

OGGETTO: Motivazione tecnico-scientifica per l'acquisto in unicità del sistema di Leica Stellaris WLL Plus Falcon Spatial Biology

CUP: I53C25001560009

Progetto: Cell Imaging Lab for the investigation of plant stress factors (ZIMPS) EFRE/FESR 2021-2027

Si presenta una motivazione tecnico-scientifica dettagliata della richiesta di acquisizione in unicità di un sistema avanzato di microscopia confocale laser scanning (CLSM) Leica Stellaris WLL Plus Falcon Spatial Biology equipaggiato con White Light Laser pulsato, beam splitter acusto-ottico (AOBS), rilevatori Power Hybrid, tecnologia Fast Lifetime Contrast (FLIM in tempo reale) e modulo di super-risoluzione LIGHTNING, nell'ambito del progetto ZIMPS, finalizzato allo sviluppo di applicazioni avanzate di *spatial biology* in sistemi vegetali e insetti.

Il progetto ZIMPS si inserisce nel contesto delle moderne strategie di ricerca orientate alla comprensione integrata delle interazioni pianta–ambiente e pianta–insetto a livello cellulare e subcellulare, mediante approcci quantitativi e multidimensionali. L'obiettivo scientifico è la realizzazione di un'infrastruttura di imaging capace di analizzare simultaneamente la distribuzione spaziale di mRNA, proteine, proteine fluorescenti, microrganismi simbiotici o patogeni in tessuti complessi, cambiamenti sub cellulare, preservandone l'integrità strutturale e funzionale.

Le peculiarità morfo-strutturali dei tessuti vegetali e degli insetti — tra cui la presenza di parete cellulare rigida, elevata autofluorescenza (clorofilla, composti fenolici, cuticola), significativa eterogeneità ottica e spessori tissutali rilevanti — impongono requisiti strumentali altamente specifici che non possono essere soddisfatti da sistemi confocali convenzionali. In tale contesto, risulta scientificamente indispensabile disporre di una piattaforma CLSM caratterizzata da elevata flessibilità spettrale, sensibilità di rilevazione, discriminazione temporale del segnale e capacità di super-risoluzione tridimensionale.

Elemento centrale della configurazione richiesta è la presenza di una sorgente White Light Laser (WLL) pulsata, sintonizzabile in continuo tra 440 nm e 790 nm con incrementi di 1 nm. Tale tecnologia consente l'accesso a circa 350 linee laser selezionabili, permettendo l'ottimizzazione precisa della lunghezza d'onda di eccitazione in funzione dei massimi di assorbimento dei fluorofori impiegati nelle applicazioni di *spatial biology* (RNA-FISH multiplex, proteine fluorescenti, biosensori, marcatori microbici). La possibilità di modulare finemente l'eccitazione consente di massimizzare l'efficienza quantica dei fluorofori, ridurre l'eccitazione off-target e minimizzare fenomeni di fototossicità e fotobleaching, particolarmente critici nei tessuti vegetali vivi. La natura pulsata della sorgente è inoltre requisito imprescindibile per l'integrazione con misure di Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM).

La presenza di un beam splitter acusto-ottico (AOBS) è tecnologicamente essenziale per consentire la gestione simultanea e indipendente fino a otto linee laser, con selezione dinamica delle finestre di eccitazione ed emissione senza ricorso a filtri ottici

fisici intercambiabili. Questa architettura permette imaging multicanale altamente multiplex, necessario per la rilevazione concomitante di più target molecolari nello stesso volume cellulare, garantendo stabilità ottica, riduzione della cross-talk spettrale e riproducibilità quantitativa. Tali caratteristiche sono fondamentali per studi di colocalizzazione ad alta complessità nei tessuti vegetali.

