

Università degli Studi di Firenze
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Corso di Laurea Triennale in Chimica



Preparazione e caratterizzazione di lipoplessi da nucleolipidi.

Preparation and characterization of lipoplexes
from nucleolipids.

Tesi di Laurea di

Lisa Romei

Relatore *Prof.ssa Debora Berti*

Anno accademico 2010/2011

Indice

Indice.....	2
Elenco abbreviazioni.....	4
1. Introduzione.....	5
2. Materiali e Metodi.....	9
2.1 Materiali.....	9
2.2 Tecniche di preparazione.....	10
2.3 Tecniche sperimentali.....	10
2.3.1 Dynamic Light Scattering.....	10
2.3.2 Potenziale ζ	12
2.3.3 Assorbimento UV-visibile.....	14
2.3.4 Dicroismo Circolare.....	15
2.3.5 Small Angle X-Ray.....	16
3. Risultati e discussione.....	18
3.1 C ₁₈ UMe e DNA a singolo e doppio filamento.....	18
3.1.1 Dynamic Light Scattering.....	19
3.1.2 C ₁₈ UMe dA ₅₀	20
3.1.3 C ₁₈ UMe dA ₅₀ dT ₅₀	22
3.1.4 Misure di potenziale Zeta.....	25
3.1.5 Studi di cinetica.....	29
3.1.6 Spettroscopia UV-visibile.....	32
3.1.7 Dicroismo circolare.....	34
3.1.8 Esperimenti di melting.....	41
3.1.9 Small Angle X-Ray.....	48

3.2 Lipoplessi con DNA a singolo filamento a confronto.....	49
3.2.1 Dynamic Light Scattering.....	51
3.2.2 Spettroscopia UV-visibile.....	53
3.2.3 Dicroismo Circolare.....	54
3.3 Lipoplessi con DNA/C ₁₈ UMe e con DNA/CTAB.....	56
3.3.1 Dynamic light Scattering: CTAB e dA ₅₀	57
3.3.2 Dynamic light Scattering: CTAB e dA ₅₀ dT ₅₀	59
3.3.3 Spettroscopia UV-visibile.....	62
3.3.4 Dicroismo Circolare.....	63
3.3.5 CTAB e dT ₅₀	66
4. Conclusioni.....	69
Riferimenti bibliografici.....	72

Elenco Abbreviazioni

- **DLS** Dynamic Light Scattering
- **CD** Circular Dichroism
- **SAXS** Small Angle X-Ray
- **CTAB** cetil trimetilammonio bromuro
- **ss** single strand
- **ds** double strand

1 Introduzione

In questo lavoro di tesi, vengono studiate la formazione, le caratteristiche chimico-fisiche e nanostrutturali di lipoplessi costituiti da oligonucleotidi a singolo e a doppio filamento con un tensioattivo cationico in soluzione acquosa. Il tensioattivo in esame è un nuovo nucleolipide sintetico con residuo idrofobico a 18 atomi di carbonio, avente un derivato uridinico sulla testa polare, la cui struttura è mostrata in figura 1. Nell'ambito di questa ricerca ci focalizziamo sullo studio di complessi formati a partire da una singola catena di 50 adenine e dal C₁₈UMe e di complessi formati a partire da un doppio filamento di 50 adenine e 50 timine e dal C₁₈UMe.

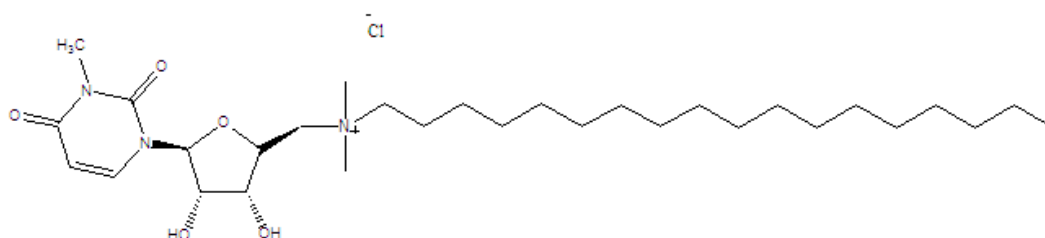


Figura1. Il nucleolipide C₁₈UMe

Servendosi di numerose tecniche sperimentali, si vuole dimostrare che l'interazione tra il nucleolipide e il DNA non è semplicemente di natura elettrostatica, ma ha un contributo specifico di riconoscimento molecolare delle basi. Verrà preso in esame il sistema C₁₈UMe con DNA sia a singolo filamento che a doppio filamento. Per completezza verrà utilizzato in alternativa al singolo filamento di adenine, un singolo filamento di 50 timine e il comportamento del nucleolipide sarà confrontato con quello di un lipide cationico standard dotato di una catena alchilica composta da 16 atomi di carbonio, il CTAB.

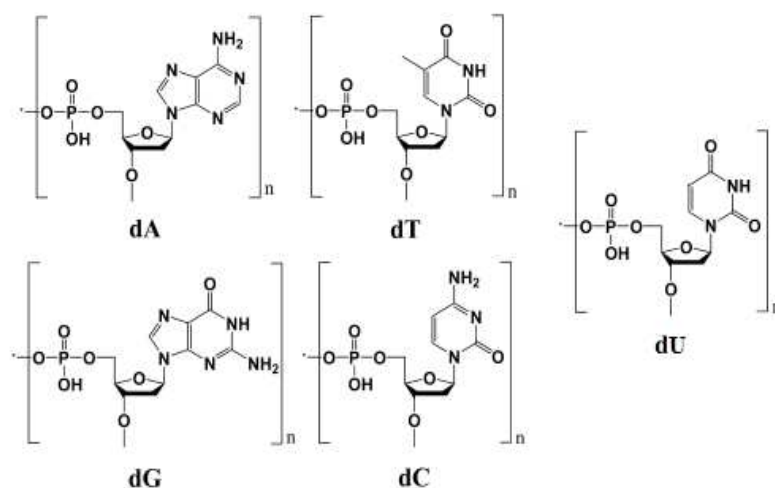


Figura2. Struttura molecolare di vari nucleotidi.

Questo lavoro nasce come un'estensione dei recenti studi di X. Liu e N.L. Abbott^[1], i quali sostengono che la nanostruttura dei lipoplessi sia diversa a seconda che il DNA utilizzato sia a singolo filamento o a filamento doppio. E' tuttavia necessario specificare che, nei loro esperimenti, Liu e Abbott non hanno impiegato i nucleolipidi ma il CTAB e che i polielettroliti anionici di cui si sono serviti erano a catena più corta di quelli utilizzati in questo lavoro di tesi.

I composti anfifilici godono dell'attenzione di numerosi settori dalla chimica sintetica, delle biotecnologie, della chimica supramolecolare, della catalisi, della chimica fisica... Piccole modificazioni nella struttura di questi composti possono comportare drastici cambiamenti nelle proprietà osservate. L'importanza delle specie anfifiliche, in particolare cationiche, consiste nel fatto che esse sono in grado di interagire con macromolecole biologiche, specialmente con DNA^{[2][3][4][5][6]} e RNA. I lipoplessi sono un'allettante alternativa ai vettori virali nel settore della terapia genica, che può essere considerata il trattamento della malattia tramite l'introduzione di materiale genetico terapeutico nel nucleo delle cellule di un organismo^{[7][8]}. I vettori di trasferimento genico si distinguono in vettori virali e non virali. I virus sono eccellenti per la trasfezione nelle cellule bersaglio, ma si è scoperto che possono essere iniziatori di mutagenesi. I complessi di anfifili, per esempio cationici, con polimeri (poliplessi) o con i lipidi (lipoplessi) sono meno costosi e più semplici da produrre. Inoltre possono essere maneggiati senza pericolo, non richiedendo, quindi, personale specializzato.

Le prime applicazioni dei lipidi cationici alla trasfezione risalgono a circa venti anni fa, mentre la terapia genica risale a più di 35 anni fa^[9]. Ad oggi si cercano metodi per

condurre il materiale genetico all'interno della cellula superando numerosi ostacoli durante il trasporto^[10]. I maggiori limiti che si presentano sono la membrana cellulare e quella nucleare, senza parlare del sistema immunitario e lisosomi pronti alla demolizione di tutto ciò che risulta estraneo all'organismo. Occorre anche considerare la necessità di un rilascio ideale del DNA dal lipide tramite la disgregazione del lipopleppo, una volta che questo è giunto a destinazione.

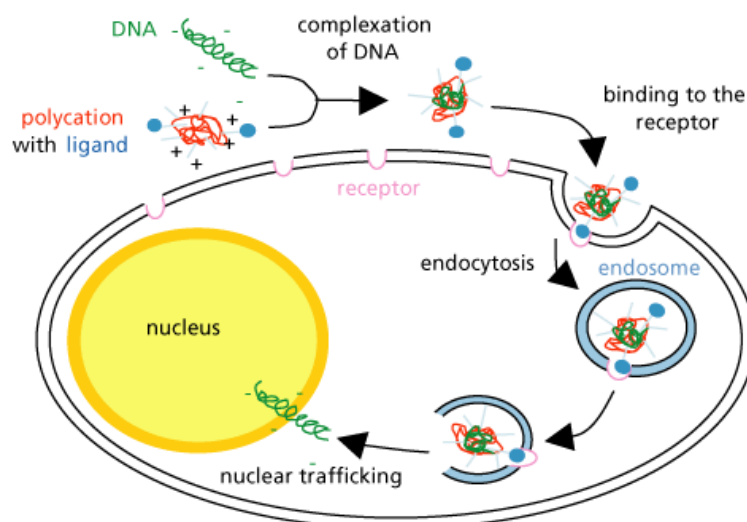


Figura3. Trasfezione.

Sembra che esista una relazione tra la struttura dei complessi e loro capacità di trasfezione^{[11][12]}, dunque per costruire un complesso che sia efficiente come vettore genico occorre uno studio approfondito. Infatti, l'interazione elettrostatica tra il tensioattivo cationico e i gruppi fosfato del DNA è del tutto aspecifica.

Gli anfifili a testa nucleosidica sono stati sintetizzati per legarsi al DNA, con un'interazione basata sul riconoscimento molecolare tra acidi nucleici. Il DNA è un importante e naturale polielettrolita e diventa compatto in presenza di surfattanti cationici o di vescicole cariche positivamente. Il compattamento è un fattore da tenere estremamente sotto controllo; recentemente si è visto che può essere ulteriormente favorito tramite l'uso di nanoparticelle di silice^[13].

I nucleolipidi dispongono di un elevato grado di biocompatibilità: il carattere lipofilo li rende capaci di superare la membrana cellulare e di essere più resistenti all'attacco di enzimi. Questa classe di composti anfifilici presenta caratteristiche e proprietà differenti in dipendenza dalla natura, dalla lunghezza della catena idrofobica e, ovviamente, dalla base. In acqua queste specie si auto-aggregano secondo regole dettate dalla natura anfifilica e nucleosidica. Le interazioni che derivano sono di natura idrofobica, di Van

der Waals e forze di London.

Il nucleolipide C₁₈UMe (figura 1), usato in questo studio, è dotato di una carica positiva rappresentata da un gruppo ammonio quaternario legato in posizione 5' dell'anello zuccherino. La porzione idrofobica è costituita da un gruppo ammonio legato in posizione 5' e l'azoto in posizione 3 dell'uracile è stato alchilato con un gruppo metile.

La preparazione di lipoplessi non è complicata, ma occorre sapere che la variazione dei procedimenti di preparazione e delle condizioni sperimentali possono comportare dimensioni degli aggregati diversificate esaminabili al DLS^[14]. Per tale ragione abbiamo scelto di seguire nei nostri esperimenti sempre la medesima procedura, al fine di ottenere risultati riproducibili.

Lo stato dell'arte nel campo dei lipoplessi e complessi del DNA in genere è sterminato^{[15][16]}, ma poco è stato scritto sulla nanostruttura dei complessi da oligonucleotidi e anfifili cationici a singola catena^[17]. Inoltre numerosi sono gli articoli riguardo i nucleoanfili^[18], ma poca è la letteratura dedicata al riconoscimento molecolare e ai fattori strutturali che lo controllano.

In questa tesi si determinano le caratteristiche dell'interazione, le dimensioni e la forma degli aggregati supramolecolari DNA-nucleolipide. Si valuta quindi l'effettiva adeguatezza del C₁₈UMe nel processo di riconoscimento che avviene durante la formazione di aggregati supramolecolari con il DNA nel mezzo acquoso, soffermandosi sul determinante ruolo giocato dal suo gruppo di testa uridinico. Le dimensioni dei complessi sono state determinate dalle misure di DLS e del potenziale ζ mentre le variazioni strutturali del DNA^{[19][20]} sono state rilevate dalle analisi di spettrofotometria UV-visibile e dal dicroismo circolare.

2 Materiali e metodi

2.1 Materiali

Il nucleolipide C₁₈UMe è stato sintetizzato dal gruppo di ricerca di Perugia guidato dal Professor G. Savelli. Il lipide CTAB è stato acquistato da Carlo Erba.

Per la preparazione dei complessi sono state utilizzate le seguenti tipologie di DNA:

- dA₅₀ con peso molecolare pari a 15598.04 g/mol
- dT₅₀ con peso molecolare pari a 15147.54 g/mol
- dA₅₀dT₅₀ con peso molecolare pari a 30745,58 g/mol

I singoli filamenti sono stati sintetizzati presso la School of Chemistry dell'Università di Southampton. Per la formazione del dA₅₀dT₅₀, sono state unite in laboratorio soluzioni equimolari in acqua di dA₅₀ e di dT₅₀. Successivamente per garantire un corretto appaiamento tra basi è stato effettuato un processo di annealing. L'annealing consiste nel portare il DNA ad una temperatura di circa 75°-80° e lasciarlo raffreddare lentamente fino a temperatura ambiente.

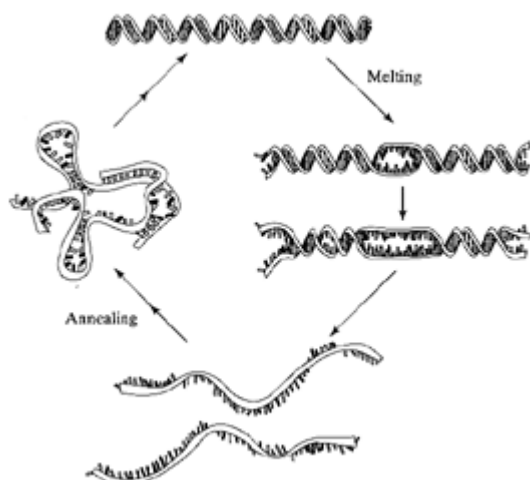


Figura4. Processo di melting e processo di annealing .

2.2 Tecniche di preparazione

Il protocollo con cui eseguire i campioni non è unico. Conviene, comunque, utilizzare lo stesso procedimento per rendere l'esperimento riproducibile e confrontabile. I campioni che sono stati preparati per questa trattazione, sono stati studiati esclusivamente in acqua milli Q, senza impiego di tampone o sali.

Sono state preparate soluzioni 10mM di C₁₈UMe e CTAB per i campioni con rapporto +/- maggiore dell'unità, mentre una soluzione 1 mM di C₁₈UMe e CTAB per i campioni con rapporto +/- inferiore all'unità. Per quanto riguarda il DNA sono state preparate soluzioni con concentrazione 250 µM.

Nella preparazione dei campioni di lipoplessi, l'ordine di aggiunta dei componenti nelle varie proporzioni è stato: 1) DNA, 2) H₂O, 3) C₁₈UMe.

2.3 Tecniche sperimentali

2.3.1 Dynamic Light Scattering

Le misure delle soluzioni al dynamic light Scattering (DLS) sono state effettuate tramite un apparecchio Brookhaven Instrument (BI 9000AT correlatore e BI200 SM goniometro); il detector utilizzato è BI APD , mentre la sorgente di luce è la seconda armonica di un laser diode Nd:YAG (532 nm) Coherent Inova, polarizzato linearmente nella direzione verticale. Tutti i campioni sono stati misurati a 25°C e lasciati termostatare nell'apposita cella per qualche minuto.

L'intensità di luce scatterata è stata rilevata ad un angolo di 90°.

Le funzioni di auto-correlazione sono state analizzate con due metodi: tramite l'inversione di Laplace con algoritmo CONTIN^{[21][22]} e il metodo dei cumulanti di secondo grado. Tutto questo al fine di poter ricavare il diametro idrodinamico medio calcolato con la media pesata sulla distribuzione di popolazione e il range di popolazione, nel primo caso; il diametro idrodinamico e la polidispersità, nel secondo caso.

Lo scattering dinamico è dovuto alle fluttuazioni temporali dell'intensità della luce diffusa, che sono causate dal moto browniano delle particelle in soluzione. In una

misura DLS si mantiene il detector ad un angolo fisso rispetto alla direzione della luce laser incidente e quindi a una distanza fissa dal campione. L'analisi delle fluttuazioni di intensità può essere eseguita attraverso lo studio della funzione di autocorrelazione temporale. L'autocorrelazione è la media del prodotto della stessa variabile a distanza di un ritardo temporale:

$$g^2(q, \tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t)^2 \rangle}$$

$g^2(q, \tau)$ è la funzione non normalizzata; q è modulo del vettore d'onda e τ è il ritardo temporale.

$$q = \frac{4n\pi}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

dove λ_0 è la lunghezza d'onda del laser e θ è l'angolo di scattering.

La relazione di Siegert lega $g^2(q, \tau)$ a $g^1(q, \tau)$, quest'ultima reca informazioni circa i parametri fisici degli oggetti in soluzione:

$$g^2(q, \tau) = B(1 + f^2[g^1(q, \tau)]^2)$$

dove B è la linea di base e f è un parametro di ampiezza relativo alle ottiche dello strumento. Da queste misure dinamiche di diffusione di luce possiamo ottenere informazioni sui tempi di rilassamento delle particelle disperse nel sistema, sul coefficiente di diffusione e sul raggio idrodinamico, che dipende fortemente dal volume e dalla forma delle particelle.

Per un sistema con una popolazione di sfere monodisperse $g^1(q, \tau)$ è una funzione di decadimento esponenziale singolo:

$$g^1(q, \tau) = e^{-\Gamma\tau}$$

dove $\Gamma = D_\tau q^2$, Γ è la velocità di decadimento e D_τ è il coefficiente di diffusione traslazionale. Per piccoli ritardi la correlazione è elevata perché le particelle si sono mosse poco dalle loro posizioni di partenza, mentre a tempi lunghi la correlazione tra intensità di scattering istantanea e iniziale viene persa esponenzialmente a causa dei movimenti delle particelle.

Per campioni diluiti è possibile ricavare il diametro idrodinamico medio delle specie dal coefficiente di diffusione tramite la relazione di Stokes Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

dove k_B è la costante di Boltzmann, T è la temperatura assoluta, η è la viscosità del mezzo e R_h è il raggio idrodinamico.

Nel caso più comune in cui il campione è polidisperso la funzione di autocorrelazione è la somma dei decadimenti esponenziali delle singole specie. Per esempio nei metodi dei cumulanti la funzione $g^1(q, \tau)$ viene espansa in serie di Taylor intorno al valore medio della velocità di decadimento. Quando la soluzione è molto polidispersa si utilizza l'algoritmo CONTIN^{[21][22]}, una trasformata inversa di Laplace.

2.3.2 Potenziale ζ

Le misure per il potenziale Zeta sono state eseguite con uno strumento Zeta PALS (dove PALS sta per Phase Analysis Light Scattering), Zeta Potential Analyser (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY). Le analisi sono state effettuate a 25°C e per ogni campione sono stati raccolti 10 misure. I valori riportati nei grafici sono la media aritmetica \pm la deviazione standard.

Più precisamente, le misure sono state effettuate tramite il sistema ZetaPALS.

Le particelle disperse in un liquido sono spesso dotate di una carica superficiale. Se è applicato un campo elettrico (E) queste si muoveranno verso il polo negativo o quello positivo. La direzione dello spostamento sarà una chiara indicazione della carica sulle particelle in sospensione. La velocità di traslazione (V_s) è proporzionale alla grandezza della carica superficiale $V_s = \mu E$, dunque una volta misurata tale velocità e la direzione, si possono calcolare la mobilità e il potenziale Zeta. La seguente relazione

lega il potenziale Zeta (ζ) e la mobilità elettroforetica μ :
$$\mu = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta}$$

dove ε è la costante dielettrica, ζ è il potenziale zeta, $f(ka)$ è la funzione di Henry, k^{-1} è la lunghezza di Debye che caratterizza lo spessore del doppio strato che circonda la particella carica e dipende dalla forza ionica del mezzo, a è il raggio della particella e η è la viscosità del solvente.

Se la particella possiede una carica superficiale, si verificherà un aumento della concentrazione di controioni attorno alla superficie. Lo strato di liquido che circonda la particella si divide in due zone: quella più interna, detta strato di Stern, dove gli ioni

sono fortemente legati e una porzione esterna, detta strato diffuso, dove le interazioni sono più deboli. Lo strato di Stern e lo strato diffuso costituiscono il doppio strato elettrico, all'interno del quale si distingue un confine entro cui degli ioni si muovono con la particella, mentre al di fuori gli ioni non seguono il moto della particella. Il potenziale relativo a tale confine è il Potenziale Zeta.

Questo è un parametro legato alla densità superficiale di carica, ovvero ai fenomeni di attrazione o repulsione in soluzione, e dunque alla stabilità degli aggregati. Se il valore di Potenziale Zeta è elevato, la repulsione elettrostatica impedisce l'aggregazione delle particelle disperse; mentre quando è basso le forze attrattive prevalgono e le specie danno origine a fenomeni di coagulazione.

Il potenziale Zeta decresce esponenzialmente con l'aumento della distanza dalla superficie carica della particella, figura 5.

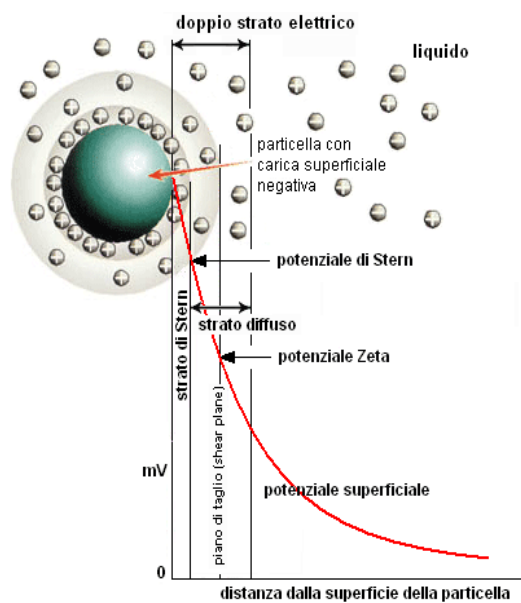


Figura5. Rappresentazione degli strati che circondano una particella carica in soluzione e andamento del Potenziale Zeta con la distanza dalla particella.

