fotodinamica dei tumori, considerato anche che il composto è atossico e biologicamente ben tollerato se non esposto alla luce.

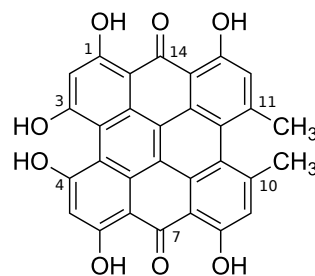


Figura 1.1: Struttura chimica dell'ipericina.

1.1.1 Proprietà chimiche

L'ipericina, mostrata in figura 1.1, ha un peso molecolare di $504.44 \text{ g mol}^{-1}$ e si presenta in fase solida a temperatura ambiente. È solubile in molti solventi organici polari e generalmente insolubile in solventi apolari; l'acqua costituisce una notevole eccezione essendo un pessimo solvente per valori di pH compresi tra 3 e 11. Le soluzioni contenenti ipericina hanno un colore rosso nella maggior parte dei solventi organici, verde in quelli basici mentre in acqua si forma una dispersione violacea di aggregati. Tipicamente si preferisce sciogliere l'ipericina in etanolo (solubilità $\simeq 10 \text{ mg/mL}$) o in *dimesilossido* (DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, solubilità $\simeq 25 \text{ mg/mL}$), nei quali presenta bande di assorbimento e di fluorescenza intense e ben risolte (figura 1.4). In questo lavoro si è sempre impiegato il DMSO come solvente per l'ipericina, essendo molto meno citotossico dell'etanolo.

In solventi polari l'ipericina si presenta generalmente in forma anionica, con la regione detta *bay* (i due gruppi ossidrilici in posizione 3-4 della 1.1) privata di un protone ($\text{pK}_a \simeq 1.8$) [8] e legata da un legame idrogeno molto corto [9]. Nel seguito per brevità si continuerà a indicare con *ipericina* anche questa forma anionica. Il pK_a delle regioni dette *peri* (in posizioni 6-7-8 e 13-14-1) è invece di circa 9 e 12 rispettivamente per una e due deprotonazioni nello stato fondamentale del composto.

ⁱÈ interessante notare come alcuni insetti si siano adattati per evitare gli effetti deleteri della fotosensibilizzazione, come i lepidotteri della specie *Platynota flavedana* che ripiegano le foglie di iperico per oscurarsi al loro interno [6]

Nonostante la semplice apparenza strutturale l'ipericina dà luogo ad una serie di equilibri strutturali relativamente complessi [4]. La distribuzione dei legami con gli idrogeni rende possibili 10 forme tautomeriche distinte dell'ipericina, ottenute trasferendo un protone da un gruppo ossidrilico a uno carbonilico. Con tecniche computazionali è stato mostrato che il tautomero energeticamente più favorevole è quello mostrato nella struttura 1.1, con i gruppi carbonilici in posizione 7 e 14, separato da una barriera energetica di 41 kJ mol^{-1} dal tautomero 1-7. Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che in soluzione si abbia sempre a che fare con una distribuzione di tautomeri e non con un singolo isomero. Alcune prove di questo fatto verranno discusse nel capitolo 3. Oltre al tautomerismo si deve considerare che la struttura tridimensionale della molecola non è esattamente planare, ma presenta caratteristici angoli torsionali individuati tramite diffrattometria X. Questo fatto suggerisce la presenza di 4 stereoisomeri torsionali che danno luogo ad un'ulteriore distribuzione di isomeri all'equilibrio.

La scarsa solubilità in acqua è dovuta alla natura fortemente idrofobica della molecola che porta alla formazione di aggregati per *stacking* in cui l'interazione tra i momenti di dipolo modifica fortemente gli spettri di assorbimento e causa la perdita quasi completa della fluorescenza (*H-aggregates*).

1.1.2 Proprietà spettroscopiche

In figura 1.2 sono riportati gli spettri di assorbimento e fluorescenza di una soluzione $12 \text{ } \mu\text{M}$ di ipericina in DMSO. Il fatto che il DMSO sia un ottimo solvente per l'ipericina è dimostrato dal grafico 1.3 in cui è riportata l'assorbanza A a due lunghezze d'onda in funzione della concentrazione di ipericina (hyp): l'andamento in funzione della concentrazione c è lineare come previsto dalla legge di Lambert-Beer: $A = \epsilon cl$, dove l è il cammino ottico della luce nel campione. I coefficienti di estinzione molare che si stimano da un *fit* lineare dei valori mostrati sono $\epsilon_{599} = 51600$ e $\epsilon_{554} = 24000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Lo spettro di assorbimento è caratterizzato da una struttura vibronica evidente, con due bande nel visibile molto intense a 599 e 554 nm dovute ai primi due livelli vibrazionali ($\nu = 0, 1$) della transizione $S_0 \rightarrow S_1$; un terzo picco vibrazionale ($\nu = 2$) più debole è visibile intorno a 516 nm. Il picco a 481 nm è il primo della transizione $S_0 \rightarrow S_2$. Ciascuna transizione vibronica è a sua volta separata in due sottolivelli, la cui struttura fine si manifesta come spalle visibili sui picchi più intensi. Data la geometria approssimativamente planare dell'ipericina ci si aspettano momenti di dipolo di transizione orientati lungo i due assi della molecola e dunque ortogonali: questo fatto è stato confermato da misure di anisotropia di fluorescenza come sarà illustrato in seguito. In particolare la transizione $S_0 \rightarrow S_1$ è stata attribuita ad una transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ orientata lungo l'asse minore della molecola, cioè quello perpendicolare ai gruppi carbonilici [10]. La 1.2 mostra che lo spettro di fluorescenza è l'immagine speculare delle bande di assorbimento $S_0 \rightarrow S_1$,

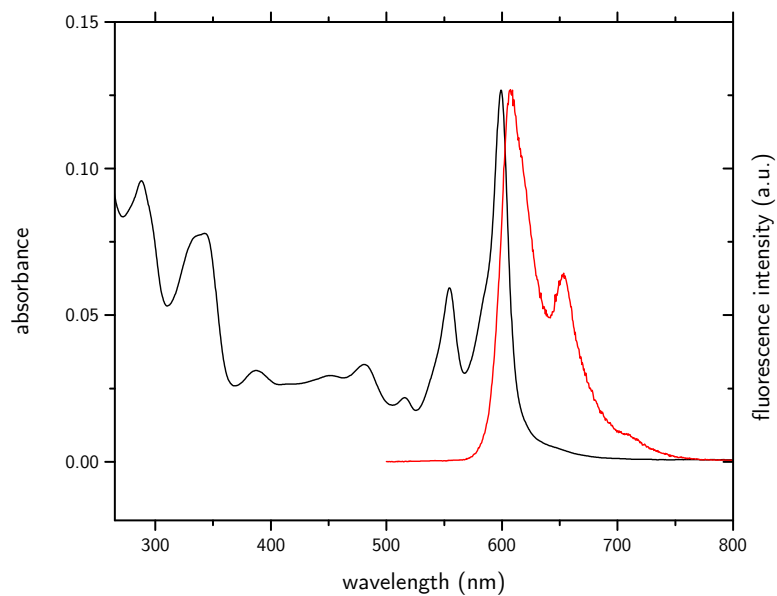


Figura 1.2: Spettri di assorbimento ed emissione ($\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$) di una soluzione $12 \mu\text{M}$ di ipericina in DMSO.

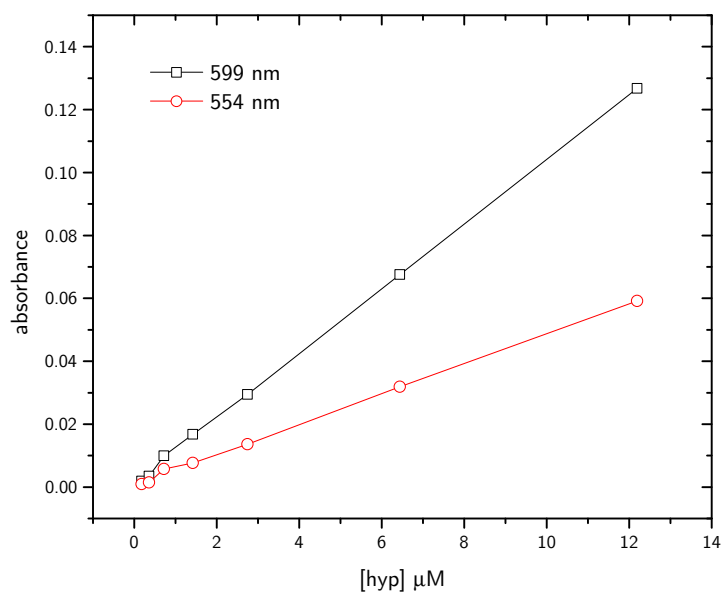


Figura 1.3: Verifica della legge di Lambert-Beer per l'ipericina in DMSO.

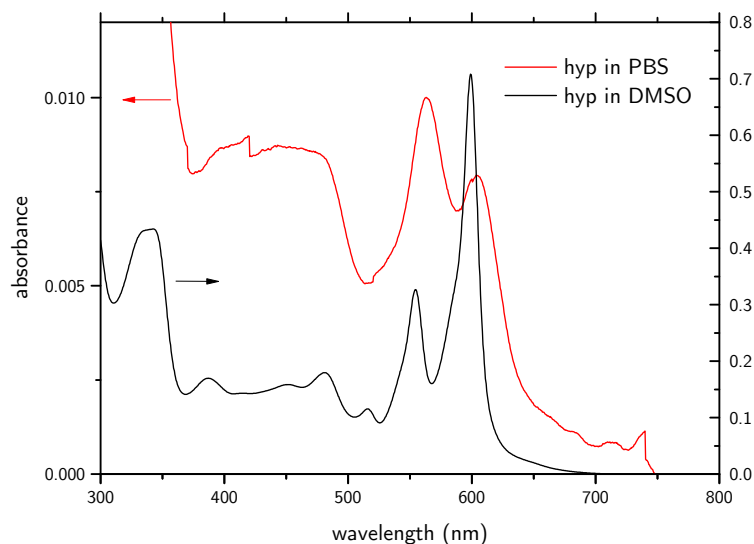


Figura 1.4: Confronto tra gli spettri di assorbimento dell'ipericina in DMSO e PBS.

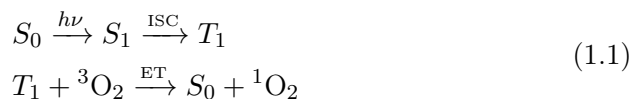
con uno *Stokes shift* di circa 8 nm. La resa quantica di fluorescenza in DMSO è stata calcolata in [11] e vale 0.35 ± 0.02 ; il decadimento dell'intensità di fluorescenza è mono-esponenziale con costante di tempo $\tau = 5.5 \pm 0.1$ ns. La figura 1.4 mostra il confronto tra gli spettri di assorbimento dell'ipericina in DMSO e un tampone acquoso (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, pH = 7.4). A parità di concentrazione l'assorbanza in PBS è circa 4 volte inferiore rispetto a quella in DMSO e le bande hanno un profilo diverso, con il picco più rosso meno intenso di quello più blu. La formazione di aggregati fa sì inoltre che la soluzione non abbia fluorescenza apprezzabile e presenti un notevole *scattering Rayleigh* apprezzabile come un fondo proporzionale a λ^{-4} .

1.1.3 L'ipericina come fotosensibilizzatore

Un *fotosensibilizzatore* è una specie chimica che si eccita assorbendo radiazione e media qualche reazione fotoindotta a livello cellulare. Nell'ottica di questo lavoro hanno importanza i fotosensibilizzatori capaci di produrre specie citotossiche di interesse terapeutico, come quelli impiegati nella terapia fotodinamica dei tumori. Si è soliti chiamare fotosensibilizzatori di *tipo 1* quelli che coinvolgono un trasferimento di carica verso un accettore, mentre di *tipo 2* quelli che si basano su un trasferimento di energia. L'ipericina è tra i più potenti fotosensibilizzatori presenti in natura. È noto che la sua azione fotosensibilizzatrice dipende dalla presenza di ossigeno e avviene sia con meccanismi di tipo 1 (produzione di ROS - *Reactive Oxygen Species*) che

di tipo 2, sebbene il secondo caso sia quantitativamente prevalente [7].

La fotosensibilizzazione dell'ossigeno singoletto è un fenomeno alquanto comune in natura ed è presentato in dettaglio nel riferimento [3], nel quale ne sono anche illustrate le implicazioni biologiche. In sintesi si ricorda che la molecola O_2 ha la peculiarità di avere lo stato fondamentale in configurazione di tripletto di spin, indicata nel linguaggio degli orbitali molecolari con $^3\Sigma_g^-$, mentre come primi stati eccitati i singoletti di spin $^1\Delta_g$ (doppiamente degeneri, di energia 95 kJ mol^{-1} , comunemente detto *ossigeno singoletto*) e $^1\Sigma_g^+$ (non degeneri, di energia 158 kJ mol^{-1}). Molte sostanze organiche possono produrre ossigeno singoletto dai loro stati eccitati di tripletto fotoindotti secondo la reazione



dove ISC sta per *Inter System Crossing*, cioè la transizione non radiativa di una specie eccitata verso un'altra di diversa molteplicità di spin ed ET sta per *Energy Transfer*. L'accoppiamento spin-orbita, particolarmente rilevante in molte molecole organiche, rende possibile l'ISC che sarebbe una transizione spin-proibita. La seconda delle 1.1 (diseccitazione dello stato di tripletto del fotosensibilizzatore per *quenching* da parte dell'ossigeno molecolare) descrive invece un processo spin-permesso, che ha quindi un rendimento piuttosto elevato, considerata l'abbondanza naturale di O_2 e la sua elevata diffusività. Il rendimento quantico di formazione di ossigeno singoletto, Φ_Δ , per la 1.1 sarà dato da

$$\Phi_\Delta = \Phi_T \Psi_\Delta \quad (1.2)$$

dove Φ_T è la resa quantica di formazione del tripletto del fotosensibilizzatore e Ψ_Δ è l'efficienza del trasferimento di energia.

La resa quantica di produzione dell'ossigeno singoletto si può misurare direttamente dalla diseccitazione radiativa (fosforescenza) nell'infrarosso centrata a 1270 nm ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$), oppure impiegando tecniche calorimetriche o analisi quantitative delle reazioni di foto-ossidazione [3]. Per l'ipericina i valori misurati sono molto elevati, ad esempio in etanolo $\Phi_\Delta = 0.73$ e valori simili sono riportati per molti solventi organici [12], mentre in liposomi, membrane cellulari, mitocondri $\Phi_\Delta \simeq 0.3 - 0.4$.

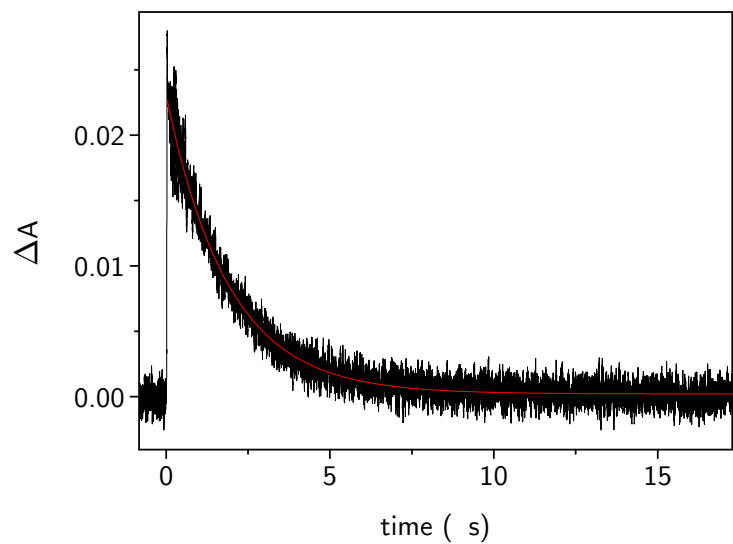
In questo lavoro non si sono fatte misure dirette della resa quantica Φ_Δ , ma si è registrato il decadimento temporale dello stato di tripletto dell'ipericina tramite *laser flash photolysis*, con l'apparato strumentale descritto in appendice A.3. In presenza di ossigeno libero, come quello che diffonde spontaneamente in campioni biologici, la produzione di 1O_2 è il canale di decadimento dello stato di tripletto più probabile, favorito rispetto all'ISC o al decadimento radiativo per fosforescenza. Per questo fatto la misura risolta in tempo del decadimento del tripletto di una specie chimica permette una valutazione qualitativa della bontà come fotosensibilizzatore.

In figura 1.5(a) è riportato il decadimento dell'assorbanza dell'ipericina in DMSO ottenuto eccitando la soluzione a $\lambda_{exc} = 532$ nm e rivelando il fascio di *probe* a $\lambda_{pr} = 510$ nm. La lunghezza d'onda di *probe* è stata scelta sul picco di una banda di assorbimento transiente, come riportato in [13]; il valore positivo di ΔA misurato conferma trattarsi di un processo di assorbimento da stato eccitato. Il decadimento del segnale è ben descritto da un singolo esponenziale con costante di tempo $\tau = 1.89 \pm 0.004$ μs , che è senz'altro un valore attribuibile al decadimento del tripletto. Per confronto è riportata la stessa misura svolta sul complesso ipericina-apomioglobina ([hyp]=11 μM , [apoMb]=35 μM), descritto nella sezione 1.3. Anche in questo caso il decadimento è mono-esponenziale, ma con un tempo di decadimento più lungo, $\tau = 11.56 \pm 0.01$ μs , che si può attribuire alla presenza dell'ipericina in una cavità interna della proteina, schermata dal contatto diretto con il solvente e con l'ossigeno in soluzione. Come riprova del ruolo dell'ossigeno come *quencher* del tripletto in [2] è riportata la misura del decadimento del tripletto ottenuta dallo spettro di fosforescenza risolto in tempo di una soluzione del complesso in aria e in un ambiente saturato di O₂. A parità di condizioni sperimentali il tripletto ha una costante di decadimento rispettivamente di 11.1 ± 0.4 μs e 5.0 ± 0.4 μs .

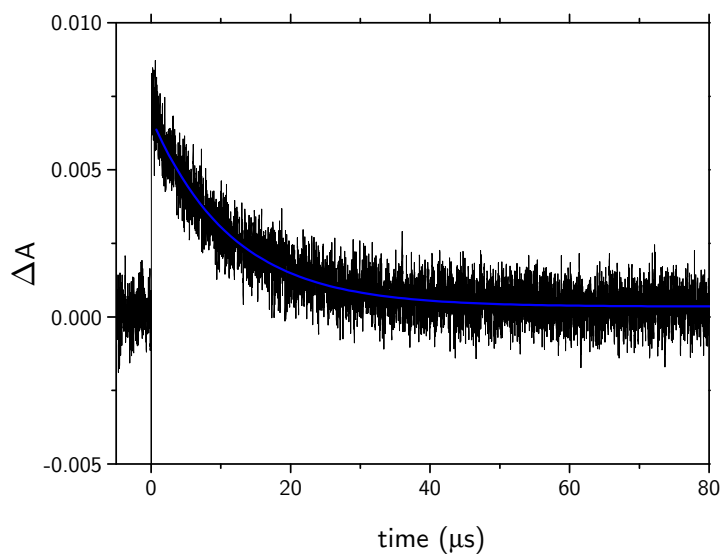
1.2 L'apomioglobina

La mioglobina (Mb) è una piccola proteina globulare abbondante nei muscoli dei vertebrati dove si lega all'ossigeno e ne permette il trasporto e l'accumulo. È stata ampiamente studiata per la sua relativa semplicità ed è stata la prima proteina risolta strutturalmente tramite diffrazione di raggi X da Kendrew nel 1959. I 153 amminoacidi della proteina sono strutturati secondo il *fold* tipico della super-famiglia proteica delle globine: essi formano 8 α -eliche denominate A-H connesse da *turns*, mentre non sono presenti altre strutture secondarie né ponti disolfuro. Come le altre globine la mioglobina ospita un cofattore detto *gruppo eme*, immerso in una tasca idrofobica tra le eliche E ed F, responsabile del colore rosso della proteina. Il gruppo eme è una molecola porfirinica (protoporfirina IX) con un atomo di ferro al centro (normalmente sotto forma di ione ferroso, Fe²⁺) coordinato dai quattro atomi di azoto pirrolici dell'anello porfirinico. Un residuo di istidina (HisF8), detta istidina *prossimale*, forma un quinto legame di coordinazione con il ferro, contribuendo all'ancoraggio dell'eme alla matrice proteica. Il sesto ed ultimo legame di coordinazione si forma con il ligando gassoso (O₂, CO, NO), legato anche tramite un ponte a idrogeno ad un secondo residuo di istidina, detta *distale* (HisE7), il cui stato di protonazione agisce come meccanismo allosterico per regolare l'accessibilità dei ligandi alla cavità dell'eme (*histidine gate*).

Con il termine *apomioglobina* (apoMb) si indica la sola matrice proteica



(a)



(b)

Figura 1.5: Cinetiche di assorbimento transiente dell'ipericina in DMSO rivelata a $\lambda = 510$ nm (a) e del complesso con apomioglobina, rivelata a $\lambda = 520$ nm (b). In entrambi i casi l'eccitazione è a $\lambda_{exc} = 532$ nm.

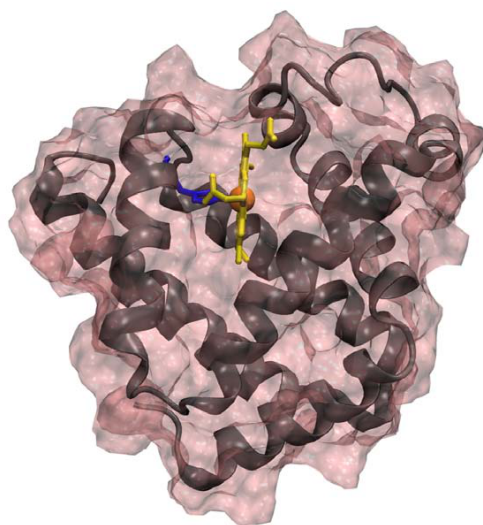


Figura 1.6: La mioglobina (PDB 1WLA) rappresentata come *cartoon* e superficie molecolare con il gruppo eme evidenziato in giallo.

della mioglobina, cioè la mioglobina privata del gruppo eme. L'apomioglobina si ricava dalla mioglobina attraverso un protocollo chimico che sfrutta una parziale denaturazione acida della proteina [14] e viene spesso utilizzata per studi su complessi aventi molecole diverse dall'eme ospitate all'interno della cavità proteica. A differenza della mioglobina che è strutturalmente molto stabile, l'apomioglobina tende più facilmente all'*unfolding* e all'aggregazione, essendo più sensibile al pH, alla concentrazione di sali in soluzione e alla temperatura. Oltre allo stato nativo, N, e quello completamente *unfolded*, U, sono noti due stati intermedi metastabili, I ed E, che possono essere popolati in certe condizioni [15].

1.3 Il complesso ipericina-apomioglobina

Un ligando ed un substrato presenti in soluzioni acquose possono formare spontaneamente complessi termodinamicamente stabili che beneficiano di interazioni entropiche tra i due, come quelle idrofobiche. L'ipericina ad esempio si lega spontaneamente a molte strutture sopramolecolari come liposomi, proteine e DNA. Tra le proteine capaci di formare complessi rientrano molte apoglobine, nelle quali l'ampia cavità idrofobica che ospita l'eme può accogliere svariati cofattori, come la biliverdina, la piranina, il rosso nilo. L'ovvia biocompatibilità delle globine le rendono strutture particolarmente interessanti come vettori di agenti *teranostici* [2]. La possibilità di formare un complesso 1:1 tra l'apomioglobina e l'ipericina è suggerita dalla somiglianza strutturale dell'ipericina con il gruppo eme, come mostrato in figura 1.7. Tale possibilità è stata vagliata tramite uno studio computazionale di *doc-*

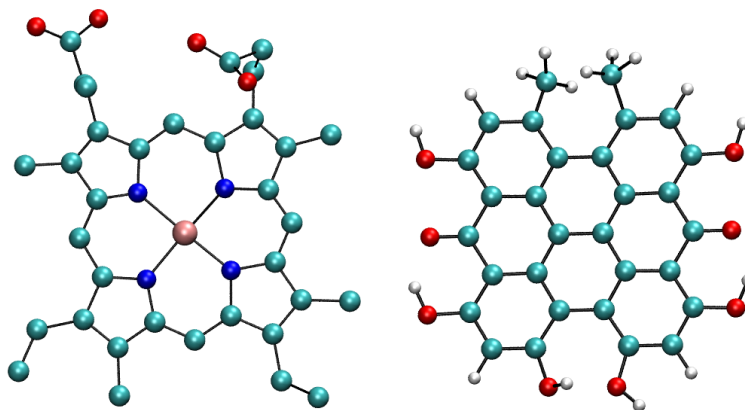
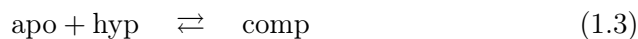


Figura 1.7: Confronto tra le strutture del gruppo eme (a sinistra) e dell'ipericina (a destra).

king molecolare presentato in [2] dal quale risulta un legame stabile, con variazione di energia libera di $-9.89 \text{ kcal mol}^{-1}$, in posizione molto simile a quella naturale dell'eme. Il vantaggio principale di un complesso 1:1 che lo rende preferibile ad altri vettori, come liposomi, risiede nel fatto che questo impedisce l'aggregazione dell'ipericina ed il conseguente *quenching* degli stati eccitati che sono alla base della sua azione fotodinamica e delle proprietà di fluorescenza.

Da un punto di vista sperimentale la formazione del complesso si può seguire in modo diretto dagli spettri di fluorescenza. Come detto l'ipericina libera in soluzione acquosa è in forma aggregata e non fluorescente. Aggiungendo ipericina ad una soluzione di apomioglobina in tampone si nota lo strutturarsi di uno spettro di fluorescenza intenso e simile a quello dell'ipericina in un buon solvente, come etanolo o DMSO (figura 1.2), che indica la presenza dell'ipericina in un ambiente sostanzialmente meno polare del tampone. Questo fatto, insieme all'osservazione che non si ha cambiamento negli spettri aggiungendo ipericina ad una soluzione di mioglobina in tampone, suggerisce che lo svilupparsi della fluorescenza sia dovuto al legame dell'ipericina nella cavità dell'eme [2].

Il legame dell'ipericina e della proteina è descritto dalla cinetica chimica del primo ordine



$$\begin{cases} \frac{[\text{comp}]}{[\text{apo}][\text{hyp}]} = k_a \\ [\text{apo}] = [\text{apo}]_t - [\text{comp}] \\ [\text{hyp}] = [\text{hyp}]_t - [\text{comp}] \end{cases} \quad (1.4)$$

dove k_a è la costante di associazione e le quantità tra parentesi quadre indicano le concentrazioni delle specie all'equilibrio (senza pedice) e totali (con il pedice t). Dalle 1.4 si ricava la concentrazione del complesso all'equilibrio in funzione delle concentrazioni totali di ipericina e proteina:

$$[\text{comp}] = \frac{1}{2k_a} \left(k_a[\text{apo}]_t + k_a[\text{hyp}]_t + 1 + \sqrt{(k_a[\text{apo}]_t + k_a[\text{hyp}]_t + 1)^2 - 4k_a^2[\text{apo}]_t[\text{hyp}]_t} \right) \quad (1.5)$$

Quando si può trascurare il termine quadratico in $[\text{comp}]$, ad esempio in largo eccesso di proteina, la 1.5 si può semplificare nell'espressione

$$[\text{comp}] \simeq \frac{k_a[\text{apo}]_t[\text{hyp}]_t}{1 + k_a([\text{apo}]_t + [\text{hyp}]_t)} \quad (1.6)$$

che mette in evidenza l'andamento a saturazione. Date le 1.4, 1.5 l'intensità di fluorescenza della soluzione sarà proporzionale a

$$F \propto \Phi_{\text{hyp}}[\text{hyp}] + \Phi_{\text{comp}}[\text{comp}] \quad (1.7)$$

dove i fattori Φ_{hyp} e Φ_{comp} sono le rese quantiche di fluorescenza dell'ipericina libera in soluzione e del complesso. Come detto per soluzioni acquose la resa quantica di fluorescenza dell'ipericina libera è praticamente nulla.

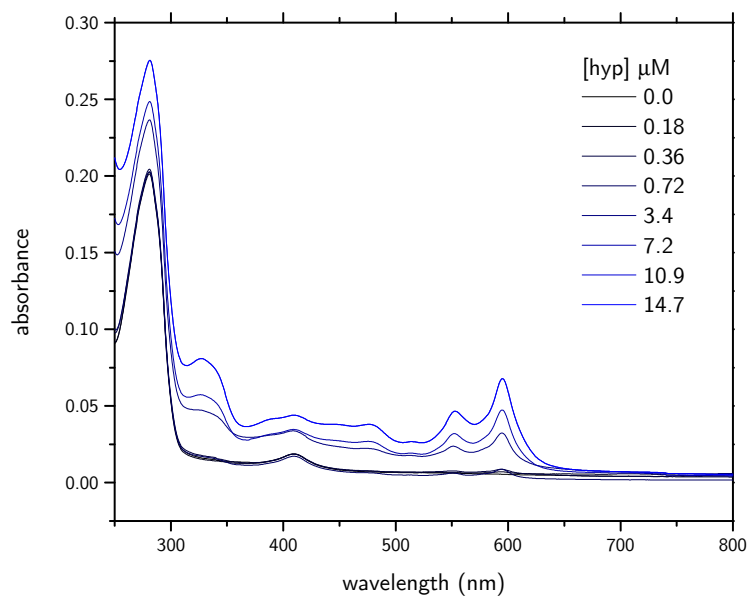
1.3.1 Titolazione del complesso

La formazione del complesso ipericina-apomioglobina è stata studiata titolando con aggiunte successive di ipericina una soluzione di apomioglobina sciolta in tampone PBS. La concentrazione di proteina pari a $60 \mu\text{M}$ è stata ricavata dall'assorbanza a 280 nm noto il coefficiente di estinzione molare $\varepsilon_{280} = 15800$. Per ogni aggiunta sono stati misurati gli spettri di assorbimento (figura 1.8(a)), di emissione e di eccitazione ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$, figura 1.8(b)). L'isoterma di legame si è ottenuta dall'integrale di tutto lo spettro di emissione (figura 1.10). Il valore della costante di associazione si è ricavato dal *fit* della 1.7, $k_a = (0.21 \pm 0.01) \mu\text{M}^{-1}$.

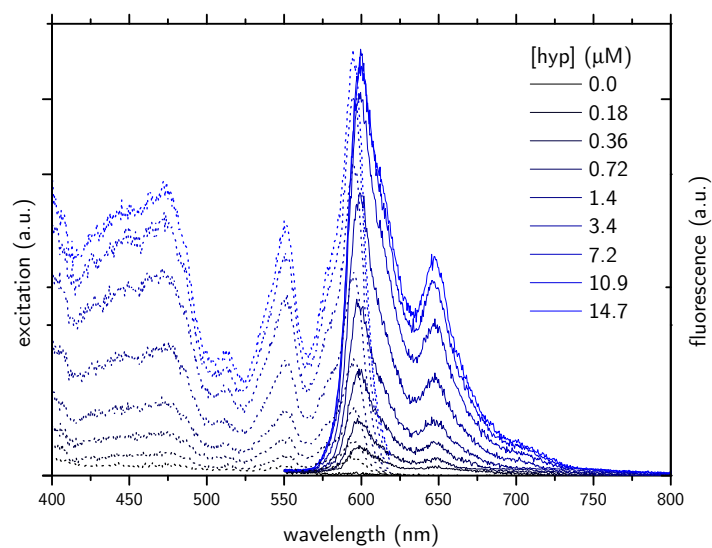
Anisotropia di fluorescenza

Una prova ulteriore della formazione del complesso è fornita dalla misura dell'anisotropia di fluorescenza. In figura 1.11 sono riportati gli spettri di anisotropia di eccitazione dell'ipericina in DMSO e del complesso con apomioglobina, rivelati a 620 nm. L'anisotropia della soluzione in DMSO è nulla su tutto l'intervallo, fatto attribuibile alla dinamica rotazionale della molecola. L'anisotropia misurata allo stato stazionario, r è data dalla formula di Perrin [16]

$$r = \frac{r_0}{1 + \tau/\theta} \quad (1.8)$$



(a)



(b)

Figura 1.8: Spettri assorbimento (a) ed emissione/eccitazione (b) del complesso ipericina-apomioglobina.

