

# ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902029676A1

Publication Date

20130907

Applicant

FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA

Title

BIOSAGGIO E DISPOSITIVO PER RIVELARE E/O QUANTIFICARE LA  
CAPACITA' DI CELLULE NEURONALI DI FORMARE ESTENSIONI  
NEURITICHE E/O CONNETTERE ALTRI NEURONI

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"Biosaggio e dispositivo per rivelare e/o quantificare la capacità di cellule neuronali di formare estensioni neuritiche e/o connettere altri neuroni"

Di: FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA, nazionalità italiana, Via Morego, 30, 16163 GENOVA

Inventori designati: Luca BERDONDINI, Silvia DANTE, Emanuele MARCONI, Marco SALERNO

Depositata il: 7 marzo 2012

\*\*\*

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un procedimento di biosaggio e ad un dispositivo per l'implementazione del saggio finalizzato a rivelare e/o quantificare la capacità di cellule neuronali di formare estensioni neuritiche e/o connettere altri neuroni.

Il procedimento ed il dispositivo oggetto dell'invenzione sono utili particolarmente come strumento di ricerca applicata a modelli animali per lo studio delle proprietà funzionali di cellule neuronali, nonché in ultima analisi come strumento nella diagnosi di malattie neurodegenerative associate a variazioni nella connettività e morfologia neuronale.

Nella ricerca concernente lo status fisiologico di cellule neuronali nelle loro interazioni/correlazioni, cioè nella loro comunicazione elettrica tramite gli assoni ed i coni terminali di crescita, è nota l'importanza di poter disporre di cellule neuronali in posizioni ben definite come ad esempio in una griglia, nonché della possibilità di esercitare su di esse un'influenza dominante sulle loro rispettive connessioni.

Le tecniche di patterning classico di materiali sono basate su tecniche di fotolitografia e di litografia a fascio elettronico proprie dell'industria della microelettronica, traendo vantaggio dalla relativa tecnologia sviluppata negli ultimi 50 anni.

Tuttavia, queste tecniche sono difficilmente combinabili con materiali organici e biologici, sensibili e delicati propri delle bioscienze, in quanto esse sono applicate a materiali organici rigidi (wafer di silicio) e si basano su radiazioni elettromagnetiche che inducono un danno ed implicano l'impiego di solventi organici aggressivi durante le fasi di processo.

In alternativa alle tecniche di litografia a radiazione, sono anche note le cosiddette tecniche di litografia soft che permettono di ottenere mo-

delli di segnali cellulari di adesione/repulsivi, secondo qualsiasi disposizione desiderata.

Queste tecniche sono generalmente basate sull'imprinting di un determinato stampo (master), costituente un modello, su di un substrato di interesse per la crescita cellulare, mediante un "inchiostro" di interesse organico /biologico/nanoparticellare.

Tuttavia, nonostante il loro nome, anche queste tecniche recenti si basano sui metodi tradizionali di litografia (basati su radiazioni) sopra menzionati, per la fabbricazione del suddetto stampo, che è abitualmente realizzato su maschere di wafer di silicio o di quarzo rigide ed eventualmente solo successivamente riprodotte in una replica "soft" (usualmente di PDMS).

Pertanto la preparazione di motivi (pattern) paralleli di litografia soft è parimenti costosa, dispendiosa in termini di tempo e richiede equipaggiamenti di grandi dimensioni e costi elevati a causa della necessità di realizzare il suddetto stampo, e non è quindi prontamente adattabile alla rapida produzione di prototipi che possono essere richiesti quando le proprietà iniziali del motivo d'interesse non sono ben definite.

Inoltre le tecniche di patterning classico non consentono un biosaggio morfologico neuronale, ovvero una quantificazione dell'estensione neuritica e della capacità dei neuroni di connettersi.

La presente invenzione risolve il problema di creare reti di cellule neuronali ben caratterizzate sul piano comportamentale dal punto di vista della loro morfologia e della loro topologia. Inoltre l'invenzione risolve il problema di fornire una tecnica per la produzione di motivi di cellule neuronali basata su materiali organici soft e su semplici metodologie fisiche di contatto (meccanico) con l'utilizzo di una punta a pennino per immersione.

È stato inoltre dimostrato che la tecnica di preparazione del motivo utilizzata nell'invenzione è in grado di disaccoppiare il carattere topografico (morfologico) del motivo da quelli chimico-fisici (cioè affinità chimica, rigidità di contatto, carica elettrica ovvero potenziale elettrico superficiale).

Un'altra finalità dell'invenzione è quella di fornire un saggio che semplifica la valutazione morfologica della ramificazione neuronale, attualmente difficoltosa e dispendiosa in termini di tem-

po, in quanto basata su tecniche di visualizzazione e di successiva analisi dell'immagine, quali l'analisi Sholl.

In vista degli scopi e dei compiti sopra citati, costituisce oggetto dell'invenzione un biosaggio ed il relativo dispositivo per la sua attuazione aventi le caratteristiche definite nelle rivendicazioni che seguono, che costituiscono parte integrale della presente descrizione.

Il biosaggio secondo l'invenzione si fonda sulla scoperta del fatto che motivi discontinui (ad esempio *spots*) di siti promotori di adesione (ad esempio polilisina) per cellule neuronali, definiti su di un substrato continuo avente proprietà di inibitore dell'adesione di cellule neuronali (ad esempio agarosio), sono in grado di stabilire e dirigere la formazione di estensioni neuronali e di connessioni fisiche in funzione della distanza tra i pattern discontinui.

Nell'ambito dell'invenzione è stato inoltre scoperto che esiste tra i siti (spot) di adesione una distanza critica che influenza la capacità dei neuroni di sentirsi l'un l'altro e di estendere connessioni fisiche reciproche. Questa distanza critica può variare tra colture neuronali da anima-

li sani (wild-type) e colture da modelli animali di patologie.

Sulla base di queste osservazioni, il biosaggio secondo l'invenzione prevede le seguenti operazioni.

