



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN
INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI

STUDIO DELLE DINAMICHE DELLA CONCENTRAZIONE
INTRACELLULARE DI GLUCOSIO MEDIANTE NANOSENSORI FRET IN
PIATTAFORME MICROFLUIDICHE INTEGRATE

Relatore: Dott. Nicola Elvassore

Correlatore: Ing. Alessandro Zambon

Laureando: GIACOMO PADOVAN

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

A due Uomini.

Uno era solito indossare un ditale, e mi insegnò molte cose
e l'altro, col cappello calcato in testa, teneva ben salda una cazzuola.

A un piatto di pasta al pomodoro delle 12 e un quarto,
e a un piatto di ossibuchi...

che l'amor di nonna rendeva così speciali.

Riassunto

La Tesi è uno studio condotto presso il laboratorio BioERA dell'Università degli Studi di Padova e presso il Venetian Institute of Molecular Medicine (VIMM), Padova. Oggetto dello studio è la misura della dinamica del glucosio intracellulare ad alta risoluzione spazio temporale mediante nanosensore *Förster Resonance Energy Transfer* (FRET) espresso nel citosol di colture cellulare C2C12, utilizzando una piattaforma microfluidica automatizzata. Caratteristiche fondamentali della metodologia implementata sono la bassa invasività e la possibilità di ottenere informazioni sul glucosio intracellulare in tempo reale a livello cellulare; esso risulta un metodo robusto e ripetibile.

I risultati emersi dallo studio hanno permesso di determinare le curve di calibrazione per i nanosensori utilizzati, lo studio della dinamica di accumulo e consumo glicolitico all'interno della cellula, monitorare la velocità di glucose-uptake a stimolazioni diverse.

Alla fine del lavoro è stato analizzato l'effetto sulla concentrazione dovuta ad inibitori dei trasportatori del glucosio e della glicolisi. Queste applicazioni specifiche hanno permesso di valutare l'applicabilità del nanosensore come strumento per lo studio ad alta risoluzione degli effetti dovuti a sostanze biochimiche in grado di interagire con il ciclo di regolazione del glucosio.

I nanosensori FRET per il glucosio, oltre ad aprire molte strade nello studio della fisiologia cellulare, possono costituire uno strumento semplice, ripetibile ed economico, capace di ridurre notevolmente i tempi e costi di valutazione farmacologica degli effetti di principi attivi che inibiscono o stimolano l'*uptake* di glucosio

Indice

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1	3
1.1 OMEOSTASI DEL GLUCOSIO E DIABETE.....	3
1.2 MISURAZIONE DEL GLUCOSIO.....	3
1.2.1 Metodi di misurazione tradizionali	4
1.2.2 Misurazione mediante FRET	5
1.3 SISTEMI MICROFLUIDICI	6
1.4 MICROFLUIDICA E APPLICAZIONI BIOLOGICHE.....	8
1.5 MOTIVAZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	9
CAPITOLO 2	11
2.1 SOFT LITOGRAFIA	11
2.1.1 Creazione della fotomaschera	12
2.1.2 Creazione del master tramite fotolitografia.....	13
2.1.2.1 Pretrattamento del wafer.....	13
2.1.2.2 Deposizione del photoresist.....	13
2.1.2.3 Trattamento termico ed esposizione	14
2.1.2.4 Trattamento termico e sviluppo	14
2.1.3 Produzione dello stampo in PDMS per piattaforma microfluidica	15
2.1.3.1 Proprietà del PDMS.....	16
2.1.3.2 Produzione stampo in PDMS.....	17
2.1.4 Fabbricazione e unione tramite tecnica di adesione al plasma.....	18
2.2 PIATTAFORMA MICROFLUIDICA MULTISTRATO IN PDMS INTEGRATA	19
2.2.1 Le valvole micromeccaniche.....	19
2.2.1.1 Microvalvole <i>Push-up</i> e <i>Push-down</i>	21
2.2.1.2 Pompa peristaltica.....	22
2.3 PRODUZIONE DI MICROCHIPS INTEGRATI MEDIANTE SOFTLITOGRAFIA	23
2.3.1 Creazione delle fotomaschere	23
2.3.2 Creazione dei master tramite fotolitografia.....	24
2.3.3 Produzione dei chip: tecnica off-ratio	24
2.3.3.1 Preparazione del silicone nei master.....	25
2.3.3.2 Cottura e allineamento degli strati	26
2.3.3.3 Fabbricazione e test della piattaforma microfluidica.....	26
2.3.4 Produzione dei chip: tecnica on-ratio.....	27

2.3.4.1 Preparazione stampi di PDMS.....	27
2.4 COLTURA DI MIOBLASTI MURINI IN SISTEMI MICROFLUIDICI.....	28
2.4.1 Colture cellulari.....	28
2.4.1.1 Coltura di C2C12.....	28
2.4.1.2 Espansione delle cellule in coltura.....	29
2.4.1.3 Congelamento e scongelamento delle cellule.....	29
2.4.2 Colture cellulari in microfluidica.....	30
2.4.2.1 Piattaforma microfluidica utilizzata.....	30
2.4.2.2 Preparazione della soluzione con lipoplessi per la transfezione.....	31
2.4.2.3 <i>Coating</i> della camera microfluidica.....	32
2.4.2.4 Semina e transfezione in camera microfluidica.....	32
2.5 SISTEMA AUTOMATIZZATO DI CAMBIO BUFFER SALINO IN CAMERA MICROFLUIDICA.....	34
2.5.1 Piattaforma microfluidica integrata per il cambio del buffer salino.....	35
2.5.2 Sistema di perfusione del liquido nel microchip.....	36
2.5.2.1 Pompaggio attraverso <i>vial</i> in pressione.....	37
2.5.2.2 Pompa a siringa.....	38
2.5.3 Apparato per il controllo di piattaforme microfluidiche integrate.....	38
2.5.3.1 Elettrovalvole.....	38
2.5.3.2 <i>Signaling</i> dal PC alle elettrovalvole.....	39
2.5.3.3 Programmazione del software LabVIEW.....	40
2.6 PROTOCOLLO PER GLI ESPERIMENTI FRET.....	41
2.6.1 Microscopio.....	41
2.6.2 Preparazione delle soluzioni saline.....	42
2.6.3 Protocollo esperimento FRET.....	42
2.7 ELABORAZIONE DATI DA SEQUENZA DI IMMAGINI FRET.....	44
2.7.1 Metodo di correzione SBT e sottrazione del background.....	45
2.7.2 Baseline correction.....	47
2.7.3 Analisi dell'area di un picco.....	49
2.7.4 Funzioni del programma FRET_calculation_programme.....	50
CAPITOLO 3.....	51
3.1 PROGETTAZIONE DI UN SISTEMA AUTOMATIZZATO PER LA COLTURA IN CAMERA MICROFLUIDICA.....	51
3.1.1 Semina, transfezione e coltura in piattaforme microfluidiche integrate.....	51
3.1.2 Determinazione del substrato migliore.....	54
3.1.3 Calibrazione della pompa peristaltica.....	55
3.1.3.1 Metodo di calibrazione con battente di liquido.....	55
3.1.3.3 Risultati della calibrazione della pompa peristaltica con battente di liquido.....	56

3.1.3.2 Calibrazione mediante <i>beads</i>	59
3.2 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO FRET IN CAMERE MICROFLUIDICHE	61
3.2.1 Scelta dell'obiettivo da utilizzare nelle prove	61
3.2.2 Scelta del tempo tra due acquisizioni	62
3.2.3 Analisi della qualità di una prova e altre questioni	63
3.2.3.1 Intensità iniziale delle cellule	63
3.2.3.2 Primi istanti di acquisizione del segnale	64
3.2.3.3 Spostamento del piano focale	65
3.2.3.4 Analisi dei singoli segnali CFP e YFP	66
3.3 VERIFICA DEL CONTRIBUTO DELLA PRESSIONE OSMOTICA	68
3.3.1 Calcolo della pressione osmotica	68
3.3.2 Picchi a 5mM di saccarosio confrontati con glucosio	70
3.3.3 Serie di picchi a concentrazione diversa di glucosio	71
3.3.4 Picco di saccarosio dopo picchi di glucosio	73
CAPITOLO 4	75
4.1 VERIFICA DELLA SATURAZIONE DEI NANOSENSORI UTILIZZATI	75
4.2 RANGE DI UTILIZZO E RETTE DI TARATURA DEI NANOSENSORI	77
4.2.1 Curve di taratura dei nanosensori	78
4.3 SCELTA DEL NANOSENSORE	80
4.4 VALIDAZIONE DELLE PROVE FRET	80
4.5 CALCOLO DELLE DINAMICHE DI RISPOSTA DEL NANOSENSORE FLIP-600	82
4.6 PROVE CON INIBITORI	87
4.6.1 Inibizione del trasporto attraverso la membrana: Verapamil	87
4.6.2 Inibizione della glicolisi: 3-BrPA	89
CONCLUSIONI	93
APPENDICE A	95
A1 FRET_CALCULATION_PROGRAMME	95
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	103

Introduzione

I meccanismi legati all'insorgenza di complicanze connesse all'omeostasi del glucosio e il conseguente sviluppo di patologie risultano ancora poco conosciuti. Elevato interesse è rivolto allo studio del glucosio come mezzo chiave per ottenere informazioni specifiche legate a disfunzioni nella sua regolazione. Conoscere in dettaglio come avviene il suo trasporto attraverso la membrana e consumo da parte delle cellule risulta decisivo nella ricerca in questo campo.

Gli strumenti attuali che consentono un monitoraggio del glucosio intracellulare hanno una bassa risoluzione spazio-temporale, che preclude lo studio dei fenomeni rapidi e dell'individuazione del contributo della singola cellula; talvolta richiedono la manipolazione di isotopi radioattivi e sono inadeguate per un'analisi *high-throughput*.

Questo lavoro di tesi si prefigge di misurare la dinamica del glucosio intracellulare ad alta risoluzione spazio temporale mediante nanosensore *Förster Resonance Energy Transfer* (FRET) utilizzando una piattaforma microfluidica automatizzata. È utilizzato il metodo FRET mediante nanosensori specifici che, legandosi al glucosio, cambiano la loro conformazione spaziale. Queste sonde, se eccitate ad una specifica lunghezza d'onda, forniscono una risposta, in termini di rapporto tra l'intensità luminosa di due fluorofori che la compongono, correlata negativamente alla concentrazione di glucosio intracellulare. Caratteristiche fondamentali della metodologia implementata è la bassa invasività e la possibilità di ottenere misure in tempo reale.

Nel Capitolo 1 è discussa l'importanza della misurazione del glucosio intracellulare e dei flussi che lo regolano all'interno della cellula, in relazione a patologie metaboliche quali il diabete. Dopo una breve introduzione sui metodi di misurazione tradizionali, è descritta l'innovazione e i vantaggi dell'analisi FRET. L'utilizzo della microfluidica come strumento di controllo delle colture su microscala è esposta in relazione al controllo del microambiente in cui si trovano le cellule. Sono quindi descritte motivazioni e scopo della tesi.

Nel Capitolo 2 sono illustrati materiali e metodi impiegati durante questa tesi. Si trattano in particolare le tecniche di microfabbricazione utilizzate per la realizzazione della piattaforma, del metodo impiegato per ottenere la misura delle dinamiche del glucosio intracellulare mediante nanosensori con tecnologia FRET, i criteri di analisi e la correzione dati.

Il Capitolo 3 è dedicato, nella prima parte, alla progettazione e calibrazione di una piattaforma microfluidica integrata per la coltura automatizzata di cellule. Successivamente si focalizza l'attenzione sul *set-up* della strumentazione utilizzata, che ha determinato numerose scelte per la definizione del protocollo sperimentale. Infine si riportano i risultati di prove realizzate per validare gli esperimenti e determinare il contributo della pressione osmotica sugli stessi.

Nel Capitolo 4 è riportata la discussione dei risultati ottenuti. La prima parte è dedicata alla determinazione delle curve di calibrazione dei nanosensori utilizzati e alla scelta del sensore con prestazioni più elevate. La seconda parte tratta l'analisi della dinamica di risposta del sensore a stimoli di glucosio a diversa concentrazione esterna. Infine si affrontano due casi studio con sostanze in grado di inibire la glicolisi e il trasporto del glucosio. L'effetto di questi due inibitori specifici è analizzato in tempo reale.

Capitolo 1

Stato dell'arte e obiettivi

1.1 Omeostasi del glucosio e diabete

Il glucosio è la maggiore forma di trasporto di carbonio e energia nei mammiferi. I tessuti degli organismi multicellulari dipendono da un continuo apporto di glucosio ed il suo utilizzo da parte delle cellule è funzione del trasporto e del metabolismo (*Fehr and Frommer et al., 2003*).

Nella salute di un individuo, l'omeostasi del glucosio controlla la concentrazione di zucchero nel sangue. Mentre un alto livello di glucosio innesca la secrezione di insulina da parte del pancreas la quale aumenta il *glucose uptake* e riduce la produzione di glucosio da parte del fegato, una sua bassa concentrazione permette il rilascio del glucagone che ne aumenta la produzione.

Il diabete di Tipo 1 compare quando le cellule pancreatiche sono distrutte dal sistema immunitario del corpo umano. Nel diabete di Tipo 2 non è generalmente compromessa la funzionalità pancreatica, vi è produzione di insulina ma le cellule recettrici (principalmente muscolari e adipose) sono insulino-resistenti, di conseguenza la loro risposta all'insulina risulta alterata, come appunto il *glucose uptake*.

Il diabete di Tipo 2 rappresenta tra l'85% e il 95% dei malati di diabete dei paesi sviluppati; il numero totale di persone affette da questa malattia sono circa 285 milioni e, secondo stime, il numero di malati è destinato a crescere fino a 438 milioni entro il 2030 (stime *International Diabetes Federation, 2010*). Comparato ad altre cause di morte il diabete ha una percentuale attribuitagli del 10%; questa patologia viene associata a numerose complicanze come ad esempio: problemi cardiovascolari, nefropatia, neuropatia, amputazioni, retinopatia.

La sua elevata diffusione ha determinato un costo globale per le spese mediche nel 2007 compresa tra i 230 e i 420 milioni di dollari statunitensi (*International Diabetes Federation, 2007*).

1.2 Misurazione del glucosio

L'analisi quantitativa e dinamica di metaboliti, tra i quali il glucosio, è limitata da sfide tecniche nell'ottenimento di informazioni in tempo reale a livello cellulare e subcellulare (*Chaudhuri and Frommer et al., 2011*). Poiché il glucosio, e in particolare la sua

concentrazione, rappresenta la chiave nella diagnosi e studio del diabete risulta fondamentale avere a disposizione metodi robusti e ripetibili per la sua misura. Il glucosio può essere misurato su due livelli di scala: come glucosio extracellulare e come glucosio intracellulare. Il glucosio extracellulare rappresenta, ad esempio, il target principale per la diagnosi della patologia in campo medico. Le tecniche disponibili per la misura del glucosio extracellulare sono essenzialmente basate su misure enzimatiche o spettroscopia gas massa, in cui la limitazione maggiore è rappresentata dalla sensibilità della misura a bassi livelli di variazione di concentrazione. La misura del glucosio intracellulare risulta fondamentale nell'analisi dei flussi di consumo glicolitico che avvengono all'interno della cellula, fortemente legati ad esempio ai cicli enzimatici e al *pathways* dei regolatori, quali ad esempio l'insulina.

1.2.1 Metodi di misurazione tradizionali

Tradizionalmente l'*uptake* di glucosio è misurato determinando l'accumulo di radiotraccianti nelle cellule; il flusso di glucosio è misurato tramite la misura dell'efflusso del glucosio radioattivo nelle cellule in cui è posto (Niklas *et al.*, 2010).

In un tipico esperimento *in vitro*, circa un milione di cellule in piastra per coltura sono esposte per 20 minuti a deoxyglucosio radiomarcato, a causa della sua fosforilazione nel citosol dall'esochinasi, la radioattività intrappolata all'interno della cellula è stimata come proporzionale al tasso glicolitico. Negli esperimenti *in vivo*, il tracciante è assunto per via endovenosa, dopo un periodo di 20 minuti circa, la radioattività accumulata nei tessuti è rilevata con autoradiografia o mediante F-2-deoxy-2-fluoro-glucosio (FDG) positron emission tomography (PET) *scanning* non invasiva.

Queste tecniche presentano alcuni limiti. Innanzitutto esse utilizzano analoghi al glucosio, non trattati dall'esochinasi alla stessa maniera del glucosio, e possono essere tossici anche a bassi dosaggi (Kurtoglu *et al.*, 2007). L'accumulo di questi analoghi al glucosio non è determinato solamente dal metabolismo ma dipende anche dall'efficienza del trasporto all'interno della membrana cellulare. Inoltre, queste tecniche mediante isotopi hanno una bassa risoluzione spazio-temporale, che preclude l'individuazione di fenomeni rapidi e del contributo della singola cellula. Infine esse sono relativamente intense e richiedono la manipolazione di isotopi radioattivi, che le rendono inadeguate per un'analisi *high-throughput* (Bittner *et al.*, 2010).

Un approccio alternativo, non isotopico, al tasso metabolico è la misura del consumo di ossigeno, che grazie a recenti tecniche di sviluppo fornisce una migliore risoluzione temporale ma i dati ottenuti sono relativi a tutte le cellule di un tessuto (Gerencser *et al.*, 2009).

Un altro metodo per monitorare il trasporto di glucosio è possibile utilizzando tecniche elettrofisiologiche come la *voltage clamping* a due elettrodi che monitora i trasportatori di glucosio nella cellula (sodio per le cellule animali) (Loo et al., 1998).

1.2.2 Misurazione mediante FRET

La *Förster Resonance Energy Transfer* (FRET) mediante nanosensori fornisce uno strumento unico per l'analisi quantitativa di flussi con risoluzione subcellulare (Takanaga and Frommer 2010).

Il FRET è una tecnica ottica per la misura di piccole distanze (1-10nm), descritto più di 50 anni fa, è usato oggi in molte ricerche biomediche e farmacologiche (Förster, 1948).

La tecnologia FRET permette la misura in tempo reale del flusso di glucosio in cellule vive in maniera minimamente invasiva. Il cuore di questa tecnica è il nanosensore per il glucosio. L'elemento di identificazione del glucosio nel sensore è derivato da una proteina periplasmica che lega il glucosio/galattosio, prodotta da batteri (*glucose binding protein*, MgIB) (Vyas and Quijcho et al. 1998). Questa proteina, derivata da *Escherichia Coli*, lega il glucosio o il galattosio con affinità nanomolare e determina un cambiamento conformazionale in seguito al legame col recettore. Questa modifica conformazionale in una popolazione di proteine leganti glucosio/galattosio può essere monitorata mediante FRET.

Le unità proteiche che formano il sensore sono una coppia di *Green Fluorescent Proteins* (GFP): *Cyan* e *Yellow Fluorescent Protein* (CFP e YFP). Le proteine *GFP-based* sono strutturalmente stabili, relativamente inerti e possono essere inserite in punti di interesse (Takanishi and Zheng et al. 2006). La formazione del cromoforo da parte di queste proteine fluorescenti avviene automaticamente in condizioni fisiologiche, apparentemente dovuto ad una biosintesi autocatalizzata (Barondeau et al., 2003). Le due proteine fluorescenti sono così inserite nella struttura portante della *glucose binding protein* (Figura 1.2). In seguito al legame con il glucosio, la forma conformazionale della *glucose binding protein* cambia e ciò comporta un cambiamento nella relativa distanza e/o orientamento della CFP e YFP, che corrisponde ad un cambiamento del rapporto del FRET.

In base al tipo di sensore, il cambiamento nel FRET può essere correlato positivamente o negativamente. In questo modo il monitoraggio del glucosio è dato dalla misura dell'intensità luminosa emessa dai due fluorofori alle due lunghezze d'onda caratteristiche. L'utilizzo del sensore e la sua affinità al glucosio dipendono dal sistema biologico considerato: se il livello di glucosio nella cellula eccede il limite massimo o non raggiunge il limite minimo del *range* di rilevamento, nessuna risposta sarà rilevata (Hou and Frommer et al., 2011).

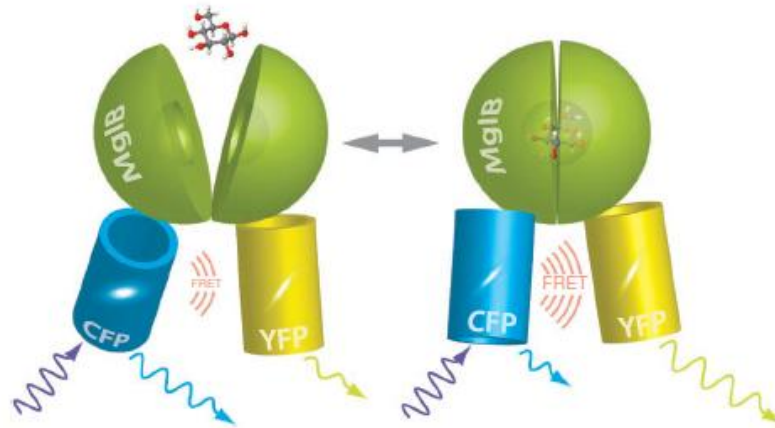


Figura 2.2 La glucose binding protein è accoppiata con i fluorofori CFP e YFP. Dopo eccitazione della CFP l'energia è trasferita alla YFP non radio attivamente. L'avvicinamento tra i due fluorofori, dovuti ad un cambiamento conformazionale, comporta un aumento del rapporto YFP/CFP.

Il FRET è basato su un meccanismo quantico tra i due fluorofori: un donatore e un accettore fluorescente.

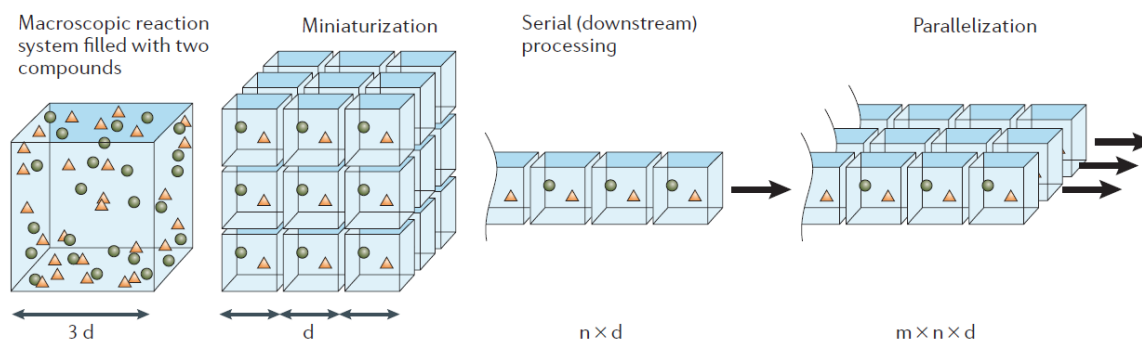
Il trasferimento di energia attraverso il meccanismo FRET diminuisce l'intensità fluorescente del donatore (CFP) e incrementa la fluorescenza dell'accettore. Infatti, una frazione dell'energia assorbita dal donatore è emessa nello spettro di eccitazione dell'accettore. In altri termini l'efficienza FRET è definita come la frazione assorbita dal donatore e trasferita all'accettore. L'efficienza di trasferimento dell'energia è inversamente proporzionale alla sesta potenza della distanza tra i due fluorofori (*Okumoto and Frommer et al., 2008*). Il rapporto del FRET è misurato come il rapporto tra l'intensità luminosa emessa nello spettro di emissione YFP e quella emessa nello spettro CFP (YFP/CFP).

Il rapporto di emissione derivato dai due fluorofori, misurato in cellule estratte da mammifero perfuse con medium a diversa concentrazione di glucosio, è stabile e garantisce un alto rapporto segnale/rumore. L'accumulo di glucosio da parte della cellula dipende dal valore del *glucose-uptake* e dal metabolismo; nel tempo il valore del rapporto si stabilizza ad un nuovo livello e vi rimane fino a che il glucosio non è eliminato dalla cellula.

1.3 Sistemi microfluidici

Per microfluidica s'intende la scienza e l'ingegneria dei sistemi nei quali il comportamento del fluido si differenzia dalla teoria convenzionale a causa della piccola scala del sistema (Figura 1.1). Il termine microfluidica viene usato non per collegare la meccanica del fluido ad una determinata piccola scala, come per esempio i micron, ma per far riferimento a situazioni in cui è la piccola scala a generare cambiamenti nel comportamento del fluido stesso. La scala usata è tale da permettere, mediante sistemi fluidici miniaturizzati, la perfusione di volumi di

fluidi dell'ordine dei micro o dei nanolitri, usando microcanali di dimensioni che variano generalmente tra le decine e le centinaia di micrometri (Whitesides, 2006). Si ottengono così un'elevata precisione e un'alta risoluzione del microambiente controllato, la quantità di reagenti e di sostanze di rifiuto diminuisce notevolmente; i tempi di reazione sono minori e diventano possibili più operazioni in parallelo (Beebe and Walker et al., 2002).



Parameter	Macroscopic example	Factor change	Microscopic example
Length of edge	1 mm	d	1 μm
Surface	1 mm^2	d^2	1 μm^2
Volume	1 μl	d^3	1 fl
Number of molecules	10^9	d^3	1
Diffusion time over d ($D = 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$)	15 min	d^2	1 ms
Example: in flowing systems			
Linear flow rate	1 $\mu\text{m/s}$	d	1 mm/s
Separation time	10^5 s (>1 day)*	d^2	100 ms
Example: in planar array			
Number of volumes per microwell plate	96	d^2	10^8

Figura 1.1 Vantaggi della miniaturizzazione nel trasporto di fluidi. I tempi di trasporto di massa e calore sono ridotti dalle piccole distanze caratteristiche della microfluidica. Inoltre, processi in parallelo e analisi possono essere facilmente ottenute nel sistema di flusso (Dittrich and Manz, 2006)

La realizzazione di dispositivi microfluidici avviene tramite particolari tecniche di microfabbricazione, come la fotolitografia e il “*replica molding*”, che permettono di creare stampi in materiale elastomerico, generalmente siliconico, facilmente assemblabili e a basso costo. Per tali scopi è utilizzato il Polidimetilsilossano (PDMS), il quale possiede alcune proprietà chimiche fisiche eccellenti: è chiaro, è permeabile ai gas, ha un basso modulo elastico ed è biocompatibile (Bartolo and Studer, 2008).

Negli ultimi anni molto interesse è stato rivolto al campo della microfluidica integrata su larga scala mLSI (*Microfluidic Large Scale Integration*). La mLSI si riferisce allo sviluppo di piattaforme di ultima generazione contenenti una serie di micro dispositivi integrati, come ad esempio micro valvole, micro pompe, iniettori e mixer. Tali dispositivi permettono di aumentare notevolmente le potenzialità offerte da una singola piattaforma microfluidica (Melin and Quake, 2007).

A causa delle piccole dimensioni caratteristiche, le piattaforme microfluidiche presentano fluidi con numero di Reynolds (Re) sufficientemente piccoli da rendere irrilevanti effetti inerziali. Bassi valori di Re implicano che le forze viscosive siano preponderanti rispetto alle forze inerziali e il regime di moto che ne consegue risulta laminare (*Squires and Quake, 2005*).

L'intero campo di moto di un sistema in perfusione può essere risolto tramite le equazioni di Navier-Stokes, in genere ricorrendo ad un metodo di risoluzione numerico e con opportune condizioni al contorno. La più importante e la più usata tra le condizioni al contorno è quella di *no-slip*, secondo cui le velocità all'interfaccia tra due diverse fasi devono essere uguali. Di conseguenza la velocità di un fluido in prossimità delle pareti di un canale microfluidico sarà nulla (*Ong and Fu et al., 2008*).

Nel caso di moto laminare il profilo di velocità è spesso facile da determinare a partire da parametri come la geometria dei canali, le perdite di carico e le proprietà del fluido. Grazie all'invariabilità del profilo di velocità lungo la coordinata assiale, le linee di flusso del fluido rimangono costanti nel tempo e il miscelamento di più correnti avviene esclusivamente per diffusione. Su piccola scala, inoltre, aumenta significativamente la superficie specifica del sistema; ciò comporta un migliore scambio di materia.

A seconda della geometria del sistema microfluidico e delle condizioni operative può prevalere un moto di tipo convettivo o diffusivo. In genere nei microsistemi le velocità dei fluidi in gioco sono relativamente basse, quindi la variabile cruciale per calcolare il numero di Peclet e caratterizzare il regime di moto del sistema è la lunghezza dei canali. Per canali sufficientemente lunghi il numero di Peclet risulta maggiore dell'unità e il sistema si troverà in regime convettivo, viceversa si avrà un regime diffusivo.

1.4 Microfluidica e applicazioni biologiche

In campo biologico grande interesse è rivolto all'introduzione di nuove tecnologie che permettano la coltura e gestione di esperimenti multiparametrici automatizzati, consentendo allo stesso tempo analisi qualitative e quantitative in tempo reale. Un accurato controllo delle colture cellulari è ottenibile attraverso la loro miniaturizzazione (*Folch and Toner, 2000*).

Operare con colture cellulari a livello di microscala consente un maggiore controllo del microambiente permettendo di mimare con maggior precisione le interazioni tra cellule e matrice extracellulare presente *in vivo*. Un controllo simile a livello cellulare non sarebbe possibile in colture statiche, dove il contenuto di nutrienti e fattori solubili cambia continuamente nel tempo (*Kim and Yu et al., 2007*).

Alti livelli di organizzazione strutturale di tessuto funzionale *in vivo* possono essere replicati *in vitro* attraverso l'utilizzo delle tecniche litografiche, che rappresentano un metodo semplice

e versatile per raggiungere un elevato controllo sulla scala dei micron dell'organizzazione spaziale del substrato (*Whitesides and Ingber et al., 2001*).

Piattaforme microfluidiche per colture cellulari combinano i vantaggi della miniaturizzazione e dell'osservazione a microscopio in tempo reale con l'abilità di modellare substrati cellulari, variando nel tempo la composizione dei *medium* per colture e ottenendo condizioni molto più simili a quelle fisiologiche di qualsiasi altro sistema *in vitro*, in termini di apporto di nutrienti e regolazione delle stimolazioni (*Gòmez-Sjöberg and Quake, 2007*).

La microfluidica offre l'opportunità di studiare con grande risoluzione sistemi multicellulari e a singola cellula permettendo un controllo localizzato delle condizioni sperimentali all'interno del sistema (*Breslauer and Lee et al., 2006*).

1.5 Motivazione e scopo della tesi

I meccanismi che sottostanno all'insorgenza di malattie dismetaboliche sono ancora poco conosciuti. Elevato interesse è rivolto al ruolo del glucosio come mezzo chiave per ottenere informazioni specifiche legate a disfunzioni nella sua regolazione ciclica. Conoscere in dettaglio come avviene il suo trasporto attraverso la membrana e consumo da parte delle cellule risulta decisivo nella ricerca. Fondamentale a tale scopo risulta disporre di metodi di misura che forniscano informazioni sul suo contenuto a livello cellulare e subcellulare in modo robusto, ripetibile e fisiologicamente compatibile con la coltura stessa.

I metodi convenzionali attualmente più diffusi per la misura del glucosio intracellulare sono invasivi, presentano una bassa risoluzione spazio-temporale, forniscono dati per un'intera popolazione di cellule e talvolta utilizzano isotopi radioattivi.

La metodologia FRET associata ad un nanosensore (cromoforo) per il glucosio è stata sviluppata negli ultimi anni; essa risulta uno strumento sensibile al monitoraggio del trasporto di glucosio e della sua concentrazione nel citoplasma (*Kim and Williams et al., 2012*).

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è misurare la dinamica del glucosio intracellulare ad alta risoluzione spazio temporale mediante nanosensore FRET utilizzando una piattaforma microfluidica automatizzata.

Il nanosensore FRET per il glucosio, già applicato con colture cellulari (tra tutte le HEK), è utilizzato in questo caso con C2C12, una linea cellulare derivata da cellule muscolari murine in grado di ben mimare la fisiologia del muscolo scheletrico *in vivo*. Il muscolo scheletrico è stato scelto poiché rappresenta uno dei tessuti *target* nello studio di numerose malattie metaboliche, in particolare il diabete. Questa linea cellulare è facile da gestire in laboratorio e mantiene inalterate le sue caratteristiche nel tempo, a beneficio della riproducibilità degli esperimenti. Queste caratteristiche rendono le C2C12 un ottimo modello di partenza per lo sviluppo di questo lavoro.

Il lavoro realizzato ha presupposto la messa a punto un apparato strumentale per la coltura automatizzata di mioblasti murini (C2C12) in ambiente microfluidico e lo sviluppo di un sistema in grado di riprodurre stimolazioni cicliche di glucosio variabili in ampiezza, fase e concentrazione attraverso la perfusione in una camera di coltura microfluidica. Si ottiene un effetto sinergico dovuto all'utilizzo di tecnologie che ben mimano condizioni di ambiente fisiologico per le cellule (camere di coltura microfluidiche) ad una bassa invasività e alta risoluzione del metodo di misura (metodologia FRET).

Il glucosio intracellulare, misurato in tempo reale, viene rilevato con precisione attraverso l'utilizzo di nanosensori sensibili al glucosio prodotto direttamente dalle cellule stesse dopo l'inserimento di materiale genetico esogeno con un procedimento di transfezione. Con questa tecnica è possibile analizzare la risposta a variazioni di concentrazioni di glucosio su una singola cellula con una risoluzione di alcuni secondi. Si è successivamente provveduto alla calibrazione delle sonde e allo sviluppo di un protocollo ottimale di analisi. Il *range* di misura determinato durante la calibrazione è quello corrispondente a condizioni basali di glucosio tra 0.5 e 5mM.

L'accumulo di glucosio intracellulare, e quindi la risposta del sensore, è determinato da un equilibrio tra l'*uptake* dovuto al trasporto attraverso la membrana e il consumo dovuto alla glicolisi. Quando il sistema di trasporto è in equilibrio si raggiunge lo stato stazionario dove consumo e *uptake* sono bilanciati. La velocità di accumulo può essere ottenuta dalla pendenza della risposta a stimoli di glucosio rispetto a condizioni di privazione (concentrazione extracellulare pari a 0mM).

Alla fine del lavoro è stato analizzato l'effetto sulla concentrazione dovuta ad inibitori dei trasportatori del glucosio e della glicolisi. Queste applicazioni specifiche hanno permesso di valutare l'applicabilità del nanosensore come strumento per lo studio ad alta risoluzione degli effetti dovuti a sostanze biochimiche in grado di interagire con il ciclo di regolazione del glucosio.

I nanosensori FRET per il glucosio, oltre ad aprire molte strade nello studio della fisiologia cellulare, possono costituire uno strumento semplice, ripetibile ed economico, capace di ridurre notevolmente i tempi e costi di valutazione farmacologica degli effetti di principi attivi che inibiscono o stimolano l'*uptake* di glucosio.

Capitolo 2

Materiali e metodi

In questo capitolo sono descritti i materiali e metodi impiegati nel seguente lavoro di tesi. Saranno illustrate le tecniche di soft litografia applicate rispettivamente nella tecnica dello stampo per replica con un polimero elastomerico per la creazione di *microchips* semplici monostrato e nella tecnica *on-ratio* e *off-ratio* per la fabbricazione di piattaforme microfluidiche integrate multistrato.

Il lavoro ha compreso la progettazione e la messa a punto di un'apparecchiatura automatizzata per il controllo di piattaforme multistrato per la gestione della perfusione di *buffer* salino in camere microfluidiche. Vengono inoltre illustrate le tecniche per la semina e il mantenimento di colture cellulari C2C12 in piattaforme microfluidiche ed il loro impiego negli esperimenti mediante metodologia FRET.

Nell'ultima parte sono riportati i protocolli per gli esperimenti svolti e la metodologia di analisi dei dati.

2.1 Soft litografia

La microfabbricazione, ovvero la generazione di microstrutture, è essenziale per molte scienze e tecnologie moderne. La miniaturizzazione e l'integrazione di una serie di dispositivi hanno vantaggi nei fenomeni di trasporto; riducono tempi, costi, quantità dei reagenti e consumo di energia, migliorano i limiti di rilevazione (*Xia and Whitesides, 1998*).

Il *patterning* richiesto nella microfabbricazione dei dispositivi utilizzati è ottenuto tramite soft litografia, una tecnica basata su assemblaggio e riproduzione tramite stampo.

Il termine "*soft*" deriva dall'impiego di materiali elastomerici tra i quali il più utilizzato è il polidimetilsilossano o PDMS. L'elemento chiave della soft litografia è uno stampo elastomerico sulla cui superficie sono impresse strutture in rilievo. Per imprimere un determinato *pattern* è necessario innanzitutto produrre un master rigido, su wafer di silicio o vetro, che viene utilizzato come stampo.

Il presente lavoro di tesi ha visto l'impiego del processo di soft litografia, riportato in Figura 2.1, che può essere riassunto nelle seguenti fasi:

- ideazione di una specifica geometria e stampa in alta definizione su carta trasparente;
- deposizione di uno strato omogeneo e di spessore noto di polimero fotosensibile su wafer di silicio pretrattato, tramite uno *spin coater*;

- pretrattamento termico del photoresist e successiva esposizione a radiazioni UV (la reticolazione delle zone esposte alle radiazioni viene completata con un secondo trattamento termico);
- eliminazione delle zone non reticolate con opportuno solvente e conseguente ottenimento del master;
- trattamento del master con clorotrimetilsilano;
- deposizione di uno strato di PDMS non reticolato e successiva reticolazione per via termica;
- rimozione dello stampo in PDMS.

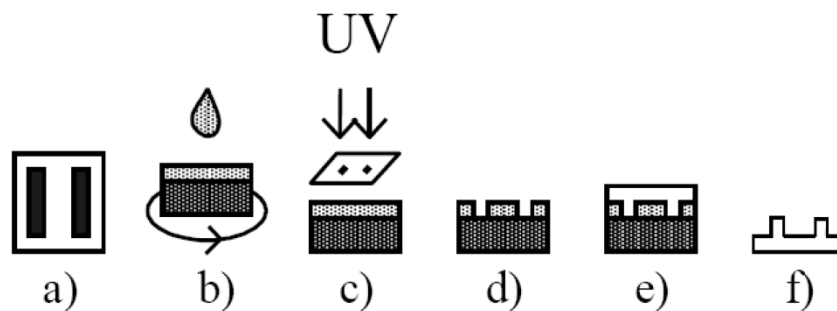


Figura 2.1 Schematizzazione del processo di soft litografia: (a) realizzazione della fotomaschera; (b) deposizione del photoresist su wafer di silicio tramite spin-coater; c) esposizione a raggi UV; (d) sviluppo del master con opportuno solvente, con eliminazione delle zone non reticolate; (e) deposizione del PDMS e successiva reticolazione; (f) ottenimento dello stampo solido in PDMS

2.1.1 Creazione della fotomaschera

Il primo passo per la produzione di chip microfluidici è la creazione grafica della fotomaschera. Quest'ultima è la stampa a grandezza naturale su fogli trasparenti della geometria dello stampo che si desidera ottenere; essa viene creata con un programma di disegno vettoriale come Autocad (Autodesk).

Il disegno della geometria richiede regole precise come riportato nel sito della *Stanford Microfluidics Foundry* della *Stanford University*, (California, USA). Sono stati adottati i seguenti accorgimenti: rapporti altezza-larghezza dei canali superiori a 1:10 che impediscono alla struttura di collassare, l'utilizzo di *marker* per l'allineamento, la grandezza e la distanza tra i fori di ingresso ed uscita del fluido. La scala è impostata in micron per facilitare il disegno in Autocad, con una precisione nelle lunghezze fino a 4 decimali.

Completato il disegno è necessario scalare l'intera geometria dell'1.5%, moltiplicando tutte le lunghezze per 1.015; questo per compensare il ritiro del polimero nel momento in cui viene estratto dallo stampo in silicio dopo polimerizzazione.

Nel disegno della geometria di un *wafer*, risulta conveniente sfruttare in modo ottimale lo spazio a disposizione, inserendo il maggior numero possibile di *microchips*.

Una volta terminato il disegno, avendolo suddiviso in zone chiuse grazie al comando polilinea, si procede alla colorazione della fotomaschera. Il file .dwg è convertito e colorato utilizzando il programma Adobe Illustrator (Adobe) che permette di colorare opportunamente di nero o bianco le zone del disegno, distinguendo ciò che risulterà in rilievo da ciò che non lo sarà nel momento dello sviluppo. Precisamente per un *photoresist* negativo si colora di nero tutto ciò che non deve essere in rilievo (la luce UV non passa e il polimero non reticola) mentre i canali, le camere, le scritte che compongono la geometria sono lasciati in bianco.

In quest'ultima fase il disegno è inviato alla stampa su lastra fotografica trasparente. La precisione richiesta è di almeno 8000 dpi, garantita da una stampante laser ad alta risoluzione. Il risultato finale è una lastra con zone di trasparenza e di opacità in corrispondenza del disegno geometrico da riprodurre sul *wafer*.

