

Microtecnologie per l'analisi molecolare

di Gianluca De Bellis, Giancarlo Caramenti, Mihaela Ilie, Elena Cianci, Vittorio Foglietti, Cristina Battaglia e Luigi Rossi Bernardi

Il completamento del sequenziamento di numerosi genomi incluso quello umano ha aperto frontiere scientifiche e tecnologiche senza precedenti. La quantità di informazione genetica disponibile rende necessario lo sviluppo di sistemi di analisi sempre più veloci, paralleli ed economici. Questo è possibile solo attraverso la miniaturizzazione dei sistemi stessi e lo sviluppo di metodiche adeguate.

Il completamento del sequenziamento del genoma umano e quello di molti altri organismi (primo tra tutti in ordine di tempo il lievito seguito poi da moltissimi microrganismi anche di interesse industriale come *E. coli*) ha reso possibile realizzare ciò che precedentemente era inimmaginabile: studiare un organismo, anche complesso, attraverso la conoscenza dei suoi geni. Questa possibilità apre orizzonti vastissimi all'indagine scientifica e spazi enormi per l'applicazione industriale nei settori più diversi. Per citare un settore applicativo particolarmente investito da questo cambio epocale, basti pensare allo sforzo in corso presso le compagnie farmaceutiche di grandissime dimensioni per utilizzare questo enorme bagaglio di conoscenza allo scopo di identificare nuovi bersagli molecolari utilizzabili nel trattamento delle più svariate patologie. All'approccio di scoperta di nuovi farmaci tramite la strategia di sintesi combinatoriale si affianca sempre più quello dell'identificazione del bersaglio molecolare sul quale designare il farmaco. Questa nuova branca scientifica, denominata "farmacogenomica", è entrata prepotentemente in scena assorbendo risorse economiche e umane sempre maggiori. La farmacogenetica in parallelo cerca di studiare e utilizzare la variabilità genetica degli individui della stessa specie per valutarne la suscettibilità all'assunzione di farmaci in sviluppo. A questo settore industriale investito dalla rivoluzione genomica,

G. De Bellis, G. Caramenti, Istituto di Tecnologie Biomediche (Itb)-Cnr, Lita - Via Fratelli Cervi, 93 - 20090 Segrate (MI); M. Ilie, E. Cianci, V. Foglietti, Istituto di Elettronica dello Stato Solido (less)-Cnr - Via Cineto Romano, 42 - 00156 Roma (M. Ilie anche presso University Politehnica, Bucharest, Bd. Iuliu Maniu 1-6, Bucharest, Romania); C. Battaglia, L. Rossi Bernardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche - Università di Milano - Via Fratelli Cervi, 93 - 20090 Segrate (MI). debellis@itba.mi.cnr.it



Figura 1 - Il gruppo di lavoro sui microarray, costituitosi intorno ad un progetto di ricerca tecnologico finanziato dal Progetto Finalizzato CNR Biotecnologie, si è via via esteso a numerosi gruppi e ambiti applicativi diversificati

ca, si affianca quello, per certi versi più tradizionale, dell'indagine diagnostica molecolare in ambito sanitario. Questo scenario svela perché siano indispensabili nuovi strumenti analitici. La massa di informazioni come quelle racchiuse nel genoma umano è talmente ampia da richiedere strumenti analitici di nuovo tipo, ancorché basati su concetti consolidati. La miniaturizzazione dei sistemi analitici stessi è la strada più ovvia da seguire per ottenere un aumento della quantità di informazione analizzata e una contemporanea diminuzione dei costi per analisi. Tra i molti settori di indagine analitica che sono stati investiti dalla spinta verso la miniaturizzazione, certamente quello maggiormente coinvolto è quello dell'analisi degli acidi nucleici.

I DNA chip o DNA microarray

I polinucleotidi sono ampiamente utilizzati come sonde molecolari grazie alla peculiare capacità di accoppiamento (ibridazione) tra catene nucleotidiche tra loro complementari. Essi infatti riconoscono la presenza del proprio complemento legandosi reversibilmente. Questa capacità viene sfruttata in

Articolo presentato all'incontro "Le micro/nanotecnologie nei settori biomedicale, farmaceutico, biotecnologico: la rivoluzione industriale appena iniziata?" (Federchimica - Cnr), Milano, maggio 2001.

