

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI FIRENZE



FACOLTÁ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

Dipartimento di Chimica

TESI DI LAUREA TRIENNALE

**“Biosensori di affinità per lo studio dell’aggregazione
di fibrille amiloidi $\alpha\beta$ (1-42)”**

**“Affinity Biosensors for studying the
aggregation of amyloid fibrils $\alpha\beta$ (1-42)”**

RELATORE

Chiar.ma Prof.ssa

Maria Minunni

LAUREANDA

Silvia Lo Guasto

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

INDICE

CAPITOLO PRIMO Introduzione

| | |
|---|--------|
| 1.1. Scopo del lavoro | pag.1 |
| 1.2. Il problema dell'Alzheimer e delle fibrille | pag.3 |
| 1.2.1. L'Alzheimer | pag.3 |
| 1.2.2. Fibrille amiloidi | pag.12 |
| 1.3. Descrizione dei biosensori di affinità (QCM & SPR) | |
| 1.3.1. Biosensore | pag.15 |
| 1.3.2. QCM (Quartz Crystal Microbalance = Microbilancia al Cristallo di Quarzo) | pag.18 |
| 1.3.3. SPR (Surface Plasmon Resonance = Risonanza Plasmonica di Superficie) | pag.23 |
| 1.4. Stato dell'arte sullo sviluppo di biosensori per l'analisi di aggregazione di fibrille amiloidi | pag.27 |

CAPITOLO SECONDO Materiali & Metodi

| | |
|--|--------|
| 2.1. Apparato strumentale del QCM | pag.33 |
| 2.1.1. Cristallo piezoelettrico | pag.33 |
| 2.1.2. Cella | pag.35 |
| 2.1.3. QCA (Quartz Crystal Analyzer = Analizzatore per Cristalli di Quarzo) | pag.37 |

| | |
|--|---------|
| 2.2. Apparato strumentale basato sulla tecnica SPR: il BiacoreX™ | pag.39 |
| 2.2.1. BiacoreX™ | pag.39 |
| ❖ Reagenti | pag.43 |
| ❖ Campioni | pag. 47 |
| 2.3. Analisi con il QCM | pag.49 |
| 2.4. Analisi con il BiacoreX™ | pag.54 |

CAPITOLO TERZO Risultati relativi all'analisi per lo studio dell'immobilizzazione e dell'aggregazione delle fibrille amiloidi ottenuti con il QCM

| | |
|--|--------|
| 3.1. Immobilizzazione delle fibrille amiloidi | pag.57 |
| 3.1.1. Ottimizzazione dell'immobilizzazione delle fibrille amiloidi | pag.58 |
| 3.1.2. Ottimizzazione della concentrazione delle fibrille amiloidi | pag.60 |
| 3.1.3. Ottimizzazione e studio del tempo di immobilizzazione delle fibrille amiloidi | pag.61 |

| | |
|---|--------|
| 3.2. Crescita delle fibrille sul chip (aggregazione dei monomeri) | pag.62 |
| 3.2.1. Ottimizzazione della concentrazione delle soluzioni di da aggiungere per l'aggregazione | pag.62 |
| 3.2.2. Studio e ottimizzazione del tempo di incubazione della aggregazione dei monomeri | pag.63 |
| 3.3. Studio dell'attività inibitoria da parte del Clioquinolo | pag.66 |

CAPITOLO QUARTO Risultati relativi all'analisi per lo studio dell'immobilizzazione e dell'aggregazione delle fibrille amiloidi ottenuti con il BiacoreXTM

| | |
|---|--------|
| 4.1. Risultati ottenuti sfruttando la Risonanza Plasmonica di Superficie | pag.68 |
|---|--------|

| | |
|--------------------|--------|
| CONCLUSIONI | pag.72 |
|--------------------|--------|

| | |
|---------------------|--------|
| BIBLIOGRAFIA | pag.74 |
|---------------------|--------|

1° CAPITOLO

INTRODUZIONE

1.1. Scopo del lavoro

Il morbo di Alzheimer, una malattia degenerativa definita come una “epidemia silenziosa”, colpisce un numero significativo di persone; di questa malattia si conoscono pochissime cause e nessuna cura medica attuale, ma solo delle misure di prevenzione, risultano essere disponibili.

La formazione di fibrille amiloidi (placche amiloidi) nel tessuto cerebrale di un essere umano, è sintomo della presenza della malattia di Alzheimer (*Aguilar et al., 2005; Cheng et al., 2012; Fukuda et al., 2010; Gobbi et al., 2010; Kotarek et al., 2008; Kumar et al., 2010; Ogi et al., 2011; Zhang et al., 2011*).

Questo lavoro di tesi ha avuto come obiettivo lo studio e lo sviluppo di biosensori label-free rispettivamente basati su trasduzione piezoelettrica ed ottica. Nel primo caso è stato utilizzato un sistema piezoelettrico che utilizza sensori QCM, Quartz Crystal Microbalance, mentre per il sistema ottico si è utilizzata la Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR, Surface Plasmon Resonance) ed in particolare la strumentazione BiacoreXTM.

I due sistemi di trasduzione presentano entrambi la caratteristica di poter monitorare in tempo reale e senza l'impiego di marcatori, eventi all'interfaccia

tra la superficie del sensore e la soluzione dell'analita. Nello specifico, questa capacità è stata qui utilizzata per studiare eventi di aggregazione molecolare. In particolare, si è voluto studiare l'effettivo aggregarsi di fibrille amiloidi su superfici d'oro opportunamente modificate.

Inoltre, una volta valutata la possibilità effettiva di seguire l'evento di aggregazione sia con il sistema piezoelettrico che con quello SPR, si è proceduto a valutare eventuali effetti inibitori dell'aggregazione da parte del Clioquinolo (CQ). I sistemi sviluppati sono stati poi confrontati.

Il CQ è un farmaco che è stato ritirato dal commercio nel 1970, poiché in Giappone si erano manifestati dei danni ai nervi ottici dei pazienti che lo assumevano.

Dopodiché risultò essere disponibile solo in alcuni Stati, come ad esempio il Canada o l'Australia, dove viene usato solo nei laboratori a scopo di ricerca (*Ding et al., 2005*).

Esso sembra sciogliere le placche senili e ridurre i depositi proteici cerebrali, tipici della malattia di Alzheimer, mediante un'azione chelante sull'eccesso di rame e zinco nel cervello, riuscendo a dimezzare i livelli dei depositi di beta – amiloide (*Wang et al., 2012*).

Uno studio condotto in una clinica australiana (*Ritchie et al., 2003*), ha dimostrato che l'assunzione di questo farmaco, da parte dei pazienti affetti dal morbo di Alzheimer, prima provoca un aumento della quantità della proteina tau e delle proteine associate e dopo una diminuzione.

Questo approccio terapeutico deve essere ancora convalidato.

1.2. Il problema dell'Alzheimer e delle fibrille

1.2.1. L'Alzheimer

Il morbo di Alzheimer (o demenza senile di tipo Alzheimer, o demenza degenerativa primaria di tipo Alzheimer o semplicemente Alzheimer) è una delle forme più comuni di demenza degenerativa invalidante che si presenta nei soggetti prevalentemente in età senile (oltre i 65 anni di età), ma può presentarsi anche in età presenile (prima dei 65 anni) (www.ahaf.org).

Con il termine “demenza” si intende un deterioramento cognitivo cronico progressivo.

È un processo degenerativo che rende l'individuo che ne è affetto incapace di una vita normale e provocandone alla fine la morte.

Questo morbo colpisce circa il 5% della popolazione con più di 65 anni e si stima che entro il 2050 ne sarà affetta una persona su 85 a livello mondiale (www.centroalzheimer.org; www.informazione.it).

Storia

Nel 1901 uno psichiatra e neuropatologo tedesco, Alois Alzheimer, intervistò una sua paziente, la signora Auguste D., di 51 anni. Le mostrò diversi oggetti e dopo le chiese cosa le era stato indicato, ma lei non poteva ricordare. All'inizio il dottor Alzheimer registrò tale comportamento come *disordine da amnesia di scrittura*.

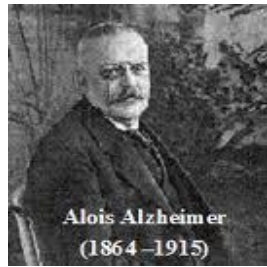


Figura 1.1: Il Dott. Alois Alzheimer e la sua paziente Auguste D.

Attraverso un esame autoptico egli notò nel tessuto cerebrale di una donna che era morta in seguito ad una strana malattia mentale, dei segni particolari nel tessuto cerebrale: la presenza di agglomerati (placche amiloidi) e di fasci di fibre aggrovigliate (viluppi neuro-fibrillari) e grovigli (dovuti alla proteina tau, che in questo caso è presente in quantità eccessiva e malfunzionante) (Maurer et al., 1997).



Figura 1.2: la proteina tau e le fibrille amiloidi nel tessuto cerebrale colpito dall'Alzheimer.

Negli anni successivi si verificarono altri undici casi simili.

Nel 1910 lo psichiatra tedesco Emil Kraepelin citò questo comportamento nel suo *Manuale di Psichiatria* definendolo come “*Malattia di Alzheimer*”.



Figura 1.3: il Dott. Emil Kraepelin.

Nei pazienti affetti da questo morbo si osserva la perdita di cellule nervose nelle aree cerebrali vitali per la memoria e per altre funzioni cognitive, ed un basso livello di alcune sostanze chimiche (come l'acetilcolina) che lavorano come neurotrasmettitori e che sono coinvolti nella comunicazione tra le cellule nervose.

Clinica

Il decorso clinico della malattia è lento e può essere diverso, per ogni singolo paziente, nei tempi e nelle modalità sintomatologiche; si suddivide in tre fasi:

- 1° fase lieve;
- 2° fase intermedia;
- 3° fase avanzata o severa.

Nelle *fasi lievi* ed *intermedie* si riscontrano:

- difficoltà di produzione di linguaggio;
- incapacità nella definizione di nomi di persone e/o di oggetti;
- disorganizzazione nella composizione di frasi;

- scorretto uso del linguaggio;
- difficoltà nella pianificazione e nella gestione di compiti complessi.

Nelle *fasi intermedie* ed *avanzate* si riscontrano, invece:

- problemi comportamentali (vagabondaggio, reazioni comportamentali incoerenti, etc...);
- problemi psichiatrici (confusione, ansia, depressione, deliri, allucinazioni, etc...);
- disorientamento spazio-temporale;
- difficoltà nella cura della persona.

I pazienti possono vivere fino a 8-10 anni dopo la diagnosi della malattia.

La patologia viene spesso anticipata dal *MCI (Mild Cognitive Impairment = deterioramento cognitivo lieve)*, un leggero calo di prestazioni in diverse funzioni cognitive legate alla memoria, all'orientamento o alle capacità verbali. All'inizio si manifesta come una demenza caratterizzata da deficit cognitivi (come l'amnesia).

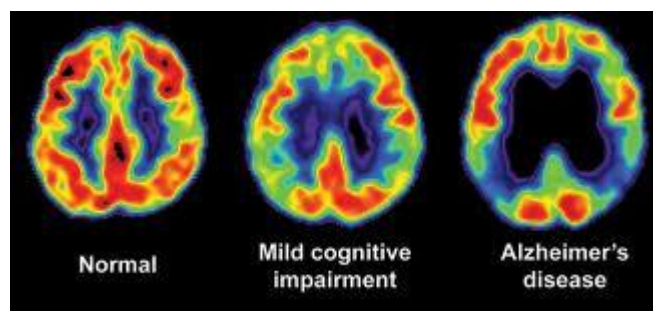


Figura 1.4: immagine di una scansione del cervello (in 3 stati diversi) eseguita tramite la **PET**

(**Positron Emission Tomography = Tomografia ad Emissione di Positroni**).

Vengono colpiti i diversi tipi di memoria, nel seguente ordine:

- *on-going memory*: riguardante i fatti del giorno;
- *memoria prospettica*: riguardante l'organizzazione del futuro prossimo;
- *memoria episodica retrograda*: riguardante i fatti della propria vita o eventi pubblici del passato;
- *memoria semantica*: riguardante le conoscenze acquisite;
- *memoria procedurale*: riguardante l'esecuzione automatica di azioni.

Questi disturbi cognitivi possono presentarsi anche prima che venga formulata una diagnosi di demenza di Alzheimer.

Diagnosi

La diagnosi precoce è molto importante sia perché offre la possibilità di trattare alcuni sintomi della malattia, sia perché permette al paziente di pianificare il suo futuro, quando è ancora in grado di prendere decisioni.

Durante il decorso della malattia si può solo fare una diagnosi "probabile" della malattia.

I medici si avvalgono di diverse fasi:

- esami clinici (sangue, urine, liquido spinale);
- test neuropsicologici per misurare la memoria, la capacità di risolvere problemi, il grado di attenzione, la capacità di contare e di dialogare;
- *TAC (Tomografia Assistita dal Computer)* cerebrali per identificare ogni possibile segno di anormalità.

L'unico modo di fare una diagnosi certa di demenza di Alzheimer è attraverso l'identificazione delle placche amiloidi nel tessuto cerebrale, possibile solo con l'autopsia dopo la morte del paziente.

Patogenesi

L'Alzheimer è causato da una diffusa distruzione di neuroni da parte dell'amiloide beta (*Cheng et al., 2012; Fukuda et al., 2010; Gobbi et al., 2010; Ogi et al., 2011;*), una proteina che si deposita tra i neuroni agendo come collante, inglobando placche e grovigli neurofibrillari.

Si verifica inoltre una forte diminuzione di acetilcolina (neurotrasmettitore) nel cervello. Queste modificazioni cerebrali impediscono al neurone di trasmettere gli impulsi nervosi, e ciò può causare la morte nel paziente (*Kihara et al., 2004; www.livestrong.com/article/144948-acetylcholine-alzheimers-disease/*).

A livello neurologico macroscopico, il cervello diminuisce sia in peso che in volume.

