



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

Scuola di Dottorato di Ricerca in
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
Indirizzo di INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI
XXIII Ciclo

TESI DI DOTTORATO

**CELLULE STAMINALI E
MATRICI BIOMIMETICHE NANOSTRUTTURATE
PER LA MEDICINA RIGENERATIVA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Coordinatore di indirizzo: Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Dottoranda: Dott.ssa Roberta Danesin

Gennaio 2011

INDICE

Premessa	V
RIASSUNTO	V
SUMMARY	VII
PARTE A	1
Identificazione, isolamento e caratterizzazione di cellule staminali surrenali di ratto	1
Capitolo 1: INTRODUZIONE	3
1.1 Il surrene	3
1.1.1 Anatomia e produzione ormonale	3
1.1.2 Cellule staminali surrenali.....	5
Teoria zonale.....	6
Teoria della zona proliferativa intermedia	6
Teoria della migrazione	7
1.2 Scopo della tesi	9
Capitolo 2: METODI	11
2.1 Caratterizzazione delle cellule surrenali di ratto.....	11
2.1.1 Saggio in vivo con BrdU	11
Somministrazione di BrdU a ratti neonati.....	11
Analisi immunohistochimica dei surreni di ratto	11
<i>Inclusione in paraffina</i>	11
<i>Rimozione della paraffina e reidratazione delle sezioni</i>	12
<i>Analisi immunohistochimica per individuare le cellule BrdU positive</i>	12
2.2 Localizzazione delle cellule CD90, CD105 e c-kit positive tramite analisi immunohistochimica e di immunofluorescenza	13
2.2.1 Immunohistochimica	13
2.2.2 Immunofluorescenza	14

2.3 Isolamento e coltura delle cellule della zona capsulare e della parte midollare della ghiandola surrenale.....	14
2.3.1 Estrazione	14
2.3.2 <i>Population Doubling</i>	15
2.3.3 Immunoseparazione magnetica	16
Condizionamento di biglie magnetiche con anticorpo	16
Immunoseparazione	16
2.3.4 Differenziazione adipogenica ed osteogenica <i>in vitro</i>	17
Induzione dei differenziamenti.....	17
Metodiche per valutare i differenziamenti	17
<i>Analisi morfologica</i>	17
<i>Saggio Oil-Red-O per la presenza di trigliceridi</i>	17
<i>Saggio von Kossa per la deposizione di sali di calcio</i>	18
Capitolo 3: RISULTATI E DISCUSSIONE	21
3.1 Localizzazione delle cellule BrdU positive.....	21
3.2 Localizzazione delle cellule CD105+, CD90+, c-kit+	21
3.3 Colture primarie di cellule surrenali.....	22
3.4 Colture di cellule surrenali CD90+ o CD105+	23
3.5 Differenziazione adipogenica ed osteogenica su colture primarie, colture di cellule CD105+, colture di cellule CD90+.....	23
Capitolo 4: CONCLUSIONI	27
PARTE B	29
Matrici biomimetiche nanostrutturate per l'ingegneria del tessuto osseo	29
Capitolo1: INTRODUZIONE	31
1.1 BIOMATERIALI PER L'INGEGNERIA TESSUTALE	31
1.1.1 <i>Scaffold</i> per la rigenerazione ossea.....	32
1.1.2 Matrici nanofibrose.....	34
Separazione di fase termicamente indotta (TIPS)	34
<i>Electrospinning</i>	35
<i>Self-assembling</i>	37

1.1.3 <i>Scaffold</i> biomimetici e sequenze adesive	41
1.2 SCOPO DELLA TESI	43
Capitolo 2: METODI	45
2.1 PREPARAZIONE DEI PEPTIDI	45
2.1.1 Sintesi peptidica in fase solida	45
Deprotezione del gruppo Fmoc	48
Condensazione o <i>coupling</i>	49
2.1.2 Test sulla resa di funzionalizzazione della resina.....	50
2.1.3 Sblocco del peptide dalla resina	51
2.1.4 Purificazione e caratterizzazione cromatografica.....	53
2.1.5 Analisi di massa.....	55
2.2 <i>SCAFFOLD</i> POLIMERICI.....	56
2.2.1 Elettrofilatura degli <i>scaffold</i> polimerici.....	56
2.2.2 Analisi al microscopio elettronico.....	57
2.2.3 Analisi spettroscopica infrarossa in Trasformata di <i>Fourier</i>	57
2.2.4 Trattamento con tampone salino	59
2.2.5 Misura dell'angolo di contatto.....	60
2.3 SAGGI BIOLOGICI <i>IN VITRO</i>	61
2.3.1 Coltura di osteoblasti.....	61
2.3.2 Semina delle cellule sugli <i>scaffold</i>	61
2.3.3 MTT test.....	62
2.3.4 Determinazione dei livelli di calcio: metodo <i>o</i> -CPC.....	63
2.3.5 Espressione genica: q-PCR	66
2.3.6 Analisi statistica	73
Capitolo 3: RISULTATI E DISCUSSIONE	75
3.3 SINTESI E PURIFICAZIONE DI PEPTIDI.....	75
3.3.1 EAK.....	75
3.3.2 RGD-EAK.....	79
3.3.3 RGD-EAK sc.....	84
3.3.4 DAK	87
3.3.5 EAbuK.....	91
3.3.6 EYK.....	95
3.4 CARATTERIZZAZIONE DEGLI <i>SCAFFOLD</i>	99

3.4.1 Morfologia degli <i>scaffold</i> elettrofilati.....	99
3.4.2 Spettroscopia infrarossa.....	100
3.4.3 Bagnabilità.....	102
3.5 SAGGI BIOLOGICI <i>IN VITRO</i>	105
3.5.1 Valutazione dell'adesione.....	105
3.5.2 Determinazione del calcio nella matrice.....	107
3.5.3 Espressione genica di ALP, OPN e BSP.....	108
Capitolo 4: CONCLUSIONI _____	113
ABBREVIAZIONI _____	115
BIBLIOGRAFIA _____	119

Premessa

Il lavoro di ricerca svolto nel triennio di dottorato si è focalizzato su due progetti.

Il primo ha riguardato l'individuazione di cellule staminali nel surrene di ratto, al fine di poterle isolare e caratterizzare.

Nel secondo progetto ci si è occupati della progettazione e realizzazione di matrici biomimetiche nanofibrose per la rigenerazione del tessuto osseo.

RIASSUNTO

Il primo progetto di ricerca ha cercato di chiarire le conoscenze attuali riguardo l'esistenza di cellule staminali adulte residenti nel tessuto surrenale. Sebbene alcune evidenze sperimentali suggeriscano l'esistenza di tali cellule nella parte esterna della corticale surrenale, al riguardo non c'è ancora una teoria riconosciuta in modo unanime: non è stata identificata la loro zona d'origine, né tantomeno sono stati individuati dei *marker* caratteristici che permettano di isolarle.

L'individuazione di tali cellule potrebbe trovare applicazione nella cura di malattie surrenali, ad esempio nell'ipocorticosurrenalismo permetterebbe di evitare la terapia ormonale a vita e quindi, rappresenterebbe la terapia d'elezione.

Il progetto si è quindi prefisso come obiettivi di identificare e isolare una popolazione di cellule staminali all'interno della ghiandola surrenale di ratto.

Tramite analisi immunohistochimica e di immunofluorescenza sono state ricercate: a) zone cellulari BrdU+ (ratti trattati alla nascita con BrdU), a ciclo cellulare lento; b) *marker* di staminalità CD105, CD90 e c-kit.

Dai surreni di ratto sono state estratte due sottopopolazioni di cellule, capsulari e della parte interna: queste sono state coltivate *in vitro*, osservate e immunoseparate per CD105 e CD90. Infine, è stata testata la capacità differenziativa delle colture sia in senso osteogenico che adipogenico.

Nel secondo progetto sono stati ideati e prodotti *scaffold* da impiegare nell'ambito dell'ingegneria del tessuto osseo. La progettazione di uno *scaffold* per l'ingegneria tessutale risulta essere alquanto complessa visto che un supporto ideale per la colonizzazione cellulare dovrebbe possedere le caratteristiche, strutturali e funzionali, della matrice extracellulare. Lo *scaffold* ideato ha natura ibrida essendo composto di un

polimero di sintesi biodegradabile quale il poli(ϵ -caprolattone) e di peptidi auto-assemblanti. La struttura fibrosa dello *scaffold* su scala micrometrica è stata assicurata mediante un processo di elettrofilatura. D'altro canto, è noto che i peptidi auto-assemblanti formano spontaneamente matrici tridimensionali con fibre nanometriche estremamente gradite a differenti tipi di cellule, incluse quelle del tessuto osseo. Sono stati ottenuti sei differenti tipi di *scaffold* utilizzando sei diversi peptidi, ottenuti per sintesi su fase solida, tra i quali una sequenza auto-assemblante coniugata ad un motivo adesivo RGD. Le matrici sono state estesamente caratterizzate mediante analisi di spettroscopia elettronica a scansione, spettroscopia all'infrarosso in trasformata di *Fourier* e valutazione dell'angolo di contatto. Le matrici risultano essere composte da un intreccio di fibre di dimensioni comparabili a quelle della matrice extracellulare; inoltre, è stato possibile confermare che la struttura β -sheet, che è alla base dell'auto-aggregazione, è presente nelle matrici e viene incrementata, nel caso del peptide auto-assemblante con motivo RGD, dal pre-trattamento con soluzione salina. E' stato inoltre dimostrato come l'arricchimento con piccole percentuali (5%) di peptidi dello *scaffold* in poli(ϵ -caprolattone) produca un grado di bagnabilità notevolmente superiore e quindi crei i presupposti per una maggior colonizzazione della matrice da parte delle cellule. I saggi biologici, eseguiti su tutti gli *scaffold*, hanno permesso di dimostrare che la presenza di sequenze auto-assemblanti incrementa in modo significativo l'adesione cellulare, la produzione di calcio e l'espressione di geni che codificano per proteine importanti per gli osteoblasti.

SUMMARY

The aim of the first part of this research project was to improve the knowledge about the existence and location of adult stem cells in the adrenal gland.

Although some experiments might suggest that undifferentiated cells derived from the external periphery of cortical zone, the origin of the regenerating cells remains ambiguous, and there are not currently known surface markers for defining these cells.

Two distinct cellular populations, from the capsular zone and from the inner part of the adrenal gland, were isolated and investigated *in vitro* in order to study their phenotype, their proliferative potential and plasticity.

The second research project aims to design scaffolds for bone tissue engineering.

The development of novel scaffolds for bone tissue engineering is very complex, because ideal support for cellular colonization would possess the same structural and functional characteristics of ECM.

In this work, the creation of hybrid scaffolds, mixing a very well known biocompatible synthetic polymer, poly(ϵ -caprolactones), with different self-assembling peptides, is presented. The microfibrillar structure of the scaffold is assured by the electrospinning process, whereas the nanofibrillar structure is produced by the self-assembling process of peptides. We prepared six different scaffolds adding six different peptides to poly(ϵ -caprolactones). These peptides were synthesized by solid phase strategy, and one sequence was prepared condensing a RGD motif to a self-assembling sequence.

The characterization of the different scaffolds was carried out through SEM morphological analysis, FT-IR spectroscopy and contact angle measurements.

All prepared scaffold exhibit interwoven nanofibers comparable to the ECM ones.

FTIR investigations showed that self-assembling peptides incorporated in the PCL nanofibers retain the β -sheet conformation, and that an incubation with saline buffered solution can increase the percentage of this structure in the RGD containing peptide.

The enrichment with peptides improves the wettability of the polymer scaffold adding an important requirement for better cellular adhesion.

The biological assay showed that the presence of self-assembling peptides into the scaffold increases cellular adhesion, the calcium amount and the gene expression of some proteins important for osteoblast.

PARTE A

Identificazione, isolamento e caratterizzazione di cellule staminali surrenali di ratto

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Il surrene

1.1.1 Anatomia e produzione ormonale

I surreni, due piccole ma importantissime ghiandole situate superiormente ai reni, sono costituite da due distinte porzioni, la corticale e la midollare, distinte per origine embriologica e per caratteristiche anatomico-fisiologiche. L'intera ghiandola è rivestita da una capsula connettivale.

La porzione midollare, situata internamente, costituisce circa $\frac{1}{4}$ della massa della ghiandola ed è deputata alla sintesi e al rilascio di catecolamine (adrenalina e noradrenalina).

La midollare è completamente avvolta dalla porzione corticale nella quale, nell'adulto, si possono distinguere ulteriori tre zone anatomiche e funzionali che producono e secernono vari ormoni steroidei a partire dal colesterolo. Tali zone dall'esterno verso l'interno sono:

- ✓ la zona glomerulare (zG): presenta cellule che sotto la regolazione del sistema renina-angiotensina, sintetizzano e secernono mineralcorticoidi, in particolare l'aldosterone, implicato nel mantenimento dell'equilibrio idrico-salino;
- ✓ la zona fascicolata (zF): caratterizzata da cellule organizzate in colonne, è in grado di produrre glucocorticoidi, in particolare cortisolo e corticosterone, che controllano il metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine;
- ✓ la zona reticolare (zR): sintetizza e secerne ormoni sessuali, come androgeni, estrogeni e progesterone.

Gli ormoni prodotti dalle ghiandole surrenali sono in grado di agire sull'omeostasi fisiologica e sul metabolismo dell'organismo, per cui è facilmente comprensibile come eventuali processi patologici interferenti con le normali funzioni delle surrenali possano portare a gravi problemi di salute.

Dal punto di vista funzionale, le malattie della corticale surrenale possono manifestarsi o come eccesso (ipersurrenalismo), o come carenza (iposurrenalismo) di secrezione

Introduzione

degli ormoni steroidei (tutti, oppure quelli specificatamente prodotti in una delle tre zone della corticale). Tra queste patologie, quella che richiama maggiore attenzione è l'ipossurrenalismo inteso come carenza di glucocorticoidi e/o mineralcorticoidi, in quanto queste molecole sono essenziali alla sopravvivenza dell'individuo. La terapia base consiste, infatti, in un trattamento ormonale sostitutivo, ma com'è noto, non rappresenta la cura d'elezione.

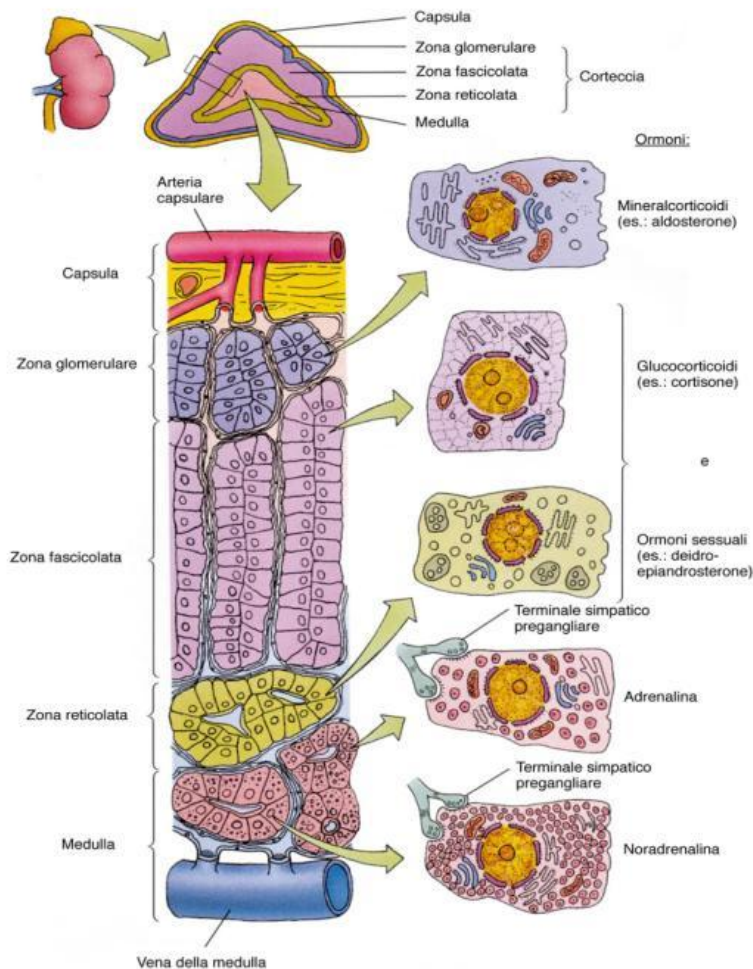


Figura 1.1. Rappresentazione schematica della ghiandola surrenale.

Il processo di regolazione ormonale della ghiandola surrenale è molto complesso in quanto è finemente regolato da un meccanismo a *feedback*, che coinvolge nel caso dei glucocorticoidi anche l'asse ipotalamo-ipofisiario, e nel caso dei mineralcorticoidi il sistema renina-angiotensina. La situazione risulta ancora più complicata nel caso della secrezione dei glucocorticoidi che segue essenzialmente un ritmo circadiano ma che varia fortemente anche in risposta a stimoli esterni.

Introduzione

La somministrazione di ormone esogeno anche se distribuita nell'arco della giornata, quindi, difficilmente riesce a mimare correttamente il normale ritmo circadiano e/o fisiologico di secrezione ormonale. Questo comporta spesso una determinazione approssimativa dei dosaggi da somministrare, aggiustando via via la posologia per evitare sia il perdurare di un'insufficienza ormonale, sia di ricadere nell'iperdosaggio. L'esigenza di ottenere sempre nuovi e più efficaci strumenti terapeutici, insieme alla necessità di riuscire a comprendere sempre più appieno il reale funzionamento fisiologico di queste ghiandole, hanno tenuto vivo l'interesse degli studiosi verso quest'organo.

Per quanto riguarda l'omeostasi delle ghiandole surrenali, similmente per quanto avviene per altri organi, si ritiene che essa possa esser mantenuta dalla presenza in loco di cellule staminali somatiche tessuto-specifiche. Secondo questa ipotesi alcune cellule resterebbero relativamente indifferenziate e quiescenti finché non fosse necessario, a seguito di un danno, un ripopolamento dell'organo: a quel punto esse sarebbero in grado di dare il via alla proliferazione e differenziazione. Riuscire a identificare queste rare cellule progenitrici, sarebbe un grande passo avanti per la comprensione del mantenimento dell'omeostasi delle ghiandole surrenali, ma potrebbe portare anche a più importanti traguardi: tra cui una migliore conoscenza degli eventi che portano allo sviluppo di masse tumorali surrenali, ma soprattutto anche ad importanti applicazioni cliniche, come ad esempio, il trapianto di cellule staminali che rappresenterebbe una valida e più fisiologica alternativa alla somministrazione ormonale a vita.

1.1.2 Cellule staminali surrenali

Sebbene siano stati condotti molti studi volti a localizzare la zona dalla quale originano per differenziazione le cellule della corticale del surrene, non è stato possibile identificare in modo univoco la sede dell'attività proliferativa, né si è giunti ad una chiara e completa descrizione dei complessi fattori che regolano tale processo. Sull'origine delle staminali corticali, rimangono aperte ancora diverse ipotesi, tra cui:

- ✓ la teoria zonale;
- ✓ la teoria della zona proliferativa intermedia;
- ✓ la teoria della migrazione.

Teoria zonale

Questa teoria, al momento ritenuta la meno probabile, è sostenuta da un minor numero di ricercatori. Secondo tale teoria, proposta per la prima volta da Chester Jones nel 1948, ogni zona presente nella corticale del surrene è in grado di rigenerare le proprie cellule. Questa ipotesi prevede, quindi, l'esistenza di tre siti proliferativi, uno in ogni zona (Chester Jones, 1948; Mitani et al., 2003). In particolare, successivi studi sulla rigenerazione corticale, hanno portato alcune evidenze a favore di questa tesi, e ad ipotizzare due distinti processi di rigenerazione, l'uno in condizioni fisiologiche, l'altro in condizioni patologiche. Il processo fisiologico di rinnovamento cellulare si ritiene avvenire principalmente per divisione cellulare delle cellule differenziate presenti nelle tre zone corticali, mentre il processo innescato in condizioni patologiche sembra coinvolgere le cellule staminali corticali. Tali cellule sono state identificate in alcune cellule isolate vicino alle pareti dei vasi capillari di tutta la zona corticale, e in modo più abbondante nella parte più esterna; esse in risposta a stimoli patologici possono dare origine a cellule progenitrici poco differenziate che sono in grado di proliferare e di differenziarsi nei vari tipi di cellule parenchimali corticali in base alla loro localizzazione (Kashirina, 2003).

Teoria della zona proliferativa intermedia

Il modello di rigenerazione proposto da questa teoria prevede l'esistenza nella corticale surrenale di una ulteriore zona chiamata zona indifferenziata intermedia (*undifferentiated zone*, zU). Le prime osservazioni al riguardo sono da attribuire a Idelman (1978) che ipotizzò la sua presenza tra la zona glomerulare e quella fascicolata; comunque recenti studi hanno confermato la presenza di zU almeno nel ratto e nel topo (Ogishima et al., 1992; Mitani et al., 1994) e hanno portato ad una prima caratterizzazione delle cellule in essa residenti. Le cellule presenti in zU vengono considerate indifferenziate rispetto alle altre cellule corticali, perché non sono in grado di produrre gli ormoni surrenali, in quanto prive degli enzimi deputati alla loro sintesi. In particolare però, l'attività proliferativa più intensa è stata riscontrata non solo in zU ma anche nelle zone limitrofe, dove in risposta a stimoli del sistema renina-angiotensina o dell'ACTH si ha un picco di replicazione rispettivamente spostato verso zG o verso zF (Mitani et al., 2003). In base a questi ultimi progressi si ritiene, quindi, che le cellule indifferenziate presenti in zU possano dare origine a due tipi di cellule: da una parte a

cellule che ripopolano la zona fascicolata, proliferano e infine migrano verso l'interno, differenziandosi in cellule zF e zR; dall'altra a cellule che contribuiscono solo al mantenimento di zG e non migrano verso altre zone. In entrambi i casi, cioè sia a livello della midollare sia a livello della corticale esterna, le cellule degenerano e poi muoiono per apoptosi (Mitani et al., 2003).

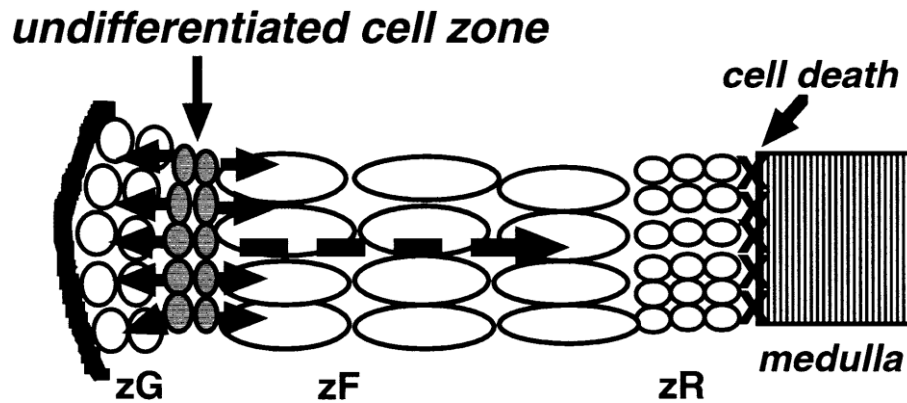


Figura 1.2. Teoria della zona proliferativa intermedia. Il meccanismo d'azione proposto individua in zU, una zona di cellule staminali che provvedono al ripopolamento dell'organo. Le cellule di zU si differenziano in cellule di zG, o in cellule di zF. Quest'ultime migrano verso l'interno, si differenziano in cellule di zR e vanno incontro ad apoptosi al confine con la midollare (Mitani et al., 2003).

Teoria della migrazione

La teoria della migrazione, sebbene sia stata tra le prime ipotesi ad essere state formulate già più di un secolo fa (Gottschau, 1883), è a tutt'oggi una delle più accreditate. Essa è contrapposta alla teoria zonale, in quanto ritiene che una singola regione sia in grado di riprodurre tutte le cellule del parenchima corticale. Tale sito, è individuato nella parte più esterna della ghiandola come uno strato di cellule capsulari o sottocapsulari, che attraverso un processo di differenziazione e di migrazione centripeta verso l'interno, sono in grado di generare almeno tre tipi di cellule differenti, terminando poi il loro ciclo vitale al confine tra zona reticolare e midollare. Questa ipotesi è stata avvalorata nel tempo da numerosi studi. Alcuni tra questi hanno, ad esempio, riscontrato una maggior attività mitotica nella regione sottocapsulare e una maggiore attività apoptotica a livello del confine tra zona reticolare e midollare (Zajicek et al., 1986; Mesiano et al., 1997). Successivamente anche gli esperimenti di enucleazione hanno dimostrato che rimuovendo la parte interna della ghiandola surrenale e lasciando intatta la parte capsulare e sottocapsulare, si può ottenere una completa rigenerazione della ghiandola e delle sue zone corticali che appaiono istologicamente e funzionalmente come nelle normali condizioni fisiologiche (Skelton,

Introduzione

1959; Perrone et al., 1986). Un'ulteriore conferma è data dagli studi sul trapianto di cellule surrenali corticali in animali adrenalectomizzati, con il quale è possibile ottenere una rigenerazione completa con la formazione di una ghiandola funzionante (Thomas et al., 1997 e 2000). In particolare è stato dimostrato che se si trapiantano cellule appartenenti a zG si ha la formazione di nuovo tessuto simile a zG e a zF, mentre se si esegue un trapianto di cellule derivanti da zF, non si nota la formazione di nessuna struttura (Teebken et al., 2000; Yanase et al., 2006). Questi esperimenti tuttavia, si limitano a dimostrare solo la presenza, nella parte esterna della corticale di cellule in grado di rigenerare la ghiandola. L'origine delle cellule staminali surrenali rimane ancora ambigua.

