



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12  
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

### OSASUN ZIENTZIAK

**Zelulen banan-banako atxikipena  
lortzeko “Microcontact Printing”  
teknikaren garapena**

*Maite Garcia-Hernando,  
Jaione Etxebarria- Elezgarai,  
Fernando Benito-Lopez eta  
Lourdes Basabe-Desmots*

145-152 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.04.20>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



## Zelulen banan-banako atxikipena lortzeko “Microcontact Printing” teknikaren garapena.

Garcia-Hernando Maite.<sup>1</sup>, Etxebarria-Elezgarai Jaione.<sup>2</sup>, Benito-Lopez Fernando.<sup>1,3</sup>, Basabe-Desmots Lourdes.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>AMMa-LOAC Ikerkuntza Taldea, Microfluidics Cluster UPV/EHU, Kimika Analitika Departamentua, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz.

<sup>2</sup>BIOMICs Microfluidics Ikerkuntza Taldea, Microfluidics Cluster UPV/EHU, Lascaray Ikergunea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz.

<sup>3</sup>Sentsoreen Ikerkuntzarako Zentro Nazionala, Dublin Hiriko Unibertsitatea, Dublin, Irlanda.

<sup>4</sup>IKERBASQUE, Zientziarako Euskal Fundazioa, Bilbo.

[mgar93@gmail.com](mailto:mgar93@gmail.com)

### Laburpena

Lan honetan, kuantifikazio digitalaren bidez zelula-proteina interakzioak neurtzeko teknika zehatza eta azkarra azaltzen da. Horretarako, “Microcontact Printing ( $\mu$ CP)” deritzon “patterning” edo egituraketa teknikaz baliatuz, zelulen banan-banako atxikipena indultzeko proteina-patroi optimizatuak sortu dira. Patroia atxikipen gune independenteak diren proteina irlez osatuta dago, sare bat osatuz, eta zelula-proteina interakzioak okupazio portzentai eran kuantitatiboki adieraziz. Lan honetan lortutako jakintzak terapia zelularretan eta medikuntza pertsonalizatuan eragina izatea du helburu.

**Hitz gakoak:** zelula-proteina, patterning, Microcontact Printing, banako zelula, okupazio portzentai.

### Abstract

*In this paper, we report an accurate and rapid method to make digital quantifications of cell-protein interactions. We use a patterning technique called “Microcontact Printing ( $\mu$ CP)” to form a protein pattern which creates an array optimised to promote single cell adhesion. Thanks to this array with independent adhesion sites, cell-protein interactions can be quantitatively measured as occupation percentage. The knowledge gained from this work aims to make an impact in cellular therapies and personalised medicine.*

**Keywords:** cell-protein, patterning, Microcontact-Printing, single-cell, occupation percentage.

## 1. Sarrera eta motibazioa

Zelulen *in vivo* hazkuntza hauen ingurune hainbat faktoreengatik mugatuta dago, mikro-ingurune deritzonagatik. Mikro-ingurune horretan daude inguruko zelulek igorritako seinale biokimiko, biomekaniko eta bioelektrikoak, matrize extrazelularra (MEZ), medioko faktore solugarriak, topografia edo MEZ-eko propietate fisikoak eta ingurune fluidikoa. Aurreko faktore guzti horiek zelularen portaera modula dezakete, honen patu finalean eraginez. Matrize extrazelularra zelulen inguruan eta zelula desberdinen artean dagoen espazioa da, gehienbat proteinez eta substantzia solugarriez osatuta dagoena. Bertan zelulenzako elikagaiak egoteaz aparte, hauen jardura modulatu duten seinale biokimikoak ere badaude, seinale hauen adibide MEZ-eko proteinen eta zelulen arteko interakzioak izanik. Matrize extrazelularreko proteinetariko bat fibronektina da, zelula mota guztietan dauden errezeptore batzuekin loturak sortzen dituena, era honetan zelulen portaera erregulatzeko seinaleak igorritik.

