



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

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

*Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata*

---

**Caratterizzazione strutturale dei G-Quadruplex nell'idrogel di  
guanosine: studio della flessibilità e periodicità tramite microscopio a  
forza atomica (AFM)**

**Structural characterization of G-Quadruplexes in guanosine hydrogel:  
flexibility and periodicity by atomic force microscopy (AFM)**

Candidato:

**De Marini Andrea**

Relatore:

**Prof. Mariani Paolo**

Sessione Estiva

Anno Accademico 2020-2021



# INDICE

<b>SCOPO DELLA TESI</b>	6
<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</b>	
1.1: <i>acidi nucleici</i>	9
1.2: <i>Applicazione dell'AFM su DNA</i>	17
1.3: <i>Basi azotate e derivati</i>	19
1.3.1: <i>guanina</i>	19
1.3.2: <i>guanosina e derivati</i>	21
1.4: <i>Idrogel</i>	24
1.4.1: <i>Storia degli Idrogel</i>	26
1.4.2: <i>Idrogel di G-Quadruplexes</i>	28
1.4.3: <i>Studi di AFM su Idrogel di G/GMP</i>	31
<b>CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI</b>	
2.1: <i>Preparazione dei campioni</i>	34

2.2: <i>Titolazione acido-base</i>	35
2.3: <i>Formazione dell'Idrogel</i>	38
2.4: <i>Indagine AFM</i>	39
2.4.1: <i>Allestimento campioni</i>	41
2.4.2: <i>Microscopia a scansione di sonda</i>	41
2.4.3: <i>Caratteristiche generali AFM</i>	43
2.4.4: <i>Componenti AFM</i>	45
2.4.5: <i>Metodi operativi dell'AFM</i>	49
2.5: <i>Valutazione immagini ed uso di Software</i>	50
2.5.1: <i>Gwyddion</i>	50
2.5.2: <i>IgorPro</i>	51
<b><i>CAPITOLO 3: analisi dei risultati e discussione</i></b>	
3.1: <i>Prefazione immagini AFM</i>	58
3.2: <i>Filamenti singoli</i>	62
3.3: <i>Filamenti curvi</i>	68
3.4: <i>Nodi</i>	73
<b><i>CAPITOLO 4: conclusioni</i></b>	98



## SCOPO DELLA TESI

Gli idrogel ad alto contenuto di acqua, formati dall'auto assemblaggio di piccole molecole di origine biologica, fanno parte di sistemi molecolari che negli ultimi decenni hanno riscontrato un grande interesse nella ricerca per via delle promettenti applicazioni biotecnologiche e nanotecnologiche. Diverse sono le molecole che sono state oggetto di studio, e fra tutte spiccano, per semplicità strutturale nonché per la loro intrinseca biocompatibilità, piccoli peptidi. Tuttavia i peptidi non sono gli unici sistemi biomolecolari capaci di andare incontro ad auto assemblaggio e quindi a formare gel. Un comportamento simile è stato osservato e studiato già da tempo in molecole di natura nucleica. E' ben noto, infatti, che la guanina (G) e derivati possono organizzarsi a formare idrogel: la guanosina-5'-monofosfato (GMP) ad esempio si auto-assembla in soluzione acquosa a formare strutture liquido-cristalline di tipo colonnare, in cui le unità fondamentali sono delle tetrad di GMP (dette G-quartet) impilate le une sulle altre a formare dei quadruplessi (detti G-quadruplex). Tuttavia, l'aggiunta di guanosina (GUA) alla GMP comporta la formazione di idrogel ad alto contenuto di acqua, formati da una rete supramolecolare 3D di quadruplessi altamente flessibili legati da cross-

link di natura non covalente. Questi idrogel hanno viscosità programmabile (legata cioè alla composizione in GUA e GMP) e sono molto stabili, ricchi di acqua (fino al 99% del loro peso), biocompatibili e biodegradabili. Essendo dei gel fisici risultano sensibile a "stimoli" ambientali, come variazioni di pH o di temperatura. Tutte queste caratteristiche li rendono molto interessanti nel campo bionanotecnologico, ad esempio come sistemi per il drug-delivery a rilascio controllato.

Scopo di questa tesi è stato quello di analizzare le proprietà strutturali dei gel, in particolare esaminando in maniera approfondita le informazioni sui quadruplessi, sulle interazioni non covalenti che si sviluppano tra loro (viste anche come nodi o superavvolgimenti) e sulla rete 3D da loro formata che sono presenti nelle immagini di Microscopia a Forza Atomica (AFM). Infatti, mediante questa tecnica è possibile ottenere immagini ad alta risoluzione di questi aggregati filamentosi a composizione mista di GUA/GMP e tramite l'uso di opportuni software è possibile ricavare informazioni dettagliate, necessarie per una corretta interpretazione strutturale e funzionale. Come già detto, la guanosina-5'-monofosfato tende a formare in soluzione acquosa lunghe strutture supramolecolari colonnari, la cui struttura di base consta di un "piatto" planare costituito da quattro molecole di GMP tenute insieme da legami idrogeno. L'impilamento di ogni singolo piatto comporta la

formazione di una struttura colonnare ad elica (quadruplesso) che permane anche dopo addizione di guanosina (GUA): tuttavia la presenza di GUA determina maggior flessibilità dei quadruplessi e una riduzione della carica superficiale e per conseguenza la formazione della rete tridimensionale. Le immagini AFM di queste eliche miste hanno permesso di annotare come le stesse assumano a causa delle possibili interazioni e della loro grande flessibilità una grande varietà di forme. Nelle immagini di AFM sono infatti osservabili una miriade di filamenti, disposti sia singolarmente che intrecciati, quasi a formare delle “reti” e degli anelli, e ancora dei corpi visibilmente più densi e che non assumono aspetto filamentoso ma bensì simil nodulare. Tramite l’uso di software dedicati, è stato possibile stabilire le altezze per tutta la lunghezza dei filamenti, sia quando presenti in forma singola che intrecciata, nonché le dimensioni dei corpi densi. Questa tesi riporta dunque una descrizione delle differenti morfologie degli aggregati supramolecolari che si possono osservare in questi sistemi e rappresenta la prima annotazione di tali strutture, al fine di cogliere le possibili relazioni tra proprietà di flessibilità e periodicità e composizione.



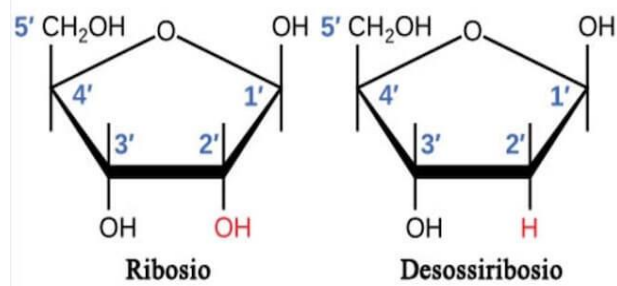
## CAPITOLO 1: Introduzione

### *1.1: acidi nucleici*

Gli acidi nucleici quali DNA ed RNA sono macromolecole di rilevante importanza biologica in quanto depositari dell'informazione genetica indispensabile per il normale sviluppo di qualsiasi organismo vivente. Entrambe le macromolecole ,di DNA ed RNA, sono polimeri aventi come base dei particolari monomeri, detti nucleotidi che possiedono un peso molecolare di migliaia di Dalton. Ogni nucleotide è composto di tre parti distinte.

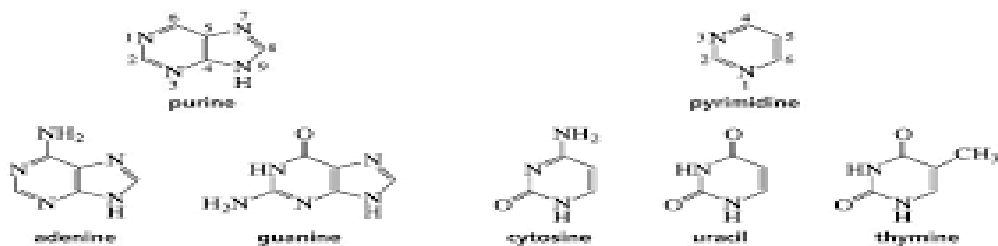
- Zucchero pentoso a cinque atomi di carbonio
- Una base azotata
- Un gruppo fosfato

Nel caso dell'RNA il pentoso è il Ribosio, mentre per il DNA troviamo il desossiribosio come mostrato in figura 1.1.



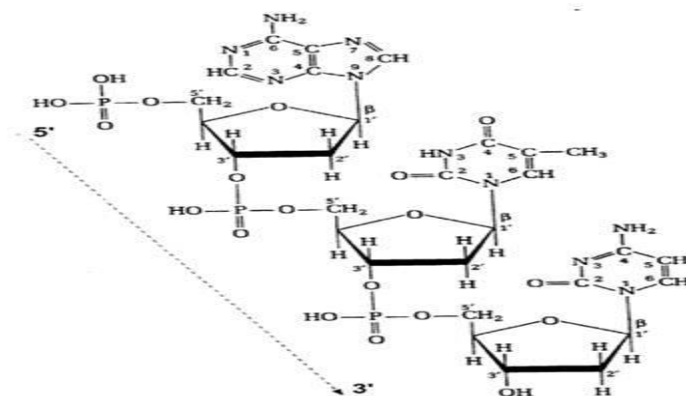
**Figura 1.1:** strutture del ribosio e desossiribosio gli zuccheri pentosi dell'RNA e DNA, rispettivamente.

La figura 1.1 mostra le differenze strutturali dei due pentosi, infatti i due zuccheri differiscono per i gruppi sostituenti legati al carbonio 2', notiamo infatti la presenza di un gruppo idrossilico(OH) nel ribosio, ed un semplice idrogeno(H) nel desossiribosio. Le basi azotate, altre molecole che costituiscono gli acidi nucleici, possono essere raggruppate in due categorie, che sono denominate: Purine e Pirimidine, figura 1.2.



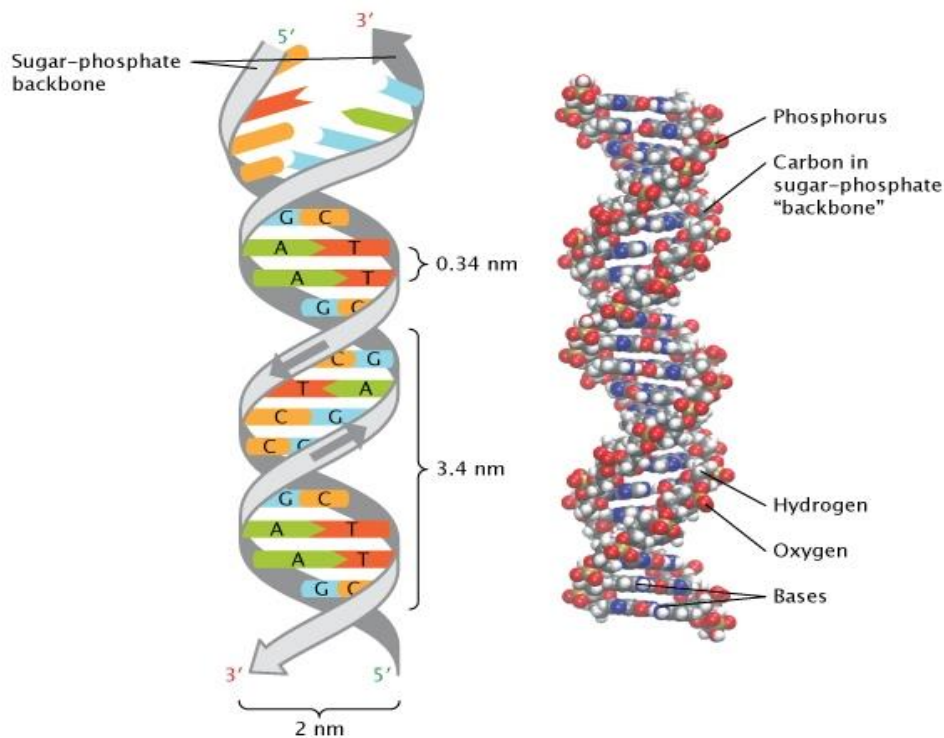
**Figura 1.2:** schema riassuntivo della basi azotate di DNA e RNA.

Nel DNA le purine sono l'adenosina (A) e la guanina (G) mentre le pirimidine sono la timina (T) e la citosina (C). La stessa classificazione vale anche per l'RNA ad eccezione della timina, che è rimpiazzata dall'uracile (U). Nel DNA e nell'RNA le basi sono sempre unite all'atomo di carbonio 1' del pentoso tramite un legame di tipo covalente. Le basi puriniche sono legate all'azoto 9, mentre quelle pirimidiniche si legano all'azoto 1. Il gruppo fosfato, infine, si lega al carbonio 5' dello zucchero sia del DNA che dell'RNA. E' bene tenere presente che la struttura costituita da pentoso e base azotata viene detta nucleoside, pertanto un nucleotide viene detto anche nucleoside fosfato. Per la formazione dei polinucleotidi, componenti DNA ed RNA, i nucleotidi vengono uniti da un legame covalente, ovvero da un legame fosfodiesterico, tra il gruppo fosfato attaccato di carbonio al 5' del pentoso di un nucleotide ed il carbonio in 3' del pentoso appartenente all'altro nucleotide.



**Figura 1.3:** formazione di filamento di acido nucleico.

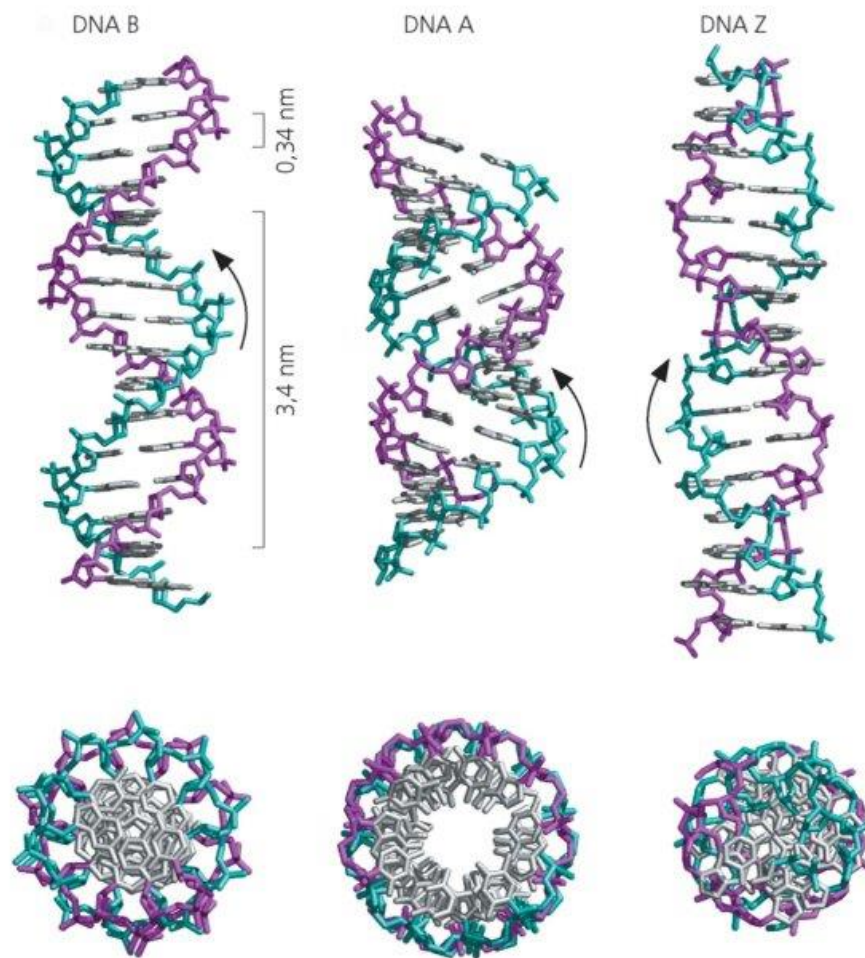
Nel modello proposto da Watson e Crick, la molecola di DNA possiede diverse caratteristiche. La molecola consiste di due catene polinucleotidiche avvolte l'una intorno all'altra a formare un doppia elica destrorsa, avente diametro di **2nm**. Inoltre le due catene sono antiparallele, infatti i due filamenti sono orientati in direzioni opposte. In quanto uno dei filamenti è orientato in direzione 5'-3', mentre l'altro corre nella direzione opposta, ovvero 3'-5'. Gli scheletri di zucchero-fosfato si trovano all'esterno della doppia elica, mentre le basi sono rivolte verso l'asse centrale. Le basi di entrambe le catene hanno struttura piatta e disposta perpendicolarmente all'asse longitudinale del DNA. Le basi dei filamenti opposti sono unite da legami idrogeno, e sono consentiti solo due appaiamenti specifici: A-T e C-G. Le coppie di basi sono distanziate di 0,34nm nell'elica di DNA, un giro completo dell'elica richiede **3,4nm** quindi ci sono 10 coppie di basi per ogni giro d'elica (*Watson and Crick.,1953*). A causa del tipo di legame tra le basi, le impalcature zucchero-fosfato della doppia elica non si trovano ad avere sempre la stessa distanza dall'asse dell'elica. Tutto ciò comporta la formazione di due solchi aventi differente dimensione e pertanto denominati solco maggiore e solco minore come mostrato in figura 1.4 .



**Figura 1.4:** scheletro riassuntivo della doppia elica di DNA.

Il modello appena descritto prende il nome di B-DNA (*Watson and Crick.,1953*) ed è la forma prevalente in ambiente umido (*P.J Russel.,GENETICA II*). Quando l'umidità è relativamente bassa, il DNA assume un'altra configurazione, detta A-DNA. Sia B-DNA che A-DNA presentano eliche destrorse e portano rispettivamente 10 e 10,9 coppie di basi per giro completo dell'elica. Questi valori corrispondono in modo molto peculiare ai dati derivati dallo studio delle fibre di DNA ai raggi X. In conclusione gli studi di diffrazione ai raggi X, suggeriscono che A-DNA assume una configurazione più corta e larga, con solco maggiore profondo e

stretto e solco minore largo e poco profondo. Mentre la conformazione B-DNA risulta essere più sottile e slanciata rispetto a A-DNA, con un ampio solco maggiore ed un solco minore stretto e di uguale profondità. Infine viene riportata anche un'altra configurazione detta Z-DNA. Detta configurazione si presenta come elica sinistrorsa e dispone 12 paia di basi per giro d'elica. Le basi sono inclinate di 8,8 gradi rispetto alla perpendicolare con l'asse dell'elica. Nello Z-DNA l'elica è sottile ed ha forma elongata, mostrando un solco minore profondo ed un solco maggiore posto più vicino alla superficie dell'elica tanto da non risultare in maniera distinta. Infine nell'elica dello Z-DNA dispone i gruppi fosfato più vicino rispetto alle altre forme precedentemente descritte.



**Figura 1.5:** varie conformazioni in cui si presenta il DNA.

Altro costituente del DNA cromosomico sono le sequenze telomeriche presenti alle estremità dei cromosomi. Durante il processo di replicazione del DNA, l'enzima DNA polimerasi catalizza la formazione di nuovi filamenti di DNA, tramite delle piccole sequenze nucleotidiche dette primers. I primers

verranno rimossi in seguito, e quindi verrà a formarsi un'estremità con del DNA a singolo filamento. La telomerasi è l'enzima deputato al "riempimento" di quelle estremità terminali di DNA a singolo filamento che si formano durante la replicazione. Attraverso questo meccanismo è possibile allungare il DNA, evitando così che si perda l'informazione genetica ad ogni replicazione cellulare. Il DNA telomerico consiste di una regione cromosomica molto importante, composta da una specifica sequenza ricca in guanine, 5'-TTAGGG-3'. Tale sequenza è la regione dove la telomerasi agisce. Le sequenze ricche di guanina permettono l'aggregazione di queste basi azotate attraverso interazioni specifiche che permettono la formazione del ben più noto G-quadruplex. In questo ambito tale aggregazione provoca la diminuzione dell'attività telomerasica. Inoltre i profili di espressione indicano che il gene della telomerasi è relativamente espresso nelle cellule somatiche o sane, mentre risulta particolarmente espresso nelle cellule tumorali (*Lauren Pecorino.,2008*). Il tutto porta a riflettere come i G-quadruplex possono essere considerati come possibili target nella terapia antitumorale. Infatti la stabilizzazione dei G-quadruplex previene l'attività della telomerasi, prevenendo così la proliferazione delle cellule tumorali, quindi sono da considerarsi come promotori di oncogeni come il classico c-Myc (*Dash end Saha., 2016*).



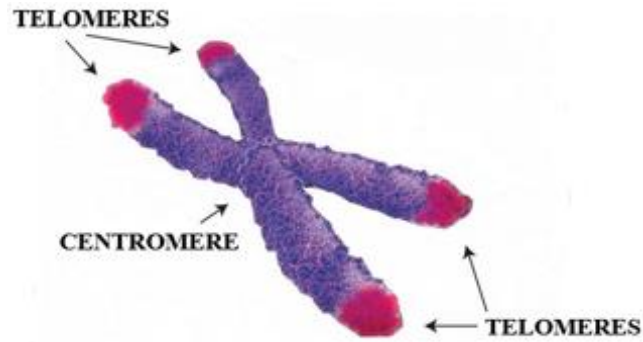
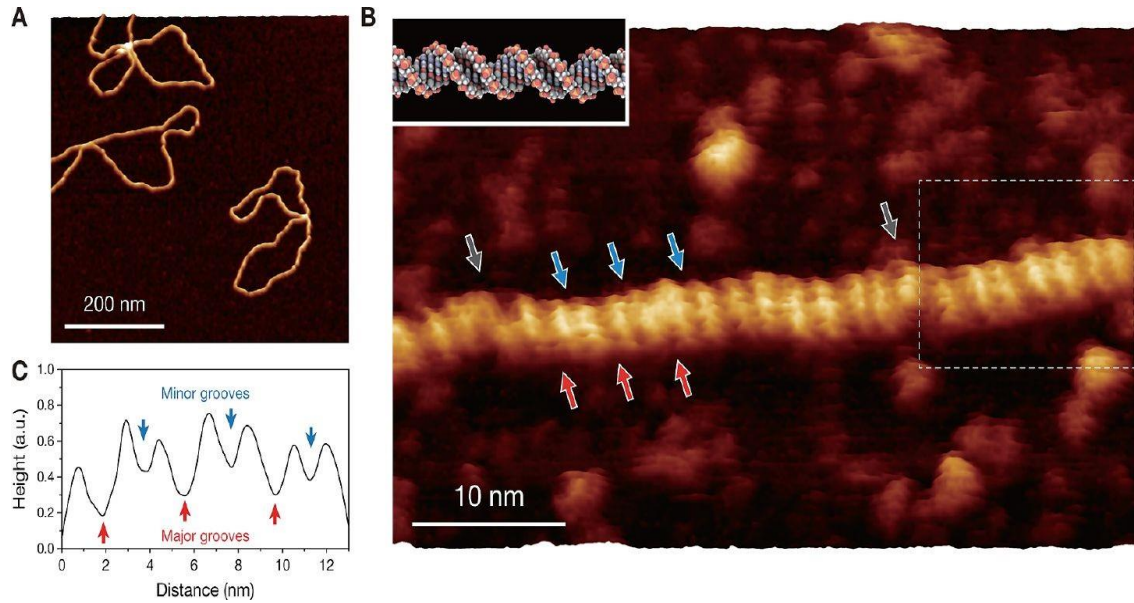


Figura 1.6: struttura telomeri.

## 1.2: Applicazione dell'AFM sul DNA

Dopo che Watson e Crick (*Watson and Crick.,1953*) fornirono il loro modello, ci sono stati ulteriori tentativi di indagine sulla struttura del DNA, e l'AFM si è dimostrata una valida tecnica di visualizzazione per strutture biomolecolari in soluzione (*Binnig et al.,1986*). In particolare, l'utilizzo di una variante della canonica AFM, ovvero l'FM-AFM, si è dimostrata idonea nell'ottenere immagini di dsDNA con minuziosi dettagli come mostra la figura 1.7 (*Ido et al.,2013*).



**Figura 1.7:** immagini ottenute tramite FM-AFM, in 1.5a DNA plamidico p UC18, 1.5b solchi maggiore e minori, 1.5c valori dei solchi. Shinichiro Ido, Kenjiro Kimura, Noriaki Oyabu, Kei Kobayashi, Masaru Tsukada, Kazumi Matsushige, and Hirofumi Yamada, “Beyond the Helix Pitch: Direct Visualization of Native DNA in Aqueous Solution” Vol.7 no.2 1817-1822., 2013.

La figura sovrastante, mostra una triade di immagini ottenute tramite FM-AFM, partendo da una prima immagine a bassa risoluzione dove è mostrato del DNA plasmidico(pUC18). Le frecce blue e rosse mostrano un particolare molto importante, ovvero la presenza dei solchi tipici dell’impalcatura del B-DNA, infine nell’immagine 1.7c sono riportati i valori dei solchi maggiore e minore (Ido et al.,2013). La somma dello spessore totale dei due solchi, assume valore di 3,7nm con una deviazione standard di 0,15nm (Ido et al.,2013) , tale valore, risulta essere diverso di quello riportato sul modello (3,4nm) classico proposto da Watson e Crick, basato su studi di diffrazione ai

raggi-X (*Watson and Crick.,1953*). Questo significa che il valore riportato ,del passo dell'elica, di 3,7nm con deviazione standard di 0,15nm, sembrerebbe il valore reale che assume in condizioni fisiologiche(*Ido et al.,2013*).

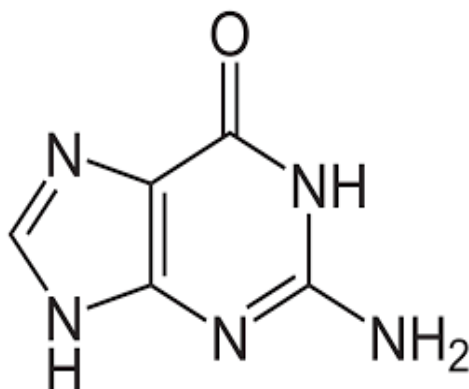
### *1.3: Basi azotate e derivati.*

Le basi azotate compongono i nucleotidi degli acidi nucleici, DNA ed RNA, e se ne distinguono due categorie quali: purine e pirimidine. Alle purine appartengono le basi Adenina e Guanina, mentre alle pirimidine appartengono la citosina, timina ed infine l'uracile che è presente nell'RNA al posto della timina che è costituente esclusiva del DNA. Le basi azotate del DNA si appaiono tra di loro mediante legami idrogeno, mentre nell'RNA, essendo solitamente a singolo filamento, non risultano essere appaiate tra di loro.

#### *1.3.1: Guanina*

Come descritto nei precedenti paragrafi la struttura che compone il DNA è formata da tre specie chimiche distinte quali: un gruppo fosfato, uno zucchero pentoso ed una base azotata. Tra le basi azotate, in questo elaborato, ci siamo focalizzati sulla Guanina ed i suoi derivati. La Guanina rientra nelle basi

azotate puriniche, essendo costituita da un anello pirimidinico fuso ad un amidazolo figura 1.8.