2.1.2 Creazione del master tramite fotolitografia

Il master rigido (*mold*) è ottenuto tramite un processo di microfabbricazione che si basa sulla deposizione di *photoresist* su wafer di silicio, sul quale viene impressa la geometria desiderata.

Il *photoresist* utilizzato (SU-8 2000) è una resina epossidica fotosensibile negativa, chimicamente e termicamente stabile, fornita dall'azienda Microchem. La ditta fornisce anche le indicazioni per il protocollo del processo fotolitografico.

2.1.2.1 Pretrattamento del wafer

Si utilizza un wafer di silicio di tipo N, di diametro di 76.2 mm; per ottenere un miglior risultato, il substrato di silicio è pulito ed asciugato prima di depositare il *photoresist*.

La pulizia viene effettuata utilizzando in successione acetone, metanolo ed infine acqua deionizzata. Il wafer viene posto in piastra calda a 120°C per almeno 15 minuti in modo tale che l'acqua eventualmente presente sulla superficie possa evaporare, al fine di non compromettere la successiva adesione del *photoresist*.

In questa fase di pretrattamento è di fondamentale importanza evitare che il wafer venga sporcato da polvere o simili.

2.1.2.2 Deposizione del photoresist

In questa fase si vuole ottenere un *wafer* di silicio con depositato del *photoresist* polimerizzato con un'altezza di 100µm, da utilizzare come stampo per la produzione di un *microchip* semplice monostrato.

Le operazioni che seguono devono essere condotte al buio per evitare la preventiva reticolazione del polimero fotosensibile: l'unica fonte di luce utilizzabile è una lampada a luce gialla adatta allo scopo.

Il wafer viene posto sullo *spin coater* (WS-650-23NPP della Laurell) depositando centralmente una quantità di *photoresist* necessaria a ricoprire circa il 30% della superficie del wafer stesso (circa 1ml ogni 25mm di diametro del substrato), evitando di formare bolle d'aria.

Il *photoresist* SU-8 2000 (Microchem) è disponibile in dodici viscosità standard, che permettono di ottenere spessori da 0.5 a più di 200 micron con un singolo processo di deposizione. Per ottenere una struttura dell'altezza di 100 micron si utilizza il SU-8 2100, per il quale viene fornita, dalla ditta produttrice, la relazione tra lo spessore del film di polimero ottenibile e la velocità di rotazione del secondo *step*.

Lo *spin coater* è quindi avviato con il seguente programma:

- 1° *step*: velocità di *spin* di 500rpm per 10 secondi con accelerazione di 100rpm/sec;
- 2° *step*: velocità di *spin* di 3000rpm per 45 secondi con accelerazione di 300rpm/sec.

Il wafer rimosso dallo *spin coater* viene lasciato in una piastra di Petri chiusa a riposo in superficie piana per almeno 10 minuti, in modo da uniformare la superficie di polimero depositata.

2.1.2.3 Trattamento termico ed esposizione

La fase di deposizione del *photoresist* è seguita dal riscaldamento su piastra (*soft-bake*) al fine di distendere le tensioni interne al materiale e far evaporare parzialmente il solvente presente al suo interno. La precottura avviene a 95°C su piastra riscaldante (Torrey Pines Scientific), la cui durata è funzione dello spessore del film depositato. Per lo spessore di 100 micron il wafer è lasciato in piastra riscaldante per 15 minuti.

Per l'esposizione si utilizza una lampada a raggi UV (OAI) con lunghezza d'onda 365nm. L'energia di esposizione E_e , da impostare prima dell'esposizione, viene fornita in base allo spessore desiderato; per 100 micron l'esposizione è di 230mJ/cm².

L'intensità di emissione I della lampada è letta a *display* in mJ/s cm² e varia in base al tempo di vita della lampada. È possibile quindi determinare il tempo di esposizione t secondo la seguente formula:

$$t = \frac{E_e}{I}. \quad (2.1)$$

La lampada ha un tempo di riscaldamento di circa 20 minuti. Prima di procedere con l'esposizione è necessario adagiare la fotomaschera sul wafer con la parte lucida a contatto con il substrato. Questo permette che, una volta esposto alle radiazioni, polimerizzi solo la zona di polimero in corrispondenza delle zone trasparenti.

2.1.2.4 Trattamento termico e sviluppo

Il trattamento termico che segue l'esposizione prevede una prima fase detta Post Exposure Bake (PEB) necessaria a favorire la completa reticolazione del polimero e l'evaporazione dei

solventi. Anche in questo caso si pone il wafer in piastra riscaldante a 95°C per un tempo che dipende dallo spessore di *photoresist* (10 minuti per 100 micron).

La fase di sviluppo successiva prevede l'impiego di un apposito solvente per eliminare le zone non reticolate: viene utilizzato metossimetacrilato (Sigma). Il wafer viene immerso in una piastra di vetro contenente il solvente e agitato mediante un oscillatore automatico (Grant). Il tempo di sviluppo è determinato dallo spessore di *photoresist*: il protocollo prevede 10 minuti per un'altezza di 100 micron; tuttavia si è notato che tempi di qualche minuto inferiori a quelli consigliati sono sufficienti per ottenere uno sviluppo completo. Durante lo sviluppo è necessario controllare lo stato di avanzamento circa ogni minuto, a partire dal quarto minuto di sviluppo, in modo da terminarlo prima che subentri un sovrasviluppo del *photoresist*.

Per controllare lo stato dello sviluppo ed infine bloccare l'operazione si utilizza alcol isopropilico (Sigma). Il wafer viene poi asciugato con un getto di aria compressa fino a che i reagenti utilizzati non sono evaporati completamente.

Il trattamento termico finale detto *Hard Bake* migliora le proprietà meccaniche dello stampo al fine di assicurarne la durata nel tempo. Il *photoresist* SU-8 2000 è una resina termica e le sue proprietà possono cambiare ogni volta che viene esposta a temperature superiori alle quali non è mai stata sottoposta. L'*Hard Bake*, durante il quale si raggiungono temperature superiori a quelle di normale utilizzo, avviene su piastra riscaldante programmabile come segue:

- 1° *step*: 65°C per 2 minuti;
- 2° *step*: rampa di 120°C/h fino ad una temperatura di 160°C;
- 3° *step*: mantenimento a 160°C fino a 2 ore di *Hard Bake* totale;
- 4° *step*: ritorno a temperatura ambiente a piastra spenta.

In Tabella 2.1 sono riportate alcune proprietà fisiche del *photoresist* dopo la reticolazione.

Tabella 2.1 Valori approssimati di alcune proprietà fisiche del *photoresist* dopo reticolazione

PROPRIETÀ	VALORE
Forza di adesione (mPa) Silicon/Glass	38/35
Temperatura di transizione vetrosa, T _g (°C)	210
Stabilità termica (°C @ 5% wt. Loss)	315
Conducibilità termica (W/mK)	0.3
Carico di rottura (Mpa)	60
Allungamento a rottura (%)	6.5
Modulo di Young (Gpa)	2.0

2.1.3 Produzione dello stampo in PDMS per piattaforma microfluidica

La produzione dello stampo in silicone richiede tre passaggi fondamentali:

- preparazione di una miscela liquida, composta da una base e un agente reticolante;

- deposizione della miscela sul master rigido ottenuto tramite processo fotolitografico;
- cottura del PDMS ed estrazione dello stampo.

Prima di illustrare dettagliatamente le fasi di produzione dello stampo in silicone, verranno descritte le caratteristiche principali del PDMS.

2.1.3.1 Proprietà del PDMS

I polidimetilsilossani hanno una combinazione unica di proprietà che deriva dalla presenza di una catena silossanica inorganica e gruppi metilici organici attaccati alla catena. Questi elastomeri si adattano bene alle superfici, anche non planari nella scala micrometrica, e su aree relativamente ampie (*Xia and Whitesides, 1998*).

Il polidimetilsilossano, o PDMS, è caratterizzato da una bassa temperatura di transizione vetrosa e quindi è fluido a temperatura ambiente, ma può essere convertito rapidamente in solido tramite *cross-linking*.

Il PDMS elastomero più comunemente utilizzato è il Sylgard 184 della Dow Corning. Viene fornito in un kit contenente una base costituita da una gomma siliconica liquida (PDMS terminante con gruppi vinilici) ed un agente reticolante (miscela di un complesso al platino e copolimeri di metilidrossisilossano e dimetilsilossano), che vengono miscelati tra loro in un determinato rapporto. A questo punto la miscela viene versata sul master e scaldata ad elevate temperature per ottenere un elastomero solido e cross-linkato, grazie alla reazione tra i gruppi vinilici ($\text{SiCH}=\text{CH}_2$) e idrosilanici (SiH).

Il materiale così ottenuto è caratterizzato da una bassa tensione superficiale (~ 21.6 dyn/cm) e da una buona stabilità chimica, inoltre, non essendo igroscopico, non rigonfia con l'umidità. Altra caratteristica è la permeabilità ai gas, in particolare all'ossigeno e all'anidride carbonica, e la stabilità termica (fino a circa 186°C in aria); è trasparente dal punto di vista ottico fino a 300nm e quindi può essere trattato anche tramite raggi UV. Il PDMS elastomero è isotropico e omogeneo e gli stampi che si ottengono possono essere deformati meccanicamente per manipolare le strutture impresse. Uno stesso stampo di PDMS, inoltre, può essere usato più volte per vari mesi senza che si abbia una diminuzione apprezzabile delle performance. Nella Tabella 2.2 sono riportate alcune caratteristiche fisiche e meccaniche del PDMS, prima e dopo la reticolazione.

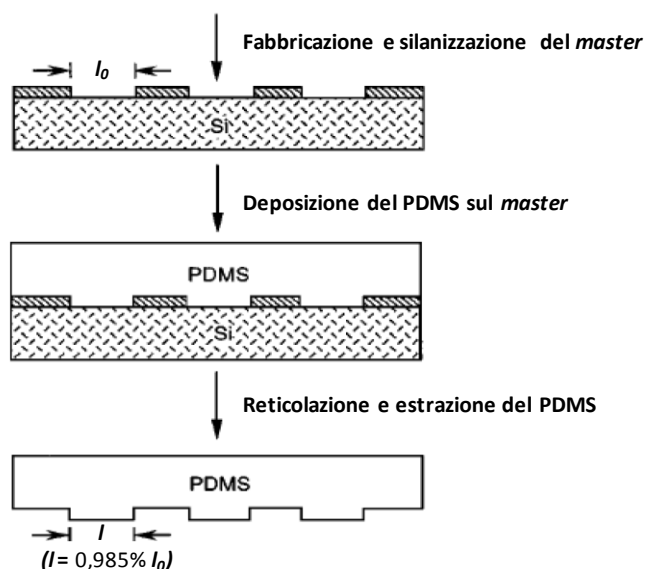
Tabella 2.2 Valori di alcune proprietà fisiche e meccaniche del PDMS prima (*) e dopo reticolazione (**).

PROPRIETÀ	VALORE
Viscosità @ 23°C (mPa×s) *	4000
Tempo di passivazione @ 23°C (ore) *	2
Resistenza alla trazione (MPa) **	7.1
Allungamento a rottura (%) **	140
Coefficiente di conduttività termica (W/m×K) **	0.17
Rigidità dielettrica (kV/mm) **	6.5
Permittività **	2.75

Il PDMS presenta alcune criticità: si restringe di circa l'1.5% in seguito al processo di cottura, inoltre la morbidezza propria di un elastomero limita l'*aspect-ratio* delle microstrutture che si vogliono ottenere, ne consegue che quando il rapporto altezza-lunghezza è troppo alto o troppo basso la struttura può subire deformazioni o distorsioni che provocano difetti nello stampo finale.

2.1.3.2 Produzione stampo in PDMS

Lo stampo elastomerico viene preparato mediante *cast molding*: un prepolimero dell'elastomero viene versato su un master con impressa una struttura in rilievo sulla superficie e dopo la successiva reticolazione viene estratto. Il master viene a sua volta fabbricato tramite fotolitografia. Nella Figura 2.2 sotto riportata viene illustrata in modo schematico la procedura di fabbricazione di uno stampo in PDMS.

**Figura 2.2** Schema della produzione di uno stampo in PDMS

Il silicone (Sylgard 184, Dow Corning) si ottiene miscelando tra loro in un recipiente la base ed un agente reticolante. Viene solitamente utilizzato un rapporto in peso di 10:1 tra base ed

agente reticolante. La quantità di silicone da utilizzare varia in base all'altezza che si vuole ottenere nello stampo finale.

La soluzione ottenuta viene mescolata energeticamente per qualche minuto al fine di renderla il più omogenea possibile. A questo punto è necessario togliere tutte le bolle di aria che sono state inglobate durante l'agitazione per evitare difetti nella struttura finale. Il recipiente viene posto in una camera di degasaggio chiusa ermeticamente e collegata ad una pompa da vuoto. Una volta tolta l'aria all'interno della camera si stacca la pompa a vuoto e si lascia riposare per circa 20 minuti per poi sfiatare lentamente: in questo modo le bolle d'aria hanno il tempo di risalire all'interno della soluzione verso l'interfaccia dove coalescono per poi esplodere. È possibile velocizzare il processo ripetendo le fasi di degasaggio e sfiato per 2-3 volte nei primi minuti.

Nel frattempo il substrato di silicio è posto sotto cappa chimica in un contenitore chiuso, all'interno del quale vi è un becher con circa un millilitro di clorotrimetilsilano (Aldrich) per circa 10 minuti. Questo trattamento, detto silanizzazione, serve a far depositare un film di silano sulla superficie del *mold* per favorire la successiva fase di estrazione dello stampo di PDMS.

Il silicone degasato viene depositato sul wafer in cui è impressa la geometria da trasferire sullo stampo finale e in seguito viene ripetuta l'operazione di rimozione delle eventuali bolle formatesi durante questa fase.

Il wafer ricoperto di silicone è posto in un forno caldo per un tempo sufficiente alla reticolazione. La polimerizzazione completa può essere ottenuta lasciando lo stampo a 80°C per 90 minuti o a 65°C per 120 minuti.

Una volta finita la cottura lo stampo viene estratto separando la parte di silicone dal wafer di silicio.

2.1.4 Fabbricazione e unione tramite tecnica di adesione al plasma

Lo stampo in silicone viene tagliato mediante dei bisturi per conferirne la forma finale. È necessario praticare dei fori per l'ingresso e l'uscita del liquido: per fare ciò si utilizzano degli aghi *dispenser tips* 20G con diametro esterno di 0.91mm (Nordson EFD).

Infine, per creare i canali e le camere microfluidiche che danno origine alla piattaforma, è necessario saldare lo stampo in PDMS ad una superficie piana e priva di residui. Per far ciò si utilizza il trattamento al plasma, che permette di unire in modo irreversibile due strati di PDMS o uno strato di PDMS al vetro.

Le superfici da plasmare devono essere pulite in modo da eliminare polvere e residui di PDMS derivati dalla precedente fase. A questo proposito si utilizza del nastro adesivo (3M-Scotch) che viene fatto aderire e poi rimosso per 4-5 volte dalla superficie dello stampo in

silicone da plasmare. Il vetro è lavato con *Micro-90 cleaning solution* (Sigma) al 2% in acqua e asciugato con aria compressa.

Per generare il plasma, ovvero un gas parzialmente ionizzato ma neutro, si utilizza un “*Plasma cleaner*” (Harrick Plasma). La camera chiusa, in cui si inseriscono gli strati con le superfici da far aderire tra loro rivolte verso l’alto, viene portata sottovuoto fino a raggiungere una pressione di circa 0.3mbar, garantendo all’interno della camera un costante ingresso di aria dall’esterno, necessaria per la generazione del plasma stesso. Il bombardamento da parte di ioni ad alto livello energetico, formati attraverso l’applicazione di intensi campi magnetici, porta alla formazione di radicali sulle superfici interessate, rendendole adesive.

Dopo un tempo di esposizione pari a due minuti, i pezzi estratti vengono fatti aderire tra loro ciò che si osserva è una forte adesione grazie alla formazione di legami covalenti tra le due superfici. Il processo di plasmatura è irreversibile e permette un solo tentativo entro i 2-3 minuti successivi all’esposizione.

La piattaforma microfluidica è infine posta in piastra riscaldante (Falc) a 100°C per almeno 15 minuti.

2.2 Piattaforma microfluidica multistrato in PDMS integrata

Nel presente paragrafo si descrive parte di una tecnica chiamata “*multilayer soft lithography*” che combina la soft litografia con la capacità di plasmare assieme più strati di elastomero con diverse funzioni (Unger et al, 2000).

Questa tecnica permette di formare piattaforme microfluidiche multistrato, con strutture a complessità crescente in base al numero di strati, con *pattern* e funzioni diverse, plasmati assieme. Il presente lavoro di tesi limita la spiegazione ai *microchips* formati da due soli strati, detti *layers*.

Il vantaggio è dato dalla possibilità di integrare al loro interno sistemi semiautomatizzati o completamente automatizzati di controllo e movimentazione del fluido, riducendo così il numero di dispositivi esterni necessari. Questo permette di controllare tutta la movimentazione dei fluidi interna al *microchip* per mezzo di un PC, aumentandone la precisione e diminuendo le operazioni svolte da operatore.

Prima della descrizione della fabbricazione piattaforme microfluidiche multistrato integrate mediante le tecniche *on-ratio* e *off-ratio*, sarà descritto nel successivo paragrafo l’elemento base di questi dispositivi: la valvola micromeccanica.

2.2.1 Le valvole micromeccaniche

Le valvole micromeccaniche (o microvalvola a membrana) danno la possibilità di creare piattaforme microfluidiche integrate di alta complessità, dove singoli componenti con

funzioni diverse (valvole, pompe peristaltiche, multiplexer) sono integrati in un unico chip per eseguire specifiche applicazioni.

La microvalvola è l'elemento che sta alla base del trasporto di fluido e ha un ruolo analogo a quello del transistor nei semiconduttori elettronici (Melin and Quake, 2007).

Essa è prodotta attraverso lo stampo in PDMS da due diversi *masters* rigidi: uno per lo strato dei canali del liquido in flusso (*flow layer*) e uno che contiene i canali che deflettono la membrana della valvola nei canali del flusso e fermano il liquido quando sono pressurizzati (*control layer*). La membrana elastica si forma quando i due stampi di silicone sono plasmati assieme, in modo tale da permettere ai canali del controllo e ai canali del *flow layer* di intersecarsi ortogonalmente (Figura 2.3).

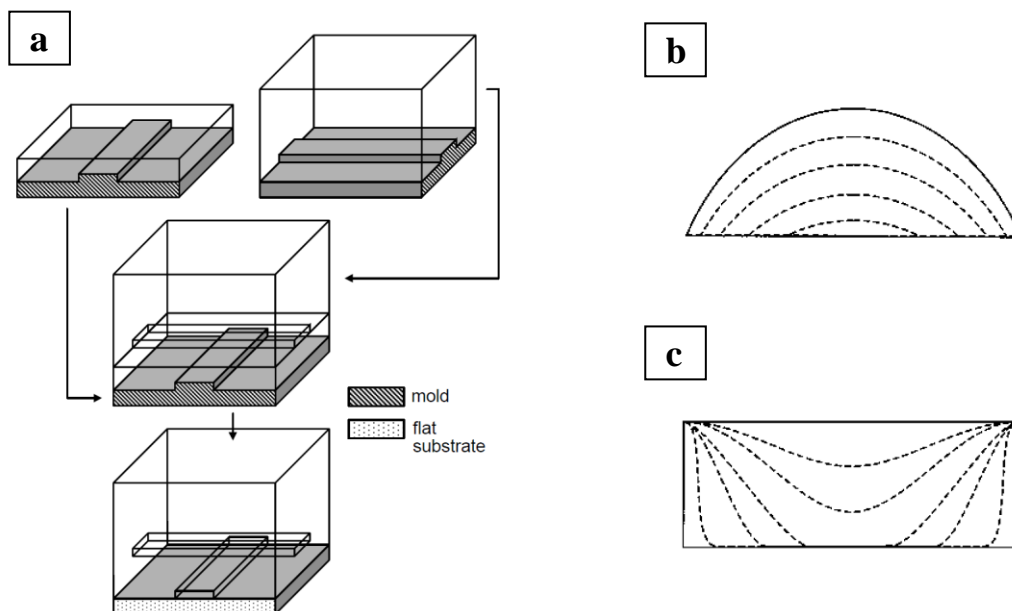


Figura 2.3 (a) Schema di fabbricazione per soft litografia multistrato. Lo strato superiore è spesso circa 4mm per conferire stabilità meccanica, mentre gli altri strati sono sottili. (b) e (c) schema di chiusura per microvalvole semicircolari e rettangolari. Le linee tratteggiate indicano la deflessione della membrana; una chiusura completa si ottiene solamente con valvola semicircolare

I canali del *flow layer* devono avere un profilo semicircolare (Figura 2.3b) per permettere alla membrana di aderire perfettamente e chiudere il passaggio del liquido quando è attuata.

La microvalvola è di tipo *on-off* e la geometria della membrana (altezza, larghezza e spessore) ne determinano la pressione p (o meglio il Δp) di attuazione. Si riportano in Tabella 2.3 le dimensioni della larghezza dei canali di *control* e *flow layer* che formano una valvola consigliate dalla *Stanford Microfluidics Foundry* in base alla differenza pressione idraulica tra i due strati.

Tabella 2.3 Dimensioni delle valvole in base alla differenza di pressione degli strati come riportato sul sito della Stanford Microfluidics Foundry

PUSH-DOWN VALVE			PUSH-UP VALVE		
VALVE AREA	FLOW CHANNEL HEIGHT	CLOSING PRESSURE	VALVE AREA	FLOW CHANNEL HEIGHT	CLOSING DIFFERENTIAL PRESSURE
100um x 100um	5um	10psi	100um x 100um	5um	5psi
100um x 100um	10um	10psi	100um x 100um	10um	5psi
100um x 100um	15um	10psi	100um x 100um	15um	5psi
N/A	20um	N/A	100um x 100um	20um	5psi
N/A	25um	N/A	150um x 150um	25um	5psi
N/A	30um	N/A	150um x 150um	30um	5psi
N/A	35um	N/A	150um x 150um	35um	5psi
N/A	40um	N/A	200um x 200um	40um	5psi
N/A	45um	N/A	200um x 200um	45um	5psi

2.2.1.1 Microvalvole *Push-up* e *Push-down*

Nelle piattaforme microfluidiche integrate multistrato le microvalvole sono formate da uno strato più sottile ed uno più spesso. Lo spessore dello strato sottile, ovvero lo strato che sta tra il vetro e lo strato spesso, è dato dall'altezza dei canali di cui è composto sommata allo spessore della membrana di attuazione della valvola.

Si possono avere due tipi di valvole a seconda della posizione del canale del *flow layer* rispetto al *control layer*. Nel tipo *Push-down* (Figura 2.4) la pressione idraulica nei canali di controllo flette la membrana verso il basso, all'interno dei canali del liquido, determinandone la chiusura. In questo caso i canali del controllo sono all'interno dello strato spesso, e la membrana ricopre il canale del fluido. Questa geometria è adatta a canali di flusso bassi, con rapporto altezza/profondità massimo di 1:10.

Al contrario, quando il canale di controllo passa al di sotto del canale di flusso si ha una microvalvola di tipo *Push-up* (Figura 2.5). La pressurizzazione idraulica del canale di controllo fa deflettere la membrana verso l'alto all'interno del canale del flusso bloccando il canale. In questo caso, per la medesima geometria, è necessaria una pressione minore per garantire la chiusura della valvola rispetto al tipo *Push-down*.

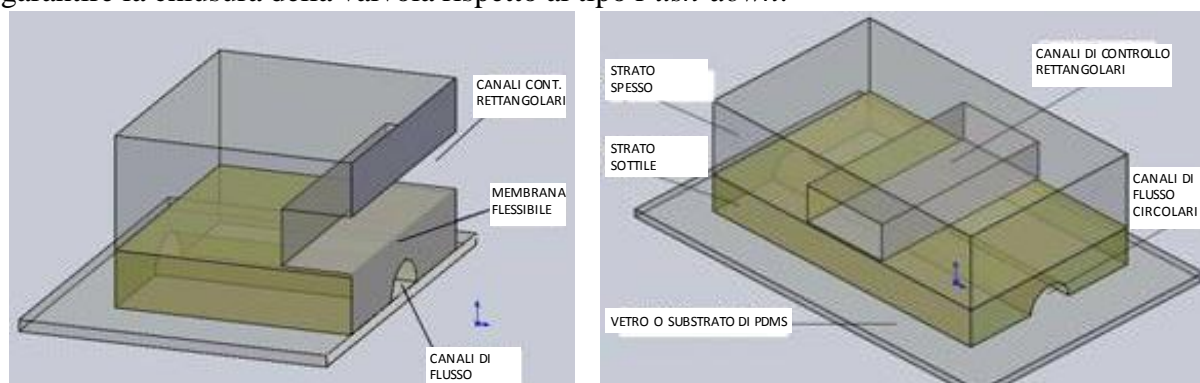


Figura 2.4 Valvola di tipo *Push-down* in sezione e vista dall'altro

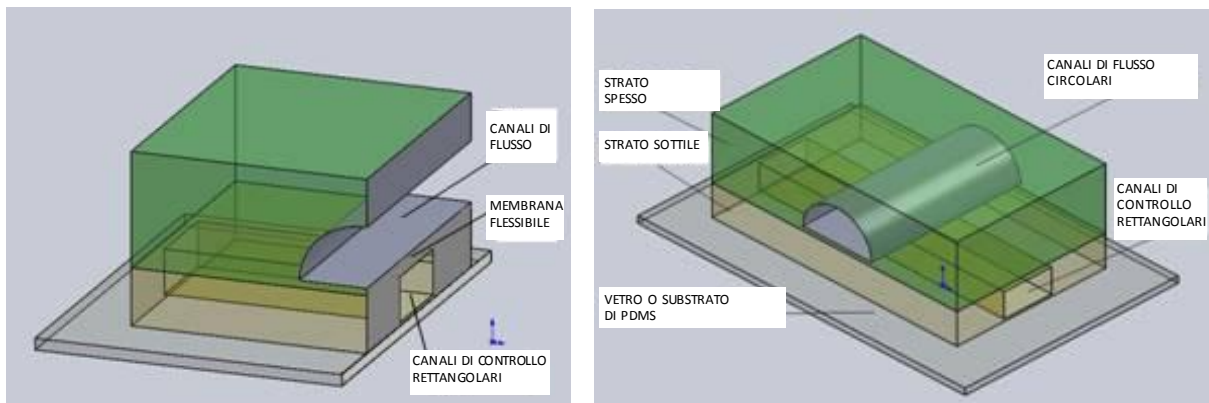


Figura 2.5 Valvola di tipo Push-up in sezione e vista dall'altro

Le piattaforme microfluidiche utilizzate nel lavoro descritto in questa tesi hanno tutte valvole di tipo *Push-up*.

In seguito è mostrata una generica valvola aperta (Figura 2.6a) e chiusa (Figura 2.6b) come la si può osservare a microscopio stereoscopico.

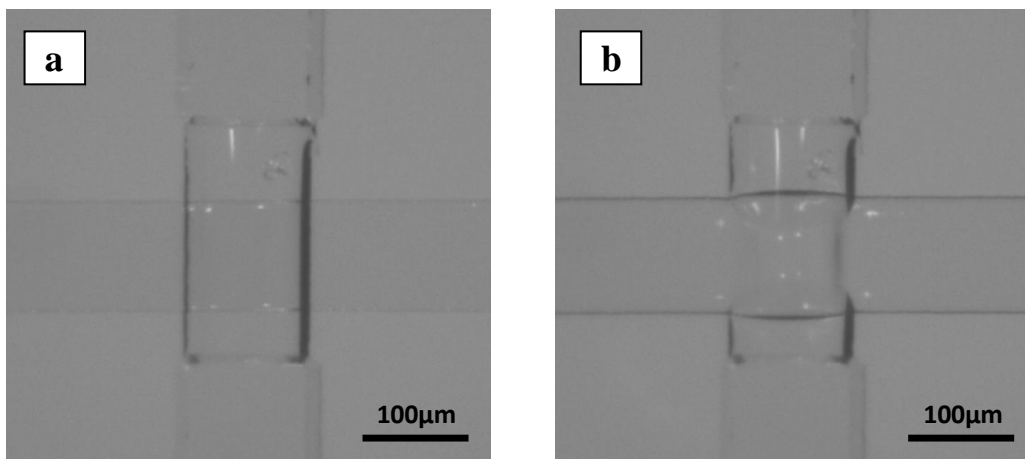


Figura 2.6 Microvalvola (a) aperta e (b) chiusa osservata a stereomicroscopio

2.2.1.2 Pompa peristaltica

Una serie di valvole attuate in sequenza può essere utilizzata come pompa peristaltica, come schematizzato in Figura 2.7a. Un movimento peristaltico del liquido interno al canale avviene quando tre microvalvole a membrana sono attuate con la sequenza 101, 100, 110, 010, 011, 001, dove 0 e 1 rappresentano rispettivamente una valvola aperta e chiusa (Figura 2.7b).

Una pompa di questo tipo permette il trasporto di una quantità molto precisa di liquido. Il dosaggio è controllato dal numero di cicli completi di attuazione della pompa mentre la velocità del liquido dalla frequenza alla quale le valvole sono attuate. Questo tipo di pompa sfrutta le proprietà elastiche del PDMS.

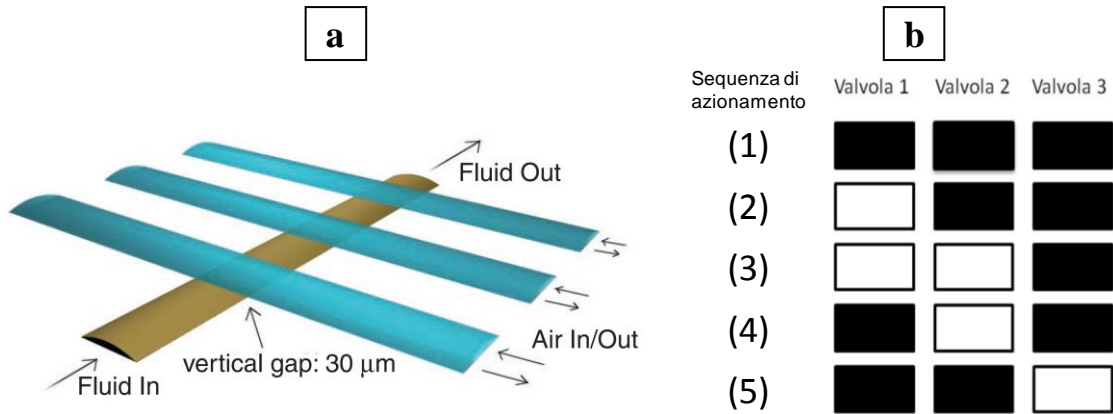


Figura 2.7 (a) Schema di una pompa peristaltica e (b) sequenza di azionamento

2.3 Produzione di *microchips* integrati mediante softlitografia

Sono qui descritti i metodi di fabbricazione di piattaforme microfluidiche integrate. Le fasi di produzione, già descritte nel paragrafo 2.1.3 per un *microchip* semplice, sono integrate nei paragrafi successivi.

2.3.1 Creazione delle fotomaschere

Sono create due diverse fotomaschere, una per il *control layer* e una per il *flow layer*. Per quanto riguarda le regole generali per creare una fotomaschera si rimanda al paragrafo 2.1.1. In questo paragrafo si integrano queste regole con ulteriori accorgimenti da seguire per la creazione di due fotomaschere, una per ogni strato, a complessità superiore.

I due strati sono disegnati sovrapposti in Autocad, ma su *layers* (inteso come strumento Autocad) diversi. È molto importante che nei due *layers* siano presenti dei *markers* sovrapposti, solitamente a forma di croci concentriche (esempi in Figura 2.8), indispensabili nella successiva fase di allineamento.

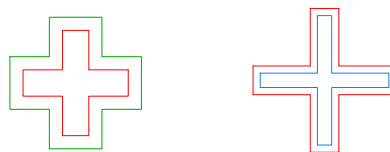


Figura 2.8 Esempi di markers (i due colori indicano che sono situati in layer diversi)

Ogni volta che un canale di controllo si sovrappone ad un canale del flusso e non si vuole creare una valvola, devono essere creati dei sostegni all'interno del canale di controllo, tali da permettere la compressione del canale del liquido che sta a valle, evitando l'ostruzione del canale di flusso in modo da impedire alla membrana di flettersi (Figura 2.9).

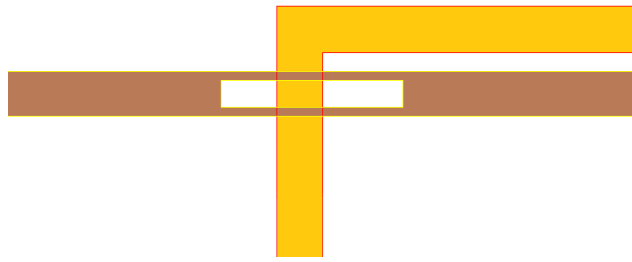


Figura 2.9 Intersezione tra canale di controllo (in marrone) e di flusso (in giallo) senza la creazione di una microvalvola. Grazie ai due piccoli condotti marroni la parte di canale di controllo a valle è messa in pressione.

Una volta completato il disegno, i due *layers*, disegnati sovrapposti in Autocad, vengono separati. Solo la geometria del *flow layer* è scalata dell'1.5% moltiplicando tutte le lunghezze per 1.015, questo perché prima della plasmatura si toglie dal *wafers* di silicio soltanto il lato spesso, che si ritira e diventa delle giuste dimensioni per essere allineato.

I due *layers* danno origine a due diverse fotomaschere, colorate in maniera diversa. I *photoresist* utilizzati, infatti, sono diversi: uno è positivo e l'altro negativo in quanto danno origine a canali semicircolari e rettangolari. Mediante il programma Adobe Illustrator si distingue ciò che è in rilievo da ciò che non lo è nel *master*. Per il *control layer* si colora di nero tutto ciò che non deve essere in rilievo (la luce UV non passa e il polimero non reticola) mentre i canali, le camere, le scritte che compongono la geometria sono lasciati in bianco. Al contrario per il *flow layer* si colora di nero tutto ciò che è in rilievo: i canali, le camere, le scritte; tutto il resto è lasciato in bianco.

Le fotomaschere sono stampate su lastra fotografica con una risoluzione di almeno 8000 dpi per garantire la riuscita di tutte le successive fasi di microfabbricazione.

2.3.2 Creazione dei master tramite fotolitografia

Si vogliono ottenere due *masters* di silicio con depositato del *photoresist* polimerizzato: uno per il *control layer* di spessore 30 μ m e uno per il *flow layer* di spessore 30 μ m. Per il primo si usa un *photoresist* (SU-8 2050, Microchem) che è una resina epossidica fotosensibile negativa mentre per il secondo si usa il *photoresist* SPR2207 (Rohm and Haas, Dow Chemical), che a differenza di quelli presi in considerazione fin ora è una resina epossidica fotosensibile positiva e forma dei canali semicircolari.

Per i protocolli di utilizzo si rimanda ai *data-sheet* delle rispettive ditte di produzione.

2.3.3 Produzione dei chip: tecnica off-ratio

Questa tecnica permette di legare due strati di PDMS a diversi rapporti base/agente reticolante, grazie alla diffusione dell'agente reticolante nei pochi micron della zona di contatto.

Questo protocollo permette di avere un allineamento molto preciso tra i vari strati, avvalendosi inoltre della relativa reversibilità del metodo prima della successiva reticolazione in forno.

È molto importante che tutto il metodo di lavorazione venga svolto in un ambiente pulito come una *clean room* ovvero in appositi contenitori privi di polvere, per non compromettere la funzionalità finale della piattaforma microfluidica. Per questo l'operatore deve indossare camice, guanti e cuffia.

Si descrive di seguito la tecnica *off-ratio* per la produzione di *microchip* con valvole di tipo *Push-up*.

2.3.3.1 Preparazione del silicone nei master

I due wafer di silicio, uno per il *control* e uno per il *flow layer*, vengono trattati in un contenitore chiuso con clorotrimetilsilano che rende più facile l'estrazione del PDMS. Terminato questo processo, della durata di 15 minuti, i due master vengono posti su due piastre di Petri dopo una pulizia da polvere e piccoli residui con aria compressa.

Per ottenere i due stampi elastomerici si miscelano tra loro in due recipienti la base ed un agente reticolante utilizzando un rapporto in peso tra base ed agente reticolante diverso per le due miscele. Lo strato sottile ha un rapporto base/reticolante 20:1 mentre lo strato spesso ha un rapporto 5:1. La modalità di preparazione e degasaggio è analoga a quella riportata nel paragrafo 2.1.3.2.

Anche le quantità di PDMS da preparare sono diverse, lo strato sottile (50 μ m) che forma il *control layer* necessita solo di qualche grammo di silicone, mentre lo strato spesso invece ha un'altezza di 25-45mm e necessita quindi di una quantità ben maggiore di polimero.

Il PDMS dello strato spesso viene depositato sul wafer in cui è impressa la geometria del *flow layer* all'interno di un contenitore di foglio di alluminio costruito in base alle dimensioni del wafer tramite impronta, in seguito viene ripetuta l'operazione di rimozione delle eventuali bolle formatesi durante questa fase.

Invece il wafer in cui è impressa la geometria del *control layer* è posto sullo *spin coater*: si deposita centralmente il silicone dello strato sottile, tenendo presente che la quantità deve essere necessaria a ricoprire circa il 30% della superficie del wafer, facendo attenzione ad inglobare meno aria possibile.

Lo *spin coater* è avviato con il seguente programma: velocità di *spin* di 2200rpm per 1 minuto e 15 secondi con accelerazione di 133rpm/sec. In questo modo si provvede a formare uno strato di 50 μ m. Il *master* è poi risposto in una superficie piana a 25°C per 1ora e 30 minuti, al fine di rendere perfettamente piano lo strato di PDMS, che appena rimosso dallo *spin coater* presenta invece delle minuscole imperfezioni dovute alla presenza della struttura del controllo.

In tutte queste operazioni i wafer sono messi a contatto con l'aria della stanza il meno possibile, le operazioni di deposizione del silicone devono essere veloci mentre nel resto del tempo il wafer rimane all'interno della piastra pulita.

2.3.3.2 Cottura e allineamento degli strati

La cottura e l'allineamento degli strati sono operazioni delicate e spesso determinano l'efficienza finale della piattaforma microfluidica.

Il protocollo di cottura avviene in due *step*: si procede inizialmente con una prima cottura parziale di entrambi gli stampi, atta a migliorare le proprietà meccaniche in modo da poterli maneggiare ma senza far reticolare completamente il polimero. Lo strato sottile è posto in un forno ventilato caldo a 60°C per 45 minuti, lo strato spesso è posto in forno a 60°C per 35 minuti. Questo stampo è posto in forno circa 10 minuti prima dello stampo con lo strato sottile e ciò permette di avere una ventina di minuti di tempo dopo la rimozione dal forno dello strato spesso, per estrarre il PDMS dal silicone, tagliare con un bisturi il silicone della forma voluta e bucare ingressi e uscite del liquido del *flow layer* mentre lo strato sottile finisce il ciclo in forno (si veda paragrafo 2.1.4).

Lo strato spesso è pulito con del nastro adesivo per rimuovere ogni residuo e sporco. Quando lo strato sottile è tolto dal forno si procede alla fase di allineamento. Con un gesto repentino si sovrappone il PDMS dello strato spesso sopra il wafer con lo strato di PDMS sottile in modo che l'orientamento dei canali sia quello voluto. Avendo solitamente questi *microchip* precisione nell'ordine di qualche decina di micron non è possibile allineare perfettamente le microvalvole a occhio nudo. Si pone quindi il chip al microscopio (Leica S8AP0) e partendo da un'estremità si allineano i due strati facendo combaciare i *markers*.

Conclusa quest'operazione si procede al secondo *step* di cottura: per ottenere la polimerizzazione completa si colloca il wafer con i due strati di silicone allineati in forno per un tempo di 15 minuti a 60°C e a cui segue 1 ora e 30 minuti a 80°C. In questo periodo il reticolante in eccesso nello strato spesso (5:1) diffonde rapidamente nello strato sottile (20:1) in difetto di reticolante. Terminata la fase di cottura si estrae lo stampo separando la parte di silicone dal wafer di silicio.

2.3.3.3 Fabbricazione e test della piattaforma microfluidica

Terminata la reticolazione si taglia con un bisturi il silicone sottile procedendo attorno allo strato spesso. Il chip, completo dei due *layer*, viene così estratto e vengono praticati i fori per l'ingresso del fluido che metterà in pressione i canali del *control layer*. Per far questo si utilizzano aghi *dispenser tips* 20G con diametro esterno di 0.91mm (Nordson EFD).

Come già accennato nel paragrafo 2.1.4 è necessario saldare lo stampo in PDMS ad una superficie piana e priva di residui tramite il trattamento al plasma il quale permette di unire in modo irreversibile due strati di PDMS o uno strato di PDMS al vetro.

