

COMPITI E SUDDIVISIONE FONDI TRA LE UNITÀ DI RICERCA
prot. 2005027857

Coordinatore Scientifico	Alessandra Maria ANDREONI
Ateneo	Università degli Studi INSUBRIA Varese-Como
Titolo della Ricerca	Timing di singoli fotoni di fluorescenza con fotodiodi a valanga per il riscontro sperimentale di dinamiche molecolari di interesse biomedico previste su tempi di 10-100 picosecondi.
Finanziamento assegnato	Euro 117.000
Durata	24 Mesi

Obiettivo della Ricerca

La ricerca punta a migliorare la prestazione di un fotorilevatore al silicio (diodo a valanga a singolo fotone, SPAD) che ci permetterà di studiare, con misure di decadimento della fluorescenza risolto nel tempo, fenomeni inerenti a ricerche avanzate nei campi della tecnologia biomedica e farmacologica, i quali, per la loro rapidità o rarità, sono fuori dalla portata dell'indagine di altri gruppi diversamente equipaggiati. Il nostro SPAD è il cuore del sistema di timing di singoli fotoni già operativo con la più rapida risposta impulsiva disponibile al mondo, circa 30 ps di larghezza a metà altezza (FWHM), corrispondente all'indeterminazione intrinseca nell'innescamento della valanga presentata dal solo rilevatore con una superficie sensibile di diametro 40 micron.

I principali sviluppi possibili nel corso del progetto sono, in ordine cronologico di realizzazione, l'aumento del diametro a 100 micron, conservando il basso tasso di conteggi di buio proprio degli SPAD attuali (poche centinaia di conteggi al secondo) e l'ottimizzazione della loro funzionalità in regime di alto tasso di conteggi (minimo 5 MHz) con tempi morti dell'ordine di 10 ns. L'integrazione degli SPAD con fibre pigtailed per la miglior raccolta e trasduzione del segnale di fluorescenza rappresenta l'ultimo passo in direzione di una completa valorizzazione delle attuali prestazioni di timing. Queste azioni porteranno infatti allo sviluppo di tecniche di timing di singolo fotone dotate non solo di elevatissima risoluzione temporale, ma anche di elevata probabilità di rilevazione e timing dei fotoni di fluorescenza emessi dal campione. Quest'ultima caratteristica è indispensabile per utilizzare il nostro apparato nelle situazioni più interessanti, cioè nella caratterizzazione di composti fotolabili, che sono numerosi in biologia (si pensi alle molecole fotosensibili nell'occhio o a quelle coinvolte nella fotosintesi) e in aree tecnologiche quali la fotografia o la progettazione di farmaci (principi attivi e loro fotoattivazione in sistemi a rilascio localizzato).

L'obiettivo della prima applicazione proposta, che richiede in principio solo risoluzione temporale, è la dimostrazione che variazioni di pochi Angstrom nella distanza donore-accettore in sistemi che esperiscono transfer energetico di risonanza di Forster (FRET) inducono mutamenti nel decadimento della fluorescenza del donore che siamo in grado di quantificare. Questo è un risultato cruciale, applicabile alla ricerca sui composti Black-Hole Quenchers (BHQ), i quali mostrano elevatissima capacità di quenching della fluorescenza del donore via FRET qualora si trovino nelle sue immediate vicinanze. Sonde per il sequenziamento del DNA, costituite da oligonucleotidi doppiamente marcati, in posizioni note, con un fluoroforo donore ed un BHQ, sono state progettate per emettere fluorescenza rilevabile solo se ibridate al bersaglio. Tuttavia una piena affidabilità nell'utilizzo dei BHQ per il sequenziamento, in alternativa ai metodi basati sulla marcatura radioattiva, è subordinata alla misura quantitativa del decadimento della fluorescenza dei donori "quenched", che avviene su tempi molto brevi. Non c'è infatti ancora alcuna dimostrazione sperimentale che la situazione di "intensità di fluorescenza non rilevabile" possa essere univocamente associata allo stato di sonda non legata. Misurando invece il decadimento della fluorescenza del donore in assenza del bersaglio, quando ovviamente la sonda non è ibridata, con risoluzione di 30 ps, siamo in grado di suffragare questa affermazione indipendentemente dalle modificazioni indotte nello spettro di assorbimento dalla presenza del quencher e con una certezza inferiore solo a quella ottenibile con una streak camera a singolo fotone.

Gli studi da effettuare sui complessi Curcumina/Ciclodestrine sono mirati a dimostrare che la Curcumina stessa, molecola estremamente fotolabile, acquista fotostabilità in seguito all'incorporazione in una opportuna ciclodestrina, ma riacquista la sua attività antibatterica fotoindotta se posta a contatto con gel acquosi. L'obiettivo finale del gruppo guidato dalla Prof. Tonnesen (Oslo) è lo sviluppo di un farmaco commercializzabile per una nuova fototerapia delle carie.