Rimane ad esempio, ancora da chiarire in modo definitivo se le cellule staminali surrenali derivino dalla capsula o dalla regione sottocapsulare. Alcuni autori, infatti, sostengono l'ipotesi che le cellule staminali risiedano nella capsula e siano delle cellule di tipo fibroblastoide, altri che siano cellule indifferenziate presenti nella regione subcapsulare (Kim et al., 2007). Recentemente è stata proposta una soluzione a questo dilemma e che al contempo è in grado spiegare l'esistenza della zU sostenuta nella precedente teoria.

Secondo quest'ultimo modello le cellule staminali surrenali risiedono nella capsula, che rappresenta il luogo fisico di origine, e svolge anche il ruolo di nicchia. Le cellule capsulari staminali sono in grado di dividersi in modo asimmetrico generando una cellula capsulare e una cellula progenitrice indifferenziata. Tali progenitori vengono genericamente definiti subcapsulari, ma è possibile riscontrarli in un'area più o meno ampia comprendente in parte anche la zG, che oramai si ritiene caratterizzata dalla presenza di più tipi cellulari (Okamoto et al., 1997). La variabilità nella localizzazione delle cellule indifferenziate, siano esse staminali o progenitrici, può a ragione essere attribuita al modello sperimentale considerato e cioè alle differenze di specie esistenti nell'anatomia di zG (spessore e tortuosità); questo può portare di volta in volta ad una localizzazione isolata o all'individuazione di zone di cellule indifferenziate (zU nel ratto). Le cellule progenitrici indifferenziate sono considerate altamente proliferanti e, in risposta a diversi stimoli, capaci di migrare centripetamente verso l'interno, differenziandosi lungo il percorso nelle cellule delle varie zone (Kim et al., 2007 e 2009).

Sebbene le maggiori evidenze scientifiche siano a favore della teoria della migrazione, non è ancora possibile definire le cellule indifferenziate individuate nella capsula come

Introduzione

cellule staminali adulte surrenali, né tantomeno riferirsi a quelle subcapsulari come progenitori veri e propri. Innanzitutto non sono ancora noti i *marker* superficiali che caratterizzano le cellule staminali surrenali e non è stata dimostrata la presenza di una nicchia a supporto dello sviluppo di queste cellule. Per questo anche le cellule isolate in realtà sono state selezionate come popolazioni indifferenziate solo per evidenze indirette, come la carenza di granuli lipidici o di enzimi steroidogenici (Dunn et al., 2009), o per l'assenza di alcuni *marker* specifici presenti delle cellule steroidogeniche differenziate.

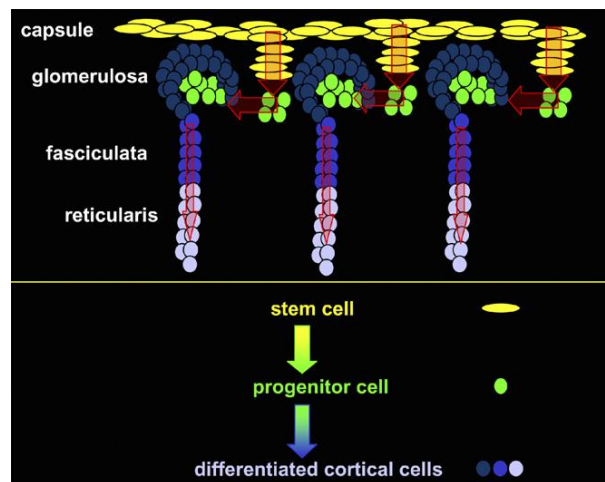


Figura 1.3. Teoria della migrazione. Il meccanismo ipotizzato individua nella regione capsulare le staminali surrenali, dalle quali originerebbero delle cellule progenitrici localizzabili a livello di zG. Il modello prevede una migrazione centripeta con una differenziazione verso le cellule steroidogeniche surrenali (Kim et al., 2007).

1.2 Scopo della tesi

Attualmente, l'insufficienza cortico-surrenalica viene trattata con una terapia sostitutiva a base di ormoni steroidei. Tale trattamento non è ideale, in quanto la richiesta di ormoni varia continuamente con lo stato fisiologico. In tale contesto una terapia basata sull'utilizzo di cellule staminali potrebbe rappresentare una valida alternativa. Tuttavia, nonostante i grandi sforzi volti a localizzare in modo esatto la sede dell'attività proliferativa all'interno della corteccia surrenale, non è stata completamente chiarita la natura delle cellule staminali dalle quali originano per differenziazione le cellule della corticale. Sulla base di questi presupposti, questo progetto si propone di identificare e isolare una popolazione di cellule staminali all'interno della ghiandola surrenale di ratto.

Introduzione

CAPITOLO 2

METODI

2.1 Caratterizzazione delle cellule surrenali di ratto

2.1.1 Saggio in vivo con BrdU

La bromodeossipurina (BrdU) è un nucleotide marcato che dopo somministrazione viene incorporato nel DNA durante la sua sintesi. Nel tempo però, non tutte le cellule mantengono una stessa concentrazione di marcatore: a tempi di osservazione lunghi solo cellule con un ciclo cellulare lento conservano una concentrazione sufficiente alla loro identificazione.

Somministrazione di BrdU a ratti neonati

A 24 ratti *Sprague-Dowley* di 3 giorni è stata iniettata per via sottocutanea BrdU (Sigma) (50 µg/g) per due volte al giorno per 3,5 giorni. Gli animali sono stati poi sacrificati ad intervalli di 2 o 4 mesi, e i surreni rimossi. Gli organi rimossi sono stati utilizzati per ottenere sezioni al criostato e al microtomo utili per l'analisi immunohistochimica e di immunofluorescenza.

Analisi immunohistochimica dei surreni di ratto

Inclusione in paraffina

I surreni sono stati fissati per 24 ore con una soluzione al 2% di paraformaldeide (Sigma Aldrich) in soluzione salina isotonica a 4°C. Dopo essere stati lavati in PBS sono stati disidratati in alcol etilico (Carlo Erba, Milano, Italia) con una scala a concentrazioni crescenti e in continua agitazione: 1 ora in alcool 70%, 1 notte in alcool 70%, 1 ora e 30 minuti in alcool 90%, 2 ore in alcool 100% con cambio di solvente ogni 30 minuti, 1 ora in xilolo (Carlo Erba) con cambio solvente dopo 30 minuti, 1 ora in xilolo. I surreni sono stati poi lasciati per una notte in stufa a 56°C in una soluzione xilolo/paraffina 1:1. Sono seguiti, infine, due passaggi di 1 ora ciascuno in paraffina, in stufa a 56°C e l'inclusione in vaschette d'acciaio. I campioni inclusi in paraffina sono stati conservati a -20°C e tagliati al microtomo in fettine di 5 µm. Le sezioni sono state adagiate su vetrini e lasciati asciugare a temperatura ambiente.

Rimozione della paraffina e reidratazione delle sezioni

Per procedere con le colorazioni, le sezioni sono state sparaffinate tramite due passaggi in xilolo, ciascuno di 5 minuti, e idratate tramite passaggi di 3 minuti ciascuno in una scala discendente di alcool: alcool 100%, alcool 95%, alcool 80%, per finire con un passaggio di 30 secondi in acqua di fonte.

Analisi immunohistochimica per individuare le cellule BrdU positive

L'ubicazione delle cellule BrdU positive è stata determinata su sezioni di surrene inclusi in paraffina. Le sezioni (5 µm) sono state per prima cosa sparaffinate e idratate secondo il metodo precedentemente descritto, e lasciate in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente. Il blocco delle perossidasi endogene è stato ottenuto con un'incubazione per 15 minuti a 37°C con H₂O₂ al 3% (Sigma). Le sezioni sono state lavate e poi lasciate per 5 minuti in PBS, quindi, è stato effettuato, un pre-trattamento enzimatico aggiungendo una soluzione preriscaldata di tripsina (Sigma) 0,1% in PBS e incubando tutto per 10 minuti a 37°C. Dopo aver lavato in PBS, si è aggiunta una soluzione al 5% di *Normal Goat Serum* (GS, Sigma) in PBS per 15 minuti a 37°C.

È seguita un'incubazione per 2 ore a 37°C con l'anticorpo primario anti-BrdU (Sigma) diluito (1:250) in una soluzione all'1% di albumina sierica bovina (BSA, Sigma), 0,5% *Tween 20* (Sigma), 0,1% Sodio Azide (Sigma) in PBS. Successivamente si sono sciacquate le sezioni in PBS per 3 volte, 5 minuti ciascuna.

L'anticorpo secondario *Biotinylated Goat Anti-Mouse IgGs (ExtrAvidine Peroxidase kit*, Sigma) è stato diluito (1:20) con una soluzione 1% BSA in PBS e lasciato agire per 30 minuti a temperatura ambiente in camera umidificata. Le sezioni sono state lavate e poi lasciate in PBS sotto lenta e continua agitazione per 5 minuti. Si è proceduto all'aggiunta di *ExtrAvidine Peroxidase (ExtrAvidine Peroxidase Kit)* diluita (1:20) con una soluzione 1% BSA in PBS, per 30 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state lavate e poi lasciate in PBS sotto lenta e continua agitazione per 5 minuti.

Si è filtrata sopra le sezioni una soluzione di 3-amino-9-etil-carbazolo (AEC, Sigma) costituita da 3,8 mL di tampone sodio acetato 0,05M pH 5, 20µL di H₂O₂ 3% e 0,2 mL *AEC stock solution*, ottenuta sciogliendo una pastiglia di AEC in 2,5 mL di N-N-dimetilformammide (Sigma): si è lasciato agire per 5-10 minuti monitorando la colorazione. Le sezioni sono state sciacquate in H₂O distillata, quindi si è proceduto all'applicazione del montante acquoso *Dako Ultramount* (Dako) e all'essiccazione dei

vetrini in stufa a 70°C per una decina di minuti. Il giorno successivo è stato possibile completare il montaggio dei vetrini con montante organico *Histochoice MB* (Amresco).

2.2 Localizzazione delle cellule CD90, CD105 e c-kit positive tramite analisi immunoistochimica e di immunofluorescenza

La ricerca di positività per i *marker* di superficie CD90, CD105 e c-kit, è stata condotta su sezioni di surrene di ratti non trattati precedentemente con BrdU tagliate al criostato (7 µm) con analisi immunoistochimica e di immunofluorescenza; gli anticorpi primari anti-CD90, anti-CD105, anti-c-kit (Santa Cruz Biotechnology) sono stati utilizzati in diluizione rispettivamente di 1:50, 1:50 e 1:100.

2.2.1 Immunoistochimica

Le sezioni sono state fissate con acetone (Carlo Erba), pre-raffreddato a -20°C, per 10 minuti a 4°C, poi lavate tre volte con PBS. Le perossidasi endogene sono state bloccate con H₂O₂ allo 0,3% in metanolo (Carlo Erba) per 30 minuti in camera umida. Dopo aver lavato in acqua distillata per 3 minuti, è stata aggiunta una soluzione 10% di *Horse Serum* (HS, Gibco) in PBS, per 20 minuti in camera umida. Le sezioni sono state lavate con PBS e poi trattate in camera umida con *l'Avidin Biotin Blocking Kit* (Vector). È stato aggiunto, quindi, l'anticorpo primario (anti-CD90, anti-CD105 o anti-c-kit, alle diluizioni precedentemente menzionate) dissolto in 1,5% HS in PBS e le sezioni sono state incubate per 60 minuti in camera umida e al buio. Sono seguiti tre lavaggi in PBS di 5 minuti ciascuno e poi l'applicazione dell'anticorpo secondario biotinilato *Biotinylated Pan-specific antibody* (PAN, Vector) diluito in 1,5% HS in PBS secondo le modalità del produttore (2gtt in 2,5 mL di una soluzione 1,5% HS in PBS), per 30 minuti in camera umida. Dopo aver lasciato le sezioni in PBS per 5 minuti, si è proceduto applicando ABC kit (Vector) e il cromogeno 3,3'-diaminobenzidina (*DAB substrate kit for peroxidase*, Vector) secondo le istruzioni dei kit. Le sezioni sono state contrastate con ematossilina (Carlo Erba), disidratate e infine montate con montante organico *Histochoice MB* (Amresco).

2.2.2 Immunofluorescenza

L'analisi di immunofluorescenza è stata fatta su sezioni di surreni di ratto non trattato con BrdU, tagliate al criostato. Prima di procedere con il protocollo le sezioni sono state portate a temperatura ambiente, mantenendole al riparo dalla luce.

Quindi, le sezioni sono state prima fissate con acetone pre-raffreddato a -20°C , per 10 minuti a 4°C , poi lavate tre volte con PBS. Dopo aver rimosso l'eccesso di liquido, si è proceduto con l'incubazione, in camera umida e al buio, con una soluzione 10% di GS in PBS per 20 minuti. Dopo aver nuovamente lavato con PBS e rimosso il liquido, è stato aggiunto l'anticorpo primario (anti-CD90, anti-CD105 o anti-c-kit, alle diluizioni precedentemente menzionate) dissolto in 1,5% GS in PBS e le sezioni sono state incubate per 60 minuti in camera umida e al buio. Dopo aver fatto tre lavaggi con PBS di 5 minuti ciascuno, è stato aggiunto l'anticorpo secondario *Goat anti-rabbit IgG-FITC* (Santa Cruz Biotechnology) diluito (1:80) in 1,5% di GS in PBS, e le sezioni sono state incubate per 45 minuti in camera umida e al buio. Infine si è lavato per tre volte con PBS, tre volte con H_2O distillata e poi si è proceduto con il montaggio con *Vectashield Mounting Medium with Dapi* (Vector), un montante per fluorescenza contenente 4-6 diamidino-2-fenilindolo (DAPI).

2.3 Isolamento e coltura delle cellule della zona capsulare e della parte midollare della ghiandola surrenale

2.3.1 Estrazione

Sono stati sacrificati 28 ratti *Sprague-Dawley* di 4 mesi.

Le ghiandole surrenali, una volta estratte, sono state ripulite dal tessuto adiposo. Successivamente si è proceduto alla loro decapsulazione, separando la **parte capsulare** (comprendente la capsula e la zona glomerulare) dalla **parte interna** (comprendente la restante parte della corticale e la midollare surrenale); entrambe le parti sono state immerse in una soluzione dissociante non enzimatica (PBS) per 10 minuti sotto agitazione in bagno termostato a 25°C . Dopo filtrazione su filtri *cell strainer* (45 μm , Falcon) il filtrato è stato conservato e i tessuti sono stati sottoposti ripetutamente all'azione enzimatica di una soluzione 2 mg/mL di Collagenasi di tipo I (Worthington Biochemical Corporation) e 0,1 mg/mL di Deossiribonucleasi di tipo I (Worthington Biochemical Corporation) in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Euroclone) *High Glucose*. Per favorire il distacco delle cellule anche la digestione

Metodi

enzimatica è stata effettuata sotto agitazione in bagno termostato a 25°C per 15 minuti. La soluzione enzimatica è stata quindi filtrata su filtri *cell strainer* e il filtrato è stato centrifugato a 2200 giri/min, a 4°C per 10 minuti. Il surnatante è stato aggiunto nuovamente ai tessuti, mentre i *pellet* ottenuti sono stati risospesi in terreno proliferativo *DMEM High Glucose* supplementato con il 20% di siero fetale bovino (FBS, Gibco), e 1% di una soluzione di penicillina, streptomina e amphotericina (Sigma-Aldrich) e posti a 4°C.

Si sono effettuate 3 digestioni enzimatiche, riunendo insieme i *pellet* ottenuti, infine per eliminare gli enzimi e i lipidi ancor presenti nel *pellet* finale si sono effettuati tre lavaggi con terreno centrifugando ogni volta come descritto precedentemente.

Le cellule ottenute sono state risospese in terreno proliferativo, seminate in piastre (Falcon), e coltivate a 37°C in 5% CO₂, cambiando terreno a giorni alterni.

Le colture primarie sono state osservate giornalmente al microscopio ottico (Leitz DMIRB) per determinare la comparsa di colonie di cellule fibroblastoidi. Tali colonie sono state isolate mediante incubazione con tripsina 0,25% (Sigma) ed EDTA 0,02% (Sigma) in PBS.

2.3.2 Population Doubling

Le cellule isolate dalla parte capsulare sono state seminate su piastre da 6pz a una densità pari a 1×10^4 cellule/cm², staccate con tripsina/EDTA come precedentemente descritto e contate mediante camera di *Bürker*. La conta è stata eseguita al raggiungimento della confluenza (ogni 72 ore) a partire dalla seconda generazione e i raddoppi di popolazione o *Population Doubling* sono stati calcolati utilizzando la seguente equazione:

$$\text{Population Doubling} = \frac{\log_{10}(N_h) - \log_{10}(N_i)}{\log_{10}(2)}$$

Dove N_i è il numero di cellule seminate ed N_h è il numero di cellule raccolte.

Per ottenere il numero cumulativo dei raddoppi di popolazione o *Population Doubling Level* si sono sommati i valori di *Population Doubling* di una generazione a quelli delle generazioni precedenti. Le conte sono state eseguite in triplo.

2.3.3 Immunoseparazione magnetica

Una volta espanso, dalle colture di cellule fibroblastoidi si sono ricavate delle sottopopolazioni utilizzando vari tipi di *marker* di membrana, quali CD90, CD105. La selezione è stata ottenuta con tecnica di immunoseparazione mediante biglie condizionate con anticorpi specifici contro tali *marker* (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

Condizionamento di biglie magnetiche con anticorpo

Da una soluzione acquosa di 4×10^8 biglie/mL (Dynabeads M-450 Tosylactivated, Dynal Invitrogen) si sono prelevate 1×10^8 biglie, le quali sono state trasferite in una provetta sterile posizionata su un magnete (Dynal MPC-S) e sottoposte a lavaggio con *buffer* 1 (PBS 0,1 M, pH 7,4). Successivamente è stato aggiunto l'anticorpo specifico a una concentrazione di $5 \mu\text{g}/10^7$ biglie e la soluzione è stata incubata a 37°C per 15 minuti, in agitazione. Si sono aggiunti 25 μL di PBS contenente 0,1% di BSA (Sigma) e si è proseguita l'incubazione a 37°C dalle 16 alle 24 ore, in agitazione.

In seguito, dalla provetta posta sul magnete si è tolto il *buffer* 1 e si è aggiunto *buffer* 2 (PBS, pH 7,4 con 0,1% BSA e 2 mM EDTA) per 5 minuti a 4°C . Sono stati effettuati in tutto tre lavaggi con *buffer* 2 per 5 minuti a 4°C e nell'ultimo passaggio lo si è sostituito con *buffer* 3 (Tris (Sigma) 0,2 M, pH 8,5 con 0,1% BSA) e si è incubato a 37°C per 4 ore, in agitazione.

Il *buffer* 3 è stato nuovamente sostituito con *buffer* 2, per un volume finale di 250 μL in modo da ottenere una concentrazione di biglie pari a 1×10^8 biglie/mL.

Immunoseparazione

Le cellule, dopo essere state staccate e contate, sono state sospese in una soluzione di PBS con 0,1% BSA, ad una concentrazione pari a 1×10^6 cellule/mL.

Le biglie magnetiche condizionate con uno degli anticorpi specifici sono state aggiunte alla sospensione cellulare, utilizzando un rapporto 1:5 tra cellule e biglie.

Dopo un'incubazione di 30 minuti a 4°C , con agitazione manuale ogni 5 minuti, la sospensione di cellule e biglie è stata sottoposta all'azione di un campo magnetico per 5 minuti, per separare il surnatante. Sono stati effettuati tre lavaggi con una soluzione di PBS allo 0,1% di BSA, allontanando ogni volta il surnatante dopo esposizione al campo magnetico. I surnatanti, contenenti la frazione negativa, sono stati riuniti e centrifugati a 1500 rpm per 5 minuti e le cellule sono state risospese in terreno di proliferazione. La

frazione positiva, composta dalle cellule legate alle biglie e che pertanto erano rimaste nella provetta posta sul magnete, è stata allontanata dal campo magnetico e risospesa in terreno di proliferazione. Entrambe le frazioni sono state seminate nuovamente.

2.3.4 Differenziazione adipogenica ed osteogenica *in vitro*

Induzione dei differenziamenti

Sulle cellule isolate dalla parte capsulare (I, III e V generazione) e dalla parte interna del surrene (II generazione), e sulle popolazioni CD90+ o CD105+, sono stati condotti degli studi di plasticità *in vitro* per determinare l'eventuale capacità differenziativa in altri tipi cellulari; in particolar modo le cellule sono state differenziate verso la linea adipogenica e osteogenica.

A tale scopo si è proceduto alla semina delle cellule in piastre da 24pz, poiché era stata precedentemente notata una scarsa affinità di queste cellule per il vetro, dal quale tendono a staccarsi con facilità. Una volta raggiunta la semi-confluenza il terreno di coltura è stato sostituito con terreno *StemPro Adipogenesis Differentiation Kit* (Gibco), per il differenziamento adipogenico e *StemPro Osteogenesis Differentiation Kit* (Gibco) per il differenziamento osteogenico.

Come controllo negativo per tutte le differenziazioni si sono utilizzate cellule coltivate con solo terreno proliferativo.

Metodiche per valutare i differenziamenti

Analisi morfologica

Le cellule, durante il processo di differenziazione sono state osservate tutti i giorni al microscopio ottico e le immagini sono state acquisite tramite una videocamera digitale *Nikon*.

Saggio Oil-Red-O per la presenza di trigliceridi

La presenza di granuli lipidici nelle colture cellulari indotte a differenziamento adipogenico è stata determinata con la colorazione *Oil-Red-O*.

Il colorante lipofilo *Oil-Red-O* è ampiamente utilizzato per caratterizzare le cellule adipose differenziate, perché è in grado di legare i lipidi neutri contenuti nelle vescicole grasse delle cellule mature, evidenziandole in rosso.

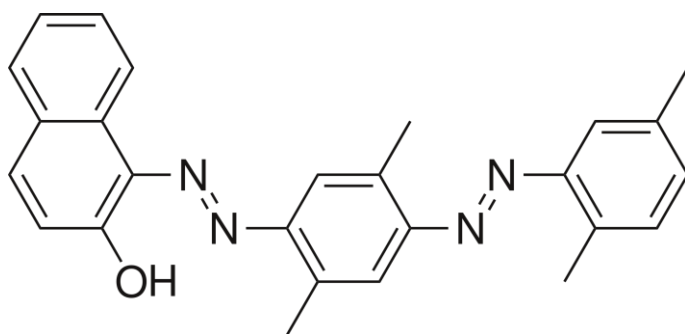


Figura 2.1. *Oil-Red-O*.

Procedura

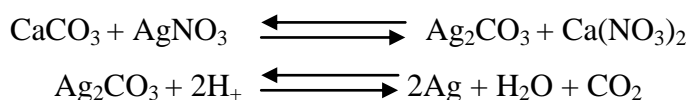
Le cellule, fissate per 1 ora a temperatura ambiente in formalina 10%, sono state lavate con H₂O MilliQ per due volte e incubate per 15 minuti con una soluzione di isopropanolo (Carlo Erba) allo 0,5% di *Oil-Red-O* (Sigma), filtrata e diluita al 60% in H₂O MilliQ. Successivamente le cellule sono state lavate due volte con H₂O distillata e contrastate con ematossilina per un tempo variabile dai 30 secondi a un minuto. Dopo ripetuti lavaggi in H₂O di fonte, i preparati sono stati lasciati in H₂O distillata per l'osservazione al microscopio.

Come controllo si sono utilizzate cellule coltivate in terreno proliferativo.

Saggio von Kossa per la deposizione di sali di calcio

La capacità di produrre matrice mineralizzata da parte delle cellule indotte a differenziamento osteogenico è stata valutata mediante colorazione di *von Kossa* (Jaiswal et al., 1997), che permette di evidenziare la deposizione dei sali di calcio.

Alla base di questo metodo vi è una reazione di sostituzione: il tessuto è trattato con una soluzione di nitrato d'argento, l'argento cationico presente in soluzione si sostituisce al calcio nel sale originario (generalmente fosfato o carbonato) formando un sale d'argento che viene evidenziato riducendo l'argento ione ad argento metallico.



Procedura

Le cellule, fissate per 5 minuti a 4°C in paraformaldeide 2% in soluzione salina isotonica, sono state lavate due volte con H₂O MilliQ, incubate in una soluzione acquosa di nitrato d'argento all'1% (Sigma) ed esposte a luce UV (Philips HPW) per 45

Metodi

minuti. Successivamente le cellule sono state lavate con H₂O MilliQ, trattate per 5 minuti con soluzione acquosa contenente 3% di tiosolfato di sodio (Sigma), lavate nuovamente con H₂O MilliQ e colorate per 30 secondi con soluzione acquosa allo 0,2% di safranina (Sigma) filtrata. Dopo ripetuti lavaggi in H₂O di fonte, i preparati sono stati lasciati in H₂O distillata per l'osservazione al microscopio.