A) Deposizione su di un substrato inibente l'adesione di cellule neuronali di una pluralità di spot di una sostanza promotrice di adesione per dette cellule neuronali; questa procedura può essere attuata con l'impiego di apparecchiature per la produzione di nanomatrici commerciali ("nanoarrayer").

Il suddetto substrato viene generalmente depositato su di un supporto solido piano, tipicamente di vetro, che è un materiale di scelta primaria per le bioscienze per la sua facile integrazione con la microscopia ottica tradizionale, grazie alla sua trasparenza. Tuttavia non sussistono vincoli particolari per la natura del supporto.

Il substrato inibente l'adesione delle cellule neuronali è tipicamente formato da una sostanza formante un idrogelo, come agarosio o polietilenglicole, che viene depositato sul supporto preferibilmente mediante tecnica di spin-coating, che permette di ottenere uno spessore uniforme, omogeneo e controllato. È preferibile che lo spessore del sub-

strato inibente sia inferiore a 100 nm, più preferibilmente inferiore a 40 nm. Spessori dell'ordine da 10 nm a 20 nm sono risultati particolarmente vantaggiosi nel caso di impiego di agarosio come substrato, in quanto in questo caso si è osservata una migliore vitalità neuronale e si è osservato che la sostanza promotrice di adesione (nella fattispecie polilissina, PDL) non solo è in grado di fornire siti di adesione per i neuroni, ma permette altresì la crescita di una rete confinata che si estende per coprire la superficie del modello tra gli spot di tale sostanza.

È pertanto vantaggioso disporre di substrati molto sottili; il limite inferiore di spessore essendo generalmente dettato soltanto dalla tecnica di deposizione (spin-coating) e dalla necessità di ottenere substrati continui, con caratteristiche uniformi ed omogenee.

La sostanza promotrice di adesione per le cellule neuronali è in generale una sostanza di natura proteica o un polipeptide con gruppi amminici esposti; possono anche essere utilizzati polimeri contenenti gruppi amminici, come ad esempio polietilennimina (PEI) o nano materiali, come ad esempio nanotubi di carbonio, che possono agire come siti di

adesione.

B) In corrispondenza delle zone decorate con i motivi di sostanza promotrice di adesione vengono piastrate e lasciate aderire le cellule neuronali sottoposte al saggio, che vengono quindi mantenute in incubazione in condizioni di coltura idonea a favorire la crescita di estensioni neuritiche.

C) La formazione di estensioni neuritiche tra gli spot viene determinata dopo un appropriato periodo di incubazione rivelando, la formazione di tali estensioni neuritiche di interconnessione tra cellule neuronali adiacenti ed adese agli spot. La rivelazione delle estensioni neuritiche può avvenire preferibilmente mediante immunofluorescenza, ma anche mediante misure elettriche (ad. es, misure di impedenza) su circuiti integrati nel substrato o mediante metodi ottici.

Ai fini della rivelazione della formazione di estensioni neuritiche mediante immunofluorescenza, le cellule possono essere fissate (ad esempio con paraformaldeide) con aggiunta di una soluzione di bloccaggio comprendente anticorpi marcatori della tubulina e quindi del citoscheletro (ad esempio anti- $\beta$ IIIITub) ed anticorpi marcatori delle cellule gliali. L'anticorpo marcatore della tubulina è ri-

levante per mettere in evidenza i dendriti e gli assoni. Tecniche di transfezione o infezione potrebbero essere usate per la rivelazione "life" facendo esprimere delle proteine fluorescenti nelle cellule in studio.

Il marcatore delle cellule gliali (anti-GFAP) è utile per discriminare neuroni da glia.

La misura delle connessioni può includere l'uso di tecniche ottiche (microscopia o integrate con l'uso di guide d'onde) oppure elettriche e/o elettrochimiche quali misure d'impedenza o funzionali con microelettrodi. Le misure con microelettrodi permetterebbero di verificare anche la funzionalità della connessione fisica neuritica.

D) Il biosaggio secondo l'invenzione contempla quindi la determinazione della distanza (critica) tra gli spot in corrispondenza della quale si verifica la suddetta formazione di estensioni neuritiche di interconnessione. La determinazione di tale distanza viene effettuata verificando la formazione di estensioni neuritiche tra spot spazati tra loro a diversa distanza.

A questo scopo il dispositivo per l'effettuazione del saggio, o il relativo corredo, può contemplare diverse forme di attuazione.

Può essere contemplato un corredo per l'attuazione del saggio comprendente una pluralità di supporti, ciascuno dei quali presenta almeno un rispettivo motivo, ad esempio con una configurazione a matrice, di spot di adesione equidistanziati tra loro, e dove ciascun motivo presenta un passo tra gli spot diverso rispetto al passo degli altri motivi, ad esempio con un incremento di passo costante. In questo caso, la distanza critica tra gli spot è determinata effettuando il saggio in parallelo o in sequenza, nelle medesime condizioni, utilizzando più supporti.

Alternativamente, può essere contemplato un singolo supporto presentante una pluralità di motivi, ove ciascun motivo è formato da una pluralità di spot equidistanziati secondo un primo passo pre-determinato, e presenta un passo di equidistanza diverso, ad esempio in ordine crescente, rispetto agli altri motivi.

Può essere anche contemplata la realizzazione su di un supporto di una pluralità di spot secondo uno o più motivi, ad esempio aventi andamento lineare, aventi ciascuno un passo tra spot adiacenti, crescente o decrescente, in modo graduale. Tipicamente, sulla base delle prove effettuate, il passo

o distanza tra gli spot di un determinato motivo può essere compreso tra 10  $\mu\text{m}$  e 200  $\mu\text{m}$  e, nel caso in cui siano realizzati più motivi distinti, ad esempio a matrice, l'incremento di passo tra motivi può essere variato con incrementi tali da coprire il campo sopra indicato.

La configurazione dei motivi non è particolarmente critica e può comprendere motivi ad andamento lineare (e.g. rettilineo) o, come già indicato, a matrice ad esempio esagonale o quadrata.