La superficie piana a cui fissare lo stampo può essere costituita da un vetrino delle dimensioni minime dettate dalle dimensioni del chip prodotto e dello spessore di circa 100. Per un'adesione più efficace si può in alternativa utilizzare un vetrino sul quale è stato depositato uno strato sottile di PDMS reticolato (di qualche decina di micron tramite *spin coater*). Dopo la plasmatura la piattaforma microfluidica è posta in piastra riscaldante a 100°C per almeno 15 minuti.

Infine è necessario testare ogni singola valvola micromeccanica della piattaforma osservando il *microchip* al microscopio. Ci si pone con l'obiettivo su una valvola e si mette in pressione con aria il canale del controllo corrispondente. All'oculare si verifica che soltanto le valvole di quel canale vengono chiuse, mentre gli altri canali di controllo non devono essere pressurizzati.

2.3.4 Produzione dei chip: tecnica *on-ratio*

Gli stampi di silicone che formano i vari strati sono uniti tra di loro usando la tecnica di adesione al plasma. A differenza della tecnica *off-ratio* si utilizza una miscela base/agente reticolante di 10:1 per tutti gli strati. Questo implica che il silicone è preparato in uno stesso recipiente e la cottura avviene in una sola fase fino a completa reticolazione. I tempi di realizzazione di un *microchip* integrato sono più bassi, la quantità di silicone utilizzato è minore, la qualità del silicone è migliore in quanto le sostanze base e agente reticolante sono fornite dalla casa produttrice in rapporto di peso 10:1 che garantisce una polimerizzazione efficace. Tuttavia questo protocollo ha una bassa precisione di allineamento tra i due strati.

2.3.4.1 Preparazione stampi di PDMS

Si prepara e degasa la quantità voluta di PDMS con rapporto base/agente reticolante di 10:1 mentre i wafer sono trattati con clorotrimetilsilano. A questo punto lo strato spesso e quello sottile di silicone sono posti nei *master* fotolitografici come nella tecnica vista precedentemente e indicata al paragrafo 2.2.4.1.

La cottura dei due *molds* con il PDMS sopra depositato avviene in un unico *step* in forno caldo a 80°C per 2 ore per lo strato spesso, mentre è sufficiente un'ora per lo strato sottile.

Una volta tolti dal forno, lo strato spesso viene separato dal *wafer* di silicio, tagliato tramite bisturi nelle giuste dimensioni, bucato per creare gli ingressi e le uscite del liquido, pulito dai residui e dalla polvere con del nastro adesivo.

Lo strato spesso è unito allo strato sottile grazie alla tecnica di adesione al plasma (paragrafo 2.1.4). Questa tecnica non permette, a differenza della *off-ratio*, di aver più di un tentativo per far aderire i due strati. La difficile precisione di cui è dotata, dovuta al fatto che l'allineamento sia fatto a mano dall'operatore senza microscopio e con una sola possibilità, non permette la fabbricazione di piattaforme microfluidiche complicate o con una precisione maggiore di

500µm (una distanza enorme per la microfluidica). Alternativamente è possibile utilizzare un metodo di allineamento che utilizzi dei bracci meccanici, ai quali sono fissati i due strati di silicone, montati in una struttura che comprende microscopio. Il trattamento al plasma è indotto da uno strumento maneggevole e direzionabile come lo High Frequency Tester and Mixer Corona Treater della Electro-Technic Products Inc. Questo permette di avere un allineamento con la stessa precisione della tecnica *off-ratio*.

Una volta fissato lo strato spesso a quello sottile si pone il *wafer* con i due strati in piastra calda a 100°C per 15 minuti. Successivamente si estrae il silicone dal silicio e si praticano i fori per l'ingresso e l'uscita del fluido che metterà in pressione i canali del *control layer*.

I due strati di PDMS, ora uniti assieme, vengono fissati ad un supporto rigido piano (vetro o vetro con membrana di silicone) come già citato nel paragrafo 2.2.4.3.

Analogamente alla tecnica *off-ratio*, il protocollo deve essere svolto in ambiente pulito e gli stampi devono essere meno tempo possibile al contatto con l'aria della stanza.

Le piattaforme microfluidiche sono testate mettendole in pressione con un fluido e controllando l'effettivo funzionamento di ogni singola valvola.

2.4 Coltura di mioblasti murini in sistemi microfluidici

Di seguito vengono descritti i protocolli di coltura e transfezione cellulare adottati. La metodica qui indicata è frutto di diversi mesi di prove servite all'ottimizzazione del protocollo sperimentale. Le piattaforme microfluidiche saranno poi utilizzate per esperimenti FRET.

2.4.1 Colture cellulari

In questo paragrafo è descritto il mantenimento di una cultura di C2C12 in piastre Petri in condizioni statiche. Queste cellule sono successivamente integrate nella piattaforma microfluidica.

2.4.1.1 Coltura di C2C12

Le C2C12 sono una linea cellulare derivata da mioblasti murini immortalizzati isolati da topi C3H. Esse vengono coltivate, su piastre Petri gelatinate, in terreno proliferativo costituito da Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) addizionato con un 10% di siero fetale bovino (FBS, Gibco Life Technology) e con gli antibiotici penicillina 100 U/ml e streptomycin 100 mg/ml (Pen/Strep mix, Gibco Life Technology).

Al fine di mantenere inalterata la miogenicità di queste cellule è necessario evitare il raggiungimento della confluenza. Per le sub-colture, le cellule adese vengono staccate mediante trattamento con l'enzima proteolitico tripsina (Tripsina-EDTA 0.05%, Gibco Life Technology).

Quando raggiungono la confluenza, le C2C12 possono essere indotte a differenziare fondendo in miotubi contrattili che esprimono proteine muscolospecifiche. La fusione dei mioblasti e la formazione dei miotubi vengono favorite mediante la sostituzione del terreno proliferativo con terreno differenziativo. Il terreno differenziativo è costituito da Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) addizionato con un 2% di siero di cavallo (HS, Gibco Life Technology), e con gli antibiotici penicillina 100 U/ml e streptomicina 100 mg/ml (Pen/Strep mix, Gibco Life Technology).

Le colture vengono mantenute in incubatore (Thermo Scientific Steri-Cycle) alla temperatura di 37°C, in un'atmosfera al 5% di CO₂ e con un'umidità relativa del 95%.

2.4.1.2 Espansione delle cellule in coltura

Le cellule in coltura vengono staccate mediante rimozione del terreno proliferativo e trattamento con tripsina in incubatore per 3 minuti. Dopo aver verificato al microscopio che le cellule si siano effettivamente staccate, la tripsina viene neutralizzata, per evitare la degradazione di proteine di membrana, mediante l'aggiunta di terreno con siero. La sospensione cellulare così ottenuta viene quindi raccolta e centrifugata (PK 130, ALC) a 1200rpm per 5 minuti. Il surnatante viene aspirato e il pellet cellulare risospeso in pochi millilitri di terreno proliferativo (a seconda del volume del pellet). Circa 20µl di tale soluzione vengono introdotti in ciascuna delle due griglie di una camera di Burkner, in seguito viene poi effettuata la conta cellulare a microscopio.

Si può quindi prelevare dalla sospensione cellulare originaria un volume tale da avere la quantità di cellule desiderata per procedere con la semina su piattaforma microfluidica o su piastra per l'espansione della coltura cellulare.

Per favorire l'adesione dei mioblasti su piastra vengono depositati circa 7ml di gelatina e mediante agitazione distribuiti uniformemente sull'intera superficie. La gelatina viene quindi rimossa inclinando la piastra da un lato, in modo da lasciare sulla superficie solamente un sottile film che viene fatto asciugare all'aria sotto cappa sterile, per almeno 15 minuti.

Seminando le C2C12 ad una densità iniziale di 2065cellule/cm² (120,000 cellule in una piastra Petri da 10cm di diametro) sarà necessario espandere nuovamente le cellule dopo due giorni di coltura mentre, seminandone la metà, le cellule possono essere mantenute in coltura per tre giorni.

2.4.1.3 Congelamento e scongelamento delle cellule

Le cellule sono congelate a -80°C in una soluzione di FBS e dimetilsolfossido (DMSO, Sigma) come riserva per futuri esperimenti. Il DMSO aumenta la viscosità in modo tale da evitare che durante il processo di congelamento si formino cristalli di ghiaccio all'interno della cellula che causerebbero la rottura della membrana cellulare.

Il pellet di cellule in preparazione per il congelamento viene risospeso in FBS filtrato quindi aggiunto goccia a goccia il 10% in volume di DMSO. Si trasferisce 1ml di questa soluzione, calcolata in modo da contenere 1 milione di cellule circa, in una Cryovial (Simport) che viene rapidamente posta in un congelatore alla temperatura di -80°C .

Lo scongelamento avviene in maniera repentina immergendo la Cryovial contenente le cellule congelate in un bagnetto termostato a 37°C .

La soluzione scongelata viene trasferita in una provetta sterile alla quale vengono aggiunti 7ml di terreno proliferativo. Per limitare lo shock osmotico i primi 1-2ml sono aggiunti goccia a goccia.

La sospensione cellulare viene centrifugata a 1200rpm per 10 minuti, il surnatante rimosso e il pellet risospeso in qualche ml di terreno proliferativo. Le cellule sono così pronte per essere seminate in una piastra di Petri.

2.4.2 Colture cellulari in microfluidica

Si descrive in questo paragrafo il protocollo per il *coating*, la semina e la transfezione di nanosensori FRET mediante lipoplexso in mioblasti murini C2C12 in camere microfluidiche di diametro pari a 3mm.

2.4.2.1 Piattaforma microfluidica utilizzata

La piattaforma microfluidica in cui le cellule sono coltivate è fabbricata come citato ad inizio capitolo (paragrafo 2.1). In Figura 2.10 si riporta la fotomaschera di una parte del microchip. Per gli esperimenti sono utilizzati chip a 12, 4, 3 e 2 camere.

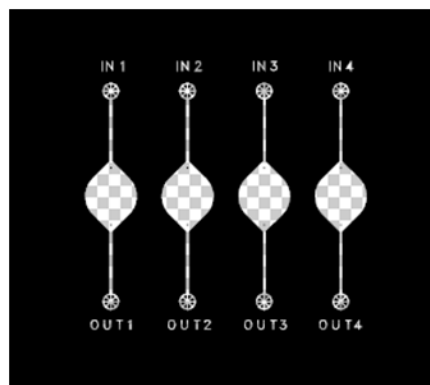


Figura 2.10 Fotomaschera della piattaforma microfluidica

La camera ha un diametro di 3mm e un'altezza di $100\mu\text{m}$, i canali di ingresso e uscita alla camera microfluidica sono lunghi 3.5mm, larghi $130\mu\text{m}$ e alti $100\mu\text{m}$.

Al di sopra dei buchi di ingresso e uscita del liquido (in e out in Figura 2.10) sono plasmati delle riserve di liquido (denominati anche pozzetti) formate da un parallelepipedo in PDMS forati con *biopunch* (HealthLink) da 3mm necessari come scorta di terreno per supplire

all'evaporazione all'interno del *microchip*. I pozzetti di liquido, riempiti di colorante blu scuro, sono messi in evidenza in Figura 2.11b.

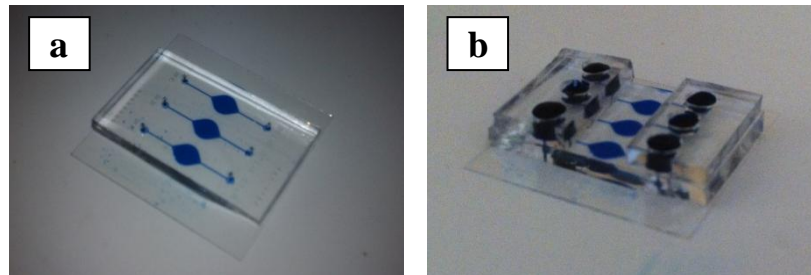


Figura 2.11 Piattaforma microfluidica per colture cellulari a 3 camere senza (a) e con (b) riserva di liquido

I vetrini con i quali questi chip vengono plasmati sono in borosilicato (Thermo Scientific Microscope Cover Slips, Menzel-Glaser), con dimensioni 24x60mm e spessore #1 (0.13-0.16mm) per rendere possibile la messa a fuoco con obiettivo 40x ad olio.

2.4.2.2 Preparazione della soluzione con lipoplessi per la transfezione

La transfezione è l'introduzione di materiale genetico esogeno (transgene) in cellule riceventi. Il gene transfettato è espresso dalla cellula in maniera autonoma.

Per la transfezione delle cellule di 24 camere microfluidiche è necessario poco più di 1ml di soluzione con all'interno i lipoplessi, ovvero i composti che permettono la lipofezione, un particolare tipo di transfezione.

La lipofezione è il trasferimento nelle cellule eucariotiche di DNA, RNA o di altri composti incapsulati in una vescicola fosfolipidica. Per facilitarne il passaggio attraverso la membrana cellulare, si racchiude il DNA in strati lipidici artificiali. (Enciclopedia Treccani)

Il DNA racchiuso nella vescicola fosfolipidica è detto lipoplesso, la sostanza utilizzata per inglobare il DNA è la Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Il DNA utilizzato è di due tipi, pcDNA3.1 FLIPglu-600uDelta13V e pcDNA3.1 FLIPglu-30uDelta13V, entrambi da ADDGene (www.addgene.org). Ogni tipo di DNA esprime un diverso nanosensore del glucosio, denominati uno FLIPglu-600 $\mu\Delta$ 13V e uno FLIPglu-30 $\mu\Delta$ 13V, costituito da proteine fluorescenti nel ciano e nel giallo (Cyan Fluorescent Protein CFP e Yellow Fluorescent Protein YFP).

Si descrive in seguito la preparazione di 1200ul di soluzione per la transfezione.

In due diverse microprovette si aggiungono 12 μ l di Lipofectamina in 200 μ l di Opti-MEM Reduced-Serum Medium (Gibco Life Technology) e 1.6 μ g di DNA in 200 μ l di Opti-MEM. Le due microprovette sono poste ad incubare sotto cappa a temperatura ambiente (23-25°C) per 5 minuti.

La soluzione contenente il DNA è miscelata con quella di Opti-MEM e Lipofectamina e posta a incubare per 20 minuti sotto cappa a temperatura ambiente. Infine questa soluzione di

lipoplessi viene diluita con 800ml di Opti-MEM. Questa soluzione è utilizzabile nelle ore immediatamente successive alla preparazione e non può essere conservata.

2.4.2.3 Coating della camera microfluidica

Le piattaforme microfluidiche autoclavate sono maneggiate con delle pinze sterili sotto cappa e posti su piastre di Petri sterili da 10cm.

Le camere microfluidiche in cui sono seminate le cellule devono essere ricoperte con un film di Matrigel (BD) per favorire l'adesione delle cellule al vetro. La soluzione con Matrigel 2.5% in DMEM, dopo essere stata risospesa con molta cura essendo gelatinosa, viene poi introdotta nella cameretta mediante una pipetta manuale P1000 (Gilson). Si aspirano circa 200ul di soluzione per mezzo della P1000, il cui puntale è appoggiato al microchip in maniera da farlo combaciare con il canale di ingresso del liquido alla camera. La soluzione è spinta all'interno del microchip per mezzo della pressione esercitata dalla pipetta. Il *coating*, svolto per tutte le camere, è concluso quando si osserva la soluzione uscire dal canale di output della piattaforma microfluidica.

I *microchips* sono quindi incubati per 1 ora a temperatura ambiente in modo tale da permettere la deposizione delle proteine all'interno della camera.

Infine si sostituisce questa soluzione con Opti-MEM, si riempie con Opti-MEM il pozzetto di riserva al di sopra del canale di input, dal canale di output si aspira il terreno con una pipetta Pasteur in vetro collegata ad una pompa a vuoto. Tale operazione è svolta in aspirazione dal canale di output facendo attenzione a non aspirare completamente il terreno del pozzetto di riserva, onde evitare d'inserimento di aria nella camera.

2.4.2.4 Semina e transfezione in camera microfluidica

Questa fase avviene dopo quella di espansione (paragrafo 2.4.1.2) su piattaforme microfluidiche sterili alle quali si è fatto il *coating*. Le cellule, sospese in quantità nota in una provetta con del terreno di crescita, sono prelevate nella quantità di 1 milione e centrifugate per 5 minuti a 1200rpm. Una volta rimosso il surnatante, il pellet cellulare è risospeso in 250µl di soluzione di lipoplessi.

Si aspira il terreno presente nei pozzetti delle piattaforme microfluidiche e si sospinge la soluzione con le cellule all'interno della camera dal canale di ingresso mediante una pipetta manuale P200. Una volta che tutte le camere di un singolo chip microfluidico sono state seminate si controlla a microscopio l'omogeneità di distribuzione delle cellule e la densità di semina (Figura 2.12). La densità di semina deve essere al 50/70% della confluenza per garantire una migliore transfezione.

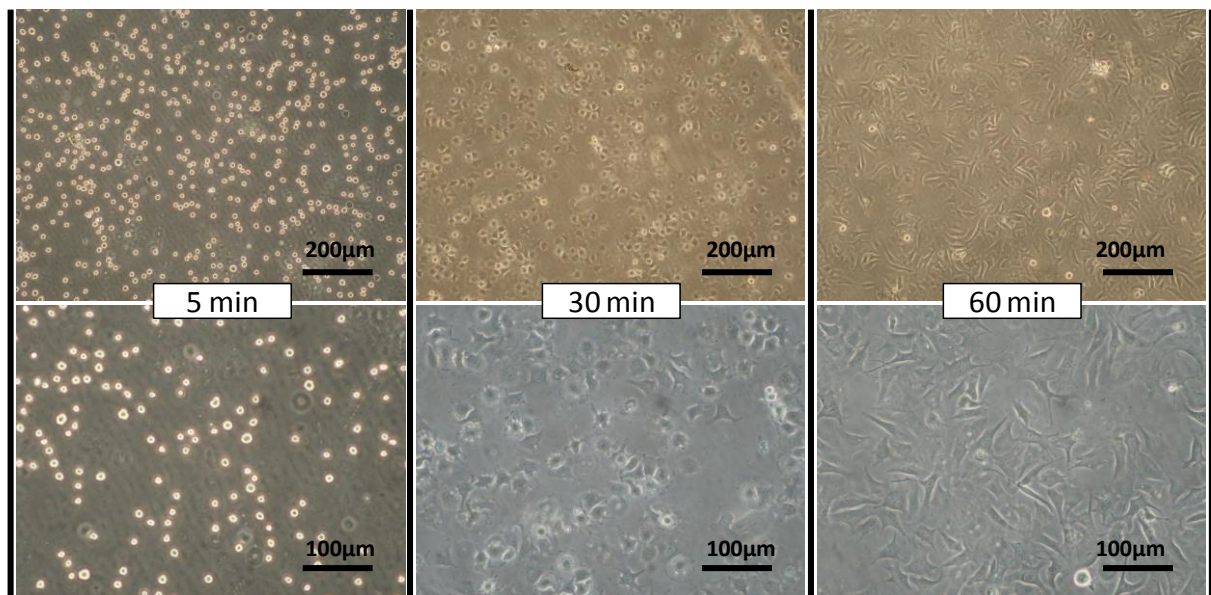


Figura 2.12 Particolare di una camera microfluidica dopo 5, 30 e 60 minuti dalla semina

Le piastre contenenti i *chips* sono poste in incubatore alla temperatura di 37°C. Risulta importante che non vi sia del liquido nei pozzetti di riserva nei primi istanti di incubazione dopo la semina, questo infatti potrebbe muoversi per il principio dei vasi comunicanti e trascinare le cellule non ancora adese, inficiando l'omogeneità di distribuzione. Le cellule aderite (dopo 60 minuti circa, Figura 2.12), non vengono trascinate con il liquido.

La transfezione dura 4 ore, durante le quali il terreno nelle camere viene cambiato ogni ora con del terreno con lipoplessi fresco. Questo *refill*, che avviene lentamente per gravità, aumenta la possibilità di transfezione delle cellule. Per far ciò si trasferiscono 20µl di soluzione da un pozzetto all'altro in modo che il cambio avvenga spontaneamente attraverso una bassa velocità.

Trascorse le 4 ore, il terreno con i lipoplessi viene sostituito con DMEM proliferativo. Si colma il pozzetto di input con il terreno e si aspira dal pozzetto di output con una pipetta Pasteur collegata con una pompa a vuoto. Infine entrambi i pozzetti devono essere riempiti da terreno per contrastare l'evaporazione all'interno dell'incubatore. Le piattaforme microfluidiche sono conservate all'interno di un incubatore alla temperatura di 37°C, in un'atmosfera al 5% di CO₂ e con un'umidità relativa del 95%.

Per garantire la sopravvivenza delle cellule è necessario cambiare il terreno proliferativo ogni 24 ore. Come in piastra, anche in microfluidica quando raggiungono la confluenza le C2C12 possono essere indotte a differenziare mediante la sostituzione del terreno proliferativo con terreno differenziativo.

La Figura 2.13, dove è riportata una camera microfluidica a 20 ore dalla transfezione in campo chiaro e in fluorescenza, è un *merge* di foto al 20x effettuate con microscopio Olympus IX 71.

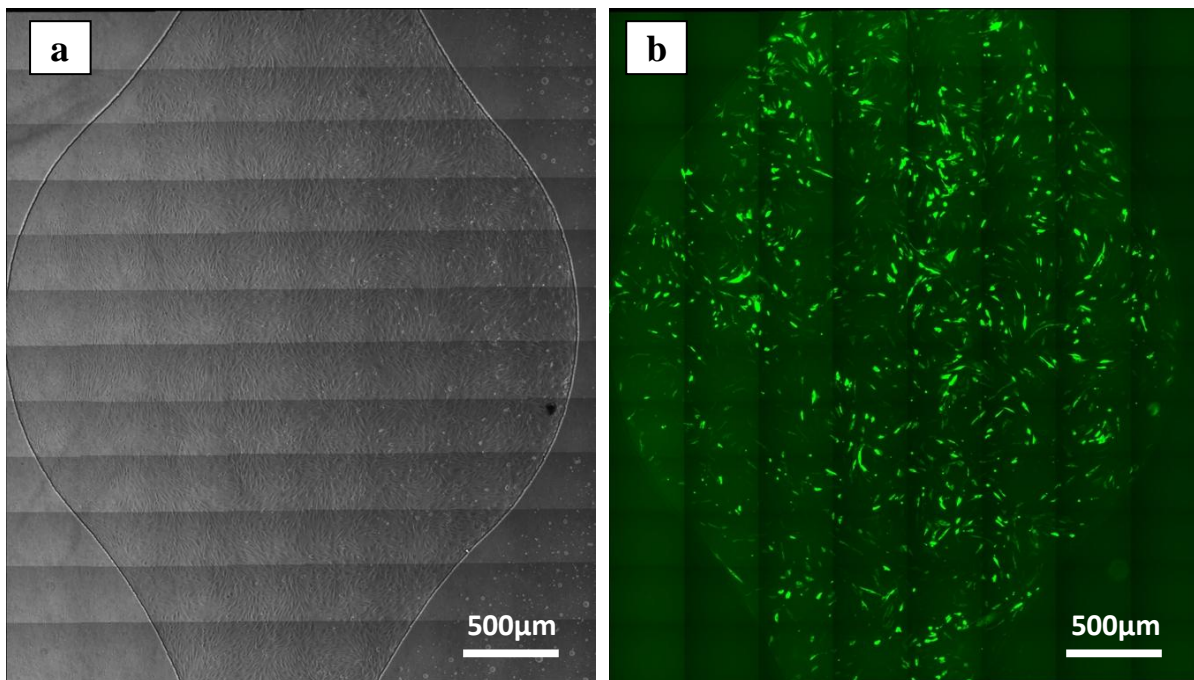


Figura 2.13 Camera microfluidica (a) in luce trasmessa e (b) in fluorescenza ottenuta da un merge di acquisizioni al 20x

2.5 Sistema automatizzato di cambio *buffer* salino in camera microfluidica

In questo paragrafo è descritto l'apparato sperimentale utilizzato in questo lavoro di tesi, progettato e realizzato per il cambio di terreno con diverse concentrazioni di glucosio in una camera microfluidica sulla quale si svolge un esperimento FRET. Per la realizzazione di questi esperimenti è necessario infatti che alla camera microfluidica al cui interno è presente una coltura cellulare, perfusa da terreno con una certa concentrazione di glucosio, sia effettuato un *refill* con un terreno diverso con un tempo dell'ordine di qualche decina di secondi. Di conseguenza, per garantire un tempo così breve di cambio del terreno in perfusione a portate molto ridotte (nl/min), è necessario che il sistema di *split* del liquido sia integrato in una piattaforma microfluidica a monte del *microchip* con la camera microfluidica. La progettazione di quest'apparato è svolta considerando che questo strumento possa risultare:

- trasportabile e poco ingombrante;
- versatile (si possano controllare piattaforme microfluidiche diverse tra loro);
- indipendente da fonti di corrente esterne nel trasporto tra le diverse stanze;
- adeguato per permettere un raggio di spostamento delle piattaforme microfluidiche di circo 50cm;
- automatizzato (ovvero gestito da PC).

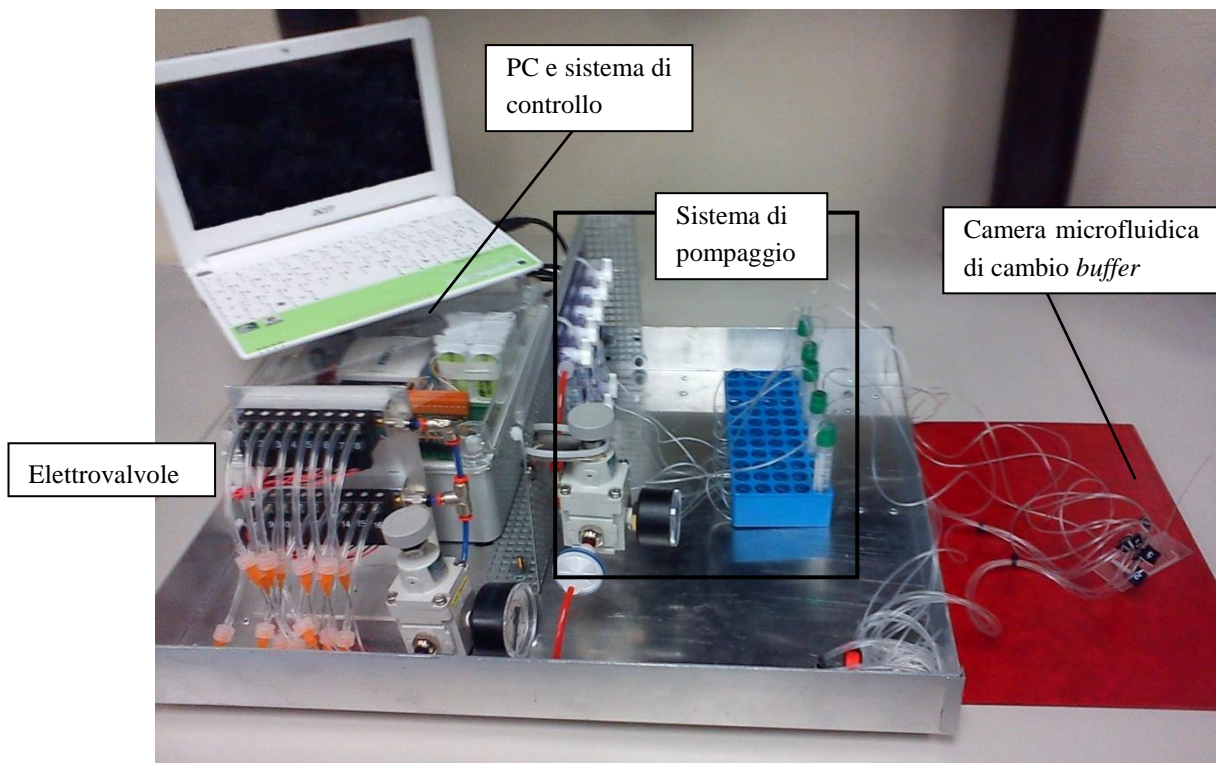


Figura 2.14 Apparato sperimentale per la gestione di piattaforme microfluidiche integrate

Questo sistema, mostrato in Figura 2.14, è composto da quattro parti:

- piattaforma microfluidica integrata per lo *split* di *buffer* salino alle diverse concentrazioni da collegare con il microchip della camera microfluidica contenente la coltura cellulare;
- complesso per il pompaggio di liquido (terreno di coltura o *buffer* salino) all'interno delle piattaforme microfluidiche composto da *Cryovial* con funzione di riserva e valvole a sfera per la regolazione del flusso di aria pressurizzata;
- sistema dedicato alla parte di controllo formato da elettrovalvole collegate al *microchip* e gestite da un PC;
- piattaforma in alluminio (40cmx35cm) che funge da contenitore di quanto elencato e ne permetta il trasporto.

In aggiunta, esso è dotato di batterie ricaricabili per l'alimentazione di corrente elettrica durante il trasporto e di un ingresso per l'aria compressa.

Questo apparato verrà descritto in dettaglio nei paragrafi a seguire.

2.5.1 Piattaforma microfluidica integrata per il cambio del buffer salino

La piattaforma microfluidica integrata progettata per gli esperimenti svolti è mostrata in Figura 2.15. Essa è stata ideata per garantire un rapido cambio di *buffer* in perfusione in una camera microfluidica di un *microchip* posto a valle.

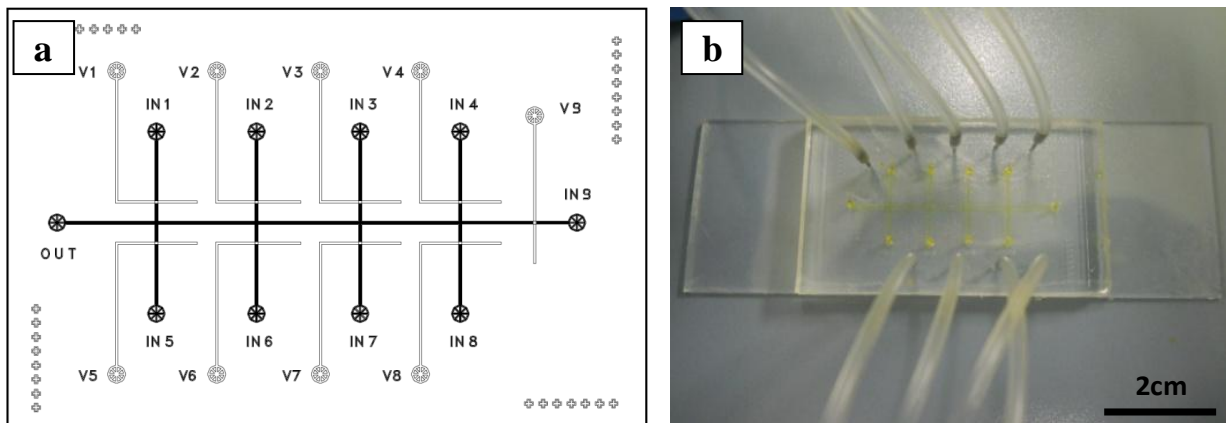


Figura 2.15 Piattaforma microfluidica integrata per il cambio di buffer. Nello schema (a) i canali del flow layer sono in nero mentre quelli del control layer sono in grigio. Nella foto (b) il controllo del chip è collegato per mezzo di tubi di tygon ed aghi, i canali di flusso sono colorati in giallo mediante colorante alimentare

Il flow layer (in nero in Figura 2.15a) è composto da: 9 canali di ingresso denominati *in* e un canale di uscita denominato *out*. Ogni singolo canale di ingresso è controllato da una microvalvola a membrana azionata dalla pressione idraulica di un'elettrovalvola gestita a PC. Questo *microchip* permette di collegare fino a 9 diverse sostanze in ingresso e di selezionare quella voluta in uscita.

Nel canale di uscita è infilato un tubo PEEK (IDEX) lungo 6cm, con diametro interno di $65\mu\text{m}$ e esterno di $510\mu\text{m}$. Esso è resistente e flessibile; il diametro interno di piccole dimensioni permette di collegare il *microchip* con qualsiasi altra piattaforma microfluidica garantendo un tempo di percorrenza al suo interno di qualche secondo.

La piattaforma microfluidica è fabbricata in PDMS mediante la tecnica *on-ratio*; essa ha dimensioni finali di $37.5\text{mm} \times 25\text{mm}$. I canali del flow layer hanno sezione semicircolare con diametro di $170\mu\text{m}$ e altezza di $30\mu\text{m}$; i canali del control layer hanno sezione rettangolare di dimensione di $130\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$. La valvola, di tipo *Push-up*, ha quindi dimensione $170\mu\text{m} \times 130\mu\text{m}$.

A fronte di una pressione del liquido in flusso che può variare da un minimo di 2psi e fino a 10psi, quella a cui vengono sottoposti i canali di controllo per permettere la chiusura della valvola è di 30psi, come da Tabella 2.3. Il tempo di percorrenza massimo del liquido all'interno del *chip* qui descritto compreso di tubo PEEK, con una pressione dei canali in flusso di 2psi, è di 5 secondi: a queste condizioni la portata risulta essere di circa $4\mu\text{l}/\text{min}$.

2.5.2 Sistema di perfusione del liquido nel microchip

In questo paragrafo sono illustrati i dispositivi adottati per il pompaggio del liquido (*buffer* salino) in piattaforme microfluidiche.

Nelle applicazioni microfluidiche le portate in gioco sono molto basse e richiedono un'accurata regolazione.

2.5.2.1 Pompaggio attraverso *vial* in pressione

Il sistema principale adottato per la movimentazione di liquido in piattaforme microfluidiche è costituito da *Cryovial* (Greiner Bio-one) con funzione di riserva messe in pressione con aria compressa (Figura 2.16).

Le *Cryovial* (dette *vial*), con capienza di 5ml, sono modificate per fungere da riserva di liquido. Sul tappo a chiusura ermetica sono praticati due fori nei quali sono inseriti due aghi (ID 21G, OD 0.8mm, Chemil), sigillati con colla epossidica (LOCTITE M-31CL HYSOL, medical device epoxy adhesive) in modo da far tenuta. Uno dei due aghi è sufficientemente lungo essere immerso nel liquido fino a raggiungere il fondo della *vial*. Nell'altra estremità esso è infilato in un tubo in Tygon (ID 0.020inch, OD 0.060inch, Cole Parmer) a sua volta collegato all'ingresso del *microchip* per mezzo di un ago in acciaio lungo 0.5in (ID 0.013in, OD 0.025in, New England Small Tube Corporation). Il secondo ago, molto più corto, non entra all'interno del liquido ed è collegato con un tubo in Tygon ad un collettore a polycarbonato con rotazione di 360° (General Control), che permette la gestione indipendente di un flusso d'aria in uscita da un regolatore di pressione (CKD Corporation). In questo modo si mette in pressione il liquido all'interno della *vial* il quale fluisce attraverso il tubo in Tygon e nel *microchip*. La pressione del regolatore può essere variata tra 0psi e 10psi aumentando la portata nel *microchip*; pressioni superiori non possono essere adottate per non compromettere la tenuta del chip (vedi Tabella 2.3).

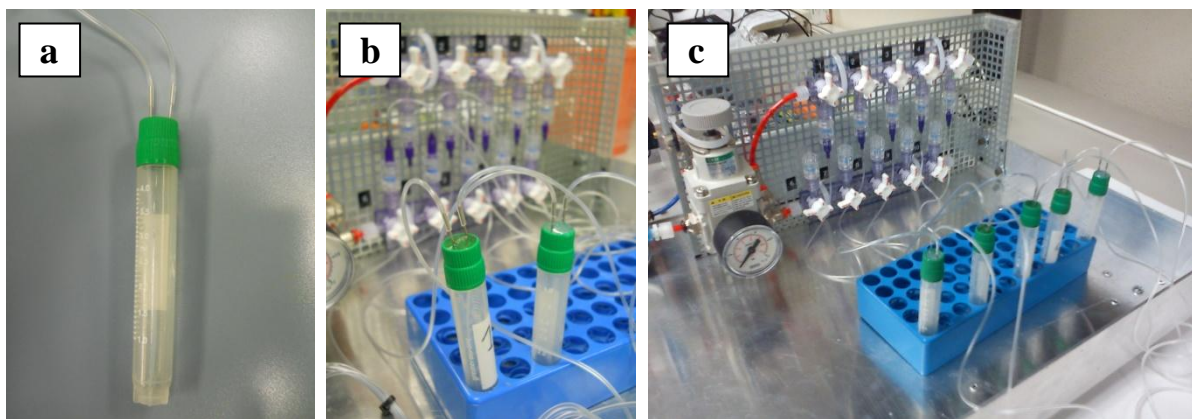


Figura 2.16 (a) *Vial* con aghi collegato a tubi in tygon, uno dei quali è collegato al sistema di gestione del flusso d'aria (b) e (c)

Questo sistema, utilizzato a monte della piattaforma microfluidica integrata descritta nel paragrafo 2.5.1, è composto da 9 *vial* e può quindi gestire 9 terreni diversi.

2.5.2.2 Pompa a siringa

Un altro strumento per il pompaggio del liquido in piattaforme microfluidiche è la pompa a siringa (Harvard apparatus). Essa è abbinata al sistema di *vial* in pressione per avere un controllo preciso della portata in perfusione.

La pompa a siringa utilizzata è costituita da un sistema di pompaggio montato sopra un corpo di controllo. La testa della pompa è dotata di un'unità *multirack* in cui possono essere alloggiare due siringhe in vetro o in plastica, di volume compreso tra 1ml e 20ml.

Fissando il volume delle siringhe utilizzate e la portata desiderata è fissato il tempo di pompaggio. La pompa può funzionare sia in modalità di pompaggio (*infuse*) che in modalità di aspirazione (*refill*). In Figura 2.17 è riportata una foto dell'intero apparato.



Figura 2.17 Pompa a siringa (Harvard apparatus)

Questo strumento è adottato quando è richiesta una precisione elevata nella portata in microfluidica. La pompa è utilizzata in modalità *refill*: la siringa è collegata, mediante un tubo in Tygon del diametro di 0.02in tramite ago da siringa 21G (Nordson EFD), in uscita alla camera microfluidica. Aspirando la portata desiderata il liquido all'interno delle *vial* in pressione fluisce attraverso il sistema di tubi nel *microchip* di *split* e quindi nella camera. Si utilizzano siringhe in plastica da 3ml (BD).

2.5.3 Apparato per il controllo di piattaforme microfluidiche integrate

In questo paragrafo è esposto il sistema di controllo delle microvalvole di una piattaforma microfluidica integrata per mezzo di elettrovalvole pneumatiche a solenoide gestite da PC.

2.5.3.1 Elettrovalvole

Ogni canale di controllo di una valvola microfluidica è collegato ad una elettrovalvola pneumatica a solenoide a 3 vie (24V, CKD Corporation). Questa valvola, denominata anche valvola a fungo, è di tipo *on-off* e regola un flusso di aria compressa alla pressione di 30psi mediante un regolatore di pressione (CKD Corporation) posto a monte.

L'elettrovalvola è collegata in uscita ad un tubo in PVC D4 di circa 10cm di lunghezza che funge da riserva di acqua. Il tubo di PVC è raccordato con un *luer* maschio (Male Luer Lock X 1/8" Hose Barb, General Control) ad un ago da siringa 23G (Nordson EFD), il quale è

infilato in un tubo in Tygon di 40cm che termina con un ago. Quest'ago è infilato nell'ingresso del canale di controllo di una microvalvola. L'acqua nel tubo è messa in pressione quando l'elettrovalvola è aperta, di conseguenza tutto il sistema collegato si pressurizza con conseguente flessione istantanea della membrana che occlude il canale corrispondente.

L'apparato utilizzato è composto da 16 elettrovalvole gestite da PC (Figura 2.18).

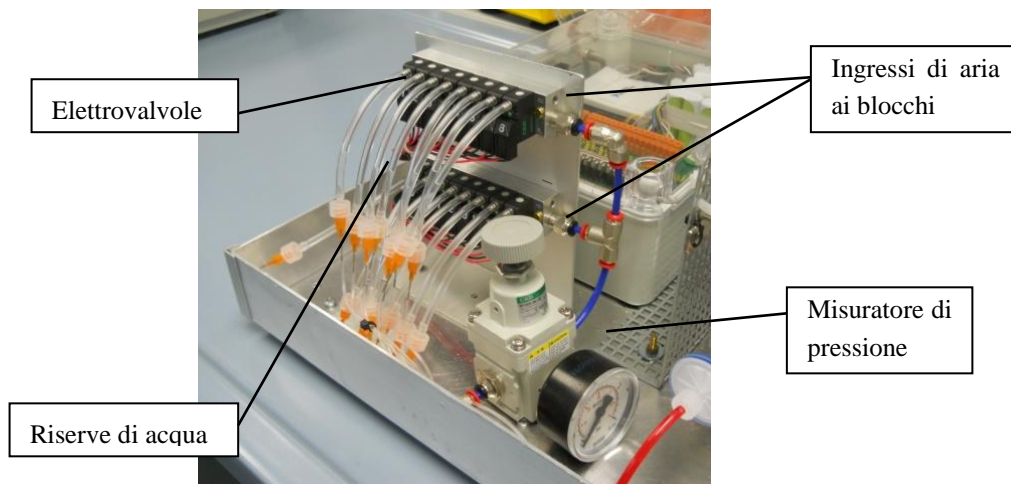


Figura 2.18 Serie di 16 elettrovalvole montate su due blocchi da 8 ciascuno

2.5.3.2 Signaling dal PC alle elettrovalvole

Le elettrovalvole sono collegate a un modulo buffer a 16 uscite statiche, ingresso TTL e uscita (Eurogi). Esso è il vero cuore dell'automazione, in quanto genera un segnale (I/O) con potenziale pari a 24V, amplificando la corrente in uscita da un modulo per generare segnali digitali (NI USB-6501, National Instruments), ingresso digitale e uscita TTL di tipo *on-off* (0-5V), interfacciato tramite una presa USB ad un *laptop*.

