



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**METODOLOGIA PER LA DETERMINAZIONE IN VITRO DELL'INTERAZIONE
PEPTIDE PROTEINA TRAMITE LA TECNICA SERS.**

Relatore: Prof. Marina Gobbo

Correlatore: Prof. Moreno Meneghetti

Controrelatore: Prof. Donatella Carbonera

LAUREANDO: Busato Matteo

ANNO ACCADEMICO: 2022/2023

INDICE

1 INTRODUZIONE	3
1.1 Nanomedicina	3
1.2 Nanoparticelle plasmoniche	4
1.3 Spettroscopia Raman e tecnica SERS	6
1.4 Uso delle tecniche SERS nella rivelazione delle biomolecole	9
1.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA	10
2 SCOPO DELLA TESI	14
3 RISULTATI E DISCUSSIONE	16
3.1 L'interazione avidina-biotina	16
3.2 Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro	17
3.3 Sintesi di nanostrutture SERS	20
3.4 Sintesi del peptide biotinilato e delle nanostrutture biotinilate	22
3.5 Stampante e preparazione dell'inchiostro	26
3.6 Tiolazione della streptavidina e della neutravidina	27
3.7 Preparazione dell'inchiostro e prove di stampa	30
3.8 Riconoscimento di spots funzionalizzati con PD-L1 da parte di nanostrutture con il peptide FP3	33
4 CONCLUSIONI	40
5 PARTE SPERIMENTALE	41
5.1 Reagenti	41
5.2 Strumentazioni	41
5.3 Sintesi e caratterizzazione del peptide biotinilato (MB01)	43
5.4 Sintesi e caratterizzazione delle nanostrutture SERS biotinilate	46
5.5 Formulazione dell'inchiostro	49
5.6 Stampa e incubazione con nanostrutture biotinilate	53
5.7 Sintesi delle nanostrutture SERS funzionalizzate con FP3	55
5.8 Incubazione con PD-L1 e analisi SERS	59

BIBLIOGRAFIA 63

RINGRAZIAMENTI 67

1. INTRODUZIONE

1.1 NANOMEDICINA E NANOMATERIALI

La nanomedicina è una branca della medicina dove i nanomateriali vengono utilizzati per fini diagnostici o terapeutici. Un nanomateriale è un qualsiasi materiale con dimensioni che vanno da 1 a 100 nm (**figura 1**). Alcuni esempi possono essere nanostrutture basate sul carbonio, come dendrimeri o nanotubi di carbonio, nanoparticelle colloidali oppure sistemi polimero-anticorpo [1]. Questo tipo di materiali grazie alle loro piccole dimensioni presentano delle proprietà uniche che li distinguono dai materiali macroscopici. In primo luogo essi presentano un elevato rapporto tra area superficiale e volume che conferisce loro un'elevata energia superficiale, rendendoli sistemi molto reattivi. In questo modo i nanomateriali risultano facilmente funzionalizzabili con diversi ligandi attraverso i quali è possibile modularne la solubilità in diversi solventi nonché le loro interazioni con l'ambiente circostante. Le dimensioni nanometriche inoltre sono responsabili delle particolari proprietà meccaniche, elettriche ed ottiche che rendono questi materiali adatti ad un ampio spettro di applicazioni, come nel campo delle comunicazioni, della biologia e della medicina [2].

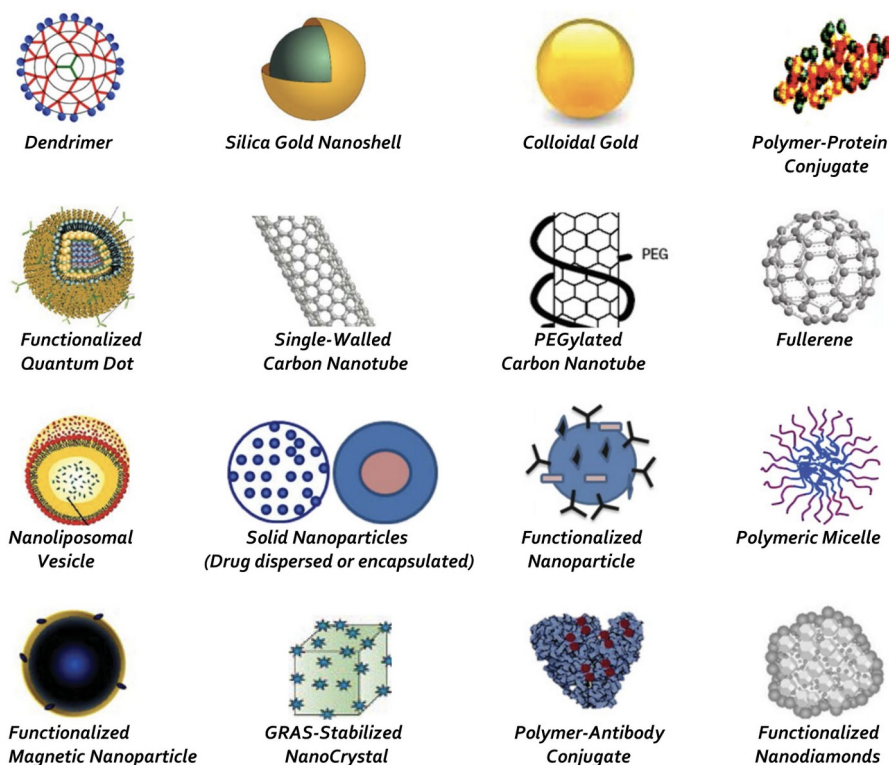


Figura 1: esempi di nanomateriali [1]

In anni recenti in campo biomedico è cresciuto l'interesse per i nanomateriali come nanocarriers di farmaci, per fini terapeutici, oppure come sonde per l'imaging in quanto possono essere facilmente funzionalizzati con agenti di targeting [3][4]. Grazie ai nanocarriers infatti è possibile disperdere nell'ambiente biologico principi attivi scarsamente solubili in acqua; inoltre caratteristiche come forma, composizione e area superficiale possono essere opportunamente modulate per proteggere le macromolecole incapsulate dai meccanismi di difesa interna (come la degradazione enzimatica e l'immunodegradazione) o per aumentare la specificità del targeting, che in questo modo riesce a raggiungere anche precisioni subcellulari. Un ulteriore vantaggio dei nanocarriers è che possono rilasciare farmaci in modo controllato stimolando opportunamente l'ambiente circostante (variazione di pH oppure di temperatura). In questo modo è possibile massimizzare l'efficacia della terapia e l'efficienza dell'imaging diagnostico. Questo ha permesso di superare i limiti imposti dalla medicina convenzionale, vale a dire la scarsa biodisponibilità, la scarsa specificità e la presenza di effetti collaterali vari[2]. Rispetto ai più comuni nanocarriers a base polimerica o lipidica, i nanocluster inorganici presentano il vantaggio di essere estremamente robusti e molto stabili nonché molto resistenti ai processi di degradazione enzimatica. Essi possono essere prodotti di dimensioni abbastanza piccole (< 20 nm) da poter essere estratti facilmente per via fecale o renale. Inoltre le loro intrinseche proprietà elettroniche, ottiche e magnetiche, opportunamente modulabili attraverso il controllo di caratteristiche come forma, dimensione e composizione, ne fanno degli strumenti multifunzionali per l'imaging e la terapia. I nanocarriers inorganici possono essere suddivisi in magnetici, semiconduttori e plasmonici.

1.2 NANOPARTICELLE PLASMONICHE

In anni recenti, grazie agli sviluppi nel campo dei nanomateriali, è cresciuto l'interesse per le nanoparticelle inorganiche nel campo delle terapie antitumorali e delle strategie di imaging a scopo diagnostico. Questo soprattutto per quanto riguarda nanoparticelle di metalli nobili come oro e d'argento, in quanto esibiscono un forte assorbimento nel visibile e nel NIR dovuto alla risonanza plasmonica superficiale localizzata (LSPR) e un elevato coefficiente di estinzione [5].

Le nanoparticelle d'oro in particolare, sono sistemi biocompatibili in quanto presentano un'elevata stabilità dal punto di vista chimico-fisico e una tossicità nulla. Inoltre tali

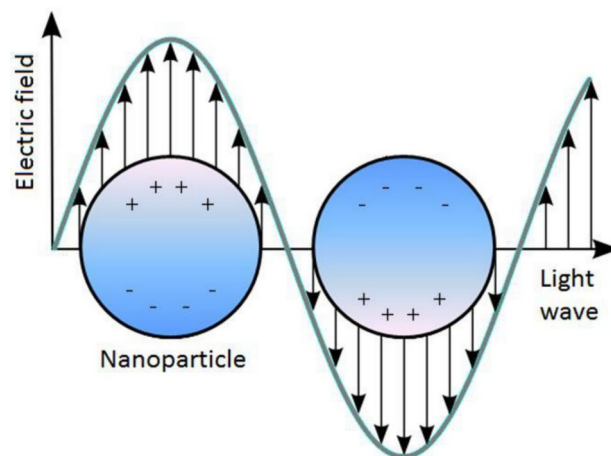


Figura 2: Rappresentazione grafica dell'oscillazione plasmonica superficiale.

sistemi possono essere facilmente funzionalizzati con molecole biologiche attraverso la formazione di legami con gruppi carbossilici, amminici e tiolici. In particolare questi ultimi sono i più utilizzati in ambito medico poiché il legame Au-S risulta essere particolarmente forte, nonché stabile in ambiente fisiologico fino a tre settimane [6][7].

La proprietà fisica fondamentale per la diagnostica è la risonanza plasmonica superficiale (LSPR). Essa è dovuta all'eccitazione del plasmone superficiale di una nanoparticella metallica di dimensioni più piccole della lunghezza d'onda della radiazione incidente ($2R > \lambda$, con R raggio della particella). Il campo elettrico di quest'ultima induce uno spostamento degli elettroni di conduzione rispetto alla massa positiva polarizzando la nanoparticella (**Figura 2**). Ciò comporta che nel sistema verrà esercitata una forza che andrà ad opporsi a questo spostamento di elettroni, generando un'oscillazione del plasmone chiamata oscillazione plasmonica superficiale, che seguirà la componente elettrica della radiazione elettromagnetica incidente. Quando quest'ultima sarà in risonanza con la frequenza d'oscillazione del plasmone, si avrà l'oscillazione collettiva di tutti gli elettroni presenti nella banda di conduzione e si potrà osservare un picco nello spettro di assorbimento delle nanoparticelle, dovuto alla risonanza plasmonica. Nel caso dei metalli nobili tale picco si trova nel visibile, generando sospensioni colorate [8]. Le condizioni alle quali questo avviene dipendono da svariati fattori come il solvente in cui sono disperse le nanoparticelle, la dimensione e la forma di queste ultime. Nel caso delle nanoparticelle d'oro del diametro di 30 nm sospese in acqua, il picco di risonanza plasmonica cade a 520 nm, generando una sospensione di colore rosso. Come scritto sopra, le dimensioni delle nanoparticelle, e quindi il loro stato di aggregazione, andranno ad influenzare lo spettro di assorbimento. Infatti aggregati d'oro di dimensioni maggiori di 30 nm mostrano un picco plasmonico più largo e spostato verso il rosso, generando una

sospensione blu-viola. Questo è dovuto al fatto che maggiori saranno le dimensioni delle nanoparticelle più la radiazione incidente avrà difficoltà a polarizzare omogeneamente il plasmone causando un rallentamento della radiazione elettromagnetica lungo la nanoparticella [8].

Questo tipo di nanosistemi plasmonici sono stati ampiamente sfruttati per amplificare il segnale Raman nella cosiddetta tecnica SERS, permettendo di ottenere segnali risolti e di intensità molto elevate paragonabili a quelle della fluorescenza.

1.3 SPETTROSCOPIA RAMAN E TECNICA SERS

L'effetto Raman, alla base dell'omologa spettroscopia vibrazionale, è dovuto al fenomeno dello scattering anelastico degli elettroni. In particolare si tratta degli scattering di Stokes e di anti-Stokes: nel primo la molecola dopo l'eccitazione ritorna ad uno stato vibrazionale ad energia superiore di quello di partenza, mentre nel secondo l'elettrone si trova già in uno stato vibrazionale ad alta energia prima dell'eccitazione per poi decadere a quello fondamentale (**Figura 3**). In questo modo viene misurata la differenza in energia tra i fotoni incidenti e quelli scatterati, tipicamente come variazione in termini di numero d'onda (Raman Shift).

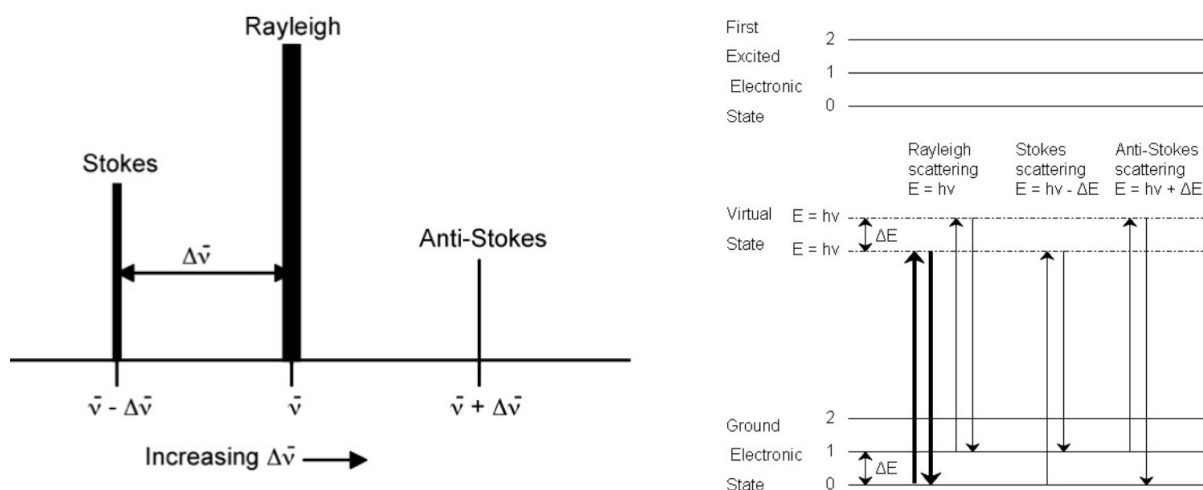


Figura 3: Rappresentazione grafica degli scattering di Stokes, di anti-Stokes e di Rayleigh

Le vibrazioni Raman, dipendono dalla polarizzabilità della molecola e risulteranno attive soltanto con una variazione di quest'ultima (**figura 4**). Infatti mediante spettroscopia Raman è possibile effettuare misure di campioni dispersi in acqua, in quanto questa possiede una polarizzabilità pressoché nulla [9].

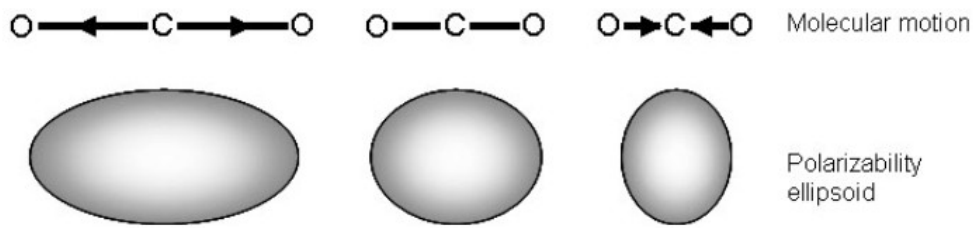


Figura 4: Variazione di polarizzabilità nella molecola di CO₂

Il principale svantaggio della spettroscopia Raman sta nel fatto che gli scattering di Stokes e anti-Stokes hanno un'intensità molto debole se paragonata a quella dello scattering di Rayleigh o alla fluorescenza. Per ovviare a questa problematica è stata ideata la tecnica SERS, in cui molecole Raman attive assorbite sulla superficie di nanoparticelle plasmoniche, con LSPR a lunghezze d'onda simili a quelle delle radiazioni incidenti, mostrano un'amplificazione del segnale di 10^9 volte superiore a quello del semplice segnale Raman. Inoltre la tecnica SERS ha anche il vantaggio di quencher la fluorescenza delle molecole Raman attive, in quanto l'interazione di queste con le particelle plasmoniche altera i processi di emissione. Questo risulta molto utile in primis perché la fluorescenza compete con i segnali Raman e poi perché in questo modo è possibile ottenere segnali Raman di molecole fluorescenti [10].

L'amplificazione del segnale nell'effetto SERS può essere attribuita a due principali contributi, uno elettromagnetico, e l'altro chimico. Nel primo la radiazione elettromagnetica incidente causa la risonanza plasmonica superficiale localizzata della nanoparticella metallica, generando un'amplificazione del campo elettromagnetico locale (**figura 5**). Questo andrà ad interagire con le molecole Raman attive assorbite sulla superficie della nanoparticella metallica causando un'amplificazione del segnale di scattering di 10^8 . Complessivamente il campo elettrico della radiazione incidente viene amplificato di E^4 . E' importante specificare, che l'effetto SERS è strettamente legato alla superficie della nanoparticella. Infatti il campo elettrico della radiazione scatterata scale con cubo del raggio raggio ($E \sim R^{-3}$) e dunque l'effetto SERS produrrà un campo $E \sim R^{-12}$ [10]. Tale campo, inoltre, non è omogeneamente distribuito sulla superficie, ma risulta più intenso nelle cavità comprese tra le nanoparticelle e in alcune zone più strette ed appuntite che fungeranno da antenna. Saranno proprio le poche molecole adsorbite su queste zone, dette hot-spots, che, generano l'amplificazione maggiore del segnale.

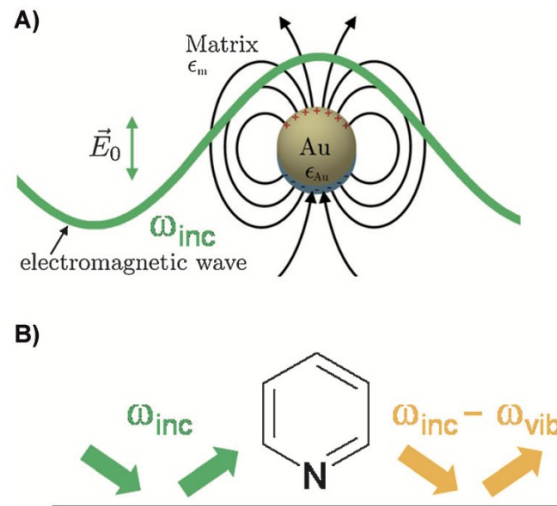


Figura 5: Effetto SERS elettromagnetico: A) Nanoparticella d'oro che si comporta come una nanoantenna dopo l'eccitazione della LSPR. B) Sia la radiazione incidente (in verde) che quella scatterata vengono amplificate dalla LSPR [6].

L'effetto chimico, invece, causa un'amplificazione più debole del segnale Raman, di circa $10^1 - 10^2$, dovuta alla generazione di nuovi stati elettronici a trasferimento di carica dovuta all'interazione tra molecola Raman attiva e nanoparticella metallica [10].

Un'amplificazione maggiore si può ottenere se poi le molecole Raman attive assorbite sulla superficie della nanoparticella assorbiranno a lunghezze d'onda vicine a quelle della radiazione incidente, in quanto vi sarà un aumento della sezione d'urto dello scattering Raman. In questo caso si parla di tecnica SERRS (Surface Enhanced Resonant Raman Scattering) e viene spesso adoperata per la caratterizzazione di analiti con una capacità di scattering molto piccola. Infatti se tali molecole, dette SERRS reporter, sono assorbite su di una nanoparticella plasmonica assieme ad un analita, è possibile identificare indirettamente quest'ultimo molto facilmente grazie ai segnali generati dal SERRS reporter. Chiaramente quest'ultimo deve possedere segnali caratteristici e facilmente identificabili, nonché una buona resistenza alla radiazione incidente. In tali condizioni questa tecnica può produrre amplificazioni del segnale Raman fino a 10^{15} volte, risultando così una tecnica con un LOD estremamente basso e dunque molto adatta per scopi diagnostici.

1.4 USO DELLE TECNICHE SERS NELLA RIVELAZIONE DI BIOMOLECOLE

La grande sensibilità della tecnica SERS può essere sfruttata per rilevare la presenza di biomolecole associate a particolari funzioni cellulari o rilevanti nell'insorgere di fenomeni patologici. Rispetto alla fluorescenza, la tecnica più nota tra le tecniche di imaging, presenta alcuni vantaggi, in particolare: a) non ha i problemi di fotobleaching e fotodegradazione delle molecole fluorescenti per cui può essere usata con lunghi tempi rilevazione; b) i segnali SERS sono molto più stretti di quelli di fluorescenza e caratteristici dell'analita il che permette di distinguere analiti diversi usando una stessa lunghezza d'onda di eccitazione (multiplexing detection). Tuttavia la rilevazione diretta di segnali SERS di proteine è difficile perchè l'efficienza di scattering è relativamente modesta, c'è scarsa interazione della biomolecola con le particelle metalliche e gli spettri sono complessi e spesso non riproducibili, forse a causa della degradazione della proteina o di una sua diversa orientazione sulla superficie metallica [11]. Per questi motivi di solito la tecnica SERS viene usata in modo indiretto combinando una molecola con intensi e caratteristici segnali Raman (SERS reporter) ad una capace di riconoscere in modo specifico la proteina (ad es un anticorpo) entrambe associate su una nanoparticella plasmonica [12].

Il gruppo in cui ho svolto il lavoro di tesi, in collaborazione con il gruppo del Nano Optical Laboratory del DiSC, si è occupato negli ultimi anni dello studio di nanostrutture SERS funzionalizzate con peptidi come agenti di targeting per recettori proteici sovraespressi su cellule tumorali. Ad esempio nel 2017 è stato pubblicato un lavoro in cui è stata confrontata la capacità di riconoscere cellule tumorali da parte di nanocluster d'oro funzionalizzati con un SERS reporter e, come agente di targeting un dodecapeptide o un anticorpo specifici per l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), un recettore sovraespresso in alcuni tipi di cellule tumorali. In questo senso le nanostrutture SERS si sono dimostrate un valido strumento di imaging grazie ai segnali molto intensi e risoluti. Le nanostrutture SERS funzionalizzate col peptide hanno anche mostrato capacità di targeting migliori dell'anticorpo (Cetuximab, già utilizzato a scopo terapeutico) dimostrando che la funzionalizzazione di nanostrutture con peptidi permette di ottenere specificità paragonabili a quelle di un anticorpo ma con effetti collaterali minori.[13].

La preparazione di nanostrutture SERS, capaci di riconoscere determinati marcatori proteici richiede comunque una progettazione attenta al fine di ottenere segnali intensi e riproducibili in nanosistemi funzionalizzati con agenti di targeting e compatibili con ambienti biologici complessi. In genere sono necessarie diverse prove per determinare la

configurazione ottimale del nanosistema e per questo uno screening preliminare della capacità della nanostruttura funzionalizzata di riconoscere il recettore bersaglio, prima di arrivare alle colture cellulari, sarebbe in grado di accelerare di molto l'ottimizzazione del nanosistema. Questo potrebbe essere fatto con test di tipo-ELISA, comunemente utilizzato nel riconoscimento in vitro di biomarcatori tumorali.

1.5 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY: ELISA

Il test ELISA è un saggio immunologico realizzato su fase solida, utilizzato per rilevare la presenza in modo qualitativo e quantitativo di un particolare ligando. Fu ideato nel 1972 da Engval e Perlmann come saggio per quantificare il binding di anticorpi a specifici antigeni fissati su piastre di polistirene[14]. In particolare, un antigene specifico per un anticorpo, viene assorbito passivamente all'interno di una serie di pozzetti disposti su di un supporto solido, in genere di polistirene, polivinile poliacrilammide [15][16] o vetro [17]. Poi, in seguito all'aggiunta nel pozzetto di una soluzione contenente uno o più anticorpi marcati (con un enzima o un gruppo fluorescente) il ligando specifico si legherà sull'antigene immobilizzato mentre quelli non specifici potranno essere allontanati con un semplice lavaggio. Nel caso di ligandi marcati con un gruppo fluorescente l'analisi spettrofotometrica permette di rilevare direttamente la presenza dell'antigene. Nel caso di ligandi marcati con un enzima una lettura qualitativa immediata può essere fatta mediante l'aggiunta di un substrato dell'enzima che sviluppa colore, mentre un'analisi quantitativa può essere effettuata attraverso tecniche spettrofotometriche o elettrochimiche che vadano a misurare l'attività enzimatica del marcatore [18].

I vantaggi di questo saggio riguardano in primis la sua semplicità con la quale è possibile saggiare rapidamente, e con piccoli volumi di campione, la presenza di diversi analiti contemporaneamente. Inoltre il fatto che gli antigeni vengano assorbiti passivamente sul supporto solido rende possibile un'ampia flessibilità nel design di questi saggi, permettendone l'utilizzo per molti ligandi [18].

Esistono quattro diverse varianti di questo saggio: ELISA diretto, ELISA indiretto, ELISA a sandwich ed ELISA competitivo [16]. L'ELISA diretto, è la variante più semplice del saggio (**figura 6**). Esso prevede che l'antigene sia fatto assorbire all'interno del pozzetto e che successivamente si proceda con l'incubazione dell'anticorpo, marcato con un enzima per il suo rilevamento. Dopo i lavaggi, per aggiunta del substrato enzimatico si svilupperà un segnale che potrà poi essere rilevato con tecniche spettrofotometriche o elettrochimiche. Questo approccio viene utilizzato soprattutto per determinare il titolo di un anticorpo e

verificare il riconoscimento dell'epitopo di un determinato antigene, mentre risulta inefficace per identificare l'antigene in campioni reali (es nel sangue) [18].

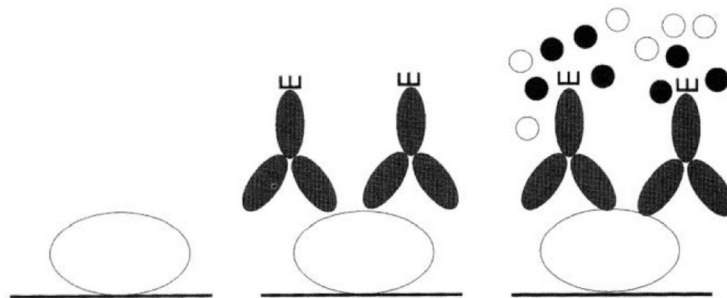


Figura 6: Passaggi del test ELISA diretto. Da sinistra:assorbimento passivo dell'antigene sul pozzetto, aggiunta della soluzione di anticorpo marcato, e rilevazione. Ogni passaggio è intervallato da una procedura di lavaggio. [18].

L'ELISA indiretto è utilizzato per l'analisi quantitativa e qualitativa di anticorpi in campioni di siero [19]. Esso utilizza un antigene assorbito su un supporto solido (**figura 7**) su cui si lega l'anticorpo primario, eventualmente contenuto nel campione del siero, che può essere rivelato grazie al binding specifico con un anticorpo secondario marcato.

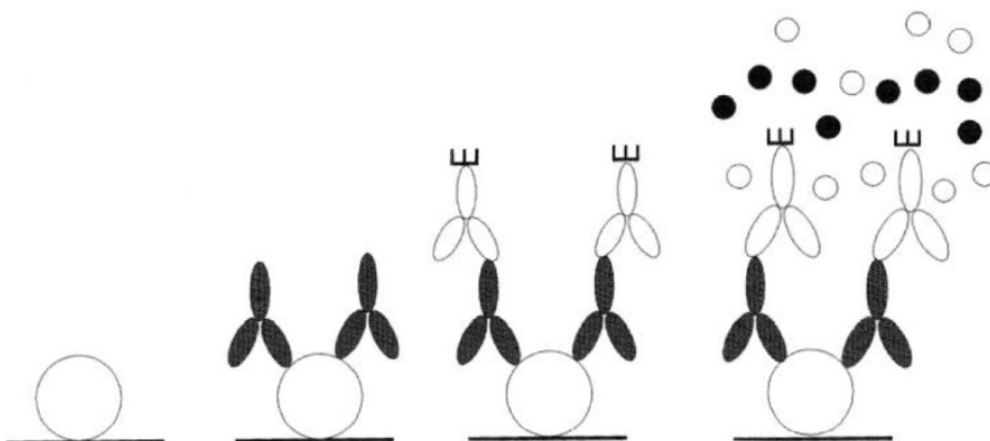


Figura 7: Passaggi del test ELISA indiretto. Da sinistra:assorbimento passivo dell'antigene sul pozzetto, aggiunta del campione di sangue contenente l'anticorpo specifico, aggiunta della soluzione di anticorpo secondario marcato e rilevazione. Ogni passaggio è intervallato da una procedura di lavaggio. [18].

L'ELISA a sandwich invece viene utilizzato per rilevare la presenza di determinati antigeni in campioni reali [20]. In questo tipo di variante del test ELISA il pozzetto viene saturato con una soluzione di anticorpo primario (**figura 8**), in modo da bloccare tutti i siti di binding aspecifico. A seguito di un lavaggio viene poi aggiunto il campione reale contenente l'antigene e, dopo lavaggi, nuovamente l'anticorpo primario, formando così una struttura a sandwich (anticorpo-antigene-anticorpo). La rilevazione viene fatta mediante l'aggiunta di un anticorpo secondario specifico opportunamente marcato.

