



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI CHIMICA BIOLOGICA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA E BIOTECNOLOGIE

INDIRIZZO BIOTECNOLOGIE

XX CICLO

Prestazioni della tecnica di transfezione selettiva di cellule di mammifero in adesione tramite strutture integrate su silicio

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Lorenzo Pinna

Supervisore : Ch.mo Prof. Carlo Reggiani

Dottorando : Stefano Girardi

SOMMARIO

Il progetto NaChip (IST-2001-38915) prevede la realizzazione di un sistema non invasivo per il monitoraggio dell'attività elettrica di colture di neuroni di ippocampo di ratto.

Tale dispositivo consta di un microchip di silicio contenente dei siti di trasduzione a effetto di campo EOSFET (*Electrolyte Oxide Silicon Field Effect Transistor*) attraverso i quali è possibile registrare delle variazioni elettriche da cellule nervose. Tale segnale risulta inficiato da un elevato rumore elettrico caratteristico dello strumento. Al fine di migliorare il rapporto del segnale/rumore si inserisce questo lavoro che verte ad aumentare l'accoppiamento elettrico della cellula al transistor tramite l'addensamento dei canali del sodio voltaggio-dipendenti nella zona d'interfaccia del neurone col substrato.

Sono state utilizzate le subunità accessorie $\beta 1$ e $\beta 2$ del canale Nav1.2 nell'ipotesi che, interagendo tramite il loro dominio extracellulare con particolari proteine, rispettivamente contattina 1 (CNT1) e tenascina C (TNC), possano portare all'addensamento del canale nella zona d'interfaccia cellula/transistor. Tramite la creazione di proteine di fusione fluorescenti per le subunità $\beta 1$ e $\beta 2$, è stato possibile analizzare l'effetto della sovraespressione delle chimere in neuroni di ippocampo di ratto E18, ed il loro ruolo nell'indirizzamento del canale Nav1.2 in presenza di rivestimenti proteici del substrato. Tale analisi è stata effettuata mediante l'utilizzo della microscopia TIRF, che permette l'osservazione della sola zona di adesione della cellula senza avere il contributo di altri piani focali.

Questo ha condotto all'individuazione di un effetto imprevisto della subunità $\beta 2$ nell'aumentare sensibilmente il branching dendritico, e ciò ha permesso di sfruttare tale caratteristica per migliorare l'accoppiamento elettrico cellula/transistor ed aumentare quindi il rapporto segnale/rumore.

È stato necessario utilizzare i siti di stimolazione EOSC (*Electrolyte Oxide Semiconductor Capacitor*) per veicolare all'interno dei neuroni, sovrastanti la zona di registrazione, le subunità $\beta 1$ e $\beta 2$ al fine di aumentare l'accoppiamento elettrico. Questo ha portato allo sviluppo di una tecnica innovativa, non prevista dal progetto NaChip, ovvero l'elettroporazione in adesione delle cellule. I siti EOSC possono esser utilizzati, tramite opportuni accorgimenti, per elettroporare con un alto grado di selettività spaziale cellule in adesione, permettendo di veicolare all'interno delle stesse diversi tipi di molecole, come verrà descritto nel presente lavoro.

ABSTRACT

The NaChip project (IST-2001-38915) aims to the realization of a non-invasive system for monitoring the electrical activity of neurons culture.

Such device is a silicon microchip containing EOSFET (Electrolyte Oxide Silicon Field Effect) transistors, through which it is possible to record the electrical activity from nervous cells.

This device has an elevated signal/noise ratio, an intrinsic characteristic of the instrument.

To improve the relationship of the signal/noise ratio, this job focuses on the improvement of the cell-transistor connection, through the accumulation of sodium channels at the neuron-to-substrate interface .

We have used $\beta 1$ and $\beta 2$ auxiliary subunits of Nav1.2 channel, that, interacting through their extracellular domain with particular proteins, respectively contactin 1 (CNT1) and tenascin C (TNC), can carry the accumulation of the sodium channel in the cell/transistor interface.

Through the creation of fluorescent fusion proteins for $\beta 1$ and $\beta 2$, it has been possible to analyze the effect of the overexpression of the chimeras in E18 rat hippocampal neurons, and their role in the sorting of the channel in the presence of substrate coatings. Such analysis has been carried out by means of TIRF microscopy, that allows the observation of the adhesion zone of the cell with an elevated signal/noise ratio.

This has brought us to the discovery of an unexpected effect of $\beta 2$ in the considerable increase of the dendritic branching, thus allowing to take advantage of such characteristic in order to improve the electrical coupling connection cell/transistor and to increase the signal/noise ratio.

The necessity of a selective transfection of a single neuron over the recording zone, has carried to the development of a innovative and not programmed technique using the stimulation site EOSC (Electrolyte Oxide Semiconductor Capacitor). This site can be used for electroporation of a limited number of cells in adhesion, allowing to put inside the cell various types of molecules as it will be explained in the present job.

CAPITOLO 1 **6**

1.	INTRODUZIONE	6
1.1	MONITORAGGIO DI UNA RETE NEURONALE	6
1.2	STRUTTURA DEL CHIP	7
1.2.1	TRANSISTOR EOSFET	8
1.2.2	RICEZIONE DEL SEGNALE EXTRACELLULARE	9
1.3	IL CANALE DEL SODIO VOLTAGGIO DIPENDENTE $Na_v1.2$	11
1.3.1	SUBUNITÀ β	13
1.3.2	INTERAZIONI CON PROTEINE DI ADESIONE CELLULARE	14
1.4	MICROSCOPIA A FLUORESCENZA TIRF	16
1.5	STIMOLAZIONE DELLA CELLULA	18
1.5.1	IL CAPACITORE EOSC	19
1.6	METODI DI TRANSFEZIONE	19
1.6.1	METODI BIOCHIMICI	20
1.6.2	METODI VIRALI	21
1.6.3	METODI FISICI	21
1.7	ELETTROPORAZIONE	22
1.7.1	ELETTROPORAZIONE IN CUVETTA	25
1.7.2	ELETTROPORAZIONE IN ADESIONE	26

CAPITOLO 2 **28**

2.	MATERIALI E METODI	28
2.1	BIOLOGIA MOLECOLARE	28
2.1.1	PLASMIDI E CLONI	28
2.1.2	CEPPI BATTERICI E TERRENI DI COLTURA	29
2.1.3	SEQUENZE DEGLI OLIGONUCLEOTIDI SINTETICI PER LA PCR (<i>PRIMER</i>)	30
2.1.4	REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)	31
2.1.5	ELETTROFORESI IN GEL D' AGAROSIO	32
2.1.6	ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEL DNA PLASMIDICO DA CELLULE BATTERICHE	33
2.1.7	RESTRIZIONE DEL DNA	34
2.1.8	PURIFICAZIONE DEI FRAMMENTI DI DNA DOPO PCR O DOPO RESTRIZIONE	34
2.1.9	LIGAZIONE DI FRAMMENTI DI DNA	34
2.1.11	VERIFICA DELLE LIGAZIONI VIA RESTRIZIONE O PCR	35
2.1.12	SEQUENZIAMENTO DEL DNA	36
2.1.13	CONSERVAZIONE DEI CLONI A $-80^{\circ}C$	36
2.2	BIOLOGIA CELLULARE	36
2.2.1	SOLUZIONI STERILI	36
2.2.2	TERRENI DI COLTURA	37
2.2.3	ANTICORPI E MARCATORI CELLULARI	38
2.3	COLTURE CELLULARI	39
2.3.1	LINEA CELLULARE	39

2.3.3	SCONGELAMENTO DELLE CELLULE	40
2.3.4	PREPARAZIONE DI COLTURE PRIMARIE DI NEURONI	40
2.4	SUPPORTI DI COLTURA PER CELLULE	41
2.4.1	VETRINI	41
2.4.2	CHIP	41
2.4.3	RIVESTIMENTO DEI VETRINI	42
2.5	TRANSFEZIONE TRANSIENTE IN ADESIONE	42
2.7	STRUMENTI	43
2.7.1	MICROSCOPIA	43
2.7.2	APPARATO DI ELETTROPORAZIONE	44
2.7.3	PROTOCOLLI DI ELETTROPORAZIONE	44
2.7.4	IMPULSI DI ELETTROPORAZIONE	45

CAPITOLO 3 **46**

3.	SCOPO TESI	46
3.1.2	SEGNALE EXTRACELLULARE NEURONI IPPOCAMPO	48
3.2	INGEGNERIZZAZIONE DELLE SUBUNITÀ β	49
3.3	ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLE CHIMERE	51
3.3.1	ESPRESSIONE DELLA β 1Y	51
3.3.2	ESPRESSIONE DELLA β 2Y	53
3.4	RIVESTIMENTO PROTEICO	54
3.4.1.2	Espressione della β 1Y su rivestimenti di CNT1	55
3.4.1.3	Espressione della β 2Y su rivestimenti di TNC	56
3.4.2	CONSIDERAZIONI	57
3.5	TRANSFEZIONE IN ADESIONE	57
3.6	PROVE PRELIMINARI	58
3.6.1	ELETTROPORAZIONE DI CHO-K1	59
3.6.1.1	Trypan blue	59
3.6.1.3	Anticorpo coniugato Alexa514	61
3.6.2	CONSIDERAZIONI	62
3.7	ELETTROPORAZIONE DI NEURONI DI IPPOCAMPO DI RATTO E18	63
3.7.1	TRYPAN BLUE	63
3.7.2	FALLOIDINA CONIUGATA ALEX568	64
3.7.3	PLASMIDE CODIFICANTE EYFP	64
3.8	DISCUSSIONE	66
3.9	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	68
	BIBLIOGRAFIA	69

CAPITOLO 1

1. INTRODUZIONE

1.1 Monitoraggio di una rete neuronale

Lo studio dei segnali di una rete neuronale rappresenta un campo di estremo interesse. La possibilità di analizzare come un segnale venga generato e processato da reti neurali, sia con modelli matematici che tramite tecniche elettrofisiologiche, avviene in genere con metodiche invasive che comportano la possibilità di analizzare solo singolarmente le cellule e per un limitato intervallo temporale, quindi con una limitata risoluzione spaziale e temporale se si considera l'intera rete.

Il cambiamento di prospettiva derivante dalla possibilità di ottenere informazioni sull'attività di neuroni, in modalità non invasiva e contemporanea da diversi singoli elementi di una rete neurale, potrebbe rappresentare una metodologia chiave per ottenere informazioni in una vasta gamma di ambiti scientifici. Ad esempio potrebbe contribuire a dare indicazioni sull'effetto di farmaci, l'espressione genica o le modificazioni stimolo-dipendenti della rete, analizzandole a livello dell'intera rete stessa.

Allo stato attuale la raccolta d'informazioni sull'attività elettrica di cellule eccitabili è prevalentemente basata sull'utilizzo di tecniche standard di elettrofisiologia che prevedono l'utilizzo di microelettrodi in vetro. Con tale metodologia risulta impraticabile una registrazione protratta oltre un breve arco temporale, e la registrazione simultanea di diverse cellule è estremamente indaginoso. Le cellule utilizzate con questa tecnica difficilmente riescono a mantenere uno stato vitale in quanto la metodica viene effettuata in ambienti che differiscono da quelli in cui le cellule vivono.

Per il raggiungimento di questi obiettivi, la linea di ricerca intrapresa si basa sull'utilizzo di trasduttori di segnale elettrico tipo EOSFET (*Electrolyte Oxide Silicon Field Effect Transistor*) integrati in un substrato di silicio passivato con diossido di silicio. L'utilizzo di tali dispositivi è stato possibile grazie alla collaborazione con il prof. Peter Fromherz del Dipartimento di Neurofisica del Max Plank Institute di Monaco.

Tale dispositivo integra delle aree sensibili in un supporto conveniente per la sopravvivenza di colture cellulari e permette di registrare un segnale

senza che le cellule vengano sottoposte a tecniche invasive che ne precluderebbero la vitalità. Inoltre la presenza di un alto numero di zone di registrazione rende possibile la registrazione simultanea di diverse cellule. Lo strato di diossido di silicio su cui la coltura cresce, possiede inoltre caratteristiche chimico-fisiche affini ai consueti supporti in vetro, evitando quindi il rilascio di molecole non compatibili con le colture cellulari (non avvengono cioè processi elettrolitici come nei supporti in metallo).

1.2 Struttura del chip

Il dispositivo per la registrazione consiste in un supporto in ceramica per il chip in silicio, con dei piedini in oro per l'ancoraggio ad un *socket* attraverso cui è possibile interagire tramite comuni *software* utilizzati in elettrofisiologia. Ad esso è incollata una camera in perspex per permettere l'utilizzo di terreni di crescita necessari alla coltura cellulare. Il sistema prevede l'utilizzo di un amplificatore in corrente da 16 canali, a cui arriva il segnale della corrente di *drain*, e di una scheda di amplificazione che viene gestita mediante un programma scritto in Labview.

La zona di registrazione possiede un'area variabile tra 0.38 mm^2 e 0.7 mm^2 , costituita da un substrato di diossido di silicio (SiO_2), nella quale sono inseriti transistor EOSFET alternati a capacitori EOSC (*Electrolyte Oxide Semiconductor Capacitor*), utilizzabili per elicitarne un segnale, disposti in due *array* paralleli per un totale di 64 siti di registrazione/stimolazione (Figura 1).

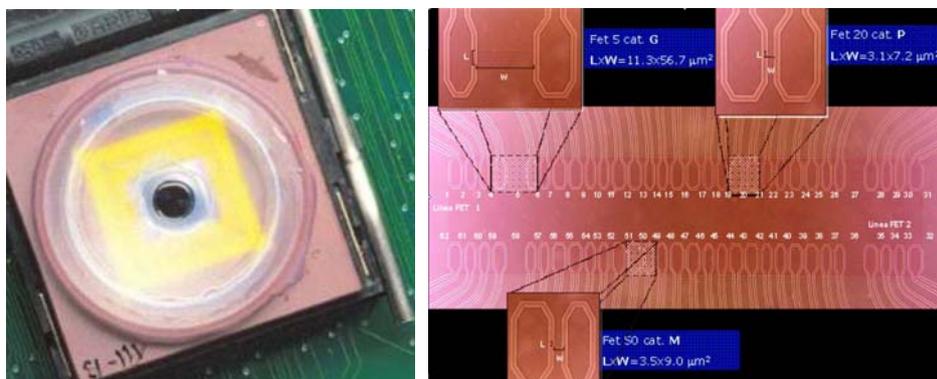


Figura 1 A sinistra immagine del chip a destra immagine della camera del chip. Ingrandimenti: esempi delle geometrie dei transistor

Questo dispositivo è stato costruito con diverse geometrie di transistors che coprono aree differenti. Vengono suddivisi in tre tipologie: cat.G con un'area di $11.3 \times 56.7 \mu\text{m}^2$, cat. P $3.1 \times 7.2 \mu\text{m}^2$, cat.M $3.5 \times 9 \mu\text{m}^2$.

La costruzione del dispositivo è stata effettuata presso il Dipartimento di Neurofisica del Max Planck Institute per la Biochimica di Martinsried, sotto la supervisione del prof. Peter Fromherz e dei suoi collaboratori.

Questi dispositivi permettono una risoluzione spaziale decisamente migliore rispetto ad altri dispositivi come MEA (*Multi Electrode Array*), anche se di contro posseggono un elevato rumore intrinseco, e permettono quindi di registrare il segnale derivante da una singola cellula, cosa non ancora possibile con l'uso di elettrodi di metallo date le elevate dimensioni che vanno a coprire un'area che può contenere gruppi di cellule.

1.2.1 Transistor EOSFET

Il transistor EOSFET deriva da modificazioni strutturali del MOSFET (*Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor*), un tipo di transistor usato principalmente nei dispositivi digitali (Figura 2). Esso è costituito da: un semiconduttore intrinseco di massa (*bulk*) che costituisce il materiale su cui avviene l'integrazione del dispositivo; due regioni tra loro separate e altamente dopate in modo opposto al substrato che prendono il nome di *Source* e *Drain*; uno strato di materiale isolante, tipicamente diossido di silicio che ricopre ed isola le strutture integrate; ed infine un elemento conduttivo a contatto con lo strato di ossido, che, in corrispondenza delle regioni non dopate, costituisce il *Gate*. Il terminale di *gate* è uno strato di polisilicio sopra il canale, ma separato dal canale tramite un sottile strato isolante di biossido di silicio (SiO_2).

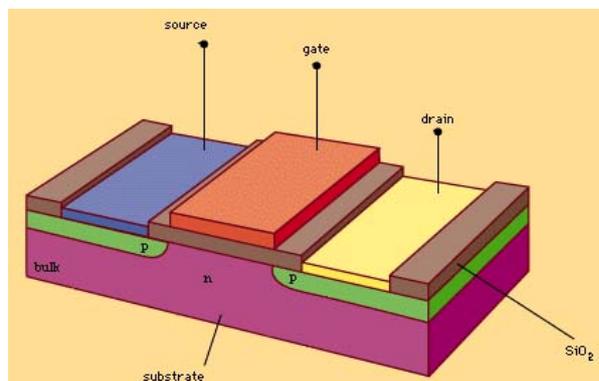


Figura 2 Schema dispositivo MOSFET

La differenza tra dispositivi EOSFET e MOSFET riguarda il terminale di *gate* che viene sostituito da un elettrolita. Questo approccio permette di osservare variazioni di potenziale di cellule eccitabili in vivo, essendo di fatto contemporaneamente un substrato di crescita ed uno strumento di registrazione.

Quando si applica una tensione tra i terminali di *gate* e *source*, il campo elettrico che si genera crea il cosiddetto "canale" nel substrato sottostante. Le proprietà conduttive della regione del canale determinano l'intensità di corrente che scorre tra *source* e *drain*. Da queste considerazioni emerge come esista una relazione che lega il potenziale elettrico applicato al contatto di *gate* (misurato rispetto alla tensione contatto di *source*) all'intensità della corrente I che scorre tra il contatto di *source* e quello di *drain* quando sottoposti ad una differenza di potenziale V .

Conoscendo i potenziali che vengono posti fra *Source* e *Drain* è possibile misurare differenze di potenziale che si vengono a creare al di sopra dell'area sensibile, in quanto queste differenze vanno a modificare le proprietà conduttive del *gate*, e quindi monitorare potenziali d'azione che vengono generati da cellule eccitabili, come ad esempio neuroni, senza che quest'ultimi vengano danneggiati.

1.2.2 Ricezione del segnale extracellulare

Cellule nervose e muscolari si distinguono dalle altre cellule eucariotiche per la capacità di generare e propagare segnali elettrici sotto forma di potenziali d'azione. Responsabili della genesi del potenziale d'azione nei neuroni sono speciali proteine integrali di membrana plasmatica: i canali ionici per Na^+ e K^+ a controllo di voltaggio (o voltaggio-dipendenti). Ogni canale è altamente selettivo per un particolare ione e ne facilita elevati flussi passivi secondo gradiente elettrochimico (Kandel et al., 1994).

La registrazione di un potenziale d'azione da un neurone tramite dispositivi EOSFET è possibile solo quando essa sovrasta la regione sensibile del transistor e solo in particolari condizioni di adesione cellulare, che si creano nella zona d'interfaccia tra il substrato e la cellula. In questa sottile regione, che separa la membrana plasmatica cellulare dal transistor sottostante è presente la soluzione elettrolitica, in cui viene effettuata la registrazione, oltre a proteine della matrice extracellulare deposte, ed infine le proteine di membrana espresse dalla cellula stessa deputate all'interazione

con l'ambiente esterno. Questi elementi, che includono l'area di adesione, la distanza membrana-substrato e resistenza specifica, determinano in diverso modo la resistenza alla conduzione della corrente ionica nella regione di interfaccia cellula-transistor.

Da un punto di vista elettrico, tanto la membrana cellulare quanto il substrato di adesione, possono essere considerati in prima approssimazione come due condensatori ideali (Figura 3). L'elevata resistenza offerta da questo sottile conduttore isola la zona centrale del contatto dalla sua periferia, che è caratterizzata da una impedenza trascurabile.