Dena den, gaur egun erabiltzen diren teknika konbentzionalak ez dira gai zelulen mikro-ingurunea zehazki kontrolatzeko, ezta zelulek proteinekiko duten afinitatea kuantitatiboki neurtzeko. Horri aurre egiteko, azken bi hamarkadetan zehar, mikroteknologiaren garapenak zelulen mikro-ingurune hainbat faktoreen kontrol zehatzagoa lortzen lagundu du, ondorioz, zelula hazkuntza hobe eta konplexuagoetara helduz (Lautenschläger eta Piel, 2013; Halldorsson *et al.* 2015). Mikroteknologia horien barne dago “protein micropatterning” deritzon teknika multzoa. “Patterning” edo egituraketa zelula bizidunek substratu edo gainazal batean duten

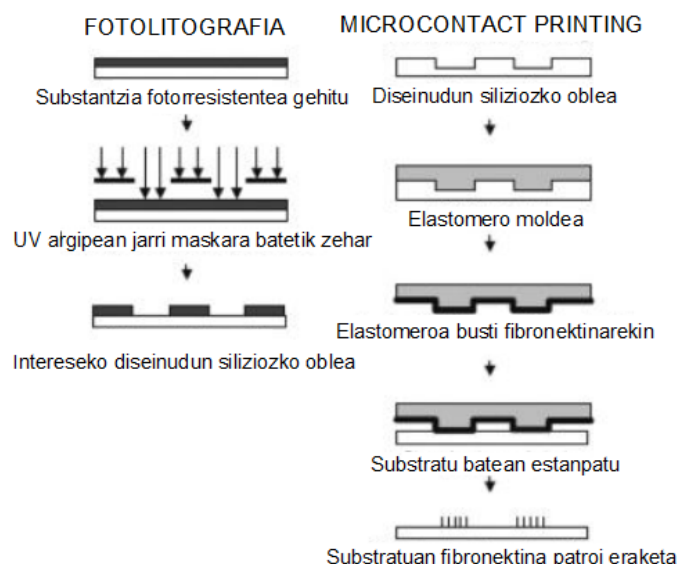
kokapena eta egituraketa kontrolatzeko tresna baliogarria da, eta zelulen biologian, farmakologia pertsonalizatuan eta ehunen injeniaritzan oso erabilia izan da 1990 -eko hamarkadan agertu zenetik. Proteina mikro-patroiei esker, zelulek gainazal batean sortzen dituzten egiturak kontrola daitezke, eta ondorioz, hauen kokapena tamaina, forma, migrazioa (Jiang *et al.* 2005), bideragarritasuna (Chen *et al.* 1997), eta baita proliferazio (Nelson eta Chen 2002) eta diferentziazio (McBeath *et al.* 2004) prozesuak ere.

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honetan proteina-patroiak gauzatzeko erabiltzen den teknika litografia leunean oinarritutako “Microcontact Printing ( $\mu$ CP)” deritzona da. Litografia patroiei ezberdinen erreplikak egiteko fabrikazio teknika bat da, eta zigilu gisa elastomerozko molde bigunak erabiltzen direnean, litografia leuna deitzen zaio. Elastomerozko moldea beste molde zurrun batetik lortzen denez, lehendabiziko pausua proteina-patroiaren diseinua ekoiztea da, fotolitografia fabrikazio teknikaren bidez, siliziozko substratu zurrun baten gainean. Ondoren, molde zurruneko patroien egitura elastomerozko zigilu bigunera transferitzen da, substratu edo gainazal batera molekula zehatzak kokapen espezifikoarekin transferitzeko (1. irudia). Teknika honetan onarrituta, substratutzat proteina ezberdinak erabiliz eta hauekin tamaina ezberdineko irudiez osatutako patroiak osatuz, plaketen atxikipen espezifikoa frogatu izan da (Basabe-Desmots *et al.* 2010). Gainera, lan horretan plaketekiko afinitate handieneko substratua aztertzeaz gain, proteina irla bakoitzeko atxikitutako plaketa kantitatea kontrolatzeko gaitasuna ere erakutsi du teknikak. Ildo horretatik jarraituz, plaketak banan banan atxikitze teknika ere garatu izan da (Lopez-Alonso *et al.* 2013), banakako monitorizazioa gauzatzeko baliogarria izan dena bai diagnostiko bai tratamendurako. Hori dela eta, aurrekoan oinarrituta, lan honen helburua animalia zelulak banan-banan atxiki eta monitorizatzeko teknikaren garapena jorratzea da, hori burutzeko hurrengo azpigelburuak daudelarik:

- Zelulak banan-banan itsasteko proteina-patroi egokiaren diseinua
- Fotolitografia prozesuaren optimizazioa intereseko diseinua duen molde zurruna sintetizatzeke.
- Molde zurruneko egiturak elastomerozko molde bigunera transferitzea.
- Microcontact printing teknikaren optimizazioa fibronektinazko patroiak substratura transferitzeko.
- Zelulen banakako atxikipen frogak fibronektina patroien funtzionamendua balidatzeko.

1. Irudia. Litografia leunaren diagrama, Fotolitografia (ezkerra) eta “Microcontact Printing” (eskuina) teknikak adierazita.



### 3. Ikerketaren muina

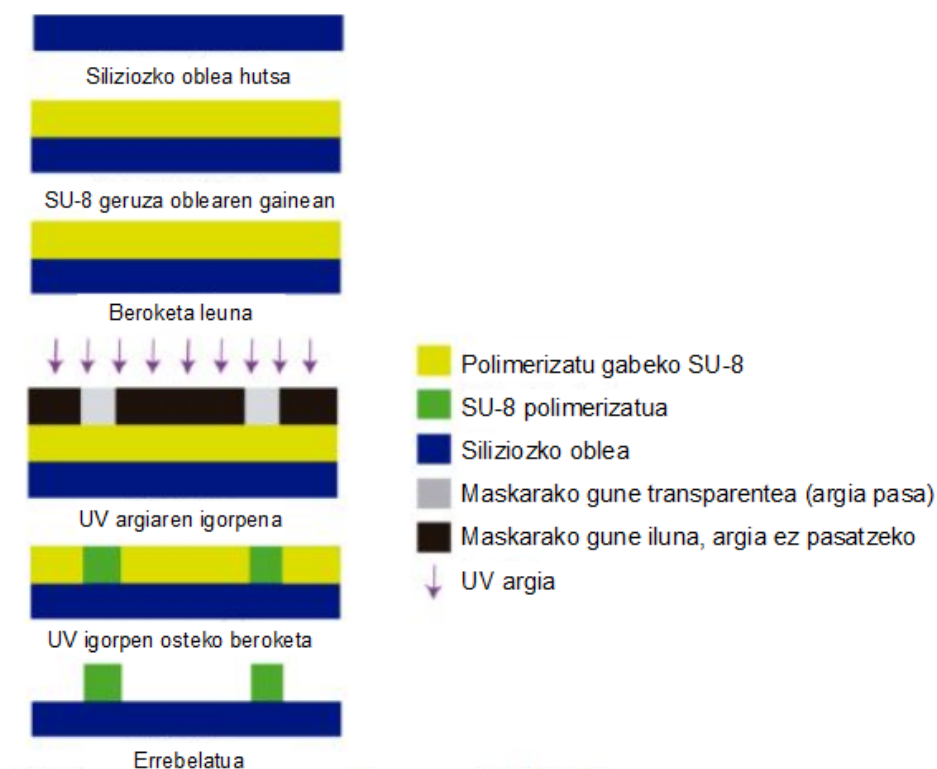
#### a) Zelulak banan-banan atxikitzeo patroiarene diseinua

Taldeak aurretik frogatu du 20  $\mu\text{m}$ -ko diametroko fibronektina irlak direla zelulak bakarka atxikitzeo egokienak, irlen artean 50  $\mu\text{m}$ -ko distantzia utziz elkarren artean interakzio fisikorik ez dagoela ziurtatzeko. Beraz halako irudiez osatutako patroia laukiak (1 cm x 1 cm) diseinatu dira.