Studi di fattibilità in merito a misure che potrebbero rivelarsi utili per la caratterizzazione della sequenza temporale degli eventi che portano al ripiegamento delle proteine costituiscono l'obiettivo della nostra ultima attività nell'ambito del progetto. Siamo convinti che le prestazioni degli SPAD e del sistema di timing che raggiungeremo nel corso del progetto siano le migliori premesse per un risultato positivo. La rilevazione di un decadimento multiesponenziale della fluorescenza in cui ogni componente può essere ricondotta ad uno stadio specifico del processo di folding dovrebbe essere alla nostra portata, vista l'eccellente risoluzione temporale. La debolezza dei segnali che ci troveremo ad acquisire, a causa della scarsa quantità di polipeptidi e mutanti che avremo a disposizione, potrà essere compensata dall'ottimizzazione dell'ottica di collezione e del tasso di acquisizione.

Innovazione rispetto allo stato dell'arte nel campo

Il termine di paragone per i Single Photon Avalanche Diodes (SPAD) sono quelli disponibili nella produzione industriale di PerkinElmer Optoelectronics che, accanto a buone prestazioni (efficienza quantica, ecc.) presentano vari svantaggi: tensione operativa elevata (400V); bassa risoluzione temporale (>250ps) alta dissipazione di potenza e autoriscaldamento; tecnologia di

fabbricazione costosa e dedicata, incompatibile con l'integrazione monolitica con altri dispositivi; limitata affidabilità e vita operativa; ecc.. Gli SPAD planari sviluppati dal Politecnico di Milano (POLIMI) operano con bassa tensione e bassa dissipazione, sono realizzati in tecnologia planare compatibile con integrazione monolitica, sono robusti e affidabili e con altissime risoluzioni temporali (circa 30ps). Nello sviluppo degli SPAD planari e dell'elettronica associata l'unità PoliMi ha da vari anni svolto un'attività pionieristica ed è riconosciuta leader a livello mondiale. Con l'introduzione del concetto di active quenching circuitry (AQC) ha aperto la via all'applicazione pratica degli SPAD e tuttora a ogni SPAD va associato un AQC per poterne sfruttare a pieno le prestazioni. L'evoluzione della tecnologia ci permetterà di sviluppare AQC via via più compatti, affidabili e di uso pratico, fino ad arrivare ad AQC in forma di circuito integrato (iAQC) sui quali vi è ora ampio spazio per progredire, realizzando moduli SPAD-iAQC miniaturizzati, affidabili e ad alte prestazioni.

Moduli compatti per il conteggio e il timing di singoli fotoni sono già stati sviluppati dall'unità POLIMI utilizzando rivelatori SPAD con diametro dell'area attiva pari a 10 - 20 µm. Questi moduli sono stati impiegati con successo in applicazioni laser scanning microscopy, in sistemi per analisi genetiche mediante separazione elettroforetica del DNA in chip di vetro e applicazione della tecnica LIF (Laser Induced Fluorescence), per la misura di tempi di volo di fotoni in mezzi parzialmente opachi a causa dell'alta diffusione (in collaborazione con l'unità UNINSUBRIA). Un modulo viene correntemente utilizzato in un laboratorio di punta nello studio dei comportamenti dinamici di singole molecole di interesse biologico, diretto dal Prof. S. Xie, Harvard University, Department of Chemistry and Chemical Biology. Gli esperimenti richiedono elevatissima sensibilità in misure di fluorescenze con vite medie di qualche decina di picosecondi. Per ottenere la necessaria risoluzione temporale è stato progettato e realizzato un circuito per il prelievo veloce del segnale di corrente di valanga.

Il percorso tracciato dall'Università dell'Insubria di Como (UNINSUBRIA), nel senso di un proficuo utilizzo degli SPAD e dell'elettronica associata, passa per tre applicazioni di frontiera rese possibili dalla rapidità della risposta impulsiva della tecnica di rivelazione (attualmente, risposta all'impulso laser: 34 ps di larghezza a mezza altezza), dalla ridottissima rate dei conteggi di buio, inferiori a 100 Hz, e dall'ampia gamma di frequenze di eccitazione rese disponibili dalle sorgenti laser ad impulsi ultrabrevi (5-10 ps) già in possesso di UNINSUBRIA (Ti:zaffiro e Nd:VAN più armoniche). Il primo filone investigativo concerne l'individuazione dei processi molecolari di stato eccitato responsabili dell'attività antivirale ed antitumorale fotoindotta di derivati della Curcumina, e mira alla progettazione di un farmaco idrosolubile. Il secondo riguarda analisi conformazionali con risoluzione dell'ordine dell'Angstrom su oligonucleotidi di DNA doppiamente marcati con cromofori commerciali e con uno dei cosiddetti black-hole quenchers, oltre alla verifica sperimentale della consistenza di un nuovo approccio teorico al problema della dinamica di transizione conformazionale delle proteine, secondo il quale il processo di ripiegamento (folding) sarebbe guidato dall'accoppiamento di pochi residui fortemente interagenti all'interno della sequenza di aminoacidi.

