

Politecnico di Milano

Tesi di laurea magistrale
Scuola di Ingegneria dei Sistemi
Facoltà di Ingegneria Fisica
Corso di laurea di Micro e Nano Ottica



**STUDIO DELLA FORMAZIONE DI POLIPLESSI PER
GENE DELIVERY MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI
FLUORESCENZA RISOLTA NEL TEMPO**

A cura dello studente:

Capelli Giulio

Matricola 750292

Relatore: **Prof. D'Andrea Cosimo**

Correlatore: **Prof.ssa Taroni Paola**

Anno Accademico 2010/2011

SOMMARIO

La *gene delivery* è un procedimento nel quale si introducono artificialmente sequenze di DNA all'interno del nucleo di una cellula. La possibilità di trasferire in una cellula sequenze di DNA "terapeutiche" consente attualmente di curare diverse tipologie di malattie umane. Il trasferimento delle catene nucleotidiche, o trasfezione, deve essere mediato da un vettore appositamente realizzato, chiamato vettore genico, che riesca a proteggere il DNA e trasportarlo fino all'interno della cellula. Il processo che comporta la trasfezione è complesso e poco chiaro. Gli sforzi dell'attuale ricerca biologica sono diretti a scoprire i meccanismi che comportano l'efficace somministrazione dei vettori genici. Tuttavia il principale ostacolo nella indagine dei processi di trasfezione e di ricerca di efficienti vettori per il rilascio di geni, è la mancanza di tecniche sperimentali applicate alla *gene delivery*. Il lavoro di tesi presenta come la tecnica di fluorescenza risolta nel tempo può fornire informazioni utili allo studio di vettori polimerici per il trasporto di geni. I polimeri cationici si dispongono attorno al DNA e lo condensano in una struttura più facilmente assimilabile dalla cellula. Nelle misure realizzate si studiano le variazioni di decadimento di fluorescenza del Sybr Green I, marcatore fluorescente del DNA ampiamente diffuso negli ambienti specializzati. In particolare le modifiche del tempo di vita di fluorescenza corrispondono ad una diversa struttura del polimero attorno al DNA. Dall'analisi delle misure effettuate è stato osservato che l'inserimento di polimero in soluzione induce il fenomeno di *quenching* di fluorescenza. Il valore del tempo di vita varia a seconda del tipo di polimero, della concentrazione di questo e della soluzione tampone nel quale è preparato il poliplesso. Di conseguenza una misura di fluorescenza risolta nel tempo può fornire informazioni utili per la comprensione della struttura di un poliplesso e quindi può aiutare a progettare vettori polimerici per *gene delivery*.

ABSTRACT

Gene delivery is the process in which artificial DNA sequences are introduced inside the nucleus of a cell. The possibility to transfer “therapeutic” DNA sequences into a cell currently allows the treatment of different kinds of human diseases. The transfer of nucleotide chains, or transfection, must be realized by a specially designed carrier, or gene carrier, able to protect the DNA and transport it inside the cell. The processes involved in transfection are complex and poorly understood. The current biological research efforts are directed at discovering the mechanisms involved in effective delivery of gene carriers. However, the main obstacle in the investigation of transfection processes and in the search for efficient carriers, is the lack of experimental techniques applied to gene delivery. The thesis presents how a time resolved fluorescence technique can provide useful information to the study of polymeric carriers for gene transport. Cationic polymers are arranged around the DNA and condense it into a structure more easily assimilated by the cell. Experimental measurements study the changes in fluorescence decay of Sybr Green I, a fluorescent marker of DNA widely used in specialized areas. In particular, fluorescence lifetime modifications correspond to a different structure of the polymer around the DNA. From the analysis of the measurements carried out it was observed that the inclusion of polymer in solution induces the phenomenon of fluorescence quenching. The value of fluorescence lifetime varies depending on the type of polymer, the concentration of this and the buffer solution in which the polyplex is prepared. Fluorescence lifetime can provide useful information to understand the structure of a polyplex and thus can help develop polyplexes with a higher transfection efficiency.

INDICE

- <i>Sommario</i>	1
- <i>Abstract</i>	2
- <i>Indice</i>	3
- <i>Lista delle tabelle e delle figure</i>	4
- <i>Introduzione</i>	6
CAPITOLO 1: GENE DELIVERY E FLUORESCENZA	7
- <i>1.1 Gene delivery</i>	7
- <i>1.2 Vettori per il rilascio di geni</i>	8
- <i>1.3 Polimeri cationici</i>	10
- <i>1.4 Fluorescenza</i>	14
- <i>1.5 Fluorescenza risolta nel tempo</i>	16
- <i>1.6 Conteggio di singoli fotoni correlati nel tempo (TCSPC)</i>	20
- <i>1.7 Marcatori fluorescenti</i>	21
- <i>1.8 Utilizzo della spettroscopia di fluorescenza risolta nel tempo applicata alla gene delivery</i>	22
CAPITOLO 2: APPARATO SPERIMENTALE	27
- <i>2.1 Sorgente laser</i>	27
- <i>2.2 Cammino ottico</i>	30
- <i>2.3 Sistema di rivelazione di singolo fotone correlato nel tempo</i>	33
- <i>2.4 Caratterizzazione del sistema</i>	38
- <i>2.4.1 Calibrazione spettrale</i>	38
- <i>2.4.2 Risposta all'impulso del sistema di misura</i>	41
- <i>2.5 Software di analisi dati</i>	43
- <i>2.6 Campioni di misura</i>	45
- <i>2.7 Misure di Dynamic Light Scattering, Zeta Potential ed efficienza di trasfezione</i>	47
CAPITOLO 3: RISULTATI SPERIMENTALI	49
- <i>3.1 Confronto tra i polimeri Chito-g-PEI, bPEI 2kDa e bPEI 25kDa</i>	50
- <i>3.1.1 Caratterizzazione dei polimeri in funzione del rapporto NP</i>	50
- <i>3.1.2 Dinamica di complessazione</i>	57
- <i>3.1.3 Dinamica di decomplessazione</i>	63
- <i>3.2 Correlazione tra efficienza di trasfezione e tempo di vita di fluorescenza</i>	72
- <i>Conclusioni e sviluppi futuri</i>	78
- <i>Riferimenti</i>	81

LISTA DELLE TABELLE E DELLE FIGURE

- *Fig. 1:* Schema del trasporto e rilascio di geni all'interno della cellula, pag. 11
- *Fig. 2:* Diagramma di Jablonski, pag. 14
- *Fig. 3:* Spettro di assorbimento e di emissione della molecola Rodamina 110, pag. 15
- *Fig. 4a:* Efficienza di trasfezione dopo l'inserimento dei 3 poliplessi in una coltura cellulare *in vitro* in funzione del NP, pag. 24
- *Fig. 4b:* Vitalità cellulare dopo l'inserimento dei 3 poliplessi in una coltura cellulare *in vitro* in funzione del NP, pag. 24
- *Fig. 5:* Stabilità in potenza della sorgente laser, pag. 28
- *Fig. 6:* Schema a blocchi del percorso ottico, pag. 30
- *Fig. 7:* Schema spettrometro e tubo fotomoltiplicatore, pag. 32
- *Fig. 8:* Schema a blocchi del sistema di rilevazione, pag. 33
- *Fig. 9:* Schema funzionamento scheda per il conteggio di singolo fotone, pag. 34
- *Fig. 10:* Segnali del CFD, pag. 36
- *Fig. 11:* Canali del fotomoltiplicatore nei quali vengono rivelati gli impulsi laser alle lunghezze d'onda 540nm, 570nm e 600nm, pag. 38
- *Fig. 12:* Spettri di emissione normalizzati sul picco della soluzione Cumarina540a-DCM in Etanolo, pag. 40
- *Fig. 13:* Spettri di emissione di fluorescenza di Sybr Green intercalato nel DNA misurati con il sistema risolto nel tempo, pag. 41
- *Fig. 14:* Risposta all'impulso del sistema di misura, pag. 42
- *Fig. 15:* Esempio di curva di decadimento in ingresso al software, pag. 44
- *Fig. 16:* Curve di decadimento alla lunghezza d'onda 520nm del Sybr Green I legato al pDNA e al ssDNA, pag. 46
- *Fig. 17:* Intensità di fluorescenza del Sybr Green al variare di NP dei polimeri legati al DNA, pag. 50
- *Fig. 18:* Tempi di vita e ampiezze di fluorescenza mono e bi esponenziale al variare di NP, pag. 51
- *Tab. 1:* Tempi di vita mono e bi esponenziali dei 3 polimeri, pag. 52
- *Fig. 19:* Spettri di assorbimento dei 3 polimeri, pag. 55
- *Fig. 20:* *Dynamic Light Scattering; Zeta potential*, pag. 54
- *Fig. 21:* Schema del protocollo delle misure di complessazione, pag. 57
- *Fig. 22:* Intensità di fluorescenza in funzione del tempo, pag. 58
- *Fig. 23:* Dinamica di formazione dei poliplessi. Tempi di vita e ampiezze di fluorescenza in funzione del tempo, pag. 59
- *Fig. 24:* Spettri di emissione di fluorescenza ad inizio e fine dinamica, pag. 63
- *Fig. 25:* Schema del protocollo delle misure di de complessazione, pag. 64
- *Fig. 26:* Dinamica di decomplessazione dei poliplessi ad opera dell'Eparina in concentrazione: a) 10 a 1; b) 7.5 a 1; c) 5 a 1, pagg. 65,66

- *Fig. 27:* Dinamica risolta nel tempo di decomplessazione del poliplesso ad opera dell'Eparina in concentrazione: a) 10 a 1; b) 7.5 a 1; c) 5 a 1, pagg. 67,68
- *Fig. 28:* Confronto tra spettro di emissione SybrGreen+DNA e spettri di emissione dei 3 polimeri a fine decomplessazione con Eparina, pag. 71
- *Fig. 29:* Efficienza di trasfezione dei 3 poliplessi in funzione di NP, pag. 72
- *Fig. 31:* Efficienza di trasfezione in funzione del tempo di vita di fluorescenza dei 3 poliplessi, pag. 73
- *Fig. 31:* Efficienza di trasfezione del IPEI 25kDa in 3 *buffer* al variare di NP, pag. 74
- *Fig. 32:* Tempi di vita di fluorescenza del IPEI 25kDa in 3 *buffer* al variare di NP, pag. 74
- *Fig. 33:* Efficienza di trasfezione in funzione del tempo di vita di fluorescenza, pag. 75
- *Fig. 34:* Efficienza di trasfezione in funzione del tempo di vita di fluorescenza delle coppie polimero-*buffer* misurate, pag. 76

INTRODUZIONE

Gli esperimenti svolti ed analizzati in questa tesi riguardano l'applicazione della tecnica di spettroscopia di fluorescenza risolta nel tempo alla caratterizzazione dei processi di *gene delivery* mediante poliplessi.

Nel capitolo 1 si introdurrà inizialmente il contesto nel quale si inserisce lo studio sperimentale, descrivendo cosa si intende e quali sono i risvolti pratici della tecnica di *gene delivery*. Si focalizzerà quindi l'attenzione sulle difficoltà di questa tecnica e sulle sfide aperte per migliorarla. Si cercherà poi di seguire i passaggi logici che hanno portato all'utilizzo della spettroscopia di fluorescenza risolta nel tempo nel contesto biologico di ricerca di un efficace vettore di trasfezione.

Nel capitolo 2 si descrive l'apparato sperimentale utilizzato in laboratorio. Le misure di spettroscopia ottica richiedono una parte strumentale ottica e una parte di rivelazione ed elaborazione elettronica. Si cerca per ogni componente di spiegare la sua funzione e quali siano le caratteristiche necessarie per gli esperimenti svolti. A fine capitolo si presentano i campioni di misura utilizzati: soluzioni di polimeri cationici e acidi nucleici, marcati dal Sybr Green I, diluiti in *buffer* salini.

L'analisi dei campioni sperimentali è sviluppata nel capitolo 3. Si presenta un'analisi completa sulla complessazione operata dai polimeri Chito-g-PEI, bPEI 25kDa e bPEI 2kDa dal punto di vista delle misure di fluorescenza risolta nel tempo. I poliplessi, formati dai 3 polimeri, sono confrontati tra loro e si cerca di derivare come si dispongano diversamente attorno al DNA. Si svolge anche uno studio sulle dinamiche di complessazione e di decomplessazione sui 3 poliplessi. Nella seconda parte del capitolo sono stati considerati nuovi polimeri, lPEI 25kDa, il PLL e il bPEI 10kDa, per aumentare la significatività delle osservazioni ottenute. Si è cercato di correlare i dati di fluorescenza risolta nel tempo con i dati di efficienza di trasfezione dei polimeri. Quest'ultima parte si avvicina maggiormente all'applicazione del lavoro di tesi nell'ambito di *gene delivery*. Infatti dalla misura del tempo di vita si cercano informazioni utili al biologo per guidarlo nella ricerca di un vettore polimerico efficiente.

A fine lavoro sono presentate le conclusioni raggiunte e i possibili sviluppi futuri.

CAPITOLO 1: GENE DELIVERY E FLUORESCENZA

In questo capitolo sono inizialmente introdotti gli aspetti, le finalità e le problematiche principali legate alla *gene delivery*. Sono poi presentati i vettori per il rilascio di geni, con una particolare attenzione ai polimeri cationici. Si spiega quindi l'utilità di marcare in fluorescenza gli acidi nucleici, sottolineando le caratteristiche ed i vantaggi del Sybr Green I. Infine viene introdotto il fenomeno della fluorescenza con particolare attenzione alle dinamiche di fluorescenza. Lo scopo di questo capitolo è cercare di spiegare come la tecnica di fluorescenza risolta nel tempo può essere utile per la ricerca di un efficiente vettore di geni.

1.1 GENE DELIVERY

La *gene delivery*, o traducendo in Italiano "trasferimento di geni", è un procedimento nel quale si introducono artificialmente sequenze di acidi nucleici all'interno del nucleo di una cellula¹.

Le catene di acidi desossiribonucleici, o DNA, contenute nel nucleo delle cellule di un organismo codificano l'informazione genetica che consente alla cellula di svolgere qualsiasi sua funzione². Le sequenze di DNA che codificano una particolare azione della cellula, come ad esempio l'espressione di una proteina, si chiamano "geni"². I geni quindi rappresentano per una cellula una serie di istruzioni da seguire per svolgere le sue regolari funzioni.

Esistono patologie umane che comportano la mancanza o la modifica di alcuni geni. Queste malattie possono essere trasmesse per via ereditaria oppure possono essere contratte. Un elevato numero di queste malattie comportano la mutazione di un gene, alterazioni monogeniche, che in alcuni casi non permettono al gene stesso di esprimersi³. Di conseguenza le mutazioni geniche presentano il rischio per la cellula di non essere più in grado di svolgere alcune azioni, che talvolta sono vitali sia per la cellula che per i tessuti che essa compone.

Le malattie geniche possono essere trattate andando a rilasciare nelle cellule malate le sequenze nucleotidiche corrispondenti ai geni mancanti o modificati. Queste sequenze vengono sintetizzate in laboratorio e trasferite all'interno del nucleo delle cellule da curare. Il

trattamento che prevede il rilascio di geni per curare i pazienti affetti da malattie geniche si chiama terapia genica⁴.

Anche i tumori possono essere trattati andando ad interagire con il contenuto genico di una cellula tumorale⁵. Inoltre la terapia genica può essere applicata anche a malattie generiche che non necessariamente riguardano mutazioni di DNA. Questo perché la *gene delivery*, andando a rilasciare catene nucleotidiche, consente alla cellula di esprimere, cioè produrre, proteine ed enzimi specifici per la guarigione di una malattia. In questo modo ad esempio si cercano di trattare alcune malattie cardiovascolari⁶.

La terapia genica ha delle potenzialità enormi di sviluppo nella correzione di deficienze geniche e nella cura di molte malattie che possono essere contratte dall'uomo. Tuttavia occorre considerare che il procedimento di introduzione di materiale genetico all'interno di una cellula segue delle dinamiche complesse e la somministrazione artificiale di sequenze nucleotidiche all'interno della cellula non è, fino ad oggi, un processo al tempo stesso sicuro ed efficiente⁷.

L'approccio più intuitivo per trasferire geni, o trasfettare, è depositare le sequenze di DNA "nudo" direttamente sulle cellule. Questo metodo è il più semplice e più sicuro per il paziente, poiché la trasfezione non è mediata da nessun'altra sostanza che possa interagire negativamente con l'organismo. Tuttavia la somministrazione diretta di soli acidi nucleici è inefficace⁸. Infatti il materiale genetico da solo non è in grado di superare le membrane biologiche a causa della sua carica superficiale negativa che si respinge elettrostaticamente con le cariche negative delle superfici biologiche della cellula⁹.

Negli ultimi due decenni per rendere efficace il rilascio di geni sono nati e sono stati sviluppati, negli ambienti di ricerca biochimici, dei "vettori" che avessero le caratteristiche adatte per trasportare efficacemente il materiale genetico dall'esterno all'interno della cellula¹⁰.

1.2 VETTORI PER IL RILASCIO DI GENI

Un vettore genico ha il compito di legarsi al DNA e portarlo all'interno della membrana cellulare. Una volta all'interno deve poterlo rilasciare per permettergli di entrare nel nucleo cellulare, luogo dove avviene l'espressione delle sequenze di DNA.

Ogni tipologia di vettore ha il suo specifico funzionamento e interagisce con il DNA e con l'ambiente cellulare in modalità differenti. Tuttavia si possono delineare degli aspetti comuni tra i vari vettori: devono essere in grado di proteggere gli acidi nucleici dalle nucleasi presenti nel sangue e nei fluidi biologici che possono rompere i legami tra le catene nucleotidiche; devono favorire il superamento della barriera cellulare; devono rilasciare gli acidi nucleici una volta entrati nella cellula¹¹.

I vettori utilizzati in biologia per trasferire il materiale genetico all'interno delle cellule si dividono in due categorie principali: virali e non-virali.

I vettori virali sfruttano la naturale capacità dei virus di trasferire il loro contenuto genetico alla cellula ospite. I virus infatti hanno naturalmente evoluto tecniche di trasfezione genica, in modo da riuscire a sopravvivere e a duplicarsi sfruttando i processi di trascrizione ed espressione proteica di cellule ospiti. L'utilizzo di virus come vettori prevede che il materiale genico originario del virus venga sostituito interamente con le sequenze nucleotidiche da trasferire. L'efficacia dei vettori virali nel trasferimento di geni in cellule mammarie è elevata nelle prove sia *in vitro* sia *in vivo*¹². Tuttavia il loro utilizzo comporta diversi inconvenienti: i vettori virali sono riconosciuti dal sistema immunitario che li ostacola e ne limita l'efficacia; hanno una capacità limitata di trasporto di materiale nucleotidico; alcuni sono in grado di interagire con il genoma delle cellule ospiti, andando a modificare la struttura genetica e introducendo il rischio di mutazioni geniche. Soprattutto quest'ultima è la questione più delicata poiché mette a rischio l'incolumità di un paziente sottoposto ad una terapia genica¹³.

La necessità di trovare soluzioni sicure per la salute dei pazienti soggetti a terapie geniche, ha portato a ricercare vettori alternativi a quelli virali.

I principali vettori non virali sono i polimeri e lipidi cationici. Questi vettori hanno la proprietà di legarsi spontaneamente al DNA grazie a forze elettrostatiche e formano con il materiale nucleotidico dei complessi che prendono il nome di poliplessi, nel caso dei polimeri, e lipoplessi, nel caso dei lipidi.

Si possono trovare diversi vantaggi nell'utilizzo di poliplessi e lipoplessi come vettori per il rilascio di geni:

- i) comportano una risposta immunitaria minima, anche nel caso di ripetute somministrazioni;
- ii) possono essere prodotti in grande quantità e conservati con facilità;
- iii) non hanno limitazioni sulla quantità di DNA che possono trasportare;
- iv) sono realizzabili con tecniche semplici¹⁴.

Tuttavia i vettori non-virali posseggono gli svantaggi di avere bassa efficienza di trasfezione paragonata ai vettori virali ed, in alcuni casi, elevata citotossicità. La ricerca di vettori non-virali per la *gene delivery* è promettente in quanto consentirebbe di superare le necessità di sicurezza dei vettori virali. L'obiettivo principale è individuare i vettori polimerici o lipidici che massimizzano l'efficienza di trasfezione. In particolare la caratterizzazione della struttura e della funzione dei vettori non-virali è essenziale nella progettazione di efficienti sistemi per il rilascio di geni¹⁵. Il successo dei vettori non-virali dipende da molti fattori, tra i quali la struttura chimica dei reagenti cationici, la struttura sovramolecolare dei poliplessi e lipoplessi, la loro interazione con la membrana cellulare, la localizzazione all'interno della cellula e la semplicità di rilascio dei vettori cationici¹⁶.

I poliplessi basano la loro efficienza di vettori di geni sulla capacità di condensare il DNA e rilasciarlo una volta entrato nella cellula. Alcuni polimeri riescono a condensare il DNA fino a dimensioni di decine di nanometri, ed in generale i vettori polimerici hanno dimensioni inferiori se confrontate a quelle dei vettori lipidici¹⁷. Questo aspetto è importante e potrebbe essere cruciale per il trasferimento di geni, poiché piccole dimensioni dei complessi potrebbero favorire l'efficacia di trasfezione, in particolare *in vivo*¹⁸. I vettori polimerici inoltre sono relativamente semplici da realizzare e possiedono un'infinità di combinazioni possibili tra monomeri, e quindi una flessibilità nel produrre polimeri con caratteristiche diverse. I lipoplessi invece hanno elevata affinità con la membrana fosfolipidica della cellula ed in generale sono più stabili, rispetto ai polimeri, nei fluidi biologici extracellulari¹⁹.

1.3 POLIMERI CATIONICI

I polimeri cationici usati come vettori per il trasporto di acidi nucleici sono generalmente macromolecole che posseggono ammine protonabili in soluzione. Il DNA è carico negativamente grazie alla presenza di gruppi fosfati che hanno carica negativa permanente.

L'idea che sta alla base dell'utilizzo dei polimeri cationici è la capacità di complessare il DNA attraverso l'interazione di forze elettrostatiche. Infatti in una soluzione a pH neutro i gruppi amminici dei polimeri acquistano ioni positivi e quindi il polimero risulta carico positivamente. I gruppi fosfati del DNA e le ammine dei polimeri si attirano per interazione elettrostatica²⁰. In questo modo in soluzione si forma il complesso tra DNA e polimero (poliplesso) che può essere somministrato alle cellule sia *in vivo* che *in vitro*.

La formazione del poliplesso ha il vantaggio di essere semplice da realizzare²¹. Questo perché il processo di formazione del poliplesso avviene spontaneamente. Il polimero deve essere in grado di disporsi attorno al DNA e condensarlo, così da poterlo trasportare nella cellula. Infatti se il polimero possiede una sufficiente densità di cariche positive riesce grado a ridurre le dimensioni delle catene nucleotidiche ed in questo modo favorisce l'introduzione nella cellula del DNA. L'eccesso di gruppi cationici del polimero rispetto a quelli anionici del DNA conferisce al poliplesso una carica netta positiva che, ancora per interazione elettrostatica, consente l'adesione del poliplesso alla superficie esterna, carica negativamente, della cellula²². Quindi sia la formazione del poliplesso sia l'adesione sulla cellula sono realizzate da forze elettrostatiche. In figura 1 è schematizzato il percorso di trasporto e di rilascio di geni dall'esterno della cellula all'interno del nucleo cellulare che sarà ora descritto in dettaglio per un polimero cationico.

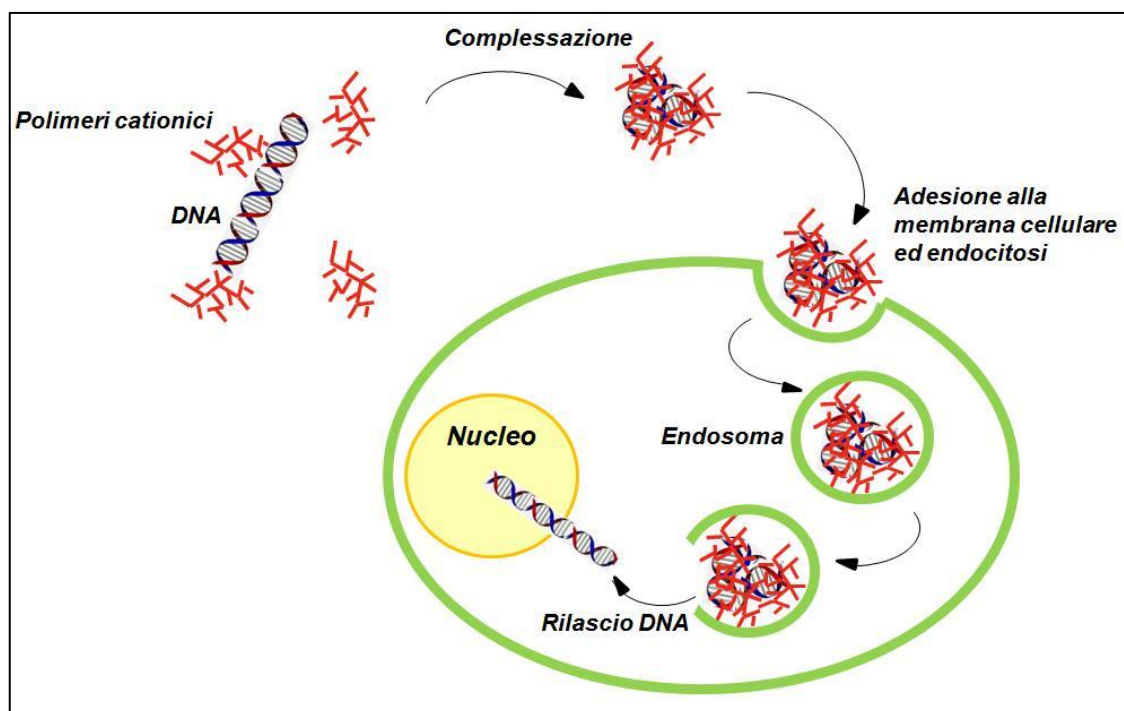


Fig. 1 – Schema del trasporto e rilascio di geni all'interno della cellula

Le dimensioni dei poliplessi sono dell'ordine delle decine o centinaia di nanometri²³ e possono attraversare la barriera citoplasmatica della cellula attraverso il processo di endocitosi. Il processo di endocitosi permette alla cellula di inglobare al suo interno le macromolecole e i soluti che non possono attraversare la membrana cellulare. La membrana ripiega internamente, avvolge il poliplesso ed infine una parte di membrana che ha avvolto il poliplesso si stacca inglobandolo²⁴.

Si sottolinea che uno dei fattori che determina l'efficacia di un vettore polimerico, ma anche di un vettore genico in generale, è la sua capacità di superare la citomembrana. Quali siano i fattori responsabili dell'endocitosi non sono del tutto chiari. Trovare quali caratteristiche deve avere un polimero per essere efficacemente inglobato nella cellula è uno dei principali obiettivi della ricerca attuale sui vettori polimerici.

Una volta all'interno della cellula, i complessi DNA/polimero sono racchiusi in vescicole chiamate endosomi. Tuttavia il contenuto genico deve poter essere rilasciato prima nel citoplasma e poi nel nucleo perché venga espresso. Quindi è necessaria la rottura della membrana degli endosomi per consentire il rilascio del contenuto genico. Nel caso di lipoplessi si ipotizza che i lipidi destabilizzino e rompano la membrana degli endosomi, mentre il rilascio nel citoplasma per un vettore polimerico ha una spiegazione diversa. Si ipotizza che il polimero si comporti da "spugna protonica", fenomeno maggiormente noto con il nome inglese *proton sponge*. Secondo questa ipotesi il pH nel compartimento dell'endosoma è pari a 5.5 e quindi maggiormente acido. Di conseguenza il numero di gruppi amminici protonati aumenta generando un gradiente di carica che induce un flusso di ioni Cl^- verso l'endosoma. L'incremento di concentrazione di ioni Cl^- genera un flusso d'acqua che, infine, gonfia la membrana dell'endosoma fino alla sua rottura²⁵.

L'ultimo passaggio che completa il processo di trasfezione di un vettore genico è l'ingresso del DNA all'interno del nucleo cellulare. Per quanto riguarda un vettore polimerico, il DNA deve staccarsi dal polimero per poter entrare nel nucleo. Anche questo è un aspetto importante per il successo di un polimero come vettore. Infatti il poliplesso deve disgregarsi solo dopo essere entrato nella cellula ed è un'operazione non semplice poiché il DNA e il polimero sono legati elettrostaticamente. E' stato finora ipotizzato che una parte di DNA venga rilasciata dal polimero a seguito del cambiamento del pH all'interno dell'endosoma, che quindi si ritrova già

libero quando è rilasciato nel citoplasma²⁶. E' necessario trovare un polimero che al meglio rilasci il DNA nel citoplasma. L'ideale potrebbe essere trovare un polimero che si rompa a contatto con una molecola presente solo all'interno della cellula, una sorta di *trigger* di disgregazione del poliplesso.

Un polimero utile come vettore di *gene delivery* deve essere in grado di formare un complesso stabile con il DNA, non deve disgregarsi in ambiente extracellulare, deve essere inglobato dalla cellula ed infine disgregarsi solo dopo aver superato la membrana cellulare. La ricerca dei migliori polimeri è complessa e non è semplice trovare polimeri che presentino tutte le caratteristiche necessarie. Soprattutto alcune caratteristiche come quella di stabilità extracellulare e instabilità intracellulare sono in contrasto tra loro e difficili da ottenere contemporaneamente.