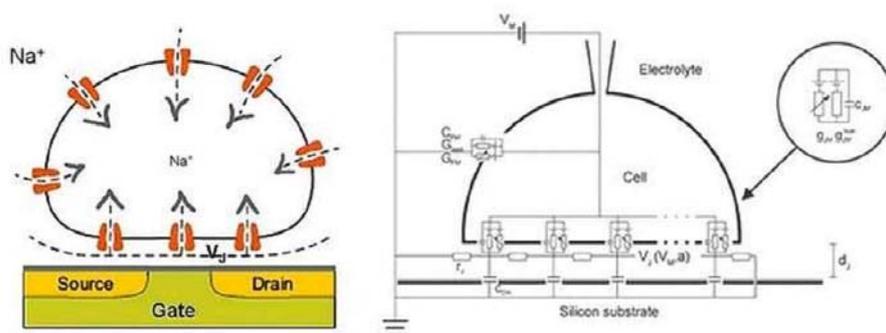


Figura 3 A sinistra una rappresentazione schematica del funzionamento del dispositivo. A destra evidenziati i parametri della modellizzazione elettrica della membrana

Queste caratteristiche peculiari dell'interfaccia generano una resistenza alla corrente ionica, originando quindi una differenza di potenziale in giunzione che influenza la regione corrispondente al *Gate* del transistor, modulando a sua volta la corrente di *Drain* che viene registrata.

E' da sottolineare che solo i canali presenti nella porzione di membrana cellulare che aderisce al substrato contribuiscono alla generazione del potenziale individuabile dal dispositivo di misura, ed essi sono una frazione della popolazione totale dei canali della cellula stessa.

Inoltre va puntualizzato come caratteristiche intrinseche della giunzione, quali per esempio la distanza tra membrana-transistor e l'area di adesione del corpo cellulare, determinino l'entità della resistenza in giunzione e quindi, proporzionalmente, il segnale registrabile dai transistor. Il segnale extracellulare e' direttamente proporzionale al raggio di adesione ed inversamente proporzionale alla distanza membrana cellulare-diossido di silicio.

1.3 Il canale del sodio voltaggio dipendente $Na_v1.2$

Il canali del sodio voltaggio dipendente sono raggruppati in un'unica famiglia con diverse isoforme (da $Na_v1.1$ a $Na_v1.9$).

Tali isoforme hanno una distribuzione variabile in tessuti diversi ed alcune di esse sono tessuto-specifiche: per esempio, i canali $Na_v1.2$ e $Na_v1.3$ sono espressi nel sistema nervoso centrale, mentre l'espressione di $Na_v1.1$ e $Na_v1.6$ si rileva anche nel sistema nervoso periferico, assieme a $Na_v1.9$; $Na_v1.4$ è un'isoforma specifica del muscolo scheletrico, $Na_v1.5$ è espresso solo in cuore (Goldin et al., 2000).

Le isoforme della sottofamiglia Na_v1 condividono la stessa struttura proteica: si tratta di complessi multimerici transmembrana costituiti da una subunità principale α e da un numero di subunità accessorie β variabile a seconda dell'isoforma che si considera (Catterall et al., 2005).

Sono note due varianti di splicing denominate rII (Noda et al., 1986a) e rIIA (Auld et al., 1988; Auld et al., 1990) che differiscono per alcune sostituzioni nucleotidiche, sette delle quali si traducono in sostituzioni aminoacidiche. Venti nucleotidi divergenti cadono all'interno di una regione che è codificata da due esoni soggetti a splicing alternativo, con produzione di rII o rIIA (Sarao et al., 1991).

Il complesso del canale $Na_v1.2$ è composto da una subunità principale funzionale α , di circa 2005 aminoacidi e 260 kDa (Messner & Catterall, 1985) che costituisce il poro acquoso attraverso cui avviene il flusso degli ioni, alla quale sono associate due subunità accessorie $\beta 1$ di 36 kDa e $\beta 2$ di 33 kDa (Catterall, 1996) che contengono regioni extracellulari con motivi di tipo immunoglobulinico (Figura 4).

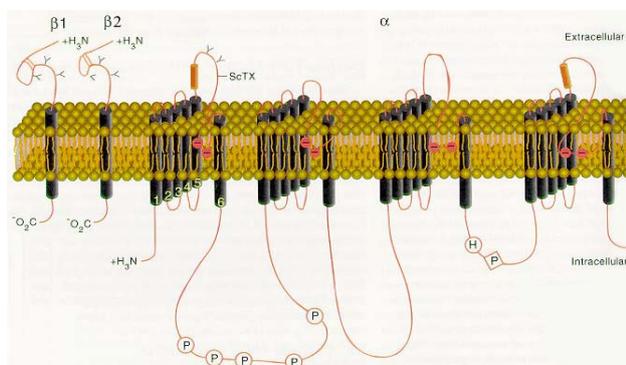


Figura 4 Immagine schematica del canale del sodio $Na_v1.2$ di ratto e delle subunità accessorie $\beta 1$ e $\beta 2$.

La struttura secondaria prevista per la subunità principale α presenta, compresi tra il dominio C-terminale e quello N-terminale entrambi citoplasmatici, quattro (I-IV) domini omologhi con una substruttura identica composta da 6 (S1-S6) α -eliche transmembrana con un *loop* rientrante in membrana tra ogni coppia S5-S6 che compone l'apertura extracellulare del poro e in cui risiedono le proprietà di selettività a particolari specie ioniche (Heinemann et al., 1992) e di sensibilità alla tossina bloccante TTX.

La voltaggio-dipendenza dell'attivazione dei canali Nav1 è conseguenza di movimenti di residui carichi verso l'esterno del poro, provocati da una depolarizzazione del potenziale elettrico di membrana (Hodgkin & Huxley, 1952).

Le α -eliche S4 sono formate da *motif* ripetuti di un aminoacido con carica positiva seguito da due residui idrofobici; sono infatti presenti in queste strutture ripetizioni di gruppi aminoacidici a carica totale positiva (residui di arginina o lisina) a cui sono associati due residui idrofobici, che, in condizioni di potenziale di membrana a riposo, trattengono queste α -eliche all'interno del canale, mentre con una depolarizzazione della membrana vengono rilasciate verso la regione extracellulare del poro permettendone un riarrangiamento in una configurazione permeabile agli ioni (Guyetal, 1986).

Il caratteristico processo di inattivazione rapida che contraddistingue i canali ionici del sodio voltaggio dipendenti, che si ipotizzava basato su un meccanismo di occlusione del poro da parte di una particella citoplasmatica legata al canale attraverso una struttura di tipo flessibile (Armstrong, 1981; Hille, 1991), ha trovato conferma in esperimenti (Vassilev et al., 1988) con cui si è studiato l'effetto sull'inattivazione veloce di anticorpi mirati al loop citoplasmatico tra il dominio III ed il dominio IV (Vassilev et al., 1989) (Figura 5).

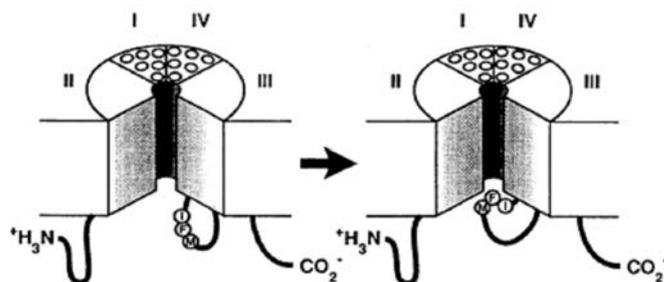


Figura 5 Rappresentazione schematica del meccanismo di inattivazione veloce della subunità α

Studi di mutagenesi (West et al., 1992a) hanno individuato un motivo critico nella triade idrofobica I1488, F1489, M1490, al punto che la mutazione IFM/QQQ induce la rimozione totale del processo di inattivazione, e la sola mutazione F1489Q ne riduce l'effetto in modo consistente. Il fenomeno che porta all'occlusione del poro è stato anche verificato (Eaholtz et al., 1998) con un peptide contenente la triade IFM, col quale è stata evidenziata la presenza, in corrispondenza del poro, di amminoacidi del *loop* S4-S5 coinvolti nella formazione del sito recettore per il segmento IFM (Smith et al., 1997). È stata inoltre dimostrata l'importanza di residui di serina nel loop intracellulare tra i domini I e II (Cantrell et al., 2001) come substrati per l'attività di una complessa rete di protein chinasi A e C, al fine della regolazione del funzionamento del canale a seconda dell'ambiente circostante.

Le caratteristiche che differenziano il canale *wild type* rNa_v1.2a utilizzato negli esperimenti rispetto all'isoforma rNa_v1.2, sono un marcato *shift* nella voltaggio dipendenza dell'attivazione verso potenziali di membrana meno polarizzanti ed una cinetica di attivazione meno rapida (Auld et al., 1988; Noda et al., 1986).

1.3.1 Subunità β

Al canale del sodio Na_v1 sono associate 4 subunità β che modulano le proprietà del canale e l'indirizzamento di quest'ultimo in siti specifici della membrana, come ad esempio, nei nodi di Ranvier (Davis et al., 1996).

Le subunità accessorie del canale del sodio sono proteine transmembrana monopasso con le estremità N-terminale rivolte al lato extracellulare, in cui è presente un dominio immunoglobulinico omologo per struttura a domini simili riscontrati nelle proteine coinvolte nei processi di adesione CAM (*Cell Adhesion Molecule*; Isom & Catterall, 1996).

Esperimenti di elettroforesi sul canale Na_v1.2 estratto da cervello di ratto hanno stabilito che le interazioni tra β 1 e α sono non covalenti, mentre β 2 instaura ponti disolfuro con α (Hartshorne et al., 1982). Data l'elevata similarità di β 3 con β 1, è molto probabile che anch'essa si leghi ad α con interazioni non covalenti (Morgan et al., 2000). β 4 invece, che condivide con β 2 il 35% di identità aminoacidica, in condizioni di elettroforesi non riducente migra come complesso con α e presenta un residuo di cisteina nel

dominio *Ig-like* che è un putativo sito di legame disolfuro con α (Yu et al., 2003).

Sono note in letteratura modulazioni dell'attività del canale, tanto in oociti che in linee cellulari, indotte dalla coespressione delle subunità accessorie $\beta 1$ e $\beta 2$. Negli oociti è stato riscontrato un effetto della coespressione del canale con la subunità $\beta 2$ (Isom et al., 1995b) che comporta un incremento delle correnti di picco accompagnato da una debole variazione della voltaggio dipendenza e da un forte incremento della capacità della membrana cellulare. Lo stesso studio eseguito nel caso della subunità $\beta 1$ ha mostrato come in questo caso l'incremento nell'ampiezza delle correnti sia molto più accentuato. In linee cellulari di mammifero si riscontrano scostamenti importanti rispetto all'espressione della sola subunità principale, dovuti all'espressione delle due subunità accessorie. Se da un lato è stato dimostrato come un'espressione stabile su cellule CHO-K1 della sola subunità principale porti a caratteristiche del canale molto simili a quelle riscontrabili nel sistema neurale nativo (West et al., 1992b), dall'altro l'espressione stabile della α e della $\beta 1$ porta a scostamenti molto significativi verso potenziali più negativi nelle caratteristiche di voltaggio dipendenza sia dell'attivazione che dell'inattivazione (Isom et al., 1995).

Interazioni omofile sono state evidenziate in cellule S2 di *Drosophila Imelanogaster* transfettate con $\beta 1$ o $\beta 2$, le quali formano aggregati sia in presenza che in assenza di rIIA, mentre la sola subunità rIIA non induce aggregazione (Malhotra et al., 2000).

E' stato identificato nel dominio intracellulare di $\beta 1$ un residuo di tirosina fondamentale per l'interazione eterofila *in cis* con l'anchirina (Kordeli et al., 1995).

1.3.2 Interazioni con proteine di adesione cellulare

L'interazione del canale $Na_v 1$ con le proteine di adesione cellulare avviene tramite le subunità accessorie. Queste interazioni sono necessarie per la corretta localizzazione subcellulare dei canali ionici nei neuroni, in particolare ai nodi di Ranvier e alla regione iniziale dell'assone (AIS, *Axon Initial Segment*). In figura 6 sono rappresentate le interazioni tra le subunità, $\beta 1$ e $\beta 2$, e le proteine CNT1, TNC e la subunità α .

La contattina 1 (CNT1) è una proteina CAM espressa sia dai neuroni sia dalle cellule gliali (Koch et al., 1997) ed è costituita da sei domini immunoglobulinici di tipo C2, seguiti da quattro domini fibronectinici e da una “coda” GPI (glicosilfosfatidil inositolo) che la àncora alla membrana plasmatica (Berglund & Ranscht, 1994; Reid et al., 1994).

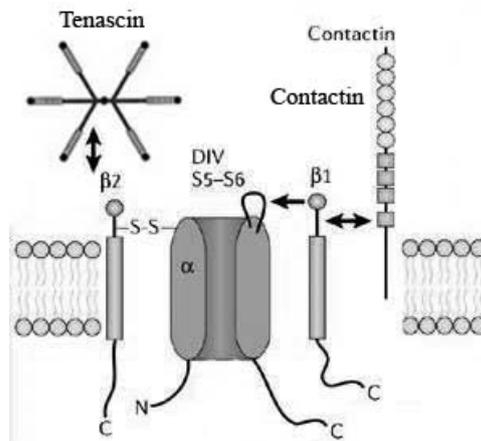


Figura 6 Rappresentazione schematica delle interazioni del canale Na_v1.2

Questa proteina interagisce con il canale Na_v1.2 attraverso una delle subunità accessorie, la $\beta 1$ (Isom et al., 1995a). L’interazione avviene attraverso i domini fibronectinici di CNT1 con il dominio immunoglobulinico di $\beta 1$ (McEwen & Isom, 2004). Tale dominio interagisce anche con la subunità α , ma per addensare il canale in membrana plasmatica sono necessarie anche le interazioni che la subunità $\beta 1$ instaura con α attraverso la regione prossima alla membrana e il dominio C-terminale, con il quale interagisce anche con l’anchirina (McEwen et al., 2004). In sistemi cellulari il dominio *Ig-like* della subunità $\beta 1$ interagisce con altre due proteine CAM neuronali: Nf155, in cui il dominio extracellulare partecipa all’interazione, e NrCAM, che partecipa con i domini extracellulare ed intracellulare (McEwen & Isom, 2004).

Interazioni che coinvolgono la subunità $\beta 2$ avvengono con la proteina di matrice tenascina C (TNC). Le tenaschine costituiscono una famiglia di cinque glicoproteine oligomeriche di matrice extracellulare con una struttura a domini comune. La tenascina C in particolare presenta all’estremità N-terminale una serie di eptadi ripetute responsabili dell’assemblaggio in esameri, seguite da domini EGF-like (*Epidermal Growth Factor*), da domini fibronectinici di tipo III (FNIII) e da un dominio globulare fibrinogeno all’estremità C-terminale. Esistono diverse isoforme dovute a splicing alternativo con lunghezza variabile, tenaschine short (TNS) con peso

molecolare compreso tra 180 e 255 KDa (Gulcher et al., 1989), e TNL (long), di 230-320 KDa (Aukhil et al., 1990). La TNC, attraverso i domini fibronectinici (FN1-2, 6-8, FNA, FNB), interagisce con il dominio immunoglobulinico di $\beta 2$, mentre i domini EGF-like e fibrinogeno non interagiscono con la subunità (Srinivasan et al., 1998).

1.4 Microscopia a fluorescenza TIRF

La necessità di osservare la zona di giunzione tra cellula e substrato ha posto la necessità di adottare tecniche particolari di microscopia.

Il potere risolutivo di un microscopio ottico su un piano xy non è infinito e i suoi limiti risiedono, oltre che nella capacità del sistema ottico di riuscire a discriminare due punti luminosi contigui, anche in caratteristiche intrinseche della luce, secondo la relazione descritta nel criterio di Rayleigh, con un limite inferiore (a meno di tecniche di microscopia particolari) di circa 200 nm.

La diffrazione della luce, durante la sua focalizzazione tramite una lente, avviene in uno spazio ben maggiore delle dimensioni della molecola di origine. Tale fenomeno ha un riscontro anche nell'asse z: componenti luminose provenienti da differenti profondità influenzano quelle che giacciono nel piano focale individuato dall'obiettivo, confondendo l'interpretazione dell'origine del segnale visualizzato (Murphy, 2001).

L'utilizzo di microscopi confocali non è adatto per campioni con segnali deboli; inoltre il sezionamento ottico lungo l'asse z risulta minore di 500 nm, con conseguenti difficoltà di interpretazione in preparati di cui si vuole osservare la zona di giunzione con il substrato.

La microscopia TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*) è una tecnica che permette di analizzare una sottile regione di un campione di cellule o di tessuto ad una risoluzione maggiore rispetto ad altri tipi di microscopia, come la microscopia confocale.

Questo è dovuto alla generazione di un campo elettromagnetico evanescente generato nella riflessione, il quale stimola i fluorofori nell'interfaccia e la cui intensità decade esponenzialmente in funzione della profondità di penetrazione nel mezzo con diverso indice di rifrazione. Ne risulta la possibilità di visualizzare i fluorofori appartenenti alla sottile regione prima descritta, con un contributo pressoché nullo dei soprastanti piani focali.

Ciò è conseguenza del semplice principio fisico su cui la TIRF si basa: per angoli di incidenza della luce superiori ad un valore critico (θ_c), tutta la luce incidente viene riflessa dall'interfaccia vetro-cellula, invece che essere rifratta. Una piccola parte dell'energia incidente, detta "onda evanescente", penetra attraverso l'interfaccia e si propaga all'interno del preparato, eccitando eventuali fluorofori presenti in prossimità dell'interfaccia (Figura 7). Poiché l'onda evanescente ha un decadimento esponenziale all'aumentare della distanza dal vetro, vengono eccitati i fluorofori presenti in una sottile regione del preparato prossima alla superficie di adesione, modulabile tra 80 e 200 nm, che comprende la membrana plasmatica e la regione corticale.

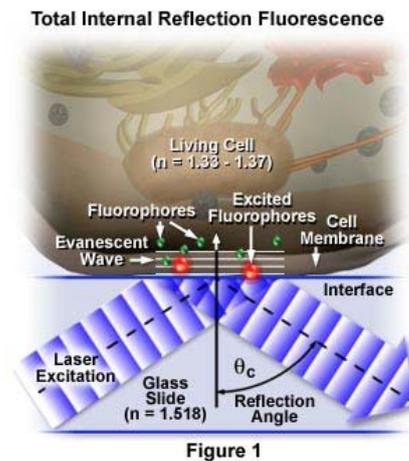


Figura 7 Rappresentazione del principio su cui si basa la TIRF

Fluorofori che si trovano in regioni della cellula più lontane dalla superficie non vengono eccitati: l'immagine che ne risulta è quindi priva del contributo dei piani focali superiori (Axelrod, 2001).

Per poter generare un'onda evanescente, l'angolo di incidenza della luce deve superare i 65° , in accordo con la legge di Snell, ed è possibile raggiungere tale valore tramite l'uso di un obiettivo dall'elevata apertura numerica. Un obiettivo ad immersione ad olio con lente di vetro avente un'apertura numerica pari a 1.45, consente un angolo di apertura di 72° che supera l'angolo critico per la TIRF (Schneckenburger, 2005).

Ciononostante, se si è interessati ad analizzare anche le regioni interne della cellula la microscopia confocale permette di effettuare sezioni ottiche su tutto il volume cellulare escludendo il contributo dei piani fuori fuoco e superando in risoluzione l'epifluorescenza classica (Axelrod, 2001).