Come controllo si sono utilizzate cellule coltivate in terreno proliferativo.

Metodi

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Localizzazione delle cellule BrdU positive

L'analisi immunohistochimica è stata condotta su surrene di ratto (2 e 4 mesi) trattati alla nascita con il nucleotide marcato BrdU. Tramite l'osservazione delle sezioni di surrene incluso in paraffina, sono state evidenziate due zone BrdU-positive: una sottocapsulare, e una più interna, tra la zona reticolare e la midollare (figura 3.1).

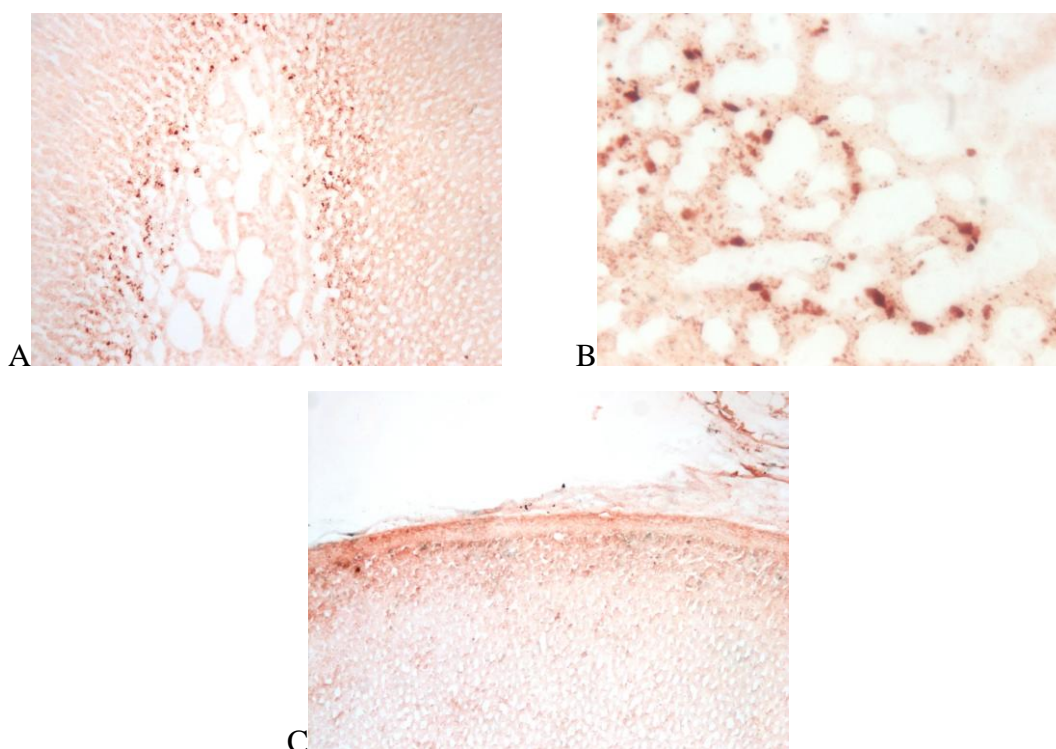


Figura 3.1. Immunohistochimica con anticorpo anti-BrdU su sezioni di surrene di ratto. A) ratto di 2 mesi, ingrandimento x100; B) ratto 2 mesi, ingrandimento x400, zR; C) ratto di 4 mesi, ingrandimento x100.

3.2 Localizzazione delle cellule CD105+, CD90+, c-kit+

I *marker* cellulari superficiali CD90, CD105 e c-kit caratteristici delle cellule staminali sono stati ricercati attraverso analisi immunohistochimiche e di immunofluorescenza condotte su surrene di ratti non trattati con BrdU. Entrambe le analisi hanno evidenziato zone di positività capsulari e sottocapsulari per CD105 e CD90 (figura 3.2). Le sezioni sono risultate, invece, tutte c-kit negative.

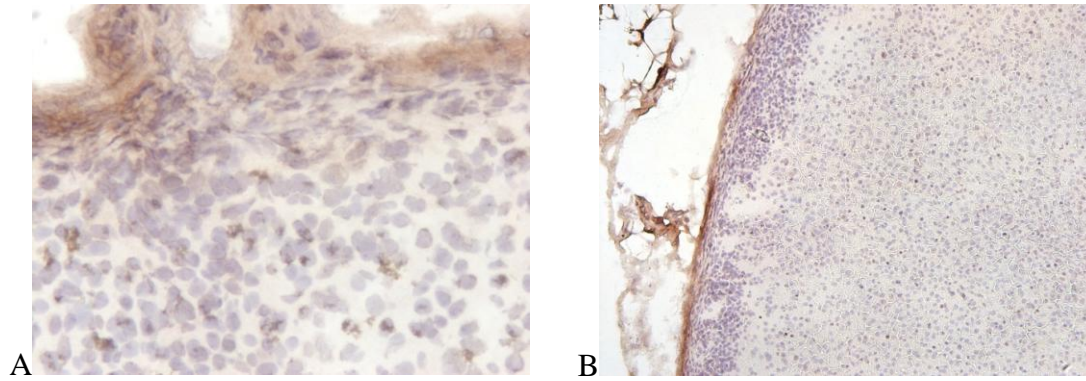


Figura 3.2. Immunoistochimica con anticorpi anti-CD105 e anti-CD90 su sezioni di surrene di ratto. A) ratto di 2 mesi, ingrandimento x400; B) ratto 2 mesi, ingrandimento x100, CD90.

3.3 Colture primarie di cellule surrenali

Tramite decapsulazione delle surrenali, di 28 ratti *Sprague-Dawley* di 4 mesi, sono state ottenute due colture cellulari chiamate: cellule capsulari e della parte interna.

In un primo momento, sono state valutate le migliori condizioni di crescita ed espansione delle cellule estratte, in funzione delle caratteristiche dei componenti del terreno utilizzato. In particolare (dati non riportati) è stata analizzata la risposta verso terreni a basso o alto contenuto di glucosio: si è riscontrato che un terreno proliferativo ideale per queste cellule deve avere alto contenuto di glucosio e anche di siero, infatti, in terreni poveri di queste due componenti, con il progredire delle generazioni, le cellule tendono a staccarsi dalla superficie di coltura.

Nei primi stadi, le colture cellulari sia delle capsule, che della parte interna si sono dimostrate molto eterogenee per la loro morfologia (cellule poligonali, allungate, etc), ma nelle generazioni successive, si sono potute isolare alcune cellule di tipo fibroblastoide (figura 3.3).

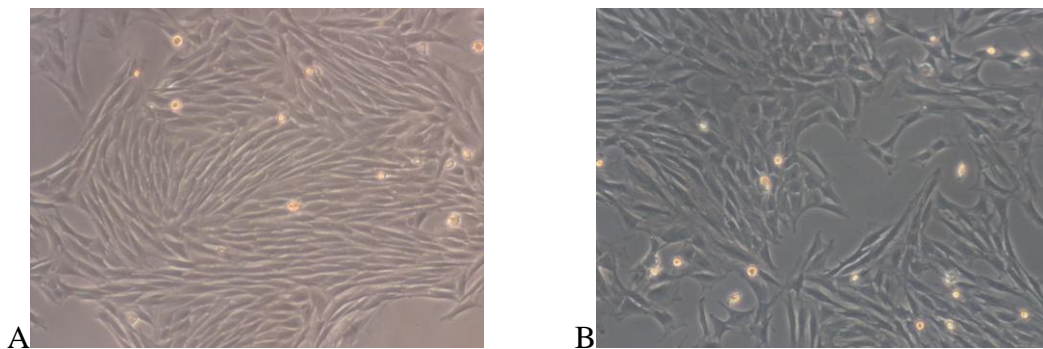


Figura 3.3. Microscopia ottica a contrasto di fase di colture cellulari primarie estratte da surrene di ratto di 4 mesi. A) cellule estratte dalle capsule; B) cellule estratte dalla parte interna. Ingrandimento x100.

Le cellule capsulari sono state mantenute in coltura fino alla diciannovesima generazione e tra la seconda e la diciannovesima generazione sono stati ottenuti 20 raddoppi cumulativi di popolazione senza riscontrare variazioni di morfologia cellulare (figura 3.4).

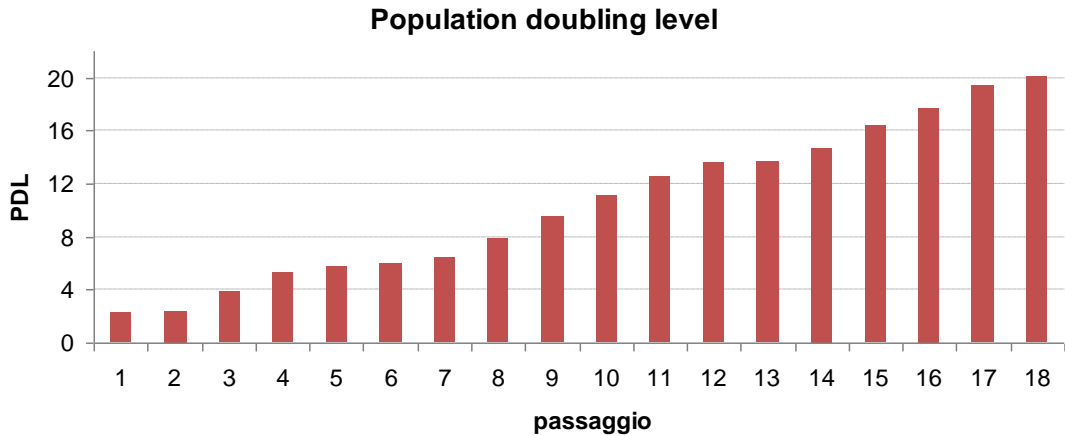


Figura 3.4. Population Doubling Level (PDL) di cellule fibroblastoidi capsulari da surrene di ratto.

3.4 Colture di cellule surrenali CD90+ o CD105+

Dalle colture primarie di cellule surrenali, sia capsulari che della parte interna sono state isolate sottopopolazioni di cellule esprimenti determinati antigeni di superficie, mediante immunoseparazione magnetica con biglie (Dynabeads M-450 Tosylactivated, DYNAL Invitrogen) condizionate ora con anticorpo anti-CD105, ora con anticorpo anti-CD90. Le cellule immunoseparate presentavano morfologia fibroblastoide.

Le cellule della parte interna CD90+ o CD105+ hanno proliferato solo fino alla seconda generazione, mentre le cellule capsulari CD90+ o CD105+ hanno proliferato più a lungo, rispettivamente fino alla decima e quinta generazione.

3.5 Differenziazione adipogenica ed osteogenica su colture primarie, colture di cellule CD105+, colture di cellule CD90+

Sia le cellule capsulari che quelle della parte interna presentavano, a 7 giorni dalla coltivazione con il terreno differenziativo adipogenico qualche cellula rotondeggiante contenente vacuoli, che sono stati confermati essere lipidici mediante colorazione *Oil-*

Risultati e Discussione

Red-O (figura 3.5). A 14 giorni tali cellule erano in numero maggiore e ben evidenziabili, ma rappresentavano solo circa un 10% delle cellule presenti.

Nelle colture CD105+ e CD90+, sia capsulari sia della parte interna, non erano presenti vacuoli lipidici neanche a 14 giorni dall'inizio della differenziazione adipogenica.

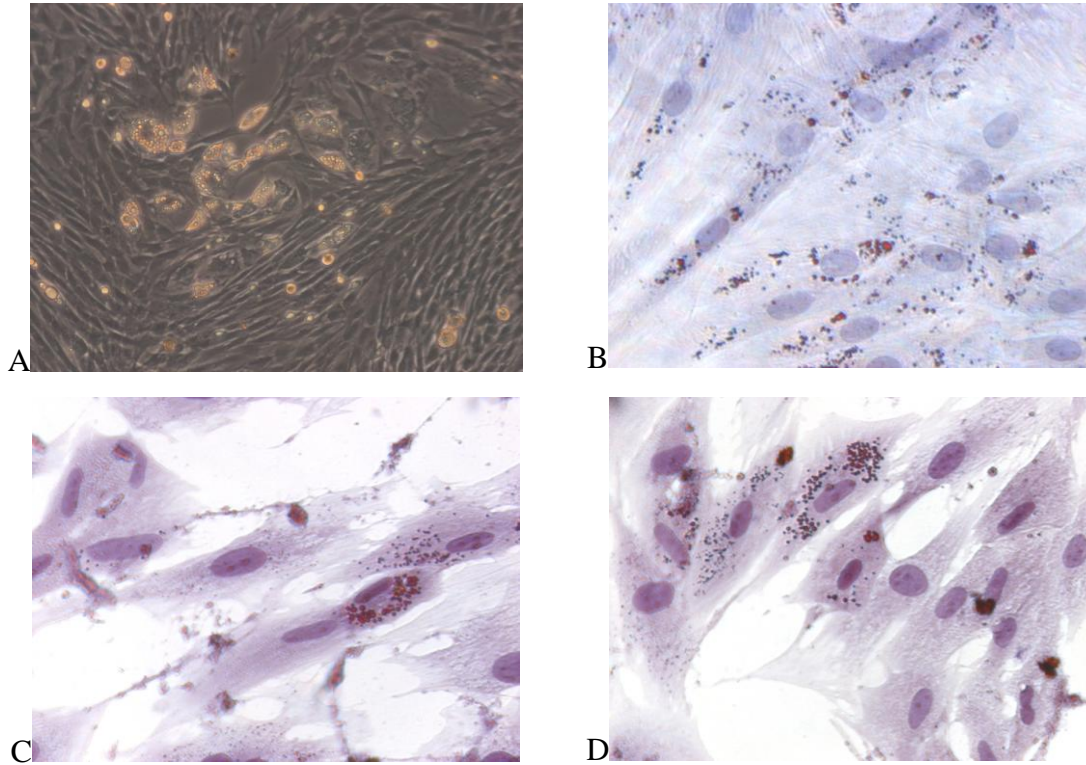


Figura 3.5. Colture di cellule surrenali di ratto dopo coltivazione in terreno adipogenico. A) Microscopia ottica a contrasto di fase di colture cellulari capsulari coltivate per 14 giorni in terreno adipogenico. Ingrandimento x100. B) colorazione *Oil-Red-O* di cellule della parte interna coltivate per 7 giorni in terreno adipogenico. Ingrandimento x400. C) colorazione *Oil-Red-O*, e successivamente con ematossilina, di cellule della parte interna coltivate per 14 giorni in terreno adipogenico. Ingrandimento x400.

La colorazione *von Kossa*, per il differenziamento osteogenico, ha evidenziato che le colture di cellule capsulari e di cellule della parte interna depositavano sali di calcio a partire da 8 giorni dal differenziamento con terreno osteogenico. Anche se a 14 giorni si notava un incremento dei depositi di calcio, le colture non presentavano una differenziazione completa (figura 3.6). Anche in questo caso, le colture immunoseparate, CD105+ e CD90+, non hanno mostrato segni di differenziamento risultando negative alla colorazione.

Risultati e Discussione

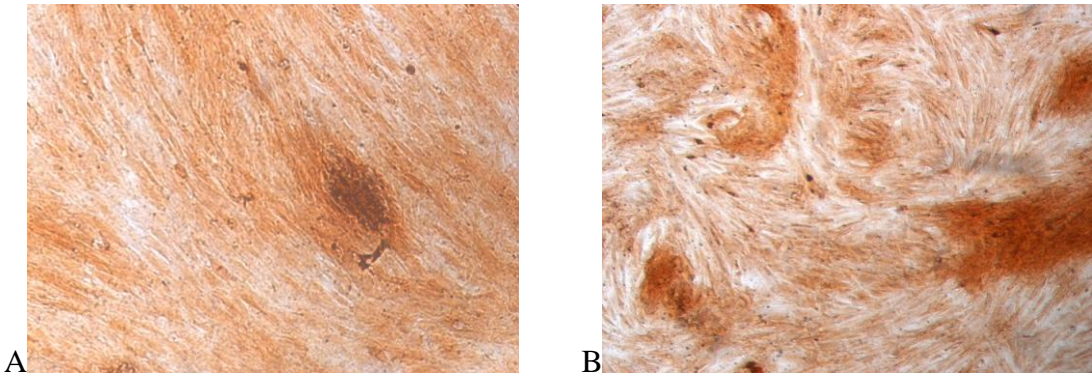


Figura 3.6. Colture di cellule surrenali di ratto dopo coltivazione in terreno osteogenico e colorazione *von Kossa*. A) cellule capsulari coltivate per 8 giorni in terreno osteogenico. Ingrandimento x100. B) cellule della parte interna coltivate per 14 giorni in terreno osteogenico. Ingrandimento x100.

Risultati e Discussione

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

I dati raccolti evidenziano la presenza, nella zona sottocapsulare e in una zona più interna al confine tra la zona reticolare e la midollare, di popolazioni cellulari a lenta divisione.

Tali cellule potrebbero rappresentare una popolazione staminale, infatti, nelle colture ottenute sia dalla zona sottocapsulare che interna, alcune cellule si sono differenziate *in vitro* dopo opportuna stimolazione in senso adipogenico ed osteogenico.

Tuttavia, sebbene non sia stato possibile identificare il fenotipo di tali popolazioni, esse non sembrano essere positive a CD105 e CD90 in quanto le cellule isolate da tali marcatori non presentavano *in vitro* potenzialità differenziativa.

Conclusioni

PARTE B

Matrici biomimetiche nanostrutturate per l'ingegneria del tessuto osseo

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 BIOMATERIALI PER L'INGEGNERIA TESSUTALE

La prima fase della costruzione di un tessuto ingegnerizzato inizia con la progettazione e la costruzione di uno *scaffold*, che funge da supporto per la crescita delle cellule che daranno origine al nuovo tessuto.

Sebbene le caratteristiche finali dipendano dalla specifica applicazione, uno *scaffold* ideale deve possedere alcune caratteristiche basilari tra quelle di seguito indicate (Salgado et al., 2004):

- Biocompatibilità: il materiale utilizzato deve suscitare una specifica risposta biologica, benefica per l'organismo, senza interferire o interagire in modo dannoso con le attività fisiologiche dell'organismo (non deve provocare infiammazioni o degradarsi in componenti tossici).
- Bioattività: il materiale deve possedere superficie e/o cavità interne con proprietà chimiche e topografiche 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 e quindi per la formazione dei tessuti.
- Biodegradabilità: successivamente all'impianto i materiali devono degradarsi con velocità proporzionale alla rigenerazione tessutale e al rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) in sostanze non tossiche e senza interferire con i tessuti circostanti.
- Struttura tridimensionale: la rigenerazione di tessuti richiede un supporto che emuli la struttura tridimensionale della matrice extracellulare per permettere l'organizzazione delle cellule in strutture complesse. Una struttura porosa con porosità elevata e interconnessa è ideale: a) per assicurare un sufficiente apporto nutritivo verso le cellule e consentire di rimuovere i prodotti del metabolismo

cellulare, b) per permettere la crescita e la riorganizzazione cellulare *in vitro*, c) per permettere la vascolarizzazione.

- Proprietà meccaniche: lo *scaffold* deve possedere proprietà meccaniche paragonabili a quelle del tessuto da sostituire in condizioni fisiologiche.
- Processabilità: il materiale deve essere facilmente lavorabile e sterilizzabile.

Gli *scaffold* non sono dunque supporti meccanici passivi, ma partecipano attivamente alla ricostruzione dei tessuti: essi provvedono alla stabilità meccanica della struttura, necessaria per l'organizzazione tridimensionale delle cellule, e, mentre accompagnano la loro crescita fino alla formazione del tessuto, il materiale che li compone viene assorbito dalle cellule ospiti con una velocità di degradazione uguale a quella di biosintesi cellulare.

1.1.1 *Scaffold* per la rigenerazione ossea

In particolare nella realizzazione degli *scaffold* per la rigenerazione del tessuto osseo devono essere ben equilibrate le proprietà meccaniche, la porosità e la degradabilità. Infatti, queste matrici dovrebbero essere: a) abbastanza resistenti per poter sostenere il carico di lavoro dell'osso; b) biodegradabili, ma con cinetica lenta, per favorire il lento processo riparativo dell'osso e continuare nel ruolo di "sostegno"; c) molto porose (70-80%) con un diametro di pori tra i 200 e i 900 μm (Salgado et al., 2004) per mimare il tessuto osseo e permettere la penetrazione delle cellule.

Oltre a rispondere a tutti i precedenti requisiti, dovrebbero inoltre promuovere i seguenti processi (Salgado et al., 2004):

- Osteoconduzione: lo *scaffold* dovrebbe fornire un ambiente appropriato alla migrazione, adesione e proliferazione delle cellule ossee (Davies, 1998).
- Osteoinduzione: intesa come la capacità dello *scaffold* di favorire il reclutamento *in vivo* di cellule staminali e osteoprogenitrici, e la loro differenziazione osteogenetica, attraverso opportuni stimoli.
- Osteogenesi: processo di formazione e sviluppo di tessuto osseo da parte degli osteoblasti.

L'intervento che è in grado di garantire la promozione di tutte queste proprietà è il trapianto osseo. Esso non è di facile realizzazione sia per la possibilità di autoprilevo,

Introduzione

sia per la scarsa reperibilità di donatori. Infatti, purtroppo, ancora troppo spesso insorgono alcune complicanze importanti, come l'infiammazione profonda, la parestesia, gli ematomi, il dolore e la prolungata ospedalizzazione (30% casi di autotrapianto); oltre a questi si possono aggiungere il rigetto e la trasmissione di malattie in caso di allotrapianti (Porter et al., 2009).

Per superare tali problemi, sono stati sviluppati diversi tipi di impianti con materiali sia naturali che sintetici. Tra i materiali naturali più utilizzati troviamo alcuni costituenti dell'ECM (es. collagene, acido ialuronico etc), ma anche tessuti animali opportunamente processati e decellularizzati; invece tra i prodotti sintetici, molto utilizzati sono i polimeri degradabili (il poli(ϵ -caprolattone), PCL; l'acido polilattico PLA; l'acido poliglicolico, PGA) (Oha et al., 2007). Certamente l'utilizzo di materiali naturali permette di ottenere degli *scaffold* in grado di interagire meglio con i tessuti, ma al contempo caratterizzati da proprietà meccaniche scadenti, ampia variabilità nelle proprietà fisiche (es. degradazione meno controllabile) e possibile insorgenza di infiammazione. Al contrario l'utilizzo di materiali sintetici di norma garantisce un miglior controllo delle proprietà meccaniche e una scarsa biocompatibilità.

Poiché essenzialmente gli impianti tradizionali hanno solamente funzioni osteoconduttive, l'interesse è sempre più spesso incentrato nella realizzazione di *scaffold* biomimetici.

In particolare, gli *scaffold* ingegnerizzati di ultima generazione tendono a ricreare il più possibile l'ambiente dell'ECM, mimandone funzioni e struttura (Ayres et al., 2010).

La matrice extracellulare è costituita da una rete complessa di macromolecole secrete localmente dalle cellule. Sebbene esistano delle variazioni abbastanza ampie nella composizione dell'ECM, che riflettono le peculiari funzioni svolte dal tessuto, essa è formata principalmente da glicosamminoglicani (GAG) (costituiti da catene polisaccaridiche, formano la "sostanza basale" con consistenza di gel) e proteine fibrose, fra cui collagene, elastina, fibronectina. La struttura nanofibrosa tridimensionale formata dalle proteine fibrose, garantisce innanzitutto supporto, ma le varie componenti giocano anche un ruolo attivo nella regolazione del comportamento delle cellule con cui entrano in contatto, influenzandone sopravvivenza, sviluppo, migrazione, proliferazione, forma e funzione. L'ECM del tessuto osseo si differenzia da quella di altri tessuti in quanto, oltre alla componente organica, contiene una fase mineralizzata. Tale componente inorganica, composta in prevalenza da sali di fosfato e di calcio

sottoforma di idrossiapatite, e in minor misura da carbonato di calcio e altri minerali, rappresenta circa il 70% dell'ECM ossea (Albert et al., V edizione).

1.1.2 Matrici nanofibrose

Per ottenere *scaffold* nanofibrosi, con diametri simili a quelli delle fibre dell'ECM (tra i 50 e i 500 nm), possono essere utilizzati tre metodi: separazione di fase termicamente indotta (*Thermal Induced Phase Separation*, TIPS), *self-assembling* ed *electrospinning*. (Ayres et al., 2010).

Separazione di fase termicamente indotta (TIPS)

La separazione di fase consente di convertire, in seguito all'aggiunta di un non-solvente, una soluzione polimerica omogenea in un sistema bifasico: per induzione di una qualche instabilità termodinamica (temperatura, composizione, solubilità), si separano, quindi, una fase solida arricchita in polimero che costituirà la matrice, e una fase liquida arricchita dal non-solvente che costituirà i pori.

