

Giovanni Abramo

MICROSCOPIO 3D per le biomolecole



Il Premio Nobel per la chimica 2017 è stato assegnato agli scienziati che hanno messo a punto la crio-microscopia elettronica, una tecnica rivoluzionaria che permette di analizzare le molecole biologiche in 3D

Nel 2017 l'Accademia Svedese ha assegnato allo svizzero Jaques Dubochet (università di Losanna), al tedesco Joachim Frank (Columbia university) e allo scozzese Richard Henderson (Medical research council laboratory) il premio di circa 940mila euro per gli studi compiuti su un nuovo e rivoluzionario metodo per *vedere* le molecole biologiche. Fin dagli anni '70 fino a oggi, i tre ricercatori hanno studiato e perfezionato la tecnica della microscopia per poterla applicare anche alle molecole biologiche, che fino a quel momento era impossibile visualizzare con i normali microscopi elettronici.

Queste molecole, infatti, sono particolarmente sensibili al fascio di elettroni usato per poter osservare ingrandimenti di molecole inorganiche o piccole molecole organiche (la lunghezza d'onda degli elettroni è infatti minore di quella della luce e permette quindi di osservare oggetti molto più piccoli rispetto a quelli osservabili con un microscopio ottico) ed era sempre stato difficile o impossibile impedirne la degradazione.

La Crio-microscopia, invece, sfrutta le basse temperature raggiunte da un solvente per congelare le molecole biologiche e quindi riuscire a vederne la struttura complessa. Per capirci qualcosa in più abbiamo parlato con Martino Bolognesi direttore del dipartimento scienze biomolecolari e biotecnologie dell'università di Milano, membro dell'Accademia nazionale dei lincei, dell'Accademia Europaea, e di Embo, esperto in cristallografia di proteine, biochimica, biofisica e metodi bio-computazionali, e crio-microscopia elettronica in singola particella.

In che contesto si inserisce questa nuova tecnica?

«Come noto, oggetti molto piccoli possono essere studiati attraverso la microscopia ottica, il cui potere risolutivo è legato alla lunghezza d'onda della radiazione visibile. Quando si vogliono esaminare campioni in maggiore dettaglio, quindi entrare nel mondo dei corpuscoli subcellulari e delle loro strutture molecolari, è necessario avvalersi di radiazioni elettromagnetiche (la "luce" del microscopio ottico) in grado di risolvere dettagli più fini. Si possono usare i raggi X, e quindi entrare nel dominio della cristallografia, o gli elettroni, a cui è associabile una radiazione elettromagnetica di lunghezza d'onda molto breve (qualche centesimo di Å, quindi circa 10-12 m), in grado di "risolvere" (distinguere spazialmente) i dettagli atomici. Il microscopio elettronico concettualmente funziona esattamente come il microscopio ottico, ma usa elettroni anziché fotoni del visibile. Gli elettroni possono essere convogliati e focalizzati con lenti elettromagnetiche (essendo particelle cariche), e ci consentono di esplorare il mondo delle molecole biologiche con una risoluzione prossima a quella atomica della cristallografia. In campo biologico, però, i campioni sono molto delicati, e le proteine, gli acidi nucleici e le altre molecole mal tollerano l'energia dei fasci elettronici usati nei microscopi elettronici tradizionali».

Come funziona il crio-microscopio?

«Da qualche anno, per venire incontro a questa evidente limitazione, i campioni biologici (ad esempio una soluzione contenente un complesso multi-proteico) vengono rapidamente "vetrificati" a temperature criogeniche. Questo processo consiste nel raffreddare molto rapidamente microscopiche quantità della soluzione in studio tramite immersione in etano liquido. Il campione vetrificato viene poi esaminato nel microscopio elettronico, mantenendolo costantemente a temperature criogeniche (ca. -190 °C). In questa maniera, e anche grazie all'uso di detector molto sensibili - di recente progettazione e che consentono di usare dosi di elettroni contenute - il campione viene preservato dal danno indotto da radiazione, e l'analisi di crio-microscopia può essere portata a termine in condizioni molto prossime a quelle native.

Un capitolo a parte andrebbe dedicato agli aspetti



Martino Bolognesi

computazionali associati alla elaborazione delle immagini acquisite tramite il crio-microscopio elettronico. Basti citare che anche in questo ramo della ricerca i progressi recenti sono stati essenziali, e tutt'altro che scontati. I principi fisici, e gli algoritmi utilizzati e in continuo aggiornamento, sono il risultato di sforzi congiunti di importanti gruppi di ricercatori e programmatori presso i principali centri di ricerca mondiali attivi in questo campo.

Dall'insieme di quanto sopra brevemente descritto, non è difficile comprendere come il Premio Nobel per la Chimica 2017 sia stato assegnato a Dubochet, Frank e Henderson per i contributi che i tre ricercatori, negli anni, hanno fornito per la messa a punto di tecniche sperimentali, algoritmi di calcolo e detector ad alta sensibilità per lo studio della struttura tridimensionale di macromolecole biologiche a risoluzione quasi atomica».

Quali sono i campi di applicazione di questo super microscopio?

«I crio-microscopi elettronici del tipo installato presso l'università di Milano hanno trovato diffusione nel mondo a partire dal 2015 circa, prevalentemente per le analisi di particelle subcellulari e grandi complessi molecolari, con risoluzioni a livello almeno di residuo aminoacidico o di nucleotide. Nel laboratorio di Milano (unico per il momento in Italia) esaminiamo complessi molecolari di proteine e acidi nucleici, in contesti di ricerca che vanno dalle malattie degenerative, al controllo della trascrizione del Dna, ai meccanismi dei complessi enzimatici e di modifica degli acidi nucleici, ai canali ionici cardiaci. Questi sono alcuni dei progetti attivi al momento; in realtà, non esistono particolari limiti alle applicazioni del metodo, posto che il campione da esaminare sia ottenibile in forma pura, omogenea, e sufficientemente solubile. Naturalmente, sono attivi anche progetti commissionati dall'utenza».