2.3.3 Assorbimento UV-visibile

Le misure di assorbimento UV visibile sono state eseguite con uno spettrofotometro CARY100BIO VARIAN. L'intervallo spettrale nel quale sono state prese le acquisizioni va dai 200nm ai 350nm, con velocità di acquisizione 300nm/min. Per poter effettuare anche le misure di melting è stato fondamentale l'impiego del termostato ad acqua VARIAN. La rampa di riscaldamento è compresa tra i 25°C e i 75°C. Alcuni spettri di assorbanza riportati sono quelli acquistati in contemporanea allo spettro CD, convertendo il segnale di voltaggio in densità ottica.

La spettroscopia di assorbimento UV-visibile riguarda l'assorbimento della radiazione luminosa dello spettro elettromagnetico che comprende il campo del visibile (350 nm-700 nm) e il vicino ultravioletto (200 nm-350 nm).

Quando un fotone possiede una quantità di energia sufficiente da indurre una transizione elettronica, si verifica un assorbimento che segue la Legge di Lambert-Beer: $A = \epsilon b C$, dove A è l'assorbanza, ϵ (L/cm mol) è il coefficiente di estinzione molare, b è il cammino ottico (cm) e C è la concentrazione molare (mol/L).

Gli elettroni coinvolti nella transizione sono:

- di tipo σ , collocati lungo l'asse di legame tra nuclei degli atomi;
- di tipo π , dotati di maggior densità elettronica situata al di fuori dell'asse di legame tra nuclei;
- di tipo n, ovvero gli elettroni di non legame.

Tipo di transizione	Lunghezza d'onda della radiazione necessaria per ottenere una transizione
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	110 – 135 nm
$\pi \rightarrow \pi^*$	160 – 255 nm
n \rightarrow σ^*	
n \rightarrow π^*	> 285 nm

2.3.4 Dicroismo circolare

Per l'acquisizione di spettri CD è stato usato uno spettropolarimetro JASCO J-715.

Le celle di misura Hellma utilizzate sono in quarzo con cammino ottico di 0.5 cm. Sono stati ritenuti necessari 15 acquisizioni per campione in un range di lunghezze d'onda da 200 nm a 350 nm. La velocità di scansione è stata impostata sui 100 nm al minuto.

Il Dicroismo circolare (CD) è una tecnica spettroscopica in cui si verifica un diverso assorbimento di una radiazione polarizzata circolarmente a destra e a sinistra :

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_R - \varepsilon_L.$$

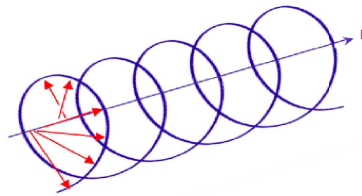


Figura6. radiazione circolarmente polarizzata. Le frecce di colore rosso sono i vettori campo elettrico, con ampiezza costante, che ruotano circolarmente attorno alla direzione di propagazione.

L'effetto CD è riportato spesso in termini di ellitticità molare $[\theta]$:

$$[\theta] = \frac{\theta}{Cb}$$

dove C è la concentrazione molare e b è la lunghezza della cella porta-campione (cm).

$$\theta = \arctan\left(\frac{E_R - E_L}{E_R + E_L}\right)$$

dove E è l'ampiezza del campo elettrico delle due componenti (R, destra e L, sinistra).

Empiricamente è stato trovato che $[\theta] = 32.98 \Delta\varepsilon$ (deg cm²/dmol).

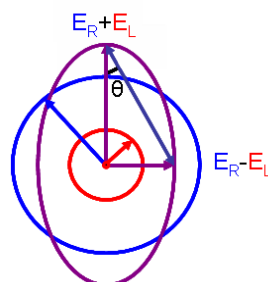


Figura7. Campo elettrico della componente destra (E_R) e della componente sinistra (E_L).

Il Dicroismo circolare è una tecnica molto sensibile per la determinazione di alcune forme di struttura secondaria e di alcune forme di struttura terziaria che derivano dalla condensazione degli acidi nucleici in soluzione e delle proteine, ma anche per studi sulla stereoisomeria delle sostanze.

2.3.5 Small angle X-rays Scattering

Le misure SAXS sono state effettuate con uno strumento SAXS-WAXS Hecus X-ray System GMBH (Graz Austria) che consiste in una sorgente di raggi X Genix Microfocus X-Ray. Lo strumento è equipaggiato di due dectore, uno dei quali è lungo 50 mm (1024 canali). La temperatura è controllata da un sistema Peltier TCCS-3 Hecus. I campioni sono stati analizzati in capillari di diametro 1.5 mm. È stato creato il vuoto, durante le misure, affinché fosse minimizzato lo scattering dell'aria.

In questa tecnica viene usato come sorgente un fascio di raggi X nell'intervallo di lunghezze d'onda tra 0.1 nm e 0.2 nm. La radiazione diffusa viene raccolta a basso angolo: da 0.1° a 10°. Come è noto, in generale, per i fenomeni di scattering ad una certa lunghezza d'onda λ misurata, la dimensione esplorata ad un certo angolo θ è dell'ordine di $\lambda/2\theta$ (per piccoli angoli $\sin\theta \approx \theta$). Nel range angolare della particolare tecnica è dunque possibile studiare le caratteristiche di forma e dimensioni di particelle dell'ordine dei 5-25 nm. Quando i raggi X attraversano il campione, gli elettroni degli atomi colpiti, sono indotti a oscillare alla frequenza dell'onda incidente e, di conseguenza, a emettere onde secondarie. Nel SAXS infatti più che interazione tra raggi X e materia si ha un'interazione tra raggi X e elettroni.

Generalmente l'intensità di luce diffusa, mediata su tutte le orientazioni delle particelle sotto esame, può essere espressa come:

$$I(q) = N_p(1/q) n_e^2(1/q)$$

dove $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$ ed è definito come il vettore di scattering, ottenuto dalla differenza tra il vettore d'onda della radiazione diffusa e il vettore d'onda della radiazione incidente; $N_p(1/q)$ è il numero di elementi che diffondono nel volume irradiato e $n_e(1/q)$ è il numero di elettroni in un atomo a basso angolo.

A bassi angoli, l'intensità è funzione del raggio di girazione R_g :

$$I(q) \simeq I(0) \exp(-q^2 R_g^2/3)$$

Si può aggiungere che il metodo è accurato e non distruttivo a cui possono essere sottoposti sia campioni solidi che liquidi. Per sistemi diluiti, il risultato di un esperimento di scattering a basso angolo è influenzato dalla struttura delle particelle e del loro arrangiamento spaziale. Pertanto la curva di diffusione è il prodotto della funzione di scattering dell'aggregato (fattore di forma $P(q)$) e della funzione di interazione tra i vari aggregati (fattore di struttura $S(q)$). Per tale motivo, possiamo scrivere la seguente relazione:

$$I(q) = P(q)S(q)$$

A diluizione infinita il fattore di struttura è uguale a 1 e non interferisce nella determinazione della forma delle particelle dal fattore di forma, $P(q)$.

3 Risultati e discussione

3.1 C₁₈UMe e DNA a singolo e doppio filamento

In questo capitolo è riportata la caratterizzazione dei lipoplessi in soluzione tramite le tecniche di Dynamic Light Scattering (DLS), spettroscopia UV-visibile, spettroscopia CD, misure di potenziale Zeta e spettroscopia SAXS.

In particolare, si prendono in esame il sistema del C₁₈UMe e DNA a catena singola formata da 50 nucleobasi adenina ed il sistema del C₁₈UMe e DNA a catena doppia di 50 nucleobasi adenina e 50 nucleobasi timina.

Il C₁₈UMe è dotato di una testa cationica avente una funzionalità uridinica, una nucleobase che nell'RNA dà interazione Watson-Crick con la base complementare adenina. Il sistema nucleolipidico e il DNA non interagiscono unicamente per l'attrazione elettrostatica che si instaura tra la carica negativa dei gruppi fosfato presenti sullo scheletro covalente del DNA e la carica positiva del tensioattivo cationico, ma ci sarà anche un contributo supplementare di interazioni deboli (legame a idrogeno e stacking). Tale contributo idrofobico darà origine alle differenziazioni dei sistemi in esame. Per rendere uguale l'interazione elettrostatica nei due sistemi, si è scelto di mantenere costante la densità delle cariche negative (83μM).

3.1.1 Dynamic Light Scattering DLS

Sono state preparate nove soluzioni acquose :

[C ₁₈ UMe]	[dA ₅₀] o [dA ₅₀ dT ₅₀]	+/-
1204 µM	83 µM	14,5
612 µM	83 µM	7,4
306 µM	83 µM	3,7
204 µM	83 µM	2,5
102 µM	83 µM	1,2
51 µM	83 µM	0,6
25 µM	83 µM	0,3
12 µM	83 µM	1,5
6 µM	83 µM	0,1

Tabella 1. Concentrazioni di C₁₈UMe e DNA utilizzate.

La concentrazione di DNA è costante e la concentrazione del tensioattivo cationico è variabile. La concentrazione di DNA 83 µM è riferita alle nucleobasi mentre quella dell'intero filamento è 1,7 µM . La CMC (ovvero la concentrazione critica micellare) del C₁₈UMe è stimata tra 0,1 mM e 1 mM, in quanto la CMC del C₁₈TAB è pari a 0.35 mM, mentre quella del CTAB è 8mM. Inoltre il range di concentrazione del nucleolipide è stato scelto in modo che ci fossero campioni simmetricamente distribuiti per numero prima e dopo il punto isoelettrico. Come evidenziato in giallo in tabella 1, il rapporto +/- 1.23 si riferisce al campione più prossimo alla compensazione elettrostatica tra il polielettrolita ed il tensioattivo.

3.1.2 C₁₈UMe e dA₅₀

Sono state eseguite preliminarmente misure del solo tensioattivo C₁₈UMe in mezzo acquoso, alle concentrazioni: 10 mM, 1 mM, 0.1 mM, 0.01mM.

L'intensità di scattering registrata è bassa già per il campione più concentrato, circa 4 kcps, perché il numero delle micelle in soluzione non è elevato. Le dimensioni di queste specie sono dell'ordine dei 200 nm. Si ritiene che l' intervallo di concentrazione di nucleolipide compreso tra 1 mM e 0.1 mM contenga la CMC, per cui le funzioni di autocorrelazione dell'intensità di scattering relative ai campioni di solo tensioattivo che ricadono in questo range sono rumorose. Il campione con [C₁₈UMe]= 0.01mM ha un'intensità uguale a quella del solvente, in accordo con il fatto che non ci attendiamo micelle in soluzione.

L' aggiunta del DNA al tensioattivo a tutte le concentrazioni studiate (da 6 μM a 1204 μM) provoca un notevole incremento di intensità di light scattering che testimonia la formazione dei complessi in soluzione.

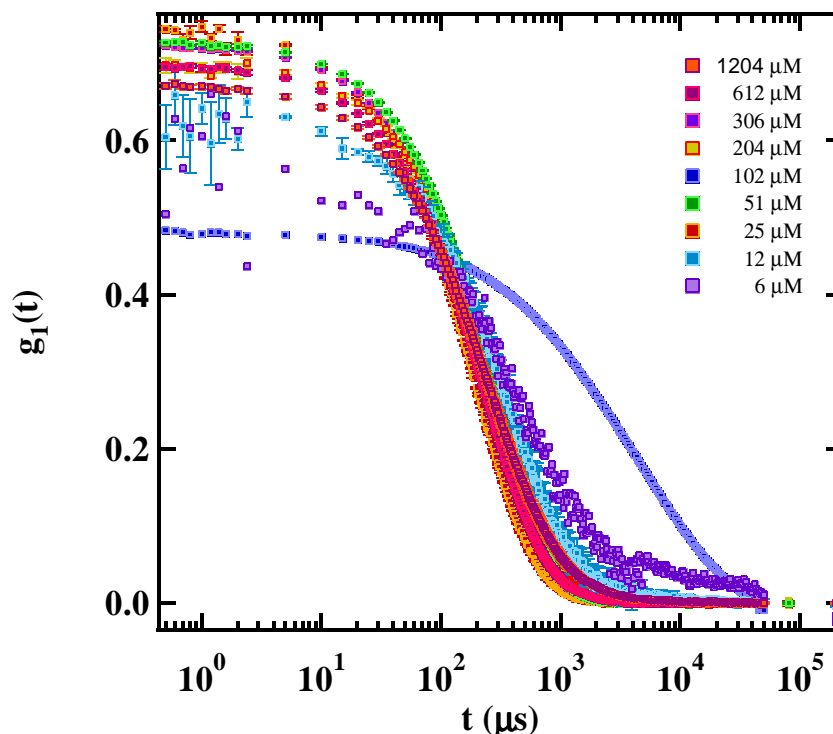


Figura8. Curve di correlazione, relative ai sistemi con C₁₈UMe e dA₅₀. La concentrazione del nucleolipide varia come da legenda, mentre la concentrazione di dA₅₀ è costante (1.7μM).

Il campione con rapporto +/- 1.2 ha un andamento che si discosta dagli altri, in quanto la soluzione è opalescente e, dopo circa due ore dalla preparazione, presenta del precipitato. In corrispondenza di tale concentrazione di nucleolipide quindi il sistema è molto instabile. Per gli altri campioni, le dimensioni sono molto simili tra loro: tra i 200 nm e i 300 nm di diametro. Le soluzioni con eccesso di nucleolipide subiscono il noto l'effetto della “condensazione rientrante”, ovvero presentano particelle con diametro medio paragonabile a quello delle specie presenti nelle soluzioni dove il rapporto +/- è minore dell'unità. La dispersione con rapporto +/- pari 0.3 ([C₁₈UMe]= 25 μM) è caratterizzata da aggregati con diametro medio minore. Tenendo conto che $g^1(q, \tau)$ ha un decadimento esponenziale:

$$g^1(q, \tau) \propto e^{-\Gamma \tau}$$

dove $\Gamma = D_T q^2$ è la velocità di decadimento e D_T è il coefficiente di diffusione traslazionale, se le particelle sono di piccole dimensioni il loro moto, in soluzione sarà rapido, di conseguenza, la curva di autocorrelazione relativa avrà tempi di rilassamento minori; viceversa se si formano aggregati più grandi, queste si muoveranno più lentamente, dunque la curva registrata avrà tempi di rilassamento maggiori.

3.1.3 C₁₈UMe e dA₅₀dT₅₀

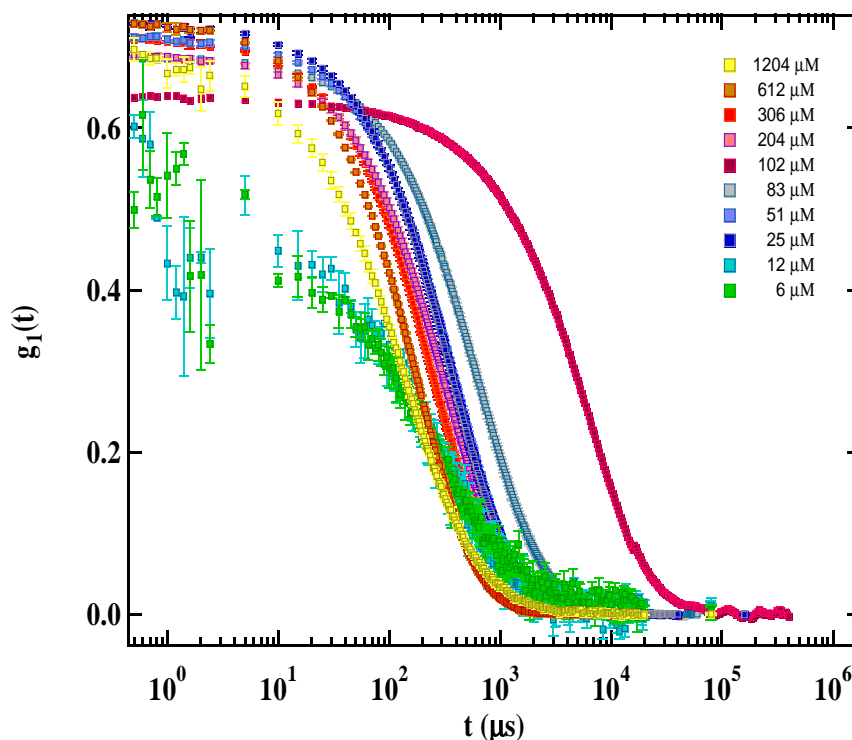


Figura9. Curve di correlazione, registrate al DLS, dei campioni con nucleolipide C₁₈UMe e dA₅₀dT₅₀. La concentrazione del C₁₈UMe varia come si vede dalla legenda., mentre la concentrazione di dA₅₀dT₅₀ rimane costante a 1.7 μM .

Le curve relative alle concentrazioni massime di nucleolipide ([C₁₈UMe 1204 μM e 612 μM]), sono stabili e definite già dalle prime misure; si può inoltre apprezzare che le dimensioni degli aggregati sono tra le più piccole.

Per quanto riguarda le soluzioni di nucleolipide con concentrazione 306 μM e 204 μM , le curve migliorano notevolmente il giorno dopo la preparazione dei campioni: evidentemente si stabilizzano in seguito a una particolare cinetica.

Il campione con 306 μM di C₁₈UMe, come nel caso del sistema con dA₅₀, presenta precipitato. Si noti come l'andamento della curva relativa alla concentrazione C₁₈UMe 102 μM si discosti dalle altre. È stata, inoltre, preparata una soluzione in cui il rapporto nucleolipide: DNA fosse 1:1, ovvero entrambi con concentrazione 83 μM .

Le soluzioni a concentrazione 51 μM e 25 μM mostrano aggregati di grandi dimensioni sui 300 nm, inoltre sono completamente sovrapposte .

Le misure dei campioni con forte eccesso di nucleotide, con rapporto +/- 1.5 e 0.1 (rispettivamente [C₁₈UMe]= 12 μM e 6 μM), rivelano un'intensità di scattering molto bassa e le relative curve sono rumorose.

L'effetto della “condensazione rientrante” fa sì che gli aggregati presentino un eccesso di nucleolipide e quelli con eccesso di DNA, abbiamo dimensioni inferiori a 200 nm.

Tramite le misure al light scattering dinamico è possibile ricavare informazione sulla dimensione delle particelle grazie all'utilizzo di opportuni modelli di fitting per le curve di autocorrelazione. In questo caso, trattandosi di sistemi polidispersi, l' algoritmo più appropriato è CONTIN^{[21][22]}.

Per i lipoplessi formati a partire dal nucleolipide C₁₈UMe e il DNA a singolo filamento di adenina, si ottiene l' andamento relativo alle dimensioni medie delle specie nei vari campioni di figura 10.

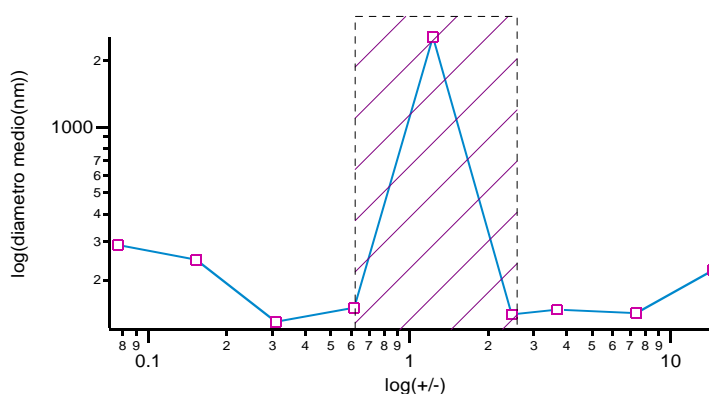


Figura10. Nel grafico è riportato il diametro medio dei complessi in funzione del rapporto +/- dei sistemi contenenti nuC₁₈UMe (a contrazione variabile) e dA₅₀ (con concentrazione fissa: 1.7µM). I dati sono stati raccolti al DLS.

Si noti come l'effetto della “condensazione rientrante” riporti simili i diametri delle specie nelle soluzioni simmetricamente poste a destra e a sinistra rispetto a quella critica. Gli aggregati che si formano in eccesso di nucleolipide, diminuiscono di grandezza senza però raggiungere i valori del campione con rapporto +/- pari a 0.3.

Inoltre, il picco maggiore in corrispondenza della soluzione con concentrazione di nucleolipide pari a 102 µM, è relativo a particelle con diametro superiore al micron, che continuamente evolvono e crescono fino a precipitare. Il corpo di fondo compare solo dopo alcune ore dalla preparazione del campione, ovvero dopo che la cinetica del sistema è conclusa. Nel grafico, l'intervallo di concentrazione “critico” è stato delimitato e tratteggiato.

Invece per il sistema dei complessi formati a partire dal nucleolipide C₁₈UMe e DNA a doppio filamento, si ottiene l'andamento che qui segue:

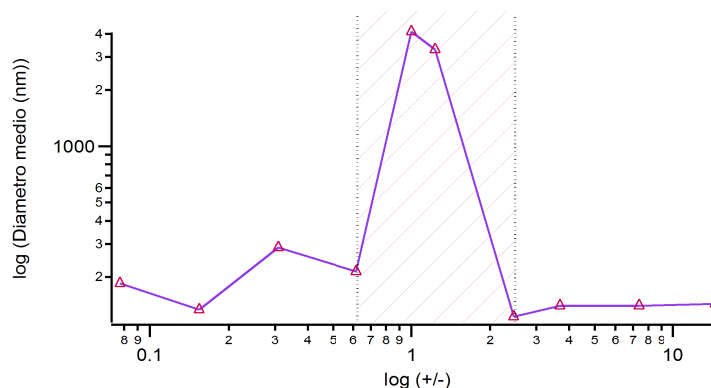


Figura11. Il grafico mostra l'andamento il diametro medio dei complessi in funzione del rapporto +/- dei sistemi contenenti nuC₁₈UMe (a concentrazione variabile) e dA₅₀dT₅₀ (a concentrazione fissa 1.7μM). I dati sono stati raccolti al DLS.

Il picco massimo è relativo alla soluzione con rapporto +/- pari all'unità. Le linee tratteggiate verticali indicano l'intervallo in cui le soluzioni sono instabili e presentano precipitato. Gli aggregati o i complessi di aggregati hanno dimensioni enormi fino a 4000 nm.

Anche in questo grafico si osserva l'effetto della “condensazione ri-entrante”. L'andamento dei due sistemi a confronto, in corrispondenza dei rapporti +/- inferiori a 1 e maggiori di 1, è differente. Per quanto riguarda il DNA single strand, il grafico mostra una certa simmetria; mentre per il double strand, prima dell'intervallo critico, i diametri sono abbastanza diversificati. Oltrepastato il punto isoelettrico le dimensioni restano pressoché costanti.