Le catene monomeriche possono essere allungate per ottenere il peso molecolare adeguato. Infatti il peso molecolare gioca un ruolo importante nella complessazione degli acidi nucleici²⁷, poiché in molti casi un elevato peso molecolare consente di condensare il DNA in una forma più compatta.

I polimeri possono assumere forme diverse: lineari e più o meno ramificate. Offrono una infinità di combinazioni possibili di unità monomeriche. Sintetizzando polimeri con monomeri con caratteristiche chimico fisiche differenti si ottengono polimeri che esibiscono nuove proprietà. Nei polimeri si può aggiungere un *graft* e quindi unire ad una catena di monomeri una specifica molecola. Da tutte queste considerazioni si riassume che i polimeri offrono una elevata flessibilità e potenzialità di avere le proprietà di essere efficaci vettori di geni.

Nella progettazione di un efficace poliplesso il rapporto tra le concentrazioni di polimero e DNA, di solito espresso secondo il rapporto di cariche positive delle ammine e negative dei gruppi fosfati (abbreviato con NP), è un aspetto fondamentale da considerare. Mentre nell'ambito della complessazione del DNA, oltre alle proprietà fisico chimiche esibite dalle singole unità monomeriche e al peso molecolare del polimero, gioca un ruolo importante anche il numero di ammine primarie, secondarie e terziarie, sia nel realizzare complessi stabili sia nel generare l'effetto "spugna protonica".

1.4 FLUORESCENZA

La fluorescenza è il fenomeno fisico per il quale un materiale assorbe fotoni incidenti e li riemette isotropicamente ad una lunghezza d'onda superiore²⁸. Una molecola che possiede proprietà di fluorescenza, come ad esempio un colorante o un marcatore di DNA, si chiama fluoroforo. Un elettrone di un fluoroforo può essere promosso, a seguito dell'assorbimento di un fotone, dal livello energetico fondamentale ad un livello energetico eccitato di singoletto S_1 . Nello stato S_1 un elettrone è accoppiato, con spin opposto, all'elettone nell'orbitale dello stato fondamentale. Conseguentemente, il ritorno allo stato fondamentale è una transizione permessa per dipolo elettrico ed avviene rapidamente con l'emissione di un fotone. L'intervallo medio di tempo tra l'eccitazione dell'elettone e l'emissione di un fotone è chiamato tempo di vita di fluorescenza e tipicamente è dell'ordine di grandezza dei nanosecondi. In seguito verrà descritto in dettaglio il tempo di vita di fluorescenza e si evidenzierà come esso dipenda da diversi fattori esterni al fluoroforo.

Generalmente un elettrone nello stato S_1 rilassa al più basso livello vibrazionale di S_1 e questo processo è detto rilassamento termico. Il rilassamento termico è un processo molto rapido, dell'ordine di 10^{-12} s, ed è probabilisticamente concluso prima della emissione di un fotone di fluorescenza. Quindi l'emissione di fluorescenza avviene da uno stato eccitato in equilibrio termico e cioè dallo stato vibrazionale più basso del livello di eccitazione. Il ritorno allo stato fondamentale avviene su un generico stato vibrazionale e successivamente anche tale stato raggiunge l'equilibrio termico.

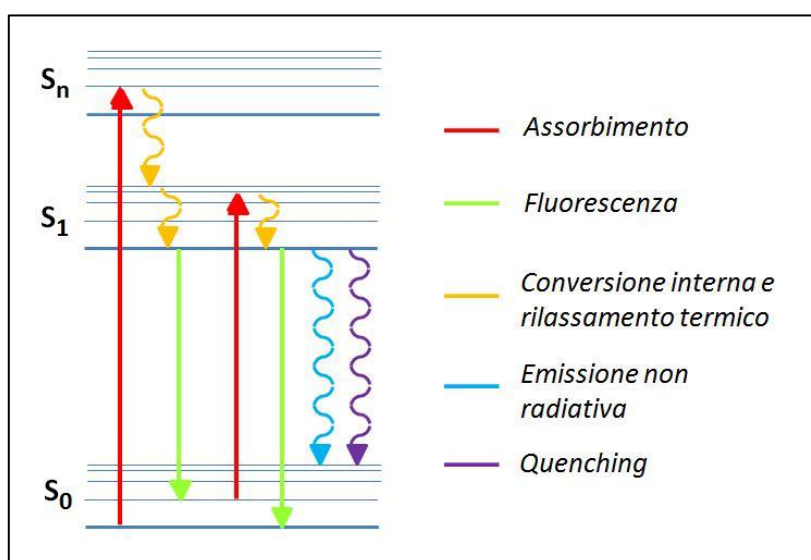


Fig. 2 – Diagramma di Jablonski. S_0 , S_1 , S_n stati di singoletto con relativi livelli vibrazionali. I colori sono rappresentativi e non hanno alcuna corrispondenza con lunghezze d'onda

Lo schema del processo di assorbimento ed emissione di fluorescenza, noto con il nome di Diagramma di Jablonski, è mostrato in figura 2. Dal diagramma di Jablonski si osserva che il fluoroforo può avere più di un livello di singoletto sul quale un elettrone può essere promosso a seguito dell'assorbimento di un fotone. Quando un elettrone è eccitato su S_2 , S_3 , S_n poi esso rilassa allo stato elettronico con energia inferiore (S_1) per il fenomeno di conversione interna, ed ancora rilassa termicamente al più basso livello vibrazionale di S_1 .

A causa del fenomeno di rilassamento termico, il fotone riemesso possiede energia inferiore rispetto a quello di eccitazione. Pertanto le lunghezze d'onda di emissione di fluorescenza sono maggiori di quelle di eccitazione. Di conseguenza lo spettro di emissione rispetto a quello di assorbimento è spostato verso lunghezze d'onda inferiori e questo fenomeno è chiamato *Stokes shift*.

Un elettrone dallo stato S_1 può decadere su un livello vibrazionale qualsiasi, non necessariamente quello ad energia più bassa. I livelli vibrazionali degli stati fondamentale e di singoletto sono simili in quanto nell'eccitazione elettronica, secondo il principio di Franck-Condon, la geometria dei nuclei rimane invariata²⁸. Come conseguenza di questi due aspetti fisici si ottiene che lo spettro di emissione di fluorescenza non dipende dalla lunghezza d'onda di eccitazione ed è, tenendo conto dello Stokes shift, tipicamente l'immagine speculare dello spettro di assorbimento. In figura 3 è mostrato un esempio di molecola fluorescente che presenta sia il fenomeno di Stokes shift sia la simmetria tra gli spettri di assorbimento ed emissione.

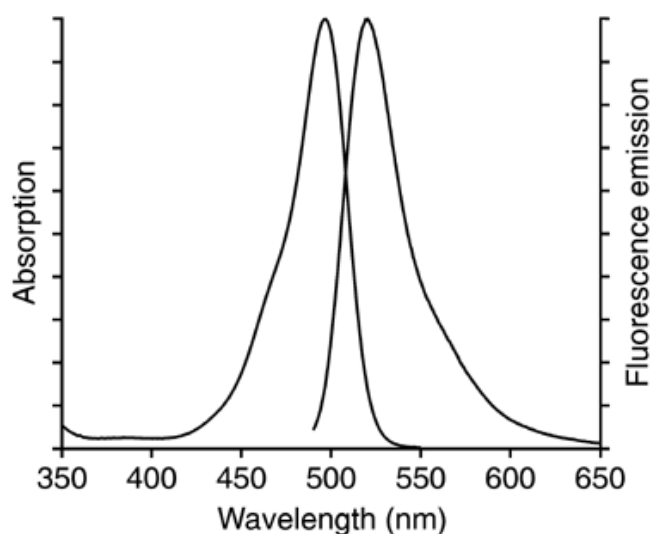


Fig. 3 – Spettro di assorbimento e di emissione della molecola Rodamina 110 a pH7

La spettroscopia di fluorescenza presenta molte applicazioni, come ad esempio in chimica o biologia, in quanto molti processi possono essere studiati andando ad osservare le modifiche dello spettro di emissione di un fluoroforo. In particolare l'interazione con un solvente o modifiche chimiche per la presenza di altre molecole possono modificare lo spettro di emissione.

Un elettrone nello stato eccitato S_1 presenta più di una via di diseccitazione. Perché si verifichi il fenomeno di fluorescenza l'elettrone sullo stato di singoletto deve diseccitarsi emettendo un fotone, detto di fluorescenza. Tuttavia esistono delle vie di diseccitazione non radiative che competono con l'emissione di fluorescenza. L'efficienza quantica di fluorescenza è il rapporto tra il numero di fotoni emessi e fotoni assorbiti e può assumere valori compresi tra 0 e 1. L'efficienza quantica è uno dei principali parametri di un fluoroforo e definisce quanto intensa sia l'emissione di fluorescenza in funzione della intensità di eccitazione. Questo parametro dipende da diversi fattori come la struttura chimica del fluoroforo, la composizione dei suoi livelli energetici o la presenza di molecole che "spengono" la fluorescenza. Infatti un fluoroforo può diseccitare dallo stato di singoletto anche per vie non radiative. Ad esempio l'elettrone può perdere energia termicamente o trasferirsi su un livello energetico non radiativo. Maggiore è la percentuale di fotoni che diseccitano per vie non radiative e minore è l'efficienza quantica.

Il fenomeno di *quenching*, o "spegnimento", è uno dei fattori che influenzano l'efficienza quantica di fluorescenza. Il *quenching* di fluorescenza è il fenomeno per il quale una molecola, detta *quencher*, diseccita l'elettrone di fluorescenza. Il *quencher* fornisce al fluoroforo una via di diseccitazione alternativa alla emissione radiativa di fluorescenza. Pertanto si riduce il numero di fotoni emessi rispetto a quelli assorbiti.

1.5 FLUORESCENZA RISOLTA NEL TEMPO

In un sistema fisico nel quale sono presenti molte molecole fluorescenti, un fascio di eccitazione di fluorescenza promuove un certo numero di elettroni sullo stato eccitato S_1 . Considerando per semplicità una sorgente laser di eccitazione molto stretta approssimabile ad una Delta di Dirac, la variazione nel tempo del numero di molecole nello stato eccitato può essere modellizzata dalla *rate equation*²⁸:

$$(1) \quad \frac{dn(t)}{dt} = - \left(\frac{dn(t)}{dt} \right)_F - \left(\frac{dn(t)}{dt} \right)_{NF} = -n(t) k_{F0} - n(t) k_{NF} = \\ = -(k_{F0} + k_{NF})n(t)$$

Dove n è il numero di fluorofori nello stato eccitato, k_{F0} è il tasso intrinseco di fluorescenza, e k_{NF} è pari alla somma dei tassi di diseccitazione non di fluorescenza.

Definendo $\tau_F = \frac{1}{k_{F0} + k_{NF}}$ come il tempo di vita di fluorescenza osservato e risolvendo l'equazione differenziale (1) si ottiene:

$$(2) \quad n(t) = n(0) e^{-\frac{t}{\tau_F}}$$

Pertanto la dinamica di diseccitazione del livello S_1 è descritta matematicamente da un esponenziale decrescente.

Poiché non tutti gli elettroni che tornano allo stato fondamentale contribuiscono alla fluorescenza, occorre tener conto solo di quelli che emettono fotoni nel calcolare l'intensità di fluorescenza emessa. L'intensità di fluorescenza è ottenuta dalla diseccitazione delle molecole che tornano allo stato fondamentale moltiplicate per l'efficienza quantica di fluorescenza φ_F :

$$(3) \quad I(t) = -\varphi_F \frac{dn(t)}{dt}$$

Sostituendo l'equazione (2) nella (3), si ottiene:

$$(4) \quad I(t) = \frac{\varphi_F}{\tau_F} n(0) e^{-\frac{t}{\tau_F}} = k_{F0} n(0) e^{-\frac{t}{\tau_F}} = I(0) e^{-\frac{t}{\tau_F}}$$

Dove τ_F è il tempo di vita di fluorescenza, e dipende anche da decadimenti non radiativi e *quenching*. Si nota che l'ampiezza di fluorescenza $I(0)$ dipende dal numero iniziale di molecole eccitate. E questo è proporzionale al numero di fluorofori presenti in soluzione che quindi possono assorbire i fotoni incidenti. Infatti maggiore è il numero di fluorofori presenti in soluzione e conseguentemente maggiore è il numero di elettroni che sono eccitati sul livello di singoletto.

L'intensità di emissione di fluorescenza è generalmente descritta in funzione del tempo secondo un modello esponenziale o di somma di esponenziali decrescenti. Il modello esponenziale possiede una o più costanti di decadimento che corrispondono al tempo, o tempi, di vita di fluorescenza. Infatti il decadimento di fluorescenza può presentare più di un tempo di vita, in particolare quando: siano presenti differenti tipologie di molecole fluorescenti; i fluorofori si trovino in ambienti o formino legami differenti.

Nel caso, per esempio, di andamento bi-esponenziale di fluorescenza ad esempio si avrebbe l'equazione della intensità:

$$(5) \quad I(t) = A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}}$$

Dove τ_1 e τ_2 sono i tempi di vita della dinamica di fluorescenza e A_1 e A_2 le rispettive ampiezze.

Come si nota dall'equazione (5), l'intensità è suddivisa nel valore di ampiezza e di tempo di vita di fluorescenza. Per ottenere il valore in continua dell'intensità occorre integrare nel tempo la curva esponenziale.

$$(6) \quad I = \int_0^{+\infty} A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} dt = A_1 \left[-\tau_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} \right]_0^{+\infty} + A_2 \left[-\tau_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} \right]_0^{+\infty} =$$

$$= A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2$$

Quindi da una misura risolta nel tempo si può calcolare il valore di intensità in continua emessa dalle molecole fluorescenti, sommando il prodotto tra ampiezza e tempo di vita delle varie componenti di decadimento.

Le ampiezze di fluorescenza sono i coefficienti moltiplicativi dei termini esponenziali dell'equazione che modella il decadimento di fluorescenza, e coincidono con i valori iniziali delle singole componenti esponenziali. Il valore iniziale del decadimento di fluorescenza è proporzionale al numero di fluorofori presenti nel campione di misura. Conoscere le ampiezze di fluorescenza e quindi il valore iniziale della curva di decadimento consente di distinguere se la riduzione di intensità di fluorescenza sia dovuta alla diminuzione del numero di fluorofori o alla riduzione del tempo di vita. Le ampiezze, se normalizzate sulla loro somma, indicano quale sia il peso relativo delle singole componenti esponenziali.

Un fluoroforo possiede tempi di decadimento di fluorescenza propri che tuttavia possono variare a seconda delle modifiche strutturali che subisce, dei legami che forma e del microambiente che gli sta attorno. Il tempo di vita si può anche considerare come il tempo nel quale il fluoroforo nello stato eccitato può interagire con l'ambiente circostante. Solitamente l'effetto dell'interazione con l'ambiente esterno comporta una riduzione del tempo di vita, perché il solvente o le molecole attorno al fluoroforo possono essere delle vie di diseccitazione per la fluorescenza, e quindi il *quenching* di fluorescenza è uno dei principali responsabili del cambiamento di tempo di vita. Il fenomeno di *quenching* consente, tramite l'analisi dei tempi di vita della fluorescenza, lo studio dei processi in soluzione o in presenza di altre molecole. Inoltre nei processi in soluzione il tempo di vita può dipendere da molte caratteristiche del campione, quali ad esempio la concentrazione di soluto, l'interazione con il solvente o i siti di legame e pertanto è molto sensibile a variazioni chimico fisiche dell'ambiente circostante al fluoroforo. Quando il fenomeno di *quenching* è dovuto all'interazione con una particolare molecola nel solvente, questa molecola viene chiamata *quencher*. Si vuole notare che la distanza tra *fluoroforo* e *quencher*, soprattutto quando il fluoroforo si trova in una soluzione, è inversamente proporzionale alla efficienza di spegnimento del *quencher*. Quindi più una molecola *quencher* si avvicina al fluoroforo, maggiore è l'effetto di *quenching* di fluorescenza, con la conseguente riduzione di intensità e tempo di vita di fluorescenza.

L'insieme delle interazioni di un fluoroforo con il microambiente attorno si possono notare nella variazione dell'andamento della fluorescenza.

Nel particolare caso delle misure del Sybr Green, poiché l'ambiente esterno al fluoroforo è il poliplesso, allora le modifiche strutturali del poliplesso si possono studiare dalle variazioni del decadimento esponenziale del marcatore. Questo è il concetto fondamentale della presente tesi.

Da una misura in continua della fluorescenza non si può osservare il decadimento esponenziale di fluorescenza ma è necessaria una tecnologia che permetta di ottenere una risoluzione temporale sufficiente a rivelare la dinamica di decadimento di fluorescenza.

1.6 CONTEGGIO DI SINGOLI FOTONI CORRELATI NEL TEMPO (TCSPC)

La misura di una curva di decadimento di fluorescenza, che ha durata tipica dell'ordine dei nanosecondi, non è possibile realizzarla attraverso l'utilizzo di un sistema diretto di rivelazione. Inviando un impulso ultrabreve e monitorando il decadimento temporale dell'intensità con un fotorivelatore non si riesce a ricavare il tempo di vita di fluorescenza. Infatti mentre l'ottica riesce a generare impulsi ultrabrevi e raggiunge la risoluzione temporale necessaria, l'elettronica di rivelazione può non essere sufficientemente veloce da seguire il decadimento esponenziale di fluorescenza. Allora la tecnica utilizzata per la rilevazione del segnale di fluorescenza risolta nel tempo è il conteggio di singoli fotoni correlati nel tempo (TCSPC). Questa tecnica prevede l'utilizzo di un fotomoltiplicatore in regime di conteggio di singoli fotoni. In tale modalità viene misurata la distribuzione temporale dei singoli fotoni rispetto ad un evento di riferimento dato dalla eccitazione laser. La misura viene effettuata misurando il ritardo tra il fotone di eccitazione e il fotone emesso.

Il principio alla base di questa tecnica è rilevare un campione statistico di intervalli temporali tra eccitazione ed emissione di singoli fotoni per correlarlo con il tempo di vita del fluoroforo. Per poter contare un singolo fotone per impulso di eccitazione, la probabilità di rivelare un fotone nel fotomoltiplicatore deve essere bassa. Generalmente la probabilità è di rilevare 1 fotone di fluorescenza su 100 impulsi di eccitazione. In questo modo si riduce al minimo la probabilità di rilevare più di un fotone per volta. Per non rendere troppo lunga una misura, occorre usare frequenze di ripetizione degli impulsi di eccitazione dell'ordine delle decine di Mhz. Infatti ad esempio inviando 10^7 impulsi di eccitazione al secondo, e rilevando 1 fotone ogni 100 impulsi, si conterebbero 10^5 fotoni al secondo²⁹. In questo modo con misura di qualche secondo di durata si otterrebbe un buon campione statistico per ricavare la curva di decadimento di fluorescenza e i suoi tempi di vita.

Si nota che contare i singoli fotoni significa discretizzare la curva di decadimento, e quindi avere un maggior numero di fotoni rilevati comporta avere una curva più vicina alla realtà. Per aumentare il numero di fotoni rilevati si può agire in due modi: si può allungare il tempo di misura; oppure aumentare l'intensità del laser di eccitazione, purché non aumenti la probabilità di rivelare più di un fotone contemporaneamente.

La curva dei ritardi rilevati coincide con il decadimento esponenziale di fluorescenza.

1.7 MARCATORI FLUORESCENTI

I marcatori fluorescenti sono sostanze che contemporaneamente sono in grado di legarsi ad una specifica molecola ed emettere fluorescenza. I marcatori trovano molte applicazioni in biologia molecolare, come ad esempio nelle tecniche di elettroforesi su gel, real-time PCR e quantificazione di DNA in una soluzione^{30,31,32}. Inoltre hanno anche molte altre applicazioni come ad esempio l'*imaging* su campioni biologici *in vivo* o *in vitro*.

In questa tesi si considera un particolare sottogruppo di marcatori fluorescenti, cioè quei marcatori che diventano intensamente fluorescenti solamente se legati ad una specifica molecola. Quindi non solo permettono di rilevare la presenza di una molecola specifica in un campione ma anche determinarne la quantità presente. Questo è possibile perché l'intensità di fluorescenza può essere messa in relazione con la quantità di marcatori che fluorescono.

La molecola con la quale si lega il marcatore ed il microambiente che lo circonda modificano le caratteristiche di fluorescenza, come ad esempio l'intensità o il tempo di vita. Come sarà descritto nei paragrafi 1.6 e 1.7 le variazioni delle caratteristiche di fluorescenza permettono di ricavare informazioni sulla soluzione nel quale è inserito.

Il marcatore fluorescente utilizzato nella presente tesi è il Sybr Green I, che è un marcatore commerciale ampiamente diffuso. L'idea alla base di questa tesi è studiare le modifiche indotte sul DNA marcato dal Sybr Green dal microambiente. Questo marcatore si inserisce all'interno della doppia elica del DNA, ed è quindi selettivo e dà informazioni sul DNA. Il Sybr Green si lega anche al DNA a singola elica ma con una efficienza di fluorescenza circa 11 volte inferiore rispetto al DNA a doppia elica. Il meccanismo di legame del Sybr Green con il DNA è l'intercalazione. Il processo di intercalazione del Sybr Green, come per tutti gli agenti intercalanti, è reversibile³³.

Il Sybr Green è un marcatore molto diffuso e recentemente il suo utilizzo ha sostituito quasi completamente quello dell'Etidio Bromuro, che è un'altro marcatore del DNA. Il motivo che ha favorito la diffusione del Sybr Green è la sua assenza, a differenza dell'Etidio Bromuro, di rischi mutagenici per il biologo³⁴. L'aspetto della sicurezza di un ricercatore, come quella di un paziente nei confronti dei virus come vettori genici, è nella maggior parte dei casi sufficiente per scegliere l'uno o l'altro marcatore. Inoltre il Sybr Green è più semplice da produrre del Bromuro di Etidio. L'unico aspetto vantaggioso del Bromuro di Etidio è una maggiore efficienza

quantica di fluorescenza. Tuttavia l'efficienza del Sybr Green è elevata e non risulta un fattore limitante nelle sue applicazioni.

Dunque il Sybr Green è un promettente marcatore di fluorescenza e per questo è stato utilizzato nelle misure di questa tesi.

1.8 UTILIZZO DELLA SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA RISOLTA NEL TEMPO APPLICATA ALLA GENE DELIVERY

Le attuali ricerche sperimentali legate alla *gene delivery* sono dirette ad individuare i vettori che massimizzano l'efficacia di trasfezione e minimizzano la tossicità cellulare. La vera sfida è quella di individuare quali siano le caratteristiche fisico chimiche che determinano l'efficacia di un vettore per il trasporto di geni. Essendo un fenomeno complesso quello che regola l'inglobamento di un vettore all'interno della cellula, occorre considerare molte variabili. Poter ricavare informazioni complete su un fenomeno complesso vuol dire avere a disposizione molte tecniche di indagine che possano fornire tutti i punti di vista necessari per studiarlo. Si sottolinea come in particolare i processi di complessazione e di rilascio del DNA, che sono alla base del rilascio di geni soprattutto quello mediato da polimeri, sono poco compresi. Questo proprio a causa della mancanza di metodi di investigazione di questi processi³⁵.

In questo contesto si inserisce il lavoro presentato in questa tesi. Si vuole infatti sperimentare se la spettroscopia di fluorescenza risolta nel tempo può essere un metodo ottico utile per ricavare informazioni sulla complessazione operata dai vettori genici e se può guidare la scelta di uno o l'altro vettore.

La fluorescenza è una misura ottica. In generale le misure ottiche presentano il vantaggio di non essere invasive e di avere una elevata sensibilità di misura. Infatti una misura di fluorescenza non modifica un campione e questo si traduce in una tecnica che può essere ripetuta molte volte. Mentre l'elevata sensibilità consente di misurare segnali bassi e non è necessario utilizzare grandi quantità di campioni di misura. Questo è utile soprattutto per campioni biologici, dei quali si hanno disponibilità limitate.

L'attenzione è stata focalizzata sullo studio dei polimeri cationici come vettori. Come descritto in precedenza, un polimero si dispone attorno al DNA e lo condensa in una forma finale con dimensioni inferiori. La struttura e le dimensioni del poliplesso hanno una elevata influenza

sulla efficacia di trasfezione. Studiare dei campioni polimerici attraverso la tecnica di spettroscopia di fluorescenza risolta nel tempo ha lo scopo di ottenere informazioni sui cambiamenti strutturali che intervengono nella formazione del poliplesso. Lo studio dei poliplessi è stato eseguito in collaborazione con il dipartimento di Chimica del Politecnico di Milano con il quale si collabora sull'applicazione della spettroscopia di fluorescenza alla caratterizzazione di poliplessi per *gene delivery*.

Il gruppo di Chimica ha sviluppato una serie di polimeri per *gene delivery*, tra i quali si presta particolare attenzione al polimero Chito-g-PEI. Questo polimero è originale nell'applicazione di trasporto di materiale genetico³⁶. Il Chito-g-PEI rappresenta una nuova generazione di vettori polimerici che sfruttano l'unione di diversi polimeri al fine di ottenere la somma delle loro proprietà. Infatti unisce la elevata capacità di trasfezione del PEI e la bassa citotossicità del Chitosano.

Il PEI, polietilenimina, è uno dei polimeri più studiati e impiegati tra i vettori non-virali ed è spesso considerato come obiettivo da raggiungere nello sviluppo di un polimero efficace nel trasferire geni³⁷. Tuttavia la ricerca di un vettore polimerico non si può fermare al PEI poiché questo presenta una elevata citotossicità. Sia l'efficienza di trasfezione che la citotossicità dipendono dal peso molecolare e dal grado di ramificazione del polimero³⁸. Si possono sintetizzare PEI lineari o ramificati ed in entrambi i casi è stata riscontrata una elevata capacità di trasfezione. La configurazione lineare è composta da ammine primarie e secondarie, mentre quella ramificata contiene differenti rapporti di ammine primarie, secondarie e terziarie. Poiché i polimeri cationici posseggono una elevata densità di gruppi amminici, e questi protonano in *buffer*, il PEI presenta una elevata densità di cariche positive³⁹. L'elevata densità di cariche riesce a complessare stabilmente il DNA, quindi a favorire l'ingresso nella cellula, e generare l'effetto di "spugna protonica".

Le ammine primarie nel PEI ramificato possono essere sostituite con un radicale ed aumentare le prestazioni del PEI. In letteratura si trovano già esempi di polimeri composti di PEI e PEG (glicole polietilenico), di PEI e PLL (poli-L-Lisina) ed altri⁴⁰. Il gruppo con il quale è stata portata avanti la collaborazione ha realizzato un *graft* di Chitosano unito al PEI ramificato (bPEI) con peso molecolare 2 kDa. Il Chitosano è un polimero naturalmente biodegradato dal corpo umano e quindi è biocompatibile e non tossico⁴¹. Anche il bPEI a basso peso molecolare non è tossico, ma è poco efficiente nel trasferire geni. Dal momento che un aumento del peso

molecolare del bPEI determina una maggiore efficienza di trasfezione, l'aggiunta del Chitosano al bPEI 2kDa ha proprio lo scopo di aumentare il peso molecolare. I risultati di efficienza di trasfezione e di vitalità cellulare a seguito dell'inserimento in vitro dei polimeri bPEI a basso ed alto peso molecolare e del Chito-g-PEI sono stati misurati dal gruppo di Chimica e riportati in figura 4.