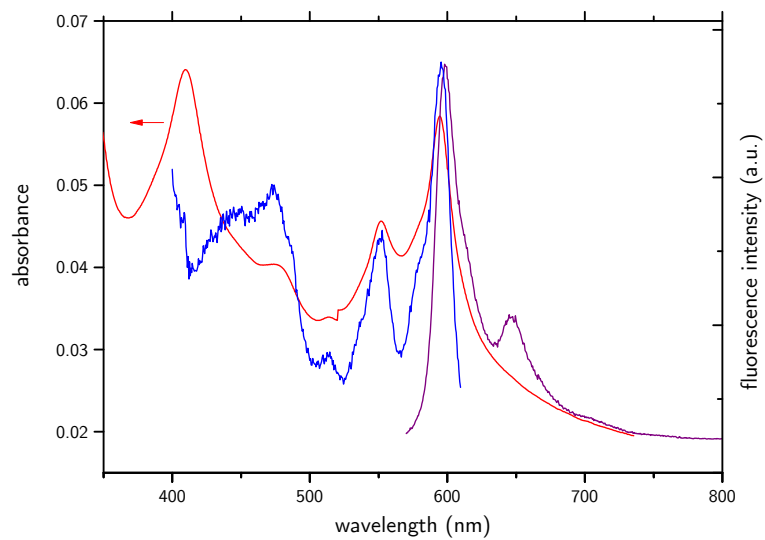


Figura 1.9: Sovrapposizione degli spettri di assorbimento, emissione ed eccitazione del complesso.

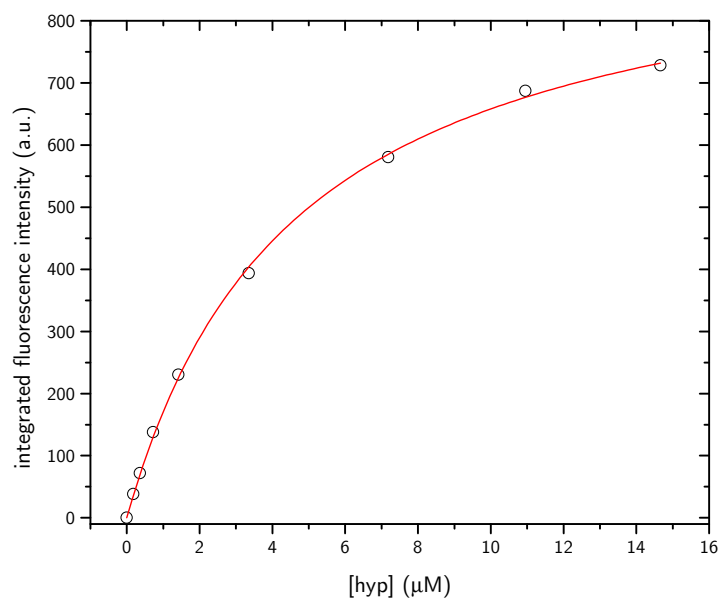


Figura 1.10: Isotherma di legame e *fit* secondo la 1.5 del complesso.

dove r_0 è l'anisotropia fondamentale, misurata in assenza di rotazione del fluoroforo, τ la vita media di fluorescenza e θ il tempo di rilassamento rotazionale. Se la vita media di fluorescenza è molto superiore ai tempi di rilassamento rotazionali l'anisotropia di fluorescenza tende ovviamente a zero (si ricorda che la vita media di fluorescenza dell'ipericina in DMSO vale 5.5 ns [11]). Nel complesso ci si aspetta una dinamica rotazionale più lenta e dunque un'anisotropia significativamente diversa da zero ($\theta = 8.3$ per l'apomioglobina [16], con $\tau = 6.4$ ns [2]). Lo spettro di anisotropia che si ricava è molto simile a quello riportato in letteratura per l'ipericina in un vetro di etanolo e metanolo a 77 K [17].

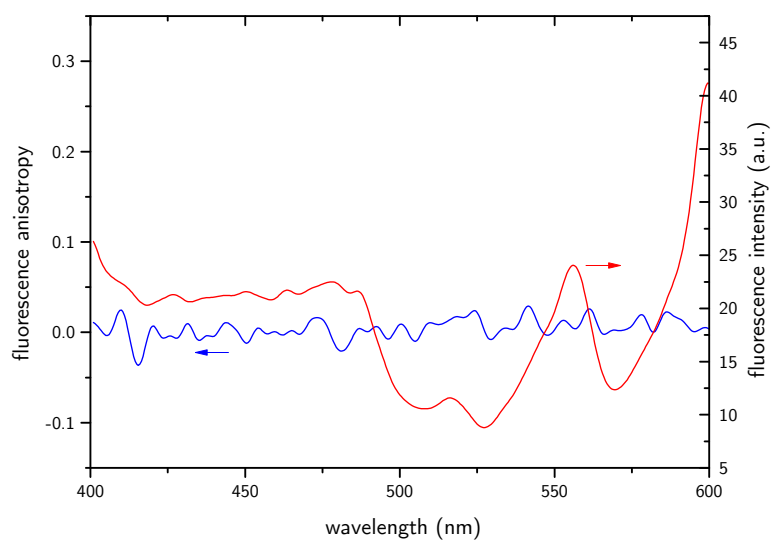
Per inciso si nota che l'anisotropia del complesso è leggermente negativo fino a $\lambda \simeq 500$ nm per poi raggiungere rapidamente un valore stazionario di circa 0.3 per lunghezze d'onda maggiori. Confrontando lo spettro di anisotropia con quello di eccitazione si nota che le due regioni dello spettro di anisotropia corrispondono rispettivamente alle bande delle transizioni $S_0 \rightarrow S_2$ e $S_0 \rightarrow S_1$: queste osservazioni suggeriscono che i momenti di dipolo delle due transizioni formino un angolo prossimo a 90° . Poiché l'emissione di fluorescenza avviene sempre per una transizione $S_1 \rightarrow S_0$ si misura un valore di anisotropia non nullo fintanto che si eccita lo stesso stato dal quale avviene l'emissione, S_1 : in tale caso infatti i momenti di dipolo relativi all'assorbimento e all'emissione sono paralleli, o quasi. Quando invece si eccita uno stato eccitato superiore al primo, come S_2 , questo rilassa rapidamente per conversione interna verso S_1 dal quale avviene l'emissione radiativa. L'anisotropia di fluorescenza dipende dall'angolo β tra i momenti di dipolo secondo il fattore $(3 \cos^2 \beta - 1)/2$. Un valore di β intorno a 90° è consistente con l'anisotropia misurata e con la geometria approssimativamente planare della molecola [17].

Resa quantica di fluorescenza

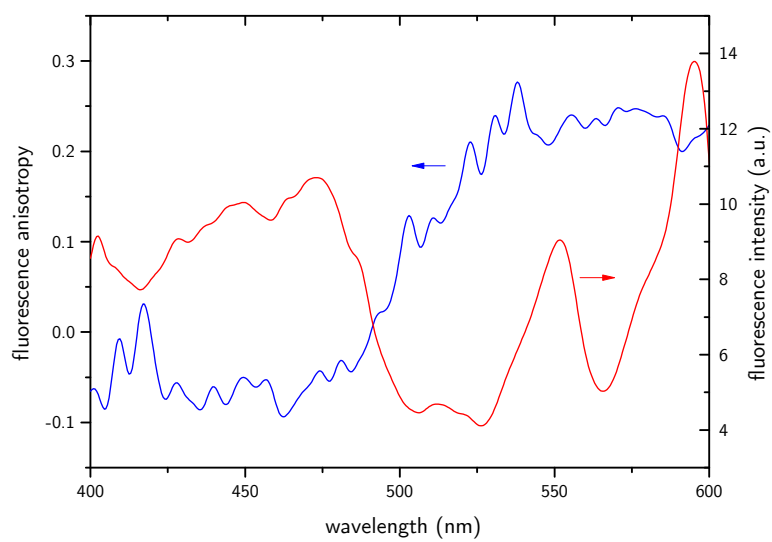
La resa quantica di fluorescenza del complesso è stata calcolata dallo spettro di fluorescenza integrato ($\lambda_{exc} = 554$ nm) di una soluzione in largo eccesso di apomioglobina ([apo]=26 μ M, [hyp]< 1 μ M) in modo da avere praticamente tutta l'ipericina legata nel complesso (1.4). Nota la resa quantica in un solvente di riferimento ($\Phi_{DMSO} = 0.35 \pm 0.02$ [11]) si può calcolare la resa quantica secondo la formula [16]

$$\Phi = \Phi_{DMSO} \frac{I}{I_{DMSO}} \frac{OD_{DMSO}}{OD} \left(\frac{n}{n_{DMSO}} \right)^2 \quad (1.9)$$

dove I sono le intensità di fluorescenza integrate, OD le assorbanze alla lunghezza d'onda di eccitazione e $n = 1.334$, $n_{DMSO} = 1.477$ sono gli indici di rifrazione delle soluzioni. Il valore ricavato per il complesso è $\Phi = 0.14 \pm 0.02$.



(a)



(b)

Figura 1.11: Spettri di eccitazione (in rosso) e di anisotropia di eccitazione (in blu) dell'ipericina in DMSO (a) e del complesso (b).

Tabella 1.1: Confronto delle proprietà spettroscopiche dell'ipericina in DMSO e in complesso con apomioglobina in PBS.

	DMSO	complesso apoMb
Max assorbanza $S_0 \rightarrow S_1$ (nm)	599 ± 1	595 ± 1
Max fluorescenza $S_1 \rightarrow S_0$ (nm)	604 ± 1	599 ± 1
Vita media di fluorescenza (ns)	5.5 ± 0.1	4.0 ± 0.1 (25.4%) 6.4 ± 0.1 (67.6%)
Resa quantica di fluorescenza	0.35 ± 0.02	0.14 ± 0.02
Anisotropia di fluorescenza	554 nm	0.00
	559 nm	0.02
Vita media del tripletto (μs)	1.89 ± 0.01	11.56 ± 0.01
Resa quantica di 1O_2 (Φ_Δ)	0.33^*	0.14^*

* dai riferimenti [2] e [18]

1.4 Tentativi con aponeuroglobina e apocitoglobina

Nell'ottica di ottenere un complesso nanostrutturato con l'ipericina oltre all'apomioglobina si sono vagliate le apoproteine di altre due globine, la neuroglobina e la citoglobina. Entrambe sono state scoperte recentemente e in seguito individuate nei genomi di diversi mammiferi. Come la mioglobina anche queste due proteine sono coinvolte nell'omeostasi dell'ossigeno a livello cellulare, e sebbene la loro funzione non sia ancora del tutto chiara sembra che abbiano una funzione protettiva dei tessuti in caso di ipossia funzionando da *scavenger* di gas citotossici [19].

L'interesse per queste due globine nasce dalla presenza di cavità interne di dimensioni superiori a quelle della mioglobina, messe in evidenza da esperimenti di *rebinding* in seguito a *laser photolysis* e da studi computazionali [20] [21]. Questo fatto suggerisce che entrambe abbiano un'affinità maggiore per un ligando da introdurre dall'esterno, come l'ipericina.

Per indagare questo fatto si è cercato di ripetere le misure svolte sull'apomioglobina su campioni di aponeuroglobina e apocitoglobina umane forniti dal laboratorio della professoressa Sylvia Dewilde dell'università di Antwerp, espresse tramite DNA ricombinante in *Escherichia coli*, purificate e liofilizzate. Entrambe le apoproteine tuttavia si sono mostrate scarsamente solubili in tamponi acquosi, indipendentemente dalla loro concentrazione salina e dalla composizione. Questo fatto è stato inizialmente attribuito alla formazione di ponti disolfuro intermolecolari, visto che entrambe le proteine presentano

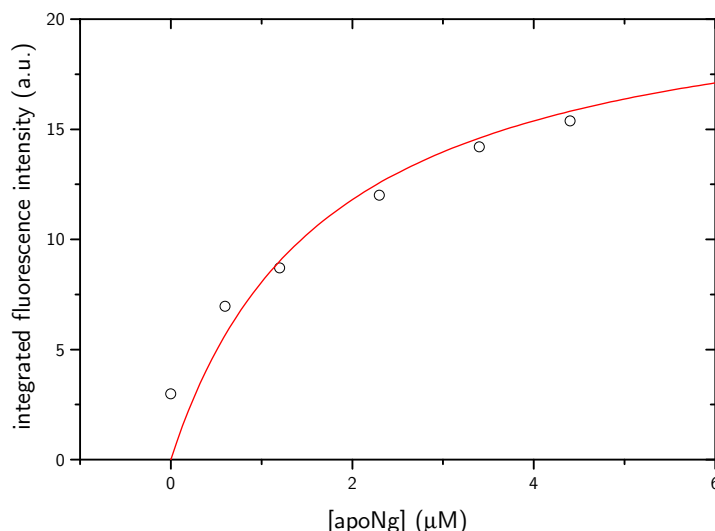


Figura 1.12: Isoterma di legame e *fit* secondo la 1.5 del complesso ipericina-aponeuroglobina.

residui di cisteina, tuttavia ulteriori tentativi con proteine mutanti in cui le cisteine sono state sostituite da serine hanno avuto esiti addirittura peggiori. La ragione per cui la solubilità delle proteine sia così bassa non è chiara ed è forse da attribuirsi al metodo di liofilizzazione, o alle condizioni di trasporto e conservazione dei campioni.

L'unico campione che è stato possibile utilizzare parzialmente è quello di aponeuroglobina non mutante, dal quale si è potuto ricavare un campione di concentrazione $\simeq 60 \mu\text{M}$, sufficiente per ricavare la costante di legame ed il tempo di decadimento del tripletto.

L'isoterma di legame, riportata in figura 1.12 è compatibile con una costante di associazione di circa $k_a = (0.5 \pm 0.2) \mu\text{M}^{-1}$, superiore a quella misurata per l'apomioglobina. Come tuttavia si nota dal grafico l'accordo con il modello non è completamente soddisfacente, fatto confermato da una successiva titolazione con ipericina che ha mostrato la presenza di almeno un secondo sito di legame, molto meno affine con il ligando, responsabile di una crescita praticamente lineare dell'intensità di fluorescenza integrata per concentrazioni sufficientemente elevate di proteina. Il decadimento dello stato di tripletto del complesso, misurato come in precedenza attraverso *laser flash photolysis* eccitando a 532 nm e rivelando a 510 nm, avviene con costante di tempo $(14.9 \pm 0.08) \mu\text{s}$.

Capitolo 2

Microscopia a super-risoluzione

2.1 Il limite della diffrazione nell'ottica

Il *potere risolutivo* di uno strumento destinato alla produzione di immagini, come un microscopio, un telescopio, un obbiettivo fotografico, un occhio, è sempre limitato dal fenomeno della *diffrazione* della radiazione che forma l'immagine. Nel limite dell'ottica geometrica, cioè quando si trascurano i fenomeni di diffrazione e si considera che la propagazione della radiazione avviene per *raggi*, un sistema *stigmatico*, cioè privo di aberrazioni ottiche, produce un'immagine puntiforme dato un oggetto puntiforme. Quando non si può trascurare il carattere ondulatorio della radiazione questo non è più vero, anche in assenza di aberrazioni, e l'immagine di un punto luminoso è sempre una *figura di diffrazione* di dimensioni finite.

La teoria del potere risolutivo degli strumenti ottici, inteso come la separazione minima che deve intercorrere tra due sorgenti puntiformi nell'oggetto affinché appaiano distinte nell'immagine, è stata avviata da *Abbe* (1873) [22] e *Lord Rayleigh* (1879) [23], ai quali si devono i risultati classici noti come *limite di Abbe* della microscopia

$$\begin{aligned}\Delta_{x-y} &= \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \\ \Delta_z &= \frac{2\lambda}{(n \sin \alpha)^2}\end{aligned}\tag{2.1}$$

e la formula di *Rayleigh* per il potere risolutivo angolare di un sistema ottico

$$\Delta_a = 1.22 \frac{\lambda}{D}\tag{2.2}$$

dove Δ_{x-y} , Δ_z indicano rispettivamente il potere risolutivo lineare sul piano focale e nella direzione assiale, Δ_a il potere risolutivo angolare, λ la lunghezza d'onda della radiazione, n l'indice di rifrazione del mezzo dove essa si propaga, α la semiapertura angolare del microscopio e D il diametro dell'apertura dell'obbiettivo.

Rayleigh introdusse per primo un criterio empirico per definire *spazialmente risolti* due punti: il massimo dell'intensità della figura di diffrazione di un punto deve cadere più distante del primo minimo della figura di diffrazione dell'altro (*criterio di Rayleigh*).

La condizione 2.2 si ricava dal criterio di Rayleigh come mostrato in figura in 2.1(c), considerando l'immagine di un oggetto puntiforme diffratta da un'apertura circolare e raccolta in un piano sufficientemente distante dall'apertura (condizione di *campo lontano* o di *Fraunhofer*, schematizzata in 2.1(a) $R \gg a^2/\lambda$). Detta I_0 l'intensità emessa dal punto oggetto, l'intensità dell'immagine diffratta è data da [24, p. 439]

$$I = I_0 \left(\frac{2J_1(ka \sin \theta)}{ka \sin \theta} \right)^2 \quad (2.3)$$

dove $k = 2\pi/\lambda$ è il numero d'onda, J_1 la funzione di Bessel del primo tipo e i parametri geometrici quelli rappresentati in figura 2.1(a). Questa immagine di diffrazione, mostrata in figura 2.1(b), è nota come *disco di Airy*; presenta una zona centrale dove cade il massimo dell'illuminazione seguita da anelli concentrici di luminosità decrescente. Per $\sin \theta \simeq \theta$ si trova che il primo minimo della 2.3 si ha per $ka \simeq 1.22\pi$, cioè per $2\pi a/\lambda \simeq 1.22\pi$ che è la 2.2. In termini di risoluzione lineare la 2.2 per il piano focale di un microscopio diventa $\Delta = 0.61\lambda/(n \sin \alpha)$ che coincide con la 2.1 a meno di una piccola differenza nel prefattore. Nella trattazione di Rayleigh la scelta di un'apertura circolare è soltanto una comodità analitica e geometrie diverse del bordo comportano soltanto piccole differenze nel prefattore del risultatoⁱ [26].

Se da una parte il criterio di Rayleigh fornisce un metodo immediato per stimare la risoluzione di uno strumento ottico in termini pratici e sperimentalmente accessibili, dall'altra la 2.1 si ricava nel contesto dell'ottica di Fourier e rappresenta il limite teorico della risoluzione ottenibile nei termini in cui è posto il problema.

Si consideri un caso unidimensionale in cui un oggetto esteso produce un'illuminazione incoerente $O(x)$ dipendente solo dalla coordinata x raccolta da un sistema ottico attraverso una fenditura perpendicolare ad x di larghezza D . Ciascun punto dell'oggetto ha per immagine la figura di diffrazione della fenditura, che è della forma $(\sin(mx)/\pi x)^2$ con $m = 2\pi \sin(\alpha)n/\lambda$ nel caso

ⁱIn realtà Toraldo di Francia ha dimostrato [25] che scegliendo opportunamente la *funzione di pupilla* dell'apertura, cioè la distribuzione della luce trasmessa dal diaframma, è possibile aumentare indefinitamente il potere risolutivo per due punti di uno strumento ottico, cioè è possibile ridurre arbitrariamente il raggio della primo disco luminoso della figura di diffrazione e al contempo aumentare quello del primo disco oscuro. Tuttavia più che si riducono le dimensioni del disco centrale più che diminuisce il suo illuminamento, con il risultato che il potere risolutivo viene limitato dalla quantità di luce rivelabile. Pupille di questo tipo, dette *super-risolventi*, non sono inoltre utilizzabili per *imaging* diretto di oggetti estesi a causa della forte illuminamento dei lobi secondari e trovano applicazione soltanto in astronomia [26].

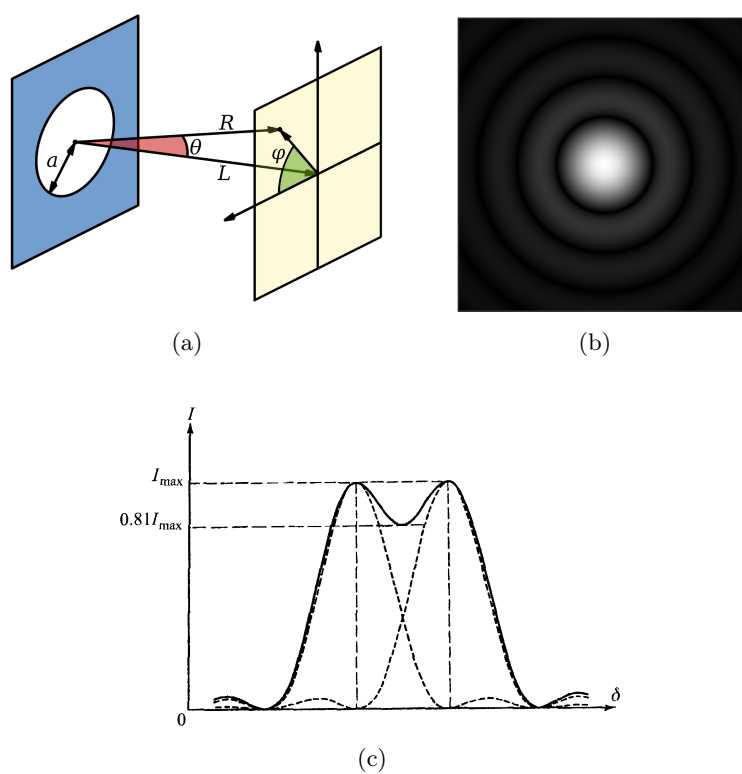


Figura 2.1: Criterio di Rayleigh. L'immagine (a) è tratta dal riferimento [27], l'immagine (c) da [25].

di un microscopio [26, p. 268]. L'illuminamento dell'immagine $I(x)$ risulterà dalla convoluzione della luminanza dell'oggetto con la figura di diffrazione

$$I(x) = \int_{-\infty}^{\infty} O(s) \frac{\sin^2 m(x-s)}{\pi^2 (x-s)^2} ds \quad (2.4)$$

Lo spettro dell'immagine sarà quindi dato dal prodotto dello spettro della luminanza dell'oggetto per lo spettro della figura di diffrazione, che da una semplice integrazione risulta essere la funzione triangolare

$$\text{F.T. (Airy)} = \begin{cases} m/\pi - |f| & \text{per } |f| < m/\pi \\ 0 & \text{altrimenti} \end{cases} \quad (2.5)$$

Risulta quindi che lo spettro dell'immagine è limitato e non contiene frequenze superiori in valore assoluto a m/π . Dal teorema del campionamento segue allora che l'immagine $I(x)$ sarà completamente individuata quando si assegnino i valori di illuminamento dell'oggetto in una serie discreta di punti equispaziati di $\pi/2m = \lambda/4n \sin(\alpha)$ (l'estensione a più dimensioni è immediata).

Si è giunti alla conclusione che il numero di *gradi di libertà* dell'immagine è finito, a fronte di un numero di gradi di libertà dell'oggetto virtualmente infinito. In termini ottici questo si traduce nell'impossibilità di risolvere un reticolo di punti luminosi spaziati meno di $\pi/2m = \lambda/4n \sin(\alpha)$, o meglio, trattandosi di *risolvere* dei punti non si parlerà di un reticolo di soli punti luminosi, che apparirebbe un oggetto uniformemente illuminato e senza dettagli, ma nel caso più semplice si dovrà trattare un reticolo di punti alternativamente luminosi e oscuri, con la distanza tra i punti luminosi non inferiore a $\pi/m = \lambda/2n \sin(\alpha)$, che è la 2.1.

Nelle migliori condizioni in cui può operare un moderno microscopio, dotato di un obiettivo apocromatico ad immersione 100x, il fattore $n \sin \alpha$, detto *apertura numerica* (N.A.), vale al più 1.4; con luce di lunghezza d'onda $\lambda = 500 \text{ nm}$ si raggiunge quindi un potere risolutivo ottico di $\Delta_{x-y} \simeq 200 \text{ nm}$, $\Delta_z \simeq 500 \text{ nm}$ secondo le 2.1.

Un espediente diretto per aumentare la risoluzione senza ricorrere a radiazioni energeticamente troppo intense, e quindi dannose per i campioni, come i raggi X, consiste nell'usare particelle massive come elettroni, i quali hanno una lunghezza d'onda di *de Broglie* $\lambda = h/p$ ed un'energia corrispondente di $E^2 = (hc/\lambda)^2 + (m_0 c^2)^2$. I microscopi elettronici moderni raggiungono infatti poteri risolutivi fino a qualche decina di picometri, al costo però di preparazioni dei campioni molto invasive e incompatibili con studi di campioni biologici in vita.

2.1.1 Tecniche di super-risoluzione

I risultati di Abbe e Rayleigh sono stati nel tempo oggetto di approfondite analisi nel tentativo di aggirarne i limiti: tra i lavori pionieristici si possono

citare quelli di *Toraldo di Francia* (1952, 1955) [25] [28] e *Lukosz* (1966) [29] che ne hanno chiarito il carattere non assoluto, ma piuttosto pratico:

[...] *This means that at the present there is only a practical limit (if any) and not a theoretical limit for two-point resolving power.* [28]

In particolare per quanto riguarda la microscopia si possono individuare in ultima analisi tre condizioni sotto le quali valgono le 2.1 e 2.2:

1. Campo lontano (*far field*),
2. Illuminazione uniforme ed estesa (*wide field*) del campione,
3. Dipendenza lineare dell'emissione dell'oggetto dalla sua illuminazione.

Se viene a mancare una delle precedenti condizioni è possibile che il potere risolutivo di uno strumento ottico superi i limiti classici esposti sopra: si parla allora di tecniche a *super-risoluzione* o *nanoscopia*. Le principali tecniche a super-risoluzione sviluppate sono elencate in seguito, in corrispondenza della condizione che viene meno [30], [31]:

1. SNOM (*Near-field Scanning Optical Microscopy*),
TIRFM (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*)
2. SIM (*Structured Illumination Microscopy*)
3. STED (*STimulated Emission Depletion microscopy*),
PALM/STORM (*Photo-Activated Localization Microscopy / Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*)

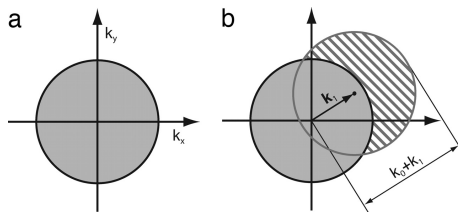


Figura 2.2: Principio della microscopia SIM. Immagine tratta da [32].

Per quanto riguarda il primo punto si ricorda che i risultati esposti sopra non si applicano nella regione di *campo vicino*, dove sono localizzate le *onde evanescenti*, che si attenuano esponenzialmente allontanandosi dalla sorgente. Nella microscopia SNOM il campo vicino è sondato da un'apertura nanometrica, ad esempio l'estremità di una fibra ottica, posta a distanza piccola rispetto alla lunghezza d'onda della

luce. In questo modo si può ottenere l'immagine ad altissima risoluzione (fino a 20 nm) della superficie di un campione per scansione. Anche nella microscopia TIRFM si sfrutta la localizzazione del campo evanescente indotto per riflessione totale nella parte di spazio dove non si propaga l'onda riflessa. In questo caso il campo serve ad eccitare dei fluorofori lungo la piccola profondità in cui si propaga ($\simeq 100$ nm), permettendo di registrare

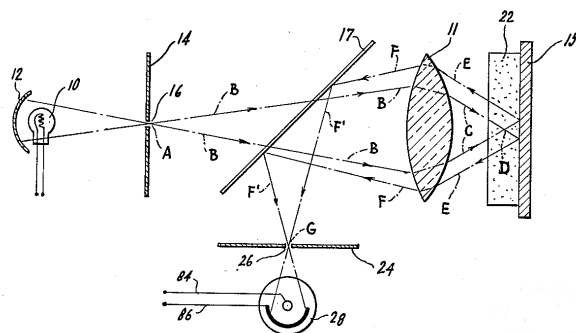
in *wide field* la fluorescenza di un solo piano illuminato, senza il contributo fuori fuoco di altri piani.

Al secondo punto compare una tecnica *wide field*, la microscopia SIM, che sfrutta un'illuminazione modulata a frange alternativamente chiare e scure. Il principio della SIM è illustrato in figura 2.2: a sinistra è rappresentato il limite della microscopia di campo lontano, nella quale i numeri d'onda accessibili sono limitati dalla 2.1, che in due dimensioni definisce il cerchio grigio di raggio k_0 nello spazio reciproco. Imponendo un'illuminazione a frange si moltiplica il *pattern* spaziale dell'oggetto con una modulazione, diciamo sinusoidale di vettore d'onda k_1 . Nello spazio reciproco questo corrisponde a traslare il cerchio di frequenze accessibili di un vettore k_1 . La possibilità di imporre una modulazione nell'illuminazione è soggetta agli stessi limiti della diffrazione per cui k_1 in modulo sarà al più pari a k_0 : in questo modo introducendo un numero opportuno di modulazioni spaziali dell'illuminazione (almeno 3) si potrà esplorare una regione di raggio doppio, cioè si potrà ottenere un potere risolutivo *doppio* rispetto alla 2.1.

Gli acronimi STORM e PALM si riferiscono a tecniche basate su un principio comune, la *localizzazione* di singole molecole in *wide field*. Il campione viene marcato con fluorofori fotoattivabili, come coloranti organici o proteine fluorescenti. A partire da una configurazione completamente *dark* dei fluorofori se ne attivano stocasticamente alcuni usando un'opportuna illuminazione, in modo che i siti fluorescenti siano più distanti del potere risolutivo dell'ottica impiegata. In queste condizioni le PSF delle singole molecole appariranno separate nell'immagine e raccogliendo un numero sufficiente di fotoni da ciascun fluoroforo attivo sarà possibile calcolarne il centroide, localizzando le singole molecole con una precisione dettata soltanto dalla statistica di raccolta dei fotoni e dalla risoluzione spaziale del rivelatore. L'immagine di un campione si ottiene combinando migliaia di *frames* così ottenuti, e la risoluzione dipenderà in modo critico dalla densità dei fluorofori e dalla loro distribuzione nell'oggetto.

2.2 La microscopia STED

La microscopia STED (*STimulated Emission Depletion microscopy*) è una tecnica di microscopia di fluorescenza a super-risoluzione in campo lontano proposta dal gruppo di *Hell* nel 1994 [33] e successivamente dimostrata sperimentalmente dagli stessi [34] [35]. Un microscopio STED si basa su un microscopio confocale, schematizzato in 2.3, nel quale una sorgente di eccitazione viene schermata da un *pinhole* di entrata (n° 16 in figura 2.3), e focalizzata da un'ottica (n° 11) nel campione, eccitando un volume di dimensioni definite dal limite di diffrazione illustrato sopra. La geometria di tale volume è descritta dalla *Point Spread Function* (PSF), cioè dall'andamento dell'intensità luminosa in funzione delle coordinate spaziali $r = (x, y, z)$ e del

tempo t :

$$h(r, t) = \frac{1}{2} c n \epsilon_0 |E(r, t)|^2 \quad (2.6)$$

L'idea alla base della microscopia STED è quella di aumentare il potere risolutivo riducendo le dimensioni effettive della PSF di eccitazione, impedendo l'emissione spontanea di fluorescenza ai bordi del volume eccitato confocalmente tramite emissione stimolata di radiazione, da cui il nome della tecnica. A questo scopo viene introdotta una seconda sorgente, detta fascio di STED o *depletion*, capace di indurre emissione stimolata nei fluorofori. Il fascio STED viene conformato otticamente con tecniche interferenziali in modo da avere un profilo anulare sul piano focale (*doughnut shape*), buio al centro, e viene allineato in modo da essere coassiale al fascio di eccitazione. Con analoghe tecniche è possibile conformare il fascio anche lungo l'asse ottico, permettendo una *depletion* tridimensionale, come mostrato in figura 2.4(a).

