



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

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

**Corso di Laurea Magistrale  
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

---

**IDROGEL DI GUANOSINE PER APPLICAZIONI  
NANOBIOTECNOLOGICHE: MECCANISMI DI INTERAZIONE E  
DIFFUSIONE DI SONDE FLUORESCENTI**

**GUANOSINE HYDROGELS FOR NANOBIOTECH APPLICATIONS: BINDING  
MODES AND DIFFUSIVITY OF FLUORESCENT PROBES**

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Loredana Rao

Relatore

Chiar.mo Prof.

Paolo Mariani

Sessione Estiva 2021

Anno accademico 2020/2021



# SOMMARIO

<i>SCOPO DELLA TESI</i> .....	5
<i>1 INTRODUZIONE</i> .....	9
<i>1.1 Nanotecnologia a DNA</i> .....	9
<i>1.1.1 Nanostrutture a DNA per il trasporto di Farmaci</i> .....	10
<i>1.2 Idrogel</i> .....	11
<i>1.2.1 Idrogel di guanosine</i> .....	13
<i>1.2.2 Formazione di fasi Liquido-Cristalline a partire dalla GMP</i> .....	14
<i>1.2.3 Idrogel G/GMP</i> .....	17
<i>1.3 Drug delivery e coloranti</i> .....	19
<i>2 MATERIALI E METODI</i> .....	23
<i>2.1 Preparazione dei campioni</i> .....	23
<i>2.1.1 Rapporti molari e percentuali d'acqua nei campioni</i> .....	26
<i>2.2 Molecole aggiunte al sistema</i> .....	28
<i>2.2.1 Probes fluorescenti</i> .....	28
<i>2.2.2 PEG</i> .....	31
<i>2.3 Spettroscopia UV-Visibile</i> .....	32
<i>2.3.1 Strumentazione</i> .....	34
<i>2.3.2 Titolazione e calcolo delle costanti di legame</i> .....	36
<i>2.3.3 Spettrofotometria a temperatura</i> .....	39
<i>2.4 Spettrofluorimetria</i> .....	40
<i>2.4.1 Strumentazione</i> .....	41
<i>2.4.2 Spettrofluorimetria a temperatura</i> .....	42
<i>2.5 Transilluminatore</i> .....	43
<i>2.6 Misure di diffusione verticale</i> .....	44
<i>2.7 Microscopia Confocale</i> .....	45
<i>2.7.1 FRAP</i> .....	47
<i>2.7.2 Strumentazione e preparazione dei campioni</i> .....	48
<i>2.8 Diffrazione dei Raggi X</i> .....	50
<i>2.8.1 Cristallografia a Raggi-X e Legge di Bragg</i> .....	52
<i>2.8.2 Strumentazione</i> .....	55

2.8.3 Preparazione del campione e analisi dati .....	56
2.8.4 Small e Wide Angle X-Ray Scattering (SAXS/WAXS).....	59
2.8.5 Preparazione dei campioni.....	61
2.9 Microscopia a Forza Atomica (AFM) .....	63
2.9.1 Strumentazione .....	63
2.10 Immagini al SEM .....	66
2.11 Modello 3D di un quadruplesso .....	69
<b>3 RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>70</b>
3.1 Analisi spettroscopica .....	70
3.1.1 Titolazione dei campioni .....	70
3.1.2 Interazioni colorante-idrogel e calcolo delle <i>K</i> di legame.....	72
3.2 Fluorescenza.....	88
3.3 Diffusione dei coloranti nel gel.....	93
3.3.1 Diffusione verticale .....	93
3.3.2 FRAP .....	99
3.4 Analisi strutturale.....	108
3.4.1 SAXS e WAXS .....	108
3.4.2 Diffrazione dei Raggi X.....	116
3.4.3 AFM .....	125
3.4.4 SEM .....	131
3.5 Modello tridimensionale di un quadruplesso .....	135
<b>4.CONCLUSIONI</b> .....	<b>140</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>143</b>

## ***SCOPO DELLA TESI***

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare l'applicabilità di *Idrogel di Guanosine* nelle nanobiotecnologie, in particolare come *smart carrier* per il drug delivery.

È ben noto che la *Guanina* (G) una delle quattro basi azotate del DNA, è in grado di formare in acqua particolari strutture note come *G-quartets*, ossia quartetti planari di guanine ottenuti grazie alla formazione di legami idrogeno tra quattro guanine secondo una geometria non canonica detta di Hoogsteen (ovvero, una geometria differente rispetto a quella di Watson e Crick tipica del legame G-C nella doppia elica di DNA). A causa delle loro proprietà anfifiliche, questi quartetti mostrano in soluzione un'ulteriore capacità di auto-assemblaggio, impilandosi uno sull'altro a formare in maniera gerarchica dei dimeri (G-ottameri), trimeri (G-dodecameri) e così via, fino alla formazione di lunghi cilindri a forma di quadrielica (G-quadruplexes). Tutte queste strutture sono stabilizzate da ioni metallici di piccole dimensioni (ad esempio,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ), capaci di inserirsi nella piccola cavità al centro del G-quartet e di complessarsi con gli atomi di ossigeno che protrudono al suo interno. G-quartets e G-quadruplexes si formano *in vivo* e sono stati osservati, ad esempio, a livello delle estremità telomeriche dei cromosomi, nelle porzioni ricche di G. Le stesse strutture possono essere ottenute *in vitro* in soluzione acquosa per auto-assemblaggio della 5'-guanosina monofosfato (GMP) in presenza, ad esempio, di ioni  $\text{K}^+$ : in questo caso, i quartetti e le quadrieliche mostrano una superficie carica negativamente, per la presenza dei fosfati della GMP disposti esternamente. Per conseguenza, nei quadruplessi, i quartetti impilati sono ruotati l'uno rispetto all'altro di un angolo di  $30^\circ$ . Inoltre, in funzione della concentrazione, e proprio a causa delle forti repulsioni elettrostatiche, i

quadruplessi di GMP formano fasi liquido-cristalline di tipo colonnare (fasi liotropiche di tipo colesterico ed esagonale).

È stato dimostrato recentemente che è possibile ottenere G-quadruplex in soluzione anche utilizzando una miscela di due derivati della guanina, la Guanosina (Gua, neutra) e la GMP (carica negativamente). Tuttavia, la riduzione di carica superficiale dovuta alla sostituzione di molecole di GMP con quelle di Gua determina una maggior flessibilità dei quadruplessi e la realizzazione di cross-link dovuti a deboli interazioni attrattive di tipo van der Waals. Come risultato, si osserva la formazione di un idrogel trasparente, fortemente idratato (fino al 99% in peso di acqua sul peso totale) e molto stabile, un gel fisico composto da una vera rete supramolecolare tridimensionale di quadruplessi flessibili legati da cross-link di natura non covalente. Le caratteristiche di questo “self-assembling” idrogel, altamente idratato e viscoso, stabile, biocompatibile e biodegradabile, sensibile a diversi stimoli ambientali, come variazioni di pH o di temperatura, anche definito *SMART hydrogel*, dipendono dalla composizione.

Questa tesi aveva come obiettivo proprio quello di approfondire alcune proprietà macro e microscopiche dell'idrogel di guanosina (tra le altre, struttura e flessibilità, viscosità, diffusione di molecole, interazioni con modelli di farmaci antitumorali) in funzione del rapporto tra i due derivati della guanina ed in presenza di molecole ospiti, al fine di valutare la possibilità di utilizzarlo nelle nanotecnologie a DNA, in particolare come *smart carrier* per il trasporto dei farmaci.

Negli corso degli ultimi decenni, le nanotecnologie sono notevolmente progredite e, composte da materiali sempre più biocompatibili e smart come il DNA, si sono affacciate a numerose applicazioni biotecnologiche e mediche; essendo la Guanina una normale componente del DNA ed essendo in grado di

formare degli idrogel smart capaci di intrappolare enormi quantità di acqua e, contemporaneamente, molecole idrosolubili, l'idrogel è stato proposto a sua volta come nanocarrier per il drug delivery.

Seguendo una rigorosa procedura sperimentale sono stati preparati idrogel a differente composizione di Gua e GMP (rapporti molari 1:4, 2:5, 1:2, 3:4, 1:1, in modo da valutare l'effetto delle cariche sui quadruplessi) e contenenti differenti quantità di acqua (90, 95, 98% di acqua). La diffusione di molecole ospiti all'interno dei gel prodotti e la capacità dei gel stessi di caricarsi sono state studiate utilizzando dei coloranti fluorescenti, come il DAPI, la THT e la FITC-Destrano. Si noti che il DAPI e la THT sono modelli per farmaci antitumorali, mentre il FITC-Destrano è un derivato della fluoresceina coniugata al destrano, molto utilizzata per misure di FRAP ed è preso come modello di riferimento per gli altri coloranti. Tramite misure di assorbanza e fluorescenza è stato possibile stimare le costanti di legame delle varie molecole, per comprendere come questi interagiscono con le maglie del gel, in funzione del rapporto  $G/GMPK^+$  e della composizione d'acqua. Come primo risultato, abbiamo dimostrato che la THT e il DAPI interagiscono con i quadruplessi in maniera differente, il primo tende ad intercalarsi tra quartetti, il secondo interagisce con la superficie esterna dei quadruplessi localizzandosi nel solco della quadri elicica. Al contrario, il FITC-Destrano, essendo una molecola fortemente idrofila, non si lega alla rete, indipendentemente dalle sue dimensioni ( in particolare sono state saggiate molecole di dimensioni diverse: 4kDa e 70kDa). È stato poi evidenziato che i coloranti hanno un comportamento diverso in funzione del rapporto tra G e GMP: la THT, che non è fluorescente in soluzione acquosa, mostra una fluorescenza più elevata nei gel meno carichi e più viscosi (massima nel 1:1); al contrario, il DAPI ha una fluorescenza più alta in soluzione acquosa e, di conseguenza, presenta una

fluorescenza maggiore nei campioni più carichi e meno viscosi (massima nel 1:4).

I coefficienti di diffusione delle tre molecole all'interno del network dell'idrogel sono stati determinati mediante misure di FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching), effettuate tramite microscopia confocale. Abbiamo potuto constatare che, mentre la THT mostra un comportamento simile a quello della FITC-Destrano, dove il recupero della fluorescenza dopo il photobleaching è molto rapido, per il DAPI non è stato possibile determinare il coefficiente di diffusione, dato che tale molecola sembra avere una bassa capacità di diffondere attraverso il network del gel. Questi risultati sono stati confermati da misure di diffusione macroscopica, effettuate con spettroscopia di fluorescenza.

Un secondo aspetto importante che viene presentato in questa tesi riguarda gli eventuali effetti delle molecole ospiti sulla struttura del network del gel. Questi aspetti su possibili effetti strutturali sono stati analizzati mediante misure di diffrazione dei raggi X (XRD e SAXS/WAXS) e di imaging (AFM, Microscopia a Forza Atomica).

Le misure di AFM hanno dimostrato un'effettiva variazione nell'aspetto del network dopo aggiunta di DAPI e THT, mentre le misure di diffrazione dei raggi X hanno evidenziato forti proprietà orientazionali dovute alla natura anisotropica del gel, ma non hanno indicato cambiamenti evidenti nello stacking dei quartetti e nelle proprietà strutturali dei quadruplessi, suggerendo dunque una grande stabilità e capacità di loading.

In conclusione, gli studi effettuati sull'idrogel di Guanosine come possibile sistema di interesse nanobiotechologico hanno fornito risultati incoraggianti e aprono la strada ad applicazioni in campo medico e biotechologico.



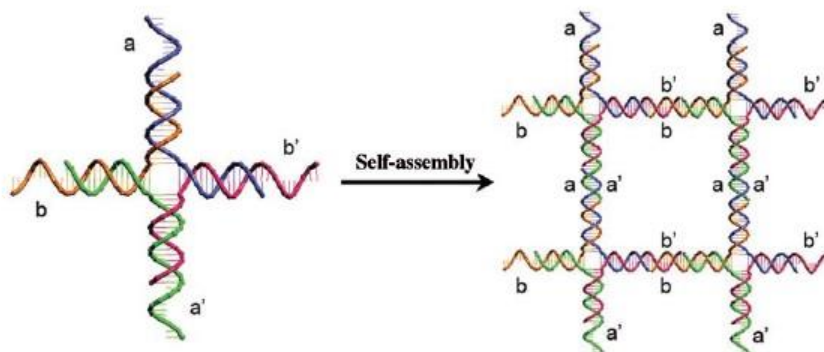
## ***1 INTRODUZIONE***

### ***1.1 Nanotecnologia a DNA***

Negli ultimi decenni il progresso nell'ambito delle nanotecnologie ha permesso di raggiungere traguardi stupefacenti: con il miglioramento delle tecniche di analisi e una più approfondita conoscenza della natura e delle caratteristiche chimico-fisiche delle macromolecole biologiche, in particolare del DNA, è diventato possibile costruire strutture bi e tridimensionali di natura organica per applicazioni nanobiotechonologiche.

Si parla più precisamente della Nanotecnologia a DNA, una branca della nanoingegneria che sfrutta la natura precisa e prevedibile dell'appaiamento delle basi del DNA e della sua capacità di, in maniera più o meno transitoria, legare numerosi ligandi e probe fluorescenti, per costruire nanostrutture indagate per diverse possibili applicazioni in biotecnologia e medicina.

Ned Seeman, pioniere di questa scienza, fu il primo a proporre l'idea che, combinando le estremità coesive del DNA e le giunzioni di Holliday (Fig.1.1), si potessero ottenere delle matrici geometriche multidimensionali [5]; da allora un'enorme varietà di nanostrutture a DNA sono state segnalate e prodotte con successo da numerosi gruppi di ricerca [3; 4].



*Fig. 1.1 Giunzioni di Holliday [1]*

Tra i casi più semplici, “la giunzione a croce a quattro bracci”, può essere costruita utilizzando quattro singoli filamenti di DNA che, nel modello, sono complementari gli uni agli altri. A causa del base-pairing di Watson-Crick, solo le porzioni di filamenti che sono complementari tra loro si legano l'un l'altro per formare un duplex di DNA. Questa giunzione a quattro bracci è la forma statica di una giunzione di Holliday.

Queste giunzioni possono essere utilizzate in molecole più complesse. La più importante di queste è quella a “doppio-crossover”, o motivo DX, in cui due duplex di DNA si trovano uno accanto all'altro, e condividono due punti di giunzione.

Il motivo DX viene utilizzato come elemento strutturale per più grandi complessi di DNA (e.g. motivo TX, motivo Cross Tile...Fig.1.2).

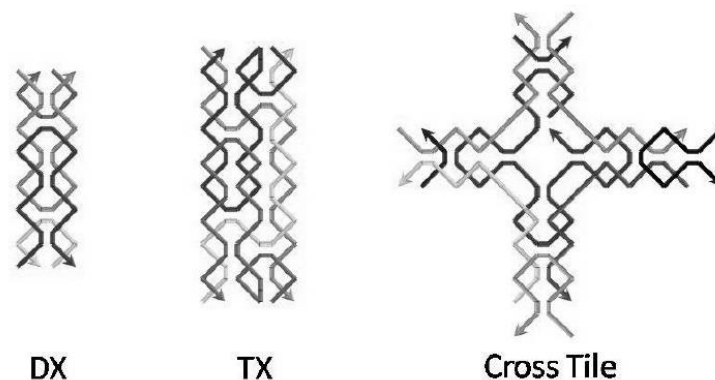


Fig. 1.2 Motivo DX, TX e Cross Tile [2]

### ***1.1.1 Nanostrutture a DNA per il trasporto di Farmaci***

La presente tesi focalizza l'attenzione su queste Nanostrutture a DNA, quando proposte come soluzione alla somministrazione di farmaci, in particolare come *smart carrier* per il Drug Delivery, al fine di ottenere dei modelli

molecolari che ben si prestano al rilascio controllato di molecole farmaceutiche, o chemioterapici.

Queste tecnologie a DNA sono state proposte con lo scopo di limitare gli effetti tossici di alcuni farmaci, fornendo uno scaffold completamente biocompatibile e funzionalizzabile.

Tipicamente l'efficacia di un farmaco viene valutata nel complesso degli effetti benefici e avversi che può causare: il tipo di somministrazione, la dose, l'interazione del farmaco con le varie componenti cellulari, con altre macromolecole ed enzimi, l'accumulo nei tessuti, l'emivita, la biocompatibilità e la stabilità, sono tutti fattori che vengono presi in considerazione per determinarne l'efficacia e l'affidabilità.

Normalmente i farmaci devono essere ottimizzati per limitare i potenziali effetti tossici sull'organismo, dati in particolare da un eventuale accumulo nei tessuti o dalla produzione di metaboliti secondari nocivi, oltre che dalla loro generale scarsa solubilità e dall'impossibilità di riconoscere un target specifico.

## ***1.2 Idrogel***

Il termine Idrogel si ritrova per la prima volta in letteratura a partire dal 1894, in riferimento a gel colloidali di sali inorganici; l'accezione moderna del termine si deve però al lavoro di Wichterle e Lim del 1960, in cui gli idrogel vengono definiti come dei network cross-linked tridimensionali di polimeri idrofilici naturali, in grado di trattenere enormi quantità di acqua [7].

Possono essere costituiti a partire da polimeri sintetici, come polietilen glicole, poliacrilato di sodio, polivinil alcol, oppure da sostanze naturali come proteine, acidi grassi, zuccheri o acidi nucleici.

Queste componenti si assemblano a formare idrogel che possono essere classificati a seconda delle interazioni che avvengono al suo interno: sulla base di interazioni di natura fisica (come  $\pi$ -stacking, legami idrogeno, Van der Waals o interazioni elettrostatiche) o di natura chimica (cross-linking di legame). (fig.1.3).

Inoltre, rispondono a stimoli di vario tipo, come variazioni del pH, della temperatura o delle concentrazioni di una o più componenti del gel stesso.

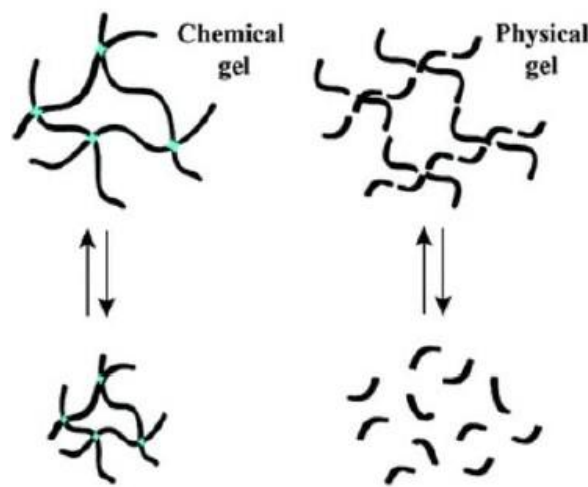


Fig. 1.3 Gel fisici e gel chimici [6]

Le caratteristiche intrinseche degli idrogel, come l'elasticità, la capacità di immagazzinare enormi quantità di acqua che, insieme alla natura porosa del gel stesso, permette di intrappolare anche altre molecole di varia natura, li rendono dei materiali unici.

È da sottolineare anche il fatto che gli idrogel di origine naturale presentano proprietà che li rendono migliori rispetto a quelli sintetici, come la biocompatibilità, biodegradabilità e la capacità di auto assemblarsi (SMART idrogel) in strutture di ordine molecolare superiore, con la capacità di generare anche dei gel in situ.

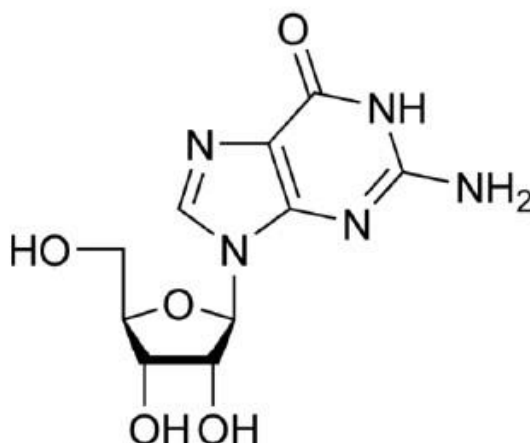
Sono stati infatti proposti nel tempo per una molteplicità di scopi diversi, ad esempio nella nanotecnologia, nella sensoristica, in biotecnologia e medicina, in particolare nel contesto dell'ingegneria tissutale e nel trasporto di farmaci.

### ***1.2.1 Idrogel di guanosine***

Come detto precedentemente, gli idrogel possono essere costituiti da acidi nucleici: in questo contesto sono visti come degli elementi strutturali unici piuttosto che dei messaggeri del codice genetico. Un caso molto interessante è rappresentato da un particolare idrogel derivante dalla base azotata guanina del DNA: l'idrogel di guanosine è il punto su cui si fonda questa tesi.

L'idrogel di guanosine è un gel su base acquosa a maglie tridimensionali, costituito da due derivati della guanina, una delle basi azotate puriniche del DNA:

- la Guanosina (Gua), nucleoside composto dalla guanina legata a un anello di ribosio mediante un legame  $\beta$ -N-glicosidico, ha carattere idrofobico a pH neutro (fig.1.4);



*Fig. 1.4 Guanosina (Gua)*

- la 5'-Guanosina Monofosfato (GMP), nucleotide altamente idrosolubile con un gruppo fosfato che le conferisce carica negativa (fig.1.5).

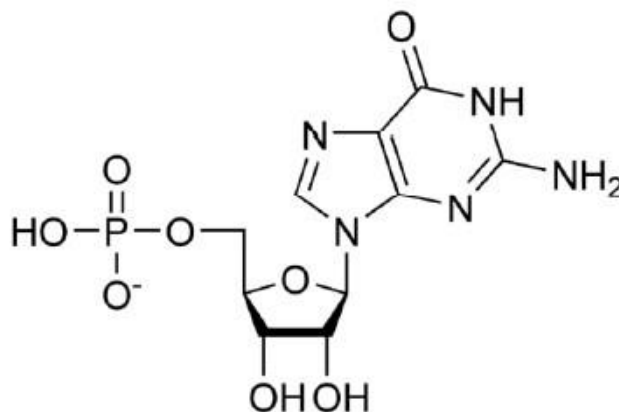


Fig. 1.5 5'-Guanosina-Monofosfato (GMP)

### 1.2.2 Formazione di fasi Liquido-Cristalline a partire dalla GMP

È noto che la 5'-Guanosina Monofosfato (GMP) è in grado di formare dei Supramolecular Hydrogels in condizioni controllate: il processo si può riassumere in step sequenziali, dapprima quattro molecole di GMP interagiscono tramite legami di Hoogsteen, formando dei quartetti planari, detti appunto G-Quartets; i quartetti si impilano gli uni sugli altri, sfalsati di un angolo di circa  $30^\circ$ , sfruttando non solo interazioni non covalenti (come interazioni elettrostatiche e  $\pi$ -stacking) ma anche la presenza di cationi monovalenti come K, Na, Li..., che si dispongono tra due quartetti e determinano un'interazione catione-dipolo con gli ossigeni dei gruppi chetonici. Il processo prosegue con la formazione di strutture dette G-octamers e, infine, si formano lunghe quadrieliche dette G-quadruplexes [9] (fig.1.6).

L'idrogel che ne deriva è quindi composto da una rete tridimensionale di quadruplessi, la cui carica negativa complessiva deriva dai gruppi fosfato delle GMP che sporgono esternamente a ogni quadrielica, in un ambiente altamente ricco di acqua.

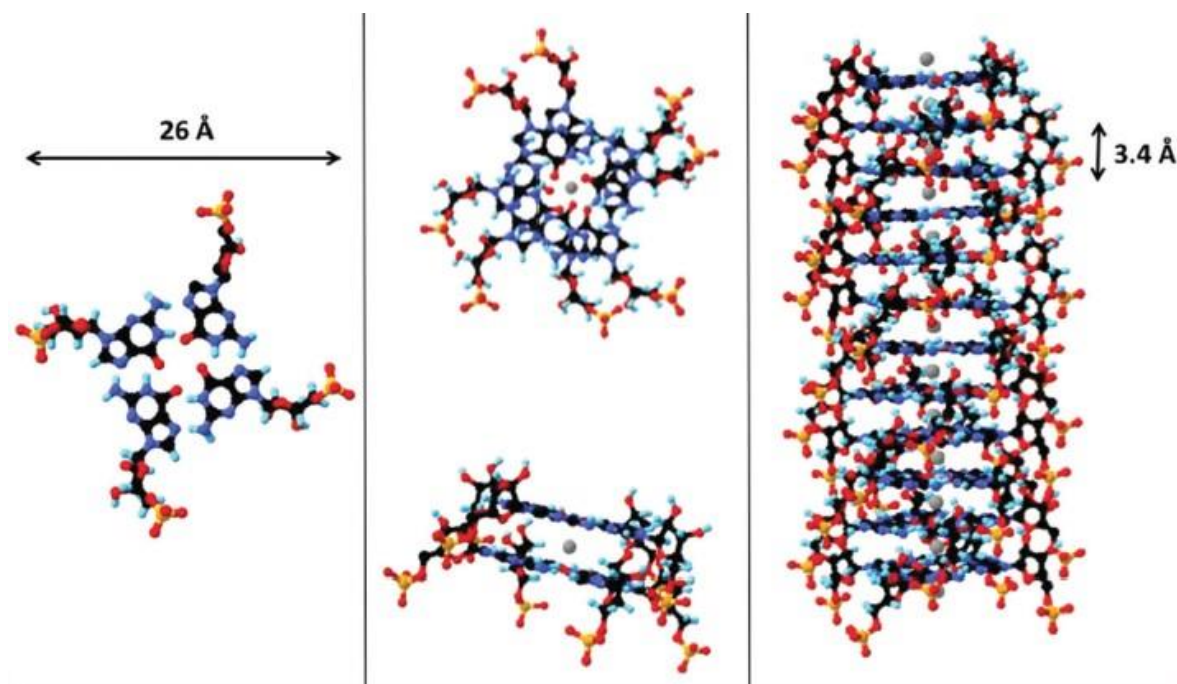
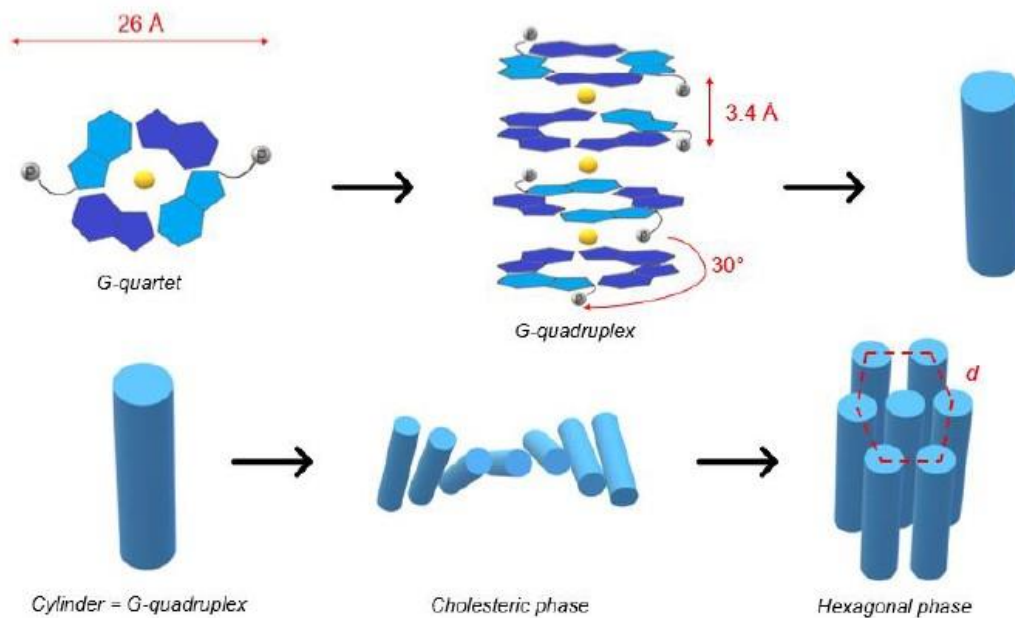


Fig. 1.6 Esempio della struttura dei quadruplessi. Da destra verso sinistra: G-quartet, G-octamer, G-quadruplex, l'atomo centrale rappresenta il catione potassio, che stabilizza i quartetti [9]

I quadruplessi di GMP presentano proprietà strutturali particolari e si collocano nella categoria peculiare di quei composti definiti *Cristalli Liquidi* (LC): questi sistemi formano mesofasi, ossia fasi di aggregazione con proprietà fisiche a metà fra quelle dei cristalli e quelle dei liquidi isotropi. I LC si possono classificare a loro volta in Liotropici, se le molecole formano la mesofase in un opportuno solvente in un certo intervallo di concentrazioni, e in Termotropici, se la formazione della mesofase avviene in un certo range di temperatura.

In particolare, la GMP possiede proprietà liquido-cristalline colonnari, caratterizzate dalla formazione di una fase liotropica di tipo colesterico e di una di tipo esagonale: infatti tali fasi LC sono formate da strutture cilindriche ordinate (i quadruplessi appunto), con i fosfati posti esternamente; in base allo stato di idratazione del sistema si osserva un passaggio graduale dalla fase nematica o colesterica a esagonale. Partendo da un sistema molto diluito, la GMP si auto-aggrega e si osserva la formazione di quadruplessi; al diminuire della concentrazione d'acqua, i G-quadruplexes si dispongono vicini, ma ruotati gli uni rispetto agli altri (fase colesterica). Questa fase appare come una sorta di grande elica. Continuando a diminuire ulteriormente la concentrazione d'acqua si arriva a una fase più ordinata, in cui i vari G-quadruplexes sono ancora più vicini e disposti parallelamente tra di loro (fase esagonale).



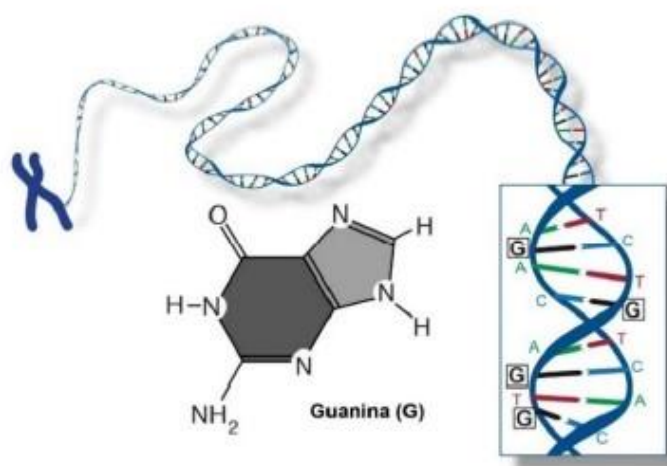
*Fig. 1.1 Fasi cristalline: Cilindrica, Colesterica ed Esagonale*



Le caratteristiche liquido-cristalline del GMP sussistono finché si mantiene la struttura ordinata dei quadruplessi nel reticolo, tuttavia, come verrà evidenziato nei prossimi capitoli, le suddette caratteristiche vengono progressivamente perse se, a parità di concentrazione di acqua nel sistema, si riduce la carica negativa complessiva dei quadruplessi: aggiungendo alla GMP anche la Guanosina, priva di carica, si osserva comunque la formazione di fasi LC a più bassa diluizione, ma all'aumentare della concentrazione d'acqua si osserva la formazione del reticolo del gel. Questo è reso possibile da una maggiore flessibilità dei quadruplessi e dalla possibilità di formazione di legami attrattivi non-covalenti tra le quadrieliche [9; 12; 13] .

### ***1.2.3 Idrogel G/GMP***

Come accennato precedentemente, l'idrogel su cui sono stati condotti gli esperimenti riportati in questa tesi non è composto solo da GMP ma anche dalla Guanosina.



*Fig. 1.8 Guanina*

I primi studi sull'idrogel di guanosine si hanno a partire dal 1962 quando D. Davies scoprì che la 5'-guanosina monofosfato fosse in grado di formare delle strutture caratteristiche che definì G-quartet, composte da quattro molecole di GMP poste agli estremi di un quartetto planare; si scoprì che il comportamento peculiare della GMP fosse dovuto alla sua capacità di formare, oltre al base-pairing canonico di Watson-Crick con la citosina, dei legami di Hoogsteen con altre guanine.

Circa dieci anni più tardi si scoprì che queste strutture sono riscontrabili anche in vivo, in particolare a livello delle estremità telomeriche dei cromosomi: queste sono costituite da sequenze ripetute ricche di guanina, 5'-dTTAGGG-3', che possono formare particolari strutture a quadrupla elica dette G-quadruplexes, date dall'impilamento di quartetti planari di guanine [10]. Da allora una serie di scoperte hanno aperto una strada ai più recenti studi sugli idrogel di guanosine.

L'idrogel G/GMP è caratterizzato, come visto prima per la sola GMP, da un network tridimensionale e cross-linked di G-quadruplexes, quello che cambia è che i quartetti possono essere costituiti sia da G che da GMP in proporzione variabile e del tutto casuale, questo comporta che le maglie del gel siano più lasse per via della minor carica negativa dei quadruplessi. Diminuiscono quindi le forze di repulsione fra i quartetti ma aumentano quelle attrattive. Si perdono in parte le caratteristiche liquido-cristalline citate per la GMP, pur conservando la fase colonnare dovuta alla presenza dei quadruplessi.

Il gel risulta in un composto altamente viscoso ed elastico, completamente trasparente ed estremamente idratato (fino al 98% del volume totale). È in grado di reagire a un elevato numero di stimoli diversi, in particolare a

variazioni di pH e di Temperatura, a varie concentrazioni di sali e a stati di idratazione differenti.

L'idrogel è inoltre completamente biodegradabile e biocompatibile, essendo costituito quasi unicamente da acqua e basi azotate del DNA, inoltre la procedura di preparazione non prevede l'utilizzo, e quindi la dispersione, di materiali nocivi per l'ambiente, questo lo rende particolarmente adatto ad essere utilizzato a scopi medici e biotecnologici.

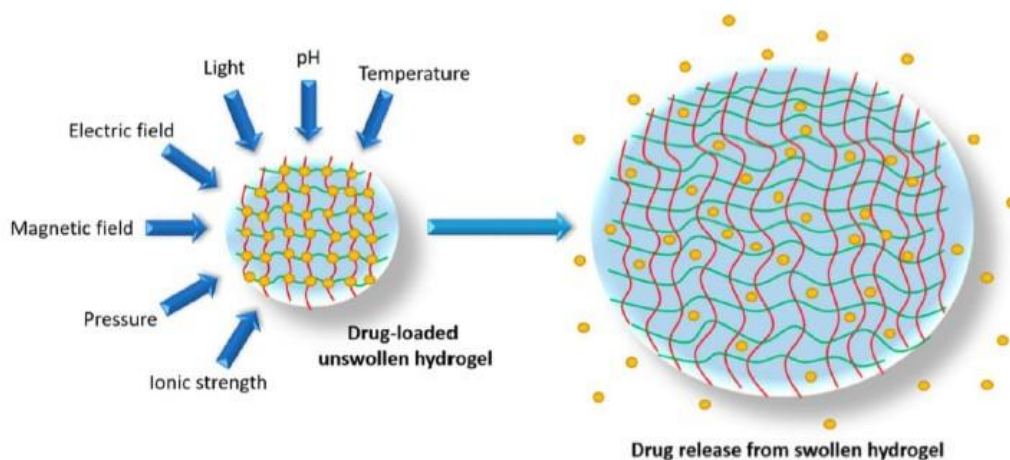
### ***1.3 Drug delivery e coloranti***

In questa tesi l'idrogel di guanosine è stato proposto come possibile nanobiotecnologia a DNA. Pur non essendo costituito da DNA, le guanosine che formano il gel lo rendono del tutto paragonabile.

In particolare, l'applicazione per cui è stato proposto è quella del drug delivery: con questo termine si intende la somministrazione di farmaci tramite l'impianto o l'iniezione di sistemi a rilascio controllato detti Nanosistemi (o matrici), tramite i quali si possono ottenere vantaggi rispetto alle terapie farmacologiche convenzionali. Infatti, l'intero quantitativo di farmaco viene somministrato tutto in una volta attraverso il Nanosistema e rilasciato così in maniera controllata.

Un notevole vantaggio nell'uso dei Nanosistemi per il Drug Delivery risiede nella possibilità di indirizzare il rilascio del farmaco solamente in una specifica zona, evitando il contatto potenzialmente nocivo tra il farmaco ed organi non interessati. Il rilascio avviene per diffusione o disgregazione del Nanosistema e più innovativamente tramite un legame chimico tra il farmaco e la matrice, legame destinato a rompersi per azione enzimatica o in particolari condizioni chimico/fisiche (come a determinati valori di pH o

Temperatura) solo in una determinata zona dell'organismo che ha esigenza d'esser curata (fig.1.9).



*Fig. 1.9 Esempio di rilascio di farmaci dalla matrice del gel in seguito a stimoli di varia natura [8]*

Per gli studi condotti sull'idrogel di guanosine non sono stati utilizzati farmaci specifici, ma si è optato per delle sonde fluorescenti: queste sono molecole di varia natura in grado di emettere una radiazione luminosa sottoforma di fluorescenza se irradiati con una radiazione luminosa ad una specifica lunghezza d'onda.

Questi coloranti fluorescenti sono stati scelti in primo luogo perché la caratteristica fluorescenza emessa da ognuno li rende facilmente monitorabili all'interno del sistema, quindi permette di seguirne il comportamento in determinate condizioni; inoltre, essendo i composti scelti normalmente utilizzati per colorare il DNA, sono in grado di interagire anche con il network di guanosine che compone l'idrogel, anche se in modo diverso. Sono stati quindi usati per simulare un possibile farmaco intrappolato nel network dell'idrogel, al fine di valutarne i meccanismi di interazione e di rilascio.

A tal proposito, è importante sottolineare che sono state valutate varie modalità di interazione tra i coloranti scelti e l'idrogel, questo perché, a seconda della natura del legame che avviene tra i due, il probe potrebbe non essere rilasciato dal carrier, quindi non svolgere la funzione per cui è stato caratterizzato.

Ad esempio, nel caso di un probe che lega il DNA (e quindi nel caso di molti chemioterapici), questo può interagire con la doppia elica in due modi diversi: possono instaurarsi legami di natura covalente, caso in cui il ligando si lega in maniera irreversibile al DNA, portando spesso a danni irreversibili della doppia elica, oppure legami di natura non covalente, quindi si instaurano interazioni deboli, come forze elettrostatiche, di Van der Waals, legami idrogeno o stacking, sono legami reversibili che permettono il rilascio del probe.

Come nel caso del DNA, i probes fluorescenti possono interagire con i quadruplessi che formano l'idrogel secondo queste diverse modalità; nel presente caso di studio è stata esclusa la possibilità di utilizzare probes che potessero formare legami covalenti a causa del rischio del mancato rilascio del probe stesso, ma sono stati scelti coloranti che dessero solo interazioni deboli con il sistema [15].

In particolare, possono verificarsi due casi: il colorante può intercalarsi ai quartetti che formano il quadruplesso tramite prevalentemente stacking, oppure può legarsi esternamente tramite interazioni elettrostatiche e/o legami idrogeno.

Per avere una visione più ampia, è stato anche valutato il caso in cui il probe non interagisce con le guanosine.

Come oggetto di studio sono stati usati tre diverse sonde fluorescenti:

- la Tioflavina T: è un sale del benzotiazolo ottenuto dalla metilazione della diidrotiotoluidina con metanolo in presenza di acido cloridrico; è ampiamente utilizzato per visualizzare e quantificare la presenza di aggregati proteici mal ripiegati detti placche amiloidi, ma è in grado di legarsi anche alla doppia elica di DNA. Quando succede, il colorante diventa fluorescente.
- il Dapi: lega fortemente regioni del DNA ricche in A-T.
- la Fluoresceina Isotiocianato-Destrano: la FITC è il più comune derivato della fluoresceina; essa è un composto organico fluorescente dotata di un gruppo isotiocianato ( $-N=C=S$ ) molto reattivo. In questo caso la FITC viene utilizzata per marcare il destrano (polisaccaride a struttura ramificata di lunghezza variabile, formato da diverse unità di glucosio, prodotto da alcuni microrganismi). Queste molecole sono disponibili in commercio con pesi molecolari compresi tra 4 e 70 kDa.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Preparazione dei campioni

L'idrogel di G/GMPK<sup>+</sup> su cui si basa questa attività di tesi è stato prodotto a partire dai due derivati della guanina citati precedentemente: la Guanosina (Gua) e la 5'-guanosina monofosfato (GMP).

