

Kapitlene er disse:

1. Introduksjon – hva emnet handler om
2. Enkelt molekyl analyse (SCA) – teknikker for å se individuelle biomolekyler
3. Biopatterning – hvordan man mørnstrer aktive biomolekyler på overflater og hvorfor
4. Celleverktøy – celle-på-chip
5. Organer på chip I – 3D cues og vaskularisering
6. Organer på chip II – andre organer på chip
7. Nukleon syre analyse – og proteiner i lab-on-chip settinger
8. Protein analyser – DNA nanoteknologi, analyse og bygge blokker
9. Mikrofabrikasjon – å lage verktøy for biologi (altså hardware)
10. Elektron mikroskopi/FIB – nanoskala resolusjon cellulær imaging
11. Hydrogel strukturering – hvordan skape myke materialer og hva man skal lage
12. Mikrofluider – liten flyt, spesielle krav
13. Droplet basert mikrofluid – Digital biologi, en dråpe i gangen

Jeg skal gå igjennom emnet og forberede meg til eksamen som er den 8. juni. Samtidig må jeg levere inn en semesteroppgave. Den ønsker jeg skal være basert på den jeg leverte forrige semester og at den skal være om en egenlaget sensor basert på parallel-plate kapasitans.

## **Kapittel 1: Introduksjon**

Foreleser: Øyvind Halaas

Nanomedisin I: hypen er at man skal klare å lage autonome systemer for å finne og reparere sykdommer. Det er ikke bare en hype dog.

- Definisjonen er at nanomedisin er den medisinske anvendelsen av nanoteknologi.
- Nanomedisin er verden hurtigst voksende marked. Health care market: 10 000 billion dollar/ year by 2020 (about 10 % of the worlds spending). Significant portion to nanotechnology, 1000 billion dollar by 2015.

## Nanomedisin: hva er det?

I nanomedisin, så bryr vi oss mer om medisin enn nano.

- Det er en multidisiplinær tilnærming til helt nye medisinske behandlinger.

MOL3014

Analytical tools  
- diagnosis, sensors,  
research

MOL3015

Imaging  
- In vivo  
- In vitro

Therapy  
- Drug delivery  
- Tissue repair

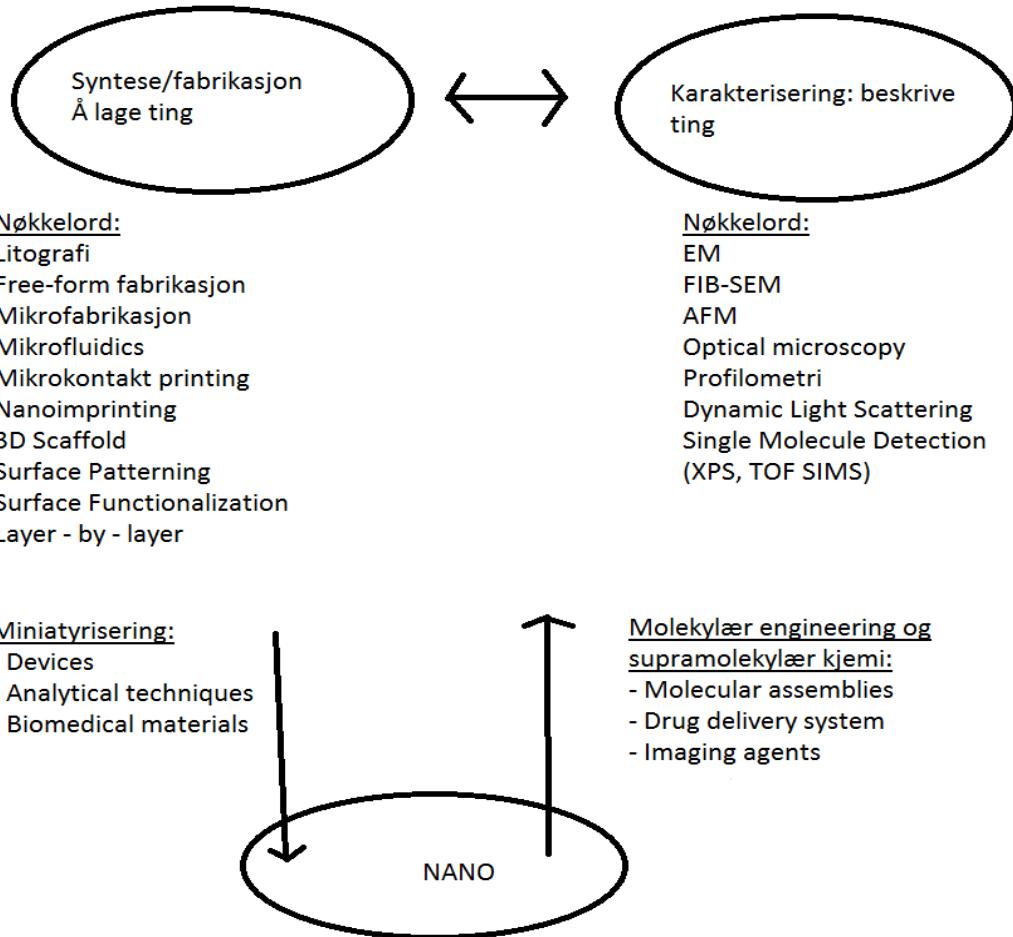
Material science, Chemistry, Physics, Molecular biology, Engineering

Safety, Chemical use, Regulation

- Det er en link til en meget bra side om genetikk fra Utah. For å komme fram til siden, så kan man google: «learning genetics Utah» i søkeret.

De to siden av nanoteknologi medisin:Det ble for lite plass til figuren jeg lagde på tegneprogrammet Paint over dette. Derfor må man se ned på neste side for å lese om dette

avsnittet.



### Når vi har små ting, hvordan kan vi lage store ting?

- Topp-ned tilnærminger er for dyre:

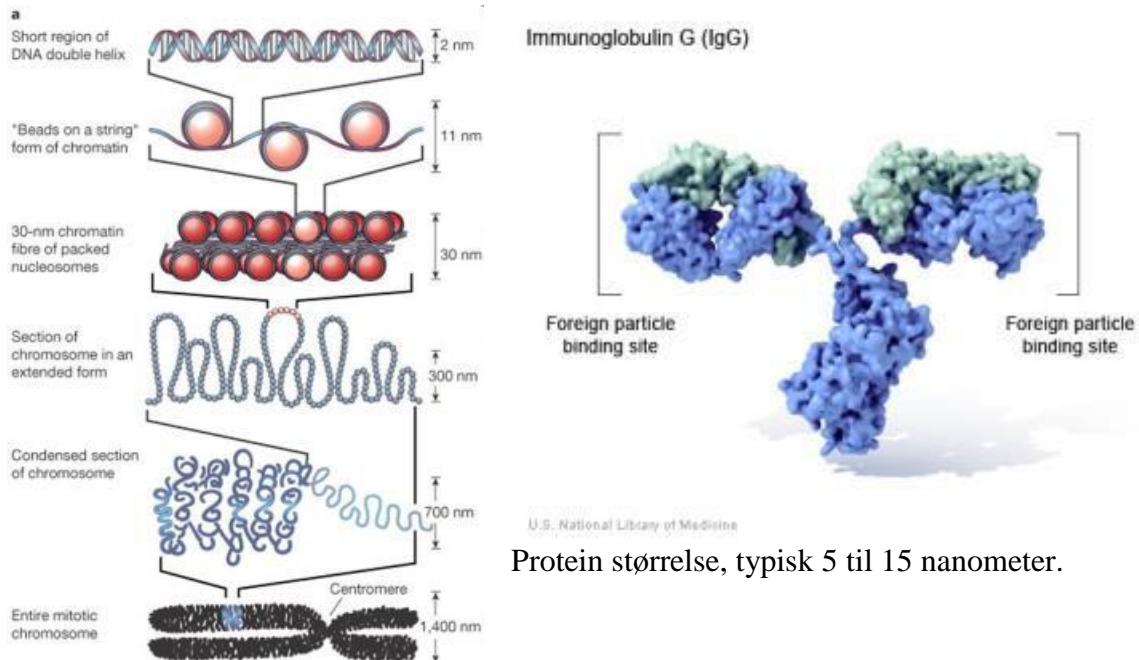
Mikromaskineri, fotolitografi, electron-beam litografi, focused ion beams

- Bottom-up, eller såkalte self-assembly er nødvendig

Moderne syntetisk kjemi muliggjør syntese av kjemikalier fra molekyler og nye metoder behøves.

### Størrelsen på livets byggesteiner:

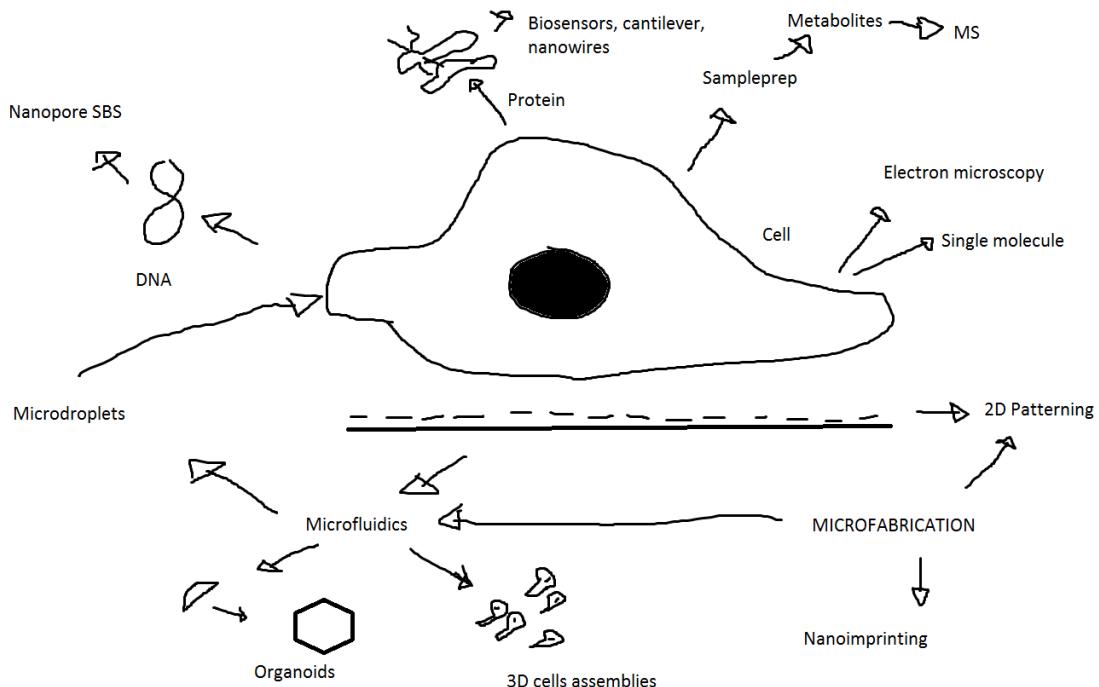
Lengden til DNA/menneskelige celler = 4 \* 1 m



### Kompleks og «skitten» biomedisin – noen veldig unøyaktige tall:

10 000 000	different species
7 000 000 000	different people
25 000	human protein-coding genes
300 000 000	basepairs in human genome
100 000?	SNP/genome
500 000	human proteins => Typical concentrations $10^{18}$ - $10^{12}$ molecules/ml
2000	extracellular metabolites (will increase)
20 000	drugs (will increase)
2000	pathogens
10 000 000	antibodies/person
1 000 000	T cells/person
70 000 000	different cancers

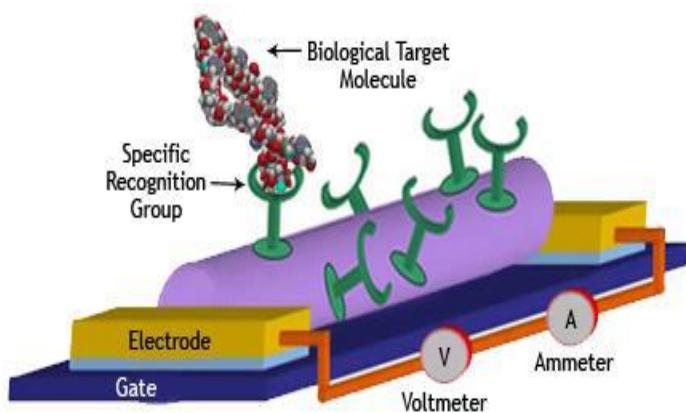
## Course outline: nanotechnology for biomedicine: analysis



Figur 1: viser hvordan emnet er bygget opp og hvordan de forskjellige delene henger sammen

For figuren ovenfor bør man heller se på den i forelesningsfoilerne ettersom den jeg har laget i paint er ganske dårlig og av lav kvalitet (smør på flesk setning der).

### Eksempel:



Kan nanotråder bli brukt til å oppdage biomolekyler? Mange former for nanoteknologier med ekstrem sensitivitet blir brukt for å se om de passer for biosensorer. Vi har et eksempel hvor nanowire sensorer (a coded nanowire suspension arrays og semiconductor

nanowire based field effect transistors) blir brukt for multipleks deteksjon av biomolekyler som nukleonsyrer og proteiner. Nanotrådene: < 1um i diameter og noen titalls mikroner i

lengde. Man kan plassere mange nanoledninger i en array og derav oppdage optiske, elektriske og massebaserte tilnærminger. Hver ledning har sin oppgave.

Det finnes da to metoder:

- Optical encoded nanowire suspension arrays, with fluorescence microscopy readout, which offer flexible multiplexing using readily available instrumentation.
- Semiconductor nanowire field-effect transistors (FETs) which offer ultrasensitive, label-free electrical detection

Begge metodene har blitt demonstrert for biologisk multipleksing. Innenfor elektronikken er multipleksing dette: Innenfor telekommunikasjon, er **multipleksing (MUX-ing)** det å kombinere to eller flere informasjonskanaler i en felles transmisjonsmedium ved å bruke maskinvare kalt en multiplekser (eller MUX). Det motsatte av dette er kjent som demultipleksing eller invertert multipleksing. George O. Squier (1863–1934) oppfant prinsippet i 1910 ved å bruke en bærefrekvens til å kombinere flere telefonsignaler i én telefonlinje.

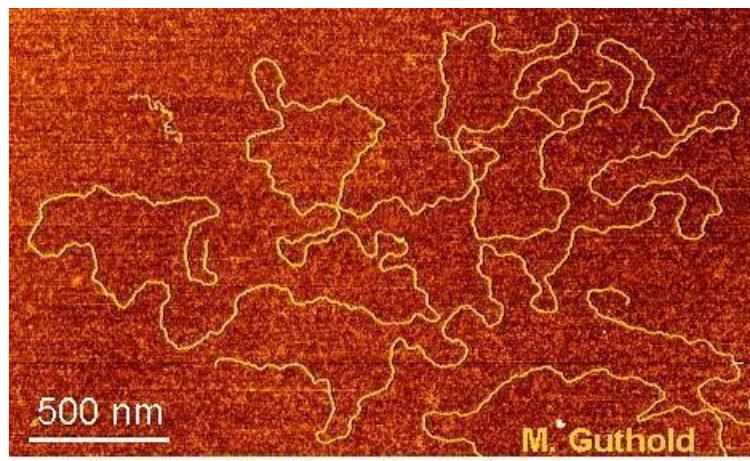
I elektronisk kommunikasjon, er de to basisformene av multipleksing tidsdelt multipleksing (TDM) og frekvensdelt multipleksing (FDM). Innenfor optisk kommunikasjon kalles analog FDM bølgelengdemultipleksing, ofte omtalt med den engelske betegnelsen wavelength division multiplexing (WDM).

Innenfor koding av videosignaler er **multipleksing** prosessen med å kombinere flere lyd- og/eller bildestrømmer i en signalstrøm. Det motsatte av dette, å dele strømmene inn i sine opprinnelige separate signalstrømmer, er kalt demultipleksing.

Innenfor spektroskopi er uttrykket brukt i en sammenheng til å indikere at et eksperiment er utført med en blanding av flere frekvenser på en gang og at resultatet ble avdekket etter bruk av Fouriertransformasjon.

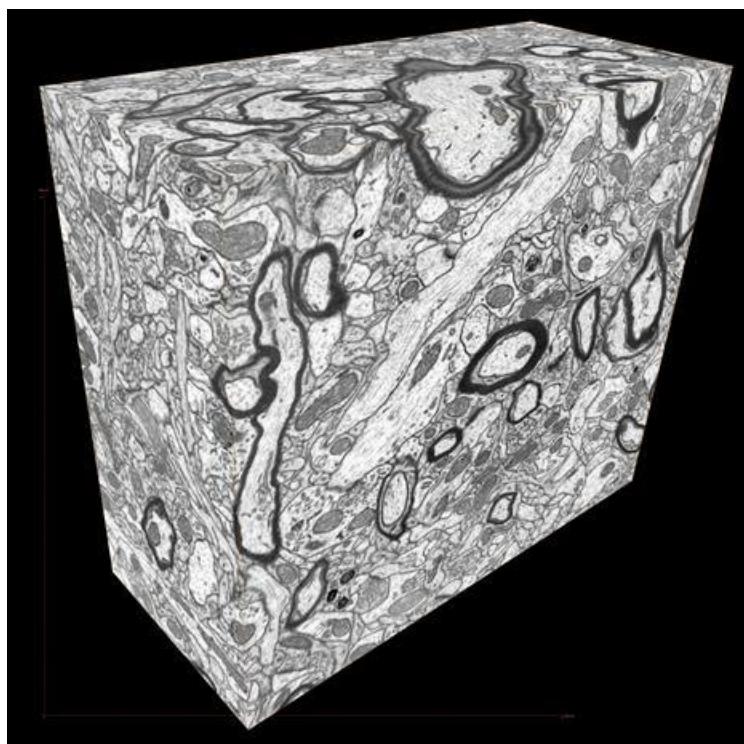
### Ekstrem resolusjon av levende materie:

I denne delen er det avbildet to bilder tatt med henholdsvis: Atomic force microscopy (AFM) og 3D electron microscopy.



$\lambda$ -DNA

AFM = er en veldig høy-resolusjon type scanning probe microscopy (SPM), med demonstrert resolusjon på fraksjoner av en nanometer. Det har en cantilever eller tipp som det prober (eller undersøker prøven med).



3D elektron mikroskopi = er rett og slett 3D-imaging av de gamle elektron-mikroskop metodene.

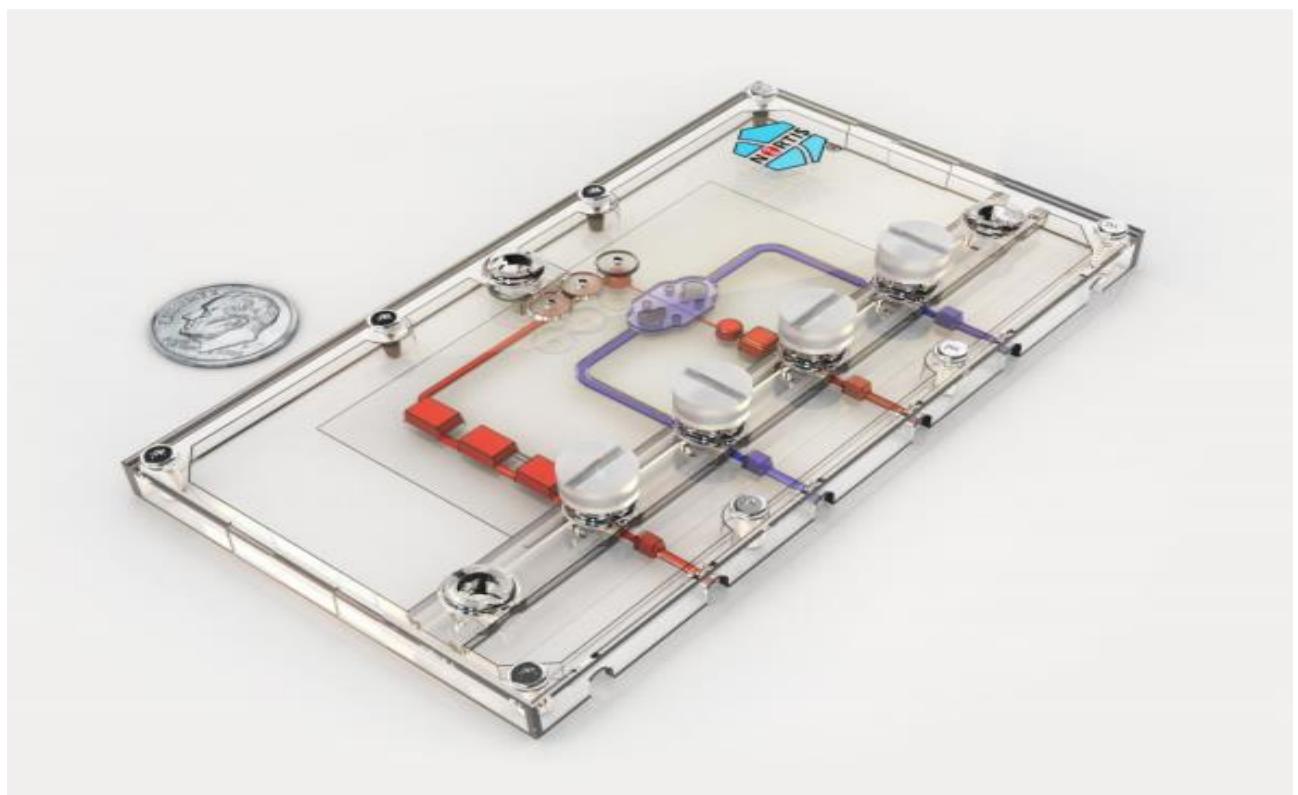
### Kan vi få cellene til å oppføre seg som vi vil ved å lage de riktige omgivelser?

Stamcelle fornyelse/differensiering er avhengig av både løselig og strukturerte biologiske hint.

### Kan vi gjenskape kroppslige funksjoner utenfor en kropp?

Er et labrelatert spørsmål. Man spør seg om man kan skape labtilstander som kan gjenskape organer og/eller kroppslige funksjoner.

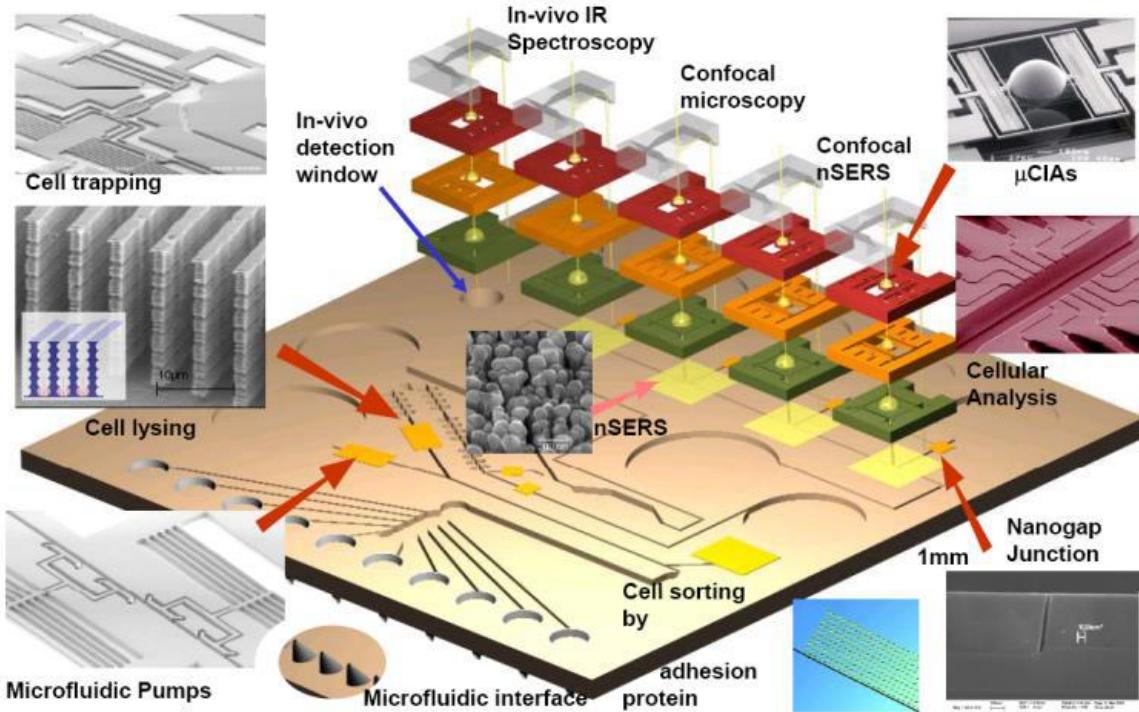
- Jeg vil si ja til dette spørsmålet ettersom vi har eksempler på 11 kroppsdelar fremvokst i en lab. Disse er ikke komplette organer, men eksemplene vi har er disse: fallopian tubes (organoide, det indre cellelaget av fallopian tubes), minihjerne: cerebral hemisfære, optic stalk og cephalic flexure, som er på størrelse med et blyantviskelær ble laget fra hudceller. Det er likt en 5-ukers menneskelig fetus. Minihjerte: stamceller ble utviklet til hjertemuskel og connective tissue (en av fire vevtyper). Så ble det organisert til et lite kammer og «slag». Hjertet banker, mens konnektiv vev binder det til fatet det ble vokst på.
- Disse er bare 3 eksempler. For resten, se på nettsiden til livescience.



*Figur 2: Kan vi gjenskape kroppslike funksjoner utenfor kroppen (et eksempel ovenfor)*

*μTas – mikroskala total analyse system:*

Biologiens våte drøm. Mikrotas er en verdensomspennende konferanse som omhandler mikrofluidikk.



Så følger litt gjennomgang i emnet i praksis og forskjell på nanomedisin I og nanomedisin II:

Biomedisinsk komponent	«Nano» komponent	
Life	MOL3014	MOL3015 Enviromental Nanotoxicology Nanoethics
Population		Species nanotoxicology
Organismer		In vivo imaging NP Drug delivery NP Nanotoxicology
Organ	Assembly, chip	Tissue engineering
Cell	Capture, manipulation	Stem cells, Immune cells
Matrices	Characterization, fabrication	Tissue engineering
Molecules: Protein Nucleic acid Metabolite	Quantification, characterization, sequencing, manipulation, sample prep, sensors	

Emnet er ikke grunnleggende vitenskap, det er en måte å tenke på.

Medisinsk nanoteknologi: Ting man ønsker å vite for å være i stand til å utnytte den nye verdenen av nanoteknologi for biomedisinske analyser.

Syllabus: bioanalyse (MOL3014) (Utenfor kroppen):

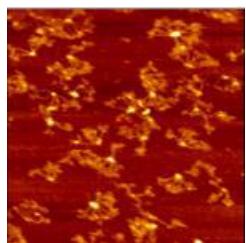
Diagnose, research; biosensors, genome, proteome, drug screening, cell devices, in vitro imaging, microfabrication, nanocharacterization.

Hva vi håper å lære i MOL3014 (på engelsk):

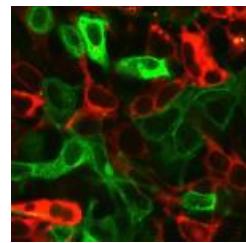
- What is medical nanotechnology about?
- New way of approaching biomedicine
- How can we make use of nanotechnology in biomedical analysis, and what are others doing? Anecdotal accounts
- More specifically: How do we identify and measure DNA, protein, cell behaviour and disease todays and what is to come..
- Find requirements for bioanalytical devices (many unsolved problems for you to solve!)
- Look at some fabrication processes and microfluidic devices
- Important to acknowledge that this is an emerging field not having entirely identified itself
- Provide a cross-disciplinary environment where we can learn from each other

## Kapittel 2: Single molecule detection

Dette kapittelet er delt inn i to:



Del 1: Atomic Force Microscopy on a surface



Del 2: Fluorescence Correlation Spectroscopy in solution

Figur 3: bilde tatt med AFM

Figur 4: Bilde tatt med Fluorescence mikroskopi

Forelesningene begynner med å nevne at 2016 Kavli-prisen i nanovitenskap gikk til de som oppfant AFM. Den ene mottakeren, Gerd Binning, vant også Nobelprisen i 1986 (fysikk).

### Læringsmål for forelesningen:

- Beskriv de to grunnleggende prinsippene for funksjonen av Atomic Force Mikroskoper
- Gi eksempler på bruk i biologi og medisin
- Beskriv prinsippet for fluorescence korrelasjons spektroskopi
- Gi eksempler på dette også i biologi og medisin
- Integrer disse to teknikkene med andre forelesninger i MOL3014

### Først skriver jeg ned det foreleseren omtaler som suggested readings. De er såkalte reviews:

**Bio AFM:** Hinterdorfer og Dufrene. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy:

På grunn av dets piconewton kraft sensitivitet og nanometer posisjonelle nøyaktighet, så har atomic force microscopy (AFM) stått frem som et kraftig verktøy for å utforske kreftene og dynamikken til interaksjonene mellom individuelle ligander og receptorer, enten på isolerte molekyler eller på cellulære overflater. Disse studiene krever at man setter på spesifikke biomolekyler eller celler på AFM-tipper og på solide støtter og måle de ubundne krefter mellom modifiserte overflater ved bruk av AFM force spektroskopi. [I reviewen beskriver man moderne metodologi for molekyler gjenkjennelsesstudier ved bruk av AFM, med vekt på

strategier tilgjengelig for å forbedre AFM tips og prøver, og på prosedyrer for å oppdage og lokalisere single molecular recognition events] (ikke så viktig det i klamme).

#### **Y.F.Dufrene: AFM for nanoscale microbe analysis:**

Nanoskala overflate-analysen av mikrobiale celler representerer en stor utfordring i moderne mikrobiologi og er kritisk for å utvikle nye bioteknologiske og biomedisinske applikasjoner. Ved å bruke AFM topografisk imaging, kan forskere visualisere ultrastrukturer til levende celler i fysiologiske betingelser og deres subtile modifikasjoner på cellevekst eller behandling med dop. Chemical force microscopy, hvor AFM-tipper er modifisert med spesifikke funksjonelle grupper, noe som tillater forskere å måle molekylære krefter og kjemiske egenskaper av celle-overflater på en skala av bare 25 funksjonelle grupper. Molekylær gjenkjennelses-imaging gir AFM ved å gi en metode til å lokalisere spesifikke reseptorer på celler, som for eksempel celle adhesjonsproteiner eller antibiotiske bindingssteder.

#### **KM Berland: Fluorescence correlation Spectroscopy: a new tool for quantification of molecular interactions**

Fluorescence correlation spektroskopi (FCS) gir en kraftig metode til å måle molekylær dynamikk og interaksjoner på en stor variasjon av eksperimentelle systemer og miljøer. Man fokuserer i artikkelen på FCS-metoder til å kvantisere molekylære interaksjoner, inkludert bruken av diffusjonsanalyse og molekylær telling. Både autocorrelasjon og cross-correlasjon FCS målinger blir diskutert.

#### **C. Bustamante: In singulo Biochemistry: When less is more**

Det har gått over 15 år fra når metoder for enkelt-molekyl deteksjon og manipulasjon ble først introdusert i biokjemisk forskning. Siden da har applikasjonen av disse metodene til en stor variasjon av problemer vokst på en forbløffende måte. Mens det opprinnelig var slik disse eksperimentene førte til mer bekreftende resultater enn nye oppdagelser, så er det slik i dag at enkelt-molekyl metoder ofte er metoden for å etablere ny mekanisme-basert resultater i biokjemisk forskning. Gjennom denne prosessen, så har forbedringer i sensitivitet, versatilitet og både spatiale og temporale resolusjoner forekommet hånd-i-hånd med deres applikasjoner.

### Enkelt molekyl studier:

Hvorfor?

- For å studere grunnleggende molekylære prosesser, som for eksempel proteinfolding, konformasjons forandringer, stepping av molekylære motorer.

Hvordan?

- Enkelt molekyl deteksjon: FRET, FLIM, FCS, TIRF  
Fluorescence label (s)
- Enkelt molekyl manipulasjon: optiske/magnetiske feller, AFM  
Prober utøver definerte krefter og å studere dynamiske og konformasjons forandringer, samt måle krefter
- Komplementære tilnærmingar

### Analoge versus digitale målinger:

Analoge går fra 0 pM til 10 pM. Digitale går fra 0 aM til 3,5 fM. Altså bedre resolusjon med digitale målinger.

### DEL 1: ATOMIC FORCE MICROSCOPY (AFM):

- Kort introduksjon til AFM
- Høy-resolusjon imaging
- Enkelt-molekyl interaksjoner
- Funksjonelle kart over bio-overflater
- Et verktøy i dop development forskning

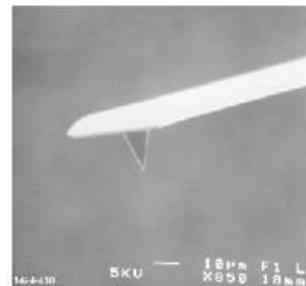
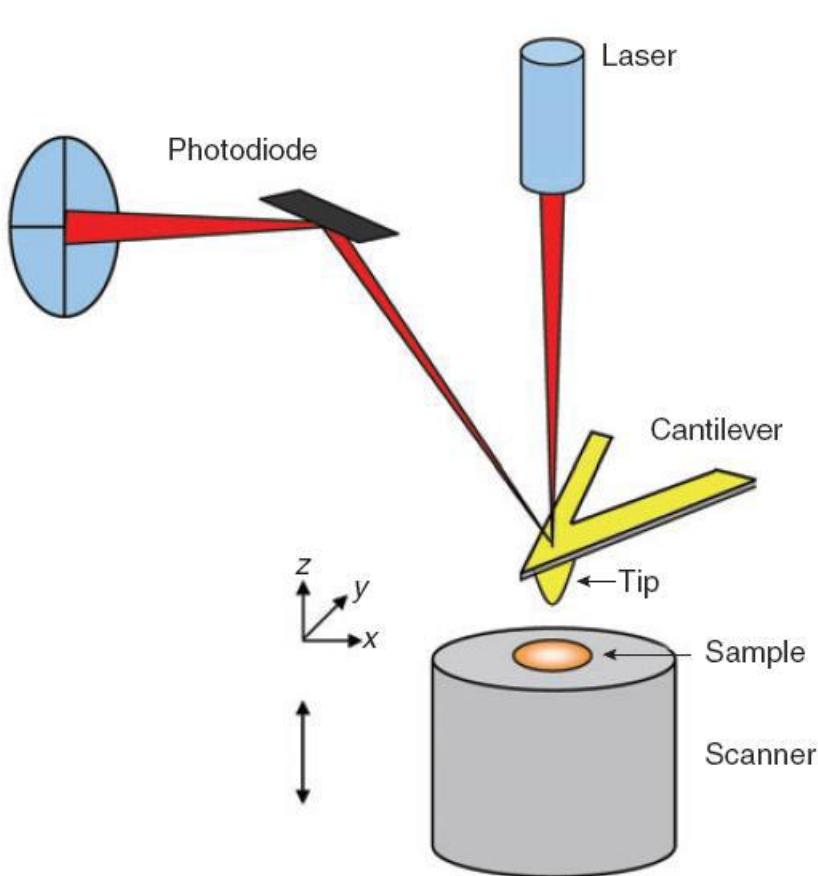
Jeg skal forklare litt om AFM fra wikipedia og andre nettsteder:

AFM er en veldig høy resolusjonstype av scanning probe microscopy. Resolusjonen er på fraksjoner av en nanometer. Informasjonen er tatt opp ved å føle på eller berøre overflaten med en mekanisk probe,

AFM har tre hovedegenskaper: kraftmåling, imaging og manipulasjon. Ved kraftmåling kan

AFM blir brukt til å måle kraften mellom probeb og prøven som en funksjon av deres gjensidige separasjon. Man kan bruke dette til å utføre kraft spektroskopi. Ved imaging er det slik at reaksjonen til proben av kreftene som prøven påtrykker på det kan bli brukt til å danne et 3D topografisk image av en prøveoverflate med høy oppløsning. Ved manipulasjon, så er det slik at kreftene mellom prøve og tippen kan brukes til å forandre prøvens egenskaper.