Questi componenti elettronici sono alimentati da un trasformatore a 24V. Un sistema di batterie ricaricabili a 24V garantisce alla parte elettronica un'autonomia di circa 15 minuti quando il trasformatore è staccato dalla rete elettrica.

I programmi di gestione delle valvole sono creati attraverso l'ambiente di sviluppo integrato per il linguaggio di programmazione visuale LabVIEW (NI). Essi permettono sia il controllo manuale che l'automazione del sistema di controllo regolando nel tempo l'apertura e la chiusura delle microvalvole in base a cicli precisi definiti dall'operatore.

L'intero apparato è presentato in Figura 2.19.

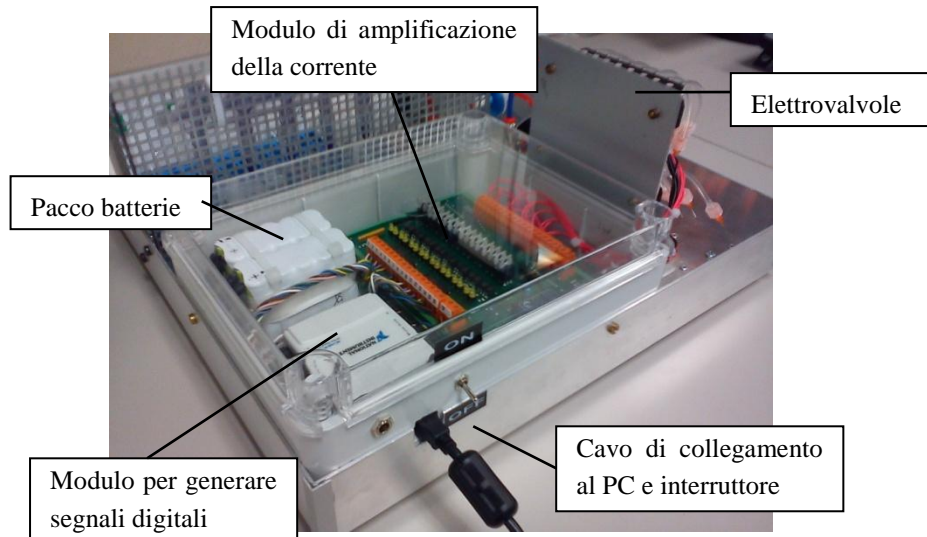


Figura 2.19 Componenti elettronici per la gestione delle elettrovalvole

2.5.3.3 Programmazione del software LabVIEW

Il linguaggio di programmazione usato in LabVIEW si distingue dai linguaggi tradizionali perché grafico (non esiste sotto forma di testo) e può essere salvato come file binario, visualizzabile e compilabile solo da LabVIEW. La definizione di strutture dati ed algoritmi avviene con icone e altri oggetti grafici, ognuno dei quali incapsula funzioni diverse, uniti da linee di collegamento (*wire*), in modo da formare una sorta di diagramma di flusso. Tale linguaggio viene definito *dataflow* (flusso di dati) in quanto la sequenza di esecuzione è definita e rappresentata dal flusso dei dati stessi attraverso i fili monodirezionali che collegano i blocchi funzionali. Gli oggetti dello schema a blocchi comprendono: terminali, funzioni, costanti, strutture, chiamate ad altri programmi e fili di collegamento.

L'interfaccia utente si realizza con controlli e indicatori, che costituiscono i terminali interattivi d'ingresso e d'uscita, rispettivamente. I controlli sono matrici, manopole, potenziometri, pulsanti, quadranti ed altri; essi simulano i dispositivi d'ingresso degli strumenti e forniscono dati allo schema a blocchi. Gli indicatori sono grafici, tabelle, LED, termometri e molti altri; simulano i dispositivi d'uscita degli strumenti e visualizzano i dati che lo schema a blocchi acquisisce o genera.

Il software LabVIEW (versione 8.2) è necessario per costruire i programmi per la gestione della piattaforma e del modulo citato nel paragrafo 2.5.3.2. In ogni programma è necessario inserire dei blocchi che attivino, gestiscono e spengano i canali fisici disponibili nel modulo di generazione digitale. Occorre prestare attenzione al canale fisico selezionato nel modulo.

I segnali elettrici generati hanno la funzione di attivare le micro valvole elettriche che permettono di far arrivare il flusso di aria compressa nella piattaforma. Ad una diversa sequenza di segnali corrisponde un differente funzionamento dei dispositivi pneumatici presenti nella piattaforma microfluidica. Le elettrovalvole vengono regolate attraverso un segnale *digital-output* attraverso un linguaggio booleano.

2.6 Protocollo per gli esperimenti FRET

Di seguito è descritto l'equipaggiamento richiesto e il protocollo per gli esperimenti FRET in cellule in coltura in camere microfluidiche per lo studio delle dinamiche del glucosio intracellulare mediante nanosensori. Per far ciò si varia la concentrazione del glucosio in una soluzione di sali che perfonde la camera microfluidica con la coltura cellulare mediante l'apparato visto nel paragrafo 2.5.

Questo protocollo è ispirato a “*Hou et al. (2011), Nature protocols, 6, 1812-1833*” e adattato ad una coltura di C2C12 in piattaforma microfluidica integrata.

2.6.1 Microscopio

L'Olympus IX81 in dotazione è un microscopio invertito con sistema multiplo di filtri a fluorescenza e monta degli obiettivi 20x ad aria, 40x, 60x e 100x ad olio.

Il sistema di illuminazione (MT20, Olympus) incorpora otto filtri montati su rulli, motorizzati e gestiti da *software*. La lampada a fluorescenza a vapori di xeno, con potenza di 150W, è collegata al microscopio tramite una fibra ottica.

Il software *cellR 2.0* (Olympus), permette la creazione di un protocollo sperimentale che gestisce automaticamente i filtri a fluorescenza e il tempo di acquisizione. A schermo è possibile visualizzare in tempo reale le immagini acquisite dalla videocamera digitale incorporata nel microscopio. Per immagini adatte al metodo FRET è possibile acquisire in modalità *dual view* per gli spettri YFP e CFP grazie ad un *beam-splitter* (Multispec Microimager, Optical Insight). Questo permette di acquisire, in maniera simultanea (in un tempo minore di 1ms), quattro immagini necessarie all'analisi: si rilevano l'emissione CFP (470nm) e YFP (535nm) contemporaneamente, prima eccitando in CFP (430nm) e poi eccitando in YFP (500nm).



Figura 2.20 Olympus IX81

Per gli esperimenti svolti sono stati utilizzati gli obiettivi a 20x e 40x, modalità di acquisizione *dual view*, tempo di acquisizione di 200ms, tempo tra due acquisizioni di 10 secondi e 20 secondi, *binning* pari a 4, intensità della luce fluorescente incidente del 33%. Tutte le prove sono condotte in una stanza buia alla temperatura di 23-25°C.

2.6.2 Preparazione delle soluzioni saline

Il terreno con glucosio utilizzato nelle prove è una soluzione isotonica di sali che ha un *range* di pH tra 7 e 7.2 adatto a colture cellulari. Nelle prove svolte si è utilizzato Dulbecco's Phosphate Buffered Saline + CaCl₂ + MgCl₂ (DPBS⁺⁺, Gibco Life Technologies). Tutte le soluzioni di DPBS⁺⁺ e glucosio sono preparate diluendo una madre unica a concentrazione 40mM.; questa soluzione è preparata mescolando del D-glucosio anidro in polvere (Fluca) a cui segue neutralizzazione del pH. La soluzione madre, una volta preparata, viene filtrata e maneggiata in cappa sterile per evitare contaminazioni. Si preparano soluzioni a 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2.5mM, 3mM, 4mM, 5mM, 10mM, 20mM e 40mM.

Si è utilizzata inoltre, per alcune prove, una soluzione di DPBS⁺⁺ e saccarosio (Fluka) preparata in modo analogo.

Per quanto riguarda esperimenti con inibitori è preparata una soluzione di DPBS⁺⁺ e glucosio all'1.5mM con Verapamil (Sigma), inibitore del trasporto di glucosio attraverso la membrana (*Louters and Holstege, 2010*) con concentrazione 150µM.

Infine, in una soluzione di DPBS⁺⁺ e glucosio all'1,5mM, si è disciolto acido Bromopiruvico (3-BrPA, Sigma), un inibitore della glicolisi (*Pereira and Galina et al., 2009*), a concentrazioni di 150µM, 15µM e 150nM.

2.6.3 Protocollo esperimento FRET

Sono descritte le operazioni svolte durante le prove di acquisizione FRET di C2C12 in coltura in camere microfluidiche.

Come prima cosa è necessario pulire con acqua purificata e deionizzata ad un alto livello le *vial* di riserva del liquido e i tubi di Tygon ad esse collegate. Si collegano poi le *vial* agli ingressi della piattaforma microfluidica integrata utilizzata per lo *split*, descritta nel paragrafo 2.5.1, e la si lascia in perfusione con acqua purificata e deionizzata per una decina di minuti, in maniera tale da rimuovere eventuali residui o bolle d'aria. In questa fase è consigliato controllare al microscopio il funzionamento di tutte le microvalvole della piattaforma microfluidica.

Le *vial* ed i tubi in Tygon sono riempiti con le soluzioni necessarie alla prova. Dopo aver effettuato il collegamento dei tubi in Tygon al *microchip*, è necessario far fluire tutto il liquido presente in ciascuna *vial* per almeno due minuti ciascuno e constatarne l'uscita dal tubo PEEK.

Una volta acceso il microscopio e fissato il microchip per lo *split* vicino all'oculare (Figura 2.21), è possibile recuperare la piattaforma con le camere microfluidiche con al loro interno le C2C12 in coltura. Il *microchip*, che solitamente è composto da 2, 3 o 4 camere, è posto ad oculare e in fluorescenza sono osservate le cellule al suo interno, scegliendo il campo con le cellule migliori. Si collega il tubo PEEK in ingresso mentre il liquido è in flusso per evitare la formazione di bolle d'aria all'interno della camera; un tubo di Tygon che va ad un contenitore in uscita alla camera scelta. Nel caso in cui sia necessario un controllo preciso della portata in uscita viene collegata una pompa a siringa.

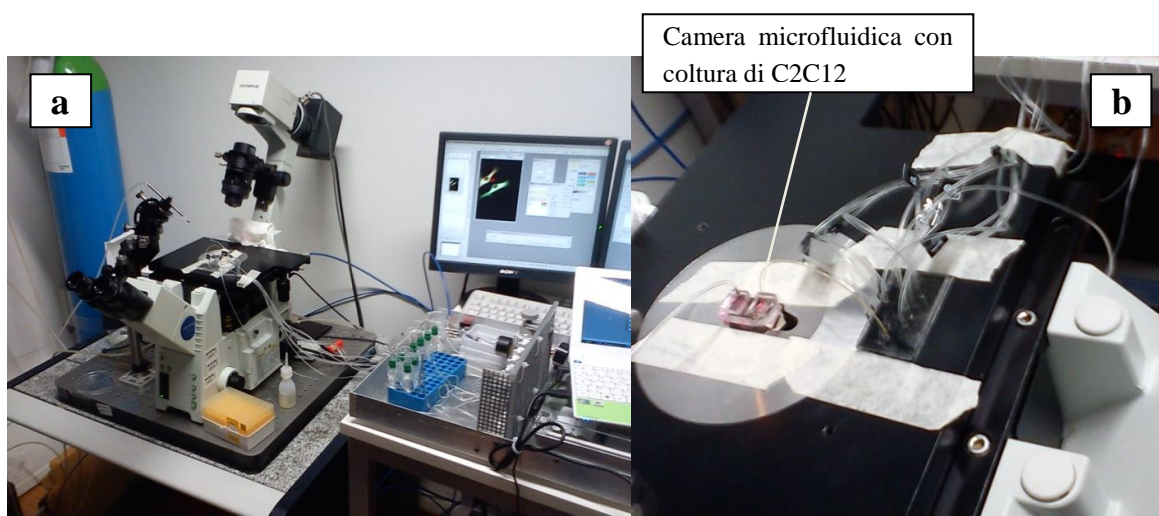


Figura 2.21 (a) Apparato sperimentale utilizzato per l'acquisizione FRET e per la gestione e il cambio di terreni diversi in una (b) camera microfluidica fissata sopra l'obiettivo

Del DPBS++ senza glucosio è fatto fluire per 10 minuti all'interno della camera. A questo punto è possibile iniziare l'acquisizione.

Usando un programma LabVIEW temporizzato è possibile eseguire varie tipologie di esperimenti. Il principio base è quello evidenziato in Figura 2.22, ovvero effettuare una serie di picchi di glucosio. Un picco è formato da due gradini di concentrazione: istantaneamente (in un tempo inferiore a 10 secondi) si passa da *buffer* salino a concentrazione 0mM a *buffer* con concentrazione XmM (dove X è una concentrazione nota tra quelle di paragrafo 2.6.2); dopo un tempo necessario a raggiungere lo stato stazionario si ritorna al *buffer* con concentrazione pari a 0mM effettuando il secondo gradino. Il tempo che intercorre tra due gradini è impostato a 4 minuti. I picchi in serie possono essere a concentrazione diversa (Figura 2.22a) o alla stessa concentrazione (Figura 2.22b).

Si monitora la risposta del rapporto del FRET ai picchi effettuati nel tempo.

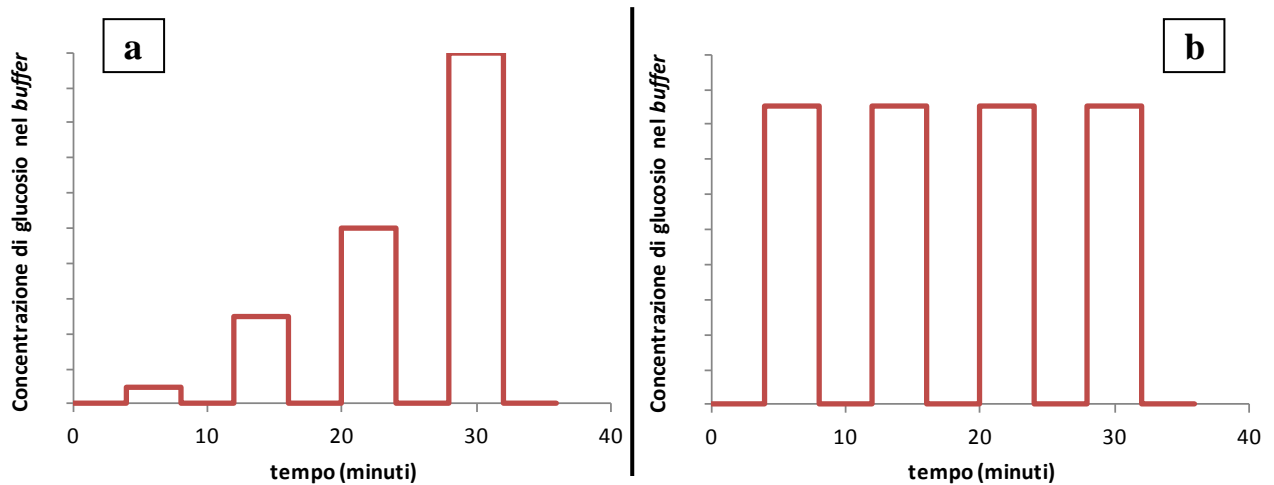


Figura 2.22 Picchi in serie (a) a concentrazione crescente e (b) alla stessa concentrazione

2.7 Elaborazione dati da sequenza di immagini FRET

La sequenza di immagini è analizzata con il software Matlab (MathWorks). Quest'ultimo è utilizzato in concomitanza con uno *script* Matlab chiamato `FRET_calculation_programme`. Questo script permette di aprire la sequenza di immagini in formato .TIFF e di definire il numero di ROIs (*regions of interest*), ovvero il campo dell'immagine in corrispondenza della cellula (per la quale si intende far l'analisi) delimitato da un rettangolo (inserito a tastiera).

Le immagini sono convertite dal programma in scala di grigi per ottenerne l'intensità luminosa fluorescente in valore unico di ogni singolo pixel. Per ogni ROI vengono rilevati i valori di intensità luminosa fluorescente pixel per pixel nel tempo e salvati in una matrice.

`FRET_calculation_programme` applica la correzione SBT (vedi 2.7.1) e un *fitting* polinomiale per *baseline correction* (vedi 2.7.2).

Queste due funzioni sono richieste per l'analisi di cellule in un campo visivo acquisito nel tempo durante un esperimento FRET (Figura 2.23).

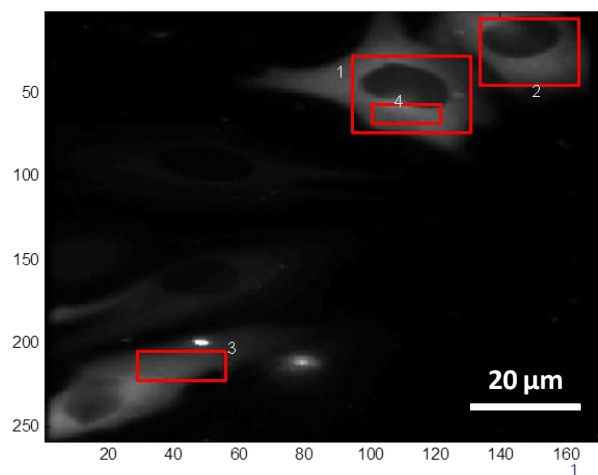


Figura 2.23 Campo visivo di C2C12 a 40x in scala di grigi con ROIs in rosso

Si vuole porre l'attenzione sull'utilizzo di Matlab per l'analisi di immagine. Per validare lo *script* si sono confrontate le analisi fatte sulla stessa ROI con il suddetto programma e con due strumenti di analisi più tradizionali, quali ImageJ (NIH) e Excel (Microsoft) ottenendo così una differenza media di meno dello 0.3% e verificandone così l'attendibilità.

2.7.1 Metodo di correzione SBT e sottrazione del background

I dati di intensità luminosa delle ROIs, ricavate da un monitoraggio in tempo reale delle cellule al microscopio, devono essere anzitutto corrette da due fattori: il segnale di *background* (ad esempio dovuto ad autofluorescenza) e il sovrapporsi degli spettri di eccitazione ed emissione di CFP e YFP, un fenomeno chiamato *spectral bleed-through* (SBT) evidenziato in *Figura 2.24* (Hou et al., 2011).

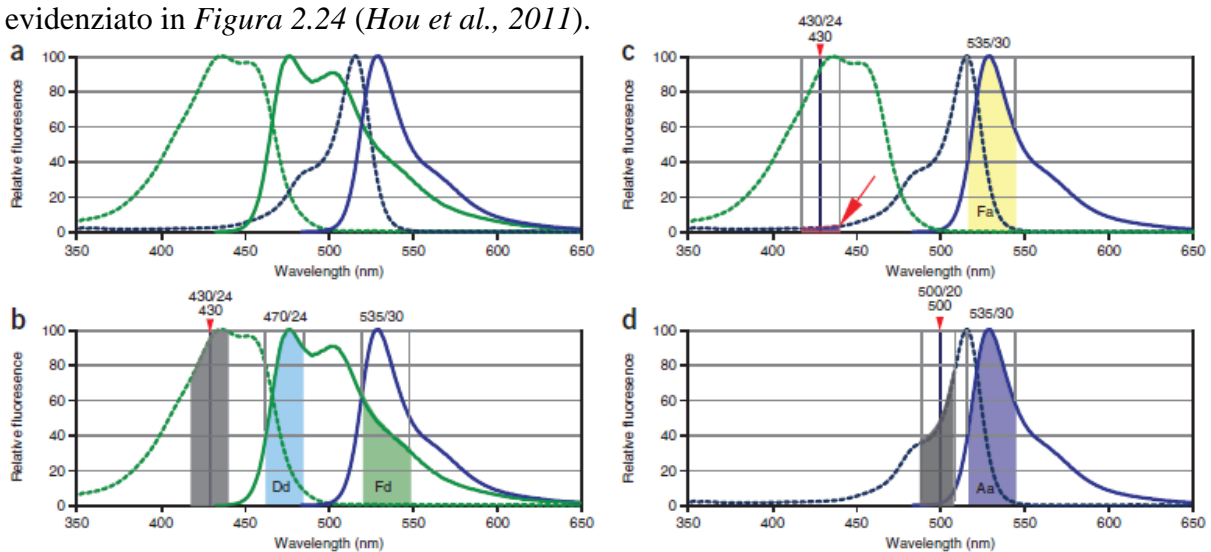


Figura 2.24 Sovrapposizione degli spettri di eccitazione ed emissione di CFP e YFP. I nanosensori sono eccitati a 430nm, ed è misurata l'intensità risultante in emissione fluorescente a 470nm e 535nm. (a) Eccitazione (linee tratteggiate) ed emissione (linee continue) nello spettro CFP (in verde) e YFP (in blu) (b) Quando il nanosensore è eccitato a 430nm (area grigia), la risultante emissione CFP (linea verde continua) è rilevata sia nel canale a 470nm che in quello a 535nm. [...] D_d è rappresentato da un'area blu mentre l'SBT nel canale di emissione YFP è illustrato da un'area verde. L'emissione CFP rilevata in 535nm è sottratta per correzione SBT (equazione 2.2). (c) (d) L'eccitazione a 430nm (linea verde tratteggiata), sebbene responsabile principalmente dell'eccitazione CFP, provvede anche a una debole eccitazione YFP (freccia rossa), che porta a SBT. [...] F_a è illustrata come l'area gialla, mentre l'SBT nel canale di emissione YFP (quando eccitato a 500nm) A_a è mostrata nell'area viola. L'emissione da YFP deve essere rimossa dalla correzione SBT (equazione 2.2) (Hou et al., 2011)

Per correggere il segnale di *background* lo script in Matlab a cui si fa riferimento effettua una sottrazione tra le ROIs definite all'interno delle cellule e la ROI definita del *background*, definita in un punto dell'immagine in cui non vi sono cellule fluorescenti. Il *background* è sottratto per i tre spettri presi in considerazione: donatore (emissione nello spettro CFP come conseguenza dell'eccitazione nello spettro CFP), accettore (emissione YFP come risultato

dell'eccitazione YFP) e emissione FRET (emissione YFP come risultato dell'eccitazione CFP).

Si ottengono così tre grafici, uno per ogni spettro di eccitazione-emissione pulito dal segnale di *background*, come in Figura 2.25.

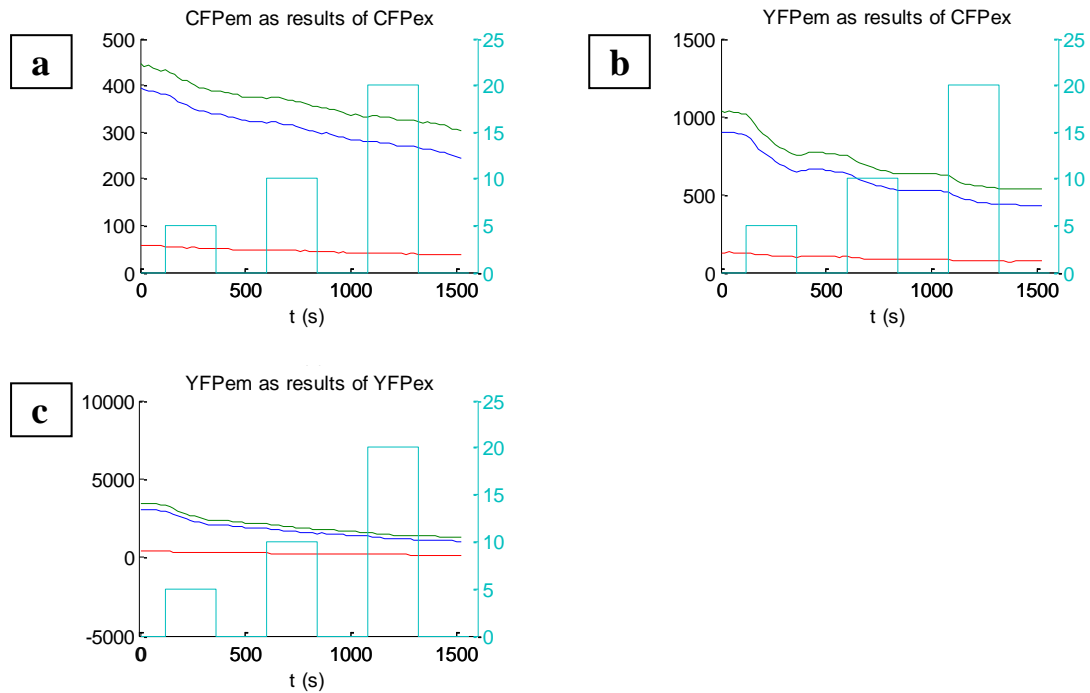


Figura 2.25 Spettri di eccitazione-emissione ricavati dall'analisi di intensità luminosa di 3 cellule a cui è sovrapposto in azzurro la concentrazione di glucosio nel buffer in perfusione nel tempo. Gli spettri acquisiti, ai quali è sottratto il background, sono (a) CFPex/CFPem (emissione CFP dovuta ad eccitazione CFP), (b) CFPex/YFPem e (c) YFPex/YFPem

Le espressioni dei singoli fluorofori sono utilizzate per determinare il *bleed through* (sovrapposizione degli spettri di eccitazione ed emissione). L'intensità di emissione dell'accettore dovuta all'eccitazione del donatore (CFPex/YFPem) è corretta dalla formula proposta da Hou *et al.*:

$$F^c = F - (F_d/D_d) \times D - (F_a/A_a) \times A; \quad (2.2)$$

dove F è la fluorescenza del FRET apparente CFPex/YFPem, D è la fluorescenza del donatore CFP (CFPex/CFPem) e A è la fluorescenza dell'accettore (YFPex/YFPem).

Il contributo allo SBT del donatore è dato dal termine F_d/D_d , mentre quello dell'accettore è rappresentato da F_a/A_a . Questi valori sono costanti e sono stati ottenuti da Hou utilizzando due fluorofori modificati: per ricavare F_d/D_d si è utilizzato un fluoroforo che presenta una deficienza nella parte YFP (FLIPglu-30 μ Δ 13V \dagger Venus). F_d/D_d è calcolato come il rapporto tra l'emissione nel campo di rilevazione del YFP (535nm) dovuta allo spettro di emissione CFP e l'emissione nel campo di rilevazione CFP (470nm) con eccitazione CFP. Per F_a/A_a si è

utilizzato un fluoroforo che presenta una deficienza nella parte CFP (FLIPglu-30 $\mu\Delta$ 13V†eCFP), questo valore è calcolato come il rapporto tra l'emissione YFP dovuta all'eccitazione nel canale CFP (430nm) e l'emissione YFP dovuta all'eccitazione nel canale YFP (500nm). Il valore di F_d/D_d utilizzato è 0.773 ± 0.001 mentre il valore di F_a/A_a risulta pari a 0.053 ± 0.0007 . (Hou et al., 2011)

Questa correzione è effettuata dallo script per ogni singolo valore di intensità luminosa fluorescente (ogni pixel acquisito a microscopio) e per tutte le ROIs.

Successivamente il rapporto del FRET è modificato come segue:

$$r = F_c/D. \quad (2.3)$$

Il rapporto r è infine normalizzato in base al valore di r al tempo zero per ogni ROI:

$$r_{norm} = r/r_{t0}. \quad (2.4)$$

La correzione fin qui effettuata permette di ottenere immagini come in Figura 2.26, graficate come funzione della perfusione di *buffer* salino con e senza glucosio nel tempo.

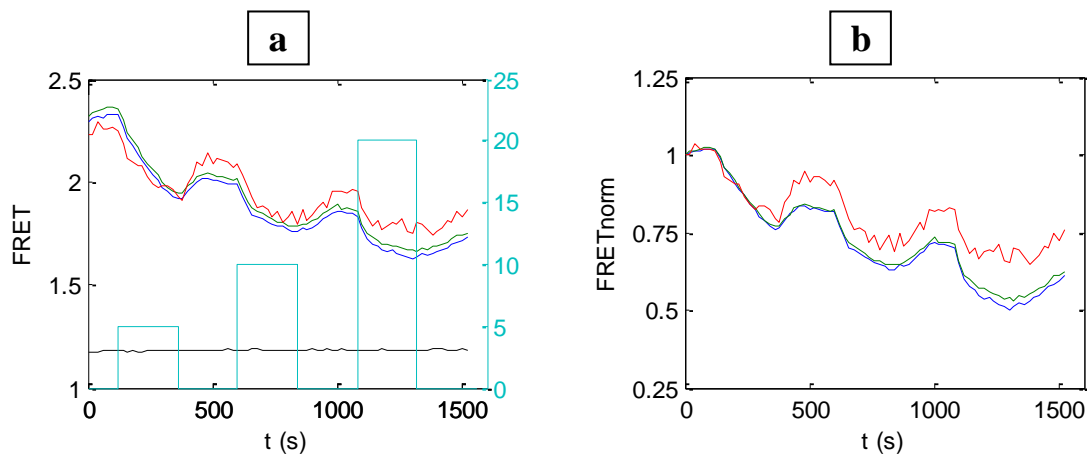


Figura 2.26 (a) Rapporto FRET in funzione del tempo senza correzioni con background (nero) a cui è sovrapposto in azzurro la concentrazione di glucosio nel buffer, (b) rapporto FRET in funzione del tempo, normalizzato al primo valore con SBT e sottrazione del background

2.7.2 Baseline correction

Il secondo *step* prevede la correzione della *baseline* formata dai valori del rapporto del FRET nel tempo nel periodo di perfusione senza glucosio (*buffer with no glucose*). Questa correzione è atta allo scopo di avere lo stesso rapporto r_{norm} (pari a 1) per tutti i valori nel tempo in cui non vi è perfusione di glucosio. Esso risulta quindi utile alla comparazione tra diverse cellule o ROIs.

Sono presi in considerazione solo i valori al tempo t in cui la concentrazione esterna di glucosio è pari a zero ed è passato un certo tempo di ritardo t_{delay} dall'istante in cui si passa da *buffer* con a quello senza glucosio. Questo è dovuto alla lenta discesa della concentrazione interna della cellula e di conseguenza al lento aumento del rapporto FRET dopo che la concentrazione esterna di glucosio diventa zero. Infatti, se il cambio di concentrazione esterno è repentino e pari a 10 secondi (se confrontato con i tempi di acquisizione di 10/20 secondi), la concentrazione interna impiega un tempo fino a 10/12 volte superiore per tornare ad uno stato stazionario.

I valori del rapporto FRET estrapolati tra due picchi sono poi raggruppati e si calcola la media aritmetica (linee più spesse in Figura 2.27a).

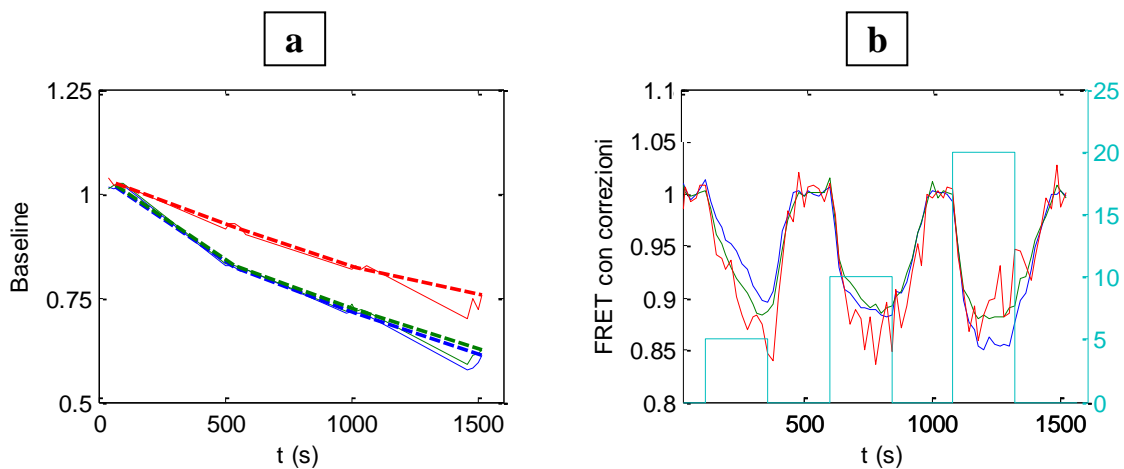


Figura 2.27 (a) valori del rapporto FRET utilizzati per baseline correction e media di ogni serie di valori estrapolati (linee più spesse tratteggiate) e (b) grafico finale con valori del rapporto corretti a cui è sovrapposto la concentrazione di glucosio nel buffer salino in funzione del tempo (in azzurro)

Successivamente si esegue un *fitting* delle medie appena calcolate con un polinomio di grado deg scelto dall'operatore. Per fare questo si utilizza la funzione Matlab, già presente nel database, `polyfit` per ogni colonna del rapporto FRET. Ogni valore r_{norm} è corretto con il valore del polinomio al tempo corrispondente.

Questa tecnologia di elaborazione di immagini FRET, il cui risultato finale è riportato in Figura 2.27b, risulta utile ad una miglior analisi dei dati e un confronto tra esperimenti diversi.

Infine si vuol evidenziare che *baseline correction* e normalizzazione si ripercuotono sui dati. Questi ultimi sono necessari per analisi comparative tra cellule o ROIs differenti, ma l'algoritmo qui usato non è basato sulla correzione del *photobleaching* (Hou et al., 2011).

2.7.3 Analisi dell'area di un picco

Questa tecnica di analisi è utile per calcolare l'area sottesa ad un singolo picco di variazione del rapporto del FRET. Tale variazione è dovuta ad un cambio di concentrazione tra il *buffer* senza glucosio e un *buffer* a concentrazione di glucosio nota.

Grazie ai valori dell'area dei picchi ottenuti con concentrazione diversa di glucosio nel *buffer*, è possibile costruire delle curve di taratura dei nanosensori FRET utilizzati. L'area è calcolata grazie ad un'integrazione mediante il metodo dei rettangoli su ogni singolo picco attraverso un programma denominato `FRET_calculation_programme_area`.

Questo *script* applica la correzione dei dati che riporta la *baseline* a valori in un intorno di 1. Per ogni picco il frame iniziale su cui è effettuato il calcolo di area è quello corrispondente al cambio della concentrazione di glucosio. Questo punto è riconosciuto dal programma quando è caricata la dinamica di perfusione. Il frame finale del calcolo dell'area varia da picco a picco in base alla concentrazione e alla dinamica di risalita (t_{delay}) ed è inserito a tastiera.

Dati quindi *frame* iniziale e finale del picco e, considerando la *baseline* pari a 1, la formula usata per il calcolo dell'area risulta essere la seguente:

$$Area = tframe * nframe - \sum_{framein}^{framefin} r_{norm} \quad (2.5)$$

Dove *tframe* è il tempo di rilevazione che intercorre tra due *acquisizioni*, *nframe* è il numero totale di valori considerati, *framein* e *framefin* sono rispettivamente il *frame* iniziale e quello finale, *rnorm* è il rapporto del FRET corretto come da paragrafi 2.7.1 e 2.7.2.

Quest'area è visualizzata in grigio in Figura 2.28.

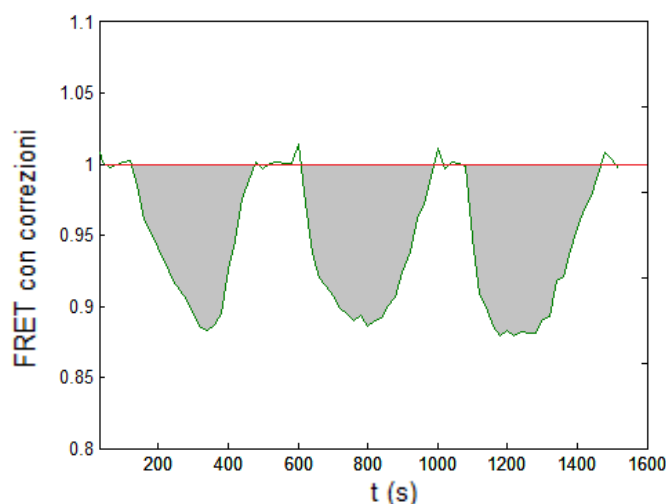


Figura 2.28 In grigio sono evidenziate le aree calcolate dal programma

Il programma calcola l'area di tutti i picchi di un esperimento. I vari valori d'area, inseriti in un grafico dove in ascissa vi è la concentrazione del glucosio nel *buffer* in perfusione, generano una retta di taratura.

2.7.4 Funzioni del programma *FRET_calculation_programme*

Si riportano infine le principali funzioni del programma *FRET_calculation_programme*, riportato per intero in Appendice A:

- caricamento della sequenza di immagini (*frame*) in formato TIFF del campo visivo del microscopio: CFPem come risultato di CFPex; YFPem come risultato di YFPex e l'intensità di emissione FRET come segnale YFPem risultante da CFPex;
- converte le immagini in scala di grigio;
- permette di definire a tastiera le *ROIs* e il *Background*;
- *setting* dei parametri di algoritmo per la *baseline correction*: F_d/D_d e F_a/A_a , del grado del polinomio per effettuare la *baseline correction*, del *frame* iniziale e finale su dal quale al quale svolgere l'analisi, nel caso si voglia eliminare parte dell'esperimento;
- definizione del tempo di ritardo t_{delay} ;
- caricamento da un file Excel della concentrazione di glucosio nel *buffer* nel tempo durante la perfusione per la sovrapposizione al grafico finale;
- sottrazione del *background*, correzione SBT, normalizzazione, *baseline correction* come spiegato nel paragrafo 2.7;
- generazione di una figura che comprende i grafici dei 3 spettri in emissione acquisiti (Figura 2.25);
- generazione di una figura con 4 grafici: 1) rapporto del FRET senza correzione, 2) dopo sottrazione del background, correzione SBT e normalizzazione, 3) dati estrapolati per la *baseline correction*, 4) grafico finale del rapporto del FRET corretto;
- creazione di un file Excel con i dati *output* del rapporto del FRET in funzione del tempo prima e dopo la correzione;
- calcolo dell'area dei vari picchi come da paragrafo 2.7.3;
- stampa a schermo di un grafico con i valori d'area in funzione della concentrazione di glucosio;
- creazione di un file Excel con i dati dell'area in funzione della concentrazione.

Capitolo 3

Ottimizzazione e verifica delle prove FRET

In questo capitolo sono descritti i risultati preliminari dello studio inerente l'ottimizzazione delle prove FRET, in relazione all'obiettivo utilizzato e al tempo che deve intercorrere tra due successive acquisizioni. È stata definita e applicata una metodologia per la validazione di un esperimento sia durante che successivamente alla prova.

Il lavoro ha inoltre compreso la messa a punto di una sequenza di operazioni automatizzata mediante PC, per il controllo di piattaforme multistrato nelle fasi di semina, coltura e transfezione di cellule in camere microfluidiche, al quale è seguito il *set-up* delle apparecchiature.

Infine si è valutato il contributo osmotico del glucosio contenuto nel *buffer* salino alle varie concentrazioni utilizzate.

3.1 Progettazione di un sistema automatizzato per la coltura in camera microfluidica

In questa parte della tesi è descritto il sistema automatizzato per la gestione di colture in camere microfluidiche per coltura a lunga durata (fino a 10 giorni). Parte di questa progettazione è realizzata praticamente nell'apparato descritto nel paragrafo 2.5 che riguarda tutta la parte di gestione esterna alla piattaforma microfluidica (controlli operativi, elettrovalvole, *vial* in pressione, etc.).

Quanto segue è la descrizione di come può essere attuato un sistema costituito da un chip microfluidico automatizzato, mediante il pompaggio e il controllo di tutte le sostanze perfuse nella camera microfluidica. Sono inoltre riportati alcuni risultati preliminari necessari alla fase di progettazione.

3.1.1 Semina, transfezione e coltura in piattaforme microfluidiche integrate

L'automatizzazione di tutte le pratiche manuali per la semina, la transfezione e il mantenimento per diversi giorni di una coltura cellulare in camere microfluidiche costituiscono gli obiettivi principali di questa parte della tesi.

Per automatizzazione si intende la gestione tramite PC di tutte le operazioni necessarie all'esecuzione di un esperimento in microfluidica, in questo modo la presenza dell'operatore si limita alla preparazione delle soluzioni e al loro collegamento iniziale alla piattaforma. L'operatore può così monitorare la coltura senza svolgerci operazioni quotidiane.