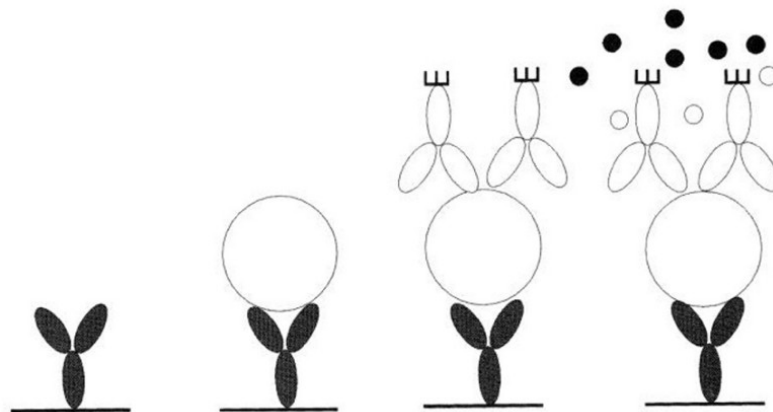


Figura 8: Passaggi del test ELISA a sandwich. Da sinistra: assorbimento passivo dell'anticorpo primario sul pozzetto, aggiunta della soluzione di antigene, seconda aggiunta della soluzione di anticorpo primario, aggiunta della soluzione di anticorpo secondario marcato e rilevazione. Ogni passaggio è intervallato da una procedura di lavaggio. [18].

L'ELISA competitivo infine, viene utilizzato per misurare la capacità di binding di anticorpi. In questa tipologia di saggio, un pozzetto viene rivestito con un antigene e successivamente viene fatto incubare un campione contenente due anticorpi (**figura 9**). In seguito, attraverso l'utilizzo di anticorpi secondari marcati, è possibile studiare la competizione tra i due anticorpi per il binding del singolo antigene [18]. Una possibile variante del metodo appena descritto permette invece di studiare le capacità di inibizione di un particolare anticorpo, effettuando l'incubazione separata dei due anticorpi anziché incubare la miscela.

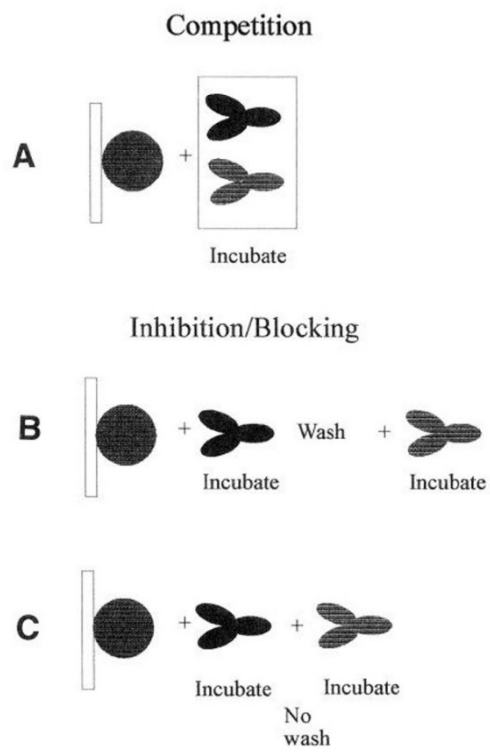


Figura 9: ELISA competitivo **A)** ELISA per lo studio della competizione, **B e C)** ELISA per lo studio dell'inibizione[18].

2. SCOPO DELLA TESI

In questo lavoro di tesi ci si propone di sviluppare una metodologia per testare in vitro l'affinità di nanostrutture SERS funzionalizzate con peptidi per una molecola bersaglio, in genere una proteina sovra-espressa su cellule tumorali che deve essere disponibile commercialmente in tutto o in parte.

Prendendo spunto dalla tecnica ELISA si intende funzionalizzare un supporto in vetro con la proteina bersaglio, usando come legante nanoparticelle d'oro, che possono essere depositate ordinatamente in centinaia di spot sul vetrino con una stampante 2D. Su ciascuno di questi spot d'oro, costituiti di centinaia di nanoparticelle funzionalizzate con la proteina, potrà essere testata la nanostruttura SERS con l'agente di targeting e l'interazione efficace potrà essere rivelata tramite la spettroscopia Raman.

Come modello di studio si userà inizialmente l'interazione Avidina-biotina e per questo dovranno essere preparate nanostrutture SERS funzionalizzate con biotina, mentre sul vetro dovrà essere "stampata" l'avidina o una delle sue varianti.

Una volta messa a punto la metodologia questa potrà essere applicata a problemi di maggior interesse in campo medico quali il riconoscimento del PD-L1 (Programmed Death Ligand 1), un antigene sovraespresso sulla superficie delle cellule tumorali e coinvolto nei meccanismi di inibizione del sistema immunitario nelle terapie antitumorali.

Questo antigene riesce ad interagire con PD-1 (Programmed Death-1) (**figura 10 A,B**), una proteina presente sulla membrana dei linfociti T e responsabile della risposta

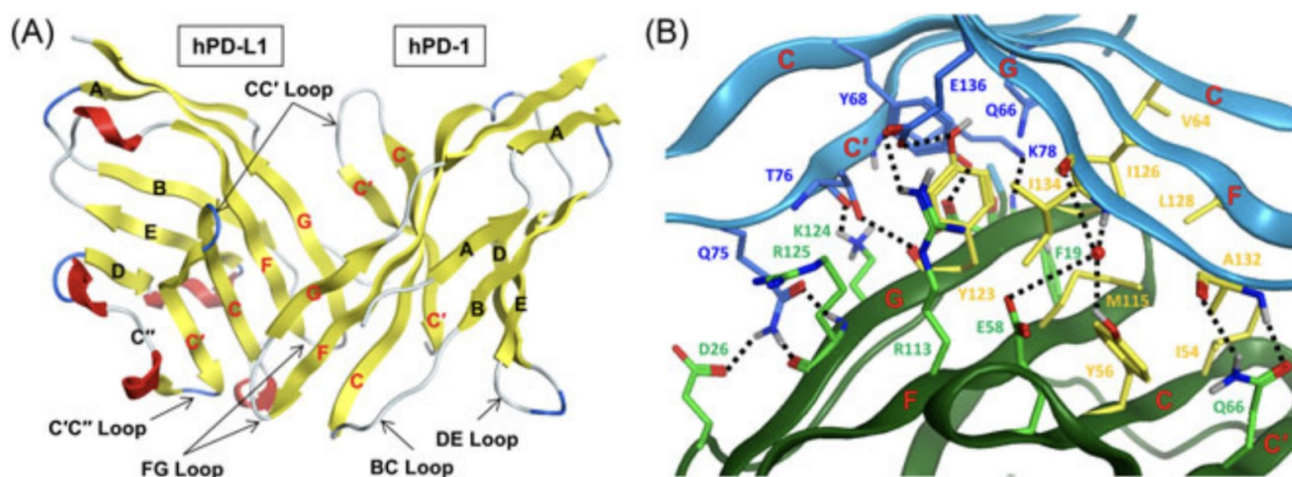


Figura 10: A, Interazione tra PD-1 e PD-L1. **B**, aminoacidi chiave nell'interazione tra PD-L1 (modello verde) e PD-1 (modello blu). Le linee nere tratteggiate indicano legami ad idrogeno e interazioni mediate da molecole d'acqua (modelli rossi). Gli aminoacidi dell'interfaccia idrofobica PD-L1/PD-1 sono rappresentati in giallo [21].

immunitaria contro le cellule tumorali. L'interazione PD-1/PD-L1 porta alla soppressione dell'attivazione dei linfociti T, permettendo così alle cellule tumorali di eludere la sorveglianza immunitaria e di proliferare.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 L'INTERAZIONE AVIDINA - BIOTINA

Il legame tra avidina e biotina costituisce una delle interazioni non-covalenti più forti conosciute, con una K_d circa 10^{-15} M, e per questo viene estesamente sfruttato in applicazioni biotecnologiche.

L'avidina è una glicoproteina tetrameric (66 kDa) isolata dall'albume dell'uovo di gallina capace di legare quattro unità di biotina, una molecola costituita da un anello tiofenolico e uno imidazolidinico condensati e da una catena laterale di acido valerico (**Figura 11**) [22] [23]. La proteina è costituita da quattro subunità ognuna formata da 128 amminoacidi organizzati in domini β antiparalleli ed è fortemente glicosilata: la glicosilazione conta per circa 10% della massa totale dell'avidina [24]. Da analisi cristallografiche sono state ottenute informazioni riguardo ai siti di binding per la biotina[25][26]. In ognuna delle subunità, il sito di binding si trova 9 Å di sotto della superficie della proteina e sia gruppi idrofobi che idrofili vengono utilizzati nel binding della molecola. Una volta che la biotina è legata all'avidina essa risulta completamente immersa nella proteina e lascia esposta la catena valerica.

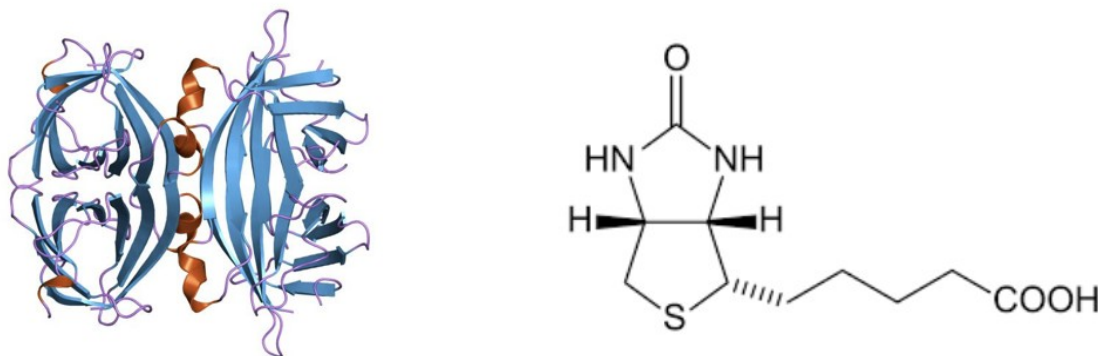


Figura 11: Avidina (a sinistra) e biotina (a destra)

Poiché è il sistema biciclico della biotina il principale responsabile del binding con la proteina [25], il gruppo carbossilico può essere modificato per sintetizzare derivati biotinilati. È importante sottolineare che ligandi di grandi dimensioni possono impedire stericamente l'interazione tra la biotina e siti di binding a causa della profondità a cui si trovano questi ultimi. In questi casi vengono utilizzati degli spaziatori tra la catena valerica e il ligando in modo da favorire l'interazione tra il sistema biciclico e il sito di binding.

La basicità dell'avidina (pI c.ca 10,5) e l'elevata glicosilazione possono causare binding aspecifici su diversi materiali ed essere un problema in molte applicazioni. Per questo in applicazioni biotecnologiche l'avidina è stata sostituita da proteine con proprietà di binding per la biotina analoghe ma con migliori caratteristiche chimico-fisiche. In particolare la streptavidina, una proteina batterica estratta da *Streptomyces avidinii*, non glicosilata e neutra [27] o la neutravidina, sviluppata successivamente con tecniche di protein engineering, che non è glicosilata e ha pI 6.3 [22]. Entrambe le proteine sono state usate in questo progetto di tesi.

3.2 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI NANOPARTICELLE D'ORO

I metodi utilizzati per la sintesi di nanostrutture di metalli nobili, si possono dividere in strategie bottom-up che top-down. Le tecniche bottom-up prevedono la manipolazione diretta di atomi e molecole attraverso delle reazioni chimiche. Alcuni esempi possono essere quella della riduzione di stati ossidati del metallo (e.g. HAuCl_4) con riducenti come NaBH_4 oppure citrato assieme ad agenti di capping che prevengono l'aggregazione dei cluster. Queste tecniche presentano alcuni vantaggi come un buon controllo della forma e della dimensione delle nanoparticelle e una buona versatilità nella scelta dei solventi e dei ligandi; tuttavia esse presentano degli svantaggi che rendono queste modalità inadatte allo scopo di questa tesi. In primis la funzionalizzazione con biomolecole di nanostrutture sintetizzate con queste metodologie risulta complessa a causa di problemi di compatibilità tra i ligandi e l'ambiente di reazione; inoltre la presenza di agenti stabilizzanti rende difficile lo studio delle proprietà chimico-fisiche della nanoparticella, come nel caso del SERS dove è necessario che la molecola in studio sia legata in stretta prossimità della alla superficie delle nanoparticelle. Infine la maggior parte dei reagenti utilizzati risultano essere citotossici e quindi non biocompatibili, risultando così inadatti per scopi terapeutici o diagnostici *in vivo* [28][29].

In questo progetto di tesi è stata utilizzata la tecnica LASiS (Laser ablation synthesis in solution), una strategia top-down, sviluppata da Henglein nel 1993 [30], in cui le nanoparticelle vengono prodotte mediante ablazione laser in soluzione di un target metallico. In questa tecnica un laser viene focalizzato su una pastiglia d'oro immersa per circa 2 cm in una soluzione di sodio cloruro micromolare. Nel momento in cui il laser colpisce la superficie, questa ne assorbe l'energia generando del plasma localizzato che successivamente, genera una bolla di cavitazione che si condensa formando nanoparticelle. Queste poi passano in soluzione generando una sospensione colloidale.

Le nanoparticelle così formate risultano stabili senza agenti chimici stabilizzanti come tensioattivi, grazie ad una carica negativa superficiale che ne evita la flocculazione. E' stato verificato che questa sia dovuta ad una reazione tra ossigeno disciolto in acqua e nanoparticelle d'oro in formazione. In particolare è stato osservato che circa il 3-7% è soggetto a questo fenomeno che genera ponti Au-O-Au. La presenza in soluzione degli ioni cloruro poi, comporta la rottura dei legami tra oro e ossigeno e porta alla formazione delle specie AuO^- che generano la carica negativa superficiale che stabilizza la soluzione colloidale. E' importante specificare che la concentrazione degli ioni cloruro in soluzione non deve essere troppo elevata altrimenti la carica negativa superficiale delle nanoparticelle viene schermata causando l'aggregazione di queste ultime [31]. Per ottenere particelle stabili per tempi lunghi (mesi) solitamente si usano concentrazioni pari a $10 \mu M$ di NaCl in acqua.

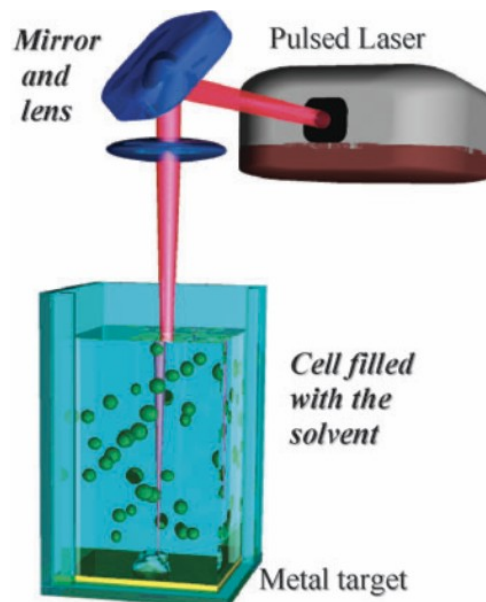


Figura 12: set-up per la sintesi di nanoparticelle d'oro [30]

Le condizioni per la generazione di nanoparticelle d'oro sono state ottimizzate nel laboratorio ospitante (NOL, Nanostructure and Optics Laboratory del Disc) e consistono nell'uso di impulsi di 9 ns di un laser Nd:YAG a 1064 nm con una frequenza di ripetizione pari 10 Hz e una fluensa di $10 J/cm^2$. Le particelle risultano avere una taglia costante poiché vengono sottoposte all'interazione con numerosi impulsi laser in soluzione dopo essere state generate. Nelle condizioni usate è possibile ottenere nanoparticelle di forma sferica, con diametro medio di 20 nm e un ζ -potential pari a -30 mV. Inoltre la

manipolazione della potenza del laser e della sezione di impatto sul target d'oro, parametri che determinano la fluena del laser, si è dimostrata fondamentale per migliorare l'efficienza del processo [13]. Infatti aumentando la potenza del laser e aumentando la sezione d'impatto (focalizzando meno il laser) per mantenere la fluena costante, è possibile ottenere particelle ablate in un minor tempo, ma dalle medesime caratteristiche [32][33].

Le nanoparticelle d'oro così ottenute vengono caratterizzate attraverso spettroscopia UV-Vis-NIR. Lo spettro di assorbimento delle nanoparticelle, infatti, presenta tre zone caratteristiche attraverso le quali è possibile determinarne la concentrazione e lo stato di aggregazione (**figura 13**). La prima zona è quella a lunghezza d'onda minori di 500 nm ed è dovuta alle

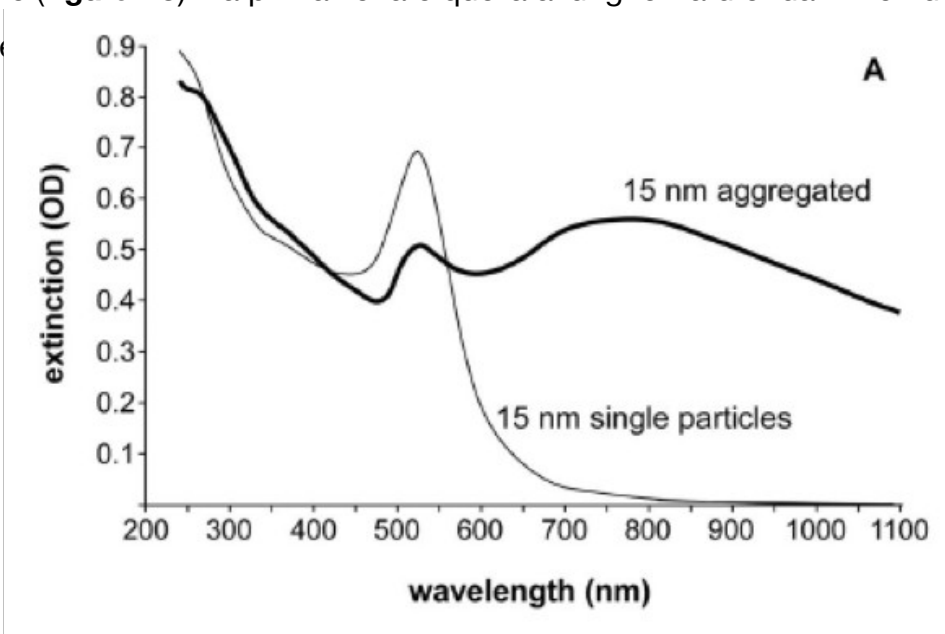


Figura 13: spettro UV-Vis-NIR di nanoparticelle singole e aggregate

eccitare gli elettroni dalla banda di valenza a quella di conduzione. La seconda porzione di spettro, ovvero quella compresa tra i 500 e i 700 nm, e la terza, che si estende nel NIR fino a 1200 nm, sono relative alle risonanze plasmoniche. In particolare a 520 nm cade il picco dovuto all'eccitazione del plasmone dell'oro, causato dall'oscillazione dipolare degli elettroni delle nanoparticelle d'oro. La sua presenza isolata è sintomo di particelle non aggregate. La presenza di risonanze a lunghezze d'onda maggiori, invece, è dovuta alla presenza di aggregati, nei quali si generano dei multipoli dovuti ad accoppiamenti elettronici tra nanoparticelle: in particolare maggiore è la dimensione dell'aggregato più il picco subirà uno spostamento verso il rosso in termini di lunghezze d'onda (red-shift). La zona tra 500 e 700 nm identifica aggregati piccoli (fino ad una decina di nanoparticelle), mentre quella fino a 1200 nm aggregati di dimensioni maggiori. La concentrazione delle

nanoparticelle è determinata attraverso il programma MATLAB Fitspettri. Questo, basato su simulazioni BEM (boundary elements method), cioè calcoli a elementi finiti, permette di predire concentrazione e stato di aggregazione delle nanoparticelle d'oro colloidale, nonché degli enhancement factors dei segnali Raman dovuti alla formazione di hot-spots che favoriscono l'effetto SERS). Il programma interpreta uno spettro di estinzione come una combinazione lineare dei contributi di 100 aggregati di nanoparticelle d'oro, ognuno composto in modo random da un numero di particelle sferiche che va da 1 a 10 e con un diametro che va da 15 a 40 nm. In questo modo è possibile calcolare il coefficiente di estinzione molare di ogni aggregato e di conseguenza il suo peso nella simulazione dello spettro sperimentale. Per la determinazione della concentrazione delle nanoparticelle nelle soluzioni colloidali è stato invece sfruttata l'estinzione a 400 nm, che trovandosi nella zona delle transizioni interbanda, non viene influenzato da picchi di risonanza plasmonica e quindi dalla presenza di aggregati [34].

3.3 SINTESI DI NANOSTRUTTURE SERS

Una volta sintetizzate le nano particelle d'oro, queste sono state utilizzate per due scopi: come base per la formulazione degli inchiostri da stampare sui vetri e per produrre nanostrutture SERS funzionalizzate con opportuni ligandi. Per sintetizzare le nanostrutture SERS sono stati utilizzati come SERS reporters, cioè come molecole il cui spettro risulta essere fortemente intensificato dalle nanostrutture plasmatiche, due coloranti, il Texas red (TR) e la malachite green (MG), che, dovendosi legare fortemente ai cluster d'oro, in particolare negli hot spots inter-particella, sono funzionalizzati con gruppi tiolici. In particolare TR presenta un picco di assorbimento a 589 nm, risultando dunque ideale come SERS reporter, avendo la banda di assorbimento parzialmente sovrapposta

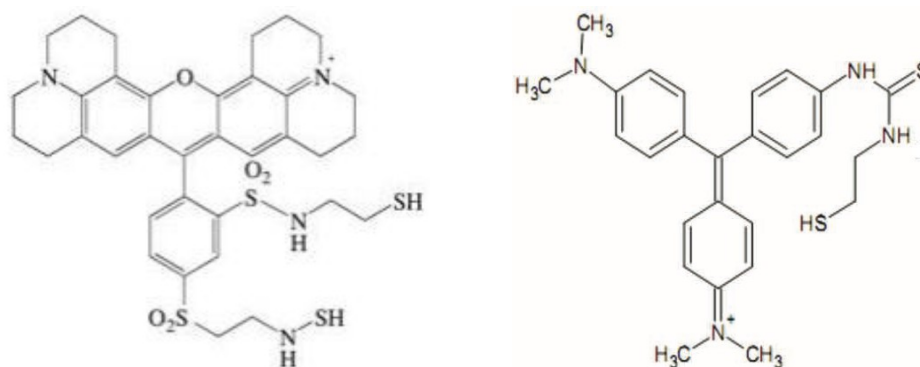


Figura 14: TR (sinistra) e MG (destra) [34].

alla risonanza plasmonica degli aggregati d'oro. Tale reporter presenta due segnali SERS a 1505 cm^{-1} e a 1649 cm^{-1} dovuti rispettivamente agli stretching dei legami carbonio-azoto e carbonio-carbonio [35]. Anche MG presenta una banda di assorbimento parzialmente sovrapposta con le risonanze plasmoniche delle nanoparticelle aggregati ($\lambda_{\text{abs}} = 624 \text{ nm}$) e un picco molto SERS presente a 1618 cm^{-1} [35][36].

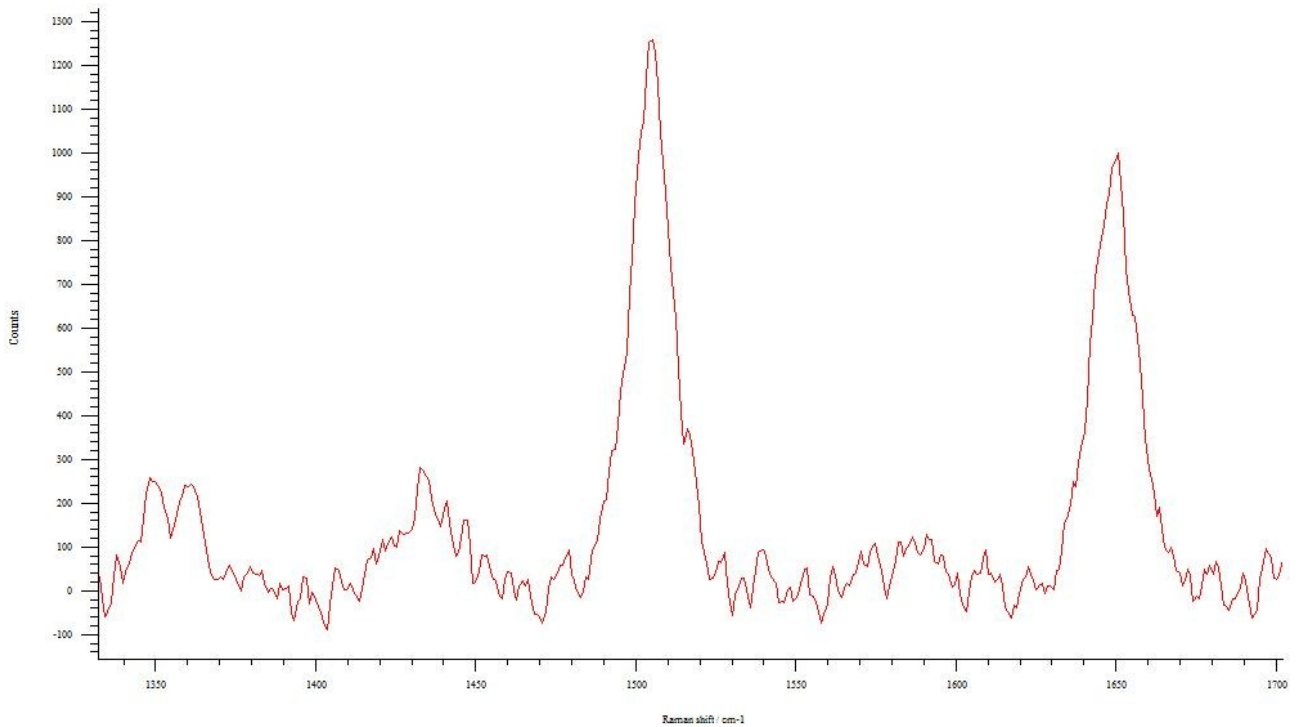


Figura 15: spettro SERS del Texas red bitiolato (TR-SH₂)

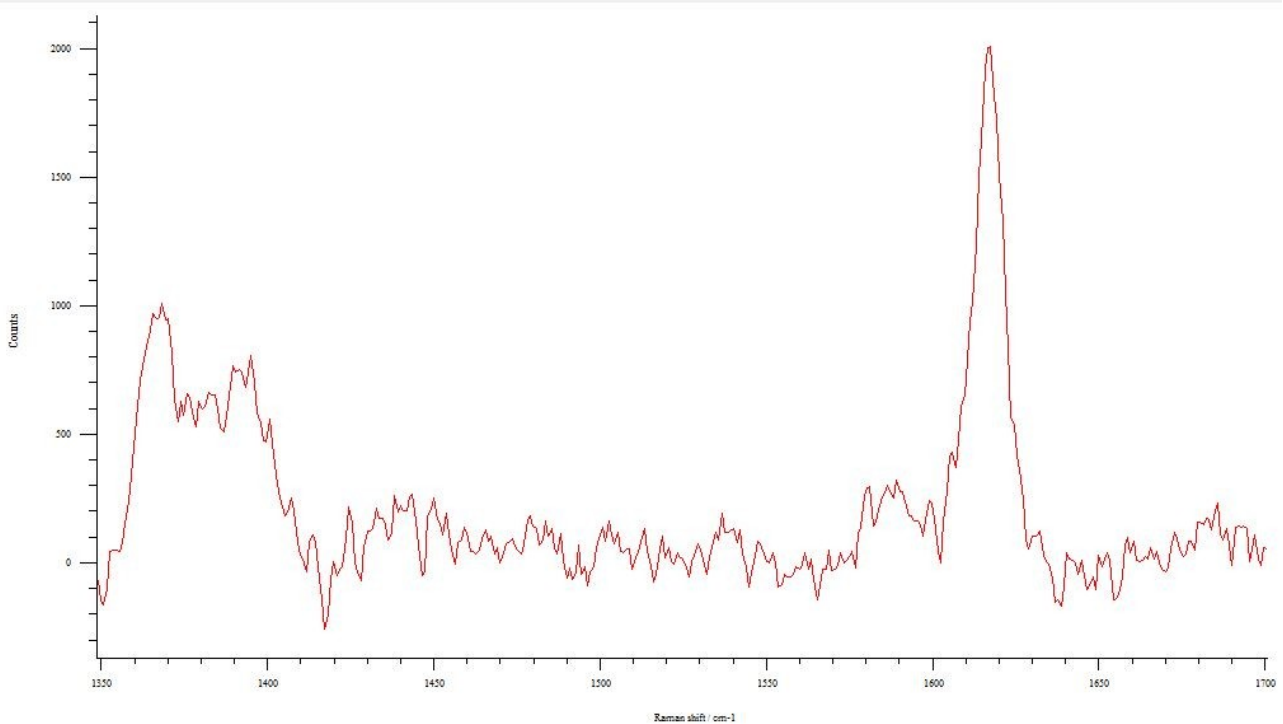


Figura 16: spettro SERS del malachite green tiolato (MG-SH)

La procedura di funzionalizzazione delle nanoparticelle con il reporter avviene semplicemente aggiungendo una minima quantità di quest'ultimo alle particelle e allontanando l'eccesso tramite centrifugazione. Successivamente è necessario caratterizzare la sospensione tramite spettroscopia UV-Vis per verificare la formazione di aggregati e la conseguente formazione di hot spots. Ciò è verificabile qualitativamente anche ad occhio nudo osservando un viraggio della soluzione da rosso a viola scuro. Infine è necessario anche una caratterizzazione SERS per verificare la presenza dei segnali del reporter.

