



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

**Studio del meccanismo di apertura e ripiegamento di un
biosensore di DNA tramite l’uso di pinzette ottiche**

Relatore

Prof.ssa Annamaria Zaltron

Laureando

Anna Luise

Anno Accademico 2018/2019

Indice

| | |
|--|------------|
| Introduzione | iii |
| 1 Principio fisico delle Pinzette Ottiche | 1 |
| 2 Strumento | 5 |
| 2.1 Setup sperimentale del mini-Tweezers | 5 |
| 2.2 Funzionalizzazione delle biglie | 7 |
| 2.3 Camerette microfluidiche | 8 |
| 3 Sistema biologico | 11 |
| 3.1 Sensore biomolecolare | 12 |
| 3.2 Modello Worm-Like Chain | 14 |
| 4 Esperimento | 19 |
| 4.1 Procedura sperimentale | 19 |
| 4.2 Dati sperimentali e discussione | 23 |
| 5 Conclusioni | 29 |

Introduzione

La biofisica molecolare è una disciplina scientifica che utilizza le tecniche ed i metodi di indagine della fisica per studiare i processi che avvengono su scala molecolare. Di particolare interesse è lo studio della struttura, della cinetica e delle funzioni delle biomolecole, tra cui fanno parte gli acidi nucleici e le proteine. Solitamente gli studi biologici vengono effettuati su sistemi che presentano un numero molto elevato di molecole, al fine di studiarne il comportamento medio, ma in questo modo spesso non si è in grado di osservare variazioni energetiche del sistema molto piccole, come quelle associate all'esistenza di stati di transizione intermedi nel ripiegamento di proteine e molecole di DNA o le translocazioni cinetiche dei motori molecolari. Per questo motivo sono ormai fondamentali quelle tecniche che permettono di effettuare esperimenti sulle singole molecole (SME). Al giorno d'oggi questo tipo di esperimenti sono al centro della ricerca in biofisica, perché offrono un punto di vista completamente differente e quindi consentono di comprendere in modo più approfondito i processi molecolari. La principale differenza tra questo tipo di esperimento e i metodi della biochimica tradizionale risiede nel tipo di media effettuata quando si misurano le proprietà del sistema. Gli esperimenti a singola molecola permettono infatti di accedere ai processi biomolecolari seguendo una molecola individuale; è possibile misurare le distribuzioni che descrivono determinate proprietà molecolari, caratterizzare la cinetica delle reazioni e osservare possibili stati intermedi. In più forniscono ulteriori informazioni sulla termodinamica e la cinetica che a volte sono difficili da ottenere in esperimenti che coinvolgono un grande numero di molecole.

Le tecniche più utilizzate che permettono di manipolare oggetti micrometrici e studiarne le forze in gioco sono: la microscopia a forza atomica (Atomic Force Microscopy, AFM), le pinzette magnetiche (Magnetic Tweezers, MT) e le pinzette ottiche (Optical Tweezers, OT). Lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi è l'Optical mini-Tweezers, un sistema in cui viene usata luce laser nel vicino infrarosso che permette di intrappolare e muovere in maniera controllata biglie di materiale dielettrico di piccole dimensioni, alle quali è possibile fissare il sistema biologico che si desidera studiare. In questa tesi l'attenzione si concentra sull'acido deossiribonucleico, detto più comunemente DNA, che contiene le informazioni genetiche necessarie alla biosintesi di RNA e proteine, molecole indispensabili per gli organismi viventi.

Le nuove ricerche e gli sviluppi nel campo dei biosensori svolgono ruoli importanti anche nella vita quotidiana. Negli ultimi anni, i biosensori sono stati sempre più utilizzati per il monitoraggio dei processi biologici e sintetici impiegati nella chimica industriale e clinica. Inoltre il rilevamento di specifiche sequenze di DNA è significativo in diversi campi come: l'analisi degli alimenti, l'ambiente e l'area del monitoraggio e della diagnostica della salute umana. L'analisi delle sequenze geniche e lo studio dei polimorfismi genetici svolgono un ruolo fondamentale nel rilevamento rapido delle mutazioni genetiche, offrendo la possibilità di eseguire diagnosi affidabili anche prima che compaiano i sintomi di una malattia. Nelle aree ambientali e alimentari la rilevazione di specifiche sequenze di DNA può essere utilizzata per la rilevazione di organismi geneticamente modificati (OGM) o batteri patogeni.

L'hairpin di DNA studiato è un biosensore, ossia sfrutta la capacità che possiede una catena singola di DNA, la sonda, di ibridizzare con una catena che ha una sequenza complementare, il target. Nello specifico, il biosensore studiato in questo lavoro di tesi è stato progettato per applicazioni nell'ambito della nanomedicina per la veicolazione mirata di farmaci. Infatti, è possibile legare alla molecola di DNA (nella zona dello stem) una certa quantità di farmaco,

la quale viene rilasciata solo in seguito all'apertura dell'hairpin indotta dal riconoscimento di un determinato target. Lo scopo di questo lavoro è lo studio di un sistema che presenta tre siti di riconoscimento del target e più nello specifico mira a caratterizzarne i principali parametri elastici e la presenza di possibili stati intermedi nel processo di allungamento e ripiegamento dell'hairpin, che potrebbero consentire un rilascio graduale del farmaco. Le proprietà elastiche delle biomolecole infatti, oltre a determinare la struttura molecolare, sono altamente correlate alla funzione che svolgono le molecole.

La tesi si articola nel seguente modo:

- Nel primo capitolo viene introdotto il principio fisico su cui si basa il funzionamento delle pinzette ottiche.
- Nel secondo capitolo si descrive in dettaglio lo strumento utilizzato, prestando particolare attenzione al setup sperimentale e alle camerette microfluidiche in cui si svolgono gli esperimenti.
- Nel terzo capitolo si parla nello specifico del sensore biomolecolare studiato, ossia l'hairpin di DNA con 49 nucleotidi, con un accenno a studi già fatti in passato su questa tipologia di biosensori. Inoltre si presenta la risposta elastica delle biomolecole descritta dal modello teorico Worm-Like Chain.
- Infine nel quarto capitolo si mostra la procedura sperimentale adottata, si analizzano e discutono i dati sperimentali. Inoltre si mostra la possibilità di configurazioni intermedie.

Capitolo 1

Principio fisico delle Pinzette Ottiche

Nel 1970 Arthur Ashkin osservò sperimentalmente che l'interazione tra un singolo fascio di luce omogeneo e una particella micrometrica provocava l'accelerazione di quest'ultima lungo la direzione della luce. Inoltre Ashkin capì che, nel caso di fascio laser con un profilo di intensità gaussiano, la forza coinvolta nell'interazione può essere scomposta in due contributi principali: la forza di scattering (scattering force) che causa il moto lungo la direzione di propagazione del fascio e quella di gradiente (gradient force) che spinge la particella verso la zona centrale del fascio dove l'intensità è maggiore. Successivamente, con l'utilizzo di due fasci laser identici contropropaganti, Ashkin riuscì anche ad intrappolare la particella, in quanto le forze di scattering erano tali da annullarsi a vicenda. Tale dispositivo per manipolare particelle di materiale dielettrico di piccole dimensioni è oggi conosciuto sotto il nome di Optical Tweezers (pinzette ottiche) e viene utilizzato anche nel campo della biofisica molecolare per studiare la struttura, le funzioni e la cinetica delle biomolecole.

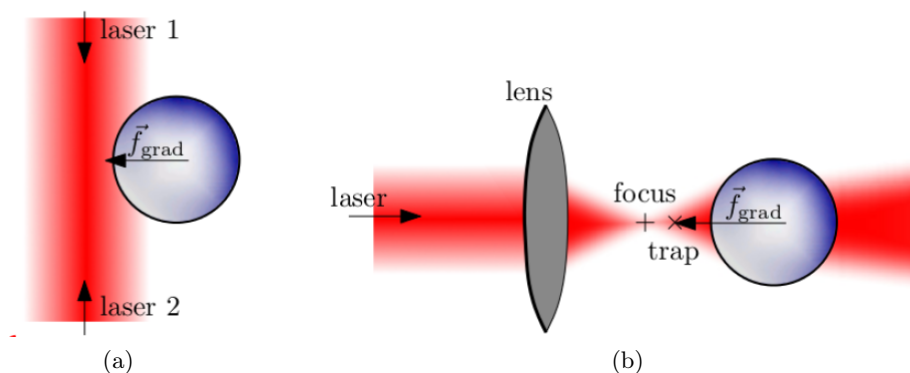


Figura 1.1: *Optical Tweezers: (a) Fasci laser contropropaganti in cui le forze di scattering si elidono a vicenda, mentre la forza di gradiente spinge la biglia verso il centro del fascio. (b) Utilizzando una lente ad alta apertura numerica, la forza di gradiente è talmente elevata da portare la biglia vicino al fuoco della lente, dove l'intensità della luce è maggiore, ed intrappolarla in un punto ben preciso.*

Per spiegare il principio fisico su cui si basa il funzionamento delle Optical Tweezers bisogna usare tre approcci teorici differenti, a seconda del rapporto tra la lunghezza d'onda della luce λ e il diametro della particella d . Con $d \gg \lambda$ siamo in regime di Mie in cui si può usare l'ottica geometrica. Con $d \ll \lambda$ siamo nel regime di Raylight in cui la biglia si può considerare come un dipolo sferico immerso in un campo elettromagnetico uniforme. Ed infine con $d \approx \lambda$ ci troviamo in un regime intermedio, in cui si usa la teoria generalizzata di Lorenz-Mie (GLMT) cercando le soluzioni delle equazioni di Maxwell con le opportune condizioni al contorno. Nel nostro caso la lunghezza d'onda utilizzata è $\lambda = 0.805 \mu\text{m}$ e il diametro della biglia è $d = 2-3 \mu\text{m}$.

Trattiamo ora i primi due casi più nel dettaglio:

1. Regime di Mie ($d \gg \lambda$): Si descrive il fascio luminoso come composto da un insieme di raggi, ognuno di loro caratterizzato da una intensità e una direzione, che seguono le leggi dell'ottica geometrica. Il momento lineare del raggio incidente \vec{p}_i viene scomposto nella componente riflessa \vec{p}_r e quella trasmessa \vec{p}_t . La quantità di moto associata alla biglia si trova quindi per conservazione della quantità di moto totale del sistema come:

$$\vec{p}_b = \vec{p}_i - (\vec{p}_r + \vec{p}_t)$$

Spesso, dato che il raggio riflesso è molto più debole di quello trasmesso, il contributo al momento dato da \vec{p}_r viene trascurato. La forza risultante applicata alla biglia sarà quindi data dalla variazione nel tempo di \vec{p}_b :

$$\vec{f}_b = \frac{d\vec{p}_b}{dt}$$

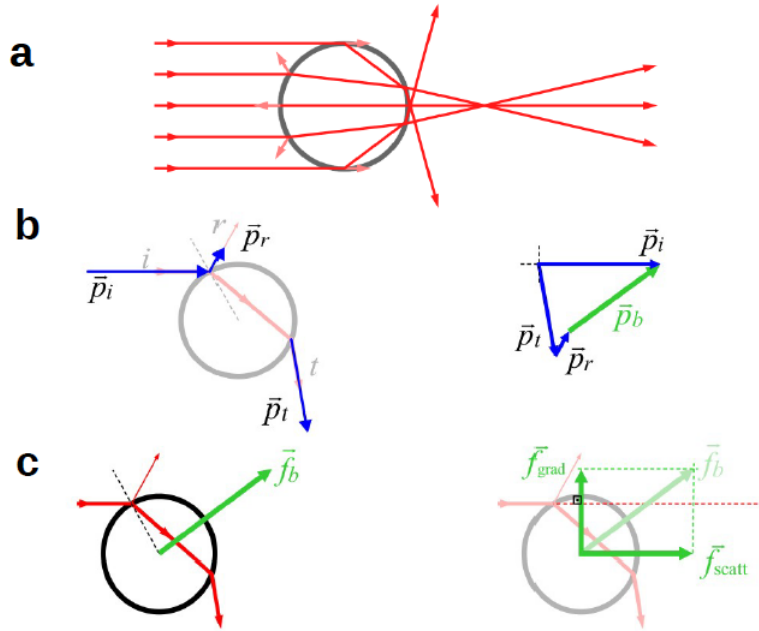


Figura 1.2: Regime di Mie: (a) Rappresentazione dell'interazione tra i singoli raggi che incidono sulla biglia e vengono riflessi e rifratti. (b) Percorso di un raggio incidente con momento lineare \vec{p}_i che viene riflesso con momento \vec{p}_r e trasmesso con momento \vec{p}_t . (c) A sinistra si vede che il momento lineare totale trasferito alla biglia \vec{p}_b ha la stessa direzione della forza risultante; mentre a destra si scompone \vec{f}_b in due componenti: la forza di scattering \vec{f}_{scatt} e quella di gradiente \vec{f}_{grad} .

La forza risultante viene scomposta in due componenti: quella parallela alla direzione del fascio incidente, detta forza di scattering \vec{f}_{scatt} e quella perpendicolare, detta forza di gradiente \vec{f}_{grad} , che è proporzionale al gradiente di intensità del fascio. La forza totale sarà poi data dalla somma dei contributi dati dai singoli raggi. Nel caso particolare in cui il fascio con profilo gaussiano sia fortemente focalizzato risulta possibile intrappolare l'elemento con cui il fascio interagisce, dal momento che la forza di gradiente sarà dominante su quella di scattering e tenderà a mantenere la particella nella posizione in cui la luce ha intensità maggiore, ossia il fuoco della lente.

2. Regime di Raylight ($d \ll \lambda$): La biglia di materiale dielettrico è immersa in un campo elettromagnetico uniforme quindi viene trattata come un piccolo dipolo sferico, in questo modo si ottengono delle espressioni separate per le due componenti della forza. La forza di scattering di un dipolo sferico con indice di rifrazione n_m è:

$$\vec{F}_{scatt} = n_m \frac{\sigma I_0}{c} \hat{k}$$

con I_0 l'intensità del fascio, c la velocità della luce, \hat{k} il versore che indica la direzione di propagazione del fascio e σ la sezione d'urto di scattering di una particella di raggio r . Quest'ultima è pari a:

$$\sigma = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2$$

con m l'indice di rifrazione effettivo della particella, ottenuto dal rapporto tra l'indice della particella e quello del mezzo ($m = n_b/n_m$).