La TIPS è una tecnica particolare di separazione di fase che permette di ottenere matrici polimeriche porose e nanofibrose. Il processo si articola in cinque fasi: a) dissoluzione del polimero in un solvente organico, b) separazione di fase e formazione del gel, c) estrazione del solvente dal gel con acqua, d) congelamento, e) liofilizzazione sotto vuoto (Ma et al., 1999, Smith et al., 2009). Lo step che controlla maggiormente la formazione delle fibre, e la microporosità, è la fase di gelificazione (tempi e temperature), ad esempio temperature basse in tale fase portano ad ottenere *network* di fibre su scala nanometrica (Vasita et al., 2006). Per controllare la macroporosità dello *scaffold* invece, spesso vengono aggiunti nella fase di separazione dei porogeni come zuccheri o sali.

Questa metodica quindi permette di ottenere matrici fibrose con porosità anche del 98% in modo relativamente semplice; tuttavia il *range* limitato di polimeri utilizzabili e i problemi legati a residui di porogeni o di solvente organico presenti nelle matrici finali, limitano l'uso effettivo di questa tecnica per l'ottenimento di buoni *scaffold* (Ayres et al., 2010).

Electrospinning

L'*electrospinning* è una tecnica nota da tempo che permette di produrre sottili filamenti polimerici mediante l'applicazione di forti campi elettrici. Questo metodo si è rivelato negli ultimi anni particolarmente interessante per ottenere matrici fibrose dal diametro micro-nanometrico da utilizzarsi nell'ambito della *tissue engineering* (Pham et al., 2006, Cui et al., 2010).

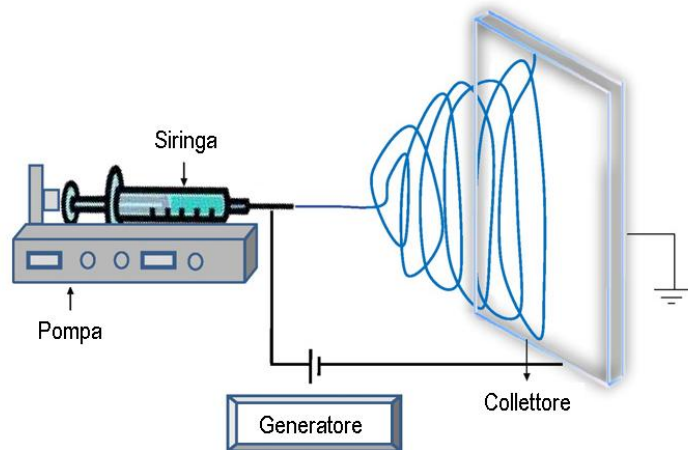


Figura 1.1. Disegno schematico dell'apparato di electrospinning, *set-up* orizzontale.

Il processo di *electrospinning* prevede l'applicazione di un campo elettrico ad un fluido polimerico (in soluzione o fuso) estruso dall'ago di una siringa. La tensione impartita (10-40 kV) genera una forza elettrostatica che prevale ampiamente sulla tensione superficiale e gli sforzi viscosi della massa polimerica: il fluido si carica positivamente e per repulsione assume forma conica (cono di *Taylor*).

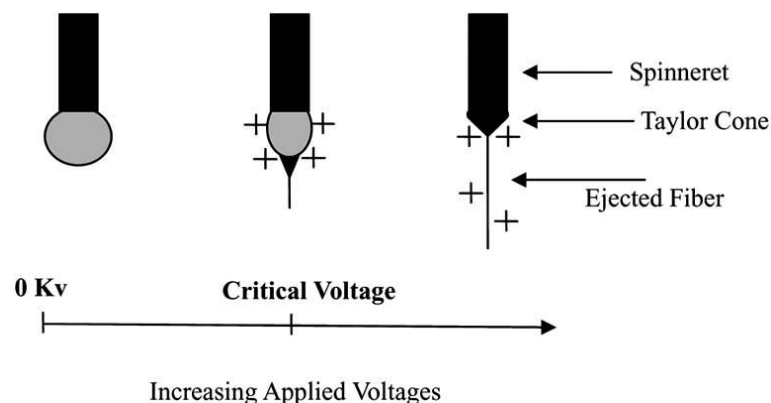


Figura 1.2. Formazione del cono di *Taylor* e del getto polimerico carico positivamente.

Al raggiungimento di un valore critico di tensione si forma un vero e proprio getto che si proietta in direzione dell'elettrodo opposto dove è posizionato un collettore metallico.

Il getto, attraversando il campo elettrico, viene accelerato e assottigliato, grazie anche all'evaporazione del solvente: il filamento stirato che ne deriva si deposita sul collettore (Sell et al., 2010, Wang et al., 2009).

Tra i vantaggi di questa tecnica ricordiamo l'economicità, la semplicità, e la versatilità. Innanzitutto è possibile elettrofilare una vasta gamma di polimeri (sintetici, naturali, miscele di polimeri o copolimeri) (Pham et al., 2006, Ashammakhi et al., 2008), e ottenere fibre utilizzabili in moltissimi campi: dalla realizzazione di filtri antibatterici industriali, alla preparazione di composti di supporto per macchine nanoelettroniche (Cui et al., 2010), fino all'utilizzo in campo biomedico, come *drug delivery* di farmaci (Chew et al., 2006, Yoo et al., 2009) o *scaffold* per *tissue engineering* (Lim et al., 2009).

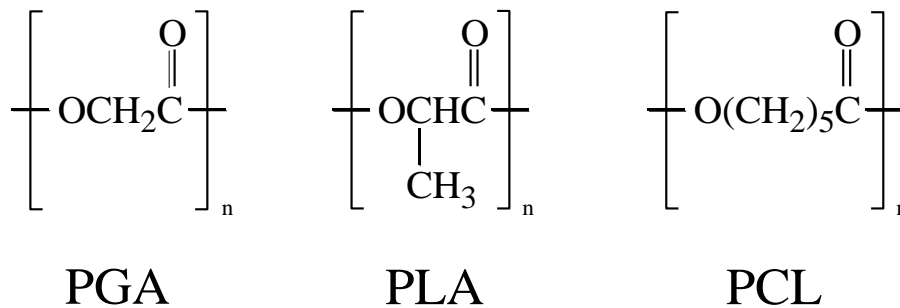


Figura 1.3. Poliesteri biodegradabili comuni: acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), poli(ϵ -caprolattone) (PCL).

Per quanto riguarda le applicazioni di ingegneria tessutale, la tecnica dell'*electrospinning* risulta mimare la natura fibrosa della matrice ed è stata applicata inizialmente a soluzioni di polimeri biodegradabili quali PLA, PGA, PCL e loro copolimeri. Ulteriori benefiche caratteristiche possono essere attribuite alle matrici elettrofilate di polimeri sintetici biodegradabili per arricchimento della soluzione da elettrofilare con polimeri naturali, proteine, peptidi, farmaci o geni che aggiungano un effetto farmacologico o che vadano a collocare nel nuovo *scaffold* sequenze-segnale per promuovere la colonizzazione dello *scaffold* stesso da parte delle cellule mediante l'incremento dell'adesione, della proliferazione e del differenziamento. Tra i polimeri naturali vengono utilizzati il collagene, il fibrinogeno, le proteine della seta, l'elastina e l'acido ialuronico (Sell et al., 2010).

Studi recenti indicano, quale ulteriore miglioria, l'arricchimento delle matrici elettrofilate di polimeri sintetici con una fase minerale simile a quella presente nell'osso nativo (Fujihara et al., 2005; Yu et al., 2009).

Da subito il PCL è stato indicato come candidato principale per ottenere una matrice nanofibrosa e degradabile per la rigenerazione dell'osso in quanto Yoshimoto et al. (2003) hanno dimostrato che uno *scaffold* elettrofilato di tale polimero è un buon supporto per le cellule staminali di midollo osseo di ratto che, *in vitro*, producono matrice mineralizzata in 4 settimane. Da quanto riportato in letteratura sembra che lo svantaggio maggiore di tali matrici sia da ascrivere alla loro innata idrofobicità che limita l'adesione iniziale delle cellule a tali *scaffold* (Jang et al., 2009) e quindi l'ottenimento di una popolazione cellulare numerosa. Il mescolamento del PCL con polimeri naturali è una strategia per ovviare a tale limite e incrementare la compatibilità cellulare (Zhang et al., 2005). Per esempio la miscelazione del PCL con gelatina in rapporto 1:1 incrementa la penetrazione delle cellule staminali del midollo osseo nello *scaffold* mentre la miscela di gelatina e PLA, in varie proporzioni, migliora la vitalità di cellule osteoblastiche rispetto al controllo di solo PLA (Kim et al., 2008) e incrementa l'espressione di molti geni caratteristici delle cellule del tessuto osseo. Le strategie per modificare l'idrofobicità iniziale dello *scaffold* in PLC oltre al mescolamento dello stesso con biopolimeri includono il *coating* con polimeri naturali.

Self-assembly

L'auto-assemblaggio (*Self-assembly*) molecolare viene definito come la spontanea organizzazione di molecole in strutture ben definite e stabili, in condizioni di equilibrio termodinamico. Il fenomeno avviene grazie all'instaurarsi di molte interazioni non covalenti come i legami a idrogeno e le forze di *van der Waals*: prese singolarmente queste sono interazioni deboli, ma nell'insieme esse determinano strutture molto stabili. Questo fenomeno è ubiquitario in natura, ed è alla base dei meccanismi che portano alla formazione delle membrane plasmatiche, alla doppia elica del DNA, all'aggregazione di proteine come collagene e fibroina della seta (Zhang, 2001).

Tra le molecole in grado di auto-assemblare, una classe particolarmente interessante, per la capacità di formare strutture 2D e 3D, è rappresentata dai peptidi ionico complementari scoperti da Zhang et al. (1993). Questi peptidi sono stati suddivisi in cinque sottoclassi in funzione della struttura e dell'applicazione finale: *Tipo I*, "Lego molecolare" che forma idrogeli che possono essere utilizzati come *scaffold* nell'ingegneria tissutale, il *Tipo II*, "interruttori molecolari" che operano come un azionatore molecolare; il *Tipo III*, "uncino molecolare" e "velcro molecolare" utilizzati

Introduzione

per l'ingegneria di superfici; il *Tipo IV*, nanotubi peptidici e nanovesicche o “capsula molecolare” per il trasporto di geni e proteine e il *Tipo V*, “cavità molecolare” per la biomineralizzazione.

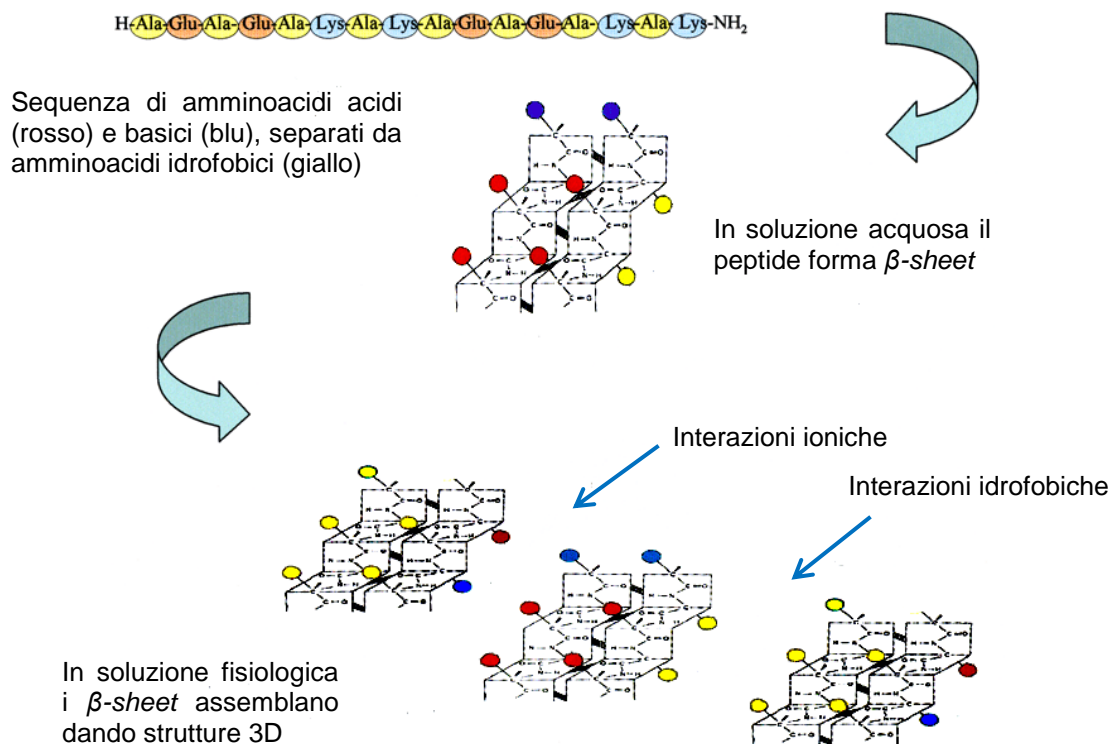


Figura 1.4. Modello proposto per l'auto-assemblaggio di peptidi ionico-complementari. In particolare si riporta la sequenza del peptide EAK con il caratteristico *pattern* dato dall'alternanza di residui carichi e idrofobici (Dettin, 2009).

I peptidi auto-assemblanti ionico-complementari di *Tipo I* (Zhang, 2001) 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.). I peptidi che presentano questo particolare *pattern* amminoacidico in genere assumono, in differenti solventi, una struttura secondaria di tipo β -sheet che, grazie ad interazioni sia di carattere ionico che idrofobico (figura 1.4), può assemblarsi in fibre, membrane e idrogeli all'aumentare della concentrazione o variando altri parametri fisico-chimici (Zhang et al., 1994; Schachner M., 2000). Il processo di auto-assemblaggio dipende fortemente dalla sequenza peptidica (Xiong et al., 1995; Jun et al., 2004), dalla concentrazione (Fung et al., 2003), dal pH (Hong et al., 2003), dalla presenza di sali e dal tempo (Chen, 2005). I peptidi appartenenti alla classe *Tipo I* sono stati ulteriormente suddivisi in diversi moduli in base al disegno secondo il quale si alternano le cariche, il modulo I, - + - + - +

Introduzione

- +; il modulo II, - - + + - - + +; il modulo III - - - + + +; il modulo IV, - - - - + + + +, etc.

Il primo membro di questa classe di peptidi, scoperto da Zhang et al. (1993), è il peptide EAK (AEAEAKAKAEAEAKAK) che si struttura in foglietti β che auto-assemblano in membrane, completamente atossiche, a seguito dell'aggiunta di sali in soluzione (più precisamente ioni monovalenti positivi). Il tipo di sale utilizzato sembra giocare un ruolo importante nell'indurre il processo di auto-assemblaggio: l'ordine di efficacia nell'induzione della formazione di membrane è $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$. Le membrane formate dal peptide EAK possono sopportare temperature elevate fino a 90°C per più di 4 ore in soluzioni all'1% di SDS, sono resistenti alla digestione con diverse proteasi – inclusa tripsina, α -chymotripsina, papaina, proteasi K e pronasi – alla concentrazione di $100 \mu\text{g/mL}$, sono meccanicamente stabili e possono essere trasferite da una soluzione ad un'altra per mezzo di supporti solidi (Zhang et al., 1993; Chen, 2005).

Le membrane, secondo il modello proposto, vengono a formarsi dall'accatastarsi di foglietti di strutture *β -sheet*: ciascun foglietto si lega al precedente, tramite ponti ionici tra i gruppi carichi delle catene laterali (residui di acido glutammico e di lisina), e al successivo, tramite interazioni idrofobiche tra le catene laterali dei residui di alanina.

Peptidi auto-assemblanti hanno trovato applicazione (i) quali substrati per la crescita dei neuriti e la formazione di sinapsi (Holmes et al., 2000; Gelain et al., 2006); (ii) quali promotori di nanofibre iniettabili per microambienti intramiocardici per cellule endoteliali (Davis et al., 2005); (iii) come *scaffold* per lo sviluppo e la riparazione di cartilagine (Firth et al., 2006).

I peptidi auto-assemblanti sono stati studiati estesamente quali potenziali biomateriali per le terapie osso-correlate per le loro proprietà osteoconduttive (Nakahara et al., 2010; Horii et al., 2007). Tali *scaffold*, se comparati a matrici come MatrigelTM, sono in grado di assicurare risultati migliori nella rigenerazione ossea di difetti cranici nei topi (Misawa et al., 2006). Quindi per piccoli difetti le matrici di peptidi auto-assemblanti sono in grado di promuovere la mineralizzazione e l'organizzazione di cellule di nicchia, mentre per difetti estesi e sostituti di ossa con notevole capacità di carico non hanno caratteristiche meccaniche sufficienti (Semino, 2008). Per ovviare a tale svantaggio è stata proposta una nuova strategia: la produzione di piattaforme

bioingegnerizzate che combinino la resistenza meccanica di un supporto con una struttura a gabbia (*scaffold*) con le proprietà rigenerative proprie degli idrogeli dei peptidi auto-assemblanti. In questa direzione Bokhari et al (2005) hanno proposto un ambiente tridimensionale micrometrico di poly-HIPE coniugato ad un idrogel di peptide auto-assemblante (RADA 16-I) in grado di assicurare una struttura nanometrica ottimale per la crescita e la differenziazione degli osteoblasti.

Recentemente, una serie di peptidi auto-assemblanti ionico complementari sono stati progettati per studiare l'abilità di differenti residui amminoacidici di indurre le strutture β -sheet e conseguentemente di formare matrici tridimensionali in presenza di sali (Gambaretto et al., 2008). Le modificazioni proposte non hanno riguardato nessun cambiamento nel *pattern* tipico dei peptidi auto-assemblanti (alternanza di residui polari e apolari e periodicità dei residui carichi), ben rappresentato dalla sequenza EAK progettata da Zhang S. (Zhang et al., 1993). Le modifiche sono state apportate per studiare l'importanza della lunghezza di catena laterale per i residui acidi (Glu→Asp in DAK); l'influenza di differenti residui idrofobici (Ala→Abu in EAbuK e Ala→Tyr in EYK); la perturbazione prodotta da una sequenza additiva (addizione in N-terminale della sequenza RGD in RGD-EAK) nel processo di auto-aggregazione. Per discriminare la capacità dello *scaffold* auto-assemblato dalla capacità della sequenza RGD di promuovere l'adesione cellulare è stato sintetizzato un peptide, denominato RGD-EAK sc, condensando il tripeptide RGD alla sequenza *scrambled* di EAK.

La modifica del residuo idrofobico Ala→Abu mantiene la capacità del peptide di formare strutture β -sheet mentre la modifica Ala→Tyr permette la formazione in soluzione di strutture β -hairpin. Entrambi i peptidi auto-assemblano in matrici alla presenza di ioni monovalenti positivi.

La modifica del residuo acido in DAK fornisce un peptide con marcata propensione all' α -elica in soluzione mentre la modifica in RGD-EAK non preclude la possibilità di ottenere conformeri β -sheet. Come atteso, il peptide RGD-EAK sc non è in grado di formare strutture secondarie β -sheet in soluzione e conseguentemente non auto-aggrega in soluzione salina. Per maggiore chiarezza si riportano in tabella 1.1 le sequenze dei peptidi sintetici utilizzati nel presente lavoro di tesi.

Tabella 1.1. Sequenze dei peptidi utilizzati.

Sigla	Sequenza
EAK	A-E-A-E-A-K-A-K-A-E-A-E-A-K-A-K
DAK	A-D-A-D-A-K-A-K-A-D-A-D-A-K-A-K
EAbuK	Abu-E-Abu-E-Abu-K-Abu-K-Abu-E-Abu-E-Abu-K-Abu-K
EYK	Y-E-Y-E-Y-K-Y-K-Y-E-Y-E-Y-K-Y-K
RGD-EAK	R-G-D-A-E-A-E-A-K-A-K-A-E-A-E-A-K-A-K
RGD-EAK sc	R-G-D-A-A-K-A-E-A-E-A-A-E-K-A-K-A-E-K

I peptidi sono tutti ammidi terminale.

Abu = acido 2-amminobutirrico -NH-CH(CH₂-CH₃)-CO-

1.1.3 Scaffold biomimetici e sequenze adesive

Un materiale si definisce biomimetico (Folch et al., 2000; Sarikaya et al., 2003) quando promuove specifiche risposte cellulari in grado di dirigere la formazione di nuovo tessuto (Sakiyama-Elbert et al., 2001). Il riconoscimento biomolecolare dei materiali da parte delle cellule può essere ottenuto attraverso due strategie: un primo approccio consiste nell'incorporazione di molecole solubili, come fattori di crescita o DNA plasmidico, in *carriers* (Murphy et al., 1999; Whitaker et al., 2001; Richardson et al., 2001; Babensee et al., 1999); 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. Le molecole in grado di interagire in modo specifico con i recettori della superficie cellulare includono proteine dell'ECM intere o piccole sequenze derivate da tali proteine in grado di promuovere specifiche funzioni cellulari.

Il legame del recettore cellulare con il ligando (proteina o peptide bioattivo) presente sul materiale biomimetico determina la forza dell'adesione della cellula alla superficie (Rezania et al., 1997), la velocità di migrazione della cellula sopra o attraverso il materiale (Kouvroukoglou et al., 2000; Dee et al., 1999) e l'estensione della formazione e l'organizzazione del citoscheletro (Rezania et al., 1999). Poiché le risposte biologiche sono dipendenti da molteplici variabili come l'affinità tra recettore e ligando, la densità e la distribuzione spaziale del ligando (Massia et al., 1991; Houseman et al., 2001),

questi debbono essere considerati parametri fondamentali per la progettazione del materiale biomimetico.

La molecola più comune utilizzata per ottenere superfici biomimetiche è la sequenza RGD (arginina-glicina-acido aspartico): si tratta di un peptide-segnale per l'adesione cellulare individuato nel 1984 presente nella fibronectina, nella laminina nella vitronectina, nel collagene di tipo I, nel fibrinogeno, nel fattore *Von Willebrand*, nell'osteopontina (OPN), nella tenascina, nella sialoproteina dell'osso (BSP), in proteine di membrana, in proteine batteriche e virali, in neurotossine e disintegrine. L'elevato numero di studi svolti utilizzando tale sequenza deriva dalla sua vasta distribuzione in ogni parte dell'organismo, dalla sua abilità nell'attivare più di un tipo di recettore cellulare per l'adesione (integrine) e nell'impatto biologico su cellule ancoraggio-dipendenti sia sull'adesione che sul comportamento e sulla sopravvivenza. E' stato dimostrato che almeno 12 delle 24 integrine finora individuate aderiscono a molecole della matrice extracellulare con un meccanismo RGD-dipendente. La conformazione del *loop* contenente il motivo RGD e le sequenze che lo fiancheggiano nelle diverse proteine sono responsabili per la differente selettività verso le integrine (Hersel et al., 2003). L'attività del tripeptide è legata anche al blocco del terminale carbossilico o alla presenza di amminoacidi che fiancheggiano la sequenza in quanto l'attività varia come segue: GRGDSP>RGDS>RGD ammido-terminale>RGD carbossi-terminale (inattivo). RGD, quale fattore solubile, inibisce l'adesione cellulare alla fibronectina mentre, come fattore ancorato, promuove l'adesione cellulare alla superficie. Altre sequenze-segnale utilizzate per funzionalizzare varie superfici modello sono: KQAGDV e il motivo PHSRN dalla fibronectina, VAPG dall'elastina, le sequenze YIGSR, CDPGYIGSR, IKVAV, RNIAEIIKDI, YFQRYLI, PDSGR della laminina (Richardson et al., 2001; Babensee et al., 1999) oltre a sequenze basiche quali FHRIKA, PRRARV, WQPPRARI, KRSR, poliarginine, polilisine, KKQRFHRNRKG e FRHRNRKGY dalla vitronectina e RKKRRQRRR dalla proteina Tat di HIV (Hersel et al., 2003).

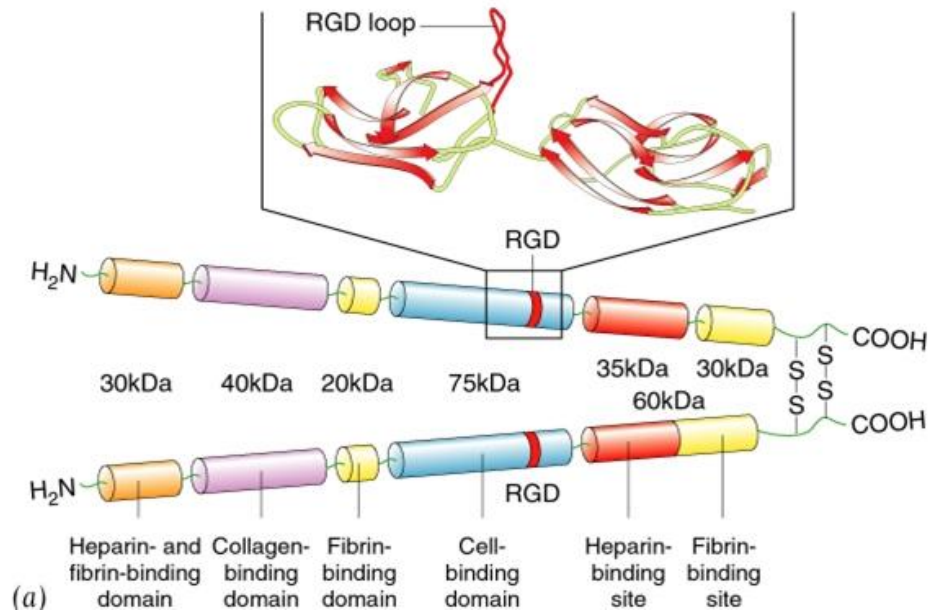


Figura 1.5. Struttura della fibronectina con ingrandimento del *loop* contenente il motivo RGD.