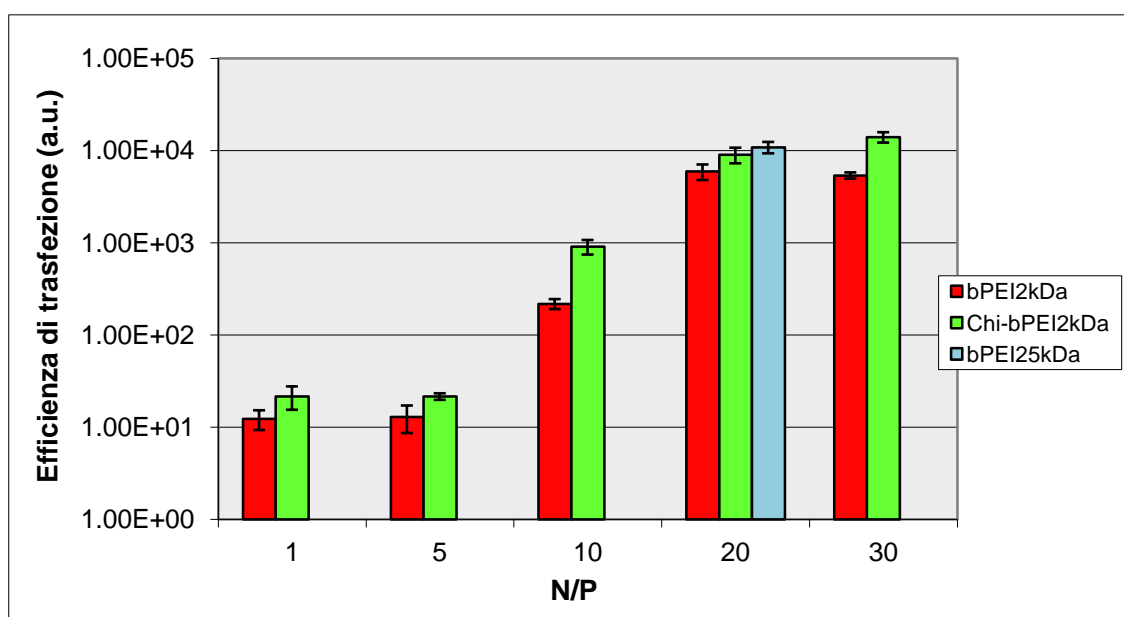


Fig. 4a – Efficienza di trasfezione dopo l’inserimento dei 3 poliplessi in una coltura cellulare in vitro in funzione di NP

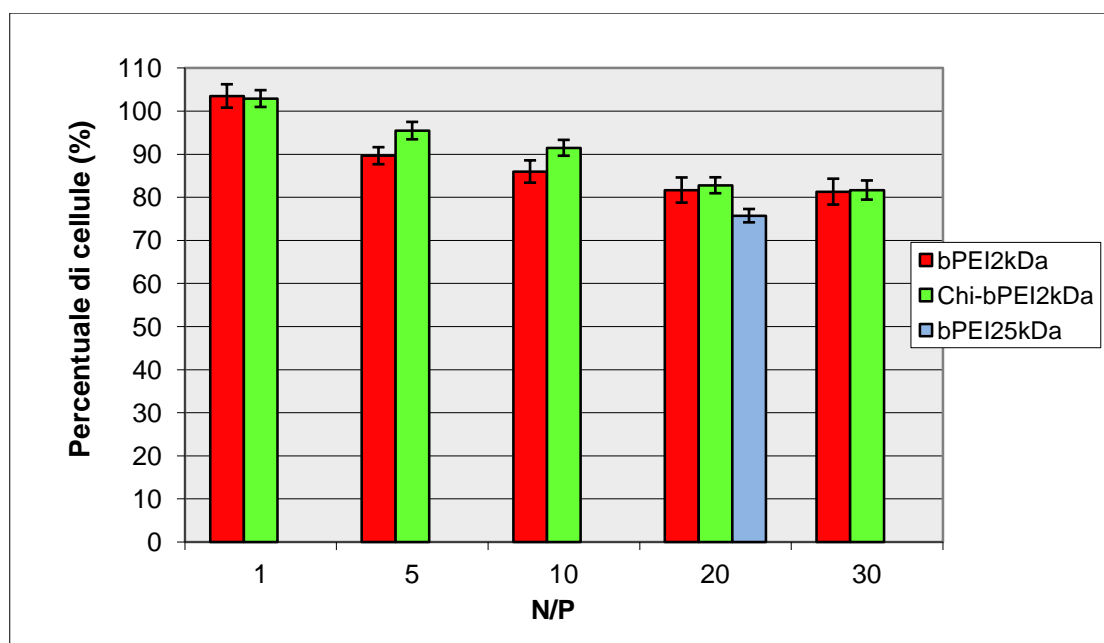


Fig. 4b – Vitalità cellulare dopo l’inserimento dei 3 poliplessi in una coltura cellulare in vitro in funzione di NP

E' stato osservato che l'aggiunta del Chitosano al bPEI 2 kDa conferisce alla molecola risultante una minore tossicità, se confrontata con quelle del PEI ad alto e a basso peso molecolare. Tuttavia con il Chito-g-PEI non si raggiungono le stesse capacità di trasfezione del bPEI 25 kDa.

Questi 3 polimeri rappresentano un caso di studio adatto alla tecnica di spettroscopia di fluorescenza risolta nel tempo, in quanto è necessario capire quali siano le differenze tra i 3 polimeri e se possibile anche individuare i vantaggi e gli svantaggi di questi. In particolare la tecnica ottica di misura proposta vuole andare ad individuare quando si presentino delle differenze nella struttura dei 3 poliplessi, poiché influenzano l'efficienza di trasfezione.

In biologia la misura di fluorescenza in continua di un marcatore del DNA è una tecnica per ricavare informazioni utili per la *gene delivery*. Nella ricerca di promettenti vettori polimerici, la diminuzione di intensità di fluorescenza è un indice per capire quanto efficacemente il polimero complessi il DNA. Infatti all'aumentare della concentrazione di polimero in soluzione con il DNA si osserva una diminuzione dell'intensità di fluorescenza, e questa si può associare alla formazione del poliplesso. In questo modo si possono avere delle indicazioni prima di applicare il poliplesso sulle cellule se esso ha complessato o meno il DNA³⁵.

La misura di fluorescenza risolta nel tempo di un marcatore del DNA vuole aumentare le informazioni che si possono ottenere anche prima degli esperimenti di trasfezione sulle cellule. Infatti, come detto prima, la misura risolta in tempo separa i contributi di tempo di vita e di ampiezza. Il tempo di vita di fluorescenza è strettamente legato al microambiente attorno al fluoroforo. Nel caso specifico di un intercalante come il Sybr Green, il microambiente è costituito dal complesso DNA e polimero cationico che si dispongono attorno al fluoroforo. Dunque conoscere il tempo di vita può fornire indicazioni sulla struttura che il poliplesso forma, che è un aspetto fondamentale per valutare l'efficacia di un vettore genico. Così come si può studiare quando avvengono differenze strutturali del poliplesso si può anche ricavare una indicazione sulla stabilità che i poliplessi formano.

L'ampiezza di fluorescenza è proporzionale alla quantità di Sybr Green legata al DNA. Mentre nel caso di decadimento multiesponenziale le ampiezze di fluorescenza permettono di conoscere quanto sia il "peso" di un tempo di vita rispetto ad un altro e così essere più specifici sulle informazioni del poliplesso.

Le misure eseguite nella tesi sono di spettroscopia. Dalla misura dello spettro di emissione del marcatore di fluorescenza del DNA si possono ricavare informazioni importanti. In particolare cambiamenti di forma o traslazioni in lunghezza d'onda dello spettro di emissione possono fornire anche informazioni su modifiche del Sybr Green e dei suoi legami con il DNA.

Quindi in generale l'obiettivo dell'utilizzo della tecnica di spettroscopia di fluorescenza risolta nel tempo è quella di ottenere nuove informazioni e di intuire come queste possono essere utili nella realizzazione di vettori per *gene delivery*. Infine si cerca anche di capire fin dove la tecnica di fluorescenza risolta nel tempo si può spingere nello studio dei vettori per il rilascio di geni.

In questa tesi si propone l'utilizzo della tecnica di spettroscopia di fluorescenza risolta nel tempo per studiare le caratteristiche e le dinamiche di complessazione tra polimeri cationici e DNA. E' stato utilizzato il Sybr Green per marcare in fluorescenza il DNA. L'analisi sui poliiplessi è quindi realizzata andando ad osservare le variazioni di tempi di vita e di ampiezze di fluorescenza del Sybr Green.

CAPITOLO 2: APPARATO SPERIMENTALE

L'apparato sperimentale utilizzato nelle misure trattate nella tesi consente di misurare il decadimento di fluorescenza contemporaneamente su 32 lunghezze d'onda e per questo si parla di misure di spettroscopia di fluorescenza risolta nel tempo. Da queste misure si ottengono informazioni sia sullo spettro di emissione di un fluoroforo sia sulla sua variazione temporale.

Le componenti strumentali che caratterizzano una misura di fluorescenza risolta nel tempo sono la sorgente laser con funzionamento in regime impulsato e il sistema di rivelazione a singolo fotone. Questi consentono di studiare la dinamica di decadimento di fluorescenza attraverso la tecnica di conteggio di singoli fotoni correlati nel tempo.

Nella prima parte del capitolo sono presentate le componenti del sistema sperimentale, riportando le caratteristiche tecniche e cercando di spiegare le loro funzioni. Lo schema di misura di spettroscopia di fluorescenza risolta nel tempo è composto da tre parti fondamentali: la sorgente laser, il sistema di rivelazione a singolo fotone e il percorso ottico. Nella seconda parte è caratterizzato il sistema secondo gli aspetti di calibrazione spettrale e risposta all'impulso del sistema. Mentre a fine capitolo si descrivono i campioni di misura utilizzati e il software realizzato appositamente per analizzare i dati misurati.

2.1 SORGENTE LASER

La sorgente laser utilizzata è il sistema laser SuperK EXTREME (NKT photonics, Danimarca) che genera tramite *mode locking* impulsi con larghezza temporale a metà altezza di circa 10 ps nell'intervallo spettrale del visibile e vicino infrarosso. Questi impulsi laser possono essere emessi ad una frequenza di ripetizione regolabile tra 2 MHz e 80 MHz. Il sistema invia un segnale elettrico di *trigger* che può essere regolato fino ad un ritardo di 9.2 ns a passo 10-15 ps e collegato al sistema elettronico di rivelazione per sincronizzare la parte ottica con la parte elettronica della strumentazione.

Gli stadi di generazione del fascio laser si dividono in due. Il primo stadio si chiama *master oscillator* e genera l'impulso di *seed* a 1080 nm. Il *master oscillator* è una fibra ottica drogata

Itterbio che, pompata da un diodo laser a 976 nm, emette l'impulso di *seed* che poi andrà ad essere amplificato dal secondo stadio. Il secondo stadio di generazione del laser è costituito da una fibra ottica drogata Itterbio che, pompata da un secondo diodo laser a 976 nm, amplifica l'impulso di *seed* fino ad una potenza massima di 8 W.

La sorgente laser utilizzata è molto stabile in potenza. Le variazioni di potenza rimangono entro 1.5%. In figura 5 è rappresentata una misura della potenza in uscita del laser in funzione del tempo realizzata dalla casa produttrice del sistema laser.

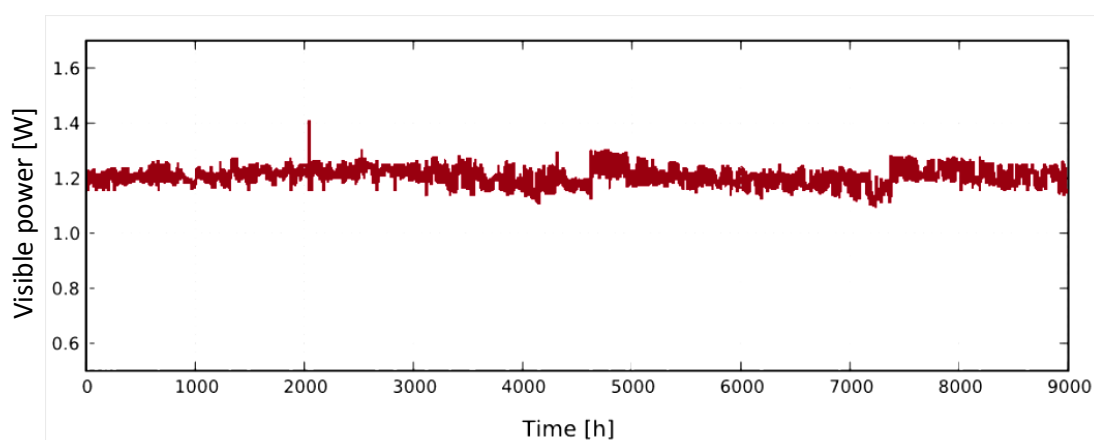


Fig. 5 – Stabilità in potenza della sorgente laser

Il laser SuperK EXTREME copre le lunghezze d'onda tra 400nm e 2400nm, e quindi è un laser che genera impulsi su un ampio spettro di lunghezze d'onda. In particolare la sorgente laser ottiene l'allargamento spettrale dell'impulso di *seed*, dopo che questo è stato amplificato, attraverso la tecnologia di fibre di cristallo fotonico (NKT photonics, Danimarca). Le fibre di cristallo fotonico sono delle particolari fibre ottiche che allargano per effetti ottici non lineari lo spettro di frequenze di un impulso laser che le attraversa⁴².

Il sistema laser comprende anche un selezionatore di lunghezza d'onda (SuperK SELECT, NKT photonics, Danimarca) che collegato via computer consente di selezionare in uscita una singola lunghezza d'onda con FWHM di circa 1.8 nm nel visibile. Il SuperK SELECT riceve il fascio laser collimato in uscita dal laser e tramite un filtro acusto ottico, accordabile in lunghezza d'onda, seleziona la lunghezza d'onda in uscita e focalizza il fascio laser in una fibra ottica.

Negli esperimenti è stata selezionata la lunghezza d'onda di 490nm in uscita dal laser, ovvero il picco di eccitazione del Sybr Green. Tuttavia la possibilità del sistema laser di accordare la

lunghezza d'onda in uscita dal laser su un ampio spettro di frequenze è stata utilizzata per calibrare l'intervallo spettrale misurato dal sistema di rivelazione come verrà descritto in seguito.

La frequenza di ripetizione degli impulsi utilizzata nelle misure è di 40 MHz, così da misurare una curva di decadimento di fluorescenza su un intervallo temporale massimo di 25 ns. E' possibile sincronizzare questo intervallo temporale con il segnale elettrico di *trigger* inviato dal laser, così da traslare temporalmente la curva di decadimento di fluorescenza e centrarla sull'intervallo temporale di misura.

La stabilità in potenza è un altro aspetto importante del sistema laser, soprattutto perché consente di eseguire misure sulle dinamiche di intensità di fluorescenza. Al contrario se il laser non fosse stabile si potrebbero attribuire fluttuazioni del laser a variazioni di intensità. Inoltre nelle misure sperimentali è stato corretto il valore di intensità in funzione della potenza inviata sul campione. Di conseguenza la proprietà di stabilità del laser garantisce che la correzione in potenza sia mantenuta valida per l'intera durata di misura.

Per guidare il fascio elettromagnetico dall'uscita del sistema laser fino al tavolo ottico è stata utilizzata una fibra ottica multimodo *graded index* (50 μm nucleo/ 125 μm mantello). La fibra ottica scelta ha un nucleo largo, che quindi ammette alla propagazione di molti modi in fibra, ed è adatta alla conduzione della luce visibile.

2.2 CAMMINO OTTICO

Il cammino ottico guida il fascio laser di eccitazione sul campione di misura e dal campione al sistema di rivelazione. In figura 6 è illustrato il percorso ottico schematizzato del sistema di misura.

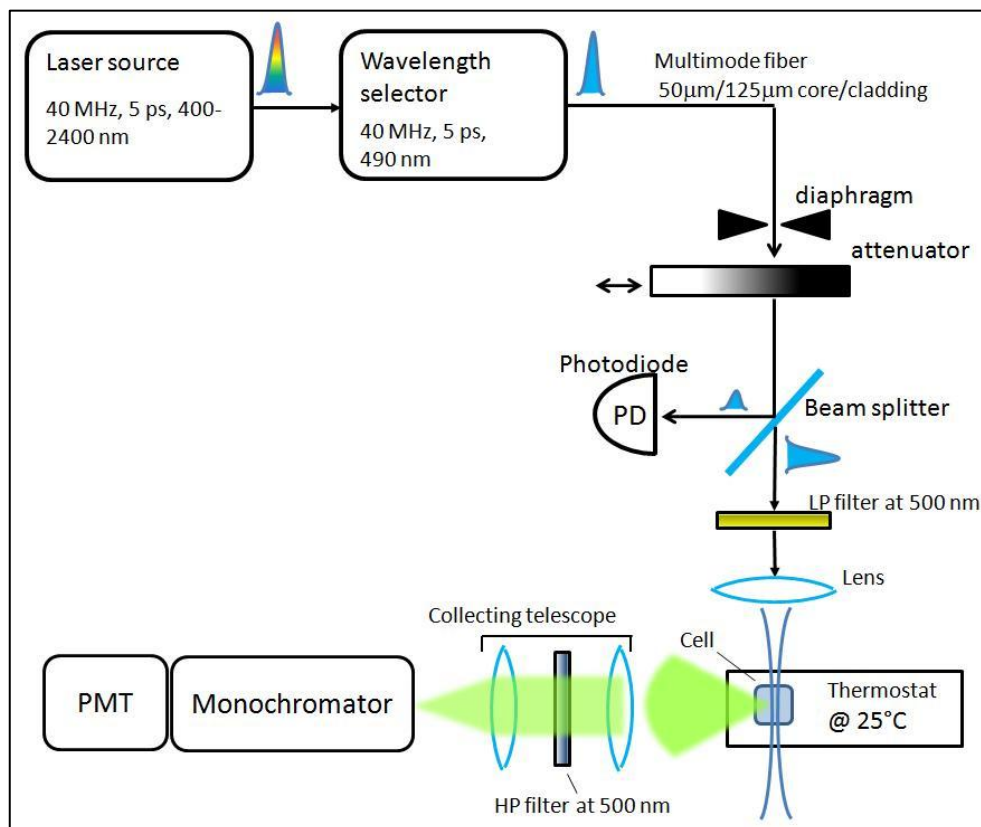


Fig. 6 – Schema a blocchi del percorso ottico

In uscita dalla fibra ottica un collimatore converge il fascio laser su una serie di ottiche che guidano la luce fino al campione di misura. Il primo componente ottico è un disco attenuatore con zone gradualmente riflettenti che ha la funzione di regolare la potenza incidente sul campione. E' caratterizzato da un diametro di 10 cm e la attenuazione che essa produce ha densità ottica variabile tra 0 e 4. Infatti eccessiva potenza incidente sul campione comporta due effetti negativi: i) il *bleaching* dei fluorofori nel campione e quindi il danneggiamento del campione; ii) l'emissione di un segnale di fluorescenza troppo elevato che potrebbe saturare il *range* dinamico in intensità del sistema di rilevazione. Al contrario, scarsa potenza incidente sul campione genera un segnale di misura basso e rumoroso.

Attraverso un fotodiiodo è misurata la potenza ottica incidente sui campioni. Un separatore di fascio, come si vede in figura 6, riflette una parte di luce di eccitazione sul fotodiiodo. Il

fotodiodo è stato connesso ad un computer tramite la scheda di acquisizione dati NI USB 6229 (National Instrument) e i valori in uscita di tensione sono stati calibrati e convertiti in potenza attraverso un radiometro. La massima potenza, per la strumentazione utilizzata e alla lunghezza d'onda di 490nm, inviabile sul campione è di 110 μ W. La conoscenza della potenza incidente sul campione ha diverse funzioni. Infatti consente di confrontare campioni differenti, rendendo la misura indipendente dalla potenza di eccitazione che illumina il campione. Inoltre la potenza laser incidente, soprattutto su misure di lunga durata, può avere delle derive ed il fotodiodo consente di controllarle.

Due specchi ed una lente focalizzano il fascio di luce di eccitazione all'interno della cuvetta contenente la soluzione da misurare. I campioni di misura sono tutti in fase liquida. Per contenerli è stata utilizzata una cuvetta, a forma di parallelepipedo in quarzo di dimensioni ridotte. La cuvetta utilizzata ha dimensioni interne 3x3x20 mm³. Con queste cuvette è sufficiente preparare una soluzione di 30 μ l e quindi si riduce al minimo l'utilizzo di costosi campioni biologici. Il quarzo è un materiale adatto a misure ottiche nel visibile in quanto non assorbe e non diffonde onde elettromagnetiche nello spettro visibile. Il fascio incidente sulla cuvetta è focalizzato con uno *spot* di circa 0.5 mm. Il fascio laser incide su un lato della cuvetta. Essendo la luce di fluorescenza emessa in direzione isotropa, è possibile posizionare l'ottica di raccolta ortogonalmente al fascio di eccitazione. L'angolo di 90° tra direzione di incidenza e di raccolta ha il vantaggio di ridurre la diffusione indesiderata del fascio di eccitazione nel percorso di raccolta. Per avere chiara la geometria si può osservare in figura 6 come l'ottica di raccolta sia posizionata rispetto al fascio incidente sul campione.

La cuvetta è mantenuta a temperatura costante di 25°C da un termostato. E' stato osservato, nel corso delle misure, che la temperatura ambiente può influenzare gli esperimenti. Pertanto, per evitare possibili modificazioni dei campioni sperimentali e rendere le misure più riproducibili, è stata controllata la temperatura della cuvetta. Il termostato utilizzato è composto da una cella di Peltier e dei resistori come attuatori, una termocoppia come sensore di temperatura e un controllore in retroazione negativa.

L'ottica di raccolta è composta da un telescopio ottico e dallo spettrometro SP-2150i (Princeton Instruments). Il telescopio ottico consente di massimizzare l'angolo di raccolta di emissione di fluorescenza. La prima lente del telescopio è una lente con elevata apertura numerica (*f number* pari a 2) la cui focale è posizionata sulla celletta all'altezza dell'emissione di

fluorescenza. La seconda lente focalizza il fascio di misura verso lo spettrometro per immagini. E' importante che nello spettrometro arrivi un fascio focalizzato e non disperso in tutte le direzioni come quello emesso dalla fluorescenza. Infatti lo spettrometro tramite un reticolo di diffrazione divide angularmente le componenti spettrali del fascio focalizzato al suo ingresso e le separa spazialmente sul rivelatore. Lo spettrometro utilizzato possiede un f number circa pari a 4 e una lunghezza focale di 150 mm. Il reticolo nello spettrometro ha una densità di righe di 1200g/mm e $blaze$ 500nm.

All'uscita dello spettrometro è posizionato il sistema di rilevazione dei fotoni di fluorescenza. La dispersione spettrale operata dallo spettrometro ha lo scopo di dividere le componenti spettrali della fluorescenza su diversi punti sensibili del fotocatodo. Infatti il rivelatore è di tipo multianodo e, come verrà in seguito descritto, consente la rivelazione in parallelo dei fotoni incidenti sulle varie zone del fotocatodo. In figura 7 si nota che lo spettrometro divide sul fotocatodo, lungo la direzione orizzontale, le lunghezze d'onda che compongono il segnale di fluorescenza.

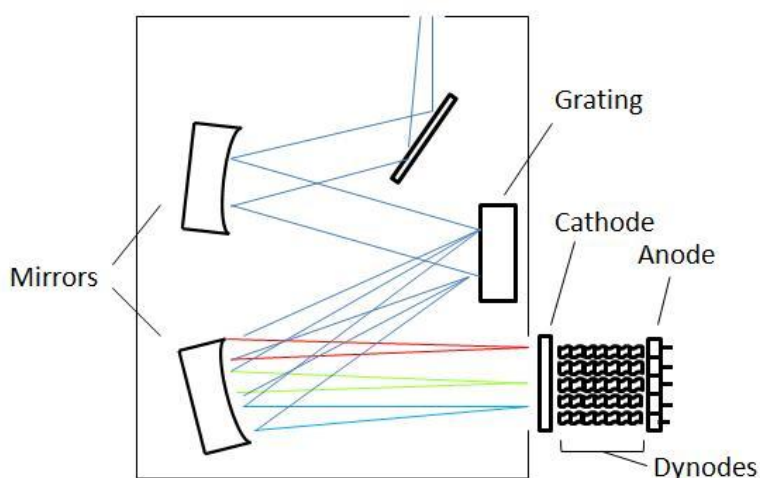


Fig.7 – Schema spettrometro e tubo fotomoltiplicatore

Nelle misure effettuate, il reticolo dello spettrometro è stato ruotato in modo che a metà dell'area sensibile del fotocatodo incidesse la lunghezza d'onda 575 nm. Ottenendo così la rivelazione di uno spettro simmetrico attorno a 575 nm e una banda di circa 117 nm. Verrà caratterizzato più avanti nella tesi, nel paragrafo di "calibrazione spettrale", lo spettro misurato dal sistema.

2.3 SISTEMA DI RIVELAZIONE A SINGOLO FOTONE CORRELATO NEL TEMPO

I segnali provenienti dal campione devono essere rivelati ed analizzati da una strumentazione in grado di misurarne l'andamento temporale. La tecnica impiegata, come introdotto nel capitolo 1, è il conteggio di singoli fotoni correlati nel tempo (TCSPC). I passaggi logici del sistema di rivelazione a singolo fotone sono rappresentati in figura 8.

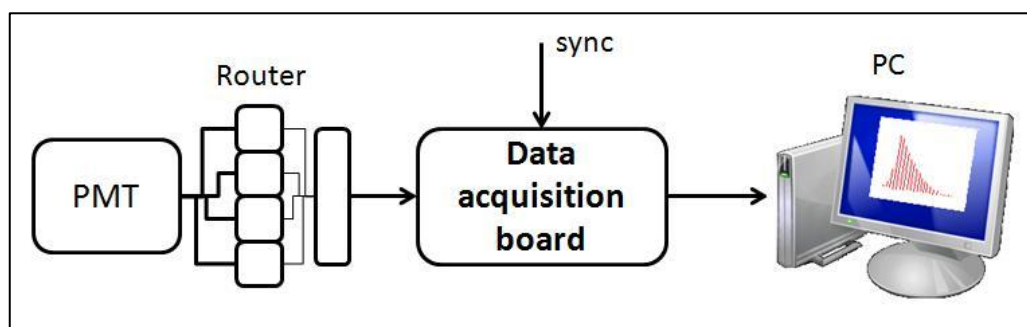


Fig. 8 – Schema a blocchi del sistema di rivelazione

All'uscita dello spettrometro, un fotomoltiplicatore a 32 canali (H7260, Hamamatsu) è utilizzato per la rivelazione dei fotoni. Il fotorivelatore trasforma la ricezione di un fotone in un segnale di corrente elettronica. Il fotocatodo è ricoperto da un materiale sensibile, a Multi-Alkali, che genera i fotoelettroni. Il fotomoltiplicatore è polarizzato a -800 V sul catodo e tenuto a massa l'anodo, mentre i dinodi hanno un potenziale negativo che cresce avvicinandosi all'anodo. Una differenza di potenziale elettrico è quindi mantenuta tra ogni *step* di amplificazione, o dinodi. La ddp accelera gli elettroni che, andando ad impattare sul materiale sensibile dei dinodi, generano elettroni secondari. La serie di dinodi amplifica a valanga il numero di elettroni del segnale. In questo modo da un solo elettrone si ottiene una corrente elettrica sufficientemente intensa da poter elaborare elettronicamente.

L'anodo ha una larghezza di 31.8 mm lungo la quale sono affiancati 32 canali di rivelazione della corrente elettronica generata dall'arrivo di un fotone. Ognuno dei 32 canali è separato spazialmente e riceve il segnale dei fotoelettroni originato da una sola componente spettrale separata angularmente sul fotocatodo dal monocromatore. In questo modo è possibile ricostruire lo spettro di emissione di fluorescenza.

Dopo il fotomoltiplicatore il segnale è separato in 32 canali, che conducono il segnale elettronicamente, collegati alla scheda di acquisizione. La scheda di acquisizione è una sola e per gestire i 32 canali e indirizzare il segnale fino alla scheda di acquisizione si dispone di un *router*.

Il *router* assegna a ciascun canale del PMT un codice binario di 5 bit ($5 = \log_2 32$). La serie di bit identificativa del canale è fornita in ingresso alla scheda per il conteggio di singolo fotone, così da poter riconoscere il canale nel quale è stato rivelato il fotone.

Il *router* a 32 canali, utilizzato nelle misure, non esiste in commercio. Per ottenere un *router* a 32 canali sono stati utilizzati quattro *router* da 8 ingressi (HET-81, Becker & Hickl) ed in serie un *router* da 4 ingressi (HET-41, Becker & Hickl). I *router* sono opportunamente collegati tra loro mediante una scheda elettronica⁴³.

Il componente elettronico del *router* che genera la sequenza di bit è l'*encoder*. La corrente generata dai fotoelettroni è amplificata dai vari *step* di amplificazione e raggiunge una certa ampiezza alla fine del fotomoltiplicatore. L'*encoder* genera la sequenza di bit solo se il segnale di corrente amplificato supera una certa soglia. Tale soglia è necessaria per distinguere la rilevazione di un fotone da altri tipi di segnali elettrici che comportano un rumore di corrente.

Oltre ai bit codificativi dei canali del PMT, il *router* fornisce alla scheda di acquisizione dati altri due segnali, uno dei quali è il *bit enable*, che ha il compito di indicare alla scheda se il fotone contato sia o meno valido. Infatti, come spiegato, nella tecnica TCSPC è necessario che per ogni impulso di eccitazione venga rilevato al massimo un fotone. Il *bit enable* assume il valore logico "0" quando in più di un ingresso viene superata la soglia di rivelazione oppure quando nessun fotone viene rivelato.

Il secondo segnale in uscita è l'impulso elettrico, generato dal fotoelettrone e amplificato a valanga degli elettroni secondari del fotomoltiplicatore, ed è il segnale analogico che la scheda di acquisizione dovrà poi elaborare.

Lo schema a blocchi di funzionamento della scheda di acquisizione (SPC-130, Becker and Hickl) è mostrato in figura 9.

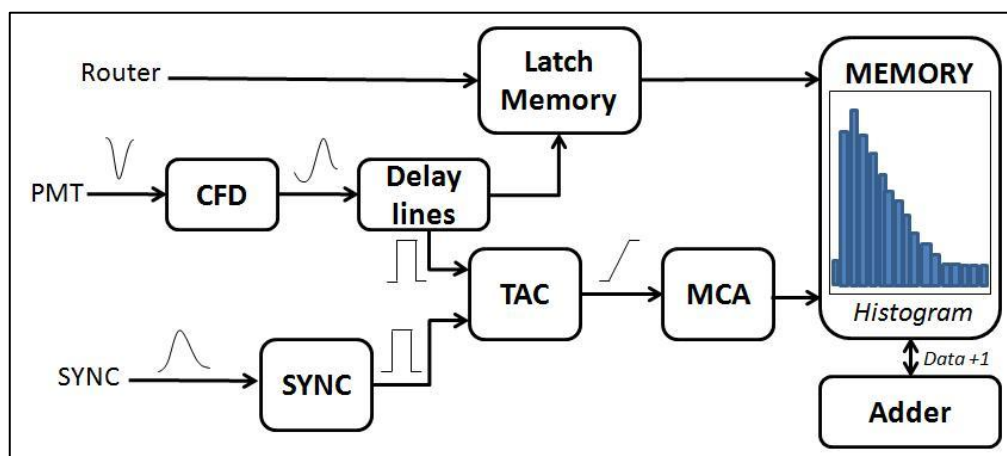


Fig. 9 – Schema funzionamento scheda per il conteggio di singolo fotone

La scheda deve misurare l'intervallo di tempo tra l'eccitazione e l'emissione di un singolo fotone di fluorescenza. Per fare questo deve:

- conoscere l'istante di tempo nel quale arriva l'impulso laser di eccitazione, che ottiene dal segnale di sincronismo (SYNC) e viene inviato direttamente dal laser;
- misurare l'istante di emissione del fotone, che ottiene elaborando il segnale proveniente dal *router*.