Nel caso presentato, la GMP utilizzata per produrre il gel è il suo sale di potassio: è infatti noto che la GMP possa presentarsi sia sottoforma di acido che come sale, nei due casi, alla formazione dei G-quartet, cambia l'atomo centrale a cui si coordinano gli ossigeni dei gruppi chetonici delle guanine (che nel primo caso è un H<sup>+</sup> e nel secondo un catione come K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> ...).

Utilizzare il sale di potassio della GMP permette di stabilizzare i quartetti e consente la formazione di un idrogel più stabile, essendo fondamentale bilanciare la carica negativa portata dagli ossigeni al centro del quartetto. Per produrre la GMPK<sup>+</sup> è stata condotta una procedura di *titolazione acido-base*.

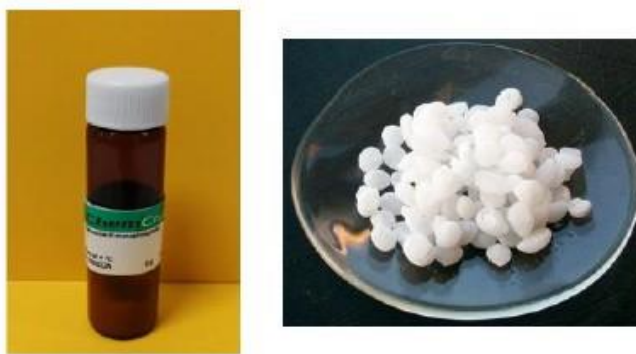


Fig. 2.1 GMPH<sup>+</sup>

- 500g di  $\text{GMPH}^+$  (fig.2.1) vengono pesati e sciolti in 15 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ all'interno di un becher, la soluzione viene agitata delicatamente per circa 20 minuti, fino a ottenere una soluzione completamente limpida.
- la soluzione viene quindi titolata aggiungendo lentamente  $\text{KOH}$  1M e portata da un valore di pH di 4 a pH 9.0 con l'ausilio di un pH-metro (con questa procedura si sostituiscono i cationi di potassio ai protoni).
- si divide la soluzione di  $\text{GMPK}^+$  in due falcon da 50ml e si aggiunge etanolo alla soluzione in rapporto 1:3 (fig.2.2), quindi si centrifuga a 4000 rpm per quindici minuti, in seguito ai quali si formerà un pellet composto dalla  $\text{GMPK}^+$  e il sopranatante che viene eliminato; si aggiunge nuovamente etanolo e si procede centrifugando una seconda volta per 15 minuti, al fine di ottenere un pellet di  $\text{GMPK}^+$  puro, che viene isolato dal sopranatante.



*Fig. 2.2  $\text{GMPK}^+$  prima della centrifugazione*

- il pellet rimasto sul fondo delle due falcon viene diviso in due eppendorf e liofilizzato overnight. Al termine della procedura di liofilizzazione si



ottiene una  $\text{GMPK}^+$  sotto forma di polvere che può essere conservata in frigorifero a  $-20^\circ\text{C}$  (fig.2.3).



*Fig. 2.3  $\text{GMPK}^+$  liofilizzata*

Lo step successivo consiste nel produrre delle soluzioni “madri” di Gua e di  $\text{GMPK}^+$ , rispettivamente 150 mg/ml e 200 mg/ml.



*Fig. 2.4 Magre di Gua e madre di  $\text{GMPK}^+$*

Una volta ottenute le madri, si procede con la preparazione dell'idrogel vero e proprio: in una eppendorf si aggiungono in maniera sequenziale la madre di

GMPK<sup>+</sup>, la madre di Gua e l'acqua milliQ ( è importante seguire questo esatto ordine essere sicuri che il gel si formi correttamente), spipettando di volta in volta con l'ausilio di una micropipetta per rendere quanto più omogeneo possibile il campione; alla fine si pone l'eppendorf all'interno di un bagnetto termostato a 80-90°C, finché la soluzione appare completamente trasparente e liquida. Rimossa dal bagnetto, la soluzione comincia rapidamente a cambiare di fase, diventando gelatinosa e altamente viscosa.



*Fig. 2.5 Aspetto di un idrogel di guanosine*

### ***2.1.1 Rapporti molari e percentuali d'acqua nei campioni***

Per gli esperimenti riportati in questa tesi, l'idrogel di guanosine è stato preparato seguendo la procedura sopra descritta, tuttavia, a seconda dell'utilizzo, sono state variate le concentrazioni delle componenti del gel al fine di ottenere:

- idrogel con diversi rapporti molari tra G e GMPK<sup>+</sup>
- idrogel con differenti percentuali d'acqua, quindi più o meno idratati

Nel primo caso sono stati preparati cinque campioni di idrogel, al fine di ottenere rapporti molari diversi, quindi variando di volta in volta le quantità di G e  $\text{GMPK}^+$  utilizzate per formare il gel stesso.

In particolare, sono stati ottenuti cinque rapporti molari di G/ $\text{GMPK}^+$ : 1:1, 3:4, 1:2, 2:5, 1:4.

È possibile notare che, al variare del rapporto tra la G neutra e la  $\text{GMPK}^+$  carica negativamente, varia parallelamente la carica complessiva dell'idrogel, quindi la viscosità: infatti nell'idrogel 1:4 la concentrazione di  $\text{GMPK}^+$  è quattro volte maggiore di quella di G, quindi risulta essere il più carico; le cariche negative dei fosfati sono distribuite ampiamente sulla superficie esterna dei cilindri di guanosine, determinando una notevole forza di repulsione tra quadruplessi, che tendono quindi ad allontanarsi tra loro, pur formando il caratteristico network tridimensionale. L'idrogel 1:4 risulta particolarmente fluido e poco viscoso.

Al contrario, nell'idrogel 1:1 la concentrazione dei due derivati della guanina è paragonabile, la carica negativa è molto minore rispetto agli altri campioni, quindi i cilindri tendono a stare più vicini tra loro, risultando in un gel altamente viscoso. All'aumentare del rapporto diminuisce la carica negativa dell'idrogel.

Nel secondo caso, sono stati preparati gli idrogel in modo tale che le percentuali d'acqua in ognuno fossero diverse.

È noto che, per poter formare l'idrogel, è necessario che la quantità di acqua presente al suo interno sia elevata; è però possibile oscillare nella percentuale, purché questa rimanga al di sopra del 90%.

Sono stati quindi prodotti tre idrogel a tre percentuali di acqua, 90%, 95% e 98% w/w. Anche in questo caso la viscosità varia e, com'è facilmente intuibile, l'idrogel meno idratato risulta più viscoso di quello con più acqua.

In tabella 1 sono riportate tutte le quantità di Gua, GMPK<sup>+</sup> e H<sub>2</sub>O in  $\mu$ l (o eventualmente di madre di colorante, quando richiesto al posto dell'acqua per la preparazione di gel) utilizzate per gli esperimenti, a seconda del caso.

	1:1	1:1	1:1	3:4	3:4	3:4	1:2	1:2	1:2	2:5	2:5	2:5	1:4	1:4	1:4
<b>GMPK<sup>+</sup></b>	231	115	46	204	102	41	287	144	57	145	73	29	326	163	65
<b>Gua</b>	197	99	40	131	66	26	123	61	25	51	45	10	70	35	14
<b>H<sub>2</sub>O</b>	72	286	414	165	332	433	90	295	418	304	402	461	104	302	421
<b>%v/v</b>	<b>90</b>	<b>95</b>	<b>98</b>	<b>90</b>	<b>95</b>	<b>98</b>	<b>90</b>	<b>95</b>	<b>98</b>	<b>90</b>	<b>95</b>	<b>98</b>	<b>90</b>	<b>95</b>	<b>98</b>

Tab. 1 Quantità di GMPK<sup>+</sup>, Gua e H<sub>2</sub>O, calcolate per tutti i gel a tutte le percentuali d'acqua

## 2.2 Molecole aggiunte al sistema

L'idrogel di guanosine è stato utilizzato sia da solo che con l'aggiunta di una serie di molecole. Nella sezione dedicata alle applicazioni delle tecniche e ai risultati, l'utilizzo di queste molecole verrà contestualizzato.

### 2.2.1 Probes fluorescenti

Per gli esperimenti riportati in questa tesi, sono stati utilizzati tre diversi fluorocromi, ossia molecole in grado di emettere fluorescenza dopo aver assorbito una radiazione a una certa lunghezza d'onda: la Tioflavina T, il DAPI e la FITC-Destrano.

#### THIOFLAVINA T

La Tioflavina T (THT) è un colorante benzotiazolico (eterociclico aromatico) con peso molecolare di 318.86 g/mol. Viene comunemente utilizzato per preparazioni istologiche e per studi di biofisica volti ad indagare la

formazione di complessi amiloidi e l'aggregazione di proteine, grazie alla sua elevata affinità per strutture ricche di  $\beta$ -sheet (riscontrabili nelle proteine); è in grado di legare anche il DNA a doppio filamento. Quando si lega ad un complesso molecolare, si verifica un aumento del picco massimo di eccitazione (da 358 nm a 450 nm) e di quello di emissione (da 445 nm a 482 nm).

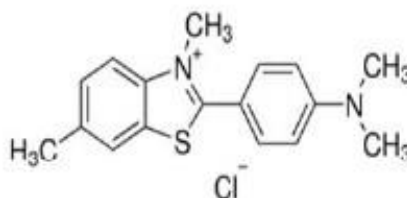


Fig. 2.6 Tioflavina T (THT)

## DAPI

Il DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) è una molecola con peso molecolare di 277.324 g/mol. L'assorbimento massimo del DAPI quando si lega al dsDNA equivale a 358 nm, mentre l'emissione massima equivale a 461 nm. Presenta un'elevata affinità per il DNA (in particolare per le basi Adenina e Timina) il che lo rende molto utile per analisi riguardanti la conta cellulare, la valutazione dell'apoptosi e altre. Si presenta sotto forma di polvere.

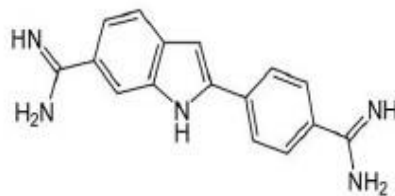


Fig. 2.7 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

## ISOTIOCIANATO DI FLUORESCEINA-DESTRANO

L'isotiocianato di fluoresceina (FITC) è il più comune derivato della fluoresceina. Essa è un composto organico fluorescente dotato di un gruppo isotiocianato ( $-N=C=S$ ) molto reattivo.

Questo composto trova impiego in biologia in quanto il gruppo isotiocianato lega la fluoresceina ai gruppi amminici e solfidrilici delle proteine, permettendone la visualizzazione in fluorimetria.

Il picco di assorbimento della FITC è all'incirca a 495 nm mentre quello di emissione in fluorescenza è sui 521 nm. Come molti altri fluorofori anche la fluoresceina isotiocianato è soggetta al fotobleaching, motivo per cui è il colorante più utilizzato negli esperimenti di microscopia confocale (l'argomento verrà trattato più avanti).

Nel caso trattato in questa tesi, la molecola di FITC utilizzata è coniugata al destrano, un polisaccaride a struttura ramificata di lunghezza variabile, formato da diverse unità di glucosio. La FITC-destrano ha un massimo di eccitazione di 493 nm e un massimo di emissione di 518 nm.

Sono state utilizzate molecole di FITC-destrano di dimensioni diverse: 4 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 70 kDa.



Fig. 2.8 Fluoresceina Isotiocianato-Destrano (FITC-Destrano)

### 2.2.2 PEG

Il PEG, o Glicole Polietilenico, è un polimero preparato per polimerizzazione dell'ossido di etilene.

Viene utilizzato in questa tesi, in particolare nelle misure di diffrazione dei raggi X, per la sua capacità di favorire un rilascio controllato di acqua. Modulando la percentuale di PEG è infatti possibile sapere quanta acqua è presente nel sistema.

Sono state utilizzate due percentuali di PEG:

- PEG 35% ottenuta sciogliendo 1.75g di PEG in 5ml di acqua
- PEG 45% ottenuta sciogliendo 2.25g di PEG in 5ml di acqua

## 2.3 Spettroscopia UV-Visibile

La spettroscopia UV-Vis è una metodologia interessata ai fenomeni di assorbimento delle radiazioni luminose della regione dello spettro elettromagnetico appartenenti al campo del visibile (350 – 700 nm) e del vicino ultravioletto (200 – 350 nm).

L'assorbimento di questo tipo di radiazioni da parte delle molecole è in grado di produrre delle transizioni energetiche degli elettroni esterni, sia impegnati che non impegnati in un legame.

Questi elettroni possono essere:

- di tipo sigma ( $\sigma$ ), costituiti da una nube elettronica addensata lungo l'asse di unione dei nuclei degli atomi interessati al legame (i legami semplici sono di tipo  $\sigma$ );
- di tipo pi-greco ( $\pi$ ), costituiti da coppie di elettroni la cui maggior densità elettronica è situata al di fuori dell'asse di unione dei nuclei (come accade nei legami doppi o tripli).

Gli elettroni  $\pi$  sono 'meno legati' e risultano perciò più facilmente eccitabili rispetto ai  $\sigma$ .

Quando atomi o molecole interagiscono con una radiazione incidente, gli elettroni assorbono l'energia e questo assorbimento è alla base della *legge di Lambert e Beer*.

Quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione, infatti l'assorbimento dipende dalla concentrazione della soluzione.

Se indichiamo con  $I_0$  l'intensità della luce incidente e con  $I$  l'intensità della luce trasmessa dalla soluzione,  $I$  sarà sempre minore di  $I_0$  perché parte è assorbita dalla soluzione, parte è riflessa, parte rifratta.



Il rapporto  $I/I_0$  viene definito trasmittanza:  $T = I/I_0$

il  $\log$  di  $I/I_0$  è invece definito Assorbanza:  $A = \log T = \log I/I_0$

la legge di Lambert Beer è uguale a:  $A = \varepsilon Cl$

- con  $A$ =assorbanza(non ha unità di misura)
- $C$ =concentrazione della soluzione o specie chimica in esame (moli/litro)
- $l$ =cammino ottico (cm), ovvero spessore dello strato attraversato dalla radiazione incidente
- $\varepsilon$  = coefficiente di assorbimento molare, caratteristico della sostanza (mol-1L cm-1)

Il coefficiente di estinzione molare ( $\varepsilon$ ) rappresenta l'Assorbanza (o Densità Ottica) di una soluzione con concentrazione 1M e cammino ottico unitario (1cm).

Secondo la legge di Lambert Beer, dunque, l'assorbanza  $A$  è proporzionale sia alla concentrazione della sostanza assorbente, sia allo spessore dello strato attraversato, per cui più elevata è la concentrazione delle molecole che passano dallo stato fondamentale a quello eccitato, maggiore sarà l'assorbanza (maggiore sarà la diminuzione dell'intensità del raggio incidente).

la legge di Lambert e Beer tuttavia è valida se:

- 1) la luce incidente è monocromatica
- 2) l'assorbimento del solvente è trascurabile
- 3) all'aumentare della concentrazione non si ha un aumento dell'indice di rifrazione e quindi una maggior dispersione del raggio nell'attraversare la soluzione stessa

4) non si verificano reazioni chimiche delle molecole del campione fra loro o con il solvente.

### 2.3.1 Strumentazione

Uno spettrofotometro è costituito da diverse componenti: una sorgente, un monocromatore, una cuvetta contenente il campione, un detector.

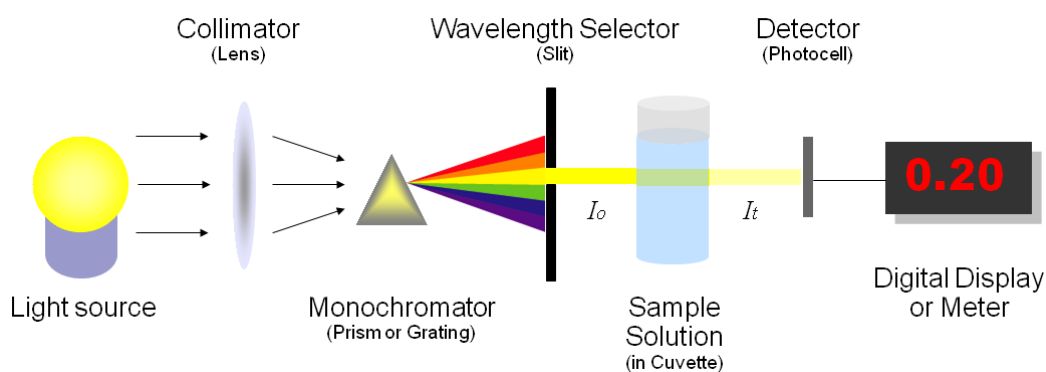


Fig. 2.9 Schema di funzionamento di uno Spettrofotometro

La sorgente della radiazione è la parte dell'apparecchio da cui prende origine la radiazione policromatica (contenente cioè tutte le lunghezze d'onda del campo richiesto) che viene diretta sul campione.

- per la regione del visibile si utilizzano lampade a incandescenza (a filamento di tungsteno, lampade quarzo-iodio o lampade tungsteno-alogeno)
- per la regione UV si usano lampade a scarica in un gas (deuterio o a idrogeno); sono costituite da un'ampolla di quarzo contenente il gas rarefatto nella quale viene attivata, tra due elettrodi, una scarica elettrica con la conseguente emissione di radiazioni con spettro continuo.

Hanno quindi al loro interno queste due lampade, che vengono opportunamente intercambiate da un meccanismo interno.

Il monocromatore è il sistema ottico usato per disperdere la luce policromatica in bande monocromatiche, che vengono inviate in successione sul campione.

Esistono due tipi di monocromatori:

- basati su FILTRI (ottici o interferenziali), che bloccano una parte della luce e lasciano passare solo la parte desiderata
- basati su un ELEMENTO DISPERDENTE (prisma o reticolo), che separano le varie componenti della radiazione e ne permettono la successiva selezione della banda desiderata.

La cella è la componente destinata a contenere il campione da esaminare; questo, generalmente in soluzione, viene introdotto in questi contenitori, generalmente chiamati cuvette.

Oltre ad essere trasparenti alla radiazione impiegata, devono avere un ben preciso 'cammino ottico' (la lunghezza percorsa dalla radiazione nel campione) che dovrà essere sufficiente ad avere assorbimenti rilevabili dallo strumento. Nel caso di questa tesi è stata utilizzata una cuvetta in quarzo con cammino ottico di 1 cm.



*Fig. 2.10 Cuvetta di quarzo con cammino ottico 1 cm (Hellma Spectrolytics).*

Il rivelatore è un dispositivo capace di produrre un segnale elettrico che dipende dall'energia delle radiazioni che lo investe.

Tale segnale elettrico (proporzionale all'intensità luminosa) viene poi trasferito a un indicatore analogico o elaborato per via elettronica in modo più o meno complesso.

Lo strumento utilizzato per questo tipo di analisi è il *DeNovix DS-11 Fx+ Spectrophotometer/Fluorometer* (DISVA), il quale permette prestazioni volte a misure di assorbanza e fluorescenza.



Fig. 2.11 Nanodrop

In particolare, sono stati utilizzati due programmi: *UV-Vis* per l'analisi che descritta in questo paragrafo, e *Fluorimetro* per la misura quantitativa della fluorescenza data dai coloranti (DAPI, THT e FITC).

Le misure di assorbanza sono state effettuate sui campioni di idrogel trattati con i tre coloranti fluorescenti.

### ***2.3.2 Titolazione e calcolo delle costanti di legame***

In primo luogo, sono state effettuate delle letture di assorbanza di campioni ottenuti per titolazione:

questa procedura ha come scopo quello di aumentare la concentrazione delle guanosine nel gel senza variare quella di colorante.

Si preparano 10 campioni, enumerati da C1 a C10, per ciascuno degli idrogel ai 5 rapporti molari menzionati precedentemente.

Ogni set di campioni C1-C10 è stato preparato seguendo un'attenta procedura in cui ogni volume (delle guanosine, dell'acqua e delle madri di colorante) è stato appositamente calcolato, il tutto secondo il principio riportato di seguito:

- Ogni set C1 a C10 di idrogel al 95% di acqua (vedi tabella 1) è stato preparato in modo tale che il volume totale di ogni campione fosse 1 ml, di cui 500µl di sola madre di colorante (THT/DAPI/FITC 4k-10k), che è il parametro che viene mantenuto costante, e i restanti 500 µl costituiti da volumi via via crescenti di idrogel più la restante parte di acqua (in modo che la somma gel + H<sub>2</sub>O fosse sempre 500 µl).

	Colorante µl	Idrogel µl	H <sub>2</sub> O µl
C1	500	50	450
C2	500	100	400
C3	500	200	300
C4	500	300	200
C5	500	400	100
C6	500	500	0
C7	500	300	200
C8	500	400	100
C9	500	500	0
C10	500	450	50

*Tab. 2 Schema della titolazione dei campioni*

Per poterlo fare, sono stati preparate madri di guanosine a concentrazione diversa, una coppia di madri (di Gua e di GMPK<sup>+</sup>) normale per i campioni

C1-C6, una coppia concentrata due volte per C7-C9 e una tre volte per C10. Ogni campione aveva quindi la stessa quantità di colorante ma non di guanosine (tabella 3)

GMPK+	Gua
200 mg/ml	150 mg/ml
400 mg/ml	300 mg/ml
600 mg/ml	450 mg/ml

*Tab.3 Concentrazione delle 2 Madri alle 3 concentrazioni*

Dalle curve di assorbanza dei campioni sono state ricavate le costanti di legame (K) di ogni probe per ciascun rapporto molare, ottenendo una serie di curve che descrivono come questi coloranti interagiscono con l'idrogel in relazione alla sua carica, quindi al rapporto molare.

Si ricava dapprima il valore y di ogni campione, secondo l'equazione:

$$y = \frac{[G + GMPk^+]/4}{(\varepsilon_A - \varepsilon_f)}$$

dove  $[G + GMPk^+]/4$  ( che definiamo per comodità [G4] ) rappresenta la concentrazione dei quartetti,  $\varepsilon_A$  è il rapporto tra l'assorbanza di ogni campione e la concentrazione di colorante al suo interno,  $\varepsilon_f$  è il rapporto tra assorbanza della madre di colorante e la sua concentrazione [25].

Ottenuti i valori delle y, si plottano su IgorPro insieme ai rispettivi valori di [G4], ottenendo un grafico con una serie di punti che rappresentano tutti i campioni di ogni set.

Infine, per ogni grafico, si effettua un fit lineare, ottenendo una retta; il rapporto tra la pendenza (b) e l'intercetta (a) della retta fornisce il valore della K di ogni set di campioni.

### ***2.3.3 Spettrofotometria a temperatura***

Sono state effettuate letture di assorbanza sull'idrogel di guanosine utilizzando uno spettrofotometro *Varian Cary 100 UV-Vis spectrophotometer* (DISVA) collegato a un bagnetto termostato: il funzionamento dello strumento è simile a quello sopracitato, la differenza sta nella possibilità di regolare la temperatura del campione contenuto all'interno della cuvetta mediante un fluido (acqua) a temperatura controllata tramite termostato. La temperatura è stata fatta salire progressivamente da 25°C a 80°C, a intervalli di 5°C è stata effettuata una misura di assorbanza, questo per tutti gli idrogel ai vari rapporti molari, sia trattati con la THT che con il DAPI.



*Fig. 2.12 Spettrofotometro Varian Cary 100 UV-Vis*

## 2.4 Spettrofluorimetria.

È la misura della fluorescenza finalizzata alla determinazione quantitativa di sostanze fluorescenti.

Si definisce fluorescenza la luminescenza emessa da una sostanza in seguito all'assorbimento di una radiazione elettromagnetica. La luminescenza è il processo in cui un atomo di una molecola emette una radiazione luminosa nel corso di una transizione da un livello elettronico di maggiore energia ad uno minore. Infatti, quando gli atomi vengono colpiti dalla radiazione luminosa, si verifica una transizione dei loro elettroni dallo stato fondamentale a quello eccitato (questo si verifica grazie ad un'energia di eccitazione  $h\nu_{EX}$  fornita al sistema); se il passaggio al livello superiore di energia è dovuto ad assorbimento delle radiazioni luminose, la successiva emissione di luce è detta fluorescenza, dovuta al ritorno ad uno stato a minore energia (l'energia di emissione può essere definita con  $h\nu_{EM}$ ).

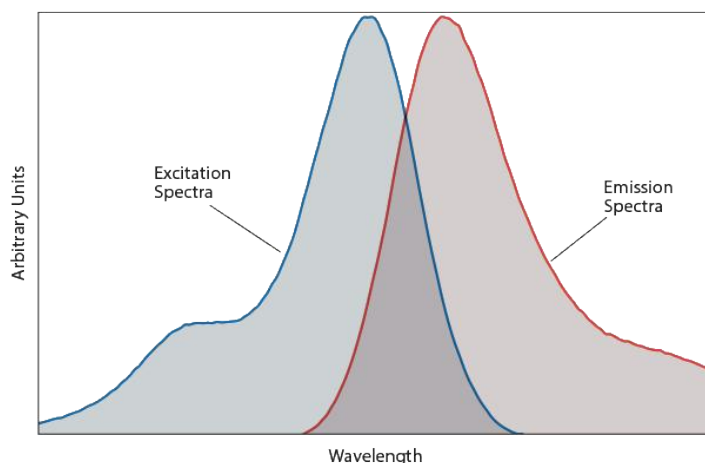


Fig. 2.13 Spettro di Eccitazione e spettro di Emissione di un fluoroforo



### 2.4.1 Strumentazione

Il principio su cui si basa questa tecnica fa riferimento all'eccitazione del campione mediante l'utilizzo di una sorgente monocromatica.

La radiazione emessa viene registrata dallo spettrofluorimetro, il quale produce uno spettro di emissione al fine di determinare quantitativamente i coloranti inseriti nel sistema. Questo spettro mostra l'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda.

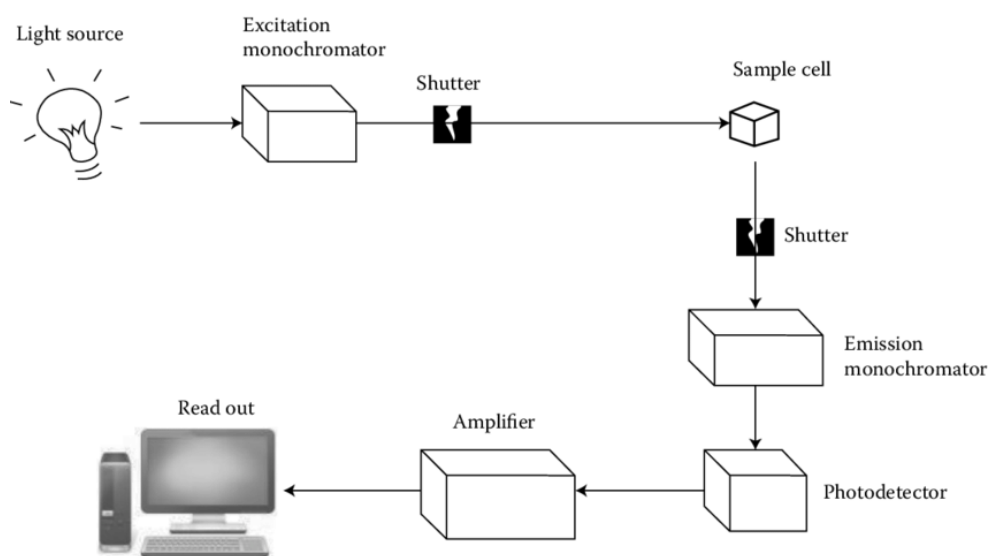


Fig. 2.14 Schema di funzionamento di uno Spettrofluorimetro

Uno spettrofluorimetro è costituito da una serie di elementi, in parte simili a quelli visti per lo spettrofotometro:

- una sorgente luminosa, costituita da una lampada, fornisce l'energia di eccitazione;
- il monocromatore: seleziona la lunghezza d'onda della luce eccitante;
- un porta campione che può essere costituito da una cuvetta o da una eppendorf ( negli esperimenti trattati ne è stata utilizzata una di 0.5 ml).

- un fotomoltiplicatore: riceve una frazione della fluorescenza emessa dal campione e la invia a sua volta ad un amplificatore, che appunto ne amplifica il segnale. Il fotomoltiplicatore è disposto a 90° rispetto alla direzione della luce eccitante, in modo da non ricevere la radiazione della sorgente eccitante che attraversa la soluzione;
- l'analizzatore: produce come output lo spettro di fluorescenza.

Lo strumento utilizzato è stato lo stesso visto per la spettroscopia, il *DeNovix DS-11 Fx+ Spectrophotometer/Fluorometer* (DiSVA).

Prima di iniziare ogni analisi, sono state fissate le lunghezze d'onda di eccitazione di ciascuna sostanza trattata: il DAPI presenta un picco di eccitazione a 358 nm, mentre la THT ha un picco variabile compreso tra 385 nm e 450 nm (dipende se si trova in forma legata o libera). Le impostazioni dello strumento permettono di considerare quattro valori di eccitazione:

- UV ~ 375 nm,
- Blu ~ 470 nm,
- Verde ~ 525 nm,
- Rosso ~ 635 nm.

#### ***2.4.2 Spettrofluorimetria a temperatura***

Come visto per la spettroscopia, è stato usato uno spettrofluorimetro *Varian Cary Eclipse Spectrophotometer* (DISVA) collegato a un bagnetto termostato per effettuare misure di fluorescenza a temperatura (vedi sopra).



Fig. 2.15 Spettrofluorimetro Varian Cary Eclipse

## 2.5 Transilluminatore

Lo strumento impiegato è il *ChemiDoc™ XRS+ System* (Bio-Rad Laboratories) del DISVA

Un transilluminatore-UV permette la visualizzazione di DNA target o di proteine, tramite l'emissione di elevati livelli di radiazioni UV. I campioni contenuti nelle eppendorf vengono posizionati direttamente sulla superficie a livello della quale trapassano le radiazioni, in modo da fare un'analisi qualitativa immediata.



Fig. 2.16 ChemiDoc™ XRS

Nel nostro caso lo strumento è stato utilizzato per visualizzare la fluorescenza emessa dai campioni di idrogel contenenti le sonde fluorescenti, responsabili dell'emissione, permettendone un confronto visivo e qualitativo.

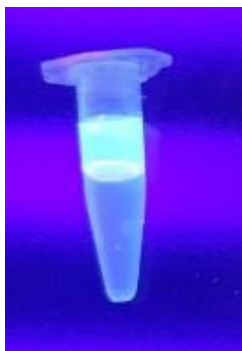
## ***2.6 Misure di diffusione verticale***

Nel corso di questa tesi, al fine di valutare il comportamento delle sonde all'interno del gel, ne è stata valutata la diffusione. Una prima analisi è stata eseguita misurando il tasso di diffusione verticale delle sonde fluorescenti nel tempo: lo studio è stato condotto in un primo momento sfruttando l'emissione di fluorescenza dei coloranti, valutata sia con analisi spettrofluorimetrica (quantitativa) che mediante osservazione diretta al transilluminatore (qualitativa).

Sono stati innanzitutto preparati, in tre eppendorf diverse, 250µl di tre idrogel, rispettivamente 1:1, 1:2, 1:4, analizzati poi con i vari coloranti:

- Idrogel 1:1, 1:2, 1:4 al 95% + THT
- Idrogel 1:1, 1:2, 1:4 al 95% + DAPI
- Idrogel 1:1, 1:2, 1:4 al 95% + FITC 4kDa
- Idrogel 1:1, 1:2, 1:4 al 95% + FITC 70kDa

Su ognuno di questi gel sono stati posti sulla superficie 250µl del rispettivo colorante fluorescente con l'ausilio di una micropipetta, avendo cura di lasciare l'eppendorf perfettamente dritta ed evitare il mescolamento involontario. Sono stati quindi ottenuti dodici idrogel, tre per ogni sonda. Ogni set è stato monitorato dapprima osservandolo con luce UV al transilluminatore e successivamente effettuando misure di fluorescenza al fluorimetro.



*Fig. 2.17 Esempio di diffusione verticale. Si nota colorante fluorescente in soluzione sopra al gel*

La procedura è stata eseguita a intervalli regolari di tempo: la prima misura è stata effettuata al tempo zero (subito dopo aver posto il colorante sul gel), seguita da una lettura 2, 4 e 6 ore dopo, successivamente ogni 24 ore circa, per una settimana.

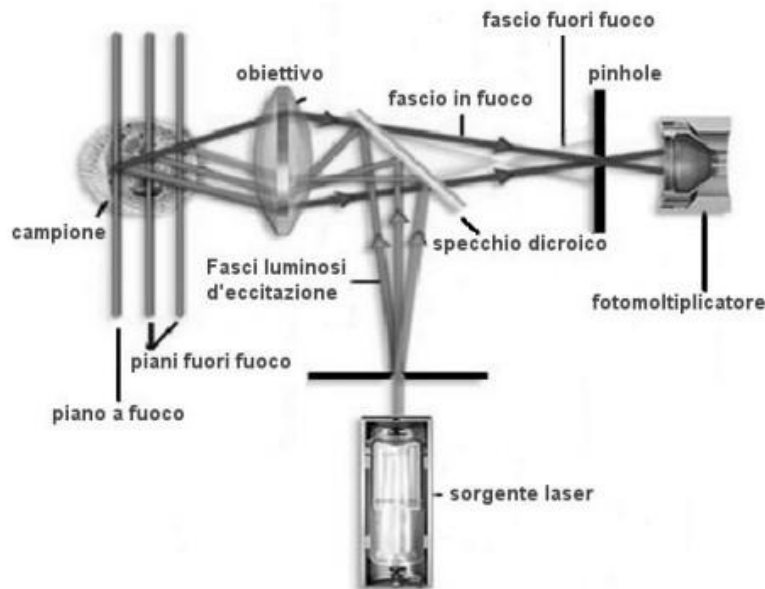
## ***2.7 Microscopia Confocale***

Sempre al fine di ricavare il coefficiente di diffusione dei coloranti nell'idrogel, si è fatto ricorso alla microscopia confocale.

La microscopia confocale si avvale di una particolare configurazione ottica messa a punto da M. Minsky nel 1957, che consiste essenzialmente nell'illuminare non tutto il campione, ma solo il piano focale che si sta osservando e nel raccogliere la luce proveniente solo dal medesimo.

In sostanza, il confocale è un microscopio ottico che si basa su una tecnologia volta ad accrescere sensibilmente la risoluzione spaziale del campione, eliminando gli aloni dovuti alla luce diffusa dai piani fuori fuoco del preparato. Lo strumento opera nel campo convenzionale degli ingrandimenti della normale microscopia ottica, ed è schematicamente costituito da un normale microscopio ottico a cui viene sovrapposto un apparato che si occupa

di illuminare e rilevare l'immagine di un campione illuminato con una scansione punto per punto.



*Fig. 2.18 Schema di funzionamento di un microscopio confocale*

Un sistema di lenti e specchi dicroici foceggia la luce laser (che è la sorgente luminosa) e consente la scansione della regione di interesse del campione sotto osservazione. La luce emessa o riflessa dal campione viene foceggiata dall'obiettivo del microscopio e raccolta da un sistema di due fotomoltiplicatori. Lungo il cammino ottico di questo fascio luminoso è interposta una piccola apertura circolare (pinhole) che scherma parte della radiazione proveniente dal campione, principalmente la luce proveniente dai piani fuori fuoco. La luce proveniente dal piano a fuoco non viene schermata e viene raccolta dal sistema di fotomoltiplicatori, contribuendo in massima parte a formare l'immagine finale osservata. Il risultato è che sia prodotta principalmente dalla luce proveniente da una sezione ristretta del campione, ovvero da quella prossima al piano a fuoco, e solo in minima percentuale da

quella proveniente dai piani fuori fuoco. Ne consegue che l'immagine finale rappresenta più nitidamente una sezione del campione sotto osservazione e che, variando il piano a fuoco, è possibile ottenere immagini di altre sezioni del campione stesso. L'insieme di tutte le sezioni consente di ottenere ricostruzioni tridimensionali del campione

### **2.7.1 FRAP**

La FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) è una tecnica ottica capace di quantificare la diffusione laterale bidimensionale di un sottile film molecolare, o di una membrana, che contenga delle sonde fluorescenti.

La tecnica permette di determinare i coefficienti di diffusione, la frazione immobile e la velocità di convezione di macromolecole o probe nanometrici sia in fusi polimerici, sia in soluzione, sia attraverso membrane polimeriche (es. gel) e di osservare fenomeni in un mezzo sottoposto a modifiche morfologiche, come un sistema biologico in coltura.

Essendo una tecnica di misura in fluorescenza, è applicabile a qualsiasi diffondente fluorescente. Il carattere non invasivo della FRAP, caratteristico delle tecniche di fluorescenza, ne facilita l'impiego in campo biofisico, ad esempio per ricerche finalizzate all'ingegnerizzazione di macromolecole e sistemi per un più efficace drug delivery o alla comprensione dei meccanismi di trasporto all'interno di matrici o tessuti biologici e costrutti cellulare.

La risoluzione spaziale (50 $\mu$ m) e temporale (min) propria di questo strumento permettono, inoltre, di caratterizzare anche sistemi disomogenei e rilevare le eventuali variazioni che questo subisce nel tempo. Il principio di funzionamento si basa sullo studio della diffusione delle macromolecole fluorescenti di una sostanza in esame, condotto analizzando misure di

fluorescenza eseguite su una ben definita regione del campione, preventivamente sottoposta ad estinzione della fluorescenza tramite photobleaching [27; 28].

### ***2.7.2 Strumentazione e preparazione dei campioni***

Lo strumento utilizzato per le misure di FRAP è il *Nikon A1 Confocal Laser Microscope* (DISVA)



*Fig. 2.19 Nikon A1 Confocal Laser Microscope*

L'apparato è costituito da un microscopio ottico, una fonte luminosa e delle sonde fluorescenti.

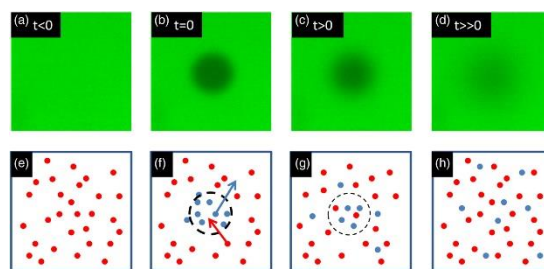
La fluorescenza è subordinata all'assorbimento di una specifica lunghezza d'onda, fattore che limita la scelta di lampade. In genere viene usata una fonte di luce ad ampio spettro a mercurio o xeno con un monocromatore.

La procedura inizia salvando l'immagine prima del bleaching, quindi la fonte di luce è puntata su una piccola porzione dello spazio visibile (utilizzando un



raggio laser di lunghezza d'onda idonea o aumentando l'ingrandimento del microscopio). Al momento del photobleaching, i gruppi fluorofori nella regione illuminata ricevono radiazione più energetica che ne fa svanire rapidamente la fluorescenza (la quale dura circa 10<sup>5</sup> fotoni prima dell'estinzione). L'immagine che ne risulta è quella di un campo uniformemente fluorescente con un punto scuro.

In seguito ai moti Browniani, le molecole fluorescenti diffondono nella regione scura sostituendo le sonde non più fluorescenti. Questa diffusione procede in modo "ordinato" e analiticamente determinabile secondo l'equazione di diffusione.



*Fig. 2.20 Esempio di una misura di FRAP. In alto sono riportate le immagini di come appare il campione, sotto è rappresentato il comportamento delle molecole.*

Per effettuare le misure di FRAP, sono stati allestiti dei vetrini da microscopia, sulla cui superficie è stata posta una goccia di idrogel contenente il probe fluorescente. Sono stati studiati i sistemi a differenti livelli di idratazione, al 90, 95 e 98% di acqua, in tre rapporti molari differenti 1:1, 1:2, 1:4; in questi campioni il colorante è stato usato direttamente nella preparazione dell'idrogel al posto dell'acqua. È stato poi posto un copri oggetto al di sopra della goccia e pressata in modo da eliminare eventuali bolle d'aria. Il vetrino così preparato è stato posto direttamente sul piano del microscopio ed analizzato immediatamente.

