

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

# Messa a punto di un sistema di microscopia per l'analisi quantitativa di segnali fluorescenti

Tesi in

BIOINGEGNERIA MOLECOLARE E CELLULARE LM

Relatore

Prof. Emanuele D. Giordano

Presentata da

Damiano Glielmi

Correlatori

Prof. Alessandro Bevilacqua

Ing. Marilisa Cortesi

Sessione III

Anno Accademico 2013-2014

# Sommario

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Introduzione .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Background e Introduzione .....</b>  | <b>6</b>  |
| BIOLOGIA SINTETICA .....  | 6         |
| DNA RICOMBINANTE .....  | 8         |
| GREEN FLUORESCENT PROTEIN.....  | 10        |
| LA FLUORESCENZA.....  | 14        |
| <b>Strumenti di acquisizione del segnale fluorescente.....</b>                | <b>16</b> |
| IL MICROSCOPIO OTTICO A FLUORESCENZA.....                                     | 16        |
| STRUTTURA E FUNZIONAMENTO .....   | 16        |
| PROTOCOLLO DI ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI.....                                | 18        |
| ANALISI DELLE IMMAGINI .....  | 18        |
| CARATTERISTICHE DEL SEGNALE ACQUISITO .....                                   | 19        |
| LO SPETTROFLUORIMETRO .....   | 23        |
| STRUTTURA E FUNZIONAMENTO .....   | 23        |
| PROTOCOLLO ACQUISIZIONE DATI.....   | 24        |
| CARATTERISTICHE DEL SEGNALE ACQUISITO .....                                   | 26        |
| <b>Esperimenti.....</b>   | <b>28</b> |
| CARATTERIZZAZIONE DISTORSIONI.....  | 28        |
| CAMERA RESPONSE FUNCTION .....  | 29        |
| PHOTBLEACHING .....   | 31        |
| VIGNETTING .....  | 32        |
| ALTRE DISTORSIONI.....  | 33        |
| ESPERIMENTI COMPARATIVI MICROSCOPIO-FLUORIMETRO.....                          | 33        |
| OPTICAL DENSITY vs. NUMBER OF CELLS .....                                     | 34        |
| VALOR MEDIO DI FLUORESCENZA.....  | 36        |
| <b>Risultati e Conclusioni.....</b>   | <b>38</b> |
| <b>Ringraziamenti.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>APPENDICE A - PROTOCOLLI.....</b>  | <b>47</b> |
| PROTOCOLLO PREPARAZIONE CAMPIONE.....   | 47        |
| PROTOCOLLO ACQUISIZIONE IMMAGINI IN FLUORESCENZA CON MICROSCOPIO OTTICO ..... | 50        |

|   |           |
|---|-----------|
| PROTOCOLLO PER CARATTERIZZAZIONE CAMERA RESPONSE FUNCTION .....                                   | 52        |
| PROTOCOLLO PER CARATTERIZZAZIONE PHOTOBLEACHING .....   | 53        |
| PROTOCOLLO PER CARATTERIZZAZIONE VIGNETTING .....   | 54        |
| PROTOCOLLO ESPERIMENTO OPTICAL DENSITY VS NUMBER OF CELLS –<br>ACQUISIZIONI CON FLUORIMETRO ..... | 55        |
| PROTOCOLLO ESPERIMENTO VALOR MEDIO FLUORESCENZA –ACQUISIZIONI<br>CON FLUORIMETRO .....            | 57        |
| <b>APPENDICE C – OPERONE LAC.....</b>   | <b>59</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>   | <b>65</b> |

## Introduzione

---

*La **biologia sintetica** ha come obiettivo quello di generare nuovi comportamenti in organismi viventi attraverso l'applicazione di principi e modelli ingegneristici ai sistemi biologici, integrando quindi le tecniche di biologia molecolare e ingegneria genetica con la standardizzazione e la modellazione matematica tipiche dell'ingegneria (Andrianantoandro et al. 2006; Endy 2005).*

*Se infatti nelle ultime decadi sono stati costruiti sistemi biologici ingegnerizzati al fine di manipolare informazioni, costruire biomateriali, produrre energia e contribuire al mantenimento o al miglioramento della salute umana e dell'ambiente, a tale progresso si è però associata una scarsa uniformità realizzativa dei suddetti sistemi, fortemente dipendenti quasi empiricamente dal laboratorio dove sono stati implementati e dallo specifico setup.*

*La biologia sintetica, pertanto, si è presentata in questo scenario come soluzione a tale problema, suggerendo e introducendo standard generali e modularità, grazie ai quali rendere confrontabili i risultati ottenuti dai diversi laboratori per dare vita a una comunità sempre più ampia di operatori in rete.*

*Uno dei maggiori successi, proprio in ottica di standard, è quello portato dal **“Registry of Standard Biological Parts”**: una piattaforma open source in continuo sviluppo e miglioramento, consistente in una libreria di sistemi biologici (**BioBricks**) e in tecniche di assemblaggio (**Assembly**) standardizzati.*

*In uno scenario di standard così definito, risulta necessario avere anche dei sistemi di misura in grado di effettuare misure quantitative dei segnali emessi dal sistema in esame, p. es. una popolazione di batteri *E. coli* trasformati con circuiti genetici sintetici.*

*L'approccio più comunemente utilizzato in biologia sintetica per studiare e analizzare il funzionamento di un circuito genetico in vitro e per valutare il*

*livello di espressione di un gene ingegnerizzato, è quello dei geni reporter. Nel laboratorio **ICM**, come in molti altri laboratori, viene utilizzato preferenzialmente come reporter standard un gene che codifica per una proteina fluorescente, la **GFP** (green fluorescent protein).*

*L'elaborato di tesi, che rientra nell'ambito di un progetto di collaborazione tra l'equipe del laboratorio **ICM "Silvio Cavalcanti"**, coordinato dal professor Giordano, e il **CVG (Computer Vision Group)** coordinato dal professor Bevilacqua, mira alla messa a punto di un sistema di misura quantitativa di segnali fluorescenti, tramite l'elaborazione di immagini acquisite in microscopia ottica.*

## Background e Introduzione

---

### BIOLOGIA SINTETICA

Per la *High-level Expert Group European Commission (2005)* la biologia sintetica è l'ingegneria della biologia:

*“Synthetic biology is the engineering of biology: the synthesis of complex, biologically based (or inspired) systems which display functions that do not exist in nature. This engineering perspective may be applied at all levels of the hierarchy of biological structures – from individual molecules to whole cells, tissues and organisms. In essence, synthetic biology will enable the design of ‘biological systems’ in a rational and systematic way.”*

L'approccio della biologia sintetica per l'ingegnerizzazione di micro-organismi risiede nell'assemblaggio di parti biologiche, ognuna in grado di svolgere una specifica funzione, in un *circuito biologico*.

Un aspetto fondamentale che rende la biologia sintetica una disciplina ingegneristica è proprio l'introduzione della standardizzazione nella costruzione di tali circuiti (Pasotti e Magni, 2010). A tal fine, infatti, è stato sviluppato il *“Registry of Standard Biological Parts” (fig. 1)*: un database di mattoncini biologici standardizzati (chiamati appunto *Bio-Bricks*), fornendo alla comunità biologica una piattaforma sulla quale condividere conoscenze ed esperimenti con lo scopo di accelerare il processo di sviluppo di nuovi sistemi biologici (Venken et al., 2013).

I BioBricks sono delle sequenze di DNA con struttura e funzione definite, sono caratterizzati da un'interfaccia comune e sono stati progettati per l'assemblaggio (*fig. 2*) e l'introduzione in organismi viventi (Knight, 2003).

Il notevole progresso della biologia sintetica ha, d'altro canto, le sue basi nelle tecniche e nelle conoscenze sviluppate dalla biologia molecolare e dall'ingegneria genetica, come il sequenziamento del DNA e la tecnologia del DNA ricombinante, che rendono possibile manipolare il contenuto genetico delle cellule (Ceroni e Cavalcanti, 2010).

### Browse parts by type

- | Catalog | List  |
|---------|---|
|         | <b>Promoters (?)</b> : A promoter is a DNA sequence that tends to recruit transcriptional machinery and lead to transcription of the downstream DNA sequence.   |
|         | <b>Ribosome Binding Site/about (?)</b> : A ribosome binding site (RBS) is an RNA sequence found in mRNA to which ribosomes can bind and initiate translation.   |
|         | <b>Protein domains (?)</b> : Protein domains are portions of proteins cloned in frame with other proteins domains to make up a protein coding sequence. Some protein domains might change the protein's location, alter its degradation rate, target the protein for cleavage, or enable it to be readily purified.   |
|         | <b>Protein coding sequences (?)</b> : Protein coding sequences encode the amino acid sequence of a particular protein. Note that some protein coding sequences only encode a protein domain or half a protein. Others encode a full-length protein from start codon to stop codon. Coding sequences for gene expression reporters such as LacZ and GFP are also included here.  |
|         | <b>Translational units (?)</b> : Translational units are composed of a ribosome binding site and a protein coding sequence. They begin at the site of translational initiation, the RBS, and end at the site of translational termination, the stop codon.  |
|         | <b>Terminators (?)</b> : A terminator is an RNA sequence that usually occurs at the end of a gene or operon mRNA and causes transcription to stop.  |
|         | <b>DNA (?)</b> : DNA parts provide functionality to the DNA itself. DNA parts include cloning sites, scars, primer binding sites, spacers, recombination sites, conjugative transfer elements, transposons, origami, and aptamers.  |
|         | <b>Plasmid backbones (?)</b> : A plasmid is a circular, double-stranded DNA molecules typically containing a few thousand base pairs that replicate within the cell independently of the chromosomal DNA. A plasmid backbone is defined as the plasmid sequence beginning with the BioBrick suffix, including the replication origin and antibiotic resistance marker, and ending with the BioBrick prefix.   |
|         | <b>Plasmids (?)</b> : A plasmid is a circular, double-stranded DNA molecules typically containing a few thousand base pairs that replicate within the cell independently of the chromosomal DNA. If you're looking for a plasmid or vector to propagate or assemble plasmid backbones, please see the set of plasmid backbones. There are a few parts in the Registry that are only available as circular plasmids, not as parts in a plasmid backbone, you can find them here. Note that these plasmids largely do not conform to the BioBrick standard. |
|         | <b>Primers (?)</b> : A primer is a short single-stranded DNA sequences used as a starting point for PCR amplification or sequencing. Although primers are not actually available via the Registry distribution, we include commonly used primer sequences here.   |
|         | <b>Composite parts (?)</b> : Composite parts are combinations of two or more BioBrick parts.  |

### Browse devices by type

We're in the process of developing new support for the specification of devices in the Registry. For the time being, please see the existing device tables below.

- Protein generators (?)**:
- Reporters (?)**:
- Inverters (?)**:
- Receivers and senders (?)**:
- Measurement devices (?)**:

Figura 1 - Categorie dei moduli presenti nel Registry of Standard Biological Parts. (<http://parts.igem.org>)

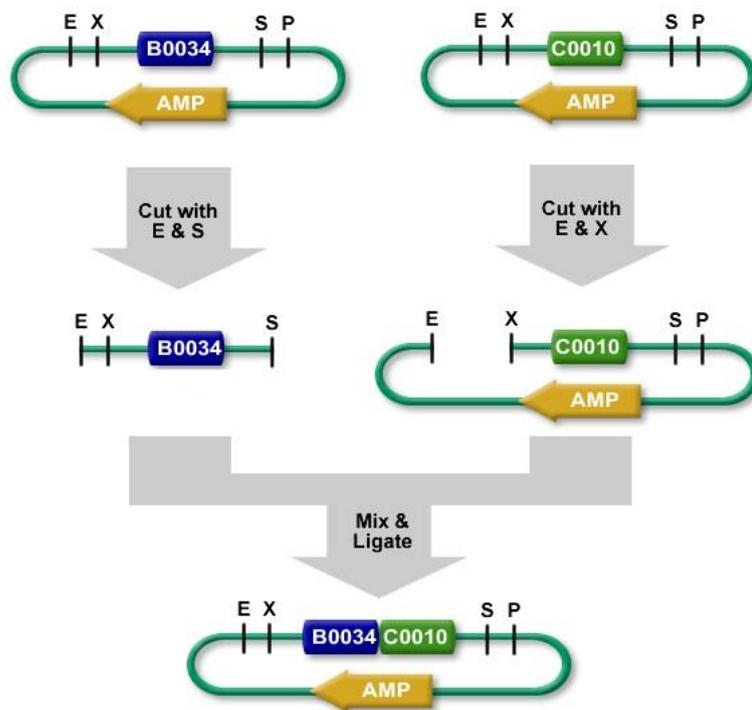


Figura 2 – Esempio di assemblaggio di biobricks tramite BioBricks Standard Assembly 10. (<http://parts.igem.org>)

## DNA RICOMBINANTE

Alla base dell'ingegneria genetica è la tecnologia del *DNA ricombinante*, tramite la quale si è in grado di realizzare circuiti genetici con sequenze provenienti da diversi organismi e di inserirle in cellule ospiti che acquisiscono nuove caratteristiche.

La tecnologia del DNA ricombinante, detta anche *clonaggio molecolare* o *ingegneria genetica*, permette di isolare, amplificare e modificare sequenze specifiche di DNA.

L'approccio illustrato di seguito viene usato per ottenere e amplificare un segmento di DNA.

1. Viene generato un segmento di DNA con opportuna sequenza, p. es. mediante sintesi chimica.
2. Il frammento è incorporato all'interno di un'altra molecola di DNA nota come vettore, che contiene le sequenze necessarie per dirigere la replicazione del DNA.
3. Il vettore, unitamente al DNA di interesse, è introdotto nelle cellule, dove viene replicato.
4. Le cellule contenenti il DNA desiderato sono identificate o selezionate.

Il clonaggio si riferisce alla produzione di un elevato numero di organismi identici, derivati da un unico progenitore, ciascuno dei quali (detto appunto clone) contiene il DNA di interesse. In un organismo ospite adatto, come batteri (*E. coli*) o lieviti (*S. Cerevisiae*), è possibile produrre grandi quantità del DNA di interesse. Nell'ambito della biologia sintetica, il clonaggio molecolare viene utilizzato per indagare l'espressione genica in condizioni controllate, e sviluppare poi nuove funzionalità nell'organismo modello utilizzato.

Come vettori di clonaggio si usano i plasmidi, una gamma di piccole molecole di DNA circolare capaci di replicazione autonoma, contenute nei batteri o nelle cellule di lievito. Queste molecole sono particolarmente sfruttate in biologia sintetica, e in generale nelle applicazioni della tecnologia del DNA ricombinante, per la loro facilità di manipolazione e per

la possibilità di selezionare facilmente gli organismi contenenti il DNA di interesse attraverso i geni per la resistenza agli antibiotici.

I plasmidi utilizzati per il clonaggio molecolare presentano un numero di copie variabile da poche unità fino a centinaia di molecole per cellula. Questo ulteriore elemento di regolazione viene modulato da una sequenza specifica di DNA detta origine di replicazione.

I plasmidi costruiti a fini di laboratorio sono relativamente piccoli, si replicano facilmente, contengono geni che specificano la resistenza nei confronti di uno o più antibiotici e un certo numero di siti per endonucleasi di restrizione, localizzati in posizioni opportune, che permettono l'inserimento del DNA esogeno (*fig. 3*) (Voet, 2013 - pag 65-76).