Un importante componente della scheda di acquisizione è il *Constant Fraction Discriminator* (CFD). Il segnale elettrico in ingresso alla scheda di acquisizione ha la forma di un impulso nel tempo. Gli impulsi elettrici di rivelazione possono presentare differenze di larghezza temporale o di ampiezza. Infatti la ampiezza del segnale dipende dalla amplificazione del PMT, che varia in funzione della lunghezza d'onda del fotone e della zona del catodo sulla quale incidono i fotoni. Mentre la dispersione temporale è dovuta al fatto che la generazione degli elettroni secondari è un meccanismo stocastico. Il fatto che arrivino degli impulsi diversi in ingresso alla scheda di acquisizione rende difficile ricostruire elettronicamente l'istante di arrivo del fotone rivelato. Infatti non si può, ad esempio, impostare una soglia di ampiezza alla quale corrisponda l'istante di arrivo del fotone. Allora si utilizza la tecnica CFD. Questa tecnica prevede di elaborare opportunamente il segnale per ricavare l'istante di arrivo del fotone. L'impulso in arrivo al componente CFD è negativo. Di questo viene fatta una copia invertita e ritardata di un tempo t_D , mentre l'impulso originale viene attenuato di un fattore α . I due impulsi vengono poi sommati e l'impulso risultante risulta avere un punto di attraversamento dello zero (*zero crossing*). Si osserva che l'indipendenza temporale del punto di *zero crossing* è possibile se viene mantenuto costante il valore α . Il punto di *zero crossing* è assunto come riferimento per la misura dell'istante di rivelazione. Il CFD possiede anche un regolatore di soglia che elimina gli impulsi di ampiezza inferiore al valore fissato di soglia. In tal modo è possibile diminuire il rumore di fondo determinato dagli impulsi spontanei del fotomoltiplicatore (corrente di buio)^{28,29}.

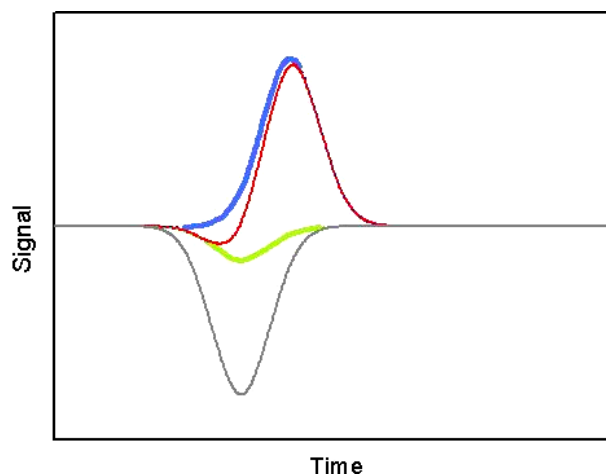


Fig. 10 – Segnali del CFD. Curva rossa: segnale in uscita dal CFD; curva grigia: segnale originale proveniente dal PMT; curva blu: segnale dal PMT cambiato di segno e ritardato; curva verde: segnale dal PMT attenuato

I segnali di SYNC e del fotomoltiplicatore vengono inviati, dopo essere stati opportunamente ritardati e formati, ad un convertitore tempo ampiezza (TAC). Il TAC permette di mettere in relazione biunivoca i ritardi temporali di rivelazione dei fotoni con dei valori prestabiliti di tensione elettrica. Infatti il TAC genera una rampa di tensione dopo aver ricevuto il segnale di SYNC dal laser. Questa rampa di tensione continua a crescere fino a quando arriva il segnale di rivelazione di un singolo fotone di fluorescenza (corrispondente allo *zero crossing* del CFD). In questo modo la tensione ottenuta a valle del TAC è proporzionale al ritardo tra impulso di eccitazione (ottenuto dal SYNC) ed istante di rivelazione del singolo fotone di fluorescenza. Il segnale del TAC viene inviato ad un analizzatore multicanali (MCA). L' MCA è un particolare convertitore analogico digitale che ha il compito di discretizzare i valori di tensione provenienti del TAC in 4096 canali. Il segnale del TAC viene quindi contato come una unità nel canale corrispondente al valore di tensione. Ripetendo molte volte la misura, si accumulano nei canali del MCA i conteggi corrispondenti ai fotoni misurati ai diversi ritardi temporali e, se i conteggi sono statisticamente significativi, tale distribuzione segue l'andamento temporale del segnale di fluorescenza²⁸.

L'informazione proveniente dal *router* consente di costruire un istogramma per ogni lunghezza d'onda rivelata. Quindi si ottengono 32 istogrammi, ciascuno dei quali costruito addizionando una unità per ogni fotone di fluorescenza ad uno dei 4096 istanti discretizzati di tempo.

La discretizzazione temporale ha intervalli temporali di 6.13 ps. Questo incremento temporale è stato impostato, via software, in modo da ottenere un *range* temporale di decadimento di fluorescenza di $6.13 \text{ ps} \times 4096 = 25108 \text{ ps} = 25.1 \text{ ns}$. Valore che coincide con il tempo di

ripetizione tra due impulsi laser. La scheda di acquisizione è collegata al computer e i dati acquisiti sono direttamente salvati sul PC.

Si osserva che in *range* dinamico di intensità di questa configurazione di misura a singoli fotoni è limitato al regime lineare di conteggio di singoli fotoni. Ad alte intensità, infatti, possono arrivare simultaneamente più fotoni sul fotocatodo e in questa modalità vengono contati come un solo fotone, introducendo quindi effetti non lineari nella misura. Di conseguenza il limite di fotoni al secondo rivelabili, per il sistema utilizzato, è di 10^6 . Questo valore è dato dal limite di velocità di elaborazione del router e della scheda di acquisizione dati.

2.4 CARATTERIZZAZIONE DEL SISTEMA

2.4.1 CALIBRAZIONE SPETTRALE

La separazione in lunghezza d'onda della emissione di fluorescenza del campione è realizzata da un reticolo di diffrazione. Le componenti spettrali raggiungono i 32 canali del PMT separati angularmente. Per calibrazione spettrale si intende che è stata effettuata sperimentalmente una misura per attribuire una lunghezza d'onda centrale ad una banda di ogni canale del PMT.

La sorgente laser è in grado di selezionare in uscita impulsi con larghezza spettrale a metà altezza di circa 1.8 nm su ampio spettro di frequenze. Sono stati inviati 3 impulsi monocromatici alle lunghezze d'onda 540nm, 570nm e 600nm.

Gli impulsi sono stati rilevati, come si vede in figura 11 rispettivamente ai canali 8, 16 e 24 del fotomoltiplicatore.

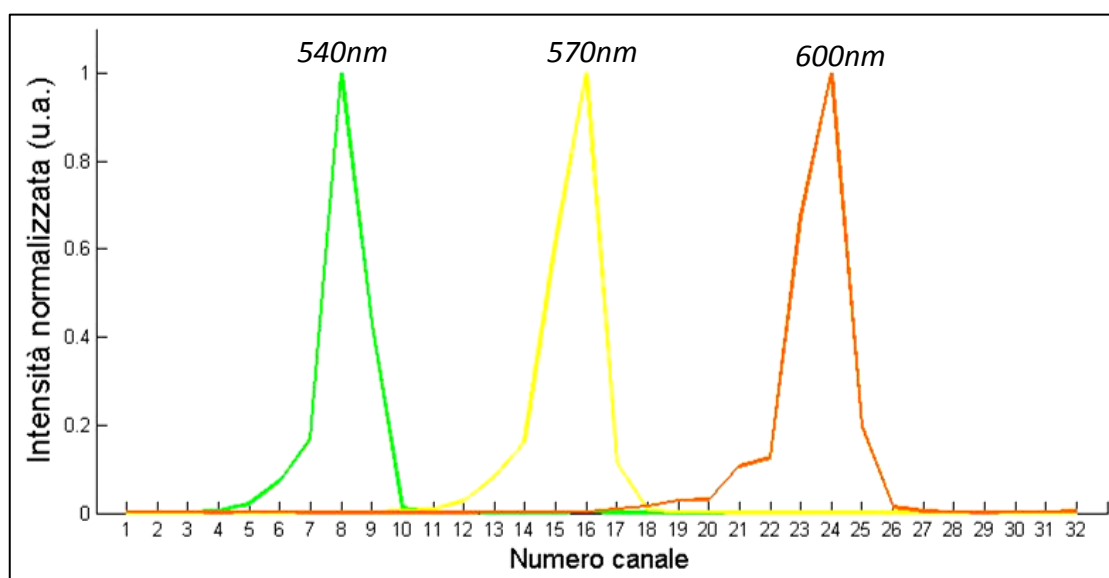


Fig. 11 – Canali del fotomoltiplicatore nei quali vengono rivelati gli impulsi laser alle lunghezze d'onda 540nm, 570nm e 600nm

Il calcolo del vettore delle 32 lunghezze d'onda corrispondenti ai canali è calcolata attraverso l'interpolazione di una retta per 3 punti. Chiamando x la variabile "canale del fotomoltiplicatore" e y la variabile "lunghezza d'onda" e considerando: $x_1=8$, $x_2=16$ e $x_3=24$; $y_1=540$, $y_2=570$ e $y_3=600$. Si ottiene la retta di equazione:

$$y = 3.75 x + 510$$

Poiché x varia da 1 a 32 si ottengono le lunghezze d'onda incidenti sui canali del fotomoltiplicatore da 513nm a 630 nm a passo di circa 3.75 nm. La lunghezza d'onda centrale impostata nel monocromatore è di 575 nm, che si trova correttamente al centro del *range* spettrale misurato. La dispersione lineare sull'area sensibile di rilevazione del fotomoltiplicatore calcolata sperimentalmente è 3.75 nm/mm. La larghezza dell'area sensibile del fotomoltiplicatore è di 31.8 mm e copre uno spettro di 117 nm.

Il sistema di misura consente di calcolare lo spettro di emissione di fluorescenza di un campione. Infatti dalla somma dei fotoni incidenti su ogni canale si ottiene l'intensità in continua emessa per ogni lunghezza d'onda. Di conseguenza giustapponendo le intensità rivelate per ogni lunghezza d'onda si ottiene lo spettro di emissione in continua di un fluoroforo.

Realizzando delle misure di prova con coloranti, Cumarina540a e DCM, si è osservato che lo spettro di emissione ottenuto sperimentalmente è impreciso. Infatti si ottiene uno spettro di emissione irregolare causato dalla differente efficienza di rilevazione di ogni canale di rivelazione, che è originata da due aspetti strumentali:

- Risposta spettrale del PMT;
- Risposta spettrale del reticolo di diffrazione.

Per calibrare lo spettro di emissione è stata effettuata una correzione spettrale post misura. La calibrazione spettrale utilizzata prevede di correggere lo spettro con dei coefficienti correttivi, così da calibrare i canali del PMT.

E' stato utilizzato come riferimento spettrale un fluoroforo del quale fosse noto lo spettro di emissione. Misurando con il sistema di misura lo spettro del fluoroforo noto, è stato possibile correggere i singoli canali di rilevazione del PMT, trovando per ciascuno il coefficiente di correzione corrispondente.

Il campione utilizzato come riferimento spettrale è una soluzione di Cumarina540a e DCM disciolti in Metanolo. La cumarina e il DCM sono due coloranti con picco di emissione rispettivamente a 540nm e 620 nm. Sono stati utilizzati questi due coloranti, opportunamente dosati, per ottenere uno spettro di emissione sufficientemente piatto nell'intervallo di lunghezze d'onda tra 510nm e 640 nm. Uno spettro piatto permette di calcolare dei coefficienti

correttivi più precisi perché, nel caso contrario, punti con derivata prima diversa da zero hanno pendenze più critiche. I coloranti Cumarina540a e DCM hanno tempi di decadimento di fluorescenza dell'ordine del ns e quindi adatti alla strumentazione di misura. Il calcolo dello spettro è ottenuto dal conteggio dei fotoni rilevati da ciascun canale del PMT.

Lo spettro della soluzione Cumarina-DCM è stato misurato con lo spettrofluorimetro Fluorolog-3 modello FL3-21 (HORIBA, USA), che è calibrato spettralmente.

Lo spettro di riferimento normalizzato, cioè la soluzione di Cumarina-DCM in Etanolo, misurato con lo spettrofluorimetro e lo spettro dello stesso campione ottenuto con il sistema di misura è riportato in figura 12.

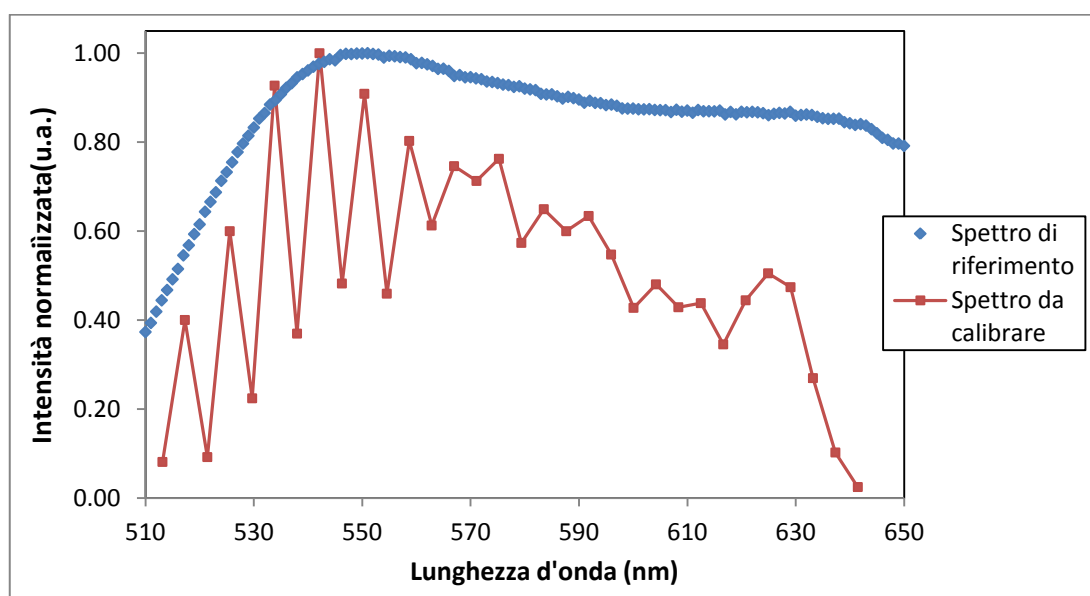


Fig. 12 – Spettri di emissione normalizzati sul picco della soluzione Cumarina540a-DCM in Etanolo: curva blu misurata con spettrofluorimetro; curva rossa misurata con sistema risolto nel tempo utilizzato nelle misure

Come si vede in figura 12, i 32 canali di rilevazione, che corrispondono alle 32 lunghezze d'onda del sistema sperimentale utilizzato, hanno un andamento irregolare e diverso dal vero andamento dello spettro descritto dalla curva blu.

I coefficienti di correzione sono stati calcolati dividendo i 32 valori di intensità interpolati nello spettro di riferimento per i 32 valori di intensità rilevati dai canali del PMT.

$$C_i = \frac{I_{\text{riferimento}}(\lambda)}{I_{\text{sistema}}(i\lambda)}, \text{ per } i : 1 \rightarrow 32$$

Ad esempio in figura 13 lo spettro del Sybr Green intercalato al DNA è presentato senza e con calibrazione spettrale.

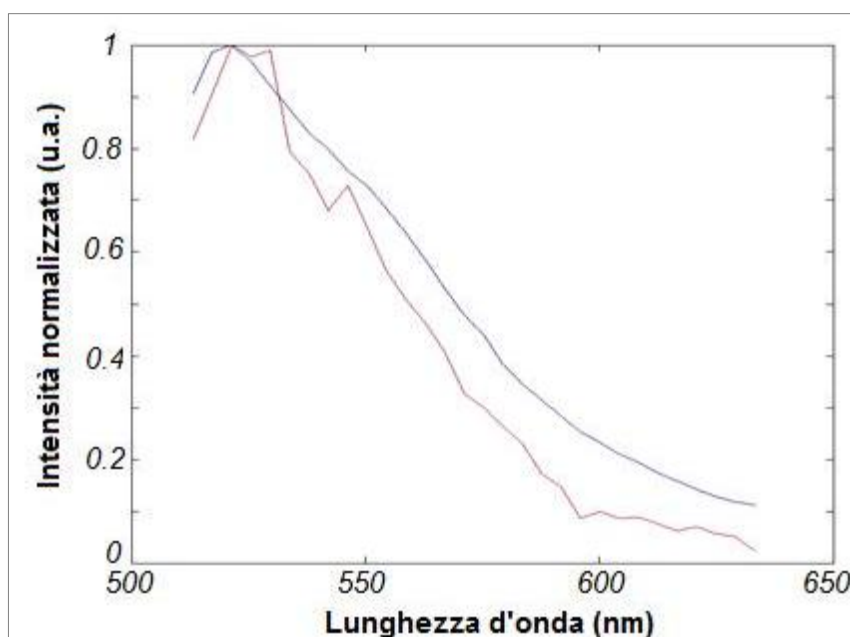


Fig. 13 – Spettri di emissione di fluorescenza di Sybr Green intercalato nel DNA misurati con il sistema risolto nel tempo: curva rossa spettro non calibrato; curva blu spettro calibrato

La curva blu in figura 13 è una curva di emissione di fluorescenza corretta poiché coincide con lo spettro di fluorescenza del Sybr Green sia misurato con lo Spettrofluorimetro sia trovato in letteratura⁴⁴. Di conseguenza il sistema è calibrato spettralmente. Una volta trovati i coefficienti correttivi, le ottiche sono state tenute fisse perché continuassero ad essere validi.

2.4.2 RISPOSTA ALL'IMPULSO DEL SISTEMA DI MISURA

La risposta all'impulso della strumentazione sperimentale utilizzata è rappresentata in figura 14. La risposta all'impulso (IRF) è stata ottenuta utilizzando come campione una cuvetta contenente acqua bidistillata. Il segnale misurato è la luce diffusa dall'acqua dell'impulso del laser.

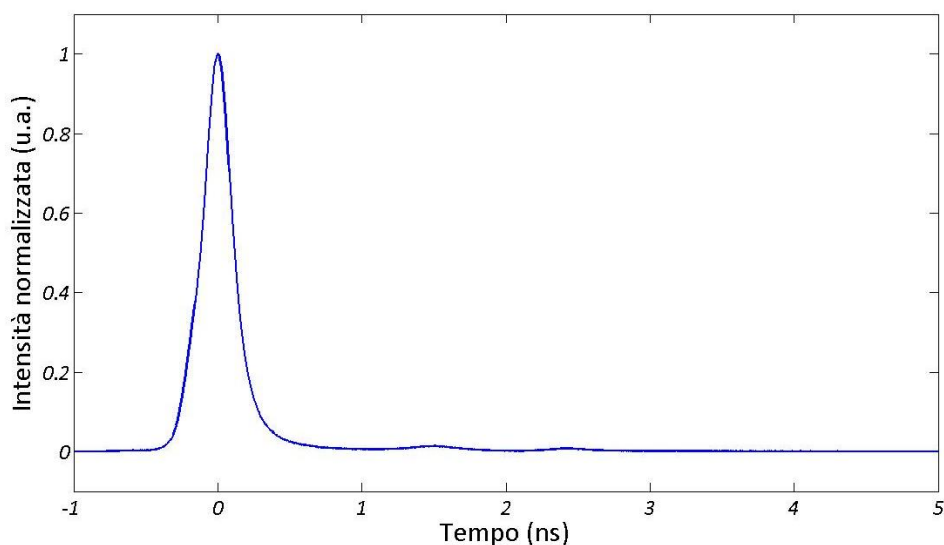


Fig. 14 – Risposta all'impulso del sistema di misura

La IRF, riportata in figura 14, ha una larghezza a mezza altezza di 200 ps circa, che corrisponde al limite di risoluzione temporale dell'intero sistema di misura.

La larghezza temporale dell'impulso laser è circa 10 ps e quindi molto inferiore della risoluzione temporale, che è determinata sia dall'allargamento temporale dovuto alla propagazione in fibra ottica sia dalla dispersione dei tempi di transito nel fotomoltiplicatore.

La curva di risposta temporale del sistema presenta due picchi secondari trascurabili. Questi picchi successivi al tempo zero sono dovuti ad un fenomeno intrinseco al sistema di amplificazione del fotomoltiplicatore e consistono in "riflessioni" di elettroni secondari. Infatti è possibile che i dinodi generino, con minor probabilità, elettroni secondari in direzione opposta a quella di transito. In questo modo alcuni elettroni secondari possono tornare allo stadio di amplificazione precedente e originano una corrente ritardata rispetto a quella di rivelazione²⁹.

E' stata caratterizzata la riproducibilità del sistema nella misura del tempo di vita. Per fare questa caratterizzazione sono state effettuate 10 misure in successione su un campione di Cumarina540a in Etanolo, che ha un tempo di vita nell'intervallo di interesse nel caso del Sybr Green, ed è stata eseguita l'interpolazione del decadimento di fluorescenza, ottenendo un valore di $3.07 \text{ ns} \pm 0.01 \text{ ns}$. Nelle misure sui campioni discusse nel successivo capitolo 3 non si riportano gli intervalli di confidenza, poiché le misure sono state eseguite solo una o due volte, a causa degli elevati costi dei campioni biologici utilizzati. Di conseguenza non è stato possibile calcolare l'incertezza di misura. Si fa comunque notare che in molti casi, i risultati di interesse

sono relativi all'evoluzione di uno stesso campione e quindi non sono influenzati dalla riproducibilità del campione biologico.

2.5 SOFTWARE DI ANALISI DATI

Per le analisi di caratterizzazione e di dinamica dei polipecti, è necessario avere un metodo veloce per calcolare i tempi di vita di fluorescenza. A tale scopo è stato sviluppato un codice, o software, che consente di realizzare una analisi in serie di curve esponenziali. In questo modo l'utente è in grado di interpolare in successione le curve di decadimento di fluorescenza e conoscere velocemente i valori dei tempi di vita.

Il software di elaborazione ed analisi dei dati raccolti nelle misure è eseguibile in ambiente Matlab. Una interfaccia grafica consente, anche ad un utente esterno, di inserire i parametri per caricare e gestire i dati da elaborare. In Matlab i dati sono ordinati in matrici multidimensionali. Questo facilita l'organizzazione dei dati, che si possono così ordinare secondo la lunghezza d'onda o il tempo o una qualsiasi variabile di misura.

Il codice consente di elaborare in una forma completa i dati ottenuti dal sistema sperimentale e può essere schematizzato nelle seguenti funzioni:

- caricamento dei dati;
- correzione dei dati;
- rappresentazione grafica delle curve di decadimento di fluorescenza;
- calcolo e rappresentazione grafica degli spettri di emissione;
- interpolazione e calcolo dei tempi di vita di fluorescenza.

Particolare attenzione si vuole prestare alle parti di codice scritte per correggere i dati e per realizzare l'interpolazione esponenziale. Queste due funzioni, infatti, consentono all'utente di ottenere l'interpolazione della curva di decadimento di fluorescenza.

La correzione, via software, dei dati sperimentali è svolta prima di ogni altra funzione poiché consente di preparare i dati. L'utente visualizza la curva di decadimento alla lunghezza d'onda di picco dell'emissione (anch'essa individuata via software), in una finestra grafica come quella riportata in figura 15.

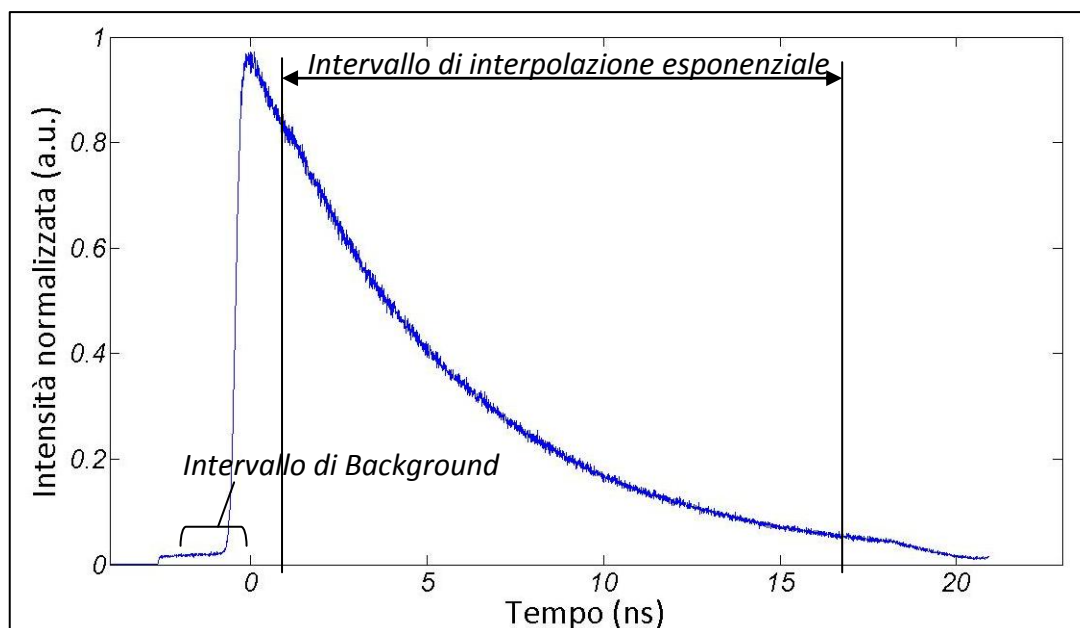


Fig. 15 – Esempio di curva di decadimento in ingresso al software

Nelle misure effettuate è presente un fondo di rumore, o *background* di rumore, di tipo termico. Il rumore termico è un rumore bianco e quindi è uguale a tutte le frequenze ed incorrelato temporalmente. Quindi nelle misure delle curve di decadimento è costante ed è un offset di misura dell'intensità.

Per ottenere una curva di decadimento temporale corretta è necessario via software il *background* di rumore.

L'utente può selezionare graficamente l'intervallo sul quale calcolare il *background*. Il software calcola la media dell'intervallo di *background*. In questo modo si ottiene un valore di *offset* da sottrarre a tutte le curve misurate alle varie componenti spettrali.

L'*offset* dovuto al background di misura influenza poco il calcolo dell'intensità. Tuttavia può essere rilevante per il calcolo del tempo di vita di fluorescenza e, non sapendo quanto possa influenzare la misura, è stato sottratto.

E' possibile anche selezionare gli estremi dell'intervallo della curva di decadimento di fluorescenza nei quali si vuole interpolare una curva esponenziale analitica. Con questa funzionalità del software l'utente può selezionare qualitativamente gli estremi di interpolazione della curva, aumentando la precisione nell'elaborazione dei dati.

L'interpolazione esponenziale permette di calcolare i tempi di vita e le relative ampiezze di fluorescenza. Il metodo utilizzato per fare l'interpolazione delle curve di decadimento è una regressione non lineare ai minimi quadrati. Il software per iterazione trova la combinazione dei

parametri della curva esponenziale modello che minimizza gli scarti quadratici con la curva sperimentale.

La curva modello e:

$$y = a e^{-\frac{t}{b}} + c e^{-\frac{t}{d}} + e$$

Dove i coefficienti a, b, c, d , ed e sono i parametri che il software cambia iterativamente per minimizzare gli scarti quadratici. La curva modello con la quale sono effettuate le interpolazioni è biesponenziale, poiché da una analisi preliminare si è osservato che i campioni presentano un solo tempo di decadimento.

Per realizzare l'interpolazione è stata utilizzata la funzione Matlab "fit". Questa funzione consente di fare una generica interpolazione impostando la equazione della curva modello, il tipo di regressione e il numero di iterazioni da effettuare.

Restituisce i valori dei coefficienti finali parametrizzati nell'equazione modello e il valore di R^2 . In questo modo si conosce subito, dal valore di R^2 , la bontà dell'interpolazione. I parametri in ingresso sono i vettori t e y da interpolare, che sono selezionati graficamente nella sezione di preparazione dei dati. Dopo l'esecuzione dell'interpolazione vengono rappresentate graficamente sia la curva sperimentale sia la curva interpolante. In questo modo l'utente può controllare se l'interpolazione sia corretta.

2.6 CAMPIONI DI MISURA

I campioni misurati sono stati preparati dal dipartimento di Chimica del Politecnico di Milano. I campioni studiati sono soluzioni composte da una soluzione tampone, o *buffer*, nel quale sono diluite concentrazioni variabili di polimeri e DNA marcato Sybr Green. L'unica sostanza con proprietà di fluorescenza è il Sybr Green, acquistato da Sigma. Questo marcatore è un intercalante del DNA, quindi in soluzione con il DNA aumenta significativamente la sua intensità di fluorescenza. Ad elevate concentrazioni ha un colore giallo-arancione. Mentre se inserito in soluzione con il DNA diventa di colore giallo-verde intenso.