Vi har to moduser for AFM: kontakt og tapping. Ved kontakt bruker AFM feedback til å både måle og regulere kreftene på prøven. Vi har en liste over hvilke resolusjoner vi kan finne ting. 1 Å = atomer, 1 nm = proteiner, 10 nm = viruser, 100 nm = også viruser, 1 um = bakterier og 10 um = 0,1 mm celler.

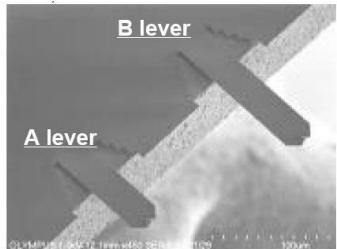


Disse to figurene viser henholdsvis hvordan en AFM fungerer i teorien (til venstre) og hvordan det ser ut (cantileveren altså) ser ut i praksis (til høyre).

Så ser vi på noen flere figurer, nå da de to modusene: kontakt og tapping. Under følger også en del informasjon om disse to modusene. Dette er ganske viktig informasjon og bør læres fordi det ofte kommer spørsmål om AFM på eksamen.

## Properties and applications

### Kontakt modus



Figur 5: Material: Silicon nitride,  
gold coating

For kontakt modus har vi disse egenskapene:  
Lever lenght 60-100  $\mu\text{m}$

Thickness 180 nm

Resonance frequency 13-37 kHz

Spring constant 0.006-0.03 N/m

### Tapping modus



Figur 6: Material: Silicon

Mens vi for tapping modus har disse egenskapene:

Lever lenght 125  $\mu\text{m}$

Thickness 4  $\mu\text{m}$

Resonance frequency 330 kHz

Spring constant 42 N/m

Så gjennomgår vi dem litt nærmere: Ved kontakt modus, så er tippen i konstant kontakt med prøven. Tippen er festet til enden av en cantilever med en lav fjærkonstant. Etter hvert som tippen sakte beveger seg langs prøve-overflaten, så sørger kontaktkraften for at cantileveren beveger seg for å tilføye seg til forandringer i topografien. Ved tapping modus kartlegger man topografien ved å lett tappe en overflate med en oscillerende prøvetipp. Cantileverens oscillasjonsamplitude forandrer seg med prøvetopografien.

### Typar av AFM:

- Imaging
- Force measurement
- Combined with fluorescence (Bioscope, Veeco)
- Array of tips (Millipede, IBM)

Scanning probe microscopy (litt repetisjon):

- Lager imager av overflater ved bruk av en probe
- Proben er beveget (scannet) over hele prøven
- Prøve-probe interaksjon er overvåket som funksjon av lokasjon
- Image resolusjon er begrenset av probe-prøve interaksjonsvolum – ikke av diffraksjon
- Interaksjon kan modifisere overflaten – nanolitografi er mulig
- Skanningsteknikken er ganske treg
- Begrenset maksimums imagestørrelse

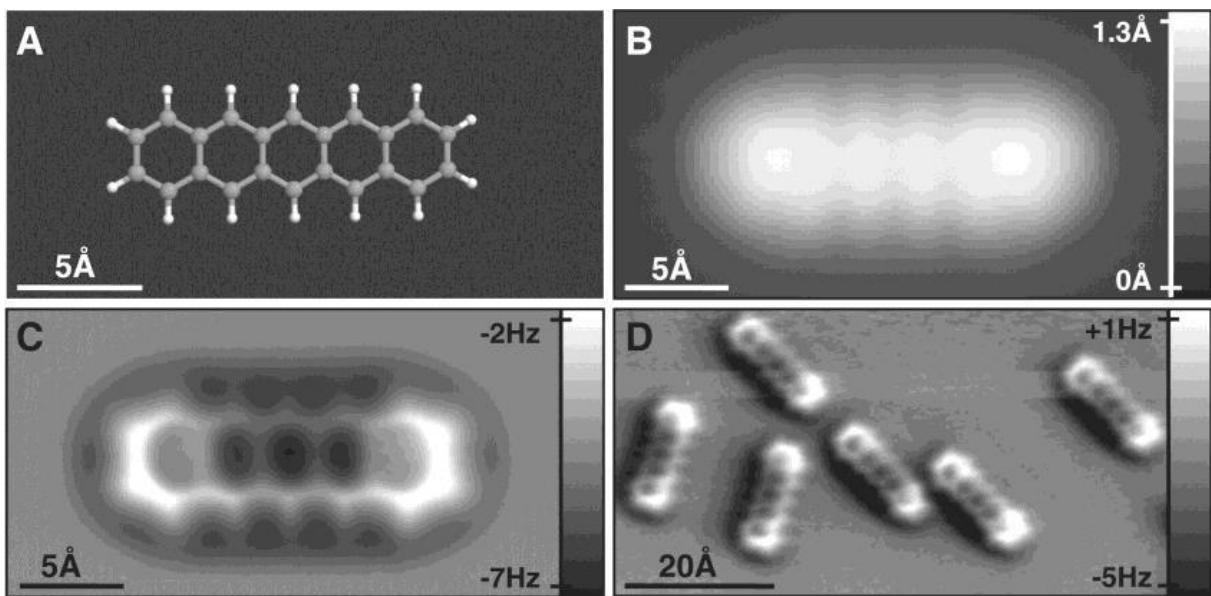
Kravene for å oppnå høy-resolusjon AFM imaging:

- Skarp tipp
- Bra designet prøve
- Balansert bufferbettingelser
- Tålmodighet

Atomisk oppløsning på molekyler med AFM:

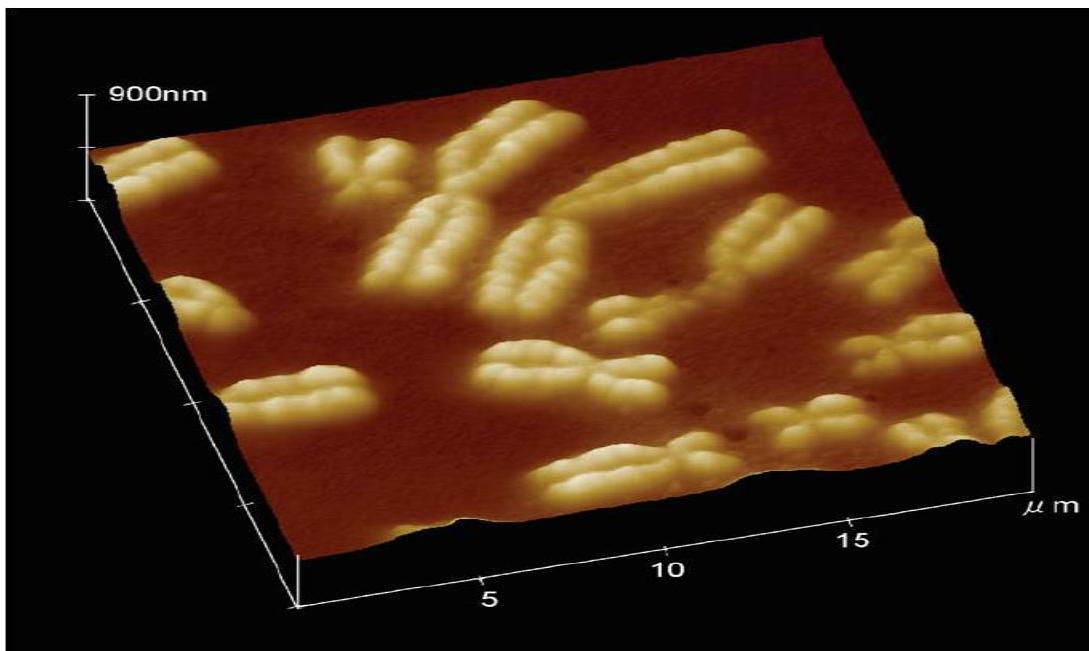
I eksempelet bruker man en CO-modifisert tipp over et pentacene molekyl. AFM-en er basert på 9Plus sensor design og er operert i et ultrahøyt vakuum ved temperatur på 5K. Hovedsteget for å oppnå atomisk oppløsning på molekyler er altså funksjonalisering av mikroskopets tipp med passende atomiske veldefinerte terminasjoner som CO molekyler. Terminasjon = hvor for eksempel en elektrisk ledning begynner eller slutter. I eksempelet fant man ut at Pauli repulsjoner gir oppløsningen, mens van der Waals og elektrostatiske krefter bare gir

bakgrunn.



Figur 7: flere bilder som er tatt med AFM

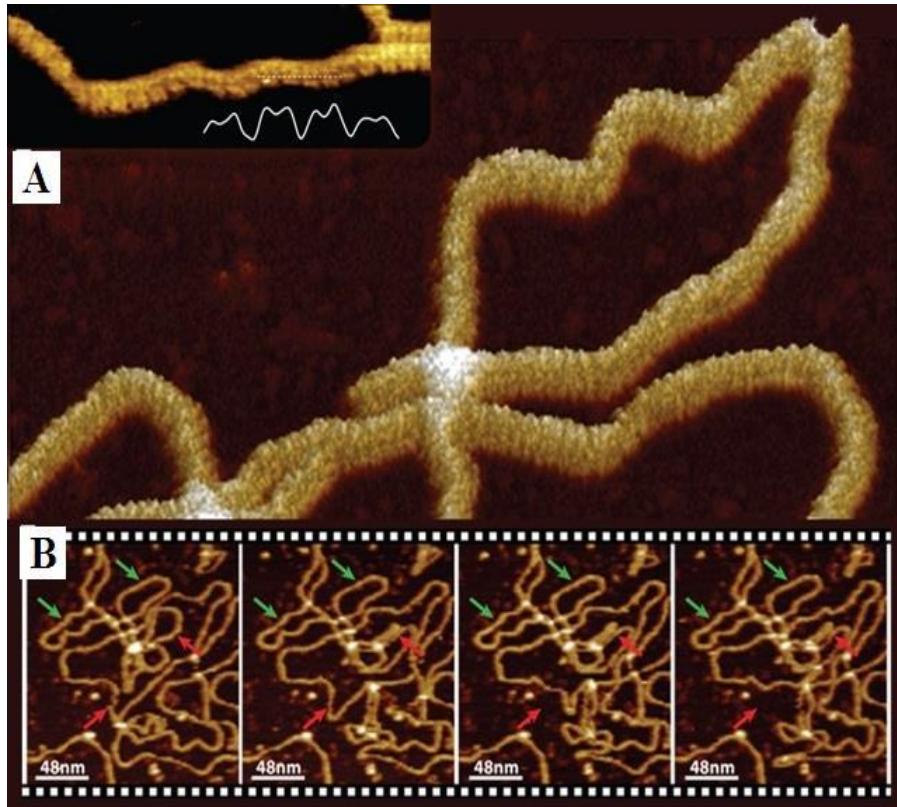
Andre eksempler som er på slidene er submolekylær resolusjon: MBL i luft. Det siste eksempelet er bruk av AFM til å se kromosomer.



Figur 8: AFM til å se på kromosomer i figuren ovenfor

Selve figuren viser et AFM bilde av faste kromosomer under flytende betingelser. Man har bare rester av menneskelig metafase kromosomer blandet i fosfat-bufret saline og observert med dynamisk modus AFM.

Man zoomer også inn på DNA. Noe imagene viser med dobbelheliksen. Dette er figur 8 i vårt lille skriv:

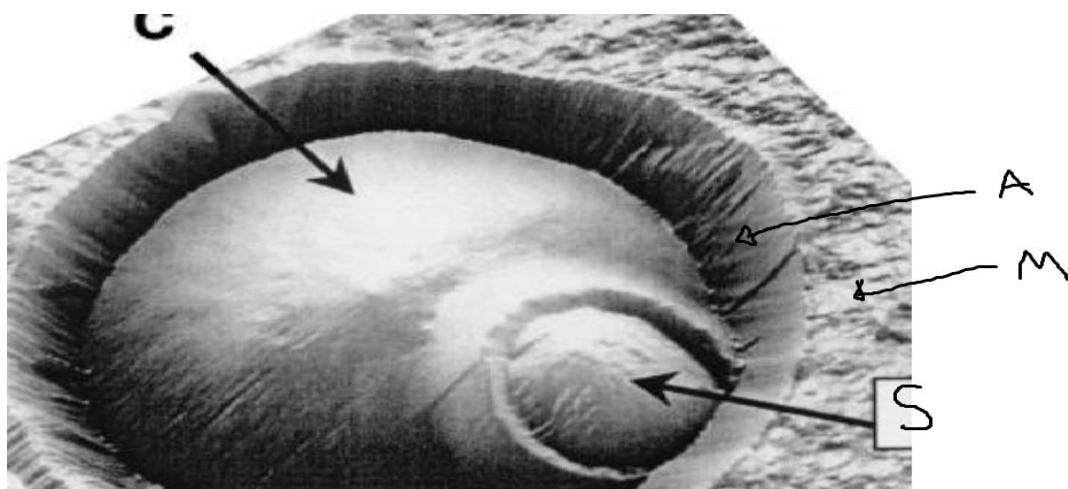


Det ble brukt DNA dobbel-heliks med peakforce tapping modus AFM. AFM blir brukt for DNA imaging for å karakterisere strukturen av SNA, protein interaksjoner, dynamikker og topologi.

Figur 9: AFM bilder tatt av kromosomer

#### AFM på enkeltceller:

Her har Yves Dufrene med flere AFM imager av overflaten til *S. Cerevisiae* i aqua-løsning. Selve bildet viser en enkelt-celle fanget i en porøs polymer-membran (B).



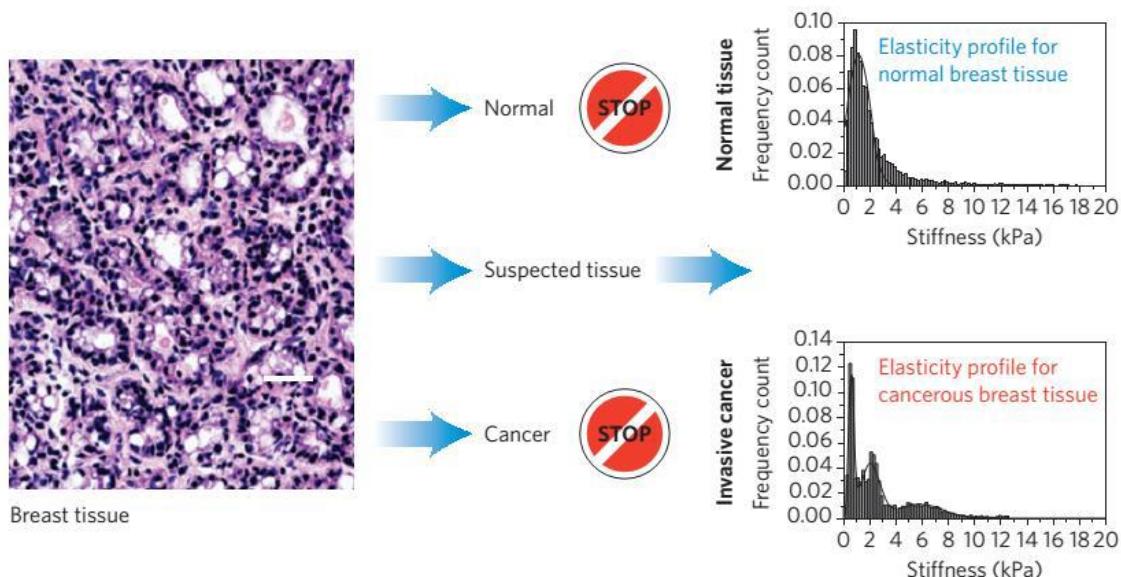
Figur 10: Bildet som viser enkelt-cellen fanget i en porøs polymer-membran

C = cellen i sentrum av bildet, S = sirkulær protusjon som kommer av arr, M = flatt område som representerer polymer-membran

Dufrene et al. Kom frem til at AFM er et komplementært verktøy til andre verktøy som viser overflaten til celler i virkelighetstid.

### Bruk av AFM i brystkreft-diagnose:

Det er snakk om potensiell bruk av AFM i brystkreftdiagnose. Diagnosen av brystkreft avhenger av per dags dato av histologisk «staining».

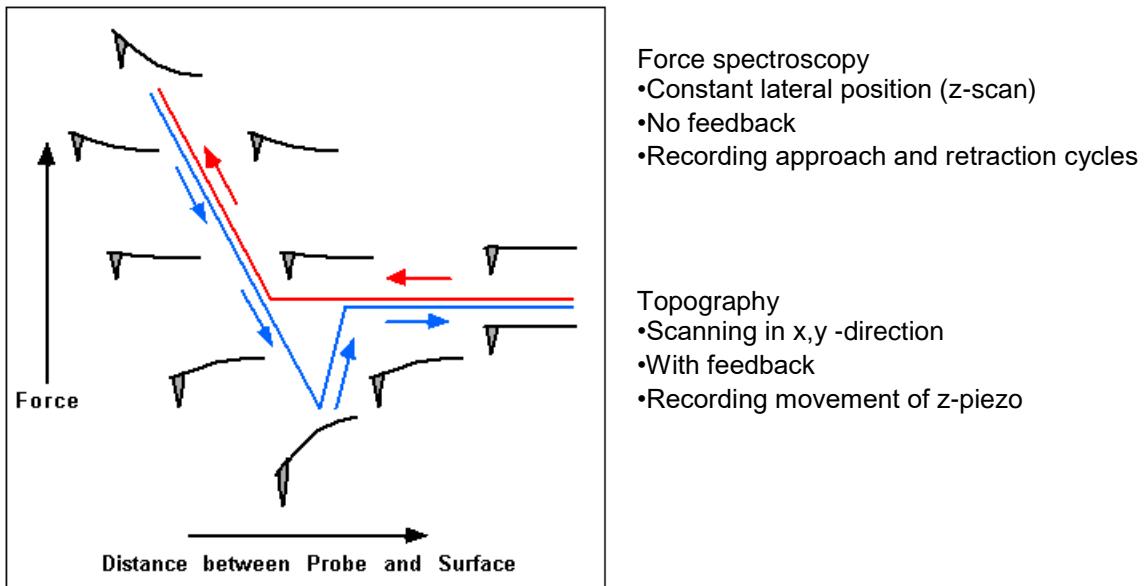


**Figure 1 |** Potential use of AFM in breast cancer diagnosis. The diagnosis of breast cancer at present relies on histological staining (left; scale bar, 50  $\mu\text{m}$ ). Histological staining classifies biopsies into three categories: no cancer (normal tissue), clearly visible cancer changes and suspected tissue that needs to be examined further (middle). Atomic force microscopy can provide a mechanical fingerprint of a suspected sample and help classify the tissue at a single-cell level (right). Histological image and stiffness distribution graphs reproduced from ref. 3.

Histologiske stains klassifiserer biopsier i 3 kategorier.: ingen kreft (normalt vev), klart synlig kreft og suspendert vev som trenger å bli undersøkt. AFM kan gi et mekanisk fingeravtrykk av en mistenkelig prøve og hjelpe til med å klassifisere vevet på enkelt-celle nivå.

## ENKELT-MOLEKYL INTERAKSJONER:

### Force-distance curves



Figur 11: viser distansen mellom probe og overflate

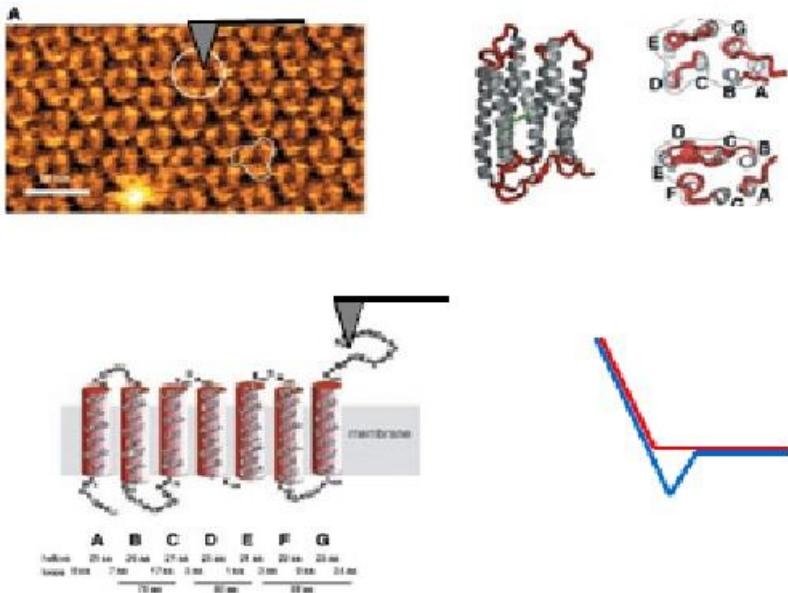
Kraft-spektroskopi: er et sett av teknikker for studiet av bindende krefter mellom individuelle molekyler. Det måler oppførelsen til et molekyl ved strekking eller torsjonell mekanisk kraft. Det er et enkelt-molekyl teknikk. I praksis er det:

- Konstant lateral posisjon (z-skann)
- No feedback
- Recording approach and refraction cycles

Topografi:

- Skanning i xy-retning
- Med feedback
- Recording movement of z-piezo

Et eksempel her er trekking av bacteriorhodopsin. Bacteriorhodopsin har blitt nøyde undersøkt med mange forskjellige teknikker.



Det har 7 transmembran helikser og intracellulære loops. Den ekstracellulære overflaten er på bunnen. Man kan måle hvor mye kraft som skal til for å trekke individuelle helikser ut av membranen.

Figur 12: viser et oppsett av bacteriorhodopsin

#### Pico- og nano – Newton krefter:

Interaksjon	Gjennomsnittlig kraft
Kovalent bånd	1-2 nN
Celle-Celle (multiple ikke-kovalente bånd)	1 nN
DNA-DNA komplementære strender	500 pN
Biotin-streptavidin	160-340 pN
Antibody-Antigen	50-250 pN
Protein-DNA	50 pN
Single glykoproteiner	25 pN
Single hydrogenbånd	10-20 pN

Med  $k = 0,1 \text{ N/m} \Rightarrow 500 \text{ pN}$  gir en defleksjon på 5 nm.  $\Rightarrow 50 \text{ pN}$  gir defleksjoner på 0,5 nm.

Med  $k = 0,01 \text{ N/m} \Rightarrow 500 \text{ pN}$  gir en defleksjon på 50 nm.  $\Rightarrow 50 \text{ pN}$  gir en defleksjon på 5 nm.

Man viser også her til et eksempel: «sacrificial bonds and hidden length: Unraveling molecular mesostructures in tough materials». Prøven går ut på at sacrificial bonds og skjulte lengder i strukturelle molekyler og kompositter har blitt funnet å øke fraktur-tøffheten til biomaterialer betraktelig ved å gi en reversibel, molekylær skala energidissipasjonsmekanisme. AFM ble brukt til å undersøke deres oppsamlingsmekanismer i deres opprinnelige (native) tilstand.

### Single molecule interaction studies:

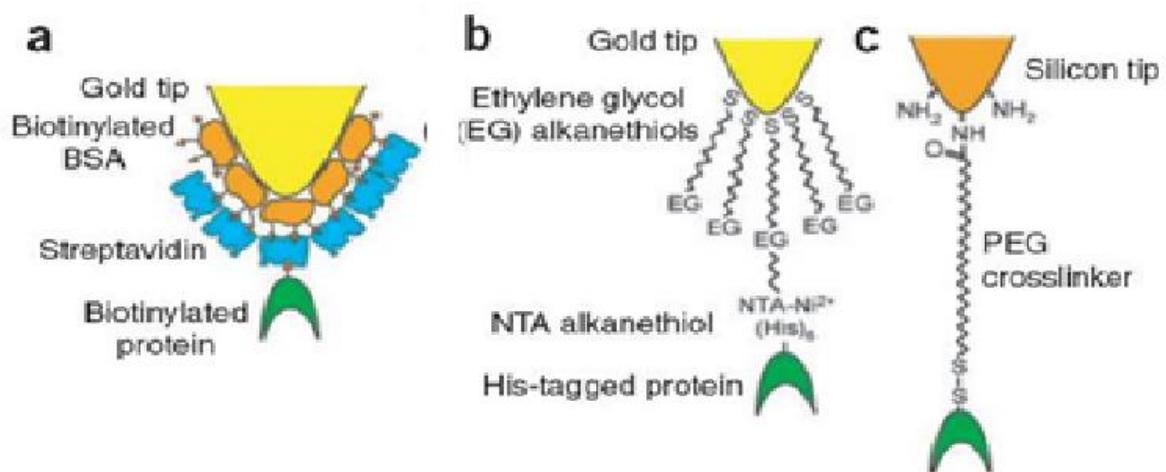
- Man studerer molekylære interaksjoner i detaljer
- Og tillegger spesifisiteter til AFM imager

### Krav:

- **Sterk binding av molekyler**
- **Lav overflatetetthet**
- **Molekyler bør være mobile**
- **Minimisere ikke-spesifikk absorbsjon**
- **Retningen til molekyler**

### Biospesifikke AFM-tipper:

Vi har 3 eksempler på biospesifikke AFM-tipper i pensum å forholde oss til. De blir lagt ved i figuren nedenfor og a, b og c er derav tre forskjellige AFM-tipper.



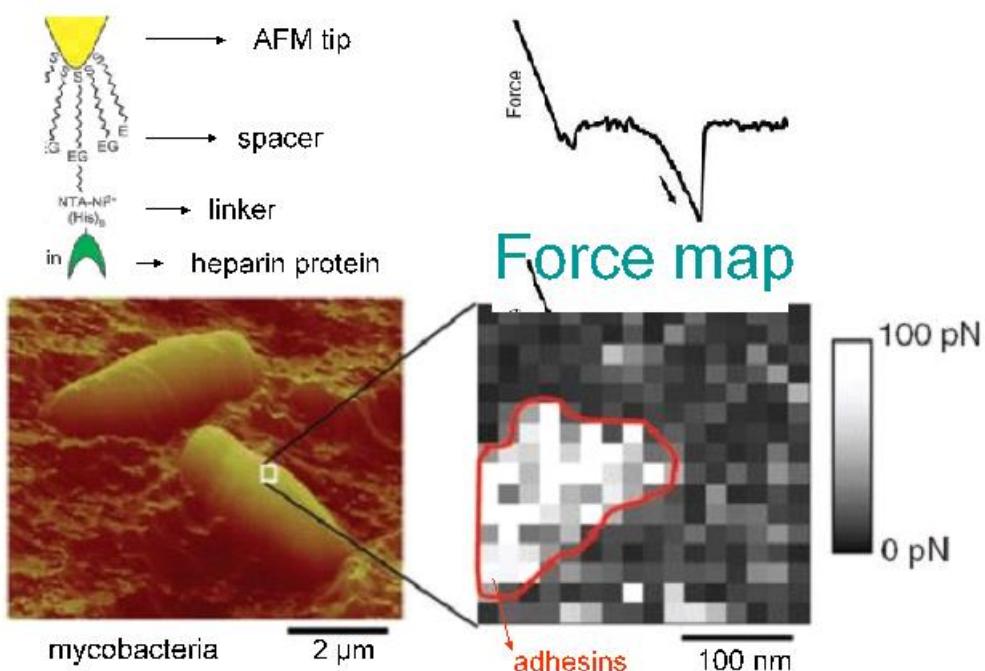
Figur 13: en oversikt over de tre biospesifikke AFM-tippene

Utførelsen er som følgende:

- Man må finne de glatte (smooth på engelsk) delene før man bruker den biospesifikke tippen
- Begrens makskontakt kraft til 100-300 pN, varierer kontakttid
- Kalibrering av fjærkontakt
- Statistikker!
- Kontroller!

#### FUNKSJONELLE KART OVER BIOFLATER:

Force-volume imaging: kan gi et kart over prøvens egenskaper ved å plotte parametere som stivhet, cantilever snap-in og adhesjon. Parametere er utstrakt fra Force Distanse (FD) spektroskopisk kurver er tatt i matrise-spacing.



Figur 14: Kraft-volum imaging

#### Et verktøy i dop utviklingsforskning:

Vi har denne rekkefølgen i utvikling av medisiner.

Studie	Drug research	Preclinical	Clinical trials
Test compounds (antall)	10 000	< 250	< 5
Noen stikkord	Forskjellige studie	Lab og dyre-eksperimenter	Phase 1: 20 -100 healthy volunteers Phase 2: 100 – 500 patients, safety Phase 3: 1000-10000 Leads to efficacy, adverse effects

Så kommer stadiene for evaluasjon/godkjennelse. Phase IV studier. Hele prosessen koster 1 milliard euro og tar over 12 år.

#### Farmasøytisk karakterisering:

Dop utviklingssyklusen er avhengig av karakteriseringsteknikker og strukturelle analyser. Når vi skal se på overflate-egenskaper, så bruker vi AFM. AFM minker utviklingstiden, gjør at man kan ta utviklingsavgjørelser tidligere og forbedre «rasjonell design» for mer robust prosess design.

AFM kan også visualisere homogenitet av dispensjoner på molekylært nivå, overvåke strukturelle forandringer. Samtidig tar XRPO uker til måneder, mens AFM oppdager mindre krystaller i løpet av timer. AFM er også den eneste teknikken som gir mekanisk informasjon på overflaten.

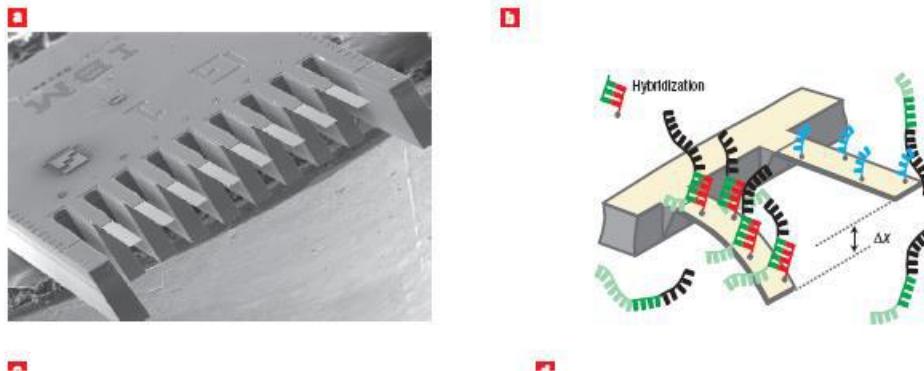
#### Biosensorer: (har hatt en del om det i MEMS-design).

- Parallelle målinger av forskjellige molekylære interaksjoner
- Label free | < 100 nM behøves

Eksempelet her er et eksperiment av Huber, F et al. Man målte protein interaksjoner med dobbelt-lag DNA oligonukleotider ved bruk av cantilever teknologi. Man undersøkte to forskjellige DNA-bundne proteiner, transkripsjonsfaktorene SPI og NF-KB, ved bruk av

cantilever array ettersom de tillater label-frie målinger av forskjellige biomolekylære interaksjoner i parallelle. Dobbelt-lagete DNA oligonukleotider inneholdende en spesifikk bindingstid for en transkripsjonsfaktor ble renset på gull-belagte cantileverer. Bindingen til trans-faktoren skaper overflate-stress, som gir bøyning i cantilever, som gir sensor altså.

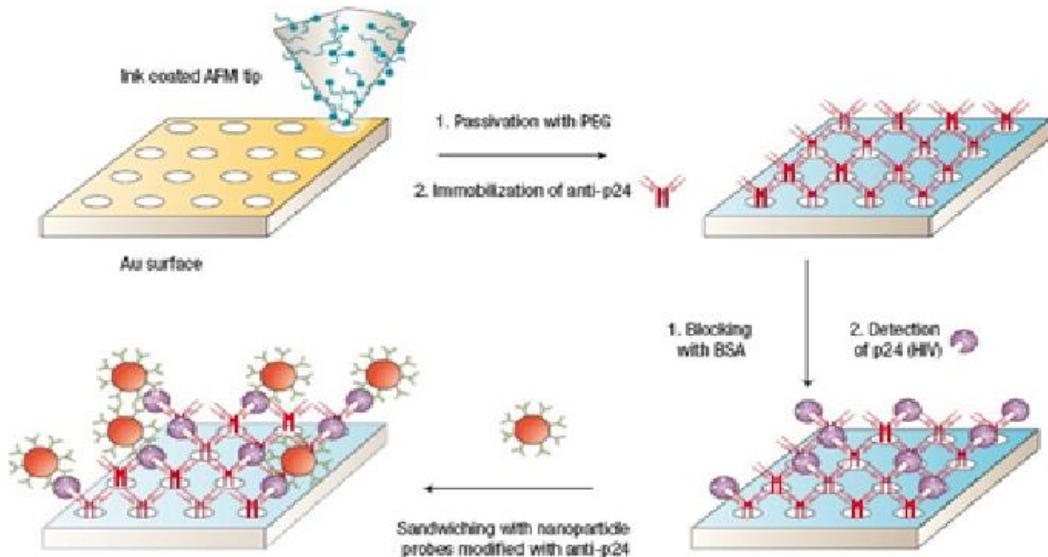
- Selve bildene er et SEM-image av mikrofabrikkert cantilever array. Cantilever = 500 mikrometer lengde, 100 mikrometer bredde og 400 nanometer tykkelse.