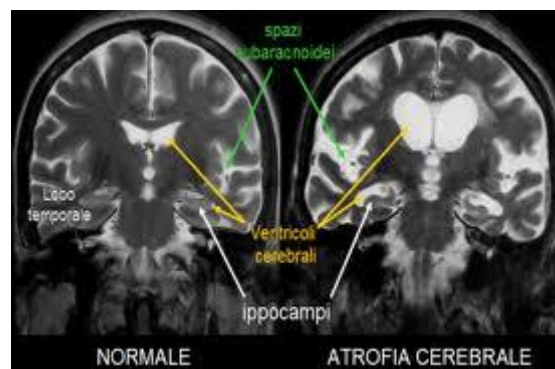


Figura 1.5: immagini di un cervello in un paziente sano (sinistra) e malato (destra) ottenute tramite **RMN (Risonanza Magnetica Nucleare)**.

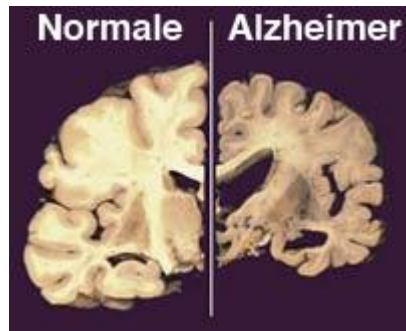


Figura 1.6: immagine di un cervello affetto dal morbo di Alzheimer
ottenuta tramite **TAC** (Tomografia Assistita dal Computer).

A livello microscopico, invece, si riscontra un depauperamento neuronale, la presenza di placche senili (placche amiloidi) e di ammassi neurofibrillari.

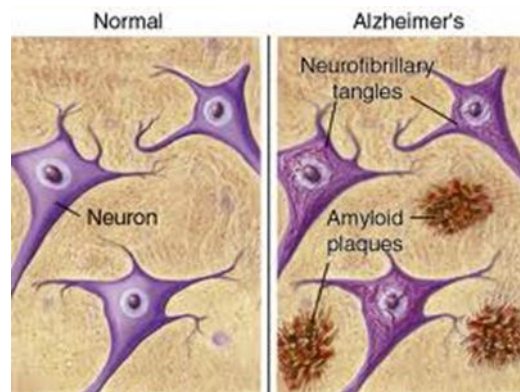


Figura 1.7: ammassi neurofibrillari e placche amiloidi in un cervello colpito dall'Alzheimer.

(**Fonte:** parkinsonitalia.wordpress.com/2011/10/14/alzheimer-affinita-con-il-parkinson).

Dal punto di vista anatomo-patologico la diagnosi clinica si può confermare solo tramite l'analisi *post-mortem* di tessuti cerebrali di pazienti affetti da

Alzheimer: si riscontra un accumulo extracellulare della proteina beta-amiloide sulla membrana dei neuroni. Queste placche neuronali innescano un processo infiammatorio.

Prevenzione

Oggi non ci sono prove definitive per sostenere l'efficacia di una qualsiasi misura preventiva per la malattia di Alzheimer, ma vi sono delle misure preventive atte a diminuire l'insorgenza di questa malattia, come:

- seguire una dieta mediterranea;
- non abusare di alcoolici;
- non fumare;
- non esporsi troppo a campi elettromagnetici a bassa frequenza;
- impegnarsi in attività intellettuali;
- avere una regolare interazione sociale;
- svolgere un'attività fisica;
- ...

Studi *post-mortem umani*, studi *su modelli animali*, o studi *in vitro*, supportano l'ipotesi che i FANS (anti-infiammatori non steroidei) possano ridurre l'infiammazione correlata alle placche amiloidi (*Cannon et al., 2004*).

Terapie farmacologiche

Attualmente non esistono farmaci in grado di fermare e far regredire questa malattia. I trattamenti disponibili puntano a contenerne i sintomi.

Nei laboratori di ricerca si sta cercando di ottenere dei principi attivi che aiutino a prevenire, a rallentare e a ridurre i sintomi della malattia (*Yan et al., 2003*).

Un'altra via di ricerca è quella di sviluppare una risposta immunologica contro la malattia cercando di sviluppare un vaccino che sia in grado di contenere la produzione del peptide beta amiloide che si aggrega a formare le placche (*Ingram, 2001*).

L'amiloide beta è una proteina associata allo sviluppo dell'Alzheimer; essa riduce il cambio di neuroni, decretandone la morte biologica e alterando le funzioni cerebrali del paziente.

Terapie non farmacologiche

Ne esistono varie, tra cui il *ROT (Reality Orientation Therapy = Terapia di Orientamento alla Realtà)* finalizzata ad orientare il paziente rispetto alla propria vita personale, all'ambiente e allo spazio che lo circonda tramite stimoli continui di tipo verbale, visivo, scritto e musicale (*Onor et al., 2007*).

Certamente individuare molecole con la capacità di inibire l'aggregazione delle fibrille risulta di notevole interesse per il potenziale che potrebbero avere nello sviluppo di nuove terapie farmacologiche.

1.2.2. Fibrille amiloidi

Riuscire a capire i principi della formazione delle fibrille amiloidi è un problema molto importante della moderna biologia.

Molte malattie umane, come l'Alzheimer, il Parkinson e l'Huntington, sono caratterizzate dalla formazione di fibrille amiloidi.

Il termine *amiloide* fu coniato per la prima volta nel 1838 dal botanico tedesco Matthias Schleiden, per descrivere un costituente amilaceo delle piante. Successivamente nel 1854, Rudolph Virchow, lo usò per indicarne una sostanza simile alla cellulosa.

L'amiloide

È una proteina fibrillare che ha un diametro di circa 10 nm e costituito da 2-6 protofilamenti; le fibrille amiloidi di tutte le proteine possiedono una stessa struttura dominante, il cross-beta, in cui i fili beta sono orientati perpendicolarmente ai foglietti beta paralleli agli assi delle fibrille. Nel cross-beta, la separazione tra gli idrogeni legati ai fili beta è di 0,48 nm, mentre la distanza tra gli strati dei foglietti beta è di circa 1,0-1,3 nm.

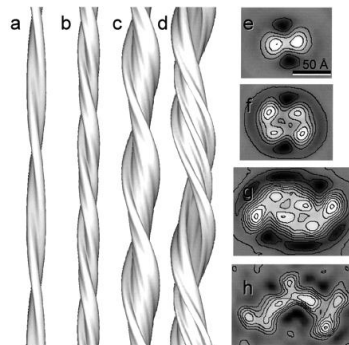


Figura 1.8: differenti strutture di fibrille amiloidi:

(*a,e*) fibrilla costituita da una coppia di protofilamenti avvolti l'uno sull'altro;

(*b,f*) fibrilla compatta costituita da 4 protofilamenti;

(*c,g*) fibrilla costituita da 6 protofilamenti;

(*d,h*) scheletro attorcigliato.

L'amiloide si accumula negli organi e nei tessuti, in modo diffuso o locale, formando dei depositi (placche) e provocando la comparsa di una malattia chiamata *amiloidosi*.

I depositi di amiloide sono tossici e causano danni alle cellule nervose molti anni prima dell'esordio della demenza di Alzheimer.

Le fibrille amiloidi non sono sempre pericolose; è stato osservato che gli organismi viventi (dai procarioti agli umani) sfruttano le formazioni delle fibrille amiloidi formatesi dalle proteine endogene per compiere normali funzioni fisiologiche. Le fibrille amiloidi normali interagiscono con la matrice extracellulare per promuovere la crescita neuritica e dei dendriti.

L'*APP* (*Amyloid Precursor Protein = Proteina Precursore dell'Amiloide*) è una grande proteina di membrana che normalmente gioca un ruolo importante nella crescita e nella riparazione dei neuroni, regola la formazione delle sinapsi, la plasticità neuronale e l'efflusso di ferro dalle cellule.

Talvolta però, in età avanzata, una forma degenera di questa proteina può accumularsi, distruggere le cellule nervose e portare alla perdita di capacità cognitive e di memoria conosciuta come morbo di Alzheimer.

Dalla prospettiva della biotecnologia, le fibrille amiloidi sembrano promettenti come complessi macromolecolari basati su nanomateriali (*Kumar et al., 2010; Mankar et al., 2011*).

Questi nanomateriali potrebbero interagire direttamente con il peptide $\alpha\beta$ -amiloide₁₋₄₂ in due diversi modi (*Bastus et al., 2001; Kogan et al., 2006*):

- 1) reprimendo la sua auto-aggregazione in placche fibrillari ed oligomeri tossici;
- 2) promuovendo la rottura degli aggregati amiloidi già presenti.

Recentemente è stata proposta una tecnica molto interessante che permette di sciogliere i depositi di amiloide fibrillare, selettivamente e a distanza, impiegando energia termica concentrata (ottenuta tramite una combinazione di campi di microonde deboli e nanoparticelle d'oro già legate all' $\alpha\beta$ -amiloide bersaglio).

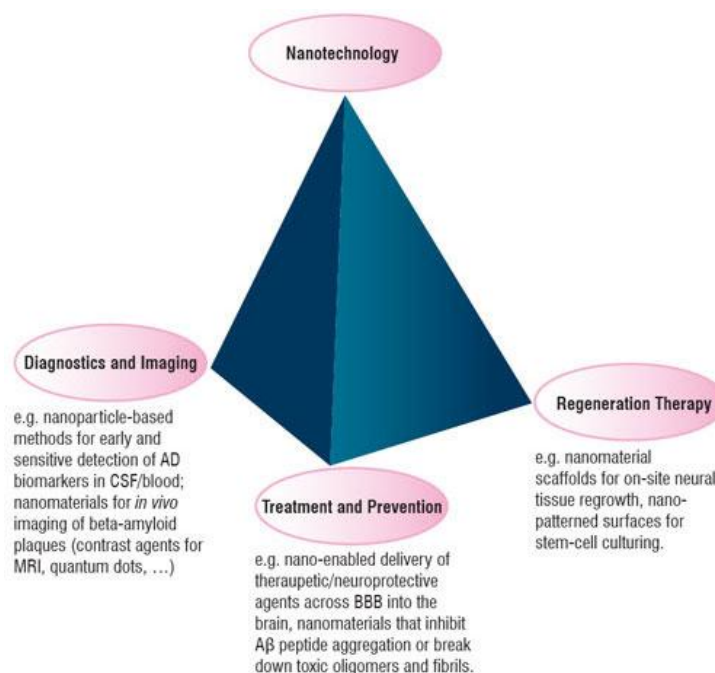


Figura 1.9: alcune applicazioni dei nanomateriali.

1.3. Descrizione dei biosensori di affinità (QCM & SPR)

1.3.1. Biosensore

Il termine “*biosensore*” è apparso per la prima volta nella letteratura scientifica alla fine degli anni '70 e venne proposto da Clark nel 1956.

La IUPAC definisce un *biosensore* come “un dispositivo analitico in grado di convertire un'attività biologica in un segnale misurabile (elettrico, ottico, acustico), mediante l'integrazione tra un elemento biologico sensibile con un sistema strumentale di trasduzione, acquisizione e analisi dati”.

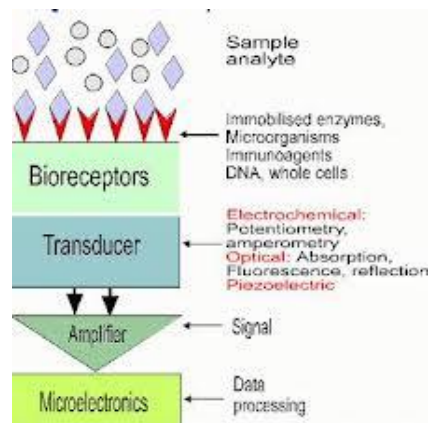


Figura 1.10: diagramma a blocchi rappresentante un biosensore.

Esso sfrutta le caratteristiche di affinità, reattività e specificità di moltissime molecole biologiche naturali (DNA, enzimi, anticorpi,...) o di altri mediatori biologici (recettori biomimetici, aptameri).

Esso presenta i seguenti vantaggi:

- basso costo;
- velocità di risposta;
- semplicità;
- rapidità d'uso;
- elevata specificità e sensibilità;
- piccole dimensioni;
- facilità di trasporto;
- minore pretrattamento del campione;
- possibilità di riutilizzo per ripetute analisi.

Un biosensore si classifica sia secondo la natura della molecola biologica utilizzata sia secondo il metodo di trasduzione adottato per la rivelazione del segnale biologico.

I biorecettori ed i metodi di trasduzione si distinguono in:

- *riconoscimento enzimatico*;
- *riconoscimento di affinità*.

A quest'ultimo gruppo si ascrive il *riconoscimento immunologico* che dà origine ai cosiddetti immunosensori;

- *metodi basati su ibridazione di acidi nucleici*; per esempio DNA per il riconoscimento di sequenze oligonucleotidiche specifiche che danno luogo a sensori ad acidi nucleici, o riconoscimenti basati su sistemi biomimetici quali quelli che utilizzano gli aptameri, acidi nucleici selezionati in vitro con opportune tecniche specifiche per determinate sostanze, ed infine, sistemi basati su polimeri a stampo molecolare (*MIP, Molecular Imprinted Polymers*).

Quindi, in generale, i biosensori si classificano in: biosensori catalitici, biosensori di affinità, label-free e label-bound.

- I *biosensori catalitici* utilizzano bio-componenti in grado di riconoscere molecole e di trasformarle in prodotti attraverso una reazione chimica.
- I *biosensori di affinità* sfruttano le specifiche capacità di una molecola di legarsi specificatamente all'elemento di bioriconoscimento.
- I *biosensori label-free* sfruttano ogni cambiamento che avviene nelle intrinseche proprietà ottiche delle biomolecole come risultato dell'interazione con l'analita di riferimento. I cambiamenti possono avvenire in polarizzazione, assorbanza, emissione.
- I *biosensori ottici label-bound* utilizzano sonde fluorescenti; le biomolecole devono essere "marcate" con sonde fluorescenti prima di essere utilizzate nella costruzione del biosensore.

Il sistema piezoelettrico (basato su QCM) ed il sistema ottico BiacoreXTM (basato sull'SPR) sono entrambi sistemi label-free and real time che permettono importanti applicazioni in chimica analitica. Entrambi i sistemi sono stati, inoltre, utilizzati molto recentemente nel contesto delle prove di crescita delle amiloidi (*Aguilar et al., 2005; Buell, Dobson, et al., 2010; Cheng et al., 2012; Gobbi et al., 2010; Kotarek et al., 2008; Kraziński et al., 2011; Ogi et al., 2011; Ryu et al., 2008; Stravalaci et al., 2011; Xia et al., 2010; Zhang et al., 2011*).

