



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN
INGEGNERIA DEI MATERIALI**

**PEPTIDI AUTO-ASSEMBLANTI NELLA FORMULAZIONE
DI NANOFIBRE POLIMERICHE ORIENTATE PER LA
RIPARAZIONE DEL TESSUTO NERVOSO**

Relatore: Prof.ssa Monica Dettin
Correlatore: Dott.ssa Dorothee Hodde

Laureando: GIANLUCA BISON

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

Riassunto

I danni al sistema nervoso centrale, che affliggono milioni di persone ogni anno, spesso producono conseguenze devastanti, come la paralisi totale o parziale.

In questo lavoro di tesi si discute delle strategie messe a punto nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti per ottenere la guarigione delle lesioni a carico del sistema nervoso.

La presente tesi sperimentale ha riguardato la preparazione di peptidi auto-assemblanti (SAP) con cui ottenere delle fibre nanometriche ibride di policaprolattone e SAP mediante elettrofilatura. Tali fibre opportunamente allineate e immerse in idrogeli di fibrina dovevano costituire le linee guida di crescita per le cellule di Schwann.

I saggi biologici per verificare l'orientamento delle cellule di Schwann sono stati eseguiti presso l'Istituto di Neuropatologia dell'Ospedale Universitario di Aachen (Dott.ssa D. Hodde) nell'ambito di una collaborazione scientifica con il Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Padova (Prof.ssa M. Dettin).

Indice

CAPITOLO 1 – Introduzione	1
1.1 I BIOMATERIALI	1
1.2 L'INGEGNERIA TISSUTALE	3
1.3 LA FUNZIONALIZZAZIONE BIOCHIMICA DEI BIOMATERIALI	5
1.4 IL SISTEMA NERVOSO	7
1.4.1 Organizzazione e struttura del sistema nervoso.....	7
1.4.2 Gli elementi del sistema nervoso centrale.....	8
1.4.2.1 I neuroni.....	8
1.4.2.2 Le cellule gliali	10
1.4.3 Le cellule di Schwann.....	11
1.4.3.1 Il trapianto e la rigenerazione delle cellule di Schwann.....	12
1.5 L'ADESIONE CELLULARE.....	14
1.6 PEPTIDI AUTO-ASSEMBLANTI.....	16
1.7 ECM E SCAFFOLD PER IL SISTEMA NERVOSO.....	18
1.7.1 Le potenzialità offerte dalle nanofibre.....	19
1.7.1.1 La fibrina.....	20
1.7.1.2 L' ϵ -policaprolattone.....	20
1.7.2 Funzionalizzazione di fibre elettrofilate con sequenze adesive	21
1.7.3 Utilizzo dei SAP nella rigenerazione neurale.....	22
1.7.4 Rigenerazione dei nervi periferici mediante guide neurali artificiali.....	23
1.7.5 Electrospinning	25
1.7.6 Matrici ibride elettrofilate di SAP e PCL	27
1.8 SCOPO DELLA TESI	29
CAPITOLO 2 – Materiali, Strumenti e Metodi	31
2.1 MATERIALI.....	31
2.1.1 Reagenti.....	31
2.1.2 Peptide sintetizzato per la funzionalizzazione.....	33
2.2 STRUMENTI.....	34
2.2.1 Sintetizzatore per sintesi peptidica su fase solida.....	34
2.2.2 Test alla ninidrina e test alla piperidina.....	34

2.2.3 Cromatografia.....	35
2.2.4 Analisi di massa.....	36
2.2.5 Analisi di dicroismo circolare (CD).....	36
2.2.6 Analisi amminoacidica.....	36
2.3 METODI	37
2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida.....	37
2.3.1.1 Test sulla resa di funzionalizzazione della resina.....	40
2.3.1.2 Attivazione del gruppo carbossilico.....	42
2.3.1.3 Test alla ninidrina.....	42
2.3.1.4 Sblocco del peptide dalla resina.....	44
2.3.2 Purificazione mediante caratterizzazione cromatografica.....	45
2.3.3 Spettroscopia UV/Vis.....	47
2.3.4 Spettrometria di massa.....	48
2.3.5 Dicroismo circolare.....	51
2.3.6 Analisi amminoacidica.....	56
CAPITOLO 3 – Parte sperimentale.....	59
3.1 SINTESI PEPTIDICA.....	59
3.1.1 Purificazione del peptide EAK.....	59
3.1.2 Sintesi del peptide RGD-EAK.....	62
3.1.3 Caratterizzazione del peptide RGD-EAK.....	64
3.1.4 Purificazione del peptide RGD-EAK.....	67
3.1.5 Sintesi del peptide RGD-EAK-IKVAV	69
3.1.6 Caratterizzazione del peptide RGD-EAK-IKVAV	71
3.1.7 Purificazione del peptide RGD-EAK-IKVAV	71
3.2 STUDI CONFORMAZIONALI DEI PEPTIDI TRAMITE CD.....	76
3.2.1 Risultati e discussione.....	77
3.3 PREPARAZIONE DEGLI SCAFFOLDS BI E TRI-DIMENSIONALI.....	79
3.4 CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA.....	82
3.4.1 Orientamento delle cellule di Schwann nello scaffold 3D di nanofibre allineate di PCL immerse in idrogel di fibrina.....	82
3.4.2 Orientamento delle cellule di Schwann nello scaffold 3D di nanofibre allineate di PCL+SAP immerse in idrogel di fibrina.....	83
3.4.3 Saggi di adesione.....	85

3.4.4 Saggi per valutare l'allungamento.....	87
3.5 DISCUSSIONE.....	88
CONCLUSIONI.....	91
NOMENCLATURA.....	93
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	97
RINGRAZIAMENTI.....	103

Capitolo 1

Introduzione

1.1 I Biomateriali

I traumi costituiscono una delle principali cause di morte della popolazione mondiale e la principale causa di decessi nella popolazione giovanile dei paesi industrializzati. L'alta incidenza dei traumatismi come causa di decesso o di danni fisici, cognitivi e comportamentali permanenti costituisce un grave problema per la società e un pesante onere economico, sociale e psicologico che coinvolge non solo le vittime, ma anche i familiari e il sistema sanitario [1].

Una delle sfide più importanti della moderna medicina è rappresentata dalla realizzazione di nuove tecniche biomediche per la ricostruzione o la sostituzione di organi o tessuti danneggiati da malattie o traumi. In questi casi, fino a poco tempo fa, i soli interventi a disposizione erano il trattamento farmacologico, la chirurgia ricostruttiva, l'utilizzo di protesi artificiali e il trapianto (autologo o eterologo). Nonostante in tutti questi ambiti siano stati compiuti enormi progressi, tutte queste terapie presentano ancora limitazioni e problemi ancora irrisolti tra cui: (i) per i trapianti eterologhi la scarsa disponibilità di donatori, la possibile trasmissione di patologie infettive, il fenomeno del rigetto e la terapia con immunosoppressori che può indebolire l'organismo e renderlo suscettibile ad altre malattie; (ii) per i trapianti autologhi la possibilità di infezioni, l'insorgenza di dolori cronici e la necessità di chirurgia secondaria; (iii) per le protesi artificiali la difficile compensazione della funzionalità perduta; (iv) per la chirurgia ricostruttiva l'invasività e la scarsa soddisfazione dei risultati ottenuti.

Da tutto ciò è nata l'esigenza di affrontare questa problematica sotto nuovi punti di vista: da qui nasce il concetto di biomateriale, legato cioè alla concezione del corpo umano come

“macchina” e come tale risulta quindi possibile la sua riparazione attraverso la sostituzione o il ripristino delle parti non più funzionanti [2].

È oggi largamente accettata una definizione di carattere operativo e funzionale che indica i biomateriali come “*i materiali sintetici progettati per un uso prolungato a contatto con mezzi biologici, minimizzando le eventuali reazioni avverse da parte dell’organismo*” [2].

Biomateriali sono dunque tutti quei materiali specificatamente progettati o utilizzati in applicazioni biomediche che costituiscono i componenti delle protesi.

La storia dei biomateriali può essere riassunta in tre tappe fondamentali:

- Biomateriali di **prima generazione**: la caratteristica fondamentale del materiale è di essere *bioinerte*, ovvero di minimizzare le interazioni chimico/fisiche tra organismo e materiale.
- Biomateriali di **seconda generazione**: il materiale deve essere *bioattivo*, ovvero si deve integrare velocemente con l’organismo provocando azioni e reazioni controllate nell’ambiente fisiologico, o *riassorbibile*, se viene gradualmente degradato nell’organismo, senza causare problemi di rigetto o tossicità.
- Biomateriali di **terza generazione**: il materiale deve essere sia *bioattivo* sia *riassorbibile*; rappresentano il presente e il futuro dei biomateriali.

I biomateriali di terza generazione sono definiti materiali *biomimetici*, in quanto interagiscono con i tessuti adiacenti attraverso meccanismi di riconoscimento biomolecolare “suggerendo” alle cellule il modo in cui devono agire. Sono cioè materiali che presentano una superficie opportunamente trattata con ancorate delle molecole dotate di attività biologica; queste molecole, una volta identificate dalle cellule mediante i recettori di membrana, inducono comportamenti specifici [3].

Nella progettazione di materiali biomimetici il riconoscimento biomolecolare dei materiali da parte delle cellule può essere ottenuto attraverso due strategie: un primo approccio consiste nel dotare i biomateriali di bioattività tramite l’incorporazione di molecole solubili, come fattori di crescita o DNA plasmidico, in *carriers* cosicché le molecole bioattive possano essere rilasciate dal materiale e promuovere o modulare la formazione di nuovo tessuto [4-5]; l’altro approccio riguarda l’incorporazione di proteine o peptidi in grado di legare le cellule sulla superficie o all’interno di biomateriali attraverso modifiche chimiche o fisiche.

L'uso di proteine intere risulta tuttavia limitato dalla scarsa stabilità, dall'elevato costo e, a volte, dalla difficoltà nel reperire i materiali. Per ovviare a tali problemi è stata messa a punto una strategia, nota come *peptide mimicry*, che offre la possibilità di individuare frammenti delle proteine native in grado di mantenere, almeno in parte, l'attività biologica propria della proteina intera. Brevi sequenze peptidiche possono essere sintetizzate per via chimica in grandi quantità e purificate fino ad elevati gradi di omogeneità. I peptidi sono economicamente più accessibili, possono essere conservati più a lungo e più facilmente delle proteine da cui derivano, in quanto più stabili e in genere maggiormente solubili in ambiente acquoso. Inoltre, possono essere opportunamente modificati per aumentarne la stabilità rispetto alla degradazione proteolitica.

Vari materiali sono stati impiegati nell'implantologia in campo medico durante gran parte del XX secolo. Nonostante si sia assistito ad un ovvio miglioramento nel tempo in quanto a sofisticazione e qualità delle materie prime, solo durante gli ultimi vent'anni si è verificata una rivoluzione nell'approccio ai concetti di materiali per protesi mediche. Secondo il vecchio approccio le protesi venivano costruite con materiali sintetici, come ad esempio il polietilene o ceramici ricoperti di titanio in associazione col polietilene, a basso coefficiente di frizione, massima inerzia e capacità minima di indurre irritazioni.

Tuttavia, vari studi hanno dimostrato che l'impiego di materiali inerti, che non innescano alcuna reazione nell'organismo ospite, né di rifiuto né di riconoscimento, non ha portato a buoni risultati. Nessun dispositivo che sia tollerato passivamente dall'organismo e non stimoli un'incorporazione ed un riconoscimento può assicurare la stabilità delle sue prestazioni nel lungo periodo. Gli studi più recenti sono pertanto rivolti all'impiego di materiali bioattivi, ovvero capaci di promuovere funzioni benefiche nelle cellule e nei tessuti che circondano l'impianto [6].

1.2 L'ingegneria tissutale

La Tissue Engineering, o ingegneria tissutale, è un campo di ricerca interdisciplinare che unisce le conoscenze dell'ingegneria con quelle della chimica, della fisica, della matematica, della biologia e della medicina al fine di capire le relazioni struttural-funzionali dei tessuti

sani o malati del corpo umano, nel tentativo di creare sostituti biologici in grado di ripristinare, migliorare o mantenere il funzionamento dei tessuti viventi.

Il termine ingegneria tissutale identifica nello specifico procedure di rigenerazione di tessuti del corpo umano mediante la semina di cellule su strutture (*scaffolds*) opportuni, la loro coltivazione in appositi reattori (bioreattori) fino alla colonizzazione dello *scaffold* ed alla produzione di nuovo tessuto (matrice extracellulare, ECM).

L'uso di biomateriali nell'ambito della *Tissue Engineering* è in forte crescita. Recenti studi hanno sottolineato quanto siano fondamentali le proprietà fisiche e le dimensioni degli stessi biomateriali che devono essere capaci di imitare le naturali interazioni cellula-ECM.

La prima fase della costruzione di un tessuto ingegnerizzato consiste nella progettazione e costruzione dello *scaffold*, che funge da supporto per la crescita delle cellule che daranno origine al nuovo tessuto. Uno *scaffold* ideale deve possedere alcune caratteristiche basilari tra quelle di seguito indicate (Salgado *et al.*, 2004):

- **Biocompatibilità:** deve suscitare una specifica risposta biologica, benefica per l'organismo, senza interferire o interagire in modo dannoso con le attività fisiologiche (non deve provocare infiammazioni o degradarsi in componenti tossici).
- **Biodegradabilità:** successivamente all'impianto i materiali devono degradarsi con velocità proporzionale alla rigenerazione tissutale e al rimodellamento dell' ECM in sostanze non tossiche e senza interferire con i tessuti circostanti.
- **Bioattività:** deve possedere superfici e/o cavità interne con proprietà chimiche e fisiche atte alla promozione dell'adesione, dello *spreading* e della proliferazione cellulare: ad esempio superfici rugose (anziché lisce), o che espongono all'interfaccia determinati gruppi funzionali, favoriscono questi processi, vitali per la regolazione, la crescita, e la differenziazione cellulare, necessari per la formazione dei tessuti.
- **Struttura tridimensionale:** la rigenerazione di tessuti richiede un supporto che mimi il complesso tridimensionale dell'ECM per permettere l'organizzazione delle cellule in strutture complesse. Una struttura con porosità elevata e interconnessa è ideale perché assicura un sufficiente apporto nutritivo e di ossigeno verso le cellule e consente di rimuovere i prodotti del metabolismo cellulare, permettendo la vascolarizzazione.

- Proprietà meccaniche: lo *scaffold* deve possedere proprietà meccaniche paragonabili a quelle del tessuto da sostituire in condizioni fisiologiche. Deve inoltre avere la resistenza meccanica necessaria per mantenere la sua struttura anche dopo l'impianto, in particolare nel caso di ricostruzioni di tessuti che supportano un carico, come ossa e cartilagine.
- Processabilità: il materiale deve essere facilmente lavorabile e sterilizzabile.

Il successo della penetrazione cellulare all'interno dello *scaffold* è spesso determinato dall'efficienza della tecnica di semina e dalle condizioni di coltura che svolgono un ruolo cruciale nell'adesione e distribuzione cellulare sullo *scaffold* stesso [7].

1.3 La funzionalizzazione biochimica dei biomateriali

Per migliorare le prestazioni di qualunque biomateriale, permettendogli di stabilire interazioni vantaggiose con l'ambiente biologico circostante, si ricorre alla funzionalizzazione biochimica: si applica alla superficie del biomateriale delle molecole organiche (come le sequenze adesive o i fattori di crescita) in grado di "colloquiare" con le cellule del tessuto ospite.

Le proteine o piccole sequenze peptidiche possono essere veicolate all'interfaccia tra ambiente biologico e materiale in differenti modi (Figura 1.1):

1. attraverso adsorbimento superficiale delle molecole biologicamente attive sfruttando semplici interazioni di natura chimico-fisica tra le biomolecole e la superficie del materiale;
2. includendo le biomolecole all'interno di un *carrier* riassorbibile (generalmente un materiale polimerico) impiegato come rivestimento superficiale dello *scaffold*. Il rilascio delle biomolecole avviene nel tempo durante la degradazione del *carrier*;
3. ancorando le molecole alla superficie attraverso un legame covalente. Le molecole possono essere ancorate direttamente o attraverso l'introduzione di una molecola con funzione di distanziatore (*spacer*), che permette di esporre meglio la biomolecola alle cellule conferendo maggiori gradi di libertà orientazionale [8].

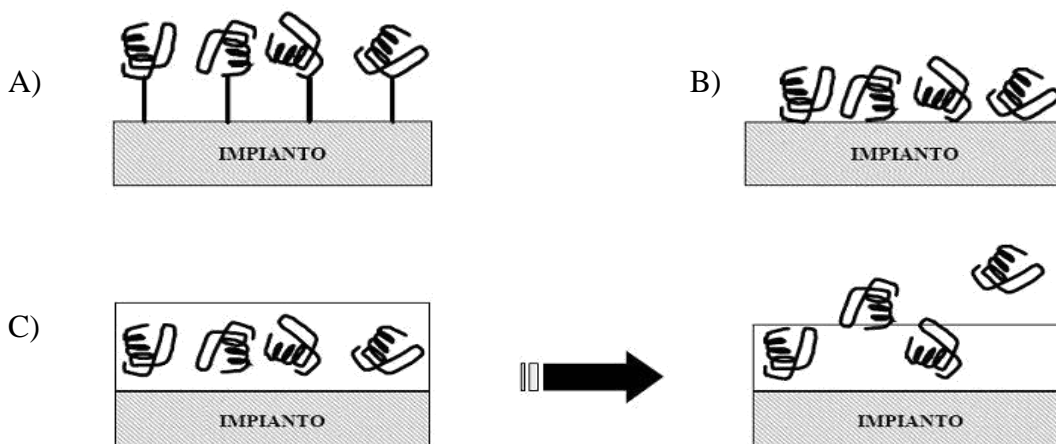


Figura 1.1 Ancoraggio mediante legame covalente con spacer (A), per adsorbimento (B) e rilascio da carrier di una proteina (C).

Procedure chimiche di recente introduzione permettono di esercitare un elevato livello di controllo anche sulla orientazione delle biomolecole, oltre che sulla stabilità del legame e sulla densità superficiale.

Facendo ricorso a tecniche di immobilizzazione covalente “specifica” (Figura 1.2), si inducono tutte le molecole a legarsi alla superficie utilizzando il medesimo gruppo funzionale, si può così ovviare all’inconveniente determinato dal fatto che, in assenza di specifici accorgimenti i peptidi si legano ai gruppi funzionali della superficie in modo del tutto casuale, provocando una orientazione non uniforme delle biomolecole in superficie, che potrebbero quindi esporre o meno il sito di legame verso i recettori cellulari.

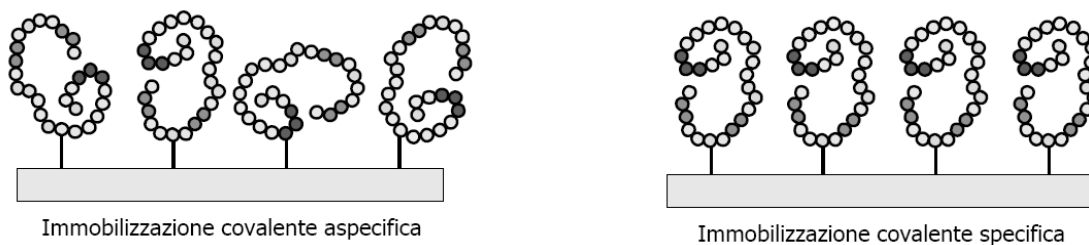


Figura 1.2 Immobilizzazione covalente aspecifica e specifica

1.4 Il sistema nervoso

Il cervello umano è il principale protagonista di quasi tutti i comportamenti che mettiamo in atto; esso controlla le attività percettive, il pensiero, la condotta. I danni del sistema nervoso centrale possono essere determinati da lesioni fisiche o interruzioni neurologiche, spesso infatti si ha la perdita di corpi cellulari neurali, assoni e relativi supporti gliali. Le lesioni fisiche non sono rare e comprendono offese dovute a resezione di tumori (neuroma acustico e meningioma del nervo ottico), lesioni traumatiche al cervello (*traumatic brain injury* -TBI-) e lesioni alla spina dorsale (*spinal cord injury* -SCI-). Non sono meno frequenti le malattie neurodegenerative come ictus cerebrale, morbo di Parkinson, Alzheimer e sclerosi multipla.

1.4.1 Organizzazione e struttura del sistema nervoso

Il sistema nervoso si suddivide in **sistema nervoso centrale (SNC)** e **sistema nervoso periferico (SNP)** (Figura 1.3). Il sistema nervoso centrale comprende il *cervello* ed il *midollo spinale*. Esso risulta connesso tramite i neuroni con ogni parte del corpo, grazie a gruppi di assoni disposti a fascio detti *nervi*, che costituiscono a loro volta il sistema nervoso periferico. I nervi convogliano gli impulsi dal cervello al corpo e dal corpo al cervello.

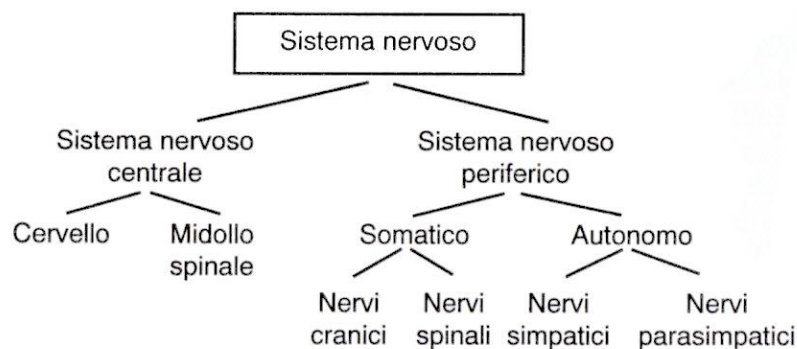


Figura 1.3 Organizzazione gerarchica del sistema nervoso.

Il sistema nervoso periferico include tutte le parti del sistema nervoso esterne al cranio e alla colonna vertebrale. Più specificatamente, del sistema nervoso periferico vengono differenziate la *componente somatica*, costituita dai nervi cranici e spinali, e la *componente autonoma* costituita dai nervi simpatici e parasimpatici.

1.4.2 Gli elementi del sistema nervoso centrale

Due sono le classi di cellule predominanti nello *spazio extracellulare* del cervello: i **neuroni** e le **cellule gliali**.

1.4.2.1 I neuroni

I neuroni sono le più importanti cellule nervose, e da essi si originano i segnali elettrici che rileviamo per comprendere il funzionamento dell'attività cerebrale. Essi non vengono più prodotti dopo la nascita e, nel corso dello sviluppo, ne aumenta solo la grandezza.

I neuroni sono costituiti da diverse parti (Figura 1.4):

- un *corpo cellulare*, o *soma*, (caratterizzato dalla presenza del nucleo);
- le *dendriti*, le estensioni del corpo cellulare;
- l'*assone*, un'estensione maggiore che origina dal nucleo e che può essere di lunghezza variabile (da alcuni nanometri a più di un metro). Essi portano le informazioni dal SNC alla periferia e viceversa.

I neuroni si differenziano tra loro per *forma* (in particolare quelli dei vertebrati sono per la maggior parte multipolari, ovvero con dendriti numerose ed un unico assone); per *dimensione* (il loro diametro va da 10 a 100 nm); ed infine per *funzione*.

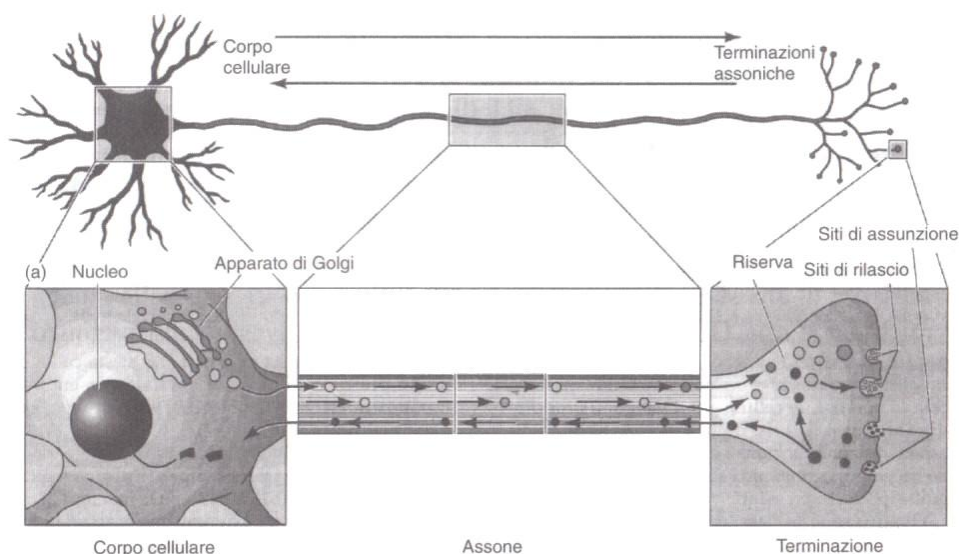


Figura 1.4 Rappresentazione del neurone e delle principali componenti che lo caratterizzano.

Il corpo cellulare contiene gli stessi organuli che si possono trovare in tutte le cellule animali. Gli organuli più importanti sono il nucleo, il reticolo endoplasmatico liscio e rugoso, l'apparato del Golgi e i mitocondri. Tutto ciò che è contenuto all'interno dei confini della membrana cellulare viene chiamato citoplasma (Figura 1.5).

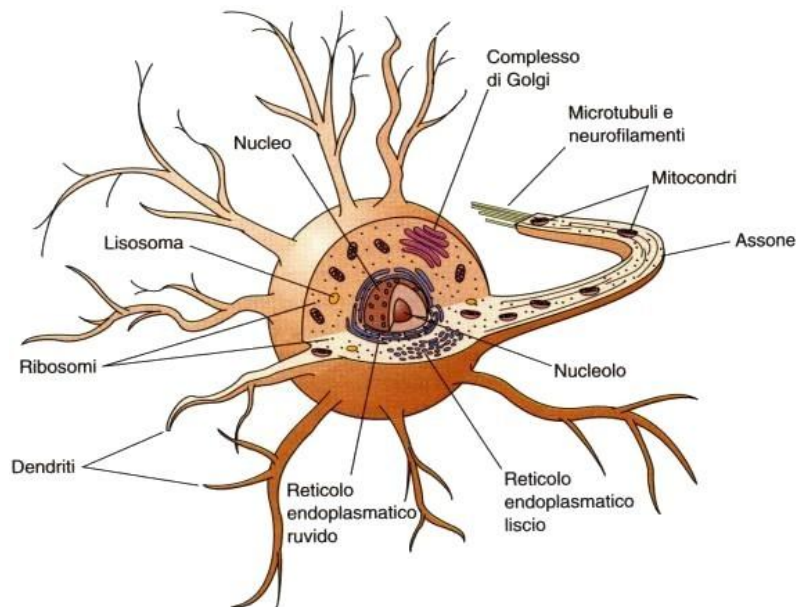


Figura 1.5 Rappresentazione grafica del neurone e del suo interno.

L'informazione neuronale viene trasmessa per mezzo delle **sinapsi** (dal greco “legare insieme”), punti di contatto per lo più situati tra le fibre terminali di un assone ed i dendriti del successivo neurone. A livello sinaptico, la fibra terminale dell'assone si rigonfia per formare un bottone terminale, all'interno del quale vi sono piccole vesciche sinaptiche. Esse contengono una specifica sostanza chimica che viene rilasciata al momento in cui l'attività elettrica si propaga lungo l'assone. Tali molecole sono comunemente definite **neurotrasmettitori** (Guyton, 1987). Tra i principali neurotrasmettitori scoperti nel cervello si ricorda la *serotonina*, l'*acido glutammico*, la *dopamina*.

Ogni neurone rilascia un solo tipo di neurotrasmettitore, che può avere funzione eccitatoria o inibitoria sul successivo neurone con cui fa sinapsi. Quando, dopo aver attraversato l'assone, un impulso nervoso giunge al bottone terminale dello stesso, il neurotrasmettitore viene rilasciato nello spazio intersinaptico e si diffonde verso la membrana del successivo neurone, legandosi a specifiche molecole proteiche (**recettori**) che si trovano in superficie. Il rilascio

induce nel recettore un cambiamento di forma tale per cui si aprono i canali presenti al suo interno, i quali vengono quindi “azionati chimicamente”.

1.4.2.2 Le cellule gliali

Le cellule gliali, a differenza dei neuroni, vengono riprodotte durante tutto il corso della vita. Esse forniscono un supporto strutturale e nutrizio a neuroni, assoni e dendriti.

La glia contribuisce principalmente alla funzione cerebrale sostenendo i processi neuronali. Sebbene il suo ruolo resta subordinato rispetto ai neuroni, il cervello non potrebbe comunque funzionare correttamente senza di essa.

Il sistema nervoso dei vertebrati è caratterizzato dalla presenza di quattro tipi di cellule gliali: gli *oligodendrociti*, le *cellule di Schwann*, gli *astrociti* e le *cellule microgliali*.

Gli oligodendrociti ricoprono gli assoni delle cellule del cervello e del midollo spinale (SNC), mentre le cellule di Schwann rivestono gli assoni che si trovano al di fuori del cervello e del midollo spinale (SNP). Queste cellule gliali formano attorno all’assone una guaina isolante (*mielina*) che incrementa notevolmente la velocità di conduzione dell’impulso nervoso (Figura 1.6).

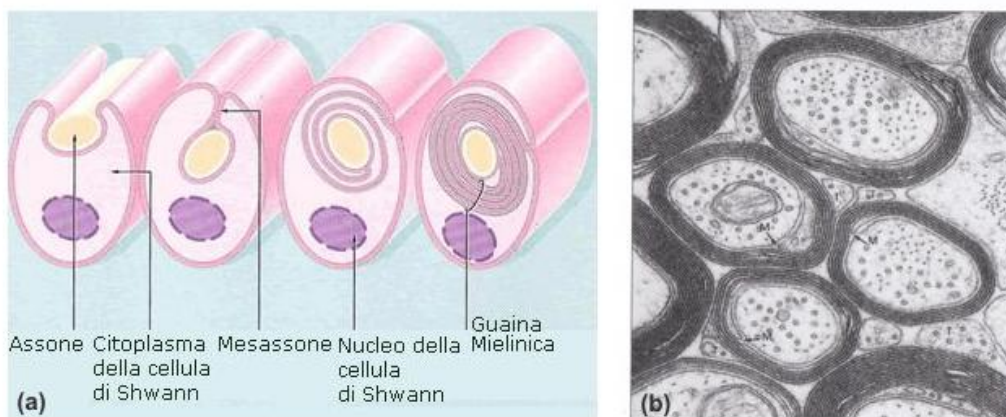


Figura 1.6 Rappresentazione del processo di mielinizzazione dell’assone (a) e un esempio di fibre mielinizzate del nervo ottico tagliate in sezione (b).

Una piccola differenza tra i due tipi di cellule sta nel fatto che gli oligodendrociti sono in grado di mielinizzare molteplici assoni, mentre ciascuna cellula di Schwann mielinizza solamente un singolo assone.

Gli astrociti riempiono lo spazio tra i neuroni, e tramite estensioni ricoprono la superficie esterna del cervello; il loro ruolo essenziale è regolare il contenuto chimico dello spazio extracellulare, rilasciando proteine importanti per la crescita e riparazione delle cellule nervose. Infine, la microglia migra verso le zone del sistema nervoso danneggiate, con la precisa funzione di rimuovere materia costituita da cellule lacerate o morte (Rosenzweig, Leiman & Breedlove, 1998).