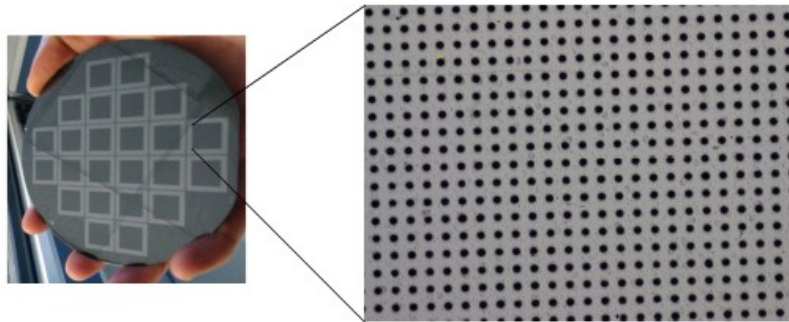
#### b) Litografia leuna

Goian aipaturiko patroiarene diseinua duen molde zurruna fabrikatu da lehenik, silizioko substratu baten gainean SU-8 deritzon erretxina fotosentikorrarekin egiturak irudikatuz. Hortarako, “lab-on-a-chip” gailuak fabrikatzeko ezaguna den fotolitografia (2. irudia) mikrofabrikazio teknika optimizatu da. Fotolitografia hurrengoan datza: siliziozko substratu hutsaren gainean SU-8 geruza gehitu (“spin coating”), beroketa leuna egin, argi utramorea (UV) irradiatu, irradiaketa ondorengo beroketa eta errebelatu. SU-8 geruza gehituta, lehenengo beroketa burutzeko silizio substratua 4 minutuz 65° C-tan eta 7 minutuz 95°C-tan eduki da. Ondoren, 160 mJ/cm<sup>2</sup> indarreko argipean jarri da 7 segunduz. Egiturak osatzeko maskara bat erabiltzen da, zeinak zonalde opaku eta gardenak dituen, argia ekidin edo pasatzen uzteko eta horrela intereseko patroiak lortzeko. Izan ere, argia pasatzen den SU-8 geruzaren guneetan aldaketa kimiko batzuk ematen dira, SU-8 polimerizazioa eraginez eta erretxina gogortuz. Hurrengo beroketa SU-8 polimerizazioa indartzeko egiten da, 1 minutu 65 °C-tan eta 5 minutu 95 °C. Azkenik, errebelatuan, disolbatzaile batean sartzen da SU-8 dun moldea eta gogortu ez diren guneak, hau da, argirik jaso ez dutenak, disolbatu egingo dira. 3. irudian ikusten den bezala, eta fotolitografiak emango duen emaitza argia jaso duten guneek osatutako erliebe-irudia izango da.