Figur 15: a viser en cantilever, mens b viser bøyningen til cantileveren

### AFM nanolitografi:

- Biologiske nanoarrays laget med AFM. Man kan bruke AFM på mange måter til å lage nanoarrays med. Et eksempel for eksempel er at man lager nanolitografi ved å ha AFM i en spesiell oscillerende modus til å samle sammen protein komplekser under fysiologiske betingelser. En annen metode er dip-pen nanolitografi hvor en AFM tipp er brukt til å skape mønstre direkte på en rekke substanser ved å bruke en stor variasjon av blekk. For eksempel thiolates til å printe inn på gulloverflater. Cantileveren fungerer som penn.
- Betingelser: sub 50 nanometer resolusjon, No «harsh» conditions, ideal for biological and other soft matter. DNA, proteiner, peptide, polymer og kolloidale nanopartikler. Vi ser på en tegning over prosessen.



Figur 16: viser hvordan man skriver med AFM-tipper

### Konklusjoner: AFM

- Under fysiologiske betingelser
- Høy oppløsning imaging, nanometer resolusjon
- Enkelt-molekyl interaksjoner, pN force resolusjon
- Functional maps of cell surfaces
- Fast skanning AFM, molekylar i handling
- Fremtiden: videre utvikling av anvendelse innen bionanoteknologi (som bioscope)

Resten av forelesningen handler om fluorescence mikroskoper. Ifølge Halaas skal han ta dette bort fra pensum. Men bør likevel leses før eksamen fordi det kan komme.

### Kapittel 3: Biopatterning (eller biomønstring)

Man skaper og kontrollerer bioaktive overflater.

Biomønstring: blir forklart som mønstring av biologiske reagenter.

Forelesningen går ut på:

- Funksjonalisering av overflater
- Å lage mønstre (på engelsk: creating patterns)
- Karakterisering av mønstre
- Bruke komponenter

Vi har i kurset kommet frem til delen om 2D-patterning.

Hvordan funksjonalisere og mønstre:

- Protein prober: AFM (kraftmålinger, protein chips [kvantitative målinger])
- In vitro arrays
- Stamcelle differensiering
- Celle interaksjoner
- Celle mønstring
- Lite spatial kontroll i 3D
- Forbedret funksjon ved mikrofluidikk

Hva mangler kontroll i tradisjonell cellebiologi?

Først ser vi på en figur over tradisjonell cellebiologi og hvordan det fungerer, før vi går inn på nanobiologi, som er det nye fenomenet.

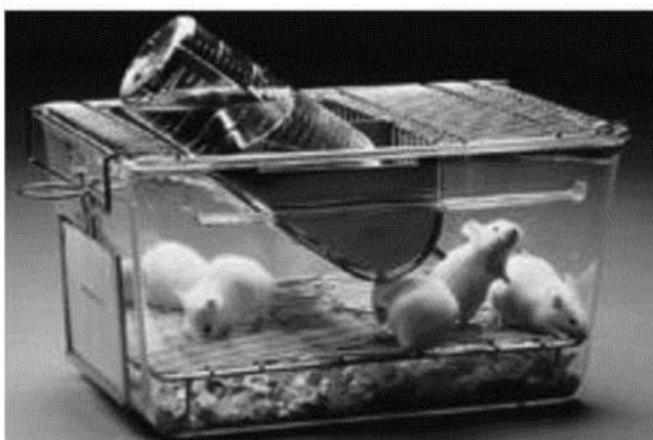
Large numbers of cells and supplies



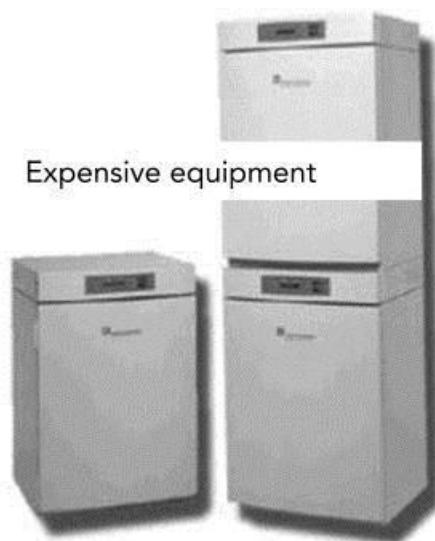
Human labor



Animal suffering

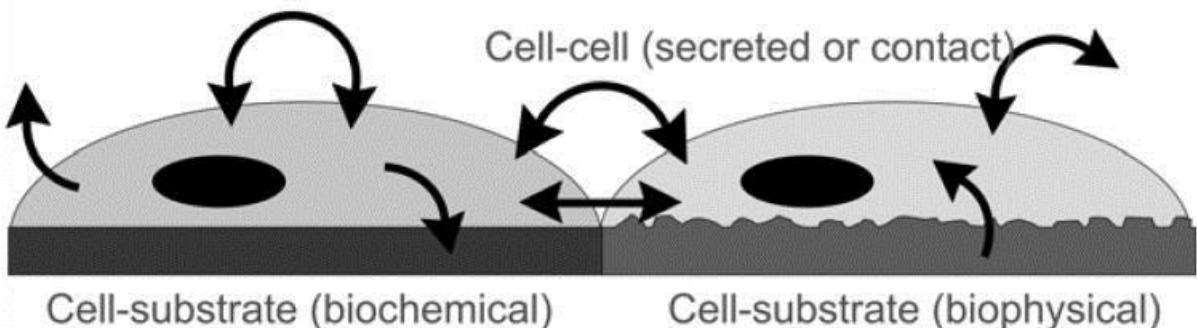


Expensive equipment



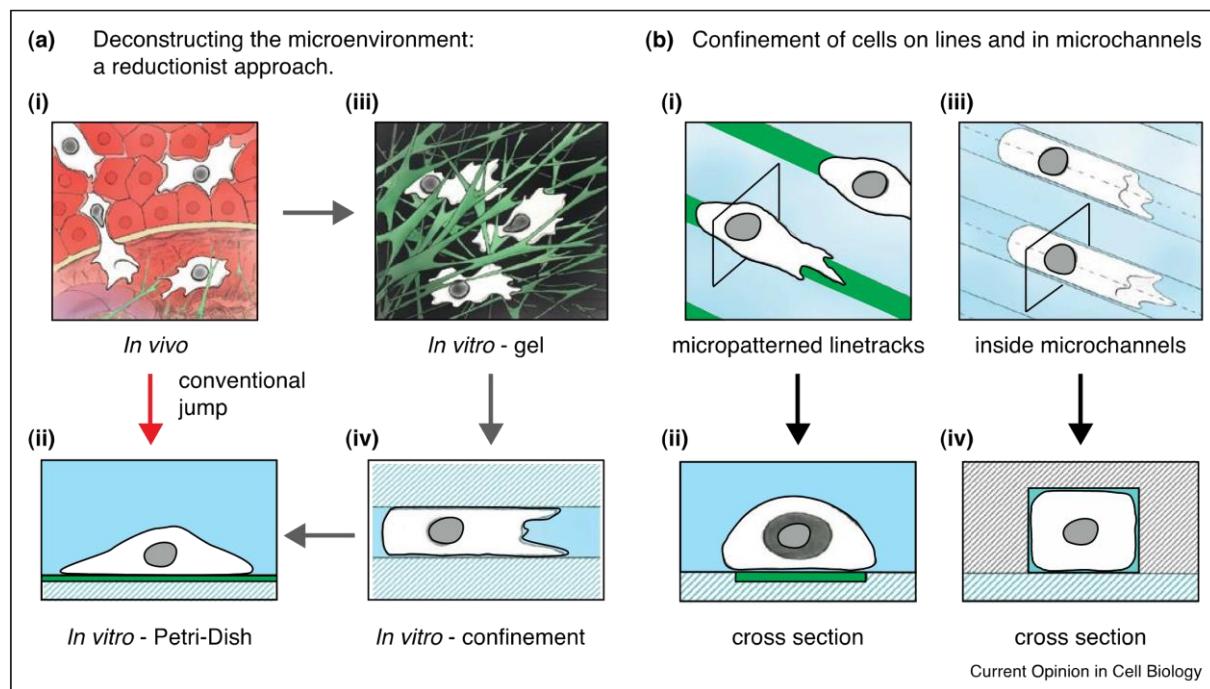
Figur 17: viser hvordan tradisjonell cellebiologi fungerer. Det er et stort antall celler og materialer som blir brukt. Man benytter seg menneskelig arbeidskraft, dyrt utstyr og det er mye lidelse hos dyrrene.

Cell-environment



Figur 18: denne figuren viser hva som mangler kontroll hos tradisjonell cellebiologi

## Celler i en petri-dish er ikke lenger bra nok: Hvorfor? «Fordi vi kan»



Figur 19: En slide som tilhører petri-dish, gir ikke å undersøke hva det er

I henhold til en rapport fra Lautenschlæger, F med flere, så kommer følgende abstract (eller sammendrag):

Individuelle celler i deres native fysiologiske tilstander møter multifaktoriale miljøer (både enkelt- og multi-celle organismer). En hovedutfordring i celle-biologi er designen av eksperimentelle metoder og spesifikke assays for å fjerne bidraget fra hver av parametere som bestemmer celle oppførsel. Etter flere tiår med petridish (eller bakterieskål som det heter på norsk) har man kommet frem til bedre teknikker. Disse teknikkene er blant annet: nye typer mikroskoper som viser store celle-aggregater eller hele vev, utviklingen av cellekultur

substrater (som 3D matriser) og mikrofabrikkerte verktøy.

**Table 1** Selected Studies on Stem Cells Using Lab-on-a-chip Devices

Stem Cell Application	Selected Studies
Control of Soluble Factors	Dynamic exposure to soluble drug Design for controlled-diffusive mixing Microfluidic based multi-injector method 'Microbioreactor' system for human embryonic stem cell differentiation Paracrine and autocrine signaling control
Control of ECM Interactions	Combining soluble and insoluble factors in microarray 3D microenvironment to study stem cell fate
Control of Cell-Cell Interactions	Design to control cell-cell interactions Design for cell pairing
Control of Mechanical Signals	Design for co-culture of mES cells with other cell types Design for temporal control of cell-cell signaling Design for heterotypic cells with different shear sensitivities Controlled elasticity geometry through PDMS patterns Control of elasticity using magnetic nanoposts Controlling nanoscale symmetry and disorder in cues Designs for surface pattern geometries Design for study of role of topography Control of 3D topography by electrospun nanowires Control of shear stress as a mechanical cue Shear control for long term culture
High Throughput Screening	High throughput integrated microfluidic systems 'High-content screening' with combinatorial stimuli Design to study high throughput temporal responses Design to screen effects of drugs in long term cultures Slow perfusion by osmotic pump for long term culture
Novel Studies for Potential Stem Cell Research	Design for reversible bonding of microfluidic device to cell culture containing cover slip by vacuum Design for reversible bonding of microfluidic device by magnetic force

*Figur 20: gir et utvalg av studier på stamceller ved bruk av Lab-on-a-chip komponenter*

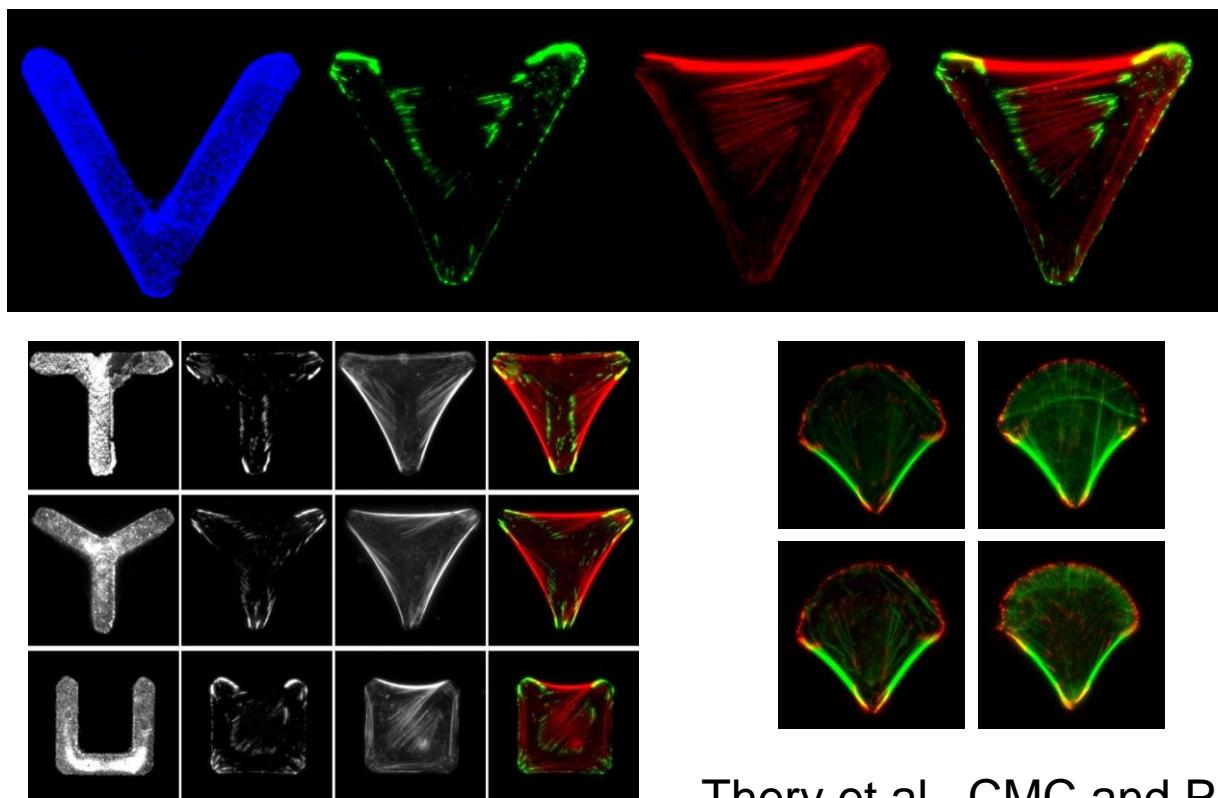
### Bruk av celle substrat mönstring:

- Subcellulær organisasjon (standardisering)
- Celle mёнstring og guidet celle motilitet
- Celle-celle kommunikasjon
- Celle – substrat interaksjon
- Celle differensiering
- Axon guidance
- Mёнstrete kulturer

++++++

### Celler danner stress fibre over ikke-adhesive kanter:

Er en rapport fra 2006 av Thery et al. Viser da fibronectin, vinculin og actin.



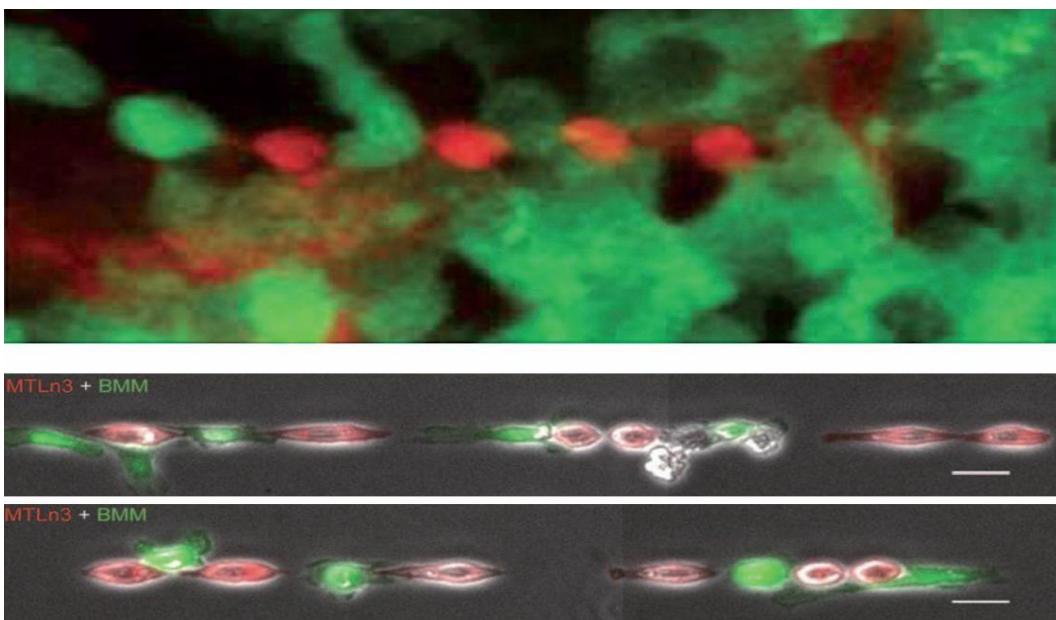
Thery et al., CMC and PNAS.

Figur 21: fibronectin = blå, vinculin = grønn og actin = rød

#### Migratoriske høyveier (migratory highways):

Vi har mange forskjellige migrasjons høyveier for celler. Et eksempel er det endoplasmiske retikulum. Der blir mange av substansene laget av celler ført til Golgi kroppen hvor det blir

klargjort ekskresjon for kroppslig bruk.



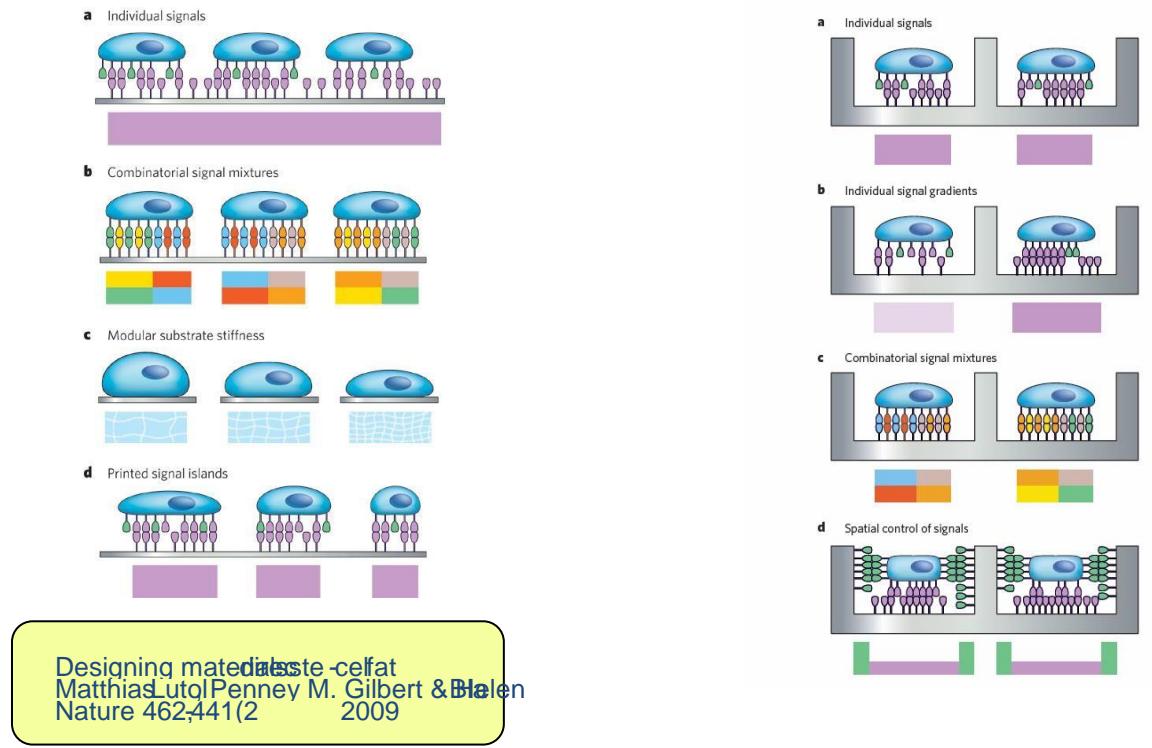
Figur 22: Fluorescence mikroskop bilder av migratoriske høyveier

I multi-cellulære organismer, finnes det guidance cues som er enten diffuserable molekyler eller ekstracellulære overflater som er funnet i reproducerebare lokasjoner og som orienterer migrasjonsceller. Mønstrene til guidance cues avgjør den komplekse *in vivo* migrasjonsrutene til motile celler. Vi har to generelle mønstre: a) broad gradient – such as diffuse chemotactic gradients; b) discrete routes (substrate pathways) like axon surfaces that represents a long specific highway for migratory Schwann cells.

- Kollektiv celle migrasjon er en kritisk prosess ved vevsdannelse og reparasjon.

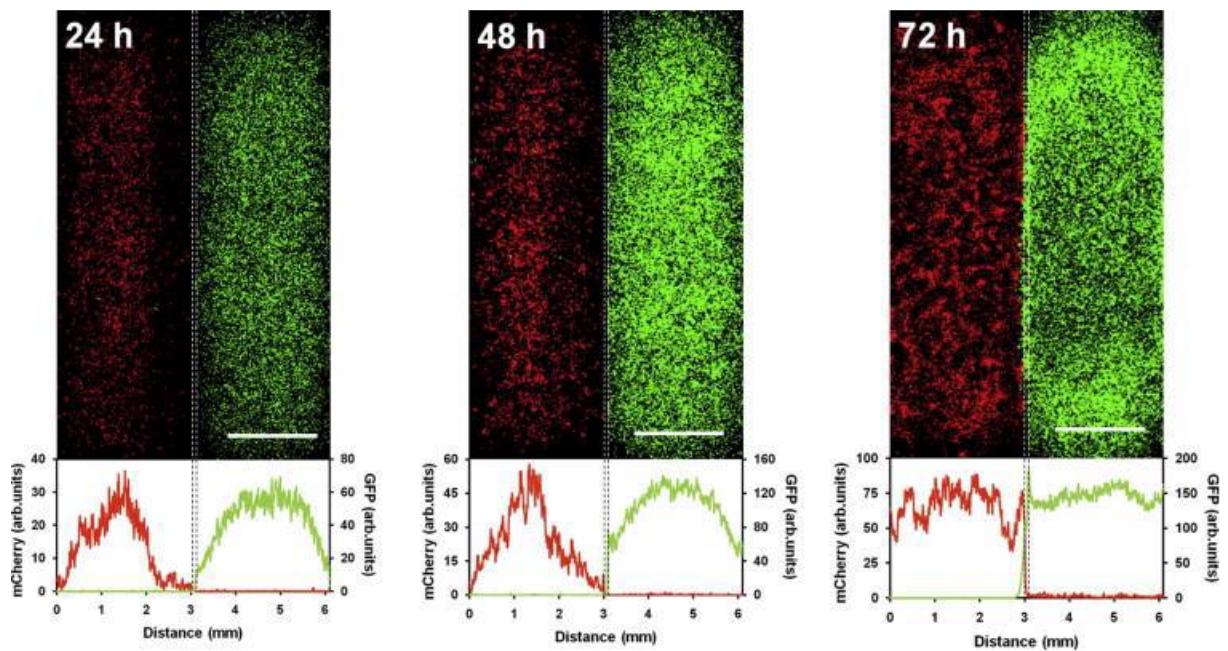
#### Printede vekstfaktorer og stivhetsstrukturer avgjør stamcelle skjebje:

Vi har en slide som viser 2D og pseudo 3D



Figur 23: slide som viser 2D og pseudo 3D

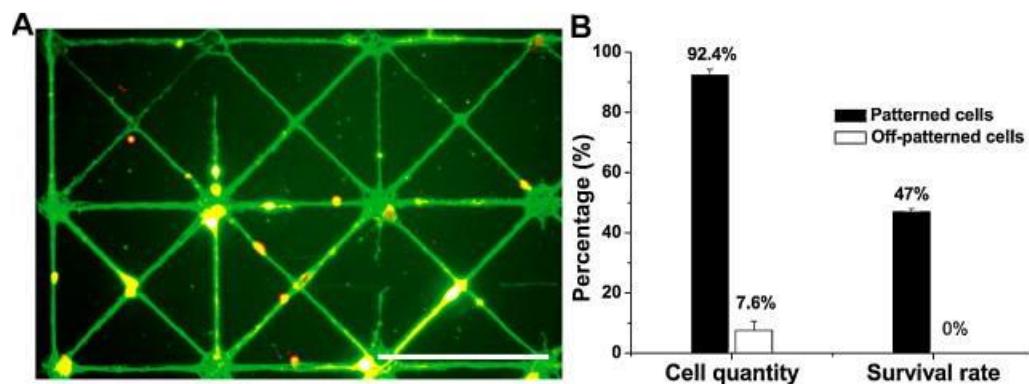
- Celler reagerer dynamisk med overflater, noe som gir mikrofluidikk sortering
- En annen slide (15 av 63) viser segregerte og mønstrede celle co-kulturer. Det omtales som en ny begynnelse i vev ingeniørvitenskap og kreftforskning.



Figur 24: viser segregerte og mønstrede celle co-kulturer

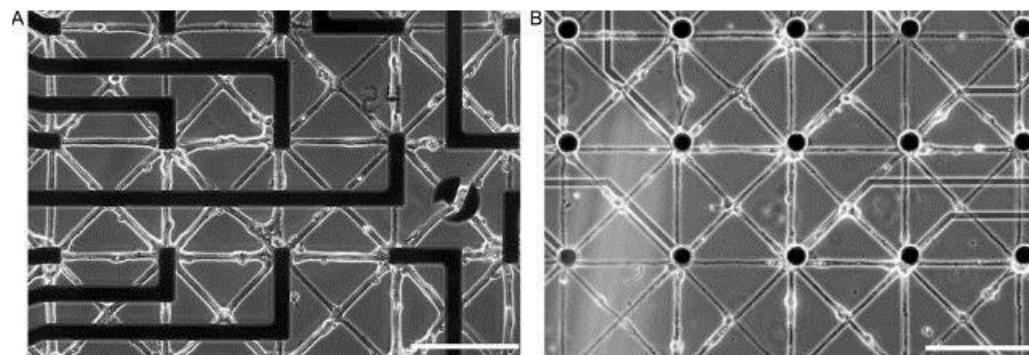
- Dette er cellemønstring i co-kulturer av heterotypiske celler. Man har to co-kulturer av celler (C2C12-cellér og HaCAT-cellér for eksempel) og kan bruke magnetisk cellemønstring. Man har svart og blå fluorescence prober lagt på, så legger man det i en disk og bruker en 96-magnet plate til å mønstre. Man har på magneten i henholdsvis 24, 48 og 72 timer. Man ser altså på forskjellene i mønstring etter de forskjellige tidsperiodene.

### Å bygge nerve nettverk med elektroder:



Figur 25: man bygger nettverk basert på adhesive mønstre

Et nerve nettverk skal repetere ytelsen til et system. Vi ser på et eksempel: Man benyttet seg av 25 000 nerver utvunnet fra et enkelt rotte-embryo. Nervene ble suspendert i en væske og koblet til et grid av elektroder til å dane et «levende komputasjonskomponent», som for eksempel en hjerne.

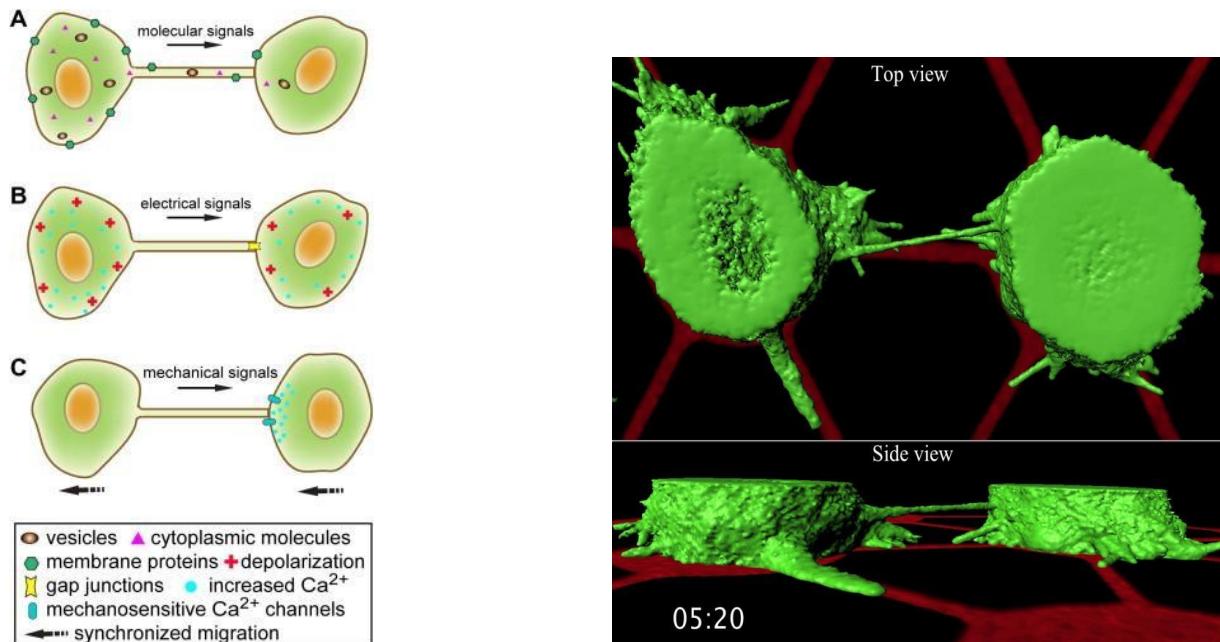


Figur 26: hører til figur 26 og forklaring av det følger nedenfor med overvåking

Så overvåker man disse nerve nettverkene ved å legge til elektroder i custom-bygde nerve nettverk.

## Fasilitet celle-celle kommunikasjon:

Evnen til celler til å motta, prosessere og respondere informasjon er viktig form mange forskjellige biologiske prosesser. Cellene kommuniserer med hverandre på forskjellige måter for å koordinere fysiologiske prosesser. Det kan sende molekylære signaler, elektroniske signaler og mekaniske signaler. Figuren nedenfor er fra HH Herdes og viser disse tre måtende å sende signaler på.

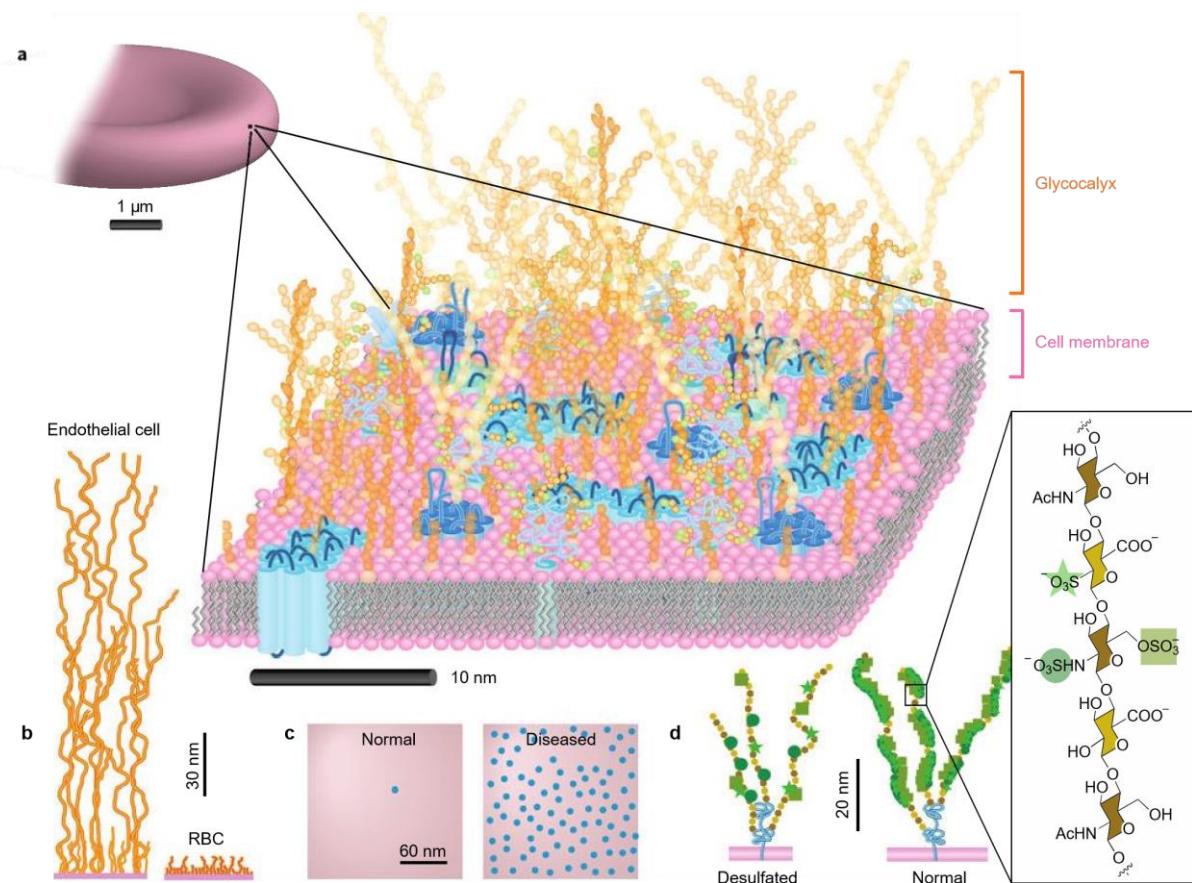


Figur 27: viser de tre måtene å sende signaler på: mekaniske, molekylære og elektriske

Først, membranen og celle-celle interaksjonen. Membranen inneholder x000 forskjellige molekyler gående fra millioner til tusener i antall.