1.5 Stimolazione della cellula

In questo tipo di dispositivo la generazione di un potenziale d'azione non può essere effettuata dallo stesso sito di registrazione. Un esempio differente sono i dispositivi che utilizzano la tecnologia MEA, nei quali l'elettrodo funziona sia da sito sensibile, per la registrazione di un segnale extracellulare, sia da elemento di stimolazione per la genesi di un potenziale d'azione.

Si rende necessario, quindi, l'utilizzo di stimolatori integrati nel chip che permettono la stimolazione della cellula soprastante e la generazione di un potenziale d'azione che può essere monitorato tramite i transistor. Tali elementi sono dei capacitori EOSC (*Electrolyte Oxide Semiconductor Capacitor*) intervallati ai siti di registrazione EOSFET (Figura 8).

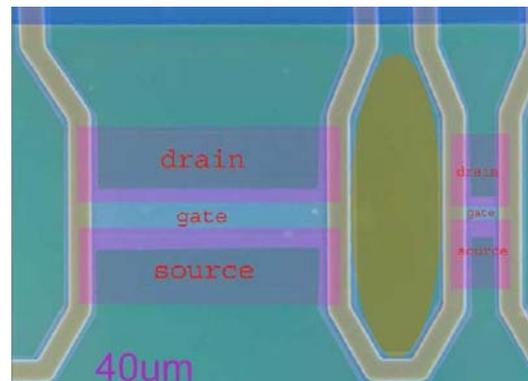


Figura 8: Immagine del dispositivo in cui si distingue una zona di stimolazione EOSC, evidenziata in giallo, e due siti EOSFET

La possibilità di indurre un potenziale d'azione è dovuta alla particolare situazione che si crea quando una cellula cresce sopra una zona di stimolazione. Nella zona di giunzione si genera una regione con un'alta caduta di potenziale, tra il punto di adesione e la periferia, posta a *ground*, a causa dell'elevata resistenza elettrica offerta dal sottile *cleft*; la regione di membrana libera, invece, possiede una differenza di potenziale minore.

Si possono così distinguere due domini: la membrana libera e quella adesa al substrato. Di fatto la membrana libera possiede un potenziale, rispetto a massa, trascurabile, mentre nella membrana adesa esso non è più trascurabile. Da ciò si deduce che la corrente attraverso la membrana adesa è guidata da un potenziale diverso da quello che guida la corrente attraverso la membrana libera (Schoen & Fromherz, 2006).

Applicando una variazione di tensione al substrato si crea una corrente che fluisce attraverso l'interfaccia di contatto e lungo la membrana cellulare, e si crea così una differenza di potenziale, sia in giunzione sia intracellulare, rispetto a massa, mentre la variazione della membrana non adesiva è trascurabile.

Questo tipo di stimolazione, che porta ad un processo di polarizzazione della membrana cellulare, può generare un potenziale d'azione in cellule eccitabili.

1.5.1 Il capacitore EOSC

Il capacitore EOS è costituito da uno strato di un materiale semiconduttore (tipicamente silicio) uniformemente drogato, sulla cui superficie è depositato uno strato di biossido di silicio. La struttura è completata da un terzo strato (gate) che caratterizza il dispositivo: nel caso si tratti di un metallo, si ha una struttura MOS (Metal Oxide Semiconductor), nel caso di un elettrolita, la struttura è detta EOS (Electrolyte Oxide Semiconductor).

La presenza di uno strato isolante che separa due materiali conduttivi rappresenta la struttura di un condensatore: per questo motivo si parla anche di EOS *capacitor*.

1.6 Metodi di transfezione

Caratteristica importante della membrana plasmatica cellulare è di essere una barriera altamente selettiva per la diffusione dei soluti tra ambiente intracellulare ed extracellulare, in particolare di sostanze ioniche e polari. Tuttavia grazie ai naturali meccanismi di trasporto, endocitosi ed esocitosi, è permessa la comunicazione e lo scambio di sostanze per il mantenimento dell'omeostasi e del metabolismo cellulare.

Talvolta risulta importante introdurre artificialmente nelle cellule molecole particolari, quali ad esempio farmaci, ioni o altre molecole biologiche di cui si vuol studiare l'influenza a livello cellulare, oppure acidi nucleici usati per inibire o favorire l'espressione di un determinato gene, oggetto di analisi. Tale processo si definisce transfezione cellulare.

La transfezione può esser suddivisa in tre categorie a seconda della metodologia utilizzata e si parla quindi di metodi biochimici, virali e fisici.

1.6.1 Metodi biochimici

I metodi biochimici sfruttano molecole vettrici che si legano al DNA creando degli aggregati che vengono endocitati dalla cellula. Tali sostanze sfruttano i gruppi fosfato carichi negativamente delle catene di DNA. La formazione di tali aggregati riesce a superare la barriera della membrana plasmatica e quindi permette l'introduzione di materiale esogeno all'interno della cellula (Figura 9).

Il metodo del “calcio-fosfato” sfrutta la reazione che avviene tra il cloruro di calcio ed i gruppi fosfato del DNA, con formazione di una molecola insolubile che precipitando aderisce alla superficie delle cellule e viene poi assorbita per endocitosi. Tale tecnica viene largamente impiegata, in quanto i componenti necessari sono di basso costo e facilmente disponibili. Il protocollo, sebbene di semplice utilizzo, è estremamente delicato in quanto piccole variazioni di pH possono inficiare tale tecnica rendendola inefficace (Jiang & Chen, 2006).

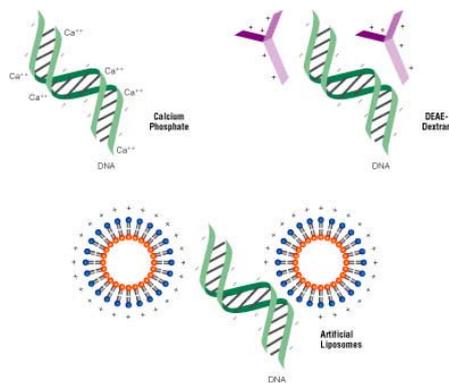


Figura 9: rappresentazione delle principali tecniche di transfezione biochimica

Un altro protocollo, che si basa sulla creazione di complessi insolubili ed assimilabili dalla cellula, prevede l'uso del DEAE-destrano. Si tratta di un polimero cationico che si lega anch'esso ai gruppi fosfato del DNA, formando composti che si depositano sulla membrana. L'uso di tale composto è tossico per le cellule, e richiede un'attenta ottimizzazione del protocollo dovendo limitare i tempi di esposizione per le cellule (Schenborn & Goiffon, 2000).

Tra i metodi con alta efficienza di transfezione i metodi più utilizzati prevedono l'uso di liposomi. Tali composti sono vescicole lipidiche sintetiche cariche positivamente, o neutre, che si legano all'acido nucleico in soluzione. Il complesso DNA-liposoma viene internalizzato grazie alla fusione del liposoma con la membrana plasmatica permettendo l'entrata di materiale esogeno. La transfezione mediata dai liposomi risulta vantaggiosa per l'alta efficienza di trasferimento genico, e la possibilità di trovare in commercio tipologie differenti adatte a diverse linee cellulari (Wasungu & Hoekstra, 2006).

1.6.2 Metodi virali

I metodi con più alta efficienza di transfezione utilizzano virus modificati. Questi metodi consistono nell'inserimento del gene da transfettare in un virus-vettore geneticamente modificato in modo da non risultare infettivo per l'operatore, capace però di infettare la coltura cellulare. Vengono utilizzati diversi tipi di virus tra cui i retrovirus (con patrimonio genetico a RNA) e gli adenovirus (a doppio filamento di DNA). Lo svantaggio principale dell'utilizzo dei retrovirus è che risultano efficaci prevalentemente in cellule in fase di mitosi: per questo non sono indicati per tessuti le cui cellule, dopo la differenziazione in fase di crescita dell'organismo, hanno perso la capacità di dividersi (come i neuroni), o la possiedono solo in parte (come gli epatociti). Gli adenovirus invece si differenziano dai retrovirus perché possono agire anche su cellule non in fase di mitosi (Condreay & Kost, 2007).

1.6.3 Metodi fisici

I metodi fisici di transfezione sono tecniche invasive che prevedono l'introduzione diretta della molecola all'interno della cellula: gli acidi nucleici vengono veicolati nel citoplasma, senza passare attraverso i meccanismi naturali di trasporto, superando gli ostacoli dovuti alla resistenza elettrica.

Molto efficace ma anche molto debilitante per la cellula è la microiniezione, in cui attraverso un microcapillare viene introdotto il materiale esogeno. Questo metodo risulta molto difficile da attuare e molto

laborioso in quanto necessita di molta pratica da parte dell'operatore. Inoltre non è adatto per transfettare numeri elevati di cellule (Gao et al., 2007).

Un altro metodo è il *gene gun*, con il quale si introducono, tramite alta pressione, particelle d'oro, o di tungsteno, rivestite di DNA all'interno della cellula. Questo sistema, molto costoso, è utilizzato per cellule difficili da transfettare con gli altri metodi, sia per applicazioni in vitro e in vivo (Gao et al., 2007).

Altri metodi consistono nella creazione di pori attraverso onde sonore a diverse frequenze (sonoporazione) (Paliwal et al., 2006), o attraverso l'uso di laser che "bucano" la membrana data l'elevata energia che riescono a raggiungere (Schneckenburger et al., 2002). Quest'ultimi due metodi sono indicati per cellule particolarmente difficili da transfettare anche se necessitano di apparecchiature costose.

Infine l'elettroporazione è forse il metodo fisico più utilizzato, soprattutto per cellule batteriche, in quanto lo stato dell'arte attuale permette di ottenere un'elevata efficienza parallelamente ad un'elevata sopravvivenza cellulare. Questo metodo utilizza dei brevi ed intensi impulsi elettrici per indurre la formazione di pori in membrana.

1.7 Elettroporazione

L'elettroporazione costituisce un metodo fisico per permeabilizzare temporaneamente la membrana cellulare, permettendo l'ingresso di molecole normalmente impermeabili ad essa (Figura 10).

Applicando brevi ed intensi impulsi di tensione alla cellula, si induce la formazione di pori transitori e reversibili sulla membrana cellulare.

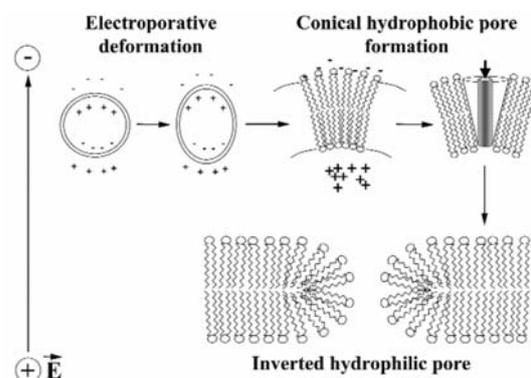


Figura 10: Rappresentazione della formazione di pori nella membrana cellulare. (da Somiari et al., 2000)

Quando il potenziale transmembrana supera la tensione di rottura dielettrica della membrana, si ha un riarrangiamento delle catene lipidiche, con la temporanea formazione di pori aventi dimensioni dell'ordine dei nanometri. E' appunto attraverso questi pori che si può ottenere in maniera controllata l'ingresso nella cellula di diversi tipi di molecole, quali ad esempio ioni, farmaci, marcatori, coloranti, anticorpi, acidi nucleici (Gehl et al., 2003).

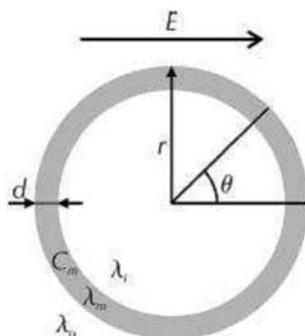


Figura 11: Modello sferico di una cellula. λ rappresenta la conduttività e C_m la capacità di membrana. (da Miklavic et al., 2006).

Al variare del tipo di cellule e dei dispositivi elettronici utilizzati per la trasmissione degli stimoli, diversi sono i parametri da ottimizzare per ottenere un buon esito della transfezione, come ad esempio la forma d'onda, l'ampiezza e la durata degli impulsi, e le soluzioni in cui effettuare l'elettroporazione. Nonostante le modalità biofisiche con cui avviene l'elettroporazione non siano state ancora completamente caratterizzate, essa è una tecnica applicabile sia in vivo che in vitro, per cellule animali, vegetali, umane.

L'applicazione di un campo elettrico esterno, E_{ext} , induce un potenziale di membrana ΔV_m descritto dall'equazione di Neumann:

$$\Delta V_m = f E_{ext} r \cos\theta \quad (1)$$

dove f è un fattore di forma dipendente da numerose variabili, che descrive l'impatto della cellula sulla distribuzione del campo, stimato essere pari a 1.5 (Kotnik et al., 1997); E_{ext} è il campo elettrico esterno applicato; r il raggio cellulare; θ l'angolo polare rispetto al campo elettrico esterno (Figura 11).

Quando ΔV_m imposto al potenziale transmembrana a riposo supera la soglia permeabilizzazione ΔV_m , si ha la formazione dei pori. Essendo la

membrana a doppio strato una caratteristica comune per le cellule eucariotiche, tale valore soglia risulta simile per vari tipi di cellule, generalmente indicato attorno ai 200-250 mV (Teissie & Rols, 1993).

Dall'equazione (1) si deduce che minore è il raggio della cellula, maggiore deve essere l'intensità del campo per ottenere la permeabilizzazione. Per questo motivo, i campi elettrici necessari per permeabilizzare le cellule di mammifero sono considerevolmente meno intensi di quelli necessari per permeabilizzare, ad esempio, i batteri. Inoltre, risulta chiaro che i mitocondri ed altri organelli cellulari non vengono permeabilizzati all'applicazione di un campo elettrico sufficiente a permeabilizzare la membrana cellulare. Al contrario, usando impulsi estremamente brevi (nell'ordine dei nanosecondi) a voltaggi molto alti, si può ottenere l'elettroporazione degli organelli senza permeabilizzare la membrana cellulare (Schoenbach et al. 2001): questo perché il tempo di applicazione dell'impulso è troppo breve per permettere alla membrana di caricarsi.

Secondo il modello di Neumann il processo di porazione ha inizio poiché, a causa dell'influenza del campo elettrico, gli ioni e le molecole dipolari solubili all'interno delle cellule si orientano nella direzione delle linee di campo. Si genera quindi un accumulo di carica positiva da un lato e negativa nel lato opposto, cui segue un allungamento della cellula lungo l'asse del campo. Questa deformazione ellissoidale provoca una diminuzione del raggio di curvatura della membrana nelle zone perpendicolari al campo. La combinazione di questi effetti altera la struttura dei lipidi, che subiscono un riarrangiamento con la formazione di pori idrofobici conici. Questi pori risultano troppo piccoli per il passaggio di molecole e tendono a riarrangiarsi verso la configurazione nativa. Tuttavia sotto stimoli protratti, i lipidi si ristrutturano e si allargano fino a formare pori idrofilici invertiti (Chernomordik et al., 1992).

La comparsa di quest'ultimi può permettere l'ingresso di macromolecole ma perché queste entrino è necessario che ci sia una forza elettroforetica che spinga le molecole all'interno della cellula. L'effetto elettroforetico consiste nel fatto che il campo elettrico induce un movimento delle molecole di DNA, cariche negativamente, in base alla direzione di applicazione: si sfruttano quindi impulsi particolari di pre-elettroporazione per indurre uno spostamento delle molecole anioniche verso la membrana cellulare (Gehl et al., 2003).

Una volta formatosi il poro esso permarrà per diversi minuti in funzione dei parametri elettrici usati nel protocollo e della temperatura. La creazione del poro non è influente per lo stato di salute della cellula, questo infatti permette sia l'entrata che l'uscita di molecole, soluti che se protratta nel tempo può portare alla morte cellulare.

È necessario quindi raggiungere livelli critici ma sotto soglia attraverso cui molecole possono essere introdotte all'interno della cellula ma senza danneggiarne la vitalità.

1.7.1 Elettroporazione in cuvetta

L'elettroporazione classica si effettua solamente con cellule sospese in un mezzo adatto, all'interno di una cuvetta in cui si inseriscono due elettrodi per la generazione del campo elettrico (Figura 12).

Generalmente la tensione necessaria per provocare la formazione dei pori è nell'ordine dei 100-200 V (Shin et al., 2004), e questo genera un aumento di calore che viene dissipato lentamente, provocando danni anche irreversibili alle cellule. Inoltre generalmente sono utilizzate grandi quantità di materiale, inteso sia come numero di cellule, sia come sostanza da transfettare. L'elevato grado di mortalità che avviene durante un'elettroporazione dev'esser calcolato ai fini sperimentali: questa mortalità è dovuta sia alla formazione dei pori, sia alla creazione di specie ioniche nocive per la cellula come la formazione di ioni Al^{3+} .

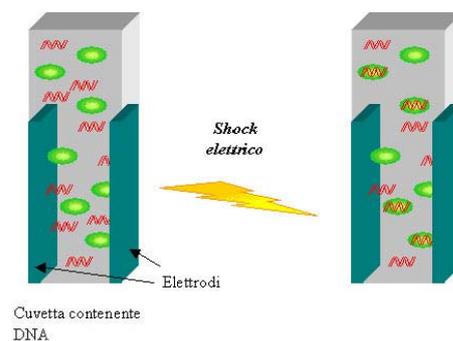


Figura 12: rappresentazione dell'elettroporazione in cuvetta.

Questa tecnica, seppur efficace e forse indispensabile per taluni tipi cellulari, non è esente da problemi in quanto necessita di particolari accorgimenti, come l'uso di un gran numero di cellule e l'impossibilità di

operare in determinati momenti del ciclo cellulare per permettere la differenziazione (ad esempio in colture di neuroni).

1.7.2 Elettroporazione in adesione

L'elettroporazione in adesione è una tecnica innovativa che permette di transfettare selettivamente una cellula in una coltura cellulare. Presenta tutti i vantaggi dell'elettroporazione classica, ma non presenta gli inconvenienti dovuti all'uso di potenziali elevati, sviluppo di specie ioniche dannose alla cellula e spreco di materiali.

L'ordine di grandezza della tensione applicata si aggira sui 2-3 V, decisamente inferiore ai voltaggi applicati in cuvetta, quindi non ci sono sbalzi termici dovuti a tensioni elevate. La vitalità cellulare è decisamente superiore ed inoltre permette la transfezione di cellule differenziate, anche in tempi successivi e sulla stessa coltura.

Tale metodo si avvale dell'utilizzo del sito di stimolazione EOSC tramite il quale è possibile portare la stimolazione a livelli critici che permettono la formazione del poro.

Come già detto la zona di adesione delimita una regione in cui si instaura un'elevata resistenza dovuta al sottile strato tra la cellula ed il substrato. Applicando una variazione di tensione al substrato si crea una corrente che fluisce attraverso l'interfaccia di contatto e lungo la membrana cellulare, generando una differenza di potenziale, sia in giunzione sia intracellulare, e se questo stimolo è abbastanza elevato si va incontro alla formazione di pori.

Questo permette di selezionare una singola cellula, o poche cellule, in coltura. Inoltre la possibilità di non esser dipendenti dallo stato in sospensione permette di utilizzare cellule che necessitino di tempi prolungati di differenziamento. In tal modo è altresì possibile utilizzare la stessa coltura in tempi di maturazione differenti.

resistenza all'ampicillina, è stato gentilmente fornito dal laboratorio del Prof. G. F. Tomaselli (Johns Hopkins University, Baltimore).