1.2 SCOPO DELLA TESI

Scopo della ricerca sarà verificare quali vantaggi possano derivare dall'utilizzo di un materiale ibrido, composto di un polimero biorassorbibile e di una componente biomimetica di peptidi auto-assemblanti nella realizzazione, tramite elettrofilatura, di uno *scaffold* per l'ingegneria del tessuto osseo. Le fasi principali della ricerca riguarderanno:

- ✓ sintesi, purificazione e caratterizzazione di una serie di peptidi auto-assemblanti;
- ✓ ottimizzazione dei parametri di processo dell'elettrofilatura;
- ✓ caratterizzazione chimico-fisica degli *scaffold*;
- ✓ saggi *in vitro* per valutare l'adesione, la produzione di Ca^{2+} e l'espressione di geni codificanti per ALP, OPN e BSP da parte di osteoblasti umani seminati sui diversi tipi di *scaffold*.

Introduzione

CAPITOLO 2

METODI

2.1 PREPARAZIONE DEI PEPTIDI

2.1.1 Sintesi peptidica in fase solida

I peptidi utilizzati per la produzione degli *scaffold*, sono stati sintetizzati presso il laboratorio della Dott.ssa Monica Dettin nel Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria dell'Università degli Studi di Padova. Essi sono stati ottenuti attraverso la tecnica della sintesi in fase solida (SPPS = *Solid Phase Peptide Synthesis*), utilizzando la chimica Fmoc, tramite procedura automatizzata con l'ausilio del sintetizzatore Syro I (MultiSynTech GmbH, Germania) o del sintetizzatore Applied Biosystem modello 431A (Perkin-Elmer, Analytical Instruments, Norwalk, CT, USA). La tecnica SPPS, messa a punto nel 1963 da Bruce Merrifield (1986), è attualmente il metodo più vantaggioso per la sintesi peptidica su piccola e media scala. Tale tecnica permette di ottenere dei peptidi in genere in 5 passaggi:

1. assemblaggio della catena;
2. sblocco dalla resina e rimozione dei gruppi protettori in catena laterale;
3. purificazione;
4. eventuali modifiche chimiche post-sintesi;
5. caratterizzazione.

Il peptide è assemblato a partire dall'estremità C-terminale a quella N-terminale con il gruppo α -carbossilico dell'ultimo amminoacido della sequenza ancorato ad un supporto solido (resina) tramite un *linker*: si ha così la crescita della catena polimerica in fase eterogenea. L'assemblaggio della catena peptidica consiste in una serie di condensazioni o *coupling* per ottenere il legame peptidico, alternate a reazioni di deprotezione. L'ancoraggio ad una matrice insolubile costituisce il vantaggio principale di questa tecnica poiché permette di condurre l'intera sintesi nello stesso contenitore (reattore); il peptide in crescita, infatti, viene facilmente isolato dopo ogni ciclo attraverso filtrazione. Questo comporta un minor spreco di materiale dovuto ad una

Metodi: Preparazione dei peptidi

minore manipolazione ed una considerevole riduzione dei tempi di lavoro in quanto la procedura può essere automatizzata (Fields et al., 1992).

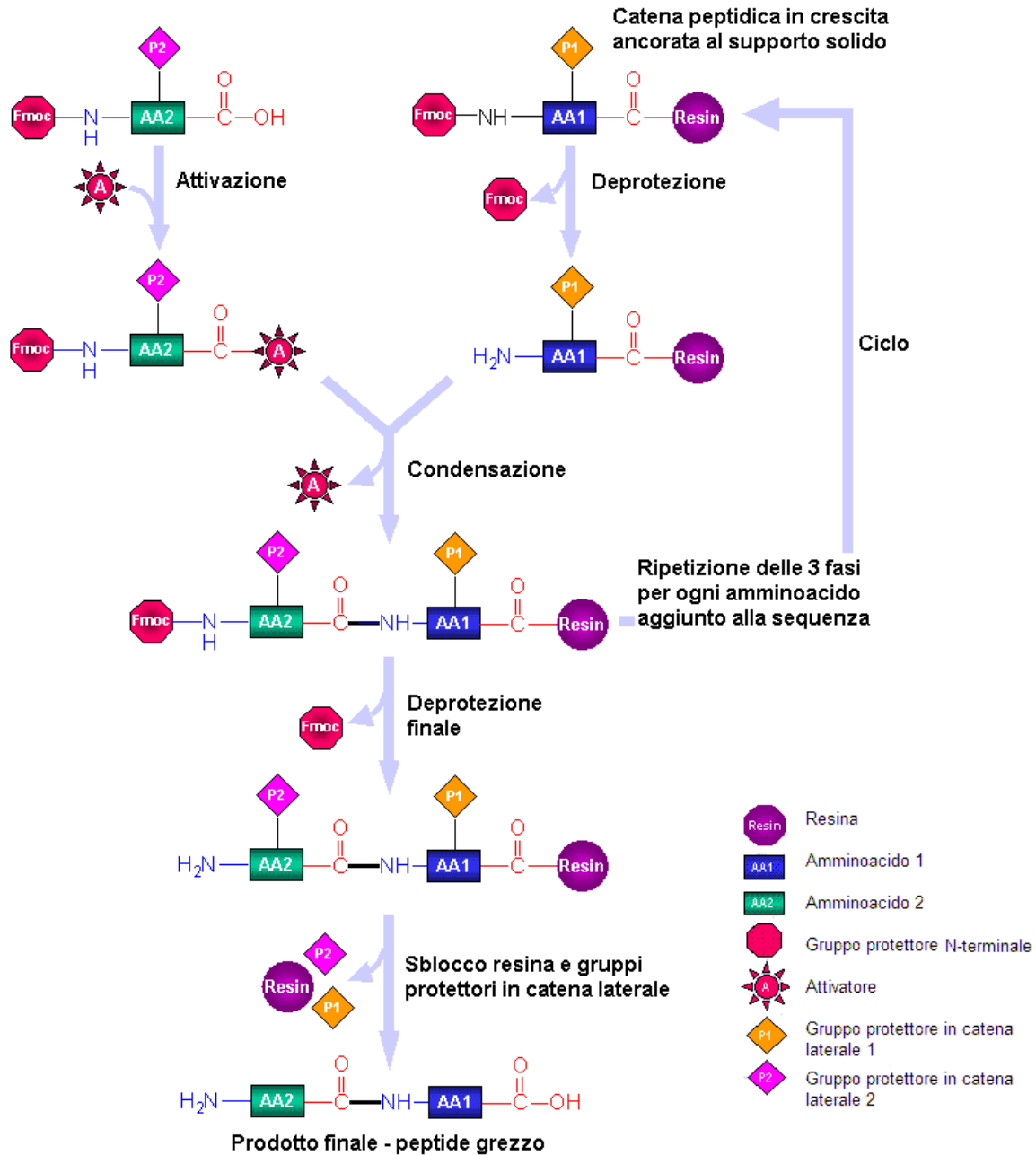


Figura 2.1. Schema generale della Sintesi Peptidica in Fase Solida (SPPS).

Resine per SPPS

Il supporto solido è costituito solitamente da resine polimeriche che possiedono la proprietà di rigonfiarsi notevolmente in solventi polari non protici come N-N-dimetilformammide (DMF), N-metil-2-pirrolidone (NMP) e diclorometano (DCM) fino

a raggiungere un volume pari a 10 volte quello iniziale (*User Manual*, 1990). Il loro rigonfiamento permette una rapida diffusione dei reagenti all'interno dei granuli. In commercio sono disponibili moltissimi tipi di resine derivatizzate con un'ampia varietà di *linker* o già funzionalizzate con un amminoacido protetto al gruppo α -amminico e in catena laterale, se richiesto.

La scelta della resina più opportuna viene fatta in base al tipo di chimica scelto e al tipo di peptide che si vuole ottenere (acido, estere o ammido terminale, protetto o meno in catena laterale). Nel presente lavoro di dottorato è stata utilizzata, per tutti i peptidi, la resina *Rink Amide MBHA* (Novabiochem, Langelfingen, Svizzera). Tale supporto, costituito da polistirene copolimerizzato con 1% di divinilbenzene, è caratterizzato da un *linker* che permette di ottenere peptidi ammido terminali.

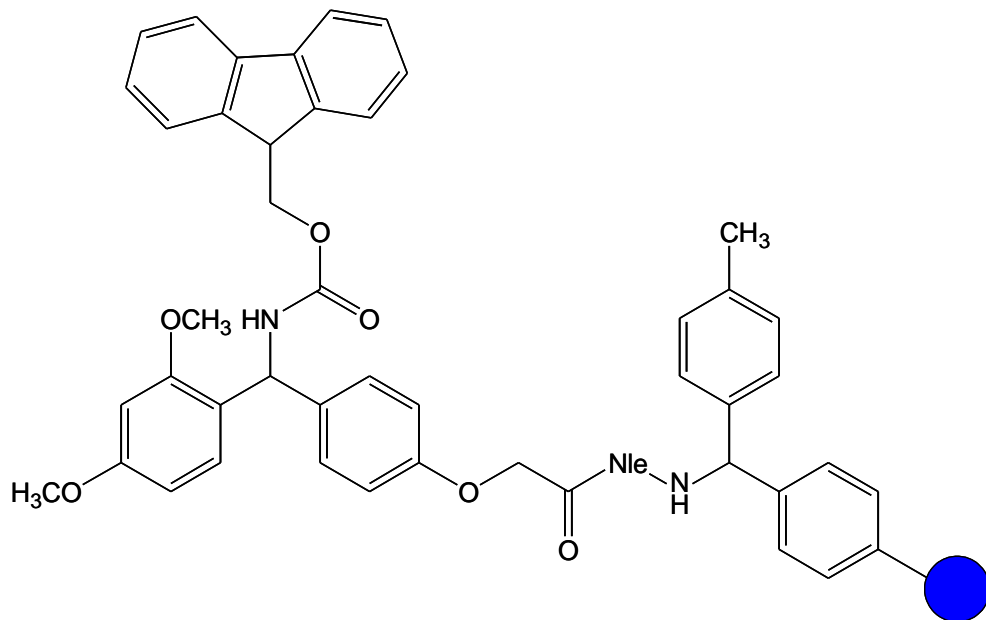


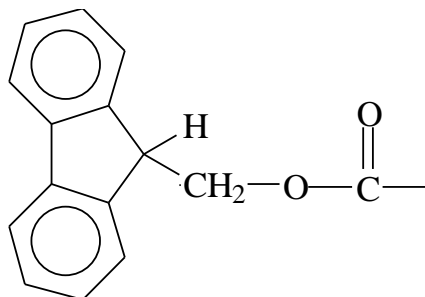
Figura 2.2. Struttura della resina *Rink Amide MBHA*, 4-(2',4'-dimetossifenil-Fmoc-amminometil)-fenossiacetamide-norleucil-4-metilbenzidrilammina, che permette di ottenere peptidi ammido-terminali.

Amminoacidi

Per permettere la formazione del legame peptidico desiderato, nella SPPS devono essere utilizzati amminoacidi caratterizzati da opportune protezioni sia del gruppo α -amminico che di eventuali gruppi reattivi presenti in catena laterale.

Nella chimica Fmoc, a protezione del gruppo α -amminico dell'amminoacido, è utilizzato il gruppo base-labile Fmoc (9-fluorenilmetilossicarbonile) (Fields et al., 1990; Carpino et al., 1972), che viene rimosso in genere con piperidina, ed in catena laterale vengono utilizzati gruppi protettori acido-labili, rimossi generalmente con acido

trifluoroacetico (TFA). Tale strategia, denominata protezione ortogonale, consente di operare un clivaggio selettivo del gruppo protettore Fmoc, mantenendo allo stesso tempo stabili i gruppi protettori laterali per evitare reazioni indesiderate.



Fmoc

Figura 2.3. Struttura del gruppo N- α -protettore denominato Fmoc.

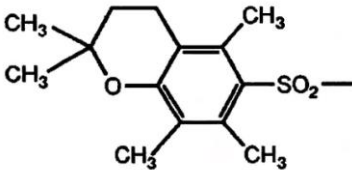
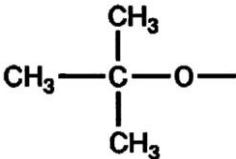
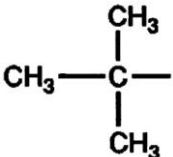
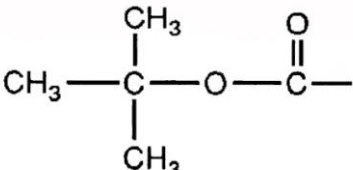
Tutti gli amminoacidi utilizzati per la sintesi dei peptidi auto-assemblanti (Novabiochem) sono Fmoc protetti al terminale amminico, alcuni di essi sono caratterizzati dalla presenza di gruppi protettori in catena laterale: Pmc per Arg, OtBu per Asp e Glu, tBu per Tyr, Boc per Lys. Tali gruppi sono riportati nella tabella 2.1.

Deprotezione del gruppo Fmoc

Il gruppo Fmoc può essere facilmente rimosso in ambiente basico in presenza di ammine; la reazione procede in genere velocemente e i prodotti secondari, essendo solubili nei comuni solventi utilizzati nella sintesi peptidica, possono essere facilmente rimossi per filtrazione (Fields et al., 1990).

La deprotezione del gruppo Fmoc dal terminale α -amminico dell'amminoacido è stata ottenuta, per procedura automatizzata su Syro I, trattando il peptide in crescita su resina con una soluzione al 40% piperidina (Biosolve, Valkenswaard, Olanda) in DMF (Biosolve) per 3 minuti, e poi per ulteriori 12 minuti con una soluzione al 20% piperidina in DMF. La procedura automatizzata adottata dal sintetizzatore Applied Biosystem 431A, ha previsto, invece, un trattamento a base di 20% piperidina in NMP (Biosolve) per 12 minuti.

Tabella 2.1. Struttura dei gruppi protettori delle catene laterali degli amminoacidi.

Amminoacido protetto	Gruppo protettore chimica Fmoc
Arg	 <p>2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil (Pmc)</p>
Asp/Glu	 <p>Etere <i>tert</i>-Butilico (OtBu)</p>
Tyr	 <p>Etere <i>tert</i>-butile (tBu)</p>
Lys	 <p><i>tert</i>-butiossicarbonile (Boc)</p>

Condensazione o coupling

Nel processo di condensazione oltre all'accessibilità e alla reattività della funzione amminica libera, risulta fondamentale la reattività del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -protetto; il gruppo carbossilico dell'amminoacido da condensare alla catena peptidica in crescita, deve essere attivato vale a dire reso più elettrofilo.

Il gruppo attivante deve essere scelto con attenzione per raggiungere efficienze di *coupling* molto elevate ed allo stesso tempo evitare potenziali reazioni secondarie (Grant, 2002). Attualmente una delle metodiche maggiormente utilizzate nelle sintesi automatizzate su fase solida è l'attivazione *in situ* che prevede l'uso di un agente attivante, ad esempio un sale di uronio come il 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU), in presenza di N-idrossibenzotriazolo

Metodi: Preparazione dei peptidi

(HOBt) e di una base quale l'ammina terziaria N-N-diisopropiletilammina (DIPEA) (Fields et al., 1991; Ball et al., 1996).

La reazione di condensazione o *coupling* è stata realizzata, con procedura automatizzata su Syro I, utilizzando 5 eq di amminoacido N- α -Fmoc-protetto sciolto in DMF (Biosolve), 5 eq di una soluzione (0,5 M) di HBTU (Chem-Impex International, USA) in DMF, e 10 eq di una soluzione (2,5 M) di DIPEA (Biosolve) in NMP (Biosolve); la reazione ha richiesto circa 45 minuti. Nel sintetizzatore Applied Biosystem 431A, l'attivazione del gruppo carbossilico è stata ottenuta, con procedura automatizzata, dissolvendo 4 eq (1 mmole) di amminoacido in NMP (2,1 mL) e aggiungendo 4 eq (1 mmole) di HBTU/HOBt (Advance Biotech Italia s.r.l., Milano, Italia) in DMF 0,45 M (2,2 mL) e 8 eq di DIPEA (0,32 mL); la reazione ha richiesto circa 25 minuti (*User Bulletin 33*, 1990).

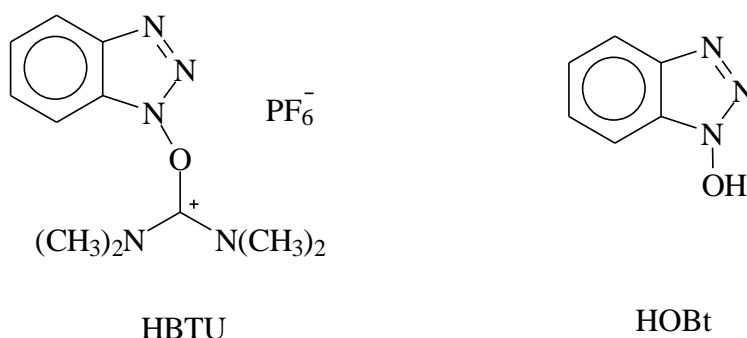


Figura 2.4. Struttura dei reagenti HBTU e HOBt.

2.1.2 Test sulla resa di funzionalizzazione della resina

La funzionalizzazione della resina con l'amminoacido, protetto al terminale α -amminico ed in catena laterale, viene stimata utilizzando la seguente procedura (*User Manual*, 1990): 4÷8 mg di resina funzionalizzata, seccata sotto vuoto per 1 ora, vengono accuratamente pesati e trattati con 0,5 mL di 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 l'N-(9-fluorenilmetil)piperidina che assorbe a 301 nm ($\epsilon=7800$) (figura 2.5).

Metodi: Preparazione dei peptidi

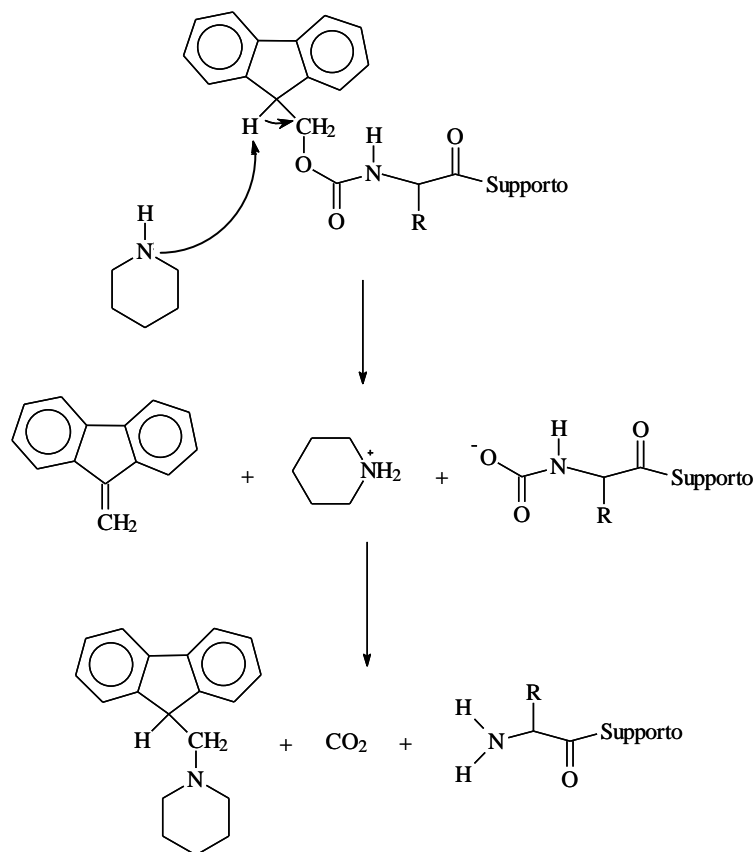


Figura 2.5. Deprotezione del gruppo Fmoc con piperidina.

Dopo aver portato la miscela ad un volume finale (V) di 50 mL con DMF, si misura l'assorbanza della soluzione a 301 nm tramite uno spettrofotometro UV/VIS a doppio raggio (spettrofotometro UV/Vis Lambda 2, Perkin-Elmer Analytical Instruments, Norwalk, CT, USA).

La sostituzione, espressa in mmoli/g viene calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Sostituzione (mmoli/g)} = [A_{301} \times V \text{ (mL)}] / [7800 \times \text{wt (g)}]$$

dove wt indica il peso del campione di resina in grammi dopo che è stato seccato sotto vuoto per un'ora.

2.1.3 Sblocco del peptide dalla resina

Il tipo di resina scelta per la realizzazione delle sequenze peptidiche desiderate, ha permesso di ottenere il distacco del peptide dalla resina con la concomitante liberazione delle catene laterali dai rispettivi gruppi protettori. Infatti, il particolare legame resina-

peptide e i gruppi protettori in catena laterale, compatibili con la chimica Fmoc, sono stabili in condizioni basiche e rimovibili in condizioni acide.

Il processo di deprotezione in ambiente acido può generare specie altamente reattive (ad esempio carbocationi) che possono provocare modificazioni covalenti di alcuni residui amminoacidici; per ridurre le reazioni collaterali indesiderate si utilizzano, quindi dei reagenti nucleofili, noti come *scavengers* (reattivi che hanno proprietà chimiche simili a quelle delle specie da proteggere) (Fields et al., 1992; King et al., 1990)

Poiché la scelta della miscela di sblocco, del tipo di *scavengers* e il tempo richiesto dalla deprotezione, dipendono dalla sequenza amminoacidica, ma soprattutto dalla natura e dal numero dei gruppi protettori utilizzati in catena laterale, verrà di seguito riportata una procedura di sblocco generale, per dettagli specifici si rimanda alla sezione dei risultati.

Procedura generale di sblocco (*Introduction to Cleavage Techniques*, 1990):

1. conclusa la sintesi si libera, con procedura automatizzata, la funzione N-terminale dal gruppo protettore Fmoc trattando il peptide protetto su resina con una soluzione 40% piperidina in DMF per 3 minuti, e poi di nuovo con 20% piperidina in DMF per 12 minuti;
2. il reattore con il peptide protetto su resina senza Fmoc è lavato con DCM (Biosolve) e posto a seccare per circa 2 ore sotto vuoto (fino a peso costante);
3. il peptide protetto su resina senza Fmoc è trasferito in un pallone, e addizionato di una miscela di sblocco così composta: 95% TFA (Biosolve), 2,5% H₂O MilliQ e 2,5% TES (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania) v/v/v (Pearson et al., 1989);
4. la miscela è mantenuta sotto agitazione magnetica, a temperatura ambiente, per 1 ora e 30 minuti, tempo che può essere incrementato in funzione del numero e tipo di gruppi protettori presenti in catena laterale (in particolare, il tempo di reazione aumenta proporzionalmente al numero di Arg(Pmc) presenti nella sequenza);
5. la resina viene eliminata tramite filtrazione su gooch G3 e la soluzione contenente il peptide viene portata a piccolo volume con evaporatore rotante (Laborota 4100-Efficient, Heidolph Instruments s.r.l., Milano, Italia). In seguito all'aggiunta di etere dietilico freddo (Prolabo, Parigi, Francia) (~ 4°C), si ha la

precipitazione del peptide, che viene successivamente filtrato con gooch G4, seccato, poi sciolto con H₂O MilliQ e liofilizzato (Lioph. Lock 4.5, Labconco, Kansas city, MO, USA).

2.1.4 Purificazione e caratterizzazione cromatografica

La purificazione dei peptidi e le analisi cromatografiche analitiche svolte in questo lavoro di dottorato sono state realizzate utilizzando la tecnica cromatografica RP-HPLC (*Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography*). L'HPLC, infatti, è una tecnica non distruttiva molto diffusa per la sua elevata sensibilità e la facilità con cui si adatta a separazioni quantitative accurate, in particolare di specie non volatili termicamente labili (ad es. peptidi) (Stulik et al., 1997). L'HPLC a fase inversa è una cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria ha caratteristiche apolari, e che utilizza come fase mobile miscele a vario titolo composte da soluzioni acquose e solventi organici (in genere acetonitrile).

Per la purificazione e l'analisi dei peptidi si sono utilizzati i seguenti sistemi cromatografici:

- HPLC Waters (Milford, MA, USA) 600E System controller, munito di autocampionatore Waters modello 717 e di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile Waters modello 2487.
- HPLC Waters 600 Controller munito di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile Waters modello 2487.

La soluzione contenente il campione è stata introdotta in testa alla colonna cromatografica tramite aspirazione nel caso di purificazione cromatografica, o per iniezione di piccolissime quantità di analita per la caratterizzazione del prodotto. Per l'eluizione dei prodotti, come fase mobile sono stati utilizzati una soluzione 0,05% di TFA in H₂O MilliQ (Eluente A) e una soluzione 0,05% di TFA in acetonitrile (CH₃CN, Sigma; Eluente B), degasati in continuo con elio. L'H₂O MilliQ è stata ottenuta da acqua bidistillata (Bidistillatore della Cecchinato, Mestre, Italia) con sistema MilliQ Waters. Il TFA è stato aggiunto in quanto, agendo come coppia ionica, incrementa la ritenzione, favorisce la solubilità dei peptidi e riduce le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanolici presenti sulla fase stazionaria; tale composto,

inoltre, non interferisce con l'analisi poiché non assorbe nella regione UV utilizzata per la rivelazione ed è facilmente rimosso in quanto molto volatile.