Per quanto concerne la rilevazione del segnale, l'integrazione di rilevatori Power Hybrid X e Power Hybrid D (Brevetto tedesco: DE 10 2011 052334 B4) rappresenta un requisito scientificamente determinante. I tessuti vegetali e degli insetti sono frequentemente caratterizzati da segnali fluorescenti deboli sovrapposti a forte autofluorescenza di fondo. I rilevatori Power Hybrid garantiscono un elevato rapporto segnale/rumore, ampia gamma dinamica e ridotta saturazione rispetto ai rivelatori GaAsP convenzionali, consentendo la rilevazione simultanea di segnali a diversa intensità nello stesso campo visivo. Tale sensibilità è indispensabile per l'analisi quantitativa di proteine a bassa espressione, mRNA rari e microrganismi intracellulari.

Un ulteriore elemento di unicità tecnologica è rappresentato dall'integrazione nativa della tecnologia Fast Lifetime Contrast per misure FLIM in tempo reale (Brevetti europei: EP 2592413 B1; EP 2 592 413 B1). Nei sistemi vegetali, la sola discriminazione spettrale risulta spesso insufficiente a causa della sovrapposizione tra emissioni di fluorofori esogeni e autofluorescenza endogena. L'analisi del tempo di vita della fluorescenza consente di distinguere segnali con spettri sovrapposti, discriminare contributi autofluorescenti e identificare variazioni microambientali associate a interazioni proteina-proteina, stato metabolico o compartimentazione subcellulare. Tale funzionalità è imprescindibile per applicazioni avanzate di *spatial biology* e per studi subcellulari quantitativi in piante e insetti.

Le attività progettuali richiedono inoltre la possibilità di analizzare l'organizzazione tridimensionale di strutture molecolari e morfologiche con risoluzione superiore al limite di diffrazione convenzionale. La tecnologia di super-risoluzione LIGHTNING (Brevetto europeo: EP 3 624 047 B1) consente di raggiungere una risoluzione fino a circa 120 nm nel piano x-y e 200 nm lungo l'asse z in modalità multicanale, mantenendo compatibilità con campioni biologici spessi e acquisizioni tridimensionali. Tale livello di risoluzione è essenziale per la caratterizzazione spaziale di complessi proteici, strutture subcellulari e interazioni ospite-patogeno a scala nanometrica.

L'elemento che giustifica l'acquisizione in unicità risiede nella combinazione integrata e proprietaria delle tecnologie sopra descritte. Le soluzioni relative alla sorgente WLL pulsata, ai rilevatori Power Hybrid, alla tecnologia Fast Lifetime Contrast e al modulo LIGHTNING sono oggetto di specifica tutela brevettuale europea e internazionale. È proprio l'integrazione nativa di tali componenti in un'unica piattaforma a consentire simultaneamente flessibilità spettrale continua, eccitazione pulsata compatibile con FLIM, rilevazione ad alta sensibilità, discriminazione temporale del segnale e super-risoluzione tridimensionale multicanale.

Il multiplexing spettrale avanzato, usato per applicazioni di *spatial biology*, si basa sulla discriminazione sul tempo di vita di fluorescenza, elevato rapporto segnale/rumore in campioni autofluorescenti e risoluzione sub-diffrazione in 3D. Nessun altro sistema attualmente disponibile sul mercato combina tali funzionalità in

modo integrato, con pari livello di controllo, sensibilità e compatibilità con le applicazioni di *spatial biology* in organismi vegetali e insetti.

In base alle considerazioni esposte, si afferma che l'acquisizione del sistema CLSM Leica Stellaris WLL Plus Falcon Spatial Biology risulta essenziale dal punto di vista tecnico e scientifico per il raggiungimento degli obiettivi del progetto ZIMPS. Si evidenziano condizioni oggettive di unicità tecnologica e irreplaceabilità sul mercato, dovute all'integrazione specifica di tecnologie brevettate non replicabili tramite soluzioni alternative equivalenti. Pertanto, si conferma che l'acquisto del sistema è indispensabile sotto il profilo tecnico e scientifico per il conseguimento degli scopi del progetto ZIMPS, e che sussistono i requisiti di unicità tecnica e non sostituibilità sul mercato ai fini dell'approvvigionamento.

In fede,

Prof. Hannes Schuler
Libera Università di Bolzano