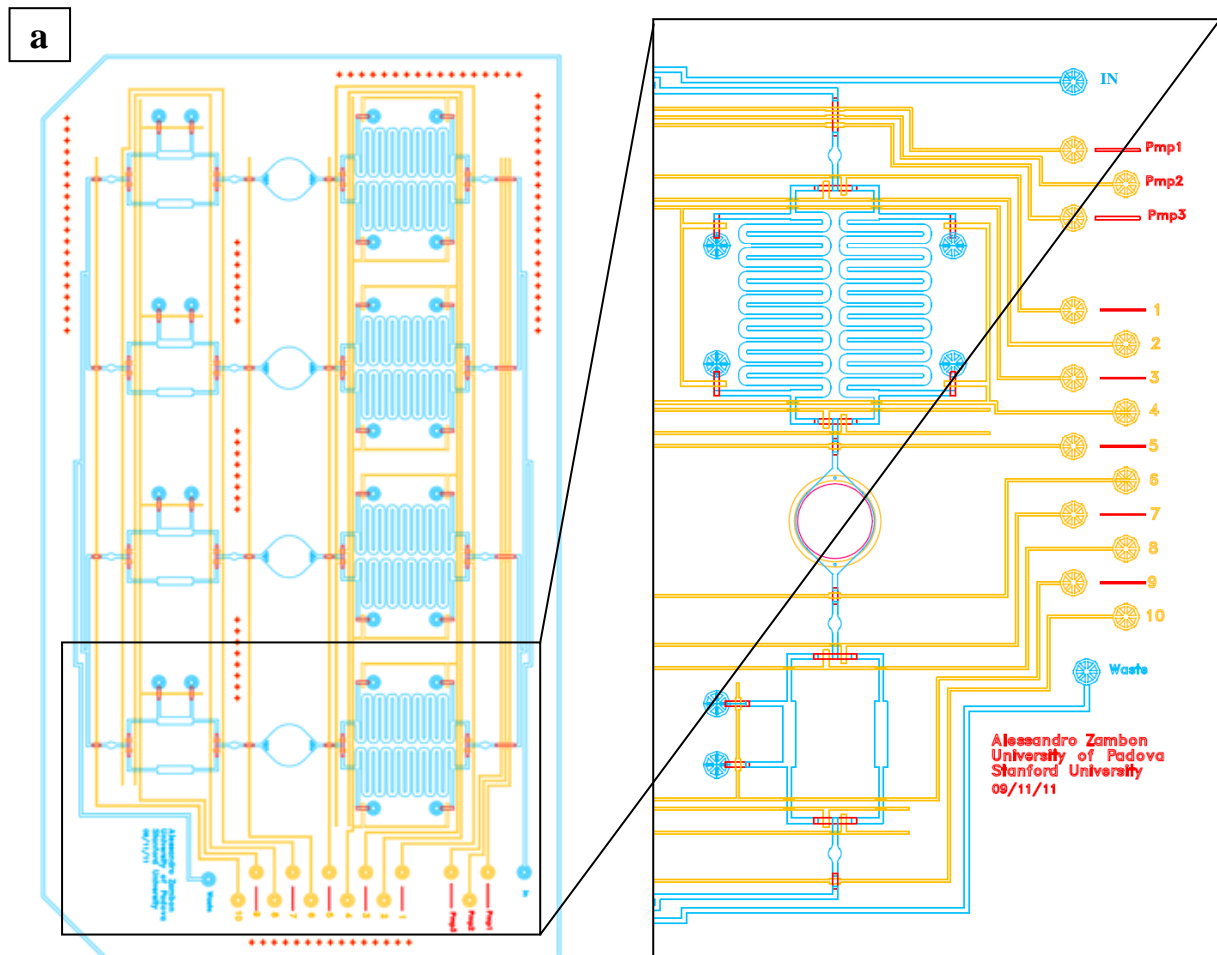


Figura 3.1 (a) Schema della piattaforma microfluidica integrata utilizzata per la coltura automatizzata di C2C12; in azzurro i canali di flusso, in giallo i canali di controllo. **(b)** Ingrandimento ruotato in corrispondenza dei fori: 'IN' e 'Waste' sono rispettivamente ingresso e uscita dal canale di flusso, 'Pmp1', 'Pmp2' e 'Pmp3' sono i canali di controllo delle tre microvalvole della pompa peristaltica, '1' e '2' servono a scegliere quale riserva di liquido far fluire in camera, '3' e '4' controllano ingresso e uscita alle riserve, '5', '6' e '10' intercettano il flusso prima e dopo la camera, '7', '8' e '9' controllano la zona per il biosensore

La piattaforma microfluidica utilizzata (Figura 3.1), sviluppata da Alessandro Zambon presso la *Stanford University* è denominata *Myoblast Chip* (MC); è dotata di un canale di ingresso e uno di uscita che alimentano in parallelo quattro camere microfluidiche dotate di una pompa peristaltica microfluidica che spinge il liquido di due riserve di liquido situate a valle di ogni camera. Integrati nel *microchip* vi sono dei canali di controllo: tre di questi controllano le

3 microvalvole che formano la pompa peristaltica, 10 canali invece, gestiscono altrettante microvalvole utilizzate per l'intercettazione del liquido nel canale del flusso. I canali di controllo sono gestiti contemporaneamente per tutti i 4 percorsi in parallelo. La piattaforma microfluidica è schematizzata in Figura 3.1, dimensioni dei canali e della camera sono riportate in Tabella 3.2.

La fase di semina e transfezione mediante il microchip integrato ripercorre le operazioni del paragrafo 2.4.2.4 in maniera automatizzata e ha durata di 4 ore. Il microchip sterilizzato è collegato per la parte di controllo delle microvalvole all'apparato di gestione descritto nel paragrafo 2.5.

In ingresso al *microchip* si collega una *vial* in pressione con del terreno di crescita per coltura cellulare, una riserva per ogni camera è riempita mediante una pipetta manuale P1000 con del terreno, lipoplessi per transfezione e le cellule mentre l'altra riserva è collegata in ingresso con una *vial* in pressione che contiene la soluzione di lipoplessi.

Un programma di gestione della piattaforma a PC provvede al controllo coordinato delle varie fasi. La valvola che mette in contatto la riserva con le cellule con la camera microfluidica viene aperta e il contenuto sospinto al suo interno per mezzo della pompa peristaltica fino al termine della fase di semina. La pompa microfluidica permette una migliore qualità di semina cellulare diminuendo gli stress meccanici sulle cellule migliorandone la distribuzione interna alla camera.

La transfezione richiede il ricambio completo della soluzione di lipoplessi ad ogni ora e per le 4 ore successive alla semina. Il *refill* della camera è effettuato iniettando mediante pompa peristaltica un volume di soluzione di lipoplessi doppio di quello della camera microfluidica (0.7mm^3). La riserva con la soluzione di lipoplessi è così vuotata nella camera mentre si riempie di terreno per coltura normale. Quindi si chiudono le valvole che collegano la riserva alla camera e si apre la valvola di uscita verso l'esterno della riserva, mentre da quella di ingresso viene iniettata della soluzione di lipoplessi fresca che verrà usata nuovamente dopo un'ora.

Conclusa la fase di transfezione il programma provvede ad un ricambio del terreno di crescita all'interno della camera microfluidica ogni 6/12 ore. Durante queste operazioni la piattaforma microfluidica è situata in un ambiente favorevole alle cellule all'interno di un incubatore a CO_2 a temperatura controllata.

Le camere microfluidiche pronte per l'esperimento FRET, sono collegate al *microchip* integrato per il cambio del *buffer* salino (si veda paragrafo 2.5.1) aprendo le microvalvole della pompa peristaltica.

3.1.2 Determinazione del substrato migliore

L'adesione delle cellule al vetro all'interno della camera microfluidica è favorita da un film di substrato necessario a ricoprire il vetro. A tal proposito sono state effettuate prove di adesione verificando lo stato delle cellule a 5 ore dalla semina. Una prova è svolta su vetro senza *coating* (Figura 3.2a) mentre le altre (Figura 3.2b-f) sono effettuate utilizzando i seguenti substrati: gelatina 0.6% in DPBS-- (Attachment Factor, Invitrogen), fibronectina (Invitrogen), Matrigel 2.5% (BD) in DMEM e Matrigel 5,0% in DMEM lasciati all'interno della camera per 20 minuti; una soluzione preparata con 950 μ l etanolo assoluto + 50 μ l acido acetico + 3 μ l di 3-trimethoxysilyl propyl methacrylate 98% (Sigma) e lasciata in camera per 3 minuti, successivamente lavata con etanolo e posta in piastra calda 2 minuti a 100°C.

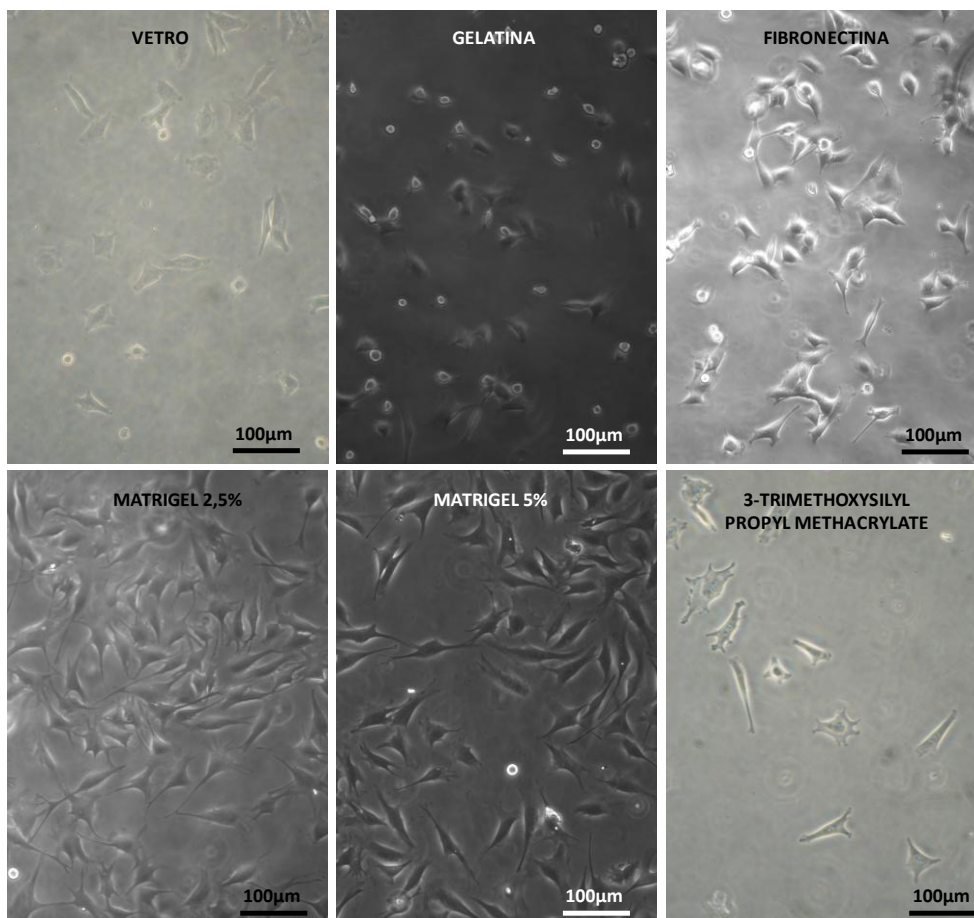


Figura 3.2 Confronto tra substrati differenti in camera microfluidica a 5 ore dalla semina

Sono state effettuate tre o più prove per ognuno dei sei substrati considerati monitorando l'esito a 1 ora, 5 ore e 24 ore dalla semina. Come si può osservare in Figura 3.2 il Matrigel garantisce la migliore adesione. Si è deciso di utilizzare come rivestimento nella fase di *coating* descritta nel paragrafo 2.4.2.3 il Matrigel 2.5% avendo le stesse prestazioni del Matrigel 5.0%.

3.1.3 Calibrazione della pompa peristaltica

La calibrazione della pompa peristaltica della piattaforma microfluidica denominata “*Myoblast chip*” (MC) (Figura 3.1) è realizzata allo scopo di:

- misurare la portata di liquido generata dalla pompa in base alla frequenza di ogni ciclo (metodologia e risultati analoghi a quelli di Lai e Folch). In questo caso la calibrazione è stata effettuata misurando l’avanzamento del fronte del liquido in un tubo di diametro interno noto;
- stimare la velocità di spostamento delle cellule nella fase di semina attraverso l’analisi del trasporto di *beads* che ne riproducono la forma.

3.1.3.1 Metodo di calibrazione con battente di liquido

Si è determinato il volume di acqua e colorante spostato nel tempo in un tubo in *Tygon* collegato all’uscita del *microchip*. Il tubo di *Tygon* (Cole Parmer), con dimensioni in Tabella 3.1 fornite dalla casa costruttrice e verificate a microscopio, è posto sull’obiettivo dello stereomicroscopio in corrispondenza dell’interfaccia liquido-aria.

Tabella 3.1 Dimensioni tubo in *Tygon* (Cole Parmer)

D interno tubo [mm]	0.51
D esterno tubo [mm]	1.52

Fissato il tubo alla base del microscopio, in modo che non possa subire movimenti durante l’esperimento, sono state registrate immagini a successivi *time point* (Figura 3.3).

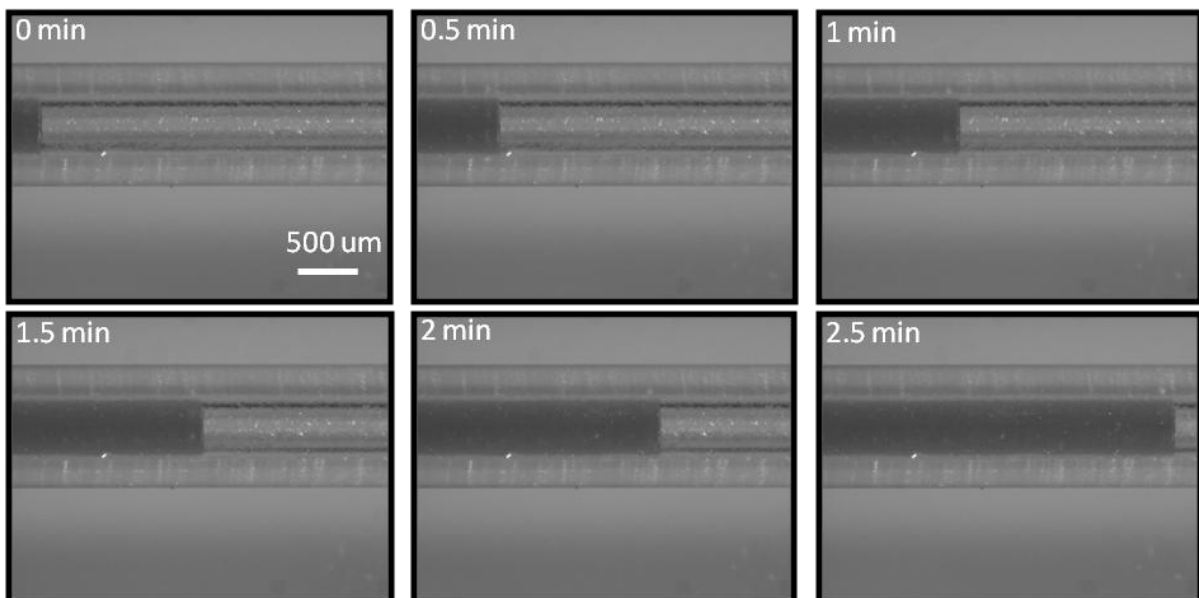


Figura 3.3 Immagini dello spostamento del liquido nel tubo di *Tygon* a tempi diversi

Noto il diametro esterno del tubo e rapportandolo alle dimensioni dei pixel delle immagini, si è determinata la distanza percorsa dal liquido rispetto al tempo zero. Noto il diametro interno si è calcolato il volume di liquido e di conseguenza la portata per diverse frequenze di attuazione della pompa.

Infine, per validare la prova, è stato necessario:

- verificare la tenuta delle valvole che formano la pompa con quest'ultime chiuse e verificando spostamento nullo nel tempo del liquido;
- effettuare prove all'estremità in entrata e in uscita del tubo (circa 20cm di differenza) per constatare che la distanza dall'uscita del chip in cui ci si pone non varia la misura.

3.1.3.3 Risultati della calibrazione della pompa peristaltica con battente di liquido

In Tabella 3.2 si riportano le dimensioni caratteristiche degli elementi di cui è composto il *microchip* MC nonché le pressioni di esercizio.

Tabella 3.2 Dimensioni caratteristiche myoblast chip e pressioni d'esercizio

Larghezza canali serpentina [μm]	300
Altezza canali di flusso [μm]	25
Diametro camera [μm]	3000
Volume camera [nL]	700
Dimensioni pompa peristaltica (fl x cl x h) [μm^3]	200x150x25
Pressione lato <i>flow</i> [psi]	10
Pressione lato <i>control</i> [psi]	30

La calibrazione è svolta con una delle due riserve di liquido con valvole chiuse, in quanto si utilizza una riserva alla volta. La portata in funzione della frequenza di attuazione della pompa è riportata in Figura 3.4.

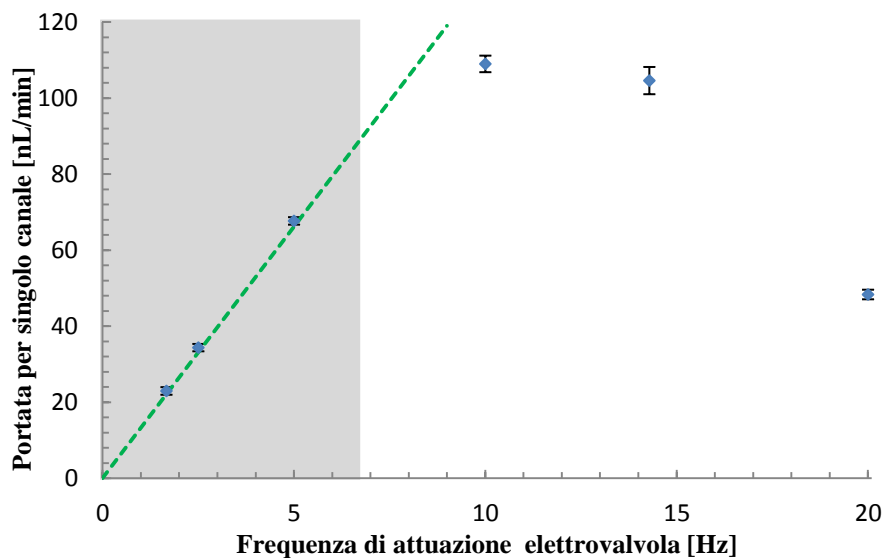


Figura 3.4 Portata della pompa peristaltica del MC a varie frequenze di azionamento delle elettrovalvole, l'andamento proporzionale tra frequenza e portata è evidenziato in grigio

Dal grafico è possibile notare come la relazione tra portata e frequenza di attivazione delle microvalvole sia proporzionale fino alla frequenza di 8Hz, che corrisponde alla portata massima, oltre la quale si assiste ad una sua diminuzione dovuta al raggiungimento del tempo di attuazione minimo delle elettrovalvole.

La pompa peristaltica è in grado di lavorare in un *range* di portate che va da un valore minimo di 0nL/min fino ad un valore massimo di circa 80nL/min. La scelta della frequenza di lavoro, alla quale è associata una specifica portata, viene scelta di volta in volta in base alle condizioni di lavoro richieste dall'esperimento. Conoscendo il volume interno della camera microfluidica si è calcolato per ogni portata il tempo di riempimento. In tabella 3.3, necessaria del punto di vista operativo, si riportano i tempi per il *refill* dell'85% e del 100% del liquido presente nella camera.

Tabella 3.3 Tempi di refill della camera a diverse frequenze di azionamento della pompa

Frequenza di azionamento [Hz]	Portata media [nL/min]	Tempo <i>refill</i> 85% [min]	Tempo <i>refill</i> 100% [min]
1.67	23.0	25.8	30.4
2.50	34.4	17.2	20.3
5.00	67.7	8.7	10.3
10.00	109.0	5.4	6.4
14.29	104.7	5.6	6.6
20.00	48.4	12.3	14.4

La portata teorica della pompa è calcolata a partire dal volume di liquido spostato da una microvalvola. Conoscendo la superficie della sezione del canale di flusso S e la lunghezza della microvalvola L si considera che il liquido fatto avanzare sia pari al volume totale del canale di flusso in corrispondenza della valvola $V_{spostato}$, calcolato mediante l'equazione:

$$V_{spostato} = S * L = (\pi * 25\mu m * 200\mu m / 2) * 150\mu m = 1.17nL; \quad (3.1)$$

dove S è la superficie di una semiellisse (il canale di flusso è semicircolare).

Conoscendo il numero di cicli al minuto della pompa è possibile calcolare la portata teorica come:

$$Portata[nl / min] = \frac{V_{spostato} * 60}{\tau}; \quad (3.2)$$

dove τ è la durata di un ciclo completo di attuazione della pompa peristaltica in secondi.

La portata teorica è riportata (in rosso) in funzione della frequenza di attuazione delle elettrovalvole in Figura 3.5. Essa è posta a confronto con la portata calcolata sperimentalmente e riportata in Figura 3.4.

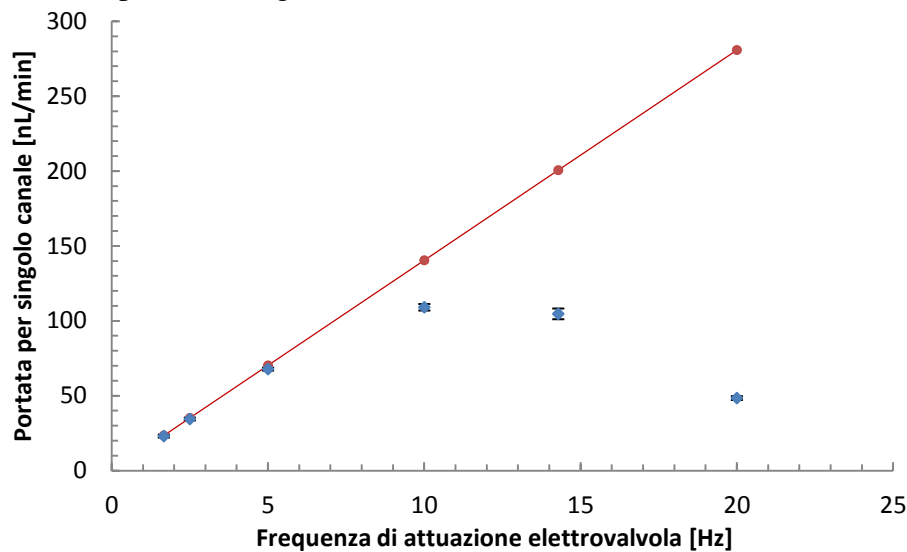


Figura 3.5 Portata teorica della valvola confrontata con dati sperimentali

Infine, per controllare l'influenza del punto di misura dell'interfaccia, sono effettuate misurazioni alle due estremità del tubo di Tygon: in prossimità all'uscita del chip e a circa 20cm dall'uscita del *microchip*.

In Figura 3.6 sono riportate le misure delle portate a due periodi τ di attuazione dell'elettrovalvola diversi, in rosso quelle in prossimità dell'uscita del *chip*, in blu quelle nell'estremità opposta distante dall'uscita del *chip*.

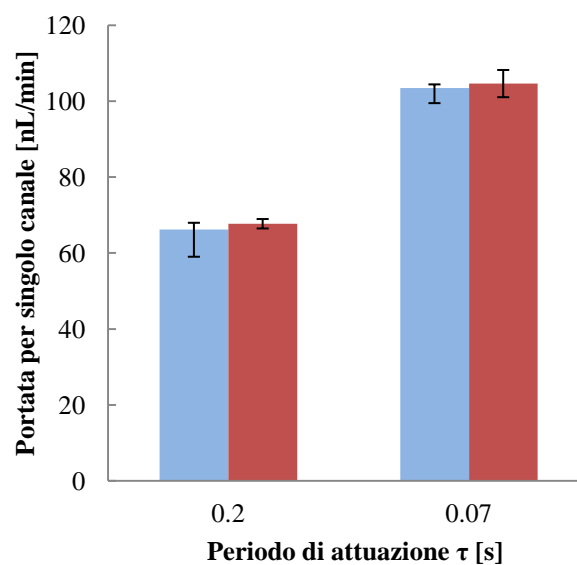


Figura 3.6 Portate in prossimità dell'uscita (in blu) e nell'estremità opposta (in rosso) per due periodi di attuazione con associate barre d'errore

Considerando le barre d'errore si osserva che non vi è sostanziale influenza del punto di misura.

3.1.3.2 Calibrazione mediante *beads*

Le *beads* sono delle sfere in PMMA (CaliBRITE3, BD Biosciences) della dimensione di alcuni micron (approssimativamente $6\mu\text{m}$) immerse in un liquido. Esse sono inserite all'interno della riserva di liquido con lo scopo di simulare la semina di cellule (Figura 3.7); attraverso l'ausilio di una telecamera montata su stereomicroscopio (Leica) è monitorato lo spostamento nel tempo per effetto dell'azionamento della pompa a diverse frequenze.

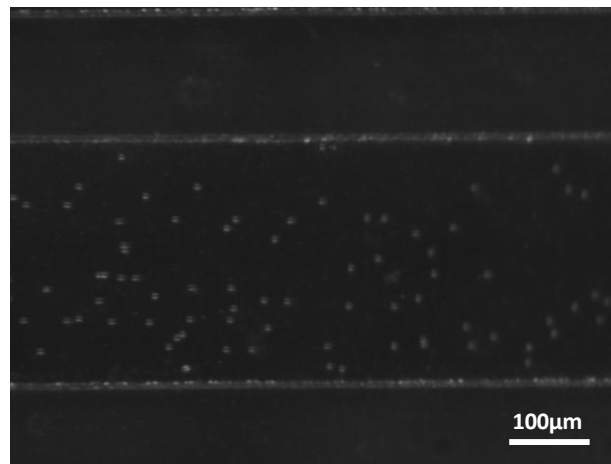


Figura 3.7 Foto a stereo microscopio di *beads* nel canale microfluidico di una riserva del MC

I video sono analizzati grazie ad un programma di *particle tracking* sviluppato in *Matlab* da Onelia Gagliano, Università degli Studi di Padova, che calcola la velocità media di tutte le *beads* in movimento. Si tratta di un metodo ottico di misura globale del campo di moto di un fluido, che fornisce, in una determinata sezione del flusso, la proiezione del campo del vettore velocità istantanea sulla sezione stessa.

I punti critici di questa tecnica sono principalmente due:

- la concentrazione delle micro particelle inserite nel fluido, se troppo bassa non consente una descrizione esauriente del campo di moto, viceversa rende difficile l'identificazione delle particelle nelle immagini;
- la scelta dell'intervallo temporale tra un frame e l'altro, infatti un intervallo troppo lungo può comportare il mancato riconoscimento di diverse particelle rendendole come appartenenti alla stessa traiettoria, viceversa intervalli troppo brevi comportano uno spostamento troppo piccolo delle *beads* e quindi la presenza di disturbi dovuti a rumore.

Il software elaborato in linguaggio *Matlab*, permette di determinare le traiettorie delle particelle a partire dalle coordinate delle medesime nei diversi frame acquisiti; può essere come segue:

- 1° *step*: individuazione della posizione delle singole *beads* e calcolo delle coordinate spaziali del centroide;
- 2° *step*: ripetizione della procedura per il numero di frame stabilito;
- 3° *step*: decidere, tramite opportune funzioni di autocorrelazione, quali particelle appartengono alla medesima traiettoria e quali escludere dall'analisi;
- 4° *step*: determinare la velocità delle particelle tracciate.

La velocità risulta dal rapporto tra lo spazio percorso dalle singole particelle e il tempo impiegato a percorrerlo. Un esempio di *particle tracking* elaborato in Matlab è riportata in Figura 3.8.



Figura 3.8 Particle tracking: ogni punto corrisponde alla posizione di una bead in un frame nel canale microfluidico. Sono analizzati 5 frame alla volta per 25 frame totali. I gruppi di frame sono evidenziati in sequenza dai colori azzurro, nero, blu, verde, rosso rispettivamente (nel rettangolo rosso il cammino completo di una bead nel tempo)

Dall'analisi dei video si nota che particelle di piccole impurità presenti nei canali sono trasportate ad una velocità superiore rispetto alle *beads*, da ciò si desume che le *beads* abbiano una *drag force* rilevante per cui non si muovono con la stessa velocità del liquido. Questo riproduce il movimento delle cellule all'interno di canali microfluidici.

In Tabella 3.4 sono riportate le velocità di spostamento delle *beads* ed il tempo di *refill* della camera in funzione della frequenza di attuazione della pompa.

Tabella 3.4 Velocità delle beads e tempo di refill della camera in funzione della frequenza di attuazione delle elettrovalvole

Frequenza di azionamento [Hz]	Velocità media [$\mu\text{m/s}$]	Tempo refill [min]
1.67	5.8	168.3
2.50	8.8	112.5
5.00	29.2	33.8
10.00	47.6	20.8
12.50	25.2	39.3
14.20	15.2	64.9
20.00	0.0	0.0

3.2 Ottimizzazione del protocollo FRET in camere microfluidiche

Il protocollo per gli esperimenti su culture cellulari in camere microfluidiche mediante metodologia FRET descritto nel paragrafo 2.6 ha richiesto numerose prove preliminari necessarie all'ottimizzazione del *set-up* della strumentazione e dei parametri di acquisizione. Il *set-up* dell'intero apparato sperimentale risulta di fondamentale importanza per la buona riuscita delle prove.

Si descrivono in seguito alcuni risultati preliminari che hanno permesso l'ottimizzazione delle prove e i metodi *on-live* e post analisi per definire la buona riuscita di un esperimento.

3.2.1 Scelta dell'obiettivo da utilizzare nelle prove

Il microscopio utilizzato monta diversi obiettivi, due dei quali hanno un campo sufficientemente ampio per permettere l'analisi su più cellule: 20x ad aria e 40x ad olio.

Si sono svolte diverse prove per verificare quale dei due obiettivi permettesse l'acquisizione di immagini migliori. Il vantaggio dell'obiettivo 20x è l'ampiezza del campo visivo, che permette di visualizzare anche più di 10 cellule fluorescenti alla volta; mentre con un obiettivo 40x se ne visualizzano al massimo 5. Tuttavia l'intensità luminosa di queste cellule risulta a schermo inferiore rispetto all'acquisizione con un obiettivo 40x, di conseguenza il rumore di fondo risulta superiore.

Le prove sono svolte con picchi successivi di DPBS++ con concentrazione di glucosio 5mM di durata di 4 minuti come riportato nel paragrafo 2.6.3, per i nanosensori presi in considerazione in questo lavoro: Flip30 e Flip600. In Figura 3.9 è riportata l'analisi delle immagini di due esperimenti esemplificativi: uno al 20x e uno al 40x. La correzione di questi è descritta nel paragrafo 2.7.

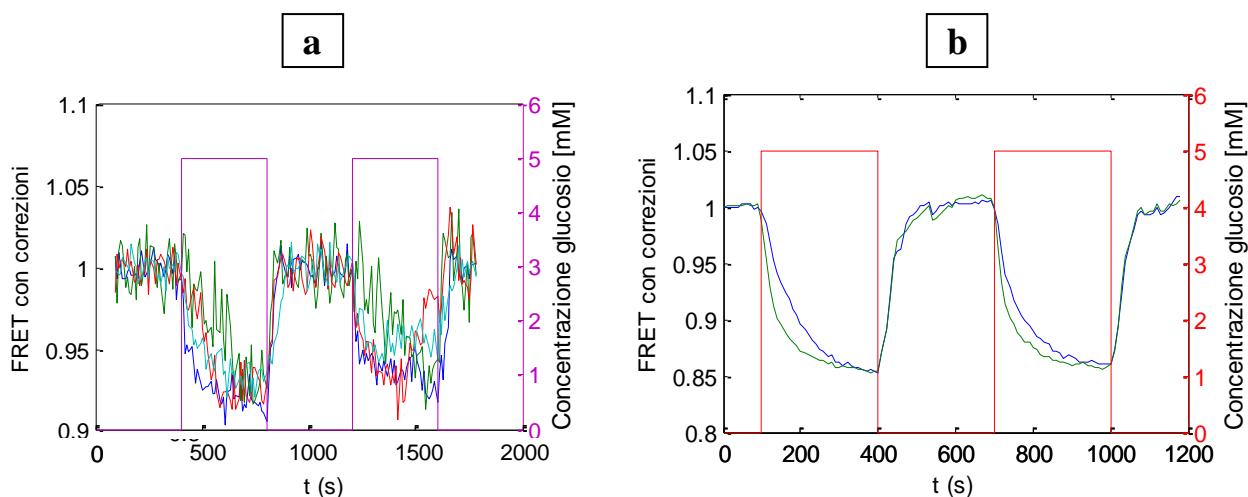


Figura 3.9 Confronto tra picchi di risposta a 5mM al 20x aria (a) e 40x olio (b)

Si sono ottenuti risultati analoghi per entrambi i nanosensori. Dalla Figura 3.9 si vede che il segnale FRET acquisito mediante obiettivo 40x ha un rumore nelle misure minore rispetto al segnale 20x, ottenendo così un rapporto segnale/rumore maggiore. Per questo motivo si sceglie di utilizzare l'obiettivo 40x olio.

3.2.2 Scelta del tempo tra due acquisizioni

Il tempo che intercorre tra due successive acquisizioni di immagine è un parametro impostabile nel protocollo gestito dal *software CellR* del microscopio. Questo tempo non può essere eccessivamente ridotto in quanto l'esposizione a fluorescenza è causa di *photobleaching* nelle cellule: il fluoroforo si degrada fotochimicamente e viene distrutto progressivamente dall'esposizione continua alla luce necessaria per eccitarlo. Questo parametro determina il tempo tra due successivi *timepoint*; se è basso il rumore nel segnale risulta elevato, se è elevato non si identificano con precisione le dinamiche nel segnale.

Le prove sono svolte con picchi successivi di DPBS++ con concentrazione di glucosio 5mM della durata di 4 minuti come riportato nel paragrafo 2.6.3. Si valuta il rumore e la qualità del segnale con tempo tra due acquisizioni di 10 secondi e di 20 secondi per i nanosensori Flip30 e Flip600. I risultati sono riportati in Figura 3.10a per i 10 secondi e in Figura 3.10b per i 20 secondi.

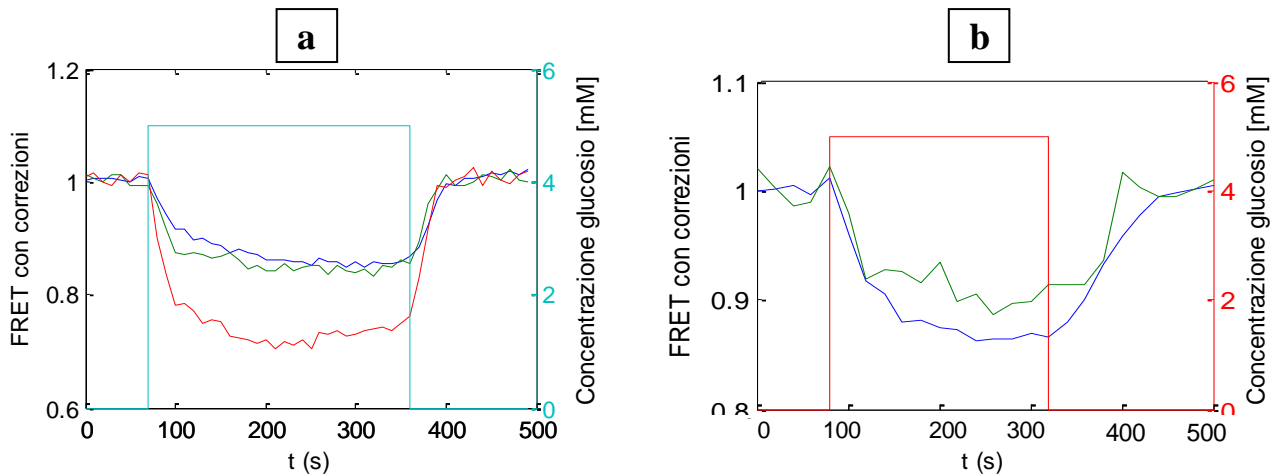


Figura 3.10 Confronto tra picchi di risposta a concentrazione di glucosio di 5mM per tempo tra due acquisizioni di (a) 10s e (b) 20s

Si sono ottenuti risultati analoghi per entrambi i nanosensori. A seguito delle prove svolte il tempo che intercorre tra due successivi *timepoint* è posto a 20 secondi, essendo il segnale meno rumoroso e rilevando la dinamica di discesa e risalita del segnale con buona precisione. In questo modo il *photobleaching* viene ridotto.

3.2.3 Analisi della qualità di una prova e altre questioni

Durante le prove FRET e nella successiva analisi delle stesse sono riscontrate alcune criticità che si riflettono sulla qualità dei dati. In seguito è riportato il relativo *troubleshooting* di tali problematiche nonché una metodologia per valutare la buona riuscita di un esperimento.

3.2.3.1 Intensità iniziale delle cellule

Il campo visivo scelto a microscopio risulta di fondamentale importanza per la qualità dei dati ricavati dall'analisi di immagine sulle cellule.

L'intensità luminosa di un pixel ha una scala compresa tra 1 e 4095. Il *background* ha solitamente un valore di intensità compreso tra 100 e 300.

Il campo visivo deve contenere più cellule possibili, tenendo conto che non si considerano le cellule con intensità di 4095 in quanto fuori scala e qualsiasi variazione di intensità non è rilevata; le cellule con intensità inferiore a 600/800 hanno un elevato rumore e non sono utili all'analisi. Si escludono anche cellule con filamenti che si allungano verso l'esterno, cellule con vescicole nella membrana o attorno al nucleo, cellule che in fluorescenza presentano piccoli puntini a elevata intensità.

In Figura 3.11 è riportato un campo visivo ottimale di tre cellule all'obiettivo 40x olio, un campo visivo con cellule a bassa intensità e uno con cellule con intensità superiore a 4095 nelle quali sono visibili puntini fluorescenti.

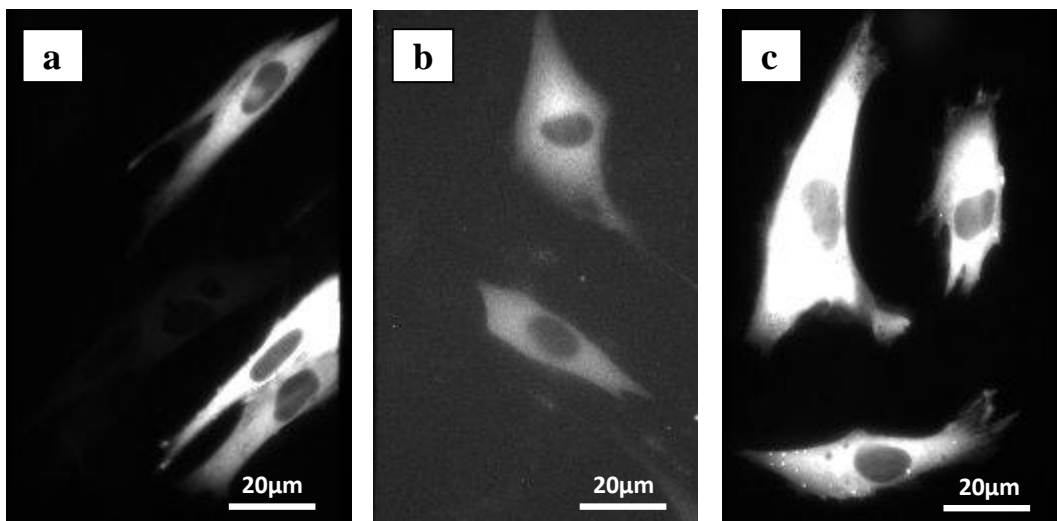


Figura 3.11 Confronto tra campi visivi acquisiti con obiettivo a olio 40x; in (a) un campo visivo ottimale, in (b) un campo visivo con cellule a bassa intensità in cui il background risulta più chiaro, in (c) un campo visivo con cellula troppo intensa (valore 4095) in alto a sinistra e cellula con puntini fluorescenti in basso

3.2.3.2 Primi istanti di acquisizione del segnale

Il rapporto del FRET non corretto ricavato dalle prove presenta due tipi di andamenti nei primi istanti della prova: uno crescente e uno decrescente, rappresentati in Figura 3.12 ed evidenziati da rettangoli arancioni.