**Figura 1.8:** *struttura della Guanosina.*

La Guanina si presenta come un solido cristallino, avente una massa molecolare di 151,12g/mol, ed è solubile in acqua per via del suo comportamento aromatico. Può interagire con altre guanine tramite interazioni di  $\pi$ -stacking, ed essendo una base azotata, va ad interagire con la sua base corrispondente, ovvero la citosina, tramite un'interazione non covalente. La natura di tale interazione, di appaiamento di basi, è stata bene spiegata grazie al modello di Watson e Crick. Tale appaiamento di basi azotate, e quindi la formazione dei legami idrogeno tra di esse, è un fenomeno necessario per la formazione della doppia elica. Tuttavia tale interazione, tra basi, non è l'unica descritta, infatti, tra le interazioni di natura non covalente, troviamo anche le interazioni di Hoogsteen, che porta alla formazione di una

struttura planare, composta da quattro Guanine , tenuta insieme da legami idrogeno. Questa struttura planare prende il nome di G-quartets, che possiede uno spazio vuoto al suo interno, come è osservabile nella figura 1.9.

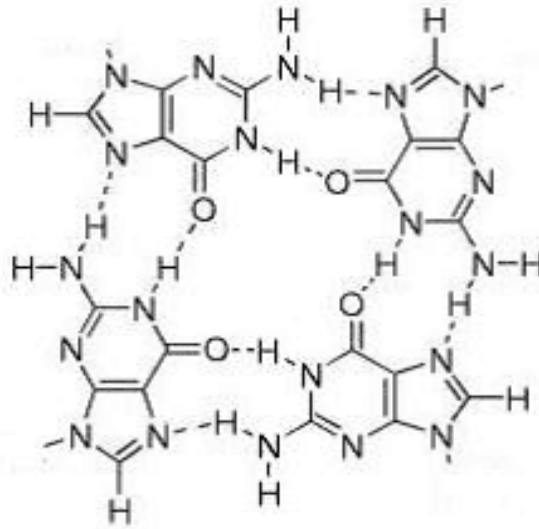
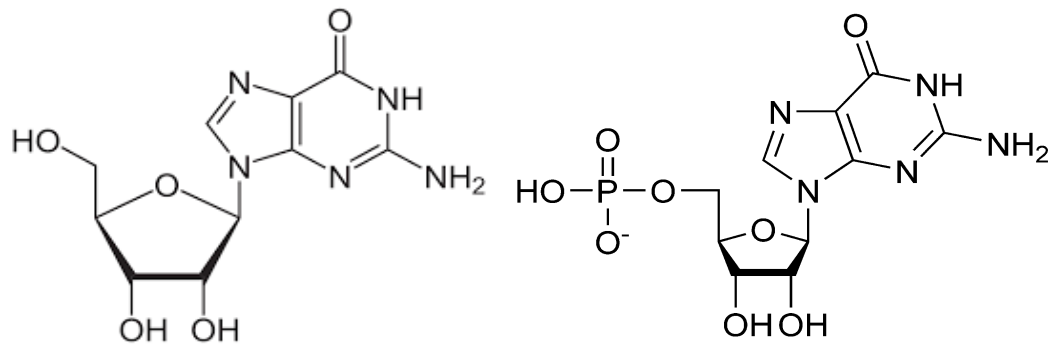


Figura 1.9: struttura del G-Quartets.

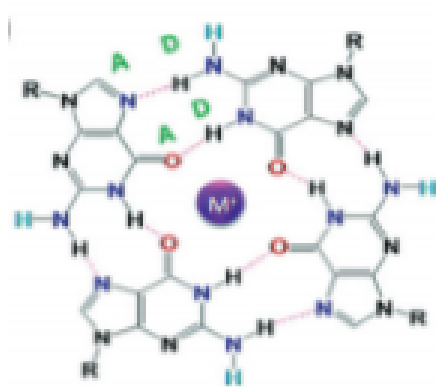
### 1.3.2: Guanosina e derivati

Quando la guanina si lega ad uno zucchero ribosio, si ha la formazione di una nuova specie chimica detta nucleoside, e nello specifico prende il nome di guanosina. Una guanosina a sua volta, può legarsi ad uno o più gruppi fosfati, acquisendo quindi nella propria nomenclatura i suffissi mono-, bi- e tri-fosfato, a seconda del numero dei fosfati legati allo zucchero.



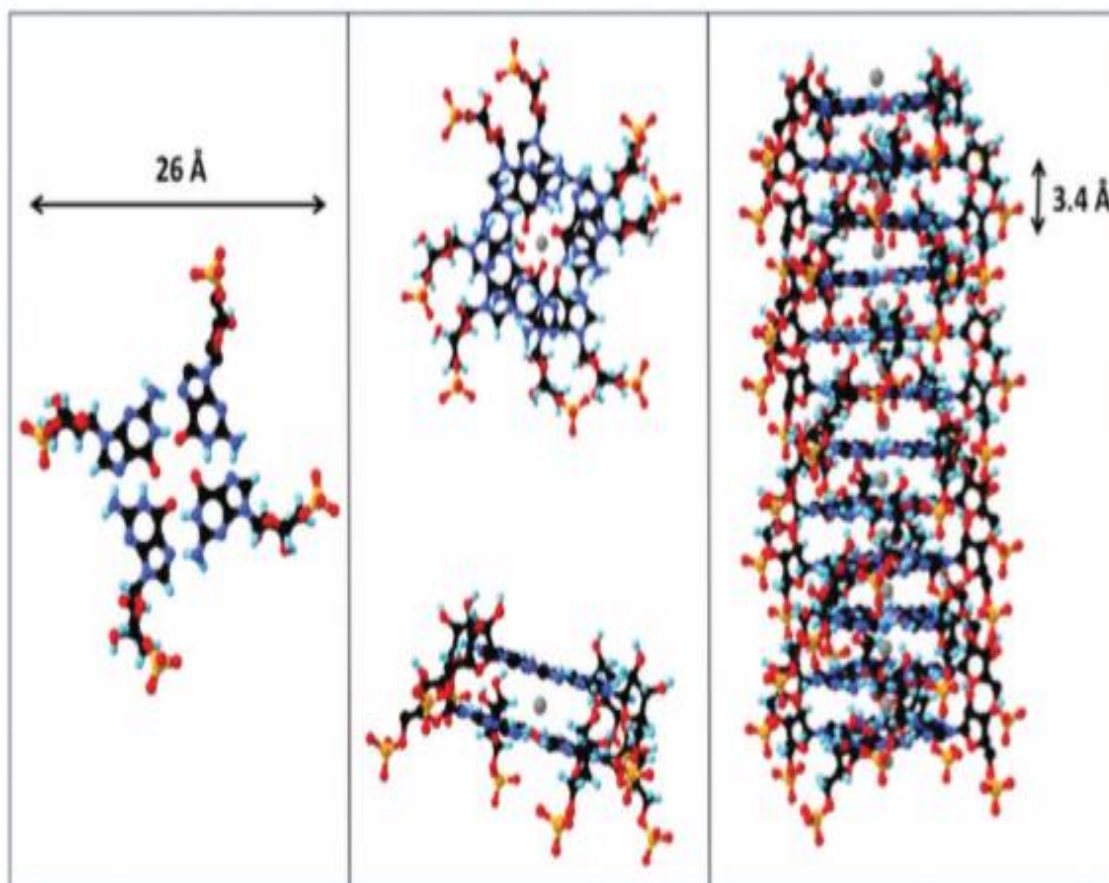
**Figura 1.10:** sinistra Guanosina, destra Guanosina-5'-monofosfato

La figura 1.10 mostra le strutture della Guanosina (GUA) e della 5'-guanosina-monofosfato (GMP). I derivati della guanina, principalmente GUA e GMP, sono più solubili in acqua, per via della presenza del ribosio che conferisce proprietà idrofiliche maggiori alla struttura. I G-quartets(G-Q) possiedono qualità di auto assemblaggio, infatti due o più G-Q possono interagire l'uno con l'altra mediante interazioni di  $\pi$ -stacking, formando così una struttura chiamata G-quadruplex. Nei quadruplex di GMP, il gruppo fosfato, così come il ribosio, sono orientati verso l'esterno della struttura. In particolare questa struttura viene maggiormente stabilizzata grazie alla presenza di cationi monovalenti, che alloggiato all'interno della cavità vacante (*Dash e Sahan., 2016*). Esiste la possibilità di poter utilizzare diversi tipi di cationi per stabilizzare la struttura del quadruplex come ;  $K^+ \geq Na^+ \geq Rb^+ \geq NH_4^+ \geq Cs^+$ , (disposti in ordine di stabilità decrescente).



**Figura 1.11:** *struttura del G-Quartets stabilizzata con un catione metallico monovalente (Dash and Sahan, 2016).*

Il catione monovalente interagisce con otto atomi di ossigeno appartenenti a due guanine, è importante notare che un ipotetico G-quartets risulta ruotato, rispetto ad un altro, di  $30^\circ$  al fine di poter minimizzare la repulsione agente tra i G-quartets. Questo comportamento porta alla formazione di un'elica, il cui diametro è aggira attorno al valore di  $26\text{\AA}$  ( $2,6\text{nm}$ ), inoltre ogni G-quartets dista dall'altro di circa  $3,4\text{\AA}$  (Carducci et al., 2018), distanza che risulta simile a quella riscontrata nel DNA, figura 1.12.



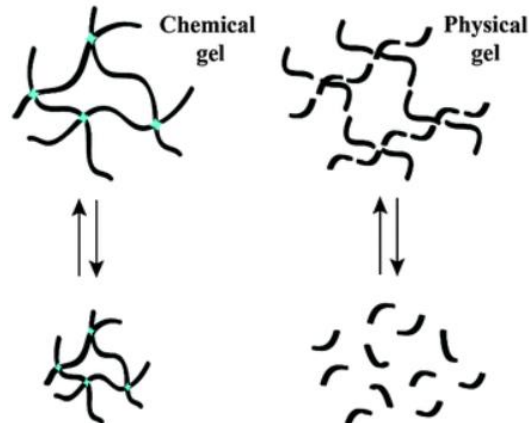
**Figura 1.12:** da sinistra a destra, *G-Quartets*, *G-Octamer*, *G-Quadruplexes* (Carducci et al., 2018).

## 1.4: Idrogel

Per idrogel si intendono quei materiali polimerici formati da un particolare polimero che forma una rete fibrosa, capace di poter intrappolare l'acqua che rappresenta l'elemento predominante dell'idrogel. Lo sviluppo di materiali innovativi di natura supramolecolare capaci di auto assemblaggio, hanno un



importante significato applicativo. Infatti gli idrogel possono essere usati in diversi settori disciplinari per via delle sue potenziali applicazioni quali: ingegneria tissutale, separazione enantiomeri, cristallizzazione delle proteine, drug delivery, e produzione di sensori (*Kitazawa et al., 2011*), oltre che alla già citata, capacità di auto assemblaggio. Essenzialmente esistono due classi distinte di idrogel, gli idrogel di sintesi chimica, in cui l'intera struttura è caratterizzata dalla formazione di legami chimici covalenti irreversibili che lo rendono molto stabile. La seconda categoria di idrogel è costituita da gel formati dallo spontaneo assemblaggio dei monomeri costituenti, figura 1.13 (*Peter and Davis., 2016*).

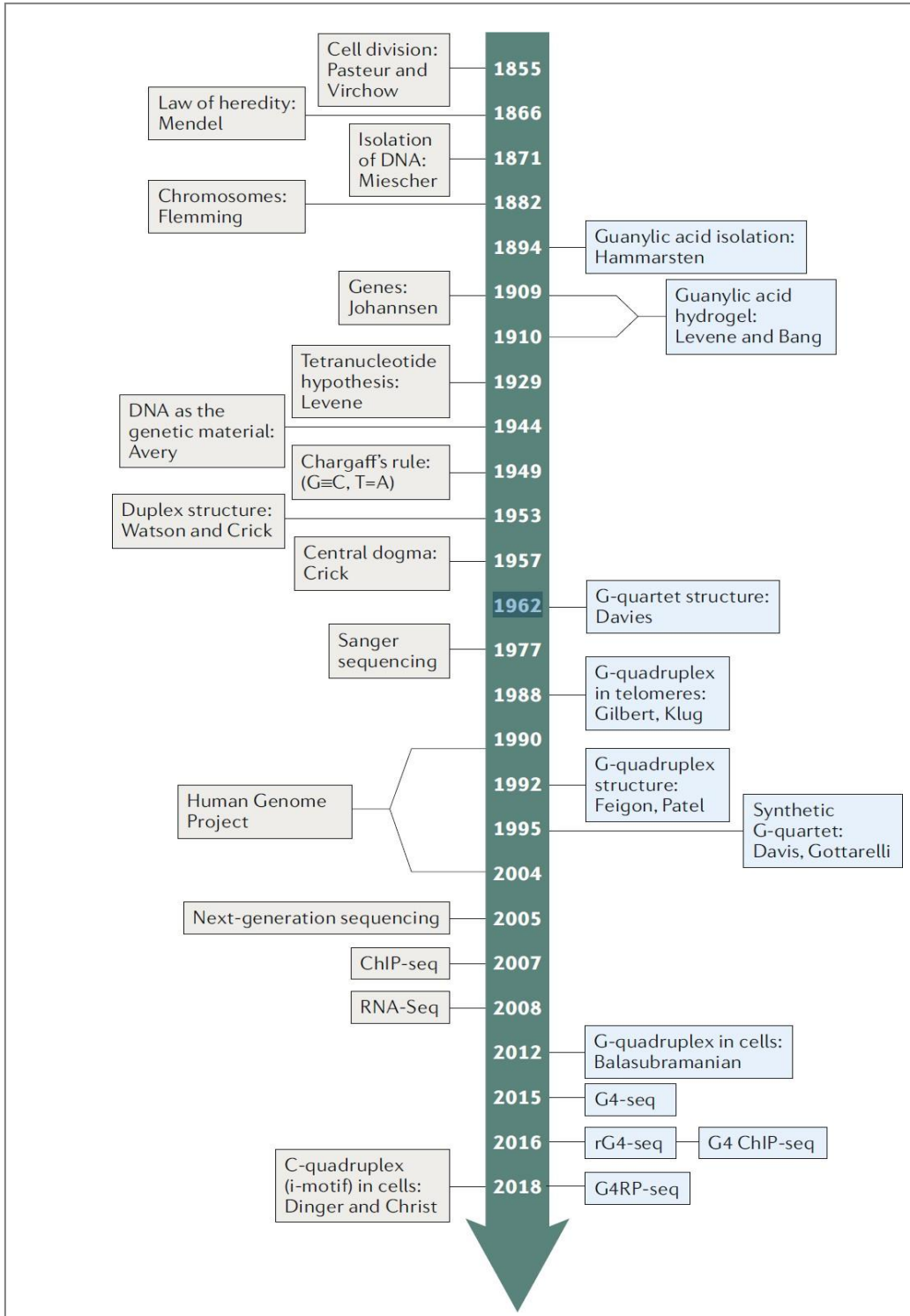


**Figura 1.13:** rappresentazione di gel di natura chimica e fisica (*Peter and Davis, 2016*).

Quando i monomeri del gel si aggregano spontaneamente tendono a mantenere il solvente acquoso in una rete tridimensionale, che esibisce proprietà simili a quelle mostrate dai gel di sintesi chimica. Tuttavia le forze di debole entità che caratterizzano gli idrogel auto assemblati impartiscono anche altre proprietà vantaggiose quali: morbidezza, assemblaggio reversibile, adattabilità ai cambiamenti ambientali quali ph, temperatura, attività enzimatica e alla forza ionica.

#### *1.4.1: Storia degli Idrogel*

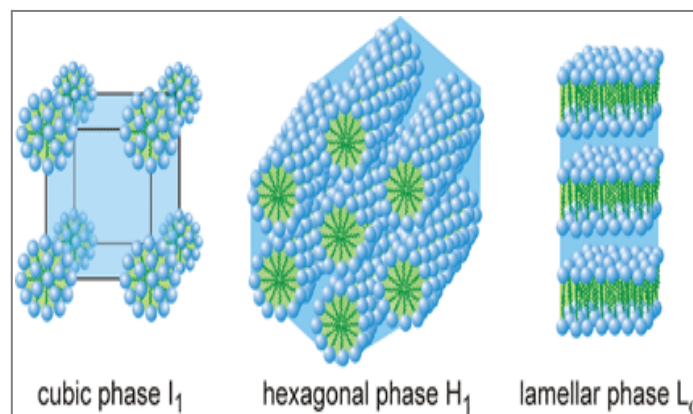
I primi studi che confutarono l'esistenza e la formazione degli idrogel risalgono al 1910, quando *Bang et al.* dimostrarono che soluzioni concentrate di GMP in soluzione acquosa formano aggregati gelatinosi. Mentre, *Gellert et al.*, nel 1962 studiarono come l'aggregato iniziale, che è responsabile della formazione del gel, sia dovuto ai G-quadruplexes che impilandosi, in presenza di cationi metallici, formano i quadruplessi capaci di costituire una rete tridimensionale (*Loich stefan.,2019*).



**Figura 1.14:** Linea del tempo degli eventi più importanti che caratterizzano scoperte relative ai G-quartets (Nature, 2019).

### 1.4.2: Idrogel di G-Quadruplexes

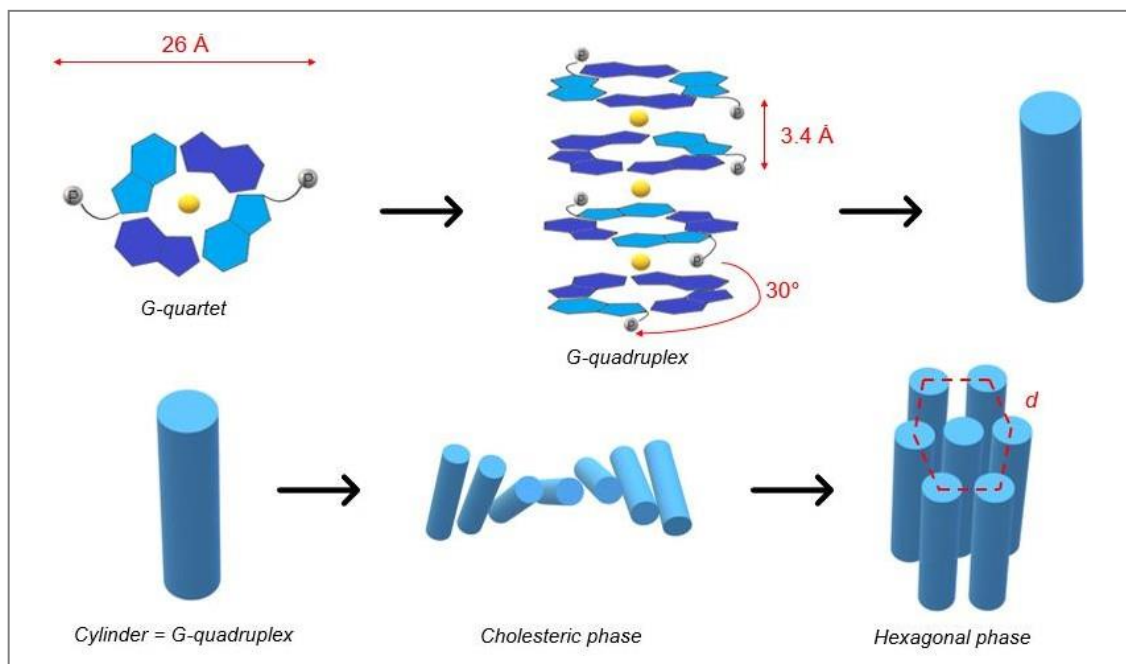
I G-quadruplexes sono rinomati per la loro attitudine ad organizzarsi a formare idrogel ad alto contenuto di acqua, ma nel loro processo di assemblaggio, tendono a formare fasi di liquido cristallino di tipo eliotropico. Un liquido cristallino consiste in un particolare stato di aggregazione della materia avente proprietà amorfe, e quindi intermedie tra un solido cristallino ed un liquido isotropo, inoltre, tali fasi, si possono presentare con diverse geometrie quali: lamellare, cubica ed esagonale, figura 1.15.



**Figura 1.15:** fase cubica, esagonale e lamellare.

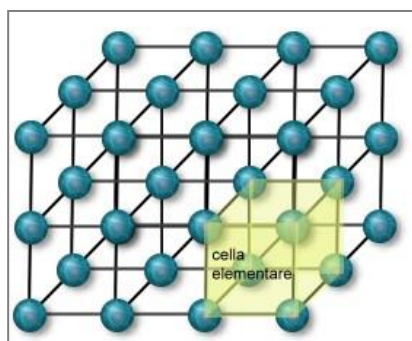
Ogni sostanza avente mesofase liquido-cristallina è ottenibile “giocando” con i parametri di temperatura o concentrazione, e quindi si parlerà di sostanza termotropica e liotropica. Quindi un generico sistema G/GMP- $K^+$ , per via delle transizioni di fase, appartiene alla categoria delle sostanze eliotropiche, e

mostra un passaggio graduale tra fase nematica, colesterica ed esagonale. Quando un normale cristallo viene riscaldato, l'energia cinetica delle molecole, all'interno del reticolo, aumenta, fino a quando il moto vibrazionale sarà tale da dissolvere l'ordine geometrico, e permettere così una fase disordinata (*Marchetti et al., 2011*). Il processo appena descritto spiega il comportamento del sistema G/GMP-K<sup>+</sup>, in quanto i G-quadruplessi possiedono qualità liquido cristalline colonnari, caratterizzate dalla formazione di una fase liotropica colesterina e/o esagonale. I quartetti di guanosine autoassemblati si impilano generando delle strutture ordinate di forma cilindrica, avendo i gruppi fosfati orientati esternamente; in funzione del contenuto d'acqua si verificherà un lento passaggio tra fase nematica, colesterica ed esagonale. Diminuendo la concentrazione dell'acqua i cilindri di G-quadruplexes iniziano a disporsi vicini tra di loro, in maniera sfalsata con un angolo di 30°, questa fase viene detta colesterica. Requisendo ulteriormente l'acqua al sistema si nota che il sistema assume un aspetto sempre più ordinato, fase esagonale, in cui i G-quadruplexes sono ancora più stipati e disposti paralleli tra di loro.



**Figure 1.16:** Le molecole in azzurro sono le GMP/K<sup>+</sup> in cui è evidenziato l'atomo di fosfato, le molecole in blu sono le guanosine (G), le sfere gialle sono gli atomi di potassio (K<sup>+</sup>) ottenuti in seguito alla titolazione della GMP/H<sup>+</sup> con KOH.

Essendo una struttura cristallina molto ordinata, ogni fase sarà caratterizzata da una cella unitaria, che si ripete fino a generare la geometria poliedrica dell'intera struttura.

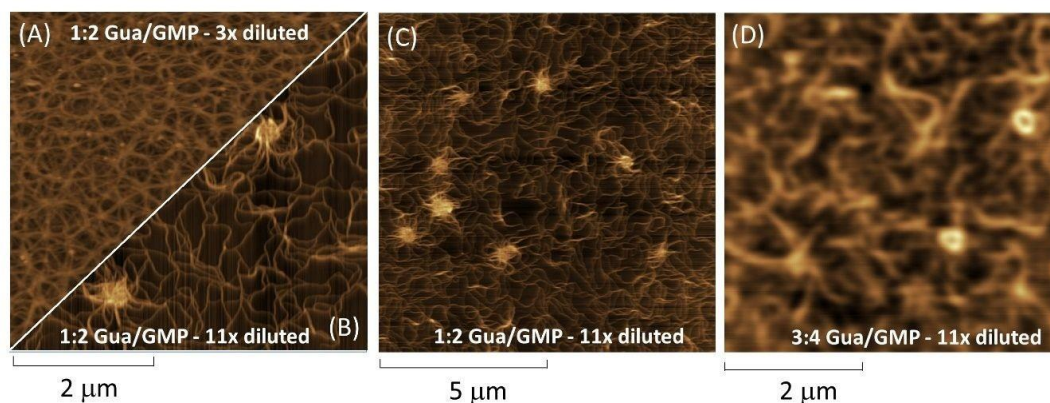


**Figura 1.17:** struttura di una cella unitaria di un cristallo.

Prendendo in riferimento un G-quadruplex costituito da G-quartets di sole GMP, possiamo notare che la superficie esterna esibisce i gruppi fosfati, così da creare un'enorme carica negativa, che comporta la repulsione con gli altri quadruplex della stessa natura. Tuttavia aggiungendo la guanosina(G) alla GMP, nel processo di formazione dei quadruplexes, otteniamo un'alternanza tra le molecole di GMP e G presenti in ogni G-quadruplex. Questo implica che i vari "piatti" avranno una maggiore tendenza ad impilarsi, non avendo una carica negativa totale. Infatti, in questo sistema, le cariche negative dei gruppi fosfati saranno minori, quindi minori saranno le forze di repulsione. Inoltre saranno promosse anche le forze di interazione di Van der Waals tra le aree ricche di Guanosina ed i quadruplessi di diversa natura.

### *1.4.3: Studi di AFM su Idrogel di G/GMP*

Come per il DNA, anche per gli idrogel di G/GMP, l'AFM si dimostra una tecnica di indagine molto valida per la descrizione strutturale di questi idrogel. Studi precedenti (*G. Nava et al., 2013*), eseguiti in AFM in modalità dinamica e con sonda in silicone su campioni aventi due differenti proporzioni tra G/GMP (1:2 e 3:4), mostrano interessanti strutture assunte da questi idrogel.

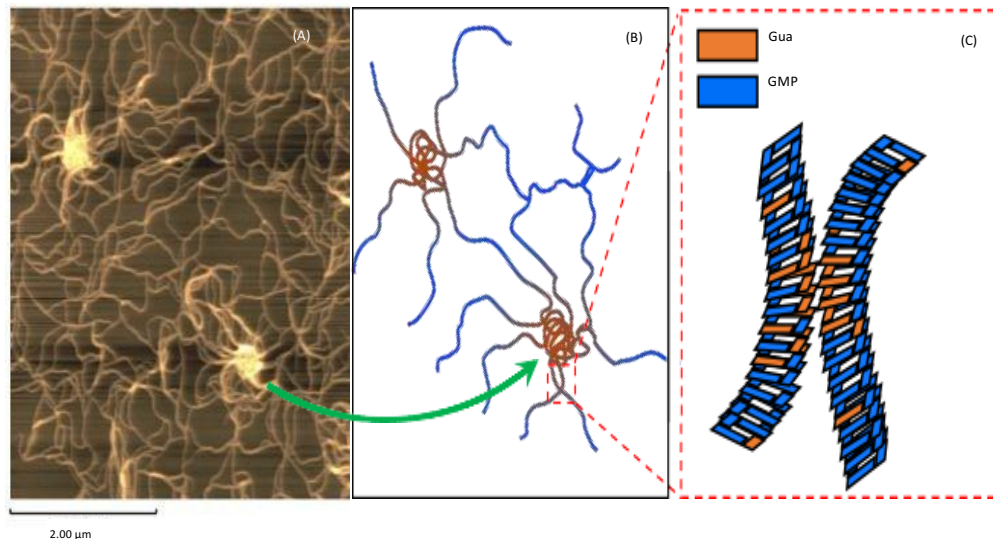


**Figura 1.18:** immagini AFM di: A) idrogel 1:2 diluizione 3x, B) idrogel 1:2 diluizione 11x, C) idrogel 1:2 diluizione 11x (scala ridotta), D) idrogel 3:4 diluizione 11x. (Nava et al.).