3.4 SINTESI DEL PEPTIDE BIOTINILATO E DELLE NANOSTRUTTURE BIOTINILATE

Per verificare la presenza della proteina sugli spots è stato sintetizzato un peptide biotinilato (MB01) dalla seguente sequenza amminoacidica: Biotina-O₂oc-Gly-Ser-Ala-Ala-Cys-NH₂, dove O₂oc rappresenta un corto oligoetilene. Come si può notare una delle estremità è caratterizzata dalla presenza dell'amminoacido cisteina, che tramite il gruppo -SH della catena laterale permetterà di legare covalentemente l'intero peptide alle nanoparticelle d'oro. Nell'altra estremità invece è presente la biotina che andrà a legare la neutravidina. Come è stato detto, nella neutravidina il sito di legame per la biotina è affossato nella proteina e quindi la sequenza di sei amminoacidi funge da spaziatore tra biotina e la nanoparticella per favorire l'interazione tra il sistema biciclo della biotina e i siti di binding della neutravidina.

Il peptide è stato ottenuto con la tecnica di sintesi su fase solida che si basa sulla crescita del peptide ancorato ad un supporto solido (resina) dal quale alla fine della sintesi verrà staccato. La tecnica permette una sintesi semplice e rapida di peptidi perchè la purificazione dei diversi intermedi, dai reagenti in eccesso ed eventuali sottoprodotti, avviene per semplice filtrazione [37].

Il supporto solido è in genere una resina composta da polistirene reticolato con divinilbenzene all'1% (miscela di isomeri para e meta). Questa percentuale permette di ottenere un'ottima resistenza meccanica e un buon grado di rigonfiamento. La resina è funzionalizzata con un composto bifunzionale (linker) attraverso il quale il peptide è ancorato alla resina e la cui chimica definisce le condizioni di rimozione del peptide dal supporto solido e il gruppo funzionale C-terminale del peptide. Per la sintesi di questo peptide è stata usata la resina Rinkamide AM (**figura 17**) che rilascia il peptide come ammido.

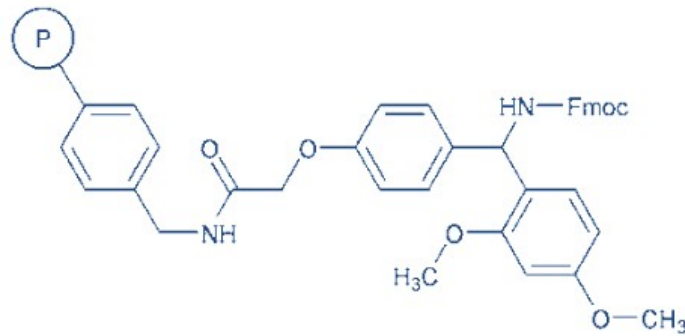


Figura 17: Resina Rink amide AM

Nella sintesi di peptidi su fase solida la crescita della sequenza avviene dall'amminoacido C-terminale verso N-terminale, attraverso una serie di passaggi che vengono ripetuti per ogni nuovo amminoacido secondo lo schema seguente:

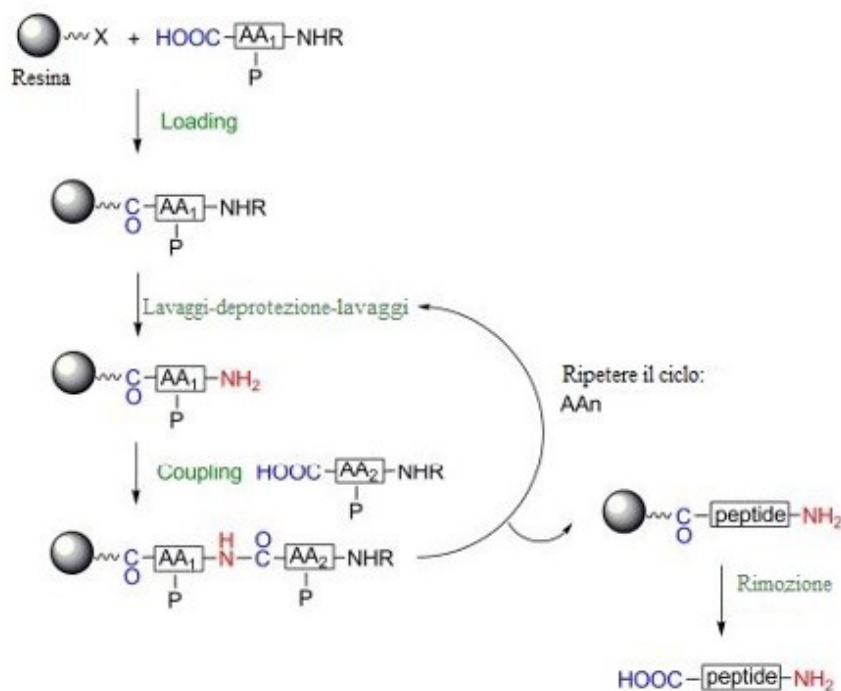


Figura 18: L'attacco di un nuovo amminoacido prevede: 1) la rimozione del gruppo protettore dalla funzione amminica dell'amminoacido/peptide ancorato alla resina; 2) la reazione di accoppiamento tra un nuovo amminoacido, attivato alla funzione carbossilica, e l'amminoacido/peptide legato al supporto solido. Ciascuna reazione è intervallata da cicli di lavaggio.

Tutti gli amminoacidi sono stati usati protetti alla funzione α -amminica con il gruppo fluorenilmetossicarbonilico (Fmoc) che viene rimosso con piperidina in una reazione di β -eliminazione [38][39], lasciando così libero il gruppo amminico per il coupling con il successivo amminoacido. Il meccanismo di rimozione del gruppo Fmoc è riportato in **figura 19**.

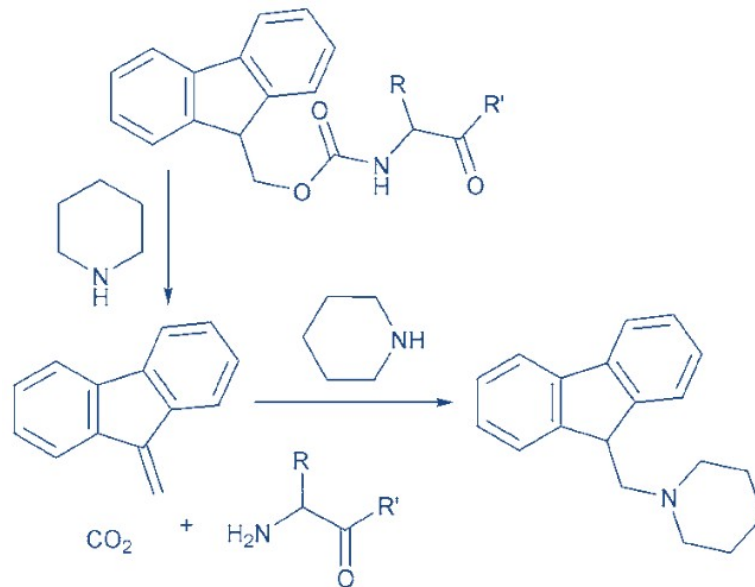


Figura 19: meccanismo di deprotezione del gruppo Fmoc

L'introduzione nella catena di un nuovo amminoacido richiede l'attivazione del suo gruppo carbossilico come estere attivo. In particolare si tratta dell'estere dell'idrossibenzotriazolo (HOBt) preparato in situ col reagente O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU). In **figura 20** è mostrato il meccanismo accoppiamento. È importante specificare gli amminoacidi che hanno in catena laterale gruppi funzionali che potrebbero competere con la formazione del legame peptidico devono avere gruppi protettori anche sulla catena laterale. In particolare per la sintesi di questo peptide è stata utilizzato il gruppo tritile per la funzione tiolica della cisteina e il gruppo *tert*-butilico per l'ossidrile della serina [40].

La crescita del peptide viene eseguita seguendo il medesimo ciclo reattivo per ogni amminoacido: deprotezione del gruppo protettore e coupling del successivo amminoacido.

Una volta che la crescita della catena peptidica è completa si procede con il distacco del peptide dalla resina e la rimozione dei gruppi protettori degli amminoacidi. Il distacco si effettua in condizioni acide, con acido trifluoroacetico (TFA) concentrato, e sfruttando acqua e etanditiolo come reagenti nucleofili sacrificali. Questi sono necessari per

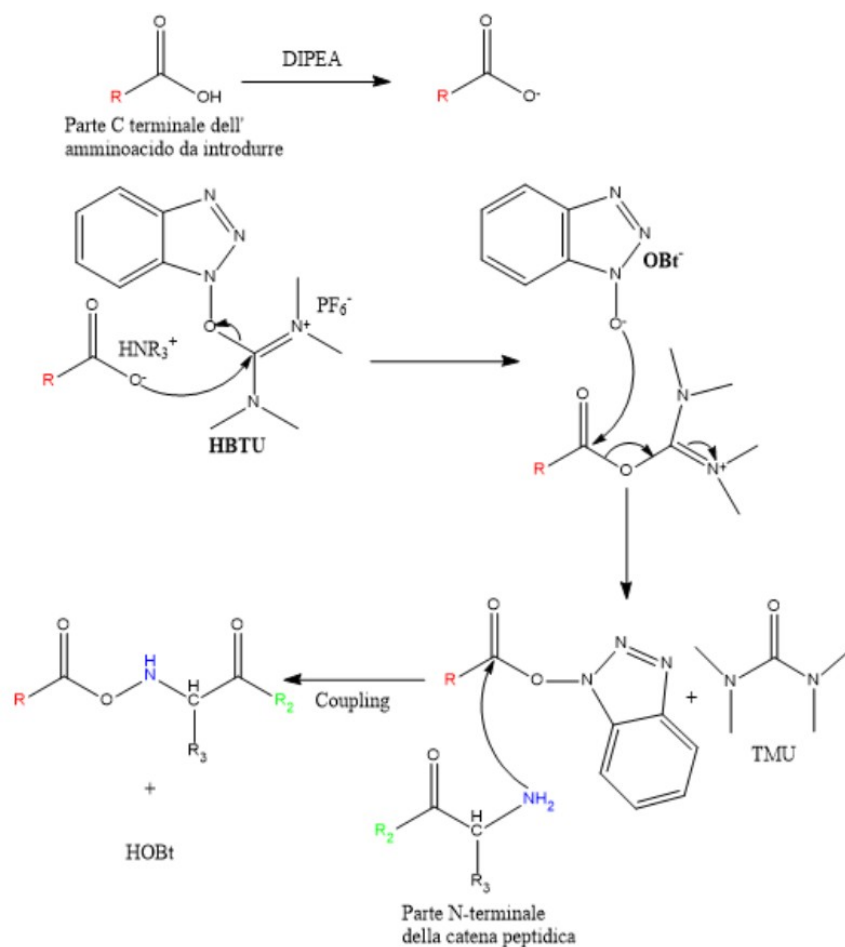


Figura 20: meccanismo di formazione del legame peptidico

bloccare le specie carbocationiche che derivano dai gruppi protettori e che potrebbero modificare irreversibilmente gli amminoacidi naturali. Il peptide così sintetizzato è stato caratterizzato attraverso HPLC analitico e spettrometria di massa.

Le nanostrutture biotinilate sono state ottenute per semplice incubazione delle nanoparticelle d'oro funzionalizzate con il TR-(SH)₂ con questo peptide assieme ad una soluzione di PEG-SH 800 per evitare la successiva formazione di aggregati di grandi dimensioni che potrebbero precipitare durante l'incubazione. Dopo la rimozione per centrifugazione del peptide e del PEG-SH non legati le nanostrutture sono state sospese in una soluzione di BSA e centrifugate a bassi giri per l'eliminazione degli aggregati più pesanti. La sospensione è stata infine caratterizzata attraverso spettroscopia UV-Vis, per determinare la concentrazione in oro delle nanostrutture, e attraverso spettroscopia Raman per verificare la presenza dei segnali del SERS reporter come riportato nella parte sperimentale.

3.5 STAMPANTE E FORMULAZIONE DELL'INCHIOSTRO

Per ottenere delle deposizioni (spots) di nanoparticelle d'oro, funzionalizzate con la proteina, su un vetrino è stata usata una stampante a getto d'inchiostro Fujifilm Dimatrix. Quest'ultima è stata progettata appositamente per la stampa di inchiostri contenenti proteine, acidi nucleici, nanoparticelle e polimeri. L'inchiostro è inserito in una cartuccia che ha 16 ugelli piezoelettrici modulabili che permettono di produrre gocce da 1

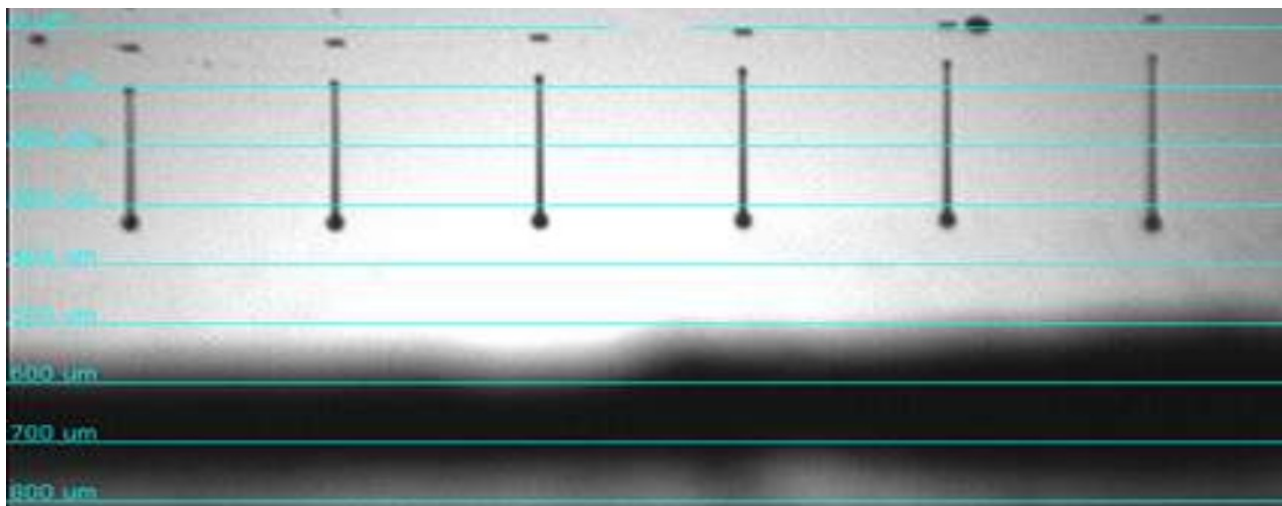


Figura 22: Gocce di inchiostro viste attraverso la telecamera della stampante

a 10 pL. Queste vengono stampate in seguito alla deformazione della membrana di una camera posta dietro ogni ugello, attuata attraverso una variazione di voltaggio. Questa operazione deve essere ottimizzata per ogni inchiostro, modulando opportunamente la variazione di potenziale per le azioni di riempimento della cartuccia, stampa e recupero (**figura 22**).

Affinché un inchiostro sia stampabile è necessario modulare opportunamente alcune proprietà chimico-fisiche del fluido, in particolare viscosità, tensione superficiale e dimensione delle particelle. Regolare opportunamente la viscosità permette all'inchiostro di entrare nella camera ed essere espulso dall'ugello agevolmente. Nel caso di inchiostri acquosi, data la bassa viscosità dell'acqua (1 cPs), è necessario aggiungere un umettante, come glicole etilenico o glicerolo al 10-20% v/v rispetto al volume finale dell'inchiostro, per raggiungere i valori ideali di viscosità compresi tra 10 e 12 cPs.

La modulazione della tensione superficiale influenza la capacità dell'ugello di espellere le gocce di inchiostro. Infatti una bassa tensione superficiale porterà l'ugello a spruzzare inchiostro in modo irregolare, ma una troppo elevata bloccherà il meccanismo di stampa. E' importante specificare che gli effetti quantitativi della tensione superficiale sono

complessi da razionalizzare, in quanto la tensione superficiale di una miscela non risulta proporzionale alla frazione molare dei singoli componenti. Nel caso di inchiostri acquosi la tensione superficiale dell'acqua (73 mN/m) viene abbassata tramite l'aggiunta di surfattanti in concentrazione fino al 5%. Questo perché la tensione superficiale di un solvente diminuisce all'aumentare del logaritmo della concentrazione di surfattante, ma solo fino ad un certo valore limite oltre il quale la tensione superficiale rimane costante, in quanto la superficie del solvente risulta satura di surfattante [41]. In tabella (**tabella 1**) sono riportati per i diversi parametri gli intervalli ideali che dovrebbero essere rispettati per aver un buon inchiostro.

Tabella 1: Parametri ideali per un inchiostro

Viscosità	Tensione Superficiale	T Ebollizione	Densità specifica	pH	Dimensioni delle particelle
10-12 cPs	32- 42 mN/m	> 100 °C	> 1	4-9	< 0,2 μm

Nel caso di inchiostri contenenti sospensioni colloidali, la modulazione delle dimensioni delle particelle sospese nell'inchiostro è particolarmente importante poiché corpi di dimensioni superiori ai 200 nm possono portare all'occlusione degli ugelli compromettendo l'integrità della cartuccia. Un buon modo di procedere, quello di filtrare l'inchiostro prima di inserirlo nella cartuccia, in modo da escludere le particelle di dimensioni maggiori.

3.6 TIOLAZIONE DELLA STREPTAVIDINA E DELLA NEUTRAVIDINA

Dato che né la streptavidina né la neutravidina contengono cisteine nella loro sequenza, queste proteine sono state tiolate per poterle legare saldamente alle nanoparticelle d'oro attraverso la formazione di un legame zolfo-oro. Per fare ciò è stata sfruttata la reazione tra il 2-Imminotiolano (reagente di Traut [42], (**figura 22**) e il gruppo amminico in catena

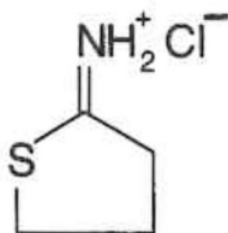


Figura 22: 2-imminotiolano cloridrato

laterale delle lisine presenti nella sequenza. La reazione comporta l'apertura dell'anello eterociclico che libera un gruppo tiolico, come mostrato in **Figura 23**.

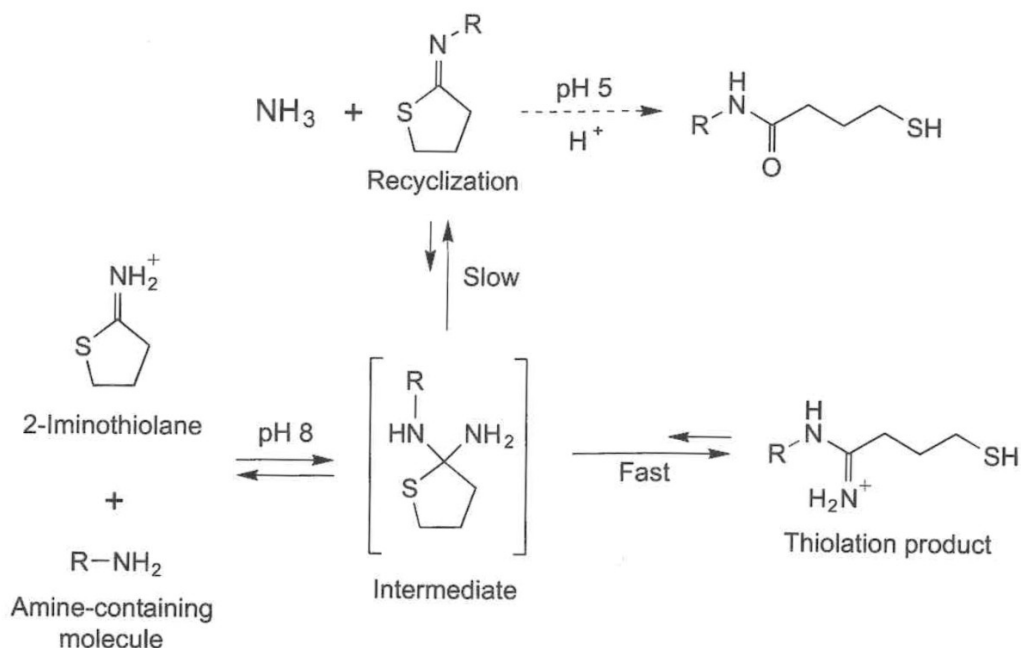


Figura 23: meccanismo di reazione della tiolazione di ammine primarie tramite 2-imminotiolano cloridrato.

La reazione decorre tra pH 7-10 tuttavia in ambiente basico il reagente di Traut risulta poco stabile in quanto tende ad idrolizzare con apertura dell'anello. A pH 8 la formazione del tiolo libero risulta trascurabile e per questo motivo la reazione viene svolta tipicamente a questo pH in tampone fosfato o fosfato salino.

Una volta che la tiolazione è terminata il prodotto è sensibile ad alcune reazioni parallele. In primo luogo il gruppo tiolico appena formato può ossidarsi a disolfuro e per evitare ciò nel tampone usato si aggiunge EDTA il quale funge da agente complessante di specie ioniche che altrimenti catalizzerebbero l'ossidazione del tiolo. Infatti queste, presenti come impurezze, possono catalizzare l'ossidazione del titolo a disolfuro. In secondo luogo, il prodotto tiolato appena formato può ciclizzare nuovamente, formando un derivato dell'imminotiolano (**figura 23**). Per questo è necessario utilizzare immediatamente il prodotto tiolato.

Il grado di tiolazione della proteina è stato valutato attraverso il test di Ellman [43], un saggio colorimetrico che serve per determinare la quantità di gruppi tiolici in soluzione. Esso si basa sulla reazione tra l'acido 2,2-dinitroditiobenzoico (DNTB) (il reattivo di Ellman) e i gruppi tiolici in soluzione secondo la reazione riportata in **figura 24** :

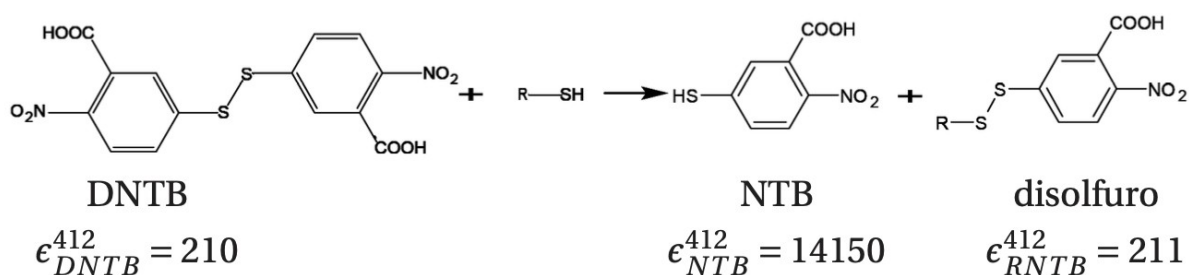


Figura 24: reazione tra gruppo tiolico e DNTB; sotto ogni molecola è riportato il relativo coefficiente di estinzione molare.

In condizioni leggermente basiche (pH 8) viene favorita la rottura del ponte disolfuro del DNTB portando ad una reazione di scambio con i gruppi tiolici liberi. Ciò porta alla formazione di due specie, l'acido 2-nitro-5-tiobenzioico (NTB) e un nuovo disolfuro. L'NTB, grazie al suo elevatissimo coefficiente di estinzione molare, presenta un assorbimento molto intenso a 412 nm da cui è possibile ricavare attraverso la legge di Lambert-Beer la concentrazione di tioli in soluzione.

3.7 PREPARAZIONE DELL'INCHIOSTRO E PROVE DI STAMPA

Il primo passo è stato quello di formulare un inchiostro che avesse le giuste caratteristiche per essere stampato con la stampante 2D DIMATIX usando cartucce con cariche da 10 pL. Viste le precedenti esperienze del laboratorio presso cui ho svolto la tesi, l'idea iniziale è stata quella di stampare su vetrino degli spots di nanoparticelle d'oro LASiS di circa 20 nm di diametro. È stato definito un pattern di stampa per ottenere matrici di spots 10x10, opportunamente distanziati per potere applicare sul vetrino delle mascherine di silicone in grado di creare per ogni matrice una camera separata di 7x7 mm in cui aggiungere i diversi reagenti nelle prove di incubazione con le nanostrutture per il targeting.

Per la formulazione dell'inchiostro sono stati provati diversi protocolli variando la concentrazione delle nanoparticelle d'oro, del SERS reporter (MG-SH), del PEG₅₀₀₀-SH 5 e della proteina. In particolare il SERS reporter è stato inizialmente aggiunto per meglio definire i confini degli spots con segnali SERS, mentre il PEG-SH è stato introdotto per evitare che le nanoparticelle aggregassero durante le centrifugazioni usate per concentrarle e di conseguenza intasassero gli ugelli della cartuccia. Nella formulazione dell'inchiostro è stata posta particolare attenzione alla regolazione della viscosità e della tensione superficiale. Per il controllo della prima si è trovato che opportune quantità di glicole etilenico (10-20% rispetto il volume finale di inchiostro) permettevano di ottenere

una viscosità dell'inchiostro funzionale alla stampa, tale quindi da non intasare gli ugelli ed essere espulso facilmente.

Per la modulazione della tensione superficiale invece è stato utilizzato come tensioattivo il sodio laurilsolfato in una percentuale del 5% rispetto al volume finale. Come si vede in **figura 25**, l'inchiostro così formulato ha prodotto degli spots visibili, ma molto irregolari.

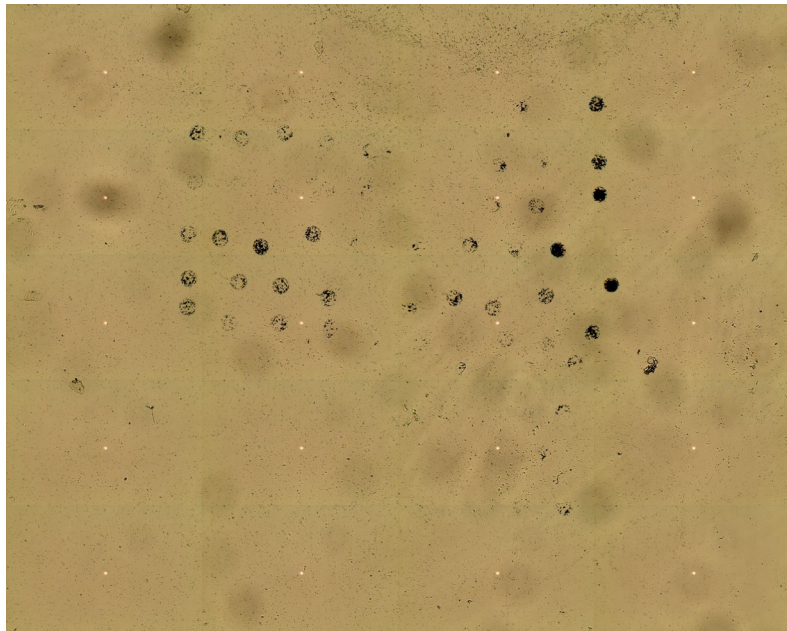


Figura 25: spots stampati con un inchiostro contenente AuNP concentrate, MG-SH, PEG-SH, glicole etilenico, sodio laurilsolfato e streptavidina.

