

**POLITECNICO DI MILANO**

**FACOLTÀ DI INGEGNERIA**

**Dipartimento di Bioingegneria**

**Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica**



**SPETTROSCOPIA IR E RAMAN APPLICATA ALLO  
STUDIO DI INTERAZIONI INTERMOLECOLARI IN  
COMPLESSI DNA/POLIMERI CATIONICI**

Relatore: Prof. Ing. Matteo TOMMASINI  
Prof. Ing. Simone VESENTINI

Correlatore: Ing. Andrea LUCOTTI

Tesi di Laurea di:  
Lisa ZUZOLO  
Matr. n. 750278

**Anno Accademico 2010-2011**

## **Indice analitico**

Sommario	»p.3
Abstract	»p.6
Introduzione	»p.9
Capitolo 1 - Spettroscopia Raman	»p.14
Capitolo 2 - Spettroscopia IR	»p.29
Capitolo 3 - Trasfezione	»p.39
Capitolo 4 - Misure Raman	»p.46
Capitolo 5 - Misure IR	»p.61
Conclusioni	»p.111
Bibliografia	»p.113

## **Sommario**

Lo scopo di questa tesi è quello di studiare il possibile utilizzo della spettroscopia vibrazionale per caratterizzare le molecole coinvolte nella trasfezione cercando di avvicinarsi il più possibile alle condizioni con cui vengono somministrate alla cellula. Il fine è quello di individuare bande di riferimento per valutare la complessazione tra il vettore di trasfezione e il DNA.

Il lavoro sperimentale è stato strutturato in due parti, ciascuna contraddistinta dall'impiego di una differente tecnica vibrazionale, rispettivamente basata sull'effetto Raman e sull'assorbimento IR. Per quanto riguarda la spettroscopia Raman, gli spettri risultanti hanno presentato una forte componente legata al solvente della soluzione esaminata e il segnale della molecola di DNA è risultato troppo debole. Per questo motivo, è stato deciso di tralasciare questa tecnica per dedicarsi alla spettroscopia IR, con la quale siamo riusciti, invece, ad attribuire al DNA e ai polimeri le loro bande caratteristiche pur operando a bassi valori di concentrazione. Infine, abbiamo analizzato le soluzioni contenenti i complessi per la trasfezione con concentrazioni più basse possibile, che sono circa 30 volte quelli impiegati nelle applicazioni biologiche e  $10^3$  volte meno dei valori riportati in recenti lavori di letteratura per soluzioni di lipoplessi (Marty 2009).

I campioni, esaminati con tecniche spettroscopiche, sono stati preparati dal gruppo del prof. Candiani, nell'ambito di una collaborazione all'interno del progetto FIRB "*Surface Assisted Selective Transfection SAST*" (codice RBFR08XH0H). Oltre alle soluzioni di plasmide in TrisEDTA o HEPES, nel laboratorio di Candiani è stato sintetizzato il polimero chitosano-g-PEI, successivamente sciolto in HEPES o acqua deionizzata.

Il dietil fosfato (DEP), scelto come semplice modello della catena nucleotidica nell'intorno del gruppo fosfato, è stato acquistato nella forma liquida pura (8.4 M) presso la Sigma-Aldrich®. Anche dopo le diluizioni in acqua per concentrazioni di 20, 15, 5, 3 e 1 mM, la soluzione acquosa ha mantenuto valori di pH molto acidi. Perciò si è deciso di aggiungere alle soluzioni delle basi, NaOH e NH<sub>4</sub>OH, e di studiare le conseguenti variazioni degli spettri in funzione del pH e della configurazione della molecola.

La caratterizzazione dell'acido desossiribonucleico è stata fatta, invece, su *calf thymus* DNA (ctDNA) e *sperm salmon* DNA (ssDNA). Il ctDNA di tipo IV è stato acquistato presso la Sigma-Aldrich® nella forma di polvere liofilizzata e diluito con acqua deionizzata per raggiungere la concentrazione di 1.575 mg/ml. Quando il ctDNA è stato complessato con i polimeri cationici studiati in questa tesi, a causa del suo elevato peso molecolare ha formato degli aggregati che tendevano a precipitare, ed erano decisamente lontani dalle condizioni di lavoro previste per la trasfezione. Per questo si è scelto di optare per ssDNA, preferito per il peso molecolare più basso. Esso è prodotto dalla Invitrogen a 10 mg/ml e poi diluito da noi fino a 0.7 mg/ml. Quest'ultima concentrazione è stata individuata come il limite inferiore per il quale la spettroscopia IR è stata in grado di rilevare un segnale significativo.

La poli-L-lisina, acquistata dalla Sigma-Aldrich®, ha massa molecolare compresa tra 4 e 15 kDa, si trova in una forma liofilizzata e ha l'acido bromidrico come agente protonante. L'acqua deionizzata è stata utilizzata come solvente per portare il polimero alle concentrazioni desiderate per la preparazione dei complessi con il DNA.

Le soluzioni dei complessi tra DNA e polimero sono state preparate scegliendo di volta in volta di controllare parametri differenti. Per esempio, nelle soluzioni di chitosano-g-PEI/ctDNA è stato fissato il rapporto tra le concentrazioni finali delle due molecole, a partire dall'aggiunta di volumi diversi di polimero a 40 mg/ml e ctDNA a 1.575 mg/ml. Il PLL con concentrazione iniziale di 20 mg/ml è stato unito a ctDNA, una volta controllando la massa delle molecole presenti nella soluzione finale, l'altra i volumi prelevati, in modo che la concentrazione finale di DNA rimanesse stabile a 0.7875 mg/ml. Infine, negli esperimenti con rapporto di carica (CR) variabile, sono state combinate, nelle dovute proporzioni, soluzioni di ssDNA 2 mg/ml e di PLL con concentrazione di cariche positive pari a 20 mM. In tutti i casi, una volta preparata la soluzione, essa è stata mescolata con una pipetta Pasteur, incubata a temperatura ambiente per 30 minuti prima di effettuare le misure ed, eventualmente, agitata meccanicamente qualora si fosse verificata la formazione di aggregati solidi.

Gli spettri Raman sono stati raccolti con spettrometro dispersivo (LabRAM HR800) prodotto dalla Horiba Jobin Yvon, accoppiato a microscopio Olympus B41X per la modalità micro. Come sorgente sono state scelte le lunghezze d'onda di 785 e 514 nm (con

eccitatrice a 457.9 nm, il segnale registrato era insufficiente). Alcune misure sono state realizzate utilizzando la modalità di raccolta *mapping* su una superficie rettangolare piuttosto estesa di 78×30  $\mu\text{m}$ .

Per la spettroscopia IR, invece, è stato utilizzato un interferometro FT-IR (Nicolet Nexus) associato ad un microscopio ottico della Thermo Instruments. Il materiale scelto per le finestre utilizzate come supporto per i campioni è  $\text{CaF}_2$ , poiché non solubile in acqua. Per la sottrazione delle bande relative alla componente acquosa dovuta all'umidità dell'aria è stato realizzato uno spettro del vapore acqueo presente nell'ambiente, mantenendo aperto il compartimento per il porta-campioni dello strumento. Inoltre, i dati raccolti aventi segnale di fondo significativo sono stati elaborati con il *software* Fityk [<http://fityk.nieto.pl/>], con il quale la *baseline* può essere tracciata manualmente e sottratta al segnale.

Grazie all'indagine realizzata con spettroscopia IR, siamo riusciti ad individuare le bande di riferimento per il DNA, nonché la relazione esistente tra le variazioni in frequenza di tali picchi e la configurazione delle molecole. Ciò è stato confermato dagli studi riportati in letteratura, dove viene mostrata la relazione tra la posizione in frequenza degli assorbimenti caratteristici e le diverse forme del DNA (Banyay et al. 2003, Falk et al. 1963). Queste variazioni spettroscopiche sono state chiaramente ritenute degli indici utili anche per verificare le modifiche della struttura tridimensionale in seguito alla complessazione con cationi o polimeri. Con gli spettri realizzati a concentrazioni piuttosto elevate di polimero e DNA siamo riusciti a confermare questo comportamento. Si è rivelato più difficile osservare lo stesso fenomeno a concentrazioni più basse, per cui sono state necessarie elaborazioni dei dati basate anche sulla misura delle intensità dei picchi.

Negli esperimenti condotti non è risultata ancora del tutto chiara la relazione tra il CR e la variazione delle intensità dei picchi ritenuti *markers* per il gene trasfettato. Inoltre ad oggi non esiste uno studio in letteratura con il quale poter fare il confronto in condizioni di lavoro simili (prossime a quelle per le quali opera la trasfezione). L'idea per uno sviluppo futuro, proprio a partire dalla sperimentazione condotta per questa tesi, potrebbe essere quella di utilizzare strumenti di spettroscopia IR più sensibili ai segnali prodotti da molecole a concentrazioni molto basse e di ampliare ulteriormente la statistica di raccolta degli spettri, anche per un *range* più stretto di CR, in modo da poter fare una valutazione statisticamente più robusta dei risultati ottenuti.

## **Abstract**

The aim of this thesis is to assess the use of vibrational spectroscopy for the characterization of the molecules involved in transfection. Care has been paid to attempt to work conditions (i.e. concentrations) close to those employed to transfect cells. The goal is to find the reference bands that can be used to monitor the complexation between the non-viral polymeric vector and DNA.

The experimental work is divided in two parts, one for each vibrational technique used, respectively based on Raman scattering and IR absorption. As for Raman spectroscopy, the final spectra of examined solutions showed a too weak signal of DNA. So, we have decided to skip this method opting for IR spectroscopy that was able to assign to DNA and polymers their characteristic bands, although the low concentration used.

We have analyzed the solutions of transfection complexes to the lowest possible concentration for which we can detect meaningful IR signals, which is about 30 times the value employed for biological application and  $10^3$  times less than the concentration value reported in recent literature investigating interactions in lipoplexes in solution (Marty 2009).

The samples that were examined with spectroscopy techniques were prepared by the group of Prof. Candiani, within a collaboration in the FIRB project named "*Surface Assisted Selective Transfection SAST*" (code RBF08XH0H). In addition to the solutions of plasmid in TrisEDTA or HEPES, the chitosan-g-PEI polymer was obtained from Candiani's laboratory and subsequently diluted in deionized water.

Diethyl phosphate (DEP), was selected as a simple model of the phosphate group of the nucleotide chain. It was acquired in its pure liquid form (8.4 M) from Sigma-Aldrich®. After the addition of water to reach the concentration of 20, 15, 5, 3 and 1 mM, the aqueous solutions of DEP have always acidic pH. So, we decided to add base (NaOH and NH<sub>4</sub>OH) and to detect the consequent variations in the spectra related to the pH and to the configuration of molecule.

The characterization of deoxyribonucleic acid was made on calf thymus DNA (ctDNA) and sperm salmon DNA (ssDNA). The ctDNA (type IV) was bought from Sigma-Aldrich® as lyophilized powder and diluted with deionized water to reach the concentration of 1.575 mg/ml. When ctDNA was complexed with the cationic polymers studied in this thesis, it formed aggregates due to its high molecular weight and it precipitated, thus reaching work conditions too far for transfection use. Therefore, we have considered ssDNA, to be preferred for its lower molecular weight. SsDNA was produced by Invitrogen at a concentration of 10 mg/ml and we have diluted it up to 0.7 mg/ml. The latter concentration represents the lower limit that still allows detection of a significant IR signal.

Poly-L-lysine (PLL) was bought from Sigma-Aldrich®. PLL had a molecular weight between 4 and 15 kDa, was lyophilized and HBr was its protonating agent. The solvent was deionized water and the polymer was prepared at the desired concentrations for the complexation with DNA.

The solutions of DNA/polymers complexes were prepared by controlling several parameters. For instances, in the solutions of chitosan-g-PEI/ctDNA we have fixed the ratio between the final concentration of the molecules, with the addition of different volumes of polymer (40 mg/ml) and ctDNA (1.575 mg/ml). PLL at initial concentration of 20 mg/ml was added to ctDNA (1.575 mg/ml), in such a way to control the PLL/DNA mass ratio or PLL/DNA volume ratio of the solutions to be mixed. In latter case the concentration of DNA in the PLL/DNA solution was kept equal to 0.7875 mg/ml for every PLL/DNA volume ratio. We have finally carried out a series of experiments where the charge ratio (CR) was controlled, by mixing in different proportion water solutions of ssDNA (2 mg/ml) and PLL (at 20 mM cation concentration). Anyway, when the solutions were prepared, they were stirred with a Pasteur pipette, incubated at room temperature for 30 minutes before the measurements and, eventually, they were agitated mechanically if they precipitated.

The Raman spectra were collected with dispersive spectrometer (LabRAM HR800), product by Horiba Jobin Yvon, coupled with the microscope Olympus B41X. We selected excitation lines at 785 and 514 nm (with excitation line at 457.9 nm the collected signal was insufficient). Some measurements were realized in mapping mode for a rectangular surface that had dimensions of 78×30 μm.

Instead, for IR spectroscopy we have used the Nicolet Nexus FT-IR interferometer associated with a Thermo Instruments optical microscope. The material of choice for the cell windows, that contain the liquid samples, was fluorite ( $\text{CaF}_2$ ) because it is not soluble in water. For the subtraction of bands relative to slightly uncompensated air humidity, we have used a spectrum of water vapor from the environment while the door of the main compartment of the instrument was open. Finally, the IR data collected were elaborated with Fityk software for a manual removal of the baseline.

Thanks to the research made with IR spectroscopy, we have identified the reference bands of DNA and observed the peak frequency variations due to structure changes in DNA configurations. The observed behavior was confirmed by literature study, showing the link between the frequency of characteristic absorption peaks and the different conformations of DNA (Banyay et al. 2003, Falk et al. 1963). These spectroscopic variations provide an useful probe of DNA structure modification upon complexation with cations or polymers. We confirmed this behavior with the spectra of polymer and DNA at high concentrations. It has been more difficult to observe this phenomenon at lower concentrations due to the increase of statistical fluctuations of the IR signal caused by slight changes in experimental conditions.

In our experiments we have not been able to evidence a clear relation between the CR and the variations of relative IR intensities of DNA marker bands. As of today we have not found any similar study in literature to establish a close comparison with the work of this thesis. Principally this is because the conditions usually considered in literature studies are very different and far to transfection conditions (i.e. much higher DNA concentrations). The idea for the follow-up investigation is to consider the experimental data collected during this thesis work and the setting of experimental conditions to study the samples with more sensitive FT-IR instruments (recently available in the laboratory) and increased statistics.



## **Introduzione**

La spettroscopia vibrazionale è una tecnica analitica basata sulla raccolta degli spettri di assorbimento o di diffusione Raman della luce, dai quali è possibile ricavare informazioni circa la composizione sia quantitativa che qualitativa dei campioni, dando così una descrizione, in senso più ampio, delle proprietà chimico-fisico dei materiali. Questa tecnica ha il vantaggio di non richiedere reagenti nella sua applicazione e di richiedere una piccola quantità di materiale sul quale si possono compiere misure ripetute. Per questi motivi, sia sotto forma di spettroscopia IR che Raman, costituisce un valido complemento dei metodi tradizionali di analisi di campioni biologici, come la risonanza magnetica o la cristallografia a raggi X. [Shaw (2002)]

Il risultato della spettroscopia vibrazionale, come anticipato, è uno spettro. Questo non è altro che un grafico avente sull'asse delle ascisse la frequenza di vibrazione dei legami interni alle molecole, su quello delle ordinate la loro intensità di assorbimento della sorgente luminosa o l'intensità con cui il campione diffonde la luce incidente. Quindi, per ogni radiazione incidente sulla molecola, questa vibra con probabilità proporzionale alla variazione di dipolo elettrico o polarizzabilità, a seconda che si tratti rispettivamente di spettroscopia IR o Raman. Per quanto riguarda, invece, la frequenza di vibrazione, questa dipende dalle masse e dalla forza del legame che tiene unite le molecole. Ne segue così, una descrizione della molecola in base ai legami "eccitati". In figura 1 sono riportati ad esempio gli spettri di assorbimento IR (a) e Raman (b) del benzene; lo spettro nella parte alta ha andamento contrario poiché misurato in trasmittanza ( $T = 1 - A$ ) invece che in assorbanza ( $A$ ).

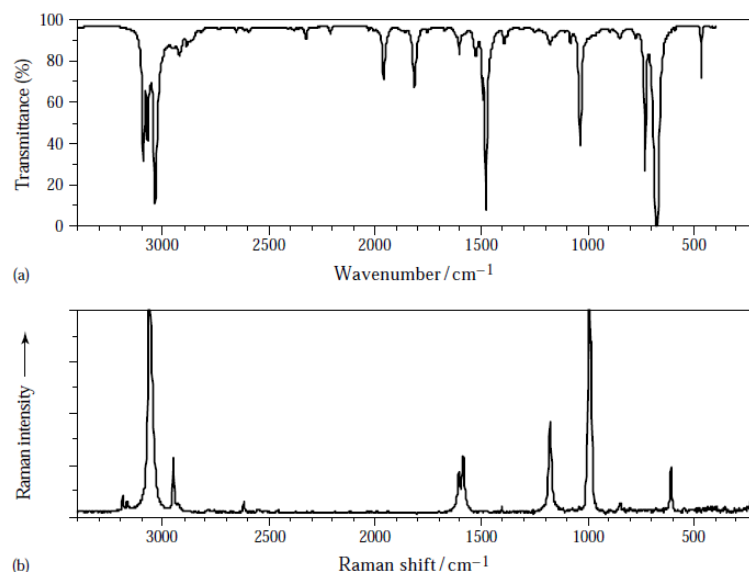


Figura 1. (a) Spettro di assorbimento IR misurato in trasmittanza e (b) spettro Raman del benzene. [Keresztury (2002)]

L'impiego di queste tecniche in ambito biologico e biomedico è ancora abbastanza circoscritto ad ambiti di ricerca, per diversi motivi. La spettroscopia IR può essere utilizzata per campioni sia solidi che liquidi; il problema consiste nel fatto che l'acqua, eventualmente presente nei materiali in esame, ha un intenso picco di assorbimento, che domina lo spettro e potrebbe nascondere una parte del segnale proveniente dal materiale biologico. Per quanto riguarda la spettroscopia che sfrutta l'effetto Raman di *scattering* di luce laser, questa è poco sensibile alla presenza d'acqua, ma richiede concentrazioni piuttosto alte di materiale, soprattutto dal punto di vista biologico, campo in cui si lavora al massimo sulla scala dei  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , ed è sensibile al riscaldamento del preparato causato dal laser e a fenomeni di fluorescenza che possono alterare il risultato dell'analisi [Jackson (2002)].

Nel campo biologico, la spettroscopia vibrazionale nasce con lo studio di componenti molecolari, come proteine, acidi nucleici, carboidrati, lipidi. A partire dagli anni '90, invece, la ricerca si sposta sulla necessità di monitorare i parametri fisiologici dei fluidi del corpo umano, come urina, siero, sangue e fluido amniotico, ma soprattutto di diagnosticare in maniera non invasiva e preventiva la nascita di forme tumorali con l'analisi di estratti cellulari o tissutali [Jackson (2002), Griffiths (2002)].

I primi studi in questo settore si svolgono grazie a due ricercatori, Elliott ed Ambrose, che investigano la configurazione spaziale delle proteine con uno spettrometro IR. Gli spettri IR dei peptidi mostrano una serie di picchi caratteristici, che, in relazione alla loro intensità e alla frequenza di vibrazione, danno informazioni specifiche circa la struttura secondaria di queste molecole. Le bande di riferimento sono l'amide I-III (indicate coi numeri romani nello spettro dell'albumina in figura 2), che sono sensibili alle variazioni della geometria molecolare poiché connesse a vibrazioni dei legami peptidici o dei gruppi ad essi legati (CO e NH) [Dukor (2002), Elliott (1950), Fabian (2002)].

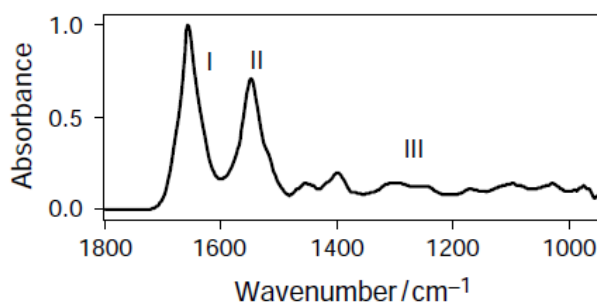


Figura 2. Spettro IR di albumina in soluzione, in cui sono indicati i picchi caratteristici dell'amide. Queste tre bande sono, nell'ordine: l'amide I (1600 - 1700  $\text{cm}^{-1}$ ) sensibile a piccole variazioni della geometria molecolare per formazione di legami idrogeno; l'amide II (1480 - 1575  $\text{cm}^{-1}$ ) soggetta ad effetti di interazione da parte delle catene laterali di aminoacidi; l'amide III (1230 - 1300  $\text{cm}^{-1}$ ) poco intensa all'IR e in parte sovrapposta alle bande di assorbimento delle catene peptidiche laterali. [Dukor (2002)]

In seguito, fiorisce l'analisi conformazionale degli acidi nucleici, ovvero i monomeri costituenti il DNA e l'RNA, formati da uno zucchero (rispettivamente deossiribosio e ribosio), una base azotata (adenina, citosina, guanina, timina o uracile) e un gruppo fosfato. Nel caso dell'acido desossiribonucleico, portatore dell'informazione genetica, gli spettri raccolti evidenziano la struttura tridimensionale della doppia elica, influenzata dall'ambiente circostante e dalla composizione delle basi. Fondamentali per l'interpretazione dei risultati spettrali, sono in particolare le bande relative allo stretching simmetrico e antisimmetrico del gruppo fosfato, situate rispettivamente intorno ai 1080 e ai 1230  $\text{cm}^{-1}$  [Blout (1949), Dukor (2002), Taillander (2002)]. Nella figura 3 è riportato lo spettro di DNA in acqua.

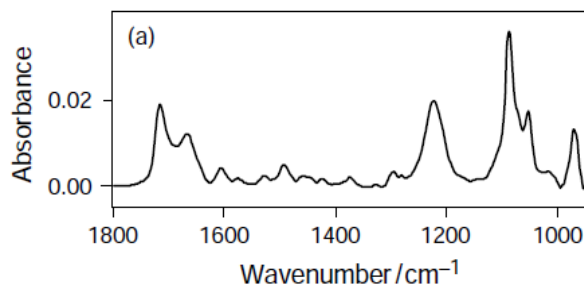


Figura 3. Spettro di DNA in acqua. Molto importante è la zona tra 1250-1000 cm<sup>-1</sup> per studi circa le variazioni conformazionali della doppia elica in condizioni differenti di idratazione e con reagenti di varia natura. Ciò è reso possibile dal comportamento dei picchi relativi al fosfato, utilizzati come marker grazie alla sensibilità del picco antisimmetrico alla configurazione dell'elica. [Dukor (2002)]

In altri ambiti applicativi, si tenta di sfruttare i vantaggi della spettroscopia in applicazioni di laboratorio, quali l'autonomia e ripetibilità delle misure su piccole quantità di campione, anche in continua e senza la necessità di reagenti. Ne segue che la spettroscopia vibrazionale è utilizzata per la quantificazione di analiti nei fluidi biologici: nel sangue si stima il rapporto tra la percentuale di plasma rispetto a quella di siero oppure la frazione di glucosio e urea. Nell'urina si determina la quantità di creatinina, oltre che di urea. Si misurano, invece, i lipidi surfattanti prodotti dai polmoni fetali nel liquido amniotico. Tuttavia, la presenza di acqua e la bassa concentrazione di questi campioni limita l'applicazione dei metodi rispettivamente basati sull'IR e sull'effetto Raman, impedendone l'uso comune nei laboratori, se non per scopi di ricerca [Griffiths (2002)].

Un'ulteriore tentativo procede, allora, nella direzione dei campioni solidi, solitamente estratti tessutali o cellule, per la detenzione del cancro. I primi risultati risalgono al gruppo di Wong che realizza spettri IR su cellule cancerogene, mentre Alfano e colleghi raccolgono spettri Raman su tessuto mammario affetto da tumore. Nel primo caso si registrano variazioni a livello molecolare, che si osservano nelle bande degli spettri relativi alla sostanza nucleare e alla membrana della cellula: nelle cellule cancerogene, rispetto a quelle sane, i legami idrogeno del gruppo fosfodiesterico degli acidi nucleici sono maggiori e producono un impaccamento che si riflette nello spettro sotto forma di un aumento di intensità del picco dello stretching antisimmetrico; nella membrana lipidica si osserva una variazione del grado di disordine delle catene alchiliche, evidenziata dalla diminuzione del rapporto metile/metilene. Nel secondo caso, invece, il tessuto mammario

sano e malato si distingue per la presenza di due bande estranee, dovute all'aumento di tessuto connettivo causato dalla presenza di un tumore [Alfano (1991), Dukor (2002), Jackson (2002), Wong (1993)].

Infine, un panorama relativamente nuovo in cui la spettroscopia vibrazionale ambisce a inserirsi come tecnica di analisi è quello della trasfezione. La trasfezione (o *gene delivery*) si riferisce al trasferimento di materiale genetico (DNA o RNA) nelle cellule somatiche attraverso un vettore virale o non, per correggere difetti genetici, per far aumentare o inibire la produzione di proteine [Parra-Guillen (2010)]. Lo scopo del mio lavoro di tesi è proprio quello di esaminare con i metodi della spettroscopia vibrazionale (in particolare IR) il segnale del DNA solo o complessato con vettori polimerici e verificare come lo spettro cambi nelle due forme.

## Capitolo 1

### Spettroscopia Raman

L'effetto Raman è un fenomeno fisico di diffusione della luce scoperto nel 1928 da Chandrasekhara Venkata Raman, su cui si basa la relativa tecnica spettroscopica. Nell'esperimento originario di Raman la luce solare, opportunamente focalizzata su un campione con una serie di telescopi e filtri per renderla monocromatica, viene diffusa con la stessa frequenza della luce incidente, tranne per una piccola frazione che subisce uno *shift* di frequenza. La differenza esistente tra la frequenza del raggio incidente e di quello diffuso è legata alla composizione chimica del campione e interessa lo stesso range spettrale della spettroscopia IR, qualunque sia la sorgente di luce utilizzata (UV, visibile o NIR). [Jackson (2002)]

1.1. Descrizione classica e quantistica dell'effetto Raman [Castiglioni (1992), Griffiths (2002), Keresztury (2002), Siebert (2008), Steele (2002)]

Si consideri il caso più semplice di una molecola biatomica eteronucleare: questa è schematizzabile con due masse  $m_1$  e  $m_2$  legate da una molla con costante elastica  $K$  (figura 1.1).

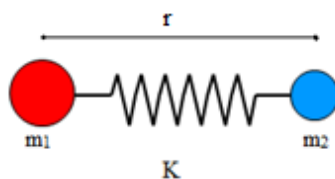


Figura 1.1. Modello di una generica molecola biatomica, con masse  $m_1$  e  $m_2$ , che rappresentano i due atomi, tenute insieme da una molla con costante elastica  $K$ , ad indicare la rigidità del legame.

Questo sistema oscilla esercitando una forza proporzionale allo spostamento delle due masse dalla posizione d'equilibrio secondo la legge di Hooke:

$$F = -Kr = -\frac{\partial V}{\partial r} r = \mu \frac{\partial^2 r}{\partial t^2} \quad (1.1),$$

per cui  $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$  è la massa ridotta e  $K = \frac{\partial V}{\partial r}$ .

La situazione d'equilibrio della molecola si verifica per  $r = R_0$ , quando la distribuzione di carica media degli elettroni tra i nuclei è tale da fornire la forza attrattiva necessaria per vincere la loro repulsione. Descrivendo il potenziale in maniera approssimata tramite serie di Taylor attorno a  $R_0$  fino al secondo ordine, si ottiene:

$$V(r) = V(R_0) + \left. \frac{dV}{dR} \right|_{r=R_0} (r - R_0) + \frac{1}{2} \left. \frac{d^2V}{dR^2} \right|_{r=R_0} (r - R_0)^2 \quad (1.2),$$

con  $\left. \frac{dV}{dR} \right|_{r=R_0} = 0$  in condizioni d'equilibrio. Pertanto risulta:

$$V(r) - V(R_0) = \frac{1}{2} \left. \frac{d^2V}{dR^2} \right|_{r=R_0} (r - R_0)^2 \quad (1.3).$$

Ponendo  $R = r - R_0$  e  $K = \frac{\partial V}{\partial r}$ , si ricava il potenziale di tipo armonico:

$$V(R) = \frac{1}{2} KR^2 \quad (1.4),$$

descritto da una parabola centrata nella posizione d'equilibrio  $R_0$  (figura 1.2).

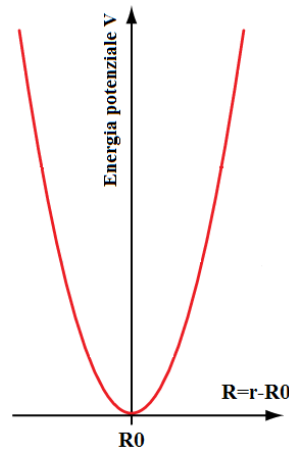


Figura 1.2. Potenziale armonico in funzione dello spostamento dalla posizione d'equilibrio.

Partendo dall'equazione (1.1), si esegue la derivata della (1.4), per cui:

$$\mu \frac{\partial^2 r}{\partial t^2} = -\frac{dV}{dR} = -kR \quad (1.5),$$

avente soluzione:

$$R = A \cos(2\pi \bar{\nu} t) \quad (1.6),$$

dove  $A$  è l'ampiezza d'oscillazione, cioè il massimo scostamento raggiunto rispetto  $R_0$ , e  $\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}}$  rappresenta la frequenza d'oscillazione. Si ottiene così la correlazione con la costante della molla, che rappresenta il legame sottoposto a vibrazione, e le masse degli atomi: la frequenza, che corrisponde alla posizione delle bande che si osservano negli spettri, aumenta con la rigidità del legame, ma diminuisce al crescere della massa ridotta del sistema in considerazione.

La funzione del potenziale è però solo approssimata armonica da una legge in prossimità della posizione d'equilibrio. L'andamento reale è di tipo anarmonico, ben descritto dalla legge di Morse:

$$V(R) = D_0(1 - e^{-aR})^2 \quad (1.7).$$

Il grafico è riportato in figura 1.3, in cui appare evidente come l'approssimazione armonica sia valida solo per piccoli scostamenti dalla posizione d'equilibrio.

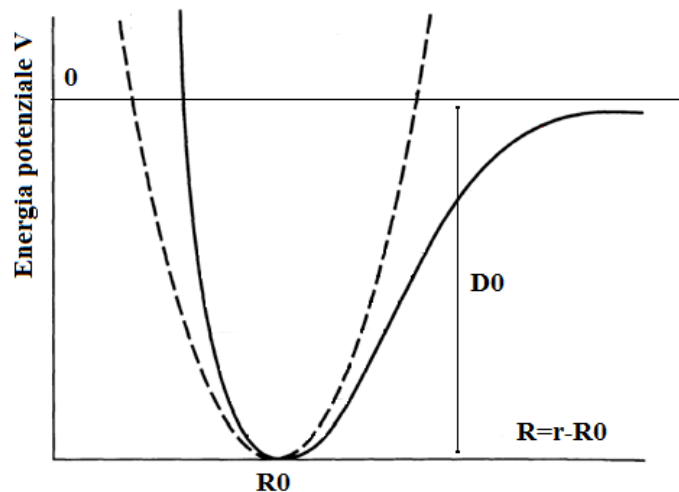


Figura 1.3. Potenziale intramolecolare anarmonico di tipo Morse (linea continua) a confronto con il potenziale armonico (linea tratteggiata).  $D_0$  è l'energia di dissociazione, definita come l'energia necessaria per rompere il legame in esame.



Questa descrizione classica del potenziale di una molecola è valida sia nel caso di spettroscopia Raman che IR, per cui sarà ripresa nel capitolo successivo. La differenza tra le due tecniche spettroscopiche risiede nella sensibilità a due parametri diversi: la spettroscopia Raman è sensibile alla variazione della polarizzabilità della molecola durante i moti vibrazionali, mentre l'IR alla variazione del momento di dipolo.

Esaminiamo più nel dettaglio il meccanismo che genera un segnale Raman. Si consideri un campo elettromagnetico interagente con la molecola biatomica eteronucleare in oggetto (vedi figura 1.1) con frequenza  $\bar{\nu}$  e un proprio valore di campo elettrico  $E$ , pari a

$$E = E_0 \cos(2\pi\bar{\nu}t) \quad (1.8).$$

Esso, interagendo con la molecola, induce una variazione del momento di dipolo del tipo:

$$\Delta\mu = \alpha E \quad (1.9),$$

dove  $\alpha$  è il tensore di polarizzabilità che esprime la tendenza della molecola ad essere polarizzata sotto l'effetto di un campo elettrico esterno. Per sostituzione della (1.8) nella (1.9) si ottiene:

$$\Delta\mu = \alpha E_0 \cos(2\pi\bar{\nu}t) \quad (1.10).$$

Per la frequenza di vibrazione molecolare  $\bar{\nu}_m$ , l'andamento della corrispondente coordinata vibrazionale  $Q$  è dato da una legge sinusoidale:

$$Q = Q_0 \cos(2\pi\bar{\nu}_m t) \quad (1.11),$$

che si introduce nella serie di Taylor della polarizzabilità rispetto alla coordinata normale:

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial\alpha}{\partial Q} Q + \dots = \alpha_0 + \frac{\partial\alpha}{\partial Q} Q_0 \cos(2\pi\bar{\nu}_m t) + \dots \quad (1.12).$$

Inserendo la (1.12) nella (1.9), si ottiene:

$$\Delta\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\bar{\nu}t) + \frac{\partial\alpha}{\partial Q} Q_0 E_0 \cos(2\pi\bar{\nu}_m t) \cos(2\pi\bar{\nu}t) \quad (1.13).$$

Attraverso una trasformazione trigonometrica (la formula di Werner  $2 \cos \alpha \cos \beta = \cos(\alpha + \beta) + \cos(\alpha - \beta)$ ) si ricava l'espressione finale del momento di dipolo:

$$\Delta\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\bar{\nu}t) + \frac{1}{2} \frac{\partial\alpha}{\partial Q} Q_0 E_0 \{ \cos[2\pi(\bar{\nu} - \bar{\nu}_m)t] + \cos[2\pi(\bar{\nu} + \bar{\nu}_m)t] \} \quad (1.14).$$

La (1.14) esprime la variazione di dipolo molecolare attraverso tre frequenze distinte, che sono le stesse relative ai tre contributi presenti nella radiazione diffusa dalla molecola avente vibrazione molecolare di frequenza  $\bar{\nu}_m$  dopo l'interazione con il raggio incidente di frequenza  $\bar{\nu}$ . I tre termini sono relativi: allo *scattering* Rayleigh, di tipo elastico, perciò con frequenza pari a quella incidente ( $\bar{\nu}$ ), allo *scattering* Raman Stokes e Raman anti-Stokes, di tipo anelastico e con frequenze rispettivamente  $(\bar{\nu} - \bar{\nu}_m)$  e  $(\bar{\nu} + \bar{\nu}_m)$ . In figura 1.4 è riportato lo spettro di una sostanza policristallina, dove si possono osservare le linee Rayleigh, Raman Stokes e anti-Stokes ai lati, perfettamente simmetriche anche se con diversa intensità.

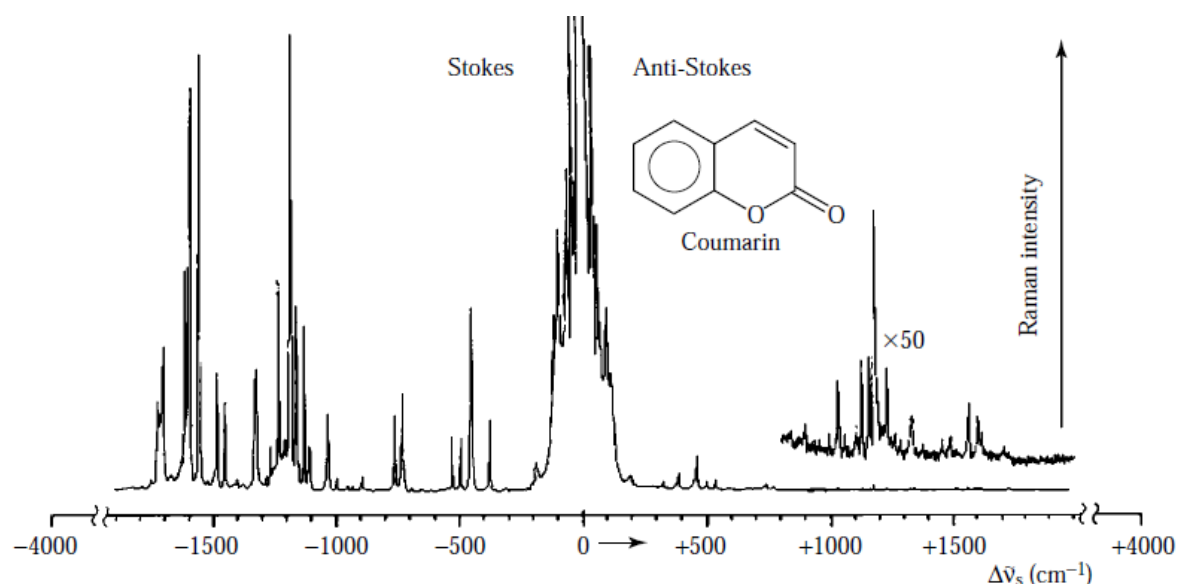


Figura 1.4. Spettro Raman di *coumarin*, una sostanza policristallina, con relative bande Rayleigh, Stokes ad anti-Stokes. Sull'asse delle ascisse è riportata la variazione della frequenza rispetto a quella del raggio incidente, per cui lo 0 corrisponde a *scattering* elastico Rayleigh. Valori negativi e positivi, invece, anelastico, rispettivamente di tipo Stokes e anti-Stokes. [Keresztury (2002)]

Consideriamo ora una descrizione del processo Raman da un punto di vista quantomeccanico. La meccanica quantistica considera il concetto di quanti discreti di energia, per cui i livelli dell'oscillatore armonico risultano quantizzati secondo:

$$\Delta E = (v + \frac{1}{2})h\bar{\nu} \quad (1.15),$$

$v$  è il numero quantico vibrazionale associato a ciascun livello energetico. Dal principio di indeterminazione di Heisenberg, gli atomi non sono mai fermi, cioè non si trovano mai nella posizione d'equilibrio; per questo motivo il minimo energetico per  $v = 0$  corrisponde a mezzo quanto e il sistema molecola non può assumere uno stato con energia cinetica dei nuclei nulla ed energia potenziale minima.

In figura 1.5 è rappresentato il confronto tra il potenziale ideale armonico e quello reale di Morse secondo la descrizione quantistica. In entrambi i casi, col crescere dell'energia potenziale si passa a livelli energetici vibrazionali successivi, equidistanti nella trattazione armonica. Mentre la regola di selezione di un oscillatore armonico impone che il "salto" avvenga solo tra livelli prossimi ( $\Delta v = \pm 1$ ), per potenziali anarmonici si osserva il rilassamento di questa regola e sono ammesse transizioni anche tra livelli non adiacenti ( $\Delta v > \pm 1$ ).

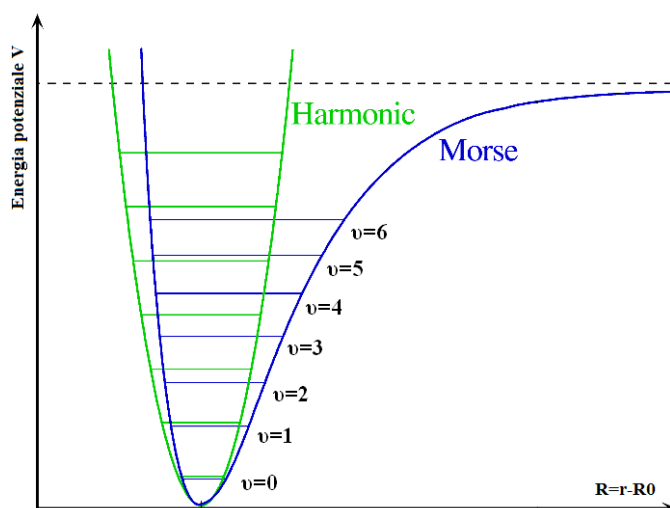


Figura 1.5. Potenziale armonico e di Morse con l'indicazione dei livelli quantici vibrazionali, valori di  $v$  crescenti sull'asse delle ordinate corrispondono a livelli energetici vibrazionali successivi.

Quanto descritto per l'oscillatore biatomico può essere esteso a ciascun modo normale in quanto in approssimazione armonica i diversi modi normali sono indipendenti tra loro. Per molecole poliatomiche composte da  $N$  atomi, l'insieme di modi vibrazionali possibili sono  $3N-6$ , ciascuno descritto da una frequenza caratteristica determinata dalle forze esercitate dagli atomi tra loro.

Dal punto di vista quantistico si può rappresentare l'effetto Raman come in figura 1.6, cioè attraverso uno schema a livelli energetici vibrazionali ed elettronici, tenendo conto dell'energia dei fotoni coinvolti secondo la legge di Planck ( $E_{fotone} = h\nu_{fotone}$ ).