La figura 1.18 mostra delle immagini ottenute all'AFM su idrogel di G/GMP avente sia proporzioni che diluizioni differenti. Si può notare una grande eterogeneità, in quanto sono visibili sia corpi molto densi a formare “gomitoli” che filamenti lineari. I filamenti lineari mostrano valori di altezze dei picchi di circa 2-3nm, quindi valori prossimi a quelli rinvenuti nei G-quadruplexes 2,4nm, (Bonazzi et al.,1991). Mentre i valori più alti nei filamenti sono dovuti all'unione di più filamenti a contatto tra di loro, infatti i filamenti convergono a formare dei grovigli simili a nodi, che mostrano valori multipli rispetto al canonico valore di 2,4nm. In conclusione, l'AFM mostra come i filamenti abbiano dimensioni compatibili ai G-quadruplex composti solo da GMP, suggerendo che l'auto assemblaggio si preservi anche negli



idrogel di G/GMP. Inoltre la flessibilità e l'adesività dei filamenti di G/GMP è maggiore rispetto ai filamenti composti dalla sola GMP, per via della riduzione della densità di carica, oltre che all'incremento del carattere idrofobico impartito dalla presenza della guanosina (*Nava et al., 2013*). La flessibilità e l'adesività sono maggiormente osservabili nelle regioni dove sono presenti i “nodi” dove la presenza della guanosina si suppone sia maggiore rispetto alle aree dove i filamenti sono lassi (*Nava et al., 2013*).



**Figura 1.19:** *rappresentazione grafica di come appaiono i nodi A) nodi all'AFM, B) ricostruzione mirata dei nodi, C) rappresentazione dei G-quadruplex di Gua/GMP. (Nava et al., 2013).*

## CAPITOLO 2: Materiali e Metodi

### *2.1 Preparazione dei campioni*

Il primo passo svolto lungo l'intero itinerario sperimentale, è stato quello di allestire adeguatamente i campioni che andranno in seguito a costituire l'idrogel di G/GMP+. Per tale proposito è stato necessario combinare precisamente le tre sostanze che andranno a formare il gel finale. Tali sostanze sono la GMP, sotto forma di sale di K, la Guanosina e l'acqua milliQ.

	<b>G</b>	<b>5'-GMP</b>	<b>Acqua</b>
<i>Peso molecolare (g/mol)</i>	283.24	363.22	18
<i>Volume specifico (mL/g)</i>	0.66	0.66	1
<i>Massa dello stock (g)</i>	0.5	0.7	/
<i>Concentrazione dello stock (g/L)</i>	150	200	/

**Tabella 2.1:** Caratteristiche principali della guanosina (G), 5'guanosina monofosfato (5'GMP) e acqua.

E' importante notare come la 5'-guanosina-monofosfato(GMP) si possa trovare sia sotto forma di acido che di sale, e che nella formazione del "piatto" di G-quartets la specie chimica posta al centro, che sia un  $H^+$  o un metallo  $M^+$ , stabilisce quattro legami con gli ossigeni formanti, idealmente, un anello. E' interessante notare come la presenza di una carica positiva, posta al centro del piatto, si dimostri necessaria nell'equilibrare le cariche negative, ed è logico pensare di utilizzare diverse specie chimiche, portanti carica positiva, in qualità di stabilizzatore e.g  $K^+ > Na^+ > NH_4^+ > Li^+$  disposti in ordine crescente di potere stabilizzante.

In definitiva per allestire i campioni, nella sperimentazione, è stata impiegata una soluzione madre 5'-GMP( $K^+$ ), ricavata a sua volta da 5'-GMP( $H^+$ ) di produzione ChemCruz.

## *2.2 Titolazione acido-base*

Al fine di poter avere uno scambio tra la forma acida con quella salina è necessario effettuare una titolazione acido base, utilizzando i seguenti reagenti

- 1) 500mg di 5'-GMP/  $H^+$
- 2) KOH 1M



**Figura 2.2.1:** sinistra GMP/H<sup>+</sup> destra KOH.

Di seguito sono mostrati i calcoli per la messa in atto della soluzione madre di 10ml di KOH 1M:

$$1 \text{ mol} : 1000 \text{ ml} = X \text{ mol} : 10 \text{ ml}$$

$$X \text{ mol} = 0,01 \text{ mol}$$

$$m \text{ KOH} = m \cdot MW = 0,01 \text{ mol} \cdot 56,109 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,56 \text{ g}$$

Si prosegue sciogliendo 500mg di 5'-GMP/ H<sup>+</sup> in 15ml di acqua distillata in un bacher, agitare in continuo, al fine di evitare che la GMP aderisca alla parete del contenitore. Utilizzando un pHmetro si può procedere alla titolazione. Dopo aver effettuato la taratura dello strumento ph=4, è possibile

aggiungere KOH 1M fino ad ottenere una soluzione a ph finale di 9,2. Ottenuta la titolazione è possibile trasferire la soluzione in due falcon da 50ml. In seguito si aggiunge Etanolo assoluto al 99% w/w in rapporto 1:3 di 5'-GMP- K<sup>+</sup>/ EtOH.



**Figura 2.2.2:** *aspetto della GMP- K<sup>+</sup> post aggiunta di Etanolo.*

Seguono due cicli di centrifugazione a 4000rpm per 15 minuti, permettendo la precipitazione della di 5'-GMP- K<sup>+</sup> e l'eliminazione dell'etanolo. Infine si instaura un processo di liofilizzazione di quattro ore per eliminare, sublimare l'etanolo ed ottenere 5'-GMP- K<sup>+</sup> come prodotto finito sotto forma di polvere.

In figura 2.2.3 è possibile mirare il prodotto finito, che risulta così pronto all'utilizzo, quindi solubile in acqua, o in alternativa essere conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 2.2.3:** *polvere di GMP- K<sup>+</sup>*.

### *2.3 Formazione dell'Idrogel*

Al fine di preparare il gel si allestiscono due soluzioni madre sia di guanosina (150mg/ml) che di 5'-GMP- K<sup>+</sup> (200mg/ml). L'ordine di aggiunta deve essere preciso e ben rispettato ovvero si aggiunge per prima cosa 5'-GMP- K<sup>+</sup>

, la guanosina ed infine l'acqua milliQ. Questo passaggio viene eseguito in una eppendorf che verrà poi riposta in un bagnetto, subito dopo aver miscelato i due composti, ad una temperatura che varia dai 70-80°C.



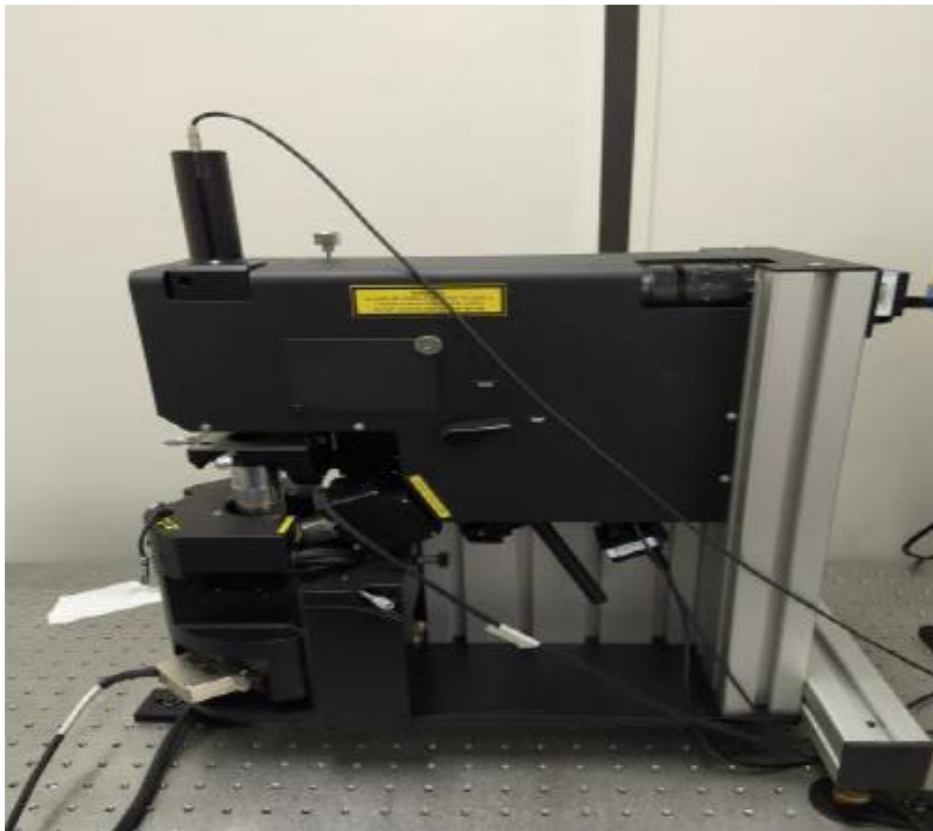
**Figura 2.3.1:** *gel di G/GMP-K<sup>+</sup> ultimato.*

È importante notare che la ratio G/GMP può variare in funzione della proporzione da utilizzare in un ipotetico esperimento (e.g 1:2 1:1 1:3). Il quantitativo d'acqua nel gel può assumere valori che vanno dal 97 al 98%, questo implica che il rimanente 2-3% sarà rappresentato da G e GMP.

## *2.4 Indagine AFM*

Per questo lavoro di tesi, le osservazioni sono state effettuate impiegando il microscopio AIST-NT AFM-Raman, modello XpLoRA Nano platform, della Horiba-Scientific in dotazione al DiSVA. Questo dispositivo coniuga le

qualità proprie della microscopia a forza atomica alle informazioni ottenibili dalla microscopia Raman. L'AIST-NT esibisce una risoluzione verticale inferiore ai nanometri, fino a 0,1nm, ed una risoluzione laterale di circa 30nm. Può visualizzare campioni della dimensione di 40x50mm e con uno spessore di 15mm, possiede un range di scansione del campione di 100x100x15 $\mu$ m. L'intervallo di posizionamento motorizzato del campione è di 5x5mm, con una risoluzione di posizionamento pari a 1 $\mu$ m. La figura 2.4.1 mostra il modello dell'AFM utilizzato in questa tesi.



**Figura 2.4.1:** *AIST-NT AFM-RAMAN.*



### *2.4.1 Allestimento campioni*

Per poter osservare il campione di idrogel è necessario diluire il campione a 1:800. Si procede a deporre 5nl di campione su di un dischetto di 1cm rivestito dalla mica. Una volta asciugato il campione, lo si depone su uno stage guidato da un tubo piezoelettrico, che permette lo spostamento nello spazio tridimensionale.

### *2.4.2 Microscopia a scansione di sonda*

La microscopia a scansione di sonda (SPM) è una delle potenti tecniche di ricerca che permettono di studiare la morfologia e le proprietà locali dei corpi solidi, con una alta risoluzione spaziale. La microscopia a scansione di sonda ha gettato le basi per lo sviluppo di nuovi metodi in nanotecnologia, ovvero in quella tecnologia dedicata alla creazione di strutture su scala nanometrica. La microscopia a scansione di sonda raggruppa diversi tipi di microscopi. Infatti dalla SPM derivano il microscopio a effetto di Tunnel (STM), il microscopio a forza atomica (AFM) il microscopio a forza magnetica (MFM) ed il microscopio ottico a forza elettrica (EFM) (*V.L Mironov.,2004*). Nonostante la grande varietà di metodiche derivanti dalla microscopia a scansione di

sonda, esistono delle caratteristiche comuni a tutte. Infatti possiamo riscontrare la presenza di una sonda appuntita che interagisce con la superficie e quindi con un campione preso in esame. Stabiliscono un'interazione tra la sonda e la superficie, con una forte variazione in funzione della distanza tra la punta ed il campione. Inoltre, la natura dell'interazione rende ciascuna tecnica sensibile rispetto a diverse proprietà fisiche locali del campione. Notiamo che tutte possiedono uno scanner, cioè un posizionatore piezoelettrico, che permette il posizionamento della sonda rispetto al campione, con valori di accuratezza di frazioni dell'Ångström. Possiedono un ciclo di retroazione che regola la distanza punta-campione, permettendo di stabilire un feedback. Infine possiedono elevata risoluzione sia verticale che laterale. La microscopia a scansione ad effetto Tunnel (STM) sfrutta l'effetto quantomeccanico del tunneling di elettroni. Fornisce una prima approssimazione della struttura locale di superfici di metalli e semiconduttori. L'STM, più che ad una misura topografica, fornisce una misura di una superficie di probabilità costante di tunneling. In particolare misura la corrente di tunneling che si stabilisce tra una punta metallica e la superficie conduttrice di un materiale, che non si trova a contatto, quando si applica una differenza di potenziale. Inoltre l'STM non sfrutta un fascio di elettroni esterno ma coinvolge gli stessi elettroni del materiale come sonda.

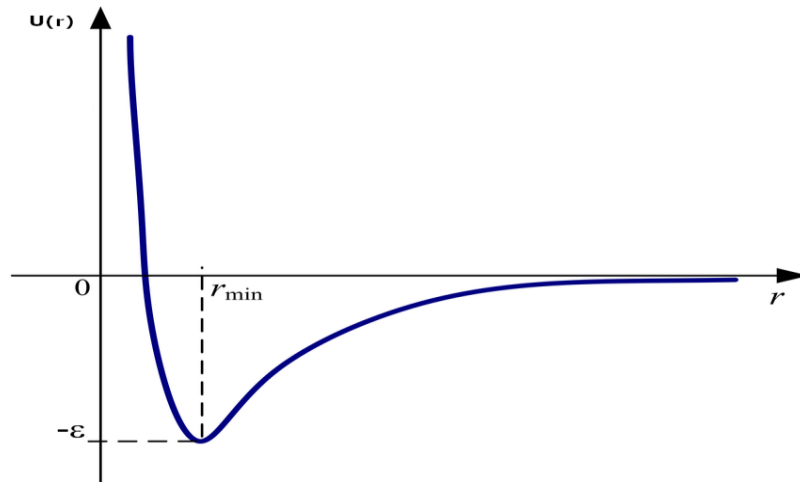
### *2.4.3 AFM caratteristiche generali*

Il Microscopio a Forza Atomica (AFM) è un particolare strumento di indagine, e di manipolazione della materia nella nano scala. Appartiene alla famiglia dei microscopi a scansione di sonda (SPM) ideato da Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber nel 1986. L'AFM può essere applicato in tutte quelle discipline di stampo tecnico ingegneristico quali: fisica dello stadio solido, ingegneria molecolare, chimica e fisica delle superfici, ma trova contesto anche nella medicina e in vari rami della biologia. In generale la microscopia a scansione di sonda poggia i suoi principi sulla scansione di un campione preso in oggetto tramite una punta, appartenente ad una sonda, che viene disposta ad una distanza non superiore ai 10nm rispetto alla superficie del campione. Allo stesso modo l'AFM sonda la superficie con una punta di dimensioni nanometriche, che è montata su di una leva elastica, detta cantilever. La punta può assumere diverse forme, si può presentare conica, paraboloidale oppure tetraedrica, ed è posta all'estremità di una micro leva. Che è a sua volta ricoperta da uno strato d'oro o di alluminio per aumentarne la riflettività. Posteriormente al cantilever è focalizzato un diodo laser, il cui raggio riflesso viene deviato, mediante specchi diecrici, verso il centro di un rivelatore di posizione a foto diodo a quadranti. Il campione viene posto su di un attuatore piezoelettrico che è capace di spostarlo a seconda della tensione

che gli viene applicata . La forza esercitata sulla punta, da parte del campione, produce una flessione sulla leva. Misurando tale flessione si può valutare la forza di interazione punta-campione. Si deduce che l'AFM non è solo una tecnica utile nell'imaging di molecole, ma è anche idoneo nella misurazione delle forze di interazione tra punta e campione. Infatti la sonda è un potente strumento per misurare forze di interazione locali. La microscopia a forza atomica sfrutta forze di natura elettromagnetica. In particolare le forze messe in campo si possono dividere in due categorie, in funzione del raggio d'azione, che può essere a lungo raggio, per le forze di Van Der Waals e corto raggio ( $< 1\text{nm}$ ) forze repulsive tra nuclei e di Pauli. La forza di interazione, che si stabilisce, tra la punta dell'AFM ed il campione è di natura sia attrattiva che repulsiva, inoltre è ben descritta dal potenziale di Lennard-Jones.

$$V(r) = 4\varepsilon\left(\frac{\sigma^{12}}{r^{12}} - \frac{\sigma^6}{r^6}\right)$$

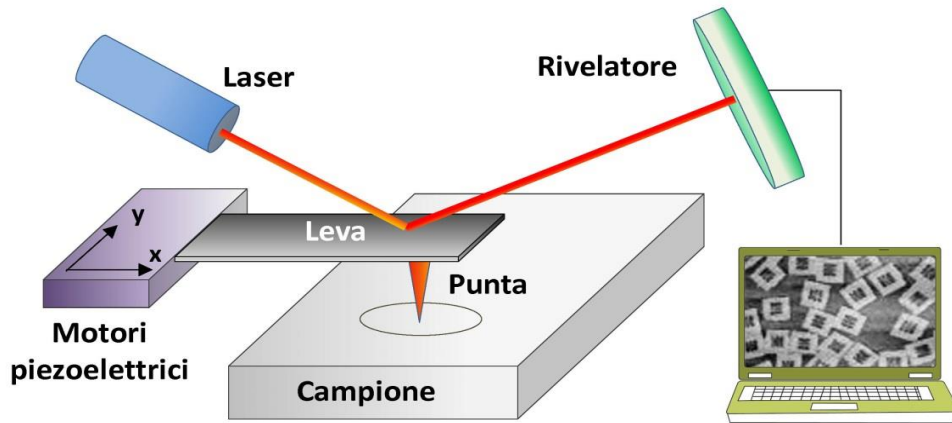
Dove  $\varepsilon$  è la profondità della buca del potenziale, mentre  $\sigma$  rappresenta il raggio della sfera che approssima l'atomo o la molecola, in un modello a sfera rigida.



**Figura 2.4.2:** grafico del potenziale Lennard-Jones distanza dipendente.

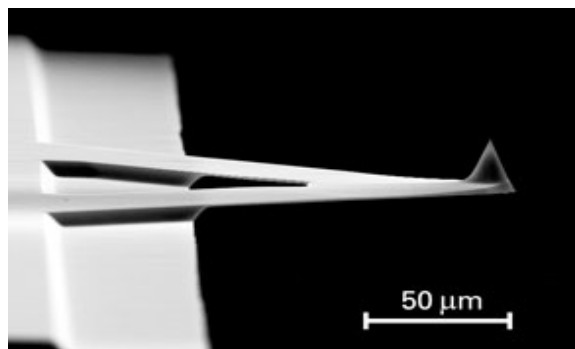
#### 2.4.4 Componenti AFM

L'AFM sonda la superficie con una punta avente un raggio terminale di dimensioni inferiori a  $100\text{\AA}$ . La punta è collocata alla fine di un'asta, il cantilever, lunga circa  $100\text{nm}$  avente una costante elastica che può raggiungere decine di  $\text{N/m}$ . Un raggio laser colpisce il retro del cantilever durante la scansione e la deflessione del raggio in seguito al contatto con la leva viene rilevato da un foto detector sensibile alla posizione. La leva, che si muove sulla superficie, sposta la posizione del laser sul detector che riesce a rilevare fino a  $10\text{\AA}$  di deflessione. Il rapporto tra la lunghezza del cammino del fascio laser tra il cantilever ed il detector, comporta un'amplificazione meccanica che consente di rilevare movimenti verticali minori dell'Angstrom.



**Figura 2.4.3:** *schema riassuntivo componenti AFM.*

Analizzando singolarmente ogni singola componente dell'AFM, notiamo che il cantilever è costituito generalmente da silicio, e viene prodotto tramite tecniche litografiche. La lunghezza della leva, con cui si lavora, è di circa  $100\mu\text{m}$ . Mentre possiamo notare che la geometria del cantilever può variare a seconda delle esigenze di modalità operative per le tecniche in noncontact, semicontact e contact mode.



**Figura 2.4.4:** *esempio di una leva a forma triangolare.*

Da notare che sul retro della leva è prevista una copertura composta da una sottile lamina di oro, che ha la funzione di riflettere il raggio proveniente dal laser verso il fotodiode. In definitiva il cantilever deve possedere alcune caratteristiche per poter svolgere la sua funzione. Quindi deve dimostrare una certa morbidezza per minimizzare la forza elastica e misurare la minima variazione superficiale. Non deve essere troppo sensibile alle vibrazioni esterne, inoltre la leva deve possedere una certa riflettività. Da notare che la ricopertura in oro conferisce una riflettività tre volte superiore rispetto a leve sprovviste di copertura. Anche la punta, posta alla fine della leva, deve possedere specifiche caratteristiche. In generale le punte possiedono forma piramidale o conica, il materiale di cui è costituita è a base di silicio drogato (p-Si) oppure Nitruro di Silicio. La punta possiede un tipico raggio di curvatura di 10 nm, un'altezza che oscilla tra i 10 e 15 μm. La produzione della punta si ottiene mediante processo di etching elettrochimico su di una piastra di silicio. Il processo si focalizza sulle facce del silicio, formando una piccola piramide con raggio inferiore ai 50 nm. Il risultato deve essere la produzione di una punta resistente ai danni derivati dal logorio da contatto con la superficie e quindi con il campione. Andando ad esplorare maggiormente le caratteristiche della punta, possiamo notare alcuni parametri

quali il Raggio di Curvatura ( $r$ ), che determina la risoluzione laterale su una superficie liscia. Le tecnologie più recenti ci permettono di ottenere punte con  $r$  vicino ai 5nm. Altro parametro da prendere in considerazione è il semiangolo ( $\theta$ ), che rappresenta il maggiore angolo di inclinazione di una parete che una punta può riconoscere,  $\theta$  assume valori compresi tra  $10^\circ$ - $45^\circ$ . Infine l'altezza della punta ( $h$ ) che determina la capacità di sondare strutture profonde. Tuttavia la massima estensione verticale registrabile dallo scanner non supera i 10nm. E' importante notare che utilizzando punte estremamente sottili permette di ottenere immagini con maggior risoluzione. Infatti se le dimensioni della punta non sono adeguate alla geometria dei solchi di un ipotetico campione, lo strumento andrà a segnalare una geometria non in linea con il campione. La formula che stabilisce la risoluzione del microscopio a forza atomica è la seguente:

$$W = \frac{4(Rc + Rm)\sqrt{Rm(Rc - Rm)}}{Rc}$$

Dove il termine  $Rm$  stabilisce il diametro apparente di un oggetto sferico, mentre  $Rc$  è il termine che indica il raggio di curvatura. Quindi la risoluzione è un parametro che dipende non solo dalle caratteristiche della punta, ma anche dalla natura del campione.



### *2.4.5 Metodi operativi dell'AFM*

Come riassunto in precedenza, nell'AFM, un raggio laser colpisce il retro della leva(cantilever) durante la fase di scansione, che viene riflesso verso un fotodiodo differenziale, che permette di convertire il segnale luminoso in elettrico. Il fotodiodo è costituito da quattro quadranti, se il cantilever è fermo, il raggio laser risulta perfettamente centrato, segnalando una certa quantità di corrente. Quando la leva percepisce una variazione superficiale, si solleva così riportando una variazione di intensità di corrente sul fotodiodo. E' inoltre importante riportare che il laser è idoneo nella segnalazione dei movimenti sia verticali che orizzontali. I metodi operativi dell'AFM sono essenzialmente tre: regime di contatto intermittente, regime di non contatto e di contatto. Nel regime di contatto intermittente, punta e campione non sono in contatto diretto. Il cantilever tende ad oscillare vicino alla propria frequenza di risonanza. Mentre l'ampiezza di oscillazione è mantenuta costante da un meccanismo di retroazione , aumentando l'ampiezza delle oscillazioni, la punta tocca il campione, ma la durata del contatto è breve. E' possibile realizzare l'oscillazione del cantilever, e quindi della punta, in due modalità, ovvero acusticamente e magneticamente. Il primo approccio consiste nel mettere a contatto della microleva un attuatore piezoelettrico, mentre il secondo consite nell'applicazione di un campo magnetico alternato

ad una microleva magnetica. La punta della microleva è tipicamente di silicio ed è posta ad una distanza compresa tra i 0,5-2nm rispetto alla superficie del campione. Quindi durante un'oscillazione, la punta sperimenta forze sia attrattive che repulsive nel campo di forza vigente tra punta e campione. Tale metodo di imaging è particolarmente indicato per materiali di origine biologica. Altro metodo operativo dell'AFM è detto a regime di contatto diretto, in cui sulla microleva viene applicata una forza che assume valore costante nel tempo dell'intera operazione. La punta, a contatto con il campione, viene fatta scorrere su di esso, e le deflessioni vengono segnalate tramite un sistema piezoelettrico. Ultimo metodo operativo dell'AFM è detto a regime di non contatto. In questa ultima modalità la distanza tra la punta dell'AFM e la superficie è compresa tra i valori di 1-10 nm. Le forze di interazione sono di tipo attrattivo. In definitiva l'AFM a regime di non contatto permette di ottenere buona risoluzione ed applicabilità su materiale biologico.

## *2.5 Valutazione immagini uso di software.*

Alla fine di questo percorso sperimentale, troviamo l'elaborazione delle nostre immagini, ottenute dall'AFM, tramite sofisticati software. Sono stati due i programmi utilizzati, al fine di trovare informazioni inerenti alla realtà

spaziale assunta dagli elementi costituenti il gel. Il primo software ad essere stato utilizzato è Gwyddion®. Tale programma è idoneo alla visualizzazione di immagini, ottenute sia con AFM che con SEM. Mentre il secondo programma è denominato Igor Pro®, che essenzialmente utilizza i file di coordinate, ottenuti con Gwyddion, e li rappresenta in grafici bidimensionali, fornendo anche valori numerici spaziali.