La forza di gradiente si ricava dalla forza di Lorentz, indotta dal campo elettromagnetico, che agisce sul dipolo:

$$\vec{F}_{grad} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \vec{\nabla} I_0$$

dove α è la polarizzabilità della particella data dalla formula:

$$\alpha = n_m^2 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 - 2} \right)$$

Per $m > 1$, quindi $n_b > n_m$, la forza di gradiente spinge la particella verso la regione con maggiore intensità della luce. Affinché la biglia possa essere intrappolata la forza di gradiente deve essere molto più forte di quella di scattering, condizione che come già accennato risulta soddisfatta per fasci di luce fortemente focalizzati.

Generalmente negli esperimenti si lavora in un regime intermedio ma il primo approccio proposto, quello dell'ottica geometrica, fornisce una buona ricostruzione qualitativa ed esaustiva degli effetti fisici che vengono coinvolti nel fenomeno dell'intrappolamento ottico.

In questa tesi le pinzette ottiche vengono usate per intrappolare e movimentare biglie micro-metriche, sfruttate per studiare un sistema biologico attaccato ad esse. Il principio fisico che sta alla base del funzionamento dello strumento è la conservazione del momento lineare. In particolare, nel caso di un oggetto che interagisce con un campo elettromagnetico:

$$\vec{\Phi}_{field} = \frac{d}{dt} (\vec{p}_b + \vec{p}_{field})$$

dove \vec{p}_{field} è la quantità di moto del campo elettromagnetico nel volume V e $\vec{\Phi}_{field}$ è il flusso del campo attraverso una superficie A . La variazione nel tempo della quantità di moto dell'oggetto, \vec{p}_b , è la forza esercitata su di esso. Supponendo che il campo sia stazionario nel volume V , risulta vera la seguente uguaglianza:

$$\vec{F} = \frac{d\vec{p}_b}{dt} = \vec{\Phi}_{field}$$

Il flusso si può scrivere come:

$$\vec{\Phi}_{field} = \oint_A \vec{\phi}_{field} da$$

con da l'elemento di superficie normale al flusso e $\vec{\phi}_{field}$ la densità del flusso della quantità di moto; quest'ultima è direttamente proporzionale al vettore di Poynting \vec{S} e all'indice del mezzo n_m , mentre è inversamente proporzionale alla velocità della luce. Otteniamo infine:

$$\vec{F} = \frac{n_m}{c} \oint_A \vec{S} da$$

La media temporale del vettore di Poynting $\langle \vec{S} \rangle$ corrisponde all'intensità della luce I che può essere misurata direttamente con un fotodetector. Indipendentemente dalle caratteristiche fisiche della biglia, andando a rilevare l'intensità della luce dopo l'interazione, si può stimare la forza esercitata sull'elemento intrappolato.

Capitolo 2

Strumento

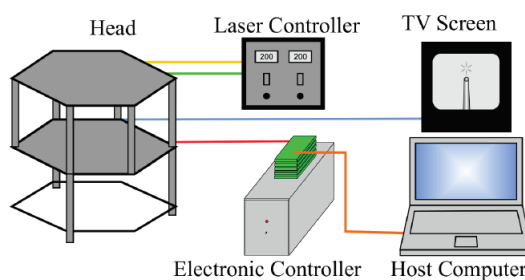
2.1 Setup sperimentale del mini-Tweezers

Il mini-Tweezers è un'evoluzione delle precedenti pinzette ottiche (Optical Tweezers) create a partire dagli anni '90: questa versione è più stabile ed ha una maggiore risoluzione nelle misure. La sua compattezza consente di appenderlo al soffitto, isolando quindi lo strumento si evita che vibrazioni e flussi d'aria influenzino negativamente gli esperimenti. L'esperimento avviene all'interno di una cameretta microfluidica. Il sistema biologico che si sta studiando ha le estremità agganciate a due biglie opportunamente funzionalizzate. All'interno della camera una biglia è fissata per suzione alla micropipetta, mentre l'altra viene intrappolata otticamente (maggiori dettagli nelle sezioni successive 2.2 e 2.3).



(a)

(b)



(c)

Figura 2.1: *mini-Tweezers*: (a) e (b) Foto dello strumento e del sistema utilizzato (c) Schema generale: gli esperimenti vengono eseguiti nella testa (head) che contiene tutte le ottiche, il laser è alimentato dal laser controller, il controller elettronico comunica con la testa e il computer, l'utente interagisce con l'esperimento tramite il computer e lo schermo TV permette di visualizzare l'esperimento.

Lo strumento consiste in due fasci laser contropropaganti che formano un'unica trappola ottica, la lunghezza d'onda utilizzata è di 805 nm e la potenza dei fasci è variabile fino a 200 mW. I fasci sono prodotti da due laser a diodo (Lumics SN0834770) accoppiati con una fibra monomodale. Il fascio prodotto ha un profilo gaussiano ed è polarizzato linearmente.

Se si utilizzasse un unico fascio laser per intrappolare il corpo, sarebbe necessario che il laser fosse focalizzato con un'alta apertura numerica (NA), in modo che la forza di gradiente compensi quella di scattering. Ci sono quindi numerosi vantaggi nell'utilizzare due fasci laser contropropaganti: le forze di scattering si elidono tra loro e questo permette di ridurre l'NA dei laser, inoltre si riesce a raccogliere in maniera efficiente la luce deflessa dalla biglia (più del 95%). Oltre a ciò, poiché l'intensità di un fascio laser con basso NA è concentrata vicino all'asse ottico, tale fascio è meno influenzato da possibili effetti dovuti all'aberrazione sferica. Un fascio laser che non ha bisogno di una forte focalizzazione, oltre a ridurre il riscaldamento del mezzo (acqua) per assorbimento dell'infrarosso, può avere una distanza focale maggiore, ciò rende possibile focalizzare il fascio più in profondità all'interno della cameretta microfluidica, riducendo effetti idrodinamici dovuti alle pareti.

I laser seguono un percorso speculare all'interno dello strumento senza mai interferire, è possibile quindi parlare di uno solo dei due laser e assumere un percorso simmetrico per l'altro (figura 2.2).

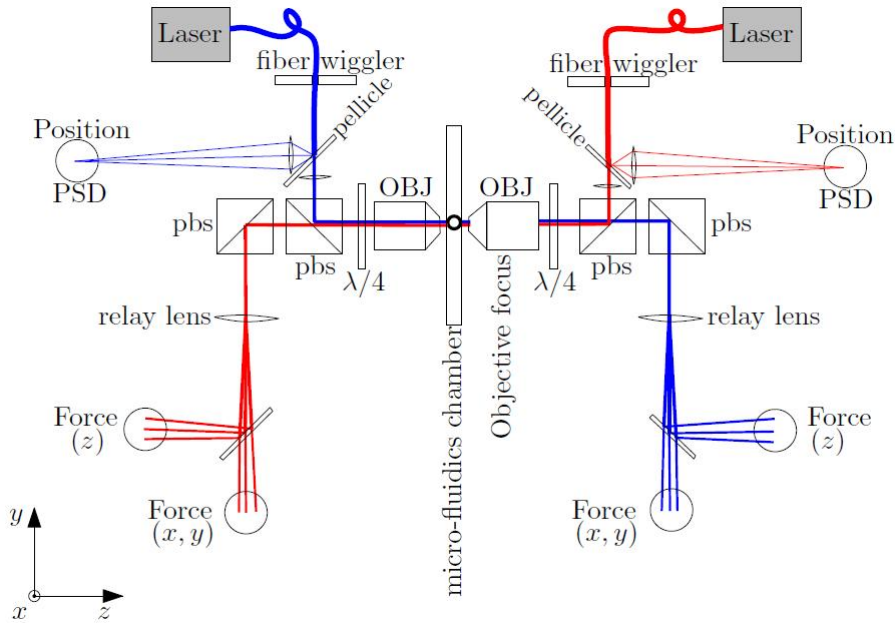


Figura 2.2: Percorso laser: i due laser contropropaganti, indicati in figura con colore blu e rosso, seguono un percorso speculare all'interno dello strumento senza mai interferire.

La luce prodotta dai laser entra in fibra ottica, quest'ultima è manovrata da un sistema chiamato wiggler che ne permette lo spostamento tramite cristalli piezoelettrici (uno spostamento della fibra provoca uno spostamento della trappola ottica). In uscita dalla fibra, il 5% del fascio viene riflesso da una pellicola e focalizzato da una lente asferica verso un sensore di posizione (Position Sensitive Detector, PSD). Il restante 95% viene collimato da una lente e arriva in un Polarizing Beam Splitter (PBS) che lo riflette selezionando la luce polarizzata orizzontalmente che viene convertita in un'onda con polarizzazione circolare da una prima lamina a quarto d'onda ($\lambda/4$). La luce viene poi focalizzata da un obiettivo a immersione in un punto focale interno alla cameretta microfluidica. La luce che fuoriesce dalla parte opposta viene raccolta da un secondo obiettivo e polarizzata verticalmente da un'ulteriore lamina $\lambda/4$. Il fascio nel suo percorso incontra due PBS e poi, dopo aver attraversato una lente di relay, viene direzionato verso due sensori di posizione e forza: uno che fornisce informazioni sulla forza lungo l'asse ottico z (F_z) e uno sulla forze del piano trasverso x e y (F_x e F_y).

Il rilevamento della posizione (x e y) e dei valori della forza (F_x e F_y) avvengono tramite sensori PSD, una sorta di diodo PIN a cui sono attaccati due layer conduttivi collegati a quattro elettrodi. Questi forniscono un segnale in corrente proporzionale allo spostamento del centroide del punto luminoso che colpisce l'area attiva. La posizione in z si ricava inserendo un filtro bulleye prima di un fotodiodo, qui il detector rivela una potenza che dipende dalla dimensione dell'area colpita dal fascio. Per la forza in z (F_z) si monitora la dimensione del diametro del fascio che diventa maggiore o minore del diametro che assume in assenza di forze (figura 2.3).

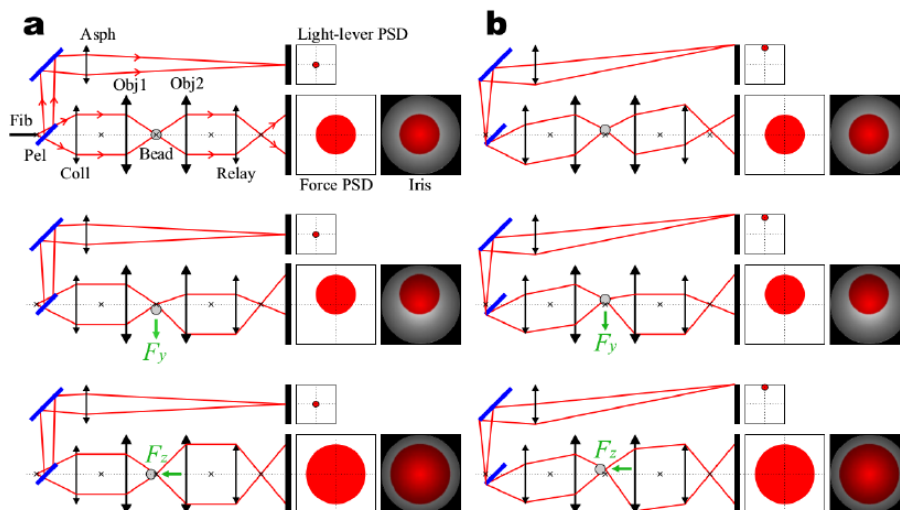


Figura 2.3: Sensore di posizione: sono riportate diverse situazioni di posizione della trappola ottica e della biglia.

Il sistema sperimentale è costituito dalla biglia intrappolata otticamente e da quella intappolata per suzione dalla micropipetta, il tutto viene visualizzato grazie ad un sistema di imaging costituito da una luce LED blu ($\lambda = 470$ nm) e una camera CCD (Water WAT-902H3 SUPREME).

2.2 Funzionalizzazione delle biglie

Le Optical Tweezers sono un sistema per effettuare studi di singola molecola, al giorno d'oggi questo tipo di esperimenti è al centro della ricerca in campo biofisico; sono utilizzati in molteplici modi, in quanto permettono di misurare parametri che descrivono certe proprietà molecolari, caratterizzare la cinetica delle reazioni biomolecolari e osservare possibili stati intermedi.

I sistemi biologici studiati sono sequenze di DNA, o di RNA, o una proteina. Queste sono fissate a delle biglie che si possono muovere in maniera controllata in modo da variare la distanza tra esse. All'estremità dell'hairpin di DNA studiato sono fissate delle maniglie (handles), ossia due catene di 29 nucleotidi, necessarie per agganciare il sistema biologico alle biglie tramite legami biochimici: questi avvengono solo tra le biglie e le estremità delle maniglie, senza interagire con il sistema biologico che si sta studiando.

Le due biglie utilizzate sono fatte di polistirene con indice di rifrazione 1.51 ed hanno dimensione differente: una ha diametro $2 \mu\text{m}$ (PC-S-2.0 Coated Polystyrene Particles-Streptavidine-polystyrene 2.0-2.9 μm , LIFELINELAB Srl) mentre l'altra $3 \mu\text{m}$ (PC-PG-3.0 Coated Polystyrene Particles-Protein G-polystyrene 3.0-3.5 μm , LIFELINELAB Srl). La biglia più piccola, chiamata SA, presenta già un rivestimento di Streptavidina che durante l'esperimento si legherà alla Biotina (legame forte Streptavidina-Biotina). La biglia più grande, chiamata AD,

deve essere funzionalizzata con Antidigoxigenina in modo che poi si leghi con una delle due maniglie modificate con Digoxigenina (legame forte Antidigoxigenina-Digoxigenina).