3.1.4 Misure di potenziale Zeta

Il potenziale Zeta è una tecnica consolidata per lo studio dei lipoplessi in quanto permette di determinarne densità di carica superficiale. Il potenziale Zeta è il potenziale elettrostatico dell'unità cinetica, ovvero dell'oggetto costituito dalla particella di campione e lo shell -composto da molecole di solvente, ioni e controioni adsorbiti- che si muove solidale ad essa. Il potenziale Zeta viene calcolato dalla mobilità elettroforetica assunta dalle particelle del campione all'interno di un campo elettrico. La seguente relazione lega il potenziale Zeta (ζ) e la mobilità elettroforetica μ :

$$\mu = \frac{2\epsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad \text{dove } \epsilon \text{ è la costante dielettrica, } \zeta \text{ è il potenziale zeta, } f(ka) \text{ è la}$$

funzione di Henry, k^{-1} è la lunghezza di Debye che caratterizza lo spessore del doppio strato che circonda la particella carica e dipende dalla forza ionica del mezzo, a è il raggio della particella e η è la viscosità del solvente. Ad una mobilità positiva corrisponde una particella carica positivamente, ad una mobilità negativa una particella carica negativamente. Quando la mobilità è zero, la velocità traslazionale è zero e questo implica che la repulsione elettrostatica è piccola.

Nel grafico di figura 12, sono riportati i valori del Potenziale Zeta del nucleolipide C₁₈UMe (alle concentrazioni maggiori della CMC) e del sistema del nucleolipide C₁₈UMe con dA₅₀ e con dA₅₀dT₅₀. La concentrazione del C₁₈UMe è compresa tra 6 μ M e 1204 μ M.

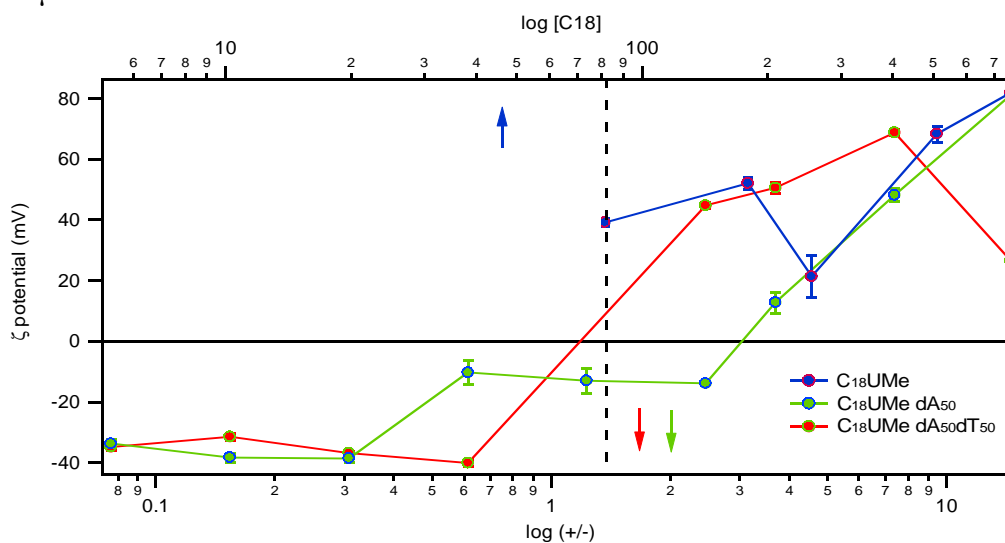


Figura12. Valore di potenziale ζ in funzione del rapporto (+/-) -asse delle ascisse inferiore- per le soluzioni che presentano lipoplessi. Valore di potenziale ζ in funzione del [C₁₈UMe] -asse superiore- per le soluzioni che presentano solo nucleolipide in soluzione acquosa.

I valori del del Potenziale Zeta di C₁₈UMe con dA₅₀ e quelli del C₁₈UMe con dA₅₀dT₅₀ sono molto simili, esclusa la regione compresa tra [C₁₈UMe]= 204 μM e 51μM , in questo intervallo, l'andamento del C₁₈UMe dA₅₀dT₅₀ segue una sigmoide. In entrambi i casi, in corrispondenza di bassi valori del rapporto +/-, il potenziale zeta è negativo, mentre via via che si aumenta la concentrazione di nucleolipide le misure risultano positive. Un comportamento molto simile si riscontra nei sistemi composti da CTAB e dA₅₀ o dT₅₀ oppure ancora dA₅₀dT₅₀^[14].

Il valore del Potenziale Zeta maggiore di zero assicura una buona stabilità del sistema, al contrario di fenomeni di aggregazione che invece si riscontrano in concomitanza del punto isoelettrico. Nelle curve che stiamo studiando, il punto isoelettrico risulta a un più basso rapporto +/- per le soluzioni con dA₅₀dT₅₀ rispetto alle soluzioni con dA₅₀. Il punto isoelettrico è il punto di massima instabilità e corrisponde all'inversione di carica che si verifica quando l'intera superficie complesso è neutralizzata.

La curva del solo nucleolipide in soluzione è posta al di sopra dello zero, era da aspettarselo trattandosi di un tensioattivo cationico.

Come è stato osservato, le misure al potenziale zeta dimostrano che l'interazione tra il polinucleotide dA₅₀ e il nucleolipide cationico è effettivamente basata su forze di natura elettrostatica^[18].

Risulta utile confrontare le misure del potenziale ζ e i dati ricavabili dal DLS. Esiste infatti una relazione tra sistemi stabili studiati tramite le due diverse tecniche.

In figura13, le linee verticali tratteggiate delimitano la regione in cui il sistema non è stabile e gli aggregati precipitano. Tuttavia l'inversione di carica si verifica in corrispondenza di un rapporto +/- superiore e quindi esterno alla delimitazione critica.

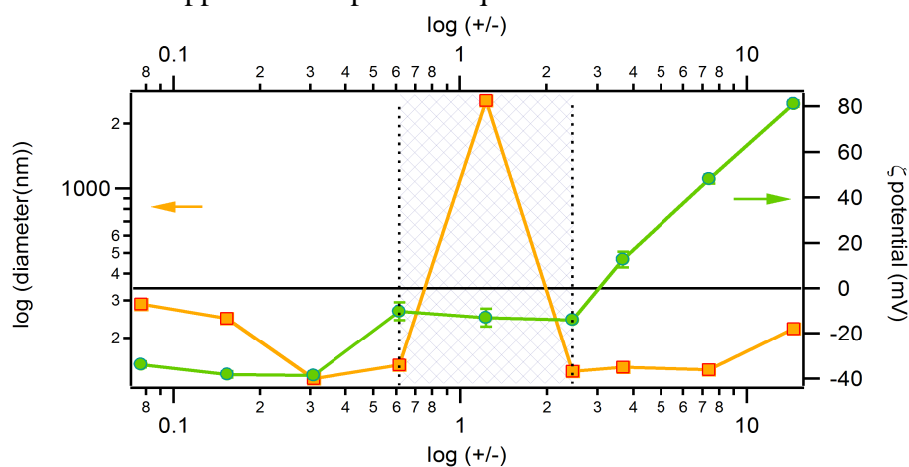


Figura13. Diametro medio in funzione del rapporto nucleolipide/ssA₅₀ (quadrati arancioni). Inoltre è riportato il potenziale ζ contro lo stesso logaritmo del rapporto +/- (cerchi verdi).

L'andamento delle dimensioni e del potenziale Zeta dei vari complessi mostra il cosiddetto effetto di “condensazione ri-entrante”. Tale fenomeno è stato definito per gli aggregati formati dall'aggiunta di poliioni a particelle colloidali di carica opposta. Quando il polielettrolita viene adsorbito sulla superficie della particella per attrazione elettrostatica questo si dispone in modo tale da minimizzare le repulsioni tra cariche concordi in catena, ovvero si forma una specie con distribuzione di carica non uniforme. Questa caratteristica di non omogeneità della carica genera un contributo di attrazione tra le varie particelle. Il fenomeno di aggregazione dipende però anche da un secondo contributo elettrostatico, ovvero la repulsione tra particelle con la stessa carica netta. Per tale motivo all'aumentare della quantità di poliione, visto che la carica netta tende a diminuire, prevale il contributo attrattivo e quindi le dimensioni degli aggregati aumentano. Raggiunta la condizione isoelettrica il fenomeno di aggregazione raggiunge il massimo. Oltre tale punto, le dimensioni diminuiscono nuovamente fino al valore iniziale o (come in questo caso) più grande per effetto di una maggiore quantità di polielettrolita adsorbito sulla superficie delle particelle.

In figura 14, la regione delimitata dalle linee tratteggiate è quella in cui il sistema non è stabile e gli aggregati precipitano. Tale intervallo comprende proprio il punto di neutralità, dove avviene l'inversione di segno al potenziale zeta.

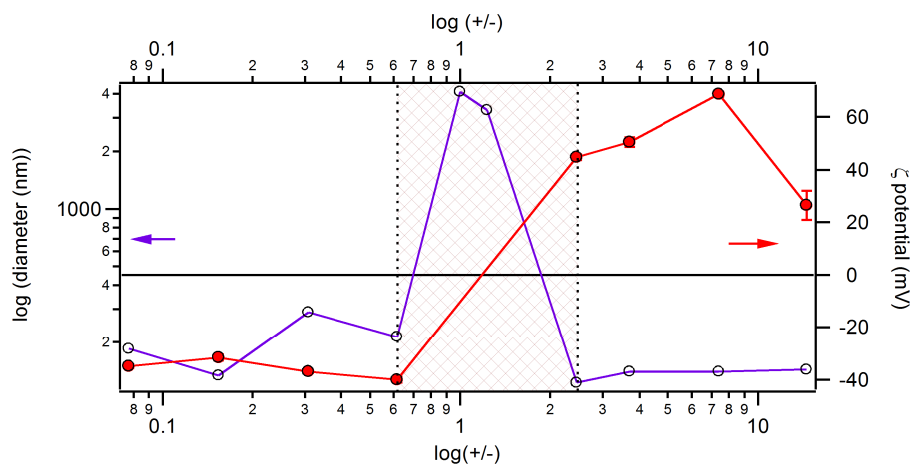


Figura14. Diametro medio in funzione del rapporto nucleolipide/dA₅₀dT₅₀ (cerchi vuoti viola). Inoltre è riportato il potenziale zeta in funzione del rapporto +/- (cerchi pieni rossi).

Se la dipendenza tra dimensioni degli aggregati rispetto all'efficienza della trasfezione è un dato che varia a seconda del sistema coinvolto, come dato generale risulta che una carica positiva dei lipoplessi favorisce una loro entrata nella cellula. I complessi con carica netta positiva risultano infatti più efficienti nella trasfezione in quanto sembra che

siano più efficacemente adsorbiti dalle membrane cellulari per interazione elettrostatica. Per esperimenti in vivo, però potrebbe portare a fenomeni di citotossicità. Un modello di interazione che spieghi i dati sopra riportati è il seguente: per bassi rapporti +/- gli aggregati più grandi sono ricoperti di DNA in eccesso, questo spiegherebbe il potenziale Zeta negativo misurato e la stabilità dei sistemi in considerazione; mentre per elevati rapporti +/-, la quantità di DNA per ogni lipoplesso è minore e dunque il Potenziale Zeta è positivo. Essendo il self-assembly funzione del nucleolipide, C₁₈UMe, al variare del rapporto +/- cambiano anche le dimensioni dei complessi. Il fenomeno è fortemente influenzato dalla flessibilità del polielettrolita. Il DNA a singolo filamento è comunemente molto più mobile e flessibile del doppio filamento, che essendo più compatto, risulta possedere maggiore rigidità.

3.1.5 Studio di cinetica

Mediante il Light Scattering Dinamico è possibile studiare anche l'evoluzione di un sistema nel tempo in termini di intensità di scattering e di determinazione dei coefficienti di diffusione delle particelle presenti. Sono state effettuate 480 scansioni consecutive della durata di due minuti ognuna. L'intensità di scattering, è un parametro che dipende dalla sesta potenza del raggio delle particelle in soluzione e dal loro numero: questa quantità è dunque utile per seguire la cinetica di aggregazione in soluzione. Il tempo zero corrisponde al momento in cui il campione è inserito nell'apposita cella di misura. Il sistema preso in considerazione è il campione che nel tempo sviluppa corpo di fondo, ovvero le soluzioni con rapporto +/- 1.2. Confrontando i sistemi con lipoplessi formati da dA_{50} e $dA_{50}dT_{50}$, si osservano modalità e tempi di precipitazione differenti.

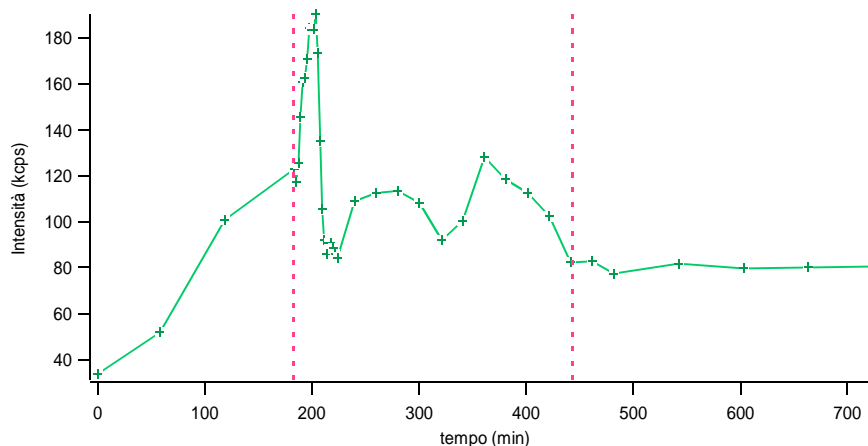


Figura15. Intensità di scattering (kcps) -del sistema con $\nu C_{18}UME$ con concentrazione $102\mu M$ e $dA_{50} 1.7\mu M$ - in funzione del tempo (mn).

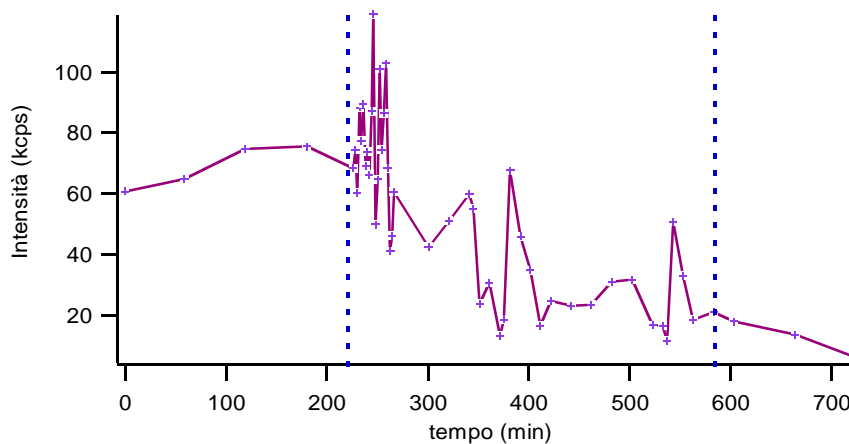


Figura16. Intensità di scattering (kcps) -del sistema con $\nu C_{18}UME$ con concentrazione $102\mu M$ e $dA_{50}dT_{50} 1.7\mu M$ - in funzione del tempo (min).

Dalle figure 15 e 16, si può schematizzare il meccanismo di formazione e precipitazione degli aggregati distinguendo tre fasi principali:

1. Fase di accrescimento degli aggregati: per il campione con $C_{18}UMe$ e dA_{50} si osserva un aumento lineare dell'intensità (da 20 kcps a 120 kcps) mentre per il sistema con $C_{18}UMe$ e $dA_{50}dT_{50}$ l'intensità si mantiene costante intorno a 60-70 kcps.
2. Fase di precipitazione: è la fase di maggiore instabilità del sistema. Per il campione con $C_{18}UMe$ e dA_{50} , l'andamento dell'intensità presenta dei picchi ben risolti: un picco massimo e due picchi più bassi con intensità minima di circa 80 kcps. Per il $C_{18}UMe$ e $dA_{50}dT_{50}$, l'intensità ha un andamento molto più variabile con massimi che si alternano a minimi in intervalli temporali molto stretti. L'intensità minima decresce e passa da 60 kcps a 20 kcps.
3. Fase di stabilizzazione: dopo la precipitazione il sistema $C_{18}UMe$ e dA_{50} presenta aggregati in soluzione, l'intensità si mantiene costante sugli 80 kcps. Il surnatante del sistema con $C_{18}UMe$ e $dA_{50}dT_{50}$ ha un'intensità di scattering che scende a zero.

Seppur non sia possibile da questi dati sperimentali distinguere la natura dell'interazione tra nucleolipide e dA_{50} o $dA_{50}dT_{50}$, quello che si conclude è la presenza di un differente comportamento di precipitazione in soluzione. Dal confronto delle cinetiche possiamo descrivere i due sistemi secondo due modelli differenti. Per il sistema con DNA a singolo filamento, l'aumento di intensità di scattering iniziale è dovuta all'accrescimento degli aggregati. In corrispondenza del rapporto +/- 1.2 nelle misure al Potenziale Zeta (figura 13) è stato registrato un valore negativo che testimonia la presenza di strutture stabili con eccesso di DNA. Nel modello di figura 17, l'accrescimento dell'aggregato coinvolge la progressiva interazione del nucleolipide con strati superficiali di dA_{50} (figura 17).

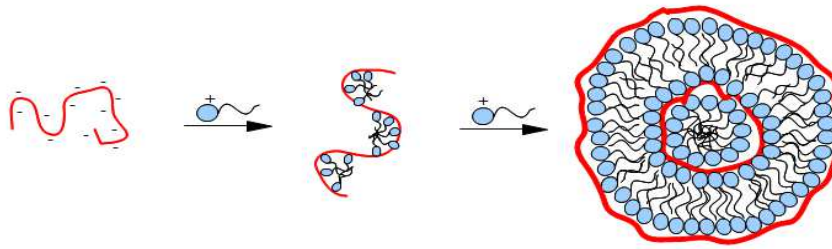


Figura17. Modello di aggregazione per C₁₈UME e dA₅₀.

Nel campione con DNA a doppio filamento, il processo di precipitazione avviene in un range temporale più ampio rispetto al sistema con dA₅₀ e l'intensità è costante, ma maggiore di quella iniziale per il singolo filamento; per i primi venti minuti. Possiamo supporre che si formino subito degli aggregati: con carica netta circa nulla, instabili e soggetti dunque ad una continua precipitazione una volta costituiti. Al Potenziale Zeta, per il rapporto +/- 1,2, si stima un valore vicino alla neutralità che conferma l'instabilità delle specie in soluzione e la conseguente precipitazione massiva. Il modello di aggregazione è mostrato in figura 18.

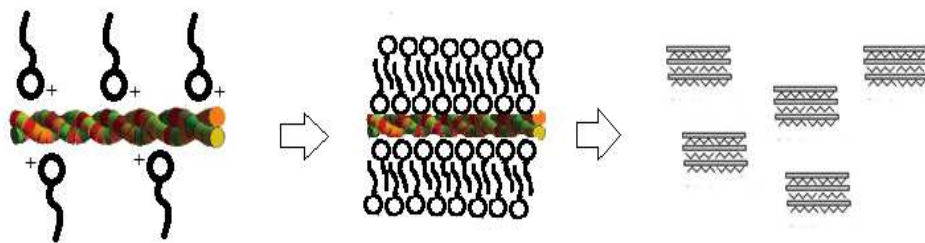


Figura18. Modello di aggregazione per C₁₈UME e dA₅₀dT₅₀.

3.1.7 Spettroscopia UV-visibile

Gli acidi nucleici assorbono la luce ultravioletta soprattutto a lunghezze d'onda da 254 nm a 260 nm. Tutto questo grazie all'interazione tra la luce UV e il sistema di anelli di purine e pirimidine. L'assorbimento degli acidi nucleici nasce da transizioni $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Si ottengono infatti spettri tra i 200 nm e i 300 nm, che risultano fortemente influenzati dalle interazioni elettroniche tra basi e molto sensibili al pH. Le bande apparentemente gaussiane sono in realtà molto più complesse, in quanto sono anche composte da più di una transizione elettronica. Comunque, le transizioni elettroniche più importanti di tutti gli acidi nucleici sono principalmente le $\pi \rightarrow \pi^*$. Queste ultime nascondono le transizioni $n \rightarrow \pi$ dovute ai ioni azoto e ossigeno.

L'uso del solvente acqua non interferisce nell'intervallo di lunghezze d'onda scelto.

Eseguendo una scansione sulle soluzioni contenenti lipoplessi di C₁₈UMe con dA₅₀, otteniamo gli spettri di figura 19.

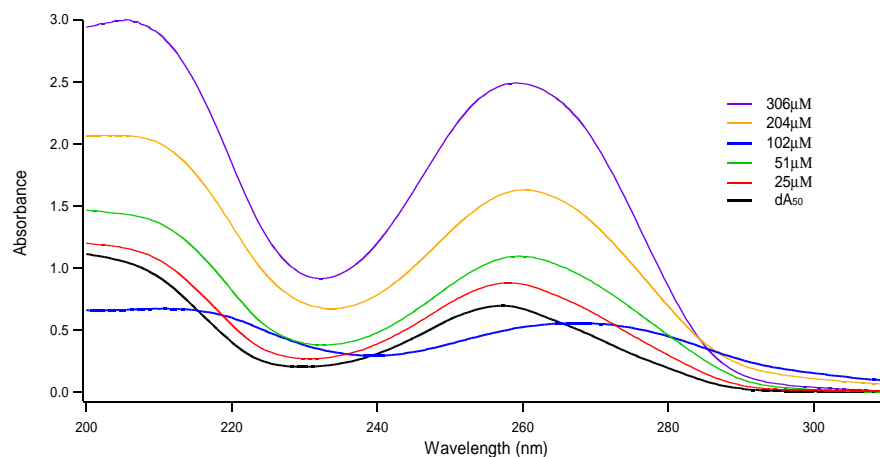


Figura 19. Assorbanza delle soluzioni di nucleolipide C₁₈UMe a varie concentrazioni, mantenendo costante quella del dA₅₀ (1.7 μM).

L'intensità di assorbanza cresce con l'aumento di concentrazione in accordo con la legge di Lambert Beer. É riportato anche lo spettro del dA₅₀ con concentrazione 1.7 μM in soluzione acquosa. La concentrazione del DNA rimane costante, dunque la variazione di assorbanza nei lipoplessi è dovuta all'aumento della concentrazione di C₁₈UMe.