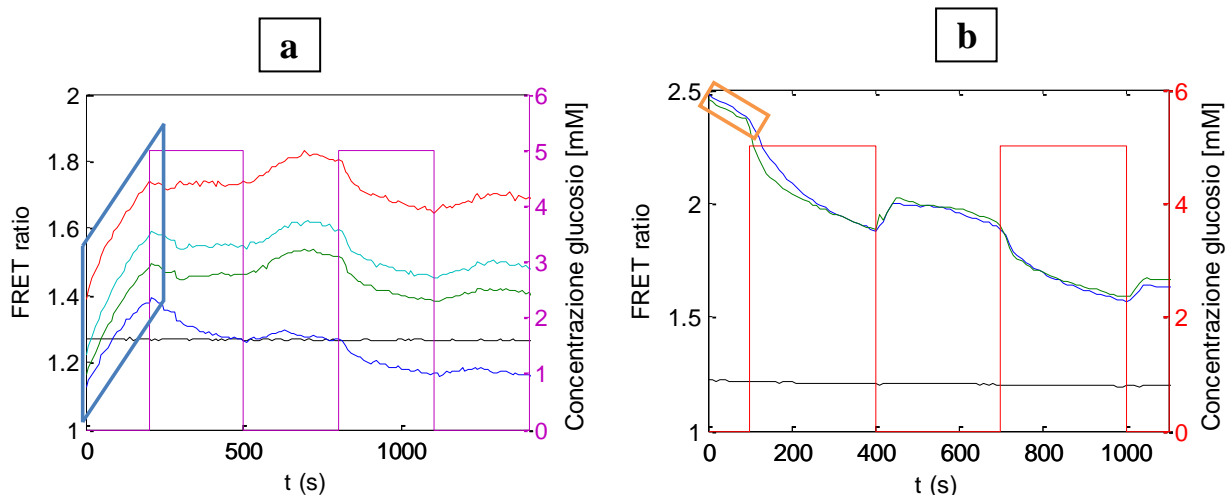


Figura 3.12 Confronto tra andamenti iniziali di rapporto del FRET in (a) con valori crescenti (riquadri in blu) e (b) con valori decrescenti nel tempo (in arancione)

Un andamento crescente dei valori del rapporto del FRET nei primi istanti della prova (solitamente dai 2 ai 5 minuti) determina che la successiva correzione dei dati e la loro analisi risulta meno efficace. Questo avviene perché l'andamento del rapporto nei *timepoint* in cui il terreno in perfusione non presenta glucosio cambia pendenza e la *baseline correction*, che utilizza un *fitting* polinomiale, non corregge con precisione il segnale. Ne consegue che il

primo picco risulta compromesso da errore (non è possibile misurare con precisione la discesa del rapporto FRET in quanto la *baseline* aumenta). Nell'analisi di prove che presentano questa problematica è necessario eliminare i *timepoints* corrispondenti ai picchi che presentano questo problema (solitamente il primo picco).

Un'analisi è tanto migliore quando il rapporto FRET presenta una decrescita costante fin dai primi *frame* acquisiti.

L'andamento nei primi istanti di acquisizione è caratteristico di tutte le cellule del campo visivo. Si ipotizza che una crescita dei valori del rapporto del FRET nei primi *frame* sia dovuta al mantenimento delle cellule per giorni in coltura con DMEM in incubatore. Il cambio di terreno (da DMEM con glucosio a DPBS++ senza glucosio), in aggiunta al cambio di temperatura a cui sono sottoposte, comporta una lenta rimozione del glucosio intracellulare fornito dal DMEM. Quindi, pur senza perfondere le cellule con glucosio, si verifica un lento aumento del rapporto dovuto appunto al consumo di glucosio presente in precedenza nella cellula (come quando si passa da PBS++ con glucosio a PBS++ senza glucosio ma con dinamica più lenta) e non una diminuzione costante dovuta al *photobleaching*.

Un metodo per diminuire l'incidenza di questa problematica consiste nella perfusione per almeno 10 minuti della camera con DPBS++ senza glucosio prima di cominciare l'acquisizione. Inoltre, essendo possibile una rilevazione istantanea del rapporto del FRET mediante il *software CellR*, è possibile fermare l'acquisizione se l'andamento è crescente, facendola ripartire in un secondo momento. Attuando questi accorgimenti il numero di prove che presenta fin dai primi istanti l'andamento voluto passa dal 30% circa all'80%.

3.2.3.3 Spostamento del piano focale

Durante tutto il tempo di acquisizione dell'esperimento, della durata massima di circa 1 ora, il *microchip* con la camera microfluidica deve rimanere fermo nel punto di prima acquisizione e non deve essere cambiato il piano focale. Infatti è sufficiente uno spostamento orizzontale o verticale di qualche micron per inficiare la prova e rendere l'immagine non analizzabile (Figura 3.13).

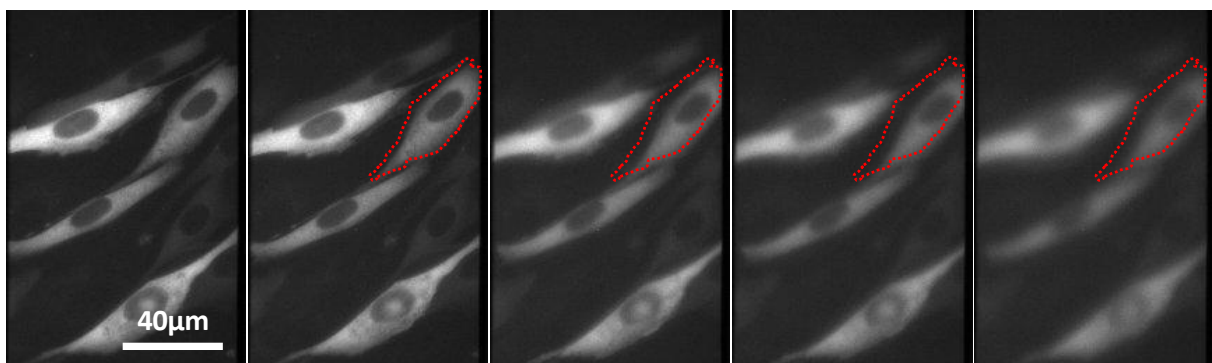


Figura 3.13 Perdita del piano focale e della posizione al tempo 0min, 4min, 8min, 12min, 16min

Per far in modo che il campo visivo rimanga allineato alla posizione iniziale di acquisizione e non si sposti il piano focale la piattaforma microfluidica è plasmata su un vetrino più lungo della sua dimensione, fissandolo alle due estremità al piano del microscopio con del nastro adesivo (Figura 2.21b).

Un'altra problematica è data dall'ingresso di bolle di aria nella camera microfluidica che può avvenire o durante l'inserimento del tubo PEEK o perché presenti nella piattaforma integrata posta a monte. Spesso le bolle d'aria, non visibili a occhio nudo, si spostano fino ad entrare nel campo visivo compromettendo la prova (Figura 3.14). Risulta quindi necessario togliere tutte le bolle d'aria dal *microchip* a monte e inserire il tubo PEEK con il *buffer* salino in flusso come spiegato in dettaglio nel paragrafo 2.6.3.

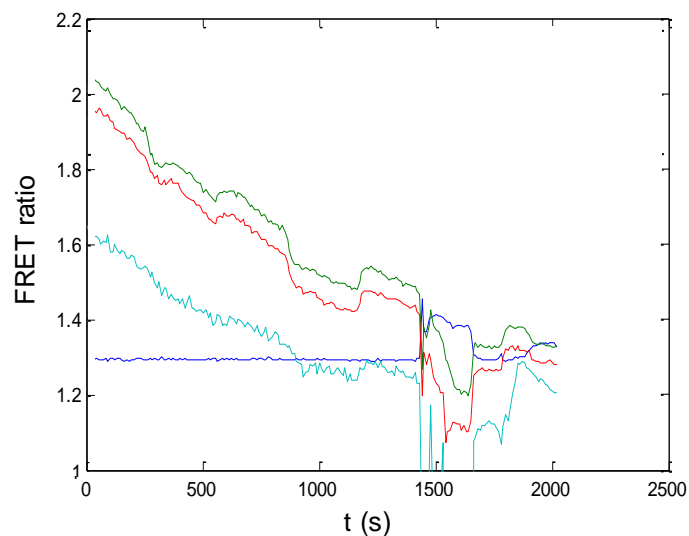


Figura 3.14 Ingresso di bolla d'aria intorno al secondo 1400 che determina una perdita del segnale

3.2.3.4 Analisi dei singoli segnali CFP e YFP

L'ultimo *step* necessario a validare una prova consiste nell'analisi dei valori di intensità luminosa dei segnali acquisiti: CFPex/CFPem (emissione nello spettro CFP come conseguenza dell'eccitazione nello spettro CFP), CFPex/YFPem (emissione YFP come risultato dell'eccitazione CFP) e YFPex/YFPem (emissione YFP come risultato dell'eccitazione YFP) descritti nel paragrafo 2.7.1.

Il cambiamento del valore del rapporto del FRET durante un picco con glucosio deriva dal fatto che parte dell'energia usata per eccitare in CFP viene trasferita al fluoroforo YFP. Questo trasferimento è tanto maggiore quanto minore è la concentrazione di glucosio intracellulare all'interno di una determinata banda di concentrazioni. Di conseguenza, se la concentrazione di glucosio cresce all'interno della cellula si osserva un corrispettivo aumento del segnale CFPex/CFPem e una parallela diminuzione del segnale CFPex/YFPem.

Sebbene il sensore utilizzato sia raziometrico, questo comporta che l'analisi risulti indipendente dalla concentrazione del nanosensore nella cellula. Nonostante ciò è possibile usare il segnale YFPex/YFPem per determinare la concentrazione del sensore nella cellula e correggere il rapporto FRET da potenziali effetti del livello di concentrazione del sensore o di altri parametri normalizzandolo con il valore YFPex/YFPem (Hou et al., 2011). Questo segnale deve risultare costante e non subire l'influenza dei picchi di glucosio.

Nell'analizzare un esperimento bisogna verificare che questi comportamenti nei tre segnali vengano rispettati per ogni picco di glucosio. In Figura 3.15 sono riportati i tre segnali CFPex/CFPem, CFPex/YFPem e YFPex/YFPem con un andamento che rispecchia quanto previsto dalla teoria e riportato in questo paragrafo, che fa validare la prova.

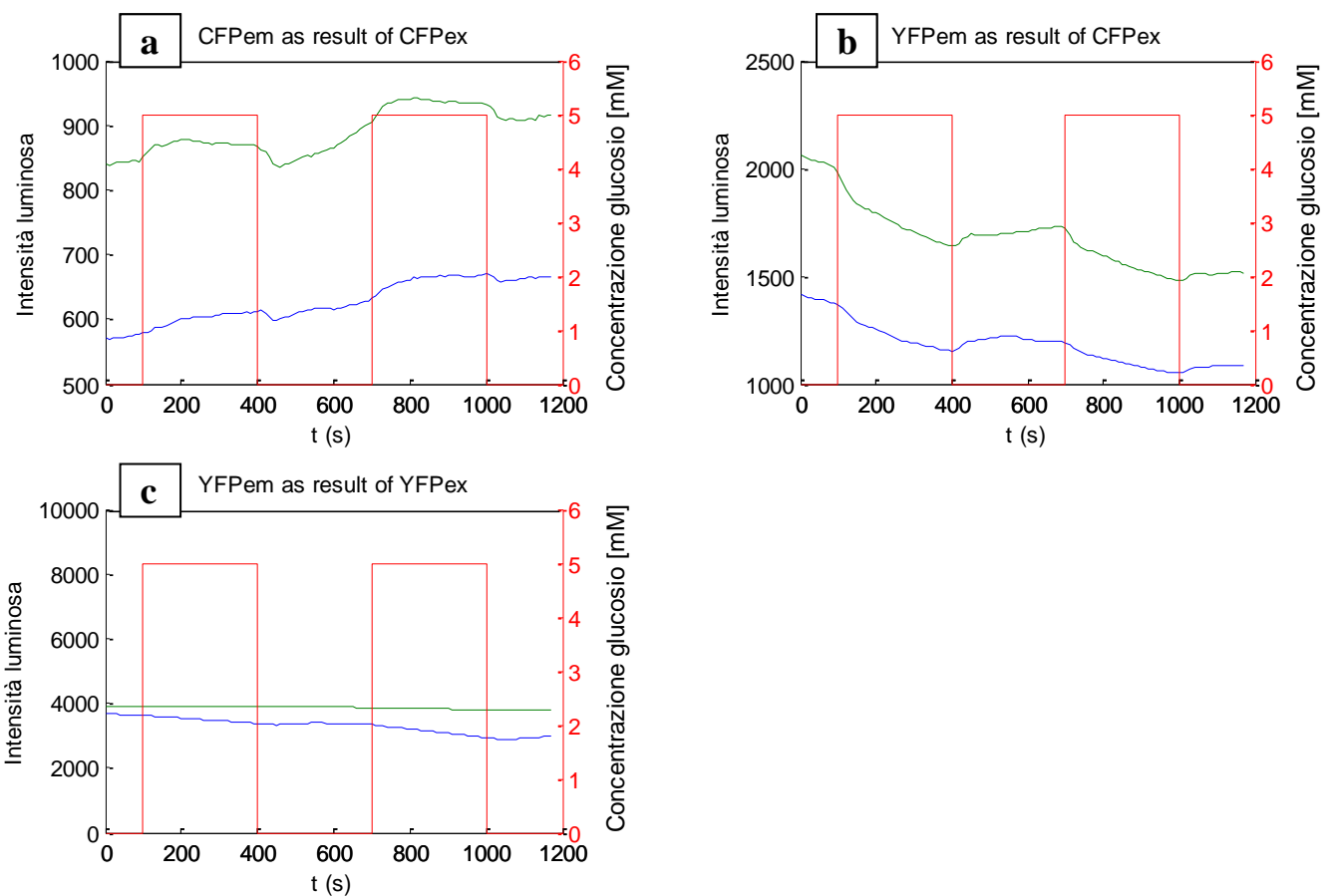


Figura 3.15 Valori di intensità nel tempo degli spettri (a) CFPex/CFPem, (b) CFPex/YFPem e (c) YFPex/YFPem di un esperimento ottimale che rispecchia la teoria

In Figura 3.16 sono riportati i valori nel tempo di CFPex/CFPem, CFPex/YFPem e YFPex/YFPem non riconducibili alla teoria; le prove di questo tipo vanno eliminate.

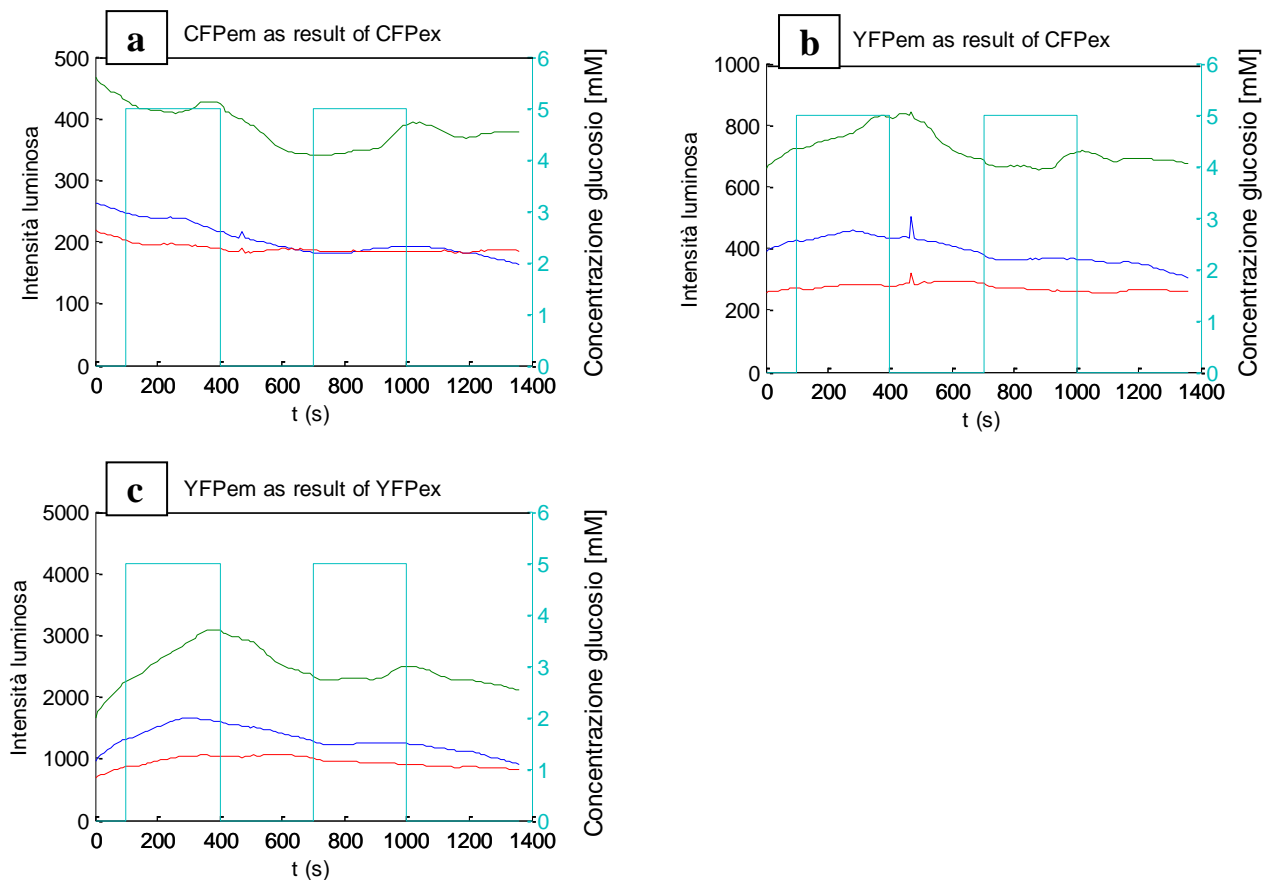


Figura 3.16 Valori di intensità nel tempo degli spettri (a) CFPex/CFPem, (b) CFPex/YFPem e (c) YFPex/YFPem di un esperimento non buono in quanto i valori dei tre spettri nel tempo hanno lo stesso andamento

3.3 Verifica del contributo della pressione osmotica

L'intento è di effettuare alcune prove per verificare che i picchi nel rapporto del FRET osservati in corrispondenza dei picchi di glucosio non sono dovuti alla diversa pressione osmotica dei terreni che perfondono la camera microfluidica. In queste prove si è utilizzato del saccarosio sostituendolo al glucosio, visto che a parità di concentrazione possiede la stessa pressione osmotica ma non è trasportato attraverso la membrana cellulare.

3.3.1 Calcolo della pressione osmotica

La pressione osmotica dei terreni utilizzati (DPBS++ a varie concentrazioni di glucosio) per la perfusione in camera microfluidica con coltura cellulare è approssimata utilizzando l'equazione di Van't Hoff per sistemi ideali (Formula 3.3) (Prausnitz *et al.*, 1999):

$$\pi = \frac{n R T}{V}; \quad (3.3)$$

dove T è pari alla temperatura ambiente (298.15K), R è la costante universale che vale 0.0821atm l/mol K, n/V (mol/l) è la concentrazione molare.

La pressione osmotica del DPBS++ è considerata isotonica con il citoplasma presente all'interno della cellula ed è calcolata a partire dalla formulazione fornita dalla casa produttrice (www.invitrogen.com) e riportata il Tabella 3.4.

Tabella 3.4 Formulazione del DBPS++ fornita dalla ditta Invitrogen

Sale disciolto	Concentrazione [mM]	π [atm]
CaCl ₂	0.901	0.022
KCl	2.67	0.065
Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	8.06	0.199
KH ₂ PO ₄	1.47	0.036
MgCl ₂ *6H ₂ O	0.493	0.012
NaCl	137.93	3.376

Sommando il contributo di tutte le sostanze disciolte, la pressione osmotica π_{tot} del DPBS++ isotonico risulta pari a 3.710atm.

In alcune prove si è utilizzato saccarosio al posto di glucosio; i valori della pressione osmotica sono analoghi per soluzioni a pari concentrazione di questi zuccheri in DPBS++. La pressione osmotica di queste soluzioni è calcolata per varie concentrazioni di zucchero (saccarosio o glucosio). In Tabella 3.5 si riportano le pressioni osmotiche e l'aumento in percentuale su quella isotonica delle soluzioni utilizzate calcolate mediante la Formula 3.3.

Tabella 3.5 Pressione osmotica e aumento percentuale sulla concentrazione 0mM di varie concentrazioni di zucchero nel DBPS++

Concentrazione di zucchero [mM]	π dovuta alla conc. di zucchero [atm]	π totale [atm]	% su π totale a conc. 0mM
0	0.0000	3.710	100.0
0.5	0.0122	3.722	100.3
1	0.0241	3.734	100.6
2.5	0.0603	3.770	101.6
3	0.0734	3.783	102.0
4	0.0979	3.808	102.6
5	0.1210	3.831	103.2
10	0.2415	3.952	106.5
20	0.4830	4.193	113.0
40	0.9660	4.676	126.0

Questi dati sono utili per capire se l'aumento di pressione dovuto allo zucchero disciolto nel DPBS++ influisca nella risposta (segnale FRET) misurata. Infatti questo aumento di pressione potrebbe risultare, a differenza di quanto teorizzato, la causa di variazione nel rapporto del

FRET in corrispondenza di un picco di glucosio. Nei paragrafi seguenti si vuole verificare se e quando la pressione osmotica risulta rilevante negli esperimenti svolti.

3.3.2 Picchi a 5mM di saccarosio confrontati con glucosio

Sono effettuate delle prove con picchi consecutivi di DPBS++ e saccarosio 5mM e prove con picchi di DPBS++ e glucosio 5mM di durata di 4 minuti. A parità di pressione e di concentrazione di zucchero, il glucosio, monosaccaride, viene trasportato attraverso la membrana ed entra nel citoplasma dove viene metabolizzato mentre il saccarosio, disaccaride, non ha possibilità di attraversare la membrana cellulare. Il saccarosio consente quindi di verificare se la variazione del segnale FRET con picchi di glucosio è dovuta alla differenza di pressione osmotica tra i terreni o alla variazione di conformazione del nanosensore che si lega al glucosio.

I dati del rapporto FRET per le due tipologie di prova sono posti a confronto in Figura 3.17, essi comprendono valori corretti e non corretti da paragrafo 2.7.

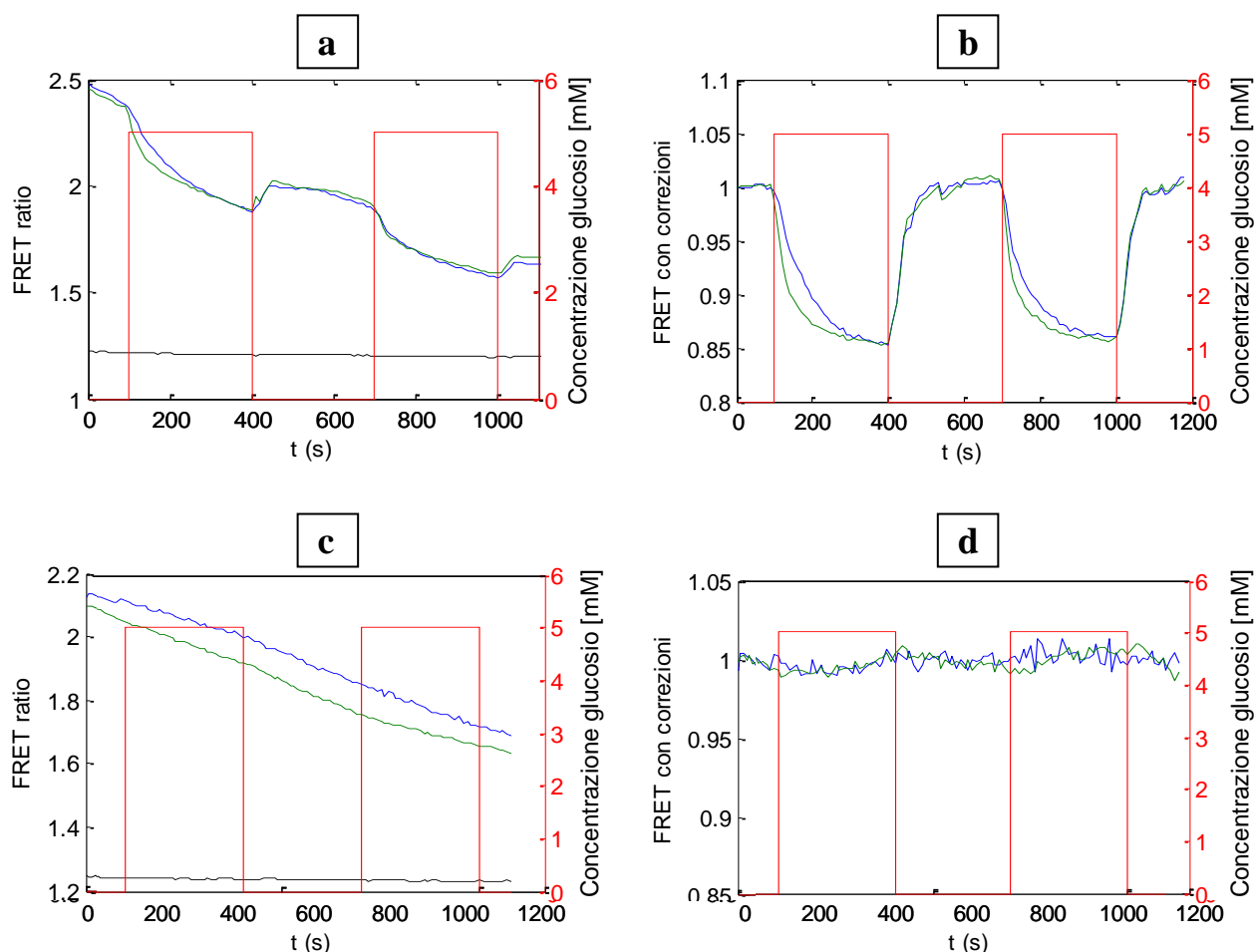


Figura 3.17 Picchi di risposta a concentrazioni di (a), (b) glucosio e (c), (d) saccarosio a 5mM, riportati come rapporto FRET non corretto(a) e (c) e dopo correzione (b) e (d)

Sono state effettuate almeno 3 prove per ogni tipologia esperimento, sia su nanosensori di tipo Flip30 che di tipo Flip600, ottenendo risultati analoghi per le due sonde.

L'analisi svolta mostra come in corrispondenza dei picchi di glucosio 5mM in DPBS++ non vi siano variazioni del rapporto del FRET, mentre in corrispondenza dei picchi con glucosio 5mM si osserva una dinamica del segnale. Questa prima prova vuole dimostrare come i picchi osservati nei valori acquisiti siano dovuti al nanosensore e non alla pressione osmotica.

3.3.3 Serie di picchi a concentrazione diversa di glucosio

In questo paragrafo sono descritti gli esperimenti effettuati per valutare la concentrazione di glucosio alla quale il contributo della pressione osmotica è rilevante nel segnale del rapporto FRET.

Sono confrontati una serie di picchi a diversa concentrazione di saccarosio: 5mM, 10mM, 20mM e 40mM della durata di 4 minuti con prove analoghe con glucosio alla stessa sequenza di concentrazioni.

Sono stati effettuati almeno 3 esperimenti per ogni tipologia, sia per la sonda Flip30 che per la sonda Flip600.

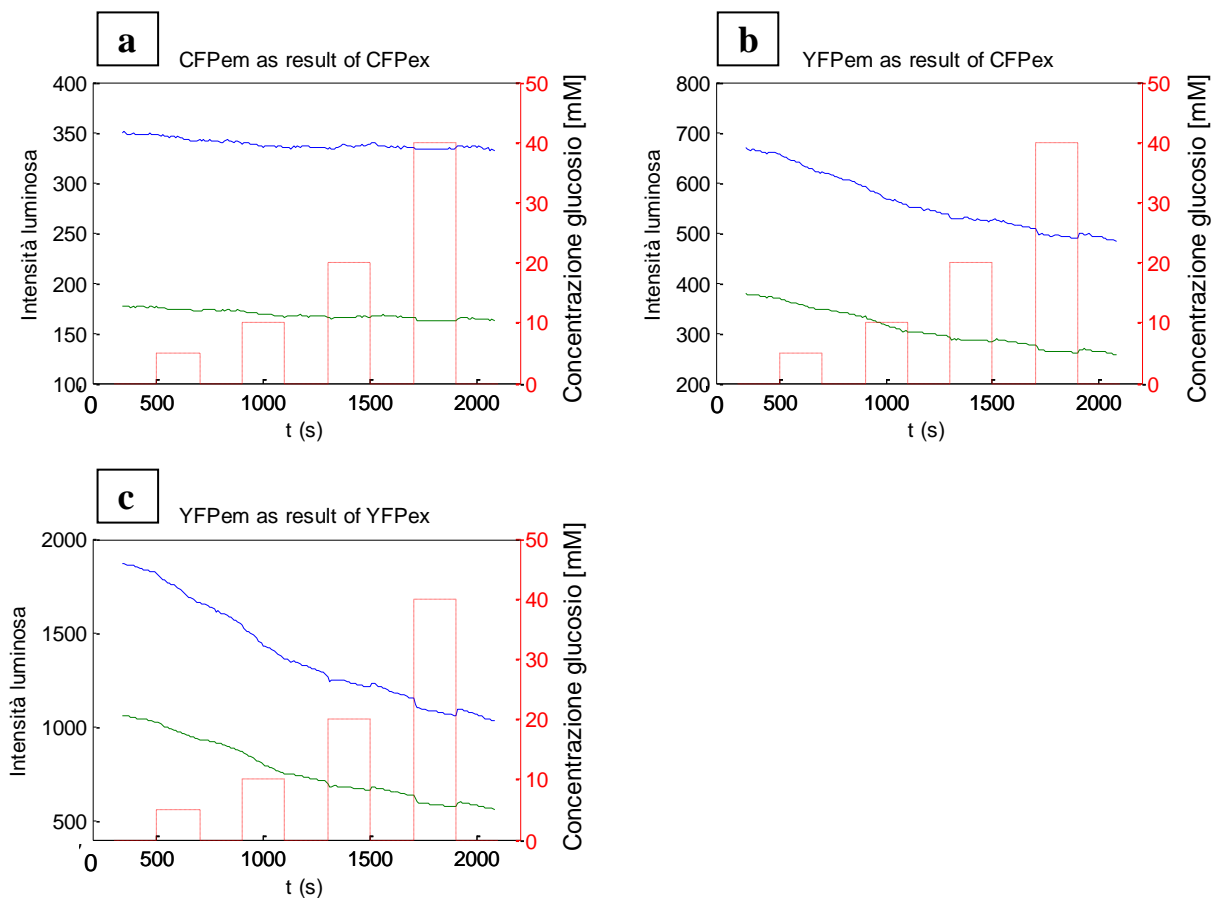


Figura 3.18 Valori di intensità nel tempo degli spettri (a) CFPex/CFPem, (b) CFPex/YFPem e (c) YFPex/YFPem per una serie di picchi a concentrazione di saccarosio di 5mM, 10mM, 20mM e 40mM (in rosso tratteggiato)

In Figura 3.18 sono riportati i valori di intensità luminosa dei singoli segnali CFPex/CFPem, CFPex/YFPem e YFPex/YFPem valutati nel citoplasma di cellule perfuse con DPS++ e saccarosio a diverse concentrazioni. Si osserva che ai valori di 20mM e 40mM si verifica un picco del segnale in corrispondenza del picco di concentrazione. Si presume che questi picchi, rilevati ad alte concentrazioni di saccarosio, siano dovuti alla pressione osmotica per due motivi:

- la pressione osmotica calcolata nel paragrafo 3.3.1 ha un contributo 4 volte (per la concentrazione di 20mM) e 8 volte (per la concentrazione di 40mM) superiore in percentuale rispetto a quella con concentrazione basale di 5mM;
- tutti e tre i segnali si abbassano contemporaneamente e non presentano l'andamento descritto nel paragrafo 3.2.3.4.

In Figura 3.19 si riporta il confronto tra una prova con un treno di concentrazione di saccarosio (in rosso) e uno di glucosio (in giallo).

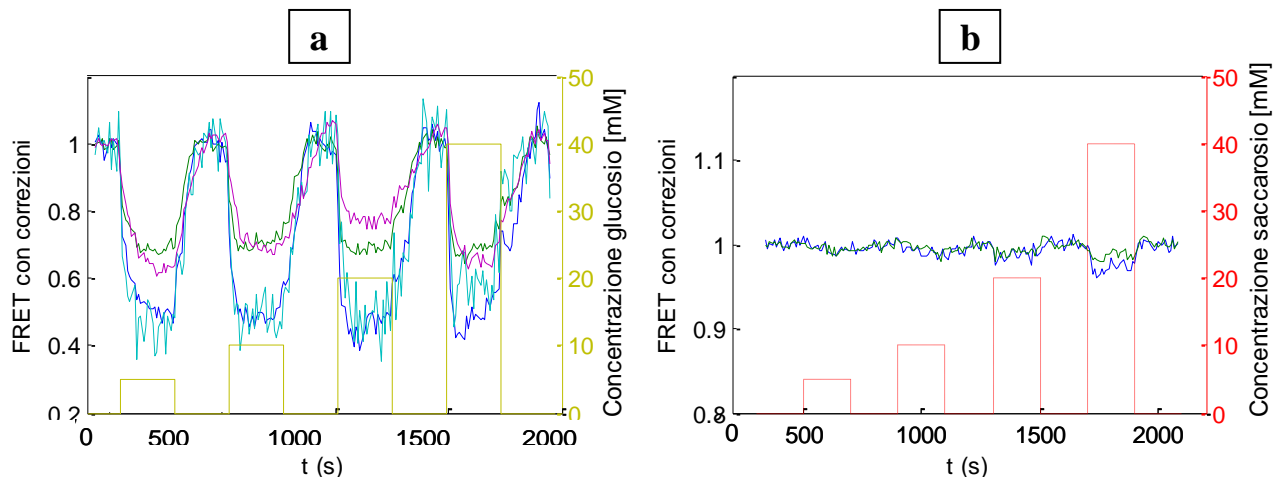


Figura 3.19 Risposta a una serie di picchi a concentrazione 5mM, 10mM, 20mM e 40mM di (a) glucosio(in giallo) e (b) saccarosio (tratteggiato in rosso). Per confrontare i picchi di Dall'analisi fatta si può notare la diversa risposta a saccarosio e glucosio del segnale FRET ricavato dal citoplasma cellulare. I picchi osservati in corrispondenza della concentrazione di 20mM e 40mM di saccarosio sono dovuti all'osmosi, mentre i picchi di glucosio hanno un effetto marcato sul rapporto FRET a tutte le concentrazioni e sono dovuti alla risposta del sensore al cambiamento conformazionale dovuto al legame della proteina al glucosio.

A riprova di questo fatto è svolta un'analisi delle aree dei picchi di risposta come descritto nel paragrafo 2.7.3 riportata in Figura 3.20.

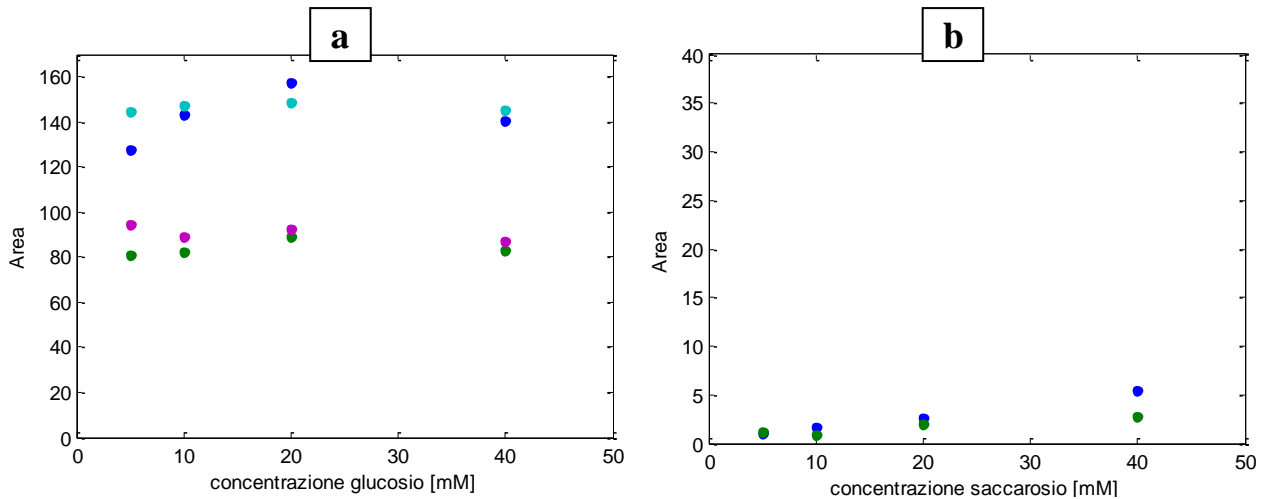


Figura 3.20 Calcolo delle aree dei picchi di risposta a concentrazioni di 5mM, 10mM, 20mM e 40mM di(a) glucosio e (b) saccarosio. Il grafico di destra ha un fondo scala minore

Si vuole così dimostrare che a concentrazioni di glucosio minori e uguali a quella basale (5mM), il segnale FRET osservato non viene interessato da fenomeni osmotici. Inoltre a convalida di ciò l'effetto dell'osmosi è osservato per valori superiori a 20mM (4-5 volte superiori a quelli utilizzati). Dall'analisi delle aree, il contributo osmotico per picchi a 40mM, concentrazione 8 volte superiore a quella basale, è valutato inferiore al 5%.

3.3.4 Picco di saccarosio dopo picchi di glucosio

Come ultimo esperimento sull'effettiva bontà della sonda si sono svolte delle prove con picchi successivi di DPBS++ a concentrazione di glucosio di 0.5mM, 1mM, 2.5mM, 3mM, 4mM, 5mM a cui segue un picco di saccarosio a 5mM.

Sono stati effettuati almeno 3 esperimenti per ogni tipologia, sia per la sonda Flip30 che per la sonda Flip600.

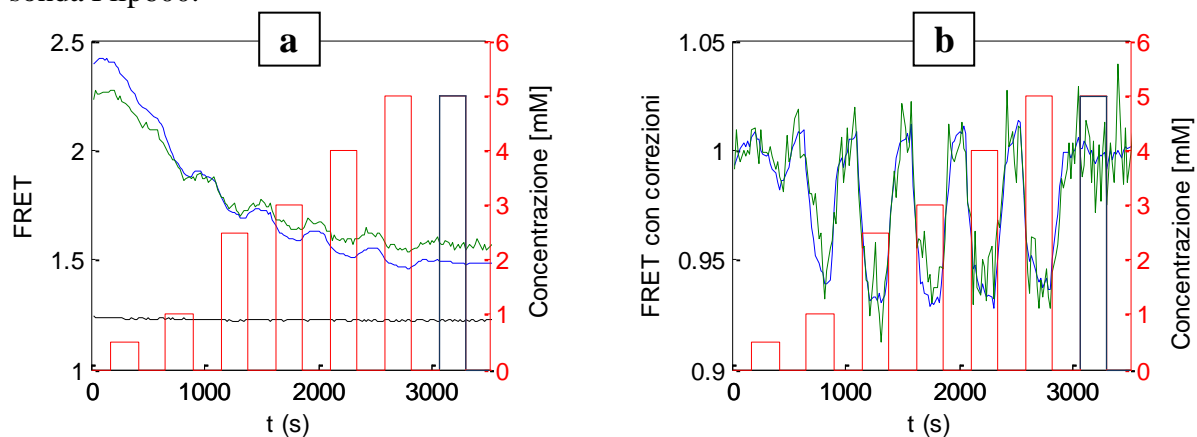


Figura 3.21 Valori di rapporto del FRET (a) senza correzioni e (b) corretto per una serie di picchi a concentrazione crescente di glucosio evidenziato in rosso (0.5mM, 1mM, 2.5mM, 3mM, 4mM, 5mM) a cui segue un picco a 5mM di saccarosio (in blu)

Come si può osservare dalla Figura 3.21 il picco di saccarosio non produce effetti nel rapporto del FRET, a differenza dei valori in cui si perfonde con glucosio. In questo modo possiamo concludere che le prove svolte non sono affette da errori dovute alla pressione osmotica.

Capitolo 4

Risultati

In questo capitolo sono presentati i risultati ottenuti dalle prove per la valutazione di nanosensori attraverso l'analisi di taratura e verifica della concentrazione alla quale il segnale risulta saturo.

Determinato il nanosensore migliore per gli scopi prefissati, è stata analizzata la dinamica di accumulo ed eliminazione del glucosio sulla base del picco di risposta. Infine sono riportate due applicazioni con inibitori.

4.1 Verifica della saturazione dei nanosensori utilizzati

Una parte consistente del lavoro ha previsto la valutazione dei nanosensori utilizzati: FLIPglu-600 $\mu\Delta$ 13V e FLIPglu-30 $\mu\Delta$ 13V, denominati rispettivamente Flip-600 e Flip-30. In questo paragrafo si descrivono le prove effettuate per verificare la saturazione delle sonde FRET al di sopra del valore basale di glucosio (circa 5mM). La saturazione avviene quando si ha la diminuzione della sensibilità del sensore al raggiungimento di una certa concentrazione, in conseguenza i picchi di risposta del rapporto FRET non variano la loro altezza all'aumentare della concentrazione di glucosio esterna alla quale la coltura è sottoposta.