Det er enten på eller gjennom membranen hvor cellehandling er initiert:

- Aktivering
- Multiplikasjon
- Differensiering
- Migrasjon
- Organisasjon

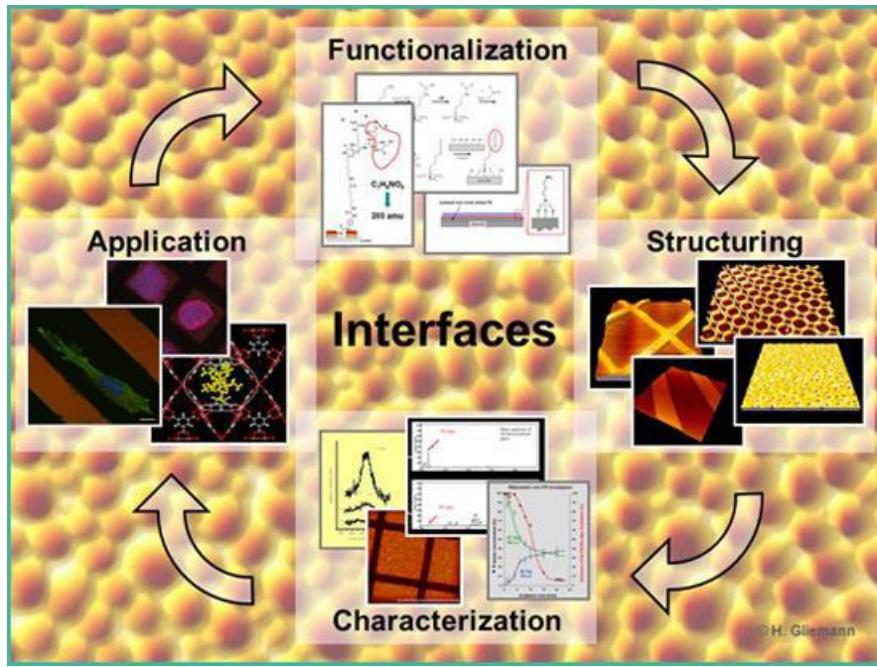


Figur 28: viser hvordan en celleoverflate ser ut

### DEN GENERELLE IDEEN BAK BIOMØNSTRING:

Denne delen kommer ofte på eksamen og må memoreres, i motsetning til forrige gang hvor du ikke klarte det. Selve prosessen går noe slikt:

- 1) Coat/pattern surface/tip/bead with functional organic groups (NH<sub>2</sub>, COOH, SH, CHO)
- 2) Conjugate bioactive molecules to pattern (proteins, peptides, nucleotides, sugars, fats and drugs)
- 3) Backfill with bioinert material (PEG, Pluroniv, PVA and BSA)



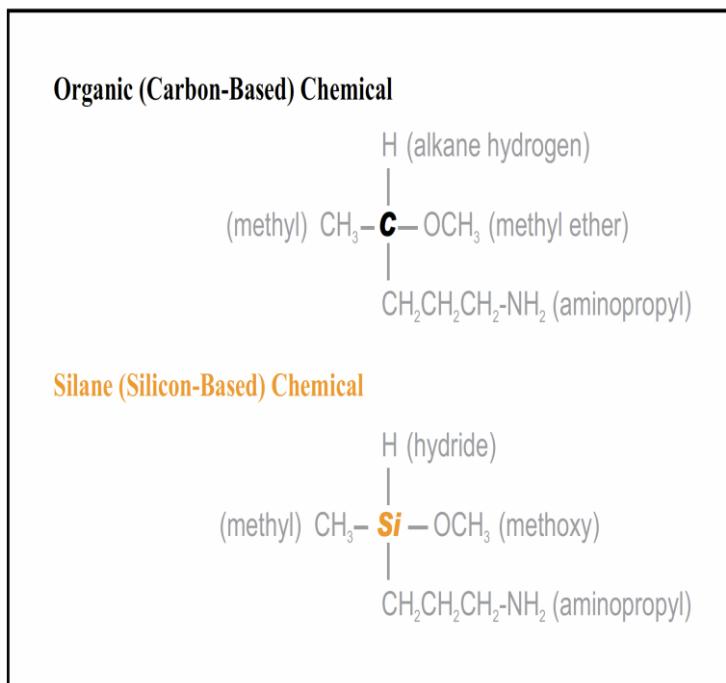
Figur 29: slide fra forklaring om biomønstring

### Substratet:

- Optikk brukt for deteksjon og overvåking.
- Foretrukket substrat er glass
- Andre muligheter som Silisium, PMMA (plexiglass, transparent), PDMS (Elastomeric metallo-organic – polymer, transparent), COC (transparent, masseprodusert) kan også brukes.
- Overflater kan bli funksjonalisert med tilsvarende kjemi som life chemistry: Organisk (karbon) versus silane (metall)

Silanisering er at man dekker en overflate med organofunksjonelle alkoxysilane molekyler.

**Figure 1. Carbon vs. silicon chemistry.**

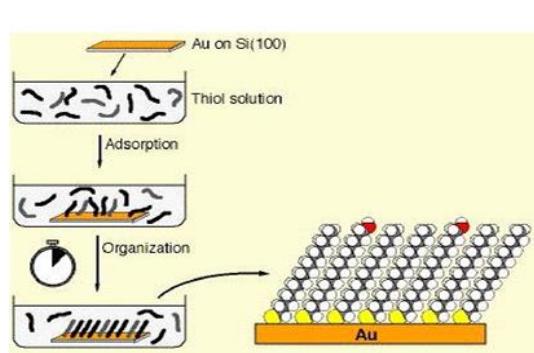


*Figur 30: Forskjell på silane og karbon kjemi*

Mineral komponenter som glass og metalloksid overflater kan alle bli silanisert fordi de inneholder hydroksyl grupper som angriper og fjerner alkoksylgrupper på silane for å danne kovalente Si-O-Si bånd. Man ønsker å aktivere overflaten.

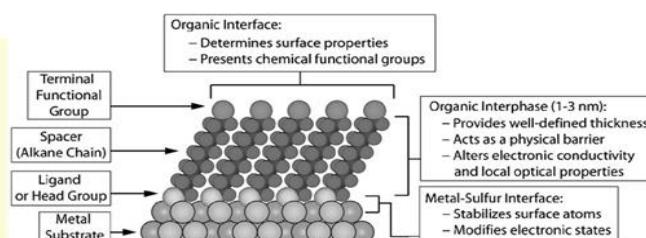
Noen andre slides (se igjennom) dekker hvordan hvordan silanisering aktiverer en overflate sammenlignet med andre substrater.

### Selv-oppsamlede lipid bilag på gull overflater:

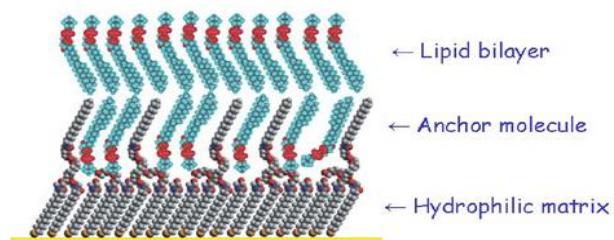


Gold at <100nm is transparent(ish), at least for larger structures such as cells

Lipidated surface



*Figure 1. Ideal self-assembled monolayer (SAM) of terminally functionalized alkylthiols bound to a Au(111) surface, showing the alkyl chains in the characteristically tilted orientation.<sup>[66]</sup> Reproduced with permission from ACS.*



### Protein conjugation and immobilization:

A conjugated protein is a protein that functions in interaction with other (non-polypeptide) chemical groups attached by covalent bonding or weak interactions. Just amino acids = simple proteins/other chemical groups conjugated proteins.

Immobilisering av proteiner tilsier at det er festet til et inert, uløselig materiale som calcium alginate.

### Crosslinker muligheter (det står options i sliden til Halaas):

- Homobifunksjonell: betyr at man har identiske reaktive grupper ved motsatt ende crosslinkerens spacer arm
- Heterobifunksjonell: har to ulike reaktive grupper
- Funksjonelle gruppe interchange
- Spacer arm (Polyetylenglykol, PEG)
- Fotoaktivbar (ved UV-lys)
- Konjugasjon til andre proteiner
- Konjugasjon til aktiverte overflater ved solid støtte
- Konjugasjon til små molekyl derivativer (fluorescence, biotin)

Crosslink = et bånd som linker en polymerkjede til en annen

### Kjemiske grupper i proteiner tilgjengelig for labeling og modifikasjon:

Primære aminer (- NH<sub>2</sub>), karboksylsyrer (COOH), sulfhydryls (- SH) og karbonyler (- CHO).

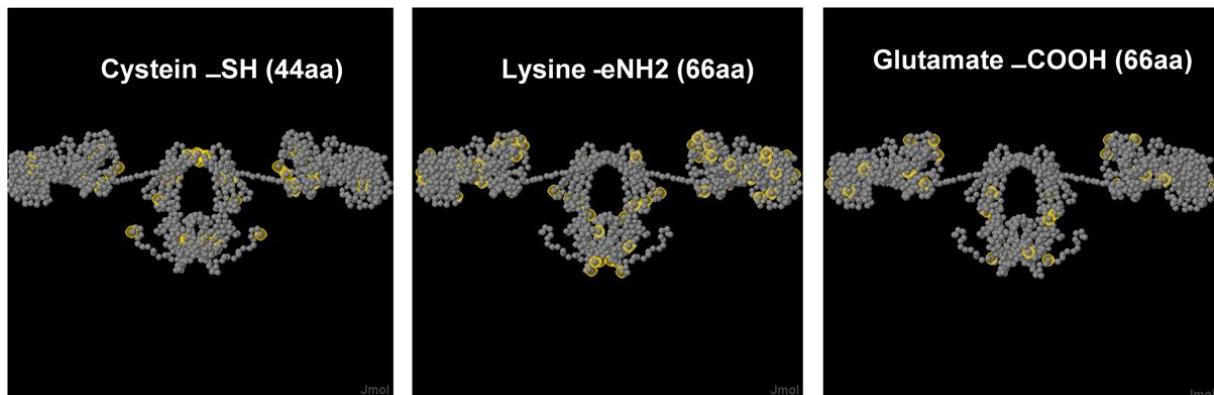
Protein crosslinker reaktive grupper: Funksjonelle grupper i proteiner og de reaktive grupper som angriper deg, fra mest populær (på toppen) til bunnen. Men først litt mer fra artikkelen:

*Crosslinking er prosessen hvor man kjemisk binder to eller flere molekyler ved hjelp av et kovalent bånd. Crosslinking reagenter er molekyler som inneholder to eller flere reaktive ender kapable til å binde seg til spesifikk funksjonelle grupper (som primære aminer, sulfhydrier osv)*

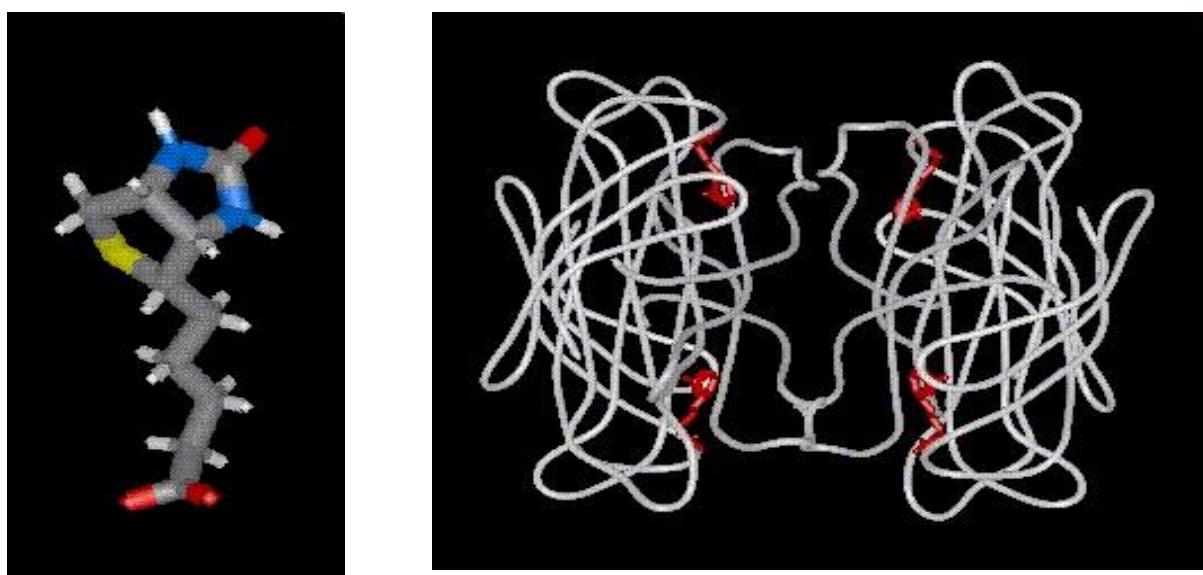
Reactivity class	Chemical group
Karboksyl-to-amine groups	Carbodimide (EDC)
Amine-reactive groups	NHS ester, imidoester
Sulfhydryl-reactive groups	Maleimide, Haloacetyl, Pyridyl sulfide
Aldehyde-reactive groups	Hydrazide, Alkoxyamine
Photoreactive groups	Diazinine, Aryl azide

- For mer om de kjemiske gruppene, se nærmere på den rapporten som det er hyperlinket til.

#### Visualisering av konjugasjonssteder på IgA:



Alle proteiner har flere konjugasjonssteder. Derfor velger en kjemi/konsentrasjon/tid som



Figur 31: den første figuren er biotin og den andre er straptavidin + 4 biotin

produserer 1 – 5 konjugater per protein statistisk sett. Biomolekyler kan bli konjugert til

biotin. Ettersom biotin binder seg til streptavidin med det høyest kjente ikke-kovalente affinitet ( $K_{assoc} = 10^{14}$ ) og er ekstremt stabil.

Biotin blir også kalt for vitamin B7 eller vitamin H. Det medvirker til cellenes karboksyleringss prosesser og katalyserer syntesen av fettsyrer og hemoglobin.



What you want



What you get

**Current protocols:  $ng$  added = 1000000000 molecules which yields good enough orientation using current methods. Including a standard with known concentration essential**

**Novel nanotech devices need higher degree of orientation, but statistically immobilized surfaces should be >250nm**

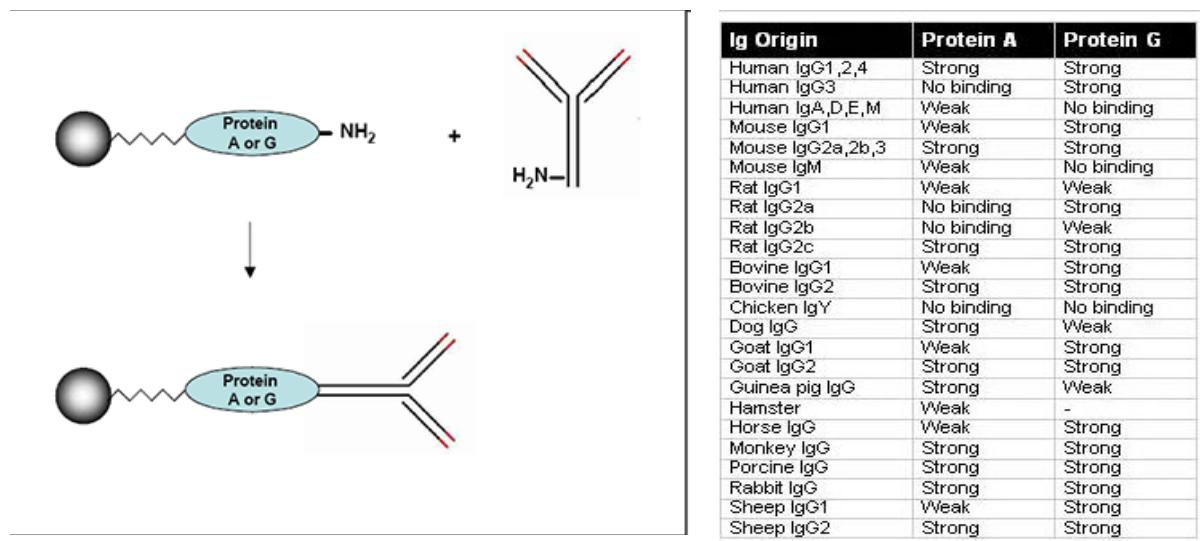
**Several layers of linkers are necessary**

Figur 32: er viktig for nanoteknologi og mørnstring ifølge mine notater

### Orientert immobilisering:

Orientasjon gjennom sekundære antibodier med affinitet for Fc porsjon av spesifikk antibody subclass.

Et eksempel: overflate proteiner på bakterier binder immunoglobulins – Fc. Delvis i selvforsvar, i molekylær biologi utnytter vi dette. Protein A = *Staphylococcus aureus*, Protein G = *Streptococcus*.



Proteiner kan bli genetisk funksjonaliserte med tag ved å bruke rekombinant DNA teknologi.

### Biomønstring:

Man plasserer molekyler hvor man vil.

### Så kommer et viktig punkt (selve prosessen):

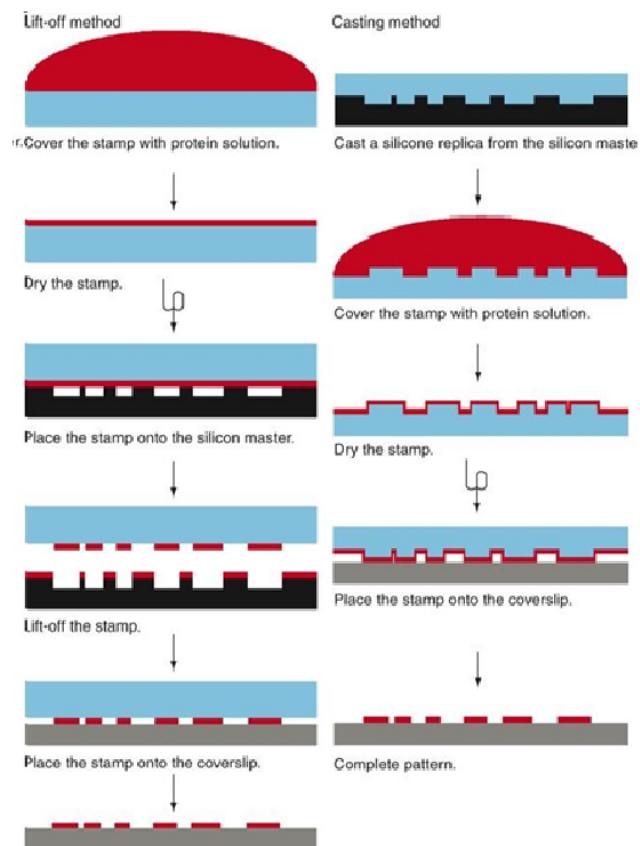
Mikrokontakt printing (omtrent 1 mikrometer) for å få substratene lokalisert på en overflate.

Vi har to metoder: lift-off metoden og casting-metoden.

## Creating positive or negative patterns

Backfilling is necessary (As in standard ELISA, PEG, BSA etc)

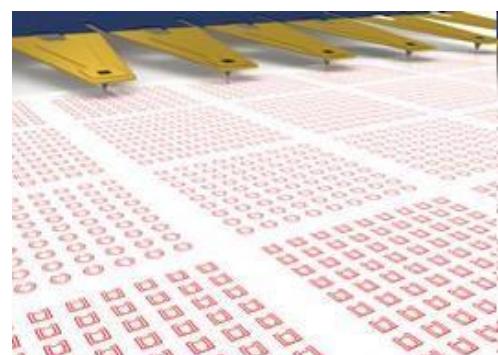
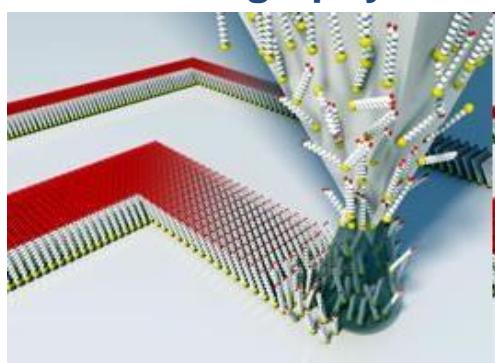
Nanoimprinting and fabrication strategies in coming lectures

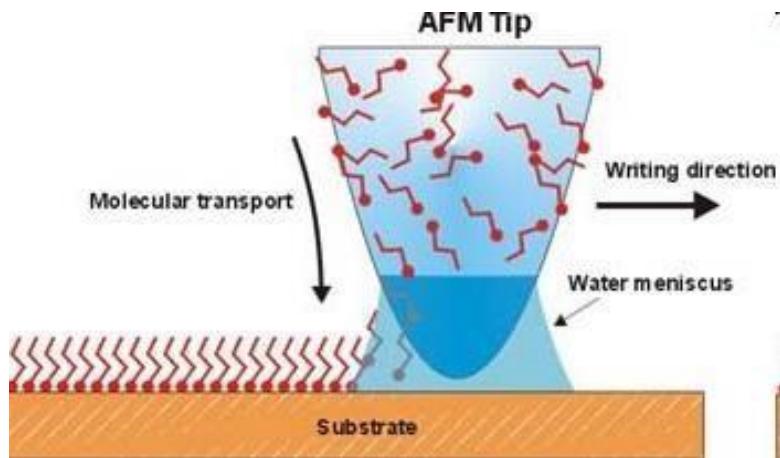


Figur 33: både casting og lift-off metodene for biomønstring i en figur

Å skrive med biomolekyler:

Using scanning probes (AFM) for deposition of proteins with 100nm features : Dip-pen lithography





### Mikrokontakt printing på gull overflater:

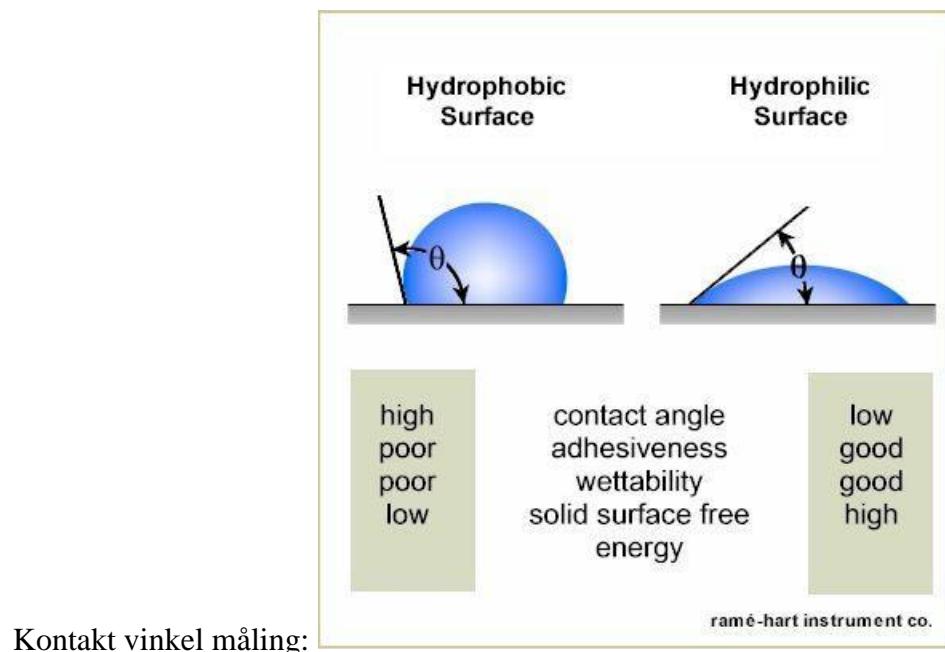
Jeg forklarte i forrige kapittel om hvordan man skriver på materialer (litografi) med en AFM.

- Coate overflaten med gull (vapor deposisjon)
- Stamp functionalized alkane-thiol
- Backfill with inert-alkane thiol

Bruke fotokjemi for plass-spesifikk immobilisering av proteiner.

### Karakterisering av molekylær deposisjon:

- Kontakt vinkel
- Crystal quartz mikrobalanse = ingen spatial oppløsning, høy masse oppløsning
- AFM
- Fluorescence mikroskopi = ikke-kvantitativ, spatial oppløsning  $\frac{1}{2}*\lambda$  (bølgelengden)
- Radioaktivitet



Figur 34: viser forskjellen på hydrofobisk og hydrofilsk overflate

Ingen spatial oppløsning, lite kjemisk informasjon. Men fint som rutine overvåking av kjemiske prosesser.

## Kapittel 4: Celleverktøy/celler på en chip:

### Læringsmål:

- Beskrive mangelfullheten av dagens metoder ved cellebiologi
- Forklare hvorfor enkelt-celle analyse er nødvendig
- Gi eksempler på celle-standardisering ved mikropatterning
- Gi eksempler på celle-feller (cell traps på engelsk)
- Vise muligheter for celleparing
- Gi eksempler på celle sortering i mikrokomponenter
- Beskrive komponenter for migrasjon i kanaler og på mønstre

### Celler:

Er den minste enheten for liv. Det finnes rundt 200 standard celletyper. Nevroner og immunceller er høyst dynamiske. Immunceller er også veldig diverse (mange millioner genotyper). Kreftceller er forandrende og ikke-klonale (metastatiske kreftceller er veldig forskjellige fra initial kreft stamceller).

### Celle-biologi:

Studien av celler gir informasjon om:

- Gene function (research, about 50 % of genes have an unknown function)
- Development (embryology, tissue repair)
- Stem cells (growth requirements, growth patterns)
- Immune-cells (vaccines, auto-immunity, cancer, allergies)
- Neurons (cell signalling and networks)
- Cancer cells (growth, aggression, metastases, drug targets)
- Drug response (activity testing)

### Hva kan man lære fra cellestudier?

- Birth (proliferation)

Cancer, tissue regeneration, immunology

- Food (metabolism, pinocytosis, endocytosis, phagocytosis)
- Disease, cancer, immunology
- Action (motility, movement)
- Immunology, cancer metastasis, tissue (re) generation
- Looks (morphology)
- Gene function, development, neuronal network
- Social networking (signalling)
- Gene/protein level alteration, internal body communication
- Death (apoptosis)
- Cancer, immunology, development, disease

### Readouts

Quantification and identification of

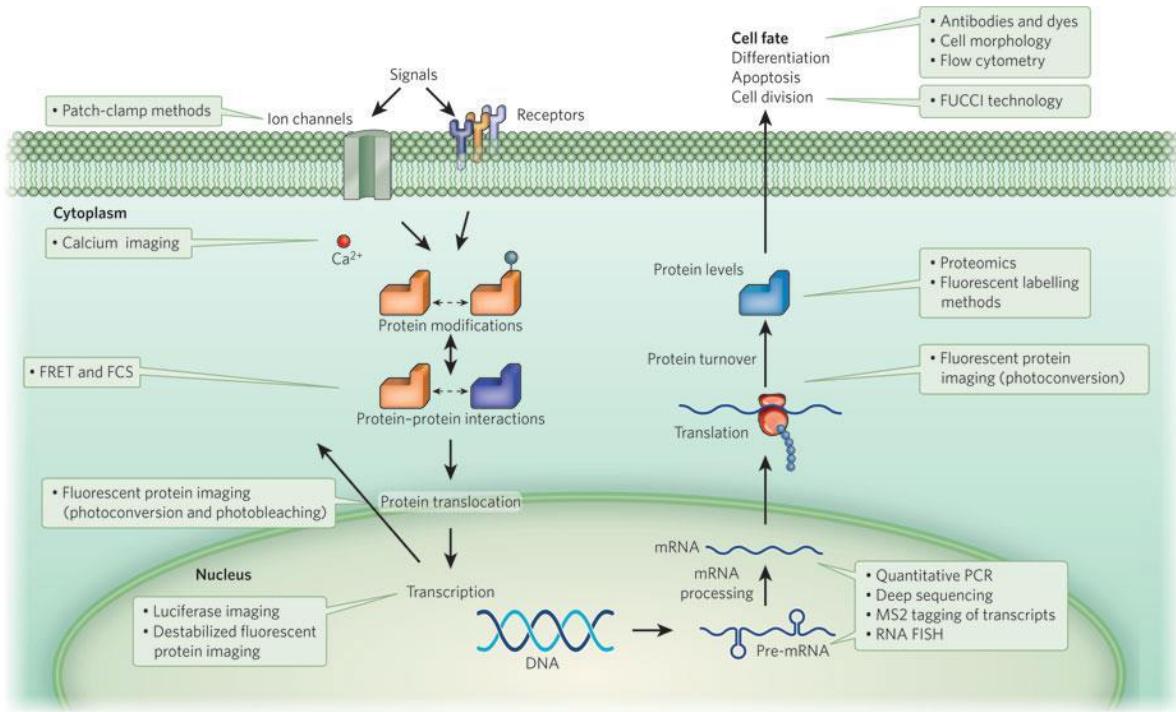
- Metabolites (intracellular, extracellular, enzyme inhibitor)
- Nucleotide (DNA, mRNA, miRNA)
- Protein (like for example cytokines, induced/repressed proteins)
- Cell (cell subtype, function, morphology, quality)
- Interactions between them

Location, timing, levels, networks

### Metoder:

- Imaging (morfologi, lokalisering)
- Biokjemisk (identitet og kantitet)
- Informatical (system)

### Hva man analyserer og hvordan:



Figur 35: som viser hvor på cellen man analyserer for å finne informasjon om noe spesifikt og hvordan man gjør det

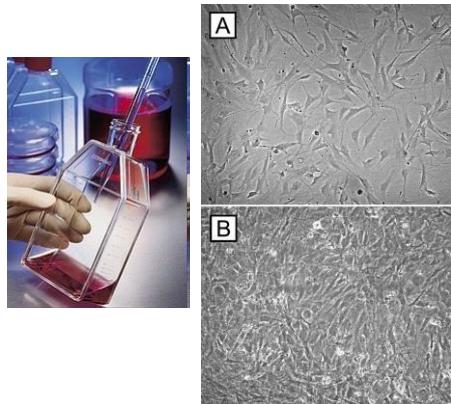
### Motivasjon for nye tilnærninger:

Dagens bulk tilnærninger har kraftige praktiske begrensninger og klarer ikke å herme etter vev på en tilfredsstillende måte. Celler er asynkrone, heterogene og avhenger av ECM og celle-celle kontakt. Vi har per dags dato ingen spatial eller temporal kontroll. Enkelt-celle studier er i dag frakoblet fra enkelt-celle analyse.

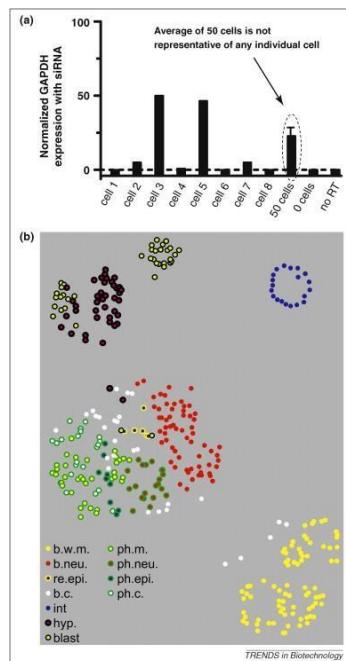
**Så hva er løsningen?** Enkelt celle analyse, standardisering av celler, mikrofluidikk og mikrodråper.

- Cellene og til med celle-linjer er heterogene, dette er utjevnet av bulk-forskning, men representerer problemer for sjeldne hendelser og ikke-synkroniserte celler. Man får problemer med enkelt-celle analyser. Dette holder på å forandre seg med teknikker som enkelt-celle genomikk, transkriptomikk, proteomikk og så videre. Man kan transformere biologien med dette.

Cells and even cell lines are heterogenous, this is averaged by bulk research, but represent problems for rare events and unsynchronized cells.



Figur 36: Poenget med denne figuren er at gjennomsnittet av 50 celler ikke er representativt av noen celle



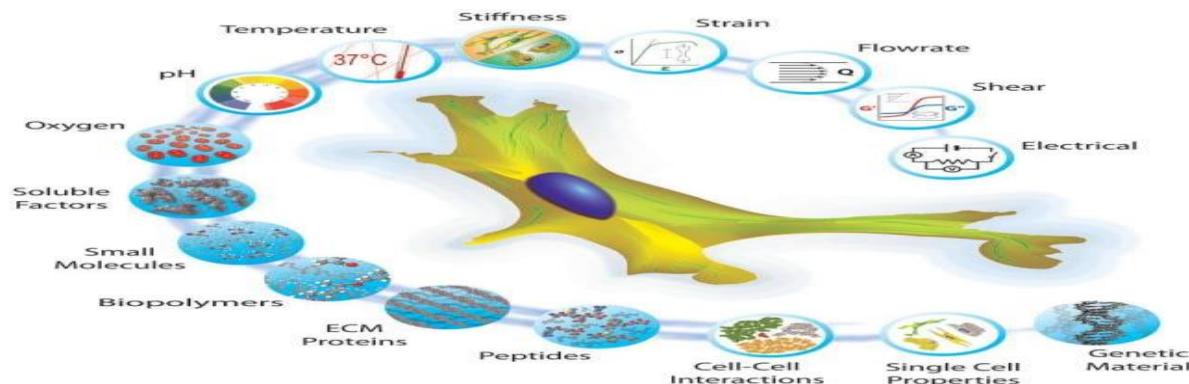
Hovedpoenget er at det er forskjell mellom enkeltceller og gjennomsnittet av celle-målinger som ofte brukes i software og vitenskapelige rapporter. Eksempler på hvordan enkelt-celle analyser kan anvendes: redusere biologisk noise, forbedre fundamentalt i eksperimentell design og data analyse. Stamceller har for eksempel stort

potensiale for regenerende medisin fordi de kan selv-fornye og differensiere langs forskjellige linjer. Med enkelt-celle analyse kan man fokusere på disse spesifikke cellepopulasjonene.

- Ved kreft er det også viktig å dissektere celle-til-celle variasjoner for å forstå tumørinitiasjon, progresjon, metastasis og terapi. Enkelt-celle analyse kan sørge for at man skiller enkelt-kreftceller og enkelt-friskeceller
- De mest kjente analyseteknikkene for molekyler er: PCR og FISH (fluorescent in situ hybridisering). Og nyere metoder som komperativ genomisk hybdridisering.