Tutte le colonne cromatografiche utilizzate nel presente lavoro di dottorato sono costituite con gel di silice funzionalizzata con catene idrocarburiche lineari di 18 atomi di carbonio (fase stazionaria apolare). Per la purificazione sono state usate le colonne Vydac C18 monomeric 238TP510 semipreparativa (5 μm , 300 Å, 10 \times 250 mm) fornita dalla Grace (Columbia, MD, USA) e Nova-Pak HR C₁₈ semipreparativa (6 μm , 60 Å, 7,8 \times 300 mm) fornita dalla Waters; per la caratterizzazione analitica sono state usate le colonne Vydac C18 monomeric 238TP54 analitica (5 μm , 300 Å, 4,6 \times 250 mm) fornita dalla Grace, e Luna C₁₈ analitica (5 μm , 100 Å, 4,6 \times 250 mm) fornita dalla Phenomenex (Torrance, CA, USA).

L'interazione che permette la ritenzione dei peptidi nella fase stazionaria è di tipo idrofobico. La cromatografia può essere eseguita in modalità isocratica o in gradiente. Nel secondo caso, quello utilizzato in questo lavoro di dottorato, un aumento graduale della concentrazione di acetonitrile rispetto all'acqua, incrementa l'idrofobicità della fase mobile e determina la competizione tra questa e la fase stazionaria, con conseguente desorbimento dell'analita ad una data percentuale di acetonitrile e successiva eluizione.

All'uscita della colonna cromatografica è posto un rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487 (Waters): la lettura è impostata generalmente alla lunghezza d'onda (λ) di 214 nm, ossia in corrispondenza del picco di assorbimento del legame peptidico.

L'acquisizione e l'integrazione dei dati sono state eseguite dal programma Empower (Waters). In una prima fase tramite RP-HPLC semipreparativa, si sono isolati e purificati i prodotti desiderati a partire dalla miscela grezza; in una seconda fase tramite RP-HPLC analitica si sono invece ottenute informazioni sul campione in esame quali ad esempio l'omogeneità e l'identità.

Infatti, note le condizioni cromatografiche (colonna, fase mobile e gradiente), il tempo di ritenzione in colonna costituisce un dato strettamente correlabile all'identità della sostanza. Inoltre, poiché risulta che l'area sottesa dal picco della sostanza è direttamente proporzionale alla quantità di campione contenuto nella miscela totale, procedendo alla sua integrazione è possibile quantificare il grado di omogeneità raggiunto dopo purificazione.

2.1.5 Analisi di massa

Le analisi di massa dei peptidi sono state effettuate dal Dott. Daniele Dalzoppo del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova con uno strumento ESI-TOF, modello *Mariner System 5220* dell'Applied Biosystem (Perkin-Elmer). Le analisi sono state eseguite con la tecnica di ionizzazione nota come *ElectroSpray Ionization* (ESI) (Siuzdak, 1994) che permette una ionizzazione del campione a temperatura ambiente e la formazione di specie multicarica, e con un analizzatore di tipo TOF (*time of flight* = a tempo di volo) che seleziona gli ioni in base al loro rapporto m/z e al tempo che essi impiegano per percorrere l'analizzatore. L'analizzatore TOF riesce a 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.

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.

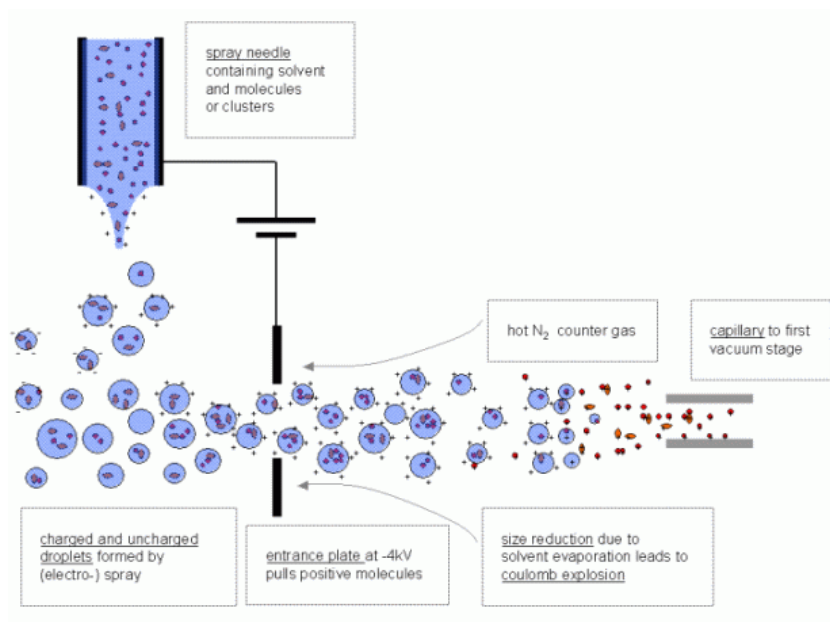


Figura 2.6. Rappresentazione schematica del processo di ionizzazione che avviene in una sorgente ES.

2.2 SCAFFOLD POLIMERICI

2.2.1 Elettrofilatura degli *scaffold* polimerici

Gli *scaffold* elettrofilati sono stati ottenuti nel laboratorio del Prof. Michele Modesti presso il Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria dell'Università degli Studi di Padova.

Per la loro realizzazione sono state preparate nel laboratorio della Dott.ssa Monica Dettin del medesimo Dipartimento, sette diverse soluzioni: quella di controllo, con solo policaprolattone (PCL, $M_n=60000$, Sigma-Aldrich) e le altre sei unendo al PCL uno tra i peptidi auto-assemblanti sintetizzati. Sono state utilizzate frazioni peptidiche con grado di omogeneità superiore al 90%.

Le soluzioni, tutte alla concentrazione del 10% (wt/wt), sono state ottenute dissolvendo il solo PCL, o il polimero e uno tra i peptidi sintetizzati, in 1,1,1,3,3,3-esafuoroisopropanolo (HFIP, Sigma-Aldrich) e, al fine di ottenere una soluzione omogenea, sono state lasciate sotto agitazione magnetica per 3 ore.

Si è deciso di mantenere costante la concentrazione e di variare, quindi, solo la composizione di soluto: a tal scopo il rapporto PCL/peptide è stato fissato in 95:5.

Il volume finale per ogni soluzione è stato di 1,5 mL di HFIP ($\rho=1,596$ g/mL), corrispondente a 2,66 g. Di conseguenza, nella soluzione di solo polimero si sono aggiunti 0,266 g di PCL, nelle soluzioni miste, invece, 0,2527 g di PCL e 0,0133 g di peptide.

L'apparato utilizzato per l'*electrospinning* è composto da un generatore di tensione *Gamma High Voltage Research* (Ormond Beach, USA), una siringa da 5 mL con ago in acciaio inox smussato 27G (Terumo), una pompa volumetrica (New Era Pump Systems, Inc.) e un collettore, in forma di una piastra quadrata in acciaio inox, ricoperta da un foglio di alluminio. Tutti gli *scaffold* sono stati ottenuti nelle stesse condizioni e secondo i seguenti parametri strumentali:

- ✓ Differenza di potenziale tra ago e collettore = 16 kV
- ✓ Flusso = 1 mL/min
- ✓ Distanza ago-collettore = 15 cm
- ✓ Pressione del flusso d'aria = 0,1 Kg/cm²

Per ogni campione, la deposizione è durata 1 ora e il processo è stato condotto a temperatura ambiente. Ciascuno *scaffold*, immediatamente dopo la filatura, è stato seccato 1 ora sotto vuoto, per allontanare i residui di solvente.

2.2.2 Analisi al microscopio elettronico

La morfologia delle fibre è stata valutata con l'aiuto di un microscopio a scansione elettronica (*Scanning Electron Microscope*, Cambridge Stereoscan 440 SEM), presso i laboratori del Prof. Emilio Ramous (Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria dell'Università degli Studi di Padova). I campioni, prima dell'analisi, sono stati ricoperti da un sottile strato di grafite per mezzo di un carbonatore (EMITECH K950x Turbo Evaporator), con una singola deposizione di 1600 ms. Le immagini sono state prodotte con un voltaggio accelerato di 15 kV e con un dettaglio corrispondente a 30000 ingrandimenti. La distribuzione dei diametri delle fibre è stata ottenuta, sempre al SEM, con un software di analisi dell'immagine.

2.2.3 Analisi spettroscopica infrarossa in Trasformata di *Fourier*

La radiazione infrarossa (IR) è la parte dello spettro elettromagnetico che si trova tra le regioni del visibile e delle microonde; essa viene di norma suddivisa in IR vicino ($13000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), IR medio ($4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$), IR lontano ($200 - 10 \text{ cm}^{-1}$). La zona di maggior interesse per le analisi di molecole organiche è quella compresa fra 4000 e 200 cm^{-1} .

La spettroscopia infrarossa è uno strumento analitico che permette di ottenere informazioni importanti riguardo alla struttura del composto in esame, e ai gruppi funzionali in esso presenti.

Tabella 2.2. Bande caratteristiche del medio IR.

Numeri d'onda (cm^{-1})	Tipo di assorbimento	Nome della regione
3400-2800	Stretching O-H, N-H, C-H	
2250-2100	Stretching $\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}\equiv\text{C}$	Gruppi funzionali
1850-1600	Stretching $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$	
1600-1000	Stretching C-C, C-O, C-N Vari tipi di bending	Impronta digitale
1000-600	Bending C-H	bending C-H

L'assorbimento di radiazione IR induce nelle molecole del campione essenzialmente due tipi di moti vibrazionali: *stretching* (stiramento) e *bending* (piegamento). Alcune bande caratteristiche della regione del medio IR sono riportate in tabella 2.2.

Il gruppo peptidico, in particolare, genera nove bande caratteristiche, chiamate ammidie A, B, I, II, III, IV, V, VI e VII (Kong et al., 2007).

Nelle presenti analisi sono state prese in considerazione le bande ammidie I ed ammidie II che sono più interessanti ai fini dell'analisi conformazionale di peptidi e proteine. La banda ammidie I ($1690-1620\text{ cm}^{-1}$) è associata per l'80% alla vibrazione di *stretching* del legame C=O, e per la restante percentuale allo stiramento del legame C-N. La sua esatta posizione è determinata anche dalla conformazione e dal *pattern* di legami a idrogeno. Essa è estremamente utile per chiarire la struttura secondaria dei peptidi: il gruppo peptidico in conformazioni *β -sheet* assorbe mediamente a $1640-1615\text{ cm}^{-1}$, se in *α -elica* assorbe a 1650 cm^{-1} .

Tabella 2.3. Correlazioni tra strutture delle proteine e frequenze della banda ammidie I

Struttura	Banda Ammidie I (cm^{-1})
<i>Antiparallel β-sheet/aggregated strands</i>	1675 – 1695
<i>3_{10}-Helix</i>	1660 – 1670
<i>α-Helix</i>	1648 – 1660
<i>Unordered</i>	1640 – 1648
<i>β-Sheet</i>	1625 – 1640
<i>Aggregated strands</i>	1610 – 1628

La banda ammidie II ($1550-1510\text{ cm}^{-1}$) deriva soprattutto dalla vibrazione di *bending* del legame N-H e dallo stiramento del legame C-N.

Le analisi sui campioni sono state fatte utilizzando uno spettrofotometro a trasformata di *Fourier* (FT-IR). Per quantificare la struttura secondaria di una proteina il metodo più utilizzato è operare un *curve fitting* della banda ammidie I dello spettro. Tale operazione permette di individuare i differenti contributi che concorrono a formare il profilo dello spettro sperimentale e che sono ascrivibili ai diversi conformeri presenti. L'area integrata sotto ogni banda componente viene calcolata e riferita come percentuale dell'area totale della banda ammidie I: il suo valore è preso come percentuale della particolare struttura secondaria nella proteina.

Le misure FT-IR di tutti i campioni sono state effettuate con l'uso di un interferometro VECTOR 22 (Bruker) FT-IR, equipaggiato con un detector DTGS, operante nel *range* 4000-400 cm^{-1} , presso il Dipartimento di Fisica dell'Università Roma Tre (Prof.ssa Giovanna Iucci). Gli spettri in riflessione degli *scaffold* sono stati ottenuti con l'ausilio di *monolayer/grazing angle* (Specac) P/N 19650. L'angolo di incidenza è stato di 70°. La valutazione del *curve-fitting* è stata fatta utilizzando curve gaussiane.

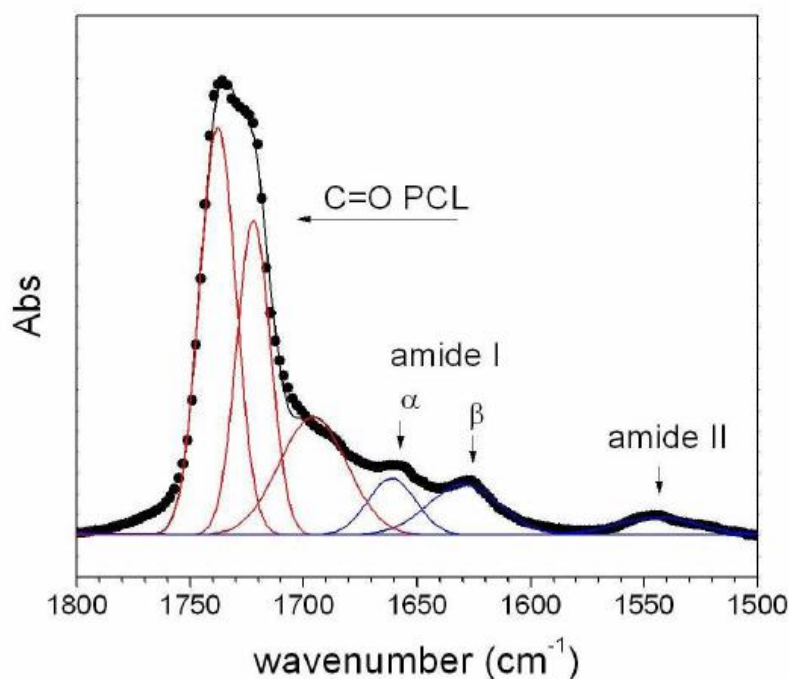


Figura 2.7. Esempio di *curve-fitting* di bande FT-IR.

2.2.4 Trattamento con tampone salino

Le condizioni ambientali possono influenzare il comportamento dei peptidi auto-assemblanti. In particolare, la presenza di cationi monovalenti promuove l'aggregazione in *scaffold* tridimensionali. Al fine di studiare eventuali cambiamenti della struttura secondaria dei peptidi inglobati negli *scaffold*, la matrice elettrofilata PCL/RGD-EAK è stata immersa, separatamente, in un tampone salino per 3 giorni.

Si è scelto un *buffer* a pH 7,4 costituito da una soluzione 150 mM di NaCl (Prolabo) e 10 mM di NaH_2PO_4 (Carlo Erba), in modo da mimare le condizioni fisiologiche.

Lo *scaffold*, prima di essere sottoposto ad analisi FT-IR, è stato risciacquato con H_2O MilliQ e seccato, per 1 ora sotto vuoto.

2.2.5 Misura dell'angolo di contatto

L'idrofilicità delle matrici elettrofilate composte da PCL e da PCL/peptide è stata misurata presso i laboratori di Fisica dei Polimeri dell'Istituto Carnot CIRIMAT-CNRS di Tolosa della Dott.ssa Valerie Samouillan, con uno strumento SURFTENS (OEG, GmbH.) Ciascun campione da analizzare è stato collocato su un vetrino in silicio. Con procedura automatizzata lo strumento ha poi depositato sulla superficie degli *scaffold* una goccia di acqua deionizzata e ha misurato l'angolo di contatto.

L'angolo di contatto è una misura indicativa della capacità di un liquido di distribuirsi su una superficie. Il metodo consiste nella misura dell'angolo tra la tangente al profilo di una goccia, depositata sulla superficie del campione, e la superficie stessa. Questo metodo di indagine fornisce diverse informazioni sul carattere della superficie esaminata: bagnabilità (se si utilizza acqua), energia superficiale (se si utilizzano liquidi diversi), omogeneità (con l'isteresi tra angolo di avanzamento e angolo di arretramento di una goccia in movimento sulla superficie). Nel caso di campioni ad uso biomedico, il parametro più importante è la bagnabilità del materiale. La goccia d'acqua posta sulla superficie piana del campione tende ad allargarsi quando la superficie è bagnabile, viceversa, assume una forma sferica quando la superficie non è bagnabile (figura 2.8)

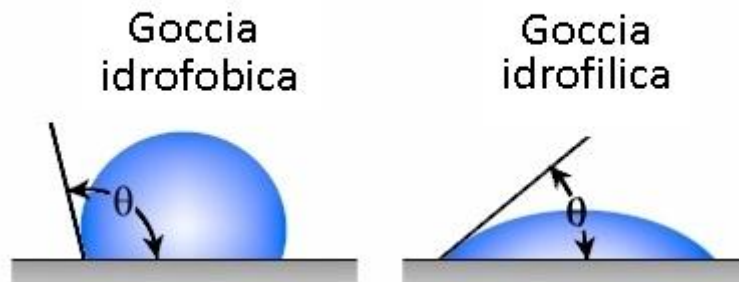


Figura 2.8. Misura dell'angolo di contatto su una superficie idrofilica e una idrofobica.

In pratica, se con θ si indica l'angolo di contatto, sono possibili tre situazioni:

- ✓ $\theta = 0^\circ$, la superficie è completamente bagnabile;
- ✓ $0^\circ < \theta < 90^\circ$, la superficie è parzialmente bagnabile;
- ✓ $\theta > 90^\circ$, la superficie non è bagnabile.

Angoli di contatto bassi sono, di conseguenza, auspicabili per un biomateriale che debba essere colonizzato dalle cellule.

2.3 SAGGI BIOLOGICI *IN VITRO*

L'interazione tra matrici elettrofilate e cellule, in particolare osteoblasti, è stata valutata impiegando sistemi di colture cellulari e modelli di studio *in vitro*, in collaborazione con la Dott.ssa Paola Brun presso il laboratorio di Istologia, Microbiologia, e Biotecnologie Mediche del Prof. Ignazio Castagliuolo dell'Università degli Studi di Padova.

2.3.1 Coltura di osteoblasti

Le cellule utilizzate negli esperimenti con gli *scaffold* sono state ottenute tramite prelievi di frammenti ossei ottenuti durante interventi di implantologia orale presso la Clinica Odontoiatrica dell'Università degli Studi di Padova, dalla mandibola di un paziente maschio di età adulta, e sono state utilizzate a scopo di ricerca previo consenso informato.

I frammenti mandibolari sono stati posti in coltura immediatamente dopo l'espianto in terreno DMEM/F12 (1:1, Gibco, Milano, Italia) addizionato di siero fetale bovino (FBS) al 20% v/v, 1% di sodio piruvato, 1% amminoacidi non essenziali e 1% di una soluzione antibiotica composta da ampicillina, streptomina e fungizone (tutti forniti dalla ditta Gibco). Dopo circa 10 giorni di coltura le cellule hanno iniziato a migrare dai frammenti di osso e, raggiunta la confluenza, sono state enzimaticamente staccate mediante incubazione con tripsina-EDTA (Gibco) e piastrate in fiasche per coltura cellulare della superficie di 75 cm² al fine di ottenere l'espansione della coltura cellulare. A questo punto e per tutta la durata degli esperimenti, le cellule sono state incubate in terreno di differenziazione, costituito dal terreno sopra descritto addizionato di 50 µg/mL di acido ascorbico (Prolabo), 10 nM desametasone (Sigma) e 10 mM di β-glicerofosfato (Sigma). Il fenotipo osteoblastico è stato successivamente confermato mediante determinazione dell'attività di fosfatasi alcalina (Yokose et al., 1996) e test di *von Kossa* per la colorazione dei cristalli intracellulari di fosfato di calcio (Bagno et al., 2007). Le cellule, seminate in fiasche, vengono mantenute in coltura per almeno 10 giorni, con rinnovo di terreno ogni tre giorni, prima di eseguire i saggi sperimentali.

2.3.2 Semina delle cellule sugli *scaffold*

Per l'esecuzione dei saggi biologici tutti gli *scaffold* precedentemente elettrofilati sono stati ritagliati in forma di disco (14 mm di diametro), per punzonatura diretta della

matrice depositata sul collettore di alluminio, utilizzando allo scopo un punzone di acciaio inossidabile e un martelletto: ogni *scaffold* ha conservato il suo supporto di alluminio. Ogni disco è stato fissato sul fondo di un pozzetto di piastre in polistirene per colture tessutali da 24 pozzetti (*tissue culture*, Costar), sterilizzato con 600 μL di etanolo (Carlo Erba) al 20% (v/v) per 10 minuti e poi lavato con 1 mL di PBS (Carlo Erba). Si è quindi proceduto alla semina degli osteoblasti sulle matrici, in terreno di differenziazione, alla concentrazione di 2×10^5 cellule/pz ($\sim 1,3 \times 10^5$ cell/cm²).

2.3.3 MTT test

La valutazione dell'adesione cellulare delle colture di osteoblasti seminate sugli *scaffold* è stata effettuata mediante l'impiego di un saggio colorimetrico, che utilizza l'agente ossidante cromogeno 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolobromuro (MTT). Il test MTT sfrutta la riduzione dell'anello tetrazolico di colore giallo in cristalli viola di formazano, trasformazione operata dalle deidrogenasi mitocondriali presenti nelle cellule vitali metabolicamente attive. I cristalli che si formano risultano insolubili in ambiente acquoso per cui devono essere estratti dalle cellule utilizzando una soluzione in grado di lisare le membrane cellulari e di solubilizzare i cristalli. Una volta ottenuta una soluzione omogenea, si misura la densità ottica dei campioni selezionando un'opportuna lunghezza d'onda. L'assorbanza misurata è direttamente proporzionale alla quantità di formazano e, a sua volta, al numero di cellule. La misura può essere espressa relativamente ad un campione, scelto come controllo. Per avere una quantificazione assoluta del numero di cellule, è necessario tuttavia costruire una curva standard nel piano che correla numero di cellule e densità ottica: di norma sono sufficienti 5 punti. Nella pratica, questi si ottengono misurando l'assorbanza di pozzetti in cui sia noto, per altra via, il numero di cellule presenti.

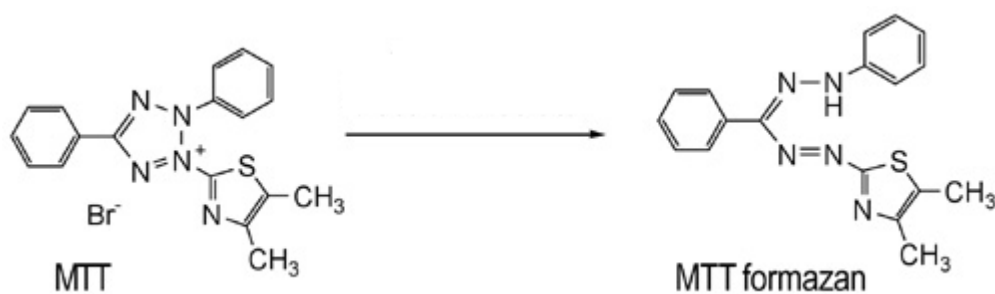


Figura 2.9. Riduzione dell'anello tetrazolico a formazano.

Procedura

Gli *scaffold*, preparati e sterilizzati come precedentemente descritto, sono stati seminati con osteoblasti umani alla concentrazione di 2×10^5 cellule/pz, e incubati per 2 ore con terreno di differenziazione a 37°C e al 5% di CO₂. Dopo aver rimosso il terreno da ogni pozzetto e aver eseguito un lavaggio con PBS per rimuovere le cellule non adese alla matrice, si è proceduto aggiungendo 100 µL/pz di una soluzione, 5 mg/mL in terreno di coltura, di MTT (Sigma-Aldrich) e con un'ulteriore incubazione per 4 ore a 37°C. Ad ogni matrice sono stati poi aggiunti 100 µL/pz di una soluzione di sodio dodecilsolfato (SDS) 10% (p/v) (Sigma-Aldrich), acidificata con HCl 0,01 N (Sigma-Aldrich), in grado di lisare la membrana cellulare e solubilizzare i cristalli di formazano. Il tutto è stato sottoposto a blanda agitazione meccanica per 12 ore a temperatura ambiente. La lettura dei valori d'assorbanza è stata eseguita su 100 µL della soluzione presente in ciascun pozzetto trasferiti in piastre da 96pz con il lettore per micropiastre *Sunrise* (Tecan) a 620 nm.

La curva standard è stata ricavata, nelle stesse modalità utilizzate per gli *scaffold*, determinando le densità ottiche di 10 pozzetti (5 punti in duplicato), di cui era noto il numero di osteoblasti umani, ottenuto per conta cellulare con camera di *Bürker*. Dalla determinazione delle densità ottiche in questi ultimi campioni è stato, quindi, possibile, mediante regressione lineare, determinare la quantità di cellule presente in ogni campione testato.