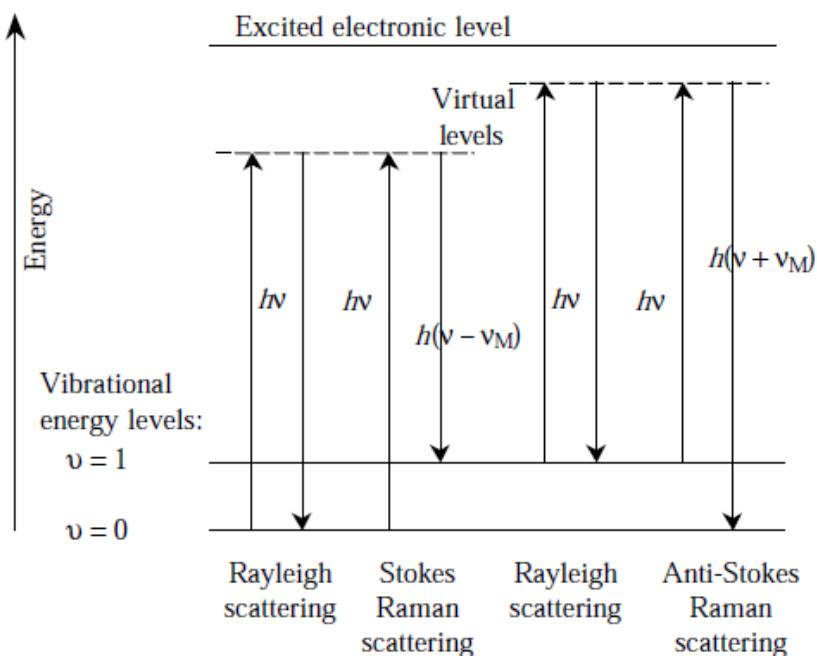


Figura 1.6. Schema a livelli energetici elettronici, reali e virtuali, e vibrazionali con possibili transizioni data una radiazione incidente di frequenza  $\bar{\nu}$ . [Keresztury (2002)]

Come si può osservare, nel caso di *scattering* Raman, un fotone con energia pari a  $h\bar{\nu}$  (secondo la legge di Planck) colpisce la molecola, la quale passa ad uno stato virtuale eccitato non stazionario, da cui decade per tornare allo stato fondamentale spontaneamente e istantaneamente. Quando la molecola torna allo stesso stato sia elettronico che vibrazionale di partenza, cioè diffonde un fotone con frequenza pari a quella incidente  $\bar{\nu}$ , si parla di *scattering* Rayleigh. Si tratta invece di *scattering* Stokes o anti-Stokes nel caso in cui ci sia una variazione nel livello vibrazionale in cui ricade la molecola rispetto a quello iniziale, rispettivamente con valore superiore e inferiore, per cui la frequenza del fotone emesso risulta nei due casi minore ( $\bar{\nu} - \bar{\nu}_m$ ) e maggiore ( $\bar{\nu} + \bar{\nu}_m$ ). Il principio che spiega il fenomeno di *scattering* è la conservazione dell'energia. Si prenda per esempio lo *scattering* Raman di tipo Stokes per potenziali armonici dal livello fondamentale a quello prossimo. Secondo l'equazione 1.15, l'energia associata allo stato fondamentale della molecola è:

$$E_i = hv_i + \frac{1}{2}hv_m \quad (1.16),$$

dove  $hv_i$  e  $\frac{1}{2}hv_m$  indicano rispettivamente l'energia del fotone incidente e quella dello stato vibrazionale in cui si trova la molecola. Lo stato eccitato è, invece, descritto come:

$$E_f = hv_f + \frac{3}{2}hv_m \quad (1.17).$$

Imponendo l'uguaglianza tra la (1.16) e la (1.17) per la legge di conservazione dell'energia, si ottiene  $hv_i + \frac{1}{2}hv_m = hv_f + \frac{3}{2}hv_m$ , che è risolta:

$$hv_f = hv_i - hv_m \quad (1.18),$$

dove il secondo membro rappresenta proprio lo *scattering* anelastico, in questo caso di tipo Stokes ma analogo per componenti di tipo anti-Stokes, del fotone riemesso dalla molecola.

## 1.2. Strumentazione utilizzata

Nel seguito viene presentata brevemente la strumentazione utilizzata per realizzare gli spettri Raman raccolti durante il lavoro sperimentale della tesi.

### 1.2.1. Raman dispersivo LabRAM HR800 [www.horiba.com ]

Lo spettrometro dispersivo utilizzato è prodotto dalla Horiba Jobin Yvon ed è accoppiato, per le misure in modalità micro, ad un microscopio Olympus BX41 (figura 1.7).



Figura 1.7. Raman dispersivo LabRAM HR800 in modalità micro con microscopio Olympus BX41 e stage per mapping.[www.horiba.com]

In figura 1.8 è riportato uno schema dello strumento, dove il detettore CCD (*Charged Coupled Device*), il suo *power supply*, quelli dello spettrometro e dello stage XY sono alloggiati all'esterno, così come la strumentazione di controllo dei lasers. Si nota anche uno stage XY per le misure di *mapping* e il relativo joystick per il posizionamento del campione, nonché una lampada di luce bianca con il proprio generatore di potenza per la messa a fuoco prima della misura. L'interfaccia con l'utente è gestita da un computer con software LabSpec per la gestione dei parametri di misura degli spettri ottenuti.

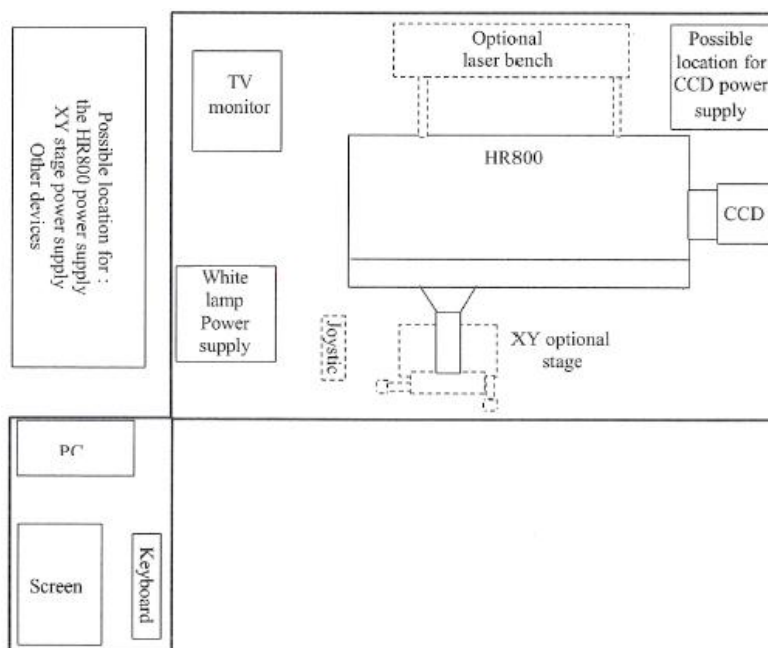


Figura 1.8. Schema dello spettrometro del Raman dispersivo LabRAM HR800.

Lo strumento ha un *set-up* formato principalmente da 5 componenti: una sorgente laser monocromatica, un microscopio, uno spettrometro, un rilevatore per la conversione dei fotoni in segnale elettrico e un'unità di controllo per l'acquisizione dei dati. A completare questo sistema, una serie di filtri sono posti lungo il cammino ottico del fascio luminoso emesso dal laser prima che colpisca il campione. Nell'ordine si ha:

- un filtro interferenziale per la pulizia del segnale laser da linee spurie di emissione, dette di plasma;
- una serie di filtri a differente densità ottica per la regolazione della potenza che illuminerà il campione;
- un filtro *notch* con duplice funzione: quella di riflettere il raggio sul campione, passando attraverso l'obiettivo del microscopio, e quella, a partire dalla luce diffusa dal campione dopo l'interazione con il raggio incidente, di eliminare la componente Rayleigh, pur lasciando passare le componenti Stokes ed anti-Stokes, che vengono, invece, disperse dal reticolo e inviate al CCD, che le elabora nello spettro Raman che poi verrà analizzato.

La sorgente monocromatica è solitamente costituita da un laser, la cui lunghezza d'onda negli strumenti commerciali può variare dal NIR (1064 nm) al profondo UV (180 nm). Nel Raman dispersivo LabRAM HR800 in dotazione al Laboratorio di Spettroscopia Vibrazionale e Dinamica Molecolare del Dipartimento CMIC del Politecnico di Milano si trovano una serie di lasers con diverse lunghezze d'onda, riportate in tabella 1.1.

<b>Laser</b>	<b>Lunghezza d'onda caratteristica</b>
HeCd	325 nm
Ar <sup>+</sup>	457.9 nm e 514 nm
HeNe	633 nm
Diodo laser	785 nm

Tabella 1.1. Lasers presenti nel LabRAM HR800 con le proprie lunghezze d'onda.

I lasers più utilizzati sono quelli agli ioni di gas nobili, per esempio Ar<sup>+</sup> (che però richiedono elevati costi di manutenzione per gli impianti di raffreddamento) e diodi laser. Una volta che il raggio emesso dalla sorgente laser supera la serie di filtri descritti in

precedenza, questo passa attraverso il microscopio ottico Olympus BX41, avente gli obiettivi riportati in tabella 1.2 con le relative aperture numeriche (NA).

<b>Obiettivi</b>	<b>NA</b>
4X	0.13
10X	0.25
20X	0.5
50X	0.7
100X	0.9

Tabella 1.2. Serie di obiettivi e relative aperture montate sul microscopio ottico Olympus BX41 del Raman dispersivo.

Una telecamera a colori e una lampada a luce bianca sono collegati al microscopio, in modo da permettere l'osservazione e la focalizzazione del campione sullo schermo del computer.

In figura 1.9 è riportato uno schema del funzionamento dello spettrometro, che si basa su una configurazione di tipo Czerny-Turner asimmetrica del monocromatore, con lunghezza focale di 800 nm e un intervallo di lunghezze d'onda di utilizzo compreso tra i 300 e i 1064 nm. Come si può osservare, la luce bianca in ingresso è inviata ad uno specchio concavo collimatore, che la indirizza al reticolo di diffrazione rotante. Essi possono essere di tre tipi a seconda della sorgente laser impiegata: 600, 1800 e 2400 linee/mm. La radiazione viene focalizzata in punti differenti, per cui viene scomposta nelle varie lunghezze d'onda e diretta verso un secondo specchio ancora concavo, che la riflette verso il reticolo del detettore CCD in punti differenti in funzione dell'angolo di rotazione del precedente reticolo.



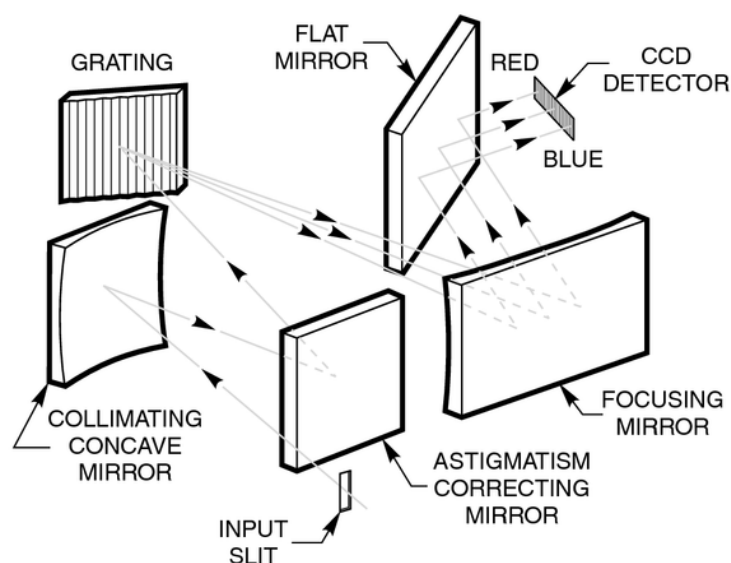


Figura 1.9. Schema dello spettrometro, composto da una fenditura d'ingresso, uno specchio concavo, detto *collimating mirror*, da un reticolo di diffrazione rotante, diverso a seconda della sorgente laser, un secondo specchio, il *focusing mirror*, e un reticolo di detenzione CCD. [www.newport.com]

Gli specchi, insieme ad alcuni filtri, fanno parte della parte ottica dello spettrometro. In particolare, esistono alcuni filtri a diverse densità ottiche in grado di attenuare la potenza iniziale  $P_0$  del laser. La densità ottica di ciascun filtro dipende dalla formula:

$$D = \log \frac{I_0}{I} \quad (1.19),$$

dove  $I_0$  è l'intensità del campo elettrico incidente sul filtro e  $I$  quella uscente. La potenza  $P$  del laser che effettivamente arriva sul campione dipende dalla densità ottica del filtro come illustrato in tabella 1.3.

Densità ottica (D)	Potenza effettiva (P)
0	$P=P_0$
0.3	$P= P_0/2$
0.6	$P= P_0/4$
1	$P= P_0/10$
2	$P= P_0/100$
3	$P= P_0/1000$
4	$P= P_0/10000$

Tabella 1.3. Relazione tra la densità ottica dei filtri e la potenza effettiva del raggio incidente il campione rispetto a quella iniziale.

Le componenti Stokes ed anti-Stokes prodotte dalla luce diffusa dal campione sono quindi raccolte dal detettore, un CCD di 1024x256 pixels, operativo a  $-70^{\circ}\text{C}$  grazie al raffreddamento con una cella Peltier. Il dispositivo è colpito dalle diverse lunghezze d'onda della radiazione diffusa, ciascuna con la propria intensità, che viene accumulata come carica elettrica, e alla fine tradotta nello spettro del campione dall'elettronica di lettura del CCD e dal computer ad essa collegato.

Nel computer risiede sia la parte di controllo dei parametri dello strumento sia la programmazione della rilevazione. Per quanto riguarda la parte hardware di controllo, è possibile scegliere la lunghezza d'onda del laser, le fenditure e i reticoli, ma anche manovrare il sistema di alloggiamento del campione, la telecamera o l'illuminazione. Come già anticipato, invece, il software è il programma LabSpec, con il quale si registra lo spettro determinando i vari parametri in termini di range spettrale, ma anche di numero e tempo di acquisizione.

1.2.2. FT-Raman Nicolet NXR 9650 [www.thermo.com, www.thermoscientific.de, Siebert (2008)]

In figura 1.10 è riportato lo strumento FT-Raman prodotto dalla Thermo Instruments.



Figura 1.10. FT-Raman Nicolet NXR 9650 prodotto dalla Thermo Instruments. [www.thermo.com]

A differenza dello strumento descritto nel paragrafo precedente, questo spettrometro è basato sul principio della Trasformata di Fourier (FT) e ha, come sorgente, un laser con lunghezza d'onda nel NIR (di tipo NdYAG a 1064 nm) con potenza massima di 2W, che permette di ovviare i problemi legati alla fluorescenza, che talora si incontrano con la strumentazione Raman dispersivo con laser nel visibile.

Come si può vedere nello schema di figura 1.11, la luce diffusa dal campione e riflessa da uno specchio ricoperto d'oro, viene indirizzata verso un interferometro di Michelson a trasformata di Fourier dopo essere stata filtrata da un *notch* che elimina la componente Rayleigh.

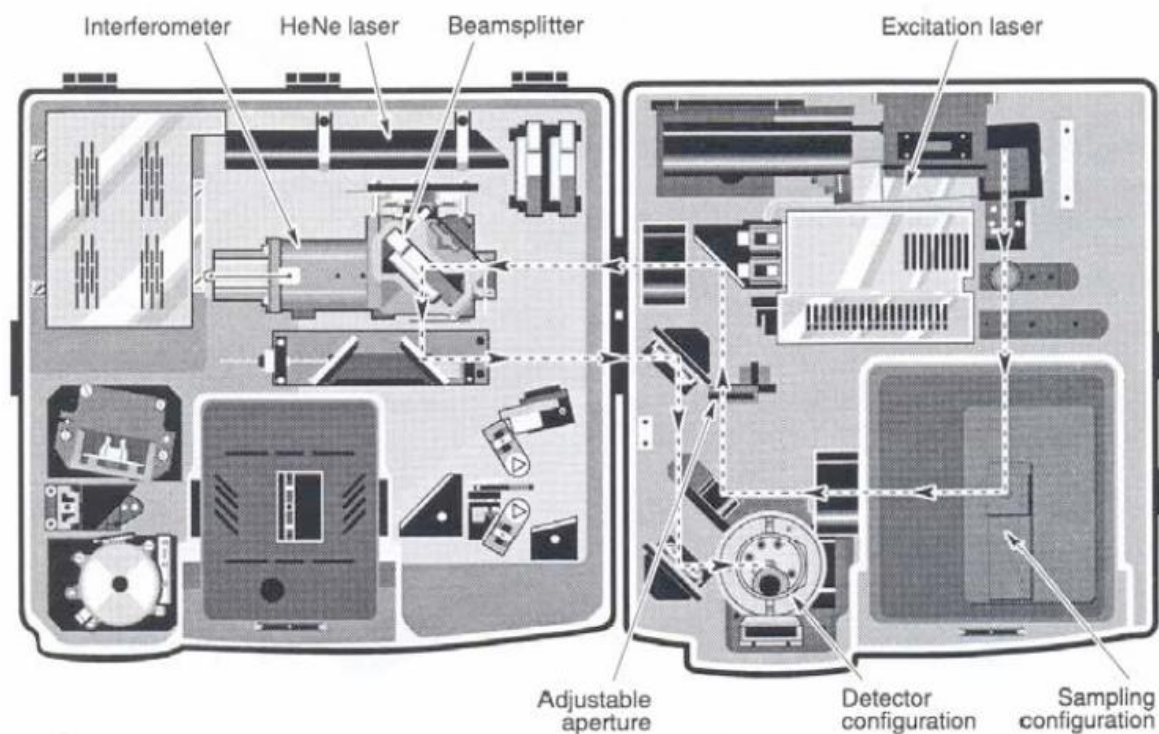


Figura 1.11. Schema dell'interno dello spettrometro FT-Raman Nicolet NXR 9650.

Oltre l'interferometro di Michelson, la luce viene raccolta da due diversi rilevatori: un sensore CCD InGaAs raffreddato con cella Peltier, oppure in Ge, raffreddato invece con azoto liquido. Per la descrizione dell'interferometro di Michelson e la rilevazione del segnale si rimanda al capitolo successivo relativo alla strumentazione IR.

I risultati ottenuti con FT-Raman non sono riportati poiché sono spettri dominati dal rumore, in cui non si riesce ad osservare il contributo di nessuna vibrazione molecolare.

### 1.3. Set-up sperimentale del Raman dispersivo

Prima di raccogliere gli spettri desiderati, occorre preparare lo strumento e impostare i parametri per la misura. Il Raman dispersivo è raffreddato con cella di Peltier fino a  $-65^{\circ}\text{C}$ , nell'apposito compartimento è inserito il corretto filtro per il taglio della luce Rayleigh, scelto in accordo con la lunghezza d'onda della sorgente. Una volta eseguita la calibrazione

dei reticoli dispersivi, lo strumento è pronto per la raccolta degli spettri. Il campione con il relativo supporto è posizionato sotto la lente del microscopio e messo a fuoco utilizzando i comandi del portacampione del microscopio, con l'aiuto della lampada e del laser. Come anticipato, i parametri che si possono variare nella misura sono:

- la lunghezza d'onda della sorgente: nelle nostre misure si sceglie la luce di colore rosso a 785 nm, proveniente da un diodo laser, e la radiazione verde con sorgente di ioni argon a 514 nm (alcune sono state realizzate anche con lunghezza d'onda a 457.9 nm, ma senza registrare alcun risultato);
- il reticolo di diffrazione (di solito 600 righe/mm) che determina direttamente il *range* di numeri d'onda nello spettro registrato e presenta il vantaggio di permettere una finestra d'osservazione più ampia (a scapito di un'accettabile perdita di risoluzione);
- lo strumento, impostato con laser a 785 nm, è in grado di realizzare misure in finestre di 600  $\text{cm}^{-1}$  circa. Con il comando *multiwindow* il *range* di misura selezionato, essendo più ampio, viene raccolto in *steps* successivi a partire dall'estremità inferiore;
- il tipo di filtro d'attenuazione della luce incidente, il quale è selezionato in maniera tale da massimizzare il segnale, evitando l'eccessivo riscaldamento del campione;
- l'apertura attraverso cui passa la luce, che limita l'area di raccolta (scelta pari a 300 o 500  $\mu\text{m}$ );
- l'obiettivo del microscopio, considerando che ad alti valori di ingrandimento (quello massimo utilizzato nelle misure è di 50X) si restringe il volume raccolto in direzione z, quindi il volume di *scattering* è centrato meglio sul campione ed interessa meno aria nel cammino ottico.

## Capitolo 2

### Spettroscopia IR

La luce infrarossa è stata scoperta da William Herschel nel 1800 durante studi condotti sull'energia associata alle lunghezze d'onda della luce visibile. Misurando la temperatura per i vari colori prodotti colpendo un prisma con luce solare, l'indagine si sposta su lunghezze d'onda oltre quella del colore rosso, il più caldo, per cui si individua una temperatura crescente. I cosiddetti "raggi calorifici" sono proprio quelli che oggi chiamiamo infrarossi, con lunghezza d'onda compresa tra 0.78-1000  $\mu\text{m}$  (vedi figura 2.1) e che sono stati impiegati, negli anni successivi, come sorgente per la spettroscopia infrarossa.[Jackson (2002)]

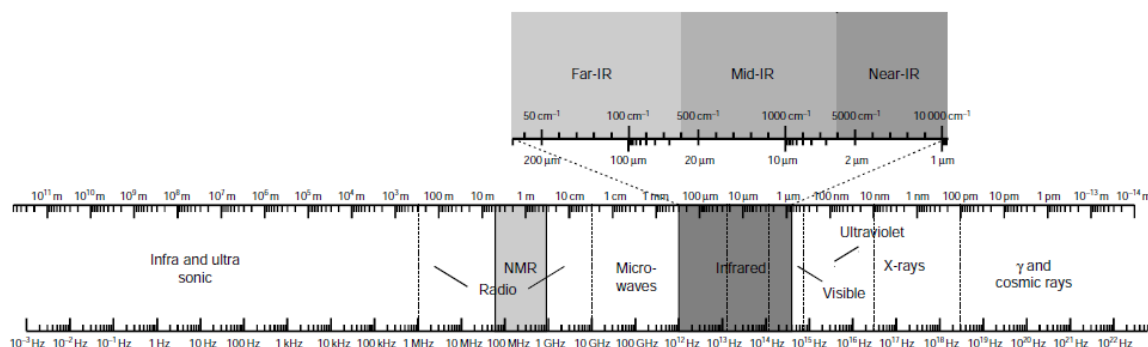


Figura 2.1. Spettro elettromagnetico. La luce infrarossa ha frequenza inferiore rispetto alla luce visibile, e lunghezza d'onda maggiore. Dato l'ampio range coperto dall'IR, questo viene solitamente distinto in tre bande: NIR, cioè near-infrared (0.78-2.5 $\mu\text{m}$ ), MIR, ovvero mid-infrared, (2.5-25 $\mu\text{m}$ ) e FIR, che sta per far-infrared (25-1000 $\mu\text{m}$ ). Nella spettroscopia vibrazionale IR si considera la luce MIR. [Schultz (2002)]

#### 2.2. Descrizione classica e quantistica della spettroscopia IR [Castiglioni (1992), Griffiths (2002), Siebert (2008), Steele (2002)]

I campioni studiati con spettroscopia IR sono irradiati con luce avente lunghezza d'onda nel MIR (vedi fig. 1.1) e, qualora l'energia associata a questi fotoni sia risonante, si inducono transizioni tra livelli energetici vibrazionali del campione, tradotte in picchi di

assorbimento negli spettri. La dinamica molecolare studia le bande di assorbimento relative ai moti interni vibrazionali conseguenti a questo processo, aventi una propria frequenza, determinata in senso classico dalle forze esercitate sugli atomi a seguito del movimento dalla condizione di equilibrio.

La trattazione del problema vibrazionale vista nel caso della spettroscopia Raman (paragrafo 1.2) per una molecola biatomica eteronucleare è valida, come già anticipato, anche per studiare l'assorbimento della radiazione IR. La legge di conservazione dell'energia  $E_f = E_i$  implica che il fotone assorbito causi la transizione vibrazionale nella molecola:

$$E_i = h\nu_{\text{fotone}} + \frac{1}{2}h\nu_{\text{vib}} \quad (2.1)$$

$$E_f = \frac{3}{2}h\nu_{\text{vib}} \quad (2.2),$$

$$h\nu_{\text{fotone}} = h\nu_{\text{vib}} \quad (2.3).$$

La spettroscopia IR è sensibile solo a quei modi vibrazionali che producono un'alterazione del momento di dipolo della molecola in esame. Le transizioni tra due livelli energetici per assorbimento di un fotone sono controllate dal momento di dipolo elettrico così definito:

$$\hat{\mu}_i = \sum_{\alpha} r_{\alpha i} q_{\alpha} \quad (2.4),$$

dove  $q_{\alpha}$  è la carica effettiva dell' $\alpha$ -esimo atomo e  $r_{\alpha i}$  è la distanza dello stesso atomo dal centro di gravità della molecola in coordinate cartesiane ( $i = x + y + z$ ). La probabilità di transizione tra i livelli energetici  $n \rightarrow m$  per l'interazione del sistema con la radiazione è proporzionale al quadrato del prodotto scalare tra il vettore del campo elettrico del raggio incidente  $\vec{E}$  e il momento di dipolo di transizione ( $n \rightarrow m$ ):

$$P_{n,m} \propto (E_x^2 |\mu_x|_{n,m}^2 + E_y^2 |\mu_y|_{n,m}^2 + E_z^2 |\mu_z|_{n,m}^2) \quad (2.5),$$

dove:

$$|\mu_i|_{n,m} = \langle \psi_m^* | \hat{\mu}_i | \psi_n \rangle \quad (2.6),$$

cioè la variazione del momento di dipolo nella  $i$ -esima direzione è diversa da 0 se non sono ortogonali tra loro le due funzioni d'onda dei livelli vibrazionali iniziale ( $\psi_n$ ) e finale ( $\psi_m$ ). La (2.6) esprime, in pratica, la probabilità di una transizione dall' $n$ -esimo livello d'energia vibrazionale all' $m$ -esimo, tipicamente corrispondenti allo stato fondamentale ( $n = 0$ ) e al primo eccitato della molecola ( $m = 1$ ), attraverso la perturbazione provocata dalla radiazione elettromagnetica incidente (vedi figura 2.2).

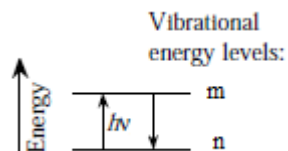


Figura 2.2. Schema dell'assorbimento e dell'emissione di una radiazione IR, con transizione vibrazionale della molecola  $n \rightarrow m$ . [Keresztury (2002)]

In conclusione, si possono osservare transizioni vibrazionali all'IR per ogni variazione del momento di dipolo della molecola, associata ad un "salto" tra due suoi livelli vibrazionali. Per esempio, non ho assorbimento nell'infrarosso per molecole biatomiche omonucleari. Invece, ad esempio un gruppo  $\text{CH}_2$  di una catena alchilica ha tre tipi di modi vibrazionali, che si possono combinare tra loro dando luogo ad un moto di tipo delocalizzato:

- di *stretching*, cioè per stiramento dei legami interatomici (vedi figura 2.3);

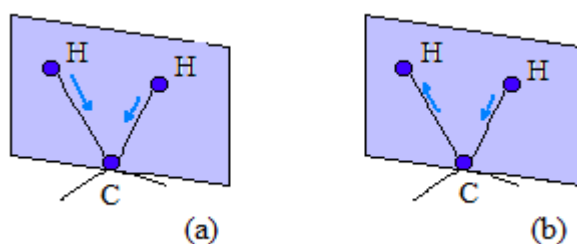


Figura 2.3 Schema di (a) *stretching* simmetrico e (b) antisimmetrico. [<http://leonardodavinci.csa.fi.it>]

- di *bending*, per deformazione degli angoli di valenza tra tre atomi successivi (vedi figura 2.4);

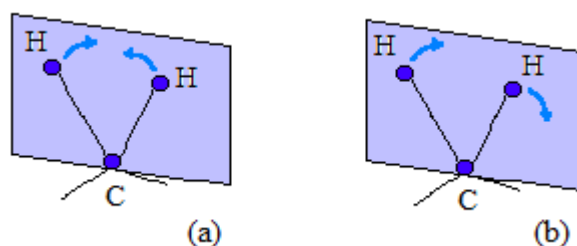


Figura 2.4. Schema di *bending* (a) *scissoring* e (b) *rocking*. [<http://leonardodavinci.csa.fi.it>]

- di *out-of-plane*, quando ho spostamento degli atomi di idrogeno rispetto al piano HCH della molecola (vedi figura 2.5).

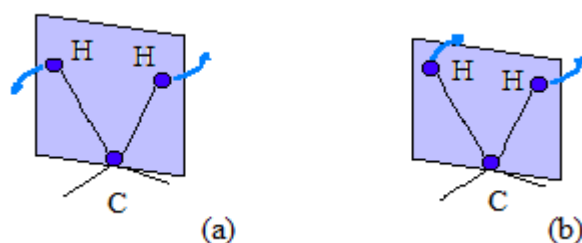


Figura 2.5. Schema di *out-of-plane* (a) *twisting* e (b) *wagging*. [<http://leonardodavinci.csa.fi.it>]

### 2.3. Strumentazione utilizzata

#### 2.3.1. Interferometro FT-IR Nicolet Nexus associato a microscopio infrarosso Thermo

Nicolet Continuum [Siebert (2008), [www.thermo.com](http://www.thermo.com), manuale dello strumento]

Lo spettrofotometro Nicolet NEXUS FT-IR e il microscopio infrarosso Thermo Nicolet Continuum con cui è accoppiato, riportati in figura 2.6, sono di Thermo Instruments.



Figura 2.6. Interferometro FT-IR Nicolet NEXUS con il relativo microscopio Thermo Nicolet Continuum.



Lo spettrofotometro è costituito da 5 componenti fondamentali: una sorgente di luce infrarossa, un interferometro, un porta-campioni regolabile, un rivelatore del segnale ottico in uscita, che viene infine elaborato da un sistema di raccolta del segnale basato sull'interferometro di Michelson e la trasformata di Fourier. In figura 2.7 è riportato lo schema del cammino ottico della luce nello strumento.

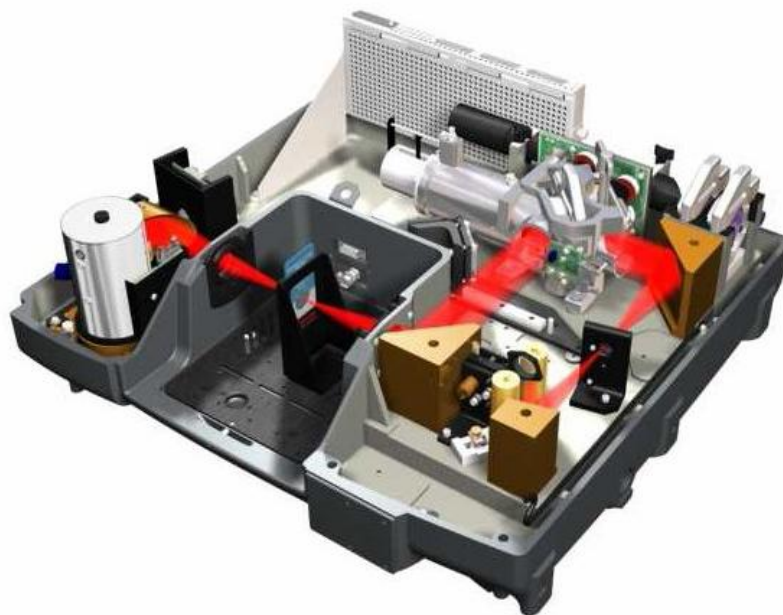


Figura 2.7. Cammino ottico della radiazione infrarossa quando il campione è alloggiato nel compartimento principale dello strumento.

La radiazione infrarossa è prodotta da una sorgente in carburo di silicio riscaldata per effetto Joule a 1200°C. Infatti, nonostante l'intensità di segnale sia proporzionale alla temperatura raggiunta dalla sorgente, dev'essere comunque limitata poiché andrebbe ad incidere sulla sensibilità del detettore, incrementando il rapporto segnale/rumore (S/N), che potrebbe anche alterare il segnale.

Prima di essere raccolta dal detettore, la luce converge sul campione grazie ad un interferometro di Michelson, schematizzato in figura 2.8. La radiazione luminosa in ingresso viene divisa attraverso il *beamsplitter* verso i due specchi, di cui uno è mobile. Le diverse distanze percorse dai fotoni provocano uno sfasamento del cammino ottico percorso dai due fasci suddivisi, i quali vengono diretti entrambi sul campione e, infine, raccolti dal detettore, ancora in funzione delle coordinate spaziali. La risoluzione massima associata a questo componente è di  $0.125 \text{ cm}^{-1}$  ed è inversamente proporzionale al valore di apertura massima di un diaframma che regola il diametro della luce in ingresso.

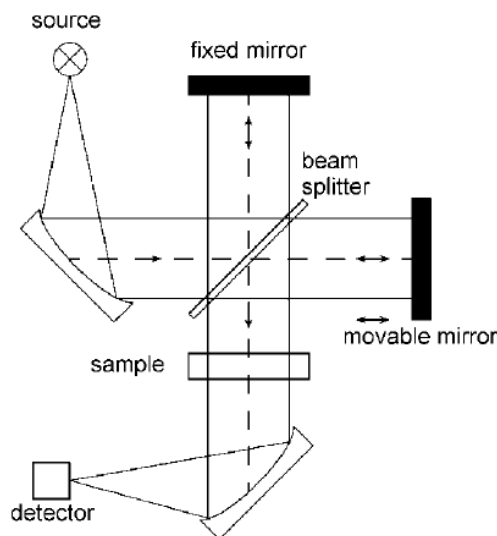


Figura 2.8. Schema dell'interferometro di Michelson. [Siebert (2008)]

Essendo il lavoro di tesi incentrato, come vedremo, su soluzione acquose di materiale biologico, la cella scelta per l'alloggiamento dei campioni deve essere adatta per i liquidi. Il porta-campioni ha così una forma tale da permettere un corretto posizionamento all'interno dello strumento, in modo che il raggio proveniente dalla sorgente, dopo aver superato l'interferometro di Michelson, passi attraverso il foro posto al centro dell'alloggiamento. Inoltre la soluzione è interposta tra due finestre di materiale opportuno, che vengono bloccate dal supporto porta-campioni. Nella tabella di figura 2.9, sono riportati i principali materiali adatti per le finestre. Come si può facilmente verificare, la scelta più adatta per soluzioni acquose è il fluoruro di calcio ( $\text{Ca}_2\text{F}$ ).

Window material	Useful range (cm <sup>-1</sup> )	Refractive index	Properties
NaCl	40 000–600	1.5	Soluble in water; slightly soluble in alcohol; low cost; fair resistance to mechanical and thermal shock; easily polished
KBr	43 500–400	1.5	Soluble in water and alcohol; slightly soluble in ether; hygroscopic; good resistance to mechanical and thermal shock
CaF <sub>2</sub>	77 000–900	1.4	Insoluble in water; resists most acids and bases; does not fog; useful for high-pressure work
BaF <sub>2</sub>	66 666–800	1.5	Insoluble in water; soluble in acids and NH <sub>4</sub> Cl; does not fog; sensitive to thermal and mechanical shock
KCl	33 000–400	1.5	Similar properties to NaCl but less soluble; hygroscopic
CsBr	42 000–250	1.7	Soluble in water and acids; hygroscopic
CsI	42 000–200	1.7	Soluble in water and alcohol; hygroscopic

Figura 2.9. Elenco dei materiali delle finestre utilizzate per i campioni liquidi con le relative caratteristiche.

Per quanto riguarda i rilevatori della luce dopo che questa ha interagito con il materiale da analizzare, questi sono di tipo DTGS (*triglycine sulfate*), raffreddati da un sistema termoelettrico, da cui dipende il range spettrale di sensibilità per numeri d'onda compresi tra 400 e 6000 cm<sup>-1</sup>.

Infine l'elettronica di controllo ed elaborazione del segnale raccolto dal detettore si basa sulla tecnica della trasformata di Fourier, la quale converte in funzione della frequenza il segnale in ingresso misurato in funzione del cammino ottico percorso. La spettroscopia basata su questo metodo, invece che su quello convenzionale, risulta molto più rapida in quanto tutte le lunghezze d'onda sono misurate simultaneamente, migliorando così l'efficienza fino allo 0.1%. Le caratteristiche principali sono l'assenza delle fenditure di selezione della lunghezza d'onda, per cui la radiazione colpisce interamente il campione senza perdite (vantaggio di Jaquinot o *throughput*), e la distribuzione del rumore indotto dal detettore su tutto lo spettro, con un conseguente guadagno del rapporto segnale/rumore (vantaggio di Fellgett o *multiplex*).

Il cammino ottico cambia nel caso di utilizzo del microscopio ottico ed è rappresentato in figura 2.10.

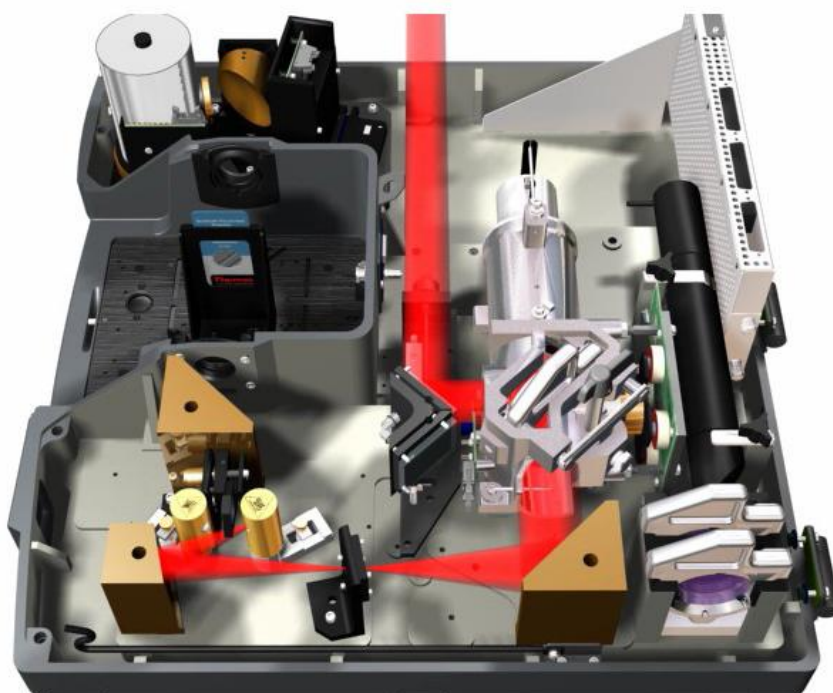


Figura 2.10. Cammino ottico della radiazione infrarossa quando il campione è alloggiato sotto il microscopio infrarosso associato all'FT-IR.

Come si può osservare, la radiazione in uscita dall'interferometro è indirizzata al microscopio e focalizzata sul campione mediante l'obiettivo IR Cassegrain 15X. I campioni, anche in questo caso, devono essere posizionati su supporti trasparenti alla radiazione infrarossa, per esempio le finestre riportate in tabella 2.1, ma anche apposite celle in diamante, su cui deporre una goccia del liquido da analizzare. Sono possibili sia misure in riflessione che in trasmissione, grazie anche ad un rivelatore MCT (*Mercury Cadmium Telluride*) raffreddato con azoto liquido, posto all'interno di microscopio stesso. L'operazione matematica di conversione dal segnale raccolto allo spettro di assorbimento del materiale in esame è ancora la trasformata di Fourier, che converte l'interferogramma ottenuto dall'interferometro di Michelson in uno spettro di assorbimento IR.

#### 2.4. Set-up sperimentale dello spettrofotometro IR [www.harricksci.com]

Lo spettrofotometro IR utilizzato per la raccolta degli spettri, viene gestito attraverso il *software* Omnic. Esiste una specifica finestra per determinare le impostazioni sperimentali, sia per quanto riguarda i parametri di raccolta dello spettro, sia per il *set-up* dello strumento

stesso. La prima parte, posta sotto l'etichetta *collect*, permette di decidere il numero di scansioni del campione che poi saranno mediate tra loro, la risoluzione e la scelta del *background*. Quando si realizza la misura di un campione, essa presenta anche l'assorbimento dei fotoni relativo alla cella in cui è posto e al solvente in cui è sciolto. Il *background* rappresenta proprio lo spettro dei componenti che si vogliono escludere dallo spettro finale di ogni campione, che il *software* è in grado di sottrarre in automatico dalla misura. Nella seconda parte della finestra di controllo, denominata *bench*, si stabilisce il compartimento di misura, cioè quello principale (*main*) o il microscopio ottico che può lavorare in trasmittanza o riflettanza. Si definisce in questa sede anche il *gain* del segnale e il valore dell'apertura (tra campione e interferometro) di solito impostata come la massima per ottenere la risoluzione voluta.

Il campione biologico, tipicamente in soluzione acquosa, viene interposto tra due finestre alloggiare in un supporto per celle da liquido. I materiali scelti per le finestre sono solitamente due:

- KBr, solubile in acqua, è utilizzato solo nel caso di campioni biologici privi d'acqua. Tali finestre hanno forma circolare, con diametro di 20 mm, spessore di 4 mm e incolori. Per distendere il materiale in maniera uniforme tra le due finestre e controllare il meato interposto, esse sono serrate tra due superfici, le quali possiedono un foro centrale per permettere il passaggio della luce proveniente dalla sorgente.
- CaF<sub>2</sub>, ottime per campioni liquidi e acquosi, tagliano alle basse frequenze (<900 cm<sup>-1</sup>). Sono anch'esse incolori, circolari, con diametro di 19 mm e spessore di 2 mm. In fase preparatoria, si inserisce la prima finestra nel supporto di figura 2.11 precedentemente aperto, si posiziona uno spaziatore in Teflon con spessore variabile e un volume tra 1 e 5 µl di soluzione al centro della finestra in modo che copra l'intera superficie (a seconda dello *spacer* scelto il volume contenuto nella cella chiusa può variare). Quindi si sovrappone la seconda finestra, un *o-ring* per evitare il contatto diretto tra la parte metallica del tappo di chiusura e la fluorite, molto delicata agli sfregamenti, e il dispositivo porta-campioni da liquido viene infine chiuso avvitando l'ultimo anello. In quest'ultima operazione risulta molto importante controllare il numero di giri della chiusura a vite per mantenere costante la lunghezza del cammino ottico nelle diverse

misure (soprattutto nel caso di segnali deboli è necessaria la costanza della geometria della cella in condizioni di misura del *background* e del campione).