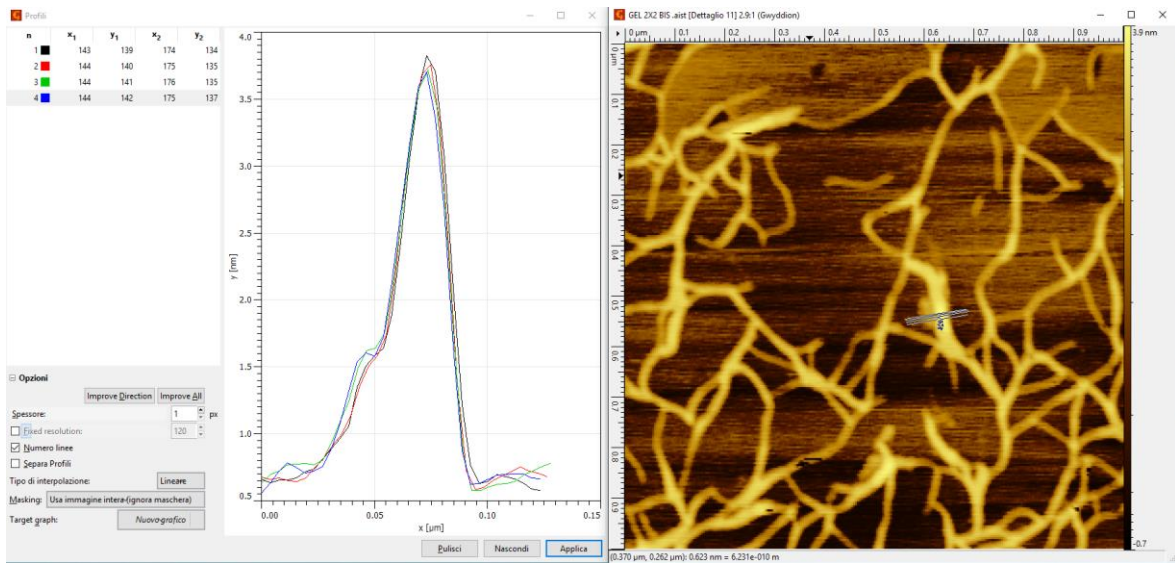
### *2.5.1 Gwyddion*

Gwyddion è un programma informatico idoneo per la visualizzazione e l'analisi dei dati ottenuti tramite le tecniche di microscopia a scansione di sonda (*D. Necas et al., 2012*) sviluppato da Czech Metrology Institute. Nello specifico, in questo elaborato di tesi, si è utilizzato tale programma, non solo per la visualizzazione delle immagini provenienti dall'AFM, ma inoltre si è utilizzata la specifica barra dei comandi per applicare, nelle immagini, delle “sagitte” utili nella nostra indagine, poiché capaci di riportare il valore delle altezze dove le stesse giacciono. Una volta applicate più di una linea su di un settore di interesse si può salvare il file, in formato txt, per poi essere visualizzato con l'altro programma utilizzato (IgorPro®).



Figura 2.5.1: barra dei comandi di Gwyddion®.

La figura 2.5.1 riporta la barra dei comandi di Gwyddion®. Tramite questo pannello è possibile selezionare, da cartella, un'immagine tramite il comando File. Una volta selezionata l'immagine, dalla sezione in basso del pannello comandi è possibile applicare diverse funzioni, come il ritaglio di un'area specifica e l'applicazione delle linee di rilevamento altezze.

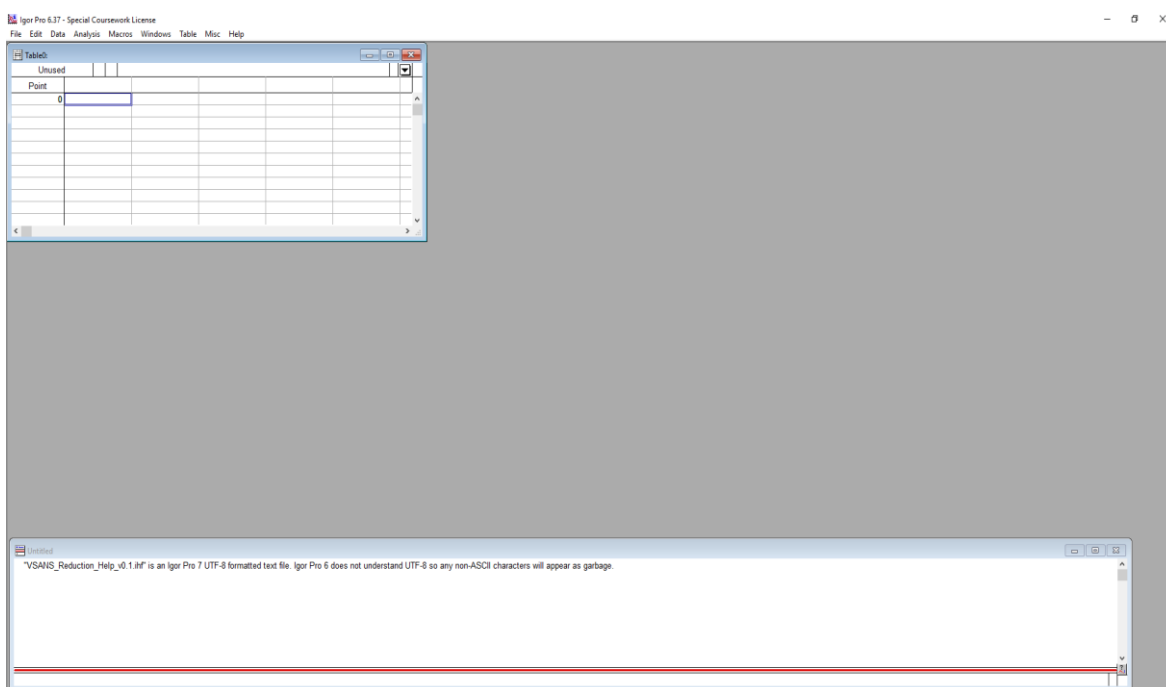


**Figura 2.5.2:** schermata d'applicazione Gwyddion®

L'immagine sovrastante, figura 2.5.2, mostra come si presenta la fase operativa di Gwyddion®. E' possibile notare nella parte destra dell'immagine, l'area dove si lavora, ed in particolare dove si possono applicare i "vettori" su di un'area di interesse. Mentre a sinistra viene riportata la sezione grafica, dove vengono riportate le curve dei corrispondenti vettori applicati in precedenza. Sempre dalla sezione di sinistra dell'immagine si può scegliere di "applicare" l'immagine e quindi salvare il file, che verrà letto in seguito.

## 2.5.2 IgorPro

IgorPro® è l'altro software di analisi dei dati scientifici, che in questa tesi è stato impiegato per poter visualizzare i file, in formato txt, ottenuti grazie ad Gwyddion®. Il programma in questione converte le coordinate txt in un grafico bidimensionale. Inoltre, tramite il pannello di controllo funzioni, è possibile ricavare informazioni inerenti ai grafici, ovvero dati di natura spaziale pertinenti all'immagine AFM.



**Figura 2.5.3:** schermata d'applicazione IgorPro®.

La figura 2.5.3 mostra come si presenta il programma. E' possibile osservare, in alto a sinistra, una tabella dove, per ogni colonna, verranno depositate le coordinate delle rispettive curve in formato txt.

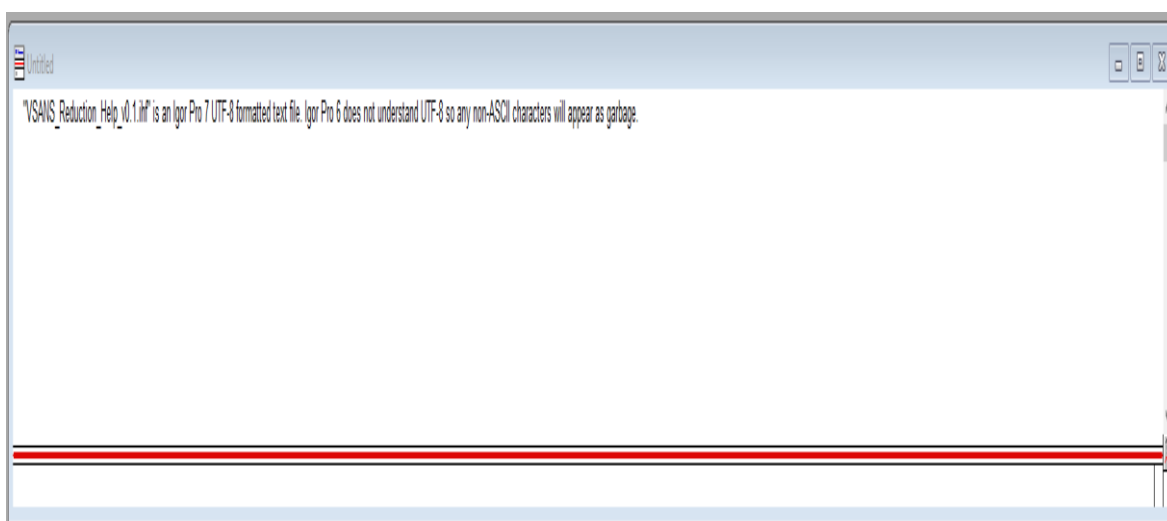
Igor Pro 6.37 - Special Coursework License  
File Edit Data Analysis Macros Windows Table Misc Help

Point	A1	A2	A3	A4	A5
0	0	8.75452e-10	0	8.76158e-10	0
1	3.86574e-09	8.20737e-10	3.85262e-09	8.46942e-10	3.88026e-09
2	7.73148e-09	7.67111e-10	7.70523e-09	8.14385e-10	7.76051e-09
3	1.15972e-08	7.67226e-10	1.15578e-08	7.11789e-10	1.16408e-08
4	1.5463e-08	8.89574e-10	1.54105e-08	7.61588e-10	1.5521e-08
5	1.93287e-08	9.41113e-10	1.92631e-08	8.32322e-10	1.94013e-08
6	2.31944e-08	8.7748e-10	2.31157e-08	9.05316e-10	2.32815e-08
7	2.70602e-08	8.84863e-10	2.69683e-08	9.32022e-10	2.71618e-08
8	3.09259e-08	9.49305e-10	3.08209e-08	8.6391e-10	3.1042e-08
9	3.47917e-08	1.0029e-09	3.46735e-08	8.71135e-10	3.49223e-08
10	3.86574e-08	9.97965e-10	3.85262e-08	9.23612e-10	3.88026e-08

**Figura 2.5.4:** particolare di una tabella riportante i valori delle coordinate di un esperimento.

L'immagine sovrastante ,figura2.5.4, mostra in particolare come si presenta la tabella durante un esperimento. Da questa immagine è possibile notare, appena sopra la tabella, una serie di comandi da cui si può non solo è possibile selezionare il file txt di interesse, ma è possibile ottenere i grafici a partire dalle coordinate caricate nelle colonne. Da notare come in ogni

colonna sono riportati valori che non sempre sono riportati in nm, e che quindi devono essere convertiti. Tramite un pannello di comando mostrato in figura 2.5.5 è possibile lavorare sulla tabella, ed in particolare standardizzare i valori in nm.



**Figura 2.5.5:** pannello di inserimento input.

Infine la figura 2.5.6 mostra come si presenta un esperimento ultimato. Da notare la presenza di cinque curve, che rappresentano le coordinate dei file txt ottenute con il programma precedente. In questo esperimento, oltre alla normalizzazione dei valori in nm, sono state rilevate le lunghezze delle basi di ogni singola curva. Inoltre il



programma fornisce sempre la lunghezza delle linee applicate, e i valori delle altezze dei picchi, sugli assi x e y rispettivamente.

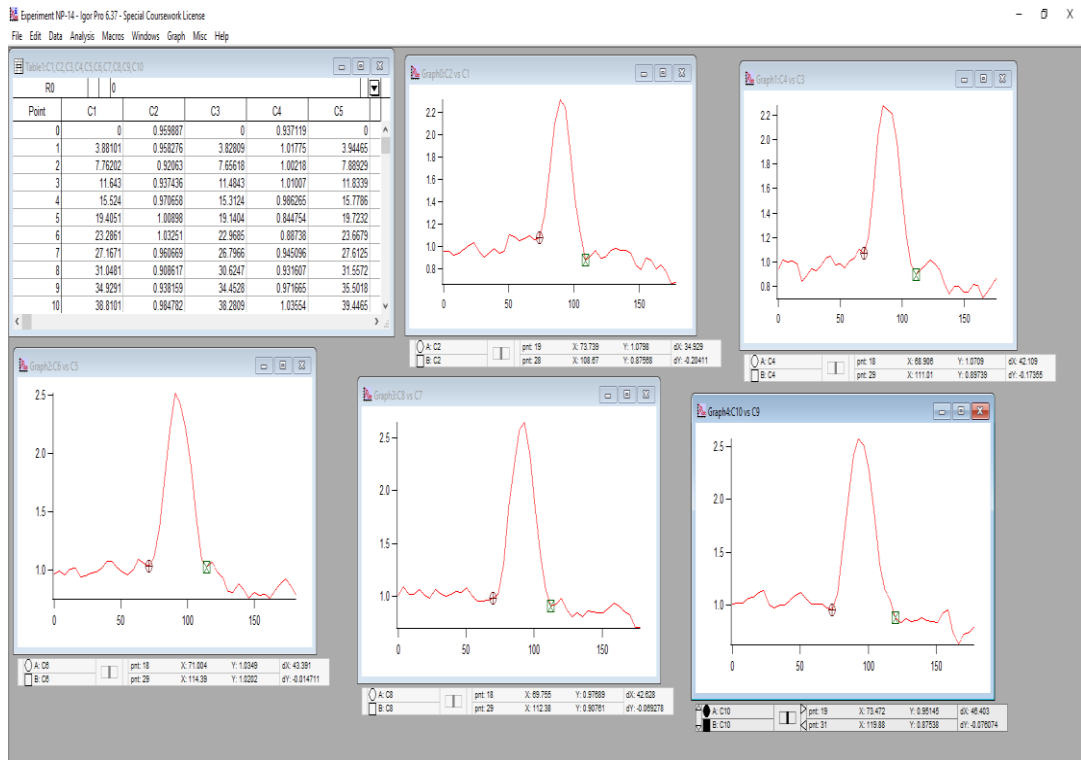
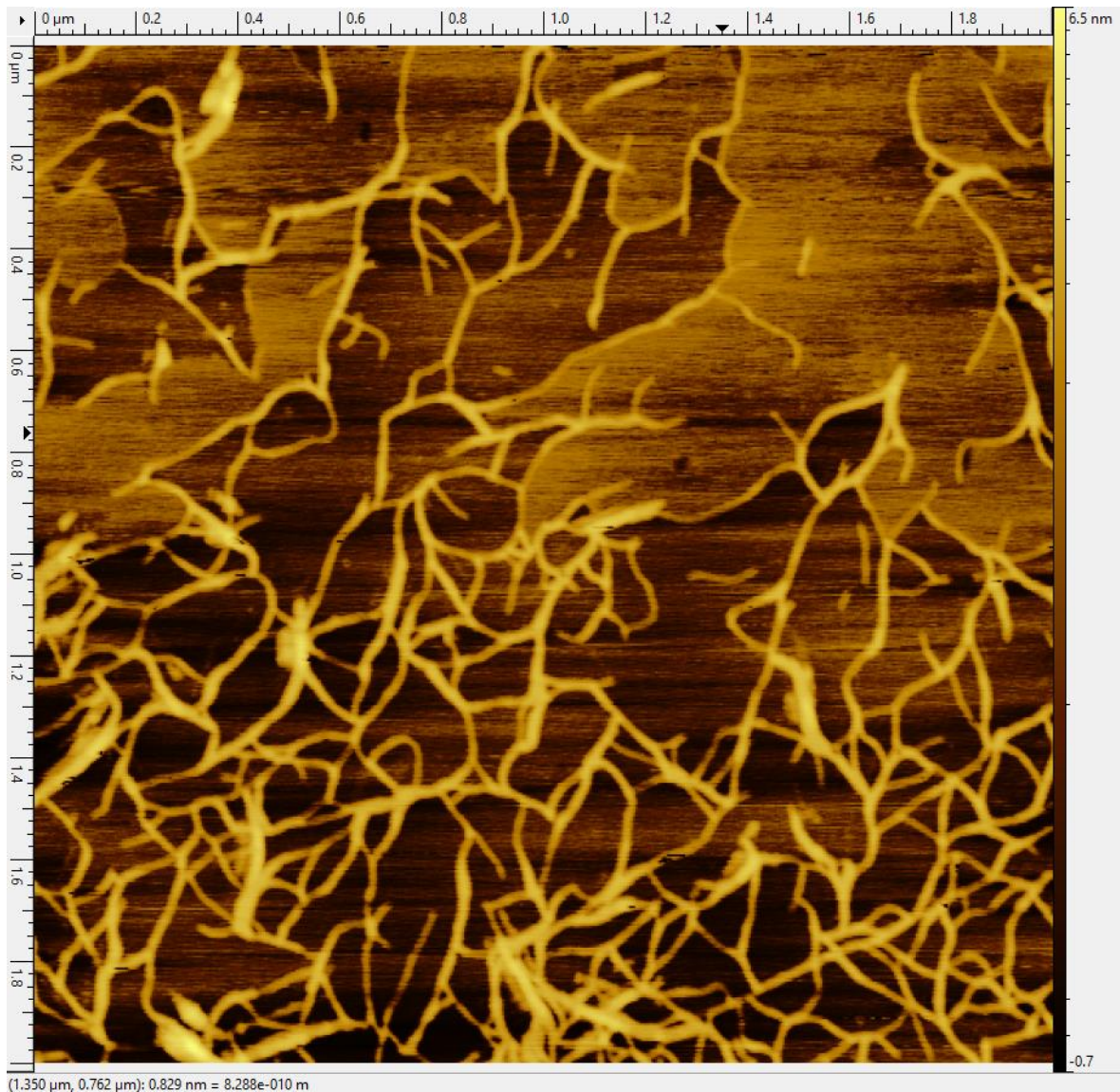


Figura 2.5.6: immagine illustrativa di esperimento IgorPro®.

## *Capitolo 3: Analisi risultati e discussione*

### *3.1: Prefazione immagini AFM*

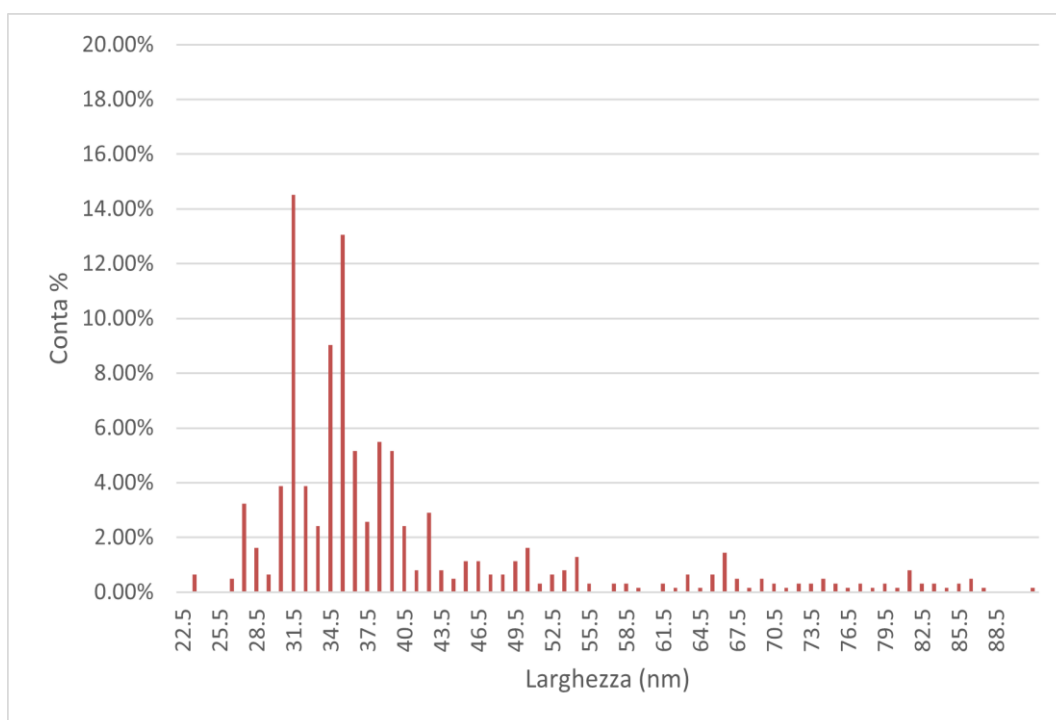
L'Oggetto su cui verte l'analisi critica dei dati riguarda un'immagine, ottenuta all'AFM, che mostra una particolare regione dell'idrogel di GUA/GMP avente una ratio di 1:2, figura 3.1. L'Immagine in questione, mostra tutto ciò che si può osservare in un idrogel di GUA/GMP, infatti sono ben visibili vari filamenti e "nodi" di varie dimensioni. In particolare, su tutta l'area dell'immagine, sono state applicate più di 620 linee che corrispondono ad un numero uguale di misure, sia per larghezza che per altezza dei vari elementi strutturali formanti il gel. Le misure sono state effettuate in regioni dove il gel mostra significative conformazioni, come filamenti singoli, che possono essere più o meno estesi, filamenti curvi, concatenati a formare "svincoli" ed agglomerati di grandi dimensioni. Le aree di interesse infine riguardano regioni del gel che si differenziano non solo per la presenza o meno di una particolare struttura, ma anche per la "densità" degli elementi presenti in loco.



**Figura 3.1:** immagine AFM di idrogel GUA/GMP, 1:2.

La figura 3.1 mostra quanto descritto in precedenza, infatti sono visibili i vari elementi che compongono il gel come filamenti singoli, nodi, strutture a svincolo, e filamenti che vanno a formare delle curve. Inoltre si può notare come nella parte bassa del gel ci sia una maggiore densità di elementi

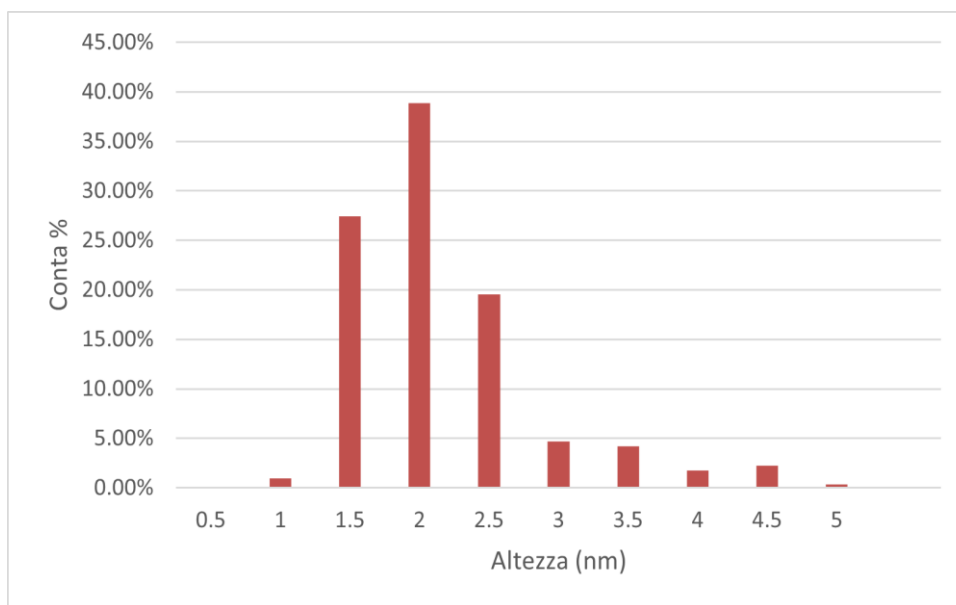
strutturali rispetto alla parte alta dove tali elementi si presentano con minore frequenza. Le oltre 620 misure prese sui vari elementi di interesse, sono state analizzate e rappresentate in istogrammi, che riportano i valori di altezza e larghezza in nm in funzione della distribuzione di frequenza, come mostrato negli istogrammi 3.1 e 3.2.



**Istogramma 3.1:** distribuzione di frequenza valori di larghezza dei filamenti figura 3.1.

Dall'istogramma 3.1 si può notare che oltre il 46% dei casi il valore della larghezza ricadono nell'intervallo compreso tra 31-35,5 nm. Valore che è concorde con i valori di larghezza stimati per i G-quadruplexes. Tuttavia non mancano casi in cui il valore della larghezza diverge da tali valori. In

particolare si può notare una percentuale superiore al 10%, dove la larghezza assume valori maggiori, anche con valori del doppio o del triplo, rispetto all'intervallo definito precedentemente.



**Istogramma 3.2:** distribuzione di frequenza valori altezze dei filamenti figura 3.1.

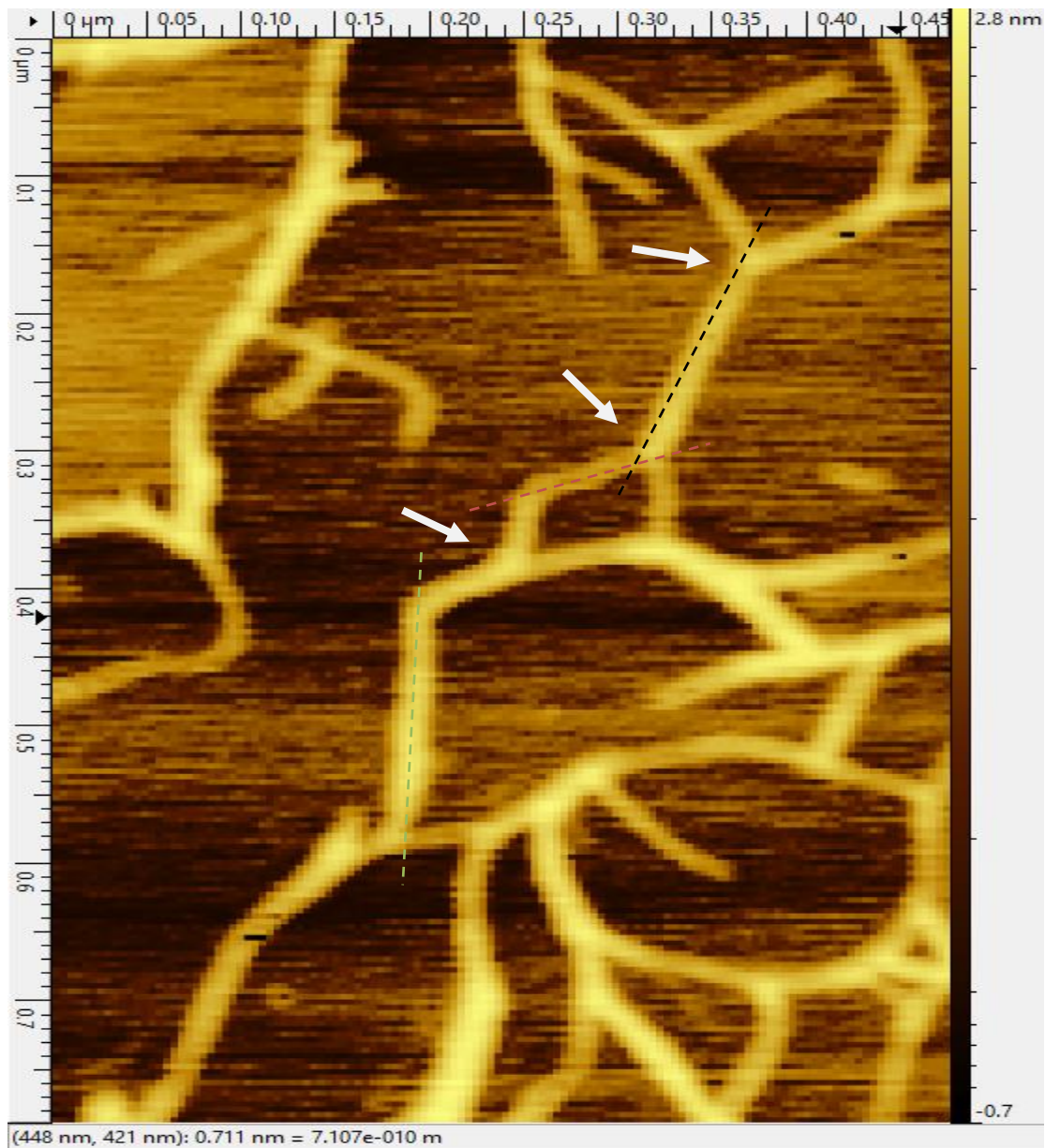
Anche nell'istogramma 3.2, che riporta l'altezza dei filamenti in funzione della percentuale della distribuzione di frequenza, si può notare un intervallo significativo. Infatti nel 60% dei casi, il valore dell'altezza rientra nel range che va da 2-3 nm, valore che rientra nei canoni delle altezze tipiche dei G-quadruplex, ovvero intorno all'intervallo che va da 2- 2,6nm. Anche in questo caso sono presenti valori multipli in altezza rispetto all'intervallo di riferimento. Infatti circa il 5% dei rilevamenti, in altezza, mostrano valori di

circa 5nm. Non meno importante è la significativa presenza, superiore al 25%, di altezze che mostrano valori che si attestano al 1,5nm.