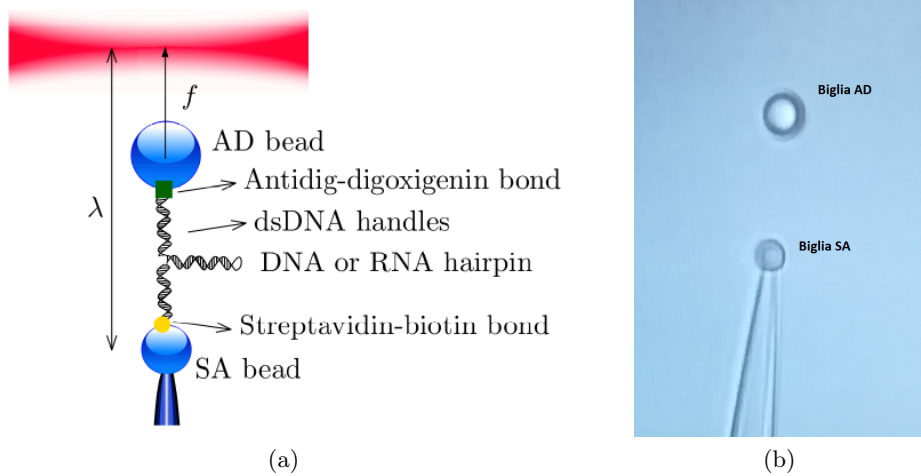


Figura 2.4: *Biglie*: (a) *Raffigurazione della configurazione sperimentale.* (b) *Esempio di configurazione sperimentale.*

2.3 Camerette microfluidiche

Gli esperimenti si svolgono all'interno di una cameretta microfluidica inserita tra due obiettivi ad immersione. Questa è costituita da due coprivetrini opportunamente puliti, di dimensioni 24 mm x 60 mm x 150 μm , tra i quali sono incollati due strati di parafilm tagliati in modo che vengano a formarsi tre canali paralleli fra loro. Il parafilm è realizzato con un Cutter basandosi su un disegno creato con AutoCAD (figura 2.5).

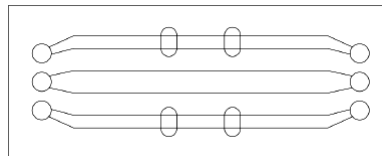


Figura 2.5: *Parafilm*: *disegno realizzato con AutoCAD del parafilm.*

I canali esterni sono in comunicazione con il canale centrale tramite due capillari dispensatori (King Precision Glass, Inc., ID (0.040 ± 0.006) mm, OD (0.10 ± 0.01) mm), posizionati in modo tale da agevolare l'entrata delle biglie. Mentre la micropipetta (King Precision Glass, Inc., ID (0.040 ± 0.006) mm, OD (0.08 ± 0.01) mm) è posta al centro della cameretta cosicché la punta si trovi al centro del canale centrale.

La micropipetta è realizzata con uno strumento chiamato Pipet Puller (figura 2.6(a)), questo consente di produrre delle pipette con una punta con un diametro interno di circa 1 μm a partire da dei capillari in vetro. Il sistema è costituito da un filo di tungsteno arrotolato in modo tale da formare due spire; il capillare viene fatto passare tra queste e fissato su due blocchi, uno superiore fisso e uno inferiore mobile che può cadere per gravità. Il generatore collegato permette di applicare una differenza di potenziale di 1.5 V, in tal modo scorre della corrente lungo il filo che, surriscaldandosi per effetto Joule, fa aumentare la temperatura tra le spire. Questo porta alla fusione del capillare e per effetto della gravità si forma la punta. Un parametro importante da impostare nello strumento è il ramp rate r : se si inserisce un valore basso la corrente nel filo di tungsteno aumenta lentamente, mentre per alti valori di r l'aumento avviene più rapidamente. Questo parametro permette di modificare la dimensione

del diametro e la forma della punta della micropipetta. Inoltre anche la distanza tra le due spire incide in modo significativo sulle dimensioni della pipetta. Il tutto è stato calibrato affinché le dimensioni finali siano quelle indicate sopra.

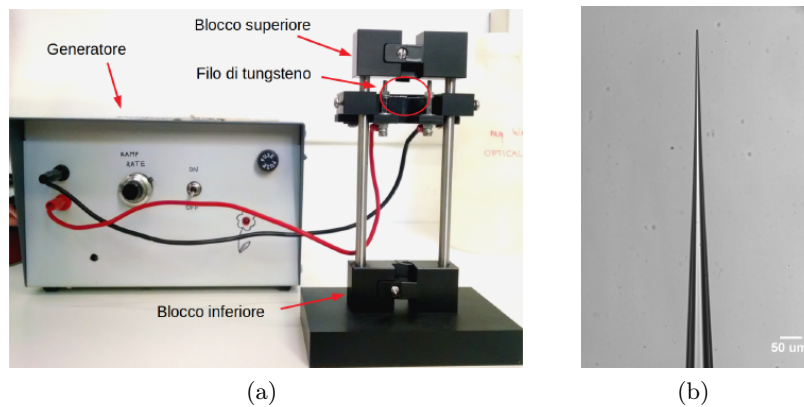


Figura 2.6: Pipet puller: (a) Strumento usato. (b) Esempio di micropipetta.

Uno dei due coprivetrini presenta dei fori, realizzati con l'utilizzo di una sabbiatrice Deltafarm (dry oxide WAFIS, allumina-bis, DENTALFARM), in corrispondenza delle estremità dei tre canali; questi permettono l'inserimento e la fuoriuscita del buffer e delle biglie. L'intera cameretta è assemblata utilizzando una piastra che viene portata a circa 100 °C, questa fonde il parafilm e fa aderire bene le varie parti. In un secondo momento, per migliorare la performance della cameretta ed evitare perdite, si è impiegato anche l'uso del NOA (Norland Optical Adhesive 68) una sostanza che solidifica se esposta a raggi UV.

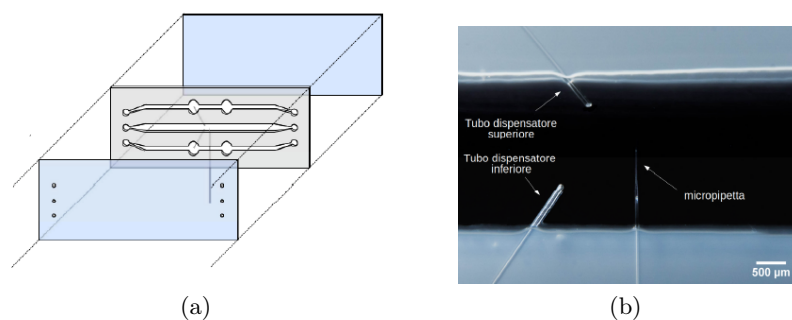


Figura 2.7: Cameretta microfluidica: (a) Assemblaggio dei vetrini e dei due strati di parafilm. (b) Esempio di posizionamento dei capillari e della micropipetta.

L'intera cameretta microfluidica viene montata su un supporto e fissata con dei piccoli blocchi di plexiglass, in questo modo è possibile posizionarla tra i due obiettivi dell'Optical Tweezers, affinché il centro del canale centrale si trovi esattamente nella zona in cui vengono focalizzati i due fasci contropropaganti.

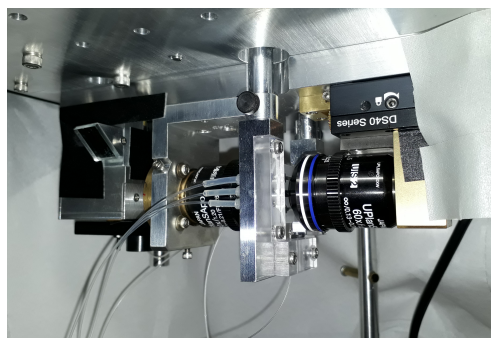


Figura 2.8: *Supporto: montaggio della cameretta sullo strumento.*

Anche il supporto presenta dei fori con filettatura, nei quali vengono inseriti dei connettori di plastica, usati per inserire i tubi d'entrata e uscita. Biglie, buffer e sistema biologico vengono inseriti nei vari canali tramite siringhe e tubi, mentre vengono raccolti in un contenitore attraverso dei tubi d'uscita. Nella fase di montaggio della cameretta si usa il NOA 68 per fissare un tubicino anche alla micropipetta, a questa è collegata una siringa riempita d'aria, che servirà per immobilizzare per suzione la biglia sulla sua punta.

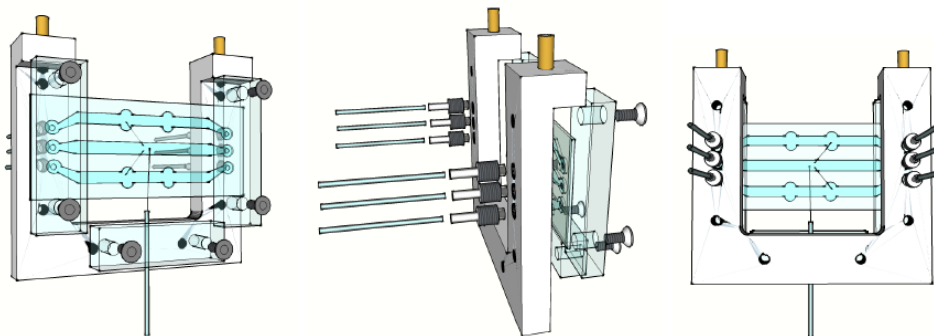


Figura 2.9: *Supporto: raffigurazione del montaggio della cameretta.*

Capitolo 3

Sistema biologico

Le biomolecole sono composti organici indispensabili per la vita della cellula e per la loro riproduzione. In questa categoria sono compresi i carboidrati, i lipidi, le proteine e gli acidi nucleici che svolgono alcune funzioni fondamentali.

Gli acidi nucleici sono delle macromolecole polimeriche costituite da monomeri detti nucleotidi, composti formati da una base azotata, uno zucchero pentoso e un gruppo fosfato. Lo zucchero è il Deossiribosio nel caso del DNA, mentre è il Ribosio nel caso del RNA. Ci sono cinque basi azotate con struttura eterociclica: adenina A, citosina C e guanina G che si trovano in entrambi gli acidi nucleici, mentre la timina T si trova solamente nel DNA e l'uracile U solo nel RNA. A e G sono purine, mentre C, T e U sono pirimidine. I nucleotidi sono tra loro collegati tramite legami fosfodiesterici, che collegano un carbonio in posizione 5' di uno zucchero pentoso al carbonio in posizione 3' del nucleotide successivo.

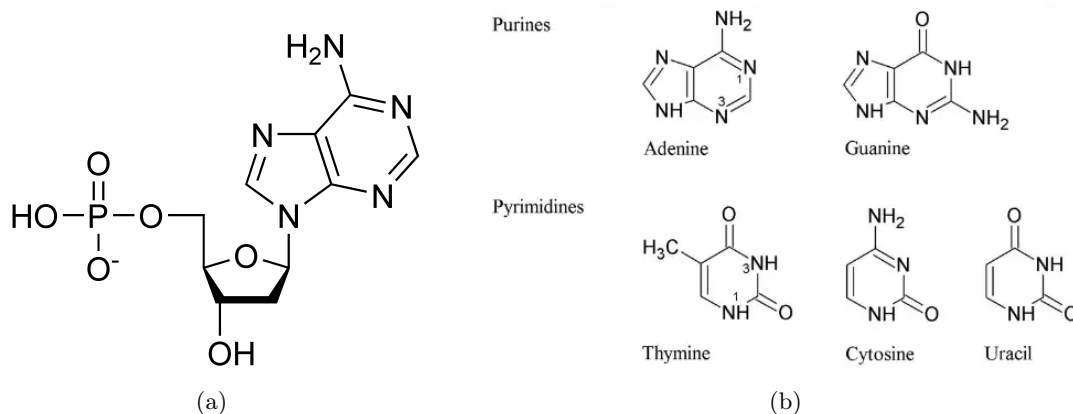


Figura 3.1: DNA: (a) Esempio di nucleotide con adenina come base azotata. (b) Basi eterocicliche azotate formate da uno o due anelli di C e N divise tra purine (un anello esatomico) e pirimidine (due anelli condensati, uno esatomico e uno pentatomico).

L'acido deossiribonucleico (DNA) contiene le informazioni genetiche necessarie alla biosintesi di RNA e proteine, molecole indispensabili per lo sviluppo ed il corretto funzionamento degli organismi viventi. Il DNA è definito come una doppia catena polinucleotidica (dove i nucleotidi di un filamento si legano con quelli dell'altro tramite legami idrogeno, in particolare A si lega con un doppio legame con T mentre C si lega con triplo legame con G), antiparallela, orientata e complementare.

3.1 Sensore biomolecolare

Il sistema biologico studiato è un hairpin di DNA la cui sequenza è la seguente: 5' – **ATACTT GATTACTGAGAGATCTACCTCA** – **A CGCGC CTTATGCTTCTTC TTATGCTTCTT CTTATGCTTCTTC GCGCG G** – **GCGCTGGCACTGTGTTTCCACCACTAACT** – 3'. Quella in grassetto è la sequenza di 49 nucleotidi in esame, mentre le sequenze alle estremità sono le maniglie che si agganciano alla sequenza complementare che è attaccata alle biglie, in particolare:

- 3' – Biotina – **TAGTGA ACTAATGACTCTCTAGATGGAGT** – 5'
- 3' – **CGCGACCGTGACACAAAGGTGGTGATTGA** – Digoxigenina – 5'

Sono sequenze di 29 nucleotidi che alle estremità hanno, nel primo caso, la Biotina che si legherà alla Streptavidina di cui è ricoperta la biglia SA; mentre nel secondo caso, c'è la Digoxigenina che forma un legame con l'Antidigoxigenina della biglia AD.

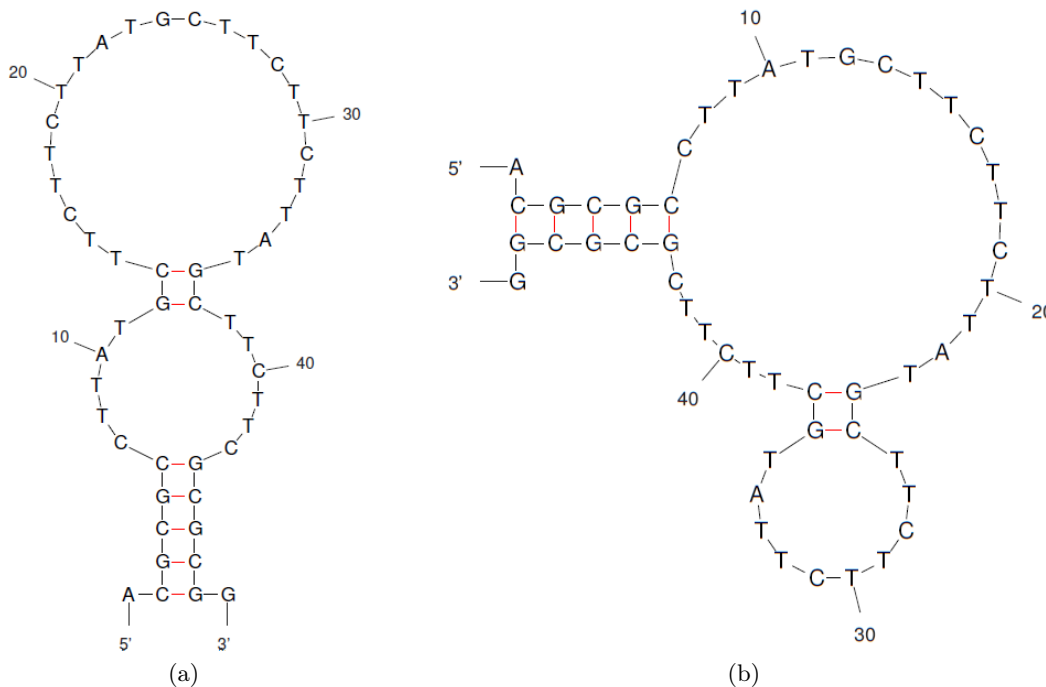


Figura 3.2: Possibili strutture: con il programma Mfold si sono trovate le due possibili strutture che l'hairpin assume a 25°C con 0.5 M di NaCl. (a) Struttura 1. (b) Struttura 2.