In ogni caso, come si nota dagli spettri Raman registrati (**figura 26**), sugli spots sono stati trovati i segnali della malachite green. Per migliorare la deposizione degli spots è stato

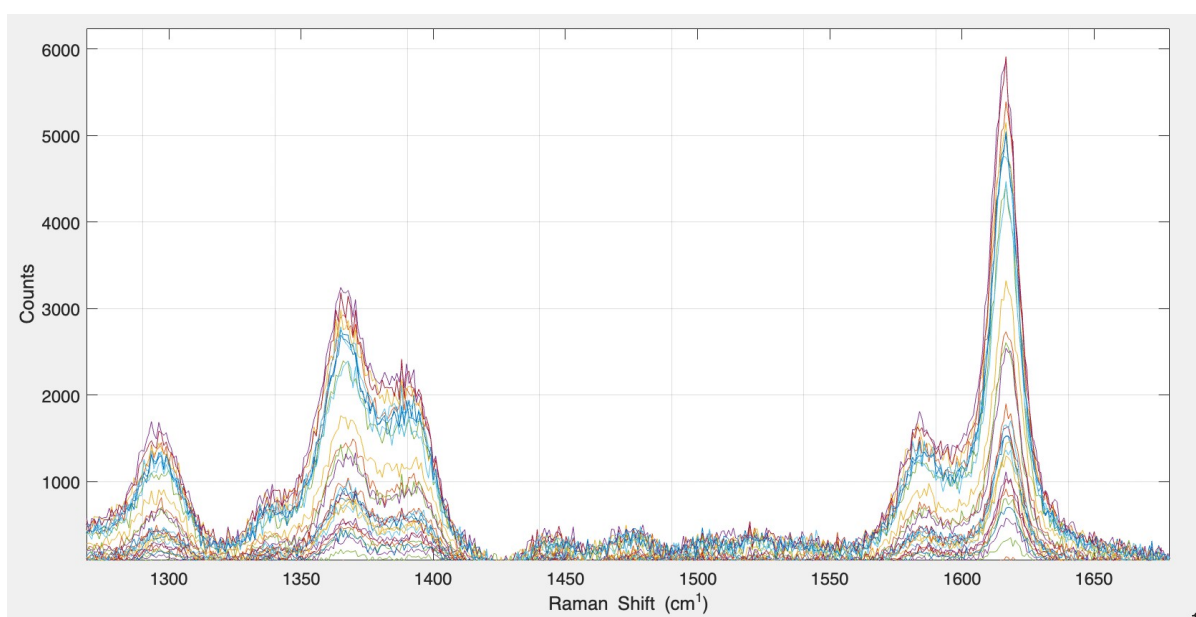


Figura 26: mappa registrata sugli spots

pensato di sostituire il sodio laurilsolfato con il tween 20 (o polisorbato 20), che risulta essere meno schiumogeno e meno dannoso per le proteine [44]. Per quanto riguarda la proteina, la streptavidina, usata nelle prove iniziali, è stata poi sostituita con la neutravidina che, come detto precedentemente, ha un'origine più controllata. Per ancorarla stabilmente alle nanoparticelle d'oro, la proteina è stata funzionalizzata con un gruppo tiolico sfruttando la reazione con imminotiolano descritta in precedenza. Come si osserva in **figura 27** gli spots sono risultati molto più regolari e anche in questo caso sono stati trovati i segnali della MG (**figura 28**).

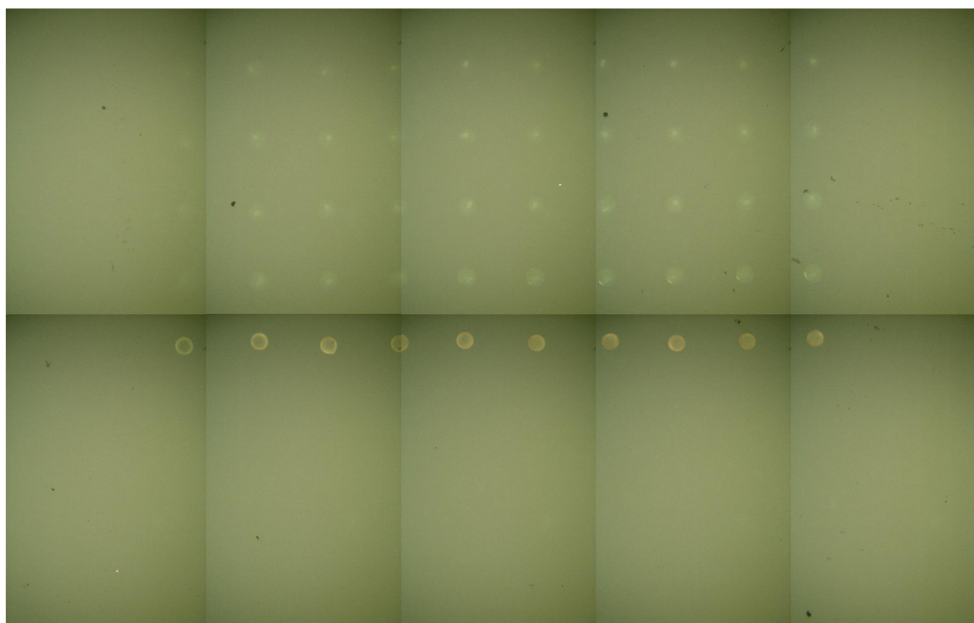


Figura 27: mappa di spots stampati contenente AuNP concentrate, MG-SH, PEG-SH, glicole etilenico, tween 20 e neutravidina.

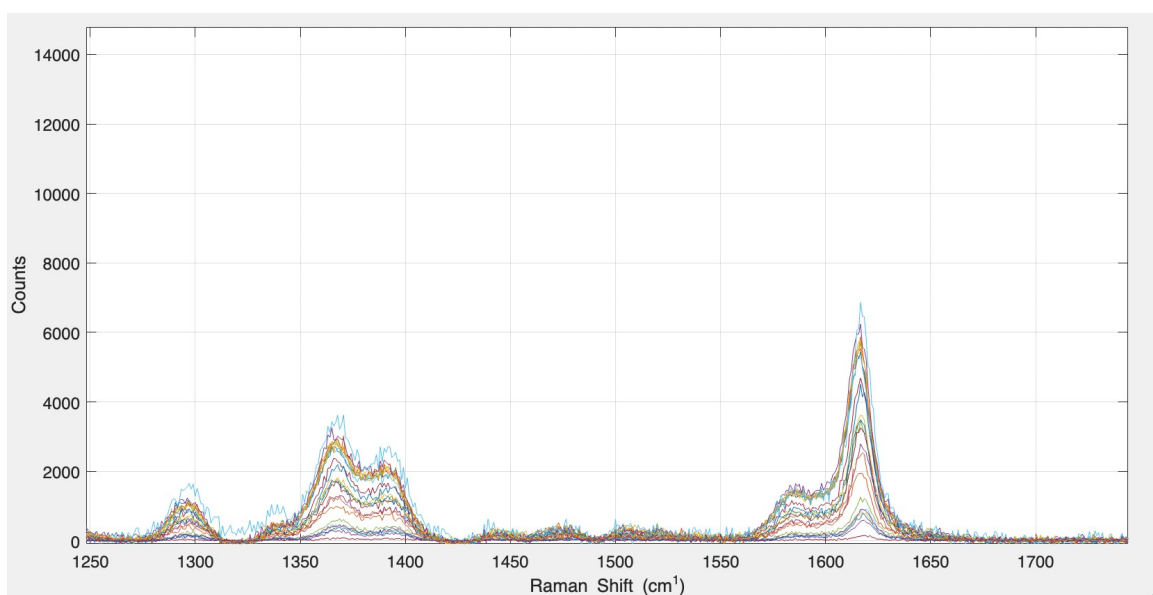


Figura 28: mappa registrata sugli spots.

Un miglioramento importante nella preparazione degli inchiostri è stato ottenuto quando è stato deciso di far passare gli inchiostri attraverso un filtro in cellulosa con una membrana da 450 nm.

Questo ha permesso di eliminare gli aggregati più grandi, che potevano intasare gli ugelli della cartuccia. A questo punto gli spots contenenti la proteina sono stati incubati con le nanostrutture SERS biotinilate per verificare la presenza dei segnali del reporter TR sugli spots, a conferma dell'avvenuto legame neutravidina-biotina. Da queste analisi si è potuto osservare la presenza dei segnali del TR dentro gli spots ma in misura non trascurabile anche al di fuori, dove non era presente la proteina, indicando la presenza di binding aspecifico con la superficie del vetrino (**figura 29**).

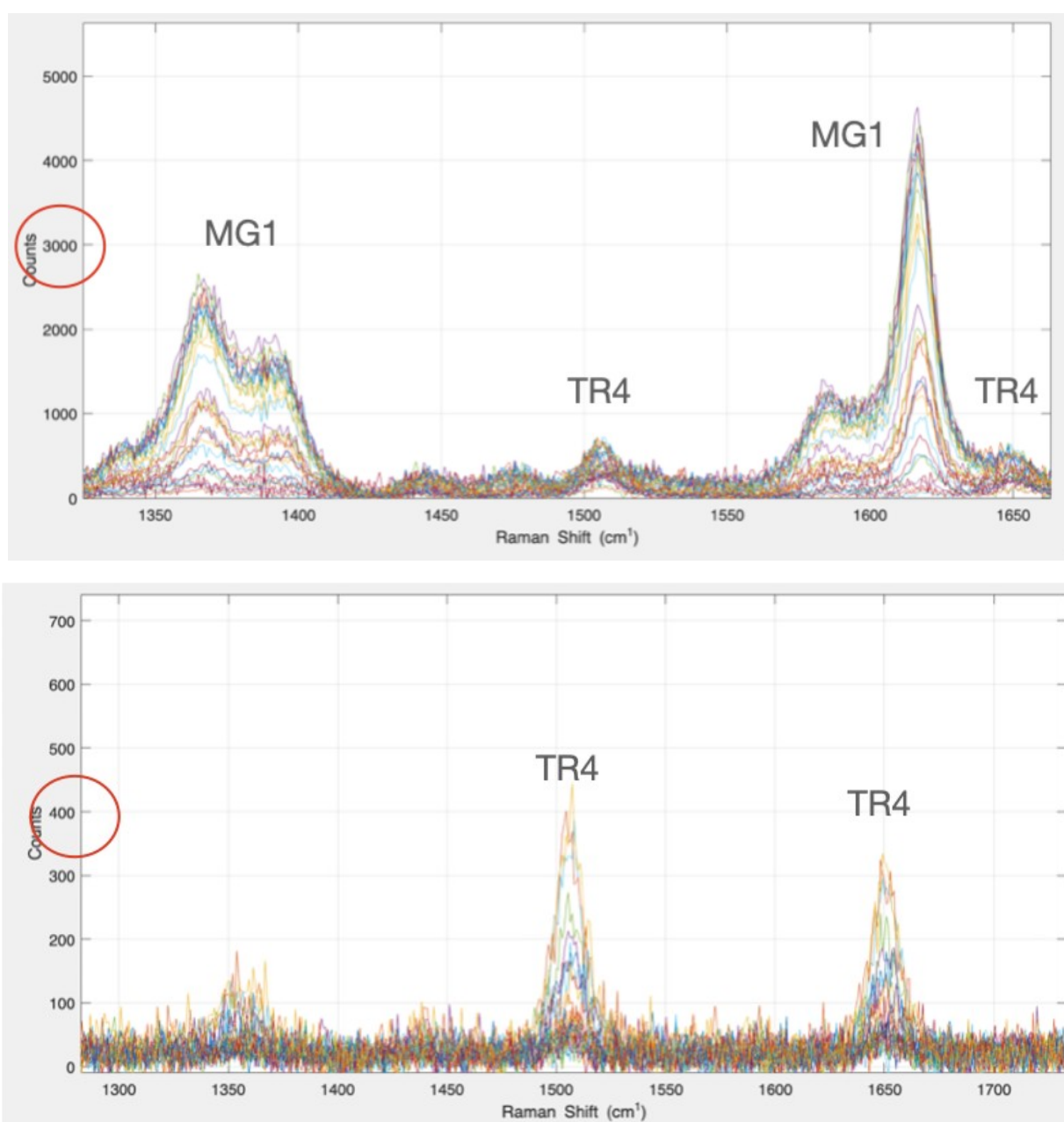


Figura 29: la mappa registrata all'interno degli spots (sopra) e all'esterno (sotto)

Per ovviare a questo problema la superficie del vetrino è stata prima trattata con una soluzione di BSA (3 mg/mL) oppure con una sospensione di caseina (6 mg/mL). In entrambi i casi però non è stato possibile eliminare completamente i segnali del TR dall'esterno degli spots

Dosando opportunamente la proteina e il PEG-SH, usato per controllare l'aggregazione, è stato possibile stampare spots intensi, anche se irregolari, che dopo incubazione con nanostrutture biotilate hanno mostrato segnali intensi del TR solamente sugli spots (**figura 30**).

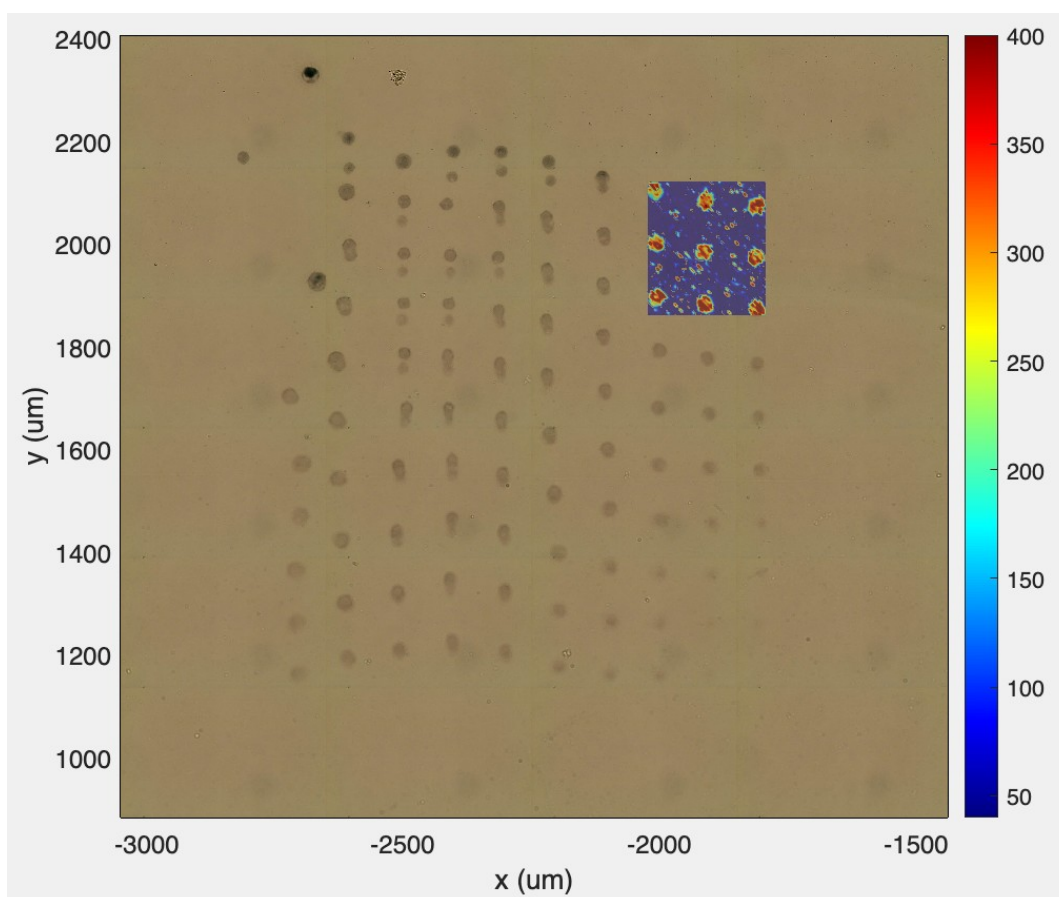


Figura 30: disposizione dei segnali del TR-(SH)₂ su spots stampati con un inchiostro formulato con: NPAu concentrate, PEG-SH, MG-SH, Neu-SH, Tween 20 e glicole etilenico.

Una volta trovata la formulazione ottimale dell'inchiostro sono state effettuate delle prove di ripetibilità, ma queste non hanno consentito di ottenere gli stessi risultati, perchè si è rivelato difficile ottenere particelle concentrate ma poco aggregate per poter essere filtrate (**figura 31**). Dopo alcune prove è stato osservato che affinché gli spots fossero visibili era necessario che l'inchiostro avesse una concentrazione di nanoparticelle d'oro superiore a 50 nM. Per limitare l'aggregazione poi è stato deciso di non utilizzare nella preparazione dell'inchiostro il SERS reporter (MG) e di aggiungere la neutraavidina tiolata

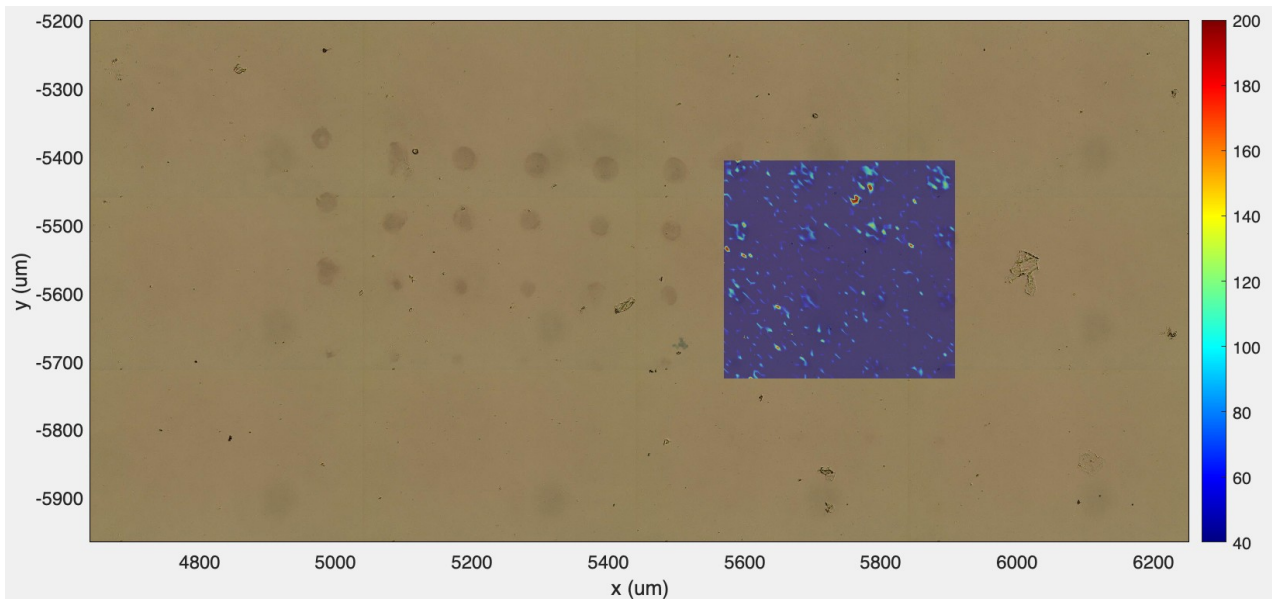


Figura 31: tentativo di riformulazione dell'inchiostro ideale.

direttamente alle nanoparticelle LASiS. In questo modo si è anche eliminato l'uso del PEG-SH dal momento che il suo tiolo poteva competere nel legarsi all'oro con la proteina tiolata. Questa strategia si è rivelata efficace, infatti dal confronto tra gli spettri UV-Vis delle particelle LASiS di partenza e dell'inchiostro finale si è potuto notare che il picco plasmonico dell'inchiostro si era spostato di poco rispetto quello delle LASiS (**Figura 32**),

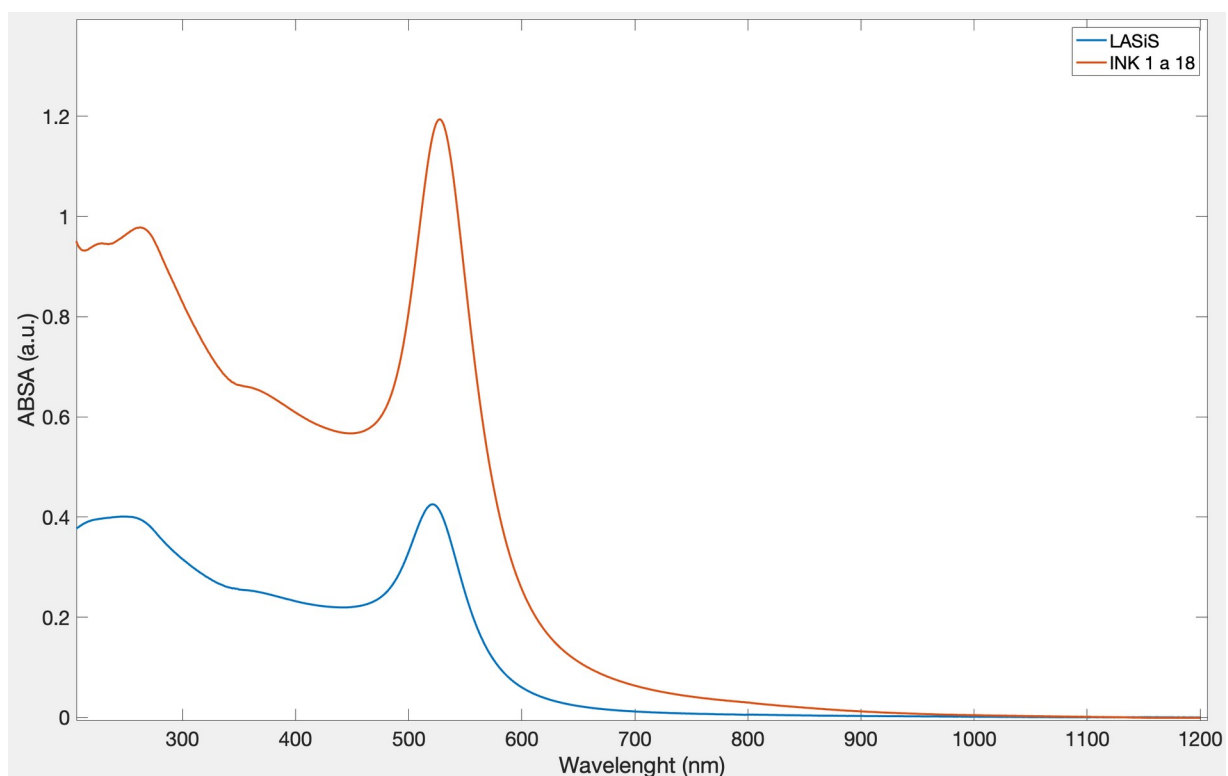


Figura 32: spettri UV-Vis delle particelle LASiS (blu) di partenza e quelle dell'inchiostro finale diluito 1 a 10 (rosso).

sintomo che le nanoparticelle d'oro nell'inchiostro finale non hanno subito aggregazione. A seguito dell'incubazione con le nanoparticelle biotinilate è stata registrata una mappa che ha mostrato i segnali del TR per la maggior parte all'interno degli spots. Inoltre, con incubazioni effettuate a settimane di distanza è stato osservato che la neutravidina negli spots aveva mantenuto una buona capacità di binding della biotina (**figure 33**).

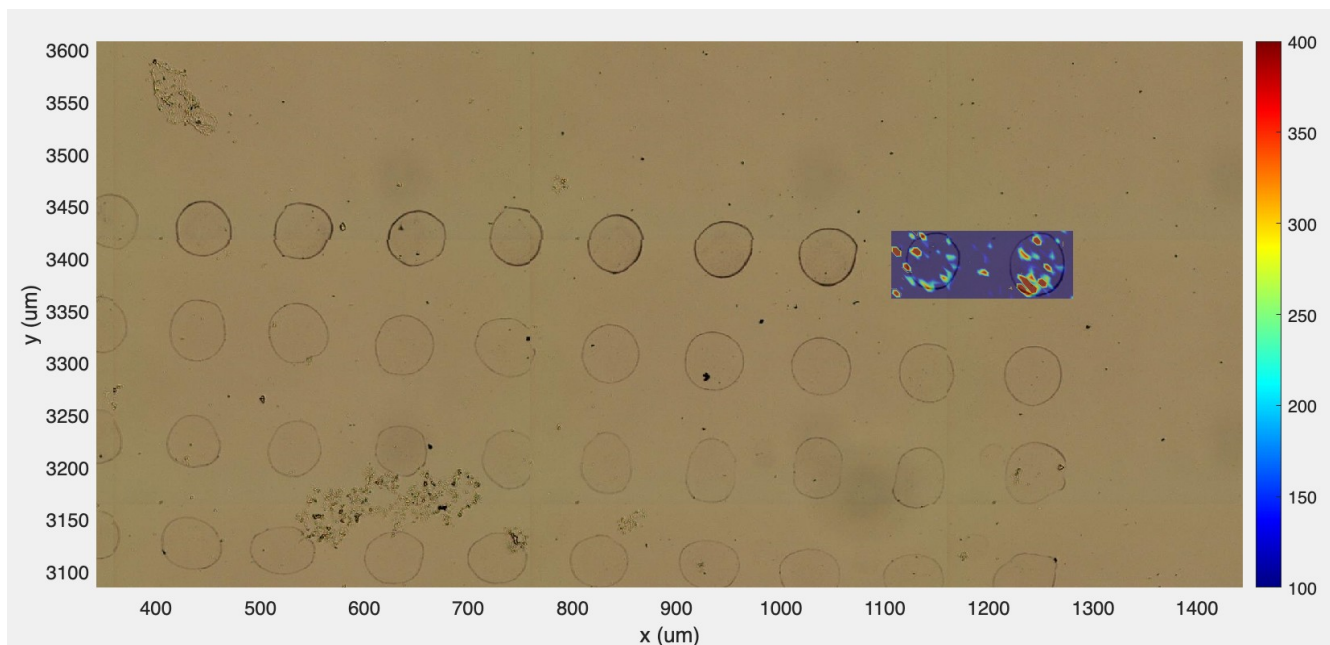


Figura 33: disposizione dei segnali del TR-(SH)₂ su spots stampati con un inchiostro formulato con: NPAu concentrate MG-SH, Neu-SH, Tween 20 e glicole etilenico. Mappa registrata dopo 2 settimane con vetrino conservato a 4°C in Petri sigillata con parafilm.

3.8 RICONOSCIMENTO DI SPOTS D'ORO FUNZIONALIZZATI CON PD-L1 DA PARTE DI NANOSTRUTTURE RIVESTITE COL PEPTIDE FP3

Si è quindi proceduto all'incubazione degli spots contenenti neutravidina con l'antigene PD-L1 marcato con biotina. Un pozzetto è stato quindi trattato con BSA e successivamente è stato incubato con una soluzione di PD-L1 biotinilato. Per verificare la presenza dell'antigene, è stata effettuata un'incubazione con una soluzione di nanostrutture SERS (TR come reporter) funzionalizzate con FP3, un peptide ingegnerizzato specifico per il targeting di questo antigene e sintetizzato nel laboratorio ospitante. In **tabella 2** è presentata la sequenza di FP3.

Tabella 2: sequenza di FP3

Peptide	Sequenza
FP3	HS-PEG3000-Lys-Lys-Lys-Gly-Gly-Trp-His-Arg-Ser-Tyr-Tyr-Thr-Trp-Asn-Leu-Asn- Thr-NH2

Le nanostrutture AuTR@FP3 sono state ottenute in concentrazione di circa 600 pM e con circa 4000 unità peptidiche per nanoparticella d'oro. Sono state caratterizzate tramite spettroscopia UV-Vis-NIR e Raman e ne sono state valutate dimensioni e carica superficiale con misure DLS e ζ -potential rispettivamente.

Parallelamente alle prove con gli spots stampati, è stata utilizzata la superficie di un vetrino commerciale funzionalizzato con neutravidina. L'antigene PD-L1 è stato depositato con la stessa procedura usata sugli spots d'oro e, in questo caso, chiaramente, l'antigene poteva essere trovato su tutta la superficie. Per verificare la specificità delle nanostrutture funzionalizzate con FP3, è stato fatto anche un esperimento in cui la superficie del vetrino con la neutravidina non è stata funzionalizzata con l'antigene, ma è stata incubata solo con le nanostrutture.

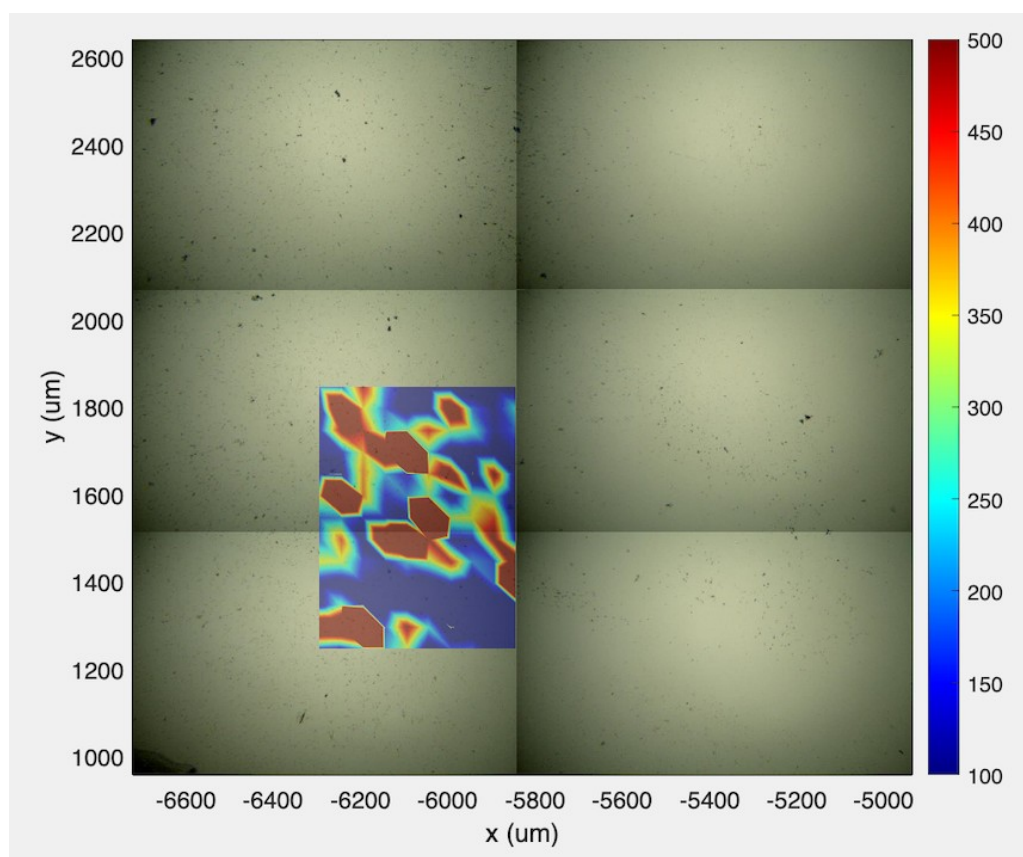


Figura 34: disposizione dei segnali del vetrino modificato con neutravidina incubato prima con PD-L1 e poi con nanostrutture SERS funzionalizzate con

FP3.