### *3.2: Filamenti singoli*

In questo elaborato di tesi sono stati considerati diversi filamenti singoli che differiscono sia per lunghezza che per la loro tendenza a formare strutture lineari o curve. La figura 3.2 mostra un filamento singolo lungo circa 865nm su cui sono state eseguite, lungo tutto il filamento, 85 misure di altezza e larghezza della fibra.

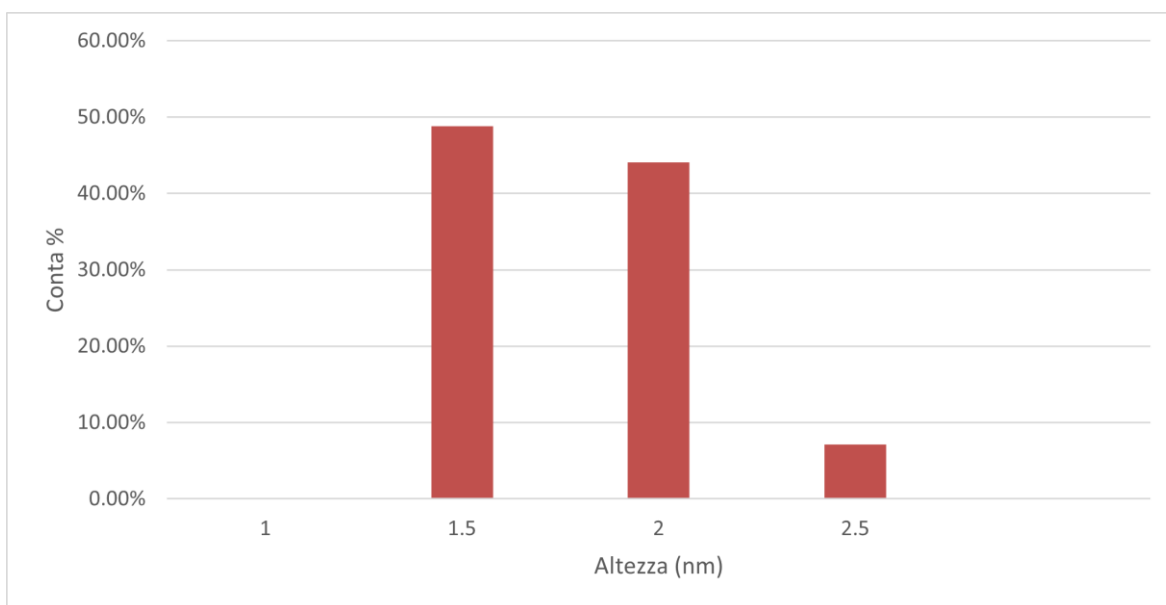




**Figura 3.2:** *filamento singolo.*

Le aree indicate dalle frecce bianche mostrano la presenza di micro “nodi” all’interno di un singolo filamento in prossimità di altri filamenti che convergono su quest’ultimi. Mentre le linee tratteggiate ,in diverso colore,

mostrano le porzioni dei filamenti di cui è stato riportato il profilo della sezione sagittale.

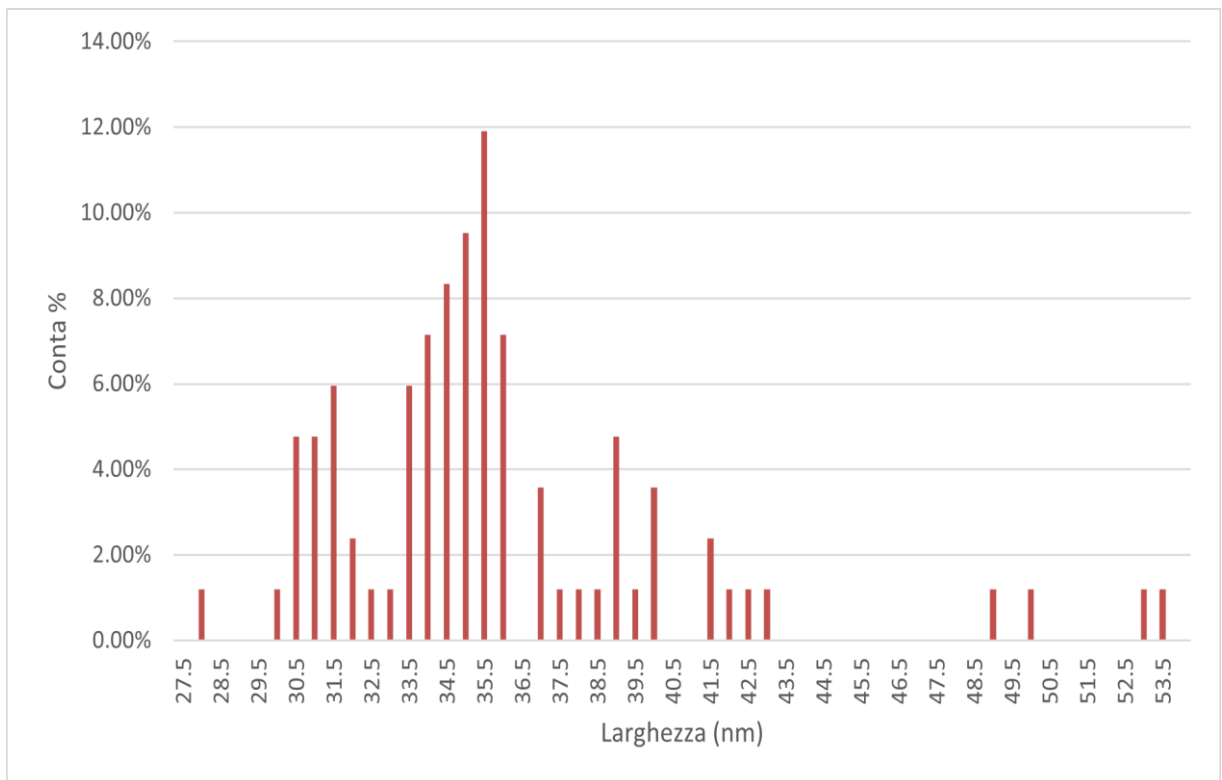


**Istogramma 3.3:** *distribuzione di frequenza valori altezza figura 3.2.*

L'istogramma sovrastante illustra i valori delle altezze espressi in funzione della percentuale della distribuzione di frequenza. E' interessante notare come circa il 50% dei valori delle altezze risulti assumere un valore pari a 1,5 nm. Valore che si dimostra molto divergente rispetto al tipico range 2,0-2,6 nm del G-quadruplex. Mentre il residuo 50% di tutte le misure effettuate su questo filamento risulta essere compreso tra i 2,0 e i 2,5 nm di altezza.

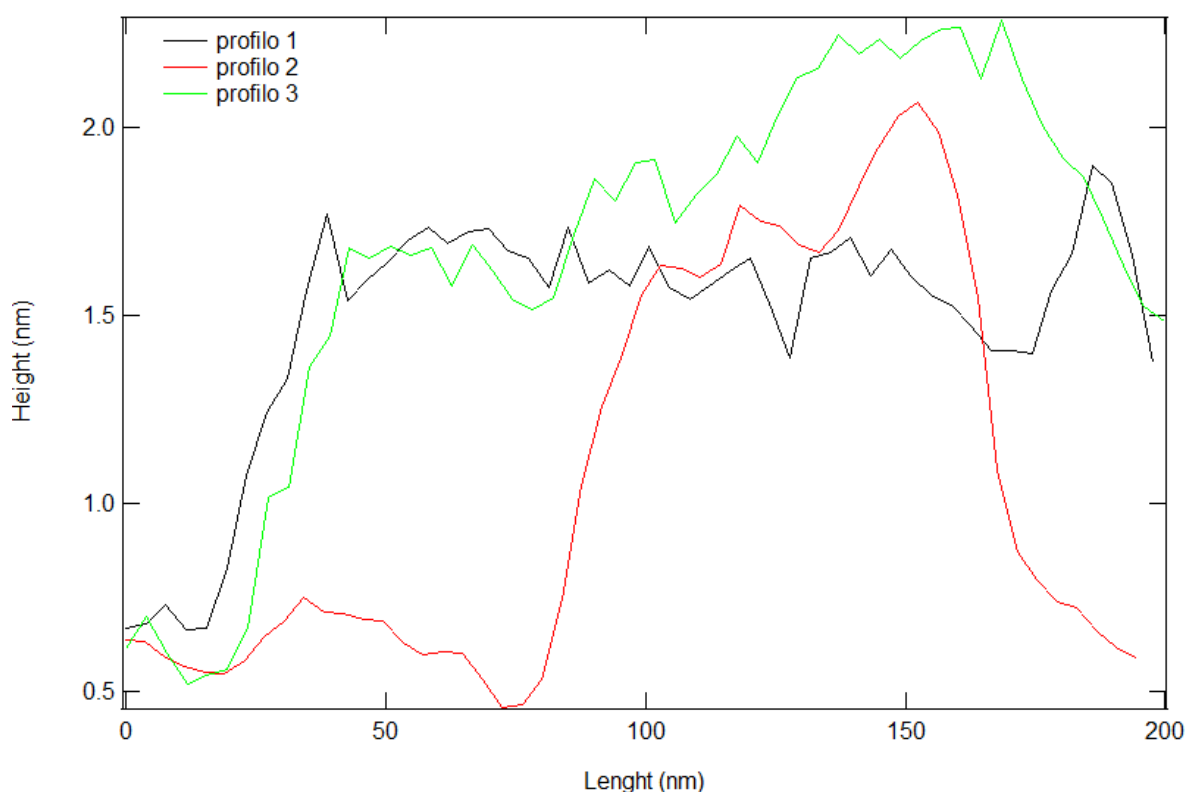


Infine l'istogramma 3.4 mostra i valori della larghezza in funzione della percentuale della distribuzione di frequenza.



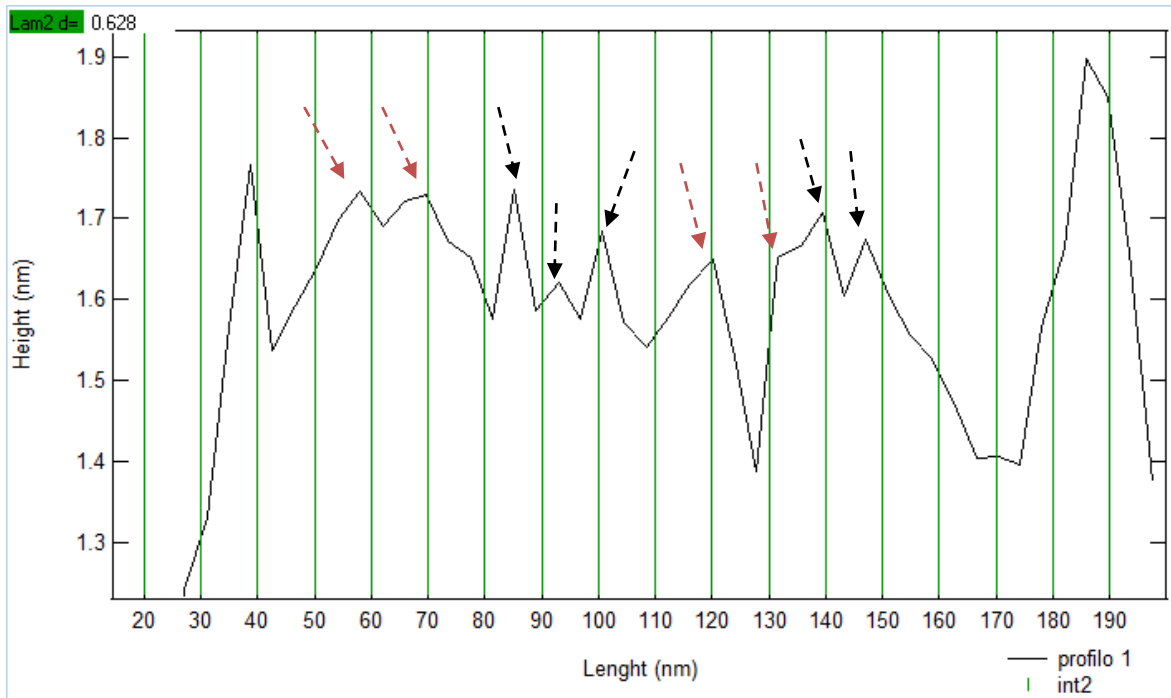
**Istogramma 3.4:** distribuzione di frequenza valori di larghezza figura 3.2.

Anche in questo caso si può notare come i valori più frequenti ricadono sul range di larghezza compreso tra 34,5 e 35,5 nm. L'analisi del profilo longitudinale, visto in figura 3.2, ci aiuta a comprendere meglio i dati visti mostrati nei grafici precedenti.



**Grafico 3.1:** *profilo longitudinale figura 3.2*

Il grafico 3.1 mostra l'insieme delle sezioni longitudinali mostrate in figura 3.2. Il grafico riporta la lunghezza in nm in funzione dell'altezza sempre in nm, mentre i tre profili corrispondono, alle linee tratteggiate mostrate nel filamento preso d'esame. Possiamo notare che i valori più alti in altezza corrispondono proprio in quelle aree indicate dalle frecce bianche in figura 3.2. Ovvero dove si concentrano quelle strutture simil nodulari in corrispondenza di altri filamenti. Mentre i valori più bassi corrispondono alle "funi" che collegano i nodi. Un'ulteriore analisi dei singoli filamenti ci mostra invece la periodicità tra i picchi registrati dall'AFM, nel grafico 3.2.



**Grafico 3.2:** sezione sagittale profilo 1.

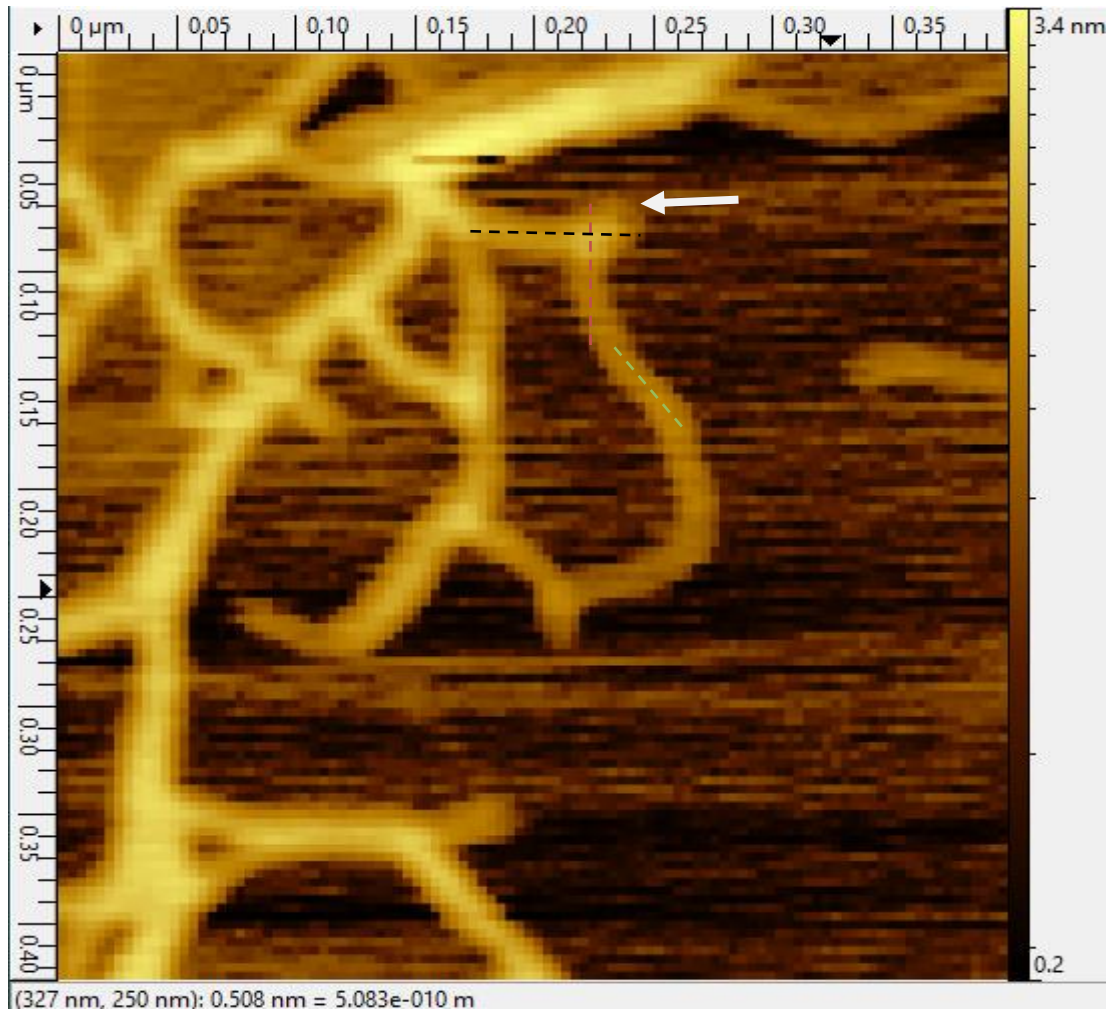
Il grafico 3.2 mostra un particolare ingrandimento del profilo n1 corrispondente al filamento evidenziato dalla linea nera tratteggiata nella figura 3.2. Ancora una volta il grafico riporta la lunghezza in nm in funzione dell'altezza, la spaziatura è stata settata ad ogni 10nm. Esaminando le distanze tra i picchi, notiamo che le frecce tratteggiate di diverso colore, stanno ad indicare quei picchi che possiedono una distanza dal successivo dello stesso valore. Infatti le frecce rosse evidenziano i picchi aventi una distanza l'uno dall'altro di 11,617nm. Mentre le frecce nere indicano i picchi distanziati di 7,7446nm, come ad esempio nella triade di picchi centrale (tra 80 e 110nm di lunghezza). Tutti questi dati, in riferimento al filamento

mostrato in figura 3.2, indicano che in prossimità dei nodi, delineati dalle frecce bianche, i valori di altezza tendono allo standard tipico dei G-quadruplex. Mentre nelle regioni che collegano i nodi potrebbero esserci le condizioni per poter disporre i quartets in una disposizione inclinata, tanto da poter permettere valori più bassi di altezza. Infine, sempre nelle regioni in prossimità dei nodi, i valori di larghezza delle basi sono più grandi per via della convergenza di altri filamenti singoli. Tali filamenti potrebbero interagire maggiormente, in virtù della presenza della GUA che contribuirebbe così ad un maggior impaccamento e quindi alla formazione del nodo.

### *3.3: Filamenti curvi*

Sempre nell'ambito dei filamenti singoli, rientrano anche tutti quei filamenti aventi una forma curvilinea. In questo studio sono state effettuate 37 misurazioni, sempre in riferimento ai valori di altezza e lunghezza dei picchi. Nella figura 3.3, viene illustrato un particolare filamento singolo curvilineo in cui sono indicate, tramite linee tratteggiate, le porzioni dove è stato valutato il profilo sagittale del filamento. Rilevando così la posizione dei picchi che compongono quel determinato settore di filamento. Inoltre, sempre nella

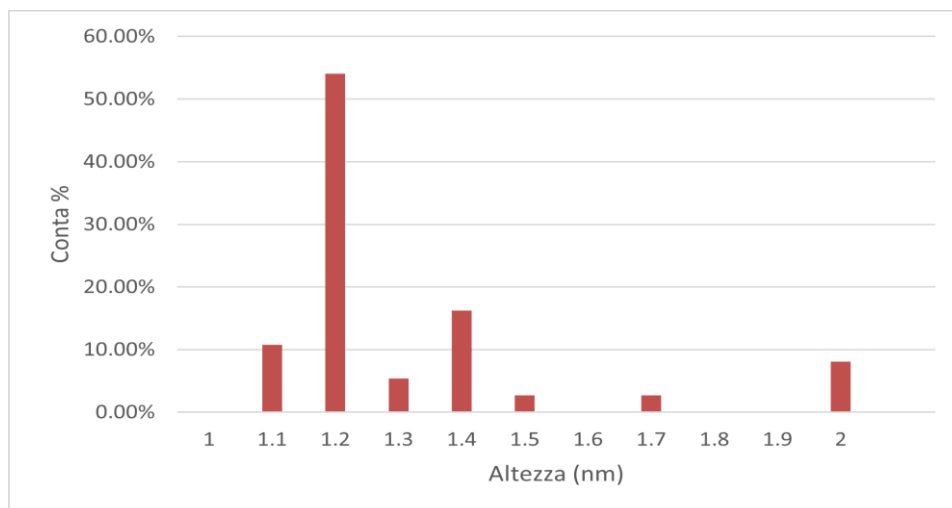
stessa figura, è possibile notare una freccia che indica la presenza di una particolare struttura simil nodulare.



**Figura 3.3:** particolare di filamento curvo.

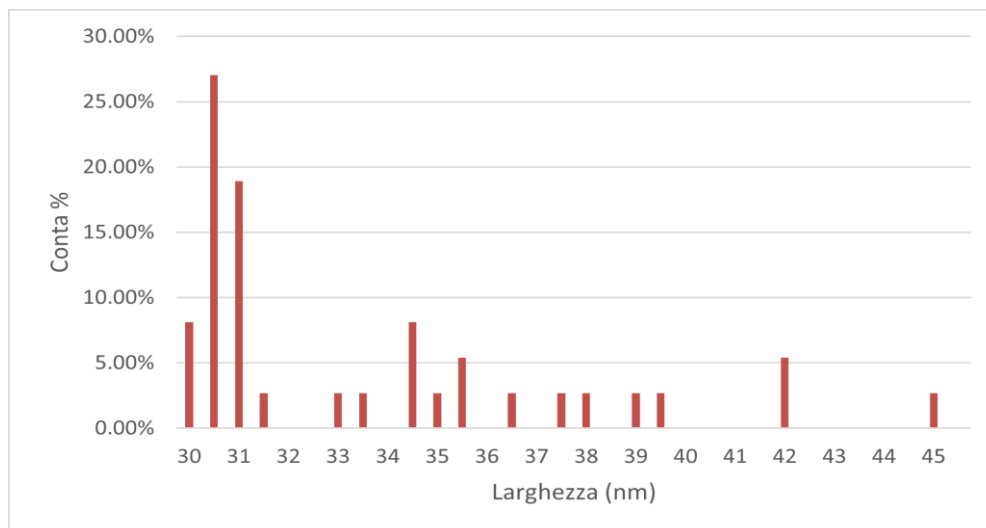
L'istogramma 3.5 riporta l'altezza in funzione della distribuzione di frequenza in riferimento al filamento curvilineo mostrato in figura 3.3. E' di

notevole importanza la presenza di valori in altezza ben al di sotto dei valori reputati comparabili con i valori classici dei G-quadruplex.



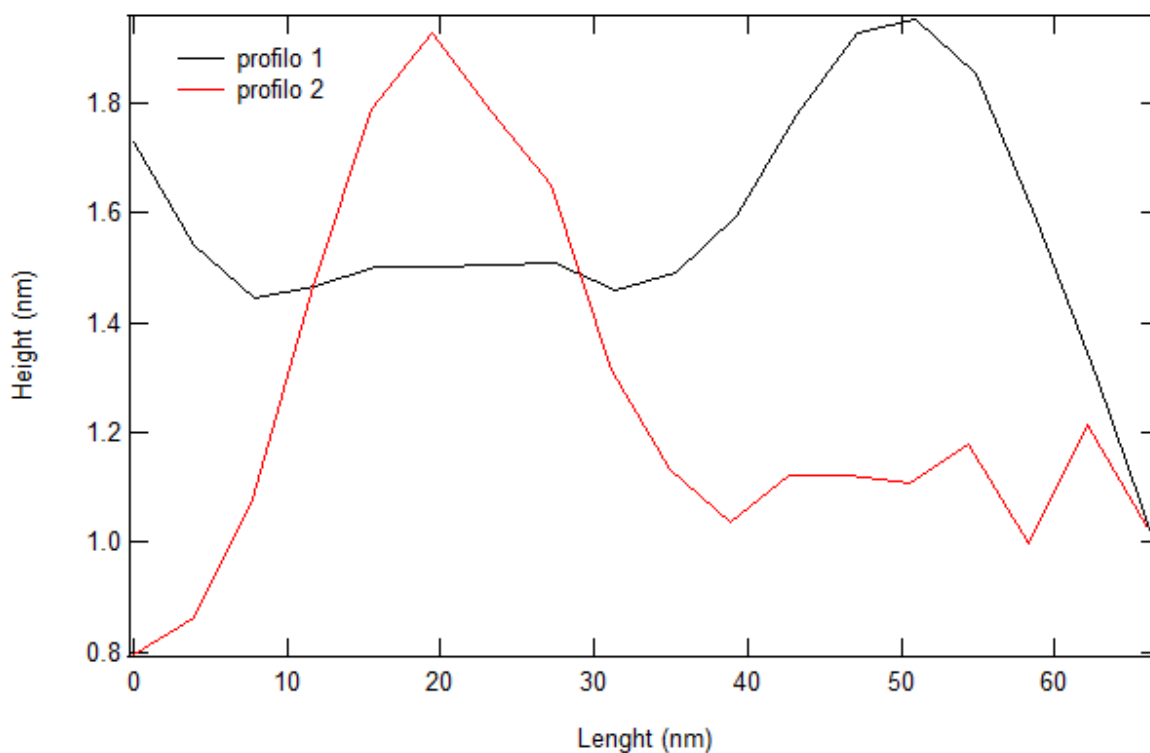
**Istogramma 3.5:** *distribuzione di frequenza altezze figura 3.3.*

Infatti più del 50% dei valori delle altezze rientrano in un range di valori che vanno da 1,1 a 1,5 nm, inoltre nemmeno il 10% rientra nel valore di 2 nm. Mentre nell'istogramma 3.6 vengono riportate i valori delle larghezze sempre in funzione della percentuale della distribuzione di frequenza.