Di seguito verranno introdotti i principi di funzionamento di questi due trasduttori per poi entrare nelle specifiche applicazioni relative allo studio di aggregazione delle fibrille amiloidi.

1.3.2. QCM (Quartz Crystal Microbalance = Microbilancia al Cristallo di Quarzo)

Questo biosensore piezoelettrico è un biosensore di tipo gravimetrico e label-free.

I cristalli piezoelettrici sono anche noti con il termine “microbilance” a causa della relazione di proporzionalità tra la massa complessiva del metallo e la variazione nella frequenza di risonanza, osservata quando la massa è depositata sul cristallo stesso, descritta dall’equazione di Sauerbrey, come di seguito descritto.

Nel 1880 i fratelli Pierre e Jacques Curie scoprirono l’effetto piezoelettrico: applicando uno stress meccanico alla superficie di vari cristalli (cristallo di Rocca, tormalina, quarzo,...) si generava un potenziale elettrico nel cristallo, con una intensità proporzionale allo stress.

Ogni materiale piezoelettrico quando viene deformato meccanicamente genera un campo elettrico, e quando un campo elettrico esterno è applicato ad un materiale piezoelettrico, esso subisce una deformazione meccanica.

I biosensori piezoelettrici sono quindi dei biosensori che sfruttano il fenomeno della piezoelettricità.

Il termine “*piezoelettrico*” deriva dalla parola greca *piezen* che significa “*premere*”.

Il segnale che si misura è dovuto alla variazione della frequenza di oscillazione di un cristallo piezoelettrico in risposta all’avvenuto legame tra l’analita e la sonda biologica sulla superficie del cristallo opportunamente modificata.

All’interno del cristallo sono presenti sia ioni di carica positiva che ioni di carica negativa; essi si separano in seguito ad una distorsione o alla pressione meccanica, provocando la separazione dei baricentri delle cariche e la formazione di dipoli elettrici che polarizzano il cristallo. In questo modo viene spiegato l’effetto della piezoelettricità.

Ogni cristallo piezoelettrico possiede una caratteristica frequenza di oscillazione (frequenza di risonanza) che dipende da vari fattori:

- dalla posizione degli elettrodi;
- dalla simmetria del cristallo;
- dalla struttura chimica;
- dall’angolo di taglio rispetto gli assi di simmetria.

Il prerequisito per il verificarsi della piezoelettricità nei cristalli è la presenza di un centro di inversione.

Esistono diversi tipi di cristalli che mostrano piezoelettricità, ma solo il quarzo è l’unico che mostra le migliori proprietà meccaniche, elettriche, chimiche e termiche.

Il quarzo viene considerato un oscillatore ideale perché vibra con la minima dissipazione di energia.



Figura 1.11: quarzo bianco grezzo.

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati cristalli di quarzo con taglio cosiddetto AT, con una frequenza di 9,5 MHz. In questo particolare tipo di cristallo: le lamine di quarzo sono state tagliate con un angolo di $35^{\circ} 15'$ rispetto all'asse z e poste tra due elettrodi di oro, ottenuti mediante l'evaporazione del metallo sulla superficie di quarzo.

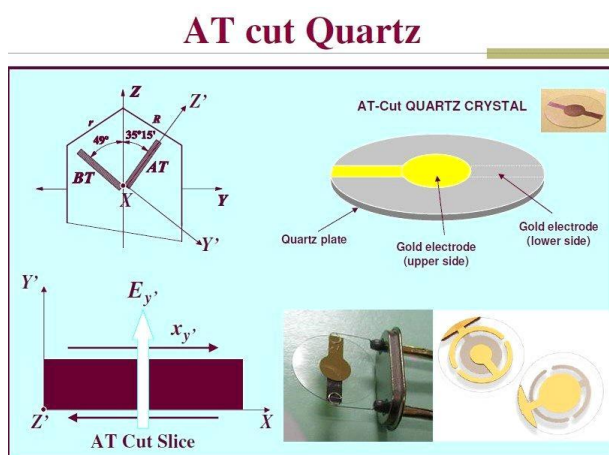


Figura 1.12: taglio AT del quarzo e sua posizione all'interno dell'elettrodo.

Esso ha un solo modo di vibrazione, definito TSM (*Thickness Share Mode* = scorrimento di spessore): le particelle si muovono in modo perpendicolare alla

direzione di propagazione dell'onda nella regione tra i due elettrodi (unica zona piezoelettricamente attiva) dove si registra la massima oscillazione.

Il quarzo è un minerale che presenta i seguenti vantaggi:

- basso costo;
- minimi difetti molecolari;
- facilità di ottenimento;
- insolubilità in acqua;
- inerzia chimica;
- mantenimento dell'effetto piezoelettrico fino a 579°C.

Il cambiamento di frequenza segue la Legge di Sauerbrey del 1959.

Legge di Sauerbrey

La Legge di Sauerbrey è un'equazione che descrive la relazione lineare tra la variazione di massa alla superficie del cristallo e la variazione della frequenza di risonanza del cristallo piezoelettrico.

La massa depositata (in maniera uniforme) non deve essere superiore al 10% del valore della massa del cristallo stesso, altrimenti non si verifica alcuna oscillazione e non si registra alcun segnale.

L'aumento della massa è proporzionale alla diminuzione della frequenza.

$$\Delta f = - 2,26 \times 10^{-6} F^2 \frac{\Delta m}{A}$$

Dove:

Δf rappresenta la variazione della frequenza espressa in Hertz (Hz);

$-2,26 \times 10^{-6}$ indica un fattore costante per il quarzo;

F^2 rappresenta la frequenza di risonanza del cristallo espressa in Hertz (Hz);

Δm rappresenta la variazione della massa espressa in grammi (g);

A rappresenta l'area dell'elettrodo espressa in centimetri quadrati (cm²).

La frequenza di risonanza fondamentale del cristallo è influenzata dallo spessore della lamina di quarzo, ed entrambi determinano il limite di sensibilità del dispositivo.

La maggior parte dei cristalli utilizzati ha una frequenza di risonanza che va dai 5 ai 15 Hz.

Ad esempio un cristallo con uno spessore di 330 μm ha una frequenza di risonanza di 5 MHz.

Utilizzando dei cristalli sottili con una frequenza di risonanza fondamentale maggiore si riesce ad aumentarne la sensibilità, ma contestualmente si aumenta il rumore strumentale.

In letteratura esistono molti esempi di cristalli sottili con uno spessore di 55 μm ed una frequenza di 30 MHz: lo spessore ridotto li rende inadatti poichè molto fragili (*Montagut et al., 2011*).

1.3.3. SPR (Surface Plasmon Resonance = Risonanza Plasmonica di Superficie)

La *Risonanza Plasmonica di Superficie* è una tecnica analitica che si basa sul fenomeno ottico dei plasmoni di superficie. Essi si ottengono ogni qual volta che un sottile strato di metallo (ad esempio l' Au) viene posto all'interfaccia di un dielettrico carico (costituito da un plasma di elettroni di conduzione).

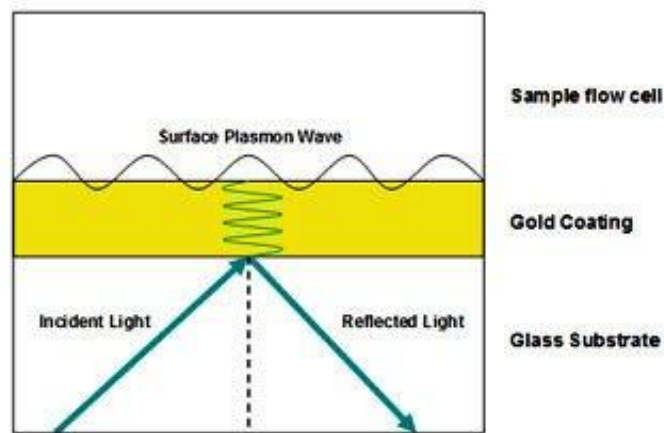


Figura 1.13: formazione di un Plasmonone di Superficie.

Il plasmonone di superficie (SP) è dovuto alla variazione di densità del plasma elettronico intorno al reticolo cristallino.

I Plasmoni di Superficie si definiscono attraverso due modi:

- 1) la propagazione di un'onda che ha una densità elettronica presente all'interfaccia di un sistema metallo-dielettrico;
- 2) la propagazione di un'onda elettromagnetica vincolata, all'interfaccia del sistema metallo dielettrico ed interpretabili tramite le quattro equazioni di Maxwell.

Questa tecnica consente di osservare in tempo reale le interazioni tra un analita in soluzione ed un ligando immobilizzato su un biosensore ed è molto utile per indagare i meccanismi di aggregazione di molte proteine e peptidi coinvolti in disordini di misfolding.

Il fenomeno della risonanza plasmonica di superficie avviene quando si verifica l'interazione tra un'onda elettromagnetica ed i plasmoni; la radiazione elettromagnetica ha un'energia ed una lunghezza d'onda tali da entrare in risonanza con i plasmoni, e può risuonare con un raggio di luce incidente con un certo angolo di incidenza, chiamata *angolo SPR*. La risonanza conduce all'estinzione della luce riflessa all'angolo SPR, spesso sopra l'angolo critico.

Il *biosensore* è costituito da un substrato di vetro (prisma) ricoperto da un film semi-trasparente di oro.

Questi biosensori reagiscono a cambiamenti direttamente proporzionali alle variazioni dell'indice di rifrazione all'interfaccia. Nei biosensori di affinità, la variazione del segnale risulta anche correlabile alla massa delle molecole legate alla superficie del sensore.

Nel sistema BiacoreXTM la superficie biosensibile costituisce il fondo di una cella a flusso di 10 nL. Un sistema di microfluidica mantiene costante un flusso di tampone al contatto della superficie biosensibile e consente di veicolare i campioni fino alla superficie del biosensore.

Quando la massa si accumula sul biosensore, l'indice di rifrazione alla superficie del biosensore varia e si osserva un aumento della risposta del biosensore, espressa in RU (Unità di Risonanza).

1 RU corrisponde a 10^{-6} unità di indice di rifrazione.

Durante la fase di dissociazione, quando il campione viene sostituito dal buffer nella cella a flusso, la massa decresce con una conseguente diminuzione della risposta in RU.

Dalle cinetiche di associazione e di dissociazione a diverse concentrazioni di analita, si possono calcolare le costanti di associazione k_a (on-rate) e di dissociazione k_d (off-rate) dell'interazione con il ligando immobilizzato, la costante di affinità KD e la stechiometria del legame.

Il segnale registrato viene riportato in un grafico, chiamato *sensorgramma*, come variazione dell'intensità del raggio riflesso o come variazione dell'angolo SPR in funzione del tempo.

Vantaggi ed applicazioni

Questa tecnica analitica, molto importante, permette di effettuare analisi (anche multiplex) in tempo reale, fornendo in questo modo molte informazioni relative alla stechiometria e alla termodinamica delle reazioni che avvengono, consentendo di determinare sia le costanti cinetiche che le costanti di affinità (anche per interazioni deboli). Inoltre, la sua elevata sensibilità dà modo di studiare l'interazione tra grandi e piccole molecole.

Tramite la Risonanza Plasmonica di Superficie è possibile determinare anche la concentrazione di un componente in una miscela ed effettuare screening di anticorpi, consentendo di studiare l'effetto del mezzo su un'interazione (pH, sali, additivi, ...). Di solito si studiano le seguenti interazioni:

- anticorpo-antigene;

- peptide-recettore;
- proteina-proteina;
- proteina-DNA;
- proteina-piccole molecole (<100Da);
- recettore di membrana-ligando.

Nel nostro caso abbiamo utilizzato l'SPR per studiare fenomeni di aggregazione delle fibrille e loro eventuale inibizione indotta dal Clioquinolo.

1.4. Stato dell'arte sullo sviluppo di biosensori per l'analisi di aggregazione di fibrille amiloidi

Per lo studio e l'analisi delle aggregazioni delle fibrille sono stati utilizzati diversi tipi di biosensori, soprattutto quelli di affinità e label-free.

Sensori di affinità e label-free sono stati utilizzati per rivelare la crescita delle fibrille e dei monomeri in real-time, tramite l'utilizzo del solo QCM (Buell, Dobson, et al., 2010; Buell, White, et al., 2010; Ogi et al., 2011; Kotarek et al., 2008; Kotarek et al., 2010;), della sola SPR (Brambilla et al., 2010; Fukuda et al., 2010; Ryu et al., 2008; Stravalaci et al., 2011; White et al., 2009; Xia et al., 2010;) o di entrambi (Cheng et al., 2012; Zhang et al., 2011;).

Un particolare tipo di biosensore, inoltre riportato per studiare i processi intermolecolari in strati sottili di superficie e la formazione di proteine fibrille su un supporto solido, è il microcantilever.

Un microcantilever è un trasduttore, un sistema nanometrico, avente la forma di un trampolino o di una leva, costituito da un supporto solido di oro o di silicio che vibra alla sua frequenza di risonanza. Vengono adoperati per la rivelazione delle interazioni tra proteina/proteina o di ibridazioni DNA/DNA.

Su uno di questi sensori viene depositata una proteina e se avviene il legame con un'altra proteina oppure un marker, avviene una deflessione del microcantilever che viene rilevata o da un laser (misura fisica) oppure produce un cambiamento di alcuni parametri elettrici rilevati da un transistor.

Kiselev et al., (2008) hanno utilizzato dei microcantilever accoppiati con un Microscopio a Forza Atomica per poter studiare l'immobilizzazione del lisozima (10mg/mL) (presente nel bianco d'uovo di una gallina) e l'aggregazione delle proteine fibrille su di esso. Le deflessioni del microcantilever sono state rilevate da un sensore laser ottico.

Nella letteratura scientifica sono presenti lavori riguardo l'applicazione di trasduttori piezoelettrici ed ottici per lo studio di fibrille dove si utilizzano sia sistemi gravimetrici (come il QCM) che sistemi ottici (come il BiacoreXTM, che sfrutta l'SPR).

In particolare, di seguito si descrive il tipo di sensore sviluppato e il relativo assetto sperimentale.