Analizzando le mappe acquisite nei pozzetti del vetrino modificato con neutraavidina (**figura 34**), si può notare la presenza di segnali SERS del TR molto intensi in quello in cui è stato incubato anche il PD-L1 biotinilato. Ciò è indice del fatto che il PD-L1 biotinilato si è attaccato alla neutraavidina presente sulla superficie del vetrino e che questo sia poi stato riconosciuto dalle nanoparticelle SERS funzionalizzate con FP3. A conferma di ciò il pozzetto in cui non è stato incubato il PD-L1 biotinilato (**figura 35**) ha mostrato segnali SERS molto più radi e deboli poiché le nanostrutture SERS sono state per la maggior parte lavate via.

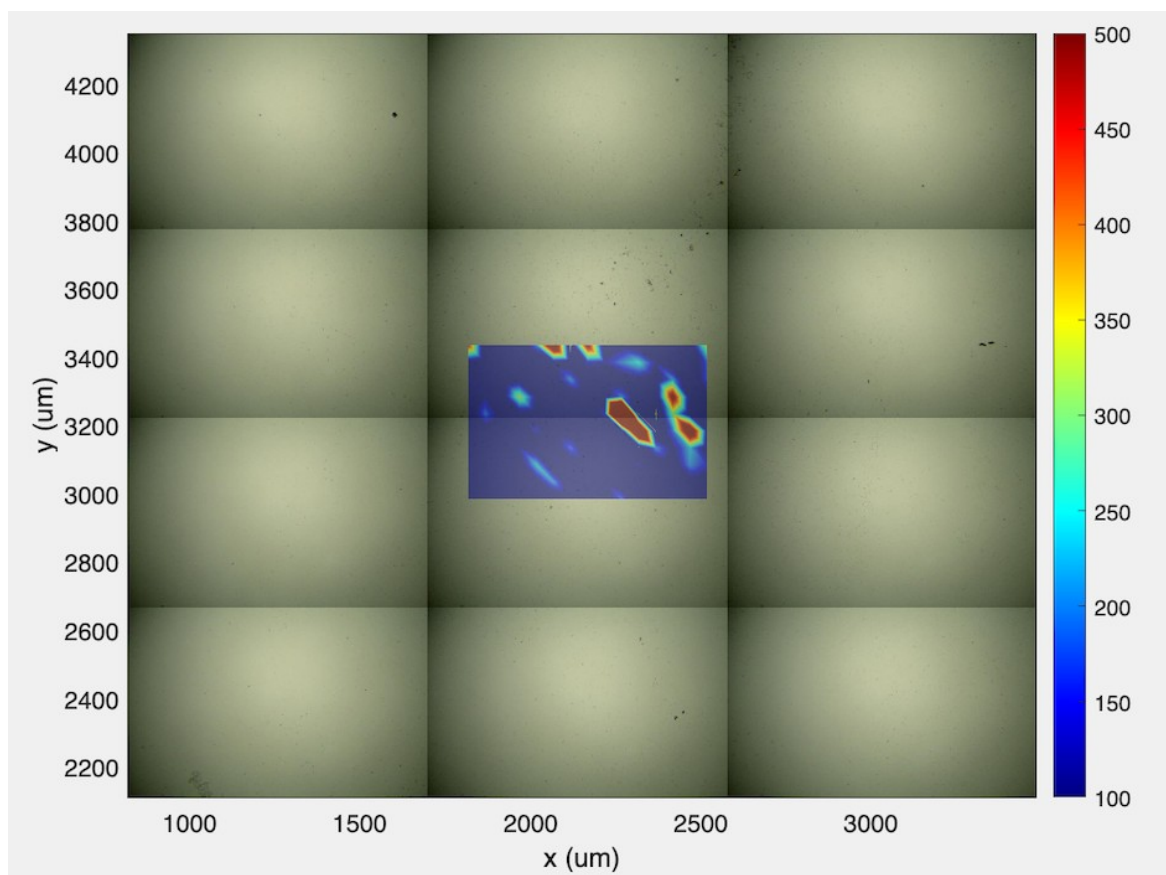


Figura 35: disposizione dei segnali (sopra) e spettri (sotto) della mappa eseguita sul pozzetto del vetrino modificato con neutraavidina incubato prima con PD-L1 e poi con nanostrutture SERS funzionalizzate con FP3.

Osservando le mappe Raman del vetrino con gli spots d'oro con neutraavidina e PDL1, i segnali del TR delle nanostrutture funzionalizzate con SP3 sono stati trovati correttamente sugli spots anche dopo alcuni lavaggi (**figura 36**). Al di fuori degli spots, dove non dovrebbe esserci proteina, si sono però notati diversi segnali Raman, anche se meno intensi, ad indicare che le nanostrutture con FP3 interagiscono in modo aspecifico con la

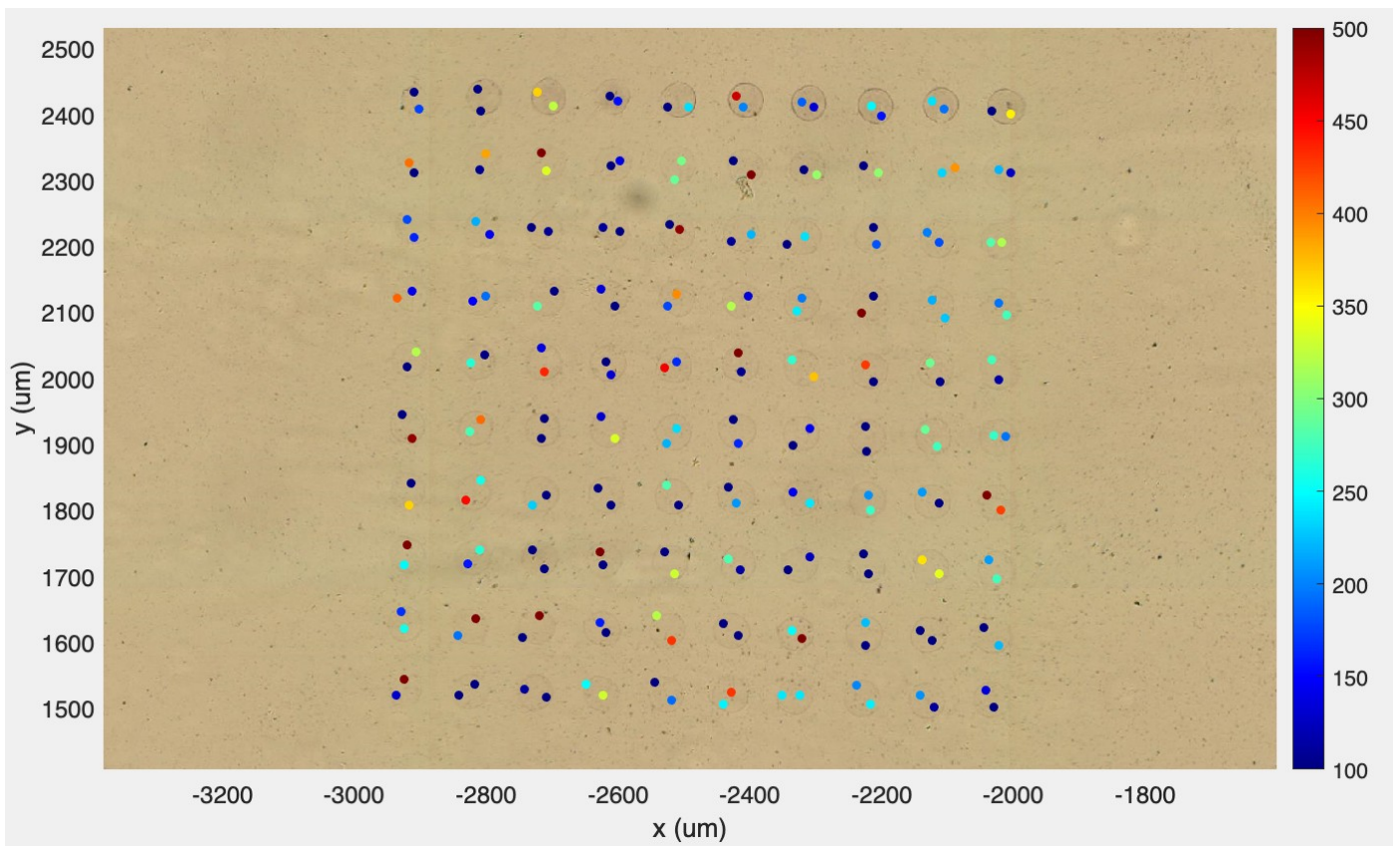


Figura 36: segnali registrati SERS del TR sugli spots: 2 misure per spot

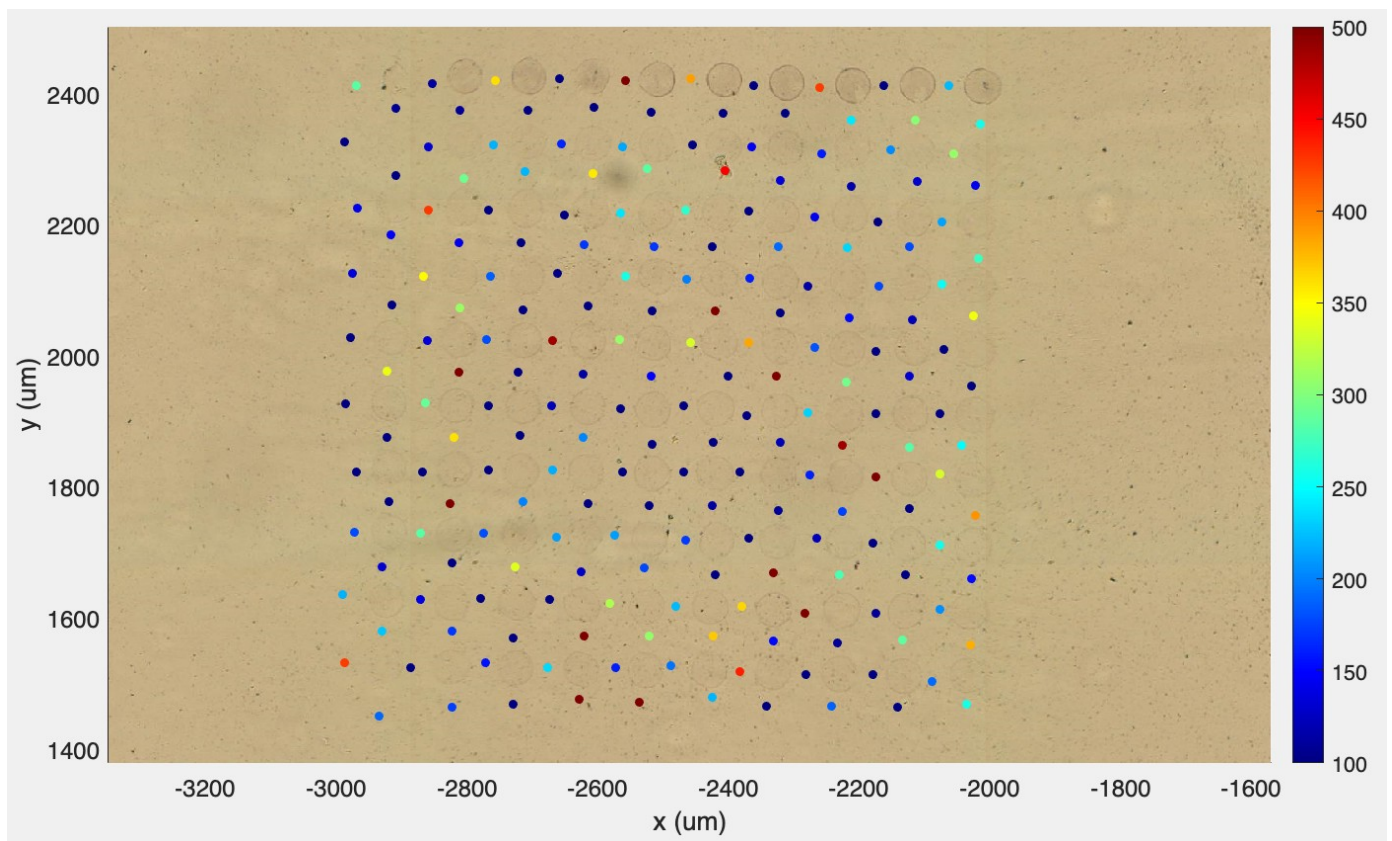


Figura 37: segnali registrati SERS del TR tra gli spots

superficie del vetrino o con eventuali residui di PDL1 che non si è riusciti a rimuovere con i lavaggi seguiti all'incubazione degli spots con PDL1 (**figure 37**).

Elaborando le mappe del pozzetto con gli spots con un programma MATLAB sviluppato in laboratorio è stato possibile ricavare i coefficienti di Pearson R, i quali indicano il grado di riconoscimento dello spettro del SERS reporter in uno spettro acquisito. In particolare è risultata una correlazione positiva del 60% dei segnali del reporter acquisiti sugli spots e del 47% dei segnali acquisiti tra gli spots. Questi risultati dunque indicano che gli spots d'oro funzionalizzati con PD-L1 riconoscono le nanostrutture SERS funzionalizzate con FP3 ma c'è ancora un problema di interazione aspecifica delle nanostrutture al di fuori degli spots d'oro che potrebbe derivare da una rimozione inefficace dell'antigene, dopo l'incubazione degli spots d'oro sui cui è fissata la neutravidina.

4. CONCLUSIONI

In questo progetto di tesi sono state gettate le basi per lo sviluppo di un test in vitro per il riconoscimento delle capacità di targeting di nanostrutture SERS funzionalizzate con peptidi specifici per il riconoscimento di molecole bersaglio. Una volta che sarà sviluppato in maniera ottimale, tale test permetterà di riconoscere rapidamente molecole rilevanti in campo medico come antigeni sovraespressi in cellule tumorali. In questo senso la grande sensibilità della tecnica SERS si è rivelata fondamentale per la rilevazione indiretta di tali molecole grazie ai suoi segnali molto intensi e risolti.

Nel corso del mio lavoro è stato possibile formulare un'inchiostro per stampare, con una stampante a getto d'inchiostro 2D, matrici di cento spot d'oro funzionalizzati con neutravidina, la cui presenza è stata poi individuata da nanoparticelle SERS biotinilate appositamente preparate. In particolare i risultati mostrano come la concentrazione e lo stato di aggregazione delle nanoparticelle d'oro presenti nell'inchiostro, nonché una corretta modulazione di proprietà come la viscosità e la tensione superficiale, giocano un ruolo fondamentale per una stampa ideale, ovvero con una regolare e ripetibile distribuzione degli spots. In definitiva la formulazione dell'inchiostro ha portato a risultati promettenti, che tuttavia dovranno essere ulteriormente ottimizzati in funzione della proteina utilizzata.

La presenza della neutravidina negli spots d'oro ha permesso di fissare l'antigene PD-L1 biotinilato sfruttando l'interazione neutravidina biotina. Su questo sistema si è potuto testare la capacità di nanostrutture SERS, funzionalizzate col peptide di targeting specifico per PD-L1, FP3, di riconoscere l'antigene. L'unica prova effettuata ha verificato il riconoscimento tra PD-L1 e FP3 grazie alla localizzazione dei segnali SERS principalmente sugli spots d'oro in cui era presente la proteina. È necessario tuttavia un ulteriore lavoro per ottimizzare le procedure di incubazione dell'antigene e delle nanostrutture funzionalizzate con il peptide di targeting, in particolare per ridurre le interazioni aspecifiche sulla superficie del vetrino dove non sono presenti gli spot.

Una volta ottimizzato questo test ridurrà notevolmente i tempi dei test in vitro per verificare l'efficacia di un determinato peptide verso un particolare antigene e potrà indirizzare solo i composti più promettenti ai più complessi test cellulari

Infine è importante specificare che un approccio multidisciplinare si è rivelato fondamentale per lo sviluppo di questo test in vitro e più in generale per la ricerca nel campo delle biotecnologie e dei nanomateriali a scopo diagnostico.

PARTE SPERIMENTALE

REAGENTI

Tutti gli Fmoc amminoacidi (Cys(Trt), Ala, Ser(tBu), Gly), la biotina, la resina e i reagenti utilizzati per la sintesi su fase solida (HOBT, HBTU, TFA e EDT), il TWEEN 20, il sodio laurilsolfato, il 2-imminotiolano cloridrato, la streptavidina e la BSA sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Merck). Fmoc-NH(CH₂-CH₂-O)₂-CH₂-CO-OH (Fmoc-O₂oc-OH) è un prodotto Iris Biotech.

La neutravidina è stata acquistata da Thermofisher mentre la proteina ricombinante biotinilata PD-L1/B7-H1 His-tag Avi-tag è un prodotto R&DSYSTEMS.

I due SERS reporter tiolati (TR-(SH)₂ soluzione 34 µM in metanolo e MG-SH soluzione 25 µM in metanolo) sono stati forniti dal laboratorio NOL. I vetrini (25 x 60 mm) funzionalizzati con neutravidina sono stati acquistati da PolyAn e le mascherine in silicone (6.5x3.2 mm) da Grace Bio-Labs. Le provette Vivaspin 2 (PES, cutoff 10 kDa) sono un prodotto Sartorius.

STRUMENTAZIONE

Spettroscopia UV-Vis-NIR

Gli spettri UV-Vis-NIR sono state registrati con spettrometro Cary 5000 a doppio raggio (Agilent Technologies) interfacciato ad un computer. Sono state utilizzate celle di quarzo con cammino ottico di 0.2 cm o 0.1 cm.

Ablazione laser

Per l'ablazione è stato utilizzato un laser a impulsi Nd:YAG (YG-981E-10, marca Quantel) che emette a 1064 nm, con frequenza di 10 Hz e durata dell'impulso di 9 ns. La potenza del laser e la sua focalizzazione sul target sono state modulate per ottenere una fluenza di circa 2 J/cm².

Misure SERS

Le misure SERS degli spots e delle soluzioni colloidali sono state registrate con uno spettrometro Raman InVia (Renishaw) con rilevatore CCD e interfacciato direttamente ad un microscopio Leica. E' stata equipaggiata una telecamera integrata per poter vedere i

campioni e focalizzare il laser. Per la registrazione degli spettri è stata utilizzata una sorgente laser ad He-Ne a 633 nm (12 mW di potenza), un reticolo da 1800 righe/mm e una potenza del laser al 10%. La calibrazione dello strumento è stato effettuata con un riferimento interno di silicio. Gli spettri delle soluzioni colloidali sono stati registrati da 1000 a 2000 cm^{-1} con un tempo di acquisizione di 10 secondi per ogni misura. Gli spettri degli spot sono stati registrati da 1350 a 1750 cm^{-1} con un tempo di acquisizione di 10 s.

Preparazione dei microarray d'oro

La stampa degli spot sui vetrini è stata effettuata tramite una stampante a getto di inchiostro DIMATRIX MATERIALS DMP-2800 SERIES interfacciata ad un computer, utilizzando cartucce DMC-11610 con ugelli da 10 pL. La stampante è stata gentilmente messa a disposizione dal prof. Flavio Maran. dell'AIRC

HPLC

Per le analisi HPLC è stato utilizzato uno cromatografo HPLC Dionex, serie P680, dotato di autocampionatore (ASI-100) e detector UV a quattro canali (215, 254, 280 e 420nm). Lo strumento è interfacciato a un computer. È stata utilizzata una colonna Vydac 218TP54 (250 x 4,6 mm, particelle 5 μm di diametro, flusso 1,5 ml/min) e il programma Chromeleon versione 6.60 per visualizzare i cromatogrammi. Per l'eluizione è stato usato un gradiente binario con le seguenti fasi mobili: **A** : H₂O – TFA 0.1% v/v; **B** : ACN 90%- H₂O 10%, TFA 0.1% v/v

Spettrometria di massa

Gli spettri di massa sono ottenuti con uno strumento HPLC-UV-ESI 1260 Infinity (Agilent Technologies) dotato di autocampionatore, detector UV-vis a 2 canali, sorgente di ionizzazione ESI, analizzatore a singolo quadrupolo e fotomoltiplicatore DAD HS. Per l'eluizione è stata utilizzata una colonna Kinetex XB-C18 (3.5 μm , 100 x 4.6 mm) e un gradiente binario con le seguenti fasi mobili: **A** : H₂O – TFA 0.1% v/v; **B** : ACN - TFA 0.1% v/v.

Misure DLS e zeta Potential

Le misure di diametro idrodinamico e Zeta Potential sono state effettuate con lo strumento Nano-ZetaSizer. Per la valutazione degli spettri del diametro idrodinamico è

stato impostato l'indice di rifrazione dell'oro a $\lambda=400\text{nm}$: 0,197. Come cuvetta è stata utilizzata "cuvetta di dimensionamento monouso a basso volume"

Per la valutazione degli spettri dello Zeta Potential è stato impostato l'indice di rifrazione dell'oro a $\lambda=400\text{nm}$: 0,197. Modello utilizzato: Smoluchowski con funzione di Henry $(f(ka))=1,5$

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEL PEPTIDE: Biotina-O20c-Gly-Ser-Ala-Ala-Cys-NH₂ (MB01)

La sintesi del peptide biotinilato è stata condotta sul sintetizzatore Advanced ChemTech 348 Ω a partire da 62 mg di resina Rink amide AM (grado di sostituzione 0.72 mmol/g). Dopo il rigonfiamento della resina in DMF la sintesi peptidica comincia con un ciclo sintetico per l'attacco di ogni nuovo Fmoc-amminoacido. Ogni ciclo comprende: 1) La deprotezione del gruppo Fmoc dalla funzione α -amminica terminale del peptide con una soluzione di piperidina al 20% v/v in DMF (2 trattamenti di 5 e 20 minuti) seguita da filtrazione dei reagenti e lavaggio della resina con DMF. 2) Accoppiamento sulla sequenza peptidica in crescita del nuovo Fmoc-amminoacido, aggiunto 5 volte in eccesso rispetto ai siti disponibili sulla resina. Viene utilizzata una soluzione 0.5 M del Fmoc-amminoacido, soluzione 0.5 M di HBTU/HOBt in DMF come attivante e una soluzione 2 M di diisopropiletilammina in Nmetil-pirrolidone (NMP). Di seguito sono riportate le quantità di amminoacidi utilizzati (**tabella 3**).

Tabella 3: masse, pesi molecolari e concentrazioni dei vari amminoacidi

Reagenti	m (mg)	PM (g/mol)
Fmoc-Cys(Trt)-OH	0,31	585,7
Fmoc-Ala-OH	0,23	311,3
Fmoc-Ala-OH	0,23	311,3
Fmoc-Ser(tBu)-OH	0,21	383,4
Fmoc-Gly-OH	0,16	297,3

Una volta terminata la sintesi automatica, la resina è stata essiccata e sono stati pesati 78 mg di peptide-resina. A questo punto si è proceduto con l'attacco manuale degli ultimi due amminoacidi (Fmoc-O20c-OH e Biotina). L'iter operativo è il medesimo di quello

seguito nella sintesi automatica. Di seguito sono riportate le quantità di amminoacidi utilizzati (**tabella 4**).

Tabella 4: masse, pesi molecolari e concentrazioni dei vari amminoacidi

Reagenti	m (mg)	PM (g/mol)
Fmoc-O ₂ Oc-OH	56,5	382,42
Biotina	33,0	244,3

A conclusione della sintesi sono stati ottenuti 87 mg di peptide-resina pari ad una resa del 95%.

Per il distacco del peptide dalla resina e la rimozione dei gruppi protettori è stata utilizzata una soluzione di acido trifluoroacetico (TFA) - etanditiolo (EDT) - acqua - trisopropilsilano (TIS) (94 : 2.5 : 2.5 : 1 v/v/v/v) in cui è stato disperso il peptide resina e tenuto in agitazione per 90 min. Dopodiché la soluzione è stata filtrata via ed evaporata sotto flusso di azoto. Il residuo è stato ripreso con etere freddo, causando la precipitazione del peptide. Questo è stata centrifugato per 3 volte a 6000 RPM per 10 minuti, eliminando il surnatante e riprendendo il precipitato con etere freddo. Dopo l'ultimo lavaggio il precipitato è stato fatto essicare con azoto e ne è stato eseguita la caratterizzazione tramite HPLC analitico e spettroscopia di massa.

HPLC analitico

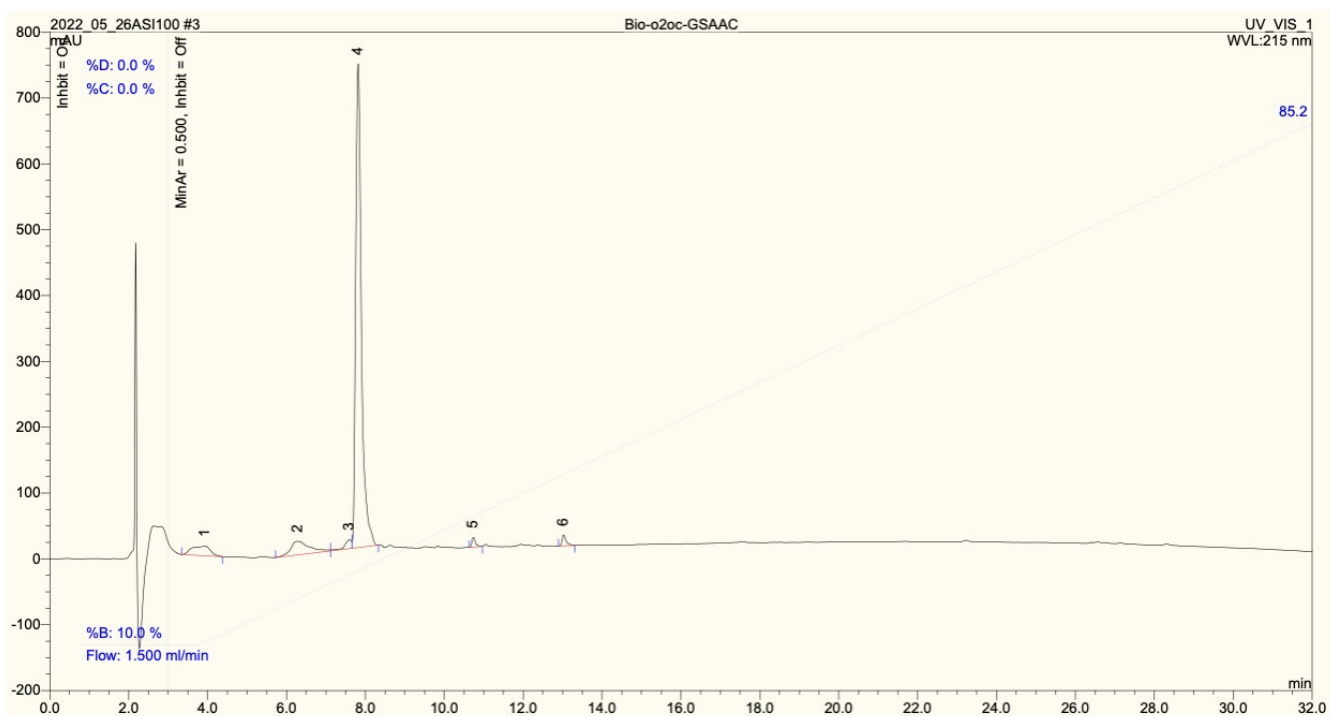


Figura 38: cromatogramma grad 10-90 30 min di MB01 in metanolo.

Colonna Vydac C18; gradiente di 3 min 10% ; 10-90% B in 30 minuti. t_R 7.82 min

Il cromatogramma è riportato di seguito (**figura 36**)

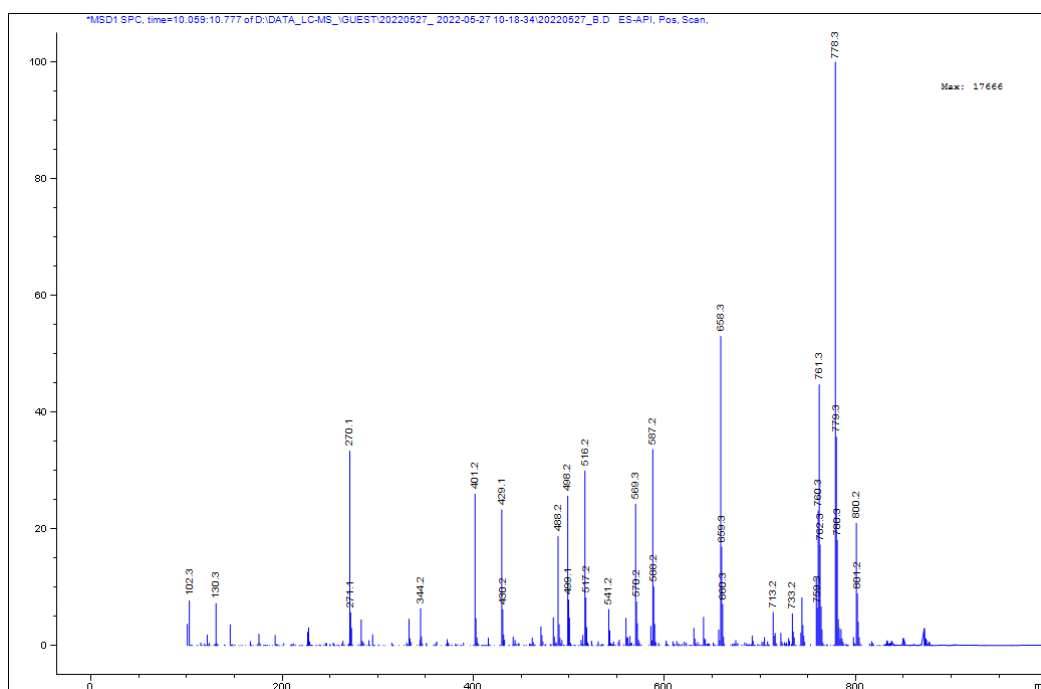


Figura 39: spettro di massa di MB01.