Ogni analisi, eseguita in triplicato, è stata condotta in parallelo su tutti i tipi di *scaffold* elettrofilati (solo PCL o PCL/peptide) e come controllo è stato valutato il comportamento delle cellule seminate direttamente su piastra *tissue culture*.

2.3.4 Determinazione dei livelli di calcio: metodo *o*-CPC

Per stimare l'attività cellulare degli osteoblasti seminati sui campioni, ci si è avvalsi di un saggio colorimetrico basato sull'*o*-cresoltaleina complessone (*o*-CPC), che consente la determinazione della concentrazione di calcio presente in una coltura *in vitro*. La quantità di calcio rappresenta un utile indicatore sul grado di mineralizzazione della matrice prodotta dagli osteoblasti: idealmente maggiore sarà il numero di osteoblasti vitali ed attivi, maggiore sarà la quantità di matrice ossea prodotta e maggiore la concentrazione di calcio registrata.

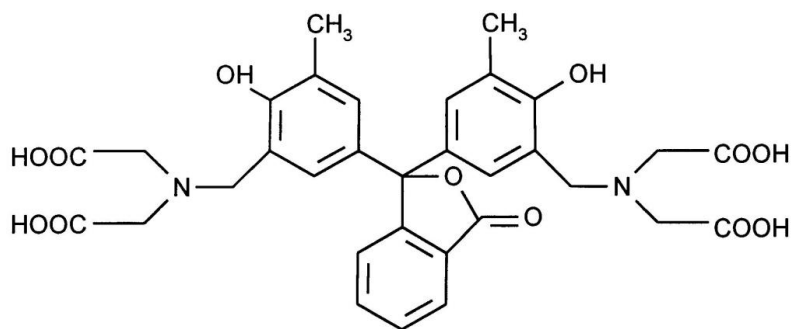
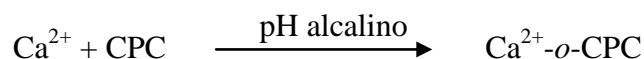


Figura 2.10. *o*-cresoftaleina complessone (*o*-CPC).

L'*o*-CPC è un indicatore acido-base in grado di formare complessi colorati con metalli diversi, a seconda delle condizioni di reazione (Kessler et al., 1964). In una soluzione a pH acido o neutro è sostanzialmente incolore, mentre a pH via via più alcalini, si assiste ad un graduale viraggio da incolore a rosa, e infine porpora (pH \geq 12). La complessazione tra *o*-CPC e ioni Ca^{2+} avviene solo in soluzione alcalina, con formazione di un composto porpora. Tuttavia, in tale condizione, se presente in grandi quantità, anche il magnesio è in grado di complessarsi con *o*-CPC. Per prevenire quindi, tale interferenza si può agire in due modi: o aggiungendo un chelante più affine per il magnesio, come l'8-idrossichinolina, o andando ad agire sul pH (a pH \geq 10 l'interferenza del magnesio è minima e a pH 12 nulla). L'utilizzo ad esempio, di 2-amino-2-metil-1-propanolo, porta dei vantaggi: stabilizzando il pH \cong 10, consente di operare in un ambiente abbastanza alcalino da minimizzare l'interferenza del magnesio, ma non troppo basico per evitare, al contempo, viraggi prematuri di colore (Moorehead et al., 1974).



L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla concentrazione del calcio presente nel campione esaminato e può essere misurata con uno spettrofotometro, generalmente tra i 550 e i 650 nm. Al fine di normalizzare i livelli di calcio alla densità di cellule effettivamente presenti, è possibile far riferimento alla concentrazione proteica in ciascun campione: per la sua determinazione, nel nostro caso si è scelto di utilizzare il saggio dell'acido bicinconinico (*Bicinchnic acid BCA Protein Assay Kit*, *Thermo Scientific, Rockford, USA*). Il Kit è formato da Reagente A, un *buffer* alcalino costituito da sodio carbonato, sodio bicarbonato, acido bicinconinico e sodio tartrato in

idrossido di sodio 0,1 M, e Reagente B, una soluzione al 4% di solfato rameico, che uniti insieme al momento dell'esecuzione del saggio costituiscono la *working solution*.

Il metodo consiste di due reazioni consecutive (Smith et al., 1985). In primo luogo i legami peptidici delle proteine, in ambiente alcalino, promuovono la riduzione dello ione Cu^{2+} del solfato rameico a ione Cu^+ ; la quantità di ione Cu^{2+} ridotta è proporzionale alla quantità di proteine presenti in soluzione. Successivamente due molecole di acido bicinconico si complessano con uno ione Cu^+ , formando un composto porpora determinabile spettrofotometricamente.

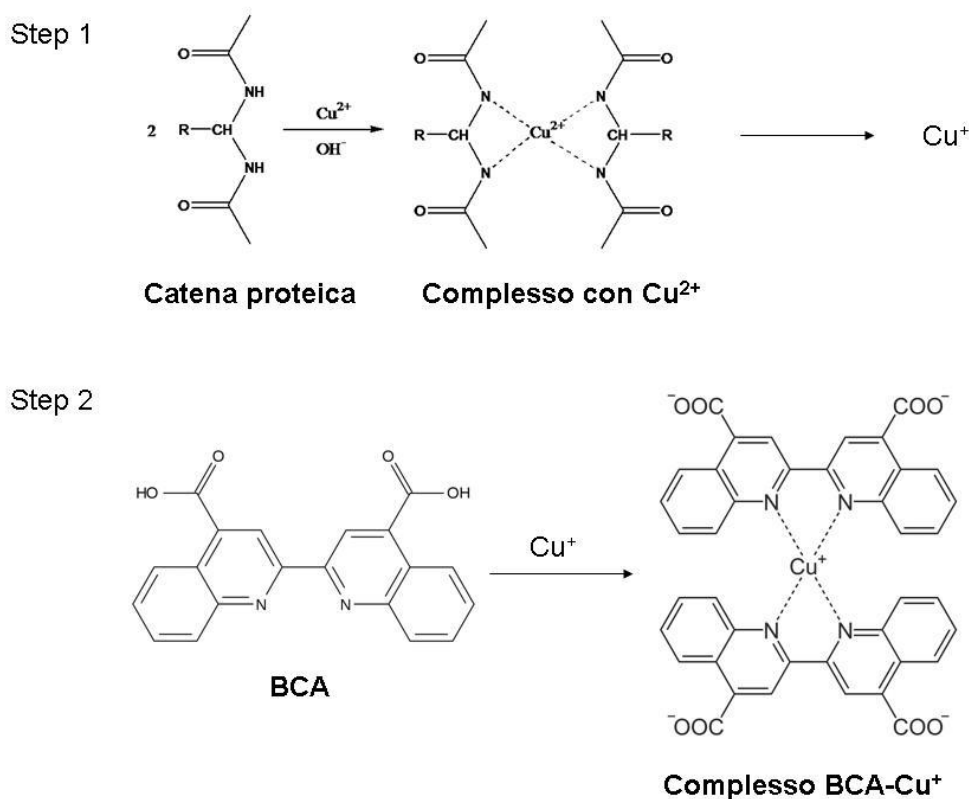


Figura 2.11. Saggio dell'acido bicinconico. Step 1: formazione di un complesso tra i legami peptidici e Cu^{2+} (reazione di Biuret), che in presenza di cisteine o residui aromatici porta alla riduzione del Cu^{2+} a Cu^+ . Step 2: due molecole di acido bicinconico si complessano con uno ione Cu^+ .

Procedura

Il saggio è stato eseguito sugli *scaffold* elettrofilati, preparati e sterilizzati come precedentemente descritto, seminati con osteoblasti umani alla concentrazione di 2×10^5 cellule/pz, e incubati per 7 giorni con terreno di differenziazione a 37°C e al 5% di CO_2 con cambio di terreno ogni 2 giorni.

Per procedere alla valutazione del contenuto di calcio, dopo 7 giorni il terreno è stato rimosso e gli *scaffold* sono stati lavati con PBS. Le matrici sono state incubate per 30

minuti a 4°C con 200 µL di acido tricloroacetico (TCA, Sigma, soluzione al 5% (p/v) in PBS), al fine di lisare le membrane citoplasmatiche ed estrarre le proteine cellulari. Un volume pari a 100 µL di lisato cellulare è stato, quindi, trasferito in piastre per microtitolazione ed aggiunto di 100 µL di una soluzione reagente formata da 47 mL di H₂O, 3 mL di HCl 3,6 mM (Sigma), e di *o*-CPC (100 µM, Sigma) e di 100 µL di un *buffer* composto da 50 mL H₂O e di 7 mL di 2-amino,2-methyl,1-propanolo (Sigma), fino al volume finale di 300 µL e pH 10.7. L'intensità del colore è stata misurata alla lunghezza d'onda di 620 nm. Parallelamente è stata allestita una curva standard con diluizioni seriali di carbonato di calcio (da 300 mg a 0 mg), per determinare la quantità di calcio nei campioni.

La normalizzazione alla densità cellulare di ogni *scaffold* è stata effettuata misurando la concentrazione proteica nel rispettivo campione con il saggio dell'acido bicinconinico (*Bicinchnic acid BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific*). Per ogni campione 25 µL di lisato cellulare, precedentemente ottenuto con il trattamento con TCA, vengono trasferiti in piastra da 96 pozzetti e addizionati di 200 µL della *working solution* del Kit BCA. Dopo un'incubazione di 10 minuti a 37°C, si effettua la lettura della piastra tramite il lettore per micropiastre *Sunrise* (Tecan) a 620 nm. La concentrazione proteica del campione viene ottenuta mediante regressione lineare, allestendo una curva standard con diluizioni 1:2 di siero albumina bovina (BSA, Sigma), a partire da 2000 µg/mL.

La quantità di Calcio presente nel campione viene espressa come mg Ca²⁺/mg di proteine cellulari del saggio BCA.

Anche in questo caso, ogni analisi, eseguita in triplicato, è stata condotta in parallelo su tutti i tipi di *scaffold* elettrofilati (solo PCL o PCL/peptide) e come controllo è stato valutato il comportamento delle cellule seminate direttamente su piastra *tissue culture*.

2.3.5 Espressione genica: q-PCR

Il diverso grado di mineralizzazione promosso delle matrici elettrofilate, è stato ulteriormente misurato attraverso lo studio dell'espressione genica degli osteoblasti su di esse seminati. L'analisi è stata eseguita su geni codificanti per fosfatasi alcalina (ALP), osteopontina (OPN) e sialoproteina ossea (BSP), tre glicoproteine che rappresentano i *marker* più utilizzati per confermare l'avvenuta mineralizzazione. Si ritiene, infatti, che queste proteine, in grado di legarsi al calcio e/o al fosforo, aiutino la

deposizione ordinata di minerali attraverso una regolazione della quantità e della grandezza dei cristalli di idrossiapatite che si formano (Clarke, 2008).

Poiché i livelli di mRNA trascritto sono correlabili all'espressione proteica, una sovraespressione di questi geni indica un maggior grado di mineralizzazione promosso dagli *scaffold*.

Per lo studio dell'espressione genica descritto in questa tesi, si è ricorsi alla metodica *Polymerase Chain Reaction* (PCR), e in particolare alla *real time-PCR* (rt-PCR o PCR quantitativa, q-PCR) una specializzazione della normale PCR che permette, oltre all'amplificazione, anche l'analisi quantitativa del cDNA (*complementary DNA*), ossia del DNA complementare a singolo filamento ottenuto per retrotrascrizione dell'mRNA estratto dal campione.

Affinché l'amplificazione del cDNA sia possibile, devono essere rispettate alcune condizioni:

- il cDNA (*DNA target*) deve essere denaturato, ossia in forma di singolo filamento;
- nella miscela di reazione devono essere disponibili deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), cioè nucleotidi liberi da polimerizzare. Vengono utilizzati in concentrazione identica per tutte e quattro le specie, tra 20 e 200 μM ;
- devono essere presenti i *primer*, in altre parole brevi sequenze (20-30 paia di basi) di oligonucleotidi. La scelta del *primer* è essenziale per la buona riuscita della PCR: la sequenza scelta deve essere specifica per la sequenza di interesse, per non complementare e permettere l'amplificazione di sequenze DNA diverse da quella del *target*;
- deve essere disponibile una DNA-polimerasi per permettere l'allungamento dei filamenti appaiati *DNA-primer*. Tale polimerasi deve essere resistente alle elevate temperature richieste per la denaturazione del cDNA, in modo da essere utilizzata per più cicli continuamente;
- devono essere scrupolosamente rispettate le giuste condizioni ambientali di temperatura, pH, concentrazione di ioni magnesio, reagenti etc.

Le reazioni chiave che avvengono durante una PCR sono:

- Denaturazione (separazione): la miscela di reazione è portata ad elevate temperature comprese tra i 95°C e 99°C per ottenere la denaturazione della doppia elica di DNA.
- *Annealing* (appaiamento): la temperatura è abbassata tra i 30°C e i 55°C per permettere l'appaiamento dei *primer* alle sequenze complementari sul cDNA.
- Estensione (allungamento): la temperatura viene nuovamente alzata alla condizione di lavoro ottimale della DNA-polimerasi scelta, generalmente tra i 65°C e i 72°C, per permettere l'allungamento dei *primer* appaiati al cDNA.

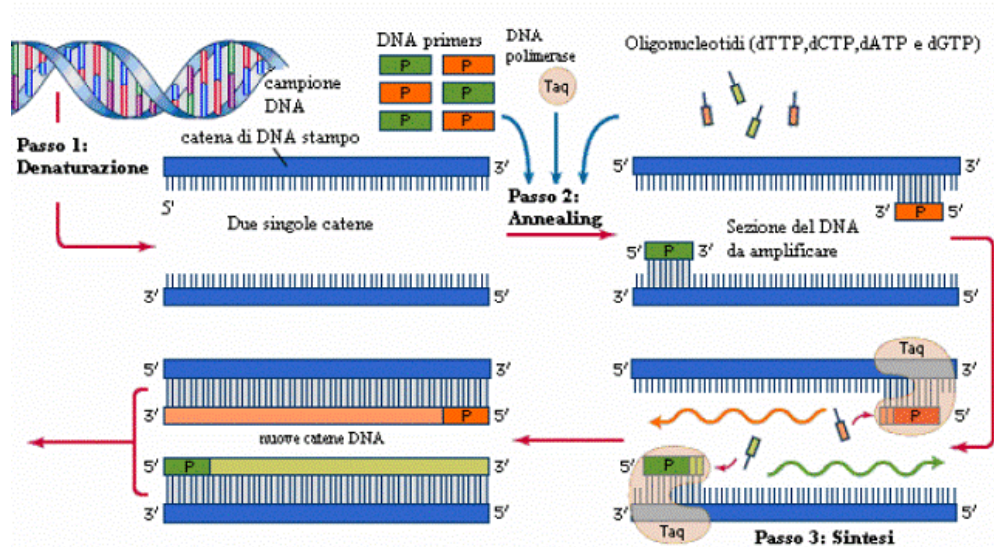


Figura 2.12. Fasi di un ciclo PCR.

Il ciclo descritto viene ripetuto tra le 30 e 40 volte, in ognuna delle quali viene duplicato anche il DNA sintetizzato nelle fasi precedenti; non si superano generalmente i 50 cicli, in quanto, anche se idealmente si dovrebbe ottenere un raddoppio del DNA-*target* ad ogni ciclo, nella pratica, oltre un certo limite si raggiunge un plateau, e si rischia di replicare materiale genomico contaminante.

La q-PCR permette la contemporanea amplificazione e quantificazione del cDNA grazie all'utilizzo di sonde fluorescenti e di termociclatori dotati di raggi laser in grado di eccitare e leggere i segnali fluorescenti. La quantità di fluorescenza emessa risulta essere proporzionale alla quantità di cDNA presente nel campione ed amplificato nel corso della reazione di PCR.

I metodi di quantificazione utilizzati nella q-PCR sono diversi e più o meno specifici secondo il tipo di sonda fluorescente utilizzata. Per la sua elevata specificità, è stato scelto il sistema TaqMan™ che utilizza sonde oligonucleotidiche (*Universal Probe Library*, UPL) a doppia marcatura con sequenze non più lunghe di 25-30 basi, disegnate in modo tale che siano complementari alle regioni geniche bersaglio della reazione di quantificazione, assicurando quindi un segnale specifico per il trascritto ricercato.

Le sequenze oligonucleotidiche delle sonde presentano all'estremità 5' un fluoroforo *Reporter* (R) rappresentato dalla 6-carbossifluorescina (FAM), e all'estremità 3' un *Quencher* (Q) dato dalla 6-carbossitetrametilrodamina (TAMRA). Quando R e Q sono separati dalla corta sequenza oligonucleotidica, Q “spegne” la fluorescenza di R e la sonda non emette fluorescenza. Durante la reazione di amplificazione innescata da *primers* specifici per il trascritto da quantificare, l'attività 5'→3' esonucleasica della *Taq* polimerasi, stacca R presente nell'estremità 5' della sequenza complementare della sonda che viene quindi utilizzata per allungare l'amplificato. L'allontanamento di R da Q permette quindi l'emissione di fluorescenza, (come illustrato in figura 2.13), che aumenta in maniera direttamente proporzionale alla quantità di amplificato. Il segnale di fluorescenza viene misurato in tempo reale durante la reazione di amplificazione e la quantificazione dell'amplificato di interesse è resa possibile dall'allestimento e contemporanea analisi di una curva standard ottenuta per diluizioni seriali del cDNA da analizzare.

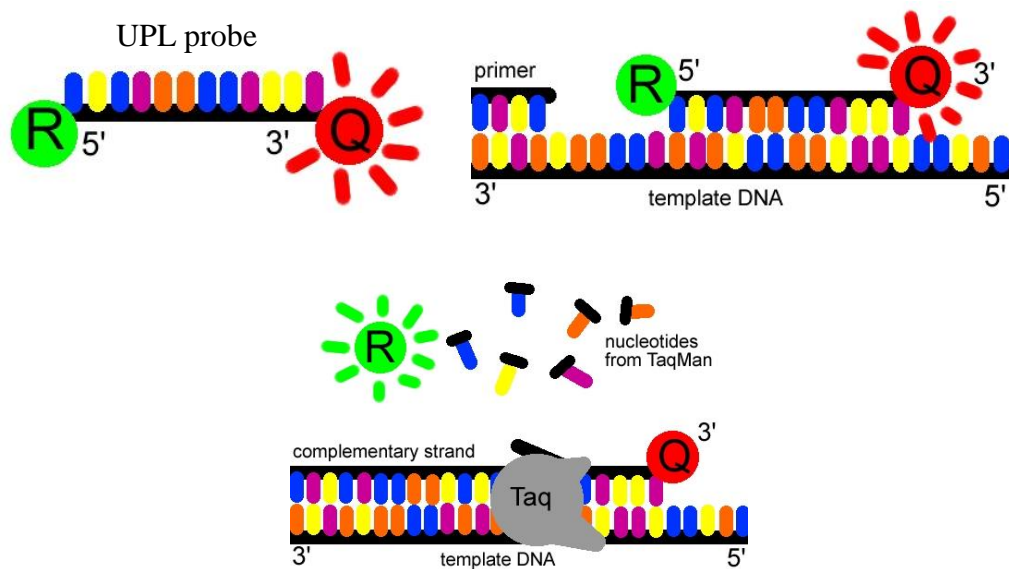


Figura 2.13. Rappresentazione schematica del principio della metodica TaqMan™.

L'espressione di ciascun gene studiato è stata normalizzata all'espressione di un gene controllo endogeno ("housekeeping"), ossia il GAPDH (gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi) determinato con metodica TaqMan™.

Procedura

Gli *scaffold*, preparati e sterilizzati come precedentemente descritto, sono stati seminati con osteoblasti umani alla concentrazione di 2×10^5 cellule/pz ($\sim 1,3 \times 10^5$ cell/cm²), e incubati per 24 ore con terreno di differenziazione a 37°C e al 5% di CO₂. La valutazione dell'espressione genica di OPN, BSP, ALP, proteine ritenute significative ai fini della produzione della matrice ossea, è stata effettuata tramite q-PCR.

Il metodo di analisi genica si sviluppa in 3 step: estrazione dell'mRNA dalle cellule seminate sulle matrici, retrotrascrizione per ottenere cDNA, amplificazione e quantificazione di cDNA mediante q-PCR.

Estrazione dell'RNA

Per l'estrazione dell'mRNA si è fatto ricorso al kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison USA) che sfrutta l'azione combinata di isotiocianato di guanidio e fenolo. L'isotiocianato di guanidio contribuisce alla dissoluzione delle proteine e all'inattivazione delle ribonucleasi (RNAsi), enzimi ubiquitari in grado di degradare l'RNA, mentre il fenolo ha la funzione di solubilizzare le proteine, separandole dagli acidi nucleici.

A 24 ore dalla semina degli osteoblasti umani sugli *scaffold*, è stato tolto il terreno ed effettuato un lavaggio con PBS. Al fine di lisare le cellule, lo *Spin Protocol* fornito dalla ditta (Manuale Tecnico #TM048) ha previsto l'aggiunta ad ogni campione di 175 µL di *RNA Lysis Buffer* (RLA): il lisato ottenuto è stato trasferito in un tubo autoclavato.

I campioni sono, quindi, stati addizionati di 350 µL di *RNA Dilution Buffer* (RDA), mescolati per inversione e centrifugati per 10 minuti, al fine di separare il sovrantante, contenente gli acidi nucleici, dal precipitato costituito invece da proteine.

Il sovrantante è stato, quindi, trasferito in un nuovo tubo e trattato con 200 µL di etanolo al 95%, mescolato bene, e caricato su colonnine dotate di membrana funzionalizzata in grado di trattenere selettivamente gli acidi nucleici.

Le membrane sono state lavate con *RNA Wash Solution* (RWA) mediante centrifugazione per 1 minuto. Dopo aver scartato il surnatante, le membrane sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente con 50 µL di una soluzione di *DNAse*

Incubation Mix costituita da 40 μL *Yellow Core Buffer*, 5 μL MnCl_2 0,09 M e 5 μL DNase I (in grado di digerire singoli e doppi filamenti di DNA), allo scopo di frammentare il DNA contaminante.

L'attività enzimatica è stata quindi bloccata mediante aggiunta di 200 μL di *DNase Stop Solution* (DSA) e successiva centrifugazione per 1 minuto. Sono stati eseguiti due lavaggi con RWA, il primo con 600 μL di RWA per 1 minuto, il secondo con 250 μL di RWA per 2 minuti, scartando ogni volta il sovrantante. Infine l'RNA è stato ottenuto aggiungendo alla membrana 100 μL di *Nuclease-Free Water* fornita nel kit e centrifugando per 1 minuto e conservando il surnatante contenente l'mRNA. L'intero processo si è svolto a temperatura ambiente, e tutte le centrifugazioni sono state effettuate a 13000 rpm. Si è proceduto quindi, con la reazione di retrotrascrizione dell'RNA ottenuto; quando questo non è stato possibile nell'immediato, si è ricorsi alla conservazione dei campioni di RNA a -80°C .

Retrotrascrizione

La retrotrascrizione, il processo di trascrizione inversa che partendo da mRNA permette di ottenere cDNA complementare che verrà utilizzato come DNA-*target* nella successiva fase di q-PCR, è stata ottenuta grazie all'azione di trascrittasi inversa compiuta dall'enzima M-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*, Applied Biosystems) derivante dal virus della leucemia murina. In particolare, 5 μg dell'RNA isolato come precedentemente descritto sono aggiunti ad una miscela costituita, per ciascun campione, da 5 μL di *Buffer* 10x (Tris-HCl 20 mM, pH 8,3, KCl 100 mM, Applied Biosystems), 11 μL di MgCl_2 (5,5 mM, Applied Biosystems), 10 μL di dNTP (2 mM, Applied Biosystems), 2,5 μL di oligonucleotidi di innesco universale (*Random Primers*, 2,5 μM , Applied Biosystems), 1,5 μL di inibitore delle RNasi (60 U/ μL , Applied Biosystems), 1,25 μL di M-MuLV (125 U/ μL) al volume finale di 50 μL . L'intero processo di retrotrascrizione è stato effettuato con il seguente programma su termociclatore *Master Cycler Personal* (Authorized Thermal Cycler, Eppendorf):

Fase 1: 25°C per 10 minuti;

Fase 2: 48°C per 60 minuti;

Fase 3: 95°C per 5 minuti.

Fase 4: 4°C per 5 minuti.

Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20°C e analizzato poi mediante reazione q-PCR al fine di quantificare i trascritti specifici per i diversi geni.

PCR quantitativa

Le reazioni di quantificazione dei trascritti genici mediante q-PCR prevedono la contemporanea amplificazione e quantificazione del campione da analizzare, ossia del cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione.

L'amplificazione dei prodotti delle reazioni di retrotrascrizione, condotta utilizzando il metodo TaqMan™, prevede di preparare per ogni gene da testare una miscela composta di 2,5 µL di cDNA, 12,5 µL di *Universal PCR TaqMan™ Master Mix* (Applied Biosystems), 0,3 µL di *primers* senso (0,1 µM) e 0,3 µL di *primers* antisenso (0,1 µM), specifici per il gene di interesse come riportato in tabella 2.4, 1 µL di sonda UPL (0,4 µM, Roche) e H₂O MilliQ per un volume finale di 25 µL.