Sono svolti esperimenti su camere microfluidiche con culture cellulare C2C12 transfettate con uno dei due nanosensori, effettuando una serie di picchi di DPBS++ e glucosio della durata di 4 minuti in perfusione con pressione 2.5psi, intervallati da DPBS++ senza glucosio per 4 minuti con lo stesso regime di flusso. La sequenza di concentrazione del terreno per i picchi è: 5mM, 10mM, 20mM e 40mM. La relativa strumentazione per il cambio di glucosio è descritta nel paragrafo 2.5 ed il protocollo sperimentale nel paragrafo 2.6. Le immagini acquisite sono elaborate mediante `FRET_calculation_programme`, *script* Matlab descritto nel paragrafo 2.6. L'area di ogni picco del rapporto FRET è calcolata come riportato nel paragrafo 2.7.3.

I valori del rapporto FRET corretti sono riportati in Figura 4.1 in funzione del tempo e come funzione della concentrazione di glucosio nel DPBS++ in perfusione (in rosso in Figura 4.1). Si riportano nel grafico i dati relativi a cellule transfettate con nanosensore Flip-600 (Figura 4.1a) e Flip-30 (Figura 4.1b) che hanno andamento esemplificativo.

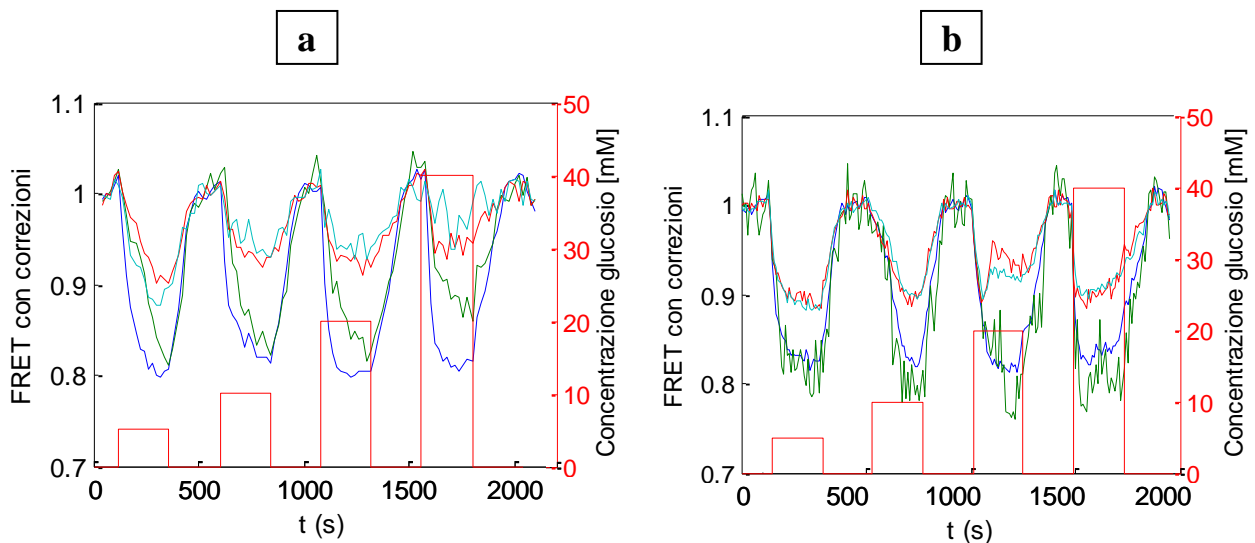


Figura 4.1 Andamento dei picchi di risposta a concentrazione di glucosio crescente (in rosso) di 5mM, 10mM, 20mM e 40mM per (a) Flip-600 e (b) Flip-30

Le prove sono state ripetute tre volte per ciascuna sonda. Dall'analisi dei risultati si osserva che:

- sia per la sonda Flip-600 che Flip-30 l'altezza dei picchi di risposta alle varie concentrazioni non varia in modo significativo;
- la dinamica di discesa del rapporto FRET appare analoga per tutti i 4 picchi quando si passa da DPBS++ senza glucosio a DPBS++ con glucosio;
- il tempo di risalita del segnale quando si passa da DPBS++ con glucosio a DPBS++ senza glucosio aumenta in funzione della concentrazione esterna.

Alla luce di questi risultati si è dedotto che entrambi i nanosensori sono saturi al di sopra della concentrazione 5mM.

A conferma di ciò, e in particolare della prima asserzione, è stata calcolata l'area di ogni picco di risposta per un totale di 11 campioni per ogni sensore. L'area di un picco dipende dall'intensità luminosa di ogni cellula; per confrontare cellule diverse si normalizzano i valori delle aree per il valore corrispondente alla concentrazione di 5mM e ne si calcola la media per ogni concentrazione. La Figura 4.2 riporta i valori ottenuti in funzione della concentrazione esterna di glucosio, i calcoli sono svolti per entrambi i nanosensori in maniera indipendente.

Dai grafici risulta che l'area dei picchi di risposta agli stimoli dovuti alle 4 concentrazioni non varia in maniera significativa. Un leggero aumento del segnale potrebbe essere dovuto in parte agli effetti della pressione osmotica. Tuttavia in questo intervallo di concentrazioni le sonde non sono utilizzabili per dinamiche del glucosio intracellulare.

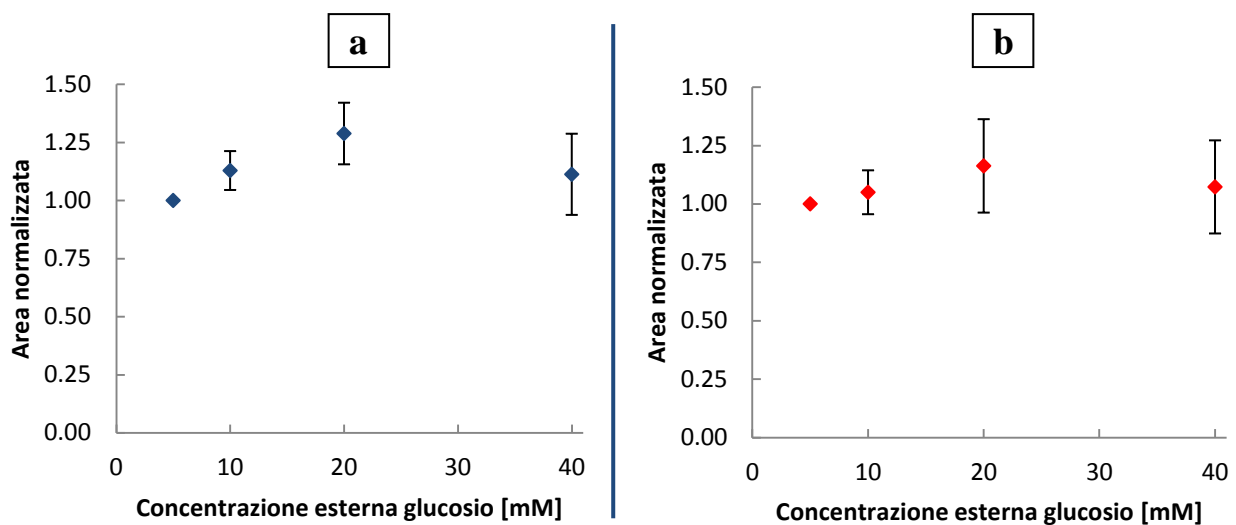


Figura 4.2 Valutazione delle aree per il sensore (a) FLIPglu-600µΔ13V (in blu) e (b) FLIPglu-30µΔ13V (in rosso). I picchi di risposta nel tempo sono determinati nel citosol di C2C12 perfuse con pulsii quadrati di glucosio esterno con concentrazione crescente di 5mM, 10mM, 20mM e 40mM. Per rendere confrontabile il valore di esperimenti diversi l'area è prima normalizzata per il picco corrispondente a 5mM e successivamente si è fatta la media aritmetica

4.2 Range di utilizzo e rette di taratura dei nanosensori

Lo scopo prefissato è dato dall'osservazione del *range* di utilizzo dei nanosensori Flip-600 e Flip-30, ovvero la concentrazione minima per indurre un segnale di risposta e quella massima per raggiungere la saturazione della sonda.

Analogamente a quanto descritto nel paragrafo 4.1 è svolta una sequenza di picchi a concentrazione crescente, con concentrazione 0.5mM, 1mM, 2.5mM, 3mM, 4mM e 5mM. Le concentrazioni sono più basse in quanto si è verificato che le sonde sono già sature ad una concentrazione di 5mM di glucosio.

Le immagini acquisite ed elaborate forniscono dati del rapporto FRET che dopo correzione sono riportati in Figura 4.3 in funzione del tempo e come funzione della concentrazione di glucosio nel DPBS++ in perfusione. Si riportano i dati di due prove esemplificative, una relativa a cellule transfettate con nanosensore Flip-600, l'altra con cellule transfettate con Flip-30.

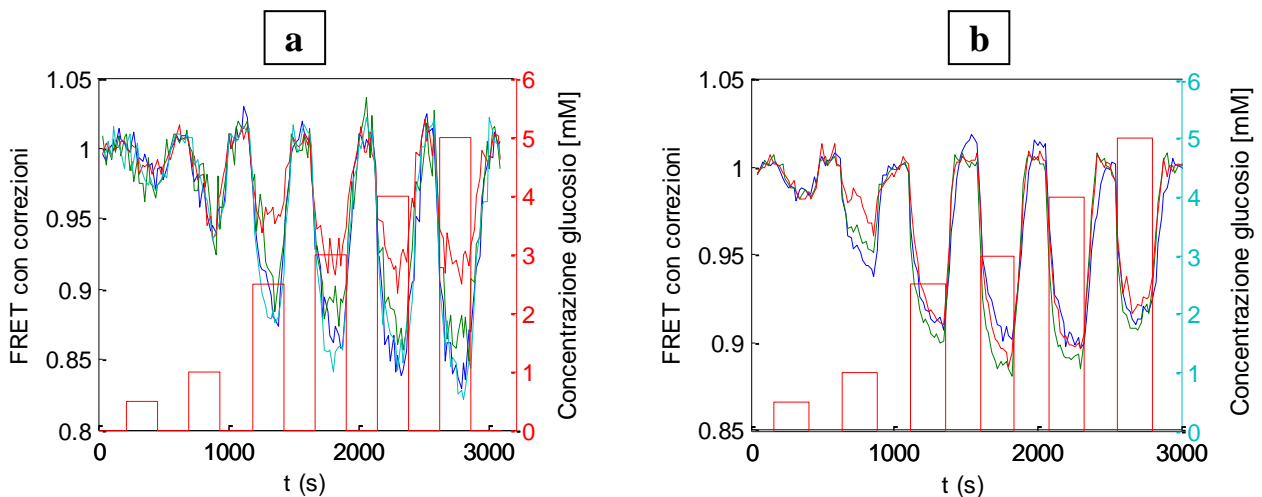


Figura 4.3 Analisi *in vitro* del sensore (a) FLIPglu-600 $\mu\Delta$ 13V e (b) FLIPglu-30 $\mu\Delta$ 13V. Il rapporto del FRET normalizzato è riportato in funzione del tempo di perfusione nell'asse x. I picchi di risposta nel tempo sono determinati nel citosol di C2C12 perfuse con pulsii quadrati di glucosio esterno con concentrazione crescente di 0.5mM, 1mM, 2.5mM, 3mM, 4mM e 5mM

Le prove sono ripetute almeno 5 volte per ogni nanosensore. Dall'analisi qualitativa dei picchi di risposta risulta che:

- nell'intervallo di concentrazioni utilizzato la sonda non è satura, in quanto si osserva un graduale aumento dell'altezza del picco di risposta;
- le velocità di crescita e decrescita della risposta variano in funzione della concentrazione esterna;

4.2.1 Curve di taratura dei nanosensori

Sono presi in considerazione 5 esperimenti per un totale di 11 cellule per ogni sensore. Questi valori sono normalizzati per l'area del picco a concentrazione di glucosio 5mM. I dati della media delle aree in funzione di ogni concentrazione e l'errore ad essi associato sono presentati in Figura 4.4; il *fitting* è effettuato mediante polinomio di terzo ordine. Entrambe le curve hanno coefficiente di determinazione (R^2) superiore a 0.995.

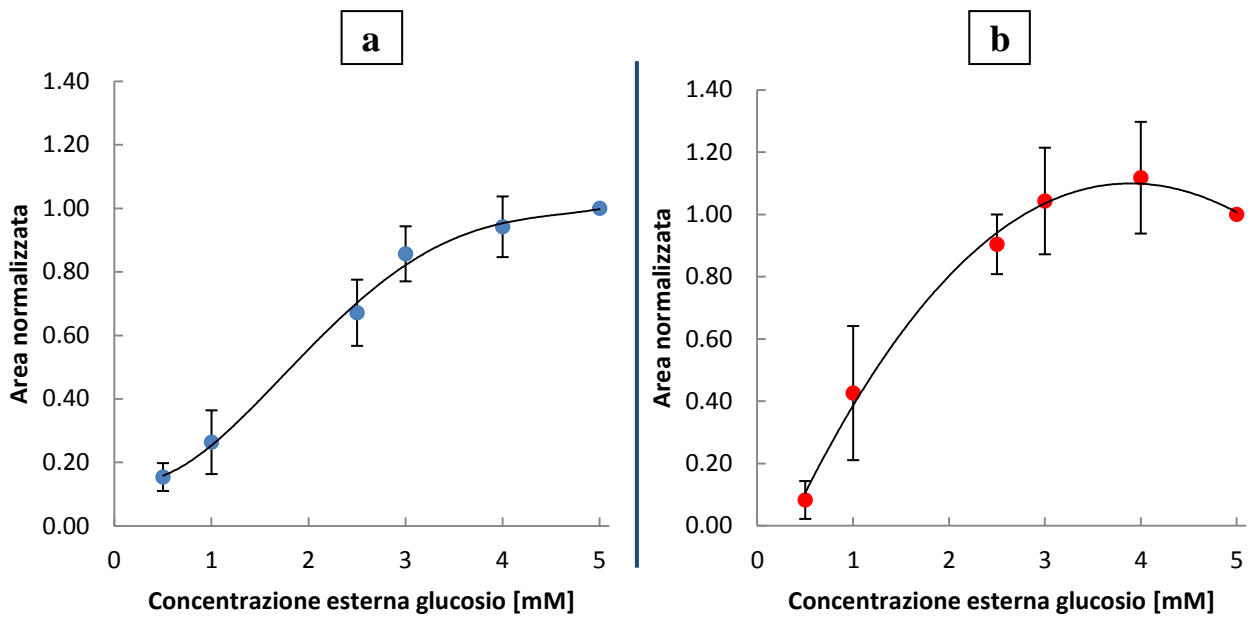


Figura 4.4 Valutazione delle aree per il sensore (a) FLIPglu-600 $\mu\Delta$ 13V (in blu) e (b) FLIPglu-30 $\mu\Delta$ 13V (in rosso). I picchi di risposta nel tempo sono determinati nel citosol di C2C12 perfuse con pulsii quadrati di glucosio esterno con concentrazione crescente di 0.5mM, 1mM, 2.5mM, 3mM, 4mM e 5mM. Per rendere confrontabile il valore di esperimenti diversi l'area è prima normalizzata per il picco corrispondente a 5mM e successivamente si è fatta la media aritmetica

I grafici di Figura 4.4 sono riportati con ascissa in scala logaritmica in Figura 4.5.

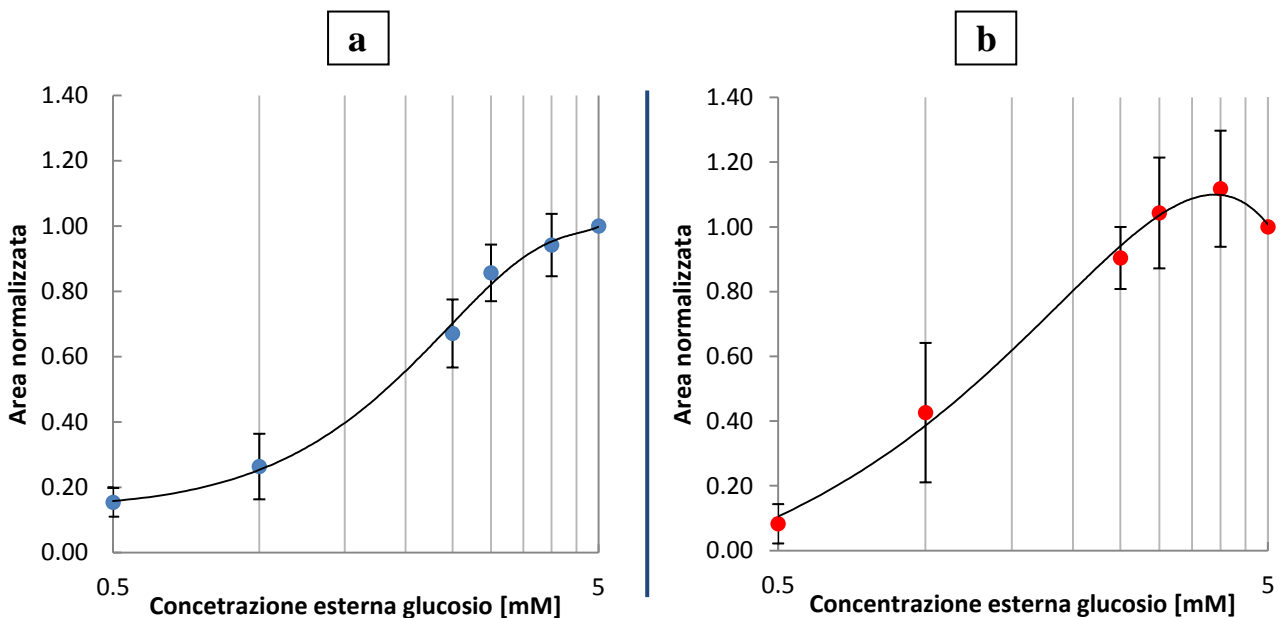


Figura 4.5 Valutazione delle aree per il sensore (a) FLIPglu-600 $\mu\Delta$ 13V (in blu) e (b) FLIPglu-30 $\mu\Delta$ 13V (in rosso) con valori di Figura 4.4 riportati in scala logaritmica

Gli andamenti delle curve, riportate in Figura 4.4 e 4.5, fanno ritenere che:

- le concentrazioni utilizzate sono interne ai limiti di operabilità, l'area infatti aumenta con la concentrazione;
- entrambe le sonde presentano punto di flesso, che coincide con il valore a sensibilità massima cioè a pendenza maggiore, che si attesta tra le concentrazioni 1mM e 2.5mM;
- cellule transfettate con nanosensore Flip-600 presentano valori caratterizzati da minore incertezza sperimentale.

Entrambe le sonde presentano limite superiore di operabilità in un intorno della concentrazione 5mM, in virtù anche di quanto visto nel paragrafo 4.1; per la sonda Flip-600 la concentrazione di 0.5mM può essere in buona approssimazione considerata il limite inferiore di operabilità, data la bassa pendenza della curva di *fit* in quel punto,

Da quanto emerge dalla Figura 4.5b per la sonda Flip-30 la concentrazione di 0.5mM non coincide con il limite inferiore di operabilità; la pendenza della curva di *fit* fa presumere che si possano osservare concentrazioni minori. Tuttavia il nanosensore Flip-30 presenta un andamento non previsto per il valore di 5mM in quanto l'area decresce rispetto alle concentrazioni più basse.

4.3 Scelta del nanosensore

Sulla base delle considerazioni, effettuate in relazione ai dati emersi da questo studio, si determina la scelta del nanosensore ritenuto migliore per la misura di glucosio intracellulare nel tipo di cellule qui utilizzato.

Il nanosensore Flip-600, rispetto al Flip-30, presenta migliori prestazioni, in particolare:

- la sonda Flip-30 presenta una media delle aree anomala per il valore di 5mM;
- l'errore sulla media delle aree, a parità di campioni, calcolata mediante deviazione standard è minore;
- la curva di taratura ha limiti di operabilità compresi tra circa 1/10 della concentrazione basale e la concentrazione basale stessa pari a circa 5mM.

Dai risultati fin qui riportati emerge che il nanosensore migliore è il FLIPglu-600 $\mu\Delta$ 13V, il quale sarà utilizzato per le prove successive.

4.4 Validazione delle prove FRET

Le prove qui descritte sono realizzate con l'intento di verificare la risposta a stimoli alla stessa concentrazione esterna di glucosio per una durata analoga alle prove precedenti (circa 50 minuti). I risultati attesi sono picchi di risposta di uguale altezza ed area per tutta la durata dell'esperimento. Sono state effettuate tre prove per una serie di 6 picchi a 1.5mM di glucosio.

La scelta di svolgere questo tipo di esperimenti alla concentrazione di 1.5mM è dovuta al fatto che questa concentrazione è in un intorno del punto di massima sensibilità nella curva di taratura in Figura 4.4a e 4.5a.

Sono svolte tre diverse prove. I dati del rapporto FRET corretti di una di queste prove sono riportati in Figura 4.6 in funzione del tempo e come funzione della concentrazione di glucosio nel DPBS++ in perfusione (in rosso).

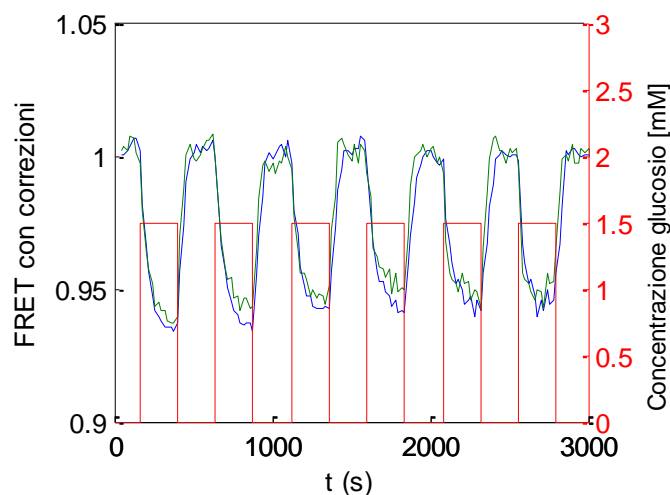


Figura 4.6 Analisi in vitro del sensore FLIPglu-600 μ A13V; il rapporto del FRET normalizzato è riportato in funzione del tempo di perfusione nell'asse x. I picchi di risposta nel tempo sono determinati con pulsii quadrati di glucosio esterno con concentrazione pari a 1.5mM

In Figura 4.7 sono riportati i dati della media delle aree normalizzate, in funzione del numero successivo del picco, a cui vengono associati gli errori calcolati grazie a deviazione standard.

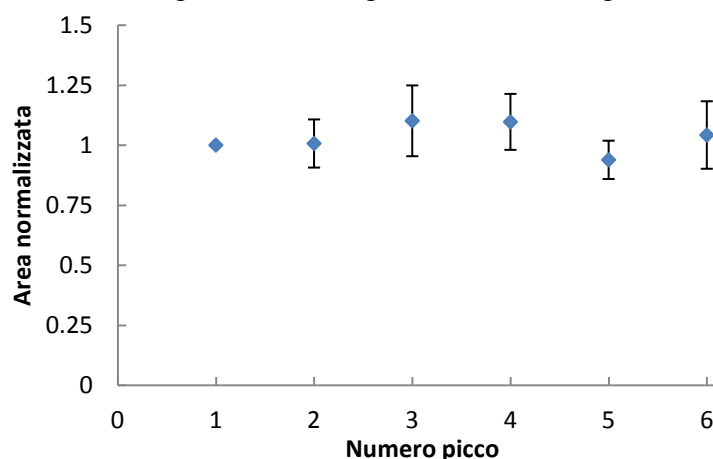


Figura 4.7 Media delle aree normalizzate al valore del primo picco in funzione del numero progressivo del picco

L'analisi dei risultati conferma che le risposte non variano durante l'esperimento per quanto riguarda l'area e la dinamica di risposta.

4.5 Calcolo delle dinamiche di risposta del nanosensore Flip-600

Un'ipotetica curva di risposta per l'accumulo e l'eliminazione del glucosio intracellulare è indicata in Figura 4.8 in funzione del tempo (l'aggiunta e la rimozione del glucosio sono indicate da linee nere verticali). L'accumulo di glucosio, rappresentato dal tratto (1) in Figura 4.8, è determinato dalla velocità di *uptake* e dalla velocità di conversione metabolica. Quando il sistema di trasporto è in equilibrio si raggiunge lo stato stazionario, tratto (2) in Figura 4.8, dove metabolismo e *uptake* sono bilanciati. L'eliminazione del glucosio, dovuto alla glicolisi, è rappresentato dal tratto (3). La velocità di accumulo può essere ottenuta dalla pendenza del tratto (1) (Okumoto S. and Frommer et al., 2008).

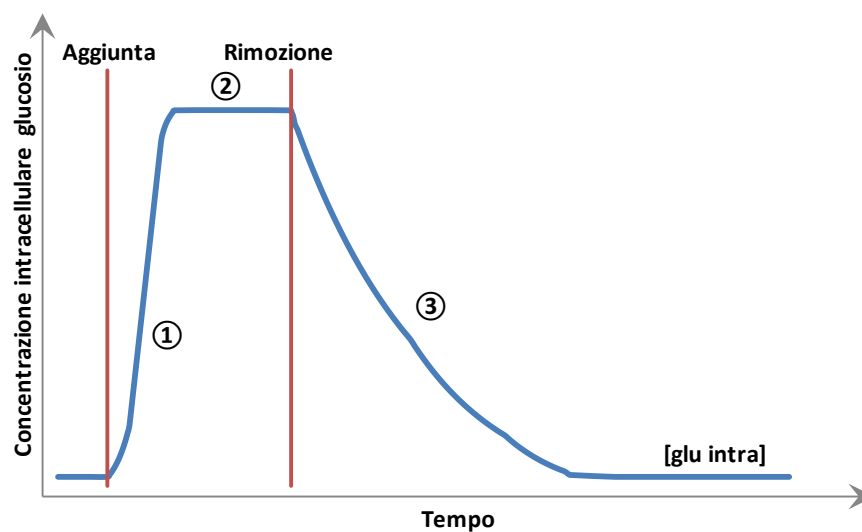


Figura 4.8 Un'ipotetica curva di risposta per l'accumulo e l'eliminazione di glucosio intracellulare nel tempo

Un nanosensore traccia il glucosio all'interno di un proprio *range* di rilevamento, così la saturazione della sonda non indica necessariamente una saturazione del sistema biologico (Figura 4.9a). Infatti al di sopra della massima concentrazione di rilevamento l'intensità del segnale in stato stazionario non varia, ciò che cambia è invece la velocità del tratto (3). La concentrazione intracellulare può essere inferiore al *range* di rilevamento; in questo caso nessuna risposta è rilevata.

Dall'analisi dei dati si può ottenere una stima della dinamica di risposta del sensore sia nell'accumulo che nell'eliminazione del sensore, nonché del tempo di risposta dell'accumulo e del consumo. In Figura 4.9b sono mostrate le curve di accumulo, stato stazionario e eliminazione a differenti valori di concentrazione esterna di glucosio.

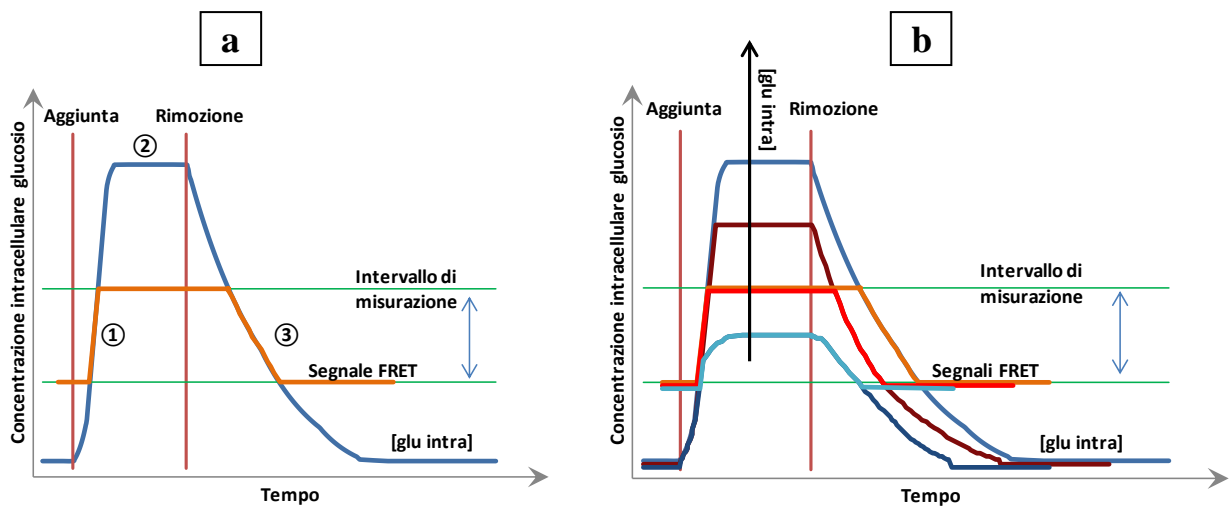


Figura 4.9(a) Saturazione della risposta ottenuta mediante FRET, (b) curve di accumulo ed eliminazione e rispettiva risposta mediante FRET a diversa concentrazione esterna di glucosio

Se la concentrazione esterna è ridotta, in modo tale che la concentrazione intracellulare di glucosio sia all'interno del *range* di rilevamento, si può osservare una risposta concentrazione-dipendente della sonda (Figura 4.10a). Inoltre, se un'adeguata frequenza è applicata, il sensore può rilevare oscillazioni del segnale (Figura 4.10b).

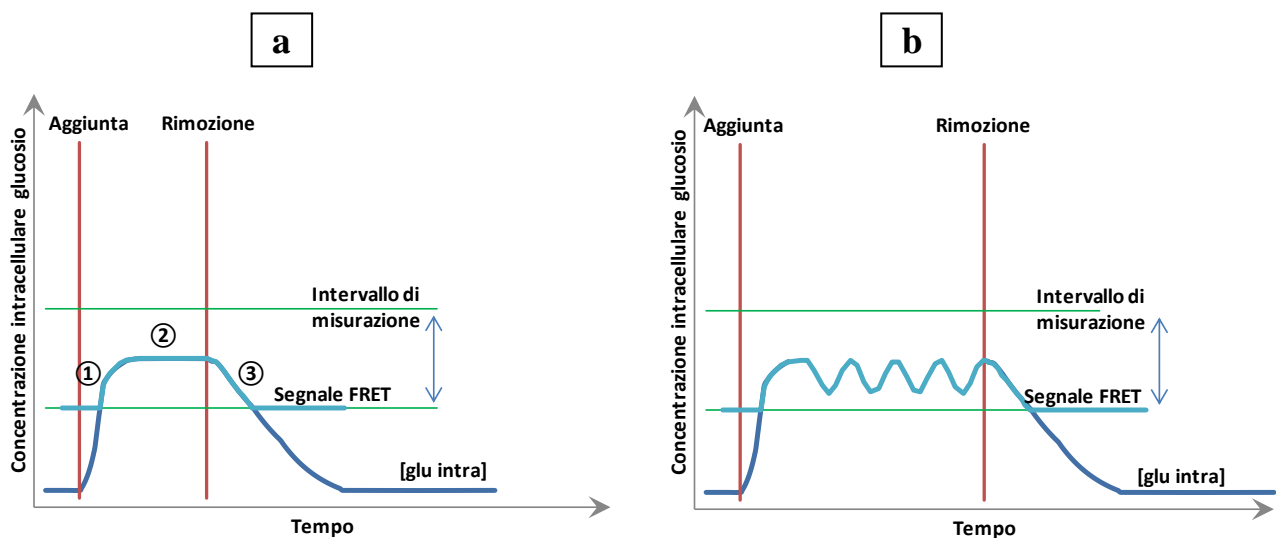


Figura 4.10 (a) Se la concentrazione esterna di glucosio è ridotta fino a che la concentrazione intracellulare è interna all'intervallo di rilevazione del sensore, si ottiene una risposta concentrazione dipendente del rapporto FRET. (b) All'interno dell'intervallo di rilevazione è possibile osservare potenziali oscillazioni del segnale.

Quanto descritto finora è propedeutico all'analisi della dinamica effettuata singolarmente su vari picchi di risposta a 0.5mM, 1mM, 2.5mM, 5mM, 10mM e 20mM di glucosio con sonda Flip-600. In Figura 4.11 sono riportati gli andamenti dei picchi di risposta per queste concentrazioni in funzione del tempo. Il picco di risposta osservato nelle prove,

differentemente da quanto visto per le Figure 4.8-4.10, ha la fase di accumulo, corrispondente al tratto (1) che fa decrescere il segnale FRET mentre nel tratto (3), dell'eliminazione di glucosio, si osserva un aumento del segnale FRET. Questo è spiegato dal fatto che il sensore utilizzato è correlato negativamente alla concentrazione di glucosio intracellulare: all'aumento della concentrazione corrisponde una diminuzione del rapporto FRET.

La velocità di accumulo è evidenziata dalla retta (tratteggiata in verde) per i picchi in Figura 4.11. La pendenza di questa retta, *fitting* dei primi istanti del tratto (1), è calcolata come intercetta tra il punto iniziale in cui vi è cambio *buffer* e il punto corrispondente al valore medio tra la linea di base che ha valore pari a 1 e lo stato stazionario, tratto (2).

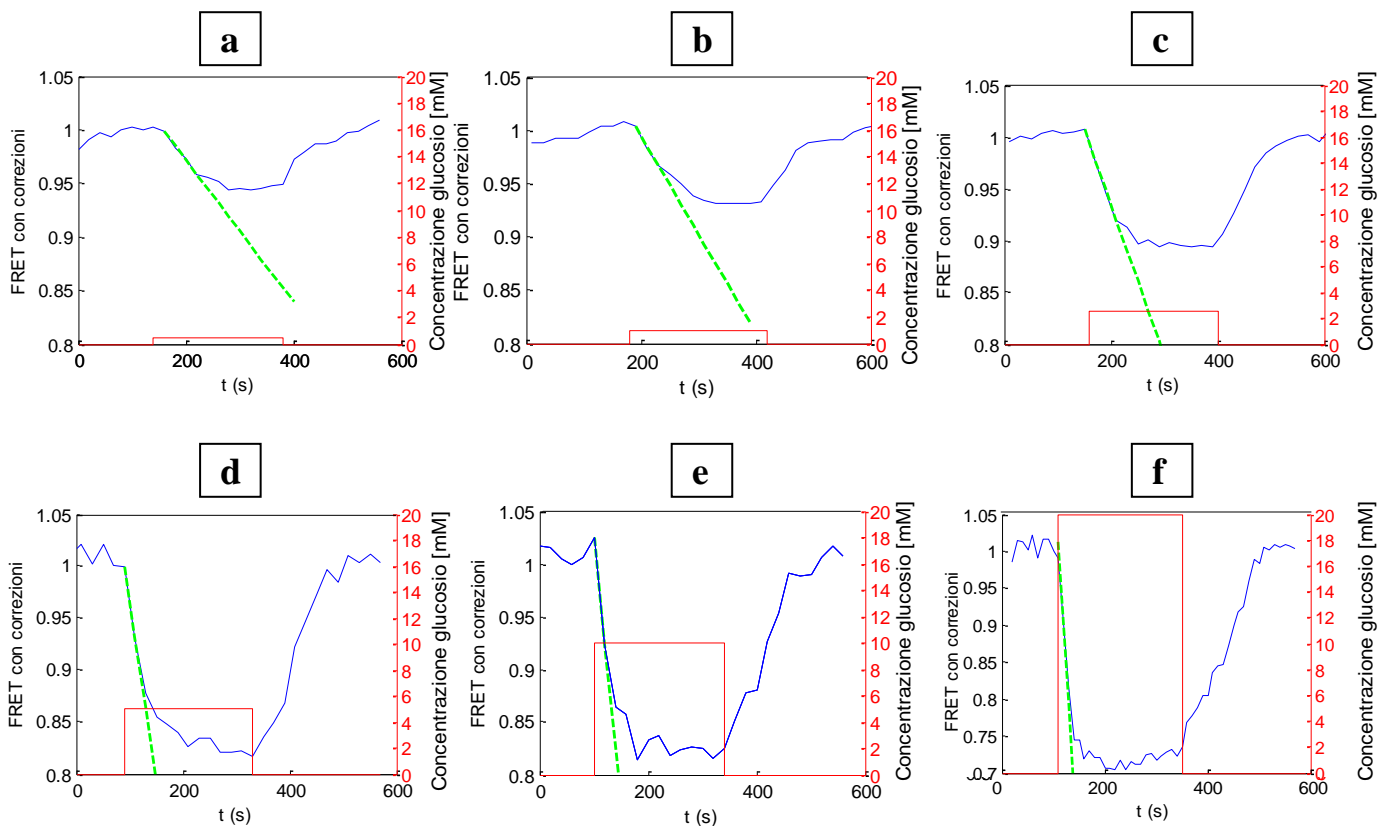


Figura 4.11 Risposta del rapporto FRET a stimoli di glucosio di (a) 0.5mM, (b) 1mM, (c) 2.5mM, (d) 5mM, (e) 10mM e (f) 20mM. Il grafico (f) ha la scala di sinistra con limite inferiore più basso rispetto agli altri. In verde sono riportate le rette, la cui pendenza è caratteristica della velocità di uptake

In Figura 4.13 sono riportati i tempi medi di accumulo in funzione della concentrazione di glucosio esterna. Questi sono calcolati a partire dall'istante in cui vi è il cambio *buffer* (da senza glucosio a con glucosio) fino all'istante in cui il valore del rapporto del FRET è pari al 95% del valore calcolato come differenza lo stato stazionario, tratto (2) e la linea di base.

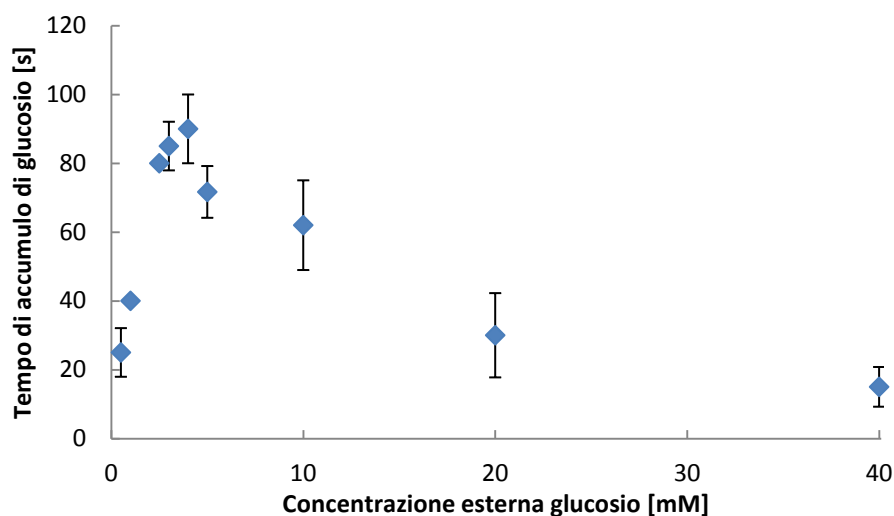


Figura 4.12 Tempi di accumulo medi in funzione delle concentrazioni per Flip-600

L'analisi quantitativa dei tempi di eliminazione, tratto (3) del segnale di risposta, è riportata in Figura 4.12. Questi tempi sono calcolati a partire dall'istante in cui vi è il cambio *buffer* (da con glucosio a senza glucosio) fino all'istante in cui il valore del rapporto del FRET è pari al 95% del valore calcolato come differenza tra la linea di base, pari a 1, e lo stato stazionario, tratto (2).