- $\beta 2_pLCT1$: il cDNA codificante la subunità accessoria $\beta 2$ del canale $Na_v1.2$ di ratto, clonato nel plasmide di espressione per oociti di *Xenopus laevis* pLCT1 a valle del promotore per la T7 RNA polimerasi e recante il gene per la resistenza alla tetraciclina, è stato gentilmente fornito dal laboratorio del Prof. A. L. Goldin (University of California).
- EC(Y)FP_pIND: le sequenze di cDNA codificanti ECFP (Enhanced Cyan Fluorescent Protein) e EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) clonate nel plasmide pIND, che conferisce ai batteri la resistenza ad ampicillina, sono state fornite dal Dr. P. J. Magalhães (Dipartimento di Scienze Biomediche, Padova).
- pcDNA3.1(-) (Invitrogen): è stato utilizzato per tutti i subclonaggi effettuati in questa tesi (Figura 14). E' un vettore di circa 5.5 Kb che, grazie al promotore CMV a monte del sito di policlonaggio, permette alti livelli di espressione di proteine ricombinanti in cellule di mammifero. Porta il gene lattamasi per la resistenza all'ampicillina in *E. coli*.

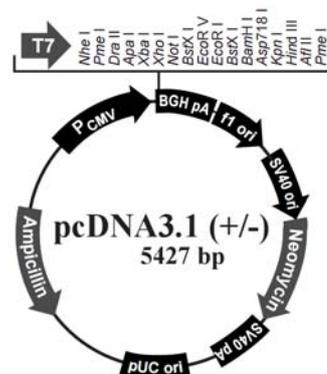


Figura 14: mappa di pcDNA3.1(-)

2.1.2 Ceppi batterici e terreni di coltura

Per tutti i clonaggi effettuati in questa tesi è stato utilizzato il ceppo di *E. coli* MAX Efficiency[®] DH5 α [™] Competent Cells (Invitrogen[™]) [F⁻ $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *phoA supE44 \lambda thi-1 gyrA96 relA1*].

Per la propagazione del plasmide pCDM8 contenente il cDNA per la subunità α rIIA del canale $Nav1.2$ di ratto è stato necessario utilizzare il

ceppo di *E. coli* One Shot[®] TOP10/P3 Competent Cells (Invitrogen[™]) [*F mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*; P3: Kan^R Amp^R (am) Tet^R (am)]. Tale ceppo porta il plasmide P3 in cui i geni che conferiscono le resistenze a tetraciclina e ampicillina sono inattivi durante la normale crescita dei batteri a causa di mutazioni *amber*. Dopo trasformazione di TOP10/P3 con pCDM8, che porta il gene codificante per il soppressore F, il ceppo diventa resistente ai due antibiotici.

Le cellule sono state coltivate in terreno liquido LB (Luria-Bertani, contenente 10g/L di peptone, 5g/L di estratto di lievito, 10g/L di NaCl) (Invitrogen[™]) o in terreno solido LB, addizionato con agar 1% (Sigma-Aldrich Co.). Questi terreni sono stati addizionati con gli opportuni antibiotici a seconda del plasmide che era necessario selezionare (concentrazioni finali: ampicillina 100 μ g/ml, tetraciclina 10 μ g/ml, ampicillina 50 μ g/ml + tetraciclina 15 μ g/ml).

2.1.3 Sequenze degli oligonucleotidi sintetici per la PCR (*primer*)

Sono state progettate sei coppie di *primer forward* e *reverse* per effettuare diversi tipi di amplificazione. La sequenza oligonucleotidica di riferimento per ciascun cDNA è quella riportata nel *database* di GenBank.

Gli oligonucleotidi sono stati progettati tramite l'uso del pacchetto Lasergene (DNASTAR), con lunghezza di almeno 20 bp, percentuale di GC pari a circa il 50% e terminanti al 3' con G o C. Le sequenze tengono conto delle temperature di appaiamento tale da permettere l'uso di temperature che evitino l'amplificazione aspecifica e compatibili con la coppia di *primer*. Sono state inoltre analizzate le caratteristiche degli oligonucleotidi per evitare la formazione di strutture intra- e intermolecolari che potessero diminuire l'efficienza dell'appaiamento con il DNA.

A ciascuna coppia sono state aggiunte al 5' le sequenze di riconoscimento (o "code") per due enzimi di restrizione diversi, al fine di un successivo clonaggio direzionale.

Tutti i *primer* sono stati sintetizzati da Sigma-Genosys.

In tabella 1 vengono riportate le caratteristiche delle coppie di oligonucleotidi utilizzate.

Poiché gli amplificati ottenuti con queste coppie di *primer* sono stati utilizzati per creare varie combinazioni di proteine chimere, solo i *reverse*

con “coda” BamHI sono stati progettati includendo un codone di stop (sottolineato) in posizione 3’ rispetto al sito di restrizione.

Templato	Nome	Sequenza	N° Basi	T _m (°C)	Enzima
ECFP EYFP Fw	W2c	5' CCGAATTCATGGTGAGCAAGGGC 3'	23	74.1	EcoRI
ECFP EYFP Rw	C2c	5' GGGGATCCGGCTACTTGTACAGCTCG 3'	26	75.0	BamHI
β1 Fw	B1Nhe	5' GCGGCTAGCCATGGGGACGCTGCTGGCTCT 3'	30	86.1	NheI
β1 Rw	B1Apa	5' ATCGGGCCCTTCAGCCACCTGGACGC 3'	26	83.2	ApaI
β2 Fw	B2Nhe	5' CGGGCTAGCCATGCACAGGGATGCCTGGCT 3'	30	85.4	NheI
β2 Rw	B2Apa	5' ATCGGGCCCGCGCTTGGCGCCATCTT 3'	26	86.6	ApaI
MCS Fw	FWpc	5' ACTCACTATAGGGAGACCCAAG 3'	22	60.0	
MCS Rw	RWpc	5' CAACAGATGGCTGGCAACTA 3'	20	63.7	

Tabella 1: Coppie di primer usate per l’amplificazione. In grigio sono evidenziati i siti di taglio. Il codone di STOP è sottolineato. **Fw:** forward **Rw:** reverse. **MCS:** multicloning site.

È stata progettata anche una coppia di *primer* sulla sequenza del plasmide pcDNA3.1(-) fiancheggiante il sito di policlonaggio, da utilizzare nel sequenziamento per la verifica dei cloni positivi. Tali oligonucleotidi possiedono una T_m prossima ai 60°C, come richiesto dal servizio sequenziamento di BMR Genomics (Padova).

2.1.4 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

L’amplificazione del templato è stata effettuata in accordo con il protocollo della ditta produttrice. Sono state utilizzate due taq polimerasi differenti: Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen[™]) oppure Expand[™] High Fidelity Taq (Roche Diagnostics).

- Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen[™]): Ogni reazione è stata condotta in un volume di 20 µl utilizzando 100ng del DNA da amplificare, 0.2 µM di *forward* e *reverse primer*, 200 µM di ciascun dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1.5 mM MgCl₂, 1U Platinum[®] Taq DNA Polymerase, in tampone 10x (200mM Tris/HCl, pH 8.4). Le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando un termociclatore PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) impostando il seguente programma:

T _{prNC} : temperatura primer senza	94°C 2'	94°C 2'	T _{prNC} °C 30''	72°C 42''	94°C 2'	T _{prC} °C 30''	72°C 42''	72°C 7'	4°C ∞
			15cicli			15cicli			

“code” recanti il sito di taglio per endonucleasi

T_{prC}: temperatura primer con “code” recanti il sito di taglio per endonucleasi

- Expand™ High Fidelity Taq (Roche Diagnostics): Ogni reazione è stata condotta in un volume di 50 µl utilizzando 15ng del DNA da amplificare, 0.15 µM di *forward* e *reverse primer*, 200 µM di ciascun dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 3U Platinum® Taq DNA Polymerase, in tampone 10x (15 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 20 mM TrisHCl (pH 7,5)). Le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando un termociclatore PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) impostando il seguente programma:

T _{prNC} : temperatura primer senza	94°C 2'	94°C 15''	T _{prNC} °C 30''	72°C 45''	94°C 15''	T _{prC} °C 30''	72°C 45''	72°C 7'	4°C ∞
			10cicli			20cicli			

“code” recanti il sito di taglio per endonucleasi

T_{prC}: temperatura primer con “code” recanti il sito di taglio per endonucleasi

2.1.5 Elettroforesi in gel d'agarosio

La separazione del DNA a doppio filamento è eseguita tramite elettroforesi su gel di agarosio (ultraPURE agarose electrophoresis grade, Gibco-BRL) 1-1.5% in tampone TAE 1x (40 mM Tris/acetato, 1 mM EDTA), in presenza di 0.25 µg/ml bromuro di etidio. Ai campioni da analizzare su gel viene aggiunto un tampone di caricamento Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega) (0.03 % blu di bromofenolo, 0.03% xilene cianolo FF, 0.4% orange G, 15% Ficoll®400, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM EDTA pH8).

Insieme ai campioni da analizzare viene caricato un marcatore di peso molecolare DNA Molecular Weight Marker II (Roche Diagnostics), in quantità pari a 250 ng, 150 ng o 1 µg, e/o Ready-Load™ 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen™).

Il gel, immerso in tampone di corsa (TAE 1x), viene sottoposto ad un campo elettrico di 80 V, per un tempo variabile al fine di ottimizzare la separazione delle bande.

Le concentrazioni di DNA sono stimate confrontando le intensità delle bande incognite con quelle dei marcatori di peso molecolare. A tale valutazione approssimativa si affianca una quantificazione precisa utilizzando lo spettrofotometro DU Series 500 (Beckman Instruments).

L'elettroforesi in gel di agarosio e la quantificazione allo spettrofotometro sono utilizzate anche per la verifica dei risultati (in termini qualitativi e quantitativi) di miniprep, maxiprep e restrizioni.

2.1.6 Estrazione e purificazione del DNA plasmidico da cellule batteriche

- Miniprep.

Il DNA plasmidico è stato ottenuto mediante preparazioni su piccola scala (miniprep, Sambrook *et al.* 1989b) utilizzando il metodo della lisi alcalina.

Partendo dalla coltura satura di *E.coli* in LB addizionato con ampicillina 100µg/ml, i batteri sono raccolti per centrifugazione e risospesi in soluzione A (50 mM glucosio, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8) preparata con 1 mg/ml lisozima (SIGMA) e 0.5mg/ml RNasi A (Qiagen).

La sospensione è incubata 5 min a temperatura ambiente; quindi si aggiunge la soluzione B (0.2 M NaOH, 1% SDS) e dopo altri 5 min la soluzione C (3 M K-acetato, 11,5% acido acetico). Si mescola molto delicatamente ad ogni passaggio per inversione. Dopo 5 min in ghiaccio si elimina il precipitato tramite centrifugazione. Al surnatante, che contiene il DNA plasmidico, è aggiunto 1 volume di isopropanolo e si incuba 5 min a temperatura ambiente. Dopo un'ulteriore passaggio di centrifugazione, il pellet di DNA è lavato in etanolo al 70%, asciugato e risospeso in TE pH 8 (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0).

- Midiprep e maxiprep.

Per ottenere preparazioni di DNA plasmidico su media (midiprep) e grande scala (maxiprep) si utilizzano rispettivamente i kit HiSpeed Plasmid

Midi e HiSpeed Plasmid Maxi (QIAGEN), seguendo le istruzioni fornite dalla ditta.

2.1.7 Restrizione del DNA

Le diverse reazioni di restrizione del DNA sono state eseguite con enzimi Promega nei rispettivi tamponi di reazione. Ogni reazione di restrizione viene condotta in un tampone adeguato, impiegando per ciascun enzima 1 unità per μg di DNA. Le reazioni sono state condotte alla temperatura ottimale dei diversi enzimi (37°C) per 1 ora.

2.1.8 Purificazione dei frammenti di DNA dopo PCR o dopo restrizione

I frammenti di DNA (amplificati ottenuti via PCR o plasmidi linearizzati) vengono separati per elettroforesi su gel di agarosio allo 0.8% (p/v) e, dopo verifica dei pesi molecolari per comparazione con i marcatori, le bande sono escisse dal gel.

Il DNA è recuperato con il kit di estrazione QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), seguendone il protocollo della ditta.

I tamponi provvedono a mantenere un'adeguata concentrazione di sali e un opportuno pH per rendere ottimale prima l'adsorbimento del DNA alla membrana e poi il suo recupero. I frammenti di DNA ottenuti dopo restrizione enzimatica di prodotti di PCR vengono purificati direttamente, senza passaggio in gel di agarosio, utilizzando il QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Entrambi i kit permettono la purificazione di DNA da circa 100 bp a 10 Kb.

2.1.9 Ligazione di frammenti di DNA

Per le reazioni di ligazione è stato usato un eccesso di inserto, nella fattispecie il rapporto molare inserto/vettore adottato è 3:1, per favorire la formazione di legami intermolecolari (inserto-vettore).

In questo caso la ligazione è stata effettuata con 50 ng di vettore in un tampone che contiene 10X che contiene 300 mM Tris-HCl (pH 7.8), 100

mM MgCl₂, 100 mM DTT e 10 mM ATP, in un volume finale di 10 µl o 20 µl in H₂O sterile.

La miscela è incubata per 16 ore a 16°C in presenza di T4 ligasi (Promega). La soluzione madre dell'enzima ha la concentrazione di 3u/µl in un tampone contenente 10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% glicerolo.

2.1.10 Trasformazione delle cellule batteriche

Per la trasformazione delle cellule batteriche è stato seguito il metodo dello shock termico (Sambrook *et al.* 1989a), che prevede che a 50 µl di cellule competenti siano aggiunti 25 ng di plasmide con l'inserto.

Le cellule sono incubate in ghiaccio per 30 min; poi subiscono uno shock termico a 42°C per 90 sec, si aggiungono sterilmente 900 µl di LB e si lascia a 37° C per 1 h.

Si effettuano due piastramenti su piastre con LB-agar addizionato, a seconda del tipo di cellule trasformate, con l'opportuno antibiotico per la selezione delle colonie che hanno assunto il plasmide.

Per il primo piastramento si utilizzano 1/10 della coltura, per il secondo i rimanenti 9/10 (previa concentrazione per centrifugazione).

2.1.11 Verifica delle ligazioni via restrizione o PCR

Lo *screening* della ligazione viene effettuato in due modi alternativi:

- Miniprep e restrizione: tramite una miniprep viene preparato il DNA plasmidico da colonie batteriche e successivamente viene sottoposto ad una opportuna reazione di restrizione enzimatica in modo da "liberare" l'inserto.

La presenza dell'inserto dal peso molecolare atteso viene verificata attraverso una corsa elettroforetica del prodotto della restrizione: cloni positivi (recanti l'inserto) daranno origine a due bande, corrispondenti al plasmide linearizzato e all'inserto; cloni negativi (privi dell'inserto) migreranno come un'unica banda che rappresenta il plasmide linearizzato.

- PCR da batteri: le colonie batteriche ottenute dopo trasformazione con il prodotto della ligazione vengono prelevate singolarmente e utilizzate come template per una PCR condotta con i *primer* precedentemente utilizzati per amplificare l'inserto.

La mix della reazione viene poi caricata su un gel di agarosio e si verifica il corretto peso molecolare delle bande ottenute.

2.1.12 Sequenziamento del DNA

Tutti i prodotti di PCR e i plasmidi con inserto ottenuti dopo ligazione vengono sequenziati per accertare l'assenza di mutazioni puntiformi.

Per il sequenziamento ci si affida al Sequencing Core presso BMR Genomics (Padova).

2.1.13 Conservazione dei cloni a -80°C

I batteri trasformati con il prodotto di una specifica ligazione o con un plasmide vuoto possono essere conservati a -80°C .

Si esegue un preinoculo di batteri trasformati in 2 ml di LB/Ampicillina sterile fatto crescere a 37°C per tutta la notte a 180 rpm. Si precipitano i batteri in microcentrifuga alla massima velocità per 5'; dopo aver eliminato il surnatante, il precipitato batterico viene risospeso in 1 ml di LB/Ampicillina (addizionato con 20% glicerolo e sterilizzato per filtrazione) e si conserva a -80°C .

2.2 Biologia Cellulare

2.2.1 Soluzioni sterili

PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7.4: 137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.0 mM Na_2HPO_4 , 2.0 mM KH_2PO_4

VERSENE, pH 7.2, 9.0 g/l NaCl, 0.2 g/l EGTA

TRIPSINA-EDTA, (Sigma-Aldrich Co.), in versene, 0.25 g/l tripsina
0.02 g/l EDTA·4Na

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), (Sigma-Aldrich Co)

Papaina, (Sigma-Aldrich Co.) in versene, 2.50 u/ml papaina, 0.25 mg/ml
BSA

Poli L-Lisina, 30-70 kDa (Sigma-Aldrich Co.), in PBS pH9.7, 10 µg/ml

Buffer1, pH 7.4, KCl 4.0 mM, MgCl₂ 10.0 mM, Na₂HPO₄
82.2mM, NaH₂PO₄ 37.8mM

Soluzioni per immnufluorescenza

Soluzione di permeabilizzazione (PS), 0.1% Triton X-100 in PBS

Soluzione di lavaggio (PBT), 0.1% Tween-20 in PBS

Soluzione di bloccaggio (BS), 1% BSA(Albumina di Siero Bovino) in BS

Mowiol[®] 4-88 (Sigma-Aldrich Co.) soluzione di polivinil alcool per il
montaggio dei addizionato di PDD (1,4 Phenylene Diamine Dihydro
chloride) per preservare i fluorofori a lungo termine.

2.2.2 Terreni di coltura

Dulbecco's Modified Eagle Media, D-MEM, (GIBCO[®]) con
GlutaMAX[™], privo di sodio piruvato, 10% FBS, 1 u/ml penicillina, 1 µg/ml
streptomicina

F-12 Nutrient Mixtures (Ham), (GIBCO[®]), (addizionato di glutammina),
10% FBS (Foetal Bovine Serum - GIBCO[®]), 10 u/ml penicillina, 10 µg/ml
streptomicina (Invitrogen[™]).

Leibovitz's L-15 Media, (GIBCO[®]), L15, 5% FBS

Neurobasale I, Neurobasal™ Medium (GIBCO®), , 1% FBS, 1% GlutaMAX™-1 (GIBCO®), 2% B-27 (GIBCO®), Serum-free Supplement (50X)

Neurobasale II, Neurobasal™ Medium, 2% B-27 Serum-free supplement (50X)

2.2.3 Anticorpi e marcatori cellulari

AntiNav1.2 (Research Diagnostic, Inc.) primario, monoclonale sviluppato in topo, 2 µg/ml in BS, epitopo C-ter intracellulare della subunità α

AntiCNT1 (BD Biosciences) primario, monoclonale sviluppato in topo, 0.83 µg/ml in BS, epitopo N-ter di contattino-1 umana

Anti β 2 (Alomone Labs) primario, policlonale sviluppato in coniglio, 20.83 µg/ml in BS, epitopo C-ter intracellulare di subunità β 2

Antimouse-TRITC (Sigma-Aldrich, Co.) secondario, policlonale sviluppato in capra, epitopo IgG-Fc, coniugato TRITC, 1:150 in BS, $\lambda_{\max} = 552$ nm, emissione $\lambda_{\max} = 577$ nm

Antimouse-FITC (Sigma-Aldrich, Co.) secondario, policlonale sviluppato in capra, epitopo IgG-Fc, coniugato FITC, 1:150 in BS, $\lambda_{\max} = 495$ nm, emissione $\lambda_{\max} = 518$ nm

Antimouse-Alexa568 (Molecular Probes™) secondario, policlonale sviluppato in capra, epitopo IgG-Fc, coniugato Alexa568, 1:300 in BS, $\lambda_{\max} = 577$ nm, emissione $\lambda_{\max} = 604$ nm

Antimouse-Alexa514 (Molecular Probes™) secondario, policlonale sviluppato in capra, epitopo IgG-Fc, coniugato Alexa514, 1:300 in BS, $\lambda_{\max} = 518$ nm, emissione $\lambda_{\max} = 542$ nm

FM® 1-43 (Molecular Probes™) colorante per membrana plasmatica, 5µg/ml in HBSS, $\lambda_{\max} = 479$ nm, emissione $\lambda_{\max} = 598$ nm

Trypan Blue (Sigma-Aldrich Co.) colorante vitale, MW 891.8 Da, in Buffer1 0.08% (v/v)

Falloidina Alexa568 (Molecular Probes™), marcatore del citoscheletro, MW 1590 Da, in Buffer1 0.8 U

2.3 Colture Cellulari

2.3.1 Linea cellulare

Mantenimento e tripsinizzazione.