1.4.3 Le cellule di Schwann

Come anticipato le cellule di Schwann sono le principali cellule gliali del sistema nervoso periferico, e la loro maggiore funzione è quella di rivestire gli assoni dei neuroni con uno strato di mielina, che conferisce ai nervi un aspetto bianco brillante.

Siccome le dimensioni di una cellula di Schwann (fino ad 1 mm) sono molto inferiori alla lunghezza di un assone (i più lunghi possono oltrepassare il metro), per mielinizzare completamente un singolo assone sono necessarie numerose cellule di Schwann, disposte lungo la lunghezza dell'assone. Le piccole parti demielinizzate che si trovano tra due cellule di Schwann si chiamano *nodi di Ranvier* (Figura 1.7) e svolgono una funzione importante: essendo le uniche aree di scambio ionico dell'assone, il potenziale d'azione si propaga (e si riproduce) solo in corrispondenza di questi nodi, dando vita al fenomeno della conduzione saltatoria, dove la velocità di propagazione del segnale risulta più elevata.

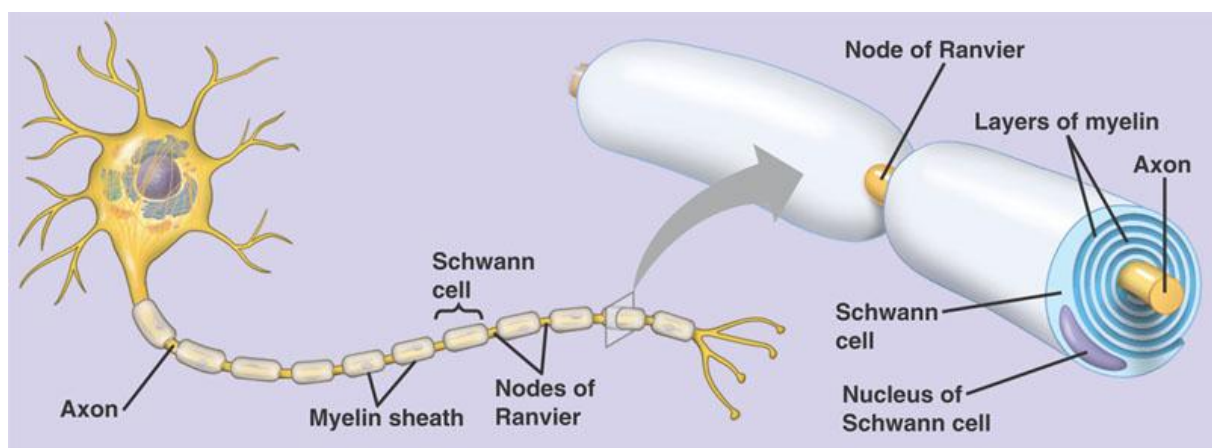


Figura 1.7 Raffigurazione del complesso assone – fibre mieliniche.

Le cellule di Schwann non rivestono solo le fibre mieliniche ma anche quelle amieliniche: le fibre nervose possono quindi essere *amieliniche*, se gli assoni sono solamente contenuti in una nicchia delle cellule di Schwann, o *mieliniche*, se tali cellule si avvolgono più volte attorno all'assone, formando una fila di manicotti, che schermano la fibra dalla corrente ionica.

Esistono inoltre dei canali che consentono il nutrimento delle cellule stesse altrimenti isolate dalla stessa guaina mielinica (funzione trofica), e che hanno anche funzione di rinnovo della guaina stessa, poiché la mielina, al contrario delle cellule nervose, non è permanente e va incontro a degradazione progressiva. Tali canali sono detti *incisure di Schmidt-Lanterman*.

Le cellule di Schwann d'altro canto sono coinvolte in molti importanti aspetti dei nervi periferici: la conduzione degli impulsi nervosi lungo gli assoni, lo sviluppo e la rigenerazione dei nervi, la produzione della loro matrice extracellulare, il supporto nutrizionale per i neuroni, la modulazione dell'attività sinaptica neuromuscolare, e infine partecipano al riconoscimento degli antigeni da parte dei linfociti T.

1.4.3.1 Il trapianto e la rigenerazione delle cellule di Schwann

La malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT), la sindrome di Guillain-Barré (GBS), la polineuropatia infiammatoria demielinizzante cronica (CIDP) e lo schwannoma sono tutte neuropatie che coinvolgono le cellule di Schwann.

Anche patologie più note e frequenti come la sclerosi multipla, o le principali malattie neurodegenerative come il Parkinson e l'Alzheimer sono legate, anche se indirettamente, alle cellule gliali. In certi casi viene infatti distrutta la *sostanza bianca* (assoni neuronali riuniti in fasci e ricoperti dalla mielina) di un segmento midollare, la lesione interrompe i segnali in verticale impedendo ai messaggi che hanno origine nel cervello di propagarsi al di sotto dell'area danneggiata e impedendo altresì ai segnali sensoriali che provengono da sotto la lesione di diffondersi al cervello.

La lesione meccanica, purtroppo non rimane *in situ*, ma conseguentemente ad essa avviene una propagazione longitudinale attraverso la sostanza grigia fino poi alla sostanza bianca che porta una progressiva situazione di malfunzionamento. Gli assoni danneggiati diventano monconi privi di collegamenti e le loro estremità troncate iniziano a disintegrarsi. In molti casi gli assoni rimangono intatti ma diventano inutilizzabili a causa della perdita del

rivestimento mielinico isolante. Al posto dei neuroni, degli assoni o delle cellule, si forma una cavità piena di liquido, o cisti, e le cellule gliali proliferano in modo anomalo, formando la *cicatrice gliale*. Insieme, cisti e cicatrici, rappresentano una barriera impenetrabile per gli assoni recisi. Il deterioramento secondario del tessuto è dovuto ad un rigonfiamento dei vasi sanguigni che lesionati, non apportano più sostanze nutritive e ossigeno alle cellule, causando la morte di molte di esse. Per migliorare queste problematiche si è cercato di concentrarsi sul processo di riparazione del tessuto cercando di stimolare la rigenerazione degli assoni danneggiati, inducendo così il loro allungamento e la riconnessione con le appropriate cellule bersaglio [10].

A partire dal 2001 un certo numero di studi sperimentali ha provato ad impiantare le cellule di Schwann in pazienti affetti da sclerosi multipla nel tentativo di indurre la rimielinizzazione [11]. Negli ultimi due decenni si sono ottenuti importanti risultati positivi per il trapianto di cellule di Schwann sia come guarigione delle lesioni del midollo spinale, sia come incentivazione della ricrescita e mielinizzazione degli assoni danneggiati del sistema nervoso centrale [12]. Trapianti di cellule di Schwann in combinazione con altre terapie, come il Chondroitinase ABC, hanno infine dimostrato di essere efficaci nel recupero funzionale di lesioni del midollo spinale [13].

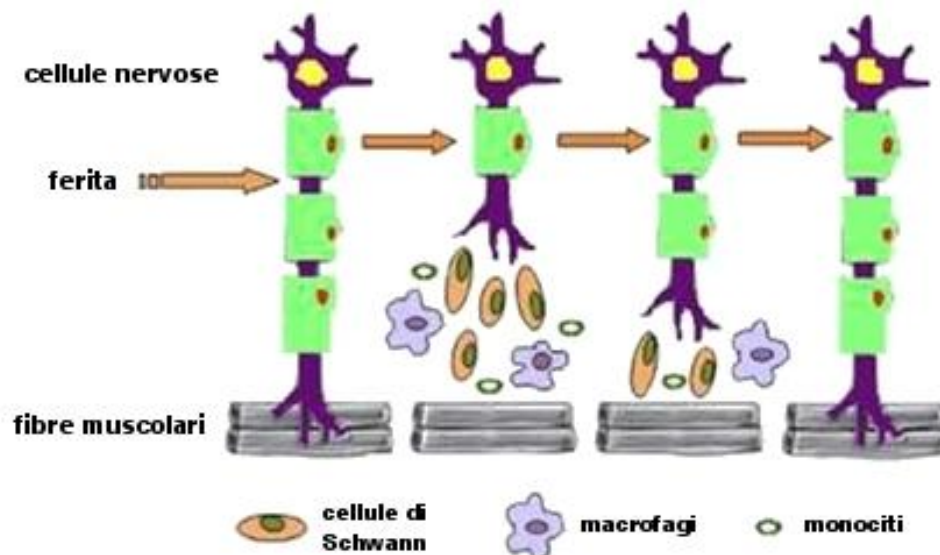


Figura 1.8 Processo di guarigione nel SNP mediato da cellule di Schwann, macrofagi e monociti.

Le cellule di Schwann sono note per il loro ruolo nel sostenere la rigenerazione dei nervi: infatti se si verifica un danno ad un nervo, esse saranno di aiuto nella digestione dei suoi assoni (*fagocitosi*). In seguito a questo processo, le cellule di Schwann sono in grado inoltre di guidare la rigenerazione realizzando una specie di tunnel che conduce verso i neuroni bersaglio. Il troncone dell'assone danneggiato è in grado di "germogliare", ricrescendo lungo il tunnel generato fino a 1 mm al giorno. In questa maniera l'assone può tornare a ricollegarsi con il muscolo o con l'organo precedentemente controllato. Tuttavia la specificità non è sempre mantenuta e gli errori sono frequenti, specialmente quando sono coinvolte lunghe distanze [14].

Se alle cellule di Schwann viene impedito di associarsi con gli assoni questi muoiono. Mentre assoni in via di rigenerazione non raggiungeranno alcun obiettivo se le cellule di Schwann non saranno disponibili per sostenerli e guidarli. Queste cellule sono quindi essenziali per il mantenimento di assoni sani.

1.5 L'adesione cellulare

Per permettere, tramite le tecniche dell'ingegneria tissutale, la realizzazione di nuovi tessuti, è fondamentale che abbiano luogo i processi di adesione e proliferazione cellulare sullo *scaffold*, appositamente progettato per mimare la matrice extracellulare naturale.

Nella matrice extracellulare (ECM) sono presenti numerose "sequenze segnale" che "comunicano" con le cellule dei tessuti circostanti. Le proteine di adesione più importanti sono la fibronectina, la laminina, la tenascina e la vitronectina. Un ruolo fondamentale nel collegamento tra cellula e matrice extracellulare, e nella trasduzione del segnale dalla ECM alla cellula, è affidato alle **integrine**, delle glicoproteine di membrana che legano le proteine della ECM (principalmente le fibronectine). Le integrine sono eterodimeri contenenti due catene, le subunità α e β , che si sviluppano principalmente nella zona extracellulare, ma che sono legate alla cellula attraverso un piccolo tratto idrofobico immerso nella membrana cellulare che si conclude con due piccole code citoplasmatiche; le integrine individuate fino ad oggi sono 24.

Una sequenza di amminoacidi riconosciuta da questi importanti recettori è il motivo RGD (Arginina-Glicina-Acido Aspartico), presente in molte proteine della ECM come la fibronectina, la laminina, la vitronectina, il collagene di tipo I, il fibrinogeno, la tenascina, l'entactina, la sialoproteina dell'osso (BSP), proteine di membrana, proteine batteriche e virali [15].

In Figura 1.9 viene riportato schematicamente il legame integrina-fibronectina attraverso il riconoscimento della sequenza adesiva RGD.

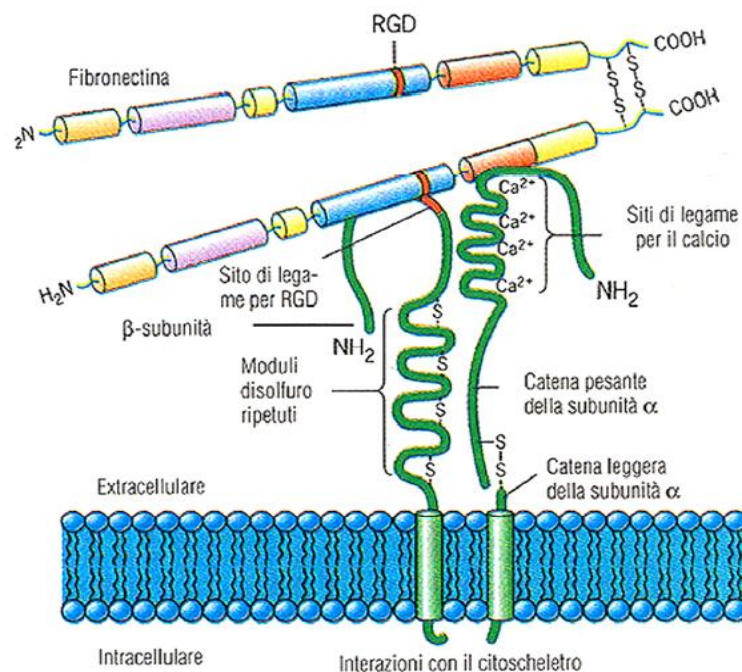


Figura 1.9 Le integrine della membrana cellulare riconoscono la sequenza adesiva RGD presente nella fibronectina.

La sequenza RGD, individuata nel 1984, è stata molto studiata ed utilizzata per le numerose funzioni fisiologiche in cui è coinvolta. Il motivo RGD può legarsi a più di un tipo di recettore cellulare per l'adesione (integrine), e il suo ruolo si è dimostrato fondamentale in tutti i tipi di tessuti. Anche le sequenze che fiancheggiano il motivo e i gruppi terminali del backbone hanno un ruolo importante nel legame con le integrine.

Una sequenza invece specifica per il tessuto nervoso è IKVAV (Isoleucina-Lisina-Valina-Alanina-Valina), derivante dalla catena α della lamina. Essa è capace di stimolare la crescita

delle estensioni delle cellule nervose consentendo il recupero dei nervi danneggiati. Non è ancora ben chiaro il meccanismo di azione ma IKVAV ha un importante ruolo biologico: oltre a supportare la sopravvivenza delle cellule che aiutano la riparazione dei nervi lesionati (oligodendrociti) e a rafforzare la crescita delle estensioni nervose, tale sequenza si è dimostrata in grado di sopprimere la crescita delle cellule che producono la cicatrice gliale (astrociti), quindi riducendo la formazione del tessuto cicatriziale.

1.6 Peptidi auto-assemblanti

Negli ultimi anni è cresciuto sempre più l'interesse e l'utilizzo di peptidi auto-assemblanti (*self-assembling peptides, SAP*) come *scaffold* per la crescita cellulare. L'interesse per questi peptidi è maturato grazie alla loro caratteristica di auto-aggregazione e di capacità di formare strutture bi e tri-dimensionali. Il fenomeno avviene grazie all'instaurarsi di numerose interazioni non covalenti come i legami a idrogeno, interazioni idrofobiche e le forze di *Van der Waals*: prese singolarmente queste sono interazioni deboli, ma nell'insieme esse determinano strutture molto stabili.

Scoperti da Zhang a inizio anni '90, i SAP si possono classificare in 5 classi principali [16]:

1. tipo I, detti “Lego molecolari”, formano degli idrogel che possono essere utilizzati nella creazione di *scaffolds*;
2. tipo II, gli “interruttori molecolari”;
3. tipo III, gli “uncini molecolari” ed i “velcro molecolari”; sono peptidi utilizzati nei trattamenti superficiali;
4. tipo IV, a cui appartengono i “nano tubi peptidici” e le “capsule molecolari” per il trasporto di geni e proteine;
5. tipo V, le “cavità molecolari” per la biomineralizzazione [17].

I peptidi auto-assemblanti sintetici possono derivare da proteine naturali oppure essere sintetizzati *ad hoc*. In ogni caso sono formati da una regione idrofilica e da una idrofobica, ed hanno la capacità di aggregare spontaneamente in soluzione fisiologica salina.

L'auto-assemblamento è legato sia alla natura intrinseca dei singoli amminoacidi, sia alla loro posizione nella sequenza. È quindi possibile ottenere una determinata struttura secondaria scegliendo e predisponendo opportunamente gli amminoacidi in sequenza.

In questo lavoro di tesi vengono utilizzati peptidi di Tipo I, detti auto-assemblanti ionico-complementari. Questi particolari peptidi sono caratterizzati dall'alternanza di residui con carica positiva e residui con carica negativa, intervallati da residui idrofobici (ad esempio sequenze del tipo: AA carico positivamente / AA idrofobico / AA carico negativamente / AA idrofobico etc.).

Peptidi di questa tipologia possono assumere, in differenti solventi, una struttura secondaria di tipo β -sheet; ogni piano di β -sheet presenta una faccia a carattere ionico con catene laterali cariche positivamente e negativamente ed una faccia idrofobica.

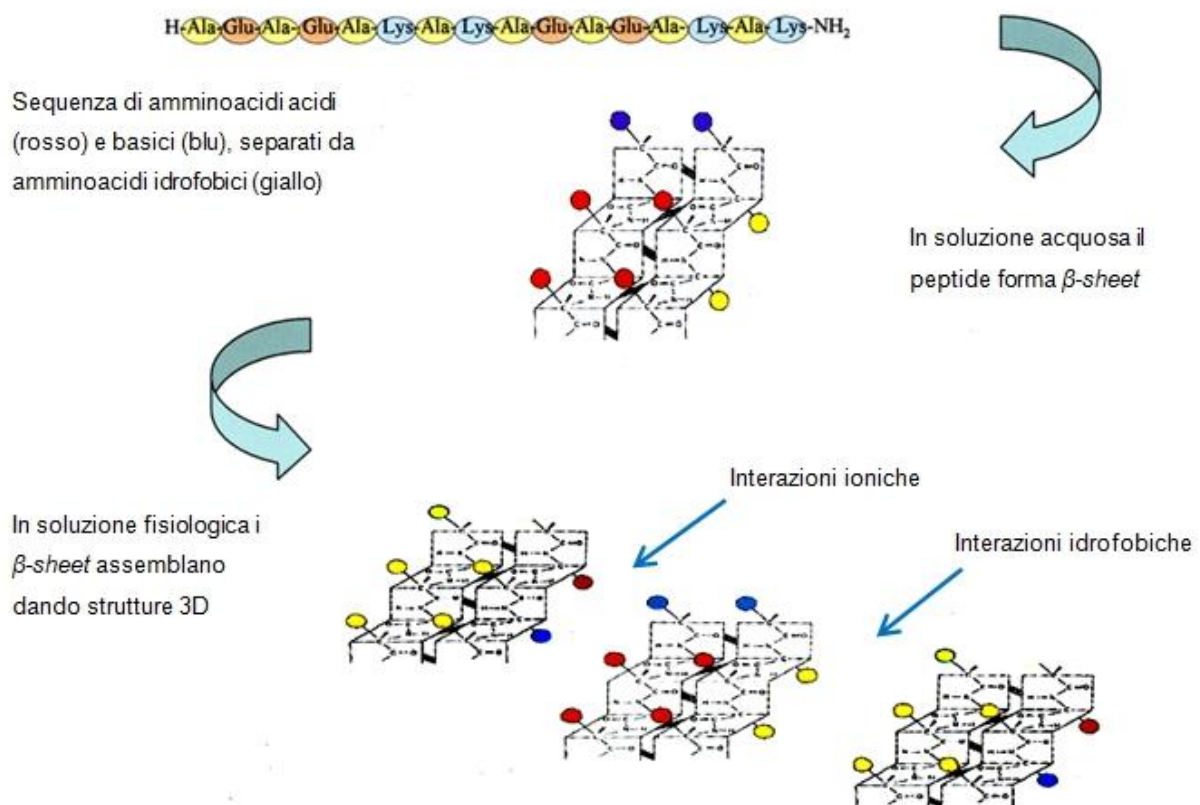


Figura 1.10 Modello proposto per l'auto-assemblaggio di peptidi ionico-complementari. In particolare si riporta la sequenza del peptide EAK con il caratteristico pattern dato dall'alternanza di residui carichi e idrofobici (Dettin, 2009).

Grazie quindi ad interazioni sia di carattere ionico che idrofobico, numerosi piani di β -sheet possono assemblarsi in strutture tridimensionali (Figura 1.10) per formare fibre, membrane e idrogeli. I parametri più importanti che regolano il processo sono: la concentrazione, il pH, la presenza di sali ed il tempo.

Il peptide EAK (AEAEAKAKAEAEAKAK), che si struttura in foglietti β che auto-assemblano in membrane a seguito dell'aggiunta di sali in soluzione (più precisamente ioni monovalenti positivi), rappresenta il primo membro di questa classe di SAP. Il tipo di ione utilizzato riveste una notevole importanza: l'ordine di efficacia nell'induzione della formazione di membrane è $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$.

Peptidi auto-assemblanti hanno trovato applicazione in diversi campi clinici: come substrati per la crescita dei neuriti e la formazione di sinapsi [18,19]; quali promotori di nanofibre iniettabili per microambienti intramiocardici per cellule endoteliali [20]; come *scaffold* per lo sviluppo e la riparazione di cartilagine [21] e per la ricostruzione di sostituti valvolari cardiaci [22].

1.7 ECM e scaffold per il sistema nervoso

Il sistema nervoso è un tessuto molto complicato se messo a confronto con altri tessuti del corpo umano, in quanto non solo ha una particolare struttura di ECM ma ha anche molte proprietà fisiche caratteristiche. Queste differenze nelle proprietà meccaniche, nella struttura e nella composizione dell'ECM hanno notevoli effetti sulle funzioni cellulari [23].

Nell'ECM del sistema nervoso centrale ad esempio si evidenzia la quasi assenza di fibronectina e collagene, mentre al contrario si nota un'abbondanza di proteoglicani, acido ialuronico, tenascina-C e tenascina-R. Questa matrice non ha solo il compito di fungere da supporto fisico e biochimico ma permette anche le cruciali funzioni omeostatiche per la sopravvivenza delle cellule. Sulla base di queste conoscenze sono stati valutati vari tipi di idrogeli capaci di imitare le caratteristiche biochimiche e meccaniche del sistema nervoso centrale al fine di essere applicati come sostituti. Questi includono derivati di idrogeli come collagene, acido ialuronico (HA), fibrina e idrogeli peptidici oltre a idrogeli sintetici, per esempio policaprolattone (PCL) e glicole polietilenico (PEG).

Gli idrogeli utilizzati per la rigenerazione del sistema nervoso devono essere in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare cercando allo stesso tempo di mantenere le funzioni principali delle cellule. Devono permettere la penetrazione cellulare e la crescita dei neuroni e naturalmente dovrebbero avere proprietà meccaniche simili a quelle dell'ECM nativa così che le cellule all'interno dell'idrogel riescano a ricevere appropriate informazioni durante la crescita.

1.7.1 Le potenzialità offerte dalle nanofibre

I nanomateriali sono ottimi candidati per la progettazione di *scaffolds* di nanofibre citocompatibili. Il loro vantaggio deriva dalla possibilità di controllare le proprietà dei materiali attraverso il loro assemblaggio a livello nanometrico. I materiali organizzati a tale livello (diametro nell'ordine di 100 nm) acquisiscono nuove caratteristiche: sono più resistenti, più leggeri, più porosi, più attivi chimicamente, meno corrosivi, aumentano la loro conduttività elettrica e le proprietà magnetiche.

Scaffolds con strutture nanometriche presentano quindi funzionalità che non avrebbero in scala micrometrica: a mano a mano che la dimensione scende a livello nanometrico, aumenta fortemente l'area superficiale; le irregolarità sulla superficie e l'area superficiale disponibile per unità di volume possono essere controllate per migliorare le proprietà fisico-chimiche dei materiali. L'elevata superficie fornisce un'ampia zona di contatto tra le cellule e le fibre e perciò aumenta l'interazione tra biomateriale e tessuto.

Dato che i componenti di organi e tessuti su scala molecolare hanno dimensioni nanometriche e che le cellule interagiscono direttamente con la ECM (nanostrutturata), le caratteristiche biomimetiche di tali materiali giocano un ruolo fondamentale nella stimolazione della crescita cellulare tanto quanto nella guida della rigenerazione del tessuto [24].

I progressi più rilevanti sono stati fatti proprio in ambito della guarigione neurale: alcuni studi hanno dimostrato che una superficie nanoporosa aumenta notevolmente la formazioni di neuriti tra i neuroni mentre viene limitata la cicatrizzazione gliale, principale ostacolo al recupero funzionale.

Si è inoltre evidenziato come le caratteristiche della struttura superficiale a livello sub-micrometrico influiscano sulla crescita neuronale; modificando la nanotopografia di una

superficie e creando una specifica nanoarchitettura è possibile aumentare la funzionalità delle cellule neuronali.

Indipendentemente dal materiale, la topografia delle nanofibre è di per sé potenzialmente in grado di modulare comportamenti cellulari come l'allineamento unidirezionale; è il caso della tesi in esame, ovvero l'investigazione sul comportamento delle cellule di Schwann su idrogeli 3D di fibrina in presenza di nanofibre di PCL elettrofilate assieme a peptidi auto-assemblanti.

1.7.1.1 La fibrina

La fibrina è una proteina fibrillare, che una volta polimerizzata è in grado di formare una "maglia" (insieme con le piastrine) sopra il luogo della ferita. Viene prodotta naturalmente dal corpo dopo l'infortunio, ma può anche essere progettata come sostituto per accelerare la guarigione dei tessuti. Lo *scaffold* consiste pertanto in una rete naturale di fibrina reticolata e ricopre un ampio uso in applicazioni per biomateriali.

Nella ricerca biomedica sono stati utilizzati *scaffold* di fibrina per riempire le cavità ossee, riparare i neuroni, le valvole cardiache, gli innesti vascolari, la superficie dell'occhio [25-26].

Scaffold di fibrina hanno diversi aspetti positivi come essere biocompatibili, biodegradabili e facilmente lavorabili. Inoltre, avendo una natura autologa, questo materiale può essere manipolato in varie forme e dimensioni.

1.7.1.2 L'ε-policaprolattone

L'ε-policaprolattone (PCL) è un polimero sintetico, il cui più grande svantaggio consiste nella mancanza di segnali specifici per il riconoscimento cellulare. Per tale motivo è indispensabile che venga arricchito con biomolecole per stimolare la risposta da parte delle cellule.

Il policaprolattone è un poliestere alifatico dotato di buone caratteristiche di biocompatibilità, riassorbibilità ed elevata stabilità termica.

Esso viene degradato mediante idrolisi dei legami esterei in condizioni fisiologiche (come nel corpo umano) e si è pertanto guadagnato una grande attenzione per l'uso come biomateriale impiantabile. In particolare, è particolarmente interessante per la preparazione di dispositivi impiantabili a lunga durata data la sua lenta degradazione.

Il PCL è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per applicazioni specifiche nel corpo umano: viene usato come materiale dei punti di sutura, e come incapsulante di una varietà di farmaci. Recenti ricerche lo vedono inoltre coinvolto in applicazioni di ingegneria tissutale come *scaffold* riassorbibile.

1.7.2 Funzionalizzazione di fibre elettrofilate con sequenze adesive

L'utilizzo di fibre orientate di polimeri biocompatibili ha fornito in passato importanti risultati per la ricrescita guidata delle cellule nervose. Gli esperimenti di Klinkhammer *et al.* hanno dimostrato come microfibre parallele di ϵ -policaprolattone (PCL) e *star shape* NCO-poli(etilenglicole-*stat*-polipropilenglicole) (sP(EO-*stat*-PO), abbreviato in sPEG, fungano da strutture guida per la migrazione cellulare e la crescita assonale [27]. L'inclusione di molecole bioattive, quali la sequenza Glicina-Arginina-Glicina-Acido Aspartico-Serina (GRGDS) o la proteina della matrice extra-cellulare fibronectina (Fn), è stata proposta per aumentare la migrazione cellulare e l'allungamento degli assoni: l'arricchimento con il peptide, ma non quello con la proteina, ha portato a un miglioramento di entrambi i fattori rispetto alle fibre in solo PCL (Figura 1.11).

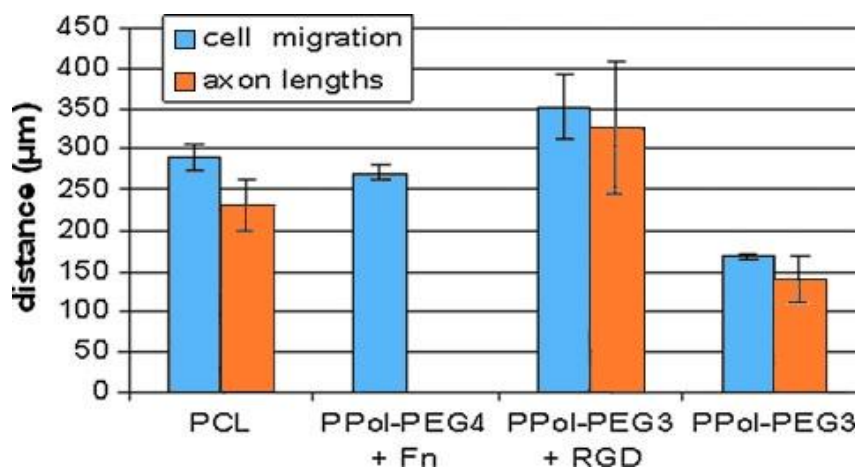


Figura 1.11 Lunghezza della ricrescita assonale e migrazione delle cellule di Schwann su un espianto di gangli spinali su differenti materiali fibrosi, dopo 4 DIV. Con la sigla PPol-PEG si intende la combinazione PCL + PCL-diol + sPEG seguita da un numero che ne identifica le specifiche di preparazione della soluzione per l'elettrofilatura: PPol-PEG3 rispetto a PPol-PEG4 presenta un maggior quantitativo in peso di PCL (60% contro 57.4%) e un minor quantitativo di sPEG (27% contro 29.5%), mentre PCL-diol rimane pressoché invariato (13% contro 13.1%).

1.7.3 Utilizzo dei SAP nella rigenerazione neurale

Il peptide più utilizzato nella produzione di *scaffolds* di nano fibre auto-assemblate per la coltura di cellule neurali è il peptide RAD 16-I (sequenza H-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-NH₂) coniugato con la sequenza IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) appartenente alla laminina, in grado di promuovere e dirigere la crescita di neuriti [28-29].

La messa a punto dei peptidi auto-assemblanti ionico-complementari si deve a Zhang S. [30]. Il peptide RAD 16-I è alla base della preparazione nota con il nome commerciale di Puramatrix™ (Figura 1.12). Questo tipo di idrogel ha dimostrato di supportare non solo l'attaccamento cellulare e i processi di crescita e differenziazione neuronale, ma anche la formazione di sinapsi dopo il congiungimento dei neuroni di ratto [31].

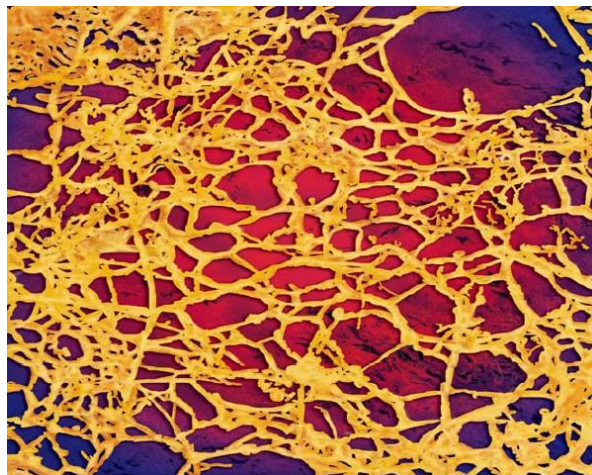


Figura 1.12 Puramatrix™ al microscopio

Nella riparazione del sistema nervoso centrale, la cicatrice gliale è il principale ostacolo alla rigenerazione dell'assone lesionato. Inibire la sua formazione risulta perciò fondamentale per la guarigione. Tysseling-Mattiace e collaboratori hanno dimostrato che utilizzando uno *scaffold* di nanofibre di peptidi auto-assemblanti funzionalizzato con IKVAV, è possibile inibire la formazione della cicatrice gliale e al contempo promuovere l'allungamento assonale dopo una lesione al midollo spinale [32].