**Istogramma 3.6:** distribuzione di frequenza valori di larghezza figura 3.3.

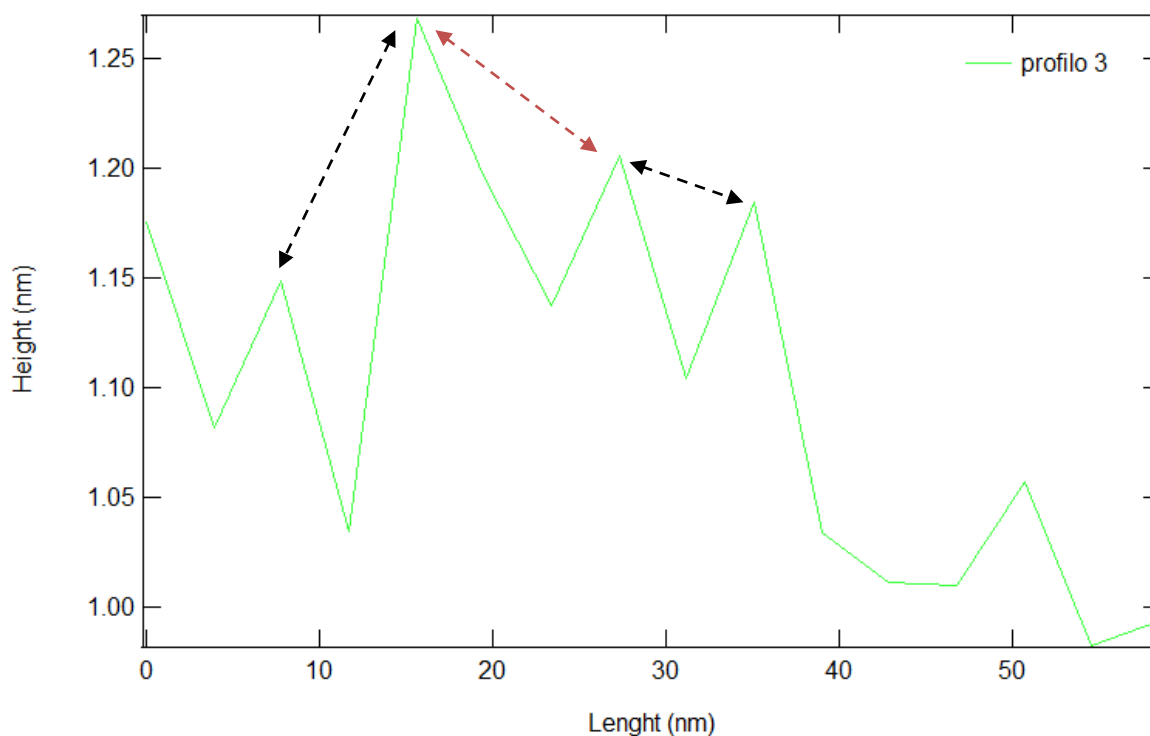
Ancora una volta è possibile notare che una considerevole percentuale, circa il 60%, rientra nell'intervallo di valori che va da 31 a 35 nm.



**Grafico 3.3:** sezione sagittale dei profili.

Nel grafico 3.3 vengono riportati i profili sagittali che vanno a delineare il nodo mostrato in figura 3.3. Il grafico riporta sull'asse delle ascisse la lunghezza (nm) in funzione dell'altezza (nm) dei picchi, riportando il profilo che cade sulle linee tratteggiate in figura 3.3. E' importante notare come il grafico 3.3 riporti un picco prossimo ai 2nm, valore correlabile con l'altezza dei quartets, annullando così la possibilità che si tratti di un nodo "a giro di bitta" in quanto non viene mai riportato un valore di altezza multiplo di 2nm.

Il grafico 3.4 mostra invece un particolare, che corrisponde al settore lineare del filamento, analizzato in figura 3.3, dalla linea verde tratteggiata.



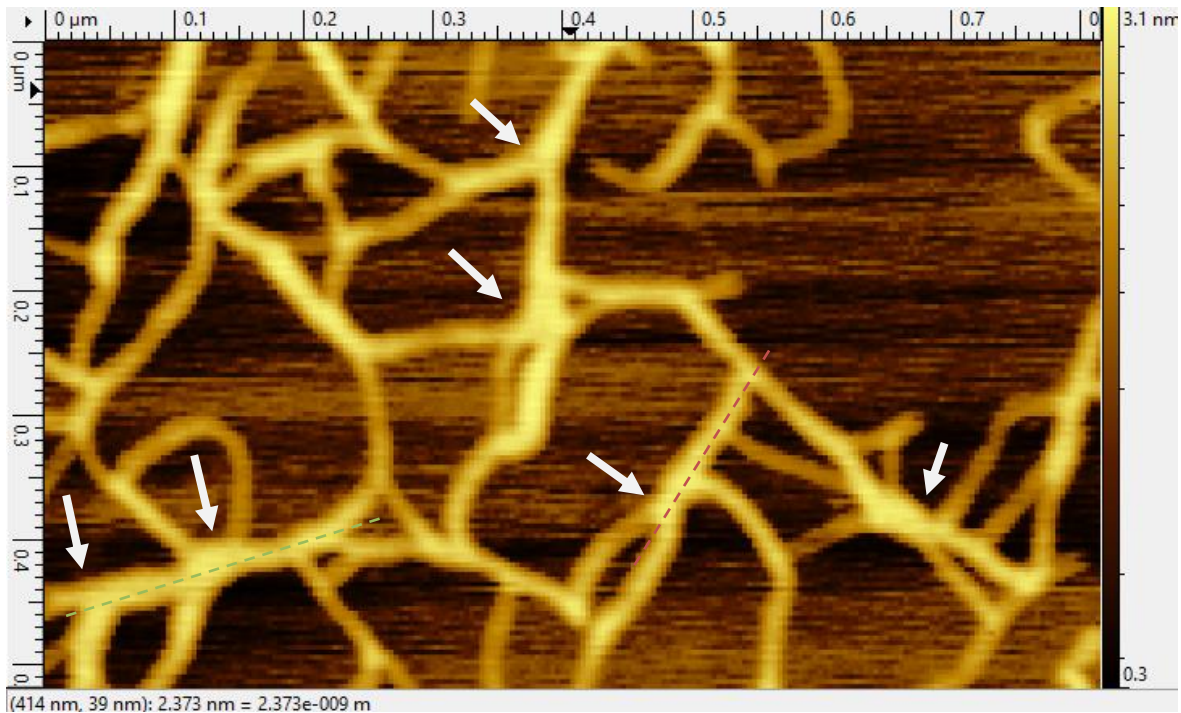
**Grafico 3.4:** *profilo sagittale settore 3 di figura 3.3*



Il grafico sovrastante mostra l'andamento dei picchi, non solo definendo la lunghezza del settore complessivo preso in considerazione, ma stabilendo anche l'altezza dei picchi e la rispettiva distanza tra gli stessi. Anche in questo caso possiamo stabilire che l'altezza massima non supera i 1,3nm. Le doppie frecce tratteggiate nere indicano due picchi consecutivi distanti tra di loro 7,8031 nm. Mentre la doppia freccia rossa, al centro, sta ad indicare due picchi distanti 11,705nm. Anche in questo caso si evince la presenza di una certa periodicità tra i picchi consecutivi. Rafforzando così la periodicità precedentemente misurata, e dal valore di 7,7446nm e 11,617nm, visti nel filamento lineare, riportato in figura 3.2.

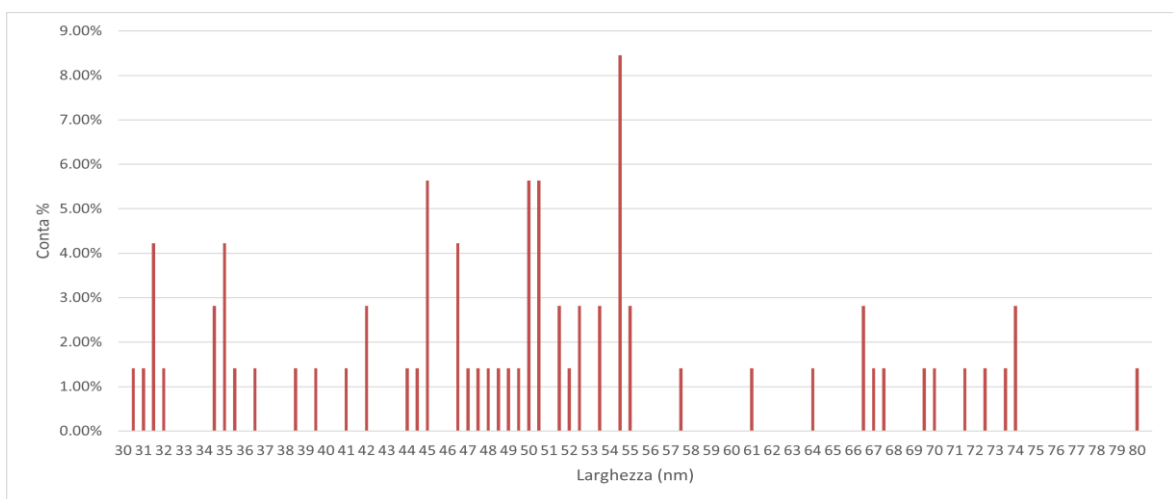
### *3.4: Nodi*

Oltre alle fibre filamentose sono state valutate anche strutture nodulari, come riportato in figura 3.4. Tali strutture nodulari si presentano come corpi simil "circolari" e si interpongono tra diversi filamenti, permettendo l'unione tra le fibre che formano il gel. In questo studio sono state effettuate 228 misurazioni su diverse tipologie di aggregati simil nodulari.



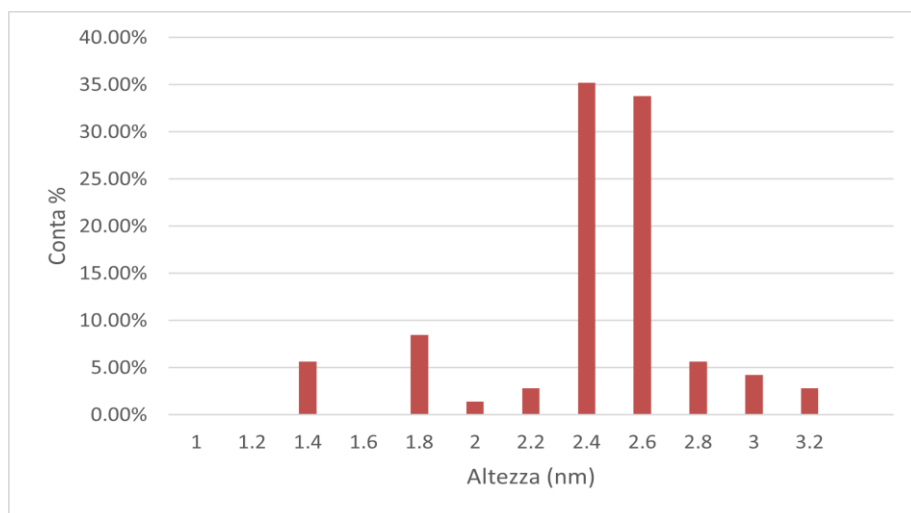
**Figura 3.4:** formazioni nodulari che collegano vari filamenti.

La figura 3.4 mostra, con delle frecce bianche, alcuni nodi di piccola entità che formano come una trama di filamenti di varia lunghezza, ed è proprio in questi nodi che sono state prese le misure di altezza e larghezza.

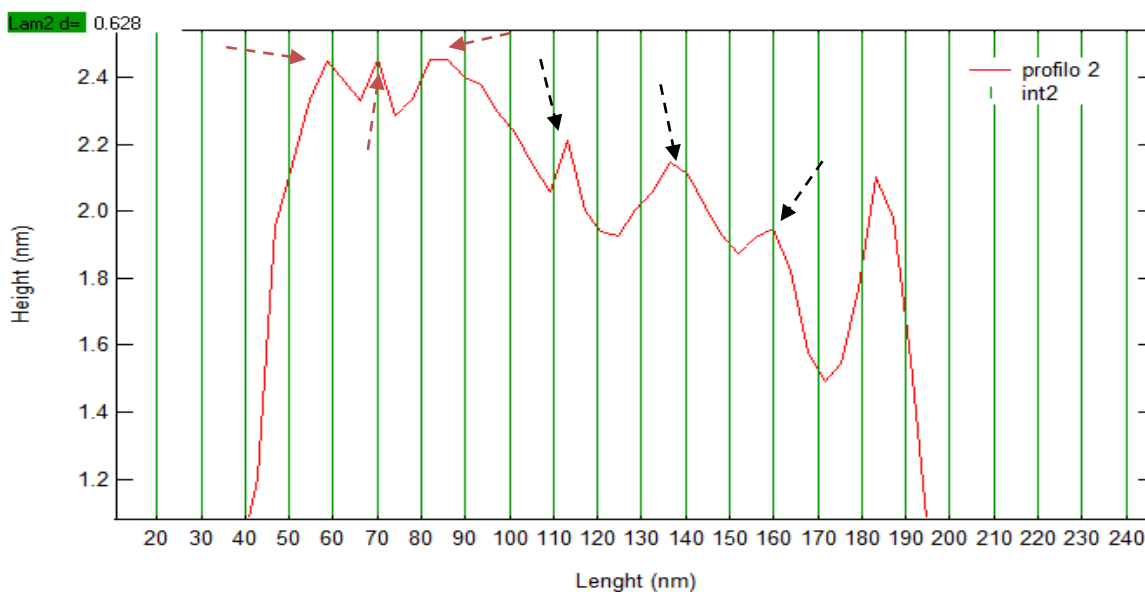


**Istogramma 3.7:** distribuzione di frequenza larghezza nodi figura 3.4.

Nell'istogramma 3.7 sono state riportate i valori delle larghezze in funzione della percentuale di distribuzione di frequenza. In questo caso possiamo notare come più del 30% dei valori cadono nell'intervallo compreso tra 50 e 55 nm, contro il 10% dell'intervallo che va da 30 a 35nm. Considerevole è anche la percentuale, intorno al 15%, delle larghezze che si attestano tra il 66 e 74 nm. Nell'istogramma successivo, (3.8), sono riportate le altezze in funzione della percentuale della distribuzione di frequenza. In questo caso possiamo notare una netta distinzione con le altezze riportate in precedenza. Infatti circa il 70% dei valori delle altezze rientra nel range compreso tra 2.2 e 2.6 nm, mentre il 10% rientra nell'intervallo che va da 2.8 a 3.2 nm, il restante 20% circa comprende quei valori tra 1.4 e 1.8 nm.

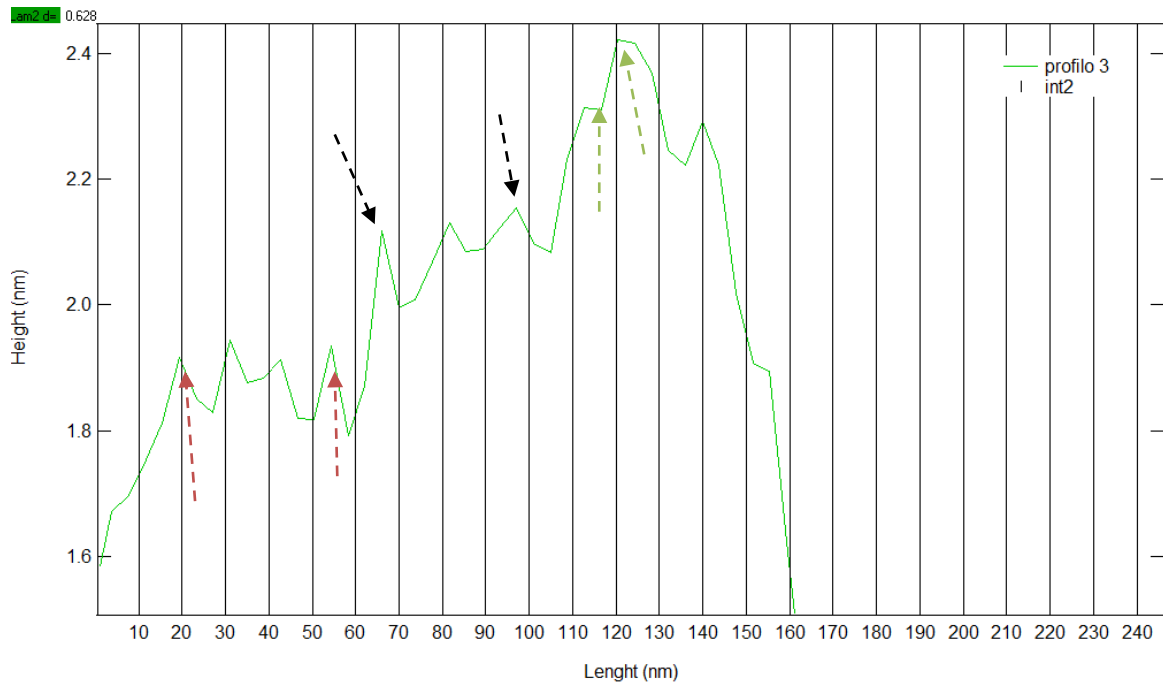


**Istogramma 3.7:** distribuzione di frequenza altezze nodi figura 3.4.



**Grafico 3.5:** sezione sagittale nodo profilo 2.

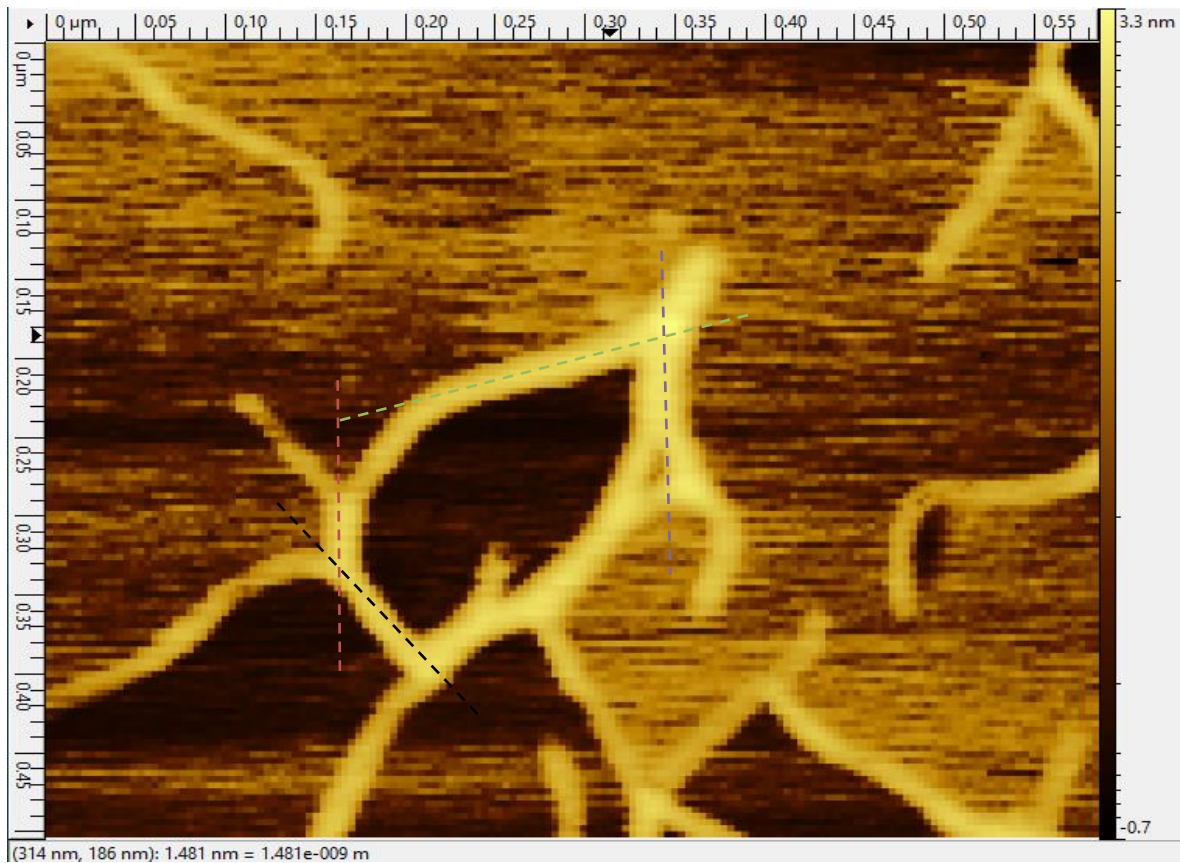
Anche per le strutture filamentose che formano “nodi” è stata fatta l’analisi dei profili sagittali in corrispondenza di alcuni particolari. Il grafico 3.5 mostra l’andamento di un particolare, appartenente profilo n2 (linea tratteggiata rossa), lungo circa 200nm. Tale settore mostra, in alcune aree lunghe circa 40nm, altezze comprese tra i 2nm e i 2.4nm. In questo settore, delineato dalle frecce rosse, viene riportata una triade di picchi tutti distanti tra di loro di 11,699nm. Mentre nella seconda triade, indicata dalle frecce nere, vengono indicati tre picchi distanti tra loro 23,397nm, valore che risulta doppio rispetto a 11,699nm.



**Grafico 3.6:** sezione sagittale nodo profilo 3.

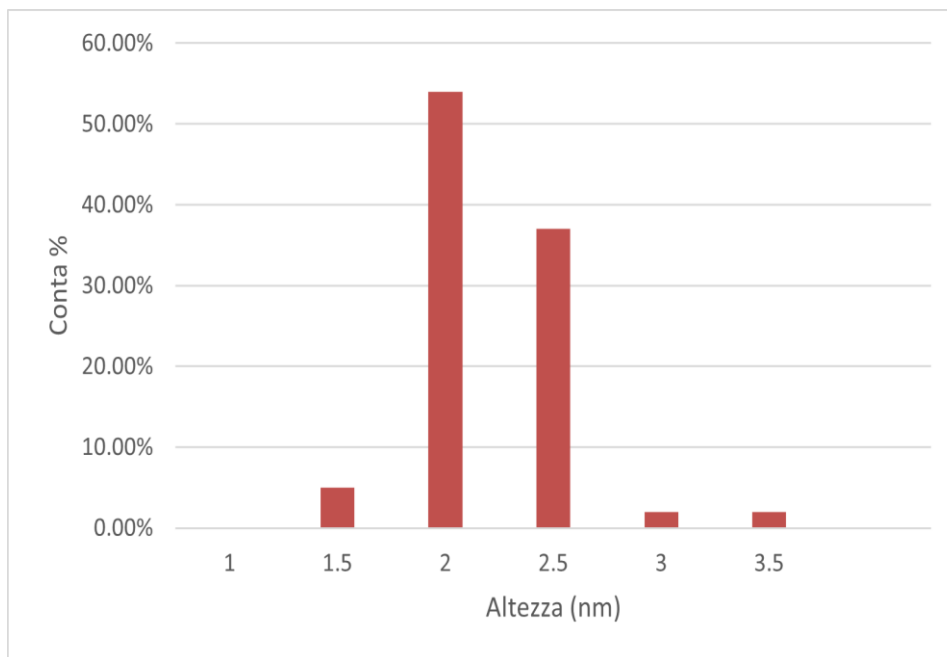
Il grafico 3.6 riporta invece il profilo sagittale appartenente ad un altro nodo, figura 3.4 linea tratteggiata verde, lungo circa 160nm. Che per buona parte del suo andamento mostra picchi sempre superiori a 1,8nm con un picco massimo di 2,4nm. Anche in questo caso possiamo notare delle sequenze di picchi distanziati tra di loro equamente. Le frecce rosse stanno ad indicare i limiti della tetrate che comprende i picchi distanti tra di loro di 11,657nm. Valore che si dimostra ricorrente anche nel profilo sagittale analizzato in precedenza. Spostandoci, sempre sullo stesso profilo, notiamo una triade di

picchi, che giace al di sopra della quota dei 2nm, delimitata dalle frecce nere. Anche in questa triade i picchi dimostrano una distanza tra di loro sempre ricorrente , ma in questo caso il valore che intercorre tra i picchi assume valori più grandi, ovvero di 15,543nm. Un ultimo intervallo tra picchi degno di nota, è indicato dalle frecce verdi. In questa sezione si può notare che la distanza tra il picco, indicato dalla freccia verde e quello successivo, corrispondente all'estremo superiore, è di 7,7713nm. Valore che risulta assai più simile a quelli riscontrati tra i picchi a bassa quota dei filamenti singoli lineari e curvilinei. La figura sottostante mostra una particolare struttura ad occhiello, simil nodulare, su cui sono state effettuate 77 misure per tutto il perimetro dell'intero "occhiello".



**Figura 3.5:** particolare di una struttura circolare chiusa.

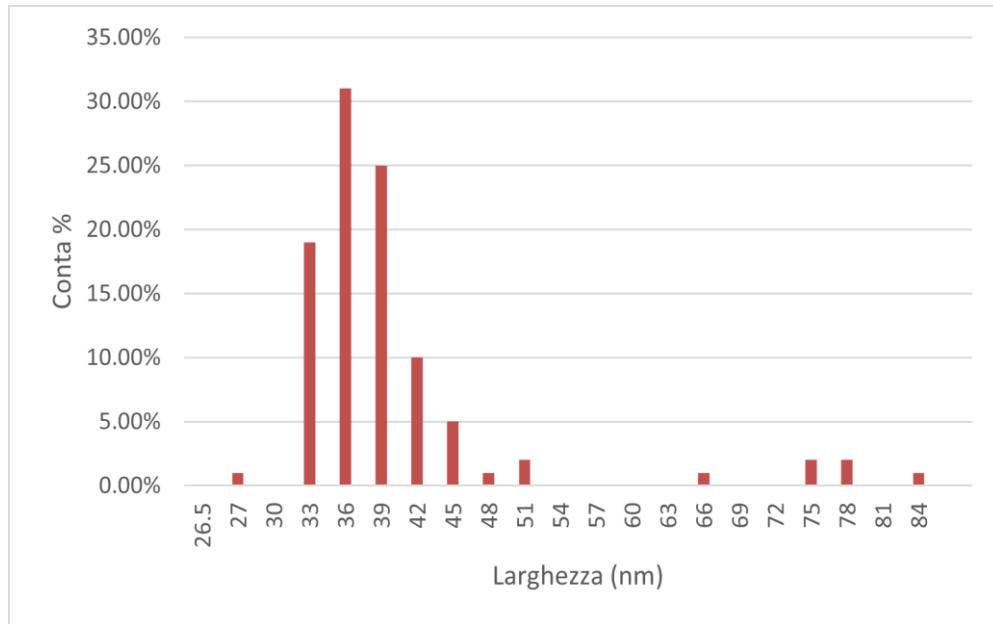
Anche per questa struttura sono stati stilati i grafici che riportano l'altezza, larghezza e profilo, quest'ultimo in particolari posizioni che cadono sulle linee tratteggiate in figura.