2. Irudia. Fotolitografia prozesuaren eskema, pauso guztiak irudikatuta.

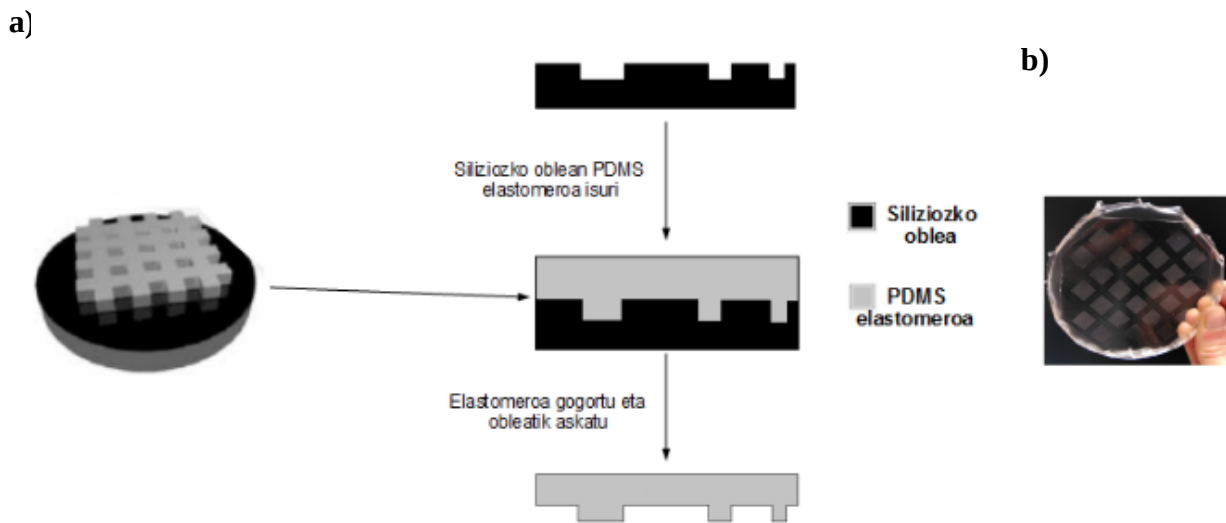


**3. Irudia.** Fotolitrografiaren emaitzak: fabrikatutako siliziozko oblearen itxura begibistaz (ezkerra) eta 20  $\mu\text{m}$ -ko diametrodun irlez osatutako sarea erreflexio-mikroskopiaarekin begiratuta 5x handipenarekin (eskuina).



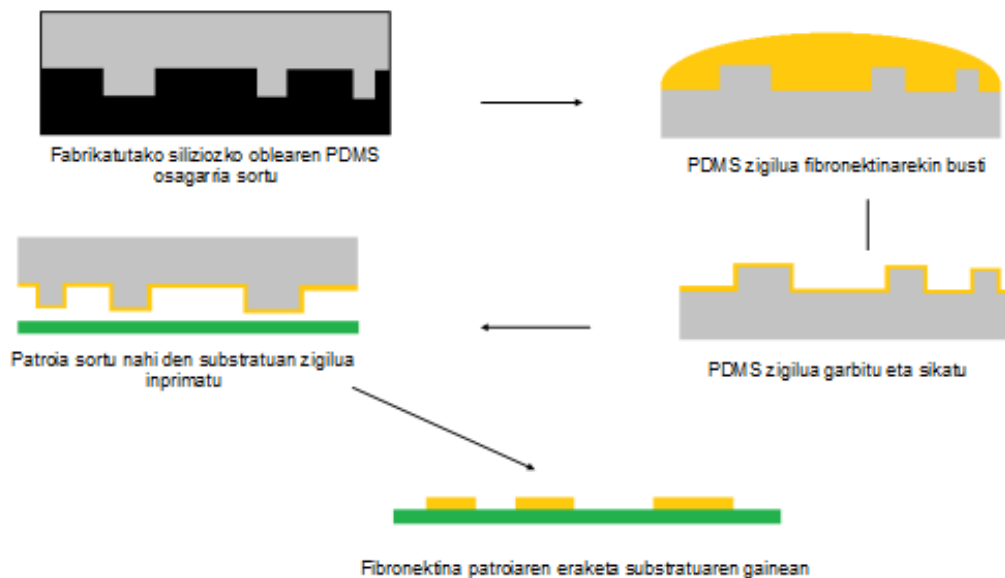
Intereseko egituradun molde zurruna polidimetilsiloxano (PDMS) elastomeroz osatutako zigilua egiteko erabili da. 4. irudian adierazten den bezala, lehenik eta behin moldearen gainean elastomero eta erreakzio haslearen arteko nahaste likidoa isurtzen da eta ondoren labean sartzen da tenperatura altuetan elastomeroaren solidifikazioa azkartu dadin. Era honetan, solidifikatzean, silikonazko zigilu bat lortzen da, siliziozko molde zurrunekeo egituren osagarriak izango dituen.

**4. Irudia.** PDMS zigiluaren fabrikazioa. PDMS zigiluarenfabrikazio prozesua (a) eta laborategian fabrikatutako zigiluaren argazkia (b).