ⁱⁱNella STED il fatto di basarsi su un *setup* confocale in rivelazione non è in realtà strettamente necessario, ma piuttosto una scelta pratica.

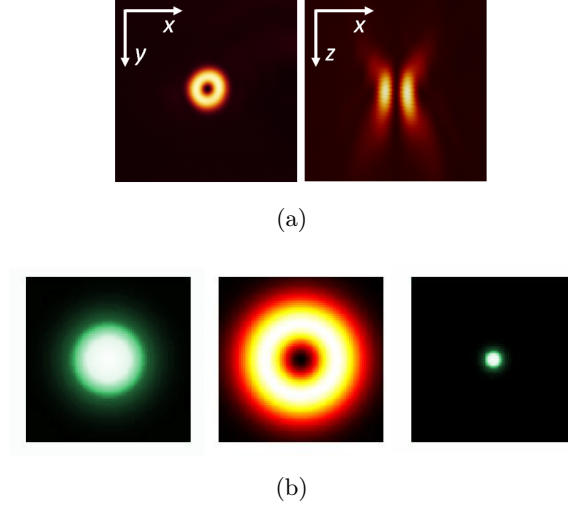


Figura 2.4: (a) PSF tipiche del fascio STED sul piano focale ed assiale, (b) PSF nel piano focale del fascio di eccitazione, di STED e della combinazione dei due.

Sia il fascio di eccitazione che quello di STED sono *diffraction limited*, ma le dimensioni della regione fluorescente che si ottiene dopo l'attivazione della STED sono minori, anche in misura considerevole, delle dimensioni *diffraction limited* che si otterrebbero con il solo fascio di eccitazione. L'emissione stimolata dei fluorofori è risonante alla lunghezza d'onda del fascio STED, per cui può essere facilmente filtrata spettralmente dall'emissione spontanea residua o eliminata tramite un *gate* temporale. I profili delle PSF dei diversi fasci sul piano focale sono mostrati in figura 2.4(b). Il guadagno di risoluzione può essere quantificato come segue. In assenza di STED la PSF confocale effettiva è data dal prodotto della PSF del fascio di eccitazione, $h^{\text{exc}}(r)$, moltiplicato per quella introdotta dall'ottica di rivelazione, $h^{\text{det}}(r)$ [37]

$$h^{\text{conf}}(r) = h^{\text{det}}(r) h^{\text{exc}}(r) \quad (2.7)$$

dove $h^{\text{exc}}(r)$ si intende mediata per un tempo superiore alla durata dell'impulso di eccitazione. Analogamente in presenza del fascio STED di PSF $h^{\text{sted}}(r)$ la 2.7 è sostituita da

$$h^{\text{eff}}(r) = h^{\text{det}}(r) h^{\text{exc}}(r) \eta(r) \quad (2.8)$$

dove $\eta(r)$ è il fattore di *depletion* ed è inteso anch'esso come media temporale.

Nella sezione seguente si illustrerà come è possibile rendere $\eta(r)$ una funzione esponenziale nell'intensità del fascio di STED scegliendo opportunamente i fluorofori e le intensità dei fasci, rendendo quindi saturabile la *depletion*. Si discuterà anche il guadagno in termini di potere risolutivo che si ricava in queste condizioni dalla 2.8.

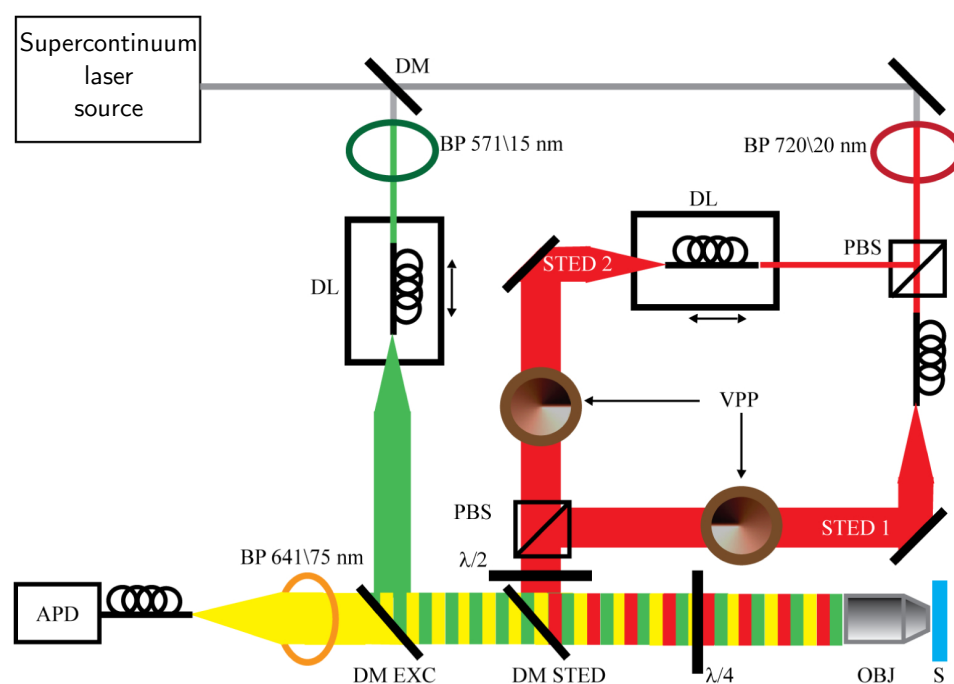


Figura 2.5: Schema ottico di un moderno microscopio STED, preso dal riferimento [38] e descritto in dettaglio nel capitolo 4. Gli impulsi di eccitazione e di STED sono ricavati filtrando una sorgente super-continua (*'laser bianco'*) attraverso filtri passa banda (BP). La temporizzazione degli impulsi, di durata intorno a 80 ps è ottenuta tramite due *delay line* (DL), mentre la conformazione del fascio di STED avviene tramite *vortex* ottici (VPP). In questo *setup* i fasci di STED sono due e differiscono per la polarizzazione, ottenuta tramite *beam splitters* polarizzanti (PBS). Il rivelatore è un fotodiodo a valanga (APD).

2.2.1 Caratteristiche spettroscopiche dei fluorofori

In precedenza si è citata la microscopia STED tra le tecniche che impiegano una dipendenza non lineare tra l'emissione di un oggetto e la sua illuminazione in quanto essa si basa sul fenomeno saturato dell'inversione di popolazione dello stato fluorescente indotta dal fascio di STED. La descrizione spettroscopica della tecnica richiede un modello a quattro stati del fluoroforo, come raffigurato in figura 2.6.

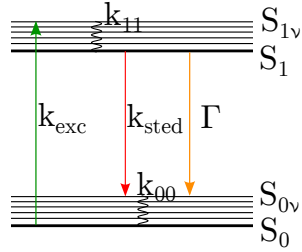


Figura 2.6: Livelli energetici dei fluorofori nella STED.

La condizione fondamentale affinché il fascio STED produca inversione di popolazione tra lo stato fluorescente e quello fondamentale è che esso induca l'emissione stimolata dei fluorofori eccitati dal fascio di eccitazione senza eccitarli a sua volta. Questa condizione si soddisfa portando i fluorofori in uno stato vibrazionale eccitato $S_{1\nu}$ del primo stato elettronico eccitato S_1 . Questo stato rilassa rapidamente (in tempi dell'ordine dei picosecondi) in modo non radiativo verso lo stato vibrazionale fondamentale S_1 dal quale avviene l'emissione di fluorescenza

(regola di *Kasha*) con tempi caratteristici del nanosecondo. Il fascio STED è accordato con la transizione $S_1 \rightarrow S_{0\nu}$ con una *rate* k_{sted} scelta in modo da produrre una depopolazione saturata dello stato S_1 pur restando minore della *rate* del processo non radiativo $S_{0\nu} \rightarrow S_0$, così da evitare una rieccitazione anti-Stokes consistente dei fluorofori. La popolazione dei livelli mostrata in figura 2.6 è regolata dalle equazioni 2.9 [39]:

$$\begin{cases} \frac{dS_0}{dt} = -k_{exc}S_0 + k_{00}S_{0\nu} \\ \frac{dS_{0\nu}}{dt} = k_{sted}S_1 + \Gamma S_1 - k_{00}S_{0\nu} \\ \frac{dS_1}{dt} = k_{11}S_{1\nu} - \Gamma S_1 - k_{sted}S_1 \\ \frac{dS_{1\nu}}{dt} = k_{exc}S_0 - k_{11}S_{1\nu} \end{cases} \quad (2.9)$$

dove le probabilità di transizione (*rate*) sono legate alle intensità dei fasci dalla relazione $k_{AB} = \sigma_{AB}I_{AB}$, con σ_{AB} sezione d'urto del processo $A \rightarrow B$ e I_{AB} numero di fotoni per unità di superficie e di tempo; Γ è la *rate* di emissione spontaneaⁱⁱⁱ.

Nella sua versione originale la STED è una tecnica pulsata che impiega per l'eccitazione un impulso laser di durata inferiore al picosecondo centrato sullo spettro di assorbimento della specie fluorescente seguito da un impulso STED dell'ordine delle centinaia di picosecondi centrato sulla coda rossa

ⁱⁱⁱAlcuni valori tipici per le *rate*: $k_{00}, k_{11} = (10^{11} - 10^{12}) \text{ s}^{-1}$, $\Gamma = 10^9 \text{ s}^{-1}$, $k_{sted} = (10^9 - 10^{10}) \text{ s}^{-1}$.

dello spettro di emissione. Il fascio STED viene acceso per un tempo t non appena si spegne il fascio di eccitazione. Risolvendo numericamente le 2.9 si trova che la dipendenza da I_{sted} della popolazione dello stato fluorescente S_1 diventa fortemente non lineare (ovvero saturabile) quando la *rate* dell'emissione stimolata diventa competitiva con la *rate* di *depletion* spontanea, pari all'inverso della vita media di fluorescenza $\tau_f = \Phi_f \Gamma^{-1}$:

$$k_{\text{sted}} > \tau_f^{-1} \Rightarrow I_{\text{sted}} > (\sigma_{\text{sted}} \tau_f)^{-1} \quad (2.10)$$

Il fattore $(\sigma_{\text{sted}} \tau_f)^{-1}$ detto *intensità di saturazione*, I_s , è una caratteristica dei fluorofori utilizzati e rappresenta l'intensità di STED per la quale lo stato fluorescente è svuotato per metà. Per $k_{\text{sted}} < k_{00}, k_{11}$ si trova che al tempo t la popolazione dello stato fluorescente è soppressa di un fattore

$$\eta(r, t) \propto \exp(-t \sigma_{\text{sted}} I_{\text{sted}}(r)) \quad (2.11)$$

Generalmente si sceglie di lavorare con durate t dell'impulso STED paragonabili alla vita media di fluorescenza dei fluorofori, dato che il processo di *depletion* dipende linearmente dal numero di fotoni che inducono emissione stimolata: tanto più lunghi saranno gli impulsi compatibilmente con $t < \tau_f$ (altrimenti essi contribuirebbero soltanto alla rieccitazione) tanto minore sarà l'intensità del fascio STED, e quindi il foto-danneggiamento, purché sia rispettata la 2.10.

2.2.2 Potere risolutivo della STED

La modulazione spaziale del fascio di STED, necessaria a conferirgli il profilo mostrato in figura 2.4(a) avviene solitamente agendo sulla fase del campo elettrico della 2.6, introducendo attraverso una maschera di fase un fattore del tipo $\exp(i\Psi(\theta, \phi))$, dove $0 \leq \phi < 2\pi$ è l'angolo azimutale e $0 \leq \theta \leq \alpha$ quello polare.

Il fascio di eccitazione, focalizzato direttamente dall'ottica sul campione sarà approssimativamente un'onda sferica, con $\Psi = 0$. Per ottenere il fascio di STED si impiegano di solito apposite *phase plate*, ad esempio i *vortex* ottici, che hanno un profilo a spirale, con il cammino ottico che varia linearmente con l'angolo azimutale. Quando un fascio di profilo gaussiano (come il consueto modo trasverso TEM_{00} di un laser) e polarizzato circolarmente attraversa il *vortex* si trasforma in un modo elicoidale, che sul piano focale appare proprio come quello mostrato in figura 2.4(a).

Inserendo il risultato 2.11 nella 2.8 si può ottenere una stima del potere risolutivo guadagnato. Approssimando le PSF del fascio di eccitazione e di STED con onde stazionarie in opposizione di fase al limite consentito dalla

diffrazione, cioè per

$$\begin{aligned} h^{\text{exc}}(r) &\propto \cos^2(\pi r n \sin(\alpha)/\lambda_{\text{exc}}) \\ I_{\text{sted}}(r) &\propto \sin^2(\pi r n \sin(\alpha)/\lambda_{\text{sted}}) \\ \lambda_{\text{sted}} &\approx \lambda_{\text{exc}} \doteq \lambda \end{aligned} \quad (2.12)$$

il potere risolutivo sarà dell'ordine dell'ampiezza a mezza altezza di $h^{\text{eff}}(r)$, che da uno sviluppo in serie della 2.8 risulta essere [40]

$$\Delta \simeq \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_{\text{sted}}/I_S}} \quad (2.13)$$

Questa espressione, che rimpiazza la 2.1, prevede una risoluzione coincidente con quella classica per $I_{\text{sted}} \rightarrow 0$, mentre teoricamente infinita per $I_{\text{sted}} \rightarrow \infty$.

In pratica i fattori che limitano il potere risolutivo sono:

- Il *photobleaching* dei fluorofori, ovvero l'eccitazione di specie non fluorescenti di lunga vita, che impone un limite alle intensità dell'impulso di STED, come discusso nella sezione 2.2.3
- Il foto-danneggiamento termico del campione
- La qualità del profilo del fascio di STED, in quanto la presenza di un'illuminazione residua nella zona centrale riduce l'inversione di popolazione e peggiora il contrasto della PSF residua.

Mentre i primi due punti sono legati alle caratteristiche dei fluorofori e del campione, il terzo dipende in modo critico dalle prestazioni ottiche del microscopio in impiegato. Nel caso della *depletion* sul piano focale ottenuta tramite *vortex ottici*, come nel sistema presentato in figura 2.5, un fattore critico è ad esempio la qualità della polarizzazione circolare del fascio focalizzato sul campione, così come la corretta sincronizzazione temporale degli impulsi di eccitazione e di STED [38].

Allo stato dell'arte attuale in campioni biologici si raggiungono risoluzioni fino a 20 nm sul piano focale e 100 nm su quello assiale, mentre la risoluzione più elevata mai raggiunta è stata di 6 nm per l'immagine di vacanze di azoto in diamante [41].

2.2.3 Il *bleaching* dei fluorofori

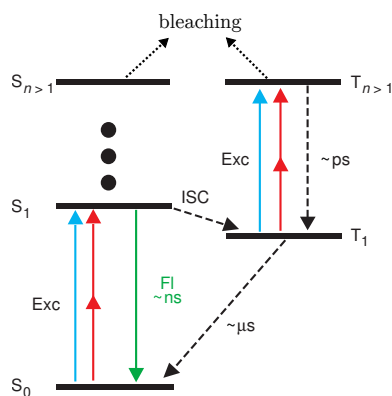


Figura 2.7: Origine del *bleaching*.

L'eccitazione di specie non fluorescenti di lunga vita media, fenomeno detto *bleaching*, pone un limite all'intensità dell'impulso di STED e quindi, per la 2.13 un limite al potere risolutivo della tecnica. Il *bleaching* può avere un'origine fotochimica, nel caso in cui un fluoroforo eccitato reagisca chimicamente generando una specie non fluorescente (spesso fotoaddotti), oppure fotofisica, nel caso in cui venga temporaneamente confinato in uno stato eccitato non fluorescente (in tal caso si parla anche di *blinking*) [42]. Per i fluorofori organici i meccanismi di *bleaching* sono spesso complessi, ma di norma coinvolgono la formazione di stati di tripletto di

lunga vita media a causa della ridotta probabilità di *inter system crossing* (ISC) inverso. La formazione degli stati di tripletto può avvenire per ISC dal primo stato eccitato di singoletto ($S_1 \rightarrow T_1$) o per ISC da stati eccitati superiori ($S_n \rightarrow T_n$ con $n > 1$) tipicamente seguito da *conversione interna* (IC) non radiativa ($T_n \rightarrow T_1$). In molecole organiche è stato mostrato che il contributo dagli stati eccitati di singoletto non è trascurabile [43].

Nella microscopia STED la causa principale di *bleaching* è il fascio di *depletion* che ha un'intensità dell'ordine delle decine di MW/cm^2 . Nella regione investita dal fascio la transizione $S_1 \rightarrow S_0$ è saturata, pertanto il contributo delle transizioni $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_n$ è trascurabile. Essendo inoltre molto efficiente la conversione interna $S_n \rightarrow S_1$ che coinvolge sottostati vibrazionali diversi con tempi caratteristici dell'ordine dei picosecondi. A differenza dell'eccitazione degli stati di singoletto quella degli stati di tripletto ha in genere un andamento opposto: quando avviene l'*inter system crossing* (ISC) $S_1 \rightarrow T_1$ le transizioni $T_1 \rightarrow T_n$ sono generalmente saturate, mancando una radiazione accordata per la *depletion* $T_1 \rightarrow T_0$. Per queste ragioni si ritiene che la formazione di specie *dark* passi dall'eccitazione di stati di tripletto.

Questo fatto è stato verificato sperimentalmente in [44], dove la fluorescenza di una porzione di superficie cosparsa di fluorofori (la proteina fluorescente GFP ed il colorante ATTO532) è stata raccolta tramite un microscopio, in funzione della frequenza di ripetizione dell'eccitazione. L'andamento del segnale di fluorescenza in funzione del tempo, riportato in figura 2.8 mostra che entrambi i fluorofori recuperano intensità di fluorescenza man mano che l'intervallo di ripetizione dell'eccitazione è aumentato. Le curve sovrapposte ai punti sperimentali rappresentano il *fit* esponenziale dei dati che fornisce in entrambi i casi una costante di decadimento dell'ordine di $1 \mu s$, che è un valore compatibile con il decadimento degli stati di tripletto

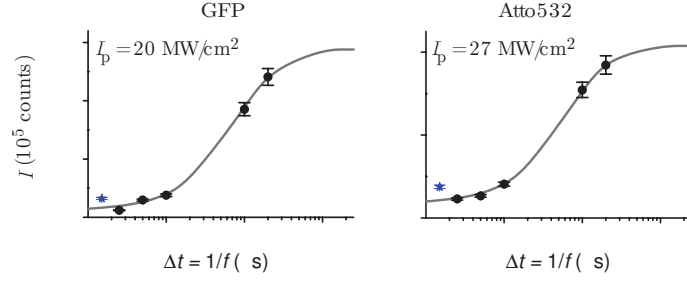


Figura 2.8: Recupero dell'intensità di fluorescenza per due fluorofori in funzione del tempo di ripetizione dell'eccitazione, adattato da [44].

di queste specie.

Nel contesto della STED il criterio di lasciar trascorrere un tempo dell'ordine del microsecondo tra il termine dell'impulso di STED e la successiva eccitazione prende il nome di *T-Rex* (*Triplet Relaxation*) e si può implementare o impostando una frequenza di ripetizione inferiore dei laser (spesso difficile da realizzare in pratica) o più semplicemente impostando una velocità di scansione sufficientemente sostenuta. Nelle condizioni di *T-Rex* a parità di intensità degli impulsi il guadagno in termini di resa quantica di fluorescenza è dell'ordine di 10 – 30 volte, come mostrato in figura 2.8. È stato inoltre verificato che impiegando frequenze di ripetizione minori è possibile aumentare le intensità di picco degli impulsi anche significativamente ($\simeq 10$ volte) con un conseguente guadagno in potere risolutivo [42]. In condizioni ideali, come quelle descritte in [45] in cui oltre alla *T-Rex* si sono impiegati *quencher* degli stati di tripletto (ROXS) si sono ottenute risoluzioni di circa 30 nm in campioni biologici.

2.2.4 Altre implementazioni della STED

Una variante notevole della tecnica descritta sopra utilizza fasci laser continui al posto di quelli pulsati (CW-STED) [46]. Il vantaggio principale risulta essere una configurazione sperimentale più semplice ed economica (la versione pulsata richiede tipicamente un laser allo zaffiro di titanio *mode-locked* accoppiato con un amplificatore ottico parametrico per la regolazione delle lunghezze d'onda di eccitazione ed un'accurata sincronizzazione temporale degli impulsi). Le prestazioni di un sistema CW-STED sono leggermente inferiori in termini di risoluzione rispetto ad un sistema pulsato a causa della presenza simultanea del fascio di eccitazione e di STED che lascia una fluorescenza residua nella regione periferica dell'eccitazione, anche se il limite in pratica è dovuto al maggiore *photobleaching* e foto danneggiamento causati dalle intensità radianti medie più elevate perché continue. La soluzione per le popolazioni della 2.9 allo stato stazionario è immediata:

$$\begin{cases} \overline{S_1} = \frac{k_{\text{exc}}}{k_{\text{sted}} + \Gamma} \overline{S_0} \\ \overline{S_{1\nu}} = \frac{k_{\text{exc}}}{k_{11}} \overline{S_0} \\ \overline{S_{0\nu}} = \frac{k_{\text{exc}}}{k_{00}} \overline{S_0} \\ \overline{S_0} + \overline{S_{0\nu}} + \overline{S_1} + \overline{S_{1\nu}} = 1 \end{cases} \quad (2.14)$$

se si verifica la condizione $k_{\text{sted}} > \Gamma > k_{\text{exc}}$, cioè quando vale la 2.10, si trova che la popolazione dello stato fluorescente è data da

$$\overline{S_1} = \frac{k_{\text{exc}}}{k_{\text{sted}} + \Gamma + k_{\text{exc}}} \quad (2.15)$$

La potenza del fascio di STED che soddisfa la 2.10 è

$$P_{\text{sted}} = \frac{A h c}{\lambda_{\text{sted}} \sigma_{\text{sted}} \tau_f} \quad (2.16)$$

dove A è l'area della sezione del fascio STED, h la costante di Planck, c la velocità della luce. Valori caratteristici sono $A = 3 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2$, $\sigma_{\text{sted}} = 3 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$, $\tau_f = 3 \text{ ns}$, $\lambda_{\text{sted}} = 650 \text{ nm}$, per cui P_{sted} è intorno a 10 mW ($\simeq 3 \text{ MW/cm}^2$), che è superiore alla potenza media tipica della STED pulsata [46], dove come visto il fascio di STED rimane acceso per una durata paragonabile al tempo di vita della fluorescenza su un periodo di ripetizione del laser che è intorno a $\tau_{\text{rep}} \simeq 10 - 15 \text{ ns}$ (tipicamente gli impulsi sono generati da laser Ti:Sapphire, che hanno una frequenza di ripetizione di 80 MHz, cioè un periodo di 12.5 ns), per cui il rapporto tra le potenze medie di un sistema continuo e uno pulsato è di almeno $\tau_{\text{rep}}/\tau_f \simeq 4$.

Recentemente è stata proposta una miglioria alla tecnica CW-STED che recupera in buona parte il potere risolutivo della STED pulsata pur mantenendo la semplicità del sistema continuo per il fascio di STED. La gated-STED (g-STED) [47] è un compromesso tra la versione pulsata e quella continua che impiega un'eccitazione impulsata e una *depletion* continua, introducendo elettronicamente un ritardo nella rivelazione del segnale di fluorescenza. Impostando un ritardo dell'ordine del nanosecondo tra il termine dell'impulso di eccitazione e la rivelazione della fluorescenza il fascio STED ha il tempo di spopolare consistentemente la periferia della zona eccitata, permettendo di recuperare il contrasto che si perdeva con CW-STED senza *gating* a causa della mancanza di separazione temporale dei fasci. Con questo accorgimento si ottiene un potere risolutivo paragonabile alla CW-STED con un'intensità del fascio di *depletion* più che dimezzata.

Tra gli sviluppi recenti meritano menzione l'accoppiamento delle tecniche di microscopia a due fotoni (2PE) con la STED [48] [49]. Le tecniche 2PE possiedono una risoluzione spaziale intrinseca perché l'assorbimento di due fotoni, in quanto fenomeno al terzo ordine dell'ottica non lineare, ha una *rate* quadratica nell'intensità del campo $k_{2PE} = \sigma_{2PE} I_{PE}^2$ ed è quindi praticamente confinato nel punto focale di un microscopio. Sfruttando l'assorbimento di due fotoni si ha anche il vantaggio di potere eccitare un sistema molecolare con radiazione di lunghezza d'onda dimezzata rispetto all'assorbimento di un singolo fotone, con la conseguenza di una penetrazione migliore della luce nella materia e uno *scattering* ridotto. Questi fatti rendono le tecniche 2PE particolarmente importanti per campioni spessi e torbidi. In [49] è stato proposto un sistema molto elegante in cui una singola lunghezza d'onda, e quindi la medesima sorgente, viene utilizzata per l'eccitazione a due fotoni e per la *depletion* lineare del fluoroforo commerciale ATTO647N.

Per concludere si può notare con *Hell* [50] che il concetto alla base della STED è in realtà più ampio di quello illustrato sopra. In generale un risultato analogo alla 2.13 si applica tutte le volte che si riesce a confinare otticamente e in modo reversibile l'emissione di fluorescenza di una specie al sotto al limite di diffrazione, indipendentemente dalla strategia impiegata. Queste tecniche vanno sotto il nome di RESOLFT (*REversible Saturable/Switchable Optically Linear Fluorescence Transition*) e prevedono la transizione saturata di un fluoroforo (o addirittura la possibilità di controllarne l'accensione e lo spegnimento, che corrisponde ad una saturazione perfetta). Oltre alla STED le tecniche RESOLFT comprendono ad esempio quelle che impiegano fluorofori fotoattivabili (coloranti organici o proteine) o effetti non lineari nell'eccitazione.

Capitolo 3

Spettroscopia *pump-probe* ultraveloce

3.1 Spettroscopia di assorbimento transiente

Alla luce di quanto esposto nel capitolo precedente le condizioni per cui un fluoroforo sia adatto alla microscopia STED sono [51]:

- La presenza di una regione spettrale dominata dall'emissione stimolata
- Una bassa intensità di saturazione I_s , cioè una *depletion* stimolata efficiente
- Fotostabilità, ovvero resistenza al *photobleaching*

La caratterizzazione sperimentale di un composto rende indispensabile lo studio di tutte le condizioni sopra elencate: questo capitolo è dedicato al primo punto, mentre nel seguente si discuteranno i successivi.

Le misure di *stato stazionario* presentate nel capitolo 1 mostrano il comportamento di un sistema molecolare che interagisce in condizioni di equilibrio con la radiazione che lo investe in modo continuo. Dagli spettri di assorbimento e di fluorescenza si possono trarre informazioni sull'energia di una transizione vibro-elettronica, sulla sua intensità e sul suo allargamento spettrale, tuttavia non si hanno indicazioni sulla dinamica con cui i diversi stati evolvono nel tempo ma solo medie temporali. Poiché le reazioni fotofisiche hanno tempi caratteristici spesso inferiori al picosecondo uno studio (quasi) stazionario non è assolutamente in grado di seguirle.

Fino agli anni '80 non è stato possibile studiare direttamente la dinamica di formazione degli stati eccitati a causa della mancanza della risoluzione temporale necessaria per sondare spettroscopicamente un campione sottoposto ad un'eccitazione entro i tempi caratteristici delle reazioni fotofisiche ($10^{-14} - 10^{-12}$ s), cioè i tempi caratteristici della dinamica dei nuclei su distanze interatomiche, ovvero delle vibrazioni nucleari (trasferimenti di

energia e di carica, formazione e rottura di legami chimici, cambiamenti conformazionali).

Gli sviluppi dell'ottica e della tecnologia dei laser degli anni '80 e '90 hanno reso disponibili impulsi di luce di durata inferiore al picosecondo e di potenza sufficiente a indurre risposte non lineari nella materia che hanno aperto la strada alla spettroscopia ottica risolta in tempo *ultraveloce*, cioè con risoluzione temporale migliore del picosecondo. In particolare i laser allo zaffiro di titanio ($\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ o Ti:Sapphire), introdotti nel 1986, hanno segnato una svolta nella produzione di impulsi al femtosecondo ed ancora oggi rappresentano la scelta di elezione in questo campo. Le particolari caratteristiche del mezzo attivo ne permettono il funzionamento pulsato in regime di *mode-locking* passivo (si riescono ad ottenere impulsi brevi fino a pochi femtosecondi, corrispondenti a 2-3 oscillazioni del campo elettromagnetico nel visibile), un'ottima accordabilità in frequenza (650 – 1100 nm) e una buona potenza media (centinaia di mW).

Il prototipo dell'esperimento risolto in tempo è la cosiddetta spettroscopia *pump-probe*, nella quale un impulso di luce, detto di *pump* (pompa), eccita un sistema molecolare che viene sondato in un tempo successivo da secondo impulso, detto di *probe* (sonda). Nella spettroscopia di *assorbimento transiente* (TA) la quantità sondata è la variazione dell'assorbimento del campione dovuta all'eccitazione della pompa. In generale la risoluzione temporale sarà determinata dalla durata degli impulsi, che devono essere tanto più brevi quanto più veloci sono i fenomeni studiati; a sua volta la risoluzione in energia (frequenza) richiederà impulsi accordabili sia in *pump* che in *probe*, in modo da avere per quanto possibile un'eccitazione selettiva (a banda stretta) e una sonda a banda larga.

3.1.1 Principio di un esperimento *pump-probe*

La risposta di un sistema molecolare sottoposto ad un campo elettrico è descritto dalla polarizzazione $\mathbf{P}$, che in generale si potrà esprimere in serie di potenze del campo applicato $\mathbf{E}(t)$:

$$\mathbf{P}(t) = \mathbf{P}^0 + \mathbf{P}^1(t) + \mathbf{P}^2(t) + \dots \quad (3.1)$$

dove $\mathbf{P}^0$ rappresenta l'eventuale polarizzazione permanente, $\mathbf{P}^1(t)$ quella lineare nel campo e così via. Solitamente le polarizzazioni ai vari ordini si esprimono nel dominio delle frequenze per mezzo delle rispettive suscettività χ^n :

$$P_i^n(\omega) = \sum_{j, \dots, l} \sum_{(p, \dots, z)} E_j(\omega_p) \dots E_l(\omega_z) \chi_{i,j, \dots, l}^{(n)}(\omega) \quad (3.2)$$

dove la somma indicata tra parentesi $(p, \dots, z)$ indica che è vincolata dalla condizione $\omega = \omega_p \pm \dots \pm \omega_z$. Si ricorda che in un sistema omogeneo le suscettività di ordine pari sono tutte nulle per ragioni simmetria, per cui la prima deviazione dall'ottica lineare è dovuta alla $\mathbf{P}^3$.

In un esperimento *pump-probe* il campione è sottoposto a due impulsi, uno di pompa ed uno di sonda ritardato di un tempo τ . Si supponga per il momento che i campi siano monocromatici, con frequenza angolare ω_1 e ω_2 :

$$E(r, t) = \varepsilon_1(t + \tau) \exp(i\mathbf{k}_1 \cdot \mathbf{r} - i\omega_1 t) + \varepsilon_2(t) \exp(i\mathbf{k}_2 \cdot \mathbf{r} - i\omega_2 t) + \text{c.c.} \quad (3.3)$$

dove $\varepsilon_1(t + \tau)$ è l'involuppo temporale del fascio di pompa, centrato in $t = -\tau$ e $\varepsilon_2(t)$ quello del fascio di sonda, centrato in $t = 0$; c.c. sta per il complesso coniugato.