Buell, Dobson, et al. (2010) riportano il sistema QCM in cui il cristallo è stato dapprima funzionalizzato con il MUA (acido 11-mercapto-undecanoico) e per poter studiare l'aggregazione delle fibrille. Il sistema viene utilizzato in flusso e permette di seguire le interazioni specifiche non covalenti tra le fibrille, ed inoltre, l'eventuale aggregazione di queste con due coloranti: il CR (Congo Red) e la ThT (Tioflavina T). Gli esperimenti, inoltre, sono validati mediante tecniche di scattering, fluorescenza e microscopia AFM (Microscopio a Forza Atomica) per la visualizzazione degli aggregati. Si cerca anche un effetto inibitore dell'aggregazione delle fibrille da parte del CR (Congo Red).

Kotarek et al. (2008) hanno concentrato la loro attenzione sullo studio dell'immobilizzazione degli intermedi della proteina β -amiloide e della loro

crescita su un cristallo piezoelettrico (funzionalizzato con avidina), effettuando misure in flusso. Inoltre, l'esperienza è stata convalidata mediante tecniche di scattering e fluorescenza con la ThT (Tioflavina T).

Zhang et al. (2011) si sono focalizzati sullo studio degli effetti provocati dagli chaperoni sulla formazione delle fibrille e delle interazioni tra quest'ultime e le fibrille (formanti proteine), utilizzando misure piezoelettriche in flusso e misure di risonanza plasmonica di superficie. Queste interazioni sono state confermate da due tipologie di tecniche: la SEC (Cromatografia per ESclusione) e lo scattering.

Ogi et al. (2011) hanno studiato i processi di deposizione di peptidi $\alpha\beta$ 1-40 e $\alpha\beta$ 1-42 utilizzando un cristallo piezoelettrico funzionalizzato con l'alcantiuolo ed effettuando misure in flusso. Misure di fluorescenza con la ThT (Tioflavina T) e misure con l'AFM (Microscopio a Forza Atomica) sono state prova dell'effettivo depositarsi di questi peptidi.

Kumar et al. (2010) hanno scelto di studiare la teoria dei meccanismi di formazione delle fibrille amiloidi dovuti alle proteine, inerenti alla loro polimerizzazione (polimerizzazione a nucleazione-dipendente e sue caratteristiche, polimerizzazione isodesmica lineare) e alla formazione delle fibrille amiloidi (inizio, meccanismi di nucleazione e crescita, reazioni di polimerizzazione: partendo da proteine con una conformazione nativa o con una conformazione aperta o ripiegata si arriva a degli intermedi di reazione, chiamati oligomeri, dovute alle interazioni elettrostatiche ed idrofobiche, per poi ottenere alla fine le protofibrille amiloidi e le fibrille amiloidi mature)

tramite le seguenti tecniche: EPR (Risonanza Paramagnetica Elettronica), diffrazione a raggi x, spettroscopia NMR, proteolisi, spettroscopia di fluorescenza, FTIR (spettroscopia IR in Trasformata di Fourier), spettrometria di massa.

Minunni et al. (1994) riportano lo studio dell'adsorbimento di alcune proteine, immunoreazioni e reazioni di affinità tra antigeni immobilizzati covalentemente e anticorpi specifici monoclonali, impiegando il QCM costituito da un cristallo piezoelettrico trattato con NaOH e HCl.

Ryu et al. (2008) hanno concentrato la loro attenzione sullo studio dell'aggregazione delle fibrille amiloidi utilizzando come tecniche analitiche l'SPR, ed un chip funzionalizzato con il MUA. Gli aggregati sono stati osservati con uno Microscopio a Forza Atomica (AFM).

Fukuda et al. (2010) si sono focalizzati sullo studio della morfologia e della struttura secondaria degli aggregati $\alpha\beta$ (1-42) su diversi substrati e sulle interazioni di questi aggregati con zuccheri multivalenti impiegando la Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR) ed un chip trattato con i raggi ultravioletti ed ozono; e visualizzando gli aggregati con un Microscopio a Forza Atomica (AFM).

Buell, White, et al. (2010) hanno studiato l'aggregazione di proteine fibrille a diverse superficie utilizzando strategie di modificazioni via covalente come la crescita delle fibrille amiloidi, le modificazioni di quest'ultime sotto condizioni

acide e condizioni fisiologiche e l'elongazione delle fibrille con proteine monomeriche modificate. L'esperimento è stato condotto effettuando misure piezoelettriche statiche impiegando un chip funzionalizzato con il PEG (PoliEtilenGlicole), tiolo o la cisteina. Si è ricorso all'uso della spettrometria di massa per poter esaminare le fibrille amiloidi attivate che sono state dissociate o attraverso cambiamenti repentini del pH o immettendoli nel DMSO (dimetilsolfossido).

Kiselev et al. (2008) hanno scelto di studiare i processi intermolecolari in strati sottili di superficie e la formazione di proteine fibrille su un supporto solido, e le relative interazioni covalenti tra le proteine ed il silicone. Hanno adoperato dei trasduttori microcantilever (MCT) per poter immobilizzare le molecole di lisozima o sulla superficie d'oro dell'elettrodo o sul supporto in silicone.

White et al. (2009) riportano lo studio dei biosensori basati su saggi label-free sulla crescita di amiloidi e le misure della crescita delle amiloidi usando trasduttori meccanici, QCM e SPR.

Brambilla et al. (2010) hanno concentrato la loro attenzione sullo studio di nuovi metodi basati sull'Elettroforesi Capillare abbinata ad un sistema di rilevazione a Fluorescenza Indotta da Laser (CE-LIF) per monitorare le interazioni tra le nanoparticelle e il peptide β -amiloide. L'analisi è stata condotta utilizzando come tecnica analitica l'SPR per immobilizzare i monomeri $\alpha\beta$ (1-42) sul chip tramite la chimica dell'amino coupling.

Stravalaci et al. (2011) si sono focalizzati sullo studio delle cinetiche di elongazione e delle proprietà di legame del peptide $\alpha\beta_{1-42}$ amiloidogenico, sintetizzato con la tecnica depsi-peptide, impiegando l'SPR ed immobilizzando i monomeri $\alpha\beta_{1-42}$ e le fibrille sul chip tramite la chimica dell'amino coupling.

In questo *lavoro di tesi* è stata studiata l'aggregazione di fibrille amiloidi $\alpha\beta_{1-42}$ su superfici d'oro opportunamente modificate, utilizzando sia un sistema gravimetrico (QCM) sia un sistema ottico (BiacoreXTM, basato sull'SPR).

Per il QCM è stato adoperato un chip costituito da un cristallo piezoelettrico al quarzo costituito da due dischetti d'oro, funzionalizzato con il MUA.

Per il BiacoreXTM è stato adoperato un chip formato da un sottile strato di vetro sul quale l'oro vi è vaporizzato, anch'esso funzionalizzato con il MUA.

Con il termine "funzionalizzare" si indicano quei trattamenti chimici che si effettuano sulle superfici dei chip, per ottenere dei gruppi funzionali tali da poter essere impiegati per l'immobilizzazione successiva di biomolecole.

Sono state studiate le interazioni covalenti tra il tiolo ed il peptide (crescita tramite l'aggregarsi di monomeri) e l'eventuale inibizione da parte del Clioquinolo.

2° CAPITOLO

MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati effettuati alla temperatura di 25°C (temperatura regolabile negli strumenti), mentre la preparazione dei reagenti a temperatura ambiente.

❖ STRUMENTAZIONE

➤ 2.1. APPARATO STRUMENTALE DEL QCM

2.1.1. Cristallo piezoelettrico

Durante il tirocinio, in laboratorio, sono stati effettuati diversi esperimenti, utilizzando dei cristalli piezoelettrici costituiti dal quarzo.

Essi sono stati acquistati sia presso la ditta Mistral (Latina, Italia) che presso l'Elbatech (Livorno, Italia).

Sono di forma circolare, con un diametro di 14 mm e con uno spessore di 165 μm .

La frequenza di risonanza fondamentale è di 9,5-10 MHz.

Tenendo conto della Legge di Sauerbrey, la variazione di frequenza legata alla differenza di massa risulta essere pari a 452 Hz/ μ g.

1 Hz equivale a 2,2 ng.

Su ciascuna faccia del cristallo (complessivamente ne ha due) è presente uno strato di lega Ni-Cr, spesso 100 Å, che permette all'oro di aderire su di esso, dopo esser stato depositato per evaporazione sotto vuoto. L'oro ha una purezza del 999,99%.

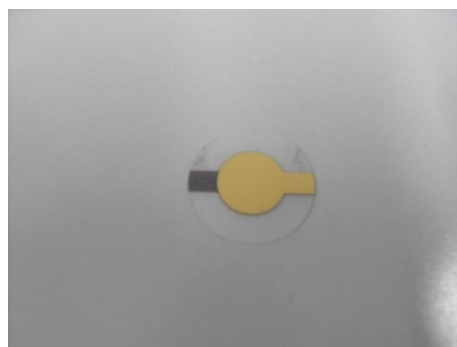
I due dischetti d'oro hanno ciascuno un'area di 42,6 mm², un diametro di 7,4 mm ed uno spessore di 900 Å; gli elettrodi d'oro vengono collegati a dei contatti di acciaio, che devono essere mantenuti sempre asciutti per non sfalsare l'analisi (ad esempio: problemi con la stabilizzazione).



a)



b)



c)



d)

Figura 2.1: *cristallo piezoelettrico.*

- a) *Custodia protettiva contenente il cristallo piezoelettrico.*
- b) *Quarzo inserito tra gli elettrodi d'oro + contatti in acciaio.*
- c) *Quarzo inserito tra gli elettrodi d'oro.*
- d) *Contatti in acciaio*

2.1.2. Cella

Nelle misure piezoelettriche i cristalli piezoelettrici utilizzati si inseriscono in opportune celle di misura costruite in metacrilato.

Il metacrilato (di metile) è una materia plastica molto duttile; la sua grande trasparenza supera quella del vetro; viene venduto anche colorato. È molto resistente, inerte agli agenti chimici e ai raggi UV.

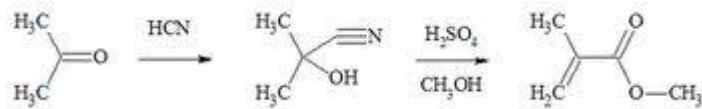


Figura 2.2: *sintesi del metacrilato (di metile).*

Si possono effettuare misure statiche o misure in flusso, utilizzando rispettivamente la parte superiore o inferiore della cella.

La trasparenza della cella permette di verificare la presenza o meno di anomalie all'interno del pozzetto, come ad esempio: la linea della soluzione non perfettamente orizzontale o il depositarsi di gocce di soluzione sulle pareti,

nelle analisi eseguite in modo statico; o la presenza di bolle d'aria nel condotto, nelle analisi eseguite in flusso.

Al fine di ottenere un corretto funzionamento dell'apparecchiatura, due o-ring in gomma mantengono il cristallo piezoelettrico nella posizione corretta ed isolano i contatti elettrici dal liquido presente nel pozzetto.

Durante l'analisi solo una faccia del cristallo piezoelettrico viene a contatto con la soluzione, mentre l'altra rimane a contatto con l'aria; e successivamente anch'essa può essere utilizzata, capovolgendo il cristallo, ed assicurandosi di asciugare l'altra parte, che non verrà più adoperata, se non dopo un accurato lavaggio.

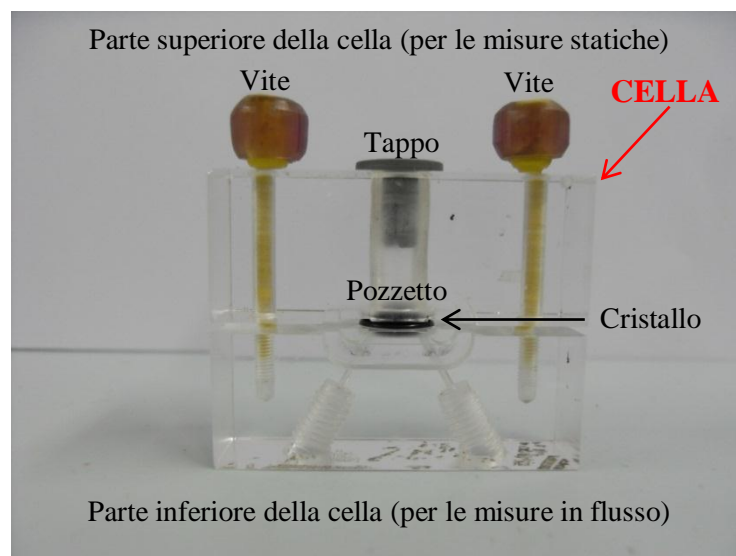


Figura 2.3: cella di metacrilato (di metile) per le misure piezoelettriche.

La cella viene collegata ad un analizzatore per cristalli di quarzo, descritto di seguito.

2.1.3. QCA (*Quartz Crystal Analyzer = Analizzatore per Cristalli di Quarzo*)

L'analizzatore per cristalli di quarzo è uno strumento atto a monitorare le variazioni di frequenza, in continuo.

Per le misure è stato utilizzato l'analizzatore QCA922 della Seiko EG&G (Chiba, Giappone).

La cella, una volta collegata allo strumento, è stata poi inserita in una scatola di polistirolo, per isolarla da correnti d'aria, dotata di un coperchio anch'esso in polistirolo, rimovibile durante il corso degli esperimenti.

Il software utilizzato per la registrazione del segnale è "WinEchem[®]".

L'analizzatore per cristalli di quarzo viene collegato ad un computer compatibile, tramite una porta seriale, ed invia alla periferica collegata il valore della frequenza che si registra ogni secondo.

Il software (acquisizione dati) "WinEchem[®]" consente la registrazione dei valori della frequenza di oscillazione del cristallo (in un intervallo di tempo di 2000 secondi) e mostra diverse informazioni in tempo reale dell'analisi in corso:

- un grafico, che può essere impostato come valori della frequenza (in Hz) vs tempo (in secondi); oppure valori della frequenza (in Hz) vs numero di acquisizioni;
- il valore medio delle 10 misure effettuate;
- la deviazione standard degli ultimi 10 valori.

La scala delle frequenze viene impostata dall'operatore: in questo caso si ha una scala di 9.500.000 Hz.