Gli spettri sono confrontati con gli spettri ideali ottenuti dalla somma delle curve relative al solo nucleolipide in soluzione acquosa e del solo DNA in soluzione acquosa per capire quanto i componenti di un sistema interagiscono tra loro.

Per ogni campione, sono riportati i valori ε che sono stati calcolati come scarto relativo $\Delta\varepsilon = |(\varepsilon_R - \varepsilon_I) / \varepsilon_I|$. La lunghezza d'onda scelta è 260 nm, in coincidenza del picco di massima intensità di assorbimento del DNA.

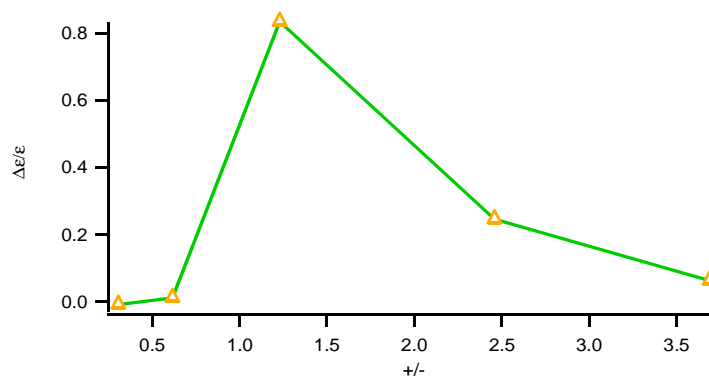


Figura20. Scarto relativo, $\Delta\varepsilon/\varepsilon$, delle curve reali da quelle ricavate dalla somma aritmetica, in funzione del rapporto +/-.

In figura 20, si osserva che gli scarti maggiori si presentano per i rapporti +/- maggiori di uno. Questo indica che a concentrazione più alte di $C_{18}UME$ si ha un maggiore effetto ipocromico nello spettro di assorbimento a 260 nm, dovuto all'interazione delle basi uridina con dA_{50} . L'effetto ipocromico è tipico del DNA, in cui la doppia elica ha intensità di assorbimento molto inferiore rispetto ai due filamenti isolati. Inoltre l'effetto ipocromico determina arrangiamenti strutturali particolari del polimero con le micelle del tensioattivo. Quando il DNA è in eccesso gli spettri si assomigliano molto, dunque l'interazione risulta minore.

Per tutti i rapporti +/-, il picco di massimo nel caso ideale si trova a lunghezze d'onda minori rispetto al picco del caso reale. Dunque, si verifica un'interazione che ha l'effetto di stabilizzare lo stato π^* , abbassandone quindi, l'energia, e di aumentare la lunghezza d'onda della banda corrispondente.

In figura 21 sono riportati gli spettri di assorbimento del sistema $C_{18}UME$ e $dA_{50}dT_{50}$. La concentrazione del DNA rimane costante mentre la concentrazione di nucleolipide varia nell'intervallo $6 \mu M - 612 \mu M$.

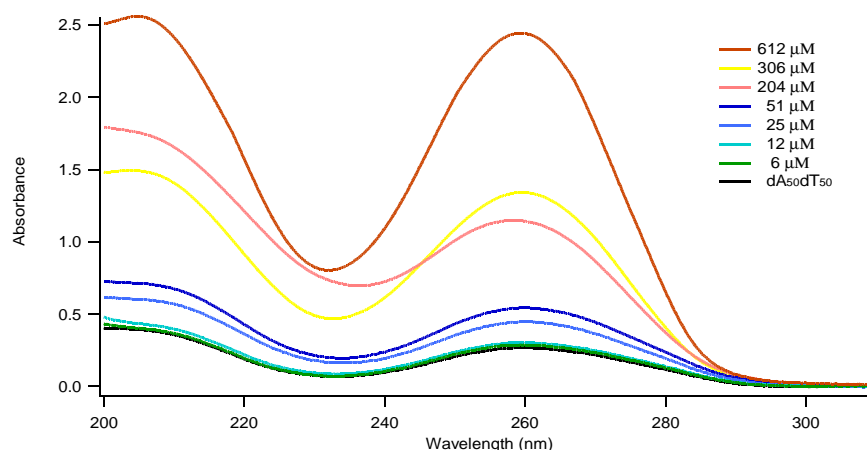


Figura21. Assorbanza contro lunghezza d'onda delle soluzioni di nucleolipide C₁₈UME a varie concentrazioni, mantenendo costante quella del dA₅₀dT₅₀ (1.7μM).

Il confronto con gli spettri “ideali” ottenuti per somma aritmetica dei componenti puri è riportato in figura 22.

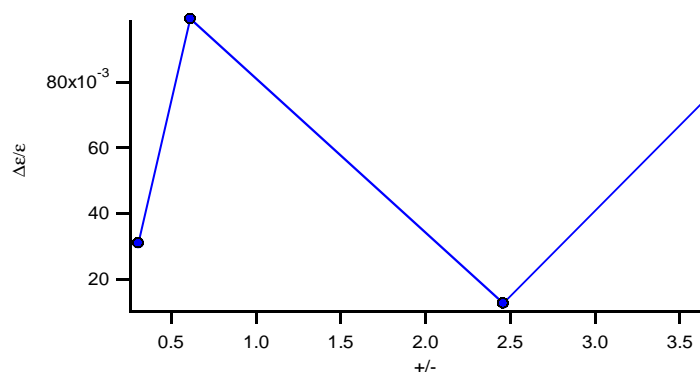


Figura22. Scarto, espresso come $\Delta\epsilon/\epsilon$, delle curve reali da quelle ricavate dalla somma aritmetica in funzione del rapporto +/-.

3.1.7 Dicroismo Circolare

Il Dicroismo circolare (CD) è una tecnica spettroscopica utile per la determinazione di alcune forme di struttura secondaria e di alcune forme di struttura terziaria che derivano dalla condensazione degli acidi nucleici in soluzione. L'effetto CD negli acidi nucleici riguarda le transizioni elettroniche delle basi aromatiche. Queste sono planari e quindi di per sé achirali, ma una volta legate ad uno zucchero chirale costituiscono un sistema asimmetrico a cui corrisponde un debole segnale CD nei nucleotidi monomerici. La chiralità di una specie, e di conseguenza l'effetto di dicroismo circolare, non è semplicemente una proprietà intrinseca in una molecola in quanto dipende fortemente

dalla sua conformazione. Il dicroismo circolare è funzione di tutti quei parametri che influiscono sulla conformazione molecolare, quali temperatura, concentrazione, solvente e intorno chimico in generale. La spettroscopia CD è particolarmente sensibile al preciso aspetto dell' elica del DNA^{[23][16]}. Generalmente, la debole chiralità dei lipidi permette di ben risolvere segnale relativo alla componente del DNA. Nel nostro caso il nucleolipide contribuisce al segnale dicroico per la presenza di uridina sulla testa polare. I tensioattivi di natura cationica apportano variazioni alla canonica forma B del DNA^[24], le cui caratteristiche sono: la banda positiva sui 275 nm, un segnale negativo sui 245 nm e un punto di crossover vicino i 258 nm^[25]. Spesso in presenza dei tensioattivi cationici, la conformazione B della doppia elica evolve nella forma C^[26].

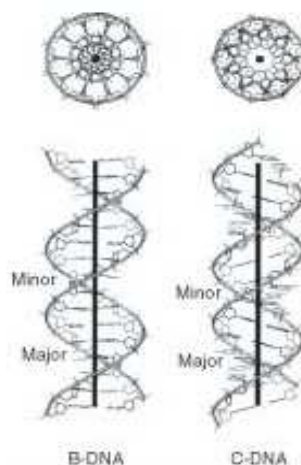


Figura23. Struttura del B-DNA e del C-DNA.

Quando il DNA è in soluzione acquosa assume la conformazione B e l'aspetto tipico è quello descritto secondo il modello di Watson e Crick: una doppia elica con passo di 3.4 nm costituito da 10 basi, con angolo di rotazione di 36.8° e cross section è 2 nm. La struttura del B DNA presenta un solco maggiore ricoperto da uno strato di molecole d'acqua che interagiscono con i gruppi fosfato dello scheletro covalente e un solco minore in cui si trova una molecola d'acqua per ogni base aromatica.

L'interazione tra le cariche positive del tensioattivo e i gruppi fosfato del DNA crea una competizione con le molecole d'acqua. In queste condizioni, la conformazione C risulta più idonea, perché maggiormente compatta. La forma C dispone di 9.3 basi per giro e l'angolo di rotazione risulta 36°.

Nello spettro CD, le differenze strutturali si evidenziano con facilità in quanto l'intensità

di un C-DNA è molto minore in corrispondenza del segnale positivo, si presenta un red shift , ma rimane costante il segnale negativo come intensità e posizione.

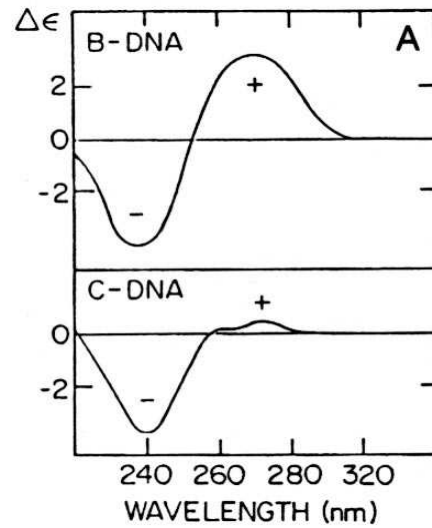


Figura24. Spettro CD per le due diverse conformazioni della doppia elica del DNA: B-DNA e C-DNA.

In figura 25 è riportato lo spettro del solo nucleolipide $C_{18}UME$ in soluzione acquosa:

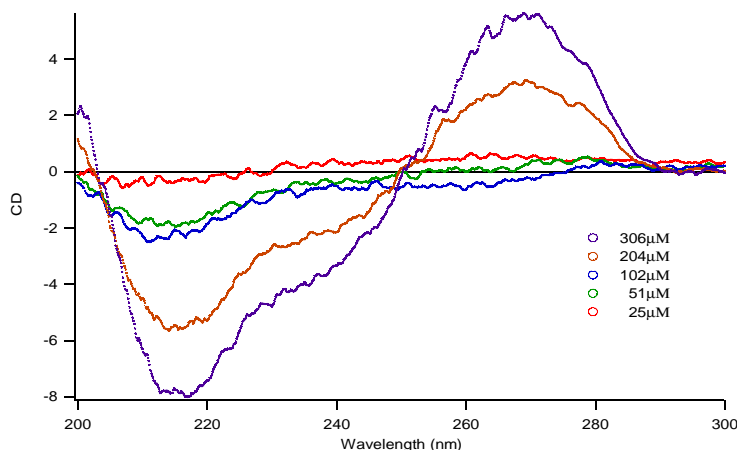


Figura25. Spettri CD delle soluzioni acquosa di $C_{18}UME$ alle varie concentrazioni riportate nella legenda.

Il segnale registrato è proporzionale alla concentrazione di $C_{18}UME$: aumenta nella regione positiva e diminuisce in quella negativa.

Se al $C_{18}UME$ aggiungiamo anche il DNA vediamo come la formazione del lipoplesso determini uno spettro CD più articolato in cui compaiono nuove bande. Infatti oltre al contributo della nucleobase uracile è presente quello delle adenine del singolo filamento dA_{50} .

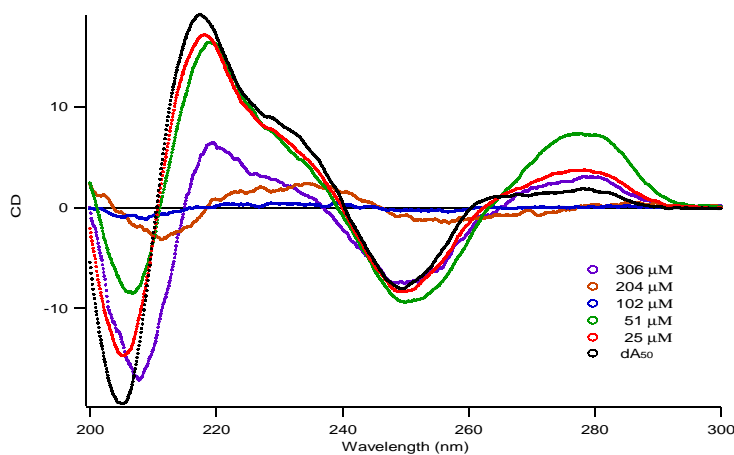


Figura26. Spettro CD delle soluzioni con $C_{18}UME$ a concentrazione variabile, a cui è riferita la legenda, e dA_{50} a concentrazione fissa: 1.7 μM

In figura 26 sono riportati gli spettri CD dei lipoplessi di $C_{18}UME$ e dA_{50} insieme allo spettro del solo DNA. Possiamo osservare una banda positiva tra 290 nm e 260 nm, in cui abbiamo la prima inversione di segno, un picco minimo attorno ai 250 nm e infine di nuovo una regione positiva tra i 240 nm e i 210 nm. Lo spettro CD del campione con

rapporto +/- 0.6 ($[C_{18}UMe]= 51\mu M$) presenta la banda più intensa a 280 nm mentre il campione con rapporto +/- 3.7 ($[C_{18}UMe]= 306\mu M$) ha un picco positivo a 220 nm meno intenso rispetto a quello delle altre soluzioni.

Anche per il dicroismo circolare si può valutare come gli spettri sperimentali siano diversi da quelli ottenuti sommando gli spettri dei singoli componenti.

Per i confronti che seguono sono state escluse le soluzioni con opalescenza ovvero quelle con concentrazione di $C_{18}UMe$ 204 μM e 102 μM .

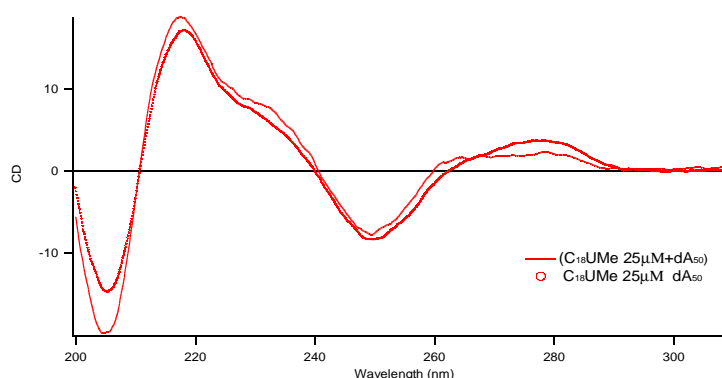


Figura27. Spettri CD a confronto somma algebrica dei singoli campioni dA_{50} e $C_{18}UMe$ e curva ottenuta dal caso reale della soluzione di $C_{18}UMe$ e dA_{50}

In figura 27, caso ideale e reale si somigliano molto, eccetto la banda positiva tra i 260 nm e i 290 nm che è diversa soprattutto per la forma, oltre per intensità.

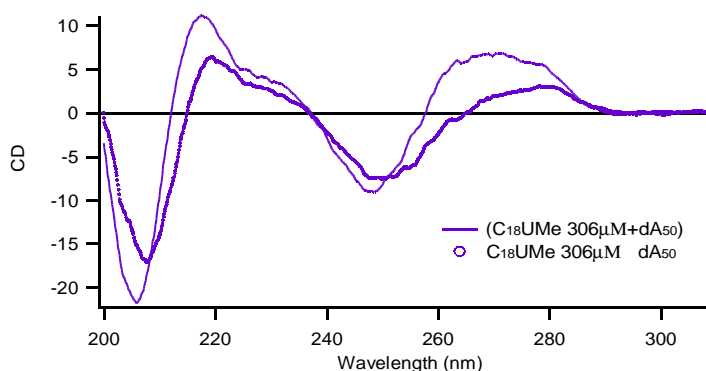


Figura28. Spettri CD a confronto somma algebrica dei singoli campioni dA_{50} e $C_{18}UMe$ e curva ottenuta dal caso reale della soluzione di $C_{18}UMe$ e dA_{50} .

Nella figura 28, il sistema ideale ha un'intensità maggiore e il massimo della componente positiva dello spettro risulta a lunghezze d'onda maggiori rispetto allo spettro misurato. Anche la forma della banda positiva tra 260 nm e 290 nm è molto diversa in entrambi i casi.

Le deviazioni dall' "idealità" sono più accentuate per i rapporti +/- maggiori di uno, quindi nei sistemi in cui il complesso presenta un eccesso $C_{18}UMe$ rispetto al dA_{50} si verificano le variazioni strutturali maggiori

Per il sistema con DNA a doppio filamento, gli spettri sono quelli riportati in figura 29.

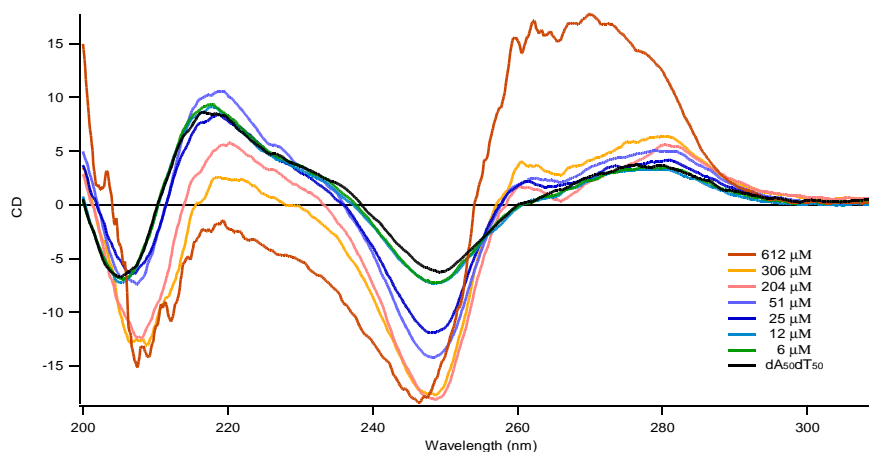


Figura29. Spettro CD delle soluzioni con $C_{18}UMe$ a concentrazione variabile e $dA_{50}dT_{50}$ a concentrazione fissa: $1.7\mu M$

La regione di destra a λ maggiori di 260 nm presenta un segnale dicroico la cui intensità cresce con l'aumento di concentrazione di nucleolipide, mentre a sinistra l'andamento è opposto. A 220 nm è presente una banda positiva e una spalla a circa 230nm. Si osserva un minimo intorno a 250 nm. A 280 nm si registra un massimo positivo di forma molto diversa e che è meno intenso dell'altra banda positiva a lunghezze d'onda minori.

Per le soluzioni con il più basso valore del rapporto +/-, si presenta una somiglianza particolare con la curva del $dA_{50}dT_{50}$. Dalla morfologia di questi spettri si può notare che la doppia elica adotta la caratteristica conformazione B e via via che la concentrazione del tensioattivo cationico aumenta, si verifica una transizione verso la forma C del DNA (vedi figura24).

A 260 nm ci sono notevoli differenze da un campione all'altro. In questo punto, le curve relative alla concentrazione di nucleolipide $12\mu M$ e $6\mu M$ e quella del $dA_{50}dT_{50}$ si sovrappongono; con i campioni con rapporto +/- è uguale a 0.616 e 0.308 ($[C_{18}UMe]= 51\mu M$ e $25\mu M$) compare una spalla. Per la soluzione con rapporto +/- = 2.5 ($[C_{18}UMe]= 204\mu M$) si osservano massimi consecutivi a circa 260 nm e 270 nm. Questa caratteristica scompare con il campione con concentrazione di $C_{18}UMe$ $306\mu M$.

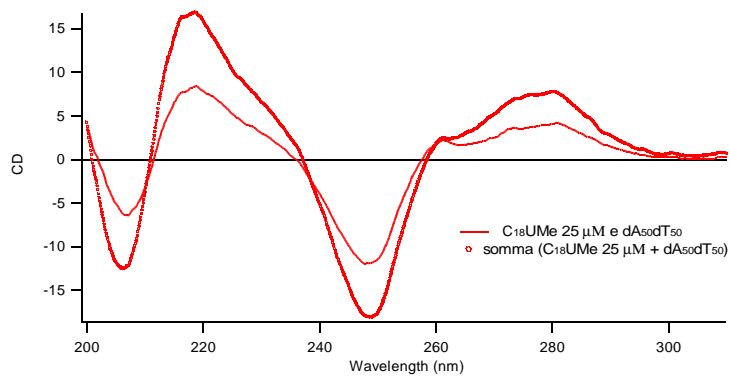


Figura30. Spettri CD a confronto somma algebrica dei singoli campioni dA₅₀dT₅₀ e C₁₈UME e curva ottenuta dal caso reale della soluzione di C₁₈UME con dA₅₀dT₅₀

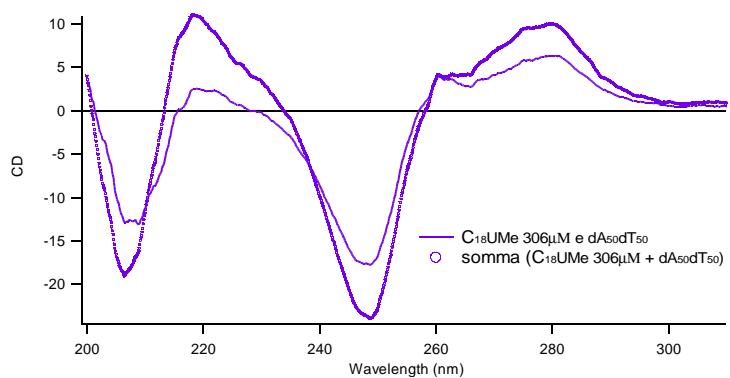


Figura31. Spettri CD a confronto somma algebrica dei singoli campioni dA₅₀dT₅₀ e C₁₈UME e curva ottenuta dal caso reale della soluzione di C₁₈UME con dA₅₀dT₅₀

La morfologia degli spettri CD nel caso ideale e reale, delle figure 30 e 31, è simile per entrambe le concentrazioni limite di nucleolipide (25μM e 306μM) mentre l'intensità del segnale dicroico varia in tutto il range di lunghezze d'onda considerato.

3.1.9 Esperimenti di UV-melting

Sono stati effettuati esperimenti di UV-melting sulle soluzioni dei lipoplessi di C₁₈UMe e DNA al fine di determinare la temperatura di melting e la stabilità termodinamica dei sistemi sotto studio^[27]. Le misure sono state eseguite monitorando l'assorbanza a 260 nm durante il riscaldamento dei campioni a 25°C a 75°C e il successivo raffreddamento fino a temperatura ambiente. La velocità di incremento e decremento di temperatura impostata è di 0.5°C al minuto.