Figura 2.11. Supporto in cui sono inserite le finestre di  $\text{CaF}_2$  tra cui è interposto il campione in soluzione.  
[www.harricksci.com]

I segnali raccolti possono esibire un segnale spurio dato dalla non perfetta compensazione del *background* a causa di variazioni di contenuto di vapore acqueo nel compartimento *main*. Per eliminare o ridurre questa componente, si realizza uno spettro a compartimento vuoto e aperto, in modo da riempirlo di particelle di vapore acqueo, che viene opportunamente sottratto a ciascuna misura in cui si osservano i picchi caratteristici dell'acqua. Questo procedimento è generalmente applicato a tutti i segnali in cui sia presente il segnale dovuto all'acqua che si riconosce per i picchi stretti e posti a distanza piuttosto uniforme l'uno dall'altro oltre i  $1500 \text{ cm}^{-1}$ .

## Capitolo 3

### La trasfezione

Come già anticipato nell'introduzione, per trasfezione (o *gene delivery*) si intende quel metodo di trasferimento di materiale genetico, sia esso DNA o RNA, nelle cellule somatiche volto a silenziare, amplificare o esprimere una proteina a scopo terapeutico o per correggere geni mutati.

Le strategie poste in atto dalla *gene delivery* sono principalmente due:

- *ex vivo*, per cui le cellule, solitamente autologhe, vengono estratte dal tessuto di un paziente, trattate e cresciute in coltura, poi re-introdotte dopo la trasfezione; è però applicata solo nel caso in cui i tessuti abbiano un'elevata aspettativa di sopravvivenza dopo l'estrazione e manipolazione di alcune cellule al di fuori dell'organismo vivente;
- *in vivo*, dove il gene viene rilasciato attraverso un vettore, di natura virale o non, o a seguito di un trattamento fisico direttamente nella cellula *target*. Il DNA/RNA non è in grado di bypassare in maniera efficace la membrana cellulare da solo, poiché sia la membrana che il materiale genetico hanno carica negativa, rispettivamente dovuta alla presenza di glicoproteine e di gruppi fosfati.

Nei prossimi paragrafi vengono presentati i materiali scelti per la trasfezione di un gene, focalizzando la trattazione sul tipo di DNA in cui inserire il frammento e su una sola classe di vettori, quella di natura cationica.

#### 3.1. Scelta del DNA per la trasfezione di un gene [Leslie (1980), Nelson (2003)]

Le tipologie di DNA analizzate nella fase sperimentale della tesi sono di due tipi: i plasmidi e frammenti di DNA cromosomiale eucariotico.

##### 3.1.1. Plasmidi

I plasmidi sono piccole molecole di DNA a doppio filamento, circolari, composte da poche migliaia di basi e libere nel citosol di cellule batteriche, distinte dal DNA cromosomiale, il

quale non è isolato in un nucleo da una membrana, ma risulta fortemente aggregato in una formazione compatta e super-avvolta detta nucleotide (vedi figura 3.1)

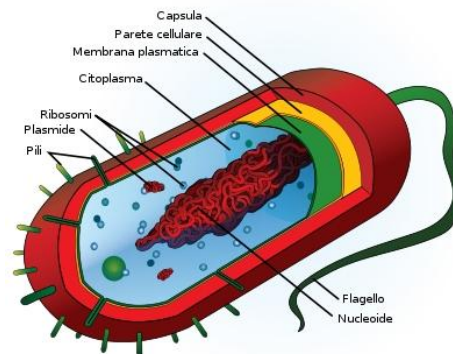


Figura 3.1. Illustrazione che schematizza una cellula batterica, mettendo in evidenza tutte le sue parti, tra cui il nucleotide e un plasmide. [www.medicinapertutti.altervista.org]

I plasmidi si replicano indipendentemente dal cromosoma e, come vedremo, questa caratteristica risulta altamente favorevole nel caso della trasfezione. Infatti, questo assicura un'adeguata amplificazione del materiale genetico, che poi verrà trasmesso nella divisione cellulare alle cellule figlie senza perdite. Quindi, nella prospettiva in cui non si conoscano con certezza le conseguenze derivanti dall'introduzione di un gene nel plasmide, il fatto che esso si moltiplichi ampiamente fornisce un vantaggio nella verifica sperimentale degli effetti della trasfezione. Oltre a questo fattore, la presenza nei plasmidi di almeno un sito di resistenza ad uno specifico antibiotico aggiunge un sistema di verifica del successo nella procedura di introduzione del gene. Ma prima di discutere questo concetto, si osservi la figura 3.2 che schematizza l'inserimento di un frammento nucleotidico nel DNA plasmidico.

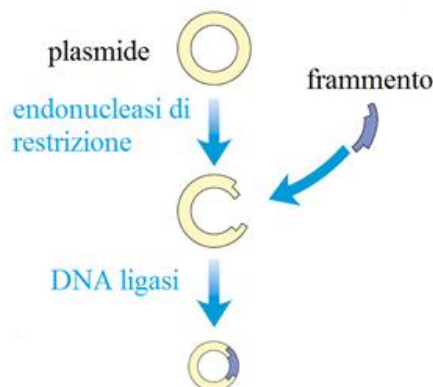


Figura 3.2. Schema dell'inserimento di un frammento di DNA in un plasmide: un enzima appartenente alla classe delle endonucleasi taglia la molecola in modo che le estremità che si formano siano complementari a quelle del frammento e siano, quindi, legate da un enzima di tipo ligasi. [Nelson (2003)]



Scegliendo opportunamente l'endonucleasi di restrizione siamo in grado di decidere in quale punto specifico inserire il gene. Questo meccanismo può rivelarsi utile per la verifica del successo della trasfezione. Infatti, tagliando un sito di resistenza ad un determinato antibiotico, si individuano le cellule contenenti il gene trafettato in base alla risposta al trattamento con tale farmaco.

### 3.1.2. DNA di cellule eucariote

Le cellule eucariote, a differenza di quelle procariote (vedi figura 3.1 e paragrafo precedente), hanno un nucleo in cui il DNA è separato dal citosol attraverso un'apposita membrana. La forma del DNA non è più circolare, ma è un doppio filamento impacchettato a super-elica, che può esistere secondo diverse configurazioni dipendenti dalla sequenza nucleotidica, dalla presenza di basi modificate e dall'ambiente in cui si trova. Nonostante le conformazioni possibili siano molte, solo tre di esse sono state osservate e sono A-DNA, B-DNA e Z-DNA (figura 3.3).

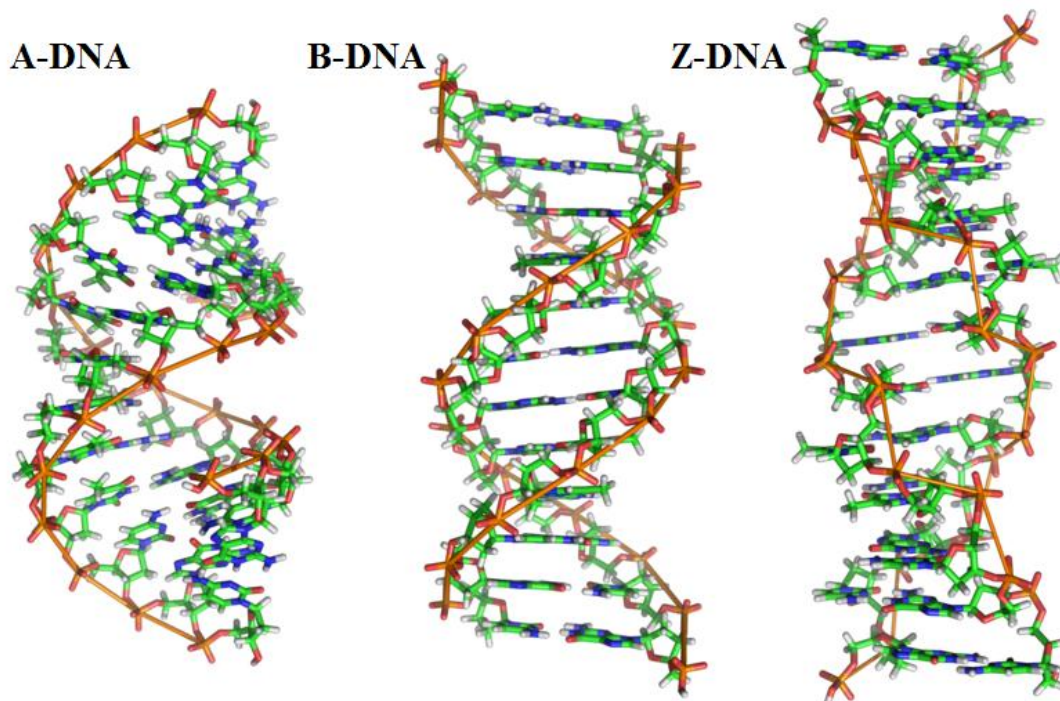


Figura 3.3. L'immagine rappresenta le tre configurazioni di DNA osservate nei sistemi biologici. La prima forma, A-DNA, ha un avvolgimento di tipo destrorso e si incontra in sistemi disidratati, lontani dalle condizioni fisiologiche. La seconda, B-DNA, è tipica delle cellule, anch'essa ad andamento destrorso, con l'asse della macromolecola perpendicolare ai legami idrogeno tra le coppie di basi e con un solco centrale apprezzabile da una vista dall'alto. L'ultima, Z-DNA, è facilmente riconoscibile per l'andamento opposto di tipo sinistrorso. [www.molecularstation.com]

La procedura di inserimento di un gene nella catena nucleotidica è analoga a quella descritta nella figura 3.2, nel senso che gli enzimi coinvolti sono gli stessi. La differenza principale risiede nella minore stabilità della macromolecola, sicuramente più sensibile alle variazioni di condizioni ambientali, come umidità e temperatura. Dal punto di vista di avere un *feedback* di riuscita della trasfezione (come per i plasmidi con i siti di resistenza agli antibiotici) per la doppia elica di DNA eucariota la soluzione più praticata per poter verificare l'introduzione di un gene è quella di aggiungere un gene per la codifica di una proteina fluorescente (GFP, ovvero Green Fluorescent Protein). In ogni caso, per una questione di costi, questo tipo di DNA risulta preferibile in sede di sperimentazione.

### 3.2. Vettori cationici [Jiang (2007), Pezzoli (2008-2010), Wong (2006)]

Lo studio promosso nella fase sperimentale di questa tesi è incentrato sull'analisi di vettori di tipo non virale, polimerici, di natura cationica. In particolare abbiamo studiato due casi: polipeptidi, o meglio PLL (poli-L-lisina), cioè ammine primarie protonate a pH fisiologico (7.4), e polimeri basati su PEI (PoliEtilenImmina), un complesso formato con il chitosano.

#### 3.2.1. Poli-L-lisina

La poli-L-lisina (PLL) (vedi figura 3.4) è un polipeptide cationico biodegradabile utilizzato per *gene delivery*: presentandosi come un'ammina primaria protonata a pH fisiologico, questa molecola si complessa spontaneamente con legami di natura elettrostatica con le cariche negative del gruppo fosfato degli acidi nucleici.

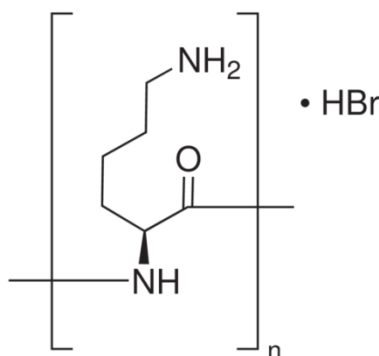


Figura 3.4. Formula della poli-L-lisina (PLL), con indicato il suo agente protonante, l'acido bromidrico (HBr). Il peso molecolare della molecola dipende dal numero di monomeri  $n$  da cui è formata. [www.sigmaaldrich.com]

Nel campo della trasfezione, il parametro della poli-L-lisina da controllare è il peso molecolare. Infatti, per elevati pesi molecolari si ottiene una buona trasfezione, poiché si formano complessi stabili con il DNA, ma si osserva anche elevata citotossicità poiché il polimero viene internalizzato in forma di aggregati che possono precipitare a seconda della forza ionica dell'ambiente. Succede il contrario per bassi pesi molecolari, dove il numero di ammine primarie protonate è insufficiente per la formazione di poliplessi.

### 3.2.2. Polimeri basati su PEI

La polietilenimmina (PEI) è considerata oggi praticamente un *gold standard* nel campo della trasfezione in merito alla sua efficienza rispetto ad altri vettori polimerici cationici, per esempio anche PLL. Si può trovare in due forme, riportate in figura 3.5: una forma lineare (*linear PEI* o lPEI), avente solo ammine secondarie, e una ramificata (*branched PEI* o bPEI), con ammine primarie, secondarie e terziarie (il  $pK_a$  più acido è quello relativo alle ammine terziarie).

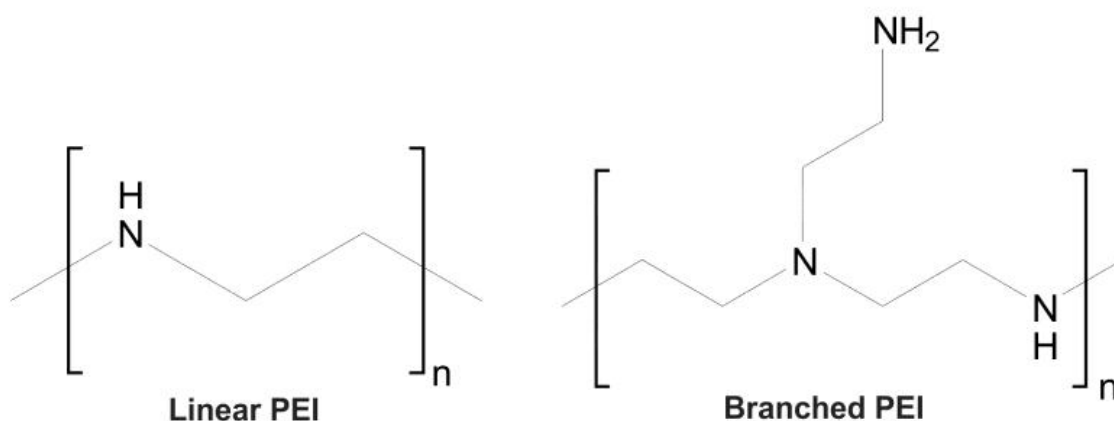


Figura 3.5. Struttura chimica della polietilenimmina (PEI) nelle due forme, lineare (a sinistra) e ramificata (a destra). [Kafil (2011)]

Come nel caso della PLL, anche per il PEI il peso molecolare influenza l'efficienza di trasfezione, insieme al grado di ramificazione della molecola. Il bPEI è solitamente preferito a lPEI, soprattutto se con basso numero di monomeri. Lo svantaggio del PEI, che ne sconsiglia l'uso esclusivo come vettore, risiede nell'elevata citotossicità poiché tale molecola non è biodegradabile, soprattutto per pesi molecolari elevati per i quali si osserva un'ottima efficienza di trasfezione. Per questa ragione sono stati sviluppati copolimeri

composti da PEI ad elevato peso molecolare combinato con chitosano, un polisaccaride ottenuto dalla deacetilazione della chitina e riportato in figura 3.6.

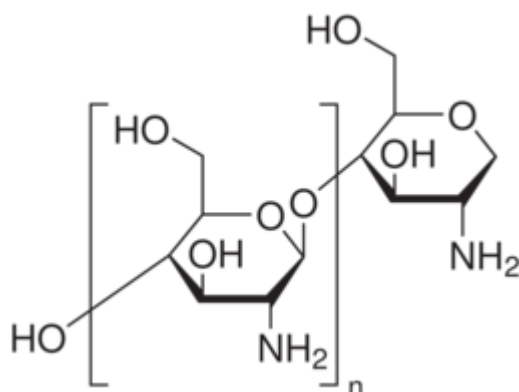


Figura 3.6. Formula chimica del chitosano. [www.sigmaldrich.com]

Il chitosano è una molecola naturale, altamente biocompatibile e biodegradabile, che, grazie al carattere prevalentemente protonato a pH fisiologico, si lega spontaneamente al DNA, anche se mantiene un basso potere trasfettante. Tuttavia, il copolimero che si ottiene dall'unione di chitosano e PEI ramificato (chitosano-*graft*-bPEI) mostra nel complesso una bassa citotossicità ed elevata efficienza di trasfezione. In figura 3.7 e 3.8 sono riportati rispettivamente i lavori di letteratura di Wong (2006) e di Jiang (2007) effettuati circa l'efficienza di trasfezione *in vitro* del chitosano-*g*-PEI in funzione del rapporto N/P (cariche positive delle ammine del polimero/cariche negative del gruppo fosfato del DNA).

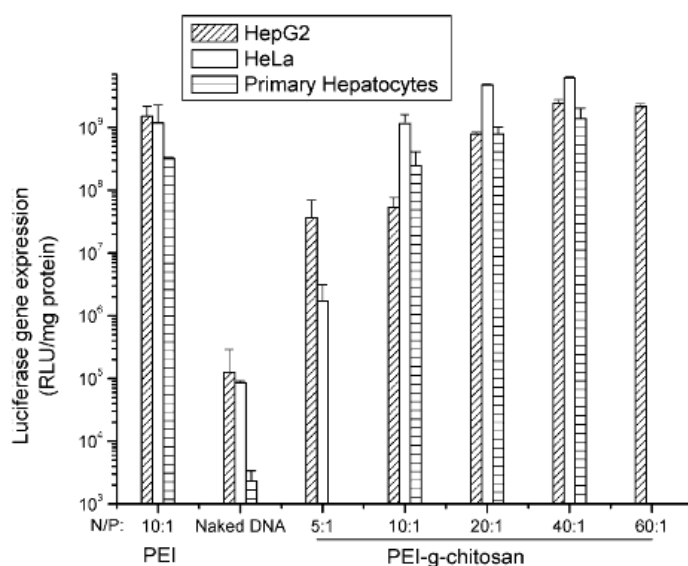


Figura 3.7. Efficienza di trasfezione *in vitro* dei complessi di chitosano-*g*-PEI/DNA per cellule di linea HepG2, HeLa e per epatociti primari a confronto con il PEI (25 KDa) e la doppia elica nucleotidica. [Wong (2006)]

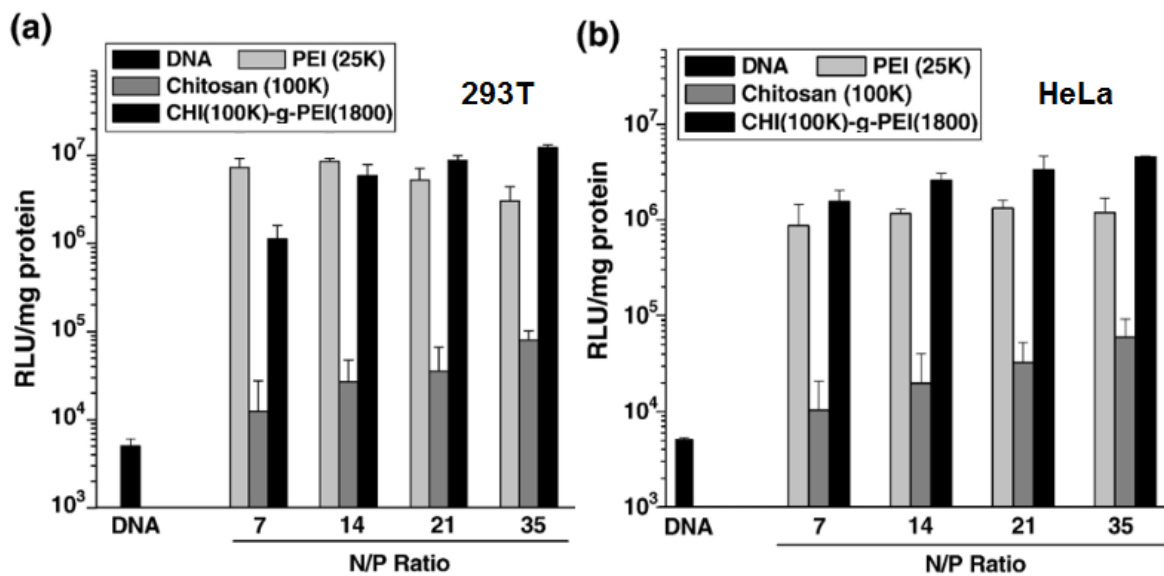


Figura 3.8. Efficienza di trasfezione *in vitro* dei complessi di chitosano-g-PEI/DNA per le cellule di linea 293T e HeLa a confronto con DNA. [Jiang (2007)]

## Capitolo 4

### Misure Raman

L'obiettivo di questa tesi è di impiegare la spettroscopia vibrazionale per vedere l'effetto della formazione del poliplesso. La prima parte del lavoro sperimentale ha utilizzato gli strumenti Raman, descritti nel capitolo 1. Dopo aver esposto lo stato dell'arte in merito allo studio del DNA con spettroscopia Raman (Prescott, 1984), abbiamo realizzato gli spettri su campioni disidratati di plasmidi e copolimero chitosano-g-PEI sciolti in *buffers* come solvente. Poiché i segnali raccolti per questi materiali portati a secco mostravano praticamente solo le bande relative alle soluzioni tamponanti, abbiamo provato a preparare le stesse molecole ma in acqua deionizzata. Gli spettri misurati questa volta su gocce di soluzione sono apparsi comunque poco intensi per le basse concentrazioni delle molecole, pur al variare della potenza della sorgente laser. Di conseguenza, non è stato possibile individuare i picchi determinati precedentemente grazie all'esame del DNA in fibra.

Esaminando gli spettri ottenuti per i diversi campioni con *set-up* sperimentali differenti, non sono stati ottenuti risultati pienamente soddisfacenti a causa della notevole difficoltà delle condizioni sperimentali. Infatti, compare un elevato rumore di fondo che si sovrappone al segnale, già piuttosto debole, per cui spesso l'analisi risulta difficile. Per poter migliorare il rapporto S/N sarebbe utile aumentare la potenza del raggio incidente sul campione, per cui, di conseguenza, crescerebbe anche l'intensità dei picchi. L'applicazione di questo principio, però, non sempre risulta possibile; dipende infatti dalle potenzialità dello strumento (esempio i laser a disposizione), che sono già state portate al massimo in questo caso, e soprattutto dal tipo di materiale da studiare. I campioni biologici pongono forti limiti nella scelta dei parametri sperimentali: per esempio, potenze maggiori significano anche temperature maggiori, che portano spesso le molecole ad uno stress eccessivo e al loro danneggiamento. Inoltre, nel campo biologico si ragiona sempre in termini di quantità molto piccole, dell'ordine dei  $\mu\text{g}$  o  $\mu\text{l}$ , che possono bastare dal punto di vista della massa necessaria per effettuare una misura al microscopio in fase solida, meno se si considerano le concentrazioni tipiche di una soluzione acquosa.

#### 4.1. Stato dell'arte [Prescott (1984)]

La scelta di utilizzare la spettroscopia Raman come tecnica per individuare le vibrazioni caratteristiche delle principali molecole coinvolte nella trasfezione (cioè il DNA e i vettori non virali) nasce da un articolo di Prescott et al. (1984), dove si illustrano i risultati ottenuti dall'esame di un campione di fibre di DNA di *calf thymus* con spettrometro Raman in diverse condizioni di umidità. Nel lavoro citato sono riportati gli spettri raccolti con una sorgente di fotoni aventi lunghezza d'onda di 514 nm e le assegnazioni fatte per le frequenze dei picchi individuati. I campioni esaminati sono distinti a seconda della conformazione A-DNA o B-DNA in cui si trovano. La tabella 4.1 mostra le assegnazioni dei picchi Raman compiute dal gruppo di Prescott nell'intervallo di frequenza compreso tra 300 cm<sup>-1</sup> e 3500 cm<sup>-1</sup> nel caso di fibre di DNA nelle due configurazioni. Sono evidenziate le vibrazioni dei gruppi caratteristici del DNA, appartenenti al *range* di lunghezze d'onda in cui abbiamo svolto le nostre indagini spettrali durante la fase sperimentale.

A-DNA (75% r.h.)	B-DNA (92% r.h.)	Assegnazioni	A-DNA (75% r.h.)	B-DNA (92% r.h.)	Assegnazioni
335	329	ade	<b>1145</b>	<b>1142</b>	<b>d(vCC); ade</b>
360	349	d	1182	1182	thy; cyt
394	390	d	1209	1217	thy
430		d	1243	1237	thy
465	467	d	1255	1257	cyt; ade
499	499	gua; thy		1292	cyt
537	535	ade	1301	1304	ade; cyt
555		d	1322	1319	gua
	569	thy	1336	1339	ade
592	595	cyt; gua	1396	1376	thy; ade; gua
622		ade; cyt; thy	1418		d(CH <sub>2</sub> δ)
642	643	ade; cyt		1422	d(CH <sub>2</sub> δ); ade
663	669	thy; gua; ade	1373	1445	d(CH <sub>2</sub> δ)
682	681	gua	1461	1463	d(CH <sub>2</sub> δ)
704		d	1483	1489	ade; gua
727	729	ade	1512	1511	ade;
748	751	thy; d	1537	1538	cyt
781	787	cyt	1574	1577	gua; ade
<b>794</b>	<b>795</b>	<b>thy; d(vOP0)</b>	1603	1610	cyt
<b>806</b>		<b>d(vOP0)</b>	1651	1649	cyt(2C=Ov); H <sub>2</sub> O
	<b>834</b>	<b>d(vOP0)</b>	1669	1669	thy; gua(C=Ov)
881		d	1717	1712	gua(C=Ov)
893	896	d	2753	2751	thy (overtone 2 X 1373)
	923	d	2894	2896	d(CHv)
	932	d	2950		d(CHv)
965	970	d	2968	2964	d(CHv)

992	1000	d	3025	3021	ade;gua (8 CHv)
1011	1013	d	3091	3095	cyt(6 CHv)
1025	1028	d	3129	3133	thy(5 CHv)
<b>1055</b>	<b>1054</b>	<b>d(vCO)</b>	3237	3237	H <sub>2</sub> O
<b>1099</b>	<b>1094</b>	<b>d(vPO<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	3426	3426	H <sub>2</sub> O

Tabella 4.1. Estratto della tabella di attribuzione dei picchi Raman del DNA secondo Prescott (1984). Si assegna ciascun picco Raman caratteristico del DNA nelle due forme in soluzione acquosa ad una determinata vibrazione molecolare. Sono evidenziate le frequenze associate a modi caratteristici di alcuni gruppi specifici della molecola. Le abbreviazioni "ade", "thy", "gua", "cyt" si riferiscono alle basi del DNA, "d" indica il *backbone* del deossiribosio, mentre v e  $\delta$  indicano, rispettivamente, i modi di stretching e deformazione angolare. [Prescott (1984)]

Nel presente lavoro di tesi sono state ripetute le misure Raman in modo da mimare le medesime condizioni sperimentali di Prescott. Sono state perciò analizzate fibre di ctDNA bagnate con una goccia di acqua deionizzata, tuttavia con eccitatrice a 785 nm. Il confronto con i dati di Prescott è riportato in figura 4.1.

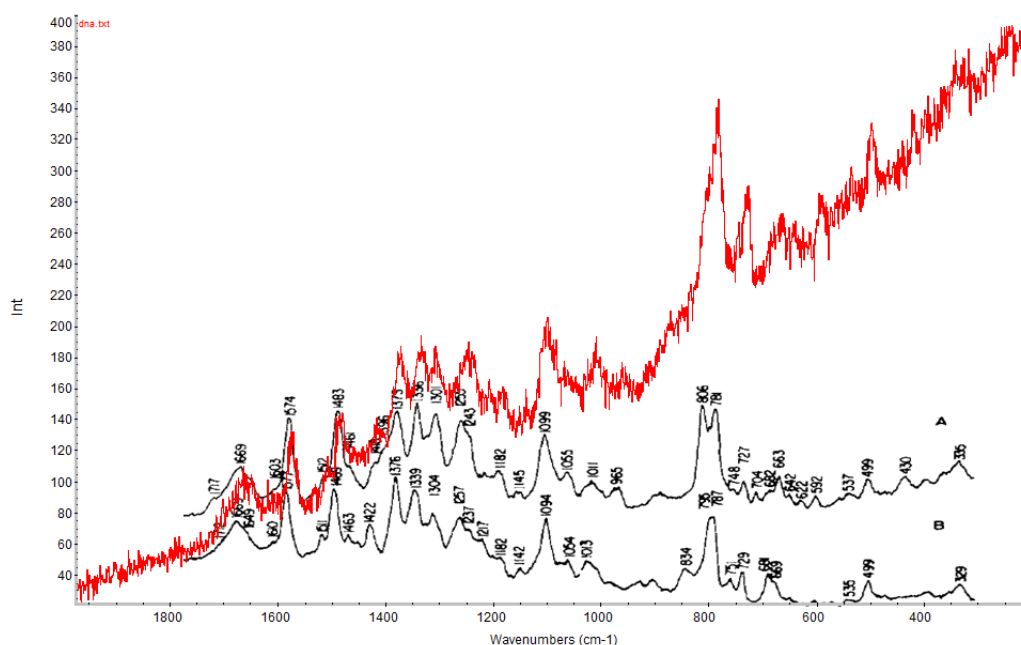


Figura 4.1. Spettri di DNA in fibra di *calf thymus* messi a confronto: in rosso è riportato il segnale raccolto a 785 nm, in nero gli spettri dell'articolo di Prescott nelle due configurazioni A-DNA (in alto) e B-DNA (in basso).

Si nota immediatamente una serie di picchi corrispondenti, posti nell'intervallo compreso tra 1000 cm<sup>-1</sup> e 1700 cm<sup>-1</sup>. Si deve tenere in considerazione che il segnale del DNA a



queste concentrazioni è sicuramente molto più intenso di quello prodotto a concentrazioni più basse e vicine a quelle utilizzate durante la trasfezione. Per questo motivo, quando nei prossimi paragrafi considereremo una soluzione di DNA a 1.575  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  saremo sicuramente, dal punto di vista sperimentale, più prossimi ai valori previsti nell'ambito della trasfezione (purtroppo comunque situati ad uno/due ordini di grandezza inferiori), ma il segnale Raman del DNA risulterà troppo debole per poter essere distinto dal fondo dato principalmente dallo *scattering* dell'acqua. Il confronto tra gli spettri di Prescott e quello registrato nella presente tesi per soluzioni acquose mostra una buona corrispondenza dei picchi (vedi figura 4.2), anche se con profili e intensità differenti a causa dell'uso di una diversa eccitazione laser e di condizioni del campione non esattamente coincidenti.

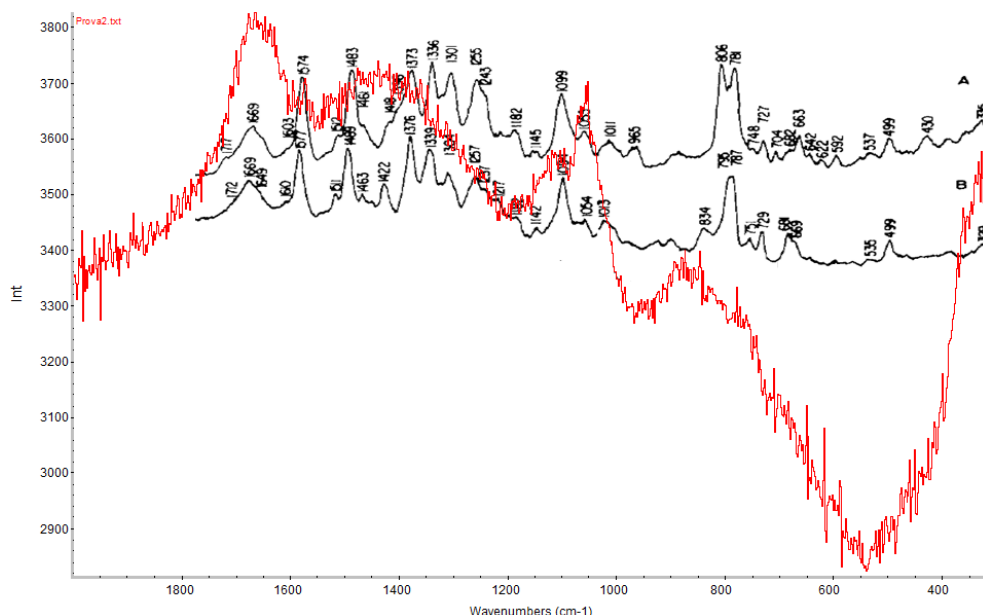


Figura 4.2. Confronto tra lo spettro estratto dall'articolo di Prescott e quello realizzato per DNA di *calif thymus* in soluzione acquosa di 1.575  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con sorgente di 514 nm, denominato prova 2 nella tabella 4.6. Nella zona compresa tra 1000  $\text{cm}^{-1}$  e 1700  $\text{cm}^{-1}$  si possono individuare delle analogie tra i due segnali, esempio i picchi attorno a 1050  $\text{cm}^{-1}$ , a 1670  $\text{cm}^{-1}$  e la spalla compresa tra essi che sembra ricalcare il profilo dei picchi sottostanti.

A partire dallo stato dell'arte, abbiamo quindi esaminato campioni di DNA e chitosano-g-PEI diluiti in solventi tamponanti o acqua a concentrazioni ridotte rispetto alle misure realizzate su fibra. Ci siamo avvicinati alle condizioni di lavoro tipiche del campo della

trasfezione poiché nostro scopo era quello di individuare le variazioni delle bande associate alle molecole in seguito alla formazione di poliplessi.

#### 4.2. Campioni disidratati [www.sigmaaldrich.com]

Le prime misure realizzate con spettrometro dispersivo Raman sono state effettuate su campioni di plasmidi e chitosano-g-PEI in soluzione tampone, disidratati in condizione ambiente su un supporto in alluminio circolare concavo dal diametro di 5 mm circa.

I plasmidi sono stati preparati in due soluzioni tampone differenti, una di TrisEDTA e l'altra di HEPES. Il primo è un complesso ottenuto combinando il tri(idrossimetil)ammino metano (abbreviato Tris, un *buffer* agente attorno al valore di pH fisiologico) con un agente chelante, l'acido etilendiamminotetracetico (EDTA, cioè un sequestratore di ioni metallici). Le due molecole sono riportate in figura 4.3.

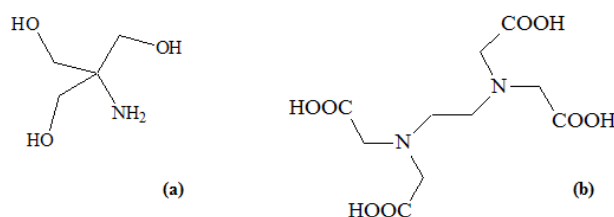


Figura 4.3. Struttura chimica delle molecole di (a) Tris, *buffer* utilizzato per campioni biologici con  $pK_a=8.07$  ed (b) EDTA, sequestratore di ioni metallici, per esempio  $Mg^{2+}$  di cui ne inibisce la funzione di stabilizzante di catena nucleotidica. [www.sigmaaldrich.com]

L'HEPES, invece, abbreviazione che indica l'acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinil-etansolfonico, è un agente tamponante zwitterionico, anch'esso molto utilizzato per scopi biologici per l'azione di *buffer* svolta nel range di pH 6.5-8.5. In figura 4.4 se ne riporta la struttura chimica.

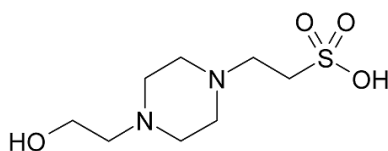


Figura 4.4. Formula chimica dell'HEPES, molecola zwitterionica con potere tamponante attorno ai suoi due valori di  $pK_a$ , rispettivamente di 3 (valore troppo acido) e 7.55. [www.sigmaaldrich.com]

Le misure del plasmide in soluzione di TrisEDTA ed i parametri relativi adottati sono elencati in tabella 4.2. Si può osservare che, oltre ad esplorare vari punti del campione, si tenta di ottimizzare la potenza del fascio incidente verso valori più elevati, ma ancora

attenuati. Le voci "sec acquisizione" e "medie" corrispondono rispettivamente al tempo di ciascuna misura (in secondi) e a quante di esse vengono mediate per ottenere lo spettro finale.

Plasmide TrisEDTA 1	potenza	20 mW	sec acquisizione	40
	freq. misura	400-1800 cm <sup>-1</sup>	medie	8
Plasmide TrisEDTA 1a	potenza	20 mW	sec acquisizione	40
	freq. misura	700-1300 cm <sup>-1</sup>	medie	8
Plasmide TrisEDTA 1b	potenza	100 mW	sec acquisizione	40
	freq. misura	400-1800 cm <sup>-1</sup>	medie	8
Plasmide TrisEDTA 2	potenza	100 mW	sec acquisizione	40
	freq. misura	400-1800 cm <sup>-1</sup>	medie	8
Plasmide TrisEDTA 3	potenza	100 mW	sec acquisizione	40
	freq. misura	400-1800 cm <sup>-1</sup>	medie	8
Plasmide TrisEDTA 4	potenza	100 mW	sec acquisizione	40
	freq. misura	400-1800 cm <sup>-1</sup>	medie	8

Tabella 4.2. Elenco delle misure realizzate per il campione di plasmide in soluzione tampone di TrisEDTA, ciascuna con le relative impostazioni. Il numero apposto a fianco del nome si riferisce alle differenti posizioni in cui gli spettri sono stati raccolti, per cui 1, 1a e 1b indicano misure effettuate nello stesso punto ma in modalità differenti. *Hole* 300  $\mu$ m, obiettivo 50X.

In figura 4.5 è riportato uno degli spettri realizzati con l'immagine della zona irradiata dalla sorgente laser, in cui sono posti in evidenza i picchi più significativi.

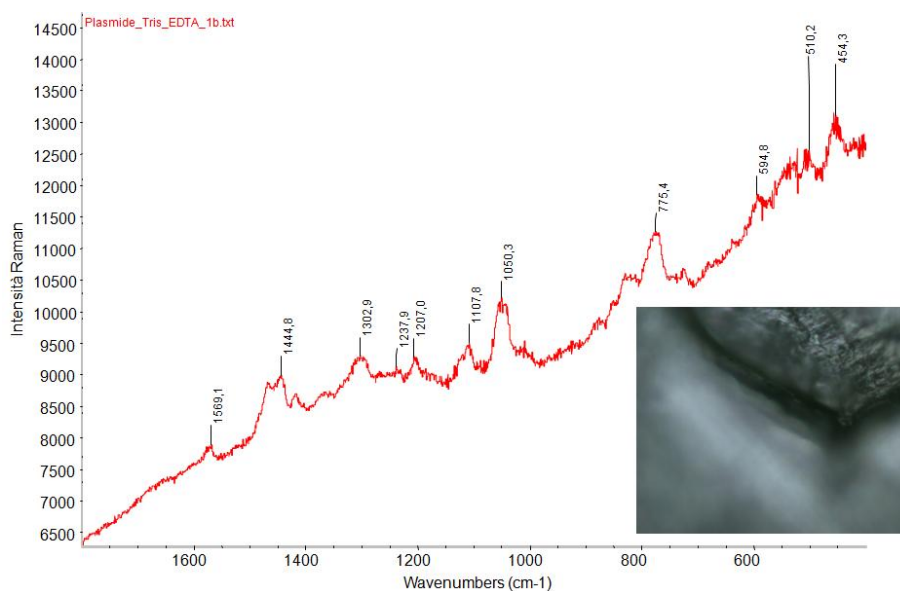


Figura 4.5. Spettro della soluzione di plasmide in TrisEDTA, tirato a secco su supporto in alluminio. Precisamente, il punto in cui il laser colpisce il campione si trova nella porzione più scura, tra le due zone dell'immagine non a fuoco. Dall'osservazione con microscopio ottico si può apprezzare come, disidratando la soluzione, il residuo secco abbia mantenuto una forma a corona circolare non omogenea che appare più scura.

Mettendo a confronto i numeri d'onda dei picchi individuati per il plasmide in TrisEDTA con le assegnazioni fatte nell'articolo di Prescott, non compaiono particolari corrispondenze. È vero che la molecola studiata da Prescott è la doppia elica di *calf thymus*, mentre noi stiamo analizzando il plasmide, però i nucleotidi che costituiscono le due diverse forme sono gli stessi e, di conseguenza, anche i modi vibrazionali associati. L'unica simmetria rilevabile tra i due spettri è relativa al picco attorno a  $1050\text{ cm}^{-1}$ , attribuito allo *stretching* del legame CO del *backbone* della catena (vedi tabella 4.1). Per il resto il profilo spettrale è assolutamente scorrelato, il che proverebbe che il segnale misurato sia dovuto interamente al solvente.

La seguente serie di misure è stata realizzata sempre su campioni di plasmide, ma diluiti in un *buffer* differente (HEPES). Mettendo a confronto, quindi, i nuovi spettri con quelli appena discussi, ci si aspetta che le corrispondenze tra i due segnali siano attribuibili alla molecola di DNA plasmidico. I picchi che compaiono, invece, in uno solo dei due casi sono riconducibili allo *scattering* Raman dei due solventi. I parametri degli spettri raccolti per plasmide in HEPES sono riportati in tabella 4.3.

Plasmide HEPES 1	potenza	100 mW	sec acquisizione	40
	freq.misura	$400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$	medie	8
Plasmide HEPES map	potenza	100 mW	sec acquisizione	30
	freq.misura	$700\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$	medie	5

Tabella 4.3. Elenco delle misure effettuate per il campione di plasmide in HEPES, dove l'abbreviazione "map" sta per *mapping*, tecnica con cui gli spettri sono raccolti in diversi punti del campione. Hole  $300\text{ }\mu\text{m}$ , obiettivo 50X.

La tecnica di *mapping*, utilizzata per il secondo elemento della tabella 4.3, prevede l'individuazione di una superficie omogenea del campione sufficientemente estesa. Essa viene suddivisa in sottoaree, su ciascuna delle quali viene misurato lo spettro secondo i parametri impostati come mostrato in tabella 4.3. In figura 4.6 è riportata l'immagine della regione osservata e, disegnata con linea tratteggiata, la superficie interessata dal *mapping* e i punti su cui si è eseguito il *mapping*.

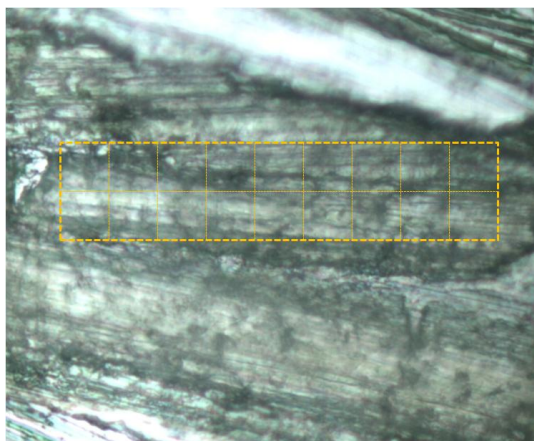


Figura 4.6. Immagine relativa al *mapping*, dove è evidenziata la porzione sottoposta a questo tipo di misura.