Nel saggio secondo l'invenzione, una volta determinata la distanza critica in corrispondenza della quale si verifica la formazione di estensioni neuritiche di interconnessione, può essere contemplata l'operazione di confronto della suddetta distanza critica, determinata per un primo tipo di cellule neuronali, con la distanza critica determinata, nelle medesime condizioni, per cellule neuronali di confronto (ad esempio mediante confronto tra cellule wild-type con cellule transgeniche).

Ulteriori caratteristiche del procedimento e del dispositivo corredo per l'attuazione del saggio risulteranno dagli esempi di attuazione che seguono.

Nei disegni annessi:

- la fig. 1a illustra immagini di immunofluorescenza ottenute su tre diversi motivi neuronali dopo 21 giorni in vitro (DIV) su identiche matrici in cui sono realizzati spot di PDL (0,5 mg/mL) consistenti di 5x5 spot separati da un passo di 50  $\mu\text{m}$  nelle direzioni x e y;
- la fig. 1b è un diagramma che illustra il parametro di connettività empirico come funzione della distanza tra gli spot di PDL per una distanza tra gli spot inferiore a 50  $\mu\text{m}$ , in corrispondenza della quale si verifica una connessione, e per una distanza superiore a 70  $\mu\text{m}$ , in corrispondenza della quale la connessione è impedita;
- la fig. 2 è un'immagine di immunofluorescenza che illustra una serie di motivi a forma di Y di spot di PDL spaziati tra loro, in condizioni di coltura neuronale, che dimostra la crescita neuronale selettiva soltanto nel braccio del motivo Y rivolto verso il basso, in cui gli spot di PDL sono separati da una distanza inferiore a 60  $\mu\text{m}$ , mentre non è evidenziata alcuna connessione per il braccio superiore, con distanza tra gli spot superiore a 80  $\mu\text{m}$ .
- la fig. 3 è un'immagine di immunofluorescenza che illustra il confronto tra la crescita e connettivi-

tà di neuroni ippocampali da topo wild type e da topo geneticamente modificato su substrati decorati da identici motivi di spots di proteina di adesione. Mentre i neuroni da topo wild type crescono arborizzazioni che connettono spots distanziati tra loro fino a 50  $\mu\text{m}$ , i neuroni da topo geneticamente modificato connettono spots separati da distanze fino a 40  $\mu\text{m}$ .

#### Esempio 1 : Preparazione del dispositivo

Per la preparazione del dispositivo uno strato di gel di agarosio viene depositato su un supporto di vetro, ad esempio un vetrino coprioggetto. Si prepara quindi una soluzione acquosa di agarosio 0,15% w/w (Sigma) sciogliendo la polvere di agarosio in acqua Milli-Q portata al punto di ebollizione in forno a microonde. La soluzione viene preparata subito prima dell'uso e tenuta su una piastra calda a  $T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$  per mantenere l'agarosio nel suo stato liquido. La deposizione di agarosio con uno spessore controllato è ottenuta tramite spin-coating (800 rpm, 30 s). I vetrini coprioggetto vengono pretrattati per 20 minuti in una camera UV/ozono per rendere idrofila la superficie e facilitare la diffusione di agarosio. Lo strato di aga-

rosio viene lasciato asciugare all'aria a temperatura ambiente per almeno 6 ore. Lo spessore dello strato risultante è stato misurato con un profilometro. Gli strati sottili ottenuti per spin coating hanno uno spessore di circa 10 nm.

Dopo la preparazione dello strato di gel di agarosio si depositano su di esso le proteine di adesione tramite il nanoarrayer. La proteina selezionata è la poli-D-lisina (PDL), MW 70000 (Sigma). La PDL è disciolta in acqua Milli-Q a una concentrazione di 1 mg/mL; aliquote di 25 microlitri sono congelate e mantenute a -20°C. Un'aliquota viene diluita con acqua Milli-Q per avere una concentrazione finale di 0,3, 0,5, o 0,7 mg/mL. Al fine di consentire la deposizione di gocce di piccolo volume, una piccola quantità di glicerolo (5% w/w) viene aggiunta alle soluzioni.

Micro dosaggio delle proteine: le matrici di micro gocce di PDL vengono prodotte tramite l'uso del nanoarrayer NanoEnabler (Bioforce), dotato di cantilevers SPT C30 S. L'umidità relativa nella camera è mantenuta a 50±5%. La forza di contatto e la distanza di ritiro sono 0,002 nN e 40 µm, rispettivamente.

Per controllare la morfologia degli spot depo-

sitati in condizioni di asciutto e bagnato è stata usata (poly- L- Lysine) PLL marcata a fluorescenza (0,5 mg/mL). Il confronto di spot di un campione asciutto in aria con gli stessi spot di un campione conservato in ambiente acquoso salino per una settimana non ha mostrato alcuna differenza nella dimensione e morfologia dello spot rispetto all'uso di PDL. Inoltre, sul campione bagnato non è stato osservato alcun segnale di diffusione di PLL tra gli spot e la zona di deposito del PLL rimane localizzata e stabile in termini di dimensioni in condizioni umide.

La superficie del dispositivo è stata caratterizzata tramite tecniche di microscopia a forza atomica (AFM) mediante l'utilizzo di MFP-3D (Asylum Research, USA). Dalle analisi effettuate risulta che le regioni di agarosio e gli spot di PDL mostrano rugosità simile, indipendentemente dalla concentrazione di PDL, indicando che la PDL rilasciata dalle goccioline di soluzione viene completamente assorbita dalla matrice porosa di agarosio. Per valutare l'effetto della diversa concentrazione di proteina è stato misurato il rapporto tra la rigidità di contatto valutata sugli spot di PDL ( $K_{PDL}$ ) e quella misurata sull'agarosio circostante

( $K_{\text{agar}}$ ), che fornisce il coefficiente di irrigidimento  $S=K_{\text{PDL}}/K_{\text{agar}}$ . I risultati mostrano che per PDL di 0,1 mg/mL l'effetto di irrigidimento è molto vicino alla soglia di sensibilità della misura rilevamento; per una concentrazione intermedia di 0,3 mg/mL  $S$  aumenta rapidamente, fino a raddoppiare quasi il suo valore, ed infine raggiunge un plateau per le concentrazioni più elevate (0,5 e 0,7 mg/mL). Su questi substrati è possibile effettuare colture cellulari standard e protocolli di fissaggio, eventualmente accoppiati a marcatura a fluorescenza per facilitare l'analisi microscopica della geometria della coltura cellulare risultante.