Si utilizza la linea cellulare CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*) fornita dalla Dr.ssa Manuela Zaccolo (Department of Biochemistry and Pharmacology, Glasgow). Questa linea stabilizzata, derivante da cellule di ovario di *Cricetulus griseus* le quali presentano morfologia epiteliale, è stata scelta in virtù della buona resa in termini di efficienza di transfezione e proprietà adesive sui supporti per biologia cellulare più diffusi.

Le cellule vengono mantenute in coltura su fiasche con superficie di 25 cm² (BD Falcon™) nel terreno nutritivo completo, in incubatore a temperatura controllata di 37°C e concentrazione di CO₂ di 5% (v/v), e rinfrescate al raggiungimento della confluenza tramite trispinizzazione (Freshney, 2000).

Il terreno viene rimosso e la coltura viene lavata con PBS al fine di eliminare eventuali tracce di siero che potrebbero inibire la tripsina. Le cellule vengono staccate dal supporto tramite azione enzimatica con tripsina-EDTA, a 37°C per 1' (quest'ultima viene inattivata tramite l'aggiunta di terreno). Le cellule così raccolte vengono fatte precipitare tramite centrifugazione e riseminate, previa conta, in una fiasca nuova alla densità di circa 20000 cellule/cm². Le cellule vengono mantenute fino al 25° passaggio, dopo il quale ne vengono scongelate di nuove al fine di evitare mutazioni che possono insorgere con il tempo.

2.3.2 Congelamento delle cellule

Durante il mantenimento di una linea cellulare vengono prelevate aliquote, contenenti circa 10^6 cellule, al fine di congelarle. Questo permette di avere virtualmente cloni cellulari in uso sempre allo stesso stadio in termini temporali. Il congelamento delle cellule viene effettuato solamente nei primi passaggi quando una coltura è relativamente “giovane”.

Il congelamento avviene in FBS al 5% di DMSO (Dimetil solfossido, agente di crioprotezione) tramite l'utilizzo del “*cryostep*” il quale è un contenitore che permette un abbassamento graduale della temperatura ($1^\circ\text{C}/\text{minuto}$) (Freshney, 2000).

Le cellule possono essere conservate per lunghi periodi (10-12 mesi) a -80°C , mentre per una conservazione di anni occorre utilizzare strumenti particolari che utilizzano azoto liquido per mantenere le cellule in uno stato di ibernazione.

2.3.3 Scongelo delle cellule

Al momento dell'uso le cellule conservate a -80°C vengono scongelate tramite bagno termostato a 37°C . Per eliminare il DMSO, tossico per le cellule, viene aggiunto del terreno di coltura e le cellule vengono precipitate tramite centrifugazione. Quest'ultime vengono risospese in terreno fresco, seminate in fiasche e mantenute in incubatore.

Il giorno successivo allo scongelamento viene rinfrescato il terreno al fine di eliminare eventuali tracce di DMSO e di cellule morte che possono inficiare la salute della coltura.

2.3.4 Preparazione di colture primarie di neuroni

Le colture primarie di neuroni sono state estratte da embrioni al 18 giorno di gestazione da ratti del ceppo Wistar (modificato da Vassanelli & Fromherz, 1997).

Una volta sacrificato il ratto si procede all'estrazione degli embrioni ed all'isolamento degli ippocampi in HBSS, i quali vengono successivamente dissociati enzimaticamente tramite l'uso di tripsina allo 0.08% per 20' a 37°C . L'azione della tripsina viene inibita dall'aggiunta di DMEM nel quale

si esegue la dissociazione meccanica tramite pipetta. I neuroni vengono quindi raccolti tramite centrifugazione a 600 g per 10'.

Si esegue un *pre-plating* di 1-2 h a 37°C al fine di eliminare la maggior parte delle cellule gliali. Il surnatante viene raccolto e centrifugato per raccogliere i neuroni, dopodiché si procede alla piastratura su vetrini, o chip, precedentemente funzionalizzati con poli L-lisina. Si seminano 100000 neuroni/cm² in terreno L-15 e si lascia in incubatore per 3 h.

Infine il terreno viene completamente sostituito con Neurobasale-I il quale verrà rinfrescato totalmente con terreno di mantenimento Neurobasale-II.

2.4 Supporti di coltura per cellule

2.4.1 Vetrini

Le cellule vengono seminate su vetrini per condurre gli esperimenti di transfezione, ed immunofluorescenza.

I vetrini in borosilicato utilizzati hanno un diametro variabile tra 12 e 25 mm e spessore di 145 µm, e devono esser sterilizzati e puliti prima dell'uso.

Attraverso cicli di sonicazione in etanolo assoluto, vengono eliminate le impurità, dopodiché i vetrini vengono fatti asciugare attraverso il flusso sterile di cappe per biologia cellulare e posti in capsule petri (BD Falcon™) da 35 mm di diametro o multipozzetto.

2.4.2 Chip

I chip vengono puliti tramite trattamento con una soluzione all'1% di Tickopur (DR H Stamm) R33 a 50°C. Si utilizza un bastoncino cotonato per lavare in modo meccanico la superficie, in presenza della soluzione, con movimenti rotatori senza premere la delicata superficie dove risiedono i transistor.

Vengono quindi lavati abbondantemente con acqua deionizzata al fine di eliminare eventuali tracce del detergente. La sterilizzazione avviene tramite alcool etilico al 70% per 1 h, quest'ultimo viene rimosso ed il chip viene fatto asciugare sotto il flusso sterile della cappa.

2.4.3 Rivestimento dei vetrini

I vetrini vengono puliti e sterilizzati, dopodiché si procede ad una funzionalizzazione aspecifica del supporto mediante trattamento con proteine solubilizzate:

Human Tenascin C (Chemicon International) 10 µg/ml in PBS;

Recombinant Human Contactin1/Fc Chimera (R&D Systems, Inc.) 10 µg/ml in PBS/0.2% BSA.

Il protocollo di rivestimento prevede una incubazione *overnight* a 37°C, successivamente vengono eseguiti 2 lavaggi con PBS ed infine un lavaggio con HBSS (modificato da Gotz *et al.*, 1996).

Vengono trattati allo stesso modo anche i chip.

2.5 Transfezione transiente in adesione

Sono stati utilizzati due metodi diversi per veicolare all'interno delle cellule il DNA plasmidico.

Per la linea cellulare CHO-K1 è stato scelto l'Arrest-In™ (Open Biosystems), costituito da poli-etilenimina, in quanto offre, per questo tipo cellulare, efficienze di transfezione prossime al 70%. Il protocollo della ditta produttrice è stato modificato al fine di ottimizzare la quantità di DNA, il volume dell'agente transfettante e del tempo d'incubazione. Brevemente si procede all'esposizione delle cellule con una mix contenente 1 µg di DNA (rapporto Arrest-in:DNA pari a 2.5:1) per 3 h a 37° C, previa incubazione di 10' della mix. Successivamente il terreno viene sostituito con terreno fresco. La transfezione avviene in adesione con cellule al 70% di confluenza.

Le colture primarie di neuroni di ippocampo di ratto sono state transfettate con Lipofectamine 2000™ (Invitrogen Co.), costituito da liposomi cationici, in quanto offre un'alta resa in termini di cellule transfettate e una bassa tossicità. Il protocollo utilizzato prevede un rapporto 1:1 (µg DNA : µl Lipofectamine) e un'incubazione di 20' a temperatura ambiente della mix, successivamente viene aggiunta al terreno di coltura con un tempo di esposizione di 3 ore, al termine del quale viene completamente sostituito con terreno fresco.

In entrambi i casi la quantità di DNA utilizzata è stata di 1 µg.

2.6 Immunofluorescenza

Al fine di ridurre cambiamenti morfologici dovuti a shock termici e osmotici, sono stati ottimizzati i protocolli di fissazione e di immunostaining. Allo scopo le cellule vengono lavate con PBS (riscaldato a 37°C) e fissate per 10' con una soluzione di formaldeide al 4%, in PBS a 37°C, preparata al momento. Vengono eseguiti dei lavaggi successivi con PBS per eliminare eventuali tracce di formaldeide.

Il preparato viene poi lavato 2 volte con PBT per 5' e permeabilizzato con PS per 5'. Viene eseguito un blocco dei siti aspecifici tramite esposizione a BS per 30', quindi viene aggiunto l'anticorpo primario, opportunamente diluito in BS, per un tempo massimo di 3-4 h a temperatura ambiente. Si eseguono 3 lavaggi con PBT per 5' e un secondo bloccaggio con BS per 30'. Si aggiunge l'anticorpo secondario, opportunamente diluito in BS, per un tempo massimo di 2 h a temperatura ambiente. Infine si eseguono 4 lavaggi con PBT per 5'.

Il vetrino può essere utilizzato per microscopia classica e quindi venire montato su di un portaoggetto utilizzando come mezzo di montaggio il mowiol, oppure messo nella camera ATTOFLUOR (Invitrogen Co.) per l'osservazione in TIRF.

2.7 Strumenti

2.7.1 Microscopia

L'analisi della corretta espressione delle chimere fluorescenti è stata effettuata in primo luogo tramite un microscopio Olympus (BX51WI). Tale microscopio è corredato di obiettivi apoplanari ad immersione in acqua 10X/0.30 w UMPlanFI, 40X/0.80 w LUMPlanFI, ed in immersione di olio 63X/1.25 Oil della Leica. Il microscopio è munito di filtri passa banda atti alla visualizzazione delle proteine fluorescenti ECFP, EYFP e dei fluorofori Alexa568.

Con tale apparecchiatura si è proceduto alla visualizzazione di preparati montati su vetro e chip di silicio.

La tecnica TIRF in epifluorescenza prevede l'utilizzo di un microscopio invertito Nikon TE2000. Tale microscopio è fornito di obiettivi 20X/0.75

PlanApo DIC, 60X/1.45 PlanApo TIRF oil e di filtri per la visualizzazione delle proteine fluorescenti ECFP, EYFP ed Alexa568. Il sistema è corredato da una camera di acquisizione Nikon2MPb/w e del software NIS Advanced Research Edition E' GIUSTA QUESTA PAROLA? prodotto da Nikon.

2.7.2 Apparato di elettroporazione

La stimolazione dei siti EOSC presenti nei chip è stata effettuata tramite un amplificatore, una scheda montante l'alloggio del chip e un programma per gestire la forma d'onda, la durata dell'impulso e la differenza di potenziale applicata.

Il sistema risulta composto da un'interfaccia PCI (National Instruments), di modello PCI E Series 6071, munita di 64 canali analogici in ingresso, 8 canali digitali e 2 canali analogici in uscita (DAC). Essa è gestita dal software Strathclyde Electrophysiology Software WinWCP (prodotto dal laboratorio di John Dempster), che permette di imporre opportuni protocolli di stimolazione in uscita al canale DAC1.

Il segnale così ottenuto viene imposto a ciascun sito di stimolazione selezionando manualmente il corrispondente contatto su una scheda in vetronite su cui viene montato il supporto per il chip (Figura 15).

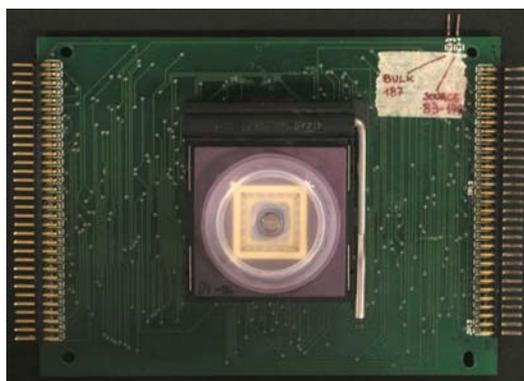


Figura 15: Fotografia del supporto per il chip.

2.7.3 Protocolli di elettroporazione

Le cellule cresciute su chip vengono lavate con buffer1 a 37°C, e successivamente viene aggiunto una soluzione di buffer1 contenente la molecola da veicolare. Eseguito lo stimolo, la soluzione viene mantenuta

per 5' a 37°C ed infine lavata con PBS a 37°C per l'osservazione diretta al microscopio. Nel caso di plasmidi il buffer1 viene rimosso totalmente e aggiunto del mezzo fresco.

2.7.4 Impulsi di elettroporazione

Tutti gli impulsi ad onda quadra vengono disegnati tramite il software WinWCP ed hanno una durata che varia da 500 ms a 1000 ms.

Le forme d'onda utilizzate per veicolare le molecole, in linee cellulari, sono costituite da onde a dente di sega con ampiezza di ± 3 V.

Gli impulsi sinusoidali vengono disegnati e generati tramite un generatore di impulsi, hanno una durata che varia da 100 ms a 1000 ms ed una ampiezza di ± 3 V; vengono utilizzati per veicolare molecole all'interno di colture primarie.

CAPITOLO 3

3. Scopo tesi

Il presente lavoro è stato svolto all'interno del progetto europeo "NaChip: development of a neuron-semiconductor interface with recombinant sodium channels" (IST-2001-38915).

Lo scopo del progetto verte alla realizzazione di un'interfaccia tra una rete neuronale e un microchip di silicio per poter monitorare i segnali che si generano all'interno della rete tramite metodi non invasivi. L'utilizzo di un microchip permetterebbe il monitoraggio sia della singola cellula, all'interno di una più vasta rete neuronale, sia di più cellule contemporaneamente senza comprometterne la salute. Lo stato dell'arte attuale permette la registrazione del segnale derivante solamente da una singola cellula o da due, tramite un *double patch*.

Il microchip è stato studiato per avere due file parallele contenenti, a seconda del disegno, 60 o 64 siti per la registrazione intervallati a siti per la stimolazione.

È stato scelto di utilizzare, come siti sensibili, delle strutture a transistor integrate sul chip, allo scopo di poter registrare i segnali derivanti da una singola cellula. Il segnale rilevabile dall'area sensibile del transistor consiste nel potenziale elettrico che si genera nella regione di adesione della cellula al substrato, dovuto al flusso di ioni attraverso i canali e dalla resistenza offerta dall'elettrolita nella regione d'interfaccia.

Il segnale che si genera nell'interfaccia, dell'ordine dei 100-1000 μV , ed il rumore elettrico intrinseco del dispositivo (50-200 μV), rende critica la rilevazione extracellulare istantanea del singolo potenziale d'azione, evidenziando così la necessità di un miglioramento del rapporto segnale/rumore.

Nell'ambito del progetto il compito dell'ottimizzazione delle componenti elettroniche al fine di ottenere dei transistor con rumori di lettura più bassi, è stato perseguito dal gruppo del Max Plank Institute for Membrane and Neurophysics diretto dal prof. P. Fromherz (coordinatore del progetto), mentre nello specifico il ruolo rivestito dal laboratorio situato presso il Dipartimento di Fisiologia Umana dell'Università di Padova è stato quello

di investigare la possibilità di incrementare il segnale nell'interfaccia neurone-transistor tramite l'interazione tra due subunità accessorie del canale del sodio voltaggio-dipendente $Na_v1.2$ e alcune proteine di adesione.

È noto in letteratura che le subunità accessorie $\beta1$ e $\beta2$ interagiscono rispettivamente con la proteina CAM contattina-1 (CNT1) e con la proteina di matrice extracellulare tenascina-C (TNC), e svolgono il ruolo di ancoraggio dei canali del sodio in determinati distretti della membrana plasmatica, fungendo da elemento di collegamento tra proteine extracellulari e strutture citoscheletriche.

Perciò, tramite il rivestimento dell'area di crescita delle colture cellulari con proteine in grado di legare le subunità accessorie, è stato ipotizzato di ottenere come risultato complessivo un incremento di canali del sodio nella regione della membrana plasmatica adesa al substrato e, quindi, del segnale individuabile dai transistor.

All'interno di questo lavoro, svolto con la collaborazione dei dr. Marco Dal Maschio, Marta Maschietto e Michele Scorzeto, è nata l'esigenza di poter transfettare una singola cellula in adesione sovrastante la zona di registrazione.

L'uso dei comuni metodi di transfezione rende impossibile transfettare una singola cellula in quanto la casistica di poter ottenere una cellula transfettata al di sopra del sito di registrazione è molto bassa. Si è quindi rivolta l'attenzione alla possibilità di utilizzare il sito di stimolazione come sito per introdurre materiale esogeno all'interno della singola cellula.

Il lavoro presentato in questa tesi si articola su più punti: il primo verte sulla creazione delle proteine chimeriche fluorescenti per le subunità $\beta1$ e $\beta2$; il secondo sulla caratterizzazione dell'espressione di tali proteine nelle cellule in esame e sullo studio dell'utilizzo delle chimere per un indirizzamento del canale tramite rivestimenti proteici; il terzo sulla messa a punto di una tecnica di transfezione selettiva per cellule in adesione, in grado di transfettare una singola cellula in coltura.

3.1 Risultati

3.1.2 Segnale extracellulare neuroni ippocampo

La registrazione di segnali extracellulari è stata eseguita su neuroni di ippocampo di ratto E18 al 6°-7° DIV per evitare una proliferazione massiccia di cellule gliali. Sono state eseguite registrazioni di neuroni *wild type* per saggiare la qualità del segnale, e anche perché l'efficienza di transfezione dei comuni metodi è prossima al 30% e quindi insufficiente al fine di trovare per probabilità un neurone transfettato sopra la linea dei FET.

Per procedere ad una registrazione dei segnali extracellulari si procede ad una taratura degli EOSFET, dopodiché, con la tecnica del *voltage clamp*, si applica un protocollo definito per la caratterizzazione del processo di attivazione. Tale metodica prevede che dopo aver impostato il potenziale intracellulare ad un livello di *holding* pari -90 mV, venga applicata una sequenza di impulsi depolarizzanti di ampiezza crescente a passi di 5 mV e della durata di 50 ms, fino ad un'ampiezza massima di 160 mV.

La registrazione del segnale extracellulare è fortemente influenzata dalla qualità della configurazione di registrazione ottenuta con il *voltage clamp*. In presenza di un tipo di accesso non ideale, ovvero con prolungati transienti di carica della membrana dovuti a resistenze molto elevate, le prestazioni del controllo del potenziale intracellulare non risultano ottimali, e quindi le depolarizzazioni della membrana sono lontane da essere transizioni idealmente istantanee. Questo si riflette nelle cinetiche di attivazione del canale che induce una sistematica riduzione dell'intensità del canale.

Allo stato attuale, benché si riesca ad ottenere un riconoscimento chiaro di quando i canali si aprono generando un flusso ionico, non è possibile caratterizzare, con il solo segnale extracellulare, i processi di attivazione del canale (figura 16).

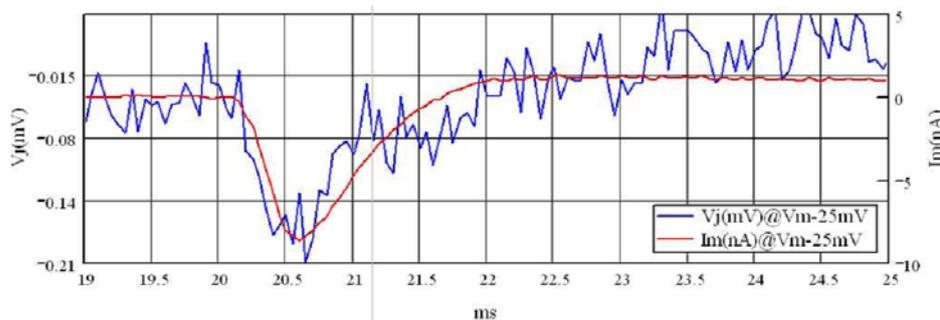


Figura 16: Segnale extracellulare registrato (blu) e segnale della corrente complessiva di membrana (rosso).