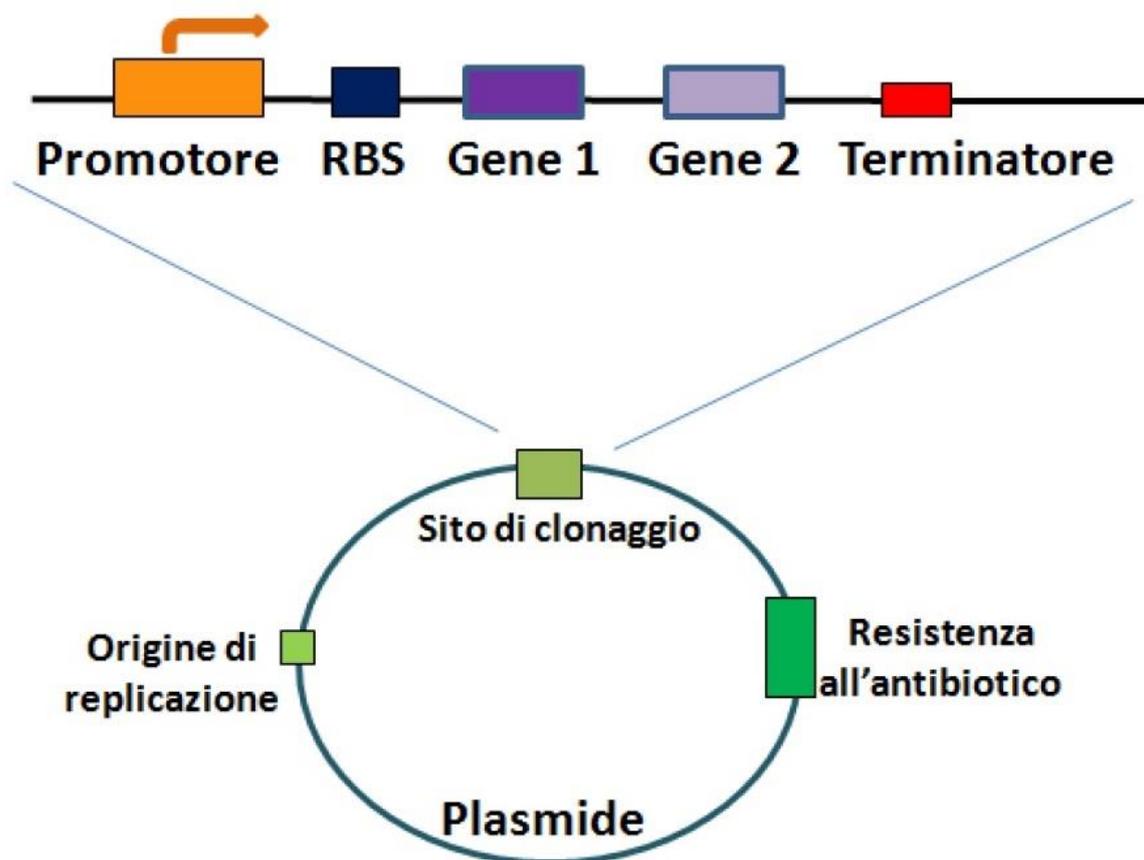


Figura 3 – Esempio di circuito genetico: esso viene inserito all'interno del sito di clonaggio presente sul plasmide necessario per la propagazione e l'espressione all'interno delle cellule. (Ceroni et al, 2010)

## GREEN FLUORESCENT PROTEIN

Con l'ingegneria genetica si può unire un gene che codifica una proteina a un "gene reporter", ed è questo l'approccio più comunemente utilizzato in biologia sintetica per studiare e analizzare il funzionamento di un circuito genetico in vitro e per valutare il livello di espressione di un gene ingegnerizzato.

Uno dei geni reporter di maggiore utilizzo è quello che codifica la proteina fluorescente verde o GFP (GFP, green fluorescent protein), originariamente individuata nella medusa bioluminescente *Aequorea Victoria* (*Shimomura et al 1962*) e che emette fluorescenza ad un picco e una lunghezza d'onda pari a 508 nm (luce verde) in seguito a irraggiamento con luce ultravioletta o blu (lunghezza d'onda ottimale a 400 nm). Questa proteina non è tossica ed è intrinsecamente fluorescente. Essa non richiede un substrato o una piccola molecola che funga da cofattore per emettere il segnale fluorescente, come spesso accade per altre proteine. In conseguenza, il suo livello di espressione può essere facilmente valutato quantitativamente con una vasta gamma di strumenti, ad esempio con un microscopio a fluorescenza.

La proteina GFP è costituita da una catena di 238 residui amminoacidici (**fig 4**), tre dei quali (Ser, Tyr e Gly) sono direttamente responsabili dell'emissione luminosa. (Voet, 2013 - pag 94)

La struttura terziaria della GFP è costituita da 11 foglietti beta disposti a formare un cosiddetto barile- $\beta$ . Alla sua base e lungo il suo asse centrale sono presenti due eliche- $\alpha$ , alle quali si lega il fluoroforo (*Tsien, 1998*). Questa particolare struttura consente al fluoroforo, contenuto all'interno del barile- $\beta$  (**fig. 5**), di essere meno esposto a reagenti che potrebbero causarne la disattivazione, presentando quindi caratteristiche di sbiancamento (*photobleaching*) relativamente più blande (*Hoang et al, 1997*).

```

ATG      AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT CTT GTT GAA TTA GAT GGT 60
ATG GTG  AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC
Met      Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly
1 Val    5          10          15          20
(1a)
GAT GTT AAT GGG CAC AAA TTT TCT GTC AGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT GCA ACA TAC GGA 120
GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC
Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly
          25          30          35          40

AAA CTT ACC CTT AAA TTT ATT TGC ACT ACT GGA AAA CTA CCT GTT CCA TGG CCA ACA CTT 180
AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG CCC ACC CTC
Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu
          45          50          55          60

GTC ACT ACT TTC TCT TAT GGT GTT CAA TGC TTT TCA AGA TAC CCA GAT CAT ATG AAA CAG 240
GTG ACC ACC CTG ACC TAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC CGC TAC CCC GAC CAC ATG AAG CAG
Val Thr Thr Phe Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
          65          70          75          80

CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG CCC GAA GGT TAT GTA CAG GAA AGA ACT ATA TTT TTC 300
CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC ATC TTC TTC
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe
          85          90          95          100

AAA GAT GAC GGG AAC TAC AAG ACA CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAA GGT GAT ACC CTT GTT 360
AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC CGC GCC GAG GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC CTG GTG
Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val
          105          110          115          120

AAT AGA ATC GAG TTA AAA GGT ATT GAT TTT AAA GAA GAT GGA AAC ATT CTT GGA CAC AAA 420
AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC ATC GAC TTC AAG GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG
Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
          125          130          135          140

TTG GAA TAC AAC TAT AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC ATG GCA GAC AAA CAA AAG AAT GGA 480
CTG GAG TAC AAC TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC GGC
Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
          145          150          155          160

ATC AAA GTT AAC TTC AAA ATT AGA CAC AAC ATT GAA GAT GGA AGC GTT CAA CTA GCA GAC 540
ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC GGC AGC GTG CAG CTC GCC GAC
Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp
          165          170          175          180

CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA CCA GAC AAC CAT TAC 600
CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC CCC GTG CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC
His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr
          185          190          195          200

CTG TCC ACA CAA TCT GCC CTT TCG AAA GAT CCC AAC GAA AAG AGA GAC CAC ATG GTC CTT 660
CTG AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTC CTG
Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
          205          210          215          220

CTT GAG TTT GTA ACA GCT GCT GGG ATT ACA CAT GGC ATG GAT GAA CTA TAC AAA TAA TAA 720
CTG GAG TTC GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAA
Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Stop
          225          230 Leu          235

```

Figura 4 - Sequenze primarie di due tipi di GFP: nella prima linea il wild type (WT), e nella seconda linea una versione modificata (EGFP).  
(Tsien, 1998)

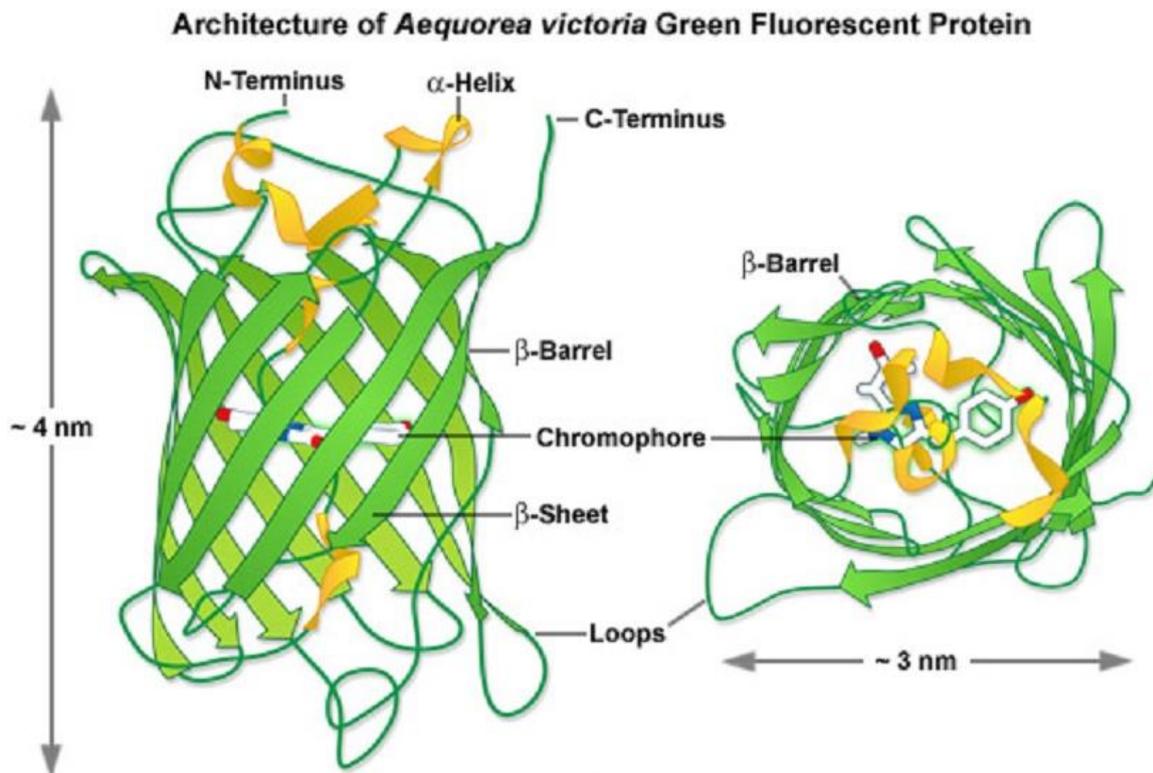


Figura 5 - Struttura tridimensionale della Green Fluorescent Protein.  
 (<http://httpzeiss-campus.magnet.fsu.edu>)

La GFP negli ultimi anni è diventata un marcatore molto utilizzato in biologia molecolare per le sue caratteristiche di stabilità, modeste dimensioni e per la possibilità che offre di modificarne entro certi limiti le proprietà spettroscopiche.

Sono stati realizzati molti tipi di GFP tramite mutazioni del gene della GFP naturale, chiamata *wild type*. Tali mutazioni, oltre ad avere differenti caratteristiche spettroscopiche reagiscono in maniera diversa a differenti condizioni di lavoro, come pH e temperatura: dando così maggiori possibilità di scelta allo sperimentatore a seconda delle sue esigenze (**fig. 6**).

I reporter fluorescenti possono essere clonati all'interno del circuito genetico in due modalità: a valle della proteina di interesse per cui devono agire da reporter, o come proteine di fusione (*Ceroni et al., 2010*). In quest'ultimo caso, la sequenza di un gene di interesse e del reporter sono fusi, in modo tale da non essere prodotti separatamente nella cellula formando un'unica proteina.

| Mutation  | Common name | $\lambda_{exc}$ ( $\epsilon$ )      | $\lambda_{em}$ (QY) | Rel. fl. @ 37°C | References |
|---|-------------|-------------------------------------|---------------------|-----------------|------------|
| <b>Class 1, wild-type</b>   |             |                                     |                     |                 |            |
| None or Q80R  | Wild type   | 395–397 (25–30)<br>470–475 (9.5–14) | 504 (0.79)          | 6               | 43, 45     |
| F99S, M153T, V163A  | Cycle 3     | 397 (30)<br>475 (6.5–8.5)           | 506 (0.79)          | 100             | 43, 45     |
| <b>Class 2, phenolate anion</b>   |             |                                     |                     |                 |            |
| S65T  |             | 489 (52–58)                         | 509–511 (0.64)      | 12              | 43–45      |
| F64L, S65T  | EGFP        | 488 (55–57)                         | 507–509 (0.60)      | 20              | 43–45      |
| F64L, S65T, V163A   |             | 488 (42)                            | 511 (0.58)          | 54              | 44         |
| S65T, S72A, N149K, M153T, I167T   | Emerald     | 487 (57.5)                          | 509 (0.68)          | 100             | 44         |
| <b>Class 3, neutral phenol</b>  |             |                                     |                     |                 |            |
| S202F, T203I  | H9          | 399 (20)                            | 511 (0.60)          | 13              | 44         |
| T203I, S72A, Y145F  | H9–40       | 399 (29)                            | 511 (0.64)          | 100             | 44         |
| <b>Class 4, phenolate anion with stacked <math>\pi</math>-electron system (yellow fluorescent proteins)</b> |             |                                     |                     |                 |            |
| S65G, S72A, T203F   |             | 512 (65.5)                          | 522 (0.70)          | 6               | 44         |
| S65G, S72A, T203H   |             | 508 (48.5)                          | 518 (0.78)          | 12              | 44         |
| S65G, V68L, Q69K, S72A, T203Y   | 10C Q69K    | 516 (62)                            | 529 (0.71)          | 50              | 44         |
| S65G, V68L, S72A, T203Y   | 10C         | 514 (83.4)                          | 527 (0.61)          | 58              | 44         |
| S65G, S72A, K79R, T203Y   | Topaz       | 514 (94.5)                          | 527 (0.60)          | 100             | 44         |
| <b>Class 5, indole in chromophore (cyan fluorescent proteins)</b>   |             |                                     |                     |                 |            |
| Y66W  |             | 436                                 | 485                 | —               | 21         |
| Y66W, N146I, M153T, V163A   | W7          | 434 (23.9)                          | 476 (0.42)          | 61              | 44         |
| F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A   | W1B or ECFP | 452                                 | 505                 | 80              | 44         |
| S65A, Y66W, S72A, N146I, M153T, V163A   | W1C         | 435 (21.2)                          | 495 (0.39)          | 100             | 44         |
| <b>Class 6, imidazole in chromophore (blue fluorescent proteins)</b>  |             |                                     |                     |                 |            |
| Y66H  | BFP         | 384 (21)                            | 448 (0.24)          | 18              | 44         |
| Y66H, Y145F   | P4–3        | 382 (22.3)                          | 446 (0.3)           | 52              | 44         |
| F64L, Y66H, Y145F   | EBFP        | 380–383 (26.3–31)                   | 440–447 (0.17–0.26) | 100             | 43, 44     |
| <b>Class 7, phenyl in chromophore</b>   |             |                                     |                     |                 |            |
| Y66F  |             | 360                                 | 442                 | —               | 22         |

Figura 6 - Caratteristiche spettrali delle principali classi di green fluorescent proteins (GFPs). (Tsién, 1998)

Prima di passare in rassegna però, i sistemi solitamente usati per la rilevazione del segnale fluorescente in un laboratorio di ricerca biomedica, diamo uno sguardo a quello che è il fenomeno della fluorescenza da un punto di vista fisico.

## LA FLUORESCENZA

Le radiazioni elettromagnetiche si propagano sotto forma di quantità discrete di energia dette **quanti** (fotoni).

La quantità di energia  $E$  di un quanto è data dalla **legge di Planck**:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

con:

- $h$  costante di Planck ( $6,626 \times 10^{-34}$  J·s);
- $c$  velocità della luce ( $2,998 \times 10^8$  m·s<sup>-1</sup> nel vuoto);
- $\nu$  frequenza della radiazione;
- $\lambda$  lunghezza d'onda della radiazione.

Quando una molecola assorbe un fotone, uno dei suoi elettroni viene trasferito dal suo orbitale molecolare di base (a energia più bassa) a uno superiore, a maggiore energia. Tuttavia, una data molecola può assorbire solo fotoni con una determinata lunghezza d'onda in quanto, come stabilito dalla legge di conservazione dell'energia, la differenza di energia tra i due stati deve corrispondere esattamente all'energia del fotone assorbito. Una molecola così eccitata può dissipare la sua energia di eccitazione in vari modi: per *conversione interna*, per *fluorescenza*, per *trasferimento di un eccitone* e per *fotoossidazione* (Voet, 2013 - pag 662).