Mettendo a confronto gli spettri ottenuti per le soluzioni e per il solo *buffer* (figura 4.7) si nota subito come non ci siano sostanziali differenze tra i diversi punti analizzati con la tecnica di *mapping*. Il vantaggio di questo tipo di misura è soprattutto nell'analisi che il *software* LabSpec permette di fare; per esempio è possibile verificare in termini colorimetrici l'intensità di un determinato picco nei vari punti, funzione poco utile per il tipo di informazioni che cerco nella mia tesi, ma fondamentale nel caso si voglia confrontare la presenza di una sostanza su una superficie in base ad un picco dello spettro. Inoltre è possibile tramite *mapping* effettuare medie spaziali degli spettri secondo una procedura semi-automatica.

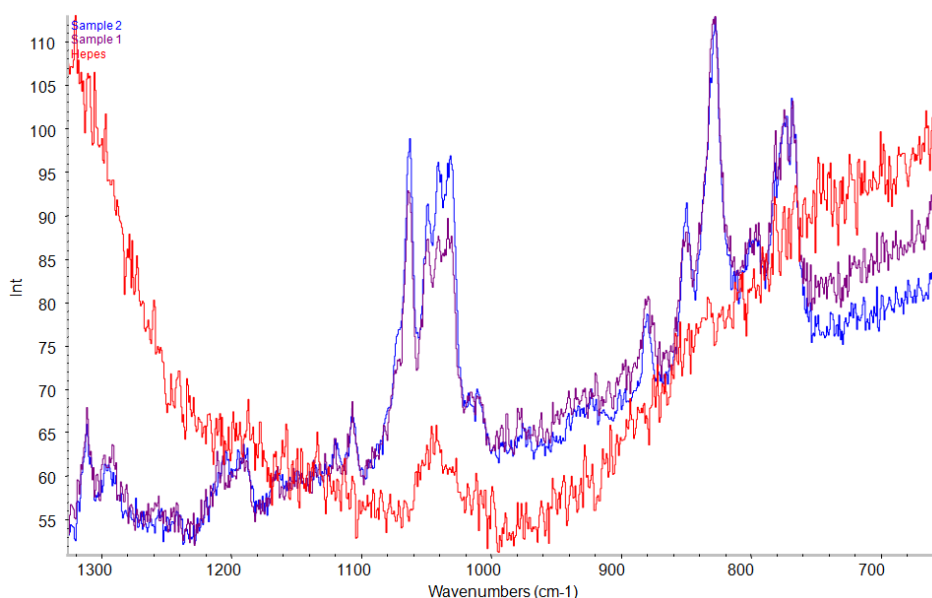


Figura 4.7. Spettri relativi alla soluzione di plasmide in HEPES (blu e viola) a confronto con lo spettro realizzato sul solo solvente tamponante (rosso).

Come nel caso in cui il solvente era TrisEDTA, il segnale registrato per il plasmide in HEPES non ha nessun riferimento comune con la molecola di ctDNA analizzata da Prescott (anche nell'intorno di  $1050\text{ cm}^{-1}$ , dove possiamo osservare una serie di picchi concentrati in uno stretto intervallo di numeri d'onda, ma aventi una forma diversa). Per quanto riguarda, invece, il confronto con lo spettro dell'HEPES, si possono osservare corrispondenze tra i due profili, nonostante l'elevata quantità di rumore. Abbiamo provato, allora, a confrontare gli spettri realizzati per le soluzioni di plasmide in solventi tamponanti differenti. Dalla figura 4.8, possiamo osservare come, in linea di massima, non ci sia una precisa corrispondenza tra i picchi, sia per quanto riguarda la frequenza, ma anche per la loro forma. Questa valutazione induce a pensare che il segnale Raman sia fortemente influenzato dai diversi tipi di *buffer* o che comunque essi provochino forti alterazioni nella configurazioni dei plasmidi visti le marcate differenze.

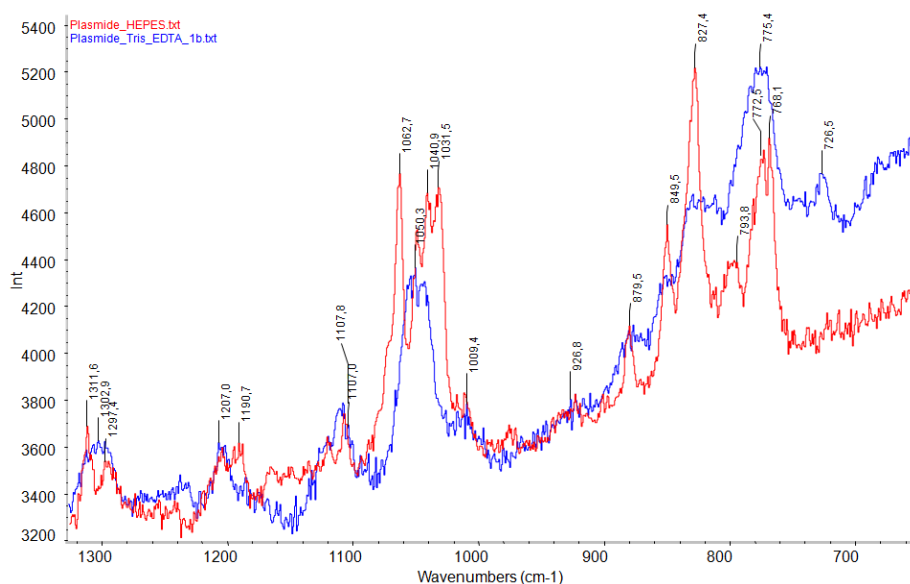


Figura 4.8. Confronto tra gli spettri delle soluzioni di plasmide nelle due differenti soluzioni tampone, rispettivamente, HEPES (di colore rosso) e Tris EDTA (blu). Sono indicate anche i numeri d'onda dei picchi.

Successivamente, sono state eseguite misure in punti differenti del campione di chitosano-g-PEI disidratato (avente HEPES come solvente), annotate in tabella 4.4.

chitosano-g-PEI 1	potenza	100 mW	sec acquisizione	10
	freq.misura	$400-1800\text{ cm}^{-1}$	medie	8
chitosano-g-PEI 2	potenza	100 mW	sec acquisizione	10
	freq.misura	$400-1800\text{ cm}^{-1}$	medie	10
chitosano-g-PEI 3	potenza	100 mW	sec acquisizione	10
	freq.misura	$400-1800\text{ cm}^{-1}$	medie	10

Tabella 4.4. Spettri ricavati dal campione di chitosano-g-PEI in *buffer* di HEPES.

Spaziando sulla superficie del supporto metallico si possono trovare regioni in cui compaiono tracce di materiale talmente inconsistenti da restituire dei segnali molto deboli, ma esistono anche zone in cui la quantità di campione è sufficiente e lo spettro che si ottiene ha picchi con buone intensità tali da permetterne l'analisi, come nel caso riportato in figura 4.9 a confronto con il segnale misurato per HEPES.

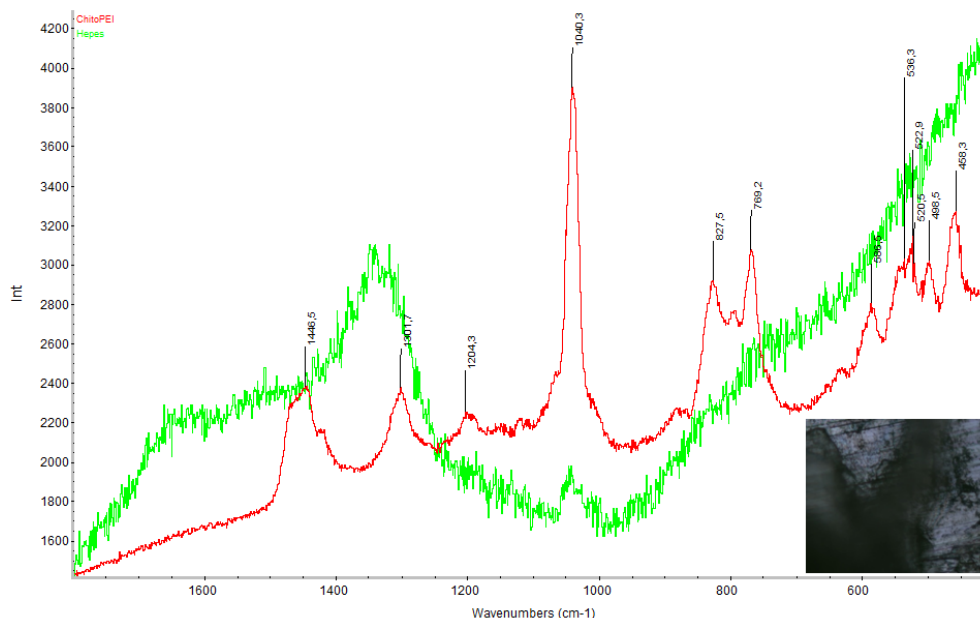


Figura 4.9. Spettro del chitosano-g-PEI (rosso) con l'immagine relativa alla zona irradiata dal laser a confronto con lo spettro dell'HEPES (verde).

Visti i risultati ricavati dagli spettri realizzati precedentemente su residui secchi di soluzioni di plasmide in solventi tamponanti, mi aspetto anche in questo caso che il segnale sia principalmente costituito da picchi Raman caratteristici del *buffer*, come già sembra dallo spettro registrato per l'HEPES in soluzione acquosa, il quale ha una buona componente legata al rumore, ma picchi a 1040 e 1300  $\text{cm}^{-1}$  come per i segnali del corrispettivo plasmide e copolimero. Accosto, quindi, i segnali registrati per plasmide e chitosano-g-PEI entrambi in HEPES (vedi figura 4.10).

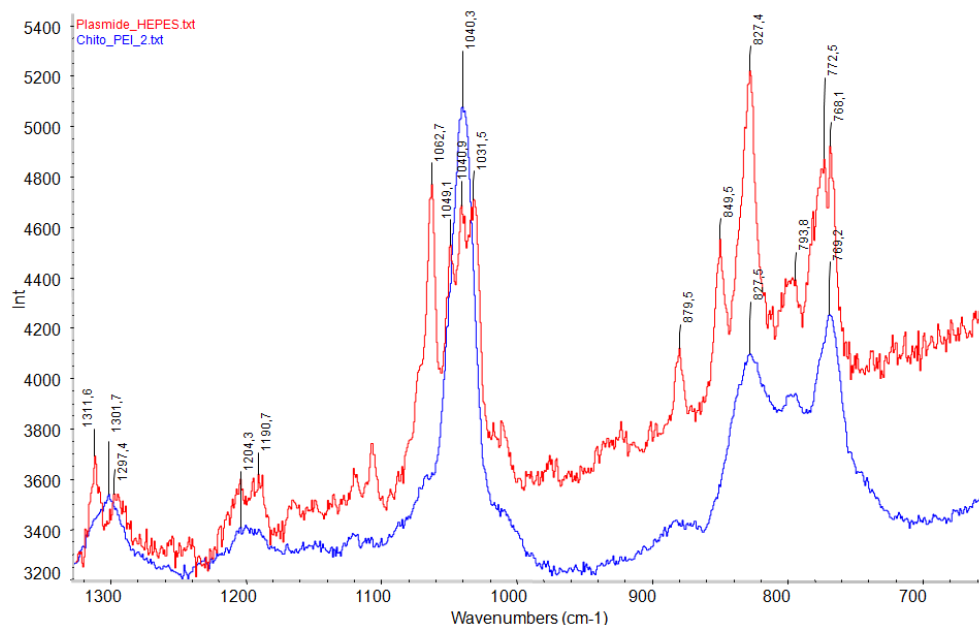


Figura 4.10. Confronto tra gli spettri di campioni in soluzione tampone di HEPES di plasmide (rosso) e chitosano-g-PEI in HEPES (blu). Si può notare come tra i due esista una corrispondenza tra la distribuzione dei picchi nell'intervallo di frequenza considerato.

Osservando i due spettri, si può individuare corrispondenza tra i numeri d'onda e la forma dei tre picchi attorno a  $800\text{ cm}^{-1}$  (rispettivamente a circa  $770$ ,  $795$  e  $830\text{ cm}^{-1}$  circa) e le tre successive bande prossime a  $1040$ ,  $1200$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$ . La conclusione che se ne trae è che tali picchi sono caratteristici del *buffer* HEPES e che il segnale della molecola (nei due casi, plasmide e copolimero) sia coperto per la sua debole intensità.

A partire dall'analisi condotta sugli spettri dei campioni disidratati, si può ragionevolmente riassumere che i segnali prodotti dalle molecole di plasmide o polimero cationico in soluzione sono molto deboli, per cui i picchi più intensi che si osservano sono attribuibili ai *buffers*. Questa conclusione si spiega proprio tramite il confronto eseguito: poiché tra campioni identici in *buffers* diversi non si osservano corrispondenze di massima nella posizione dei picchi e, viceversa, c'è analogia tra gli spettri Raman di materiali differenti posti nella medesima soluzione tampone. Si conclude che i segnali Raman sono dovuti pressoché interamente alle molecole di TrisEDTA ed HEPES.

#### 4.2. Campioni in soluzione

L'indagine Raman è stata condotta successivamente su campioni di *calf thymus* DNA in soluzione di acqua deionizzata e chitosano-g-PEI in HEPES.



#### 4.2.1. Soluzione di chitosano-g-PEI in HEPES

Per le misure Raman su chitosano-g-PEI in soluzione è stata scelta la sorgente a ioni  $Ar^+$  avente lunghezza d'onda di 514 nm (colore verde). Il fascio luminoso prodotto è controllato in potenza (valore massimo alla sorgente 2 W) attraverso un pannello di interfaccia con l'utente. Prima di raggiungere lo spettrometro, il fascio è focalizzato attraverso alcuni specchi posizionati opportunamente all'esterno sul banco di lavoro. Il filtro scelto per questa lunghezza d'onda è di tipo *edge*, e va eseguita la usuale calibrazione con l'intento di abbattere il segnale Rayleigh. In questo caso come porta-campione si adottano dei tubi NMR (vedi figura 4.11) nei quali porre il materiale allo stato liquido. Tali tubi sono posti perpendicolarmente rispetto alla radiazione incidente, così da minimizzare la porzione di vetro vista dal fascio nel suo percorso.



Figura 4.11. Tubi NMR nella confezione da 50 pezzi separati dai tappi (a sinistra) e immagine dell'oggetto assemblato (a destra). I tubi NMR utilizzati hanno diametro nominale di 5 mm, spessore della parete in vetro di borosilicato di 0.4 mm e lunghezza di 178 mm. [www.spectra2000.it]

In tabella 4.5 sono riportati i parametri relativi alle misure effettuate.

chitosano-g-PEI 1 (sln)	potenza	200 mW	obiettivo	10X	sec acquisizione	100
	freq.misura	200-1800 $cm^{-1}$	hole	300 $\mu m$	medie	10
chitosano-g-PEI 2 (sln)	potenza	100 mW	obiettivo	20X	sec acquisizione	100
	freq.misura	200-1800 $cm^{-1}$	hole	500 $\mu m$	medie	8

Tabella 4.5. Misure raccolte per soluzione di chitosano-g-PEI in HEPES. Mentre per la sorgente laser di luce rossa l'ampiezza della finestra spettrale ha un valore intorno ai 600  $cm^{-1}$ , per luce con lunghezza d'onda di 514 nm essa è più larga, fino a 1400  $cm^{-1}$ .

Pur avendo ricercato le condizioni sperimentali migliori ottimizzando l'illuminazione del campione, e assumendo tempi di acquisizione e numero di medie piuttosto elevati per poter

eliminare quanto possibile il contributo del rumore, i segnali ottenuti presentano un'intensità trascurabile rispetto alla linea di fondo dello spettro e non sono perciò riportati.

#### 4.2.2. DNA di calf thymus in acqua deionizzata

Il DNA di *calf thymus* utilizzato durante la fase sperimentale della tesi è un prodotto liofilizzato in polvere, che è stato portato alla concentrazione desiderata (1.575 µg/µl) per aggiunta di acqua deionizzata. La soluzione appare limpida e non viscosa. Le prove sono state effettuate utilizzando le tre sorgenti a disposizione dello strumento: quella a ioni Ar<sup>+</sup> (lunghezze d'onda di 457.9 nm e 514 nm) e il diodo laser a 785 nm.

La luce avente lunghezza d'onda di 457.9 nm è regolata in potenza dallo stesso pannello utilizzato per quella verde a 514 nm e segue anch'essa una parte del cammino ottico all'esterno prima di raggiungere lo spettrometro dispersivo Raman. Nelle misure effettuate, il fascio luminoso non viene attenuato (filtro D0 e potenza 200 mW) prima di colpire il campione, il reticolo di diffrazione scelto è di 1800 righe/mm, l'*hole* è fissato a 500 µm con un obiettivo del microscopio di 10X per massimizzare l'area di raccolta.

prova 1	freq.misura	600-1400 cm <sup>-1</sup>	sec acquisizione	200
	substrato	dischetto Al	medie	4
prova 2	freq.misura	300-1100 cm <sup>-1</sup>	sec acquisizione	200
	substrato	dischetto Al	medie	5
prova 3	freq.misura	900-1700 cm <sup>-1</sup>	sec acquisizione	200
	substrato	dischetto Al	medie	6
prova 4	freq.misura	500-1300 cm <sup>-1</sup>	sec acquisizione	300
	substrato	capillare verticale	medie	6
prova 5	freq.misura	1100-1900 cm <sup>-1</sup>	sec acquisizione	300
	substrato	capillare verticale	medie	6

Tabella 4.6. Serie di spettri realizzati con sorgente avente lunghezza d'onda di 457.9 nm in diverse condizioni. Filtro D0, *hole* 500 µm, obiettivo 10X.

Gli spettri ottenuti a 457.9 nm non sono mostrati poiché non hanno picchi caratteristici, ma solo un fondo piuttosto lineare con rumore uniformemente sovrapposto.

È stata considerata allora l'analisi Raman con eccitatrice verde (514 nm) secondo lo schema di tabella 4.7; la soluzione di *calf thymus* è stata studiata in due concentrazioni differenti: 1.575 µg/µl e 3\*1.575 µg/µl (ottenuta concentrando un volume di 1.5 ml di questa soluzione con una pompa ad acqua, in maniera tale da ottenere un volume finale pari ad un terzo rispetto a quello iniziale). Gli spettri sono stati realizzati utilizzando il supporto in alluminio descritto per le misure di campioni disidratati, sul quale è stata

depositata una goccia di soluzione. Il raggio luminoso viene focalizzato all'interfaccia tra l'aria e la superficie liquida, tenendo conto nel fissare il tempo della misura dell'abbassamento in direzione z dovuto all'evaporazione del solvente (acqua).

prova 1	potenza	50 mW	obiettivo	10X	sec acquisizione	200
	freq.misura	400-1600 $\text{cm}^{-1}$	substrato	Al	medie	7
prova 2	potenza	50 mW	obiettivo	20X	sec acquisizione	200
	freq.misura	400-1600 $\text{cm}^{-1}$	substrato	Al	medie	10
prova 3	potenza	50 mW	obiettivo	20X	sec acquisizione	200
	freq.misura	2600-3400 $\text{cm}^{-1}$	substrato	Al	medie	10
prova 4 conc	potenza	200 mW	obiettivo	20X	sec acquisizione	200
	freq.misura	400-1600 $\text{cm}^{-1}$	substrato	Al	medie	10
prova 5 conc	potenza	200 mW	obiettivo	10X	sec acquisizione	200
	freq.misura	400-1600 $\text{cm}^{-1}$	substrato	Al	medie	10
prova 6 conc	potenza	200 mW	obiettivo	4X	sec acquisizione	100
	freq.misura	400-1600 $\text{cm}^{-1}$	substrato	capillare	medie	10
prova 7 conc	potenza	200 mW	obiettivo	4X	sec acquisizione	100
	freq.misura	400-1600 $\text{cm}^{-1}$	substrato	capillare	medie	10

Tabella 4.7. Elenco delle misure effettuate con sorgente avente lunghezza d'onda di 514nm. L'abbreviazione "conc" nel nome dato agli spettri indica quelle soluzioni di DNA ottenute concentrando il volume a un terzo rispetto a quello iniziale, avente una concentrazione pari a 1.575  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Hole 500  $\mu\text{m}$ .

Osservando lo spettro più significativo ottenuto nel *range* di frequenza compreso tra 400  $\text{cm}^{-1}$  e 2000  $\text{cm}^{-1}$  (figura 4.12), si possono individuare alcuni picchi attribuibili al DNA, pur in presenza ancora di un forte segnale di fondo.

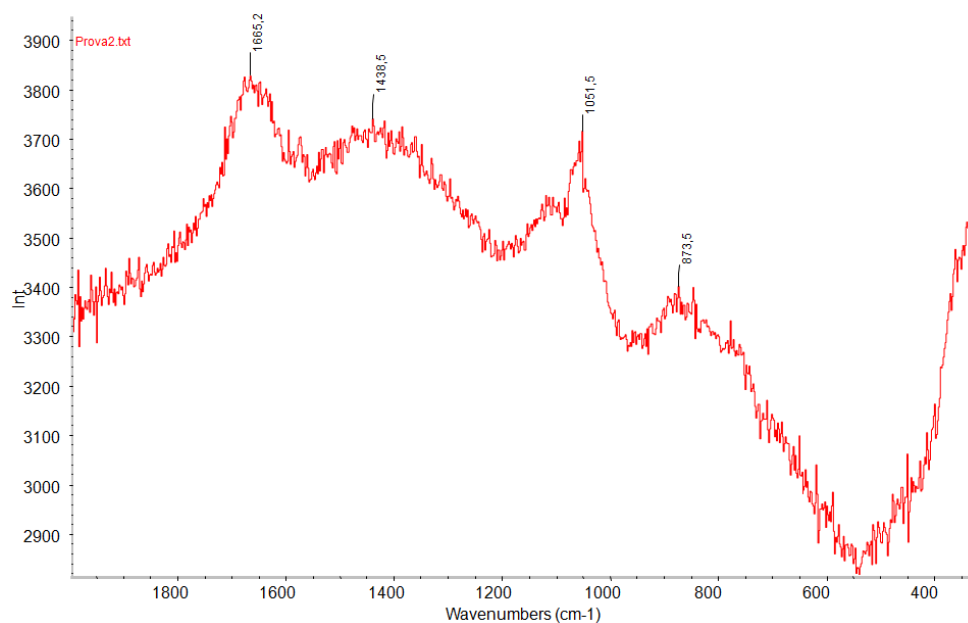


Figura 4.12. Spettro di DNA di *calf thymus* in soluzione acquosa di 1.575  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Lo spettro di figura 4.12 mostra dei segnali Raman allargati in regioni spettrali vicine a quelle attese per il DNA (si veda il confronto con i dati di Prescott riportato all'inizio del capitolo). Probabilmente l'interazione tra DNA e acqua è all'origine delle differenze tra gli spettri del DNA in fibra e in soluzione.

L'ultimo gruppo di misure (tabella 4.8) è stato effettuato con laser a 785 nm fissando l'*hole* a 500  $\mu\text{m}$  e l'obiettivo del microscopio a 10X. La qualità degli spettri Raman raccolti è analoga a quelli riportati precedentemente (figura 4.12).

prova 1	potenza	200 mW	sec acquisizione	200
	freq.misura	400-1800 $\text{cm}^{-1}$	medie	10
prova 2	potenza	200 mW	sec acquisizione	200
	freq.misura	400-1800 $\text{cm}^{-1}$	medie	10
prova 3	potenza	200 mW	sec acquisizione	200
	freq.misura	1200-600 $\text{cm}^{-1}$	medie	7
prova 4	potenza	200 mW	sec acquisizione	200
	freq.misura	1300-1900 $\text{cm}^{-1}$	medie	10
prova 5 conc	potenza	200 mW	sec acquisizione	200
	freq.misura	900-1500 $\text{cm}^{-1}$	medie	10

Tabella 4.8. Serie di misure realizzate con diodo laser come sorgente, depositando una goccia di soluzione di DNA di *calif thymus* sul supporto circolare in alluminio. L'abbreviazione "conc" ha lo stesso significato della tabella precedente. *Hole* 500  $\mu\text{m}$ , obiettivo 10X.

I risultati riportati in questo capitolo circa le misure effettuate con la spettroscopia Raman dimostrano la non idoneità di tale strumento applicato ai campioni biologici per concentrazioni usuali da un punto di vista biochimico. Pur escludendo i solventi diversi dall'acqua, caratterizzati da un intenso segnale di *scattering* Raman dei fotoni, non siamo in grado di ottenere il profilo spettrale caratteristico della molecola in esame per concentrazioni inferiori a quelle della sostanza pura (esempio DNA in fibre). Nel caso del copolimero non siamo riusciti a registrare nessuna misura e di conseguenza ad individuare alcuna banda. Per il DNA, utilizzando le diverse eccitatrici e la massima potenza, osserviamo poche bande. La più sensibile al Raman è quella relativa allo *stretching* del legame CO del *backbone* furanoso della molecola.

## Capitolo 5

### Misure IR

Avendo constatato la limitata quantità di informazioni ricavabili dagli spettri Raman dei complessi considerati, abbiamo deciso di utilizzare la spettroscopia IR. Prima di studiare le molecole effettivamente coinvolte nella trasfezione seguendo anche studi di letteratura (Marty, 2009; Mislick, 1995; Reschel, 2002), è stato proposto il dietil fosfato (DEP) come modello per lo studio del comportamento del gruppo fosfato ( $\text{PO}_2^-$ ) di un nucleotide dell'acido deossiribonucleico a partire da un lavoro di Guan (1996). Successivamente sono stati osservati gli spettri della componente genomica e dei vettori polimerici presi singolarmente, a partire da concentrazioni elevate per individuare i picchi caratteristici definibili come *markers*, confrontati rispettivamente con le assegnazioni fatte da Banyay (2002) per il DNA e da Amaral (2005) e York (2003) per i polimeri. Infine, abbiamo considerato il comportamento di tali segnali IR dei complessi di DNA e polimero per evidenziare possibili andamenti caratteristici che possano descrivere l'interazione DNA/polimero.

Nei paragrafi seguenti vedremo che gli spettri ottenuti con spettroscopia IR ci permetteranno di fare alcune considerazioni sui campioni esaminati al variare delle condizioni sperimentali. Il maggiore problema incontrato è quello di dover lavorare con valori di concentrazione molto piccoli, secondo quanto richiesto dall'applicazione alla trasfezione. Possiamo anticipare che non sarà immediato individuare *trends* nei risultati ottenuti procedendo a concentrazioni via via decrescenti.

#### 5.1. DEP [Guan (1996), Guan (1996), Leach (2001), Saenger (1985), Schneider (1996)]

Il DNA è composto da una serie di acidi nucleici aventi flessibilità dipendente dalle condizioni fisiologiche al contorno. Utilizzando la descrizione di Saenger (1985), il *backbone* è definito dalla sequenza degli atomi ( $\text{P-O}5'-\text{C}5'-\text{C}4'-\text{C}3'-\text{O}3'-\text{PO}_2^-$ ) e dei sei

angoli torsionali indentificati dalla sequenza dei loro legami ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\zeta$ ). Si rimanda allo schema della struttura riportato in figura 5.1 per la rappresentazione del *backbone*.

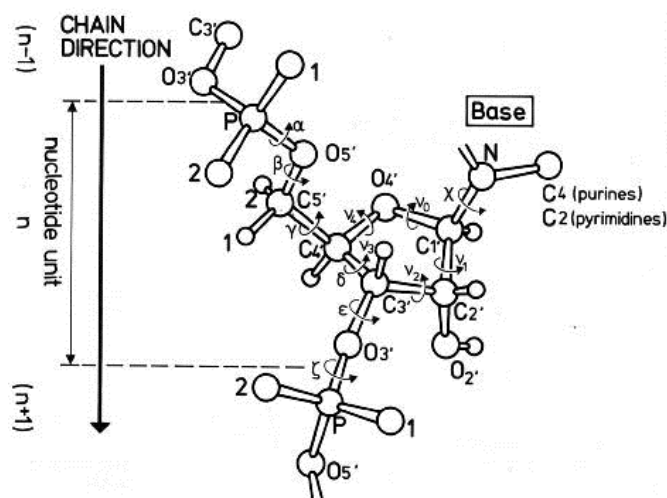


Figura 5.1. Schema della struttura del DNA in cui è evidenziata un'unità nucleotidica, dove la sequenza degli atomi del *backbone* è (P-O5'-C5'-C4'-C3'-O3'-PO<sub>2</sub><sup>-</sup>), e gli angoli torsionali sono indicati con lettere greche. [Saenger (1985)]

In un lavoro di Guan et al. (1996) il dietil fosfato (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>PO<sub>2</sub> è stato proposto come modello del gruppo PO<sub>2</sub><sup>-</sup> per analogia con la struttura nell'intorno del gruppo fosfato di un acido nucleico (vedi figura 5.2). In questi studi, si è tentato di determinare la frequenza delle bande *marker* relative al gruppo fosfato, e di altri picchi caratteristici del *backbone* in relazione al ruolo degli angoli torsionali  $\alpha$ ,  $\zeta$ , e  $\beta$  ed  $\epsilon$ . Tali angoli sono stati assegnati in base alla corrispondenza tra la molecola DEP e il *backbone* della catena nucleotidica.

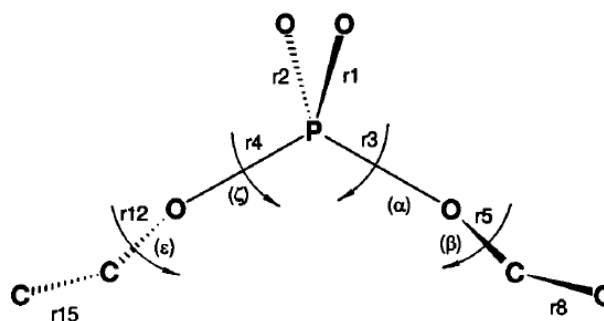


Figura 5.2. Struttura chimica della molecola di DEP, con l'indicazione degli angoli torsionali. I legami tra gli atomi sono indicati con "r#" dove # rappresenta il numero d'ordine assegnato. [Guan (1996)]

A partire da queste ipotesi, il lavoro condotto dal gruppo di Guan ha esaminato la molecola attraverso metodi quanto-chimici, e ha proseguito con il confronto con i risultati ottenuti sperimentalmente mediante spettroscopia IR. Per la modellistica molecolare Guan ha utilizzato un metodo appartenente alla categoria *ab initio*. A differenza dei metodi semi-empirici, quelli *ab initio* risolvono l'equazione di Schrödinger (che descrive le molecole utilizzando le funzioni d'onda) con approssimazioni matematiche, senza introdurre parametri sperimentali. Appartiene a questa classe il metodo di Hartree-Fock, impiegato da Guan e colleghi, il quale stima le grandezze fisiche e le proprietà chimiche del sistema, simulato in termini quantistici. Determinate in questo modo le frequenze teoriche di vibrazione del DEP, in linea di massima si sono ottenuti valori simili o poco diversi da quelli osservati negli spettri ottenuti sperimentalmente. In particolare, Guan ha rivolto l'attenzione ai segnali IR assegnati ai gruppi fosfati, per poter fare un confronto con le bande tipiche del DNA nelle tre configurazioni principali (A-DNA, B-DNA e Z-DNA). Innanzitutto sono stati distinti due gruppi di vibrazioni, rispettivamente associate allo *stretching* del fosfodiesterio OPO e del fosfodiossido  $\text{PO}_2^-$ . Dalle frequenze mostrate in tabella 5.1 si notano piccole variazioni per il gruppo  $\text{PO}_2^-$ , ma non per il gruppo fosfodiesterico. Quanto risultato è coerente col fatto che il gruppo  $\text{PO}_2^-$  nelle diverse molecole (DEP, A-DNA, etc.) è soggetto a piccole perturbazioni e mantiene sostanzialmente la sua identità chimica. Al contrario, il gruppo OPO è un costituente della sequenza di atomi del *backbone* e la sua dinamica vibrazionale risente maggiormente dell'intorno e delle differenze di struttura.

DEP	A-DNA	B-DNA	Z-DNA	Assegnazione
754	807	790	745	$\nu_s(\text{OPO})$
816	-	834±5	810	$\nu_a(\text{OPO})$
1081	1099	1092	1095	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$
1213	-	-	-	$\nu_a(\text{PO}_2^-)$

Tabella 5.1. Frequenze di *stretching* simmetrico e antisimmetrico dei gruppi fosfati per il DEP e per il DNA nelle tre configurazioni. Manca il valore dello *stretching* antisimmetrico del fosfodiesterio poiché ha un assorbimento IR associato troppo poco intenso per cui la banda non risulta osservabile nello spettro. I valori della vibrazione asimmetrica del  $\text{PO}_2^-$  non sono riportati, secondo l'articolo citato, per sovrapposizione con altre bande IR negli spettri sperimentali. [Guan (1996)]

Nell'analisi vibrazionale *ab initio* di DEP i calcoli sono stati eseguiti considerando la configurazione di minima energia potenziale della molecola, definita *trans-gauche-gauche-trans* (*t-g-g-t*) (la stessa disegnata nella figura 5.2, che fa riferimento all'orientamento degli angoli diedri presi da sinistra verso destra). Abbiamo esaminato per questo lavoro di tesi un'assegnazione dei modi vibrazionali per la molecola (nelle due configurazioni *t-g-g-t* e quasi *t-t-t-t*) utilizzando metodi quanto-chimici. Tali simulazioni DFT (*Density Functional Theory*) ci hanno permesso di verificare in modo diretto l'attribuzione dei picchi relativi allo *stretching* simmetrico e antisimmetrico del gruppo  $\text{PO}_2^-$  e hanno evidenziato effetti di *coupling* con vibrazioni di *bending* dei gruppi  $\text{CH}_2$  limitrofi che possono spiegare le ragioni dinamiche della sensibilità di questi *markers* alla configurazione del *backbone*.

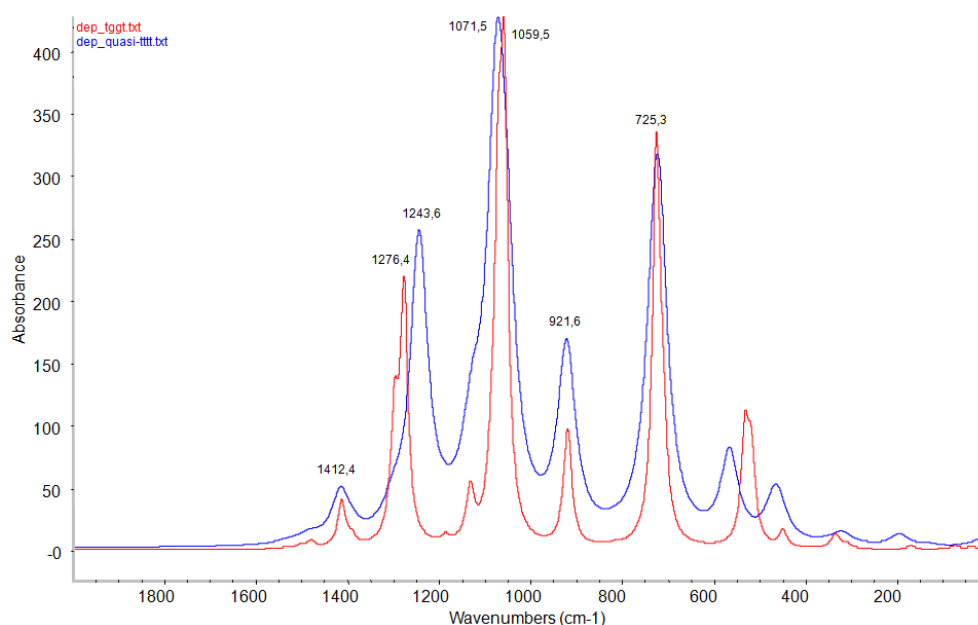


Figura 5.3. Confronto tra gli spettri ottenuti con metodo DFT da DEP in configurazione *t-g-g-t* (rosso) e quasi *t-t-t-t* (blu), quest'ultima così definita perché la conformazione della molecola determinata attraverso i calcoli è prossima a quella di una catena transplanare.

Abbiamo quindi utilizzato la spettroscopia IR per misurare gli spettri di campioni di DEP e poterli confrontare con quelli di figura 5.3, con l'obiettivo di verificare l'attribuzione fatta dai segnali *marker* del gruppo fosfato.



Il DEP iniziale era in forma liquida, con densità di  $1.29 \text{ g/cm}^3$ , massa molecolare di  $154.1 \text{ g/mol}$  e concentrazione  $8.4 \text{ M}$ . Vista la scarsità d'acqua presente, le misure realizzate sul campione puro sono state effettuate sia con finestre in KBr che  $\text{CaF}_2$ , anche se con queste ultime il segnale ha raggiunto la saturazione ed è apparso tagliato negli spettri riportati nel medesimo grafico per un confronto in figura 5.4.

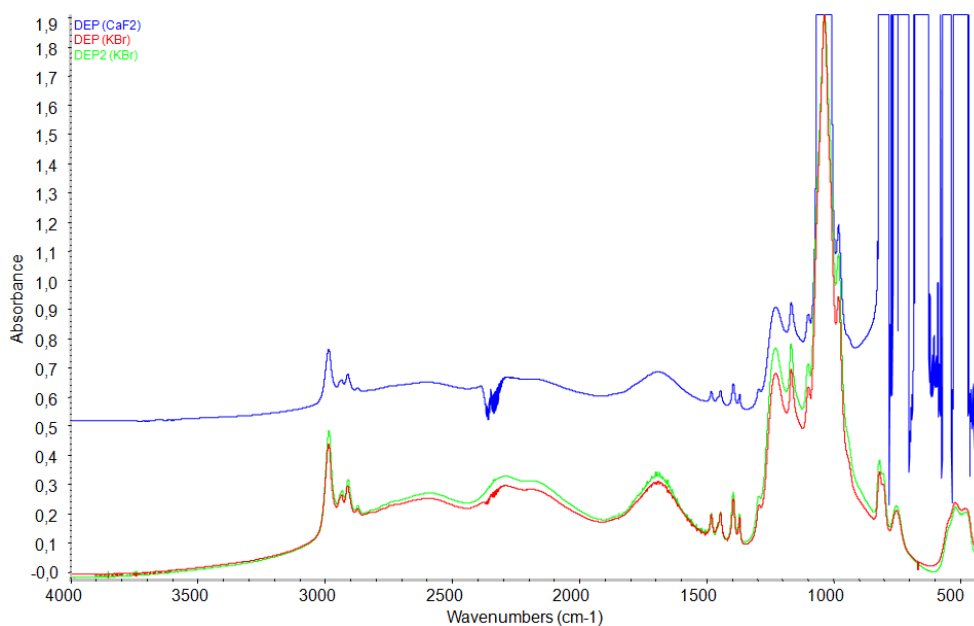


Figura 5.4. Confronto tra gli spettri realizzati con DEP puro ( $8.4 \text{ M}$ ) con finestre in KBr (rosso e verde) e in  $\text{CaF}_2$ . Si nota che nello spettro di colore blu il segnale ha raggiunto la saturazione alle basse frequenze e per il picco ad intensità più elevata attorno a  $1350 \text{ cm}^{-1}$ .

Osservando gli spettri, essi appaiono praticamente privi di rumore; la quantità d'acqua era molto bassa da non ostacolare la misura. Inoltre la concentrazione molare del DEP nel liquido puro è risultata così elevata da fornire assorbanze molto intense. La cella di fluorite ha prodotto un taglio alle basse frequenze ( $< 900 \text{ cm}^{-1}$ ) e il segnale è stato perciò saturato in tale *range*. Si può verificare una ragionevole corrispondenza in frequenza tra lo spettro determinato empiricamente e i modelli realizzati con metodo DFT per le configurazioni scelte di tipo *t-g-g-t* e quasi *t-t-t-t* (figura 5.5).

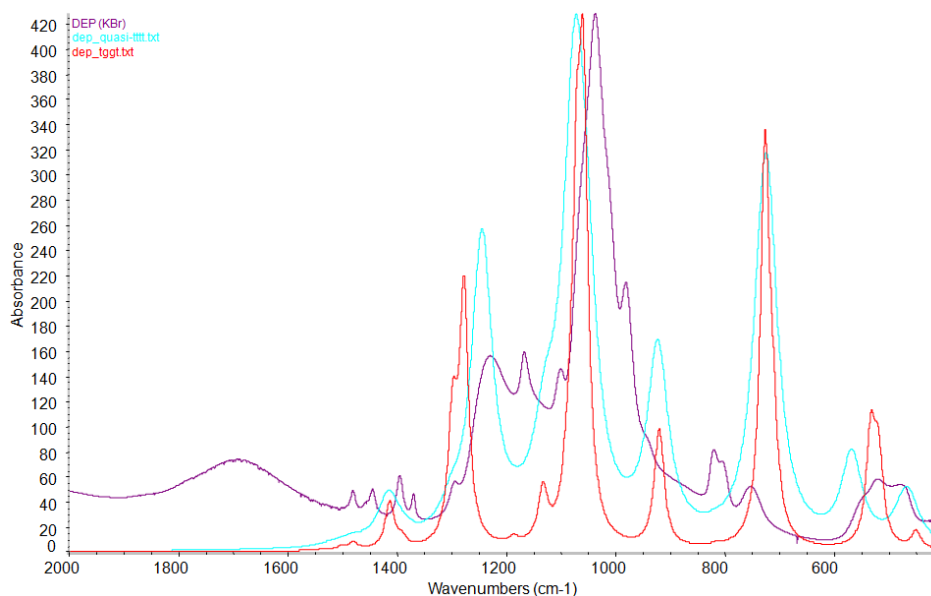


Figura 5.5. Confronto tra gli spettri ottenuti dal modello computazionale (*t-g-g-t* in rosso e *quasi-t-t-t* in ciano) e quello misurato con spettrofotometro IR.

Si può constatare come non ci siano corrispondenze perfette, ma un generale *shift* delle bande principali e non siano mantenuti i valori di intensità. Tale fatto è imponente alle semplificazioni che sono state fatte nel modello DFT che non considerano effetti conformazionali in modo completo né interazioni intermolecolari.