Nel lavoro di Gelain *et al.* una lesione al midollo spinale di ratto è stata rigenerata grazie al trapianto di condotti elettrofilati di PCL/acido polilattico-glicolico (PLGA) riempiti di peptidi auto-assemblanti [33].

Nelle pubblicazioni di Ellis-Behnke *et al.* vengono studiati degli *scaffold* di nanofibre di SAP in combinazione con chondroitinase ABC per la rigenerazione del nervo ottico [34-35].

1.7.4 Rigenerazione dei nervi periferici mediante guide neurali artificiali

Le guide neurali artificiali sono dei condotti cilindrici all'interno dei quali la rigenerazione nervosa può avvenire trovando una protezione dall'ambiente circostante ed un orientamento spaziale. La loro introduzione nella pratica clinica risale a più di 20 anni fa, quando vennero proposte come alternativa all'innesto nervoso autologo (od autotrapianto) rispetto al quale evitano il sacrificio di un nervo sano da un sito donatore.

Sussistono molteplici limitazioni e complicanze connesse all'autotrapianto: (i) il prelievo da un sito donatore può, esso stesso, essere causa di patologie [36]; (ii) le due suture che fissano l'innesto possono essere sede di una sfavorevole proliferazione fibroblastica che ostacola la progressione degli assoni rigeneranti [37]; (iii) essendo il nervo donatore spesso un piccolo nervo sensitivo, il pieno recupero nei trattamenti risulta limitato rispetto al caso di nervi motori di maggiori dimensioni.

Da circa 20 anni pertanto le guide neurali artificiali sono state sperimentate nella pratica clinica e proposte come alternativa all'innesto. Si tratta di condotti cilindrici biocompatibili all'interno dei quali il moncone nervoso in rigenerazione può trovare protezione ed orientamento [38]. Il materiale più utilizzato in questi esperimenti è un silicone, il polidimetilsilossano (PDMS), un polimero sintetico non riassorbibile, impermeabile e altamente elastomerico (Williams *et al.*, 1983). Gli esperimenti riguardanti il silicone [39] hanno portato a progressi importanti, che possono essere riassunti come segue:

- gli assoni e le cellule di Schwann crescono preferenzialmente lungo un segmento di un nervo periferico quando stimolate con guide neuronali o non-neuronali;
- il percorso che gli assoni e le cellule di Schwann associate riescono a percorrere tra la lacuna di un moncone è limitata senza l'aiuto di un condotto;

- non è possibile incrementare significativamente la velocità di ricrescita assonale attraverso una lacuna, sebbene sia possibile influenzare il numero e l'entità degli assoni che la attraversano;
- il fluido della ferita accumulato dentro al lume del condotto risulta arricchito di fattori bioattivi, generati per la maggior parte dalle cellule di Schwann, che partecipano attivamente alla guarigione. Alcuni di questi fattori sono stati pertanto incorporati nei condotti nel tentativo di favorire la ricrescita lungo una lacuna corta (laminina, testosterone, ganglioside, fattori di crescita nervosi (NGF), fattori di crescita gliali (GGF), fattori neurotrofici cerebrali (BDNF)).

Sebbene la non-riassorbibilità sia una proprietà utile per la conservazione del fluido arricchito dei fattori bioattivi nel circondario del germoglio assonale in crescita, essa diventa pericolosa in quanto gli assoni possono rimanere intrappolati dalla capsula fibrotica dell'impianto. Accade infatti che alcuni pazienti necessitino di un secondo intervento per rimuovere il condotto.

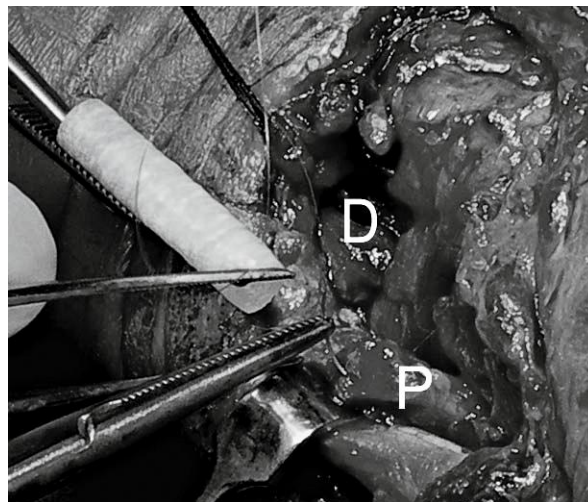


Figura 1.13 Una guida neurale tubulare in collagene viene suturata al moncone prossimale (P) in un caso di lesione del nervo ulnare al polso (D, moncone distale).

La seconda generazione di condotti nervosi prevede infatti l'utilizzo di polimeri biodegradabili. I più usati di origine naturale sono il collagene, l'alginato polisaccaride e il chitosano. La linea guida più diffusa è il collagene bovino trattato (*Neuragen*, Integra, USA). Generalmente sono idrofilici e affini alle interazioni con le cellule, ma con scarsa resistenza meccanica e necessitano di un *cross-link* per poter costituire la parete di un condotto. I

polimeri sintetici più diffusi nella pratica clinica sono invece l'acido poli-glicolico (*Neurotube*, Synovis, USA) e l'acido poli-lattico (*Neuragen*, Integra, USA). Essi hanno il vantaggio rispetto ai precedenti di poter essere fabbricati secondo specifiche, in termini di proprietà meccaniche (resistenza, flessibilità, porosità) e chimiche (velocità di degradazione).

Ci sono alcune limitazioni nell'applicazione clinica delle neuro guide attualmente disponibili in commercio. In primo luogo, la stessa struttura tubulare rende difficile l'impianto, perché non è sempre possibile avere un preciso accoppiamento tra i diametri della guida e quelli del nervo. Inoltre, anche impiantando una guida più larga fin dall'inizio, per favorire il minor danno possibile al moncone interessato, non si risolve il problema: infatti, durante la guarigione il nervo può crescere ulteriormente in diametro e la guida può, comunque, stenotizzare il nervo rigenerante. Ciò è vero anche impiegando materiali riassorbibili [40]. In secondo luogo, le guide attualmente in commercio richiedono dei punti di sutura per essere tenute in sede; anche limitandosi ad un solo punto prossimale ed uno distale, questi rappresentano di per sé una sede di possibili sfavorevoli reazioni fibroblastiche. In terzo luogo, all'aumentare della lunghezza e/o del diametro della guida impiegata, si riduce la percentuale di successo nella rigenerazione nervosa; ciò potrebbe essere in parte dovuto alla ipo-vascularizzazione del rigenerato e alla difficoltà per le cellule di Schwann di migrare su lunghe distanze [41]. Forse è la complessiva azione di tutti questi fattori che rappresenta la maggiore limitazione, da un punto di vista clinico, delle neuro guide tubulari: la conclusione è che nessuna delle opzioni oggi disponibili sul mercato si è dimostrata in grado di ottenere la rigenerazione nervosa in perdite di funzionalità superiori ai 30 mm.

1.7.5 Electrospinning

Le nanofibre utilizzate nella presente tesi sono state ottenute tramite elettrofilatura. Le nanofibre elettrofilate sono infatti risultate in grado di aumentare la rigenerazione nervosa sia in saggi *in vitro* che *in vivo* [42].

La tecnica, nota anche come *electrospinning*, utilizza forze elettrostatiche per generare fibre polimeriche con diametri variabili tra i 100-500 nm. Diversi materiali possono essere elettrofilati. Le fibre elettrofilate possono essere orientate o disposte in maniera casuale, in esse è possibile incorporare antibiotici, agenti antitumorali, proteine, perfino DNA e RNA.

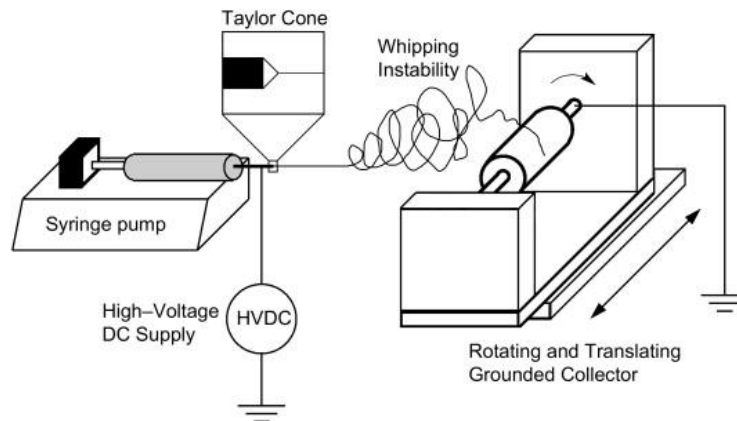


Figura 1.14 Schema di funzionamento dell'apparato per electrospinning.

Un tipico sistema per l'electrospinning è costituito da una siringa nella quale è contenuto il fluido polimerico sotto forma di soluzione o fuso; un generatore di tensione ad alto voltaggio ed un collettore posto a massa (Figura 1.14). La siringa forza il passaggio della soluzione polimerica attraverso l'ago. Il generatore, collegato all'ago, carica elettrostaticamente il fluido. All'aumentare dell'intensità del campo elettrico, la superficie del fluido sulla punta del capillare si allunga formando il cosiddetto "cono di Taylor". Se all'interno del liquido le forze elettrostatiche dovute alla repulsione di cariche simili superano la tensione superficiale, il fluido carico viene emesso a partire dall'apice del cono di Taylor e accelerato verso il collettore.

Durante il tragitto verso il collettore il getto subisce un processo di instabilità (*whipping instability*) che porta all'assottigliamento del getto stesso, aumenta il tempo di transito e la lunghezza del percorso consentendo l'evaporazione del solvente.

Le fibre sono poi raccolte in un collettore. Le configurazioni possibili per i collettori variano a seconda delle applicazioni: per *mats* di fibre orientate casualmente si utilizzano collettori stazionari; per *mats* di fibre allineate si ricorre a collettori rotanti (in questo caso la velocità di rotazione gioca un ruolo fondamentale nel determinare il grado di anisotropia).

La conducibilità e la porosità del collettore determinano invece la densità di impaccettamento (*packing density*) delle fibre raccolte.

Diversi parametri del processo (tensione applicata, velocità di flusso e distanza capillare-collettore) e della soluzione (concentrazione del polimero, volatilità del solvente e

conducibilità della soluzione) possono influenzare la formazione e la morfologia delle fibre. Sebbene si possano individuare delle relazioni generali tra la morfologia delle fibre e i vari parametri sopraelencati (Tabella 1.1), l'esatta influenza di ciascuno di essi dipende dal particolare sistema polimero/solvente.

Tabella 1.1 Effetti dei parametri di processo e della soluzione sulla morfologia delle fibre.

PARAMETRI	EFFETTI SULLA MORFOLOGIA DELLE FIBRE
Tensione applicata	Aumentando la tensione il diametro delle fibre inizialmente diminuisce, poi torna ad aumentare.
Velocità di flusso	All'aumentare della velocità di flusso aumenta il diametro delle fibre e le dimensioni dei pori, ma aumentano i difetti perché le fibre non si asciugano del tutto prima di raggiungere il collettore.
Distanza capillare-collettore	Influenza la dimensione delle fibre di uno-due ordini di grandezza. All'aumentare della distanza il diametro delle stesse diminuisce. Se però la distanza è troppo piccola si formano difetti.
Concentrazione del polimero	Influenza sia la viscosità che la tensione superficiale della soluzione. Se questa è troppo diluita la fibra si rompe prima di raggiungere il collettore, mentre se è troppo concentrata non riesce a formarsi.
Conducibilità della soluzione	All'aumentare della conducibilità il diametro diminuisce. Ma soluzioni molto conduttibili sono altamente instabili in presenza di campi elettrici elevati e il diametro della fibra risulta assai variabile.
Volatilità del solvente	Affinché avvenga una sufficiente evaporazione del solvente durante il tragitto capillare-collettore è necessario usare un solvente volatile. Al diminuire della volatilità del solvente diminuisce la densità dei pori.

1.7.6 Matrici ibride elettrofilate di SAP e PCL

La validità dell'utilizzo di nanofibre elettrofilate per impieghi in ambito biomedico è già stata dimostrata in numerose pubblicazioni scientifiche. Importanti risultati sono stati ottenuti dal gruppo di ricerca di Dettin *et al.* nella preparazione di superfici e supporti per il tessuto osseo. *Scaffolds* composti da nanofibre di PCL elettrofilate assieme a SAP hanno dimostrato una

particolare capacità nel promuovere i processi di adesione e differenziazione degli osteoblasti umani, incrementando l'espressione genica di specifiche proteine quali la fosfatasi alcalina, la sialoproteina ossea e la osteopontina [43].

L'impiego del PCL come supporto di adesione e crescita di differenti tipi di cellule è stato sperimentato da molti gruppi di ricerca [44], ma la sua utilità in campo biomedico risulta incrementata dall'arricchimento con molecole in grado di dialogare con le cellule. Gli idrogeli di peptidi auto-assemblanti (SAP) sono materiali nanostrutturati in grado di creare un ambiente favorevole per la coltura cellulare.

La produzione di fibre ibride PCL-SAP crea i presupposti per l'inserimento di sequenze adesive specifiche e modifica in modo incisivo le proprietà superficiali delle fibre come la bagnabilità. Gli *scaffold* ibridi ottenuti presentavano fibre di PCL di qualche centinaio di nanometri di diametro arricchite all'interno da fibre di SAP di diametro dieci volte più piccolo. La soluzione per l'electrospinning si è ottenuta sciogliendo il 10% in peso di PCL + SAP (in rapporto 95:5) in esafluoroisopropanolo (HFIP).

L'adesione cellulare degli osteoblasti sugli *scaffold* arricchiti con diversi tipi di peptidi auto-assemblanti (EAK, DAK, EAbuK, EYK, RGD-EAK e RGD-EAK_{sc}, quest'ultimo introdotto come sequenza "scrambled" di controllo) alla medesima concentrazione, è risultata maggiore rispetto al PCL non arricchito (Figura 1.15). L'aumento rispetto al controllo di PCL è risultato essere addirittura di un 90% nel caso di PCL/RGD-EAK.

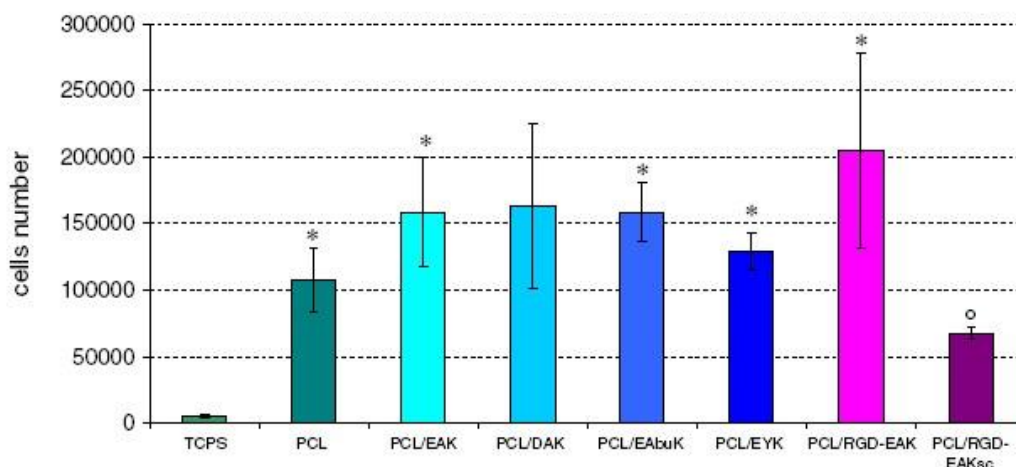


Figura 1.15 L'adesione degli *h*-osteoblasti sui vari *scaffold* dopo 2 ore di semina (2×10^5 cellule/*scaffold*) valutata con il MTT test. * = $p < 0.05$ vs PCL/RGD-EAK_{sc}, ^o = $p < 0.05$ vs PCL. Il tissue-culture polystyrene (TCPS) è usato come confronto statistico.

Anche l'analisi della quantità di calcio, indice della differenziazione e proliferazione degli osteoblasti, è risultata nettamente a favore delle matrici arricchite con SAP (Figura 1.16). Anche in questo caso i risultati migliori si sono ottenuti con RGD-EAK, ovvero con la sequenza del peptide auto-aggregante EAK coniugato con la sequenza adesiva RGD.

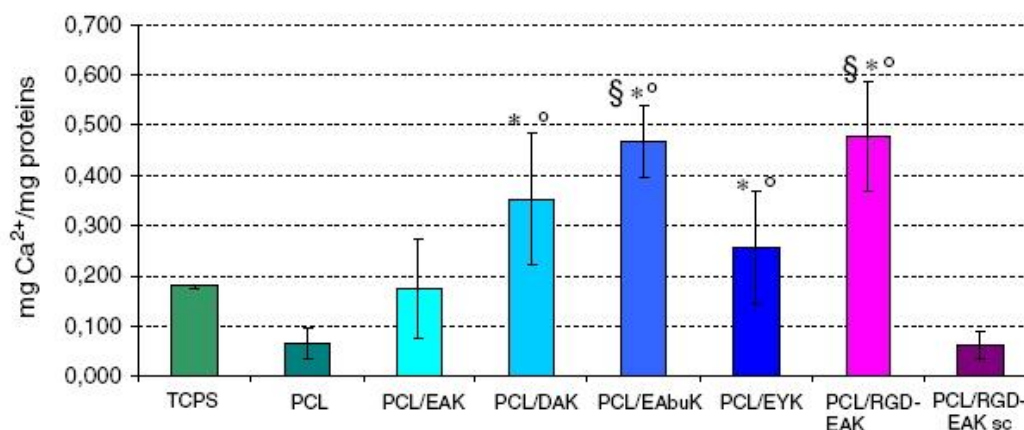


Figura 1.16 Quantità di calcio dopo 7 giorni dopo la semina sugli h-osteoblasti (2×10^5 cellule/scaffold) tramite il metodo o-CPC. * = $p < 0.05$ vs PCL/RGD-EAK_{sc}, ° = $p < 0.05$ vs PCL, § = $p < 0.05$ vs TCPS. Il tissue-culture polystyrene (TCPS) è usato come confronto statistico.

Negli esperimenti riportati in [43] si era dimostrato come gli osteoblasti umani fossero in grado di discriminare tra arricchimenti di diverso tipo e fibre di solo PCL alla concentrazione peptidica del 5% w/w rispetto al PCL stesso.

1.8 Scopo della tesi

La presente tesi nasce dall'incontro tra differenti competenze, e dall'apporto delle specifiche esperienze sperimentali, tra il gruppo di Rigenerazione Nervosa dell'Ospedale Universitario di Aachen e il gruppo di Bioingegneria Chimica dell'Università degli Studi di Padova.

Qui a Padova è stato recentemente sviluppato l'arricchimento di fibre elettrofilate di PCL con peptidi auto-assemblanti di sintesi. La sperimentazione con osteoblasti umani su matrici intrecciate di nanofibre ha confermato il gradimento delle cellule verso tale matrice. D'altro canto il gruppo di Aachen sta da tempo lavorando ad uno *scaffold* di fibrina, in cui sono

inserite come guida fibre elettrofilate di PCL allineate, per sviluppare supporti 2D e 3D per la crescita o la riparazione di tessuto nervoso (Figura 1.17).

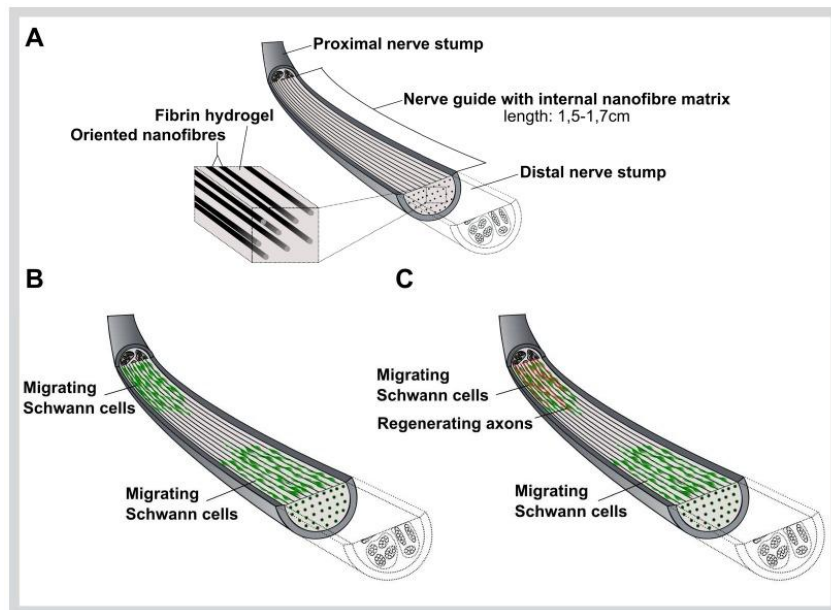


Figura 1.17 Rappresentazione della rigenerazione nervosa, mediata da nanofibre orientate, argomento di lavoro del gruppo di Aachen.

Punto d'unione tra le diverse esperienze è il presente lavoro, in cui fibre elettrofilate e allineate di PCL arricchite con peptidi auto-assemblanti sono state utilizzate nello *scaffold* messo a punto dal gruppo di ricerca tedesco.

La presente tesi sperimentale ha riguardato innanzitutto la produzione di tre differenti peptidi auto-aggreganti, due dei quali sono stati funzionalizzati con sequenza adesive. Tali molecole sono state utilizzate per la preparazione di fibre nanometriche ibride PCL-SAP. Saggi cellulari con cellule di Schwann sono stati eseguiti sui supporti bidimensionali di fibre allineate ricoperti di fibrina.

Il lavoro di tesi ha inoltre riguardato studi conformazionali sui differenti peptidi mediante dicroismo circolare, per valutare la possibile perturbazione conformazionale prodotta dall'inserimento delle sequenze adesive e la determinazione dei gruppi amminici superficiali nelle fibre ibride.

Capitolo 2

Materiali, strumenti e metodi

Lo svolgimento della parte sperimentale di questo progetto di tesi ha comportato l'utilizzo di sostanze chimiche e strumentazione di laboratorio. In questo capitolo, in primo luogo verranno elencati i principali reagenti e gli strumenti utilizzati; poi, verranno brevemente descritte le diverse metodologie adoperate.

2.1 Materiali

2.1.1 Reagenti

Reagenti forniti da *Advanced Biotech Italia* (Milano, Italia):

- HBTU;
- HOBt.

Reagenti forniti da *Biosolve* (Valkenswaard, Olanda):

- NMP;
- Piperidina;
- TFA;
- DIPEA;
- DCM;

Reagenti forniti da *Avantor Performance Materials* (Center Valley, PA, U.S.A.)

- Metanolo;
- Etanolo.

Reagenti forniti da *Carlo Erba* (Milano, Italia):

- Sodio fosfato monobasico.

Reagenti forniti da *Sigma-Aldrich* (Steinheim-Germania):

- Acetonitrile;
- Acetone;
- DMF;
- TES;
- TEA;
- NaOH;
- HCl;
- HNO₃;
- H₂SO₄.

Reagenti forniti da *Applied Biosystems* (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA):

- Anidride acetica;
- Reagenti utilizzati per effettuare il *test alla ninidrina* (o *Kaiser test*):
 - ✓ Monitor 1: soluzione al 76% (w/w) di Fenolo/Etanolo;
 - ✓ Monitor 2: soluzione 0.2 mM di KCN/Piridina;
 - ✓ Monitor 3: soluzione 0.28 M di Ninidrina/Etanolo.

Reagenti forniti da *Novabiochem* (Merck, Darmstadt, Germania):

- tutti gli amminoacidi protetti usati per la sintesi peptidica su fare solida;
- resine protette Rink-Amide MBHA.

Reagenti forniti da *Prolabo* (Merck, Darmstadt, Germania):

- Dietil-etero.

Reagenti forniti dalla ditta *Pierce* (Rockford, IL, USA):

- standard H per analisi amminoacidica;
- PITC per analisi amminoacidica.

Reagenti per l'analisi amminoacidica forniti dalla ditta *Waters* (Milford, MA, USA):

- soluzione diluente per campioni Pico Tag ($3,9 \times 10^{-6}$ M Na₂HPO₄ in H₂O, pH 7,4, CH₃CN 5%);

- eluente A della Pico Tag (soluzione a pH 6,4, preparata aggiungendo 19,0 g di NaOAc × 3 H₂O MilliQ, 0,5 mL di TEA, 200 µL di soluzione EDTA (100 mg EDTA in 100 mL di H₂O MilliQ) a 940 mL con H₂O MilliQ, quindi aggiunta di 60 mL di CH₃CN);
- eluente B della Pico Tag (200 µL di soluzione EDTA (100 mg di EDTA in 100 mL di H₂O MilliQ) aggiunta di una miscela di 600 mL di CH₃CN e 400 mL di H₂O MilliQ).

2.1.2 Peptidi per la funzionalizzazione

Peptidi utilizzati per la realizzazione degli *scaffolds*:

EAK 16 II

(*PM: 1614.83 Da*)

Sequenza:

H-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH₂

Presente in laboratorio come grezzo ottenuto in sintesi precedenti, è stato purificato e caratterizzato durante la tesi.

RGD-EAK

(*PM: 1943.16 Da*)

Sequenza:

H-Arg-Gly-Asp-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH₂

Sintetizzato, purificato e caratterizzato nel corso della tesi.

RGD-EAK-IKVAV

(*PM: 2453.81 Da*)

Sequenza:

H-Arg-Gly-Asp-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ile-Lys-Val-Ala-Val-NH₂

Sintetizzato, purificato e caratterizzato nel corso della tesi.

2.2 Strumenti

Per lo sviluppo della parte sperimentale di questo lavoro di tesi si sono utilizzate diverse apparecchiature di laboratorio chimico.

2.2.1 Sintetizzatore per sintesi peptidica su fase solida

Per realizzare le sintesi peptidiche è stato utilizzato il sintetizzatore automatico prodotto dalla *MultiSynTech* (Witten, Germania) modello Syro I (Figura 2.1).



Figura 2.1 Sintetizzatore Syro I (*MultiSynTech*).

Sono stati inoltre utilizzati: un evaporatore rotante (Laborota 4100-Efficient, *Heidolph Instruments s.r.l.*, Milano, Italia), ed un liofilizzatore (Lioph. Lock 4.5, *Labconco*, Kansas city, MO, USA).

2.2.2 Test alla ninidrina e test alla piperidina

Per eseguire questi test è stato necessario l'uso di uno spettrofotometro UV/Vis Lambda 2 (Figura 2.2), modello fornito da *Perkin Elmer* (Waltham, Massachusetts, USA).



Figura 2.2 Spettrofotometro UV/Vis Lambda 2.

2.2.3 Cromatografia

Le fasi di purificazione peptidica post sintesi sono state effettuate mediante l'utilizzo di tre diversi sistemi cromatografici:

- HPLC Waters 600 Controller, accoppiato a rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487. Il cromatogramma viene eseguito da un registratore fornito dalla Carlo Erba Strumentazione e prodotto dalla *Kipp & Zonen* (Delft, Olanda) modello BD40/BD41 Recorder.
- HPLC Waters 600E Controller, munito di auto campionatore 717 e di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487. Il cromatogramma e l'integrazione dei dati sono stati sviluppati dal programma Empower (*Waters*, Milford, MA, USA).
- HPLC Waters 1525 Binary Pump, munito di auto campionatore 2707 e di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2498. Il cromatogramma e l'integrazione dei dati sono stati sviluppati dal programma Empower Pro (*Waters*, Mildford, MA, USA).

Per eseguire le analisi cromatografiche sono stati utilizzati due diversi eluenti:

- Eluente A: 0.05% di TFA in H₂O MilliQ (fase mobile acquosa);
- Eluente B: 0.05% di TFA in acetonitrile (fase mobile organica).

L'acqua MilliQ utilizzata è stata distillata con il distillatore della ditta *Bibby-Scientific* (Staffordshire, UK) ed è stata de-salicata e privata di componenti organici mediante il sistema MilliQ della ditta *Waters*.

Per le analisi cromatografiche sono state utilizzate colonne costituite da gel di silice funzionalizzata, con catene idrocarburiche lineari di atomi di carbonio (fase stazionaria apolare), che presentano caratteristiche diverse:

- Delta Pak C₁₈ semipreparativa (*Waters*), 15 µm, 100 Å, 7.8 × 300 mm;
- Nova Pak C₁₈ semipreparativa (*Waters*), 6 µm, 60 Å, 7.8 × 300 mm;
- Zorbax 300SB C₁₈ semipreparativa (*Agilent*), 5 µm, 300 Å, 9.4 × 250 mm;
- Vydac Monomeric C₁₈ analitica (*Grace*), 5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm;
- Symmetry Shield C₈ analitica (*Waters*), 5 µm, 100 Å, 4.6 × 250 mm.

2.2.4 Analisi di massa

Le analisi di massa sono state effettuate presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli studi di Padova, in collaborazione con il Dott. D. Dalzoppo. Sono state eseguite con uno strumento ESI-TOF, modello Mariner System 5220 dell'*Applied Biosystem* (Perkin-Elmer, Analytical Instruments, Norfolk, CT, USA).

2.2.5 Analisi di dicroismo circolare (CD)

Per effettuare gli studi conformazionali sui peptidi auto-assemblanti EAK, RGD-EAK, e RGD-EAK-IKVAV è stato utilizzato uno spettropolarimetro *Jasco* (Tokyo, Japan) modello J-710. Gli spettri sono stati registrati ed elaborati tramite il programma J-700 fornito dalla *Jasco* stessa.

2.2.6 Analisi amminoacidica

La normalizzazione degli spettri CD ottenuti ha richiesto un'analisi amminoacidica per ogni sequenza peptidica. La preparazione dei campioni è stata condotta con Pico-Tag Work Station della *Waters*; per l'analisi cromatografica è stata utilizzata la colonna fornita dalla stessa ditta Pico-Tag Column (3,9 × 300 mm). La cella cilindrica in quarzo fuso con cammino ottico di 0,05 cm impiegata per tutte le analisi CD è stata fornita dalla ditta *Hellma* (Jena, Germany).

2.3 Metodi

2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida

I peptidi di questa tesi sono stati sintetizzati mediante sintesi peptidica su fase solida “SPPS” (“*Solid Phase Peptide Synthesis*”) messa a punto nel 1963 da Bruce Merrifield [45,46], adottando la chimica Fmoc. La tecnica “SPPS” rappresenta, finora, il metodo più vantaggioso per la sintesi peptidica su piccola e media scala, permettendo di ottenere un peptide in soli 5 passaggi fondamentali:

1. accrescimento progressivo della sequenza di amminoacidi su di una resina che ne diventa la base solida di partenza;
2. sblocco della catena amminoacidica sintetizzata dalla resina e rimozione dei gruppi protettori in catena laterale;
3. purificazione del peptide d’interesse dai possibili sottoprodotti di reazione;
4. eventuali modifiche chimiche post-sintesi attuate sul peptide per renderlo più idoneo alle successive sperimentazioni;
5. caratterizzazione.

Durante la sintesi, la crescita del peptide avviene dall’estremità C-terminale verso l’N-terminale, e il gruppo α -carbossilico del ultimo amminoacido della sequenza viene ancorato al supporto solido fornito dalla resina, tramite un *linker*: la crescita della catena polimerica avviene così in fase eterogenea.

Il vantaggio fondamentale di questa tecnica è rappresentato proprio dalla presenza di una matrice insolubile. Questa permette infatti di isolare il peptide in crescita, ad ogni ciclo di reazione, attraverso una semplice filtrazione; in questo modo l’intera sintesi può avvenire in un unico reattore. Lo spreco di materiale risulta minore grazie alla minor manipolazione ed alla elevata automatizzazione, che a sua volta consente una riduzione dei tempi di lavoro.