In figura 3.2 sono rappresentate le due conformazioni che può assumere la sequenza di DNA in particolari condizioni, ossia a temperatura $T = 25^\circ\text{C}$ e con una concentrazione di NaCl nel buffer pari a 0.5 M (per ottenerle si è utilizzato il programma online Mfold [9]). Si nota che la sequenza non assume la forma di un unico grande loop, ma si formano ulteriori legami che portano ad avere due loop più piccoli. Altre informazioni interessanti che vengono fornite dal software sono i vari dettagli termodinamici, come la variazione del potenziale di Gibbs ΔG , dell'entalpia ΔH e dell'entropia ΔS tra la configurazione con il DNA totalmente aperto e quella con il DNA ripiegato in quella particolare struttura.

Tabella 3.1: Dettagli termodinamici: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

| | ΔG | ΔH | ΔS |
|--------------------|----------------|-----------------|--------------------|
| Struttura 1 | -6.20 kcal/mol | -72.80 kcal/mol | -223.3 cal/(K·mol) |
| Struttura 2 | -5.39 kcal/mol | -72.80 kcal/mol | -226 cal/(K·mol) |

La chimica supramolecolare è una branca interdisciplinare che tende a focalizzarsi sui sistemi costituiti da più molecole interagenti tra loro. Negli ultimi decenni, ha permesso enormi progressi nei campi della nanotecnologia, della scienza dei materiali, della catalisi e della nanomedicina. Si sfruttano interazioni non covalenti per formare strutture funzionali che in genere risiedono all'equilibrio termodinamico; sebbene questo risulti una proprietà favorevole per molte applicazioni, pone anche un limite intrinseco alla riproduzione di proprietà come la motilità, l'adattamento, l'evoluzione e le oscillazioni, che sono tutte caratteristiche degli organismi viventi.

I filamenti di DNA e RNA sono componenti ideali per i processi di auto-assemblaggio. L'alta programmabilità e la semplice previsione termodinamica delle interazioni non covalenti coinvolte, insieme con il basso costo della sintesi, ha dato un forte impulso al campo della nanotecnologia e chimica supramolecolare.

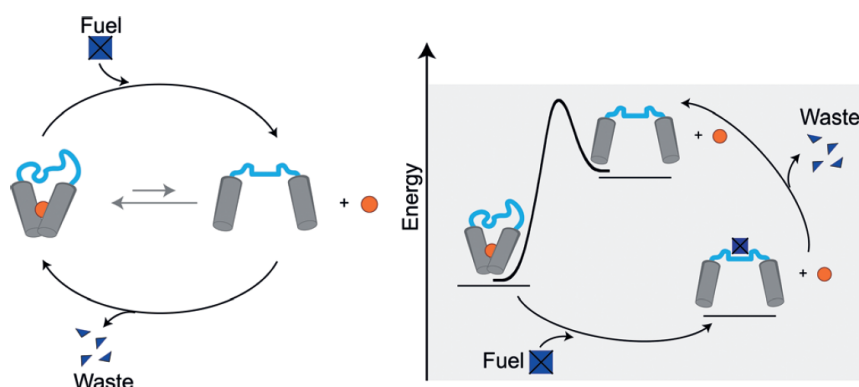


Figura 3.3: *Le interazioni non covalenti tra il recettore e un ligando sono spesso descritte come semplici processi termodinamicamente dominati, in cui i sistemi risultanti risiedono al minimo dell'energy landscape. Tuttavia, l'energia chimica è spesso impiegata per realizzare interazioni non all'equilibrio termodinamico.*

L'hairpin studiato è un biosensore, che si basa sulla capacità che possiede una catena singola di DNA, chiamata sonda, di ibridizzare con una catena che ha una sequenza complementare, chiamata target. La specificità di questi sensori dipende innanzitutto dalla selettività della sonda, che dovrebbe rispondere unicamente ad un target, anche nella presenza di catene molto simili.

Sono stati fatti vari studi su questo hairpin, in particolare dal Prof. Leonard J. Prins [4] (Dipartimento di Chimica dell'Università di Padova) e dal Prof. Francesco Ricci [3] [4] (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata), che sono coloro che hanno preparato l'hairpin di DNA dell'esperimento e che lo hanno caratterizzato come biosensore. Gli studi in realtà sono stati fatti su un hairpin con un loop più piccolo che presenta un unico sito in cui può attaccarsi il target, mentre l'hairpin studiato in questa tesi presenta tre siti di attacco.

Un esempio di particolare interesse che viene riportato è su una struttura di DNA con un loop di 18 basi. Come carico del DNA è stata impiegata una sequenza di DNA complementare alla porzione del loop di questo recettore e come combustibile (fuel) un filamento di RNA che si lega a una delle due code. Il legame del filamento di RNA (in questo caso funge da attivatore allosterico) provoca un cambiamento conformazionale che aumenta l'affinità del recettore del DNA per il carico di circa un ordine di grandezza. Per la dissipazione di energia si è utilizzato l'RNase H, un enzima endoribonucleasi, che comporta il rilascio del carico. Per questo sistema, il caricamento e il rilascio del carico è facilmente monitorato etichettando il carico del DNA con fluoroforo e il recettore con un quencher. In questo modo, l'associazione del carico è accompagnata da una diminuzione dell'intensità della fluorescenza. Questo sistema mostra prestazioni eccellenti in termini di controllabilità della durata di un singolo ciclo regolando la

concentrazione dell'enzima o del carburante. È possibile eseguire facilmente fino a sette cicli di rilascio del carico, con una leggera deviazione dell'intensità del segnale.

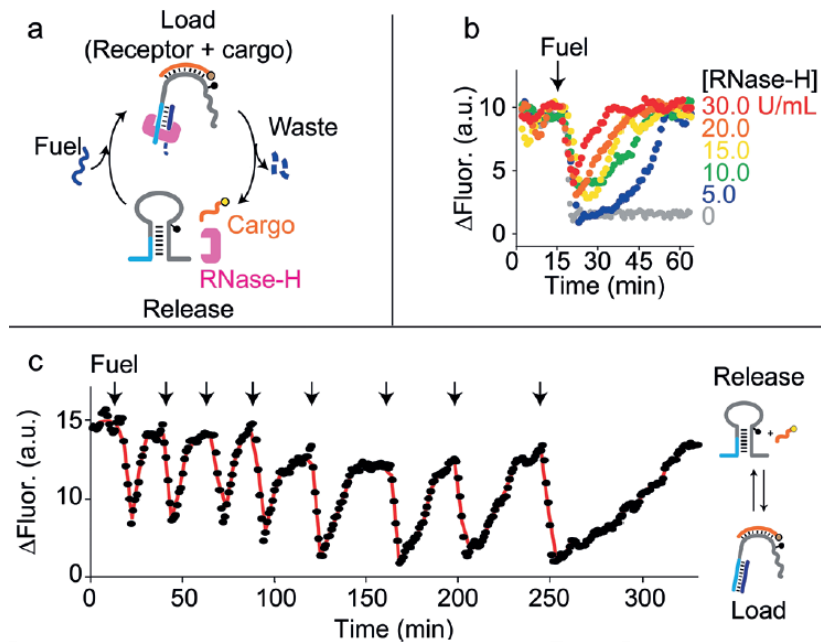


Figura 3.4: Studio fatto su una sequenza di DNA: (a) In azzurro/grigio il recettore e in arancione il carico. (b) Le tracce mostrano il caricamento transitorio del carico sul recettore dopo aver aggiunto il carburante e a diverse concentrazioni di RNase H. (c) Il grafico mostra la reversibilità del caricamento transitorio del carico.

Il sistema descritto illustra la versatilità del DNA come materiale funzionale per la progettazione di sistemi fuori equilibrio. I percorsi di dissipazione dell'energia possono essere introdotti selettivamente basandosi sulla selettività naturale degli enzimi. I sistemi mostrano un'elevata tolleranza all'accumulo di prodotti di scarto e in genere è possibile eseguire un gran numero di cicli senza significativi segni di affaticamento. Inoltre, l'elevata specificità del riconoscimento del DNA rende questo materiale ottimale per progettare sistemi dissipativi alimentati con un carburante di maggiore complessità.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è lo studio di un sistema simile a quello studiato dai Prof. Prins e Ricci, ma a livello di singola molecola. In particolare, il biosensore studiato, come detto sopra, presenta tre siti di riconoscimento del target e questo lavoro mira a caratterizzare i principali parametri elastici di questo sistema e la presenza di possibili stati intermedi nel processo di allungamento e ripiegamento dell'hairpin.

3.2 Modello Worm-Like Chain

Le proprietà elastiche delle biomolecole svolgono un ruolo fondamentale in diversi processi che si verificano su scala molecolare, ad esempio: la trascrizione e la traduzione di acidi nucleici per leggere ed elaborare informazione sulla genetica, l'impacchettamento del DNA nel nucleo di una cellula e la formazione dei filamenti di actina nel citoplasma. Inoltre le proprietà elastiche determinano la struttura molecolare e pertanto sono altamente correlate alla funzione che svolgono le molecole.

Le proprietà elastiche della doppia elica del DNA (DNA a doppio filamento, dsDNA) sono state studiate in modo approfondito usando l'OT tirando una lunga molecola dalle sue estremità. Con forze inferiori a 65 pN, dsDNA si comporta secondo il modello WLC (Worm-Like Chain) con una lunghezza di persistenza P di alcune decine di nanometri, come nel caso del λ -DNA che in condizioni ioniche standard (soluzione acquosa con 1 M NaCl) presenta una lunghezza

di persistenza di circa 50 nm [6]. Al contrario, a forze più elevate il dsDNA subisce una transizione cooperativa nota come overstretching, dove aumenta la sua estensione senza un aumento della forza applicata (figura 3.5(a)). Nel caso del DNA a singolo filamento (ssDNA) le proprietà elastiche sono più difficili da descrivere. Anche se a grandi forze (> 10 pN) la molecola allungata è ben descritta dal modello ideale FJC (Freely-Jointed Chain) o dal WLC, invece a basse forze (< 10 pN) la molecola interagisce con se stessa e forma la struttura secondaria attraverso legami idrogeno tra diversi nucleotidi. Questo effetto è rivelato dalla presenza di un plateau liscio nella curva di estensione della forza a bassi valori che si discosta dal comportamento elastico (figura 3.5(b)).

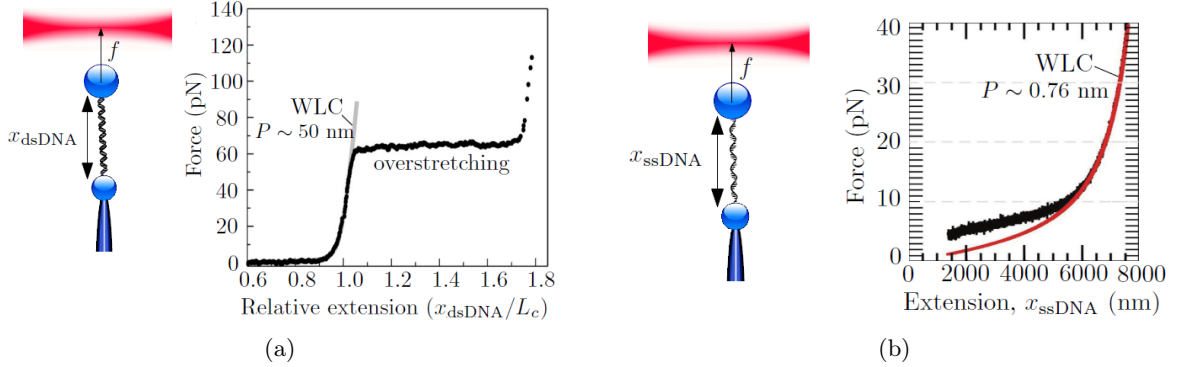


Figura 3.5: Proprietà elastiche del DNA: (a) A sinistra uno schema dell'esperimento eseguito con l'Optical Tweezers utilizzato su un dsDNA, mentre a destra un grafico che mostra il fenomeno dell'overstretching. (b) A sinistra uno schema dell'esperimento eseguito su un ssDNA, mentre a destra un grafico che mostra come a forze alte il modello WLC descriva bene i dati sperimentali.

Pertanto il lavoro di questa tesi consiste nello studiare la risposta elastica dell'hairpin di DNA, descritto nella sezione 3.1, utilizzando come strumento il mini-Tweezers, il cui setup è spiegato nel capitolo 2. Grazie alle maniglie che presenta la sequenza di DNA studiata, le estremità del sistema biologico possono essere attaccate alle due biglie: la biglia più piccola (SA), fissata per suzione alla micropipetta, forma il legame Streptavidina-Biotina; mentre la biglia più grande (AD), intrappolata dalla trappola ottica, forma il legame Antidigoxigenina-Digoxigenina. Muovendo la biglia nella trappola ottica è possibile allungare il DNA applicando una forza tale da spezzare i legami idrogeno tra i nucleotidi, monitorando così il passaggio della molecola dallo stato ripiegato (folded) a quello aperto (unfolded) e viceversa. In tal modo si possono studiare non solo le proprietà elastiche del sistema, ma anche l'eventuale presenza di stati intermedi tra i due appena citati.