Per considerare condizioni sperimentali più vicine a quelle utili per la biologia abbiamo diluito il campione di DEP in acqua a diversi valori di concentrazione (vedi tabella 5.2). Il campione di dietil fosfato è stato portato fino ad una concentrazione di tre ordini di grandezza inferiore rispetto a quella iniziale pari a 8.4 M. Le misure effettuate sono elencate in tabella 5.2, e hanno concentrazioni crescenti, fino all'individuazione di un segnale interessante visibile sopra il rumore.

MOLECOLA	CONCENTRAZIONE	SPACER	NR. SCANSIONI	RESLN
DEP	1 mM	.015	256 sc	resln 1
DEP	3 mM	.015	256 sc	resln 1
DEP	3 mM	.006	256 sc	resln 1
DEP	3 mM	.015	256 sc	resln 1
DEP	5 mM	.006	256 sc	resln 1
DEP	5 mM	.006	256 sc	resln 1
DEP	5 mM	.006	256 sc	resln 1
DEP	5 mM	.025	256 sc	resln 1
DEP	5 mM	.056	256 sc	resln 1
DEP	15 mM	.025	128 sc	resln 1
DEP	20 mM	.025	128 sc	resln 1

Tabella 5.2. Elenco delle misure effettuate per soluzioni di DEP con concentrazioni differenti.

Gli spettri di DEP realizzati a basse concentrazioni (1-3 mM) hanno mostrato intensità di segnale molto basse, per cui si può dedurre che, cambiando le condizioni al contorno a seguito di interazioni a carico del DEP, non si riuscirebbero ad apprezzare eventuali variazioni negli spettri. In figura 5.6 è riportato il confronto tra gli spettri nell'intervallo di frequenze di nostro interesse (circa 900-1400  $\text{cm}^{-1}$ ), ottenuti per i restanti campioni a concentrazioni più elevate, e registrati con un medesimo spaziatore da 0.025 mm. Essendo riportate in *common scale*, è stato osservato un andamento crescente delle intensità delle bande proporzionale al contenuto di DEP nelle soluzioni.

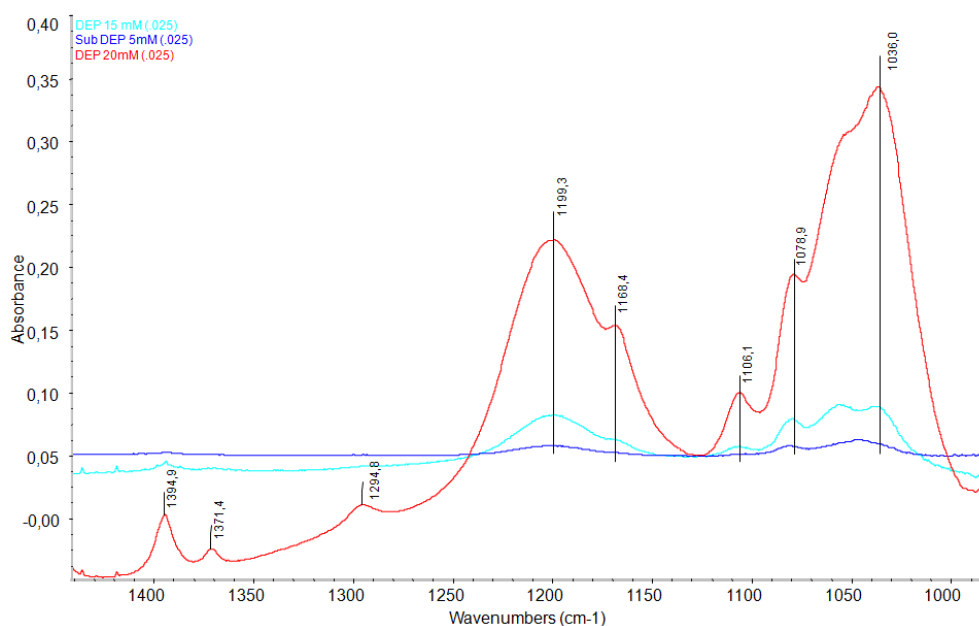


Figura 5.6. Confronto tra gli spettri di DEP in soluzioni con concentrazione di 5 mM (blu), 15 mM (ciano) e 20 mM (rosso), riportate in *common scale*. *Spacer* 0.025 mm.

Trascurando le soluzioni a basse concentrazioni, è stato misurato il pH dei campioni con indicatori su strisce di carta, dette tornasole. Queste cartine al tornasole possono essere universali (vedi figura 5.7) o ridotte ad un determinato *range* di pH: la variazione di colore è correlata ad una determinata scala di pH, il quale viene attribuito alla soluzione in esame per confronto visivo con la scala di riferimento.



Figura 5.7. Indicatore a cartina tornasole di tipo universale, cioè sull'intero intervallo di variazione di pH (1-14). [www.chimicare.org]

Le soluzioni a 5 mM, 15 mM e 20 mM hanno assunto rispettivamente i seguenti valori di pH: 3.0, 2.5 e 1.0. Ciò significa che in acqua il DEP si è deprotonato quasi completamente. Per studiare l'effetto dell'interazione del gruppo  $\text{PO}_2^-$  con cationi (in vista dello studio dell'interazione DNA/vettori cationici) abbiamo effettuato l'aggiunta di ioni ammonio o sodio a queste soluzioni di DEP. Tale aggiunta è realizzata con soluzioni basiche di NaOH e  $\text{NH}_4^+\text{OH}^-$ .

Il primo esperimento è stato effettuato aggiungendo al DEP 5 mM una base forte, l'idrossido di sodio (NaOH) in concentrazioni crescenti, scegliendo i parametri come riportati in tabella 5.3.

nome sln	DEP_NaOH 0.0269 M	DEP_NaOH 0.269 M
$[\text{NaOH}]_0$	0.0269 M	0.269 M
$[\text{DEP}]_0$	5 mM	5 mM
$V_{\text{NaOH}}$	0.1 ml	0.1 ml
$V_{\text{DEP}}$	3 ml	3 ml
$\text{pH}_{\text{sln}}$	3.5	5.2

Tabella 5.3. Parametri relativi alle due soluzioni preparate aggiungendo a 3 ml di DEP 5 mM, 0.1 ml di NaOH rispettivamente 0.0269 e 0.269 M.

In figura 5.8 sono stati riportati gli spettri relativi alle soluzioni di DEP e NaOH, preparate come indicato in tabella 5.3.

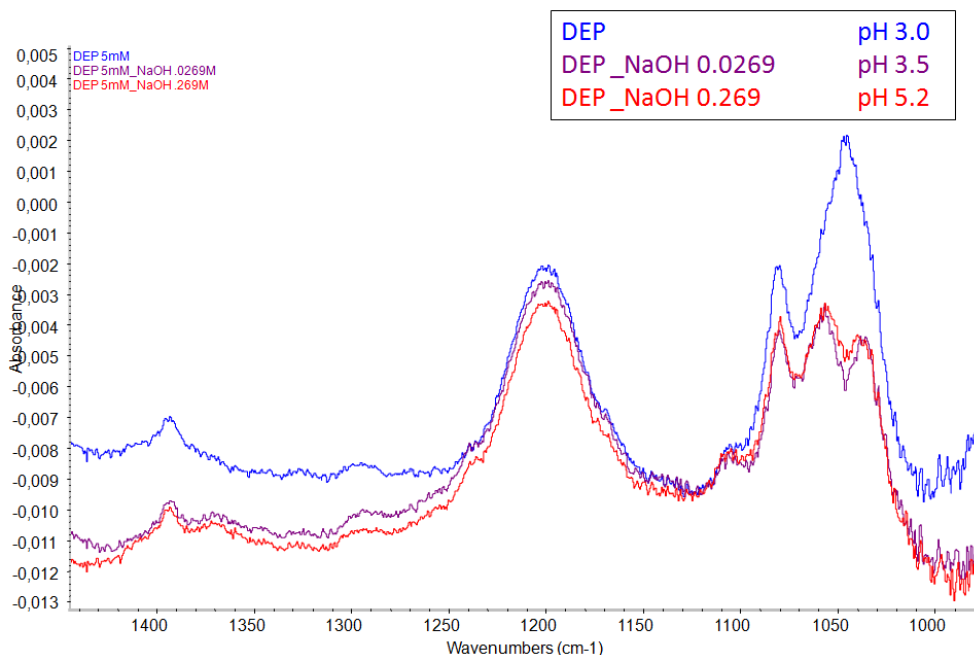


Figura 5.8. Spettri di DEP 5 mM da solo (blu) e in soluzione con concentrazioni crescenti di una base forte, NaOH, rispettivamente 0.0269 M (viola), e 0.269 M (rosso). In alto a destra sono riportati i valori di pH. Common scale, spacer 0.025 mm.

Considerando i risultati ottenuti, notiamo una certa analogia tra gli spettri in presenza di NaOH. Facendo il confronto con lo spettro della molecola di DEP in soluzione acquosa, cambia invece il profilo delle bande attorno a  $1050\text{ cm}^{-1}$  e il rapporto di intensità tra i picchi di *stretching* simmetrico e antisimmetrico del  $\text{PO}_2^-$ .

In seguito abbiamo utilizzato soluzioni acquose di ammoniaca ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) per modificare l'interazione del gruppo fosfato del DEP con un diverso catione ( $\text{NH}_4^+$ ). L'ammoniaca, una base di tipo debole, è stata presa con concentrazione iniziale di 0.76 M e aggiunta al DEP nelle tre concentrazioni di 5, 15 e 20 mM, come riportato in tabella 5.4. Si può osservare che la tabella è stata divisa in tre parti, diverse per la concentrazione di DEP iniziale e le soluzioni sono state preparate variando il numero di moli di  $\text{NH}_4\text{OH}$  di partenza (0.76 M).

mol DEP (5 mM)	mol $\text{NH}_4\text{OH}$ (0.76 M)	pH	mol DEP (15 mM)	mol $\text{NH}_4\text{OH}$ (0.76 M)	pH	mol DEP (20 mM)	mol $\text{NH}_4\text{OH}$ (0.76 M)	pH
5 $\mu\text{mol}$	1 $\mu\text{mol}$	3.5	3 $\mu\text{mol}$	3 $\mu\text{mol}$	4.0	4 $\mu\text{mol}$	4 $\mu\text{mol}$	4.5
5 $\mu\text{mol}$	3 $\mu\text{mol}$	4.5	3 $\mu\text{mol}$	9 $\mu\text{mol}$	9.0	4 $\mu\text{mol}$	12 $\mu\text{mol}$	9.5
5 $\mu\text{mol}$	5 $\mu\text{mol}$	6.1	3 $\mu\text{mol}$	15 $\mu\text{mol}$	10.0	4 $\mu\text{mol}$	20 $\mu\text{mol}$	11.0
5 $\mu\text{mol}$	10 $\mu\text{mol}$	8.7	3 $\mu\text{mol}$	30 $\mu\text{mol}$	12.0	4 $\mu\text{mol}$	40 $\mu\text{mol}$	12.0

Tabella 5.4. Indice delle soluzioni preparate con DEP in quantità molarie differenti, crescenti verso destra, e numero di moli di  $\text{NH}_4\text{OH}$  crescenti verso il basso. Nella terza colonna di ciascun gruppo è riportato il pH misurato.

Per ciascuna soluzione è stato raccolto il relativo spettro, utilizzando sempre il compartimento principale dello strumento, le due finestre in fluorite come supporto per i campioni e spaziatore avente spessore di 0.025 mm. In tutte e tre le serie di misure è rimasto stabile il valore in frequenza dei picchi individuati in accordo con quelli del DEP, ma non la loro intensità relativa, che non ha mantenuto neanche un andamento monotono, ma oscillante, in funzione della concentrazione di  $\text{NH}_4\text{OH}$ . In figura 5.9 sono riportati gli spettri rappresentativi degli esperimenti di interazione DEP/ammonio.

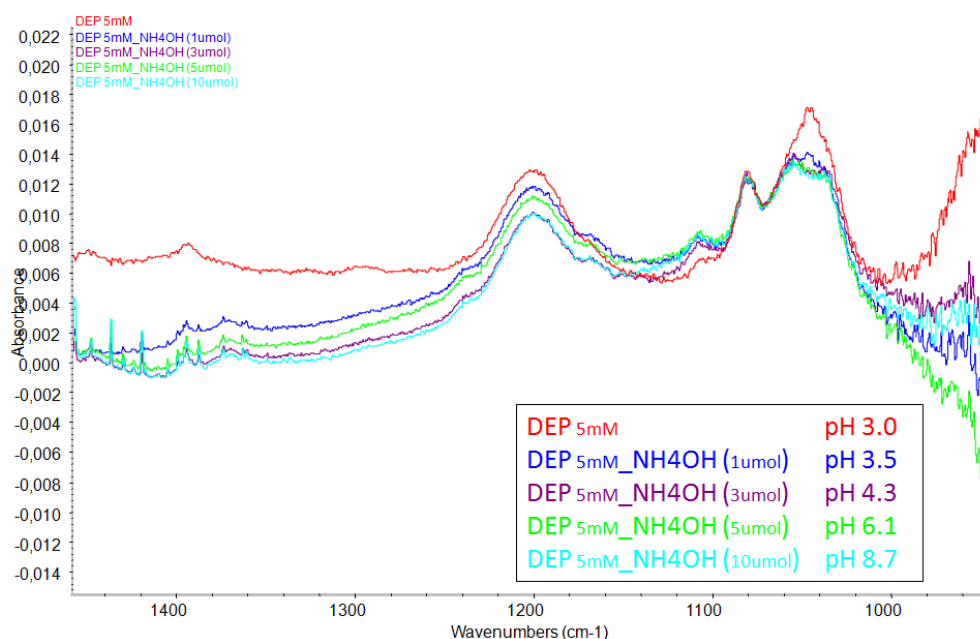


Figura 5.9. Confronto tra lo spettro di DEP 5mM da solo in soluzione acquosa (rosso) e con l'aggiunta di 1  $\mu\text{mol}$  (blu), 3  $\mu\text{mol}$  (viola), 5  $\mu\text{mol}$  (verde) e 10  $\mu\text{mol}$  (ciano) di  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.76 M. Normalizzazione sul picco di *stretching* simmetrico del  $\text{PO}_2^-$  a  $1050\text{ cm}^{-1}$  circa, *spacer* 0.025 mm.

Nell'intento di analizzare meglio il *trend* delle intensità delle bande relative al dietil fosfato interagente con ammonio, è stata disidratata con pompa ad acqua una goccia di ciascuna soluzione depositata su una finestra di  $\text{CaF}_2$ . L'idea era infatti quella che, privando il campione della componente acquosa, si sarebbero forzate le molecole ad interagire e che questa interazione indotta per soluzioni con quantità crescenti della base debole si sarebbe rilevata nel confronto tra gli spettri. I dati raccolti in questo caso hanno richiesto la sottrazione della *baseline*, diversa per ciascuno spettro, in modo da correggere gli errori che la linea di fondo provoca nel confronto tra i picchi. Per effettuare questo passaggio, gli spettri sono stati elaborati con il *software* Fityk, avente una specifica funzione che permette di disegnare e sottrarre la linea di base passante per alcuni punti posizionati

opportunamente dall'utente. L'obiettivo, non sempre realizzabile perfettamente, era quello di ottenere come risultato uno spettro con picchi aventi una *baseline* piatta. In figura 5.10 sono mostrati gli spettri a confronto dei campioni disidratati, normalizzati rispetto la banda a  $1050\text{ cm}^{-1}$ .

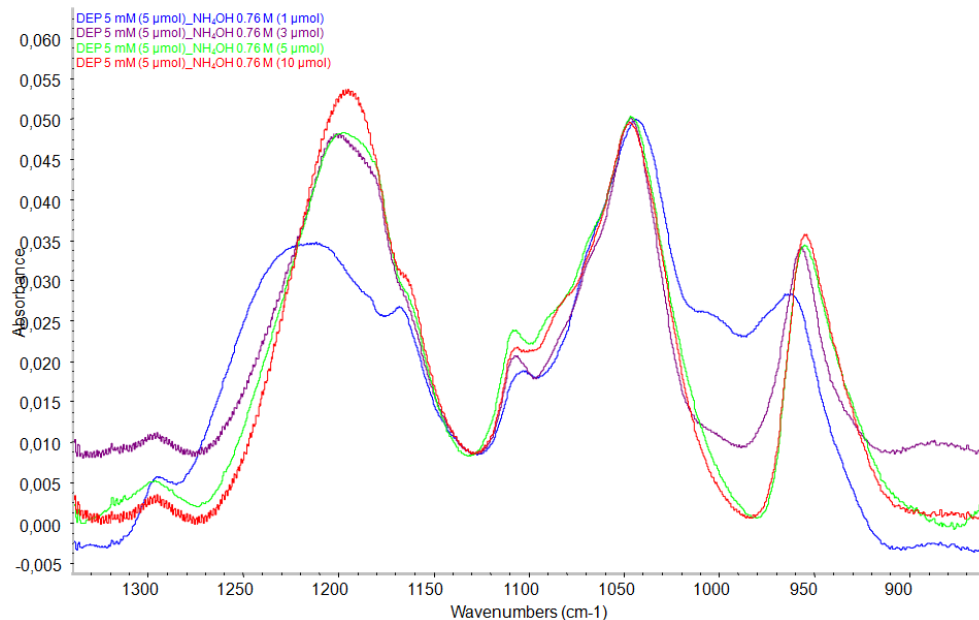


Figura 5.10. Confronto tra gli spettri delle soluzioni contenenti  $5\text{ }\mu\text{mol}$  di DEP  $5\text{ mM}$  e, rispettivamente,  $1\text{ }\mu\text{mol}$  (blu),  $3\text{ }\mu\text{mol}$  (viola),  $5\text{ }\mu\text{mol}$  (verde) e  $10\text{ }\mu\text{mol}$  (rosso) di  $\text{NH}_4\text{OH } 0.76\text{ M}$ . Normalizzazione sul picco di *stretching* simmetrico del  $\text{PO}_2^-$  a  $1050\text{ cm}^{-1}$  circa.

Osservando il picco prossimo a  $1200\text{ cm}^{-1}$  (attribuibile allo *stretching* antisimmetrico del  $\text{PO}_2^-$  secondo le assegnazioni dell'articolo di Guan citato all'inizio del paragrafo) ci si è accorti che l'intensità cresce proporzionalmente alla quantità di ammoniaca in soluzione, per cui si è effettivamente individuato il *trend* ricercato. Per quanto riguarda le frequenze delle bande caratteristiche, c'è un accordo con le considerazioni fatte nei lavori di Guan: mentre il picco relativo al modo vibrazionale di *stretching* simmetrico rimane pressoché ad un valore fissato, il contributo asimmetrico è più sensibile agli effetti di intorno e subisce uno *shift* progressivo verso le basse frequenze con l'aumentare della percentuale di ammoniaca.

Passiamo ora all'analisi spettroscopica della macromolecola di DNA per cui il dietil fosfato costituiva un modello più semplice.

5.2.DNA cromosomiale [Banyay (2003), Falk (1963), Matsui (2010), Popović (2005), Whelan (2011)]

Il DNA cromosomiale, presente nelle cellule animali, possiede la nota forma a doppia elica super-avvolta, già illustrata nel capitolo 3. Commercialmente è disponibile in vari pesi molecolari. In particolare, abbiamo considerato *calf thymus* DNA (ctDNA) e *sperm salmon* DNA (ssDNA), quest'ultimo costituito da sequenze nucleotidiche con un minor numero di basi, quindi con massa molecolare inferiore. Esaminiamo i due casi singolarmente.

5.2.1. Calf thymus DNA (ctDNA)

Innanzitutto, prima di procedere allo studio delle bande caratteristiche del materiale genomico, ci si occupa della scelta dei parametri migliori, in particolare quelli relativi al cammino ottico. L'intensità del segnale misurata in assorbanza è determinata dalla legge di Lambert-Beer  $A = \epsilon cl$ , dove  $\epsilon$  rappresenta il coefficiente di assorbimento molare (una costante tipica del campione),  $c$  la concentrazione della sostanza e  $l$  la lunghezza del cammino ottico. Secondo questa legge, per basse concentrazioni converrebbe scegliere idealmente uno spaziatore in teflon con spessore grande ed adeguato all'intensità del segnale che si vuole registrare. Di fatto, come si vede dalla figura 5.11, prendendo uno *spacer* più spesso la luce attraversa una quantità di soluzione maggiore e l'attenuazione data dal solvente (acqua) rende impossibile registrare il segnale del soluto. In funzione dello strumento utilizzato e della concentrazione del campione, esiste un valore ottimale del cammino ottico che massimizza il segnale del soluto rispetto al *background*. In tabella 5.5 è riportato l'elenco delle prove eseguite con vari spaziatori e in figura 5.11 un confronto tra le misure effettuate con spaziatori differenti.

MOLECOLA	CONCENTRAZIONE	SPACER	NR.SCANSIONI	RESLN
ctDNA	1.575 mg/ml	.006	64	1
ctDNA	4.725 mg/ml	.006	64	1
ctDNA	1.575 mg/ml	.015	256	1
ctDNA	4.725 mg/ml	.015	64	1
ctDNA	0.7875 mg/ml	.015	128	1
ctDNA	1.575 mg/ml	.025	256	1
ctDNA	1.575 mg/ml	.056	64	1
ctDNA	1.575 mg/ml	.15	64	1

Tabella 5.5. Elenco delle misure realizzate per campioni di DNA di *calf thymus*.



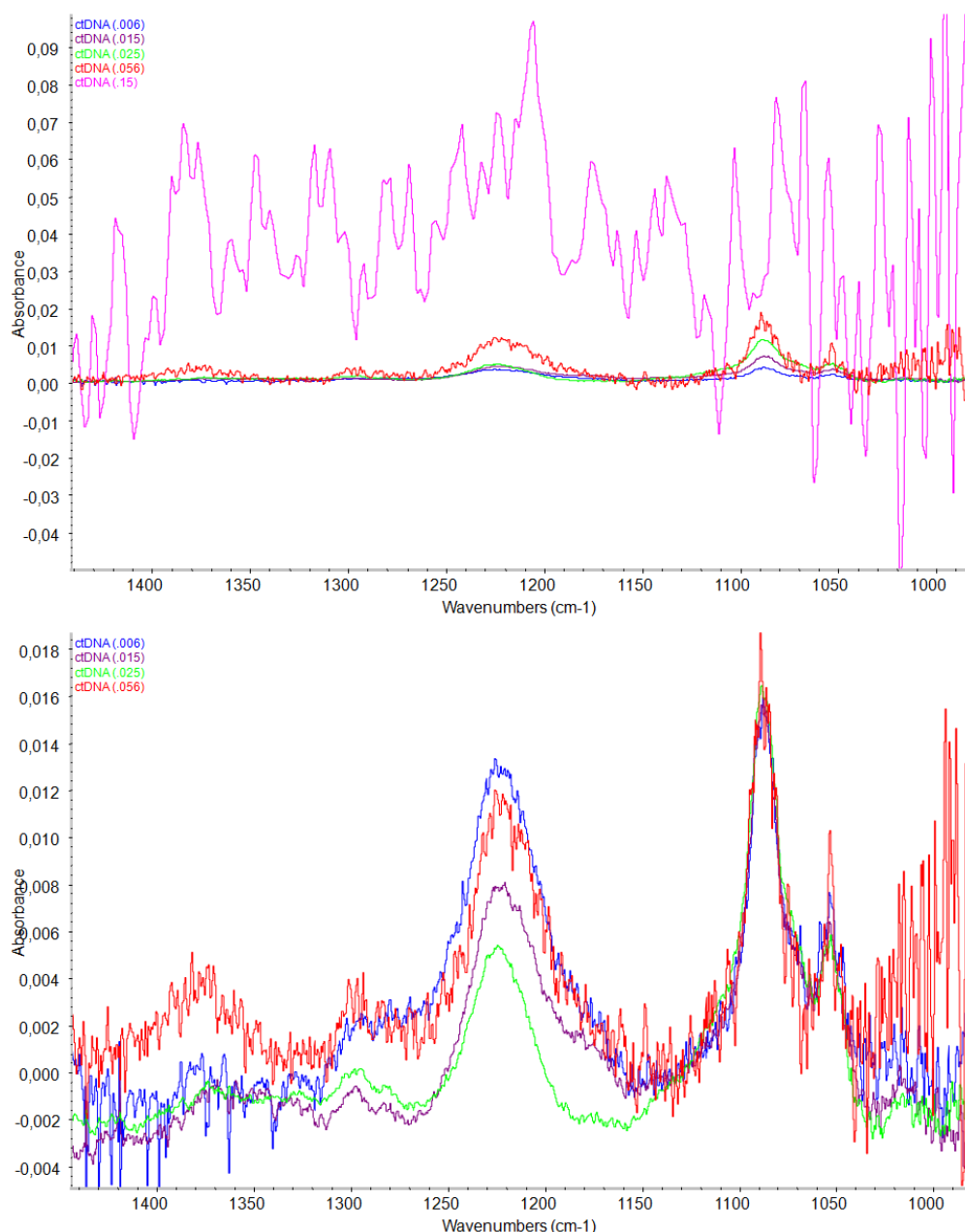


Figura 5.11. Spettri realizzati per ctDNA con concentrazione pari a 1.575 mg/ml per spaziatori con diverso spessore: 0.006 mm (blu), 0.015 mm (viola), 0.025 mm (verde), 0.056 mm (rosso), 0.15 mm (magenta). *Common scale* (in alto) e normalizzati rispetto al picco a  $1050\text{ cm}^{-1}$  (in basso).

Studiando gli spettri di figura 5.11 si è stabilito di preferire i due spaziatori con spessore 0.015 mm e 0.025 mm. Infatti, mentre per spessori superiori (0.056 mm e 0.15 mm) il rapporto S/N ha alterato progressivamente il segnale fino a nascondere i picchi della molecola in esame, uno *spacer* sottile ha prodotto un segnale troppo debole. Comunque, si noti come, a prescindere dal rumore sovrapposto, il valore di assorbanza dei picchi ha

subito effettivamente variazioni proporzionali alle dimensioni dello spaziatore, appunto secondo la legge di Lambert-Beer.

Nonostante la procedura di sottrazione dello spettro dell'acqua per eliminare i segnali dovuti alla non esatta compensazione del vapore acqueo nel compartimento *main* dello strumento, i risultati raccolti sono stati distorti da un fondo non lineare diverso per ogni misura, tale da renderle non facilmente confrontabili tra loro. Pur controllando la stretta del supporto per le finestre di fluorite e la quantità di campione interposto tra di esse, non si è riusciti a correggere completamente questo problema, per cui gli spettri sono stati elaborati con il *software* Fityk. Questo programma ha un'apposita funzione per il disegno e la conseguente rimozione della *baseline*, di modo da ridurre tutti i picchi ad una medesimo fondo lineare orizzontale. La linea di base viene tracciata interpolando con una curva dei punti opportunamente posizionati dall'operatore in modo da seguire il fondo dello spettro in maniera ragionevole.

Una volta definite le migliori condizioni di raccolta degli spettri e le procedure di elaborazione che rendono i segnali paragonabili tra loro, si è passati allo studio delle bande caratteristiche del DNA. Il ctDNA è preparato a concentrazioni progressivamente più diluite, a partire da un valore di 50 mg/ml fino a 1.625 mg/ml. In figura 5.12 sono confrontati i risultati ottenuti con spettroscopia IR per queste soluzioni; non compare il dato della soluzione con concentrazione pari a 1.625 mg/ml poiché troppo debole soprattutto a confronto con le altre.

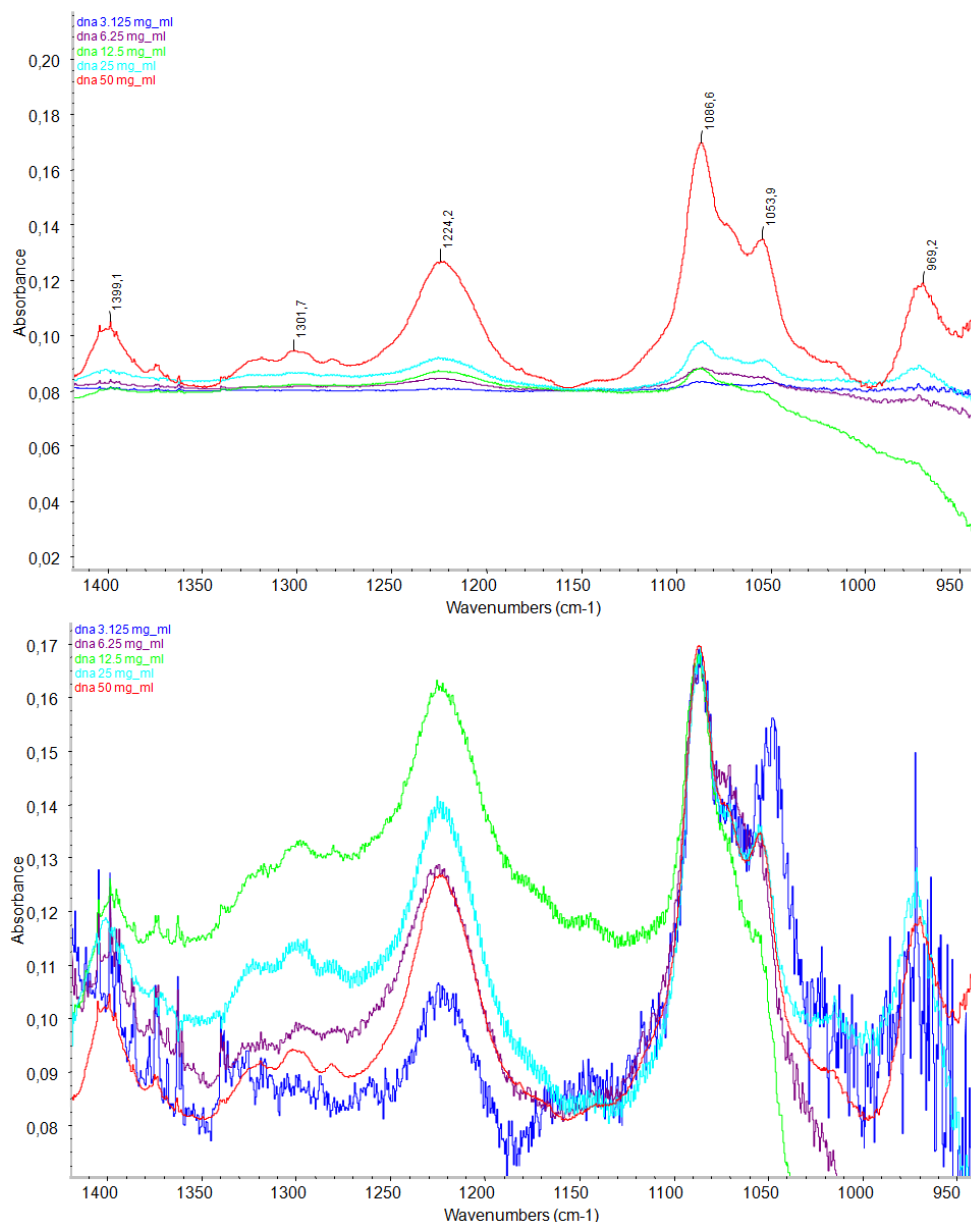


Figura 5.12. Confronto tra gli spettri di soluzioni di ctDNA a concentrazioni differenti: 50 mg/ml (rosso), 25 mg/ml (ciano), 12.5 mg/ml (verde), 6.25 mg/ml (viola) e 3.125 mg/ml (blu). Nonostante la correzione della linea di base effettuata con Fityk, il segnale del campione a 12.5 mg/ml non è ancora ben allineato con gli altri. *Common scale* (in alto), normalizzati rispetto al picco a 1050 cm<sup>-1</sup> (in basso).

Per l'assegnazione dei picchi, si fa riferimento principalmente alla raccolta di bande IR per DNA compilata da Banyay (2003). In tale studio, si suddivide il *range* spettrale (1800-800 cm<sup>-1</sup>) in quattro regioni:

- 1800-1500 cm<sup>-1</sup>: regione sensibile alle coppie di basi e al loro legame intramolecolare;
- 1500-1250 cm<sup>-1</sup>: intervallo delle vibrazioni dei legami tra furanoso e base azotata;
- 1250-1000 cm<sup>-1</sup>: *range* in cui compaiono i principali *markers* del gruppo fosfato;

- 1000-800 cm<sup>-1</sup>: frequenze attribuite alle vibrazioni del gruppo furanoso.

Dato il tipo di finestra utilizzata in questo lavoro di tesi (CaF<sub>2</sub>) e il solvente in cui sono stati sciolti i campioni, la regione osservabile è risultata compresa tra 1400 e 900 cm<sup>-1</sup>. Di conseguenza, i picchi disponibili per lo studio del DNA sono quelli relativi al gruppo fosfato PO<sub>2</sub><sup>-</sup>. In tabella 5.6 è stata richiamata la porzione di tabella relativa all'intervallo 1250-1000 cm<sup>-1</sup>, proveniente dalla raccolta di Banyay et al. (2003).

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Assignment	The 1250–1000 cm <sup>-1</sup> region in H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O Sugar–phosphate vibrations Sensitive to backbone conformation Comment
1245–1235	A-form	Main A-form marker Antisymmetric PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str [1,2,4,5]
1225-1220	B-form	Main B-form marker Antisymmetric PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str [1,2,4,5]
1221	Ribose	Ribose vib [27] Difficult to separate from 1225 B-form marker
1216-1213	Z-form	Main Z-form marker Antisymmetric PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str [4,5,31,35]
1188-1175	A-form	A-form marker [4,5,28] Sugar-phosphate backbone vib with a fairly high contribution from the sugar moiety in C3'-endo/anti type of puckering [28]
1135	Ribose	Ribose C1'C2'OC3' str (strong) [2]
1123	Z-form	Z-form [5]
1119–1116	Ribose	Ribose C1'C2'OC3' str (strong) [2,27]
1090–1085	Backbone	Symmetric PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str [1,2] Insensitive of B-to-A transition [27]
1069–1044	Furanose	CO str of backbone [2] Strongly enhanced in Z-form DNA [5,35] Calc: (1069) symmetric CO str of the backbone [49,55,56] Calc: (1049) antisymmetric CO str of the backbone [49,55,56]
1020–1010	Furanose	Furanose vib Strongly enhanced in Z-form DNA [5,35]

Tabella 5.6. Ritaglio dell'intera tabella in cui sono assegnati i modi vibrazionali delle bande di assorbimento IR del DNA. [Banyay (2003)]

Confrontando i valori riportati in tabella 5.6 con gli spettri ottenuti sperimentalmente per il DNA riportati in figura 5.12, possiamo attribuire al picco a 1224 cm<sup>-1</sup> e a 1087 cm<sup>-1</sup> lo *stretching* antisimmetrico e simmetrico del PO<sub>2</sub><sup>-</sup> (rispettivamente). Le bande a 1054 cm<sup>-1</sup> e 970 cm<sup>-1</sup> (non compresa in questo particolare di tabella ma nel resto dell'articolo) sono associate allo *stretching* dei legami CO e CC dello zucchero. Il picco a 970 cm<sup>-1</sup> non è sempre osservabile negli spettri raccolti per le soluzioni in cella di fluorite, data la vicinanza al punto di taglio dovuto proprio al materiale di cui sono fatte le finestre. Per quanto riguarda, invece, le frequenze di vibrazione relative al legame CO del furanoso e allo *stretching* simmetrico del fosfato, esse appaiono abbastanza stabili in frequenza nei diversi esperimenti da me compiuti. Non si può affermare lo stesso per la vibrazione

assegnata allo *stretching* antisimmetrico del  $\text{PO}_2^-$ . Infatti, come si osserva nella tabella 5.5, la banda riferita a tale modo vibrazionale ha valori differenti a seconda della forma in cui il DNA si trova. Per esempio, nella conformazione B-DNA (più comune) il picco avrebbe numeri d'onda variabili tra  $1225\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ ; invece, per A-DNA e Z-DNA questo picco è compreso rispettivamente nei due intervalli  $1245\text{-}1235\text{ cm}^{-1}$  e  $1216\text{-}1213\text{ cm}^{-1}$ . Ciò ci porta a pensare di poter osservare la transizione tra le configurazioni della molecola genomica a partire dalle variazioni di tale banda.

Già nel 1962 il gruppo di Falk ha studiato le variazioni dello *stretching* antisimmetrico del  $\text{PO}_2^-$ . È stata dimostrata infatti la relazione lineare esistente con la percentuale di umidità relativa, rappresentata in figura 5.13.

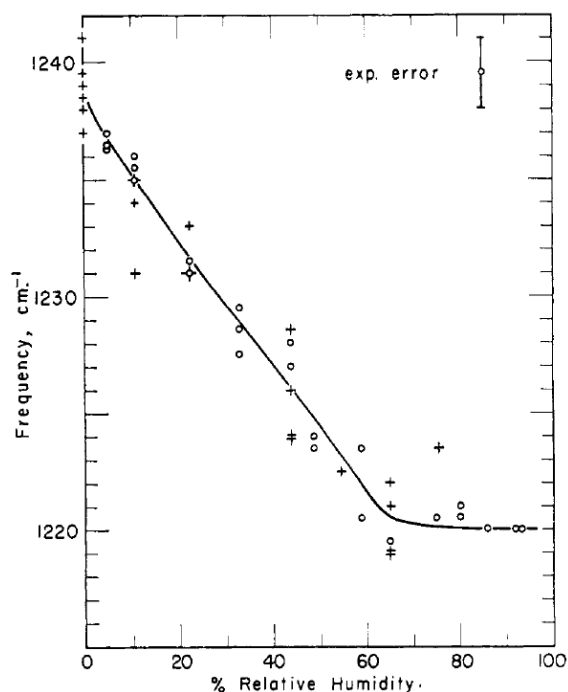


Figura 5.13. Grafico che esprime la variazione della frequenza del picco dello *stretching* antisimmetrico del  $\text{PO}_2^-$  in funzione della percentuale di umidità relativa. [Falk (1963)]

Ovviamente i due fenomeni che inducono lo *shift* della frequenza del picco antisimmetrico del fosfato (stato di idratazione e conformazione dell'elica di DNA) non sono slegati tra loro. La configurazione con cui il DNA compare è influenzata dall'idratazione dell'ambiente in cui si trova, così che le variazioni esaminate dal gruppo di Falk e Banyay sono correlate.

In letteratura, questi non sono studi spettroscopici isolati condotti sul gruppo fosfato. Per fosfati cristallini inorganici Popović ha ricavato una correlazione lineare tra i numeri

d'onda relativi allo *stretching* del legame P-O nelle sue diverse forme e la sua lunghezza (vedi figura 5.14).

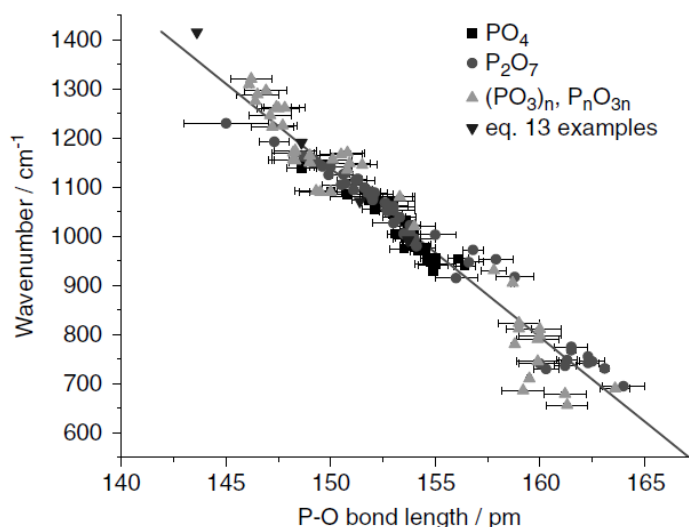


Figura 5.14. Relazione tra il numero d'onda delle bande relative a diversi gruppi fosfati in funzione della lunghezza di legame. [Popović (2005)]

Recentemente, Matsui (2010) ha descritto lo *shift* dello *stretching* antisimmetrico del  $\text{PO}_2^-$  in relazione ai cationi metallici associati alla doppia elica nucleotidica per diverse condizioni di umidità. Invece, Whelan (2011) ha confermato la variazione della frequenza della banda *marker* (gruppo fosfato) in relazione allo stato di idratazione, applicando la sperimentazione a DNA provenienti da campioni differenti (vedi figura 5.15).

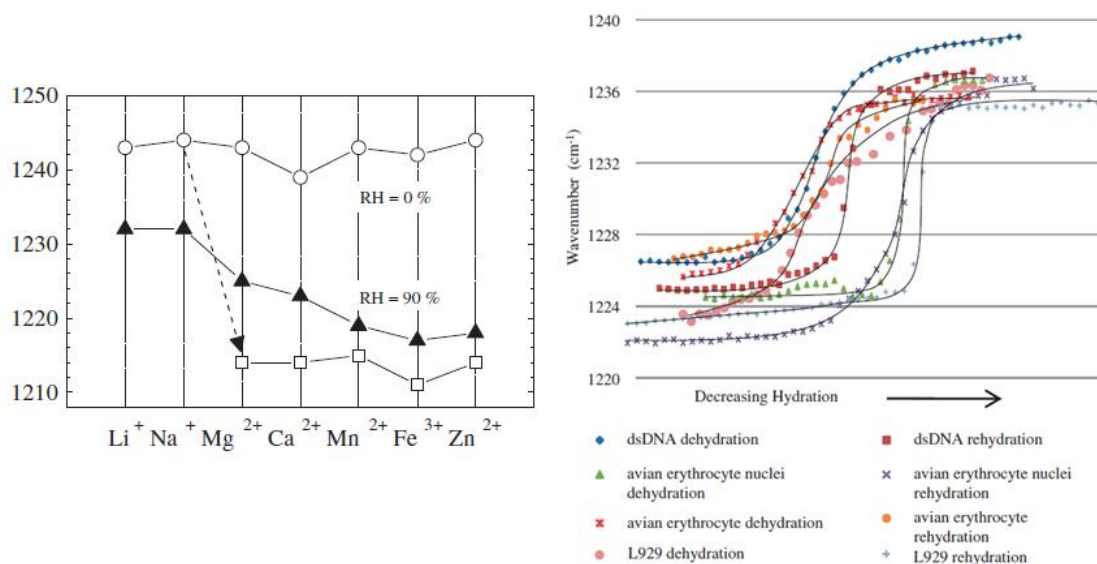


Figura 5.15. Immagini circa lo *shift* in frequenza della banda relativa allo *stretching* antisimmetrico del gruppo fosfato in funzione (a sinistra) dei cationi metallici associati al DNA in varie condizioni di umidità e (a destra) dell'idratazione dell'ambiente per molecole di natura differente. [Matsui (2010), Whelan (2011)]

Nelle condizioni sperimentali descritte in precedenza non si è ottenuta nessuna variazione della banda dello *stretching* antisimmetrico del  $\text{PO}_2^-$ , il che è indice del fatto che non è avvenuta nessuna transizione nella configurazione del DNA né si sono verificati mutamenti relativi alla percentuale d'umidità. Per poter apprezzare il fenomeno discusso nelle pagine precedenti, si è deciso quindi di variare le condizioni di misura degli spettri. Al posto di utilizzare una cella chiusa di  $\text{CaF}_2$  e il compartimento principale dello spettrofotometro in cui l'ambiente è risultato strettamente controllato e non si sono verificate modifiche, si è optato per l'utilizzo del microscopio con modalità di raccolta del segnale in trasmittanza. È stata depositata una goccia del materiale da esaminare su un supporto aperto. In questo caso, si è scelta una cella di diamante (vedi figura 5.16).