Dall'analisi dei sistemi dei componenti puri, nucleolipide C₁₈UMe in soluzione acquosa e dA₅₀dT₅₀ in soluzione acquosa, si osserva che le curve di riscaldamento e raffreddamento non sono nelle condizioni sperimentali in cui si è lavorato. Nel caso del dA₅₀ non si osserva la tipica curva sigmoideale del melting, come atteso, e il valore di assorbanza di partenza coincide con quello di fine misura (figura 34).

Per il solo nucleolipide in soluzione l'assorbanza diminuisce in valore assoluto, al contrario per dA₅₀ e dA₅₀dT₅₀ aumenta nella prima rampa di riscaldamento e poi diminuisce mentre torna a 25°C.

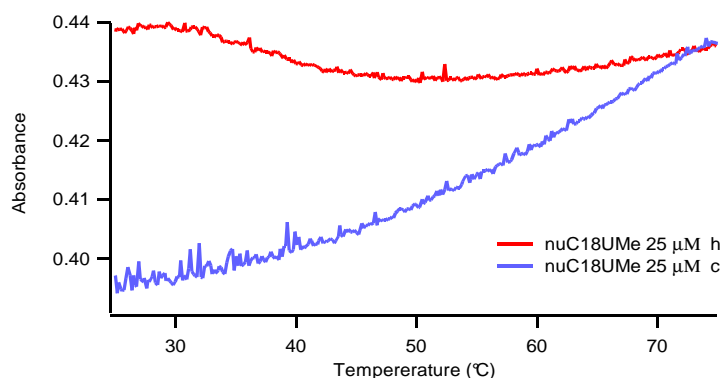


Figura32. Assorbanza in funzione della temperatura di C₁₈UMe in H₂O con concentrazione 25 μM. h=riscaldamento, c=raffreddamento.

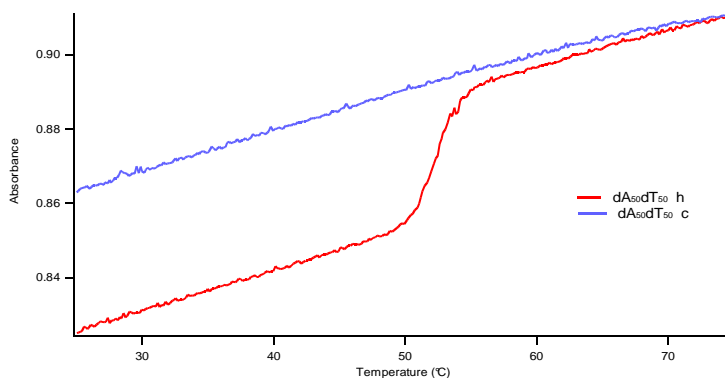


Figura33. Assorbanza in funzione della temperatura di dA₅₀dT₅₀ in H₂O con concentrazione 1.7 μM. h=riscaldamento, c=raffreddamento.

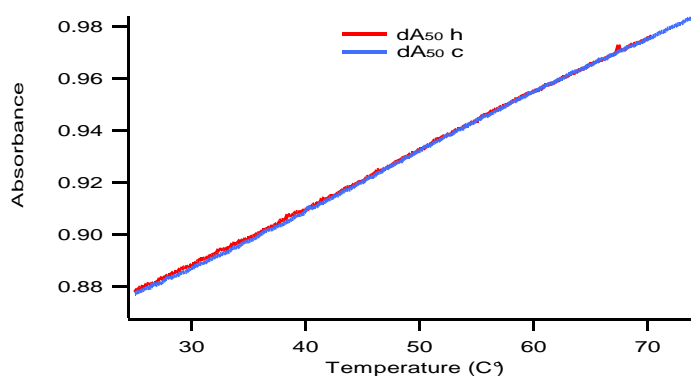


Figura34. Assorbanza in funzione della temperatura di dA_{50} in H_2O con concentrazione $1.7\mu M$. h=riscaldamento, c=raffreddamento.

La non reversibilità delle curve di melting è una caratteristica che si può osservare nelle soluzioni dei lipoplessi e in quelle con DNA a singolo filamento.

Per il sistema con dA_{50} riportiamo i seguenti grafici:

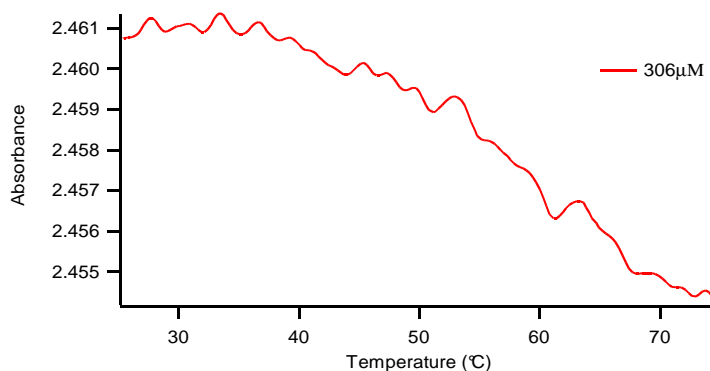


Figura35. Assorbanza in funzione della temperatura. Rampa di riscaldamento. $[C_{18}UMe]=306\mu M$ e $[dA_{50}]=1.7\mu M$.

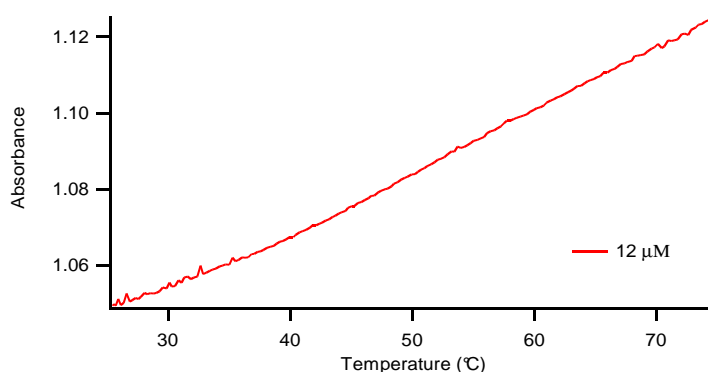


Figura36. Assorbanza in funzione della temperatura. Rampa di riscaldamento. $[C_{18}UMe]=12\mu M$ e $[dA_{50}]=1.7\mu M$.

Come è da attendersi, dove il nucleolipide è in eccesso il suo contributo prevale su quello del dA_{50} e viceversa quando il nucleolipide è in difetto prevale il contributo del dA_{50} (figura 35 e 36).

Per il sistema con i lipoplessi formati a partire dal $dA_{50}dT_{50}$, si può osservare, per basse concentrazioni di $C_{18}UMe$, il tipico andamento sigmoidale della curva di melting del DNA (figura 38).

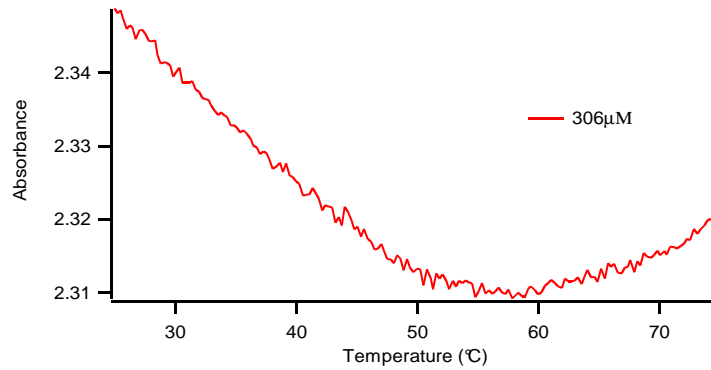


Figura37. Assorbanza in funzione della temperatura. Rampa di riscaldamento. $[C_{18}UMe]=306\mu M$ e $[dA_{50}]=1.7\mu M$.

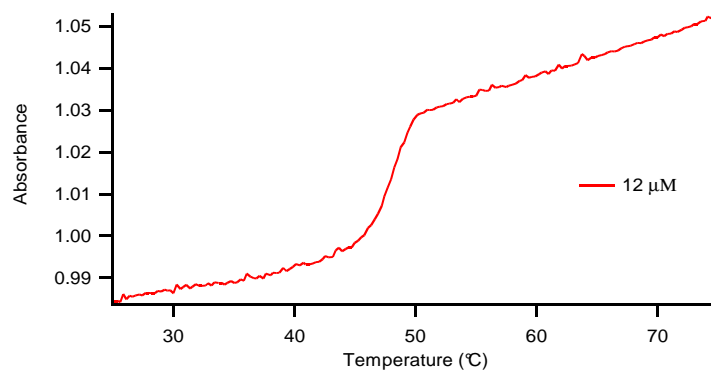


Figura38. Valori di assorbanza contro temperatura. Rampa di riscaldamento. $[C_{18}UMe]=12\mu M$ e $[dA_{50}]=1.7\mu M$.

La rampa di melting tipica del DNA a doppia elica è osservabile per la concentrazione di nucleolipide $12\mu Me$ mentre compare nei sistemi in cui c'è eccesso $C_{18}UMe$.

I sistemi a cui corrisponde la caratteristica curva sono relativi ai rapporti ± 0.616 , 0.3 e 0.1 (figura 39). Si osserva uno spostamento graduale della temperatura di melting, cioè della temperatura caratteristica del DNA che corrisponde al punto di flesso della sigmoide e alla quale si ha il 50% di DNA dissociato.

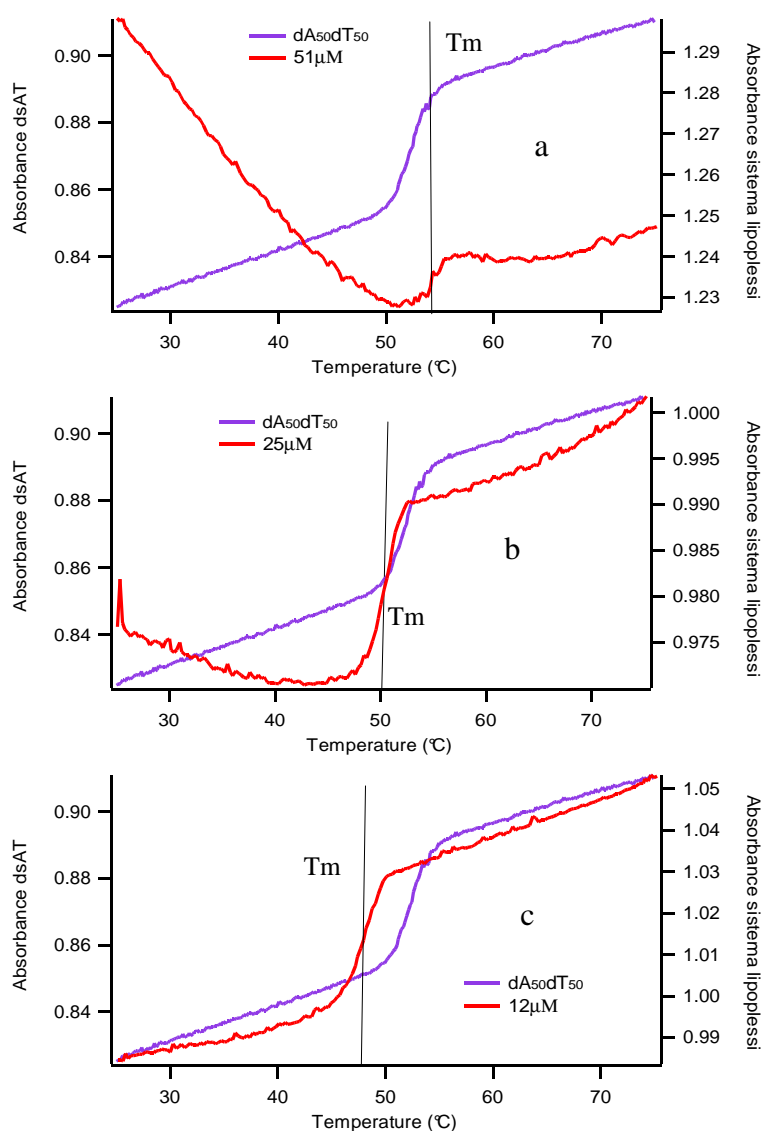


Figura 39. Grafici di melting a confronto tra il sistema con $C_{18}UME$ $dA_{50}dT_{50}$: a) $[C_{18}UME]=51 \mu M$ e $[dA_{50}dT_{50}] 1.7 \mu M$; b) $[C_{18}UME]=25 \mu M$ e $[dA_{50}dT_{50}] 1.7 \mu M$; c) $[C_{18}UME]=12 \mu M$ e $[dA_{50}dT_{50}] 1.7 \mu M$

Con la diminuzione della concentrazione di nucleolipide, si osserva una diminuzione della temperatura di melting: $T_m = 54^\circ C$ per $[C_{18}UME]=51 \mu M$, $T_m = 51^\circ C$ per $[C_{18}UME]=25 \mu M$, $T_m = 48^\circ C$ per $[C_{18}UME]=12 \mu M$. Considerando che la T_m determinata dallo spettro del $dA_{50}dT_{50}$ è $52^\circ C$, possiamo concludere che il DNA acquista stabilità termodinamica nei lipoplessi a concentrazione di $C_{18}UME \geq 51 \mu M$ (rapporto $\pm 0,62$), mentre risulta termodinamicamente più instabile nei lipoplessi con basse concentrazioni di lipide.

Tenendo conto della non reversibilità di tutti i sistemi, sono stati acquisiti spettri di assorbanza UV-visibile e misure al light scattering dinamico sugli stessi campioni prima e dopo l'esperimento di melting, per capire se e come si modifica la struttura dei

lipoplessi in seguito alle variazioni di temperatura.

Dopo le misure di melting, effettuando un confronto con i valori ottenuti dalle scansioni eseguite subito dopo la preparazione dei campioni, l'assorbanza diminuisce. Il grafico 40 riporta lo scarto tra prima e dopo il melting, espresso come valore relativo di ϵ , per ciascuna soluzione di C₁₈UMe e dA₅₀:

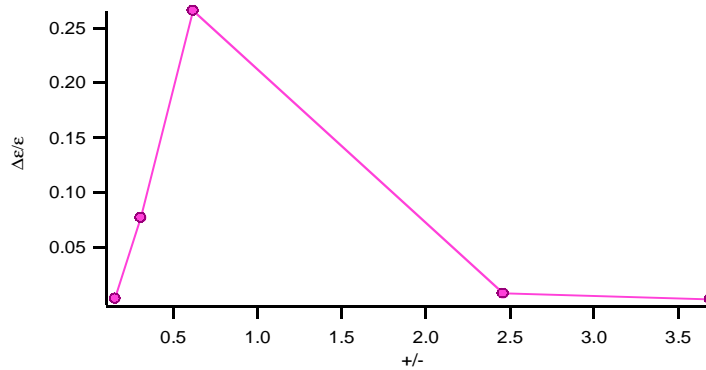


Figura40. $\Delta\epsilon/\epsilon$, delle curve prima e dopo le misure di melting dei lipoplessi di C₁₈UMe e dA₅₀. [dA₅₀]=1.7 μ M.

Lo scarto maggiore si osserva per i campioni con rapporto +/- 0.6 e 0.3 ([C₁₈UMe= 51 μ M e 25 μ M]). Per gli altri sistemi lo scarto è quasi nullo.

Per il sistema contenente il DNA con doppio filamento, si ottiene un andamento molto simile al dA₅₀ (figura41); anche in questo caso l'assorbanza dopo il melting diminuisce soprattutto con rapporto +/- 0.6 e 0.3 ([C₁₈UMe= 51 μ M e 25 μ M]).

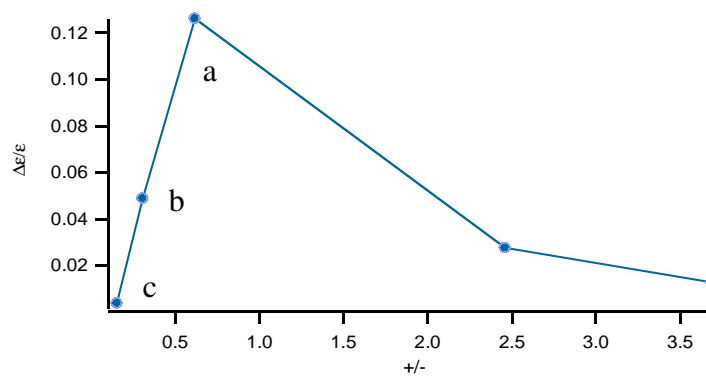


Figura41. $\Delta\epsilon/\epsilon$, delle curve prima e dopo le misure di melting dei lipoplessi di C₁₈UMe e c. [dA₅₀dT₅₀]=1.7 μ M.

La figura 42 riporta modifiche successive al melting per il solo nucleolipide C₁₈UMe in soluzione:

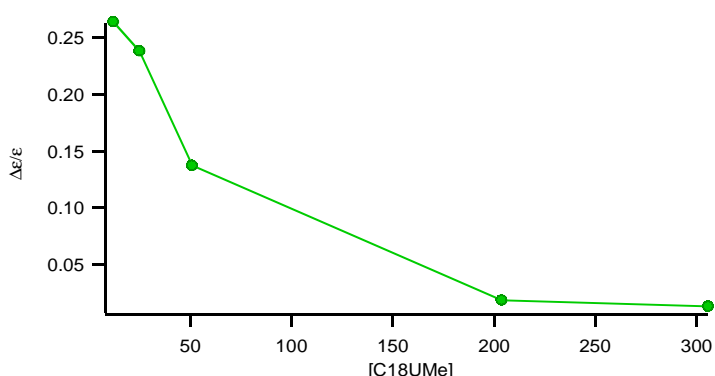


Figura42. $\Delta\varepsilon/\varepsilon$, delle curve prima e dopo le misure di melting dei campioni con C₁₈UMe e in H₂O.

In questo caso la massima variazione si riscontra per concentrazioni minime di nucleolipide.

Sono state eseguite misure di light scattering dinamico per valutare i cambiamenti strutturali tramite analisi delle curve di autocorrelazione. Dal fitting di queste curve si possono ricavare i diametri delle specie in soluzione. Confrontando le dimensioni delle specie prima e dopo il melting, si osserva per il sistema con C₁₈UMe e dA₅₀ una diminuzione dei diametri di quasi un ordine di grandezza. Le maggiori differenze si riscontrano per le soluzioni con rapporto +/- 3.7 e 2.5. I lipoplessi, infatti, si compattano in seguito a successivi cicli di melting. Questo fenomeno si osserva maggiormente a concentrazioni di C₁₈UMe via via crescenti. L'andamento dei diametri con la concentrazione di C₁₈UMe è opposto prima e dopo il melting. Prima del melting i diametri sono minori alle concentrazioni di nucleolipide più basse, dopo al contrario, i diametri sono minori alle concentrazioni più alte.

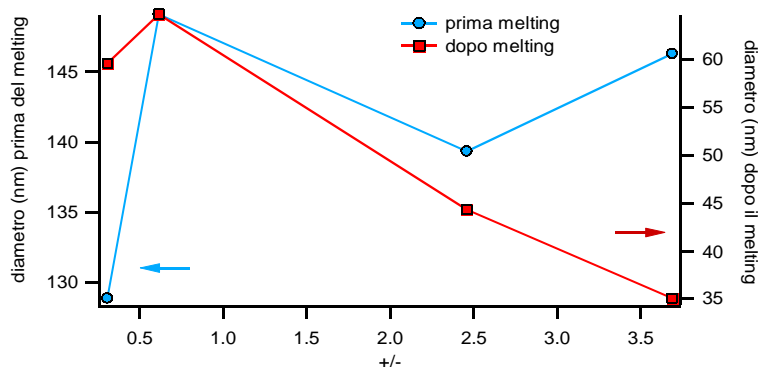


Figura43. Diametri delle varie soluzioni prima e dopo il melting del sistema a concentrazione variabile di C₁₈UMe e il dA₅₀ con concentrazione 1.7μM.

Per il sistema con C₁₈UMe e dA₅₀dT₅₀, si ha un'ulteriore diminuzione della grandezza delle specie in soluzione. Per il campione con concentrazione di nucleolipide 12 μM, si verifica una differenza di circa 200 nm. Ciò nonostante, se messi a confronto i due andamenti sono molto simili tra loro.

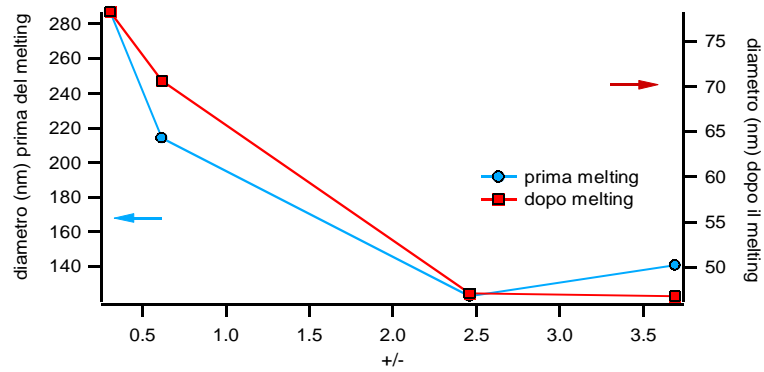


Figura44. Diametri delle varie soluzioni prima e dopo il melting del sistema a concentrazione variabile di C₁₈UMe e il dA₅₀dT₅₀ con concentrazione 1.7μM.

Anche se le dimensioni siano cambiate, i lipoplessi con DNA a doppio filamento rimangono comunque più grandi dei lipoplessi con DNA a singolo filamento. L'andamento dei diametri con la concentrazione di C₁₈UMe è lo stesso prima e dopo il melting, a differenza del caso con dA₅₀.

3.1.9 Small-angle X-ray scattering

Il SAXS è una tecnica fondamentale per lo studio delle sostanze colloidali, per determinarne la forma, la dimensione (da pochi nanometri a 100 nanometri) e la struttura interna. Il SAXS è adatto per l'analisi degli aggregati supramolecolari, come micelle o sistemi “self-assembled”. Può anche essere visto come una tecnica complementare al light scattering dinamico, in quanto indaga all'interno della struttura particellare:

Metodo	Lunghezza d'onda tipica	Range in nm^{-1}
Laser light scattering	500	10^{-3} - $4 \cdot 10^{-2}$
SAXS	0,15	$2 \cdot 10^{-2}$ - $4 \cdot 10^{-1}$

Tabella n°2. Confronto DLS e SAXS.