Quali sono gli sviluppi previsti per i prossimi anni?

«Gli sviluppi dei microscopi e dei detector continueranno a supportare analisi sempre più precise e ad alta risoluzione, permettendo di 'vedere' nel dettaglio caratteristiche molecolari di crescente interesse per la ricerca di base ma anche in campo applicativo. Mi aspetto, quindi, una forte

diffusione di questi strumenti, sia come strumento sempre più potente per l'acquisizione delle immagini microscopiche, sia per quanto riguarda la loro successiva elaborazione, che poggia su algoritmi sofisticati e su potenze di calcolo decisamente spinte. Su queste basi, la crio-microscopia elettronica troverà crescenti applicazioni nello studio delle proteine di membrana, che male si prestano all'approccio cristallografico e sono il target di circa il 40% dei farmaci più efficaci oggi disponibili. Pertanto, vedremo sicuramente un'ulteriore apertura verso i campi della progettazione razionale di farmaci, basata su strutture tridimensionali di complessi farmaco/recettore che guidino la comprensione dei processi di riconoscimento molecolare e le sintesi chimiche».

Da quanto utilizzate questo microscopio presso il vostro dipartimento?

«Il Talos Arctica 200 kV FEG (ThermoFisher Scientific) è stato installato presso il laboratorio di crio-microscopia elettronica dell'università di Milano e Fondazione Romeo ed Enrica Invernizzi (presso il dipartimento di bioscienze) nel corso del 2017. È operativo 24/7 da settembre 2017, quindi da poco più di un anno. Sta riscuotendo un sostanziale interesse a livello nazionale e internazionale, con una domanda di accesso alla facility in costante crescita (i tempi di attesa stimabili sono nell'ordine di 2-3 mesi). Abbiamo organizzato un primo workshop pratico per il training di giovani ricercatori a settembre 2018; data la forte richiesta, ripeteremo l'iniziativa a febbraio 2019».

Per quali ricerche o applicazioni avete finora utilizzato il crio-elettro microscopio?

«Una per tutte, cito un ricerca da poco conclusa e sottomessa a un rivista scientifica di primario impatto. Si tratta dell'analisi di fibrille amiloidi estratte dal cuore di un paziente, in collaborazione con il Policlinico Sna Matteo di Pavia. Soggetti affetti da amiloidosi sistemiche producono una certa proteina in forte eccesso; la proteina oggetto della patologia si aggrega in fibrille (amiloidi) che costituiscono pericolosi depositi in organi vitali. Nel caso in questione, il paziente era over-produttore di catene leggere di immunoglobuline, le quali si aggregavano in depositi amiloidi nel cuore e nel rene. Attraverso biopsia è stato possibile ottenere la microscopica quantità di amiloide necessario per l'analisi in crio-microscopia. I nostri studi hanno messo in

evidenza la struttura tridimensionale delle fibrille prodotte da questa particolare catena leggera, gettando le basi per una comprensione, a livello molecolare, di questo importante fenomeno di aggregazione proteica e crescita della formazione fibrillare, un processo che, pur se basato su proteine diverse, è comune a varie malattie degenerative, quali l'Alzheimer e il Parkinson. Come citato sopra, stiamo focalizzando un forte interesse per canali ionici responsabili di correnti cardiache, quindi proteine di membrana oligomeriche di una certa complessità, e per i meccanismi di inibizione del complesso CRISPR/CAS9 da parte di proteine naturalmente disponibili».

Cosa auspica per il futuro?

«È estremamente importante che in Italia si faccia training in queste nuove metodologie. Nel mondo esistono più crio-microscopi elettronici che operatori in grado di farli funzionare. Trattandosi di strumenti del valore di milioni di euro, una loro gestione inefficiente, o un sottoutilizzo,

rappresenterebbe uno smacco per la ricerca e un cattivo investimento per il Paese. È quindi essenziale che numerosi giovani si muovano in questa direzione, con un impegno di training stimabile sulla scala dei 3-5 anni. Una volta formati, non avrebbero problemi a trovare una sistemazione lavorativa di soddisfazione.

Un secondo importante punto riguarda il collegamento con le istituzioni. Nuove tecnologie

di ricerca e traslazionali spuntano quasi ogni anno; si pensi per esempio alla tecnologia CRISPR/CAS9 per l'editing genetico. Nel caso della crio-microscopia elettronica, stiamo assistendo allo sviluppo di un metodo di indagine che ha già rivoluzionato la biologia strutturale e le sue applicazioni in campi svariati, primo tra questi la progettazione di nuovi farmaci. Data l'entità degli investimenti richiesti, i costi di manutenzione, e quindi di utenza, sono necessari due livelli di intervento. Da un lato una oculata politica di diffusione di nuovi strumenti; e con oculata non intendo certamente una distribuzione a pioggia, ma una valutazione strategica dei siti di installazione e delle competenze lavorative dispiegabili. Dall'altro, è importante che i costi di gestione, che in esperienze analoghe nel mondo si scaricano per buona parte sull'utenza, trovino supporto in finanziamenti ad hoc. Al momento, l'utente pubblico italiano ha enormi difficoltà ad affrontare ricerche promettenti in questi campi, paradossalmente per mera mancanza di risorse».

«Nel mondo esistono più crio-microscopi elettronici che operatori in grado di farli funzionare»

© RIPRODUZIONE RISERVATA