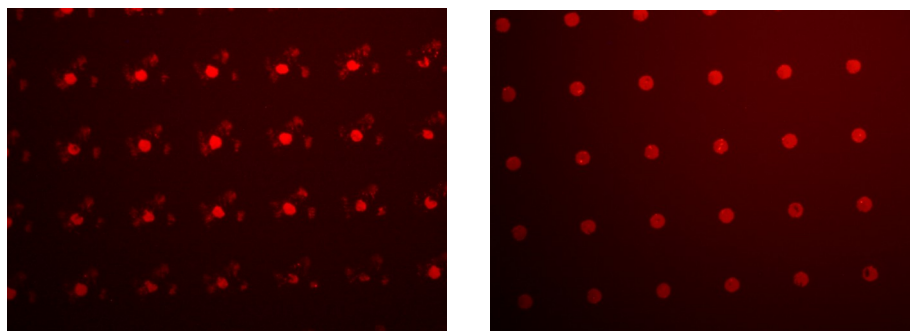
Proteina-patroiaren inprimaketa lortzeko azken pausoa “Microcontact Printing-a” da. Berau gauzatzeko, PDMS zigilua hartu, eta lehenik eta behin proteina disoluzioarekin inpregnatu behar da. Kasu honetan, soluzioak bi proteina ditu, fibronektina batetik, zelulen atxikipena indultzeko, eta BSA-TAMRA proteina fluoreszentea bestetik, kolorea emateko eta proteina patroia behatu ahal izateko. Behin zigiluak bere gainazalean proteinak xurgatzeko denbora izan duenean disoluzio hori kendu, zigilua sikatu eta substratuaren gainean imprimatu zen, 5. irudiko 4. pausoa ikusten den bezala. 30 minutu igaro eta gero, PDMS zigilua kendu, eta amaierako pausoa intereseko patroia, hau da, hasieran siliziozko oblean fabrikatutakoa lortzen da, substratu baten gainazalean proteinez osatuta.

5. Irudia. Microcontact Printing teknikaren eskema.



Pauso honen optimizazioan, PDMS sortzeko nahaste likidoan bi konposatuen arteko erlazioak printing-aren emaitzetan eragin zuzena daukala ikusi dugu (6. irudia). Erreakzio hasletzat diharduen konposatuaren kantitate handiagoekin, solidifikatze prozesuan zehar ematen diren lotura kimikoak direla eta, silikona zurrunagoa sortzen da. Konposatu haslearen kontzentrazio desberdinekin jokatzuz, egokiena PDMS zurrunagoa dela behatu dugu (6. irudia). Horren arrazoiak materialak jasaten duen tentsioa izan daiteke, hau da,  $\mu$ CP teknikak eskulan handia esaten du, eta PDMS zigiluek elastikotasun gehiago dutenean, manipulazio horretan tentsioa jasateko gaitasun txikiagoa dute, ondorioz, inprimatzerako orduan egiturek ez dute horrenbesteko egonkortasunik, patroietan zehaztasun falta emanez.

6. Irudia. Fluoreszentzia mikroskopioarekin behatutako proteina patroiak, BSA-TAMRA proteina da ikusgarri. Bi patroik ikus daitezke (20x handipena), PDMS sintesirako elastomero-erreakzio haslearen arteko erlazioa 10:1 izanik (ezkerra) eta PDMS sintesirako elastomero-erreakzio haslearen arteko erlazioa 5:1 izanik (eskuina).