Figura 5.16. Immagine di una cella di diamante a pressione chiusa (in alto) e aperta (in basso). [www.hpdo.com]

Essa è formata da due parti strette tra loro da tre viti, poste a contatto nel punto centrale proprio attraverso le facce dei rispettivi diamanti. Nel nostro caso, è stato preso uno solo dei due lati della cella, proprio per lasciare il materiale depositato al centro a contatto con l'aria. Le misure vengono impostate sempre attraverso l'applicazione Omnic dopo aver messo a fuoco la goccia di soluzione sul diamante. Poiché l'obiettivo della misura era quello di osservare la dinamica di evoluzione della soluzione tramite spettri raccolti successivamente nella stessa posizione in istanti ravvicinati, lo strumento è stato regolato con un numero di scansioni sufficientemente piccolo, in modo da raccogliere gli spettri velocemente e poter seguire meglio la cinetica di evaporazione. In tabella 5.7 sono riportate le sequenze di scansioni realizzate per i campioni a diverse diluizioni (le stesse relative alla figura 5.12)

CONC	NR	hh:mm:ss	CONC	NR	hh:mm:ss	CONC	hh:mm:ss
DNA 50 mg/ml	1	16:04:27	DNA 25 mg/ml	1	11:21:59	DNA 12.5 mg/ml	12:18:17
DNA 50 mg/ml	1	16:04:50	DNA 25 mg/ml	1	11:22:36	DNA 12.5 mg/ml	12:18:45
DNA 50 mg/ml	1	16:05:12	DNA 25 mg/ml	1	11:23:54	DNA 12.5 mg/ml	12:19:12
DNA 50 mg/ml	1	16:05:33	DNA 25 mg/ml	1	11:24:20	DNA 12.5 mg/ml	12:19:36
DNA 50 mg/ml	1	16:05:48	DNA 25 mg/ml	1	11:24:44	DNA 12.5 mg/ml	12:19:57
DNA 50 mg/ml	1	16:08:41	DNA 25 mg/ml	2	11:30:14	DNA 12.5 mg/ml	12:20:20
DNA 50 mg/ml	2	16:10:01	DNA 25 mg/ml	2	11:30:44	DNA 12.5 mg/ml	12:20:45
DNA 50 mg/ml	2	16:10:39	DNA 25 mg/ml	2	11:31:08		
DNA 50 mg/ml	2	16:11:08	DNA 25 mg/ml	2	11:31:56	DNA 6.25 mg/ml	12:36:15
DNA 50 mg/ml	2	16:11:32	DNA 25 mg/ml	2	11:32:20	DNA 6.25 mg/ml	12:36:49
DNA 50 mg/ml	2	16:12:02	DNA 25 mg/ml	2	11:32:43	DNA 6.25 mg/ml	12:37:16
DNA 50 mg/ml	2	16:12:32	DNA 25 mg/ml	3	11:37:42	DNA 6.25 mg/ml	12:37:43
DNA 50 mg/ml	2	16:12:57	DNA 25 mg/ml	3	11:38:14	DNA 6.25 mg/ml	12:38:11
DNA 50 mg/ml	2	16:13:26	DNA 25 mg/ml	3	11:38:58	DNA 6.25 mg/ml	12:38:38
DNA 50 mg/ml	2	16:14:02	DNA 25 mg/ml	3	11:40:10		

Tabella 5.7. Sequenze di misure effettuate per i campioni di DNA con diversa concentrazione.

Anche se non sono stati riportati in tabella, sono stati effettuati esperimenti analoghi anche per concentrazioni inferiori a quelle indicate (3.125 mg/ml e 1.625 mg/ml). Il fatto che questi campioni contenessero una buona percentuale d'acqua rispetto agli altri, ha reso la loro cinetica di evaporazione molto più lenta e gli spettri iniziali sono apparsi molto rumorosi. Per questo motivo non sono stati considerati. In figura 5.17 è stata riportata una sequenza di misure significative per un valore di concentrazione pari a 50 mg/ml, dove si osservano variazioni seguendo l'andamento del picco relativo allo *stretching* antisimmetrico di  $\text{PO}_2^-$ .

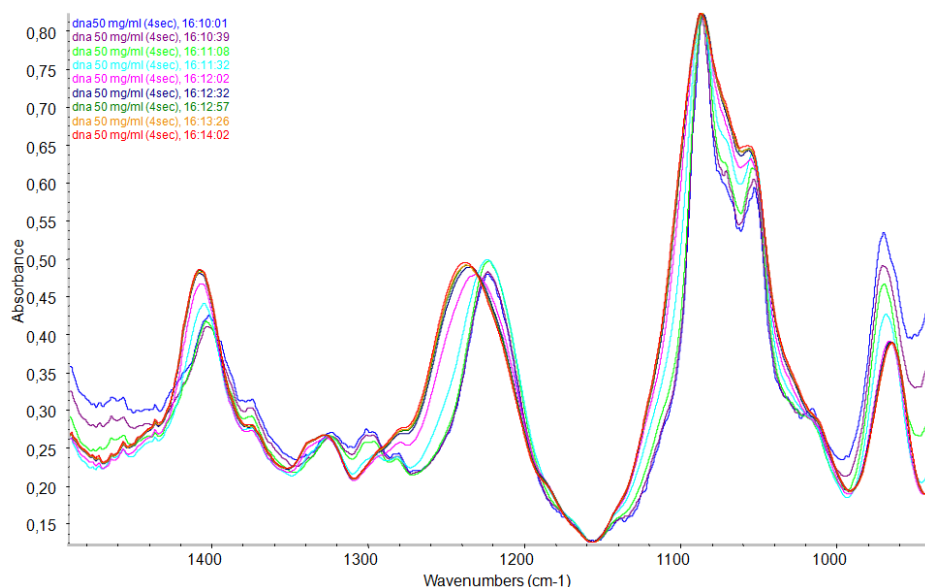


Figura 5.17. Sequenza di misure realizzate durante la cinetica di evaporazione di una goccia di soluzione di DNA di 50 mg/ml depositata su cella di diamante.



Il picco utilizzato per normalizzare gli spettri è quello relativo allo *stretching* simmetrico del gruppo fosfato, come suggerito nell'articolo di Banyay et al., poiché, come si nota, esso non è soggetto a variazioni in frequenza per i diversi stati di idratazione. Si osserva chiaramente come la banda relativa allo *stretching* antisimmetrico del  $\text{PO}_2^-$ , con la progressiva evaporazione della goccia di soluzione deposta sulla cella di diamante, subisca uno *shift* verso valori di frequenza più elevati. All'inizio, quando la percentuale d'acqua è massima, il picco è situato ad una lunghezza d'onda all'incirca di 1220-1225  $\text{cm}^{-1}$ ; con la perdita graduale della componente acquosa la banda si sposta fino ad un valore posto attorno ai 1240  $\text{cm}^{-1}$ . Confrontando tali risultati sperimentali per ogni serie di spettri raccolti durante l'evaporazione di soluzioni (anche con concentrazioni iniziali differenti) e i lavori di letteratura precedentemente citati, possiamo affermare che nelle nostre prove avviene una transizione tra A-DNA e B-DNA. Siamo stati in grado di dimostrare la ripetibilità di tali prove, ma non le effettive configurazioni delle molecole, per cui sarebbero necessari studi di cristallografia. Certo è che il buon accordo con gli studi pubblicati in letteratura ha confermato la mutazione nella struttura tridimensionale della molecola o nel suo stato d'aggregazione in relazione alla percentuale di umidità relativa.

### 5.2.2. Sperm salmon DNA (ssDNA)

Successivamente si è passati all'indagine con spettroscopia IR di ssDNA. Il motivo per cui è stato scelto questo tipo di DNA con massa molecolare inferiore rispetto al *calf thymus* DNA è da ricercare nell'interazione con i polimeri. Infatti, le catene nucleotidiche e i vettori della trasfezione nella stessa soluzione formano aggregati. Nel caso di pesi molecolari più alti, gli aggregati hanno dato alla soluzione un aspetto viscoso e hanno prodotto precipitati visibili a occhio nudo. Gli spettri raccolti per le due fasi che si sono venute a formare hanno generato risultati differenti, soprattutto in intensità, quasi che gran parte del materiale fosse sequestrato nel precipitato. Al contrario, nel caso di ssDNA, il minore peso molecolare ha reso più difficile la formazione di aggregati solidi.

Le prime misure effettuate su ssDNA hanno ripreso l'esperimento eseguito al microscopio con ctDNA e sono elencate in tabella 5.8. A differenza della prova precedente, il supporto utilizzato non è stato solo la cella di diamante di figura 5.16, ma è stata utilizzata anche una finestra di fluorite. L'obiettivo di queste prove era di dimostrare ancora che cambiando il tipo di DNA non varia il comportamento della banda relativa allo *stretching*

antisimmetrico del gruppo fosfato, come già mostrato nell'articolo di Whelan (si veda il grafico riportato in figura 5.15 a destra).

DNA 10 mg/ml					DNA 0.91 mg/ml (diam)	
SERIE	SUPPORTO	hh:mm:ss	SUPPORTO	hh:mm:ss	SERIE	hh:mm:ss
1	diam	11:32:12	CaF <sub>2</sub>	13:53:15	1	13:53:35
1	diam	11:32:36	CaF <sub>2</sub>	13:53:15	1	13:54:19
1	diam	11:33:02	CaF <sub>2</sub>	13:53:42	1	13:54:53
1	diam	11:33:25	CaF <sub>2</sub>	13:54:09	1	13:55:12
1	diam	11:33:47	CaF <sub>2</sub>	13:54:34	1	13:55:31
2	diam	12:16:04	CaF <sub>2</sub>	13:55:15	1	13:55:55
2	diam	12:16:26	CaF <sub>2</sub>	13:55:57	1	13:56:36
2	diam	12:17:09	CaF <sub>2</sub>	13:56:18	1	13:57:25
2	diam	12:17:44	CaF <sub>2</sub>	13:56:41	2	14:16:45
2	diam	12:18:10	CaF <sub>2</sub>	13:57:07	2	14:17:21
2	diam	12:18:33	CaF <sub>2</sub>	13:57:33	2	14:17:41
2	diam	12:18:53	CaF <sub>2</sub>	13:57:56	2	14:18:06
			CaF <sub>2</sub>	13:58:22	2	14:18:35
			CaF <sub>2</sub>	13:58:56	2	14:19:38
			CaF <sub>2</sub>	13:59:23	2	14:19:59
			CaF <sub>2</sub>	14:00:25	2	14:20:49
			CaF <sub>2</sub>	14:00:41	2	14:21:11
			CaF <sub>2</sub>	14:01:13	3	14:41:15
					3	14:41:47
					3	14:42:08
					3	14:42:24
					3	14:42:40
					3	14:43:45

Tabella 5.8. Elenco degli spettri realizzati con microscopio ottico. I campioni sono depositati o su cella di diamante o su finestra di fluorite.

In figura 5.18 sono stati riportati gli spettri relativi alla cinetica di evaporazione di una goccia di soluzione di ssDNA a 10 mg/ml, deposta su due supporti differenti, rispettivamente fluorite (in alto) e cella di diamante (in basso). In entrambi i casi si osserva lo stesso andamento per il *marker* relativo allo *stretching* antisimmetrico del PO<sub>2</sub><sup>-</sup>, già descritto per lo stesso esperimento con ctDNA nel paragrafo precedente. L'unica differenza è stata individuata nel tempo necessario allo svolgimento della cinetica, più lenta su CaF<sub>2</sub>.

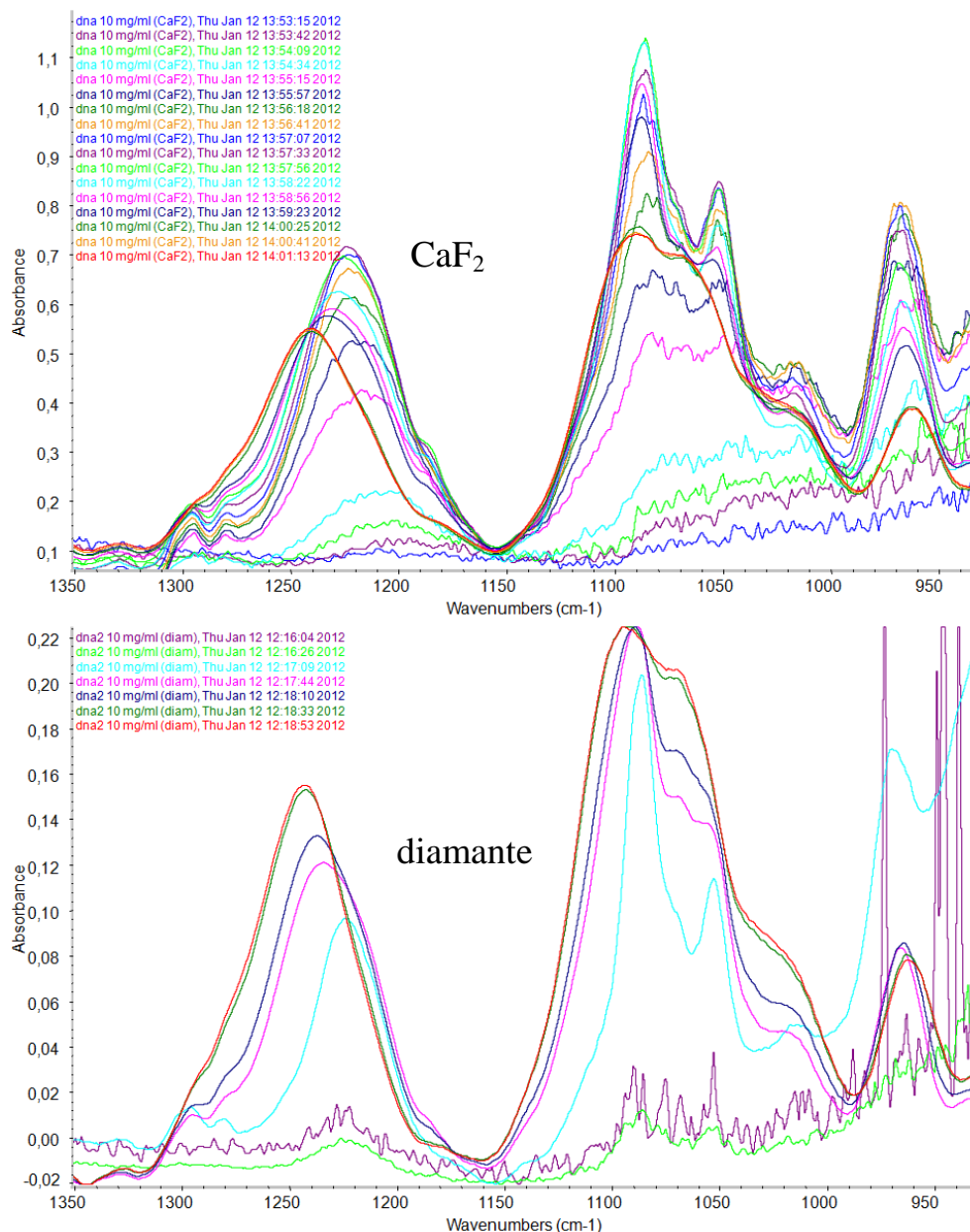


Figura 5.18. Sequenze di spettri realizzati con microscopio ottico in trasmittanza, ciascuno di 4 scansioni, con soluzione di DNA 10 mg/ml depositata su finestra di fluorite (in alto) e cella di diamante (in basso).

I successivi spettri raccolti per ssDNA avevano, invece, il preciso scopo di determinare la concentrazione più bassa alla quale la spettroscopia IR poteva spingersi ottenendo un segnale ancora interpretabile. A partire, quindi, dalla concentrazione massima, cioè quella in cui si trova commercialmente la molecola (10 mg/ml), si sono effettuate diluizioni successive (rispettivamente a 2, 1, 0.5, 0.33 e 0.1 mg/ml). Osserviamo in figura 5.19 in *common scale* il confronto tra gli spettri realizzati per campioni aventi concentrazioni

diverse per un ordine di grandezza, per verificare se tale differenza si ripercuote anche nell'intensità dei picchi.

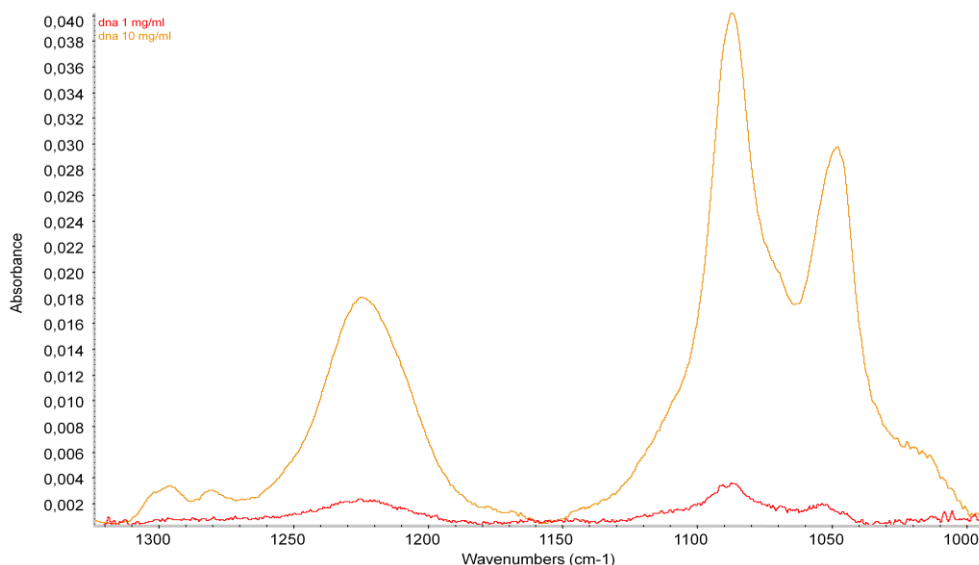


Figura 5.19. Confronto in *common scale* tra spettri di campioni con concentrazioni di 10 mg/ml (arancione) e 1 mg/ml (rosso). Si dimostra che il rapporto tra le altezze del picco simmetrico del  $\text{PO}_2^-$  è pari a quello tra i valori di concentrazione delle soluzioni in esame.

Analizzando i risultati ottenuti per le soluzioni a diversa concentrazione si può concludere che fino a valori pari a 1 mg/ml il segnale del DNA è ancora ben distinguibile rispetto alla *baseline*. Anche a 0.5 mg/ml si può fare una discreta attribuzione dei picchi, ma solo conoscendo già il segnale della molecola su cui si sta indagando,. Di conseguenza, si sceglie 0.7 mg/ml come valore limite per la concentrazione finale del DNA una volta complessato con i vettori polimerici in soluzione acquosa.

### 5.3. Vettori polimerici

Prima di studiare gli spettri relativi ai complessi derivanti dall'interazione tra materiale genetico e vettori polimerici, abbiamo esaminato questi ultimi da soli, in maniera da determinarne il segnale caratteristico. Una volta determinati i picchi del chitosano-g-PEI e della poli-L-lisina, abbiamo verificato se essi cadessero nello stesso intervallo di frequenze dove sono già state individuate le bande di riferimento per il DNA in modo da poter stimare eventuali sovrapposizioni nello spettro della soluzione del sistema DNA/polimero.

5.3.1. Chitosano-g-PEI [Amaral (2005), Brugnerotto (2001), Herlem (2010), Pezzoli (2008-2010), York (2003)]

Il chitosano-g-PEI è una molecola di sintesi, realizzata in laboratorio come indicato nella tesi di dottorato di Pezzoli (2008-2010). In letteratura abbiamo trovato l'applicazione del chitosano e del PEI nel campo della trasfezione, sia singolarmente ma soprattutto in associazione con altri polimeri per poterne migliorare l'efficienza. Prima di passare alla raccolta dello spettro della molecola sintetizzata in laboratorio, abbiamo esaminato i segnali prodotti dall'assorbimento dei fotoni da parte delle due componenti isolate (vedi figura 5.20).

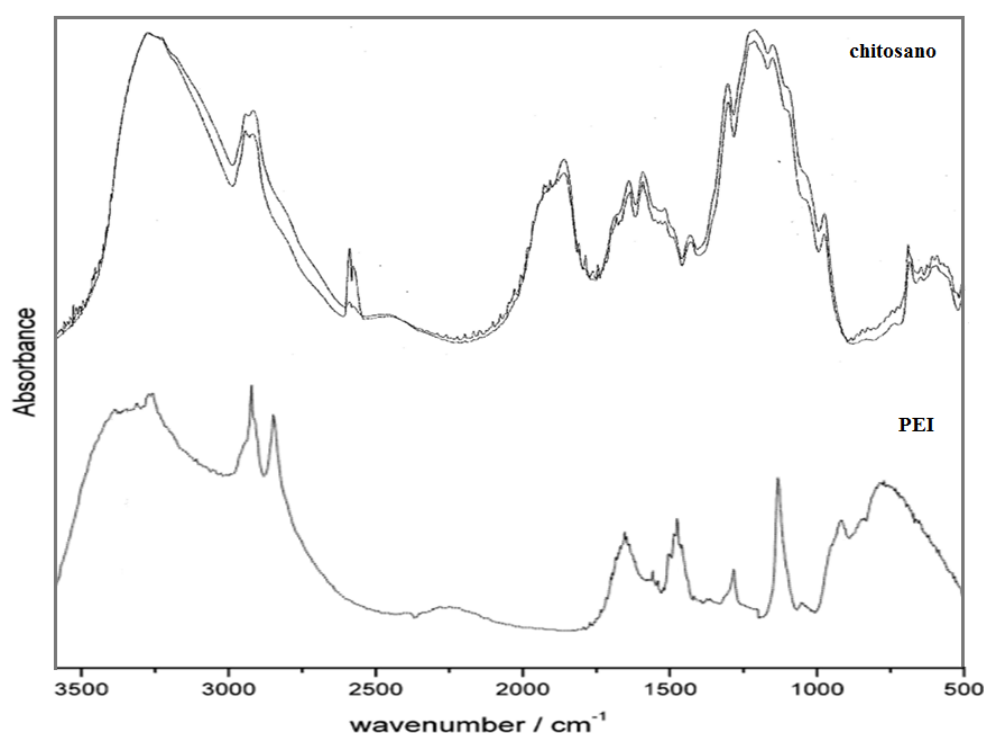


Figura 5.20. Spettro relativo al PEI (in basso) e al chitosano (in alto), dove sono sovrapposte le due forme idratata e non della molecola. [Brugnerotto (2001), Herlem (2010)]

Nell'intervallo compreso tra 900 cm<sup>-1</sup> e 1400 cm<sup>-1</sup>, è stata verificata una buona sovrapposizione tra le bande relative alle due molecole. Per quanto riguarda il polisaccaride, è stato trovato un ampio picco attorno alla lunghezza d'onda di 1100 cm<sup>-1</sup>, probabilmente dovuto alla convoluzione di più segnali vibrazionali, tra cui lo *stretching* antisimmetrico del ponte di ossigeno (il legame  $\beta(1-4)$  glicosidico) e lo *stretching* del legame C-O dei gruppi etere, assegnazione fatta in un articolo di Amaral et al. (2005). Le attribuzioni descritte, invece, dal gruppo di York (2003) per il PEI hanno portato ad

assegnare la banda stretta prossima a  $1100\text{ cm}^{-1}$  allo *stretching* del legame C-N, mentre le bande a frequenze più alte (fino a  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) al *bending* N-H e al  $\text{CH}_2$  *wagging*. Abbiamo quindi misurato gli spettri del complesso chitosano-g-PEI, dove ci si aspettava di trovare in prima istanza un segnale dato dalla sovrapposizione dei picchi relativi alle due molecole isolate.

Con spettroscopia IR sono stati analizzati i campioni preparati in due diversi solventi: HEPES e acqua deionizzata. Il primo è stato adottato per le proprietà di *buffer* attorno a valori di pH fisiologico, già esposte precedentemente. Dato che questo solvente tamponante ha prodotto picchi tali da alterare il segnale della molecola che si desiderava vedere, si è deciso di sostituirlo con l'acqua. Questa scelta non ha influito negativamente sulle misure effettuate, visto che in questa sede è risultato secondario mantenere condizioni di pH controllate, essendo lo scopo delle misure la semplice individuazione del profilo spettrale della molecola di sintesi. Lo spettro viene quindi raccolto nel compartimento principale dell'FT-IR ponendo una goccia di chitosano-g-PEI alla concentrazione di 40 mg/ml tra due finestre di fluorite con *spacer* di 0.015 mm. Dal momento che l'intensità del segnale misurata per il polimero è risultata molto bassa, è stato deciso di preparare il campione diversamente, cioè di concentrarlo ulteriormente attraverso l'evaporazione della componente acquosa presente nella soluzione. Non è stato usato nessun sistema di pompe, ma è stata depositata una goccia con pipetta Pasteur su una delle due finestre in fluorite, che viene opportunamente coperta all'interno di una piastra di Petri e lasciata a temperatura ambiente per 3 giorni, in modo che da giungere ad una disidratazione completa. Lo spettro raccolto è riportato in figura 5.21.

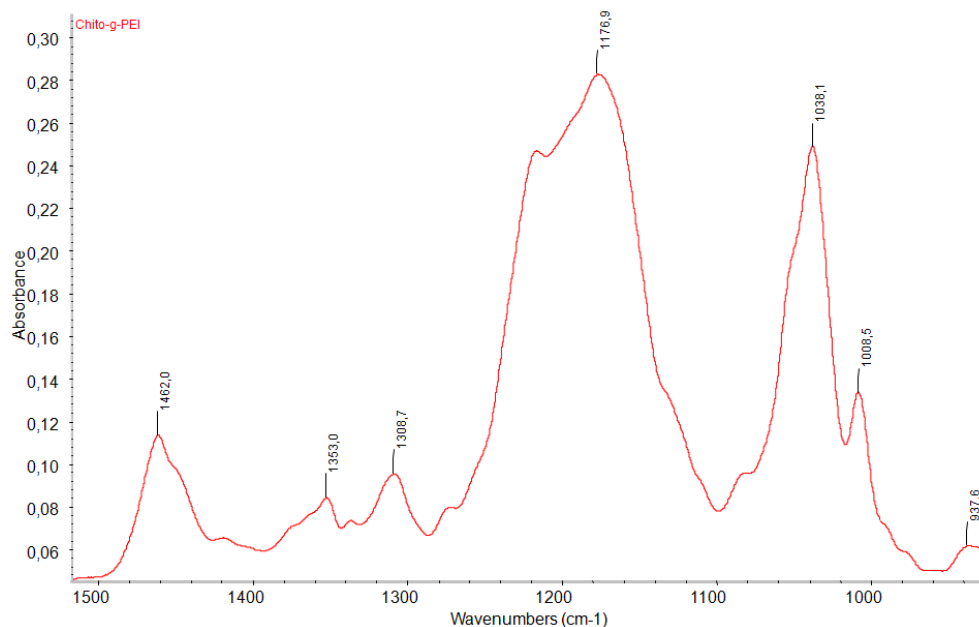


Figura 5.21. Spettro di chitosano-g-PEI disidratato da soluzione acquosa (40 mg/ml) su finestra di CaF<sub>2</sub>.

Mettendo a confronto gli spettri ottenuti sperimentalmente per chitosano-g-PEI con quelli delle due molecole isolate ricavate dalla letteratura, è stato possibile dire che il picco individuato a 1176 cm<sup>-1</sup> circa, avente un'ampia larghezza e spalle laterali dovute alla sovrapposizione di modi vibrazionali differenti, potrebbe essere dato dalla somma del contributo dello *stretching* del legame β(1-4) glicosidico del chitosano e del legame C-N presente nel PEI. Inoltre, per numeri d'onda superiori a 1300 cm<sup>-1</sup> sono stati osservati dei picchi verosimilmente attribuibili ai modi vibrazionali di NH *bending* e CH<sub>2</sub> *wagging* della polietilenimina. L'ultima considerazione che è stata fatta confrontando gli spettri delle due molecole che poi interagiranno per dar luogo alla trasfezione, cioè DNA e chitosano-g-PEI, è che purtroppo le bande caratteristiche sono piuttosto prossime in frequenza (vedi figura 5.22).



Figura 5.22. Confronto tra lo spettro di ssDNA 10 mg/ml (viola) e di chitosano-g-PEI 10 mg/ml (rosso). Spettri registrati a parità di cella e riportati in *common scale*.

Il risultato dell'interazione potrebbe quindi essere una variazione nel profilo spettrale del DNA, anche se bisogna tener conto dell'intensità del segnale di assorbimento del polimero.

### 5.3.2. Poli-L-lisina [www.sigmaaldrich.com]

Come il DNA, anche il PLL è disponibile commercialmente in varie forme a seconda della massa molecolare, ovvero del numero di monomeri di lisina di cui ciascun frammento è composto in media. Nel nostro caso, il peso molecolare della poli-L-lisina si trovava nell'intervallo 4-15 kDa. Il PLL si presenta come una polvere di colore bianco, capace di alterare il proprio aspetto assorbendo parte dell'acqua dall'ambiente umido in cui si trova. Abbiamo registrato lo spettro IR di un frammento del campione solido depositato su una parte della cella di diamante e analizzato utilizzando il microscopio ottico in trasmissione. Il risultato è riportato in figura 5.23.



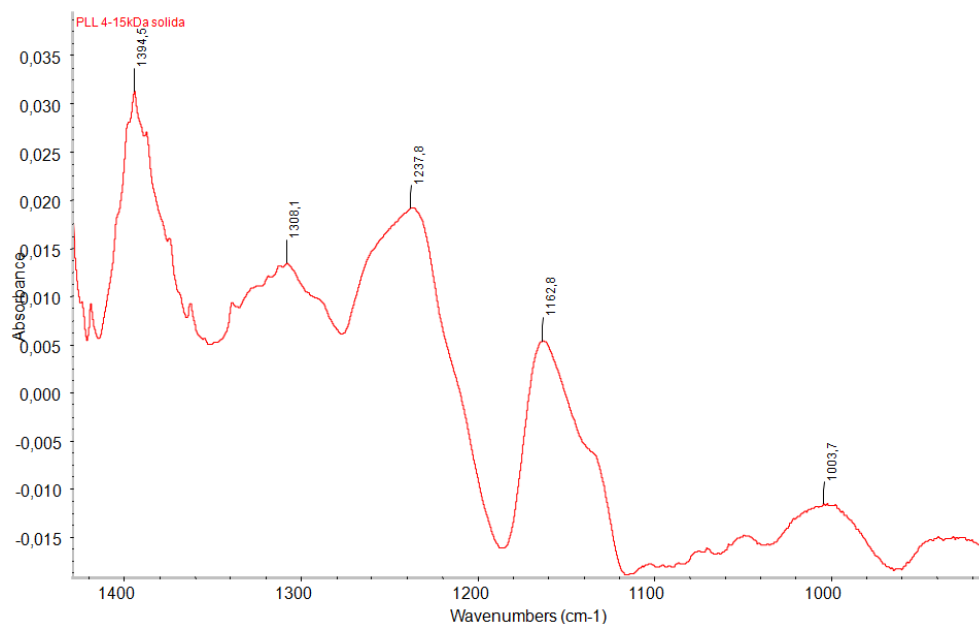


Figura 5.23. Spettro della poli-L-lisina allo stato solido, raccolto con microscopio ottico a trasmissione. Nr. scansioni: 64, apertura finestra di misura: max, risoluzione 2.

Esaminando i picchi relativi a PLL nell'intervallo di frequenze in cui sono stati determinati i *markers* del DNA, sono state individuate anche in questo caso alcune sovrapposizioni. La banda del DNA relativa allo *stretching* simmetrico del  $\text{PO}_2^-$  ( $1080\text{ cm}^{-1}$  circa) e quella del PLL attorno a  $1165\text{ cm}^{-1}$  sono libere da sovrapposizioni. Per quanto riguarda invece il picco relativo allo *stretching* antisimmetrico del gruppo fosfato, che come abbiamo visto costituisce un *marker* poiché è indice di una transizione nella struttura tridimensionale della catena nucleotidica, esso è parzialmente stato coperto dal segnale del polimero. I due spettri sono stati messi a confronto nella figura 5.24 in *common scale*. Fortunatamente, come già per chitosano-*g*-PEI, l'intensità specifica del segnale della poli-L-lisina è risultata inferiore rispetto a quella del DNA. Pertanto, nello spettro dell'interazione tra la componente genomica e il polimero, ci si aspetta un contributo trascurabile della PLL rispetto al DNA.

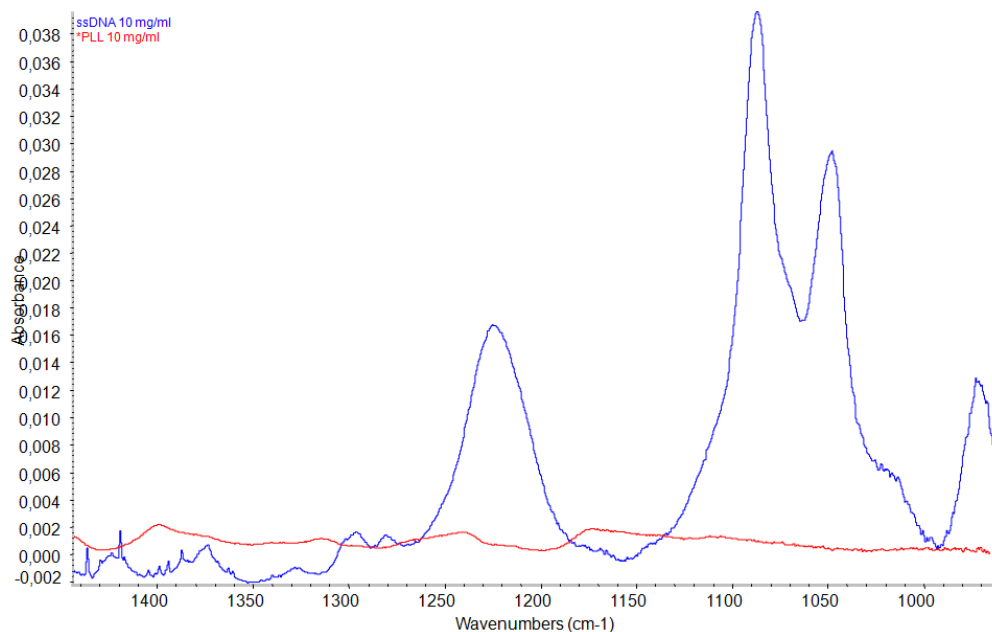


Figura 5.24. Confronto tra gli spettri di ssDNA 10 mg/ml (blu) e PLL 10 mg/ml (rosso), raccolti entrambi in cella di fluorite. *Common scale*, risoluzione 1, *spacer* 0.015 mm, nr. scansioni 128.

Per poter valutare fino a che concentrazione il segnale del PLL potrà essere considerato influente rispetto a quello del DNA, si raccolgono gli spettri delle soluzioni ottenute per diluizioni successive, elencate in tabella 5.9.

CONCENTRAZIONE	NR.SCANSIONI	RESLN	SPACER
PLL 20 mg/ml	256	1	.015
PLL 14 mg/ml	256	1	.015
PLL 6.6 mg/ml	256	1	.015
PLL 2 mM (2.92 mg/ml)	128	2	.012
PLL 2 mM (2.92 mg/ml)	128	2	.012
PLL 1.15 mg/ml	256	1	.015
PLL 0.8 mg/ml	256	1	.015

Tabella 5.9. Elenco degli spettri realizzati per soluzioni a diverse diluizioni di PLL.

Naturalmente, negli spettri di PLL in soluzione a diverse concentrazioni individuiamo sempre gli stessi picchi evidenziati in figura 5.23, ovviamente con una diminuzione di intensità, come già motivato per diluizioni progressive di ssDNA. Poiché già con PLL allo stato solido il segnale risulta debole, il valore limite di concentrazione è posto a 14 mg/ml, oltre il quale le bande non sono chiaramente distinte dal fondo.

5.4. Interazione tra materiale genetico e vettori polimerici [Marty (2009), Reschel (2002), Smith (1998), Wong (2006)]

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è quello di studiare come la spettroscopia IR possa essere utilizzata nel campo della trasfezione, precisamente per analizzare se avviene l'interazione tra il materiale genomico e i vettori polimerici, in modo da verificare la formazione dei complessi che poi verranno introdotti all'interno delle cellule per il rilascio del gene di interesse.

Le prime prove sperimentali sono state eseguite facendo interagire il polimero di sintesi a nostra disposizione, il chitosano-g-PEI, con ctDNA. Dal punto di vista della trasfezione, tale vettore ha dimostrato un'ottima efficienza, come riportato per misure *in vitro* e *in vivo* in uno studio del 2006 di Wong e colleghi, i quali hanno lavorato con DNA plasmidico (vedi figura 5.25).

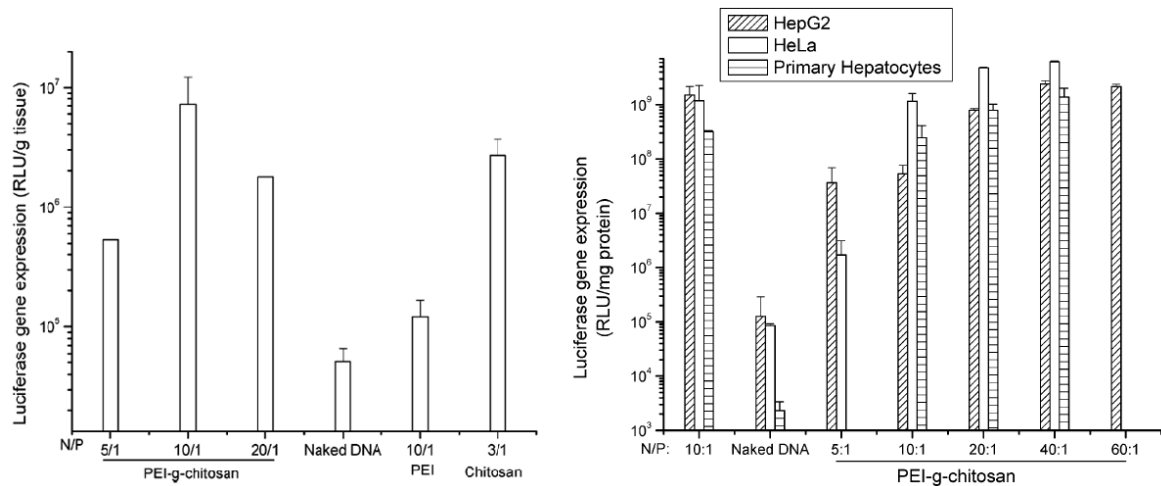


Figura 5.25. Efficienza di trasfezione *in vitro* (a sinistra) e *in vivo* (a destra) valutata per DNA e PEI presi singolarmente e per DNA con l'aggiunta di diverse quantità di polimero chitosano-g-PEI. Sull'asse dell'ordinate, in entrambi i casi, l'efficienza di trasfezione è stimata in funzione dell'espressione del gene codificante per la luciferasi. [Wong (2006)]

Nel nostro studio abbiamo considerato inizialmente soluzioni acquose di chitosano-g-PEI e DNA, per le quali sono stati mantenuti costanti i parametri relativi alla concentrazione iniziale (rispettivamente di 40 mg/ml e 1.575 mg/ml) e al volume totale (50 µl). Sono stati invece variati i rapporti tra le concentrazioni finali attraverso la miscelazione di volumi opportuni delle due soluzioni acquose di DNA e polimero, come indicato in tabella 5.10.

$[\text{chitoPEI}]_f : [\text{ctDNA}]_f$	$[\text{chitoPEI}]_0$	$[\text{ctDNA}]_0$	$\text{vol}_{\text{tot}}$
5 mg/ml : 0.7875 mg/ml	40 mg/ml	1.575 mg/ml	50 $\mu\text{l}$
8 mg/ml : 0.7875 mg/ml	40 mg/ml	1.575 mg/ml	50 $\mu\text{l}$
10 mg/ml : 0.7875 mg/ml	40 mg/ml	1.575 mg/ml	50 $\mu\text{l}$

Tabella 5.10. Elenco delle soluzioni preparate controllando i rapporti tra le concentrazioni finali delle molecole costituenti il complesso.

I volumi da prelevare dalle soluzioni iniziali di chitosano-g-PEI e ctDNA sono stati ricavati impostando le equazioni riportate di seguito, in cui tutti gli altri termini sono noti perché stabiliti a priori nella tabella 5.10.

$$[\text{chitoPEI}]_f = \frac{m^{\text{chitoPEI}}}{V_{\text{tot}}} = \frac{[\text{chitoPEI}]_0 V^{\text{chitoPEI}}}{V^{\text{chitoPEI}} + V^{\text{DNA}}}$$

$$[\text{ctDNA}]_f = \frac{m^{\text{DNA}}}{V_{\text{tot}}} = \frac{[\text{DNA}]_0 V^{\text{DNA}}}{V^{\text{chitoPEI}} + V^{\text{DNA}}}$$

$$V_{\text{tot}} = V^{\text{chitoPEI}} + V^{\text{DNA}} = V^{\text{chitoPEI}} * \left( 1 + \frac{V^{\text{DNA}}}{V^{\text{chitoPEI}}} \right)$$

$$V_{\text{tot}} = V^{\text{chitoPEI}} * \left( 1 + \frac{[\text{ctDNA}]_f}{[\text{chitoPEI}]_f} \frac{[\text{chitoPEI}]_0}{[\text{ctDNA}]_0} \right).$$

I risultati numerici sono elencati in tabella 5.11 per i tre rapporti di concentrazione stabiliti.