Al fine di aumentare questo rapporto segnale/rumore si è cercato di ricorrere all'addensamento del canale dovuto ad un *targeting* mirato, nella zona di contatto, delle subunità accessorie e con esse di conseguenza la subunità principale α .

3.2 Ingegnerizzazione delle subunità β

Una strategia per aumentare il rapporto segnale/rumore è quella di aumentare il numero di canali che risiedono nella zona di interfaccia tra cellula e substrato, tramite le interazioni che avvengono tra $\beta 1$ e $\beta 2$ ed i rivestimenti proteici.

A tale scopo sono state utilizzate le subunità accessorie del canale per creare delle chimere con proteine fluorescenti (EYFP e ECFP), con le quali è stato possibile valutare le interazioni delle chimere con i rivestimenti proteici di CNT1 e TNC. Tale strategia permette, rispetto all'immunofluorescenza, una visualizzazione diretta dell'espressione delle chimere.

Le subunità sono state entrambe clonate nel plasmide pcDNA3.1(-) ad alta espressione per cellule di mammifero. Questo ha permesso di costruire dei *primer* aventi, per entrambe le subunità, dei siti di restrizione comuni e poter quindi operare in parallelo.

Le subunità $\beta 1$, derivante dal vettore GWH1, e $\beta 2$, derivante dal vettore PLCT1, sono state subclonate in pcDNA3.1(-) tramite l'inserzione dei siti di restrizione per NheI al C-terminale e ApaI all'N-terminale. Le fusioni con le proteine fluorescenti sono state effettuate subclonando EYFP e ECFP dal vettore pIND, ed inserendole nel pcDNA3.1(-) $\beta 1/2$ tramite il sito per EcoRI al C-terminale e BamHI all'N-terminale (Figura 17).

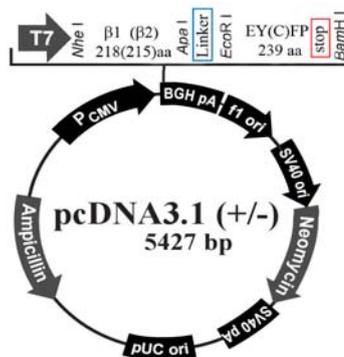


Figura 17: Schema del clonaggio per la creazione delle chimere tra $\beta 1/\beta 2$ e le proteine EYFP/ECFP nel plasmide pcDNA3.1(-). Sono segnati in rosso il codone di stop ed in blu il linker tra le due parti della chimera.

Prima del sito di taglio per BamHI è stato inserito un codone di stop in modo da terminare la traduzione della chimera, inoltre è stata inserita una sequenza *linker* tra le subunità del canale e le proteine fluorescenti.

Entrambe le proteine accessorie sono state fuse sia con la EYFP che con la ECFP, per permettere la coespressione delle chimere ed anche per permettere eventuali utilizzi con gli stessi fluorofori.

Inoltre, per controllare l'efficienza di veicolazione del plasmide con differenti metodi di transfezione in cellule neuronali, si sono subclonate le sequenze di cDNA codificanti EYFP/ECFP in pcDNA3.1(-).

I cloni batterici derivanti dalle trasformazioni sono stati controllati per verificare che la ligazione sia avvenuta con successo. Allo scopo si sono adottati due metodi, il primo prevede l'amplificazione del costrutto via PCR (Figura 18), il secondo l'uso di enzimi di restrizione del plasmide derivante dalle singole miniprep (Figura 19).

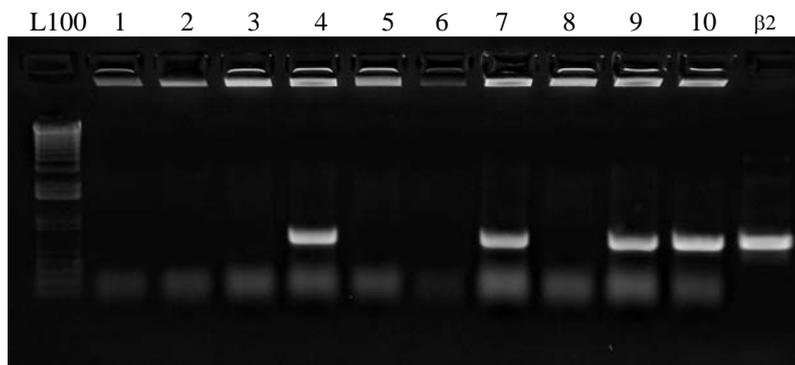


Figura 18: PCR di $\beta 2$ per verificare la presenza della chimera $\beta 2$ ECFP. 1-10: campioni, L100: Ready-Load 1 Kb Plus Ladder, $\beta 2$: controllo positivo.

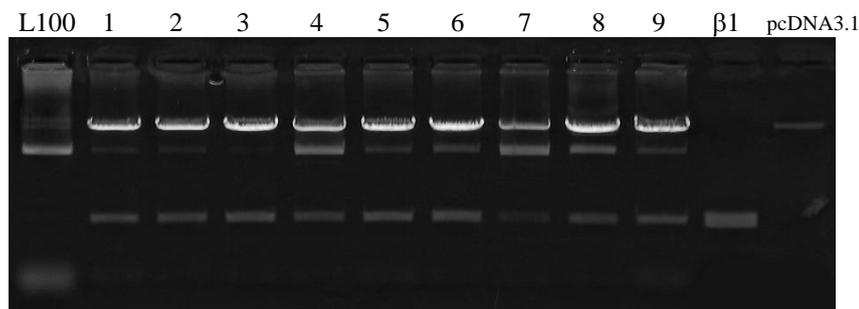


Figura 19: Restrizione di $\beta 1$ con NheI/ApaI per verificare la presenza della chimera $\beta 1$ EYFP. L100: Ready-Load 1 Kb Plus Ladder, 1-9: campioni, b1: controllo positivo, pcDNA3.1(-): plasmide linearizzato NheI/ApaI controllo positivo.

I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati per controllare l'assenza di eventuali mutazioni puntiformi, come descritto nella sezione "Materiali e Metodi".

3.3 Analisi dell'espressione delle chimere

L'espressione delle subunità fluorescenti è stata effettuata in neuroni al 6°- 8° DIV utilizzando come agente transfettante Lipofectamine 2000. Le transfezioni sono state effettuate come riportato in materiali e metodi, ed analizzate dopo 24h.

L'analisi al microscopio è stata effettuata utilizzando sia tecniche di microscopia ad epifluorescenza classica, sia con la tecnica TIRF. L'analisi al confocale risulta poco utile in quanto il sezionamento ottico non permette una buona visualizzazione della membrana.

Attraverso la tecnica TIRF è possibile eccitare solamente i fluorofori che risiedono nei 200 nm (a partire dal substrato di crescita) in cui si crea l'onda evanescente dovuta ad una riflessione totale della luce incidente il vetrino. Questo permette di ottenere delle immagini con un elevato rapporto segnale/rumore e di evidenziare solamente la membrana adesa al substrato, eliminando tutte le componenti che risiedono al di sopra di 200 nm.

3.3.1 Espressione della β 1Y

Da una prima analisi risulta evidente come la sovraespressione della β 1Y (Figura 21) venga ben tollerata dai neuroni di ippocampo di ratto, in confronto all'espressione della EYFP (Figura 20).

Si può notare come neuroni transfettati con la sola proteina fluorescente presentino la morfologia attesa, in cui si nota una preponderanza della proteina nel citoplasma, con una più bassa concentrazione nei processi dendritici. Le immagini risultano sovraesposte per la massiccia presenza della EYFP nel soma della cellula rispetto ai prolungamenti: questo fa sì che sia visibile un corpo cellulare estremamente luminoso, contro un branching dendritico meno contrastato (Figura 20).

L'espressione della β 1Y non comporta dei cambiamenti morfologici cospicui; si riscontrano però degli accumuli a livello del corpo cellulare, presumibilmente nel reticolo endoplasmatico. La presenza della β 1Y si nota anche a livello membranale, soprattutto utilizzando come tecnica di microscopia la TIRF.

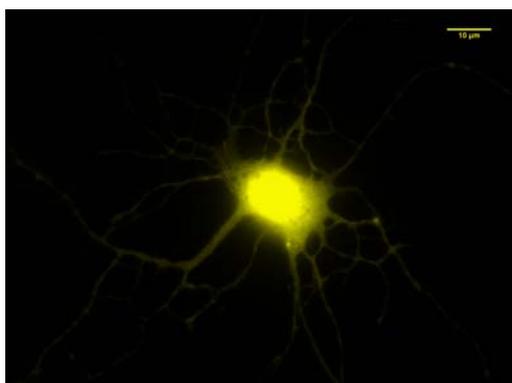


Figura 20: Espressione della proteina fluorescente EYFP in neuroni di ippocampo di ratto DIV 7.

Tramite questa tecnica si evince che la $\beta 1Y$ viene correttamente espressa e che si ritrova localizzata a livello della membrana plasmatica ma con un evidente eccesso sotto forma di *cluster* a livello del soma cellulare, e più precisamente sembra risiedere nel reticolo (Figura 21).

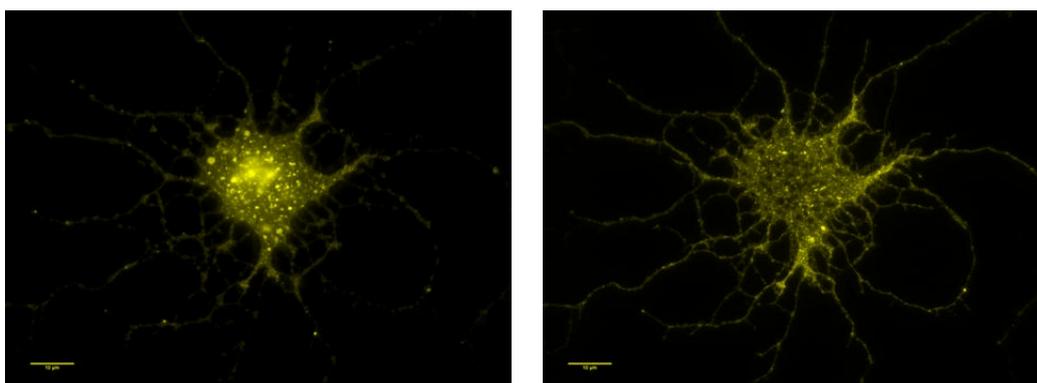


Figura 21: a sinistra immagine in epifluorescenza dell'espressione della $\beta 1Y$ in neuroni di ippocampo di ratto DIV 7. A destra immagine dello stesso piano focale con tecnica TIRF.

L'analisi elettrofisiologia, attraverso la tecnica del *voltage clamp*, è stata utilizzata per analizzare la voltaggio dipendenza del canale del sodio ed eventuali implicazioni nella sovraespressione della $\beta 1Y$.

La subunità sembra esser coinvolta in uno *shift* significativo dei potenziali di gating del canale verso potenziali di membrana più negativi di circa 10 mV rispetto alla condizione di controllo.

A questo spostamento significativo in termini di voltaggio dipendenza della curva di attivazione, si accompagna un leggero incremento dei valori medi della conduttanza specifica normalizzata alla capacità della cellula, anche se non con scostamenti significativi.

3.3.2 Espressione della $\beta 2Y$

L'espressione della subunità accessoria del canale $\beta 2Y$ è stata confrontata anch'essa con l'espressione della proteina fluorescente EYFP, rilevando importanti modifiche a livello morfologico.

Neuroni sovraesprimenti la chimera non presentano accumuli significativi a livello del soma cellulare, ma si nota una netta localizzazione a livello della membrana plasmatica, in controtendenza rispetto alla subunità $\beta 1Y$ che viene ritenuta maggiormente nel soma.

Ad un primo esame si assiste ad un significativo aumento del *branching* dendritico rispetto a neuroni *wild type* allo stesso stadio di differenziamento. Questo aumento è accompagnato da una spiccata presenza di protrusioni, simili a spine, nei dendriti. L'area totale del neurone appare aumentata nettamente rispetto alla condizione di controllo, con una numerosità e lunghezza sensibilmente maggiore.

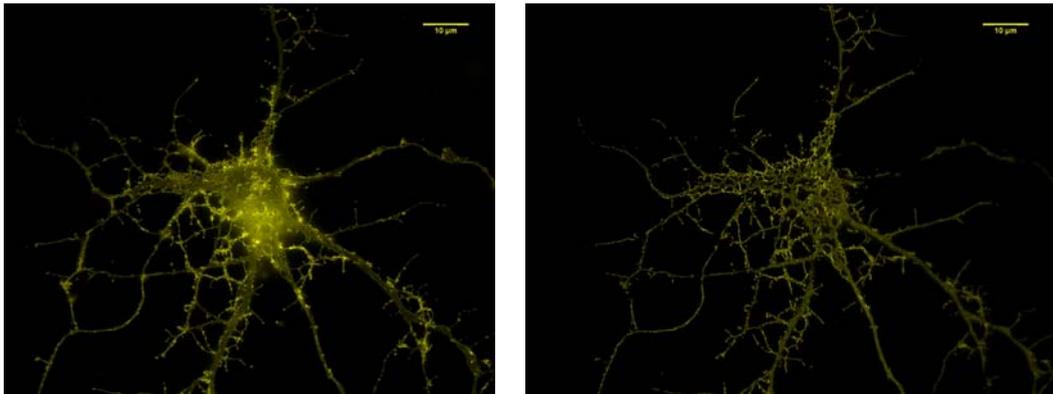


Figura 22: A sinistra immagine in epifluorescenza dell'espressione della $\beta 2Y$ in neuroni di innocampo di ratto DIV 7. A destra immagine dello stesso neurone con tecnica TIRF

Al microscopio TIRF la $\beta 2Y$ appare nettamente localizzata a livello della membrana plasmatica, con una minore componente citoplasmatica, ed appaiono più nette le protrusioni membranali, in cui si evidenzia marcatamente la localizzazione della chimera a livello della membrana (Figura 22).

Sembrerebbe che la sovraespressione della $\beta 2Y$ comporti anche una sovraespressione della componente del plasmalemma che si riflette nell'aumento sia delle protrusioni che del branching.

L'analisi elettrofisiologica dell'espressione della chimera dimostra come anch'essa, anche se in misura minore, provochi uno spostamento significativo, verso valori negativi, della voltaggio dipendenza del *gating* del canale del sodio.

3.4 Rivestimento proteico

Nell'introduzione di questa tesi sono stati riportati i riferimenti bibliografici di pubblicazioni scientifiche che hanno dimostrato l'interazione *in vitro* tra le subunità $\beta 1$ e $\beta 2$ e le proteine CNT1 e TNC, rispettivamente.

Sono state quindi effettuate delle prove di rivestimento basandosi sul lavoro di Gotz e collaboratori (1996). A tale scopo si sono utilizzate le proteine contattina 1 e tenascina C per rivestire il supporto di crescita delle cellule.

L'adsorbimento fisico è un processo caratterizzato da interazioni di natura elettrostatica, con basse forze di legame, tra i componenti di una soluzione ed una superficie solida. Il rivestimento delle superfici con tale tecnica è stato individuato come approccio iniziale alle metodiche di funzionalizzazione di substrati di coltura per la sua semplicità di implementazione, seppur siano ben note le sue limitazioni intrinseche.

Tra queste va sottolineata l'impossibilità di controllare l'orientamento delle sequenze peptidiche, responsabili dell'interazioni proteina-proteina, che comporta un parziale mascheramento degli epitopi delle proteine di rivestimento a cui si possono legare le subunità accessorie del canale.

In base a questo approccio le proteine sono state deposte sui vetrini ad una concentrazione di 10 $\mu\text{g/ml}$, ed incubate per una notte a 37°C. Per controllare l'efficienza di adsorbimento sono state eseguite delle marcature indirette delle proteine di rivestimento.

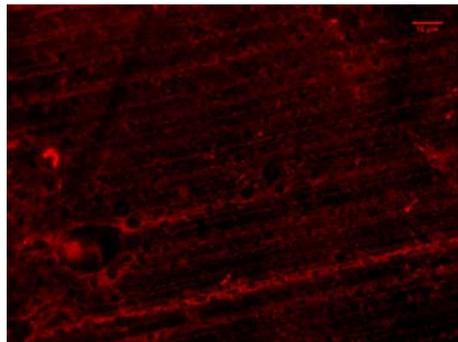


Figura 23: immunofluorescenza di CNT1 e anticorpo secondario A568 su un vetrino rivestito di CNT1 10 $\mu\text{g/ml}$.

In Figura 23 viene mostrata un'immagine in epifluorescenza del rivestimento con CNT1, marcata tramite immunofluorescenza, in cui si può notare come l'adsorbimento sia avvenuto in modo efficace, pur essendoci zone più o meno dense dovute all'impossibilità di far adsorbire la proteina in modo controllato.

3.4.1 Analisi dell'interazione delle subunità con i rivestimento proteici

Per monitorare eventuali aggregazioni dovute all'interazione delle subunità sono state effettuati dei *coating* di vetrini su cui sono state fatte crescere colture neuronali, successivamente transfettate con le chimere fluorescenti. L'analisi è stata effettuata mediante microscopia TIRF per monitorare eventuali addensamenti nella zona di adesione della cellula.

3.4.1.2 Espressione della $\beta 1Y$ su rivestimenti di CNT1

Neuroni di ratto E18 sono stati coltivati su vetrini rivestiti di CNT1, transfettati al 6 – 7 DIV e, dopo 24h di espressione, osservati in fluorescenza.

Il rivestimento di CNT1 non induce cambiamenti morfologici nella coltura e l'analisi della superficie di adesione mostra come non ci siano addensamenti significativi della subunità $\beta 1Y$ rispetto alla condizione *wt*. L'espressione della $\beta 1Y$ comporta la presenza di addensamenti a livello del soma, ma a differenza della condizione descritta al paragrafo 3.3.1 (assenza di CNT1) si osserva una riduzione dei *cluster* probabilmente dovuta alla presenza della CNT1.

Come si può vedere in Figura 24 si assiste anche ad un graduale ma non significativo aumento della produzione di dendriti primari rispetto ai neuroni esprimenti la $\beta 1Y$ fatti crescere su *coating* di sola poli l-lisina.

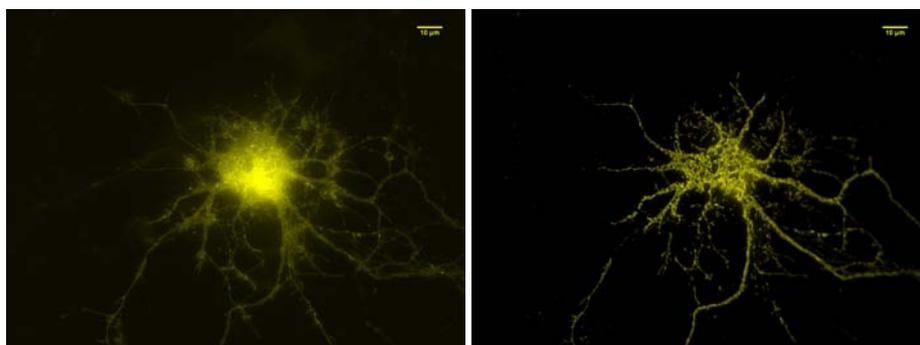


Figura 24: a sinistra immagine in epifluorescenza dell'espressione della $\beta 1Y$ in neuroni di ippocampo di ratto DIV 7 su coating di CNT1. A destra immagine dello stesso piano focale con tecnica TIRF

È stata eseguita un esperimento di immunofluorescenza sul rivestimento di contattina 1 per verificare lo stato di adsorbimento in presenza di neuroni

cresciuti su di essa. Come si può vedere in Figura 25 il rivestimento di CNT1 è stato completamente rimosso dalla crescita dei neuroni, questo sta ad indicare come sia debole il legame tra CNT1 e vetrino.