Il software non permette l'elaborazione diretta dei dati, quindi è necessario importare i file con i dati ottenuti nel programma di calcolo "Microsoft Excel[®]".



Figura 2.4: cella + QCA + computer.

➤ **2.2. APPARATO STRUMENTALE basato sulla tecnica SPR: il**

BiacoreX™

Lo strumento utilizzato è stato il BiacoreX™ (General Electric Healthcare Bio-Science AB; Uppsala, Svezia).

2.2.1. BiacoreX™

Il BiacoreX™ è uno strumento che lavora in modo semiautomatico, sfruttando la Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR).



Figura 2.5: BiacoreX™.

Esso è costituito dalle seguenti parti:

- a) una parte ottica;
- b) una microfluidica (IFC);
- c) un sensor chip;
- d) un'interfaccia elettronica collegata ad un computer (che ne elabora e ne registra il segnale sottoforma di un sensorgramma) tramite l'uso del software "BiacoreX Control Software®".

a) Parte ottica

La parte ottica è composta da un diodo LED (che emette nel vicino IR) e che funge da sorgente monocromatica polarizzata, da un prisma (coinvolto nel fenomeno della rifrazione) e da un detector che focalizza e collima il fascio luminoso, misurando le variazioni dell'indice di rifrazione.

Durante la fase di misura, questa parte ottica è fissata sul sensor chip (lato del vetro). Questa viene definita *fase di docking*. Successivamente si può misurare una curva plasmonica.

Il raggio, monocromatico ($\lambda = 635 \text{ nm} = \text{colore rosso}$) e polarizzato, viene focalizzato all'interfaccia oro-prisma, in un intervallo fisso di angoli di incidenza.

b) Microfluidica (IFC = Integrated micro Fluidics Cartridges)

La microfluidica (IFC) è costituita da una cartuccia al cui interno sono presenti sia il sistema di formazione della microcella di misura sul chip sia due microcanali. Essa si suddivide in un loop di carico del campione (dove il buffer scorre solo in fase di misura) e in loop che mantiene le celle sempre in flusso.

Il flusso è deviato alle celle, dopo la fase di caricamento del campione.

Delle microvalvole pneumatiche permettono lo scambio automatico del tragitto del campione.

In fase di docking (dopo inserimento del chip nello strumento), l'IFC si dispone sul chip (lato dell'oro), formando su di esso due microcelle di misura.

Lo strumento è in grado di generare sulla superficie del chip due celle (fc1 e fc2), poste in serie tra loro, con la possibilità di usarne una alla volta o entrambe.

È presente un termostato che garantisce una precisione di 0,01°C.



Figura 2.6 : cartuccia IFC.

Utilizzando una siringa Hamilton da 500 μ L e scegliendo la velocità di flusso, si può iniettare il buffer di corsa nella microfluidica e in modo automatico.



Figura 2.7: siringa Hamilton.

c) **Sensor chip** : chip con superficie d'oro.

Questo chip, di forma quadrata, è formato da un sottile strato di vetro sul quale è vaporizzato l'oro (SIA Au Kit Chip, General Electric Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Svezia); prima di essere introdotto all'interno del BiacoreX™, il chip viene funzionalizzato ed immesso in un supporto.



1) 2) 3)

Figura 2.8 : SIA Au Kit.

1) *Supporto per l'inserimento del chip nello strumento.*

2) *Supporto del chip.*

3) *Serie di chip d'oro da funzionalizzare.*

d) **Software registrazione ed elaborazione dati**

Il segnale SPR si registra in un grafico, chiamato *sensorgramma*: si mostra il valore del segnale (espresso in RU) vs tempo.

Per registrare ed elaborare i dati si utilizza il software “BiacoreX Control Software®”.

Oltre allo strumento QCM ed al BiacoreX™, è stato utilizzato un Thermomixer Comfort della Eppendorf (Hamburg, Germania), adoperato per l'incubazione delle fibrille.

❖ REAGENTI

Sono stati impiegati i seguenti reagenti:

- **H₂O**: *acqua Milli-Q*.
- **H₂O₂**: *acqua ossigenata (o perossido di idrogeno) al 35%*, (Merck, Darmstadt, Germania).
- **NH₃**: *ammoniaca al 28%*, (VWR, Milano, Italia).
- **Soluzione Piranha**: costituita da *acqua Milli-Q + acqua ossigenata al 35% + ammoniaca al 28%*, nella proporzione 5 : 1 : 1.

(Bisogna prestare molta cautela, perché oltre ad essere una soluzione molto corrosiva, può esplodere quando viene miscelata a composti organici).
- **Soluzione tampone o buffer**: costituito da 50 mM di PBS (Phosphate Buffered Saline = Tampone Fosfato Salino) e 100 mM di NaCl, pH 7,4.

- **MUA** = acido 11-mercapto-undecanoico ($C_{11}H_{22}O_2S$). Fornito dalla Sigma-Aldrich (USA).

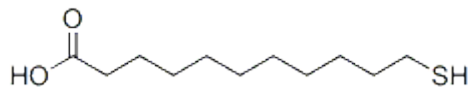


Figura 2.12: formula di struttura del MUA.

- **Etanolo** (C_2H_6O) al 96%, (Fluka, Brasile).
- **NHS** = *N*-idrossisuccinimide ($C_4H_5NO_3$), (Fluka, Milano, Italia).

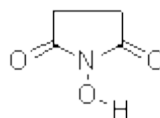


Figura 2.14: formula di struttura della NHS.

- **EDAC** = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide ($C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$), (Calbiochem, Slovacchia).
- **EA**: etanolamina o 2-amminoetanolo (C_2H_7NO), (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

Si prepara una soluzione acquosa 1M, portata a pH 8,6 e conservata in frigo a 4°C.

- **HCl**: acido cloridrico, (Merck, Darmstadt, Germania).

- **DMSO** = dimetilsolfossido (C_2H_6OS), (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).
- **CQ** = clioquinolo = 5-cloro-7-iodo-8-idrossichinolina (C_9H_5ClINO):
fornito dalla Sigma-Aldrich (Sant Louis, Missouri). Viene conservato in frigorifero alla temperatura di 4°C.

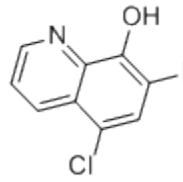


Figura 2.18: formula di struttura del CQ.

Esclusivamente per il BiacoreXTM:

- **Tampone di corsa: HBS-EP** (a pH 7,4).

Questo tampone, filtrato e degasato prima dell'uso, ha la seguente composizione:

- **HEPES** = acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinil-etansolfonico ($C_8H_{18}N_2O_4S$), 0,01M, fornito da Fluka, Milano, Italia.
- **NaCl** = cloruro di sodio, 0,15M, (Merck, Darmstadt, Germania).
- **EDTA** = acido etilendiamminotetraacetico: è un sale disodico diidrato (99%), 3mM, (Merck, Darmstadt, Germania).

- **Surfattante P20**, 0,005% in peso, (Polyoxyethylen-sorbitan monolaurate), (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

- **Tampone di immobilizzazione:** *tampone acetato*, costituito da acido acetico 10 mM + acetato di sodio (triidrato) 10 mM, portato a pH 5, usando l'NaOH.

❖ CAMPIONI

Come campione da analizzare è stato utilizzato il *peptide umano amiloide $\alpha\beta$ (1-42)* acquistato dalla EMD Chemicals Incorporated (Gibbstown, New Jersey).

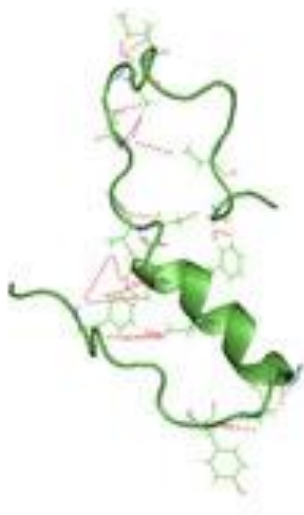


Figura 2.23: immagine del peptide umano amiloide $\alpha\beta$ (1-42).

Il campione, contenuto in una fiala, viene conservato nel frigorifero ad una temperatura di -20°C .

Si ha a disposizione una quantità pari a 25 mg (P.M.=4515 g/mol).

Dapprima sono preparate due aliquote del peptide:

utilizzando due provette se ne preparano due aliquote: dissolvendo il campione in 110 μL di DMSO ottenendo una *soluzione madre* 55 μM .

Le provette sono state poi ricoperte di uno strato di foglio di alluminio per evitare la fotodegradazione.

Da una delle due soluzioni madre sono state ottenute più *soluzioni a concentrazione di 20 μ M*, utilizzando come solvente il buffer (PBS+NaCl), da utilizzare per diversi scopi:

1) per ottenere degli aggregati chiamati *fibrille amiloidi*: una soluzione 20 μ M viene incubata alla temperatura di 37°C, per 24 ore e sotto costante agitazione (800 rpm); dopo il periodo di incubazione queste fibrille amiloidi vengono conservate in frigo alla temperatura di -20°C fino all'uso.

2) per ottenere le soluzione dei monomeri (a diversa concentrazione): un'altra soluzione 20 μ M viene utilizzata per ottenere diverse concentrazioni di monomeri e poi queste vengono conservate nel frigorifero ad una temperatura di 4°C e vengono sonicate per 5 minuti (per ottenere dei frammenti più piccoli) prima di essere impiegate nella analisi.

La *sonicazione* o *cavitazione* è una tecnica che consiste nell'ottenere dei frammenti di massa molecolare uniforme o anche di velocizzare la dissoluzione dei soluti in determinati solventi, sottoponendo un campione all'azione degli ultrasuoni, provocandone la lisi.

Come *inibitore* è stato utilizzato il *clioquinolo* (CQ); esso si presenta sotto la forma di una polvere.

Sono state preparate soluzioni di CQ a diverse concentrazioni, utilizzando come solvente l'etanolo al 96%.

2.3. ANALISI CON IL QCM

Prima di avviare l'esperimento con il QCM ed impiegare le tecniche di immobilizzazione, è necessario effettuare diverse operazioni preliminari:

- la detersione accurata del cristallo piezoelettrico;
- la funzionalizzazione del cristallo piezoelettrico;

Detersione del cristallo piezoelettrico (da svolgere sotto cappa)

Un cristallo piezoelettrico viene prelevato dalla sua confezione originale e viene sottoposto ad una pulizia accurata per poter eliminare contaminazioni dovute alla manipolazione umana ed esposizione all'aria, che potrebbero adsorbirsi sull'oro, formando uno strato idrofobico e impedendo così agli atomi di zolfo di entrare in contatto con l'oro e di formare un film tiolico ben organizzato e stabile.

All'interno di un becker si prepara una soluzione ossidante costituita da: acqua purificata Milli-Q + acqua ossigenata al 35% + ammoniaca al 28%, nella proporzione 5 : 1 : 1.

Il cristallo viene rimosso dai suoi contatti, immerso nella soluzione ossidante portata poi ad ebollizione per 10 minuti, ponendo il becker sopra una piastra riscaldante; dopo il tempo trascorso, il cristallo viene sciacquato con acqua Milli-Q ed immerso in un becker riempito di etanolo al 96%, coperto con del parafilm e al riparo della luce, per 1 ora.

Funzionalizzazione del cristallo piezoelettrico

Il cristallo piezoelettrico viene "funzionalizzato", cioè, sottoposto a trattamenti chimici tali da realizzare sulla superficie determinati gruppi funzionali, utilizzati per l'immobilizzazione di biomolecole condotta successivamente.

Preparazione del MUA

La soluzione di MUA viene preparata al momento del suo utilizzo; deve essere fresca per evitare la formazione di disolfuri.

Con l'ausilio di una bilancia analitica si pesano 6 mg di MUA che vengono immessi in un becker contenente 30 mL di etanolo al 96%.

Deposizione (o immobilizzazione) del tiolo

Si preleva il cristallo piezoelettrico (dal precedente becker) e lo si immerge nella soluzione del MUA.

Si copre il becker utilizzando del parafilm, si lascia il tutto al buio per prevenire eventuale fotodegradazione e si aspetta per un tempo pari a 48 ore per permettere la formazione del SAM.

Un SAM (*Self Assembling Monolayer* = *monostrati spontaneamente organizzati*) è un tipo di aggregazione molecolare che si ottiene immergendo un substrato in una soluzione (di solito un solvente organico) di un composto a catena alifatica.

Il gruppo SH del tiolo reagisce rapidamente con l'Au del cristallo piezoelettrico e si ancora al substrato tramite l'atomo di zolfo.

Il COOH del tiolo, invece, si lega al gruppo amminico primario $-NH_2$ del peptide.

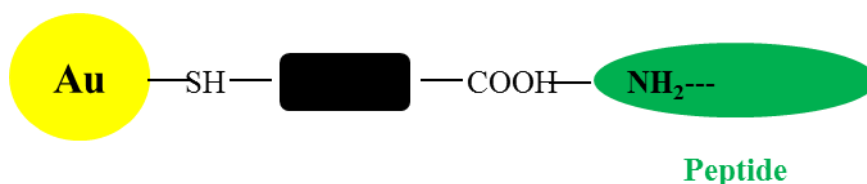


Figura 2.24: adsorbimento tra l'oro ed il tiolo e legame covalente tra il tiolo ed il peptide.

Tecniche di immobilizzazione (statiche)

Trascorse 48 ore si toglie il cristallo piezoelettrico dal becker contenente il MUA, lo si asciuga nella parte più esterna con della carta assorbente per rimuovere l'eccesso di soluzione; poi esso viene alloggiato nei suoi contatti, ripristinando così il contatto elettrico con gli elettrodi vaporizzati di oro su entrambe le facce.

Il passo successivo è il montaggio della cella, operazione molto delicata e di fondamentale importanza.

Il cristallo piezoelettrico viene posto tra due o-ring di gomma e poi racchiuso tra le due parti (una superiore ed una inferiore) della cella di misura, tenute insieme da due viti. In questa delicata fase bisogna fare attenzione a non avvitare troppo (per evitare il rompersi del cristallo piezoelettrico) né troppo poco (per evitare la fuoriuscita della soluzione presente nel pozzetto).

Dopo l'inserimento del cristallo piezoelettrico nella cella, essa viene collegata ad un analizzatore per cristalli di quarzo, e quest'ultimo ad un computer.