La risposta di interesse in un esperimento *pump-probe* è quella del terzo ordine che coinvolge due fotoni del fascio di pompa ed uno di quello di sonda, rispettando la condizione di *phase matching* (conservazione dell'impulso) per cui il vettore d'onda della polarizzazione di risposta, $\mathbf{k}$, è pari alla combinazione $\mathbf{k} = \mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2 = \mathbf{k}_2$, cioè è lo stesso del campo di sonda ed ha quindi la stessa frequenza. Se nella 3.2 si considerano solo i termini risonanti dell'espressione generale della $\chi^{(3)}$ (*rotating wave approximation*) e si verifica che i fasci di pompa e di sonda sono temporalmente separati, ovvero se il ritardo τ è molto maggiore della durata degli impulsi, la trattazione perturbativa risulta notevolmente semplificata, essendo l'ordine delle interazioni fissato.

Un'ulteriore approssimazione si può introdurre se la durata degli impulsi è maggiore dei tempi di coerenza elettroniciⁱ ma comunque trascurabile rispetto ai tempi di rilassamento nucleari, dell'ordine del picosecondo. In questo caso si possono ignorare tutti i fenomeni di *coerenza elettronica* e l'interpretazione dell'esperienza diventa intuitiva: l'impulso di pompa eccita il sistema in uno stato non stazionario, quello di *probe* sonda il sistema che conserva memoria dell'eccitazione sotto forma di un diverso numero di occupazione degli stati elettronici [52, p. 156].

La quantità misurata in un esperimento di assorbimento transiente è la trasmittanza transiente T , data dalla differenza tra l'energia del fascio di sonda raccolta dal rivelatore rispettivamente in presenza e in assenza del fascio di pompa. In un esperimento con fasci collineari la polarizzazione indotta nel campione beneficia del cosiddetto *effetto eterodina ottico* (OHE), per cui il campo $\mathbf{P}^3$ si somma al campo dell'impulso di sonda, in modo che l'intensità misurata dal rivelatore $|\mathbf{P}^3 + \mathbf{E}_2|^2$ contenga un termine lineare in $\mathbf{P}^3$ piuttosto che quadratico, quindi più intenso e facile da rivelare. Con le assunzioni fatte sopra si ricava che l'energia dell'impulso di sonda assorbita dal campione, ΔE , cioè la differenza tra l'intensità della sonda in assenza e in presenza della pompa, è descritta dall'espressione [53, p. 382]

$$\Delta E(\omega_1, \omega_2, \tau) \propto \int_{-\infty}^{\infty} I(\tau - t) S(\omega_1, \omega_2, t) dt \quad (3.4)$$

ⁱUna stima del tempo di coerenza T_2 per una transizione elettronica è data dalla relazione di indeterminazione $T_2 \simeq \hbar/(2E) = 1/(4\pi c\tilde{\nu})$, che per un'ampiezza di banda tipica per coloranti in soluzione di $\tilde{\nu} = 500 \text{ cm}^{-1}$ vale circa 50 fs.

dove $S(\omega_1, \omega_2, t)$ è la funzione di risposta del sistema molecolare, la cui misura costituisce lo scopo dell'esperimento e

$$I(\tau - t) = \int_{-\infty}^{\infty} |E_2(t')|^2 |E_1(t' + \tau - t)|^2 dt' \quad (3.5)$$

Le equazioni 3.4, 3.5 mostrano che il segnale misurato nell'esperimento è proporzionale all'integrale di convoluzione della funzione di risposta del sistema con l'integrale di correlazione tra le intensità degli impulsi di pompa e di sonda. Da queste espressioni risulta evidente la necessità di lavorare con impulsi molto brevi, dato che tutti i processi più veloci del tempo di correlazione tra pompa e sonda appariranno mediati e irrisolti. In particolare per un sistema con risposta molecolare immediata, $S(t) = \delta(t)$, si misurerà la funzione di risposta strumentale $I(\tau)$. Si può notare come l'induzione di un effetto non lineare, come quello al terzo ordine qui descritto, permette di seguire nel tempo un fenomeno molto più rapido dei comuni rivelatori elettronici (fotodiodi, fotomoltiplicatori e CCD non superano qualche frazione di nanosecondo nel migliore dei casiⁱⁱ), essendo tutta l'informazione contenuta in espressioni integrate come la 3.4, nella quale la misura di $\Delta E(\omega_1, \omega_2, \tau)$ non richiede rivelatori particolarmente veloci.

La relazione tra $\Delta E(t)$ e il cambiamento di popolazione degli stati elettronici si può stabilire considerando la variazione di *assorbanza* $\Delta a(t)$ [54]

$$\begin{aligned} \Delta E(t) = \Delta I_2(t) &= I_2(t) \exp(-a_0 d) [\exp(-\Delta a(t)d) - 1] \\ &\simeq -I_2(t) \exp(-a_0 d) \Delta a(t)d \end{aligned} \quad (3.6)$$

dove $\Delta I_2(t)$ è l'intensità del fascio di sonda, d lo spessore del campione, a_0 il coefficiente di assorbimento lineare e si è supposta la perturbazione piccola ($\Delta a(t)d \ll 1$) in modo da poter sviluppare al primo ordine l'esponenziale. Quindi

$$\frac{\Delta E}{E} = \frac{\Delta I_2}{I_2} \propto -\Delta a(\tau)d \quad (3.7)$$

Supponendo che il sistema molecolare in esame abbia n stati elettronici e che N_j sia la popolazione del j -esimo stato, la variazione di assorbimento $\Delta a(\tau)$ si potrà scrivere

$$\Delta a(\tau, \omega_2) = \sum_{i,j=1}^n \sigma_{ij}(\omega_2) (\Delta N_i(\tau) - \Delta N_j(\tau)) \quad (3.8)$$

dove $\sigma_{ij}(\omega_2)$ è la sezione d'urto del processo di assorbimento dallo stato i allo stato j , dipendente dalla frequenza ω_2 della sonda. Allora per la 3.7 si potrà scrivere

$$\frac{\Delta E}{E}(\tau, \omega_2) = -\Delta a(\tau, \omega_2)d = \sum_{i,j=1}^n \sigma_{ij}(\omega_2) (\Delta N_i(\tau) - \Delta N_j(\tau))d \quad (3.9)$$

ⁱⁱL'unica eccezione è costituita dalle *streak cameras*, particolari dispositivi optoelettronici che permettono risoluzioni temporali sotto il picosecondo.

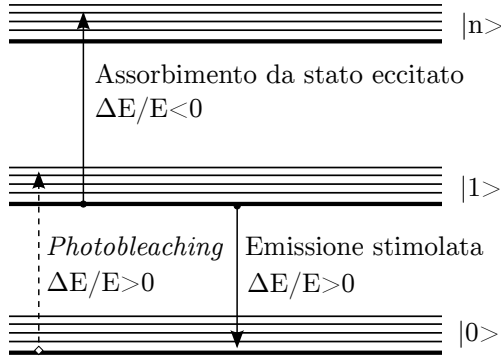


Figura 3.1: Schema delle transizioni in un esperimento *pump-probe*.

La figura 3.1 mostra uno schema delle possibili transizioni di popolazione in un sistema molecolare, insieme alle rispettive variazioni di trasmittanza che si osservano in un esperimento *pump-probe*. L'impulso di pompa popola uno stato elettronico eccitato, diciamo il primo, $|1\rangle$, riducendo di conseguenza la popolazione dello stato fondamentale $|0\rangle$ in cui il sistema si trova prima della perturbazione. Il successivo impulso di sonda registrerà quindi un assorbimento

dallo stato fondamentale minore rispetto all'esperimento svolto senza pompa; questo aumento di trasmittanza si dice *photobleaching*. L'impulso di *probe* può anche indurre emissione stimolata (SE) dallo stato eccitato dalla pompa: anche in questo caso si registrerà un aumento di trasmittanza, perché per ogni fotone di pompa ne verranno rivelati due (lo stesso si verifica in caso di diffusione Raman stimolata, SRG *Stimulated Raman Gain*). Infine si potrà registrare una diminuzione di trasmittanza dovuta all'assorbimento da parte di uno stato eccitato dalla pompa (ESA). Chiaramente si potrà verificare *photobleaching* a frequenze uguali o superiori a quelle dello spettro di assorbimento dello stato fondamentale mentre l'emissione stimolata avverrà a frequenze di sonda uguali o inferiori; l'assorbimento da stato eccitato potrà invece avvenire ad ogni frequenza.

3.2 Apparato sperimentale e misura

L'apparato sperimentale impiegato per le misure di assorbimento transiente si trova presso i laboratori del LENS di Firenze (*European Laboratory for Non-Linear Spectroscopy*) ed è descritto in dettaglio nel riferimento [55].

Un oscillatore Ti:Sapphire (Spectra Physics, Tsunami) è pompato dalla seconda armonica di un laser continuo Nd:YVO (Spectra Physics, Millennia) a sua volta pompato da un laser a diodo. Il laser Ti:Sapphire operante in modalità *self-mode-locked* genera impulsi di 70 fs centrati a 800 nm con una frequenza di ripetizione di 80 MHz. L'ampiezza spettrale degli impulsi è di poco superiore a quella *Fourier limited* e misura circa 20 nm FWHM. La potenza media in uscita all'oscillatore è di circa 600 mW, equivalente ad un'energia per impulso di 6 nJ, non ancora sufficiente a pilotare il sistema ottico di *tuning* che segue e a stimolare una risposta non lineare apprezzabile nella materia. Gli impulsi vengono quindi inviati ad un amplificatore rige-

nerativo (BMI, Alpha 1000) pompato a 1 kHz dalla seconda armonica di un laser Nd:YLF *Q-switched*. Prima di entrare nell'amplificatore la durata degli impulsi deve essere allungata tramite un elemento dispersivo (*stretcher*) per evitare che l'enorme potenza impulsiva danneggi il mezzo attivo (una barra di zaffiro di titanio). Dopo l'amplificazione in cavità controllata da una *cella di Pockels* gli impulsi vengono prelevati e inviati ad un compressore che provvede ad eliminare il *chirp* introdotto dallo *stretcher* e a riportarne la durata intorno a 90 – 100 fs. Gli impulsi così ottenuti, ($\simeq 800$ mW di potenza media alla frequenza di ripetizione di 1 kHz) vengono impiegati per generare tre fasci, uno di pompa, uno di sonda e uno di riferimento (*reference*).

Fascio di pompa

Un *beam splitter* divide il fascio in uscita dell'amplificatore in due parti: la maggior parte della luce ($\simeq 800$ mW) viene inviata verso un OPG-OPA (generatore-amplificatore ottico parametrico, prototipo TOPAS, Light Conversion) basato su un cristallo di BBO (β -borato di bario). La risposta al secondo ordine del cristallo genera due campi di frequenza inferiore (*parametric down-conversion*), la cui somma è pari a quella del campo incidente. Le frequenze generate si possono selezionare agendo sulla condizione di *phase matching* ruotando l'asse del cristallo. I campi differenza così generati, alquanto deboli, vengono amplificati in due passaggi successivi dal medesimo cristallo impiegato in configurazione di OPA. In definitiva si ottengono due fasci, detti *signal* e *idler*, accordabili rispettivamente nell'intervallo $1.2 - 1.6 \mu\text{m}$ e $1.6 - 2.4 \mu\text{m}$ con un'efficienza complessiva del 35% circa. Un ulteriore cristallo di BBO è impiegato per miscelare la luce in uscita dall'OPG-OPA con la fondamentale, la seconda o la terza armonica dell'impulso iniziale tramite generazione di frequenza somma, in modo da ottenere un impulso di pompa accordabile in tutto lo spettro tra 240 a 800 nm. In tutto questo intervallo spettrale la durata dell'impulso, misurata dall'autocorrelazione al secondo ordine, rimane sempre inferiore a 90 fs.

Fasci di sonda e di *reference*

Come fascio di sonda si impiega un impulso a banda larga nell'intervallo 350 – 750 nm che attraversa il campione e viene disperso da uno spettrografo Czerny-Turner (Chromex 250) e rivelato nelle sue componenti spettrali da un sensore CCD retroilluminato da 256 pixels (Princeton Instruments TE/CCD-1100-BP/VISAR). La calibrazione in lunghezza d'onda del sensore CCD si ottiene raccogliendo gli spettri di alcuni filtri interferenziali impiegati come standard, dai quali si ricava la corrispondenza pixel/λ .

Il fatto di usare un fascio di *probe* spettralmente ampio non è critico dal punto di vista della trattazione riportata sopra, che si riferisce per semplicità a impulsi monocromatici, ma rende anzi l'acquisizione degli spettri molto più

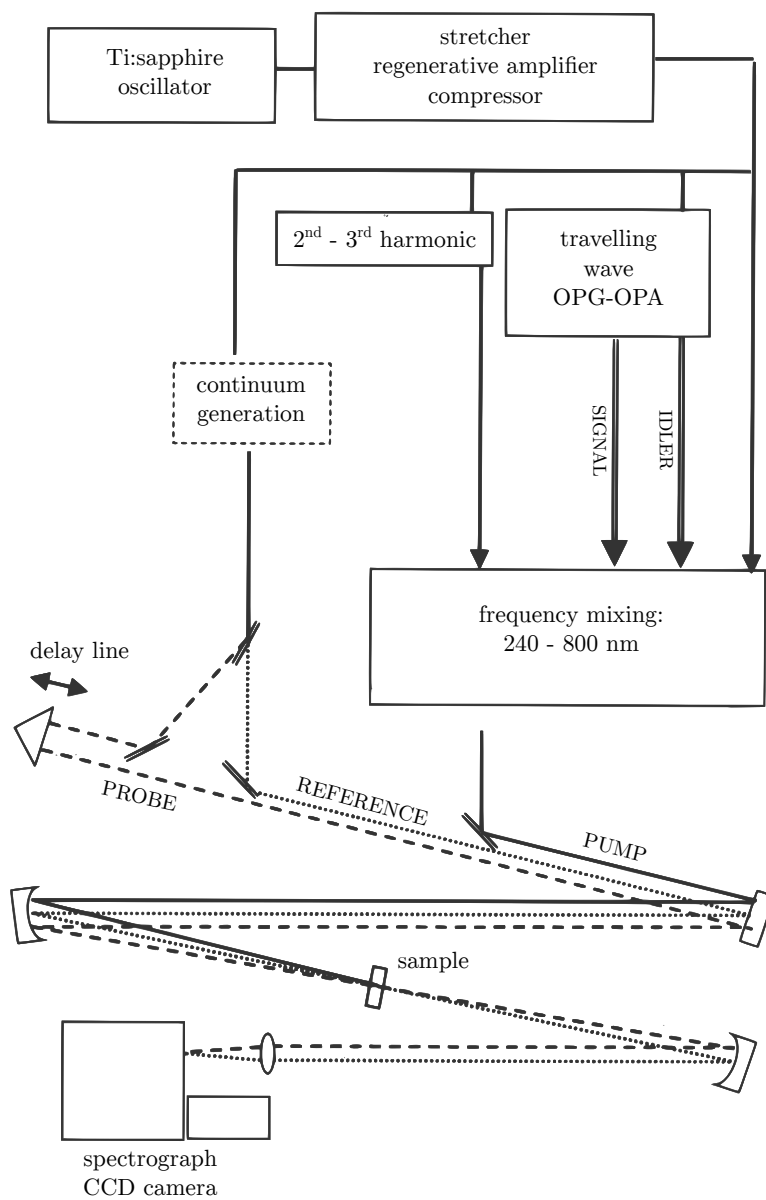


Figura 3.2: Schema dell'apparato di misura per spettroscopia di assorbimento trasiente, adattato dal riferimento [55].

agevole ed immediata (al contrario è auspicabile che il fascio di pompa sia spettralmente il più stretto possibile, idealmente *Fourier limited*, per avere un'eccitazione il più possibile selettiva). L'impulso di sonda viene generato dalla parte rimanente degli impulsi amplificati a 800 nm ($\simeq 2$ mW) che viene focalizzata su una lamina di fluorite (CaF_2) spessa 2.5 mm. All'interno della lamina una complessa serie di fenomeni non lineari genera un *continuo* spettrale di sufficiente intensità tra 1400 e 250 nm, senza alterare significativamente il profilo temporale degli impulsi [52, p. 202]. Attraverso un *beam splitter* il continuo viene separato in due fasci della stessa intensità, uno dei quali costituisce il fascio di sonda, l'altro quello di *reference*. Il fascio di *reference* segue un cammino ottico più breve degli altri due e investe per primo il campione, permettendo di misurare un fattore di normalizzazione che migliora il rapporto segnale/rumore degli spettri di trasmittanza transiente, come descritto nella sezione successiva. La manipolazione degli impulsi bianchi ultracorti è critica e richiede una particolare attenzione per limitarne la dispersione temporale (*chirping*), come descritto in seguito. In modo particolare si deve evitare per quanto possibile la propagazione in mezzi dispersivi: per questa ragione per deviare gli impulsi bianchi non si usano specchi diecrici ma riflettori metallici parabolici (che evitano peraltro aberrazioni sferiche) e gli unici elementi ottici rifrattivi aggiuntivi nel percorso del fascio sono un polarizzatore ed una lamina a $\lambda/2$, necessari a impostare la polarizzazione della sonda rispetto alla pompa all'*angolo magico*. La scelta dell'angolo tra la polarizzazione degli impulsi di pompa e di sonda è importante per evitare artefatti dovuti alla dinamica rotazionale dei cromofori eccitati durante la misura. Scegliendo un angolo pari a $\arccos(1/\sqrt{3}) \simeq 54.7^\circ$ (*angolo magico*) l'intensità di radiazione trasmessa è sempre proporzionale a quella incidente, indipendentemente dall'anisotropia rotazionale dei cromofori (definita in A.2) come mostrato in [16, p. 364].

3.2.1 Misura della trasmittanza transiente

L'oggetto della misura è la trasmittanza transiente $T = 1 - \Delta E/E$, cioè il rapporto tra l'intensità del fascio di sonda rispettivamente in presenza e in assenza del fascio di pompa, in funzione del ritardo τ tra gli impulsi e della lunghezza d'onda di eccitazione λ , sottintendendo che la rivelazione avviene in tutto l'intervallo 350 – 700 nm del continuo di sonda. La trasmittanza non viene misurata direttamente come rapporto, ma dall'espressione

$$T(\tau, \lambda) = \frac{I(\tau, \lambda)}{I(\lambda)_r} \frac{I(\lambda)_r}{I(\lambda)_0} \quad (3.10)$$

dove le intensità $I(\tau, \lambda)$ e $I(\lambda)_0$ sono quelle dell'impulso di sonda rispettivamente in presenza ed in assenza della pompa (il pedice 2 è omissso) mentre $I(\lambda)_r$ è l'intensità dell'impulso di *reference*. In pratica l'informazione contenuta in $I(\lambda)_0$ e $I(\lambda)_r$ è la stessa (l'assorbimento stazionario), ma il fatto di

dividere ogni intensità per $I(\lambda)_r$ misurata immediatamente prima permette di ridurre l'effetto di fluttuazioni spettrali degli impulsi, migliorando il rapporto segnale/rumore della misura di T [55]. La misura di T tramite la 3.10 può essere tuttavia alterata da due contributi sovrapposti all'intensità dell'impulso di sonda: uno dovuto alla luce diffusa per *scattering* della pompaⁱⁱⁱ e uno alla eventuale fluorescenza del campione. Per eliminare gli effetti di questi contributi è sufficiente misurare anche le intensità F_p e F_r , rivelate in assenza di *probe*. Allora la 3.10 si può rimpiazzare con l'espressione corretta

$$T(\tau, \lambda) = \frac{I(\tau, \lambda) - F_p}{I(\lambda)_r - F_r} \frac{I(\lambda)_r}{I(\lambda)_0} \quad (3.11)$$

Un sistema computerizzato di acquisizione dati si occupa di raccogliere automaticamente tutti gli spettri necessari alla misura della 3.11 con la possibilità di raccogliere serie con ritardi τ impostati. Per ogni ritardo viene raccolto un numero prefissato di spettri che vengono automaticamente mediati (5 nelle misure riportate in seguito).

3.2.2 Funzione di risposta strumentale

La funzione di risposta strumentale, come definita in 3.5, si può ricavare sperimentalmente in diversi modi, descritti in dettaglio nel riferimento [55]. Il metodo più semplice consiste nel registrare lo spettro di un sistema molecolare che presenta una risposta transiente di durata trascurabile rispetto al tempo di risposta strumentale (tipicamente una banda di *bleaching*), approssimabile con una δ nella 3.4. Tecniche più specifiche per la misura della funzione di risposta si basano sull'effetto Kerr ottico (dovuto alla parte reale della χ^3) nel quale il fascio di pompa induce birifrangenza in un mezzo trasparente che viene sondato da un impulso di sonda opportunamente polarizzato. In questo caso si dimostra che la risposta elettronica (istantanea) per un ritardo τ , rivelata tramite effetto eterodina ottico come descritto sopra, è proporzionale alla funzione di risposta strumentale 3.5 valutata in τ . Il pregio di questa tecnica è di essere non risonante, fatto che permette di impiegare una medesima frequenza di eccitazione per valutare la funzione di risposta su tutto lo spettro del continuo. Alternativamente la funzione di correlazione tra pompa e sonda si può misurare in un esperimento di diffusione Raman stimolata (SRG), benché in questo caso la misura sia limitata alle frequenze discrete in cui cadono le bande Raman.

3.2.3 Dispersione del continuo

Un aspetto fondamentale che va considerato nella propagazione nella materia degli impulsi ultracorti a banda larga usati come sonda è la dispersione

ⁱⁱⁱSi fa presente che non è possibile escludere il contributo della luce diffusa della pompa inserendo un *gate* temporale nella rivelazione, essendo i ritardi tra gli impulsi molto più brevi dell'elettronica.

temporale. La propagazione di un impulso è definita dalla sua velocità di gruppo

$$v_g = \left(\frac{d\omega}{dk} \Big|_{\omega_l} \right)^{-1} \quad (3.12)$$

che rappresenta la velocità alla quale si propaga il suo inviluppo (ε nella 3.3); si verifica infatti che se tutte le derivate successive di ω rispetto a k sono nulle lo spettro dell'impulso non cambia nel tempo e che $\varepsilon(t, r) = \varepsilon(t - r/v_g, 0)$ [52]. Se invece le derivate di ordine successivo non si annullano le componenti spettrali dell'impulso cambiano nel tempo e questo si disperde temporalmente, effetto che all'ordine più basso è descritto dalla *group velocity dispersion* (GVD):

$$\begin{aligned} \text{GDV} &= \frac{dv_g}{d\lambda} = 2\pi c \frac{v_g^2}{\lambda^2} k'' \\ k'' &= \frac{d^2k}{d\omega^2} = -\frac{1}{v_g^2} \frac{dv_g}{d\omega} \Big|_{\omega_l} \end{aligned} \quad (3.13)$$

Usando la relazione di dispersione dell'ottica lineare,

$$k^2(\omega) = \omega^2 \varepsilon(\omega) \mu_0 = \frac{\omega^2}{c^2} n^2(\omega) \quad (3.14)$$

dove $n(\omega)$ è l'indice di rifrazione del mezzo dove si propaga il campo, le espressioni precedenti si possono scrivere

$$v_g = \left(\frac{n_0}{c} + \frac{\omega_l}{c} \frac{dn}{d\omega} \Big|_{\omega_l} \right)^{-1} = \left(\frac{n_0}{c} - \frac{\lambda}{c} \frac{dn}{d\lambda} \Big|_{\lambda} \right)^{-1} \quad (3.15)$$

$$k'' = \frac{2}{c} \frac{dn}{d\lambda} + \frac{\omega}{c} \frac{d^2n}{d\omega^2} \quad (3.16)$$

per cui la dispersione si può attribuire alla dipendenza dalla frequenza dell'indice di rifrazione di un mezzo. La conseguenza della 3.16 è che le diverse componenti spettrali del campo si propagano a velocità diverse, fenomeno detto *chirping*: per $k'' > 0$ (*chirp* positivo, corrispondente alla dispersione normale $\frac{dn}{d\lambda} < 0$) le componenti a frequenza più bassa precederanno quelle a frequenza più alta, mentre se $k'' < 0$ (*chirp* negativo) avverrà l'opposto. In ogni caso in presenza di *chirp* un impulso non disperso (*unchirped*), ad esempio *Fourier limited*, andrà incontro ad un allargamento del profilo temporale.

Valori tipici di k'' nei vetri ottici sono dell'ordine di $10^{-25} \text{ s}^2/\text{m}$ nelle frequenze del visibile, corrispondenti ad una GVD di circa 500 fs per nm per 1 m di lunghezza di propagazione, con le componenti rosse in anticipo rispetto a quelle blu.

Il ritardo temporale delle componenti spettrali del campo dovuto alla propagazione per un tratto di lunghezza l in un mezzo dispersivo per le 3.16 sarà

$$\Delta\tau(\lambda) = l \Delta \frac{1}{v_g} \simeq \frac{l}{v_g^2} |\Delta v_g| = 2\pi c \frac{k''}{\lambda^2} \quad (3.17)$$

per $k'' = 1.2 \cdot 10^{-25} \text{ s}^2/\text{m}$, $l = 3 \text{ mm}$ il ritardo $\Delta\tau(\lambda)$ vale circa 20 fs per $\lambda = 350 \text{ nm}$, cioè il 20% per impulsi di 100 fs.

La dispersione temporale degli impulsi si manifesta negli spettri di assorbimento transiente come un ritardo delle componenti blu rispetto a quelle rosse, fatto che rende meno immediata la comprensione degli spettri. In particolare la presenza della dispersione può suggerire un'ingannevole evoluzione degli spettri, per cui una banda transiente sembra formarsi nel blu e spostarsi nel rosso a ritardi maggiori, effetto dovuto soltanto al fatto che il ritardo τ delle componenti blu è minore di quelle rosse [56]. A questo livello la dispersione si può correggere semplicemente riscaldando i ritardi per le diverse lunghezze d'onda, ognuna secondo la 3.17. Questa correzione viene infatti adottata in fase di analisi dei dati, come descritto nella sezione 3.3.1; tuttavia l'influenza della dispersione temporale introdotta dal campione sulla larghezza della funzione di risposta strumentale ne impone un limite abbastanza stringente. Nell'apparato sperimentale sono stati evitati per quanto possibile elementi rifrattivi (lenti, *beam splitter* ...) lungo il percorso dei fasci bianchi, con le eccezioni inevitabili dello spessore finito della lamina di fluorite in cui viene generato il continuo (2.5 mm), del polarizzatore del fascio, dello spessore della parete di quarzo della cella porta campione e del campione stesso.

3.2.4 Allargamento della funzione strumentale dovuto alla dispersione

A causa della dispersione dell'indice di rifrazione del campione le componenti spettrali del continuo si propagano con velocità diverse (*group velocity mismatch*, GVM). In un campione spesso gli impulsi di pompa e di sonda sono quindi sovrapposti temporalmente lungo tutto il cammino ottico soltanto quando hanno la stessa lunghezza d'onda, mentre in generale la sovrapposizione avverrà in porzioni diverse e a ritardi diversi. Questo fatto si traduce sperimentalmente in un allargamento temporale della funzione di risposta strumentale.

Una semplice stima di questo effetto si ottiene considerando il ritardo aggiuntivo $\Delta\tau$ tra gli impulsi di pompa e di sonda introdotto dalla dispersione Δn dell'indice di rifrazione:

$$\Delta\tau(\lambda) = \frac{x}{c} \Delta n(\lambda) \quad (3.18)$$

Introducendo la 3.18 nell'espressione 3.4 si può valutare la reazione strumentale ad una risposta molecolare istantanea $S(t) = \delta(t)$, ad esempio assumendo per comodità analitica impulsi con profilo temporale gaussiano di larghezza τ_1 e τ_2 , come in [55]. Integrando nello spazio la 3.4 per tutto il cammino ottico l del campione si ottiene

$$\Delta E(\tau) = \frac{c}{a\Delta n} \left(\text{erf} \left[a \left(\tau + \frac{l}{c} \Delta n \right) \right] - \text{erf}(a\tau) \right) \quad (3.19)$$

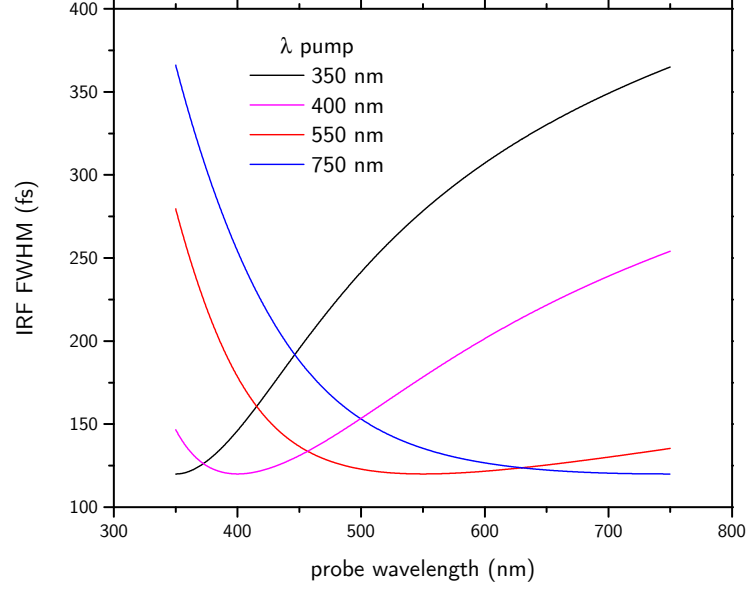


Figura 3.3: Allargamento della funzione di risposta strumentale dovuto alla dispersione del continuo nel campione. I valori riportati rappresentano l'ampiezza a mezza altezza (FWHM) della 3.19 calcolata per la propagazione in $l = 3$ mm di acqua. Per tutte le curve l'ampiezza per $\Delta n = 0$ è stata fissata a 120 fs. La dispersione dell'indice di rifrazione è presa da [57].

con

$$a = 2\sqrt{\frac{\log 2}{\Delta\tau_1^2 + \Delta\tau_2^2}} \quad (3.20)$$

Come stima del tempo di risposta strumentale è naturale considerare l'ampiezza a mezza altezza (FWHM) della 3.19. Per $\Delta n \rightarrow 0$ si ottiene $\Delta\tau = \sqrt{\Delta\tau_1^2 + \Delta\tau_2^2}$, che corrisponde all'integrale di correlazione di due gaussiane, come era da aspettarsi. Per $\Delta n \neq 0$, cioè per frequenze di sonda diverse da quella centrale della pompa, l'ampiezza della 3.19 è invece maggiore, ed è una funzione crescente di Δn , come mostrato nei grafici 3.3. Sperimentalmente si trova che l'andamento previsto dalla 3.19 è ben verificato (cfr. [55]), con un incremento del tempo di risposta per il sistema descritto in precedenza intorno ai 100 fs per un cammino ottico di 3 mm in un mezzo con dispersione $\Delta n \simeq 0.03$.

Onde evitare una perdita di risoluzione temporale significativa è quindi necessario limitare il cammino ottico nel campione al più a qualche millimetro. In pratica il miglior compromesso per avere un'assorbanza sufficiente del

campione, necessaria per un buon rapporto segnale/rumore, e uno spessore limitato si realizza impiegando una *cuvette* con cammino ottico di 2 mm.