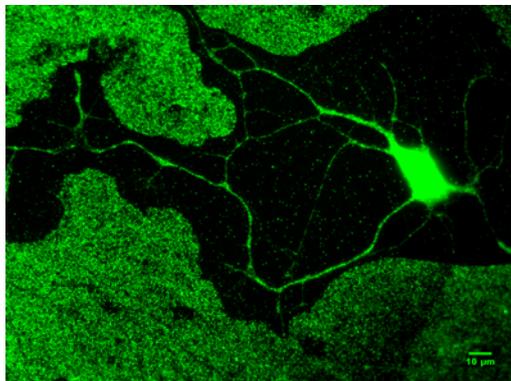


Figura 25: Immunofluorescenza con anticorpo primario anti-CNT1, anticorpo secondario coniugato Alexa514, di neurone al 7 DIV cresciuto su rivestimento di CNT1.

La semplice deposizione della CNT1 su un supporto non è sufficiente per creare uno strato stabile di proteina su cui possa interagire la subunità $\beta 1$, rendendo di fatto di difficile interpretazione quale effetto il rivestimento proteico abbia avuto sulla crescita, e poco informativa un'analisi della distribuzione delle subunità accessorie nella regione di adesione della membrana.

3.4.1.3 Espressione della $\beta 2Y$ su rivestimenti di TNC

L'espressione della subunità $\beta 2Y$ in colture di neuroni fatti crescere su *coating* di TNC è stata eseguita in parallelo agli esperimenti per la CNT1.

Ad una prima osservazione dei neuroni si nota la presenza di un significativo aumento dell'arborizzazione dei dendriti, che comporta un aumento delle dimensioni dei neuroni rispetto alla condizione di controllo.

La presenza della TNC quindi sembra influire positivamente ed agire in sinergia con l'espressione della $\beta 2Y$, come si può osservare dalla figura 26: questo fatto potrebbe essere dovuto alla conformazione ad eptameri della TNC che permette un adsorbimento migliore sulla superficie rispetto alla CNT1.

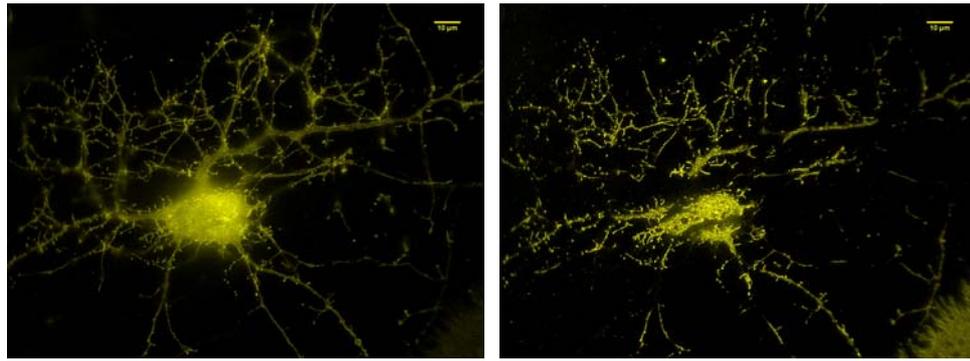


Figura 26: a sinistra immagine in epifluorescenza dell'espressione della $\beta 2Y$ in neuroni di ippocampo di ratto DIV 7 su coating di TNC. A destra immagine dello stesso piano focale con tecnica TIRF

3.4.2 Considerazioni

L'utilizzo delle proteine di rivestimento come "àncora" per l'addensamento dei canali nella zona di adesione cellulare, ha evidenziato come sia necessario funzionalizzare in modo specifico le proteine al supporto.

Una possibile soluzione per impedire la rimozione delle proteine di rivestimento, in questo caso la CNT1 e la TNC, consisterebbe nella funzionalizzazione specifica la quale lega covalentemente le proteine al substrato, inoltre permetterebbe di direzionare spazialmente l'orientamento della proteina (C. DiBello, 2004).

L'espressione delle subunità, in particolar modo della $\beta 2$, ha evidenziato come essa possa essere utilizzata per migliorare l'adesione della cellula al substrato e come questa caratteristica possa essere sfruttata per aumentare l'area della cellula e quindi migliorare l'accoppiamento neurone-transistor.

3.5 Transfezione in adesione

La possibilità di utilizzare la subunità $\beta 2$ per migliorare l'accoppiamento della cellula al transistor porta alla necessità di trovare un metodo di transfezione mirata per veicolare la chimera all'interno del neurone sovrastante il transistor.

Metodi comuni di transfezione chimica non si prestano bene a questo scopo data la loro bassa efficienza in cellule neuronali, mentre metodi virali o di microiniezione comportano uno stress elevato per la coltura di neuroni che può inficiare le analisi elettrofisiologiche.

L'attenzione è stata quindi posta sull'utilizzo dei microchip di silicio, ed in particolare dei siti di stimolazione, che si trovano vicini ai siti di registrazione, come mezzo per transfettare le cellule sovrastanti.

Nel successivo paragrafo verrà discusso come siamo riusciti a sviluppare una metodica per elettroporare selettivamente cellule in adesione tramite i capacitori EOSC.

3.6 Prove preliminari

È noto in letteratura l'utilizzo di bio-chip non solo per registrare segnali extracellulari, ma anche per elettroporare in adesione singole cellule mediante dispositivi con elettrodi in metallo MEA (Jain & Muthuswamy, 2007).

La differenza tra questi dispositivi e quelli da noi utilizzati risiede principalmente nel sito di stimolazione, in quanto i chip utilizzati presentano dei capacitori ad effetto di campo EOSC. Sono stati quindi studiati possibili protocolli che potessero esser impiegati nel caso specifico di capacitori EOSC. È stata analizzata la forma d'onda dell'impulso, la durata dell'impulso, l'ampiezza dell'onda ed infine (ma non meno importante) il *buffer* in cui si vuole elettroporare.

Infatti la soluzione in cui avviene l'elettroporazione deve rispettare determinate caratteristiche in quanto durante lo stimolo si generano forze che possono inficiare la salute della cellula, o cambiamenti di pH che possono esser degenerativi. A tale scopo la soluzione deve possedere una forza ionica bassa, al fine di minimizzare l'intensità del campo elettrico generato dagli ioni, e una *buffer capacity* capace di resistere ai cambiamenti repentini durante lo stimolo.

Allo scopo sono state allestite delle soluzioni che presentano le proprietà suddette e dopo attente analisi è stata individuata la migliore soluzione che permettesse un'adeguata vitalità cellulare, come mostrato in materiali e metodi.

È stata utilizzata una linea cellulare modello per la facilità di manipolazione come banco prova per verificare l'effettiva possibilità di elettroporare in adesione. I composti utilizzati per elettroporare sono stati scelti in base al loro peso molecolare, al fine di avere una valutazione indiretta della grandezza dei pori.

3.6.1 Elettroporazione di CHO-K1

3.6.1.1 Trypan blue

È stata utilizzata una soluzione di Trypan blue, un colorante vitale comunemente utilizzato per verificare la mortalità cellulare, in quanto possiede un basso peso molecolare ed entra facilmente in cellule danneggiate. Tramite l'utilizzo di questo colorante è stato possibile stimare le cellule morte prima dell'elettroporazione, onde evitare falsi positivi.

Per una spiegazione del protocollo utilizzato si rimanda a materiali e metodi.

Le cellule post-elettroporazione si presentano morfologicamente inalterate, facendo ipotizzare che questa tecnica non sia così invasiva, da compromettere lo stato di salute cellulare.

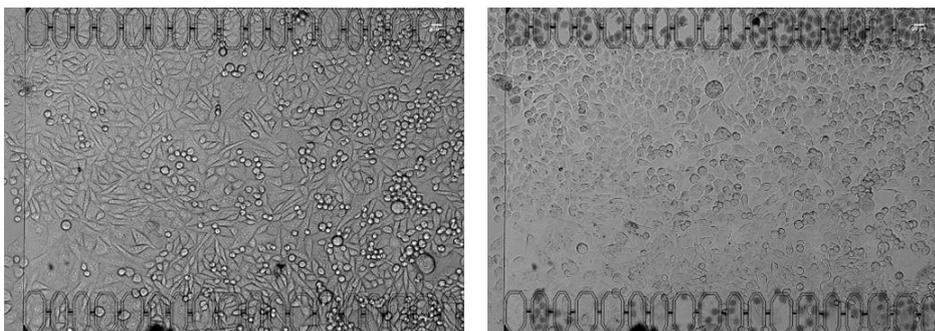


Figura 27: Elettroporazione di CHO-K1 con trypan blue. A sinistra immagine prima dell'elettroporazione per stimare le cellule morte e falsi positivi. A destra immagine post-elettroporazione.

Come si vede in figura 27 l'efficienza, prossima al 90%, è estremamente alta e non c'è presenza di cellule elettroporate al di fuori dei siti stimolati, denotando come questa tecnica sia molto promettente e dando anche prime indicazioni sull'elevata selettività del dispositivo. Quest'ultima è stata controllata in dettaglio tramite la selezione di zone arbitrarie di stimolazione.

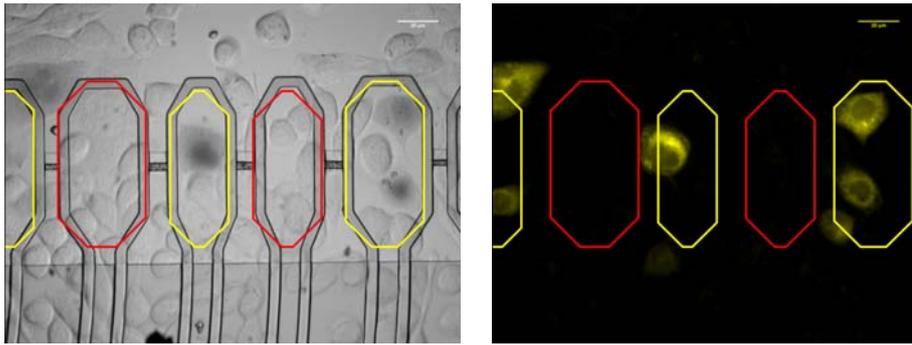


Figura24A sinistra siti di stimolazione evidenziati in giallo, in visibile, in cui si vedono elettroporate solamente le cellule stimulate. A destra la stessa immagine in fluorescenza per una migliore visualizzazione

In figura 28 viene dimostrato come selezionando un singolo spot di stimolazione (cerchiato in giallo) non ci siano presenti cellule elettroporate sui siti adiacenti non stimolati (cerchiati in rosso).

3.6.1.2 Falloidina coniugata Alexa568

È stata utilizzata la Falloidina come marcatore per i filamenti di actina del citoscheletro (*stress fibers*) per verificare se molecole di peso molecolare superiore al trypan blue fossero in grado di penetrare all'interno della cellula.

Sono stati elettroporati tutti i siti presenti nel chip per verificare l'efficienza e l'aspecificità.

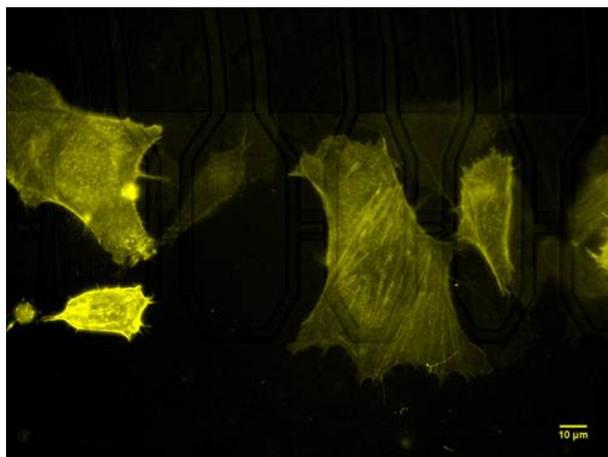


Figura25: Immagine in fluorescenza di CHO-K1 elettroporate con Falloidina coniugata al fluoroforo Alexa568 in cui si vedono chiaramente le stress fiber (l'immagine è in falsi colori).

Come si può vedere in figura 29 la falloidina riesce ad entrare nella cellula e si riescono a visualizzare chiaramente le *stress fibers*.

L'efficienza è stata calcolata esser prossima anche per la falloidina al 90%.

3.6.1.3 Anticorpo coniugato Alexa514

L'utilizzo di un anticorpo come molecola da transfettare permette di stimare la grandezza del poro che si viene a formare in membrana. Le dimensioni degli anticorpi IgG sono dell'ordine di 18-20 nm senza tener conto delle dimensioni del fluoroforo.

Dalla figura 30 si evince che le cellule riescono ad esser transfettate (con efficienza prossima al 70%) e che morfologicamente lo stato vitale viene mantenuto.

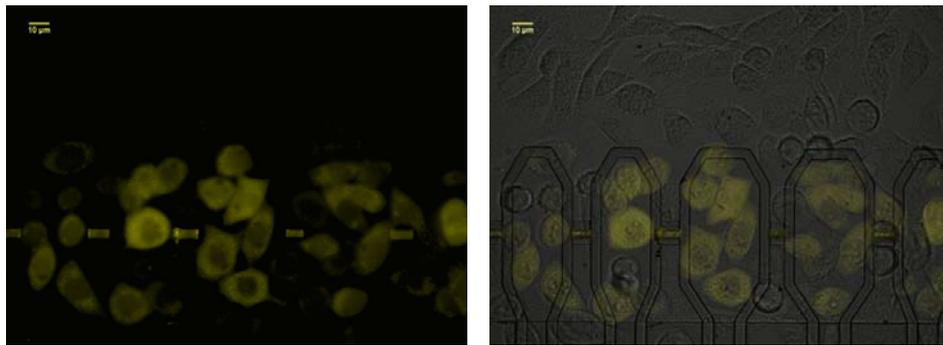


Figura26: A sinistra CHO-K1 elettroporate con anticorpo coniugato Alexa514. a destra la stessa immagine con sovrapposta l'immagine in visibile.

3.6.1.4 Plasmide codificante EYFP

Tutte le prove descritte non tengono conto della vitalità nell'arco delle 24h successive, in quanto tutti gli esperimenti condotti vengono monitorati nei successivi 20'. L'utilizzo di un plasmide codificante una proteina fluorescente (EYFP) permette di analizzare lo stato reale della salute cellulare, in quanto solamente una cellula vitale riesce ad esprimere un gene esogeno introdotto con un costrutto.

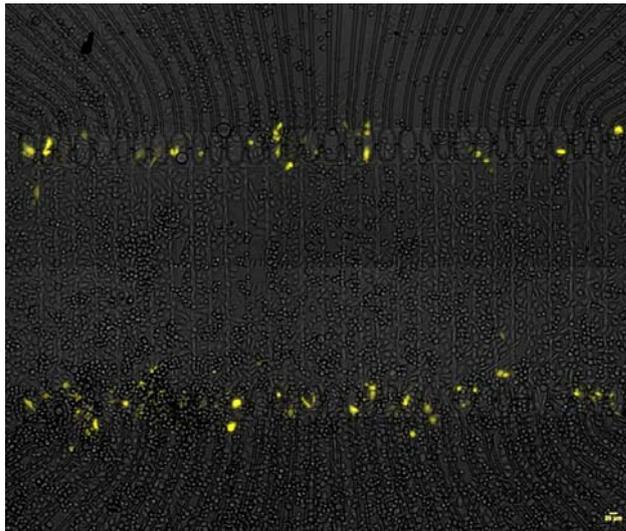


Figura27: Immagine di CHO-K1 esprimenti la proteina fluorescente EYFP 24h dopo l'elettroporazione.

È interessante notare dalla Figura 30 come questa proteina venga correttamente espressa nelle cellule elettroporate, dato che indica come tale metodica non sia invasiva per lo stato vitale delle cellule, le quali sopravvivono e riescono ad esprimere il costrutto veicolato

3.6.2 Considerazioni

L'utilizzo dei siti capacitivi come siti per elettroporare le cellule di una coltura in adesione è stata effettuata con successo.

Utilizzando vari tipi di molecole, da semplici coloranti come il trypan blue ad anticorpi ed infine a plasmidi, si è potuto dimostrare come con questa tecnica innovativa sia possibile veicolare differenti sostanze all'interno della cellula.

In figura 31 viene mostrata una elettroporazione di una coltura di CHO-K1 con il plasmide pcDNA3.1(-)EYFP, 24 h dopo la transfezione. Si nota come l'efficienza mantenuta attorno al 70%, anche nel caso di plasmidi.

Negli esperimenti discussi finora sono state utilizzate linee cellulari di facile manipolazione che pongono solide basi per effettuare esperimenti anche con colture primarie.

Nel prossimo paragrafo verranno presentati i dati inerenti a colture primarie di neuroni E18.

3.7 Elettroporazione di neuroni di ippocampo di ratto E18

3.7.1 Trypan blue

È noto come la transfezione di neuroni presenti difficoltà in termini di efficienza e come i comuni metodi di transfezione non siano efficaci al fine di ottenere un'alta percentuale di cellule transfettate nella coltura. È stato utilizzato il colorante vitale Trypan blue al fine di testare la possibilità di creare dei pori nella membrana plasmatica attraverso i siti capacitivi.

Il Trypan blue è una molecola di piccole dimensioni e questo permette di osservare eventuali danni indotti alla cellula mediante la stimolazione in adesione.

Le prime prove con la forma d'onda utilizzata per la linea cellulare CHO-K1 non sono state soddisfacenti e sono state indagate altre possibili onde al fine di riuscire a porare le cellule. Tra tutte quelle analizzate, la forma sinusoidale risulta la più performante per cellule neuronali.

Le successive stimolazioni sono state effettuate con onde sinusoidali di 50 – 100 ms, con ampiezza ± 3 V, utilizzando il buffer1 come mezzo di elettroporazione.

Nella figura 32 viene mostrata una prima elettroporazione del sito n°1 in cui si vede il neurone sovrastante al cui interno è entrato il colorante. Il neurone del sito n°2 non presenta colorazione in quanto non è stato stimolato.

Nella figura 33 viene mostrata la successiva elettroporazione del sito n°2 con conseguente colorazione del neurone. Questo esperimento indica come questa metodica sia estremamente selettiva e permetta di indirizzare la stimolazione solo alle cellule desiderate.

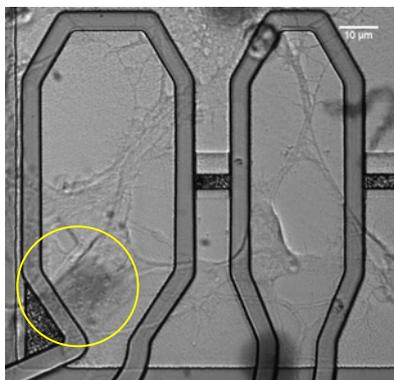


Figura29: Elettroporazione del primo sito EOSC

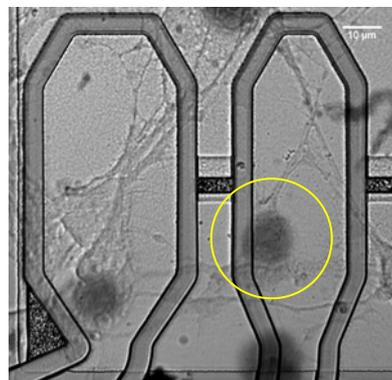


Figura28: Elettroporazione del secondo sito EOSC

I neuroni provengono da embrioni di ratto E18 e vengono utilizzati al 6 DIV. La coltura di neuroni presenta anche cellule gliali in quanto non vengono utilizzate sostanze che interferiscono con la mitosi (come la citosina arabinoside) uccidendole, ma ne viene solamente ridotta la presenza nella fase di preparazione mediante *pre-plating*.

3.7.2 Falloidina coniugata Alexa568

Sono state effettuate delle prove con un marcatore per il citoscheletro coniugato con il fluoroforo Alexa568 al fine di verificare la possibilità di veicolare all'interno dei neuroni sostanze come la falloidinaA568 di 1590 Da.