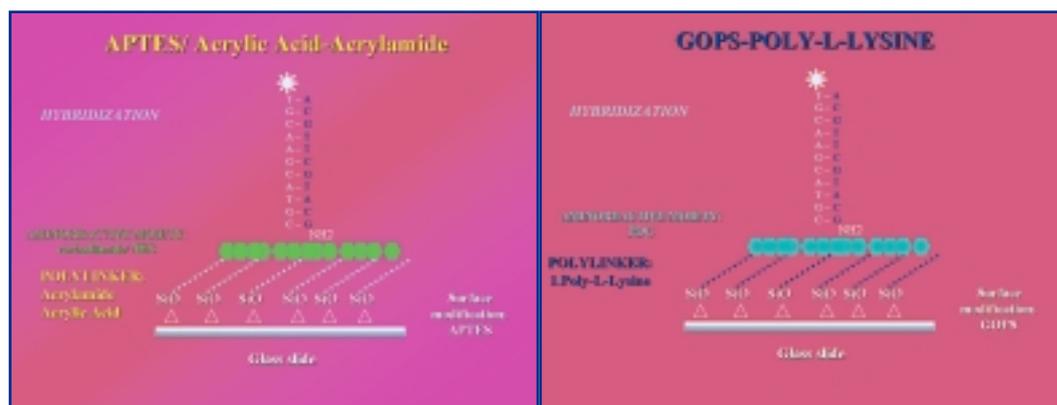


Figura 2 - Sono state messe a punto piattaforme chimiche a base polimerica per la creazione e l'uso affidabile delle micromatrici a sonde oligonucleotidiche. A) schema basato sul copolimero (acrilammide-co-acido acrilico); B) schema basato su polilissina

tutte le principali tecniche della biologia molecolare ed è il fondamento della tecnologia dei "DNA chip", un approccio rivoluzionario alla diagnostica genetica e all'analisi genomica che utilizza matrici miniaturizzate di sonde polinucleotidiche in grado di rivelare, per ibridazione, il contenuto di specifiche regioni geniche. La miniaturizzazione consente da un lato di raccogliere in parallelo una quantità di informazione genetica precedentemente inimmaginabile e dall'altro di impiegare minor tempo, usare meno materiale, avere costi più bassi e automatizzare il processo. Attualmente le matrici in questione vengono ottenute per sintesi chimica diretta su supporti opportuni (Affymetrix, CA) di un numero elevatissimo di sonde oligonucleotidiche (più di 100.000) usando le tecniche proprie dell'industria microelettronica. Grazie infatti ad un gruppo protettivo fotolabile (che sostituisce il gruppo tritile acido labile normalmente utilizzato nella sintesi di oligonucleotidi) è possibile attivare selettivamente zone fino a 10-20 μm di lato usando fotomaschere come quelle usate per la fotolitografia nella fabbricazione di microprocessori. Questo permette di completare la sintesi di un numero enorme di oligonucleotidi in un numero di passaggi bassissimo. A parità di lunghezza (N) di oligonucleotide da sintetizzare, il numero di passaggi di sintesi è invariante (4N) rispetto al numero di oligo da sintetizzare. Ciò porta ad una straordinaria potenza di analisi, a costi elevati ma con la potenzialità della produzione di massa come accade nell'industria microelettronica. I dispositivi così ottenuti vengono analizzati tramite scansione laser e analisi in fluorescenza [1-11]. Questi DNA chip possono essere ottenuti anche senza l'utilizzo di fotomaschere (estremamente costose) ma piuttosto attraverso l'utilizzo di microspecchi come quelli utilizzati nei proiettori digitali. Tali dispositivi deflettono la luce creando quindi una fotomaschera "virtuale" completamente programmabile. Questo approccio è stato sviluppato da Texas Instruments (proprietaria della tecnologia Digital Light Processor su cui si fonda questo approccio). In maniera simile ma più tradizionale, Agilent ha sviluppato un sistema in collaborazione con Rosetta InPharmatics basato sulle testine inkjet di cui HP (casa madre di Agilent) è tra i leader mondiali. Questo sistema è basato sul microposizionamento meccanico delle testine che dispensano i monomeri che in più passate generano le sonde oligonucleotidiche. Questi approcci sono quelli che garantiscono la massima densità di informazione ottenuta per esperimento.