Alla fine dell'analisi sono stati salvati il grafico di Time Measurement e l'Intensity Profile di tutte le misure, e dallo studio di questi è stato possibile ricavare il coefficiente di diffusione dei coloranti, secondo l'equazione [29]:

$$D = \frac{R_E^2 + R_N^2}{8 * \tau_{1/2}}$$

## ***2.8 Diffrazione dei Raggi X***

Una parte di questa tesi è stata dedicata allo studio della struttura del reticolo dell'idrogel in presenza dei coloranti: lo scopo era quello di capire se le distanze tra quadruplessi e/o quelle tra quartetti cambiassero quando i probes interagiscono con le guanosine, di conseguenza quello di comprendere la natura dell'interazione tra probes e quadruplessi in funzione delle variazioni osservate.

Per questo studio si è fatto ricorso a tecniche basate sulla diffrazione dei raggi X: la Cristallografia a raggi X, lo Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) e Wide Angle X-Ray Scattering (WAXS).

Con il termine “diffrazione”, si intende un fenomeno generato quando una grandezza di natura ondulatoria si propaga nello spazio e viene deviata in seguito all'interazione con un ostacolo. Il fenomeno è proprio di ogni genere di onda, come onde sonore o radiazioni elettromagnetiche, purché la lunghezza d'onda sia compatibile con le dimensioni dell'oggetto.

Nel caso del nostro studio, l'analisi è stata eseguita mediante l'ausilio dei raggi X: questi sono una porzione dello spettro elettromagnetico (non distruttiva), estremamente penetrante e con lunghezza d'onda compresa tra 0.01 nm e 10 nm. Queste radiazioni vengono impiegate principalmente per

misurare gli effetti dell'interazione con la materia cristallina, semi-cristallina e amorfa.

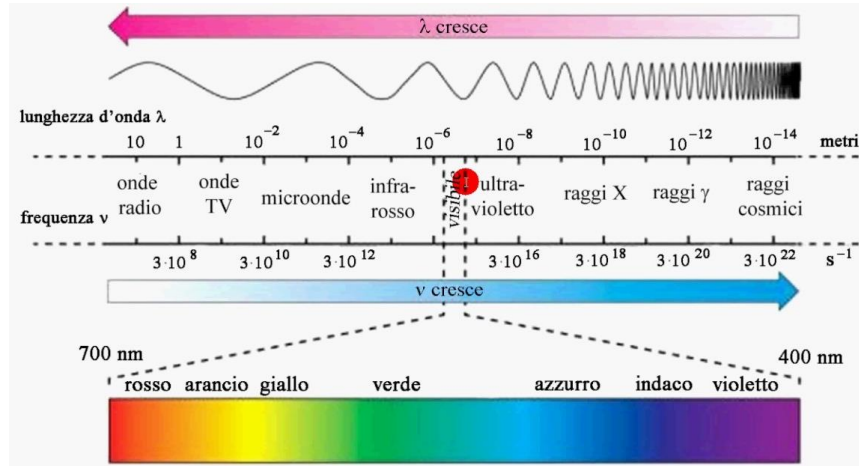


Fig. 2.21 Spettro delle radiazioni elettromagnetiche

Qualunque radiazione elettromagnetica è in grado di interagire con la materia attraverso due processi principali:

- assorbimento: nel corso del quale la radiazione cede tutta o parte della propria energia al sistema materiale, aumentandone la temperatura o determinandone la transizione ad uno stato eccitato. Nel caso dei raggi X, la radiazione incidente ha energia sufficiente per provocare transizioni elettroniche, ed espellere elettroni dagli atomi (effetto fotoelettrico).
- diffusione (scattering): la radiazione viene diffusa dalla materia e le onde elettromagnetiche ad essa associate cambiano direzione di propagazione. Tale cambiamento può essere accompagnato da scambio di energia tra fotoni e materia (scattering anelastico; scattering termico diffuso) oppure no (scattering elastico).

Quest'ultimo è il fenomeno alla base delle misure di diffrazione dei raggi X.

### 2.8.1 Cristallografia a Raggi-X e Legge di Bragg

La cristallografia a Raggi-X è una potente metodologia di analisi che si basa sulla diffrazione menzionata precedentemente, ossia un tipo di scattering elastico (scattering Thomson), basato su un fenomeno di interazione tra radiazione e materia in cui un'onda viene deflessa, cioè cambia casualmente la sua traiettoria, quando entra in collisione con una particella carica.

Dati due elettroni posti a distanza  $\vec{r}$ , molto più piccola della distanza tra elettroni e sorgente e della distanza tra elettroni e rivelatore, e siano  $\hat{s}_0$  i vettori unitari nella direzione del fascio incidente e  $\hat{s}$  i vettori unitari nella direzione del fascio deviato, è possibile descrivere la differenza di fase  $\delta$  tra i due fasci deviati come:

$$\delta = \frac{1}{\lambda} \vec{r} \cdot (\hat{s} - \hat{s}_0)$$

con  $\vec{r} \cdot (\hat{s} - \hat{s}_0)$  che rappresenta la differenza di cammino.

È inoltre possibile definire il vettore  $Q$ , che corrisponde alla quantità di moto trasferita, come:

$$Q = \frac{2\pi}{\lambda} (\hat{s} - \hat{s}_0)$$

Il modulo di  $Q$ , che si calcola come un inverso della lunghezza d'onda in  $\text{\AA}^{-1}$ , si ottiene con l'equazione:

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$$

Nel caso di un reticolo tridimensionale di atomi, come quello di un solido cristallino o, caso trattato in questa tesi, quello del reticolo di un idrogel, si può descrivere  $F(\vec{Q})$  il fattore di struttura di un reticolo tridimensionale:

$$F(\vec{Q}) = f(Q) \sum_{n_a} \sum_{n_b} \sum_{n_c} e^{i\vec{Q}(n_a\vec{a}+n_b\vec{b}+n_c\vec{c})}$$

in cui  $n_a \vec{a} + n_b \vec{b} + n_c \vec{c} = \vec{R}$  rappresentano i vettori di cella del reticolo (la cella elementare è la più piccola parte del solido cristallino che, ripetuta nello spazio attraverso traslazioni di tutti i vettori del reticolo di Bravais, forma l'intero cristallo) ed  $\vec{R}$  identifica la posizione di qualsiasi punto reticolare.

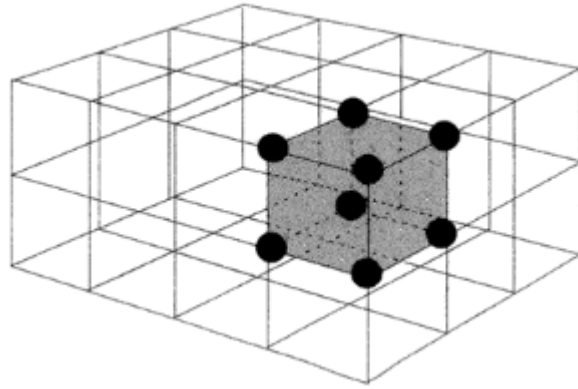


Fig. 2.22 Cella elementare

Se sono rispettate le condizioni di Von Laue,  $F(\vec{Q})$  è diverso da zero solo quando:

$$\vec{Q} \cdot \vec{a} = 2\pi h \quad \text{con } h=0, \pm 1, \pm 2 \dots$$

$$\vec{Q} \cdot \vec{b} = 2\pi k \quad \text{con } k=0, \pm 1, \pm 2 \dots \quad \equiv e^{i\vec{Q} \cdot \vec{R}} = 1$$

$$\vec{Q} \cdot \vec{c} = 2\pi l \quad \text{con } l=0, \pm 1, \pm 2 \dots$$

Allora  $F(\vec{Q})$  si può scrivere come:

$$F(\vec{Q}_{hkl}) = f(Q_{hkl}) \sum_{n_a} \sum_{n_b} \sum_{n_c} 1$$

Ciò equivale a dire che si ha interferenza costruttiva, e quindi un segnale visibile, solo a certi valori interi, positivi o negativi, di h, k, l, detti indici di Miller.

Dalle condizioni di diffrazione di Von Laue si può facilmente ottenere la legge

di Bragg (fig.2.3), con cui si può dimostrare che, ad ogni vettore  $\vec{Q}_{hkl}$  del reticolo reciproco, corrisponde una famiglia di piani nel reticolo diretto che contengono i punti reticolari e che si trovano a distanza:

$$d_{h,k,l} = \frac{2\pi}{Q_{h,k,l}}$$

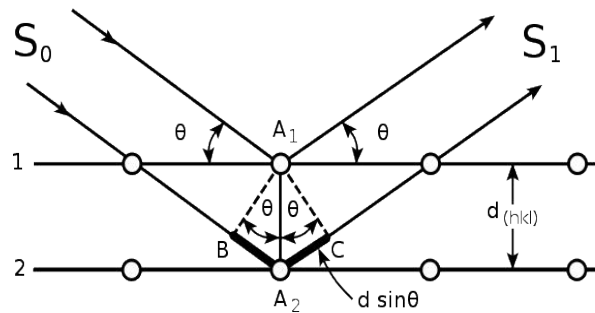


Fig. 2.23 Fenomeno della diffrazione.  $\theta$  rappresenta l'angolo del fascio incidente e del fascio riflesso,  $d$  è la distanza tra piani reticolari [wikitolearn.org]

La legge di Bragg mette in relazione il valore di  $d_{h,k,l}$  con l'angolo di scattering  $2\theta$  e la lunghezza d'onda. Si ottiene allora:

$$n\lambda = 2d_{h,k,l} \sin \theta$$

- con  $n = \pm 1, \pm 2, \dots$ , ordine di diffrazione;
- $\theta$ : angolo di diffrazione della radiazione che emerge dal cristallo, formato quindi tra il fascio incidente e i piani reticolari;
- $d$ : distanza tra i piani reticolari;
- $\lambda$ : lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica incidente.

Il risultato della diffrazione dei raggi X da parte dei piani reticolari in accordo con la legge di Bragg è rappresentato da uno spettro caratteristico bidimensionale di macchie di diffrazione, le quali vengono registrate da un rivelatore. L'intensità del segnale misurato dipende dalla distribuzione degli

atomi nella cella elementare, mentre la direzione dei raggi diffratti dipende dalla forma e dalla grandezza della cella stessa. Conoscendo la lunghezza d'onda della radiazione utilizzata (legata al tipo di anodo metallico) e il valore del seno di  $\theta$  tra la direzione del fascio incidente e i piani reticolari, è possibile risalire alle distanze dei piani reticolari ( $d$ ) e di conseguenza alla natura delle fasi presenti.

### **2.8.2 Strumentazione**

Lo strumento utilizzato per le misure è il *Diffrattometro a Raggi X* del laboratorio di Biofisica Molecolare (DISVA).

Esso è costituito da:

- un generatore di raggi X, cioè da un tubo all'interno del quale sono presenti un anodo e un catodo. Il primo, l'elettrodo positivo, è costituito da un filamento di tungsteno, che mostra un'elevata temperatura di fusione; il catodo invece è negativo ed è costituito da rame. Collegando il catodo ad un alimentatore, viene portato ad incandescenza e la produzione di elettroni avviene per effetto termoionico. Gli elettroni essendo carichi negativamente si dirigono verso l'anodo subendo deviazioni delle loro traiettorie con perdita di una parte della loro energia, che viene emessa sotto forma dei raggi X. Può capitare che un elettrone che si è generato urti un elettrone delle orbite più interne provocandone l'espulsione dell'atomo, di conseguenza un elettrone di un'orbita a maggiore energia andrà ad occupare il posto nell'orbita interna. Questo spostamento provoca pertanto l'emissione di un fotone X di energia pari a quella persa dall'elettrone nel passaggio di posizione; un processo definito radiazione caratteristica.

- un monocromatore, costituito da cristalli di quarzo che selezionano l'onda magnetica prescelta di  $\lambda = 1.54\text{nm}$ .
- un sistema di collimazione del fascio incidente per definire la forma e la grandezza del fascio.
- un porta-campione
- un detector, cioè un sistema di rilevazione del fascio diffratto, costituito da una lastra fotografica in cui sarà possibile rilevare il profilo di diffrazione, quindi l'intensità della radiazione in funzione dell'angolo di diffrazione.
- un beamstop, un elemento in piombo che impedisce il raggiungimento dei componenti del fascio diretto e ombreggia quindi la minima regione angolare possibile, così da evitare che il detector si oscuri per l'elevata intensità del fascio trasmesso.

### ***2.8.3 Preparazione del campione e analisi dati***

Il primo step di analisi consiste dunque nella calibrazione dello strumento, per farlo si utilizza il tricosano, un composto organico con una struttura molto ordinata e ripetuta che genera uno spettro costituito da linee concentriche ad intervalli regolari.

Il campione viene inserito all'interno di una slot di ottone composta da due parti, all'interno un disco di teflon forato al centro, dallo spessore di un mm che viene racchiuso tra due foglietti di mylar, attraverso i quali passano le radiazioni, e due dischetti di alluminio sempre forati. Le due componenti in ottone vengono chiuse e sigillate da quattro viti per evitare la disidratazione del campione.





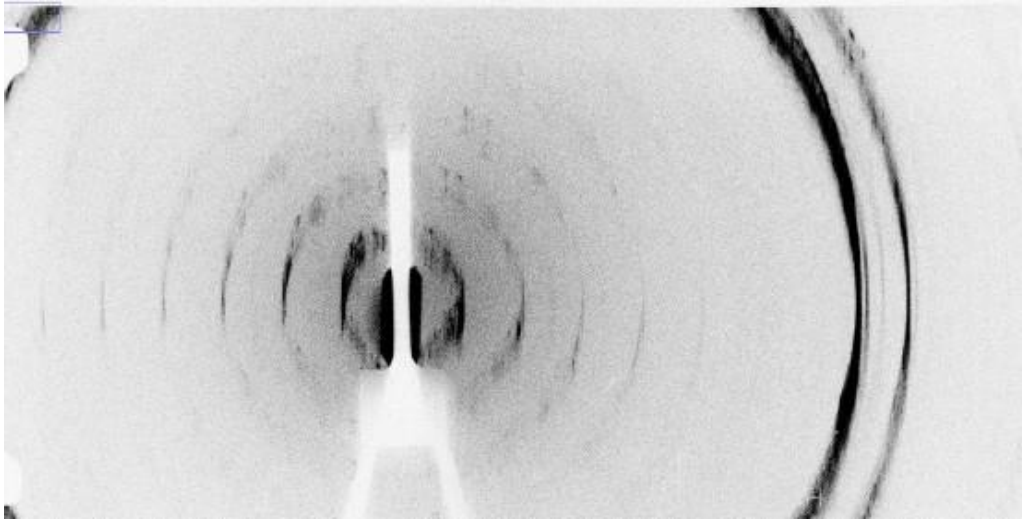
*Fig. 2.24 Tutte le componenti della slot portacampione utilizzata per i raggi X*

La slot viene dunque alloggiata in una fessura in cui il campione viene raggiunto dai raggi X, che a seconda della propria geometria sarà in grado di diffrangere i raggi X nelle varie direzioni.

Quella che si avrà alla fine dell'esperimento, data dall'interazione tra i raggi X e il campione, è un'immagine di interferenza tra i due: questo segnale ci viene mostrato attraverso dei picchi di diffrazione su un diagramma. L'analisi del profilo di diffrazione ci permette di individuare la posizione e l'intensità dei picchi: quest'ultima è un indice della densità elettronica del campione e quindi della sua composizione a livello atomico.

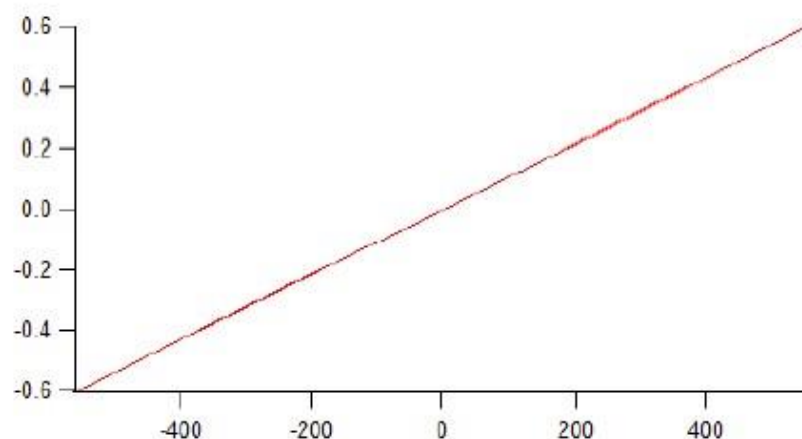
La posizione invece indica la simmetria del campione tramite cui è possibile calcolare la dimensione della cella unitaria.

In uno spettro di diffrazione si individuano due regioni principali: la regione del basso angolo, quella riscontrabile in prossimità del beamstop, con valori che descrivono la macrostruttura del cristallo, e la regione dell'alto angolo che ci dà informazioni sulla microstruttura.



*Fig. 2.25 Spettro di diffrazione del tricosano*

Una volta ottenuto lo spettro di diffrazione del tricosano, l'immagine viene convertita da analogica a digitale e, per mezzo del programma ImageJ, viene ricavato un grafico monodimensionale (della media di una serie di punti selezionati sullo spettro) relativo alle intensità dei pixel dell'immagine. Il grafico viene quindi aperto su un secondo programma, IgorPro, per mezzo del quale si ottiene una retta di calibrazione che viene utilizzata successivamente nell'analisi del campione in esame.



*Fig. 2.26 Retta di calibrazione del tricosano*

Il processo viene quindi ripetuto allo stesso modo con i campioni di idrogel da solo e con i coloranti fluorescenti, ottenendo infine il grafico dell'intensità del segnale in funzione del parametro  $Q$  citato precedentemente.

Nel caso specifico di queste misure, i campioni di idrogel ( in questo caso 1:1, 1:2 e 1:4 al 95% di acqua) sono stati preparati in maniera particolare rispetto a quelli menzionati finora e facendo ricorso a materiali diversi, quali il PEG.

In questo caso il gel privo di coloranti è stato confrontato con lo stesso ma contenente THT o DAPI, il tutto sia in un sistema meno idratato con PEG al 35% che in uno più idratato con PEG al 45%.

- I campioni sono stati preparati con le quantità di G/ GMPK<sup>+</sup> viste precedentemente, senza l'aggiunta di coloranti.
- I campioni sono stati liofilizzati over-night per seccarli completamente.
- Da ogni eppendorf sono stati prelevati 25mg di liofilizzato e posti in una nuova eppendorf, cercando di compattarli sul fondo con l'aiuto di un pestello.
- Sono state preparate due soluzioni di PEG, una al 35% e una al 45% e da queste ne sono stati prelevati 250µl e posti sui rispettivi campioni da analizzare.

#### ***2.8.4 Small e Wide Angle X-Ray Scattering (SAXS/WAXS)***

Per determinare la struttura tridimensionale del reticolo del gel e per capire se l'aggiunta dei coloranti al sistema potesse comportarne una variazione evidente, sono state effettuate delle analisi di Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) e Wide Angle X-Ray Scattering (WAXS). Gli esperimenti sono stati

condotti tramite il servizio mail-in presso la beamline BioSAXS I22 di Diamond Light Source (Harwell, United Kingdom).

- Con l'analisi SAXS viene misurata ad angoli molto piccoli (tipicamente tra  $0.1$  e  $10^\circ$ ) la diffusione elastica dei raggi X da parte di un campione. Questo consente di ottenere informazioni riguardo forma e dimensione delle macromolecole, nonché l'ordine dell'intero campione, quando le dimensioni sono tra  $1$  e  $100$  nm.
- Nel caso dei WAXS, la diffusione viene misurata ad angoli maggiori, questo rende accessibili le informazioni sulle distanze caratteristiche al di sotto di  $1$  nm, relative alla struttura interna del campione.

Quello che cambia fra le due tecniche è quindi l'ampiezza dell'angolo di scattering, che è funzione della distanza tra il campione irradiato dal fascio di raggi X e il detector: nel SAXS il campione è più lontano dal detector e più vicino alla sorgente, viceversa nel WAXS.

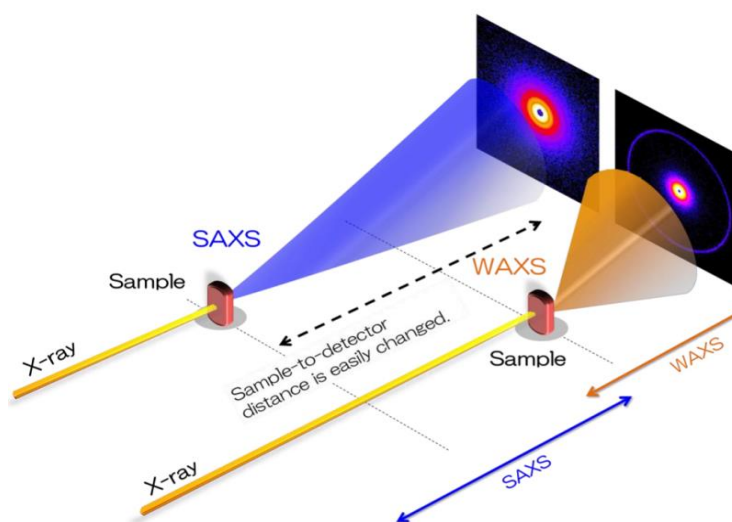


Fig. 2.27 Small Angle Scattering (SAXS) e Wide Angle Scattering (WAXS) [rigaku.com]

I campioni sono stati analizzati all'interno di speciali capillari in quarzo aventi 1mm di diametro, tutte le misure sono state effettuate a temperatura ambiente.

Gli esperimenti sono stati effettuati andando ad analizzare un range del vettore di scattering:

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$$

con  $\theta$  uguale all'angolo di scattering e  $\lambda$  uguale alla lunghezza d'onda del fascio di raggi X, il vettore è compreso tra 0.4 e 3.0 nm<sup>-1</sup> per il SAXS e tra 3.0 e 50 nm<sup>-1</sup> per il WAXS.

I risultati ottenuti per ciascuna misura sono nella forma di immagini 2D che mostrano l'intensità del fascio di raggi X scatterato in tutte le direzioni possibili. Al fine di ricavare le curve I(Q) vs. Q le immagini 2D sono state analizzate andando a calcolare la media radiale dell'intensità di scattering, alla quale è stato successivamente sottratto il contributo del background (acqua).

### ***2.8.5 Preparazione dei campioni***

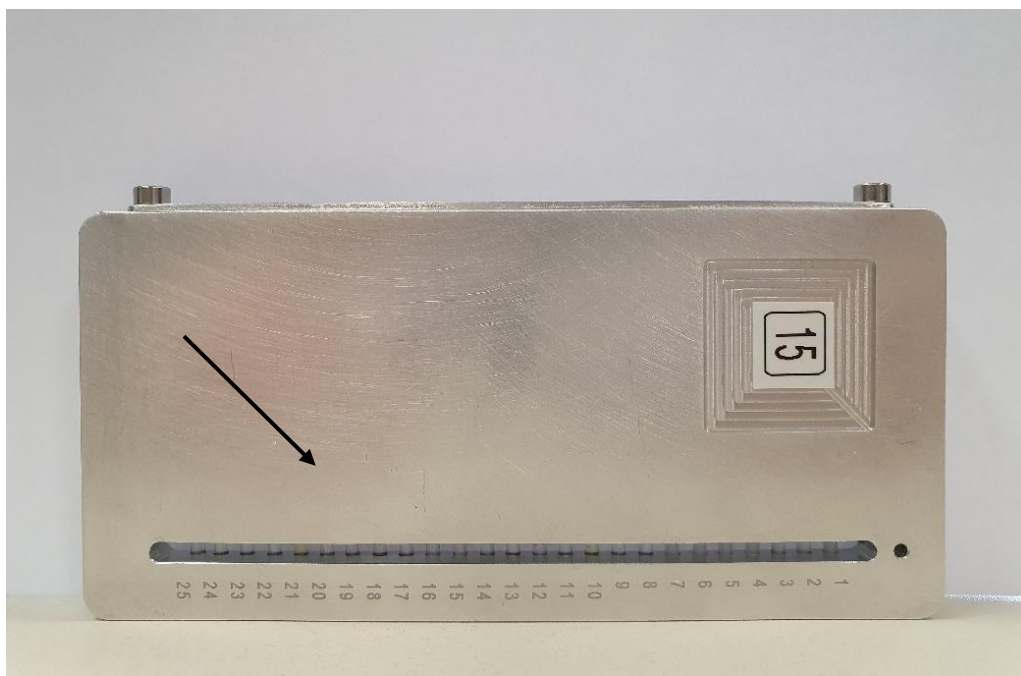
I campioni sono stati analizzati all'interno di capillari in quarzo di 1mm di diametro, successivamente posti in un portacampioni con vari alloggiamenti per i capillari. Tutte le misure sono state effettuate a temperatura ambiente, tramite l'utilizzo di un detector Pilatus P3-2M (Silicon hybrid pixel detector, DECTRIS) posto a 3m di distanza dai campioni.

Per evitare la fuoriuscita del gel dal capillare, questo è stato otturato con un pezzo di parafilm e con della colla epossidica bicomponente.

Tutti i capillari così composti sono stati inseriti nel portacampioni dedicato.



*Fig. 2.28 Capillare di quarzo utilizzato per le analisi SAXS e WAXS. All'interno si ritrovano, dal basso verso l'alto: il campione di gel, un pezzo di parafilm e della colla bifasica per chiudere il cilindro*



*Fig. 2.29 Portacampioni in cui sono stati inseriti i capillari per le analisi SAXS e WAXS*

I campioni analizzati sono stati:

- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 98% w/w
- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 98% w/w, THT
- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 98% w/w, DAPI
- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 90% w/w
- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 90% w/w, THT
- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 90% w/w, DAPI

## ***2.9 Microscopia a Forza Atomica (AFM)***

Grazie alle straordinarie prestazioni offerte dal Microscopio a Forza Atomica (AFM) è stato possibile osservare reale profilo tridimensionale dei campioni di idrogel semplici e confrontarlo con quello dei gel contenenti i probes fluorescenti; in particolare sono state saggiate la THT e il DAPI, data la loro capacità di interagire con i quadruplessi, in modo da valutare eventuali variazioni dovute alla presenza delle sonde fluorescenti. Gli idrogel analizzati erano tutti al 95% w/w.

Lo strumento è in grado di fornire immagini di qualsiasi materiale in un range compreso tra 150  $\mu\text{m}$  fino ad arrivare a pochissimi nm. Per la preparazione dei campioni, gli idrogel sono stati diluiti 1:600.

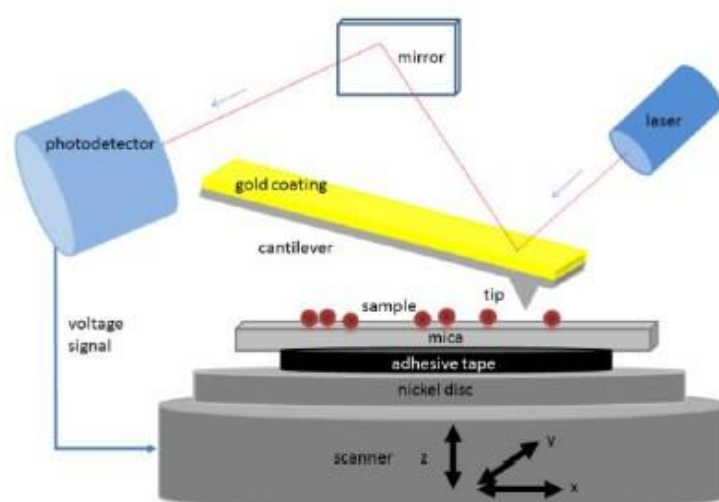
### ***2.9.1 Strumentazione***

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



*Fig. 2.30 Microscopio a Forza Atomica AFM-Raman*

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



*Fig. 2.31 Schema del funzionamento dell'AFM [34]*



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

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

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

La punta che è stata utilizzata per le misure è siliconica piramidale del raggio di  $\approx 8$  nm. I risultati ottenuti da questo strumento si presentano sotto forma di immagini. Queste possono mostrare l'immagine in funzione della magnitudo registrata dallo strumento, dell'altezza relativa al campione, e in base ad altre caratteristiche. In questa tesi verrà mostrata la morfologia del campione in

funzione dell'intensità di segnale e delle altezze. Analizzando le immagini delle altezze è stato possibile verificare le dimensioni degli oggetti, e monitorare le eventuali differenze fra i diversi campioni tramite grafici di altezza e istogrammi di frequenze delle altezze.

Il diametro dei cilindri è stato ricavato con l'equazione [32]:

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

dove  $w$  è la larghezza dell'oggetto misurato,  $R_{tip}$  rappresenta il raggio della punta e  $R_{sample}$  il raggio del campione. L'equazione è stata utilizzata per aggirare il problema della convoluzione della punta.

## ***2.10 Immagini al SEM***

Il microscopio elettronico a scansione, o SEM, è un potente microscopio che consente di visualizzare oggetti molto piccoli con una risoluzione molto alta, tipicamente tra 1 e 10nm, in virtù della radiazione utilizzata, che non è la luce come i microscopi classici ma un fascio di elettroni.

È stato utilizzato il SEM *Zeiss Supra 40 (Gemini)* del Centro di Ricerca e Servizio di Microscopia delle Nanostrutture (CISMIN) dell'Università Politecnica delle Marche.



*Fig. 2.32 Microscopio Elettronico a Scansione SEM Zeiss Supra 40*

Il SEM è costituito da:

- Una sorgente di elettroni, dalla quale viene generato il fascio di elettroni
- Una colonna costituita da diverse lenti elettromagnetiche che permettono di gestire il fascio
- Una serie di detector che raccolgono il segnale generato a seguito dell'interazione tra fascio e campione e permettono di ricostruire l'immagine o ottenere le informazioni composizionali
- Uno stage sul quale è posizionato il campione
- Un sistema di vuoto, costituito in genere da una pompa pre-vuoto più una turbomolecolare, che deve garantire un livello di vuoto che sia il più alto possibile per evitare che il fascio, o gli stessi segnali generati, incontrino ostacoli (molecole di gas) coi quali andrebbero ad interagire ottenendo di conseguenza un'immagine più rumorosa.

Il fascio di elettroni scansiona il campione seguendo un determinato pattern. Gli elettroni vengono generati in cima alla colonna del microscopio da una sorgente ed emessi quando la loro energia termica supera l'energia di emissione del materiale che costituisce la sorgente. Gli elettroni vengono quindi accelerati ed attratti da un anodo a carica positiva. Come per il microscopio ottico, delle lenti sono fondamentali per il controllo il fascio elettroni. Poiché gli elettroni non attraversano il vetro, le lenti impiegate sono elettromagnetiche. Le lenti consistono semplicemente in una bobina di fili all'interno di poli magnetici metallici. Quando la corrente passa attraverso la spirale, viene generato un campo magnetico. Dato che gli elettroni sono molto sensibili ai campi magnetici, il loro percorso all'interno della colonna può essere controllato semplicemente modificando la corrente che viene applicata alle singole lenti.

Generalmente, vengono usati due tipologie di lenti elettromagnetiche:

Le lenti condensatrici sono le prime lenti che gli elettroni incontrano all'interno della colonna mentre viaggiano verso il campione. Queste lenti convergono il fascio di elettroni prima che il cono di elettroni si apra di nuovo e venga fatto convergere ancora una volta dalle lenti obiettivo, prima di colpire il campione. Le lenti condensatrici stabiliscono la dimensione del fascio di elettroni (che determina la risoluzione), mentre la principale funzione delle lenti obiettivi è di focalizzare il fascio sul campione.

Il sistema di lenti del microscopio include inoltre l'unità di scansione, che viene utilizzata appunto per scansionare il campione col fascio. Spesso si utilizzano anche le aperture in combinazione con le lenti per controllare la dimensione del fascio. Il SEM è stato utilizzato per ottenere delle immagini dell'idrogel di Guanosine con l'elevata risoluzione propria di questo strumento.

### ***2.11 Modello 3D di un quadruplesso***

Grazie alla conoscenza della struttura dei quadruplessi, ottenuta prevalentemente tramite analisi di cristallografia a raggi X, è stato possibile costruire dei modellini tridimensionale di un quadruplesso.

Per farlo, è stato in primo luogo costruito un G-quartet a partire dai file PDB della G e GMP e utilizzando come modello il PDB di un quartetto telomerico. Per arrivare a costruire un intero quadruplesso a partire dal quartetto di G/GMP, sono stati utilizzati programmi di modelling come Avogadro e Chimera.

I cilindri sono stati stampati con la stampante *ZCorp 450*, in grado di realizzare modelli e prototipi tridimensionali in polvere composita a base di gesso per applicazioni nel settore del design e biomedicale, presente nel laboratorio di Biomateriali e Materiali Polimerici del dipartimento di Scienze e Ingegneria della Materia, dell'Ambiente e dell'Urbanistica (SIMAU).



*Fig. 2.33 Stampante 3D Z-Corp 450*

### ***3 RISULTATI E DISCUSSIONE***

#### ***3.1 Analisi spettroscopica***

Il punto principale su cui si fonda questa tesi è lo studio dell'interazione tra coloranti fluorescenti e quadruplessi e del comportamento di queste molecole quando sono all'interno dell'idrogel di guanosine, sfruttando la caratteristica fluorescenza emessa da questi probes e tutte le misure che essi consentono di eseguire; lo scopo è stato quello di valutare se l'idrogel si presta ad essere utilizzato come carrier per il trasporto di farmaci.

In primo luogo, sono state effettuate una serie di misure di assorbanza dei gel con i tre coloranti (THT, DAPI e FITC-Destrano) per determinarne la costante di legame e il tipo di interazione che avviene tra coloranti e G-quadruplexes. Lo studio è stato eseguito su campioni di idrogel ottenuti per titolazione (tab.2) a cui sono stati, in un secondo momento, aggiunti i coloranti.

##### ***3.1.1 Titolazione dei campioni***

Il primo passaggio importante è stato quello di preparare delle soluzioni madri di colorante; le stesse madri sono state poi utilizzate per tutte le altre misure di cui si parlerà di seguito.

- Madre THT: è stata ottenuta sciogliendo 0.05mg di polvere di THT in 1ml di acqua MilliQ.
- Madre DAPI: è stata ottenuta sciogliendo 0.04mg di polvere di Dapi in 1ml di acqua MilliQ.
- Madre FITC-Destrano: in questo caso sono state utilizzate solo due delle quattro molecole di cui si è parlato nei capitoli precedenti, la più piccola

4kDa e la più grande 70kDa. Le due madri sono state ottenute sciogliendo nel primo caso 0.6mg in 1 ml di MilliQ, nel secondo 1,5mg in 1ml.

Per le misure di assorbanza, sono stati preparati per titolazione dei gel al 95% di acqua per tutti e cinque i rapporti molar G/GMPK<sup>+</sup> (1:1, 3:4, 1:2, 2:5, 1:4). Lo scopo della titolazione è quello di ottenere idrogel sempre più concentrati, quindi aumentando di volta in volta la concentrazione di Gua e GMPK<sup>+</sup> e mantenendo stabile quella di colorante, al fine di capire se il comportamento dei probes e il modo in cui questi interagiscono con il gel varia in funzione della concentrazione delle guanosine e della carica complessiva dei quadruplessi.

Per ogni colorante sono stati preparati 50 campioni di idrogel (10 per ogni rapporto molare, enumerati da C1 a C10), per un totale di 200 campioni, così organizzati:

- C1-C10 idrogel 1:1 + THT/DAPI/FITC4k-10k
- C1-C10 idrogel 3:4 + THT/DAPI/FITC4k-10k
- C1-C10 idrogel 1:2 + THT/DAPI/FITC4k-10k
- C1-C10 idrogel 2:5 + THT/DAPI/FITC4k-10k
- C1-C10 idrogel 1:4 + THT/DAPI/FITC4k-10k

Di ogni campione è stata stimata la quantità di idrogel necessaria per la titolazione (in riferimento alla tab.1), quindi i gel sono stati preparati con la procedura descritta nel capitolo 2; una volta diventati freddi, è stata aggiunta la relativa parte di acqua necessaria a portare il volume a 500µl, spipettando con una micropipetta per omogenare la soluzione; infine sono stati aggiunti 500µl di colorante.

### ***3.1.2 Interazioni colorante-idrogel e calcolo delle $K$ di legame***

I campioni sono stati inseriti, uno per volta, all'interno di una cuvetta di quarzo (di cammino ottico pari a 1 cm) e ne è stata misurata l'assorbanza al Nanodrop; tutti i dati ottenuti dallo strumento sono stati elaborati utilizzando il programma IgorPro.

Per prima cosa sono state ricavate tutte le curve di assorbanza di C1-C10 dei cinque rapporti molari dell'idrogel con i rispettivi coloranti, queste sono state poi confrontate tra loro per risalire al tipo di interazione tra probes e quadruplessi, valutando in particolare il valore del picco di assorbanza e lo shift di lunghezza d'onda.

#### **▪ THT**

Tutti i grafici di assorbimento relativi ai gel con la THT mostrano un andamento simile (fig.3.1).

È possibile osservare che, all'aumentare della concentrazione delle guanosine, le curve di assorbanza di tutti i campioni subiscano un'evidente spostamento sull'asse delle X verso la regione del rosso, definito *Red Shift*, per cui la lunghezza d'onda di assorbimento aumenta gradualmente.

L'assorbanza, invece, rimane tendenzialmente la stessa per tutti i campioni, come mostrato in figura 3.2.