Dopo la deposizione della proteina i substrati sono stati sterilizzati tramite radiazione UV per 30 minuti per la successiva fase di preparazione della coltura di cellule neuronali.

#### Esempio 2 : Esecuzione del saggio

Sono stati eseguiti esperimenti in cui la distanza tra gli spot è stata variata in un intervallo di 20-120  $\mu\text{m}$  e sono state utilizzate diverse geometrie di matrice. In particolare, sono state preparate matrici quadrate di motivi di PDL costituite da 5x5 spot (fig. 1a) e utilizzate come substrato per colture cellulari primarie ippocampali. Le col-

ture sono state ottenute da cortecce di ratti Sprague-Dawley al diciottesimo giorno di gestazione. Cortecce cerebrali embrionali di ratto sono state sezionate e dissociate. Il tessuto risultante è stato risospeso in terreno Neurobasal addizionato con 2% B-27 e 1% Glutamax-I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e le cellule sono state piastrate su agarosio/PDL ad una densità di 70 cellule/mm<sup>2</sup>. Le colture sono state mantenute in un incubatore al 5% CO<sub>2</sub> a 37°C e tirate fuori solo per cambiare il mezzo di coltura. Per sostenere la crescita delle preparazioni a bassa densità, sono state preparate colture su vetrini coprioggetto in piastre multipozzetto (Corning, Lowell, MA, USA) contenenti terreno di coltura. Ogni pozzetto è stato rivestito con 0,1 mg/mL di PDL e sono state utilizzate gocce di paraffina per sostenere i vetrini coprioggetto. Il fondo del pozzetto è stato seminato con culture ippocampali con una densità di 150 cellule/mm<sup>2</sup>. Dopo la semina i vetrini coprioggetto sono stati trasferiti nei pozzetti con pinzette sterili e posti sulle gocce di paraffina con il lato della coltura cellulare rivolto verso il mezzo di coltura. Il mezzo di coltura è stato cambiato settimanalmente.

Le cellule sono state fissate con paraformal-

deide (PFA). I campioni fissati sono stati permeabilizzati con 0,1% (v/v) Triton X-100 in 1X PBS per 15 min. Una soluzione bloccante (1X PBS, 1% BSA, 5% FBS) è stata aggiunta per 45 minuti a temperatura ambiente per bloccare reazioni aspecifiche. I campioni sono stati incubati per 3 ore a temperatura ambiente con gli anticorpi monoclonali (mAb) primari coniglio anti-topo  $\beta$  IIITub e anti-GFAP (Millipore, Billerica, MA, USA) diluiti in soluzione bloccante. Successivamente, i campioni sono stati lavati e incubati con anticorpo secondario di capra anti-coniglio marcato con Alexa488 o con anticorpo monoclonale di capra anti-topo marcato con Alexa546 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per 45 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati poi allestiti utilizzando il reagente di anti-sbiadimento Prolong contenente DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e conservati a 4°C. I campioni sono stati visualizzati tramite microscopia a fluorescenza a campo largo, effettuata utilizzando il sistema di imaging Neurolucida (Bioscience mbf, Williston, VT, USA) montato su un microscopio BX51 Olympus. Le immagini sono state analizzate con ImageJ ed elaborate con Adobe Photoshop CS3 Suite (Adobe, San Jose, CA, USA).

È stata analizzata la morfologia di reti neurali sviluppate a 14 e 21 DIV. Dalle immagini d'immunofluorescenza si è verificato che su substrati con strato sottile di agarosio di 10-20 nm si osserva una buona vitalità neuronale e le gocce di PDL depositate, oltre a fornire siti di adesione per i neuroni, confinano la crescita neuronale sulla superficie del modello. Per avere un parametro di riferimento per confrontare diversi gradi di sviluppo della rete sulle superfici bio-stampate, è stato analizzato il numero di spot che in cui si è verificata una connessione fisica tra i neuroni (fig. 1a). Gli spot ricoperti da neuroni che non presentano estensioni verso i neuroni presenti su altri spot non sono stati considerati come connessi. In questo modo si ottiene un rapporto di spot connessi / spot totali che viene confrontato per i diversi passi utilizzati per creare le matrici. Si definisce passo la distanza teorica centro-centro tra spot adiacenti. Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando OriginPro (OriginLab Corp, Northampton, MA, USA). La significatività statistica sui valori di connettività è stata determinata mediante test ANOVA.

Al fine di ottenere informazioni sulle condi-

zioni di bio-patterning che facilitano o compromettono lo sviluppo di connessioni fisiche di neuroni tra gli spot di PDL, sono stati variati i vincoli geometrici del motivo e sono state indagate le influenze nella connettività neuronale inter-spot. In particolare, aumentando progressivamente la distanza tra gli spot di adesione, è stato osservato un limite nella capacità di neuroni di ampliare le connessioni tra gli spot. Per quantificare questi dati sperimentali è stato introdotto un parametro di connettività empirica. Questo era necessario in quanto le reti si estendevano diversamente per coprire la superficie patternata, ossia collegando un diverso numero di punti di adesione nella matrice. Per esempio, la fig. 1a mostra tre motivi neuronali che rappresentano tre situazioni diverse di sviluppo, tutte a 21 DIV e su identici motivi di PDL. Al fine di quantificare questi risultati e per riferirli alla distanza tra i punti, un parametro di connettività empirica  $c$  è stato definito come il numero di spot di adesione adiacenti collegati di continuo da neuriti in una matrice, normalizzato per il numero totale di spot della matrice stessa. Ad esempio, il pannello superiore in fig. 1a mostra i valori di connettività associati a ciascuno

delle matrici illustrate.