I supporti consistono in resine a base polimerica come polistirene copolimerizzato all’1% con divinilbenzene o resine poliacrilammidiche. Questi materiali presentano la capacità di gonfiarsi in presenza di solventi polari non protici come N,N-dimetilformamide (DMF), N-metil-2-pirrolidone (NMP) e diclorometano (DCM).

A seconda della scelta del *linker* per ancorare il peptide in crescita alla resina si può ottenere, in seguito allo sblocco (*cleavage*), un peptide acido, ammido terminale o caratterizzato dalla presenza di un particolare gruppo funzionale.

In questo lavoro di tesi si è utilizzata la resina Rink Amide MBHA (100-200 mesh) con grado di funzionalizzazione 0.7 mmoli/g (Figura 2.3).

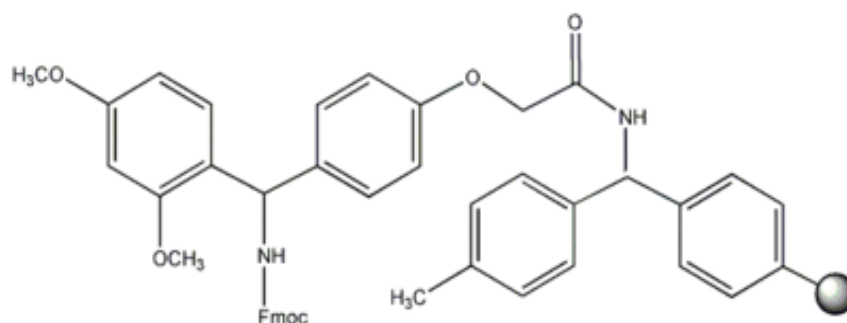


Figura 2.3 La resine Rink-Amide MBHA. Il pallino indica dov'è attaccato il filler.

La sintesi della catena peptidica coinvolge una serie di cicli di reazione, che consistono in deprotezione e condensazione (*coupling*). Prima viene rimosso il gruppo protettore α -amminico del residuo amminoacidico legato al peptide in crescita; questo grazie ad una soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti e poi una soluzione al 20% di piperidina in DMF per 12 minuti. Segue poi la reazione di condensazione tra il gruppo α -amminico e la funzione α -carbossilica attivata di un altro residuo, con la conseguente formazione di un nuovo legame peptidico. In Figura 2.4 viene schematizzata la procedura di sintesi peptidica su fase solida SPPS.

I gruppi protettori delle catene laterali sono necessari in virtù del fatto che gli amminoacidi, oltre ai due gruppi funzionali terminali della catena principale, possono contenere in catena laterale gruppi reattivi, che potrebbero interferire con la formazione del legame peptidico di interesse. Questi gruppi protettori devono però rimanere stabili nelle condizioni di deprotezione del gruppo protettore α -amminico della catena principale, altrimenti la loro funzione verrebbe meno; questo tipo di protezione viene denominata “protezione ortogonale”. Nella chimica Fmoc, a protezione del gruppo α -amminico dell'amminoacido, è utilizzato il gruppo base-labile Fmoc (9-fluorenilmetilossicarbonile) riportato in Figura 2.5 [47,48], che

viene rimosso in genere con piperidina, ed in catena laterale vengono utilizzati gruppi protettori acido-labili, rimossi generalmente con acido trifluoroacetico (TFA).

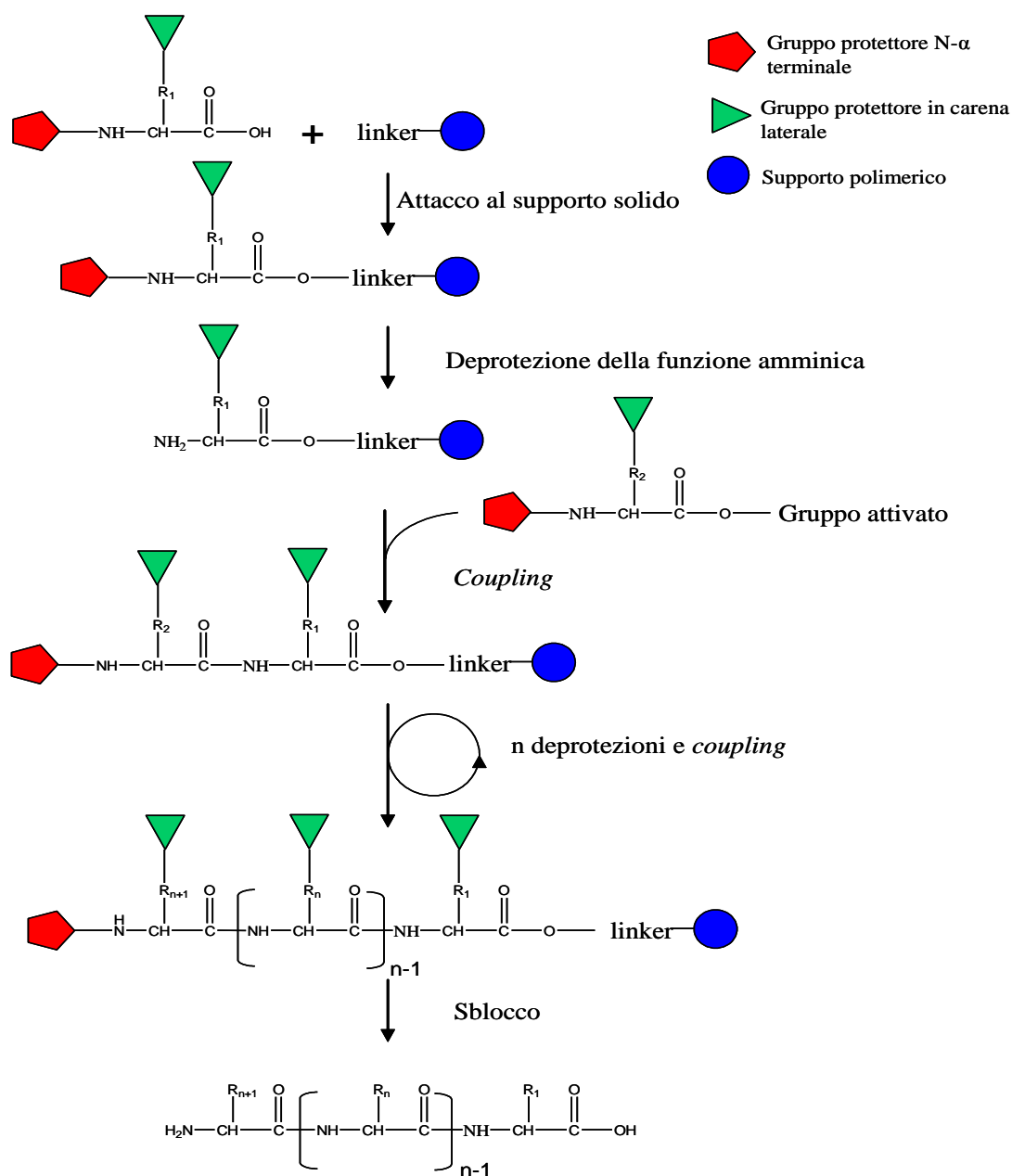


Figura 2.4 Schema generale della Sintesi Peptidica su Fase Solida SPPS.

Durante la sintesi di un peptide possono crearsi differenti sottoprodotti costituiti da sequenze incomplete (mancanti di uno o più residui, oppure troncate); questo rappresenta uno dei limiti della SPPS poiché la purificazione del prodotto desiderato da queste “impurezze” non risulta sempre facile, data la grande somiglianza.

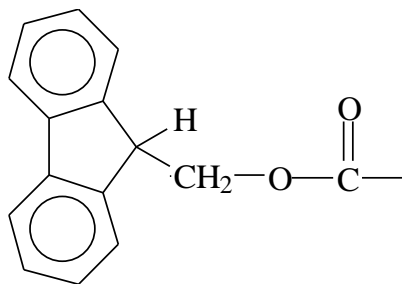


Figura 2.5 Struttura del gruppo protettore del terminale amminico denominato *Fmoc*.

Al fine di conoscere la resa di reazione, viene utilizzato il test alla ninidrina (“*Kaiser test*”). Se il test fornisce come risultato una resa non soddisfacente (< 98%), è possibile inserire nel programma di sintesi un ulteriore ciclo di *coupling* dello stesso amminoacido prima di passare alla sua deprotezione.

Come alternativa, è anche possibile bloccare tutti i gruppi amminici terminali che non hanno reagito, attraverso una reazione di *capping* con anidride acetica.

2.3.1.1 Test sulla resa di funzionalizzazione della resina

Per la valutazione del grado di funzionalizzazione della resina, ossia l’attacco del primo amminoacido, si effettua una procedura chiamata “*Test alla piperidina*”. Questo test permette di calcolare la resa di reazione mediante la quantificazione spettrofotometrica del prodotto N-(9-fluorenilmetil) piperidina, che si forma a seguito dello sblocco del gruppo *Fmoc* dal peptide su resina.

Un campione di 4÷8 mg di resina funzionalizzata, seccato sotto vuoto per circa 1 ora, e accuratamente pesato, viene trattato con una soluzione al 20% di piperidina in DMF. La soluzione viene lasciata a contatto con la resina per 15 minuti e agitata manualmente. La deprotezione del gruppo amminico del residuo legato al supporto, genera N-(9-fluorenilmetil) piperidina che assorbe a 301 nm ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Dopo aver portato la miscela a un volume di 50 mL con DMF, si misura l’assorbanza della soluzione alla lunghezza d’onda sopraindicata.

La sostituzione sperimentale, espressa in [mmoli/g] viene calcolata con la seguente formula:

$$\text{Sostituzione} = \frac{Abs_{301} \times Vol(mL)}{7800 \times wt(g)}$$

dove Abs_{301} è l'assorbanza a 301 nm, Vol è il volume della soluzione espresso in [mL], e wt indica la massa del campione di resina seccato espressa in grammi.

La resa della reazione di calcola quindi così:

$$\% \text{ RESA} = \frac{\text{Sostituzione sperimentale}}{\text{Sostituzione teorica}} \times 100$$

La sostituzione teorica è riportata sulla confezione o nel data-sheet della resina.

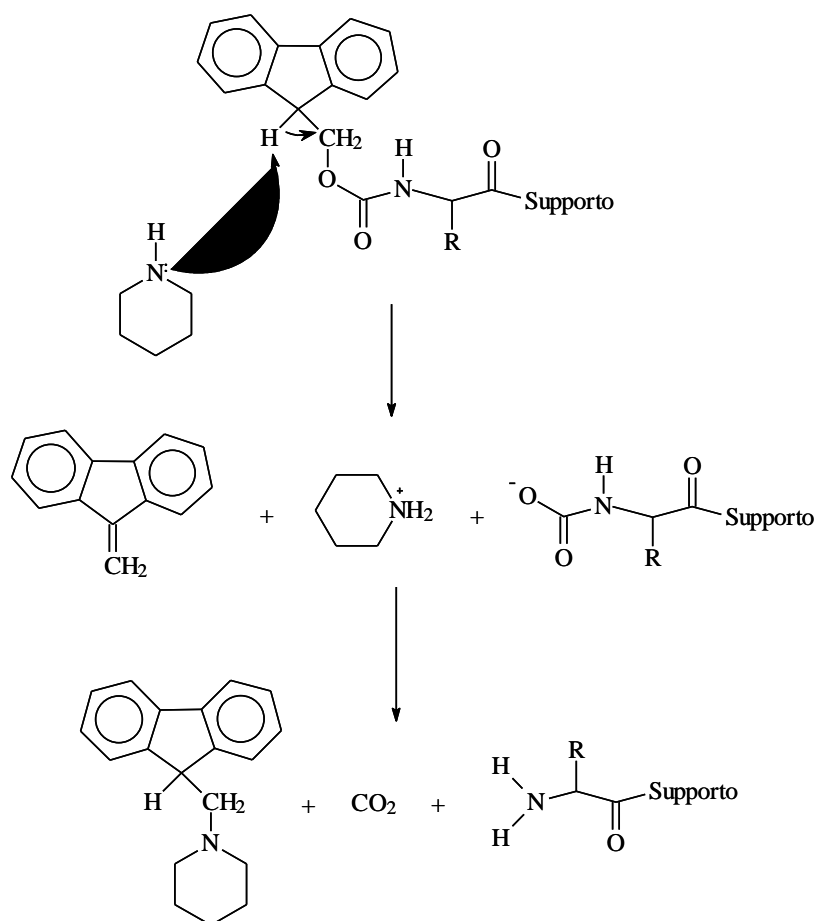


Figura 2.6 Deprotezione del gruppo Fmoc con piperidina.

2.3.1.2 Attivazione del gruppo carbossilico

La realizzazione delle reazioni di coniugazione amminoacidica coinvolge anche l'estremità carbossilica dell'amminoacido destinato a legarsi al peptide in crescita. Per rendere reattivo il gruppo carbossilico è necessario attivarlo, rendendolo più elettrofilo.

Tra i possibili metodi di attivazione del gruppo carbossilico quello utilizzato maggiormente nelle operazioni di sintesi peptidica su fase solida è l'attivazione *in situ*. Questa tecnica prevede l'uso di un agente attivante, il 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU), in presenza di N-idrossibenzotriazolo (HOBT) e di una base quale l'ammina terziaria N-N-diisopropiletilammina (DIPEA) [49, 50] (Figura 2.7).

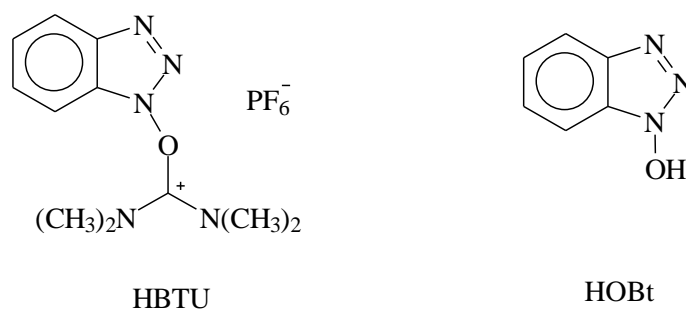


Figura 2.7 Struttura dei reagenti per l'attivazione del gruppo carbossilico: HBTU e HOBT.

La procedura automatizzata prevede l'utilizzo di 1 mL di una soluzione 0.5 M dello Fmoc-amminoacido da legare alla catena peptidica in crescita in DMF, di 1.2 mL di una soluzione 0.45 M di HBTU/HOBT in DMF e di 0.5 mL di una soluzione di DIPEA in NMP per *coupling*. La maggior parte delle reazioni di *coupling* può durare dai 20 minuti alle 2 ore. La procedura standard prevede l'inserimento di un residuo in 45 minuti, oppure in 90 minuti nel caso sia previsto un doppio *coupling*.

2.3.1.3 Test alla ninidrina

Per determinare la resa di *coupling* nelle reazioni di sintesi si utilizza il test alla ninidrina, o *Kaiser test*, il quale determina quantitativamente la presenza di gruppi amminici liberi.

La procedura prevede la preparazione di due provette: una contenente la soluzione di riferimento e una la soluzione sulla quale effettuare la misura. Si esegue il prelievo di un campione di resina compreso tra i 2 e gli 8 mg, che deve essere lavato con 3 aliquote di metanolo, alla prima delle quali si aggiungono 2-3 gocce di acido acetico (per evitare un eventuale sblocco dello Fmoc). Il campione viene poi seccato sotto vuoto per circa un'ora e successivamente pesato in maniera accurata. Si procede poi seguendo il seguente protocollo:

- Si aggiungono in sequenza: 75 μL di Monitor 1, 100 μL di Monitor 2 e 75 μL di Monitor 3;
- Riscaldamento della miscela a bagnomaria a 100°C e la si lascia a tale temperatura per circa 5 minuti;
- Si aggiungono poi 4.8 mL di soluzione di etanolo al 60%;
- Dopo aver centrifugato si misura l'assorbanza del liquido surnatante a 570 nm.

La quantità di funzioni amminiche libere è calcolata mediante la seguente formula:

$$\mu\text{moli/g di gruppi amminici} = \frac{[A \cdot V \cdot 10^{-6}]}{\varepsilon \cdot P}$$

dove A è la differenza tra il valore di assorbanza del campione e il valore di assorbanza della soluzione di riferimento a 570 nm (75 μL di Monitor 1, 100 μL di Monitor 2 e 75 μL di Monitor 3 in 4.8 mL di soluzione di etanolo al 60%); V è il volume del campione espresso in mL; ε è il coefficiente di estinzione molare pari a $15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; P è il peso del campione espresso in mg.

La resa della reazione di *coupling* è data da:

$$\text{Resa \%} = \left\{ 1 - \left[\frac{\mu\text{moli / g di gruppi amminici}}{\text{sostituzione (mmoli / g)}} \right] \cdot 10^{-3} \right\} \cdot 100$$

La reazione attraverso la quale si ottiene il cromoforo detto complesso di Ruhemann che assorbe nel visibile a 570 nm è riportata in Figura 2.8.

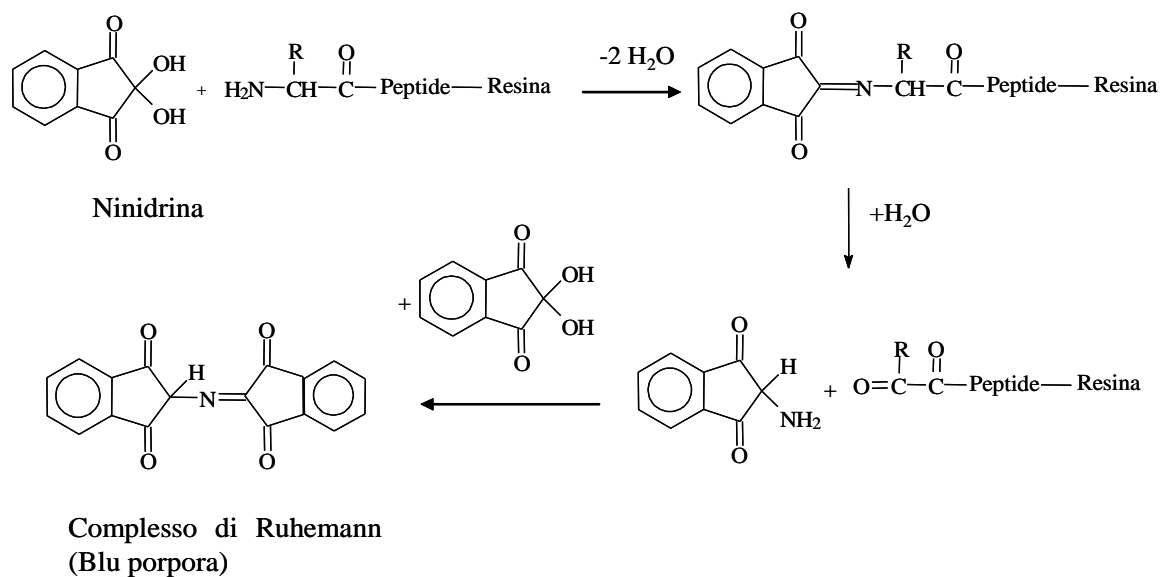


Figura 2.8 Reazione della ninidrina con il residuo N-terminale del peptide in crescita.

2.3.1.4 Sblocco del peptide dalla resina

Quando il peptide ottenuto dalla sintesi su fase solida viene trattato con la miscela di sblocco, si può ottenere la contemporanea liberazione delle catene laterali dai rispettivi gruppi protettori, oltre al distacco del peptide stesso alla resina.

La deprotezione delle catene laterali genera però specie altamente reattive, come carbocationi, che possono provocare modificazioni covalenti di alcuni residui amminoacidici. L'utilizzo di reagenti nucleofili, noti come *scavengers* (reattivi che hanno proprietà chimiche simili a quelle delle specie da proteggere), assieme al TFA durante lo sblocco, riduce in modo rilevante le reazioni collaterali indesiderate e pericolose.

La miscela di *scavengers* varia a seconda degli amminoacidi presenti nella sequenza e in base alla tipologia di gruppi protettori usati nelle catene laterali. La scelta della miscela di sblocco e il tempo richiesto dipendono innanzitutto dal tipo di resina impiegata, e dalla natura e dal numero dei gruppi protettori utilizzati in catena laterale.

Procedura generale di sblocco completo:

1. Al termine della sintesi si libera, con procedura automatizzata, la funzione N-terminale dal gruppo protettore Fmoc trattando il peptide protetto su resina con una soluzione 20% piperidina in DMF per 20 minuti;
2. il reattore con il peptide su resina viene lavato con DCM e messo a seccare sottovuoto per circa 2 ore (fino a peso costante);
3. il peptide su resina viene trasferito in un pallone e viene trattato con una soluzione 95% TFA, 2.5% H₂O MilliQ e 2.5% TES (v/v/v) [51];
4. la miscela viene mantenuta sotto blanda agitazione magnetica, a temperatura ambiente, per circa 1 ora e 30 minuti, tempo indicativo che può essere incrementato in funzione del numero e tipo di gruppi protettori presenti in catena laterale;
5. la resina viene separata per filtrazione su Gooch 3 e la soluzione contenente il peptide viene portata a volume ridotto mediante evaporatore rotante;
6. si aggiunge poi etere dietilico freddo (~ 4°C), ciò porta alla precipitazione del peptide, che viene poi filtrato utilizzando Gooch 4, seccato, sciolto con H₂O MilliQ e infine liofilizzato.

2.3.2 Purificazione mediante caratterizzazione cromatografica

Una volta sintetizzati i peptidi sono stati poi purificati attraverso la tecnica cromatografica *Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC).

La cromatografia è un metodo chimico-fisico che permette di separare i composti di una miscela sfruttando il differente equilibrio che ciascuno di essi instaura tra due diverse fasi: una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica ed una "fase mobile" che fluisce attraverso di essa [52]. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di "ritenzione"), rispetto a una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

L'HPLC a fase inversa è una cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria ha caratteristiche apolari, mentre per la fase mobile si possono utilizzare diverse miscele composte da soluzioni acquose e solventi organici (acetone nitrile nel caso in questione).

L'interazione dei peptidi nella fase stazionaria è di tipo idrofobico. Il campione da analizzare viene sciolto all'interno della fase mobile e viene fatto fluire in modo continuo attraverso la fase stazionaria immiscibile. I componenti maggiormente affini alla fase stazionaria vengono trattenuti e per questo motivo si muovono più lentamente con il flusso della fase mobile. Gli elementi con minor affinità, invece, sono debolmente trattenuti e quindi si muovono più velocemente. L'analisi cromatografica può essere eseguita in modalità isocratica o in gradiente; nel secondo caso si imposta un aumento graduale della concentrazione di solvente organico rispetto all'acqua, generando un aumento dell'idrofobicità della fase mobile. In questo modo si crea competizione tra la fase mobile e quella stazionaria provocando il rilascio dell'analita per una ben precisa concentrazione di solvente organico. Si è così in grado di sfruttare la diversa mobilità dei componenti per sottoporli ad analisi qualitativa e quantitativa.

Nella cromatografia liquida, utilizzata in questo lavoro di tesi, la fase mobile è costituita da un liquido mentre la fase stazionaria consiste in un altro liquido immiscibile adsorbito su particelle solide impaccate in una colonna. Le colonne cromatografiche, al fine di aumentarne l'efficienza, vengono riempite con gel di silice funzionalizzata (granuli con diametro pari a 3-10 μm), e vengono fatte di lunghezza compresa tra i 10 e i 30 cm e con diametri interni che variano tra i 3.9 e gli 8.0 mm. Importante è non sovraccaricare la colonna (*over loading*) e cercare di ottimizzare l'impaccamento della fase stazionaria; un eccessivo impaccamento infatti comporterebbe un rallentamento del flusso della fase mobile, rendendo necessario l'intervento di una pompa per accelerare i tempi.

Generalmente, i peptidi si separano meglio in ambiente acido, di conseguenza la maggior parte delle fasi mobili (eluenti) contiene basse concentrazioni di acido TFA (nel caso in esame lo 0,05%) il quale agisce come coppia ionica, aumentando la ritenzione, favorendo la solubilità dei peptidi e riducendo le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanolici presenti sulla fase stazionaria. In questo lavoro di tesi le analisi si sono effettuate utilizzando come eluenti lo 0,05% di TFA in H_2O MilliQ (Eluente A) e lo 0,05% di TFA in acetonitrile (Eluente B) opportunamente degasati con elio.

La soluzione contenente il campione viene introdotta in testa alla colonna cromatografica tramite aspirazione o per iniezione. All'uscita della colonna cromatografica è posto un rivelatore che può essere di varia natura: gli strumenti adoperati nel presente lavoro utilizzano spettrofotometri UV come detector e si è impostata la lunghezza d'onda (λ) a 214 nm, ovvero

in corrispondenza del picco di assorbimento del legame peptidico. In Figura 2.9 viene riportato lo schema di funzionamento dell'analisi cromatografica.

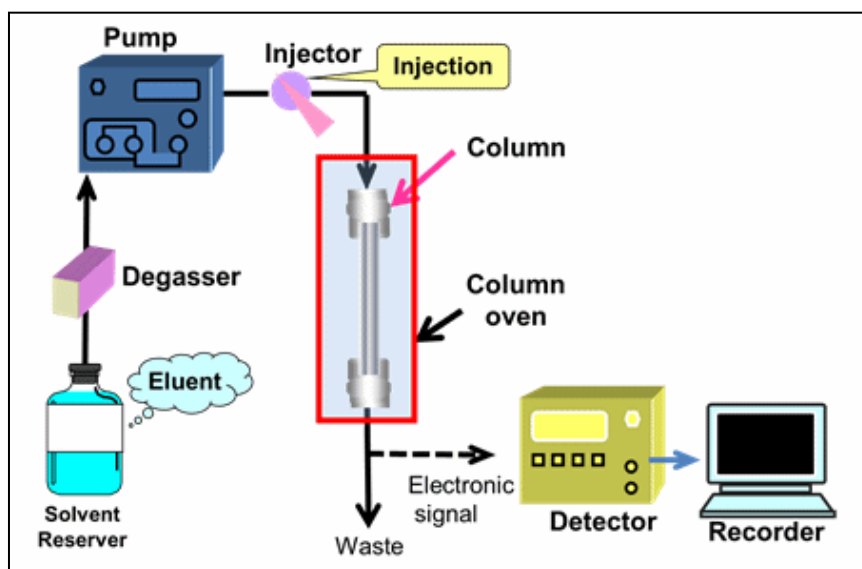


Figura 2.9 Schema un cromatografo liquido.

Nel seguente lavoro di tesi sono state eseguite analisi cromatografiche semipreparative ed analitiche. La semipreparativa si riferisce al primo processo di purificazione di un peptide, che consiste nell'isolamento del prodotto voluto e allontanamento dei componenti indesiderati. L'analitica permette invece una caratterizzazione più dettagliata del peptide, ovvero giungere alla sua identificazione e alla quantificazione del grado di purezza.

2.3.3 Spettroscopia UV/Vis

La radiazione UV/Vis copre un'ampia parte dello spettro elettromagnetico tra i 700 e i 10 nm; ma, generalmente le parti più utilizzate a scopi analitici sono il visibile (700-400 nm) e l'UV vicino (400-200 nm).

Il principio che regola la spettroscopia UV/Vis è quello di eccitare con una radiazione gli elettroni presenti nei livelli energetici di una certa molecola, promuovendoli negli orbitali molecolari a maggiore energia. Perché ciò si verifichi è necessario che la quantità di energia assorbita dall'elettrone sia almeno uguale alla differenza energetica tra i due orbitali.

In un classico spettrofotometro UV/Vis a doppio raggio, una radiazione policromatica generata da una sorgente (lampada a idrogeno o a deuterio per gli UV, lampada a tungsteno per il visibile) viene inviata ad un monocromatore; questo dispositivo seleziona la lunghezza d'onda d'interesse e la invia contemporaneamente ad una cella (con pareti in quarzo, trasparente alla radiazione) contenente la soluzione con il campione e ad un'altra cella contenente il solvente. In questo modo, con l'acquisizione dei dati tramite un rivelatore ed un registratore computerizzato, si possono facilmente eliminare le bande di assorbimento del solvente, e registrare lo spettro della sostanza in esame.

Secondo la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon_{\lambda} l M$$

dove A è la differenza tra il valore di assorbanza del campione e il valore di assorbanza della soluzione di riferimento, l è il cammino ottico espresso in cm, M è la molarità della soluzione, e ε_{λ} ($M^{-1}cm^{-1}$) è il coefficiente di estinzione molare della sostanza a quella particolare lunghezza d'onda.

Per basse concentrazioni e per valori di assorbanza comprese tra 0,1-0,8, esiste una correlazione lineare tra A e l , e l'equazione può quindi essere descritta da una retta passante per l'origine in cui, per un percorso ottico di 1 cm, il coefficiente angolare corrisponde ad ε_{λ} .

La scelta della lunghezza d'onda appropriata per effettuare le misure, viene fatta osservando lo spettro della sostanza. Per avere il massimo di sensibilità ci si deve posizionare a λ_{max} di assorbimento; tuttavia spesso vanno considerati anche altri aspetti:

- la lunghezza d'onda scelta deve essere in un intervallo in cui l'assorbanza non vari troppo rapidamente in funzione di λ ;
- se sono presenti altre sostanze o altri gruppi in grado di assorbire a λ_{max} è preferibile scegliere una banda di assorbimento che sia riconducibile al solo composto in esame.

2.3.4 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa (MS) è un metodo di analisi distruttivo, che consiste in un insieme di tecniche analitiche, particolarmente usate in chimica organica, che consentono di misurare

le masse molecolari e di determinare quindi la formula di struttura di composti incogniti, anche avendone a disposizione quantità estremamente esigue [53].

Il principio di base di questa tecnica si fonda sulla possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. Le molecole vengono ionizzate (secondo varie tecniche in relazione al tipo di sorgente impattante) nella camera di ionizzazione, dove diventano instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica. Una volta creati gli ioni in fase gassosa si passa all'analizzatore, dove questi vengono selezionati e poi separati, al rivelatore, in funzione dello spazio o del tempo, in base al loro rapporto m/z (massa/carica). Tutto l'impianto (Figura 2.10) necessita di un vuoto molto spinto, per impedire una perdita di ionizzazione dovuta ad urti con i gas atmosferici.

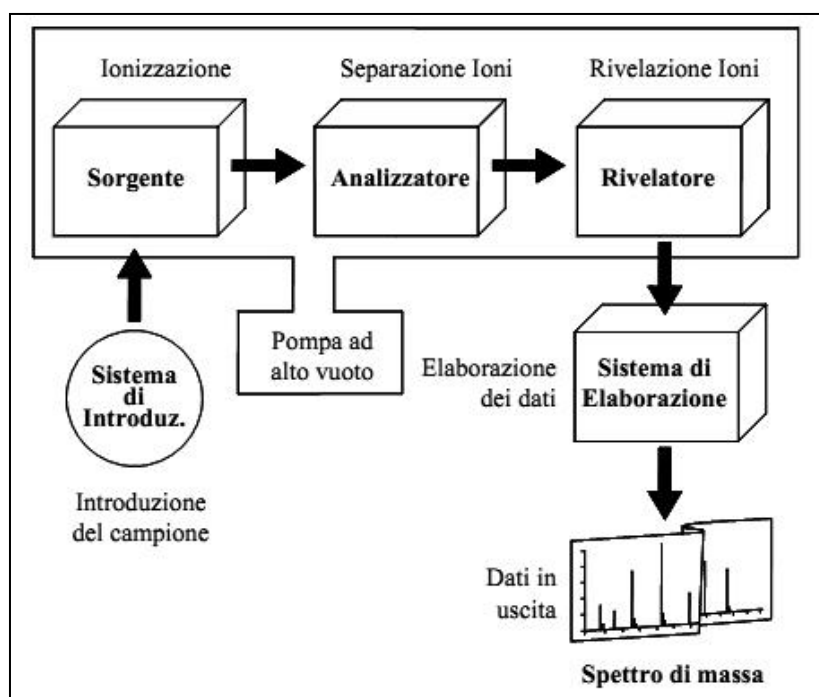


Figura 2.10 Schema di funzionamento di uno spettrometro di massa.