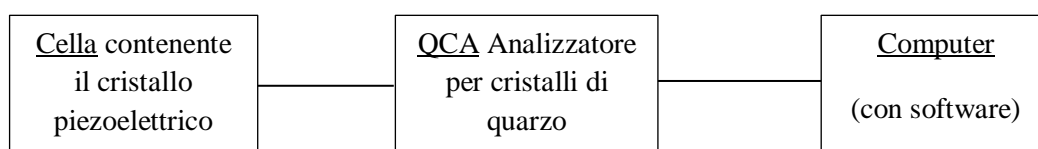


Figura 2.25: diagramma a blocchi delle apparecchiature in uso nell'analisi con il QCM.

Dopo aver montato il tutto, è possibile cominciare l'acquisizione del segnale.

Procedura per l'immobilizzazione delle fibrille amiloidi sonicate e successiva valutazione della loro aggregazione in presenza o meno dell'inibitore

Per introdurre e togliere le varie soluzioni è stata utilizzata una micropipetta e puntali usa e getta.

Come prima operazione si accendono sia il QCA che il computer, avviando anche il software "WinEchem[®]" per la registrazione del segnale (frequenza vs tempo oppure frequenza vs numero di acquisizioni).

All'interno del pozzetto della cella si introducono 100 µL di buffer (PBS+NaCl) e si aspetta che il segnale si stabilizzi (questa fase iniziale può richiedere alcune ore), registrando poi il valore della frequenza.

Dopo aver tolto il buffer, si introducono 100 µL di una soluzione costituita da 5,8 mg di NHS in 1 mL di H₂O + 38,3 mg di EDAC in 1 mL di NHS per poter attivare il gruppo carbossilico –COOH sulla superficie d'oro e si fanno trascorrere 15 minuti.

Dopo aver registrato nuovamente il valore della frequenza, si può togliere la miscela dal pozzetto della cella ed introdurre 100 µL della soluzione di fibrille amiloidi sonicate a concentrazione 10 µM.

Trascorsi 30 minuti le fibrille sonicate vengono tolte ed il pozzetto viene lavato con il buffer per rimuovere i legami non- specifici della proteina.

Dopo questo lavaggio si possono introdurre 100 µL di EA [1 M] per bloccare i siti attivi disponibili per i legami con le ammine primarie e dopo 15 minuti si può registrare il valore della frequenza.

Togliendo l'EA, il pozzetto viene lavato con il buffer e si introducono 100 µL di buffer per ristabilizzare il segnale e registrandone la frequenza.

Adesso si possono introdurre le soluzioni dei monomeri (con o senza inibitore) e poi solo l'inibitore; registrando sempre il valore della frequenza si può cercare di capire se essi si attaccano tra di loro, formando dei polimeri, e vedere se l'inibitore esplica la sua funzione o meno.

A questo punto dell'esperimento si possono introdurre 100 μL di della soluzione del monomero [2 μM] all'interno del pozzetto della cella e dopo 50 minuti si può registrare il valore della frequenza.

Dopo aver tolto questa soluzione di monomero si può utilizzare il buffer prima per lavare il pozzetto e poi se ne introducono 100 μL per ristabilizzare il segnale.

Si eseguono tutte queste operazioni per ben tre volte, in modo tale da avere una media del valore della frequenza.

Si opera allo stesso modo con l'introduzione delle soluzioni dell'inibitore (Clioquinolo).

2.4. ANALISI CON IL BiacoreX™

Il sensor chip viene dapprima lavato con la stessa tecnica descritta sopra (detersione del cristallo piezoelettrico) e poi funzionalizzato (deposizione o immobilizzazione del tiolo).

Il sensor chip così trattato viene immesso nel suo supporto e montato nello strumento.

Si avvia il software “BiacoreX Control Software®” per la registrazione non solo del sensorgramma, e si registrano le varie operazioni che vengono effettuate.

Il campione viene iniettato nel loop di carico tramite l'utilizzo di una micropipetta.

All'inizio è l'operatore stesso che comanda l'iniezione, ma poi tutto funziona in automatico, cioè lo strumento devia il flusso del buffer nel loop, portando il campione nelle celle di misura (fc1, fc2 o entrambe).

Il volume della soluzione di analita da iniettare in cella è determinato sia dalla velocità del flusso che dal tempo di contatto tra la superficie del sensor chip e la soluzione.

L'operatore decide il tempo di contatto che viene poi gestito dallo stesso strumento.

Le istruzioni dello strumento affermano che l'iniezione debba essere pari ad un volume di campione circa 20 µL in eccesso (come minimo) e che bisogna aggiungere alla coda del puntale della micropipetta delle bolle di aria alternate da

piccole quantità di campione, in modo tale da evitare una diluizione del nostro campione.

Il tampone di corsa è l' HBS-EP: si aspetta per qualche ora affinché il segnale (RU vs tempo) diventi stabile nel sensorgramma. Esso viene fatto fluire all'interno dello strumento dopo un'iniezione e l'altra.

Procedura di immobilizzazione delle fibrille

Qui di seguito sono riportate le soluzioni e la procedura impiegate negli esperimenti con l' SPR, indicando anche la velocità di flusso ed i tempi di contatto:

- NHS/EDAC: viene iniettato un volume pari a 35 μL con un flusso di 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ per 7 minuti.
- FIBRILLE AMILOIDI SONICATE: viene iniettato un volume pari a 90 μL con un flusso di 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ per 30 minuti.
- EA: viene iniettato un volume pari a 80 μL con un flusso di 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ per 10 minuti.
- MONOMERO (per tre volte distinte, affinché si possa stimare una media): se ne inietta un volume pari a 130 μL con flusso di 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ per 50 minuti.

INIBITORE (per tre volte distinte, affinché si possa stimare una media): viene iniettato un volume pari a 130 μL con un flusso di 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ per 50 minuti.

3° CAPITOLO

RISULTATI RELATIVI ALL'ANALISI PER LO STUDIO DELL'IMMOBILIZZAZIONE E DELL'AGGREGAZIONE DELLE FIBRILLE AMILOIDI OTTENUTI CON IL QCM

3.1. Immobilizzazione delle fibrille amiloidi

Dopo aver funzionalizzato il cristallo piezoelettrico con il MUA (acido 11-mercapto-undecanoico), iniziano le fasi di ottimizzazione di questo biosensore, in cui si variano diversi parametri, per poter ottenere le migliori condizioni operative alle quali si riesce ad ottenere una buona immobilizzazione delle fibrille amiloidi sul chip.

Si sono effettuate anche delle prove in cui sono state adoperate le soluzioni delle fibrille amiloidi sonicate e non sonicate, prima di venir usate nell'esperimento.

I parametri studiati, invece, che sono stati cambiati durante l'analisi con il QCM sono stati: la *concentrazione* delle soluzioni delle fibrille amiloidi ed il relativo *tempo* di incubazione.

3.1.1. Ottimizzazione dell'immobilizzazione delle fibrille amiloidi

Le soluzioni delle fibrille amiloidi (a diversa concentrazione) che sono state precedentemente preparate, vengono conservate in frigorifero alla temperatura di -20°C fino al loro uso.

È stato notato che usando le soluzioni di fibrille sonicate e non sonicate, si verificano due diversi comportamenti che sono stati registrati nel sensorgramma.

Utilizzando una soluzione di fibrille amiloidi [15 µM] non sonicata si è osservato un incremento del valore della frequenza di risonanza nel sensorgramma; ciò vuol dire che le fibrille amiloidi non si sono immobilizzate sul chip.

È stata ottenuta una frequenza di immobilizzazione pari a: $\Delta F = + 27 \text{ Hz}$.

Viceversa, utilizzando una soluzione di fibrille amiloidi [15 µM] precedentemente sonicate per 5 minuti, prima della loro immissione nel pozzetto della cella, si è osservato una diminuzione del valore di frequenza di risonanza nel sensorgramma; quindi vuol dire che le fibrille amiloidi si sono immobilizzate sul chip. È stata ottenuta una frequenza di immobilizzazione pari a: $\Delta F = - 47 \text{ Hz}$.

Tutto ciò lo si può visualizzare nel seguente grafico.

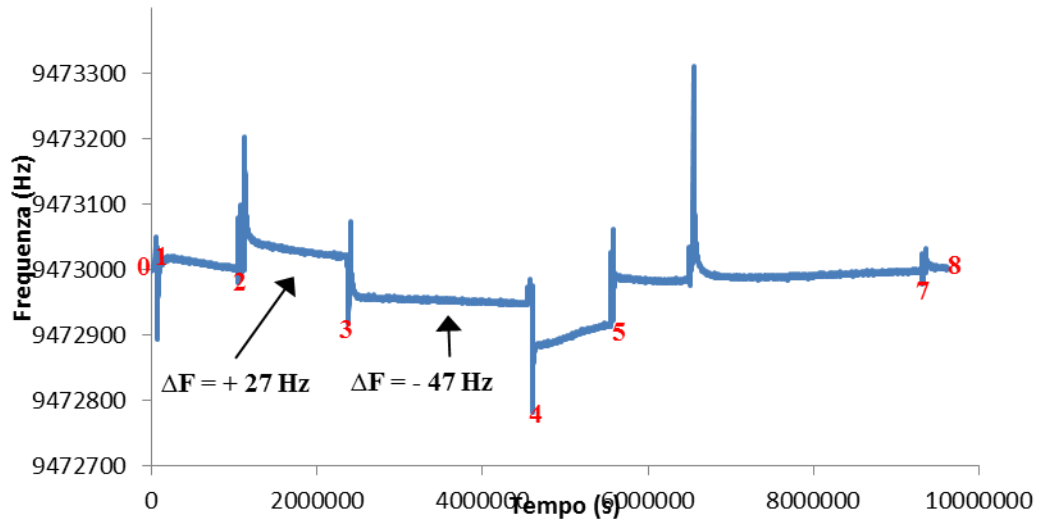


Grafico 3.1: prove di immobilizzazione con le fibrille amiloidi

non sonicate e sonicate.

In questo sensorgramma si individuano le diverse soluzioni che sono state introdotte di volta in volta (si ricorda che dopo che una soluzione viene immessa nel pozzetto, ed aspettando che trascorra il tempo di incubazione, la si toglie per utilizzarne successivamente un'altra): al punto **0** si ha già un segnale stabile del buffer (costituito da 50 mM di PBS (Phosphate Buffered Saline = Tampone Fosfato Salino) e 100 mM di NaCl, pH 7,4); da **1** a **2** si aggiungono 100 μ L di EDAC/NHS, per un tempo pari a 20 minuti; da **2** a **3** si effettua l'aggiunta di 100 μ L della soluzione di fibrille amiloidi [15 μ M] non sonicate, e si lasciano ad incubare per 30 minuti. Visto l'esito negativo, e per capirne il perché, si è subito scelto di introdurre una stessa soluzione, ma questa volta sonicata e con un lasso di tempo maggiore (35-40 minuti) (da **3** a **4**). Si è ottenuto un miglioramento relativo al valore della frequenza.

Dal numero **4** al numero **8** si è continuato ad introdurre successivamente prima l'EA (100 μ L per 15 minuti) e poi la soluzione del monomero ([2 μ M] per 45

minuti), ma si è ottenuto un non significativo, indice della non immobilizzazione delle fibrille sulla superficie del sensore.

3.1.2. Ottimizzazione della concentrazione delle fibrille amiloidi

Si sono preparate le seguenti soluzioni di fibrille amiloidi a diversa concentrazione: 30 μM , 15 μM e 10 μM .

Impiegando la soluzione di fibrille amiloidi a concentrazione 30 μM , per un tempo di incubazione di 30 minuti, si è osservato che si ottiene una scarsa immobilizzazione, con un ΔF molto basso, pari a - 10 Hz. Quindi si è testata la soluzione di fibrille amiloidi a concentrazione 15 μM osservando, invece, con lo stesso tempo di incubazione, si ottiene un notevole miglioramento sull'immobilizzazione, anche se molto lento e con relativa lenta stabilizzazione del segnale. In queste condizioni si è ottenuto un ΔF uguale a - 27 Hz.

Si è provato infine a diminuire ulteriormente la concentrazione delle fibrille, ovvero 10 μM : in questo caso si riesce ad ottenere non solo una buona frequenza di immobilizzazione ($\Delta F = - 50$ Hz), ma anche un segnale stabile dopo solo pochi minuti.

A questo punto, si è scelto di utilizzare come concentrazione ottimale quella 10 μM relativa alle soluzioni di fibrille per gli esperimenti con il QCM.

Questo comportamento delle fibrille durante la fase di immobilizzazione sulla superficie del sensore può essere spiegato dal fatto che a concentrazioni maggiori di 10 μM la densità delle fibrille sulla superficie e le interazioni

steriche tra le fibrille stesse siano tali da non permettere la loro immobilizzazione.

3.1.3. Ottimizzazione e studio del tempo di immobilizzazione delle fibrille

amiloidi

Il tempo di immobilizzazione delle fibrille sul sensore è un altro parametro importante da ottimizzare.

Buell, Dobson et al., 2010 nel loro lavoro proponevano di incubare per 30 minuti le fibrille amiloidi sonicate.

Queste condizioni sono state verificate, in più esperimenti, e si può confermare che trascorso questo tempo di incubazione si riesce ad ottenere un segnale stabile con relativa immobilizzazione delle fibrille amiloidi.

Si è provato anche ad aumentare i tempi di incubazione, effettuando le prove a 35-40 minuti di tempo di contatto delle fibrille con il sensore durante l'immobilizzazione. Anche in questo caso è stato ottenuto, come atteso, un delta di immobilizzazione in linea con il tempo di immobilizzazione di 30 minuti.

Questo tempo quindi è stato scelto per effettuare tutti i successivi esperimenti.

Usando tempi di immobilizzazione per le fibrille superiori a 40 minuti non si riesce ad ottenere un miglioramento dell'immobilizzazione delle fibrille perché tutta la superficie del sensore si è ormai saturata, le fibrille si sono già posizionate in tutta la superficie a disposizione.

3.2. Crescita delle fibrille sul chip (aggregazione dei monomeri)

Anche per quanto riguarda la crescita delle fibrille sul cristallo piezoelettrico (precedentemente funzionalizzato con il MUA ed immobilizzato con le fibrille amiloidi) ad opera dell'aggiunta dei monomeri, sono state ottimizzate sia le *concentrazioni* delle soluzioni dei monomeri che i relativi *tempi* di incubazione sulle fibrille.