L'analisi statistica è stata eseguita considerando il caso di un'interfaccia favorevole, cioè uno strato di agarosio con spessore  $t < 20$  nm, considerando una soglia di connettività  $c > 0,25$ . I risultati del valore di connettività media sulla popolazione della matrice che soddisfano i criteri sono riportati in funzione delle distanze inter-spot come nella fig. 1b). L'analisi è stata compiuta su un numero  $n$  di campioni che vanno da un minimo di  $n=48$  (passo  $d=30$   $\mu\text{m}$ ) a un massimo di  $n=120$  (passo  $d=40, 50, 60, \text{ e } 70$   $\mu\text{m}$ ) su campioni appartenenti a 15 differenti colture primarie neuronali provenienti da animali diversi. Dalla fig. 1b emerge chiaramente che una separazione degli spot inferiore a  $50$   $\mu\text{m}$  consente la connettività neuronale, mentre aumentando la distanza di oltre  $70$   $\mu\text{m}$  la connessione tra i neuroni è compromessa. Tra queste due situazioni si osserva una regione d'incertezza. Al fine di dimostrare che queste interfacce a due livelli possono essere progettate per guidare lo sviluppo di estensioni neuronali, colture neuronali sono state coltivate su semplici motivi a forma di Y, con disposizione non omogenea di spot di PDL. Sul braccio superiore gli spot sono a una distanza che supera

la soglia di distanza di connettività mentre sul braccio inferiore gli spot sono ad una distanza inferiore rispetto detta soglia. Immagini rappresentative di neuroni coltivati su queste strutture sono mostrate in fig. 2.

Come previsto, in tutti i modelli a forma di Y i neuriti si sviluppano sul braccio inferiore, collegando spot con un passo al di sotto della soglia della distanza di connettività. Inoltre, quando aderiscono sugli spot di PDL del braccio superiore, i neuroni non presentano estensioni neuritiche e non sopravvivono fino a 21 DIV.

Il biosaggio secondo l'invenzione può essere attuato mettendo a disposizione un dispositivo o un corredo che comprende uno o più supporti solidi sui quali sono realizzati uno o più motivi di spot di adesione per cellule neuronali, secondo le disposizioni precedentemente descritte e definite nelle rivendicazioni annesse, ai quali, in sede di esecuzione del biosaggio, potranno essere adese le cellule neuronali soggette al saggio.

Il corredo potrà eventualmente comprendere reagenti per la rivelazione mediante immunosaggio, particolarmente mediante immunofluorescenza, delle estensioni neuronali di interconnessione tra gli

spot formatesi dopo un periodo di incubazione.

I risultati conseguiti a seguito dell'invenzione indicano che l'impiego del biosaggio, basato su matrici o motivi di cellule neuronali adese, rappresenta un modello sperimentale facilitato e semplificato a confronto con gli studi in vivo, per contribuire alla ricerca di proprietà funzionali dipendenti da topologia, come plasticità, rigenerazione e dinamica delle reti. Nell'attuale ricerca nel settore si utilizzano sistemi di modelli basati su animali transgenici al fine di investigare tali alterazioni. Poiché malattie cerebrali, come l'epilessia, autismo, o malattia di Alzheimer, sono note per essere associate a variazioni di connettività, ed essendo noto che le neuropatologie possono avere un effetto sulle morfologie neuronali e sulla capacità delle popolazioni neuronali di stabilire connessioni fisiche, il biosaggio oggetto dell'invenzione è in grado di fornire informazioni utili per la diagnosi di malattie neurodegenerative.

A questo proposito è stato eseguito un test in cui sono state messe a confronto colture neurali da animali wild-type e da animali modificati geneticamente e portatori della sindrome di DiGeorge. Tale

malattia è nota per portare disfunzionalità nella crescita neuronale e in particolare nello sviluppo delle arborizzazioni dendritiche. Le cellule sono state piastrate e cresciute fino a 14 DIV su substrati con coating di agarosio e decorati con motivi di poli-D-lisina secondo la tecnica descritta; i motivi prescelti erano serie di 5 linee parallele di spots equidistanziati; ciascuna linea conteneva fino a 30 spots e le distanze tra spots erano differenti, in particolare via via crescenti, da linea a linea e pari a 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ .

Fig. 3 mostra le immagini di immunofluorescenza ottenute dai neuroni appartenenti ai due tipi di animali su due tipici motivi identici. I neuroni appartenenti ai topi wild-type (Fig. 3a) crescono dendriti e connettono spots fino a coprire distanze di 50  $\mu\text{m}$ . Le arborizzazioni dei neuroni degli animali modificati geneticamente arrivano a coprire distanze solo pari a 40  $\mu\text{m}$  (Fig. 3b).

In una forma di attuazione del biosaggio, eventualmente, elettrodi potrebbero essere inseriti in corrispondenza degli spot allo scopo di quantificare non soltanto la connettività, ma anche l'attività funzionale delle connessioni neuronali

che si sono formate.

### RIVENDICAZIONI

1. Biosaggio per rivelare e/o quantificare la capacità di cellule neuronali di formare estensioni neuritiche, caratterizzato dal fatto che comprende le operazioni di:

- a) realizzare su di un substrato inibente l'adesione di cellule neuronali una pluralità di spot di una sostanza promotrice di adesione di dette cellule neuronali con distanze controllate;
- b) piastrare e lasciar aderire in corrispondenza delle zone del substrato decorate con detti spot le cellule neuronali soggette al saggio;
- c) rivelare, dopo un periodo di incubazione predefinito, l'eventuale formazione di estensioni neuritiche di interconnessione tra cellule neuronali adiacenti, adese agli spot; e
- d) determinare la distanza tra detti spot, in corrispondenza della quale si verifica la formazione delle estensioni neuritiche di interconnessione, mediante confronto del comportamento di estensione neuritica tra spot spaziatati tra loro a diverse distanze.

2. Biosaggio secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detti spot di sostanza promotrice di adesione sono depositati su detto substra-

to secondo almeno un motivo, avente un passo di distanza tra spot successivi crescente.

3. Biosaggio secondo la rivendicazione 1, in cui sul suddetto substrato è depositata una pluralità di motivi, ciascuno comprendente una pluralità di spot equidistanziati, ove ciascun motivo presenta un passo di equidistanza diverso dal passo di equidistanza degli altri motivi.