Spettrometria di Massa

Il picco intenso con un tempo di ritenzione di 7,82 minuti è stato assegnato al peptide in base al suo spettro di massa.

$[M+H]^+$ calcolato = 777.32 $[M+H]^+$ trovato = 778.30

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOSTRUTTURE SERS BIOTINIALATE

Metodo generale per la sintesi nanoparticelle LASiS

La sintesi di AuNP tramite ablazione laser (AuNP LASiS) avviene focalizzando il laser su un target di oro metallico posto nell'alloggiamento presente in un cristallizzatore. All'interno del cristallizzatore viene inserito un volume tale di soluzione acquosa di NaCl 10^{-5} M da avere uno strato di almeno 2 cm di soluzione al di sopra del target.

Le specifiche del laser usate sono le seguenti: $\lambda = 1064$ nm, $\tau = 9$ ns, $\nu = 10$ Hz, Fluenza = 2 J/cm². Con questa procedura sono stati ottenuti 50 mL di sospensione colloidale d'oro, che sono poi stati caratterizzati mediante spettroscopia UV-Vis-NIR utilizzando una

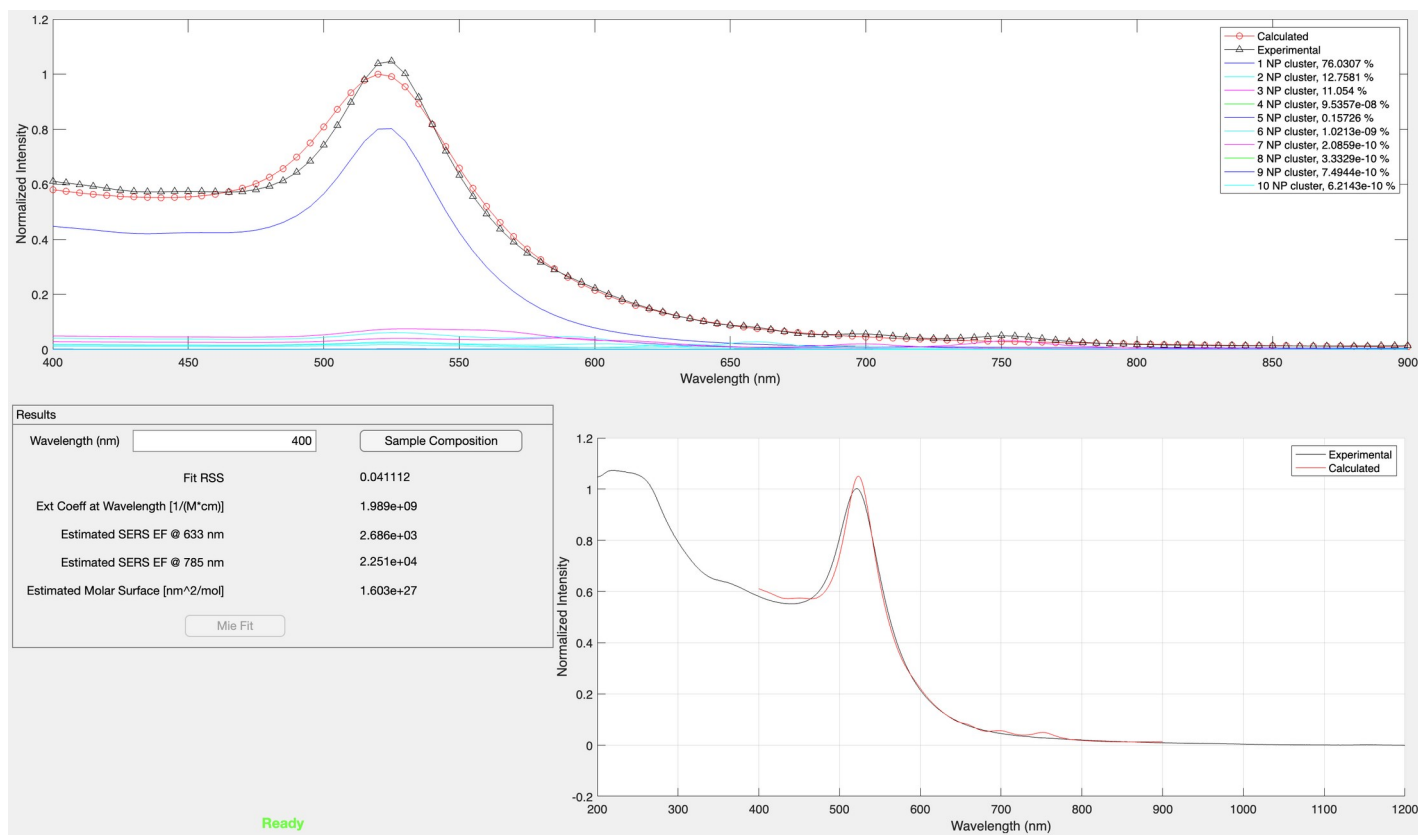


Figura 40: elaborazione dello spettro UV-Vis tramite fitspettri

cuvetta da 0,1 cm. Gli spettri ottenuti sono stati elaborati con il programma MATLAB Fitspettri del Dr. Lucio Litti. La concentrazione finale è risultata 2,14 nM (**figura 40**).

Funzionalizzazione con SERS reporter

Sono stati presi 2 mL di nanoparticelle LASiS 2,14 nM e vi sono stati aggiunti 5 μ L di 34 μ M TR-(SH)₂ in metanolo. Dopo una breve agitazione manuale, per rimuovere l'eccesso di SERS reporter, la sospensione è stata centrifugata a 3000 RCF per 10 min e il surnatante eliminato.

Tabella 5: Concentrazioni e volumi per la procedura di funzionalizzazione con TR-(SH)₂

[NPAu]	Volume NPAu	moli NPAu	[TR-(SH) ₂]	Volume TR-(SH) ₂	Moli TR-(SH) ₂	NPAu / TR4
2,14 nM	2 mL	4,24 pmol	34 μ M	5 μ L	170 pmol	39

Funzionalizzazione con peptide biotinilato

Il precipitato è stato ripreso con 2 mL di una soluzione 31 μ M di MB01 e 110 nM di PEG₈₀₀-SH in milliQ. La sospensione è stata agitata per un paio di minuti ed è stata lasciata ad incubare sulle nanoparticelle d'oro per 30 minuti sonicando di quando in quando. Durante il periodo di incubazione è stato registrato uno spettro UV-Vis-NIR in una cella al quarzo da 0,1 mm per stimare la concentrazione e osservare lo stato di aggregazione delle nanoparticelle.

Tabella 6: Concentrazioni e volumi per la procedura di funzionalizzazione con la soluzione MB01/PEG-SH

[NPAu]	Vol soluzione MB01 + PEG-SH	Moli MB01	moli NPAu	Rapporto MB01/NPAu teorico	Moli PEG-SH	PEG-SH/NPAu
1,43	2 mL	62 nmol	2,48 pmol	25000	210 pmol	70

Terminata l'incubazione il surnatante è stato allontanato tramite centrifugazione a 3000 RCF per 10 min. Il precipitato è stato ripreso con 1 mL di una soluzione 12 mg/mL di BSA in acqua milliQ e di questa sospensione è stato registrato lo spettro UV-Vis-NIR (**Figura 41**). E' stata effettuata una centrifugazione a 200 RCF per 4 minuti per allontanare le particelle più grandi precipitate sul fondo, dopodiché il surnatante è stato raccolto e

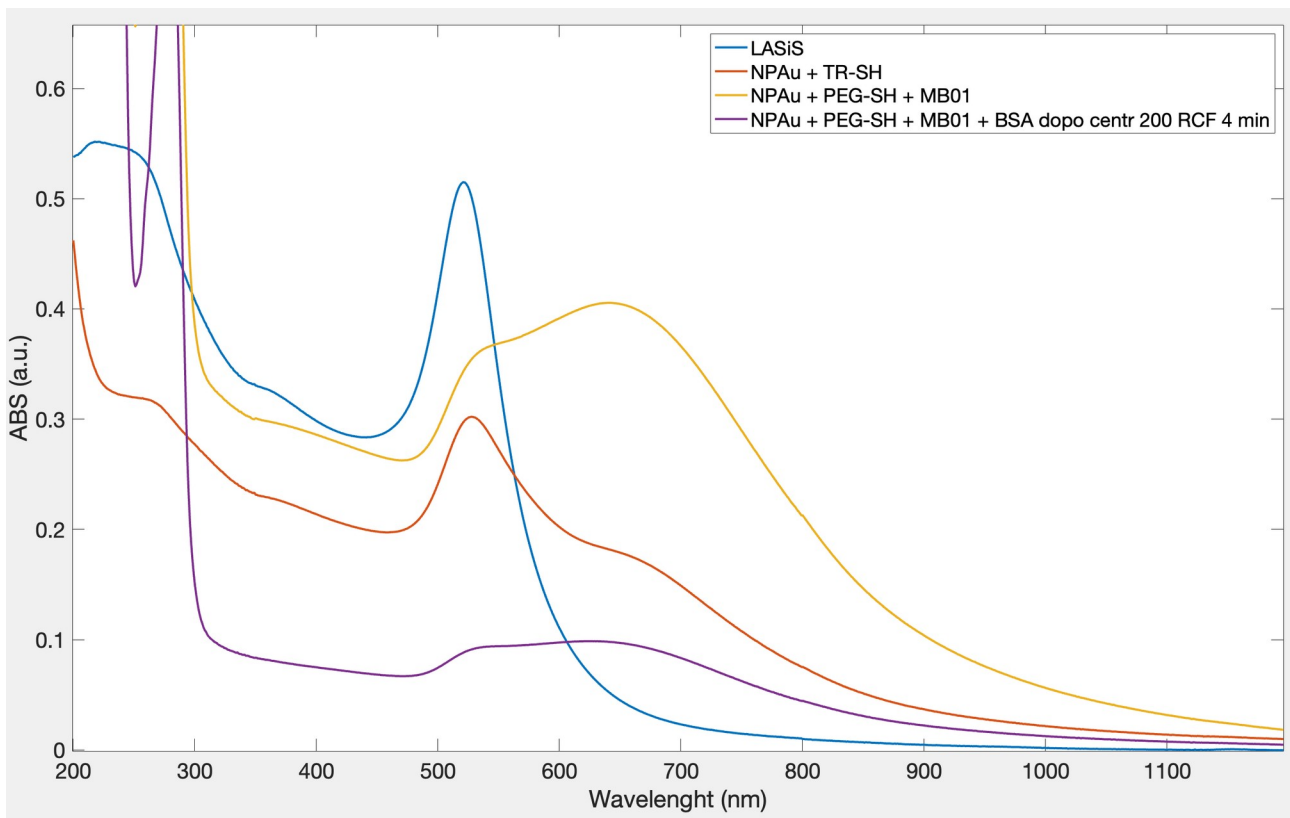


Figura 41: spettri UV-Vis-NIR dei vari passaggi sopra riportati (cella 0.1 cm) Lo spettro giallo (dopo l'aggiunta della BSA) è della la soluzione in concentrazione doppia rispetto alle precedenti.

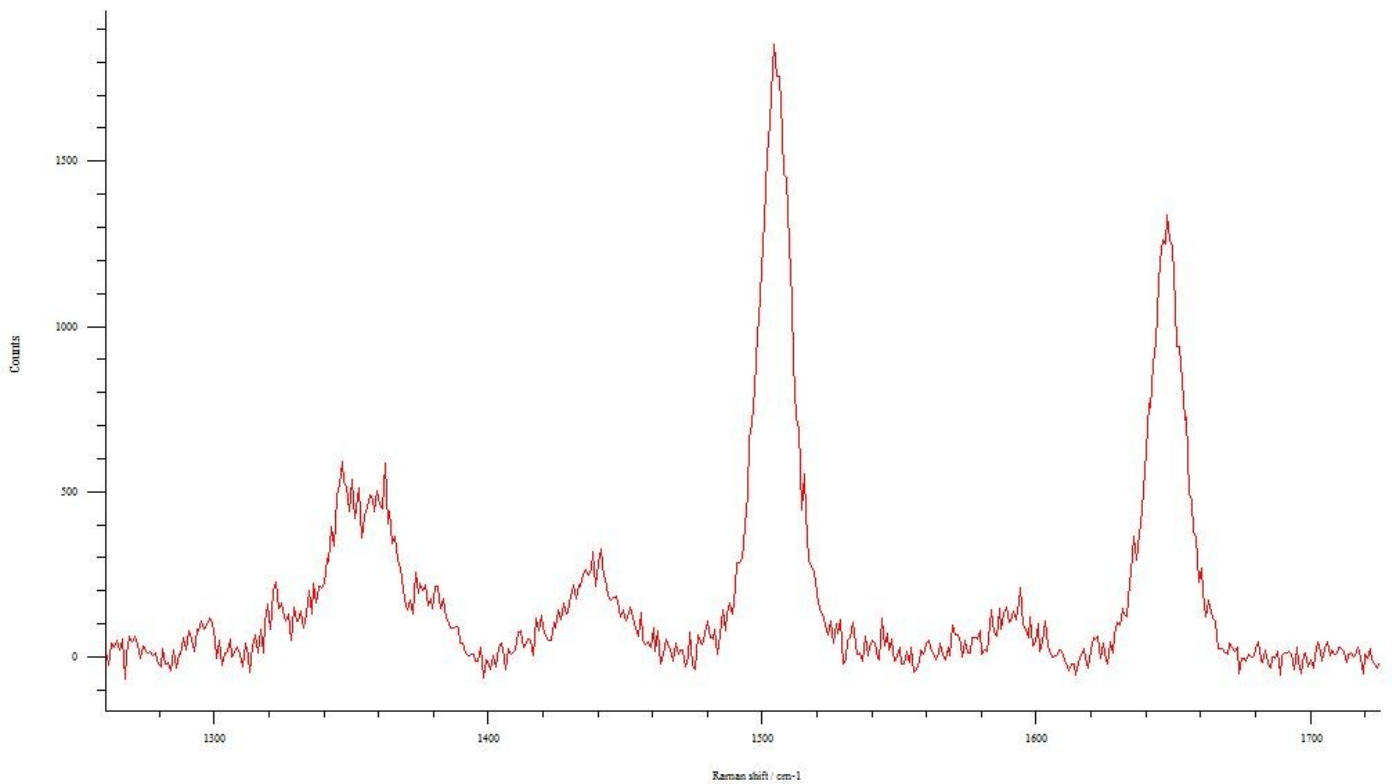


Figura 42: spettro Raman della sospensione di nanoparticelle SERS biotinilate sintetizzata

caratterizzato tramite spettroscopia UV-Vis-NIR (**figura 41**) e Raman (**figura 42**). La concentrazione finale della nanostrutture biotinilate è risultata 500 pM.

Come si può osservare dagli spettri in **figura 41** ogni lavaggio attraverso centrifugazione ha portato all'abbassamento del picco di assorbimento dell'oro massivo a 400 nm, indicando così una diminuzione della concentrazione in oro della sospensione; ciò è dovuto alla perdita di nanoparticelle tra un lavaggio e l'altro. Si può osservare inoltre che dopo ogni ciclo di centrifuga un aumento delle spalle di aggregazione rispetto al picco plasmonico delle particelle isolate; questo è sintomo della presenza di aggregati di dimensioni maggiori.

Lo spettro Raman è stato registrato nella medesima cuvetta con un obiettivo x10, una potenza del laser del 10% e un tempo di esposizione al laser di 10 secondi. Come si può osservare (**figura 42**) si riconoscono i segnali caratteristici del TR.

FORMULAZIONE DELL'INCHIOSTRO

Ablazione delle nanoparticelle LASiS

Per formulare l'inchiostro per stampare gli spot d'oro funzionalizzato con neutravidina sulla superficie del vetrino si è deciso di partire da LASiS a concentrazione maggiore rispetto alle precedenti in modo da ottenere un inchiostro con una concentrazione in oro maggiore. Per questo, come descritto precedentemente, sono stati ablati altri 50 mL di nanoparticelle d'oro e la concentrazione finale, valutata con lo spettro UV-Vis-NIR ed elaborato con il programma fitspettri, è risultata pari a 4,54 nM. (**Figura 43**).

Prima concentrazione delle nanoparticelle LASiS

In ognuna di 24 eppendorf sono stati aggiunti 2 mL della particelle LASiS appena ablate le quali successivamente sono state centrifugate a 2500 RCF per 30 minuti. Dopodiché è stato allontanato il surnatante da ognuna con una pasteur e i precipitati sono stati riuniti in due eppendorf e lasciati a sonicare per qualche minuto. La concentrazione delle nanoparticelle riunite e lo stato di aggregazione è stato valutato dallo spettro UV-Vis-NIR ed è risultato 25 nM.

Tabella 7: concentrazione e numero di moli dopo la prima fase di concentrazione delle LASiS.

[NPAu] diluito 1 a 2,5	[NPAu]	Volume NPAu totale	Moli totali di NPAu
10 nM	25 nM	3,2 mL	80 pmol

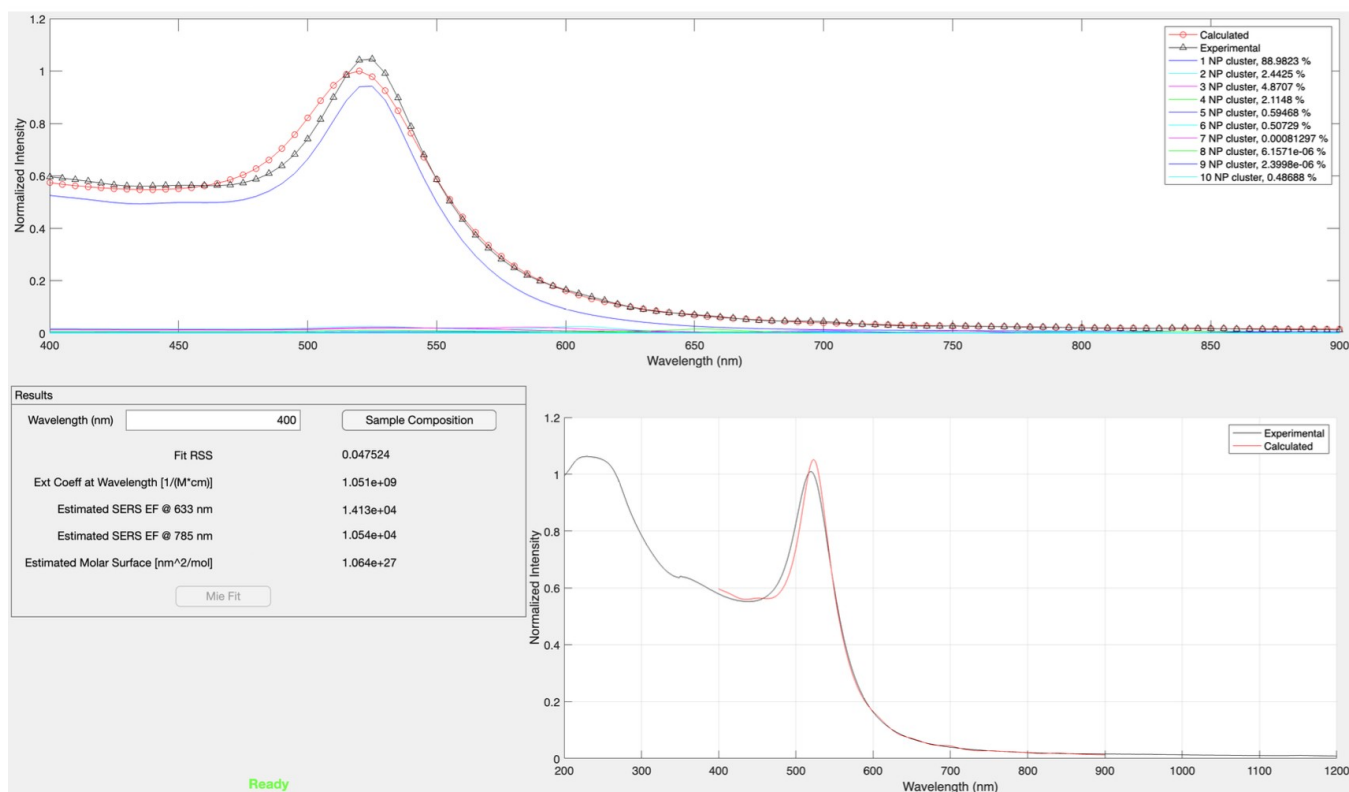


Figura 43: elaborazione dello spettro UV-Vis tramite fitspettri

Tiolazione della neutraavidina

A 3 mg di neutraavidina (60 kDa) in 350 μL di tampone fosfato (10 mM a pH 8) sono stati aggiunti 60 μL di una soluzione 14 mM di 2-imminotiolano cloridrato in acqua. La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione in vortex per un'ora dopodichè è stata trasferita in una provetta da centrifuga Vivaspin 2 per l'eliminazione dei reagenti in eccesso. La proteina è stata poi lavata con con 300 μL di PBSE (PBS 10 mM a pH 7,4 con EDTA 1mM) per centrifugazione per 4 volte (5500 RCF per 6-10 minuti a 4 $^{\circ}\text{C}$). Il filtrato contenente la proteina è stato infine portato a 300 μL con la soluzione di PBSE, e di questi 240 μL sono stati aggiunti alle nanoparticelle concentrate e lasciati in incubazione per un'ora. La soluzione restante è stata usata per determinare il grado di tiolazione della proteina attraverso il saggio di Ellman. Questo è stato effettuato costruendo prima una retta di taratura con delle concentrazioni note di cisteine ed infine raccogliendo tre misurazioni del campione di neutraavidina tiolata. In **Figura 44** sono riportati gli spettri UV-vis registrati per le diverse soluzioni.

Le assorbanze a 412 nm della proteina, corrette per il riferimento sono state inserite nella retta di taratura per ricavare la concentrazione di neutraavidina tiolata in cuvetta; da questa poi sono state ricavate le moli presenti nella soluzione madre che infine sono state confrontate con le moli iniziali di neutraavidina per determinarne il grado di tiolazione.

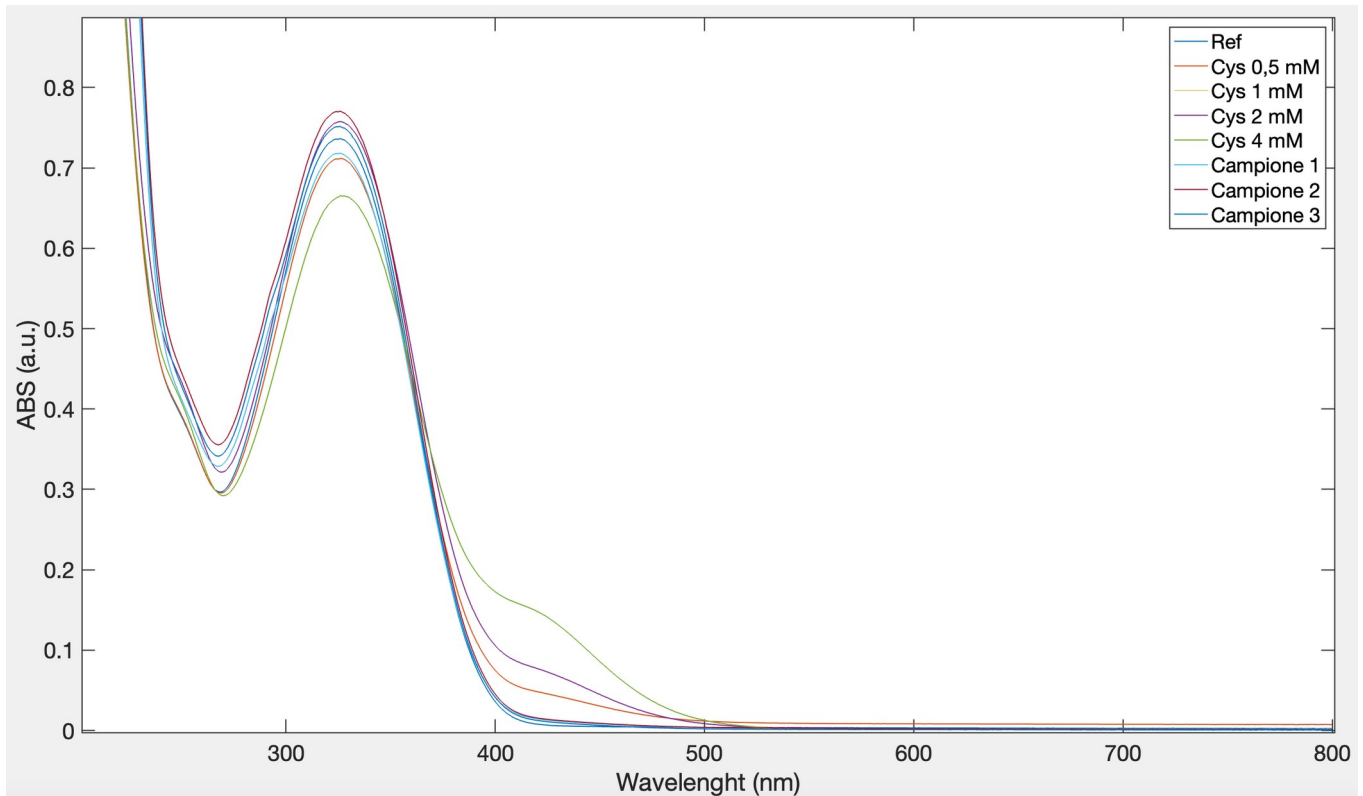


Figura 44: spettri UV-Vis registrati per il test di Ellman

Questo è risultato pari a 1,17.

Tabella 8: risultati della tiolazione

[-SH] in cuv	4,59E-06
Moli -SH in cuv	2,29E-09
Moli -SH madre	6,42E-08
Moli neutraavidina (PM 60 kDa)	5,50E-08
Grado di tiolazione	1,17

Seconda concentrazione delle particelle

La soluzione di neutravidina tiolata è stata aggiunta alle 2 eppendorf contenenti le nanoparticelle d'oro e incubata per 1 ora .

