



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

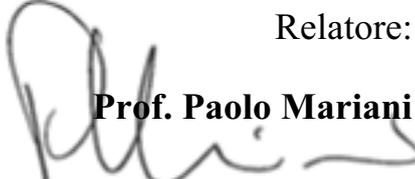
**POLIMERIZZAZIONE DI FRAMMENTI DI DNA MEDIANTE L'USO
DI UN AGENTE NON ENZIMATICO: UN CUT & PASTE
ABIOTICO?**

**POLYMERIZATION OF DNA FRAGMENTS BY A NON-
ENZYMATIC AGENT: AN ABIOTIC CUT & PASTE?**

Candidata:


Valentina Marini

Relatore:


Prof. Paolo Mariani

Sessione estiva 2021

Anno accademico 2020-2021

Sommario

Scopo della tesi	4
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Il contesto prebiotico	7
1.2 Proprietà chimico fisiche del DNA	9
1.2.1 Struttura del DNA.....	9
1.2.2 Disposizione elicoidale.....	11
1.3 Stati di aggregazione della materia	11
1.4 DNA e cristalli liquidi (LC)	14
1.5 Reazione di polimerizzazione tramite la molecola di EDC	16
2. MATERIALI E METODI	17
2.1 Preparazione dei campioni	17
2.1.1 Soluzione di DNA ad alto peso molecolare.....	17
2.1.2 Soluzione di DNA a basso molecolare.....	18
2.1.3 Sonicazione.....	19
2.1.4 Precipitazione del DNA.....	21
2.2 Materiali aggiunti al sistema	22
2.2.1 PEG (polietilen-glicole).....	22
2.2.2 EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimide cloridrato).....	23
2.2.3 GMP (5'-guanosina monofosfato).....	24
2.2.3 Spettrofotometria.....	26
2.3 Elettroforesi su gel di agarosio	29
2.4 Transilluminatore-UV	31
3. RISULTATI SPERIMENTALI	35
3.1 Analisi dei dati della reazione dell'EDC in acqua	35
3.1.1 Valutazione della cinetica della reazione di idrolisi dell'EDC.....	35
3.2 Analisi dei dati dell'elettroforesi sul gel di agarosio	42
3.2.1 Analisi dati del DNA.....	43
3.2.2 Analisi dati dell'interazione tra DNA e EDC.....	50
3.2.3 Analisi dei dati dell'interazione tra DNA-PEG-EDC.....	60
3.2.4 Analisi di microscopia AFM.....	79
4. CONCLUSIONI	97
Bibliografia	101

Scopo della tesi

Questa tesi ha come obiettivo lo studio della capacità di frammenti di DNA di polimerizzare in condizioni di scarso o medio affollamento molecolare, in vista di una possibile rilevanza nel contesto della formazione primordiale delle catene di acidi nucleici nel mondo prebiotico. Nella cellula, la polimerizzazione del DNA avviene attraverso la DNA ligasi, un enzima che è in grado di legare due frammenti che hanno subito una rottura: la ligasi catalizza infatti la formazione di legami covalenti fosfodiesterici tra nucleotidi di DNA adiacenti andando a legare quindi l'estremità 3'-OH di un nuovo tratto di DNA con l'estremità 5'-P del tratto precedentemente sintetizzato. Al fine di avere una rappresentazione del mondo prebiotico, in questa tesi la polimerizzazione è stata fatta avvenire usando un legante chimico non-enzimatico, chiamato EDC. Studi precedenti hanno già dimostrato la formazione di catene di acidi nucleici a partire da oligonucleotidi piuttosto corti in condizioni di elevato affollamento e, soprattutto, in fasi acquose segregate. In particolare, l'ordinamento molecolare dei corti oligomeri all'interno dei domini segregati, grazie al quale le regioni terminali vengono a trovarsi così vicine da diventare siti di legame per la polimerizzazione, è stato considerato essere essenziale per la formazione delle catene più lunghe. Lo scopo di questa tesi è verificare la possibile polimerizzazione di frammenti di DNA anche quando le lunghezze sono molto differenti e con un elevato o grado di disomogeneità, ovvero quando la segregazione all'interno di fasi ordinate non è più possibile.

Per ottenere dei campioni che garantissero queste caratteristiche, è stato utilizzato un DNA ad alto peso molecolare, frammentandolo attraverso un processo di sonicazione. Lo stato di frammentazione è stato caratterizzato mediante una analisi elettroforetica, che ha permesso di evidenziare quale fosse

effettivamente la lunghezza delle catene di DNA per i diversi tempi di sonicazione. Le miscele ottenute sono state poi trattate con EDC, attivando il processo di possibile polimerizzazione dei frammenti a temperature differenti e per tempi di reazione entro le 24 ore. Si noti che la molecola di EDC agisce sugli ossigeni dei fosfati esterni alla struttura del DNA, consentendo l'elongazione grazie alla formazione di legami fosfodiesterici.

Lo studio si è svolto a differenti livelli: per prima cosa si è studiato il comportamento dell'EDC in acqua sia a temperatura ambiente 25°C, che a temperature più alte come 37°C e 50°C. Come risultato è stata valutata la cinetica di reazione e la trasformazione di EDC nel prodotto finale che è l'EDU una volta che la molecola ha reagito con l'acqua. Successivamente, si è valutato l'effetto dell'EDC su piccoli frammenti di acidi nucleici in soluzione, osservando se avvenisse o meno la formazione del legame fosfodiesterico con gli ossigeni esterni del DNA dopo 24 ore. La stessa cosa è stata fatta in condizioni "affollate" (crowded), utilizzando soluzioni contenenti PEG ad alto peso molecolari e a concentrazioni diverse tra il 25% e il 40%. Misure di elettroforesi hanno permesso di quantificare il risultato della reazione di polimerizzazione, e la presenza di lunghe catene di DNA dopo azione dell'EDC è stata anche confermata con misure di Microscopia a Forza Atomica.

Come risultato generale, il PEG ha mostrato interferenza nella totalità della reazione, perché attraverso il controllo osmotico dell'attività dell'acqua all'interno del sistema ha determinato segregazione del DNA e formazione di fasi liquido-cristalline; generalmente a concentrazioni più basse di PEG, in cui più molecole di acqua sono a disposizione del DNA, l'effetto dell'EDC è meno visibile, dato che aumenta anche il disordine della struttura generale e quindi ci si allontana dalla fase liquido-cristallina ordinata. Così come la concentrazione di PEG, anche la temperatura ha lo stesso effetto, solo che in questo caso

maggiore è la temperatura maggiore è la destabilizzazione della fase liquido cristallina e quindi minore la capacità di EDC di riformare lunghi filamenti. Si può notare come l'uso della molecola abiotica insieme al PEG a temperatura ambiente favorisce maggiormente la polimerizzazione delle sequenze frammentate permettendo quindi di ottenere una sequenza più lunga, rispetto al comportamento dell'EDC ad una temperatura di 55°C, che tende a non facilitare la reazione nel processo di polimerizzazione dei frammenti.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il contesto prebiotico

Capire come è avvenuta la prima comparsa di biomolecole in una terra abiotica è da sempre stato oggetto interessante di studio.

Supponendo che tutti i componenti degli acidi nucleici fossero già disponibili nell'era prebiotica questi, avrebbero potuto assemblarsi per poter formare i polimeri dando origine a molecole più complesse come DNA e RNA.

Spiegare la formazione di legami fosfodiesterici tra i nucleotidi è stato utilizzato come punto di partenza per la costruzione di queste molecole.

L'autoassemblaggio spontaneo dei frammenti di DNA di pochi nanometri di lunghezza, in ordinati cristalli liquidi può guidare la formazione di legami chimici che legano insieme le catene corte di DNA a formare delle catene più lunghe, senza l'ausilio di meccanismi biologici.

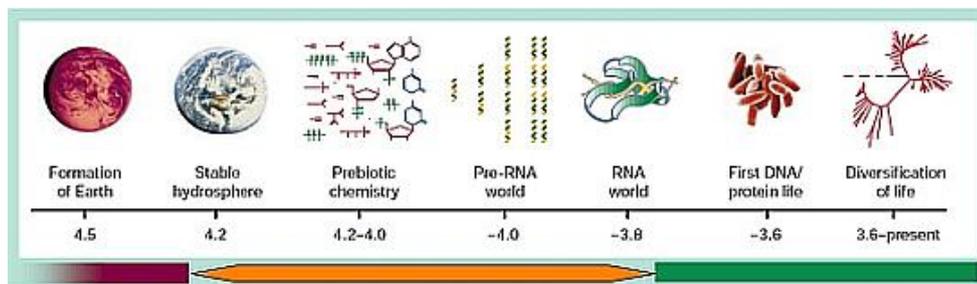


Figura 1 Linea temporale

Le prime cellule chiamate “protobionti” dovevano essere molto semplici rispetto alle cellule odierne altamente strutturate, abbastanza semplici da potersi auto assemblare spontaneamente in un ambiente terrestre che forniva solo determinati fattori chimici e fonti di energia necessari.

Esperimenti precedenti hanno dimostrato come la formaldeide e l'acido cianidrico sono dei prodotti che si formano spontaneamente dall'azione di una scarica elettrica su una miscela di gas metano, ammoniaca e acqua andando probabilmente a determinare l'insieme delle componenti prebiotiche come basi azotate e zuccheri.

Studi più recenti hanno preso in considerazione un altro fattore come la temperatura.

Infatti, la temperatura di 100°C determina una reazione molto più rapida rispetto ad una temperatura mite che si poteva trovare in età primitiva.

Nel corso di quasi un secolo molti scienziati a partire dalle prime scoperte di Miesher fino al lavoro di Watson e Crick si è giunti a comprendere la struttura del DNA.

Nel 1869 il biochimico svizzero Friedrich Miesher individuò per la prima volta una sostanza microscopica contenuta nel pus di bande chirurgiche utilizzate, la chiamò *nucleina* proprio perché era localizzata al livello del nucleo.

Successivamente nel 1919 Phoebus Lavene individuò la struttura del nucleotide, composta da base azotata, zucchero e fosfato e che il DNA fosse costituito da un filamento di nucleotidi legati tra loro proprio attraverso i fosfati.

Ma solo nel 1953 James Watson e Francis Crick presentarono sulla rivista Nature il primo modello della struttura del DNA: a doppia elica.

Struttura resa visibile grazie ad esperimenti di diffrazione di raggi X su fibre di DNA.

Il DNA (acido desossiribonucleico) contiene le informazioni che si trasmettono da una generazione all'altra ed è presente in tutti gli organismi viventi, rappresentando l'impronta genetica che identifica ciascuna persona.

1.2 Proprietà chimico fisiche del DNA

I nucleotidi che compongono il DNA sono acidi forti: in seguito alla liberazione del protone assumono carica netta negativa attorno al residuo fosfato. Ogni base azotata possiede una parte idrofobica ed una idrofilica. La parte idrofilica è coinvolta nel legame con il solvente e con la base con cui si accoppia, mentre quella idrofobica è coinvolta nell'interazione di stacking. Lo scheletro zuccheri-fosfati interagisce con il solvente e, oltre che ad avere un ruolo di primaria importanza nel definire la geometria delle molecole di solvente e ioni circostanti, previene anche l'intrusione dell'acqua nella centrale occupata dallo zucchero e dalle basi, rafforzandone l'ambiente idrofobico.

1.2.1 Struttura del DNA

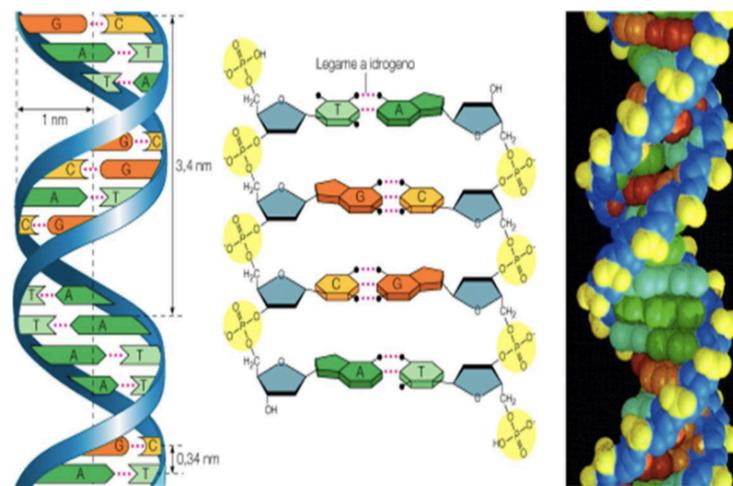


Figura 2 Struttura DNA

Il DNA è costituito da un lungo polimero di unità che si ripetono chiamate nucleotidi. La catena ha una larghezza tra 22 e i 26 Angstrom (da 2.2 a 2.6 nanometri) ed ogni unità nucleotidica è lunga 3.3 Angstrom (0.33 nm). Negli organismi viventi è presente sotto forma di doppio filamento avvolto a formare la doppia elica che è quella che gli conferisce maggiore stabilità. Il senso di avvolgimento dei due filamenti è destrorso.

Ogni nucleotide è il risultato dell'unione di tre elementi:

- Base azotata, purinica (A e G) o pirimidinica (C e T)
- Uno zucchero a 5 atomi di carbonio
- Un gruppo fosfato

Nei nucleotidi che costituiscono il DNA, lo zucchero è sempre il desossiribosio mentre le basi azotate sono: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T).

Sono presenti due tipi di interazioni tra i nucleotidi delle due catene del DNA: l'accoppiamento delle basi (pairing) e l'impilamento delle basi (stacking).

Gli accoppiamenti delle basi azotate non sono casuali ma sono condizionati dalle dimensioni delle stesse e dal numero di legami a idrogeno che si possono formare tra di loro.

Mentre l'impilamento è un legame attrattivo non covalente tra i nucleotidi adiacenti e serve a dare stabilità all'intera catena del DNA.

I due polinucleotidi che costituiscono il DNA a doppia elica sono opposti l'uno rispetto all'altro, le loro estremità zucchero-fosfato sono antiparallele. Ciò significa che la catena zucchero-fosfato di un filamento scorre nella direzione da 5' a 3', mentre l'altra scorre nella direzione da 3' a 5'.

1.2.2 Disposizione elicoidale

Tutte le basi azotate sono molecole piatte fortemente idrofobe, diventano solubili in acqua una volta attaccate ad uno zucchero e ad un fosfato per formare il nucleotide; affinché la molecola sia stabile in acqua a pH neutro le basi dovranno disporsi al centro di una struttura piegata in modo tale da evitarla; mentre i fosfati e gli zuccheri si dispongono nella parte esterna a contatto con l'acqua.

La torsione dell'elica si ha come conseguenza del comportamento delle basi che ruotano rispetto al piano dell'asse allontanandosi da quest'ultimo, ma in senso opposto alla rotazione e quindi si forma la struttura simile a un'elica.

1.3 Stati di aggregazione della materia

Tutto ciò che ha massa ed occupa spazio è definito materia. In fisica generalmente si preferisce utilizzare il concetto di massa, energia e particella.

La materia tende ad occupare uno spazio che non può essere occupato contemporaneamente da un altro oggetto, definita infatti impenetrabile.

È importante determinare le sue proprietà microscopiche come, la conoscenza delle interazioni e delle forze che agiscono, per poi andare a determinare le sue proprietà macroscopiche.

La materia in risposta a differenti condizioni termodinamiche come, ad esempio, temperatura e pressione si presenta in diverse fasi o stati della materia:

- Fase solida: stato più stabile, caratterizzato da un ordine ben definito delle molecole sia dal punto di vista tridimensionale che posizionale e le molecole non possono cambiare la posizione che occupano.
- Fase liquida: le particelle sono libere di muoversi ma sono comunque soggette a forze di attrazione sia dovute ad interazioni intermolecolari che a forze di attrazione elettrostatica reciproca, in questo caso si adattano facilmente al recipiente che li contiene.
- Fase gassosa: le particelle qui invece sono dotate di una grande mobilità occupando tutto il volume a disposizione. Non hanno né forma né volume proprie quindi sono comprimibili.
- Fase liquido cristallina: le sostanze non passano direttamente dalla fase liquida a quella solida, ma in particolari condizioni sono in grado organizzarsi in fasi intermedie (mesofasi) che presentano entrambe le caratteristiche. Le particelle presentano gradi di libertà differenti all'interno del sistema. Nel caso del cristallino i gradi sono fortemente correlati tra loro cosa che non accade nello stato liquido. I cristalli liquidi si distinguono ulteriormente in termotropici e liotropici. Per i primi il parametro di controllo principale della transizione dallo stato isotropo a quello liquido cristallino è la temperatura, per i secondi sono tanto la concentrazione quanto la temperatura.

La fase liquido cristallina presenta anche essa diverse fasi:

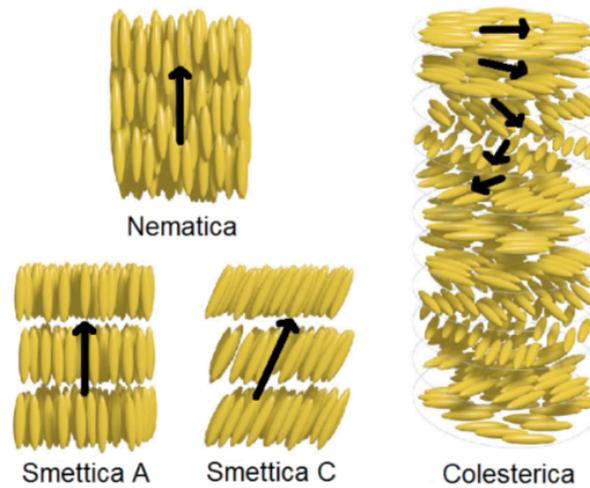


Figura 3 Fasi LC [14]

- Nematica (N): dove le particelle si presentano con orientazione fissa e il suo asse di allineamento è definito *nematico*. La distribuzione spaziale dei centri di massa è come nel caso isotropo dove c'è totale assenza di ordine del sistema perché la fase N è fluida, quindi in assenza di polarità le particelle hanno uguale probabilità di trovarsi in una certa orientazione o in quella opposta.
- Colesterica: è una fase tipica di particelle che sono dotate di chiralità così come viene definita chirale la molecola di DNA a doppia elica. In questo caso il sistema è caratterizzato da un'asse di torsione, presenta delle proprietà interessanti dal punto di vista termico e ottico.
- Smettica: le particelle sono caratterizzate da orientazione e da un ordine lamellare, ovvero da piani fissi che sono perpendicolari al piano

nematico. Esistono diverse tipologie di fasi smettiche: la smettica A (i piani sono ortogonali all'asse nematico) e la smettica C (i piani ortogonali sono obliqui rispetto all'asse nematico), ma smettica C* (composto da molecole chirali). È possibile ottenere una fase smettica di tipo colesterico dove le particelle appartenenti ai diversi piani ruoteranno in maniera uniforme intorno a un certo asse di torsione mostrando una rotazione spiraleggiante.

- Colonnare: le particelle si dispongono sui vertici di un esagono perpendicolarmente all'asse nematico e le orientazioni delle particelle seguiranno l'asse nematico.

Viene perso però l'ordine tipico del caso smettico: infatti le particelle non seguono l'ordine lamellare e non sono parallele all'asse nematico. Quindi un sistema molto più simile al caso cristallino.

1.4 DNA e cristalli liquidi (LC)

Studi che risalgono agli anni 1950-1960 hanno dimostrato la presenza di fasi liquido-cristalline del DNA, caratterizzato da una fase chiamata *mesofase* proprio perché mantiene delle caratteristiche intermedie tra lo stato liquido e lo stato solido. È una caratteristica propria di quei composti che sono dotati di una forma *anisotropa*.

Quando l'elemento costitutivo è chirale, come nel caso del DNA, la fase nematica può trasformarsi in colesterica (N*).

Successivamente attraverso l'uso della microscopia ottica polarizzata e dallo scattering a raggi X sono state individuate due fasi liquido cristalline: la nematica chirale e la colonnare.

Si parla di fase nematica se si prende in considerazione l'elevata lunghezza di persistenza delle doppie eliche del DNA dove, in questa situazione la doppia elica può essere idealizzata come una barra rigida. Proprio su questo argomento, Osanger per la prima volta spiegò la transizione da isotropa a nematica considerando il DNA come barre rigide che manifestano l'ordine liquido-cristallino a determinati valori di pressione e temperatura.

Si parla di aste rigide perché si fa riferimento ad oggetti di studio che non esercitano alcuna forza l'uno sull'altro fino a quando non si toccano, a quel punto invece intervengono le forze di repulsione. Il sistema è entropico quando ci si trova in una fase isotropa dove gli orientamenti delle aste sono ugualmente probabili.

Considerando sistemi cilindrici duri, a valori di densità piuttosto alti ci si aspetta una transizione di fase dalla nematica a quella smettica di tipo A.

Come dimostrato da Livolant, nel DNA la fase smettica è sostituita da quella colonnare a causa della presenza di flessibilità e polidispersità del DNA.

Variazioni di temperatura e concentrazione di sali determinano una variazione dell'ordinamento liquido-cristallino.

All'aumentare della temperatura diminuisce questa fase perché vengono meno le interazioni tra le estremità end to end dei frammenti e hanno dimostrato che nonostante le colonne siano disposte in maniera disordinata l'una rispetto all'altra i frammenti di DNA non si rompono proprio perché l'energia termica è troppo bassa per rompere l'impilamento tra le basi che costituiscono i frammenti.

1.5 Reazione di polimerizzazione tramite la molecola di EDC

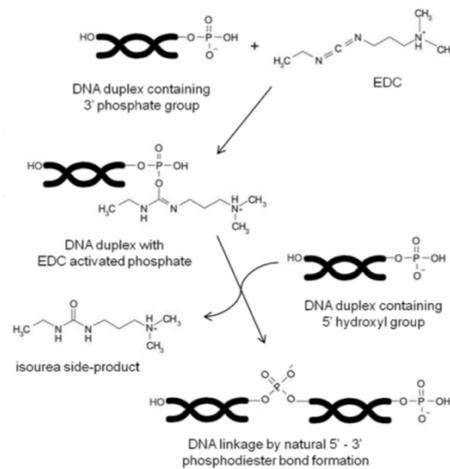


Figura 4 Schema di reazione dell'EDC (Fraccia et al 2015)

L'1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimide cloridrato (EDC) è una molecola carbodiimide in grado di far avvenire una reazione di polimerizzazione tramite la formazione di legami fosfodiesterici. In particolare, nel caso del DNA agisce sugli ossigeni dei fosfati esterni alla struttura del DNA, attivandoli e determinando la formazione di un legame di tipo covalente con l'ossigeno di un gruppo fosfato immediatamente successivo a quello considerato. In questo modo, utilizzando frammenti di DNA di lunghezza variabile ottenuti tramite sonicazione si può pensare di far avvenire l'elongazione dei singoli frammenti di acido nucleico. Quindi, tramite l'utilizzo di questa molecola abiotica condensante in questo lavoro di tesi, è stato possibile dimostrare un miglioramento della fase liquido cristallina del DNA in quanto migliorano allo stesso tempo l'efficacia dei legami che si instaurano, migliorando di conseguenza la propria stabilità di fase.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Preparazione dei campioni

Sono stati preparati dei campioni con una concentrazione di 2mg/ml suddivisi successivamente in provette diverse in base alle tempistiche della sonicazione effettuata.

Per ogni campione preparato sono state valutate 3 diverse reazioni dopo 24h:

- DNA+PEG
- DNA+PEG+EDC 25°C
- DNA+PEG+EDC 55°C

2.1.1 Soluzione di DNA ad alto peso molecolare

Il DNA utilizzato per la maggior parte degli esperimenti è stato il DNA di salmone ad alto peso molecolare: Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon sperm.

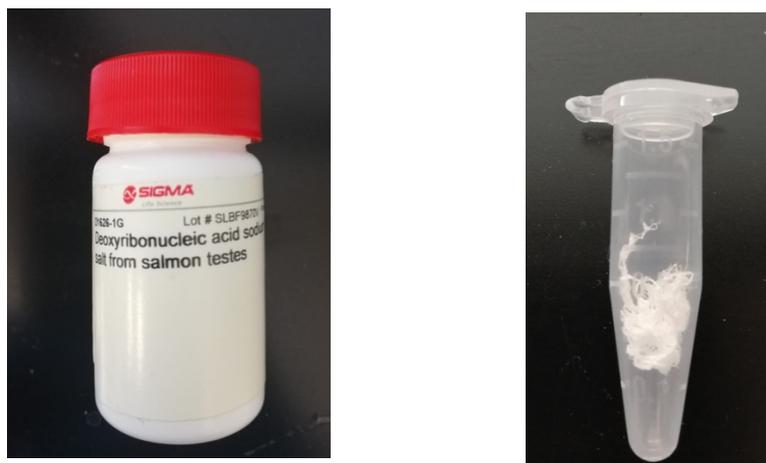


Figura 5. DNA alto peso molecolare

In particolar modo è stato applicato per lo studio delle interazioni chimico-fisiche attraverso l'uso di un agente legante come l'EDC.

È di aspetto bianco e di consistenza solida, una volta solubilizzato in acqua o nella soluzione tampone il suo aspetto varia da bianco a trasparente.

Lo studio si basa principalmente sulla determinazione dei frammenti diversi che compongono il DNA ottenuti dopo aver sonicato il campione e individuati attraverso la loro migrazione nel gel di agarosio.

Quindi, il DNA una volta pesato, è stato solubilizzato all'interno della soluzione tampone TE buffer a pH 7.4 (Tab.1)

Il TE buffer è composto da:

		cf
Tris/Hcl	pH 7.4	10 mM
EDTA	pH 8.0	1 mM

Tab.1 TE buffer

2.1.2 Soluzione di DNA a basso molecolare

Il DNA a basso peso molecolare utilizzato è stato: Deoxyribonucleic acid, low molecular weight from salmon sperm.



Figura 6. DNA basso peso molecolare

Si presenta come una polvere liofilizzata, di colore marrone chiaro che diventa trasparente una volta solubilizzata in acqua.

Il suo utilizzo è avvenuto principalmente per poter fare un confronto sull'efficacia dell'agente abiotico sulle strutture esterne del DNA rispetto a quello che è stato frammentato meccanicamente mediante l'ausilio del sonicatore.

Anche questo risultato è stato poi osservato attraverso la corsa elettroforetica.

2.1.3 Sonicazione

Il passaggio successivo dopo aver ottenuto una soluzione omogenea di DNA è la tecnica della sonicazione.

Lo strumento che è stato utilizzato è Elmasonic Easy 10/H Ultrasonic Cleaner



Figura 7. Strumento utilizzato per la sonicazione del DNA

Il principio sul quale si basa la sonicazione è la generazione di vibrazioni meccaniche attraverso l'utilizzo della corrente elettrica ad elevata frequenza prodotta da un generatore. Gli ultrasuoni generati vengono trasmessi in una

vaschetta contenente ghiaccio o acqua che può essere anche impostata a diverse temperature, causando altri fenomeni fisici nei liquidi, creando le condizioni necessarie per favorire le reazioni chimiche. Il più importante di questi è la *cavitazione*: la formazione ed il collasso delle bolle in un liquido. Le bolle gassose esposte agli ultrasuoni assorbiranno l'energia meccanica dell'onda, di modo che le onde elastiche si possano espandere. Lo sviluppo della cavità dipende dall'intensità del suono. Quindi appena si inizia a formare una bolla di cavitazione, le molecole di gas o le stesse molecole di liquido iniziano a diffondere nel vuoto creato nella zona a pressione inferiore. Più cresce la bolla più diventa negativa la pressione al suo interno accelerando il processo di diffusione di gas al suo interno in quanto con l'aumento delle sue dimensioni, aumenta la sua superficie (l'interfaccia tra il vuoto e il liquido circostante). La combinazione di questi fattori contribuisce alla diffusione delle molecole nella bolla di cavitazione: maggiore è il gas disciolto nel liquido maggiore sarà la diffusione di gas all'interno della bolla di cavitazione durante la sua crescita.

Il risultato è che qualsiasi gas che si è diffuso nella bolla di cavitazione non può sfuggire totalmente indietro nel liquido prima della definitiva implosione della bolla. Qualsiasi gas residuo nella bolla agisce smorzando l'intensità della implosione.

È l'implosione della cavità che crea un inusuale substrato per le reazioni chimiche.

La compressione di un gas genera calore. Quando le bolle di cavitazione implodono in liquidi irradiati, la loro compressione è così rapida che una piccola quantità di calore viene dissipata dalla cavità durante il suo collasso.

Il liquido circostante ancora freddo provvederà a raffreddare la cavità

riscaldata, così, viene prodotto un punto caldo (*hot-spot*) ma di breve durata localizzato in un liquido freddo.

Dunque, la cavitazione serve come un mezzo per concentrare l'energia diffusa del suono in una forma chimicamente utile.

Il DNA attraverso il taglio ultrasonico viene frammentato in maniera precisa in varie lunghezze a seconda delle tempistiche adottate senza l'utilizzo di sostanze chimiche ma solo attraverso l'utilizzo di forze puramente meccaniche.

2.1.4 Precipitazione del DNA

La precipitazione è una tecnica di estrazione degli acidi nucleici: avviene perché l'alcool, rispetto al DNA, è assai più affine all'acqua, per cui l'acqua che circonda il DNA mantenendolo in soluzione viene sequestrata dall'alcool ed il DNA, non più idratato e non essendo solubile in alcool, precipita.

È una tecnica composta di una serie di passaggi al fine di ottenere un pellet costituito da frammenti di DNA prodotti tramite sonicazione a tempi diversi.

Una volta avvenuta l'evaporazione dell'etanolo, il sedimento risulta secco e di colore bianco, prelevabile per ulteriori analisi, come nel nostro caso attraverso l'uso di PEG ed EDC.

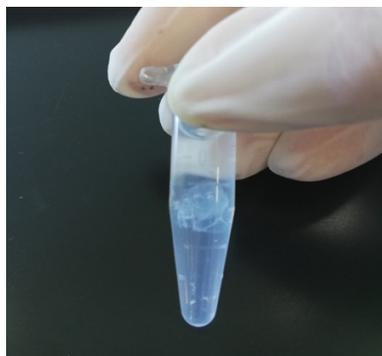


Figura 8 Soluzione di acetato di sodio ed etanolo con DNA alto peso molecolare

- Procedimento per effettuare la precipitazione:
 1. regolare la concentrazione dei Sali della soluzione di partenza con acetato di sodio (3M, pM =82.0, pH 5.2) aggiungendone 1/10 del volume totale
 2. aggiungere il doppio del volume di etanolo puro freddo
 3. lasciare la soluzione over night a -80°C
 4. centrifugare a 14.000 rpm per 30 minuti a 4° C
 5. lavare aggiungendo etanolo all'80%
 6. centrifugare a 14.000 rpm per 15 minuti a 4° C
 7. far asciugare il pellet sottovuoto per 30 minuti

2.2 Materiali aggiunti al sistema

2.2.1 PEG (polietilen-glicole)

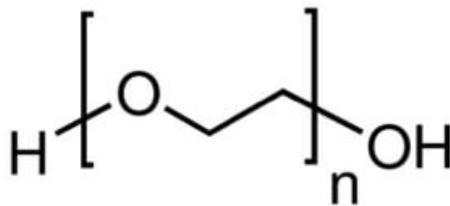


Figura 9. polietilen-glicole (PEG)

È un polimero formato per polimerizzazione dell'ossido di etilene. È solido ed è solubile in acqua. Le sue proprietà fisiche come ad esempio la viscosità, varia in base alla concentrazione che viene utilizzata: a valori bassi è liquido,

mentre al crescere della quantità pesata può presentarsi come un solido ceroso.

La pressione osmotica è alla base della sua attività, infatti è stato utilizzato per controllare la concentrazione di acqua presente all'interno del nostro sistema di DNA, così da poterne studiare la sua struttura.

A seconda delle diverse percentuali di PEG è possibile variare il quantitativo di acqua e controllare l'organizzazione generale del sistema.

Il PEG è stato aggiunto al prodotto della precipitazione ed è stato controllato dopo 24 h.

2.2.2 EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimide cloridrato)

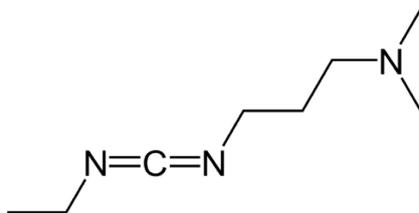


Figura 10. EDC

Si presenta come un solido bianco, con peso molecolare di 191,70 g/mol, cristallino, igroscopico.

Viene utilizzato per la sua velocità di reazione e quindi per poter osservare i risultati in tempi brevi. La quantità utilizzata per poter verificare la sua attività viene calcolata prendendo in considerazione la lunghezza delle basi del DNA sonificato, considerando che deve essere dalle 10 alle 50 volte superiore alla quantità di DNA. (Todisco et al 2018).

Per verificare la sua attività, al di sopra del pellet di DNA ottenuto dalla precedente precipitazione viene quindi posta una miscela composta da EDC sciolto all'interno di una soluzione madre di PEG e fatta reagire per 24h. Un'altra caratteristica che riguarda questa molecola abiotica è la sua efficacia come agente disidratante comunemente usato nella sintesi di ammidi, esteri ed anidridi o nella sintesi di peptidomimetici. Il suo prodotto trasformato in un mezzo acquoso, cioè idrolizzato è l'EDU.

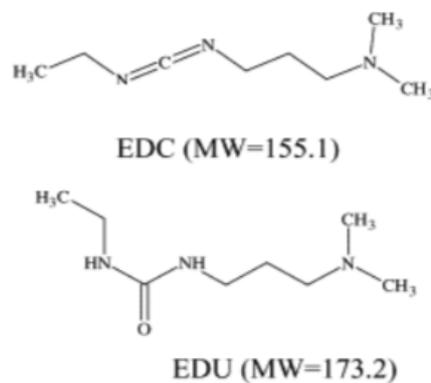


Figura 11. EDC, in alto, e la sua forma idrolizzata, l'EDU, in basso.

La sua cinetica di reazione è stata monitorata per 2-3 giorni consecutivi a 25°C-37°C-50°C attraverso l'utilizzo di uno spettrofotometro.

2.2.3 GMP (5'-guanosina monofosfato)

La 5'-guanosina monofosfato (GMP, definita anche acido guanilico) è un nucleotide composto dalla guanina (base azotata purinica), a cui è attaccato un anello di ribosio mediante un legame N-glicosidico e a cui a sua volta si lega un gruppo fosfato. Si presenta con un basso peso molecolare (363.22 g/mol).

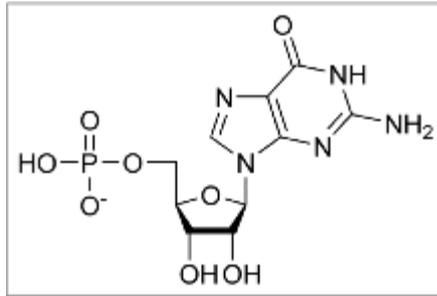


Figura 12. 5'-Guanosina monofosfato (GMP)

- La *guanosina* (G) è nucleoside, il cui peso molecolare corrisponde a 283.24 g/mol.

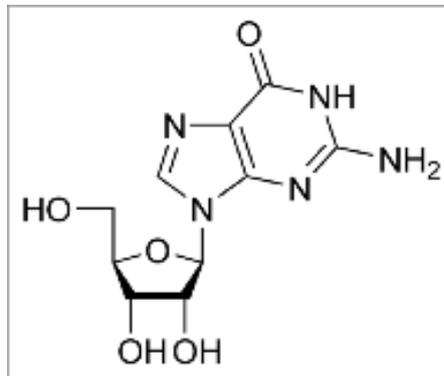


Figura 13 Guanosina (G)

La differenza tra GMP e G è la seguente:

- La GMP è altamente solubile a pH neutro, non forma un gel autonomamente ed è dotata di carica negativa;
- La G è insolubile e priva di carica.

la base azotata contenuta nel 5'-guanosina monofosfato è dotata di una singolare proprietà: è l'unica in grado di formare legami idrogeno di tipo Hoogsten con altre basi uguali ad essa, quindi altre guanine. In tal modo si giunge alla formazione dei cosiddetti *G-quartets* (G4), unità cicliche planari assimilabili a dei "dischi".

2.2.3 Spettrofotometria



Figura 14. Spectrophotometer LLG-uniSPEC 2.

È in grado di effettuare analisi quali-quantitative attraverso una sorgente luminosa e le onde elettromagnetiche a seconda della frequenza e relativa lunghezza d'onda vengono suddivise in base allo spettro elettromagnetico. Il fotometro è il dispositivo che determina l'intensità come funzione della lunghezza d'onda della radiazione luminosa.

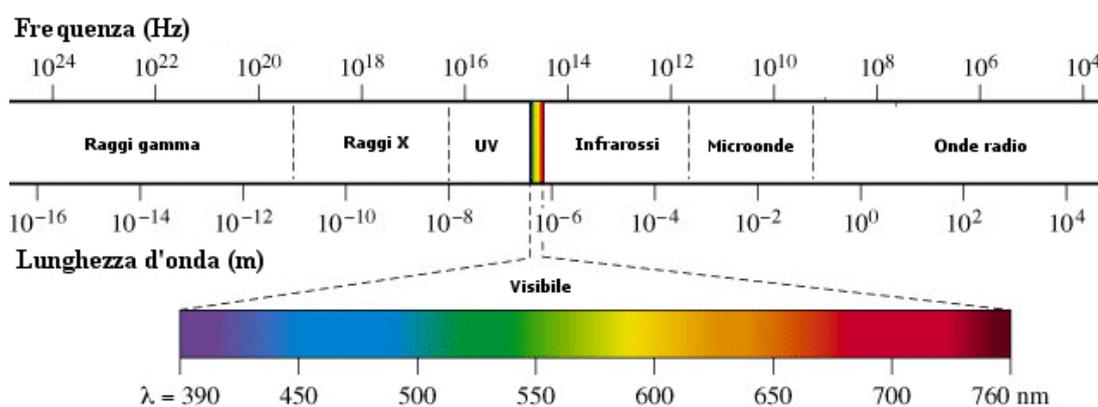


Figura 15. spettro elettromagnetico

Con in nostri occhi noi siamo in grado di vedere solo le radiazioni comprese tra 760 nm e 390 nm, il cosiddetto “spettro visibile”. Generalmente quando la luce colpisce un oggetto, lo possiamo vedere di un certo colore: questo è dovuto al fatto che le componenti dell'oggetto, o i pigmenti che lo ricoprono,

sono in grado di assorbire determinate sequenze, mentre altre vengono riflesse e sono quelle che giungono ai nostri occhi. Per esempio, un oggetto rosso assorbirà delle frequenze blu/ viola e rifletterà quelle giallo/rosso, un oggetto nero è in grado di assorbire tutte le radiazioni rispetto ad uno bianco che invece le riflette tutte.

Il principio dello spettrofotometro è proprio questo, la capacità della luce di essere assorbita, a diverse frequenze, dalle sostanze chimiche o biologiche.

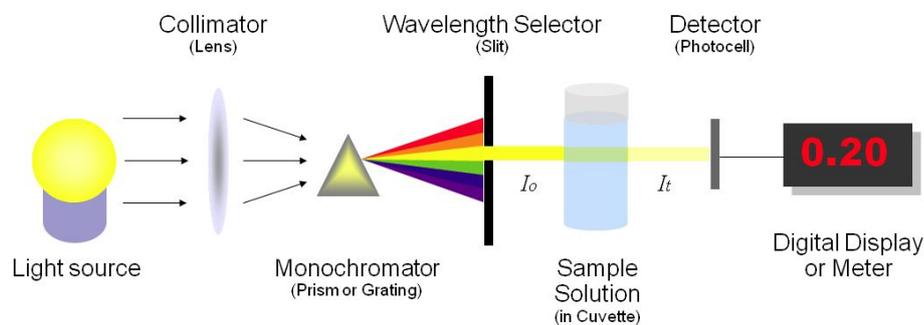


Figura 16. componenti di cui è costituito lo spettrofotometro

La sorgente di luce, generalmente nell'UV/visibile, genera luce che viene filtrata da un monocromatore in grado di lasciar passare una singola lunghezza d'onda (nel nostro caso impostata tra 300-190 nm). Questa radiazione passa attraverso una particolare provetta chiamata *cuvetta*. Il raggio luminoso quindi passando attraverso il campione sarà in parte assorbito determinando una differenza di intensità luminosa tra raggio incidente e raggio trasmesso ma la frequenza e la lunghezza d'onda sarà la stessa. Poi un detector determinerà l'intensità della radiazione che vi arriva.

Uno dei parametri importanti che viene determinato dallo strumento è l'*assorbanza*, definita come: $A = \log(I_0/I_t)$

Dove I_0 e I_t sono rispettivamente le intensità di luce trasmessa e iniziale.

Segue la legge principale della spettrofotometria, la **legge di Lambert e Beer** secondo la quale Assorbanza e concentrazione del campione in cuvetta sono linearmente dipendenti.

$$A = \epsilon c l$$

Dove:

- **c**: è la *concentrazione molare (M)* della sostanza nella cuvetta
- **ϵ** : il *coefficiente di estinzione molare* (espresso quindi in $M^{-1}cm^{-1}$), una costante caratteristica per ogni sostanza (varia a seconda della lunghezza d'onda incidente e indica la capacità di quella sostanza di assorbire quella radiazione)
- **l**: il *cammino ottico*, cioè la lunghezza della cuvetta in cm.
Generalmente questa è standardizzata in 1 cm per lato, pertanto può essere trascurata nella formula.

Parte della componente luminosa potrebbe essere bloccata o dispersa in ogni caso anche dalla cuvetta vuota o dal solvente utilizzato, pertanto lo strumento viene in genere tarato a zero di assorbanza (mediante un apposito pulsante lasciando all'interno dello strumento la cuvetta vuota o la cuvetta con il solo solvente).

2.3 Elettroforesi su gel di agarosio

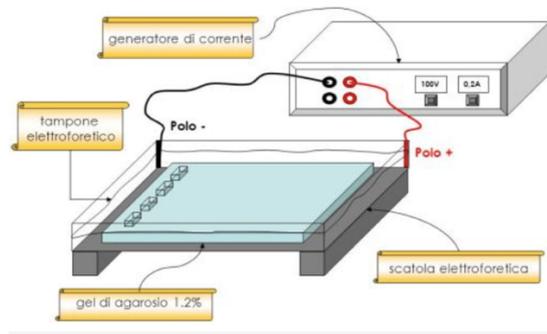


Figura 17. Generatore di corrente e cameretta elettroforetica

La corsa elettroforetica è una metodica di routine che viene utilizzata per analizzare gli acidi nucleici e consente di valutarne l'integrità e di individuare l'estensione dei diversi frammenti ottenuti. In questo caso viene valutato il corretto funzionamento dell'EDC e viene osservato attraverso la sua capacità di riuscire a legare i frammenti di DNA.

Permette la migrazione dei frammenti sfruttandone la carica (come nel caso del DNA che è carico negativamente) in un campo elettrico, attraverso un gel di agarosio come supporto per la separazione.

Il polimero di agarosio contiene gruppi carichi, in particolare piruvato e solfato. Durante la corsa elettroforetica si può assistere all'insorgenza di un fenomeno è la conseguenza di una differenza di carica tra le molecole di acqua del tampone e la superficie del gel (Il tampone utilizzato per questi esperimenti è il TBE 10X). Ciò genera una forza motrice che provoca il movimento verso il catodo degli ioni del tampone che, per un effetto di trascinamento del solvente, portano con sé anche molecole prive di carica. Il gel è un'ottima matrice di lavoro tridimensionale sia per gli acidi nucleici che per le proteine formata da molecole di agarosio elicoidali strutturate in

fasci superavvolti, raggruppati in strutture formanti canali attraverso i quali poi passano le molecole.

I campioni vengono caricati in pozzetti creati nel gel prima della sua solidificazione attraverso l'utilizzo di un pettinino a poca distanza dal margine del polo negativo.

Lo scopo è quello di far correre i frammenti dal polo negativo al polo positivo lungo il gel e districandosi tra le maglie a seconda della loro lunghezza e peso molecolare; quelle più piccole attraversano più velocemente i pori rispetto a quelle più grandi.

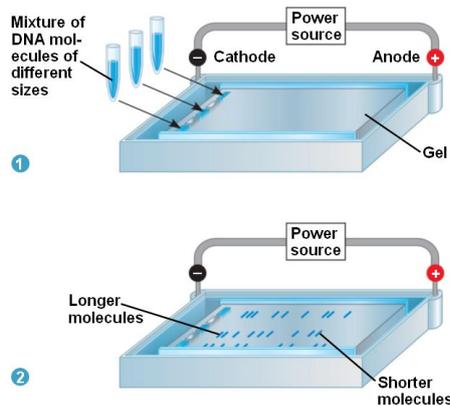


Figura 18: 1) come vengono caricati i campioni nel gel

2) bande ottenute durante la migrazione

Il risultato finale viene visualizzato con illuminazione UV attraverso l'utilizzo di un transilluminatore.

2.4 Transilluminatore-UV



Figura 19. ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad Laboratories)

Lo strumento utilizzato è il ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad Laboratories) che permette di rendere visibili le bande ottenute sul gel di agarosio e anche delle proteine tramite l'emissione di radiazioni UV. Il gel viene posto direttamente sulla superficie a livello della quale passano le radiazioni, per fare un'analisi qualitativa immediata grazie al rilevamento rapido e sensibile della chemioluminescenza.

2.5 Spettroscopia a forza atomica (AFM)



Figura 20 Microscopio AFM-Raman (Horiba Scientific)

Le misure sono state realizzate con il Microscopio AFM-Raman (Horiba Scientific) di cui il DiSVA è dotato.

Il supporto utilizzato è un piccolo dischetto dal diametro di 1 cm, la cui superficie viene ricoperta con della mica. Si dispongono 5 μl di campione sul dischetto e lo si lascia asciugare all'aria prima di effettuare la misura. Il supporto viene adagiato su uno stage guidato da un tubo piezoelettrico che permette lo spostamento del campione lungo i tre assi (x, y, z) con risoluzione micrometrica.

Il microscopio a forza atomica non fa uso di lenti per formare l'immagine, ma si avvale di una sottilissima punta metallica di silicio posizionata all'estremità di una leva flessibile (cantilever) eseguendo così una scansione della superficie del campione. Durante la scansione si stabiliscono deboli forze di interazione tra punta e campione, che determinano una flessione della leva ed una conseguente rivelazione della topografia del campione stesso.

Il sistema ottico è invece costituito da un laser e da un fotodiodo: il laser viene riflesso dal retro del cantilever verso il fotomoltiplicatore che converte l'energia luminosa in energia elettrica e amplifica il segnale in entrata.

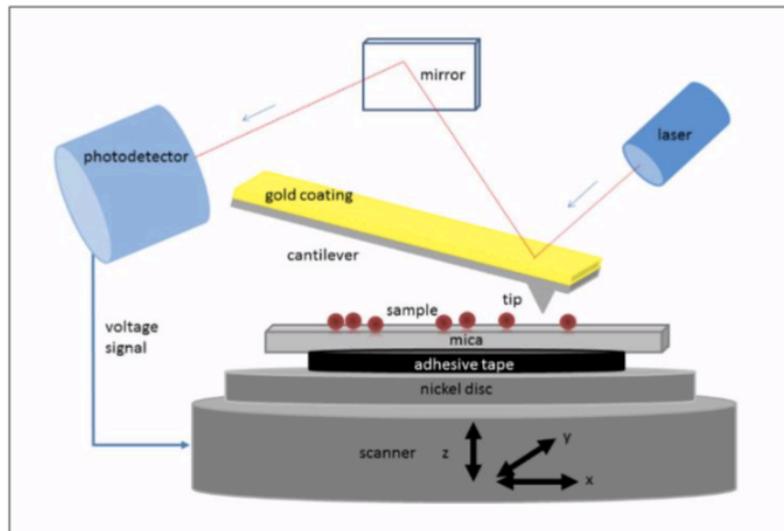


Figura 21 Microscopio AFM-Raman (Horiba Scientific)[15]

Esistono varie modalità con cui può funzionare lo strumento. Le più importanti sono non contact mode, contact mode e tapping mode. Nel primo caso la punta si trova in risonanza con la superficie del campione con il quale interagisce elettrostaticamente. Modulazioni nella superficie del campione produrranno cambiamenti nei legami stabiliti fra la punta e il campione e quindi la punta per mantenere la stessa risonanza sarà costretta a modificare la distanza dal campione. Questi spostamenti sono registrati e utilizzati per la ricostruzione dell'immagine della superficie del campione. Nel secondo modo la punta si trova in continuo contatto con la superficie e del campione sulla quale si muove strisciando, mentre nel terzo caso, la leva viene fatta oscillare ad una frequenza di qualche centinaio di kHz in modo da stabilire un contatto intermittente. Le immagini presenti in questa tesi sono state effettuate in “non contact mode”.

La punta che è stata utilizzata per le misure è una punta siliconica piramidale del raggio di ≈ 8 nm.

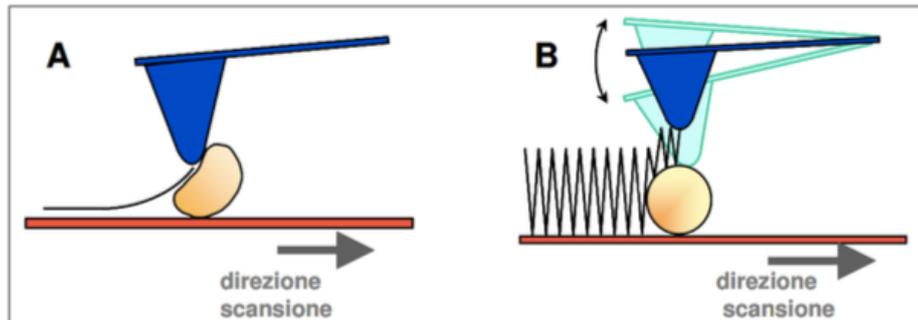


Figura 22. Modalità di scansione del campione: *contact mode* (a) e *tapping mode* (b).

I risultati ottenuti da questo strumento si presentano sotto forma di immagini. Queste possono mostrare l'immagine in funzione della magnitudo registrata dallo strumento, dell'altezza relativa al campione, e in base ad altre caratteristiche. In questa tesi verranno mostrate immagini della morfologia del campione in funzione dell'intensità di segnale e delle altezze. Analizzando le immagini delle altezze è stato possibile verificare le dimensioni degli oggetti, e monitorare le eventuali differenze fra i diversi campioni tramite grafici di altezza e istogrammi di frequenze delle altezze. Tramite i grafici di altezza è possibile scegliere una parte dell'immagine per poterne verificare la dimensione lungo l'asse y, mentre con gli istogrammi di frequenze delle altezze si vanno a calcolare tutte le altezze pixel per pixel registrate dallo strumento e si graficano poi in funzione del numero di conteggi.

3. RISULTATI SPERIMENTALI

3.1 *Analisi dei dati della reazione dell'EDC in acqua*

L'1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) in una soluzione acquosa si comporta come una molecola linker ed il suo comportamento è duplice in base all'ambiente nel quale è posto a reagire. Quando si trova solo in acqua viene idrolizzato in un composto a base di urea denominato N-ethyl-N'-(3-(dimethylamino)-propyl) urea (EDU) e la velocità di reazione viene descritta mediante k_w . Nel momento in cui nella soluzione invece, sono presenti dei gruppi fosfato come quelli presenti esternamente alla struttura del DNA l'EDC li attiva determinando così la formazione di legami fosfodiesterici tra il fosfato attivato e il gruppo ossidrilico (2'-OH) dell'anello del ribosio posto al di sopra e al di sotto del fosfato stesso ma potrebbe anche che si vada a legare al gruppo ossidrilico di un ribosio di un frammento nelle vicinanze.

3.1.1 *Valutazione della cinetica della reazione di idrolisi dell'EDC*

Considerando che la reazione di idrolisi dell'EDC presenta come unico reagente l'EDC stesso, possiamo affermare che si tratta di una reazione di primo ordine. Infatti, la velocità, a temperatura costante, dipende solamente dalla concentrazione dell'unico reagente. Dal punto di vista teorico possiamo descrivere questo fenomeno grazie a delle formule.

La velocità di reazione viene espressa dalla formula seguente:

$$v = k \cdot [\text{EDC}] \frac{-d [\text{EDC}]}{dt}$$

Da cui,

$$\frac{-d [\text{EDC}]}{[\text{EDC}]} = k \cdot dt$$

In queste equazioni compare il termine k che corrisponde alla costante di velocità (l'unità dimensionale è data dal reciproco del tempo, $1/t$). Inoltre, il segno negativo indica che la concentrazione di EDC diminuisce con il procedere della reazione, cioè all'aumentare del tempo. La stessa formula può essere espressa più semplicemente nella forma integrata:

$$-\int_{\text{EDC}_0}^{\text{EDC}} \frac{d [\text{EDC}]}{[\text{EDC}]} = k \int_0^t dt$$

da qui ne deriva:

$$\ln \frac{[\text{EDC}]}{[\text{EDC}]_0} = -k t$$

$$[\text{EDC}] = [\text{EDC}]_0 \cdot e^{-kt}$$

Sia nella forma differenziale che in quella integrata queste equazioni sono note come *equazioni cinetiche* (o *leggi di velocità*).

Per avere una conferma del fatto che si tratti di una reazione di primo ordine, basta riportare in un grafico $\ln [\text{EDC}]$ in funzione del tempo di reazione. Si otterrà una retta che interseca l'asse y, la cui pendenza è in grado di definire il valore del parametro k .

Soffermandoci sui dati ottenuti sperimentalmente, sono stati analizzati per prima cosa gli spettri derivanti l'analisi di spettrofotometria. Sono stati pesati 0.015 gr di EDC e sciolti in 2 ml H₂O di milliQ. Della soluzione madre è stata fatta una diluizione 1:30 per poter ottenere il picco di assorbanza migliore da cui far partire le successive misure.

Si è deciso di valutare in che modo e secondo quali tempistiche l'EDC si trasformasse in EDU ripetendo la misura ogni 60 minuti.

La concentrazione di EDC iniziale si può calcolare sia considerando la legge di Lambert Beer: $A = \epsilon c l$, oppure partendo dai grammi e dal volume iniziale in cui è stato sciolto:

$$m_{EDC} = \frac{m_{EDC} (g)}{MW_{EDC}(g/mol)} = \frac{0.015}{191.70} = 7.83 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

$$M_{EDC} = \frac{n_{edc} (mol)}{V_{H2O} (l)} = \frac{7.83 \times 10^{-5}}{0.002} = 0.039 \text{ M}$$

Anche in questo caso le misure sono state condotte a temperatura ambiente (25°C) e la lunghezza d'onda impostata nello spettrofotometro era compresa tra 190 e 300 nm.

Sono state analizzate tre diverse situazioni in cui era possibile valutare la cinetica di reazione dell'EDC ripetendo la misura per più giorni consecutivi:

1. Temperatura di 25°C per 3 giorni
2. Temperatura di 37°C per 2 giorni
3. Temperatura di 50°C per 2 giorni

Al fine di ottenere dei risultati che ci permettessero di valutare la sua cinetica in condizioni differenti, le misure sono state effettuate a 37°C e 50°C

servendoci quindi di un bagnetto termostato, in modo da mantenere le eppendorf alla stessa temperatura durante tutto il tempo dell'analisi spettrofotometrica.

Per tutte le misurazioni effettuate il campione è stato messo in una cuvetta in quarzo da 1 cm di spessore.

Inizialmente lo spettrofotometro è stato azzerato o “tarato sul bianco” per reimpostare la linea di base dell'assorbanza sul colore di fondo del campione (in questo caso è stato fatto con il solo utilizzo di H₂O milliq) poi è stato spostato il sensore verso la cuvetta che conteneva il campione da analizzare.

Dall'osservazione dei grafici si può osservare anche la presenza di un *punto isosbestico* che si ha quando una miscela costituita da due specie chimiche in equilibrio chimico fra loro ad una determinata lunghezza d'onda. Può essere anche definito in termini di estinzione molare (ϵ): il punto isosbestico è il punto in cui due specie chimiche in equilibrio tra loro hanno la stessa estinzione molare. Al punto isosbestico il valore dell'assorbanza o dell'estinzione molare non dipenderà dal valore della concentrazione delle singole specie, ma dalla somma di queste.

Osservando un grafico d'assorbimento, se sono presenti uno o più punti isosbestici (fig. 2) possiamo affermare che le specie chimiche che hanno generato il grafico sono all'equilibrio tra loro in quel punto preciso.

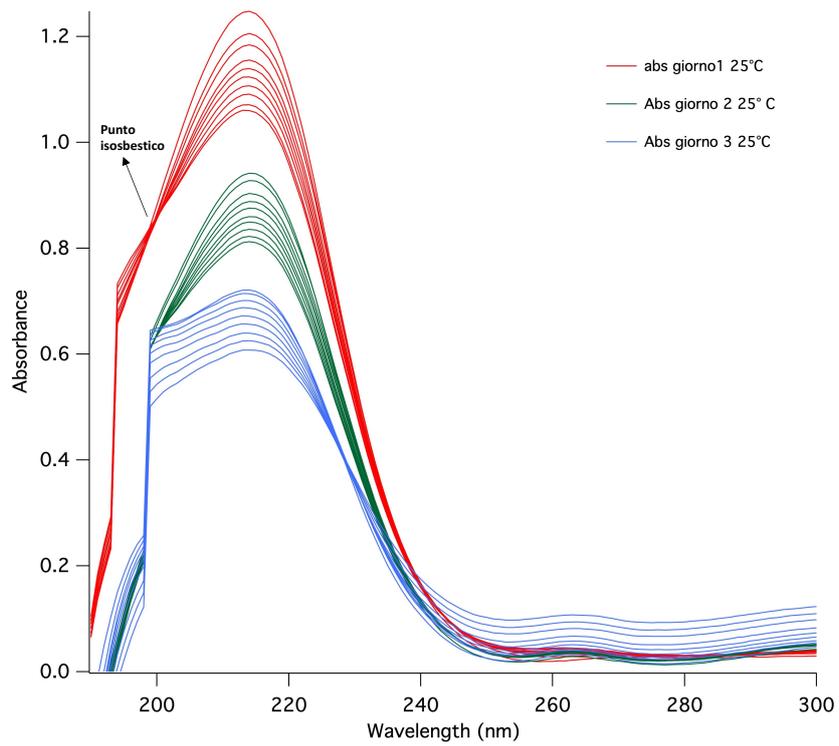


Figura 23 Spettro di assorbimento dell'EDC in acqua a temperatura ambiente (25°C). La reazione è stata monitorata per 3 giorni.

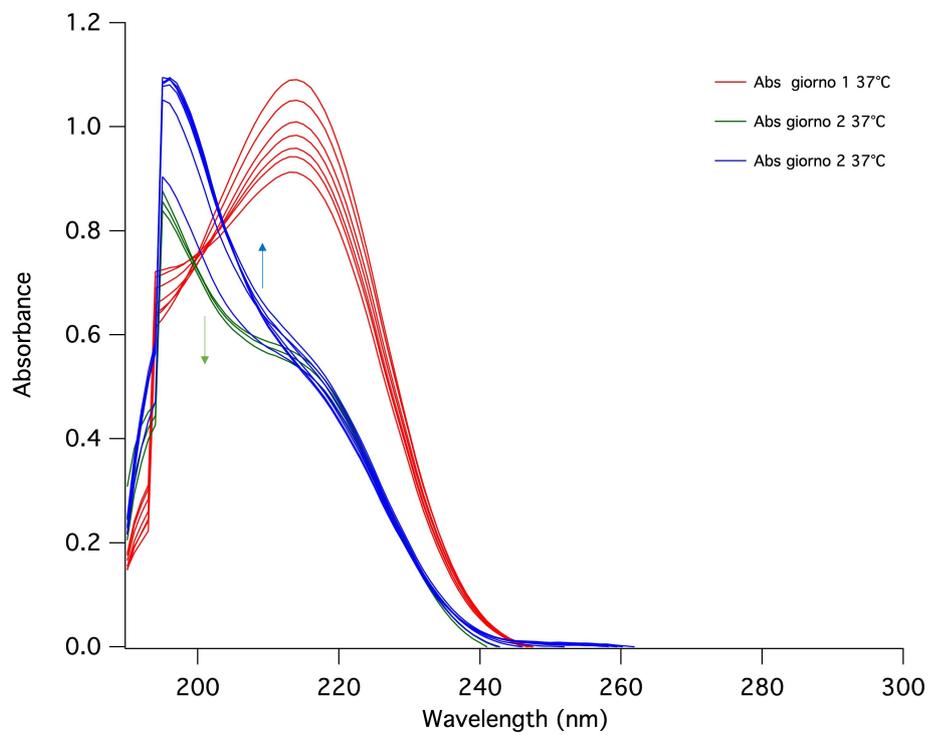


Figura 24 Spettro di assorbimento dell'EDC in acqua a temperatura (37°C). La reazione è stata monitorata per 2 giorni.

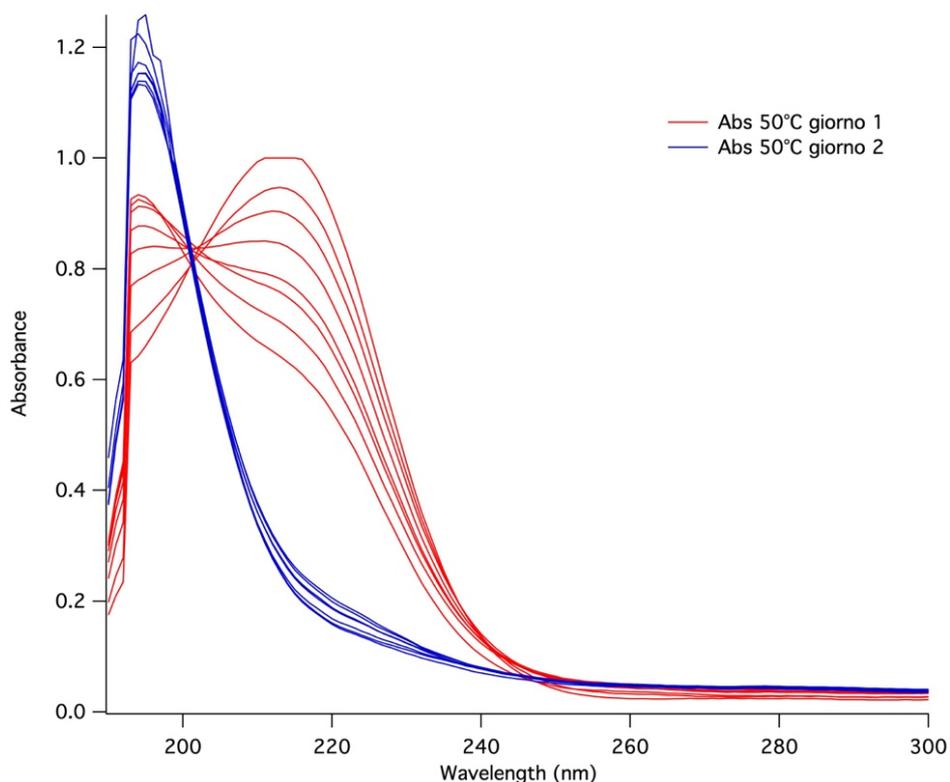


Figura 25 Spettro di assorbimento dell'EDC in acqua a temperatura (50°C). La reazione è stata monitorata per 2 giorni.

Le curve (fig. 23-24-25) sono state ottenute in relazione al valore dell'assorbanza riportata sull'asse delle y e della lunghezza d'onda sull'asse delle x mostrando una diminuzione del suo valore in funzione del tempo. In generale ciò che ci premeva dimostrare era proprio la capacità della molecola abiotica di poter interagire con le molecole di acqua in un tempo relativamente breve, facendo avvenire la reazione a dimostrazione del fatto che questa si trasforma nel suo prodotto finale che è l'EDU.

La reazione è stata studiata anche tramite le formule indicate sopra, al fine di ricavare dei grafici in cui viene espresso il $\ln [EDC]$ sull'asse delle y in funzione del tempo di reazione indicato sull'asse . Tramite l'equazione ricavata dalla retta è stato possibile risalire al valore di k_w .

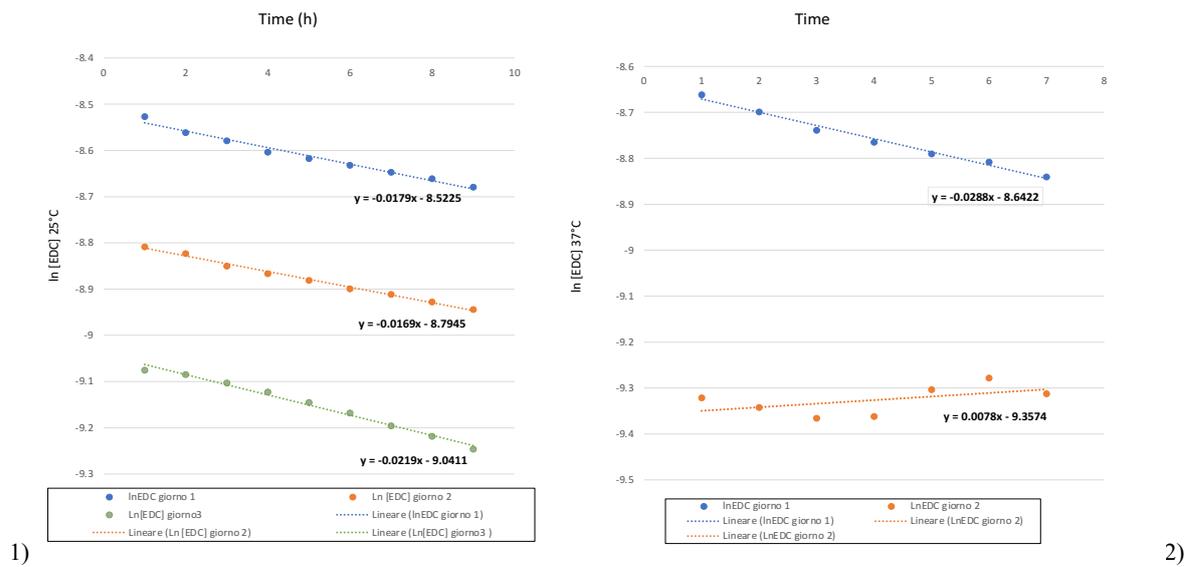


Figura 26: 1) cinetica di reazione dell'EDC monitorata per 3 giorni a 25°C. 2) cinetica di reazione dell'EDC monitorata per 2 giorni a 37°C

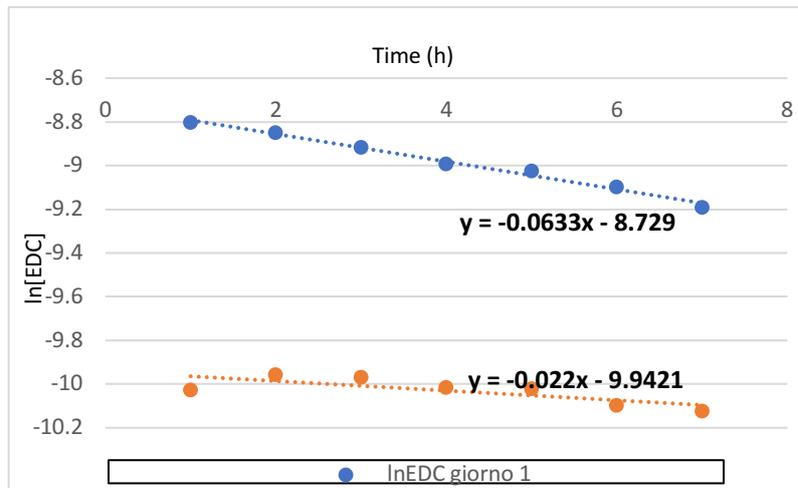


Figura 27 cinetica di reazione dell'EDC monitorata per 2 giorni a 55°C

Dall'equazione ottenuta in tutte le rette, risulta effettivamente che il valore di k_w aumenta all'aumentare della temperatura, quindi di conseguenza aumenta anche la velocità di reazione.

Solo al secondo giorno si può notare come indicato dalla freccia blu (fig.24) un leggero rialzo delle curve di assorbanza nelle ultime misure , determinando poi un discostamento dall'andamento generale delle k_w . Questo si osserva solo alla temperatura di 37°C (tab.2).

k_w (mol·L ⁻¹ · s ⁻¹)	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3
25°C	-0.0179	-0.0169	-0.0219
37°C	-0.0288	0.0078	
50°C	-0.0633	-0.022	

Tab.2. I valori ottenuti della k_w

3.2 Analisi dei dati dell'elettroforesi sul gel di agarosio

L'obiettivo di questa analisi era valutare la capacità della molecola abiotica di creare legami fosfodiesterici con gli ossigeni dei gruppi fosfato esterni alla struttura del DNA al fine di ottenere delle lunghe catene ed i risultati ottenuti sono stati ricavati da corse elettroforetiche a 60V.

Il gel di agarosio permetterebbe l'individuazione dei diversi frammenti e le migrazioni in base al loro peso molecolare quindi, i frammenti più piccoli tendono a trovarsi nella parte in basso del gel rispetto a quelli più lunghi.

Originariamente sono state preparate concentrazioni diverse di gel di agarosio: 2-3-4-5% ma, la migliore concentrazione per poter individuare le corte catene di DNA è risultata quella al 2%.

3.2.1 Analisi dati del DNA

Per la preparazione del gel al 2% è stato pesato 1 gr di agarosio e sciolto in una soluzione tampone TBE 1X.

La soluzione tampone è proprio quella che viene utilizzata nella preparazione di gel elettroforetici di agarosio ed è composta da tris- acido borico-EDTA (TBE 1X).

La soluzione viene posta su una piastra riscaldata fino al completo scioglimento dell'agarosio. Dopo pochi minuti, si aggiungono 3.5 µl di *SYBR safe DNA* che è un colorante per gel fluorescente altamente sensibile.

Dopodiché viene versata rapidamente nella cameretta elettroforetica e si inserisce il *pettine* per permettere la formazione dei pozzetti prima che il gel si rapprenda. Una volta che si è solidificato si procede con il caricamento dei campioni nei pozzetti.

Gli standard utilizzati come riferimento sono stati: Thermo Scientific GeneRuler 1kb (fig. 28.1) e AmpliSize Molecular Ruler 50–2,000 bp Ladder (fig.28.2).

Entrambi servono per avere un confronto, in termini di lunghezza per bp (paia di basi), delle bande che vengono rilevate nel gel attraverso il transilluminatore-UV.

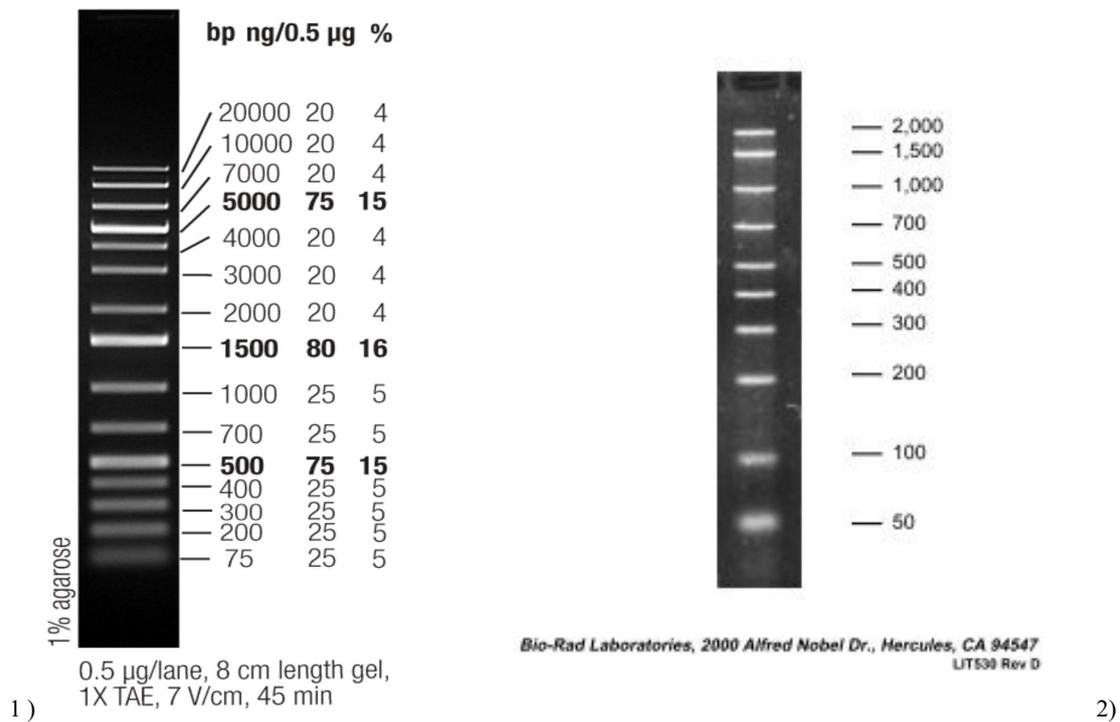


Figura 28: Standard: 1) Thermo Scientific GeneRuler 1kb. 2) Amplisize molecular ruler 50-2.000 bp Ladder

Per poter osservare i dati ottenuti dalla corsa elettroforetica, sono stati caricati in pozzetti diversi, le soluzioni contenenti 5 µl del DNA sonicato e non, più il DNA a basso peso molecolare, aggiungendo in tutti i campioni 5 µl di Blue Juice Gel Loading Buffer (10X) che serve per tracciare facilmente campioni di DNA grazie alla capacità di non oscurare le bande ma di correre al di fuori dei frammenti. Nel primo pozzetto invece sono sempre stati inseriti 4 µl dello standard, il quale viene scelto in base al DNA più o meno frammentato.

Le prove iniziali sono state fatte su frammenti di DNA ad alto peso molecolare sciolto nel TE buffer con concentrazione iniziale di 2 mg/ml. L'analisi è stata valutata però su campioni sonicati a tempi differenti in modo da riuscire ad osservare quanto fossero frammentati rispetto alla situazione di partenza.

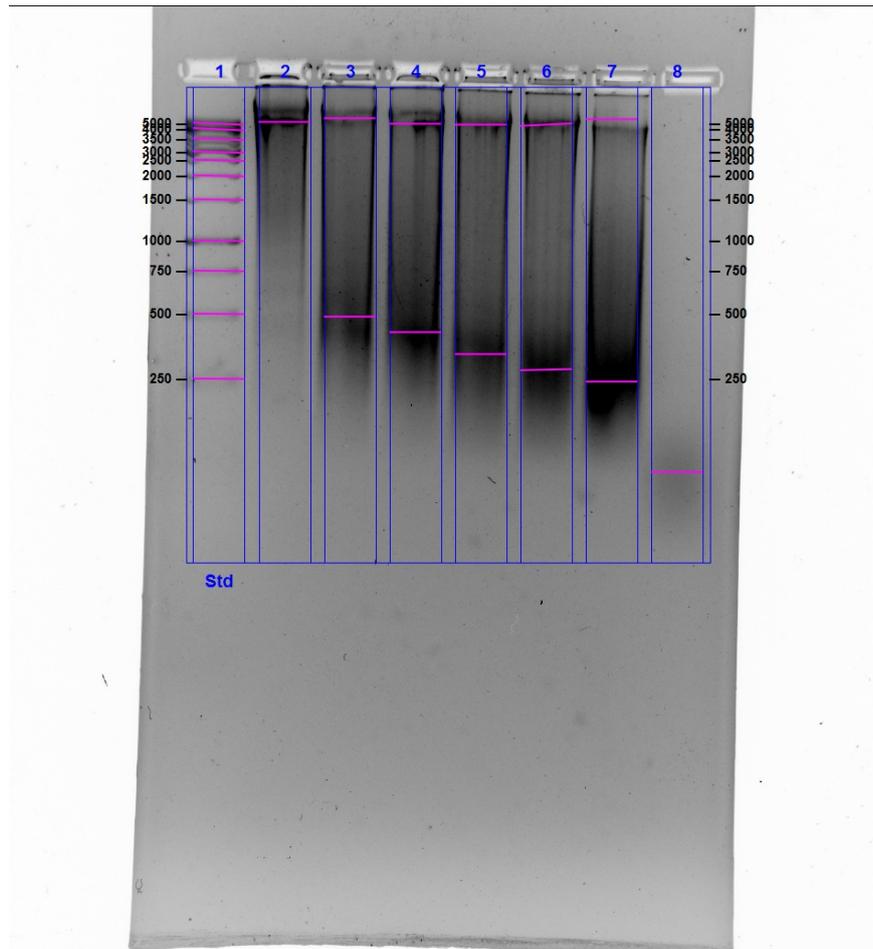


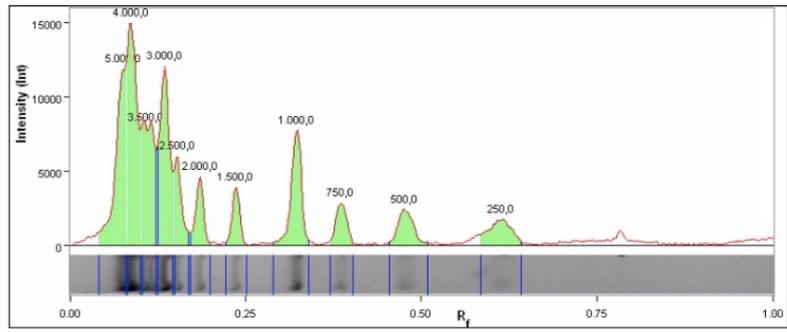
Figura 29 1) standard (fig.26.1) 2) DNA alto peso molecolare, 3) 20' son, 4) 30' son, 5) 40' son, 6) 50' son, 7) 60' son, 8) DNA basso peso molecolare.

Attraverso ulteriori analisi mediante lo stesso programma *Image Lab* che viene utilizzato per l'acquisizione delle immagini al transilluminatore, è possibile individuare e studiare i picchi relativi alle intensità delle bande, che indicano le paia di basi ottenute.

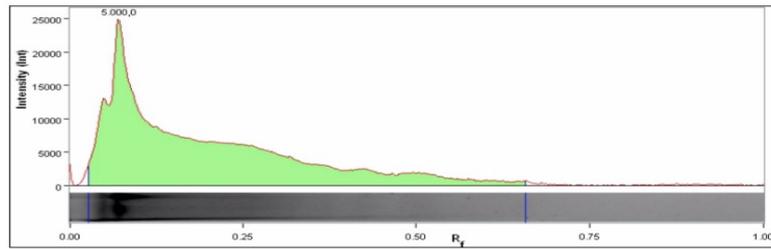
Il "Relative Front" che ha un valore compreso tra 0 e 1, mostra il movimento delle bande dall'alto verso il basso, indicata dalla porzione presa in considerazione che è quella colorata in verde.

Nelle figure 30-31-32 vengono riportate dall'alto verso il basso i picchi relativi alle paia di basi ottenute durante la sonicazione: prima lo standard utilizzato, poi dal picco a 5.000 bp del DNA non sonicato fino a quello ottenuto analizzando il DNA avente un basso peso molecolare.

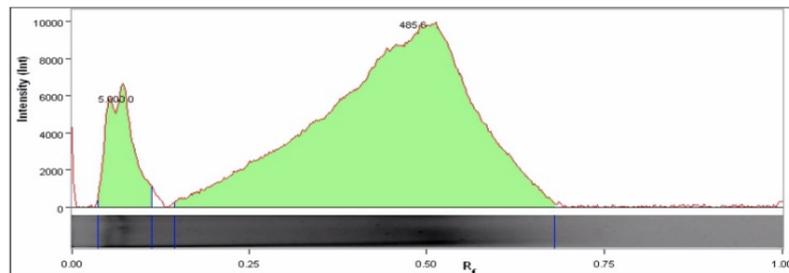
Gli stessi grafici sono stati ricavati considerando le paia di basi ottenute per ogni tempo di sonicazione e dalle immagini indicate si riesce ad osservare come il picco diminuisca all'aumentare del tempo di sonicazione, mostrando quindi che la tecnica è stata eseguita correttamente. Questo risultato rispecchia ciò che si osserva nella figura 29, in cui il DNA costituito da frammenti più piccoli tende a correre più velocemente attraverso le maglie del gel e quindi lo possiamo osservare nella parte più bassa dell'agarosio.



	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	5000	0,077	6.723.192
2	4000	0,088	8.109.920
3	3500	0,110	5.413.240
4	3000	0,110	6.360.816
5	2500	0,154	2.315.432
6	2000	0,187	1.977.136
7	1500	0,237	1.670.032
8	1000	0,323	4.410.728
9	750	0,387	1.756.944
11	250	0,613	2.177.168

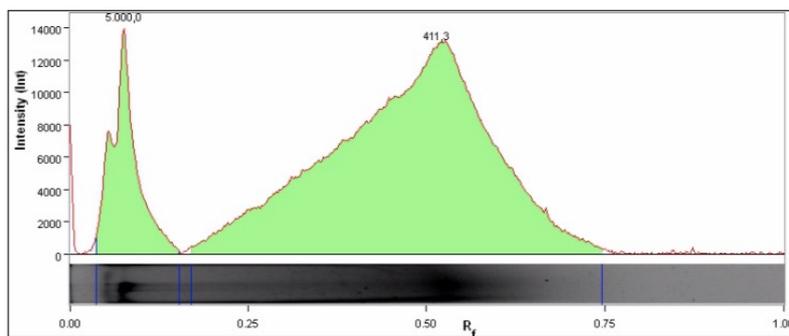


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	5.000	0.073	98.176.008

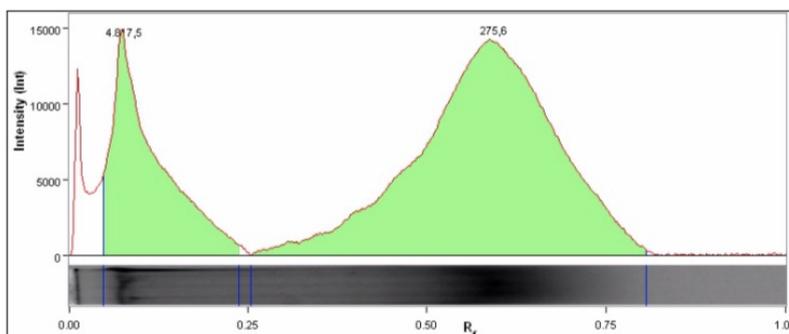


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	485.6	0.483	76.783.896

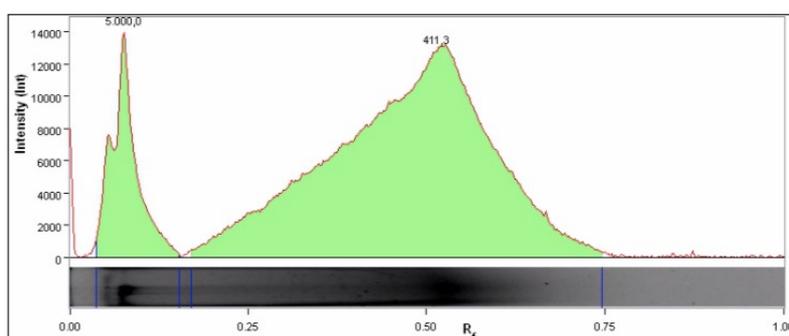
Figura 30



	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	411.3	0.515	107.271.080

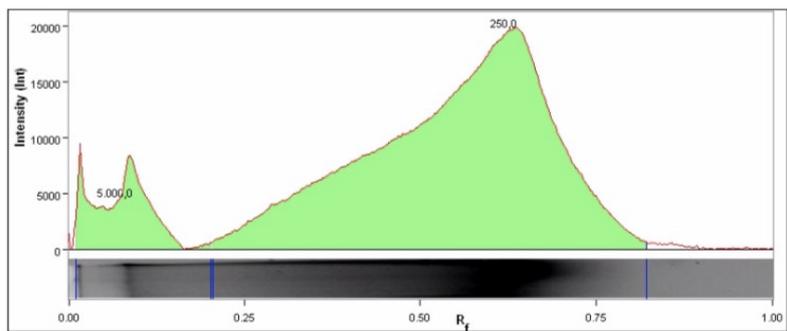


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	325.4	0.562	93.392.152

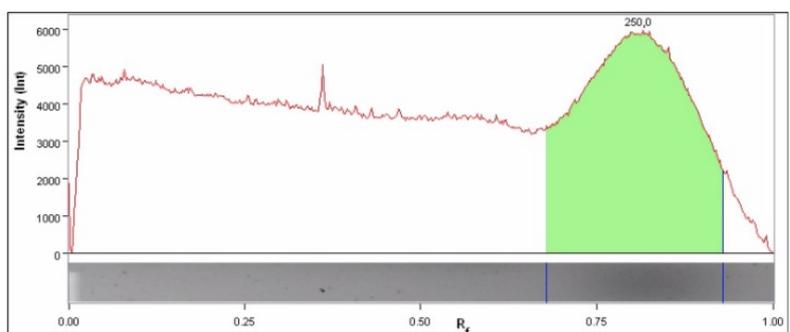


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	275.6	0.594	99.751.624

Figura 31



	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	250	0.619	194.629.624



	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	250	0.810	36.443.400

Figura 32

3.2.2 Analisi dati dell'interazione tra DNA e EDC

Gli stessi campioni preparati per l'analisi precedente sono stati poi utilizzati per valutare la reazione con la molecola abiotica per dimostrare quale fosse la situazione migliore per far avvenire la polimerizzazione del DNA.

I grammi di EDC da pesare all'interno di ogni campione sonicato con un volume finale di 50 μ l sono stati calcolati in base alle paia di basi di cui è composto il frammento posto in analisi, tenendo conto del fatto che il rapporto tra il numero di moli di EDC e DNA deve essere costante e che il peso molecolare medio di una coppia di basi di DNA è 330 pg/pmol.

Abbiamo approssimato il valore della massa (gr) di EDC in eccesso: 0.0004 g in modo da poterli pesare sulla bilancia analitica.

Una volta preparati campioni con la giusta quantità di EDC sono stati fatti reagire per 24 h e degli stessi, sono state preparate due eppendorf diverse: una è stata lasciata a temperatura ambiente (25°C), l'altra nel bagnetto termostato a 55°C.

Il giorno successivo sono stati caricati 5 μ l di ogni campione + 5 μ l di Blue Juice nei pozzetti di gel di agarosio al 2% seguendo lo stesso procedimento dell'analisi indicata precedentemente.

Anche in questo caso la corsa elettroforetica è stata impostata a 60V per 1h 30 minuti.

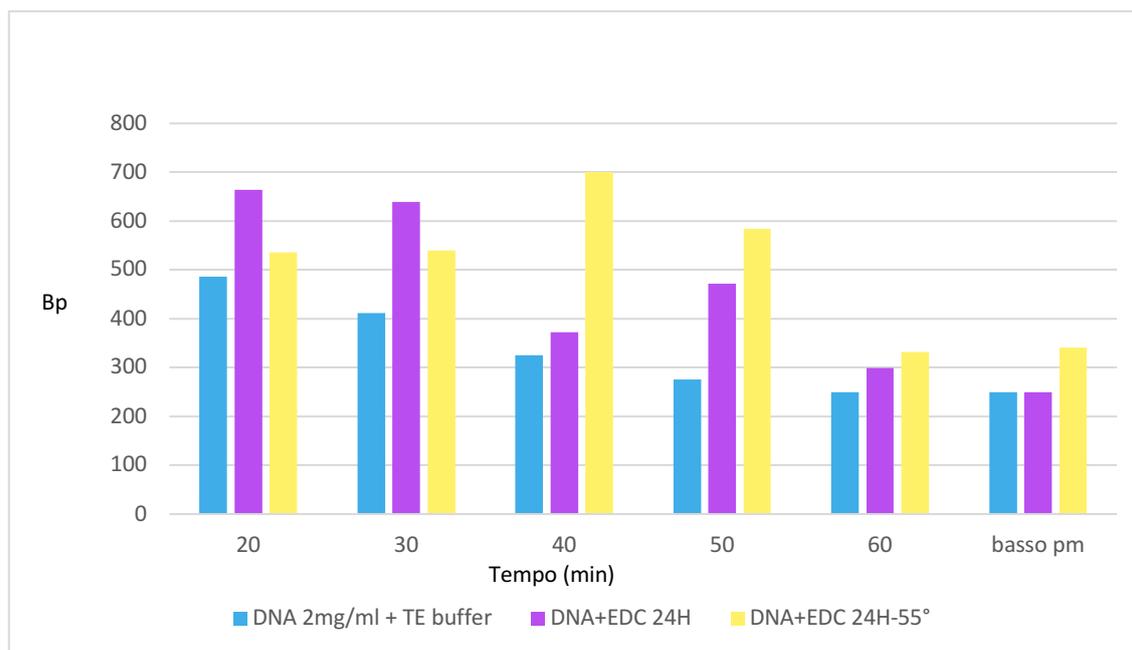


Figura 33 confronto tra DNA nel TE buffer, DNA polimerizzato a 25°C e DNA polimerizzato a 55°C

Il grafico a barre mostrato nella figura 33 ci ha dato la possibilità di analizzare il confronto della polimerizzazione del DNA a temperature differenti relazionando le paia di basi in funzione del tempo. Effettivamente si può notare che nei campioni che sono stati sonicati la reazione di polimerizzazione mediante l'uso di EDC è avvenuta correttamente perché le paia di basi ottenute risultano maggiori e quindi la catena di DNA è più lunga rispetto alla situazione iniziale, senza tralasciare la temperatura che è risultato un parametro fondamentale per poter descrivere l'andamento generale della reazione: questa è stata mantenuta prima a 25°C e sembrerebbe non incidere sulla capacità di legame.

La stessa cosa vale per l'azione legante della molecola abiotica ad una temperatura maggiore di 55°C, il risultato ci permetterebbe di determinare una lunghezza maggiore delle catene, per cui il numero delle paia di basi ottenute si mostravano nella parte più alta del gel. La capacità della molecola abiotica a 55°C di riuscire però a formare legami fosfodiesterici tra i

frammenti ottenuti ad una sonicazione di 20' e 30' minuti è minore rispetto a temperatura ambiente, per il resto dei campioni invece la reazione a 55°C è più funzionale.

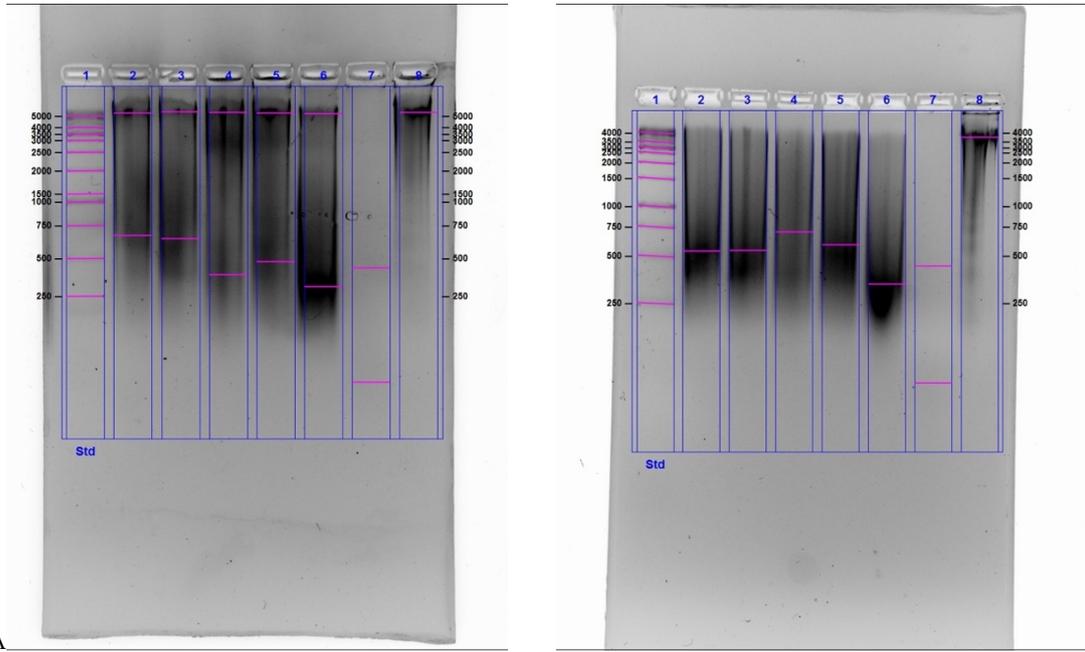
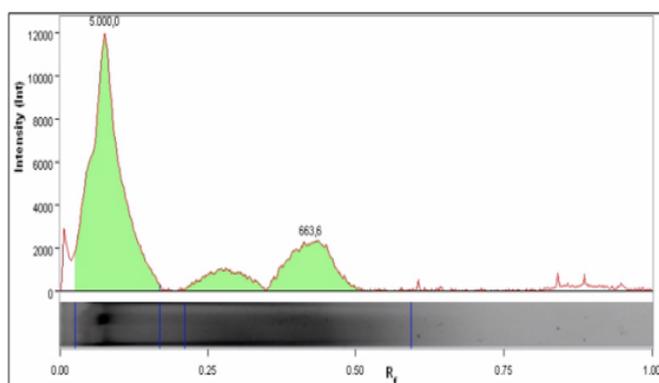
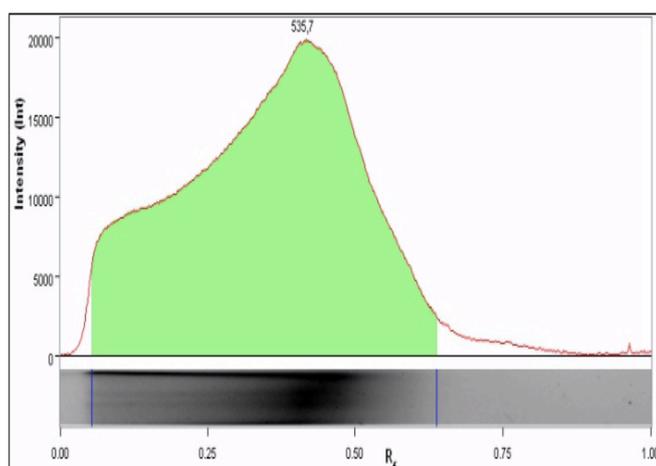


Figura 34 Le immagini riportano il risultato della corsa elettroforetica, la A è della polimerizzazione a 25°C mentre la B è quella ad una temperatura di 55°C.

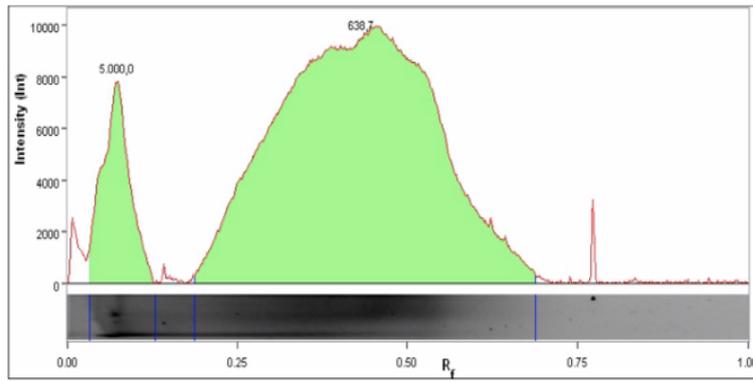


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	663,6	0,424	11.404.860

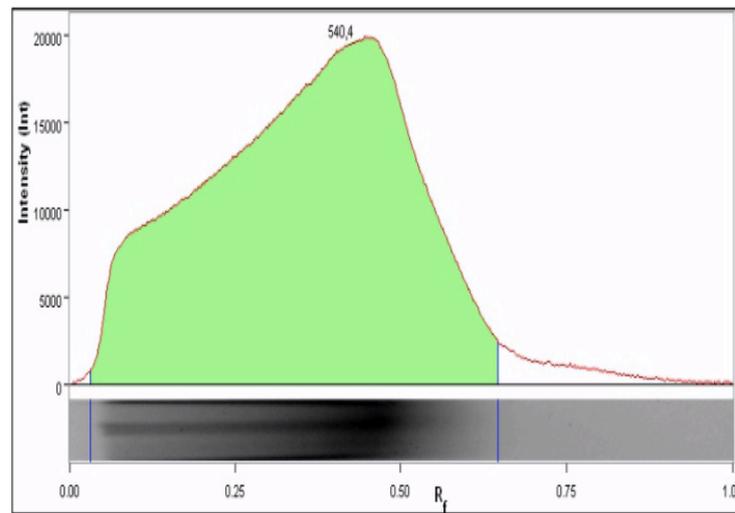


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	535,7	0,412	267.297.435

Figura 35. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione dopo 20' di sonicazione : rispettivamente 25°C e 55°C.

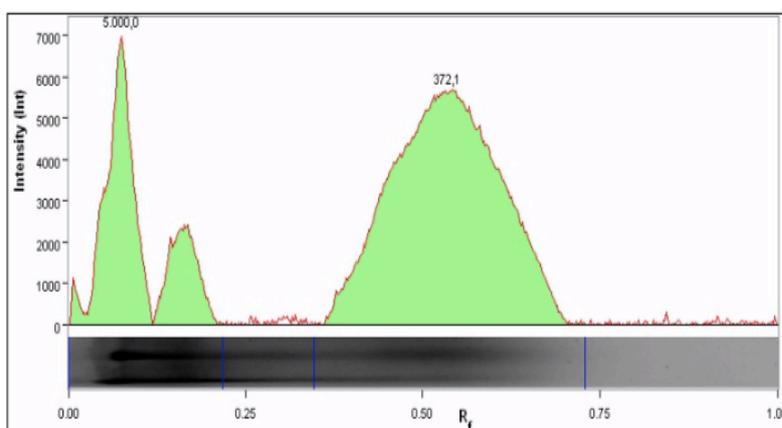


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	638,7	0,433	105.690.840

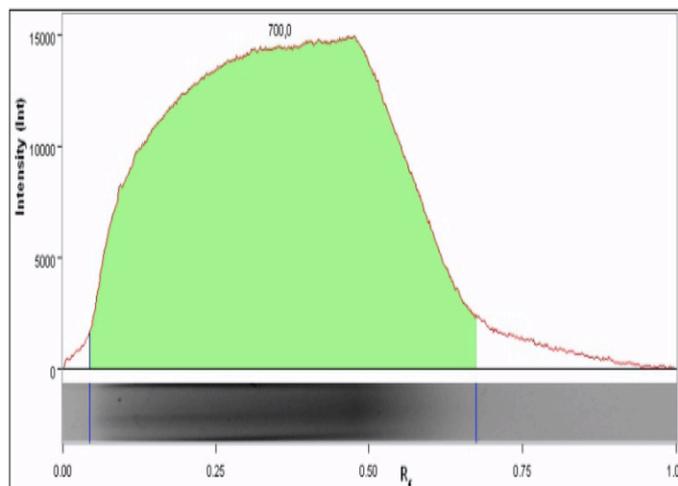


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	540,4	0,411	272.656.582

Figura 36. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione dopo 30' di sonicazione : rispettivamente 25°C e 55°C.

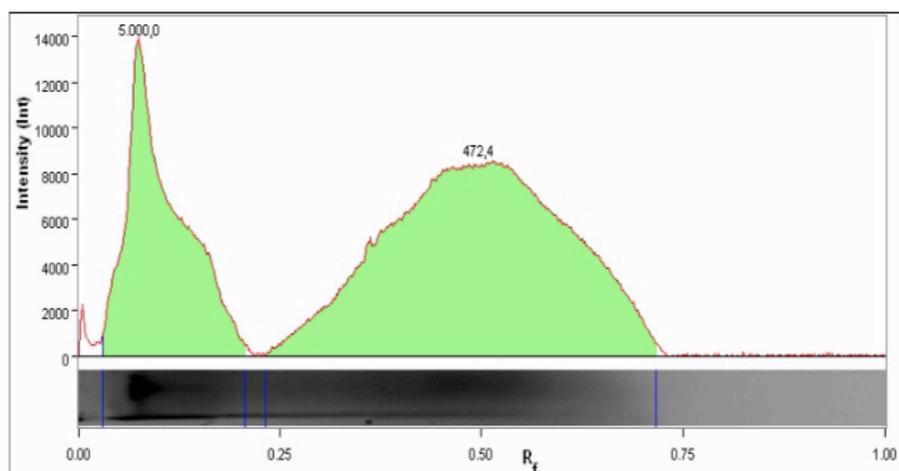


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	372,1	0,535	38.134.260

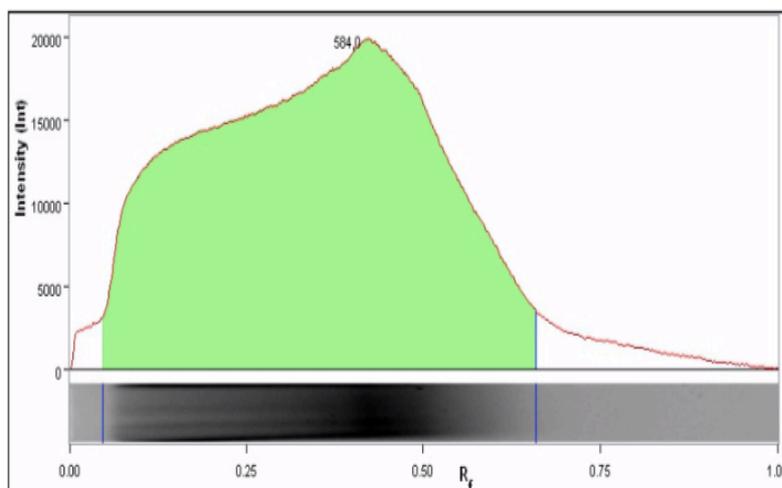


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	700,0	0,356	246.149.652

Figura 37. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione dopo 40' di sonicazione : rispettivamente 25°C e 55°C.

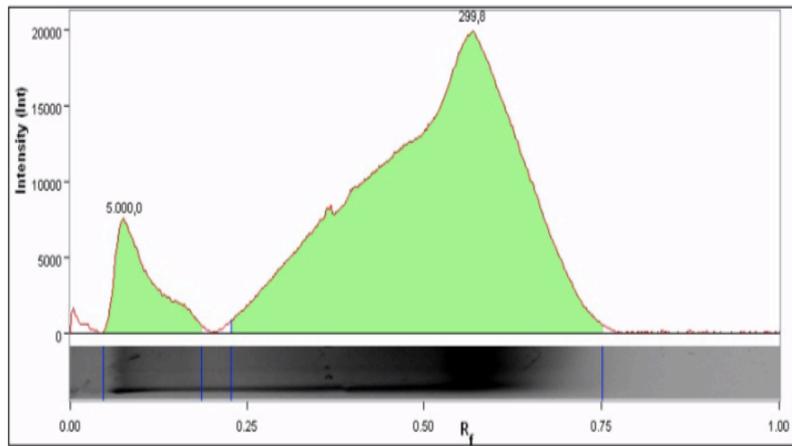


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	472,4	0,498	89.609.520

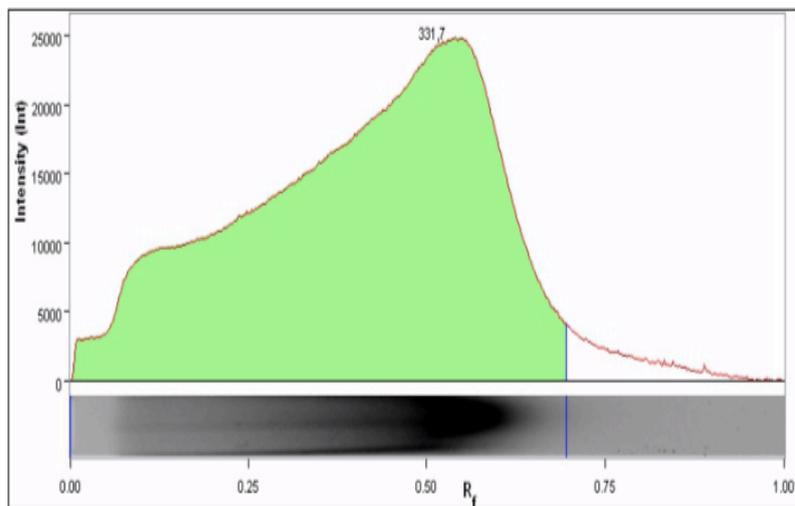


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	584,0	0,394	333.460.330

Figura 38. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione dopo 50' di sonicazione : rispettivamente 25°C e 55°C.

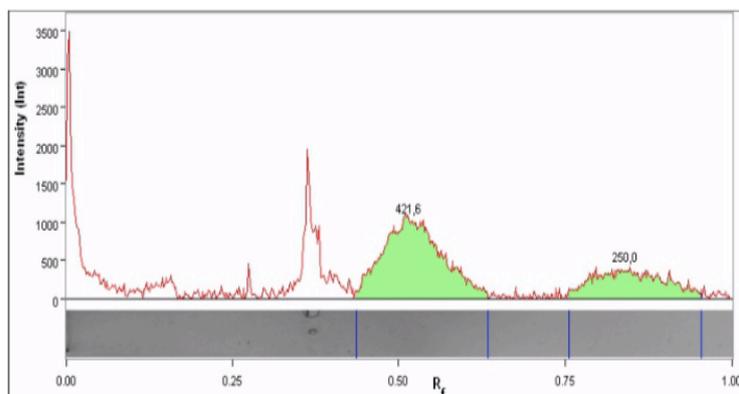


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	299,8	0,569	180.754.380

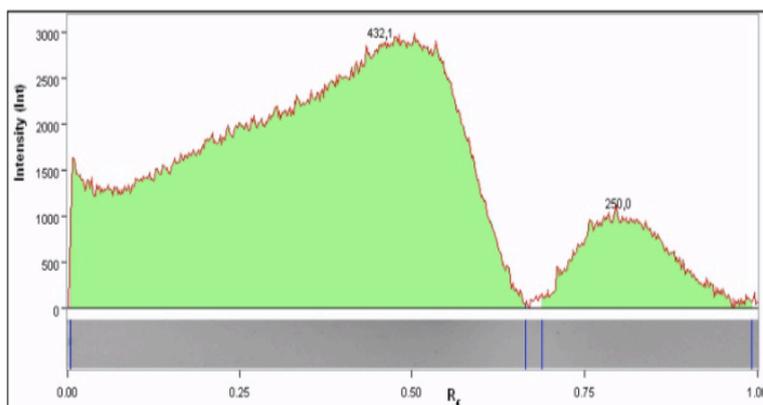


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	331,7	331,7	322.193.100

Figura 39. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione dopo 60' di sonicazione : rispettivamente 25°C e 55°C.

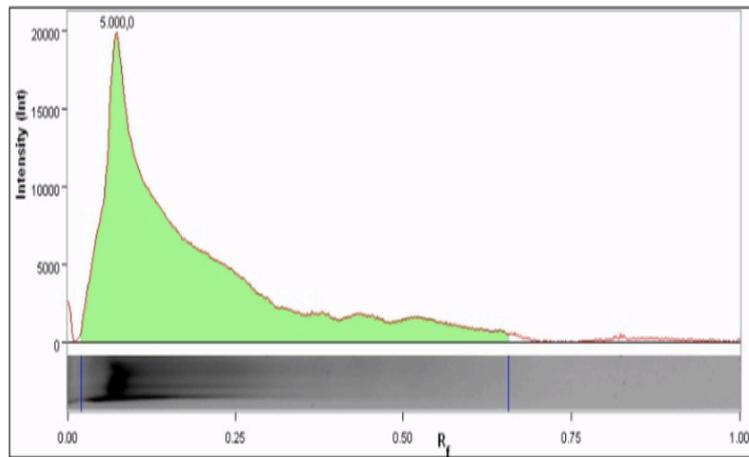


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	250,0	0,840	1.943.880

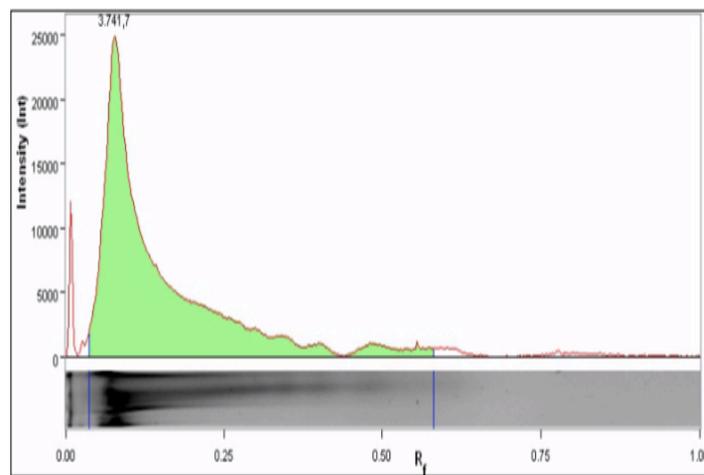


	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	432,1	0,456	47.012.380
2	250,0	0,799	6.215.768

Figura 40. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione del DNA a basso peso molecolare: rispettivamente 25°C e 55°C.



	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	5.000,0	0,076	94.855.380



	Base pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	3.741,7	0,078	80.754.303

Figura 41. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione del DNA non sonicato: rispettivamente 25°C e 55°C

Le curve sono state ottenute dal programma *ImageLab* usato anche per quantificare i picchi e mostrano il rispettivo peso molecolare del DNA, confermando come la reazione avvenisse in maniera corretta confrontandoli in relazione alla temperatura considerata inizialmente.

3.2.3 Analisi dei dati dell'interazione tra DNA-PEG-EDC

La preparazione dei campioni è stata la stessa per ogni analisi, ma in questo caso ad ogni tempistica sono state verificate due tipi di situazioni con concentrazioni di PEG diverse: 40% e 25%.

Su ogni eppendorf che conteneva il pellet di DNA frammentato (ottenuto dalla precipitazione come descritto nella sezione materiali e metodi), sono stati aggiunti 50 μ l di PEG più o meno concentrato in modo da riuscire ad avere un'idratazione del campione controllata e per permettere un confronto tra le reazioni è stato aggiunto in un secondo momento l'EDC (valutato a temperature differenti).

I grammi da pesare della molecola abiotica sono stati calcolati sempre considerando che il rapporto tra le moli di DNA ed EDC deve rimanere costante. Inoltre, è stato notato che la quantità da pesare in soli 50 μ l era molto piccola quindi è stata fatta una soluzione madre per tutti i campioni di 600 μ l di PEG e poi è stata aggiunto l'EDC, da qui sono stati prelevati i 50 μ l da posizionare sopra al pellet di DNA.

Per ogni campione sono state analizzate tre situazioni di reazione differenti e ognuno di questi è stato caricato nel gel di agarosio al 2% il giorno successivo:

1) PEG 40%:

T. sonicazione (min) 20'-30'-40'-50'-60'	50 μ l PEG	50 μ l PEG+ EDC (25°)	50 μ l PEG+EDC (55°)
DNA (basso pm)	50 μ l PEG	50 μ l PEG+EDC (25°)	50 μ l PEG+EDC (55°)

Tab 3. Preparazione dei campioni per l'elettroforesi su gel di agarosio

La prima analisi che è stata fatta è quella del DNA con il PEG al 40%, creando così una situazione con poche molecole di acqua che potessero interagire con le molecole di DNA. Il giorno seguente sono stati prelevati 5 μ l di ogni campione facendo particolarmente attenzione nel prelevare il DNA posizionato sul fondo della provetta per poi caricarli nei pozzetti del gel ed eseguire la corsa elettroforetica (la metodica di caricamento dei campioni è sempre stata la stessa per tutte le prove effettuate).

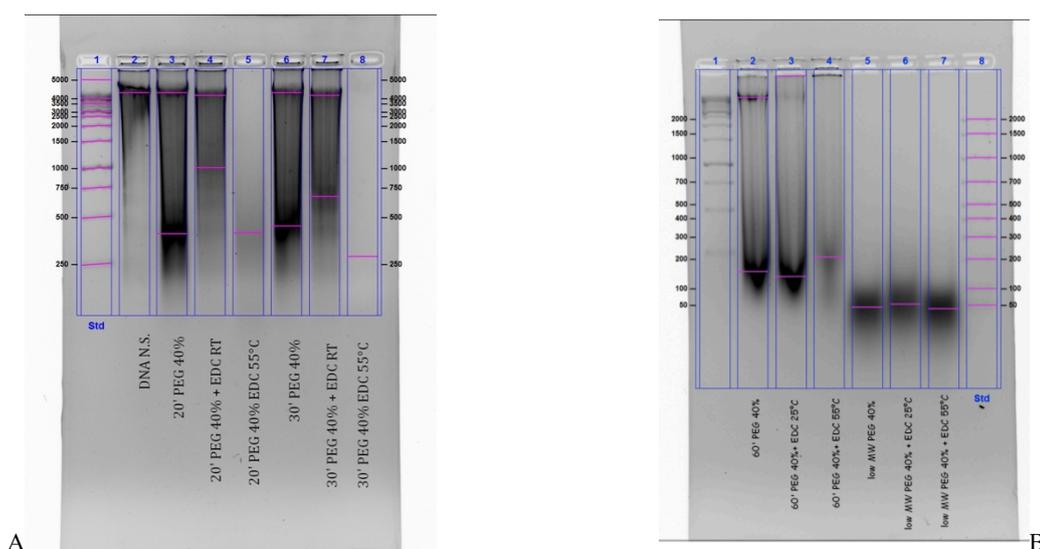
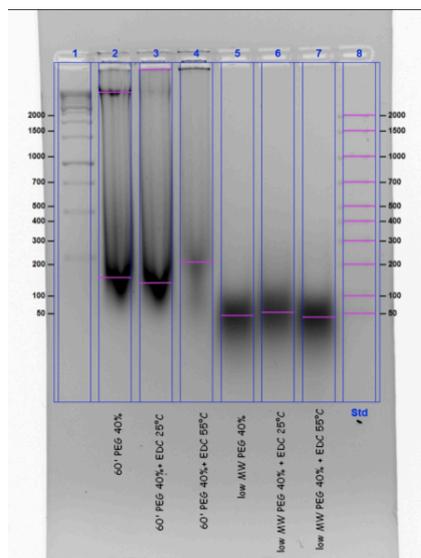


Figura 42. Corse elettroforetiche del DNA con PEG al 40% ed EDC a 25°C-55°C: A) 20' e 30' min di sonicazione, b) 40' e 50' min di sonicazione.



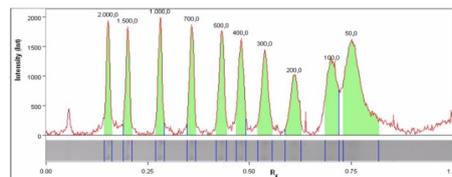
C.

Figura 43. Corse elettroforetiche del DNA con PEG al 40% ed EDC a 25°C-55°C: 60' min di sonicazione e DNA a basso pm. (2.DNA-PEG, 3.DNA-PEG-EDC25°C,4.DNA-PEG-EDC 55°C, 5. DNA basso pm-PEG, 6. DNA basso pm-PEG-EDC 25°C, 7.DNA basso pm-PEG-EDC 55°C

Le due immagini riportate sotto mostrano:

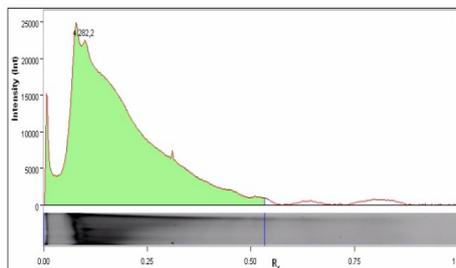
1. lo standard utilizzato per queste analisi (fig. 28.2) con le rispettive paia di basi ottenute
2. il DNA non sonicato a 4282.2 pb che viene utilizzato come controllo per valutare il comportamento degli altri campioni.

Lane 8 - Bio-Rad AmpliSize Molecular Ruler



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		2.000.0	0.153	786.647	N/A	N/A	6.9	5.5
2		1.500.0	0.202	787.472	N/A	N/A	6.7	5.4
3		1.000.0	0.291	964.232	N/A	N/A	7.5	6.0
4		700.0	0.359	890.310	N/A	N/A	7.8	6.2
5		500.0	0.431	1.000.994	N/A	N/A	8.7	7.0
6		400.0	0.480	962.408	N/A	N/A	8.4	6.7
7		300.0	0.538	1.054.684	N/A	N/A	9.2	7.4
8		200.0	0.611	908.954	N/A	N/A	7.9	6.3
9		100.0	0.703	1.414.938	N/A	N/A	12.3	9.9
10		50.0	0.751	2.826.631	N/A	N/A	24.6	19.7

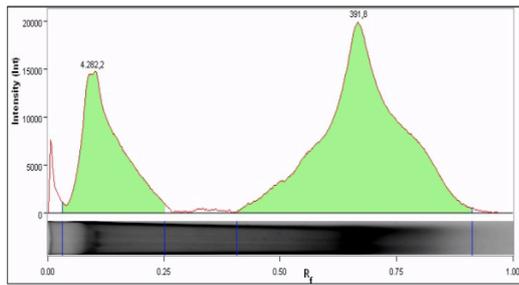
1.



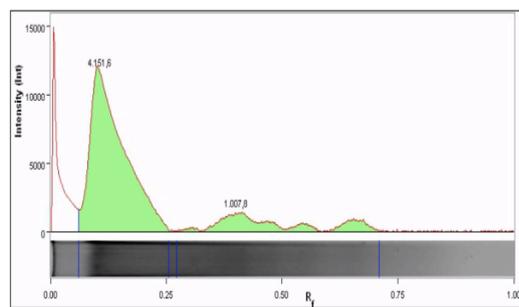
Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		4.282.2	0.098	132.106.774	N/A	N/A	100.0	97.1

2.

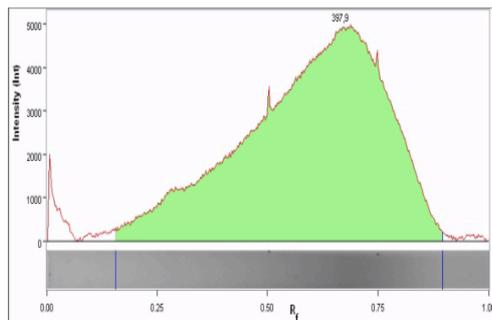
La stessa analisi eseguita per valutare i risultati ottenuti dopo la frammentazione del DNA è stata ripetuta anche per osservare come si comportasse il DNA quando era costretto ad interagire con il PEG al 40% + EDC sia a temperatura ambiente che a 55°C. Le immagini sotto riportate mostrano la crescita e la diminuzione delle altezze dei picchi in base alle diverse situazioni poste in analisi.



	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	391,8	0,669	106.697.612

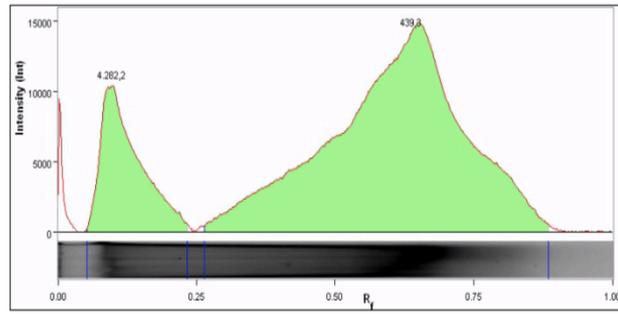


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	1.007,8	0,402	7.085.744

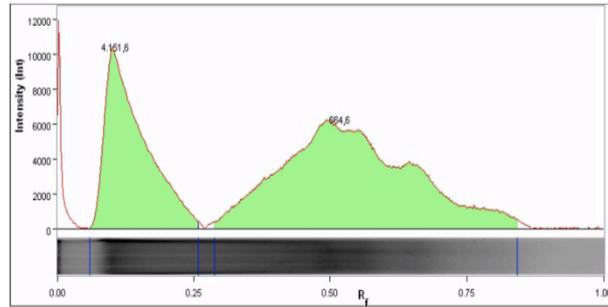


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	397,9	0,665	58.455.996

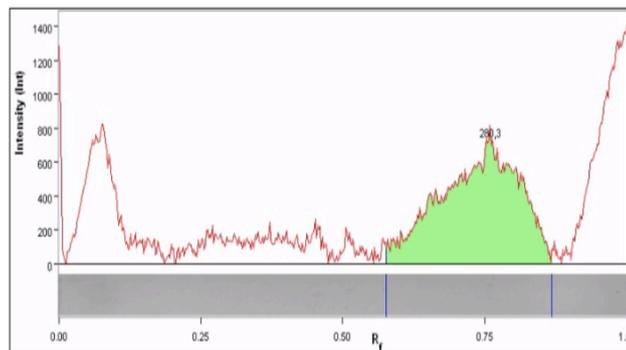
Figura 44. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione ad una sonicazione di 20' rispettivamente DNA-PEG40%, DNA-PEG40%+EDC25°C, DNA-PEG 40%+EDC55°



	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	439,3	0,638	125.292.760

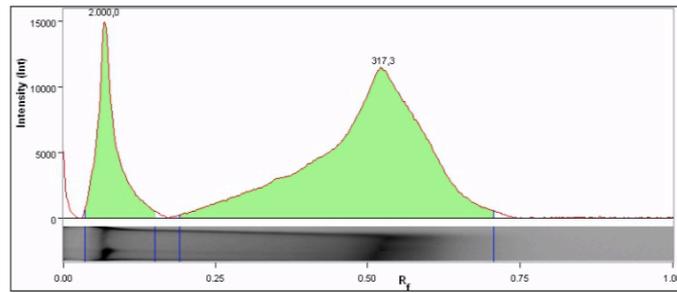


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	664,6	0,519	54.614.888

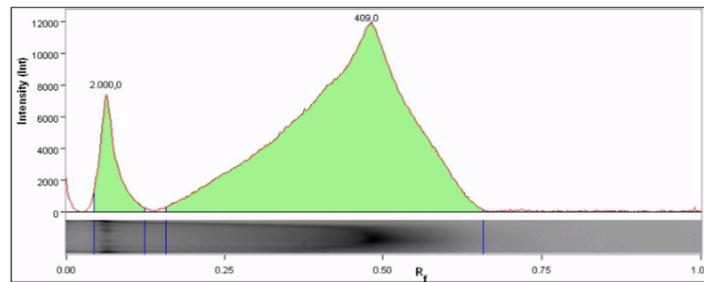


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	280,3	0,762	3.355.706

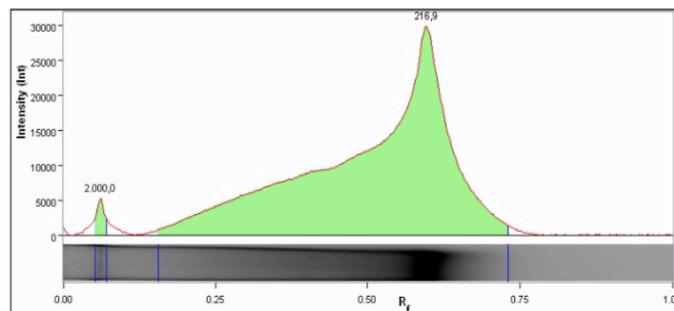
Figura 45. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione ad una sonicazione di 30'rispettivamente DNA-PEG40%, DNA-PEG40%+EDC25°C, DNA-PEG 40%+EDC55°C



	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	317,3	0,527	102.901.074

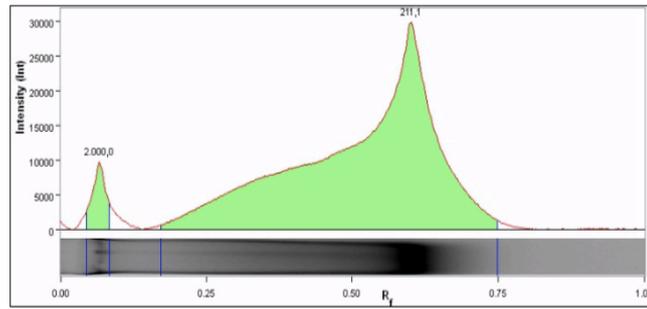


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	409,0	0,475	102.721.478

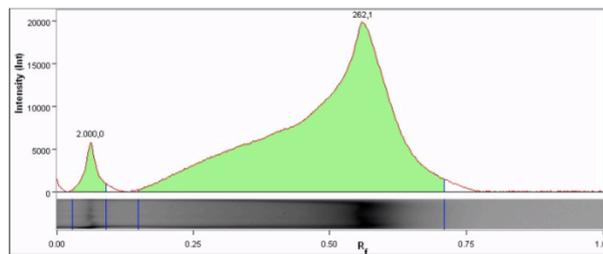


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	216,9	0,596	199.404.011

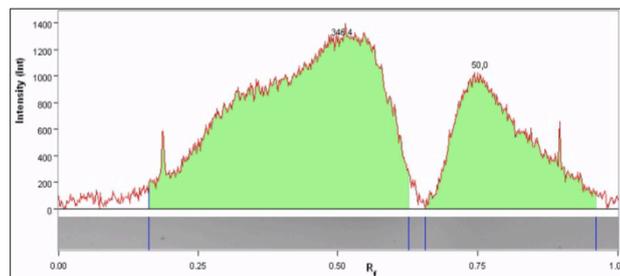
Figura 46.. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforica in relazione alla polimerizzazione ad una sonicazione di 40'rispettivamente DNA-PEG40%, DNA-PEG40%+EDC25°C, DNA-PEG 40%+EDC55°C



	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	211,1	0,601	218.039.574

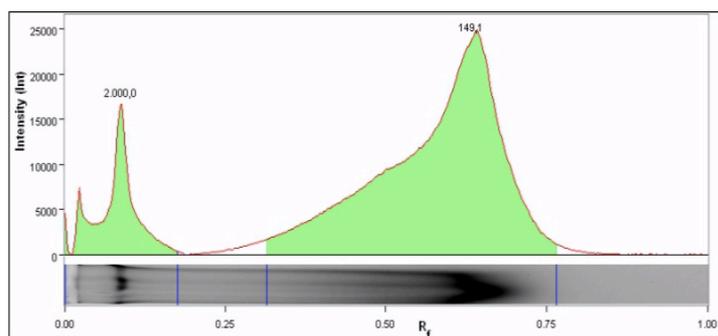


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	262,1	0,562	165.321.304

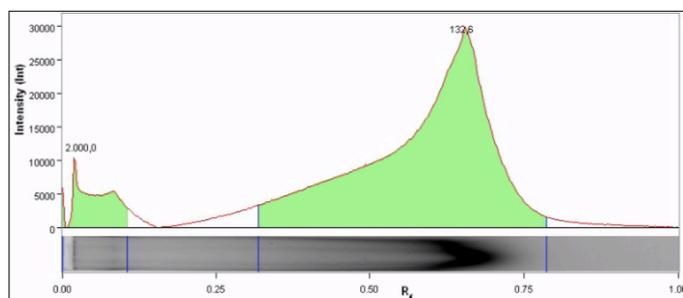


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	346,4	0,509	14.596.777
2	50,0	0,754	5.950.445

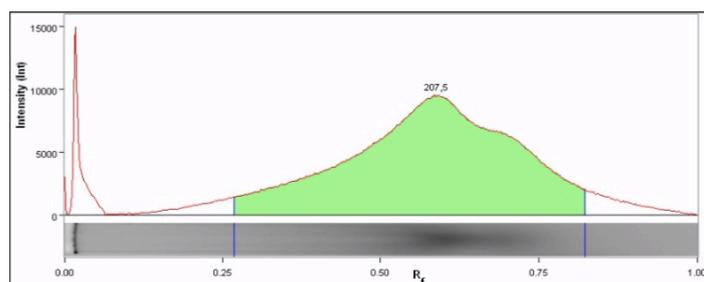
Figura 47. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione ad una sonicazione di 50' rispettivamente DNA-PEG40%, DNA-PEG40%+EDC25°C, DNA-PEG 40%+EDC55°C



	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	149,1	0,634	191.957.100

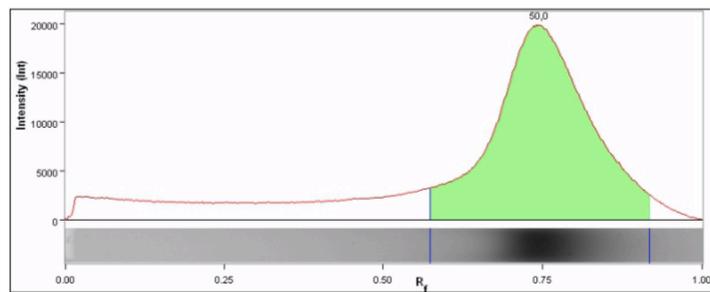


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	132,6	0,649	209.988.840

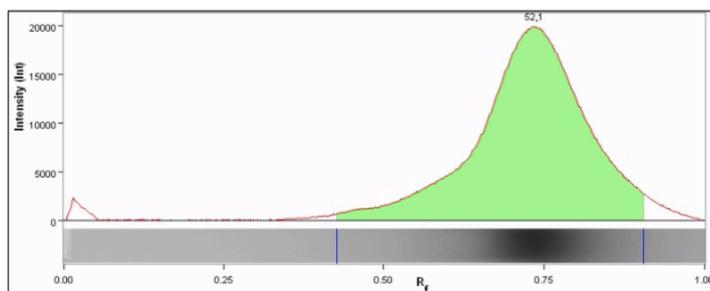


	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	207,5	0,588	120.277.500

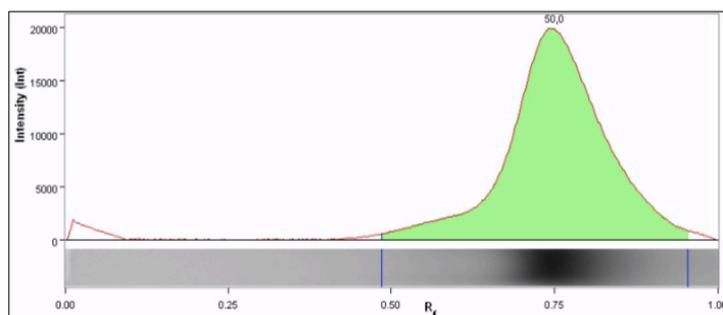
Figura 48. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforica in relazione alla polimerizzazione ad una sonicazione di 60'rispettivamente DNA-PEG40%, DNA-PEG40%+EDC25°C, DNA-PEG 40%+EDC55°C



	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	50,0	0,745	145.969.920



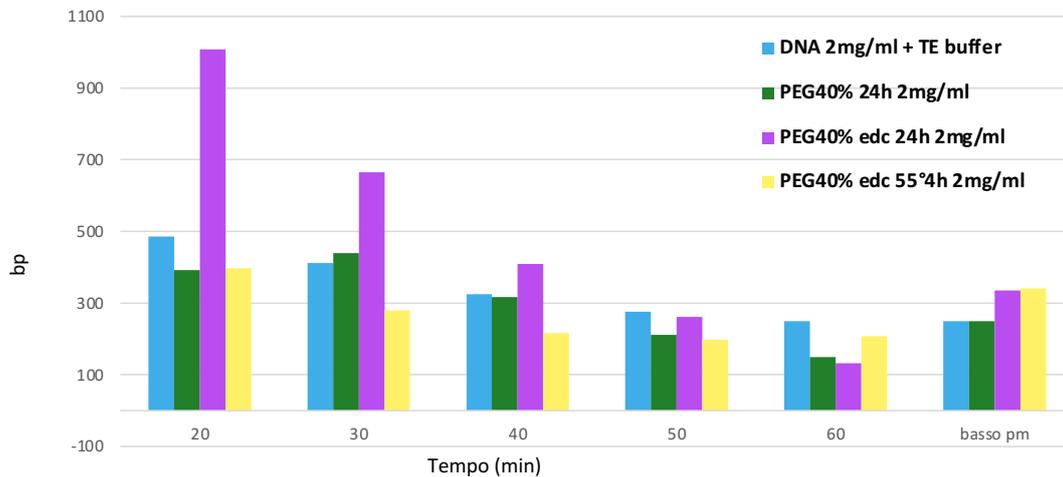
	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	52,1	0,736	146.290.440



	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (int)
1	50,0	0,750	144.216.120

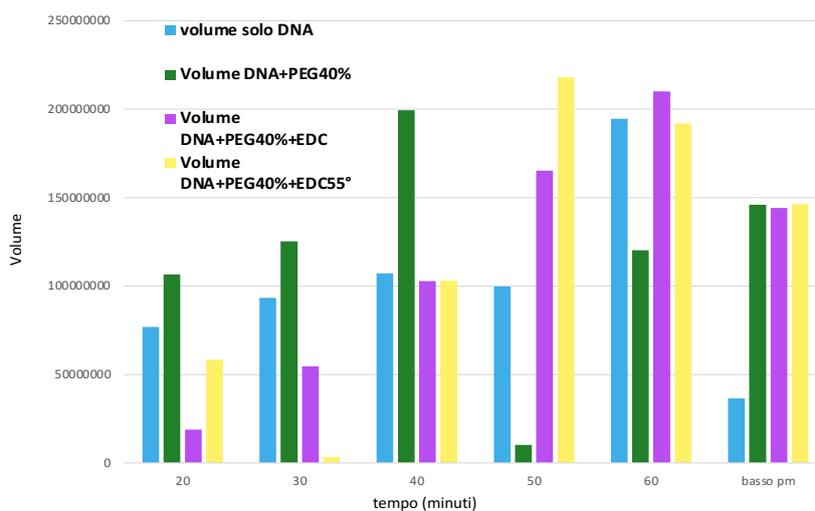
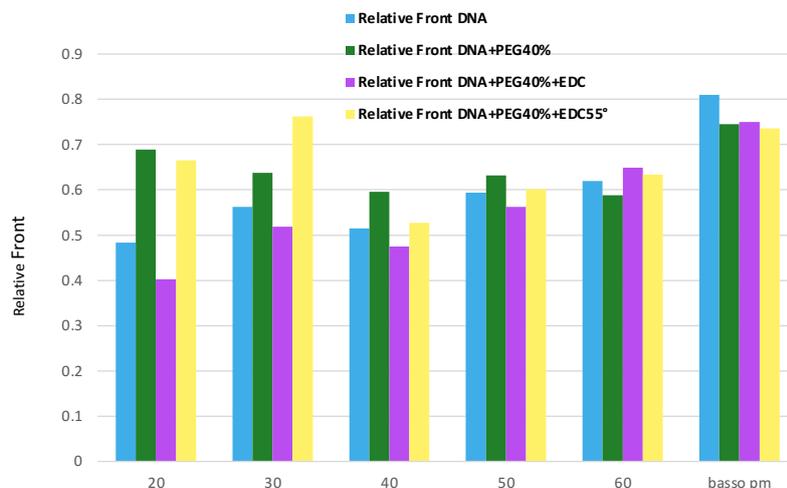
Figura 49. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione del DNA. a basso peso molecolare rispettivamente DNA-PEG40%, DNA-PEG40%+EDC25°C, DNA-PEG 40%+EDC55°C

Gli stessi risultati (fig. dalla 44 alla 49) vengono rappresentati in maniera più precisa in questo istogramma:



Si può osservare come il comportamento dei frammenti del DNA cambia al variare della presenza del PEG al 40% e della temperatura di reazione utilizzata per far avvenire la polimerizzazione.

Da una prima analisi si può notare come la formazione dei legami fosfodiesterici avviene, ma la capacità dell'EDC di reagire è differente: a temperatura ambiente (25°C) la polimerizzazione dei frammenti si presenta in misura maggiore rispetto ad una temperatura di 55°C. Questo perché maggiore è la concentrazione di PEG all'interno del sistema e maggiore sarà la propensione delle molecole di DNA di trovarsi nella cosiddetta situazione di affollamento permettendo così l'interazione tra i frammenti di DNA e la molecola abiotica. Questa situazione però non la ritroviamo quando la temperatura è maggiore, perché, tende a non facilitare la formazione di frammenti più lunghi e di conseguenza l'interazione tra EDC e DNA.



Il grafico a barre sopra riportato ci permette di descrivere la relazione tra il volume occupato dai frammenti di DNA e il rispettivo tempo di sonicazione.

Prendendo in considerazione il volume occupato dai frammenti di DNA ricavati per sonicazione di 20' e le paia di basi ottenute con l'analisi degli stessi campioni, si può notare come dopo la polimerizzazione si ottengono

frammenti che sembrerebbero avere una lunghezza paragonabile tra loro, osservabile anche dalla curva che si forma che è più stretta.

Mentre il valore del volume calcolato considerando i frammenti ottenuti dopo una sonicazione di 60' e successiva polimerizzazione, mostrano una curva più larga, molto probabilmente perché i frammenti non hanno tutti la stessa dimensione. L'azione legante della molecola abiotica permetterebbe quindi ai frammenti piccoli di legarsi tra loro, ma non riuscirebbe comunque a formare dei frammenti lunghi talo da poter determinare una curva stretta.

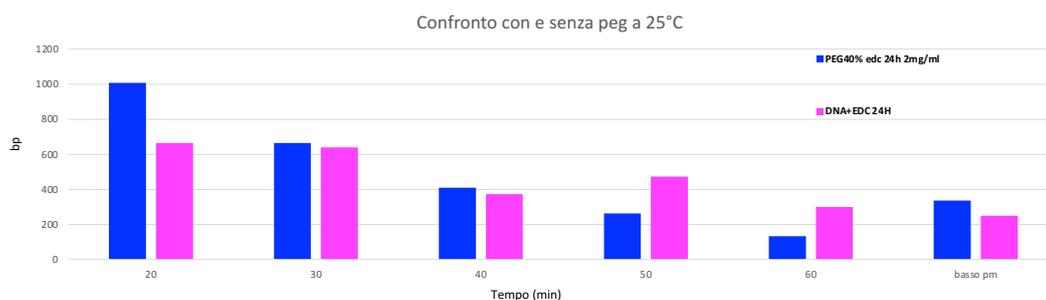


Figura 50. Istogramma che rappresenta la lunghezza dei frammenti in funzione del tempo a temperature differenti.

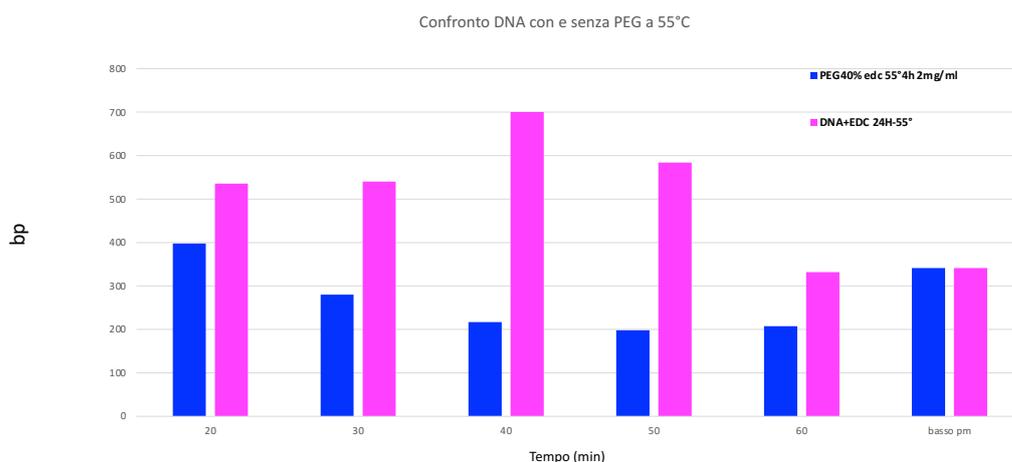


Figura 51. Istogramma che rappresenta la lunghezza dei frammenti in funzione del tempo a temperature differenti.

Facendo confronti differenti si può notare come nelle immagini 50 e 51, attraverso un confronto tra campioni con e senza PEG al 40% e successiva reazione di polimerizzazione a temperatura diverse, i risultati ottenuti dimostrano come l'azione legante della molecola abiotica ad una temperatura di 55° funzioni con un'efficacia maggiore solo quando il DNA non si trova a contatto con il PEG, il DNA con peso molecolare più basso non sembra mostrare differenze, mentre la concentrazione di PEG sul DNA a 30' e 40' di sonicazione ad una temperatura di 25°C non sembrerebbe influire particolarmente sulla complessità della reazione. Parallelamente a 20' minuti e per analisi del DNA a basso peso molecolare sembra funzionare meglio la polimerizzazione quando c'è interazione con il PEG. Al contrario a 50' e 60' minuti l'EDC senza PEG funzionerebbe meglio.

2) PEG 25%:

T. sonicazione (min) 20'-30'-40'-50'-60'	50 µl PEG	50 µl PEG+EDC (25°)	50 µl PEG+EDC (55°)
DNA (basso pm)	50 µl PEG	50 µl PEG+EDC (25°)	50 µl PEG+EDC (55°)

Tab 4. Preparazione dei campioni per l'elettroforesi su gel di agarosio

Per poter stabilire un confronto sul comportamento delle molecole utilizzate abbiamo ricreato le stesse situazioni ma questa volta utilizzando una concentrazione di PEG al 25% per valutare reazione dell'EDC, ottenendo così

una situazione quasi opposta alla precedente dove nel sistema sono presenti più molecole di acqua che potrebbero reagire con l'EDC determinando così un minore effetto di polimerizzazione. Dopo diversi tentativi di corsa elettroforetica siamo riusciti ad ottenere valori discreti per fare un paragone valido solo con le sonicazioni del DNA a 30' e 60' minuti e successiva valutazione dell'azione legante ad una temperatura di 25°C.

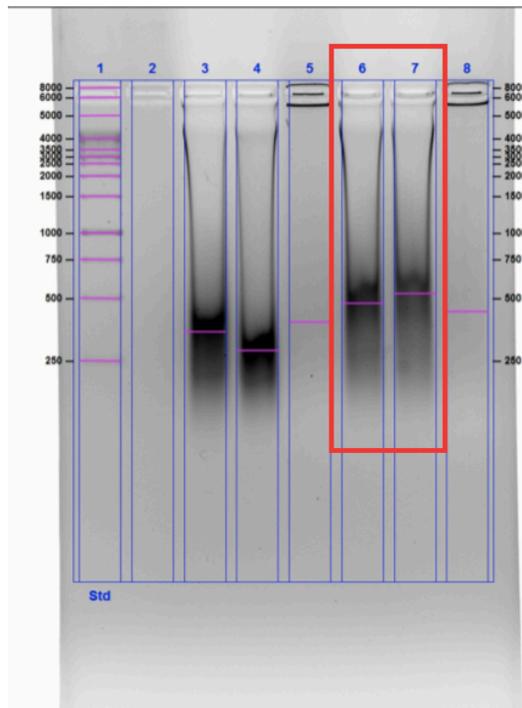


Figura 52 L'immagine riporta il risultato della corsa elettroforetica, il riquadro rosso è la zona analizzata: 6. DNA30'-PEG25%, 7. DNA 30'-PEG25%-EDC 25°C.

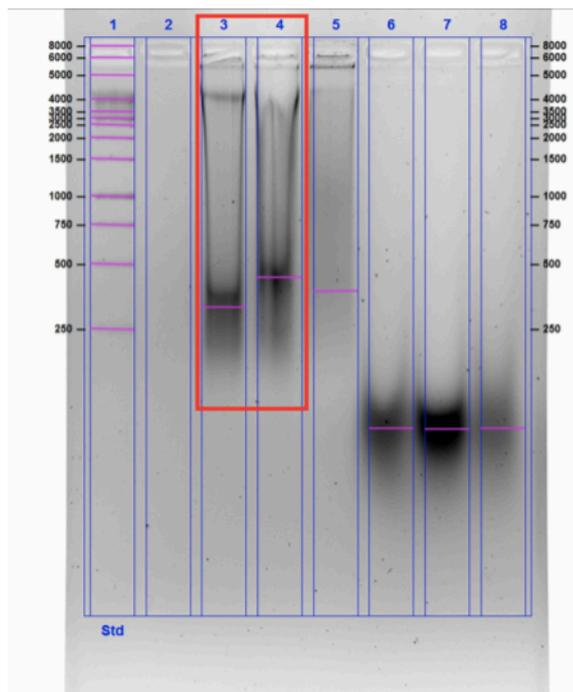
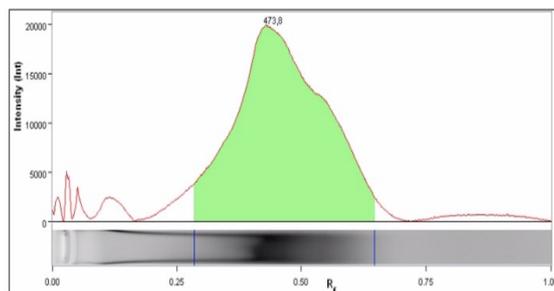
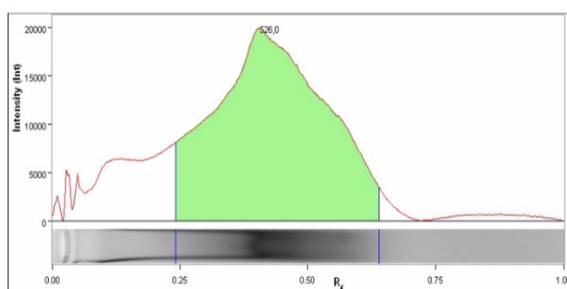


Figura 53 L'immagine riporta il risultato della corsa elettroforetica, il riquadro rosso è la zona analizzata: 3. DNA60'-PEG25%, 4. DNA 60'-PEG25%-EDC 25°C.

Le curve in figura mostrano i picchi relativi alle sonicazioni 30' e 60' minuti del DNA dopo aver effettuato una corsa elettroforetica di campioni precedentemente trattati con il PEG al 25%, con e senza EDC ad una temperatura di 25°C.

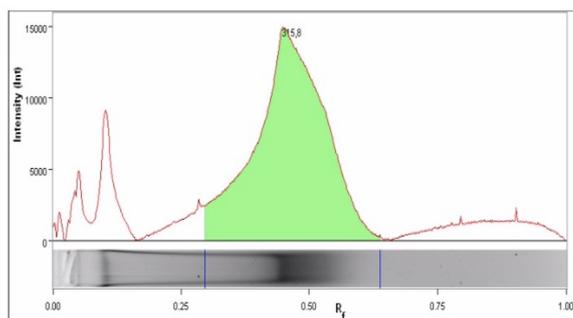


Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (nt)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		473,8	0,445	203.464.863	N/A	N/A	100,0	87,0

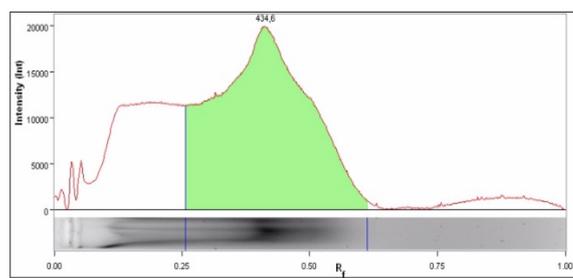


Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (nt)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		526,0	0,425	268.460.561	N/A	N/A	100,0	77,5

Figura 54. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione dopo una sonicazione di 30'rispettivamente DNA-PEG25%, DNA-PEG25%+EDC25°C



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		315,8	0,467	135.327.180	N/A	N/A	100,0	71,7



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		434,6	0,415	225.755.940	N/A	N/A	100,0	64,7

Figura 55. Vengono mostrati i picchi dall'alto verso il basso, ottenuti dalla corsa elettroforetica in relazione alla polimerizzazione dopo una sonicazione di 60'rispettivamente DNA-PEG25%, DNA-PEG25%+EDC25°C

Anche in questa prova la lunghezza dei frammenti del DNA varia perché avviene la polimerizzazione ed è stata dimostrata dal fatto che dopo 24h di reazione con la molecola abiotica il numero di paia di basi ottenute è maggiore, quindi la catena di DNA si allunga

La stessa cosa è messa in evidenza nel grafico a barre sotto riportato (fig. 56).

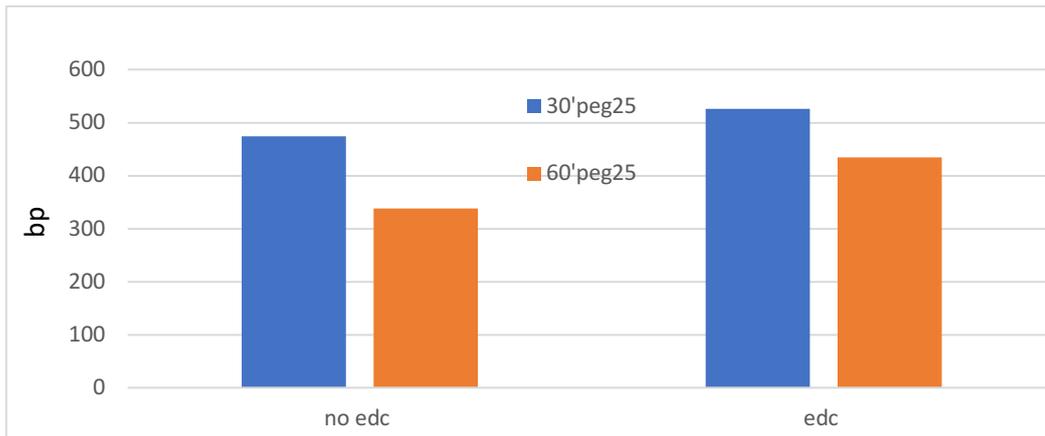


Figura 56. Confronto del DNA con PEG 25% polimerizzato e non

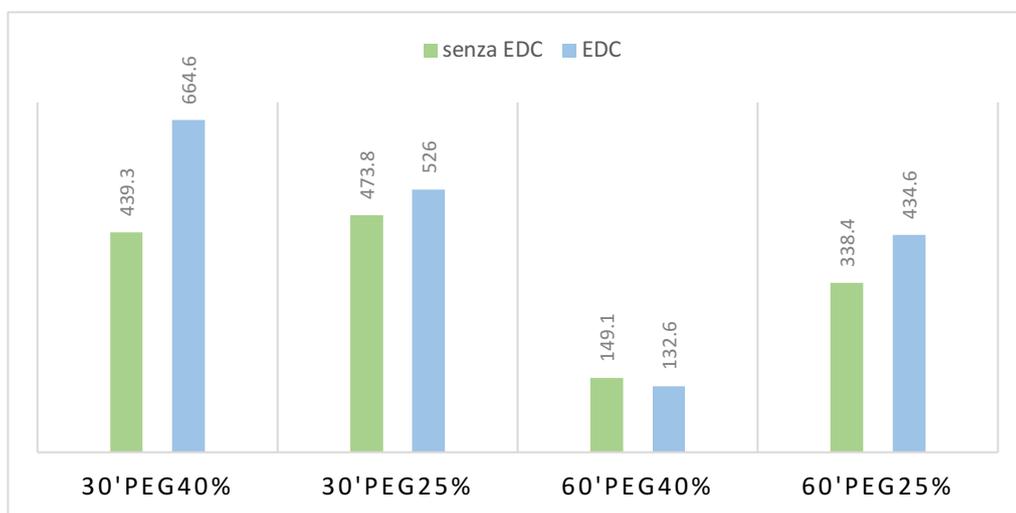


Figura 57. Confronto tra la polimerizzazione del DNA a concentrazioni diverse di PEG e tempi di sonicazione

Facendo un confronto tra le due diverse concentrazioni di PEG e tempi di sonicazione sia con EDC che senza riportati nella figura 57, e analizzando di quanto i frammenti si siano allungati rispetto a quelli che non hanno subito l'interazione con la molecola abiotica, possiamo osservare come la polimerizzazione avvenga in tutti i casi tranne ad un tempo di sonicazione di 60' con concentrazione di PEG al 40%. Questo è evidenziato dal fatto che la banda che possiamo osservare con EDC a 25°C sembra essere più bassa rispetto alle altre.

3.2.4 Analisi di microscopia AFM

Per le prove eseguite mediante la microscopia a forza atomica sono stati presi in considerazione i seguenti campioni.

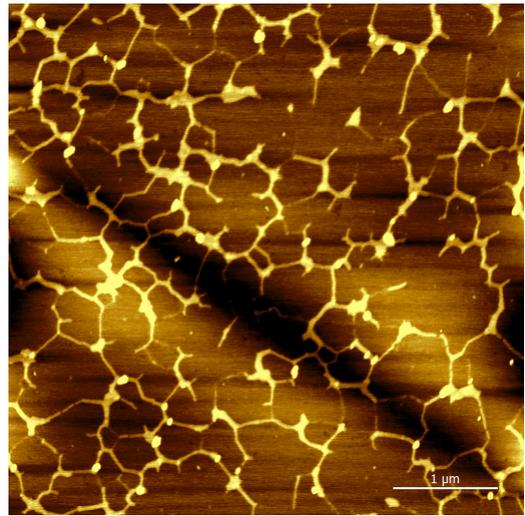
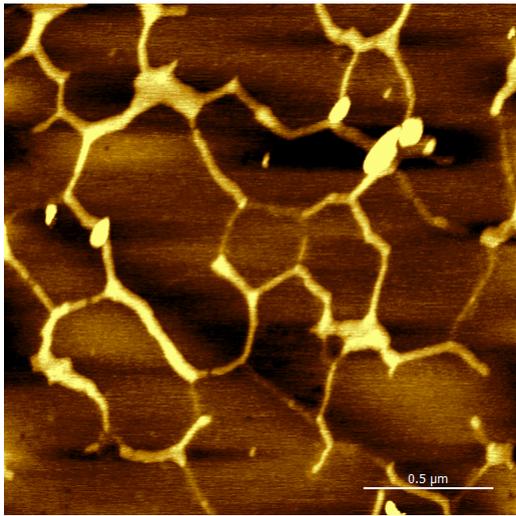
Campioni	Diluizioni
DNA 30'	1:100
DNA 30'+ EDC 25°C	1:10
DNA 50'	1:50
DNA 50'+ EDC 25°C	1:10
DNA non sonicato	1:20
DNA basso peso molecolare	1:20

TAB. 5 diluizioni utilizzate per analisi AFM dei campioni sonicati a 30' e 50' minuti

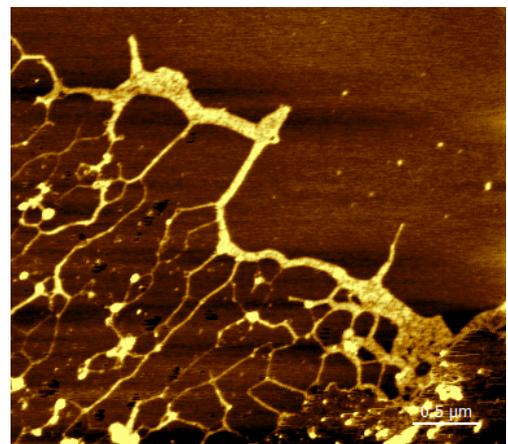
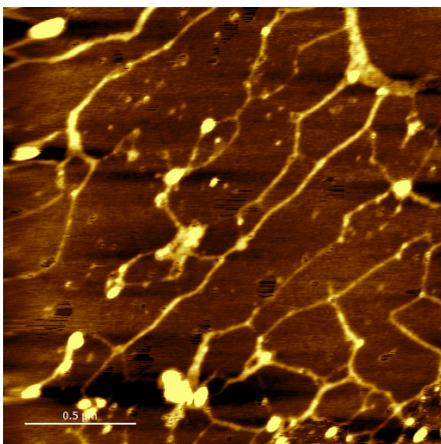
Da analisi precedenti è stato dimostrato come questa tecnica può essere utilizzata per osservare il superavvolgimento del DNA. La mica viene spesso utilizzata come substrato ma, lo svantaggio del suo uso per osservare immagini di DNA è che entrambe sono cariche negativamente a pH neutro in soluzione acquosa impedendo quindi l'adsorbimento del DNA nel substrato dove viene posizionato. Tra i diversi metodi per modificare la carica della mica troviamo quella di creare un buffer, quello utilizzato per le nostre analisi è costituito da: HEPES 4mM, MgCl₂ 2mM, NaCl 10 mM.

La mica, quindi, viene precedentemente tratta con 30 µl di buffer e viene lasciata ad asciugare per 15 minuti permettendo così lo scambio tra le cariche, il passaggio successivo e sciacquare il substrato con H₂O milliq e infine aggiungere 5 µl del campione da analizzare per l'osservazione delle immagini.

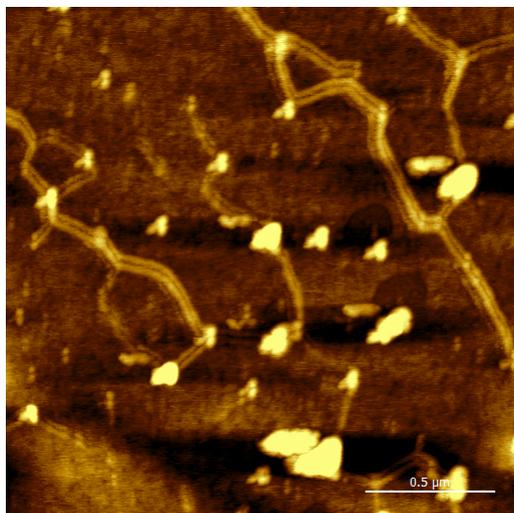
Frammenti di DNA ottenuti con una sonicazione di 30' minuti:



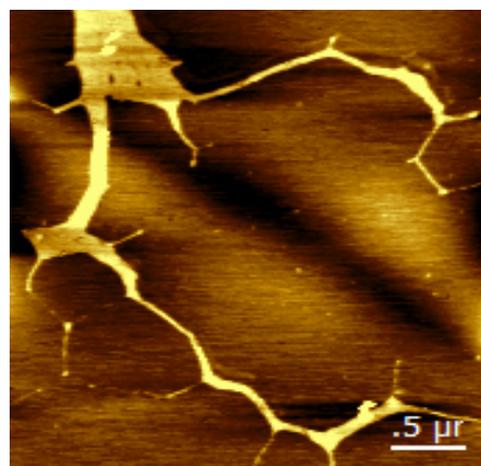
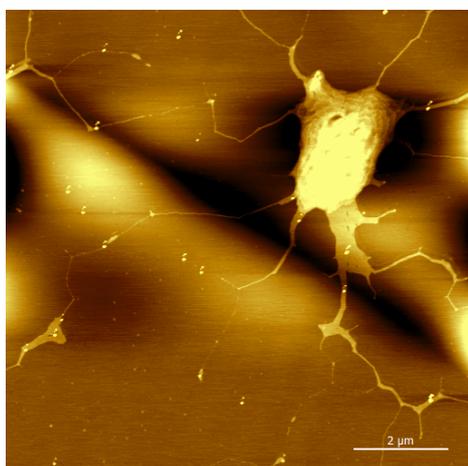
Filamenti più lunghi di frammenti di DNA polimerizzati:



Frammenti di DNA ottenuti con una sonicazione di 50' minuti:



Filamenti più lunghi di frammenti di DNA polimerizzati:



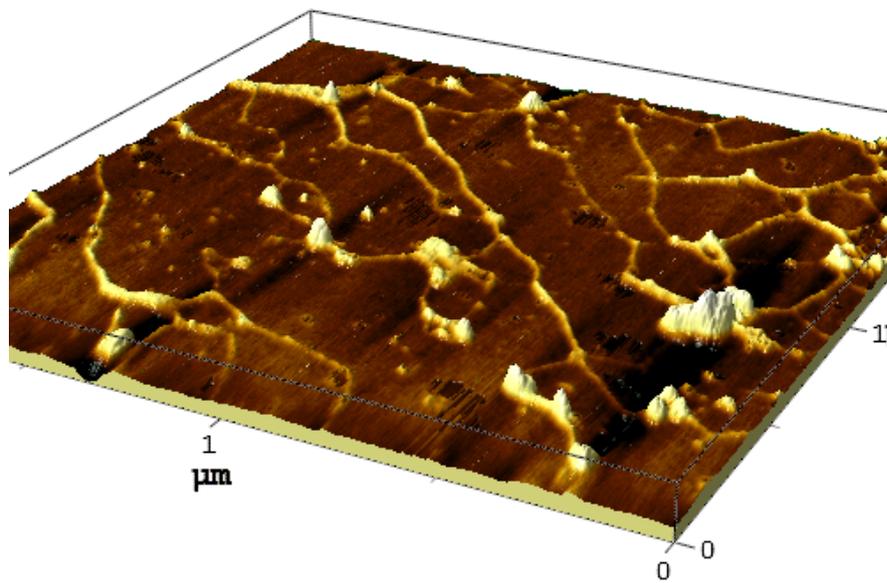
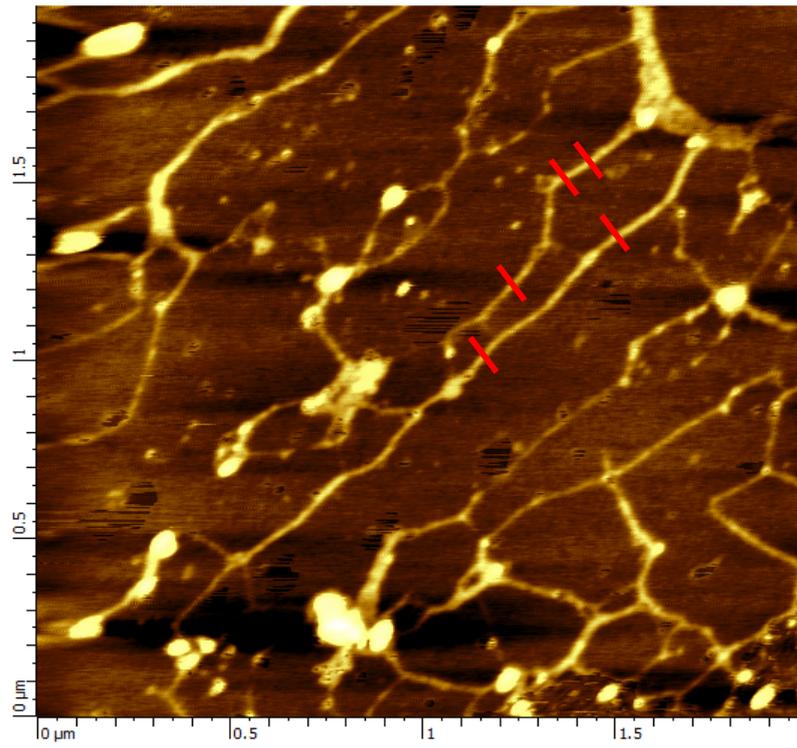
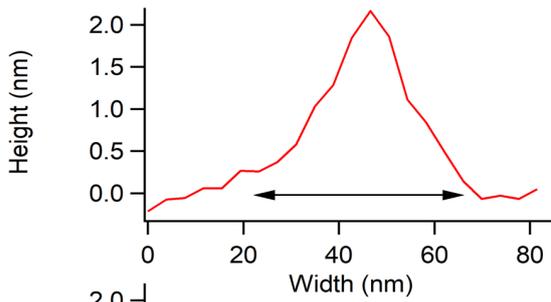
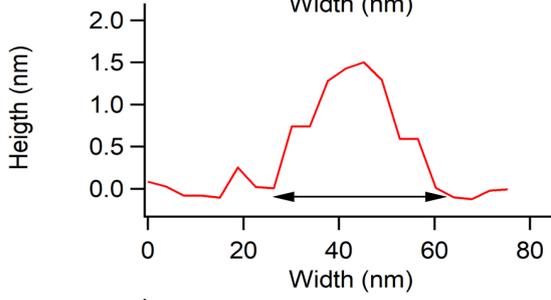


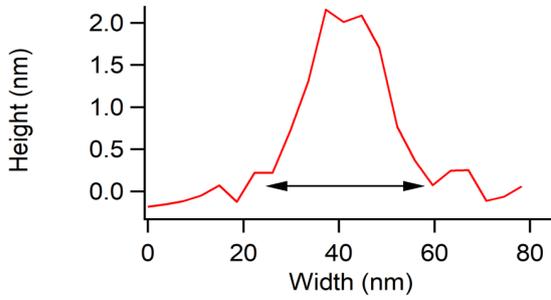
Figura 58 immagine AFM del DNA polimerizzato: i trattini rossi mostrano le sezioni analizzate successivamente.



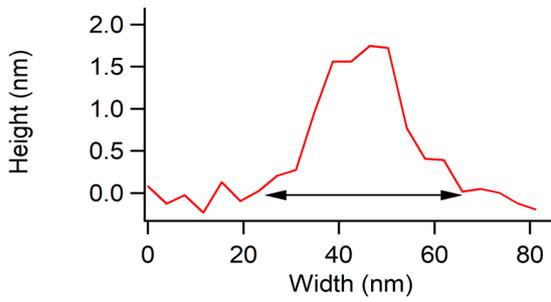
D misurata	D reale	H
38 nm	11,28 nm	2,25 nm



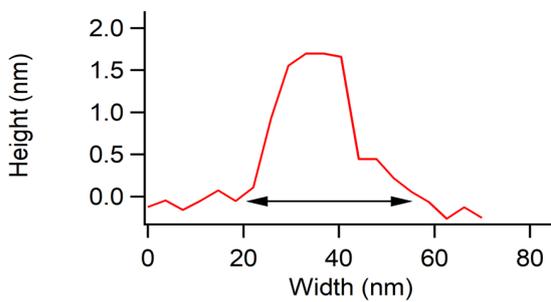
D misurata	D reale	H
33,1 nm	8,55 nm	2,15 nm



D misurata	D reale	H
33,54 nm	8,78 nm	1,65 nm



D misurata	D reale	H
35 nm	9,57 nm	1,8 nm

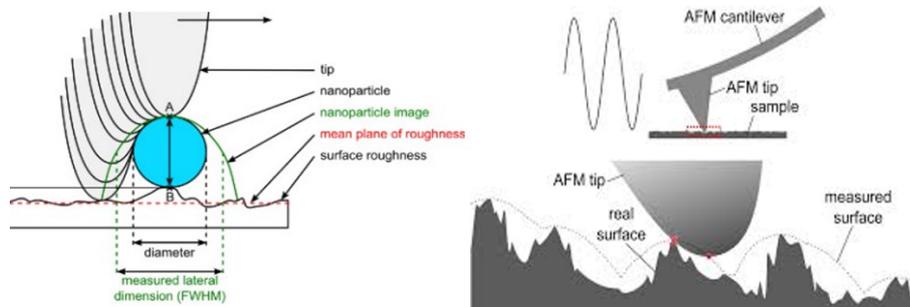


D misurata	D reale	H
33,1 nm	8,55 nm	1,7 nm

Figura 59

Le porzioni prese in analisi mostrano le curve rappresentate nella figura 59, con i rispettivi valori delle altezze e delle larghezze.

Le altezze misurate (H) variano a seconda della sezione analizzata, ma il valore ottenuto non fornisce una stima precisa del diametro del DNA a causa del fenomeno della *convoluzione* della punta.



Quello che viene misurato dal cantilever non è il diametro effettivo del DNA ma è un valore più alto perché l'errore causato dalla convoluzione.

Per risolvere il problema e risalire al diametro reale è stata applicata la seguente equazione (Sennato S.) [13].

$$w = 4 \cdot \sqrt{R_{tip} \cdot R_{sample}}$$

dove w è la larghezza misurata, R_{tip} rappresenta il raggio della punta e R_{sample} il raggio reale del campione. Dal raggio è stato ricavato il diametro del DNA come riportato in tabella (fig. 46).

Il taglio indicato dal trattino rosso mostra misure che sono assimilabili al diametro effettivo di una doppia elica di DNA.

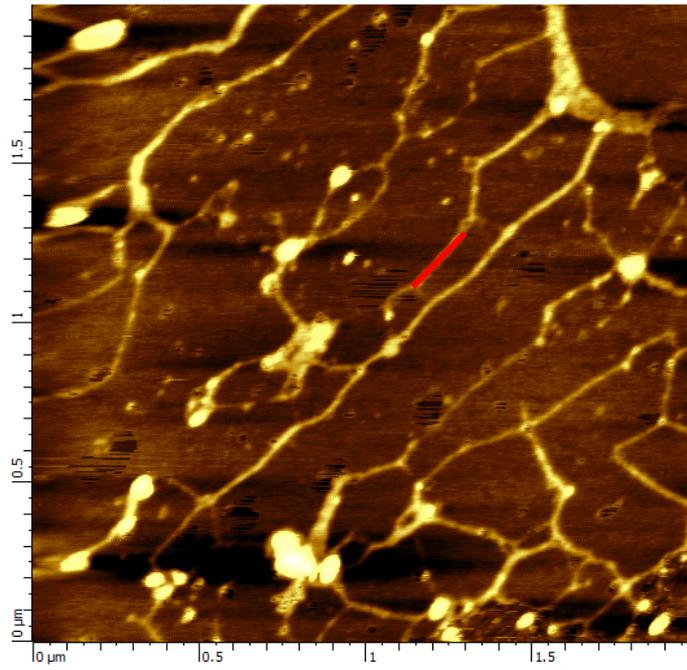


Figura 60 DNA polimerizzato: taglio che indica la presenza di solchi maggiori e minori

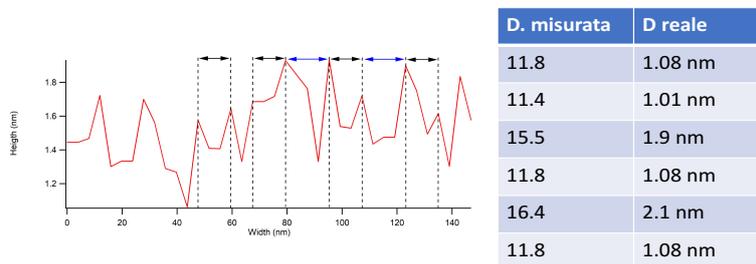
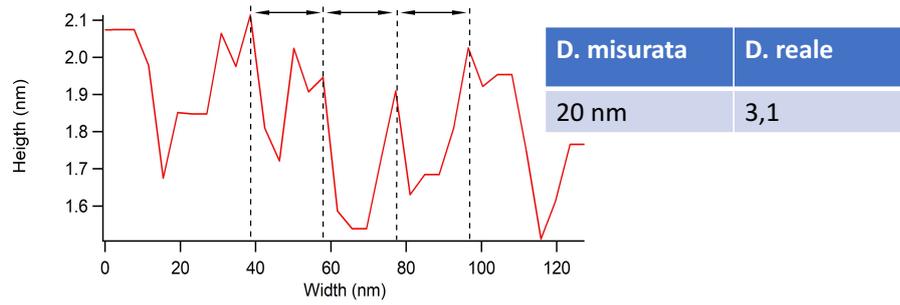


Figura 61. Solchi del DNA

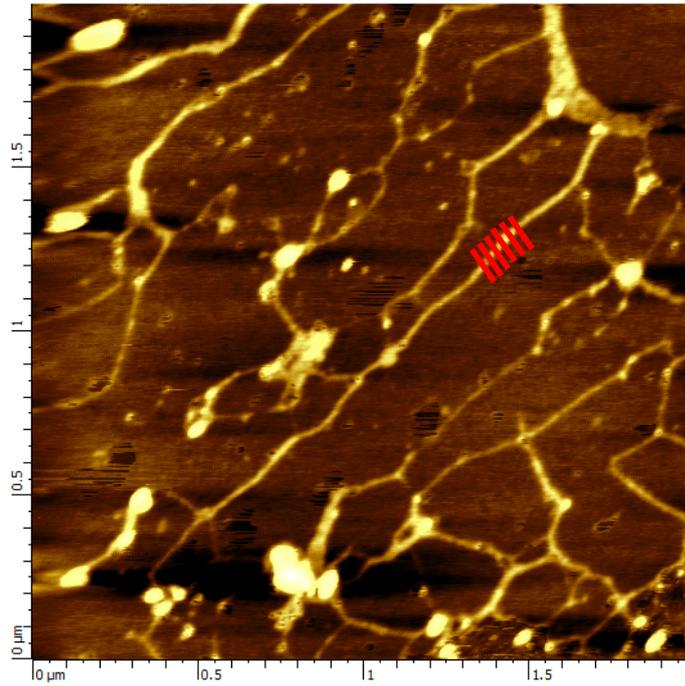


Figura 62 Sezioni trasversali che indicano l'andamento elicoidale dell'elica

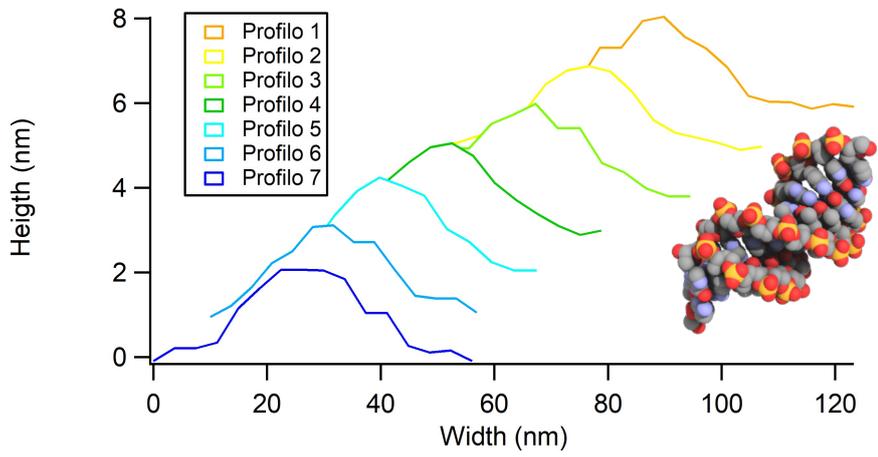


Figura 63

Le altezze riportate nella figura 59 mostrano dei valori interessanti in quanto rispecchiano la larghezza reale del DNA.

Andando a considerare varie sezioni consecutive di un filamento (fig.61), i due picchi che si osservano nelle varie curve si spostano in relazione all'andamento elicoidale del DNA.

L'analisi è stata eseguita su un frammento di DNA di un campione trattato con EDC di cui non è stata misurata la larghezza ma la lunghezza tramite una sezione parallela all'asse maggiore del filamento.

Quello che si può osservare dai vari picchi mostrati nel grafico (fig.60), è che molto probabilmente sono una rappresentazione del profilo del frammento: è evidente la presenza dell'alternanza tra solco minore e solco maggiore confermate dal valore reale ottenute dalle misure eseguite. Quindi il DNA sembra conservare in seguito alla polimerizzazione la caratteristica conformazione a doppia elica.

DNA non sonicato:

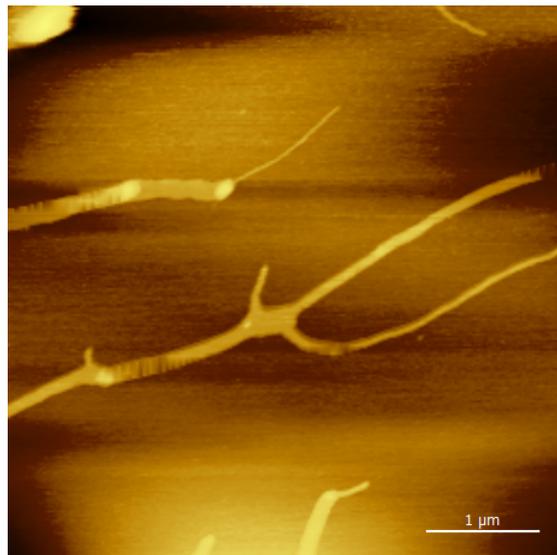


Figura 64 Immagine AFM del DNA non sonicato

DNA a basso peso molecolare:

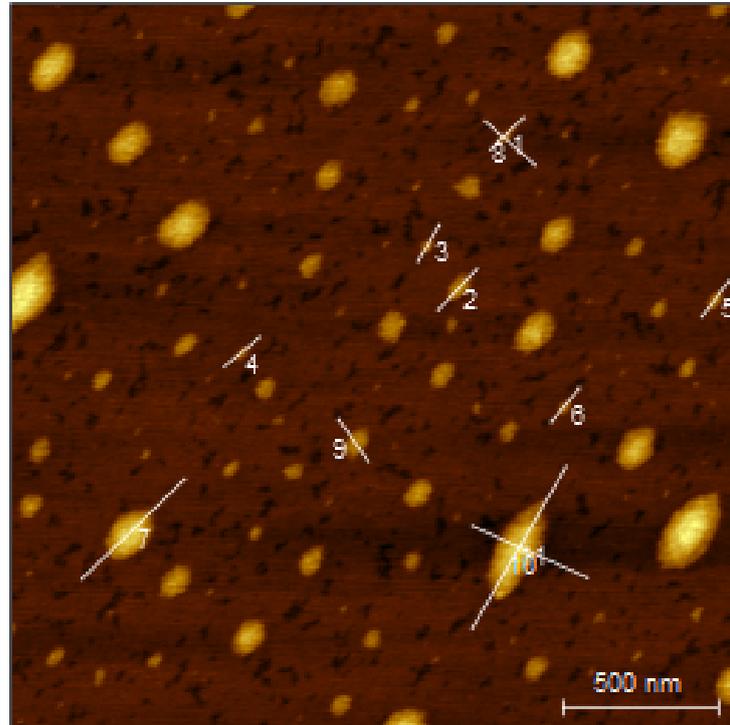
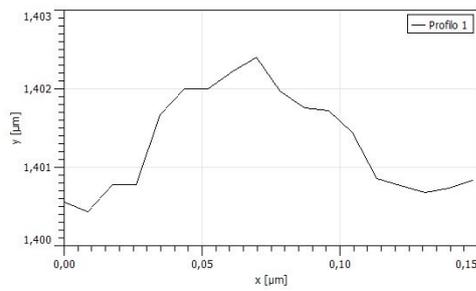
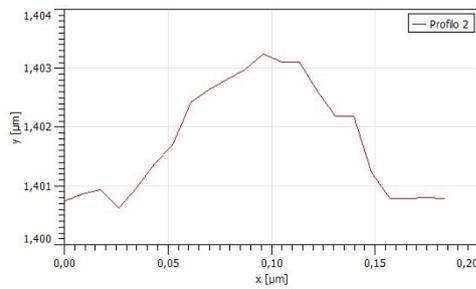


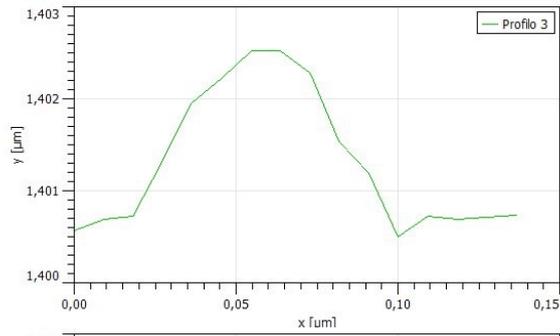
Figura 65 Sezioni di DNA a basso peso molecolare



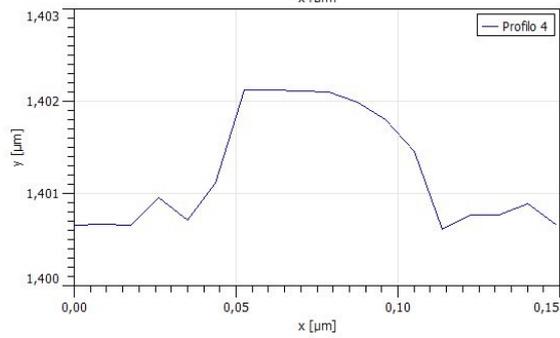
D. misurata	Altezza
61.18 nm	1.63 nm



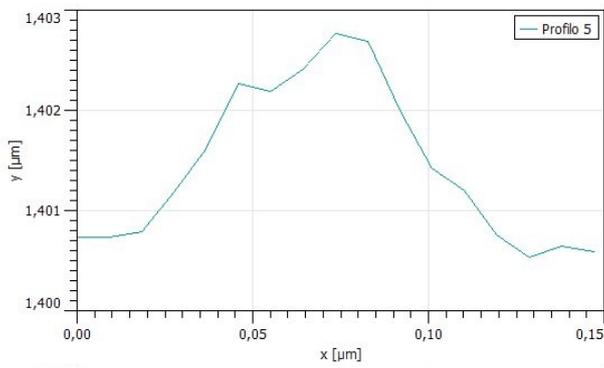
D. misurata	Altezza
112.5nm	2.48 nm



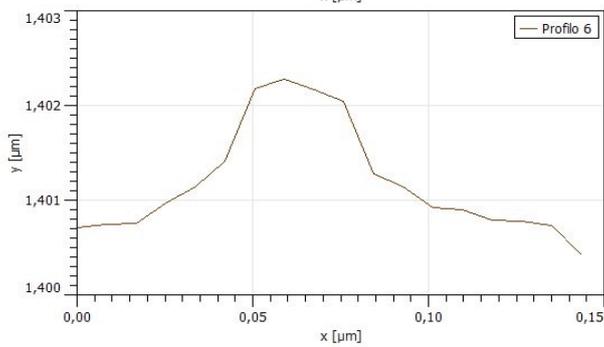
D. misurata	Altezza
52.78 nm	1.97 nm



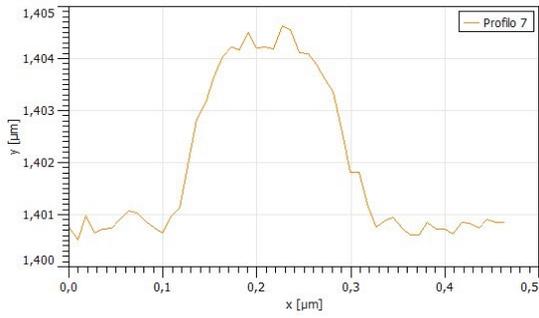
D. misurata	Altezza
47.89 nm	1.4 nm



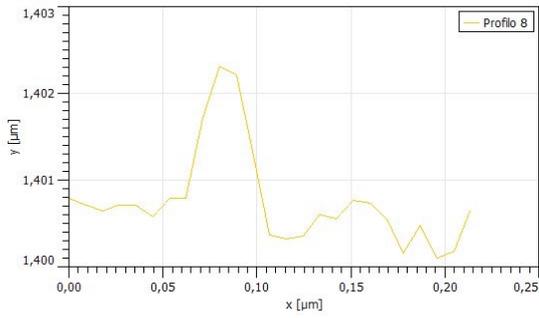
D. misurata	Altezza
72 nm	2 nm



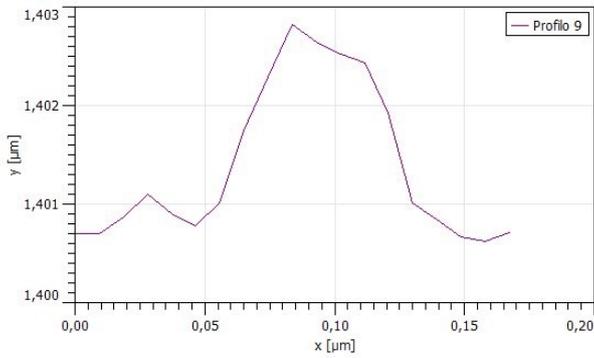
D. misurata	Altezza
55.12nm	1.5 nm



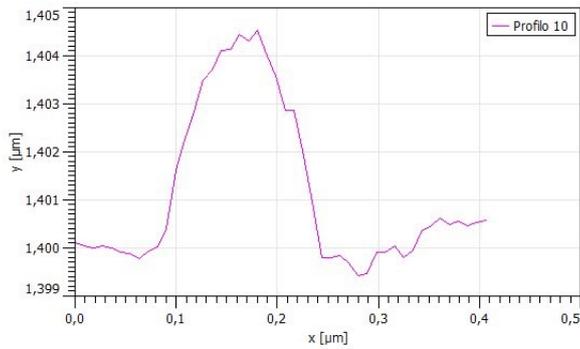
D. misurata	Altezza
378 nm	3.77 nm



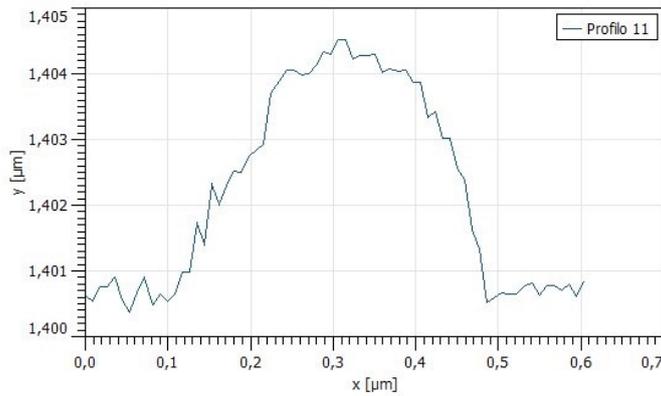
D. misurata	Altezza
15.54 nm	1.73 nm



D. misurata	Altezza
44.75 nm	1.9 nm



D. misurata	Altezza
203 nm	4.6 nm



D. misurata	Altezza
1146 nm	3.7 nm

Come si può vedere dalla figura 63, sono state tracciate delle sezioni che rappresentano le larghezze e le lunghezze dei vari segmenti. I valori calcolati seguendo la formula indicata sopra, sono stati riportati nelle tabelle insieme al valore delle altezze.

3.2.5 Analisi dati di GMP ed EDC mediante corsa elettroforetica

La 5'-guanosina monofosfato (GMP) si può trovare sia sotto forma di acido che di sale ed i principali cationi per determinare un differente grado di stabilizzazione sono: $K^+ > Na^+ > NH_4^+ > Li^+$ (indicati con ordine crescente di stabilizzazione).

Tutti i campioni utilizzati per questa tesi sono stati ottenuti servendosi di una soluzione madre costituita da 5'-GMP (K^+), la quale è stata prodotta a partire dalla 5'-GMP (H^+) (acquistata dalla ditta "ChemCruz"): è stato necessario effettuare una titolazione acido-base per poter scambiare la forma acida con quella salina.

- Titolazione acido-base

Per effettuare la titolazione acido-base della 5'-GMP, occorrono:

1. 500 mg di 5'-GMP/ H^+ ,
2. KOH 1M

Come primo passaggio è necessario servirsi di un becher per sciogliere 500 mg di 5'-GMP/ H^+ in 15 ml di acqua bidistillata, agitando delicatamente e in continuo per evitare che la GMP rimanga adesa sulle pareti e sul fondo del becher. Ultimato questo passaggio e servendoci di un apposito pHmetro, si procede con la titolazione. Dopo aver calibrato lo strumento, vedremo che la soluzione appena preparata avrà un $pH \approx 4$. Si rende necessario proprio ora la titolazione con KOH 1M, al fine di raggiungere un pH alcalino ($pH = 9.2$). A questo punto la soluzione apparirà dall'aspetto opaco. Si prosegue trasferendo

l'intera soluzione in due *falcon* da 50ml e aggiungendo poi Etanolo assoluto (99% w/w) in rapporto 1:3 (5'GMP-K⁺/EtOH).



Figura 66 Aspetto della GMP/K⁺ successivo all'aggiunta di ETOH.

Occorre effettuare due cicli di centrifuga a 4000 rpm per 15 minuti, al fine di far precipitare la 5'GMP-K⁺ grazie alla presenza dell'etanolo (si presenterà sotto forma di un composto bianco). Infine, dopo aver eliminato l'etanolo in eccesso, ultimare il tutto con la liofilizzazione per almeno 4 ore: sarà così possibile far avvenire la sublimazione di tutto l'etanolo per avere come composto ultimo la 5'GMP-K⁺ pura, sotto forma di polvere.



Figura 67 GMP-K⁺ liofilizzata.

Può essere utilizzata direttamente sciogliendola in acqua oppure conservata a -20°C .

I campioni per la corsa elettroforetica sono stati preparati sciogliendo 0.004 gr di GMP in 200 μl di H_2O partendo da una sua concentrazione iniziale di 10 mg/ml, mentre, i grammi di EDC da sciogliere all'interno della soluzione sono stati calcolati considerando i grammi iniziali di GMP e sono stati fatti correre su un gel di agarosio all'1% a 60V per 30° minuti. La concentrazione di PEG per l'analisi dell'interazione tra le molecole è stata del 30%. Le misure sono state fatte dopo 48h ed è stata valutata l'attività della molecola abiotica in relazione ai vari monomeri di GMP in due situazioni differenti: sia a temperatura ambiente (25°), sia ad una temperatura più alta di 40°C (lasciando il campione nel bagnetto termostato).

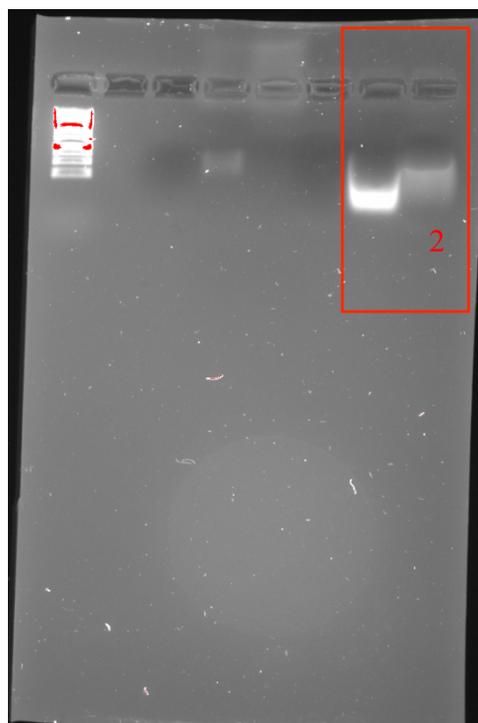
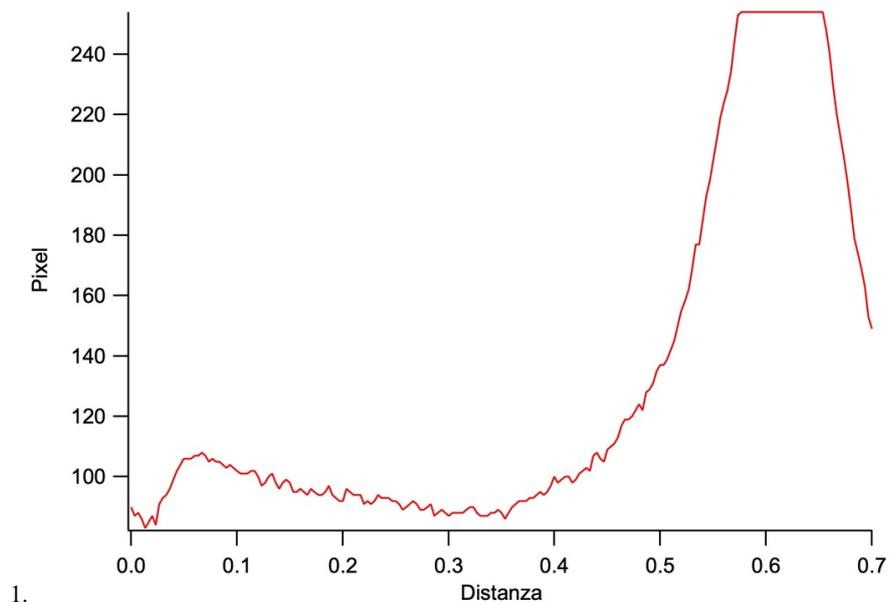


Figura 68 Nel riquadro rosso viene mostrata la GMP-PEG30%-EDC 25°C , GMP-PEG30%-EDC 40°C

Sembra interessante notare come la polimerizzazione non avviene solo fra frammenti che possono essere più o meno lunghi ma anche in situazioni come queste, dove, si parte da una soluzione contenente singoli monomeri. Si può notare come oltre alla capacità della GMP di formare legami idrogeno di tipo Hoogsten con altre basi uguali ad essa, quindi altre guanine, riesce a creare dei legami di tipo fosfodiesterico con le molecole di EDC.

La situazione ideale per far avvenire la reazione (fig.48) è quella dove la soluzione viene posta a temperature più alte (pozzetto 2), infatti mettendo in relazione la distanza compresa tra l'inizio del pozzetto e la fine della migrazione del campione con l'intensità dei pixel rilevati si osserva una riduzione della distanza tra i due.

Nel caso in cui la temperatura è maggiore la distanza risulta essere minore per cui il campione rilevato all'interno si trova ad una distanza minore rispetto all'inizio del pozzetto portandoci a pensare che la reazione di polimerizzazione dei monomeri sia avvenuta correttamente.



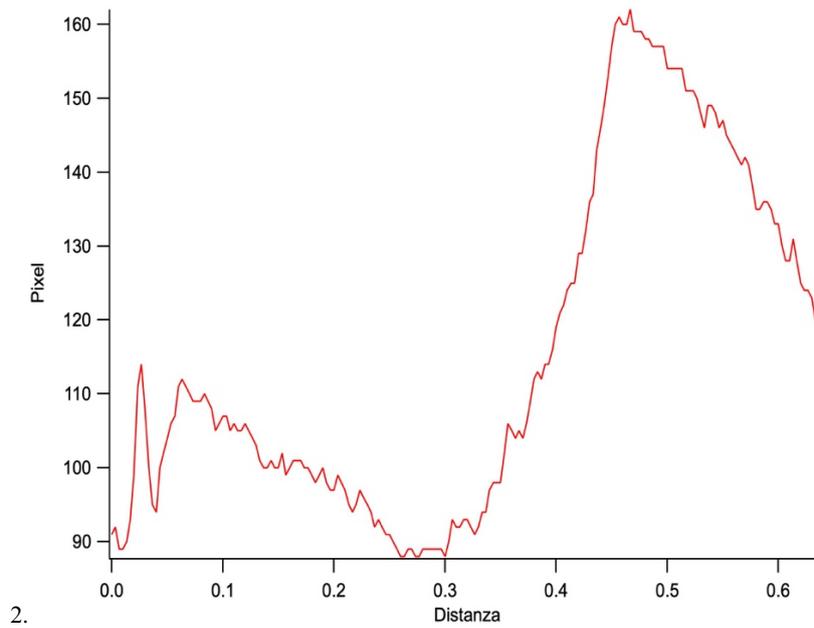


Figura 69. Curve che mostrano il picco dato dal rapporto tra i pixel e la distanza (tra il pozzetto e la fine del campione)

Attraverso l'utilizzo del programma Igor è stato possibile ottenere un valore corrispondente alla distanza (asse x) in cui viene maggiormente rilevata l'intensità dei pixel (asse y) calcolati:

- GMP-PEG30%-EDC 25°C: x= 0.57 y=254
- GMP-PEG30%-EDC 55°C: x= 0.45 y= 161

4. CONCLUSIONI

Questa tesi è stata rivolta allo studio della polimerizzazione del DNA mediante l'uso di leganti chimici non enzimatici. Per riuscire a dimostrare tale azione sono stati eseguiti diversi tentativi attraverso l'impiego di catene corte di DNA si salmone ottenute tramite sonicazione legate tra loro da molecole di 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). Infatti, questa molecola non enzimatica (quindi abiotica) è in grado di creare dei legami fosfodiesterici di tipo covalente tra un gruppo ossidrilico dello zucchero presente nel backbone della molecola di DNA e il fosfato posto immediatamente sopra o sotto di esso nella catena. Come risultato generale, il lavoro effettuato ha permesso di dimostrare che la polimerizzazione di frammenti di DNA avviene anche quando le lunghezze sono molto differenti e con un elevato o grado di disomogeneità, ovvero quando la segregazione all'interno di fasi ordinate non è più possibile. Questo tema è centrale nel contesto della formazione primordiale delle catene di acidi nucleici nel mondo prebiotico, dato che studi precedenti avevano dimostrato la formazione di catene di acidi nucleici a partire da oligonucleotidi piuttosto corti in condizioni di elevato affollamento e, soprattutto, in fasi acquose segregate. In particolare, l'ordinamento molecolare dei corti oligomeri all'interno dei domini segregati, grazie al quale le regioni terminali vengono a trovarsi così vicine da diventare siti di legame per la polimerizzazione, era stato considerato essere essenziale per la formazione delle catene più lunghe. Questo lavoro suggerisce che l'impossibilità di avere fasi segregate non inibisce la polimerizzazione non enzimatica.

Il lavoro si è svolto per prima cosa valutando la velocità di reazione dell'EDC in un'ambiente acquoso e la sua successiva trasformazione nel

prodotto finale a base di urea (EDU). Tale molecola è stata poi utilizzata come mezzo di polimerizzazione in sistemi contenenti frammenti di DNA di lunghezze e omogeneità differenti. Le analisi di spettroscopia UV-Vis fatte durante il progredire della reazione ci hanno permesso di caratterizzare in modo migliore la cinetica di reazione dell'EDC sia quando si trova in un ambiente acquoso semplice, sia quando è posto in un sistema composto da frammenti di DNA. Si noti che l'azione di polimerizzazione da parte dell'EDC sulle molecole di DNA è stata valutata sia in condizioni diluite che in presenza del PEG: in questo caso si è voluto verificare come la pressione osmotica esercitata dal polimero, che dovrebbe determinare un maggiore o minore affollamento dei frammenti di DNA, influisca sulla reazione.

Lo studio dei prodotti di reazione (in termini di lunghezza dei frammenti di DNA e di peso molecolare) è stato effettuato mediante AFM ed elettroforesi su gel. Da una parte, le immagini AFM hanno dimostrato come cambia l'aspetto del DNA frammentato rispetto ad uno polimerizzato in presenza di EDC; dall'altra, l'elettroforesi su gel di agarosio ha confermato che il peso molecolare dei frammenti aumenta con il progredire della reazione, indice del fatto che le catene diventano sempre più lunghe. Altro aspetto interessante è stato il confronto dei risultati della reazione di polimerizzazione svolta alle diverse temperature: i risultati mostrano che a temperatura ambiente (25°C) la polimerizzazione è molto evidente tranne quando si utilizza DNA a basso peso molecolare, mentre ad una temperatura di 55°C le catene risultano più lunghe rispetto a quelle ottenute a 25°C, ad eccezione dei frammenti ottenuti a tempi di sonicazione di 20' e 30', probabilmente piuttosto lunghi.

Quando i campioni di DNA frammentato sono preparati in presenza di PEG, si è osservato che ad una concentrazione di PEG al 40% l'interazione con l'EDC è molto efficace, probabilmente a causa della debole idratazione del sistema (ovvero, solo poche molecole di acqua sono a disposizione per il DNA, per cui l'attività dell'EDC risulta rafforzata). Probabilmente la spiegazione è strutturale: in tale contesto si potrebbe pensare che il DNA sia tendenzialmente predisposto a trovarsi in una situazione di affollamento (*crowded*) e quindi di potersi disporre nella sua forma ordinata liquido-cristallina facilitando i legami esterni con la molecola abiotica. In questo caso i risultati dell'elettroforesi mettono in evidenza che la polimerizzazione ad una temperatura di 25°C avviene più facilmente rispetto ai risultati ottenuti a temperature più alte, probabilmente a causa della sensibilità alla temperatura dell'impaccamento del DNA nella fase liquido-cristallina. Al contrario, lavorando in un ambiente diverso rispetto al precedente, ovvero utilizzando un PEG poco concentrato (25%), si determina all'interno del sistema una situazione di disordine maggiore in quanto l'idratazione dei frammenti di DNA è sicuramente maggiore e ci si allontana dalla fase liquido cristallina già ad una temperatura di 25°C. Per conseguenza, l'azione legante dell'EDC sarebbe meno visibile.

Per dimostrare che la molecola abiotica riesce a creare legami fosfodiesterici anche con frammenti molto più piccoli rispetto ai polimeri di DNA ottenuti per sonicazione, alcune prove di polimerizzazione sono stati svolte utilizzando monomeri di GMP. Anche in questo caso, lavori precedenti avevano dimostrato come il monomero in acqua potesse formare per autoassemblaggio eliche quaduple caratterizzate da una struttura molto simile a quella osservata nel DNA (elica doppia) e come in tali condizioni i residui

di ribosio fossero così vicini da poter interagire con EDC e formare legami fosfodiesterici. Gli esperimenti di polimerizzazione con EDC sono stati perciò condotti su campioni di GMP in fase esagonale, ovvero in una fase liquido-cristallina costituita da quadruplessi allineati e impaccati in un reticolo esagonale. Al fine di garantire il controllo delle condizioni di polimerizzazione e della presenza di un ambiente particolarmente concentrato su cui l'EDC potesse agire, i campioni sono stati preparati sotto stress osmotico, ovvero in presenza di PEG concentrato al 30%. I risultati di elettroforesi mostrano che l'EDC provoca la polimerizzazione, soprattutto visibile quando la temperatura è di 4°C, ovvero quando l'ordine liquido-cristallino è maggiore.

Nel loro insieme, questi risultati confermano uno scenario verso l'ipotesi dell'origine primordiale delle prime molecole biologiche portatrici dell'informazione genetica in cui la segregazione e l'affollamento molecolare giocano un ruolo fondamentale.

Bibliografia

1. Joyce GF, Szostak JW. Protocells and RNA Self-Replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Sep 4;10(9):a034801. doi: 10.1101/cshperspect.a034801. PMID: 30181195; PMCID: PMC6120706.
2. Fraccia TP, Smith GP, Zanchetta G, Paraboschi E, Yi Y, Walba DM, Dieci G, Clark NA, Bellini T. Abiotic ligation of DNA oligomers templated by their liquid crystal ordering. *Nat Commun.* 2015 Mar 10;6:6424. doi: 10.1038/ncomms7424. Erratum in: *Nat Commun.* 2015;6:7463. Yougwooo, Yi [Corrected to Youngwoo, Yi]. PMID: 25752840; PMCID: PMC4366493.
3. Naskar S , Saurabh S , Jang YH , Lansac Y , Maiti PK . Liquid crystal ordering of nucleic acids. *Soft Matter.* 2020 Jan 22;16(3):634-641. doi: 10.1039/c9sm01816f. PMID: 31840704.
4. Hennes RJ, Holm NG, Engel MH. Abiotic synthesis of amino acids under hydrothermal conditions and the origin of life: a perpetual phenomenon? *Naturwissenschaften.* 1992 Aug;79(8):361-5. doi: 10.1007/BF01140180. PMID: 1522920.
5. Todisco M.; Fraccia T.P.; Smith G. P.; Corno A.; Bethge L.; Klussman S.; Paraboschi E.M.; Asselta R.; Colombo D.; Zanchetta G.; Clark N.A.; Bellini T. Nonenzymatic Polymerization into long linear RNA templated by liquid crystal self-assembly (2018) *ACS Nano.*
6. Yang Y, Hang J. Fragmentation of genomic DNA using microwave irradiation. *J Biomol Tech.* 2013 Jul;24(2):98-103. doi: 10.7171/jbt.13-2402-005. PMID: 23814501; PMCID: PMC3671502.

7. Mann TL, Krull UJ. The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2004 Nov 15;20(5):945-55. doi: 10.1016/j.bios.2004.06.021. PMID: 15530791.
8. Elsner HI, Lindblad EB. Ultrasonic degradation of DNA. *DNA.* 1989 Dec;8(10):697-701. doi: 10.1089/dna.1989.8.697. PMID: 2693020.
9. Garafutdinov RR, Galimova AA, Sakhabutdinova AR, Chemeris AV. [PCR-based evaluation of sequence specificity of DNA fragmentation by ultrasound]. *Mol Biol (Mosk).* 2016 Mar-Apr;50(2):272-8. Russian. doi: 10.7868/S0026898416020051. PMID: 27239847.
10. Pyne AL, Hoogenboom BW. Imaging DNA Structure by Atomic Force Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2016;1431:47-60. doi: 10.1007/978-1-4939-3631-1_5. PMID: 27283301.
11. Hansma HG, Laney DE, Bezanilla M, Sinsheimer RL, Hansma PK. Applications for atomic force microscopy of DNA. *Biophys J.* 1995 May;68(5):1672-7. doi: 10.1016/S0006-3495(95)80343-7. PMID: 7612809; PMCID: PMC1282069.
12. Iwaura R. Visualization of periodic electric polarizability of helical nanofibers formed by self-assembly of nucleotide-bearing bolaamphiphiles and natural-source DNA as a template. *Soft Matter.* 2017 Nov 15;13(44):8293-8299. doi: 10.1039/c7sm01420a. PMID: 29072751.
13. Sennato S. *Scanning Probe Microscopy: AFM.* (2017)
14. Orellana A. G. Cristalli liquidi basati sul DNA: modellizzazione e simulazioni al computer
15. T. Rades, A. Mullertz and Y. Perrie. *Springer Controlled Release Society Book Series on Advances in Science and*

Technology: Analytical Techniques in Pharmaceutical Sciences, Section
5 Imaging Techniques, Chapter 21 Applications of AFM
in Pharmaceutical Sciences. (Eds.), (2014)', n.d.