$[\text{chitoPEI}]_f : [\text{ctDNA}]_f$	$[\text{chitoPEI}]_0$	$[\text{ctDNA}]_0$	$\text{vol}_{\text{tot}}$	$\text{vol}_{\text{chitoPEI}}$	$\text{vol}_{\text{ctDNA}}$
5 mg/ml : 0.7875 mg/ml	40 mg/ml	1.575 mg/ml	50 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
8 mg/ml : 0.7875 mg/ml	40 mg/ml	1.575 mg/ml	50 $\mu\text{l}$	14.29 $\mu\text{l}$	35.71 $\mu\text{l}$
10 mg/ml : 0.7875 mg/ml	40 mg/ml	1.575 mg/ml	50 $\mu\text{l}$	16.67 $\mu\text{l}$	33.33 $\mu\text{l}$

Tabella 5.11. Elenco delle soluzioni preparate con i parametri decisi nella tabella precedente e, in aggiunta, volumi richiesti delle soluzioni iniziali del polimero e del DNA opportunamente calcolati.

Le soluzioni preparate secondo le specifiche date in tabella 5.11 sono composte da due fasi: una parte liquida limpida e trasparente con, immerso, un piccolo aggregato bianco opaco di alcuni mm e dalla consistenza proporzionale al rapporto polimero/DNA. Provando a sciogliere questa massa più densa mescolando la soluzione con una pipetta Pasteur o punte in metallo, essa non si è disintegrata, anzi appare viscosa. Pertanto, per ciascuna soluzione, è stata realizzata una coppia di misure di assorbimento IR, ponendo tra due finestre in fluorite una goccia della porzione liquida trasparente e l'aggregato solido. In figura 5.26 sono stati riportati due grafici, dove sono stati separati i risultati ottenuti nei due casi.

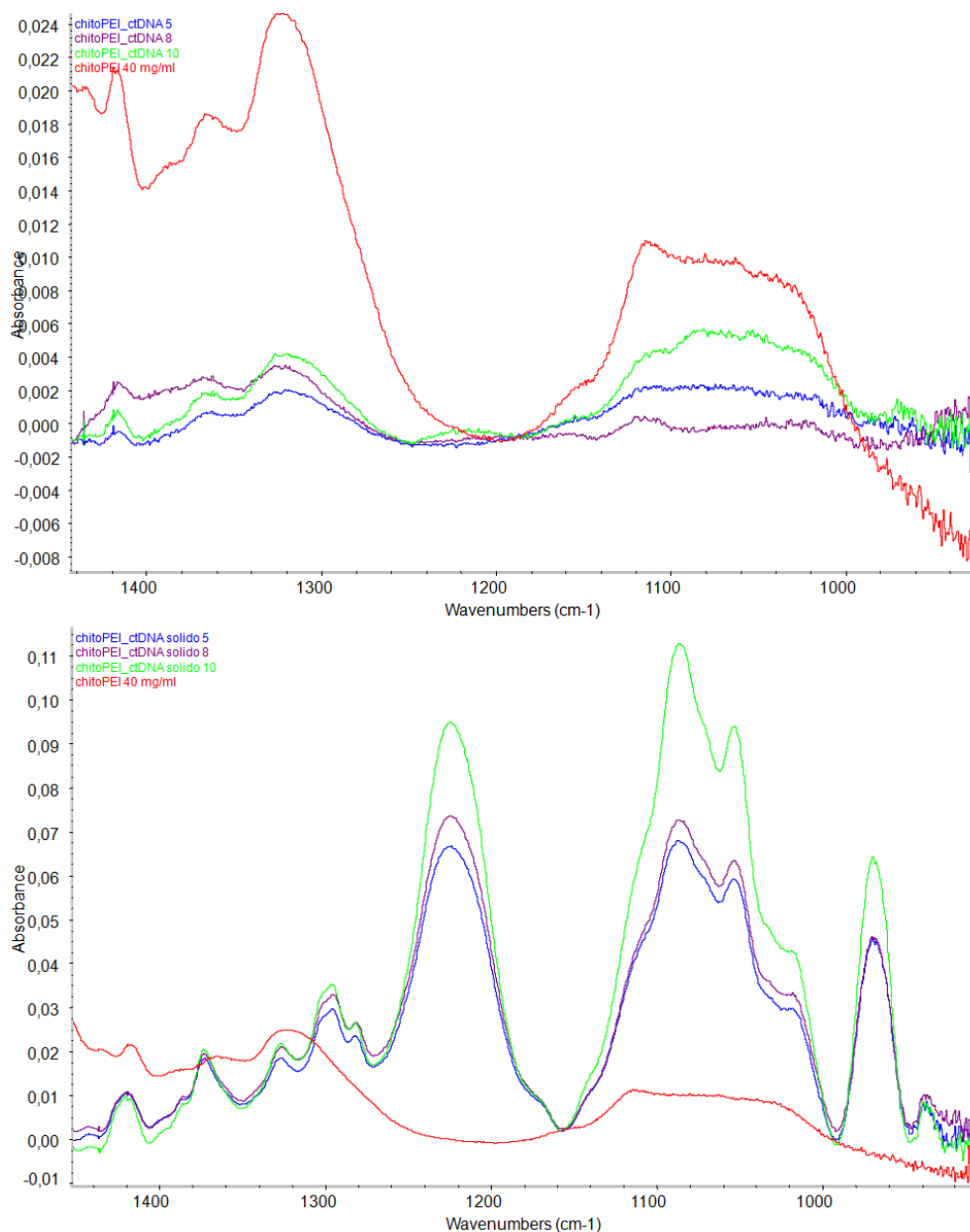


Figura 5.26. Spettri delle soluzioni contenenti i vettori polimerici e il materiale genetico secondo le preparazioni illustrate nel testo e i dati di tabella 5.11, cioè secondo i rapporti di concentrazione 5:0.7875 (blu), 8:0.7875 (viola) e 10:0.7875 (verde), a confronto con lo spettro del chitosano-g-PEI (rosso). In alto sono riportate le misure per la fase liquida del campione, in basso per quella solida. *Common scale*, risoluzione 1, *spacer* 0.015 mm, nr. scansioni 128.

Le misure realizzate sulla parte liquida e su quella solida hanno mostrato il medesimo profilo anche per diversi rapporti di concentrazione finale, sono cambiati solo i valori di intensità con l'aumentare della quantità di polimero contenuta. Invece, tra i due casi sono state osservate mutazioni relative alle posizioni delle bande principali. Mettendo a

confronto gli spettri misurati per le soluzioni contenenti i complessi (per ciascuna delle due fasi) con i segnali prodotti dal polimero, è stata rilevata una buona corrispondenza tra le bande per quanto riguarda i campioni liquidi (figura 5.26 in alto), al contrario per i precipitati (figura 5.26 in basso). L'ipotesi che abbiamo formulato dati questi risultati è che ciascuna delle due fasi presente in soluzione sia costituita quasi interamente da una delle due molecole, rispettivamente polimero per la parte liquida e DNA per quella solida. Per validare questa considerazione, in figura 5.27 sono stati messi a confronto gli spettri realizzati per le soluzione di interazione con lo spettro di ctDNA.

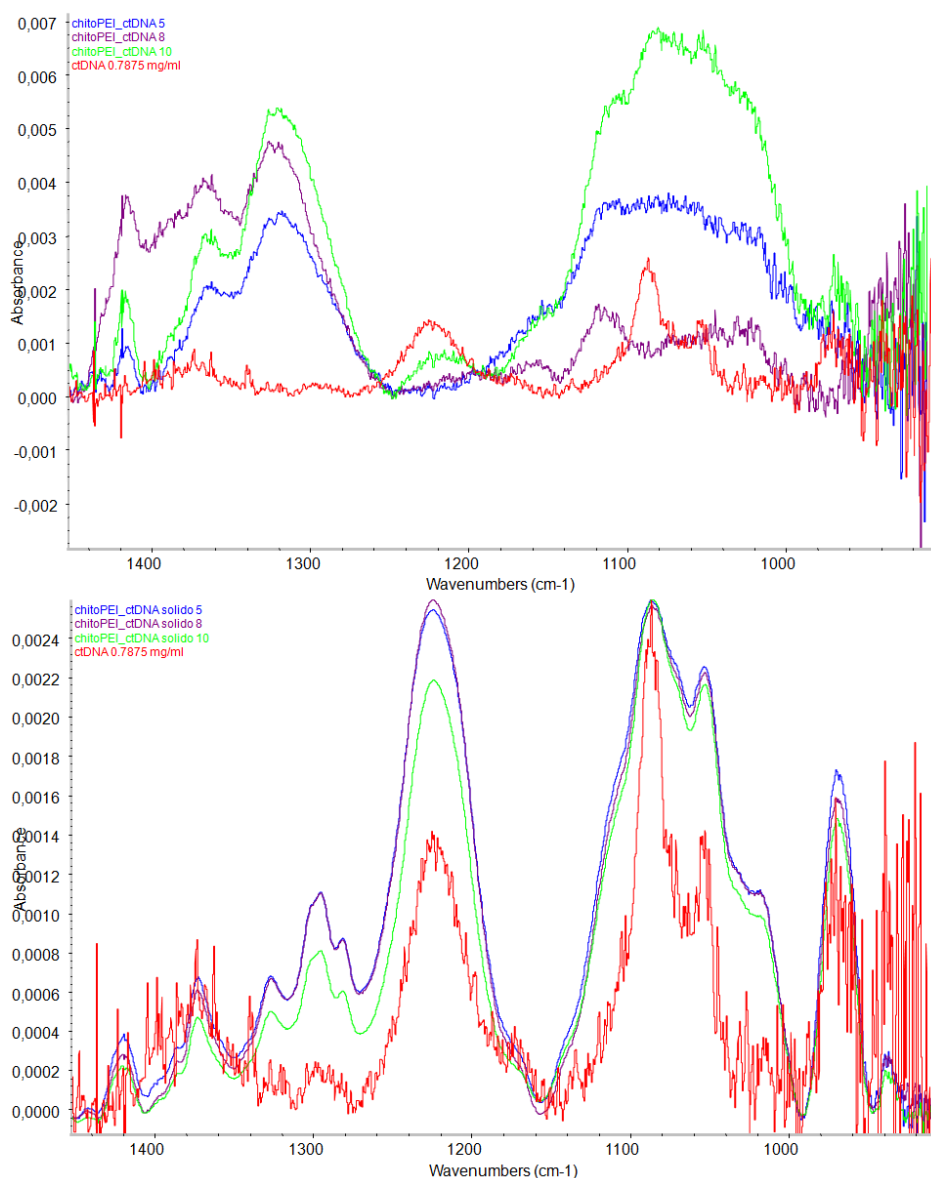


Figura 5.27. Confronto degli spettri di interagito misurati sulla fase liquida (in alto, *common scale*) e su quella precipitata (in basso) nei tre rapporti di concentrazione 5:0.7875 (blu), 8:0.7875 (viola), 10:0.7875 (verde) con quello di ctDNA 0.7875 mg/ml (rosso). Risoluzione 1, *spacer* 0.015 mm, nr. scansioni 128.

Si è notato immediatamente come solo gli spettri realizzati sull'aggregato (non sulla fase liquida) presentassero i picchi tipici del DNA, cioè quelli relativi allo *stretching* simmetrico e antisimmetrico del  $\text{PO}_2^-$  (rispettivamente vicino a  $1090\text{ cm}^{-1}$  e  $1220\text{ cm}^{-1}$ ) e quelli relativi al CO e CC *stretching* del *backbone* dello zucchero, posti rispettivamente a circa  $1050$  e  $970\text{ cm}^{-1}$ . Inoltre, avendo normalizzato in questo caso i segnali sulla banda relativa allo *stretching* simmetrico del gruppo fosfato, è stato osservato un incremento nel valore di intensità del picco di *stretching* antisimmetrico riferito al medesimo gruppo proporzionalmente con la quantità di polimero presente in soluzione. Questa considerazione ci ha portato a pensare che il fenomeno di precipitazione del DNA sia causato proprio dalla presenza di chitosano-g-PEI in soluzione. Probabilmente il polimero è in grado di alterare le condizioni al contorno, tanto da indurre una modifica nella configurazione della doppia elica nucleotidica, la quale si è andata a compattare fino alla forma che noi abbiamo osservato. L'intensità crescente è risultata, quindi, connessa allo stato di aggregazione della molecola, tanto che la legge di Lambert-Beer ha potuto confermare questa ipotesi. Infatti, valori elevati di assorbimento possono essere connessi ad una maggiore concentrazione della molecola nel precipitato su cui è stata realizzata la misura. Perciò le concentrazioni finali calcolate in tabella 5.10 non sono state effettivamente mantenute nelle soluzioni preparate. Possiamo ragionevolmente concludere che le due molecole siano pressoché divise nelle due fasi: la fase solida è risultata costituita principalmente da ctDNA (vedi figura 5.27 in basso), mentre quella liquida, invece, da chitosano-g-PEI (vedi figura 5.26 in alto). In aggiunta, il valore di frequenza del modo vibrazionale di *stretching* antisimmetrico del gruppo fosfato nello spettro della fase precipitata è prossimo a quello attribuito alla configurazione B-DNA, ovvero la forma più idratata. Di conseguenza questo dato sostiene l'ipotesi per cui la massa biancastra che si forma e precipita rappresenta una forma di aggregazione della molecola di DNA in condizioni di saturazione d'acqua. Il fenomeno di formazione di aggregati all'interno di una soluzione costituita da DNA e polimero è stato descritto anche da Smith et al. (1998). Questo gruppo ha affermato che la costituzione di un aggregato piuttosto che di un complesso solubile potesse dipendere dal pH, dalla forza ionica, dalla temperatura, dal solvente, dalla concentrazione e omogeneità dei reagenti in soluzione. Inoltre, il fatto che il DNA utilizzato sia risultato avere un peso molecolare maggiore rispetto al polimero di chitosano-g-PEI favorirebbe questo tipo di aspetto.

Nonostante la formazione di questa massa solida ci permetta di avere spettri con bande molto intense e quindi chiaramente distinguibili rispetto alla linea di base, siamo molto lontani dalle condizioni attese nel campo della trasfezione, in cui si lavora con concentrazioni dell'ordine di 0.02 mg/ml. Perciò sono state modificate le condizioni delle soluzioni per ovviare a fenomeni di precipitazione e avvicinarsi alle condizioni della trasfezione per quanto possibile.

Per agevolare questo studio che ha richiesto un nuovo campione polimerico, l'indagine si è spostata sul PLL di massa molecolare 4-15 kDa, disponibile commercialmente. La prima modalità con cui tale vettore è stato complessato al ctDNA ha tenuto conto dei rapporti in massa di PLL/ctDNA, per cui abbiamo scelto i parametri riportati in tabella 5.12.

<b>RAPPORTI IN MASSA</b>	<b>[PLL]<sub>0</sub></b>	<b>[ctDNA]<sub>0</sub></b>	<b>m<sub>PLL</sub></b>	<b>m<sub>ctDNA</sub></b>	<b>V<sub>PLL</sub></b>	<b>V<sub>ctDNA</sub></b>	<b>[PLL]<sub>f</sub></b>	<b>[ctDNA]<sub>f</sub></b>
1 : 3	20 mg/ml	1.575 mg/ml	20 µg	60 µg	1 µl	38.095 µl	0.51 mg/ml	1.53 mg/ml
2 : 3	20 mg/ml	1.575 mg/ml	20 µg	30 µg	1 µl	19.05 µl	1 mg/ml	1.50 mg/ml
3 : 3	20 mg/ml	1.575 mg/ml	20 µg	20 µg	1 µl	12.7 µl	1.46 mg/ml	1.46 mg/ml
3 : 1	20 mg/ml	1.575 mg/ml	60 µg	20 µg	3 µl	12.7 µl	3.82 mg/ml	1.27 mg/ml

Tabella 5.12. Elenco dei parametri delle soluzioni preparate al variare del rapporto in massa.

In questo caso non si è riscontrata la formazione di una massa solida, ma gli spettri riportati in figura 5.29 hanno basse intensità. Nell'immagine manca lo spettro riferito al rapporto in massa di 3:1, poiché mostrava un segnale di DNA debole e poco significativo

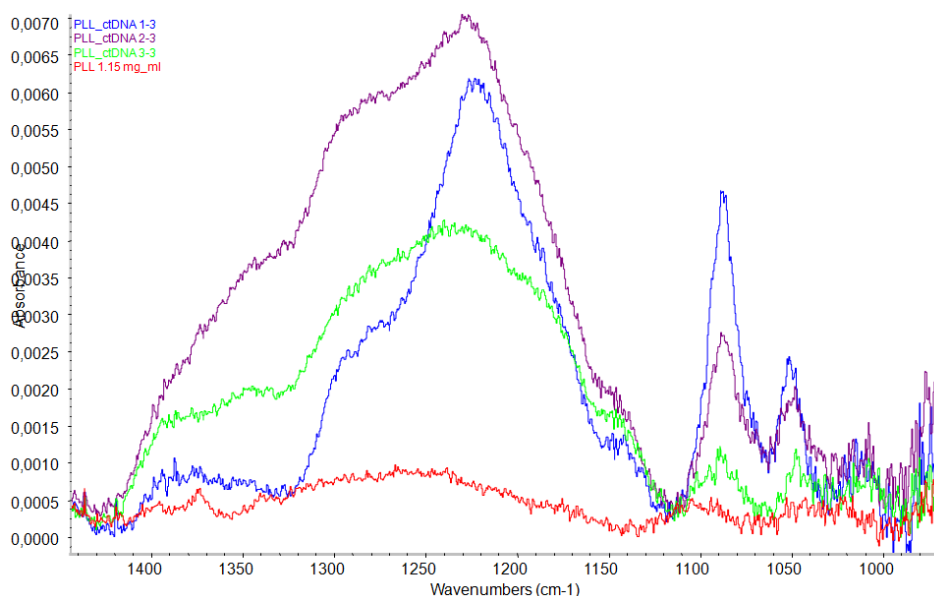


Figura 5.29. Spettri riferiti alle soluzioni di PLL e ctDNA preparate seguendo i rapporti in massa della tabella 5.12, rispettivamente 1:3 (blu), 2:3 (viola) e 3:3 (verde), a confronto con lo spettro registrato per PLL 1.15 mg/ml (rosso). *Common scale*, risoluzione 1, *spacer* 0.015 mm, nr. scansioni 128.



Gli spettri possono essere letti in questo modo: all'aumentare della quantità di polimero presente in soluzione è cambiata la forma e l'intensità relativa della banda dello *stretching* antisimmetrico del gruppo fosfato a circa  $1220\text{ cm}^{-1}$ . Infatti, considerando il segnale relativo alla maggiore concentrazione finale di ctDNA (rapporto in massa 1:3) è stato individuato l'aspetto usuale con i picchi assegnati al gruppo fosfato di DNA. Passando a concentrazioni finali sempre più basse per la crescente percentuale di PLL sciolto in soluzione, la situazione non è risultata più la stessa: l'intervallo compreso tra  $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  non ha subito alterazioni in termini di lunghezza d'onda, ma solo di intensità, come prevedibile; invece, il *marker*, inteso come il modo vibrazionale del  $\text{PO}_2^-$  antisimmetrico, ha perso la propria forma. La nuova conformazione sembra appunto essere il risultato della somma di più bande presenti a frequenze maggiori e che abbiamo attribuito al polimero secondo le assegnazioni fatte nel paragrafo precedente.

L'approccio per cui sono stati controllati i rapporti di massa dei due componenti ha reso dei risultati difficilmente confrontabili poiché le concentrazioni finali dei soluti non sono fissate. Solo un lavoro in cui l'attenzione è posta a mantenere costante la concentrazione finale di una molecola comporta degli spettri in cui l'intensità delle sue bande devono essere paragonabili a meno di modifiche del legame a cui il modo vibrazionale fa riferimento. Per questo motivo, ci siamo concentrati sullo studio di soluzioni a concentrazioni controllate. In tabella 5.13 sono stati riportati i parametri scelti per la preparazione delle soluzioni, di cui è stato stabilito il volume totale, il rapporto tra i volumi di ctDNA e PLL e, appunto, la concentrazione finale della macromolecola genomica.

<b>RAPPORTO IN VOLUME</b>	<b>V<sub>tot</sub></b>	<b>[PLL]<sub>0</sub></b>	<b>[ctDNA]<sub>f</sub></b>	<b>V<sub>PLL</sub></b>	<b>V<sub>ctDNA</sub></b>	<b>[ctDNA]<sub>0</sub></b>	<b>[PLL]<sub>f</sub></b>
1 : 3	50 $\mu\text{l}$	20 mg/ml	0.7875 mg/ml	12.5 $\mu\text{l}$	37.5 $\mu\text{l}$	1.05 mg/ml	5 mg/ml
2 : 3	50 $\mu\text{l}$	20 mg/ml	0.7875 mg/ml	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	1.3125 mg/ml	8 mg/ml
3 : 3	50 $\mu\text{l}$	20 mg/ml	0.7875 mg/ml	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	1.575 mg/ml	10 mg/ml

Tabella 5.13. Elenco delle soluzioni preparate fissando i rapporti in volume delle componenti, la concentrazione finale di ctDNA e il volume totale.

Le soluzioni così preparate hanno mostrato la formazione della massa biancastra, già incontrata nei complessi con chitosano-g-PEI, solo per rapporto in volume PLL/ctDNA pari a 3:3. Le conclusioni che abbiamo tratto sono le stesse: per concentrazioni sufficienti di PLL l'interazione con il ctDNA, di elevato peso molecolare, sono così intense da

produrre aggregati così estesi da precipitare in forma di flocculato biancastro. Nella fase liquida (sopranante) è rimasto poco materiale in soluzione, come evidenziato dagli spettri registrati. Il confronto tra gli spettri realizzati in figura 5.30.

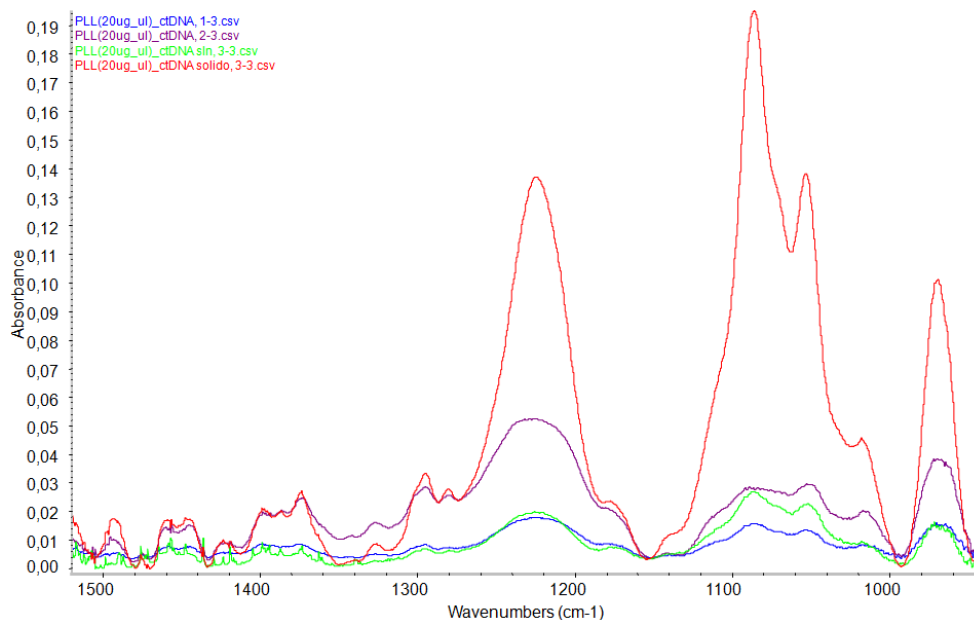


Figura 5.30. Confronto tra gli spettri realizzati per le soluzioni di PLL e ctDNA preparate come indicato in tabella 5.11, rispettivamente per rapporti in volume 1:3 (blu), 2:3 (viola), 3:3 misurato per la fase liquida (verde) e solida (rosso). *Common scale*, risoluzione 1, *spacer* 0.015 mm, nr. scansioni 128.

Come si vede dal grafico di figura 5.30, gli spettri hanno sostanzialmente mantenuto lo stesso aspetto, cioè le frequenze riferite ai modi vibrazionali non hanno subito *shift* da un campione all'altro. Le principali differenze si sono incontrate nei valori di intensità. Mentre, come previsto, le altezze dei picchi di *stretching* del  $\text{PO}_2^-$  e dei legami CO e CC dello zucchero per le due soluzioni in cui non si è verificata la formazione dell'aggregato hanno mostrato valori crescenti proporzionali alla quantità di molecole di polimero, questo andamento non è stato rispettato nell'ultimo caso. Infatti, per il rapporto volumetrico 3:3 la fase liquida del complesso PLL/ctDNA si è presentata con un'intensità più debole di quella che ci si potrebbe aspettare; viceversa per la fase solida, dove si sono osservate delle bande molto più intense rispetto alle attese. Si è tornati quindi alla conclusione per cui le condizioni di concentrazione nella soluzione dove si è formato l'aggregato sarebbero alterate in relazione a quelle calcolate nella tabella 5.12, a causa dei fenomeni di flocculazione osservati.

Per risolvere questo problema legato alle soluzioni finali con una concentrazione troppo elevata di molecole, è stato ripetuto il medesimo esperimento, a partire da PLL a 1.15 mg/ml (invece che 20 mg/ml). I nuovi parametri sono riportati in tabella 5.14.

RAPPORTO IN VOLUME	V <sub>tot</sub>	[PLL] <sub>0</sub>	[ctDNA] <sub>f</sub>	V <sub>PLL</sub>	V <sub>ctDNA</sub>	[ctDNA] <sub>0</sub>	[PLL] <sub>f</sub>
1 : 3	50 µl	1.15 mg/ml	0.7875 mg/ml	12.5 µl	37.5 µl	1.05 mg/ml	0.2875 mg/ml
2 : 3	50 µl	1.15 mg/ml	0.7875 mg/ml	20 µl	30 µl	1.3125 mg/ml	0.46 mg/ml
3 : 3	50 µl	1.15 mg/ml	0.7875 mg/ml	25 µl	25 µl	1.575 mg/ml	0.575 mg/ml

Tabella 5.14. Elenco delle soluzioni preparate fissando i rapporti in volume delle componenti, la concentrazione finale di ctDNA e il volume totale. Rispetto alla tabella precedente varia la concentrazione iniziale, e di conseguenza quella finale, riferita a PLL, per evitare che aggregi come visto precedentemente nel preparato con rapporto 3:3.

Effettivamente, utilizzando una tale concentrazione di PLL non si è arrivati alla formazione di nessuna massa solida, ma questa concentrazione è risultata avere un valore troppo basso per poter incidere sul segnale IR prodotto dal DNA. Come si nota anche in figura 5.31, infatti, gli spettri dei campioni interagiti hanno mostrato le medesime bande caratteristiche del ctDNA e il contributo della PLL sul DNA non è risultato praticamente rilevante, se non in termini di linea di fondo.

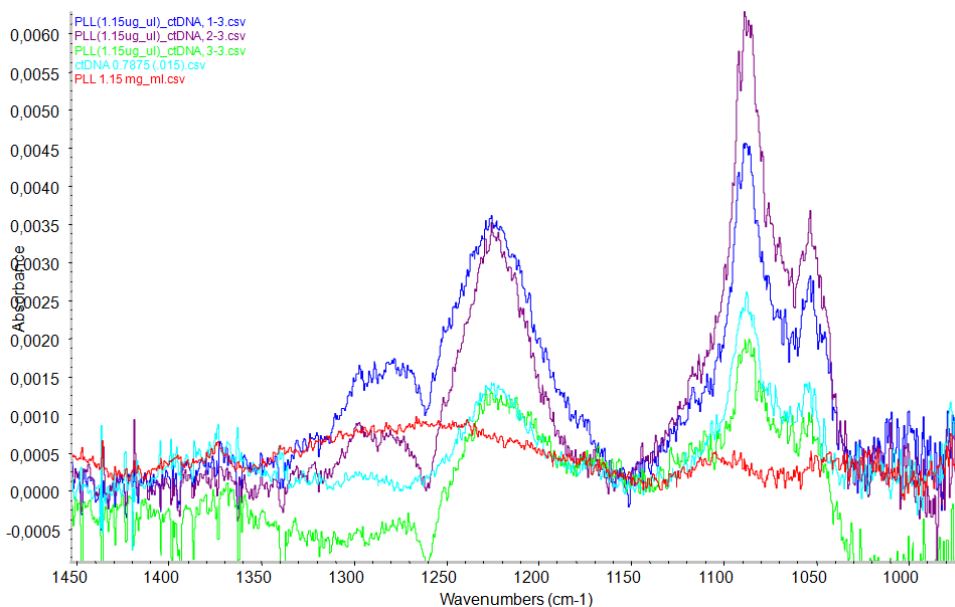


Figura 5.31. Spettri relativi al complesso PLL/ctDNA secondo le condizioni di tabella 5.12; i rapporti in volume PLL/DNA 1:3 (blu), 2:3 (viola), 3:3 (verde), a confronto con le molecole di ctDNA 0.7875 mg/ml (ciano) e PLL 1.15 mg/ml (rosso) presi in soluzione acquosa. *Common scale*, risoluzione 1, *spacer* 0.015 mm, nr. scansioni 128.

La serie degli spettri riportata in figura 5.32 dovrebbe prevedere un andamento decrescente delle bande del DNA nella sequenza di rapporti di volume PLL/DNA 1:3, 2:3 e 3:3. Ciò è stato verificato tranne che per il campione a rapporto 2:3, a causa di errori sperimentali che verranno discussi estesamente alla fine del capitolo.

Fino a qui abbiamo preparato i complessi di polimero/DNA fissando, nell'ordine, i rapporti di concentrazione, massa e volume e cercando di lavorare con ordini di grandezza più vicini possibile a quelli utilizzati nell'ambito della trasfezione. In letteratura è stato individuato un metodo usuale per riportare le condizioni di trasfezione in relazione al CR (*Charge Ratio*). Esso è stato definito quale il rapporto tra le concentrazioni molari delle cariche positive delle ammine relative al polimero cationico e quelle negative del gruppo fosfato del DNA (detto anche N/P). Per esempio, in un lavoro di Reschel et al. (2002), i complessi trasfettanti sono stati preparati mescolando con un agitatore magnetico una soluzione di ctDNA avente acqua o HEPES come solvente, a cui sono state aggiunte quantità diverse di polimero cationico. In entrambi i casi le concentrazioni sono state valutate in funzione del numero di moli di carica rispetto al peso della molecola (mol/g) e, il valore ottenuto, è risultato una costante caratteristica della molecola che si stava considerando; tale carica specifica rimane invariata qualunque sia la massa molecolare del polimero. A partire da queste considerazioni circa il metodo con cui sono complessati polimeri e DNA nel campo della trasfezione, abbiamo applicato anche noi la stessa tecnica per la preparazione delle soluzioni. È stato deciso di utilizzare come vettore cationico la PLL con peso molecolare di 4-15 kDa, la cui costante caratteristica vale 4.8 nmol/ $\mu$ g (tale valore tiene conto della presenza dell'acido bromidrico già associato alla poli-L-lisina nella forma commerciale). Per la componente genomica, invece, l'ssDNA, ha costante pari a 3.03 nmol/ $\mu$ g. La soluzione acquosa iniziale del polimero aveva una concentrazione di cariche positive di 20 mM (cioè 2.92 mg/ml) ed è stata fatta interagire con ssDNA, la cui concentrazione finale è stata fissata a 0.7 mg/ml. Avevamo infatti stabilito precedentemente dall'esame spettrale che al di sotto di questo valore non saremmo stati in grado di osservare il segnale relativo alla molecola. Impostati questi parametri, prima di procedere con le misure, abbiamo osservato i risultati ottenuti dalla collaborazione con il gruppo del prof. Candiani circa la complessazione del DNA con PLL, l'efficienza di trasfezione e la vitalità cellulare al variare del rapporto N/P (vedi figura 5.32).

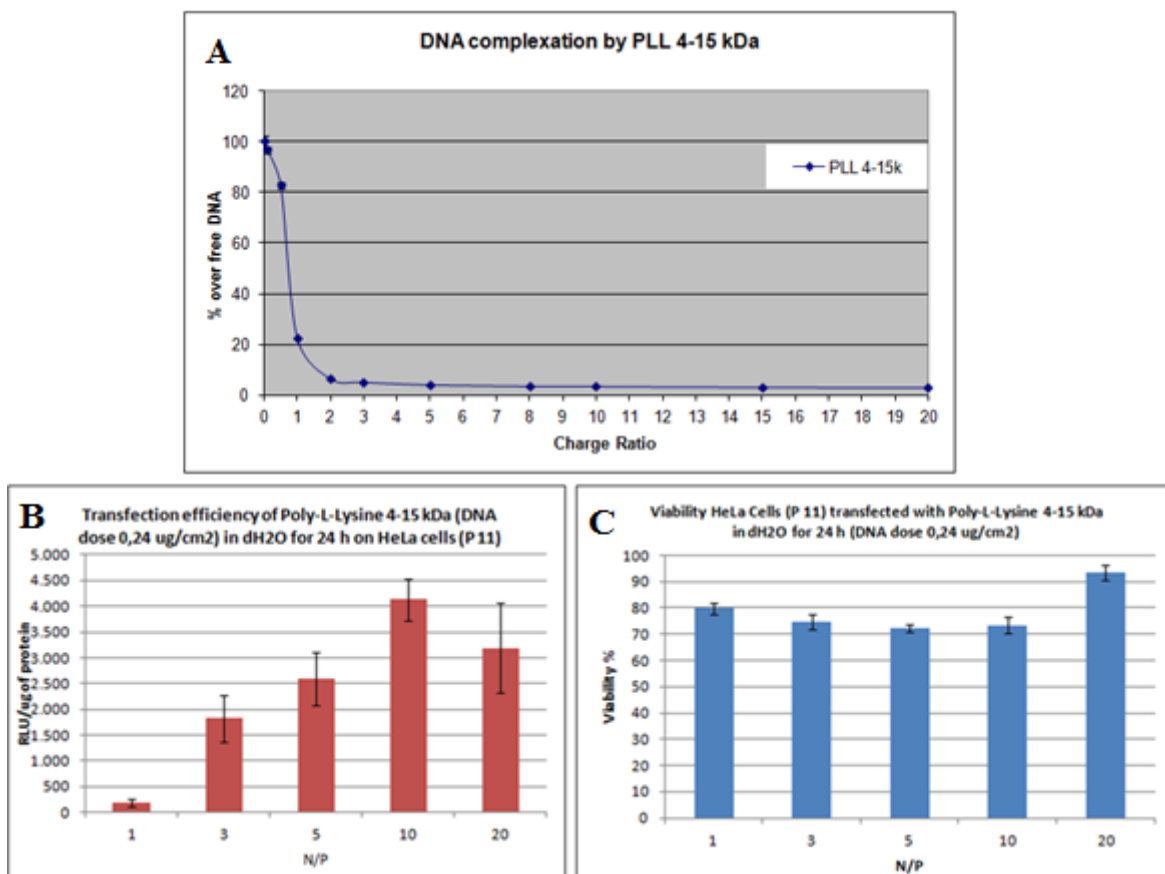


Figura 5.32. Tre grafici relativi alla valutazione della trasfezione al variare del rapporto N/P per PLL con concentrazione di cariche positive pari a 20 mM e ssDNA, la cui concentrazione finale è fissata a 0.02 mg/ml. In (A) la curva esprime la percentuale di DNA libero e dà informazioni circa l'interazione delle due molecole; in (B) si valuta l'efficienza di trasfezione in funzione della luce prodotta dalle cellule in cui il processo avviene con successo; infine, in (C) si stima la vitalità cellulare, ovvero la citotossicità sulle cellule per valori crescenti del rapporto N/P.

Come è stato osservato dalla prima curva (grafico A), si è dedotto che aumentando la quantità di polimero, mantenendo appunto invariata la concentrazione finale del DNA, è diminuita la percentuale di doppia elica libera in soluzione, fino ad una condizione di saturazione per cui essa è apparsa in pratica complessata completamente con PLL. Nel secondo grafico (B) è stata definita l'efficienza del fenomeno di trasfezione in funzione della luce prodotta dall'enzima codificato dal gene trasfettato (tipicamente luciferasi). Infine, è stata valutata la citotossicità (grafico C) in base alla vitalità delle cellule trattate con il vettore polimerico considerato.

In base a questi risultati, sono state preparate soluzioni per CR compresi tra 0.1 e 6, in modo da investigare il primo tratto della curva di complessazione del DNA (vedi figura

5.32A). Non siamo stati in grado di superare valori di CR pari a 6 poiché siamo vincolati a non diluire ulteriormente il DNA oltre una concentrazione di 0.7 mg/ml, soglia imposta dallo strumento vista altrimenti l'impossibilità di raccogliere spettri significativi. Nel campo della trasfezione, invece, i rapporti N/P attorno a 10, considerati ottimali secondo i grafici riportati nella figura 5.32, si sono riusciti a realizzare per la possibilità di utilizzare quantità molto più piccole di materiale genetico, con concentrazioni almeno di un ordine di grandezza inferiore rispetto al nostro.

A partire da 7  $\mu$ l di una soluzione acquosa di ssDNA a 2 mg/ml si sono aggiunti 13  $\mu$ l di PLL, preparata come segue. Sono state calcolate le moli di cariche negative relative ai gruppi fosfati della catena nucleotidica moltiplicando la costante caratteristica della carica della molecola (3.03 nmol/ $\mu$ g) per la sua massa in soluzione. Per ottenere la concentrazione di ammine necessarie a raggiungere il rapporto N/P richiesto, le moli di cariche negative sono state divise per il volume di PLL stabilito (13  $\mu$ l) e moltiplicate per il CR in esame. Infine sono stati determinati i volumi di acqua deionizzata e PLL iniziale (con concentrazione di cariche positive pari a 20 mM) necessari per raggiungere il valore di concentrazione appena ricavato. In tabella 5.15 sono stati riportati i parametri numerici ricavati al variare del CR.

CR	V <sub>ssDNA</sub>	V <sub>PLL</sub>	mol <sub>ssDNA</sub>	[+] <sub>PLL</sub>	V <sub>PLL</sub>	V <sub>dH2O</sub>
0.1	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	0.33 mM	0.33 $\mu$ l	19.67 $\mu$ l
0.5	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	1.63 mM	1.63 $\mu$ l	18.37 $\mu$ l
1.0	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	3.26 mM	3.26 $\mu$ l	16.74 $\mu$ l
2.0	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	6.53 mM	6.53 $\mu$ l	13.47 $\mu$ l
3.5	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	11.42 mM	11.42 $\mu$ l	8.58 $\mu$ l
5.0	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	16.31 mM	16.31 $\mu$ l	3.69 $\mu$ l
6.0	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	19.58 mM	19.58 $\mu$ l	0.42 $\mu$ l

Tabella 5.15. Elenco dei parametri impostati per le soluzioni al variare di CR, tenendo conto di avere una concentrazione iniziale di cariche positive della PLL pari a 20 mM, una concentrazione finale di ssDNA di 0.7 mg/ml, e le costanti di carica specifica relative alle due molecole rispettivamente pari a 4.8 e 3.03 nmol/g.

Per ogni CR sono state preparate 2 o 3 soluzioni in *batch* differenti, in modo da poter registrare un numero maggiore di spettri IR da esaminare successivamente. In figura 5.33 sono stati riportati, ad esempio, gli spettri realizzati per CR 0.1 e CR 3.5.

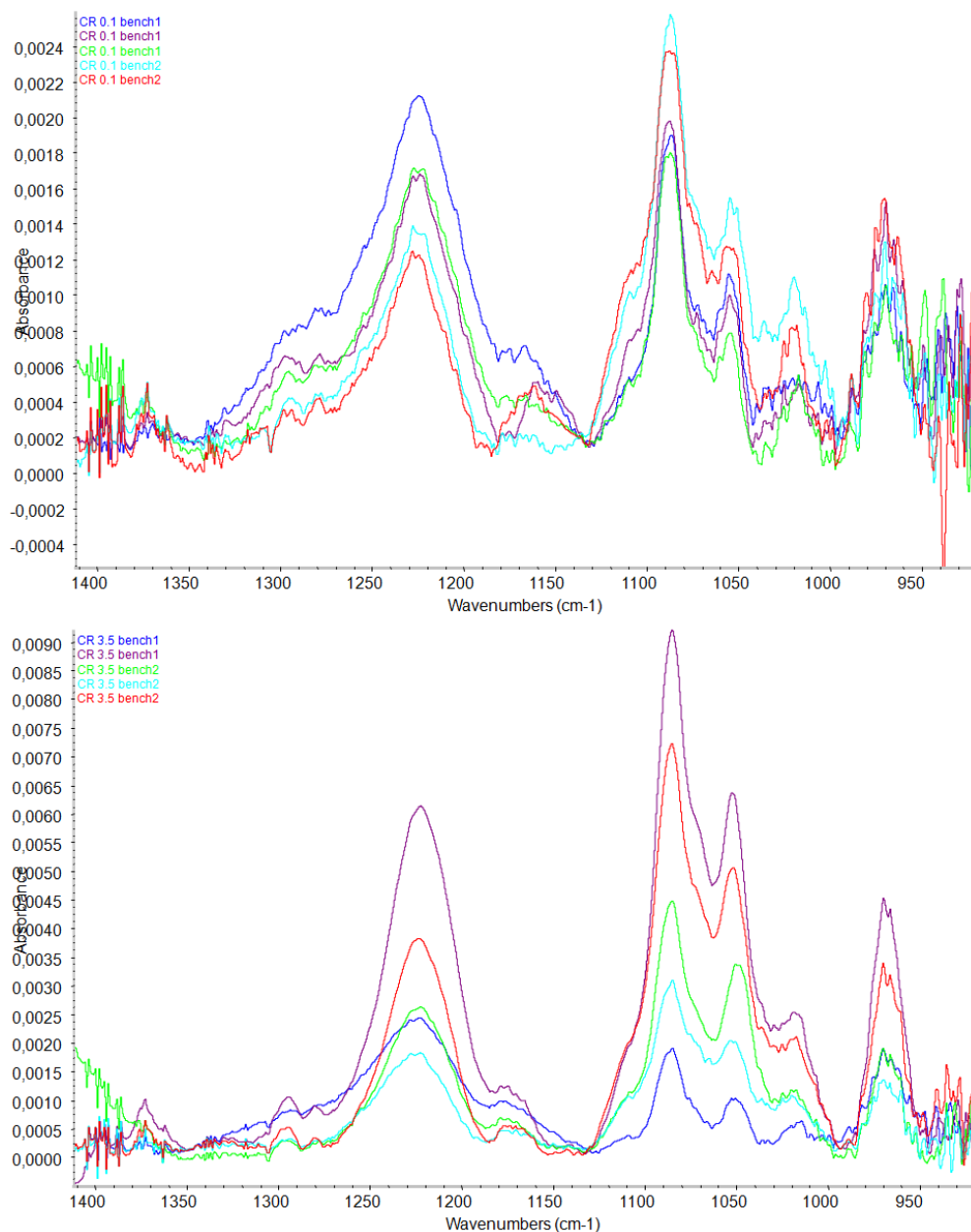


Figura 5.33. Confronto tra gli spettri raccolti per due diversi CR (0.1 in alto, 3.5 in basso), entrambi preparati in due *batch* indicati nell'etichetta. *Common scale*, risoluzione 2, *spacer* 0.012 mm, nr. scansioni 128.