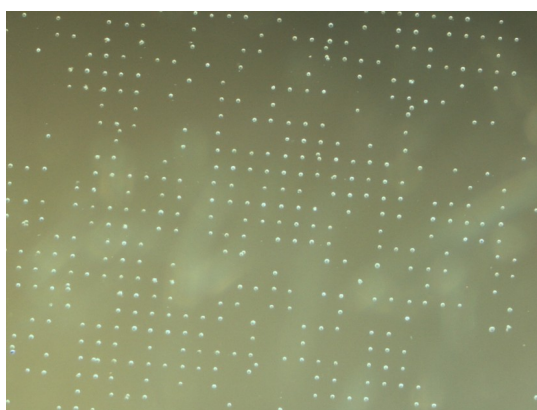


### c) Zelulen hazkuntza proteina patroidun substratuetan

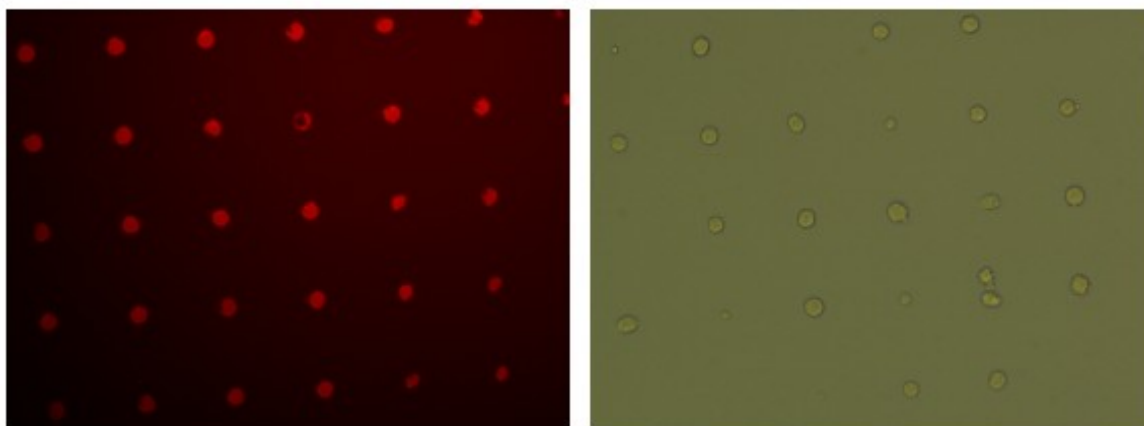
Azkenik, behin proteina-patroiak era egokian eratu direla ziurtatuta, zelulak erein dira horien gainean. Horretarako hazkuntzan dauden zelulaz beteriko flasketik gainazalean atxikita dauden zelulak askatu behar dira lehenik, tripsina entzima erabiliz, tripsinizazio deritzon prozesuan. Puntu honetan zelulak suspentsioan daudenez, hauen kontzentrazioa neurtu dugu zelula kontagailu batekin, ondoren 1 cm x 1 cm-ko proteina patroia bakoitzean 100.000 zelula ereiteko beharreko bolumena gehitzeko.

Behin zelulak ereinda, patroia guztian zehar itsatsi ahal izateko, bi noranzkotan mugitzen den dendunkarian jarri da zelulak ereinda zituen plaka, hauexek ondo heda daitezten. Inkubazio hau 37 °C-tan eta %5-eko CO<sub>2</sub> kontzentrazioan egin da, zelulen bideragarritasun egokia bermatzekotan. 90 minutuko inkubazio aldia pasa ondoren, plaka atera eta mikroskopio optikoan behatu da zelulen atxikipena (7. irudia).

**7. Irudia.** Mikroskopio optikoarekin ateratako argazkia (4x handipena). Ikusten den puntu bakoitza zelula bat da. Zelula bakarrez osatutako sarea ikusten da, diseinatutako patroiarri jarraiki.



**8. Irudia.** Zelulen atxikipen portzentaia kalkulatzeko, gune berebean fluoreszentzia mikroskopioarekin behatutako patroia (20x handipena) (ezkerra) eta mikroskopio optikoarekin behatutako zelulak (20x handipena) (eskuina) konparatzen dira.



Behaketa honetatik atxikipen portzentaia kalkulatu daiteke hurrengo formula aplikatuz:

$$\text{Okupazio portzentaia} = \frac{\text{zelula atxikita duten irila kopurua}}{\text{irila kopuru totala}} \times 100 = \frac{23}{30} \times 100 = \% 76,67$$

#### 4. Ondorioak

Lan honetan zelulen banan-banako kokapena zehaztasunez kontrolatzeko diseinua eta teknika garatu da. 20  $\mu\text{m}$ -ko diametroko fibronektina irlak inprimatuz eta hauen artean 50  $\mu\text{m}$ -ko distantzia utziz, adhesio-gune independenteak sortu dira zelulak espezifiki eta banan-banan kontrolatu ahal izateko.

Gainera, fibronektina proteina erabiliz, zelula mota honek proteina honekiko afinitate altua duela ikusi da, %76,67-ko atxikipena agertu baitute. Hortaz, fibronektinak MEZ-ean duen funtsezko papera agerian geratu da, hau da, *in vivo* zelulek fibronektinarekin loturak lotzeko duten joera baieztatu da, proteina honek seinalizazioan eta hortaz zelulen jarreran duen garrantzia baieztatuz.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Teknika hau oraindik oso berria dela kontuan harturik, ikerkuntza sakonagoa espero da ondorengo urteetan. Gainera, zelulen banako kontrolak zelulen biologia ezagutzeko aukera ematen duenez, orain arteko teknika konbentzionalek dituzten mugak gainditzeko aukera zabala eskaintzen du. Zelulen biologian garrantzi itzela dauka zelula eta proteina desberdinen arteko interakzioak ezagutzea, baina baita ehunen injeniaritzan ere, izan ere, arlo honek gaur egun duen erronkarik handiena da zelulen mikroingurunearen mimetizazioa. Mimetizazio horretara heltzeko, funtsezkoa da zelulen biologia eta hauen beharrianak ezagutzea, hazkuntzak optimizatzeko aukera egon dadin.