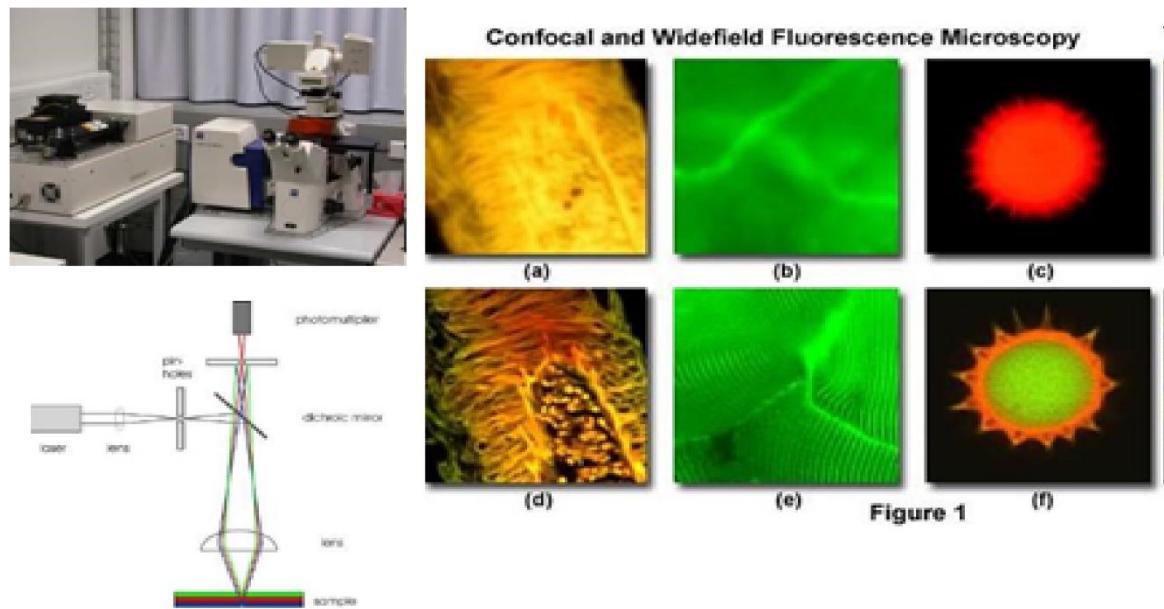
### Hvordan påvirke celle-skjebne:

Mikroteknologier gir muligheten for høyt lokaliserte celle perturbasjoner.



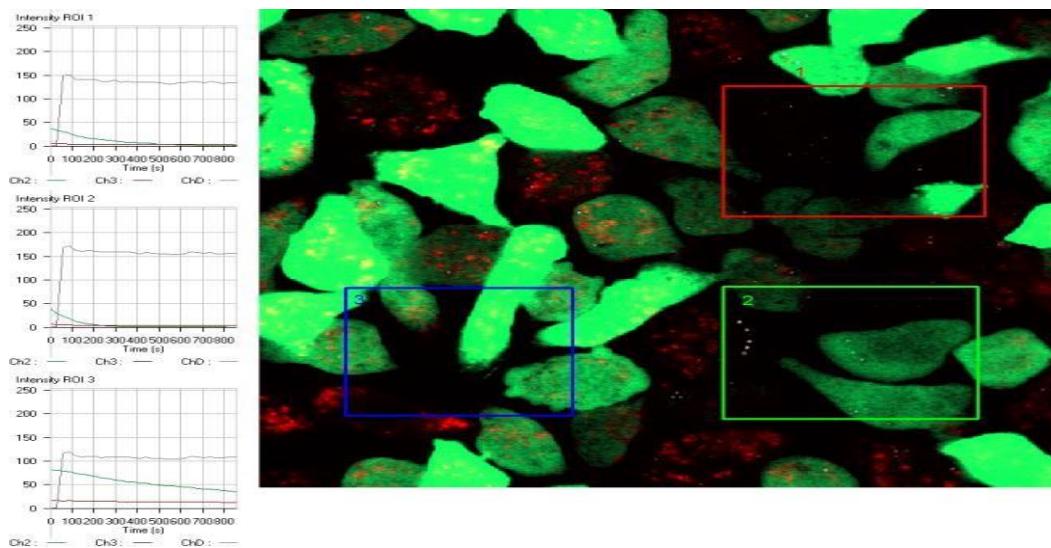
## Enkeltcelle studier i dag:

I eksemplene nedenfor går vi igjennom forskjellige måter å studere enkelt-cellér på i dag, samt noen eksempel imager av dem. Vi begynner med konfokalt mikroskop. Et konfokalt mikroskop tillater kun fokus på et enkelt-lag bestemt av pinhole.



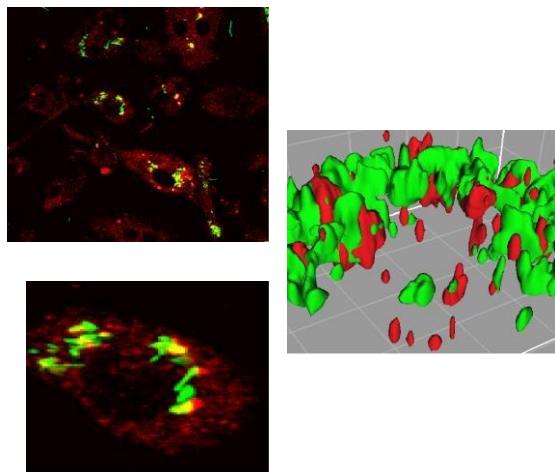
Figur 37: viser et teoretisk oppsett av konfokalt mikroskop og flere eksempel imager

Celler er irriterende heterogene. Det neste eksempelet er tatt av foreleseren og sensor i emnet, Øyvind Halaas, selv og bør derfor kanskje regnes som viktig?



Figur 38: er et fluorescent bilde tatt av Øyvind Halaas

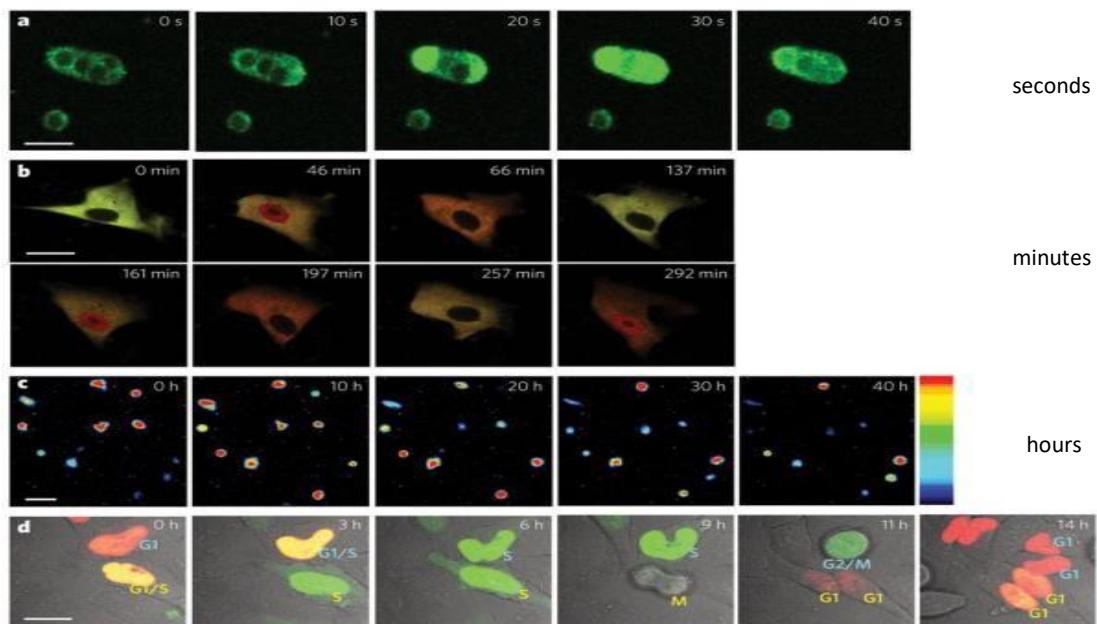
Celle imaging krever erfarene forskere. Manuskript dommere krever kvantitatittivt bevis. Optisk imaging er essensielt, men nye verktøy er nødvendige for å bli objektive.



Sliden spør leseren om dette: Question: How often does the red drug delivery system meet the green intracellular bacteria? Av dette kan vi da forstå at det røde i figuren ved siden er drug delivery systemet, mens det grønne er den intracellulære bakterien.

Figur 39: viser optisk imaging av drug delivery system (rødt) og intracellulær bakterie (grønn)

Celler er dynamiske strukturer og de opplever forandringer på mange forskjellige tidsskalaer (se sliden som kommer nedenfor for forskjell i sekunder, minutter og timer).



Figur 40: viser at celler er dynamiske strukturer som forandrer seg i forskjellige tidsskalaer

### Mikroskop:

- Good at high content (morphological detail) analysis
- Good at high resolution (spatial) analysis
- Good at time-resolved analysis

- Expensive
- Bad at analysing many cells
- Information only for 3-4 different molecules

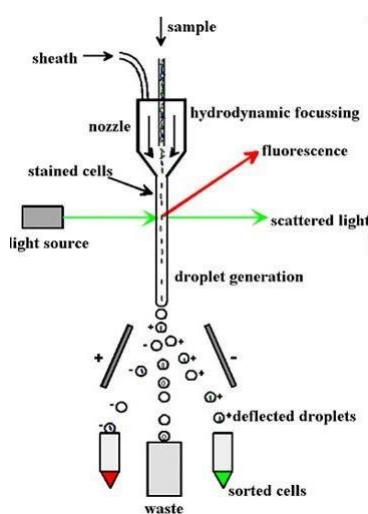
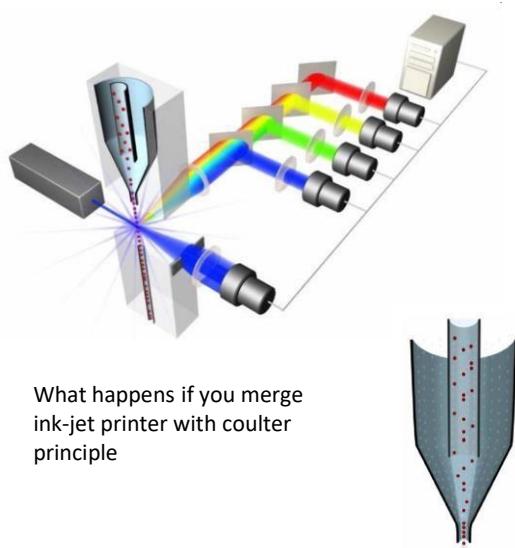
### Enkelt-celle verktøy man har i dag:

**Flow cytometer:** teorien bak dette utstyret er at det er laser eller impedansbasert biofysikk teknologi brukt i celletelling, cellesortering og protein ingeniørvitenskap, ved å suspendere celler i en strøm av fluid og passere dem forbi et elektronndeteksjonsapparat.



Figur 41: viser en flow cytometrisk celle sorterer fra 1990

En flow cytometrisk celle sorterer er hva man får, når man krysser en ink-jet printer med Coulter counter (som er en partikkelstørrelse analyser)



Figuren til venstre forklarer hvordan en flow cytometer fungerer. På den helt til venstre ser du hva som skjer når ink jet printer og coulter prinsippet blir slått sammen. Til høyre med celler i

praksis. Flow cytometri kan oppdage sjeldne celletyper. Man kan analysere opp til 8 protein-nivåer i hver celle subset. Flow cytometri har disse positive og negative sider ved seg:

- Flow cytometer er god til å analysere mange celler (millioner) [positiv]
- Hurtig instrument (20 000 celler/sekund) [positiv]
- Kan analysere opp til 8 fluorescente parameter på en gang + størrelse og optisk densitet [positiv]
- Dårlig på dynamisk analyse (er for det meste endepunkt analyse) [negativ]
- Dyrt [negativ]
- Ingen morfologi informasjon [negativ]

### Neste generasjon celle biologi: celler på en chip:

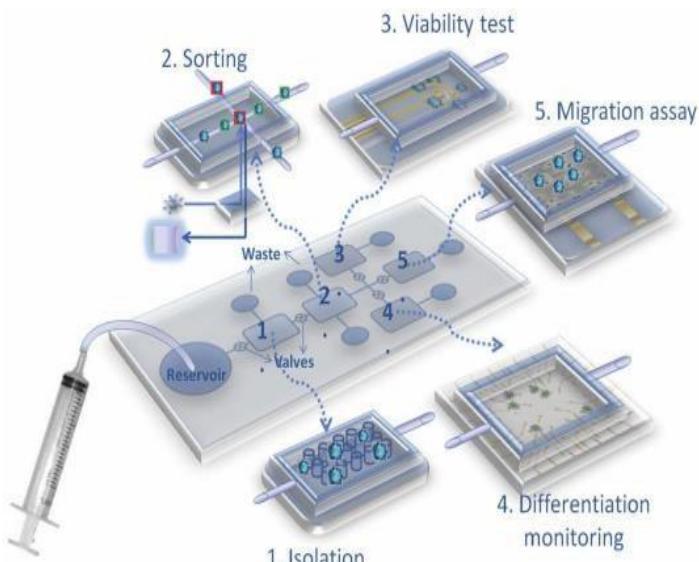


Figure 2

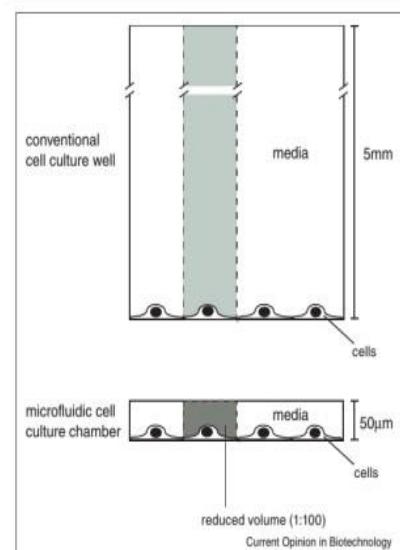
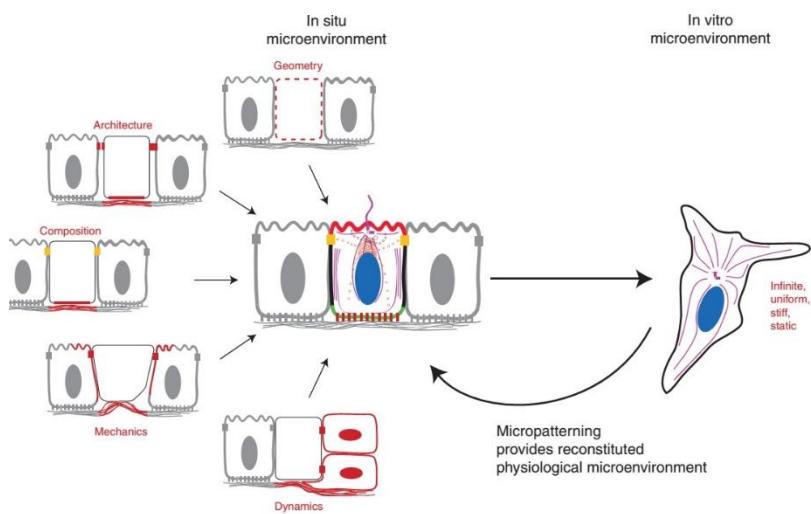


Illustration of 'small-volume effects' in microfluidic cell culture devices. Smaller culture media volume for a given cell results in faster consumption of nutrients and increased concentration of metabolites or secreted molecules, similar to tightly packed tissues.

*Figur 42: Illustration of "small-volume effects" in microfluidic cell culture devices. Smaller culutre media volume for a given cell results in faster consumption of nutrients and increased concentration of metabolites or secreted molecules, similar to tightly packed tissues.*

### Hva mangler fra konvensjonell celle kulturer?



Figur 43: er en figur som viser *in situ* og *in vitro* mikromiljøer

*In situ* betyr at man observerer noe i

situasjonen, mens *in vitro* betyr i akten.

Spatial og temporal kontroll av cellemiljøer på skalaen til cellen (0,1 til 100 mikrometer, millisekunder til dager):

- a) Kontroll av vekstmedium (mikrofluidikk):
  - Kjemostat, termostat
  - Drug delivery (serial dilutions, oscillations, etc...)
  - Gradients
- b) Surface control (micropatterning, microfabrication):
  - Adhesion (stamping of adhesion molecules, contact guidance)
  - Cell shape
  - Cell positioning (for cell/cell communication)
- c) Substrate mechanical properties
- d) Volume control for 3D confinement (micro-carbon for cells or in-vitro assays)
- e) And all combinations of the above

**Table 1** Selected Studies on Stem Cells Using Lab-on-a-chip Devices

Stem Cell Application	Selected Studies
Control of Soluble Factors	Dynamic exposure to soluble drug Design for controlled-diffusive mixing Microfluidic based multi-injector method 'Microbioreactor' system for human embryonic stem cell differentiation Paracrine and autocrine signaling control
Control of ECM Interactions	Combining soluble and insoluble factors in microarray 3D microenvironment to study stem cell fate
Control of Cell-Cell Interactions	Design to control cell-cell interactions Design for cell pairing Design for co-culture of mES cells with other cell types Design for temporal control of cell-cell signaling Design for heterotypic cells with different shear sensitivities
Control of Mechanical Signals	Controlled elasticity geometry through PDMS patterns Control of elasticity using magnetic nanoposts Controlling nanoscale symmetry and disorder in cues Designs for surface pattern geometries Design for study of role of topography Control of 3D topography by electrospun nanowires Control of shear stress as a mechanical cue Shear control for long term culture
High Throughput Screening	High throughput integrated microfluidic systems 'High-content screening' with combinatorial stimuli Design to study high throughput temporal responses Design to screen effects of drugs in long term cultures
Novel Studies for Potential Stem Cell Research	Slow perfusion by osmotic pump for long term culture Design for reversible bonding of microfluidic device to cell culture containing cover slip by vacuum Design for reversible bonding of microfluidic device by magnetic force

Figuren ovenfor viser noen utvalgte studier av stamceller ved bruk av lab on a chip komponenter.

#### ENKELTCELLE KOMPONENTER:

Jeg antar her at sliden mener at de gjør dette:

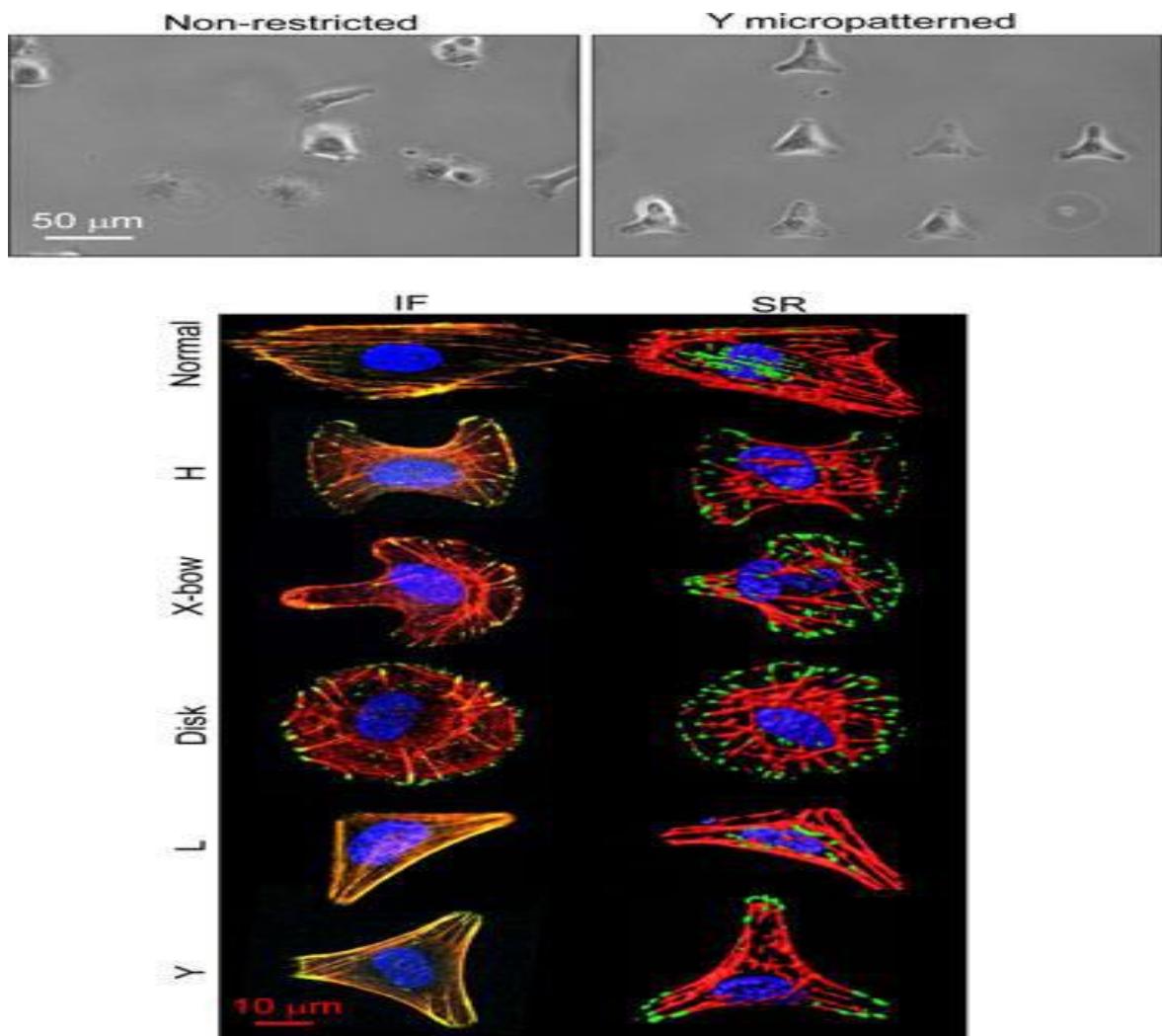
- Man ser på hver enkelt dynamikk
  - Relaterer til tidligere forelesninger
- 1) Standardisere enkeltcelle morfologi
  - 2) Isolere celler
  - 3) Fange (på engelsk: trap) celle
  - 4) Celleparering
  - 5) Velge ut celler
  - 6) Cellemigrasjon
  - 7) Multipleksing
  - 8) Co-kulturer

Så går resten av forelesningen ut på å forklare disse 8 metodene og teknikker for å utføre dem.

Med enkeltcelle analyse kan man på generelt grunnlag utføre dette:

- Løse mysteriet i genuttrykk profiler mellom individuelle celler
- Unngå feilen med å ta gjennomsnitt av hele cellepopulasjoner
- Oppdage tidligere ikke-oppdagete sub-populasjoner og oppdage nye regulatoriske baner

1) Vi ser på standardisering av enkeltcelle organisering først:

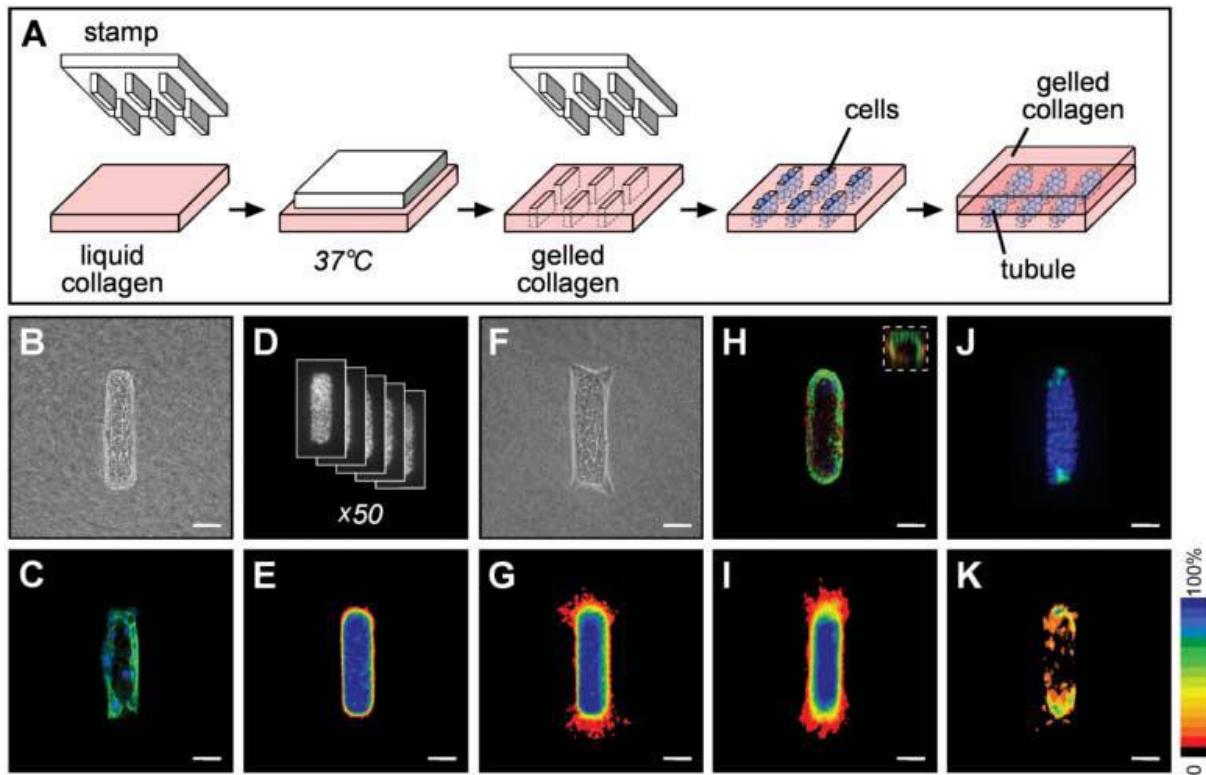


Figur 44: hvordan standardisering av enkeltcelle fungerer

Standardisering betyr i vanlig ordlag et dokument som er skrevet for å gi veiledning til forberedelse av et materiale for å gjøre en sammenligning med lignende materialer i forskjellige laboratorier eller samme laboratorium, men da i forskjellige tider. Standardisering for celle-baserte produkter for disse fasene. Jeg kopierte noen viktige aspekter (på engelsk):

Standardization for cell-based or cell-derived products, in general, has a number of distinct phases, which include: 1. Confirming the key attributes of selected candidate cell sources and using a range of analytical techniques to compare them to enable final selection of the cell source of preference. 2. Establishment of standardized scale-up and analytical systems for the bioprocessing of the cells to make the therapeutic product including stable expansion of undifferentiated cells. 3. Establishment of standardized assays and reference materials to assess the key safety and efficacy properties of the final therapeutic product. Each stage involves a process of setting definitions or specifications for the

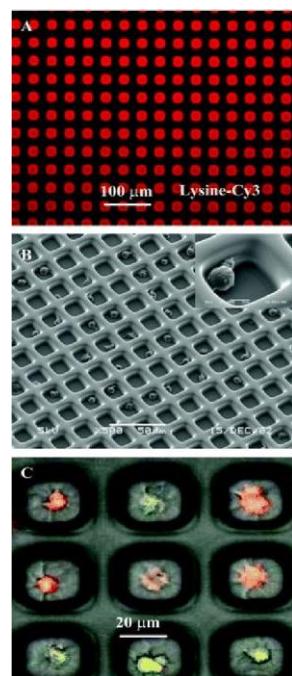
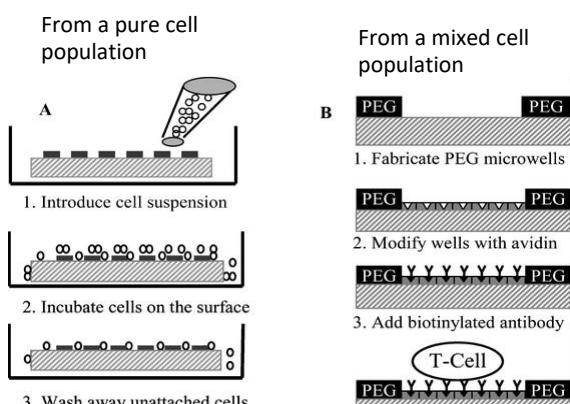
cells and conditions and procedures to handle and grow them, and then establishing relevant controls to ascertain how each culture adheres to these specifications.

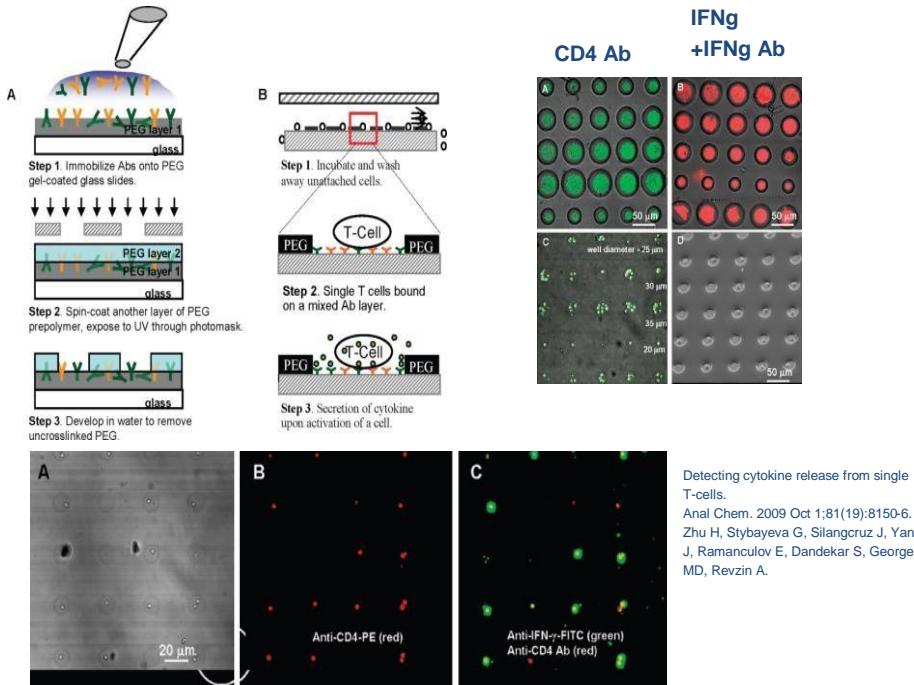


Figur 45: viser et eksempel på standardisering av celler

2) Isolere celler: viser forskjellige måter å isolere celler på.

## 2) Single cell capture in microwells





Også en del av  
2 og kalles for  
2) Microwells  
with detection  
modes i  
slidene til  
Halaas.

Some cells are not adherent and dont want to be:

*Alternative to adherent cells: Hanging drop cultures in microfluidics*

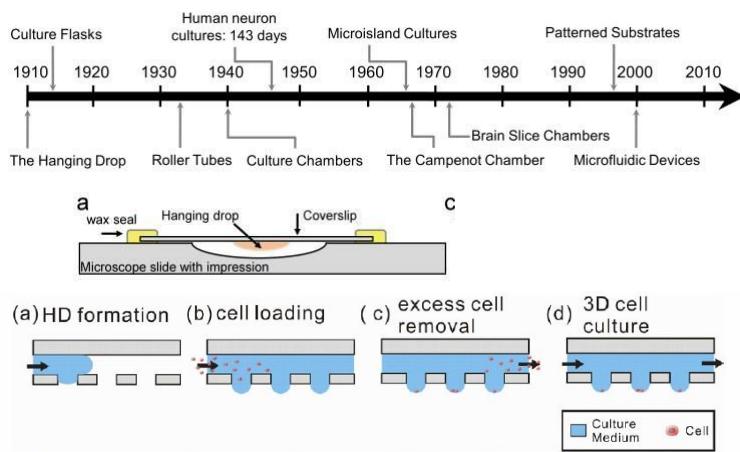
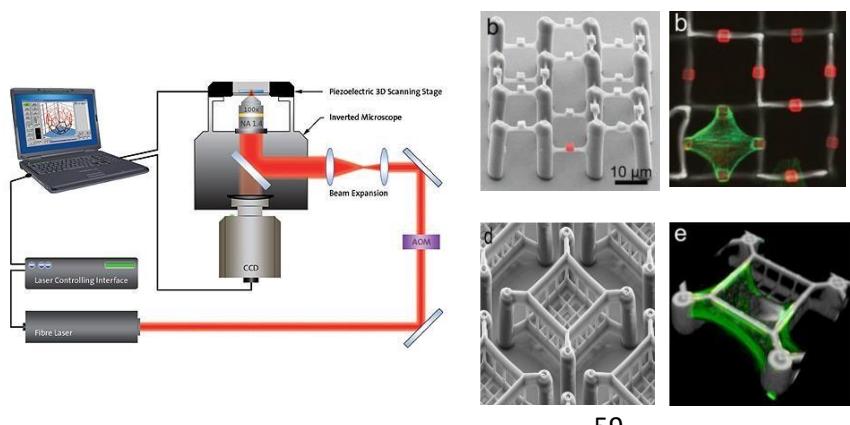


Figure 1: A cross-section of the operation of the microfluidic HD platform. (a) The microfluidic channel is filled and droplets are formed and hanging at the openings. (b) Cells are driven by the flow and docked in the HD. (c) Untrapped cells are rinsed off. (d) Cells are incubated and their extracellular solution can be modulated through the microchannel while gas can also be exchanged directly through the HD that is open to air.