4. Biosaggio secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che comprende la fase di ripetere le operazioni a), b) e c), nelle medesime condizioni, con l'impiego di un substrato presentante almeno un motivo di spot equidistanziati con decremento o incremento, in ciascuna ripetizione, del passo di equidistanza tra detti spot, fino a determinare il passo critico in corrispondenza del quale si è rivelata o, rispettivamente, non rivelata la formazione di dette estensioni.

5. Biosaggio secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, caratterizzato dal fatto che comprende l'operazione di confrontare detto passo critico, determinato per un primo tipo di cellule neuronali, con quello determinato nelle medesime condizioni per cellule neuronali di confronto.

6. Biosaggio secondo la rivendicazione 5, applica-

to in sequenza o in parallelo a cellule neuronali di animale wild-type e a cellule neuronali dello stesso animale geneticamente modificato.

7. Biosaggio secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che il passo, o i passi, tra gli spot sono compresi nell'intervallo tra 5  $\mu\text{m}$  e 200  $\mu\text{m}$ .

8. Biosaggio secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che il substrato inibente l'adesione è uno strato di agarosio o polietilenglicole, avente uno spessore inferiore a 40 nm.

9. Biosaggio secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detta sostanza promotrice di adesione è un polipeptide avente gruppi amminici esposti, o un polimero includente gruppi immnici, o nano-particelle che forniscono siti di adesione cellulare.

10. Biosaggio secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la fase di rivelazione della formazione di dette estensioni neuritiche viene effettuata mediante saggio di immunofluorescenza o saggio basato su metodi ottici o elettrici, quali misure di impedenza su elettrodi integrati al substrato o ottica integrata al substrato.

11. Corredo per l'effettuazione di un biosaggio secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10, caratterizzato dal fatto che comprende uno o più supporti solidi, comprendenti almeno un motivo o una pluralità di motivi, formati ciascuno da una pluralità di spot separati di una sostanza promotrice di adesione di cellule neuronali, depositati su di un substrato di una sostanza inibente l'adesione di dette cellule neuronali, depositata come rivestimento di detto supporto ed in cui almeno un motivo è formato da spot spaziati tra loro da un passo progressivamente crescente, ovvero ciascuna di detta pluralità di motivi è formata da spot equidistanziati tra loro ove ciascun motivo presenta un passo tra gli spot diverso rispetto al passo degli altri motivi e opzionalmente reagenti per la rivelazione mediante immunosaggio di estensioni neuritiche di interconnessione tra detti spot.

12. Corredo secondo la rivendicazione 11, in cui detto substrato inibente l'adesione è uno strato di agarosio o di polietilenglicole, avente preferibilmente uno spessore inferiore a 40 nm.

13. Corredo secondo la rivendicazione 11 o 12, in cui detta sostanza promotrice di adesione è un polipeptide avente gruppi amminici esposti o un poli-

mero includente gruppi amminici.

CLAIMS

1. Bioassay for detecting and/or quantifying the ability of neuronal cells to form neuritic extensions, characterised in that it comprises the steps of:

a) producing on a substrate inhibiting the adhesion of neuronal cells a plurality of spots of a substance promoting the adhesion of said neuronal cells with controlled distances;

b) plating and allow to adhere at the regions of the substrate patterned with said spots the neuronal cells subjected to the assay;

c) detecting, after a predetermined incubation period, the possible formation of neuritic extensions interconnecting adjacent neuronal cells, adherent to the spots; and

d) determining the distance between said spots, at which the formation of interconnecting neuritic extensions occurs, by comparison of the behaviour of neuritic extension between spots spaced at different distances.

2. Bioassay according to claim 1, characterised in that said spots of adhesion promoting substance are deposited on said substrate in accordance with at

least one pattern, having an increasing pitch distance between successive spots.

3. Bioassay according to claim 1, wherein a plurality of patterns is deposited on said substrate, each pattern comprising a plurality of equally spaced spots, where each pattern has a pitch of equidistance different from the step of equidistance of the other patterns.

4. Bioassay according to claim 1, characterised in that it comprises the step of repeating the steps a), b) and c), under the same conditions, with the use of a substrate having at least a pattern of spots equally spaced with a decrease or increase, in each repetition, of the equidistance pitch between said spots, up to determine the critical pitch in correspondence of which the formation of said extension is detected or, respectively, not detected.

5. Bioassay according to any one of claims 1 to 4, characterised in that it comprises the step of comparing said critical pitch, determined for a first type of neuronal cells, with that determined in the same conditions for neuronal cells used for comparison.

6. Bioassay according to claim 5, applied in sequence or in parallel to neuronal cells of a wild-type animal and neuronal cells of the same genetically modified animal.

7. Bioassay according to any one of the preceding claims, characterised in that the pitch, or pitches, between the spots are in the range between 5  $\mu\text{m}$  and 200  $\mu\text{m}$ .

8. Bioassay according to any one of the preceding claims, characterised in that the adhesion inhibiting substrate is a layer of agarose or polyethylene glycol, having a thickness less than 40 nm.

9. Bioassay according to any one of the preceding claims, wherein said adhesion promoting substance is a polypeptide having exposed amino groups, or a polymer including imino groups, or nano-particles that provide sites for cell adhesion.

10. Bioassay according to any one of the preceding claims, wherein the step of detecting the formation of said neuritic extensions is carried out by immunofluorescence assay or assay based on optical or electrical methods, such as impedance measurements on electrodes integrated to the substrate or optics integrated to the substrate.

11. Kit for carrying out a bioassay according to any one of claims 1 to 10, characterised in that it comprises one or more solid supports, comprising at least one pattern or a plurality of patterns, each formed by a plurality of separate spots of a substance promoting the adhesion of neuronal cells, deposited on a substrate of a substance inhibiting the adhesion of said neuronal cells, deposited as a coating of said support and wherein at least a pattern is formed by spots spaced by a pitch progressively increasing pitch, or each of said plurality of patterns is formed by spots equidistant to each other in which case each pattern has a pitch between the spots different than the pitch of the other patterns and optionally reagents for the detection by immunoassay of neuritic extensions of interconnection between said spots.