Per **fluorescenza**, si intende quel fenomeno per il quale la molecola eccitata decade al suo stato energetico di base, emettendo un fotone. Il fotone emesso sotto forma di fluorescenza ha generalmente una lunghezza d'onda maggiore (energia più bassa) rispetto a quello assorbito inizialmente (**fig. 7**).

In diversi ambiti scientifici, si ricorre ormai al fenomeno della fluorescenza come metodo non distruttivo per tener traccia o analizzare molecole biologiche attraverso un'emissione fluorescente associata. Nel nostro caso particolare, tale fenomeno viene utilizzato per il buon livello di precisione di misura sulla popolazione batterica, promosso inoltre dalla facile induzione di fluorescenza in batteri. Come visto nei paragrafi precedenti, infatti, esistono tecniche consolidate, mutate dalla biologia molecolare, che permettono di

introdurre nei batteri DNA esogeno (trasformazione) e quindi associare la produzione di un fluoroforo (es: GFP) a quella di una proteina di interesse, inducendo quindi una relazione di proporzionalità tra le concentrazioni delle due molecole.

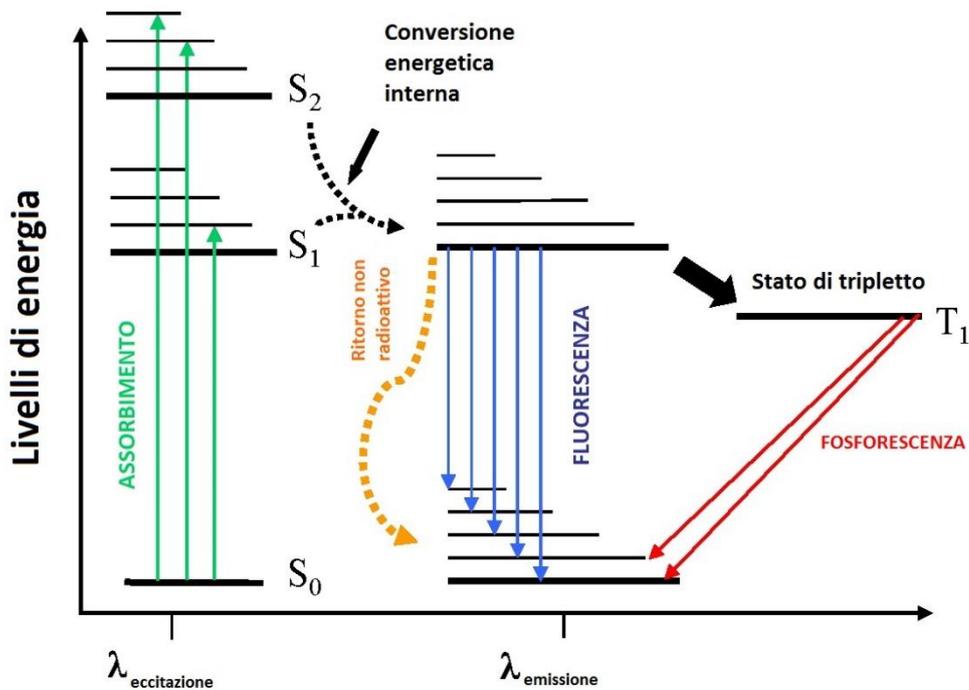


Figura 7 - Diagramma di Jablonski: rappresenta la transizione di energia in un caso generico di fluorescenza (<http://upload.wikimedia.org>)

Esistono diversi approcci per la rivelazione di segnali in fluorescenza, e nel prossimo capitolo verranno affrontati i due maggiormente utilizzati nell'ambito della biologia sintetica: la *microscopia ottica in fluorescenza*, e la *spettrofluorimetria*.

## Strumenti di acquisizione del segnale fluorescente

---

Il laboratorio ICM dispone di un microscopio ottico in fluorescenza NIKON TE 2000U e di un lettore multi piastra TECAN INFINITE M200, entrambi in grado di effettuare misure in fluorescenza. Una delle principali differenze tra i due strumenti sta nella precisione sul dato analizzato: il microscopio viene tradizionalmente utilizzato per misure qualitative, mentre il lettore multi piastra per misure quantitative. In seguito troviamo i principi di funzionamento di un microscopio ottico in fluorescenza e di un lettore multi piastra generici.

### IL MICROSCOPIO OTTICO A FLUORESCENZA

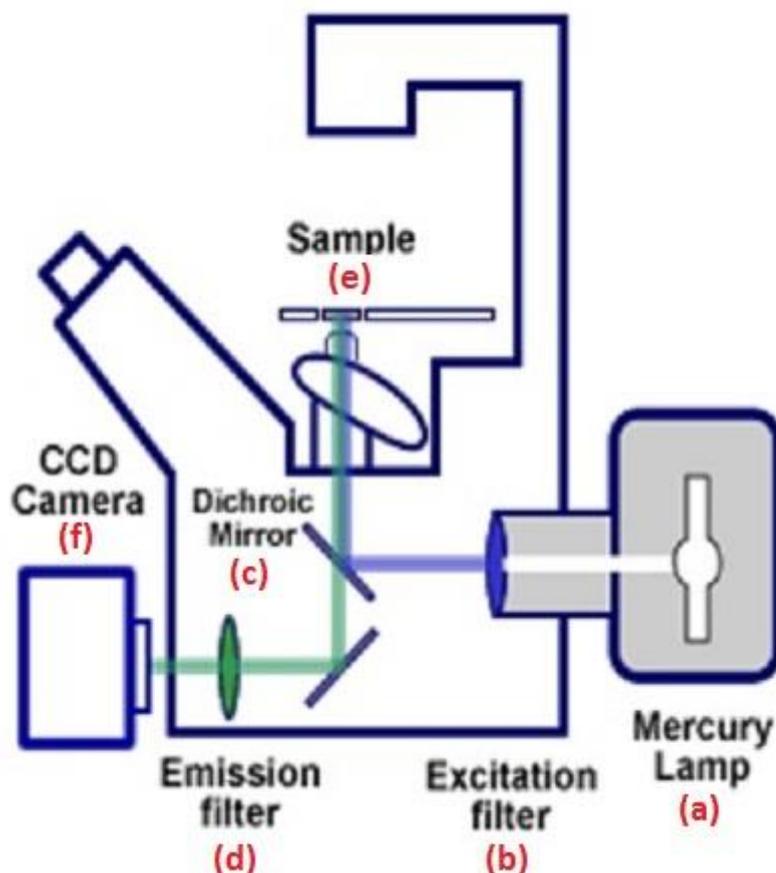
Come già anticipato, il fenomeno della fluorescenza si presenta quando una sostanza assorbe luce a una determinata lunghezza d'onda e simultaneamente emette parte di questa energia a una lunghezza d'onda maggiore, di solito nella regione visibile dello spettro. Per poter osservare tale fenomeno attraverso un microscopio, è necessario dunque illuminare l'oggetto (*fig. 8-e*) con luce ad alta intensità e a una specifica lunghezza d'onda.

### STRUTTURA E FUNZIONAMENTO

Nella microscopia a fluorescenza le cellule vengono illuminate con un fascio di luce a una lunghezza d'onda specifica, quale è quella assorbita dal campione (lunghezza d'onda di eccitazione), determinando l'emissione di luce a una diversa lunghezza d'onda (lunghezza d'onda di emissione).

Le lunghezze d'onda, di eccitazione e di emissione, sono caratteristiche per ciascun reporter fluorescente e possono essere selezionate e discriminate grazie all'utilizzo di appositi filtri o di un monocromatore. In un microscopio a fluorescenza la luce incidente sul campione è emessa tipicamente da una lampada a vapori di mercurio (*fig. 8-a*) che emette radiazioni nella regione a bassa lunghezza d'onda del visibile e nel vicino ultravioletto. Nel percorso

ottico, prima di raggiungere il campione, la radiazione viene convogliata e selezionata da un sistema di filtri di eccitazione (*fig 8-b*), dicroico (*fig 8-c*) e sbarramento (*fig 8-d*).



---

Figura 8 - Schema rappresentativo di un microscopio ottico in fluorescenza (<http://www.bristol.ac.uk>)

I filtri di eccitazione permettono di illuminare il campione con lunghezze d'onda selezionate provenienti dalla sorgente luminosa, i filtri di sbarramento sono invece scelti per bloccare (assorbire) le lunghezze d'onda d'eccitazione e permettono di far passare solo le lunghezze d'onda emesse dal campione, infine gli specchi dicroici sono specializzati nel riflettere efficientemente lunghezze d'onda d'eccitazione e lasciare passare lunghezze d'onda d'emissione.

## PROTOCOLLO DI ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI

Il principale utilizzo del microscopio in dotazione al laboratorio ICM di Cesena consiste nell'acquisizione di immagini in fluorescenza con lo scopo di stimare l'intensità del segnale emesso dalla GFP. Questo valore viene generalmente considerato proporzionale alla concentrazione della proteina stessa permettendone quindi la quantificazione.

L'acquisizione di immagini al microscopio ottico in fluorescenza, prevede l'esecuzione di determinati protocolli come previsto dal set-up sperimentale e dal tipo di esperimento in questione.

Di norma, per un'acquisizione generica sono previsti i seguenti passi:

- Preparazione dei vetrini secondo il protocollo previsto per il test;
- Messa a fuoco campione in campo chiaro per non sottoporre il campione a eccessiva stimolazione in fluorescenza;
- Passaggio alla modalità di fluorescenza:
  - Perfezionamento messa a fuoco;
  - Scelta campo da acquisire.
- Acquisizione immagini tramite il sistema fotocamera digitale (attraverso un software dedicato);
- Salvataggio dati, e pre-elaborazioni sul formato:

Per maggiori delucidazioni, si rimanda il lettore all'appendice per avere indicazioni specifiche sui protocolli utilizzati negli esperimenti condotti.

## ANALISI DELLE IMMAGINI

Il vantaggio principale della microscopia ottica in fluorescenza, consiste nella possibilità di avere accesso ad un dato "grezzo", rappresentato dall'immagine acquisita tramite l'utilizzo di una fotocamera digitale (*fig 8-f*).

Tale dato, è rappresentato da una matrice di pixel (dove la risoluzione dipende dal tipo di sensore CCD della fotocamera in questione), ognuno dei quali a un valore numerico oscillante tra 0 e  $2^n-1$  (dove  $n$  è il numero di bit del formato scelto) (*fig 9*). È dunque possibile, date le tecniche di analisi e

processo di immagine, lavorare tale dato numerico al fine di avere un'informazione quantitativa sull'esperimento in questione.

Le informazioni quantitative ottenibili da questo tipo di dato possono essere svariate: dalla semplice conta dei batteri in un campo acquisito, alla valutazione della distribuzione di fluorescenza di una popolazione batterica.

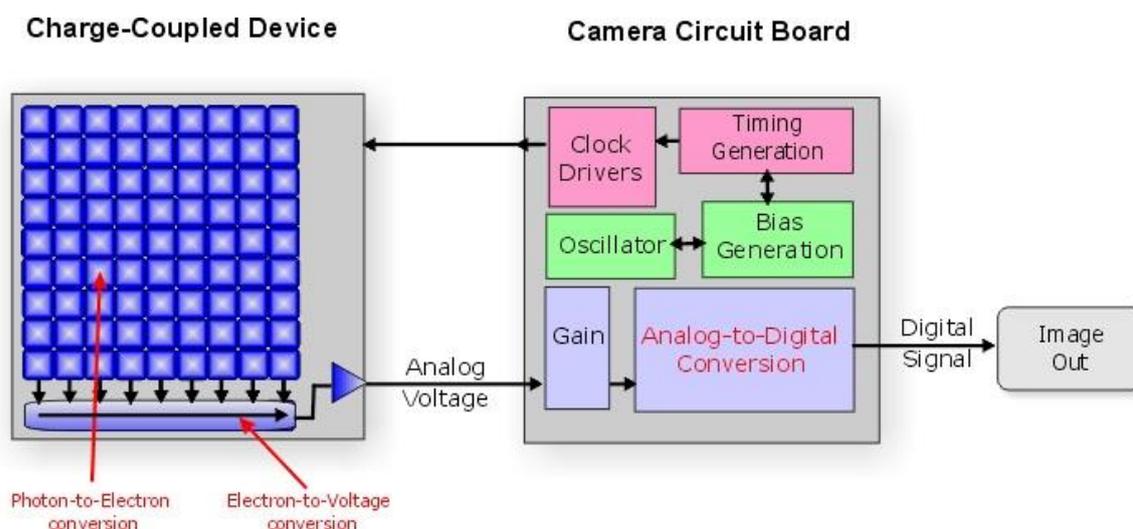


Figura 9 - Schema di acquisizione dell'immagine digitale, dal sensore CCD all'immagine numerica acquisita al calcolatore (<http://exoplanet.as.arizona.edu>)

## CARATTERISTICHE DEL SEGNALE ACQUISITO

Il problema principale dell'immagine digitale acquisita tramite microscopia in fluorescenza, è legata alla presenza di una serie di distorsioni introdotte dal sistema di acquisizione. Tali aberrazioni, sono legate al set-up sperimentale stesso e sono riconducibili agli effetti della *Camera Response Function*, al fenomeno del *Photobleaching*, al fenomeno del *Vignetting*, e ad altri fenomeni distorsivi secondari.

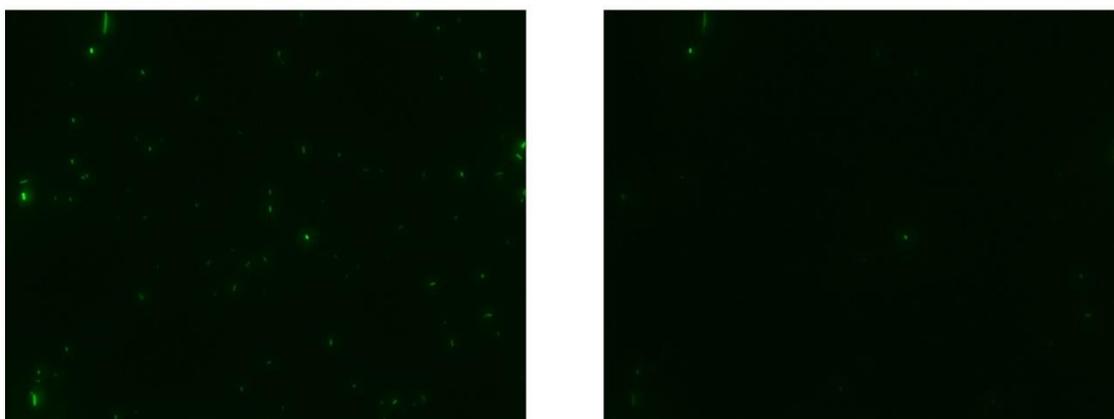
Ovviamente, al fine di utilizzare tale dato a scopi di misura quantitativa, è strettamente necessario caratterizzare tali distorsioni e poterle successivamente correggerle.

## *CAMERA RESPONSE FUNCTION*

La **Camera Response Function** (di qui in seguito **CRF**) è una curva che descrive le distorsioni introdotte dalla specifica fotocamera utilizzata, ovvero come la radianza che arriva sul sensore viene trasformata nell'intensità dei pixel dell'immagine. Il sensore CCD presente nella fotocamera digitale collegata al microscopio, è progettato per produrre segnali elettrici direttamente proporzionali alla luminosità della scena registrata I. Purtroppo tale relazione non risulta essere lineare, a causa delle varie fasi di acquisizione dell'immagine, come ad esempio la conversione ADC (*fig. 9*), e risulta perciò necessario trovare una relazione che permetta di valutare la radianza effettiva della scena I, a partire dalla luminosità M prodotta dal sistema di acquisizione (Arcaroli, 2010).