Le misure al SAXS sono state eseguite sul precipitato delle soluzioni di lipoplessi aventi rapporto +/- 1,2. Gli spettri in figura 45 mostrano la presenza di un picco di una struttura. Alla luce dei dati sperimentali non siamo in grado di stabilire con esattezza quale sia effettivamente la nanostruttura dei complessi. Si ipotizza una fase lamellare (L^c_a), tipica della maggior parte dei lipoplessi, in cui i filamenti di DNA si trovano tra due doppi strati lipidici. Generalmente, l'organizzazione strutturale dipende dalle caratteristiche del lipide e dal rapporto tensioattivo cationico/ DNA.

Dai picchi di figura 48, si nota che il campione con dA_{50} ha un periodo di ripetizione lamellare 48.5 \AA , maggiore di quello del campione con $dA_{50}dT_{50}$, che è di 45.4 \AA .

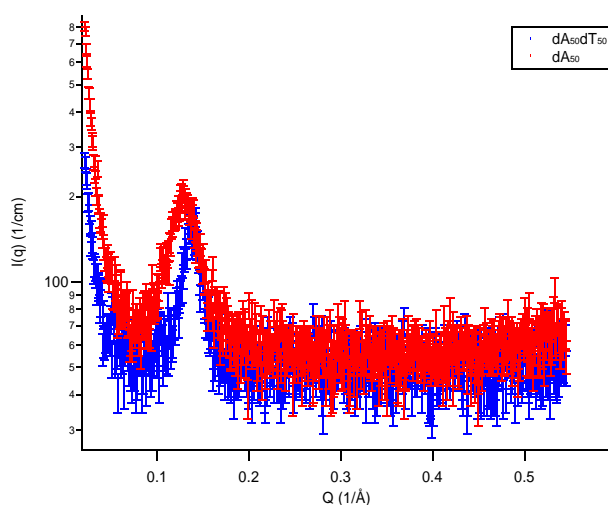


Figura45. Spettro SAXS del campione $C_{18}UMe dA_{50}dT_{50}$ (curva blu) e del $C_{18}UMe dA_{50}$ (curva rossa).

3.2 Lipoplessi con DNA a singolo filamento a confronto

Al fine di valutare l'effetto del riconoscimento molecolare tra il tensioattivo cationico e un singolo filamento di acidi nucleici, oltre al sistema con lipoplessi formati a partire da dA₅₀, è stato inoltre preparato un sistema composto da un DNA con 50 basi timina. Si vuol dunque dimostrare che, data la presenza di un' uridina sulla testa cationica del nucleolipide C₁₈UMe, l'interazione con un acido nucleico sia favorita dalla presenza delle basi complementari, cioè adenine. Nel caso del dT₅₀ l'interazione tra lipide e DNA sarebbe dunque essenzialmente di tipo elettrostatico (tra i gruppi fosfato dello scheletro del DNA e l'ammonio quaternario del nucleolipide). Dalla diversa natura dell'interazione tra i componenti si vuole capire se si formano lipoplessi aventi strutture e morfologie diverse.

Le soluzioni con dT₅₀ sono state preparate con lo stesso procedimento dei sistemi già esaminati e utilizzando le medesime concentrazioni, mantenendo costante quella del DNA.

Le concentrazioni dei campioni studiati sono riportate in tabella n°3.

[C ₁₈ UMe]	[dT ₅₀]	+/-
1204 µM	83 µM	14,5
612 µM	83 µM	7,4
306 µM	83 µM	3,7
204 µM	83 µM	2,5
102 µM	83 µM	1,2
51 µM	83 µM	0,6
25 µM	83 µM	0,3
12 µM	83 µM	1,5
6 µM	83 µM	0,1

Tabella n°3. Concentrazioni di C₁₈UMe e DNA utilizzate

In azzurro sono evidenziati i campioni con rapporto +/- maggiore dell'unità e in rosa quelli con rapporto +/- minore di uno. Il rapporto +/- 1.2 è relativo al campione più instabile in soluzione.

Ripetendo le stesse misure eseguite per i sistemi di C₁₈UMe / dA₅₀ e dA₅₀dT₅₀, vogliamo adesso caratterizzare i lipoplessi con dT₅₀ e vedere le differenze con i precedenti sistemi.

3.2.1 Dynamic light scattering

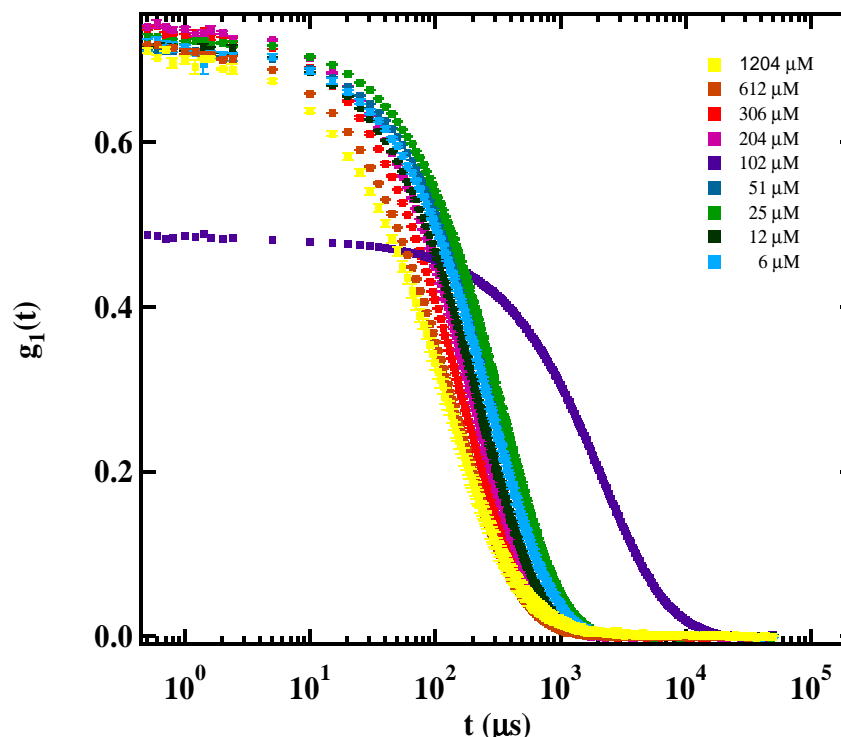


Figura46. Curve di autocorrelazione relative alle soluzioni di nucleolipide a concentrazione variabile -come si vede dalla legenda- e dT_{50} a concentrazione fissa, $1.7 \mu\text{M}$. Il grafico mostra la funzione di autocorrelazione $g^1(t)$ in funzione del tempo t (μs).

Le intensità di scattering registrate aumentano al crescere del rapporto +/- . La soluzione con concentrazione di nucleolipide $102 \mu\text{M}$ è, anche per questo sistema, opalescente. Infatti dalle analisi della funzione si ottiene che in soluzione sono presenti specie che superano i 1000 nm .

È evidente l'effetto di "condensazione rientrante", ovvero che in eccesso e in difetto di nucleolipide le dimensioni dei lipoplessi sono confrontabili. Le soluzioni con concentrazione vicina a quella critica di $C_{18}\text{UMe}$, presentano curve di autocorrelazione con tempi di rilassamento maggiori rispetto a quelle con concentrazione di $C_{18}\text{UMe}$ $1204 \mu\text{M}$. Con i lipoplessi formati dal singolo filamento di 50 adenine (figura 8), le dimensioni delle soluzioni con il più alto e il minore rapporto +/- hanno invece le stesse dimensioni.

Estrapolando le dimensioni delle specie prima e dopo l'intervallo critico possiamo vedere che tipo di andamento presenta il sistema $C_{18}UMe$ dT_{50} al variare della concentrazione di nucleolipide.

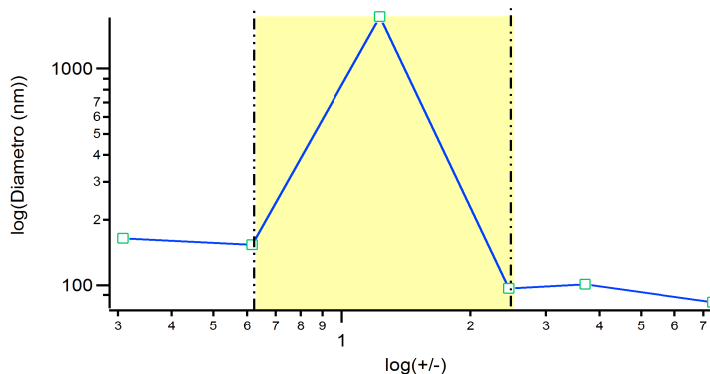


Figura47. Diametro medio in funzione del rapporto +/-, dove la concentrazione del tensioattivo cationico $C_{18}UMe$ varia, mentre la concentrazione del dT_{50} è costante: $1.7\mu M$.

Come già si osserva dalle curve di autocorrelazione, le soluzioni con rapporto +/- superiore all'unità hanno in soluzione specie più piccole di quelle soluzioni con rapporto +/- inferiori all'unità. Dal confronto degli andamenti registrati in figura 47 e in figura 48, i diametri delle specie costituite da $C_{18}UMe$ dT_{50} sono più simili a quelli dei lipoplessi con $dA_{50}dT_{50}$ che a quelli con dA_{50} . I complessi formati a partire da dT_{50} sono più piccoli di quelli dei sistemi precedentemente presentati.

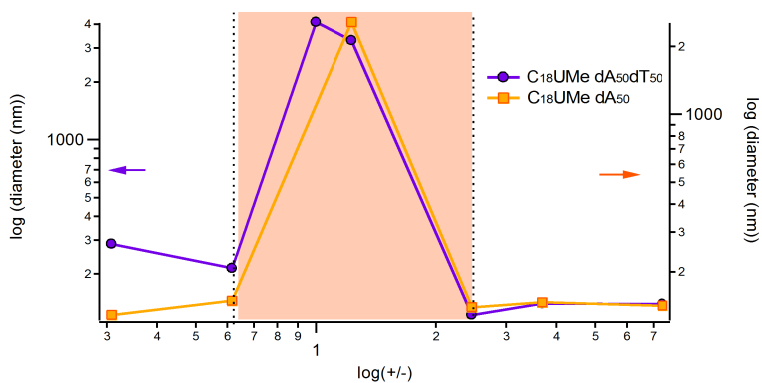


Figura48. Diametro medio in funzione del rapporto +/-, Confronto tra gli andamenti tra il sistema con $C_{18}UMe$ e dA_{50} e tra il sistema con $C_{18}UMe$ e $dA_{50}dT_{50}$.

3.2.2 Spettroscopia UV-visibile

All'aumentare della concentrazione crescono i valori di assorbanza a 260 nm. Al variare della concentrazione di C₁₈UME nei campioni, non si osserva il red shift della banda di assorbimento (come osservato con dA₅₀).

La particolarità di questo grafico consiste nel fatto che lo spettro UV del dT₅₀ da solo in soluzione abbia valore di assorbanza maggiore dei sistemi dove si hanno contemporaneamente C₁₈UME e dT₅₀, dunque oltre al contributo delle timine anche quello delle uridine.

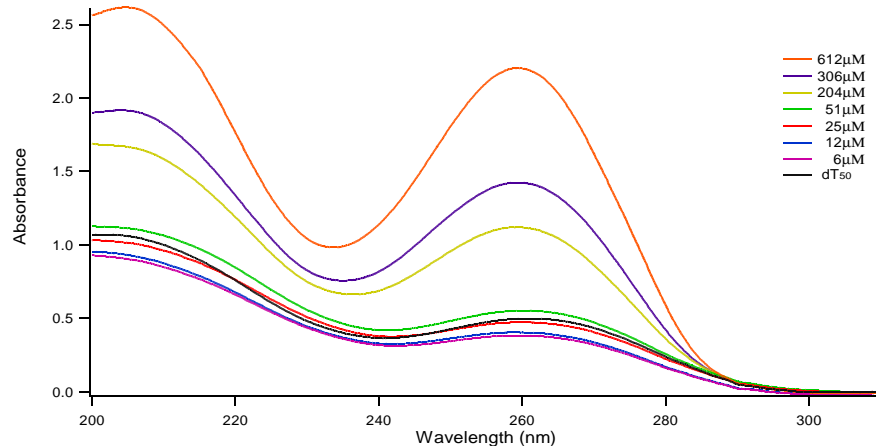


Figura49. Gli spettri UV sono di campioni contenenti il nucleolipide C₁₈UME a concentrazione variabile – come si vede dalla legenda – e il DNA a singolo filamento dT₅₀ a concentrazione fissa (1.7 μM).

3.2.3 Dicroismo Circolare

Gli spettri CD, mostrati in figura 50, presentano una banda negativa a lunghezze d'onda inferiori di 260nm e una banda positiva a lunghezze d'onda superiori. Lo spettro presenta un piccolo blue-shift del segnale positivo a 280 nm alla concentrazione di C₁₈UME più alte.

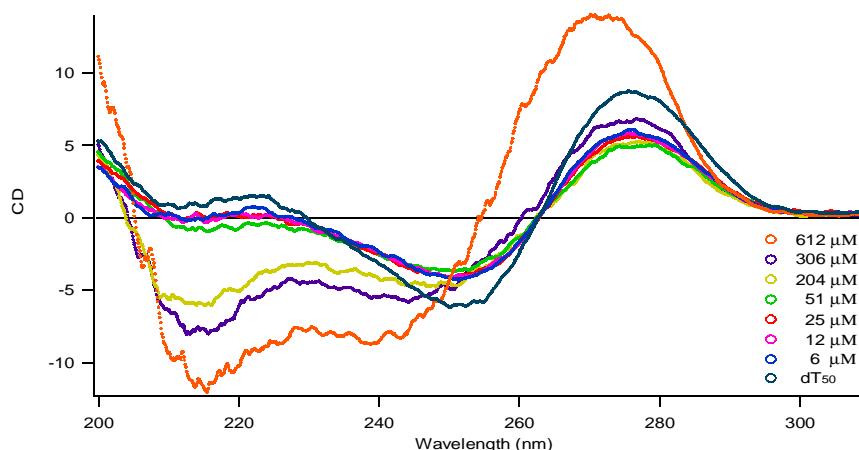


Figura50. Intensità CD in funzione della lunghezza d'onda (nm). Le soluzioni contengono il nucleolipide C₁₈UME a concentrazione variabile – vedi legenda – e il dT₅₀ a concentrazione fissa (1.7μM).

La curva relativa alla soluzione con concentrazione 612 μM, ha una banda negativa che si estende da 210 nm fino a 255 nm e un picco positivo che arriva fino a 300nm. Le curve con concentrazione 306 μM e 204 μM mostrano che la banda negativa si trova a circa 263 nm; il picco negativo è molto meno intenso della curva precedentemente descritta. Prendendo in esame i restanti quattro campioni con rapporto +/- inferiore all'unità, si può notare spettri tra loro quasi identici.

Si osserva, poi, una banda negativa che si trova tra i 225 nm e i 263 nm e un picco positivo che si sovrappone alla curva gialla relativa al campione con rapporto +/- 2.5. Questi ultimi spettri mostrano una somiglianza con lo spettro del solo dT₅₀ in acqua, essendo questo in eccesso nelle soluzioni che stiamo prendendo in considerazione; è ragionevole ipotizzare una variazione strutturale del DNA nel lipoplesso in corrispondenza del punto isoelettrico.

Un utile confronto consiste nel porre nello stesso grafico uno spettro CD misurato sperimentalmente e un altro ottenuto dalla somma aritmetica degli spettri CD relativi al C₁₈UME in soluzione acquosa e al dT₅₀ in soluzione acquosa. In figura 51 e in figura 52 sono riportati gli spettri CD dei campioni con concentrazione di nucleolipide pari a

25 μ M e 306 μ M. In entrambi i casi si osserva che non c'è molta differenza nella morfologia degli spettri a confronto; si osserva soltanto una diversa intensità dal massimo e dal minimo di assorbimento. Il sistema in esame risulta diverso dal punto di vista delle interazioni dai sistemi studiati in precedenza, soprattutto dal sistema C₁₈UME e dA₅₀ dove si osservavano significative variazioni dall'“idealità” nella forma e nell'intensità dei segnali CD (vedi figura 27 e 28). Questo dimostra che nei campioni con dT₅₀, le interazioni tra DNA e lipide hanno un minore contributo legato alle basi aromatiche e sono prevalentemente di tipo elettrostatico in quanto l'uridina e la timina non sono basi complementari secondo Watson-Crick.

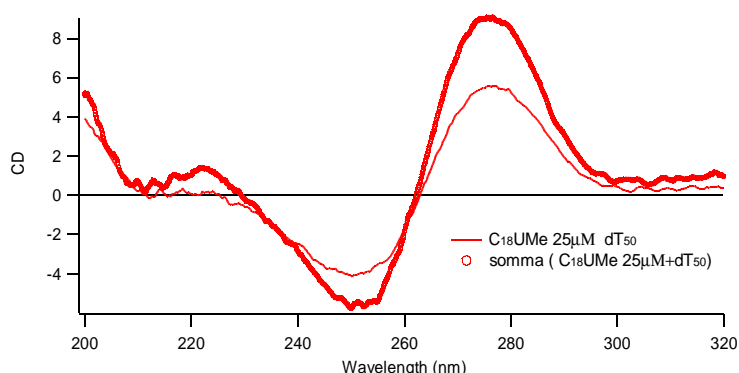


Figura51. Spettro reale e ideale CD del sistema con C₁₈UME in concentrazione 25 μ M e dT₅₀ 1.7 μ M, curva con linea continua.

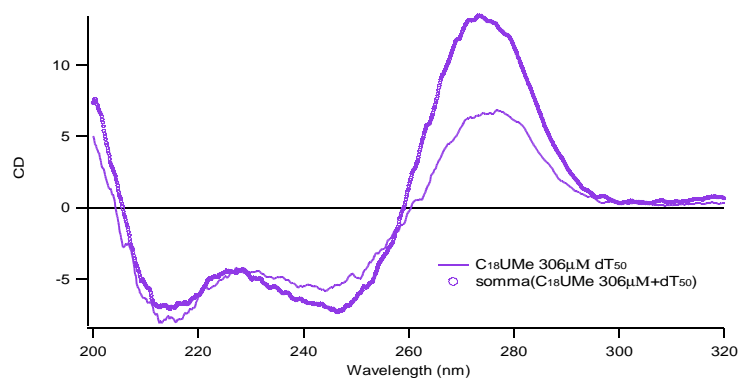


Figura52. Spettro reale e ideale CD del sistema con C₁₈UME in concentrazione 306 μ M e dT₅₀ 1.7 μ M, curva con linea continua.

3.3 Lipoplessi con DNA/C₁₈UMe e con DNA/CTAB

Continuando lo studio sull'effetto del riconoscimento molecolare sull'aggregazione tra C₁₈UMe e DNA a singolo e doppio filamento, sono state preparate soluzioni analoghe utilizzando CTAB (figura 53), un lipide cationico con 16 atomi di carbonio come modello di tensioattivo cationico aspecifico.

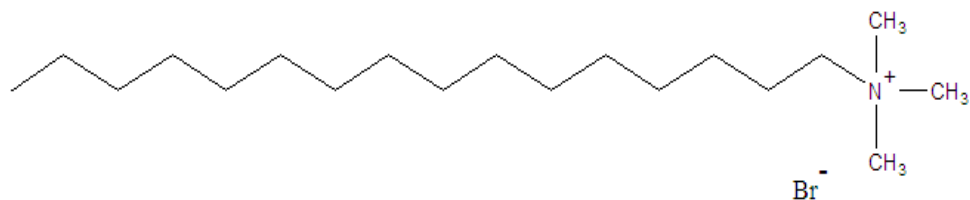


Figura53. Formula chimica del CTAB.

In questo capitolo, sarà posta l'attenzione sulle differenze riscontrate tra sistemi CTAB e C₁₈UMe con il DNA a singolo filamento dA₅₀ e tra sistemi CTAB e C₁₈UMe con DNA a doppio filamento dA₅₀dT₅₀. I dati e le informazioni ricavate sono stati forniti dalle stesse analisi eseguite sui sistemi analizzati nei capitoli precedenti.

Sono state preparate cinque campioni con concentrazione di C₁₈UMe e CTAB riportate in tabella n°4:

[CTAB]	[dA ₅₀] o [dA ₅₀ dT ₅₀]	+/-
306 µM	83 µM	3,7
204 µM	83 µM	2,5
102 µM	83 µM	1,2
51 µM	83 µM	0,6
25 µM	83 µM	0,3

Tabella n°4: Concentrazioni di C₁₈UMe e DNA utilizzate.

Per l'analisi si sono scelti due rapporti +/- limite 3.7 e 0.3, corrispondenti alla massima e alla minima concentrazione di nucleolipide.

3.3.1 Dynamic light Scattering: CTAB e dA₅₀

I tre campioni con eccesso di lipide sono opalescenti le misure sono state eseguite dopo un giorno così da poter ottenere sistemi più stabili. Il campione con concentrazione di CTAB 204 µM ha precipitato e la sospensione liquida che lo sovrasta è limpida. La soluzione con 25µM di lipide è l'unica che non presenta opalescenza. Per questo sistema riusciamo a eseguire misure della soluzione con rapporto +/- pari a 1.2.

Nel grafico di figura 54, sono confrontate le curve di autocorrelazione dei campioni corrispondenti alle concentrazioni di lipide e nucleolipide pari a 25 µM.

L'andamento osservato è differente da un sistema all'altro: si nota soprattutto che i complessi nel sistema con C₁₈UMe sono più piccoli, infatti la relativa curva presenta tempi di rilassamento minori di quella del CTAB.

Anche per i campioni con concentrazione 306µM di tensioattivo, figura 55, si verifica che il CTAB forma specie più grandi dei lipoplessi con nucleolipide.

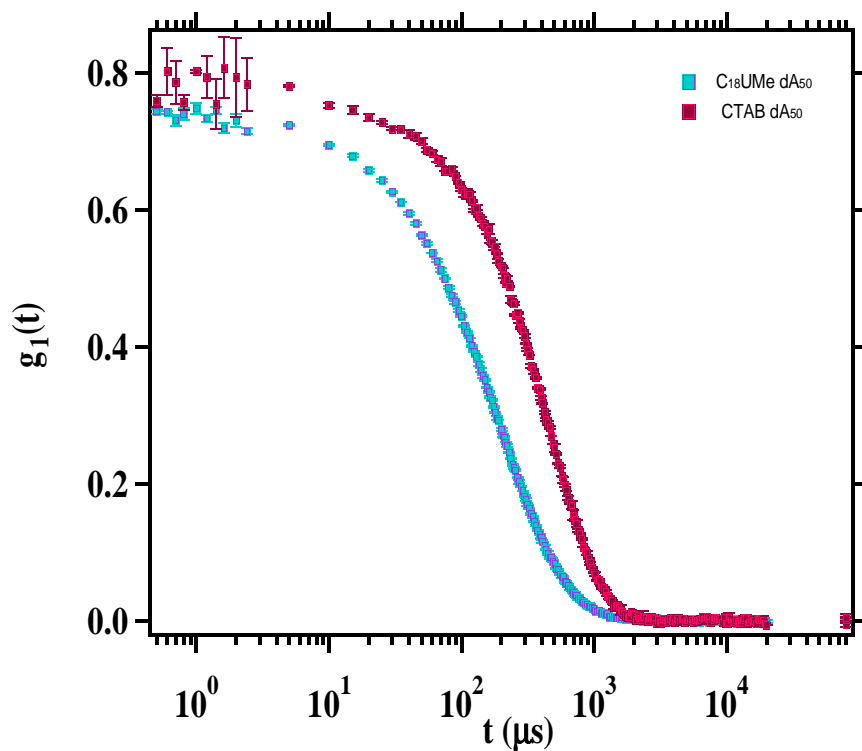


Figura54. Curve di correlazione, di CTAB e dA₅₀ e C₁₈UME e dA₅₀ . La concentrazione del tensioattivo cationico è 25μM, quella di dA₅₀ è 1.7μM.