Criteri di verificabilità

Parte dei criteri di verificabilità che si suggeriscono si basano sulla continuità a lungo termine delle collaborazioni che il progetto innesca e/o rafforza. Infatti, punto di forza di questo progetto è che i due gruppi proponenti hanno coinvolto un certo numero di gruppi collaboratori che partecipano a titolo informale sia alla realizzazione dei dispositivi SPAD (IMM-CNR; Austria Micro System del consorzio Europractice) che all'effettuazione di esperimenti interdisciplinari (Prof. H. H. Tonnesen, Dip. di Farmacologia, Università di Oslo; Prof. R. A. Broglia, Dip. Di Fisica, Università di Milano). Ci aspettiamo poi che i risultati siano facilmente diffusi in una varietà di comunità scientifiche. Adirittura prima di iniziare la nostra attività di ricerca nel progetto, abbiamo già ricevuto espressioni di interessamento da utilizzatori dei rivelatori (Prof. Alexander Sergienko, Università di Boston, MA) e da gruppi di fotobiologi (Prof. Joan Roberts, Fordham University, New York City, NY) che hanno proposto applicazioni rispettivamente all'ottica quantistica ai pigmenti della visione. I colleghi dell'Università di Milano, che hanno modellizzato il protein folding individuando le LES, desiderano formalizzare la collaborazione se gli studi di fattibilità qui contenuti avranno successo. Proprio in questo campo i partecipanti del POLIMI si avvalgono della prestigiosa collaborazione con il gruppo di biochimici guidato dal Prof. X. Sunney Xie all'Università di Harvard.

In conclusione, più che il numero di articoli pubblicati, poiché entrambi i gruppi coinvolti vantano elevati tassi di pubblicazione, il parametro sulla cui base giudicare il successo del progetto nel suo complesso potrà essere il numero e la qualità delle nuove collaborazioni che avrà dischiuso.

Elenco delle Unità di Ricerca

Sede dell'Unità	Università degli Studi INSUBRIA Varese-Como
Responsabile Scientifico	Alessandra Maria ANDREONI
Finanziamento assegnato	Euro 66.600

Compito dell'Unità

Il gruppo UNINSUBRIA ha un ruolo principale nelle applicazioni del timing super-veloce di singoli fotoni con i diodi SPAD. Per tutte le applicazioni verranno utilizzati impulsi di eccitazione provenienti dalle armoniche dei due laser mode-locked, Nd:VAN e Ti:zaffiro di cui il gruppo dispone. Tuttavia nelle fasi iniziali lavorerà allo sviluppo del sistema di rivelazione/misura.

Fase 1, mesi 0-4 Sara' valutata l'efficienza quantica degli SPAD con aree attive di diametro pari a 50, 75 e 100 micron in funzione della sovratensione alle lunghezze d'onda disponibili dalle citate sorgenti laser. Verranno corrispondentemente determinate le risoluzioni temporali ottenibili nella catena di timing di singoli fotoni. I fotorivelatori a questo livello di sviluppo saranno utilizzati

negli esperimenti sulle sonde di DNA marcate con il donatore di fluorescenza, D, ed il black-hole quencher, BHQ.

Fase 2, mesi 0-6 Verso la fine di questa fase, si caratterizzeranno quanto a risposta temporale e rate massima di conteggio i moduli rivelatori di singoli fotoni che includono tutta l'elettronica necessaria in maniera integrata (circuiti di polarizzazione del rivelatore, generatori delle tensioni necessarie al corretto funzionamento dell'iAQC, sistema di controllo di temperatura a doppio stadio Peltier, scheda elettronica veloce per il prelievo del segnale di valanga).

Fase 3, mesi 6-9 Il modulo sviluppato verrà installato all'interno del set-up di misura ed utilizzato per le misure sulle sonde di DNA marcate con D e BHQ in condizioni di FRET massimamente efficiente (al limite del minimo valore dell'efficienza quantica di fluorescenza) - per le misure sui complessi Curcumina/Ciclodestrina in soluzione acquosa.

Fase 4, mesi 9-15 Gli SPAD prodotti da IMM-CNR verranno collaudati e caratterizzati sperimentalmente, come fatto in Fase 1 e 2 per le versioni precedenti di rivelatori e moduli.