## *PHOTOBLEACHING*

Il **photobleaching** è un fenomeno legato al decadimento nel tempo del segnale fluorescente, a causa della distruzione fotochimica del fluoroforo da parte della radiazione eccitante. In microscopia, il photobleaching, influisce sull'osservazione e sull'analisi di molecole fluorescenti, a causa della probabilità di essere distrutte dalla luce alla quale vengono esposte per stimolare la loro stessa fluorescenza.



---

Figura 10 - Effetti del photobleaching: stesso campione acquisito all'istante 0 (a sinistra) e a distanza di 4 minuti (a destra). Esposizione 60ms (Acquisizioni effettuate nel laboratorio ICM)

Tale fenomeno risulta legato alla quantità di radiazione ricevuta dal fluoroforo, e dunque al tempo totale di esposizione, motivo per il quale risulta particolarmente rilevante nelle acquisizioni a tempo risolto (time-lapse) (*fig. 10*).

### *VIGNETTING*

Il **vignetting** è un altro tipo di distorsione che affligge l'acquisizione dell'immagine digitale e consiste nell'effetto di attenuazione radiale dell'intensità luminosa dell'immagine (dal centro dell'asse ottico fino ai bordi della stessa) (*fig. 11*). Tale effetto, intrinsecamente legato ai sistemi ottici, rappresenta un problema per quanto riguarda la parte di image analysis legato a stage di processazioni come la segmentazione e l'object tracking (Piccinini et al, 2012).



Figura 11 - Effetto vignetting (<http://digitalphotographylive.com>)

### *ALTRE DISTORSIONI*

Oltre ai fenomeni suddetti, compromettono la misura altri elementi legati alle variabilità nello svolgimento dell'esperimento come condizioni atmosferiche (p. es. possono influenzare la luminosità dell'ambiente di laboratorio), la preparazione del campione utilizzato e l'operatore; ma anche

variabilità intrinseche allo stesso set-up, come l'intensità della lampada (che è legata a un inevitabile decadimento temporale per l'usura).

La possibilità di correggere tali distorsioni, rende la microscopia in fluorescenza uno strumento molto importante per l'analisi quantitativa in biologia sintetica: grazie ad essa infatti è possibile ottenere informazioni su singola cellula, e dunque avere informazioni più complete sulla popolazione cellulare. Tramite l'osservazione di un gran numero di cellule, si possono calcolare informazioni statistiche come media e varianza di grandezze biologiche di interesse. In riferimento a questi, p. es., un dato importante ricavabile tramite microscopia è legato alla morfologia della singola cellula, informazione non ricavabile con altri strumenti, come il fluorimetro, che forniscono solamente informazioni circa il valore medio della popolazione (*Giorni, 2011*).

Tale tecnologia, però, non è esente da difetti: il procedimento di preparazione del vetrino, le condizioni di vita cellulare nello stesso, e la difficoltà nell'automatizzare le acquisizioni, possono introdurre dei bias non indifferenti nella misura. Problema però facilmente risolvibile, grazie all'utilizzo di un sistema di incubatore per microscopio e di un microscopio con messa a fuoco automatica.

## LO SPETTROFLUORIMETRO

Il lettore multi piastra viene utilizzato per valutare la fluorescenza totale presente nel campione in esame. Tale strumento è un fluorimetro in grado di leggere la fluorescenza direttamente da piastre multi-pozzetto, soluzione altamente vantaggiosa nel caso si vogliono svolgere analisi simultanee su diversi campioni (circuiti genetici), oppure inserire replicati tecnici e replicati biologici di un campione sulla stessa piastra, per migliorare il dato ottenuto.

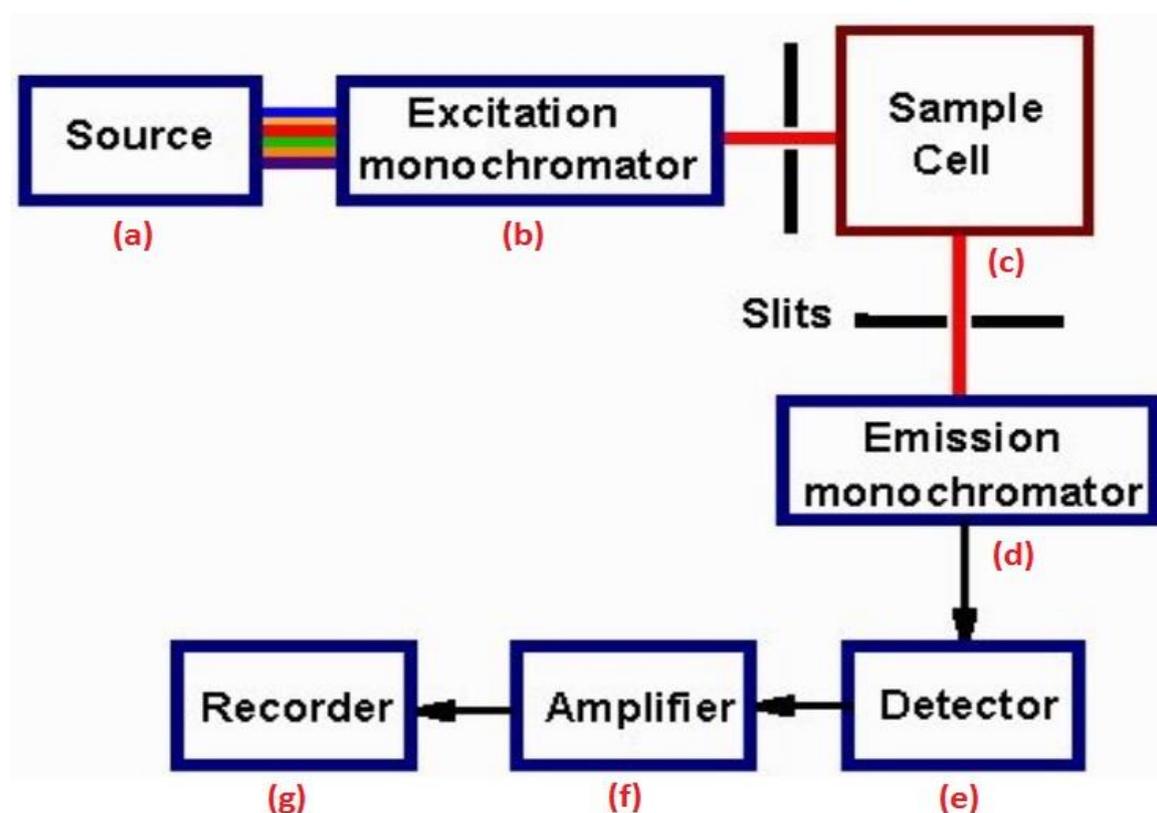


Figura 12 - Schema a blocchi di un fluorimetro  
(<http://omero.farm.unipi.it>)

## STRUTTURA E FUNZIONAMENTO

Ovviamente anche la fluorimetria sfrutta il principio per cui alcune molecole emettono luce in uno spettro caratteristico (lo spettro di emissione) immediatamente dopo aver assorbito energia radiante ed essere state portate

in uno stato eccitato. Diversi sorgenti, selettori di lunghezza d'onda e circuiti di rivelazione vengono usati in fluorimetri di diversa sensibilità (*Webster, 2010*). Per quanto riguarda il fluorimetro utilizzato nel laboratorio ICM, il sistema è composto da una sorgente di luce (lampada di arco allo xenon, condensatore, blocco filtri) (*fig 12-a*), un monocromatore di eccitazione (in grado di selezionare tutte le lunghezze d'onda nel range 230 nm : 850 nm) (*fig. 12-b*), delle fibre ottiche di eccitazione e trasmissione, un monocromatore di emissione (anche questo in grado di ricevere tutte le lunghezze d'onda nel range 230 nm : 850 nm) (*fig 12-d*) ed infine di un sistema di detezione (filtri e fotomoltiplicatore) (*fig 12-e*). Oltre alla fluorescenza totale presente nel campione, il lettore multi piastra è in grado di registrare valori di densità ottica (OD), grandezza utile a identificare la fase di crescita cellulare e indispensabile per la normalizzazione dei dati.

## PROTOCOLLO ACQUISIZIONE DATI

Per la preparazione dei costrutti da analizzare, si segue la stessa procedura utilizzata per le analisi al microscopio in fluorescenza (vedi appendice), ma in questo caso non è prevista la preparazione di un vetrino.



Figura 13 - Piastre per fluorimetro (<http://www.tecan.com>)

Con il lettore multi-piastra, data la possibilità di analizzare più costrutti nello stesso esperimento, si procede con la preparazione della piastra (*fig. 13*) scegliendo la quantità di campione da inserire in ogni pozzetto, la disposizione dei campioni nei diversi pozzetti della piastra, e il tipo di campioni da inserirvi (replicati tecnici, replicati biologici, terreno di coltura, etc.).

Una volta identificata la disposizione, e specificata nell'interfaccia software dello strumento (*fig. 14*), si definiscono le impostazioni che l'apparecchio dovrà seguire nell'arco della durata dell'esperimento:

- Modello piastra utilizzata;
- Range di temperatura da mantenere;
- Numero di cicli dell'esperimento;
- Azioni meccaniche:
  - Shaking;
  - Move plate out.
- Misure di assorbanza
  - Lunghezze d'onda;
  - Numero di flash.
- Misure di fluorescenza
  - Lunghezze d'onda;
  - Numero di flash;
  - Guadagno.

Il dato in output, dal quale procedere con le elaborazione quantitative, è un foglio di calcolo .xls in cui sono contenute le misure di assorbanza e fluorescenza di ogni pozzetto per ognuno dei cicli previsti dall'esperimento.

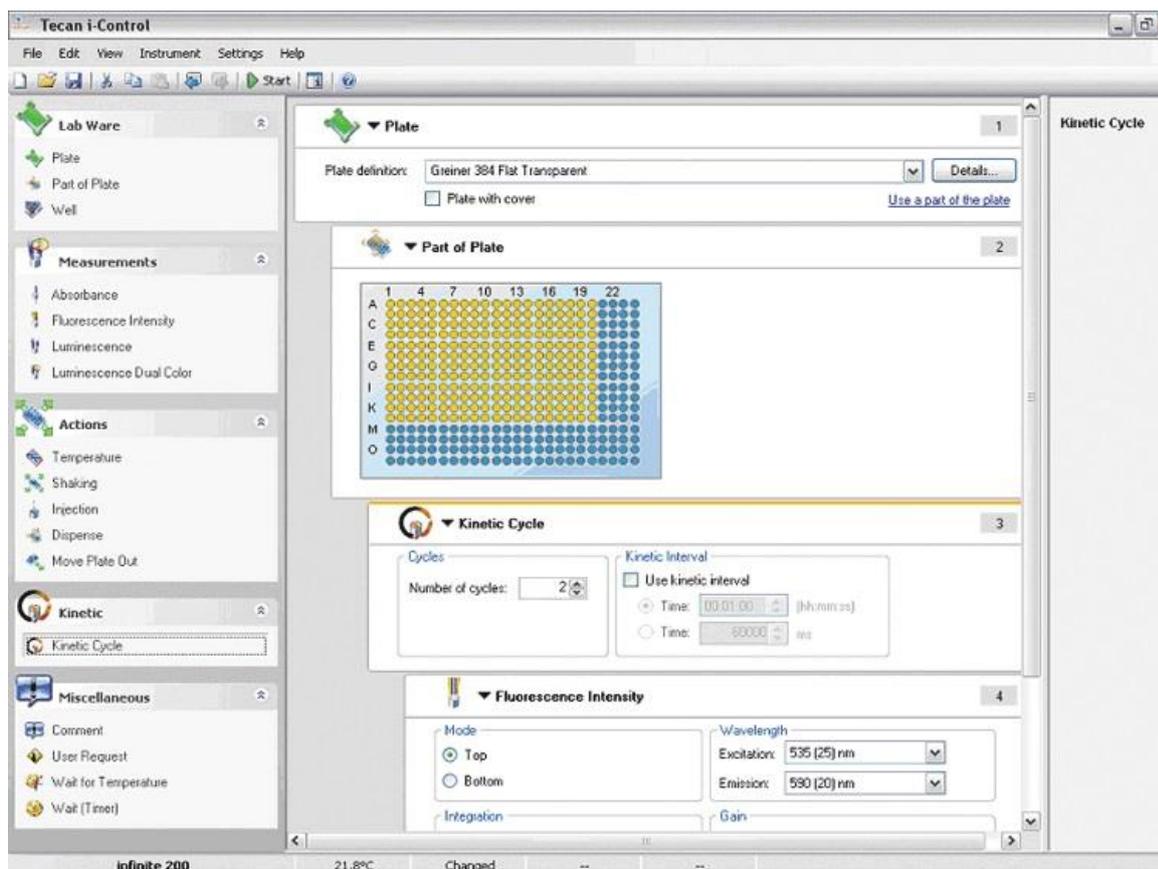


Figura 14 - Screenshot del software proprietario per la preparazione di un esperimento al fluorimetro (<http://www.tecan.com>)

## CARATTERISTICHE DEL SEGNALE ACQUISITO

Il segnale acquisito tramite fluorimetria, è relativo al valore di fluorescenza media misurata in ogni singolo pozzetto, e dunque riferito a ogni soluzione analizzata. Tale dato in fluorescenza può essere utilizzato per valutare la concentrazione della molecola fluorescente in soluzione, considerando i fotoni emessi proporzionali alla quantità di fluoroforo presente. Tale relazione, però, presenta caratteristiche lineari soltanto a basse concentrazioni di fluoroforo ( $<10^{-5}$  M).

La relazione che lega la concentrazione del fluoroforo alla fluorescenza emessa dal campione può essere modellata nel modo seguente:

$$F = K * Q_y * I_0 * (1 - 10^{-\epsilon * b * c})$$

con:

- $F$  intensità della fluorescenza;
- $K$  costante geometrica propria dello strumento;
- $Q_y$  efficienza quantica del fluoroforo (fotoni emessi/fotoni assorbiti);
- $I_0$  intensità della luce incidente;
- $\epsilon$  coefficiente di estinzione molare;
- $b$  lunghezza del percorso ottico;
- $c$  concentrazione del fluoroforo.

A concentrazioni minori di  $10^{-5}$  M però questa relazione può essere approssimata con la seguente relazione lineare:

$$F = K * Q_y * I_0 * 2.303 * \epsilon * b * c$$

Misure quantitative assolute risultano quindi possibili anche se spesso risultano più accurate misure quantitative relative, cioè riferite a una misura standard di un campione definito unitario ed espresse in unità arbitrarie di fluorescenza: in questo modo, infatti, si svincola il valore misurato dalla dipendenza dallo strumento di misura (per lo spettrofluorimetro vi è dipendenza da: l'intensità della lampada, l'efficienza dei monocromatori, la banda passante utilizzata, la sensibilità del tubo fotomoltiplicatore, etc.).

Rispetto a quanto visto per la microscopia in fluorescenza, la fluorimetria presenta diversi vantaggi che fanno sì che tale tecnologia sia tra le più utilizzate nell'ambito della misura di segnali fluorescenti in biologia sintetica: ridotta manipolazione del campione, valutazione integrata dell'assorbanza, mantenimento delle condizioni di crescita fisiologiche e possibilità di acquisizioni dinamiche.

Purtroppo però, per come è concepita e realizzata, tale misura fornisce soltanto informazioni medie sul campione analizzato. Il dato ricavato è rappresentativo infatti solo della fluorescenza media, problema invece che non si presenterebbe, nel caso si affermasse un sistema sperimentale in grado di fare valutazioni della densità di fluorescenza di un intero campione tramite microscopia in fluorescenza. Ed è proprio per questo che sono stati effettuati gli esperimenti di cui si parlerà nel seguente capitolo.

## Esperimenti

---

Gli esperimenti presentati in questo lavoro si sono svolti nel laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare ICM, in un periodo compreso tra Settembre 2014 e Marzo 2015, destinati alla messa a punto di un sistema di acquisizione per misure quantitative di fluorescenza tramite microscopia ottica. Tale lavoro rientra nell'ambito di un progetto di collaborazione tra l'equipe del laboratorio ICM, coordinato dal professor Giordano, e il CVG (Computer Vision Group) coordinato dal professor Bevilacqua.