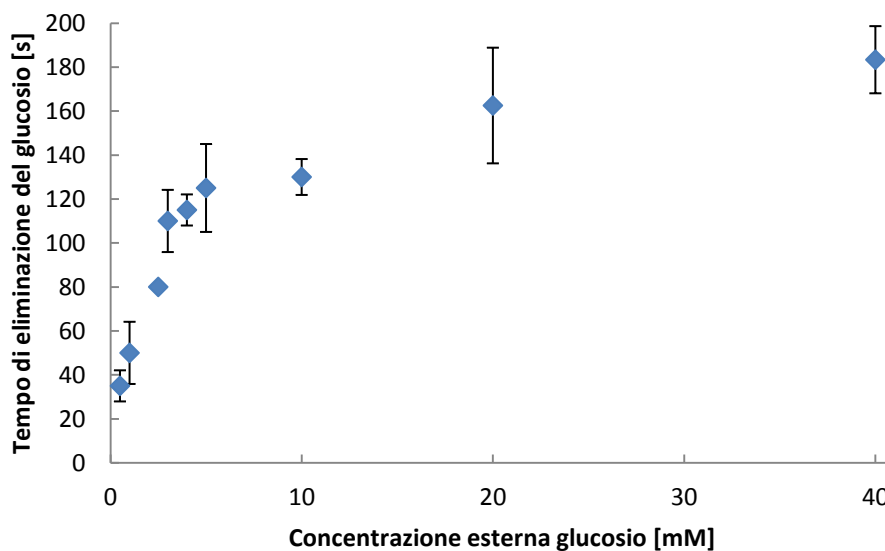


Figura 4.13 Tempi di eliminazione medi in funzione della concentrazione esterna di glucosio per Flip-600

Dall'analisi delle dinamiche dei picchi di risposta risulta che:

- mentre il valore del picco di risposta varia da cellula a cellula in base all'intensità delle cellule anche a fronte della correzione, tantoché l'area necessita di essere normalizzata, la

dinamica dell'accumulo, tratto (1), e dell'eliminazione, tratto (3), risulta costante, a meno dell'errore sperimentale, per i picchi ad una certa concentrazione;

- per valori di concentrazione interni alla banda di rilevamento del nanosensore è possibile osservare tutta la dinamica di accumulo e eliminazione (la risposta non è “troncata”); questo è ben visibile in Figura 4.11a e b, nei picchi a 1mM e a 2.5mM;

- in Figura 4.12 vi è un massimo, infatti al di sopra della concentrazione di saturazione (circa 5mM) il tempo di accumulo diminuisce all'aumentare della concentrazione in quanto non è possibile vedere tutta la dinamica ma solo la prima parte; la diminuzione di questo tempo è dovuta al raggiungimento della saturazione del sensore;

- mano a mano che si aumenta la concentrazione esterna di glucosio il tempo di eliminazione aumenta, come da Figura 4.13, in quanto il metabolismo necessita di più tempo per consumare il glucosio intracellulare.

La pendenza delle rette del tratto iniziale di accumulo è caratteristica della velocità di *glucose uptake* (si veda *Bittner and Barros et al. 2010*). Per i picchi di risposta in Figura 4.11 è calcolata la pendenza di ogni retta; essa è riportata in Figura 4.14 in funzione della concentrazione esterna di glucosio.

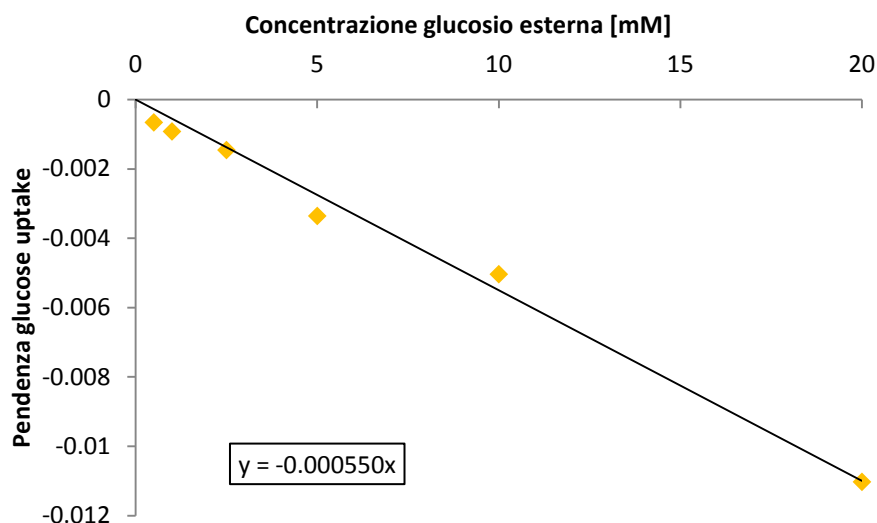


Figura 4.14 Pendenze, le quali rappresentano la velocità del *glucose uptake*, in funzione della concentrazione esterna. Nel grafico è visualizzata la retta di fitting con equazione

Dalla Figura 4.14 si evince che il *glucose uptake* aumenta in maniera lineare in funzione della concentrazione esterna.

Il *glucose uptake*, inteso come flusso di glucosio Q che attraversa la membrana, dipende dal numero di canali di trasporto del glucosio attivi N_c [canali/cellula], dalla differenza di concentrazione tra esterno e interno della cellula Δc [mol/m³], dallo spessore della membrana cellulare l_{mem} [m] e dalla permeabilità k [m²/s]. Esso può essere approssimato come (Formula 4.1):

$$Q[\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s cellula}] = N_c k \frac{\Delta c}{l_{\text{mem}}}. \quad (4.1)$$

Considerando N_c e l_{mem} costanti, il flusso dipende solamente dalla permeabilità e dalla differenza di concentrazione. La permeabilità k è approssimata a partire dalla pendenza della retta, estrapolata mediante *fitting*, di Figura 4.14, ed è pari a $5.50\text{e-}4\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (il segno meno è omesso in quanto deriva dalla correlazione negativa del sensore utilizzato all'aumento di concentrazione di glucosio).

4.6 Prove con inibitori

L'accumulo di glucosio intracellulare, e quindi la risposta del sensore, è determinato da un equilibrio tra l'*uptake* dovuto al trasporto attraverso la membrana e il consumo dovuto alla glicolisi.

In questo paragrafo sono descritti i risultati ottenuti con due tipi di inibitori: un inibitore del trasporto (Verapamil) e un inibitore della glicolisi (3-BrPA).

4.6.1 Inibizione del trasporto attraverso la membrana: Verapamil

Lo scopo di questo studio è l'osservazione dell'effetto dell'inibitore dei canali del calcio Verapamil (*calcium channel blocker*, CCB) in tempo reale e in maniera non invasiva, mediante FRET. Questa sostanza, come dimostrato da precedenti studi (*Louters and Holstege, 2010*), ha un effetto inibitorio sull'attività di trasporto del GLUT1 e di conseguenza sull'*uptake* di glucosio da parte della cellula.

La sequenza di picchi di glucosio con cui la coltura cellulare è perfusa è analoga come tempi e metodo a quella descritta nel paragrafo 4.1, il nanosensore utilizzato è il Flip-600. Gli stimoli sono effettuati con concentrazione di glucosio di 1.5mM. Per i primi 8 minuti di esperimento, corrispondenti al primo picco (in verde in Figura 4.15), non è presente Verapamil nel *buffer* in perfusione, esso viene introdotto nei 4 picchi successivi (in rosso in Figura 4.15). La concentrazione di inibitore nel *buffer* salino è pari a 150 μ M sia in quello con glucosio che in quello senza. Le prove sono ripetute per tre volte.

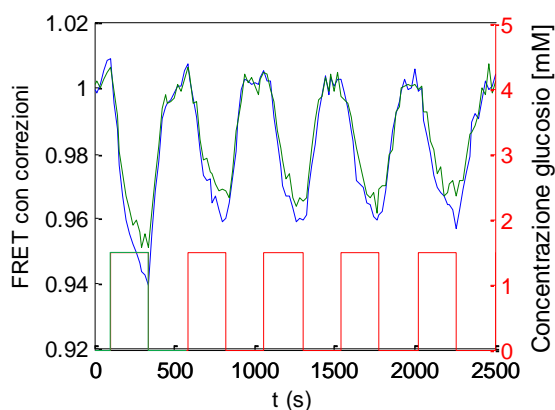


Figura 4.15 Analisi in vitro mediante sensore FLIPglu-600 $\mu\Delta$ 13V; il rapporto del FRET normalizzato è riportato in funzione del tempo di perfusione (asse x). I picchi di risposta nel tempo sono determinati con pulsii quadrati di glucosio esterno con concentrazione pari a 1.5mM prima senza (in verde) e successivamente con Verapamil (in rosso)

Dall'analisi della risposta, riportata in Figura 4.15, si può osservare come immediatamente dopo l'ingresso dell'inibitore il segnale è ridotto; questo dimostra la riduzione del *glucose uptake*.

Per quantificare la riduzione del segnale è svolta un'analisi delle aree dei picchi, normalizzando i valori per il primo picco (Figura 4.14).

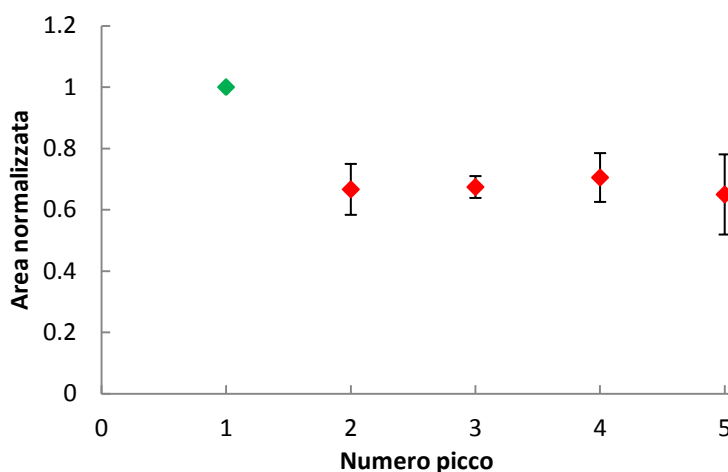


Figura 4.16 Media delle aree normalizzate al valore del primo picco in funzione del numero progressivo del picco. In verde senza Verapamil, in rosso con Verapamil

Mediante i valori riportati in Figura 4.16 è calcolata una diminuzione del segnale per effetto dell'inibitore del 33.7% ($\pm 2.3\%$).

Analizzando la pendenza delle curve, e facendo la media tra i picchi ottenuti senza inibitore e quelli con inibitore risulta che la velocità di uptake diminuisce del 38.6% ($\pm 9\%$). Da precedenti studi (Louters and Holstege, 2010), effettuati mediante tracciante radioattivo, viene calcolata una riduzione dell'uptake del 30% ($\pm 7\%$) con la medesima concentrazione di Verapamil. Da questo confronto si può ricavare che la diminuzione del segnale (sia per l'area che per la pendenza), utilizzando una concentrazione esterna di glucosio di 1.5mM, è linearmente dipendente alla diminuzione del trasporto di glucosio attraverso la membrana.

Una considerazione aggiuntiva riguarda il fatto che mediante quest'analisi si riesce ad ottenere la velocità di effetto del sensore, che in questo caso avviene negli istanti immediatamente successivi al suo ingresso nella camera microfluidica.

Alla luce dei risultati ottenuti sono svolte delle prove per verificare la reversibilità del sensore. Queste sono condotte effettuando 2 picchi di glucosio senza inibitore, 2 picchi con inibitore e di nuovo altri 2 picchi senza inibitore. Le prove sono ripetute per tre volte; i risultati sono riportati in Figura 4.17.

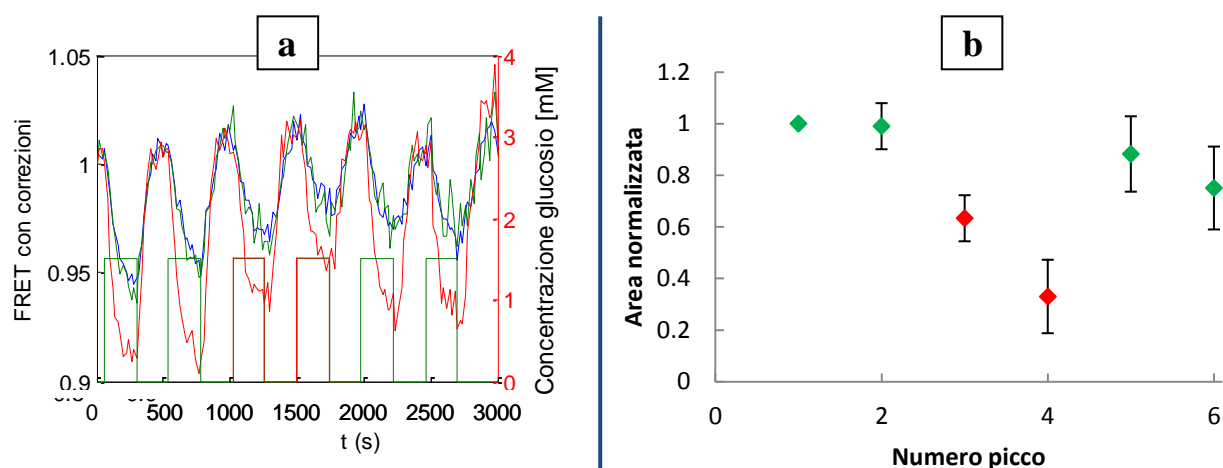


Figura 4.17 (a) Analisi *in vitro* mediante sensore FLIPglu-600 μ A13V; il rapporto del FRET normalizzato è riportato in funzione del tempo di perfusione (asse x). I picchi di risposta nel tempo sono determinati con pulsii quadrati di glucosio esterno con concentrazione pari a 1.5mM prima 2 stimolazioni senza (in verde), successivamente 2 con Verapamil (in rosso) e di nuovo 2 senza. **(b)** Media delle aree normalizzate al valore del primo picco in funzione del numero progressivo del picco. In verde senza Verapamil, in rosso con Verapamil

Come previsto in letteratura, da Figura 4.17 risulta che il Verapamil è reversibile.

4.6.2 Inibizione della glicolisi: 3-BrPA

L'inibitore 3-BrPA inibisce competitivamente la glicolisi a livello dell'esochinasi (Ko et al., 2004). Le cellule trattate con 3-BrPA avranno, a parità di concentrazione esterna, una concentrazione intracellulare di glucosio più elevata. Di conseguenza, se la perfusione avviene con una concentrazione esterna posta tra i limiti di taratura del nanosensore, mediante esperimenti FRET è ipotizzabile osservare un aumento della risposta nelle cellule.

Per investigare gli effetti del 3-BrPA nella riduzione della glicolisi si è utilizzato del DPBS++ con 150nM, 15 μ M e 150 μ M di 3-BrPA. Le prove sono effettuate con concentrazione di glucosio esterno disciolto in DPBS++ di 1.5mM, i picchi sono svolti in maniera analoga alle altre prove.

Sono svolte due tipologie di esperimenti:

- le cellule sono perfuse con 2 picchi di DPBS++ e glucosio senza inibitore a cui seguono 4 picchi di DPBS++ con 3-BrPA, in maniera analoga a quanto descritto nel paragrafo precedente;
- prima della prova FRET, il terreno di coltura è cambiato con DPBS++ e 3-BrPA e le cellule sono poste in incubatore per 30 minuti; per le prove FRET le cellule sono perfuse con 4 picchi di glucosio con inibitore.

Per le concentrazioni di 3-BrPA di 150nM, 15 μ M sono state svolte solamente il primo tipo di prove, senza osservare nessuna differenza tra la risposta alla perfusione di glucosio senza inibitore e con inibitore.

Entrambe le tipologie di esperimenti sono state valutate con concentrazione di 150 μ M di 3-BrPA ma non si riesce a osservare l'effetto dell'inibitore sui picchi di risposta (Figura 4.18).

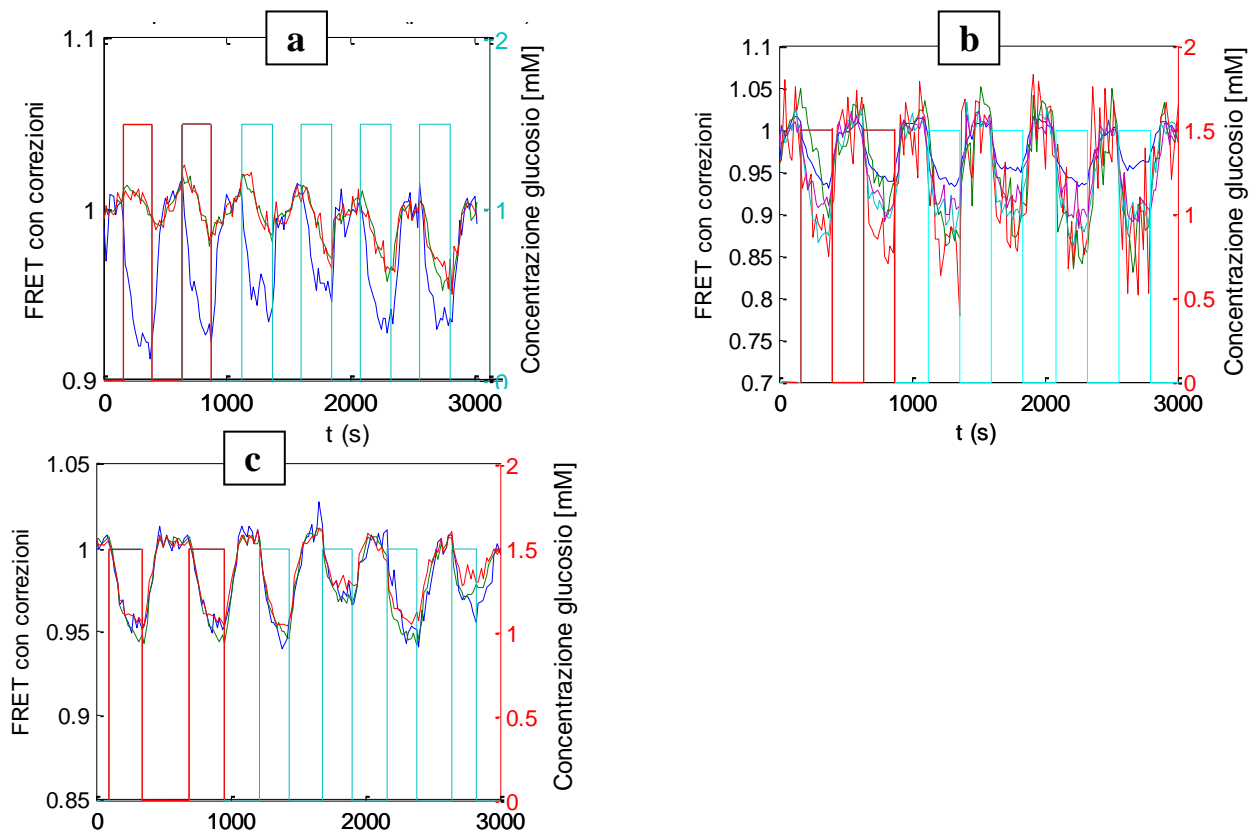


Figura 4.18 Analisi in vitro mediante sensore FLIPglu-600 μ Δ 13V; il rapporto del FRET normalizzato è riportato in funzione del tempo di perfusione (asse x). I picchi di risposta nel tempo sono determinati con pulsii quadrati di glucosio esterno con concentrazione pari a 1.5mM prima senza (rosso) e successivamente con 3-BrPA (in azzurro) con concentrazione (a) 150nm, (b) 15 μ m e (c) 150 μ m

Si ipotizzano due motivazioni:

- l'inibitore, essendo di tipo competitivo, non ha un effetto marcato sulla glicolisi tale da non rendere evidente l'aumento di concentrazione di glucosio intracellulare con questa metodologia;
- la glicolisi non è un fenomeno rilevante nelle C2C12 tale da rendere quantificabile la sua inibizione.

Conclusioni

L'apparato strumentale progettato permette di ottenere informazioni sul glucosio intracellulare in tempo reale a livello cellulare e subcellulare. Il protocollo stilato permette di ottenere una misura del rapporto del FRET, mediante l'utilizzo di nanosensori espressi nel citosol; esso risulta un metodo robusto e ripetibile.

I nanosensori testati permettono, mediante tecnologia FRET, lo studio della dinamica di accumulo e consumo glicolitico all'interno della cellula in maniera minimamente invasiva.

Le piattaforme microfluidiche progettate, fabbricate mediante softlitografia, sono tali da permettere stimolazioni cicliche di glucosio variabili in ampiezza, fase e concentrazione attraverso la perfusione in una camera di coltura microfluidica dove è mantenuta una coltura di C2C12. Si è inoltre progettato e calibrato un microchip integrato per la coltura di cellule automatizzata nel tempo e gestita mediante PC.

Il *set-up* dell'apparato strumentale utilizzato ha compreso la scelta dell'obiettivo, del tempo che intercorre tra due successive acquisizioni e un metodo per la validazione dei risultati ottenuti.

Un programma, sviluppato come *script* di Matlab effettua, sulle immagini ottenute, il calcolo del rapporto FRET in funzione del tempo, correggendone i valori mediante *SBT e baseline correction*, tali da rendere i risultati di più esperimenti tra loro confrontabili. Questo programma permette di calcolare l'area di ogni picco di risposta.

Il rapporto FRET di emissione derivato dai due fluorofori, misurato in C2C12 perfuse con *buffer* salino a diversa concentrazione di glucosio, risulta stabile e garantisce un elevato rapporto segnale/rumore. Una conferma aggiuntiva è data dalla verifica che la risposta ottenuta in corrispondenza di picchi di glucosio non è interessata da fenomeni dovuti a pressione osmotica dei terreni che perfondono la camera fino alla concentrazione di 40mM di zucchero disciolto.

Il metodo di misura utilizzato si è dimostrato robusto, ripetibile e con buona risoluzione spazio-temporale, tanto da permettere analisi su singola cellula in tempo reale. I due nanosensori utilizzati, FLIPglu-600 $\mu\Delta$ 13V e FLIPglu-30 $\mu\Delta$ 13V, si sono dimostrati correlati negativamente al cambiamento del FRET, infatti il rapporto FRET diminuisce in corrispondenza di un aumento della concentrazione intracellulare di glucosio.

La calibrazione delle sonde ha definito delle curve di taratura interne al *range* vicino alle condizioni basali di glucosio tra 0.5 e 5mM; il segnale si può ritenere in buona approssimazione saturo al di sopra di 5mM. Il nanosensore valutato come migliore per questo tipo di rilevazioni è il FLIPglu-600 $\mu\Delta$ 13V, che presenta un'incertezza sperimentale minore

nella curva di taratura. Massima sensibilità nella rilevazione si è ottenuta per valori di concentrazione esterna di glucosio in un intorno di 1.5mM.

Le dinamiche della risposta osservata possono dare un'indicazione sull'accumulo di glucosio nella cellula, dovuto ad un equilibrio tra *glucose-uptake* e metabolismo; se la concentrazione intracellulare è interna all'intervallo di rilevazione del sensore si possono osservare oscillazioni del segnale dovute a variazione nella concentrazione di glucosio nel citosol.

L'effetto di inibitori sul *glucose uptake* è stato analizzato mediante un inibitore alla glicolisi a livello di endochinasi (3-BrPA) e un inibitore al trasporto di glucosio attraverso i canali calcio (CCB o Verapamil). Un effetto sulla concentrazione interna è rilevato solamente con l'utilizzo di Verapamil. Queste applicazioni specifiche hanno permesso di valutare l'applicabilità del nanosensore come strumento per lo studio ad alta risoluzione; l'analisi sulla diminuzione del segnale nelle risposte a stimoli con glucosio e Verapamil ha evidenziato, confrontandola con studi precedenti, una dipendenza lineare tra l'*uptake* di glucosio e la risposta del rapporto FRET.

Appendice A

Programma per l'analisi dei dati FRET

A1 FRET_CALCULATION_PROGRAMME

Si riporta in seguito lo *script* Matlab utilizzato per l'analisi di immagine, la correzione dati e la visualizzazione delle figure da prove FRET, in riferimento al paragrafo 2.7.4.

```
% PROGRAMMA PER ELABORARE IMMAGINI FRET
% In questo programma è possibile elaborare immagini FRET decidendo frame
% iniziale e finale in cui far l'analisi. Il programma calcola l'area di
% ogni picco di risposta
% La sequenza di immagini deve avere estensione .TIF

clear all
clc
close all;

R = [];
ROI = [];
CFP = [];
Fc = [];
D = [];

% DEFINIZIONE COSTANTI

CFPex = 430;
YFPex = 500;

% DEFINIZIONI PARAMETRI ACQUISIZIONE

nf = 347;           %numero totale frame
fi = 1;            %frame iniziale
tf = 20;           %tempo di acquisizione tra 2 frame in secondi
nconc = 4;         %numero totale di stimolazioni
delay = 100;       %ritardo in secondi per baseline correction
deg = 9;           %grado del polinomio per baseline correction
dur = [380,880,1380,1900,2380,2900,3300]; %vettore x calcolo area

% ACQUISIZIONE IMMAGINI

% Definizione delle ROI

cho = input('Vuoi definire nuove ROI (1) o utilizzare quelle definite
precedentemente??\n');

% Visualizzazione immagine per scelta ROI
```

```

[VIS,map] = imread ('YFP_Split_0.TIF',1);
colormap('gray');
imagesc(VIS);

if cho == 1

% Definizione del Background
ROI(2,1,1) = input ('Inserire il primo punto del BG lungo x\n');
ROI(1,1,1) = input ('Inserire il primo punto del BG lungo y\n');
ROI(2,2,1) = input ('Inserire il secondo punto del BG lungo x\n');
ROI(1,2,1) = input ('Inserire il secondo punto del BG lungo y\n');

% Definizione numero e coordinate ROI
nROI = input ('Definire il numero di ROI\n');
nROI = nROI + 1;

for i = 2:nROI
    ROI(2,1,i) = input ('Inserire il primo punto lungo x\n');
    ROI(1,1,i) = input ('Inserire il primo punto lungo y\n');
    ROI(2,2,i) = input ('Inserire il secondo punto lungo x\n');
    ROI(1,2,i) = input ('Inserire il secondo punto lungo y\n');
end

% Salvataggio su file delle ROI come 'ROI.dat' se non definite in
% precedenza

[n,m,l] = size(ROI);
f1 = fopen('ROI.dat','w');
for i=1:l
    for j = 1:n
        for k = 1:m
            fprintf (f1,'%8.4f\t',ROI(j,k,i));
        end
        fprintf(f1,'\n');
    end
    fprintf(f1,'\n');
end
fclose(f1);

% Caricamento ROI dal file 'ROI.dat' se già nella directory Matlab

else
f2 = fopen('ROI.dat');
APPROI = fscanf (f2,'%g %g',[2 inf]);
fclose(f2);
APPROI = APPROI';
[nROI,hh] = size (APPROI);
clear hh;
nROI = nROI/2;
for i = 1 : nROI
    for j = 1 : 2
        for k = 1 : 2
            ROI(j,k,i) = APPROI(j+((i-1)*2),k);
        end
    end
end
clear APPROI
end

% Acquisizione intensità da immagini CFP denominate: 'CFP_Split_N.TIF'
% dove N = 1 se l'acquisizione è CFPem/CFPex, N = 0 se l'acquisizione è

```

```

% YFPem/CFPex

for i = 1:nf
    AA,map] = imread ('CFP_Split_1.TIF',i);
    colormap('gray');
    eval (['CCFP(:, :, ' num2str(i) ') = AA;']);
    [BB,map] = imread ('CFP_Split_0.TIF',i);
    colormap('gray');
    eval (['CYFP(:, :, ' num2str(i) ') = BB;']);
end

% Acquisizione intensità da immagini YFP denominata: 'YFP_Split_0.TIF'
% dove l'acquisizione è YFPem/YFPex

for i = 1:nf
    [CC,map] = imread ('YFP_Split_0.TIF',i);
    colormap('gray');
    eval (['YYFP(:, :, ' num2str(i) ') = CC;']);
end

% ELABORAZIONE IMMAGINI
% Creazione tabella 3D con intensità dei pixel delle immagini per ogni
% ROI creata nel tempo.
% Calcolo dell'intensità media di ogni ROI per ogni frame considerato

for k = 1:nROI
    for j = 1:(nf-fi)
        RCCFP(:, :, j) = ...
            CCFP(ROI(1,1,k):ROI(1,2,k),ROI(2,1,k):ROI(2,2,k), (j+fi));
        meanCCFP(j, k) = mean(mean(RCCFP(:, :, j)));
        RCYFP(:, :, j) = ...
            CYFP(ROI(1,1,k):ROI(1,2,k),ROI(2,1,k):ROI(2,2,k), (j+fi));
        meanCYFP(j, k) = mean(mean(RCYFP(:, :, j)));
        RYYFP(:, :, j) = ...
            YYFP(ROI(1,1,k):ROI(1,2,k),ROI(2,1,k):ROI(2,2,k), (j+fi));
        meanYYFP(j, k) = mean(mean(RYYFP(:, :, j)));
    end
    clear RCCFP;
    clear RCYFP;
    clear RYYFP;
end

% SOTTRAZIONE DEL BACKGROUND ALLE ROI

for i=2:nROI
    meanCCFP(:, i) = meanCCFP(:, i) - meanCCFP(:, 1);
    meanCYFP(:, i) = meanCYFP(:, i) - meanCYFP(:, 1);
    meanYYFP(:, i) = meanYYFP(:, i) - meanYYFP(:, 1);
end

% GRAFICI YFPem/YFPex, CFPem/CFPex, YFPem/CFPex
% Creazione di una figura con i tre grafici: YFPem/YFPex, CFPem/CFPex,
% YFPem/CFPex in funzione della concentrazione di glucosio in
% perfusione nel tempo con definizione di minimo e massimo di ogni asse

[PER]= xlsread('frame_perfusione.xlsx'); % caricamento foglio excel con
% dati degli stimoli (prima colonna il tempo in secondi, seconda
% colonna la concentrazione

t = [(tf*fi-tf):tf:tf*(nf-2)]; % vettore tempo
t=t';

```

```

figure;
subplot(2,2,1); % CFPem/CFPex
ax = plotyy (t,meanCCFP(:,2:end),PER(:,1),PER(:,2));
title ('CFPem as result of CFPex');
xlabel('t (s)');
legend show;
axes(ax(1));
xlim ([0 2000]);
axes(ax(2));
ylim ([0 5]);
set(gca,'YTick',[0:1:5]);
set(ax(1),'Box','Off');
xlim ([0 2000]);

subplot(2,2,2); % YFPem/CFPex
ax = plotyy (t,meanCYFP(:,2:end),PER(:,1),PER(:,2));
title ('YFPem as result of CFPex');
xlabel('t (s)');
axes(ax(1));
xlim ([0 2000]);
axes(ax(2));
ylim ([0 5]);
set(gca,'YTick',[0:1:5]);
set(ax(1),'Box','Off');
xlim ([0 2000]);

subplot(2,2,3); % YFPem/YFPex
ax = plotyy (t,meanYYFP(:,2:end),PER(:,1),PER(:,2));
title ('YFPem as result of YFPex');
xlabel('t (s)');
axes(ax(1));
xlim ([0 2000]);
axes(ax(2));
ylim ([0 5]);
set(gca,'YTick',[0:1:5]);
set(ax(1),'Box','Off');
xlim ([0 2000]);

```

```
% CALCOLO DEL FRET SENZA CORREZIONI
```

```
FRnc = meanCYFP ./ meanCCFP; % Calcolo FRET
```

```

figure;
subplot(2,2,1);
plot (t,FRnc(:,1),'k');
hold on;
plotyy (t,FRnc(:,2:end),PER(:,1),PER(:,2));
title ('ratio FRET senza correzioni');
xlabel('t (s)');
ylabel('FRET');
legend show;
axes(ax(1));
xlim ([0 2000]);
axes(ax(2));
ylim ([0 5]);
set(gca,'YTick',[0:1:5]);
set(ax(1),'Box','Off');
xlim ([0 2000]);

```

```
% SBT CORRECTION
```

```

% R = CFPex/YFPem

R = CFPex ./ meanCYFP;

% D = CFPex/CFPem

D = CFPex ./ meanCCFP;

% A = YFPex/YFPem

A = YFPex ./ meanYYFP;

% Indici per SBT correction

K1 = 0.773;
K2 = 0.053;

% Fc = F - (Fd/Dd) x D - (Fa/Aa) x A

R = R - (K1 .* D) - (K2 .* A);

R = R ./ D;

% normalizzazione del ratio FRET corretto secondo SBT

for i= 1:nROI
    normR(:,i) = R(:,i) ./ R(1,i);
end

% Grafico Fret normalizzato dopo SBT
subplot(2,2,2);
plot (t,normR(:,1),'k');
hold on
plot (t,normR(:,2:end));
title ('FRET con correzione SBT e normalizzato');
xlabel('t (s)');
ylabel('FRETnorm');

% BASELINE CORRECTION

% Correzione con polyfit con estrapolazione valori baseline
[n,m] = size(normR);
normR2 = [];
normR2(:,1)= t;
normRng = [];
k = 1;
s = zeros(1,nconc+1);

for i = 1:(nconc+1)
    i = i-1;
    for h = 1 : n
        if i < (nconc-1) && (PER(i*4+3,2)) <= 5
            if t(h)>= (PER(i*4+1,1)+ 40)
                if t(h) < (PER(i*4+2,1))
                    normRng(k,1)=t(h);
                    for j = 2 : m
                        normRng(k,j)=normR(h,j);
                    end
                end
            end
        end
    end
end

```

```

        k=k+1;
        s(i+1) = s(i+1) + 1 ;
    end
end

else
    if t(h)>= (PER(i*4+1,1)+delay)
        if t(h) < (PER(i*4+2,1))
            normRng(k,1)=t(h);
            for j = 2 : m
                normRng(k,j)=normR(h,j);
            end
            k=k+1;
            s(i+1) = s(i+1) + 1 ;
        end
    end
end
end
end

% Copiatura dati fino all'ultimo frame
for i=1:(n-1)
    if t(i) == normRng (end,1)
        [k,h] = size (normRng);
        normRng(k+1,1) = t(i+1);
        normRng(k+1,2:end) = normR (i+1,2:end);
    end
end

% Medie per baseline correction su fraame senza glucosio

s=s';
meann = [];
j=0;
k=1;

for i= 1 : nconc
    k = 1+j;
    j = (j+s(i));
    for h = 1:m
        meann (i,h) = mean(normRng(k:j,h));
    end
end

i = nconc+1;
k = i+j;
for h = 1:m
    meann (i,h) = mean(normRng(k:end,h));
end

% Grafico della baseline

subplot(2,2,3);
plot (normRng(:,1),normRng(:,2:end));
hold on
plot (meann(:,1),meann(:,2:end),'LineWidth',2);
title ('Baseline e media per ogni intervallo');
xlabel('t (s)');
ylabel('Baseline');

```

```

% Fitting del polinomio sulle medie della baseline e sottrazione ai
% dati normalizzati e corretti con SBT

for i = 2:m
p = polyfit( normRng(:,1), normRng(:,i), deg );
    for j = 1:n
        normR2(j,i) = (normR(j,i) - polyval(p,t(j)) +1 );
    end;
end;

% GRAFICO FINALE

subplot(2,2,4);
ax = plotyy (t,normR2(:,2:end),PER(:,1),PER(:,2));
title(['FRET dopo baseline correction']);
xlabel('t (s)');
ylabel('FRET con correzioni');
axes(ax(1));
xlim ([0 2000]);
axes(ax(2));
ylim ([0 5]);
set(ax(2),'ycolor','r')
set(gca,'YTick',[0:1:5]);
set(ax(1),'Box','Off');
xlim ([0 2000]);

% CALCOLA AREA
% Il calcolo dell'area è svolto su ogni picco di risposta definendo nel
% vettore dur l'istante di fine calcolo per ogni picco

[n,m] = size (normR2);
area = [];
dur=dur';
for j=2:m
    for i=1:nconc
        area(i,1) = PER(i*4-1,2);
        tem = PER(i*4-1,1);
        tem = tem/tf - (fi-2);
        temp = dur(i)/tf-(fi-2);
        area(i,j) = tf * (1*(temp - tem + 1) - sum(normR2((tem):(temp),j)));
    end
end

% Grafico con i valori di area in funzione della concentrazioni per
% ogni ROI

figure;
plot (area(:,1), area(:,2:end), '.', 'MarkerSize',15);
ylim ([0, 40]);
xlim ([0, 5]);
xlabel('concentrazione glucosio [mM]');
ylabel('Area');

% SALVATAGGIO DATI
% Salvataggio dei dati dopo baseline correction

f3 = fopen('FRET.dat','w');
for j = 1:n
    for k = 1:m
        fprintf (f3,'%8.4f\t',normR2(j,k));
    end
end

```

```
        fprintf(f3,'\n');
    end
fclose(f3);

% Salvataggio dei dati area

f4 = fopen('Area.dat','w');
for j = 1:nconc
    for k = 1:m
        fprintf (f3,'%8.4f\t',area(j,k));
    end
    fprintf(f4,'\n');
end
fclose(f4);
```


Riferimenti Bibliografici

- Barondeau D. P. and Getzoff E. D. *et al.* (2003). Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12111-12116.
- Bartolo D. and Vincent Studer V. (2008). Microfluidic stickers. *Lab Chip*, **8**, 274-279.
- Beebe D. J. and Walker G. M. *et al.* (2002). Physics and applications of microfluidics in biology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **4**, 261-286.
- Bittner C. X. and Barros L. F. *et al.* (2010). High resolution measurement of the glycolytic rate. *Front Neuroenergetics*, **2**, article 26, 1-11.
- Breslauer D. N. and Lee L. P. *et al.* (2006). Microfluidics-based systems biology. *Molecular Biosystem*, **2**, 97-112.
- Chaudhuri B. and Frommer W. B. *et al.* (2011). Dynamic imaging of glucose flux impedance using FRET sensors in wild-type Arabidopsis plants. *J Exp Bot.*, **62**, 2411-2417.
- Dittrich P. S. and Manz A. (2006). Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nature*, **5**, 210-218.
- Fehr M. and Frommer W. B. *et al.*, (2003). In Vivo Imaging of the Dynamics of Glucose Uptake in the Cytosol of COS-7 Cells by Fluorescent Nanosensors. *J Biol Chem*, **278**, 19127-19133.
- Folch A. and Toner M (2000). Microengineering of cellular interactions. *Annu. Rev. Biomed. Eng*, **2**,. 227–256.
- Förster, T. (1948). Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann.Phys.*, **2**, 55–75.
- Gòmez-Sjöberg R. and Quake S. R. *et al.* (2007). Versatile, Fully Automated, Microfluidic Cell Culture System. *Anal. Chem.*, **79**, 8557-8563.
- Gerencser A. A. and Brand M. D. *et al.* (2009). Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion. *Anal. Chem.*, **81**, 6868–6878.
- Hou B. and Frommer W. B. *et al.* (2011). Optical sensors for monitoring dynamic changes of intracellular metabolite levels in mammalian cells. *Nature Protocols*, **6**, 1018-1833.

- International Diabetes Federation (2007). The IDF Diabetes Atlas. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, third edition.
- Kim L. and Yu H. *et al.* (2007). A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells. *Lab on a chip*, **7**, 681-694.
- Kim W. H. and William D. R. *et al.* (2012). Visualizing Sweetness: Increasingly Diverse Applications for Fluorescent-Tagged Glucose Bioprobes and Their Recent Structural Modifications. *Sensors*, **12**, 5005-5027.
- Ko Y. H. *et al.* (2004). Advanced cancers: eradication in all cases using 3-Bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 269-275.
- Kurtoglu M. and Lampidis T. J. *et al.* (2007). Differential toxic mechanisms of 2-deoxy-D-glucose versus 2-fluorodeoxy-D-glucose in hypoxic and normoxic tumor cells. *Antioxid. Redox. Signal.*, **9**, 1383–1390.
- Lai H. and Folch A. (2010). Design and dynamic characterization of “single-stroke” peristaltic PDMS micropumps. *Lab Chip*, **11**, 336–342.
- Loo D. D. F. *et al.* (1998). Conformational changes couple Na⁺ and glucose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7789–7794.
- Louters L. L. and Holstege C. P. *et al.*, 2010. Verapamil Inhibits the Glucose Transport Activity of GLUT1. *J. Med. Toxicol.*, **6**, 100-105.
- Melin J. and Quake R. (2007). Microfluidic Large-Scale Integration: The Evolution of Design Rules for Biological Automation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **36**, 213-231.
- Niklas J. and Heinzle E. *et al.* (2010). Metabolic flux analysis in eukaryotes. *Curr. Opin. Biotech.*, **21**, 63–69.
- Okumoto S. and Frommer W. B. *et al.* (2008). Quantitative imaging for discovery and assembly of the metabolome. *New Phytol.*; **180**, 271–295.
- Ong S. and Fu Y. *et al.* (2008). Fundamental principles and applications of microfluidic systems. *Frontiers in Bioscience*, **13**, 2757-2773.
- Pereira da Silva A. P. and Galina A. *et al.* (2009). Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. *Biochem. J.*, **417**, 717–726.

- Prausnitz J. M. et al. (1999). *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria* (3rd edition). Prentice Hall PTR, New Jersey (USA).
- Squires T. M. and Quake S. R. (2005). Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.*, **77**, 977-1026.
- Takanaga H. and Frommer W. B. (2010). Facilitative plasma membrane transporters function during ER transit. *Faseb J*; **24**, 2849-2858.
- Takanishi C. L. and Zheng J. et al. (2006). GFP-based FRET analysis in live cells. *Brain Res.*, **26**, 1091-1132.
- Vyas, N.K. and Quioco, F.A et al. (1998). Sugar and signal-transducer binding sites of the Escherichia coli galactose chemoreceptor protein. *Science*, **242**, 1290–1295.
- Xia Y. and Whitesides G.M. (1998). Soft lithography. *Ann. Rev. Mater. Sci.*, **28**, 153-184.
- Whitesides G. M. and Ingber D. E. et al (2001). Soft lithography in biology and biochemistry. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **3**, 335-373.
- Whitesides G.M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, **442**, 368-373.

Siti web

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/> (ultimo accesso: 01/10/2012)

<http://dpb.carnegiescience.edu/> (ultimo accesso: 01/10/2012)

<http://www.stanford.edu/group/foundry/Services.html> (ultimo accesso: 01/10/2012)