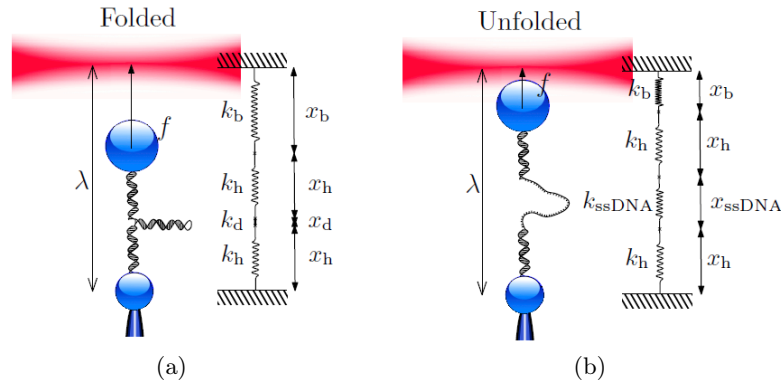


Figura 3.6: Stati del sistema biologico: (a) Illustrazione schematica dello stato folded, completamente chiuso. (b) Illustrazione schematica dello stato unfolded in cui l'hairpin è aperto.

Riportando in un grafico la forza applicata al sistema in funzione della distanza tra le due biglie, la transizione tra lo stato folded e quello unfolded si può visualizzare come un salto di forza. Tale salto è una conseguenza dello spostamento della biglia dal centro della trappola ottica che si verifica quando la molecola si apre o si ripiega. Le forze in cui avvengono tali transizioni possono cambiare ogni volta che ripeto lo stesso esperimento con la medesima molecola a causa delle fluttuazioni termiche.

La distanza che dobbiamo considerare è quella tra la trappola ottica e la biglia fissata alla micropipetta. Questa distanza λ si ottiene come somma di vari contributi: un eventuale offset λ_0 che dipende dalla posizione di riferimento da cui prendiamo le misure, dalla posizione della biglia catturata rispetto alla trappola ottica x_b , dall'estensione delle maniglie (handles) x_h e l'estensione dell'hairpin lungo l'asse della forza x_{DNA} .

$$\lambda = \lambda_0 + x_b + x_h + x_{\text{DNA}} \quad (3.1)$$

Il valore x_{DNA} dipende dallo stato in cui si trova la molecola: se l'hairpin è nello stato folded il DNA si dispone in modo da minimizzare l'energia come se fosse un dipolo, come mostrato nell'illustrazione schematica in figura 3.6(a), quindi $x_{\text{DNA}} = x_d$ ossia la proiezione del diametro della doppia elica di DNA lungo l'asse della forza; se invece l'hairpin è nello stato unfolded $x_{\text{DNA}} = x_{\text{ssDNA}}$ ossia è pari all'estensione della molecola completamente aperta.

L'estensione della proiezione del diametro della doppia elica dell'hairpin lungo l'asse della forza, $x_d(f)$, è modellizzata come un singolo legame di lunghezza d (di seguito preso uguale al diametro dell'elica, $d = 2$ nm) che si è orientato in quel determinato modo a causa dell'azione della forza. Il contributo energetico che descrive questo effetto è dato da $E = -fd \cos \theta$, con $\theta \in [0, \pi]$ l'angolo relativo tra il legame e l'asse della forza. La funzione di partizione corrispondente è:

$$Z \propto \int_{-1}^1 e^{\frac{fd \cos \theta}{k_B T}} d(\cos \theta) = \frac{k_B T}{fd} \sinh \left(\frac{fd}{k_B T} \right)$$

Da questo si ricava la formula seguente (che risulta uguale a quella che descrive il comportamento elastico di un polimero nel modello FJC):

$$x_d(f) = k_B T \frac{\partial \log Z}{\partial f} = d \left[\coth \left(\frac{fd}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{fd} \right] \quad (3.2)$$

Per ricavare $x_{\text{ssDNA}}(f)$ si parte dal fatto che un piccolo spostamento dalla posizione di equilibrio iniziale, $\Delta \lambda$, corrisponde ad una piccola variazione della forza, Δf . Il rapporto tra queste due quantità fornisce il coefficiente che indica la rigidità efficace:

$$\frac{\Delta \lambda}{\Delta f} = \frac{1}{k_{\text{eff}}} = \frac{1}{k_h} + \frac{1}{k_b} + \frac{1}{k_{\text{DNA}}}$$

dove k_h , k_b e k_{DNA} sono le costanti elastiche relative alle varie parti del sistema. k_{eff} è invece pari alla pendenza delle curve che si trovano sperimentalmente.

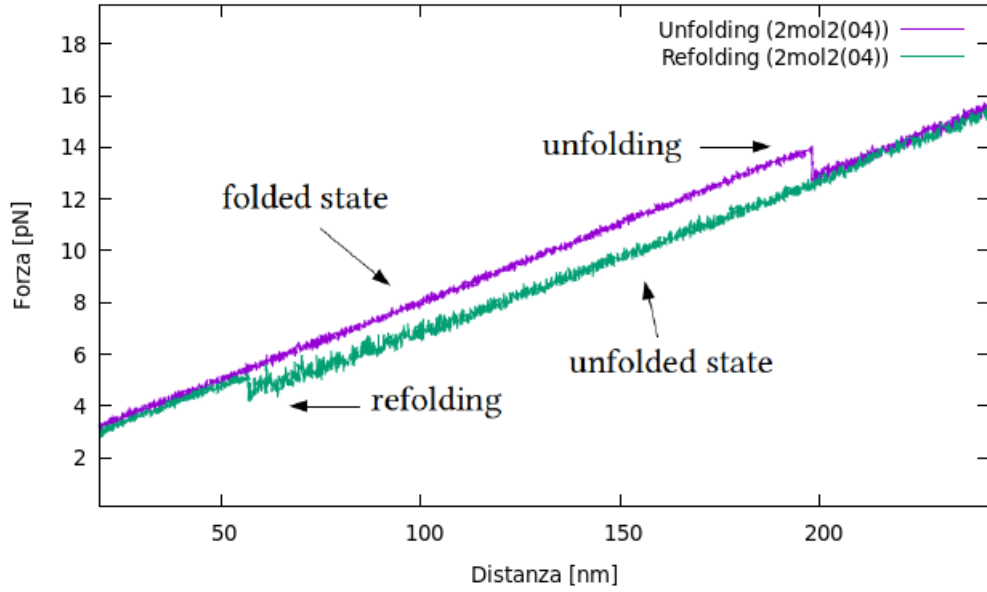


Figura 3.7: Grafico di un'apertura (unfolding) e un ripiegamento (folding) di una molecola di DNA.

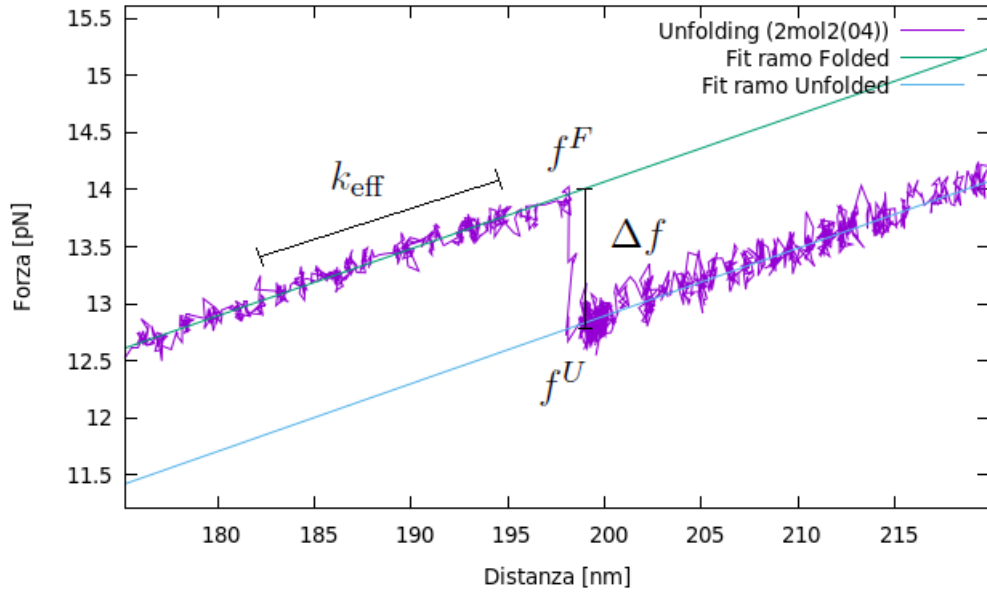


Figura 3.8: Passaggio dallo stato F allo stato U: esempio di un grafico della forza in pN in funzione della distanza in nm tra la biglia SA, fissa per suzione, e la trappola ottica.

Dalla figura 3.8 si osserva che il passaggio dal sistema chiuso (F) al sistema aperto (U), a cui corrisponde un salto di forza $\Delta f = f^F - f^U$, avviene senza variazione della posizione, ossia con $\Delta\lambda = 0$. Quindi:

$$\lambda(f^F) = \lambda(f^U)$$

$$x_h(f^F) + x_b(f^F) + x_d(f^F) = x_h(f^U) + x_b(f^U) + x_{ssDNA}(f^U) \quad (3.3)$$

Se il valore Δf è diviso per la rigidità effettiva del sistema quando l'hairpin è ripiegato k_{eff}^F allora:

$$\begin{aligned} \frac{\Delta f}{k_{eff}^F} &= \Delta x_h + \Delta x_b + \Delta x_d \\ &= [x_h(f^F) - x_h(f^U)] + [x_b(f^F) - x_b(f^U)] + [x_d(f^F) - x_d(f^U)] \end{aligned} \quad (3.4)$$

Inserendo la (3.3) nella (3.4) si ottiene:

$$x_{\text{ssDNA}}(f^U) = \frac{\Delta f}{k_{\text{eff}}^F} + x_d(f^U)$$

Dove $x_d(f^U)$ si ottiene dalla (3.2).

Si assume che la risposta elastica delle biomolecole come ssDNA, RNA o catene peptidiche si comporti secondo il modello WLC, sviluppato nel 1949 da Kratky e Porod. La formula di interpolazione per questo modello è:

$$f = \frac{k_B T}{P} \left[\frac{1}{4(1 - x_{\text{ssDNA}}/L_c)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x_{\text{ssDNA}}}{L_c} + \sum_{n=2}^7 a_n \left(\frac{x_{\text{ssDNA}}}{L_c} \right)^n \right] \quad (3.5)$$

dove P è la lunghezza di persistenza, legata all'elasticità del polimero, ovvero formalmente è quella distanza oltre la quale si perde la correlazione tra le direzioni delle tangenti ai vettori che individuano le posizioni di due paia di basi consecutive. L_c è la lunghezza di contorno, ossia la lunghezza totale del sistema definita come $L_c = N \cdot d_b$, dove N è il numero totale di nucleotidi che si sono aperti (sia dello stem sia del loop) e d_b la distanza media tra due nucleotidi che solitamente è $d_b = 0.5 \div 0.8$ nm nel caso del DNA a singolo filamento. I coefficienti a_n ($n = 2, \dots, 7$) possono essere assunti pari a zero secondo Bustamante [6] oppure possono assumere i seguenti valori numerici proposti da Bouchiat [7]: $a_2 = -0.5164228$, $a_3 = -2.737418$, $a_4 = 16.07497$, $a_5 = -38.87607$, $a_6 = 39.49944$, $a_7 = -14.17718$. Nella seguente tesi si sceglie di seguire l'approccio di Bustamante, si usa la formula della forza (3.5) con $a_n = 0$ per ricavare i valori della lunghezza di persistenza P e della lunghezza di contorno L_c .

Capitolo 4

Esperimento

4.1 Procedura sperimentale

Gli esperimenti di singola molecola avvengono all'interno di una cameretta microfluidica (descritta nella sezione 2.3) in cui viene fatto fluire del buffer, una soluzione tampone composta da: 0.5 M di NaCl, 0.01 M di TRIZMA base (Sigma Aldrich T1503) e H₂O, con un pH tra 7.3 e 7.5. La procedura sperimentale è la seguente:

- **Preparazione:** Si procede all'incubazione delle biglie AD per circa 20 minuti con il DNA in concentrazioni tali affinché si leghi idealmente, con legame Antidigoxigenina-Digoxigenina, una sola molecola alla biglia. In parallelo si diluiscono le biglie SA con il buffer con un rapporto di diluizione 1:1000.
- **Inserimento delle biglie:** Una volta pronte, le biglie vengono inserite con delle siringhe in due canali differenti: le SA nel canale inferiore, mentre le AD in quello superiore della cameretta microfluidica. I due canali nominati sono in comunicazione con quello centrale attraverso dei capillari dispensatori.
- **Intrappolamento delle biglie:** Si procede prima inserendo le SA che, all'uscita del tubicino dispensatore inferiore, vengono catturate con una trappola ottica. Muovendosi lungo la camera si porta la biglia sulla punta della micropipetta e la si fissa su di essa per suzione. Successivamente si inseriscono le AD che, analogamente alle SA, si catturano otticamente all'uscita del tubicino dispensatore superiore. Questa biglia, intrappolata otticamente, viene portata in prossimità della micropipetta.
- **Inizio delle misure:** Muovendo la camera si avvicinano delicatamente le due biglie affinché entrino in contatto, si aspetta poi qualche istante in modo che si possa formare il legame Streptavidina-Biotina tra la Streptavidina nella SA e la Biotina all'estremità della maniglia della biomolecola fissata sulla AD. A questo punto il sistema biologico da studiare è fissato su entrambe le biglie e si possono effettuare le misure.

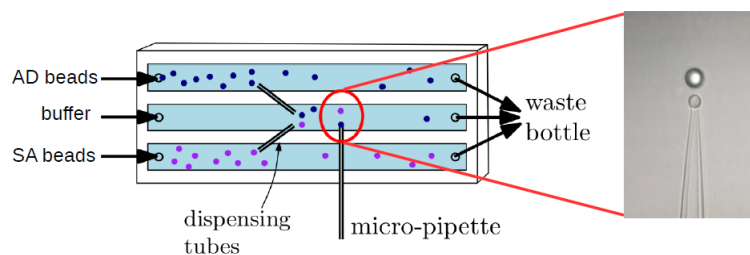


Figura 4.1: Procedura sperimentale: dal canale superiore entrano le biglie chiamate AD, mentre da quello inferiore quelle chiamate SA. Nel canale centrale, contenente buffer filtrato, si svolge l'esperimento.

Una volta che il sistema biologico è pronto si iniziano ad allontanare le biglie, con una velocità costante pari a $v = 50$ nm/s, finché la forza registrata arriva ad un valore impostato (in questo caso specifico 20-25 pN). Successivamente si riavvicinano fino a riportarle quasi a contatto e si attende per un tempo pari a $t = 5$ s a basse forze per poi riprendere a riallontanarle.