Il DNA utilizzato è di due tipi: il plasmide pGL3–Luciferase Reporter Vector (pDNA), acquistato da Promega Italia, e il Salmon Sperm DNA (ssDNA), da Invitrogen. L'utilizzo di uno o dell'altro tipo di DNA è indifferente, in quanto l'intercalazione del Sybr Green avviene allo stesso modo e

si ottiene una simile efficienza quantica e lo stesso tempo di vita di fluorescenza. Il confronto tra i due tipi di DNA è stato realizzato sperimentalmente. In figura 16 sono mostrate le due curve di decadimento del Sybr Green legato al pDNA o al ssDNA. Come si vede l'andamento è lo stesso.

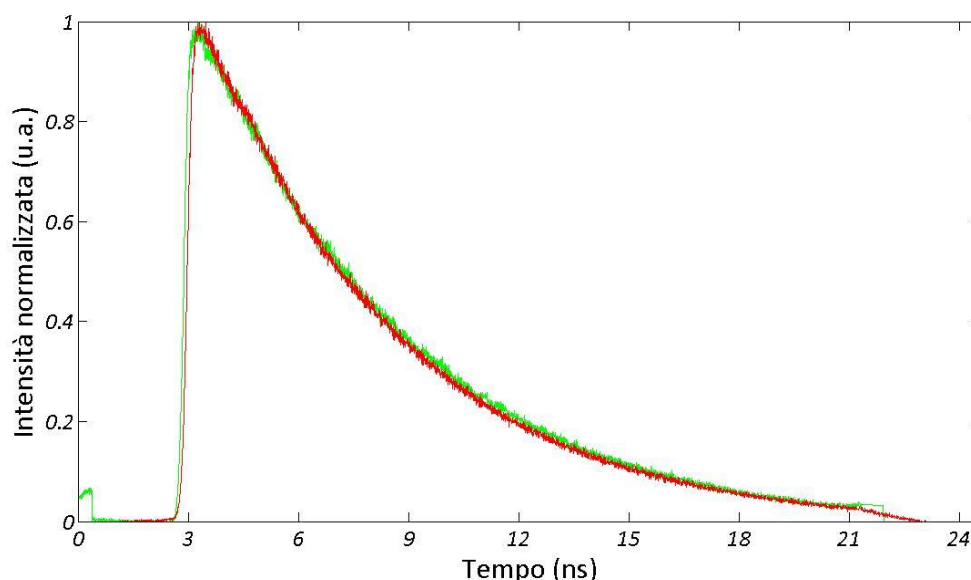


Fig. 16 – Curve di decadimento alla lunghezza d'onda 520nm del Sybr Green I legato al pDNA (curva verde) e al ssDNA (curva rossa)

I campioni di misura sono preparati con concentrazioni di polimero e DNA espresse come rapporto tra il numero di gruppi amminici del polimero cationico e numero di gruppi fosfati del DNA. Il rapporto tra gruppi amminici e gruppi fosfati si abbrevia per comodità con NP. I campioni sono quindi composti da polimeri a differenti valori di NP, ed in particolare sono stati utilizzati i polimeri: bPEI 10 kDa (bPEI10) e IPEI 25 kDa (IPEI25) acquistati da PolyScience; Poli-L-Lisina (PLL) acquistata da Sigma; Chitosano, bPEI 25kDa (bPEI25) e bPEI 2 kDa (bPEI2) acquistati da Sigma; il copolimero Chito-g-PEI sintetizzato dal gruppo di collaborazione di Chimica.

I *buffer* salini utilizzati hanno la funzione di solventi per disperdere il DNA e i polimeri. Il *buffer* consente di mantenere il pH della soluzione circa neutro. In condizioni di pH neutro i polimeri sono protonati e quindi possono legarsi e complessare il DNA. I *buffer* adoperati nelle misure sono l'Hepes, l'NaCl e il PBS (*Phosphate Buffer Solution*).

Il protocollo di preparazione dei campioni prevede inizialmente di realizzare due soluzioni con pari molarità contenenti: un *buffer* salino unito a DNA, marcato Sybr Green, e lo stesso *buffer*

salino unito ad un polimero. Queste due soluzioni si miscelano in quantità tali da ottenere i desiderati rapporti NP.

Le soluzioni, dopo essere state preparate, sono lasciate circa 20 minuti termostatate a 25 °C perché raggiungessero la stabilità termodinamica.

2.7 MISURE DI DYNAMIC LIGHT SCATTERING, ZETA POTENTIAL ED EFFICIENZA DI TRASFEZIONE

Nel capitolo 3 sono riportate alcune misure realizzate con strumentazioni e tecniche differenti da quelle descritte finora. Queste misure sono state eseguite dal gruppo di collaborazione del dipartimento Chimica e consentono di completare le analisi sviluppate nella presente tesi. Le informazioni che arricchiscono l'analisi sui campioni di misura riguardano la dimensione dei poliplessi, il loro *zeta potential* e l'efficienza di trasfezione.

Sia la dimensione sia lo *zeta potential* dei poliplessi sono stati misurati tramite il sistema Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). La dimensione dei complessi di polimero e DNA è ottenuta attraverso la tecnica di *Dynamic Light Scattering*, questa tecnica misura la diffusione delle particelle che si muovono per moti browniani e calcola la loro dimensione sfruttando le relazioni di Stokes-Einstein⁴⁵. Lo *Zeta Potential* corrisponde alla carica netta superficiale dei poliplessi ed è misurata attraverso la tecnica *Laser Doppler Micro-elettroforesi*. Brevemente, questa tecnica prevede di applicare un campo elettrico alla soluzione nella quale sono disperse le molecole, o i poliplessi nel caso in questione, e queste si muovono con una velocità che dipende dal loro *Zeta Potential*. La velocità delle molecole è rilevata tramite interferometria laser⁴⁶.

I dati di efficienza di trasfezione sono ottenuti da esperimenti *in vitro* su colture cellulari di HeLa. Le HeLa sono cellule tumorali della cervice umana e sono molto utilizzate nelle sperimentazioni di trasfezione *in vitro*. Un vettore genico contenente una sequenza di DNA che codifica la proteina Luciferasi, viene somministrato alla coltura cellulare. Dopo 24 ore si controlla l'effetto del vettore. Si deposita sulla coltura cellulare un substrato particolare che ha due effetti: lisare, cioè sciogliere, le membrane cellulari per liberare il contenuto proteico delle cellule e reagire con le Luciferasi espresse nel processo di trasfezione. Il substrato regisce con le

Luciferasi secondo il fenomeno di chemiluminescenza. A seconda della intensità di chemiluminescenza, normalizzata per la densità di cellule, si ricava la quantità di Luciferasi espressa e quindi si ottiene l'efficienza del vettore genico utilizzato.

CAPITOLO 3: RISULTATI SPERIMENTALI

In questo capitolo è sviluppata l'analisi delle misure realizzate sui poliplessi. Le analisi si possono suddividere in due parti. Nella prima parte sono confrontati 3 polimeri, il Chito-g-PEI (Chi-PEI), il bPEI 2kDa (bPEI2) e il bPEI 25kDa (bPEI25). Come spiegato nel capitolo 1 si vuole indagare in particolare il polimero Chi-PEI. Questo polimero è stato sintetizzato dal gruppo di Chimica con il quale si collabora e può essere utilizzato nella *gene delivery*. E' un copolimero composto da bPEI2 unito alla molecola di Chitosano, dove quest'ultimo ha l'effetto di aumentare il peso molecolare. Di conseguenza si ottiene un polimero le cui macromolecole contengono catene di PEI ramificato ma hanno peso molecolare intermedio tra il bPEI2 e il bPEI25. Nelle misure effettuate nella tesi si vuole confrontare l'effetto della struttura del poliplesso realizzato dal Chi-PEI con quelle dei poliplessi formati dai polimeri bPEI2 e bPEI25. Il confronto dei 3 poliplessi ha lo scopo di esaminare le proprietà strutturali e fisico-chimiche che differenziano i 3 polimeri nell'ambito della complessazione del DNA.

Per ogni campione è, in primo luogo, proposta l'analisi ricavabile dalla informazione di fluorescenza in continua. Questa informazione è già largamente utilizzata dai biologi negli esperimenti di complessazione. Infatti, come spiegato nel capitolo introduttivo, l'intensità di fluorescenza del Sybr Green può essere messa in relazione con la complessazione del DNA. Accanto all'analisi in continua è discussa l'analisi del tempo di vita di fluorescenza, questo per ricavare informazioni più specifiche sulla struttura dei poliplessi e quindi anche superare i limiti dell'informazione ottenuta dalla sola intensità dei fluorofori.

Nella seconda parte del capitolo sono presentate e discusse le analisi su altri polimeri: l'IPEI 25kDa (IPEI25), la poli-L-Lisina (PLL) e il bPEI 10kDa (bPEI10). Aumentare il numero di polimeri analizzati ha lo scopo di aumentare la significatività delle osservazioni ottenute dall'analisi. Infatti si vuole capire se l'informazione della tecnica risolta nel tempo può essere generalizzata a più polimeri.

Infine è studiata la correlazione tra tempo di vita di fluorescenza ed efficienza di trasfezione dei campioni analizzati.

3.1 CONFRONTO TRA I POLIMERI Chito-g-PEI, bPEI 2kDa e bPEI 25kDa

3.1.1 CARATTERIZZAZIONE DEI POLIMERI IN FUNZIONE DEL RAPPORTO NP

Il rapporto tra gruppi amminici e fosfati (NP) è il parametro utilizzato per definire i rapporti di concentrazione tra polimero e acidi nucleici. Come è descritto nel capitolo 1, il DNA è carico negativamente, in modo permanente, grazie alla presenza dei gruppi fosfati. I polimeri cationici posseggono dei gruppi amminici che protonano in soluzione, così il polimero acquista cariche positive. Il numero di cariche positive di un polimero dipende dal pH della soluzione. Di conseguenza il rapporto tra cariche positive e negative dipende dal pH. Nelle misure sperimentali si esprime la concentrazione di polimero rispetto al DNA secondo il valore di NP.

In questo paragrafo si confrontano le intensità e i tempi di vita di fluorescenza dei 3 polimeri, bPEI2, Chi-PEI e bPEI25, in funzione di NP. La curva di intensità di fluorescenza in funzione del rapporto di carica NP per i 3 polimeri, in figura 17, è ricavata, dai dati sperimentali, con una integrazione temporale della curva di decadimento di fluorescenza. La curva è quindi una misura di fluorescenza in continua ed è equivalente alla misura di uno spettrofluorimetro.

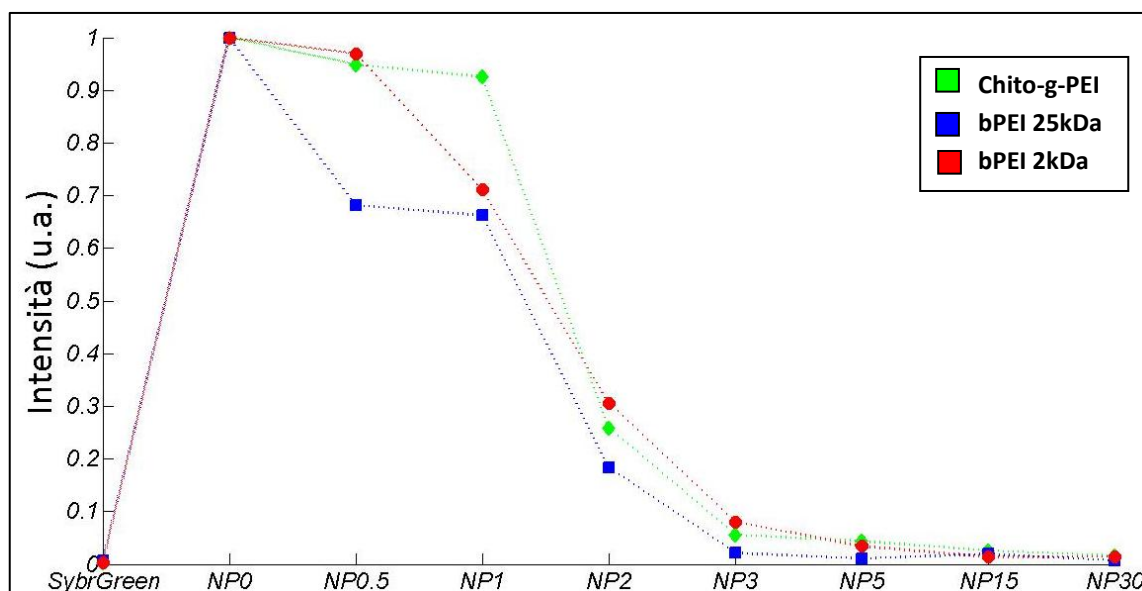


Fig. 17 - Intensità di fluorescenza del Sybr Green al variare di NP dei polimeri legati al DNA

I dati sono stati normalizzati sul picco di fluorescenza a NP pari a 0, cioè assenza di gruppi amminici in soluzione e quindi assenza di polimero. E' stato scelto NP0 perché i 3 campioni sono composti dalle stesse sostanze e concentrazioni (DNA marcato Sybr Green diluito con concentrazione 10mM in Hepes) e la normalizzazione permette di confrontare i 3 polimeri.

Descrivendo quanto riportato in figura 17, l'intensità di fluorescenza è minima per il campione di Sybr Green non legato al DNA. La curva assume il massimo valore quando il Sybr Green è intercalato nel DNA ed è assente il polimero (NP0), con un valore circa 500 volte più intenso del Sybr Green libero in soluzione. Poi l'intensità decresce all'aumentare della concentrazione di polimero seguendo una discesa monotona di intensità analoga per i 3 campioni.

Si nota che i differenti polimeri hanno un'influenza diversa sull'intensità emessa. In particolare il complesso contenente DNA e bPEI25 ha un segnale di fluorescenza decresce più rapidamente al crescere di NP rispetto agli altri 2 poliplessi. A NP30 per il polimero bPEI25, ad esempio, la presenza di polimero in soluzione con il DNA diminuisce di un fattore 140 circa l'intensità di fluorescenza rispetto al riferimento a NP0. Mentre nei casi bPEI2 e Chi-PEI la riduzione di intensità è circa 70 volte rispetto a NP0.

Quelli appena descritti sono dati utili per un'iniziale analisi sui campioni misurati. Tramite le misure di fluorescenza risolta nel tempo si vogliono studiare i poliplessi alle varie concentrazioni più in dettaglio. In figura 18 sono mostrati gli andamenti dei tempi di vita e le relative ampiezze di fluorescenza in funzione di NP.

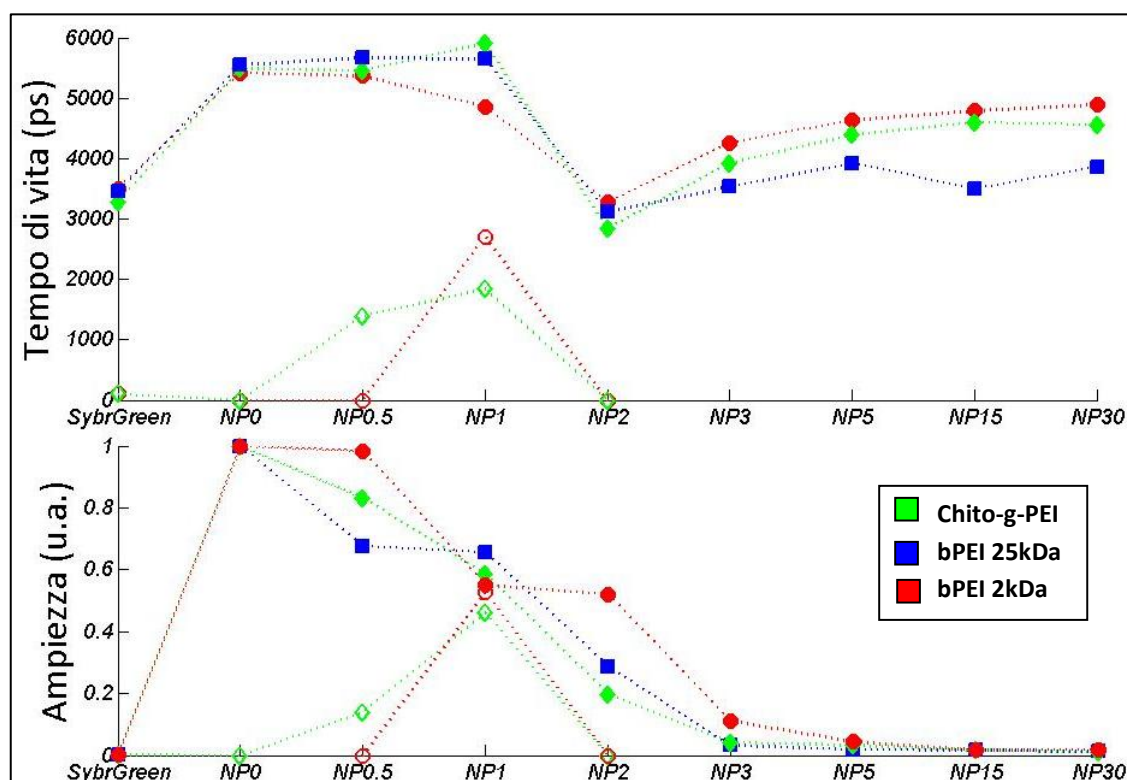


Figura 18 –Sopra: Tempi di fluorescenza mono e bi esponenziale al variare di NP; sotto: Ampiezza di fluorescenza mono e bi esponenziale al variare di NP

Il tempo di vita del Sybr Geen, che è l'unico fluoroforo presente in soluzione, varia a seconda del rapporto NP in soluzione. Il Sybr Green in assenza di DNA assume un andamento biesponenziale con i seguenti tempi di vita: $\tau_1=3.3$ ns e $\tau_2<0.1$ ns. Essendo la risposta del sistema intorno a 200 ps non è possibile dare una stima esatta del tempo di vita più rapido.

Quando il Sybr Green è legato al DNA il tempo di vita è massimo e la curva di decadimento assume un andamento monoesponenziale. Il valore sperimentale a NP0 è uguale, entro i limiti di incertezza della strumentazione, per le 3 curve. Questo è corretto dal punto di vista sperimentale poiché i 3 campioni a NP0 sono composti dalle stesse sostanze e concentrazioni.

A NP pari a 2 si raggiunge il minimo di tempo di vita che poi cresce all'aumentare del NP. Tracciando una curva che unisce i tempi di vita di fluorescenza per i campioni a NP superiori a 2, si osserva un andamento con concavità verso il basso analogo per i 3 polimeri. Quindi varia molto a NP bassi, mentre cresce poco a NP alti. Infatti si nota poca differenza tra i tempi di vita a NP15 e NP30. Si sottolinea però che la variazione è poca ma misurabile. I campioni ad NP elevato sono di maggior interesse per la *gene delivery*, in quanto presentano una maggiore efficienza di trasfezione. Si nota inoltre che la presenza di polimero porta ad una riduzione del tempo di vita rispetto al caso in assenza di polimero (NP0).

In tabella 1 sono riportati i valori dei tempi di vita rilevati.

NP	PEI-Chitosano		bPEI 2kDa		bPEI 25kDa	
	<i>Tau1 (ns)</i>	<i>Tau2 (ns)</i>	<i>Tau1 (ns)</i>	<i>Tau2 (ns)</i>	<i>Tau1 (ns)</i>	<i>Tau2 (ns)</i>
0	5.5		5.4		5.5	
0.5	5.5	1.4	5.4		5.7	
1	5.9	1.8	4.9	2.7	5.6	
2	2.8		3.3		3.1	
3	3.9		4.3		3.5	
5	4.4		4.6		3.9	
15	4.6		4.8		3.5	
30	4.6		4.9		3.9	

Tabella 1 – Tempi di vita mono e bi esponenziali dei 3 polimeri

Il polimero Chi-PEI a NP0.5 e NP1 così come il polimero bPEI2 a NP1 hanno andamenti biesponenziali. Mentre i tempi del bPEI25 sono tutti monoesponenziali e variano in modo significativo solo per valori di NP pari o superiori a 2.

I polipecti con NP0.5, NP1 e NP2 presentano un comportamento particolarmente anomalo. Infatti si ha la presenza di un comportamento biesponenziale ed una grossa riduzione dei tempi di vita. Il Chi-PEI a NP0.5 ha ampiezze relative $A_1=86\%$ e $A_2=14\%$, mentre il campione a NP1 ha ampiezze relative $A_1=56\%$ e $A_2=44\%$. Per il bPEI2 a NP1 le ampiezze sono $A_1=51\%$ e $A_2=49\%$. Questi andamenti biesponenziali hanno ampiezze del secondo tempo di vita non trascurabili.

L'andamento del grafico dell'ampiezza è molto simile a quello dell'intensità rappresentato in figura 17. Infatti l'ampiezza decresce all'aumentare di NP. In particolare a NP30 i valori delle ampiezze dei 3 polimeri sono nello stesso ordine dei valori delle intensità, ovvero il bPEI2 ha una ampiezza maggiore, il Chi-PEI è intermedio ai due e il bPEI25 ha ampiezza minore.

Si discutono ora le misure presentate in questo paragrafo cercando di dedurre ciò che accade al microambiente attorno alle catene nucleotidiche ed interpretando il ruolo del polimero nella complessazione del DNA. Si vuole verificare se i 3 polimeri si distribuiscono in modo differente attorno alle catene nucleotidiche e se questo si può ricavare da una misura risolta nel tempo. In particolare da questi dati si vogliono ricavare informazioni sul microambiente che i 3 polimeri formano attorno al DNA marcato Sybr Green.

Come punto di partenza si considera che l'intensità diminuisce al crescere della quantità di polimero in soluzione. La diminuzione di intensità potrebbe avere diverse cause:

- 1) una parte di Sybr Green esce dalla catena nucleotidica;
- 2) la presenza del polimero favorisce il *quenching* della fluorescenza;
- 3) il polimero si dispone attorno al DNA+SybrGreen e riassorbe la fluorescenza emessa dal SYBR Green legato al DNA.

L'ipotesi 3) si esclude subito perché gli spettri di assorbimento dei polimeri, mostrati in figura 19, non presentano un elevato assorbimento alle lunghezze d'onda di emissione del DNA marcato Sybr Green. La misura degli spettri di assorbimento è stata realizzata attraverso uno spettrofotometro e riportata in figura 19.

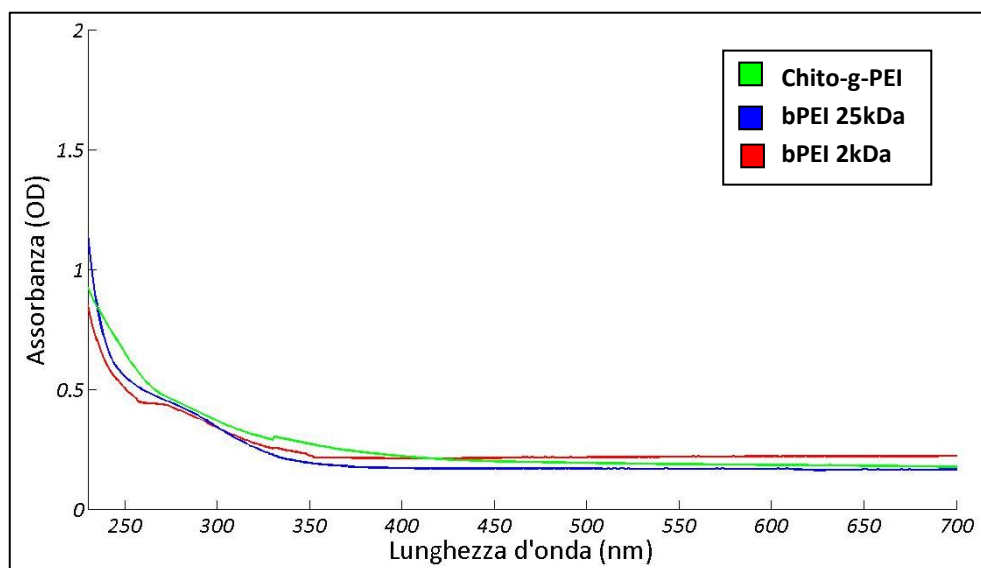


Fig. 19 – Spettri di assorbimento dei 3 polimeri

Dall'analisi della misura risolta nel tempo, si osserva che i campioni a NP alto hanno valori di tempi di vita inferiori a quelli del SybrGreen+DNA in assenza di polimero (NP0). I 3 polimeri, nel formare il complesso con il DNA, accorciano il tempo di decadimento di fluorescenza. Quindi spengono più velocemente la fluorescenza del fluoroforo fornendogli delle vie di diseccitazione non radiative, quindi si verifica il *quenching* di fluorescenza. Il fenomeno di *quenching* dipende generalmente dalla distanza tra fluoroforo e *quencher*. Pertanto è probabilmente il polimero che, disponendosi attorno al DNA, comprime la struttura del poliplesso e determina il *quenching*. In questo modo la struttura complessiva raggiunge dimensioni inferiori e le catene di DNA, probabilmente, risultano ripiegate su loro stesse fornendo al Sybr Green nuove vie di diseccitazione.

Le variazioni di tempo di vita osservate all'aumentare di NP è difficile stabilire se dipendano anche queste principalmente dalla dimensione del poliplesso. Tuttavia si può affermare che i poliplessi modificano la loro struttura in dipendenza del rapporto NP, anche ad alti valori di questo.

Per trovare eventuali correlazioni con la modifica strutturale sono state eseguite, in collaborazione con il gruppo di lavoro del dipartimento di Chimica del Politecnico di Milano, le misure di *Zeta Potential* e *Dynamic Light Scattering* sul campione composto da Chi-PEI. In figura 20 sono riportati gli andamenti della dimensione e *Zeta Potential* in funzione di NP.

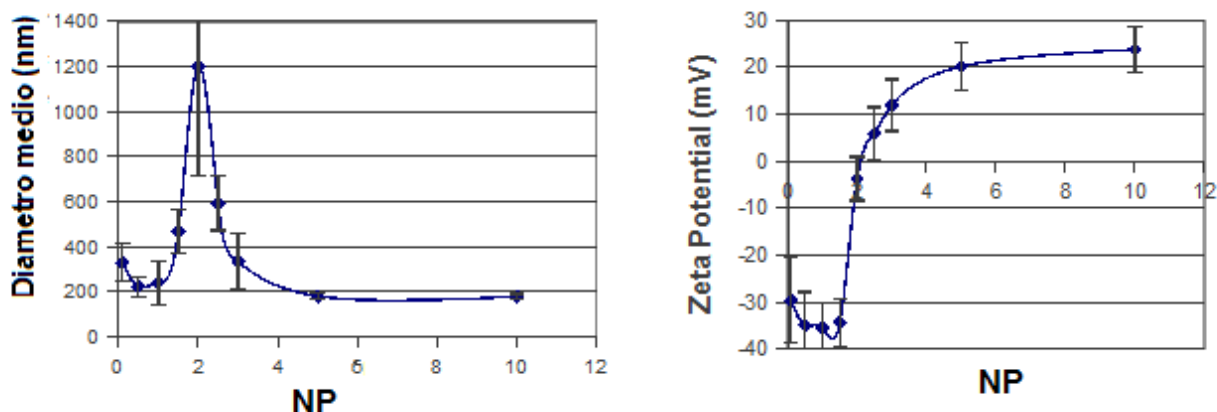


Fig. 20 – Dynamic Light Scattering (sinistra); Zeta potential (destra)

Queste due tecniche di misura sono brevemente descritte nel capitolo 2. Dai due grafici si osserva che in corrispondenza di NP2 si ha la comparsa di particelle di grossa dimensione (circa 1000 nm) ed una carica superficiale circa neutra. La carica superficiale delle particelle in soluzione, o *Zeta Potential*, è positiva per NP superiori a 2, cioè per quantità maggiori di polimero i complessi sono caricati positivamente.

Osservando la misura di *Zeta Potential* riportata in figura 20, per concentrazioni di polimero superiori a NP2 si formano particelle con eccesso di cariche positive. Mentre dal grafico di *Dynamic Light Scattering* si osserva che i poliplessi hanno una dimensione minore a NP alti. Probabilmente l'eccesso di cariche positive comporta che il polimero si disponga in quantità maggiore attorno alle catene nucleotidiche (che sono cariche negativamente) presenti in soluzione e quindi riesca a comprimerle in dimensioni inferiori. Quanto osservato dalle misure di *Dynamic Light Scattering* e *Zeta Potential* è in accordo con l'ipotesi che sia l'effetto di compressione operato dal poliplesso sul Sybr Green a determinare il *quenching* di fluorescenza.

In corrispondenza di NP2, cioè ad una carica circa neutra dalla misura di *Zeta Potential*, si ha il minimo di tempo di vita di fluorescenza. Si interpreta che, non essendoci una carica netta, le catene polimeriche sono in competizione tra loro per legarsi al DNA e i poliplessi tendono ad aggregarsi in macromolecole che presentano un aumento dei canali di diseccitazione non radiativi e quindi una riduzione del tempo di vita. Infatti possedendo carica netta nulla i singoli complessi che si formano non si respingono tra di loro e si aggregano in molecole di dimensioni maggiori. Quindi le misure di *Dynamic Light Scattering* e *Zeta Potential* confermano per i

poliplessi a valori bassi di NP un comportamento anomalo, il quale è stato osservato dalla misura di fluorescenza risolta nel tempo.