Tabella 9: dati dell'aggiunta di neutravidina tiolata

[NPAu]	Vol NPAu	Moli di NPAu	Massa Neu	Vol soluz Neu-SH	[Neu-SH]	Vol Neu-SH	Moli di Neu-SH	Neu-SH/NPAu
25 nM	3,2 mL	80 pmol	3 mg	280 μ L	180 μ M	240 μ L	43 nmol	540

Una volta terminata l'incubazione le due eppendorf sono state centrifugate a 3000 RCF per 30 minuti per concentrarle a 450 μ L in un'unica eppendorf. La sospensione è stata filtrata su membrana in cellulosa da 450 nm. A 350 μ L di filtrato sono stati aggiunti 20 μ L di Tween 20 (1 mM) e 80 μ L glicole etilenico. Dell'inchiostro finale è stato registrato lo spettro di estinzione UV-Vis-NIR e la concentrazione finale in nanoparticelle d'oro è risultata di 77 nM

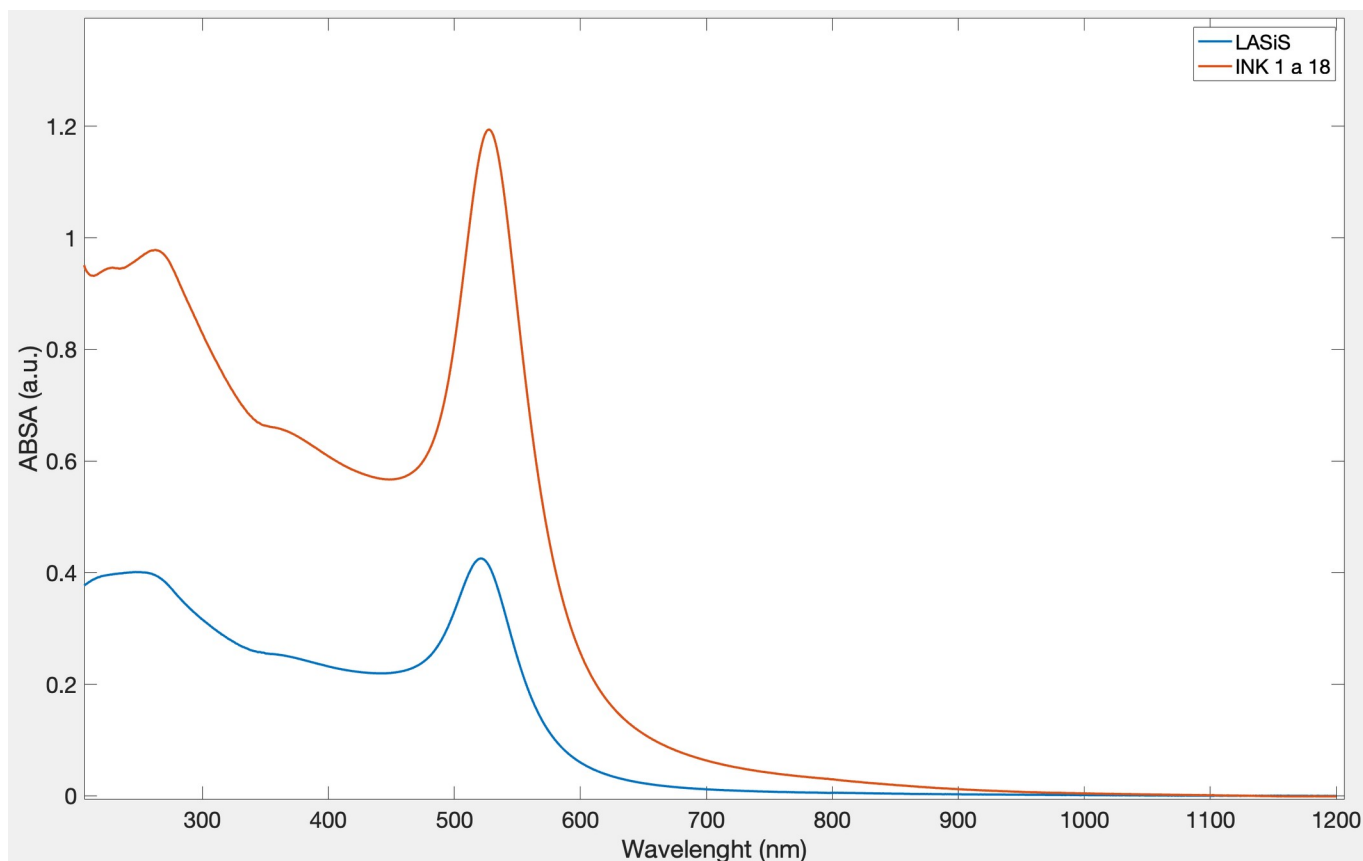


Figura 45: spettro UV-Vis-NIR delle LASiS di partenza (blu) e nell'inchiostro finale diluito 1 a 10 (rosso). Cella 0.1 cm

STAMPA E INCUBAZIONE CON NANOSTRUTTURE BIOTINILATE

Pulizia dei vetri e stampa

Prima di procedere alla stampa è stato necessario lavare i vetri da stampare. In questo senso è stato seguito il seguente protocollo:

- Sonicare per 40 minuti i vetri immersi in un'apposito tensioattivo;
- Sonicare per 30 minuti i vetri immersi in alcol isopropilico;
- Sonicare per 30 minuti i vetri immersi in acetone;
- Asciugare i vetri con azoto e conservarli in una capsula Petri sigillata con del parafilm.

La stampa è avvenuta effettuando prima una verifica del funzionamento della cartuccia caricando quest'ultima con dell'alcol isopropilico. Successivamente la cartuccia è stata caricata con l'inchiostro appena formulato e si è proceduto all'ottimizzazione dei parametri di stampa attraverso la telecamera della stampante. In particolare sono state settate condizioni tali affinché si ottenesse una goccia di inchiostro rotonda e priva di gocce satellite. Alla fine sono state adottate le seguenti condizioni di stampa:

- wafeworm "pendenza alta" (vedi **figura 46**)
- Voltaggio = 22 mV;
- Ugello 8.

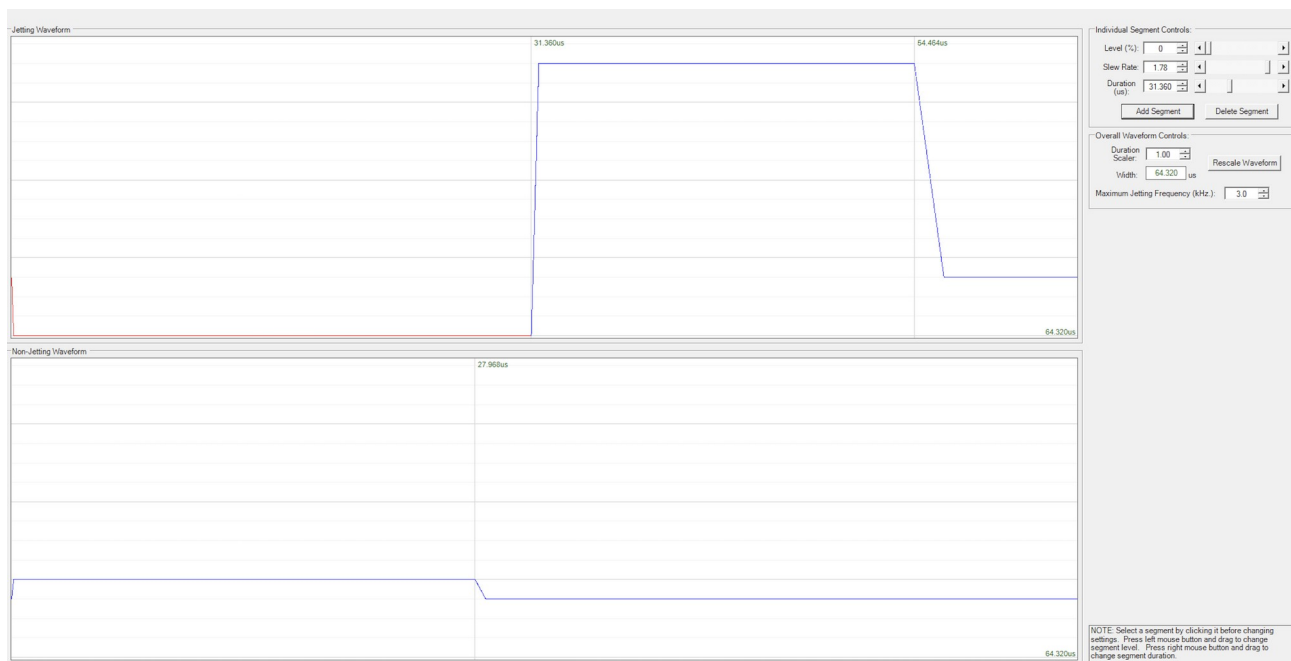


Figura 46: waveform utilizzata

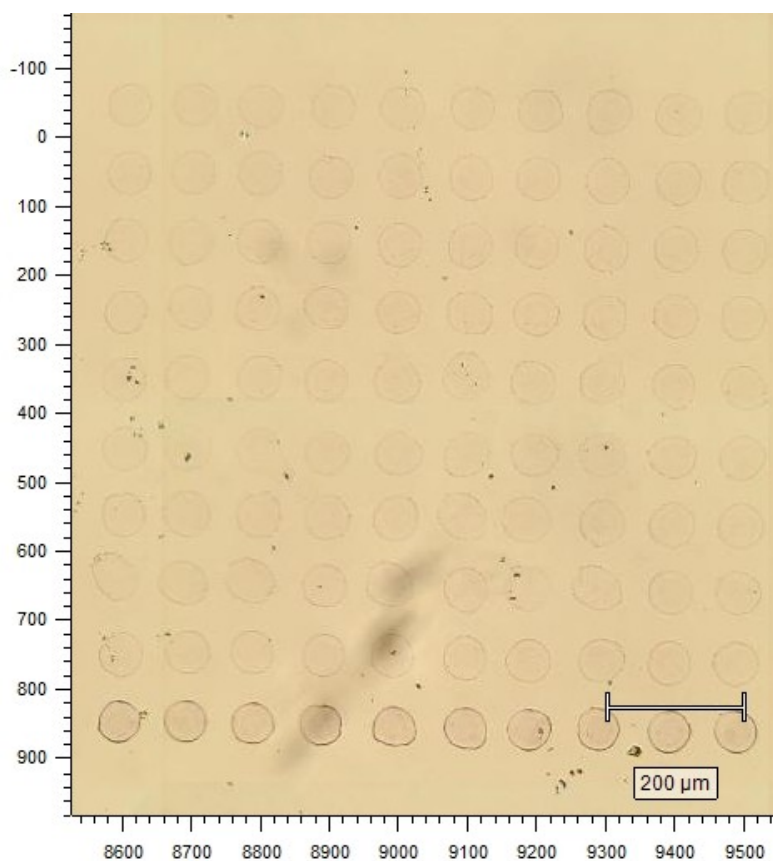


Figura 47: matrice di spot stampata prima dell'incubazione.

E' stato deciso di stampare 3 vetrini. In questo senso è stato prima selezionato il disegno di stampa e dopodiché è stata avviata la stampa alla stampa. Gli spot sono stati stampati in matrici 10x10 a partire da 6,5 mm dal punto di origine della stampa a una distanza di 9 mm l'una dall'altra. Questo ha permesso di stampare gli spots in modo che risultassero all'interno dei pozzetti di una mascherina in silicone successivamente applicata.

Incubazione con nanoparticelle biotinilate e analisi SERS

L'incubazione delle nanostrutture biotinilate è stata effettuata pretrattando per un minuto un pozzetto con 100 μ L di una soluzione 1 mg/mL di BSA in acqua di cui in seguito ne è stato lavato via l'eccesso con acqua. Sono poi stati aggiunti 200 μ L di un wash buffer (TRIS 25 mM, NaCl 150 mM, TWEEN 20 0,5% pH 7,2). Il pozzetto è stato svuotato ed è stato effettuato un altro lavaggio con la medesima procedura. Successivamente sono stati aggiunti 100 μ L della sospensione di nanostrutture biotinilate che sono stati lasciati in incubazione per due ore, coprendo il pozzetto con del parafilm all'interno di una Petri

sotto agitazione su un piano oscillante. Al termine dell'incubazione il pozzetto è stato nuovamente lavato con il wash buffer per due volte per rimuovere le nanostrutture rimaste sulla superficie del vetrino ed infine con acqua per rimuovere i residui di NaCl presente nel tampone.

Sono state registrate le mappe Raman di alcune porzioni di un pozzetto (**figura 48**) con le seguenti impostazioni del laser dello strumento: $\lambda = 633 \text{ nm}$, potenza = 10%, tempo di esposizione = 10 s. Le mappe sono state infine elaborate con il programma MATLAB "Mappe 2D", il quale ha permesso di avere una rappresentazione bidimensionale delle mappe ottenute.

Il vetrino è stato custodito a 4°C in una Petri sigillata con del parafilm e dopo due settimane, con una nuova incubazione, è stato verificato che gli spots con neutravidina erano ancora in grado di legare le nanostrutture biotinilate.

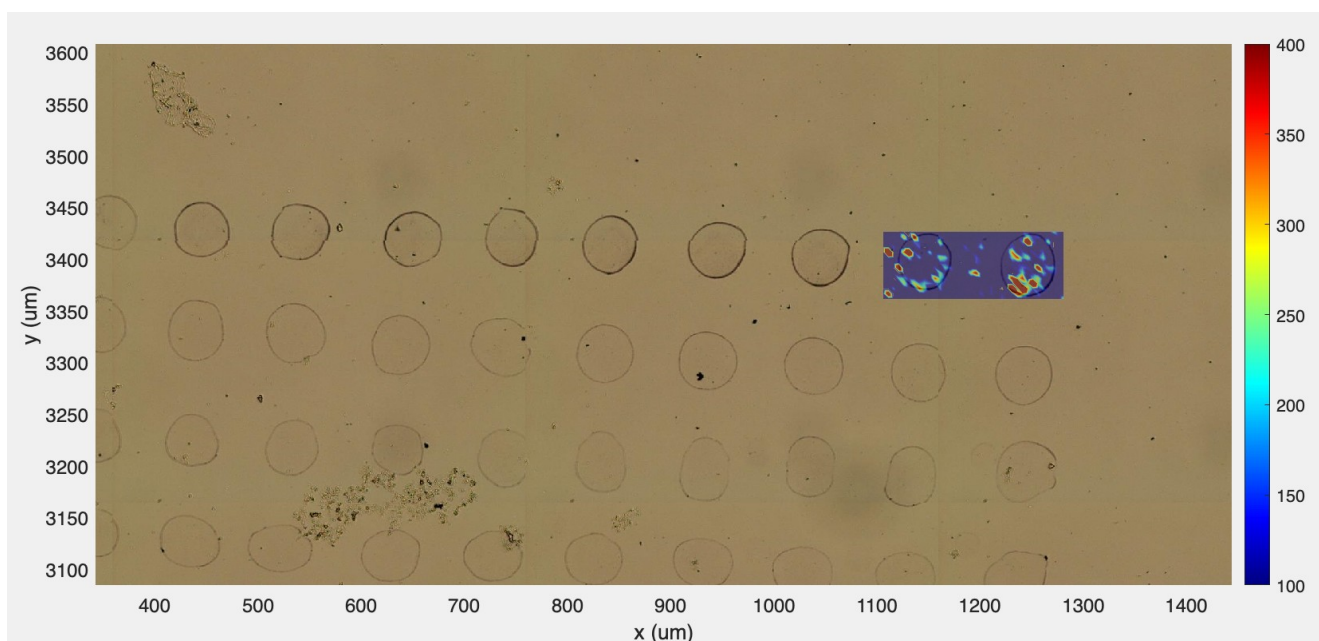


Figura 48: disposizione dei segnali di TR dopo l'incubazione con le nanostrutture biotinilate I segnali sopra i 100 count sono stati trascurati in quanto dovuti ad un rumore di fondo.

PREPARAZIONE DELLE NANOSTRUTTURE SERS FUNZIONALIZZATE CON FP3

A 1 mL di nanoparticelle LASiS 3,8 nM sono stati aggiunti 50 μL di soluzione di TR (34 μM in metanolo). Dopo una breve agitazione manuale, per rimuovere l'eccesso di SERS reporter, la sospensione è stata centrifugata a 5000 RCF per 10 min e il surnatante eliminato. Il precipitato è stato ripreso con 1 mL di una soluzione acquosa 121 μM di FP3 (PM c.ca 5500 Da). La sospensione è stata sonicata per un paio di minuti ed è stata

lasciata ad incubare per 20 minuti sonicando di quando in quando. Terminata l'incubazione il surnatante è stato allontanato tramite centrifugazione a 5000 RCF per 10 min e usato per calcolare la quantità di peptide legato sulle nanoparticelle. Dal confronto tra i valori di assorbanza a 280 nm della soluzione del peptide usata nell'incubazione e quella del surnatante (**figura 49**) è stato possibile avere una stima del peptide legato all'oro ovvero di 4000 peptidi per nanoparticella d'oro.

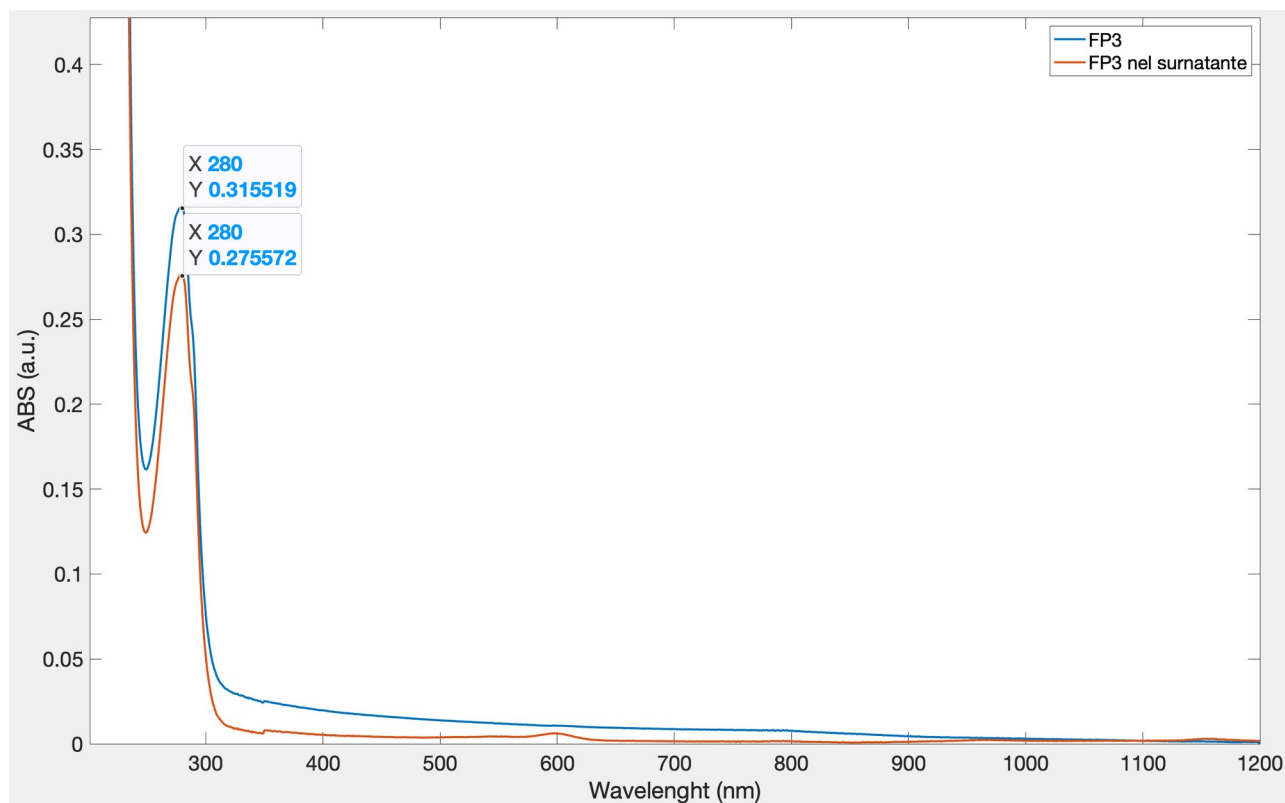


Figura 49: confronto tra gli spettri di estinzione del peptide tal quale (blu) e del surnatante contenente l'eccesso (arancione).

Dopo incubazione col peptide le nanoparticelle funzionalizzate sono state riprese con 1 mL di milliQ e dopo un ulteriore lavaggio per eliminare l'eccesso di peptide è stato registrato lo spettro UV-Vis-NIR (**figura 50**). La sospensione è stata centrifugata a 5000 RCF per 10 minuti ed il precipitato è stato sospeso in 1 mL di PBS e aggiunti 3 mg di BSA. Infine è stata effettuata una centrifugazione a 100 RCF per 1 minuto per allontanare le particelle più grandi precipitate sul fondo. Dopodiché il surnatante è stato raccolto e caratterizzato tramite spettroscopia UV-Vis-NIR, Raman, DLS e ζ -potential. La concentrazione finale di nanoparticelle d'oro è stata valutata pari a 630 pM.

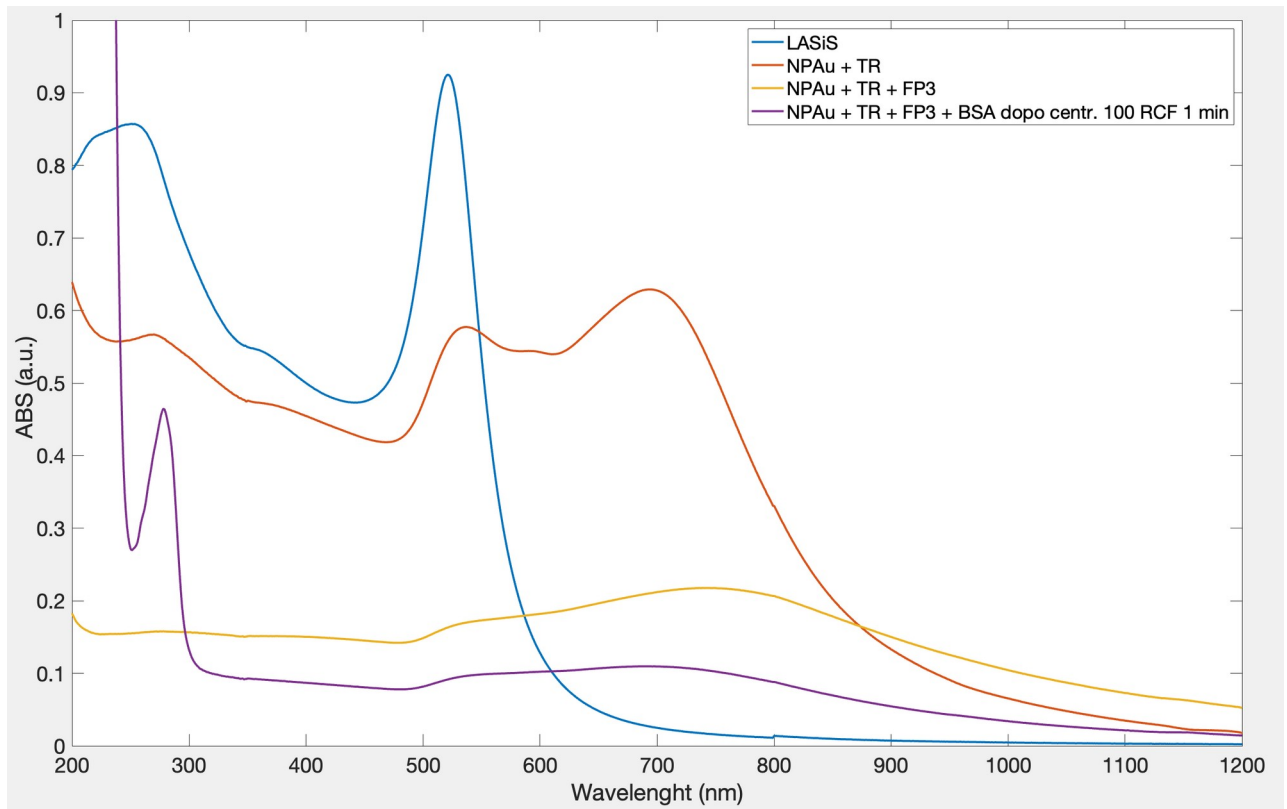


Figura 50 : spettri UV-Vis-NIR della preparazione della particelle SERS funzionalizzate con FP3

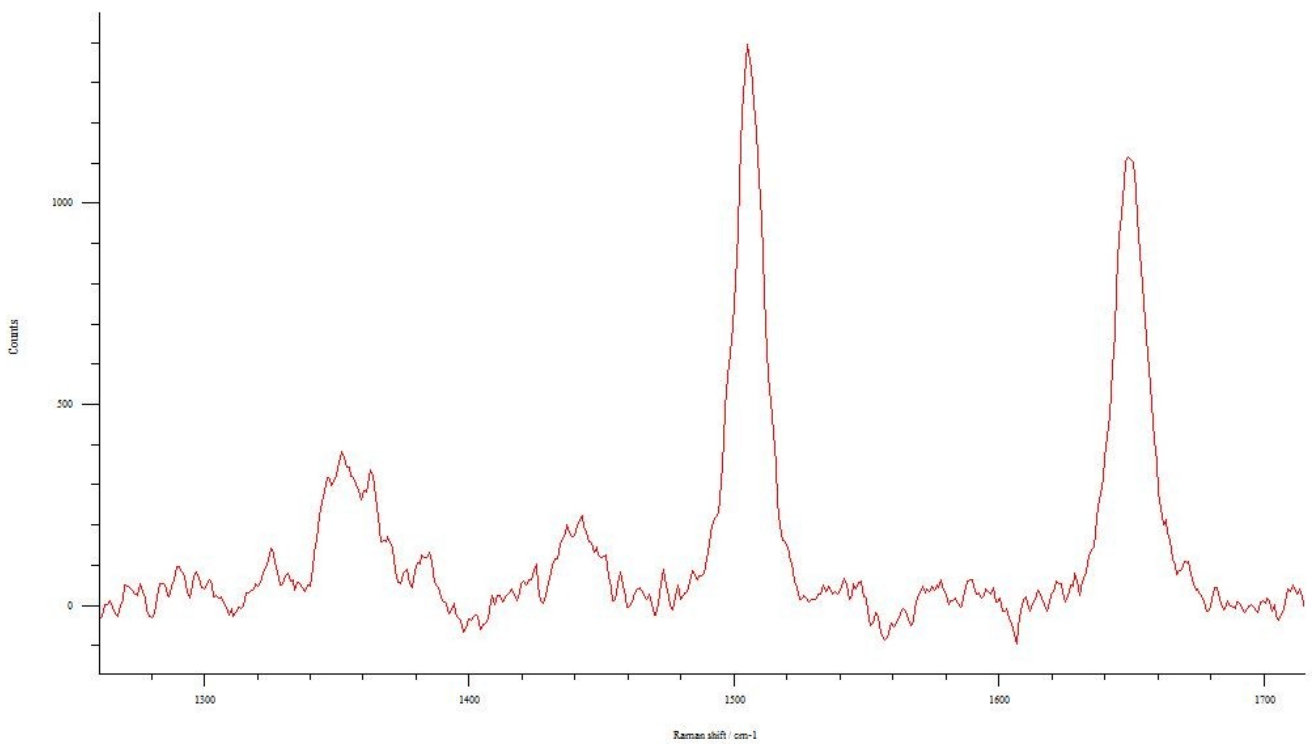


Figura 51: spettro Raman della sospensione di nanostrutture SERS funzionalizzate con FP3

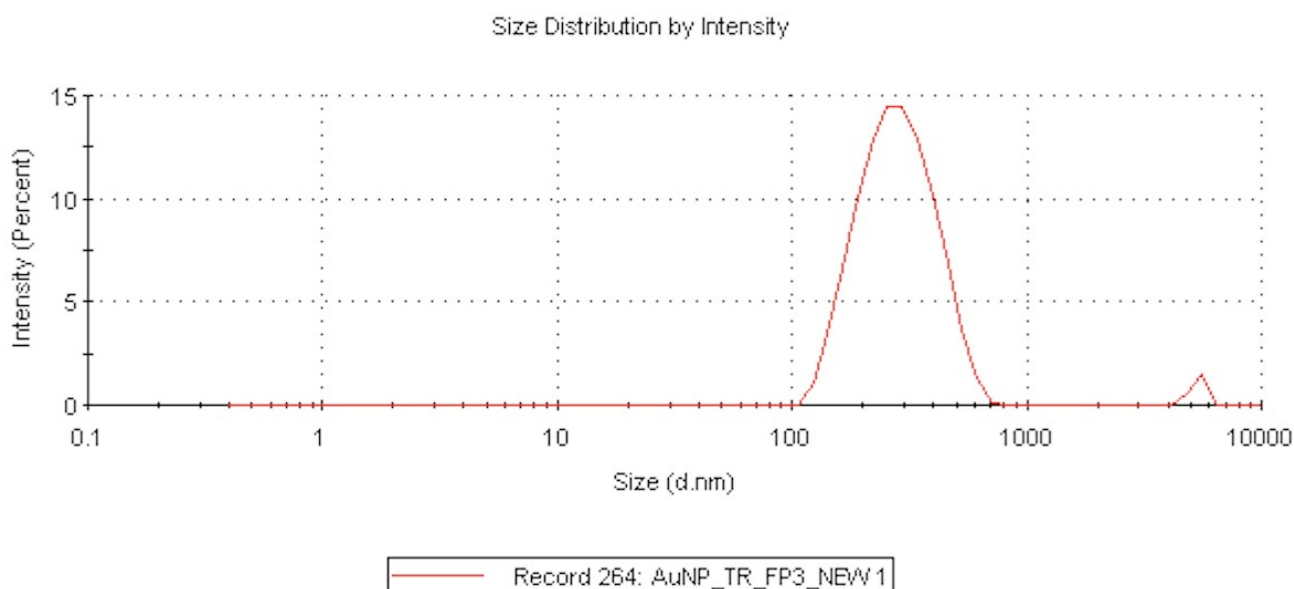


Figura 52: DLS della sospensione di nanoparticelle SERS funzionalizzate con FP3.

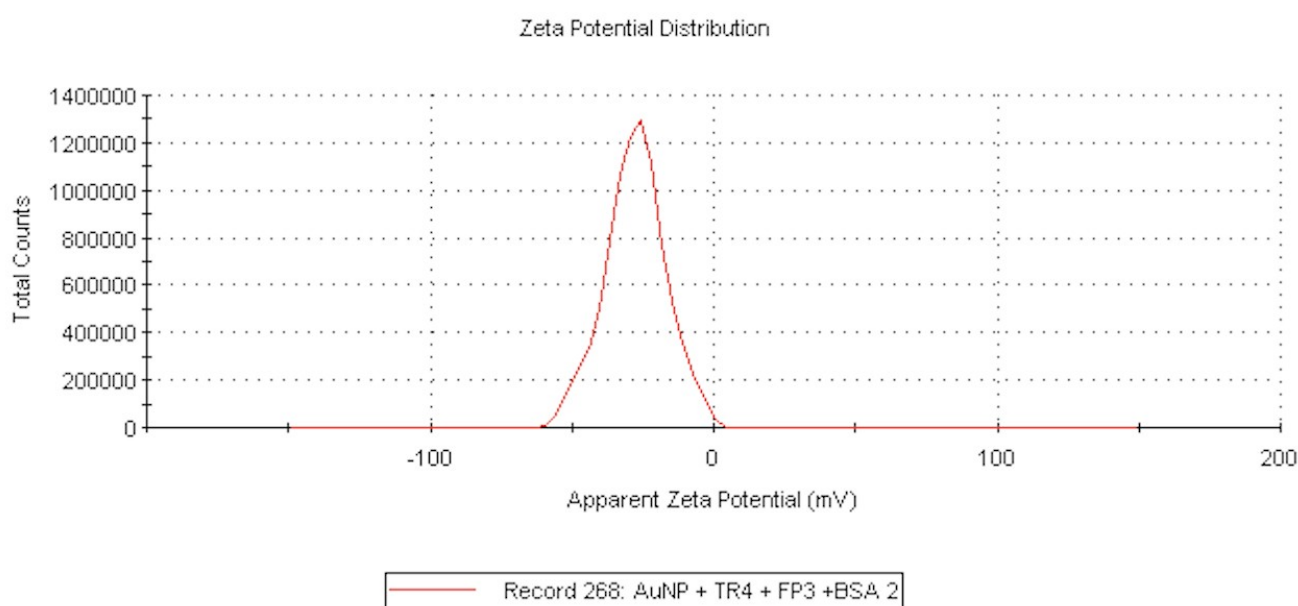


Figura 53: ζ -potential della sospensione di nanoparticelle SERS funzionalizzate con FP3.