Si registrano varie informazioni tra cui la forza applicata all'hairpin di DNA e la distanza λ tra la trappola ottica e la biglia fissata per suzione alla micropipetta (formula (3.1)), in questo modo si monitora la risposta della biomolecola al variare della forza applicata. Aumentando la forza l'hairpin si allunga fino a rompere i legami tra le basi che compongono la catena nucleotidica, finché il sistema non è completamente aperto. Invece riportando le biglie vicine, dato che si stanno avvicinando le maniglie, i legami si riformeranno dopo un tempo di attesa a basse forze pari a 5 s.

Per ricavare le informazioni sulla lunghezza di persistenza e sulla lunghezza di contorno, i grafici che vengono analizzati sono quelli che presentano sull'asse delle ascisse la distanza λ e su quella delle ordinate la forza f . Di seguito vengono presentati due esempi di curve di apertura (unfolding, figura 4.2(a) e 4.2(b)) e due di ripiegamento (folding, figura 4.2(c) e 4.2(d)), in cui si può osservare il salto di forza che corrisponde alla rottura/creazione di legami. Da sottolineare che, nel caso siano presenti più salti di forza, che corrispondono alla possibilità che l'hairpin non si apra/chiuda totalmente subito, il salto da considerare è nel caso dell'unfolding quello a valori di λ maggiori (ossia quando tutti i legami si rompono), mentre nel caso del folding quello a valori di λ minori (quando tutti i legami si creano).

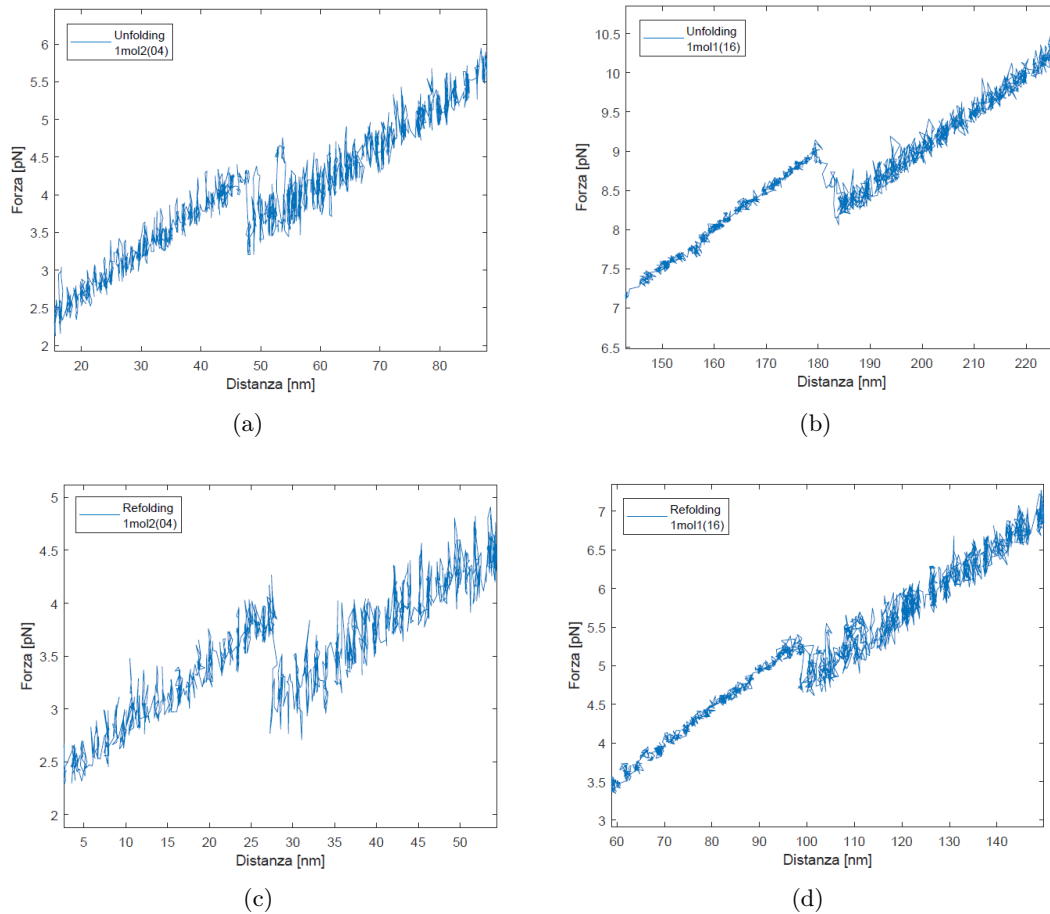


Figura 4.2: Confronto tra curve di folding e unfolding di due molecole diverse. Curve di unfolding: (a) L'hairpin si apre a forze basse, intorno a 4 pN. (b) L'hairpin si apre a forze più alte, circa a 8.5 pN. Curve di folding: (c) L'hairpin si chiude intorno a 3.5 pN. (d) L'hairpin si chiude a forze leggermente più alte, circa a 5 pN. I grafici (a) e (c) sono riferiti alla stessa molecola, così come i grafici (b) e (d). Si nota come le forze a cui si aprono/richiudono le molecole possono essere anche molto diverse fra loro.

Bisogna effettuare un'analisi puntuale di ogni curva perché l'hairpin potrebbe aprirsi e chiudersi in tre modalità differenti: cooperativa quando le coppie di nucleotidi si aprono/chiudono contemporaneamente, non cooperativa quando invece si aprono/chiudono uno alla volta oppure mista quando il sistema presenta sia modalità cooperativa sia non cooperativa. Dall'analisi delle curve è possibile rilevare solamente il numero di nucleotidi che si aprono o chiudono in maniera cooperativa, dato che nel caso non cooperativo la forza varia in modo graduale non contribuendo al salto di forza.

Si effettuano due fit lineari della curva in modo da trovare la pendenza e l'intercetta delle rette; un fit è relativo allo stato folded (quello superiore), mentre l'altro relativo allo stato unfolded (quello inferiore). Si riporta ora un esempio di risultati relativi ad una curva di unfolding con relativo fit.

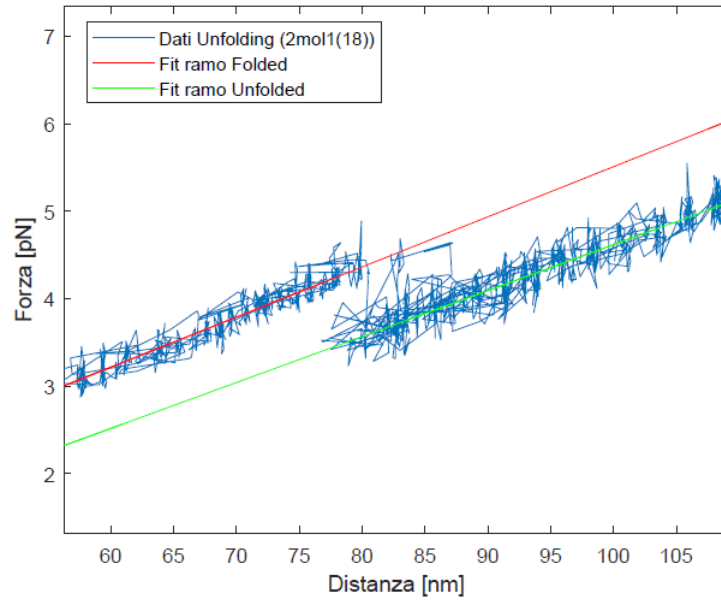


Figura 4.3: *Fit lineare: esempio di fit della curva di unfolding di una molecola.*

Si indica con k_{eff}^F e k_{eff}^U le pendenze e con q^F e q^U le intercette delle rette rispettivamente superiore ed inferiore.

Tabella 4.1: *Parametri dei due fit.*

| | Ramo folded | Ramo unfolded |
|--------------------|---------------------------|--|
| k_{eff}^F | (0.053 ± 0.002) pN/nm | k_{eff}^U (0.057 ± 0.001) pN/nm |
| q^F | (-0.6 ± 0.2) pN | q^U (-0.2 ± 0.1) pN |

Successivamente si seleziona il valore della distanza λ_i a cui avviene la rottura del sistema, tale valore corrisponde al limite superiore del ramo folded, che si indica con f^F , e al limite inferiore del ramo unfolded, che si indica con f^U . Il salto di forza si calcola nel seguente modo:

$$\begin{cases} f^F = k_{\text{eff}}^F \cdot \lambda_i + q^F \\ f^U = k_{\text{eff}}^U \cdot \lambda_i + q^U \end{cases} \Rightarrow \Delta f = f^F - f^U$$

I valori ottenuti per questo particolare caso sono riassunti in tabella 4.2.

Tabella 4.2: Valore del salto di forza a cui avviene la rottura.

| Salto di forza | |
|----------------|--------------------|
| f^F | (3.6 ± 0.2) pN |
| f^U | (4.4 ± 0.1) pN |
| Δf | (0.8 ± 0.2) pN |

Basandoci ora sull'illustrazione schematica del salto in figura 4.4 possiamo partire dalla formula (3.1) e valutare la distanza $\lambda(f)$ alle forze f^F sul ramo folded ($\lambda_i(f^F)$) e unfolded ($\lambda^U(f^F)$).

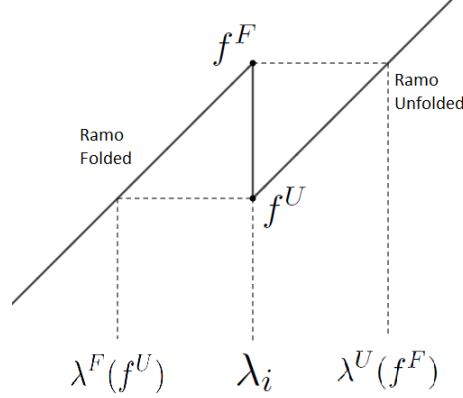


Figura 4.4: Rappresentazione schematica del salto.

$$\begin{cases} \lambda_i(f^F) = \lambda_0 + x_b(f^F) + x_h(f^F) + x_d(f^F) \\ \lambda^U(f^F) = \lambda_0 + x_b(f^F) + x_h(f^F) + x_{ssDNA}(f^F) \end{cases}$$

Sottraendo la prima dalla seconda:

$$\Delta\lambda(f^F) = \lambda^U(f^F) - \lambda_i(f^F) = x_{ssDNA}(f^F) - x_d(f^F)$$

Otengo quindi come stima dell'estensione della molecola completamente aperta:

$$x_{ssDNA}(f^F) = x_d(f^F) + \Delta\lambda(f^F) \quad (4.1)$$

Dove $x_d(f^F)$ si determina da (3.2), mentre $\Delta\lambda(f^F)$ si ricava dai dati sperimentali. Per una stima migliore del valore di $\Delta\lambda$ si procede nel seguente modo: si calcola la distanza tra le due rette per diversi valori della forza a partire da f^U , procedendo con un passo pari a $\Delta f/10$, fino ad arrivare a f^F . Per ogni valore f_i con $i = 0, \dots, 10$ si calcola:

$$\begin{cases} \lambda^F(f_i) = \frac{f_i - q^F}{k_{eff}^F} \\ \lambda^U(f_i) = \frac{f_i - q^U}{k_{eff}^U} \end{cases} \Rightarrow \Delta\lambda(f_i) = |\lambda^F(f_i) - \lambda^U(f_i)| \quad (4.2)$$

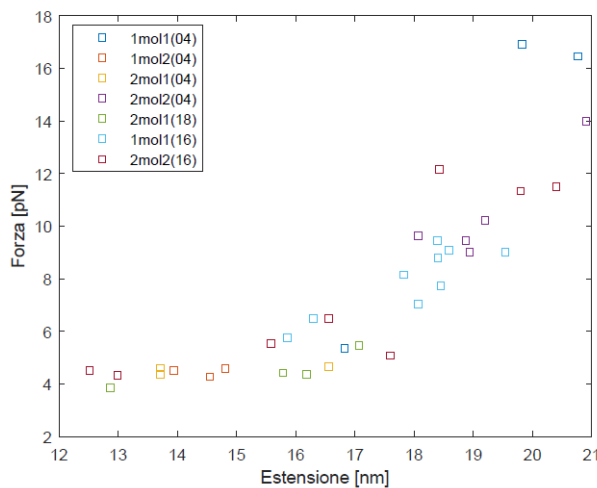
La stima definitiva di $\Delta\lambda(f^F)$ si ottiene come media aritmetica dei valori ricavati da (4.2). Per questa particolare molecola usata come esempio, i risultati vengono riportati in tabella 4.3.

Tabella 4.3: Valore dell'estensione dell'hairpin $x_{ssDNA}(f^F)$ e dei due valori usati per calcolarlo.

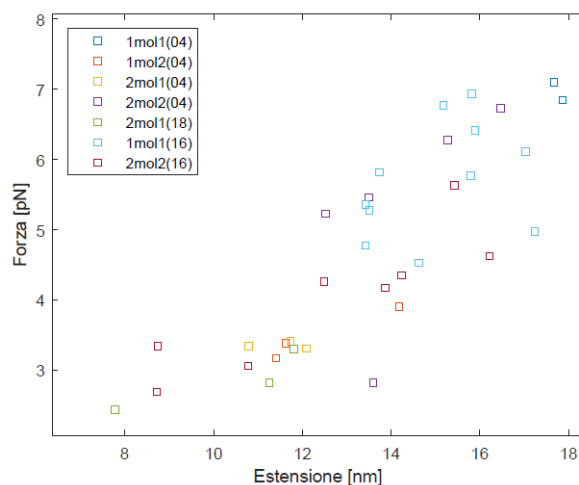
| Estensione | |
|----------------------|---------------------|
| $\Delta\lambda(f^F)$ | (14.4 ± 0.4) nm |
| $x_d(f^F)$ | (1.1 ± 0.2) nm |
| $x_{ssDNA}(f^F)$ | (15.5 ± 0.4) nm |

4.2 Dati sperimentali e discussione

Si analizzano tutte le curve di folding e unfolding delle varie molecole come spiegato nella sezione 4.1, poi si riportano in un grafico i risultati con l'estensione $x_{\text{ssDNA}}(f^F)$ in nm sulle ascisse e la forza f^F in pN sulle ordinate.



(a)



(b)

Figura 4.5: Grafici con l'estensione $x_{\text{ssDNA}}(f^F)$ in nm sulle ascisse e la forza f^F in pN sulle ordinate: (a) Grafico con tutti i dati ricavati analizzando le curve di unfolding. (b) Grafico con tutti i dati ricavati analizzando le curve di folding.