Confrontando tra loro i 3 polimeri, si osserva che per rapporti di NP superiori a 2 i tempi di vita di fluorescenza del complesso Chi-PEI+DNA si inseriscono a metà dei valori di bPEI2 e bPEI25. Si può pensare che il peso molecolare abbia una influenza sulla struttura finale che i poliplessi raggiungono. Infatti il Chi-PEI è composto da segmenti di bPEI 2kDa uniti alla molecola di Chitosano, che aumenta il peso molecolare complessivo, che è circa pari al bPEI 25kDa. Le catene polimeriche di Chi-PEI hanno dunque una struttura intermedia ai 2 PEI misurati e questo lo si ipotizza anche dal fatto che presentano dei valori di tempo di vita di fluorescenza intermedi. Mentre il bPEI25 costituisce un poliplesso con il DNA dove la fluorescenza del Sybr Green è soggetta maggiormente al fenomeno di *quenching*, quindi strutturalmente più compresso.

Al crescere del valore di NP l'ampiezza di fluorescenza, in modo simile all'intensità, decresce per i 3 polimeri. Dalla misura della sola intensità non si può distinguere se la diminuzione sia dovuta al *quenching* o alla diminuzione del numero di molecole fluorescenti. Mentre dalla misura di ampiezza di fluorescenza si può interpretare che una parte consistente di Sybr Green esca dalla catena nucleotidica poiché il polimero lo espelle. L'espulsione del Sybr Green è probabilmente dovuta al fatto che il polimero complessando il DNA altera i siti di legame del Sybr Green.

E' importante notare che non osserviamo la comparsa del tempo tipico del Sybr Green libero. Quindi l'emissione di fluorescenza misurata è probabilmente quella del Sybr Green rimasto debolmente legato al DNA. L'aspetto importante, quindi, è che una parte di Sybr Green rimane legata nei NP più alti, che sono i campioni interessanti per la trasfezione. Il segnale del Sybr Green a NP elevati, anche se più debole del caso a NP0, è misurabile e può essere usato come "monitor" della conformazione del poliplesso.

Si ha conferma di quanto appena detto dalla consultazione della letteratura. Infatti sono già stati portati a termine esperimenti di fluorescenza risolta nel tempo utilizzando l'Etidio Bromuro, come marcatore del DNA, e polimeri differenti da quelli sperimentati in questa tesi. Da questi lavori è stato osservato che, ad alti valori di NP, il marcatore di fluorescenza rimane debolmente legato al DNA e continua a fluorescere con un tempo di vita differente a seconda della configurazione che assume il poliplesso³⁵. A differenza di quanto si trova in letteratura,

nelle misure discusse nella presente tesi si sottolinea che sono stati studiati nuovi polimeri, tramite la tecnica di fluorescenza risolta nel tempo, ed è stato utilizzato come marcatore di DNA il Sybr Green. Questo marcatore infatti, rispetto all'Etidio Bromuro, è il maggiormente diffuso negli ambienti di ricerca biologica e non presenta rischi mutagenici per il biologo.

In conclusione, la presenza di polimero determina la fuoriuscita di una parte di Sybr Green dalla catena nucleotidica (questo spiega la forte riduzione di ampiezza e quindi di intensità) e allo stesso tempo il poliplesso nel suo insieme presenta una conformazione differente.

3.1.2 DINAMICA DI COMPLESSAZIONE

Si discutono ora le misure di intensità e tempo di vita di fluorescenza in funzione della dinamica di complessazione tra DNA e i 3 polimeri.

Si ricorda che un vettore per il rilascio di geni deve essere in grado di formare i complessi, essere stabile in ambiente extracellulare e disgregarsi all'interno della cellula. Una misura che indaghi la dinamica di formazione del poliplesso ha una notevole importanza. La misura della dinamica di formazione del poliplesso (polimero+DNA) fornisce dati utili sul tempo necessario prima che la soluzione di DNA e polimero raggiunga la stabilità, cioè un equilibrio tra le forze di legame.

E' schematizzato in figura 21 la procedura seguita per sperimentare la complessazione del DNA.

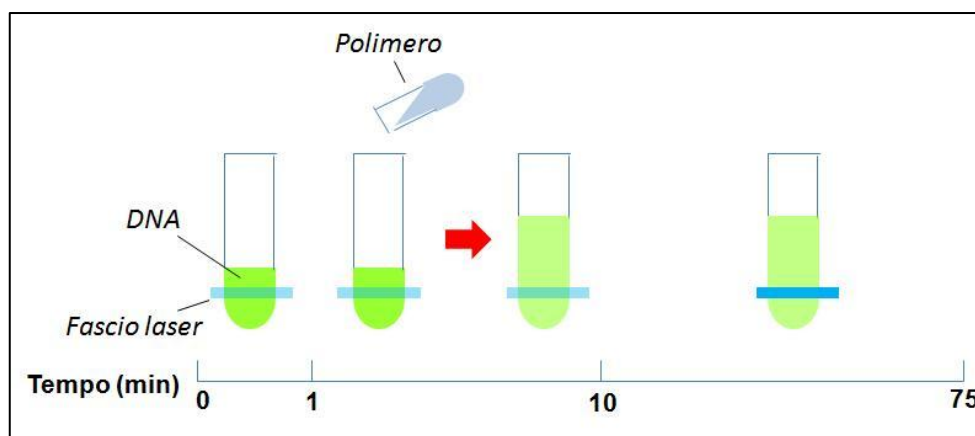


Fig. 21 – Schema del protocollo delle misure di complessazione

Il campione all'inizio della misura dinamica è una soluzione contenente solo DNA, marcato Sybr Green, diluito in HEPES. Si segue la dinamica di complessazione inserendo, dopo circa 1 minuto,

il polimero in concentrazione NP30 nella soluzione iniziale. In particolare si è concentrati sui poliplessi a NP30, poiché con questo rapporto di carica si ottiene la migliore prestazione di trasfezione. Le misure sono state eseguite per un intervallo temporale di circa 75 minuti. Per i primi 10 minuti, dove il segnale subisce variazioni rapide, è stato eseguito un campionamento ogni 12 s. Poi nella seconda parte della dinamica è stata cambiata la potenza del laser incidente ed è stato eseguito il campionamento del segnale ogni 120 s. In particolare è stata aumentata la potenza del fascio laser incidente per aumentare l'intervallo dinamico di intensità misurabile, essendo basso il segnale dopo l'inserimento del polimero.

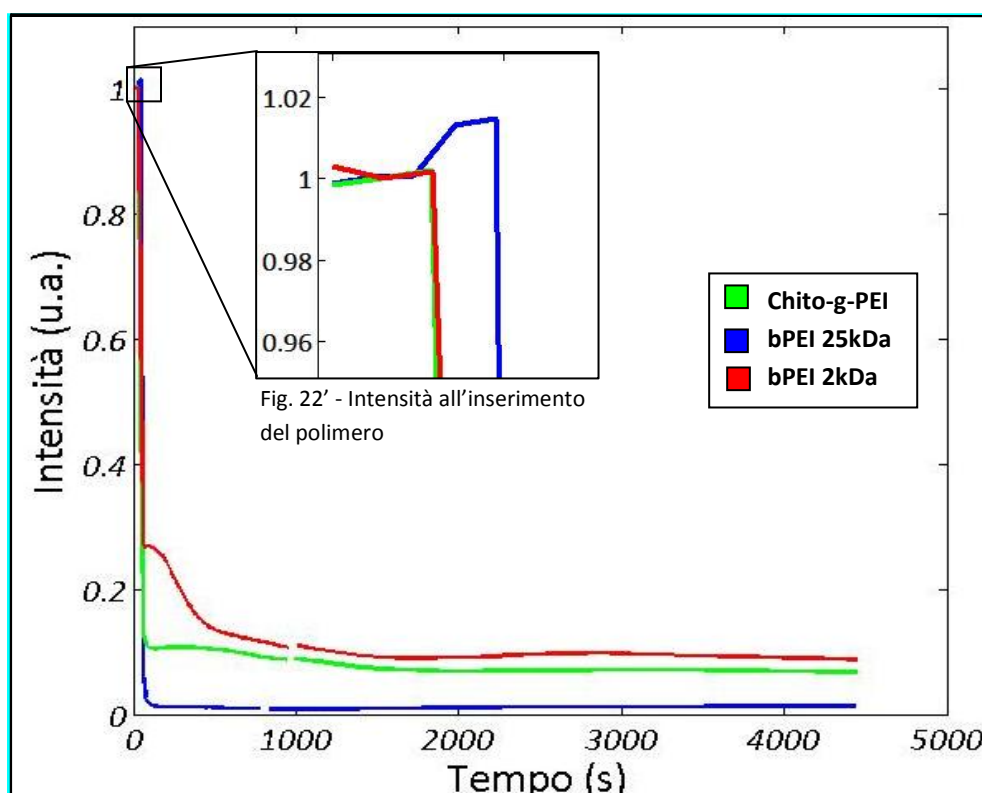


Fig. 22 – Intensità di fluorescenza in funzione del tempo. Normalizzazione sulla media dell'intensità prima dell'inserimento del polimero

In figura 22 sono riportati gli andamenti della intensità di fluorescenza (integrale nel tempo della curva di decadimento) dei poliplessi, formati dai 3 polimeri a confronto, in funzione del tempo. La discontinuità corrisponde all'interruzione di misura per regolare la potenza laser incidente, tuttavia questa non compromette la misura poiché si nota in tutti i casi una continuità di andamento tra le curve.

L'intensità decresce rapidamente all'inserimento del polimero nel DNA. Quindi la formazione del poliplesso è molto rapida, circa 10 s. Segue una fase di transitorio nella quale si osserva una risalita dell'intensità fino ad un massimo e una successiva discesa. La fase di transitorio nelle

curve Blu e Rossa presentano un picco meno accentuato, ma è comunque presente un punto a derivata nulla. Dopo circa 2000 secondi la soluzione raggiunge la stabilità in intensità di fluorescenza. L'intensità raggiunta a fine dinamica dal complesso formato dal Chi-PEI è intermedia agli altri due. Questo è in accordo con la misura di intensità in funzione del NP, dove il campione Chi-PEI a NP30 ha un'intensità intermedia agli altri 2 polimeri.

Particolarmente adatta allo studio della formazione del poliplesso è l'analisi dei tempi di vita e ampiezze di fluorescenza. Infatti il processo dinamico che porta all'unione del polimero con il DNA è costituito da un cambiamento strutturale del poliplesso. La misura dinamica consente di studiare gli andamenti e gli equilibri termodinamici del processo di complessazione. In figura 23 è presentata la dinamica di formazione del poliplesso dal punto di vista del tempo di vita e della relativa ampiezza di fluorescenza. Si parla di singolo tempo di vita perché l'andamento rilevato negli esperimenti è mono-esponenziale.

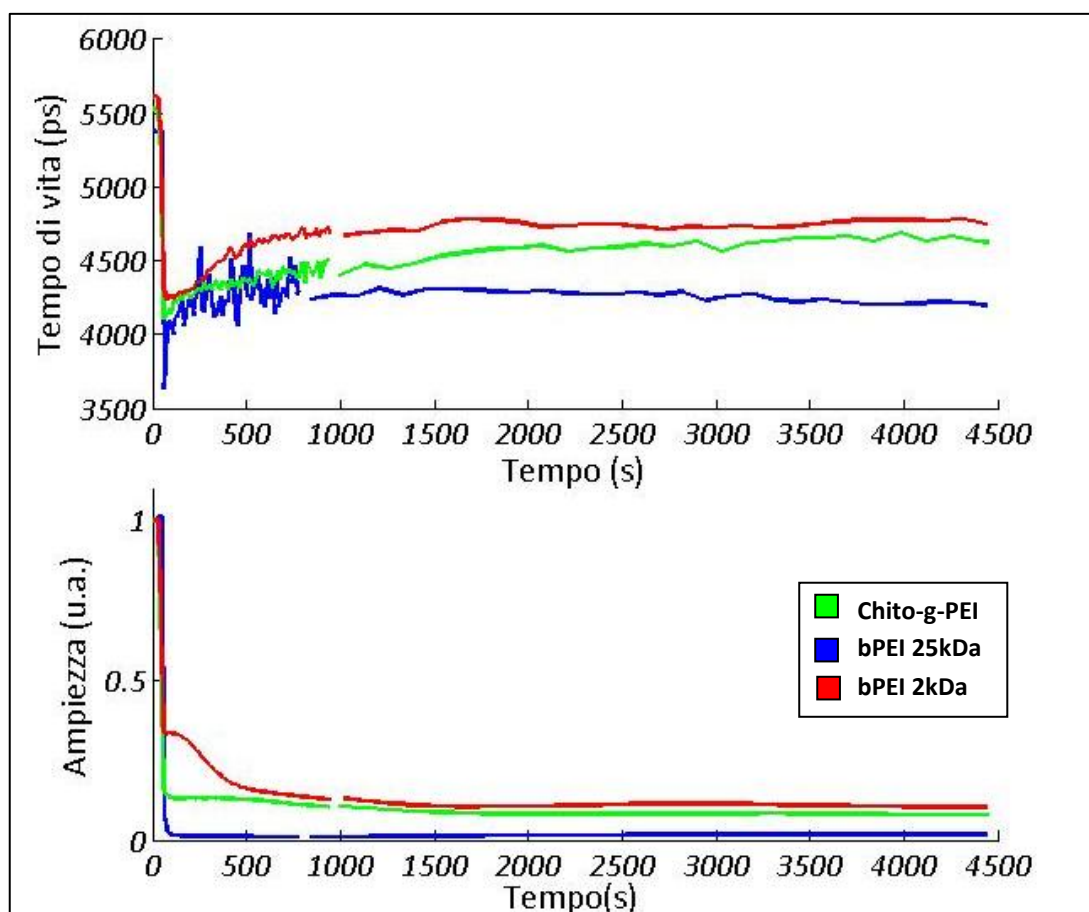


Fig. 23 –Dinamica di formazione dei poliplessi. Sopra: tempi di vita di fluorescenza in funzione del tempo; sotto: ampiezze di fluorescenza in funzione del tempo

Il tempo di vita del campione di DNA marcato Sybr Green è già stato misurato e, come riportato in tabella 1, vale 5.5 ns. I valori per i 3 campioni ad inizio dinamica sono compresi tra 5.4 ns e 5.6 ns e coincidono, tenendo conto dell'incertezza strumentale, con il valore in tabella 1. Analoghe considerazioni sono valide per il valore di tempo di vita a fine dinamica. I 3 polimeri a fine dinamica assumono i valori 4.1 ns per il campione bPEI25, 4.6 ns per il Chi-PEI e 4.8 ns per il bPEI2, e coincidono con quelli misurati nella parte di caratterizzazione non dinamica dei 3 polimeri, anche questi riportati in tabella 1.

Il valore del tempo di vita continua a cambiare fino al tempo di circa 1500 secondi. Dall'osservazione del grafico in figura 23 in alto, risulta che l'effetto dell'inserimento di polimero in soluzione è rapido e in circa 10 secondi decrementa il tempo di vita da 5.5 ns a 4.1 ns per il Chi-PEI, 4.2 ns per il bPEI2 e 3.7 ns per il bPEI25. La curva poi cresce fino a raggiungere il valore di stabilità.

Il grafico delle ampiezze, figura 23 in basso, è simile a quello di intensità, in figura 22. Decresce rapidamente a seguito dell'inserimento del polimero in soluzione. Segue poi una fase di transitorio fino a circa 1500 secondi. Ed infine i 3 poliplessi raggiungono un valore di stabilità in ampiezza.

La diminuzione di intensità può essere dovuta alla riduzione di ampiezza o alla diminuzione del tempo di vita. Come già spiegato i grafici di tempo di vita e di ampiezza separano i due contributi della riduzione di intensità. Si consideri ad esempio il campione bPEI2, l'inserimento del polimero comporta la riduzione del 74% di intensità di fluorescenza. Dalle misure del campione bPEI2 si ricava che l'ampiezza si riduce del 67% mentre il tempo di vita si riduce del 24%. Questi valori tornano poiché l'intensità è pari al 26% del valore iniziale e si ottiene dal prodotto tra 0.33 e 0.76, valori finali rispettivamente di ampiezza e tempo di vita. Mentre l'inserimento del Chi-PEI determina la riduzione dell'intensità al 10 %, dato dal prodotto dei valori di ampiezza 0.13 e tempo di vita 0.74. L'intensità per il campione bPEI25 decresce rapidamente all' 1.3 %, dato dal prodotto dei valori di ampiezza 0.017 e tempo di vita 0.71.

Analizzando i valori sperimentali, l'intensità di fluorescenza per i 3 polimeri decresce fino ad un valore stabile al tempo di circa 1500 secondi. Dall'informazione della misura risolta nel tempo si osserva che a seguito dell'inserimento del polimero si ha un rapido decremento del valore del tempo di vita, questo perché la soluzione subisce un improvviso cambiamento. Poi il valore del

tempo di decadimento di fluorescenza aumenta in modo monotono fino a raggiungere un valore finale stabile. Questo suggerisce che il complesso DNA e polimero continua a miscelarsi e a cambiare conformazione per una durata di circa 1500 secondi. Dopo tale istante di tempo raggiunge una forma finale stabile. La conoscenza del tempo necessario per raggiungere la stabilità è una informazione molto utile per un biologo, che così può conoscere quando un vettore genico è pronto per essere somministrato nelle cellule.

Il tempo di vita decresce per effetto della complessazione del polimero, in ognuno dei 3 campioni. Il polimero modifica la struttura e si dispone attorno alle catene nucleotidiche condensandole. Di conseguenza il polimero è la causa del *quenching* di fluorescenza.

Confrontando i 3 polimeri nella dinamica di formazione del poliplesso. Si osserva un andamento analogo per i 3 campioni. Infatti la misura in intensità mostra una diminuzione molto rapida, una risalita con un massimo ed infine il raggiungimento della stabilità. Mentre la misura del tempo di vita presenta un rapido decremento per effetto dell'inserimento del polimero, poi il tempo di vita risale verso un valore finale di equilibrio differente per i 3 polimeri. Probabilmente la dinamica di complessazione è qualitativamente analoga perché i polimeri si legano alle catene nucleotidiche in modo simile. Quantitativamente i 3 poliplessi raggiungono valori diversi all'equilibrio termodinamico. Il bPEI25 è il polimero che presenta un *quenching* maggiore osservabile in un tempo di vita di fluorescenza inferiore. Il Chi-PEI ha una dinamica di complessazione intermedia a quella del bPEI2 e bPEI25, infatti lungo tutta la dinamica i suoi tempi di vita sono intermedi a quelli degli altri due polimeri.

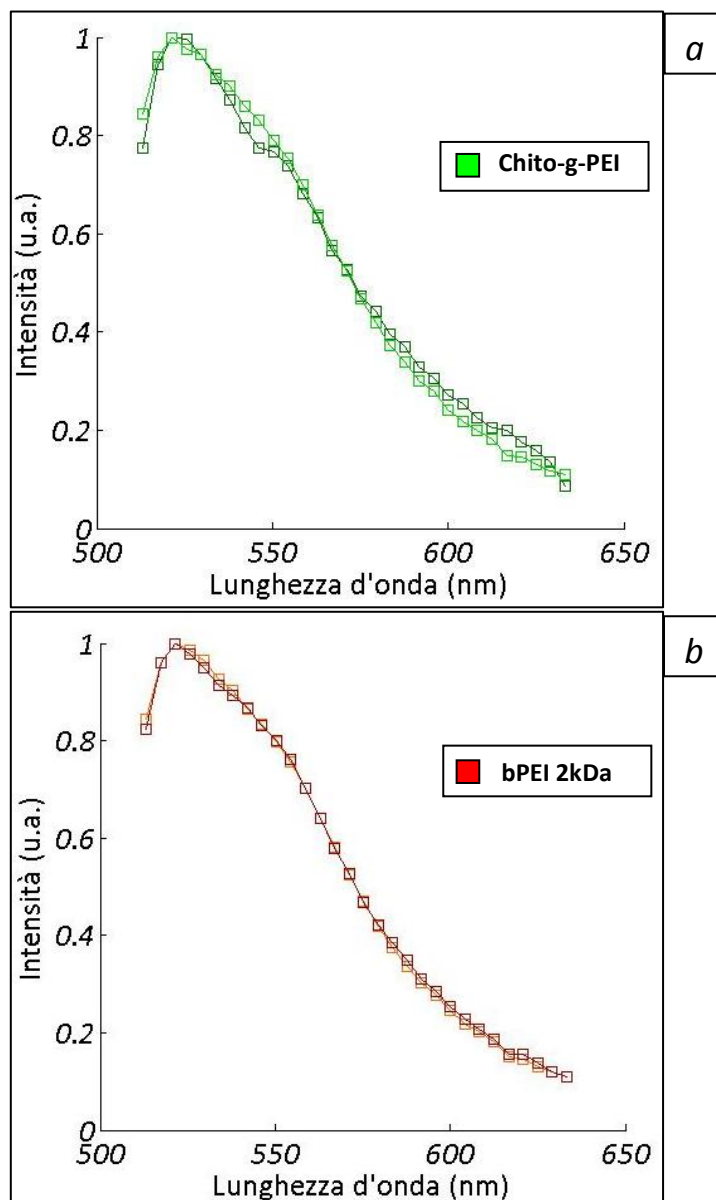
Come già discusso, il *quenching* dipende dalla dimensione del poliplesso e come questo influenzi il Sybr Green. E' possibile ipotizzare che le dimensioni dei poliplessi composti dal bPEI25 siano inferiori a quelle dei complessi formati da bPEI2 e da Chi-PEI.

L'ampiezza di fluorescenza decresce molto per effetto dell'inserimento dei polimeri, e nel caso massimo si riduce, a fine dinamica, all'1 % circa per il bPEI25, pertanto una grande percentuale di Sybr Green esce dal DNA. I valori che raggiungono i 3 polimeri sono differenti. L'ampiezza del campione bPEI25 si stabilizza ad un valore inferiore agli altri due polimeri. E' probabile che il bPEI con peso molecolare 25 kDa formi un complesso che comprime maggiormente le catene nucleotidiche rispetto allo stesso polimero con peso molecolare inferiore e al Chi-PEI. Di

conseguenza il bPEI25 libera in soluzione una quantità maggiore di Sybr Green, giustificando così la forte riduzione di ampiezza e di intensità a fine complessazione.

Il Sybr Green rimasto legato debolmente all'interno del poliplesso è la molecola che continua ad emettere per fluorescenza. Quindi la misura del suo segnale di fluorescenza è un "monitor" per controllare la formazione dei complessi.

Si riporta che in letteratura sono presenti studi realizzati con il marcatore Bromuro di Etidio che hanno osservato variazioni spettrali di emissione di fluorescenza a seguito della complessazione di DNA plasmidico con i polimeri bPEI 22kDa e Poli-L-Lisina³⁵. Mentre nelle misure effettuate con il Sybr Green sui 3 polimeri considerati non sono state osservate variazioni significative degli spettri di emissione. In figura 24 sono riportati gli spettri di emissione del Sybr Green a inizio e fine dinamica.



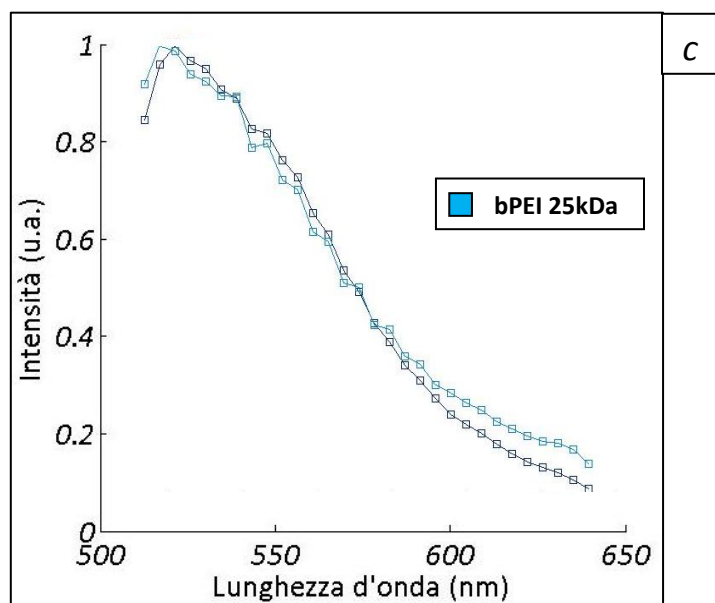


Fig. 24 – Spettri di emissione di fluorescenza ad inizio e fine dinamica di complessazione del
a) Chi-PEI; b) bPEI2; c) bPEI25

3.1.3 DINAMICA DI DECOMPLESSAZIONE

Una caratteristica chiave per consentire l'efficacia di trasfezione di un vettore polimerico è la stabilità all'interno dell'ambiente extracellulare. In letteratura è riportato che i poliplessi hanno una limitata stabilità nel sangue ed in altri fluidi biologici, dovuta alle interazioni con macromolecole biologiche cariche negativamente, come proteine e polisaccaridi, che possono portare alla disgregazione del vettore polimerico. Inoltre è ipotizzato che maggiore è il legame tra polimeri cationici e acidi nucleici, maggiore risulta la stabilità del poliplesso nei fluidi biologici⁴⁷. Perciò si vuole studiare la resistenza chimico-fisica all'ambiente extracellulare del poliplesso.

La stabilità extracellulare non è sufficiente per rendere ideale un vettore genico, infatti questo deve sì essere resistente prima di entrare nella cellula, ma poi decomplessarsi, o comunque far uscire il contenuto trasportato, all'interno di essa per poter trasferire i geni nel nucleo cellulare. Una volta all'interno della cellula deve potersi rompere con facilità e così rilasciare le catene nucleotidiche inglobate. Quindi non sempre un vettore molto resistente è anche quello più efficiente.

Per riprodurre *in vitro* l'ambiente extracellulare che il complesso finale di DNA e polimero incontra quando viene inserito in un ambiente biologico, è stata aggiunta Eparina alla soluzione. E' stata utilizzata l'Eparina perché è una proteina diffusa nel sangue ed ha una elevata densità di cariche negative, dovuta alla presenza di numerosi gruppi solfati⁴⁸.

La misura di decomplessazione del poliplesso è il processo inverso della complessazione studiata precedentemente. In questo modo si vuole studiare la dinamica che un diverso polimero segue nel disgregarsi dal DNA. Anche questa dinamica di disgregazione, oltre a quella di formazione, consente di ottenere informazioni utili per capire quale possa essere il miglior vettore polimerico.

Sono state quindi eseguite misure sulla intensità e tempo di vita di fluorescenza in funzione della dinamica di decomplessazione tra DNA e i 3 polimeri per effetto della presenza di Eparina.

Per studiare la dinamica di decomplessazione dei poliplessi è stata aggiunta Eparina, dopo circa 2 minuti dopo l'inizio della misura, in una soluzione stabile di polimero e DNA (NP 30). Sono state inserite tre diverse concentrazioni di Eparina: "10:1", 10 μg di eparina per μg di DNA; "7.5:1", 7.5 μg di eparina per μg di DNA; e "5:1", 5 μg di eparina per μg di DNA. Le tre diverse concentrazioni hanno lo scopo di osservare differenti comportamenti dei polimeri a seconda della quantità di molecole "disgreganti".

E' schematizzato in figura 25 la procedura seguita per studiare la decomplessazione del poliplesso.