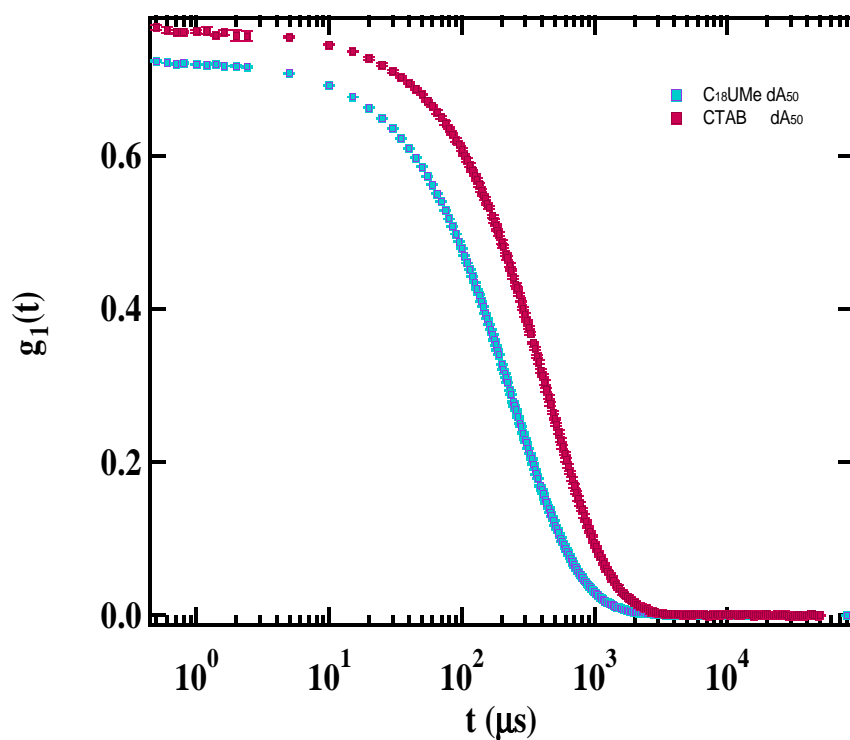


Figura55. Curve di correlazione di CTAB e dA₅₀ e C₁₈UME dA₅₀. La concentrazione del tensioattivo cationico è 306μM, quella di dA₅₀ è 1.7μM.

Mettendo insieme le informazioni sui diametri medi ottenuti tramite le misure al DLS – figura56 –, si osservano diversi intervalli di criticità riguardo alle soluzioni opalescenti o con precipitato. Il CTAB è instabile in un'ampia regione di concentrazione di tensioattivo e si ha la precipitazione per un rapporto +/- 2,5. Il diametro medio dei lipoplessi formati da C₁₈UMe è in media inferiore a quello con CTAB di circa 40 nm.

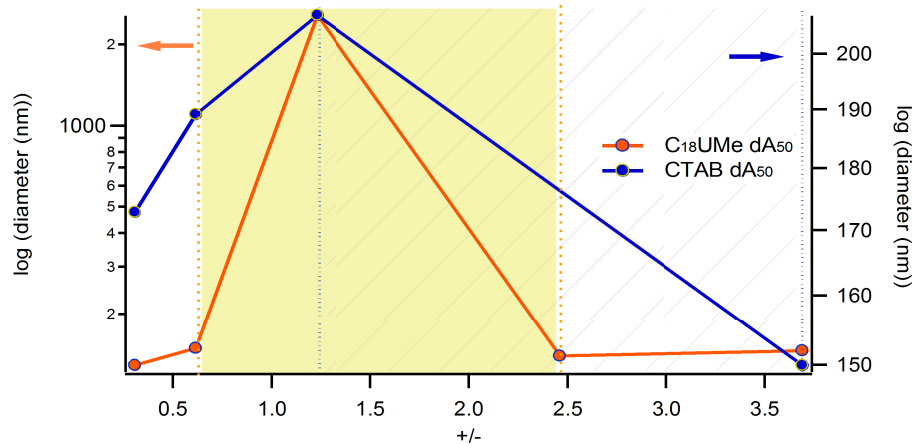


Figura56. Diametri medi -ricavati al DLS- contro il rapporto +/- . La spezzata gialla rappresenta il sistema nuC₁₈UMe e dA₅₀, la spezzata blu rappresenta il sistema CTAB e dA₅₀. [DNA]=1.7μM.

3.3.2 Dynamic light Scattering: CTAB e dA₅₀dT₅₀

Nell'intervallo di concentrazione da noi utilizzato, i sistemi con CTAB e dA₅₀dT₅₀ sono instabili: il range di soluzioni in cui si verifica precipitazione di aggregati è più esteso rispetto agli altri sistemi studiati e riguarda i rapporti +/- 3,7 e 2,5.

In generale, si osserva l'effetto della “condensazione ri-entrante” che è ancora più accentuato in quanto le curve hanno tempi di rilassamento differenti, quindi le dimensioni degli aggregati variano molto da un campione all'altro.

Come accade per i campioni con filamento singolo di DNA, i lipoplessi con CTAB risultano di dimensioni maggiori rispetto a quelli con C₁₈UMe.

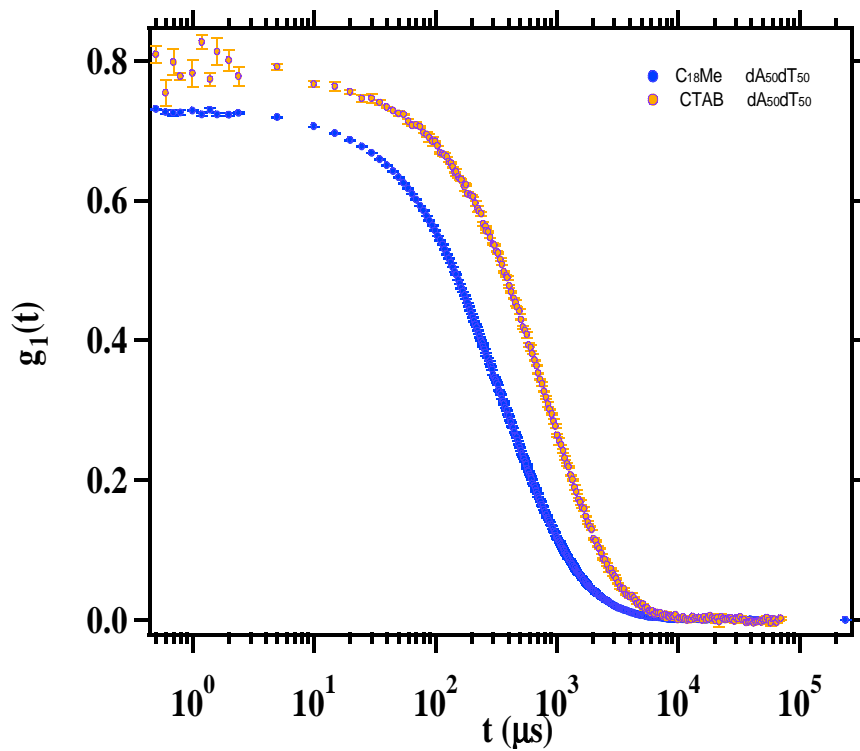


Figura57. Curve di correlazione, registrate al DLS, relative al sistema con CTAB e $dA_{50}dT_{50}$ e al sistema $C_{18}UMe$ e $dA_{50}dT_{50}$. La concentrazione del tensioattivo cationico è $25 \mu M$, mentre la concentrazione di $dA_{50}dT_{50}$ è $1.7 \mu M$.

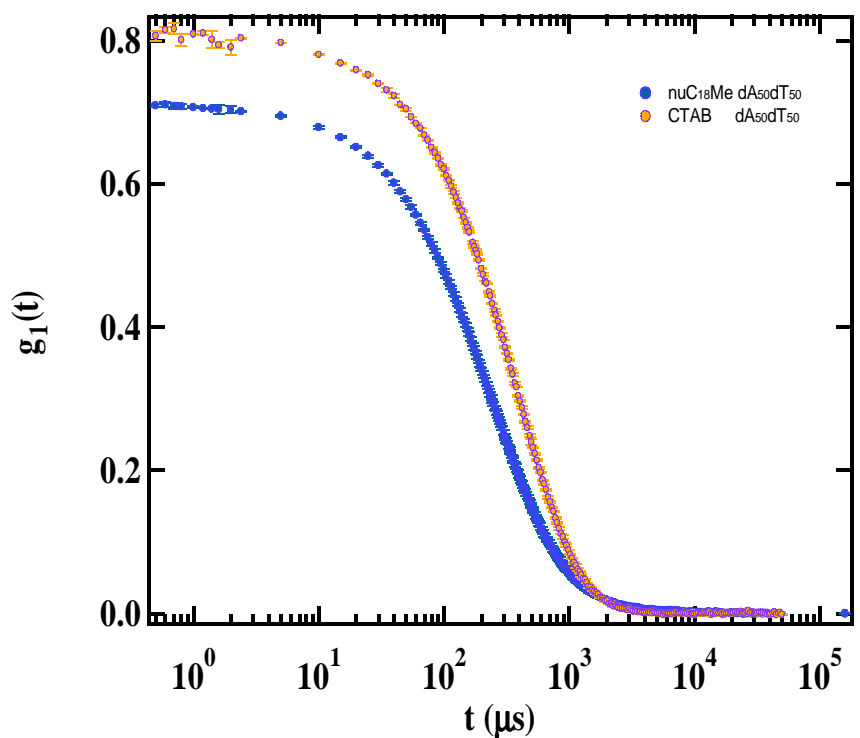


Figura58. Curve di correlazione, registrate al DLS, relative al sistema con CTAB e $dA_{50}dT_{50}$ e al sistema $C_{18}UMe$ e $dA_{50}dT_{50}$. La concentrazione del tensioattivo cationico è $306 \mu M$, mentre la concentrazione di $dA_{50}dT_{50}$ è $1.7 \mu M$.

L' intervallo critico di concentrazione delle soluzioni contenenti CTAB risulta molto più esteso di quello con il C₁₈UMe.

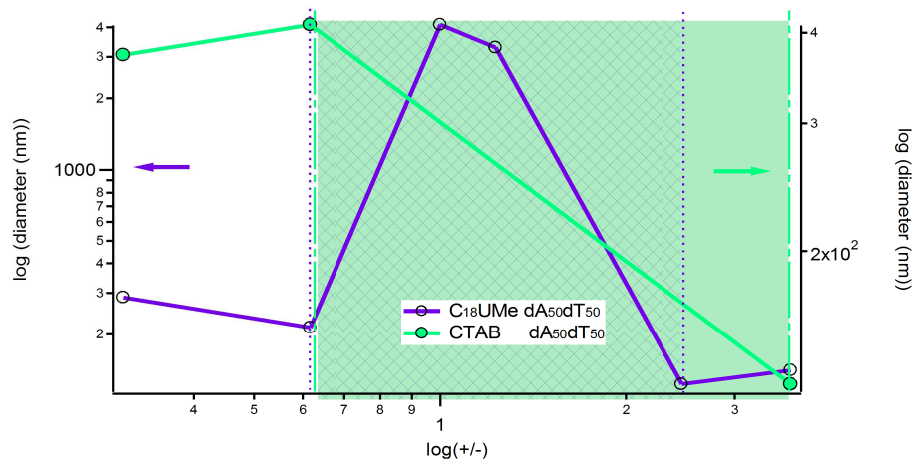


Figura59. Il grafico mostra il logaritmo delle dimensioni dei diametri medi ricavati al DLS contro il logaritmo del rapporto +/- . La spezzata viola rappresenta il sistema nuC₁₈UMe e dA₅₀dT₅₀, la spezzata verde rappresenta il sistema CTAB e dA₅₀dT₅₀.

I lipoplessi con CTAB e con DNA a doppio filamento presentano un diametro medio maggiore di quelli preparati a partire da dA₅₀. Questo aspetto si verifica anche per i lipoplessi costituiti da nucleolipide C₁₈UMe.

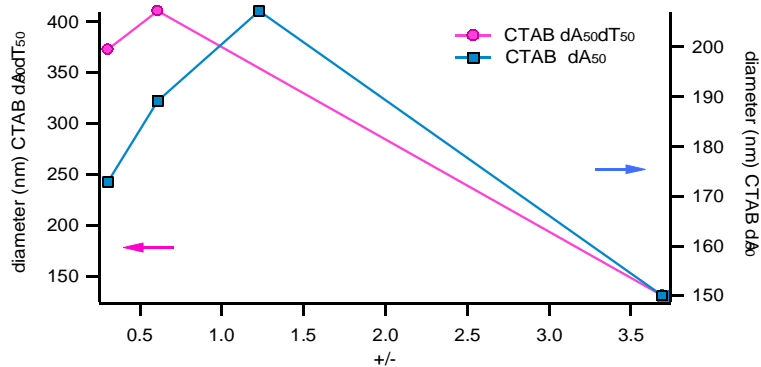


Figura60. Diametri medi in funzione il rapporto +/- . La spezzata rosa rappresenta il sistema CTAB e dA₅₀dT₅₀, la spezzata blu rappresenta il sistema CTAB e dA₅₀dT₅₀.

Si noti che per effetto della “condensazione-rientrante”, in eccesso di lipide, il diametro medio registrato è circa 150 nm, mentre aumenta fino a 400 nm quando il DNA risulta in concentrazione maggiore rispetto al CTAB.

3.3.3 Spettroscopia UV-visibile

Per la concentrazione di tensioattivo cationico $25\mu\text{M}$, in difetto di uridina, la successione dei valori di assorbanza è invertita: il campione con C_{18}UMe e dA_{50} dispone di uno spettro con intensità inferiore del corrispondente con CTAB e dA_{50} .

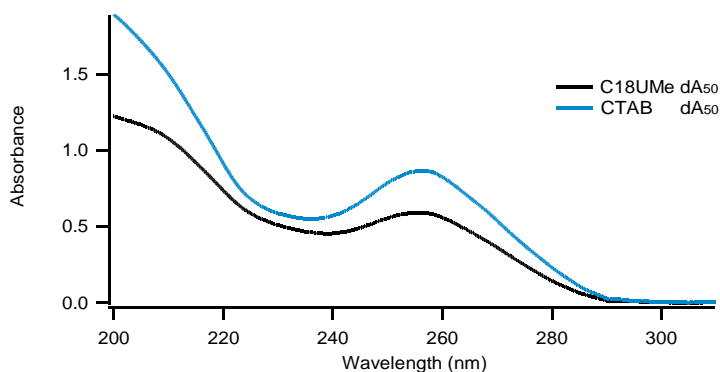


Figura61. Spettri di assorbanza relativi al sistema con CTAB e dA_{50} e al sistema C_{18}UMe e dA_{50} . La concentrazione del tensioattivo cationico è $25\mu\text{M}$, mentre la concentrazione di dA_{50} è $1.7\mu\text{M}$.

Il campione con rapporto $\pm = 3.7$, in eccesso di C_{18}UMe , mostra un'assorbanza maggiore del campione con CTAB. L'uridina contribuisce dunque aumentando il valore di assorbanza.

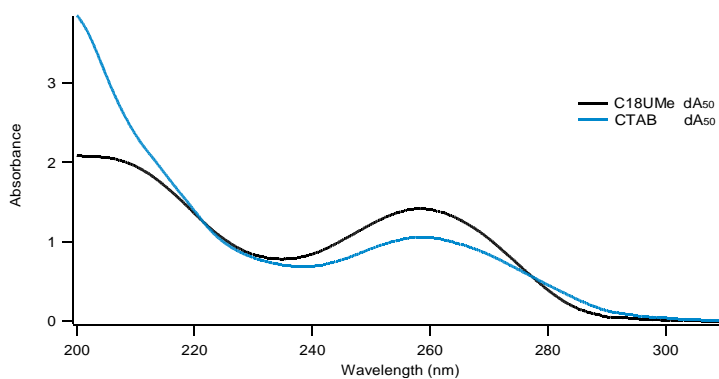


Figura62. Spettri di assorbanza relativi al sistema con CTAB e dA_{50} e al sistema C_{18}UMe e dA_{50} . La concentrazione del tensioattivo cationico è $306\mu\text{M}$, mentre la concentrazione di dA_{50} è $1.7\mu\text{M}$.

Per le soluzioni con rapporto +/- 3.7 e 0.31 , il picco in assorbanza relativo al campione con il nucleolipide e dA₅₀dT₅₀ presenta un'intensità maggiore del picco del campione con CTAB e dA₅₀dT₅₀.

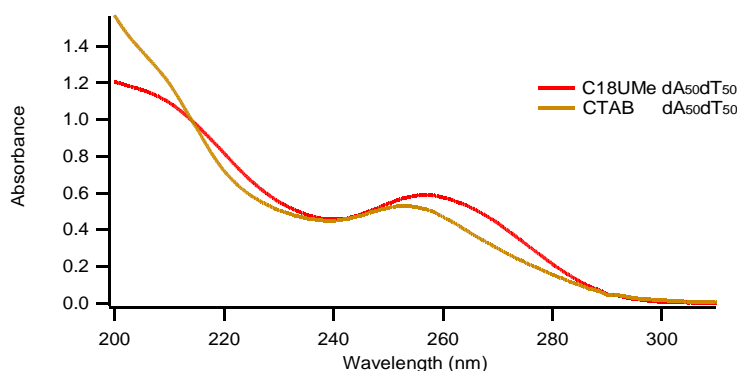


Figura63. Spettri di assorbanza relativi al sistema con CTAB e dA₅₀dT₅₀ e al sistema C₁₈UMe e dA₅₀. La concentrazione del tensioattivo cationico è 25 µM, mentre la concentrazione di dA₅₀dT₅₀ è 1.7µM

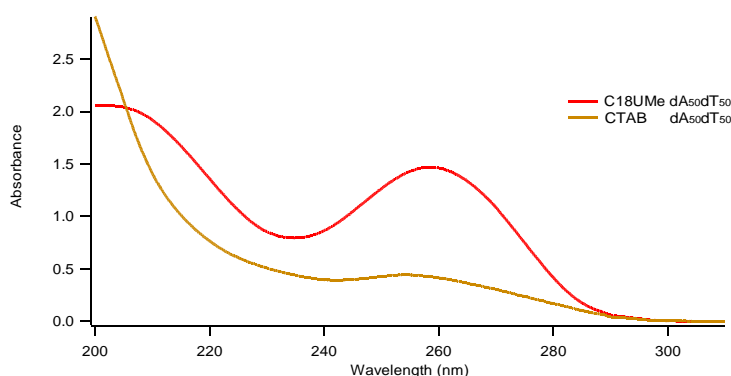


Figura64. Spettri di assorbanza relativi al sistema con CTAB e dA₅₀dT₅₀ e al sistema C₁₈UMe e dA₅₀. La concentrazione del tensioattivo cationico è 306 µM, mentre la concentrazione di dA₅₀dT₅₀ è 1.7µM

In tutti i casi considerati, gli spettri dei campioni contenuti CTAB risultano shiftati a una lunghezza d'onda inferiore a 260 nm.

3.3.4 Dicroismo Circolare

Il dicroismo circolare permette di ottenere informazioni sulla diversa struttura dei lipoplessi in esame.

Anche per questo tipo di misure, sono state scelti solamente due campioni: quelli con rapporto +/- pari a 3.7 e a 0.31.

Innanzitutto, il nucleolipide avrà il contributo aggiuntivo dell'uridina rispetto al CTAB, come si può valutare dai grafici che seguono le differenze maggiori stanno sicuramente

nell'intensità del segnale CD. Quando è presente il C₁₈UMe si verifica un fenomeno di abbattimento ipocromico in tutti gli spettri. Per le soluzioni più concentrate di tensioattivo, sia nel caso dei sistemi con doppio filamento di DNA sia quelli con singolo filamento, si evidenzia anche un'enorme differenza nella morfologia degli spettri. Il sistema con concentrazione di nucleolipide 306 μM risulta shiftato sull'asse delle lunghezze d'onda rispetto al campione con CTAB, con la stessa concentrazione. Le differenze sono minori quando il C₁₈UMe risulta in difetto rispetto al DNA, come si osserva dalle figure 65 e 67.

Gli spettri per i sistemi a singolo filamento di DNA – con concentrazione di tensioattivo pari a 25 μM – sono molto più simili nella regione tra 260 e 290 nm; mentre per i sistemi con dA₅₀dT₅₀, gli spettri quasi si sovrappongono in tutto il range che precede i 260 nm. In figura 65, non si osservano variazioni proprio nella banda positiva da 260 nm a 290 nm. In questo range, l'aspetto caratteristico della banda relativa ai lipoplessi con CTAB ricorda lo spettro registrato per il campione con concentrazione 204 μM di C₁₈UMe e 1.7μM di dA₅₀dT₅₀ (vedi figura29): l'intera banda sembra quasi dividersi in due picchi minori consecutivi.

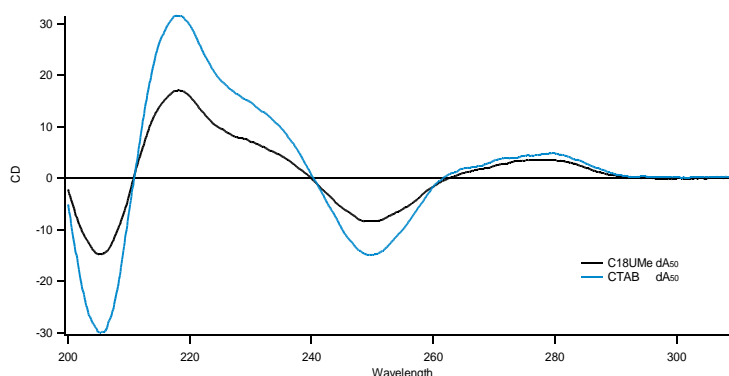


Figura65. Segnale CD contro lunghezze d'onda (nm) del sistema con C₁₈UMe in concentrazione 25 μM e dA₅₀ 1.7μM e del sistema con CTAB in concentrazione 25 μM e dA₅₀ 1.7μM .