Prima di eseguire il fit si è deciso di dividere l'asse delle ordinate in 15 intervalli, in modo tale da dividere il grafico in strisce orizzontali; all'interno di queste si effettua la media aritmetica dei punti che vi ricadono dentro. Questa procedura è dettata dal fatto che, nell'analisi delle curve di folding e unfolding, viene selezionato manualmente il valore della distanza a cui corrisponde il salto della forza. Questo metodo porta con sé un errore intrinseco, legato anche alla difficoltà che a volte si presentava nell'analizzare alcune curve. Si è preferito quindi dividere l'asse delle ordinate in intervalli, anziché quello delle ascisse, dato che la forza f^F la si trova in modo più diretto, al contrario dell'estensione $x_{\text{ssDNA}}(f^F)$ che deriva da un'analisi più elaborata. Si effettua poi l'interpolazione dei dati ottenuti da questa successiva analisi con la formula (3.5) del modello Worm-Like Chain. Nel caso dei dati relativi all'unfolding si è escluso un punto dopo aver eseguito una prima analisi dei residui. Il fit finale dei dati di unfolding è presentato in figura 4.6.

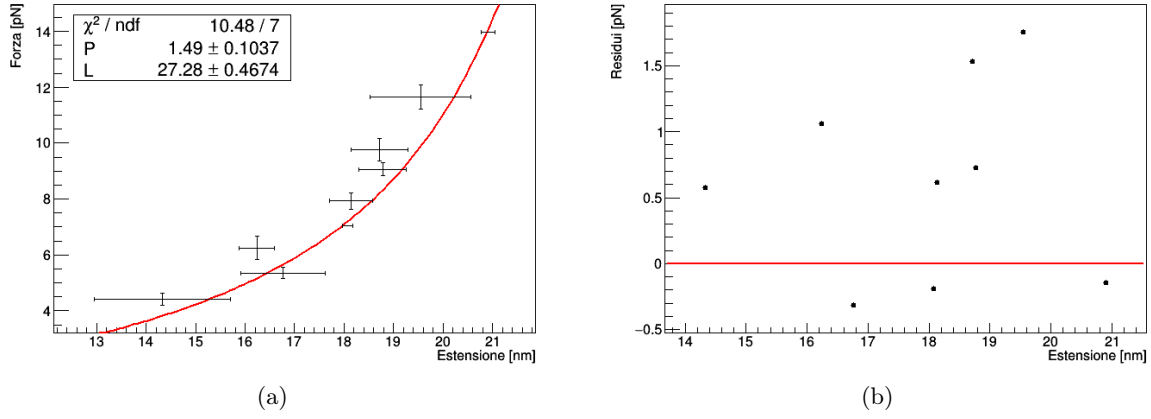


Figura 4.6: *Fit dei dati di unfolding con modello WLC: (a) Fit con la formula (3.5) per ricavare i parametri P e L_c . (b) Grafico dei residui.*

In tabella 4.4 sono riportati i valori dei parametri P e L_c ricavati dall'interpolazione relativa alla figura 4.6

Tabella 4.4: *Risultati: lunghezza di persistenza P e lunghezza di contorno L_c .*

| Parametri (unfolding) | |
|------------------------------|---------------------|
| P | (1.5 ± 0.1) nm |
| L_c | (27.3 ± 0.5) nm |

Il fit finale dei dati di folding è presentato in figura 4.7.

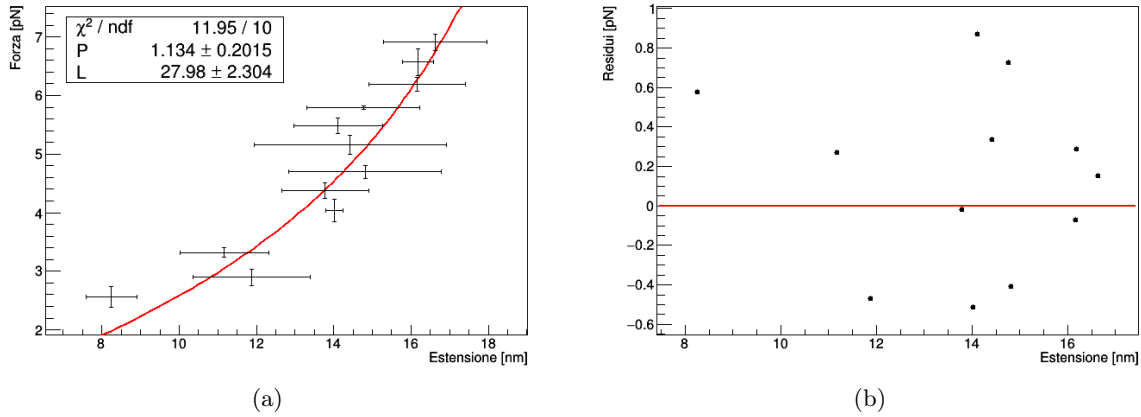


Figura 4.7: *Fit dei dati di folding con modello WLC: (a) Fit con la formula (3.5) per ricavare i parametri P e L_c . (b) Grafico dei residui.*

In tabella 4.5 sono riportati i valori dei parametri P e L_c ricavati dall'interpolazione relativa alla figura 4.7

Tabella 4.5: *Risultati: lunghezza di persistenza P e lunghezza di contorno L_c .*

| Parametri (folding) | |
|----------------------------|--------------------|
| P | (1.1 ± 0.2) nm |
| L_c | (28 ± 2) nm |

L'interpolazione dei dati sperimentali con il modello WLC fornisce due valori di lunghezza di contorno che sono perfettamente compatibili tra loro. Inoltre, ricordando che $L_c = N \cdot d_b$ e utilizzando il valore $d_b = (0.58 \pm 0.02)$ nm riportato in [8] relativo a molecole di DNA a singolo filamento, si può ottenere il numero di nucleotidi che si sono aperti/chiusi nei processi di unfolding/folding studiati. Tale valore è pari a $N = (47 \pm 2)$ per le curve di unfolding e $N = (48 \pm 4)$ per quelle di folding, risultando pertanto ottimamente compatibili con il valore nominale di nucleotidi che compongono il sistema biologico e sono coinvolti nella formazione dell'hairpin, ossia $N = 47$. per quanto riguarda le lunghezze di persistenza P , queste sono compatibili con i valori riportati in letteratura [8] per sistemi biologici simili a quello studiato in questo lavoro, ossia hairpin di DNA a singolo filamento con lunghezza inferiore al centinaio di nucleotidi.

Dopo aver trovato le stime dei valori della lunghezza di persistenza e lunghezza di contorno, questi possono essere usati per analizzare più nel dettaglio alcune curve (forza-vs-distanza) che presentano degli evidenti doppi salti di forza. Le molecole che esibiscono tali salti sono compatibili con l'aver una struttura con un doppio loop come in figura 3.2(a) e 3.2(b). Di seguito vengono presentati un esempio per ogni configurazione dell'hairpin di DNA possibile. Si analizza prima la struttura in figura 3.2(a) con i due loop di dimensioni simili: dopo la rottura dei primi legami, con conseguente apertura del primo loop, si osserva un'estensione della molecola compatibile con $N_1 = 21$ nucleotidi aperti. Successivamente si rompono anche i restanti legami in modo che anche il secondo loop si apra totalmente; questo secondo salto di forza che si osserva corrisponde ad ulteriori $N_2 = 26$ nucleotidi aperti, per un totale di $N_{\text{tot}} = 47$ nucleotidi. I grafici in figura 4.8 sono curve di unfolding di una stessa molecola. Si notano chiaramente, in particolare in figura 4.8(a), due salti di forza a livelli differenti.

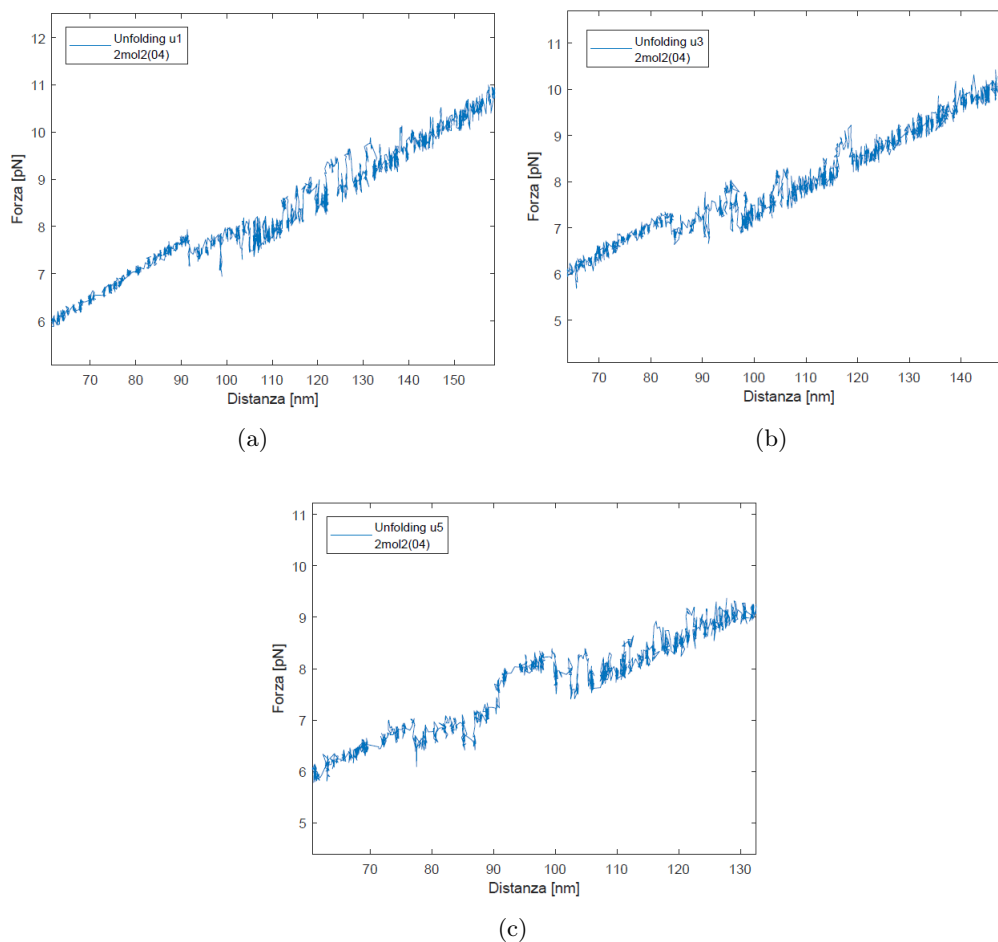


Figura 4.8: Curve di unfolding di una stessa molecola: si nota che in tutti e tre i casi sono presenti dei salti di forza compatibili con una struttura con doppio loop come in figura 3.2(a).

Di seguito si presenta il grafico con i risultati ottenuti analizzando le curve in figura 4.8 in modo analogo al metodo presentato nella sezione 4.1. Bisogna ricordare che i valori di lunghezza di persistenza P e lunghezza di contorno L_c sono stati ricavati a partire da un fit che presenta i dati di estensione $x_{\text{ssDNA}}(f^F)$ e forza f^F relativi a molecole diverse. È quindi normale che ci siano dei leggeri scostamenti dal modello teorico dei dati sperimentali presi in esame in questo specifico caso trattato. In particolare, in questa fase l'analisi è resa difficoltosa dal fatto che i due rami di ciascuna curva di estensione devono essere interpolati in prossimità del salto di forza, dove però spesso si hanno pochi punti sperimentali a disposizione, visti i tempi ridotti con cui l'hairpin passa da uno stato energetico all'altro.

Le curve teoriche rappresentate graficamente hanno come parametri $P = (1.5 \pm 0.1)$ nm e $L_c = N \cdot d_b$ con $d_b = (0.58 \pm 0.02)$ nm e N che varia a seconda del caso.

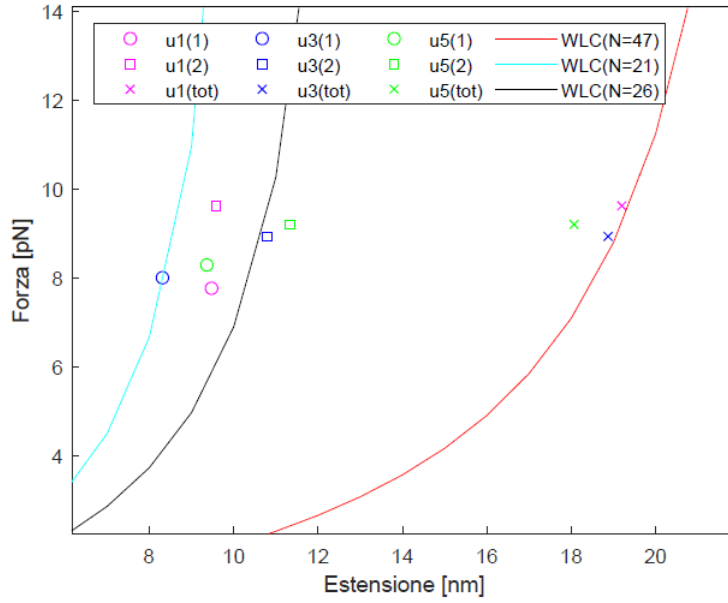


Figura 4.9: *Struttura 1*: nel grafico compaiono i dati relativi a tre curve di unfolding differenti che si possono distinguere in base al colore rosa, blu o verde. Le estensioni e relativa forza del primo salto, ossia corrispondente all'apertura del primo loop, sono indicate con un cerchio. Quelle relative al secondo salto, quindi all'apertura del secondo loop, sono indicate con un quadrato. Infine, i valori di forza ed estensione relativi all'apertura totale dell'hairpin di DNA sono indicati con una crocetta. Sono inoltre graficate le curve di forza secondo il modello Worm-Like Chain relative ad una sequenza di DNA con $N=47$ (rosso), $N=21$ (azzurro), $N=26$ (nero) di nucleotidi aperti.

Si osserva in figura 4.9 che i dati si avvicinano molto alle curve teoriche; nello specifico i valori dei numeri di nucleotidi aperti in ogni salto è riportato in tabella 4.6. I valori relativi alla curva u3 (blu) sono quelli che si avvicinano maggiormente alle configurazioni studiate.