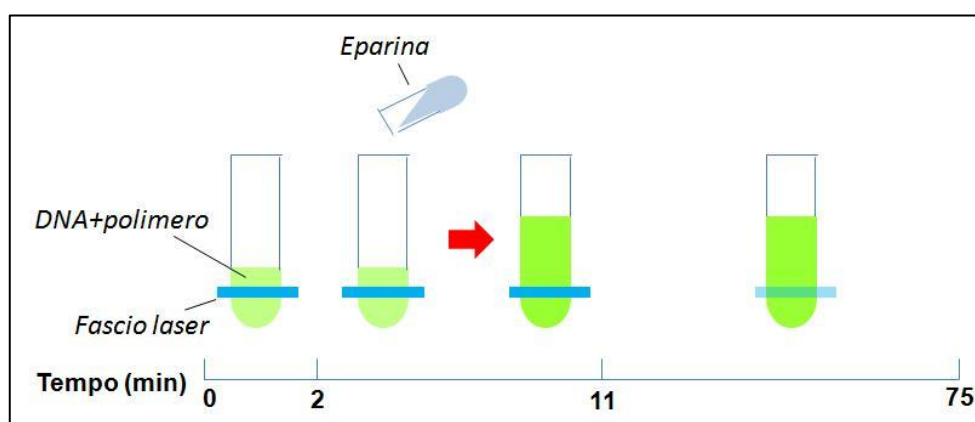
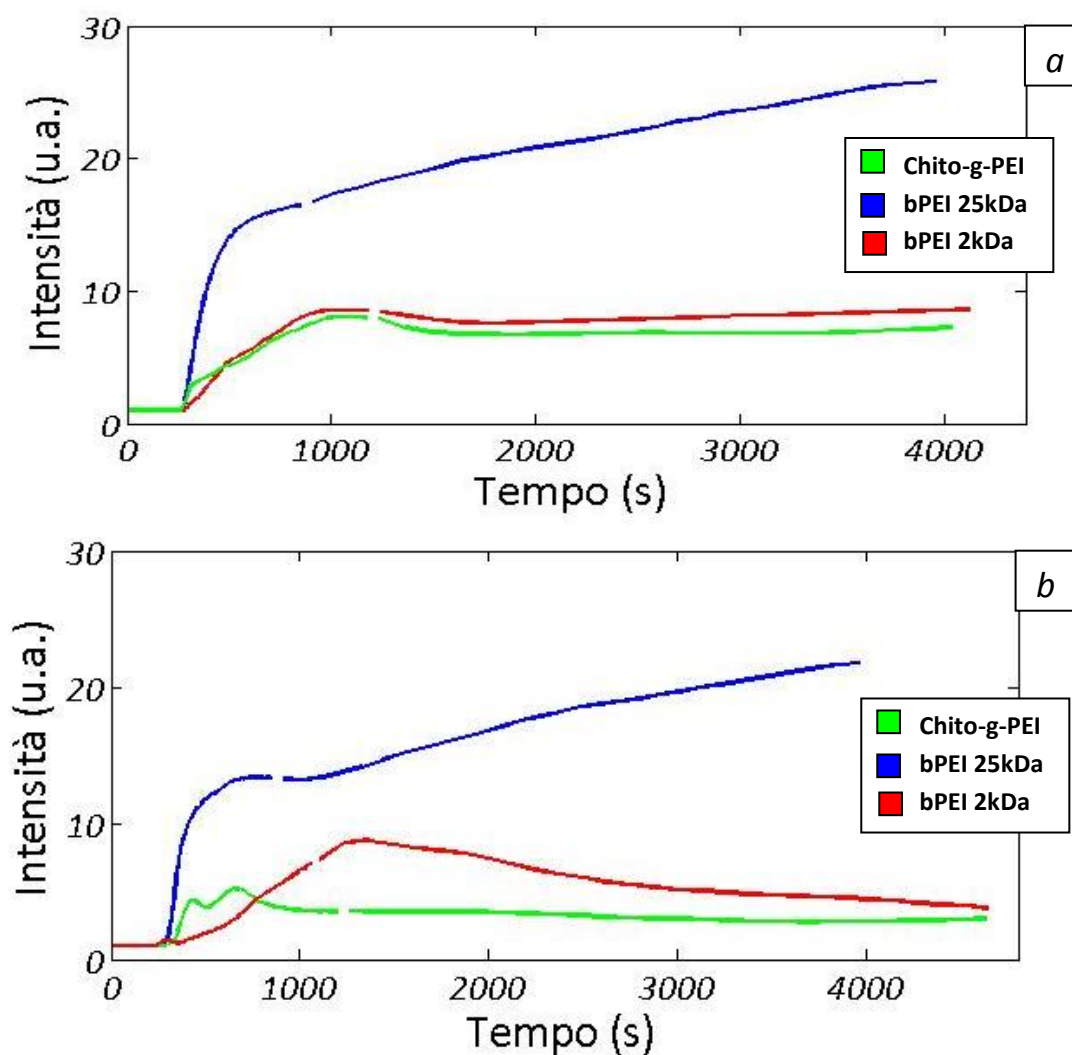


Fig. 25 – Schema del protocollo delle misure di decomplessazione

L'effetto dell'Eparina è stato seguito per circa 75 minuti. Per i primi 11 minuti il campionamento è stato eseguito ogni 12 s. Poi nella seconda parte della dinamica è stata regolata la potenza del fascio laser ed è stato allungato il tempo di campionamento a 120 s. E' stata ridotta la potenza del fascio laser incidente per evitare la saturazione del segnale di misura. Nell'intervallo di tempo durante il quale è stata impostata la nuova potenza del laser si osserva una discontinuità nei grafici in figura 26.

In figura 26a,26b e 26c sono riportati gli andamenti della dinamica di intensità di fluorescenza per i 3 poliplessi alle diverse concentrazioni di Eparina. La misura è normalizzata sul valore iniziale di intensità, pertanto il grafico rappresenta l'efficacia relativa dell'Eparina a scompiessare i diversi polimeri.

Si osserva un particolare comune alle 3 misure, cioè l'Eparina è stata inserita dopo circa 120 secondi dall'inizio della misura mentre l'aumento di intensità è visibile solo dopo circa 250 secondi. Probabilmente questo ritardo nel segnale dell'Eparina è dovuto alla lenta diffusione dell'Eparina nella soluzione.



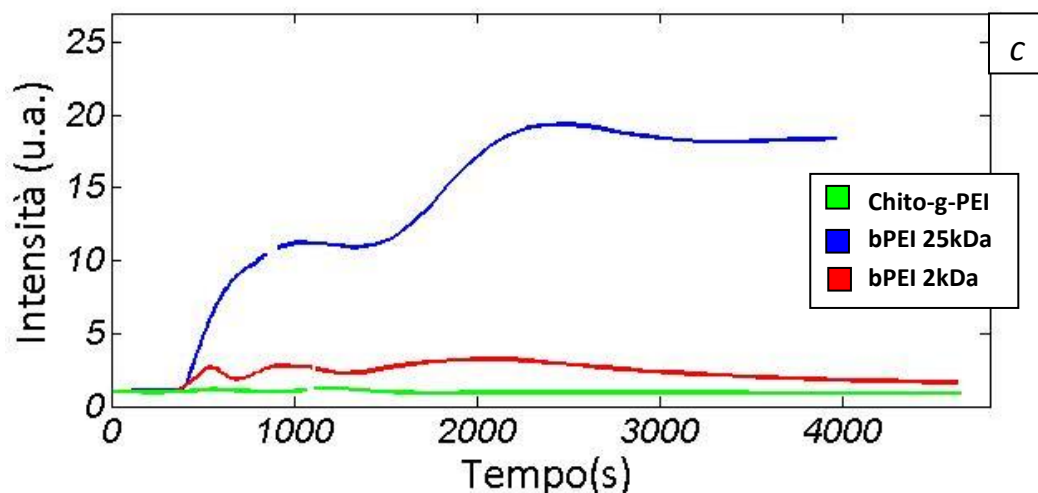


Fig. 26 – Dinamica di decomplessazione dei poliplessi ad opera dell'Eparina in concentrazione: a) 10 a 1; b) 7.5 a 1; c) 5 a 1. Normalizzazione sul valore iniziale dell'intensità

Il campione bPEI25 risente maggiormente la presenza di Eparina. Nella soluzione con concentrazione di Eparina 10:1 dopo 4000 secondi il segnale aumenta di circa 26 volte rispetto al valore iniziale. Anche a concentrazioni minori di Eparina l'aumento percentuale di intensità è elevato e corrisponde a circa 20 volte il valore iniziale. Si osserva che è la situazione opposta alla misura di dinamica di complessazione, nella quale si ricorda che il campione bPEI25 raggiunge un valore di intensità inferiore agli altri due polimeri.

Nei campioni bPEI2 e Chi-PEI l'effetto dell'Eparina è visibile solo ad elevate concentrazione (10 μg di Eparina per 1 μg di DNA), dove l'intensità aumenta di circa 8 volte rispetto al valore iniziale, in assenza di Eparina in soluzione. Quando la quantità di Eparina miscelata in soluzione è inferiore a 10:1, non si ha un cambiamento apprezzabile di intensità. In questi campioni, con concentrazione di Eparina 5:1 e 7.5:1, dopo una salita del segnale presentano una discesa ad un valore di equilibrio poco superiore a quello di partenza.

In alcune misure si osserva che la crescita di intensità presenta uno o più minimi secondari. Una possibile spiegazione è che questi punti di minimo siano dovuti alla lenta diffusione dell'Eparina all'interno della soluzione. Tuttavia occorrono ulteriori misure per chiarire meglio questi andamenti.

Come per le misure analizzate finora, è stata osservata la dinamica del tempo di vita di fluorescenza durante la decomplessazione. In letteratura si trovano analisi sull'effetto dell'Eparina su vettori genici marcati con fluorofori, ma nessuno di questi analizza

l'informazione risolta nel tempo della fluorescenza durante la decomplessazione con Eparina⁴⁹. Le figure 27a,27b e 27c mostrano le variazioni dei tempi di vita e delle ampiezze dei 3 polimeri per effetto dell'Eparina.

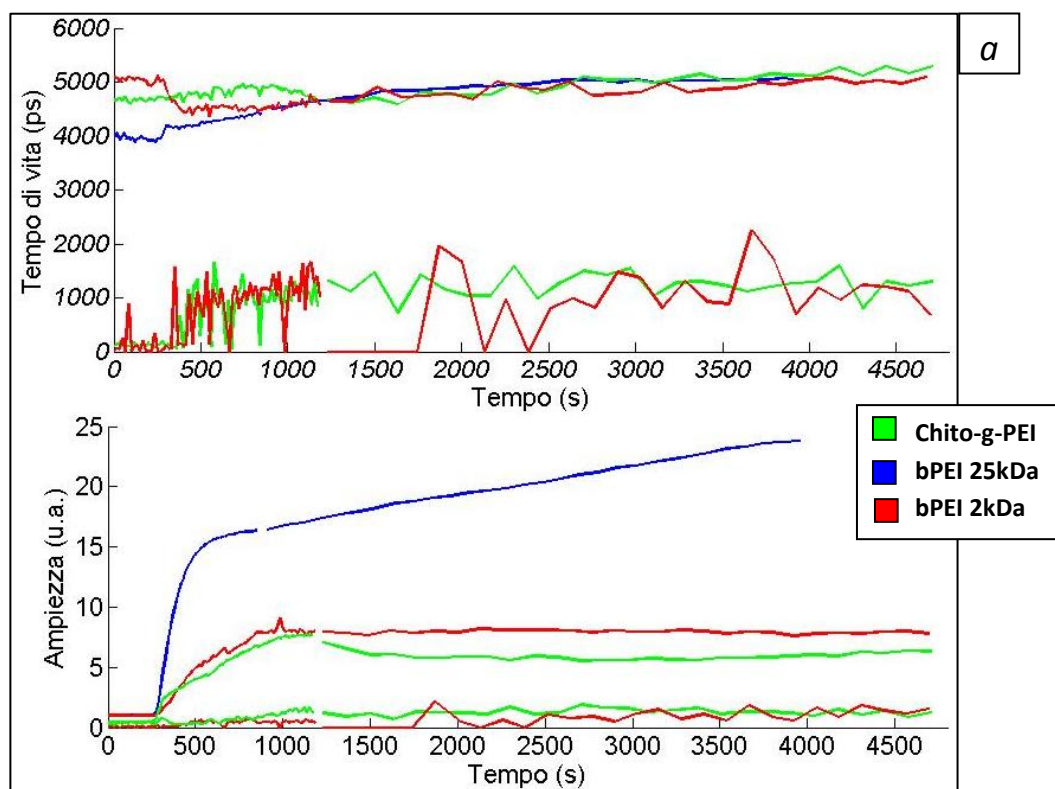


Fig 27a – Dinamica risolta nel tempo di decomplessazione del poliplesso ad opera dell'Eparina in concentrazione 10:1

Osservando la figura 27a dei tempi di vita si nota che l'influenza dell'Eparina è visibile dopo circa 250 secondi nei 3 campioni. Quindi conferma quanto detto sul ritardo di diffusione dell'Eparina osservato nella misura di intensità.

Le soluzioni contenenti Chi-PEI e bPEI2 presentano un comportamento biesponenziale in corrispondenza con la crescita di intensità. Il secondo tempo di vita ha un valore intorno a 1,0 ns ed ha una ampiezza circa 9%. La misura del secondo tempo di vita è molto rumorosa, e sono stati osservati problemi di convergenza dell'interpolazione. L'unico campione a presentare un tempo di vita monoesponenziale anche dopo l'inserimento dell'Eparina è il bPEI25.

Considerando sempre la misura in figura 27a, il tempo di vita principale dopo l'inserimento dell'Eparina cresce in maniera costante e converge al valore di circa 5.1 ns in modo uguale per i 3 polimeri. I 3 polimeri, partendo dai rispettivi valori dei tempi di vita, raggiungono un valore finale comune.

Le figure 27b e 27c completano le misure di decomplessazione per effetto dell'Eparina.

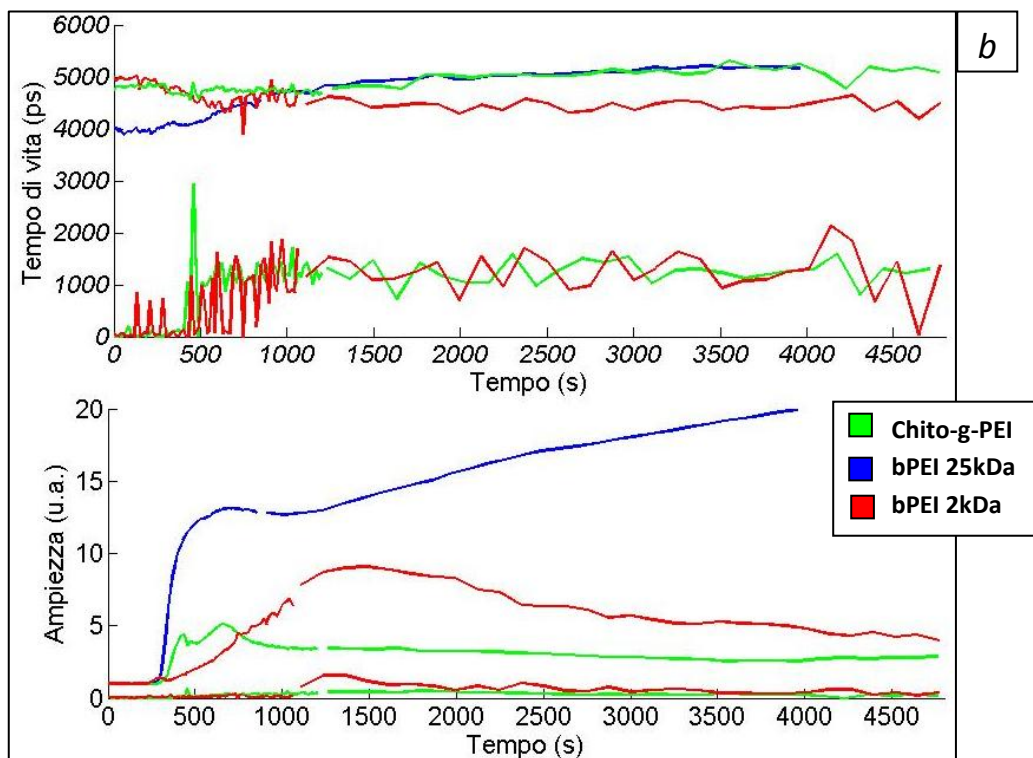


Fig. 27b – Dinamica risolta nel tempo di decomplessazione del poliplesso ad opera dell'Eparina in concentrazione 7.5:1

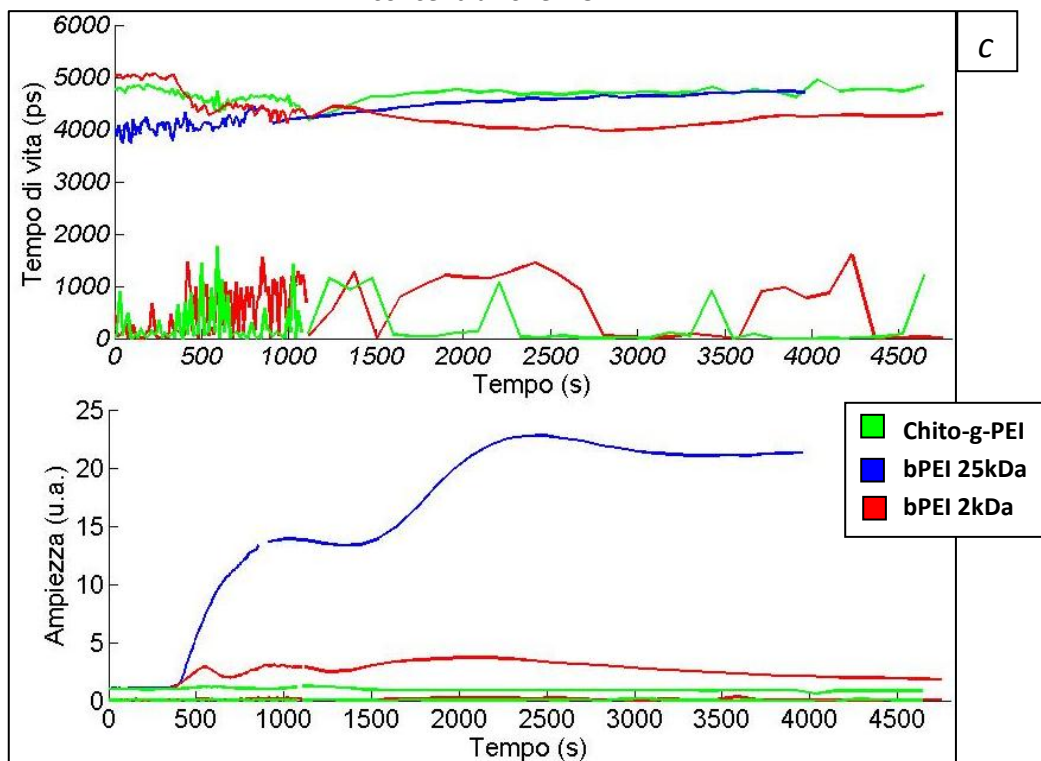


Fig. 27c – Dinamica risolta nel tempo di decomplessazione del poliplesso ad opera dell'Eparina in concentrazione 5:1

Anche a concentrazioni più basse di Eparina, nel campione bPEI25 si nota un effetto evidente di aumento di ampiezza e il tempo di vita cresce fino al valore di circa 5.1 ns. L'andamento del tempo di vita principale del Chi-PEI coincide, dopo che la soluzione è modificata dall'Eparina, con quello del bPEI25 in tutti i 3 casi di concentrazione di Eparina.

Il campione bPEI2 raggiunge il valore a regime di 5.1 ns solo nel caso di concentrazione di Eparina 10:1. Mentre nei casi di concentrazione inferiore di Eparina il tempo di vita principale decresce fino a circa 4.2 ns. Quindi il tempo principale del campione bPEI2 assume valori differenti dagli altri 2 polimeri.

Si nota infine dai grafici che il secondo tempo di vita nei campioni Chi-PEI e bPEI 2kDa a concentrazioni basse di Eparina ha ampiezze inferiori e risulta particolarmente rumorosa. La conseguenza è che in alcuni punti non si ottiene la convergenza dell'interpolazione con una curva biesponenziale.

Si discute ora quanto descritto sui grafici di decomplessazione. L'aumento di intensità di fluorescenza indica che l'Eparina sta rompendo i poliplessi. Di conseguenza una certa percentuale di DNA non è più complessata dal polimero ed il Sybr Green torna ad essere intercalato nel DNA e a fluorescere con maggior intensità.

Il campione bPEI25 risente maggiormente la presenza di Eparina in soluzione e questo è possibile notarlo sia dalla misura di intensità in continua sia dall'andamento dei tempi di vita. L'intensità aumenta molto e il singolo tempo di vita raggiunge valori confrontabili, per tutte le tre concentrazioni di Eparina. Pertanto, anche a bassa concentrazione l'Eparina influenza fortemente e rompe i legami tra il polimero bPEI25 e il DNA. Da questo si ipotizza che il bPEI25 è il polimero con una struttura meno stabile fra i 3 studiati. Tuttavia si sottolinea che la minor stabilità non è equivalente ad una scarsa efficacia di trasfezione.

Il tempo di vita principale del Chi-PEI ha andamento coincidente con quello del bPEI25, per tutte le concentrazioni di Eparina. Altrettanto interessante è osservare che il tempo di vita principale del Chi-PEI ad inizio dinamica ha un valore simile al bPEI2, mentre a fine dinamica coincide con il valore del bPEI25. Poiché il Chi-PEI è composto da catene di bPEI2, si può supporre che la struttura del poliplesso formato dal Chi-PEI sia maggiormente simile a quella

del bPEI2. Mentre è probabile che la dinamica di decomplessazione porti il Chi-PEI ad avere una struttura finale più simile al bPEI25.

La soluzione finale, a concentrazione 10:1, è caratterizzata da un tempo di vita lungo, 5.1 ns, e nei casi bPEI2 e Chi-PEI anche dalla comparsa di un secondo tempo di vita. La comparsa di un secondo tempo di vita può essere utilizzata come "monitor" dell'effetto dell'Eparina. Ad alte concentrazioni, infatti, la presenza di un andamento biesponenziale potrebbe indicare che il poliplesso sta decomplessando; al contrario a basse concentrazioni il secondo tempo di vita ha una ampiezza inferiore, e quindi l'Eparina trova più difficoltà a rompere i legami dei polimeri bPEI2 e Chi-PEI.

Infine si nota che in presenza di Eparina, nel caso 10:1, il tempo di vita cresce fino a 5.1 ns e quindi tende al tempo di vita, di 5.5 ns, del SybrGreen+DNA in HEPES. Questo è un possibile indicatore per ipotizzare che la struttura sta tornando simile al solo SybrGreen+DNA.

Le ampiezze hanno un andamento simile all'intensità, quindi il maggior contributo nella variazione di intensità è dovuto alla maggiore o minore quantità di SybrGreen intercalato nel DNA.

Dai grafici delle ampiezze di fluorescenza si ricava che la quantità di Sybr Green che torna ad essere intercalata nel DNA è maggiore per il campione bPEI25. Suggestendo quindi che i poliplessi formati da bPEI25 decomplessano maggiormente rispetto agli altri 2 polimeri.

Per i polimeri bPEI2 e Chi-PEI si osserva un incremento significativo di ampiezza solo nel caso di elevata concentrazione di Eparina. Di conseguenza l'Eparina ha minore effetto su questi polimeri. Trasferendo questa osservazione alla applicazione dei due polimeri come vettori genici, si può ipotizzare che in ambiente extracellulare questi due polimeri siano più resistenti rispetto al bPEI25.

E' stato confrontato lo spettro di emissione del Sybr Green intercalato nel DNA e i 3 spettri di emissione a fine dinamica con Eparina 10:1 per ottenere un'analisi più completa sulla decomplessazione dei poliplessi. Dalla figura 28 si vede che lo spettro di emissione del Sybr Green non varia in presenza di Eparina.

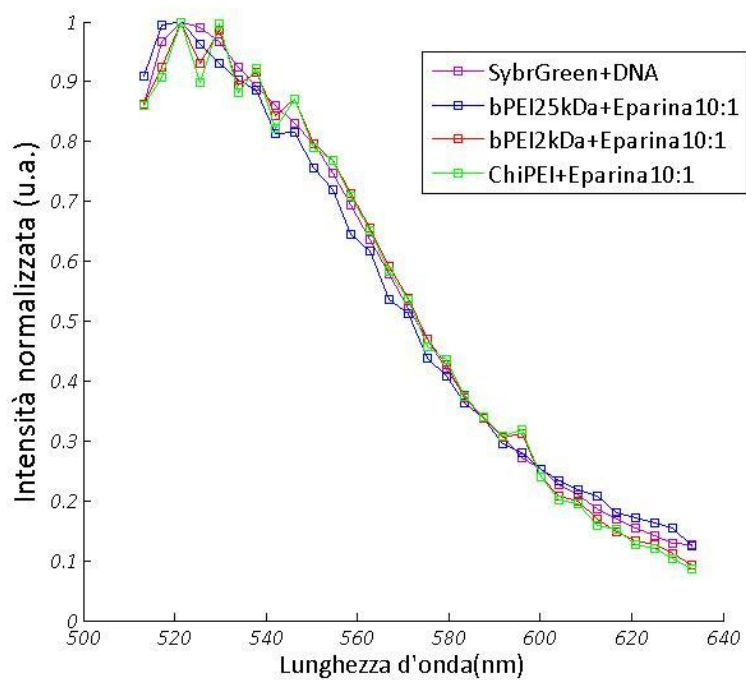


Fig.28 – Confronto tra spettro di emissione SybrGreen+DNA e spettri di emissione dei 3 polimeri a fine decomplessazione con Eparina

3.2 CORRELAZIONE TRA EFFICIENZA DI TRASFEZIONE E TEMPO DI VITA DI FLUORESCENZA

Nelle analisi sulle misure effettuate è stato fino ad ora correlato il tempo di vita di fluorescenza del Sybr Green con la struttura del poliplesso ed è stato osservato che i valori del tempo di vita identificano differenti strutture del polimero attorno al DNA. Si ricorda che nell'ambito di progettazione di un efficace vettore polimerico, la struttura finale raggiunta dal poliplesso svolge un ruolo molto importante. Dato che sono state osservate dipendenze tra variazioni di struttura e tempo di vita, si vuole ora indagare se esista una correlazione tra i valori dei tempi di vita di fluorescenza e l'efficienza di trasfezione dei poliplessi. Attraverso questa analisi si vogliono avvicinare le informazioni della tecnica di fluorescenza risolta nel tempo alla finalità della *gene delivery*.

I dati sulle efficienze di trasfezione dei polimeri Chi-PEI, bPEI2 e bPEI25, fornite dal dipartimento di Chimica del Politecnico di Milano, sono presentate in figura 29.

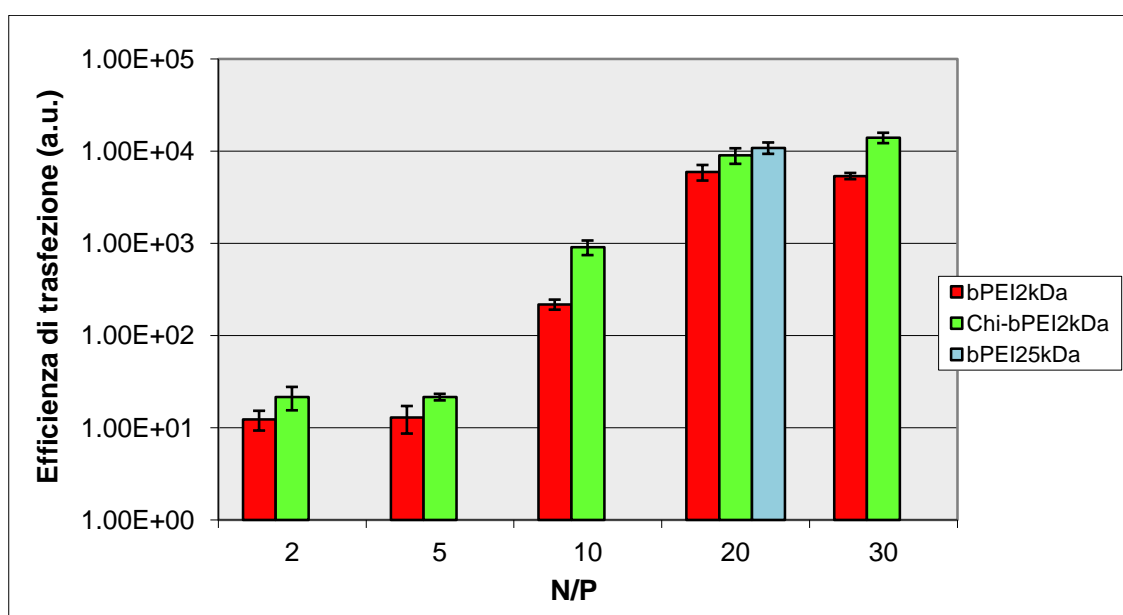


Fig. 29 – Efficienza di trasfezione dei 3 poliplessi in funzione di NP

Dal grafico in figura 29 si osserva che il gruppo di Chimica ha compiuto misure su una scala di NP sui polimeri Chi-PEI e bPEI2 così da realizzare un confronto completo fra i due polimeri. Infatti hanno osservato come l'aggiunta di Chitosano al monomero di bPEI 2kDa aumenti la efficienza di trasfezione a tutte le concentrazioni di polimero. Mentre la misura di efficienza di

trasfezione sul bPEI25 è realizzata a NP20 poiché a questa concentrazione il polimero trasfetta più efficacemente. Sono quindi confrontati i dati di efficienza di trasfezione con i tempi di vita di fluorescenza per i polimeri Chi-PEI e bPEI2 per i diversi valori di NP. Il grafico in figura 30 riporta la correlazione tra questi dati.

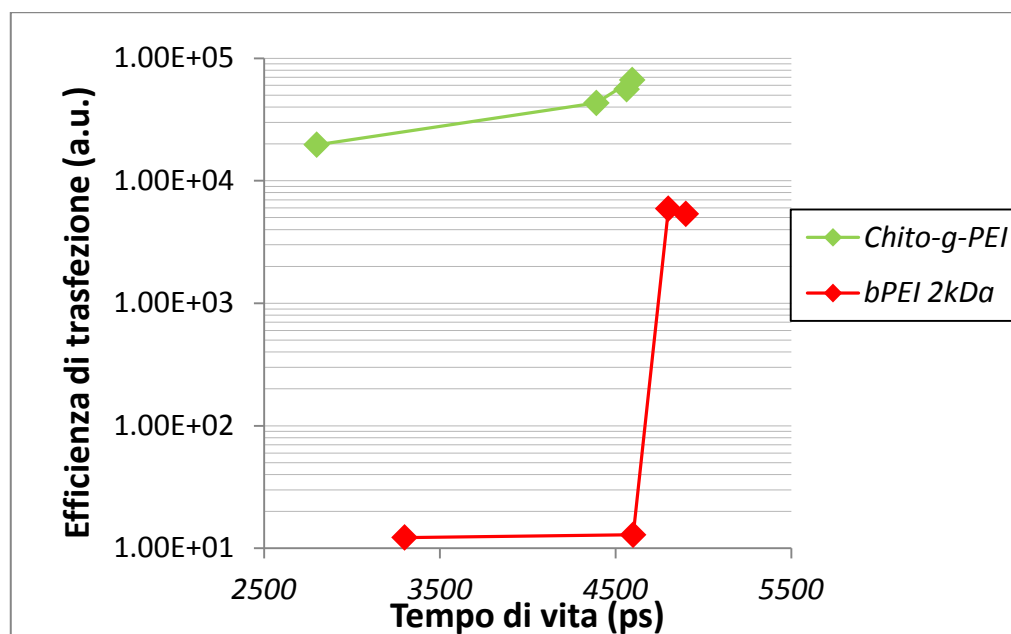


Fig. 30 – Efficienza di trasfezione in funzione del tempo di vita di fluorescenza dei 3 polimeri

L'efficienza di trasfezione aumenta al crescere di NP e del tempo di vita di fluorescenza. Il bPEI2 presenta un aumento significativo di efficienza di trasfezione solo a valori elevati di NP, i quali posseggono tempi di vita più elevati. Si osserva dal grafico, in figura 30, come la curva di efficienza di trasfezione del Chi-PEI parta da un valore inferiore di tempo di vita rispetto al bPEI2.