**Istogramma 3.9:** percentuale distribuzione di frequenza altezze figura 3.5.

Nell'istogramma 3.9 sono riportate le altezze in funzione della percentuale di distribuzione di frequenza. Anche in questo caso particolare si può notare una totale divergenza con i valori riportati nei filamenti lineari. Infatti più dell'80% dei valori dell'altezza cade nel range compreso tra 2 e 2.5nm. Mentre al di sotto del 10% troviamo i valori di 1.5nm, valore fortemente rappresentativo in altri filamenti studiati in questo lavoro. Il restante 5% è rappresentato dai valori di altezza compreso tra i 3 e 3.5nm.

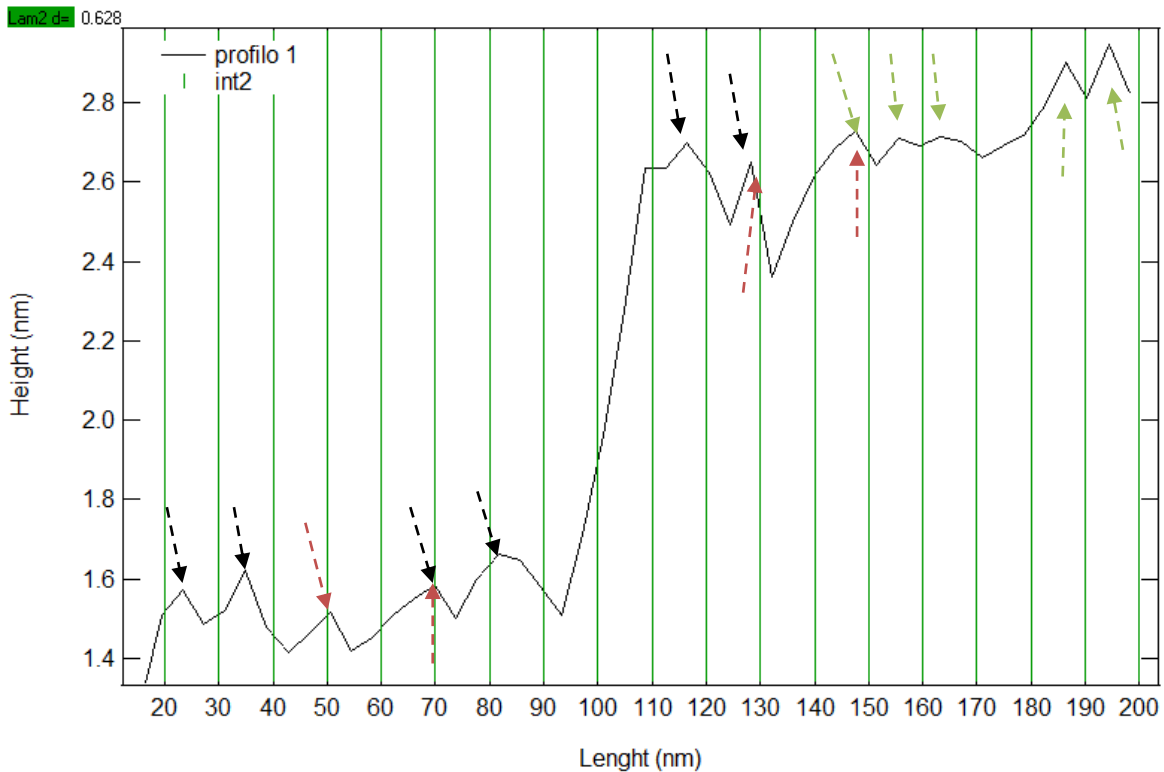




**Istogramma 3.10:** percentuale di distribuzione di frequenza larghezze figura 3.5.

L'istogramma sovrastante riporta i valori delle larghezze in funzione della percentuale di distribuzione della frequenza. In questo caso possiamo notare che circa il 50% dei valori sono compresi tra 33 e 36nm, range che è sempre confermato nelle strutture esaminate precedentemente. Poche sono le eccezioni, infatti sotto al 5%, rientrano quei valori compresi tra 75 e 84nm, mentre un buon 35% rientra tra i valori di 39 e 42nm.

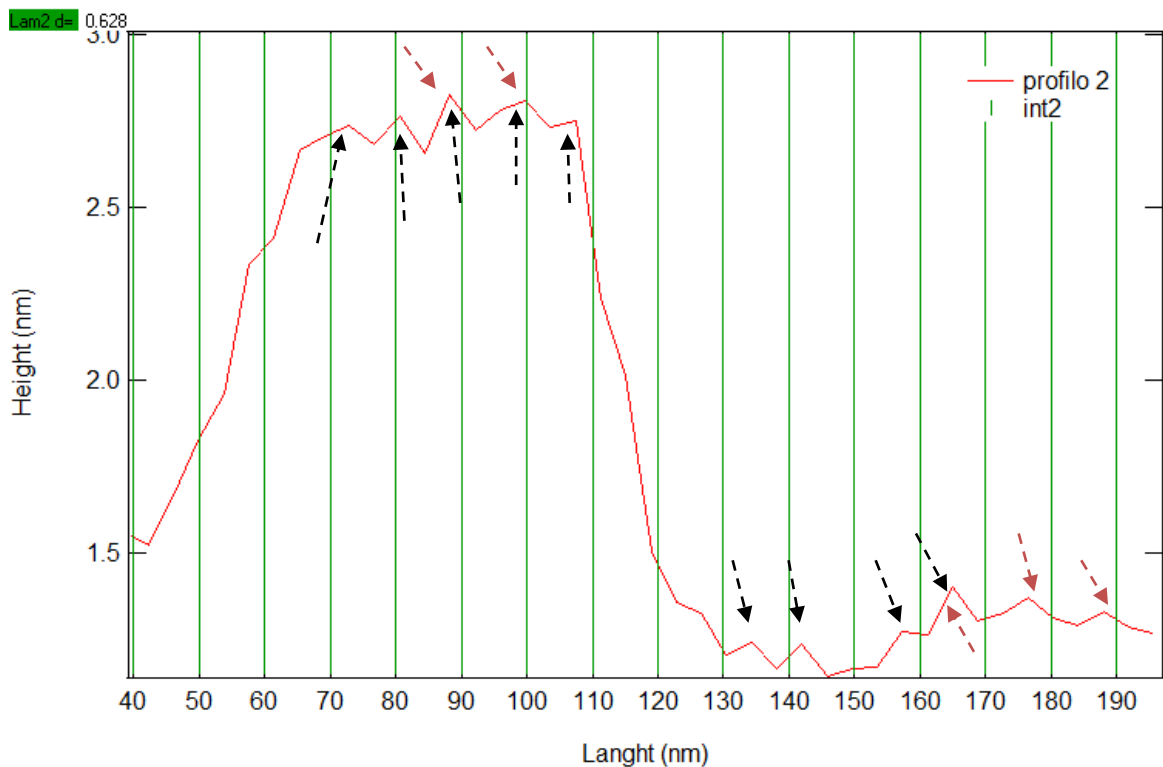
Il grafico 3.8 mostra il profilo che cade sulla linea tratteggiata nera, appartenete alla struttura ad occhio.



**Grafico 3.8:** sezione longitudinale profilo 1 struttura occhiello.

Nel grafico viene riportato sull'asse delle ascisse la lunghezza in nm in funzione dell'altezza espressa sempre in nm. Il profilo in questione è lungo circa 200nm e comprende altezze dei picchi che vanno da un minimo di 1,4nm fino ad un picco massimo di circa 2,8nm. Anche in questo caso notiamo delle interessanti periodicità in termini di distanza tra i picchi registrati. Le frecce nere indicano quei picchi che mostrano una distanza periodica costante di 11,656nm. Le frecce rosse indicano quei picchi aventi invece una distanza fissa di 19,422nm, infine , le frecce verdi, di 7,7709nm. Questi picchi non solo mostrano una pluralità di valori periodici, ma mostrano

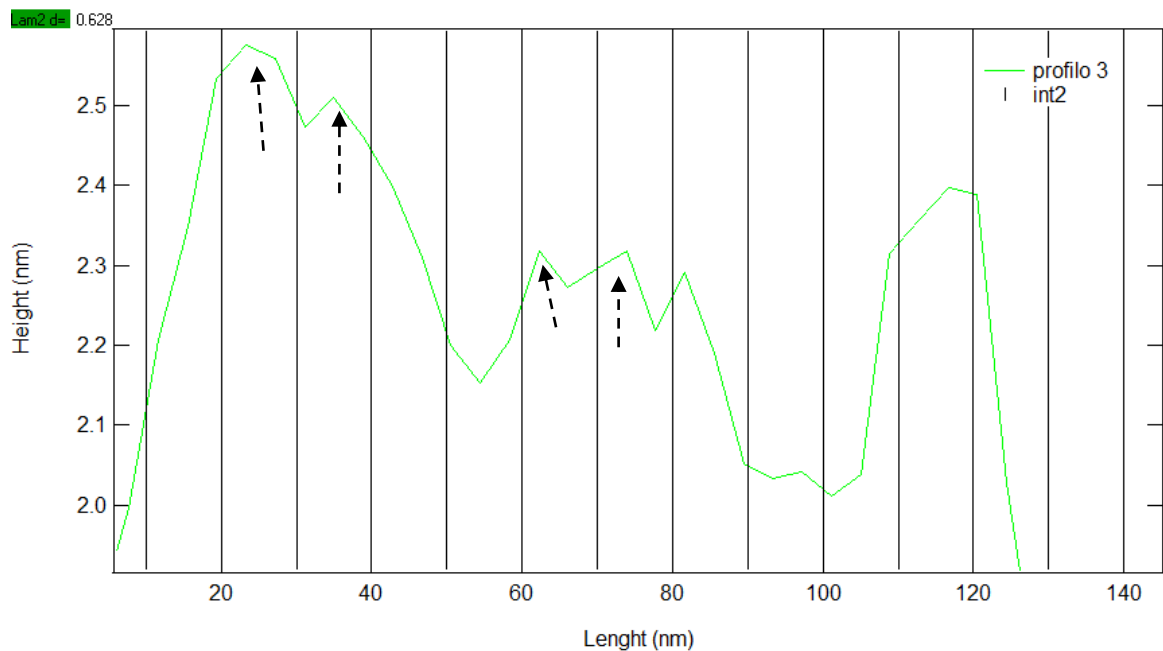
come certi valori ridondanti, come quelli mostrati dalle frecce nere e rosse, si dimostrino costanti sia a quote basse, come 1,4 1,6nm, che a quote massime come 2,8nm. Notiamo inoltre una certa periodicità anche in certi picchi che mostrano valori già precedentemente analizzati nei filamenti singoli (7,7709nm).



**Grafico 3.9:** sezione longitudinale profilo 2.

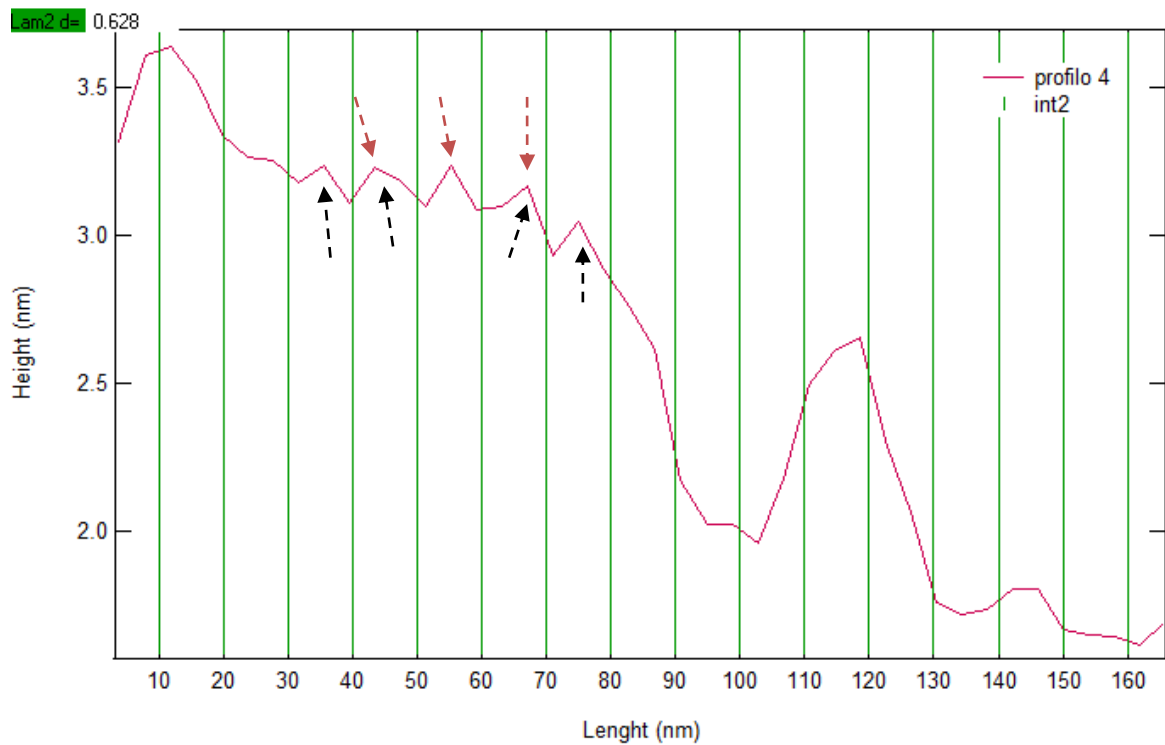
Il profilo analizzato nel grafico sovrastante misura oltre 190nm, possiede picchi di altezza variabile con minimi parzialmente al di sotto del 1,5nm e massimi quasi a sfiorare i 3nm. Possiamo notare che anche in questo settore

dell'occhiello risultano esserci valori periodici. Infatti le frecce nere indicano tutti quei picchi aventi una distanza fissa di 7,6744nm , mentre le frecce rosse indicano quelli distanti tra loro di 11,512nm. E' interessante notare come anche in questo caso, ovvero nelle sezioni appartenenti ad una struttura così complessa, si conservi una certa periodicità in ogni regione del profilo esaminato. Infatti i valori di 7,6744nm e 11,512nm sono assunti sia dai picchi che registrano altezze superiori a 2,5nm che in quelli aventi valori in altezza inferiori a 1,5nm.



**Grafico 3.10:** sezione longitudinale profilo 3.

Il grafico 3.10 mostra un altro particolare settore appartenente alla struttura nodulare ad occhiello. In questo specifico caso notiamo una sola periodicità all'interno di un segmento lungo circa 130nm. Infatti le frecce nere indicano quattro picchi, presi in coppia, distanti tra loro 11,664nm. Anche in questo settore possiamo notare come la periodicità dei valori si mantiene costante a diverse altezze, seppur con differenze meno significative.



**Grafico 3.11:** sezione longitudinale profilo 4 occhiello.

Il grafico riporta un ultimo profilo lungo circa 160nm, nei quali i picchi riportati non mostrano mai un'altezza al di sotto dei 2nm. In quest'ultimo caso si può notare come tra i picchi, ad alte quote, esista una certa periodicità.

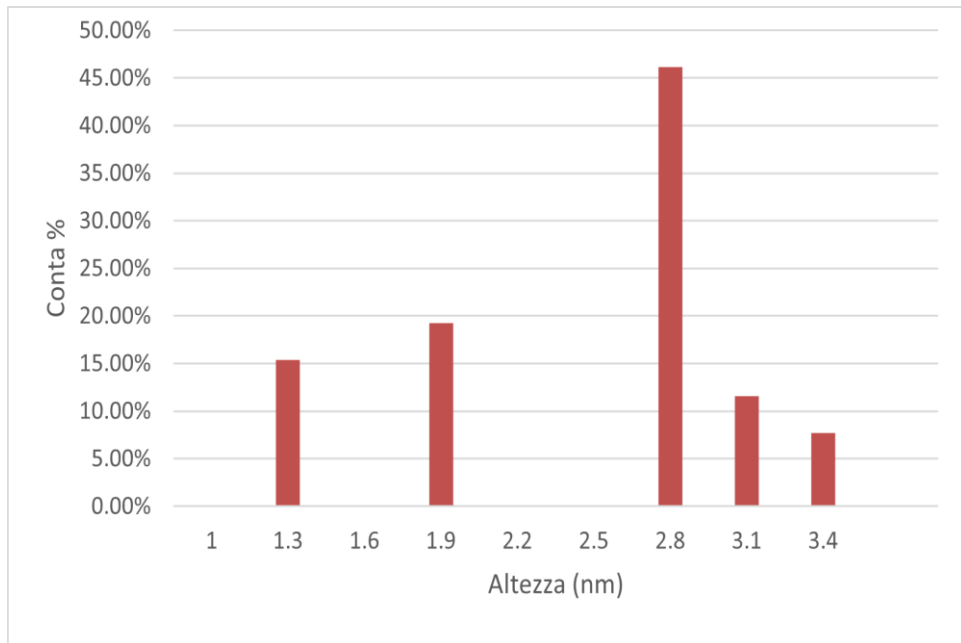
Le frecce nere indicano i picchi distanti tra loro 7,8992nm, mentre le frecce rosse quelli distanti 11,849nm.

Altra struttura presa in considerazione si tratta di una “forcina” a tre uscite, come mostra la figura 3.5.



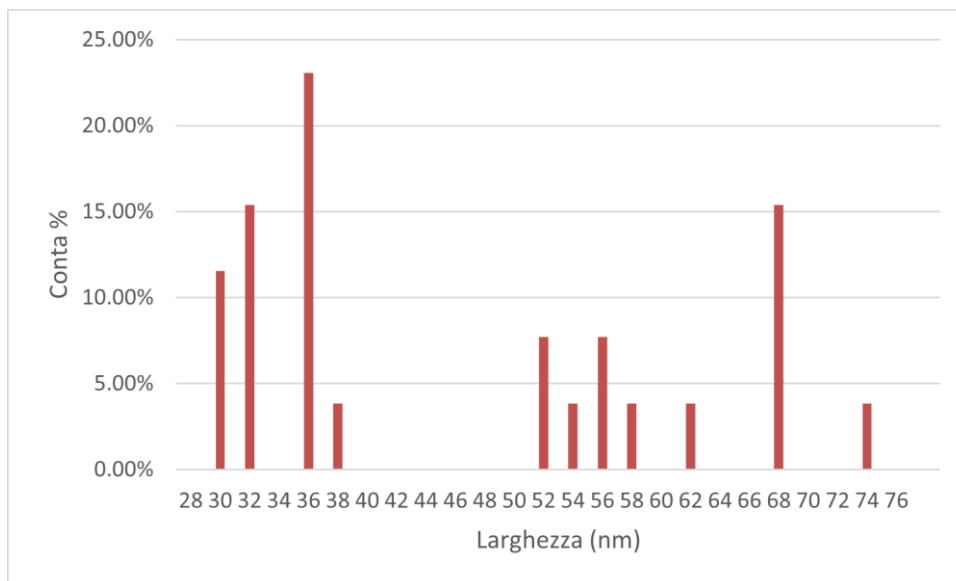
**Figura 3.5:** *struttura a forcina.*

Su di questa struttura sono state prese 26 misure totali per il rilevamento della larghezza e dell'altezza, tali misure sono state prese sia sul corpo centrale che sui filamenti che seguono il corpo centrale.



**Istogramma 3.11:** *percentuale distribuzione di frequenza altezze figura 3.5.*

L'istogramma 3.11 mette in relazione l'altezza dei picchi registrati dall'AFM in funzione della percentuale della distribuzione di frequenza. Notiamo che oltre il 45% delle altezze assumono valore di 2,8nm. Mentre circa il 20% rientra nell'intervallo compreso tra 3,1 e 3,4nm, infine il rimanente 35% dei valori di altezza rientra nell'intervallo compreso tra 1,3 e 1,9nm.

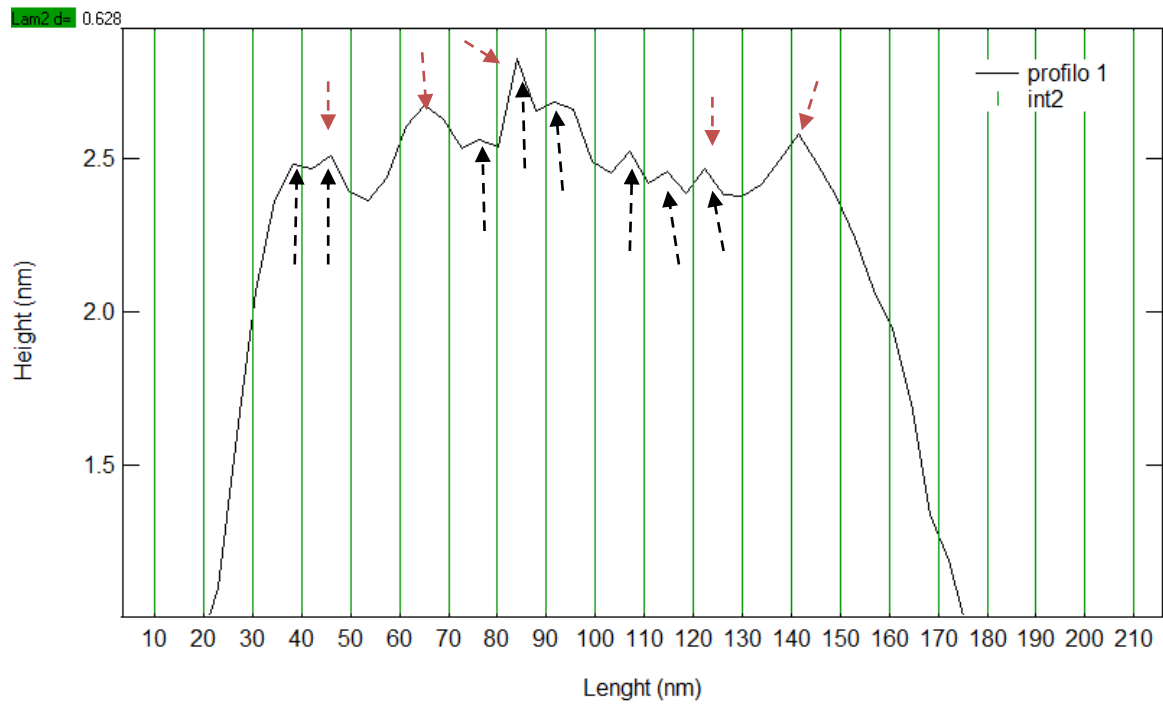


**Istogramma 3.12:** *percentuale distribuzione di frequenza larghezza figura 3.5.*

L'ultimo istogramma riporta i valori delle larghezze, espressa in nm, in funzione della percentuale di distribuzione di frequenza. In questo caso notiamo che il 15% delle larghezze rientra nel valore di 68nm, mentre il 24% dei valori delle larghezze rientra nell'intervallo compreso tra 52 e 58nm. Infine oltre il 25% delle larghezze si attesta al valore di 36nm ed un altro 25% è compreso tra i valori di 30 e 32nm. Questi dati ci suggeriscono che i valori più grandi delle larghezze sono dovuti ad un'aggregazione uno o più filamenti, mostrando così valori multipli. Mentre i valori che convergono a 30 e 32nm stanno ad indicare filamenti singoli. Anche per questa struttura a "forcina" sono state registrate le periodicità sia per il corpo centrale che per un filamento singolo. I grafici a seguire mostrano l'andamento dei picchi in



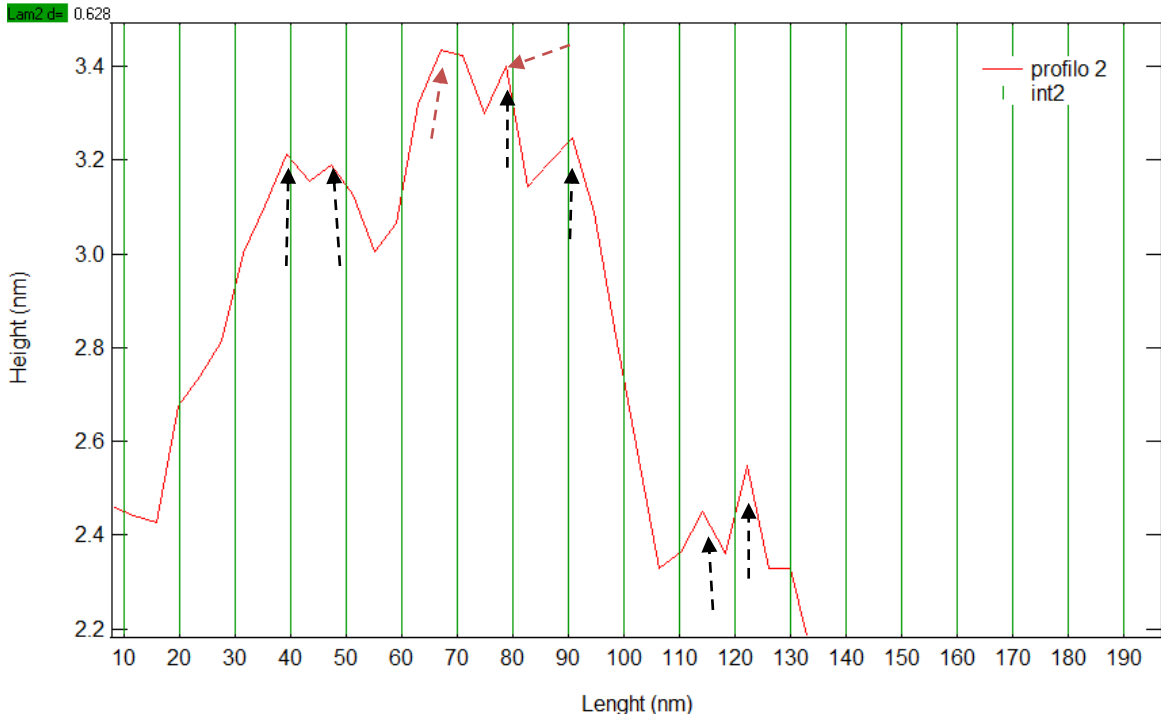
regioni le cui quote si attestano al di sopra dei 2nm e con punte a sfiorare i 3,5nm.



**Grafico 3.12:** sezione longitudinale profilo 1.

Il grafico sovrastante riporta un settore longitudinale lungo circa 180nm, con picchi alti oltre 2,5nm. Dal grafico 3.12 possiamo notare un nutrito numero di picchi che sono indicati da delle frecce. Le frecce di diverso colore contraddistinguono i picchi in base al valore della distanza tra un picco ed il suo successivo. Le frecce nere stanno ad indicare tutti quei picchi che possiedono una distanza di 7,6466nm. Possiamo notare che ci sono 2 triplette di picchi che registrano regolarmente una distanza di 7,6466nm tra un picco

ed il successivo. Le frecce rosse indicano invece tutti i picchi distanti tra di loro 19,117nm. Si evince chiaramente che anche in strutture di una certa dimensione esiste una ben precisa periodicità nella spaziatura dei picchi.