Le analisi di massa di peptidi/proteine utilizzati in questo lavoro di tesi, sono state eseguite con uno strumento ESI-TOF ed uno strumento MALDI-TOF. Vengono di seguito le peculiarità delle due tecniche:

- L'ESI-TOF utilizza una tecnica di ionizzazione nota come *ElectroSpray Ionization* (ESI) che permette una ionizzazione del campione a temperatura ambiente e la formazione di specie multicarica, accompagnata da un analizzatore di tipo TOF (*time of flight* = a tempo di volo) che seleziona gli ioni in base al loro rapporto m/z (massa/carica) e al tempo che essi impiegano per percorrere l'analizzatore. Il TOF può misurare valori di massa anche estremamente elevati con un'alta sensibilità. Un rivelatore infine, acquisisce il flusso di ioni e trasforma il flusso di corrente in un segnale che può essere amplificato, inviato ad un computer e poi processato dal software "Data Explorer TM".

L'ESI utilizza un gas inerte (di solito azoto) per favorire il processo di nebulizzazione provocato da una forte differenza di potenziale applicata all'ago metallico dell'iniettore che genera goccioline cariche di soluzione (analita e solvente). Questo processo avviene in soluzione (acquosa e organica) che viene poi nebulizzata in una camera termostata, ad 80°C in genere, in cui è applicato un campo elettrico. La nebulizzazione, comporta la formazione di piccole goccioline di solvente che contengono delle specie ionizzate (analita carico). Nella sorgente, il gas fluisce a bassa velocità per facilitare l'evaporazione del solvente, questo permette di trattare anche composti termolabili. Man mano che il solvente contenuto nelle goccioline evapora, queste si rimpiccioliscono fino a che la repulsione elettrica, aumentata a causa della crescente densità di carica, supera la tensione superficiale della goccia; a questo punto la gocciolina "scoppia" creando una corrente di ioni nudi che vengono poi indirizzati da un gradiente di campo verso l'analizzatore.

- Il MALDI-TOF utilizza invece il *MALDI* (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) come tecnica di ionizzazione: il campione è immerso in un largo eccesso di matrice e bombardato da un fascio laser. Il laser colpisce le molecole di matrice che, assorbendo la luce ultravioletta, passano ad uno stato eccitato e provocano un veloce riscaldamento della regione interessata; si ha quindi l'espulsione di aggregati di analita solvatato dalle molecole di matrice e una desolvatazione con conseguente trasferimento di un protone (reazione acido-base tra le molecole di analita e della matrice). L'analizzatore infine è sempre di tipo TOF.

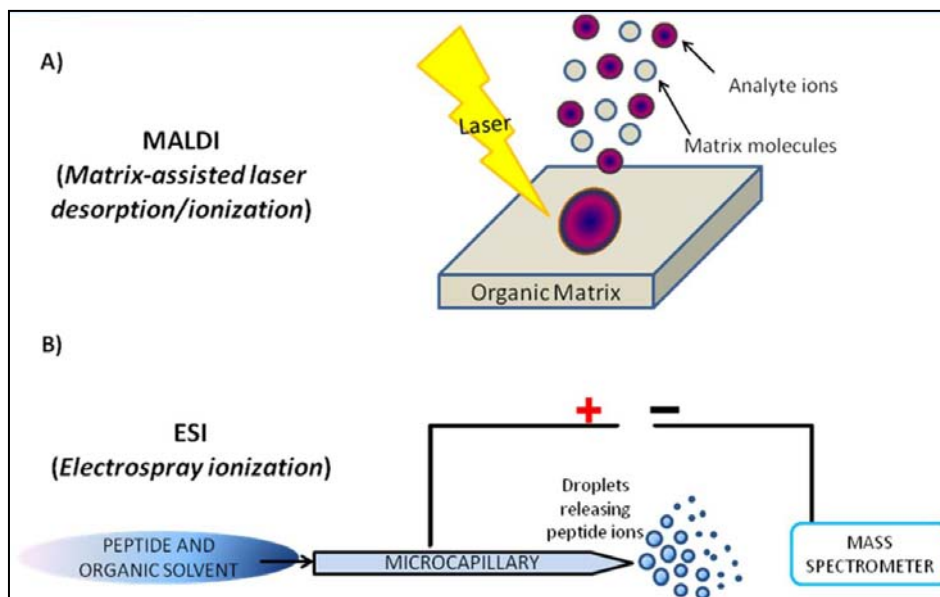


Figura 2.11 Rappresentazione schematica dei due diversi processi di ionizzazione

La rielaborazione di tali segnali fornisce uno spettro di massa: una serie di picchi di intensità variabile la cui posizione corrisponde ad un determinato valore di m/z mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati. Le intensità dei picchi sono espresse in percentuali del picco più intenso, il cosiddetto picco base, cui si assegna arbitrariamente il valore di 100. Il potere risolutivo ($PR = m/\Delta m$) dà una misura di quanto sensibile a differenze di massa è lo strumento utilizzato e dipende direttamente dalla massa del campione analizzato. La maggior parte degli elementi che compongono i composti organici possiede diversi isotopi naturali di cui di solito il più leggero è anche il più abbondante: lo studio del pattern isotopico relativo ad un particolare ione, nel caso la risoluzione dello strumento sia sufficientemente elevata da mostrarlo e conoscendo le percentuali di abbondanza naturale degli isotopi di ogni elemento presente, è un altro strumento possibile per risalire alla formula molecolare di un composto incognito.

2.3.5 Dicroismo Circolare

Il dicroismo circolare (CD) viene utilizzato ai fini dello studio delle conformazioni assunte dalle macromolecole in soluzione. Questa tecnica è legata alla proprietà delle molecole chirali, quali le proteine, di interagire con la luce polarizzata. La luce piano-polarizzata si può scomporre in due componenti, circolarmente polarizzata sinistra (L) e circolarmente

polarizzata destra (R), aventi la stessa lunghezza d'onda, fase e ampiezza ma opposto senso di rotazione. Le due componenti attraversano un mezzo otticamente attivo con velocità v_L e v_R diverse, dovute ai differenti indici di rifrazione, n_L e n_R ; di conseguenza, uscendo sfasate, si verifica una rotazione del piano di polarizzazione, dando origine al fenomeno della rotazione ottica.

Il potere rotatorio Φ misura l'angolo di rotazione del piano di polarizzazione della radiazione emergente rispetto a quello della radiazione incidente, secondo la relazione:

$$\Phi = \frac{180 \cdot l \cdot (n_L - n_R)}{\lambda}$$

dove l è il cammino ottico del composto chirale e $(n_L - n_R)$ è la birifrangenza circolare.

Con la tecnica del dicroismo circolare si misura la differenza di assorbimento tra la luce polarizzata circolarmente destra e quella polarizzata circolarmente sinistra. A seguito di questo assorbimento, diverso in intensità per i due versi di polarizzazione, il vettore elettrico non oscilla più su un solo piano, ma inizia a descrivere un'ellisse; il semiasse minore (a) e maggiore (b) dell'ellisse formano un triangolo e l'angolo θ , opposto al semiasse minore, è detto ellitticità. Assorbimenti A_L e A_R diversi (se presenti) escono da un mezzo otticamente attivo con diversa ampiezza: ciò è imputabile ai differenti coefficienti di estinzione molare, ε_L e ε_R .

$$\theta = \arctg \left(\frac{a}{b} \right)$$

θ è legato alla differenza delle assorbanze A_L e A_R secondo la relazione:

$$\theta = \frac{2.303 \cdot (A_L - A_R) \cdot 180}{4 \pi} = 33 \cdot \Delta A$$

Variando la lunghezza d'onda λ varia anche ΔA . Il dicroismo circolare studia quindi la variazione di ellitticità θ in funzione della lunghezza d'onda λ .

Per meglio confrontare campioni diversi per concentrazione e cammino ottico, è stata introdotta l'**ellitticità molare** $[\theta]$:

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot 100}{C \cdot l} = 3300 \cdot \Delta\varepsilon$$

dove C è la concentrazione molare della soluzione contenente il campione. La seconda uguaglianza risulta dalla legge di Lambert-Beer.

In particolare, per peptidi e proteine si parla di ellitticità molare per residuo:

$$[\theta]_R = \frac{[\theta]}{(n^\circ \text{ residui} - 1)}$$

dove con $(n^\circ \text{ residui} - 1)$ si intende il numero di cromofori presenti nella molecola in assenza di altri gruppi CD visibili, ovvero il numero di legami peptidici.

Perché un composto presenti attività chirottica, e sia quindi CD attivo, si devono verificare due condizioni:

1. il composto deve possedere cromofori in grado di assorbire determinate λ ;
2. i cromofori devono essere chirali, o intrinsecamente (asimmetria configurazionale), o per induzione da centri asimmetrici vicini, o per asimmetria conformazionale (strutture elicoidali).

La spettroscopia CD è stata estensivamente applicata alla caratterizzazione strutturale di peptidi e proteine. Sia il gruppo peptidico che gli anelli aromatici dei residui Trp, Tyr e Phe sono cromofori planari simmetrici, e quindi achirali, che diventano otticamente attivi per induzione asimmetrica sia da parte dei carboni C_α di ciascun residuo, sia da parte della struttura secondaria chirale della catena polipeptidica.

L'importanza della spettroscopia CD per studi conformazionali sta nel fatto che le proprietà ottiche rotatorie sono estremamente sensibili alla geometria molecolare: differenti conformazioni di catene polipeptidiche danno luogo a differenti modi di accoppiamento dei momenti di transizione dei gruppi cromofori presenti, con effetti vistosi sugli spettri CD.

Le applicazioni del CD per gli studi conformazionali di peptidi (o proteine) possono essere raggruppate in:

1. monitoraggio delle variazioni conformazionali (dovute ad esempio a denaturazione della proteina o del peptide, interazione con un substrato, variazioni di solvente, pH o temperatura, ecc.);
2. stima del contenuto di strutture secondarie.

Il metodo più diretto per analizzare lo spettro CD di una proteina in termini di struttura secondaria è quello di interpolarlo (*fitting*) con una combinazione di spettri CD di riferimento (*standard*) di strutture secondarie note.

Greenfield e Fasman [54] furono i primi ad introdurre questa procedura; si basarono sugli spettri della poli(L-lisina) in soluzione acquosa in struttura α -elica destrorsa (a pH > 10.5 e T ambiente), in β -sheet (a pH > 10.5 e T \geq 50°C) e disordinata (*random-coil*, a pH < 10.5) (Figura 2.12).

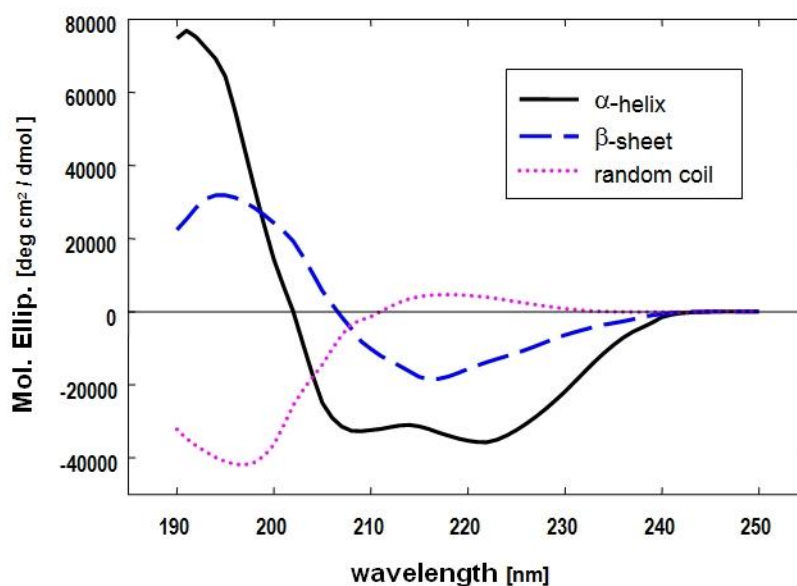


Figura 2.12 Spettri della poli(L-lisina) in soluzione acquosa in diverse condizioni: α -elica destrorsa, pH > 10.5 a T ambiente; β -sheet, pH > 10.5 e T \geq 50°C; random-coil, pH < 10.5.

Studi condotti su un gran numero di peptidi sintetici e naturali hanno consentito di definire degli spettri standard per tre importanti tipi di conformazione: α -elica, struttura β e *random-coil*. Lo spettro dell' α -elica presenta un massimo a 192 nm e due minimi a 208 e 222 nm. La struttura β è caratterizzata da due bande di intensità paragonabile: una positiva a 194 nm e una negativa a 217 nm. La struttura disordinata, o "*random coil*", fornisce, infine, un minimo a 197 nm.

Più complessa risulta, invece, la definizione di curve tipiche per i vari tipi di β -turn [55]. Sembra comunque accertato che, mentre i β -turn di tipo I e di tipo III presentano uno spettro simile all' α -elica, i β -turn di tipo II esibiscono uno spettro di classe B secondo la distinzione operata da Woody (Tabella 2.1).

Tabella 2.1 Definizione delle classi degli spettri CD secondo Woody.

Classe	Segno della banda	Range di λ
A	-	210-220
	+	195-200
	-	<190
B	-	>220
	+	200-210
	-	<190
C	-	200-210
	+	180-195
	-	>225
D	+	210-220
	-	190-200
	+	<190

L'assegnazione delle bande CD deve essere comunque fatta con prudenza e possibilmente supportata da dati ottenuti con altre tecniche (IR, NMR, ecc.) in quanto, ad esempio, è noto che lo spettro CD dell' α -elica dipende dalla sua lunghezza; la posizione esatta e l'intensità delle bande relative ed assolute dei β -sheet variano da caso a caso; lo spettro del *random coil*, che è di solito utilizzato per rappresentare la parte dello spettro che corrisponde ai residui non assegnati a nessun'altra categoria strutturale, varia notevolmente in intensità, alle volte addirittura nel segno della banda; infine, si dovrebbe tener conto delle distorsioni nella geometria di α -elica e β -sheet e del contributo dei gruppi aromatici delle catene laterali anche nel lontano UV.

2.3.6 Analisi amminoacidica

La determinazione della composizione amminoacidica di una proteina permette di sapere da quanti e quali amminoacidi è formato il polipeptide. Gli attuali metodi a disposizione per questo tipo di analisi comportano tre passaggi fondamentali: l'idrolisi della proteina con liberazione degli amminoacidi che la costituiscono, la loro separazione dalla miscela costituita dall'idrolizzato e loro quantificazione.

L'idrolisi amminoacidica effettuata in questo lavoro è una idrolisi in fase vapore. Un campione di peptide da analizzare viene idrolizzato come segue: ~ 3 nmoli di peptide vengono trasferite in una provetta e vengono fatte reagire, in un reattore di reazione sigillato in atmosfera di azoto e contenente 250 μL di HCl 6 N e 1-2 cristalli di fenolo nel caso siano presenti Tyr o Trp nella sequenza, alla temperatura di 110°C e per 24 ore (procedura *Pico Tag* messa a punto per la Pico Tag Work Station della Waters). Da notare che servono condizioni molto drastiche per avere la scissione del legame peptico, di natura poco reattivo perché stabilizzato per risonanza.

Le provette utilizzate per i campioni e il reattore di reazione vanno preventivamente lavati con la miscela solfo-nitrica (1:1 di HNO₃ e H₂SO₄), sciacquati abbondantemente con H₂O MilliQ, etanolo e seccati sotto vuoto.

Sui campioni e, parallelamente, su 5 μL di soluzione standard di amminoacidi della Pierce (contiene 2.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ per ogni amminoacido in HCl 0.1N) si opera come segue:

1. si portano a secco le soluzioni (si arriva a 70-80 mTorr);
2. si aggiungono 20 μL di soluzione *redry* (metanolo, H₂O MilliQ, TEA, in rapporto (v:v:v) 2:2:1);
3. si portano a secco le soluzioni;
4. si derivatizzano gli amminoacidi con 20 μL di una soluzione contenente metanolo, H₂O MilliQ, TEA, PITC in rapporto (v:v:v:v) 7:1:1:1 per 10 min esatti;
5. si portano a secco le soluzioni;
6. si aggiungono 30 μL di metanolo e si portano nuovamente a secco i campioni;
7. si aggiungono 400 μL di diluente PicoTag allo *standard* mentre per i campioni se ne impiegano 250 μL ;

8. si sonicano i campioni per 2 min;
9. si filtrano le soluzioni.

Tale metodica serve per ottenere il sequenziamento della catena, necessario per risalire alla sequenza primaria (degradazione di Edman). È un processo a ciclo che permette di staccare un aminoacido per volta e nella giusta sequenza. Nello specifico permette di funzionalizzare ciascun residuo con il PITC ottenendo così un derivato, un PTH-amminoacido, che contiene il gruppo laterale tipico dell'amminoacido di partenza (Figura 2.13). Questo infine è facilmente rilevabile a 254 nm e adatto ad essere separato per via cromatografica su colonna a fase inversa.

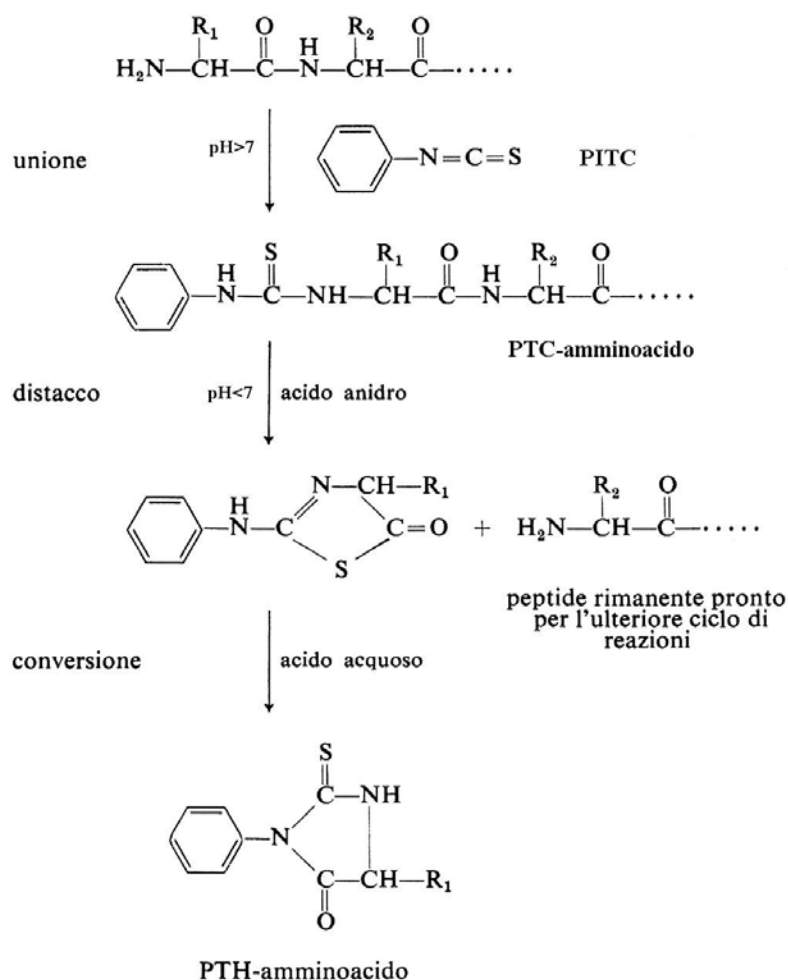


Figura 2.13 Reazione tra PITC e un amminoacido generico.

L'analisi cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Pico Tag (3.9 × 300 mm) mantenuta a temperatura costante di 46°C, eluente A e B specifici per il sistema Pico Tag

(vedi composizione nel sottoparagrafo reagenti di questo capitolo), flusso 1 mL/min ed il seguente gradiente binario: 100% di A per 1 min, dallo 0% di B su A al 46% di B in 20 min, dal 46% al 100% di B in 1 min, 100% di B per 5 min; lettura dell'assorbanza a 254 nm.

L'integrazione dei picchi cromatografici degli standard ha permesso la formulazione di rette di taratura per ciascun PTH-amminoacido e quindi la quantificazione del contenuto amminoacidico del campione.

Questa analisi permette di quantificare la concentrazione esatta di un peptide in soluzione in quanto il valore di concentrazione calcolato a partire dalla quantità pesata di peptide non tiene conto della percentuale di acqua che rimane nel prodotto in seguito a liofilizzazione.

Capitolo 3

Parte sperimentale

Nel seguente capitolo verranno esposti i vari passaggi svolti per ottenere i materiali oggetto della tesi, ovvero le procedure di laboratorio per creare gli *scaffolds* necessari agli esperimenti sulle cellule.

3.1 Sintesi peptica

3.1.1 Purificazione del peptide EAK

Il peptide auto-assemblante EAK era già presente in laboratorio in forma “grezza”.

Sequenza

(PM: 1614.83 Da)

H-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH₂

Si è quindi proceduto alla diretta purificazione del grezzo, mediante cromatografia RP-HPLC semipreparativa, iniettando circa 40 mg di peptide grezzo sciolti in circa 30 mL di eluente A per ogni analisi.

Sette cromatografie (un esempio in Figura 3.1) sono state condotte nelle medesime condizioni operative:

- Colonna: Delta Pak C₁₈;
- Flusso: 4 mL/min;
- Fondoscala: 4.00 ABS;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% di B al 16% di B in 64 minuti;

- Detector a 214 nm;
- Velocità della carta: 0.5 cm/min.

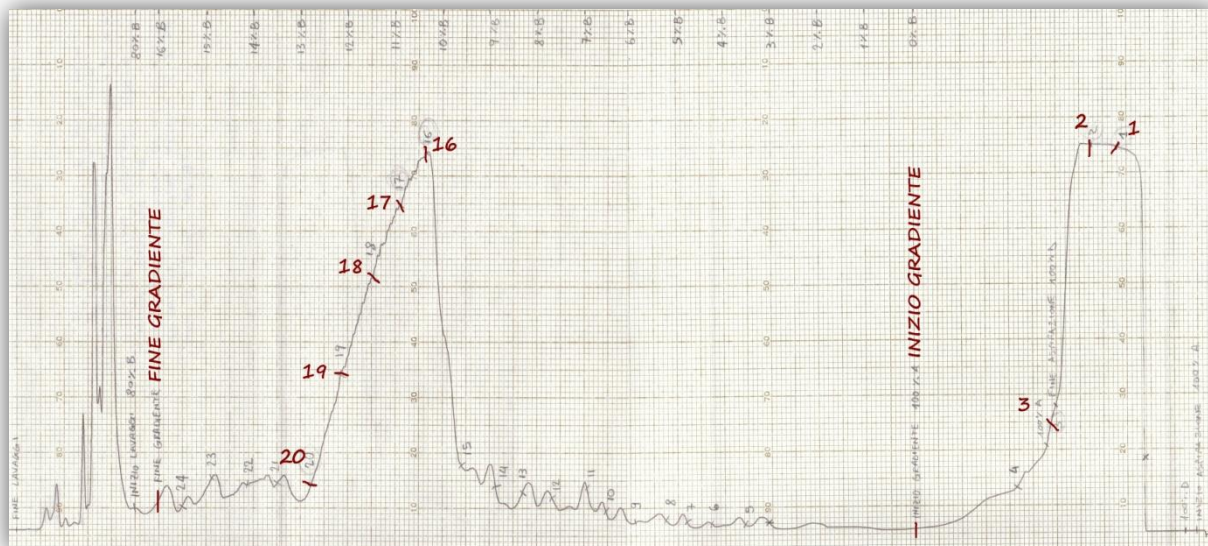


Figura 3.1 Cromatografia semipreparativa del grezzo del peptide EAK. Colonna: Delta Pak C₁₈ (15µm, 100 Å, 7.8×300nm); flusso: 4 mL/min; fondoscala: 4.00 Abs; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dal 0 al 16 % di eluente B in 64 minuti; detector: 214 nm; velocità della carta 0,5 cm/min.

Da notare come si ottenga, prima dell'inizio del gradiente, l'eluizione di parte del prodotto. Con una differente colonna, la Nova Pak (6µm, 60 Å, 7.8×300nm), il problema non si era presentato, probabilmente a causa della minore granulometria della matrice silicea presente al suo interno.

L'eluato è stato frazionato in differenti provette in base al tracciato cromatografico. Le frazioni raccolte, sono poi state sottoposte a cromatografia analitica per confermare la presenza e il grado di purezza del peptide desiderato. Di seguito le condizioni operative delle corse analitiche:

- Colonna: Vydac Monomeric C₁₈;
- Volume di iniezione: 50 µL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;

- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: dal 7% di B al 17% di B in 20 minuti;
- Detector a 214 nm.

Un esempio in Figura 3.2.

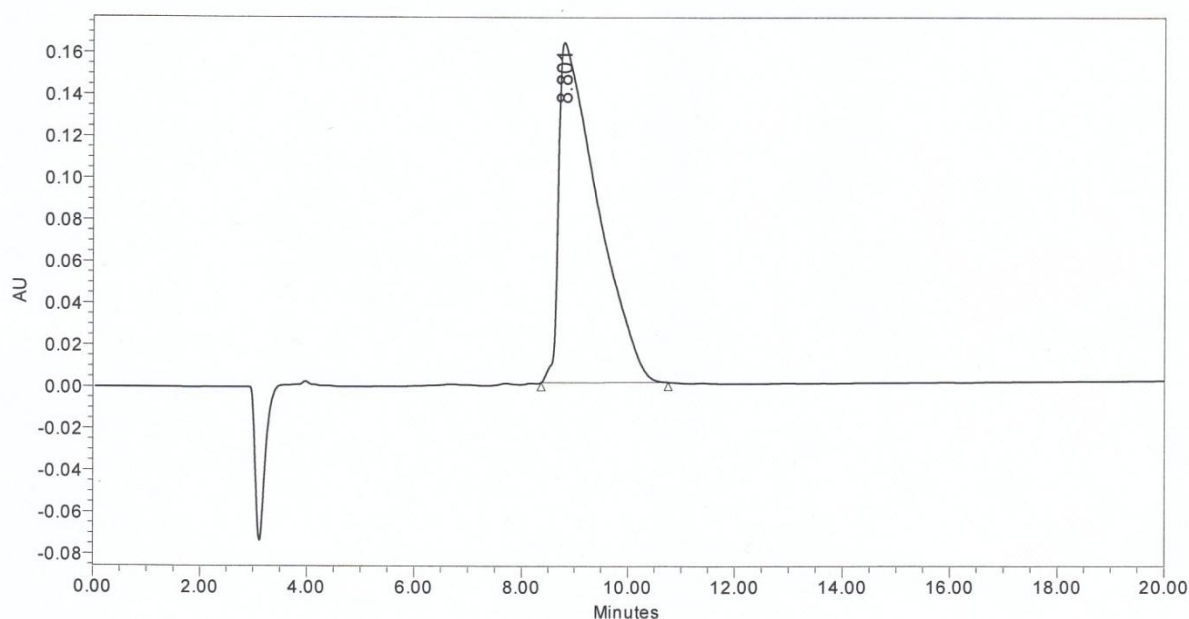


Figura 3.2 Cromatografia analitica della frazione 18 raccolta dalla semipreparativa riportata in figura 3.1. Colonna: Vydac Monomeric C₁₈ (5 μ m, 300 Å, 4.6 \times 250nm); iniezione: 50 μ L; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dal 7% al 17% di eluente B in 20 minuti; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Tutte le analitiche presentano un picco centrato a 8.8 minuti che, analizzato tramite spettrometria di massa, si è dimostrato essere il peptide desiderato.

In base al grado di omogeneità e purezza le frazioni sono state riunite e liofilizzate, ottenendo:

- 68.24 mg di peptide con purezza > 99%;
- 2.17 mg con purezza > 92%;
- 29.95 mg di frazioni con contaminanti che eluiscono a tempi inferiori rispetto al prodotto target;
- 12.19 mg di frazioni con contaminanti che eluiscono a tempi superiori rispetto al prodotto target.

3.1.2 Sintesi del peptide RGD-EAK

Il peptide auto-assemblante RGD-EAK è stato ottenuto mediante il processo di sintesi su fase solida, utilizzando il sintetizzatore Syro I con chimica Fmoc. Sono state condotte due sintesi, uguali e parallele. Come fase solida è stata usata la resina *Rink Amide MBHA* (sostituzione 0.7 mmoli/g). Sono stati utilizzati 180 mg (corrispondenti a 0.126 mmoli) per il primo reattore e altri 179 mg (corrispondenti a 0.1253 mmoli) per il secondo reattore.

Sequenza

(PM: 1943.16 Da)

H-Arg-Gly-Asp-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH₂

Sono state preparate le soluzioni 0.61 M in DMF dei seguenti amminoacidi:

- Fmoc-Ala-OH;
- Fmoc-Asp(OtBu)-OH;
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH;
- Fmoc-Gly-OH;
- Fmoc-Lys(Boc)-OH;
- Fmoc-Arg(Pmc)-OH.

Per aumentare la resa di reazione sono stati utilizzati 5 equivalenti per ciascun amminoacido rispetto alla resina.

Sono state poi preparate le soluzioni necessarie alla reazione:

- soluzione al 40% di piperidina in DMF;
- soluzione di DIPEA in NMP;
- soluzione di 0.45M HBTU/HOBt in DMF.

Sintesi

La reazione di sintesi ha avuto inizio con 6 cicli di lavaggio della resina con DMF. E' stato impostato un doppio *coupling* del primo amminoacido Fmoc-Lys(Boc)-OH per il *loading* della resina, terminato il quale si è interrotto il processo per valutare il grado di funzionalizzazione della resina con il "*Test alla piperidina*". Secondo le metodologie

descritte al paragrafo 2.3.1.1 si è ottenuta una resa pari al 100%. La reazione di sintesi è poi ripresa con i restanti 18 cicli a doppio *coupling* di 45 minuti ciascuno.

La rimozione del gruppo Fmoc, protettore della funzione N- α -amminica di ciascun residuo incorporato nel peptide in crescita è stata condotta trattando il peptide con 1 mL della soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -Fmoc protetto, nelle reazioni di condensazione, è stata ottenuta dissolvendo 1 mL della soluzione con gli amminoacidi in 1.4 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF con l'aggiunta di 0.625 mL di DIPEA in NMP. Per finire è stato impostato il ciclo di de-protezione dal gruppo Fmoc dell'ultimo amminoacido

A sintesi terminata i due reattori sono stati sottoposti ad alcuni lavaggi con DCM, e messi a seccare sotto vuoto per 1 ora. Sono stati ottenuti 416.2 mg di peptide su resina dal primo reattore e 475.0 mg dal secondo.

Sblocco del peptide dalla resina

Si è quindi proceduto con lo sblocco del peptide e la deprotezione delle catene laterali. Entrambi i reattori sono stati trattati con una miscela di 5 mL composta nell'ordine da:

- 0.125 mL di H₂O MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.750 mL di TFA.

Il TFA (95% della miscela) serve per sbloccare il peptide dalla resina e dalle protezioni laterali, il TES e l'acqua (5%) servono *scavengers*, ovvero molecole per bloccare i carbocationi che potrebbero modificare il prodotto voluto.