Per cercare di ottenere maggiori informazioni sono state eseguite alcune misure sul polimero PEI lineare con peso molecolare 25 kDa. Il polimero IPEI 25kDa (IPEI25) è composto dallo stesso monomero e stesso peso molecolare del bPEI 25kDa, polimero ampiamente analizzato finora, ma ha una forma differente, infatti il primo è lineare mentre il secondo è ramificato. Il polimero IPEI25 è stato scelto perché presenta una elevata capacità nel trasferire i geni e si conoscono i valori di efficienza di trasfezione in funzione del rapporto NP. L'efficienza di trasfezione in funzione di NP per il campione IPEI 25kDa è riportata in figura 31.

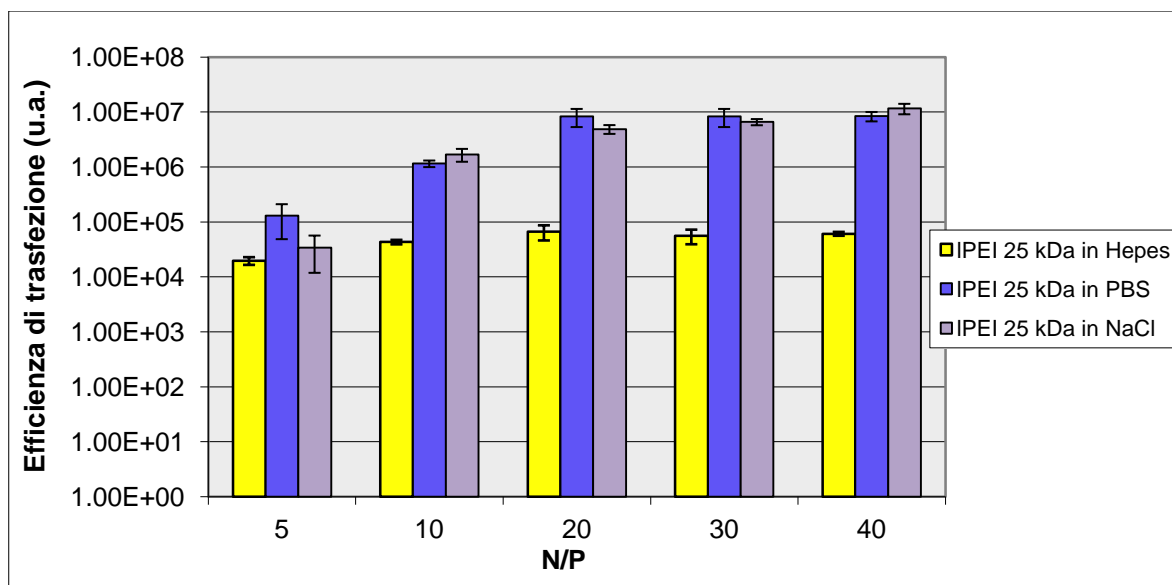


Fig. 31 – Efficienza di trasfezione del IPEI 25kDa in 3 buffer al variare di NP

Il polimero è stato confrontato in 3 diversi buffer. Si nota come l'efficienza di espressione genica cambi di ordini di grandezza a seconda del buffer utilizzato. Fra i 3 buffer misurati, l'NaCl e il PBS favoriscono la trasfezione genica rispetto all'Hepes.

Inoltre, del grafico in figura 31, si osserva che l'efficienza di trasfezione aumenta al crescere della concentrazione di polimero in soluzione. La dipendenza dell'efficienza di trasfezione dalla concentrazione di polimero è confermata dalla letteratura. Infatti un vettore polimerico riesce a complessare meglio il DNA se ha un elevato numero di cariche positive, e queste aumentano proporzionalmente alla concentrazione di polimero⁵⁰.

Mentre la misura sperimentale sui tempi di vita fluorescenza per il campione IPEI25 diluito nei 3 *buffer* è mostrata in figura 32.

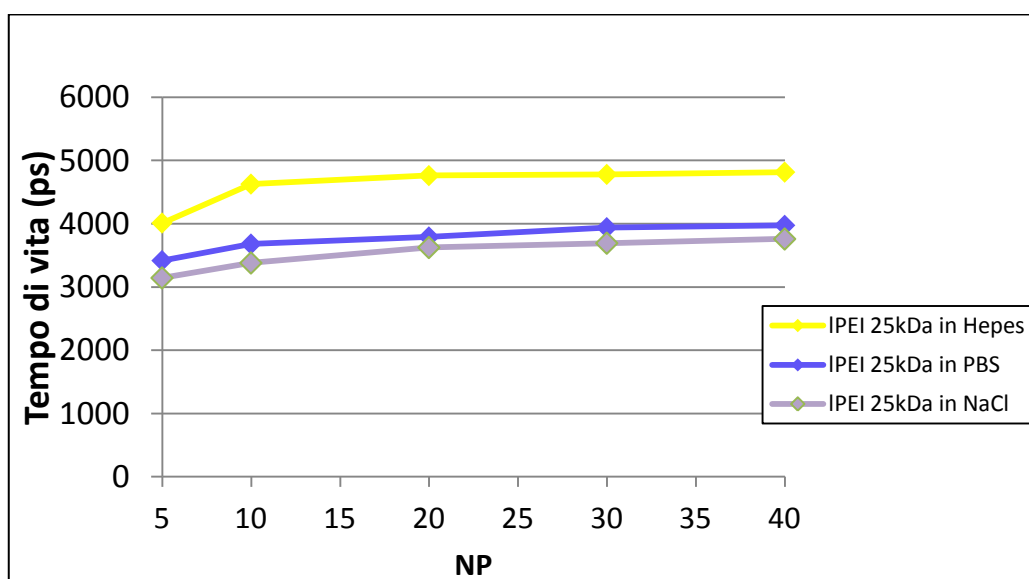


Fig. 32 – Tempi di vita di fluorescenza del IPEI 25kDa in 3 buffer al variare di NP

I valori dei tempi di vita per i 3 diversi campioni crescono in funzione dell'aumento di NP. Si sottolinea che questa crescita, con una curva con derivata seconda negativa, è stata osservata in tutte le misure sui tempi di vita analizzate finora nella tesi.

Sul polimero IPEI25 nei 3 buffer è stato osservato che all'aumentare di NP aumenta sia l'efficienza di trasfezione che il tempo di vita di fluorescenza. Di conseguenza si può supporre che esista una dipendenza anche tra efficienza di trasfezione e tempo di vita di fluorescenza.

Il grafico di efficienza di trasfezione in relazione con il tempo di vita per i 5 rapporti di carica del polimero IPEI25 è riportato in figura 33.

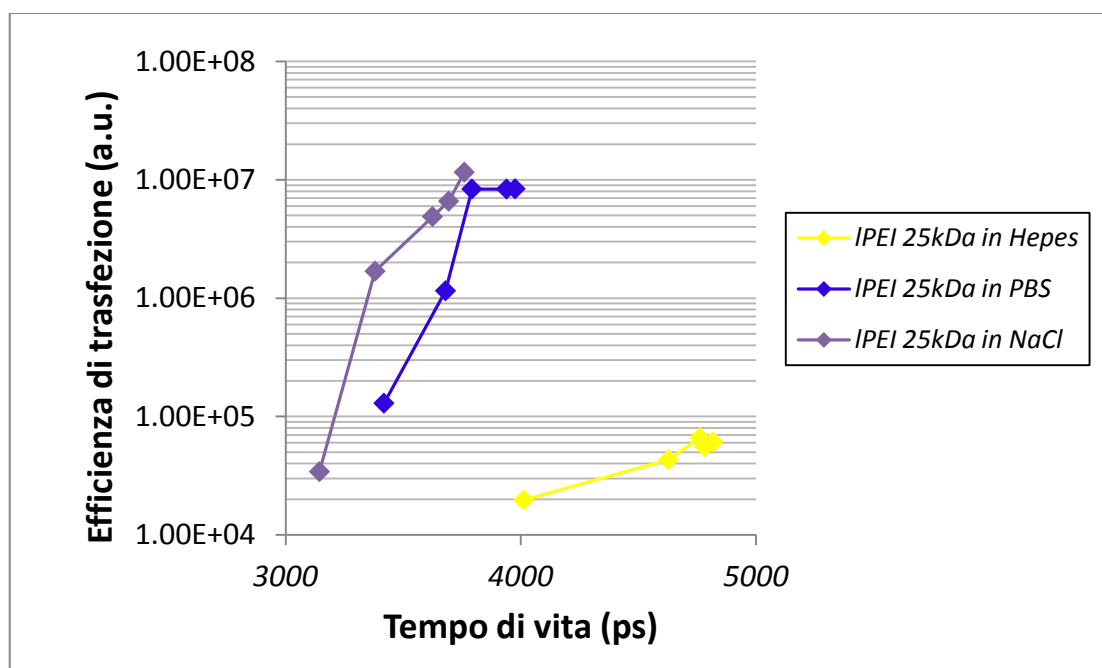


Fig. 33 – Efficienza di trasfezione in funzione del tempo di vita di fluorescenza

Considerando i campioni accomunati dallo stesso *buffer* risulta evidente, dal grafico in figura 33, che l'efficienza di trasfezione cresce all'aumentare del tempo di vita e quindi sia presente una correlazione positiva fra le due variabili.

Si nota inoltre che i campioni in PBS e NaCl, che sono i più efficienti, hanno tempi di vita inferiori. Ad esempio il campione IPEI25 in NaCl è il più efficiente e i suoi tempi di vita si trovano tra 3.1 ns e 3.7 ns. Mentre nel caso di IPEI25 in Hepes i tempi di decadimento si trovano compresi tra 4.0 ns e 4.8 ns. Quindi questo polimero ad efficienze di trasfezione minori possiede tempi di vita maggiori, e viceversa. Campioni in buffer differenti sembrano avere una correlazione negativa tra efficienza di trasfezione e tempo di vita.

Questo sembra suggerire che per ogni tipo di campione il tempo di vita aumenti al crescere del NP, ma un campione sia più efficace di un altro se possiede un tempo di vita inferiore.

Per verificare se sia possibile conoscere l'efficienza di trasfezione dalla misura del tempo di vita sono stati misurati nuovi polimeri come campioni e nuovi *buffer*.

Per eliminare la dipendenza del tempo di vita di fluorescenza dal NP è stato considerato solo un valore di NP per coppia polimero-*buffer*. Nella nostra analisi è stato scelto per ogni coppia polimero-*buffer* il valore di NP più trasfettante.

Nella figura 34 sono mostrati i dati di efficienza di trasfezione in funzione del tempo di vita di fluorescenza per le coppie polimero-*buffer* misurate.

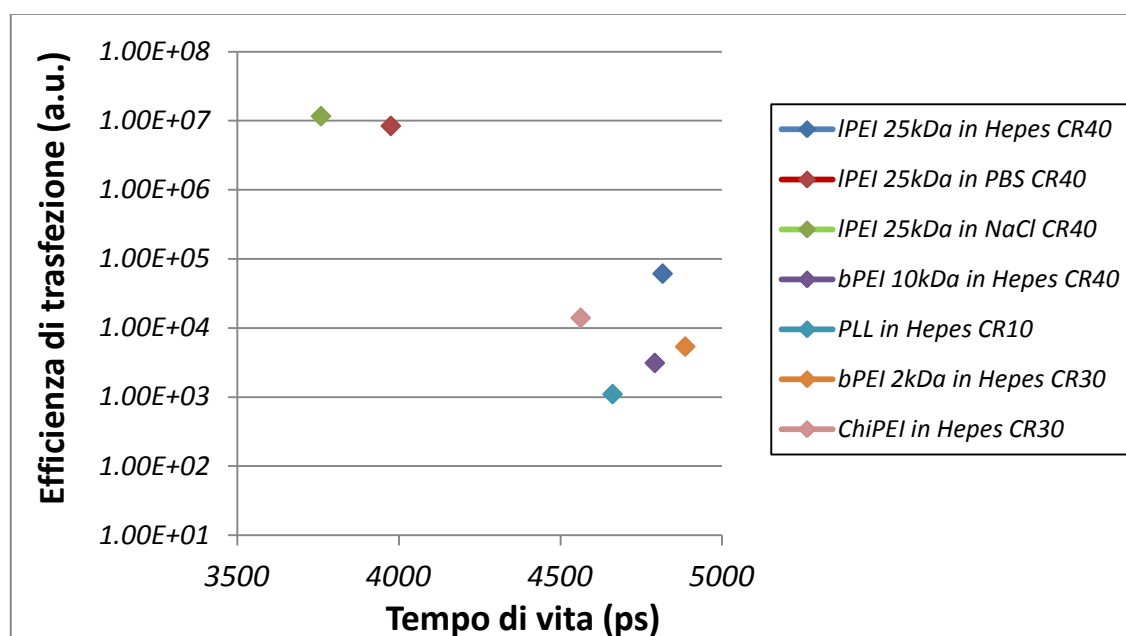


Fig. 34 – Efficienza di trasfezione in funzione del tempo di vita di fluorescenza delle coppie polimero-*buffer* misurate

Si osserva dalla figura 34 che le coppie polimero-*buffer* che presentano efficienze di trasfezioni simili si addensano agli stessi tempi di vita. I campioni con efficienza di trasfezione maggiore si posizionano su tempi di decadimento inferiori.

Quindi considerando solo il campione più trasfettante per ogni coppia polimero-*buffer* si ipotizza l'esistenza di una correlazione negativa tra efficienza di trasfezione e tempo di vita di fluorescenza. Dalle analisi svolte si ottiene come indicazione che, probabilmente, per selezionare un vettore polimerico adatto a trasfettare sia meglio scegliere la coppia polimero-

buffer che possiede il tempo di vita inferiore. Poi, una volta scelto il polimero, occorre realizzare il poliplesso ottimizzando il valore di NP. Tuttavia occorre considerare che quella appena proposta è una analisi preliminare per studiare possibili correlazioni tra di vita ed efficienza di trasfezione, infatti il numero di campioni considerati non può rappresentare una casistica completa. Future analisi potrebbero riguardare l'utilizzo di nuovi polimeri e nuovi buffer.

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il lavoro di tesi aveva come finalità studiare le variazioni di struttura di un poliplesso mediante la spettroscopia di fluorescenza risolta nel tempo. I valori di decadimento di fluorescenza riguardanti la formazione e la struttura di un poliplesso sono utili nell'ambito di ricerca di vettori genici nella *gene delivery*. Per realizzare le misure sperimentali è stato utilizzato il Sybr Green I, un marcatore molto diffuso del DNA, e diversi polimeri preparati dal dipartimento di Chimica del Politecnico. Tra questi polimeri è stata prestata maggiore attenzione al Chito-g-PEI, che è un polimero cationico originale e poco citotossico. Il Chito-g-PEI è un copolimero di Chitosano e bPEI 2kDa. I campioni di misura utilizzati erano soluzioni contenenti DNA, marcato Sybr Green, e polimeri a differenti NP. Le misure di fluorescenza risolta nel tempo consentono di ottenere i valori di tempo di vita e ampiezza di fluorescenza. Queste offrono il vantaggio, rispetto ad una misura in continua di fluorescenza, di poter studiare il microambiente di un fluoroforo e le sue modifiche fisico chimiche. Il polimero attorno al DNA+SybrGreen modifica il tempo di vita di fluorescenza.

Dalle misure sperimentali di complessazione sono state osservate variazioni nel decadimento esponenziale di fluorescenza emessa. Il Sybr Green può essere utilizzato per studiare variazioni di tempi di vita di fluorescenza nel processo di complessazione tra DNA e polimeri cationici.

A seguito dell'inserimento di polimero in soluzione, l'intensità di fluorescenza decresce poiché il Sybr Green non è più intercalato nel DNA. La percentuale di Sybr Green che viene liberata in soluzione cresce all'aumentare della concentrazione di polimero, mentre il Sybr Green rimasto debolmente legato cambia tempo di vita di fluorescenza.

Il Sybr Green legato alle catene nucleotidiche, in assenza di polimero, presenta una intensa fluorescenza con decadimento mono-esponenziale e tempo di vita di 5.5 ns. I poliplessi invece presentano tempi di vita di fluorescenza inferiori, che crescono con concavità negativa all'aumentare di NP, per NP maggiore di 2. Per i poliplessi composti da differenti polimeri sono stati misurati differenti valori di tempi di vita, e questo si verifica anche nei casi ad NP elevato che sono i più interessanti per la trasfezione.

La dinamica di complessazione e di decomplessazione ha mostrato come sia possibile seguire le dinamiche di formazione e di disgregazione del poliplesso osservando l'andamento temporale

del tempo di vita di fluorescenza. Dopo circa 25 minuti termina la variazione del tempo di vita e si deduce che il poliplesso abbia raggiunto una struttura stabile.

Fra i 3 polimeri considerati nell'analisi, il bPEI25 riduce il tempo di vita e l'ampiezza di fluorescenza in modo maggiore rispetto al Chi-PEI e al bPEI2. Da questo è stato ipotizzato che il bPEI25 comprime maggiormente il DNA rispetto ai polimeri Chi-PEI e bPEI2, ottenendo complessi di dimensioni inferiori che spengono maggiormente, per *quenching*, la fluorescenza del Sybr Green. Questa osservazione è stata confermata dalle misure sulla dimensione dei poliplessi realizzate con la tecnica di *Dynamic Light Scattering*.

I dati ricavati dalla tecnica di fluorescenza risolta nel tempo sono stati confrontati con i dati di trasfezione dei polimeri studiati. Si è osservato che per ogni coppia polimero-buffer l'efficienza di trasfezione cresce all'aumentare del tempo di vita di fluorescenza, ma le coppie polimero-buffer con tempi di vita minori presentano efficienze di trasfezione maggiori. Tuttavia occorrono ulteriori studi su nuovi polimeri e nuovi *buffer*, per poter realizzare uno studio completo di correlazione tra efficienza di trasfezione e tempo di vita di fluorescenza.

L'utilizzo del Sybr Green e lo studio sulla complessazione dei poliplessi attraverso la fluorescenza risolta nel tempo può essere di aiuto al biologo per la caratterizzazione di un vettore polimerico. Infatti è stata verificata la possibilità di utilizzare il Sybr Green nello studio dei poliplessi, il quale è un marcatore sicuro per la salute del biologo. Inoltre la tecnica di fluorescenza risolta nel tempo può essere accostata a tecniche di misura già utilizzate dal biologo per caratterizzare un polimero come vettore genico. Infatti può aggiungere informazioni alle misure di *Dynamic Light Scattering* e *ZetaPotential* e in alcuni casi sostituirle. In questo modo un biologo può ottenere un insieme completo di informazioni che lo guidino sulla scelta di un polimero ancora prima di fare esperimenti di trasfezione su cellule.

Un possibile sviluppo futuro del lavoro proposto in tesi è allargare lo studio ai lipidi usati nella *gene delivery*. Infatti anche i lipidi cationici complessano il DNA secondo forze elettrostatiche, formando i lipoplessi. Di conseguenza si potrebbero comprendere le differenze strutturali di complessazione anche per il caso dei lipidi cationici. I lipoplessi, come i poliplessi, sono vettori non virali e presentano i vantaggi di questa classe di vettori per il trasporto di geni.

Avvicinando ancora di più lo studio di fluorescenza alla somministrazione di geni in una cellula, si potrebbe indagare in quale compartimento viene inglobato e quindi con quali sostanze e

quale ambiente viene in contatto il poliplesso. Da queste informazioni si potrebbe cercare di progettare un polimero, o in generale un vettore, che reagisca e si rompa dopo aver varcato la barriera cellulare, così da liberare con facilità il contenuto genico. Per fare questo si può ricorrere alla tecnica di *fluorescence lifetime imaging* (FLIM), la quale consiste nel fare immagini dei tempi di vita di fluorescenza distribuiti spazialmente in un campione. L'idea di base dell'applicazione della FLIM alla *gene delivery* è sempre di caratterizzare con i tempi di vita di fluorescenza i differenti poliplessi. Attraverso la FLIM si potrebbe tracciare il percorso di un poliplesso all'interno di una cellula e localizzare i suoi tempi di vita nelle immagini realizzate.

Dalle misure di fluorescenza risolta nel tempo si ottengono valori che dipendono dalla struttura raggiunta dai poliplessi in soluzione e questi si possono correlare con simulazioni del polimero che si dispone attorno al DNA. Di conseguenza si potrebbero ricostruire le dinamiche di formazione di un poliplesso. La misura di fluorescenza risolta nel tempo fornisce informazioni univoche per la scelta di un vettore polimerico per *gene delivery* e può essere di aiuto nella progettazione di efficiente vettore di geni.

RIFERIMENTI

1. Kamimura K, Suda T, Zhang G, Liu D, *Advances in Gene Delivery Systems*, Pharmaceut Med. 2011 Oct 1;25(5):293-306.
2. Robert J. Booker, *Genetics: Analysis and Principles*, McGraw-Hill, 2008.
3. Desnick RJ, Schuchman EH., *Gene therapy for genetic diseases*, *Acta Paediatr Jpn.* 1998 Jun; 40(3):191-203.
4. Both G, Alexander I, Fletcher S, Nicolson TJ, Rasko JE, Wilton SD, Symonds G., *Gene therapy: therapeutic applications and relevance to pathology*, *Pathology.* 2011 Oct;43(6):642-56.
5. Wilson DR, *Viral-mediated gene transfer for cancer treatment*, *Curr Pharm Biotechnol.* 2002 Jun;3(2):151-64.
6. Rubanyi GM, *The future of human gene therapy*, *Mol Aspects Med.* 2001 Jun;22(3):113-42
7. Pezzoli Daniele, PhD thesis "Development and Characterization of Novel Stimuli-Responsive Materials for Gene Delivery", 2010, Politecnico di Milano.
8. Nishikawa M, Huang L, *Nonviral vectors in the new millennium: Delivery barriers in gene transfer*, *Human Gene Therapy*, Volume 12, Issue 8, 2001, Pages 861-870.
9. Xu Y., Szoka Jr. F.C., *Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection*, *Biochemistry*, Volume 35, Issue 18, 7 May 1996, Pages 5616-5623.
10. Mulligan, R.C, *The basic science of gene therapy*, *Science*, Volume 260, Issue 5110, 1 January 1993, Pages 926-931.
11. Panyam J. ,Labhasetwar V., *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 55, Issue 3, 24 February 2003, Pages 329-347.
12. Breyer, B. Jiang, W. Cheng, H. Zhou, L. Paul, R. Feng, T. He, *Virus efficaci sia in vivo che in vitro Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy*, *Current gene therapy*, Volume 1, Issue 2, July 2001, Pages 149-162.
13. Check E., *Harmful potential of viral vectors fuels doubt over gene therapy.* *Nature* 2003;423:573-574
14. T. Niidome, L. Huang, *Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors*, *Gene Ther.* 2002 Dec;9(24):1647-52
15. Li S, Huang L, *Nonviral gene therapy: promises and challenges*, *Gene Ther.* 2000 Jan;7(1):31-4.
16. C.Tros de Ilarduya, Y. Sun, N. Duzgunes, *Gene delivery by lipoplexes and polyplexes*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010;40:159-170.
17. Dunlap DD, Maggi A, Soria MR, Monaco L, *Nanosopic structure of DNA condensed for gene delivery*, *Nucleic Acids Res.* 1997 Aug 1;25(15):3095-101.
18. Liu L, Yang YL, Wang C, Yao Y, Ma YZ, Hou S, Feng XZ, *Polymeric effects on DNA condensation by cationic polymers observed by atomic force microscopy*, *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010 Jan 1;75(1):230-8.

19. Karmali PP, Chaudhuri A., Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises, *Med Res Rev.* 2007 Sep;27(5):696-722.
20. Choosakoonkriang S, Lobo BA, Koe GS, Koe JG, Middaugh CR, Biophysical characterization of PEI/DNA complexes, *J Pharm Sci.* 2003 Aug;92(8):1710-22.
21. Davis ME, Non-viral gene delivery systems, *Curr Opin Biotechnol.* 2002 Apr;13(2):128-131.
22. Pires P, Simões S, Nir S, Gaspar R, Düzgünes N, Pedroso de Lima MC, Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells, *Biochim Biophys Acta.* 1999 Apr 14;1418(1):71-84.
23. Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, Remy JS, Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability, *Pharm Res.* 1998 Sep;15(9):1332-1339.
24. Simões S, Slepshkin V, Pires P, Gaspar R, de Lima MP, Düzgüneş N, Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides, *Gene Ther.* 1999 Nov;6(11):1798-1807.
25. Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP, Escande D., Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells, *J Biol Chem.* 1998 Mar 27;273(13):7507-11.
26. Funhoff AM, van Nostrum CF, Koning GA, Schuurmans-Nieuwenbroek NM, Crommelin DJ, Hennink WE, Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH, *Biomacromolecules.* 2004 Jan-Feb;5(1):32-39.
27. Eltoukhy AA, Siegwart DJ, Alabi CA, Rajan JS, Langer R, Anderson DG, Effect of molecular weight of amine end-modified poly(β -amino ester)s on gene delivery efficiency and toxicity, *Biomaterials.* 2012 May;33(13):3594-3603.
28. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2006 Springer
29. W. Becker, *Advanced time-correlated single photon counting techniques*, 2005 Springer
30. Rengarajan K, Cristol SM, Mehta M, Nickerson JM, Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores, *Mol. Vis.* 2002, 8, 416–421
31. Iida R, Yasuda T, Tsubota E, Nakashima Y, Sawazaki K, Aoyama M, Matsuki T, Kishi K, Detection of isozymes of deoxyribonucleases I and II on electrophoresed gels with pictogram sensitivity using SYBR Green I, *Electrophoresis* 1998, 19, 2416–2418.
32. Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A, Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature, *Nucleic Acids Res.* 2007;35(19):e127.
33. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F, Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications, *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 12;32(12):e103
34. Singer VL, Lawlor TE, Yue S, Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test), *Mutat Res.* 1999 Feb 2;439(1):37-47.

35. Vuorimaa E, Urtti A, Seppänen R, Lemmetyinen H, Yliperttula M, Time-resolved fluorescence spectroscopy reveals functional differences of cationic polymer-DNA complexes, *J Am Chem Soc.* 2008 Sep 3;130(35):11695-11700
36. Jiang HL, Kim YK, Arote R, Nah JW, Cho MH, Choi YJ, Akaike T, Cho CS, Chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier, *J Control Release.* 2007 Feb 12;117(2):273-280.
37. Lemkine GF, Demeneix BA., Polyethylenimines for in vivo gene delivery, *Curr Opin Mol Ther.* 2001 Apr;3(2):178-82.
38. Wightman L, Kircheis R, Rössler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, Wagner E, Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo, *J Gene Med.* 2001 Jul-Aug;3(4):362-72.
39. Eltoukhy A.A., Siegwart D.J., Alabi C.A., Rajan J.S., Langer R., Anderson D.G., Effect of molecular weight of amine end-modified poly(β -amino ester)s on gene delivery efficiency and toxicity, *Biomaterials*, Volume 33, Issue 13, May 2012, Pages 3594-3603.
40. Ahn CH, Chae SY, Bae YH, Kim SW, Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery, *J Control Release.* 2002 Apr 23;80(1-3):273-282.
41. Corsi K., Chellat F., Yahia L., Fernandez JC, *Biomaterials* 2003, 24, 1255-1264.
42. F.L. Pedrotti, L.S. Pedrotti, "Introduction to optics", 2001, Prentice Hall.
43. Paglia Floriano, Degree thesis "Progettazione e sviluppo di un sistema laser a ps per imaging in tempo reale dell'emodinamica cerebrale", 2004, Politecnico di Milano.
44. G. Cosa, K.S. Focsaneanu, J.R.N. McLean, J.P. McNamee, J.G. Scaiano, Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double stranded DNA in aqueous buffered solution, *Photochemistry and photobiology*, 2001, 73(6): 585-599.
45. Bruce J. Berne, Robert Pecora, "Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics", 2000, Dover Publications.
46. <http://www.malvern.com/Zetasizer>
47. Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Göpferich A, Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Volume 60, Issue 2, July 2005, Pages 247-266.
48. Cox; Nelson D., *Lehninger, Principles of Biochemistry, Freeman, 2004.*
49. Varkouhi AK, Mountrichas G, Schiffelers RM, Lammers T, Storm G, Pispas S, Hennink WE., Polyplexes based on cationic polymers with strong nucleic acid binding properties, *Eur J Pharm Sci.* 2012 Mar 12;45(4):459-66.
50. Rungsardthong U., Ehtezazi T., Bailey L., Armes S.P., Garnett M.C., Stolnik S., Effect of polymer ionization on the interaction with DNA in nonviral gene delivery systems, *Biomacromolecules*, Volume 4, Issue 3, May 2003, Pages 683-690.