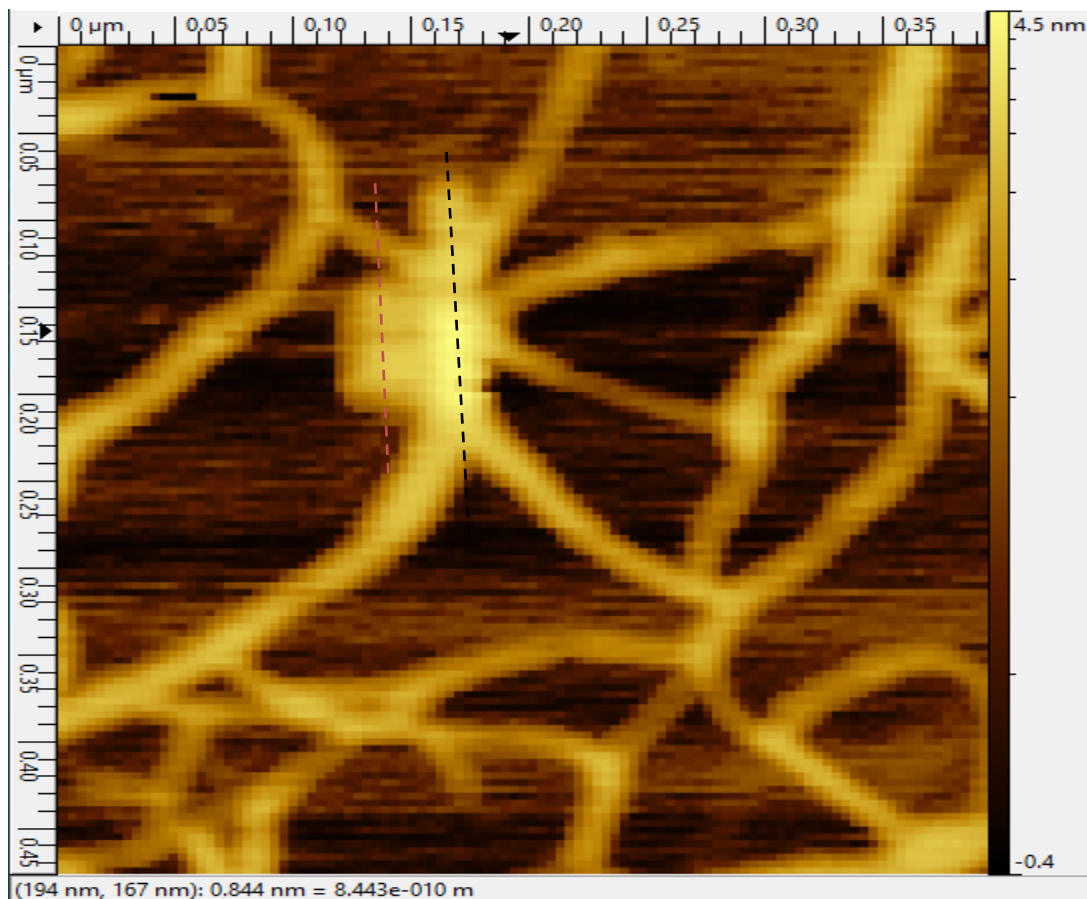


**Grafico 3.13:** sezione longitudinale profilo 2.

Il grafico sovrastante mostra un altro particolare della struttura a forcina, ovvero il profilo di un braccio uscente della lunghezza di 130nm. In questo settore possiamo vedere la presenza di picchi che vanno ben al di sopra dei 3nm, con massimi che sfiorano 3,5nm. Anche in questo settore sono stati evidenziati i picchi in funzione della loro distanza. Infatti le frecce nere indicano i picchi distanti dal consecutivo, segnato dalla freccia nera, avente

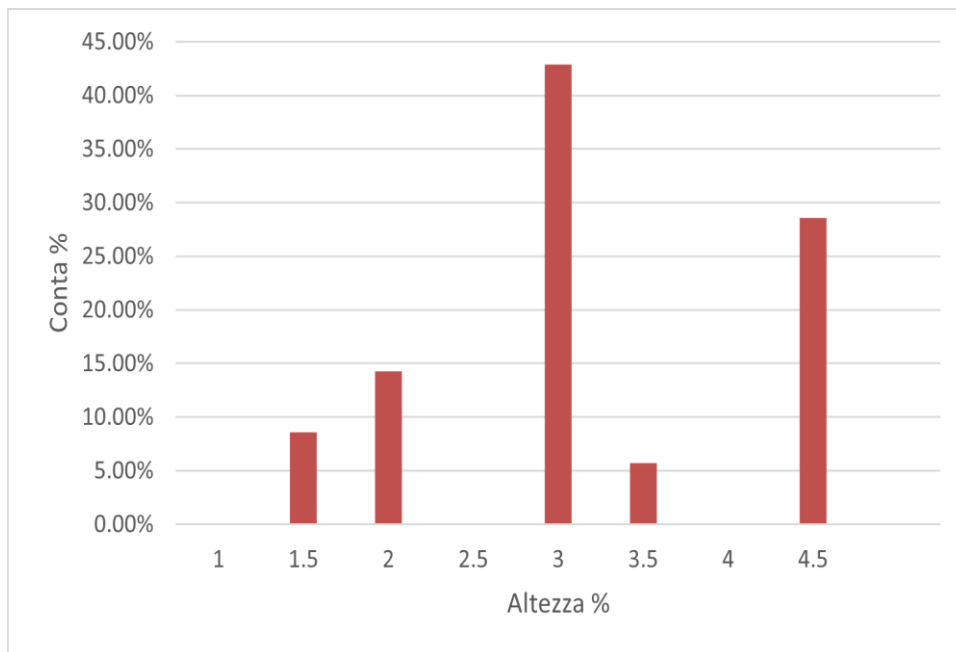
una distanza fissa di 7,6466nm, mentre con le frecce rosse di 19,117nm. Da questo profilo si evince facilmente che la periodicità della distanza tra i picchi, non solo è costante ma risulta essere convergente ai valori stimati nei precedenti filamenti.

Ultima struttura presa in considerazione in questo studio, si tratta di un ammasso non filamentoso, irregolare di grande dimensione. Su questa struttura sono state effettuate 58 misure, sempre per la valutazione dei valori di altezza e larghezza.



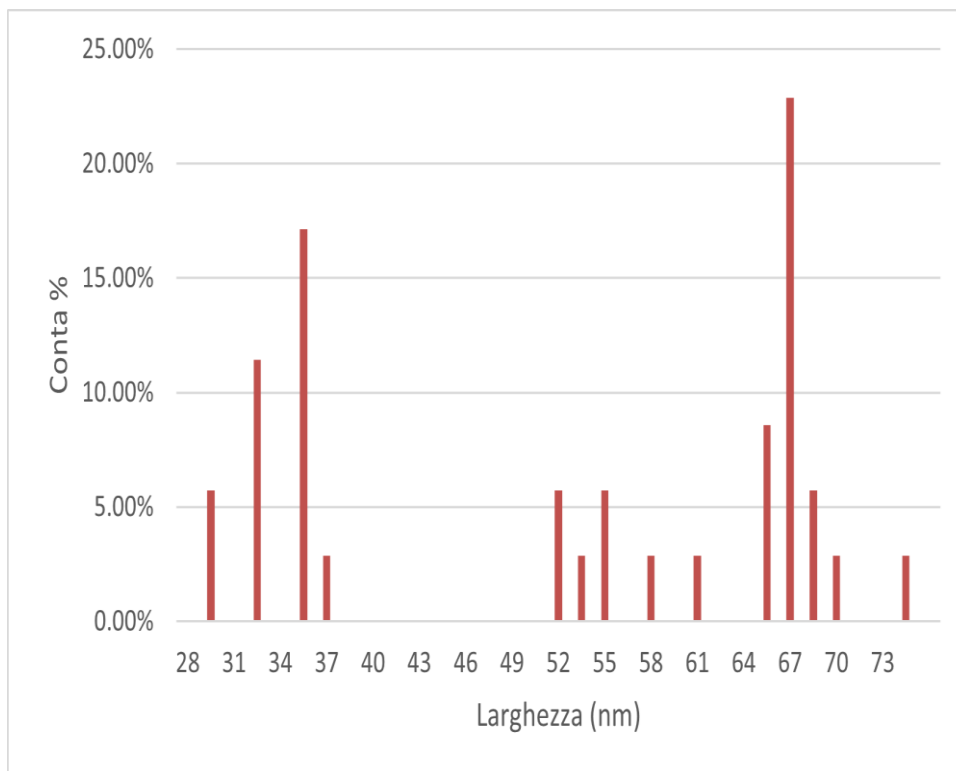
**Figura 3.6:** *agglomerato.*

Anche in quest'ultimo caso, nel grafico sottostante sono state inserite i valori di altezza in funzione della percentuale della distribuzione di frequenza.



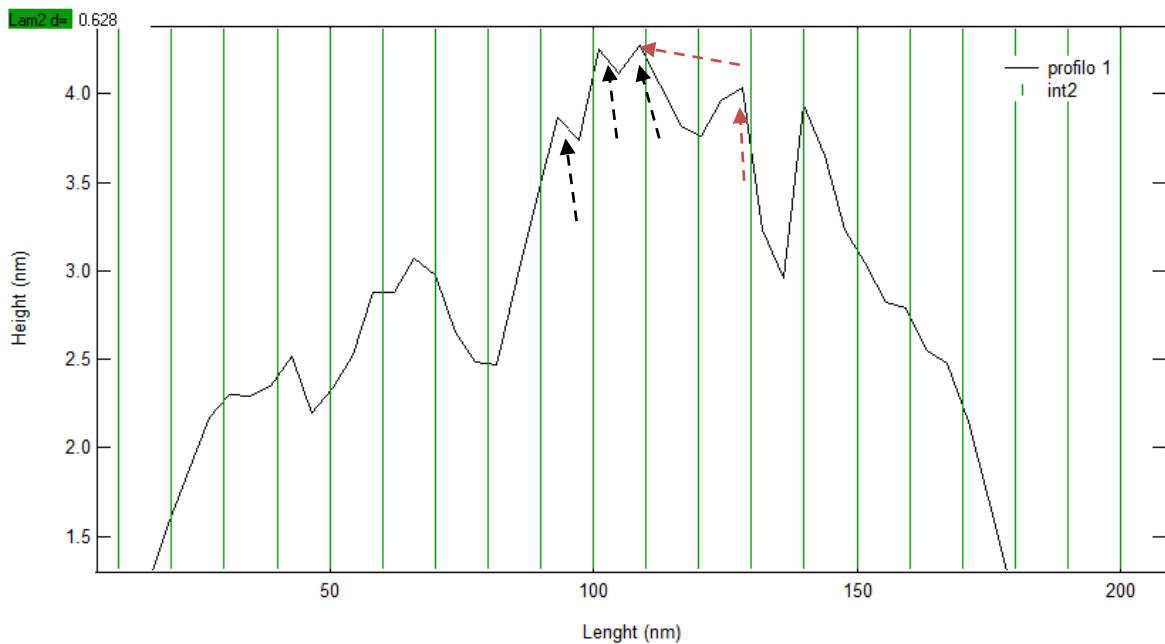
**Istogramma 3.12:** percentuale di frequenza in riferimento all'altezza figura 3.6.

Da quest'ultimo grafico possiamo notare non solo che oltre il 45% dei valori di altezza ricade nel range compreso tra 3 e 3.5nm, ma che circa il 30% dei valori si attestano al valore di 4.5nm. Inoltre circa il 15% dei valori rientra nel valore di 2nm, e solo l'8% circa si attesta al 1.5nm, valore dimostratosi molto rappresentativo in altre misure, per altri filamenti. L'ultimo istogramma, il 3.13, riporta come sempre, il valore della larghezza in funzione della percentuale della distribuzione di frequenza.



**Istogramma 3.13:** percentuale distribuzione di frequenza dei valori di larghezza figura 3.6.

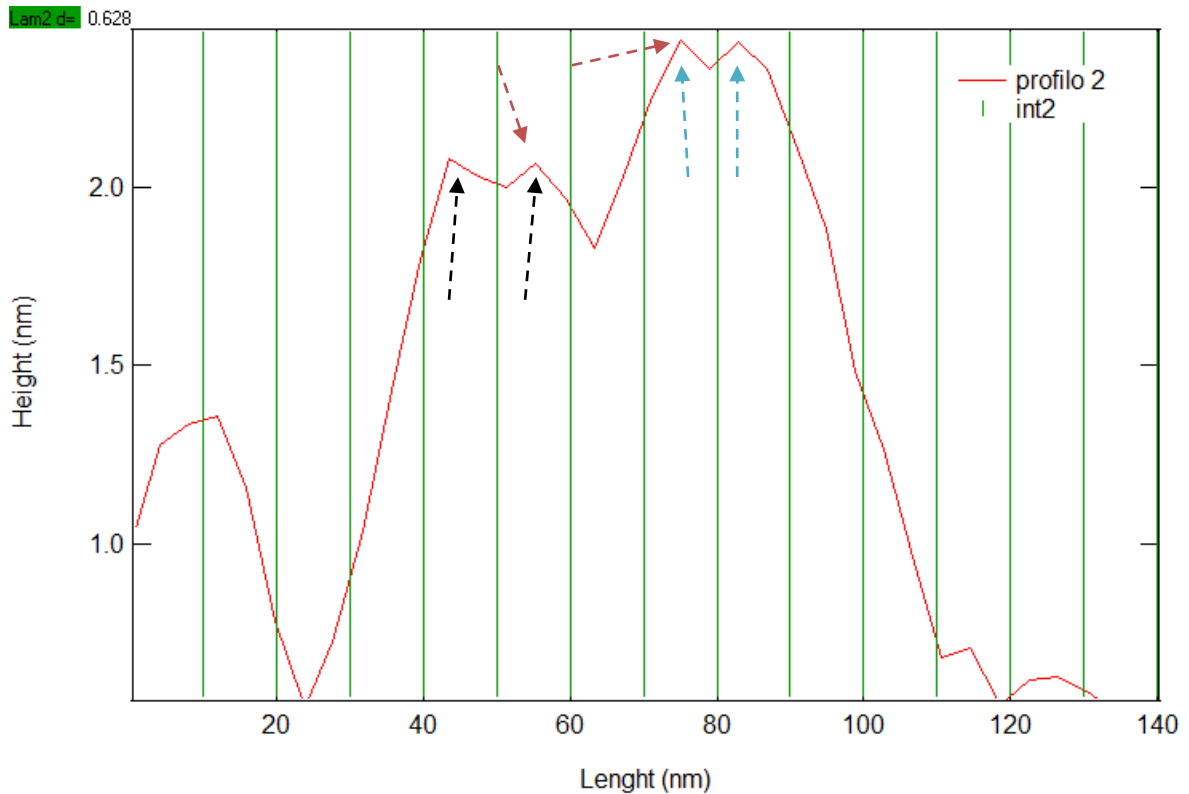
Da questo grafico si può notare che circa il 37% dei valori di larghezza ricade dentro l'intervallo compreso tra 64 e 70nm. Mentre il 31% dei valori di larghezza rientra nel range compreso tra 31 e 37nm, e soltanto un timido 15% dei valori rientra in intervalli meno visti in precedenza, come 52 e 55nm.



**Grafico 3.14:** sezione longitudinale profilo 1 agglomerato.

Il grafico 3.14 mostra una sezione longitudinale della struttura glomerulosa vista in precedenza. Il taglio della sezione misura circa 180nm, con altezze che vanno anche a doppiare la canonica altezza di un filamento di G-quadruplex. In particolare non si notano mai picchi inferiori ai 2nm, mentre sono ben visibili picchi, nella sezione centrale del profilo compresa tra 90 e 120nm, che superano i 4nm. Anche in questo ammasso strutturale si è voluto studiare la periodicità della distanza tra i picchi. Come sempre, sono stati evidenziati tutti quei picchi degni di rilievo. Le frecce nere indicano i picchi

consecutivi, distanti tra loro 7,7736nm, mentre le frecce rosse quelli distanti tra loro 19,434nm.



**Grafico 3.15:** sezione longitudinale profilo 2.

Un ultimo grafico stabilisce il profilo della struttura ai piedi di quella analizzata precedentemente. Il profilo in questione è lungo meno di 120nm con altezze, anche in questo caso, considerevoli e superiori a 2nm. In questo profilo non notiamo una periodicità fissa tra i picchi che si susseguono, tuttavia notiamo coppie di picchi che registrano valori simili a quelli visti in questo studio. Osservando le frecce nere, notiamo che i due picchi sono

distanti tra loro 11,855nm, i picchi segnati dalle frecce rosse 19,758nm ed infine i picchi contraddistinti dalle frecce blu distano tra di loro 7,903nm. Tali valori non si ripetono periodicamente all'interno del profilo considerato. Tuttavia questi valori sembrano essere particolarmente convergenti ai valori periodici tra i picchi osservati nei filamenti. In conclusione possiamo osservare che i valori di altezza e larghezza, ricavati dalle sezioni trasversali dei filamenti, sono spesso molto simili, ed in certi casi uguali, ai valori ricavati dai precedenti studi. Tuttavia non mancano valori in altezza e larghezza divergenti. Infatti si registrano valori di altezza dei picchi che doppiano i valori di 2nm, valori che possono essere spiegati tramite una sovrapposizione dei filamenti di G-quadruplex. Lo stesso vale anche per quelle strutture dove si registrano valori di larghezza multipli. Infatti per questo modello, si può pensare all'unione di più filamenti, uno di fianco all'altro, tenuti insieme anche grazie alle forze di interazione idrofobiche dovute all'inserimento della Guanosina. Per le altezze inferiori ai 2nm, si può pensare di essere davanti ad un nuovo "modello", in cui i "piatti" di tetradi sono inclinati ed impacchettati tra di loro. Infine per quanto concerne la valutazione della periodicità si può ritenere evidente l'esistenza di certi valori di spaziatura tra i picchi. In particolare risultano frequenti tra i filamenti valori di distanza tra i picchi che oscillano tra 7,6-7,8nm. Valore che risulta



ricorrente non solo tra quei picchi che trovano posto a bassa quota, ma anche ad alta quota, presenti all'interno di un dato filamento. Oltre a questo intervallo di valori, è importante segnalare anche i valori periodici compresi tra 11,5-11,8nm, nonché di 15,543nm e di 23,397nm. Intervalli che possono essere ritenuti implicati nella "spaziatura" tra picchi posti a diverse quote.

## *Capitolo 4: Conclusioni*

Questo elaborato di tesi ha come obiettivo, non solo di indagare sulle conformazioni strutturali che possono assumere i filamenti di un idrogel GUA/GMP, ma anche quello di indagare sulla periodicità e quindi predire la flessibilità che tali strutture possono dimostrare. Gli idrogel composti dalla sola 5'-Guanosina-monofosfato(GMP), si presentano come filamenti fibrosi composti da delle tetradi di GMP, che sono legate tra di loro mediante legame idrogeno, e che a loro volta si impacchettano tra di loro mediante interazioni idrofobiche di  $\pi$ -stacking tra le tetradi. Tali filamenti possiedono un diametro tipico di 26Å, ovvero di circa 2,6nm. L'aggiunta della Guanosina, materiale insolubile in acqua, alla GMP comporta la formazione di idrogel misti (filamenti più flessibili rispetto alle strutture composte dalla sola GMP). Quindi la Guanosina va a formare legami non covalenti con la GMP formando così delle tetradi miste. Nella pratica sperimentale si possono eseguire protocolli diversi al fine di ottenere degli idrogel composti da una precisa proporzione tra la Guanosina e la GMP. In questa tesi si è applicato un protocollo di esecuzione, volto alla realizzazione di un idrogel avente una proporzione tra GUA/GMP di 1:2. Come prima cosa si è provveduto

all'allestimento dei campioni, attraverso una titolazione acido base è possibile attuare la conversione della GMP dalla forma acida a quella a quella salina. La titolazione introduce un catione metallico, nelle tetradi, che permetterà la stabilizzazione dell'interazione con gli ossigeni presenti lungo la fibra del filamento. In seguito ,per la formazione del gel, si devono preparare due soluzioni madre di Guanosina(150mg/ml) e di 5'-GMP- $M^+$ (200mg/ml). L'ordine di aggiunta delle due specie chimiche comporta una precisa sequenza. Infatti viene depositata per prima, in un eppendorf, la 5'-GMP- $M^+$  poi la Guanosina e solo alla fine l'acqua milliQ. Infine la provetta, con tutti i costituenti che andrà a formare il gel, verrà lasciata all'interno di un bagnetto ad una temperatura di 70-80°C. Una volta che il gel si sarà formato, una piccola aliquota la si può prelevare per disporla su di una superficie(mica) al fine di poterla visualizzare al microscopio a forza atomica(AFM). Il microscopio a forza atomica funziona tramite una leva che all'estremità dispone di una punta di silicio cha va ad interagire con il campione. Dietro alla leva è proiettato un fascio laser costante, che culmina su di un detector. L'interazione che avviene tra un campione, posto sulla superficie della mica e la punta di silicio, comporta un alterazione del segnale laser, che il rilevatore andrà a segnalare e ad rielaborare. Tramite questa tecnica di imaging, insieme all'ausilio dei strumenti informatici, è possibile, non solo visualizzare la

struttura che assumono i filamenti di GUA/GMP, ma è anche possibile valutare la periodicità di queste strutture. L'analisi dei dati, pervenuti in questa tesi, ci suggerisce una certa periodicità tra i picchi rilevati dall'AFM, nonché un certo dimorfismo strutturale tra i filamenti singoli. Prendendo in considerazione il profilo sagittale dei filamenti visualizzati in questo studio, notiamo che nella maggioranza dei casi i picchi, che si susseguono uno dopo l'altro, possiedono distanze sempre costanti all'interno di un settore di un certo filamento. Infatti, in questo studio, non è affatto raro notare la presenza di picchi, disposti anche a diverse altezze, che assumono valori uguali. In particolare possiamo notare che i picchi si susseguono periodicamente con una distanza dall'altro che rientra nell'intervallo tra 7,5-7,8nm. E' inoltre importante segnalare anche una certa somiglianza nella periodicità anche in picchi appartenenti a filamenti diversi. Infatti picchi presenti in filamenti, che dimostrano altezze inferiori al classico 2-2,6nm del G-quadruplex, dimostrano avere una periodicità di circa 7,7nm. Valore sovrapponibile alla periodicità registrata in filamenti con picchi che sfiorano anche i 4nm. In definitiva la periodicità tra i vari filamenti presi in esame sembra essere fortemente correlabile tra di loro. Infine i valori di altezza e larghezza presi sui vari filamenti, ci suggeriscono, come indicato in letteratura, che sono presenti filamenti G-quadruplex aventi altezza compresa nell'intervallo 2-2,6nm.

Tuttavia non mancano strutture che possiedono altezze ben superiori, spiegabili come una sovrapposizione di filamenti G-quadruplex (strutture nodulari). Inoltre l'altezza inferiore a 2nm, ma con periodicità dei picchi vicina a quelle dei G-quadruplex mostrata in certi filamenti, può essere spiegata immaginando i quartets inclinati, rispetto al classico G-Q, oppure si può trattare di una forzatura dovuta dall'interazione con la punta del cantilever. Infine i valori delle larghezze multipli dei singoli filamenti, descritte nelle strutture nodulari e doppiini, si possono spiegare grazie all'accostamento di due o più filamenti, tenuti insieme grazie anche alle forze di interazione non covalente dovute alla presenza della Guanosina.

## ***Bibliografia***

1. Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acid. *Nature* **1953**, 171, 737-738.
2. *Biologia Molecolare del Cancro Meccanismi Bersagli Terapie*, **2008**, cap. 3, par.3.3 pag 55-56, Lauren Pecorino.
3. Functional architectures derived from guanine quartets. J. Dash and P. Saha. **2016** *Organic and Biomolecular Chemistry*
4. G. Binnig, Atomic Force Microscope, in. *Physical Review Letters*, Vol. 56, n.9, 1° gennaio **1986**, pp. 930-933, DOI:10.1103/*PhysRevLett*.56.930.
5. Kitazawa, M.; Ito, S.; Yagi, A.; Sakai, N.; Uekusa, Y.; Ohta, R.; Inaba, K.; Hayashi, A.; Hayashi, Y.; Tanemura, M. High Resolution Imaging of Plasmid DNA in Liquids in Dynamic Mode Atomic Force Microscopy Using a Carbon Nanofiber Tip. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2011**, 50, 08LB14

6. Shinichiro Ido, Kenjiro Kimura, Noriaki Oyabu, Kei Kobayashi, Masaru Tsukada, Kazumi Matsushige, and Hirofumi Yamada, “Beyond the Helix Pitch: Direct Visualization of Native DNA in Aqueous Solution” Vol.7 no.2 1817-1822., **2013**
  
7. F. Carducci, J.S Yoneda, R. Itri and P. Mariani, *Soft Matter*, **2018**, 14, 2938-2948.
  
8. D. Necas & Klapetek **2012**. “Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis”. *Central European Journal of Physics*. 10(1) 181.
  
9. J Dasha and P Saha: Functional architectures derived from guanine quartets, **2016**, *Org. Biomol. Chem.* Vol. 14, 2157-2163.
  
10. G. Peter and J. Davis, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 3188-3206.
  - I. Beng, **1910**. *Biochem. Z.*, 26-293.

- 11.M. Gellert, M. N. Lipsett and D. R. Davis: Helix formation by Guanylic Acid. **1962**, *Proc. Nat. Sci.* Vol 48, 2013-2018.
- 12.Loic Stefan and David Monchaud, “Applications of Guanosine Quartets in Nanotechnology and Chemical Biology”, *Nature. Reviews Chemistry* 3, no.11 (November **2019**): 650-68.
- 13.Alessandro Marchetti and Valentina Domenici, “Un’introduzione critica-Parte II”, **2011**, 15.
- 14.G. Nava., F. Carducci., R. Itri, J. Sakamoto Yoneda, T. Bellini, P. Mariani “Quadruplex Knots as Network Nodes: Nano-Partitioning of Guanosine Derivates in Suprmolecular Hydrogels”, *The Royal Society of Chemistry*, J. Name., **2013**, 00,1-3.
- 15.S. Bonazzi, M. Capobianco, M. M. De Moralis, A. Garbesi, G. Gottarelli, P. Mariani, M. G. Pozzi Bossi, G. P. Spada and L. Tondelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, **113**; 5809-5816.



16. Victor L. Mironov., *Fondamenti di Microscopia a Scansione di sonda*  
*ACCADEMIA RUSSA DELLE SCIENZE ISTITUTO PER LA FISICA*  
*DELLE MICROSTRUTTURE*, traduzione dalla versione inglese **2004**;  
Introduzione pag.6
17. Peter J. Russel., *GENETICA, II-Edizione Italiana, 1996. Cap-10,*  
*pag298-304.*
18. Bang, I. Untersuchungen über die Guanylsäure. *Biochem. Z.* **1910**, 26,  
293–311.