3.2.5 Preparazione del campione e del *setup*

Il campione è contenuto in una *cuvette* di quarzo con cammino ottico di 2 mm sul fondo della quale è tenuta in rotazione una piccola ancora magnetica che permette il ricircolo della soluzione limitandone il fotoaccumulo e il conseguente foto-danneggiamento. Come ulteriore precauzione la frequenza di ripetizione del laser è stata abbassata da 1 kHz a 100 Hz mediante un *chopper* meccanico. L'assenza di foto-danneggiamento è stata verificata per ogni campione studiato appurando l'identità degli spettri di assorbimento stazionari raccolti prima e dopo la misura transiente. Tutte le misure sono state svolte a temperatura ambiente. La potenza media dell'impulso di pompa alla lunghezza d'onda di eccitazione, misurata attraverso un *power meter*, è stata sempre regolata intorno a $150 \mu\text{W}$ (corrispondenti ad un'energia per impulso di 150 nJ) inserendo un filtro neutro prima del campione o agendo una lamina polarizzatrice a $\lambda/2$ nel sistema di generazione. La *cuvette* viene posta nel punto focale comune a due paraboloidi metallici, il primo dei quali focalizza i fasci collineari di pompa, sonda, *reference* nel punto focale *diffraction limited*, mentre il secondo serve da collimatore e invia la luce raccolta al rivelatore. Uno schermo posto tra il campione ed il secondo specchio intercetta il fascio di pompa impedendogli di raggiungere direttamente il rivelatore. I tre fasci vengono allineati spazialmente servendosi di un *pinhole* posto sulla faccia interna di una *cuvette* geometricamente identica a quella usata per il campione, contenete un campione standard (cumarina 153 o rodamina) che presenta un segnale transiente molto intenso. Dopo aver incrociato i fasci sul *pinhole*, cioè sulla parete interna della *cuvette*, il campione viene spostato tramite un traslatore micrometrico in modo da portare il punto focale all'interno della soluzione. Il segnale transiente dello standard permette di ottimizzare l'allineamento spaziale dei fasci, massimizzandone l'intensità in tempo reale, e di stabilire l'origine dei tempi, $\tau = 0$, quando gli impulsi di pompa e sonda investono contemporaneamente il campione. Il ritardo tra gli impulsi è regolato da una linea di ritardo meccanica controllata elettronicamente dal sistema di acquisizione dati (100 fs corrispondono a $30 \mu\text{m}$). L'origine dei tempi si trova in tempo reale, acquisendo spettri transienti dello standard variando il ritardo a partire da valori negativi, per i quali la sonda precede la pompa, finché non inizia a strutturarsi lo spettro e compaiono gli 'artefatti coerenti' quando gli impulsi sono temporalmente sovrapposti ($\tau = 0$). Gli artefatti coerenti si manifestano quando il sistema molecolare eccitato dalla pompa viene sondato quando è ancora in uno stato di *coerenza elettronica* (o *ottica*), che non è descritto dalla 3.4. Quando il ritardo temporale tra gli impulsi non è trascurabile rispetto al tempo di coerenza, solitamente indicato con T_2 , il campo elettrico della sonda interagisce

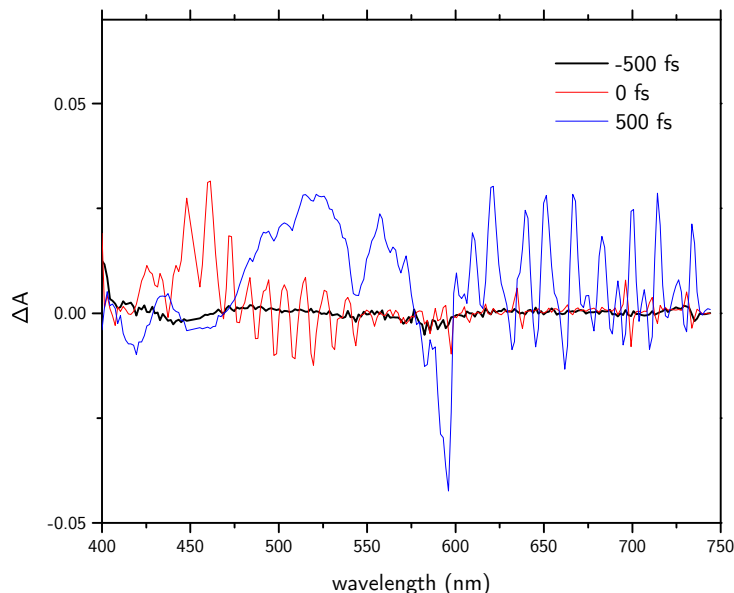


Figura 3.4: Spettri transienti dell'ipericina in DMSO intorno a $\tau = 0$.

coerentemente con la polarizzazione indotta dalla pompa: in un sistema collineare (e se la polarizzazione dei fasci non è ortogonale) i dipoli indotti dalla pompa si troveranno in fase o in opposizione di fase rispetto al campo della sonda in funzione del ritardo (cioè di un numero pari o dispari di lunghezze d'onda). Poiché a causa della dispersione il ritardo dipende dalla lunghezza d'onda della sonda gli spettri raccolti entro il tempo di coerenza presentano una caratteristica modulazione come quella mostrata in figura 3.4.

La figura 3.4 riporta gli spettri transienti di una soluzione di ipericina in DMSO a cavallo del ritardo impostato come $\tau = 0$. Per ritardi negativi (traccia nera) lo spettro è identicamente nullo. Il ritardo $\tau = 0$ viene impostato non appena compare la modulazione dovuta alla sonda sulla coda blu dello spettro (traccia rossa). Gli artefatti compaiono nella regione blu a causa del *chirp* positivo degli impulsi bianchi di sonda: inizialmente la componente rossa della sonda precede l'impulso di pompa e quindi non interferisce con lo stato coerente. Per ritardi superiori gli artefatti si spostano sulla coda rossa e nel blu inizia a strutturarsi lo spettro di assorbimento transiente (traccia blu).

3.3 Misure e analisi dei dati

Le misure di assorbimento transiente hanno lo scopo di individuare i diversi comportamenti degli stati fotoeccitati ma anche di seguirne la dinamica di formazione e decadimento. Per questa ragione gli spettri transienti vengono raccolti in funzione del ritardo τ , secondo una serie temporale fissata per mettere in luce la dinamica di vari fenomeni fotofisici. L'analisi delle serie temporali ha lo scopo di individuare quali sono i diversi contributi che formano lo spettro e la loro dinamica temporale. In seguito si cercherà di costruire un modello chimico-fisico che descriva adeguatamente i fenomeni osservati.

3.3.1 Analisi globale con GLOTARAN

L'analisi più completa delle serie temporali è sicuramente un'analisi globale, in cui un modello viene accordato con l'intera serie di dati sperimentali e non con le singole cinetiche. L'analisi globale dei dati è solitamente un compito complesso che necessita di appositi strumenti informatici. In questo lavoro si è impiegato il programma GLOTARAN, sviluppato appositamente per l'analisi globale di dati spettroscopici e microscopici risolti in tempo. GLOTARAN è un programma a codice aperto e libero che offre un'interfaccia grafica intuitiva per la libreria TIMP del software R. La documentazione del programma è reperibile sul sito <http://glotaran.org> e nei riferimenti [58] e [59], mentre una descrizione dettagliata dell'algoritmo di analisi si trova in [60].

L'assunzione alla base dell'analisi globale svolta dal programma è che la serie temporale di spettri $\Psi(\lambda, t)$ risulti dalla sovrapposizione di un numero finito di componenti indipendenti che evolvono nel tempo, cioè sia data da

$$\Psi(\lambda, t) = \sum_l^n c_l(t) \varepsilon_l(\lambda) \quad (3.21)$$

dove la somma è estesa alle n componenti dello spettro, c_l rappresenta l'andamento temporale della componente l -esima e ε_l il suo profilo spettrale. Si suppone che la forma funzionale delle $c_l t$ sia noto, e dipenda da un numero finito di parametri non lineari da determinare. Nessuna assunzione è invece fatta sulle ε_l che non devono essere note o modellate a priori. I parametri incogniti compaiono dunque come un vettore θ nell'espressione

$$\Psi(\lambda, t) = \sum_l^n c_l(t, \theta) \varepsilon_l(\lambda) \quad (3.22)$$

oppure in forma matriciale

$$\Psi = \mathbf{C} \mathbf{E}^T \quad (3.23)$$

dove Ψ è una matrice $m \times n$, con m entrate temporali e n entrate spettrali, mentre le matrici $\mathbf{C}$ e $\mathbf{E}$ hanno per colonne rispettivamente i profili temporali della concentrazione delle componenti e le componenti spettrali.

In una situazione ideale, in assenza di rumore, ci si aspetta che il numero di componenti spettrali indipendenti sarà pari al rango della matrice $\mathbf{E}$, o analogamente dal rango di $\mathbf{C}$, essendo indipendente l'evoluzione temporale di ciascuna componente.

$$\text{rank } \Psi = \text{rank } \mathbf{C} = \text{rank } \mathbf{E} \doteq n_c \quad (3.24)$$

In una situazione realistica la presenza di rumore casuale richiede un criterio più sensibile per individuare le componenti spettrali di interesse fisico, essendo in generale il rango delle matrici pari a quello massimo. A questo scopo GLOTARAN impiega la tecnica di *decomposizione ai singoli valori* (SVD) sulla matrice Ψ . Questa viene fattorizzata secondo l'espressione

$$\Psi = \mathbf{U}\Sigma\mathbf{V}^* \quad (3.25)$$

dove $\mathbf{U}$ e $\mathbf{V}$ sono matrici unitarie e Σ è una matrice diagonale con entrate reali non negative SV_n dette *valori singolari*. Si conviene di ordinare i valori singolari in modo che $SV_n \geq SV_{n-1} \geq \dots \geq SV_{n_c} > SV_{n_c+1} = \dots = 0$. I valori singolari permettono di stimare il numero di componenti indipendenti presenti nello spettro. L'introduzione di una perturbazione aleatoria additiva $\mathbf{N}$ (rumore) nella 3.23 modifica sia i valori singolari imperturbati sia rispettivi vettori della decomposizione. È noto che un limite superiore alla correzione sui valori singolari è dato dal maggiore dei valori singolari della perturbazione, SV_N [60]. Quando la perturbazione è sufficientemente piccola si verifica che $SV_n - SV_{n+1} \gg SV_N$ per ogni n e le componenti indipendenti di interesse fisico si identificano con quelle corrispondenti ad un valore singolare maggiore di una soglia introdotta dal rumore.

Il programma mostra graficamente il risultato della SVD e permette di valutare qualitativamente il numero di componenti necessario a parametrizzare lo spettro prima di ogni analisi.

Le funzioni di evoluzione temporali $c_l(t)$ impiegate dal programma sono cinetiche esponenziali, ovvero del primo ordine:

$$c_l(t) = \sum_j a_{j,l} \exp(-k_{j,l}t) \quad (3.26)$$

Più realisticamente nell'evoluzione degli spettri va incluso il contributo della risposta strumentale (cfr. la 3.5 nella sezione 3.2.2) per cui un'espressione completa per descrivere le cinetiche misurate è data dalla convoluzione della 3.26 con la funzione strumentale $i(t)$, approssimata con una gaussiana di opportuna media e larghezza

$$c_l(t) = \sum_j a_{j,l} \exp(-k_{j,l}t) \otimes i(t) \quad (3.27)$$

Nell'algoritmo alla base di GLOTARAN, detto *variable projection*, le $\varepsilon_l(\lambda)$, ricavate come descritto dalla decomposizione SVD, compaiono come parametri

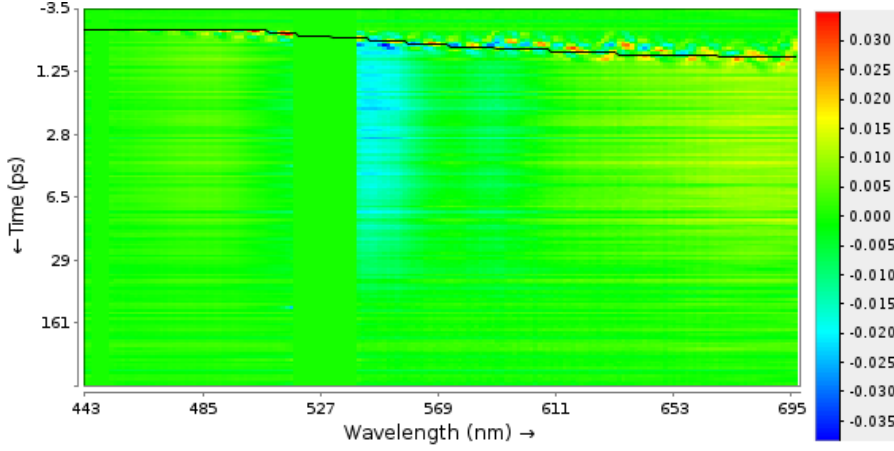


Figura 3.5: Rappresentazione grafica della matrice degli spettri come mostrata in GLOTARAN, con evidenziato il *fit* della curva di dispersione.

lineari dipendenti dal vettore di parametri incogniti θ , motivo per cui sono detti *linearmente condizionati* e non richiedono alcuna stima iniziale se non nel numero [58]. I parametri θ , cioè i tempi di decadimento degli esponenziali, devono invece essere stimati in modo ragionevole prima di procedere con l'analisi, che si basa in ultima istanza sulla minimizzazione non lineare della quantità

$$\left\| \Psi(\lambda, t) - \sum_l^{n_c} c_l(t, \theta) \varepsilon_l(\lambda) \right\|^2 \quad (3.28)$$

dove la norma è quella euclidea.

Tra gli altri parametri che richiedono una stima esplicita rientrano quelli che parametrizzano la funzione di risposta (media e larghezza della gaussiana) e la curva di dispersione del continuo. Quest'ultima è rappresentata con un polinomio di grado arbitrario che approssima la 3.17: in tutte le analisi svolte un polinomio di secondo grado si è rivelato sufficiente allo scopo.

Il *fit* dell'ampiezza della funzione di risposta strumentale ha sempre dato valori nell'intervallo 100 – 200 fs, compatibili con quelli pubblicati in letteratura per lo stesso sistema [55]. A causa della complessità insita nella procedura la bontà di ogni risultato richiede la valutazione di tre criteri [58]:

1. Il controllo della convergenza della minimizzazione
2. Il controllo della SVD dei residui, che deve apparire priva di una struttura fisicamente sensata
3. L'ispezione visiva del grafico dei residui, in funzione sia dei tempi che delle frequenze, e degli errori statistici stimati per i parametri

In particolare se non è verificato il secondo punto si è probabilmente scelto un numero di componenti dell'SVD troppo ristretto e non sufficiente a descrivere

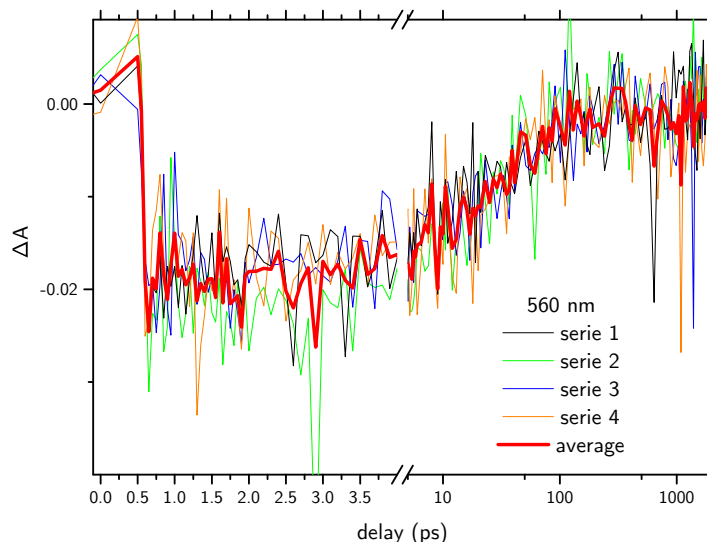


Figura 3.6: Esempio di operazione di media su 4 serie mostrata in funzione del ritardo τ .

gli spettri. Una cattiva stima iniziale dei parametri, o un numero insufficiente di essi, possono invece far fallire i punti 1 e 3.

3.4 Misure di assorbimento transiente

Le misure di assorbimento transiente hanno riguardato campioni di ipericina in DMSO, in complesso con apomigioglobina e in un tampone basico a pH 10. Gli spettri sono stati raccolti secondo una serie temporale di 160 punti, con ritardi compresi tra -5 ps e 1841 ps, distribuiti in modo approssimativamente esponenziale. La misura completa di ogni serie richiede circa 50 minuti. Per ciascuna misura sono state raccolte un numero di serie compreso tra 3 e 6, le quali sono state ispezionate singolarmente e mediate nel caso fossero compatibili, come mostrato in figura 3.6, in modo da ridurre il rumore aleatorio di un fattore $\sqrt{n}$ per una media su n serie. La causa dell'irriproducibilità di diverse serie dello stesso campione è sempre stata attribuibile alla diminuzione della potenza dell'impulso di pompa, causata da un'instabilità del sistema di generazione o dalla deriva di condizioni ambientali come la temperatura.

Per facilitarne la comprensione gli spettri vengono presentati in forma normalizzata, cioè senza il contributo del *bleaching*. Gli spettri normalizzati si ottengono sottraendo agli spettri transienti i corrispondenti spettri di assorbimento stazionario riscaldati al minimo della banda di *bleaching*, come

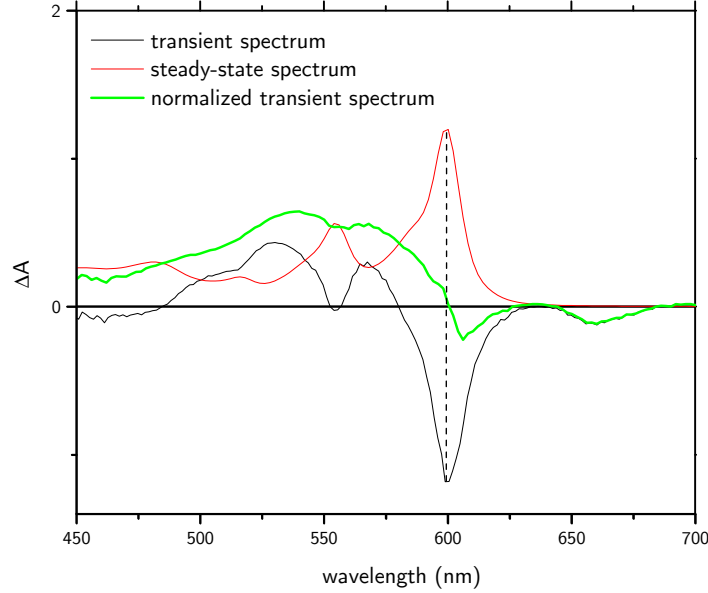


Figura 3.7: Normalizzazione degli spettri transienti al minimo della banda di *bleaching*, indicata con il tratteggio verticale.

mostrato in figura 3.7. Dagli spettri così normalizzati è immediato identificare l'assorbimento da stato eccitato (ESA, $\Delta A > 0$) e l'emissione stimolata (SE, $\Delta A < 0$).

Nelle figure 3.10 e 3.11 sono presentati gli spettri e le cinetiche transienti di una soluzione di ipericina $120 \mu\text{M}$ in DMSO con $\lambda_{\text{pump}} = 400 \text{ nm}$. Per ogni campione e per ogni valore di λ_{pump} si userà la stessa convenzione: procedendo in senso orario dal grafico in alto a sinistra la figura 3.10 mostra gli spettri transienti normalizzati come descritto sopra per ritardi $\tau = 3, 10, 100, 1000 \text{ ps}$ sovrapposti agli spettri di assorbimento stazionario e di fluorescenza (dove disponibile) mostrati in tratteggio; il *fit* dello spettro a $\tau = 10 \text{ ps}$ secondo le componenti spettrali individuate dall'analisi SVD con GLOTARAN; le diverse componenti spettrali normalizzate al massimo ed infine il loro andamento temporale. La seguente figura 3.11 mostra invece 4 cinetiche di particolare interesse insieme al *fit* globale. Si noti che tutti i grafici in funzione del ritardo sono presentati con una doppia scala, lineare fino a 2 ps e logaritmica in seguito per facilitare la visualizzazione dei dati.

3.4.1 Ipericina in DMSO

In figura 3.10 sono riportati gli spettri di una soluzione di ipericina 120 μM in DMSO eccitata con impulsi di $\lambda_{\text{pump}} = 400$ nm, con potenza per impulso di 150 nJ e frequenza di ripetizione 100 Hz, ottenuti direttamente dalla seconda armonica del fascio amplificato del laser Ti:Sa. È evidente una larga banda di ESA che si estende tra 400 e 600 nm a tutti i ritardi considerati e la presenza di emissione stimolata in corrispondenza dei picchi dello spettro di emissione ($\lambda = 604, 654$ nm). Il massimo del *bleaching* è in corrispondenza del massimo di assorbimento per ($\lambda = 599$ nm). L'analisi globale delle serie mostra la presenza di 3 componenti spettrali che si manifestano immediatamente a $\tau = 0$ ps. La prima decade molto rapidamente (80 fs) e si può attribuire agli effetti di coerenza ('artefatto coerente') durante il breve ritardo in cui la pompa e la sonda sono temporalmente sovrapposte. La seconda decade in 12 ps e presenta due componenti positive in corrispondenza delle bande di fluorescenza dell'ipericina, mentre la terza decade più lentamente (6.6 ns) e ha due evidenti contributi negativi in corrispondenza delle bande di assorbimento stazionario della soluzione ($\lambda = 554, 599$ nm). L'interpretazione fisica delle componenti spettrali individuate è chiarificata dall'analisi delle cinetiche temporali riportate in figura 3.11. La cinetica corrispondente al massimo dell'assorbimento, $\lambda = 599$ nm, mostra la presenza istantanea del *bleaching* seguita da un'ulteriore decrescita del segnale, con una costante di tempo dell'ordine di 10 ps. Questo è attribuibile all'instaurarsi dell'emissione stimolata, che cade nella stessa regione dell'assorbimento a causa del piccolo *Stokes shift* della soluzione. La presenza di segnale negativo che si forma con la stessa costante di tempo in corrispondenza della seconda banda di emissione, intorno a $\lambda = 654$ nm, conferma questa interpretazione. Il resto della cinetica del sistema è descritto dalla terza componente spettrale, più lenta, che mostra l'instaurarsi immediato del *bleaching* e dell'ESA che decadono con tempi dell'ordine dei nanosecondi. Il tempo stimato dall'analisi globale di 6.6 ns è compatibile con il tempo di vita media di fluorescenza del composto di 5.5 ns, considerata l'incertezza nello stimare un decadimento così lungo con una misura estesa fino a 1.8 ns. La cinetica a $\lambda = 528$ nm mostra chiaramente questa cinetica dell'ESA, mentre la mancanza di evoluzione temporale sul primo picco di assorbimento, per $\lambda = 554$ nm è dovuta al compensarsi dei contributi del *bleaching* e dell'ESA.

Le figure 3.12 e 3.13 mostrano i risultati di misure analoghe svolte sullo stesso campione eccitato con impulsi centrati a $\lambda_{\text{pump}} = 555$ nm, in corrispondenza della transizione $S_0 \rightarrow S_1$, $\nu = 2$. Il fascio di pompa è stato ottenuto dalla seconda armonica del *signal* dell'OPA. La porzione degli spettri intorno alla lunghezza d'onda di eccitazione è stata rimossa in quanto presentava soltanto un picco di *scattering* senza interesse. L'analisi degli spettri mostra un andamento qualitativo identico a quello con eccitazione a $\lambda_{\text{pump}} = 400$ nm, con l'unica differenza dei tempi di decadimento per le 3

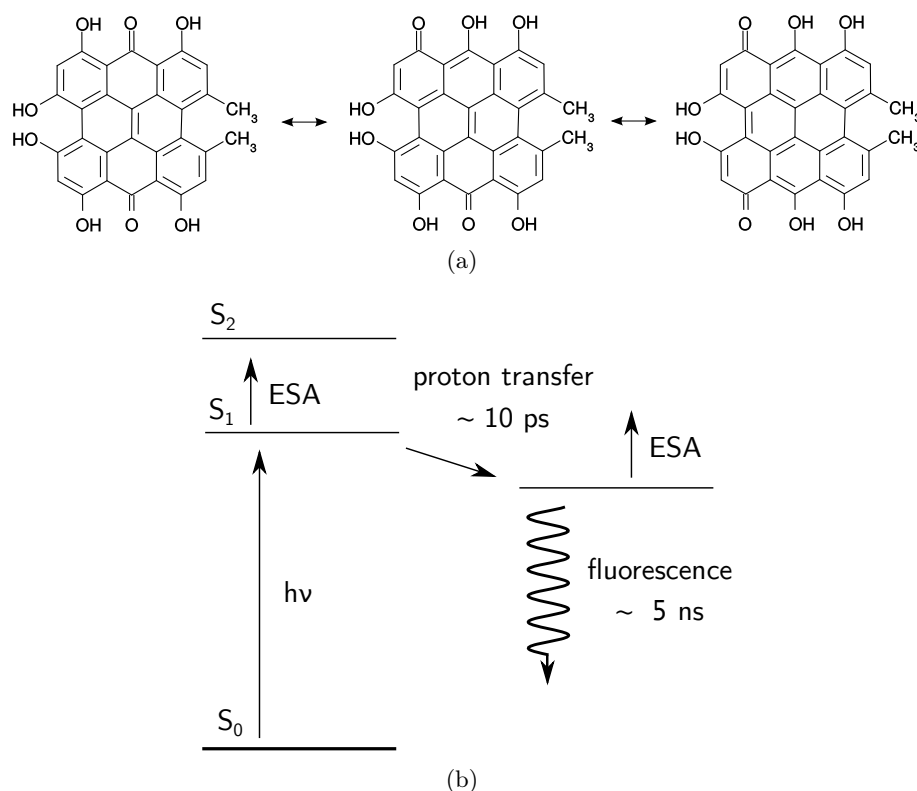


Figura 3.8: (a): a sinistra è rappresentata l'ipericina nella sua forma non tautomerizzata, seguita da due tautomeri originati dal trasferimento intramolecolare di uno e due protoni rispettivamente. (b): schema proposto per la dinamica degli stati eccitati dell'ipericina in DMSO e apoMb.

componenti spettrali, che risultano rispettivamente di 3 fs, 5.6 ps e 4.1 ns. La tabella 3.1 e la figura 3.20 permettono un confronto diretto dei risultati. Si nota che gli spettri misurati con $\lambda_{\text{pump}} = 555$ nm presentano una strutturazione maggiore rispetto a quelli con $\lambda_{\text{pump}} = 400$ nm, ben evidente intorno a 500 nm: questo fatto è dovuto all'allargamento spettrale causato dall'eccitazione di uno stato più 'caldo' pompando a 400 nm.

Le misure presentate confermano diversi risultati parziali noti in letteratura per analoghe soluzioni di ipericina in DMSO [13] [61] che mettono in evidenza l'instaurarsi dell'emissione stimolata con un ritardo dell'ordine dei picosecondi dipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione. Tale ritardo è stato imputato alla generazione della specie fluorescente tramite un trasferimento di protoni che dà origine ad una forma tautomerizzata dell'ipericina, come quelle mostrate in 3.8(a). Il più semplice schema della dinamica consistente con i dati riportati è mostrato in figura 3.8(b).

Un ulteriore esperimento ha riguardato lo stesso campione saturato in atmosfera di azoto per qualche minuto. Lo spettro transiente per $\tau = 5$ ps,

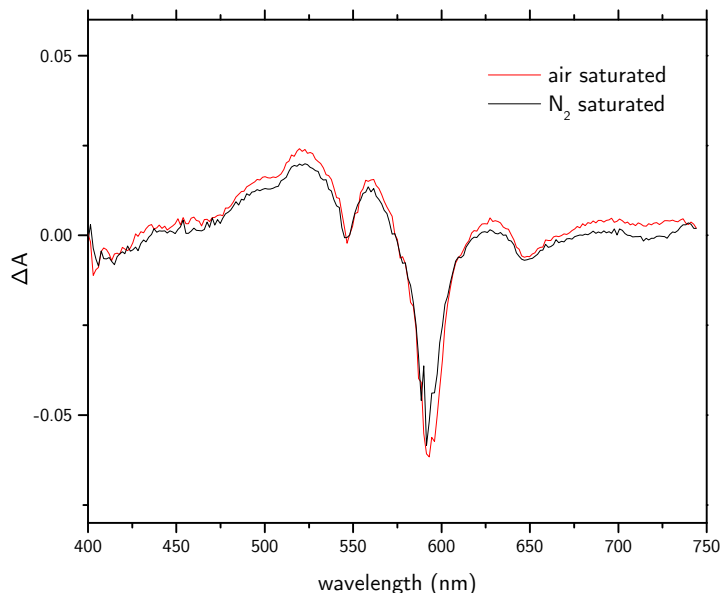


Figura 3.9: Confronto tra gli spettri transienti dell'ipericina in DMSO prima e dopo saturazione con N_2 .

mostrato in figura 3.9, non mostra significative differenze rispetto a quello della soluzione in aria riportato per confronto. L'indipendenza degli spettri dalla concentrazione di ossigeno in soluzione conferma l'attribuzione dello stato di singoletto per gli stati eccitati, mancando ogni evidenza di *quenching* del tripletto da parte dell' O_2 .

3.4.2 Ipericina in complesso con apoMb

Le figure 3.14, 3.15, 3.16 e 3.17 mostrano analoghe misure svolte sul complesso ipericina-apomioglobina ($[apo]=530 \mu M$, $[hyp]\simeq 120 \mu M$). La soluzione è stata ottenuta aggiungendo qualche μL di una soluzione di ipericina in DMSO molto concentrata ($\simeq 4 mM$) ad una soluzione di apomioglobina in PBS. La piccola aggiunta di DMSO (circa il 5 %) ha provocato la denaturazione di una parte della proteina che ha formato un evidente residuo aggregato in soluzione. Tale residuo è stato rimosso centrifugando il campione per 10 minuti a 10000 giri/minuto. Lo spettro di assorbimento stazionario della soluzione dopo la centrifugazione non ha evidenziato anomalie ed il campione è stato misurato senza ulteriori purificazioni. A differenza delle precedenti misure si è preferito cambiare il sistema di generazione degli impulsi di pompa per la misura con eccitazione sulla banda di assorbimento $S_0 \rightarrow S_1$ in modo da avere maggiore stabilità del fascio. In questo caso si è

Solvente	λ_{pump}	P_{pump}	τ componente SVD		
			1	2	3
DMSO	400 nm	150 mW	83 fs	12.4 ps	6.6 ns
	555 nm	150 mW	3 fs	5.6 ps	4.1 ns
apoMb	400 nm	150 mW	14 fs	5.7 ps	2.3 ns
	545 nm	130 mW	3 fs	3.4 ps	2.2 ns
pH 10	545 nm	150 mW	6 fs	31.2 ps	-

Tabella 3.1: Riepilogo dell'analisi globale (GLOTARAN) degli spettri transienti dell'ipericina nei diversi solventi considerati.

impiegato il *mixing* del segnale dell'OPA con la fondamentale del Ti:Sa per generare impulsi centrati a 545 nm. Si è inoltre scelto di ridurre leggermente la potenza del fascio (130 mW) per non saturare il rivelatore con la luce diffusa per *scattering* dal complesso.

Anche per il complesso l'analisi globale rivela tre componenti che hanno la stessa interpretazione di quelle dell'ipericina in DMSO. In figura 3.21 gli spettri del complesso vengono confrontati con quelli della soluzione in DMSO, entrambi per $\tau = 10$ ps e $\lambda_{\text{pump}} = 400$ nm. Gli spettri sono normalizzati al massimo dell'assorbanza stazionaria dei campioni. Si nota un andamento spettrale analogo, con tuttavia un ESA più diffuso per il complesso in tutto l'intervallo spettrale considerato. Dai grafici delle cinetiche emerge un certo errore sistematico del modello a tempi lunghi: questo è imputabile alla presenza di un decadimento biesponenziale dell'intensità di fluorescenza (cfr. tabella 1.1) che è difficile da stimare visto il limite della misura a ritardi inferiori a 1.8 ns. Le costanti stimate di 2.2 e 2.3 ns sono in ottimo accordo con il più breve dei tempi di vita media della fluorescenza dell'ipericina in PBS^{iv} [2] e si possono attribuire alla frazione di ipericina non legata alla proteina. Il tempo di vita della seconda componente, cioè il *rise time* dell'emissione stimolata, risulta sempre minore nel caso del complesso. Analogamente all'ipericina in DMSO l'eccitazione a $\lambda_{\text{pump}} = 545$ nm comporta una diminuzione del tempo di vita di circa la metà.

^{iv}Come detto la resa quantica di fluorescenza dell'ipericina in tampone è trascurabile e le misure sono possibili solo con tecniche a singolo fotone (TCSPC).