Altri approcci si fondano sulla microdeposizione di frammenti

oligo o polinucleotidici precedentemente sintetizzati o altrimenti selezionati. Queste metodiche soffrono di una minore potenzialità operativa in quanto sono fisicamente limitate dai parametri propri del posizionamento di microquantità di materiale. Tuttavia in molte applicazioni diagnostiche la quantità di informazione così ottenibile è assolutamente superiore alle metodiche standard e più che sufficiente a coprire le esigenze di analisi di

mutazioni o di espressione nella gran parte dei geni [12-16]. Approcci potenzialmente più innovativi prevedono la microfabbricazione di matrici di sensori in grado di rilevare l'avvenuta ibridazione (Nanogen, CA) [17]. La possibilità di attivare elettricamente le singole celle di misura permette di condurre l'ibridazione in condizioni ottimali rispetto allo specifico probe.

Sviluppo e applicazione delle microtecnologie in Italia

Le tecnologie appena descritte hanno ricevuto un supporto massiccio negli Stati Uniti sia da parte pubblica sia industriale. Le grandi compagnie farmaceutiche hanno intuito per prime la potenzialità dei sistemi appena descritti investendo massicciamente in questo ambito. Molto significativo l'esempio di Glaxo che ha acquisito una forte partecipazione azionaria in Affymetrix in modo da ottenere un DNA chip mirato alla analisi rapida del genoma di HIV, da utilizzare durante il trattamento antivirale per tracciare le mutazioni del genoma stesso che portano a resistenza. L'evidenza clinica della resistenza è molto successiva all'evidenza molecolare, perciò l'analisi molecolare permette di decidere il momento in cui è opportuno cambiare terapia farmacologica. Da sottolineare come questo settore veda ormai interessati anche colossi dell'industria microelettronica come la già citata Texas Instruments e Motorola, che ha investito 250 milioni di dollari in questo ambito, acquisendo parte del know-how da piccole start-up. In Italia ST Microelectronics ha iniziato lo stesso percorso. La situazione italiana è molto più arretrata sia a causa della scomparsa di una forte presenza industriale nel settore farmaceutico, sia per gli investimenti relativamente bassi nel settore delle microtecnologie. Solo recentemente il finanziamento pubblico si è rivolto anche a questo settore. Nell'ultimo Piano Nazionale della Ricerca si è individuato come strategico questo ambito e di conseguenza sono stati aumentati gli investimenti soprattutto attraverso il recentissimo bando Firb (Fondo Incentivazione della Ricerca di Base).

Nel corso degli ultimi quattro anni abbiamo cercato, presso il Lita di Segrate (Laboratorio Interdisciplinare di Tecnologie Avanzate) sia in ambito Cnr (Istituto di Tecnologie Biomediche) sia in ambito universitario (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche) di aggregare un ampio gruppo di competenze che partendo da un nucleo tecnologico si allargassero via via a contesti applicativi di interesse sia industriale sia accademico (Figura 1). Questo approccio, certamente



Figura 3 - Foto dello scanner a fluorescenza laser indotta progettato dagli autori e realizzato da Quanta Systems. Sulla sinistra si notano i due motori galvanometrici che orientano gli specchi di deflessione del raggio laser sulla lente piana sottostante

inusuale nel nostro paese, ha permesso di catalizzare energie in un ambito fortemente multidisciplinare. A partire dal 1997, anno d'inizio della ricerca finanziata dal Progetto Finalizzato Cnr "Biotecnologie", il gruppo, che coinvolge numerosi ricercatori e tecnologi (prof. Rinaldo Cubeddu, Cnr-Ceqse, Milano per la parte laser e ottica, prof. Paolo Dario, Scuola Superiore "S. Anna" di Pisa per la parte di microfluidica e meccatronica, prof.