Tabella 4.6: Nelle prime tre colonne sono riportati i numero di nucleotidi N_1 , N_2 e N_{tot} rispettivamente del primo salto, del secondo salto e del salto totale. Quelli indicati sono esattamente i valori di N che servono a riprodurre la formula (3.5). Le ultime due colonne invece riportano i valori di estensione x_{ssDNA} calcolati come somma dei due salti o direttamente guardando il salto totale.

Struttura 1

| | N_1 | N_2 | N_{tot} | $x_{\text{ssDNA},1+2}$ | $x_{\text{ssDNA,tot}}$ |
|-----------|------------|------------|------------------|------------------------|------------------------|
| u1 | 24 ± 1 | 23 ± 1 | 46 ± 2 | (19.1 ± 0.2) nm | (19.20 ± 0.07) nm |
| u3 | 21 ± 1 | 27 ± 1 | 46 ± 2 | (19.11 ± 0.08) nm | (18.9 ± 0.3) nm |
| u5 | 23 ± 1 | 28 ± 1 | 44 ± 2 | (20.7 ± 0.3) nm | (18.1 ± 0.4) nm |

Si analizza ora la struttura in figura 3.2(b) con il primo loop vistosamente più grande del secondo: dopo la rottura dei primi legami si osserva un'estensione della molecola compatibile con $N_1 = 33$ nucleotidi aperti. Successivamente si rompono anche i legami rimanenti in modo che anche il secondo loop si apra; questo secondo salto di forza corrisponde ad ulteriori $N_2 = 14$ nucleotidi aperti, per un totale di $N_{\text{tot}} = 47$ nucleotidi.

I grafici in figura 4.10 sono curve di unfolding di una stessa molecola.

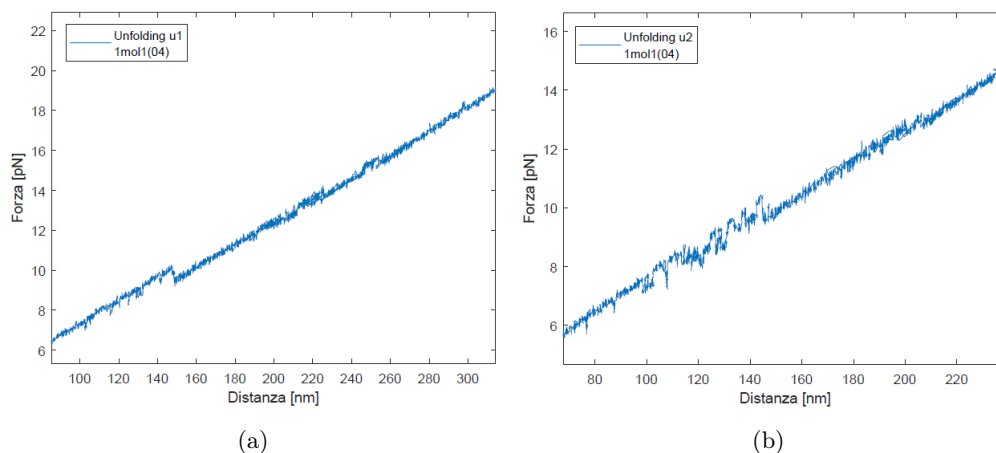


Figura 4.10: Curve di unfolding di una stessa molecola: si nota che in tutti e due i casi sono presenti dei salti di forza compatibili con una struttura con doppio loop come in figura 3.2(b).

Analogamente a prima, di seguito si presenta il grafico con i risultati ottenuti analizzando le curve in figura 4.10.

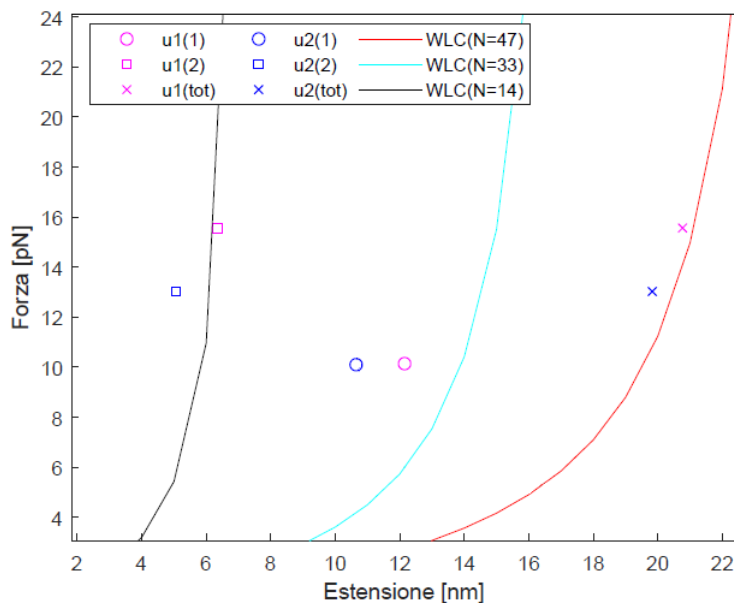


Figura 4.11: Struttura 2: nel grafico compaiono i dati relativi a tre curve di unfolding differenti che si possono distinguere in base al colore rosa o blu. Le estensioni e relativa forza del primo salto, ossia corrispondente all'apertura del primo loop, sono indicate con un cerchio. Quelle relative al secondo salto, quindi all'apertura del secondo loop, sono indicate con un quadrato. Infine, i valori di forza ed estensione relativi all'apertura totale dell'hairpin di DNA sono indicati con una crocetta. Sono inoltre graficate le curve di forza secondo il modello Worm-Like Chain relative ad una sequenza di DNA con $N=47$ (rosso), $N=33$ (azzurro), $N=14$ (nero) di nucleotidi aperti.

Si osserva in figura 4.11 che i dati relativi al secondo salto si avvicinano molto alle curve teoriche. I valori dei numeri di nucleotidi aperti in ogni salto è riportato in tabella 4.7.

Tabella 4.7: Nelle prime tre colonne sono riportati i numeri di nucleotidi N_1 , N_2 e N_{tot} rispettivamente del primo salto, del secondo salto e del salto totale. Quelli indicati sono esattamente i valori di N che servono a riprodurre la formula (3.5). Le ultime due colonne invece riportano i valori di estensione x_{ssDNA} calcolati come somma dei due salti o direttamente guardando il salto totale.

Struttura 2

| | N_1 | N_2 | N_{tot} | $x_{ssDNA,1+2}$ | $x_{ssDNA,tot}$ |
|-----------|------------|------------|------------|-----------------------|---------------------|
| u1 | 29 ± 1 | 14 ± 1 | 46 ± 2 | (18.5 ± 0.2) nm | (20.8 ± 0.3) nm |
| u2 | 26 ± 1 | 12 ± 1 | 45 ± 2 | (15.71 ± 0.07) nm | (19.8 ± 0.3) nm |

Vale la pena notare come il numero di nucleotidi aperti nel primo salto risulti leggermente inferiore al valore teorico di $N_1 = 33$. Tale scostamento potrebbe essere dovuto sia al fatto che l'hairpin prima dell'apertura definita del primo loop apre e chiude parzialmente alcuni dei nucleotidi dello stem (vedi figura 4.10(a) a forze più basse) e che nella successiva fase di chiusura alcune delle paia di basi rimangono aperte, così che il numero di nucleotidi coinvolti nella successiva apertura risulti inferiore a quello atteso. È chiaramente necessario aumentare il numero di dati sperimentali per avvalorare statisticamente quanto finora osservato.

Capitolo 5

Conclusioni

Le nuove ricerche e gli ultimi sviluppi nel campo dei biosensori si sono concentrate nel monitoraggio dei processi biologici e sintetici impiegati nella chimica industriale e clinica, nell'analisi degli alimenti, nell'ambiente e nell'area del monitoraggio e della diagnostica della salute umana. In tale ambito si inserisce questo lavoro di tesi, che aveva come obiettivo lo studio della risposta elastica di un hairpin di DNA sotto l'azione di una forza applicata alle sue estremità tramite l'uso delle pinzette ottiche. Inoltre si voleva verificare la presenza di possibili stati intermedi nel processo di allungamento e ripiegamento dell'hairpin.

L'hairpin studiato è un biosensore formato da 49 nucleotidi che presenta tre siti di riconoscimento del target, ossia una sequenza complementare con la quale può ibridizzare. Nelle condizioni di lavoro in cui sono stati raccolti i dati, ossia a temperatura 25°C e con concentrazione di NaCl nel buffer pari a 0.5 M, il sistema biologico presenta due possibili strutture a doppio loop.

Lo strumento utilizzato è il mini-Tweezers che consiste in due fasci laser contropropaganti di lunghezza d'onda 805 nm che formano una trappola ottica all'interno della cameretta microfluidica in cui avviene l'esperimento. Il sensore biomolecolare che si sta studiando ha le estremità agganciate con legami Streptavidina-Biotina e Digoxigenina-Antidigoxigena a due biglie micrometriche opportunamente funzionalizzate: una biglia è fissata per suzione ad una micropipetta, mentre l'altra viene intrappolata otticamente. In questa configurazione è possibile studiare il comportamento dell'hairpin nella fase di rottura e formazione dei legami idrogeno tra le basi, vengono infatti allontanate le biglie, con una velocità costante pari a $v = 50$ nm/s, finché la forza registrata arriva ad un valore impostato di 20-25 pN. Successivamente si riavvicinano fino a riportarle quasi a contatto e si attende per un tempo pari a $t = 5$ s per poi riprendere a riallontanarle. Si registrano varie informazioni tra cui la forza applicata all'hairpin di DNA e la distanza tra la trappola ottica e la biglia fissata per suzione alla micropipetta, in questo modo si monitora costantemente la risposta della biomolecola al variare della forza applicata. Aumentando la forza l'hairpin si allunga fino a rompere i legami dello stem, finché il sistema non risulta completamente aperto. Invece riportando le biglie vicine, dato che si stanno avvicinando le maniglie, i legami si riformeranno dopo un tempo di attesa a basse forze pari a 5 s.

Sono state studiate le curve di unfolding e folding sperimentali analizzando i salti di forza e il valore di forza al quale avviene il cambiamento di configurazione dell'hairpin, dallo stato folded (chiuso) allo stato unfolded (aperto) o viceversa. Questa analisi ha permesso di calcolare i valori di estensione dell'hairpin di DNA al variare della forza applicata e il loro andamento sperimentale è stato confrontato con il modello teorico Worm-Like Chain (WLC).

L'interpolazione dei dati con il modello WLC fornisce una lunghezza di persistenza pari a $P = (1.5 \pm 0.1)$ nm per le curve di unfolding e $P = (1.1 \pm 0.2)$ nm per quelle di folding, valori compatibili con quanto riportato in letteratura in [8] per sistemi biologici simili a quello studiato in questo lavoro, ossia hairpin di DNA a singolo filamento con lunghezza inferiore al centinaio di nucleotidi. Altro parametro ricavato è la lunghezza di contorno, pari a $L_c = (27.3$

± 0.5) nm per le curve di unfolding e $L_c = (28 \pm 2)$ nm per quelle di folding. Conoscendo inoltre la distanza tra i nucleotidi in molecole a singolo filamento di DNA, $d_b = (0.58 \pm 0.02)$ nm, è stato ricavato il numero di nucleotidi che si sono aperti/chiusi nei processi di unfolding/folding studiati. Tale valore è pari a $N = (47 \pm 2)$ per le curve di unfolding e $N = (48 \pm 4)$ per quelle di folding, risultando pertanto ottimamente compatibili con il valore nominale di nucleotidi che compongono il sistema biologico e sono coinvolti nella formazione dell'hairpin, ossia $N = 47$.

Ci sono alcune molecole che esibiscono nelle curve forza-vs-distanza dei doppi salti di forza compatibili con l'avere una delle due strutture con doppio loop come in figura 3.2(a) o 3.2(b). Nel primo caso dopo la rottura dei primi legami dello stem, con conseguente apertura del primo loop, si osserva un'estensione della molecola compatibile con $N_1 = 21$ nucleotidi aperti. Successivamente si rompono anche i restanti legami in modo che anche il secondo loop si apra totalmente; questo secondo salto di forza che si osserva corrisponde ad ulteriori $N_2 = 26$ nucleotidi aperti. Nel secondo caso invece il primo salto di forza corrisponde a $N_1 = 33$ nucleotidi aperti, mentre il secondo a $N_2 = 14$. Per un totale, in entrambi i casi, di $N_{\text{tot}} = 47$ nucleotidi. È stata pertanto confermata l'esistenza di due stati intermedi nel processo di apertura e ripiegamento dell'hairpin, che risultano riconducibili alle configurazioni a doppio-loop predette da simulazioni di biofisica molecolare.

Bibliografia

- [1] Anna Alemany, *Dynamic force spectroscopy and folding kinetics in molecular systems*, Università di Barcellona, settembre 2014
- [2] Clara Zaccaria, *Optical mini-Tweezers: un esperimento di singola molecola*, Università di Padova, 2018
- [3] F. Ricci, A. Valleée-Beélisle, A. Porchetta e K. W. Plaxco, *Rational Design of Allosteric Inhibitors and Activators Using the Population-Shift Model: In Vitro Validation and Application to an Artificial Biosensor*, Journal of the American Chemical Society, 27 agosto 2012
- [4] E. Del Grosso, A. Amodio, G. Ragazzon, L. J. Prins e F. Ricci, *Dissipative Synthetic DNA-Based Receptors for the Transient Loading and Release of Molecular Cargo*, Angewandte Chemie International Edition, 2018
- [5] F. Ritort, *Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications*, J. Phys.: Condens. Matter 18 (2006) R531–R583
- [6] C. Bustamante, J. Marko, E. D. Siggia, e S. B. Smith, *Entropic elasticity of λ -phage DNA*, Science, Vol. 265, No. 5178, pp. 1599–1600, 1994
- [7] C. Bouchiat, M. D. Wang, J. F. Allemand, T. Strick, S. M. Block, and V. Croquette, *Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements*, Biophysical journal, Vol. 76, No. 1, pp. 409–413, 1999
- [8] Anna Alemany e Felix Ritort, *Determination of the Elastic Properties of Short ssDNA Molecules by Mechanically Folding and Unfolding DNA Hairpins*, Wiley Online Library, 2014
- [9] M. Zuker, *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*, <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>, Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-15, 2003
- [10] Kavita V, *DNA Biosensors-A Review*, Journal of Bioengineering & Biomedical Science 7: 222, 2017
- [11] LaFSI, Univerità degli Studi di Padova http://lafsi.dfa.unipd.it/index.php/it/?option=com_content&view=article&id=144&catid=12&lang=it-IT