3.2.1. Ottimizzazione della concentrazione delle soluzioni di monomeri da aggiungere per l'aggregazione

Sono state preparate le soluzioni di monomeri con le seguenti concentrazioni: 5, 3,3 e 2 μM .

Adoperando una soluzione di monomeri a concentrazione 5 μM (100 μL) è stato osservato, per più volte, che non si verifica alcuna aggregazione. Infatti, in seguito ad aggiunte di soluzione di monomero, sono state ottenute le seguenti frequenze: $\Delta F = + 34 \text{ Hz}$ e $\Delta F = + 443 \text{ Hz}$. È stata successivamente utilizzata una soluzione intermedia di monomero pari a 3,3 μM , però anche in questo caso non è stata osservata aggregazione dei monomeri, ottenendo un $\Delta F = + 11 \text{ Hz}$.

Utilizzando infine una soluzione 2 μM , si è potuto osservare, fin dalla prima prova, un buon risultato. Si è notato uno shift di frequenza pari ad $\Delta F = - 23 \text{ Hz}$ che indica l'avvenuta aggregazione da parte dei monomeri sul chip (vedere grafico 3.2).

La concentrazione ottimale per la soluzione dei monomeri è stata quella 2 μM .

Inoltre, è stato osservato che impiegando soluzioni di monomeri preparate all'istante, invece che riposte da più di 48 ore a 4°C, si ottengono migliori valori di ΔF , cioè, ottengo una quantità di monomero aggregato maggiore, fin dalla prima aggiunta.

3.2.2. Studio e ottimizzazione del tempo di incubazione dell'aggregazione dei monomeri

Per cercare di capire quale tempo di incubazione dei monomeri sulle fibrille potesse risultare quello ottimale, si sono eseguite diverse prove impiegando i seguenti tempi: 15-20 minuti, 30-45 minuti, 50-60 minuti.

Con un tempo di incubazione tra 15 e 20 minuti si ottiene un valore della frequenza di immobilizzazione molto basso, $\Delta F = - 3$ Hz, e si può dedurre che di conseguenza si sia aggregato poco monomero sulla superficie del chip.

Lo stesso discorso può venir fatto quando sono stati utilizzati tempi di incubazione tra 30 e 45 minuti. Si ottiene una aggregazione del monomero molto bassa, pari a - 6 Hz.

La questione cambia quando si fa trascorrere un lasso di tempo tra 50 e 60 minuti per l'incubazione e per l'ottenimento dell'aggregazione dei monomeri. Si ottengono valori delle frequenze di immobilizzazione significativi. È stato ottenuto un valore di $\Delta F = - 23$ Hz (vedere grafico 3.2).

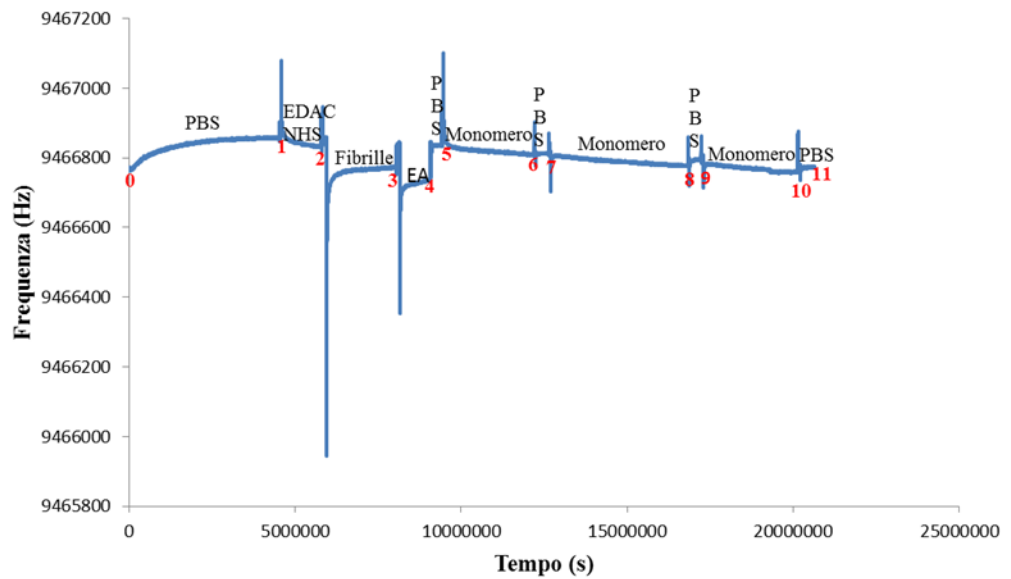


Grafico 3.2: sensorgramma relativo ad immobilizzazione e crescita delle fibrille e dei monomeri.

In questo sensorgramma si individuano le diverse fasi di lavoro sul sensore piezoelettrico, numerate da **0** a **11**, relative a: **0-1** stabilizzazione baseline con il buffer PBS, **1-2** attivazione con EDAC/NHS, **2-3** aggiunta delle fibrille sonicate, **3-4** disattivazione con EA, **4-5** buffer PBS per riprendere il valore della baseline dopo l'immobilizzazione, **5-6** prima aggiunta del monomero e monitoraggio della crescita sulle fibrille in real-time, **6-7** buffer PBS per registrare lo shift di frequenza (Hz) dovuto alla crescita, **7-8** seconda aggiunta del monomero, **8-9** di nuovo buffer PBS per leggere la variazione di frequenza ed infine **9-10** terza ed ultima aggiunta del monomero con conseguente aggiunta di PBS **10-11**.

Concludendo, l'aggregazione delle fibrille si verifica meglio a concentrazioni basse, ovvero 2 μM ; mentre per quanto concerne i tempi, con tempi brevi (15-20 minuti) l'aggregazione è appena iniziata e non si osservano shift significativi; con tempi intermedi (30-45 minuti) l'aggregazione è già ben avviata, ed utilizzando tempi più lunghi (50-60 minuti) si ottiene il massimo dell'aggregazione delle fibrille.

3.3. Studio dell'attività inibitoria da parte del Clioquinolo

È stato osservato che la somministrazione di Clioquinolo provoca in alcuni casi un rallentamento della progressione del morbo di Alzheimer (*Ritchie et al., 2003; Cherny et al., 2001*). In questo si è voluto testare quindi tale molecola sui biosensori QCM su cui erano state precedentemente le fibrille.

Per poter valutare l'attività inibitoria da parte di questa molecola sulla crescita delle fibrille, sono state testate soluzioni di Clioquinolo in presenza di monomeri. Il *tempo* di incubazione in questo caso non è stato ottimizzato ed è stato mantenuto lo stesso tempo di incubazione per l'aggregazione delle monomeri, ovvero 50 minuti.

Quando il Clioquinolo 10 μM è stato introdotto contemporaneamente con una soluzione di monomero 2 μM per 50 minuti, la diminuzione netta della frequenza è risultata pari a 6 Hz, che è un valore significativamente più piccolo rispetto all'incubazione del solo monomero ($\Delta F = - 23$ Hz), in assenza di CQ. Durante le aggiunte in serie, la presenza del CQ con i monomeri induce un netto incremento della frequenza (vedere grafico 3.3). Ciò significa che probabilmente la presenza del CQ induce il distacco di parte dei monomeri già aggregati alle fibrille sulla superficie del sensore.

Per mostrare che questa piccola variazione di frequenza non è dovuta alla saturazione della superficie immobilizzata, una soluzione di monomero contenente solo il monomero [2 μM] è stata incubata sulla superficie per 50 minuti, ottenendo infine una netta diminuzione della frequenza pari a 41 Hz. Questo recupero del salto della frequenza indica quindi che il CQ inibisce

l'elongazione attraverso l'interazione con più monomeri, ma meno con le fibrille sulla superficie.

Il CQ è stato introdotto anche da solo sulla superficie immobilizzata, ottenendo un irrilevante cambiamento della variazione della frequenza e indicando quindi che il CQ ha un'affinità debole con i seeds immobilizzati sulla superficie. Ciò è dovuto alla idrofilicità del gruppo alogeno e del gruppo idrossile del Clioquinolo che impediscono l'interazione del CQ con la parte centrale idrofobica delle fibrille.

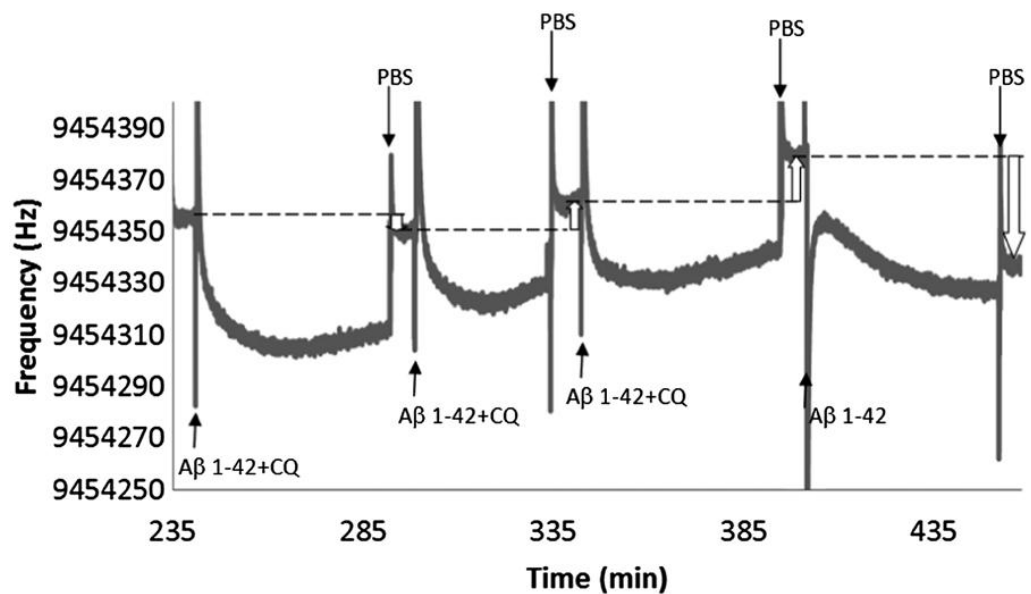


Grafico 3.3: aggiunte in serie dei monomeri $\alpha\beta_{1-42}$ [$2 \mu\text{M}$] con il CQ [$10 \mu\text{M}$].

Successive aggiunte di monomeri $\alpha\beta_{1-42}$ [$2 \mu\text{M}$]

danno inizio al processo di elongazione.

4° CAPITOLO

RISULTATI RELATIVI ALL'ANALISI PER LO STUDIO DELL'IMMOBILIZZAZIONE E DELL'AGGREGAZIONE DELLE FIBRILLE AMILOIDI OTTENUTI CON IL BiacoreX™

4.1. Risultati ottenuti sfruttando la Risonanza Plasmonica di Superficie

Sul sensore BiacoreX™ si effettuano aggiunte ripetute di monomero, per verificare la crescita delle fibrille.

Allo scopo di studiare eventuali problemi di aggregazione diretta del monomero aggiunto in soluzione, in assenza delle fibrille immobilizzate, si procede dapprima con una serie di esperimenti di seguito descritti.

Il sensorgramma ottenuto con il BiacoreX™, mostra quattro aggiunte successive di monomeri $\alpha\beta_{1-42}$, su una superficie in assenza delle fibrille pre-immobilizzate. In seguito alle aggiunte di soluzioni di monomero, si osserva un corrispondente aumento del segnale. Questo comportamento è ripetuto fino al momento in cui la superficie non viene esposta alla molecola di CQ. Il CQ iniettato da solo, non mostra interazione con la superficie per se. Il comportamento osservato indica una certa capacità da parte del monomero di interagire con la superficie anche in assenza di fibrille immobilizzate. Nel dettaglio, quando i monomeri $\alpha\beta_{1-42}$, in assenza ed in presenza del CQ, vengono introdotti sulla superficie d'oro passivata, si osservano rispettivamente, i seguenti valori di RU (Unità di Risonanza): 276 ± 20 e 162 ± 22 .

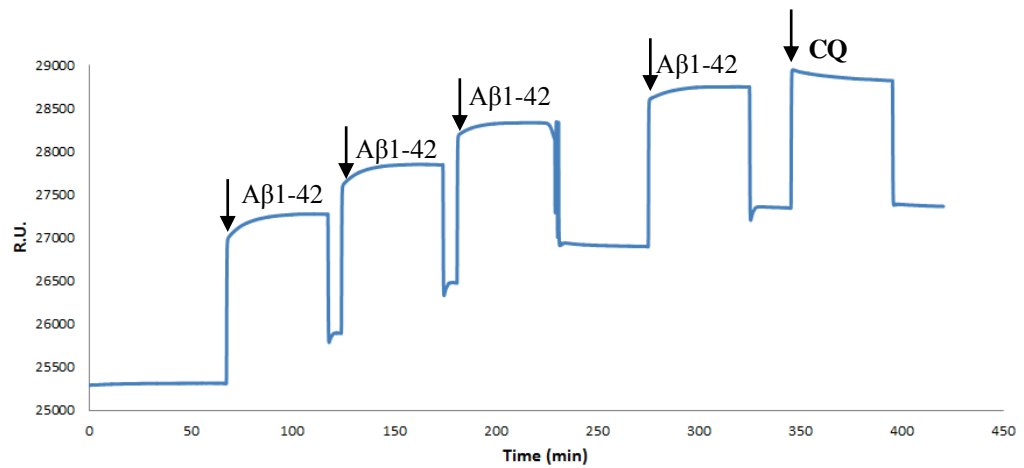


Grafico 4.1: sensorgramma dell' SPR (RU vs t) che mostra le aggiunte in serie del monomero $\alpha\beta_{1-42}$ [$2 \mu\text{M}$] (si verifica un aumento del valore dell'RU) e delle aggiunte del CQ [$10 \mu\text{M}$] (si verifica un aumento irrilevante del valore dell'RU) sulla superficie immobilizzata con le fibrille [$15 \mu\text{M}$].