#### 6. Erreferentziak

- Basabe-Desmouts L., Ramström S., Meade G., O'Neill S., Riaz A., Lee L.P., Ricco A.J. eta Kenny D. (2010). Single-step separation of platelets from whole blood coupled with digital quantification by interfacial platelet cytometry (iPC). *American Chemical Society Publications (Langmuir)*, 26 (18), 14700-14706.
- Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., eta Ingber D.E. (1997). Geometric control of cell life and death. *Science*, 276, 1425-1428.
- Halldorsson S., Lucumi E., Gómez-Sjöberg R. eta Fleming R.M.T. (2015). Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosensors & bioelectronics*, 63, 218-231, DOI 10.1016/j.bios.2014.07.029.
- Jiang X.Y., Bruzewicz D.A., Wong A.P., Piel M., eta Whitesides M. (2005). Directing Cell migration with asymmetric micropatterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 102, 975-978.
- Lautenschläger F. eta Piel M. (2013). Microfabricated devices for cell biology: all for one and one for all. *Current opinion in cell biology*, 25, 116, DOI 10.1016/j.ccb.2012.10.017.
- Lopez-Alonso A., Jose B., Somers M., Egan K., Foley D.P., Ricco A.J., Ramström S., Basabe-Desmouts L., eta Kenny D. (2013). Individual platelet adhesion assay: measuring platelet function and antiplatelet therapies in whole blood via digital quantification of cell adhesion. *Analytical Chemistry*, 85 (13), 6497-6504.
- McBeath R., Pirone D.M., Celeste M.N., Bhadriraju K eta Chen C.S. (2004). Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Developmental Cell*, 6, 483-495.
- Nelson C.M. eta Chen C.S. (2002) Cell-cell signaling by direct contact increases cell proliferation via a PI3K-dependent signal. *FEBS Letters*, 514, 238-242.



## 7. Eskerrak eta oharrak

Egileok gure esker ona adierazi nahiko genuke Eusko Jaurlaritzako Industria, berrikuntza, merkataritza eta turismo Sailari ELKARTEK 2015 deialdiko KK-2015/0000088 zenbakidun diru laguntzarekin ikerketa hau babesteagatik.

Bestalde, egileok Euskal Herriko Unibertsitateko Marian Martínez de Pancorbo katedruna eskertu nahiko genuke UPV/EHUko laborategi instalazioen erabilera gure eskura jartzeagati, baita DNA Bankuko (SGIker) Maite Álvarez Doktores, laguntza tekniko eta pertsonalarekin eta Europako finantziarioarekin (FEDER eta FSE) laguntzeagatik. Baita eskertu nahiko lukete “NANBIOSIS” ICTS-ak emandako asistentzia tekniko eta intelektuala, zehazki Bioinjeniaritza, Biomaterialak eta Nanomedikuntza (CIBER-BBN) elkarteko Farmako Formulazio taldeak (U10).

Maite Garcia-Hernandok “2016ko UPV/EHUn ikertzaile prestakuntzarako kontratatzeko diru laguntzen deialdia” eskertu nahiko luke PIF16/204 zenbakidun laguntzarekin ikerketa hau babesteagatik, baita Ainhoa Gonzalez Pujana doktoregaiari, laneko azken ataleko elulen atxikipen saiakuntzetan bere laguntzagatik.

Fernando Benito-Lopezek, Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioko Ramón y Cajal” programako onuraduna denak, “European Union’s Seventh Framework Programme (FP7) for Research, Technological Development and Demonstration, 604241” proiektua eskertu nahiko luke.