3.4.3 Ipericina in tampone a pH 10

Per corroborare l'ipotesi avanzata sopra secondo cui la specie fluorescente di lunga vita media si forma con la tautomerizzazione dell'ipericina per trasferimento protonico si è svolta una misura su una soluzione di ipericina in tampone basico a pH 10^v ([hyp] $\simeq$ 120 μ M, $\lambda_{\text{pump}} = 545$ nm). In ambiente basico ci si aspetta che la regione *peri* della molecola sia deprotonata, come anticipato nel capitolo 1, e non abbia quindi la possibilità di trasferire protoni. Come noto l'ipericina non è direttamente solubile in soluzioni acquose per pH inferiori a 12, fatto reso evidente dalla disomogeneità della soluzione e dal suo *scattering*. Aggiungendo il 10% circa di DMSO si ottiene una soluzione limpida e con uno spettro di assorbimento intenso e ben strutturato, mostrato in tratteggio rosso nel riquadro in alto di figura 3.18, caratterizzato da due bande centrate a 560 nm e 600 nm con un profilo invertito rispetto a quelle dell'ipericina in DMSO. Questo fa supporre che l'ipericina non formi aggregati in misura considerevole ma sia principalmente in soluzione con una diversa protonazione dei gruppi idrossile nella regione *peri*.

Gli spettri transienti riportati in figura 3.18 e 3.19 mostrano una notevole differenza con i precedenti e sono compatibili con una singola cinetica di *bleaching* ed ESA che compare immediatamente e decade in 31.2 ps, mentre non c'è traccia di emissione stimolata o di alcun altro fenomeno a tempi più lunghi. Questo risultato supporta il modello proposto sopra e mette in luce l'importanza dello stato di protonazione della molecola al fine di generare una specie fluorescente. In particolare secondo quanto riportato in [4] a pH 10 un singolo gruppo idrossile della regione *peri* è deprotonato, per cui la specie fluorescente è da attribuirsi ad una forma doppiamente tautomerizzata dell'ipericina, come quella riportata a destra della figura 3.8(a). Una conclusione analoga è presentata nel riferimento [61]. La differenza della costante di tempo della seconda componente misurata per l'ipericina in DMSO e nel complesso è attribuibile al diverso intorno che circonda l'ipericina; in particolare alla presenza di residui carichi e all'acqua di idratazione nella cavità della proteina che rendono più veloce il trasferimento protonico.

Si può infine notare come dall'analisi delle misure svolte non vi sia traccia della formazione di stati di tripletto. Questo fatto è da attribuire alla dinamica più lenta che non si riesce a cogliere nell'intervallo di ritardi coperto. Si ricorda invece che la cinetica di decadimento del tripletto, ancora più lenta, è stata misurata tramite *laser flash photolysis* al nanosecondo ed è riportata nella sezione 1.1.3. Spettri transienti al nanosecondo dell'assorbimento $T \rightarrow T$ sono pubblicati in [62].

^vHanna Instruments HI 7010 10.01 pH Buffer Solution.

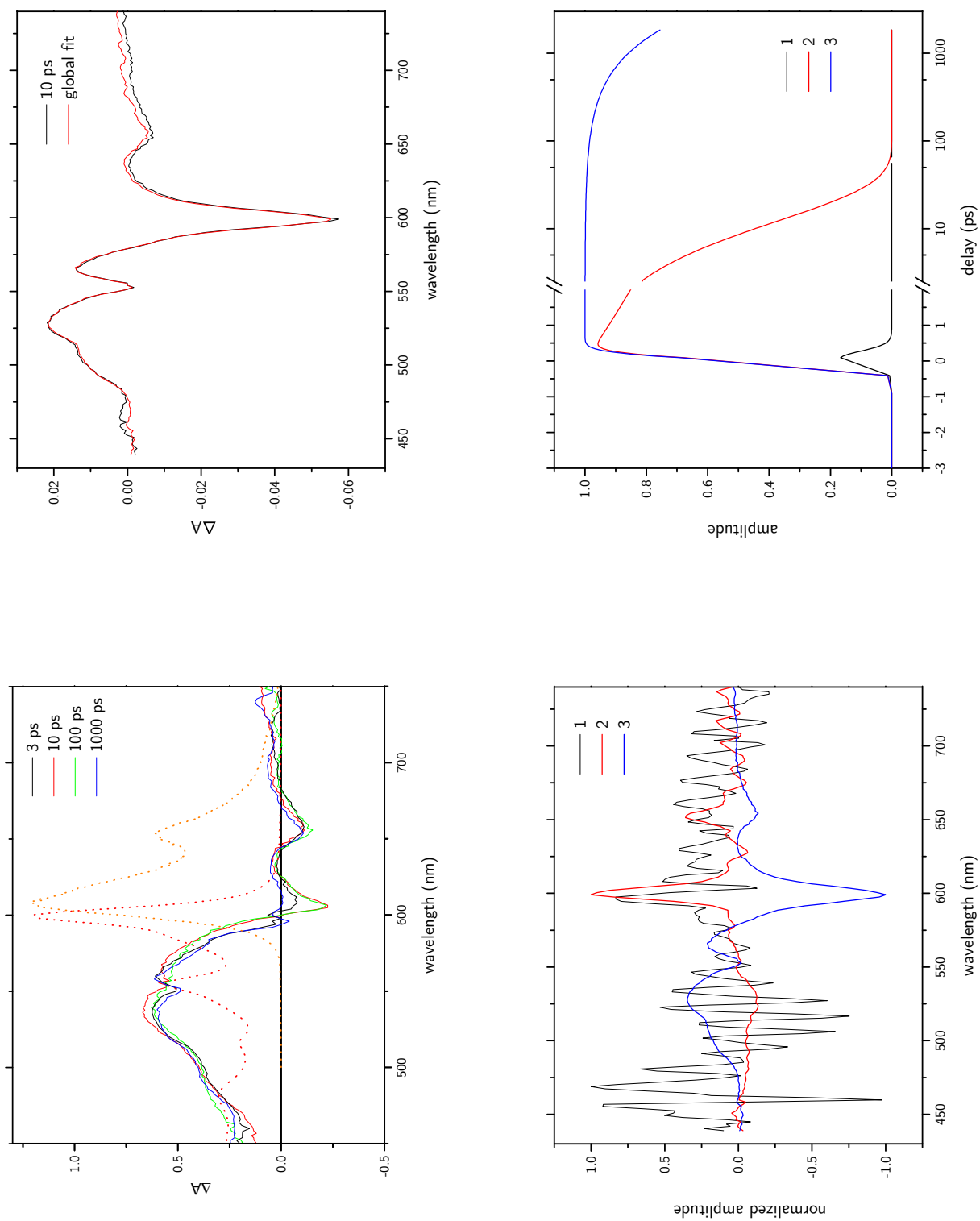


Figura 3.10: Spettri di assorbimento transiente per ipericina in DMSO, $\lambda_{\text{pump}} = 400 \text{ nm}$.

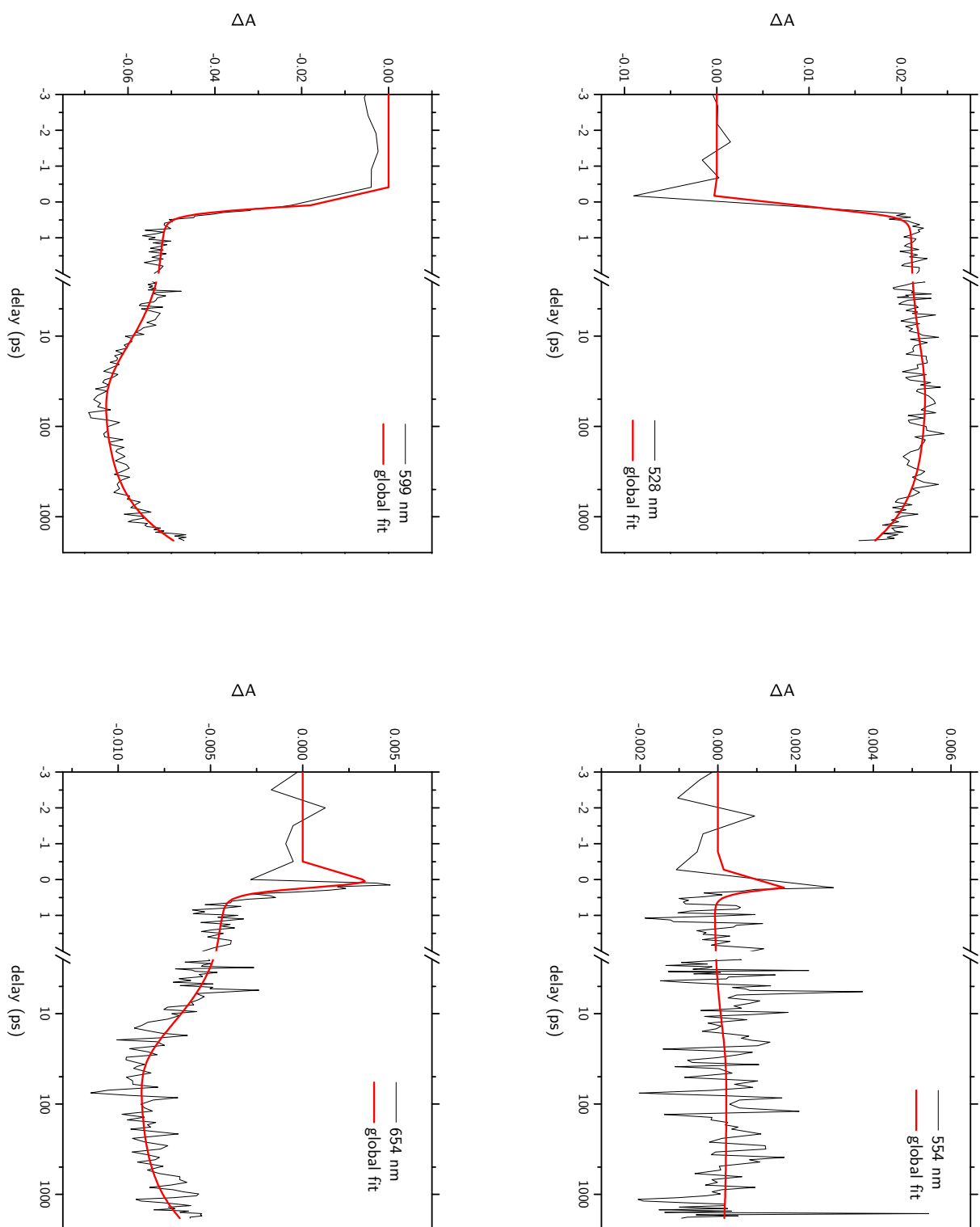


Figura 3.11: Cinetiche di assorbimento transiente per ipericina in DMSO, $\lambda_{\text{pump}} = 400$ nm.

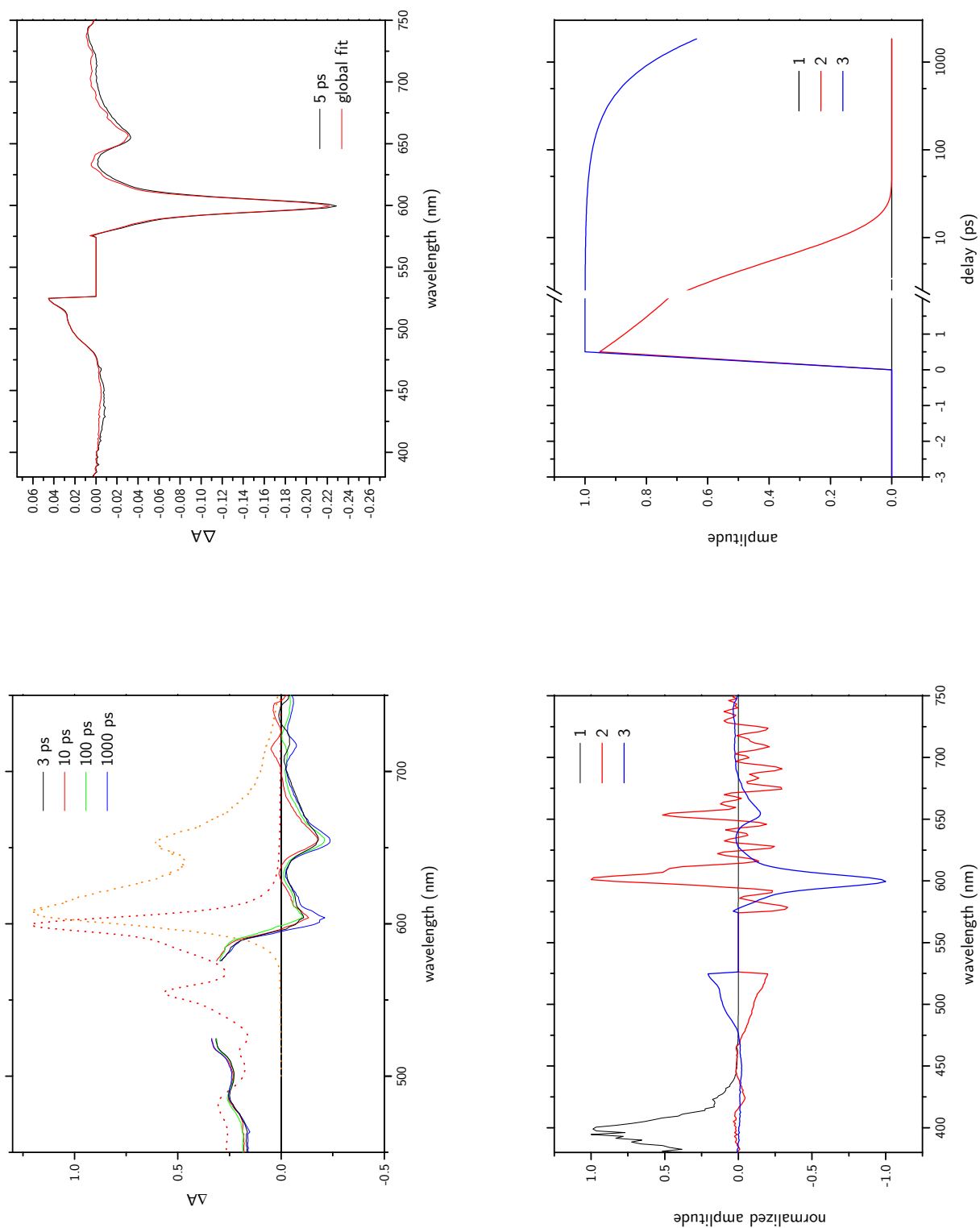


Figura 3.12: Spettri di assorbimento transiente per ipericina in DMSO, $\lambda_{\text{pump}} = 555$ nm.

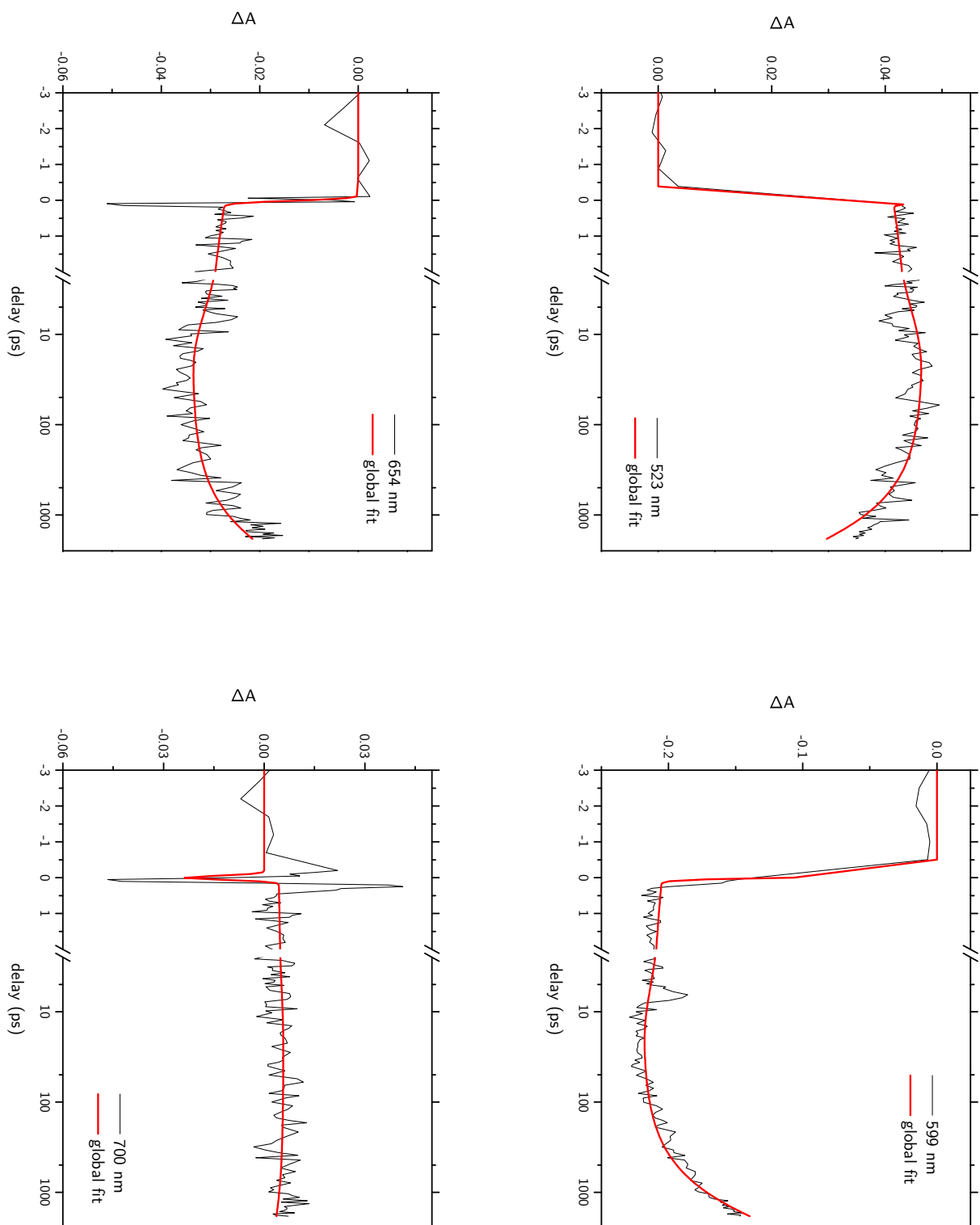


Figura 3.13: Cinetiche di assorbimento transiente per ipericina in DMSO, $\lambda_{\text{pump}} = 555 \text{ nm}$.

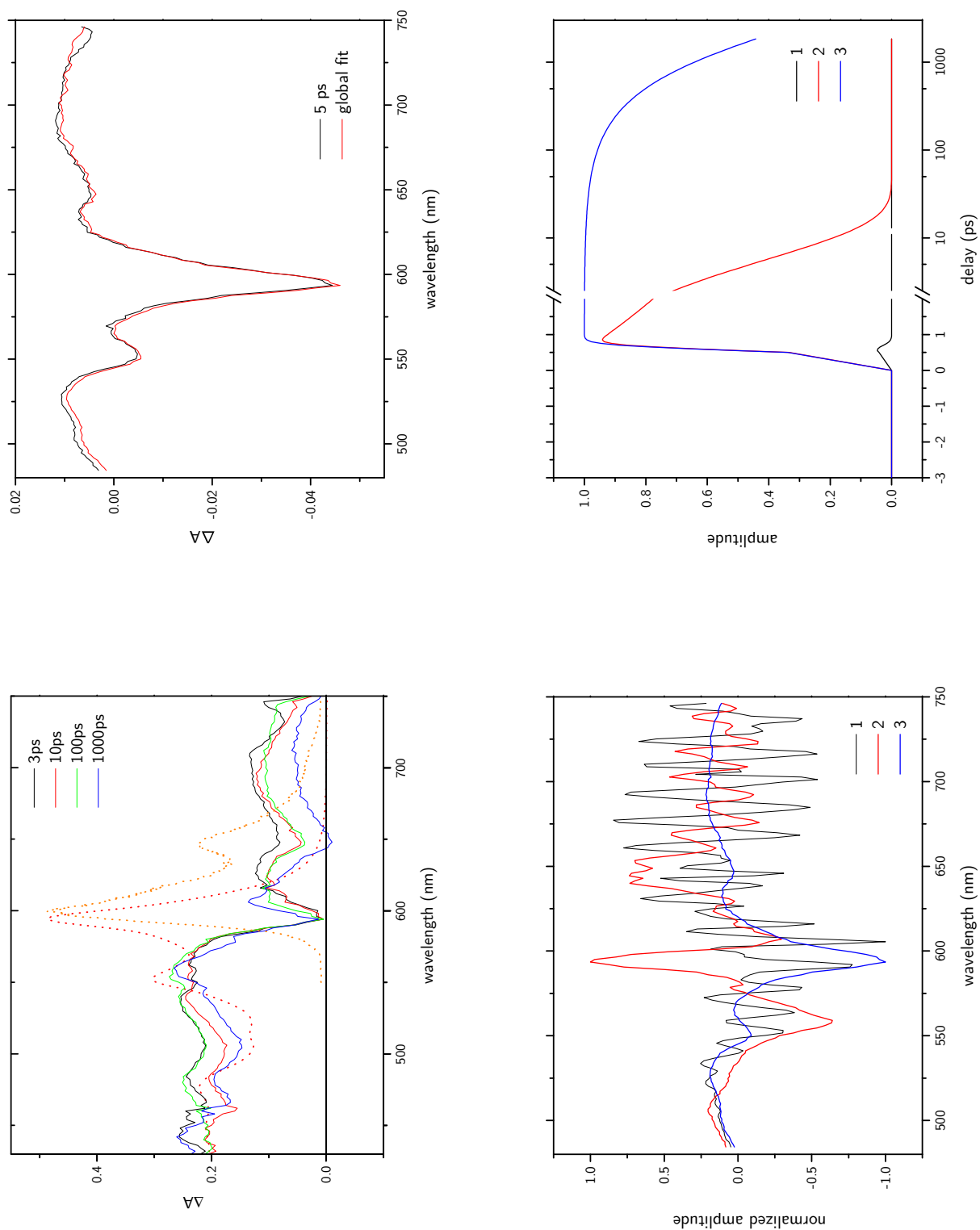


Figura 3.14: Spettri di assorbimento transiente per il complesso ipericina-apoMb, $\lambda_{\text{pump}} = 400$ nm.

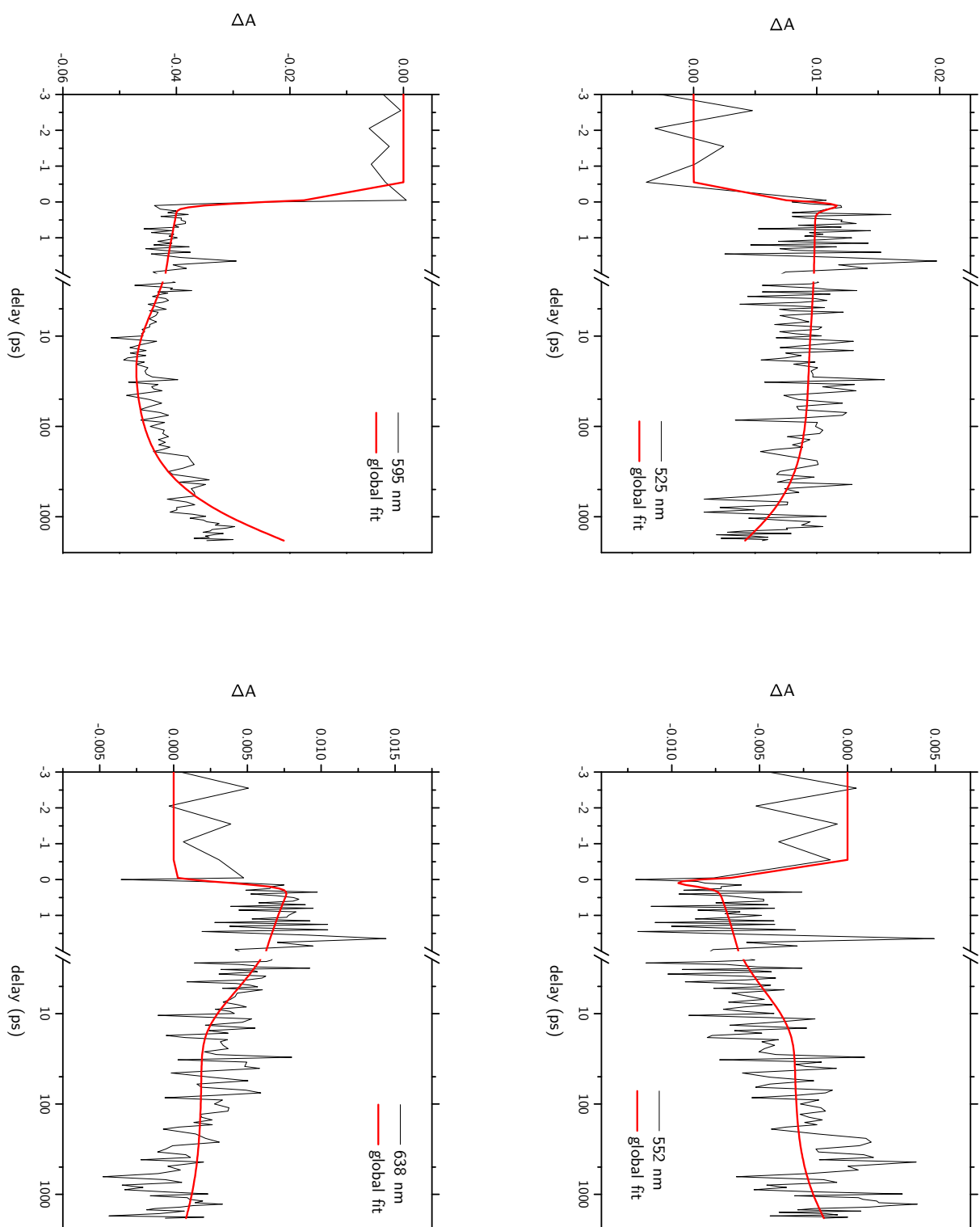


Figura 3.15: Cinetiche di assorbimento transiente per il complesso ipericina-apoMb, $\lambda_{\text{pump}} = 400$ nm.

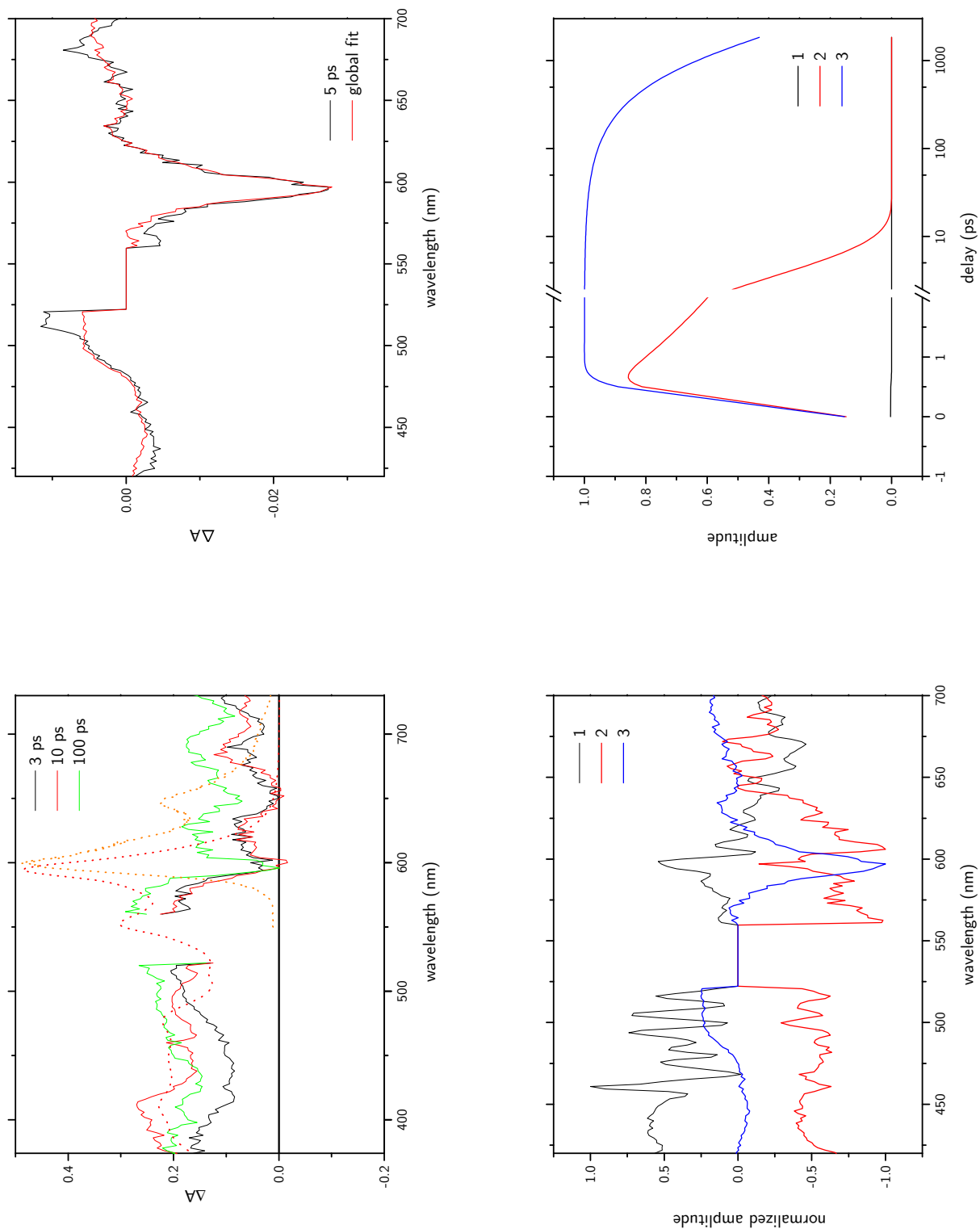


Figura 3.16: Spettri di assorbimento transiente per il complesso ipericina-apoMb, $\lambda_{\text{pump}} = 545$ nm.

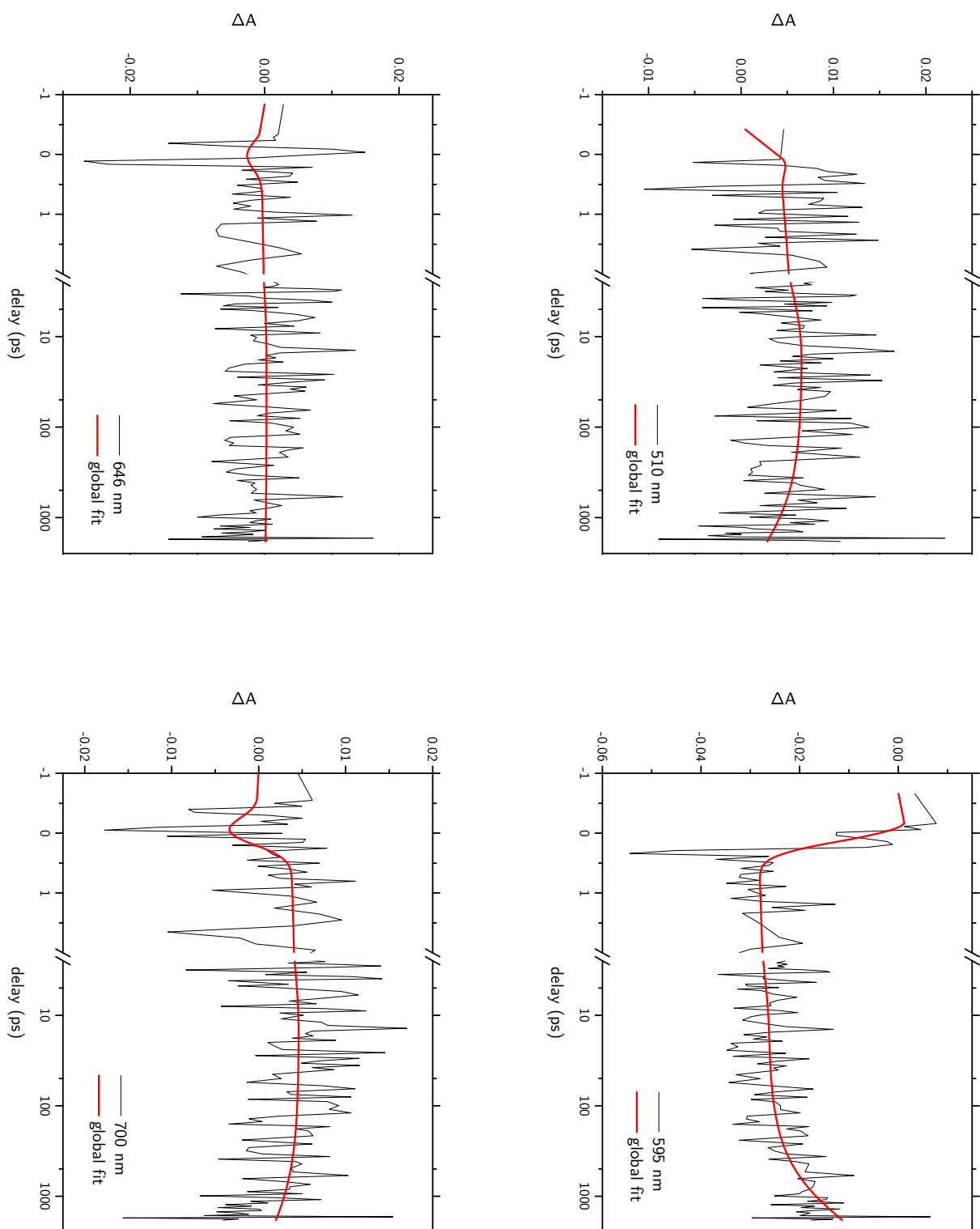


Figura 3.17: Cinetiche di assorbimento transiente per il complesso ipecina-apoMb, $\lambda_{\text{pump}} = 545 \text{ nm}$.