Per la messa a punto del set-up per misure quantitative di fluorescenza tramite microscopia ottica in fluorescenza, si è suddiviso il lavoro in due parti principali: in prima istanza si è cercato di caratterizzare e dunque compensare le aberrazioni legate al sistema di acquisizione di cui si è parlato nel precedente capitolo; in un secondo momento, invece, si è ricorso ad una serie di esperimenti in parallelo tra il microscopio NIKON TE2000U e il fluorimetro TECAN INFINITE M200 per testare la validità e robustezza del suddetto set-up.

### CARATTERIZZAZIONE DISTORSIONI

Come già anticipato, uno dei limiti fondamentali che limitano l'impiego delle immagini ottenute tramite microscopia per misure quantitative, sono le aberrazioni che affliggono lo strumento di acquisizione

Per stimare in maniera corretta il segnale di interesse, dunque, si è proceduto alla caratterizzazione di tale sistema in tre step fondamentali, riguardanti:

- Camera Response Function;
- Photobleaching;
- Vignetting;
- Distorsioni secondarie.

Vediamo ora nel dettaglio le scelte effettuate per la caratterizzazione e correzione di tali alterazioni.

## CAMERA RESPONSE FUNCTION

L'aberrazione principale da caratterizzare, come detto nel precedente capitolo, è frutto della relazione non lineare tra la luminosità  $M$  registrata dal sistema di acquisizione e la radianza effettiva della scena  $I$ .

Consideriamo questa trasformazione descrivibile tramite una funzione  $g(I)$ :

$$M = g(I)$$

per risolvere il problema occorre ricavare la funzione inversa:

$$f = g^{-1}$$

in modo da ricavare  $I$  come:

$$I = f(M)$$

Per questa valutazione, è stato scelto il modello proposto da Mitsunaga (*Mitsunaga et al., 1999*), con le estensioni apportate da Bevilacqua (*Bevilacqua et al., 2008*), secondo cui la CRF può essere approssimata con un polinomio, e stimata attraverso una serie di immagini successive dello stesso soggetto a esposizione diversa: dato che, in questo scenario, varia solamente l'intensità luminosa rilevata e non la radianza della scena.

Il modello suddetto prevede la caratterizzazione della CRF stimandola con una funzione polinomiale di ordine  $N$  e coefficienti  $c_n$  così definita:

$$I = f(M) = \sum_{n=0}^N c_n M^n$$

con:

- $M$  matrice dei valori dei pixel;
- $I$  energia luminosa raccolta dai pixel;
- $f$  funzione di risposta della fotocamera.

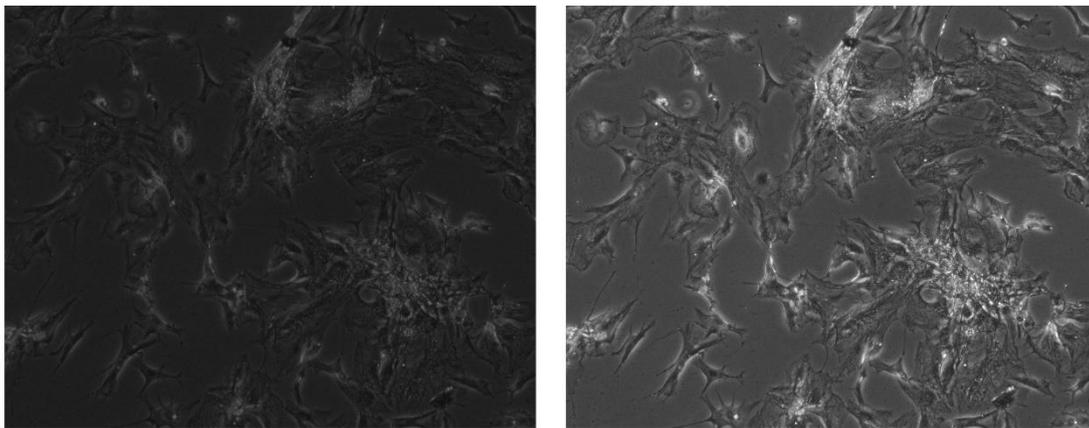
A partire dalle immagini acquisite, dunque, si sono stimati i parametri  $c_n$  di tale polinomio al variare dell'indice  $N$  minimizzando la seguente funzione costo:

$$\varepsilon = \sum_{q=1}^{Q-1} \sum_{p=1}^P \left[ \sum_{n=0}^N c_n M_{p,q}^n - R_{q,q+1} \sum_{n=0}^N c_n M_{p,q+1}^n \right]^2$$

con:

- $R_{q,q+1}$  rapporto tra due diversi tempi di esposizione  $e_q$  e  $e_{q+1}$ ;
- $P$  indice relativo al p-esimo pixel;
- $Q$  numero di immagini utilizzate;
- $M_{p,q}$  livello del p-esimo pixel, nella q-esima immagine, con tempo di esposizione  $e_q$ .

Da un punto di vista operativo, nel laboratorio ICM, si è proceduto alla stima della CRF attraverso acquisizioni eseguite in campo chiaro di due serie di immagini ottenute con tempi di esposizione diversi (*fig. 15*).




---

Figura 15 - Immagini di cellule eucariotiche, acquisite in modalità di microscopia in campo chiaro: fanno parte del set di immagini acquisite per la valutazione della CRF: in questo caso, a destra quella acquisita con maggiore esposizione (*NIKON TE2000U*)

Essendo noti i tempi di esposizione con cui le immagini sono state acquisite, i parametri della CRF sono stati valutati in ambiente MATLAB, e successivamente inseriti come parametri fissi nel codice sorgente del software di analisi di immagini realizzato dall'Ing. Cortesi.

In particolare, in MATLAB, è stata realizzata una funzione in grado di valutare i valori di radianza effettivamente giunta al sensore, a partire dall'immagine acquisita dal microscopio (convertita in formato 8-bit – scala di grigi).

Dai dati sperimentali è emerso che il polinomio che minimizza l'errore ha grado 3, e i seguenti coefficienti  $c_n = \{-0.066; 0.146; 0.915; 0.005\}$ , per cui la CRF è stata approssimata attraverso il seguente polinomio di terzo grado:

$$I = f(M) = -0.066M^3 + 0.146M^2 + 0.915M + 0.005$$

Essendo

$$g(I) = f^{-1}(M)$$

è stato necessario invertire tale equazione per poter applicare la giusta correzione all'immagine; il metodo scelto in questo caso è quello di Cardano, avendo cura di scegliere la soluzione compatibile con il dominio di  $g(I)$ .

Infine è stata realizzata una look up table (LUT) che associa a ciascun livello di grigio il corrispondente valore di radianza.

## PHOTOBLEACHING

Per valutare gli effetti del photobleaching sul sistema di acquisizione di immagini in fluorescenza del laboratorio, sono state eseguite acquisizioni in time-lapse di batteri E. coli emettenti un livello pressoché costante di fluorescenza. La tecnica del time-lapse è risultata molto utile per valutare il comportamento dinamico del sistema: essa infatti prevede di ottenere immagini dello stesso soggetto a intervalli di tempo regolari e con lo stesso tempo di esposizione.

I parametri della curva di photobleaching sono stati stimati al calcolatore, in ambiente PYTHON, e rappresentati inizialmente mediante una funzione esponenziale decrescente. Essendo di particolare interesse l'attenuazione del segnale fluorescente rispetto alla condizione iniziale, si è stimato soltanto un parametro, la costante di tempo  $k$  dell'esponenziale, per l'attenuazione del photobleaching:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-kt}$$

con:

- $I$  ed  $I_0$  intensità misurata ed intensità iniziale;
- $k$  parametro di attenuazione da photobleaching;
- $t$  tempo di esposizione.

Questo parametro dovrebbe prescindere dal tempo di esposizione utilizzato durante l'acquisizione delle immagini, tuttavia sperimentalmente si è notata una relazione di proporzionalità diretta tra il valore di  $k$  e il tempo di esposizione. Questo fenomeno è legato all'impossibilità, nel set-up corrente, di isolare l'effetto del photobleaching da altre aberrazioni come la contaminazione da luce ambientale.

Si è pertanto deciso di introdurre una dipendenza di  $k$  dal tempo di esposizione; questa funzione è stata ottenuta fittando i valori della costante di tempo, stimati a partire da immagini acquisite con tempi di esposizione diversi, con una parabola. Dai dati sperimentali è emerso che i coefficienti della parabola suddetta sono  $\{0.26; -0.12; 0.008\}$ , per cui dipendenza di  $k$  dal tempo di esposizione è stata così descritta:

$$k(t) = 0.26t^2 - 0.12t + 0.008$$

Anche in questo caso, si è successivamente provveduto ad inserire tali parametri di attenuazione nel codice sorgente del software di analisi. La funzione realizzata, infatti, è in grado di correggere le distorsioni apportate dal fenomeno del photobleaching, a partire dai parametri di  $k(t)$  (individuati sperimentalmente) e dal tempo di esposizione dell'immagine acquisita.

## VIGNETTING

Per quel che riguarda il vignetting, si è notato di come il sistema di acquisizione del laboratorio ICM non presenti una significativa distorsione da vignetting.

L'assenza di tale fenomeno, è stata confermata da test effettuati con un vetrino calibratore verde (Fluorescent Green Reference Slide) (*fig. 16*); in ognuna delle immagini acquisite, eseguite a diversi tempi di esposizione, i livelli di intensità luminosa sono rimasti infatti costanti su tutti i pixel, e al di sotto del livello di saturazione.



---

Figura 16 - Vetrini calibratori, in ordine: Blue Fluorescent Reference Slide, Red Fluorescent Reference Slide, Green Fluorescent Reference Slide, Yellow Fluorescent Reference Slide (<http://www.tedpella.com>)

## ALTRE DISTORSIONI

Si è proceduto, infine alla correzione dell'effetto sulla misura finale da parte di altre aberrazioni diverse da quelle precedentemente descritte.

Per questo tipo di effetti distorsivi secondari, si è scelto di utilizzare un calibratore, ossia un sistema/costrutto noto utilizzato come standard per normalizzare i dati acquisiti in ogni esperimento. Naturalmente, in tale configurazione, si suppone che tutte le distorsioni e variabilità che affliggono l'immagine rimangano costanti nell'arco della durata dell'esperimento.

## ESPERIMENTI COMPARATIVI MICROSCOPIO-FLUORIMETRO

Dopo aver ultimato la calibrazione iniziale del set-up, sono stati eseguiti esperimenti comparativi tra microscopio ottico e fluorimetro, al fine di trovare delle correlazioni tra il dato ottenuto dall'elaborazione di immagini dell'uno (da validare), con quello dell'altro (già validato). Sono stati perciò confrontati i valori di densità ottica e i valori medi di fluorescenza ricavati dal fluorimetro e i dati ricavati al microscopio, il tutto su costrutti che

esprimono GFP in modo costitutivo e/o regolato trascrizionalmente (*Appendice B*).

## OPTICAL DENSITY vs. NUMBER OF CELLS

Con questo esperimento ci si è posto l'obiettivo di individuare una relazione tra la densità ottica (O.D.) valutata tramite la misurazione di assorbanza al fluorimetro, e la stima del numero di cellule in un campione ottenuta dalla elaborazione di immagini acquisite tramite microscopia in fluorescenza. L'esperimento, ha visto l'utilizzo dei due seguenti costrutti genetici:

- P1429-GFP-T su plasmide ad alto numero di copie (pSB1A2);
- P2547-GFP-T su plasmide ad alto numero di copie (pSB1A2).

e si è basato su acquisizioni in contemporanea di dati, tramite le due strumentazioni in oggetto, ad intervalli di tempo predefinite.

Le colture batteriche overnight (ON), sono state diluite fino ad un OD di 0.05 e trasferite in 2 falcon da 15 ml (una per il microscopio e l'altra per il fluorimetro).

Ad intervalli di 60 minuti, sono stati acquisiti i dati con i due strumenti:

- Fluorimetro:
  - Valutazione (da procedura automatica) della O.D. di ogni pozzetto della piastra.
- Microscopio:
  - Acquisizione immagini per ogni campione come da protocollo (vedi Appendice).

Ad esperimento finito, i dati acquisiti hanno subito le seguenti processazioni:

- Fluorimetro:
  - Normalizzazione della O.D. valutata nel singolo pozzetto rispetto alla O.D. misurata nel pozzetto con il solo terreno di coltura. In questo modo si è potuto regolare l'offset della misura, eliminando il contributo portato dall'autofluorescenza del terreno.
- Microscopio:
  - Elaborazione delle immagini tramite software di segmentazione. Valutazione del numero medio di cellule per campo e calcolo

della concentrazione della coltura (Cell/  $\mu\text{L}$ ). Quest'ultimo passaggio è consistito nella compensazione del volume utilizzato per la preparazione del vetrino e del fattore di concentrazione. Come si può leggere dai protocolli in appendice infatti, nella preparazione del vetrino, *“per evitare eccessive sovrapposizioni di batteri nel campo del microscopio, si sceglie un apposito fattore di concentrazione in modo da modulare il numero di cellule nel campo (e dunque nell'immagine acquisita)”*: tale intervento viene poi modulato al calcolatore mediante compensazione di tale fattore, in modo da avere una stima non affetta da errori.

Ed infine la valutazione dei grafici di:

- Fluorimetro:
  - O.D. vs time
- Microscopio
  - Concentrazione (Cell/  $\mu\text{L}$ ) vs time

Dai dati sperimentali, valutati sugli esperimenti di 3 giorni, è stato possibile individuare una relazione tra la densità ottica del campione e il numero di cellule, che è risultata essere di tipo lineare.

Fittando i dati sperimentali, utilizzando tutti i punti a disposizione (fino all'ora 6), i parametri della retta (**fig. 5**) risultano essere  $c_n = \{71.59; -6.34\}$ :

$$OD(Ncells) = y(x) = 71.59x - 6.34$$

con un indice di correlazione pari al 94.05%.

Fittando invece, i dati sperimentali, scartando l'ultimo dei punti a disposizione (fino all'acquisizione 5.5h), i parametri della retta (**fig. 6**) risultano essere  $c_n = \{56.95; -3.66\}$ :

$$OD(Ncells) = y(x) = 56.95x - 3.66$$

con un indice di correlazione pari al 99.6%.

## VALOR MEDIO DI FLUORESCENZA

Con questo esperimento ci si è posto l'obiettivo di individuare la correlazione tra i valori di intensità di fluorescenza media valutati tramite fluorimetria, e i valori di fluorescenza valutati tramite l'elaborazione di immagini acquisite tramite microscopia.

L'esperimento, ha visto l'utilizzo tre costrutti genetici:

- Due non indotti (uno con funzione di calibratore, l'altro non inducibile per avere un maggior numero di livelli di fluorescenza):
  - P1429-GFP-T su plasmide ad alto numero di copie (pSB1A2);
  - P2547-GFP-T su plasmide ad alto numero di copie (pSB1A2).
- Uno indotto a concentrazioni di IPTG (induttore) differenti:
  - P2547-O1-GFP-T su plasmide ad alto numero di copie (pSB1A2):
    - 0  $\mu\text{M}$  di IPTG;
    - 25  $\mu\text{M}$  di IPTG;
    - 50  $\mu\text{M}$  di IPTG;
    - 100  $\mu\text{M}$  di IPTG.

Anche in questo caso le colture batteriche overnight (ON), sono state diluite fino ad un OD di 0.05 e trasferite in 2 falcon da 15 ml avendo sempre cura di preparare una differente provetta per ogni strumento.

Le acquisizioni sono state effettuate ad intervalli di 30 minuti (i costrutti non indotti sono stati analizzati al microscopio soltanto ogni 60 minuti):

- Fluorimetro:
  - Valutazione della fluorescenza di ogni pozzetto della piastra. In questo tipo di esperimento, non si è utilizzato il fluorimetro in modalità dinamica, ma sono stati acquisiti i dati ogni volta da una piastra diversa, in modo da avere condizioni più simili possibili a quelle dei campioni analizzati al microscopio (prelievo di 400 $\mu\text{L}$  di volume da ogni campione).
- Microscopio:

- Acquisizione immagini per ogni campione come da protocollo (vedi Appendice).