Mauri, Università di Milano Bicocca, per l'analisi Informatica, dott. Vittorio Foglietti Cnr-less, per la parte di microfabbricazione, oltre ai già citati Cnr-Irb e Università di Milano), ha costituito il nucleo attorno al quale sono stati sviluppati numerosi studi e ricerche innovative in questo settore. Il gruppo coordinato dal dott. De Bellis e dal prof. Luigi Rossi Bernardi si è interessato di diversi aspetti della tecnologia microarray. La preparazione di matrici e il controllo qualitativo dei materiali (oligonucleotidi) sono stati studiati molto a fondo, quali premesse per l'ottenimento di dispositivi effettivamente utilizzabili [18-23]. Un punto di rilievo è costituito dallo sviluppo di nuove piattaforme chimiche a base polimerica, che sono un punto cruciale per l'ottenimento di microarray di elevata qualità (Figura 2).

Con il gruppo del Cnr-Ceqse e del Politecnico di Milano si sono studiate a fondo le problematiche di rilevazione del segnale in fluorescenza utilizzando sia telecamere intensificate (I-CCD) sia sistemi photon counting esplorando le tecniche di rilevazione di fluorescenza tempo risolta [24]. Inoltre l'esperienza accumulata ha permesso la progettazione di un sistema a scansione laser per microarray, successivamente realizzato da una società esterna (Quanta Systems, Milano) per conto del Cnr (Figura 3).

Nel contempo, in collaborazione con il prof. Ferrara e il prof. Benatti (del Cba, centro di Biotecnologie Avanzate dell'Istituto dei Tumori di Genova) si è iniziata una collaborazione che mira a ottenere micromatrici finalizzate allo studio dell'HLA. Nel quadro di questo progetto, si è valutato (in collaborazione con la prof. Marchelli, Università di Parma) l'utilizzo dei PNA (Peptide Nucleic Acids) come sonde molecolari sui microarray.

In collaborazione con il Cnr-less, inoltre, si sono realizzati dispositivi che concettualmente sono riconducibili alla filosofia di Nanogen, richiamata sopra, e di cui diamo una descrizione più dettagliata più avanti. Tutta questa attività ha creato la massa critica necessaria (anche in termini di giovani ricercatori preparati in questo ambito assolutamente nuovo per il nostro paese) per affrontare progetti applicativi di ampio respiro. Grazie a finanziamenti della Comunità Europea si stanno esplorando l'applicazione dei microsistemi nel contesto ambientale (MIDI-Chip per l'identificazione di cianobatteri in bacini lacustri) e alimentare (DNA-Track, per l'identificazione di OGM, finanziato anche dal Murst e dal Cnr).

Inoltre grazie ai finanziamenti ottenuti dal Murst con la legge

46 si sono intrapresi progetti con Biosearch (analisi tramite microarray della diversità microbica nel suolo), Lepetit (analisi genome wide per il miglioramento produttivo di ceppi produttori di antibiotico), Kendrion (identificazione virale), Polymed (tipizzazione HLA) e Novuspharma (tecnologie microarray per lo sviluppo di nuovi farmaci).

Sviluppo di un sistema microfabbricato a matrice di elettrodi

Tra le molteplici attività condotte nel contesto appena ricordato, un posto particolare è occupato dalla sperimentazione di un sistema a matrice di microelettrodi [25, 26]. Come detto, un punto cruciale nell'analisi tramite microsistemi è la massimizzazione della velocità. Per l'identificazione di acidi nucleici si sfrutta in massima parte la capacità di riconoscimento tra sequenze fra loro complementari. Il processo è governato da leggi ben note che per quanto riguarda la velocità di ibridazione indicano come il tempo impiegato dalla metà delle molecole a riconoscersi è inversamente proporzionale alla concentrazione del DNA bersaglio [DNA target]:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \cdot [\text{DNA target}]$$

ne risulta che la reazione è tanto più veloce quanto maggiore è la concentrazione di analita. Allo stesso modo la concentrazione di prodotto è governata ovviamente da questa relazione:

$$K_{eq} = [\text{probe-DNA target}] / [\text{probe}][\text{DNA target}]$$

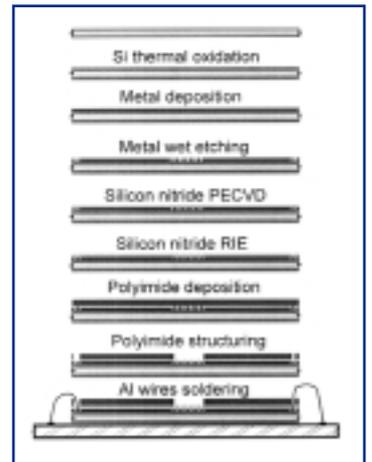


Figura 4 - Schema dei passaggi di processo per la produzione delle matrici di microelettrodi