Tabella 10: caratteristiche finali delle nanostrutture SERS funzionalizzate con FP3.

[NPAu]	Diametro idrodinamico medio	ζ -potential medio
630 pM	280 nm	-27 mV

INCUBAZIONE CON PD-L1 E ANALISI SERS

Incubazione con PD-L1

L'antigene PD-L1 biotinilato è stato legato alla neutravidina presente nei pozzetti di due tipi diversi di vetrini: quello su cui erano stati stampati gli spots di nanoparticelle d'oro e un vetrino commerciale modificato in superficie con neutravidina. I pozzetti sono prima stati pretrattati per 1 minuto con 100 μ L BSA (1 mg/mL), lavati con acqua e lavati ancora 2 volte con TRIS 25 mM, NaCl 150 mM, TWEEN 20 0,5% pH 7,2 (wash buffer).

100 μ L di una soluzione di PD-L1 biotinilato (2 μ g/mL) in PBS sono stati aggiunti ad un pozzetto su ciascun vetrino e i vetrini sono stati lasciati sotto blanda agitazione per un'ora in una capsula Petri. Sul vetrino commerciale un secondo pozzetto è stato pretrattato con BSA ma non è stato incubato con PD-L1. Dopo l'incubazione i pozzetti sono stati lavati (x 3 volte) con il wash buffer, dopodiché tutti e tre i pozzetti sono stati l'incubati con le nanostrutture SERS funzionalizzate con FP3 per due ore in agitazione. I pozzetti sono stati infine lavati vigorosamente con il wash buffer per rimuovere le nanostrutture non legate e poi con acqua per rimuovere i residui di sale.

Analisi SERS

Sono state registrate le mappe Raman dei pozzetti con le seguenti impostazioni del laser: $\lambda = 633$ nm, potenza = 10%, tempo di esposizione = 10 s, obiettivo 10x. Le mappe sono poi state elaborate con il programma MATLAB Mappe2D. In **figura 54** è mostrata la mappa ottenuta dal pozzetto del vetrino commerciale incubato con PD-L1 e in **figura 55** quella sul pozzetto non trattato con PD-L1.

Sul vetrino contenente gli spots d'oro funzionalizzati con PD-L1 le mappe sono state raccolte selezionando 200 punti, sia dentro che tra gli spots. Sono state utilizzate le impostazioni del laser: $\lambda = 633$ nm, potenza = 10%, tempo di esposizione = 10 s, obiettivo 10x. Le mappe sono poi state elaborate con il programma MATLAB Mappe2D e sono mostrate in **figura 56** (segnali sugli spots) e **figura 57** (segnali tra gli spots).

Il programma ha permesso di ottenere i coefficienti di Pearson R (0-1, 1 correlazione completa) che consentono di valutare la corrispondenza di uno spettro raccolto con uno spettro di riferimento. Valori superiori a 0,6 sono stati considerati indicare una buona correlazione con lo spettro di riferimento, che nel presente caso è lo spettro SERS del TR.

In figura 59 e 60 vengono riportati i coefficienti R contro l'intensità dei segnali. Come si può notare, il valore di 0,6, consente di considerare segnali con sufficiente intensità.

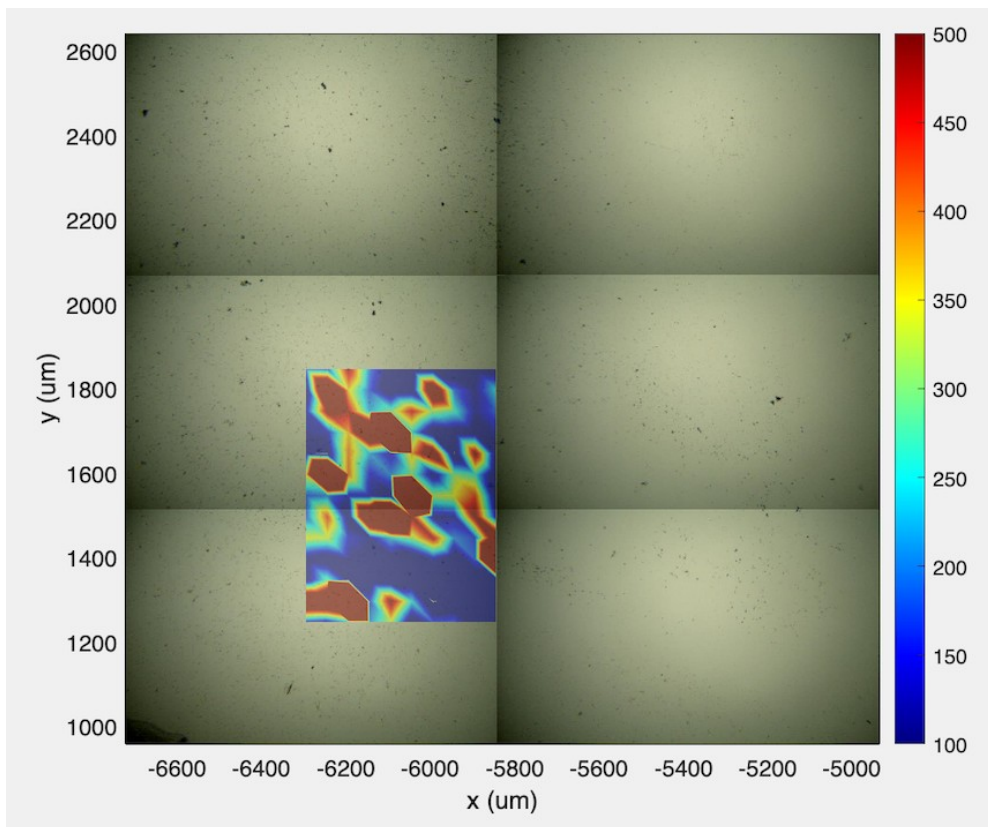


Figura 54 : disposizione dei segnali della mappa eseguita sul pozzetto del vetrino modificato con neutravidina incubato con PD-L1.

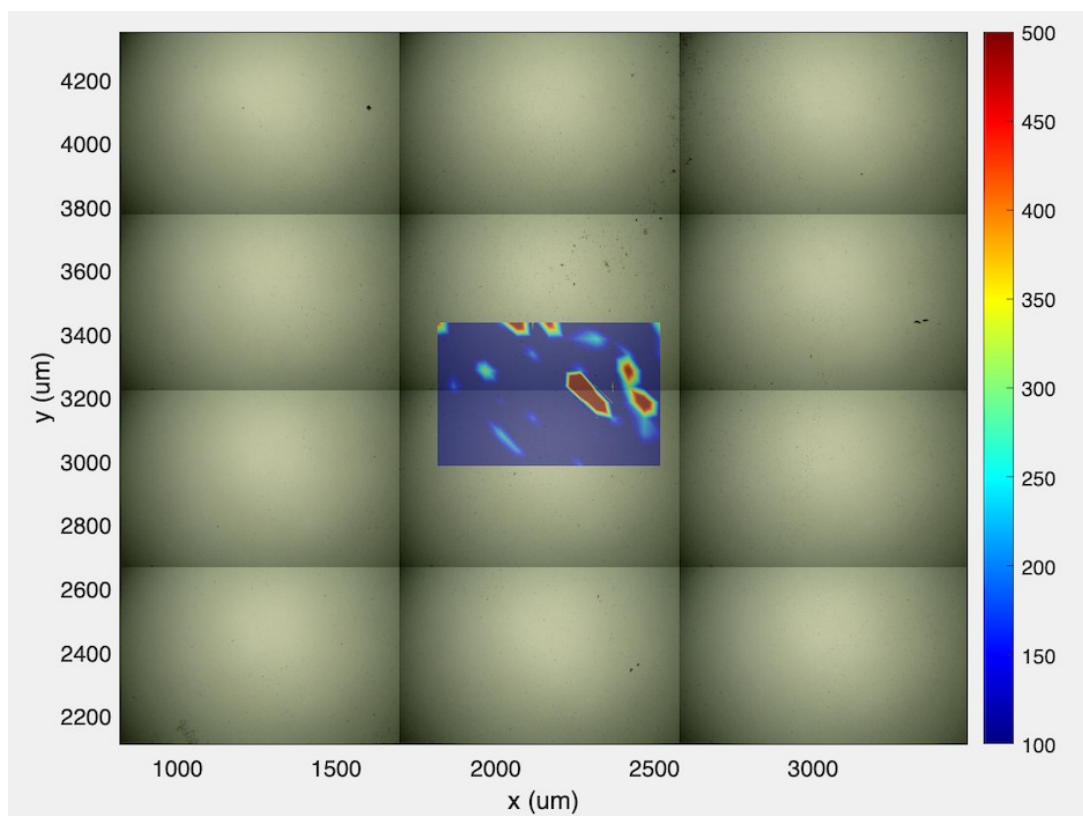


Figura 55: disposizione dei segnali (sopra) della mappa eseguita sul pozzetto del vetrino saturato con neutravidina **non** incubato con PD-L1.

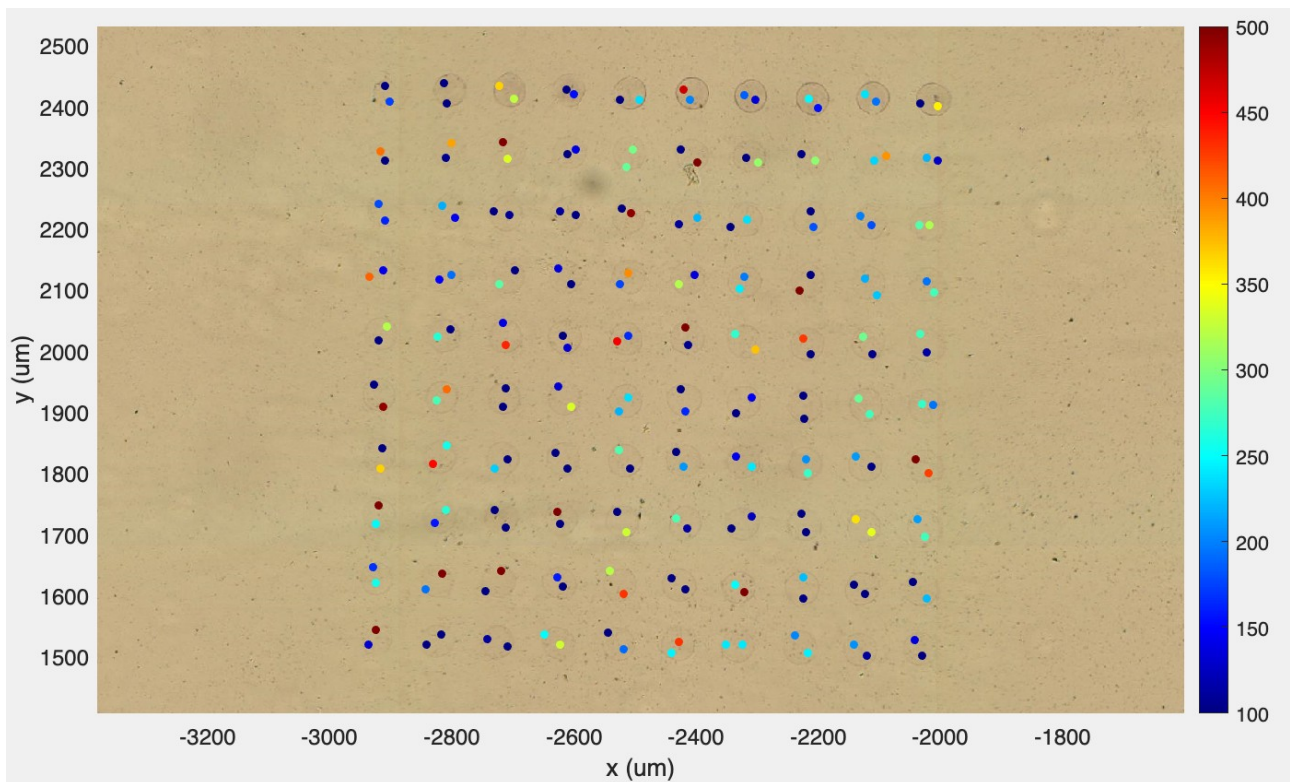


Figura 56: disposizione dei segnali della mappa acquisita sugli spots del vetrino stampato con l'inchiostro formulato e incubato prima con PD-L1 e poi con nanostrutture SERS funzionalizzate con FP3.

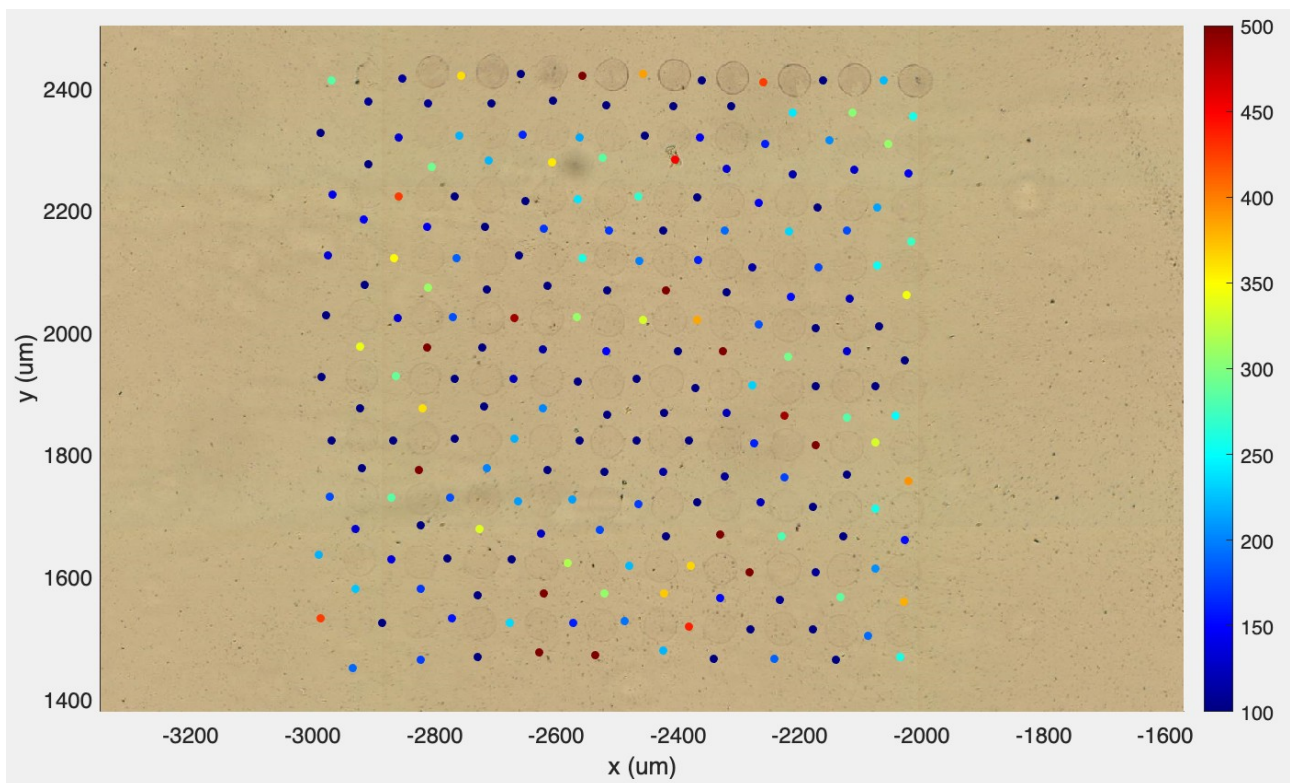


Figura 57: disposizione dei segnali della mappa acquisita tra e fuori dagli spots del vetrino stampato con l'inchiostro formulato e incubato prima con PD-L1 e poi con nanostrutture SERS funzionalizzate con FP3.

Per le mappe acquisite sugli spots sono stati trovati 120 spettri su 200 (60%) con una correlazione positiva.

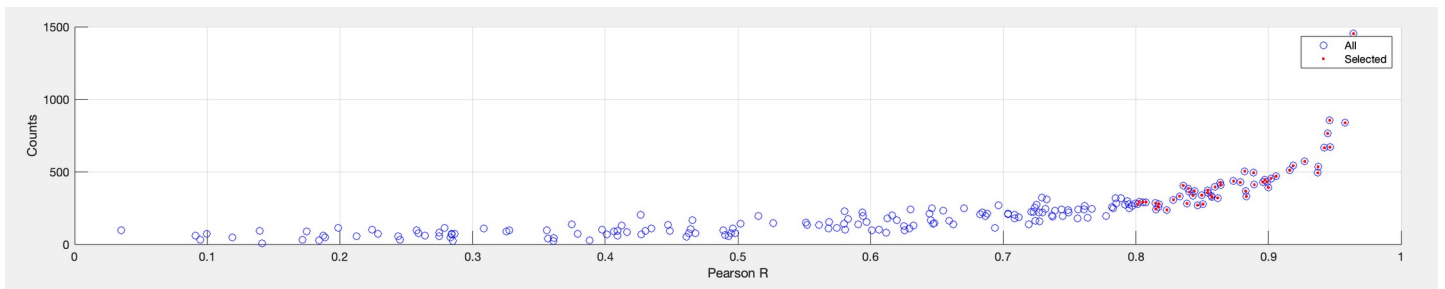


Figura 58: valori di Pearson R degli spettri raccolti sugli spots vs intensità

Per le mappe acquisite tra gli spots invece sono stati trovati 94 spettri su 200 (47%) con una correlazione positiva

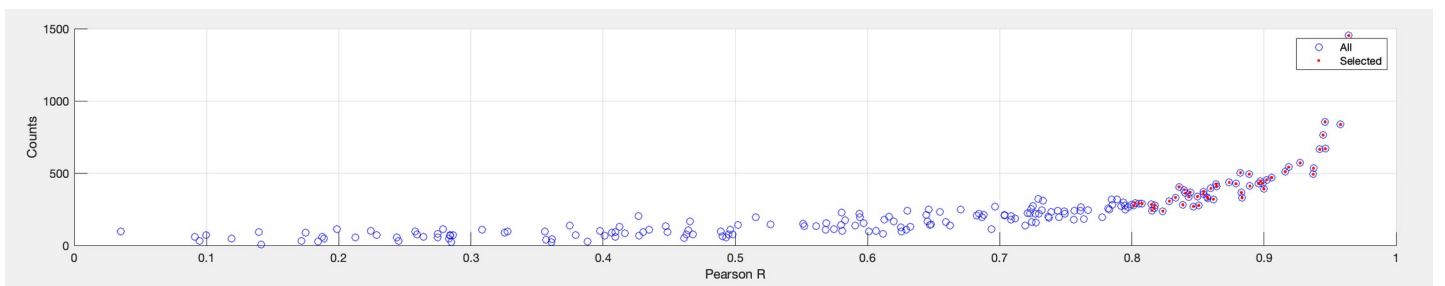


Figura 59: valori di Pearson R degli spettri raccolti tra gli spots vs intensità

BIBLIOGRAFIA

1. S. Tinkle, S. E. McNeil, S. Mu-hlebach, R. Bawa, G. Borchard, Y. Barenholz, Lawrence Tamarkin, N. Desai, Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap, *Annals of the New York Academy of Science*, pp. 1313-1335, 2014.
2. C. Guanying, R. Indrajit, Y. Yang, and Paras N. Prasad, Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy, *Chemical Reviews*, 116 (5), pp 2826-2885, 2016.
3. P. Sharma, S. Brown, G. Walter, S. Santra, B. Moudgil, Nanoparticles for bioimaging. *Advance Colloid Interface Science* 123–126, pp. 471–485, 2006.
4. M. E. Davis, Z. Chen, D. M. Shin, Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7 (9), pp. 771–782, 2008.
5. G. Partha, H. Gang, D. Mrinmoy, K. Chae Kyu, V. M. Rotello, Gold nanoparticles in delivery applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, pp. 1307–1315, 2008
6. N. T. Flynn, T. N. T Tran, M. J. Cima, R. Langer, Long-term stability of self-assembled monolayers in biological media, *Langmuir*, Vol 19 (26), pp 10909-10915, 2003.
7. D. L. Kokkin, R. Zhang, T. C. Steimle*, I. A. Wyse, B. W. Pearlman, and T. D. Varberg, Au-S Bonding Revealed from the Characterization of Diatomic Gold Sulfide, AuS, *The journal of physical chemistry*, Vol 119 (48), pp. 11659-11667, 2015.
8. S. K. Ghosh, T. Pal, Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications, *Chemistry Review*, Vol. 107, pp 4797-4862, 2007.
9. W. Xie, S. Schlücker, Rationally designed multifunctional plasmonic nanostructures for surface-enhanced Raman spectroscopy: a review, *Report on progress in physics*, 77, 2014.
10. G. McNay, D. Eustance, W. E. Smith, Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERS): A Review of Applications, *Applied spectroscopy*, Vol 65 (8), pp. 825-837, 2011.
11. L. A. Lane, X. Qian, S. Nie, SERS Nanoparticles in Medicine: From Label-Free Detection to Spectroscopic Tagging, *Chemical review*, 115(19), pp. 10489-10529, 2015.
12. D. Cialla-May, X.-S. Zheng, K. Weberabc, J. Popp, Recent progress in surface-enhanced Raman spectroscopy for biological and biomedical applications: from cells to clinics, *Chemical Society Reviews*, 46, 2017.

13. F. Biscaglia, S. Rajendran, P. Conflitti, C. Benna, R. Sommaggio, L. Litti, S. Mocellin, G. Bocchinfuso, A. Rosato, A. Palleschi, D. Nitti, M. Gobbo, M. Meneghetti, Enhanced EGFR Targeting Activity of Plasmonic Nanostructures with Engineered GE11 Peptide, *Advanced Healthcare Materials*, 2017.
14. E. Engval, P. Perlmann, Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, *The journal of immunology*, Vol. 109 No.1, 1972.
15. L. Wide, H. Bennish, S. G. Johansson, Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies, *Lancet*, 1967.
16. G. Büyükköroğlu, B. Şenel, Engineering of monoclonal antibodies, *Omics Technologies and Bio-Engineering*, 2018.
17. R. W. Rauterberg, E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with covalently bound protein on glass tubes: 1. Stable antigenicity and binding of IgG as a model antigen after repeated use. *Immunobiology* 166(1), pp. 24-34, 01/1984.
18. J. R. Crowther, ELISA: Theory and Practice. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 42, Humana Press, pp. 35–62, 1995.
19. A. V. Lin, Indirect ELISA, *Methods in molecular biology*, 1318, pp 51-59, 2015.
20. S. D. Schmidt, M. J. Mazzella, R. A. Nixon, P. M. Mathews, A β measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Methods in Molecular biology*, Vol 849, pp 507-527, 2012.
21. J. Yang, L. Hu, Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: From antibodies to small molecules, *Medical Research Review*, 39, pp. 265-301, 2019.
22. A. T. Marttila, O. H. Laitinen, K. J. Airene, T. Kulik, E. A. Bayer, M. Wilchek, M. S. Kulomaa, Recombinant Neutralite Avidin: a non-glycosylated, acidic mutant of chicken avidin that exhibits high affinity for biotin and low non-specific binding properties, *FEBS Letters*, 467, pp. 31-36, 2000.
23. O. Livnah, E.A. Bayer, M. Wilchek, J. L. Sussman, Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1;90(11), pp 5076-5080, June 1993.
24. S. Izrailev, S. Stepaniants, M. Balsera, Y. Oono, K. Schulten, Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex, *Biophys J*. 72(4), pp 1568-1581, April 1997.
25. R. Barbucci, A. Magnani, C. Roncolini, S. Silvestri, Antigen-antibody recognition by Fourier transform IR spectroscopy/attenuated total reflection studies: biotin-avidin complex as an example. *Biopolymers* 31(7), pp. 827-834, June 1991.

26. T. Lakshmipriya, S. C. B. Gopinath, U. Hashim, T-H Tang, Signal enhancement in ELISA: Biotin-streptavidin technology against gold nanoparticles, *Journal of Taibah University Medical Sciences* 11(5), pp. 432-438, 2016.
27. A. Jain, A. Barve, Z. Zhao, W. Jin, K. Cheng*, Comparison of avidin, neutravidin, and streptavidin as nanocarriers for efficient siRNA Delivery, *Molecular Pharmaceutics*, 14(5), pp. 1517-1527, 2017.
28. V. Amendola, M. Meneghetti, Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11, pp. 3805- 3821, 2009.
29. R. O. T. Mendieta, Synthesis of colloidal nanomaterials through femtosecond laser ablation, *Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales Universitat Jaume I*, 2016
30. A. Fojtik, A. Henglein, Laser ablation of films and suspended particles in a solvent: formation of cluster and colloid solution, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 97 (2), pp. 252-254, 1993.
31. J. Sylvestre, S. Poulin, A. V. Kabashin, E. Sacher, M. Meunier, J. H. T. Luong, Surface Chemistry of Gold Nanoparticles Produced by Laser Ablation in Aqueous Media, *Journal of Physical Chemistry*, 108, pp. 16864-16869, 2004.
32. D. Perez,¹ L. K. Béland, D. Deryng, L. J. Lewis, M. Meunier, Numerical study of the thermal ablation of wet solids by ultrashort laser pulses, *Physical Review*, 77, pp. 14108-14116, 2008.
33. F. Biscaglia, I. Caliguri, F. Rizzolio, G. Ripani, A. Palleschi, M. Meneghetti, M. Gobbo, Protection against proteolysis of a targeting peptide on gold nanostructures, *Nanoscale*, 23, 2021.
34. L. Litti, M. Meneghetti, Predictions on the SERS enhancement factor of gold nanosphere aggregate samples, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21, pp. 15515-15522, 2019.
35. M. Meneghetti, A. Scarsi, L. Litti, G. Marcolongo, V. Amendola, M. Gobbo, M. Di Chio, A. Boscaini, G. Fracasso, M. Colombatti, Plasmonic Nanostructures for SERS Multiplexed Identification of Tumor-Associated Antigens, *Small*, 8(24), pp. 3733-3738, 2012.
36. L. An, J. Deng, L. Zhou, H. Li, F. Chen, H. Wang, Y. Liu, Simultaneous spectrophotometric determination of trace amount of malachite green and crystal violet in water after cloud point extraction using partial least squares regression, *Journal of Hazard Materials*, 175 (1-3), pp. 883-888, 2010.

37. R. B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis I The synthesis of a tetrapeptide, Contribution from the Rockefeller Institute, 85, pp.2149-2154, 1963.
38. L.A. Carpino, G.Y. Han, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group, Journal of Organic Chemistry, 37 (22), pp. 3404–3409, 1972
39. J. M. Palomo, Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. RSC Advances, 4 (62), pp. 32658- 32672, 2014
40. G.B. Fields, R.L Noble, Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids, International Journal of Peptide and Protein Research, pp. 161–214, 1990.
41. A. K. Jan, Surface and thermodynamic study of micellization of non ionic surfactant, Journal of Materials and Environmental Science, 8(4), 2018.
42. S. Muller, Synthetic Peptides as Antigens, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 1999.
43. R. Chadda, J.L. Robertson, Single-Molecule Enzymology: Fluorescence-Based and High-Throughput Methods, Methods in Enzymology, 2016.
44. D. K. Chou, R. Krishnamurthy, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, M. C. Manning, Effects of Tween 20 and Tween 80 on the stability of Albutropin during agitation, Journal of Pharmaceutical Sciences, 94 (6), pp. 1368 - 1381, 2005.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i prof. Marina Gobbo e Moreno Meneghetti per il costante supporto e dedizione dedicati nella realizzazione di questo progetto.

Si ringrazia il Dr. Lucio Litti per aver messo a disposizione di questo progetto i programmi MATLAB utilizzati per l'elaborazione di mappe Raman e spettri UV-Vis-NIR.

Si ringrazia Anna Mercedi del NOL per il supporto operativo dato.

Si ringrazia il prof. Flavio Maran per aver messo a disposizione la stampante 2D DIMATRIX MATERIALS e la relativa attrezzatura per la stampa.

Si ringrazia il prof. Fabrizio Mancin per aver messo a disposizione lo strumento DLS Nano-Zetasizer e le relative attrezzature per svolgere le misure DLS e ζ -potential.

Ringrazio Valentina Concato per il grande supporto morale e mio padre e mia madre per avermi dato l'opportunità di seguire questo percorso di studi.