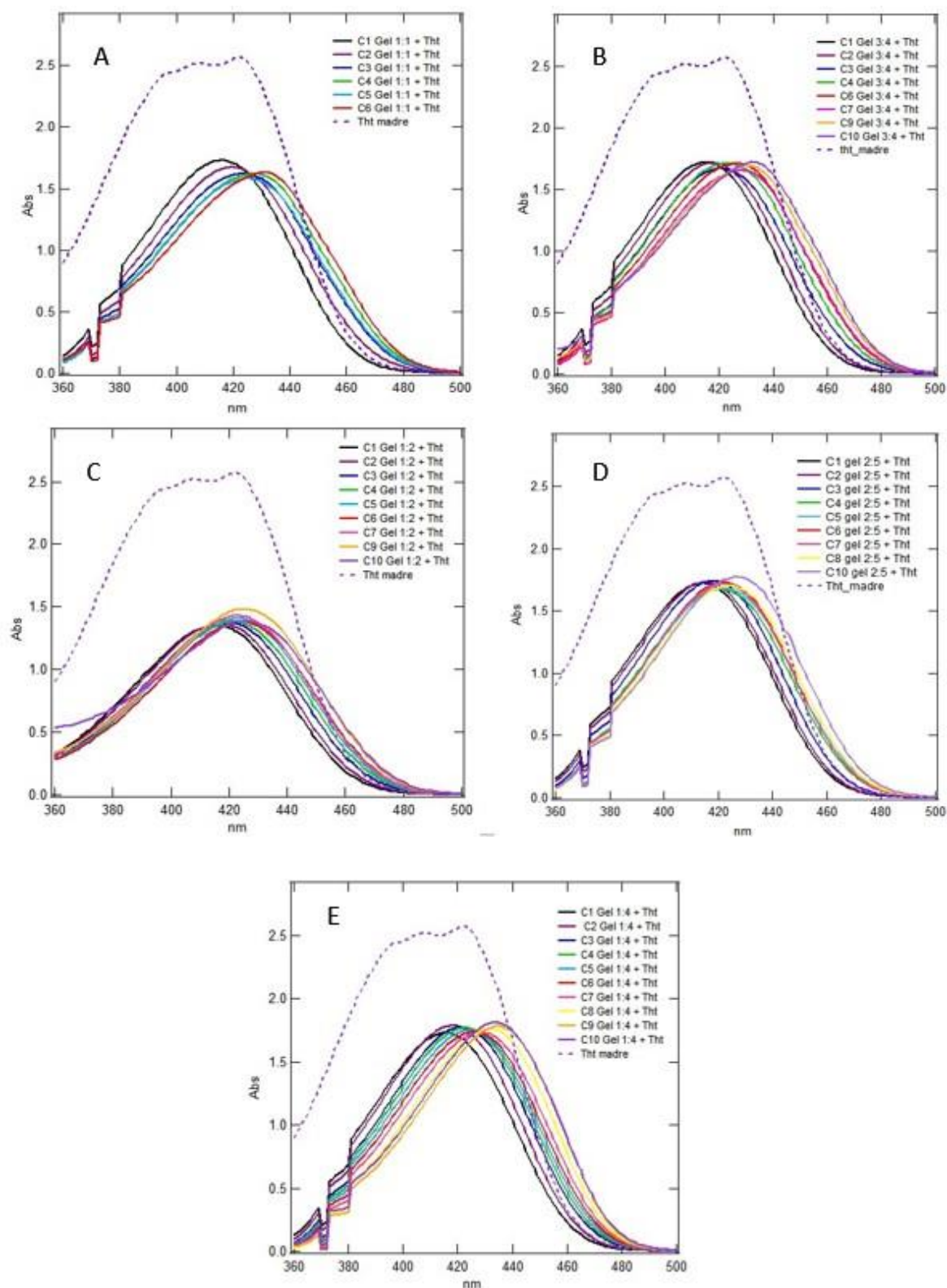


Fig. 3.1 Spettri di assorbimento dei Gel con la THT. (A) gel 1:1+THT; (B) gel 3:4+THT; (C) gel 1:2+THT; (D) gel 2:5+THT; (E) gel 1:4+THT

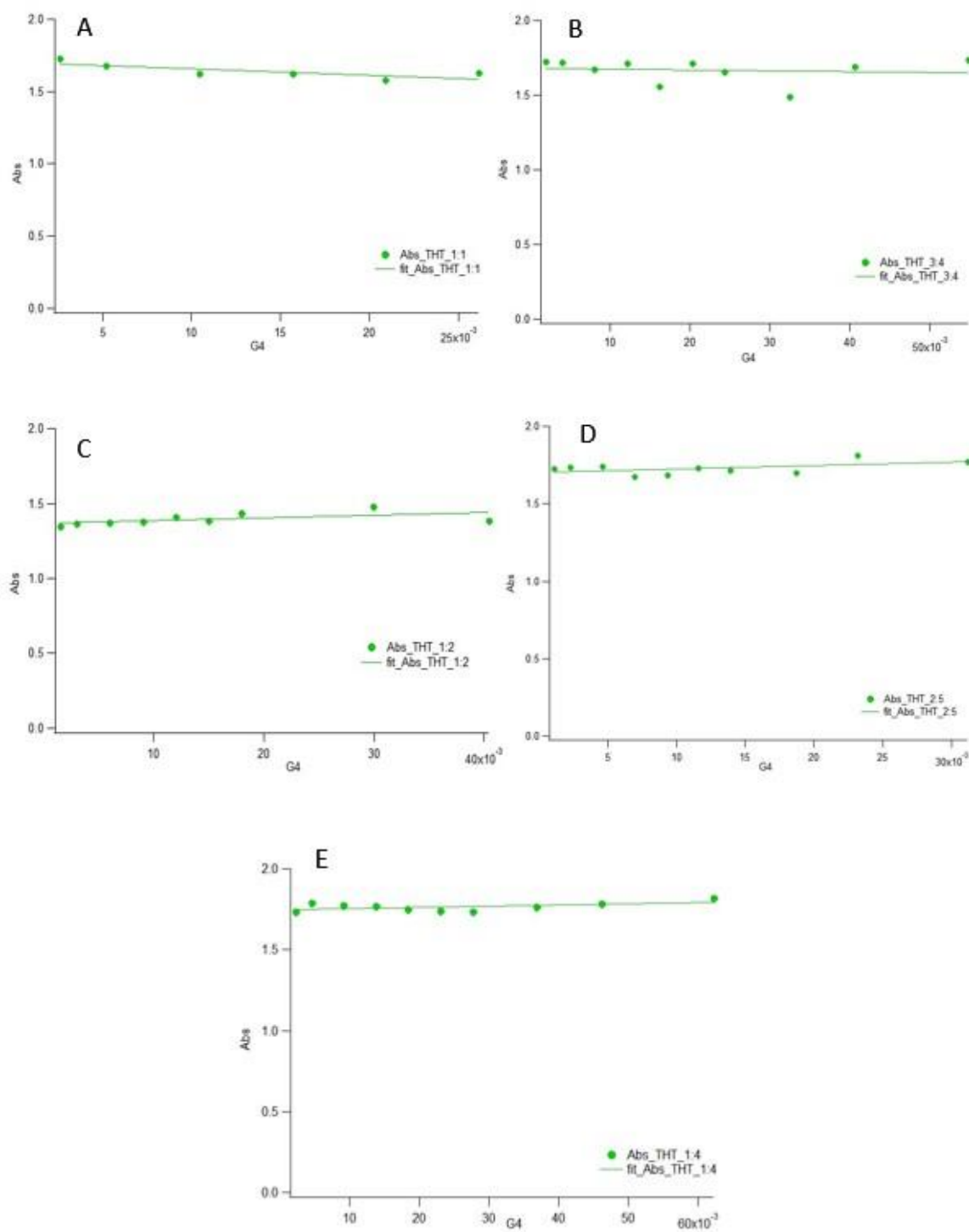


Fig. 3.2 Andamento dell'assorbanza nei gel con la THT.

- **DAPI**

Dai grafici di assorbimento ottenuti dai campioni colorati con il DAPI (fig.3.3) si osserva un andamento diverso rispetto a quello precedente. In questo caso, nei campioni C1/C10 a tutti i rapporti molari è evidenziabile il Red Shift, quindi uno spostamento della lunghezza d'onda verso il rosso, ma è meno marcato rispetto a quello che si osserva nelle curve relative alla THT. È più evidente, invece, un aumento dell'assorbanza man mano che cresce la concentrazione delle guanosine nell'idrogel, com'è possibile notare dall'andamento delle rette mostrate in figura 3.4.

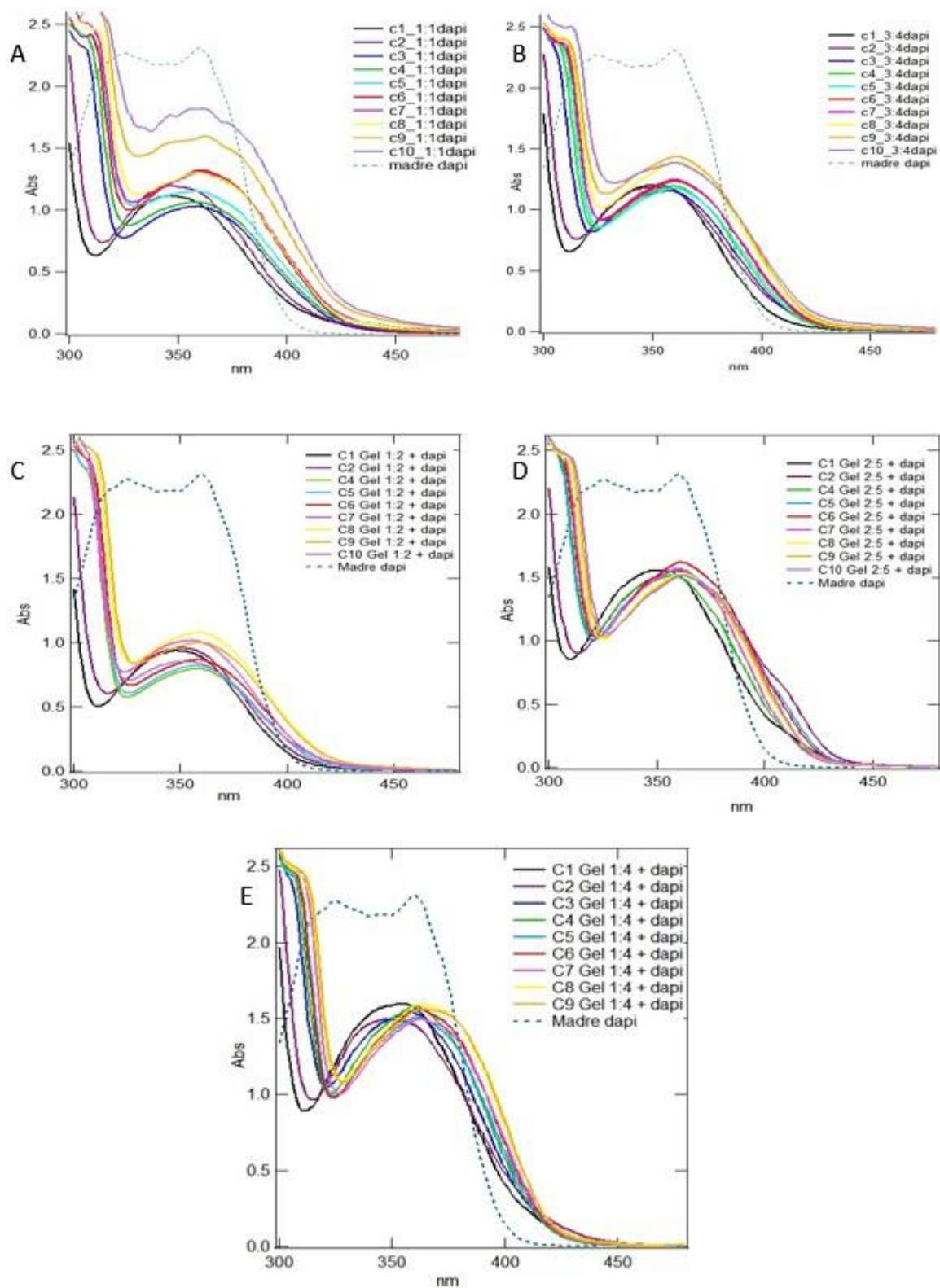


Fig. 3.3 Spettri di assorbimento dei Gel con il DAPI. (A) gel 1:1+DAPI; (B) gel 3:4+DAPI; (C) gel 1:2+DAPI; (D) gel 2:5+DAPI; (E) gel 1:4+DAPI

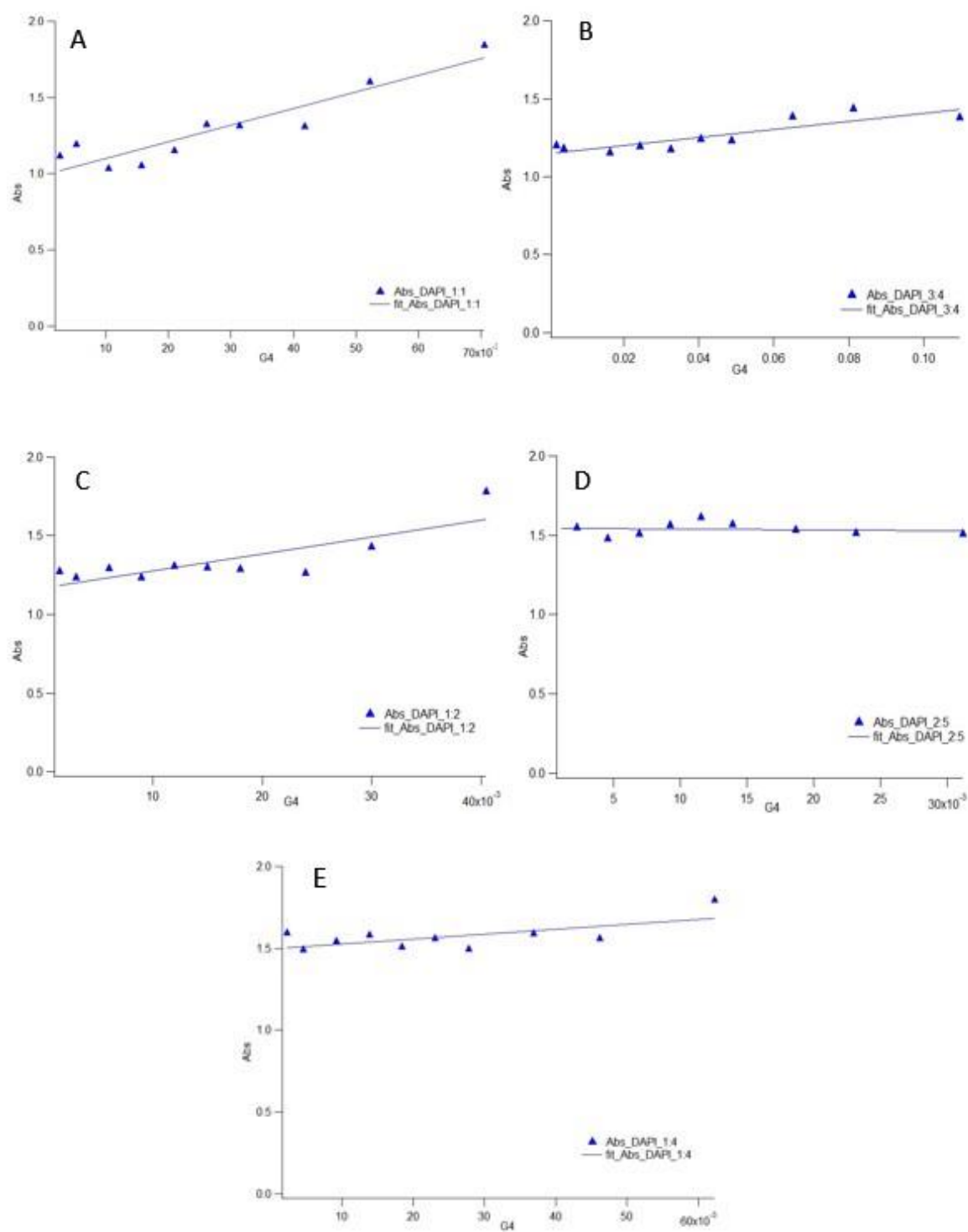


Fig. 3.4 Andamento dell'assorbanza nei gel con il DAPI.

## ▪ FITC

Nel caso della FITC-Destrano, supposto da principio che la molecola non si leghi ai quadruplessi come la THT e il DAPI, è stata fatta un'analisi di prova su tre dei cinque rapporti G/ GMPK<sup>+</sup>, in particolare sul 1:1, 1:2 e 1:4.

In questo caso, a differenza delle misure eseguite sugli altri due probes, non si evidenzia Red Shift perché assorbono tutti alla stessa lunghezza d'onda.

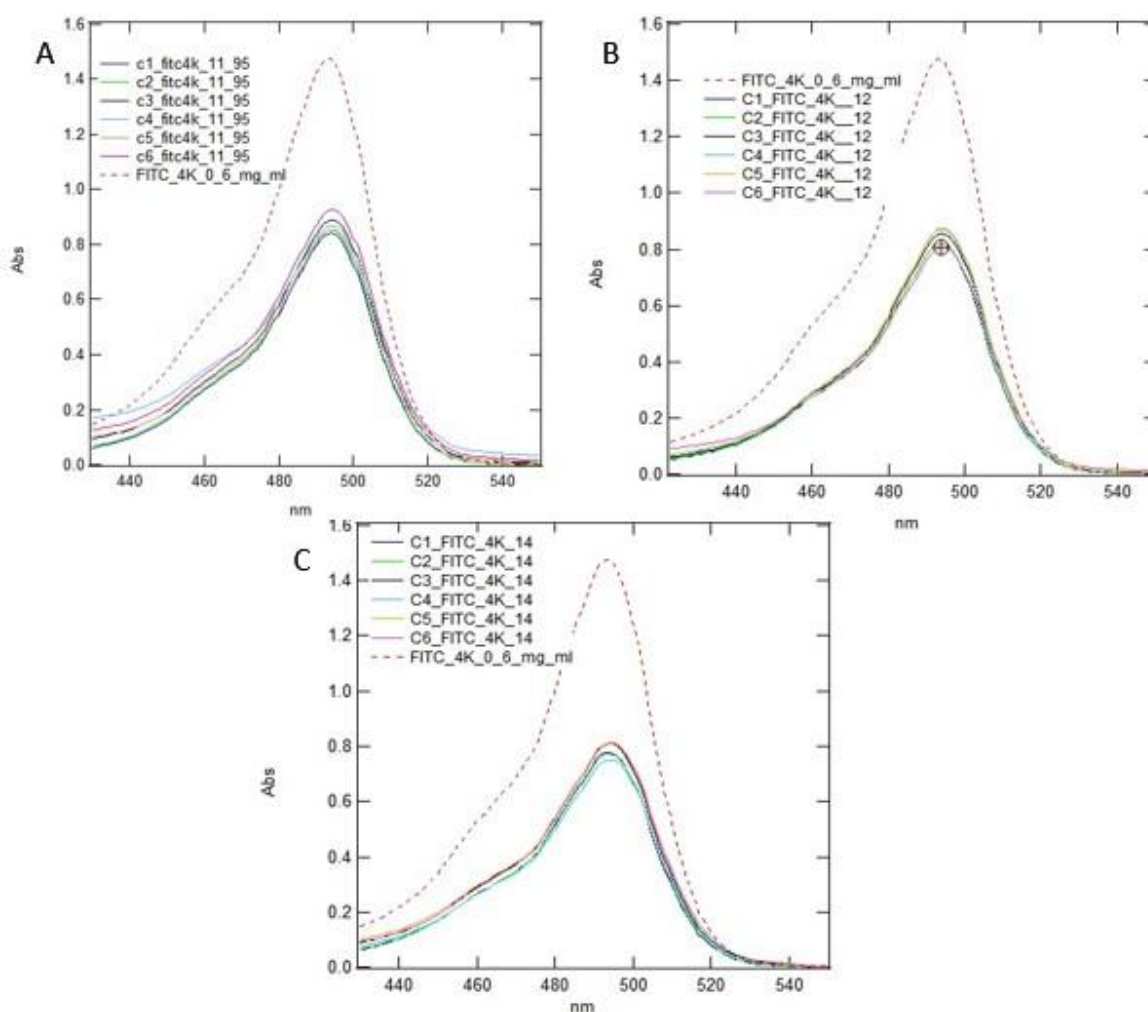


Fig. 3.5 Spettri di assorbimento dei Gel con la FITC-Destrano 4kDa. (A) gel 1:1+4kDa; (B) gel 1:2+4kDa; (C) gel 1:4+4kDa

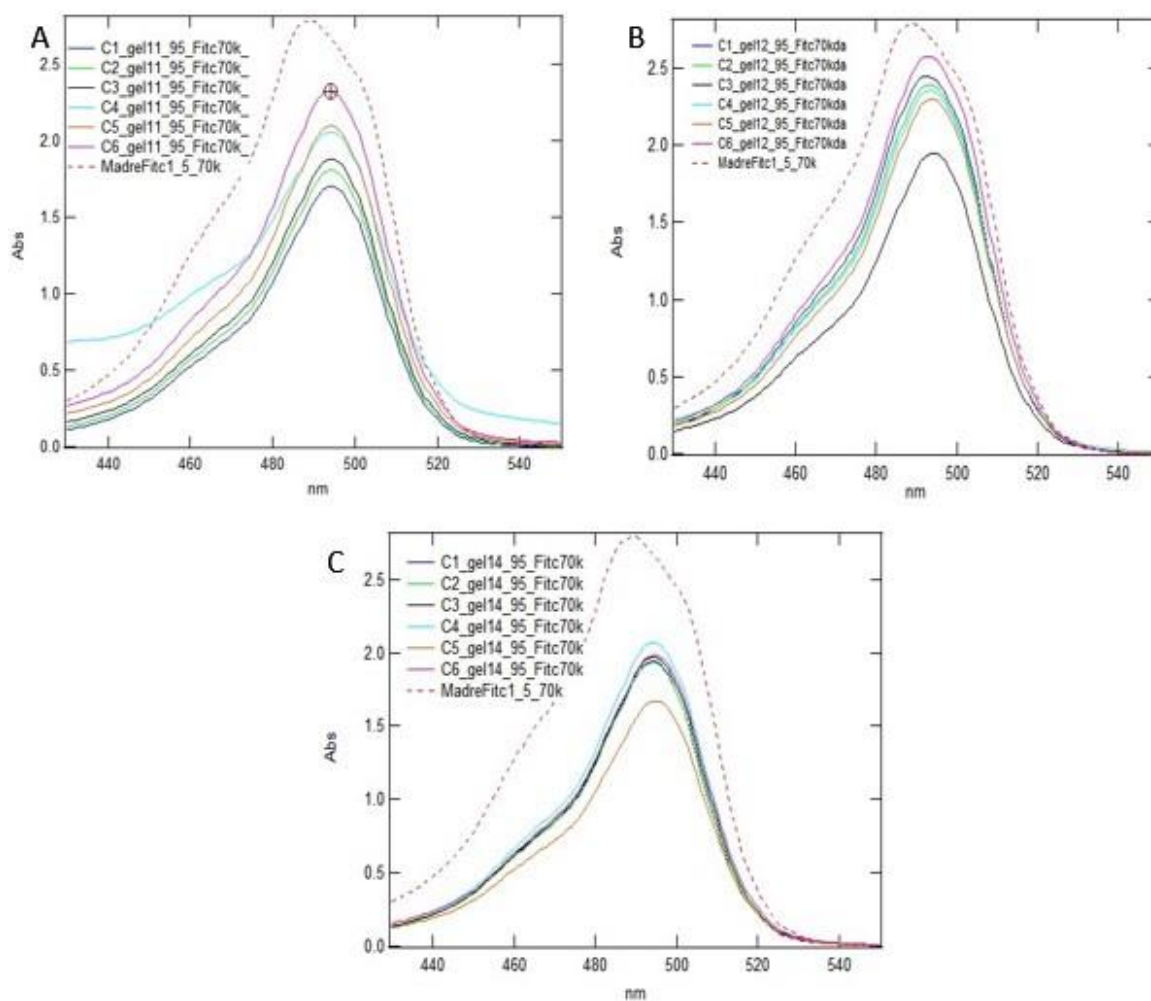


Fig. 3.5.2 Spettri di assorbimento dei Gel con la FITC-Destrano 70kDa. (A) gel 1:1704kDa; (B) gel 1:2+70kDa; (C) gel 1:4+70kDa

Anche nel caso della FITC il massimo di assorbimento non aumenta o diminuisce ma fluttua, infatti, facendo un fit lineare tra tutti i picchi, si può osservare come l'assorbanza rimanga tendenzialmente stabile o, al più, aumenti leggermente, come mostrato in figura 3.6.



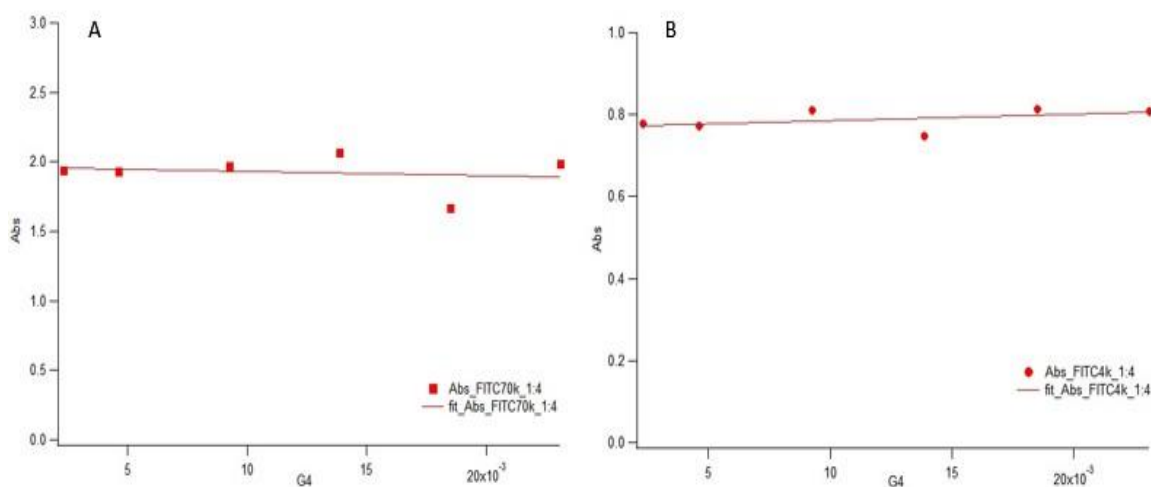


Fig. 3.6 Andamento dell'assorbanza nei gel con FITC 4 e 70kDa

Dalle curve di assorbimento e dai fit lineari appena visti, è possibile evidenziare un differente comportamento dei tre coloranti, legato evidentemente al diverso tipo di interazione che avviene: il red shift si osserva solo nelle curve degli idrogel trattati con la THT e il DAPI ed è sinonimo del fatto che i probes si legano effettivamente ai quartetti di guanosine, anche se in modo diverso. Infatti, mentre la THT sembra interagire intercalandosi tra G-quartets per  $\pi$ -stacking (come evidenziato proprio dal red shift), il DAPI interagisce prevalentemente con la superficie esterna dei quadruplessi tramite interazioni di tipo elettrostatico (cui è dovuto l'incremento dell'assorbanza), e in minima parte intercalandosi (dato comunque l'accenno di spostamento della lunghezza d'onda evidenziato in tutte le curve).

La FITC-Destrano, invece, non mostra red shift ma solo piccole variazioni nell'assorbanza: questo fenomeno è probabilmente dovuto al fatto che i probe (sia 4kDa che 70kDa) non si legano ai quartetti che compongono il gel.



Si è quindi passati a calcolare le costanti di legame (K) della THT e del DAPI, mentre la FITC-Destrano è stata momentaneamente scartata poiché non si lega alle guanosine.

La procedura è stata eseguita nel seguente modo:

- Dapprima a ogni curva dei campioni C1-C10 è stato sottratto un offset, in modo tale da portare a zero la parte piatta della curva; sono stati poi salvati tutti i valori dei picchi di assorbanza e a questi è stato sottratto il relativo offset, per avere una stima corretta del picco di assorbimento di ogni campione.
- Tutti i valori di assorbanza così ricavati sono stati salvati su un file Excel, compresa l'assorbanza della madre di colorante; nello stesso file sono stati riportati i valori precedentemente descritti come [G4], ossia la concentrazione dei quartetti nell'idrogel.
- È stata calcolata, per ogni campione, la y dell'equazione descritta nel capitolo 2 (*Aslanoglu M.*):

$$y = \frac{[G + GMPK^+]/4}{(\varepsilon_A - \varepsilon_f)}$$

Ogni y è stata quindi plottata su IgorPro insieme alla x, che in questo caso è rappresentata proprio dalla concentrazione di [G4] di ogni campione.

Sono stati ottenuti così tutti i grafici di tutti i set di campioni C1-C10 relativi ai vari rapporti  $G/GMPK^+$ , in cui ogni punto rappresenta un campione; questo è stato fatto esattamente allo stesso modo sia per i gel trattati con il DAPI che per quelli con la THT.

A questo punto, per ogni grafico, è stato fatto un fit lineare, ottenendo una retta (di equazione  $y=a+bx$ ) con i relativi valori di a e b (intercetta e pendenza).

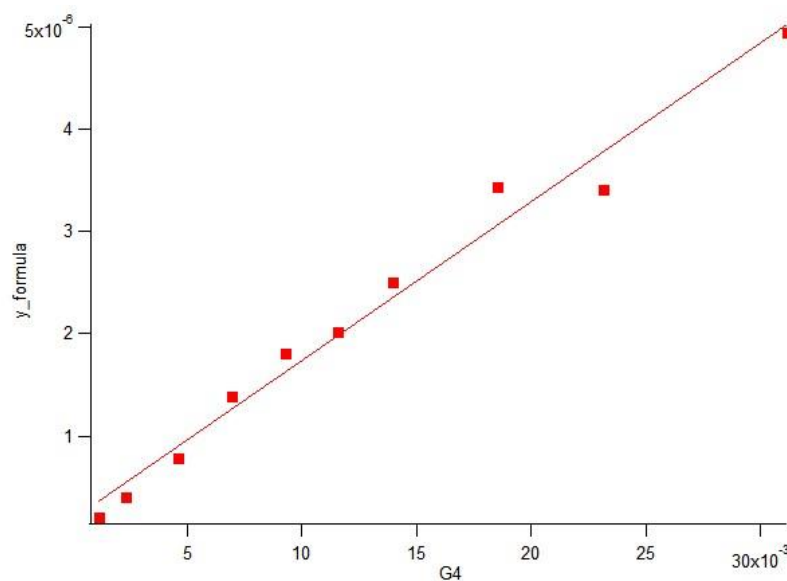


Fig. 3.7 Fit delle  $[G4]$  dei campioni titolati C1-C10

La costante di legame dei campioni C1-C10 dei vari rapporti molari è stata calcolata come il rapporto tra la pendenza e l'intercetta:

$$K = \frac{b}{a}$$

Tutti i valori delle  $K$  relative a ogni rapporto molare sono stati plottati in un unico grafico: quello mostrato di seguito è una rappresentazione dell'andamento delle costanti di legame di entrambi i coloranti in relazione al rapporto  $G/GMPK^+$ .

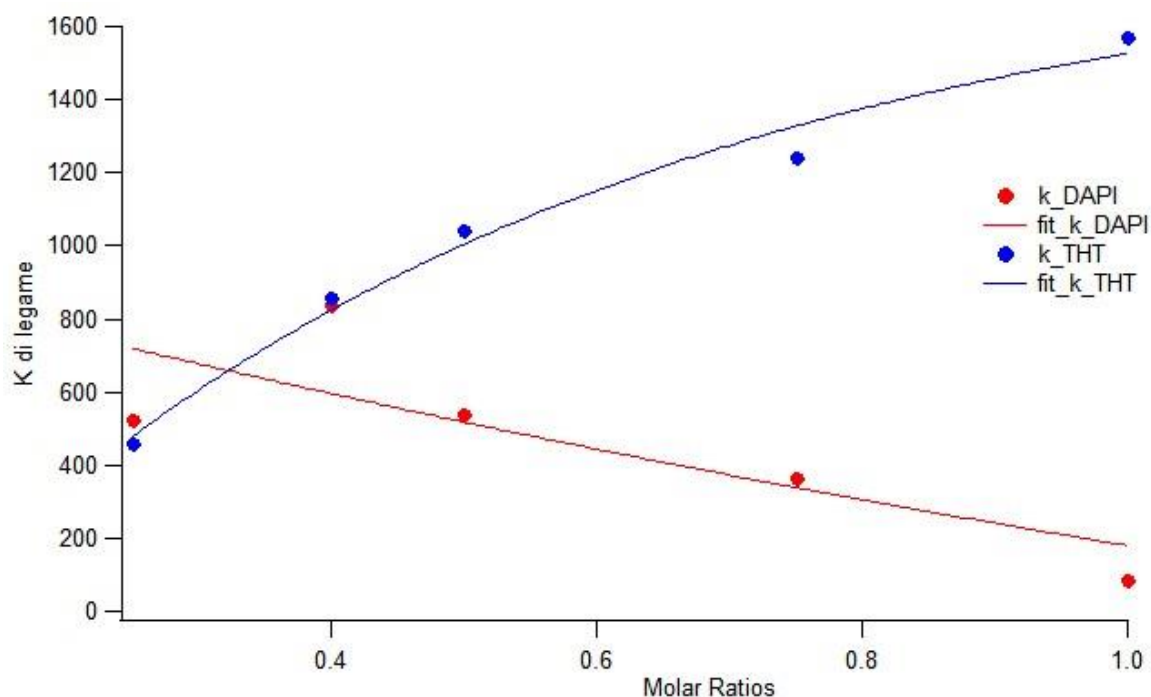


Fig. 3.8 Curve delle costanti di legame K della THT e del DAPI

Come si può notare dal grafico in figura 3.8, i due coloranti presentano una curva con andamento diverso:

- La K nei campioni trattati con la THT tende ad aumentare al diminuire del rapporto G/GMPK<sup>+</sup>: nel gel 1:4, che si presenta più liquido rispetto agli altri per via di una maggior repulsione tra quadruplessi dovuta alle cariche negative della GMPK<sup>+</sup>, la K di legame è più bassa; nell'idrogel 1:1, che invece è il più viscoso, la carica negativa complessiva è minore e i quadruplessi più vicini tra loro, la K di legame è più alta. Relativamente alla carica complessiva, si può notare come la THT sembri avere affinità crescente per gli idrogel man mano che questi perdono carica negativa. Questo è dovuto probabilmente al fatto che, meno l'idrogel è carico, più la Tioflavina T riesce ad intercalarsi tra i quartetti di guanosine.

- Il DAPI mostra un andamento diametralmente opposto: si notano valori di K più alti per i gel più carichi negativamente e fluidi, quale il gel 1:4, e più bassi per i gel meno carichi e viscosi come il campione 1:1. Questo si osserva perché il DAPI presenta due cariche positive, per cui si lega maggiormente al gel più carico negativamente (1:4 appunto) per interazione elettrostatica.

In un secondo momento sono state eseguite delle letture di assorbanza in funzione della temperatura dei campioni di gel (non titolato).

Dei cinque idrogel G/GMPK<sup>+</sup> sono stati scelti i tre più indicativi, 1:1, 1:2 e 1:4, e di questi ne è stata misurata l'assorbanza all'aumentare della temperatura: per ogni idrogel, si è partiti con una prima lettura a 25°C, poi la temperatura è stata aumentata di volta in volta di 5°C con l'ausilio di un bagnetto termostato collegato direttamente allo strumento, fino ad arrivare a 80°C. La stessa operazione è stata eseguita sia per gli idrogel con il DAPI che per quelli con la THT. I risultati mostrano anche in questo caso andamenti differenti tra i due coloranti.

- Nei gel con la THT l'assorbanza diminuisce all'aumentare della temperatura, in maniera più netta per il campione 1:1, per cui ha più affinità. Allo stesso modo, nei tre idrogel si osserva un abbassamento della lunghezza d'onda di assorbimento.

Il comportamento della THT si può facilmente spiegare pensando alla sua tendenza ad intercalarsi fra G-quartets: quando si aumenta la temperatura i cilindri di guanosine vengono progressivamente degradati e la THT viene liberata nel mezzo; non essendo più intercalata, l'assorbanza diminuisce, così come la lunghezza d'onda (fig.3.9).

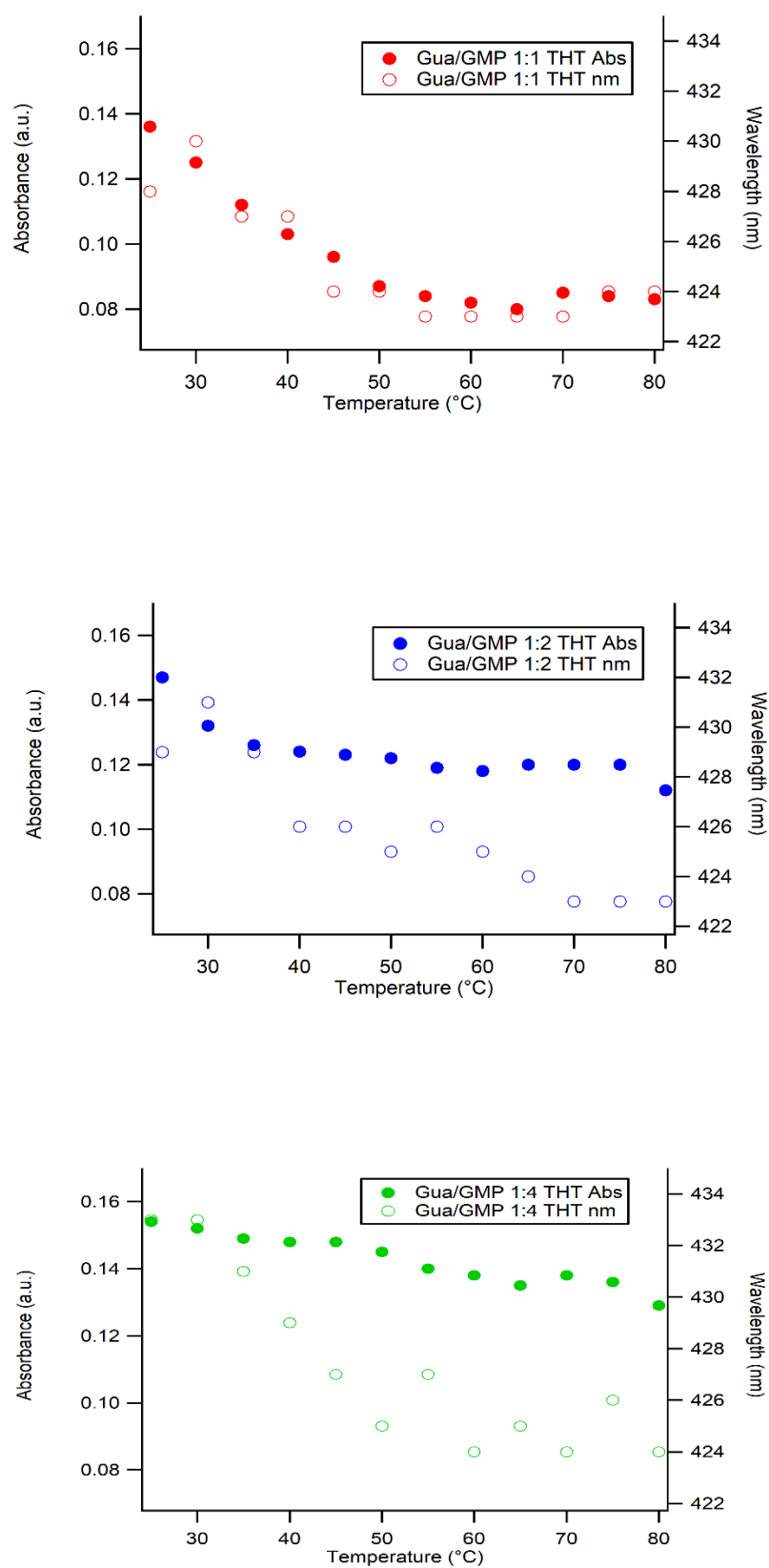


Fig. 3.9 Curve di assorbimento a temperatura dei gel con la THT.

- Nel caso dei gel trattati con il DAPI si osserva qualcosa di più peculiare. All'aumentare della temperatura, la lunghezza d'onda diminuisce: come visto già per la THT, questo fenomeno potrebbe essere legato al fatto che parte del DAPI si intercala ai G-quartets, per cui si nota uno spostamento della lunghezza d'onda verso il blu man mano che il sistema si degrada in seguito a riscaldamento, quando la sonda passa in soluzione. Tuttavia, l'aumento dell'assorbanza suggerisce che l'interazione del DAPI con il solco laterale possa preservarsi anche su piccoli frammenti di quadruplessi o su aggregati non specifici di G/GMPK<sup>+</sup> probabilmente presenti a più alta temperatura. Tenuto conto della grande affinità del DAPI per il gel 1:4 (dove cioè la costante di legame è la più alta), il grande aumento di assorbanza osservato in funzione della temperatura in questo gel (fig.3.10) sembra avvalorare questa ipotesi.