Tuttavia, se lo stesso esperimento di aggiunte di monomero viene effettuato su superficie che invece recano la fibrilla immobilizzata, si osserva un segnale maggiore. Infatti soluzioni alla stessa concentrazione ($2 \mu\text{M}$) forniscono valori di risonanza molto più alti. In particolare si ottiene una risposta significativa pari a 541 ± 61 .

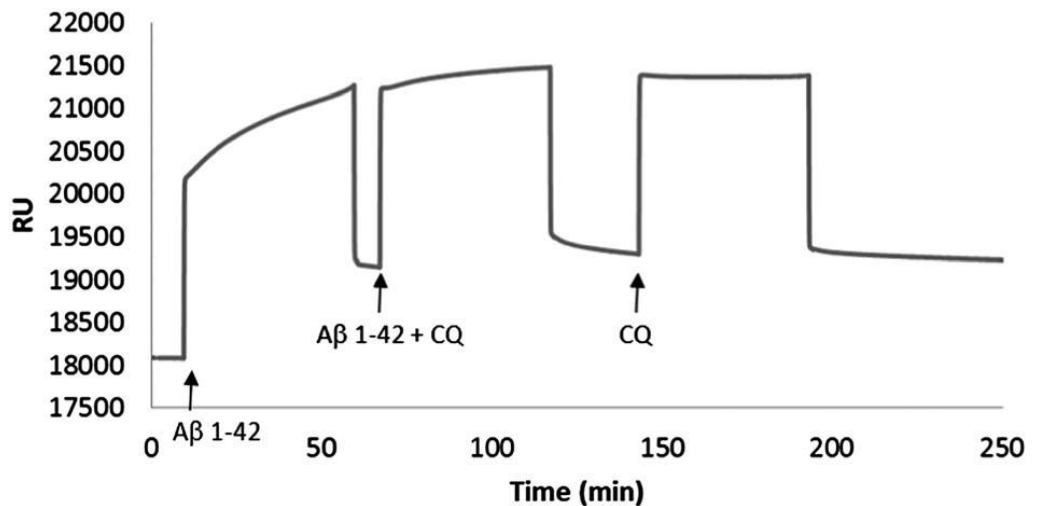


Grafico 4.2: *sensorgramma che mostra l'effetto inibitore del CQ [10 μM] sull'aggregazione, quando lo si introduce in presenza ed in assenza delle fibrille αβ₁₋₄₂ sulla superficie immobilizzata.*

Alla fine di tutte le aggiunte è stato osservato un incremento di circa 2000 RU corrispondente a 32 ng della fibrilla αβ₁₋₄₂ depositatasi sulla superficie del sensore avente un'area di 16 mm² (1000 RU = 1 ng mm⁻²) (Abrantes *et al.*, 2001).

Una volta osservato un risultato chiaro sulla effettiva elongazione delle fibrille, si è voluto vedere se, aumentando la concentrazione della soluzione dei monomeri, si potesse ottenere un incremento della velocità di allungamento delle fibrille (Cannon *et al.*, 2004). A questo scopo è stata utilizzata una concentrazione più alta di monomeri e pari a 30 μM.

I nostri risultati sono compatibili con quelli riportati in letteratura, come ad esempio l'incremento del valore di RU che è raddoppiato in un intervallo di 50 minuti.

Infine, sono state effettuate delle aggiunte di monomero in presenza del Clioquinolo 10 μM . Lo shift di RU osservato è risultato minore di quello ottenuto alla stessa concentrazione di monomeri in assenza di CQ.

Allo scopo di verificare l'assenza d'interazione del CQ da solo, con la superficie recante le fibrille, è stata saggiata un soluzione di 10 μM di CQ che non ha fornito variazioni di segnale.

Possiamo quindi concludere che anche il sistema basato sulla risonanza plasmonica di superficie è idoneo a monitorare sia la crescita delle fibrille che l'inibizione del Clioquinolo.

CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi è consistito nella messa a punto di due sistemi label-free capaci di seguire in tempo reale l'aggregazione di fibrille di beta amiloide, e di osservare l'attività di inibitore del Clioquinolo sulla crescita delle fibrille stesse.

A questo scopo sono stati utilizzati un sistema piezoelettrico basato sulla microbilancia al quarzo (QCM) ed un sensore ottico, basato sulla Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR).

Sui relativi sensori sono state dapprima effettuate immobilizzazioni di fibrille e, successivamente, osservata l'elongazione in seguito ad aggiunta di soluzioni contenenti i monomeri costituenti le fibrille stesse. Le condizioni per questi saggi sono state studiate ed ottimizzate.

La chimica di immobilizzazione utilizzata è basata sulla formazione di un self-assembled monolayer di MUA sul cristallo piezoelettrico ricoperto di oro. Attivato con EDAC/NHS, è stato infine realizzato l'amino-coupling delle fibrille sul sensore. Questa chimica si è dimostrata efficace nel prevenire adsorbimenti non specifici dei monomeri sulla superficie del biosensore.

Dallo studio condotto si evince che l'aggregazione di nuovi monomeri alle fibrille già immobilizzate avvenga solo utilizzando soluzioni preparate di fresco ad una concentrazione di 2 μM di monomeri. Inoltre la sonicazione della stessa soluzione risulta essere un passaggio obbligato per ottenere una buona immobilizzazione delle fibrille sulla superficie.

Con entrambi i sistemi è stato possibile osservare direttamente l'elongazione delle fibrille in tempo reale e senza l'uso di marcatori.

Questo approccio conferma inoltre quanto già in parte riportato in letteratura, in cui sia la tecnica QCM che SPR sono state utilizzate in studi di elongazione di fibrille, insieme a sistemi di microcantilever.

Una volta appurata la capacità di questi sistemi di seguire l'elongazione delle fibrille, e sincerandosi dell'assenza di adsorbimenti aspecifici sulla superficie, si è provveduto a saggiare il Clioquinolo per le sue capacità inibitorie del processo. Si può concludere affermando che l'aggregazione dei monomeri alle fibrille può essere seguita sia dal sistema piezoelettrico QCM che dal sistema basato sulla tecnica SPR.

La progettazione di questi metodi label-free mostra buone promesse sullo screening rapido ed efficace per l'aggregazione di modulatori, che possono essere altamente preziosi nello sviluppo di nuove terapie contro l'Alzheimer.

L'effetto inibitore da parte del Clioquinolo sull'aggregazione di beta amiloidi è un punto molto importante del nostro studio e può essere ulteriormente studiato e sviluppato per poter produrre, in un futuro non troppo lontano, farmaci atti a curare il morbo di Alzheimer.

BIBLIOGRAFIA

- Abrantes M., Magona M. T., Boyd L. F., Schuck P.; *Analytical Chemistry*, 73, 2828-2835; **2001**.
- Aguilar M. I., Small D.II; *Neurotoxicity Research*, 7(1,2), 17-27; **2005**.
- Bastus N. G., Kogan M. J., Amigo R., Grillo-Bosch D., Araya E., Turiel A., Labarta A., Giralt E., Puntès V. F.; *Materials Science and Engineering*, 27, 1236-1240; **2001**.
- BIAcore System Manual, *Pharmacia Biosensor AB*; **1992**.
- Brambilla D., Verpillot R., Taverna M., De Kimpe L., Le Droumaguet B., Nicolas J., Canovi M., Gobbi M., Mantegazza F., Salmona M., Nicolas V., Scheper W., Couvreur P., Andrieux K.; *Analytical Chemistry*, 82, 10083-10089; **2010**.
- Buell A. K., Dobson C. M., Knowles T. P. J., Welland M. E.; *Biophysical Journal*, 99, 3492-3497; **2010**.
- Buell A. K., White D. A., Meier C., Welland M. E., Knowles T. P. J., Dobson C. M.; *Journal of Physical Chemistry*, 114, 10925-10938; **2010**.
- Cannon T. C. F., Alto L. T., McAlpine F. E., Malú G Tansey M. G.; *Molecular Neurodegeneration*, volume 4, articolo numero 47; **2009**.
- Cannon M. J., Williams A. D., Wetzel R., Myszka D. G.; *Analytical Biochemistry*, 328, 67-75; **2004**.

- Cantini E., tesi di laurea: “*DNA sensing: from rational design of probes to surface nanostructuring*”. Relatore: Minunni Maria. Corso di laurea in chimica, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università degli Studi di Firenze. Consultabile presso la Biblioteca del Polo Scientifico; **2010**.
- Cheng X. R., Hung V. W. S., Scarano S., Mascini M., Minunni M., Kermann K.; *Analytical Methods*, 4(8), 2228-2232; **2012**.
- Cherny R. A., Atwood C. S., Xilinas M. E., Gray D. N., Jones W. D., McLean C. A., Barnham K. J., Volitakis I., Fraser F. W., Kim Y., Huang X., Goldstein L. E., Moir R. D., Lim J. T., Beyreuther K., Zheng H., Tanzi R. E., Masters C. L., Bush A. I.; *Neuron*, 30, 665-676; **2001**.
- Ding W.-Q., Liu B., Vaught J. L., Hamauchi H., Lind S. E.; *Cancer Research*, 65, 3389-3395; **2005**.
- Frederix F., Bonroy K., Reekmans G., Laureyn W., Campitelli A., Abramov M. A., Dehan W., Maes G.; *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 58, 67-74; **2004**.
- Fukuda T., Matsumoto E., Onogi S., Miura Y.; *Bioconjugate Chemistry*, 21, 1079-1086; **2010**.
- Gobbi M., Re F., Canovi M., Beeg M., Gregori M., Sesana S., Sonnino S., Brogioli D., Musicanti C., Gasco P., Salmona M., Masserini M. E.; *Biomaterials*, 31, 6519-6529; **2010**.
- Ingram D. K.; *Neurosciences*, 24, 305-307; **2001**.
- Janshoff A., Galla H. J., Steinem C.; *Angewandte Chemie International Edition*, 39, 4004-4032; **2000**.
- Janshoff A., Gutenberg J., Steinem C.; *Wiley*, 9, 313-354; **2011**.

- Kihara T., Shimohama S.; *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 64, 99-105; **2004**.
- Kiselev G. A., Kudrinskii P. V., Yaminskii I. V., Vinogradova O. I.; *Protection of Metals*, 44, 535-541; **2008**.
- Kogan M. J., Bastus N. G., Amigo R., Grillo-Bosch D., Araya E., Turiel A., Labarta A., Giralt E., Puentes V. F.; *Nano Letters*, 6, 110-115; **2006**.
- Kotarek J. A., Johnson K. C., Moss M. A.; *Analytical Biochemistry*, 378, 15-24; **2008**.
- Kotarek J. A., Moss M. A.; *Analytical Biochemistry*, 399, 30-38; **2010**.
- Kraziński B. E., Radecki J., Radecka H.; *Sensors*, 11, 4030-4042; **2011**.
- Kumar S., Udgaokar J. B.; *Current Science*, 98, 639-656; **2010**.
- Mankar S., Anoop A., Sen S., Maji S. K.; *Nano Reviews*, volume 2; **2011**.
- Maurer K., Volk S., Gerbaldo H.; *The Lancet*, 349, 1546-1549; **1997**.
- Minunni M., Skládal P., Mascini M.; *Analytical Letters*, 27(8), 1475-1487; **1994**.
- Montagut Y., García J. V., Jiménez Y., March C., Montoya Á., Arnau A. Libro: *Biosensors - Emerging Materials and Applications*, ISBN: 978-953-307-328-6; capitolo 9; **2011**.
- Nicotera P., tesi di laurea: “*La risonanza plasmonica di superficie per lo studio di interazioni di affinità*”. Relatore: Minunni Maria. Corso di

laurea in chimica, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università degli Studi di Firenze. Consultabile presso la Biblioteca del Polo Scientifico; **2010**.

- Nikiforov M. P., Thompson G. L., Reukov V. V. Jesse S., Guo S., Rodriguez B. J., Seal K., Vertegel A. A., Kalinin S. V.; *ACS Nano*, 4, 689-698; **2010**.
- Ogi H., Fukunishi Y., Yanagida T., Yagi H., Goto Y., Fukushima M., Uesugi K., Hirao M.; *Analytical Chemistry*, 83, 4982-4988; **2011**.
- Onor M. L., Trevisiol M, Negro C., Signorini A., Saina M., Aguglia E.; *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementia*, 22, 261-272; **2007**.
- Ritchie C. W., Bush A. I., Mackinnon A., Mastwyk M., MacGregor L., Kiers L., Cherny R., Li Q.-X., Tammer A., Carrington D., Mavros C., Volitakis I., Xilinas M., Ames D., Davis S., Beyreuther K., Tanzi R. E., Masters C. L.; *Archives of Neurology*, 60 (12), 1685-1691; **2003**.
- Ryu J., Joung H. A., Kim M. G., Park C. B.; *Analytical Chemistry*, 80, 2400-2407; **2008**.
- Santucci A., tesi di laurea: “Sviluppo di un biosensore piezoelettrico a base di DNA per la ricerca di batteri patogeni”. Relatore: Minunni Maria. Corso di laurea in chimica, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università degli Studi di Firenze. Consultabile presso la Biblioteca del Polo Scientifico; **2003**.
- Schneider T. W., Martin S. J.; *Analytical Chemistry*, 67, 3324-3335; **1995**.
- Stravalaci M., Beeg M., Salmona M., Gobbi M.; *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2772-2775; **2011**.

- Tombelli S., Minunni M., Mascini M.; *Methods*, 37, 48-56; **2005**.
- White D. A., Buell A. K., Dobson C. M., Welland M. E., Knowles T. P. J.; *FEBS Letters*, 583, 2587-2592; **2009**.
- Wang T., Wang C. Y., Shan Z. Y., Teng W. P., Wang Z. Y.; *Journal of Alzheimer's disease*, 29(3), 549-559; **2012**.
- Wong S. S., Harper J. D., Lansbury P. T., Lieber C. M.; *Journal American Chemical Society*, 120, 603-604; **1998**.
- Xia N., Harrington M. G., Wang J., Zhou F.; *Analytical Chemistry*, 82, 10151-10157; **2010**.
- Yan Q., Zhang J., Liu H., Khan S. B., Vassar R., Biere A. L., Citron M., Landreth G.; *The Journal of Neuroscience*, 23(20), 7504 –7509; **2003**.
- Zhang H., Xu L. Q., Perrett S.; *Methods*, 53, 285-294; **2011**.