Per l'elaborazione dei risultati si è utilizzato ancora uno script realizzato dalla dott.ssa Cortesi in ambiente PYTHON, grazie al quale sono stati elaborati i dati provenienti dalle misure di fluorescenza da parte di entrambi gli strumenti.

Nell'elaborazione si è valutato il valor medio di fluorescenza dei 5 costrutti analizzati (in unità di fluorescenza arbitraria) da parte di entrambi gli strumenti, in particolare per ogni punto rappresentato è stata valutata la media:

- degli ultimi 4 istanti temporali per:
  - p2547O1gfp 25  $\mu$ M;
  - p2547O1gfp 50  $\mu$ M;
  - p2547O1gfp 100  $\mu$ M
- di tutti i 4 istanti temporali per:
  - p2547gfp;
  - p1429gfp.

## Risultati e Conclusioni

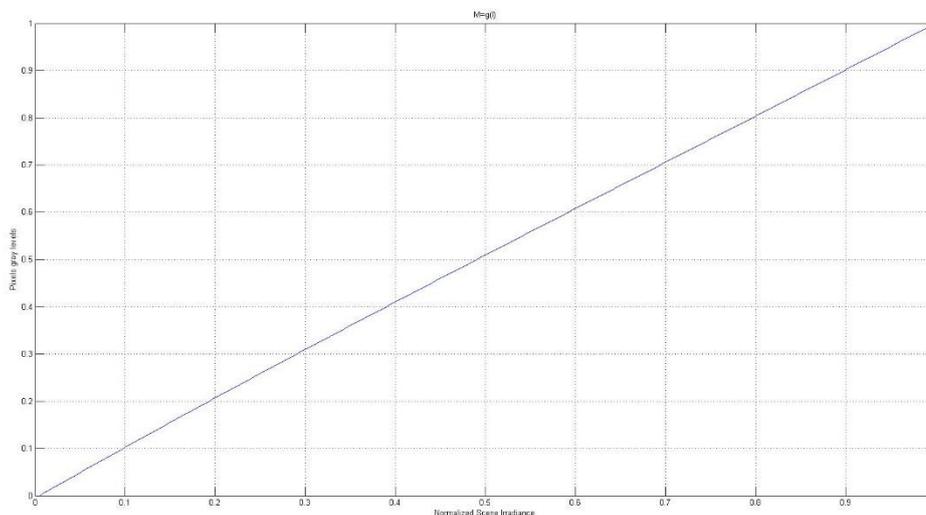
---

Come già discusso precedentemente lo scopo delle prove sperimentali effettuate durante questo progetto è stato duplice: da un lato si sono corrette le principali aberrazioni che gravano sul sistema di microscopia, dall'altro si è proceduto alla validazione dello strumento di misura paragonandone i risultati a quelli ottenuti con un fluorimetro.

In riferimento alla caratterizzazione delle distorsioni si è affrontato il problema per ogni fase nel seguente ordine:

- Caratterizzazione CRF;
- Caratterizzazione photobleaching;
- Caratterizzazione vignetting;
- Caratterizzazione altre distorsioni.

Dal fitting dei dati acquisiti per la valutazione della *CRF*, si è giunti alla correzione del problema attraverso una look up table (LUT) che associa a ciascun livello di grigio acquisito dal sistema il rispettivo valore di radianza.



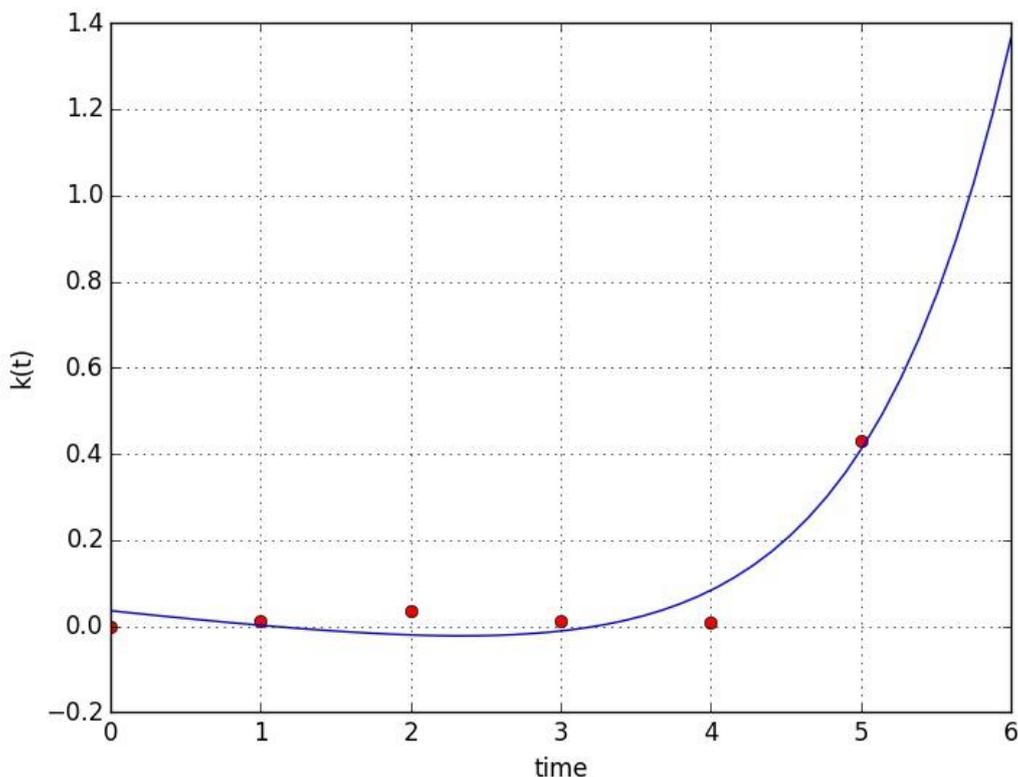
---

Figura 17 - Fitting della funzione di risposta (MATLAB)

Tale tabella è stata realizzata a partire dall'inversione della funzione di risposta  $f(M)$  valutata con un polinomio del terzo grado, i cui coefficienti (valutati sperimentalmente) risultano essere  $c_n = \{-0.066; 0.146; 0.915;$

0.005} e che ha un andamento quasi lineare nel dominio di interesse (*fig. 17*).

Per la caratterizzazione del *photobleaching*, si è andati ad identificare l'effetto dell'attenuazione per diversi valori del tempo di esposizione. Dai dati sperimentali è emersa, diversamente da quanto inizialmente ipotizzato, una dipendenza di  $k$  dal tempo di esposizione. Tale problema, non è legato alla distruzione fotochimica del fluoroforo per l'effetto di *photobleaching*, ma al contributo di illuminazione portato dal laboratorio di ricerca. Non riuscendo ad isolare l'effetto del *photobleaching*, si sono dovuti eseguire esperimenti che permettessero l'individuazione di una funzione  $k(t)$ . L'elaborazione e il fitting dei dati, hanno portato al fitting di  $k(t)$  tramite un polinomio del secondo grado (*fig. 18*), con coefficienti  $c_n = \{0.26; -0.12; 0.008\}$ .



---

Figura 18 -  $k(t)$ : fitting con parabola, a partire da 6 punti sperimentali  
(PYTHON)

Dalle acquisizioni effettuate con un apposito vetrino calibratore (Green Fluorescent Reference Slide), a diversi tempi di esposizione, si è invece notato come il sistema non fosse particolarmente affetto dal fenomeno di *vignetting*, motivo per cui non sono state realizzate correzioni per tale problema. Dalle acquisizioni effettuate con tale vetrino, fabbricato volutamente con caratteristiche di fluorescenza uniformi, si è potuto notare come i livelli di fluorescenza dei vari campi acquisiti erano costanti su tutti i pixel registrati, senza superare i valori di saturazione.

Per tutte le distorsioni secondarie, non trattandosi di problemi facilmente caratterizzabili e comunque aventi un effetto distorsivo minore, si è scelta come soluzione l'utilizzo di una calibrazione (tramite un costruito genetico comportamento noto). Si farà in modo, perciò, di eseguire all'inizio di ogni esperimento (o per tutta la durata dello stesso), acquisizioni di immagini del calibratore che fungeranno da normalizzatore per l'esperimento in questione. Si è ritenuto sufficiente tale soluzione, in quanto si è presupposto che tali effetti distorsivi rimangano costanti nello svolgimento dell'intero esperimento.

Una volta realizzate le correzioni suddette, la fase di validazione ha previsto il confronto dei dati acquisiti con tale set-up e quelli acquisiti tramite fluorimetria:

- Confronto OD/Numero di cellule;
- Confronto Intensità medie di fluorescenza.

Dal confronto OD/Numero di cellule è emersa, come da previsioni, una relazione lineare tra il dato di assorbanza acquisito al fluorimetro e il numero di cellule/ $\mu$ l valutato a partire dalle immagini ottenute al microscopio.

Per avere validità statistica, il fitting dei dati è stato fatto a partire dalle acquisizioni di due costrutti genetici diversi, eseguite nell'arco di 3 giorni. Per ognuno dei 13 istanti di tempo campionati, sono state valutate media e deviazione standard delle densità ottiche e della concentrazione di cellule di tutti i campioni analizzati. Si sono così ottenuti due vettori (media e deviazione standard) dei dati ricavati in microscopia e due dei dati ricavati in fluorimetria.

Potendo tralasciare la variabile tempo, trattandosi di acquisizioni a campionamento simultaneo, l'obiettivo è stato dunque quello di trovare una

relazione diretta che legasse il valore medio di O.D. al valore medio di Numero di Cellule.

Tale relazione, utilizzando tutti i punti misurati in fase sperimentale, è rappresentata da una retta con coefficienti  $c_n = \{71.59; -6.34\}$ . Dai dati sperimentali, però, si è notato un accentuato discostamento dalla linearità a partire da livelli di O.D. superiori a 0.75 (**fig. 19**): comportamento anche in questo caso prevedibile come già scritto in (*Madigan et al., 2012*).

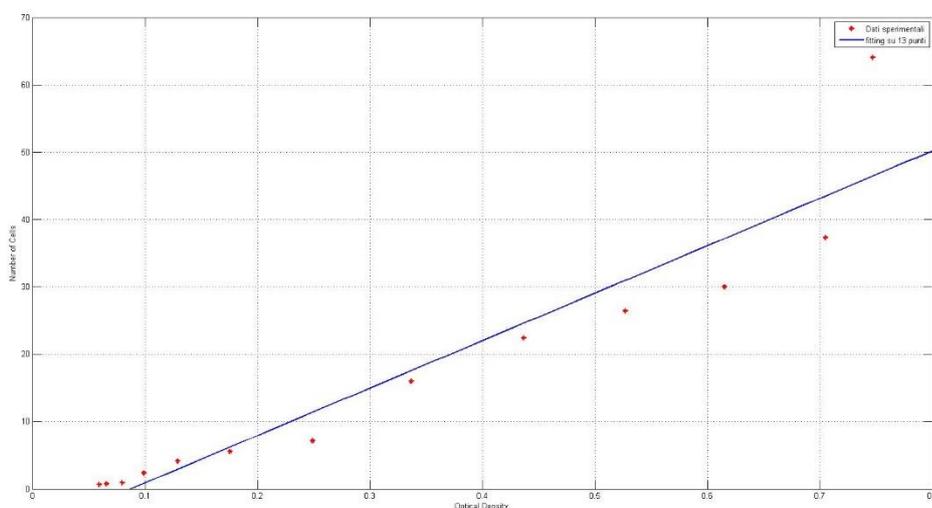


Figura 19 - Fitting relazione OD/Numero di Cellule, effettuato considerando anche i valori di densità ottica maggiori di 0.7 (MATLAB)

Sono stati fittati allora i dati sperimentali escludendo il punto relativo all'ultimo istante di acquisizione (nel quale l'O.D. supera il valore di 0.7) e si è individuata una nuova relazione lineare (**fig. 20**), in questo caso con coefficienti  $c_n = \{56.95; -3.66\}$ .

Sono stati fittati allora i dati sperimentali escludendo il punto relativo all'ultimo istante di acquisizione (nel quale l'O.D. supera il valore di 0.7) e si è individuata una nuova relazione lineare, in questo caso con coefficienti  $c_n = \{56.95; -3.66\}$ .

Tale relazione approssima meglio, rispetto alla relazione precedente retta (**fig. 21**), e i dati sperimentali infatti hanno confermato anche un miglioramento del coefficiente di correlazione: 99.6% contro il 94.05%.

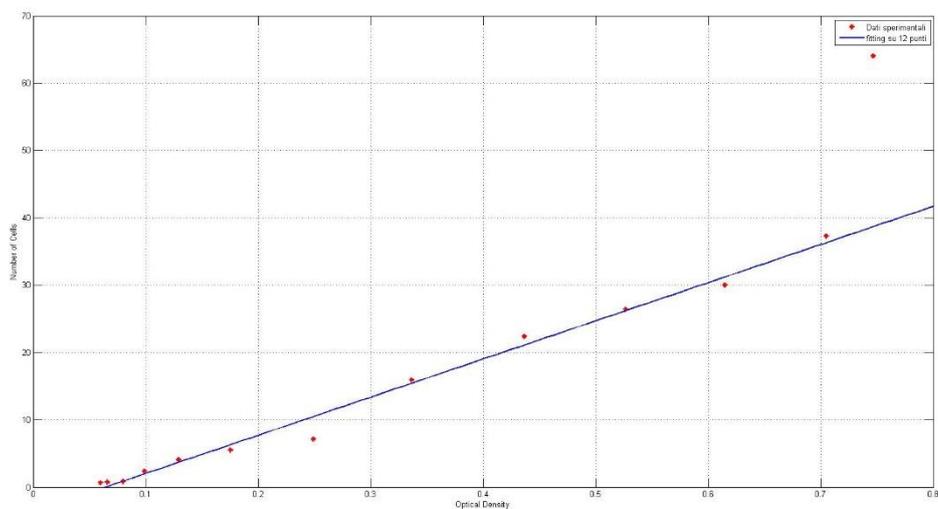


Figura 20 - Fitting relazione OD/Numero di Cellule, effettuato scartando l'ultimo dato sperimentale, ossia quello relativo alle OD maggiori di 0.7, lasciato comunque nel grafico per sottolineare la non linearità (MATLAB)

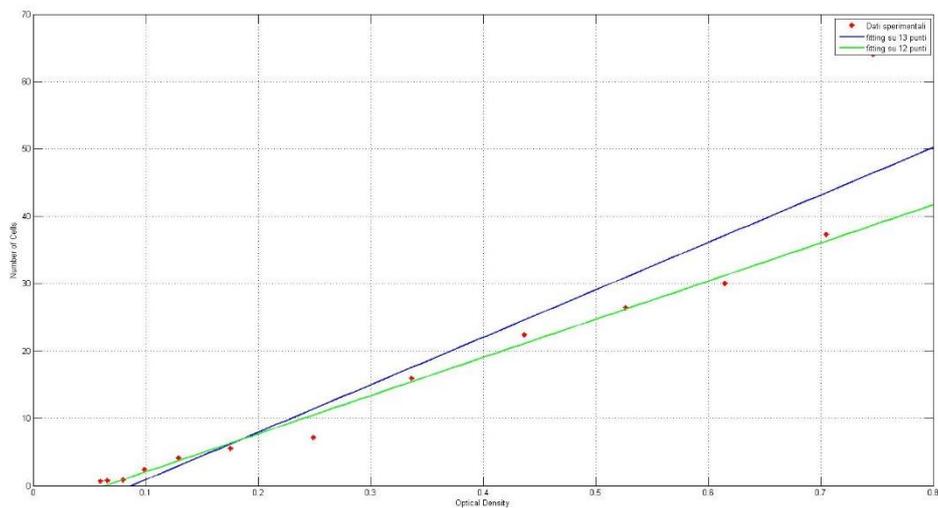


Figura 21 - Grafico OD/Numero di cellule, con entrambi i fitting (MATLAB)

Sebbene i risultati positivi e concordi dell'esperimento precedente, questi non dimostrano ancora la totale validità del sistema di misura in oggetto, in quanto non strettamente legati all'intensità di fluorescenza del campione.