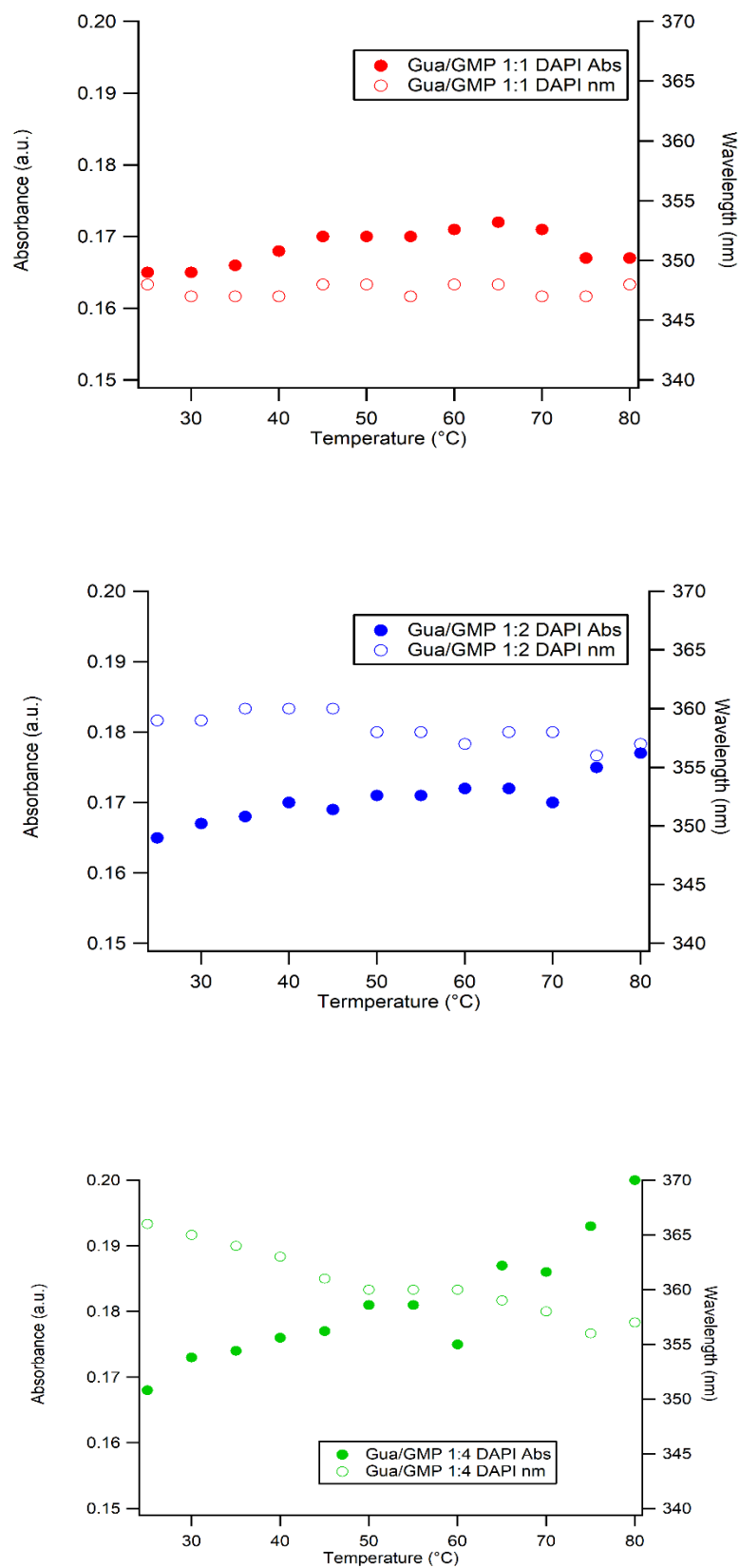


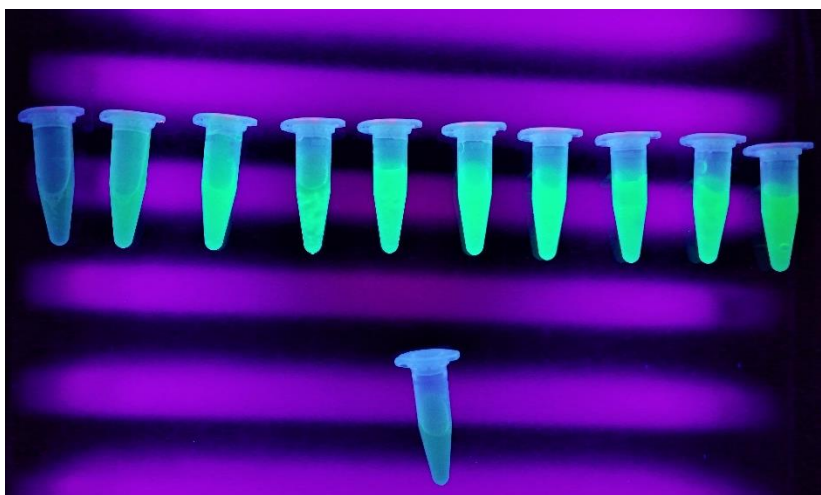
Fig. 3.10 Curve di assorbimento a temperatura dei gel con il DAPI.

### 3.2 Fluorescenza

Per provare quanto affermato sopra, sono state eseguite delle misure di fluorescenza sui gel con THT e DAPI.

Le analisi sono state condotte su campioni di idrogel 1:1, 1:2 e 1:4 al 95% di acqua, che sono stati titolati come spiegato precedentemente per ottenere le serie C1-C10, e hanno evidenziato che:

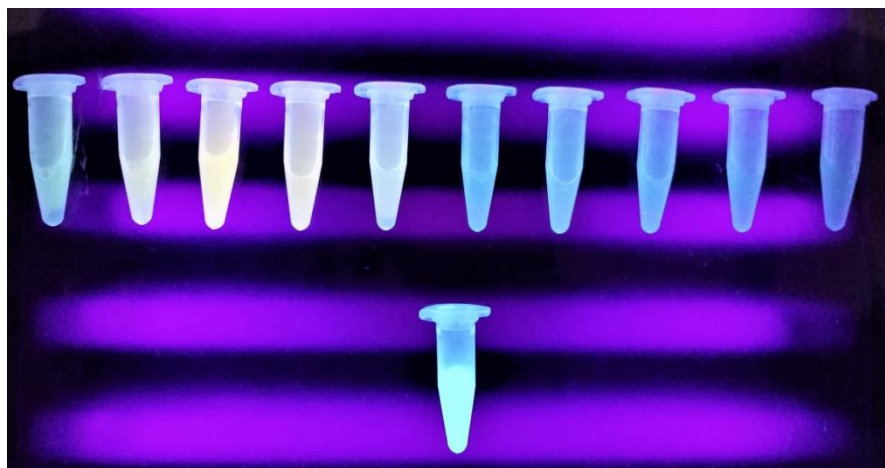
- Nel caso della THT, la figura 3.11 scattata al transilluminatore mostra che la fluorescenza dei campioni aumenta all'aumentare della concentrazione di guanosine nell'idrogel, quindi passando da C1 a C10 l'intensità di fluorescenza cresce. Nella madre di THT (riportata in basso nella figura), si può notare come la fluorescenza emessa sia estremamente bassa: questo è dovuto al fatto che la sonda in soluzione acquosa presenta libera rotazione del legame C-C dell'anello benzotiazolico rispetto all'anello aminobenzenico; quando la molecola si intercala ai quartetti la rotazione viene impedita e la molecola emette fluorescenza.



*Fig. 3.11 Fluorescenza dei campioni (da sinistra a destra) C1-C10 + THT. in basso la madre di THT*



- Il contrario avviene per il DAPI, dove l'intensità di fluorescenza diminuisce all'aumentare della concentrazione delle guanosine nel gel. È infatti possibile notare quanto detto precedentemente, cioè che la madre di DAPI emette fluorescenza più alta perché in soluzione acquosa, mentre il legame con i quadruplessi ne diminuisce l'intensità.



*Fig. 3.12 Fluorescenza dei campioni (da sinistra a destra) C1-C10 + DAPI. In basso è la madre di DAPI*

Nel grafico è riportato un esempio dell'andamento della fluorescenza dei gel con i due coloranti, che rispecchia quanto visto nelle immagini al transilluminatore, con l'intensità di fluorescenza del DAPI che diminuisce drasticamente e quella della THT che aumenta; l'andamento è lo stesso per gli altri rapporti molari.

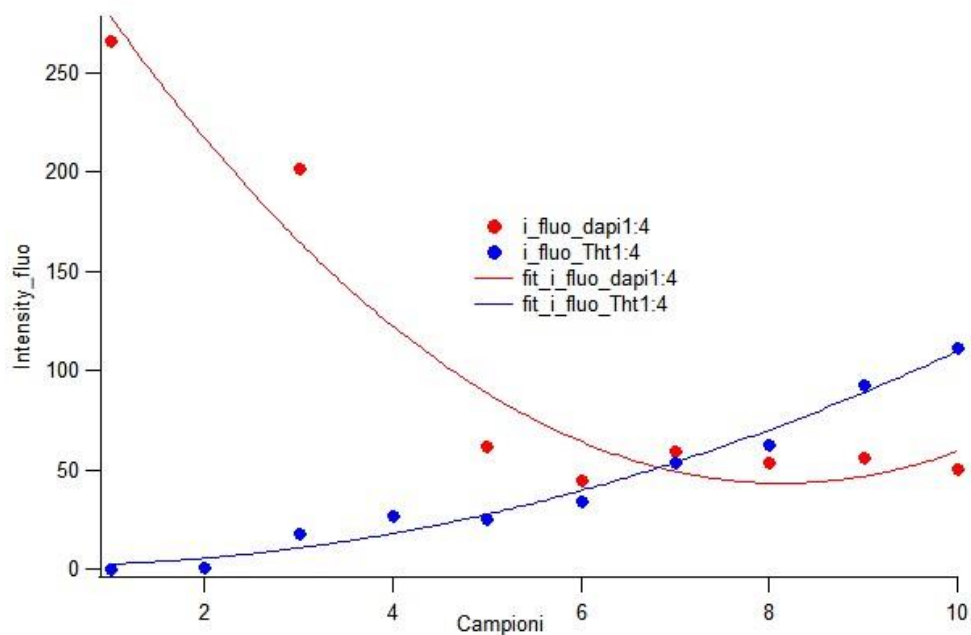


Fig. 3.13 Confronto tra le curve di fluorescenza dei campioni C1-C10 con la THT e il DAPI

Allo stesso modo, sono state eseguite delle misure di fluorescenza a temperatura degli idrogel 1:1, 1:2 e 1:4 al 95% di acqua colorati con il DAPI e la THT, stavolta non titolati.

Le letture, come per le misure di assorbanza, sono state condotte incrementando la temperatura da 25°C a 80°C a intervalli di 5°C; inoltre le misure sono state eseguite tentando con le split permesse dallo strumento, cioè diverse aperture della finestra da cui passa la radiazione eccitante, per trovare quale fosse la migliore 2.5, 5 e 10. Quella che dava risultati migliori è stata la 2.5 (fig.3.14).

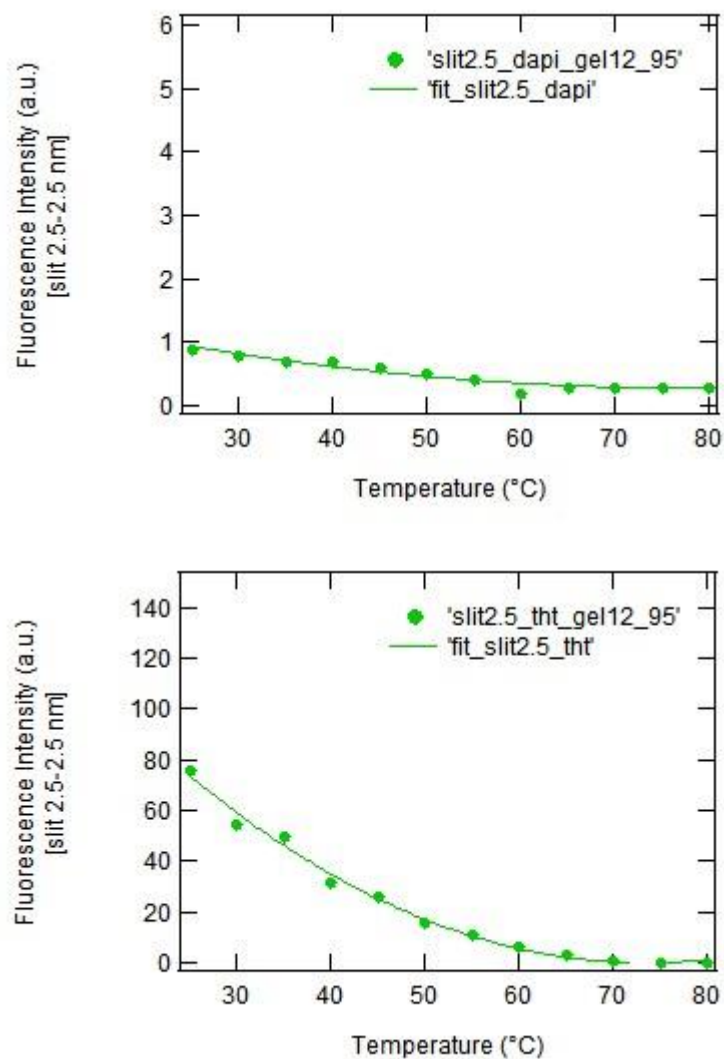


Fig. 3.14 Curve di fluorescenza a temperatura. Sopra il DAPI, sotto la THT

- L'intensità di fluorescenza della THT diminuisce all'aumentare della temperatura. Come citato precedentemente, la THT in soluzione acquosa non emette fluorescenza mentre, quando viene aggiunta all'idrogel e si intercala fra G-quartets, la sua fluorescenza aumenta; per cui, quando all'aumentare della temperatura l'idrogel si denatura e torna in fase liquida, si osserva un progressivo abbassamento della fluorescenza perché i quartetti si denaturano e viene liberata THT.

- Nel caso dei gel con il DAPI la diminuzione dell'intensità di fluorescenza può essere spiegata facendo riferimento a quanto detto per letture di assorbanza a temperatura, cioè che il colorante sembra essere in grado di interagire non solo con il solco esterno dei quadruplessi, ma anche con aggregati non specifici di G/GMPK<sup>+</sup> o con frammenti più piccoli che si formano quando il network si denatura in seguito all'incremento della temperatura.

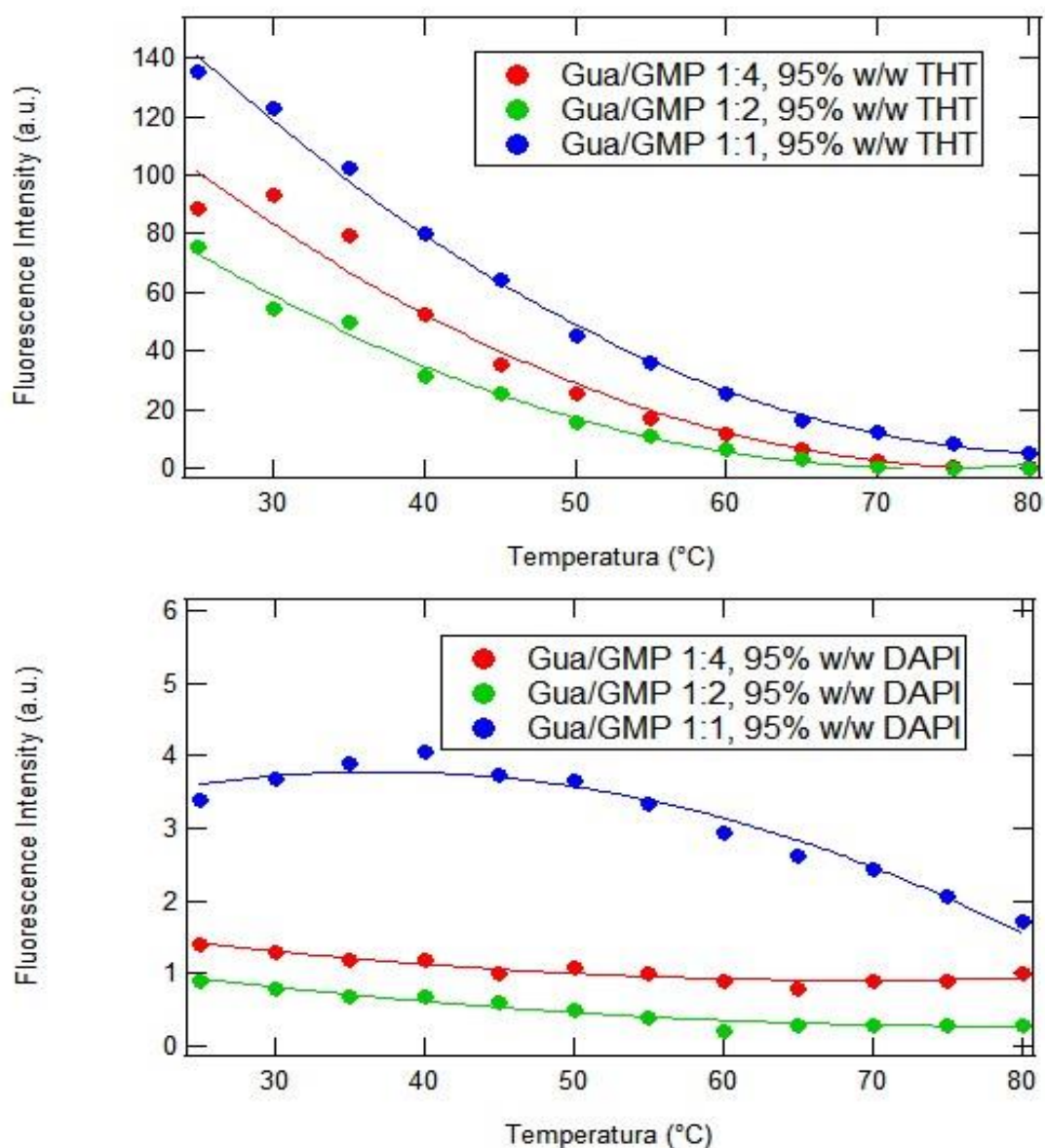


Fig. 3.15 Confronto tra curve di fluorescenza a temperatura dei gel con la THT e il DAPI

### ***3.3 Diffusione dei coloranti nel gel***

Proseguendo lo studio sull'applicabilità degli idrogel di guanosine come carrier per il drug delivery, sono state eseguite due diverse tecniche per ottenere una stima della diffusione dei coloranti nel gel: una misura prevedeva di monitorare la fluorescenza dei campioni nel tempo man mano che il colorante diffondeva nell'idrogel, l'altra misura è stata effettuata mediante la tecnica definita FRAP. Questi studi sono stati fondamentali poiché l'utilizzo di questi coloranti e l'analisi del loro comportamento quando all'interno del network di guanosine, apre a strada a future sperimentazioni con molecole chemioterapiche.

#### ***3.3.1 Diffusione verticale***

Come spiegato nel capitolo precedente, questa fase dello studio è stata condotta su tre dei cinque rapporti G/GMPK<sup>+</sup>, in particolare 1:1, 1:2 e 1:4 al 95% w/w, ed è stata eseguita allo stesso modo per THT, DAPI, FITC 4kDa e 70kDa.

Sono state preparate diverse eppendorf contenenti 250 µl dei seguenti idrogel:

- Idrogel 1:1, 1:2, 1:4 + THT
- Idrogel 1:1, 1:2, 1:4 + DAPI
- Idrogel 1:1, 1:2, 1:4 + FITC 4kDa
- Idrogel 1:1, 1:2, 1:4 + FITC 70kDa

Su ognuno dei quattro set di campioni sono stati aggiunti con una micropipetta 250µl di soluzione madre di colorante, avendo cura di mantenere le eppendorf dritte, per evitare che gel e madre si mescolassero e falsassero la misura.

È stata eseguita immediatamente una lettura di fluorescenza allo spettrofotometro sia con lunghezza d'onda di eccitazione nel blu che nell'UV (quella UV è risultata essere la più adatta), quindi una misura al tempo zero, in particolare ogni misura è stata ripetuta tre volte consecutive e ne è stata fatta una media; delle stesse eppendorf è stata poi eseguita una valutazione qualitativa della fluorescenza al transilluminatore.

Le due misure sono state eseguite, allo stesso modo per tutti i campioni, a tempi diversi, al tempo 0, dopo 2, 4 e 6 ore, poi ogni 24 ore per una settimana.

- Nel caso della THT si nota un rapido aumento della fluorescenza nel tempo: all'inizio l'intensità della fluorescenza emessa è bassa, poi, man mano che il colorante diffonde verticalmente attraverso le maglie del gel, la fluorescenza emessa cresce e arriva a plateau.

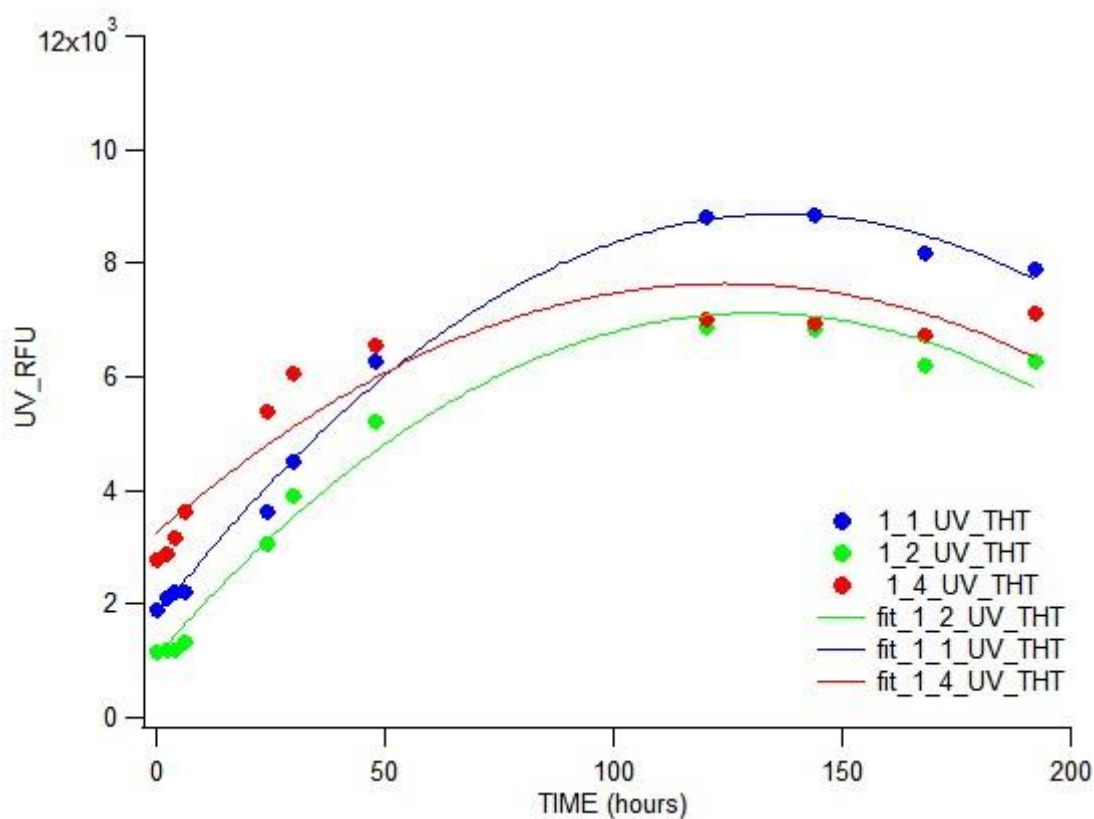
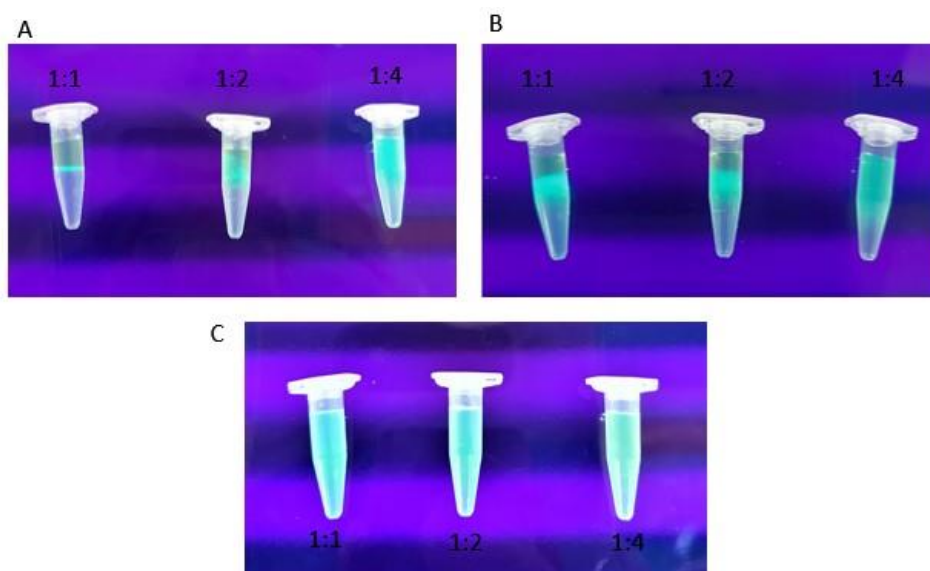


Fig. 3.16 Andamento della diffusione verticale dei gel con la THT

Le immagini in figura 3.17 rappresentano i tre idrogel, 1:1, 1:2 e 1:4 con la THT al tempo zero, dopo sei ore e alla fine dell'analisi, a 195 ore. È evidente che la fluorescenza aumenta nel tempo, parallelamente alla diffusione del colorante.

Si può notare che: al tempo 0 la fluorescenza nel gel 1:1 si evidenzia solo all'interfaccia acqua-gel, per poi aumentare notevolmente non appena il colorante inizia a diffondere. Nel gel 1:4 la fluorescenza è subito evidente perché, essendo l'idrogel più liquido, le due fasi si sono mescolate non appena il colorante è stato posto sul gel. Si nota comunque l'aumento di fluorescenza tra la prima misura e l'ultima a 195 ore.



*Fig. 3.17 Fluorescenza dei gel 1:1, 1:2 e 1:4 con la THT; (A) fluorescenza al tempo zero  $t_0$ ; (B) fluorescenza dopo 6 ore; (C) fluorescenza dopo 195 ore*

- Il DAPI diffonde con velocità simile all'interno del gel, tuttavia è ben evidente che la fluorescenza impieghi più tempo per raggiungere un plateau; inoltre sono osservabili andamenti più diversificati nei tre idrogel rispetto a quelli visti per la THT, soprattutto tra il gel 1:1 e 1:4, questo perché il DAPI risente molto del rapporto molare dell'idrogel (fig.3.18).

Non è stato però possibile monitorare la fluorescenza per tempi più lunghi perché il colorante è fotosensibile, quindi la continua esposizione alla luce e agli UV utilizzati per le misure lo danneggia.

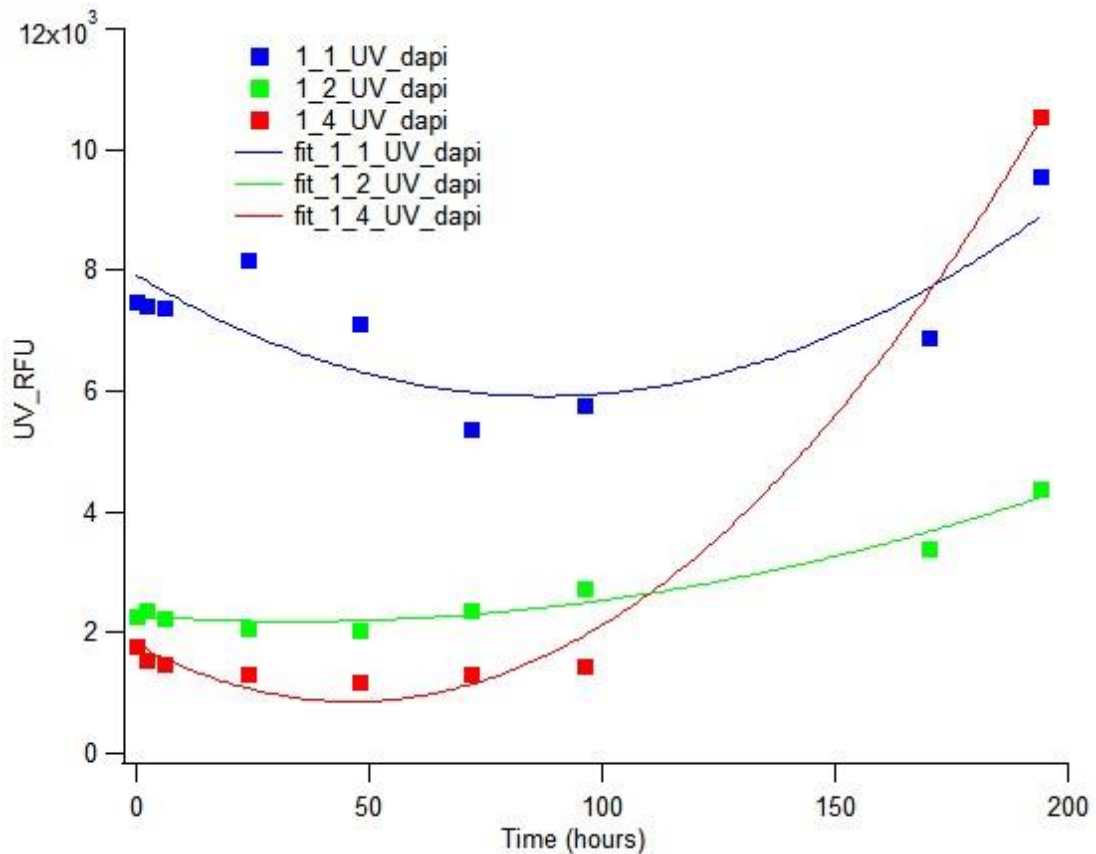
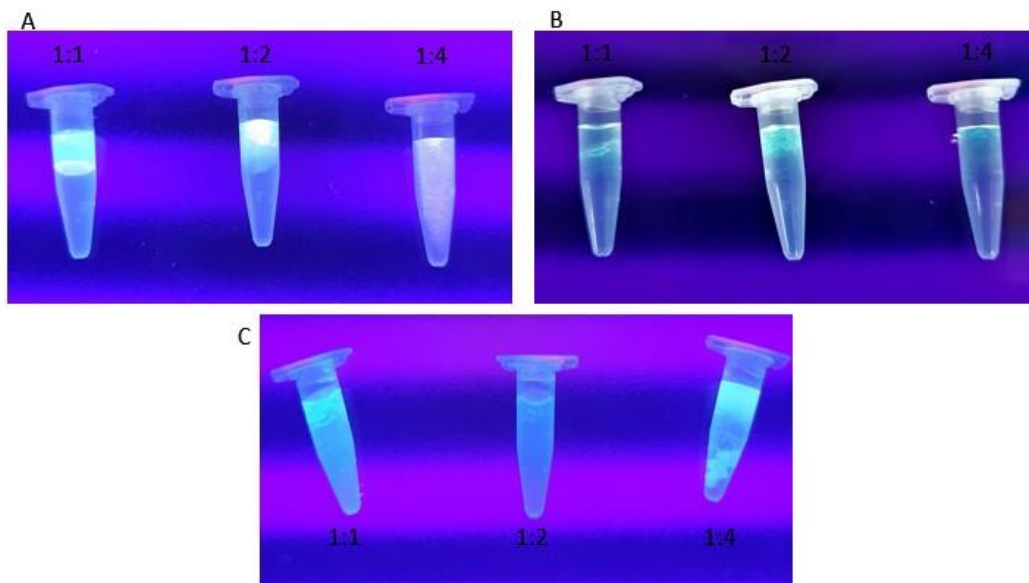


Fig. 3.18 Andamento della diffusione verticale nei gel con il DAPI

Nella figura 3.19 si possono osservare i tre gel 1:1, 1:2 e 1:4 al tempo zero, dopo 6 ore e dopo 195 ore. Si nota una più elevata fluorescenza all'inizio dell'analisi, quando il DAPI è ancora interamente in soluzione acquosa, e la formazione di aggregati opachi nell'idrogel, dati probabilmente dalla formazione di precipitati.





*Fig. 3.19 Fluorescenza dei gel 1:1, 1:2 e 1:4 con il DAPI; (A) fluorescenza al tempo zero t0; (B) fluorescenza dopo 6 ore; (C) fluorescenza dopo 195 ore*

- Nel caso della FITC-Destrano, le molecole 4kDa e 70kDa hanno comportamento diverso in funzione della differente dimensione delle molecole: la FITC 70kDa diffonde lentamente all'interno delle maglie dell'idrogel e, parallelamente, la fluorescenza impiega tempi più lunghi di quelli considerati nell'esperimento per arrivare a un massimo. La FITC 4kDa, in virtù delle ridotte dimensioni, diffonde rapidamente e la fluorescenza arriva a plateau in tempi più brevi (fig.3.20).

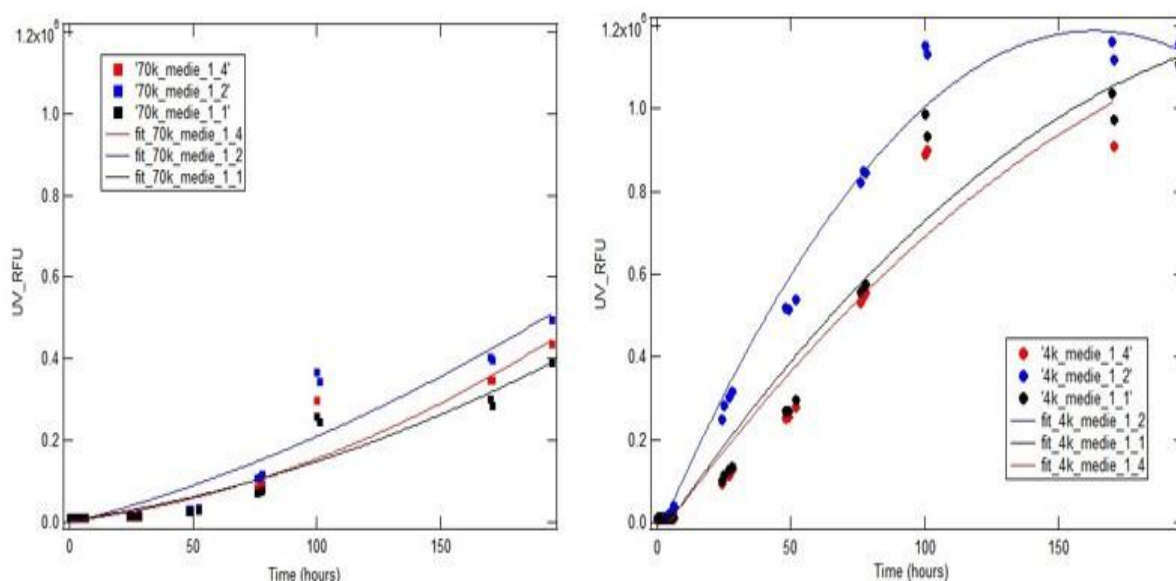


Fig. 3.20 andamento della fluorescenza dei gel trattati (a destra) con FITC 70kDa, (a sinistra) 4kDa

Le immagini al transilluminatore in figura 3.21 mostrano che, dopo 195 ore, la FITC 4kDa è arrivata a diffondere in tutto il gel, mentre la 70kDa si trova ancora prevalentemente nella parte alta dell'eppendorf, perché le sue dimensioni le impediscono di attraversare il network di quadruplessi.

Si nota inoltre come l'intensità della fluorescenza delle due molecole nei tre gel sia pressoché la stessa, non è quindi influenzata dall'interazione con le guanosine (il che conferma quanto detto precedentemente, cioè che la FITC non lega le guanosine e che la fluorescenza emessa dal probe è indipendente, almeno in questo caso, dalla presenza dei G-quadruplexes nel mezzo).

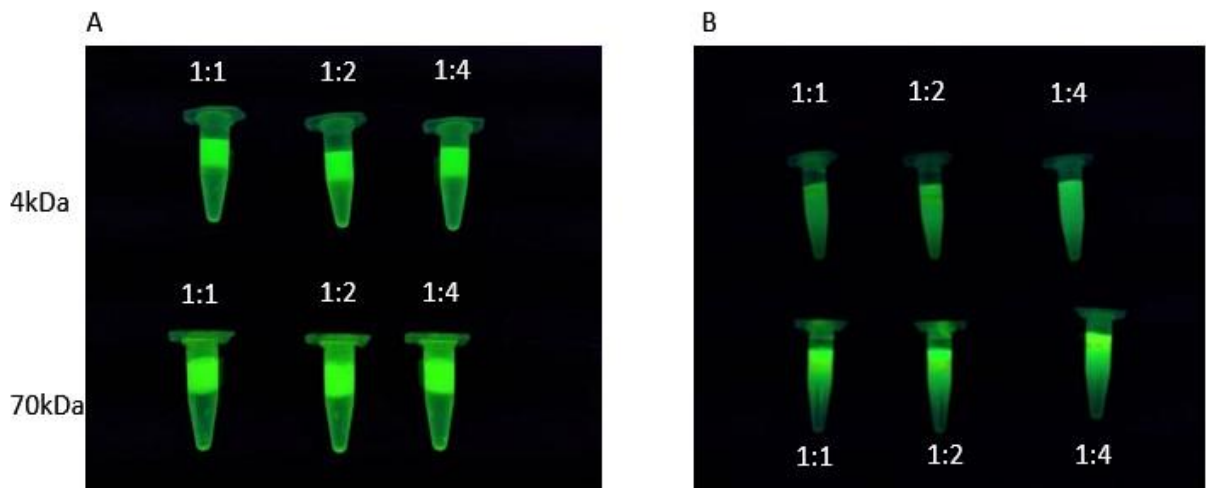


Fig. 3.21 Fluorescenza dei gel 1:1, 1:2 e 1:4 con la FITC 4kDa e 70kDa; (A) fluorescenza al tempo zero  $t_0$ ; (B) fluorescenza dopo 6 ore; (C) fluorescenza dopo 195 ore

### 3.3.2 FRAP

È stata proseguita l'analisi della diffusione dei coloranti nel gel facendo ricorso a una tecnica più potente, la FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching).

Le misure di FRAP sono state eseguite, per completezza, alle tre percentuali di acqua viste nei capitoli precedenti.

In particolare, sono stati analizzati campioni di gel 1:1, 1:2 e 1:4, tutti e tre al 90, 95 e 98% di acqua, trattati con la FITC-Destrano 4kDa, 10kDa, 20kDa e 70kDa, con la THT e con il DAPI. Come spiegato nel capitolo 2, i campioni sono stati preparati miscelando  $\text{GMPK}^+$ , Gua e la madre di colorante in specifiche quantità, a seconda della percentuale di acqua considerata (non viene utilizzata acqua pura per la preparazione, ma direttamente le madri di colorante).

La FRAP ha permesso di misurare quantitativamente i coefficienti di diffusione dei coloranti nel gel, quindi di capire come la struttura del probe e

la sua interazione con i quadruplessi incida sulla velocità con cui esso diffonde.

Sono state dapprima eseguite le misure utilizzando la FITC-Destrano: la FITC è il probe fluorescente più utilizzato per la FRAP, nel caso di questa tesi è stato utilizzato coniugata al destrano, per ottenere quattro molecole di dimensioni diverse in base al numero di residui di destrano.

Le misure sono state eseguite tutte allo stesso modo: come spiegato nel capitolo 2, è stato dapprima preparato un vetrino su cui è stata posta una goccia di gel con il colorante e, sopra il campione, è stato adagiato un vetrino copri oggetto. Il vetrino così composto è stato disposto capovolto sul portaoggetti del microscopio confocale.

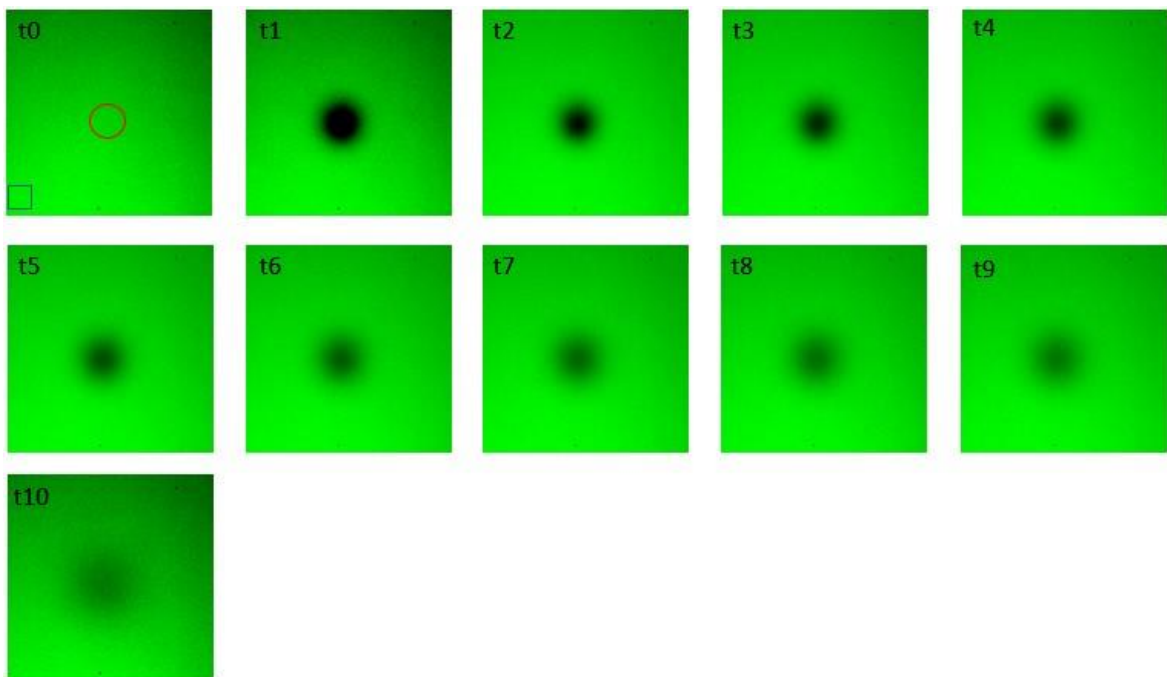
Una volta messa a fuoco un'area uniforme del campione tramite l'oculare, è stata accesa la prima lampada, che emette a 488nm.