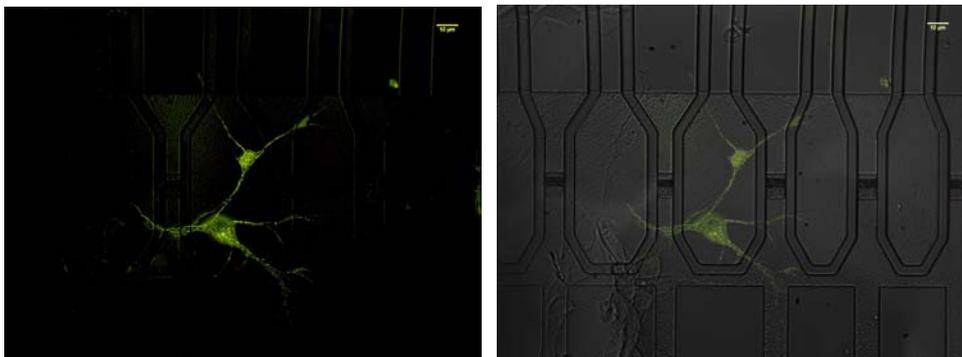


Figura30: A sinistra immagine di neurone elettroporato con Falloidina coniugata Alexa568. A destra immagine sovrapposta del visibile con la fluorescenza. (L'immagine è in falsi colori)

In Figura 34 si può vedere come la stimolazione dei siti vada ad elettroporare solo le cellule sovrastanti e come non ci sia distinzione tra neuroni e cellule gliali, le quali vengono anch'esse porate permettendo l'ingresso della tossina.

Anche in questo caso vengono marcate le strutture citoscheletriche della cellula.

3.7.3 Plasmide codificante EYFP

L'uso di un plasmide che codifichi per un costrutto di interesse è la prova più importante per poter verificare la sopravvivenza delle cellule, in quanto permette di osservare un prodotto di espressione che sta ad indicare lo stato salutare della cellula.

È stato utilizzato come vettore un plasmide ad alta espressione per cellule di mammifero codificante la proteina EYFP, la quale è stata scelta in virtù della sua brillantezza e della resa quantica migliore rispetto ad altre proteine fluorescenti. L'uso di filtri dicroici passa banda inoltre garantisce la corretta stimolazione ed il corretto raccoglimento della luce emessa senza il rischio di raccogliere fonti di autofluorescenza.

Il protocollo utilizzato prevede l'utilizzo di onde sinusoidali di 100 ms utilizzando il buffer1 come mezzo per veicolare il plasmide all'interno della cellula.

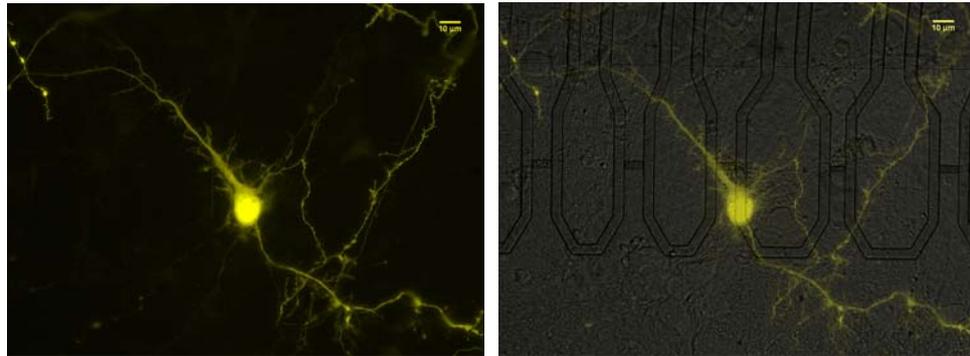


Figura31: A sinistra immagine di neurone 6 DIV dopo 24h di espressione della proteina fluorescente EYFP. A destra merge del visibile con la fluorescenza.

In figura 35 viene mostrata una coltura di neuroni su chip al 6 DIV, elettroporati con pcDNA3.1(-)EYFP e posti in espressione per 24 h.

Osservando il neurone fluorescente (che perciò è stato porato, ha assunto il plasmide ed ha espresso la proteina) si noti come lo stato di salute della cellula sia preservato e come questa riesca ad esprimere un costrutto previa elettroporazione.

3.8 DISCUSSIONE

Il lavoro di ricerca sviluppato durante il dottorato si proponeva l'obiettivo di investigare se il rivestimento della superficie di crescita delle colture cellulari con determinate proteine della matrice extracellulare, potesse essere in grado di ottimizzare l'accoppiamento neurone-transistor.

L'ipotesi di partenza supponeva che proteine della matrice extracellulare deposte sul substrato fossero in grado di legare, e quindi immobilizzare, le subunità accessorie del canale del sodio $\beta 1$ e $\beta 2$ favorendone un addensamento nella regione di adesione cellula-substrato.

Indirettamente, tramite il legame delle subunità accessorie al canale del sodio, anche la densità di quest'ultimo sarebbe stata incrementata, aumentando la numerosità delle proteine che sono responsabili del segnale individuabile dal microchip e quindi, in ultima analisi, il segnale stesso.

La sovraespressione delle subunità $\beta 1$ e $\beta 2$ nei neuroni mostra chiaramente come esse siano coinvolte nella modulazione delle caratteristiche della voltaggio dipendenza dell'attivazione, influenzando uno spostamento verso potenziali negativi dell'apertura dei canali. Inoltre, le subunità intervengono a livello morfologico modificando in modo sensibile la struttura della cellula. Infatti in neuroni esprimenti la chimera $\beta 2Y$ si assiste ad un significativo aumento dell'arborizzazione neuritica. Questo dato è in accordo con gli effetti riscontrati in oociti, che sviluppano microvilli dopo iniezione dell'RNA codificante $\beta 2$ (Isom et al., 1995a) ed in cellule HEK 293 in cui i microvilli compaiono dopo l'espressione della chimera con GFP (Zimmer et al., 2002).

Questi effetti risultano più marcati in presenza di rivestimenti di TNC, la quale probabilmente agisce in modo sinergico alla subunità $\beta 2$, aumentandone gli effetti.

Recentemente è stato dimostrato che anche la subunità $\beta 4$, la cui sequenza aminoacidica è molto simile a $\beta 2$, induce ramificazioni estese in cellule Neuro2a ed in neuroni di ippocampo murini, con formazione di spine dendritiche (Oyama et al., 2006).

Nel caso della $\beta 1$ invece non si assiste a modificazioni nella struttura neuronale degne di nota, anche se anch'essa partecipa ad una modificazione della voltaggio dipendenza seppur in modo minore.

L'utilizzo di proteine di rivestimento come fattore per l'addensamento delle subunità è da migliorare in quanto si sono presentati casi in cui i deboli

legami che concorrono all'adsorbimento della proteina al substrato siano stati recisi con facilità. Questa metodica ha reso comunque possibile l'osservazione di come dall'esterno della cellula possano arrivare stimoli che inducano modificazioni, come ad esempio l'azione sinergica della TNC nel promuovere un aumento dell'arborizzazione.

Migliorare l'accoppiamento del neurone al transistor, mediante la sovraespressione delle subunità $\beta 1$ e $\beta 2$, ha permesso di utilizzare i siti capacitivi EOSC in modo alternativo.

L'idea di prostrarre la stimolazione, al fine di indurre la formazione di pori in membrana, ha permesso di indagare la possibilità di veicolare all'interno di una cellula sostanze esogene con un alto grado di selettività. L'utilizzo di siti specifici integrati nel substrato di crescita come mezzi per introdurre materiale estraneo alla cellula permette di svincolarsi dall'utilizzare sostanze chimiche o tecniche complicate, oltre a permettere la possibilità di utilizzare la stessa coltura in tempi differenti aprendo innovative prospettive riguardo la transfezione.

I vari esperimenti effettuati sono stati fatti per monitorare la possibilità di inserire in modo specifico molecole all'interno della cellula, e queste molecole possono essere di varia natura, come confermano i dati presentati in cui si sono utilizzate sostanze che spaziano da coloranti, a tossine, anticorpi ed infine a plasmidi codificanti proteine. L'elevata sopravvivenza delle cellule inoltre dimostra come tale metodo non sia invasivo e permetta di ridurre sia le quantità dei materiali utilizzati, sia il tempo per l'operatore.

La possibilità offerta nell'esser esenti dalla necessità di avere cellule a confluenza (onde aumentare la percentuale di transfezione) e di non sottostare alla probabilità intrinseca dei vari metodi transfettivi, permette di analizzare in modo mirato le modificazioni di una cellula in una coltura.

L'uso dell'elettroporazione in adesione si rende utile in tutti i casi in cui si necessita di un arco temporale per permettere alle cellule la differenziazione e cosa più importante la possibilità di transfettare con un alto grado di specificità selettivamente singole cellule.

3.9 Conclusioni e prospettive future

L'utilizzo dei transistor rende possibile monitorare l'attività elettrica di cellule eccitabili con metodi non invasivi. Lo stato dell'arte di questi dispositivi attualmente non è ottimale e necessitano di ulteriori sviluppi per aumentare il rapporto segnale/rumore.

Lo studio delle subunità accessorie del canale del sodio ha permesso di scoprire nuove funzioni che vanno oltre la modulazione del canale, e che sottolineano la duplicità di azione della $\beta 2$ in termini di adesione e promozione dello sviluppo dei neuriti.

L'utilizzo della CNT1 e TNC per rivestire i substrati ha messo in luce come si renda necessaria una deposizione controllata e stabile delle proteine mediante metodi di funzionalizzazione specifica. Tali metodi potranno in futuro mettere in luce eventuali coinvolgimenti nell'addensamento dei canali nella zona di adesione.

Infine la messa a punto di una nuova metodica di elettroporazione in adesione per la transfezione mirata di materiale esogeno di cellule in coltura apre la via per nuovi approcci di studio di colture in seno al monitoraggio delle modificazioni di individui in una popolazione con differenti molecole.

BIBLIOGRAFIA

Armstrong C.M. (1981) Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev* 61: 644-682.

Aukhil I., Slemp C.C., Lightner V.A., Nishimura K., Briscoe G. & Erickson H.P. (1990) Purification of hexabrachion (tenascin) from cell culture conditioned medium, and separation from a cell adhesion factor. *Matrix* 10: 98-111.

Auld V.J., Goldin A.L., Krafte D.S., Catterall W.A., Lester H.A., Davidson N. & Dunn R.J. (1990) A neutral amino acid change in segment IIS4 dramatically alters the gating properties of the voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 323-327.

Auld V.J., Goldin A.L., Krafte D.S., Marshall J., Dunn J.M., Catterall W.A., Lester H.A., Davidson N. & Dunn R.J. (1988) A rat brain Na⁺ channel α subunit with novel gating properties. *Neuron* 1: 449-461.

Axelrod D. (2001) Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* 2: 764-774.

Berglund E.O. & Ranscht B. (1994). Molecular cloning and in situ localization of the human contactin gene (CNTN1) on chromosome 12q11-q12. *Genomics* 21: 571-582.

Cantrell A.R. & Catterall W.A. (2001) Neuromodulation of Na⁺ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2: 397-407.

Catterall W.A. (1996) Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and function. *Trends in Neuroscience* 9: 7-10.

Catterall W.A., Goldin A.L. & Waxman S.G. (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol Rev* 57: 397-409.

Chernomordik L. V. (1992) Electropores in Lipids Bilayers and Cell Membranes, in D. C. Chang (et al.), *Guide to Electroporation and Electrofusion*, chap 5, Academic Press, Inc., San Diego, CA.

Condreay J.P., Kost T.A. (2007) Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr Drug Targets* 8(10): 1126-31. Review.

Davis J. Q., S. Lambert & V. Bennett (1996) : Molecular composition of the node of ranvier: Identification of ankyrin- binding cell adhesion molecules

neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* 135, 1355-1367.

Eaholtz G., Zagotta W.N. & Catterall W.A. (1998) Kinetic analysis of block of open sodium channels by a peptide containing the isoleucine, phenylalanine, and methionine (IFM) motif from the inactivation gate. *J Gen Physiol* 111: 75-82.

Freshney R.I. (2000) Culture of animal cells - A manual of basic technique - . Fourth edition. Wiley-Liss.

Gao X., Kim K.S. & Liu D. (2007) Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next. *AAPS J* 9, 92-104.

Gehl J. (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 177, 437-447.

Goldin A.L., Barchi R.L., Caldwell J.H., Hofmann F., Howe J.R., Hunter J.C., Kallen R.G., Mandel G., Meisler M.H., Berwald Netter Y., Noda M., Tamkun M.M., Waxman S.G., Wood J.N. & Catterall W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28: 365-368.

Gotz B., Scholze A., Clement A., Joester A., Schutte K., Wigger F., Frank R., Spiess E., Ekblom P. & Faissner A. (1996) Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *J Cell Biol* 132: 681-699.

Gulcher J.R., Nies D.E., Marton L.S. & Stefansson K. (1989) An alternatively spliced region of the human hexabrachion contains a repeat of potential N-glycosylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 1588-1592.

Guyetal H.R. (1986) Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 508-512.

Hartshorne R.P., Messner D.J., Coppersmith J.C. & Catterall W.A. (1982) The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits. *J Biol Chem* 257: 13888-13891.

Heinemann S.H., Terlau H., Stuhmer W., Imoto K. & Numa S. (1992) Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356: 441-443.

Hille B. (1991) Ionic channel of excitable membranes. *Sinauer Associates Inc*, sec.ed.

Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117: 500-544.

Isom L.L. & Catterall W.A. (1996) Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature* 383: 307-308.

Isom L.L., Ragsdale D.S., De Jongh K.S., Westenbroek R.E., Reber B.F., Scheuer T. & Catterall W.A. (1995a) Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83: 433-442.

Isom L.L., Scheuer T., Brownstein A.B., Ragsdale D.S., Murphy B.J. & Catterall W.A. (1995b) Functional co-expression of the beta 1 and type IIA alpha subunits of sodium channels in a mammalian cell line. *J Biol Chem* 270: 3306-3312.

Jain T. & Muthuswamy J. (2007) Bio-chip for spatially controlled transfection of nucleic acid payloads into cells in a culture. *Lab Chip*. 7, 1004-1011.

Jiang M., Chen G. (2006) High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat Protoc* 1(2): 695-700.

Kandel E.R., Schwartz J.H. & Jessel T.M. (1994) *Principi di neuroscienze*. 2^a edizione. Casa Editrice Ambrosiana.

Koch T., Brugger T., Bach A., Gennarini G. & Trotter J. (1997) Expression of the immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule F3 by oligodendrocyte-lineage cells. *Glia* 19: 199-212.

Kordeli E., Lambert S. & Bennett V. (1995) AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *J Biol Chem* 270: 2352-2359.

Kotnik T., Bobanovic F. & Miklavcic D. (1997) Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields – a theoretical analysis. *Bioelectrochem Bioenerget* 43, 285–291.

Malhotra J.D., Kazen-Gillespie K., Hortsch M. & Isom L.L. (2000) Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J Biol Chem* 275: 11383-11388.

McEwen D.P. & Isom L.L. (2004) Heterophilic interactions of sodium channel beta1 subunits with axonal and glial cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 279: 52744-52752.

McEwen D.P., Meadows L.S., Chen C., Thyagarajan V. & Isom L.L. (2004) Sodium channel beta1 subunit-mediated modulation of Nav1.2 currents and cell surface density is dependent on interactions with contactin and ankyrin. *J Biol Chem* 279: 16044-16049.

Messner D.J. & Catterall W.A. (1985) The sodium channel from rat brain. Separation and characterization of subunits. *J Biol Chem* 260: 10597-10604.

Miklavcic D. & Puc M. (2006) Electroporation, *University of Ljubljana (Ljubljana, Slovenia); Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*.

Morgan K., Stevens E.B., Shah B., Cox P.J., Dixon A.K., Lee K., Pinnock R.D., Hughes J., Richardson P.J., Mizuguchi K. & Jackson A.P. (2000) beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2308-2313.

Murphy D.B.(2001) In John Wiley and sons, editors, *Fundamentals of light microscopy and electronic*.

Noda M., Ikeda T., Kayano T., Suzuki H., Takeshima H., Kurasaki M., Takahashi H. & Numa S. (1986a) Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* 320: 188-192.

Noda M., Ikeda T., Suzuki H., Takeshima H., Takahashi T., Kuno M. & Numa S. (1986) Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature* 322: 826-828.

Oyama F., Miyazaki H., Sakamoto N., Becquet C., Machida Y., Kaneko K., Uchikawa C., Suzuki T., Kurosawa M., Ikeda T., Tamaoka A., Sakurai T. & Nukina N. (2006) Sodium channel β 4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mice. *J. Neurochem.* 98: 518-529.

Paliwal S. & Mitragotri S. (2006) Ultrasound-induced cavitation: applications in drug and gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 3, 713-726.
Reid R.A., Bronson D.D., Young K.M. & Hemperly J.J. (1994) Identification and characterization of the human cell adhesion molecule contactin. *Brain Res Mol Brain Res* 21: 1-8.

Riemen G. et al. (2004) Buffer solution for electroporation and a method comprising the use of the same, United States, Patent application Publication.

Sarao R., Gupta S.K., Auld V.J. & Dunn R.J. (1991) Developmentally regulated alternative RNA splicing of rat brain sodium channel mRNAs. *Nucleic Acids Res* 19: 5673-5679.

Schenborn E.T., Goiffon V. (2000) DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Methods Mol Biol* 130: 147-53.

- Schneckenburger H. (2005) Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications. *Curr Opin Biotechnol* 16: 13-18.
- Schneckenburger H., Hendinger A., Sailer R., Strauss W.S. & Schmitt M. (2002) Laser-assisted optoporation of single cells. *J Biomed Opt* 7, 410-416.
- Schoen I. & Fromherz P. (2006) The mechanism of extracellular stimulation of nerve cells on an electrolyte-oxide-semiconductor capacitor. *Biophys J* 92, 1096-1111.
- Schoenbach K.H., Beebe S.J. & Buescher E.S. (2001) Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* 22, 440-448.
- Shin Y.S., Cho K. & Kim JK. (2004) Electrotransfection of mammalian cells using microchannel-type electroporation chip. *Anal Chem* 76, 7045-7052.
- Smith M.R. & Goldin A.L. (1997) Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. *Biophys J* 73: 1885-1895.
- Somiari S., Glasspool-Malone J., Drabick Joseph. J., Gilbert Richard A., Heller R., Jaroszeski M. J. & Malone Robert W. (2000) Theory and *in Vivo* Application of Electroporative Gene Delivery. *Molecular Therapy* 2: 178-187
- Srinivasan J., Schachner M. & Catterall W.A. (1998) Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15753-15757.
- Teissie J. & Rols M.P. (1994) Manipulation of cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electroporation. *Ann NY Acad Sci* 720, 98-110.
- Vassanelli S. & Fromherz P. (1997) Neurons from rat brain coupled to transistors. *Appl Phys A* 65: 85-88.
- Vassilev P.M., Scheuer T & Catterall W.A. (1988) Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241: 1658-1661.
- Vassilev P.M., Scheuer T & Catterall W.A. (1989) Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8147-8151.
- Wasungu L., Hoekstra D. (2006) Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release* 116(2): 255-64.

West J.W., Patton D.E., Scheuer T., Wang Y., Goldin A.L. & Catterall W.A. (1992a) A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10910-10914.

West J.W., Scheuer T., Maechler L. & Catterall W.A. (1992b) Efficient expression of rat brain type IIA Na⁺ channel alpha subunits in a somatic cell line. *Neuron* 8: 59-70.

Wood W. & Martin P. (2002) Structures in focus - filopodia. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34: 726-730.

Yu F.H., Westenbroek R.E., Silos-Santiago I., McCormick K.A., Lawson D., Ge P., Ferreria H., Lilly J., DiStefano P.S., Catterall W.A., Scheuer T. & Curtis R. (2003) Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci* 23: 7577-7585.

Zimmer T., Biskup C., Bollensdorff C. & Benndorf K. (2002) The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na⁺ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol* 186: 13-21.