I reattori sono poi stati lasciati reagire per 2 ore sotto agitazione magnetica. Al termine della reazione si è filtrata via sottovuoto la resina, mentre la soluzione contenente il peptide grezzo è stata raccolta in un pallone e concentrata a piccolo volume tramite evaporatore rotante. Successivamente il prodotto è stato recuperato per precipitazione mediante aggiunta di etere etilico freddo (4°C), poi filtrato con un Gooch G4 e messo a seccare sotto vuoto per 1 ora.

Una pesata grossolana dei due peptidi grezzi ottenuti dai due Gooch ha fornito rispettivamente 96.35 mg e 160.71 mg.

3.1.3 Caratterizzazione del peptide RGD-EAK

Dal pallone seccato derivante dal reattore 2 sono stati prelevati dei campioni per eseguire delle analitiche sul grezzo. Pesati quindi 0.53 mg, sono stati sciolti in 0.53 mL di H₂O MilliQ. La soluzione è stata poi centrifugata e filtrata. È stata poi fatta una corsa analitica (SPA) alle seguenti condizioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Volume di iniezione: 200 μL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: dal 0% di B all' 80% di B in 40 minuti;
- Detector a 214 nm.

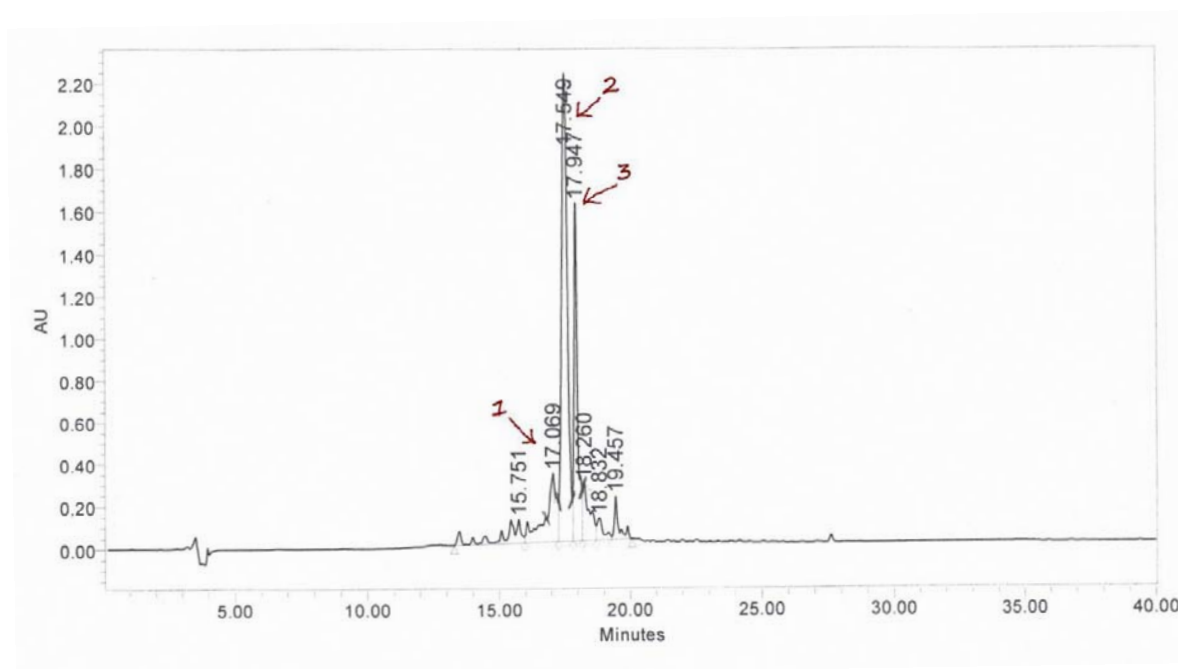


Figura 3.3 Cromatografia analitica (SPA) del grezzo 2 con raccolta dei picchi indicati. Colonna: Symmetry Shield C₈ (5μm, 100 Å, 4.6×250nm); iniezione: 200 μL; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dal 0% all' 80% di eluente B in 40 minuti; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Sono state raccolte 3 provette, di cui la provetta 2 presenta un picco ben pronunciato a 17'30'', e un secondo picco meno profondo a quasi 18' (provetta 3).

È stata pertanto eseguita una seconda analitica (Figura 3.4) per cercare di isolare e centrare al meglio i picchi; queste le condizioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Volume di iniezione: 30 μL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: dal 10% di B al 28% di B in 36 minuti
- Detector a 214 nm.

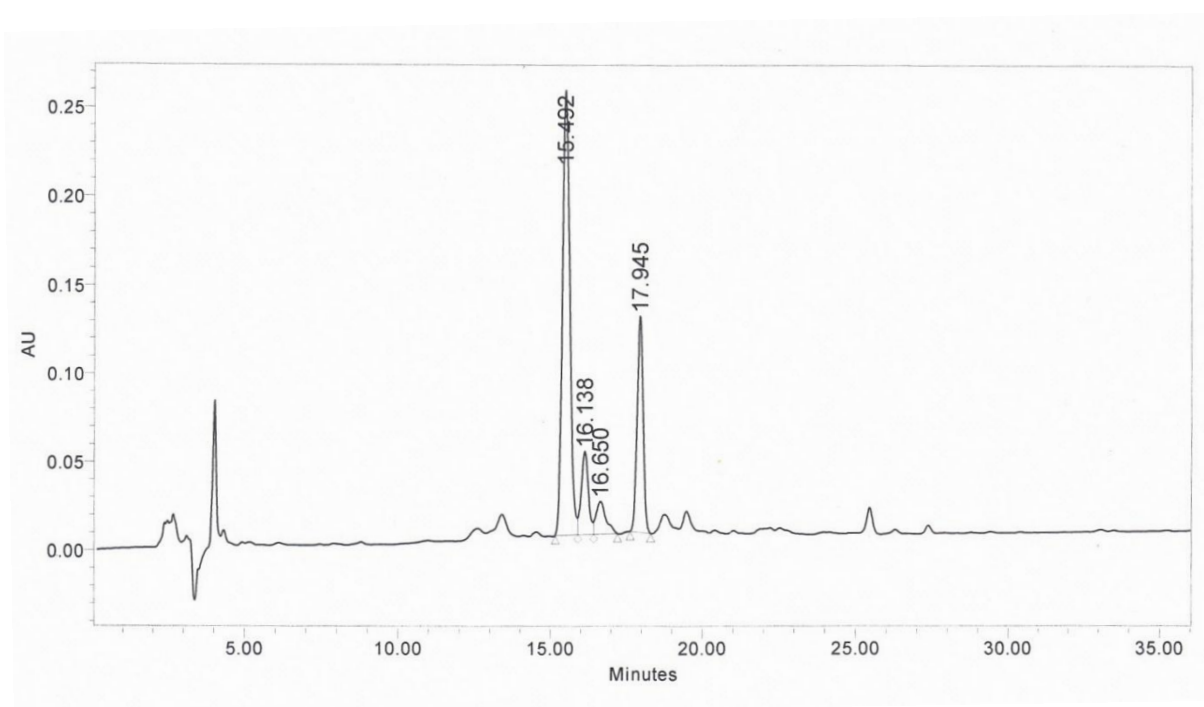


Figura 3.4 Cromatografia analitica del grezzo 2. Colonna: Symmetry Shield C₈ (5μm, 100 Å, 4.6×250nm); iniezione: 30 μL; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dal 10% al 28% di eluente B in 36 minuti; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Per verificare la natura della molecola si è deciso di effettuare una analisi di massa (ESI) dei 2 picchi più pronunciati, ovvero le frazioni 2 e 3 della SPA (Figura 3.5).

Dalle due deconvoluzioni è risultato:

- Il primo picco (Fr.2) è riconducibile al peptide desiderato (PM_{Sperimentale}: 1943.14 Da; PM_{Teorico}: 1943.16 Da).

- Il secondo picco (Fr.3) ha invece massa 1885.14 Da ed è pertanto riconducibile alla sequenza RGD-EAK privata di una Gly (PM = 57 Da).

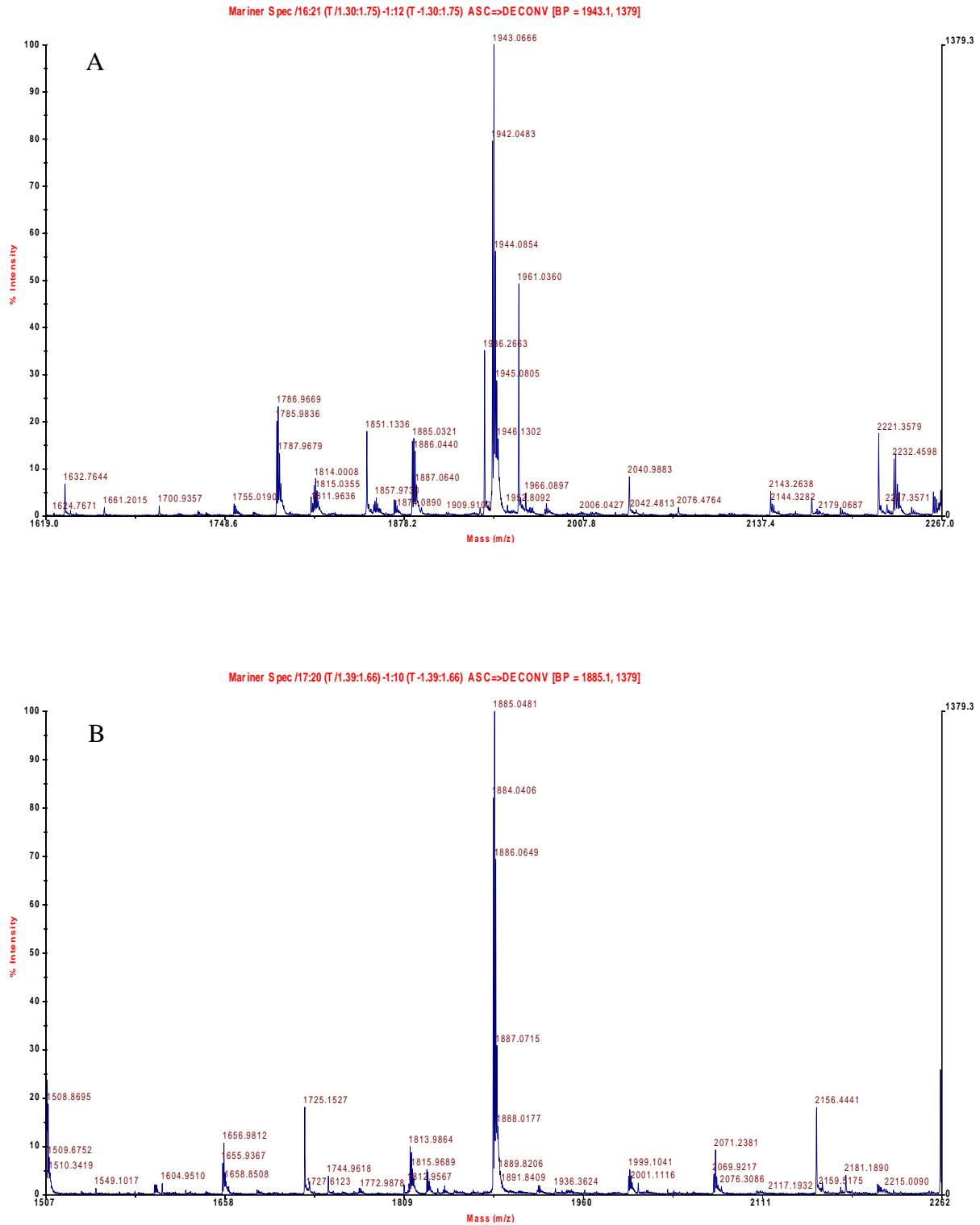


Figura 3.5 Spettro di massa (ESI) del peptide RGD-EAK grezzo 2, SPA, frazioni 2 (A) e 3 (B).

3.1.4 Purificazione del peptide RGD-EAK

Si è quindi proceduto alla purificazione dei due grezzi, mediante cromatografia RP-HPLC semipreparativa, iniettando circa 30 mg di peptide grezzo sciolti in circa 20 mL di eluente A per ogni corsa. Sono state condotte in tutto otto corse (in Figura 3.6 si riporta la SP1), nelle medesime condizioni operative:

- Colonna: Nova Pak C₁₈;
- Flusso: 4 mL/min;
- Fondoscala: 4.00 ABS;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% al 10% di B in 2 minuti, poi dal 10% al 18% di B in 32 minuti;
- Detector a 214 nm;
- Velocità della carta: 0.5 cm/min.

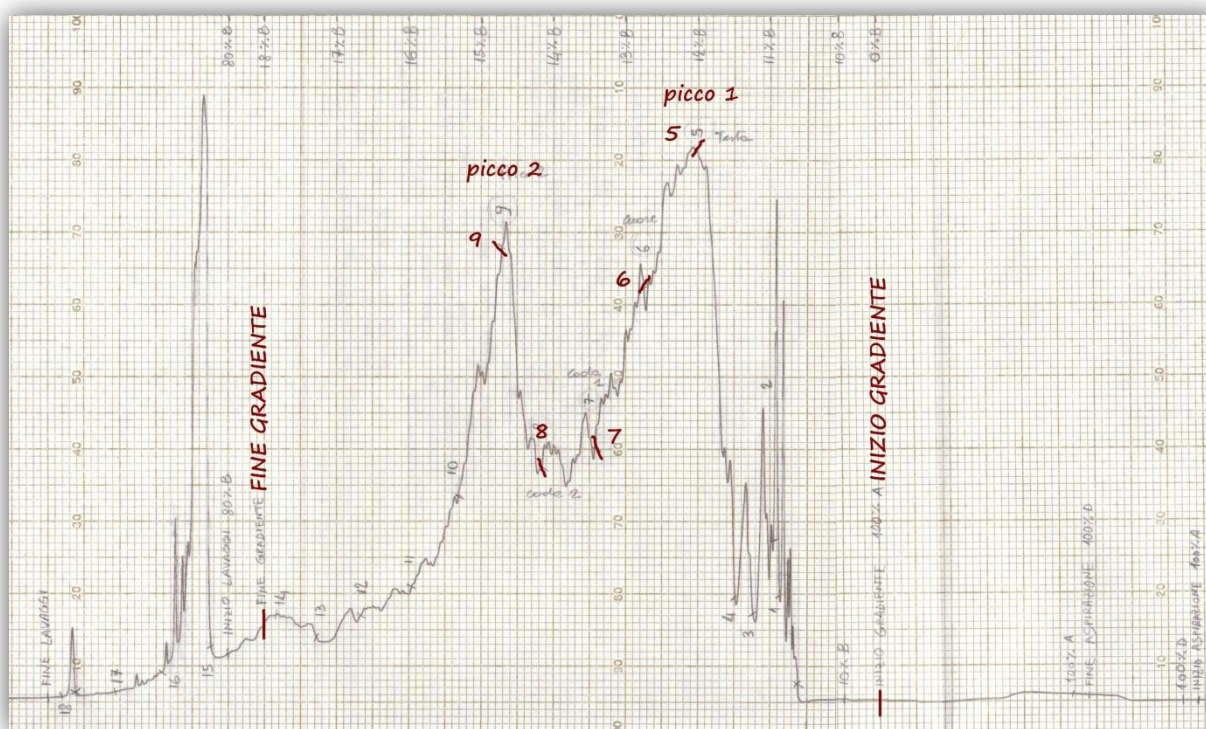


Figura 3.6 Cromatografia semipreparativa 1 del grezzo 2 del peptide RGD-EAK. Colonna: Nova Pak C₁₈ (6µm, 60 Å, 7.8×300nm); flusso: 4 mL/min; fondoscala: 4.00 Abs; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dal 0 al 10 % di eluente B in 2 minuti, e dal 10 al 18% di B in 32 minuti; detector: 214 nm; velocità della carta 0,5 cm/min.

Anche nel cromatogramma della corsa semipreparativa è evidente la presenza dei due picchi, ben distinti e imputabili a due prodotti diversi.

L'eluato è stato frazionato in differenti provette in base al tracciato cromatografico; le frazioni raccolte, comprese quelle del picco secondario, sono poi state sottoposte a cromatografia analitica per confermare la presenza del peptide desiderato, escludendo quindi ulteriori prodotti secondari di sintesi. Di seguito le condizioni operative per tutte le frazioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Volume di iniezione: 30 μ L;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: dal 10% di B al 25% di B in 30 minuti;
- Detector a 214 nm.

In Figura 3.7 si riporta l'analitica della frazione 6 relativa alla prima semipreparativa (SP1).

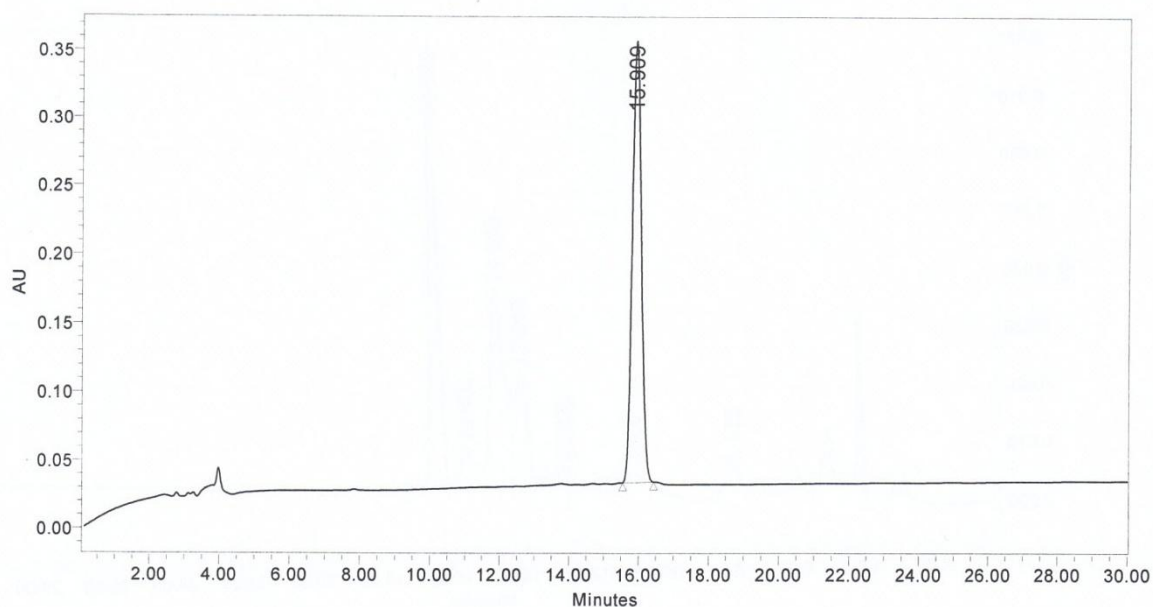


Figura 3.7 Cromatografia analitica della frazione 6 raccolta dalla semipreparativa riportata in figura 3.6. Colonna: Symmetry Shield C₈ (5 μ m, 100 Å , 4.6 \times 250nm); iniezione:30 μ L; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dal 10% al 25% di eluente B in 30 minuti; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

In base al loro grado di omogeneità le frazioni sono state riunite e liofilizzate, ottenendo:

- 53.96 mg di peptide con purezza > 99%;
- 15.97 mg di frazioni con purezza > 85%;
- 18.94 mg di frazioni con purezza > 60%;
- 18.27 mg di frazioni con purezza > 50%;
- 23.27 mg di frazioni con purezza > 40%;
- 19.46 mg di peptide privo di un residuo di Gly.

3.1.5 Sintesi del peptide RGD-EAK-IKVAV

Il peptide auto-assemblante RGD-EAK-IKVAV è stato sintetizzato mediante sintesi su fase solida, utilizzando il sintetizzatore Syro I con chimica Fmoc. Come supporto solido si è utilizzata la resina *Rink Amide MBHA* (sostituzione 0.7 mmoli/g): 177.9 mg (corrispondenti a 0.1245 mmoli) sono stati posti nel reattore 1 e 178.7 mg (0.1251 mmoli) nel reattore 2.

Sequenza

(PM: 2453.81 Da)

H-Arg-Gly-Asp-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ile-Lys-Val-Ala-Val-NH₂

Sono state preparate le soluzioni 0.61 M in DMF dei seguenti amminoacidi:

- Fmoc-Ala-OH;
- Fmoc-Asp(OtBu)-OH;
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH;
- Fmoc-Gly-OH;
- Fmoc-Ile-OH;
- Fmoc-Lys(Boc)-OH;
- Fmoc-Arg(Pmc)-OH;
- Fmoc-Val-OH.

Sono state poi preparate le soluzioni necessarie alla reazione:

- soluzione al 40% di piperidina in DMF;
- soluzione di DIPEA in NMP;
- soluzione di 0.45M HBTU/HOBt in DMF.

Sintesi

La resina è stata inizialmente fatta rigonfiare mediante 3 lavaggi con DMF, è stato impostato un doppio *coupling*, dell'amminoacido Fmoc-Lys(Boc)-OH per il *loading* della resina, terminato il quale si è eseguito il "*Test alla piperidina*". La resa ottenuta è stata del 100%.

Data la comparsa di un errore da parte del software nei primi cicli di *coupling*, che ha causato l'interruzione della sintesi, si è deciso comunque di eseguire una reazione di acetilazione per evitare *deleted peptides*. È stata pertanto preparata la seguente soluzione: 10% di anidride acetica e 5% di lutidina in DMF. 5 mL di soluzione di anidride acetica e lutidina in DMF sono stati posti in ogni reattore e lasciati a reagire per circa 20 minuti sotto blanda agitazione magnetica. La soluzione è stata poi filtrata sottovuoto e sono stati fatti 5 lavaggi dei reattori con DMF.

Sono stati poi impostati i restanti cicli di sintesi che consistevano in 23 *coupling* doppi, formati da due *coupling* singoli, ciascuno di 45 minuti.

La rimozione del gruppo Fmoc, protettore della funzione N- α -amminica di ciascun residuo incorporato nel peptide in crescita è stata condotta trattando il peptide con 1 mL della soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -Fmoc protetto, nelle reazioni di condensazione, è stata ottenuta aggiungendo 1 mL della soluzione con gli amminoacidi, 1.4 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF e 0.625 mL di DIPEA in NMP. Per finire è stato impostato il ciclo di de-protezione dal gruppo Fmoc dell'ultimo amminoacido

A sintesi terminata i due reattori sono stati sottoposti ad alcuni lavaggi con DCM per togliere il NMP in eccesso, e messi a seccare sotto vuoto per 1 ora. Sono stati ottenuti 417.80 mg di peptide su resina dal primo reattore e 375.25 mg dal secondo.

Sblocco del peptide dalla resina

I due reattori sono stati trattati con una miscela di 5 mL composta da:

- 0.125 mL di H₂O MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.750 mL di TFA.

Sono poi stati lasciati reagire per 2 ore sotto agitazione magnetica. Al termine della reazione si è filtrata via sottovuoto la resina, mentre la soluzione contenente il peptide grezzo è stata raccolta in un pallone e concentrata a piccolo volume tramite evaporatore rotante. Successivamente il prodotto è stato recuperato per precipitazione mediante aggiunta di etere etilico freddo (4°C), poi filtrato con un Gooch G4 e messo a seccare sotto vuoto per 1 ora.

Una pesata grossolana dei due peptidi grezzi ottenuti dalle due precipitazioni ha fornito rispettivamente le masse di 121.5 mg e 163.08 mg.

3.1.6 Caratterizzazione del peptide RGD-EAK-IKVAV

0.89 mg di grezzo del reattore 1 sono stati pesati e sciolti in 0.89 mL di H₂O MilliQ. La soluzione è stata centrifugata e filtrata. È stata poi fatta una corsa analitica nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Volume di iniezione: 30 µL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% di B al 60% di B in 30 minuti;
- Detector a 214 nm.

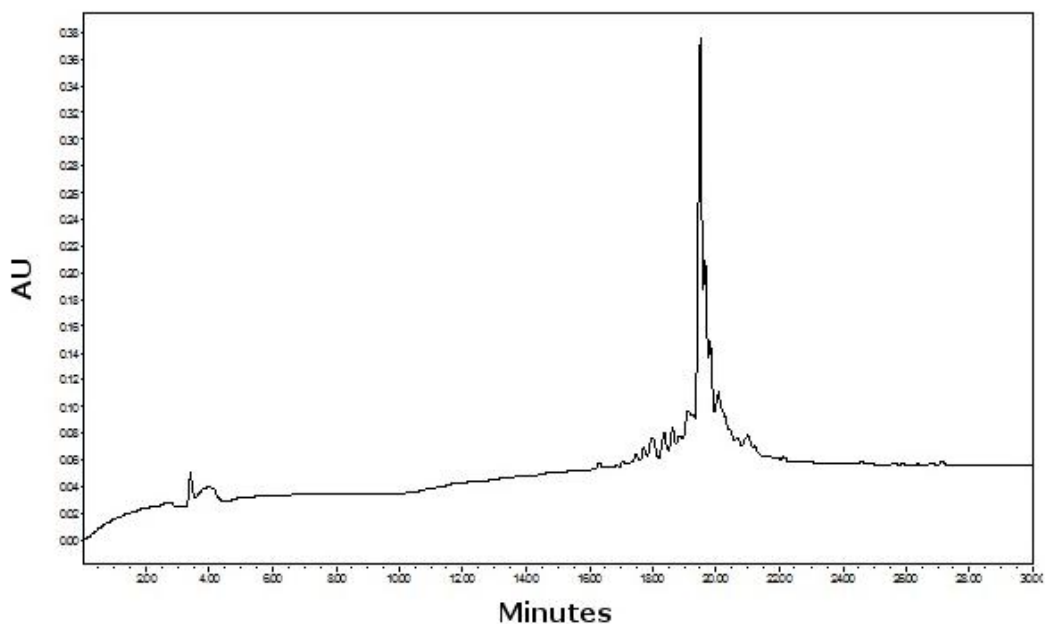


Figura 3.8 Cromatografia analitica del grezzo 1. Colonna: Symmetry Shield C₈ (5 μ m, 100 Å, 4.6 \times 250nm); iniezione: 30 μ L; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: da 0% al 60% di eluente B in 30 minuti; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

3.1.7 Purificazione del peptide RGD-EAK-IKVAV

Si è quindi proceduto alla purificazione dei due grezzi, mediante cromatografia RP-HPLC semipreparativa, iniettando circa 25 mg di peptide grezzo sciolti in circa 25 mL di eluente A per ogni analisi.

Sono state condotte in tutto undici corse (in Figura 3.9 si riporta la SP1), nelle medesime condizioni operative:

- Colonna: Delta Pak C₁₈;
- Flusso: 4 mL/min;
- Fondoscala: 4.00 ABS;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% al 15% di B in 2 minuti, poi 15% di B costanti per 10 minuti, poi dal 15% al 23% di B in 32 minuti;
- Detector a 214 nm;
- Velocità della carta: 0.5 cm/min.

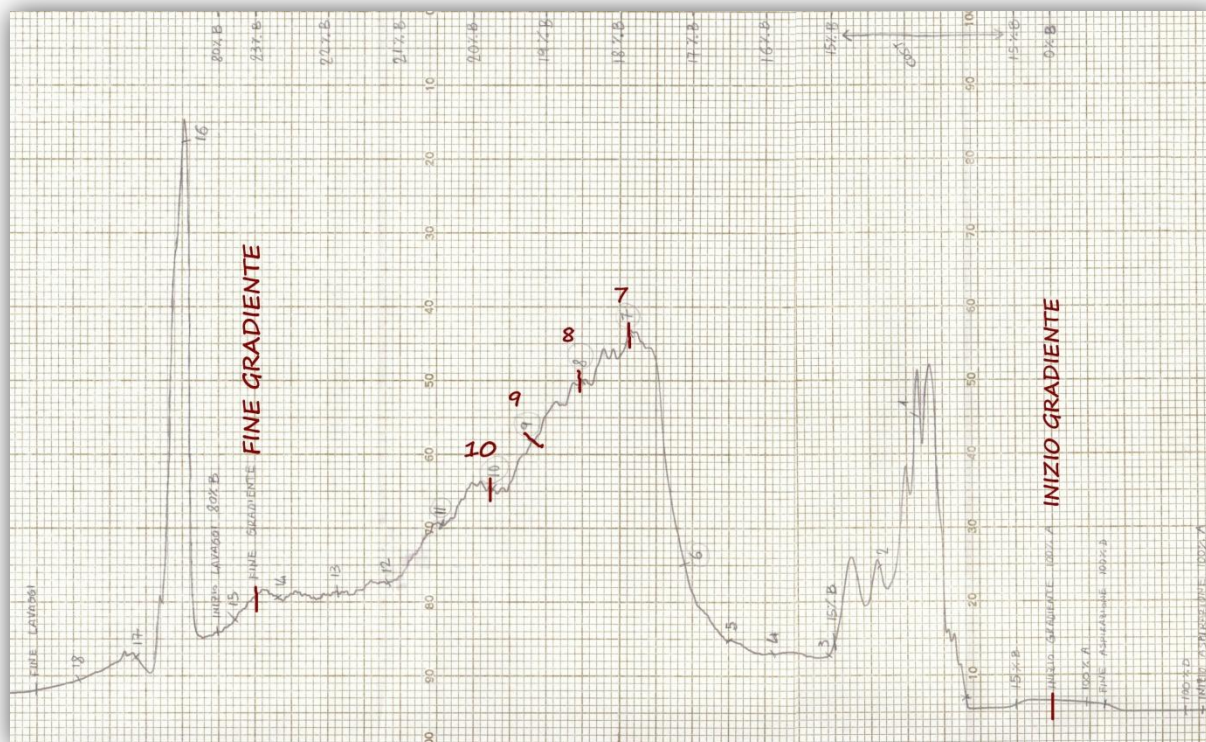


Figura 3.9 Cromatografia semipreparativa 1 del grezzo 1 del peptide RGD-EAK-IKVAV. Colonna: Delta Pak C₁₈ (15 μ m, 100 Å, 7.8 \times 300mm); flusso: 4 mL/min; fondoscala: 4.00 Abs; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dal 0 al 15% di eluente B in 2 minuti, poi 15% di B costante per 10 minuti, poi dal 15 al 23% di B in 32 minuti; detector: 214 nm; velocità della carta 0,5 cm/min.

Sono state poi eseguite le cromatografie analitiche delle frazioni raccolte dal picco principale (frazioni 7, 8, 9 e 10 nel caso della SP1). Le corse sono state condotte nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Symmetry Shield C₈;
- Volume di iniezione: 30 μ L;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: dal 16% di B al 26% di B in 20 minuti;
- Detector a 214 nm.

In Figura 3.10 si riporta l'analitica della frazione 8 relativa alla SP1.