In particolare, la procedura eseguita è la seguente:

- Appena messo a fuoco con l'oculare, il campione ha un aspetto uniforme, la fluorescenza è diffusa su tutto il riquadro dell'immagine acquisita dal confocale.
- Si impongono sull'immagine due ROI (Region Of Interest): una di stimolazione (S-ROI), in cui si fa avvenire il bleaching e di cui viene fissato il raggio (25micron), e una di riferimento (R-ROI), utilizzata per confrontarne la fluorescenza.
- A questo punto, impostati i tempi di acquisizione delle immagini, quindi la durata in secondi del tempo che intercorre tra avvio della misura e bleaching, la durata in secondi del bleaching e il tempo di recupero della fluorescenza, fissata inoltre la larghezza del pinhole a circa 2 AU (questo valore corrisponde a 34.5 micron per il laser con lunghezza d'onda 488nm), si avvia la FRAP.

- Nei primi secondi l'immagine continua ad avere una fluorescenza uniforme, nel momento del bleaching, quando viene accesa la seconda lampada che emette a 405 nm, si crea uno spot nero nel punto esatto in cui è stata posta la S-ROI di stimolazione; questo fenomeno è dovuto alla degradazione fotochimica delle sonde, che smettono di emettere fluorescenza.
- Durante il tempo di recupero, quando viene riaccesa la lampada a 488nm, si osserva un progressivo aumento della fluorescenza a livello dello spot, dovuto alla diffusione laterale delle molecole fluorescenti integre.

Nelle immagini in figura 3.22 sono riportate delle istantanee dei vari momenti della FRAP relativi a un campione di FITC-Destrano, come appena descritto.



*Fig. 3.22 Fasi della FRAP. (t0) momento che precede il bleaching; (t1) bleaching, si osserva lo spot nero in corrispondenza della S-ROI; (da t2 a t10) tempo di recupero*

Al termine della misura di FRAP si ottengono due grafici: il Time Measurement e l'Intensity Profile, su cui si eseguono tutte le analisi successive e da cui si ricava il valore del coefficiente di diffusione del colorante.

- Il grafico di *Time Measurement (TM)*: rappresenta l'andamento della fluorescenza in funzione del tempo (prima, durante e dopo il photobleaching).

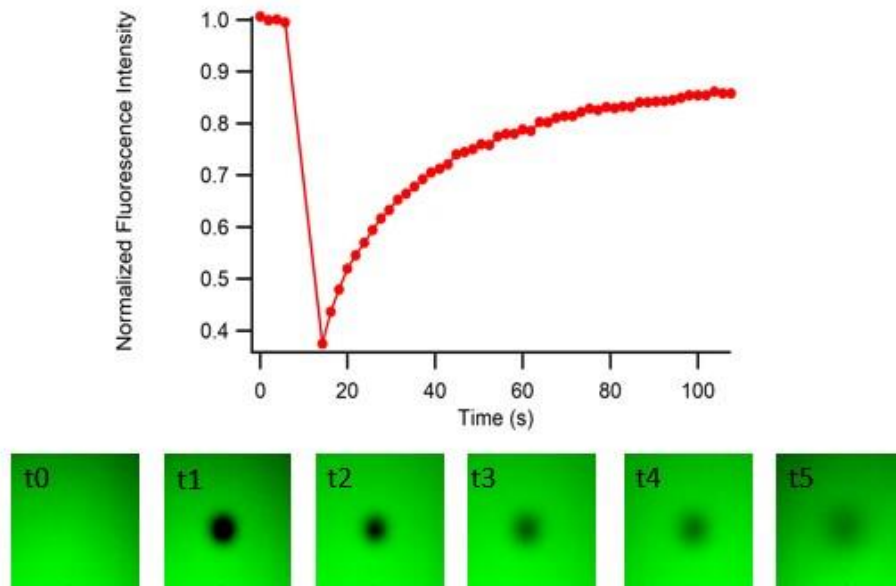


Fig. 3.23 Grafico di Time Measurement sopra, foto del campione corrispondenti sotto.

È possibile osservare che nei primi secondi dell'acquisizione (sono stati impostati in particolare 4s) la curva è piatta perché la fluorescenza è uniforme; poi, nel momento esatto in cui avviene il bleaching, la curva scende istantaneamente ad un valore prossimo allo zero a causa della formazione dello spot nero in cui le molecole non emettono fluorescenza, per poi risalire non appena le molecole iniziano a diffondere lateralmente.

Un valore importante che si può ricavare da questa misura è il  $\tau_{1/2}$ , ossia il tempo in cui si raggiunge la metà del recupero della fluorescenza iniziale. Questo valore si ricava tramite l'equazione [30]:

$$F_t = F_0 + \frac{(F_\infty - F_0)t}{t + \tau_{1/2}}$$

dove  $F_t$  è l'intensità di fluorescenza al tempo  $t$ ,  $F_\infty$  è la fluorescenza al tempo infinito e  $F_0$  è la fluorescenza al tempo zero.

- l'*Intensity Profile (IP)*: rappresenta l'intensità di fluorescenza all'interno dello spot causato dal bleaching in funzione del suo diametro effettivo.

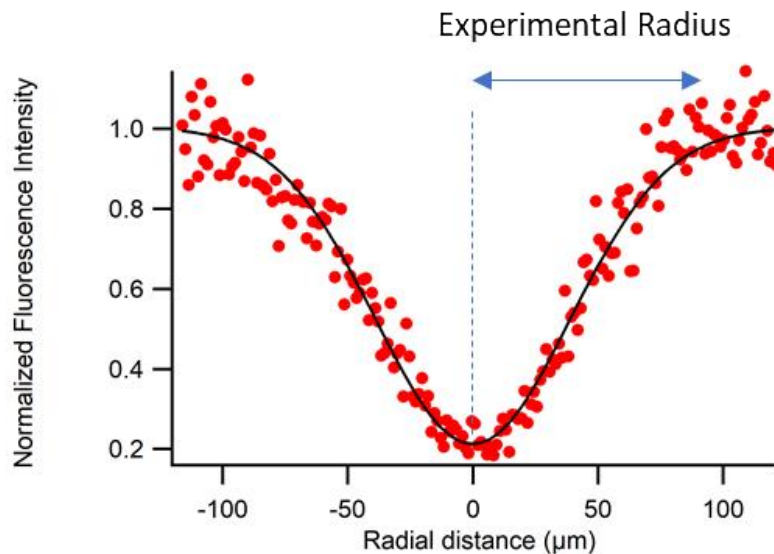


Fig. 3.24 Intensity Profile

Dall'equazione riportata di seguito è possibile ricavare  $R_E$ , o raggio equivalente, ossia il raggio reale dello spot che si è creato in seguito al photobleaching (contrapposto a  $R_N$ , che è il raggio nominale imposto alla S-ROI) [29]:

$$f_{(x)} = 1 - K * e^{\left(\frac{-x^2}{R_E^2}\right)}$$

Ricavati  $\tau_{1/2}$  e  $R_E$ , è infine possibile ottenere il coefficiente di diffusione del probe nel mezzo (idrogel), data dall'equazione [29]:

$$D = \frac{R_E^2 + R_N^2}{8 * \tau_{1/2}}$$

Tutti i valori di D ottenuti dalle misure di diffusione degli idrogel con i vari coloranti sono stati plottati in un unico grafico per agevolare il confronto (fig.3.25).

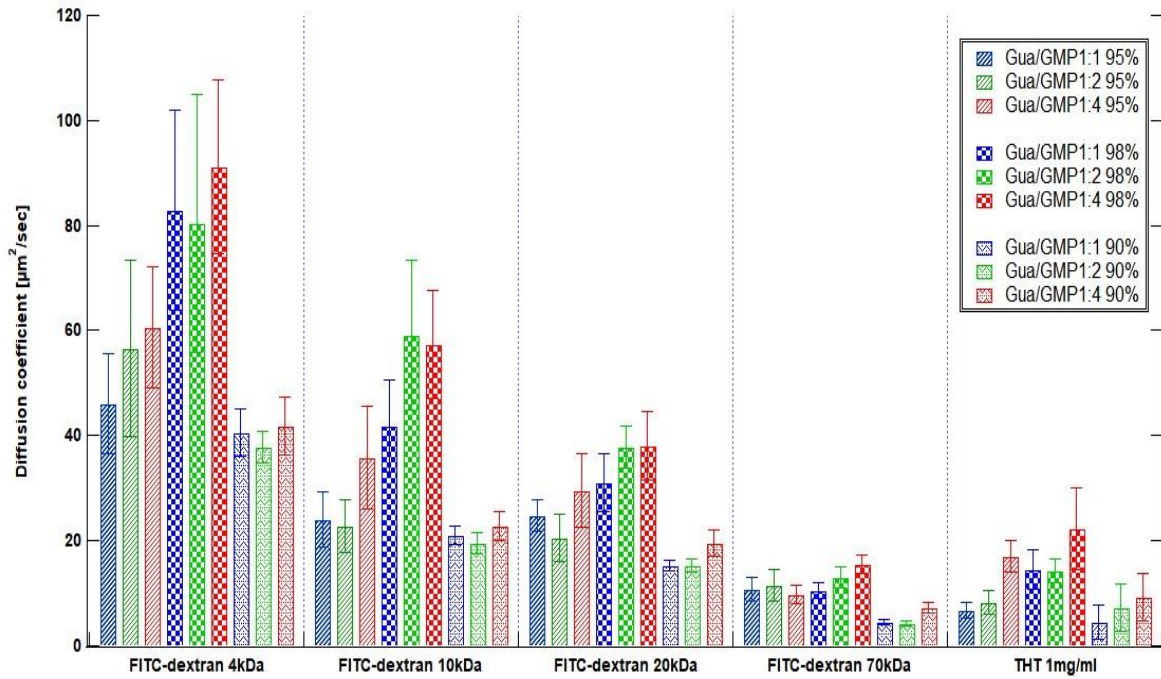


Fig. 3.25 Coefficienti di diffusione. Da sinistra verso destra: FITC-Destrano 4kDa, FITC-Destrano 10kda, FITC-Destrano 20kDa, FITC-Destrano 70kda; THT. Le barre in alto rappresentano gli errori.



Come si può notare dal grafico (fig.3.25), il DAPI non è stato incluso nei risultati della FRAP perché non è stato possibile eseguire delle misure ripetibili, per via dell'aspetto poco omogeneo dei campioni.

Sono state eseguite con successo le misure di diffusione sugli idrogel trattati con le quattro molecole di FITC-Destrano e con la THT, e i risultati ottenuti sono molto interessanti.

Nel corso dell'esperimento, nel corso delle prime misure di FRAP è stata utilizzata come sonda fluorescente la FITC-Destrano. Sono state impiegate molecole di dimensioni diverse che permettessero di studiare correttamente il processo di diffusione attraverso le maglie del gel in funzione della grandezza del probe.

Si osserva che, per le molecole più piccole come la FITC 4kDa e la 10 kDa, i risultati sono ottimali e simili tra loro, sebbene la FITC 4kDa mostri valori notevolmente superiori di coefficiente di diffusione rispetto a tutti gli altri campioni analizzati.

È anche possibile notare che, com'è facile immaginare, la diffusione avvenga più efficacemente negli idrogel più acquosi, quindi al 98% di  $H_2O$  e negli idrogel con rapporto G/ GMPK<sup>+</sup> 1:4. La motivazione di questo fenomeno può essere attribuita al fatto che, a questo rapporto molare, il gel si presenta meno viscoso, quindi i probes diffondono con maggior facilità.

Per quanto riguarda la FITC 70kDa, invece, il coefficiente di diffusione rimane mediamente basso in tutti i gel analizzati, indipendentemente dal rapporto molare e dalla quantità di acqua presente nel sistema, a causa delle dimensioni della molecola che rendono difficile la diffusione; ma questa, seppur in misura minore rispetto alle altre molecole, avviene comunque.

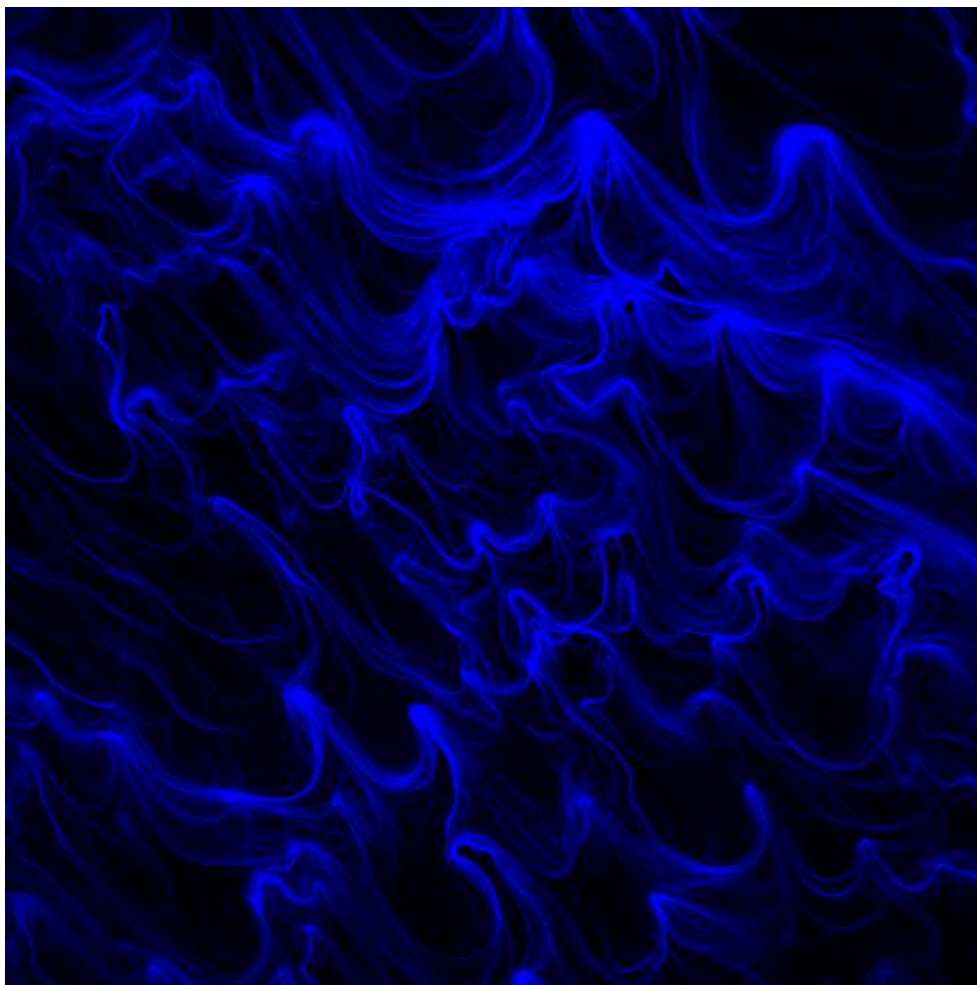
Particolare attenzione va rivolta, invece, alle stesse misure svolte non con la FITC ma con la THT.

Anche in questo caso i valori la diffusione avviene lentamente, eppure, rispetto alla FITC 70kDa, la differenza tra gel al 98% di acqua e le altre percentuali e tra gel 1:4 e gli altri rapporti G/GMPK<sup>+</sup> è molto più evidente. È probabile che il basso coefficiente di diffusione registrato sia dovuto semplicemente al fatto che la molecola di THT si intercala ai quartetti, e che, in seguito al bleaching, possa aver bisogno di più tempo per diffondere rispetto a quello considerato per le misure.

È da notare, inoltre, come gli errori delle misurazioni siano molto diversi in base alla sonda utilizzata: nelle misure con le FITC di dimensioni minori le barre di errore sono molto grandi, conseguenza del fatto che queste molecole, essendo piccole, diffondono con più facilità, anche durante lo stesso bleaching. La radiazione a 405 nm causa la formazione di uno spot dai contorni non netti e più grande rispetto al diametro della S-ROI proprio per questo motivo.

Nel caso della FITC 70kDa gli errori sono molto inferiori e lo spot di bleaching risulta essere più netto, poiché le molecole faticano a diffondere. Allo stesso modo nei gel trattati con la THT, ma, come accennato prima, nel caso di questo colorante la diffusione è più lenta perché la molecola si intercala ai quartetti.

Gli idrogel contenenti il DAPI, seppur preparati nella stessa maniera, risultavano altamente disomogenei, con striature e aggregati di colorante che hanno reso difficile eseguire misure ripetibili di FRAP



*Fig. 3.26 Aspetto dell'idrogel + DAPI al microscopio confocale*

L'esito di queste analisi è importante dal punto di vista dell'applicabilità dell'idrogel nel contesto del drug delivery, in quanto permette di paragonare ai probes utilizzati un eventuale futuro farmaco che interagisce allo stesso modo con i quadruplessi.

### ***3.4 Analisi strutturale***

Questa seconda parte della tesi è stata volta all'analisi strutturale dell'idrogel di guanosine. L'esigenza di seguire questo percorso è nata in seguito ai risultati ottenuti dall'utilizzo delle molecole fluorescenti. Appurato che le sonde si legano al network di guanosine (dalla stima delle costanti di legame  $K$ ), e che le interazioni che hanno con queste possono essere simili a quelle di un eventuale farmaco, è sorta l'esigenza di indagare se la struttura del gel viene in qualche modo influenzata dalla presenza dei probes, se il reticolo di G-quartets rimane inalterato e se cambia il complesso equilibrio di forze attrattive e repulsive che permette l'esistenza del network.

Per approfondire e dare risposta a questa serie di considerazioni, sono state performati potenti tecniche basate sull'utilizzo di raggi X, come la Diffrazione dei Raggi X (XRD) la SAXS e la WAXS, o sull'utilizzo di fasci di elettroni, come nel caso del SEM, o ancora la Microscopia A Forza Atomica (AFM).

Tutte queste tecniche hanno permesso di monitorare i cambiamenti del network di G-quadruplexes in funzione della presenza di coloranti, allo scopo di comprendere come questi interagiscono con le guanosine e se l'interazione altera la struttura del gel.

#### ***3.4.1 SAXS e WAXS***

Il primo passo è stato quello di valutare se l'aggiunta di coloranti all'idrogel altera la caratteristica struttura dei quartetti, dei quadruplessi e le distanze che normalmente li separano quando sono in soluzione acquosa.

Per questo motivo, una delle prime tecniche a cui si è fatto ricorso è stato lo Scattering Dei Raggi X, in particolare lo Small Angle X-Ray Scattering SAXS e il Wide Angle X-Ray Scattering WAXS.

Sono stati preparati dei campioni di gel 1:4 al 90 e al 98% di acqua, e depositati in speciali capillari di quarzo. Questi sono stati poi inviati ad Oxford, presso il Diamond Light Source:

- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 98% w/w
- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 98% w/w, THT
- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 98% w/w, DAPI
- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 90% w/w
- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 90% w/w, THT
- Idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 90% w/w, DAPI

I campioni di idrogel presi in considerazione hanno una composizione molare G/GMPK<sup>+</sup> di 1:4 e variano per il diverso grado di idratazione (98% e 90%).

Inoltre, per ciascuna delle due serie sono stati valutati anche campioni di idrogel addizionati di due probe fluorescenti (DAPI 0.04 mg/ml e THT 0.05 mg/ml), al fine di valutare eventuali effetti legati alla variazione della struttura microscopica dell'idrogel.

Le curve SAXS sono state analizzate servendosi di un modello geometrico per descrivere i quadruplessi nell'idrogel. Il modello utilizzato è quello del cilindro flessibile (worm-like chain), di raggio R e lunghezza L polidispersa. Mediante un processo di fitting delle curve sperimentali, l'uso del modello ha permesso di valutare i parametri riportati nella tabella per i vari campioni analizzati.

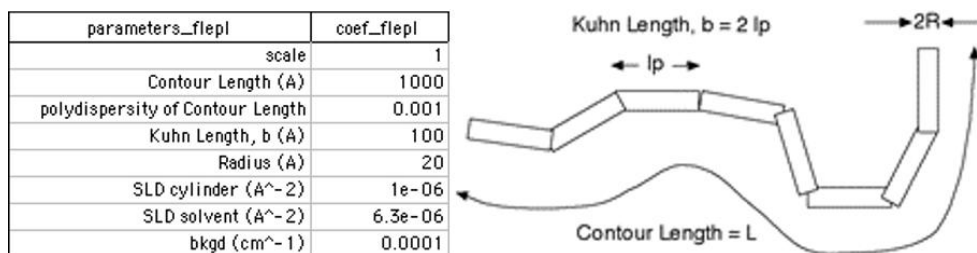


Fig. 3.27 Modello di un cilindro flessibile polidisperso (Flexible Cylinder Polydisperse lenght), lunghezza e parametri ad esso associati

La funzione intensità di fluorescenza  $I(Q)$  vs. vettore di scattering  $Q$  ad esso corrispondente è quella rappresentata nella Fig.3.28.

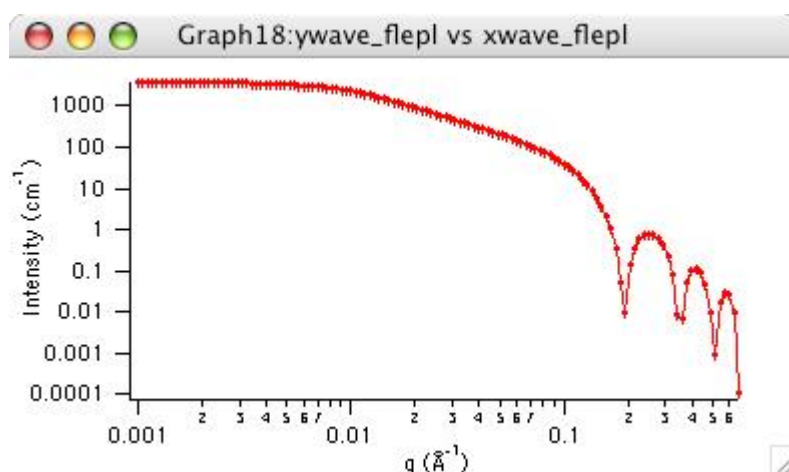


Fig. 3.28 Funzione di  $I(Q)$  vs  $Q$

Nel modello, il quadruplesso di lunghezza totale  $L$  (chiamata contour length) viene descritto come una catena di un certo numero di segmenti localmente rigidi di lunghezza  $lp$ , chiamata *lunghezza di persistenza* e definita come la lunghezza sotto la quale il cilindro flessibile può essere considerato un'asta rigida (si noti che il modello per descrivere la rigidità di una catena utilizza la lunghezza di Kuhn ( $b$ ), semplicemente definita come:

$$b = 2 * lp$$

La *polidispersità* della lunghezza è inclusa nel modello, ed è descritta come una distribuzione di Schulz per la lunghezza del contorno del cilindro.

### Analisi SAXS

Il primo risultato fa riferimento alle immagini 2D ottenute dall'analisi SAXS (fig.3.29). Sono stati presi in esame solo due campioni (uno per idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 98% w/w acqua, e idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 90% w/w acqua), in quanto gli altri appartenenti alle stesse serie presentano un profilo simile. Un primo risultato ottenuto dalle immagini SAXS indica l'idrogel di guanosine come un sistema anisotropico, dotato di capacità orientazionali. Inoltre, è evidente che il sistema con maggiore idratazione risulta più disordinato rispetto al campione preparato al 90% di acqua. Infatti, nel primo caso lo scattering si osserva identico in tutte le direzioni, mentre nel secondo compare solamente in due regioni del detector (la gradazione di colore va dal blu al rosso rispettivamente per l'intensità di scattering più bassa e più alta).

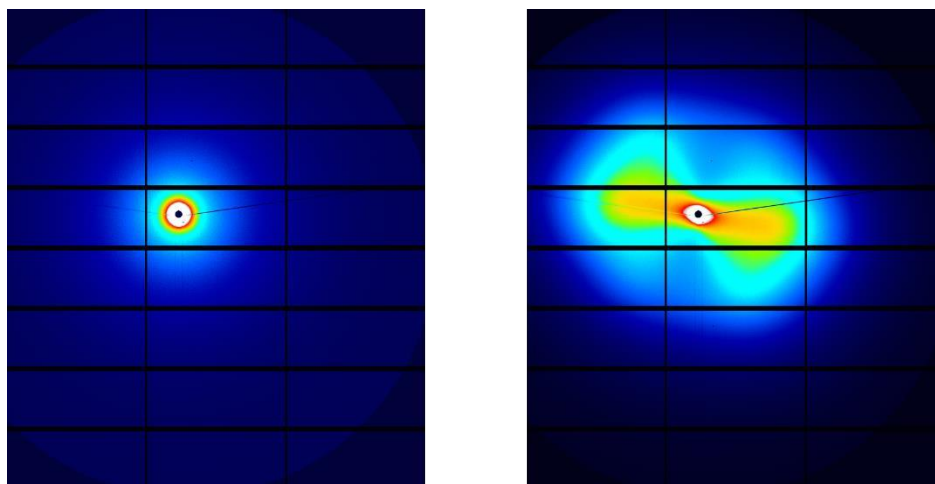


Fig. 3.29 Sinistra: campione di idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 98% w/w acqua; destra: campione di idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 90% w/w acqua

Le immagini 2D sono state analizzate calcolando la media radiale dell'intensità di scattering, portando così a definire il profilo 1D relativo a  $I(Q)$  vs.  $Q$ .

Nella figura 3.30 seguente vengono mostrati i profili 1D di ciascun campione, fittati con il modello semplice sopra citato.

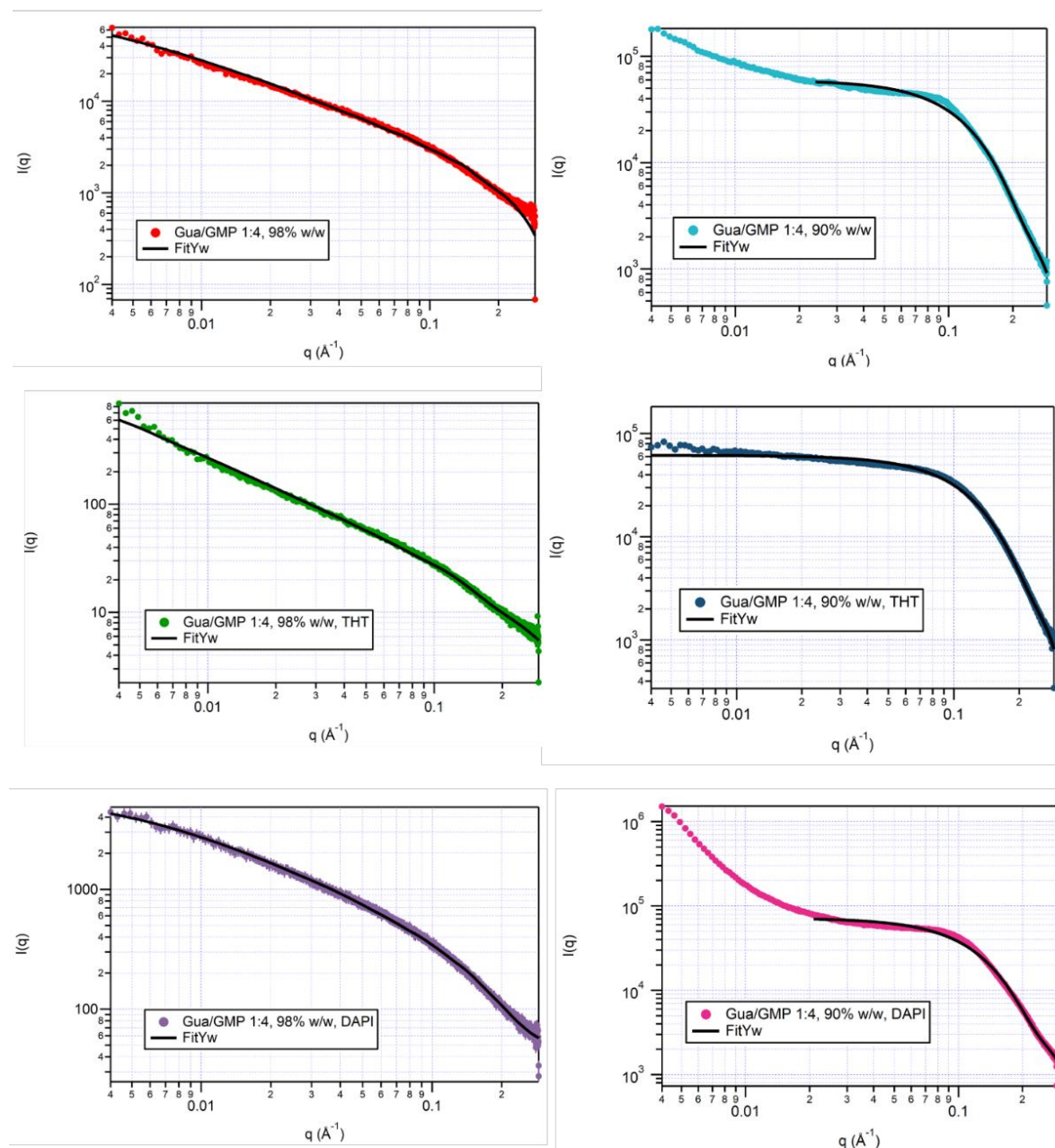


Fig. 3.30 Profili 1D dei campioni



I parametri del modello calcolati dal fit delle curve sperimentali sono invece mostrati nelle tabelle seguenti (4 e 5).

	G/GMPK <sup>+</sup> 1:4, <b>98%</b> (1)	G/GMPK <sup>+</sup> 1:4, <b>98%</b> , THT (2)	G/GMPK <sup>+</sup> 1:4, <b>98%</b> , DAPI (3)
R (Å)	10	9	11
Length (Å)	273	805	33.69
Polydispersity (Å)	0.77	0.49	3.32

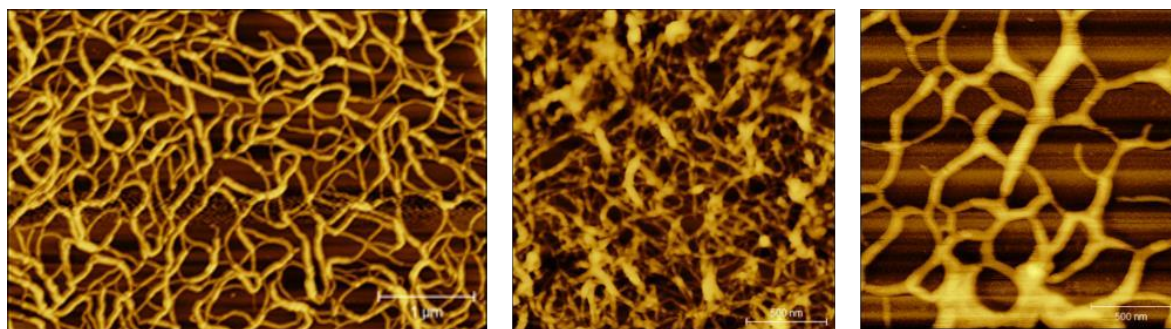
*Tab.4*

	G/GMPK <sup>+</sup> 1:4, <b>90%</b> (4)	G/GMPK <sup>+</sup> 1:4, <b>90%</b> , THT (5)	G/GMPK <sup>+</sup> 1:4, <b>90%</b> , DAPI (6)
R (Å)	12	12	12
Length (Å)	45.0	40	38.4
Polydispersity (Å)	0.00041	0.00666	0.00142

*Tab.5*

Il fit descrive bene i campioni di idrogel preparati con un maggiore quantitativo di acqua (98%) a differenza di quelli contenenti il 90% di acqua: questo risultato suggerisce che nel secondo caso vi è una maggiore aggregazione dei quadruplessi e che quindi la curva di scattering contiene non solo il fattore di forma degli oggetti presenti, ma anche un fattore di struttura,  $S(Q)$ , relativo alle interazioni tra gli aggregati. Ciò si rende evidente nei grafici dalla presenza di una grande pendenza della curvatura a piccoli  $Q$ . Va dunque sottolineato che queste curve sono state fittate solo parzialmente tramite il modello “Flexible Cylinder Polydisperse length”, vista l’impossibilità di utilizzare lo stesso modello a bassi valori di  $Q$  per la comparsa del fattore di struttura. In tabella vengono riportati i parametri che meglio descrivono le varie curve.

I campioni preparati al 98% di acqua presentano una lunghezza complessiva dei vari quadruplessi molto alta per il campione  $G/GMPK^+$  1:4 con e senza THT, mentre nel campione in cui è presente il DAPI i filamenti appaiono più corti e dotati di un maggior grado di polidispersione. Questo risultato permette un confronto diretto con le immagini ottenute dalla microscopia a forza atomica (AFM) di cui si parlerà più avanti: si noti la presenza di quadruplessi corti e maggiormente polidispersi nel campione di idrogel in cui è presente il DAPI (fig.3.31)

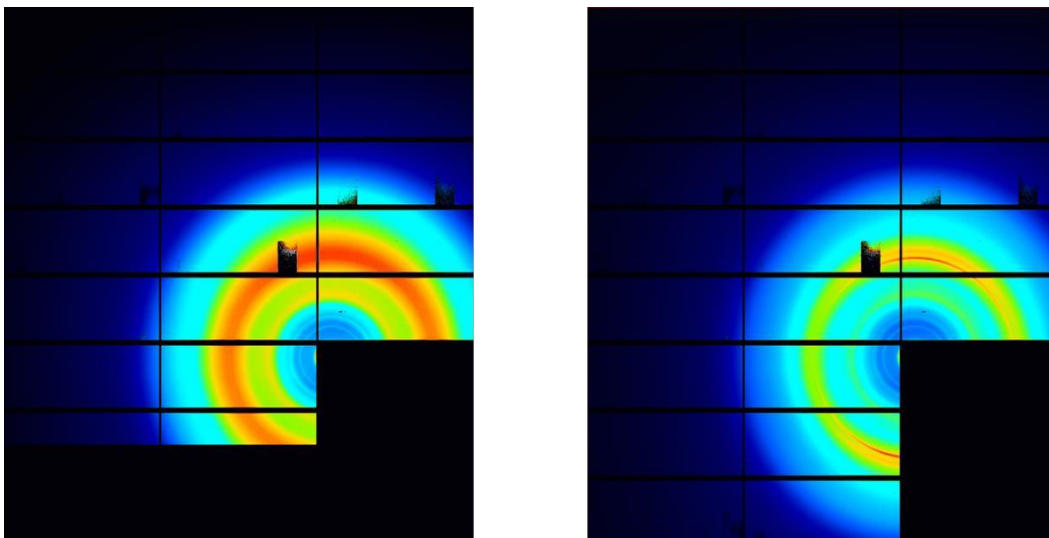


*Fig. 3.31 Da sinistra verso destra  $G/GMPK^+$  1:2,  $G/GMPK^+$  1:2 THT,  $G/GMPK^+$  1:2 DAPI*

Al contrario, per quanto riguarda i campioni preparati al 90% di acqua, si può notare che i valori indicano una lunghezza dei quadruplessi che non varia molto tra tutti i casi analizzati. Inoltre, in questi campioni la polidispersione ha valori molto più bassi rispetto alla serie dei campioni preparati al 98% di acqua.

### **Analisi WAXS**

L'analisi Wide Angle X-ray Scattering ha permesso di ottenere immagini 2D come quelle rappresentate nella seguente figura 3.32.



*Fig. 3.32 Sinistra: campione di idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 98% w/w acqua, destra: campione di idrogel G/GMPK<sup>+</sup> 1:4 90% w/w acqua*

In questo caso, dato l'intervallo di  $Q$  che viene analizzato, vengono ottenute informazioni sulle proprietà strutturali legate allo stacking dei G-quartets, permettendo anche di definire la distanza tra ciascuno di essi.

Per prima cosa, è possibile confermare i risultati ottenuti dall'analisi SAXS: visto il maggior disordine dei campioni più idratati (98% w/w), il segnale SAXS appare diffuso rispetto a quello che invece si ha per i campioni preparati al 90% w/w di acqua (le immagini confermano la forte orientazione del campione).

Passando ad analizzare le corrispondenti immagini 1D ottenute per media radiale delle immagini, otteniamo il grafico in figura 3.33.

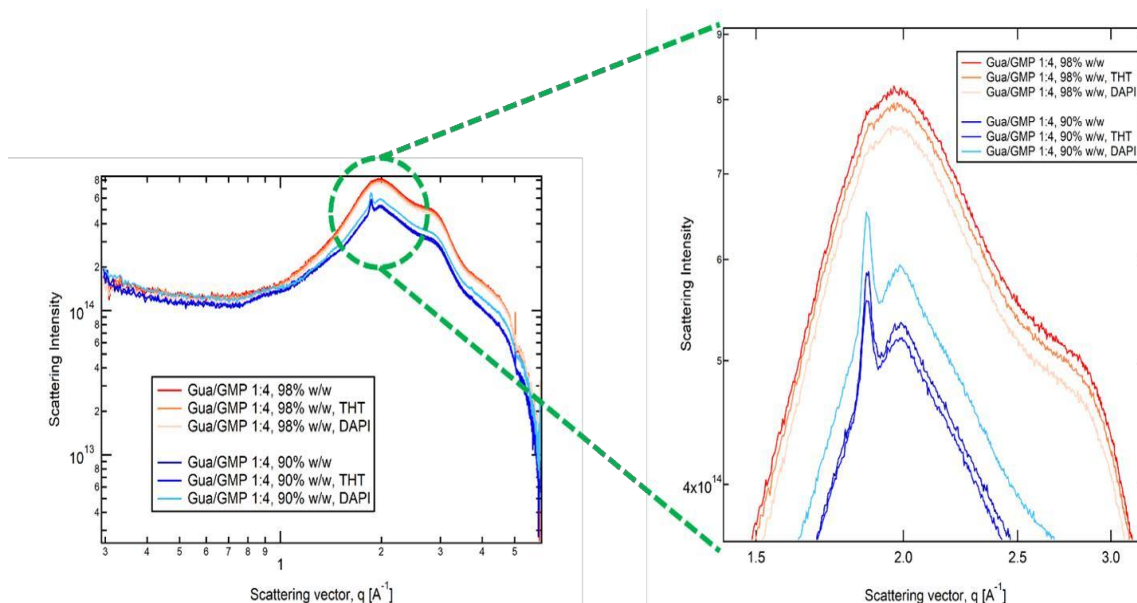


Fig. 3.33 Picco a 3.4 Å

È necessario enfatizzare la regione del grafico compresa tra 1.5 e 3.0 Å<sup>-1</sup>, poiché proprio in quella porzione, al di sopra di una banda larga dovuta alla struttura disordinata dell'acqua, si ha la comparsa di un picco stretto e molto intenso corrispondente ad una distanza di ripetizione di 3.4 Å. Questo si osserva bene solamente per i campioni con minore idratazione (curve blu), come già discusso. Il fatto che il picco a 3.4 Å si osservi in tutti i campioni di idrogel analizzati indica che sia il THT che il DAPI non modificano le proprietà di impilamento dei G-quartets a formare i quadruplessi.