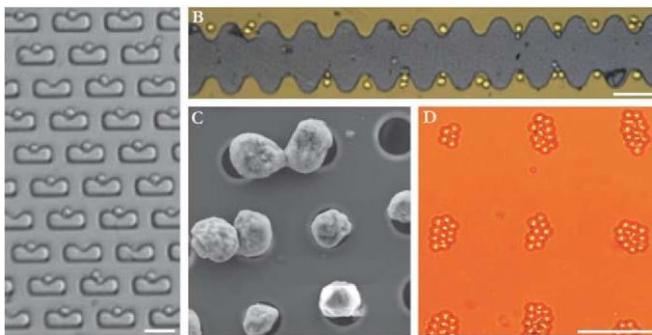
Most cells are not in their natural state on a hard surface

- Suspended single cell cultures



Figur 46: Nanoscribe i 3D

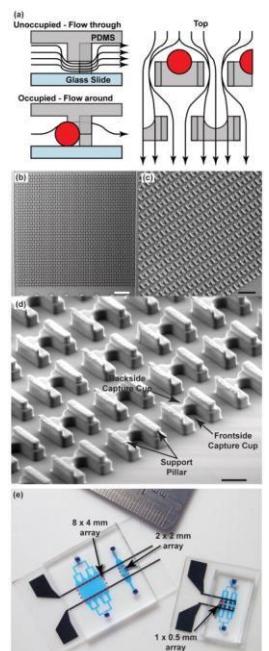
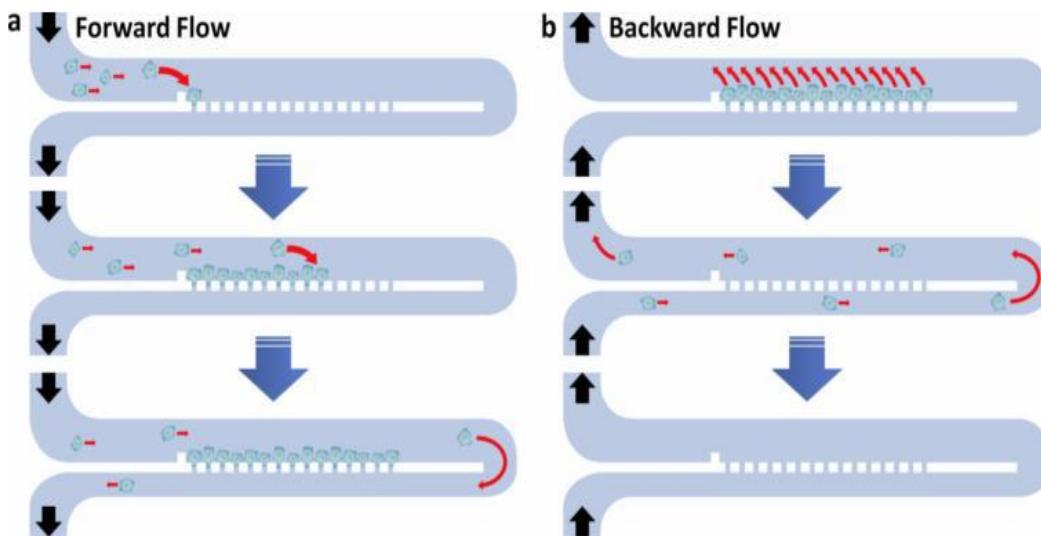
### 3) Å fange (trap) celler:



De er alternativer til printede biomønster.

Fanging av ikke-adherende celler ved spesifikke lokasjoner som utnytter fluid

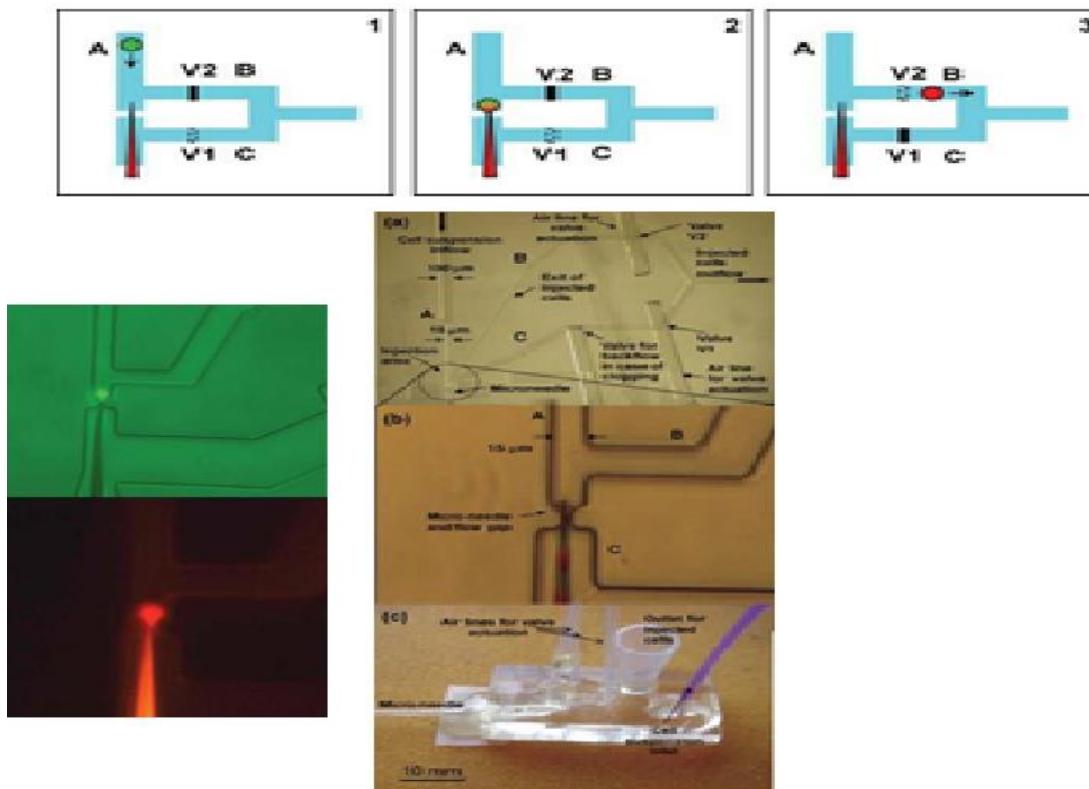
Figur 47: viser hvordan å fange celler fungerer



Figur 48: er en resettable trap, som gjør det slik at man kan slippe løs celler etter at man har fanget dem.

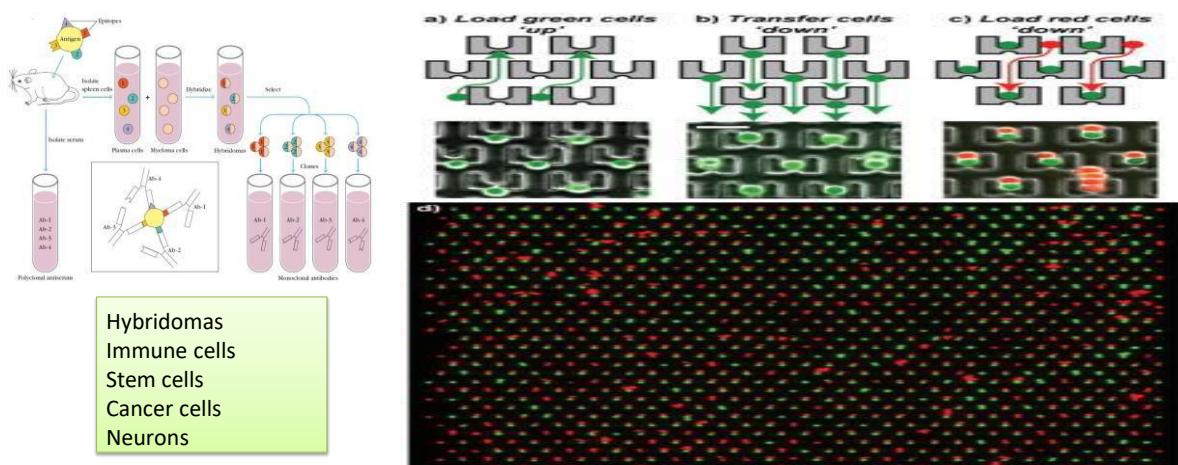
dynamikker.

I den siste figuren som følger nedenfor og kommer fra en rapport fra Adamo (som kan være svært viktig for seg når du skal skrive semesteroppgaven, her kan du forsøke å inkludere det de har funnet inn i sensoren eller komponenten du har laget for å oppdage kreftceller). I rapporten til figuren rapporterer man en tilnærming for enkeltcelle mikroinjeksjon hvor fluid strømmer en celler direkte på en fast mikronål, dette blir gjort i kontrast til en bevengende mikronål mot en immobilisert celle (som er gjort ved den konvensjonelle metoden som blir gjort til vanlig, som ved en glukose målende biosensor muligens?).



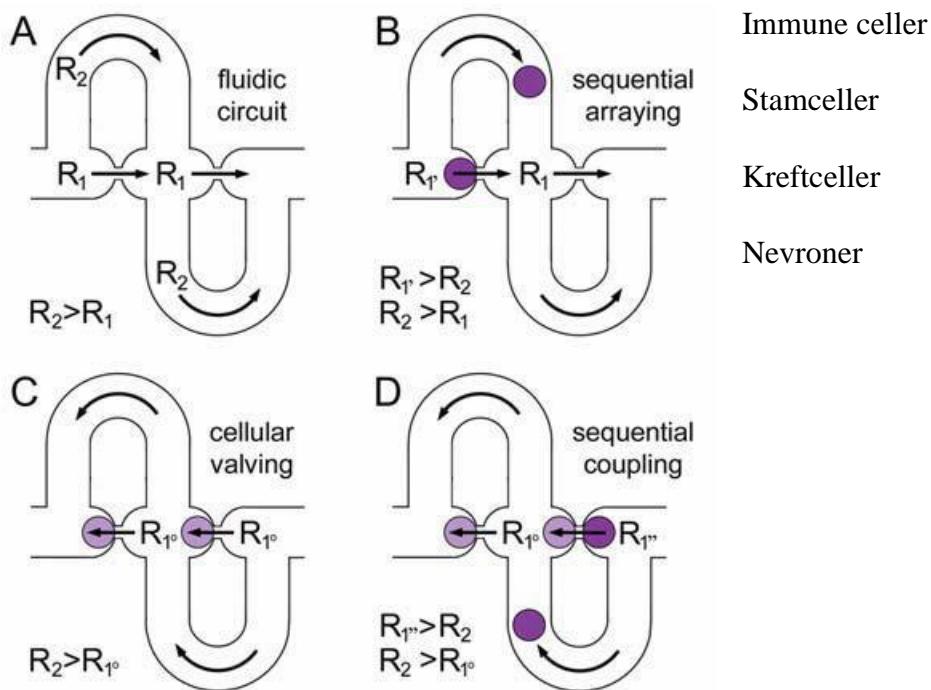
Figur 49: viser hvordan mikrofluidikk blir brukt til å bevege celler

- 4) Cellefanging og celleparing (kombinasjon av punkt 3 og 4 før man går på punkt 4 alene):



Figurene er hentet fra  
hybridomas.

Celleparing med mikrofluidikk:



Figur 50: A microfluidic array with cellular valving for single cell co-culture

5) Celle isolasjon kan gjøres med:

- Adhesjon
- Størrelsesfiltering
- Dielektrophoresis
- Fluorescence

Les resten selv. Det er bare en rekke figurer som forklarer hvordan de andre tre punktene fungerer. Les fra slide 20-34 selv. Det er for mye å skrive her og nå.

## **Kapittel 5: Nanoprotein sensorer:**

Forelesningen er av Peter Kollensperger fra NTNU Nanolab og underoverskriften er at det er om Biosensorer/POC sensing/Protein sensorer.

Først litt om nanoprotein sensorer generelt (før vi går inn på forelesningen):

Det finnes mange former for nanoprotein sensorer. Noen av typene er: elektrokjemiske sensorer, nanoporer (hvor proteiner punktsetter membraner) og sensorer som kan oppdage enkelte proteinmolekyler oppfunnet av MIT i USA. Jeg begynner først med elektrokjemiske protein sensorer:

### ***Elektrokjemiske sensorer:***

Electrochemical-based protein sensors offer sensitivity, selectivity and reliability at a low cost, making them very attractive tools for protein detection. Although the sensors use a broad range of different chemistries, they all depend on the solid electrode surface, interactions with the target protein and the molecular recognition layer. Traditionally, redoxenzymes have provided the molecular recognition elements from which target proteins have interacted with. This necessitates that the redox-active enzymes couple with electrode surfaces and usually requires the participation of added diffusional components, or assembly of the enzymes in functional chemical matrices. These complications, among many others, have seen a trend towards non-enzymatic-based electrochemical protein sensors. Several electrochemical detection approaches have been exploited. Basically, these have fallen into two categories: labeled and label-free detection systems. The former rely on a redox-active signal from a reporter molecule or a label, which changes upon the interaction of the target protein. In this review, we discuss the label-free electrochemical detection of proteins, paying particular emphasis to those that exploit intrinsic redox-active amino acids.

*Nanopor laget av Oxford: <https://nanoporetech.com/how-it-works/types-of-nanopores>*

Er førstegenerasjonsteknologi som bruker skreddersydd, proprietær por-dannende proteiner til å lage porer i membraner. Pore-dannende proteiner er ganske vanlige i naturen. Som eksempel kan vi nevne protein æ-hemolysin og andre tilsvarende proteinporer som er funnet i celle-membraner, hvor de fungerer som kanaler for ioner eller molekyler til å bli transportert inn og ut av celler.

$\alpha$ -hemolysin is a heptameric protein pore with an inner diameter of 1 nm, about 100,000 times smaller than that of a human hair. This diameter is the same scale as many single molecules, including DNA. The pore is highly stable and has been characterised in great detail by Oxford Nanopore and our collaborators. The Company has optimised the large-scale production of this and many other bespoke pore-forming proteins, each of which have different characteristics suitable for different applications. Oxford Nanopore is continuously investigating new nanopores with new properties that can improve product performance.



**HOW DOES NANOPORE SEQUENCING WORK?**  
A protein nanopore is set in an electrically resistant polymer membrane. An ionic current is passed through the nanopore by setting a voltage across this membrane. If an analyte passes through the pore or near its aperture, this event creates a characteristic disruption in current (as shown in the above diagram). Measurement of that current makes it possible to identify the molecule in question.

**NANOPORE WORKFLOW**  
Workflow versatility: no fixed run time allows on-demand sequencing and real time adjustment

A key feature of the MinION device, the PromethION and the GridION system is that there is no fixed run time; a user can run any of the systems for a short or long period of time as data is streamed in real time. This can enable real-time analyses so that the user can predetermine an experimental endpoint and run the system for as long as it takes to collect sufficient data to address that question.

Oxford Nanopore has developed custom high-performance, low-cost Application-Specific Integrated Circuits (ASICs) for the MinION device, the PromethION and the GridION system. These ASICs apply biased potentials across each nanopore in the sensor array chip and measure the resulting ionic current flow.

These ASICs have been designed to measure current at very high sampling frequencies, tens of kHz per nanopore, while minimising measurement noise and maximising signal. Each ASIC contains a high-density array of low-noise amplifier circuitry, and can be scaled to measure from tens to thousands of channels, with further projects underway for larger chips. More than one ASIC may be included in a product if higher-throughput systems are required.

Figur 51: er en oversikt over nanopore biosensor

### *Nanoledninger for bruk i nanomedisin:*

[http://cmliris.harvard.edu/assets/Nanomedicine\\_1\\_51.pdf](http://cmliris.harvard.edu/assets/Nanomedicine_1_51.pdf)

Devices based on nanowires are emerging as a powerful and general platform for ultrasensitive direct electrical detection of biological and chemical species. Here, representative examples where these new sensors have been used for detection of a wide-range of biological and chemical species, from proteins and DNA to drug molecules and viruses, down to the ultimate level of a single molecule, are discussed. Moreover, how

advances in the integration of nanoelectric devices enable multiplexed detection and thereby provide a clear pathway for nanotechnology, enabling diverse and exciting applications in medicine and life sciences, are highlighted.

*En sensor utviklet av MIT som oppdager enkelt-proteiner:*

<http://news.mit.edu/2017/new-sensors-detect-single-protein-molecules-0123>

Hvordan kapittelet er lagt opp (eller Outline som det heter på engelsk):

- Intro
- Overview biosensors (definitions and performance metrics and how they generally work)
- What happens when we make things smaller?
- Proteins as sensing layer and as an analyte
- Sticking molecules onto surfaces (functionalisation/immobilisation)
- Examples of signal generation, amplification and transduction methods (electrical/electrochemical, optical, mechanical/mass change and magnetic)

Læringsmål:

Ved slutten av denne forelesningen bør man være i stand til å:

- Definere begrepene som indikerer at det er en biosensor ytelse og forklare forskjellene mellom dem
- Forklare fordelene og bakdelene med å miniaturisere i biosensing og evaluere tilpasningen av forskjellige sensing teknologier til forskjellige analytiske settinger ved å bruke eksempler
- Konseptualisere forskjellige typer biosensor ved å tenke på transdusere og sensor molekyler som moduler og være i stand til å gi eksempler på bruk av nanoteknologi til å forbedre biosensing

Neste generasjon protein deteksjon:

- Proteiner er de soleklart viktigste gruppene av makromolekyler som er i stand til å utføre arbeid
- De gjør dette ved å danne større enheter (komplekser) som kan bli sett på som «molekylære maskiner». De har primære, sekundære, tertiære og kvartiære strukturer direkte assosiert med funksjon
- Har utviklet seg i løpet av evolusjonen til høyt effektive og spesifikke komponenter som utfører nærmest enhver tenkelig, kjemisk reaksjon
- Proteomics og 3D strukturelle studier er essensielle for å forstå oppsamling, komposisjon, struktur og funksjon til slike materialer
- Dette kan gi oss muligheten til å gjenskape syntetiske varianter av maskinene som nanoverktøy i medisinsk vitenskap og behandling

#### BIOSENSORENES HISTORIE OG MARKED:

De to mest kjente biosensorer er det til å oppdage graviditet og det for å måle blodsukker. En bruker enzym til å oppdage en kjemikalie (blodsukker), mens det andre bruker antibodies til å oppdage et hormon. Men begge er OTC/PoC.



I figuren til venstre er den øverste biosensoren brukt til å måle glukose, mens den nederste blir brukt til å måle om en kvinne er gravid eller ikke. Begge har et biosensor-element i seg.

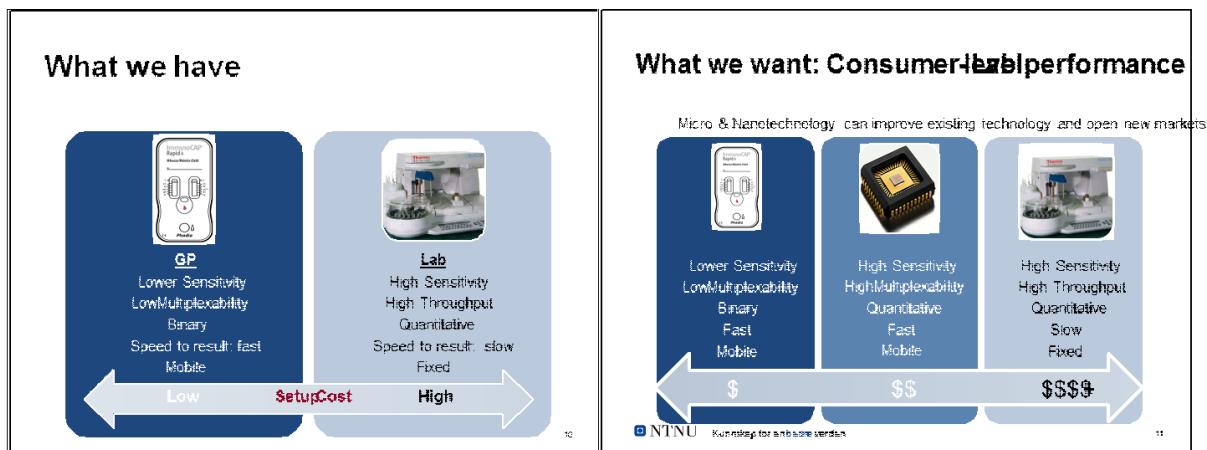
#### Biosensorer og biomarkører:

Biosensorer er brukt i:

medisin, biomedisinsk forskning, drug discovery, miljøovervåking, matinnhold, matkvalitet

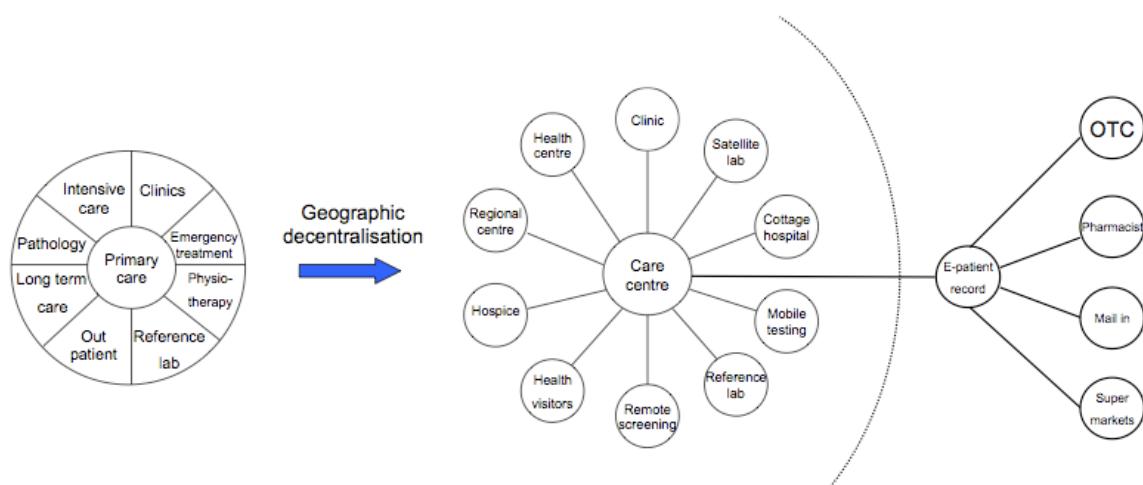
og matsikkerhet, sikkerhet og forsvarsindustri. Vedrørende biosensorer i medisin har vi disse formene for testing og hvordan de fungerer:

- Sentralt laboratorium testing (vev/fluid prøve => store automatiske analyserer, immunoassays, histopatologi, denne formen for testing er tidskrevende og dyrt)
- Point – of – care testing (vev/fluid prøve => kompakt transportabel instrument, test striper (altså biosensorer) – Lab – on – a – chip, denne formen gir hurtige diagnoser)
- In vivo real time testing (biosensorer i vev eller blodårer, kontinuerlig pasientovervåking, direkte feedback til terapi)



Figur 52: gir oss hva vi har per dags dato og hva vi ønsker oss i fremtiden med nanoteknologi

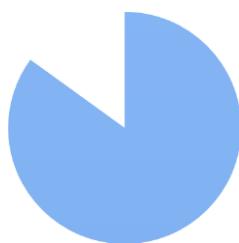
### Desentralisering:



Figur 53: viser desentraliseringssliden

- bevegelse av tjenester ut av sentraliserte laboratorium og inn til legekontor eller hjem (ved kroniske sykdommer)
- Passende for leger som er ute i felten ved screening for STD i skoler for eksempel
- Pasienter tar økende ansvar for avgjørelser relatert til deres helse er en konsekvens

#### De viktigste aspektene ved en biosensor:

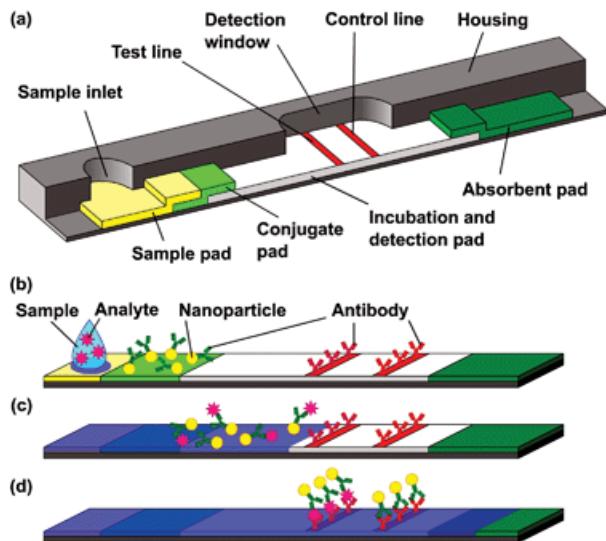


Figur 54: blått = glukoseandel av markedet 11.1 milliarder dollar, hvitt = resten av markedet 2.2 milliarder dollar

- Markedsstørrelse og etterspørsel
- IVD: 52 milliarder \$ (PoC = \$ 8 milliarder (2009), PoC = \$ 12 milliarder (2013))
- Markedsgeografi
- USA og Europa: 69 %
- Asia (Japan) og Stillehavsområdet: 18 %
- Verdens mest suksessfulle PoC test er fortsatt glukose hjemmetesting, med 85 % av markedet i dette ene segmentet (se figur 53). Andre applikasjoner vokser derimot ganske hurtig.

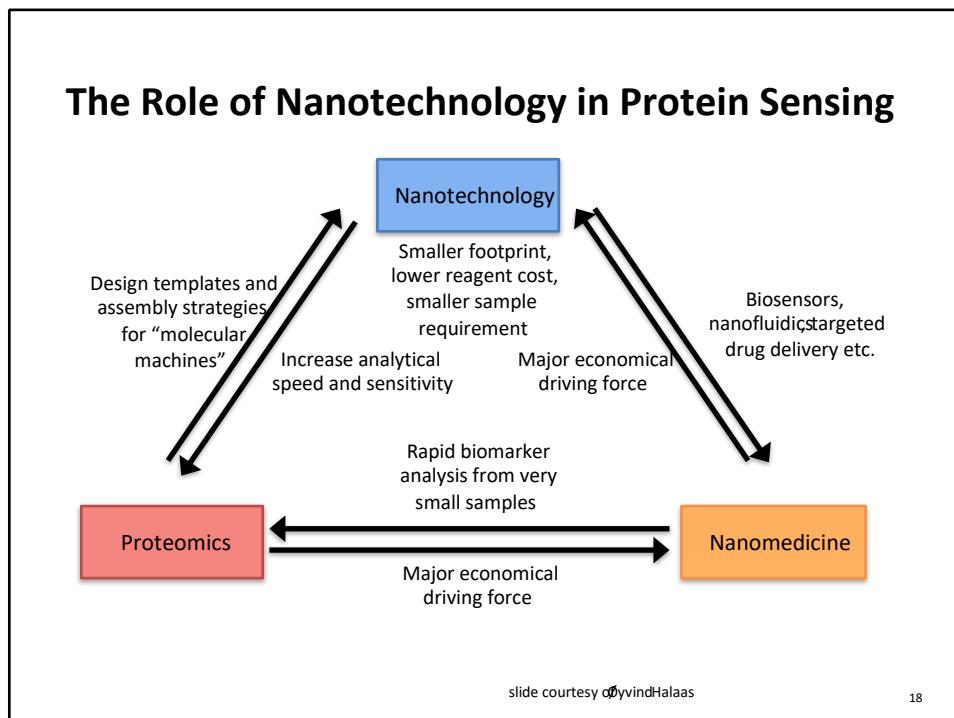
#### Et kjapt eksempel (graviditetstesteren):

+ enkelt å bruke



- + lav kostnad
- High sample retention and low sample delivery efficiency
- Large sample volume
- High limit of detection (LOD) for coulometric detection
- May be confusing if multiplexed

### Rollen til nanoteknologi i Protein sensing:



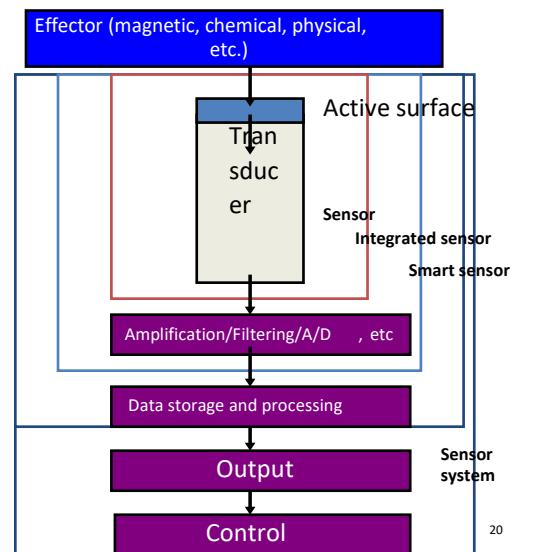
Figur 55: viser hva nanoteknologi kan gjøre i nanomedisin og proteomikk. Er en trekant som viser dette

### Biosensorer (oversikt og definisjoner):

Definisjonen og figuren der kan bli viktig fordi et spørsmål kommer om det på eksamen til høsten.

# Definitions of Biosensors

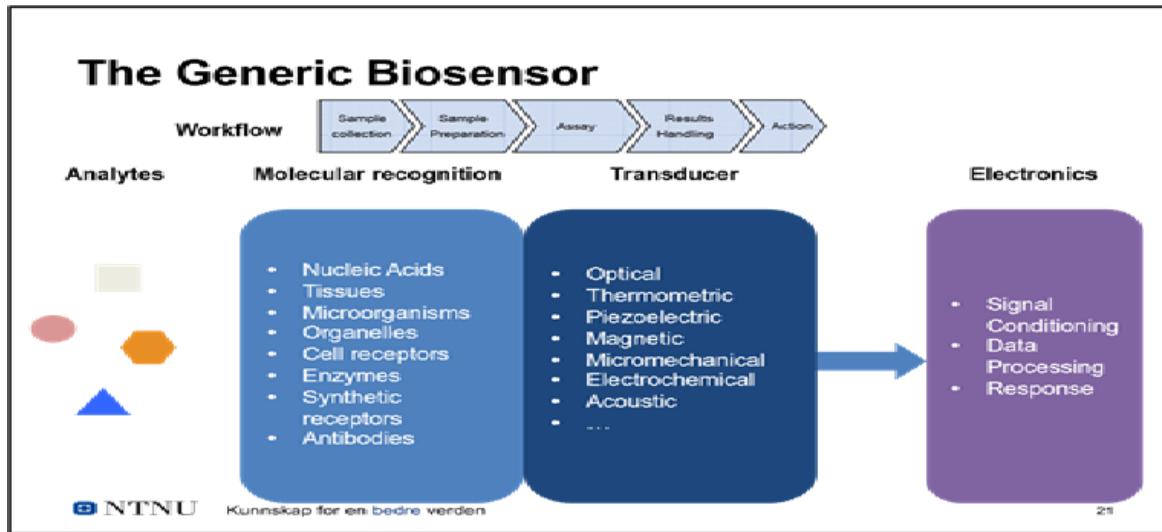
- Bioensors are measurement devices which utilise biological reactions to detect and quantify a specific analyte or event
  - Usually a lot more difficult to make than sensors that measure physical parameters
- Distinction between biosensors and chemical sensors
  - biosensor contain a biomolecule (such as an enzyme, antibody, or receptor), a cell or even tissue as the active detection component
- A sensor, a transducer, transmitter and detector or often used as synonyms.
  - devices that convert one form of energy into another
  - provide the user with a usable energy output in response to a specific measurable input



Figur 56: viser hvordan biosensorer er definert. Figuren til høyre er svært viktig fordi det viser komponentene til en biosensor

- Biosensorer er målingskomponenter som benytter seg av biologiske reaksjoner til å detektere og kvantifisere en spesifikk analyte eller hendelse (som oftest langt mer vanskelig å lage enn sensorer som måler fysiske parameter, med sistnevnte tenker vi da for eksempel på parallel-plate sensorer eller piezoresistive sensorer)
- Forskjell mellom biosensorer og kjemiske sensorer (biosensorer inneholder et biomolekyl [som et enzym, antibody eller reseptør], en celle eller til og et vev som den aktive komponenten)
- En sensor, en transduser, transmitter og detektor er ofte brukt som synonymer (transduser-betegnelsen peker på at det er et redskap som konverterer en energiform til en annen og det gir brukeren en bruklig energi output i respons til en spesifikk målbar input)
- Figuren her er svært viktig fordi på eksamen kom et spørsmål om å forklare de forskjellige delene som finnes på en biosensor.

Generisk biosensor:



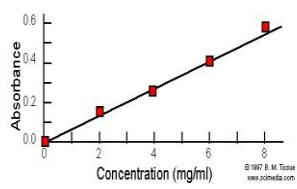
Figur 57: er en figur som viser arbeidsflyten til sensor, analytter, molekylær gjenkjennelse, transduser-form og endepunkt i form av elektronikk

## PERFORMANCE METRICS:

### Calibration: standard curve

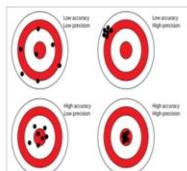
- Process of adapting a sensor output to a known physical or chemical quantity to improve sensor output accuracy i.e. remove bias

Working or standard curve:  
 - measure the signal from a series of standards of known concentration  
 - used to determine the concentration of an unknown sample  
 - to calibrate the linearity of an analytical instrument  
 - for relatively simple solution



### Accuracy

The degree of correctness with which a measuring system yields the "true value" of a measured quantity (e.g. bull's eye) – see calibration

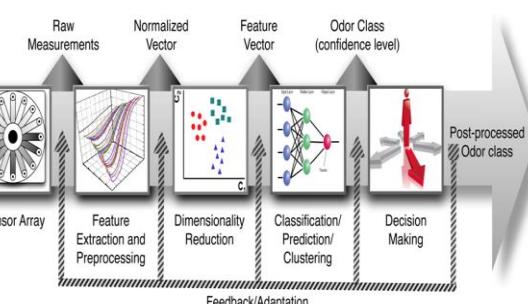


### Sensitivity

- A sensor detects information input,  $I_{in}$ , and then transduces or converts it to a more convenient form,  $I_{out}$ .
- Sensitivity is the amount of change in a sensor's output in response to a change at a sensor's input over the sensor's entire range. **Not the Same as Lower Limit of Detection!**
- Very often sensitivity approximates a constant - i.e. the output is a linear function of the input.
- Sensitivity may mathematically be expressed as

### Selectivity

- Selectivity: The ability of a sensor to measure only one parameter, in the presence of other similar (or different) substances
- Because of the lack of perfect selectivity arrays are often implemented (e.g. electronic nose, see below)



Figur 58: denne første figuren tar for seg kalibrasjon, sensitivitet, nøyaktighet og selektivitet

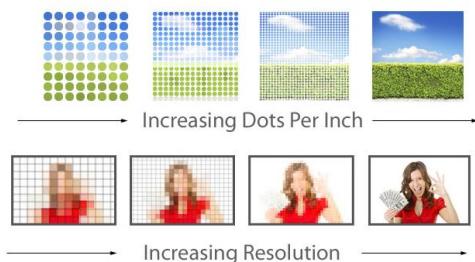
## Precision

- The difference between the instrument's reported values during repeated measurements of the same quantity.
- Typically determined by statistical analysis of repeated measurements
- The standard deviation ( $\sigma$ ) is a statistical measure of the precision in a series of repetitive measurements (also often given as  $\sigma/n$  with  $n$  the number of data,  $x_i$  is each individual measurement, and  $\bar{x}$  is the mean of all measurements)

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

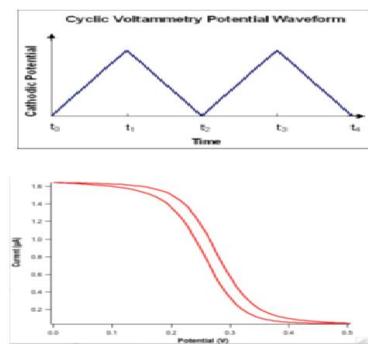
## Resolution

- The smallest increment of change in the measured value that can be determined from the instrument's readout scale.
- can you distinguish two samples of slightly different concentration? Does the display have enough digits to show the change (the sensor may have enough sensitivity to detect)?