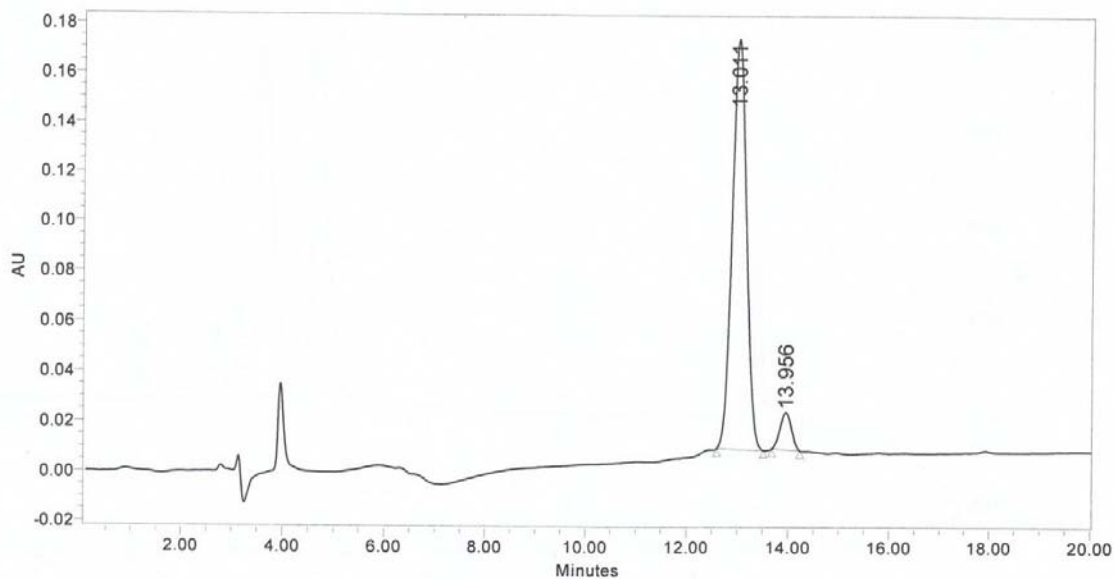


Figura 3.10 Cromatografia analitica della frazione 8 raccolta dalla semipreparativa riportata in figura 3.9. Colonna: Symmetry Shield C₈ (5 μ m, 100 Å, 4.6 \times 250nm); iniezione: 30 μ L; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dal 16% al 26% di eluente B in 20 minuti; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Si è poi eseguita un'analisi di massa (ESI) di tale frazione 8 per confermare la presenza del prodotto di reazione desiderato. La tecnica ha restituito un peso molecolare di PM = 2453.4 Da, molto vicino al peso molecolare teorico del peptide (2453.81 Da) (Figura 3.11).

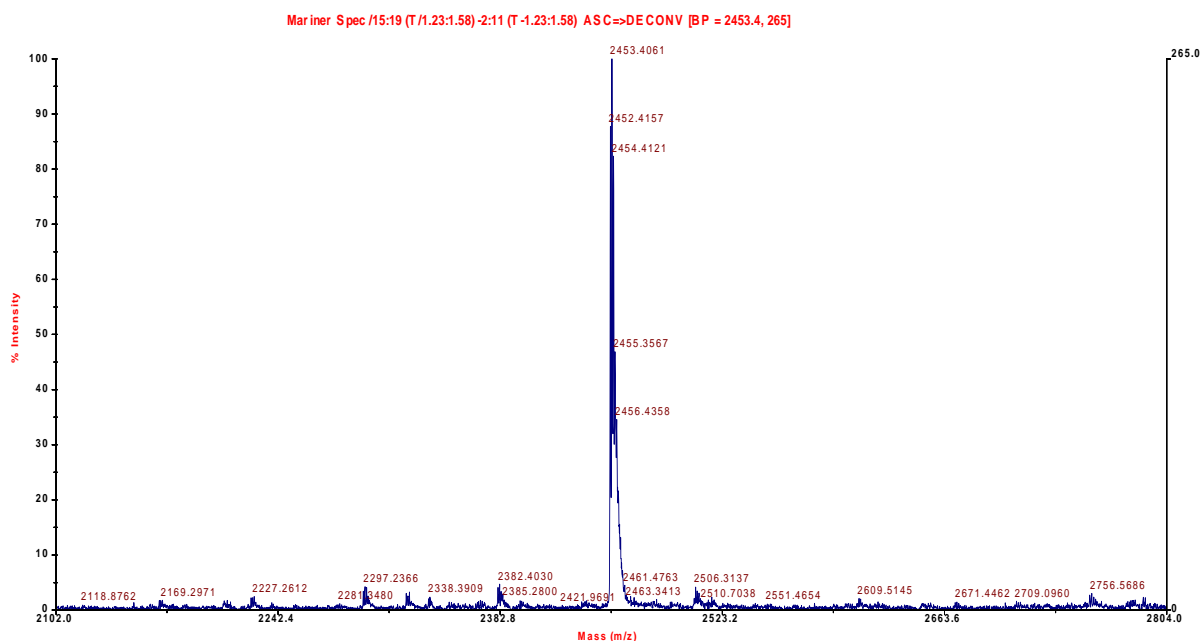


Figura 3.11 Spettro di massa (ESI) del peptide RGD-EAK-IKVAV frazione 8 raccolta dalla semipreparativa 1.

Nessuna frazione ha dimostrato un grado di purezza maggiore del 95%, pertanto si è proceduti con una seconda purificazione dei peptidi già liofilizzati. In Figura 3.12 una cromatografia della “frazione più pura” ottenuta con una ripurificazione. La diluizione del campione e il tipo di colonna rimangono invariati, ma il gradiente è stato rallentato per facilitare la presa campioni. Queste le condizioni:

- Colonna: Delta Pak C₁₈;
- Flusso: 4 mL/min;
- Fondoscala: 4.00 ABS;
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% al 15% di B in 2 minuti, poi dal 15% al 23% di B in 40 minuti;
- Detector a 214 nm;
- Velocità della carta: 0.5 cm/min.

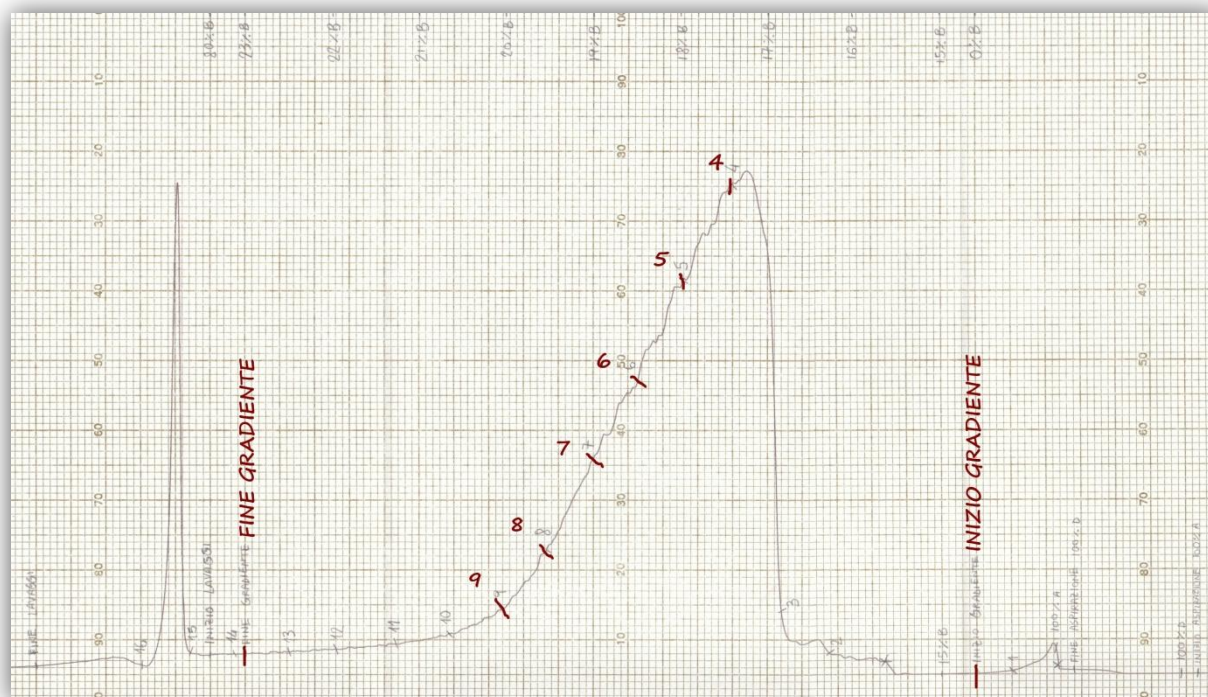


Figura 3.12 Cromatografia semipreparativa per la ripurificazione del peptide RGD-EAK-IKVAV. Colonna: Delta Pak C₁₈ (15µm, 100 Å, 7.8×300nm); flusso: 4 mL/min; fondoscala: 4.00 Abs; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: dal 0 al 15 % di eluente B in 2 minuti, poi dal 15 al 23% di B in 40 minuti; detector: 214 nm; velocità della carta 0,5 cm/min.

Dalla seconda purificazione si è così riusciti ad ottenere un prodotto più pulito. In base al grado di omogeneità le frazioni sono state riunite e liofilizzate ottenendo:

- 18.33 mg di peptide con purezza > 98%;
- 2.79 mg di peptide con purezza > 96%;
- 12.35 mg di peptide con purezza > 92%;
- 4.08 mg di frazioni con purezza > 85%;
- 13.87 mg di frazioni con purezza > 50%;

3.2 Studi conformazionali dei peptidi tramite dicroismo circolare

Le misure di dicroismo circolare (CD) sono state ottenute con uno spettropolarimetro Jasco modello J-710. Gli spettri sono stati registrati ed elaborati tramite il programma J-700 fornito dalla medesima ditta, utilizzando celle cilindriche in quarzo fuso con cammino ottico di 0.5 mm. Le misure CD sono state condotte in H₂O MilliQ, a temperatura ambiente adottando i seguenti parametri:

- *range*: 185-255 nm;
- *step resolution*: 0,2 nm;
- *scan speed*: 5 nm/min;
- *accumulation*: 4;
- *response*: 2 o 0.25 sec;
- *band width*: 2.0 nm;
- *sensitivity*: 20 mdeg.

Le soluzioni sono state ottenute portando ad un volume di 500 µL, con H₂O MilliQ, 10 µL di una soluzione madre preparata sciogliendo quantità pesate di peptide con H₂O MilliQ in modo da ottenere una concentrazione di $2,5 \times 10^{-3}$ M. Le concentrazioni esatte delle soluzioni, preparate in maniera tale da avere una concentrazione di 5×10^{-5} M, sono state determinate tramite analisi amminoacidica quantitativa seguendo la procedura riportata al paragrafo 2.3.6.

Si sono ottenute le seguenti concentrazioni sperimentali: 2.87×10^{-5} M per il peptide auto-assemblante EAK, 3.27×10^{-5} M per il peptide RGD-EAK e 3.18×10^{-5} M per il peptide RGD-EAK-IKVAV.

La concentrazione dei cromofori, utilizzata per normalizzare gli spettri, è stata ottenuta moltiplicando la concentrazione esatta delle soluzioni CD ricavata sperimentalmente per il numero di legami peptidici.

3.2.1 Risultati e discussione

EAK

Lo spettro CD del peptide auto-assemblante EAK in H₂O MilliQ è caratterizzato da una banda positiva molto intensa intorno ai 195 nm ed una banda negativa piuttosto allargata da 208 a 220 nm (Figura 3.13).

Lo spettro sembra confermare la presenza di strutture β -sheet (banda positiva a 195 nm e banda negativa a 217 nm) anche una componente di struttura α -elicoidale non è da escludere.

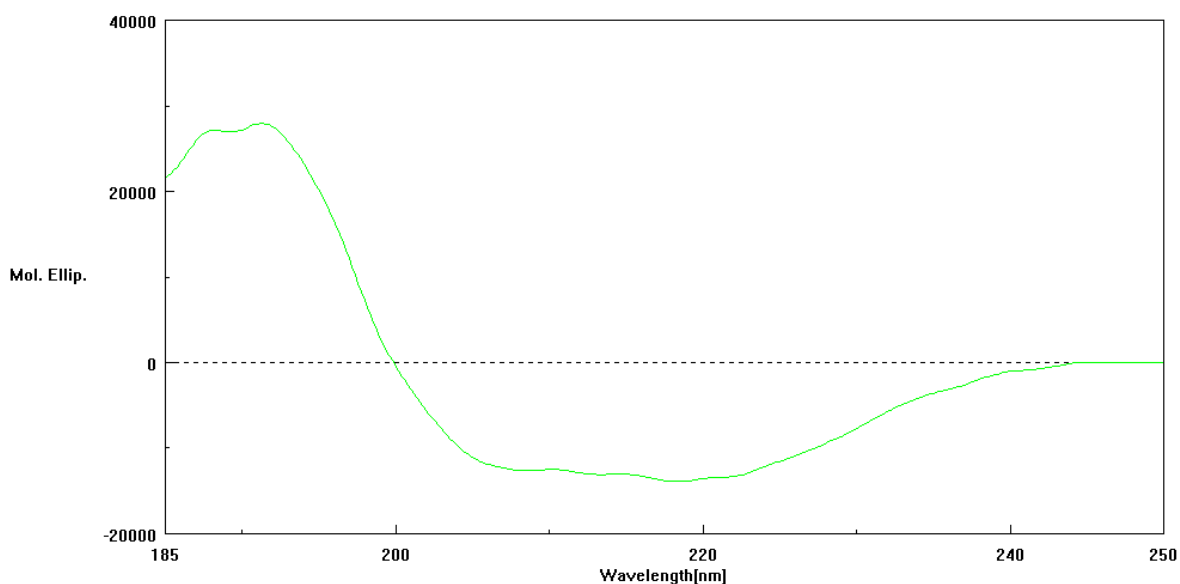


Figura 3.13 Spettro CD del peptide auto-assemblante EAK 16II in H₂O MilliQ.

RGD-EAK

Lo spettro CD del peptide RGD-EAK in H₂O MilliQ (Figura 3.14) è caratterizzato dalla presenza di due bande: una banda positiva intensa a 192 nm e una banda allargata a circa 200 nm.

L'andamento è molto simile a quello a quello riportato per EAK.

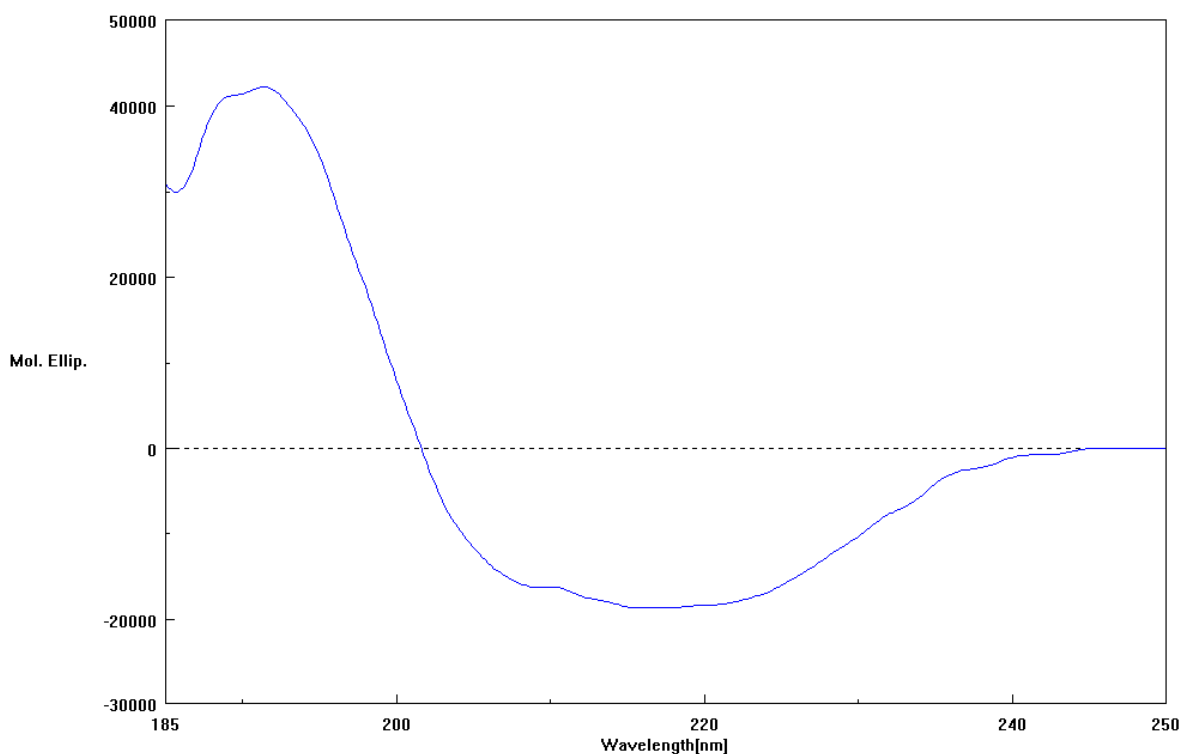


Figura 3.14 Spettro CD del peptide auto-assemblante RGD-EAK in H₂O MilliQ.

RGD-EAK-IKVAV

Lo spettro del peptide RGD-EAK-IKVAV (Figura 3.15) mostra la presenza di tre bande ben distinte, una positiva a 192 nm e due negative a 208 e 222 nm, imputabili probabilmente alla copresenza di conformeri β -sheets e α -elicoidali.

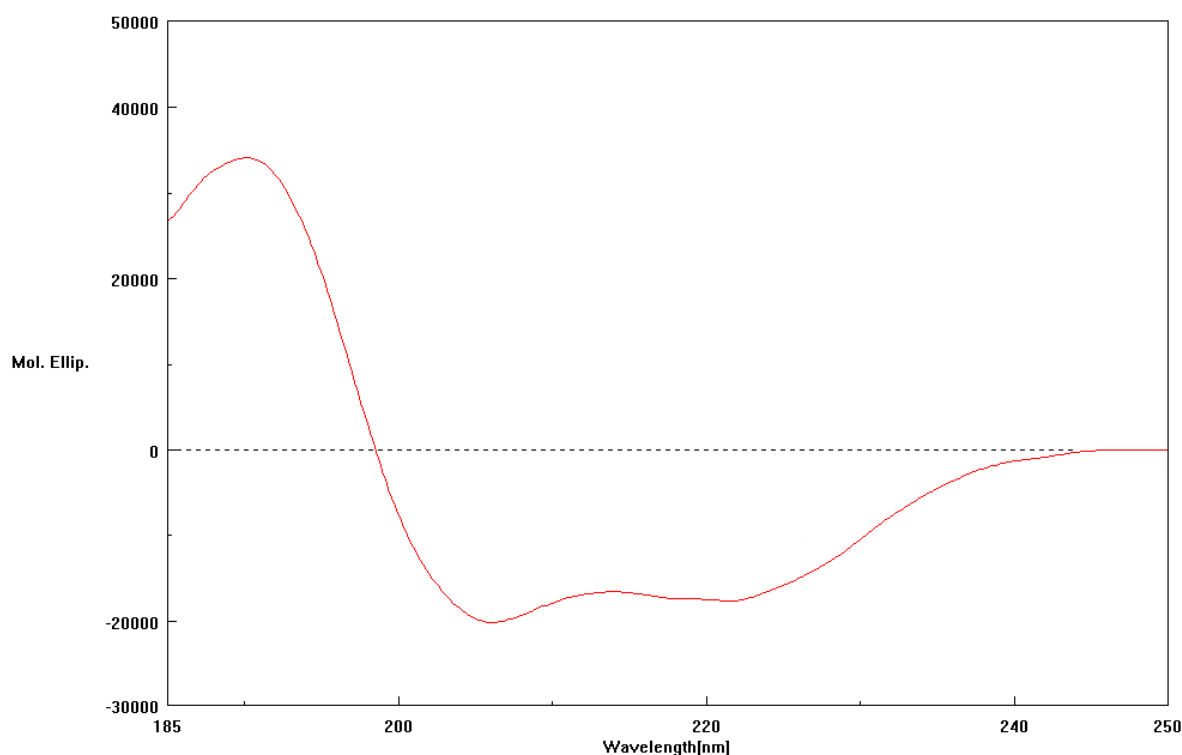


Figura 3.15 Spettro CD del peptide auto-assemblante RGD-EAK-IKVAV in H₂O MilliQ.

3.3 Preparazione degli *scaffolds bi e tri-dimensionali*

La fase di preparazione delle nanofibre ibride di policaprolattone e peptidi auto-assemblanti è stata eseguita presso l'Istituto di Neuropatologia dell'Ospedale Universitario di Aachen. Tali fibre sono state ottenute tramite elettrofilatura alle seguenti condizioni:

- tensione applicata: 12 kV;
- velocità di flusso: 0.5 mL/h;
- distanza capillare – collettore: 13 cm.

Le soluzioni sono state preparate sciogliendo in esafluoroisopropanolo (HFIP) l'8% in peso di PCL (Mn: 70000-90000) e SAP in rapporto 95:5. Contemporaneamente è stata preparata una soluzione campione di riferimento, di solo PCL sempre all'8% in peso in cloroformio/metanolo.

Le fibre prodotte sono risultate altamente allineate e coplanari (in Figura 3.16 un'immagine tratta col microscopio ad epifluorescenza).

Esse risultano avere diametri di 200-300 nm e sono di distanza variabile tra 1÷10 μm tra di loro.

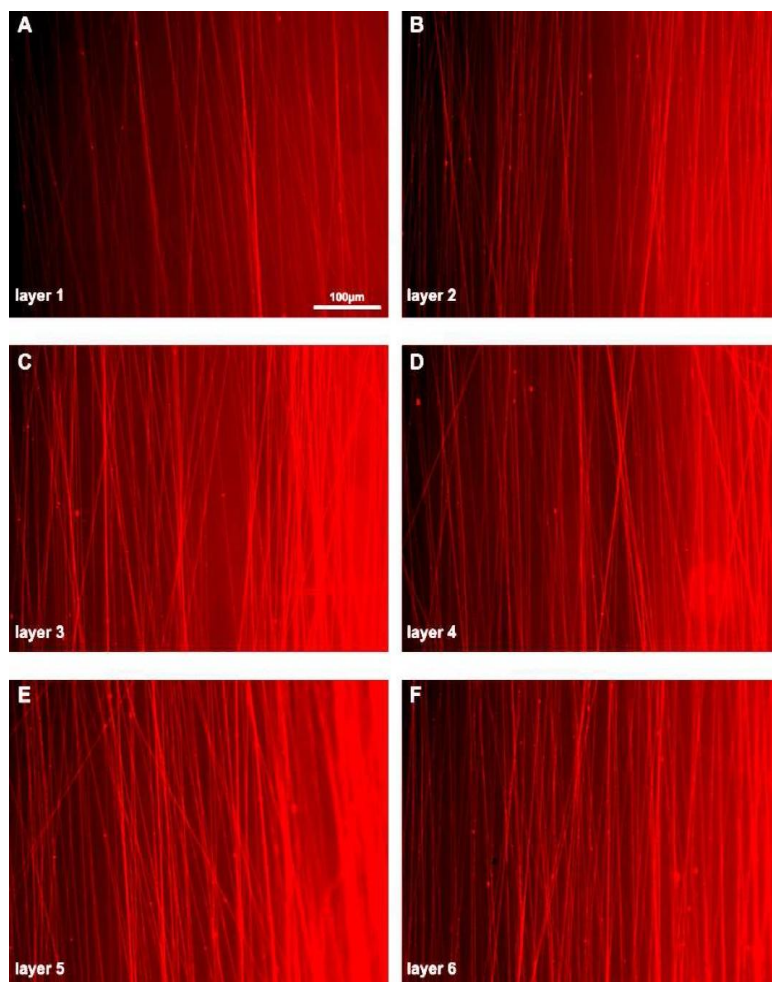


Figura 3.16 Immagine al microscopio a fluorescenza ottenuta incorporando il tracciante lipofilico Dil nelle nanofibre di PCL durante l'elettrofilatura.

Le fibre, sono poi state raccolte in cornici di supporto e infine impilate allo scopo di ottenere strutture tridimensionali (Figura 3.17).

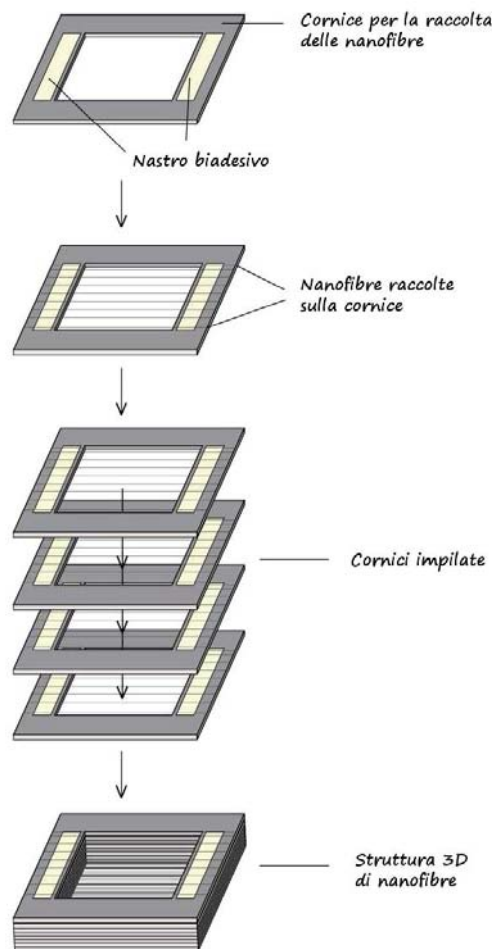


Figura 3.17 Ottenimento degli arrays 3D delle nanofibre elettrofilate.

Gli *arrays* ottenuti si sono dimostrati essere molto stabili sia in aria sia quando immersi in idrogeli di fibrina: gli strati di fibre coplanari non hanno subito distacchi o disordini (Figura 3.18).

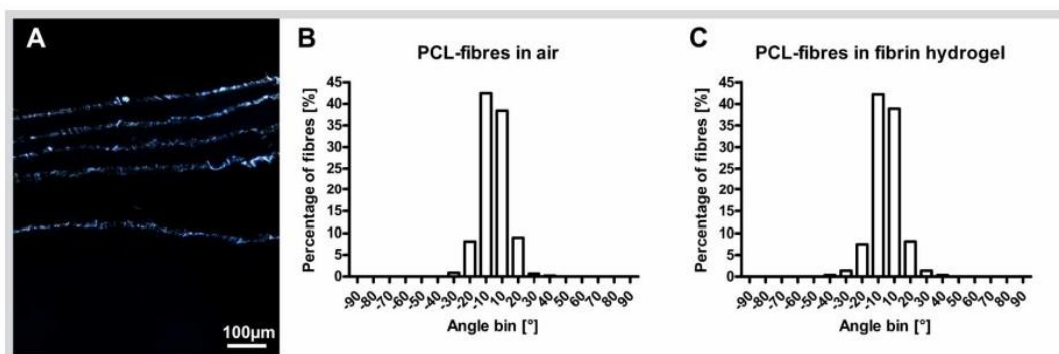


Figura 3.18 Stabilità degli arrays 3D misurata con l'angolo di inclinazione delle fibre in aria (B) e in presenza di idrogel di fibrina (C). In (A) un'immagine al microscopio.

3.4 Caratterizzazione biologica

Le cellule utilizzate per gli esperimenti sono cellule di Schwann derivanti dal nervo sciatico di un ratto adulto. In prima istanza il gruppo di Aachen ha analizzato il comportamento di tali cellule a contatto con i substrati costituiti da soli idrogeli di fibrina e dalle fibre di PCL incorporate negli idrogeli; in seconda istanza il comportamento cellulare a contatto con i substrati di nanofibre di PCL arricchiti con SAP.

3.4.1 Orientamento delle cellule di Schwann nello scaffold 3D di nanofibre allineate di PCL immerse in idrogel di fibrina

In presenza di soli idrogeli di fibrina le cellule di Schwann dimostrano dei processi di allungamento multiplo e ramificato, che si estende dal nucleo della cellula fino a una distribuzione random degli assoni. Non si evidenzia quindi nessun orientamento preferenziale nella crescita (Figura 3.19).

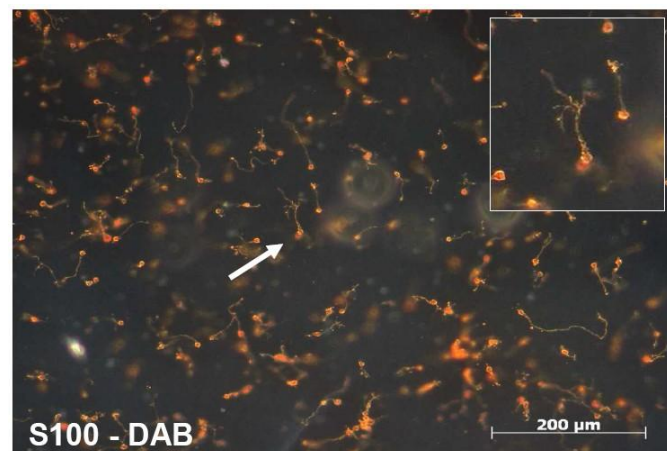


Figura 3.19 Spettrofotometria del comportamento delle cellule di Schwann a contatto con un substrato di idrogeli di fibrina dopo 4 DIV. Come tracciante sono stati usati S100 e DAB.

In presenza di fibre di PCL incorporate in idrogeli di fibrina, le cellule dimostrano una forte affinità ad associarsi con i differenti strati orientati degli *arrays* 3D, mentre solamente poche di esse tendono a crescere tra due diversi strati. Le cellule di Schwann risultano estendersi seguendo l'orientazione delle nanofibre, dimostrando una marcata preferenza nel seguire l'allungamento nell'orientazione delle fibre di PCL stesse (Figura 3.20).

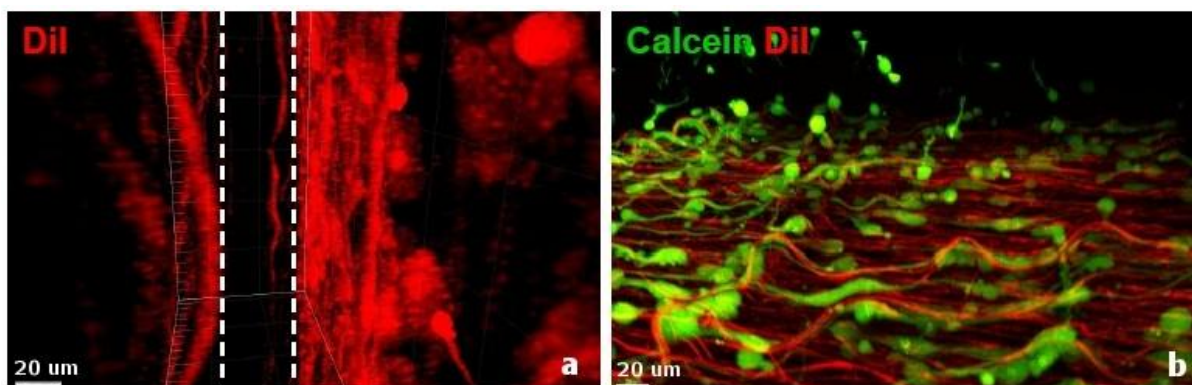


Figura 3.20 Spettrofotometria del comportamento delle cellule di Schwann a contatto con un substrato di nanofibre di PCL con idrogeli di fibrina dopo 4 DIV. In (a) si nota lo spazio tra due strati di arrays praticamente privo di cellule, in (b) l'allungamento cellulare segue la direzione delle fibre. Come tracciante sono stati usati Dil (in rosso) e Calceina (in verde).

3.4.2 Orientamento delle cellule di Schwann nello scaffold 3D di nanofibre allineate di PCL+SAP immerse in idrogel di fibrina

Si sono studiate la crescita e la migrazione delle cellule su differenti tipi di substrati: (i) fibre di solo PCL, usate come controllo, (ii) fibre di PCL + EAK, (iii) fibre di PCL + RGD-EAK, (iv) fibre di PCL + RGD-EAK-IKVAV.

In tutti i casi le cellule adottano una morfologia bi- o unipolare, dimostrando una forte preferenza nel seguire l'orientazione delle nanofibre (Figura 3.21). Non sembra esserci una rilevante differenza tra le fibre con o senza i SAP.

Per valutare la migrazione cellulare sono state analizzate le cellule di Schwann da espunti di gangli spinali (*dorsal root ganglia, DRG*) di ratto. Le cellule e gli assoni crescono partendo dal ganglio seguendo la direzione delle nanofibre: le nanofibre arricchite con i tre peptidi sintetici danno risposte analoghe alle fibre di solo PCL. In Figura 3.22 si mette come confronto l'immagine relativa alla migrazione cellulare in presenza di un substrato piano di poli-L-lisina laminina (PLL-laminina), dove risulta chiara una mancata preferenza nella direzione di crescita.