Come si può osservare in entrambi i grafici di figura 5.33 (il che vale anche per gli spettri relativi ad altri CR non mostrati), si notano ampie variazioni di intensità delle bande, indipendentemente dal *batch* considerato. Tali variazioni non possono essere solo imputate ad effetti di *baseline*, ma possono essere anche dovuti a variazioni locali di concentrazione nel volume di misura dovute ai fenomeni di aggregazione tra polimero e DNA. La valutazione di questo aspetto richiederà studi successivi a questa tesi.

Abbiamo verificato, quindi, l'attribuzione dei picchi alle due molecole del complesso eseguendo il confronto con gli spettri dei costituenti puri (ssDNA e PLL) riportati in figura 5.34.

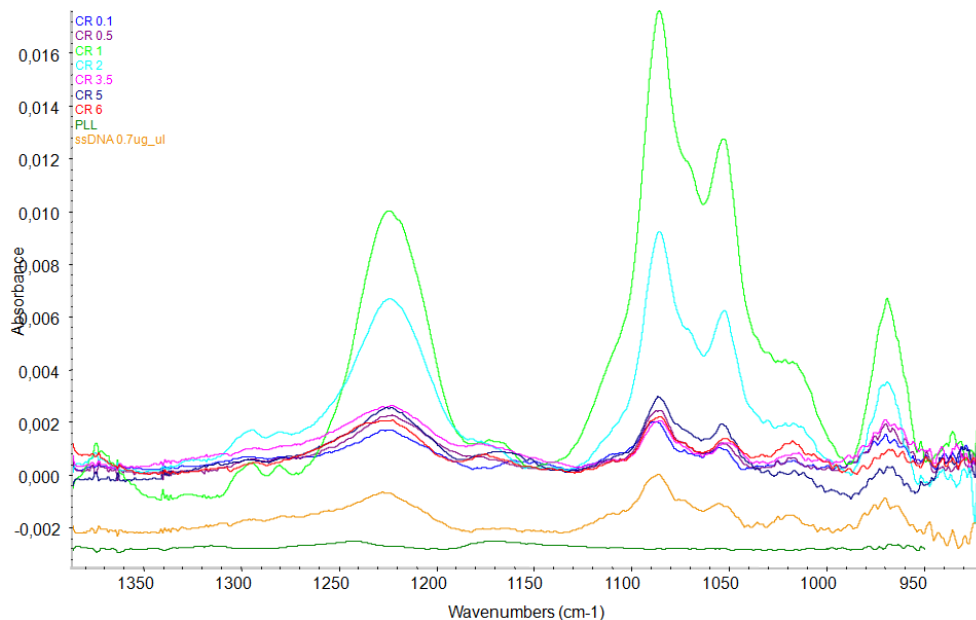


Figura 5.35. Confronto tra gli spettri al variare del CR con quelli di ssDNA (giallo) e PLL (verde scuro). *Common scale*, risoluzione 2, *spacer* 0.012 mm, nr. scansioni 128.

Dalla figura 5.34 si nota come il profilo spettrale dei complessi dipenda soprattutto dal contributo di ssDNA; il PLL si è sommato più che altro a incrementare l'intensità della banda attorno a  $1170\text{ cm}^{-1}$  e come spalla al picco riferito al modo vibrazionale di *stretching* antisimmetrico. Il peso quasi irrilevante associato al segnale del PLL è dovuto alla sua intensità decisamente più debole rispetto a quella del DNA.

Per limitare l'effetto delle fluttuazioni del segnale a diversi valori di CR abbiamo effettuato delle medie degli spettri, il cui risultato è riportato nella figura 5.35. Si osserva una variazione di intensità molto marcata per il campione a CR 1. L'analisi delle frequenze dei picchi simmetrico e asimmetrico del fosfato (figura 5.36) mostra che in effetti intorno a CR 1 è presente una transizione che corrisponde abbastanza bene con la rapida decrescita della percentuale di DNA libero nella curva di complessazione mostrata in figura 5.32(A).



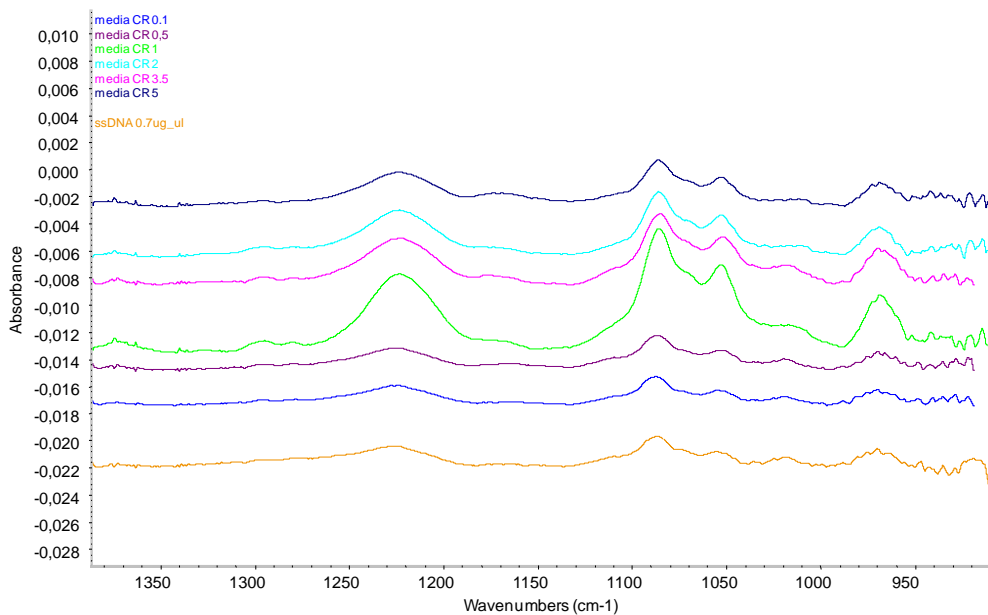


Figura 5.35. Confronto tra gli spettri ottenuti dalla media dei segnali raccolti per ogni CR e quello del DNA.

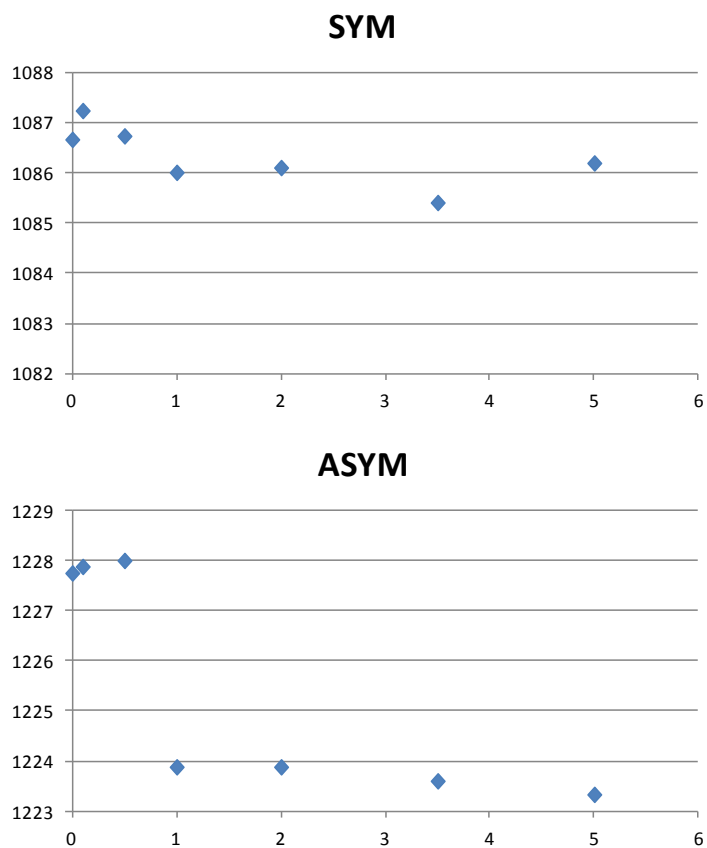


Figura 5.36. Variazione in frequenza dei picchi simmetrico e antisimmetrico del gruppo fosfato calcolata sugli spettri della figura 5.34

Abbiamo deciso di seguire il metodo di analisi di uno studio di Marty et al. (2009) applicato a lipoplessi (interazione tra lipidi e DNA) per poter individuare un nuovo parametro in grado di descrivere le variazioni dei complessi per i diversi CR. In questo lavoro, a partire dai risultati ottenuti con tecnica FT-IR, è stato fatto un confronto tra i rapporti delle intensità di alcune bande con quella del picco attorno a  $970\text{ cm}^{-1}$  preso come riferimento (attribuito al *CC stretching* dello zucchero). Abbiamo deciso di misurare le altezze delle bande relative al *CO stretching* del gruppo furanoso, allo *stretching* simmetrico e antisimmetrico del  $\text{PO}_2^-$  relativamente ad un segmento di retta tracciato come *baseline* per questi picchi. Un'apposita funzione di Omnic ci ha permesso di eseguire facilmente questo procedimento. Una volta misurate le intensità, abbiamo calcolato i rapporti riferiti alla banda dello *stretching* simmetrico del fosfato e al *CO stretching* del furanoso. I valori di media e deviazione standard calcolati per ciascun rapporto al variare di CR sono riportati in tabella 5.16.

CR	SYM/970	stdev	ASYM/970	stdev	970/SYM	stdev	ASYM/SYM	stdev
<b>0</b>	1,97	0,01	1,56	0,30	0,51	0,00	0,79	0,15
<b>0,1</b>	1,90	0,35	1,45	0,68	0,54	0,11	0,74	0,27
<b>0,50</b>	1,48	0,48	0,94	0,63	0,75	0,28	0,58	0,22
<b>1,00</b>	1,47	0,07	0,93	0,07	0,68	0,03	0,63	0,05
<b>2,00</b>	1,66	0,30	1,33	0,63	0,62	0,10	0,78	0,22
<b>3,50</b>	1,41	0,50	1,08	0,90	0,84	0,48	0,68	0,34
<b>5,00</b>	1,55	0,24	1,13	0,18	0,66	0,10	0,73	0,08
<b>6,00</b>	1,86	0,42	1,42	0,53	0,56	0,13	0,74	0,18

Tabella 5.16. Elenco dei valori medi e delle deviazioni standard calcolate per i vari CR. Il numero di campioni per ciascun CR sono 6, eccetto che per valori di CR pari a 1 e 2 per cui diventano 7.

Abbiamo costruito quindi dei grafici a dispersione (uno per ogni rapporto tra le intensità dei picchi calcolato), aventi CR sull'asse delle ascisse e i relativi valori medi sulle ordinate. Ciascun punto ha riportata la barra d'errore pari alla deviazione standard (vedi figura 5.37).

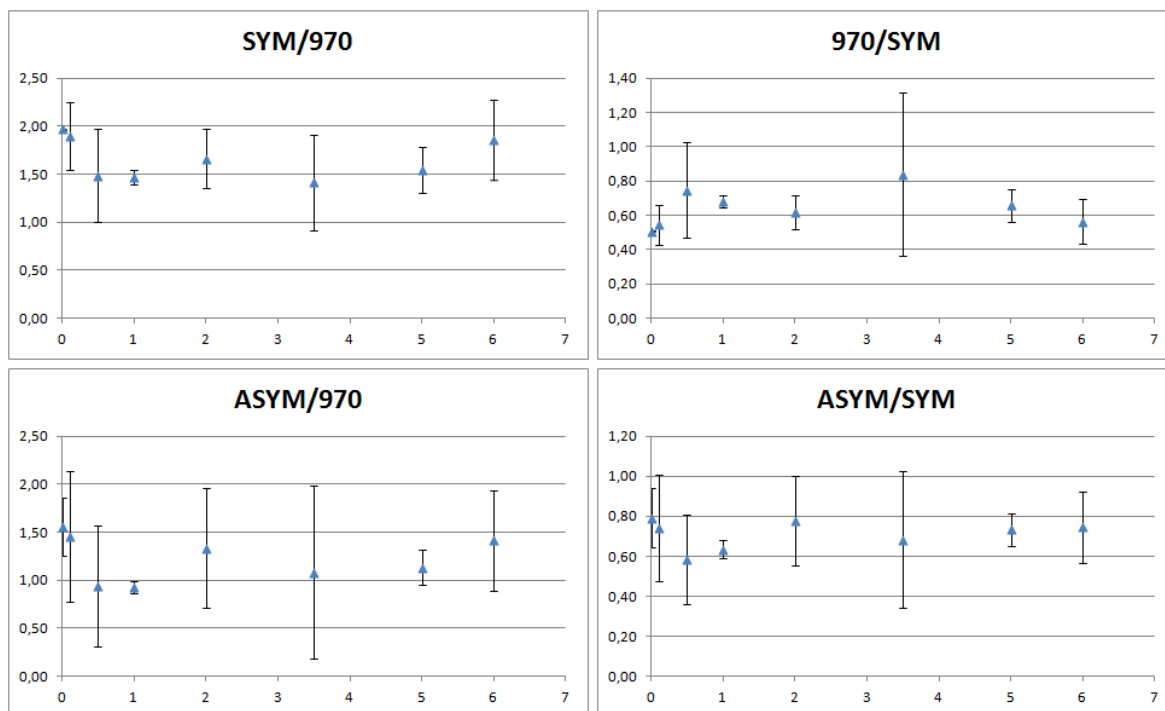


Figura 5.37. Grafici a dispersione che riportano, per ogni CR, il rapporto di intensità delle bande indicate per i complessi PLL/ssDNA.

Osservando gli andamenti dei rapporti di intensità tra le bande caratteristiche dei complessi, si nota come essi possano ritenersi costanti entro le bande d'errore. A titolo di esempio abbiamo messo a confronto i nostri risultati con alcuni di quelli di Marty, riportati in figura 5.38.

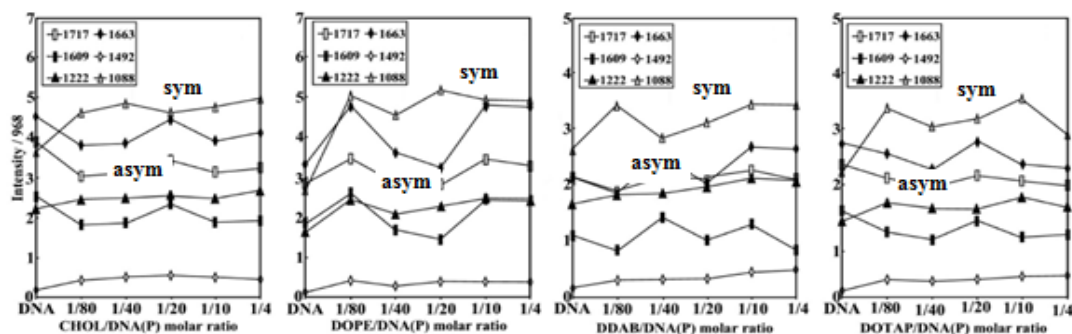


Figura 5.38. Grafici per diversi tipi di lipoplessi (riportati sotto l'asse delle ascisse), in cui è tracciato il profilo del rapporto tra alcune bande caratteristiche (le lunghezze d'onda sono riportate nelle etichette) al crescere di N/P. [Marty (2009)]

Considerando le curve riferite alle intensità dei picchi di *stretching* del fosfato, sia simmetrico che antisimmetrico, rispetto a quella del CO *stretching*, nei risultati di Marty riportati per un intervallo di CR (0-0.25) molto più stretto se paragonato con quello da noi

considerato (0-6), abbiamo incontrato un andamento piuttosto lineare e leggermente crescente. Purtroppo, nei punti riportati nel grafico mancano i dati statistici (deviazione standard) per cui non siamo in grado di valutare la dispersione dei dati che ci informano in merito all'attendibilità della misura. Da un confronto con i nostri risultati in figura 5.36, per esempio, ci siamo accorti che il problema nella definizione dell'andamento è legato proprio all'ampio intervallo che abbiamo individuato nello scostamento massimo delle misure dal valore medio. Abbiamo potuto però individuare un'altra importante differenza all'interno della trattazione eseguita da Marty e colleghi. Mentre è stata nostra cura lavorare per quanto possibile in condizioni prossime a quelle definite nel campo della trasfezione, le quali ci hanno creato non pochi problemi di intensità del segnale e manipolazione dei campioni, nello studio di Marty del 2009 la concentrazione del materiale genomico è significativamente più elevata. Sono state trattate concentrazioni che superano di tre ordini di grandezza quelle da noi impiegate, condizioni per le quali anche noi saremmo in grado di misurare con il nostro strumento degli spettri in cui definire meglio il profilo delle bande e, quasi sicuramente, anche le intensità dei picchi avrebbero valori in assorbanza meno dispersi attorno al valore medio.

#### 5.4. Interazione tra materiale genetico e $NH_4OH$

Abbiamo provato, infine, a verificare sempre con lo stesso procedimento la variazione dei rapporti tra le bande caratteristiche del DNA, complessandolo però con ammoniaca ( $NH_4OH$ ), in maniera da eliminare le sovrapposizioni dei segnali dovuti alle catene polimeriche. Per la preparazione della soluzione, abbiamo ripreso lo schema riportato in tabella 5.13. Abbiamo assunto per semplicità che  $NH_4OH$  in acqua sia dissociato in  $NH_4^+$  e  $OH^-$ , perciò la molarità delle cariche positive è stata stimata equivalente a quella della soluzione. Osserviamo i parametri numerici ricavati in tabella 5.17.

CR	$V_{ssDNA}$	$V_{NH_4OH}$	$[-]_{ssDNA}$	$[+]_{NH_4OH}$	$V_{NH_4OH}$	$V_{dH_2O}$
0.1	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	0.33 mM	0.33 $\mu$ l	19.67 $\mu$ l
0.5	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	1.63 mM	1.63 $\mu$ l	18.37 $\mu$ l
1.0	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	3.26 mM	3.26 $\mu$ l	16.74 $\mu$ l
2.0	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	6.53 mM	6.53 $\mu$ l	13.47 $\mu$ l
3.0	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	9.79 mM	9.79 $\mu$ l	10.21 $\mu$ l
3.5	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	11.42 mM	11.42 $\mu$ l	8.58 $\mu$ l
5.0	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	16.31 mM	16.31 $\mu$ l	3.69 $\mu$ l
6.0	7 $\mu$ l	13 $\mu$ l	42.42 nmol	19.58 mM	19.58 $\mu$ l	0.42 $\mu$ l

Tabella 5.17. Elenco dei parametri ricavati per i complessi di  $NH_4OH/ssDNA$  al variare di CR.

In figura 5.39 sono stati riportati gli spettri delle soluzioni preparate al variare del rapporto N/P come indicato in tabella 5.17.

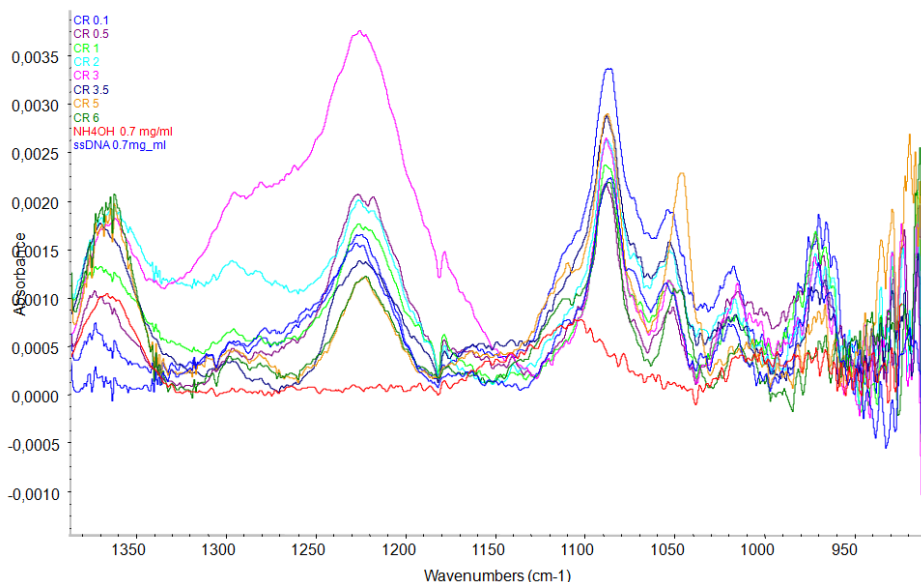


Figura 5.39. Confronto tra gli spettri di  $\text{NH}_4\text{OH}$  (rosso), ssDNA (blu) presi singolarmente, entrambi con concentrazioni pari a 0.7 mg/ml, e delle soluzioni contenenti gli interagiti al variare del CR: 0.1 (blu), 0.5 (viola), 1 (verde), 2 (ciano), 3 (magenta), 3.5 (blu scuro), 5 (giallo) e 6 (verde scuro). *Common scale*, risoluzione 2, *spacer* 0.012 mm, nr. scansioni 128.

Il confronto tra i complessi di ssDNA con la base debole  $\text{NH}_4\text{OH}$  hanno mostrato, come nel caso precedente, una crescita non lineare dell'altezza dei picchi in merito alla percentuale di base aggiunta alla soluzione. Non avendo bande caratteristiche nell'intervallo di nostro interesse, l'ammoniaca non ha inciso sul segnale misurato per le soluzioni di interagito, se non per lunghezze d'onda superiori a  $1350\text{ cm}^{-1}$ . Infatti questo picco è risultato strettamente legato alla quantità di  $\text{NH}_4\text{OH}$  aggiunta al DNA.

Abbiamo, quindi, esaminato il rapporto tra le intensità dei picchi, misurati come illustrato precedentemente nel caso di PLL/DNA al variare di CR e sono stati riportati nei grafici di figura 5.40.

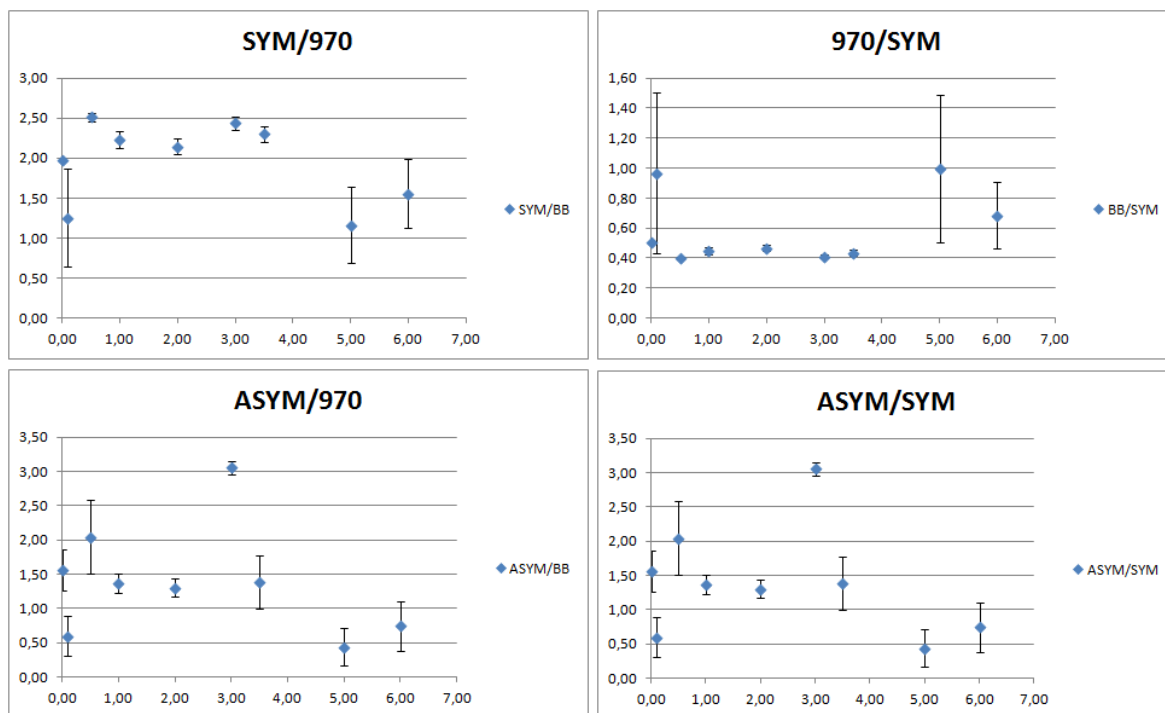


Figura 5.40. Grafici a dispersione che riportano, per ogni CR, il rapporto di intensità delle bande indicate per i complessi  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{ssDNA}$ . Per ciascun CR sono state realizzate 2 misure, eccetto che per valori pari a 0.1, 5 e 6.

In questo caso, le bande di errore hanno mostrato deviazioni standard più piccole, quindi una ridotta dispersione dei rapporti tra le intensità delle bande indicate rispetto al valore medio. Per quanto riguarda l'andamento, però, diventa difficile definirlo. Osservando, per esempio, il rapporto tra le intensità riferite alle bande dello *stretching* del medesimo gruppo fosfato, solo differenti per modo vibrazionale (antisimmetrico/simmetrico), si è notato un andamento crescente per valori bassi di CR, che poi è diventato quasi costante.

In base ai risultati riportati per i complessi di PLL/DNA e per quelli di  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{ssDNA}$  si può concludere di non essere ancora in grado di stimare un andamento circa l'intensità dei vari picchi, sia normalizzati rispetto alla banda di *stretching* simmetrico, sia rispetto a quella di CO *stretching* del furanoso. Per poter migliorare questa valutazione, sarebbe però necessaria la raccolta di più spettri, in maniera tale da poter validare qualunque conclusione con una migliore statistica dei dati. Inoltre, sussiste il problema legato alla dispersione dei risultati attorno al valore medio. La soluzione potrebbe trovarsi nella sistematicità della preparazione dei campioni, nella pulizia dei supporti utilizzati con FT-IR e nel controllo micromeccanico della cella di misura.

## Conclusioni

Facendo riferimento alla letteratura, principalmente al lavoro di Prescott del 1984, abbiamo analizzato con spettroscopia Raman campioni di DNA e chitosano-g-PEI, solidi e in soluzione. Gli studi condotti sugli spettri Raman realizzati con sorgenti di luce visibile a diversa lunghezza d'onda hanno portato a risultati insoddisfacenti. Infatti, le ridotte concentrazioni delle soluzioni e la scarsa sensibilità della tecnica rendono la spettroscopia Raman poco idonea per la caratterizzazione dei complessi ottenuti dall'interazione di tipo polimero/DNA nelle condizioni di interesse per la trasfezione.

Per questo motivo è stata considerata la spettroscopia IR. Inizialmente, questa tecnica è stata applicata all'analisi di molecole a basso peso molecolare che potessero fare da modello per la macromolecola di DNA, nel nostro caso il dietilfosfato (DEP). Dallo studio degli spettri di DEP è stata dimostrata l'importanza delle bande relative al gruppo fosfato, le quali sono state prese come *markers* per la caratterizzazione di questa molecola e delle sue interazioni con l'intorno. Dal confronto con i successivi spettri realizzati per DNA (di *calf thymus* e, successivamente, di *sperm salmon*), abbiamo verificato come i modi vibrazionali del  $\text{PO}_2^-$  siano utili anche come riferimento per la detezione di variazioni nella struttura tridimensionale della catena nucleotidica. Prima di studiare i complessi polimero/DNA, abbiamo focalizzato l'indagine sui due polimeri cationici isolati, di nostro interesse per la trasfezione, cioè chitosano-g-PEI e PLL, in modo da identificare il loro profilo spettrale nel *range* di interesse. Da queste prove abbiamo verificato come i segnali prodotti siano molto deboli, praticamente privi di bande strette caratteristiche della molecola, per cui abbiamo stimato che il contributo che daranno agli spettri di campioni interagiti non sarà determinante, se non per la formazione di spalle a picchi attribuibili al DNA. Abbiamo quindi preparato le soluzioni dei due polimeri interagenti con DNA in diverse condizioni. L'obiettivo di questi esperimenti era di dimostrare l'avvenuta complessazione attraverso gli spettri misurati sui campioni interagiti in condizioni prossime a quelle utilizzate per la trasfezione. L'aspettativa principale era quella di osservare una variazione della configurazione del DNA attraverso lo *shift* o mutamento nella forma della banda-*marker* dello *stretching* antisimmetrico del  $\text{PO}_2^-$ . In verità, gli

spettri in cui siamo riusciti ad osservare i cambiamenti attesi sono stati quelli con valori di concentrazione più lontani da quelli auspicati per la trasfezione, principalmente per il fatto che segnali IR intensi con variazioni significative sono registrati per campioni molto concentrati per i quali si osservano anche fenomeni di aggregazione e precipitazione. Riferendoci a quanto riportato nell'analisi dati di un recente lavoro di letteratura (Marty 2009), abbiamo riportato il risultato delle nostre misure in grafici in cui si traccia il rapporto tra le intensità dei picchi caratteristici (ovvero quelli di *stretching* simmetrico e antisimmetrico del fosfato o del legame CO presente nello zucchero), in funzione del rapporto di carica (CR) tra cariche negative (DNA) e positive (polimero cationico). Con i risultati ottenuti, definiti statisticamente attraverso la media e la deviazione standard per ogni caso studiato, non siamo riusciti ad osservare un *trend*, cioè un andamento specifico dei valori calcolati al crescere del rapporto N/P. Non è certamente agevole il confronto con il lavoro di Marty del 2009, poiché è stato svolto in condizioni sperimentali troppo differenti dalle nostre per concentrazione delle molecole (elevata) e per la mancanza di indicazioni sull'errore sperimentale. Infatti, siamo riusciti ad individuare variazioni più o meno marcate dell'intensità del picco attorno a  $1220\text{ cm}^{-1}$  normalizzato rispetto alle altre due bande di riferimento, ma non siamo stati in grado di trovare la causa di tale comportamento, il quale è apparso non monotono.

Devo ringraziare il progetto di ricerca FIRB "*Surface Assisted Selective Transfection SAST*", RBFR08XH0H, che ha finanziato l'acquisto di tutti i materiali e accessori di misura che hanno reso possibile lo studio sperimentale di questo lavoro di tesi.



## **Bibliografia**

R. R. Alfano, C. H. Liu, L. Sah, H. R. Zhu, D. L. Akins, J. Clearly, R. Prudente and E. Cellmer, *Human Breast Tissue Studied by IR Fourier Transform Raman Spectroscopy*, *Lasers in the Life Sciences*, 4 (1), 23-28, 1991.

I. F. Amaral, P. L. Granja and M. A. Barbosa, *Chemical Modifications of Chitosan by Phosphorilation: an XPS, FT-IR and SEM study*, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 16 (12), 1575-1593, 2005.

M. Banyay, M. Sarkar and A. Gräslund, *A Library of IR Bands of Nucleic Acids in Solution*, *Biophysical Chemistry*, 104, 477-488, 2003.

E. R. Blout and M. Fields, *Absorption Spectra: VII. The Infra-red Spectra of Some Nucleic Acids, Nucleotides, and Nucleosides*, *Journal of Biological Chemistry*, 178, 335-343, 1949.

J. Brugnerotto, J. Liazardi, F. M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrières and M. Rinaudo, *An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization*, *Polymer*, 42, 3569-3580, 2001.

R. K. Dukor, "Vibrational Spectroscopy in the Detection of Cancer", in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, 2002.

A. Elliott and E.J. Ambrose, *Structure of Synthetic Polypeptides*, *Nature*, 165 (4206), 921-922, 1950.

H. Fabian and W. Mäntele, "Infrared Spectroscopy of Proteins", in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, 2002.

M. Falk, K. A. Hartman Jr. and R. C. Lord, *Hydratation of deoxyribonucleic Acid. II. An Infrared Study*, *Journal of the American Chemical Society*, 85, 387-391, 1963.

P. R. Griffiths, "Introduction to Vibrational Spectroscopy", in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, 2002.

- Y. Guan and G. J. Thomas Jr., *Vibrational Analysis of Nucleic Acids. IV. Normal Modes of the DNA Phosphodiester Structure Modeled by Diethyl Phosphate*, *Biopolymers*, 39 (6), 813-835, 1996.
- Y. Guan and G. J. Thomas Jr., *Vibrational Analysis of Nucleic Acids. V. Force Field and Conformation-Dependent Modes of the Phosphodiester Backbone Modeled by Diethyl Phosphate*, *Biophysical Journal*, 71, 2802-2814, 1996.
- G. Herlem, T. Gharbi and N. B. Sedrine, *Analyzing ab Initio Infrared Spectra and Electronic Properties of Polyethylenimine Water Complexes in the Solid State*, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 945, 27-32, 2010.
- M. Jackson and H. H. Mantsch, "Pathology by Infrared and Raman Spectroscopy", in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- H. Jiang, Y. Kim, R. Arote, J. Nah, M. Cho, Y. Choi, T. Akaike, C. Cho, *Chitosan-Graft-Polyethylenimine as a Gene Carrier*, *Journal of Controlled Release*, 117, 273-280, 2007.
- V. Kafil, Y. Omid, *Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells*, *BioImpacts*, 1(1), 23-30, 2011.
- G. Keresztury, "Raman Spectroscopy: Theory", in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- A. R. Leach, *Molecular Modeling: Principles and Applications*, Pearson Education EMA 2001.
- A. G. Leslie, S. Arnott, R. Chandrasekaran, R. L. Ratliff, *Polymorphism of DNA Double Helices*, *Journal of Molecular Biology*, 143 (1), 49-72, 1980.
- R. Marty, C. N'soukpoé-Kossi, D. Charbonneau, C. M. Weinert, L. Kreplak and H. Tajmir-Riahi, *Structural analysis of DNA Complexation with Cationic Lipids*, *Nucleic Acids Research*, 37 (3), 849-857, 2009.
- H. Matsui, M. Nagatori, H. Sakamoto, K. Mizoguchi and N. Toyota, *Hydration States and Metallic Intercalation Effects in Dry DNA*, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 71, 440-443, 2010.

- D. L. Nelson, M. M. Cox, *Introduzione alla biochimica di Lehninger*, Zanichelli editore S.p.A., 2003.
- Z. P. Parra-Guillen, G. Gonzalez-Aseguinolaza, P. Berraondo, I. F. Troconiz, *Gene Therapy: a pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling overview*, *Pharmaceutical Research*, 27, 1487-1497, 2010.
- D. Pezzoli, *Development and Characterization of Novel Stimuli-Responsive Materials for Gene Delivery*, tesi di dottorato in ingegneria dei materiali, 2008-2010.
- L. Popović, D. de Waal and J. C. A. Boeyens, *Correlation between Raman Wavenumbers and P-O Bond Lengths in Crystalline Inorganic Phosphates*, *Journal of Raman Spectroscopy*, 36, 2-11, 2005.
- B. Prescott, W. Steinmetz and G. J. Thomas Jr., *Characterization of DNA Structures by Laser Raman Spectroscopy*, *Biopolymers*, 23, 235-256, 1984.
- T. Reschel, C. Koňán, D. Oupický, L. W. Seymour, K. Ulbrich, *Physical Properties and in Vitro transfection efficiency of Gene Delivery Vectors Based on Complexes of DNA with Synthetic Polycations*, *Journal of Controlled Release*, 81, 201-217, 2002.
- W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, 1985.
- B. Schneider, M. Kabelac and P. Hobza, *Geometry of the Phosphate Group and Its Interactions with Metal Cations in Crystal and ab Initio Calculations*, *Journal of the American Chemical Society*, 118, 12207-12217, 1996.
- C. P. Schultz, "Role of Near-infrared Spectroscopy in Minimally Invasive Medical Diagnosis", in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- L. C. Smith, J. Duguid, M. S. Wadhwa, M. J. Logan, C. H. Tung, V. Edwards and J. T. Sparrow, *Synthetic Peptide-based DNA Complexes for Nonviral Gene Delivery*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 30, 115-131, 1998.
- R. A. Shaw and H. H. Mantsch, "Vibrational Spectroscopy Applications in Clinical Chemistry", in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, 2002.

F. Siebert and P. Hildebrandt, *Vibrational Spectroscopy in Life Science*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.

D. Steele, "Infrared Spectroscopy: Theory", in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, 2002.

E. Taillander and J. Liquier, "Vibrational Spectroscopy of Nucleic Acids", in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, 2002.

D. R. Whelan, K. R. Bambery, P. Heraud, M. J. Tobin, M. Diem, D. McNaughton and B. R. Wood, *Monitoring the Reversible B to A-like Transition of DNA in Eukaryotic Cells Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, *Nucleic Acids Research*, 39 (13), 5439-5448, 2011.

K. Wong, G. Sun, X. Zhang, H. Dai, Y. Liu, C. He and K. W. Leong, *PEI-g-chitosan, a Novel Gene Delivery System with Transfection Efficiency Comparable to Polyethylenimine in Vitro and after Liver Administration in Vivo*, *Bioconjugate Chemistry*, 17, 152-158, 2006.

P. T. T. Wong, R. K. Wong and M. F. K. Fung, *Pressure-Tuning FT-IR Study of Human Cervical Tissues*, *Applied Spectroscopy*, 47, 1058-1063, 1993.

S. S. York, S. E. Boesch, R. A. Wheeler and R. Frech, *Vibrational Assignments for High Molecular Weight Linear Polyethylenimine (LPEI) Based on Monomeric and Tetrameric Model Compounds*, *Macromolecules*, 36, 7348-7351, 2003.

#### **Elenco siti web consultati**

<http://www.chimicare.org>

<http://www.harricksci.com>

<http://www.horiba.com>

<http://www.medicinapertutti.altervista.org>

<http://www.molecularstation.com>

<http://www.newport.com>

<http://www.sigmaldrich.com>

<http://www.spectra2000.it>

<http://www.thermo.com>

<http://www.thermoscientific.de>

<http://fityk.nieto.pl>

## **Ringraziamenti**

Arrivata alla fine di questo percorso importante e atteso, le persone da ringraziare sono veramente tante. Spero di non dimenticarne nessuna.

Innanzitutto, vorrei ringraziare il prof. Tommasini che mi ha sempre aiutato in ogni fase dello svolgimento della tesi con la disponibilità e l'ottimismo che lo contraddistinguono, infondendo consigli, voglia di imparare, conoscere e approfondire in ambiti sempre nuovi. Ma soprattutto, per il difficile compito di correzione dell'elaborato scritto, vista la mia scarsa simpatia verso la sintassi italiana. Il prof. Lucotti per il suo sostegno e per avermi insegnato ad utilizzare la strumentazione.

Un grazie speciale va a Dario, perché con la sua pazienza e dolcezza è riuscito a prendersi cura di me e delle mie ansie, nonostante non sia stato poi così facile. Grazie di essere riuscito a capire quando mi serviva tempo, di essere stato presente quando avevo bisogno di te e di non avermi mai abbandonato. Anche di tutte le litigate. E a Laura. Perché è mia sorella, la mia sicurezza, il mio grillo: sai che ci sarà sempre, per qualunque cosa e che ti aiuterà ad affrontare tutto e tutti. Con un po' di pepe, perché lei è così.

Poi un ringraziamento per tutti gli amici, che hanno speso una parola, un sorriso per tirarmi su o farmi perdere via e che a volte non sanno neanche quanto bene mi hanno fatto perché non sono riuscita a dirglielo. Sarebbero veramente, ma veramente tante le persone da citare. Comincio con la Francy, Mario e la loro bellissima famiglia, per aver accettato le mie manie e fissazioni, per avermi sempre fatto sentire una di loro e per la loro generosità. Perché sono proprio stata una "fortunella" a conoscere delle brutte persone come loro. La Vero, l'amica che ha sempre la parola giusta per te, che vive le tue gioie e i tuoi dolori, che se non ci fosse bisognerebbe inventarla. La Vale, per la sua energia, la sua solarità e la sua passione che ti travolge e ti costringe a vedere le cose belle, anche se a fianco a lei è più facile. Poi il magico mondo, una seconda casa. Grazie a Elena e alla sua determinazione mista a fragilità, che mi ha insegnato a lavorare per raggiungere un obiettivo mettendoci il cuore. A Marco per come mi ha capito e mi ha aiutato ad affrontare i momenti duri e le mie debolezze, perché mi ha aiutato a crescere.

Un grazie a tutta la mia famiglia. A tutti voi che mi siete sempre stati vicini, convinti che io ce la potessi fare, che io fossi la migliore. Non sapete quanto è stato importante. Un piccolo grazie in particolare è rivolto alla mia nana: anche se non lo sa, ma con la sua spontaneità e naturalezza mi ha aiutato a distrarmi e dimenticare le mie preoccupazioni e pignolerie.

Infine loro, che arrivati a questo punto staranno piangendo più di me nello scrivere queste due pagine. Un grazie davvero speciale, anche se non sarà mai sufficiente per esprimervi tutto. Sappiate che senza il vostro appoggio, la vostra forza e il vostro impegno non sarei mai potuta arrivare fino a qui. Perché avete creduto in me sempre e avete fatto in modo che io potessi avere tutto dalla vita. Perché voi vi laureate veramente insieme a me, il merito è tutto vostro. Grazie mamma e papà!