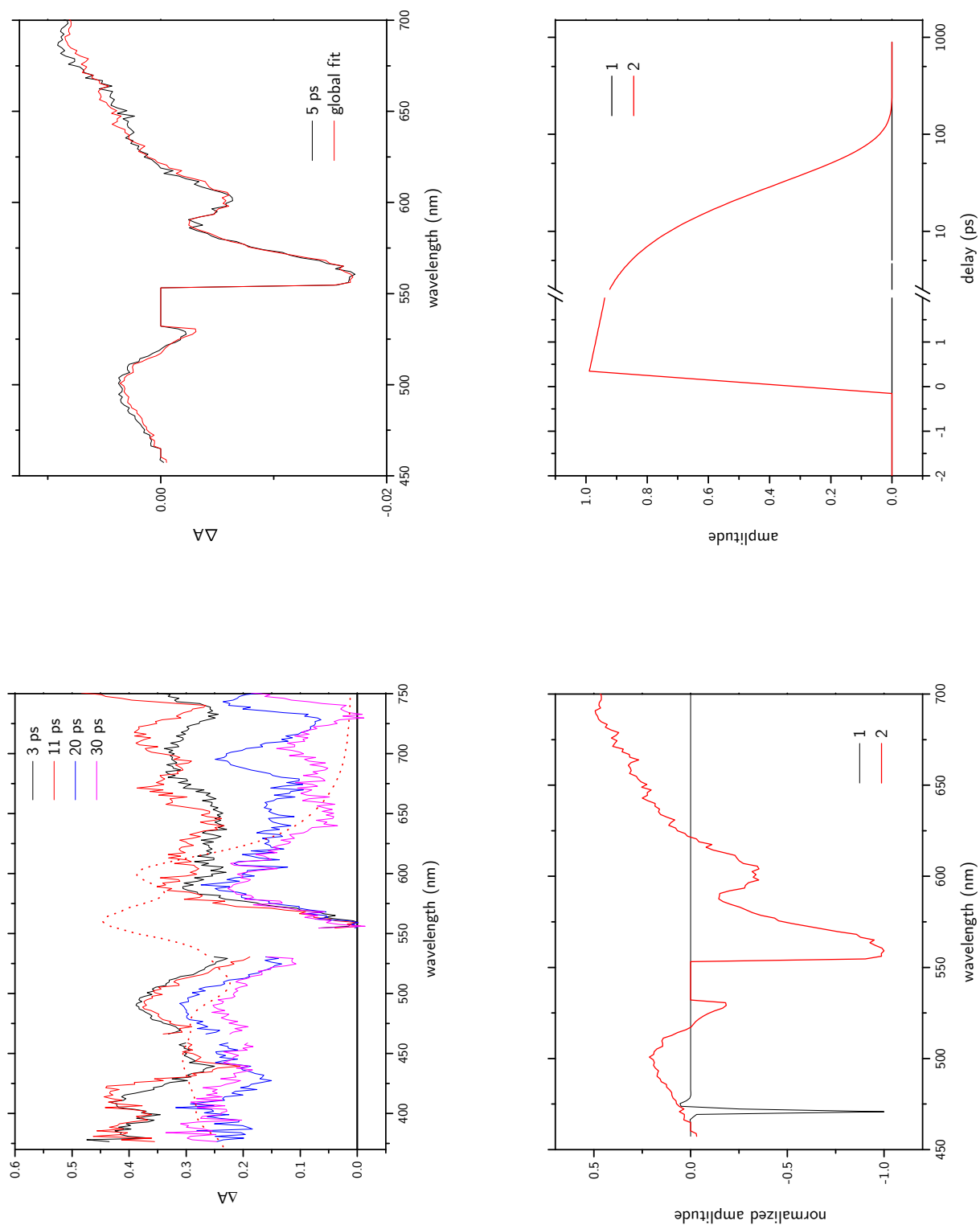


Figura 3.18: Spettri di assorbimento transiente per ipericina in tampone a pH 10, $\lambda_{\text{pump}} = 545 \text{ nm}$.

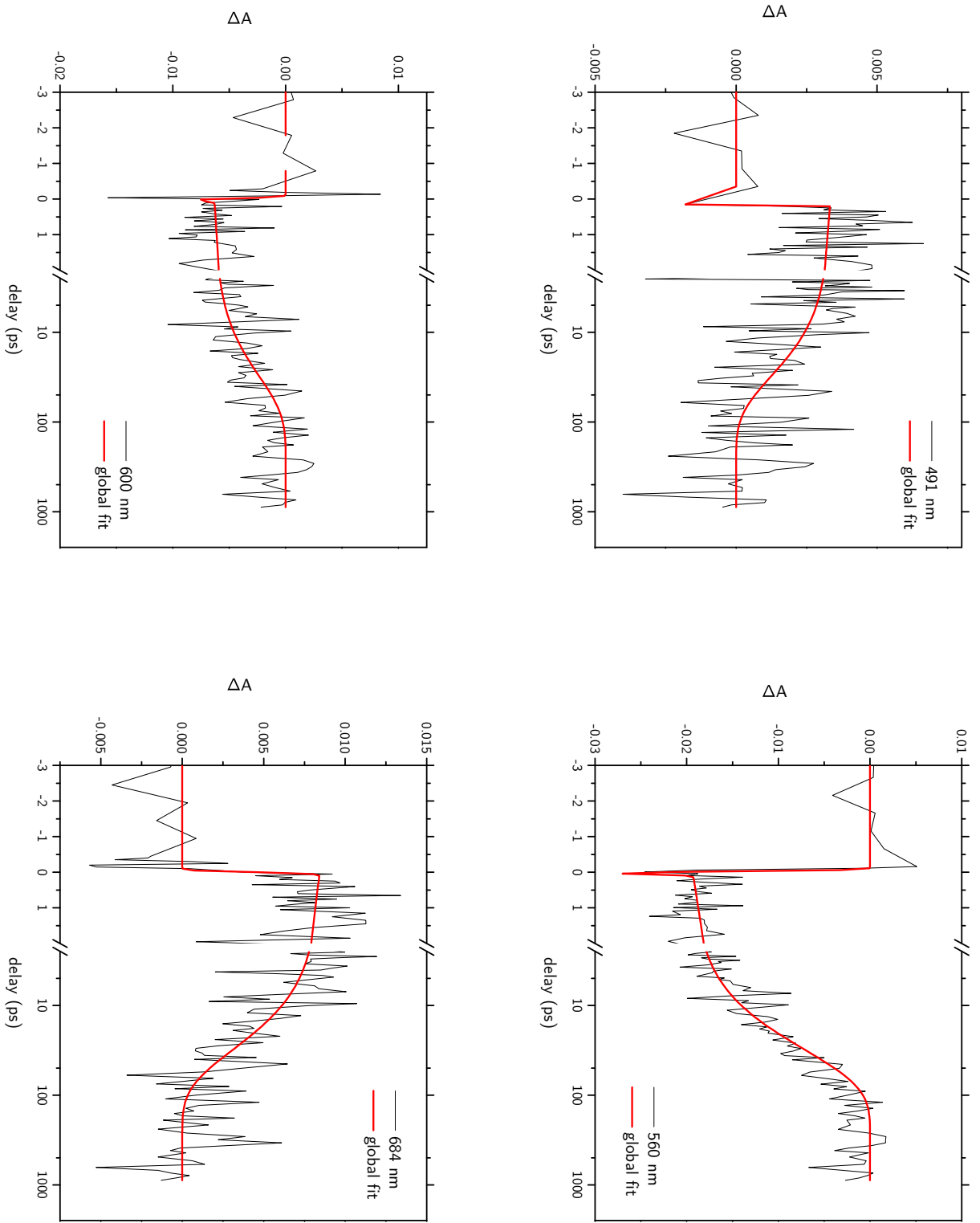
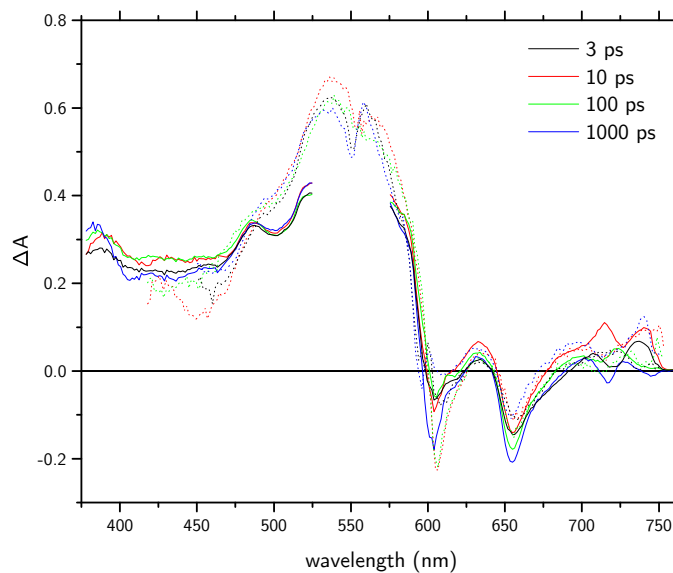
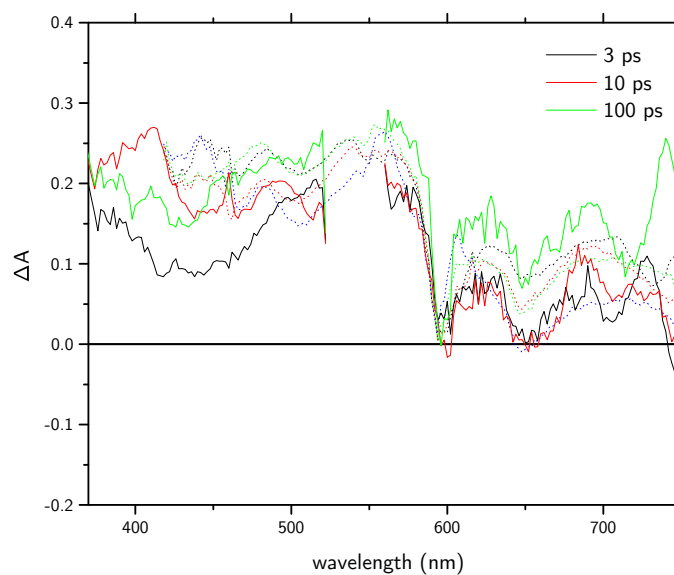


Figura 3.19: Cinetiche di assorbimento transiente per ipericina in tampone a pH 10, $\lambda_{\text{pump}} = 545$ nm.



(a)



(b)

Figura 3.20: In alto: confronto degli spettri transienti dell'ipericina in DMSO per $\lambda_{\text{pump}} = 400$ nm (linea tratteggiata) e 555 nm. In basso lo stesso confronto per il complesso con $\lambda_{\text{pump}} = 400$ nm (linea tratteggiata) e 545 nm.

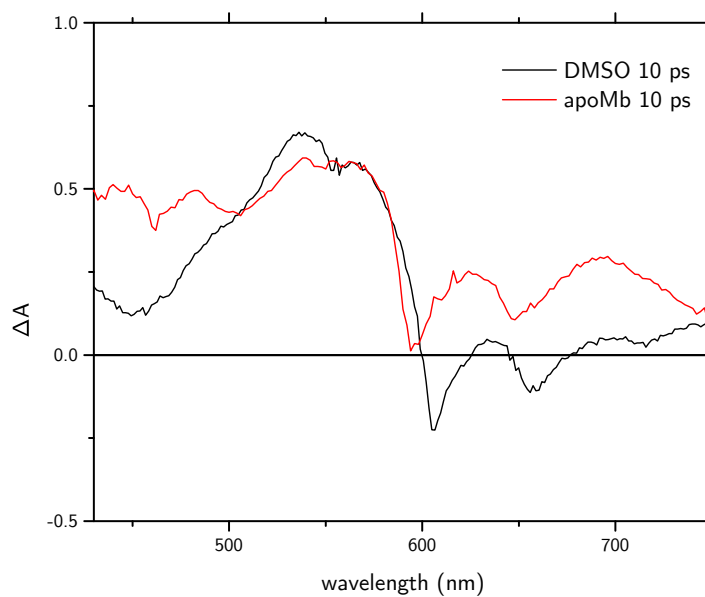


Figura 3.21: Confronto tra gli spettri transienti dell'ipericina in DMSO e in complesso con apoMb per $\tau = 10$ ps e $\lambda_{\text{pump}} = 400$ nm. Gli spettri sono normalizzati al massimo dell'assorbanza stazionaria.

Capitolo 4

Applicazioni alla microscopia STED

4.1 Apparato sperimentale

Nel capitolo precedente si è mostrato che l'ipericina in DMSO o in complesso con l'apomioglobina presenta in corrispondenza delle transizioni di fluorescenza due regioni spettrali dominate dall'emissione stimolata, e soddisfa quindi la condizione necessaria affinché il composto sia applicabile alla microscopia STED. Una caratterizzazione più completa dei fluorofori richiede di valutarne l'intensità di saturazione I_s che compare nelle 2.10 e 2.13 e la resistenza al *photobleaching*. Il modo più diretto di ottenere queste informazioni è attraverso lo studio diretto del fluoroforo tramite un microscopio STED: in questo capitolo si riportano i risultati ottenuti presso l'IIT (Istituto Italiano di Tecnologia) di Genova.

Il microscopio STED impiegato è schematizzato in figura 4.1 e descritto in dettaglio nel riferimento [38]. Lo strumento è stato progettato per ridurre la complessità del sistema di generazione degli impulsi di eccitazione e di STED pur mantenendo una completa accordabilità nel visibile che si basa su metodo alternativo ad una cascata di sistemi non lineari come quella descritta nel capitolo precedente. Lo svantaggio di un tale sistema risiede nella necessità di usare impulsi ultracorti, per necessità energetiche, al fine di alimentare tutti i processi non lineari richiesti. Come illustrato nella sezione 2.2.1 la durata ideale degli impulsi di STED è invece dell'ordine di una frazione della vita media di fluorescenza dei fluorofori, quindi tipicamente nell'intervallo 0.1 – 2 ns. Per questa ragione un sistema basato su un OPO/OPG richiede necessariamente un sistema di dispersione temporale degli impulsi (reticoli, fibre ...) che complica ulteriormente il dispositivo e ne aumenta il costo. Una valida alternativa consiste nell'usare una sorgente continua di luce coerente impulsata (*'laser bianco'*) che opportunamente filtrata fornisca sia la sorgente di eccitazione che quella di STED. Nel siste-

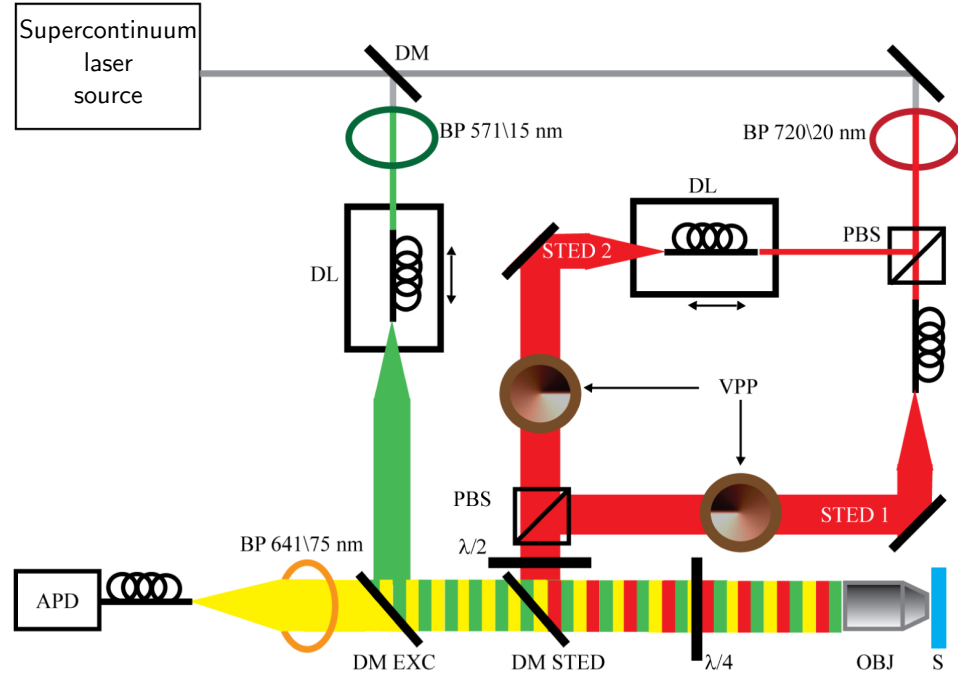


Figura 4.1: Schema ottico del microscopio STED impiegato, preso dal riferimento [38].

ma impiegato la sorgente è un laser supercontinuo in fibra con frequenza di ripetizione di 2 MHz (Fianium, UK) dal quale si ottengono gli impulsi di eccitazione e di STED tramite due filtri passa banda (BP in figura 4.1). La durata degli impulsi, di circa 80 ps è adatta all'eccitazione e alla *depletion* dei fuorofori senza ulteriori modifiche, mentre la temporizzazione relativa degli impulsi è controllata mediante due *delay line* (DL). Per controllare la polarizzazione del fascio di STED (che deve risultare circolare sul campione) questo viene separato in due componenti con polarizzazione ortogonale da un *beam splitter* polarizzatore. Entrambi i fasci passano da un *vortex ottico* opportunamente orientato e successivamente ricomposti da un *beam splitter*. La polarizzazione circolare e di orientazione opposta dei fasci di STED è ottenuta mediante la lamina a $\lambda/4$ posta prima dell'obiettivo di focalizzazione (HCX PL APO 100 $\times$ /1.4 Oil STED orange, Leica Microsystems, Germany). La lamina a $\lambda/2$ posta prima dello specchio diroico deviante il fascio di STED (DM STED) migliora la qualità della polarizzazione lineare del fascio sopprimendo le componenti depolarizzate. La fluorescenza del campione è raccolta dal medesimo obiettivo e focalizzata sull'estremità di una fibra ottica multimodo accoppiata con un fotodiodo a valanga (APD) che funge da rivelatore. La scansione del campione nelle tre dimensioni spaziali avviene tramite un sistema piezoelettrico di precisione.

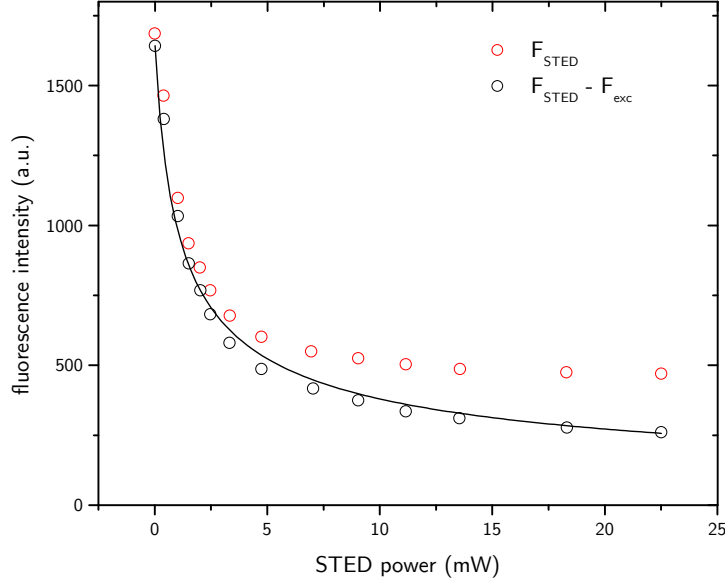


Figura 4.2: Curva di *depletion* per il complesso ipericina-apoMb, $\lambda_{\text{ex}} = 580$ nm, $\lambda_{\text{STED}} = 715$ nm. F_{STED} è l'intensità di fluorescenza in presenza di entrambi i beam di eccitazione e di STED, F_{exc} è l'eccitazione diretta del fascio di STED. La curva nera rappresenta il *fit* secondo la 2.13.

4.2 Curva di *depletion* del complesso hyp-apoMb

L'intensità di saturazione di un fluoroforo si può ricavare direttamente da una serie di immagini di fluorescenza di un campione raccolta al variare dell'intensità del fascio di STED. La figura 4.2 mostra in rosso i valori di intensità di fluorescenza integrata su una regione spaziale estesa di un vetrino cosparso di una soluzione del complesso hyp-apoMb in tampone. La fluorescenza, dovuta a singole molecole in soluzione o a piccoli aggregati, decresce evidentemente all'aumentare della potenza del fascio di STED. Un'analoga serie di immagini raccolta in presenza del solo fascio di STED permette di individuare il contributo indesiderato di eccitazione dovuto alla *depletion*: in questo caso a causa della regione spettrale non ideale per la STED ($\lambda_{\text{STED}} = 715$ nm) l'eccitazione diretta non è trascurabile ma l'effetto dominante rimane comunque l'emissione stimolata. I valori di fluorescenza corretti per l'eccitazione diretta del fascio di STED sono mostrati in nero, insieme al *fit* secondo la 2.13: la diminuzione dell'intensità di fluorescenza dovuta alla STED è chiaramente pari al guadagno di risoluzione dovuto al restringimento della PSF. Il valore che si ricava per l'intensità di saturazione è $I_s = (0.56 \pm 0.02)$ mW.

4.3 Immagini a super-risoluzione di cellule in vita

In questa sezione si presenta una collezione di immagini di microscopia STED relativa a diverse cellule, batteriche e umane. Tutte le immagini sono state ottenute con il sistema descritto sopra con $\lambda_{\text{ex}} = 570$ nm, $\lambda_{\text{STED}} = 715$ nm, dopo aver incubato le colture cellulari in una soluzione del complesso hyp-apoMb in tampone (concentrazione di ipericina $\simeq 1$ mM). In alcuni casi si riporta il confronto tra l'immagine confocale (senza il fascio di STED) e la corrispettiva immagine a super-risoluzione, insieme ad un grafico del profilo dell'intensità di fluorescenza lungo un segmento che permette di quantificare il guadagno di potere risolutivo. Queste verifiche sperimentali hanno anche permesso di valutare come trascurabile il *bleaching* del fluoroforo: la ripetizione di diverse immagini del medesimo oggetto non hanno evidenziato apprezzabile diminuzione dell'intensità di fluorescenza.

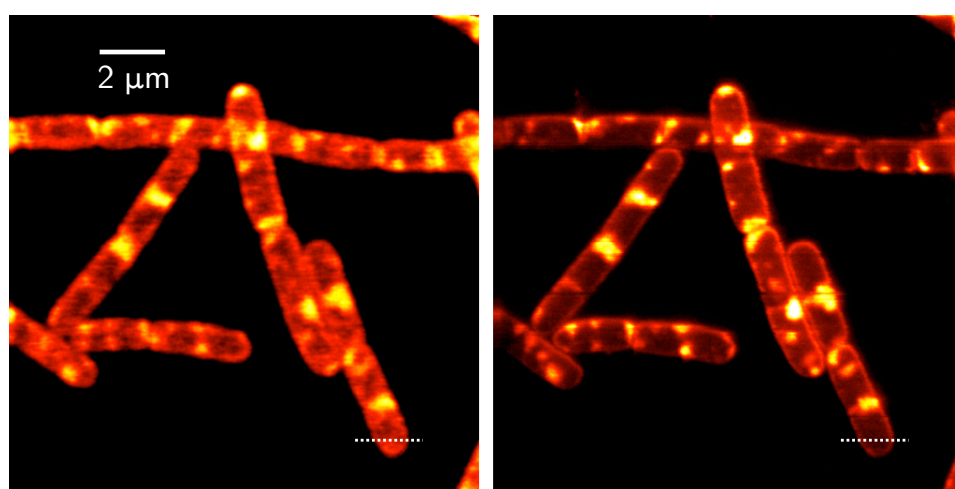
Alcune prove, svolte incubando le colture direttamente con ipericina, non hanno mostrato differenze qualitative nella distribuzione del fluoroforo nelle strutture cellulari e nella qualità delle immagini, ragione per cui si ritiene che l'ipericina in prossimità di strutture cellulari si ripartisca tra queste e l'apomioglobina. Una parziale conferma di questo fatto è fornita da misure di anisotropia di fluorescenza e di spettroscopia di correlazione di fluorescenza (FCS) svolte su liposomi incubati con il complesso hyp-apoMb. Da quest'ultime in particolare è emerso che in soluzione convivono due specie fluorescenti caratterizzate da coefficienti di diffusione attribuibili all'ipericina in complesso con apoMb e nella membrana dei liposomi. L'effettiva ripartizione dell'ipericina è tuttavia ancora da chiarire e necessita ulteriori indagini.

4.3.1 Distribuzione dell'ipericina e fotosensibilizzazione

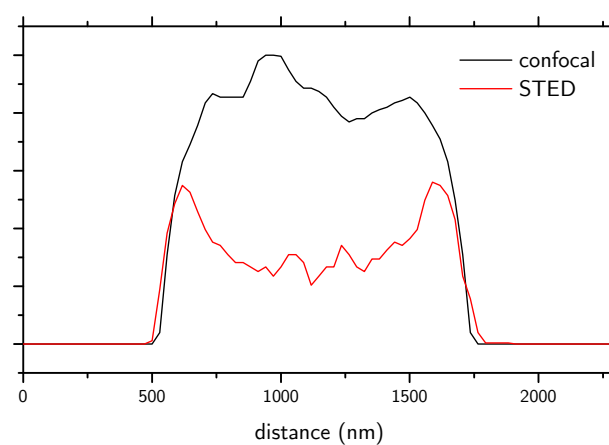
La distribuzione dei fluorofori nelle cellule di *Bacillus subtilis* (Gram-positivo) e *Escherichia coli* (Gram-negativo) (figure 4.3 e 4.4) mostra che il colorante si localizza preferenzialmente nella membrana plasmatica e nei poli di contatto tra i batteri. I profili dell'intensità di fluorescenza evidenziano il guadagno di risoluzione nelle immagini STED, in particolare dalla 4.3(b) si nota come nell'immagine confocale non sia affatto risolta la membrana cellulare che invece appare distintamente nella corrispettiva immagine STED, con uno spessore dell'ordine di 200 nm. Similmente nella versione confocale della 4.4(b) le membrane hanno uno spessore apparente superiore a 500 nm, che si riduce a meno della metà nella corrispettiva STED.

In cellule eucariotiche (linee PC3, da carcinoma prostatico umano in figura 4.5 e HeLa nelle figure 4.6 e 4.7) il carattere lipofilo dell'ipericina è confermato da un'analoga predilezione per la membrana plasmatica e nucleare della cellula nonché per il reticolo endoplasmatico.

L'*imaging* di queste cellule ha permesso di mettere in luce gli effetti della fotosensibilizzazione dell'ipericina indotta dai fasci di eccitazione e STED durante lo svolgimento delle misure: in figura 4.5 si nota la presenza di una piccola vescicola tondeggiante all'esterno della membrana plasmatica, risultato dalla produzione di specie citotossiche conseguente all'intensa illuminazione dei fasci. Le cellule HeLa mostrano ancora più evidenti esiti di *necrosi* cellulare sotto forma di analoghe vescicole all'esterno della membrana cellulare che si ingrandiscono e infine si distaccano rompendo la continuità della membrana.

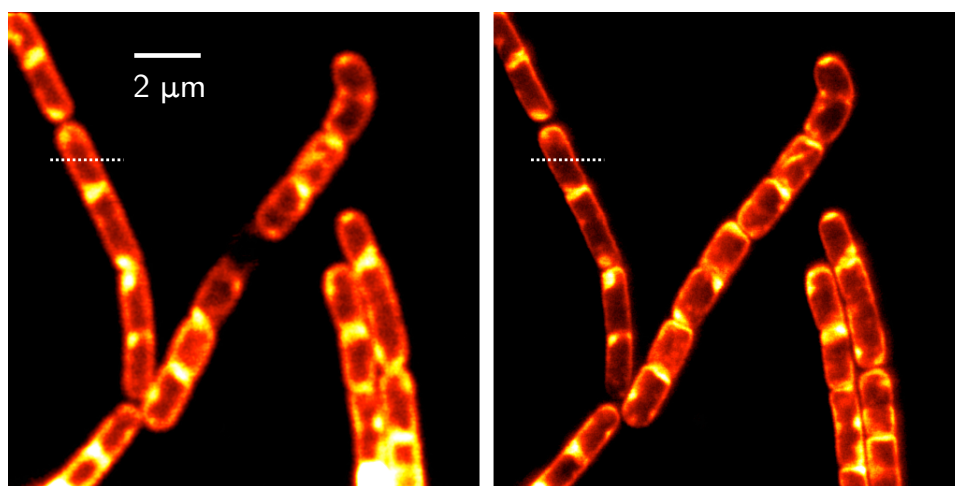


(a)

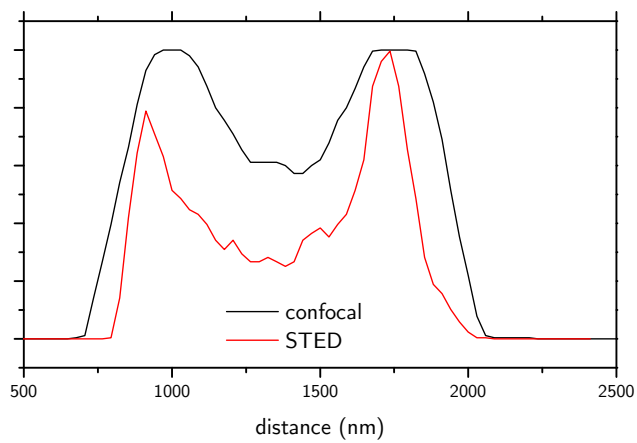


(b)

Figura 4.3: (a) Immagini di *Bacillus subtilis* confocale (a sinistra) e STED (a destra). (b) Profilo lineare delle immagini nei segmenti indicati in tratteggio.



(a)



(b)

Figura 4.4: (a) Immagini di *Escherichia coli* confocale (a sinistra) e STED (a destra). (b) Profilo lineare delle immagini nei segmenti indicati in tratteggio.