## Hysteresis

- The difference in the output when a specific input value is approached first with an increasing and then with a decreasing input.
- Occurs in e.g. voltammetric and piezoelectric sensors



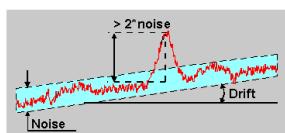
Figur 59: presisjon, resolusjon og hysterese for performance metrics

## Dynamic range, gain and dynamic error

- (Linear) dynamic range: Ratio of the largest to the smallest value of a range
- Gain: Ratio of the amplitude of an output to input signal (Amplifier)
- Dynamic error: The error that occurs when the output does not precisely follow the transient response of the measured quantity

## Signal-to-noise-ratio-S/N and Drift

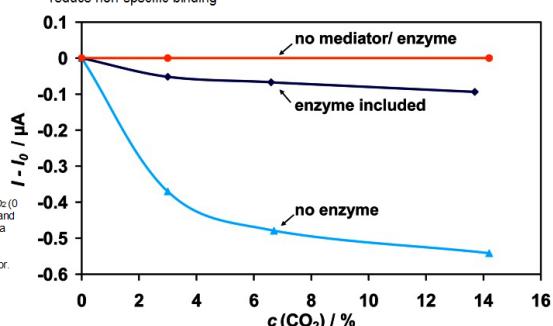
- S/N: The ratio of the output signal with an input signal to the output signal with no input signal
  - Noise is normally measured "peak-to-peak"
  - Sometimes, noise is averaged over a specified period of time
  - Practical significance of noise is the factor which limits detector sensitivity. Generally 2x signal-to-noise ratio
- Drift: Gradual departure of the instrument output from the calibrated output. An undesirable change of the output signal.



Cross-sensitivity of an enzymatic formaldehyde biosensor to CO<sub>2</sub> (0 - 14 % (v/v)). Successively, the biological components enzyme and the mediator (phenothiazine) were omitted. The reason there is a larger change with mediator only is that the electrode is more easily accessible with no enzyme bound to its surface.  
Need to change to a non CO<sub>2</sub> sensitive electron transfer mediator.

## Interference

- Interferent: any factor causing bias in a sensor measurement
- Cross-sensitivity: The influence of one measurand on the sensitivity of the sensor for another measurand
- Cross-reactivity: often found in antibodies, an antibody may bind several proteins with similar epitopes – can be used to improve selectivity in array based sensors
- Crosstalk: Electromagnetic noise transmitted between leads or circuits in close proximity to each other
- Matrix effect: the effect on an analytical method caused by all other components of the sample except the specific compound to be quantified
- Blocking solutions are often used to reduce non-specific binding



## MINIATYRISERING OG NANOTEKNOLOGI (hva skjer når vi gjør ting mindre?)

### WHY MINIATURIZATION

- Redundancy and arrays (more "pixels")
- Faster devices
- Lower power budget
- Increased sensitivity and selectivity
- Wider dynamic range
- Less energy and materials used in manufacturing
- Integration with electronics
- Exploitation of new effects
- Cost/performance advantages
- Improved reproducibility & parallel processing (e.g. semi-fab)

Effektene av miniaturisering er:

Altså at små volumer fører til en økt overflate til volum ratio og dette fører til:

- Hurtigere varme dissipasjon
- Hurtigere evaporasjon

- Større relativ areal for friksjon
- Økt energi krev for å overkomme energitap
- Kortere diffusjonstider
- Etc.

Physical Quantity	Scaling Exponent of I	Units
Area	2	$\text{m}^2$
Bending stiffness	1	$\text{N m}^{-1}$
Buoyant force	3	N
Capacitance	1	F
Capacitor electric field	-1	$\text{Vm}^{-1}$
Deformation	1	m
Drag and lift forces	$2 + 2n$ (n is fluid relative velocity)	N
Electrostatic energy	3	J
Electrostatic force	2	N
Frictional force	2	N
Heat capacity	3	$\text{J K}^{-1}$
Inductance	1	H
Magnetic force	4	N
Mass (m)	3	kg
Mass moment of inertia	5	$\text{Kg.m}^2$
Ohmic current	2	A
Resistance	-1	$\Omega$
Resistive power loss	1	$\text{A}^2\Omega$
Shear stiffness	1	$\text{N m}^{-1}$
Strength	2	$\text{N m}^{-2}$
Strength-to weight ratio	-1	m
Surface tension force	1	N
Thermal conductance	1	$\text{W K}^{-1}$
Thermal time constant	2	s
Viscous forces	$1 + v$ (v is fluid relative velocity)	N
Voltage	1	V
Volume (V)	3	$\text{m}^3$

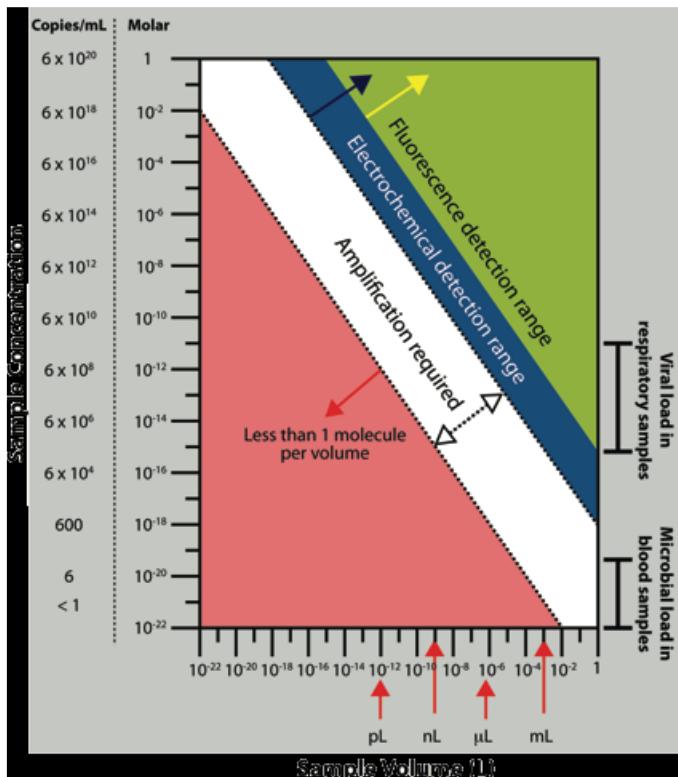
Figur 60: scaling laws

### Miniatyrisering og prøve-volum:

- Miniatyrisering er en blandet velsignelse vedrørende andelen prøve som er nødvendig for å oppdage en gitt analytisk konsentrasjon. Det volumet er gitt av:

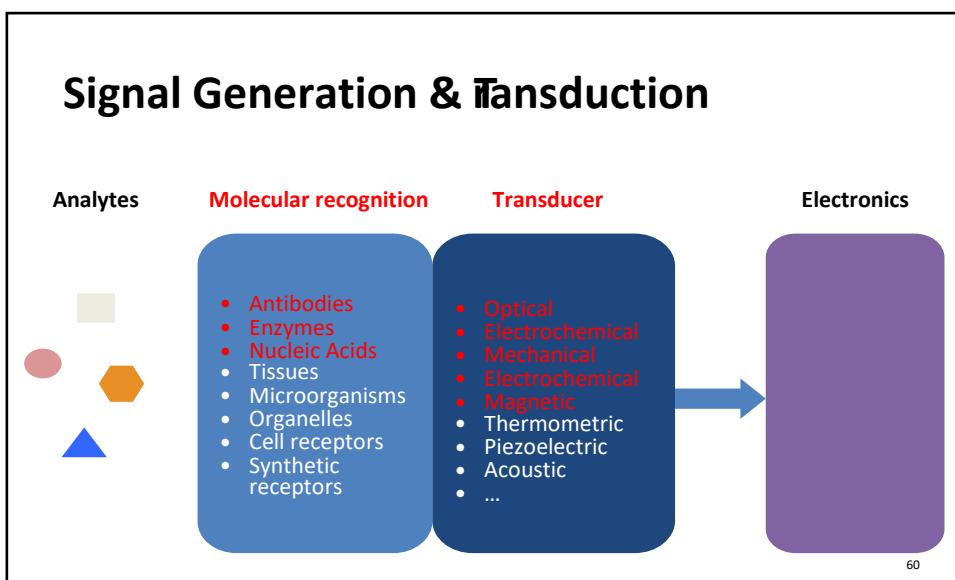
$$V = \frac{1}{\eta * N_A C_i},$$

hvor  $\eta$  = sensoreffektivitet med verdi mellom 0 og 1.  $N_A$  = Avogadros tall,  $C_i$  = konsentrasjon av analytten (gitt i  $\frac{mol}{l}$ ).



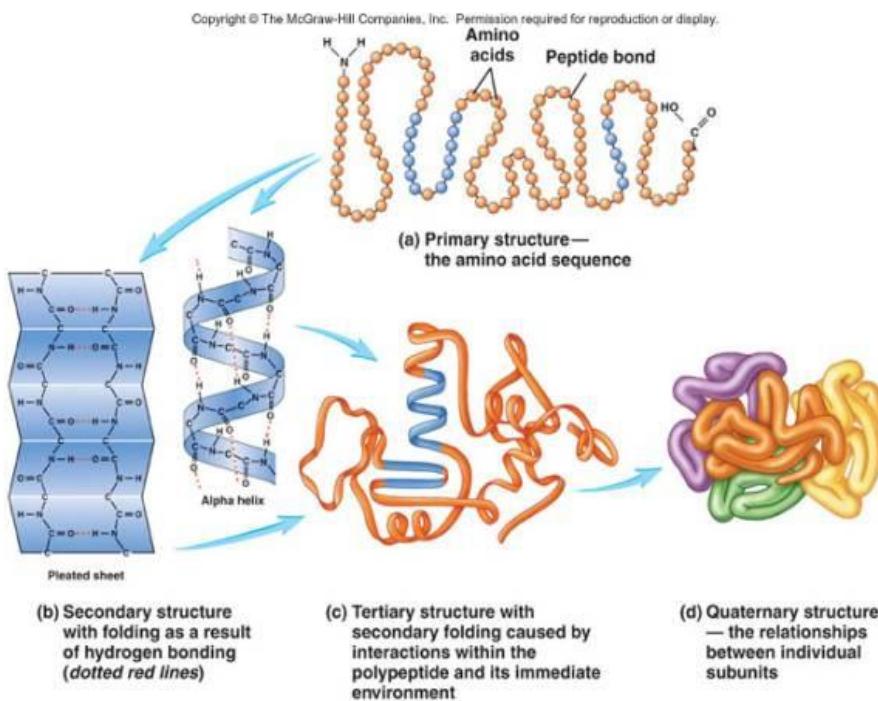
- Hvilket volum er nødvendig for å ha et statistikk signifikant antall analytt-molekyler tilgjengelig for målinger?
- Tap av analytt-molekyler til ikke-spesifikk adsorbsjon for å for eksempel å gjøre prøve-kontainer veggene større.

## PROTEINER OG PROBER (analyte og gjennkjennelseslag)



Figuren til venstre går igjennom hele forelesningen og skal liksom gå frem stegvis, fra analytter, molekylær gjennkjennelse, transduser og elektronikk.

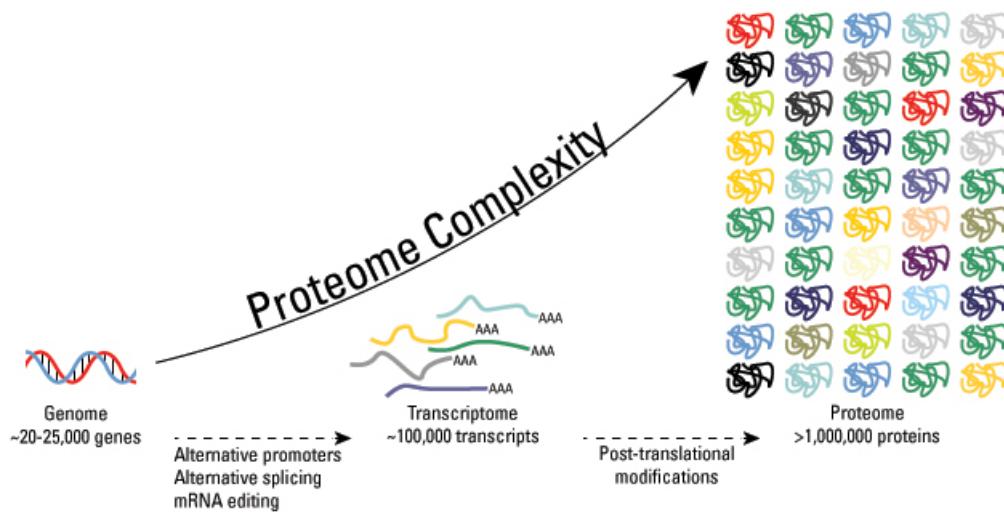
Før vi går igjennom proteinsensorer, så må man forklare litt nærmere om proteiner generelt. Det første vi skal forklare er det at det har fire strukturer; primær, sekundær, tertiær og kvartær. For referanse, se figur nedenfor.



Figur 61: viser primær, sekundær, tertiær og kvartær strukturer med en liten forklaring

Proteomikk: er storskala studier av proteiner, selve uttrykket er en derivasjon av genomikk, som er en tilsvarende studie av genomet. Proteomet er et helt sett av

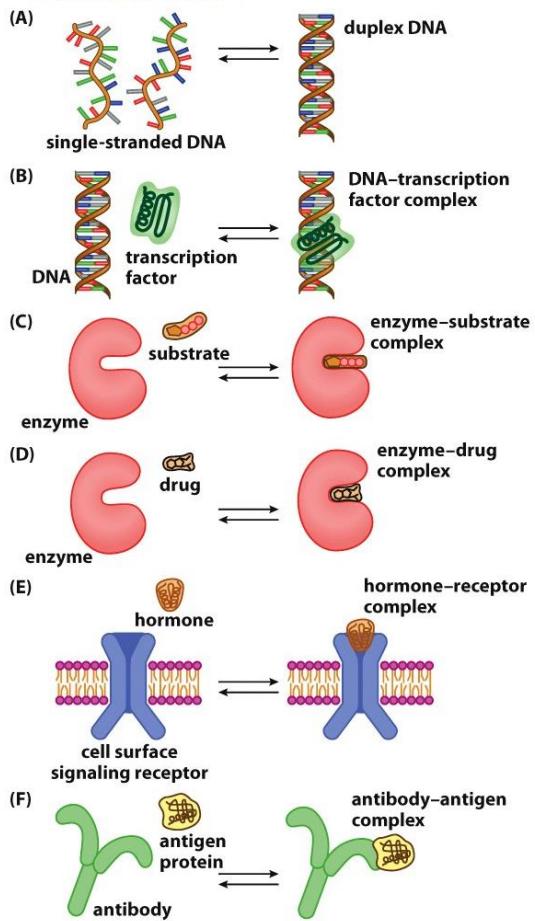
proteiner, produsert eller modifisert av en organisme eller system.



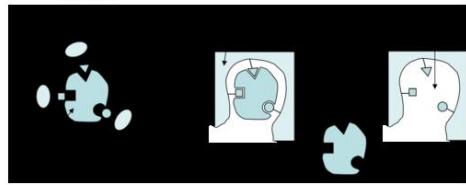
## Proteomics og Interomics

Figur 62: Proteomics og Interomics

## Affinity Nanobiosensors



- Also DNA/RNA/Peptide Aptamers & binding proteins
- Molecularly Imprinted Polymers (MIPs)



## Antibodies

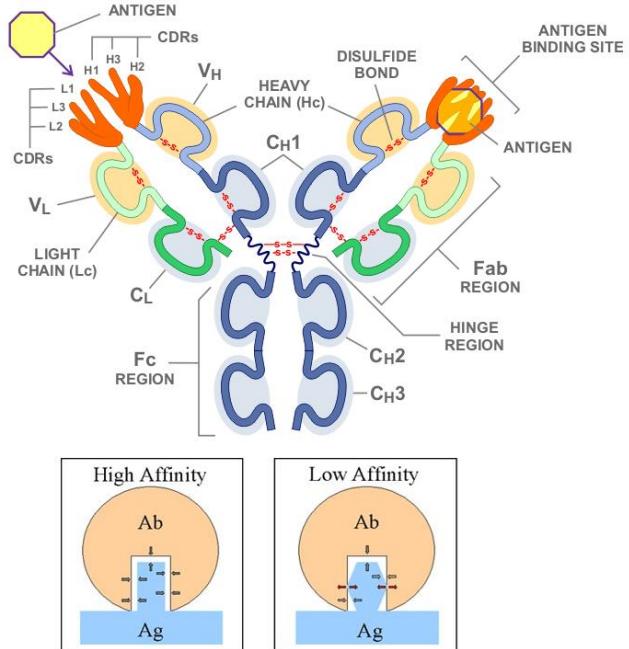
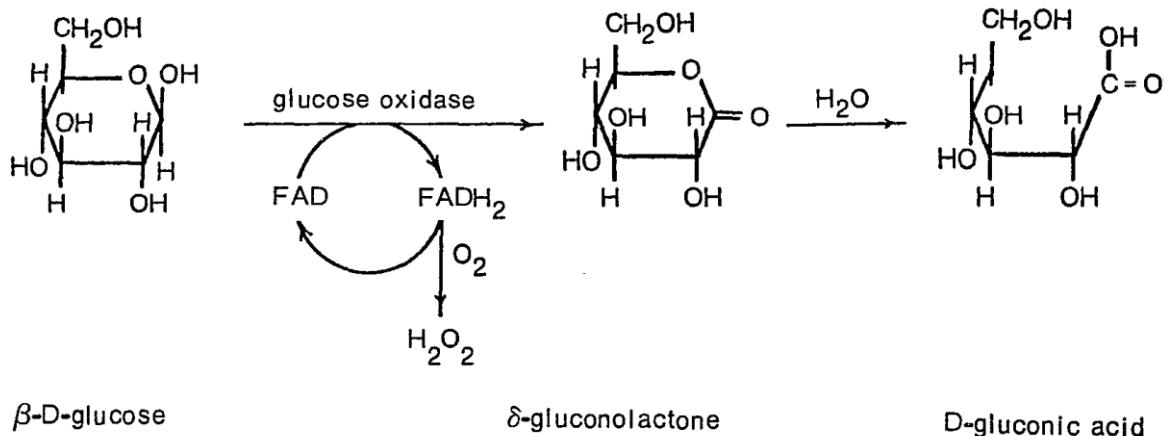
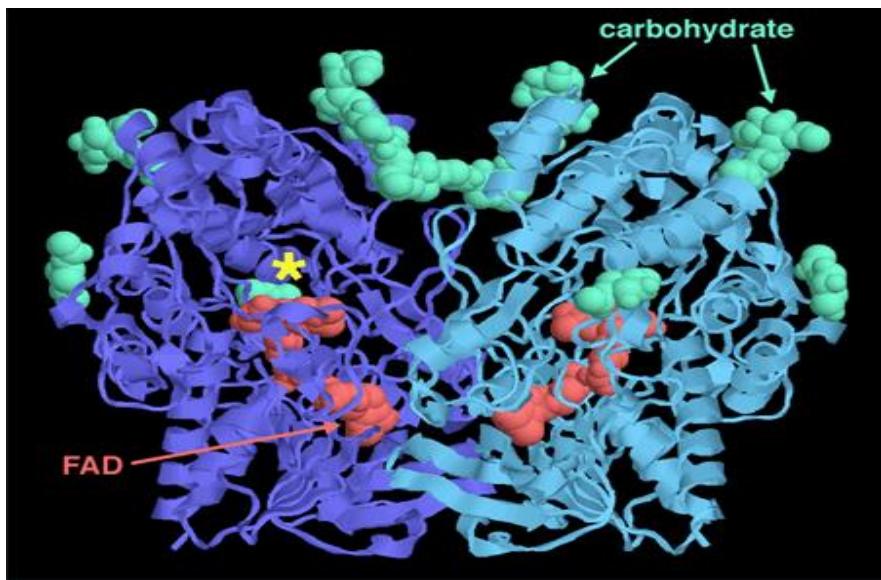


Figure 12.1 The Molecules of Life (© Garland Science 2013)

Figur 63 viser afginity nanobiosensorer og antobodies

## Enzymer:

- Utfører katalytiske handlinger, ved å konvertere et substrat til produkter
- Not consumed so have signal amplification effect «built in»
- Kan bli engineered for å katalysere spesifikke reaksjoner og forbedre karakteristikker
- Et eksempel er glukose oksidase (her kan man referere til glukose sensorer)



Figur 64: Reaksjonen for glukose oksidase

#### VANLIGE PROTEIN OPPDAGELSESMETODER:

##### Signal forsterkelse:

- I nukleotid analyse, så kan man forsterke analytten (PCR)
- Ikke mulig i proteinanalyse, slik at en må forsterke signalet istedenfor
- Signal kan bli forsterket gjennom en label (fluorophore, kjemiluminescence, enzymatisk turnover, PCR av DNA label, sølvdeponering på ladete partikler, etc..)

1. Proteins are usually specially isolated through either separation techniques (e.g electrophoresis) or specific immobilisation (often followed by washing to remove unbound molecules)
2. A secondary protein-specific reagent/probe with a label is added and washed away
3. Substrate for signal amplification is added and reading taken at a fixed time point

Western blot: (noen ganger omtalt som protein immunoblot) er en viden benyttet analytisk teknikk brukt i molekylær biologi, immunogenetikk og andre molekylær biologi for å oppdage spesifikke proteiner i en prøve av vev ekstrakt.

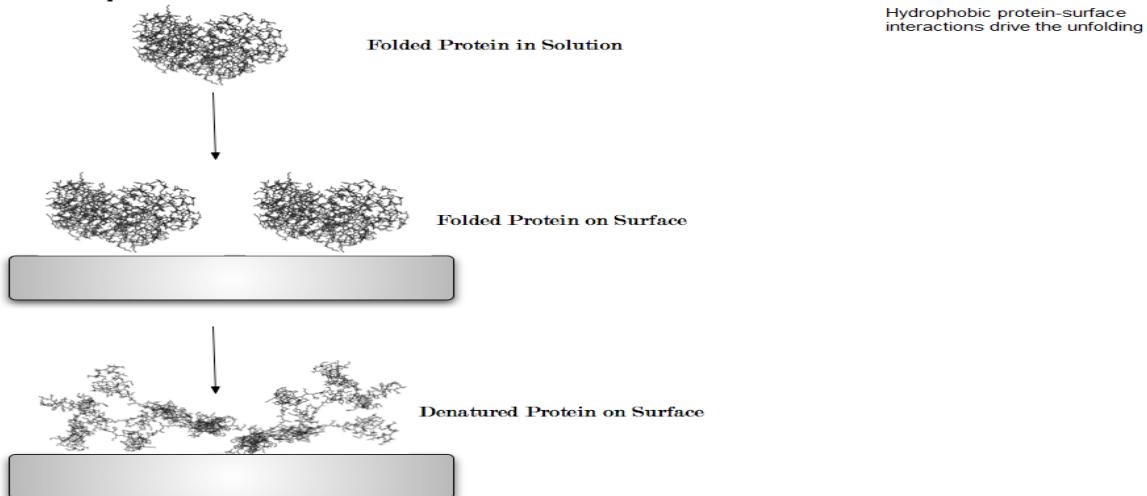
Artificial [antibodies](#) are created that react with a specific target protein. The sample to be tested is prepared and put together with these antibodies on a membrane – if the specific protein sought for is present, after a [gel electrophoresis](#) step this will result in an accordingly stained band on the western blot

### Massespektroskopi:

er en metode som er ganske ofte brukt innen mange emner på NTNU. Bør være kjent.

### SURFACE FUNCTIONALISATION:

#### **'Soft' Biomolecules and 'Hard' Surfaces are Often Incompatible**



#### **Surface Induced Denaturation & Aggregation is a Multi-Step Process**

**LES SLIDE 28 OG 29 PÅ NYTT IGJEN.**

Initial Adsorption  
entropically driven desolvation  
and weak  
surface bonding  
Subsequent Adsorption  
strong  
bonding  
Whilst a problem with  
mesoscale  
sensors it is potentially  
much worse on the micro-  
and  
nanoscale as the signal can  
be  
much reduced by loss of  
function

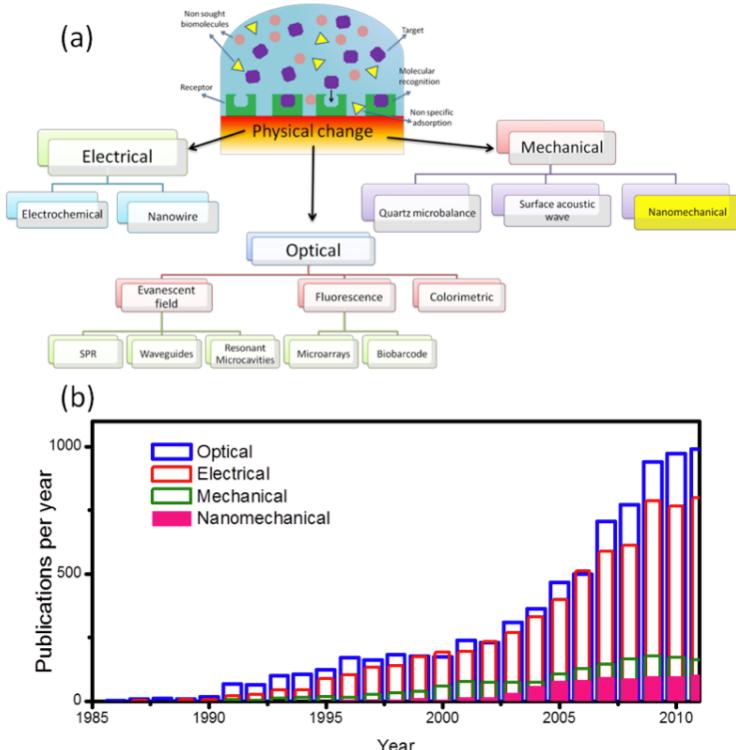
# SIGNAL GENERATION, AMPLIFICATION & TRANSDUCTION (nanoteknologi i)

## Some Transduction Methods

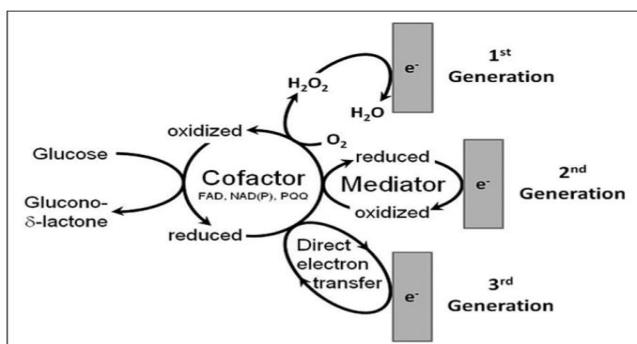
Electrons (Redox): Current Measurements

- Ions (Activity, conductivity): Potential Measurements
- Photons (Fluorescence, scattering, plasmonics): Optical Measurements
- Mass change: Mechanical measurements

Although all of these have been used on the meso (mm) and micro scales there has been a major performance enhancement by moving to the nanoscale.



## Electrochemical (Redox) Nanobiosensors



**Figure 1.** Schematic representation of the principles of first-, second-, and third-generation glucose sensors. Electrons from the glucose oxidation reaction are first taken up by the enzyme's cofactor (primary electron acceptor) and transferred to either oxygen (first generation), an electron mediator (second generation), or directly to the electrode (third generation).

Next? Use molecular wire to GOx redox centre to connect electron transfer directly to e.g. carbon nanotubes

Example: Glucose sensor (in US, ~9% of population has diabetes)

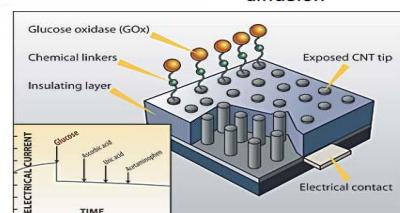
Three generations of glucose sensors

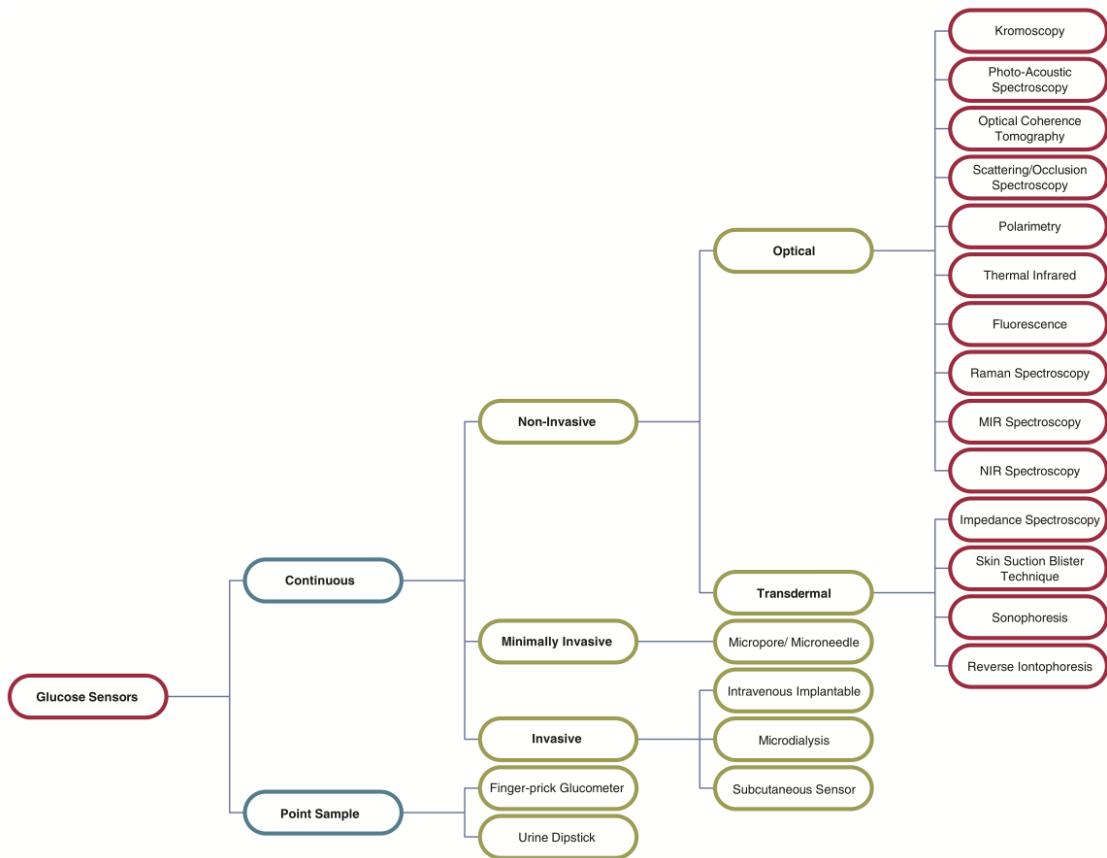


Bottleneck: uses O<sub>2</sub> to generate signal, which can vary widely. Samples had to be pre-diluted in



Current commercial solution: use a synthetic electron transfer mediator such as Ferrocene. Fast electron transfer but still dependent on diffusion





Figur 65: Many ways to skin a cat

Les side 33-46 på egen hand. Det var for mye å skrive og for mange figurer å tegne.

## Kapittel 6: DNA sensorer:

Her har jeg printet ut hele forelesningen. Det gir da at jeg heller leser det fremfor å skrile det ned her. Det er rett og slett for mye å skrile ned og jeg har tidspress.

## Kapittel 7: Organer på chip I

Det er to deler av dette temaet. Det første tar for seg det mest grunnleggende ved organer på chip. Resten kommer i kapittel 8.

### Outline av kapittelet:

Tissue/organer-på-en-chip

## Mikrofysilogiske systemer

- Motivasjon
- 3D niche
- Eksempler fra litteraturen
- Hva er neste?

### Læringsmål:

Man må være i stand til å:

- Forstå hvorfor og hvordan vev på chip er viktig. Forklare celle: ECM interaksjoner og de cellulære nichene
- Beskrive konstruksjoner/oppsamlinger for følgende organoider/blodårer

### Vitenskapelig motivasjon for hvorfor vev-på-en-chip?

Tradisjonelle in-vitro assays gjør ikke følgende:

- Tilstrekkelig representerer vev funksjonaliteter
- Gir dynamiske miljøer
- Tillater komplekse arkitektur eller organisert multicellularitet

Tradisjonelle in vivo assays gjør ikke følgende:

- Tillater usikre (unsafe på engelsk) eksperimentering på engelsk
- Tilstrekkelig representerer menneskelig biologi
- Tillater spatial og temporal kontroll

### En annen motivasjon er etiske og politiske grunner:

Dyreforskning blir begrenset over hele verden. I EU har vi at:

Direktiv 2010/63/EU til EU-parlamentet og til rådet fra 22.september 2010 vedrørende beskyttelse av dyr brukt for vitenskapelige formål (på engelsk):

- Directive represents an important step towards achieving the final goal of full replacement of procedures on live animals for scientific and educational purposes as soon as it is scientifically possible to do so.

I USA har vi også dette:

- Spare tid og penger på dyretesting
- Speed up utvikling av medisiner og testing
- Patentere og selge utviklet teknologi

#### Den viktige rollen for medisinsk nanoteknologi:

Rekonstruere vev og organer ved å kombinere cellebiologi, bioteknologi, molekylær biologi, materialvitenskap og mikro/nanoteknologi. Imitere (eller mimikere) et levende organ eller vev ved å ha lignende strukturell, funksjonelle biokjemiske og mekaniske egenskaper. Å øke hastigheten på optimering og produksjonen av medisinkandidater og drug delivery system gjennom kjemisk syntese mikrofluidikk. Komponent realtime overvåking av medisinrespons. Disse er alle områder medisinsk nanoteknologi kan spille en viktig rolle. Fokusområder: grunnleggende forskning, kreft, medisiner, toksikologi og injeksjoner.