12. A kit according to claim 11, wherein said substrate inhibiting the adhesion is a layer of agarose or polyethylene glycol, preferably having a thickness less than 40 nm.

13. A kit according to claim 11 or 12, wherein said substance promoting adhesion is a polypeptide having exposed amino groups or a polymer including amino groups.

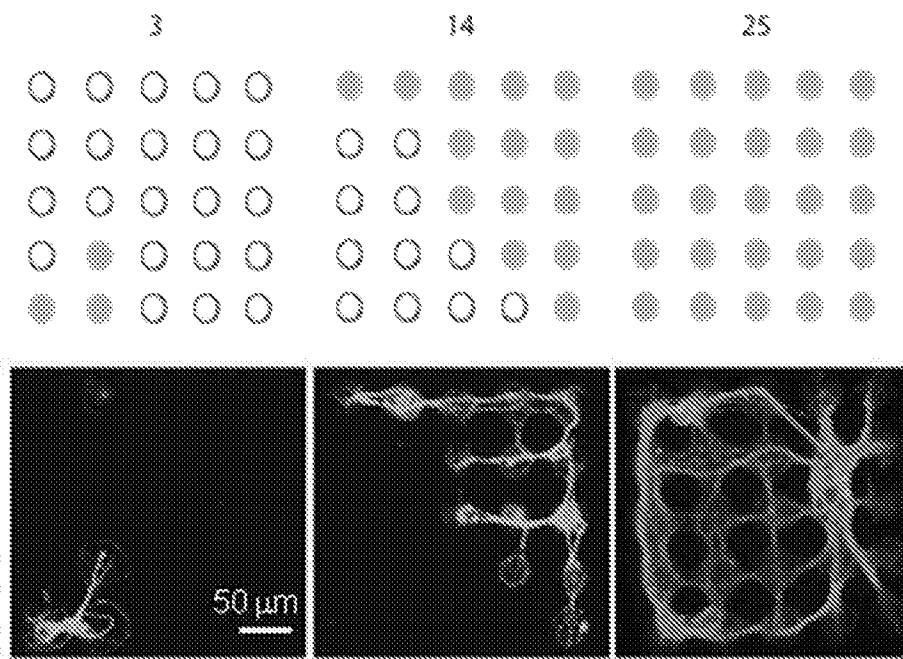


FIG. 1a

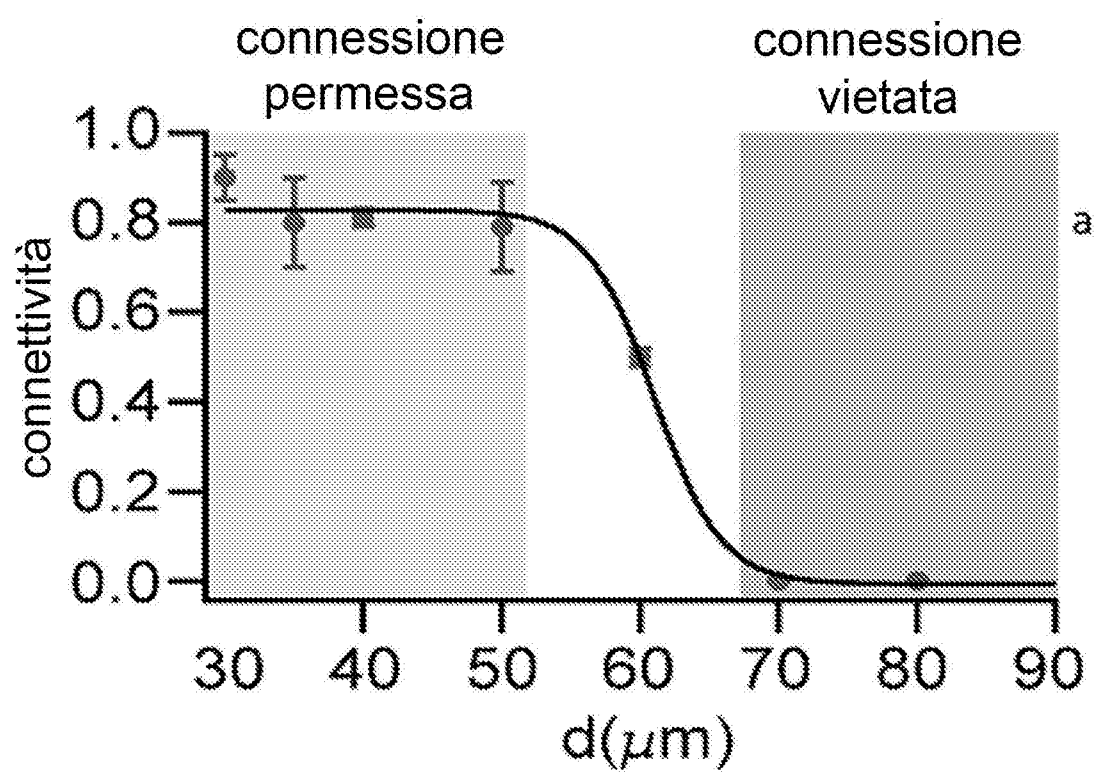


FIG.1b

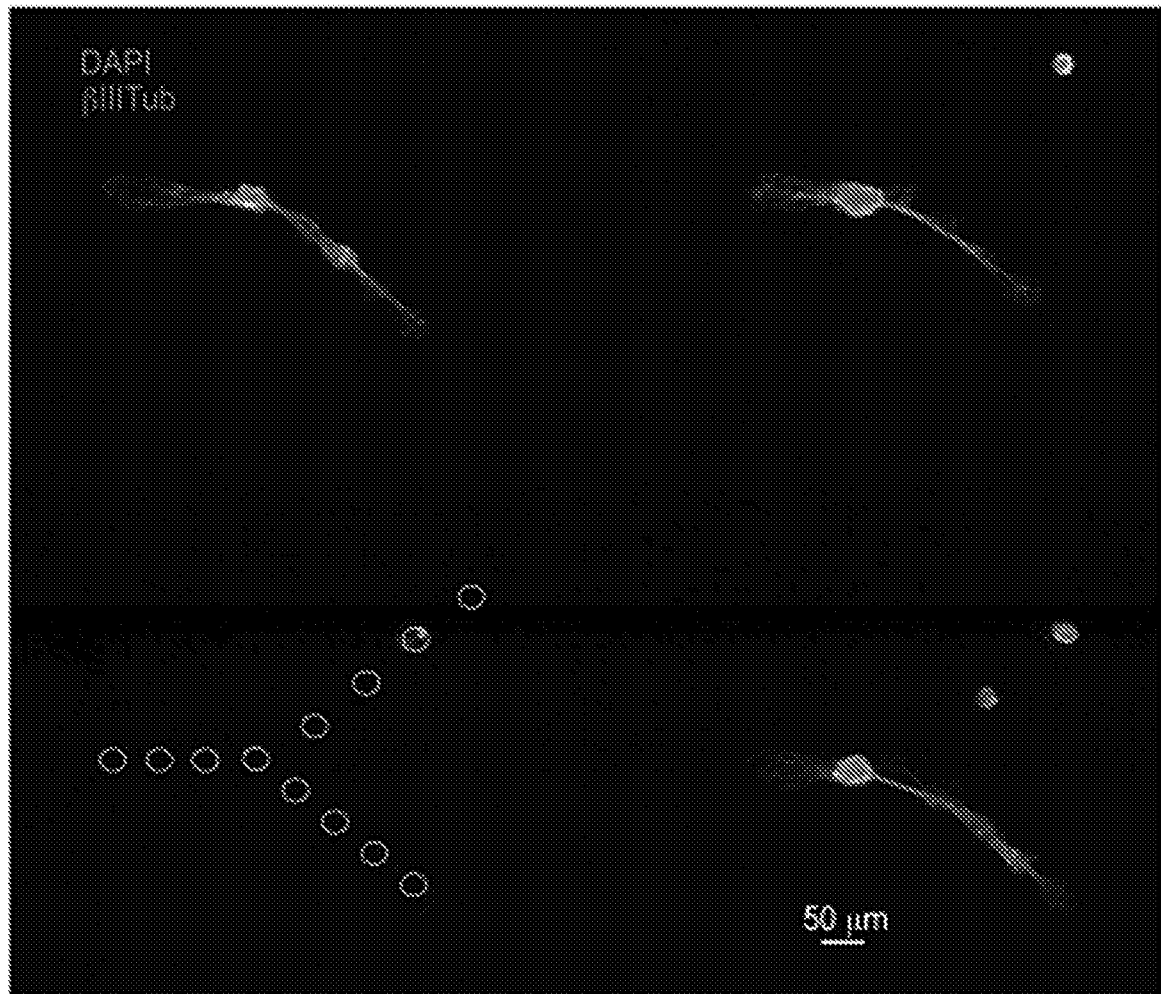


FIG.2

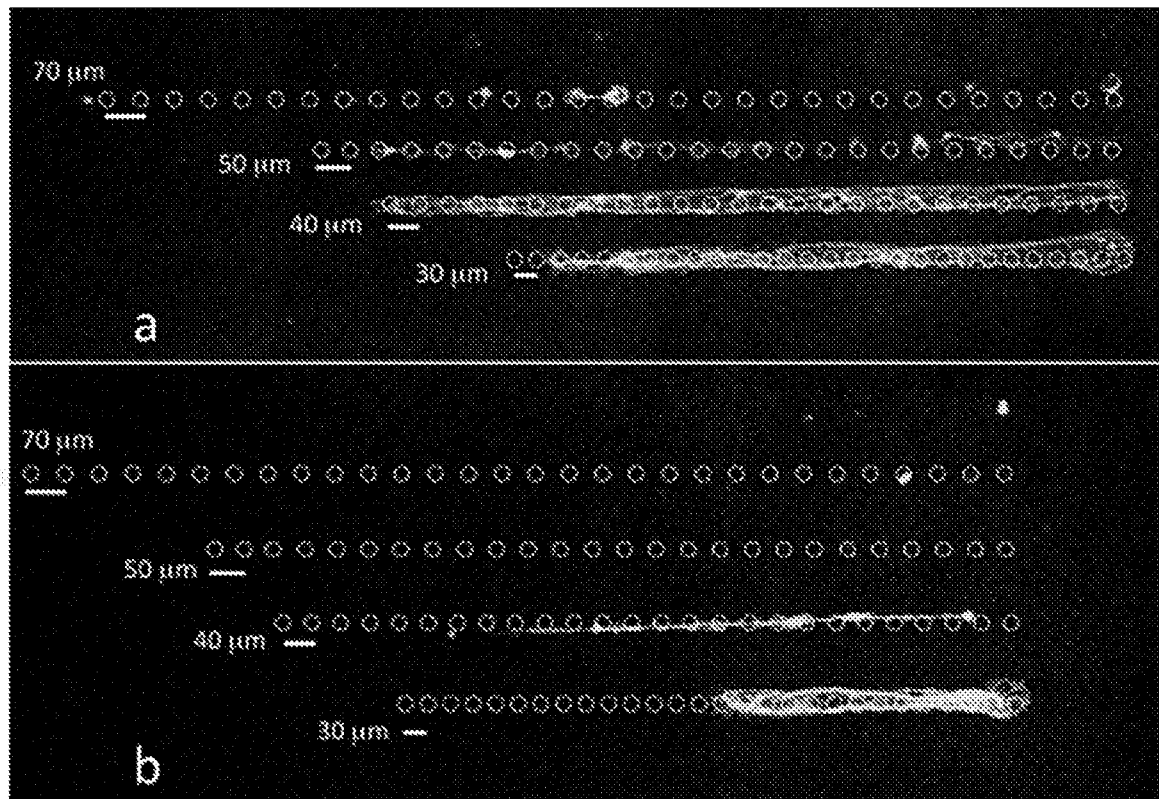


FIG.3