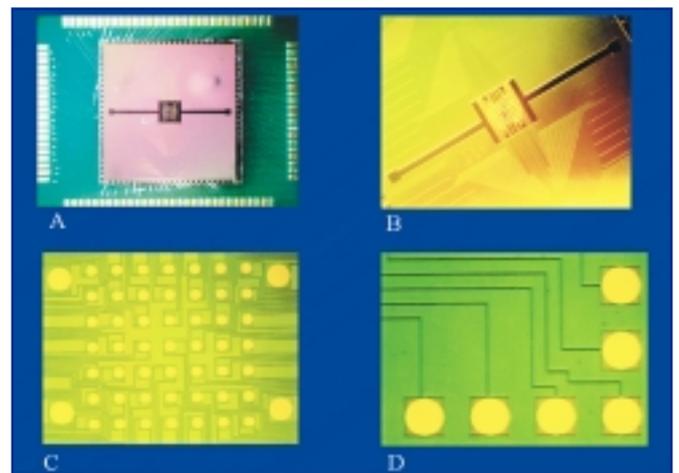


Figura 5 - Ingrandimenti successivi del dispositivo a micromatrice di elettrodi. A) vista d'insieme dopo saldatura sul circuito, B) vista del dispositivo microfabbricato, C) zona dei microelettrodi e D) dettaglio degli elettrodi

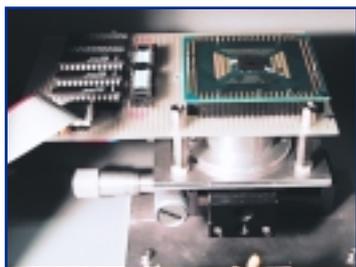


Figura 6 - Vista d'insieme del dispositivo montato nella camera di misura e dell'elettronica di controllo



Figura 7 - Fotografia del circuito microfluidico che sormonta il dispositivo a matrice di microelettrodi (Proc. of the Conf. Moems and Miniaturized Systems, part of Spie 2001 International Symposium on Microchining and Microfabrication, M.E. Motamedi, R. Goering (Eds.), 22-25 October 2001, San Francisco, vol. 4561, in press)

anche clinica. Noi abbiamo mutuato il concetto realizzando un dispositivo contenente 49 microelettrodi e 4 controlettrodi, oltre all'elettronica necessaria a pilotare il tutto e al software di gestione. I passaggi di fabbricazione sono mostrati, per una delle configurazioni utilizzate, in Figura 4. Le tecniche citate sono comuni nell'industria microelettronica e sono scalabili dalla fase di prototipazione alla fase di produzione in parallelo su wafer di silicio. In Figura 5 è mostrato l'aspetto del dispositivo ad ingrandimenti via via crescenti (5 A,B,C,D).

Tutto questo deve essere pilotato attraverso opportuni circuiti elettronici e relativo software e deve essere montato all'interno di un sistema di scansione a fluorescenza laser indotta (da noi progettato). La Figura 6 mostra proprio l'interno della camera di misura. Poiché l'analisi in questione coinvolge anche la movimentazione di fluidi, è stato progettato e realizzato un

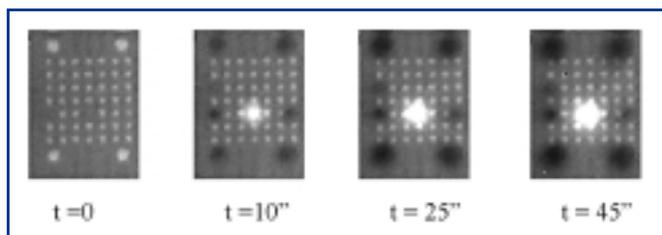


Figura 8 - Immagini in fluorescenza ottenute tramite il sistema a scansione laser. Al tempo zero la fluorescenza è diffusa ovunque. Applicando una corrente l'elettrodo carico positivamente aumenta la sua fluorescenza in un tempo molto breve