### 3.4.2 Diffrazione dei Raggi X

Si è passati quindi ad una analisi strutturale mediante Diffrazione dei Raggi X (XRD); le misure sono state eseguite presso il laboratorio di Biofisica Molecolare del DISVA.

Si è scelto di ricorrere a questa tecnica in quanto già ampiamente utilizzata per determinare la struttura e le fasi cristalline dell'idrogel di guanosine. È noto, infatti, che l'idrogel possiede fasi liotropiche di tipo colesterico e/o esagonale, a seconda dell'idratazione del sistema; l'obiettivo è stato quello di valutare se la presenza dei coloranti alterasse la fase del gel e, in caso affermativo, valutare in che modo e a cosa fosse dovuta la variazione osservata. I campioni analizzati sono stati:

- gel 1:1, 1:2 e 1:4 senza coloranti + PEG al 35%
- gel 1:1, 1:2 e 1:4 senza coloranti + PEG al 45%
- gel 1:1, 1:2 e 1:4 + THT + PEG al 35%
- gel 1:1, 1:2 e 1:4 + THT + PEG al 45%
- gel 1:1, 1:2 e 1:4 + DAPI + PEG al 35%
- gel 1:1, 1:2 e 1:4 + DAPI + PEG al 45%

Per l'esperimento, sono stati preparati i 18 gel appena menzionati e sono stati liofilizzati over-night per seccarli completamente.

Da ogni eppendorf contenente i liofilizzati sono stati prelevati 25mg di campione secco e posti in una nuova eppendorf, cercando di compattarli sul fondo con l'aiuto di un pestello.

Sono state poi preparate due soluzioni di PEG, una al 35% e una al 45%, e da queste ne sono stati prelevati 250µl e posti sui rispettivi campioni da analizzare. Il PEG è stato lasciato sui campioni per 24 ore, in modo tale che l'acqua potesse diffondere al gel liofilizzato sottostante e idratarlo in maniera controllata, dipendentemente dalla percentuale di PEG (i campioni al 35% ricevono più acqua rispetto a quelli al 45%).

Dopo 24 ore, è stato rimosso tutto il PEG dalle eppendorf con l'aiuto di una micropipetta, facendo attenzione a non prelevare anche il gel sottostante.

Alla fine, è stato prelevato il campione di gel rimasto sul fondo dell'eppendorf con una spatolina e posto nel portacampioni allestito appositamente per le misure di diffrazione, descritto nel capitolo 2. È stata quindi eseguita la misura di diffrazione su tutti i campioni. Sono state dapprima ottenute delle immagini convertite in digitale a partire dalla lastra fotografica su cui viene impresso lo spettro di diffrazione del campione. Le immagini sono state aperte con ImageJ e da queste è stato ottenuto un grafico dei pixel della porzione mediana dell'immagine, in rapporto alla loro intensità. Questo è stato poi analizzato e processato su IgorPro, ottenendo infine un grafico con i valori del vettore di scattering  $Q$  sull'asse delle  $x$  e dell'intensità sull'asse delle  $y$ . I grafici di tutti i campioni, raggruppati in base alla percentuale di PEG e al colorante utilizzati sono riportati di seguito. Confrontando i risultati tra loro, è possibile fare alcune considerazioni interessanti. Per ognuno di questi grafici è stato preso il valore del primo picco, corrispondente al basso angolo, poi, scegliendo come simmetria quella esagonale e impostando come parametro di cella il valore del picco, è stato ottenuto il valore delle distanze tra piani reticolari (indicato come  $hex\ a$ ); questo corrisponde, quindi, alla distanza tra i quadruplessi per ogni gel considerato. Queste distanze (in Å) sono confrontate nella tabella 6.

	<b><i>Gel+PEG 35%</i></b>	<b><i>Gel+PEG 35%+DAPI</i></b>	<b><i>Gel+PEG 35%+THT</i></b>
<b><i>1:1</i></b>	34.32	35.25	34.42
<b><i>1:2</i></b>	35.58	36.01	<b>37.76</b>
<b><i>1:4</i></b>	36.08	42.21	34.76
	<b><i>Gel+PEG 45%</i></b>	<b><i>Gel+PEG 45%+DAPI</i></b>	<b><i>Gel+PEG 45%+THT</i></b>
<b><i>1:1</i></b>	30.07	32.84	33.11
<b><i>1:2</i></b>	30.1	32.53	<b>34.53</b>
<b><i>1:4</i></b>	33.46	34.01	33.11

*Tab.6 Valori delle distanze tra quadruplessi, dati dal valore di "hex a" ottenuto per ogni curva*

Dalla tabella e dalle immagini degli spettri è possibile fare una serie di osservazioni interessanti. Per prima cosa è stato chiarito che, nonostante la presenza dei coloranti, la fase esagonale si forma in tutti i casi, come riscontrato dalla presenza del picco a basso angolo.

Osservando quindi i valori riportati in tabella si può dedurre che:

- Nei gel senza coloranti, man mano che si aumenta il rapporto G/GMPK<sup>+</sup>, quindi la carica negativa sulla superficie dei quadruplessi, questi si allontanano l'uno rispetto all'altro a causa delle crescenti forze repulsive. Nei gel al 45% le distanze sono ovviamente minori rispetto a quelli al 35% perché il PEG rilascia minori quantità di acqua al sistema. Il risultato rispecchia le aspettative e il comportamento immaginato dei quadruplessi.

In figura 3.34 sono mostrati i grafici degli spettri di diffrazione dei gel senza coloranti, trattati con le due soluzioni di PEG: le posizioni dei picchi relativi al basso angolo (rette colorate) equivalgono ai valori delle distanze riportato in tabella.

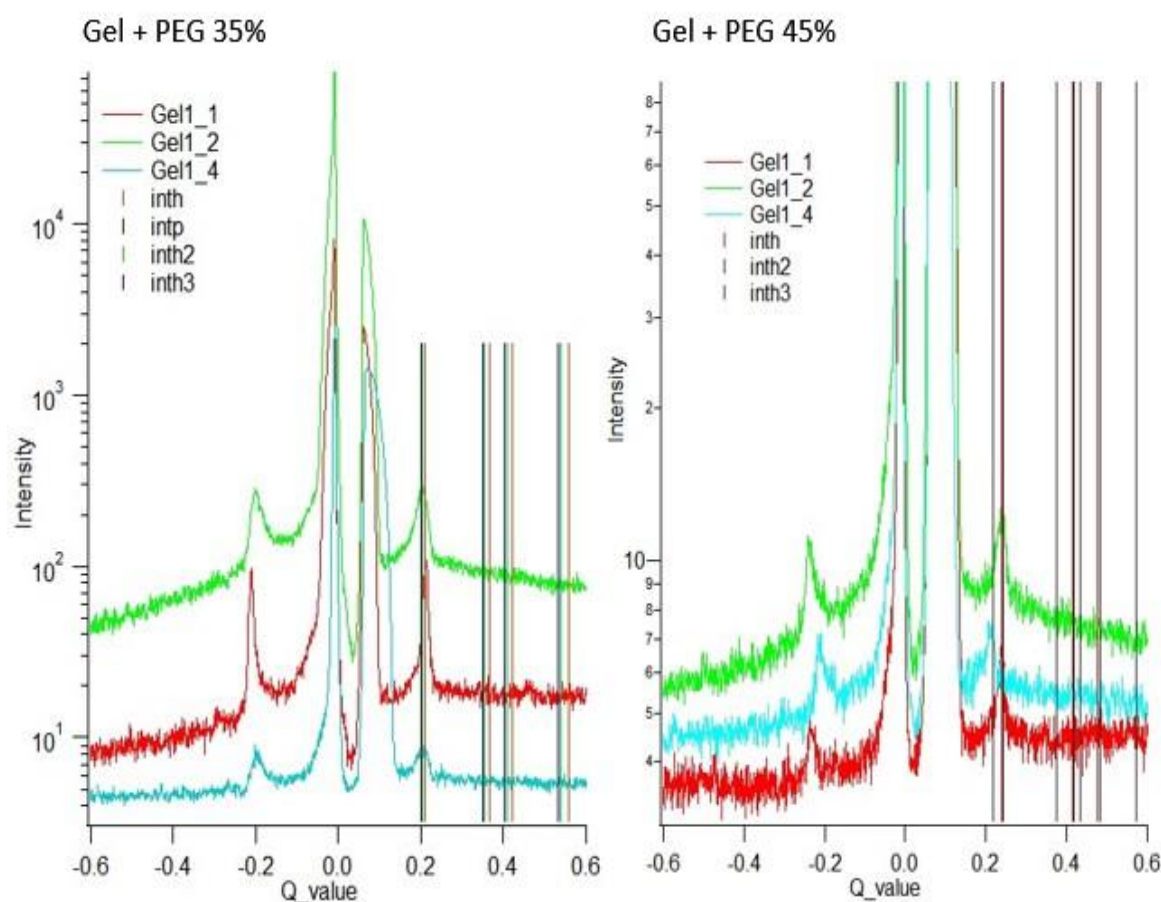


Fig. 3.34 Spettri di diffrazione del gel senza coloranti: a destra con PEG al 35%; a sinistra con PEG al 45%

- Anche nel caso dei gel trattati con il DAPI, si può osservare che la distanza tra cilindri aumenta al crescere della carica complessiva del gel, quindi maggiore nel gel 1:4 e minore nel gel 1:1. È da notare il fatto che tutti i valori sono superiori a quelli visti per il gel senza coloranti, sia nei sistemi più idratati che in quelli con meno acqua. Questo fenomeno può essere spiegato considerando diverse ipotesi: è possibile che il DAPI, legandosi alla superficie esterna dei quadruplessi, richiami acqua di idratazione che si interpone tra i cilindri e contribuisce ad aumentare la distanza che li separa. È possibile, inoltre, che la presenza del DAPI nel sistema causi un aumento della flessibilità dei quadruplessi e, anche in questo caso, una



maggior richiesta di molecole di acqua. L'ultima affermazione trova riscontro negli stessi spettri di diffrazione del DAPI riportati in figura 3.35, in cui il picco relativo alla fase esagonale (che si osserva in tutti gli altri gel) non è ben evidenziabile, oltre che dal fatto che i campioni trattati con il DAPI siano tutti più liquidi rispetto all'idrogel da un punto di vista macroscopico.

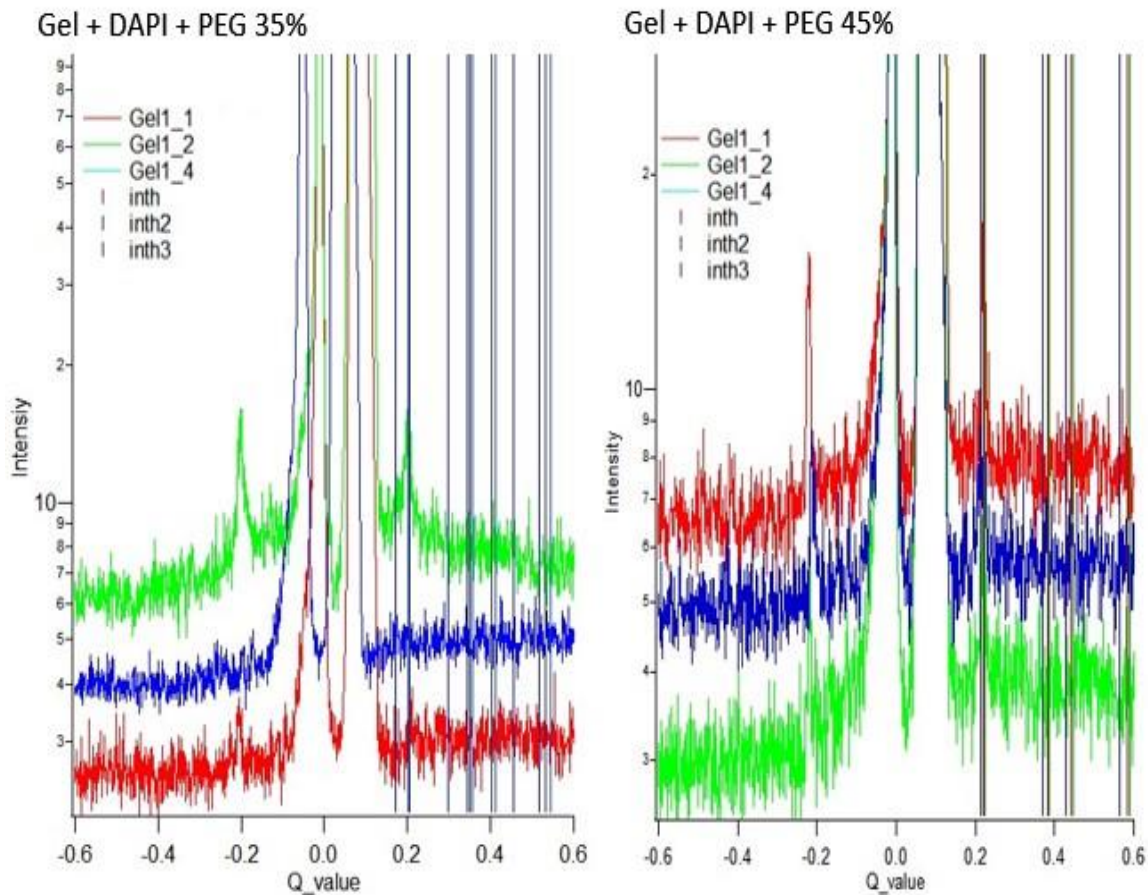


Fig. 3.35 Spettri di diffrazione dei gel con il DAPI: a destra PEG al 35%; a sinistra PEG al 45%

- In ultimo, è da prestare particolare attenzione al caso della THT. Si può innanzitutto notare che, come nei casi precedenti, le distanze tra quadruplessi nei campioni con il PEG al 35% sono maggiori rispetto a

quelle al 45%; inoltre, è evidente che la THT non alteri la fase esagonale tipica di questo idrogel, come si può notare negli spettri in figura 3.36.

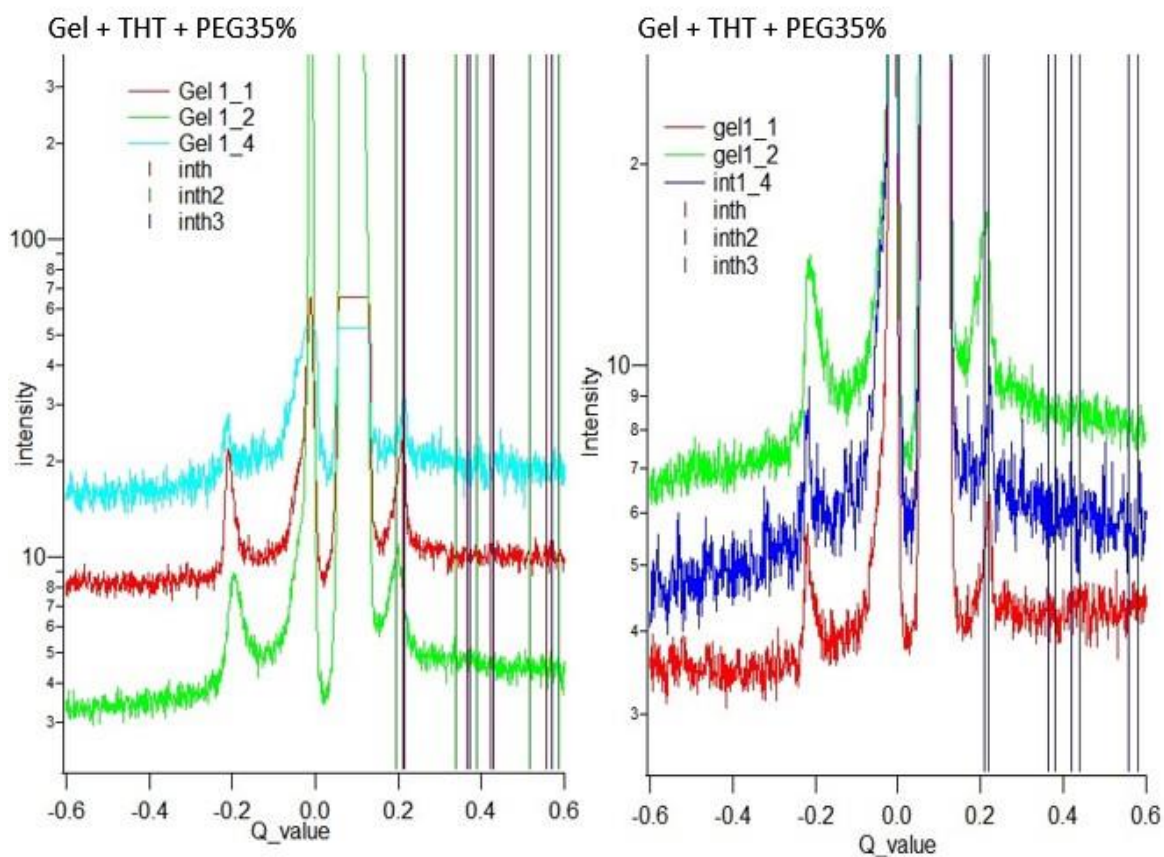


Fig. 3.36 Spettri di diffrazione del gel con la THT: a destra PEG al 35%; a sinistra PEG al 45%

Tuttavia, sono stati riscontrati dei valori anomali di distanze nei due idrogel 1:2. Questo fenomeno può essere spiegato pensando innanzitutto al modo in cui la THT interagisce con il gel: intercalandosi tra i quartetti ed essendo in parte carica positivamente, è plausibile che la presenza del colorante alteri il delicato equilibrio tra forze repulsive che si instaura normalmente all'interno del network.

Può darsi che questo causi una rotazione dei vari quartetti, che cercano di trovare una configurazione più stabile in seguito al legame con il probe.

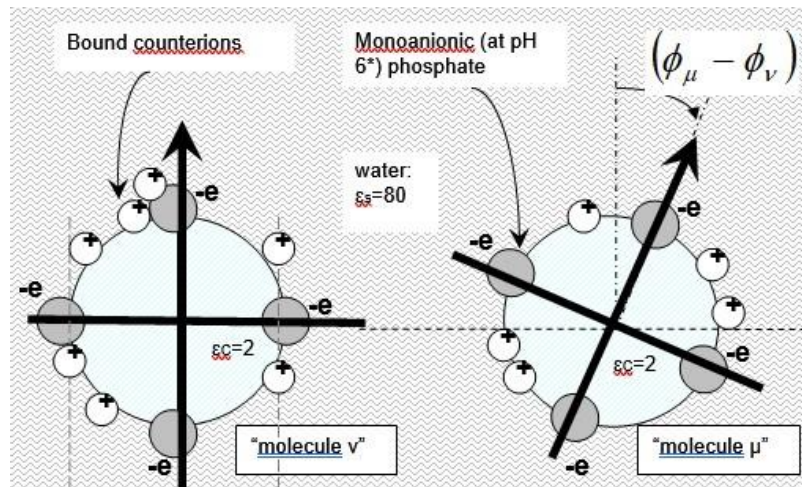


Fig. 3.37 Rotazione di un quartetto di guanosine; in figura sono indicati anche i controioni, con carica positiva

È inoltre possibile che avvenga uno slittamento dei quadruplessi gli uni rispetto agli altri e un aggiustamento nelle distanze che li separano, sempre al fine di raggiungere una nuova configurazione tale da minimizzare le forze di repulsione (si noti che la repulsione tra le cariche negative portate dai fosfati della GMP è la principale forza in gioco in un sistema come quello trattato in questa tesi). Il tutto provoca anche in questo caso un richiamo di acqua da parte del sistema.

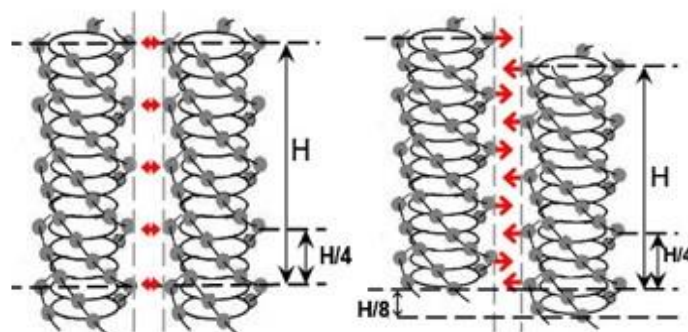


Fig. 3.38 Slittamento dei quadruplessi lungo l'asse parallelo alla loro lunghezza

È evidente che i gel 1:2 abbiano una configurazione particolare, per cui la perturbazione causata dalla presenza della THT altera maggiormente la struttura.

È interessante notare anche che negli spettri di diffrazione è presente il picco relativo all'alto angolo, che si riferisce alla distanza tra G-quartets e che è uguale a  $3.34\text{\AA}$ , lo stesso valore ottenuto dalle misure di Wide Angle Scattering.

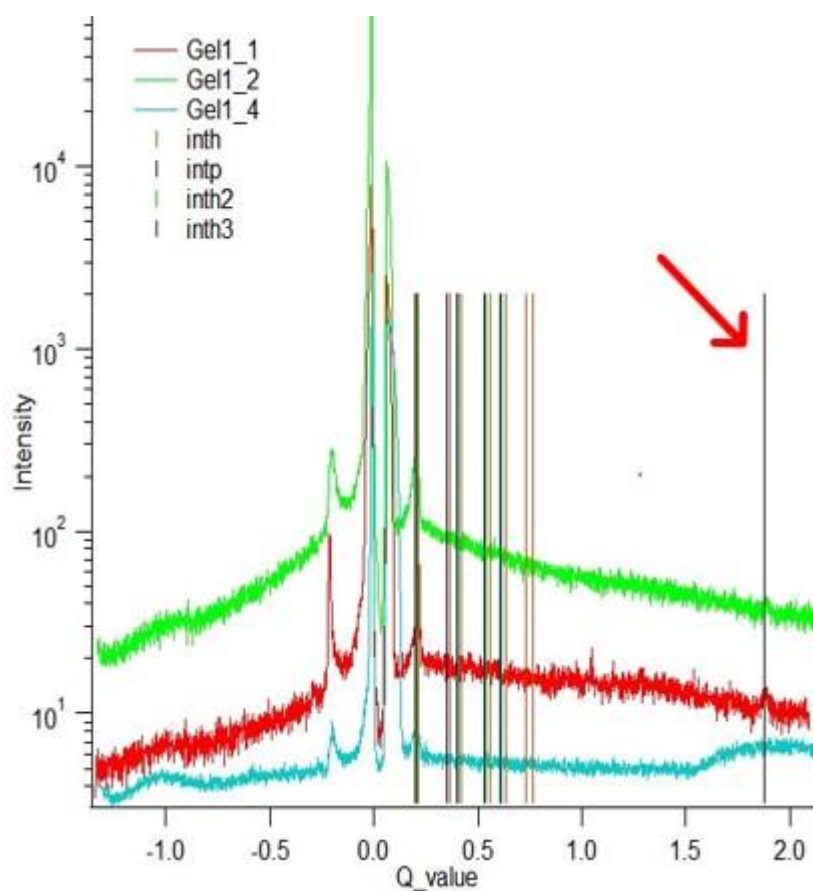


Fig. 3.39 Spettro di diffrazione degli idrogel. L'esempio in figura mostra il picco relativo all'alto angolo (indicato dalla freccia)

### 3.4.3 AFM

I risultati ottenuti dalle analisi ai raggi X hanno confermato che i classici G-quadruplexes si formano anche in presenza dei coloranti, sebbene con variazioni nelle distanze e nella flessibilità del sistema.

L'attenzione è stata quindi rivolta a valutare se fosse l'aspetto tridimensionale del network a subire delle variazioni o se questo rimanesse inalterato quando presenti le molecole fluorescenti.

Sono stati preparati dei campioni al 95% di H<sub>2</sub>O per l'analisi AFM come descritto nel capitolo 2( tab.1); ogni gel è stato diluito 1:600 (perché, se si osservassero alla concentrazione di partenza, si vedrebbe solo un grosso ed indistinguibile aggregato di quadruplessi, che rischierebbe peraltro di danneggiare la punta dello strumento). Per poter vedere i singoli tubi di guanosine è stato quindi necessario diluire notevolmente i gel.

L'analisi AFM permette di ottenere delle "fotografie" degli idrogel ad ingrandimenti molto elevati e ad alta risoluzione, da cui è stato possibile stimare le dimensioni dei quadruplessi nel gel con e senza coloranti.

Di seguito sono riportate una serie di immagini ottenute dallo strumento, da cui sono state misurate le larghezze di alcuni tubi di guanosine.

Le figure 3.40 e 3.41 rappresentano un idrogel 1:2 senza coloranti a due ingrandimenti diversi. È ben evidente il reticolo tridimensionale, con filamenti più sottili, filamenti più spessi e particolari strutture definite nodi, dovuti all'organizzazione supramolecolare dei quadruplessi.



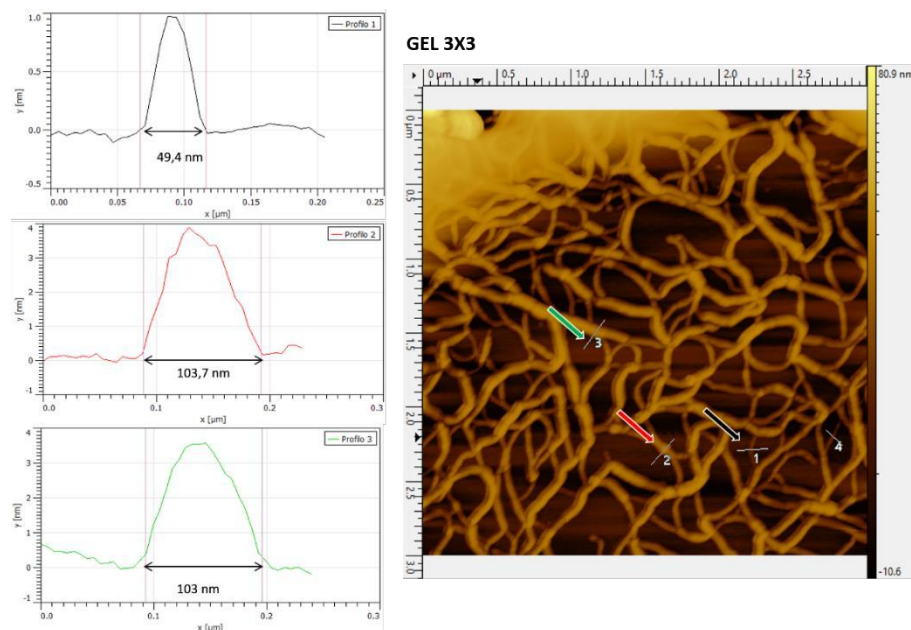


Fig. 3.40 A destra l'immagine AFM di una sezione  $3 \times 3 \mu\text{m}$  di un idrogel 1:2. A sinistra i grafici relativi alla larghezza delle sezioni indicate dalle frecce

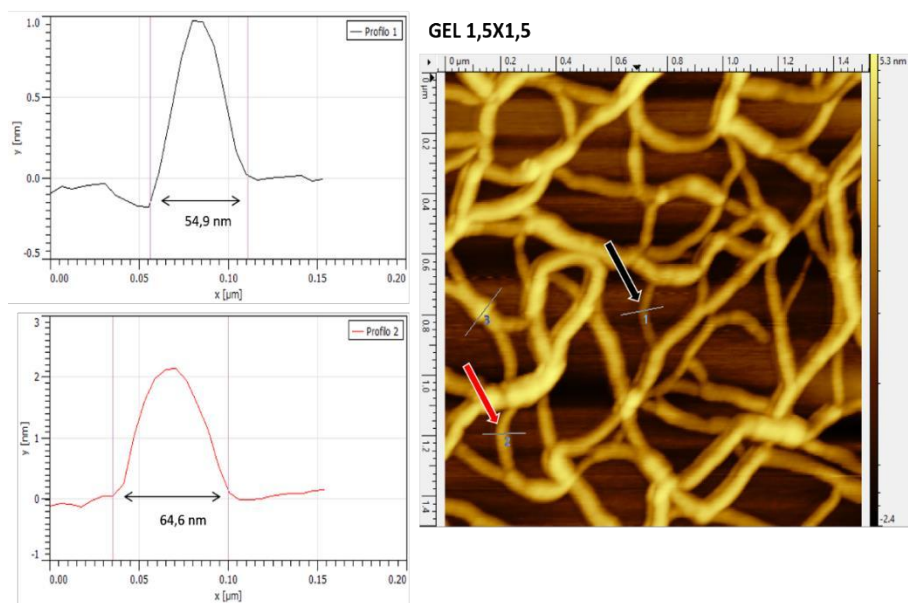


Fig. 3.41 A destra l'immagine AFM di una sezione  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$  di un idrogel 1:2. A sinistra i grafici relativi alla larghezza delle sezioni indicate dalle frecce

Le immagini in figura 3.42 e 3.43 sono state ottenute dallo stesso gel 1:2 con il DAPI. Anche in questo caso si nota la formazione del network, che sembra

essere più flessibile e polidisperso, come già dimostrato nelle analisi trattate precedentemente.

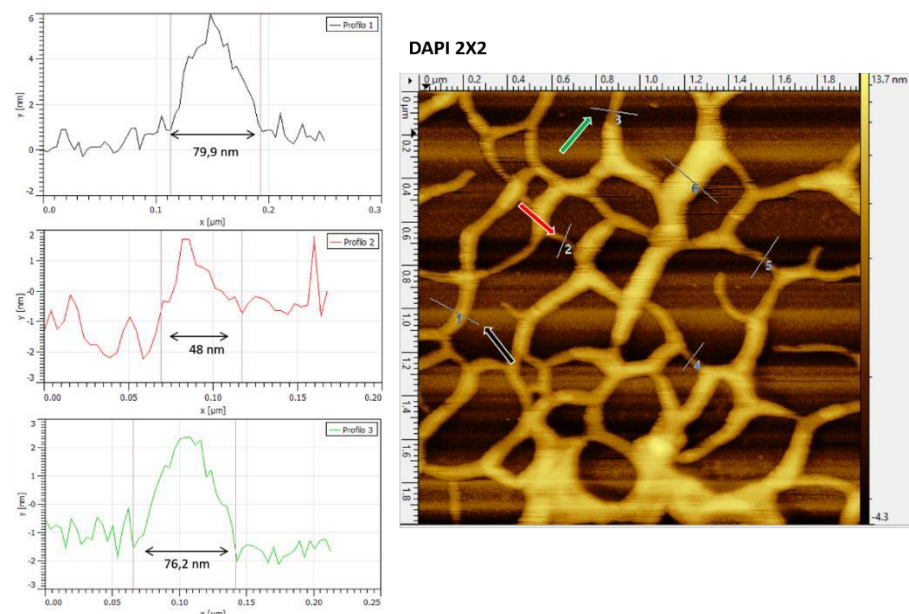


Fig. 3.42 A destra l'immagine AFM di una sezione 2x2 μm di un idrogel 1:2 con il DAPI. A sinistra i grafici relativi alla larghezza delle sezioni indicate dalle frecce

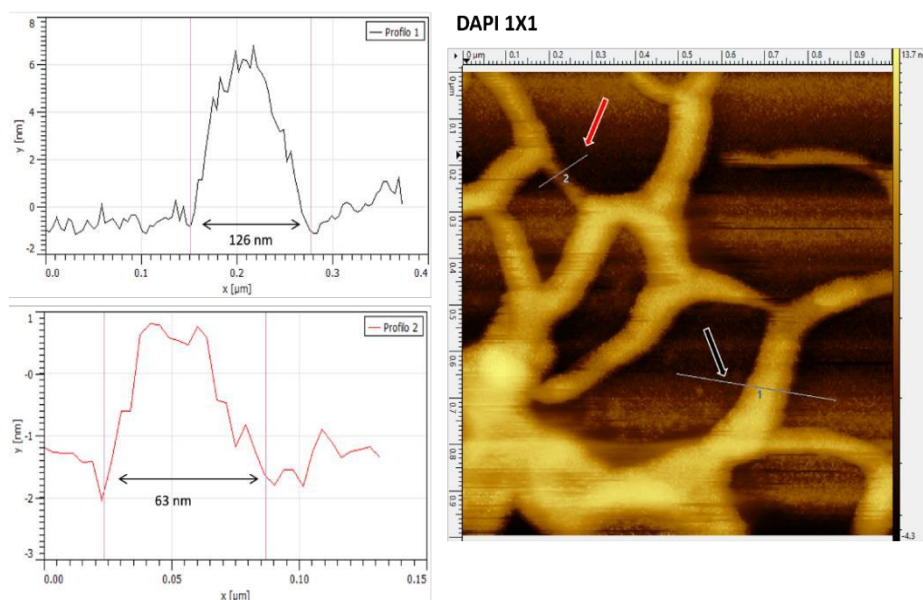


Fig. 3.43 A destra l'immagine AFM di una sezione 1x1 μm di un idrogel 1:2 con il DAPI. A sinistra i grafici relativi alla larghezza delle sezioni indicate dalle frecce

Il gel con la THT mostra anch'esso il reticolo tridimensionale, ma le maglie del gel sembrano più fitte. (Fig 3.44 e 3.45).

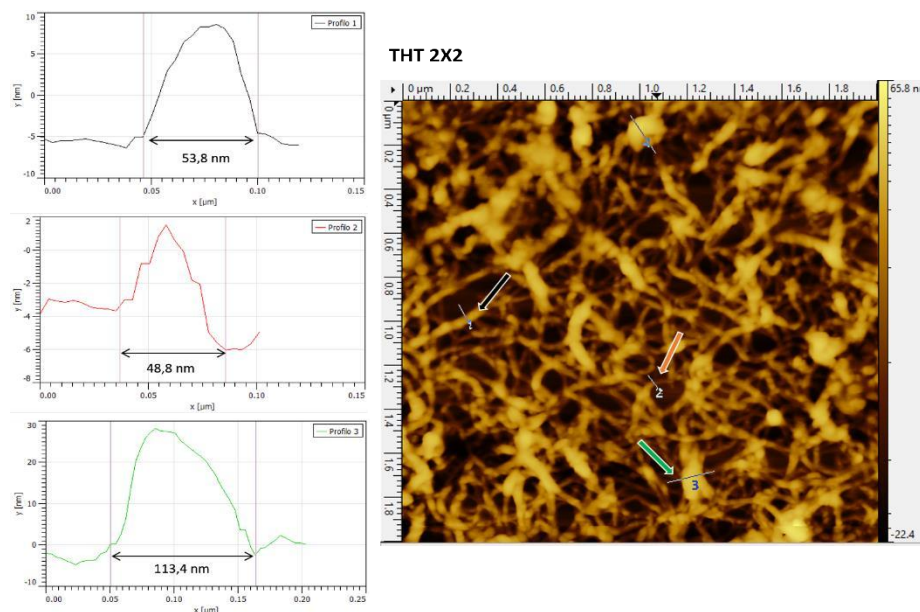


Fig. 3.44 A destra l'immagine AFM di una sezione 2x2 μm di un idrogel 1:2 con la THT. A sinistra i grafici relativi alla larghezza delle sezioni indicate dalle frecce

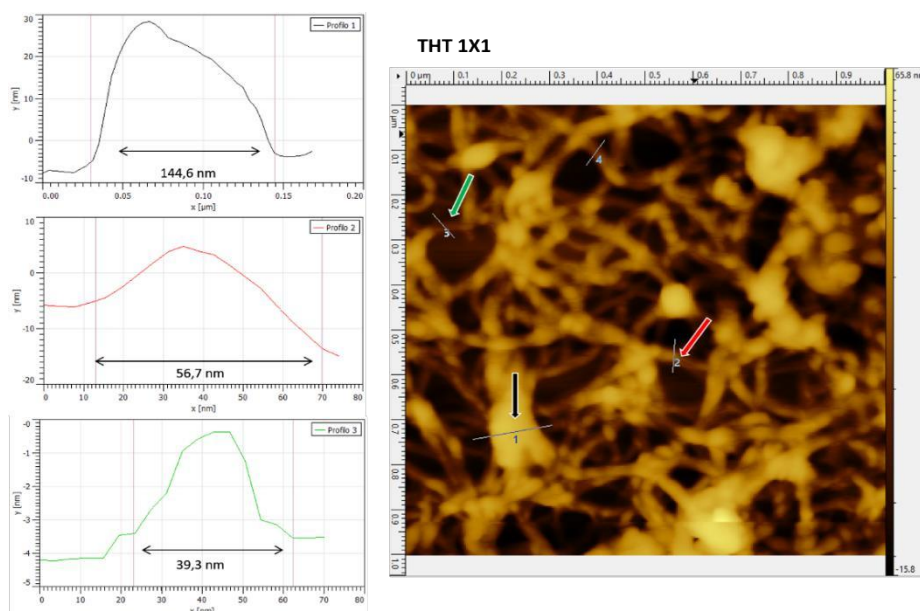


Fig. 3.45 A destra l'immagine AFM di una sezione 1x1 μm di un idrogel 1:2 con la THT. A sinistra i grafici relativi alla larghezza delle sezioni indicate dalle frecce



Per ognuna delle immagini ottenute sono state misurate e confrontate tra loro le larghezze e le altezze di alcuni filamenti, come riportato in tabella 7.

	W1	W2	W3
Gel	49.4 nm	103.7 nm	103 nm
Gel + DAPI	79.9 nm	48 nm	76.2 nm
Gel + THT	53.8 nm	48.8 nm	113.4 nm
	H1	H2	H3
Gel	1 nm	3.778 nm	3.50 nm
Gel + DAPI	5.4 nm	2.43 nm	3.88 nm
Gel + THT	13.11 nm	7.56 nm	30.37 nm

*Tab.7 Lunghezze (W) e altezze (H) misurate dei cilindri*

Dalla tabella è possibile osservare che le altezze dei cilindri (H) sono molto variabili: a seconda della struttura di cui è stata fatta la sezione, in alcuni casi l'altezza rispecchia l'effettivo diametro di un G-quadruplex (circa 2.5 nm), in altri risulta molto maggiore (alcuni valori superano i 30 nm); questo è un evidente segno della formazione di macrostrutture e che ciò che è stato misurato non è un singolo cilindro ma una struttura più complessa, quale può essere un nodo.

Anche le larghezze misurate variano a seconda della sezione analizzata, tuttavia, mentre le altezze dei cilindri sono stimate correttamente, le larghezze non forniscono una stima precisa del diametro dei quadruplessi a causa del fenomeno della convoluzione della punta dell'AFM.

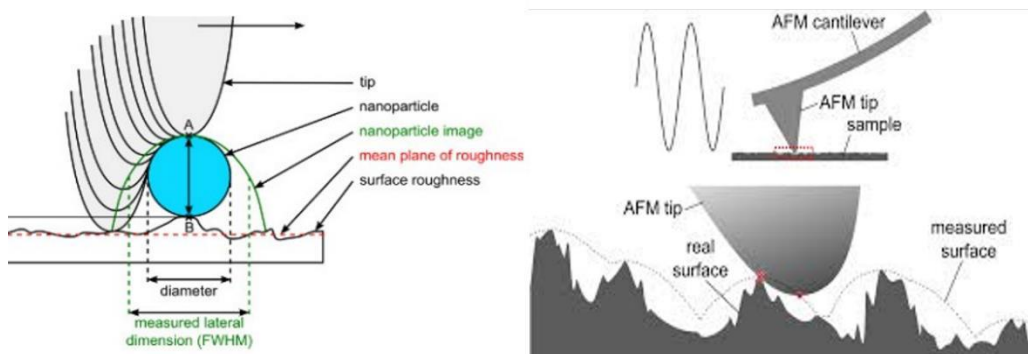


Fig. 3.46 Convoluzione della punta dell'AFM. Superficie effettiva vs superficie misurata.

Quello che viene misurato dal cantilever, infatti, non è il diametro effettivo della particella (nel caso analizzato, il diametro del quadruplesso) ma è un valore più alto perché comprende un errore causato dalla convoluzione. Per risolvere il problema e risalire al diametro reale del cilindro, è stata applicata l'equazione seguente [32]:

$$w = 4\sqrt{R_{tip} * D_{sample}}$$

dove  $w$  è la larghezza del cilindro misurata dallo strumento,  $R_{tip}$  rappresenta il raggio della punta e  $D_{sample}$  il diametro reale del campione (tabella 8).