Per un sistema di misura quantitativa di dati in fluorescenza, è necessario avere il confronto con le misure quantitative effettuate da uno strumento già validato, sono stati perciò eseguiti acquisizione simultanee tra microscopio e fluorimetro, per confrontare le intensità medie di fluorescenza misurate dai due.

L'elaborazione dei dati ha prodotto risultati soddisfacenti, le misurazioni di fluorescenza al microscopio hanno riportato un andamento dei dati di fluorescenza media simile a quello individuato dai dati elaborati al fluorimetro (*fig. 22*). Da tali dati è possibile soltanto avere un'informazione circa la concordanza delle misurazioni ottenute con i due strumenti, ma siamo ancora lontani dall'avere informazioni di tipo strettamente biologico (è stata valutata la fluorescenza media a regime).

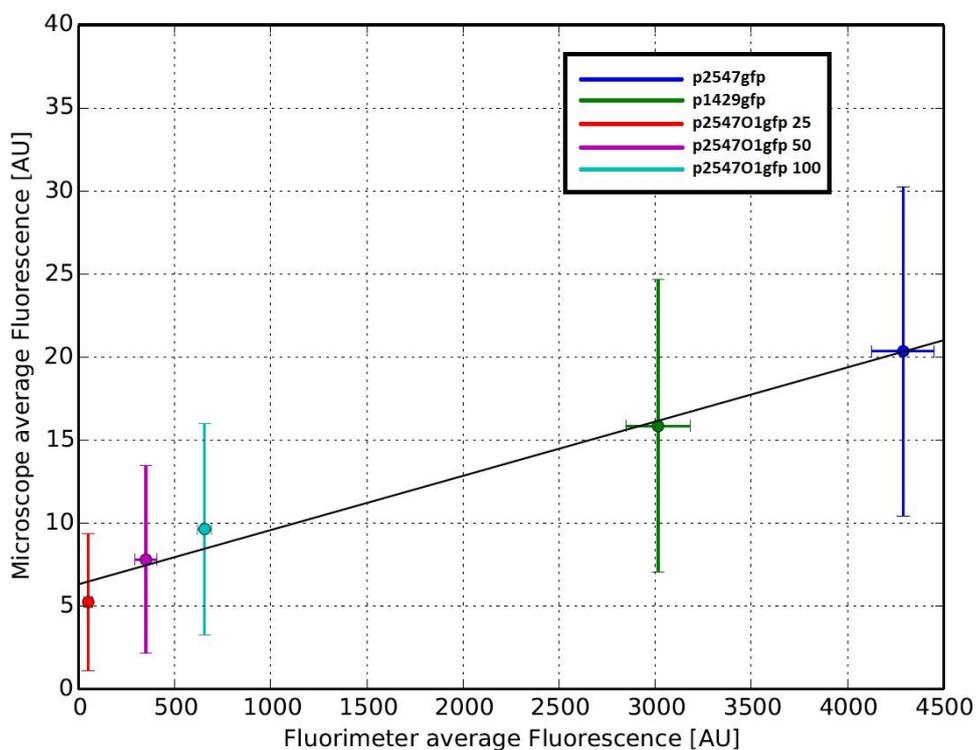


Figura 22 - Confronto valori di fluorescenza media, Fluorimetro/Microscopio (PYTHON)

Questo lavoro permette di ottenere acquisizioni tramite microscopia ottica in fluorescenza per misure quantitative, con le quali ottenere dei dati utili agli esperimenti di biologia sintetica realizzati nel laboratorio ICM. Una volta messo a punto e validato il set-up, infatti, risulterà possibile effettuare analisi statistiche più complete sulla popolazione cellulare, rispetto a quanto in precedenza valutabile tramite fluorimetro: uno dei prossimi obiettivi infatti è quello di ottenere un'informazione dettagliata sulla densità di fluorescenza dell'intero campione analizzato, e non solo il dato relativo al valore medio di fluorescenza. Un altro vantaggio sarà poi portato dalla versione definitiva di un software, dotato possibilmente di una GUI user-friendly, attraverso il quale poter elaborare direttamente le immagini acquisite dal microscopio e ricavarne i dati quantitativi richiesti.

## Ringraziamenti

---

Il lavoro svolto mi ha permesso di approfondire argomenti precedentemente trattati durante i corsi curricolari, grazie all'osservazione e all'utilizzo diretto di diverse tecniche e strumenti di laboratorio. Per questo motivo, ringrazio il Prof. Emanuele Giordano per avermi concesso tale occasione di approfondimento, l'Ing. Marilisa Cortesi per avermi seguito nello svolgimento di tale progetto e guidato a muovere i primi passi in un laboratorio di ricerca biomedica, nonché la Dott.ssa Alice Pasini e l'Ing. Lucia Bandiera per l'assistenza ricevuta nel periodo trascorso in Lab ICM.



## APPENDICE A - PROTOCOLLI

---

### PROTOCOLLO PREPARAZIONE CAMPIONE

Per preparare i campioni da acquisire tramite Microscopia in Fluorescenza, si parte dalla coltura batterica (5ml in provetta Falcon) preparata la sera precedente e lasciata in incubazione a 37° C per l'intera notte.

Prendere il campione dall'incubatore, e centrifugarlo per isolarne la parte batterica, e risospendere con nuovo terreno:

- Frequenza di rotazione (rpm): 2000;
- Durata (s): 600;
- Temperatura (C°): temperatura ambiente;
- Eliminazione surnatante;
- Aggiunta nuovo terreno M9 (ml): 5.

Misura OD con spettrofotometro:

- Lunghezza d'onda utilizzata (nm): 595;
- Cammino ottico (mm): 10;
- Volume terreno per offset (ml): 1;
- Volume campione (ml): 1;

Diluire il campione in base alla Densità Ottica (OD) desiderata:

- Calcolo fattore diluizione:
  - Rapporto OD coltura Overnight e OD desiderata;
- Diluizione:
  - Volume campione Overnight (ml): Rapporto volume iniziale e fattore diluizione;
  - Volume Terreno Aggiunto (ml): Differenza tra volume iniziale e volume preso dal campione Overnight;

Aggiungere al campione diluito l'antibiotico:

- Ampicillina 1:1000 ( $\mu\text{l}$ ): 5;

(Opzionale) Lasciare nuovamente in incubazione il campione:

- Durata (s): dipendente dall'esperimento;
- Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ):  $37^{\circ}$ ;

Tolto il campione dall'incubatore, preparare una Eppendorf con parte del campione da analizzare, lasciando nuovamente la Falcon nell'incubatore (potrà servire per analisi successive):

- Etichettatura;
- Volume (ml): 1;

Centrifugare il campione nella Eppendorf:

- Frequenza di rotazione (rpm): 3000;
- Durata (s): 600;

Per evitare eccessive sovrapposizioni di batteri nel campo del microscopio, scegliere un apposito fattore di concentrazione in modo da modulare il numero di cellule nel campo (e dunque nell'immagine acquisita):

- Eliminazione surnatante ( $\mu\text{l}$ ): quantità scelta a seconda della concentrazione desiderata nell'esperimento;
- Risospensione pellet;

Preparare il vetrino:

- Scelta vetrino porta oggetto e vetrino copri oggetto;
- Pulizia con alcool per eliminare residui organici;
- Pulizia con acqua mQ per eliminare eventuali impurità;
- Prelievo volume ( $\mu\text{l}$ ) campione: 3;
- Posizionamento campione sul vetrino porta oggetto;
- Copertura con vetrino copri oggetto.

Dopo essersi assicurati di aver ben premuto il vetrino copri-oggetto sul vetrino porta-oggetto, il campione è pronto per l'acquisizione al

microscopio, affidarsi al protocollo di acquisizione relativo all'esperimento in corso (nel caso si notasse al microscopio batteri in movimento, pressare nuovamente il vetrino).

## PROTOCOLLO ACQUISIZIONE IMMAGINI IN FLUORESCENZA CON MICROSCOPIO OTTICO

Come fase iniziale, si segue il protocollo di riferimento per la preparazione del campione da analizzare e del costruito calibratore.

Di seguito, si prepara il vetrino di prova per calibrare il set-up: tale calibrazione, effettuata tramite l'acquisizione in fluorescenza di un costruito noto (scelto come gold-standard), ha lo scopo di minimizzare alcuni errori distorsivi che compromettono la misura, come gli elementi legati alla variabilità nello svolgimento dell'esperimento (condizioni atmosferiche, campioni utilizzati, operatore) e allo stesso set-up (vignetting, intensità lampada).

Si mette a fuoco il vetrino calibratore in campo chiaro, e una volta individuato il piano dei batteri, è possibile passare alla modalità di microscopia di fluorescenza per migliorare la messa a fuoco.

Si passa dunque all'acquisizione in fluorescenza di immagini time-lapse con le seguenti specifiche:

- Campi acquisiti: dipendente dall'esperimento;
- Replicati tecnici (per campo): 2;
  - Intervallo tra le acquisizioni (ms): 1.
- Esposizione (ms): dipendente dal campione.

Alla fase di calibrazione, segue la preparazione del vetrino (come da protocollo) del costruito da analizzare e si mette anche qui a fuoco il campione in campo chiaro prima di passare alla modalità di microscopia di fluorescenza.

Migliorata la messa a fuoco in modalità di fluorescenza, si acquisiscono immagini time-lapse con le seguenti specifiche:

- Campi acquisiti: 10;
- Replicati tecnici (per campo): 2;
  - Intervallo tra le acquisizioni (ms): 1.
- Esposizione (ms): dipendente dal campione.

Sia per il calibratore che per il campione in analisi, il software Nikon NIS Elements acquisisce le immagini con le seguenti caratteristiche:

- Formato digitale (bit): 16;
- Risoluzione (pixel): 1280x1024;
- Formato: '.nd2';

Ultimo passo da eseguire prima di poter elaborare le immagini, è convertire il formato da 16-bit '.nd2' ad 8-bit '.tif'.

## PROTOCOLLO PER CARATTERIZZAZIONE CAMERA RESPONSE FUNCTION

Per la CRF le acquisizioni vengono eseguite tramite Microscopia in campo chiaro (contrasto di fase).

Si sceglie il campione da analizzare:

- Vetrino con cellule eucariote fissate (immagine statica e con vari livelli di grigio);

Una volta posizionato il vetrino e messo a fuoco il campo da acquisire, partire con l'acquisizione delle immagini, con le seguenti specifiche:

- Esposizioni (ms): 1, 1.3, 1.7, 2, 2.5, 3.3, 4.5;

Eseguire il numero fissato di prove per ogni esposizione:

- Replicati tecnici per ogni esposizione: 3;

Il software Nikon NIS Elements acquisisce le immagini con le seguenti caratteristiche:

- Formato digitale (bit): 16;
- Risoluzione (pixel): 1280x1024;
- Formato: '.nd2';

Prima di poter elaborare le immagini, convertire il formato da 16-bit '.nd2' ad 8-bit '.tif'.

## PROTOCOLLO PER CARATTERIZZAZIONE PHOTOBLEACHING

Per il Photobleaching le acquisizioni vengono eseguite tramite Microscopia in fluorescenza.

Seguire il protocollo di riferimento per la preparazione del campione da analizzare:

Preparare il vetrino (come da protocollo) e mettere a fuoco il campione in campo chiaro.

Una volta individuato il piano dei batteri, passare alla modalità di microscopia di fluorescenza per migliorare la messa a fuoco.

Acquisire le immagini in time-lapse, con le seguenti specifiche:

- Replicati tecnici: 30;
- Tempo campionamento (s): 60;
- Esposizione (ms): 0.06, 0.4, 0.6, 1.5;

Il software Nikon NIS Elements acquisisce le immagini con le seguenti caratteristiche:

- Formato digitale (bit): 16;
- Risoluzione (pixel): 1280x1024;
- Formato: '.nd2';

Prima di poter elaborare le immagini, convertire il formato da 16-bit '.nd2' ad 8-bit '.tif'.

## PROTOCOLLO PER CARATTERIZZAZIONE VIGNETTING

Per il vignetting le acquisizioni vengono eseguite tramite Microscopia in fluorescenza.

Scegliere l'apposito vetrino per l'acquisizione:

- Green fluorescence reference slide;

Acquisire le immagini con le seguenti specifiche:

- Replicati tecnici: 1;
- Esposizione (ms): 0.06, 0.4, 0.6, 1.5;

Il software Nikon NIS Elements acquisisce le immagini con le seguenti caratteristiche:

- Formato digitale (bit): 16;
- Risoluzione (pixel): 1280x1024;
- Formato: '.nd2';

Prima di poter elaborare le immagini, convertire il formato da 16-bit '.nd2' ad 8-bit '.tif'.

## PROTOCOLLO ESPERIMENTO OPTICAL DENSITY VS NUMBER OF CELLS –ACQUISIZIONI CON FLUORIMETRO

Per la preparazione del campione, seguire l'apposito protocollo già visto, avendo cura di seguire le seguenti specifiche:

- Costrutti utilizzati:
  - P1429-GFP-T su plasmide ad alto numero di copie (pSB1A2);
  - P2547-GFP-T su plasmide ad alto numero di copie (pSB1A2);
  - TOP10F' (per background fluorescence).
- Centrifugazione:
  - Velocità (rpm): 3000.
- Risospensione:
  - Aggiunta nuovo terreno M9 (ml): 60.
    - Di cui 45ml con Amp.
- Diluizione:
  - O.D. richiesta: 0.05.

Per l'acquisizione al Fluorimetro si esegue una procedura statica con queste caratteristiche:

- Preparazione piastra:
  - Volume pozzetto ( $\mu$ l): 200;
  - Struttura piastra unica.
  - Modello piastra:
    - Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene Cat. No.: 655101/655161/655192
- Impostazioni procedura dinamica:
  - Temperatura target ( $^{\circ}$ C):  $37^{\circ}$ ;
  - Numero cicli: 75;
  - Misure d'assorbanza:
    - Lunghezza d'onda (nm):  $600 \pm 9$ ;
    - Numero di flash: 16.
  - Misure di fluorescenza:
    - Modalità bottom-reading;
    - Lunghezza d'onda eccitazione (nm):  $501 \pm 9$ ;

- Lunghezza d'onda emissione (nm):  $535 \pm 20$ ;
- Guadagno manuale: 60;
- Numero di flash: 20;
- Integration time ( $\mu$ s): 20;
- Operazioni di fine ciclo:
  - Durata di shaking (s): 180;
  - Ampiezza di shaking (mm): 3;
  - Attesa (s): 10;
  - Movimento piastra-out;
  - Attesa (s): 180;
  - Movimento piastra-in.

## PROTOCOLLO ESPERIMENTO VALOR MEDIO FLUORESCENZA –ACQUISIZIONI CON FLUORIMETRO

Per la preparazione del campione, seguire l'apposito protocollo già visto, avendo cura di seguire le seguenti specifiche:

- Costrutti utilizzati:
  - P1429-GFP-T su plasmide ad alto numero di copie (pSB1A2);
  - P2547-GFP-T su plasmide ad alto numero di copie (pSB1A2);
  - P2547-O1-GFP-T su plasmide ad alto numero di copie (pSB1A2).
  - TOP10F' (per background fluorescence).
- Centrifugazione:
  - Velocità (rpm): 3000.
- Risospensione:
  - Aggiunta nuovo terreno M9 (ml): 35.
    - Di cui 30 ml con Amp.
- Diluizione:
  - O.D. richiesta: 0.05.