#### Translasjonell medisin gjennom vitenskapelig reduksjon og remodellering:

Body systems | 11 main organ systems | Four types of tissue | The cell is the minimal functional unit > 200 types | Bottom up fabrication and assembly

Vennligst forstå:

- De fleste vev er laget av repetisjoner av minimale funksjonelle enheter av sub-mm skala
- Cellene må bli organisert ved 10 mikrometer skala
- Cellene mottar cues (hint) ved 10 nanometer skala

#### Biologisk synsvinkel:

Passiv kulturskål (altså bakterier). Man ser ikke hele bildet og det du ser er overforenklet.  
Pseudo-3D dagens og fremtidens 3D vev (se figuren som er et fint eksempel)

### Mikro-enkapsulasjon:

Her er det en figur, ta den med (se slide 6 av 22).

- Maks 800 mikrometer ø for å unngå nektrolile kjerne
- Ingen spatial kontroll
- Ingen designet arkitektur
- Ingen muligheter for perfusjon, kun basert på diffusjon
- Ingen in vivo vaskulasjon observert

### Nichen:

Komponentene til et vev/organ på en chip.

- 3D biokjemisk komposisjon: matrise komponenter (naturlig og syntetisk), makro/mikro/nanostruktur (vevspesifikk), immobiliserte celleforsterkete faktorer (cellespesifikk)
- 3D biofysiske egenskaper (tensil styrke, stivhet og elastisitet, samt porøsitet)
- Vesarkitektur: mikronicher, funksjonelle enheter, kompartmentalisering, vaskulæring, interkonneksjon (andre vev, luft og mat).

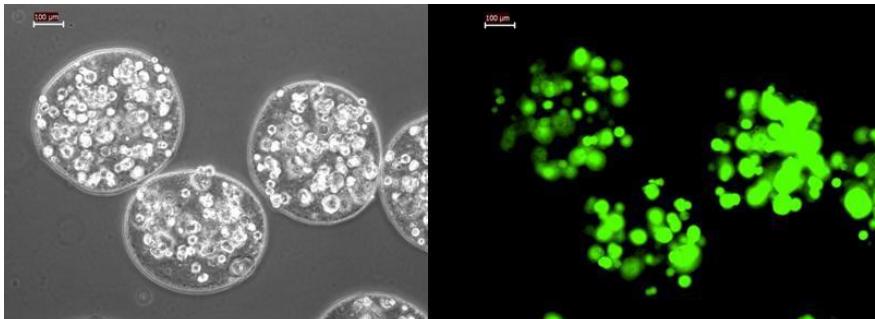
### Samme celle, forskjellige materialer:

Her er det enda en figur man må ha med: kollagen, nanofiber, fibronektin og PEG. Figuren viser bilder av alle disse materiale og hvordan de ser ut i celleform.

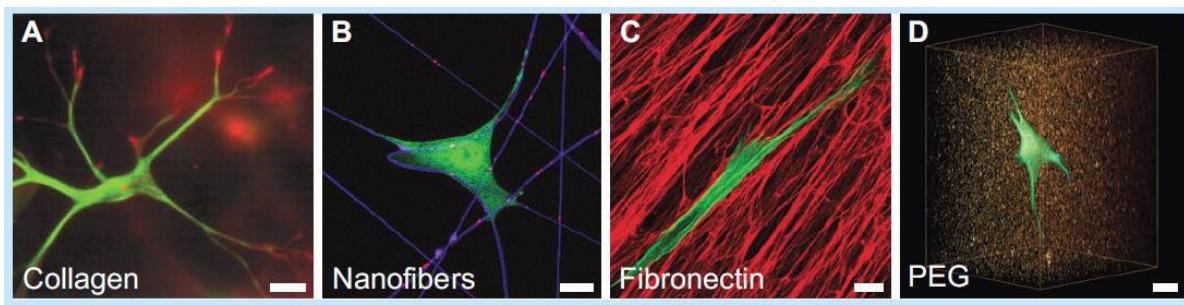
### Nichen 2:

Materialstrategier for å skape kunstige celle-instruktive niches. Man mener her da biomaterialer bruker som cellulære skaffolder for vev ingeniørvitenskap applikasjoner. Avansert materialer kan bli brukt til å inkorporere strukturelle, mekaniske og biokjemiske signaler som kan interagere med cellen og in vivo miljø i biologisk-spesifikk maner. Dette

skyldes at i skapelsen av vev er det ofte nødvendig med et skaffold for å gi et miljø eller niche. Disse skaffoldene må oppfylle en stor variasjon av kriterier. Man må minimisere det ekstracellulære miljø, slik at det coaxes deres *in vivo* motparter.



Mikroenkapsulasjon, vi ser hvordan det ser ut i praksis



Her ser vi de fire materialene kollagen, nanofiber, fibronectin og PEG

#### Ekstracellulære komponenter:

Ekstracellulær matrise er et begrep innen biologien som betegner substansen som finnes mellom cellene. Rundt alle celler, bortsett fra de cellene som sirkulerer i blodet, finnes denne substansen som består av et nettverk av proteinfibre, en grunnsubstans som består av ikke-fibrøse proteiner og molekyler, samt væske.

#### Niche: interaksjoner med ECM

ECM integrin interaksjoner fører til signaltransduksjoner som er minst like komplekse og viktige som de trigget fra løselige ligander. Det er hundrevis av ECM proteiner kodet inn i vertebrate genomer! Eksempler er Fibronektin, Fibrillin-1, LTBP-1 og Thrombospondin. 3D cellulære fenomen i utvikling, vev homeostasis og sykdom er utført av adhesive, mekaniske og kjemiske cues (hint) som kommer fra andre celler og dets ekstracellulære miljø.

#### A) Chondrogenesis

B) Angiogenesis

C) Metastasis

- Adhesive, topografiske, mekaniske og løselige cues i 2D og 3D. Figureksemplene er kollagen coated-glass i 2D og i kollagen gele i 3D.

### Lab on a chip:

Eksempler:

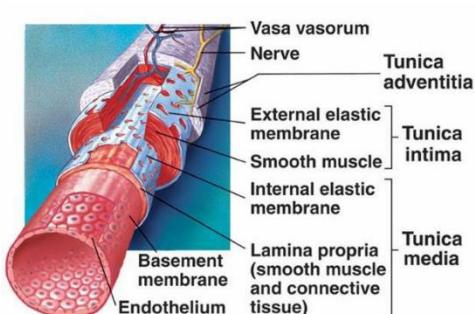
- Blodårer: mens neste kapittel handler om: lever, lunge, tarmer, lymfeknute, hjerte og svalu.

### In vivo interstetiell perfusjon:

Det er en figur her som viser drain og source som for transistoren i elektronikken. Man har et lymfevessel som fungerer som Drain med en fluidflyt fra den og til kapillæren. Kapillæren fugnerer som source og fluiden som flyter mellom dem består av fibroblaster, immune celler og makrofager blant annet. Prinsippet for vevs nærhet til source/drain:

- Ingen celler er > 2mm borte fra vaskulæret (mer vanlig da: 1mm)
- In vitro kan en celle være 0,8 mm fra luft mellom nutrient kilde (altså av kun diffusjon).
- Søppel må forlate
- Den eneste måten å oppnå dette er perfusjon.

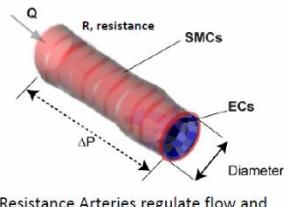
### Ingeniørvitenskapsutfordring: Hva er det en prøver å lage?



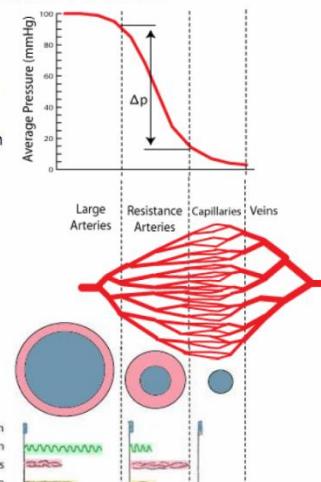
Figuren viser hva en prøver å lage. Ingen mer tekst er nødvendig egentlig.

#### Why Small Resistance Arteries

Small resistance arteries: vessels prior to capillary beds  
Tissue Components: approx. 10% endothelium, 60% smooth muscle, 30% tissue  
Highly elastic compared to capillaries, which are fragile (95% endothelium)  
Inner Outer Diameters (for mice)



Resistance Arteries regulate flow and pressure drop in circulatory system  
Control of blood pressure → key element in hypertension



## Hvorfor liten resistansårer:

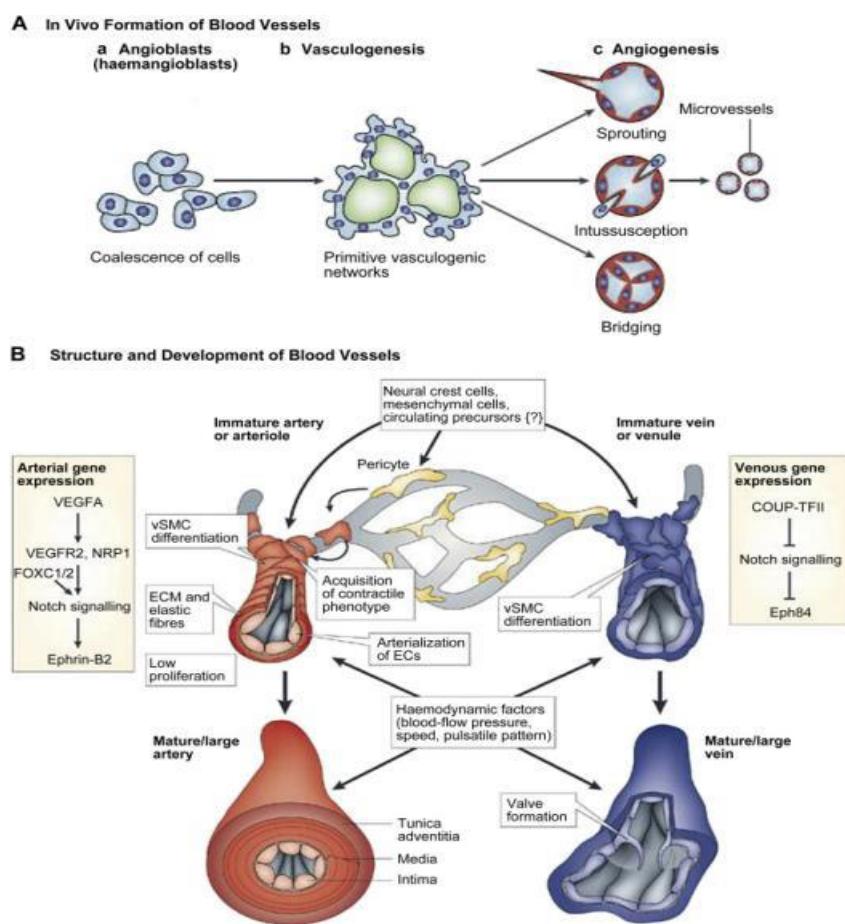
Liten resistans årer: vessels prior to capillary beds. Vevskomponenter: omtrent 10 prosent endothelium, 60 prosent glatt muskel, 30 prosent vev.

Høyst elastisk sammenlignet med kapillærer, som er skjøre (disse er da 95 prosent endothelium). Inner order diameters (mus).

- Her er det en veldig bra figur som viser forholdet mellom store årer og veins. Det er størrelsen på blodkomponentene og trykk.
- Resistansårene regulerer flyt og trykkfall i det sirkulatoriske system. Kontroll av blodtrykk => nøkkelementet i hypertension.

Så kommer en slide som viser blodårer er dannet in vivo (prosessen heter angiogenesis).

## In vivo dannelse av blodårer:

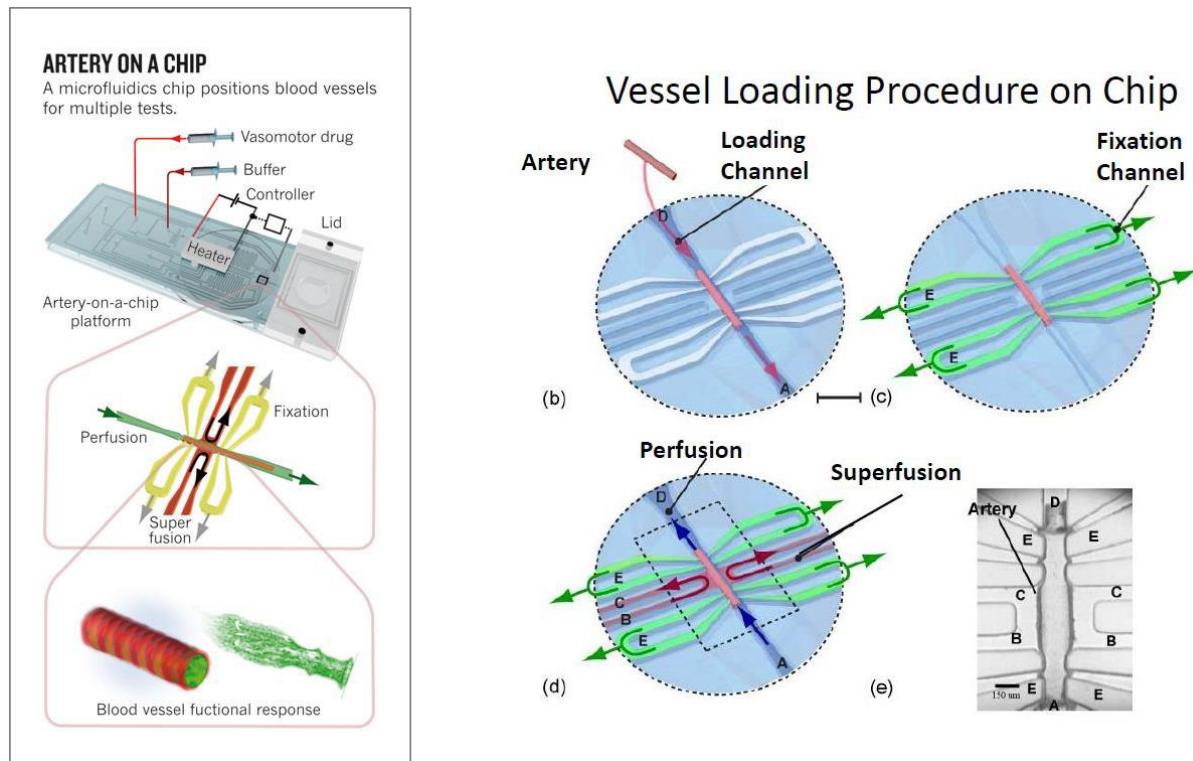


Figuren sier vel alt her. Det er skapelse av in vivo dannelse av blodvessels, som er figur A. Figur B viser struktur og utvikling av blood vessels.

## Mikrofluidikk for å studere explants:

Det er en youtube-video her. Artery on a chip: en mikrofluidikk chip posisjoner blodårer for multiple tester. Se på figuren og muligens tegn av.

## Vessel loading prosedyre på en chip:



## Hvordan strukturere kanaler med hull i når man forsøker å lage mikrovaskulatur in vitro:

### 1. Prevascularization techniques

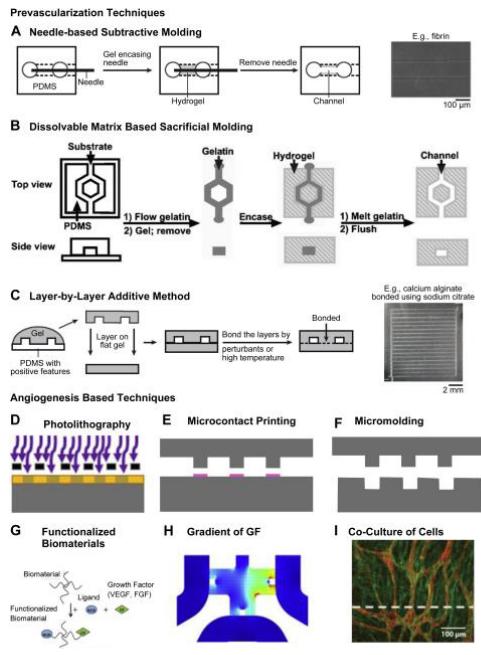
- Make channels first, then seed cells
- Simple but controlled architecture
- Easy to incorporate with other techniques/tissues

### 2. Angiogenesis-based techniques

- Provide a microenvironment permissive for the autonomous formation of blood vessels
- Uncontrollable 3D architecture
- Difficult integration with other techniques/tissues

## Prevaskularisasjonsteknikker:

Det kommer ofte spørsmål om PDMS. Det fungere som grunnleggende substrat for mange av teknikkene. Disse er nål-basert subtraktiv molding (eller forming på norsk), oppløsbar materie basert ofringsmolding, lag for lag additiv metode, angiogenesisbaserte teknikker, mikrokontakt printing, mikromolding, funksjonaliserte biomaterialer, gradient til GF, cokultur av celler.



A) Vi ser på målbasert subtraktiv molding: Inserter nål i konstruksjon for cellularisering, skap hydrogel mikromiljø, fjern nålen, så cellene. Det er en enkel prosedyre (som er et positivt tegn), men gir dessverre simpel 1D arkitektur, Hvis målet er å studere blodårer, så kan enkel målbasert subtraksjon være nok.

B) Ved opplösbar matrise-basert ofringsmolding gjør man følgende: Man skaper struktur ved å bruke litografi molde ofringsmetoder, sette i (encase på engelsk) i hydrogel, fjerne ofringsmateriale, cellularisere. Positive aspekter er at det er en ganske simpel prosedyre, og at det er mulig å skape nettverk. Negativ aspekt er at det muligens ikke klarer å representere vev.

-3D printng av vaskulær opplösbar karbohydrat glass er et eksempel på denne metoden. Prosessen fungerer slik: Print en 3D karbohydratglass gitter, enkapsuler gitteret og levende celler i ECM, opplöse gitter i cellemedia, flyt og levende celler i monolittisk ECM med perfusabel vaskulær arkitektur. Den tredje metoden er lag på lag additiv metode. Her står det ikke så mye, men det blir gitt et eksempel. Det eksempelet er blodårer på en chip. En tilhørende artikkel følger også med.

Flere eksempel på det ovenfor: mikrofluidiske vessel nettverk (uVN).

1. Microvessel formation
2. Sprouting angiogenesis
3. Perivascular interaction
4. Whole blood interaction

Et eksempel er thrombosis/platelet deponering ved å plassere forstyrret flyt i aktivert endothelium i uVN. Fra G, H og til I har man det slik man gir hint, men lar cellene selv organisere. Så følger flere figurerer (her referer Ø. Halaas til pensum for detaljer).

## KAPITTEL 8: ORGANER PÅ CHIP II

Kapittelet begynner med en artikkel fra the Guardian som utbasunerer at det nærmer seg slutten på dyreforsøk siden det funksjonelt organ-on-chip design har kommet på markedet og

som virker meget bra. Så kommer lunge-på-chip som en del av permanent utstilling på museet for moderne kunst i 2015.

En tilnærming til biomedisin: Syntetiser, avhør/undersøk, perturb og terapi er fasene for tilnærmingen. Ved syntetisering er mikrofabrikerte kulturer viktige, ved avhør benytter man seg av in vivo overvåking, mens ved perturb er metoden det er snakk om patogener og nanopartikler. Organer som har blitt delvis gjenskapt in vitro ved bruk av menneskelige celler: Lever, lunger, tarmer (intestines), lymfoidsystemer, blod-hjerne barriere, hjerte, svulster, uterus, nyre, beinmarg, skinn, glander og hjerne.

#### En oversikt over mikroteknologier for lever-studier og deres anvendelser:

Vi har 2D og 3D levermodeller. Hre har vi 2D mørnstring: hepatic vev sheet, kokulturer, DEP-basert mørnstring. 3D struktur: micowell system, ultrastruktur og 3D hepatic vev.

Mikrofluidikk: perfusjon cellekultur. Her kommer vi til overgangen mellom 2D og 3D lever modellen og mikrobioreaktorer. Så ser vi bare på bioreaktorer.

Hydrogel enkapsulasjon: Mikro/Makrokapsule, mikropartikkelfiber. Andre: decellularisert level skaffold.

Bioartificial liver	Drug screening	Liver disease model
Liver regeneration	Toxicity test	

Tabellen ovenfor viser mulige anvendelser.

#### Hvorfor skape en lever?

Den første biokunstige lever (BAL) ble utviklet i 2001. Leverceller fra et dyr ble brukt fremfor å bruke komponenter for hver funksjon av leveren. Dets næværende funksjon er ikke å erstatte leveren helt, men heller fungerer som et støttende komponent. Bioartificial liversystemer er i bunn og grunn bioreaktorer, med hepatocytter innlagt (hepatocytter er leverceller) som utfører funksjonen til en normal lever. De prosesser okysgenerert blodplasma, som er separert fra andre blodkonstituenter. Flere typer av BAL blir utviklet, inkludert hollow fiber systems og flat membrane sheet systems.

### Lever mikroarkitektur:

Man har en periportal sone (trykk O<sub>2</sub> = 65mmHg) og perivenøs sone (trykk O<sub>2</sub> = 30mmHg). I den periportale sone utføres: glukose forløsning, Glutathione peroksidasjon, Albumin dannelse og Bile dannelse. Man har også Ureagenesis (det som utgjør urin), men det er ingen av sonene. I den perivenøse sonen utføres: glukose opptak, xenobiotisk metabolisme,  $\alpha$ 1-antitrypsin dannelse, glutamin dannelse fra NH<sub>3</sub>.

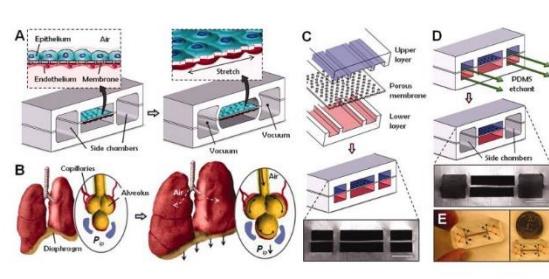
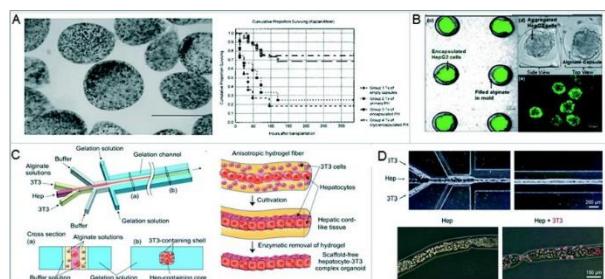
### Å skape mønstrede kokulturer:

Kokulturer holder hepatocytter fornøyde. Det fungerer faktisk slik at hepatocytter blir kokulturer. Figuren på slide 25 viser hvordan. Det er en modell for hepatitis C virus (HCV), medisin metabolisme og gift (poison) screening.

### Å mimikere den sinusoidale arkitektur:

Dielektroforesis-basert mønstring av en heterogen, globule-mimetisk, radial mønstringsmodell av hepatocytter og endoteliale celler.

### 3D løsninger på lever-problematikken:



### Eksempler er en pustende lunge på en chip:

Artikkelen heter: Reconstituting organ level lung functions on a chip. I den beskrives et biomimetisk microsystem som rekonstituerer den kritiske funksjonelle alveolar-kapillære interface til den menneskelige lunge. Det bio-inspirerte mikrokomponenter reproduuserer komplekse integrerte organ-nivå responser til bakteria og inflammatoriske cytokiner

introdusert i alveolart rom. I nanotoksikologi studier, så viste lungemimikken at sykliske mekaniske strain fremhever giftige og inflammatoriske responser av lunger til silika nanopartikler. Mekaniske aktive organer-på-chip mikrokomponenter som rekonstituerer vev-vev interface kritisk til organfunksjon kan derfor utvide kapabiliteten til cellekulturmodellen.

#### Eksempel 2: Strekking øker nanopartikkels translokasjon:

Translokasjon betyr å overføre til en ny posisjon. Det brukes om blant annet proteiner, hvor man ønsker å treffe rett plass (site på engelsk) Det betyr altså at ved å strekke, så øker man nanopartikkels translokasjon. Halaas sin egen forskning er lymfeknute på en chip. En lymfeknute er lymfatisk vev innskutt i lymfebanen som fungerer som kontrollpost for immunsystemet. Lymfeknuter blir ofte misvisende kalt for «lymfekjerteler eller glander». Halaas ønsker å gjenskape lymfeknute funksjonaliteter i laboratoriet. Disse er:

- Å forme immunologisk minne
- Teste vaksine-effektivitet
- In vitro vaksinasjon
- APC: T celle interaksjon prosess i lymfeknute
- Immunoterapi av infeksiøse sykdommer og kreft. T celle priming i lymfeknute: naive og stromale celler. Celle-celle kontakt er nøkkelen!
- Så kommer en del bilder halaas og p.rosa har tatt i nanolab

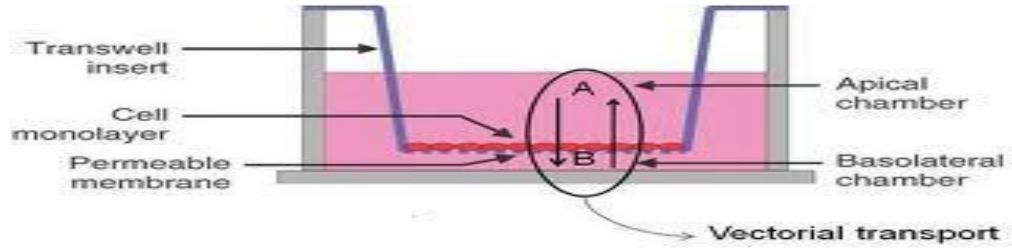
Prinsippet er: en har outlet og inlet. På karet er det grodd PDMS mikrokanaler, LPS + OVA peptid, DC monolag, adborbert Fn lag og på bunnen er det en glassoverflate.

#### Gastrointestinell trakt (GI):

Makroarkitektur. 9m lang, 30 m<sup>2</sup> areal, presistativ bevegelse. Barriere for mikrober, steder for fordøyelse. Sykdommer som er der: (inflammatorisk tarmbetennelse, kreft, fedme og medisin absorpsjon).

#### Mage i en skål (todays state of the art):

## Adsorpsjon gjennom intestinal epithelium i Transwell assay.



ADME (adsorpsjon, distribusjon, metabolisering, ekskresjon for medisinsk utvikling). Jeg skal så forklare hva PDMS er: Polydimethylsiloxane (PDMS) tilhører en gruppe av polymeriske organosilikon stoffer som er til daglig omtalt som silikoner. Det er den mest brukte silisium-baserte organiske polymer og er kjent for dets rheologiske (eller flyt) egenskaper. Den kjemiske formelen for PDMS er:  $\text{CH}_3[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ , hvor n er antall repeterende av den monomeren.

Et eksempel på en mage-på chip er: den okkupert av en mikrobiyal flora som opplever intertinal peristasis ligenden bevegelser og flyt. Å legge til mekanisk stress forbedrer modellen.

Fabrikasjonsmetode (en strategi for å lage mage-på-en-chip). Først legger man et øvre lag som man behandler med plasma, deretter

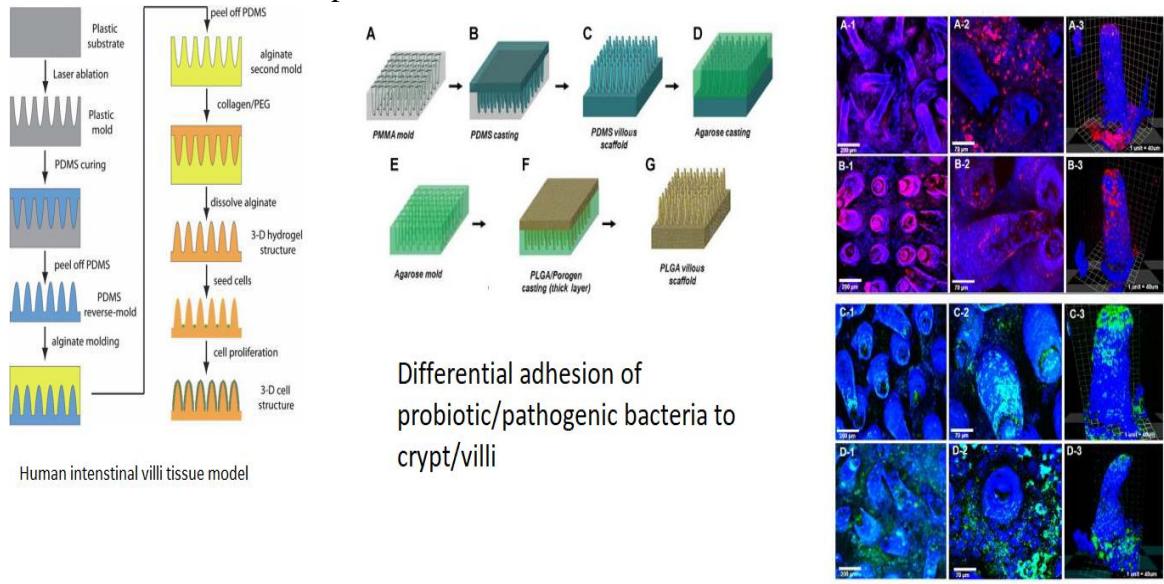
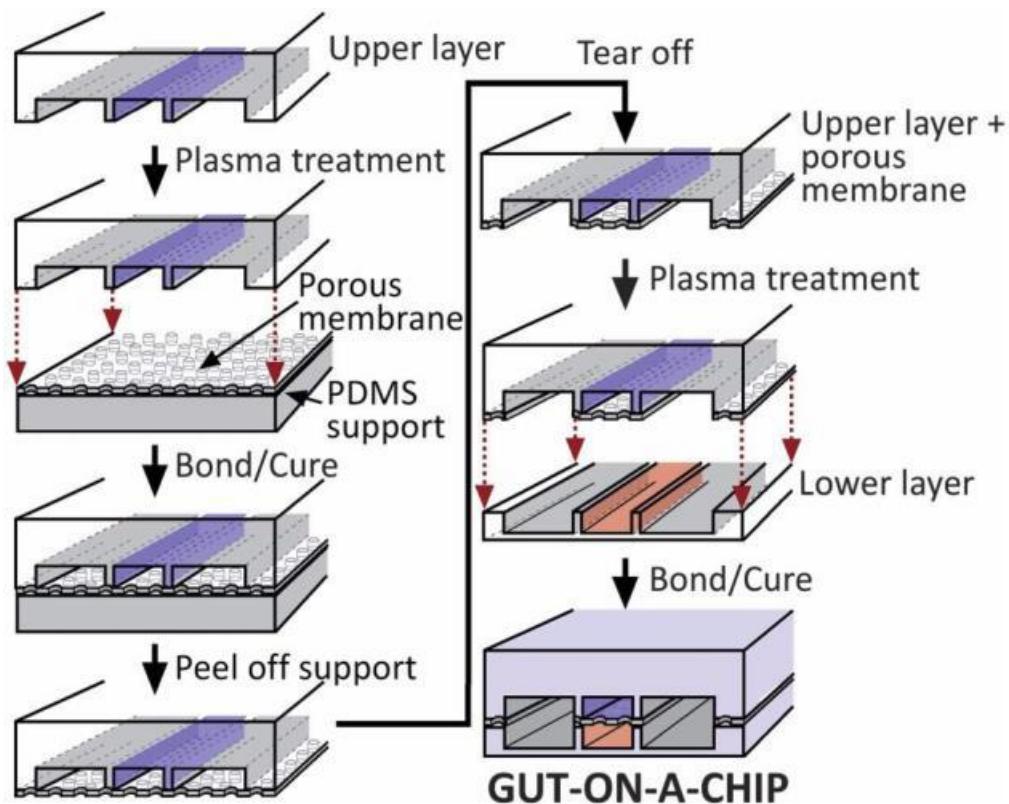


Figure 1. Confocal microscopy of PLGA scaffolds cultured for 21 days with Caco-2 (blue), and 2 h with bacteria (red and green). A = Niude, B = Lali, C = ST, and D = PAK31. 20x magnification shows full coverage of scaffold with Caco-2 and bacteria (A-2) with z focused in 40x magnification enabling visualization of individual bacteria (A-D2), and 3D rendering shows bacteria adhering selectively to different locations along the crypt-villus axis on an individual villosa measuring 500  $\mu\text{m}$  (A-D3).

Blir det et porøst membran og PDMS støtte lagt til. Dette blir så bundet før man preller av støtte. Øvre lag + porøst membran blir så plasma behandlet. Og dette blir festet til nedre lag som gjør at man får mage-på-en-chip.



## Viser gut on a chip

Et siste eksempel er svulst-på-en-chip og man forsøker å se hvordan det reagerer med immunsystemet og lever.

### Blood-brain barriere (BBB):

er en svært selektiv semi-permeabel membran barriere som separerer det sirkulerende blodet fra det ekstracellulære fluid i sentralnervesystemet. Barrieren er dannet av hjerne endotheliale celler og koblet sammen av tette junctions. For vårt vedkommende er det slik ved medisin levering at BBB stopper 98-100 prosent av medisinen. Det gir opphav til hjernesvulster og degenerative sykdommer.

### Det originale Transwell assay oppsettet:

Celler er seedet i et monolag på en permeabel membran. Transport av dopmolekyler og elektrofysiologi gjennom monolaget. Dette hører visstnok til BBB. Så følger en figur over BBB-på-en-chip. I makro og mikrotisland.

### Hjerte på en chip:

Standardisering av myocytter på chip. Eksempel: fabrikasjon av hjerte på chip substrat. Plasser tape på glasskantene, spincoat PIPA-Am, fjern tape og coate med PDMS. Det gir disse funksjonene:

- Contractility
- Action potential propagation
- Cytoskeletal arkitektur
- Real time overvåking

### Anvendelse av heart-on-a-chip:

Epinephrine respons er i samsvar med forventiningene.

### Mennekse på chip:

