



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale in  
Biologia Molecolare e Applicata (LM-6)**

**SVILUPPO DI PROTOCOLLI DI FUNZIONALIZZAZIONE  
DI SUPERFICI CON BIOMOLECOLE PER IL  
RICONOSCIMENTO VIRALE**

**BIOMOLECULAR SURFACES FUNCTIONALIZATION  
PROTOCOLS FOR VIRUS DETECTION**

Tesi di Laurea Magistrale di:

**Margherita Recanatini**

Relatore:

**Chiar.mo Prof. Paolo Mariani**

Correlatore:

**Dott. Yuri Gerelli**

**Sessione estiva**

**Anno Accademico 2023/2024**

*“Gör som havet, våga”*



# INDICE

|                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Capitolo 1 INTRODUZIONE.....</b>                                                                          | <b>8</b>  |
| <b>1.1 La pandemia da COVID-19 ed i sistemi per la rilevazione di SARS-CoV-2 dai campioni biologici.....</b> | <b>10</b> |
| <b>1.1.1 I coronavirus e la pandemia da COVID-19.....</b>                                                    | <b>10</b> |
| <b>1.1.2 Principali sistemi di rilevazione di SARS-CoV-2 in commercio.....</b>                               | <b>13</b> |
| <b>1.2 Nuove metodiche per rilevare SARS-CoV-2.....</b>                                                      | <b>17</b> |
| <b>1.2.1 I biosensori e la loro applicazione nella diagnosi da COVID-19.....</b>                             | <b>18</b> |
| <b>Capitolo 2 MATERIALI E METODI.....</b>                                                                    | <b>20</b> |
| <b>2.1 La Microbilancia a cristalli di quarzo.....</b>                                                       | <b>20</b> |
| <b>2.1.1 Introduzione alla microbilancia a cristalli di quarzo con dissipazione (QCM-D).....</b>             | <b>20</b> |
| <b>2.1.2 Proprietà piezoelettriche dei cristalli di quarzo e l'equazione di Sauerbrey.....</b>               | <b>22</b> |
| <b>2.1.3 Pulizia sensore e montaggio QCM-D.....</b>                                                          | <b>26</b> |
| <b>2.2 Il Polietilenglicole (PEG).....</b>                                                                   | <b>27</b> |
| <b>2.2.1 Interazione tra polimeri di PEG e oro.....</b>                                                      | <b>28</b> |
| <b>2.2.2 Protocollo di funzionalizzazione dei sensori con il PEG.....</b>                                    | <b>30</b> |
| <b>2.3 L'albumina sierica bovina (BSA).....</b>                                                              | <b>31</b> |
| <b>2.3.1 Protocollo di interazione tra BSA e polimeri di PEG.....</b>                                        | <b>32</b> |
| <b>2.3.2 Test di long-injection di BSA in QCM-D.....</b>                                                     | <b>33</b> |

|                                                                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.4 Enzima 2 di conversione dell'angiotensina (ACE2).....</b>                                                             | <b>33</b> |
| <b>2.4.1 ACE2 nella sindrome da SARS-CoV-2.....</b>                                                                          | <b>35</b> |
| <b>2.4.2 Protocollo di interazione tra ACE2 e PEG in QCM-D.....</b>                                                          | <b>36</b> |
| <b>2.5 Anticorpi Policlonali Anti-BSA.....</b>                                                                               | <b>37</b> |
| <b>2.5.1 Interazione tra anticorpi anti-BSA e BSA misurata tramite QCM-D .....</b>                                           | <b>39</b> |
| <b>2.6 SARS-CoV-2 Virus Like Particles.....</b>                                                                              | <b>39</b> |
| <b>2.6.1 Protocollo di interazione tra VLP e PEG in QCM-D.....</b>                                                           | <b>40</b> |
| <b>2.7 Esecuzione esperimento generico di funzionalizzazione, assorbimento e binding su una superficie.....</b>              | <b>41</b> |
| <b>Capitolo 3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>                                                                               | <b>43</b> |
| <b>3.1 Funzionalizzazione delle superfici in oro con il PEG.....</b>                                                         | <b>43</b> |
| <b>3.1.1 Funzionalizzazione della superficie con PEG-NHS e successiva interazione con BSA.....</b>                           | <b>44</b> |
| <b>3.1.2 Test di passivazione della superficie.....</b>                                                                      | <b>46</b> |
| <b>3.1.3 Test di long-injection di BSA.....</b>                                                                              | <b>48</b> |
| <b>3.2 Test di sensibilità.....</b>                                                                                          | <b>50</b> |
| <b>3.2.1 Test a tre iniezioni di BSA 0.5 mg/ml.....</b>                                                                      | <b>50</b> |
| <b>3.2.2 Long injection BSA 0.3 mg/ml.....</b>                                                                               | <b>52</b> |
| <b>3.3 Interazione tra BSA e anticorpi Anti-BSA.....</b>                                                                     | <b>55</b> |
| <b>3.4 Interazione tra SARS-CoV-2 Virus Like Particles e superfici funzionalizzate con PEG-CH<sub>3</sub> e PEG-NHS.....</b> | <b>57</b> |
| <b>3.4.1 Interazione tra VLP e PEG-NHS.....</b>                                                                              | <b>57</b> |

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.2 Interazione VLP e PEG-CH <sub>3</sub> .....                                               | 60 |
| 3.5 Interazione tra ACE2 e PEG-NHS.....                                                         | 62 |
| Capitolo 4 PRODUZIONE RICOMBINANTE DI ACE2f.....                                                | 66 |
| 4.1 Introduzione ad ACE2f.....                                                                  | 66 |
| 4.1.1 Linee cellulari e terreni di coltura.....                                                 | 67 |
| 4.1.2 Protocollo di crescita e isolamento delle colonie trasformate di BL21 in LB-agar.....     | 68 |
| 4.1.3 Protocollo di crescita cellulare ed estrazione.....                                       | 68 |
| 4.2 Protocollo di purificazione di ACE2f.....                                                   | 70 |
| 4.2.1 Protocollo di lisi cellulare.....                                                         | 70 |
| 4.2.2 Protocollo di purificazione mediante cromatografia di affinità.....                       | 70 |
| 4.2.3 Protocollo di dialisi.....                                                                | 72 |
| 4.2.4 SDS-PAGE.....                                                                             | 72 |
| 4.3 Risultati della produzione ricombinante di ACE2f.....                                       | 74 |
| 4.3.1 Analisi dei cloni ricombinanti su LB-Agar.....                                            | 74 |
| 4.3.2 Analisi del contenuto proteico delle colture cellulari pre e post induzione con IPTG..... | 76 |
| 4.3.3 Analisi dei risultati di purificazione di ACE2f.....                                      | 78 |
| Capitolo 5 CONCLUSIONI.....                                                                     | 82 |
| BIBLIOGRAFIA.....                                                                               | 88 |
| RINGRAZIAMENTI.....                                                                             | 93 |



# Capitolo 1

## INTRODUZIONE

Lo scopo di questo lavoro di tesi ha riguardato lo sviluppo e l'ottimizzazione di protocolli per la funzionalizzazione di superfici metalliche con molecole polimeriche e biologiche per lo sviluppo di interfacce multivalenti per il riconoscimento virale da utilizzare come base per lo sviluppo di bio-sensori. In questo lavoro di tesi si è proposto di sviluppare protocolli di funzionalizzazione di superfici inorganiche tramite polimeri appartenenti alla famiglia del Polietilenglicole (PEG). Il primo obiettivo del lavoro è stato quello di formare uno strato di PEG su superfici in oro che potesse poi essere con biomolecole che, all'interno del biosensore, possano ricoprire il ruolo di recettori selettivi per legare le molecole biologiche di interesse disperse in soluzione (analiti). Come step successivo del lavoro di tesi, è stata valutata la possibilità di utilizzare molecole di PEG anche per inibire l'assorbimento non-specifico che alcune biomolecole, come ad esempio le proteine, mostrano in presenza di superfici metalliche. Lo scopo finale del progetto *MuSIX*, che non rientra in questo lavoro di tesi per motivi di tempo, sarà quello di ottenere una miscela di differenti tipologie di PEG per ottimizzare l'efficienza del biosensore in termini di sensibilità e specificità della cattura di analiti in soluzione.



Nel lavoro di tesi qui presentato, sono stati utilizzati come recettori da legare al PEG, sia il recettore umano ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) che la proteina BSA (Bovine Serum Albumin). A tale scopo, attraverso esperimenti di microbilancia al quarzo, è stato di fondamentale importanza assicurarsi che tra il polimero e le proteine si formasse un legame chimico stabile (ad esempio di tipo covalente) in modo tale che il sistema PEG+recettore potesse essere utilizzato in seguito nella rilevazione di analiti specifici come la proteina Spike per ACE2 e anticorpi anti-BSA per la BSA. Una rappresentazione schematica della funzionalizzazione sistema finale mostrata in Figura 1.

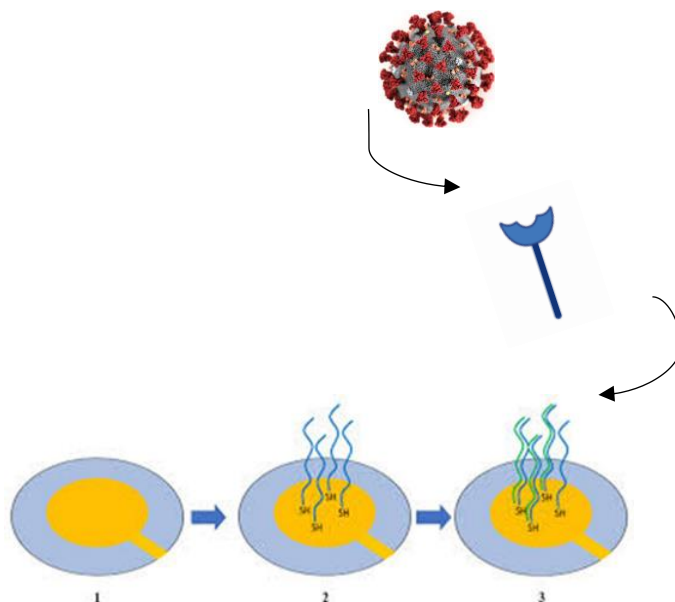


Figura 1 *Rappresentazione dei passaggi del protocollo di funzionalizzazione di un sensore QCM-D per la rilevazione di SARS-CoV-2; A: Sensore QCM-D in quarzo funzionalizzato in oro; B: Strato di Polietilenglicole sulla superficie in oro; C: Legame tra il Polietilenglicole e la proteina ACE2; D: Rilevazione del virus SARS-CoV-2 tramite l'interazione con ACE2.* Fonti: <https://www.biorender.com/>; <https://adranox.com/>; <https://www.biolinscientific.com/>.

Per rendere il biosensore (e gli esperimenti eseguiti durante la tesi) più fruibili in termini economici ed operativi, parte del mio lavoro ha riguardato lo sviluppo di un protocollo per la produzione, mediante tecniche ricombinanti, della

subunità della proteina ACE2 responsabile dell'interazione con la proteina Spike di SARS-CoV-2. In questo modo è possibile ottenere recettori altamente specifici per la proteina Spike a costi contenuti rispetto a quelli di mercato. Questa parte del progetto è stata effettuata presso il laboratorio *New York-Marche Structural Biology Center* (NY-MaSBiC).

## **1.1 La pandemia da COVID-19 ed i sistemi per la rilevazione di SARS-CoV-2 dai campioni biologici**

### ***1.1.1 I coronavirus e la pandemia da COVID-19***

A partire dall'11 marzo 2020 è stato dichiarato lo stato di pandemia a causa della rapida diffusione del virus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), fautore dell'insorgenza di polmoniti anomale manifestanti una sintomatologia tipica delle polmoniti virali recante forte dispnea, dolore toracico, febbre e compromissione dello stato di pervietà delle vie aeree con tosse secca ed evidente espettorato. Tale status patologico, ribattezzato COVID-19 (Corona Virus Disease 2019), è recato dal settimo virus umano appartenente alla famiglia dei *Coronaviridae*, virus responsabili sia di malattie respiratorie di debole entità, quali raffreddore comune o sindromi influenzali, a gravi patologie respiratorie manifestanti polmonite atipica come nel caso della SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) e la MERS (Middle East Respiratory Syndrome)

sindromi epidemiche comparse rispettivamente nel 2002 e 2012. Lo stato emergenziale globale portato da COVID-19 ha fatto insorgere sempre più la necessità di sviluppare metodi di rilevamento virale rapidi, selettivi e altamente sensibili per la diagnosi della patologia. Tale esigenza ha condotto i ricercatori a migliorare e adattare metodi di rilevamento su base antigenica o molecolare precedentemente in uso e validati nella detezione di altri microrganismi patogeni per l'uomo. Inoltre, il carattere pandemico dell'infezione ha spinto ricercatori e industria a sviluppare metodi che fossero accessibili a tutte le fasce della popolazione, e quindi a costo ridotto.

Nel dettaglio, SARS-CoV-2 è un virus a RNA (+) a singolo filamento di 30 kb contenuto all'interno di un nucleocapside racchiuso da un *envelope* lipidico che espone sulla sua superficie tre complessi proteici coinvolti nel meccanismo di patogenesi virale ed ampiamente sfruttati per lo sviluppo di sistemi di rilevazione virale a scopo diagnostico. I complessi proteici esposti sulla superficie dell'involucro lipidico sono principalmente tre: la proteina di membrana M, una proteina specifica dell'*envelope*, E, e la proteina Spike, S, responsabile della creazione della conformazione a corona del virus (tratto fenotipico da cui deriva la denominazione della famiglia virale).

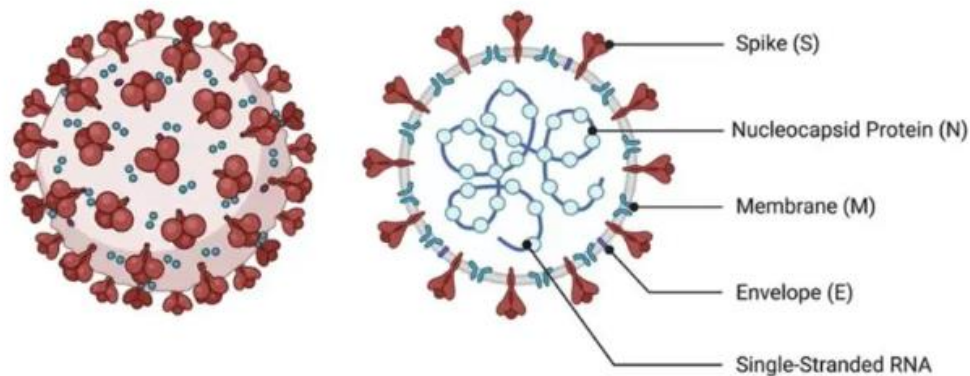


Figura 2 Immagine stilizzata rappresentante il genoma virale e dell'*envelope* lipidico da cui sporgono le proteine virali M, E ed S. Fonte: <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01108-8>

Tra queste, la proteina S è stata largamente utilizzata nello sviluppo e ottimizzazione di tecniche diagnostiche per la rilevazione di SARS-CoV-2. Si tratta di una proteina costituita da due subunità S1, recante un dominio, l'RBD (Receptor Binding Domain) che permette al virus di interagire con la proteina recettoriale umana ACE2 espressa a livello polmonare garantendo la fusione dell'*envelope* lipidico del virus con la membrana cellulare, e la subunità S2. Nel momento in cui la subunità S1 stabilisce un'interazione con il recettore ACE2, le due subunità S1 ed S2 vengono tagliate da una proteasi che porta all'attivazione del dominio S1. Tale modifica permette la fusione tra lo strato lipidico dell'*envelope* e il doppio strato fosfolipidico della membrana della cellula ospite; il virus rilascia così il genoma complessato nel nucleocapside all'interno del citosol.

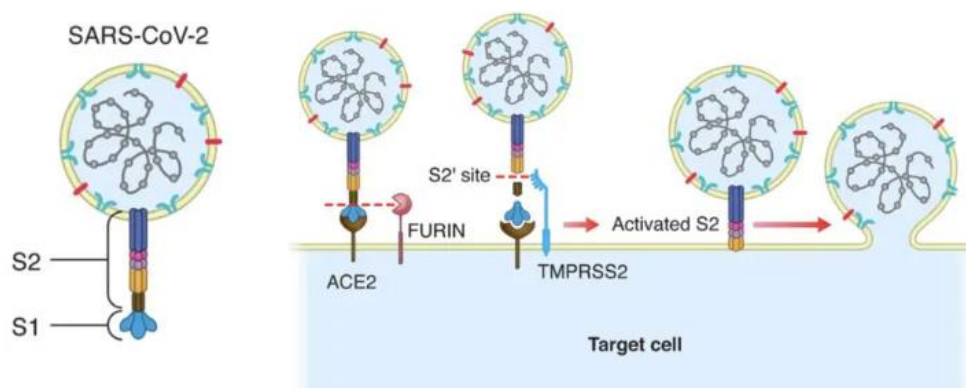


Figura 3 Immagine stilizzata delle fasi di riconoscimento ligando-recettore tra la subunità S1 della proteina Spile di SARS-CoV-2 e ACE2 con successiva fusione dell'involucro lipidico virale con la membrana cellulare dell'ospite. Fonte: <https://doi.org/10.1530/JME-21-0282>

L'infezione vede una via di trasmissione aerea mediante diretto contatto della mucosa respiratoria con aerosol infetto o *droplets* secreti direttamente da individui precedentemente contagiati. Nonostante sia stata validata anche una via di trasmissione sessuale ed il coinvolgimento di altre mucose, come quella oculare, la mucosa nasofaringea risulta la prima porta di accesso del virus nell'ospite e perciò i campioni biologici scelti per effettuare diagnosi della malattia riguardano principalmente tamponi naso e oro-faringei, salivari ed espettorato.

### **1.1.2 Principali sistemi di rilevazione di SARS-CoV-2 in commercio**

Dall'inizio della fase pandemica, molteplici test per la detezione della sindrome da COVID-19, differenti in termini economici, competenze richieste nella manipolazione del campione e tempistiche nell'ottenimento dei risultati, sono stati introdotti in commercio.

Tra i vari è possibile trovare quelli antigenici basati su tecniche immuno-cromatografiche che vedono l'utilizzo di un sistema di quattro anticorpi per ricercare antigeni esposti da SARS-CoV-2. Due degli anticorpi, uno nella linea di controllo che lega in differente epitopo dell'analita e uno nella linea di test capace di legare gli anticorpi marcati, sono legati alla superficie di una striscia in cellulosa in cui viene effettuata la corsa cromatografica e due anticorpi, marcati con molecole colorate (generalmente oro colloidale), che vengono aggiunti al campione. Una volta prelevato il campione attraverso un tampone nasale, quest'ultimo viene stemperato all'interno della soluzione contenente i due anticorpi marcati e versato all'interno della cella porta-campione presente nella striscia cromatografica. Il test risulta positivo nel momento in cui risultano delle bande colorate sia nella linea di test che nella linea di controllo.

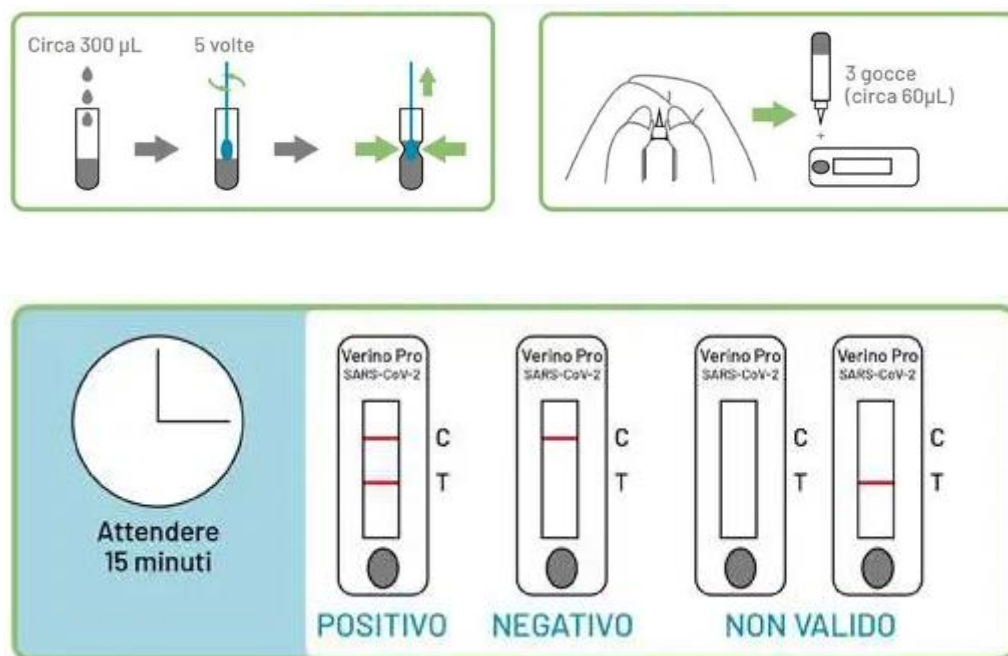


Figura 4 Rappresentazione schematica di un protocollo per la rilevazione di antigeni di SARS-CoV-2 mediante tecniche immuno-cromatografiche. Fonte: <https://www.microbiologiaitalia.it/>

La tecnica permette certamente un sistema rapido per la detezione del virus, ma si tratta di un test prettamente qualitativo, che può oltremodo condurre all'insorgenza di falsi positivi o falsi negativi poiché si tratta di una metodica strettamente dipendente dalla manualità dell'operatore e della biodisponibilità del campione (nonché fase della malattia).

Un altro esame utile alla rilevazione della malattia è l'analisi del titolo anticorpale delle immunoglobuline prodotte durante e successive l'infezione, presenti nel siero dei pazienti. Tali anticorpi, quali IgM (Immunoglobulina M) e IgG (Immunoglobulina G) risultano biodisponibili in elevate quantità e rivolti contro il virus rispettivamente indicativi di un'infezione di recente comparsa, come nel caso delle IgM, e di un'infezione passata nel caso sia alto il titolo anticorpale delle IgG. La metodica vede il prelievo di un campione di sangue venoso dal paziente, da cui viene isolato il siero e su di esso valutato il titolo anticorpale mediante tecniche immuno-enzimatiche, immuno-cromatografiche e chemiluminescenti. Il metodo risulta sia qualitativo che quantitativo, poiché consente di ricavare il titolo anticorpale, ovvero il numero di anticorpi prodotti nei confronti dello specifico antigene ricercato.

Il test di rilevazione di SARS-CoV-2 considerato il *gold standard* per la sua diagnostica è un test molecolare basato su tecniche di amplificazione degli acidi nucleici quale la RT-qPCR (Polymerase Chain Reaction). La tecnica, che rientra tra i NAAT (Nucleic Acid Amplification Test) vede l'utilizzo di tamponi naso e

oro-faringei come campioni biologici di partenza per l'estrazione del genoma virale, che è a RNA, effettuare una prima reazione di retro-trascrizione (RT) del genoma estratto ed una successiva reazione di amplificazione (qPCR) utilizzando primer specifici per la sequenza nucleotidica di frammenti del genoma virale e Taq Polimerasi come enzima che conferisce elevata processività al sistema. Il sistema qPCR si tratta di una *real-time PCR*, che consente di determinare in tempo reale la quantità di amplificati prodotti durante la reazione di PCR; ciò è reso possibile dalla presenza di molecole fluorescenti, *probes*, tipicamente viene utilizzata la TaqMan: sonde di oligonucleotidi con estremità marcate rispettivamente con un fluoroforo ed un *quencher* per bloccare la fluorescenza; nel momento in cui l'oligonucleotide ibridizza con il filamento amplificato in fase di allungamento della PCR, l'attività esonucleasica della Taq Polimerasi permette l'escissione del *quencher*, rendendo il fluoroforo capace di emettere fluorescenza. Il segnale fluorescente sarà quindi proporzionale al quantitativo di amplificati prodotti durante la reazione di PCR.

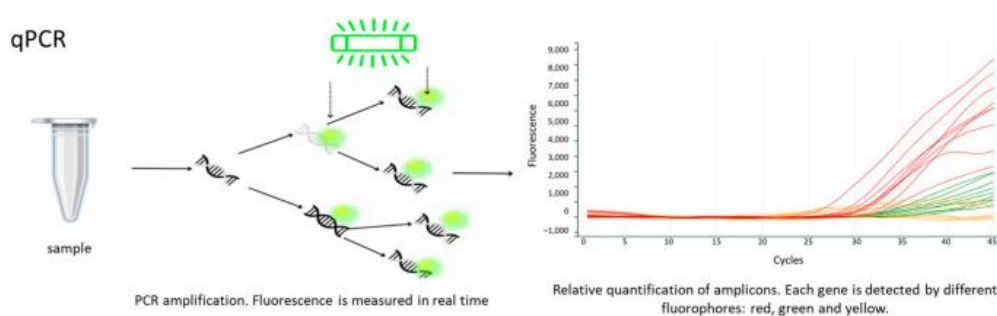


Figura 5 Schema rappresentativo di un protocollo di amplificazione mediante tecniche di qPCR. Al campione di RNA estratto da tamponi nasali e oro-faringei, vengono aggiunti gli enzimi per effettuare la reazione a catena della polimerasi, i primers, la sonda fluorescente. Fonte: <https://doi.org/10.3390%2Fijms241210233>



Il test risulta ulteriormente utile nell'identificazione di mutazioni a carico di sequenze geniche virali che codificano per quegli elementi coinvolti nel meccanismo di patogenesi, che hanno permesso al SARS-CoV-2 di acquisire maggiore trasmissibilità o rischi legati alla patogenicità, permettendo al clinico di identificare la variante tra quelle in circolazione che ha infettato il paziente sottoposto al test. Tra le varianti, la maggior parte reca mutazioni nelle proteine dell'envelope quali la proteina Spike. Tale test è stato pertanto utile per studi epidemiologici e di diffusibilità e virulenza del patogeno. Tuttavia, oltre a problematiche legate ai costi per l'utilizzo della tecnica in questione, nonché il trattamento del campione, la tecnica mostra tempistiche molto lunghe che inficiano la necessaria tempestività nella diagnosi e non fornisce indicazioni in merito al valore di Ct (*Cycle threshold*), che dovrebbe rappresentare in quale ciclo di amplificazione si ha un aumento esponenziale del numero di amplificati prodotti. In questo caso il Ct non fornisce dati riguardanti il numero delle particelle virali presenti nel campione e nemmeno il numero di molecole di RNA contenute nel campione biologico [Dorta-Gorrin 2023] affibbiando al test valenza più di tipo qualitativa che quantitativa.

## **1.2 Nuove metodiche per rilevare SARS-CoV-2**

Date i lunghi tempi di attesa e i costi elevati di metodiche di rilevazione virale quali la *gold standard* RT-qPCR o la poca affidabilità determinata dai test antigenici, è emersa la necessità di sviluppare dei sistemi che consentano una diagnosi rapida, affidabile e che possa essere valida sia in termini qualitativi che in termini quantitativi. A tale scopo sono ora in stadio di sviluppo ed

ottimizzazione sistemi che vedono lo sviluppo di sensori, capaci di rilevare la presenza di un analita disperso in un campione biologico, sfruttando specifiche proprietà chimiche e fisiche delle molecole biologiche: i biosensori.

### ***1.2.1 I biosensori e la loro applicazione nella diagnosi da COVID-19***

I sensori applicati alla ricerca e alla diagnostica in ambito medico, biosensori, sono sistemi analitici che utilizzano interazioni chimico-fisiche per interagire con molecole in soluzione; l'interazione tra la componente attiva del sensore e la biomolecola genera un segnale che il sensore stesso è in grado di trasdurre ad un rilevatore. La maggior parte dei sensori sviluppati ed in corso di validazione si basano su fenomeni ottici [Davies 2021], variazioni di potenziali elettrochimici, piezoelettricità [Alromithy 2022] o chemiluminescenza. Lo studio approfondito della chimica ed ingegneria dei materiali ha portato all'ottimizzazione della scelta dei materiali per realizzare supporti e superfici che per loro caratteristiche chimiche (quali ad esempio idrofilia, idrofobicità, carica elettrica) riescono a stabilire interazioni stabili o transienti con molecole biologiche. Ad oggi, nanotubi, nanoparticelle e superfici in grafene o oro sono stati particolarmente testati ed applicati al fine di realizzare elettrodi o transistor ad effetto di campo [Romagnoli 2023], poiché facilmente funzionalizzabili sfruttando interazioni idrofobiche, processi ossidativi, *coupling* peptidico nel e la chimica dei tioli nel caso dell'oro. Vi sono ulteriori sistemi, realizzati sulla base di proprietà ottiche di opalescenza e olografia, che sfruttano interferenze della luce incidente e riflessa dalla superficie stessa [Davies 2021]. Tra i vari sistemi applicati allo sviluppo di biosensori rivolti alla diagnosi di un'infezione

da SARS-CoV-2, i transistor ad effetto di campo basati su grafene, (gFET) [Romagnoli 2023], si sono dimostrati ottime piattaforme per la trasduzione dell'interazione tra il recettore umano ACE2 e la proteina Spike virale presente nell'*envelope* virale in un segnale elettrico facilmente interpretabile.

## Capitolo 2

### MATERIALI E METODI

#### 2.1 La Microbilancia a cristalli di quarzo

##### *2.1.1 Introduzione alla microbilancia a cristalli di quarzo con dissipazione (QCM-D)*

La microbilancia a cristalli di quarzo (QCM-D, acronimo di *quartz-crystal microbalance with dissipation monitoring*) è uno strumento che consente lo studio e la quantificazione della massa e delle proprietà viscoelastiche di strati molecolari adesi su una superficie solida. Questa superficie è depositata (tipicamente per *sputtering*) su di una sottile lamina cristallina di quarzo che, all'interno dello strumento, viene messa in oscillazione sfruttando la piezoelettricità. In questo lavoro di tesi è stato utilizzato lo strumento openQCM NEXT (Novaetech Srl), una microbilancia a cristalli di quarzo capace di monitorare anche la dissipazione di energia.

Un materiale è definito piezoelettrico se subisce una deformazione di tipo elastico nel momento in cui è sottoposto ad un campo elettrico. Nel dettaglio, l'induzione di un momento di dipolo in senso verticale sposta le cariche del

materiale rispetto la loro posizione di equilibrio e provoca una compressione del materiale; quando il momento di dipolo agisce in orizzontale, le cariche nette del materiale si distribuiscono causando uno stiramento del materiale rispetto alla deformazione compressa (Figura 6). La piezoelettricità dei cristalli di quarzo consta nel fatto che presentano intrinsecamente molti dipoli elettrici e la loro mancanza di simmetria rende più facile la variazione di dipolo nel momento in cui viene applicato il voltaggio.

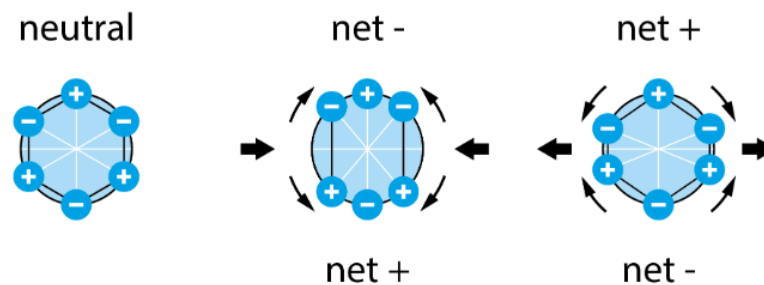


Figura 6 Rappresentazione schematica del fenomeno piezoelettrico. Rispetto alla posizione di equilibrio (immagine a sinistra), l'induzione di un dipolo elettrico genera uno spostamento delle cariche con una compressione del cristallo in direzione opposta allo spostamento di carica. Fonte: <https://www.biolinscientific.com/>

Il fenomeno deformante ha pertanto una direzionalità opposta rispetto a quella del campo elettrico agente sulla superficie del materiale e tale meccanismo è definito come *effetto piezoelettrico indiretto*, ampiamente utilizzato ed ingegnerizzato in ambito elettrico, acustico e meccanico per lo sviluppo di sensori e celle ad alto potenziale di rilevamento [Edvarsson 2024].

Nel caso della QCM-D, il materiale piezoelettrico è un cristallo sottile di quarzo (detto anche sensore nel lavoro di tesi). Tale sensore è caratterizzato da una frequenza di risonanza fondamentale, nell'ordine dei MHz, definita come  $f_0$ . Il

valore esatto di  $f_0$  dipende dalle caratteristiche fisiche del sensore, in particolare dal suo spessore, e dalle condizioni ambientali quali la temperatura e presenza di gas o liquidi in contatto con la superficie del sensore [Dixon 2008].

### ***2.1.2 Proprietà piezoelettriche dei cristalli di quarzo e l'equazione di Sauerbrey***

I cristalli utilizzati per gli esperimenti di QCM-D presentati in questa tesi sono in quarzo e presentano su di una faccia una superficie di 1 cm<sup>2</sup> che rappresenta la parte attiva del sensore, ovvero la superficie che è in contatto con le soluzioni di interesse e su cui verranno depositati i materiali studiati in questa tesi. Sulla faccia opposta sono presenti due elettrodi di contatto responsabili della conduzione del campo elettrico (Figura 7). La frequenza di risonanza di un cristallo subisce variazioni nel momento in cui del materiale (in questo caso molecole e/o macromolecole) aderiscono alla sua superficie. Questo rende possibile lo studio di adsorbimento e desorbimento dei complessi molecolari.

La funzionalizzazione del cristallo viene in genere fatta coprendo la superficie con un metallo (oro nel caso degli esperimenti condotti e riportati in questa tesi) capace di legarsi chimicamente a polimeri e molecole biologiche sfruttandone i gruppi e proprietà funzionali.



Figura 7 Disegno rappresentativo delle due superfici del sensore in quarzo: una faccia che presenta una copertura in metallo con circonferenza di  $1\text{ cm}^2$  (immagine a sinistra) ed una faccia che presenta gli elettrodi per l'induzione del campo elettrico (figura a destra). Fonte: <https://www.nanoscience.com/techniques/quartz-crystal-microbalance/>

È possibile dimostrare che l'adsorbimento di materiale sulla superficie del cristallo provoca un aumento dello spessore efficace del quarzo e, di conseguenza, induce così uno spostamento (*shift*,  $\Delta f$ ) della frequenza di risonanza fondamentale e delle sue armoniche rispetto al valore registrato in assenza del materiale aggiuntivo (Figura 8). A seconda dello spessore ( $\Delta h$ ) ed uniformità dello strato molecolare adsorbito sul sensore avremmo uno *shift* di frequenza e dissipazione (Figura 9), dal quale è possibile ricavare informazioni quantitative in termini di massa del materiale depositato

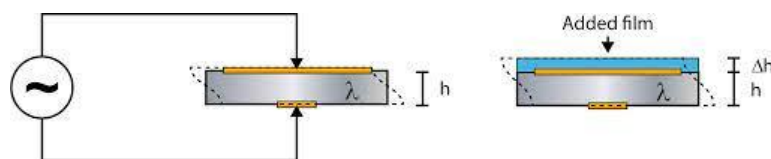


Figura 8 Immagine rappresentativa della variazione dello spessore del sensore nel momento in cui uno strato molecolare viene adsorbito sulla superficie funzionalizzata. Fonte: <https://www.bioline.scientific.com/>

Questo aumento di spessore efficace può essere convertito in una variazione della massa adsorbita sulla superficie ( $\Delta m$ ) attraverso la relazione di Sauerbrey (Equazione 1) è possibile correlare infine  $\Delta m$  a  $\Delta f$ .

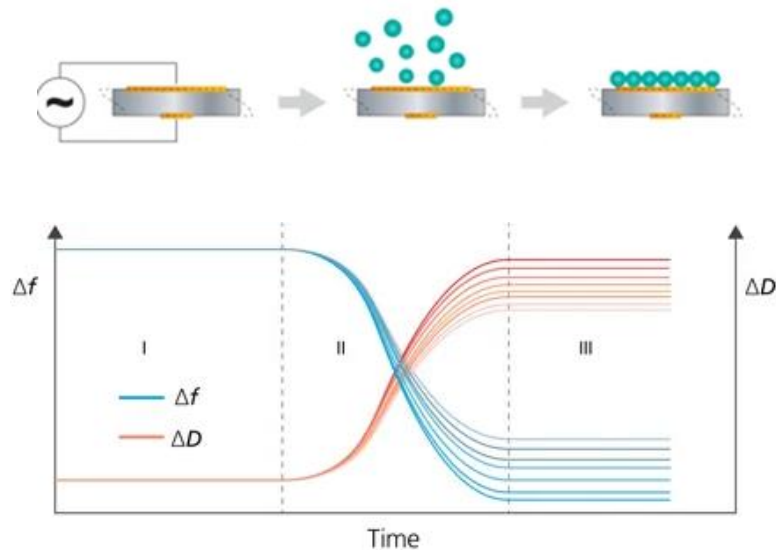


Figura 9 In alto, immagine stilizzata dell'oscillazione del sensore sottoposto a un campo elettrico con relativa deposizione di uno strato molecolare sulla sua superficie. In basso, rappresentazione grafica della variazione,  $\Delta f$ , della frequenza di oscillazione misurata per varie armoniche (curve in blu) e il relativo andamento della dissipazione dell'energia  $\Delta D$  (curve in rosso). I dati sono mostrati in funzione del tempo: I) linea di base, II) cinetica di assorbimento delle molecole e III) stabilizzazione del processo. Fonte: <https://www.biolinscientific.com/>

$$\Delta m = -C \cdot \frac{\Delta f_n}{n}$$

Equazione 1

Nella relazione di Sauerbrey  $C$  è la costante di sensibilità intrinseca del sensore,  $n$  è il numero dell'armonica presa in considerazione e  $\Delta f_n$  è la variazione di frequenza della ennesima armonica (dove  $n$  è l'indice dell'armonica). In generale è possibile dimostrare che, se il materiale assorbito ha un comportamento da film



rigido le variazioni di frequenza normalizzate,  $\frac{\Delta f_n}{n}$ , si sovrappongono (regime I in Figura 9), mentre, se il materiale si comporta come un film viscoelastico, tali contributi non saranno sovrapposti (regime III in Figura 9). Nel caso dei film rigidi l'equazione di Sauerbrey consente di effettuare misure quantitative delle masse adese sulla superficie del cristallo.

In funzione del loro spessore iniziale, i cristalli reperibili in commercio presentano una diversa frequenza fondamentale e diversa costante di sensibilità: per i sensori da 5 MHz 17.7 ng/(cm<sup>2</sup>·Hz) mentre per quelli da 10 MHz 4.4 ng/(cm<sup>2</sup>·Hz). Ciò significa che i sensori da 10 MHz sono molto più sensibili poiché capaci di rilevare quantità di massa molto piccole a parità di shift in frequenza misurato. Tuttavia, per motivi tecnologici questi sensori sono tipicamente utilizzati per misure in aria e non a contatto con un liquido. Per questo motivo, in questo lavoro di tesi, sono stati utilizzati sensori con una frequenza di risonanza di 5 MHz (QCM open, Novaetech Srl, S/N AT5-14-12-UP-10-SSC) con un diametro totale di 14 mm, con superficie attiva di 1 cm<sup>2</sup>, ricoperti con oro (Au).

All'interno di questo lavoro di tesi, le variazioni di frequenza, *shift*, sono sempre riportate come  $\frac{\Delta f_n}{n}$ . Per esigenze esclusivamente sperimentali, dovute principalmente alle fluttuazioni del segnale che sono variabili da esperimento ad esperimento, l'armonica riportata nei grafici ed utilizzata per effettuare i calcoli non è sempre la stessa per tutti gli esperimenti. Tuttavia, come già brevemente discusso, nel caso di film rigidi l'utilizzo di armoniche differenti non comporta

variazioni quantitative visto che, all'equilibrio, le variazioni della frequenza normalizzata si sovrappongono (regime I in Figura 9).

### **2.1.3 Pulizia sensore e montaggio QCM-D**

Per le misure, il cristallo viene posto all'interno di una camera con chiusura a viti [Figura 10] costituita da una base che presenta gli elettrodi ed il circuito elettrico per l'induzione del dipolo e trasduzione del segnale e da un coperchio in teflon con dei fori di entrata ed uscita per iniettare liquidi, delimitato da una guarnizione in plastica necessaria sia per immobilizzare e sigillare il cristallo, sia per evitare fuoriuscite di liquidi. La portata della camera così costituita è pari a 75  $\mu$ l.



Figura 10 *Struttura interna della camera di QCM-D in cui viene posto il sensore. A destra la componente in teflon con i fori di ingresso ed uscita per l'iniezione del campione ed a sinistra è possibile osservare parte del circuito elettrico su cui posano gli elettrodi del sensore per l'induzione del campo elettrico e la misurazione delle frequenze di oscillazione.*

Ai fori di ingresso ed uscita del liquido sono collegati dei tubi in silicone. L'estremità libera del tubo di ingresso è utilizzata per “pescare” la soluzione da iniettare nella camera del sensore, mentre quello di uscita è collegato ad una pompa peristaltica (PeriPumpONE™). Questa consente di selezionare, con alta

precisione ( $\pm 1 \mu\text{l}$ ), sia il volume di soluzione da iniettare sia il flusso. Per minimizzare le interferenze tra pompa e misure tipiche della microbilancia utilizzata (sistemi più avanzati e costosi ne sono privi), il sistema è configurato con la pompa posta a valle dello strumento per aspirare la soluzione di interesse da contenitori (quali provette Eppendorf o tubi Falcon); la soluzione viene fatta fluire prima nel vano contenente il sensore e poi attraverso la pompa fino a raggiungere, infine, un contenitore adibito al raccoglimento dei liquidi di scarto.

Il sensore viene pulito attraverso sonicazione in una soluzione acquosa contenente etanolo al 20% per 15 minuti; viene quindi asciugato sotto flusso di azoto compresso e posto in un generatore di ozono in presenza di radiazione UV per 10 minuti.

Al termine del trattamento con l'ozono il sensore viene prima sottoposto ad un risciacquo con acqua ultra-pura, poi asciugato sotto un flusso di azoto ed infine chiuso all'interno della camera; con la superficie funzionalizzata rivolta verso il supporto in PTFE. Viene quindi effettuata una calibrazione in aria attraverso il programma openQCMnext a cui segue un risciacquo in  $\text{H}_2\text{O}$  degasata per eliminare eventuali impurità rimaste sulla superficie del sensore e per settare una linea di base per l'inizio delle misure in liquido.

## **2.2 Il Polietilenglicole (PEG)**

Il polietilenglicole (PEG) è un polimero di sintesi, un polietere, ampiamente utilizzato in ambito medico, biotecnologico e terapeutico per via della sua elevata biocompatibilità ed idrofilia. Nello specifico, i polimeri di PEG sono

costituiti da una catena carboniosa di lunghezza variabile (a seconda delle necessità del prodotto finale) ottenuta per tecniche di polimerizzazione anionica dell'ossido di etilene, e da due estremità modificabili chimicamente in modo tale da attribuire proprietà funzionali e biochimiche specifiche al polimero. La solubilità del polimero di PEG è difatti determinata dalla presenza di gruppi chimici alle sue estremità capaci di prendere contatto non solo con l'acqua ma anche con i comuni solventi organici più utilizzati in ricerca chimica e biomedica, quali etanolo, cloroformio o acetone o farmaci e macromolecole attraverso reazioni di coniugazione (pegilazione) [PEG Sigma].

In questo lavoro di tesi, sono state sfruttate le capacità del PEG tiolato di funzionalizzare le superfici metalliche (oro) dei sensori in quarzo utilizzati in QCM-D, con l'obiettivo di creare uno strato polimerico altamente idratato con caratteristiche chimiche regolabili a piacere così da fungere da piattaforma generica per lo studio di fenomeni di adesione di varie molecole proteiche.

### ***2.2.1 Interazione tra polimeri di PEG e oro***

Per favorire il legame tra il polimero di PEG e la superficie in oro dei sensori sono state scelte due tipologie di molecole di PEG aventi un gruppo SH (tiolo) ad un'estremità e che differiscono per i gruppi chimici presenti all'estremità opposta a quella tiolata. Oro e zolfo interagiscono tra loro sovrapponendo gli orbitali  $p$  lungo il loro asse principale formando un legame covalente di tipo  $\sigma$  [Bertolle 2012] La dinamica di formazione di tale legame è stata negli anni ampiamente collaudata da tecniche ed esperimenti di adsorbimento di *Self*

*Assembled Monolayers* (SAMs) su superfici in oro che hanno confermato la versatilità e stabilità di tale legame.

Una delle molecole di PEG scelte presenta un gruppo aromatico, NHS, all'estremità opposta a quella tiolata, predisposto per legare le proteine attraverso una reazione di acetilazione. Nello specifico, il polimero di PEG scelto per effettuare tali esperimenti è il Thiol PEG NHS, HS-PEG-NHS (Cat. No. PG2-NSTH-2k, Nanocs Inc.), con un peso molecolare di 2000 kDa. Si tratta di un PEG eterofunzionale particolarmente attivo in condizioni alcaline e capace di legare macromolecole proteiche attraverso le ammine primarie (-NH<sub>2</sub>) (Figura 11).

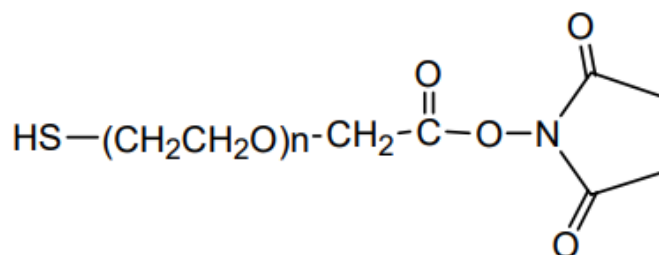


Figura 11 *Struttura chimica del Thiol PEG NHS* Fonte: <https://www.nanocs.net/>

Nel momento in cui si forma il legame ammidico il gruppo aromatico del polimero di PEG viene sostituito dal peptide. Ai fini della tesi sono state utilizzate due soluzioni acquose di Thiol-PEG-NHS: una con concentrazione pari a 1 mg/ml ed una a 0.1 mg/ml.

Per effettuare misure di passivazione è stata utilizzata un'altra tipologia di PEG (Poly(ethylene glycol) methyl ether thiol – peso molecolare medio di 2,000 Da;

Sigma-Aldrich®, nel lavoro di tesi nominato PEG-CH<sub>3</sub>) . Si tratta di un polimero lineare funzionalizzato con un tiolo ad un'estremità ed un gruppo metile all'estremità opposta (Figura 12). La presenza del gruppo SH consente il legame con la base in oro del sensore mentre la terminazione con il metile inibisce legami specifici e riduce la probabilità di assorbimento non-specifico che altrimenti avverrebbe sulla superficie non funzionalizzata.

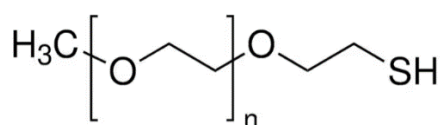


Figura 12 *Struttura chimica del PEG-CH<sub>3</sub>*. Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com>

Gli esperimenti di controllo con tale polimero sono stati eseguiti per confermare sia che il legame ammidico avvenisse esclusivamente con il polimero di PEG Thiol-PEG-NHS, sia che la superficie in oro fosse effettivamente passivata e l'assorbimento non specifico di macromolecole biologiche fosse ridotto al minimo. Nella fase sperimentale sono state utilizzate soluzioni acquose di PEG-CH<sub>3</sub> con concentrazioni pari a 0.1 mg/ml e 1 mg/ml.

### ***2.2.2 Protocollo di funzionalizzazione dei sensori con il PEG***

La funzionalizzazione delle superfici è stata effettuata direttamente in microbilancia. Questo ha permesso di misurare in tempo reale le cinetiche di assorbimento del PEG. In particolare, per ogni soluzione di PEG considerata, dopo aver effettuato una linea di base con acqua pura, sono stati flussati nella

camera 500  $\mu$ l di soluzione di PEG. La soluzione è stata poi fatta incubare per 40 minuti all'interno della QCM-D per far sì che avvenisse la pegilazione e si formasse il legame covalente tra polimero e oro. Al termine di questa fase, è stato effettuato un lavaggio fluendo 1 ml di H<sub>2</sub>O degasata (flusso: 0.2 ml/min) così da rimuovere eventuali molecole di polimero non legate alla superficie del sensore.

### **2.3 L'albumina sierica bovina (BSA)**

L'albumina sierica bovina (BSA), o Frazione V, è una proteina plasmatica ricavata dal siero bovino, caratterizzata da una carica negativa e costituita da 583 amminoacidi con struttura secondaria altamente stabilizzata da ponti disolfuro. Presenta un peso molecolare di circa 66 kDa e nella circolazione sistemica contribuisce al mantenimento della pressione oncotica (o colloidale-osmotica) regolando il passaggio di acqua tra i liquidi interstiziali e i vasi sanguigni e funge da proteina di trasporto veicolando sostanze nutritive quali acidi grassi, bilirubina, ormoni, vitamine e farmaci all'interno del flusso ematico. In ricerca di laboratorio viene ampiamente utilizzata come standard o come nutriente nei terreni finalizzati alle colture cellulari.

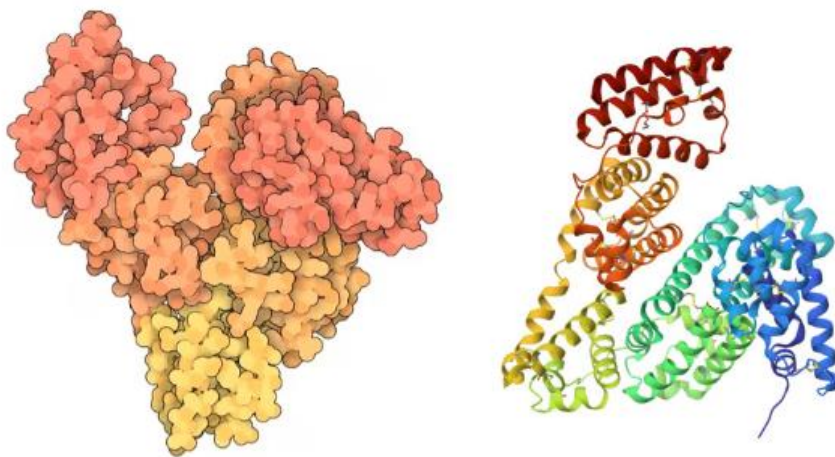


Figura 13 *Modello cristallografico della BSA depositato del Protein Data Bank. Nella figura a destra è possibile osservare l'alternanza degli elementi di struttura secondaria e la loro organizzazione nello spazio 3D.* Fonte: <https://www.rcsb.org/>

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata BSA in formula liofilizzata (Sieroalbumina, A2153, Sigma-Aldrich®) per testare la capacità di formazione del legame ammidico tra il Thiol-PEG-NHS e il gruppo N-terminale delle proteine. Sono state pesate quantità di BSA pari a 1.5 mg, 1 mg e 0.5 mg dallo stock liofilizzato, e disciolte in acqua degasata ottenendo soluzioni di BSA rispettivamente alle concentrazioni di 1.5 mg/ml, 1 mg/ml e 0.5 mg/ml.

### ***2.3.1 Protocollo di interazione tra BSA e polimeri di PEG***

A seguito della funzionalizzazione dei sensori di QCM-D con il Thiol PEG-NHS, sono stati flussati, a 0.2 ml/min, nella camera 500 µl delle soluzioni di BSA precedentemente preparate. La soluzione così iniettata è stata fatta incubare per 20h. Al termine dell'incubazione, è stato flussato 1 ml di H<sub>2</sub>O degasata (flusso 0.2 ml/min) per rimuovere le molecole proteiche non legate al PEG. Lo



stesso procedimento è stato utilizzato per effettuare test di passivazione della superficie con il PEG-CH<sub>3</sub>.

### ***2.3.2 Test di long-injection di BSA in QCM-D***

Al fine di ottimizzare le cinetiche di formazione del legame amidico tra BSA e Thiol PEG-NHS, è stato sviluppato un protocollo che vede l'iniezione di BSA in QCM-D per tempi prolungati. Nel dettaglio, a seguito della funzionalizzazione del sensore con PEG, sono stati iniettati 1.3 ml di BSA (flusso: 0.1 ml/min) e lasciato incubare per 20 h. Al termine dell'incubazione è stato effettuato un risciacquo con 1 ml di H<sub>2</sub>O ultrapura degasata (flusso 0.2 ml/min) per rimuovere le eventuali molecole proteiche non legate al PEG. Tale protocollo è stato eseguito per iniettare soluzioni di BSA pari a 1 mg/ml, 0.5 mg/ml e 0.3 mg/ml.

## **2.4 Enzima 2 di conversione dell'angiotensina (ACE2)**

ACE2 è una proteina-recettore di membrana di circa 92 kDa. Si tratta di una zinco-metallo peptidasi che appartiene alla famiglia delle dipeptil carbossipeptidasi ed è particolarmente espressa nelle cellule polmonari, nel cuore, rene ed intestino. La sua attività catalitica opera a livello del sistema RAAS (sistema renina-angiotensina-aldosterone) e si occupa della conversione dell'angiotensina II, molecola vasocostrittrice secreta dal surrene, in angiotensina (1-7), molecola vasodilatatrice che, dilatando i vasi sanguigni, riduce la pressione corporea.

ACE2 prende contatto con il citoplasma attraverso la sua porzione N-terminale, mentre mostra l'estremità C-terminale nello spazio extracellulare. A livello strutturale presenta un dominio transmembrana (TMD, *trans-membrane domain*), un collo (Neck) e due domini extracellulari di cui uno, l'RBD (*receptor binding domain*), è deputato al riconoscimento e interazione con il ligando. Il sito catalitico di ACE 2 presenta un motivo *Zinc finger* che permette di rimuovere nel substrato un singolo amminoacido in posizione C-terminale.

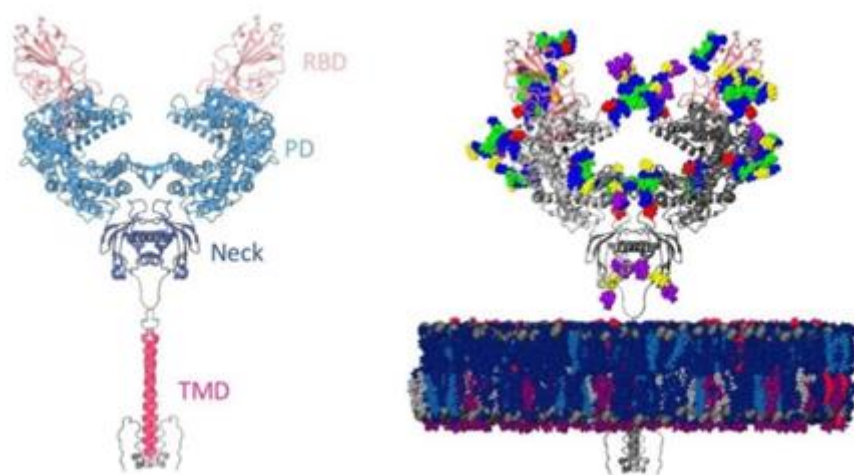


Figura 14 A sinistra, rappresentazione della struttura secondaria della proteina ACE2 umana e dei suoi domini intra, trans e extracellulari. A destra, modello rappresentativo del recettore ACE2 in membrana cellulare. Fonte: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33189680/>

Nell'uomo, il gene che codifica per tale proteina è situato a livello del braccio corto del cromosoma X (Xp22) e trascrive per sequenza amminoacidica composta da 805 amminoacidi. Tale sequenza completa comprende la sequenza segnale (qui riportata in rosso), ed i diversi domini (in nero il dominio

extracellulare, in giallo il dominio transmembrana e in verde il dominio citoplasmatico).

```
MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMN
NAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQONGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTI
YSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLKNE
MARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAY
PSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRFKEAEKFF
VSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAHHEMGGH
IQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIIGLLSPDFQEDNETEINFLK
QALTIVGTLPFTYMLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLF
HVSNDYSFIRYYTRTLTYQFQFQEQALCQAAKHEGPHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWT
LALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGD
KAYEWNNDNEMYLFSSVAYAMRQYFLKVNQMILFGEEDVRVANLKPRI SFNFFVTAPKNVSD
IIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFLNDNSLEFLGIQPTLGPPNQPPVS IWLIVFGVVMGVIVVG
IVILIFTGIRDRKKKNKARSGENPYASIDISKGENNPGFQNTDDVQTSF
```

Figura 15 Sequenza amminoacidica della proteina ACE2 in formato FASTA. Codice NCBI Q9BYF1. Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q9BYF1>

#### 2.4.1 ACE2 nella sindrome da SARS-CoV-2

Nella sindrome da SARS-CoV-2, il recettore ACE2 è in grado di stabilire un'interazione stabile con le proteine Spike situate sul pericapside di SARS-CoV-2 permettendo l'internalizzazione del virus nelle cellule e consentendogli di esplicare l'attività replicativa. Nello specifico, il legame tra il dominio RBD della Spike e l'estremità N-terminale del recettore ACE2 porta alla dissociazione della subunità S1 della Spike dalla subunità S2, rendendo quest'ultima attiva e pronta per la fusione dell'involucro lipidico virale con le membrane cellulari.

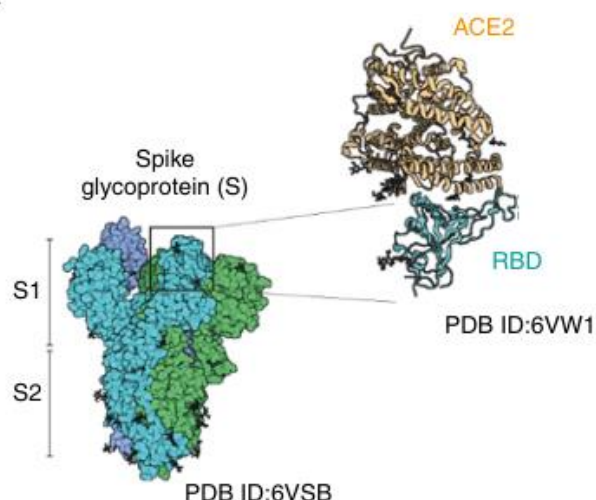


Figura 16 Nella struttura a sinistra è rappresentata la struttura tridimensionale della glicoproteina Spike con le sue due subunità (S1, S2) ottenuta per microscopia elettronica. A destra è rappresentata l'interazione tra la porzione RBD della proteina Spike e ACE2, ottenuta per diffrazione a raggi X. Fonte: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-18319-6>

In questo lavoro di tesi per effettuare esperimenti di interazione proteica in QCM-D è stata utilizzata una proteina ACE2 di 110.7 kDa di Macacus Rhesus ottenuta per via ricombinante, nello specifico è stata utilizzata Recombinant Rhesus ACE2 Protein (hFc Tag), CAT: 902011-C02H, SinoBiological Inc. Tale proteina è stata solubilizzata in 500  $\mu$ l di PBS a concentrazione 1 x per ottenere soluzioni finali di proteina di 0.2 mg/ml.

#### **2.4.2 Protocollo di interazione tra ACE2 e PEG in QCM-D**

Per effettuare esperimenti di interazione tra PEG e ACE2, sono stati iniettati 500  $\mu$ l di PEG-NHS a concentrazione 1 mg/ml, con un flusso di 0.2 ml/min. La soluzione di PEG è stata fatta incubare per 40 minuti e successivamente è stato iniettato 1 ml di acqua ultra-pura ad una velocità di flusso di 0.2 ml/min. Sono

stati quindi iniettati 500 µl di ACE2 disciolta in PBS a concentrazione 0.2 mg/ml seguendo un protocollo di *long injection* (paragrafo 2.3.2) ed il sistema è stato lasciato incubare *overnight*. A seguire, è stato effettuato un risciacquo con 1 ml di acqua ultra-pura ed attesa la stabilizzazione del segnale.

## **2.5 Anticorpi Policlonali Anti-BSA**

Gli anticorpi, immunoglobuline, sono proteine prodotte dai linfociti B attivati in risposta alla presenza un determinato antigene, molecola esogena considerata nociva per l'organismo. Le proteine anticorpali si legano ad uno sito specifico espresso dall'antigene, l'epitopo, e svolgono un'azione antagonista nei confronti di quest'ultimo neutralizzandolo. Si trattano di molecole proteiche costituite da quattro catene peptidiche, altamente stabilizzate da ponti disolfuro. Due di queste catene sono più leggere e due presentano un peso molecolare più elevato. A livello strutturale, è possibile distinguere due regioni: una regione costante ed una variabile. È per opera della regione variabile che gli anticorpi riescono a legare gli antigeni, ed è variabile in quanto ciascuna presenta una specificità per una determinata tipologia di antigeni.

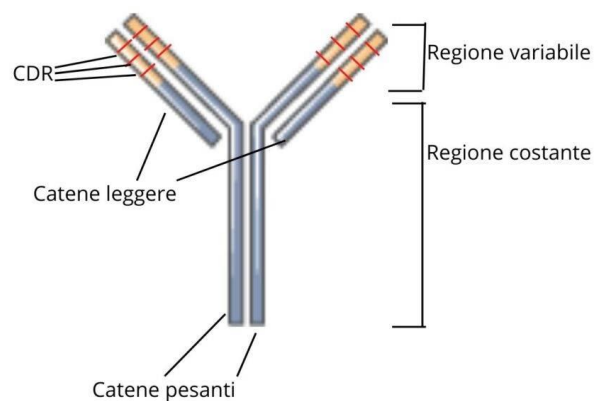


Figura 17 Immagine stilizzata della struttura di un anticorpo. Fonte: <https://www.microbiologiaitalia.it/>

È possibile distinguere le molecole anticorpali in due categorie: anticorpi monoclonali e anticorpi policlonali. La differenza tra le due specie anticorpali consta nella capacità dell'anticorpo di legarsi ad un singolo epitopo o più epitopi: nel dettaglio, gli anticorpi monoclonali sono in grado di legarsi ad un solo epitopo specifico espresso sull'antigene, gli anticorpi policlonali riconoscono più epitopi differenti espressi sullo stesso antigene.

Nel lavoro di tesi qui presentato sono stati utilizzati anticorpi policlonali anti-BSA, nello specifico sono stati usati *Bovine Serum Albumin Polyclonal Antibody* (Catalog #A11133, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) con lo scopo di studiarne l'interazione con la BSA immobilizzata sui polimeri di PEG.

### **2.5.1 Interazione tra anticorpi anti-BSA e BSA misurata tramite QCM-D**

Nella valutazione dell'interazione tra la BSA e gli anticorpi Anti-BSA, dopo la funzionalizzazione del sensore con uno strato di PEG-NHS, sono stati iniettati 1.3 ml di BSA, concentrazione 1 mg/ml, mediante la tecnica della *long injection* (paragrafo 2.3.2) a cui è seguita un'incubazione *overnight*. Al termine, è stato effettuato un risciacquo con 1 ml di H<sub>2</sub>O ultra-pura, flusso 0.2 ml/min, e atteso la stabilizzazione del segnale. Sono stati quindi iniettati 200 µl della soluzione contenente gli anticorpi Anti-BSA a concentrazione 0.2 mg/ml (flusso 0.2 ml/min). Lavorando con poco volume di soluzione madre di anticorpi Anti-BSA, per effettuare le misure sono stati iniettati piccoli volumi di soluzione, non consentendo di occupare pienamente il volume del tubo di entrata che conduce il campione alla camera QCM-D. Pertanto, la soluzione di anticorpi è stata spinta all'interno della camera iniettando 300 µl di H<sub>2</sub>O ultra-pura. Il sistema è stato quindi fatto incubare *overnight* ed è stato successivamente eseguito un risciacquo con 1 ml di acqua ultra-pura con velocità di flusso 0.2 ml/min ed atteso la stabilizzazione del segnale.

## **2.6 SARS-CoV-2 Virus Like Particles**

Per valutare l'attività recettoriale di ACE2 negli esperimenti di riflettometria e QCM-D, sono state utilizzate delle *Virus Like Particles* (VLPs), particelle a base lipidica che mimano il capsido di SARS-CoV-2. Nello specifico, gli esperimenti sono stati condotti utilizzando le particelle prodotte da Creative Biolabs® (Cat VLP-050YF), disciolte in Tris-HCl ad una concentrazione pari a 0.13 mg/ml.

Le VLP sono capsidi di SARS-CoV-2 ottenuti per via ricombinante in cellule di insetto SF21 che vedono inserite nella porzione esterna del pericapside tre proteine strutturali essenziali per il virus: la proteina Spike (S), una proteina di membrana (M) e la proteina dell'*envelope* (E). Tale struttura è capace di mimare correttamente e verosimilmente la morfologia del virus e la sua interazione con recettori di membrana ACE2 e di indurre pertanto una risposta immunitaria negli ospiti che entrano in loro contatto. L'assenza di genoma virale conferisce alle VLP proprietà non infettive e non replicative, rendendole pertanto adatte allo sviluppo sensoristico e biotecnologico.

#### ***2.6.1 Protocollo di interazione tra VLP e PEG in QCM-D***

Le soluzioni stock di VLP sono state diluite 10 volte in 1 ml di H<sub>2</sub>O ultra-pura per raggiungere una concentrazione finale pari a 0.013 mg/ml. La soluzione di VLP così ottenuta è stata utilizzata per valutare l'interazione con il PEG-NHS e PEG-CH<sub>3</sub> in QCM-D. L'analisi dell'interazione tra VLP e PEG-NHS è stata effettuata allo scopo di valutare i possibili legami amidici tra il PEG e le proteine espresse sul pericapside delle VLP, mentre quella tra le VLP e PEG-CH<sub>3</sub> è stata effettuata per assicurare che venisse ridotto l'assorbimento non-specifico delle VLP che avverrebbe se la superficie non fosse funzionalizzata.

Durante le misure con la QCM-D, dopo la funzionalizzazione del sensore con PEG-NHS e il successivo risciacquo, sono stati iniettati 335 µl di soluzione contenente le VLP diluite 0.013 mg/ml a flusso 0.2 ml/min. A causa della disponibilità di ridotte quantità di campione si è scelto di usare un protocollo di



iniezioni successive che permettesse di lavorare con un ridotto volume di soluzione. Il volume “pescato” non è infatti sufficiente per riempire sia il tubo di ingresso che la camera del sensore. Per questo motivo, in coda al volume di VLP sono stati “pescati” 200  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O per spingere la soluzione di VLP all’interno della camera di misura, che veniva in questo modo riempita. Il flusso veniva poi arrestato per permettere l’incubazione delle VLP sulla superficie di interesse. Questo protocollo è stato utilizzato per tutte quelle soluzioni non disponibili in grandi quantità. È stata quindi effettuata un’incubazione di 20h al termine della quale è stato eseguito un risciacquo con 1 ml di H<sub>2</sub>O ultra-pura e degasata a flusso 0.2 ml/min. Lo stesso protocollo è stato seguito per gli esperimenti di interazione tra le VLP e il PEG-CH<sub>3</sub>.

## **2.7 Esecuzione esperimento generico di funzionalizzazione, assorbimento e binding su una superficie**

Un generico esperimento di funzionalizzazione, assorbimento e *binding* eseguito con QCM-D, consiste dei seguenti passaggi:

- Calibrazione del sensore in aria
- Iniezione di acqua per acquisizione della linea di base
- Iniezione della soluzione di PEG (in questa tesi sono stati utilizzati tipicamente 500  $\mu$ l) e successiva incubazione (in questa tesi 40 minuti)
- Risciacquo con acqua fino alla stabilizzazione del segnale
- Iniezione della soluzione contenente la proteina di interesse e successiva lunga incubazione (in questo lavoro di tesi ~20h)

- Risciacquo con H<sub>2</sub>O fino alla stabilizzazione del segnale

I passaggi sopra elencati sono indicati in modo sommario dalla seguente figura.

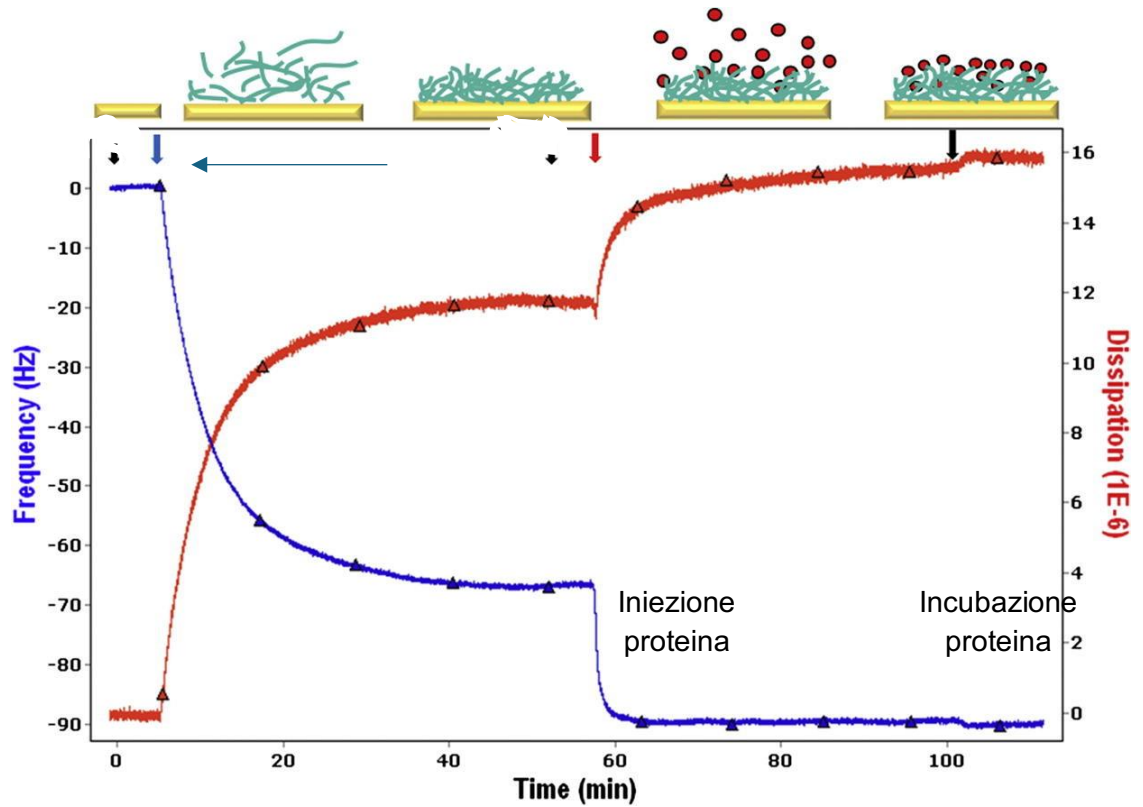


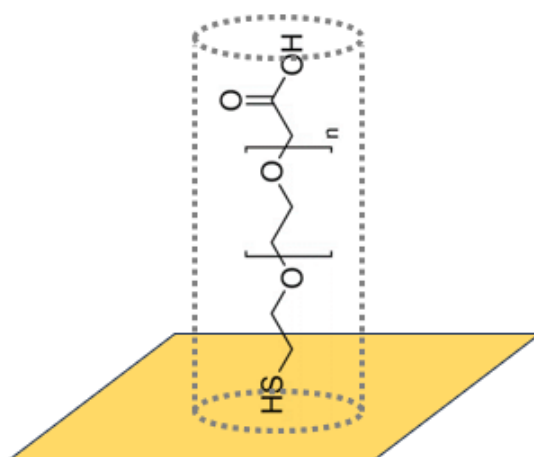
Figura 18 Rappresentazione schematica di un esperimento di QCM-D; la variazione di frequenza è rappresentata con la linea blu, la variazione di dissipazione in rosso.

## CAPITOLO 3

### RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Funzionalizzazione delle superfici in oro con il PEG

Per delineare il protocollo di funzionalizzazione delle superfici in oro attraverso il PEG sono stati eseguiti dei test per valutare la capacità delle molecole di PEG di legarsi a tutta la superficie in oro del sensore in quarzo saturando quindi l'intero sensore. Per fare ciò tutte le molecole di PEG utilizzate, dato il loro peso molecolare e quindi ridotta lunghezza, sono state considerate come delle molecole cilindriche con una base di area  $0.4 \text{ nm}^2$  calcolata considerando come raggio la distanza di legame CO (Carbonio-Ossigeno) pari a  $121 \times 10^{-3} \text{ nm}$ .



Sulla base dei calcoli effettuati, per saturare una superficie di 1 cm<sup>2</sup> sono necessarie  $2 \times 10^{13}$  molecole. Visto il peso molecolare indicato dal fornitore delle classi di PEG utilizzate, in condizioni di saturazione la variazione teorica della frequenza di risonanza è stata stimata circa 40 Hz utilizzando l'equazione di Sauerbrey e la massa di PEG assorbita in condizioni teoriche di saturazione della superficie circa 700 ng.

### ***3.1.1 Funzionalizzazione della superficie con PEG-NHS e successiva interazione con BSA***

Per funzionalizzare la superficie in oro con il PEG-NHS, dopo aver acquisito una linea di base in acqua, sono stati iniettati 500 µl di PEG-NHS 1 mg/ml in soluzione acquosa e lasciato incubare per 40 minuti registrando una variazione della frequenza pari a -35 Hz. Successivamente, è stato effettuato un risciacquo con acqua ultrapura per rimuovere eventuali molecole di PEG non legate covalentemente all'oro. Con il risciacquo la variazione di frequenza è salita a -32 Hz: ricordando che l'aumento di frequenza equivale ad una riduzione della massa assorbita (Equazione 1), la limitata perdita di materiale indicata da tale variazione conferma che lo strato di PEG è stabile e legato covalentemente all'oro. Le poche molecole di PEG rilasciate in seguito al risciacquo erano probabilmente assorbite in modo non specifico allo strato di PEG. In seguito, sono stati iniettati 500 µl di BSA ad una concentrazione di 1 mg/ml e lasciati incubare per 3h. A questa iniezione ne è poi seguita una seconda sempre di 500 µl di BSA a 1 mg/ml. Dopo questa seconda iniezione, la soluzione è stata fatta incubare *overnight*. In tali condizioni, la variazione di frequenza è scesa fino a -

38 Hz. Da questo dato è possibile calcolare che la variazione di frequenza portata dalle sole molecole di BSA, ovvero pari a -6 Hz. Al termine dell'incubazione è stato eseguito un risciacquo con 1 ml d'acqua al fine di rimuovere le molecole di BSA non legate al PEG-NHS attraverso legame amidico ed è stata quindi registrata una frequenza pari a -36 Hz. Tutti i campioni sono stati iniettati nella camera QCM-D con un flusso di 0.2 ml/min e l'esperimento è stato condotto ad una temperatura di 25°C.

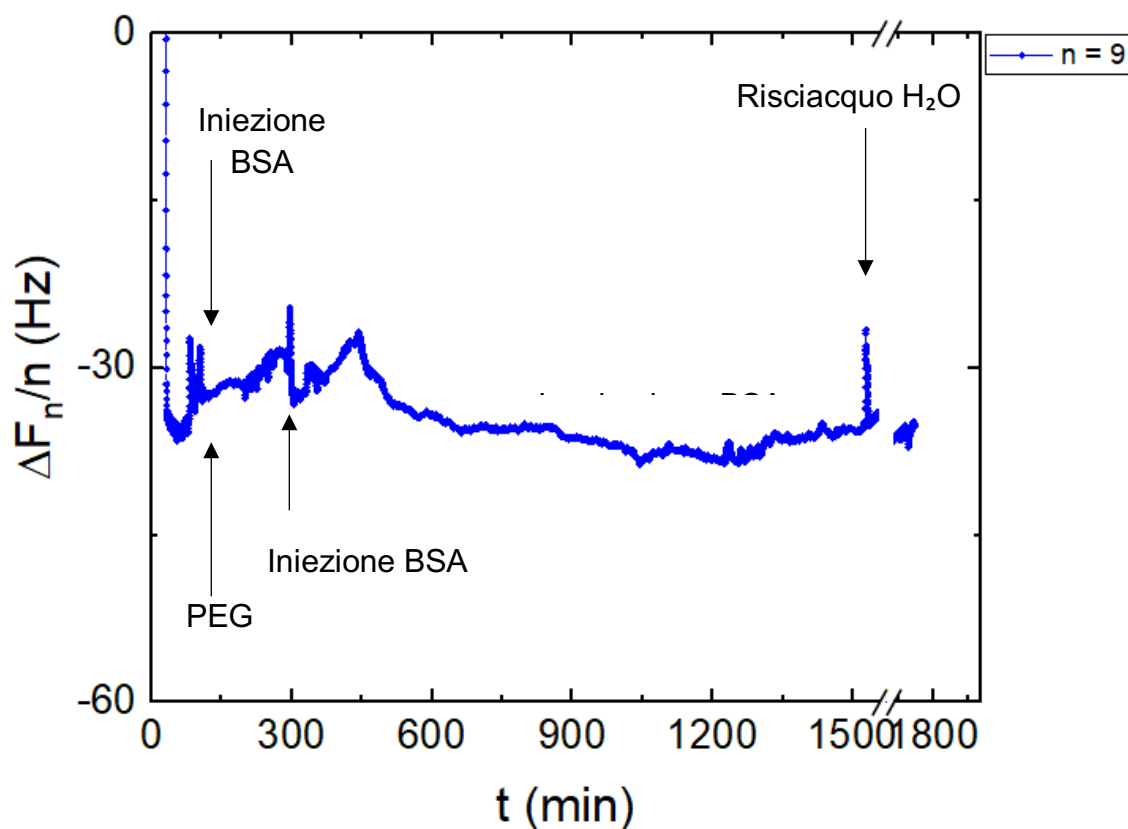


Figura 19 *Variazione della frequenza dell'armonica  $n=9$  in funzione del tempo durante la deposizione del PEG-NHS e la conseguente interazione con la BSA. Le diverse fasi dell'esperimento sono indicate con le frecce.*

Dal grafico in Figura 19, è possibile notare come uno *shift* consistente nella variazione della frequenza di risonanza si registri dopo 6 ore dall'ultima iniezione della proteina. Il grafico mostra un segnale stabile nel tempo; il legame tra il PEG e la BSA risulta stabile anche dopo un risciacquo con acqua ultrapura.

Dalla variazione in frequenza misurata a fine esperimento, è possibile calcolare, applicando l'equazione 1, la massa di proteina assorbita che corrisponde a 106.2 ng.

Data la stabilità del segnale osservata a seguito di un risciacquo con flusso continuo di acqua, è possibile ipotizzare che la BSA si sia legata in modo irreversibile alle molecole di PEG e questo confermerebbe la validità della nostra ipotesi lavorativa, già validata in altri lavori [Jin 2015], ovvero che una superficie funzionalizzata con PEG-NHS può formare legame ammidico con le proteine disperse in soluzione.

### ***3.1.2 Test di passivazione della superficie***

Per passivare la superficie del sensore, dopo l'acquisizione di una linea di base sono stati iniettati 500  $\mu$ l di PEG-CH<sub>3</sub> 0.1 mg/ml e lasciati incubare per 40 minuti. Dopodiché è stato effettuato un lavaggio con 1 ml di acqua ultra-pura ottenendo una variazione di frequenza di risonanza pari a -33 Hz. Una volta ottenuto un segnale stabile sono stati iniettati 100  $\mu$ l di BSA 1 mg/ml e spinti all'interno della camera QCM-D con 460  $\mu$ l di acqua ultra-pura. Il campione è stato quindi incubato per 20h al termine delle quali è stato eseguito un risciacquo con 1 ml di acqua registrando una variazione di frequenza finale di -35 Hz.

Come è visibile dal grafico in figura 13, durante l'incubazione della proteina si registra una variazione di frequenza di -38 Hz, ovvero -5 Hz rispetto alla variazione di frequenza registrata dopo la deposizione strato di PEG-CH<sub>3</sub>. Tuttavia, con il risciacquo al termine dell'incubazione di BSA, si ristabilisce una variazione di frequenza pari a quella registrata dallo strato di PEG. Tale segnale permette di concludere che le molecole di BSA non si siano legate irreversibilmente al PEG, poiché rimosse dal sensore durante il risciacquo. I risultati sperimentali sono stati ottenuti iniettando i campioni ad un flusso di 0.2 ml/min ad una temperatura di 25°C.

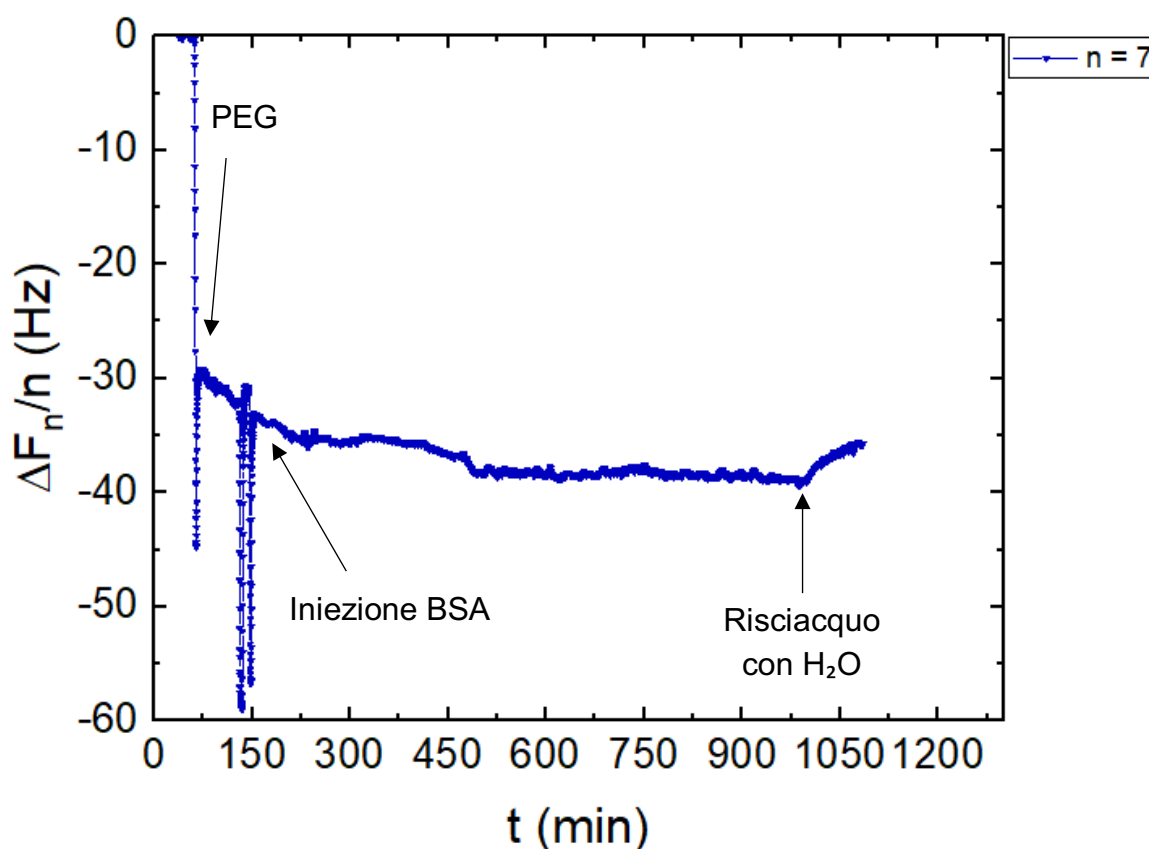


Figura 20 Variazione della frequenza  $n=3$  in funzione del tempo riguardante la deposizione di uno strato di PEG-CH<sub>3</sub> sulla superficie del sensore e BSA.

I risultati confermano quindi che la BSA non si lega con le estremità metiliche del PEG-CH<sub>3</sub> confermando la capacità di quest'ultimo come ottimo agente passivante per le superfici.

### ***3.1.3 Test di long-injection di BSA***

Per valutare l'impatto dei tempi di incubazione sulle cinetiche di assorbimento tra il PEG-NHS e la BSA è stato applicato un protocollo che vede un'iniezione prolungata di BSA (vedasi paragrafo 2.3.2). Nello specifico, a seguito dell'acquisizione della linea di base sono stati iniettati 500 µl di PEG-NHS (concentrazione 1 mg/ml) ad un flusso di 0.2 ml/min e successivamente lasciati incubare per 40 minuti. Al termine dell'incubazione è stato effettuato un risciacquo con 1 ml di H<sub>2</sub>O ultra-pura. Alla fine del risciacquo, raggiunta la stabilizzazione del segnale ed è stata registrata una variazione di frequenza pari a -37 Hz. In seguito, sono stati iniettati 1.3 ml di BSA (concentrazione 1 mg/ml) con un flusso pari a 0.1 ml/min. Al termine dell'iniezione, il campione è stato fatto incubare *overnight* registrando una variazione di frequenza di -55 Hz: con uno *shift* in frequenza di -18 Hz portato dalla sola BSA in aggiunta alla variazione precedentemente misurata con le molecole di PEG. È stato quindi effettuato un risciacquo con H<sub>2</sub>O ultra-pura per rimuovere eventuali molecole di BSA non legate al PEG. La variazione di frequenza è aumentata raggiungendo -49 Hz, indicando di conseguenza che la BSA legata ha prodotto uno *shift* corrispondente a -12 Hz. Tali condizioni sperimentali sono state effettuate ad una



temperatura di 25°C. Da questa variazione di frequenza è stato possibile calcolare, applicando l'equazione 1, la quantità di BSA effettivamente legata alle molecole di PEG. In termini di massa, questa quantità è risultata pari a 212.4 ng, ovvero pari al doppio della massa assorbita con un protocollo a singola iniezione (paragrafo 3.1.1). Questa osservazione lascia presupporre che un'iniezione lenta (0.1 ml/min contro 0.2 ml/min) e continua (15 minuti contro 5 minuti) del campione possa portare alla formazione di un maggior numero di legami stabili tra proteine e substrato polimerico.

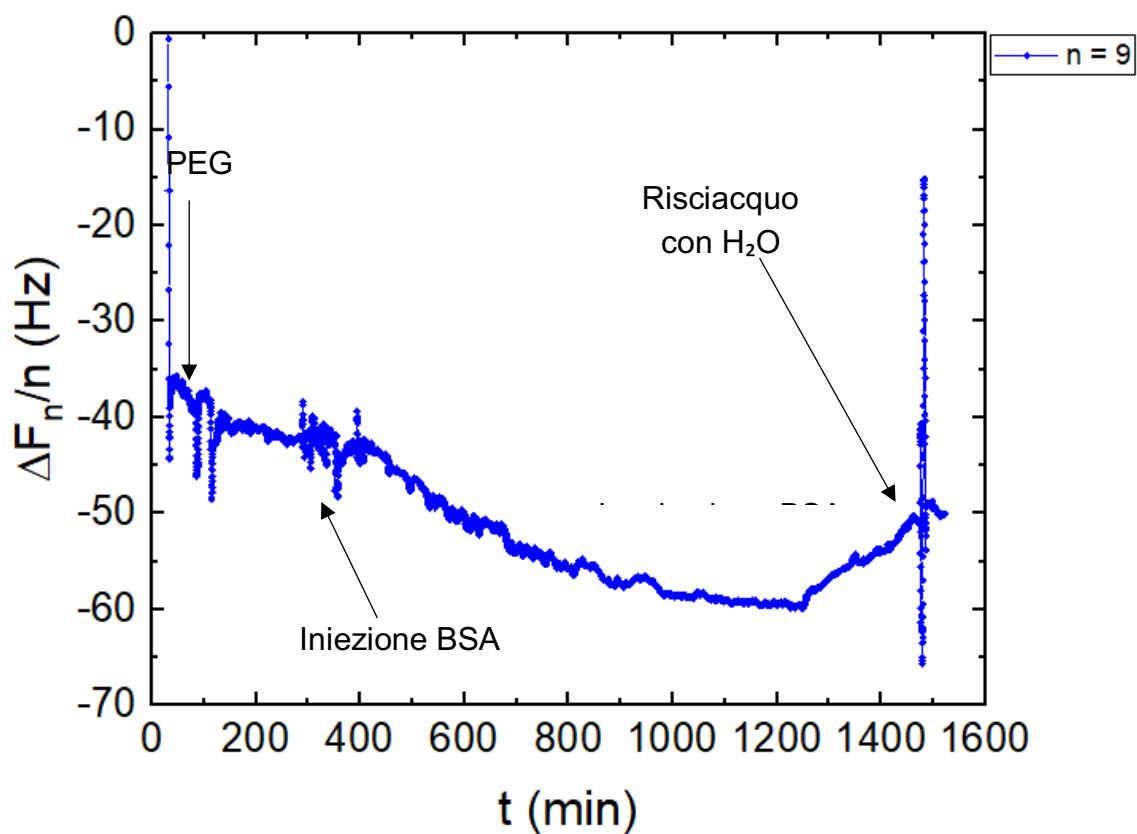


Figura 21 *Variazione della frequenza normalizzata ( $n=9$ ) riguardante la deposizione di PEG e la conseguente iniezione di 1.3 ml di BSA.*

## 3.2 Test di sensibilità

Al fine di testare la sensibilità del sistema e consentire di lavorare con campioni a minore concentrazione, sono stati valutati dei protocolli con iniezioni di BSA a concentrazioni pari a 0.5 mg/ml e 0.3 mg/ml (vs 1.0 mg/ml usati in precedenza). Dalle prove precedenti, si è scelto di optare per protocolli che vedono la *long injection* (paragrafo 3.1.3), oppure una tripla iniezione della soluzione di BSA ad intervalli di 1h.

### 3.2.1 Test a tre iniezioni di BSA 0.5 mg/ml

Per verificare la cinetica di assorbimento di soluzioni di BSA a 0.5 mg/ml, dopo la funzionalizzazione della superficie con PEG-NHS, sono stati iniettati 500 µl di BSA ad una concentrazione di 0.5 mg/ml ed è stata attesa un'ora. La seconda e la terza iniezione sono state fatte a distanza di un'ora dalla precedente (sempre 500 µl della stessa soluzione di BSA). Alla terza iniezione è seguita una lunga incubazione (*overnight*). L'esperimento è stato effettuato ad una temperatura controllata di 25 °C e le soluzioni sono state iniettate ad una velocità di flusso di 0.2 ml/min. I dati sulla frequenza sono stati acquisiti continuamente durante tutte le fasi dell'esperimento.

Lo *shift* finale, relativo alle molecole di BSA assorbite dopo l'incubazione *overnight*, è risultato pari a -16 Hz, al netto del segnale iniziale dovuto al PEG. Dopo il risciacquo finale, la rimozione eventuali molecole di BSA non legate, lo *shift* in frequenza dovuto alla sola BSA ha raggiunto -4 Hz, indicando che la maggior parte delle molecole di BSA era adsorbite ma non legate al PEG-NHS.

Tramite l'equazione 1, la massa di BSA assorbita è stata calcolata in 70.8 ng. Rispetto ai dati ottenuti iniettando soluzioni di BSA a 1 mg/ml, la quantità di BSA assorbita dal sensore risulta essere decisamente ridotta (circa il 67% in meno).

Questo risultato indica che con una soluzione di BSA 0.5 mg/ml non è possibile saturare tutti i siti di legame accessibili nello strato di PEG. In aggiunta, tale minore quantità di BSA legata al sensore, in presenza di una ridotta concentrazione di BSA in soluzione, suggerisce la possibilità che il processo di assorbimento sia influenzato (se non addirittura controllato) dall'equilibrio che si instaura tra la BSA in superficie e quella dispersa in soluzione. Tuttavia, è importante sottolineare come la quantità di BSA assorbita, ma non legata, al sensore prima del risciacquo, sia paragonabile a quella ottenuta utilizzando BSA 1 mg/ml.

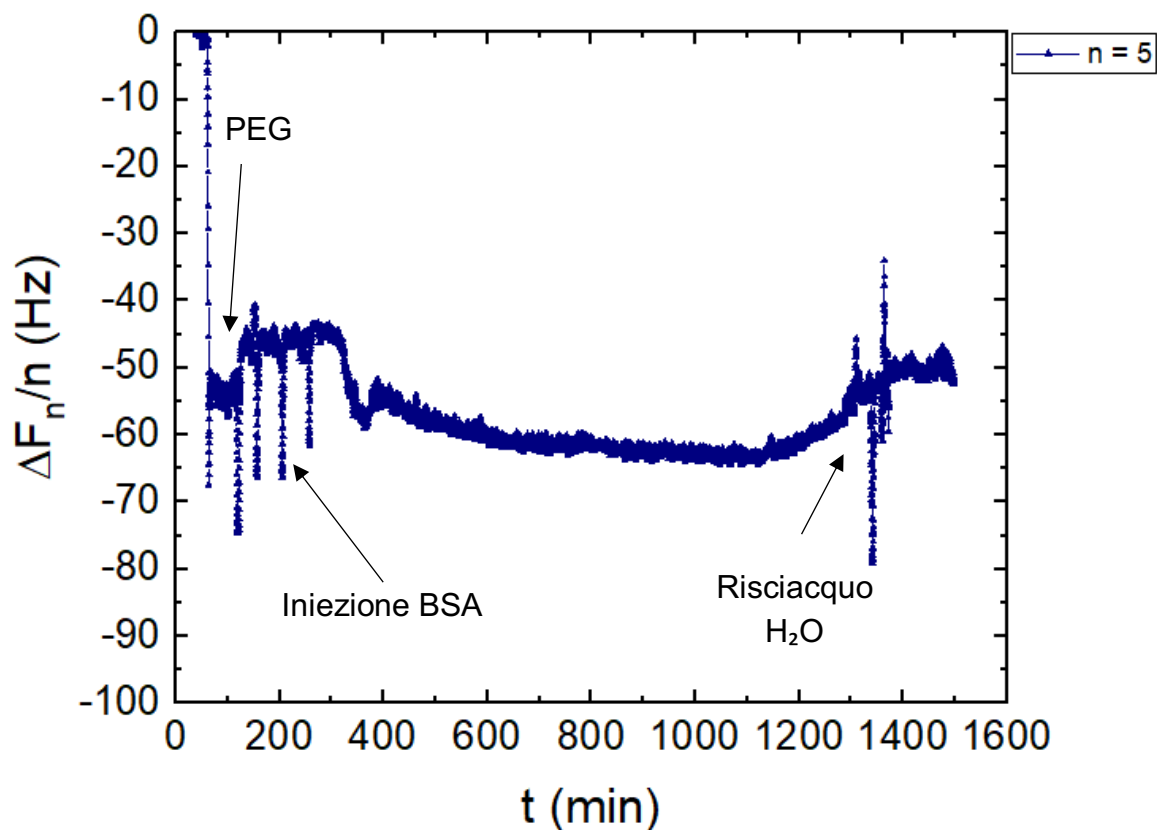


Figura 22 *Variazione della frequenza normalizzata ( $n=5$ ) riguardante la funzionalizzazione del sensore con il PEG-NHS e successiva iniezione di BSA 0.5 mg/ml.*

Dal grafico mostrato in Figura 22 è possibile notare come una variazione consistente della frequenza normalizzata ( $n=5$ ), sia avvenuta dopo 2h dall'ultima iniezione della soluzione di BSA. Il legame tra PEG e BSA risulta stabile durante l'incubazione overnight e si registra una perdita di materiale e variazione del segnale solo dopo il risciacquo con acqua al termine dell'incubazione.

### 3.2.2 Long injection BSA 0.3 mg/ml

A seguito della funzionalizzazione della superficie con uno strato di PEG-NHS sono stati iniettati 1.3 ml di BSA (concentrazione 0.3 mg/ml) ad un flusso di 0.1

ml/min e lasciati incubare *overnight*. È quindi seguito un risciacquo con 1 ml di acqua ultra-pura (flusso 0.2 ml/min) registrando un ulteriore *shift* in frequenza di -8 Hz, dovuto alle molecole di BSA legate al PEG. Tale test è stato effettuato mantenendo una temperatura controllata a 25°C.

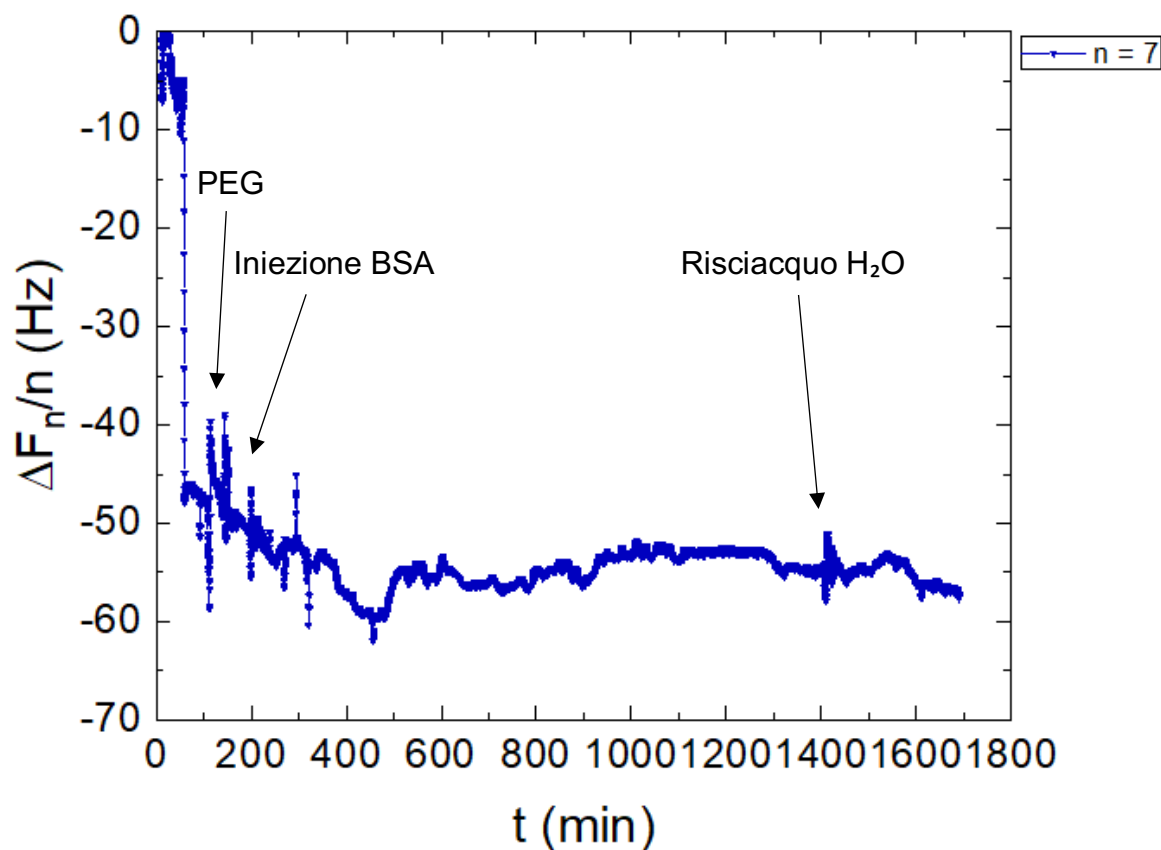


Figura 23 Variazione della frequenza normalizzata ( $n=7$ ) dell'assorbimento di PEG-NHS e dell'incubazione di BSA 0.3 mg/ml.

Come è possibile osservare dal grafico in Figura 23, l'iniezione continua di BSA consente di ottimizzare la cinetica di assorbimento della molecola sul sensore e permette di ottenere una variazione di frequenza consistente anche con soluzioni di campione diluite.

Dai dati ottenuti, applicando l'equazione 1, per una variazione di frequenza di - 8 Hz (pari alle sole molecole di BSA legate al PEG) si ottengono 141.6 ng di BSA legata stabilmente allo strato di PEG con cui è stato funzionalizzato il sensore.

Sulla base dei dati ottenuti dai test di sensibilità e quelli di interazione tra PEG-NHS e BSA mediante una *long injection* del campione, è possibile osservare come la tecnica dell'iniezione prolungata, *long injection*, permetta di ottenere un maggior numero di legami tra il polimero e la proteina. Ciò è probabilmente dato dal lento e continuo afflusso di proteina all'interno della camera di QCM-D, adatto a stabilire una maggiore biodisponibilità del campione per effettuare il legame con il PEG. Tale tecnica di iniezione, sperimentata dapprima iniettando soluzioni di BSA a concentrazione di 1 mg/ml (paragrafo 3.3.1), ha condotto all'ottenimento di un maggiore assorbimento di proteina legata stabilmente allo strato di PEG ed è quindi stato deciso di applicarla per i test di sensibilità poiché lavorando con soluzioni di BSA a bassa concentrazione è stato ancora più necessario consentire la formazione di un equilibrio tra la BSA dispersa in soluzione e quella legante il PEG a favore di quest'ultimo. È possibile dunque confermare che, tra le tecniche di iniezione dei campioni proteici all'interno della camera QCM-D, la *long injection* risulti essere migliore in termini di assorbimento del campione sul sensore funzionalizzato.

### 3.3 Interazione tra BSA e anticorpi Anti-BSA

Per valutare l'interazione tra molecole di BSA adese al sensore e anticorpi Anti-BSA, è stata prima effettuata un'incubazione *overnight* di BSA sullo strato di PEG a concentrazione 1 mg/ml seguendo il protocollo messo a punto per la *long injection* (paragrafo 3.1.1). Al termine di questo step è stato effettuato un risciacquo con 1 ml di acqua ultra-pura (0.2 ml/min) a cui è seguita l'iniezione della soluzione contenente anticorpi Anti-BSA in PBS (0.2 mg/ml). Nello specifico, sono stati iniettati 200 µl di soluzione e spinti all'interno della camera QCM-D iniettando 300 µl di acqua ultra-pura, il tutto ad una velocità di flusso di 0.1 ml/min. A questo punto il sistema è stato lasciato in incubazione *overnight* per poi essere risciacquato attraverso un flusso di acqua ultra-pura, 1 ml, con una velocità di flusso di 0.2 ml/min.

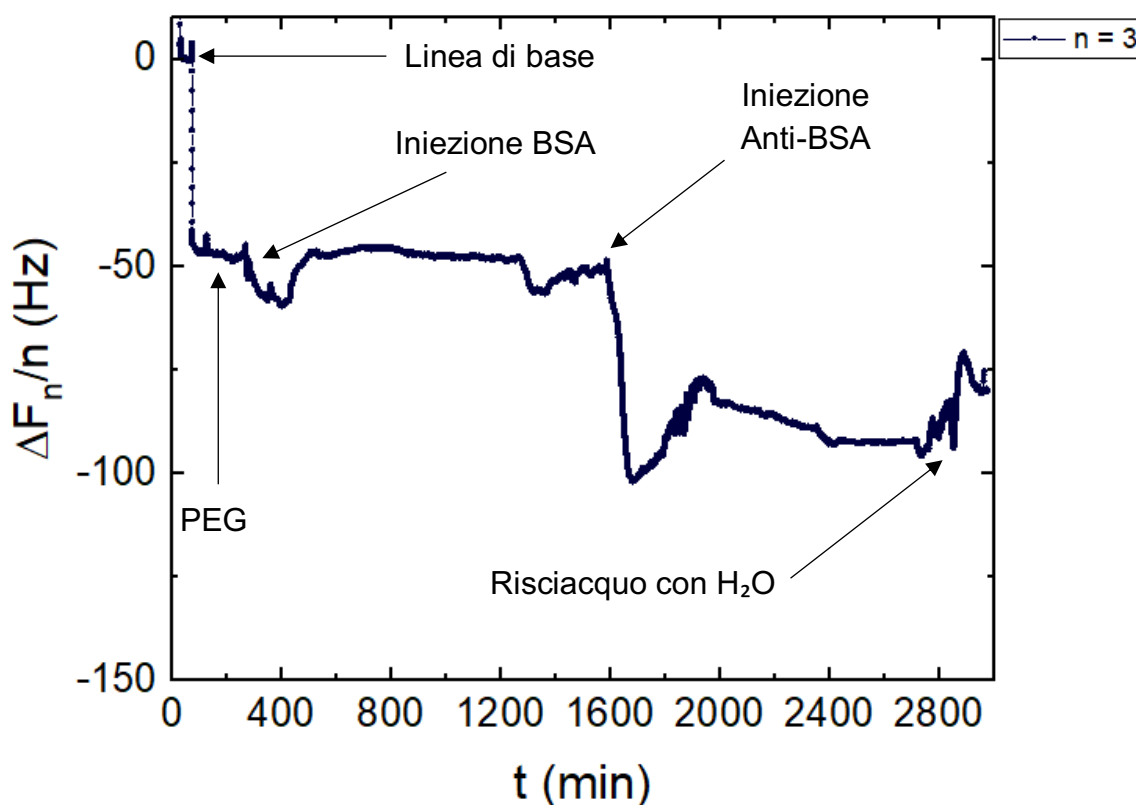


Figura 24 Grafico riguardante l'interazione tra BSA e anticorpi Anti-BSA sopra uno strato di PEG.

Come è possibile osservare dal grafico in Figura 24, si registra una variazione di frequenza, in negativo, in concomitanza con l'iniezione della soluzione contenente gli anticorpi. Il segnale cala fino a stabilizzarsi. Durante questa fase non è possibile disaccoppiare l'effetto causato dall'azione della pompa sulle frequenza dall'assorbimento vero e proprio. Una volta arrestato il flusso, il segnale leggermente (1600-1800 min) per poi stabilizzarsi. Attraverso il risciacquo finale vi è un aumento della frequenza che indica la rimozione di anticorpi non legati alla BSA. Il segnale finale si stabilizza ad una frequenza di -29 Hz, più bassa rispetto a quella raggiunta in precedenza dopo la deposizione di BSA e corrispondente a 503 ng di anticorpi. Considerando la variazione in



frequenza portata dalle sole molecole di BSA, di -4 Hz, è possibile che le molecole anticorpali si siano non solo legate alla BSA ma che abbiano interagito stabilmente anche con le molecole di PEG. A causa della limitata disponibilità di anticorpi non è stato possibile testare se questi possano interagire direttamente con il PEG, formando legami covalenti. Tuttavia, gli esperimenti qui presentati dimostrano come questo approccio possa essere usato per quantificare l'assorbimento specifico di bio-molecole.

### **3.4 Interazione tra SARS-CoV-2 Virus Like Particles e superfici funzionalizzate con PEG-CH<sub>3</sub> e PEG-NHS**

I test di interazione tra le VLPs e le due varianti di PEG utilizzate per la funzionalizzazione e la passivazione della superficie del sensore, sono stati effettuati al fine di valutare la capacità del PEG-CH<sub>3</sub> e del PEG-NHS rispettivamente di prevenire l'assorbimento specifico e favorire un legame con le VLP. Occorre sottolineare come le VLP, da test precedenti, abbiano dimostrato una forte tendenza ad assorbirsi sulla superficie in oro non funzionalizzata. Gli esperimenti sono stati condotti funzionalizzando il sensore con il PEG di interesse e iniettando successivamente le VLP lasciandole in incubazione *overnight*.

#### **3.4.1 Interazione tra VLP e PEG-NHS**

Dopo la funzionalizzazione del sensore con il PEG-NHS sono stati iniettati 335 µl di VLP (concentrazione 0.013 mg/ml) e spinti all'interno della camera di

QCM-D iniettando 200  $\mu$ l di acqua ultra-pura. La soluzione di VLP è stata lasciata incubare *overnight* ed è stato poi effettuato un risciacquo con 1 ml di acqua ultra-pura. La variazione di frequenza che si registra al termine del risciacquo, causata dalla presenza di VLP stabilmente legate al PEG-NHS è di 7 Hz rispetto allo *shift* in frequenza dato dallo strato di PEG adesivo al sensore. I test sono stati effettuati iniettando le soluzioni ad una velocità di flusso di 0.2 ml/min ad una temperatura controllata a 25°C.

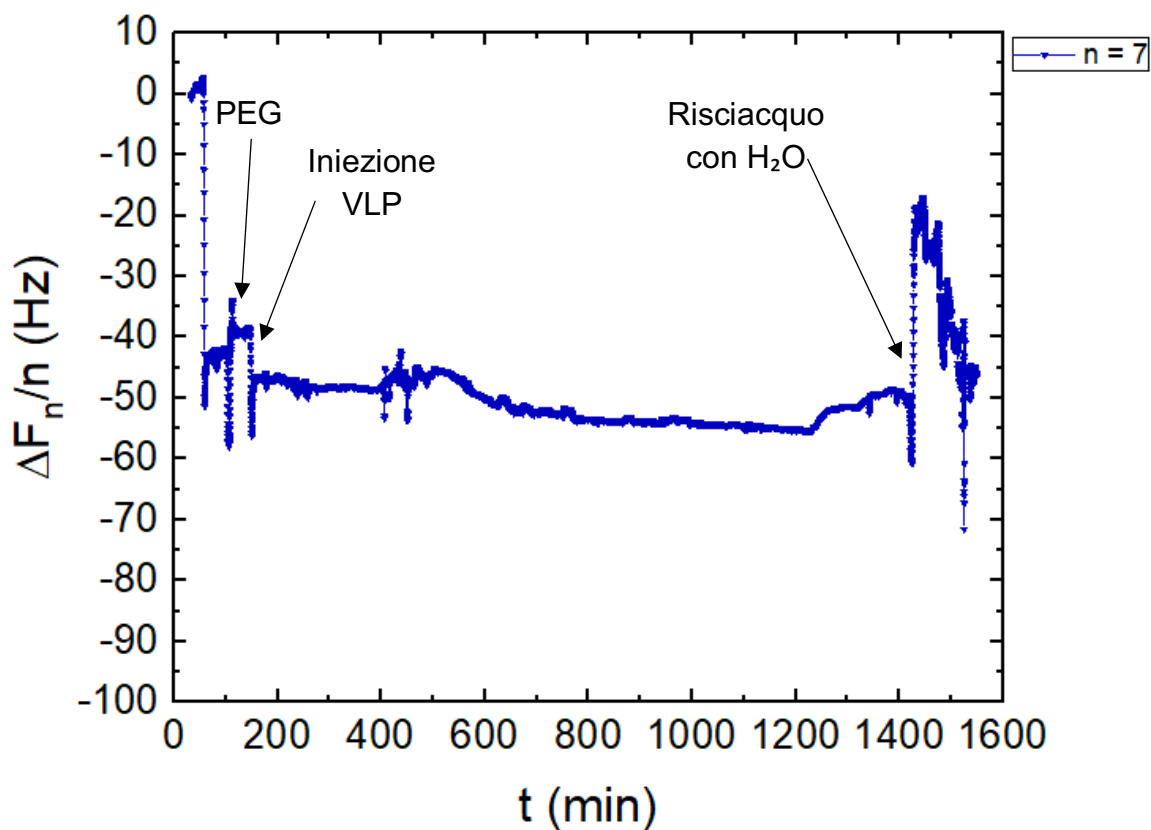


Figura 25 Variazione della frequenza normalizzata ( $n=7$ ) a seguito della deposizione dello strato di PEG-NHS e conseguente iniezione ed incubazione di VLP.

Come è possibile osservare dal grafico in Figura 25, durante la loro incubazione, le particelle virali provocano una variazione di frequenza consistente arrivando fino -16 Hz rispetto alla variazione determinata dalla funzionalizzazione con le molecole di PEG. Al termine del risciacquo finale la variazione di frequenza rimane negativa e maggiore di quella registrata con lo strato di PEG; ciò fa presupporre che le VLP abbiano interagito, attraverso un legame stabile, con il PEG-NHS. I dati così ottenuti validano l'ipotesi che la componente proteica delle VLP (proteine S, M ed E) possa stabilire legami con il PEG-NHS.

È inoltre importante considerare l'oscillazione del segnale in seguito del risciacquo finale con acqua. La presenza di VLP sul sensore, a causa delle loro dimensioni (30 nm) influenzano la stabilità del segnale. Tale comportamento è dovuto al fatto che in presenza di VLP il sistema non si comporta più come un film rigido, ma mostra le proprietà di un film viscoelastico. Le onde sonore che si propagano dal sensore verso la soluzione vengono smorzate con una diversa modalità a causa dell'aumento della viscosità del film. In aggiunta, in presenza di oggetti simili alle VLP, il ruolo dell'acqua contenuta nelle particelle, e quindi il loro stato di idratazione, può influenzare la misura [Armanious 2021]. Tuttavia, con la strumentazione utilizzata in questo lavoro di tesi non è possibile ottenere dati sufficientemente accurati per valutare il comportamento del sistema in tale regime.

### ***3.4.2 Interazione VLP e PEG-CH<sub>3</sub>***

Come precedentemente descritto per la BSA, anche nel caso delle VLP è stata valutata la possibilità di utilizzare PEG metilato per ridurre in modo significativo l'assorbimento delle VLP sulla superficie non funzionalizzata del sensore. Le misure sono state condotte ad una temperatura di 25°C, iniettando le soluzioni ad una velocità di flusso di 0.2 ml/min.

Dopo la deposizione di uno strato di PEG-CH<sub>3</sub> sono stati iniettati 500 µl di una soluzione di VLP 0.013 mg/ml. la soluzione è stata lasciata in incubazione *overnight*. All'incubazione è seguito un risciacquo con 1 ml di acqua ultra-pura. Una volta stabilizzata, la variazione di frequenza normalizzata è tornata esattamente al valore registrato in corrispondenza della formazione dello strato di PEG-CH<sub>3</sub> sul sensore.

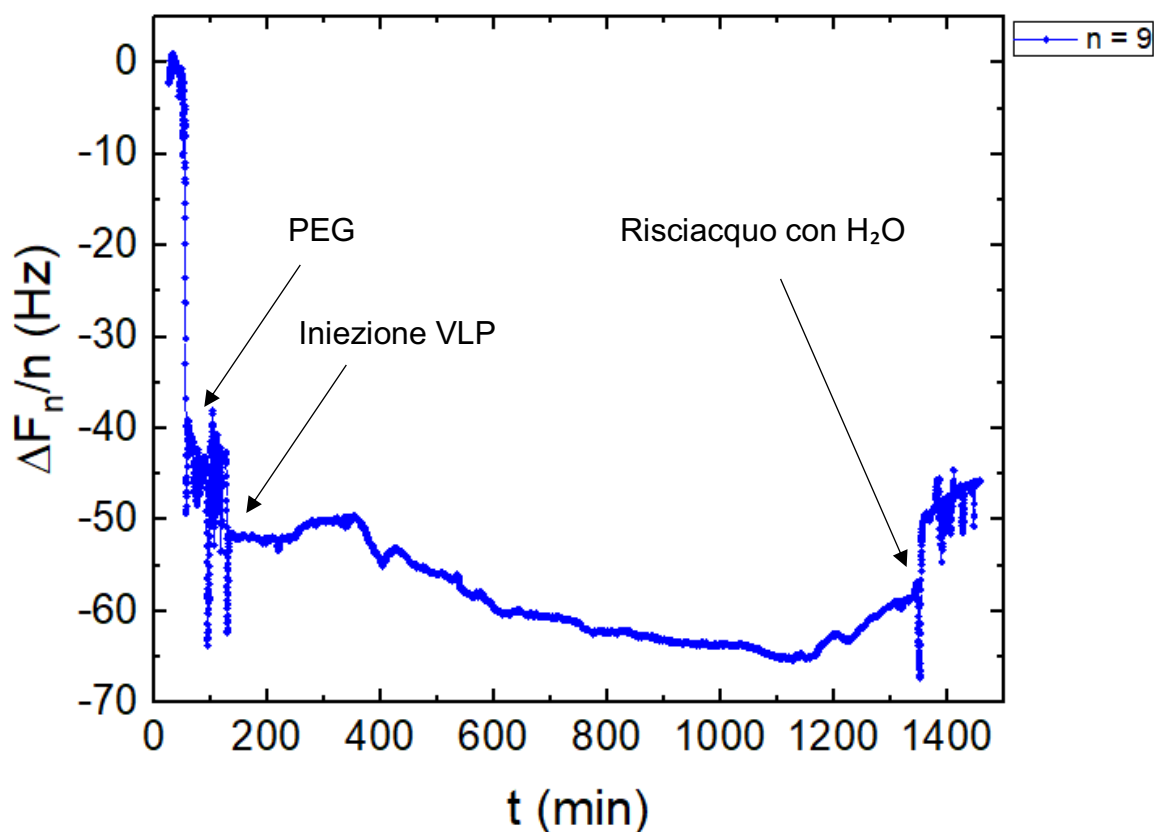


Figura 26 *Variazione della frequenza normalizzata ( $n=9$ ) dovuta all'interazione delle VLP con il PEG-CH<sub>3</sub> depositato sul sensore.*

Questi risultati sono riassunti in Figura 26. Nel grafico si può osservare come, a seguito dell'iniezione della soluzione contenente le VLP, la frequenza varia raggiungendo uno *shift* di -65 Hz, variando di -22 Hz rispetto ai dati ottenuti con lo strato di PEG. Tuttavia, a seguito del risciacquo con acqua, le particelle virali vengono rimosse dalla superficie funzionalizzata del sensore. Tale andamento della frequenza permette di validare l'ipotesi che le VLP possano essere rimosse dalla superficie con un semplice risciacquo, grazie alla passivazione della superficie. Anche se la presenza di PEG-CH<sub>3</sub> non consente di evitare

l'assorbimento aspecifico delle VLP sulla superficie, rende tuttavia possibile la loro rimozione. È importante notare come, nel momento in cui la passivazione della superficie è assente, le VLP mostrano un simile assorbimento aspecifico sull'oro che però non risulta reversibile in seguito ad un risciacquo con acqua ultra-pura. Nell'intenzione di utilizzare superfici dorate a scopo biosensoristico, la loro mancata passivazione darebbe luogo quindi a falsi positivi.

### **3.5 Interazione tra ACE2 e PEG-NHS**

Al fine di valutare l'interazione tra la proteina ACE2 e il PEG-NHS, è stata eseguita una prima funzionalizzazione del sensore con 500  $\mu$ l di PEG-NHS (1 mg/ml) che è stato lasciato incubare per 40 minuti. Al termine dell'incubazione, è stato eseguito un risciacquo con 1 ml di acqua ultra-pura. È seguita quindi l'iniezione di 500  $\mu$ l della soluzione contenente ACE2 a concentrazione di 0.2 mg/ml. La soluzione è stata iniettata mediante un protocollo di *long injection* e lasciata incubare *overnight*; è seguito un risciacquo con 1 ml di acqua ultra-pura. La variazione di frequenza registrata dall'assorbimento di ACE2 sul sensore a seguito del risciacquo, al netto dello *shift* ricavato dalla deposizione del PEG, è di -13 Hz (Figura 27), corrispondente a 230 ng di ACE2 depositata.

Successivamente all'incubazione di ACE2, sono state iniettate le VLP di SARS-CoV-2. Nel dettaglio sono stati iniettati 335  $\mu$ l di VLP a concentrazione 0.013 mg/ml con due iniezioni sequenziali a velocità di flusso 0.2 mg/ml alle quali è seguita un'incubazione *overnight*.

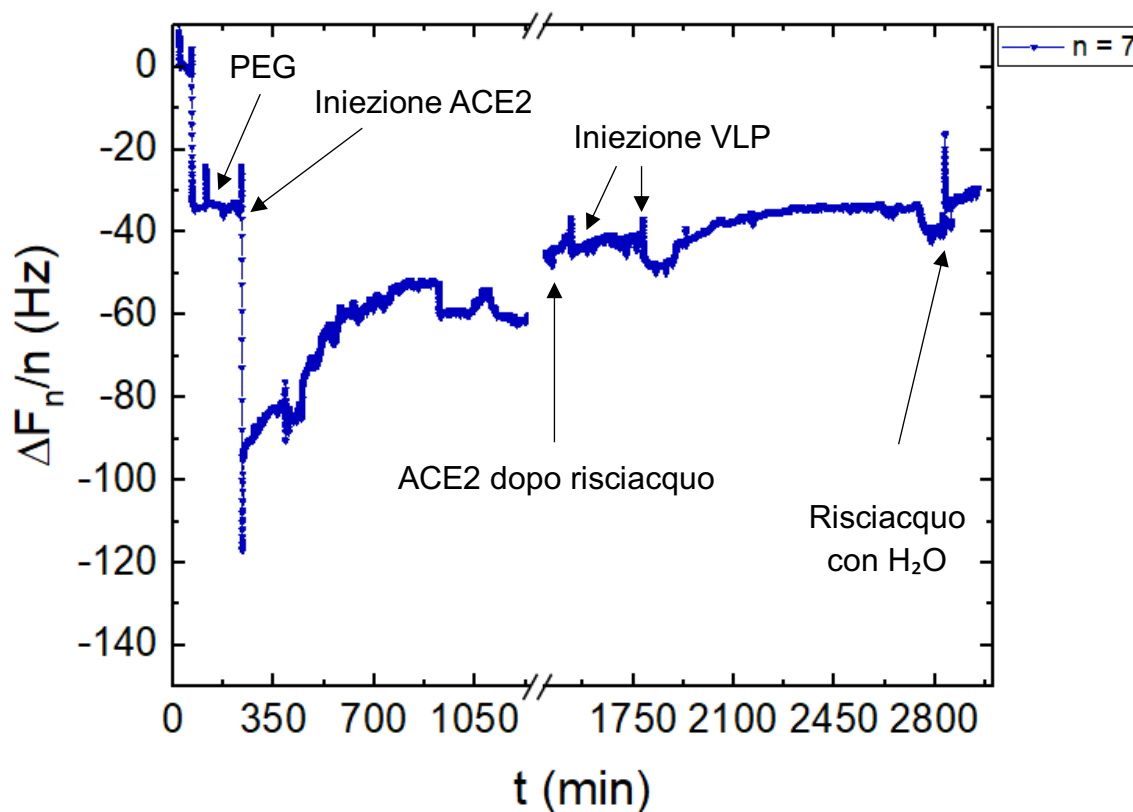


Figura 27 Variazione della frequenza, per  $n=9$ , relativa all'interazione tra PEG-NHS e ACE2 e successiva interazione con le VLP.

A seguito dell'iniezione delle VLP è possibile notare una variazione di frequenza aggiuntiva a quella corrispondente alla proteina ACE2, di -4 Hz. Tuttavia, lo *shift* di frequenza dovuto alla deposizione delle VLP è transitorio. Il segnale tende poi ad aumentare lentamente fino a stabilizzarsi ad un livello molto simile a quello raggiunto al termine del risciacquo dopo l'iniezione di ACE2. Questo andamento non ci permette di trarre alcuna conclusione sul meccanismo di interazione e sulla quantificazione della massa di VLP assorbita. L'aumento di frequenza, anche se limitato, indicherebbe che parte dell'ACE2 depositata sia abbastanza legata al PEG da resistere all'azione meccanica del risciacquo ma che il legame

non sia di tipo covalente. Le VLP, essendo prevalentemente composte da lipidi, potrebbero avere un effetto detergente relativamente ad ACE2 non covalentemente legata, causandone il desorbimento dallo strato di PEG.





## **CAPITOLO 4**

### **PRODUZIONE RICOMBINANTE DI ACE2f**

#### **4.1 Introduzione ad ACE2f**

Parte di questo lavoro di tesi è incentrato sullo sviluppo ed ottimizzazione di protocolli per la produzione ricombinante di ACE2f, dominio extracellulare della proteina ACE2 umana impegnato nel legame con la proteina Spike del pericapside virale di SARS-CoV-2. Il frammento ACE2f è un dominio di 40 kDa con una sequenza amminoacidica di 326 residui (compresi tra l'amminoacido numero 30 e il numero 356 della sequenza completa di ACE2).

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un protocollo che vede la produzione ricombinante del frammento ACE2f umana come proteina di fusione in cellule di *Escherichia Coli* con una purificazione mediante tecniche di cromatografia per affinità sfruttando la coda di 6 residui di istidina legati in posizione terminale della sequenza peptidica.

#### **4.1.1 Linee cellulari e terreni di coltura**

Come sistema di espressione per la produzione ricombinante della proteina sono state scelte linee cellulari di *E. Coli* BL21 (DE3)-pLysS già trasformate con il vettore di espressione ACE2-PET28a(+) e conservate in stock di glicerolo a -80°C. Le cellule (DE3)-pLysS sono ceppi di *E. Coli* che contengono il profago  $\lambda$ DE3 con il gene per la T7 RNA polimerasi e sono in grado di esprimere bassi livelli di lisozima T7 evitando l'inibizione della produzione di tale RNA polimerasi utile per il corretto funzionamento del sistema ricombinante [Palombini 2021] .

Il terreno di coltura scelto per la crescita cellulare è l'LB (Luria Broth – Lennox Medium). In questo lavoro di tesi è stato utilizzato in due formulazioni: una forma liquida (triptone 1% w/v, estratto di lievito 0.5% w/v e NaCl w/v 1%) ed una forma agarizzata, LB-agar (triptone 1% w/v, estratto di lievito 0.5% w/v, NaCl 1% w/v e Agar w/v 1.5%). Il terreno in forma liquida è stato utilizzato per la crescita cellulare e l'espressione ricombinante, mentre quello agarizzato è stato usato per isolare le singole colonie dagli stock conservati in glicerolo a -80°C e verificare che queste fossero state trasformate con il costrutto di interesse valutandone la sensibilità e resistenza agli antibiotici.

Ai terreni liquidi così ottenuti sono stati aggiunti gli antibiotici attivi nella selezione dei cloni batterici che hanno subito la trasformazione con il costrutto contenente il gene che codifica per ACE2f. Nello specifico, sono stati utilizzati Cloramfenicolo 34 µg/ml e Kanamicina 50 µg/ml.

#### ***4.1.2 Protocollo di crescita e isolamento delle colonie trasformate di BL21 in LB-agar***

Le singole colonie trasformate sono state isolate inoculando in piastre petri (25 ml) le cellule BL21 trasformate e conservate in glicerolo a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Nel dettaglio, sono stati preparati 100 ml di LB-agar (vedi paragrafo 5.1.1) e successivamente aliquotati in 4 falcon da 25 ml. Prima che le soluzioni si addensassero sono stati aggiunti gli antibiotici: Ampicillina 100 mg/ml 25  $\mu\text{l}$  su un'aliquota, Kanamicina 50  $\mu\text{g/ml}$  25  $\mu\text{l}$  su un'aliquota, Cloramfenicolo 34  $\mu\text{g/ml}$  25  $\mu\text{l}$  e Ampicillina 25  $\mu\text{l}$  su un'aliquota e Kanamicina 50  $\mu\text{g/ml}$  25  $\mu\text{l}$  e Cloramfenicolo 34  $\mu\text{g/ml}$  25  $\mu\text{l}$  sull'ultima aliquota. Le aliquote così ottenute sono state versate individualmente in piastre petri da 25 ml e atteso che il terreno si solidificasse. In seguito, in ciascuna piastra sono stati seminati 100  $\mu\text{l}$  della linea di BL21 precedentemente trasformata con il vettore di espressione per la produzione ricombinante di ACE2f conservata in glicerolo a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Le piastre così formate sono state poi lasciate *overnight* a  $37^{\circ}\text{C}$  in un incubatore.

#### ***4.1.3 Protocollo di crescita cellulare ed estrazione***

Dagli stock dei cloni trasformati sono stati prelevati 100  $\mu\text{l}$  e fatti crescere in 5 ml di terreno LB overnight a  $37^{\circ}\text{C}$  in sistema di agitazione a 180 rpm (rotazioni per minuto); la crescita cellulare è avvenuta all'interno di un incubatore INNOVA 44 (New Brunswick Scientific). Per verificare la crescita, al termine dell'incubazione è stato prelevato 1 ml dalla coltura cellulare e analizzata la densità ottica a 600 nm tramite uno spettrofotometro (De-Novix DS-1 FX+). È stata valutata una densità ottica pari tra 0.6-0.8 come buon indice di crescita

cellulare. A seguire, la precoltura così ottenuta è stata trasferita in 500 ml di terreno LB ed incubata a 37°C a 180 rpm per 3h. Al termine dell'incubazione è stato prelevato 1 ml di coltura (campione pre-indotto) per verificare tramite corsa elettroforetica di proteine (SDS-PAGE) il contenuto proteico della coltura cellulare prima dell'induzione alla produzione di ACE2f e confrontarlo con un campione post-indotto. Successivamente è stata indotta la produzione ricombinante di ACE2f aggiungendo 250 µl di Isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside (IPTG). Sono state testate due modalità di incubazione post-induzione differenti: un'incubazione di 3h a 37°C a 180 rpm ed una eseguita *overnight* a 20°C a 180 rpm. I diversi protocolli di incubazione sono stati applicati al fine di confrontare quanto la temperatura e il tempo di incubazione della coltura a seguito della somministrazione di IPTG influissero sulla purificazione proteica e la resa del processo. Tali differenze sono state valutate attraverso esperimenti di SDS-PAGE, valutando il contenuto proteico degli eluati ottenuti mediante i due test di incubazione (paragrafo 5.3.3). Al termine delle incubazioni è stato prelevato 1 ml (post-indotto) per valutare il contenuto proteico prodotto dalle cellule dopo l'induzione con IPTG attraverso una corsa elettroforetica delle proteine e confrontarlo con il campione pre-indotto (paragrafo 4.3.2).

Al termine della crescita cellulare, la coltura è stata centrifugata (Beckman Coulter, Avanti J-26S XP) a 4000 rpm per 30 minuti e successivamente è stato scartato il sopranatante e conservato il pellet a -80°C.

## **4.2 Protocollo di purificazione di ACE2f**

Il protocollo di estrazione e purificazione della proteina ACE2f prevede prima la sonicazione dei pellet conservati a -80°C utilizzando un apposito tampone di lisi, poi la raccolta del surnatante (lisato cellulare) a seguito di una centrifugazione. Il lisato cellulare è stato quindi lasciato equilibrare con una resina in nickel per effettuare la purificazione attraverso una cromatografia di affinità (paragrafo 4.2.2). Al termine della corsa cromatografica, l'eluato è stato raccolto, chiuso all'interno di una membrana porosa e sottoposto ad un processo di dialisi per cambiare la soluzione tampone.

### ***4.2.1 Protocollo di lisi cellulare***

Il lisato cellulare è stato ottenuto risospendendo i pellet ricavati dalle colture cellulari in 10 ml tampone di lisi (HEPES pH 7.5 50 mM, NaCl 300 mM,  $\beta$ -mercaptoetanolo 1 mM, PMSF 1 mM) contenente agenti riducenti (quali  $\beta$ -mercaptoetanolo) e inibitori delle proteasi (PMSF). Il pellet così sospeso è stato sottoposto ad una sonicazione tramite sonicatore a punta fino ad ottenere una soluzione torbida ed omogenea. A seguito della sonicazione, la soluzione è stata sottoposta ad una centrifugazione a 4000 rpm per 1h da cui è stato ricavato il surnatante.

### ***4.2.2 Protocollo di purificazione mediante cromatografia di affinità***

Per il processo di purificazione proteica, è stata utilizzata una cromatografia di affinità: tale tecnica, prevede di separare ed isolare da una soluzione di molecole

di interesse sfruttando la loro capacità di interagire e legarsi con un complesso molecolare situato nella colonna cromatografica. In questo lavoro di tesi è stata utilizzata una resina in nichel posta all'interno di una colonna cromatografica da banco, capace di legare in modo specifico il tag di 6 istidine (*His-tag*) fuso alla proteina ACE2f. Il legame tra l'*His-tag* e il nichel permette di rimuovere, attraverso una serie di lavaggi con tamponi opportuni, tutta la componente proteica non di interesse presente nel lisato cellulare e di trattenere all'interno della colonna solamente la proteina di interesse. Attraverso un'eluizione finale con una soluzione contenente imidazolo, che compete con il nichel nel legare la proteina di interesse, è possibile rompere il legame formato tra *His-tag* e nichel permettendo di eluire la proteina di interesse.

Nel dettaglio, il lisato cellulare ottenuto mediante sonicazione in tampone di lisi e successiva centrifugazione è stato fatto incubare *overnight* con la resina in nichel (Nickel Chelating Resin, G-Biosciences 9800 Page Ave, St. Louis, MO 63132, USA) a 4°C in rotazione. La miscela è stata quindi trasferita all'interno di una colonna cromatografica da banco e si è atteso che la resina si depositasse sul fondo, a contatto con il filtro. In seguito, il *flow through* (componente del lisato cellulare non legato alla resina) è stato lasciato fluire attraverso la colonna per poi essere raccolto in eppendorf da 2 ml per effettuare successivi esperimenti di SDS-PAGE al fine di confrontare il contenuto proteico contenuto in esso, nelle soluzioni di lavaggio e negli eluati.

Sono stati quindi effettuati due lavaggi con 30 ml di due soluzioni, in questo lavoro di tesi indicate come W1 (Hepes pH 7.5 50 mM, NaCl 300 mM, PMSF 1

mM ed imidazolo 10 mM) e W2 (Hepes pH 7.5 50 mM, NaCl 100 mM, PMSF 1mM ed imidazolo 10 mM). Sia per il primo lavaggio (W1), che per il secondo (W2), sono stati raccolti il primo e l'ultimo eluato in utilizzati poi per effettuare poi test di elettroforesi di proteine (paragrafo 4.2.4). Al termine dei lavaggi è stata effettuata un'eluizione del campione attraverso un buffer di eluizione (NaCl 150 mM, imidazolo 300 mM, PBS per portare a volume) raccogliendo tutto l'eluato in più aliquote da 2 ml.

#### ***4.2.3 Protocollo di dialisi***

L'eluato ricavato mediante cromatografia di affinità è stato sottoposto ad una dialisi al fine di sostituire la soluzione tampone con una soluzione di PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM) capace di conservare la struttura secondaria della proteina eliminando l'imidazolo dalla soluzione. Nel dettaglio, l'eluato è stato inserito all'interno di una membrana di dialisi con dei micropori di 12 kDa (Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, Inc. [spectrumlabs.com](http://spectrumlabs.com)). La membrana è stata quindi immersa nella soluzione di PBS e la dialisi è stata condotta *overnight* a 4°C in agitazione.

#### ***4.2.4 SDS-PAGE***

A seguito della purificazione è stata effettuata un'analisi dell'effettivo contenuto proteico della soluzione dializzata mediante tecniche di elettroforesi di proteine, (SDS-PAGE). Questa tecnica permette di separare le proteine sulla base del loro peso molecolare in un gel poroso di Poliacrilammide in condizioni denaturanti conferite dalla presenza di sodio dodecil solfato (SDS).



Da ciascun campione da analizzare sono state prelevate aliquote di 10  $\mu$ l e ad ognuna di esse sono stati aggiunti 10  $\mu$ l di Leammli Sample Buffer 4x ( $\beta$ -mercaptoetanolo 0.1%, blu di bromofenolo 0.0005%, glicerolo 10%, SDS 2% e Tris-HCl 63mM pH 6.8 5%); è seguita quindi una fase di riscaldamento dei campioni a 95°C per 3 minuti. I campioni sono stati caricati in un gel di Poliacrilammide preparato utilizzando un sistema TETRA SYSTEM (vetrini da 0.75 mm con 10 pozzetti per il caricamento dei campioni). Il gel utilizzato è costituito da uno *stacking gel* al 4% (acqua ultra-pura 1.5 ml, Acrilammide 30% 350  $\mu$ l, Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 625  $\mu$ l, SDS 10% 25  $\mu$ l, TEMED 2.5  $\mu$ l e APS 10% 25  $\mu$ l) ed un *runnin gel* al 12% (acqua ultra-pura 1.34 ml, Acrilammide 30% 1.60 ml, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 1 ml, SDS 10% 40  $\mu$ l, TEMED 2  $\mu$ l e APS 20  $\mu$ l). La corsa elettroforetica è stata effettuata all'interno di una camera elettroforetica (Mini-PROTEAN® Tetra System, BIO-RAD Laboratories Inc.) dentro la quale è stato versato un *running buffer* TGS 10x, Tris-Glicina-SDS (Tris 30g, Glicina 144 g, SDS 10 g, acqua ultra-pura 1 L). I campioni e lo standard (Precision Plus Protein Unstained Standard 1,000  $\mu$ l Cat. #1610363 BIO-RAD) sono stati caricati all'interno dei pozzetti presenti nello *stacking gel* ed al gel è stato applicato un voltaggio pari a 80 V per 30 minuti e successivamente aumentato fino a 100 V per un'ora.

Al termine della corsa elettroforetica è stata effettuata una colorazione del gel con il Comassie Stain (Metanolo 50 ml, Acido Acetico Glaciale 10 ml, Comassie Blue Brilliant 0.1 g e acqua ultra-pura 40 ml) immergendo il gel nella soluzione colorante per 10 minuti in agitazione. È stata quindi eseguita una decolorazione

immergendo il gel in una soluzione decolorante, Destain solution (Metanolo 25 ml, Acido Acetico Glaciale 10 ml, acqua ultra-pura 65 ml) per 10 minuti in agitazione. Per osservare i risultati ottenuti mediante l'SDS-PAGE, a seguito della decolorazione, il gel è stato osservato attraverso un transilluminatore (Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+, BIO-RAD).

### **4.3 Risultati della produzione ricombinante di ACE2f**

#### ***4.3.1 Analisi dei cloni ricombinanti su LB-Agar***

Per verificare che i cloni conservati in glicerolo a -80°C fossero stati correttamente trasformati con l'inserito contenente il gene di interesse per la produzione di ACE2f [Palombini 2021], quattro aliquote da 100 µl ciascuna degli stock in glicerolo sono state seminate in quattro piastre petri, LB-Agar come terreno di coltura, e contenenti rispettivamente la seguente composizione di antibiotici nelle concentrazioni precedentemente menzionate (paragrafo 5.1.2): Ampicillina, Kanamicina, Ampicillina e Cloramfenicolo, Kanamicina e Cloramfenicolo. A seguito di un'incubazione *overnight* a 37°C la crescita delle colonie è stata riscontrata esclusivamente nelle piastre contenenti sia solo Kanamicina che Kanamicina 25 µl e Cloramfenicolo 25 µl, come osservabile in Figura 28.

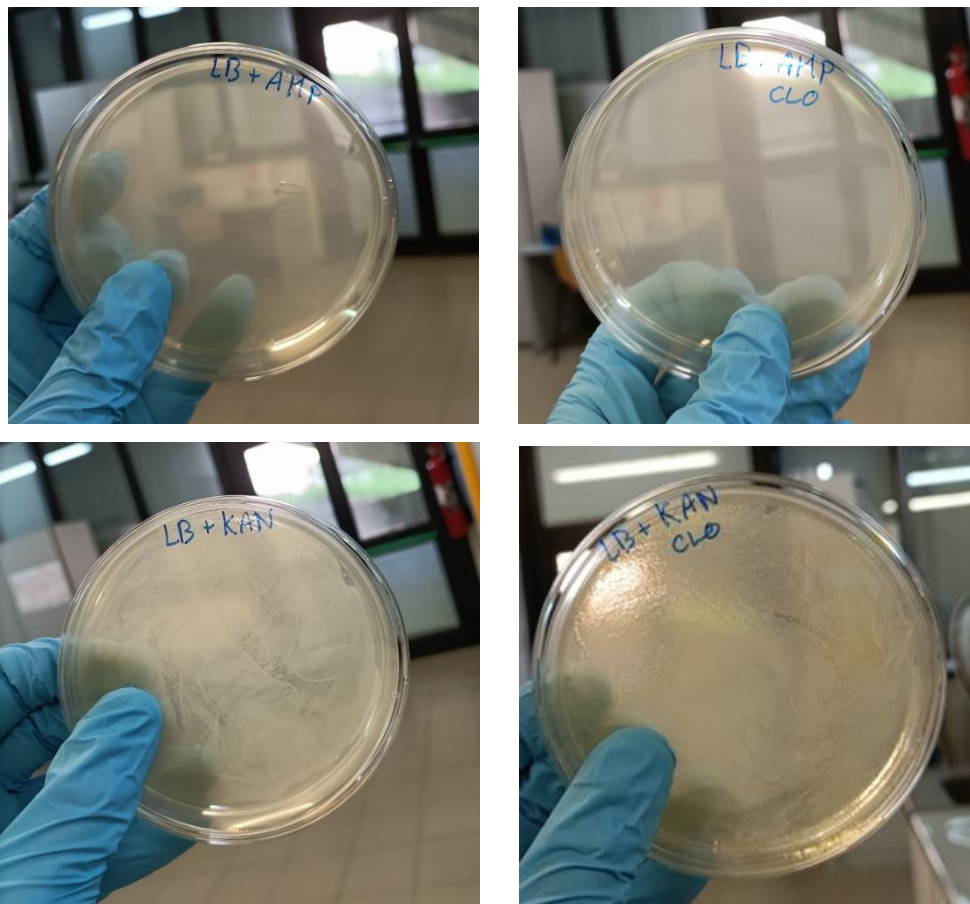


Figura 28 Crescita delle colonie di BL21 trasformate con il costrutto ACE2-PET28a(+) in LB-Agar con Kanamicina e nella piastra con Kanamicina.

La crescita esclusiva delle cellule batteriche su questi terreni dimostra che le linee cellulari utilizzate sono state correttamente trasformate con il costrutto recante il gene per la sintesi di ACE2f, il quale conferisce alla linea cellulare resistenza alla Kanamicina.

#### ***4.3.2 Analisi del contenuto proteico delle colture cellulari pre e post induzione con IPTG***

Le colture cellulari sono state sottoposte a due differenti protocolli di incubazione post-induzione con IPTG: il primo prevede un'incubazione a 37°C per 3 ore a 180 rpm, mentre il secondo prevede un'incubazione a 20°C *overnight* a 180 rpm. Entrambi i protocolli sono stati testati e confrontati per valutare come le condizioni di temperatura e tempo di incubazione influissero nella produzione ricombinante della proteina. Al fine di valutare l'effetto di tali condizioni di induzione sono stati effettuati test in SDS-PAGE di campioni di coltura prelevati pre e post induzione con IPTG (paragrafo 4.1.3) delle colture incubate a 37°C per tre ore e 20°C *overnight*.

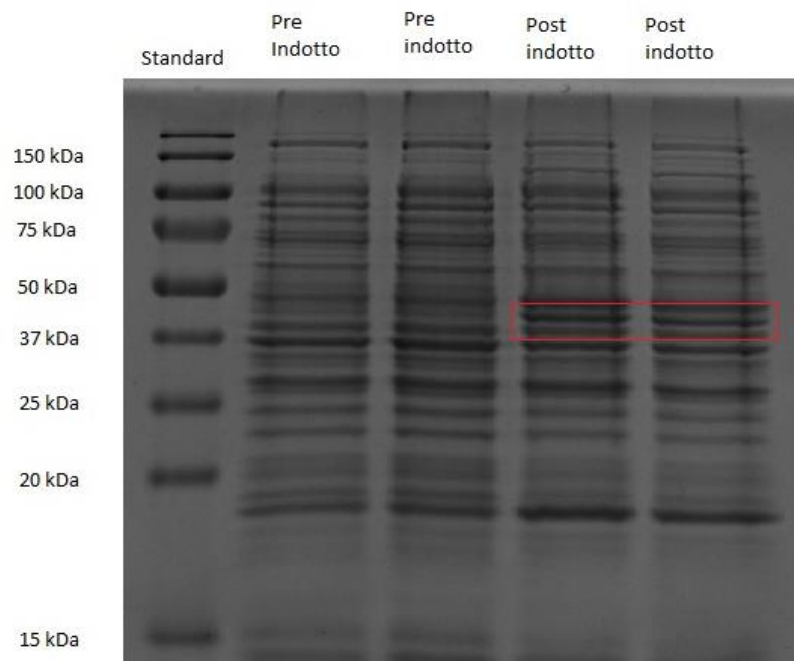


Figura 29 Gel di poliacrilamide relativo alle proteine totali estratte dalle colture cellulari prima dell'induzione con IPTG (pre-indotto) e dopo l'induzione (post-indotto) condotta a 37°C per 3 ore.

Dalla corsa elettroforetica dell'estratto proteico totale delle colture cellulari pre e post induzione è possibile notare la comparsa di una banda corrispondente a 40 kDa circa nei campioni post induzione (Figura 29). Al fine di avere conferma che tale banda fosse dovuta alla proteina di interesse, i risultati della corsa elettroforetica sono stati confrontati con test di SDS-PAGE degli eluati ottenuti a seguito delle procedure di purificazione.

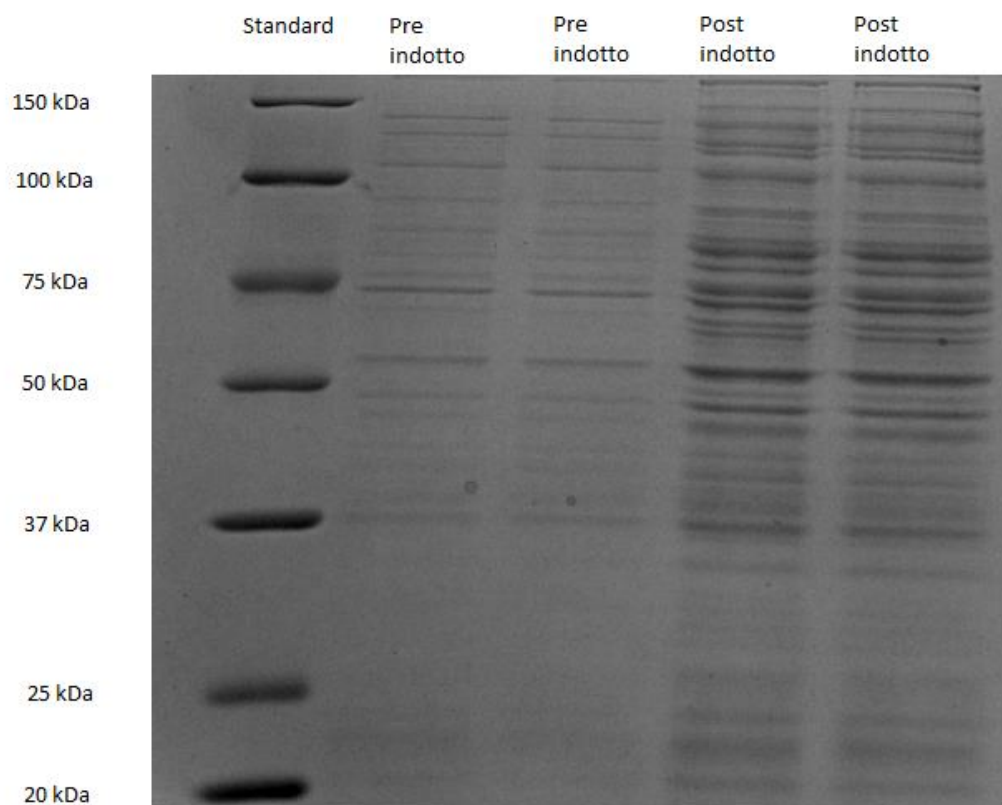


Figura 30 Gel di poliacrilamide relativo alle proteine totali estratte dalle colture cellulari prima dell'induzione e dopo l'induzione effettuata a 20°C overnight.

Con un'incubazione *overnight* a 20°C, è possibile concludere (come mostrato dal gel di poliacrilamide in Figura 30) che il contenuto proteico prodotto dalle cellule in coltura è inferiore rispetto a quello prodotto con il primo protocollo di induzione. Dalla corsa elettroforetica dell'estratto proteico totale ottenuto dalle colture incubate seguendo il secondo protocollo non è infatti possibile osservare una netta comparsa di bande aggiuntive nei campioni prelevati post induzione rispetto a quelli pre induzione. È stato quindi necessario confrontare i risultati ottenuti da tale corsa elettroforetica con dei gel di SDS-PAGE dei campioni eluati a seguito dell'estrazione e purificazione.

#### **4.3.3 Analisi dei risultati di purificazione di ACE2f**

Come effettuato per l'analisi delle proteine totali estratte dai campioni pre e post induzione, in questo lavoro di tesi ho confrontato quanto le diverse condizioni di incubazione post induzione influissero sulla produzione della proteina ricombinante di interesse. Questo processo è avvenuto attraverso l'analisi degli eluati proteici ricavati a seguito della purificazione. Le analisi sono state condotte raccogliendo, durante la purificazione per cromatografia di affinità, il *flow through*, gli eluati derivati dai lavaggi W1 e W2 e gli eluati ottenuti attraverso la soluzione di eluizione. I campioni sono stati caricati in un gel di poliacrilamide per effettuare una SDS-PAGE ed in seguito alla colorazione del gel, è stato effettuato un confronto del contenuto proteico.

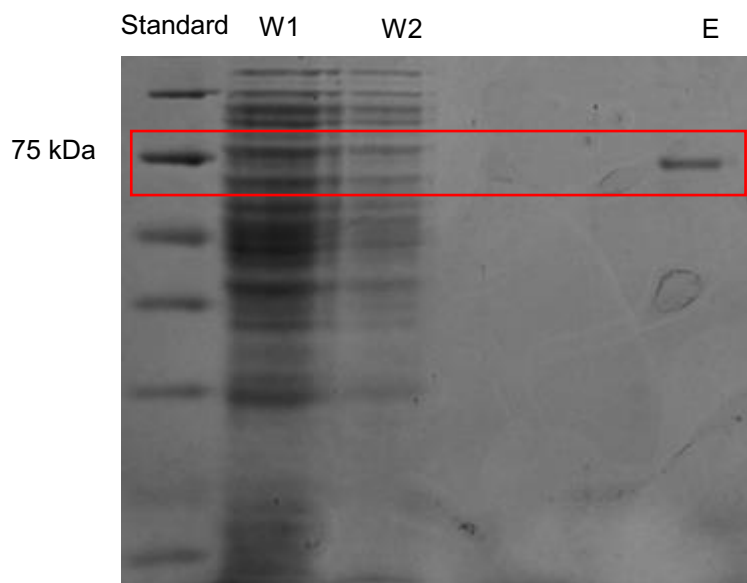


Figura 31 Gel di poliacrilamide riguardante proteine purificate mediante cromatografia di affinità da colture cellulari sottoposte a un'induzione con IPTG a 37°C per 3 ore: *flow through* (FT), soluzioni di lavaggio W1 e W2 prodotto della soluzione di eluizione (E).

La purificazione della proteina di interesse dalle colture cellulari sottoposte ad un'induzione con IPTG di 3 ore a 37°C ha portato alla produzione di un eluato che non contiene proteine del peso molecolare di ACE2f [Figura 31]. Dal gel di poliacrilammide è infatti assente la banda elettroforetica relativa alla proteina di interesse (~40 kDa), nonostante tali bande siano presenti nei campioni ricavati dal *flow through* (FT) e negli eluati ottenuti dalle soluzioni di lavaggio (W1 e W2). Tra tutte le bande visibili, è stata individuata una banda elettroforetica di peso molecolare di ~75 kDa di cui non si conosce ancora l'origine.

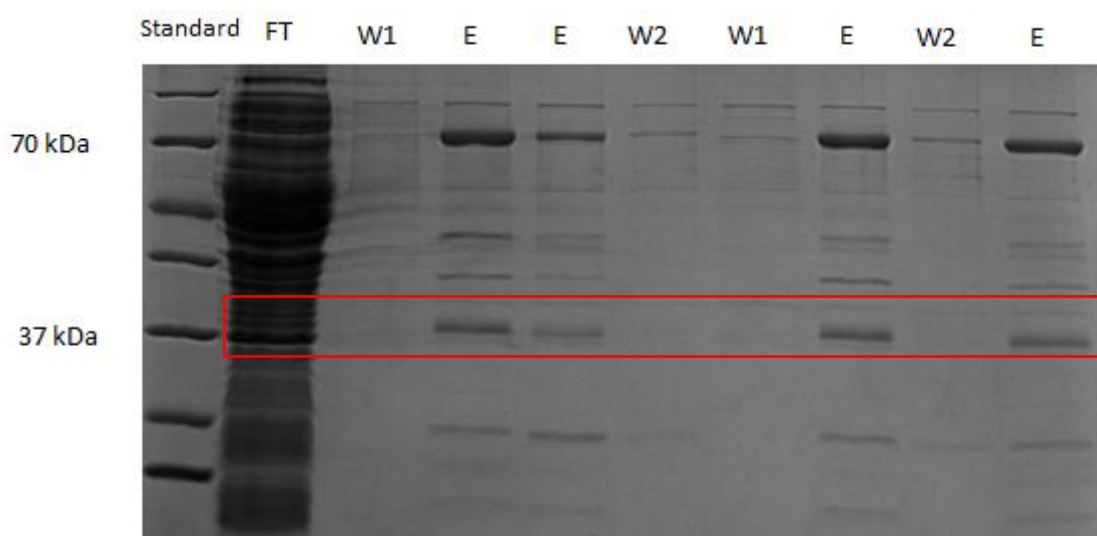


Figura 32 Gel di poliacrilammide riguardante proteine purificate per cromatografia di affinità da colture cellulari sottoposte ad un'induzione con IPTG overnight a 20°C.

Mediante l'applicazione del protocollo che prevede un'induzione con IPTG *overnight* a 20°C è stato possibile purificare proteine che presentano un peso molecolare di circa 40 kDa e che potrebbero corrispondere alla proteina ACE2f. I campioni sottoposti alla corsa elettroforetica mostrano, come visibile in Figura 32, una banda elettroforetica in corrispondenza di ~40 kDa, presente nel *flow through*, negli eluati e assente nei campioni estratti attraverso le soluzioni di lavaggio. Ciò è determinato dal fatto che la concentrazione di imidazolo presente nelle soluzioni di lavaggio non è tale da staccare la proteina di interesse recante il tag di istidine dalla resina in nichel. La presenza di bande elettroforetiche, in corrispondenza di un peso molecolare simile a quello di ACE2f, esclusivamente nel *flow through* e negli eluati finali suggerisce, con buona probabilità, la presenza di ACE2f. Dal gel mostrato in Figura 32 sono oltremodo visibili delle



bande elettroforetiche con un contenuto proteico di ~70 kDa, come riscontrato nei risultati di SDS-PAGE relativi ai campioni ottenuti mediante l'applicazione del primo protocollo di induzione [Figura 31].

Tali risultati permettono di considerare il protocollo di induzione con IPTG a 20° *overnight* come più efficace per la produzione della proteina ricombinante, permettendo non solo la possibilità di ricavare una proteina dal peso molecolare simile a quello di ACE2f, ma di produrre un quantitativo inferiore di proteine diverse da quella di interesse. È probabile che la differenza in produzione proteica determinata dai due diversi protocolli di induzione stia proprio nella temperatura alla quale avviene l'induzione. Ulteriori conferme per validare l'effettiva presenza di ACE2f negli eluati possono essere fornite da tecniche di *immunoblotting* (Western Blot).

## Capitolo 5

### CONCLUSIONI

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi prevedeva lo sviluppo di protocolli per la funzionalizzazione di superfici in oro con polimeri di PEG al fine di ottenere un'interfaccia bio-sensoristica multivalente per lo studio di interazioni tra ligandi e recettori adesi sulla superficie polimerica.

In primo luogo, è stato possibile confermare le proprietà intrinseche del PEG di formare strati molecolari, stabili e riproducibili. L'analisi dei risultati sperimentali ha confermato infatti i calcoli teorici da me effettuati prima di eseguire gli esperimenti (paragrafo 3.1). In condizioni di saturazione della superficie, i calcoli prevedevano una variazione di frequenza normalizzata di -40 Hz in seguito alla deposizione del PEG sul sensore. Questa variazione corrisponde a 700 ng di massa adesa, ovvero  $2 \times 10^{13}$  molecole sulla superficie del sensore. Questa previsione è stata verificata sperimentalmente in quanto variazione di frequenza normalizzata è risultata mediamente del valore di -42 Hz (743 ng di PEG), come dimostrato dalle diverse repliche dello stesso esperimento. Si è potuto dimostrare che il protocollo sviluppato è adatto a ricoprire interamente la superficie disponibile con uno strato molecolare di PEG in cui le singole catene sono orientate perpendicolarmente alla superficie d'oro e legate solo tramite l'estremità caratterizzata dal gruppo HS. Inoltre è stato

possibile dimostrare la resistenza e stabilità nel tempo e rispetto a risciacqui prolungati, dello strato di PEG. Tali risultati sono stati ottenuti con entrambe le tipologie di PEG utilizzate nella funzionalizzazione delle superfici in oro, PEG-NHS e PEG-CH<sub>3</sub> a conferma ulteriore dell'efficacia del protocollo di adsorbimento del polimero sul sensore. Questi risultati sono stati confermati anche tramite misure di riflettometria neutronica effettuate a marzo 2024 presso l'Institut Laue-Langevin di Grenoble. Da questi esperimenti (non riportati in questa tesi) è stato possibile confermare la saturazione della superficie d'oro in seguito all'incubazione del PEG. Inoltre, è stato possibile misurare lo spessore ed il grado di idratazione dello strato di PEG depositato.

I dati di QCM-D riguardanti l'interazione tra il PEG e le molecole di BSA mostrano risultati dipendenti dalla concentrazione della soluzione di BSA utilizzata e della modalità di iniezione all'interno della camera QCM-D, come riportato in Tabella 1.

| Concentrazione BSA e modalità iniezione | $\frac{\Delta f_n}{n}$ Hz | $\Delta m$ (ng) | N° particelle      |
|-----------------------------------------|---------------------------|-----------------|--------------------|
| 1 mg/ml singola iniezione               | -6                        | 106.2           | $1 \times 10^{19}$ |
| 1 mg/ml long injection                  | -12                       | 212.4           | $2 \times 10^{19}$ |
| 0.5 mg/ml 3 iniezioni                   | -4                        | 78.8            | $6 \times 10^{12}$ |
| 0.3 mg/ml long injection                | -8                        | 141.6           | $1 \times 10^{19}$ |

Tabella 1 *Corrispondenza tra la variazione di frequenza (normalizzata) osservata sperimentalmente e la massa ed il numero di particelle assorbite per gli esperimenti condotti con BSA.*

Singole iniezioni o serie di 3 iniezioni di BSA hanno condotto ad un basso tasso di adsorbimento della proteina sul sensore: gli *shift* di frequenza, portati dalla sola BSA, sono risultati pari alla metà di quelli misurati con un'iniezione lenta e prolungata del campione. Come riportato in Tabella 1, a parità di concentrazione della soluzione di BSA 1 mg/ml, è stato possibile ottenere una variazione di frequenza di -6 Hz applicando una singola iniezione del campione, mentre è stata ottenuta una variazione di -12 Hz, con una *long injection*. Di conseguenza, anche la massa di BSA legata stabilmente al PEG, è risultata doppia in combinazione con il protocollo basato sulla *long injection*. È pertanto possibile concludere che, i risultati sperimentali denotano la *long injection* come miglior tecnica di iniezione del campione per massimizzare la biodisponibilità della proteina

attraverso un legame stabile con l'estremità NHS del PEG. Questo protocollo ha inoltre permesso di poter lavorare anche con concentrazioni più basse di BSA (0.3 mg/ml) ed ottenere masse consistenti di proteina adese al sensore.

Dai dati ottenuti dagli esperimenti di interazione tra BSA ed anticorpi (paragrafo 3.3), è stato possibile dedurre che il rapporto di diluizione fin ora utilizzato, 0.2 mg di anticorpi in 1 ml di PBS, sia tale da sovra-saturare i siti di legame disponibili dati dalle molecole di BSA adese al sensore. Difatti, la variazione di frequenza ottenuta a seguito dell'incubazione della soluzione di anticorpi, -29 Hz (ovvero 530 ng), è decisamente maggiore rispetto a quello misurato in presenza della sola BSA (-4 Hz, ovvero 71 ng). Considerando che la BSA e gli anticorpi hanno pesi molecolari abbastanza simili si può presupporre che gli ultimi non si siano legati solo alla BSA precedentemente legata al PEG, ma anche alle estremità funzionali del PEG-NHS non saturate dalla BSA. Tale scenario è da considerare possibile poiché le ammine delle molecole anticorpali possono interagire con i gruppi NHS del PEG. Ulteriori esperimenti che riguardano un'interazione esclusiva tra PEG-NHS e anticorpi anti-BSA a concentrazione 0.2 mg/ml riuscirebbero a determinare la variazione di frequenza data dall'instaurazione di tale legame, considerata aspecifica nello scopo biosensoristico del sistema. Tuttavia, per motivi di disponibilità del campione e di tempo, non è stato possibile affrontare questo studio.

In aggiunta agli esperimenti condotti con la BSA è stato possibile testare i protocolli sviluppati utilizzando ACE2 come recettore e le VLP come analita. Bisogna sottolineare che questi esperimenti sono stati limitati in numero e

condizioni sperimentali a causa dei costi elevati dei reagenti. Gli esperimenti hanno permesso di confermare la formazione di un legame stabile tra PEG-NHS e ACE2 (paragrafo 3.5). Tuttavia, gli esperimenti di interazione con le VLP non sono stati conclusivi.

In parallelo allo sviluppo dei protocolli per la realizzazione di superfici biosensoristiche e della loro caratterizzazione, mi sono occupata della produzione ricombinante della proteina ACE2f. Sono stati usati due protocolli di produzione; le analisi hanno indicato che il protocollo che prevede un'induzione *overnight* a 20°C conduce alla purificazione di una proteina con caratteristiche molto simili ad ACE2f disponibile commercialmente. Tuttavia, il protocollo sviluppato deve essere ulteriormente testato, ad esempio attraverso *Western Blot*, per una produzione efficiente e su larga scala di ACE2f. Tra le cause delle differenze osservate nel prodotto finale vi è la minore temperatura applicata durante l'incubazione. È possibile che questa vada ad inibire la formazione di corpi di inclusione (CI), che limiterebbero la solubilità della proteina ricombinante prodotta e la sua biodisponibilità nella forma nativa. Diversi studi riportano come la temperatura alla quale viene effettuata la crescita cellulare e l'induzione dell'espressione proteica giochi un ruolo fondamentale nella formazione dei CI. Si presume che un'elevata temperatura (compresa tra i 37°C e i 47°C) durante la crescita inneschi *pathway* di segnalazione cellulare coinvolti nello shock termico [Bhatwa 2021]. Ciò risulterebbe in una maggiore produzione di proteine incluse in CI o di proteine che hanno perso il corretto ripiegamento della loro struttura secondaria. Difatti, dalle corse elettroforetiche delle proteine ricavate a seguito

di un'induzione a 37°C il quantitativo di proteine isolate risulta minore e tra di esse non è possibile osservare una proteina con proprietà elettroforetiche simili ad ACE2f. Con un'induzione a 20°C è invece possibile ricavare una miscela di proteine a diverso peso molecolare, incluse proteine con peso molecolare di circa 40 kDa (dimensioni simili ad ACE2f). Per confermare che il basso tasso di purificazione proteica a seguito dell'induzione a 37°C sia effettivamente causato dalla produzione di corpi di inclusione, sarebbe opportuno effettuare un protocollo specifico per il trattamento dei corpi di inclusione (che normalmente prevede una lisi dei CI e un'induzione del ripiegamento delle proteine in essi contenute) ed effettuare test di SDS-PAGE dei lisati provenienti dai CI.

Il protocollo che vede un'induzione con IPTG *overnight* a 20° risulta quindi, dai dati ottenuti, essere il protocollo migliore per effettuare una produzione ricombinante di ACE2f. Esperimenti di *Western Blot* con l'utilizzo di anticorpi specifici contro l'His-Tag legato alla proteina ricombinante andrebbero a completare i dati, confermando che la proteina prodotta sia effettivamente quella di interesse.

## BIBLIOGRAFIA

- [Alromithy 2022] *Novel Piezoelctric Biosensor Based on SARS-CoV-2 (COVID19) Spike Antibody for Coronavirus (COVID-19) Detection*, Fares Sulaiman Alromity, **Tesi di Dottorato, 2022**
- [Armanious 2021] *Determination of Nanosized Adsorbate Mass in Solution Using Mechanical Resonators: Elimination of the So Far Inseparable Liquid Contribution*, A. Armanious, B. Agnarsson, A. Lundgren, V. P. Zhdanov, and F. Höök, **J. Phys. Chem. C**, 125, 22733-22746, **2021**
- [Barros 2021] *The flexibility of ACE2 in the context of SARS-CoV-2 infection*, Emilia P. Barros, L. Casalino, Z. Gaieb, Abigail C. Dommer, Y. Wang, L. Fallon, L. Raguette, K. Belfon, C. Simmerling, Rommie E. Amaro, **Biophysical Journal**, 120(6), 1072-1084, **2021**
- [Bhatwa 2021] *Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in Escherichia coli and Strategies to Address Them for Industrial Applications*, Arshpreet Bhatwa, Waijung Wang, Yousef I. Hassan, Nadine Abraham, Xiu-Zeng Li, Ting Zhou **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 9, **2021**



- [Bertolle 2012] *Nanostrutture di oro per applicazioni in imaging e per il test ELISA usando l'effetto SERRS*, F. Bertolle **Tesi Magistrale, 2012**
- [Cho 2007] *Employing Two Different Quartz Crystal Microbalance Models To Study Changes in Viscoelastic Behavior upon Transformation of Lipid Vesicles to a Bilayer on a Gold Surface*, Nam-Joon Cho, Kay K. Kanazawa, Jeffrey S. Glenn, Curtis W. Frank **Analytical Chemistry**, 79, 7027-7035, **2007**
- [Davis 2021] *Holographic Sensors in Biotechnology*, Sam Davies, Yubing Hu, Nan Jiang, Jeff Blyth, Monika Kaminska, Yunzheng Liu, Ali K. Yetisen **Advance Functionl Materials**, 31, **2021**
- [Dixon 2008] *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions*, Mettew C. Dixon **Journal of Biomolecular Techniques**, 19, **2008**
- [Dobrynin 2022] *Adsorption of SARS CoV-2 spike proteins on various functionalized surfaces correlates with the high transmissibility of Delta and Omicron variants*, Daniela Dobrynin, Irina Polishchuck, Lotan Portal, Ivan Zlotver, Alejandro Sosnik, Boaz Pokroy **Materials Today Bio**, 14, **2022**
- [Dorta-Gorrin 2023] *Detection of SARS-CoV-2 Based on Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) and Its Integration into Nanomedicine and Microfluidic Devices as Point-of-Care Testing (POCT)*, Alexis Dorta-Gorrin, Jesús Navas-Méndez, Mónica Gozalo-Margüello, Laura Miralles, Lorena García-Hevia **Internationa Journal of Molecular Sciences**, 24(12), **2023**

- [Easley 2021] *A practical guide to quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of thin polymer films*, Alexandra D. Easley, Ting Ma, Chikaodinaka I. Eneh, Junyeong Yun, Ratul M. Thakur, Jodie L. Lutkenhaus **Journal of Polymer Science**, 60, 1090-1107, **2022**
- [Edvarsson 2024] *What is piezoelectricity?*, Malin Edvarsson Biolin Scientific, **2024**
- [Ghahramani 2023] *Efficient Expression in the Prokaryotic Host System, Purification and Structural Analyses of the Recombinant Human ACE2 Catalytic Subunit as a Hybrid Protein with the B Subunit of Cholera Toxin (CTB-ACE2)*, Maryam Ghahramani, Mohammad Bagher Shahsavani, Seyed Hossein Khaleghinejad, Ali Niazi, Ali Akbar Moosavi-Movahedi, Reza Yousefi **The Protein Journal**, **2023**
- [Jin 2015] *Effect of grafted PEG chain conformation on albumin and lysozyme adsorption: A combined study using QCM-D and DPI*, Jing Jin, Yuanyuan Han, Chang Zang, Jingchuan Liu, Wei Jiang, Jinghua Yin, Haojun Liang **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 136, 838-844, **2015**
- [Nimse 2014] *Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications*, Satish Balasaheb Nimse, Keumsoo Song, Mukesh Digambar Sonawane, Danishmalik Rafiq Sayyed, Taysun Kim **Sensors**, 14, 22208-22229, **2014**
- [Oliviero 2017] *Chemical Functionalization of Plasmonic Surface Biosensors: A Tutorial Review in Issues, Strategies, and Costs*, Manuela Oliviero, Sara Perotto, Gabriele C. Messina, Laura Lovato, Francesco De Angelis **Applied Materials & Interfaces**, 9, 29394-29411, **2017**

- [Palombini 2021] *Recombinant production of ACE2 protein for the SARS-CoV-2 detection by sensor*, M. Palombini **Tesi Magistrale**, 2021
- [PEG Sigma] <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/products/materials-science/biomedical-materials/polyethylene-glycol>
- [Rodahl 1996] *QCM Operation in Liquids: An Explanaton of Measured Variations in Frequency and Q Factor with Liquid Conductivity*, Micheal Rodahl, Fredrik Höök, Bengt Kasemo **Analytical Chemistry**, 68, 2219-2227, 1996
- [Romagnoli 2023] *SARS-CoV-2 multi-variant rapid detector based on graphene transistor functionalized with an engineered dimeric ACE2 receptor*, A. Romagnoli, M. D'Agostino, E.Pavoni, C. Ardiccioni, S. Motta, P. Crippa, G. Biagetti, V. Notarstefano, J. Rexha, N. Perta, S. Barocci, B. K. Costabile, G. Colasurdo, S. Caucci, D. Mencarelli, C. Turchetti, M. Farina, L. Pierantoni, A. La Teana, R. Al Hadi, F. Cicconardi, M. Chinappi. E. Trucchi, F. Mancia, S. Menzo, B. Marozzo Della Rocca, I. D'Annessa, D. Di Marino **Nano Today**, 2023
- [Threm 2012] *Photonic crystal biosensors towards on-chip integration*, Daniela Threm, Yousef Nazirizadeh, Martina Gerken **Journal of Biophotonics**, 5, 601-616, 2012
- [Vericat 2010] *Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system*, C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro, R. C. Salvarezza **Chemical Society Reviews**, 5, 2010
- [Veronese 2008] *The importance of PEGylation on Biological Therapies*, Franceso M. Veronese, Anna Mero **Biodrugs**, 22(5), 315-329, 2008

- [Su 2019] *Novel thiolated-PEG linker molecule for biosensor development on gold surfaces*, Han Su, Shaopei Li, Kagan Kerman **Biosensors and Bioelectronics**, 141, 11477, **2019**
- [Yan 2020] *Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2*, Renhong Yan, Yuanyuan Zhang, Yaning Li, Lu Xia, Yingying Guo, Qiang Zhou, **Science**, 367, 1444-1448, **2020**

## **RINGRAZIAMENTI**

Nonostante io sia una buona lettrice, non ho la penna, non sono una gran scrittrice, ed è davvero molto complesso per me riuscire ad esprimere, a parole, quello che provo arrivata alla fine di questo lungo percorso. Le emozioni sono tante, forti, e tra queste provo un'immensa gratitudine per tutti coloro che, anche per poco, hanno camminato al mio fianco durante questo viaggio e senza i quali tutto questo lavoro non sarebbe stato possibile.

Innanzitutto vorrei ringraziare il Professor Mariani per avermi accolta nel laboratorio ed avermi permesso di ampliare il mio bagaglio di conoscenze ed avermi guidata ogni giorno in lab. Un grazie enorme va a Yuri, per avermi supportata, sopportata e seguita in tutto e per tutto, nonostante le mie folli idee e la mia testardaggine. Vorrei ringraziare anche la Professoressa Cacciamani per aver donato il suo aiuto nelle fasi critiche della produzione proteica di questo lavoro di tesi.

Grazie a Paolo Moretti: so di averti portato spesso all'exasperazione, grazie per il sostegno e la sopportazione. Un grazie speciale va a Valentina, Matteo, Yessica, Eleonora, Alessia, Adnan ed ai tesisti che mi hanno accolta in lab, grazie per essere stati tutti così dolci e disponibili con me.

Grazie a Giacomo Corucci: da te ho imparato molto e sei continua fonte di ispirazione. Grazie ai miei B. di Riace, siete stati per me fonte di spensieratezza e determinazione, presenti in ogni momento e pronti a tendermi una mano e

accendere una luce nei momenti più bui. Grazie a Benji, tu non lo sai ma fai bene alle persone. Grazie a tutti i miei amici di Scienze 1-piano terra, voi siete speciali.

Grazie ad Alessia e Laura (e alla piccola Sveva ovviamente), siete le colleghe migliori che potessi desiderare, e pazze tanto quanto me.

Un grazie speciale va a Sofia, grazie perché dall'asilo sei incondizionatamente al mio fianco, perché sei e sei stata presenza costante in questo viaggio, ti voglio bene. Grazie a Marianna e Alice, perché prevedono la mia imprevedibilità e hanno saputo accogliermi sempre e sostenermi in ogni mio tentennamento. Grazie a Luca C. di cui le sole dolci parole riuscivano a ristabilire la calma e la decisione nei momenti di difficoltà. Grazie a Ferra, Sara e Lorenzo, per essere sempre pronti ad aiutarmi. A Lucia e Viola, a voi va un enorme grazie per non aver mai mollato e per non aver mai reso possibile che io mollassi. A Chiara, per avermi permesso di contare sempre su di lei.

Infine vorrei ringraziare la mia famiglia. Grazie a mia Zia Caterina, per essere così connessa a me, e grazie a Maria, nonostante la distanza riesci sempre a farti sentire a me vicina. Grazie a Tommi, per avermi tenuto la mano durante tutto il percorso, per avermi aiutata a rialzarmi dalle difficoltà, per avermi amata incondizionatamente. Grazie a mio fratello, Luca, perché mi sopporta da sempre. Mi hai insegnato più di quello che credi, e per questo te ne sarò sempre grata. Grazie ai miei genitori, per avermi capita e assecondata nelle mie scelte.

A me e voi tutti, grazie!