Induzione di IPTG:

- Volume per ogni concentrazione di IPTG ( $\mu\text{L}$ ): 125;

Per l'acquisizione al Fluorimetro, in questo caso, si esegue una campionatura ad istanti di tempi fissati (gli stessi di acquisizione al microscopio) con queste caratteristiche:

- Intervallo di campionamento (s): 1800;
- Preparazione piastra:
  - Volume pozzetto ( $\mu\text{l}$ ): 400.
  - 2 strutture:
    - Struttura 1 per istanti di campionamento pari
    - Struttura 2 per istanti di campionamento dispari
  - Modello piastra:
    - Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene Cat. No.: 655101/655161/655192

- Impostazioni procedura:
  - Numero cicli: 1;
  - Misure d'assorbanza:
    - Lunghezza d'onda (nm):  $600 \pm 9$ ;
    - Numero di flash: 16.
  - Misure di fluorescenza:
    - Modalità bottom-reading;
    - Lunghezza d'onda eccitazione (nm):  $501 \pm 9$ ;
    - Lunghezza d'onda emissione (nm):  $535 \pm 20$ ;
    - Guadagno manuale: 60;
    - Numero di flash: 20;
    - Integration time ( $\mu$ s): 20;
  - Operazioni di fine ciclo:
    - Movimento piastra-out.

## APPENDICE C – OPERONE LAC

---

Alcuni geni espressi in *E. Coli* sono costitutivi, ossia sono sempre “accesi”, altri invece sono attivi soltanto quando i loro prodotti sono richiesti dalla cellula, motivo per il quale la loro espressione deve essere regolata. Un tipico esempio di regolazione dell’espressione genica si ha quando, prendendo una coltura di *E. Coli* che si nutre di glucosio, si trasferiscono alcune cellule in un terreno contenente invece lattosio.

Nell’intervallo di quiescenza, le cellule iniziano a produrre tre enzimi non prodotti in precedenza (per l’appunto “regolati”): una permeasi, LacY, che trasporta il lattosio attraverso la membrana plasmatica dal terreno di coltura all’interno della cellula; la  $\beta$ -galattosidasi che idrolizza il lattosio in glucosio e galattosio, e una transacetilasi, LacA, con funzione ancora incerta. I geni codificanti per tali proteine, e altre coinvolte nella regolazione della loro trascrizione, si trovano in una regione del genoma di *E. Coli* chiamata Operone Lac (*Jacob et al, 1961*) (**fig.1**).

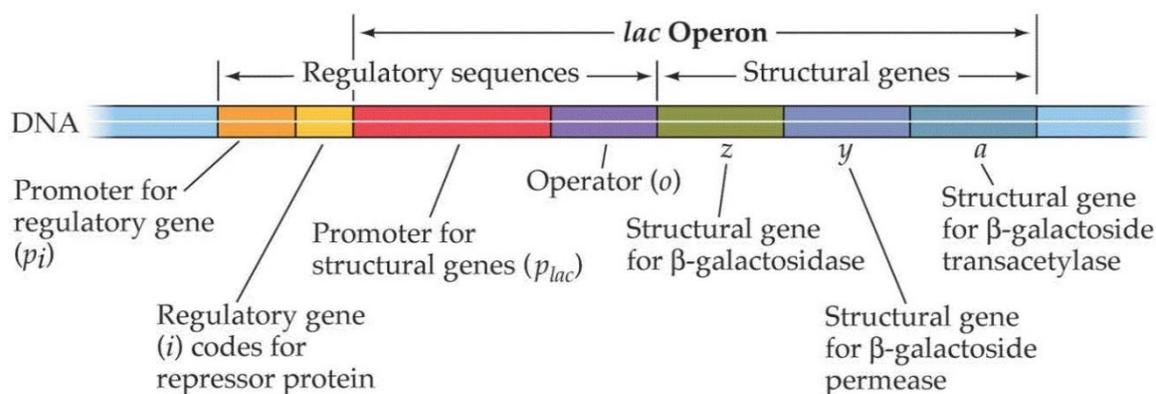


Figura 23 - Operone Lac (<http://home.comcast.net>)

Il gene *lacI* codifica per una proteina chiamata LacI, che funge da repressore. Una parte di questa molecola è in grado di legarsi a 24 bp del promotore lac che identificano l’ “operatore” lac, impedendo così che la RNA polimerasi possa trascrivere i geni lacZ, lacY e lacY.

Inoltre, il repressore contiene un altro sito dove l’allolattosio (un prodotto della reazione del lattosio con la  $\beta$ -galattosidasi) si può legare producendo un

cambio conformazionale. Come esito di questo ultimo cambiamento esso non può più legarsi alla regione operatore, staccandosi, permettendo così alla RNA polimerasi di legarsi al promotore e trascrivere i geni dell'operone Lac.

Dunque, in risposta all'aggiunta di lattosio nel terreno di coltura, si verifica l'allontanamento del repressore LacI dal sito operatore, e la trascrizione in RNA messaggero dei tre geni dell'operone. La traduzione poi, trattandosi di procarioti, avviene subito, non appena i ribosomi si legano alla molecola di mRNA.

L'assenza del repressore attivo lac, però, è condizione necessaria ma non sufficiente per un'efficace trascrizione dell'operone Lac, in quanto la presenza di glucosio nel terreno di coltura sembra reprimere o inibire la sintesi della  $\beta$ -galattosidasi: ciò avviene con un meccanismo molecolare chiamato "repressione da catabolita".

La repressione da catabolita è mediata dall'effetto che il trasporto di glucosio nelle cellule ha sulla concentrazione interna di AMP ciclico (cAMP). Se v'è abbondanza di glucosio nel terreno di crescita, tale molecola sarà importata nella cellula tramite il meccanismo di trasporto del glucosio. Non appena trasportato, il glucosio viene fosforilato con un gruppo fosfato donato da un componente del sistema di trasporto, chiamato EIIA, che è altresì in grado di attivare l'enzima adenilato ciclasi (AC). Finché tale componente partecipa al trasporto del glucosio, non è in grado di attivare l'AC: il risultato è che quando entra il glucosio nella cellula, diminuisce la concentrazione di cAMP (l'adenilato ciclasi non viene attivato per sintetizzare altro).

Se v'è, invece, una quantità piccola o nulla di glucosio nel terreno di crescita, il trasporto di glucosio non è operativo: il componente donatore di fosfato può adesso liberamente attivare l'adenilato ciclasi.

Il risultato è che in assenza di glucosio, la concentrazione di cAMP aumenta: risulta perciò esserci una proporzionalità inversa tra la concentrazione esterna di glucosio e la concentrazione citoplasmatica di cAMP.

Dunque, se manca glucosio nel terreno, aumenta la concentrazione di cAMP nel citoplasma, e questi si può legare alla proteina recettrice del cAMP (CRP), che è anche conosciuta come proteina attivatrice di catabolita (CAP). Come si può intuire dal suo nome, tale proteina è responsabile della mediazione del fenomeno di repressione da catabolita attraverso la sua

capacità di attivare la trascrizione. Il complesso CRP-cAMP si lega all'operone lac giusto a monte del promotore. In questa posizione può aiutare la RNA polimerasi a legarsi, e aumentarne enormemente il rateo di trascrizione.

Tirando le somme, l'operone Lac è soggetto sia al controllo negativo che positivo: il repressore lac, LacI, regola negativamente l'espressione; l'attivatore, cAMP-CRP, attiva positivamente l'espressione.

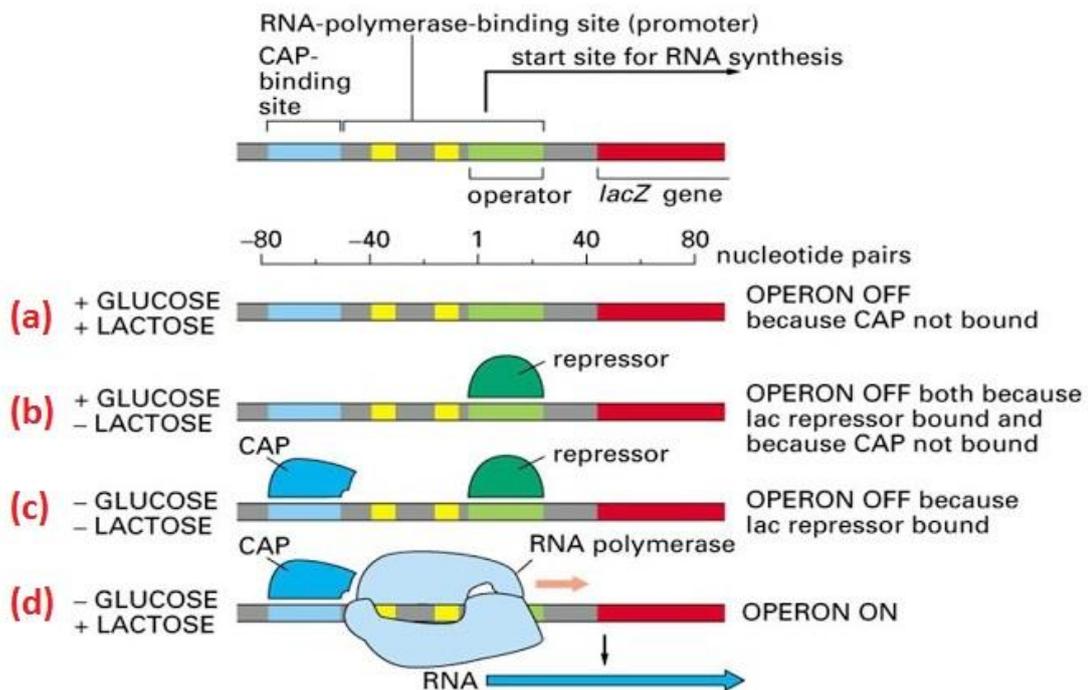


Figura 24 -Regolazione dell'operone Lac, riferita alle concentrazioni di glucosio e lattosio (<http://smallcollation.blogspot.it>)

Vi sono come risultato, in sintesi, quattro scenari base per l'espressione dell'operone lac:

- **Né glucosio né lattosio**

- Sotto queste condizioni (*fig 2-c*), ci sarebbe un alto numero di molecole di cAMP nella cellula, e il complesso CRP-cAMP sarebbe legato direttamente a valle del promotore lac. Questo meccanismo aiuterebbe la RNA polimerasi a legarsi al promotore, ma non si attiverebbe la trascrizione perché il

repressore del lattosio rimarrebbe legato al sito operatore in quanto non v'è presenza dell'induttore, ossia dell'allolattosio. In pratica non si avrebbe trascrizione dell'operone Lac. In questo scenario la cellula si trova in una condizione di scarsità di nutrienti, e quindi tende a minimizzare la produzione di proteine non essenziali alla sopravvivenza immediata, pur mantenendosi in una configurazione che le consenta di sfruttare immediatamente ogni fonte di carbonio che si presenti. Dunque, se il lattosio dovesse diventare reperibile, la cellula immediatamente risponderebbe importando tali zuccheri nella cellula tramite la lattosio permeasi, e la RNA polimerasi si troverebbe già in posizione per la formazione di  $\beta$ -galattosidasi in modo che il lattosio possa essere utilizzato subito

- **Glucosio presente, ma non lattosio**

- In queste condizioni (*fig 2-b*), ci sarebbe un basso numero di molecole di cAMP presenti nella cellula, dunque il complesso CRP-cAMP non si legherebbe al promotore lac. In più, l'attività della lattosio permeasi rimarrebbe inibita. Non ci sarebbe trascrizione dell'operone Lac. Anche questo ha senso: finché è presente glucosio nel terreno di crescita, v'è scarsa necessità di metabolizzare lattosio e dato che lattosio non è presente non v'è nemmeno la necessità di portarne dentro la cellula o di esprimere i geni dell'operone lac

- **Presenza di glucosio e lattosio**

- In queste condizioni (*fig 2-a*), ci sarebbe un basso numero di molecole di cAMP nella cellula, dunque il complesso CRP-cAMP non si legherebbe al promotore lac. La lattosio permeasi sarebbe inibita, ma alcune molecole di lattosio inizierebbero ad entrare nella cellula. Si verifica una trascrizione di operone lac a bassi livelli. Anche in questo caso la presenza del glucosio riduce la necessità di utilizzo del lattosio come fonte di carbonio. Tuttavia alcune molecole di lattosio riescono a diffondere nella cellula e quindi ad attivare debolmente l'operone lac

- **Zero glucosio e abbondante lattosio**

- In queste condizioni (*fig 2-d*), ci sarebbe un alto numero di molecole di cAMP nella cellula, dunque il complesso CRP-CAMP si legherebbe al promotore lac. La lattosio permeasi non sarebbe inibita, quindi trasporterebbe il lattosio nella cellula. Vi sarebbe la massima trascrizione dell'operone lac. Anche tutto ciò ha un senso: essendo il lattosio l'unica forma di zuccheri, la cellula deve fare in modo di utilizzare ogni molecola disponibile a suo beneficio. Perciò il sistema di trasporto lattosio permeasi porterà tali zuccheri nella cellula e l'operone lac sarà così sia indotto che attivato.

La presenza di due sistemi di controllo separati permette alla cellula di rispondere in maniera più sensibile ai bisogni imposti nei cambiamenti di condizioni di crescita, e questa è una capacità di molti operoni batterici.



## BIBLIOGRAFIA

---

[Andrianantoandro, E., Basu, S., Karig, D. K., and Weiss, R. 2006. Synthetic biology: New engineering rules for an emerging discipline. *Molecular Syst. Biol.* 2.]

[D. Endy, 2005. Foundations for engineering biology. *Nature*]

[Synthetic Biology Applying Engineering to Biology, 2005. *Report of a NEST High-Level Expert Group*]

[L. Venken, K. Leuven, K. Marchal and U. Jos Vanderleyden, 2013. *ACM Journal on Emerging Technologies in Computing Systems*]

[T. Knight, 2003. Idempotent Vector Design for Standard Assembly of BioBricks. *MIT DSpace*]

[F. Ceroni, S. Cavalcanti. Tecniche di Laboratorio di Biologia Sintetica. (*Biologia Sintetica*, S. Cavalcanti – Patron Editore – 2010, pag 161-178)]

[L. Pasotti, P. Magni. Biobrick, Standard Assembly e registro delle parti biologiche standard (*Biologia Sintetica*, S. Cavalcanti – Patron Editore – 2010, pag 179-202)]

[D. Voet, J. G. Voet, C.W. Pratt. *Fondamenti di Biochimica – Zanichelli – 2013, pag 65-76, pag 96, pag 662*]

[O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga, 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59:223–39]

[R. Y. Tsien, 1998. The green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* 1998. 67:509-44 ]

[R. Swaminathan, C.P. Hoang, A.S. Verkman. Photochemical properties of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and transfected CHO cells: analysis of cytoplasmic viscosity by GFP translational and rotational diffusion. *Biophys J.* 1997; 72:1900–1907].

[J. W. Webster, 2010 *Strumentazione Biomedica - Progetto ed applicazioni*. Edises]

[Nikon Corporation. Nikon TE2000U brochure, May 2007.]

- [Nikon Corporation. Fluorescence filter cubes, May 2010.]
- [Nikon Corporation. Nikon Inverted Microscope Eclipse TE2000 - Instruction.]
- [T. Mitsunaga, S. K. Nayar, 1999. Radiometric Self Calibration. *IEEE*]
- [A. Giorni, 2011. Tesi LM – Misure di segnali fluorescenti per l’analisi in microscopia dell’espressione genica in biologia sintetica. *Alma Mater Studiorum - Bologna*]
- [C. Arcaroli, 2010. Tesi LT – Interfaccia grafica per l’elaborazione di immagini microscopiche di colture batteriche geneticamente modificate. *Alma Mater Studiorum - Bologna*]
- [F. Piccinini , E. Lucarelli, A. Gherardi e A. Bevilacqua, 2012. Multi-image based method to correct vignetting effect in light microscopy images. *Journal of Microscopy*]
- [A. Bevilacqua, A. Gherardi e L. Carozza, 2008. A robust approach to reconstruct experimentally the camera response function, *IEEE*]
- [M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl, D. Clark. *BROCK Biology of Microorganisms, 13<sup>th</sup> Edition – Pearson Italia – 2012, Chapter 5: 133*]
- [F.J. Romero-Campero, M. J. Pérez-Jiménez, 2008. Modelling gene expression control using P systems: The Lac Operon, a case study. *BioSystems 91 (2008) 438-457*]
- [F. Jacob e J. Monod, 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol. (1961) 3, 318-356*]