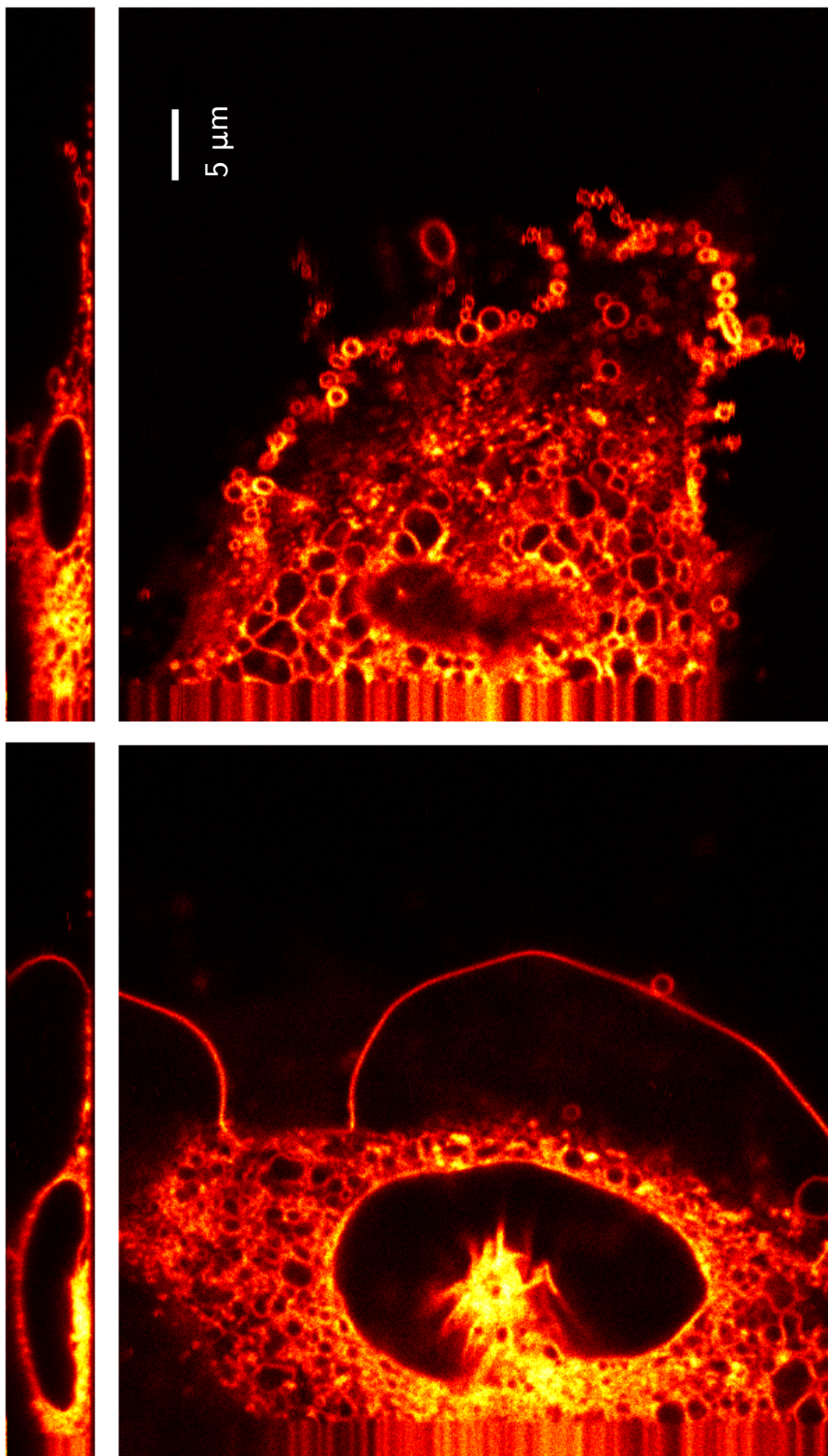


Figura 4.5: Immagini di una cellula PC3 incubata con il complesso hyp-apoMb. Le immagini in basso sono sul piano orizzontale xy mentre quelle in alto sul piano verticale xz .

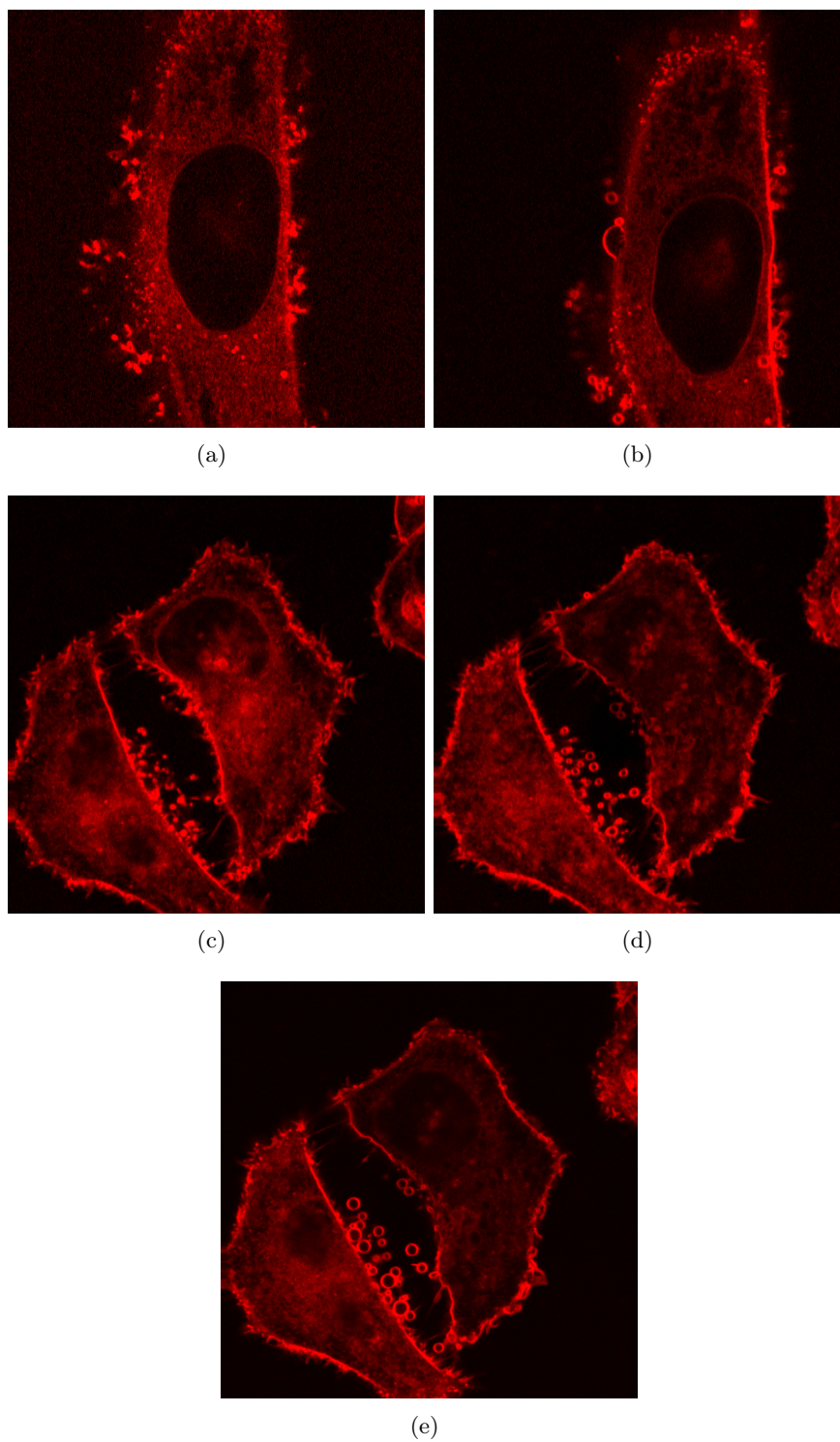


Figura 4.6: Immagini STED di cellule HeLa incubate con il complesso, $50 \times 50 \mu\text{m}$. Le immagini in sequenza sono raccolte con un ritardo di qualche minuto.

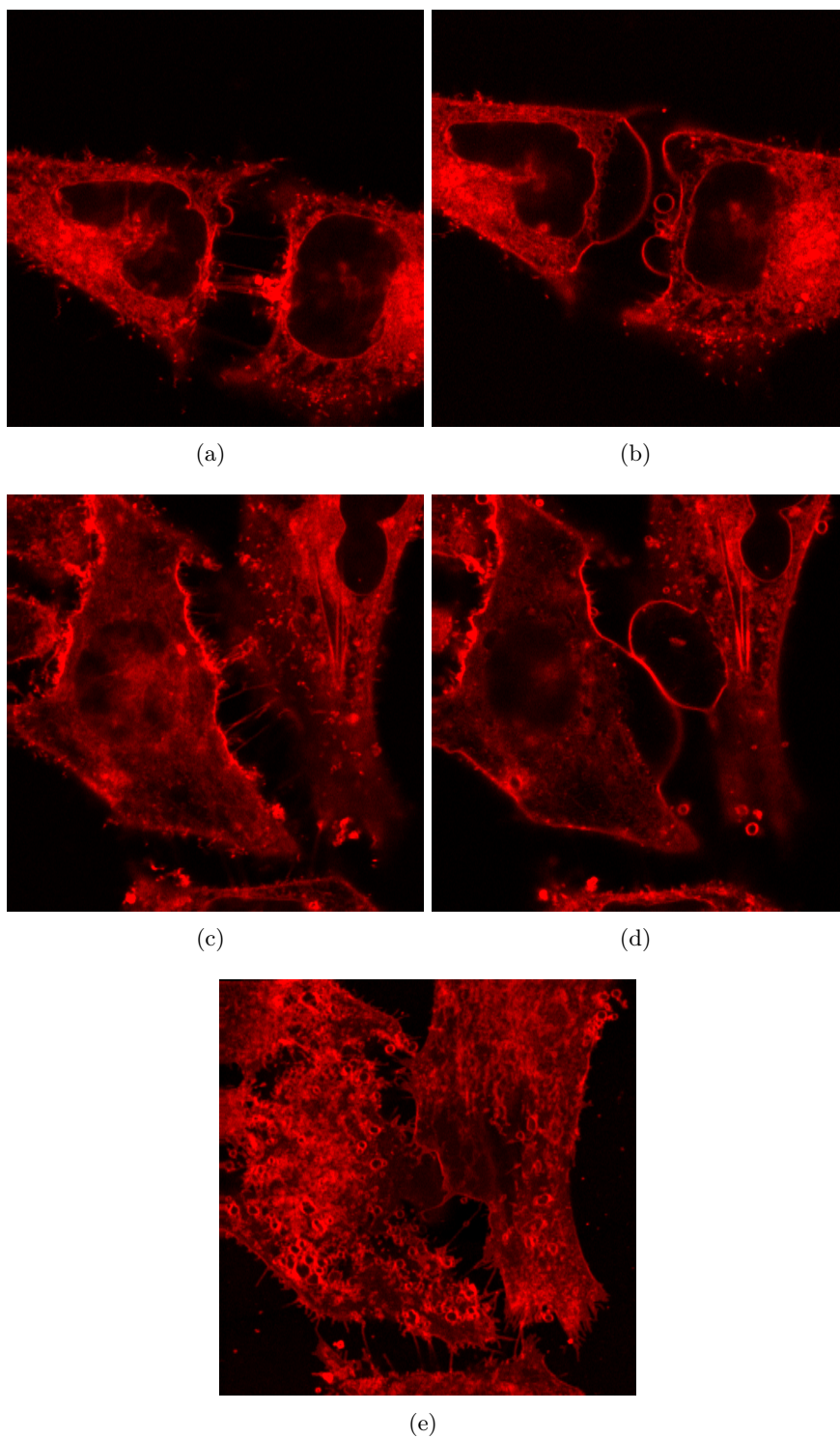


Figura 4.7: Immagini STED di cellule HeLa incubate con il complesso, $50 \times 50 \mu\text{m}$. Le immagini in sequenza sono raccolte con un ritardo di qualche minuto.

Conclusioni

La caratterizzazione spettroscopica articolata nei capitoli precedenti ha mostrato che il complesso ipericina-apomioglobina è un valido principio *teranostico*: le proprietà del complesso e dell'ipericina diffusa nelle strutture cellulari ne permettono l'applicazione in microscopia di fluorescenza a super-risoluzione STED e di conseguenza lo studio delle proprietà di fotosensibilizzazione ad un livello di risoluzione sub-cellulare, come mostrato nel capitolo 4.

Tra le questioni che rimangono da indagare è auspicabile una comprensione più approfondita della partizione dell'ipericina tra il *carrier* proteico e le strutture cellulari, in particolare in quale misura la fotosensibilizzazione sia attribuibile al complesso o all'ipericina diffusa nei compartimenti cellulari. A questo scopo sono previsti due esperimenti da condurre con una proteina fluorescente di fusione (apoMb + GFP, *Green Fluorescent Protein*) e con un complesso covalente dell'apomioglobina legato ad una variante del gruppo eme.

Il primo esperimento permetterebbe di studiare i due segnali di fluorescenza distinti, quello dell'ipericina e quello del vettore, per stabilire in quale misura l'ipericina si dissocia dal complesso e diffonde nei compartimenti cellulari.

Il secondo esperimento permetterebbe invece di studiare la fotosensibilizzazione indotta da un complesso che non dà luogo a dissociazione o partizione essendo legato covalentemente. A questo scopo è previsto l'impiego di un complesso dell'apomioglobina con una variante del gruppo eme naturale, con un atomo di zinco coordinato dall'anello porfirinico al posto di quello di ferro. Tale complesso è un appurato fotosensibilizzatore di ossigeno singoletto e pure debolmente fluorescente: l'*imaging* di fluorescenza di cellule incubate con il complesso, se possibile, permetterebbe quindi di stabilire le caratteristiche della fotosensibilizzazione indotta unicamente dal sistema legato. Tra le prospettive future che meritano di essere indagate vi è poi la funzionalizzazione del complesso finalizzata al legame selettivo con specifici recettori espressi sulla membrana plasmatica: anche in questo caso si potrebbe studiare l'effetto della generazione di specie citotossiche in particolari distretti della cellula bersaglio.

Appendice A

Campioni e strumentazione

A.1 Materiali

La mioglobina da cuore di cavallo è stata acquistata da Sigma-Aldrich, l'ipericina da HWI Analytik GmbH; i solventi impiegati avevano una purezza di grado spettrofotometrico.

Dopo la preparazione tutti i campioni sono stati conservati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, per i campioni contenenti ipericina si è anche cercato di evitare per quanto possibile l'esposizione alla luce ambientale, per impedire possibili effetti di fotodanneggiamentoⁱ.

A.1.1 Preparazione dell'apomioglobina

La apomioglobina è stata ricavata a partire da mioglobina equina seguendo il metodo del “metil-etil chetone” (butanone) descritto nel riferimento [14]. La preparazione è stata effettuata interamente a freddo. In questo metodo l'eme viene separato per parziale denaturazione acida della mioglobina: una soluzione concentrata di proteina in tampone (pH 7.4) viene portata a pH intorno a 2 titolando con acido cloridrico. Allo *stock* ottenuto viene aggiunto un volume circa uguale di butanone e quindi si sottopone la soluzione ad una vigorosa agitazione. L'eme separatosi dalla proteina, data la natura idrofobica, tende ad affiorare e può essere facilmente asportato. La soluzione di apomioglobina ottenuta è stata quindi sottoposta a diversi cicli di dialisi, prima in acqua e successivamente in tampone PBS 10 mM a pH 7.4. La concentrazione dello *stock* di apomioglobina in PBS è stata calcolata dall'assorbanza a 280 nm noto il coefficiente di estinzione molare $\varepsilon_{280} = 15800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La contaminazione di eme residuo nello *stock* è stata valutata dallo spettro di assorbimento nella banda di Soret (408 nm, $\varepsilon_{408} = 179000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ed è risultata minore del 2%.

ⁱSoluzioni di ipericina conservate a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e in oscurità sono stabili per più di 150 giorni [7].

A.2 Spettri di stato stazionario

Gli spettri di assorbimento sono stati misurati con uno spettrofotometro Jasco V-650 (Jasco Europe S.r.l., Italy) mentre quelli di emissione, eccitazione e relative anisotropie con uno spettrofluorimetro Perkin Elmer LS 50 (Perkin Elmer, Italy). Gli spettri presentati nel capitolo 3 sono stati invece misurati con uno spettrofotometro Perkin Elmer Lambda-950. Tutti gli spettri di fluorescenza riportati sono stati raccolti il campione termostato a 20 °C. Tutti i campioni sono stati misurati in *cuvette* di quarzo con cammino ottico di 4 mm se non diversamente specificato.

Anisotropia di fluorescenza

L'anisotropia di fluorescenza r è definita come

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (\text{A.1})$$

dove $I_{\parallel}$ è l'intensità della radiazione di fluorescenza parallela al piano di polarizzazione della luce di eccitazione e $I_{\perp}$ quella perpendicolare. Il denominatore della A.1 è pari all'intensità di emissione totale per transizioni di dipolo.

Sperimentalmente per misurare l'anisotropia non si applica direttamente la definizione A.1 perché in generale i monocromatori presenti nei fluorimetri hanno una diversa efficienza per le polarizzazioni verticale e orizzontale della luce raccolta. Un'espressione che tiene conto della necessaria correzione si ottiene combinando quattro misure, con tutte le combinazioni dei polarizzatori di ingresso e di uscita [16]

$$r = \frac{I_{vv} - gI_{vh}}{I_{vv} + 2gI_{vh}} \quad (\text{A.2})$$

$$g = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}$$

dove il primo pedice indica la posizione del polarizzatore di ingresso ed il secondo quella del polarizzatore di uscita.

A.3 *Laser Flash Photolysis*

Si è impegnato un sistema con geometria a 90° tra il fascio di pompa e di sonda, costituiti rispettivamente dalla seconda armonica di un laser Nd:YAG (532 nm) e dalla luce di una lampada allo xenon filtrata in lunghezza d'onda da un monocromatore. Un secondo monocromatore interposto tra il campione e il rivelatore a fotomoltiplicatore permette di selezionare la lunghezza d'onda di rivelazione. La sorgente di pompa è impulsata al nanosecondo e ha

una frequenza di ripetizione impostata a 0.5 Hz, con un'energia per impulso intorno a 10 mJ. All'uscita del primo monocromatore, prima del campione, è presente uno *shutter* meccanico che permette di sincronizzare la presenza del fascio di sonda con l'arrivo dell'impulso laser di eccitazione, in modo da non sottoporre il campione alla luce quando non necessario. Il segnale rivelato dal fotomoltiplicatore, proporzionale all'intensità della luce trasmessa, viene digitalizzato da un oscilloscopio digitale (LeCroy LT374, banda passante 500 MHz, campionamento a 8 bit - 4 GS/s) e inviato ad un computer per l'elaborazione.

Per ciascun campione viene misurato sia il segnale in presenza del fascio di pompa sia quello in assenza, in modo da ricavare la variazione di trasmittanza o di assorbanza relative. La misura viene ripetuta e mediata circa un centinaio di volte sia in presenza che in assenza di pompa al fine di migliorare il rapporto segnale/rumore.

Bibliografia

- [1] X. Chen, S. S. Gambhir e J. Cheon. «Theranostic Nanomedicine». In: *Accounts of Chemical Research* 44.10 (2011), pp. 841–841. DOI: 10.1021/ar200231d.
- [2] J. Comas-Barcelo et al. «A self-assembled nanostructured material with photosensitising properties». In: *RSC Adv.* 3 (39 2013), pp. 17874–17879. DOI: 10.1039/C3RA42609B.
- [3] P. Delcanale. «Sviluppo di nanostrutture basate su proteine per applicazioni in terapia fotodinamica dei tumori». Tesi di Laurea Magistrale. Università degli Studi di Parma, a.a. 2012-2013.
- [4] H. Falk. «From the Photosensitizer Hypericin to the Photoreceptor Stentorin— The Chemistry of Phenanthroperylene Quinones». In: *Angewandte Chemie International Edition* 38.21 (1999), pp. 3116–3136. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19991102)38:21<3116::AID-ANIE3116>3.0.CO;2-S.
- [5] A. Giese. «Hypericism». In: *Photochemical and Photobiological Reviews*. A cura di K. Smith. Springer US, 1980, pp. 229–255. DOI: 10.1007/978-1-4684-3641-9_6.
- [6] S. Sandberg e M. Berenbaum. «Leaf-tying by tortricid larvae as an adaptation for feeding on phototoxic *Hypericum perforatum*». In: *Journal of Chemical Ecology* 15.3 (1989), pp. 875–885. DOI: 10.1007/BF01015183.
- [7] A. Karioti e A. R. Bilia. «Hypericins as potential leads for new therapeutics». In: *International journal of molecular sciences* 11.2 (2010), pp. 562–594. DOI: 10.3390/ijms11020562.
- [8] R. C. Guedes e L. A. Eriksson. «Theoretical study of hypericin». In: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 172.3 (2005), pp. 293–299. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2004.12.025.
- [9] J. Uličný e A. Laaksonen. «Hypericin, an intriguing internally heterogeneous molecule, forms a covalent intramolecular hydrogen bond». In: *Chemical Physics Letters* 319.3–4 (2000), pp. 396–402. DOI: 10.1016/S0009-2614(00)00178-0.

- [10] J. L. Wynn e T. M. Cotton. «Spectroscopic Properties of Hypericin in Solution and at Surfaces». In: *The Journal of Physical Chemistry* 99.12 (1995), pp. 4317–4323. DOI: 10.1021/j100012a063.
- [11] D. S. English et al. «Hypericin, Hypocrellin, and Model Compounds: Primary Photoprocesses of Light-Induced Antiviral Agents». In: *The Journal of Physical Chemistry A* 101.18 (1997), pp. 3235–3240. DOI: 10.1021/jp963046g.
- [12] F. Wilkinson, W. P. Helman e A. B. Ross. «Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution». In: *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 22.1 (1993), pp. 113–262. DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.555934>.
- [13] D. S. English et al. «Excited-State Photophysics of Hypericin and Its Hexamethoxy Analog: Intramolecular Proton Transfer as a Nonradiative Process in Hypericin». In: *Journal of the American Chemical Society* 119.13 (1997), pp. 2980–2986. DOI: 10.1021/ja962476h.
- [14] F. Ascoli, M. R. Rossi Fanelli e E. Antonini. «Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins». In: *Hemoglobins*. A cura di E. C. Eraldo Antonini Luigi Rossi-Bernardi. Vol. 76. Methods in Enzymology. Academic Press, 1981, pp. 72–87. DOI: 10.1016/0076-6879(81)76115-9.
- [15] M. Gulotta et al. «Primary folding dynamics of sperm whale apomyoglobin: core formation». In: *Biophysical journal* 84.3 (2003), pp. 1909–1918. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74999-6.
- [16] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd edition. Springer, 2010.
- [17] K. Das et al. «Hypericin, Hypocrellin, and Model Compounds: Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Anisotropies». In: *The Journal of Physical Chemistry B* 102.8 (1998), pp. 1479–1484. DOI: 10.1021/jp973059+.
- [18] A. Losi. «Fluorescence and Time-Resolved Photoacoustics of Hypericin Inserted in Liposomes: Dependence on Pigment Concentration and Bilayer Phase». In: *Photochemistry and Photobiology* 65.5 (1997), pp. 791–801. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb01926.x.
- [19] T. Hankeln et al. «Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family». In: *Journal of Inorganic Biochemistry* 99.1 (2005). Heme-diatomic interactions, Part 1, pp. 110–119. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.11.009>.

- [20] S. Abbruzzetti et al. «Ligand migration through the internal hydrophobic cavities in human neuroglobin». In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.45 (2009), pp. 18984–18989. DOI: 10.1073/pnas.0905433106.
- [21] M. Gabba et al. «CO Rebinding Kinetics and Molecular Dynamics Simulations Highlight Dynamic Regulation of Internal Cavities in Human Cytoglobin». In: *PLoS ONE* 8.1 (gen. 2013), e49770. DOI: 10.1371/journal.pone.0049770.
- [22] E. K. Abbe. «Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung». In: *Archiv für mikroskopische Anatomie* 9.1 (1873), pp. 413–418. DOI: 10.1007/BF02956173.
- [23] J. W. S. Lord Rayleigh. «XXXI. Investigations in optics, with special reference to the spectroscope». In: *Philosophical Magazine Series 5* 8.49 (1879), pp. 261–274. DOI: 10.1080/14786447908639684.
- [24] M. Born e E. Wolf. *Principles of Optics*. 7th edition. Cambridge University Press, 1999.
- [25] G. Toraldo di Francia. «Super-gain antennas and optical resolving power». In: *Il Nuovo Cimento* 9.3 (1952), pp. 426–438. DOI: 10.1007/BF02903413.
- [26] G. Toraldo di Francia. *La diffrazione della luce*. Edizioni Scientifiche Einaudi, 1958.
- [27] Wikipedia. *Circular aperture variables*. 2009. URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ACircular_aperture_variables.svg.
- [28] G. Toraldo di Francia. «Resolving Power and Information». In: *J. Opt. Soc. Am.* 45.7 (lug. 1955), pp. 497–499. DOI: 10.1364/JOSA.45.000497.
- [29] W. Lukosz. «Optical Systems with Resolving Powers Exceeding the Classical Limit». In: *J. Opt. Soc. Am.* 56.11 (nov. 1966), pp. 1463–1471. DOI: 10.1364/JOSA.56.001463.
- [30] S. W. Hell. «Far-Field Optical Nanoscopy». In: *Science* 316.5828 (2007), pp. 1153–1158. DOI: 10.1126/science.1137395.
- [31] L. Schermelleh, R. Heintzmann e H. Leonhardt. «A guide to super-resolution fluorescence microscopy». In: *The Journal of Cell Biology* 190.2 (2010), pp. 165–175. DOI: 10.1083/jcb.201002018.
- [32] M. G. L. Gustafsson. «Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution». In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.37 (2005), pp. 13081–13086. DOI: 10.1073/pnas.0406877102.

- [33] S. W. Hell e J. Wichmann. «Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy». In: *Opt. Lett.* 19.11 (giu. 1994), pp. 780–782. DOI: 10.1364/OL.19.000780.
- [34] T. A. Klar e S. W. Hell. «Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy». In: *Opt. Lett.* 24.14 (lug. 1999), pp. 954–956. DOI: 10.1364/OL.24.000954.
- [35] T. A. Klar et al. «Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission». In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.15 (2000), pp. 8206–8210. DOI: 10.1073/pnas.97.15.8206.
- [36] M. Dyba e S. W. Hell. «Focal Spots of Size $\lambda/23$ Open Up Far-Field Fluorescence Microscopy at 33 nm Axial Resolution». In: *Phys. Rev. Lett.* 88 (16 apr. 2002), p. 163901. DOI: 10.1103/PhysRevLett.88.163901.
- [37] G. Kino e T. Corle. *Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems*. Academic Press, 1995.
- [38] S. Galiani et al. «Strategies to maximize the performance of a STED microscope». In: *Opt. Express* 20.7 (mar. 2012), pp. 7362–7374. DOI: 10.1364/OE.20.007362.
- [39] M. Bouzin et al. «Stimulated Emission Properties of Fluorophores by CW-STED Single Molecule Spectroscopy». In: *The Journal of Physical Chemistry B* 117.51 (2013), pp. 16405–16415. DOI: 10.1021/jp409330t.
- [40] V. Westphal e S. W. Hell. «Nanoscale Resolution in the Focal Plane of an Optical Microscope». In: *Phys. Rev. Lett.* 94 (14 apr. 2005), p. 143903. DOI: 10.1103/PhysRevLett.94.143903.
- [41] E. Rittweger et al. «STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution». In: *Nature Photonics* 3.3 (2009), pp. 144–147. DOI: 10.1038/NPHOTON.2009.2.
- [42] G. Donnert et al. «Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy». In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.31 (2006), pp. 11440–11445. DOI: 10.1073/pnas.0604965103.
- [43] P. Tinnefeld et al. «Higher-Excited-State Photophysical Pathways in Multichromophoric Systems Revealed by Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy». In: *ChemPhysChem* 5.11 (2004), pp. 1786–1790. DOI: 10.1002/cphc.200400325.
- [44] G. Donnert, C. Eggeling e S. W. Hell. «Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation». In: *Nature methods* 4.1 (2007), pp. 81–86. DOI: 10.1038/nmeth986.

- [45] R. Kasper et al. «Single-Molecule STED Microscopy with Photostable Organic Fluorophores». In: *Small* 6.13 (2010), pp. 1379–1384. DOI: 10.1002/smll.201000203.
- [46] K. I. Willig et al. «STED microscopy with continuous wave beams». In: *Nature Methods* 4 (2007), pp. 915–918. DOI: 10.1038/nmeth1108.
- [47] G. Vicidomini et al. «Sharper low-power STED nanoscopy by time gating». In: *Nature Methods* 8 (2011), pp. 571–573. DOI: 10.1038/nmeth.1624.
- [48] G. Moneron e S. W. Hell. «Two-photon excitation STED microscopy». In: *Opt. Express* 17.17 (ago. 2009), pp. 14567–14573. DOI: 10.1364/OE.17.014567.
- [49] P. Bianchini et al. «Single-wavelength two-photon excitation stimulated emission depletion (SW2PE-STED) superresolution imaging». In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2012). DOI: 10.1073/pnas.1119129109.
- [50] S. W. Hell. «Microscopy and its focal switch». In: *Nature Methods* 6.1 (2009), pp. 24–32. DOI: doi:10.1038/nmeth.1291.
- [51] J.-i. Hotta et al. «Spectroscopic Rationale for Efficient Stimulated-Emission Depletion Microscopy Fluorophores». In: *Journal of the American Chemical Society* 132.14 (2010), pp. 5021–5023. DOI: 10.1021/ja100079w.
- [52] J. C. Diels e W. Rudolph. *Ultrashort Laser Pulse Phenomena*. 2nd edition. Academic Press, 2006.
- [53] S. Mukamel. *Principles of nonlinear optical spectroscopy*. Oxford University Press, 1995.
- [54] G. Cerullo et al. «Time-resolved methods in biophysics. 4. Broadband pump-probe spectroscopy system with sub-20 fs temporal resolution for the study of energy transfer processes in photosynthesis». In: *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 (2 2007), pp. 135–144. DOI: 10.1039/B606949E.
- [55] F. V. R. Neuwahl, L. Bussotti e P. Foggi. «Transient absorption spectroscopy with UV-visible subpicosecond pulses». In: *Research Advances in Photochemistry and Photobiology* 1 (2000), pp. 77–94.
- [56] P. Foggi, L. Bussotti e F. V. R. Neuwahl. «Photophysical and photochemical applications of femtosecond time-resolved transient absorption spectroscopy». In: *International Journal of Photoenergy* 3 (2 2001), pp. 103–109. DOI: 10.1155/S1110662X01000125.

- [57] M. Daimon e A. Masumura. «Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region». In: *Appl. Opt.* 46.18 (giu. 2007), pp. 3811–3820. DOI: 10.1364/AO.46.003811.
- [58] J. J. Snellenburg et al. «Glotaran: A Java-Based Graphical User Interface for the R Package TIMP». In: *Journal of Statistical Software* 49.3 (giu. 2012), pp. 1–22. URL: <http://www.jstatsoft.org/v49/i03>.
- [59] J.-J. Snellenburg. «Glotaran - a tool for interactive global and target analysis of time-resolved spectroscopy and microscopy data». Master's thesis. Department of Physics e Astronomy, VU University Amsterdam, november 2010. URL: <http://tiny.cc/snellenburg-MScThesis>.
- [60] I. H. van Stokkum, D. S. Larsen e R. van Grondelle. «Global and target analysis of time-resolved spectra». In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1657.2–3 (2004), pp. 82–104. DOI: 10.1016/j.bbabi.2004.04.011.
- [61] F. Gai, M. J. Fehr e J. W. Petrich. «Observation of Excited-State Tautomerization in the Antiviral Agent Hypericin and Identification of Its Fluorescent Species». In: *The Journal of Physical Chemistry* 98.22 (1994), pp. 5784–5795. DOI: 10.1021/j100073a036.
- [62] A. Michaeli et al. «Triplet-state reactions of hypericin: time-resolved laser photolysis and electron paramagnetic resonance spectroscopy». In: *The Journal of Physical Chemistry* 97.36 (1993), pp. 9154–9160. DOI: 10.1021/j100138a015.