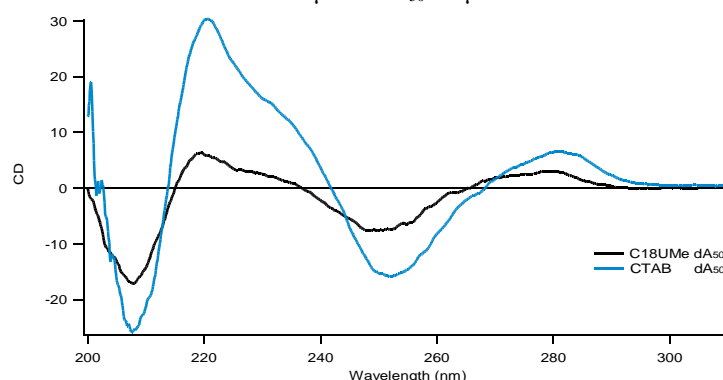


Figura66. Segnale CD contro lunghezze d'onda (nm) del sistema con C₁₈UMe in concentrazione 306 μM e dA₅₀ 1.7μM e del sistema con CTAB in concentrazione 306 μM e dA₅₀ 1.7μM .

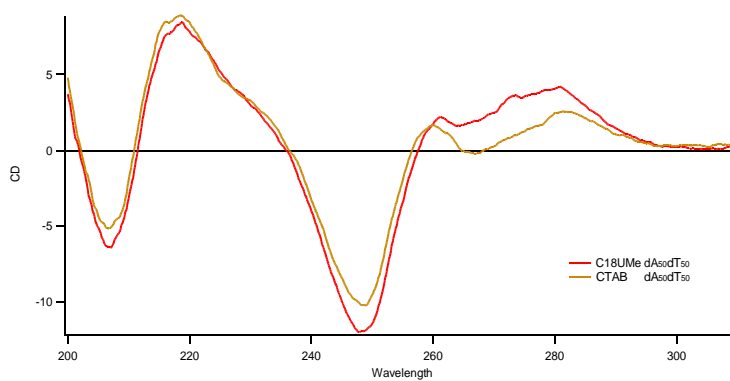


Figura67. Segnale CD contro lunghezze d'onda (nm) del sistema con C₁₈UME in concentrazione 25 μM e dA₅₀dT₅₀ 1.7μM e del sistema con CTAB in concentrazione 25 μM e dA₅₀dT₅₀ 1.7μM

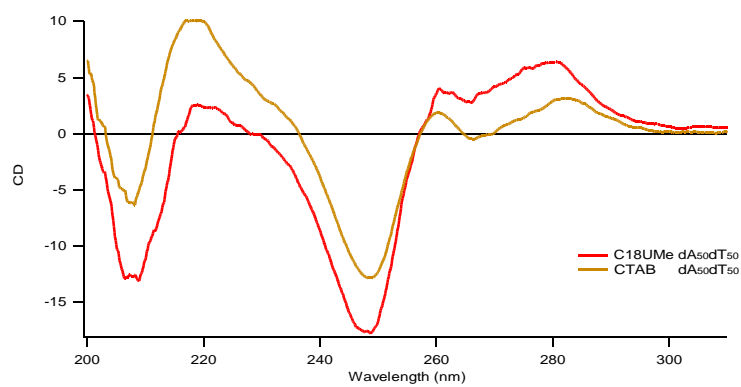


Figura68. Segnale CD contro lunghezze d'onda (nm) del sistema con C₁₈UME in concentrazione 306 μM e dA₅₀dT₅₀ 1.7μM e del sistema con CTAB in concentrazione 306 μM e dA₅₀dT₅₀ 1.7μM .

3.3.5 CTAB e dT₅₀

Usando il tensioattivo cationico CTAB, come sostiene Abbott [14] nel suo recente lavoro, la formazione dei complessi è sensibile alla composizione del singolo filamento di DNA. Nonostante Abbott usi filamenti più brevi composti da venti nucleobasi, il risultato con cinquanta basi non è molto diverso. Nei sistemi con CTAB e dT₅₀ in alcuni intervalli di concentrazione del lipide, non si formano lipoplessi. Al contrario con il dA₅₀, è possibile ottenere misure per tutti i campioni preparati.

Per i campioni con CTAB con il DNA a singolo filamento di 50 timine sono stati preparati cinque soluzioni:

[CTAB]	[dT ₅₀]	+/-
306 µM	83 µM	3,7
204 µM	83 µM	2,5
102 µM	83 µM	1,2
51 µM	83 µM	0,6
25 µM	83 µM	0,3

Tabella n°5: Concentrazioni di C₁₈UMe e DNA utilizzate.

In giallo sono evidenziati i campioni che mostrano maggiore instabilità.

Dalle misure del DLS risulta che il campione con il maggior contenuto di lipide ha un'intensità di scattering molto bassa. Lo stesso accade anche per gli ultimi due campioni con rapporto +/- minore di 1. Le curve riportate in figura 69 sono relative alle soluzioni in cui il CTAB ha concentrazione $204\mu\text{M}$ e $102\mu\text{M}$, quest'ultima presenta una lieve opalescenza.

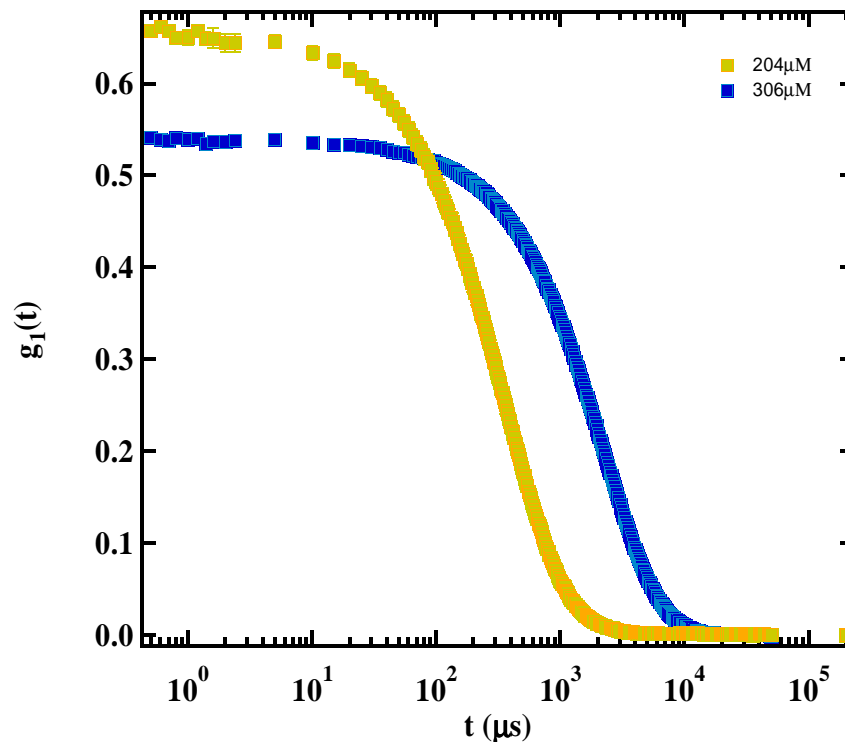


Figura69. Curve di autocorrelazione delle soluzioni con CTAB e dT_{50} registrate al DLS. La concentrazione del lipide varia – come in legenda – , mentre quella del DNA rimane costante ($1.7\mu\text{M}$).

Utilizzando come tensioattivo il CTAB, la diversa composizione del DNA comporta modifiche dimensionali e variazioni nell'intervallo di concentrazione critico in cui la soluzione presenta opalescenza e precipitato. L'interazione avviene esclusivamente tramite forze di tipo elettrostatico.

Nel caso del nucleolipide, il campione critico risulta essere per tutti e tre i sistemi quello con rapporto +/- 1,2. Dai grafici di figura 70, si osserva che il nucleolipide forma complessi più stabili a parità di concentrazione rispetto al CTAB. Inoltre le dimensioni delle specie in soluzione sono ottimali per il loro impiego in terapia genica: i diametri medi risultano tra i 100 nm e i 200 nm. Tutti i lipoplessi formati dal nucleolipide con rapporto +/- maggiore di uno sono stabili e dotati di una carica superficiale positiva, tale aspetto favorisce l'interazione del complesso con la membrana cellulare. Al contrario, per gli stessi rapporti +/-, un tensioattivo cationico aspecifico, come il CTAB, forma complessi instabili con il DNA e per tale motivo il suo impiego in gene delivery risulta meno idoneo.

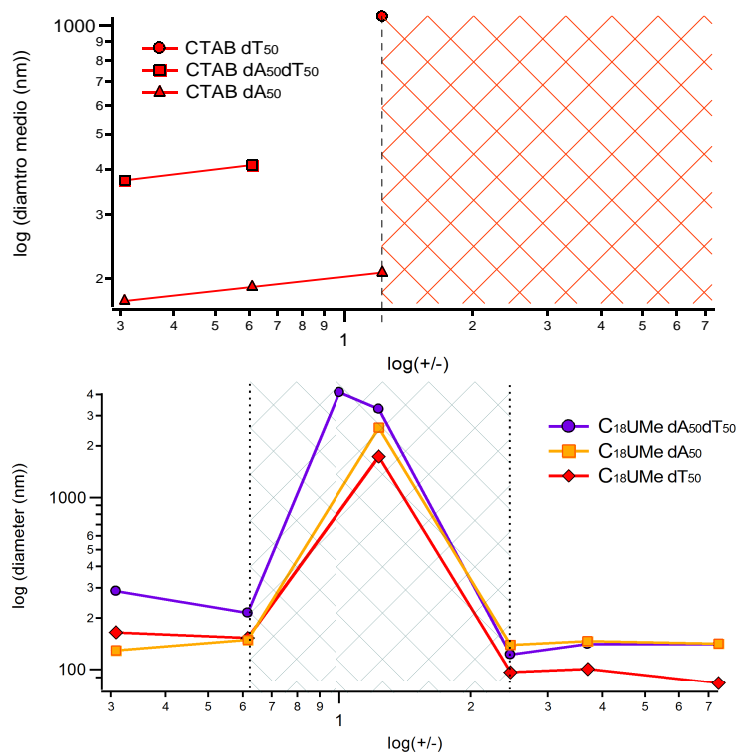


Figura70. Diametro medio in funzione del rapporto +/- . I sistemi rappresentati contengono CTAB , a concentrazione variabile, e dT₅₀ oppure dA₅₀dT₅₀ o ancora dT₅₀. [DNA]= 1.7μM (grafico in alto) e C₁₈UME, a concentrazione variabile, e dT₅₀ oppure dA₅₀dT₅₀ o ancora dT₅₀. [DNA]= 1.7μM (grafico in basso).

4 Conclusioni

Questo lavoro di tesi ha come oggetto lo studio e la caratterizzazione strutturale di lipoplessi formati da un nucleolipide cationico con derivato uridinico sulla testa polare (C₁₈UMe) e DNA a singolo e doppio filamento in soluzione acquosa. E' stato investigato un intervallo di rapporti stechiometrici nucleolipide/DNA tale da caratterizzare i complessi in tre regioni d'interesse principale: quella in cui il nucleolipide è in forte difetto ($R_{+/-} \ll 1$), quella in cui il rapporto stechiometrico è circa unitario ($R_{+/-} \approx 1$) e quella in cui il nucleolipide è in forte eccesso ($R_{+/-} \gg 1$) rispetto alle basi del DNA, mantenendo la concentrazione di DNA costante in tutti i sistemi preparati.

Il DNA in questo studio è un oligonucleotide con 50 basi di adenina (A), a singolo (dA₅₀) e a doppio (dA₅₀-dT₅₀) filamento per accoppiamento con la catena complementare con 50 timine (T).

Come atteso, tutti i lipoplessi mostrano instabilità in soluzione nella regione con $R_{+/-} \approx 1$, in cui si ha aggregazione e, dopo alcune ore dalla preparazione, precipitazione delle specie aggregate.

Seguendo il processo di formazione dei lipoplessi e la loro successiva precipitazione tramite misure di intensità di light scattering dinamico nel tempo, è stato possibile ipotizzare due diversi modelli di aggregazione delle specie. Il modello proposto per C₁₈UMe con dA₅₀ è quello di una fase iniziale di graduale accrescimento dei singoli aggregati per interazioni successive tra i nucleolipidi e le catene di oligonucleotide, fino a raggiungere le dimensioni che causano la separazione di fase. Per C₁₈UMe con dA₅₀-dT₅₀ invece il modello proposto mostra la presenza di lipoplessi tra il nucleolipide e il DNA di dimensioni maggiori rispetto ai corrispondenti con dA₅₀, che non variano nel tempo, ma che dopo una fase stazionaria (di circa 200 minuti), interagiscono fra loro

dando luogo ad un fenomeno di rapida precipitazione. Dopo la precipitazione, nel sistema con dA₅₀ si osserva ancora la presenza di aggregati di dimensioni comparabili a quelle degli aggregati iniziali, mentre nel sistema con dA₅₀-dT₅₀ non ci sono più specie disperse in soluzione. Il fenomeno di precipitazione è completo con DNA a doppio filamento mentre risulta parziale con DNA a singolo filamento; inoltre in quest'ultimo sistema il solido appare più fine e meno compatto.

A parità di rapporto stechiometrico delle specie in soluzione, dai risultati SAXS il precipitato che si forma ha una struttura liquido-cristallina con fase lamellare, sia nel sistema con il singolo che con il doppio strand, con la differenza che il periodo è maggiore per dA₅₀ rispetto a dA₅₀-dT₅₀ (48 vs 45 Å). La struttura nel lipoplesso di C₁₈UMe e dA₅₀-dT₅₀ risulta pertanto più compatta rispetto a quella con dA₅₀. Dal confronto tra i lipoplessi con dA₅₀ e con dA₅₀-dT₅₀, risultano interessanti i dati di potenziale zeta ottenuti dai due diversi sistemi. In presenza del doppio filamento, il potenziale zeta subisce un'inversione di carica, da valori negativi (in difetto di nucleolipide cationico) a valori positivi (in eccesso di nucleolipide cationico), ad un rapporto R minore rispetto al singolo filamento. I complessi con singolo filamento dA₅₀ raggiungono la neutralità di carica superficiale ad una concentrazione maggiore di C₁₈UMe, pertanto in questo caso occorre una quantità maggiore di nucleolipide per passare da un potenziale negativo ad un potenziale positivo dei lipoplessi con DNA in soluzione.

Per i sistemi con rapporti $R_{+/-} \gg 1$ possiamo osservare, da misure di DLS, che si formano aggregati di C₁₈UMe e DNA stabili in soluzione. Si verifica dunque il fenomeno della condensazione rientrante, per cui a $R_{+/-} \gg 1$ si ha una risolubilizzazione dei lipoplessi per effetto delle cariche positive del nucleolipide in eccesso che originano repulsione tra le specie formate. Per $R_{+/-} < 1$, i diametri medi dei lipoplessi con il DNA-ds sono di circa 300 nm mentre quelli con DNA-ss sono di 200 nm. Per $R_{+/-} > 1$, le dimensioni sono confrontabili. Tali differenze si accentuano in seguito a cicli melting (con un riscaldamento fino a 80°C). Il melting, processo che è irreversibile per i nostri lipoplessi, determina infatti una variazione delle dimensioni dei lipoplessi C₁₈UMe/DNA che per il sistema con C₁₈UMe oligo-ds è maggiore rispetto a quella rilevata per il sistema con C₁₈UMe oligo-ss. I complessi con DNA a singolo e a doppio filamento hanno pertanto comportamento diverso a parità di concentrazione del

polielettrolita negativo e del nucleolipide. All'aumentare del rapporto +/- per i sistemi di C₁₈UMe /DNA-ss, le differenze dimensionali degli aggregati prima e dopo il melting aumentano. Il melting provoca una compattazione maggiore per i lipoplessi con nucleolipide in eccesso rispetto a quelli con nucleolipide in difetto. Come tipicamente accade in presenza di tensioattivi cationici, si sono osservate variazioni negli spettri CD per i lipoplessi costituiti da C₁₈UMe e dA₅₀dT₅₀ che testimoniano il cambio conformazionale della doppia elica dalla struttura B di Watson-Crick a quella C.

Nella seconda parte del lavoro, è stato confrontato l'utilizzo del DNA a singolo filamento dT₅₀ con il dA₅₀ nella formazione di complessi con C₁₈UMe. Per le soluzioni con R_{+/-} < 1, le dimensioni dei lipoplessi sono dell'ordine dei 100 nm per entrambi i sistemi, invece quando R_{+/-} > 1, i complessi con dA₅₀ hanno diametro medio maggiore (200 nm) di quelli con dT₅₀ (100 nm). Nelle misure di dicroismo circolare non si osservano variazioni spettrali imputabili a interazioni tra basi non complementari, ma ad interazioni prevalentemente di tipo elettrostatico.

Infine nell'ultima parte di questo lavoro di tesi, si è confrontato il comportamento del nucleolipide C₁₈UMe con il CTAB, un tensioattivo cationico aspecifico. Per il sistema con CTAB, l'intervallo di concentrazione in cui è presente opalescenza e precipitato, è più esteso rispetto ai sistemi con C₁₈UMe. La stabilità maggiore osservata nei lipoplessi con nucleolipide C₁₈UMe è un fattore che risulta importante nella possibile applicazione in gene delivery. Tale stabilità è raggiunta con la minima concentrazione di nucleolipide (rapporti +/- circa uguali a due) che è un parametro fondamentale per determinare la tossicità in vivo dei complessi, in quanto si tratta di specie con carica. Inoltre le dimensioni degli aggregati sono ottimali per un loro futuro impiego nella terapia genica. Alla luce dei dati sperimentali, il C₁₈UMe può essere considerato un componente candidato per il trasporto di materiale genetico all'interno delle cellule e quindi contribuire allo studio nel campo della gene delivery.

Riferimenti bibliografici

1. Liu X., Abbott N.L., *The Journal of Physical Chemistry*, 2010, 114, 15554-15564.
2. Kurz A., Bunge A., Windeck M.R., Flasche W., Arbuva A., *Angewandte Chemie*, 2006, 45, 4440-4444.
3. Milani S., Baldelli Bombelli F., Berti D., Baglioni P., *Journal of The American Society*, 2007, 129, 11664-11665
4. Banchelli M., Berti D., Baglioni P., *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46, 3070-3073
5. Berti D., Baglioni P., Bonaccio S., Barsacchi-Bo G., Luisi P.L., *Journal of physical chemistry*, 1998, 102, 303-308
6. Berti D., Franchi L., Baglioni P., Luisi P.L., *Langmuir*, 1997, 13, 3438-3444
7. Liu J., Stace Naughton A., Brinker C.J., *The Royal Society of Chemistry*, 2009, 5100-5102.
8. Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., *Biochemistry*, 1987, 84, 7413-7417.
9. Friedmann T., Roblin R., *Science*, 1972, 175, 948-955.
10. Tarahovsky Y.S., *Biochemistry*, 2009, 74 (12), 1293-1304.
11. Zuhorn I.S., Bakowski U., Polushkin E., Visser W.H., *Molecular Therapy*, 2005, 11, 801-810.
12. Zhdanov R.I., Rodobed O.V., Vlassov V.V., *Bioelectrochemistry*, 2002, 58, 53-64.
13. Radiuk S., Yoshikawa K., Baigl D., *The Royal Society of Chemistry*, 2011, 7, 5854-5860.
14. Rakhmanova V.A., Pozharski E.V., Macdonald R.C., *Journal of Membrane Biology*, 2004, 200, 35-45.
15. Barthélemy P., *Comptes rendus chimie*, 2009, 12, 171-179.
16. Simberg D., Danino D., Talmon Y., *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276, 47453-47459.
17. Guo X., Cui B., Li H., Gong Z., Guo R., *Journal of Polymer Science*, 2009, 47, 434-449.

18. Cuomo F., Ceglie A., Colafemmina G., Germani R., Savelli G., Lopez F., Colloid and surfaces B: Biointerfaces, 2001, 82, 277-282.
19. Ciani L., Casini A., Gabbiani C., Ristori S., Messori L., Martini G., Biophysical chemistry, 2007, 127, 213-220.
20. Izquierdo-Ridorsa A., Casassas E., Gargallo R., Marquès I., Tauler R., Reactive & functional polymers, 1996, 28, 127-137.
21. Provencher S.W., Computer Physics Communications, 1982, 27, 213-227.
22. Provencher S.W., Computer Physics Communications, 1982, 27, 229-242.
23. Ivanov V.I., Minchenkova L.E., Schyolkina A.K., Poletayev A.I., Biopolymers, 1973, 12, 89-110.
24. Braun C.S., Jas G.S. Choosakoonkriang S., Biophysical Journal, 2003, 84(1), 1114-1123.
25. Johnson W.C., Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules, edited by Gerald D. Fasman, Plenum Press, New York, 1996.
26. Zuidam N.J., Hirsh-Lerner D., Marguliers S., Barenholz Y., Biochimica e Biophysica Acta, 1999, 1419, 207-220.
27. Tarhovskiy Y.S., Rakhmanova V.A., Epanand R.M., Macdonald R.C., Biophysical Journal, 2002, 82, 264-273.

Ringraziamenti

Innanzitutto grazie a Martina e alla sua infinita disponibilità, senza la quale questa tesi non sarebbe mai arrivata a conclusione.

Grazie Lau, che in questi tre anni abbiamo condiviso mesi terribili (cit.) di clausura a studiare ininterrottamente giornate intere. Dopo tante sofferenze, ma anche risate siamo arrivate al traguardo! Sono felice di laurearmi con te.

Grazie ai ragazzi del CSGI, al mitico gruppo dei laureandi e ai simpaticissimi intrusi dell'aula studenti che ho conosciuto e frequentato per tutto il periodo del tirocinio.

Grazie al Rifredi Beach al completo: Ale, Andre, Bea, Coq, David, Ele, Fede, Ge, Giulio, Lambe, Lau, Macri, Marco e Turo. Gli amici di sempre, gli amici di una vita, la vita. Grazie alle mie donnine che hanno reso meno pesante e freddo questo inverno scaldandolo con tè, gossip e pomeriggi al CUS.

Grazie ad Andre , alla sua pazienza e al suo appoggio in ogni momento.

Grazie alla Roberta e a Romeo che mi hanno permesso di scegliere fin da piccola la mia strada incoraggiandomi di fronte ad ogni ostacolo. Grazie ad Andy, fratello diverso.