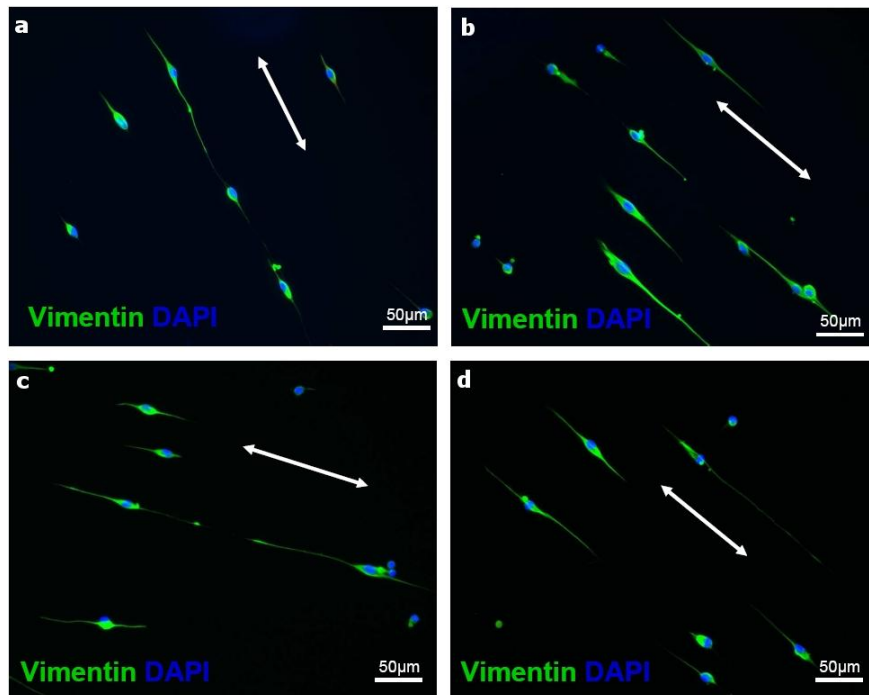


Figura 3.21 Spettrofotometria della crescita delle cellule di Schwann a contatto con un substrati di sole nanofibre di PCL (a), fibre di PCL+EAK (b), fibre di PCL+RGD-EAK (c), fibre di PCL+RGD-EAK-IKVAV (d). Tutti i campioni sono stati investigati dopo 4 giorni di cultura cellulare. La doppia freccia indica l'orientazione delle nanofibre. Come tracciante sono stati usati Vimentina (in verde) e DAPI (in blu).

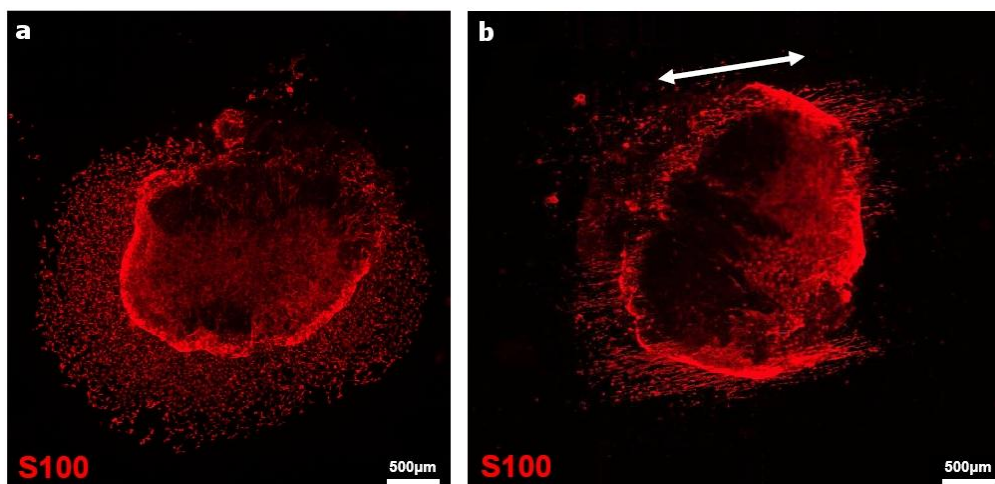


Figura 3.22 Spettrofotometria ritraente la migrazione delle cellule di Schwann da DRG a contatto con due diversi substrati: PLL-laminina (a), fibre di PCL + RGD-EAK-IKVAV (b). Il comportamento delle altre fibre di solo PCL e PCL + SAP hanno comportamento uguale a (b). Tutti i campioni sono stati investigati dopo 3 giorni di cultura cellulare. La doppia freccia indica l'orientazione delle nanofibre. Come tracciante è stato usato S100.

3.4.3 Saggi di adesione

Tutto il lavoro svolto sui saggi biologici è stato eseguito dalla Dott.ssa Hodde del gruppo di ricerca di Aachen.

I saggi di adesione su substrati bidimensionali con fibre arricchite o meno di SAP sono stati eseguiti con il metodo AlamarBlue® assay, descritto brevemente di seguito.

AlamarBlue® assay

Il saggio AlamarBlue® (*Invitrogen™*, *Life Technologies™*, Carlsbad, California) è un saggio metabolico che permette di quantificare la proliferazione cellulare grazie all'incorporazione di un indicatore di ossido-riduzione (la resazurina) che cambia colore in risposta alla riduzione chimica del terreno di coltura derivante dalla crescita cellulare.

AlamarBlue® è un indicatore di salute delle cellule, che utilizza il potere riducente delle stesse per misurarne quantitativamente la proliferazione: quando le cellule sono vive infatti mantengono un ambiente riducente nel citosol della cellula. La resazurina, il principio attivo, è di colore blu e praticamente non fluorescente. Sulle cellule entranti, la resazurina viene ridotta a resorufina, che invece è di colore rosso e altamente fluorescente. Le cellule vitali continuamente convertono resazurina a resorufina, aumentando la fluorescenza complessiva e il colore della soluzione.

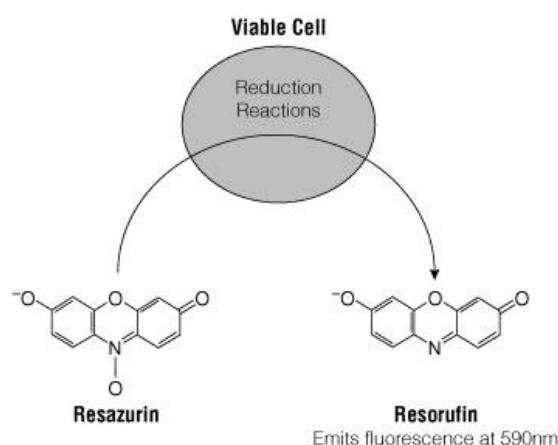


Figura 3.23 Il meccanismo di funzionamento di AlamarBlue®. La resazurina, un indicatore non fluorescente, è convertita a resorufina, fluorescente, per via di reazioni di riduzione delle cellule metabolicamente attive. La quantità di fluorescenza prodotta è proporzionale al numero totale di cellule.

Dopo aver aggiunto il reagente alle varie colture cellulari (al 10% in volume sul campione) segue una incubazione di 1-4 ore di a 37 °C. La fluorescenza risultante viene poi letta su un lettore di piastre o mediante uno spettrofotometro a fluorescenza. Infine, i risultati vengono analizzati tracciando l'intensità di fluorescenza (o assorbanza) rispetto alla concentrazione del composto.

Grafici

I substrati utilizzati per i saggi di adesione sono stati i seguenti:

- ✓ matrice 2D contenente fibre allineate di solo PCL (controllo);
- ✓ matrice 2D contenente fibre allineate di PCL + EAK;
- ✓ matrice 2D contenente fibre allineate di PCL + RGD-EAK;
- ✓ matrice 2D contenente fibre allineate di PCL + RGD-EAK-IKVAV;
- ✓ vetrini rivestiti di PLL-laminina (altro controllo).

Dall' istogramma di Figura 3.24, che raccoglie i dati di adesione cellulare in presenza del siero di coltura, non risultano rilevanti differenze tra i vari tipi di fibre; sembra che le fibre che favoriscano maggiormente l'adesione siano quelle costituite da solo PCL e da PCL+EAK.

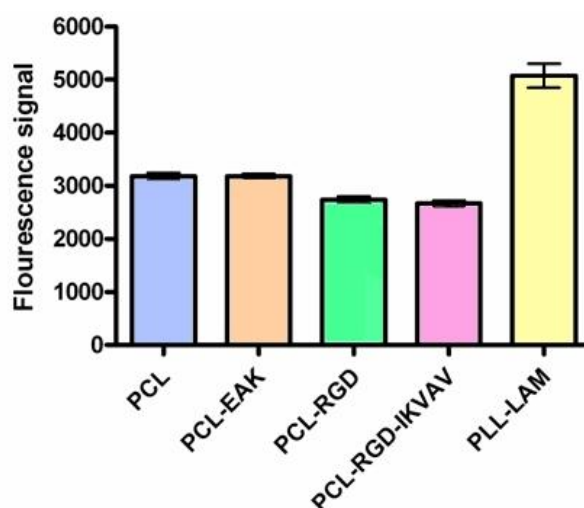


Figura 3.24 Il processo di adesione delle cellule di Schwann sui vari substrati, con medium contenente il siero.

Per verificare se le proteine del siero di coltivazione utilizzato abbiano in qualche modo mascherato la presenza dei peptidi auto-assemblanti sulla superficie delle fibre, si sono ripetuti gli esperimenti con un *medium* privo di siero (Figura 3.25).

Non si notano in ogni caso grosse variazioni: le differenze tra fibre di PCL e fibre di PCL+SAP risultano minime; è però evidente un rilevante decremento nel numero di cellule.

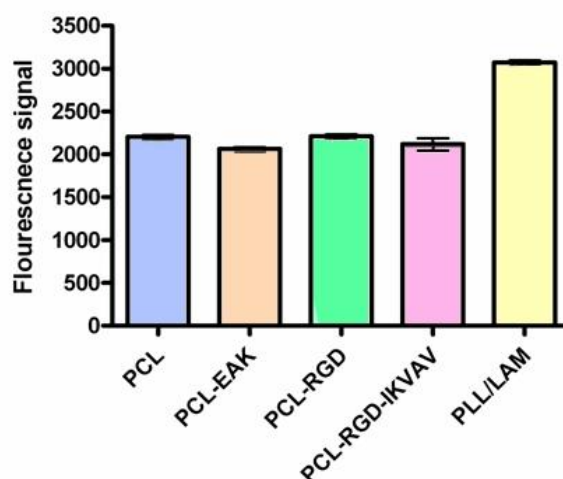


Figura 3.25 Il processo di adesione delle cellule di Schwann sui vari substrati, con *medium* senza il siero.

3.4.4 Saggi per valutare l'allungamento

Per valutare la morfologia cellulare (allungamento) è stato usato il software AxiVision della Carl Zeiss (Oberkochen, Germania), su cellule marcate con S100.

In presenza di siero compare qualche miglioramento per le fibre arricchite (Figura 3.26). I dati medi risultano superiori al riferimento (PCL) per tutti e tre i peptidi, con il miglior risultato per PCL+EAK.

Anche in assenza di siero non si rilevano particolari differenze: il substrato che in questo caso spicca maggiormente è però PCL + RGD-EAK. Il peptide contenente la sequenza adesiva IKVAV risulta invece inferiore al controllo. È interessante sottolineare che gli allungamenti sono mediamente più ingenti in assenza di siero.

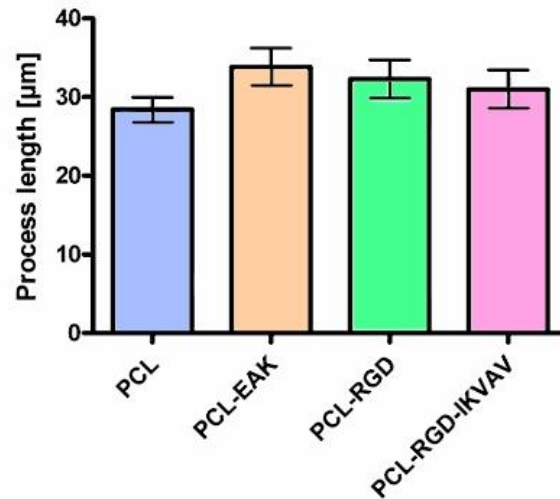


Figura 3.26 Il processo di allungamento delle cellule di Schwann sui vari substrati, con medium contenente il siero, dopo 3 DIV.

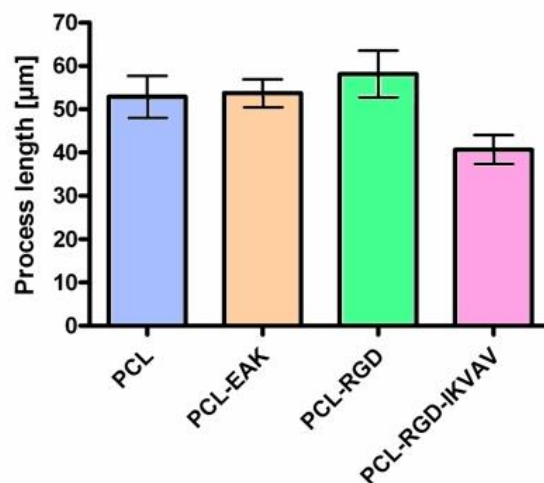


Figura 3.27 Il processo di allungamento delle cellule di Schwann sui vari substrati, con medium senza il siero, dopo 3 DIV.

3.5 Discussione

Lo scopo della presente tesi era valutare se l'introduzione di sequenze peptiche auto-assemblanti in nanofibre di policaprolattone potesse incrementare l'adesione di cellule di Schwann e il loro allungamento nella direzione delle nanofibre stesse. La sperimentazione nasceva come possibile punto di incontro tra due esperienze dai risultati promettenti: da un

lato la messa a punto di uno *scaffold* 2D e 3D di nanofibre elettrofilate di PCL, perfettamente allineate ed immerse in gel di fibrina, dimostratosi in grado di promuovere l'adesione e l'orientamento delle cellule di Schwann, dall'altro, l'arricchimento delle fibre elettrofilate con peptidi auto-assemblanti, che ha prodotto matrici in grado di migliorare l'adesione e di modulare il differenziamento di osteoblasti umani.

I risultati dei saggi biologici dimostrano però che l'arricchimento con i SAP non porta ad alcun incremento di adesione delle cellule di Schwann rispetto alle fibre di solo PCL. Questo dato è inatteso visto che due dei peptidi proposti recano ai terminali sequenze adesive specifiche. Un incremento di allungamento delle cellule rispetto al controllo è stato invece registrato per le nanofibre arricchite con tutti e tre i peptidi auto-assemblanti proposti.

Le possibili spiegazioni dei risultati non particolarmente positivi dei saggi possono essere le seguenti:

- differente sistema cellulare;
- la presenza di siero nel *medium* mette in competizione i peptidi con le proteine sieriche, che possono essere adsorbite dalle nanofibre; in parole povere il siero maschera l'azione dei SAP;
- la quantità di peptide auto-assemblante con la quale le cellule entrano in contatto è troppo esigua: va ricordato che non tutto il peptide risulterà superficiale, in parte sarà intrappolato all'interno della fibra;
- la quantità di nanofibre con cui vengono in contatto le cellule è troppo bassa in rapporto a quanto visto negli esperimenti con gli osteoblasti, che hanno utilizzato *scaffold* di nanofibre intrecciate.

La seconda spiegazione appare debole perché nel caso degli esperimenti con gli osteoblasti i saggi sono stati eseguiti in presenza di siero e hanno portato a differenze significative tra fibra arricchita e non. In aggiunta gli esperimenti con le cellule di Schwann sono stati ripetuti in assenza di siero e non hanno portato a miglioramenti effettivi.

Per valutare la terza ipotesi, sono state fatte delle analisi per valutare la composizione superficiale delle fibre allineate, tramite XPS e saggio con ninidrina. In entrambi i casi non sono risultati dati attendibili. Al contrario la determinazione della concentrazione dei gruppi

amminici superficiali tramite saggio con ninidrina, eseguita nell'ambito di un'altra tesi su matrici elettrofilate intrecciate, sta fornendo dati affidabili e riproducibili. Tali valutazioni stanno mettendo in luce che la distribuzione dei gruppi amminici in superficie varia in funzione della sequenza peptidica. Probabilmente il numero di fibre allineate è troppo esiguo per fornire una quantità di gruppi amminici rilevante. Questa esiguità potrebbe essere alla base dei mancati risultati positivi dei saggi biologici. Ulteriori sperimentazioni potranno utilizzare i peptidi auto-assemblanti non tanto nell'arricchimento delle fibre, che fungono da guida, ma come sostituti dell'idrogel di fibrina.

Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha permesso di confermare che l'utilizzo di fibre elettrofilate di policaprolattone, arricchite con peptidi auto-assemblanti, e immerse in un gel di fibrina, promuove l'orientamento e l'allungamento delle cellule di Schwann.

Nessun miglioramento significativo è stato però registrato relativamente alla presenza nella nanofibra di peptidi auto-assemblanti alle concentrazioni utilizzate.

La sperimentazione continuerà su supporti 2D e 3D, analoghi a quelli impiegati, nei quali i peptidi auto-assemblanti verranno utilizzati in sostituzione del gel di fibrina.

Nomenclatura

AA = amminoacido

PM = peso molecolare

Mn = peso molecolare medio numerico

ECM = extra-cellular matrix

SAP = self-assembling peptide

Fn = fibronectina

SNC = sistema nervoso centrale

SNP = sistema nervoso periferico

DRG = dorsal root ganglia

TBI = traumatic brain injury

SCI = spinal cord injury

CMT = Charcot-Marie-Tooth disease

GBS = Guillain-Barré syndrome

CIDP = Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy

BSP = bone sialoprotein

NGF = nerve growth factor

GGF = glial growth factor

BDNF = brain-derived neurotrophic factor

OPN = osteopontin

DNA = acido desossiribonucleico

RNA = acido ribonucleico

DIV = divisione cellulare

PCL = policaprolattone

HA = acido ialuronico

PEG / PEO = glicole polietilenico

PPG / PPO = glicole polipropilenico

sPEG = *star shaped* NCO-poly(ethylene glycol)-*stat*-poly(propylene glycol)

PGA = acido poliglicolico

PLA = acido polilattico

PLGA = acido polilattico glicolico

PLL = poli-L-lisina

PDMS = poli-dimetil silossano

A / Ala = alanina

D / Asp = acido aspartico

E / Glu = acido glutammico
F / Phe = fenilalanina
G / Gly = glicina
I / Ile = isoleucina
K / Lys = lisina
R / Arg = arginina
S / Ser = serina
V / Val = valina
Y / Tyr = tirosina
W / Trp = triptofano
Abu = acido 2-amminobutirrico
HFIP = 1,1,1,3,3,3-esafluoro-2-propanolo
MMT = bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
CCP = calcium phosphate precipitation
NMP = N-metil-2-pirrolidone
TFA = acido trifluoroacetico
DIPEA = N,N-diisopropilettilammina
DCM = diclorometano
DMF = N,N-dimetilformammide
TES = trietilsilano
TEA = trietilammina
PITC = isotiocianato di fenile
PTC = feniltiocarbamide
PTH = feniltioindantoina
Ac = acetile
NaOAc = acetato di sodio
EDTA = acido etilendiamminotetraacetico
Fmoc = 9-fluorenilmetilossicarbonile
HBTU = 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HOBt = 1-idrossibenzotriazolo
OtBu = *terz*-butilossi
t-Boc = *terz*-butilossicarbonile
Boc = vedi *t*-Boc
eq = equivalenti
UV/Vis = ultravioletto/visibile
HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*
SPPS = *Solid Phase Peptide Synthesis*
RP-HPLC = *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*
MS = mass spectrometry
ESI = *ElectroSpray Ionization*
TOF = *Time Of Flight*
MALDI = *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*

PR = potere risolutivo

CD = circular dichroism

w/w = rapporto in peso

v/v = rapporto in volume

C = concentrazione molare [M]

A = assorbanza

l = cammino ottico [cm]

M = molarità [mol/L]

w_t = peso del campione [g]

P = peso [g]

m = massa [g]

n = numero di moli [mol]

V = volume [cm³] o [mL]

n_x = indice di rifrazione di x

θ = ellitticità molare

t_R = tempo di ritenzione [sec]

ρ = densità [g/mL]

λ = lunghezza d'onda [nm]

λ_{\max} = lunghezza d'onda di massimo assorbimento [nm]

ϵ = coefficiente di estinzione molare [M⁻¹cm⁻¹]

ϵ_λ = coefficiente di estinzione molare alla determinata lunghezza d'onda [M⁻¹cm⁻¹]

Riferimenti bibliografici

1. <http://www.istat.it/it/archivio/4216>
2. Di Bello C., *Biomateriali - Introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*. Patron Editore, Bologna, 2004.
3. Di Bello C., A. Bagno, *Interazioni tra biomateriali e tessuti*. Patron Editore, Bologna, 2009.
4. Murphy WL, Mooney DJ, *Controlled delivery of inductive proteins, plasmid DNA and cells from tissue engineering matrices*. Journal of Periodontal Research, 1999; 34(7): 413-9.
5. Babensee JE, McIntire LV, Mikos AG, *Growth factor delivery for tissue engineering*. Pharmaceutical Research, 2000; 17(5): 497-504.
6. Gambaretto R, *Peptidi per la progettazione di biomateriali innovativi: sintesi e studi conformazionali*. Dottorato di ricerca in Scienze Chimiche, Facoltà di Scienze matematiche, fisiche, naturali, Università degli Studi di Napoli, 2005.
7. Thevenot P, Nair A, Dey J, Yang J, Tang L, *Method to Analyze Three-Dimensional Cell, Distribution and Infiltration in Degradable Scaffolds*. Tissue Engineering Part C Methods, 2008; 14(4): 319-31.
8. Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, McKee MD, *Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules*. Journal of Biomedical Material Research, 1998; 40(2): 324-35.
9. Alt KW, Jeunesse C, Builtrago-Téllez CH, Wachter R, Boes E, Pichler SL, *Evidence for stone age cranial surgery*. Nature, 1997; 387(6631): 360.
10. Mazzonetto I, *Materiali biomimetici per l'ingegneria dei tessuti neurali*. Tesi di laurea in Ingegneria Biomedica, Università degli Studi di Padova, 2011.
11. Inside MS, *First surgical transplant attempted to repair myelin*. New Orleans, 2001.

12. Oudega M, Xu XM, *Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord*. Journal of Neurotrauma, 2006; 23 (3-4): 453–67.
13. Fouad K, Schnell L, Bunge MB, Schwab ME, Liebscher T, Pearse DD, *Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord*. The Journal of Neuroscience, 2005; 25(5): 1169-78.
14. Carlson NR, *Physiology of Behavior*, Allyn & Bacon, Needham Heights, MA, 1986.
15. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli, Bologna, 1995.
16. Zhang S, *Emerging biological materials through molecular self-assembly*. Biotechnology Advances, 2002; 20(5-6), 321-39.
17. Turella F, *Nano-Scaffold di polimeri naturali e sintetici per l'ingegneria tissutale: preparazione e caratterizzazione*. Laurea Triennale in Scienza ed Ingegneria dei Materiali, Dipartimento di Ingegneria Meccanica, settore Materiali, Padova, 2008.
18. Holmes TC, de Lacalle S, Su X, Liu G, Rich A, Zhang S, *Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds*. PNAS USA, 2000; 97(12): 6728-33.
19. Schachner M, *Neurobiology: Nervous engineering*. Nature, 2000. 405(6788): 747-8.
20. Davis ME, Motion JP, Narmoneva DA, Takahashi T, Hakuno D, Kamm RD, Zhang S, Lee RT: *Injectable self-assembling peptide nanofibers create intramyocardial microenvironments for endothelial cells*. Circulation, 2005; 111(4): 442-50.
21. Misawa H, Kobayashi N, Soto-Gutierrez A, Chen Y, Yoshida A, Rivas-Carrillo JD, Navarro-Alvarez N, Tanaka K, Miki A, Takei J, Ueda T, Tanaka M, Endo H, Tanaka N, Ozaki T: *PuraMatrixTM facilitates bone regeneration in bone defects of calvaria in mice*. Cell Transplantation, 2006; 15(10): 903-10.
22. Bonow RO, Mann D, Zipes D, Libby P, *Braunwald's Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine*. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2008.

23. Girardi F, *Applicazioni di idrogeli di peptidi auto-assemblanti*. Tesi di laurea in Ingegneria Biomedica, Università degli studi di Padova, 2013.
24. Zhang L, Thomas J. Webster: *Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration*. *Nano Today*, 2009; 4(1): 66-80.
25. Patel R, Caruso RP, Taneja S, Stifelman M, *Use of fibrin glue and gelfoam to repair collecting system injuries in a porcine model: implications for the technique of laparoscopic partial nephrectomy*. *Journal of Endourology*, 2003; 17 (9): 799–804.
26. Toda K, Yoshitatsu M, Izutani H, Ihara K, *Surgical management of penetrating cardiac injuries using a fibrin glue sheet*. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 2007; 6 (4): 577–8.
27. Klinkhammer K, Bockelmann J, Simitzis C, Brook G, Grafahrend D, Groll J, Moller M, Mey J, Klee D, *Functionalization of electrospun fibers of poly (ϵ -caprolactone) with star shaped NCO-poly(ethylene glycol)-stat-poly(propylene glycol) for neural cell guidance*. *Journal of Material Science: Material Method*, 2010; 21(9): 2637-51.
28. Bozkurt A, Deumens R, Beckmann C, Damink L.O, Scügener F, Heschel I, Sellhaus B, Weis J, Jahnke-Dechent W, Brook G. A, Pallua N, *In vitro cell alignment obtained with a Schwann cell enriched microstructured nerve guide with longitudinal guidance channels*. *Biomaterials*, 2009; 30(2): 169-79.
29. Tashiro K, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, Yamada Y, *A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989;264(27): 16174-82.
30. Zhang S, Zhao X, Spirio L, *PuraMatrix: Self-assembling peptide nanofiber scaffold*. *Scaffolding in Tissue Engineering*, Cambridge, MA, 2005.
31. Wu Y, Zheng Q, Du J, Song Y, Wu B, Guo X, *Self-assembled IKVAV peptide nanofibers promote adherence of PC12 cells*. *Journal of Huazhong University of Science and Technology, Medicine Science*, 2006; 26(5): 594-6.
32. Tysseling-Mattiace VM, Sahni V, Niece KL, Birch D, Czeisler C, Fehlings MC, Stupp SL, Kessler JA, *Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote*

- axon elongation after spinal cord injury*. Journal of Neuroscience, 2008; 28(14): 3814-23.
33. Gelain F, Panseri S, Antonini S, Cunha C, Donega M, Lowery J, Taraballi F, Cerri G, Montagna M, Baldissera F, Vescovi A, *Transplantation of nanostructured composite scaffolds results in the regeneration of chronically injured spinal cords*. ACS Nano 2011; 5(1): 227-36.
34. Ellis-Behnke RG, Liang Y, You SW, Tay DKC, So KF, Schneider GE, *Beyond nano neuro knitting: creating of a more permissive environment using SAPNS with chondroitinase ABC for brain lesion repair and functional return of vision*. International Brain Research Organization, Amsterdam, 2007.
35. Ellis-Behnke et al, *Nanoparticles in Optic Nerve Trauma: Nanoscaffolding, Visualization and Regeneration*. Annual Meeting Syllabus, Massachusetts, 2009.
36. Staniforth P, Fisher TR, *The effects of sural nerve excision in autogenous nerve grafting*. Hand 1978; 10(2): 187-90.
37. Bora FW jr., *Peripheral nerve repair in cats. The fascicular stitch*. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1967; 49(4): 659-66.
38. Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF, *Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation*. Biomaterials 2004; 25(9): 1583-92.
39. Merle M, Dellon AL, Campbell JN, Chang PS, *Complications from silicon-polymer intubulation of nerves*. Microsurgery 1989; 10(2): 130-3.
40. Merolli A, Rocchi L, Catalano F, *Ulnar nerve re generation in a 70-years-old patient assessed upon revision of a degradable nerve-guide after nine months*. Journal of reconstructive microsurgery, 2009; 25(4): 279-81.
41. Raimondo S, Nicolino S, Tos P, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG, Perroteau I, Geuna S, *Schwann cell behavior after nerve repair by means of tissue-engineered muscle-vein combined guides*. The Journal of comparative neurology, 2005; 489(2): 249-59.

42. Cao H, Liu T, Chew SY, *The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009; 61(12): 1055-64.
43. Danesin R, Brun P, Roso M, Delaunay F, Samouillan V, Brunelli K, Iucci G, Ghezzi F, Modesti M, Castagliuolo I, Dettin M, *Self-assembling peptide-enriched electrospun polycaprolactone scaffolds promote the h-osteoblast adhesion and modulate differentiation-associated gene expression*. *Bone*, 2012; 51(5): 851-9.
44. Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP, *A Biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering*. *Biomaterials* 2003; 24:2077-82.
45. Merrifield RB, *Solid Phase Synthesis*. *Science*. 1986; 232: 341-7.
46. Fields GB, Tian Z, Barany G: *Synthetic peptides: a user's guide*. Grant G.A. (ed), W.H. Freeman and Company, New York, 1992.
47. Fields GB, Noble RL: *Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids*. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1990; 35(3): 161-214.
48. Carpino LA, Han GY: *9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group*. *The Journal of organic chemistry*, 1972; 37(22): 3404-9.
49. Fields CG, Lloyd DH, Macdonald RL, Otteson KM, Noble RL: *HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis*. *Peptide Research*, 1991; 4(2): 95-101.
50. Ball HL, Mascagni P, *Chemical synthesis and purification of protein: a methodology*. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1996; 48(1): 31-47.
51. Pearson DA, Blanchette M, Baker ML, Guindon A, *Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis*. *Tetrahedron Letters*, 1989; 30(21): 2739-42.
52. Stulik K, Pacakova V, Suchankova J, Claessens HA, *Stationary phase for peptide analysis by high performance liquid chromatography: a review*. *Analytica Chimica Acta*, 1997; 352(1-3): 1-19.

53. Siuzdak G, *The Emergence of Mass Spectrometry in Biochemical Research*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1994; 91(24): 11290-7.
54. Greenfield NJ, *Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data*. Analytical Biochemistry 1996; 235, 1-10.
55. Dettin M, Falcigno L, Campanile T, Scarinci C, D'Auria G, Cusin M, Paolillo L, Di Bello C, *A type-II beta-turn, proline-containing, cyclic penta peptide as a building block for the construction of models of the cleavage site of pro-oxytocin*. Journal of peptide science, 2001; 7(7): 358-73.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno assistito e aiutato nella realizzazione di questo lavoro: la prof.ssa Monica Dettin, per la sua professionalità e grande disponibilità dimostrata in questi mesi; Annj Zamuner, per la pazienza e l'aiuto nelle pratiche di laboratorio; tutti i laureandi presenti in laboratorio in questi mesi per aver contribuito a rendere sempre un clima di amicizia e simpatia.

Un ringraziamento particolare va a Federica che mi ha sempre supportato e sopportato in ogni mia scelta, facendomi capire che niente è insormontabile e che tutto diventa più bello se si fa con un sorriso.

I miei genitori che mi hanno sostenuto economicamente, zii e cugini per il sostegno morale.

Ringrazio Pietro per l'amicizia maturata in questi anni universitari e per aver contribuito a rendere i periodi di studio meno faticosi.

Un grazie a tutti gli amici che ti ricordano che un paio di birre fanno passare sempre tutto e che esistono cose più importanti che i libri.