Nuovamente per aumentare la sensibilità del metodo è opportuno aumentare la concentrazione di analita. Quanto detto è ovvio ma non banale. Data una determinata quantità di materiale a disposizione per l'analisi è possibile immaginare di far convergere tutto l'analita in un piccolissimo punto (il microelettrodo) aumentandone la concentrazione in maniera notevolissima (alcune centinaia di volte). Questo è possibile sfruttando la carica elettrica dei polinucleotidi conferita dai fosfodiesteri in essi contenuti. Applicando pertanto un'opportuna differenza di potenziale tra 2 o più elettrodi si ottiene la migrazione del DNA. Questo concetto, come ricordato, è stato brillantemente sfruttato da Nanogen, che oggi offre sul mercato un sistema proprietario in grado di utilizzare questo principio per condurre analisi di diagnostica molecolare

sistema microfluidico adatto, mostrato in Figura 7.

Tutto questo sistema ci ha permesso di sperimentare la tecnica di migrazione verso un elettrodo e la relativa identificazione del segnale in fluorescenza. Utilizzando oligonucleotidi sintetici marcati con cianine (Cy3, Amersham) abbiamo dapprima riempito la camera di misura con una soluzione degli stessi diluita in tampone. La scansione mostra una debole fluorescenza diffusa in tutta la camera microfluidica (meno di 1 μ l totale). Applicando un'opportuna differenza di potenziale tra i controlettrodi e uno (o più) elettrodi centrali, si nota un fenomeno di elettromigrazione molto rapido verso il positivo. In meno di 60 secondi gli oligonucleotidi in soluzione si concentrano nella zona sovrastante l'elettrodo positivo (Figura 8). Attualmente il nostro gruppo sta lavorando alla preparazione di una piattaforma chimica alternativa a quella originaria di Nanogen per la modificazione funzionale degli elettrodi tramite sonde molecolari in modo da renderli specifici verso determinate sequenze nucleotidiche bersaglio.

Bibliografia

- [1] M. Chee *et al.*, *Science*, 1996, **274**, 610.
- [2] J. Hacia *et al.*, *Nature Genetics*, 1996, **14**, 441.
- [3] D.J. Lockhart *et al.*, *Nature Biotechnology*, 1996, **14**, 1675.
- [4] D.D. Shoemaker *et al.*, *Nature Genetics*, 1996, **14**, 450.
- [5] G. Mcgall *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA*, 1996, **93**, 13555.
- [6] M.J. Kozal *et al.*, *Nature Medicine*, 1996, **2**, 753.
- [7] *US Pat.* 5,412,087.
- [8] *US Pat.* 5,578,832.
- [9] *US Pat.* 5,593,839.
- [10] *US Pat.* 5,556,752.
- [11] *US Pat.* 5,545,531.
- [12] M. Schena *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA*, 1996, **93**, 10614.
- [13] H. Yershov *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA*, 1996, **93**, 4913.
- [14] R. Drmanac *et al.*, *Science*, 1993, **260**, 1649.
- [15] *US Pat.* 5,525,464.
- [16] *US Pat.* 5,202,231.
- [17] *US Pat.* 5,605,662.
- [18] G.B. Ferrara *et al.*, *Human Immunology*, 1998, **59**, S16.
- [19] G.B. Ferrara *et al.*, *Human Immunology*, 1999, **60**, S18.
- [20] G.B. Ferrara *et al.*, *Human Immunology*, 1999, **60**, S141.
- [21] G. De Bellis *et al.*, *Minerva Biotecnologica*, 1999, **11**, 227.
- [22] G. De Bellis *et al.*, *Rapid Comm. in Mass Spectrometry*, 2000, **14**(4), 243.
- [23] C. Battaglia *et al.*, *Biotechniques*, 2000, **29**(1), 78.
- [24] G. Valentini *et al.*, *Optics Letters*, 2000, **25**, 1648.
- [25] M. Ilie *et al.*, *Micromachined Chips for Biomolecular Investigation*, *Precision Engineering*, in press
- [26] G. De Bellis *et al.*, *Microelectrodes Organized in an Array Format for Biomolecular Investigations*, *Minerva Biotecnologica*, in press.

Ringraziamenti - Si ringrazia il Progetto finalizzato Cnr Biotecnologie e il Progetto Cnr 5% Nanotecnologie per il parziale supporto finanziario e l'Abdus Salam International Centre for Theoretical Physics per un grant a Mihaela Ilie.