D sample	1	2	3
Gel	19.06 nm	84.01 nm	82.88 nm
Gel + DAPI	49.87 nm	18 nm	45.36 nm
Gel + THT	22.61 nm	18.6 nm	100.46 nm

Tab.8 Lunghezze effettive

I risultati rispecchiano quanto accennato con le altezze, cioè che alcune misure forniscono stime dei diametri assimilabili a quello di un quadruplesso, mentre i valori più alti sono riconducibili a oggetti di dimensioni maggiori: questo è dovuto al fatto che l'idrogel di guanosine non può essere definito come una rete composta da semplici cilindri, ma è caratterizzato da una complessa struttura supramolecolare in cui si intrecciano quadruplessi di guanosine a formare complessi agglomerati di dimensioni maggiori, nodi e macroeliche, che riempiono lo spazio tridimensionale in maniera apparentemente casuale. Inoltre, anche da questa analisi, si può osservare che il network si forma in ogni condizione presa in considerazione in questa analisi, purché si mantenga un certo grado di idratazione. Inoltre, si può osservare che la presenza dei coloranti non ne alteri l'aspetto, se non per un evidente aumento di flessibilità nel caso del DAPI.

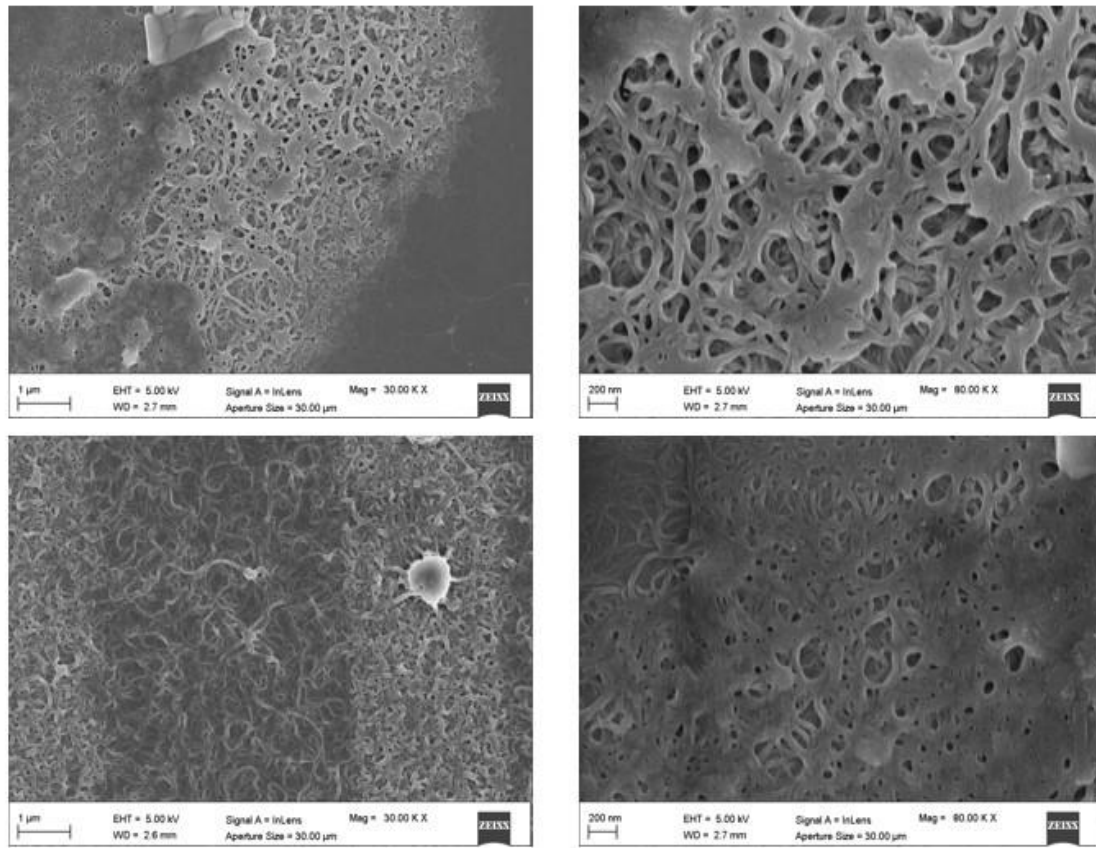
Occorrerebbero misure più approfondite per indagare le ragioni dell'apparente comportamento anomalo degli idrogel trattati con la THT.

#### **3.4.4 SEM**

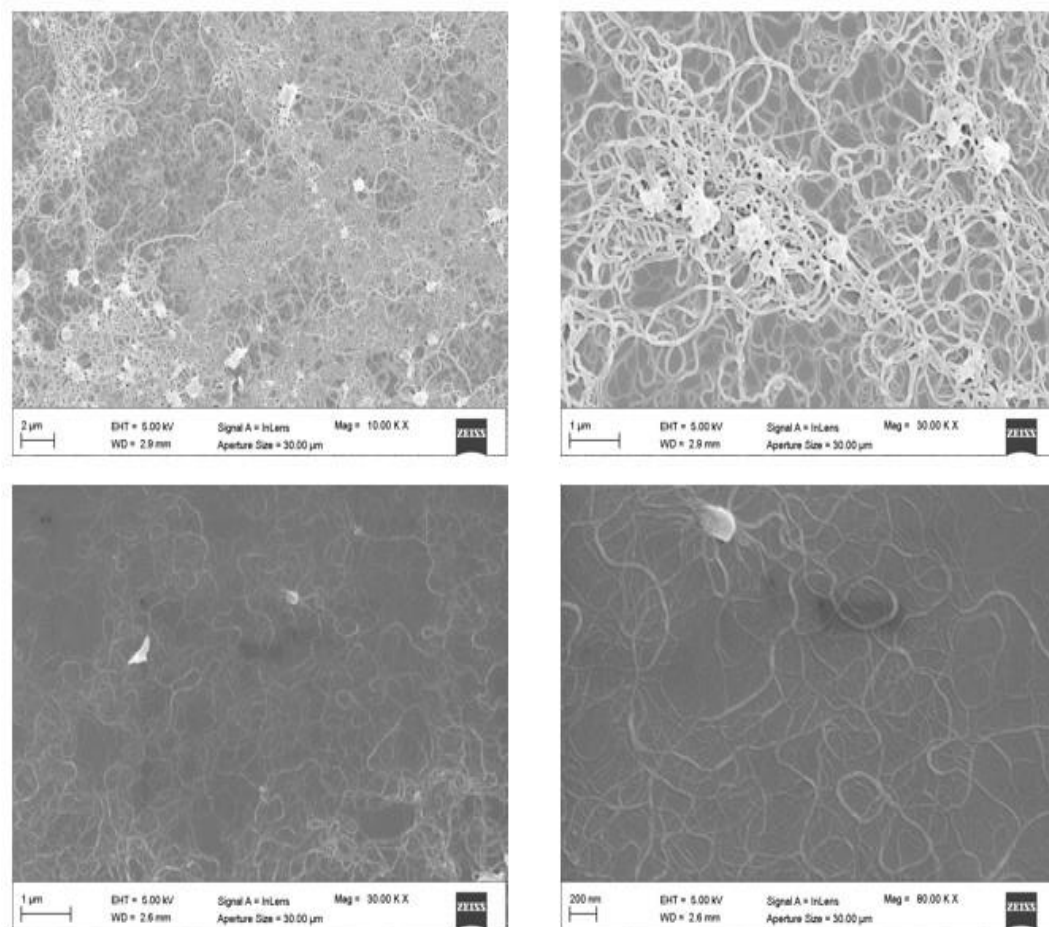
Un'altra prova volta a valutare l'effettiva formazione del reticolo tridimensionale dell'idrogel è stata l'osservazione al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM): sono stati preparati degli idrogel al 95% di acqua per l'osservazione al microscopio.

Il gel, preparato con la procedura classica e senza coloranti fluorescenti, è stato posto su un dischetto portacampione rivestito di mica e lasciato asciugare all'aria. Il dischetto così composto è stato successivamente ricoperto da una polvere d'oro, passaggio essenziale per l'osservazione al SEM, e infine inserito all'interno del microscopio.

Sono di seguito riportate una serie di affascinanti immagini del gel prese in punti diversi del dischetto e a diversi ingrandimenti, che evidenziano la presenza di un fitto reticolo di quadruplessi, più o meno lasso a seconda della zona in cui è stato fotografato.



*Fig. 3.47 Immagini SEM di un idrogel 1:2 a diversi ingrandimenti. Si nota la presenza dei nodi all'interno del network tridimensionale*



*Fig. 3.48 Immagini SEM di un gel 1:2. Dettaglio su una porzione in cui il network è più lasso, i singoli cilindri sono più distinguibili tra loro*

In figura 3.47 e 3.48 si possono apprezzare i dettagli del network dell'idrogel e l'elevata flessibilità dei quadruplessi, specialmente nei punti in cui le maglie del gel sono meno fitte. Sono evidenti i nodi menzionati precedentemente, cioè strutture di ordine supramolecolare superiore, costituiti da cilindri singoli che si intrecciano fra di loro.

Nella figura 3.49 si possono apprezzare i dettagli dei nodi e quelli che sembrano dimeri di cilindri che si diramano in cilindri singoli, in strutture simili ad Y.

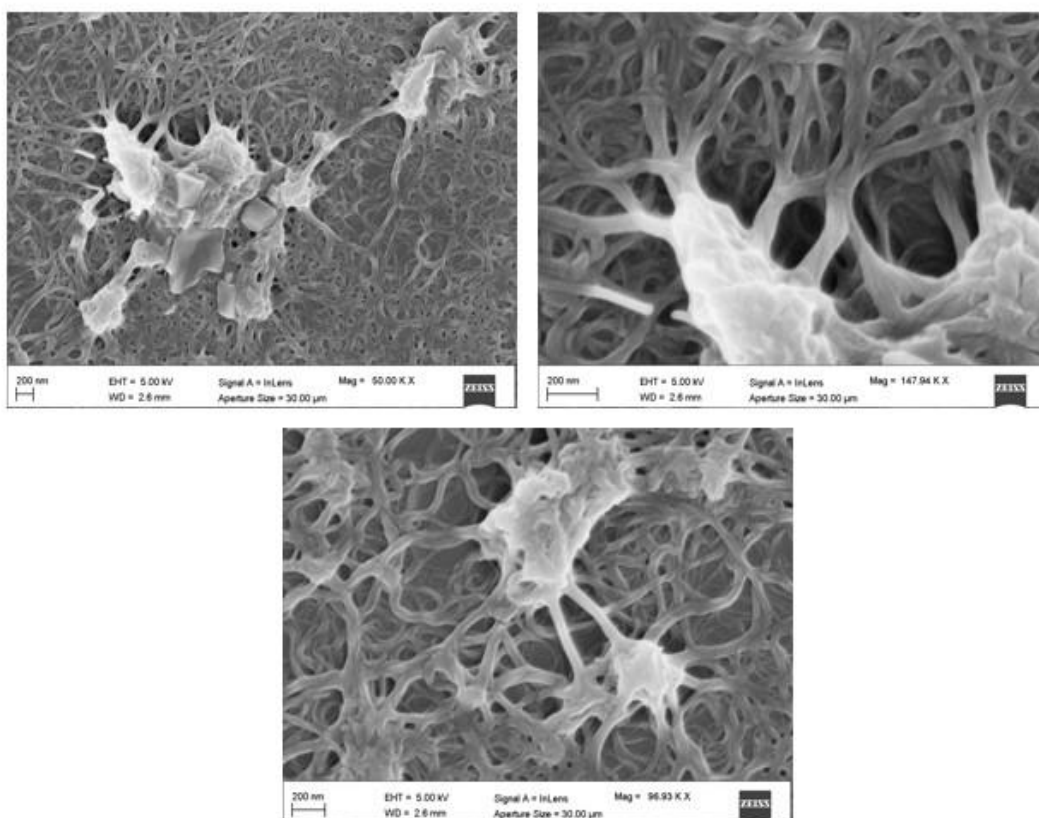


Fig. 3.49 Immagini SEM di un idrogel 1:2. Dettaglio di un nodo. Si possono distinguere le diramazioni dei cilindri a partire da macroeliche di dimensioni maggiori

Misurando lo spessore dei tubi, è evidente la presenza delle diramazioni, come riportato in figura 3.50.

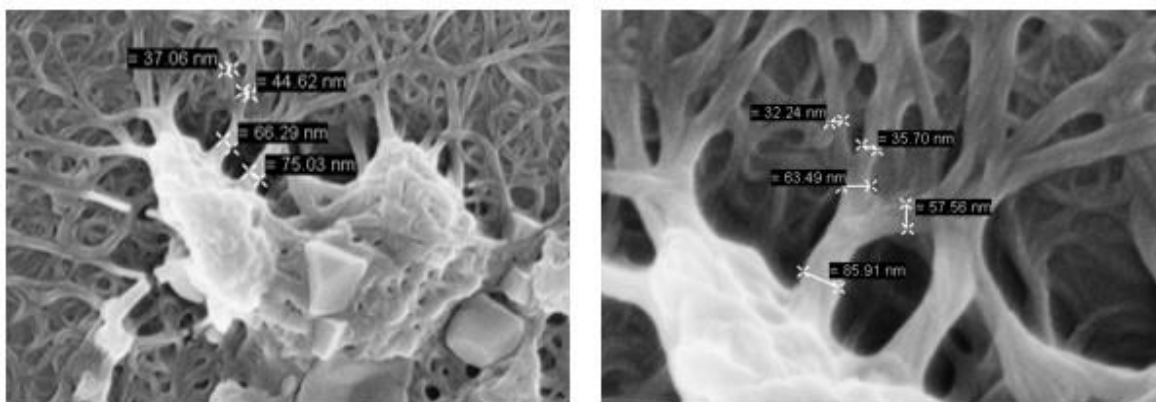


Fig. 3.50 Immagini SEM di un idrogel 1:2. Misura delle larghezze di alcuni cilindri a livello di un nodo

### ***3.5 Modello tridimensionale di un quadruplesso***

Alla fine di questo studio, viste le conoscenze acquisite sulla struttura dei G-quartets e dei G-quadruplexes, è stato possibile cimentarsi nella costruzione un modello 3D di un quadruplesso di G/GMP.

Lo scopo è stato quello di riuscire a comprendere appieno la struttura dei G-quadruplexes quando parte del network tridimensionale che compone l'idrogel di guanosine, capire come si dispone la carica negativa della GMP sulla superficie esterna del quadruplesso, quindi valutare quali sono le orientazioni dei quartetti più probabili.

Lo stesso modellino è stato costruito in tre varianti:

- Con la sola GMP, quindi senza alcuna guanosina nella struttura
- Con Gua e GMP in rapporto 1:1
- Con Gua e GMP ordinati in maniera casuale nel quadruplesso

La prima operazione eseguita è stata quella di costruire mediante il programma Avogadro un quartetto di guanosine, sulla base del modello PDB del G-quartet di un telomero, del PDB della 5'-guanosina monofosfato e della guanosina (trovati su RCSB PDB).

Di questo quartetto ne sono stati costruiti vari tipi: uno di sole GMP, uno di sole Gua, e alcuni con rapporti diversi tra G e GMP.

I G-quartets ottenuti sono stati convertiti in formato PDB.

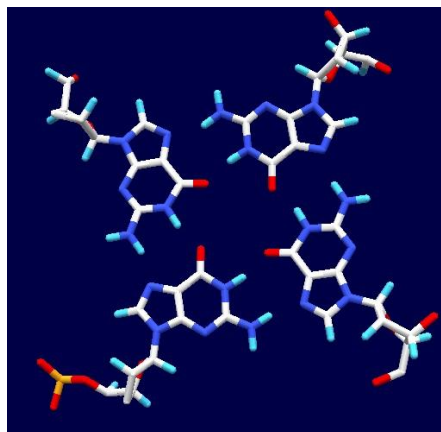


Fig. 3.51 G-quadruplex in formato PDB [33]

Per costruire un cilindro di guanosine a partire dai quartetti, è stato utilizzato il programma Chimera. A ogni quartetto ne è stato sovrapposto un altro, ad una distanza pari a 3.4Å, quella reale ricavata anche dalle analisi WAXS, e ruotandoli uno rispetto all'altro di un angolo arbitrario di 30°. A seconda del tipo di quadruplesso da costruire sono stati scelti i quartetti da utilizzare.

- Nel quadruplesso di sole GMP sono stati usati solo quartetti di GMP.
- Nel quadruplesso 1:1 sono stati usati solo quartetti composti da due Gua e due GMP.
- Nel quadruplesso misto sono stati utilizzati tutti i quartetti, in modo che la disposizione dei fosfati esterni della GMP fosse quanto più casuale possibile.

I quadruplessi ottenuti sono mostrati in figura 3.51.

I tre tubi di guanosine sono stati convertiti in formato *wrml* e *stl* e stampati grazie alla stampante 3D ZCorp 450, presente al SIMAU, mostrati in figura 3.53.



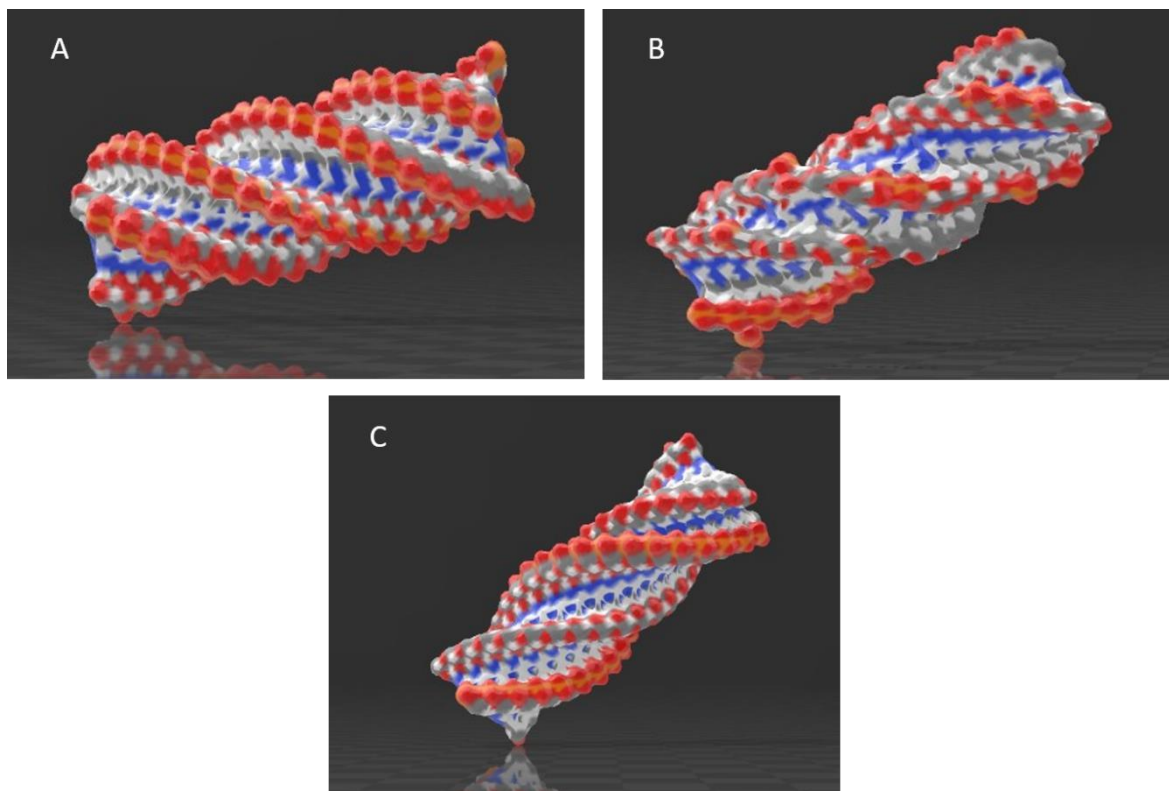


Fig. 3.52 (A) Modello 3D di un cilindro di GMPK<sup>+</sup>; (B) modello 3D di un cilindro di G/ GMPK<sup>+</sup> in proporzioni casuali; (C) modello 3D di un cilindro di G/ GMPK<sup>+</sup> in proporzione 1:1

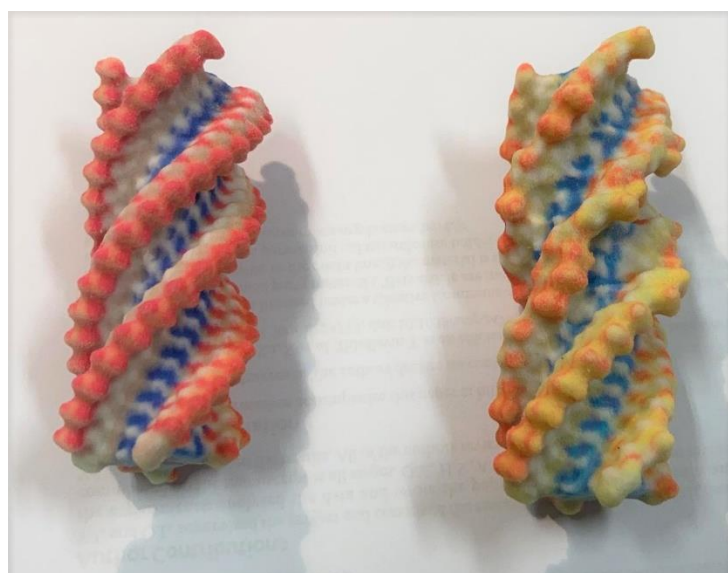
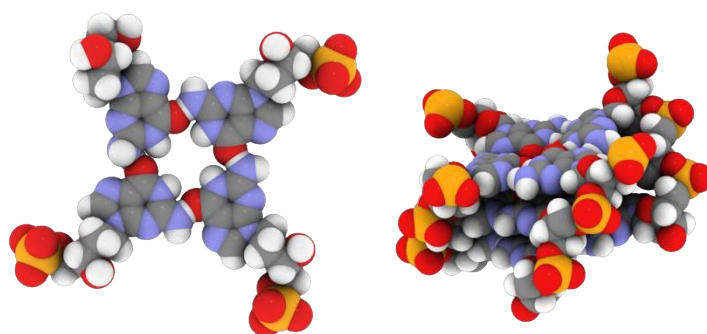


Fig. 3.53 Modelli 3D in gesso dei quadruplessi, a destra il modello casuale, a sinistra il modello con sole GMP. I colori sono quelli convenzionali.

Lo studio su questi quadruplessi modellati manualmente è stato poi implementato con l'utilizzo di un programma basato sull'Analisi Montecarlo. Grazie a questo, è stato possibile costruire un modello tridimensionale più realistico di un quadruplesso, cioè non rigido come in figura 3.52, ma con curvature tipiche del modello reale. La curvatura è una proprietà geometrica locale di una curva, in un modello come il quadruplesso è dato dall'angolo tra quartetti adiacenti.

Per farlo, è stato generato un insieme statistico rappresentativo di diverse conformazioni di curve spaziali, ponderate con dei fattori di Boltzmann. Vengono stabiliti degli angoli di orientazione tra ogni coppia di quartetti contigui: dove l'angolo è  $0^\circ$  i quartetti sono perfettamente paralleli, se l'angolo è diverso da  $0^\circ$  si crea un quadruplesso ricurvo, che quindi simulerà la flessibilità del quadruplesso.

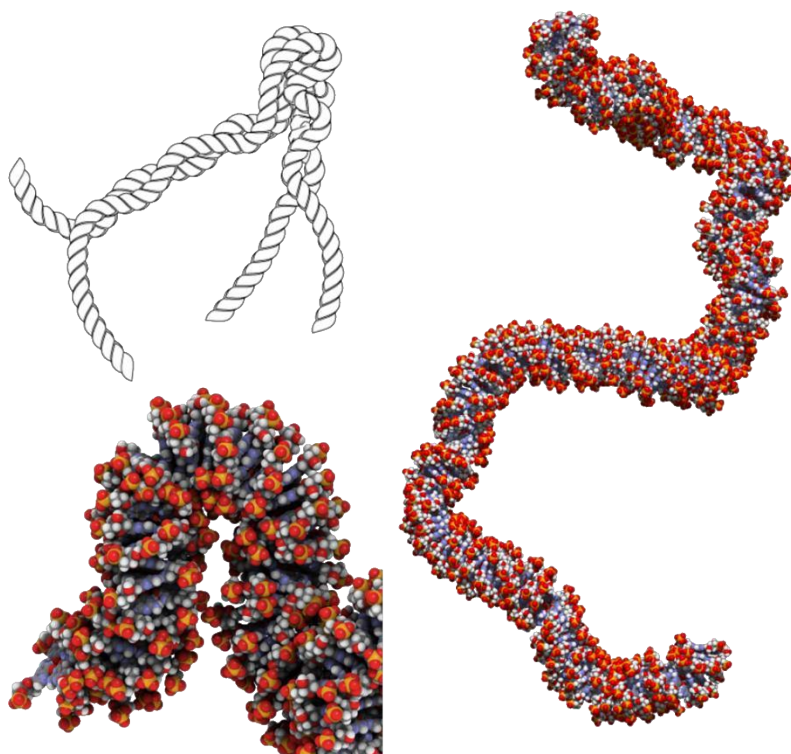
Il procedimento parte sempre dal modello di un quartetto, fino a costruire un cilindro più lungo.



*Fig. 3.54 G-quadruplex a sinistra, G-octamer a destra*

L'aspetto finale del quadruplesso non è rigido come il modellino costruito a mano, ma è flessibile e curvato in vari punti.

In figura 3.55 si può notare il dettaglio di una curva, dove i quartetti non sono paralleli ma inclinati di un certo angolo, ed è interessante notare come sia strutturalmente simile a una corda intrecciata, il che rispecchia quanto ottenuto dalle immagini AFM.



*Fig. 3.55 Modello 3D realistico di un G-quadruplex in formato PDB. Dettaglio su una curvatura*

#### ***4.CONCLUSIONI***

Questa tesi è stata sviluppata con lo scopo di proporre l'idrogel di guanosine come nanocarrier per il drug delivery.

Vista la similarità in termini di struttura e composizione con le più recenti e innovative nanobioteχνologie a DNA, è stato valutato se l'idrogel di G/GMPK<sup>+</sup>, essendo interamente costituito da derivati della guanina (una delle quattro basi azotate del DNA), si presta ad applicazioni biotecnologiche e mediche, in particolare come vettore per il trasporto di farmaci e chemioterapici.

Per testare questa ipotesi, sono stati innanzitutto scelti e utilizzati dei coloranti fluorescenti che potessero simulare un eventuale farmaco, in particolare la scelta è ricaduta sulla THT, il DAPI e la FITC-Destrano.

Durante lo svolgimento di questa tesi sono state perfonuate numerose tecniche basate su principi differenti, volte in parte a comprendere la natura dell'interazione tra i probes e i quadruplessi che formano il gel, considerando anche il comportamento del sistema in seguito all'esposizione a stimoli di varia natura (come l'innalzamento di temperatura) e in parte a indagare se l'interazione altera le caratteristiche strutturali del network.

Lo scopo è stato quello di valutare se, utilizzando e studiando il comportamento di questi probes, si potesse simulare l'effetto di un farmaco aggiunto all'idrogel, quindi capire come il complesso idrogel-farmaco possano reagire a determinate condizioni ambientali, e come le molecole possano diffondere ed essere rilasciate quando si trovano in corrispondenza del sito target, senza però alterare la naturale conformazione dei G-quadruplexes dell'idrogel stesso.

Le prime misure sono state volte a valutare l'interazione tra coloranti e idrogel: sono state utilizzate tecniche di spettroscopia e misure di fluorescenza per ricavare le costanti di legame dei probes.

Calcolate queste costanti di legame per la THT e per il DAPI, è stato possibile evidenziare che i diversi coloranti interagiscono con i quadruplessi in modo diverso: infatti la THT si lega intercalandosi tra G-quartets per  $\pi$ -stacking, mentre il DAPI lega preferenzialmente la superficie esterna dei G-quadruplexes in corrispondenza del solco laterale. La FITC-Destrano, essendo una molecola fortemente solubile, non sembra legarsi in alcun modo.

Successivamente, tramite le misure di diffusione verticale e di FRAP, è stato misurato il coefficiente di diffusione dei coloranti, che risulta strettamente collegato al tipo di interazione tra probe e quadruplessi.

Per quanto riguarda la diffusione verticale, tutti i coloranti sembrano diffondere tra le maglie del gel, ma con velocità diversa in maniera dipendente dalle loro dimensioni. Nel caso più specifico della FRAP, gli esperimenti sono stati fatti usando molecole di FITC-Destrano di diverso peso molecolare: i coefficienti di diffusione risultano dipendere dalle dimensioni delle molecole, mostrando come le molecole più piccole, non legandosi ai quadruplessi, diffondono più facilmente. Nel caso delle molecole di FITC 20kDa e 70kDa la diffusione è comunque rada, ma resa più difficoltosa dalle maggiori dimensioni.

Nel caso della THT, gli esperimenti dimostrano che questa molecola diffonde nell'idrogel in misura minore rispetto alla FITC poiché, a differenza di quest'ultima, tende a legarsi ai quartetti. Anche per il DAPI la diffusione è difficoltosa perché il colorante si lega ai quadruplessi. Tuttavia, in questo caso non è stato possibile ottenere dei risultati ripetibili di FRAP per via dell'aspetto troppo disomogeneo del campione.

Si è passato, poi, a un'analisi strutturale e conformazionale dell'idrogel: lo scopo era quello di valutare se le interazioni tra coloranti e quadruplessi potessero alterare la struttura 3D dell'idrogel, e/o se ne risentisse la rigidità del sistema. Sono state effettuate misure di Diffrazione dei Raggi X e Small Angle X-Ray Scattering e Wide Angle X-Ray Scattering, valutazioni mediante Microscopia a Forza Atomica (AFM) e Microscopia Elettronica a Scansione (SEM).

I risultati di queste analisi hanno evidenziato una effettiva variazione nella rigidità del network in relazione al colorante utilizzato: nel caso del DAPI è evidente un aumento della fluidità del sistema e un network più lasso; anche le distanze tra quartetti sembrano subire un aumento causato dal legame con il colorante e un conseguente richiamo di acqua, che rende questi idrogel meno viscosi. Nel caso della THT, il sistema rispecchia le caratteristiche di fluidità tipiche di un idrogel nativo, tuttavia le distanze tra quadruplessi aumentano quando è presente il colorante. La THT sembra avere un comportamento peculiare rispetto al DAPI: probabilmente, intercalandosi tra quartetti, la THT altera maggiormente il complesso sistema di forze attrattive e repulsive del reticolo del gel che, per tornare all'equilibrio, si riarrangia variando le distanze tra quadruplessi e la rotazione reciproca tra quartetti.

I risultati ottenuti dal presente lavoro di tesi sono molto promettenti.

L'idrogel di guanosine sembra essere in grado di interagire con molecole di varia natura senza alterare la propria struttura, prestandosi a future sperimentazioni con molecole di interesse biologico e/o chemioterapici.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Lin C, Liu Y, Rinker S, Yan H. *DNA tile based self-assembly: building complex nanoarchitectures*. Chemphyschem. 2006 Aug 11;7(8):1641-7. doi: 10.1002/cphc.200600260. PMID: 16832805.
2. Reif, John & Chandran, Harish & Gopalkrishnan, Nikhil & Labean, Thomas. (2012). *Self-assembled DNA Nanostructures and DNA Devices*. Nanofabrication Handbook. 10.1201/b11626-17.
3. Angell C, Xie S, Zhang L, Chen Y. *DNA Nanotechnology for Precise Control over Drug Delivery and Gene Therapy*. Small. 2016 Mar 2;12(9):1117-32. doi: 10.1002/sml.201502167. Epub 2016 Jan 3. PMID: 26725041.
4. Nishikawa M, Rattanakit S, Takakura Y. *DNA-based nano-sized systems for pharmaceutical and biomedical applications*. Adv Drug Deliv Rev. 2010 Apr 30;62(6):626-32. doi: 10.1016/j.addr.2010.03.006. Epub 2010 Mar 15. PMID: 20230867.
5. Seeman NC. *An overview of structural DNA nanotechnology*. Mol Biotechnol. 2007 Nov;37(3):246-57. doi: 10.1007/s12033-007-0059-4. Epub 2007 Jul 12. PMID: 17952671; PMCID: PMC3479651.
6. Gretchen Marie Peters and Jennery T. Davis, ‘*Supramolecular gels made from nucleobase, nucleoside and nucleotide analogs*’, Royal Society of Chemistry 45, 3188-3206 (2016).
7. Lee SC, Kwon IK, Park K. *Hydrogels for delivery of bioactive agents: a historical perspective*. Adv Drug Deliv Rev. 2013 Jan;65(1):17-20. doi: 10.1016/j.addr.2012.07.015. Epub 2012 Aug 18. PMID: 22906864; PMCID: PMC3514585.

8. Ian Harrison and Fabrizio Spada, '*Hydrogels for Atopic Dermatitis and Wound Management: A Superior Drug Delivery Vehicle*',  
Pharmaceutics 10, no. 2 (14 June 2018): 71,  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020071>.
9. Bhattacharyya T, Saha P, Dash J. *Guanosine-Derived Supramolecular Hydrogels: Recent Developments and Future Opportunities*. ACS Omega. 2018 Feb 22;3(2):2230-2241. doi: 10.1021/acsomega.7b02039. PMID: 31458525; PMCID: PMC6641365.
10. Carducci F, Yoneda JS, Itri R, Mariani P. *On the structural stability of guanosine-based supramolecular hydrogels*. Soft Matter. 2018 Apr 18;14(15):2938-2948. doi: 10.1039/c8sm00299a. PMID: 29611597.
11. Pedroso IM, Duarte LF, Yanez G, Baker AM, Fletcher TM. *Induction of parallel human telomeric G-quadruplex structures by Sr(2+)*. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jun 22;358(1):298-303. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.126. Epub 2007 Apr 27. PMID: 17485073.
12. Yu Y, Nakamura D, DeBoyace K, Neisius AW, McGown LB. *Tunable thermoassociation of binary guanosine gels*. J Phys Chem B. 2008 Jan 31;112(4):1130-4. doi: 10.1021/jp709613p. Epub 2008 Jan 9. PMID: 18181610.
13. Mariani P, Spinozzi F, Federiconi F, Ortore MG, Amenitsch H, Spindler L, Drevensek-Olenik I. *Guanosine quadruplexes in solution: a small-angle x-ray scattering analysis of temperature effects on self-assembly of deoxyguanosine monophosphate*. J Nucleic Acids. 2010 Jun 21;2010:472478. doi: 10.4061/2010/472478. PMID: 20725625; PMCID: PMC2915817.
14. Baldassarri EJ, Ortore MG, Spinozzi F, Round A, Ferrero C, Mariani P. *K vs. Na Effects on the Self-Assembly of Guanosine 5'-Monophosphate:*



- A Solution SAXS Structural Study*<sup>+</sup>. Nanomaterials (Basel). 2020 Mar 28;10(4):629. doi: 10.3390/nano10040629. PMID: 32231081; PMCID: PMC7221663.
15. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. *Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry*. J Photochem Photobiol B. 2013 Jul 5;124:1-19. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013. Epub 2013 Apr 6. PMID: 23648795.
  16. Bhasikuttan AC, Mohanty J. *Targeting G-quadruplex structures with extrinsic fluorogenic dyes: promising fluorescence sensors*. Chem Commun (Camb). 2015 May 4;51(36):7581-97. doi: 10.1039/c4cc10030a. PMID: 25716687.
  17. Eric C. Long; Jacqueline K. Barton. *On demonstrating DNA intercalation*. Accounts of Chemical Research 1990, 23, 9, 271-273
  18. Mohanty J, Barooah N, Dhamodharan V, Harikrishna S, Pradeepkumar PI, Bhasikuttan AC. *Thioflavin T as an efficient inducer and selective fluorescent sensor for the human telomeric G-quadruplex DNA*. J Am Chem Soc. 2013 Jan 9;135(1):367-76. doi: 10.1021/ja309588h. Epub 2012 Dec 21. PMID: 23215453.
  19. Biancardi A, Biver T, Burgalassi A, Mattonai M, Secco F, Venturini M. *Mechanistic aspects of thioflavin-T self-aggregation and DNA binding: evidence for dimer attack on DNA grooves*. Phys Chem Phys. 2014 Oct 7;16(37):20061-72. doi: 10.1039/c4cp02838d. PMID: 25130260.
  20. Reis LA, Rocha MS. *DNA interaction with DAPI fluorescent dye: Force spectroscopy decouples two different binding modes*. Biopolymers. 2017 May;107(5). doi: 10.1002/bip.23015. PMID: 28124375.

21. Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD. *DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at sites and intercalation at AU sites.* Biochemistry. 1992 Mar 31;31(12):3103-12. doi: 10.1021/bi00127a010. PMID: 1372825.
22. Yoneda JS, de Araujo DR, Sella F, Liguori GR, Liguori TTA, Moreira LFP, Spinozzi F, Mariani P, Itri R. *Self-assembled guanosine-hydrogels for drug-delivery application: Structural and mechanical characterization, methylene blue loading and controlled release.* Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2021 Feb;121:111834. doi: 10.1016/j.msec.2020.111834. Epub 2020 Dec 30. PMID: 33579472.
23. Zhao H, Feng H, Liu J, Tang F, Du Y, Ji N, Xie L, Zhao X, Wang Z, Chen Q. *Dual-functional guanosine-based hydrogel integrating localized delivery and anticancer activities for cancer therapy.* Biomaterials. 2020 Feb;230:119598. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119598. Epub 2019 Nov 3. PMID: 31722785.
24. Thambi T, Li Y, Lee DS. *Injectable hydrogels for sustained release of therapeutic agents.* J Control Release. 2017 Dec 10;267:57-66. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.08.006. Epub 2017 Aug 4. PMID: 28827094.
25. Aslanoglu M. *Electrochemical and spectroscopic studies of the interaction of proflavine with DNA.* Anal Sci. 2006 Mar;22(3):439-43. doi: 10.2116/analsci.22.439. PMID: 16733319.
26. M. Ilanchelian, R. Ramaraj, *Emission of thioflavin T and its control in the presence of DNA*, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, Volume 162, Issue 1, 2004, Pages 129-137, ISSN 1010-6030, doi.org/10.1016/S1010-6030(03)00320-4.

27. Ishikawa-Ankerhold HC, Ankerhold R, Drummen GP. *Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM*. *Molecules*. 2012 Apr 2;17(4):4047-132. doi: 10.3390/molecules17044047. PMID: 22469598; PMCID: PMC6268795.
28. Branco MC, Pochan DJ, Wagner NJ, Schneider JP. *Macromolecular diffusion and release from self-assembled beta-hairpin peptide hydrogels*. *Biomaterials*. 2009 Mar;30(7):1339-47. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.11.019. Epub 2008 Dec 18. PMID: 19100615; PMCID: PMC2642624.
29. Kang M, Day CA, Kenworthy AK, DiBenedetto E. *Simplified equation to extract diffusion coefficients from confocal FRAP data*. *Traffic*. 2012 Dec;13(12):1589-600. doi: 10.1111/tra.12008. Epub 2012 Oct 10. PMID: 22984916; PMCID: PMC3731631.
30. Klonis N, Rug M, Harper I, Wickham M, Cowman A, Tilley L. *Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics*. *Eur Biophys J*. 2002 Mar;31(1):36-51. doi: 10.1007/s00249-001-0202-2. PMID: 12046896.
31. Baschnagel J, Meyer H, Wittmer J, et al. *Semiflexible Chains at Surfaces: Worm-Like Chains and beyond*. *Polymers (Basel)*. 2016;8(8):286. Published 2016 Aug 8. doi:10.3390/polym8080286
32. Sennato. S. *Scanning probe microscopy: AFM*. 2017
33. <https://www.rcsb.org>
34. T. Rades, A. Mullertz and Y. Perrie. *Springer Controlled Release Society Book Series on Advances in Science and Technology: Analytical Techniques in Pharmaceutical Sciences*, Section 5 Imaging

Techniques, Chapter 21 Applications of AFM in Pharmaceutical Sciences. (Eds.), (2014)', n.d.