Fase 5, mesi 12-18 Verificheremo l'effettiva possibilità di operare a 1 MHz di rate di fotoni rivelati utilizzando la nuova scheda di acquisizione dei dati di timing. Saranno quindi possibili gli esperimenti sui campioni a bassa assorbanza per la luce di eccitazione, come i complessi Curcumina/Ciclodestrina in ambienti in cui siano fotostabili. Potremo iniziare anche il lavoro sui polipeptidi doppiamente marcati cioè con le due coppie di accettore/donore.

Fase 6, mesi 18-24 UNINSUBRIA riceverà il modulo finale basato sui rivelatori SPAD ottimizzati ed accoppiati con fibre pigtail che risulterà ottimale per l'esecuzione degli esperimenti ove ci si aspetta una rate di fotoni emessi estremamente bassa, o a causa della scarsa densità di molecole che emettono o perché la loro fotolabilità impone di eseguire le misure facendo assorbire al campione la dose minima di luce di eccitazione. Gli esperimenti riguarderanno:

(1) la caratterizzazione dei percorsi responsabili della attività fotosensibilizzata di complessi Curcumina/Ciclodestrina in differenti ambienti ed alla presenza di diversi substrati,

(2) la caratterizzazione degli stadi del ripiegamento di proteine.

Sede dell'Unità	Politecnico di MILANO
Responsabile Scientifico	Ivan RECH
Finanziamento assegnato	Euro 50.400

Compito dell'Unità

Il gruppo POLIMI ha come ruolo principale quello di progettare e realizzare SPAD che soddisfino i requisiti imposti dalle ricerche di UNINSUBRIA. Anzitutto occorre migliorare la tecnologia di fabbricazione degli SPAD, realizzando un processo di "gettering" efficace anche sull'ampia area sensibile richiesta. Inoltre POLIMI dovrà studiare e valutare approfonditamente l'effetto dell'elevato campo elettrico nella giunzione del dispositivo SPAD sul tasso di generazione termica e sulla sua dipendenza dalla temperatura. Infatti dati sperimentali recentemente ottenuti da POLIMI fanno ritenere che graduando opportunamente il valore del campo massimo sia possibile non solo ridurre il tasso di conteggio di buio, ma anche accentuare la sua velocità di diminuzione al diminuire della temperatura. Quest'ultimo aspetto, se confermato, risulterebbe di notevole importanza pratica, poiché permetterebbe di far operare il rivelatore con un tasso di conteggio di buio ulteriormente ridotto grazie a un moderato raffreddamento, ottenibile in condizioni operative con dispositivi Peltier. Per lo sviluppo della tecnologia degli SPAD e per la loro fabbricazione, POLIMI opererà in stretta collaborazione con un laboratorio tecnologico (Laboratorio LAMEL, Istituto IMM-CNR, sezione di Bologna). Questo laboratorio è dotato di una linea per la completa fabbricazione di dispositivi in silicio su wafer da 4 inches. I suoi ricercatori hanno nel campo delle tecnologie microelettroniche competenze scientifiche riconosciute a livello internazionale e consolidata esperienza, maturata in una attività pluriennale. Un primo run di dispositivi SPAD con aree attive di grande diametro (fino a 100 μm) è stato già portato a termine nell'ambito di precedenti programmi di ricerca in collaborazione con IMM-CNR. Benché non ottimizzati per le applicazioni previste, alcuni di questi SPAD, opportunamente selezionati, potrebbero essere utilizzati in una fase preliminare del progetto, per mettere a punto sia la parte elettronica del modulo di rivelazione che l'ottica di raccolta e focalizzazione della fluorescenza.

La realizzazione di moduli rivelatori di fotoni per il progetto, oltre allo sviluppo dei dispositivi SPAD detti, richiede la realizzazione di "Active-Quenching Circuit" AQC, necessari per il funzionamento degli SPAD in condizioni ottimali, ovvero con una sovratensione controllata, un tempo di hold-off ben definito e breve, al fine di consentire un alto tasso di conteggio (> 5 MHz), tempi di quench e reset inferiori a 10 ns. Saranno realizzati AQC monolitici (iAQC), che garantiscono la massima possibilità di miniaturizzazione del modulo di rivelazione.

Al fine di ottenere l'altissima risoluzione temporale richiesta sarà inoltre necessario sviluppare una scheda elettronica veloce per il prelievo del segnale di corrente di valanga. Si tratta di un circuito in grado di estrarre l'informazione temporale dell'istante di arrivo del fotone dalla primissima parte del fronte di corrente, dove il jitter temporale dovuto ai meccanismi di propagazione della valanga è ancora trascurabile. Il gruppo di ricerca di POLIMI è già possessore di un brevetto internazionale sulla tecnica impiegata per il prelievo del segnale.