Tabella 2.4. *Primers* senso e antisenso utilizzati per ogni gene nella reazione di amplificazione.

Gene	Sequenza dei <i>primers</i>	Cicli	Temperatura di amplificazione (°C)
OPN	<i>forward</i> : 5'ttctgcagacctgacatcc3' <i>reverse</i> : 5'ggctgtccaatcagaagg3'	40	60
BSP	<i>forward</i> : 5'caatctgtgccactcactgc3' <i>reverse</i> : 5'tcatttggtgattgcttct3'	40	60
ALP	<i>forward</i> : 5'ggcacctgccttactaactcc3' <i>reverse</i> : 5'cttagccacgttggtgtga3'	40	60
GAPDH	<i>forward</i> : 5'cggaagcccatcacca3' <i>reverse</i> : 5'ccgcctcaccatt3'	40	60

Le reazioni di amplificazione e quantificazione sono state condotte utilizzando il termociclatore ABI PRISM™ 7700 *Sequencer Detector* (Applied Biosystems) seguendo tre fasi successive:

Fase 1: 2 minuti a 50°C per attivare l'enzima uracil-N-glicosilasi al fine di rimuovere gli uracili eventualmente presenti nel campione;

Fase 2: Denaturazione. 10 minuti a 95°C necessari sia ad attivare l'enzima *Taq* polimerasi (dal batterio *Thermus aquaticus*) responsabile della reazione di amplificazione sia per consentire la denaturazione del doppio filamento di cDNA grazie alla rottura dei legami timidina-adenina e citosina-guanina;

Fase 3: *Annealing*. 1 minuto alla temperatura di 60°C, fase richiesta da tutte le coppie di *primers* (tabella 2.4), nella quale avviene anche il legame delle sonde fluorescenti al filamento di DNA che si sta formando;

Le fasi 2 e 3 sono state ripetute per 40 cicli.

Come controllo negativo è stato analizzato, al posto del cDNA, un pari volume di acqua nelle stesse condizioni. Per ogni gene, inoltre, una curva standard è stata allestita mediante amplificazione di una quantità nota del corrispondente cDNA, precedentemente clonato nel vettore pGEM-T (Promega).

Infine, l'espressione di ciascun gene studiato è stata normalizzata all'espressione di un gene controllo endogeno ("*housekeeping*"), ossia il GAPDH (gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi) determinato sempre con metodica TaqMan™. Allo scopo è stata, quindi, allestita una curva standard con concentrazioni note di GAPDH, in diluizioni progressive di 1/10, a partire da 10⁶ fino a 10. La fluorescenza dei campioni ignoti, rapportata a quella dei campioni standard, ha permesso di ottenere il numero di copie per 5 µg di mRNA.

Per garantire significatività statistica, ogni analisi, eseguita in triplicato, è stata condotta in parallelo su culture di osteoblasti umani seminati su tutti i tipi di *scaffold* elettrofilati (solo PCL o PCL/peptide) e come controllo è stato valutato il comportamento delle cellule seminate direttamente su piastra *tissue culture*.

2.3.6 Analisi statistica

I risultati dei saggi biologici *in vitro*, media di tre esperimenti, sono espressi come valori medi \pm deviazione standard. Per valutare la significatività dei valori è stato utilizzato il t-test di *Student*, considerando significativi valori $p \leq 0,05$.

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.3 SINTESI E PURIFICAZIONE DI PEPTIDI

3.3.1 EAK

Sequenza:

PM: 1614,83 Da

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

Sintesi

Il peptide EAK è stato sintetizzato su fase solida con chimica Fmoc, utilizzando un sintetizzatore automatico MultiSynTech GmbH modello Syro-1. Per la sintesi, come supporto solido, sono stati usati 360,0 mg (0,2592 mmoli) di resina Rink Amide MBHA (sostituzione 0,72 mmoli/g), suddivisi in due reattori di circa 180 mg ciascuno (0,1296 mmoli). Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: OtBu per Glu e Boc per Lys.

La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta trattando il peptide in crescita su resina con una soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti, e poi per ulteriori 12 minuti con una soluzione al 20% di piperidina in DMF. La reazione di condensazione o *coupling* è stata realizzata utilizzando ogni volta 5 eq di amminoacido N- α -Fmoc-protetto sciolto in DMF (1 mL), 5 eq di HBTU (1,2 mL di una soluzione 0,5 M HBTU/DMF) e 10 eq di DIPEA (500 μ L di una soluzione 2,5 M di DIPEA in NMP), per 45 minuti a temperatura ambiente.

La resina, dopo deprotezione del gruppo Fmoc, è stata funzionalizzata tramite doppio *coupling* (ossia due condensazioni da 45 minuti ciascuna) con l'amminoacido Fmoc-Lys(Boc)-OH. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%. Le successive quattro reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* singolo, utilizzando ogni volta le condizioni di condensazione prima riportate, mentre le rimanenti undici condensazioni sono state eseguite in *coupling* doppio. Al termine della

sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico e lavaggio con DCM, il peptide protetto su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto.

Sblocco dalla resina

Lo sblocco di tutto il peptide dalla resina, con la concomitante deprotezione delle catene laterali, è stato ottenuto utilizzando una soluzione composta di 95% TFA, 2,5% TES e 2,5% H₂O MilliQ. Si lascia reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Al termine, per filtrazione su gooch G3 si elimina la resina, e la soluzione del peptide è portata a piccolo volume tramite evaporatore rotante. Il peptide si ottiene per precipitazione con etere dietilico freddo e successiva filtrazione su gooch G4; viene seccato, poi sciolto in H₂O MilliQ e liofilizzato. Sono stati ottenuti 455,67 mg di peptide grezzo.

Analisi del grezzo

Una piccola aliquota del peptide grezzo sciolta in acqua prima della liofilizzazione è stata prelevata, diluita con H₂O MilliQ, filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 40 µL; gradiente, dal 9 al 19% di B in 20 minuti; detector, 214 nm (figura 3.1).

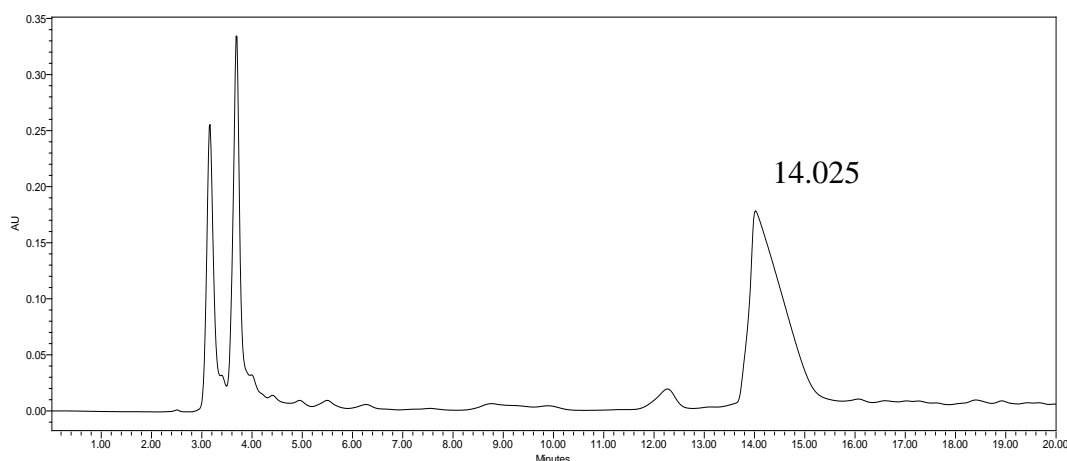


Figura 3.1. Cromatografia analitica del peptide EAK grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 40 µL; gradiente, dal 9 al 19% di B in 20 minuti; detector, 214 nm.

Risultati e Discussione: Sintesi e purificazione di peptidi

Il picco principale a $t_R = 14,025$ minuti è stato raccolto. L'analisi di massa (figura 3.2) condotta sul residuo essiccato ha confermato l'identità del prodotto desiderato (massa teorica: 1614,83 Da; massa sperimentale dopo deconvoluzione: 1614,9 Da).

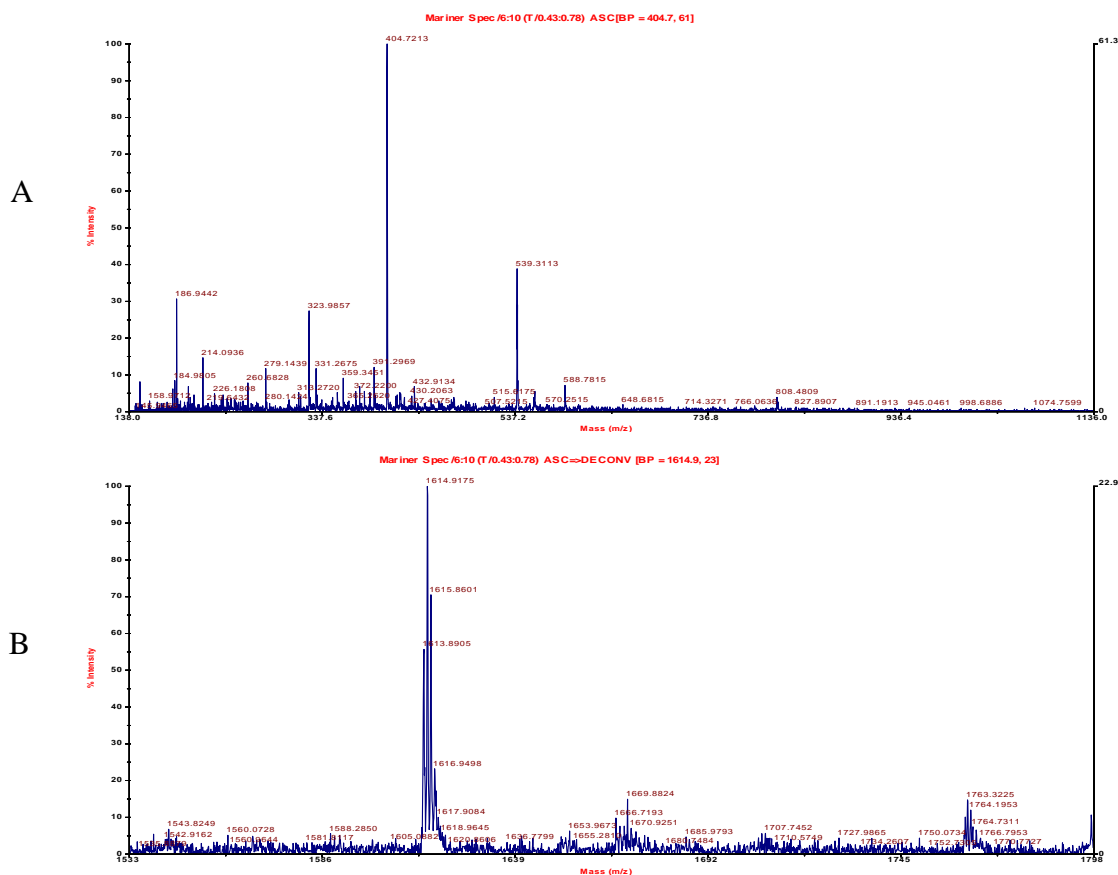


Figura 3.2. (A) Spettro di massa (ESI-TOF) della frazione corrispondente al picco a $t_R = 14,025$ minuti nel cromatogramma riportato in figura 3.1; (B) deconvoluzione dello spettro.

Purificazione

Il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia semipreparativa in RP-HPLC. Circa 30 mg di peptide grezzo per volta sono stati sciolti con 20-25 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semipreparativa nelle seguenti condizioni: colonna, Nova-Pak HR C₁₈ SP (6 μm , 60 \AA , 7,8 \times 300 mm); flusso, 4,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente, dallo 0 al 7% di B in 2 minuti e dal 7 al 17% di B in 40 minuti; detector 214 nm.

Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite cromatografia analitica utilizzando la colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 μm , 300 \AA , 4,6 \times 250 mm) con gradiente dal 9 al 19% di B in 20 minuti, e riunite secondo il loro grado di purezza.

Caratterizzazione

La caratterizzazione della frazione migliore del peptide purificato è stata eseguita tramite:

- cromatografia analitica in fase inversa, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dal 9 al 19% di B in 20 minuti; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza pari al 99,0% (figura 3.3).

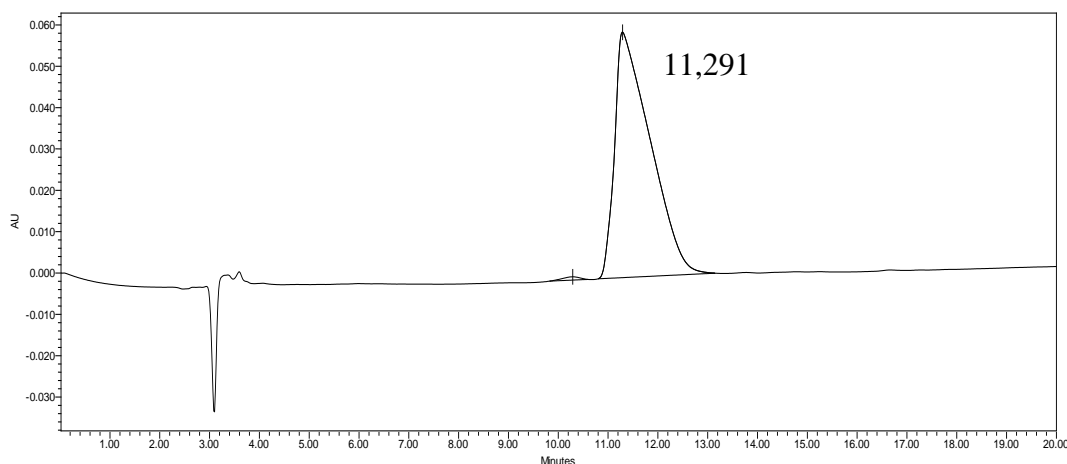


Figura 3.3. Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide EAK condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dal 9 al 19% di B in 20 minuti; detector, 214 nm.

- spettrometria di massa eseguita con uno strumento ESI-TOF: l'analisi ha fornito un valore di massa pari a 1614,8 Da in seguito a deconvoluzione dello spettro (figura 3.4).

Risultati e Discussione: Sintesi e purificazione di peptidi

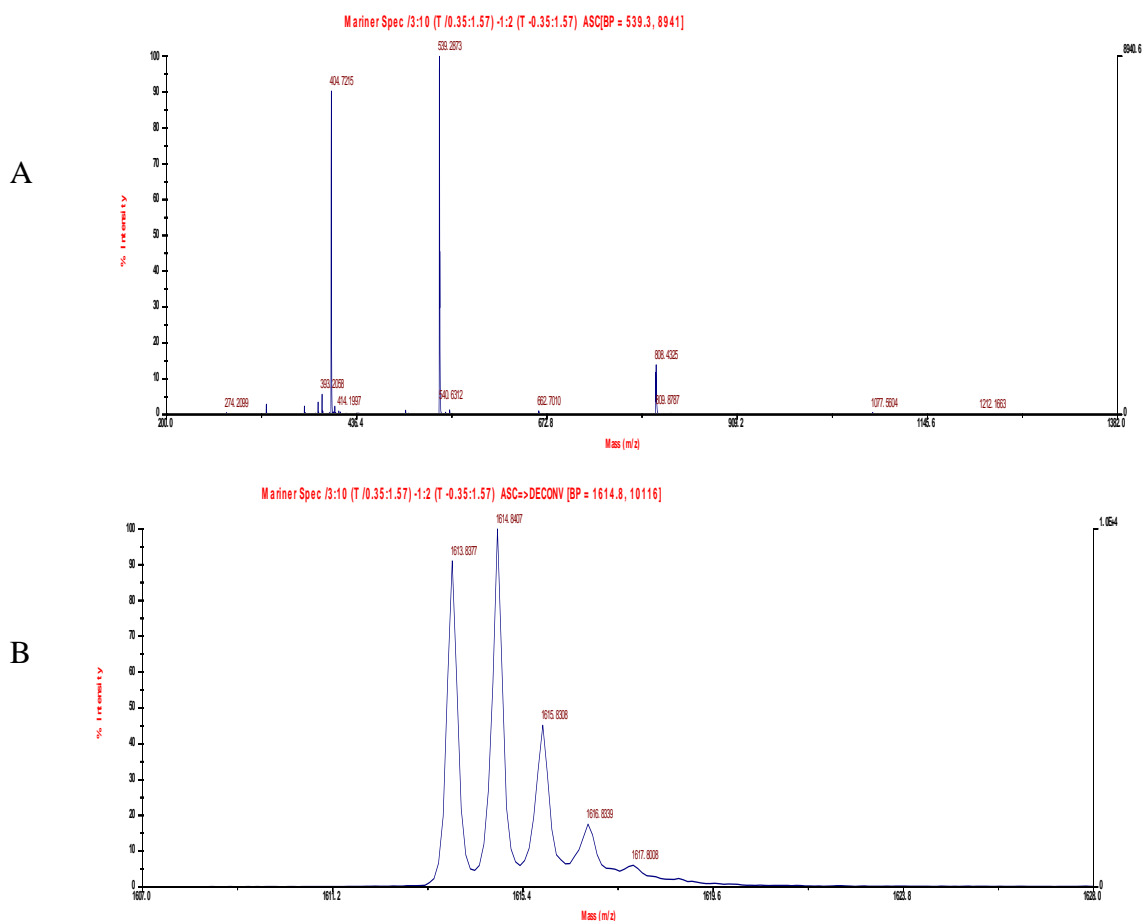


Figura 3.4. (A) Spettro di massa (ESI-TOF) della frazione migliore del peptide EAK; (B) deconvoluzione dello spettro.

3.3.2 RGD-EAK

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

Sintesi

Il peptide RGD-EAK è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, utilizzando un sintetizzatore automatico Applied Biosystems modello 431A e, come supporto solido la resina Rink Amide MBHA (sostituzione 0,66 mmoli/g). Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: OtBu per Asp e Glu, Pmc per Arg e Boc per Lys. 386,1 mg di resina Rink Amide MBHA (0,2549 mmoli) sono stati funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 1 mmole di Fmoc-Lys(Boc)-OH (4 eq). La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta per trattamento del peptide in crescita

Risultati e Discussione: Sintesi e purificazione di peptidi

su resina con una soluzione al 20% piperidina in NMP per 3 minuti. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -Fmoc-protetto è stata ottenuta, dopo dissoluzione dell'amminoacido (4 eq) con 2,1 mL di NMP, tramite aggiunta di 2,2 mL di soluzione 0,45 M HBTU/HOBt in DMF (4 eq) e 0,32 mL di DIEA (8 eq); ogni reazione di *coupling* ha richiesto 25 minuti circa. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%. Sono state, quindi, eseguite quattro reazioni di condensazione in *coupling* singolo, utilizzando 1 mmole di amminoacido N- α -Fmoc-protetto, e tutte le rimanenti condensazioni in *coupling* doppio.

Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico e lavaggio con DCM, il peptide su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto.

Sblocco dalla resina

Tutto il peptide protetto su resina è stato trattato con la seguente miscela di sblocco: 9,5 mL di TFA, 0,25 mL di TES e 0,25 mL di H₂O MilliQ.

Si lascia reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente sotto blanda agitazione meccanica. Al termine, per filtrazione su gooch G3 si elimina la resina, e la soluzione del peptide viene portata a piccolo volume con evaporatore rotante. Il peptide si ottiene per precipitazione con etere dietilico freddo e successiva filtrazione con gooch G4; viene seccato, poi sciolto in H₂O MilliQ e liofilizzato. Sono stati ottenuti 475,19 mg di peptide grezzo.

Analisi del grezzo

1,48 mg di peptide grezzo sono stati sciolti con 1480 μ L di H₂O MilliQ; la soluzione così ottenuta è stata filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 μ m, 300 Å, 4,6 \times 250 mm); flusso, 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 10 μ L; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 minuti; detector, 214 nm (figura 3.5).

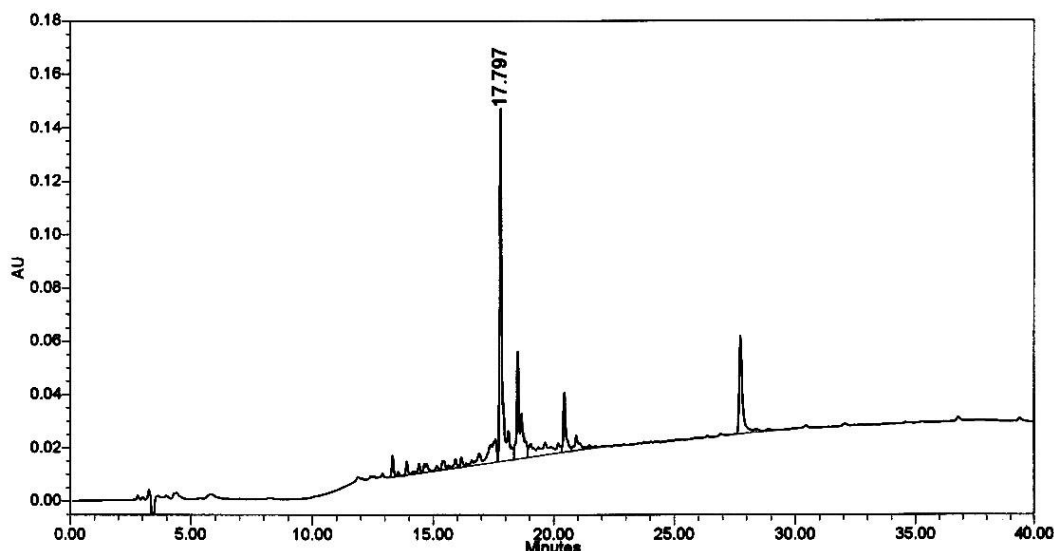


Figura 3.5. Cromatografia analitica in RP-HPLC del peptide RGD-EAK grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 μ m, 300 \AA , 4,6 \times 250 mm); flusso, 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente, dallo 0 all'80% di B in 40 minuti; detector, 214 nm.

Per poter usufruire di un campione del picco principale da caratterizzare tramite analisi di massa, 200 μ L di soluzione di grezzo sono stati eluiti in colonna analitica nelle medesime condizioni della corsa da 40 minuti fatta in precedenza.

L'analisi di massa ha confermato che il picco principale che si vede in figura 3.5 con t_R = 17,797 minuti coincide con il peptide desiderato (figura 3.6).

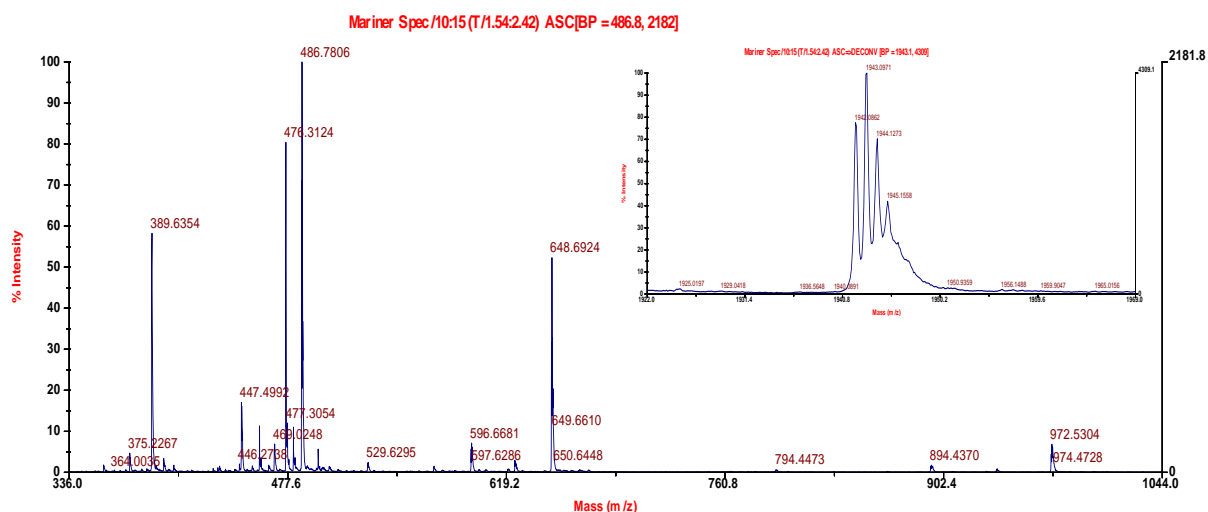


Figura 3.6. Analisi di massa della frazione contenente il picco principale che si vede in figura 3.5 con t_R = 17,797 minuti eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

Purificazione

Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia semipreparativa in RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 5-10 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semipreparativa nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ 238TP510 (5 µm, 300 Å, 10 × 250 mm); flusso, 4,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente, dallo 0 al 10% di B in 2 minuti e dal 10 al 15% di B in 20 minuti; detector, 214 nm.

Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso, 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dal 12 al 22% di B in 20 minuti; detector, 214 nm.

Le frazioni con grado di purezza inferiore al 98% sono state riunite e ulteriormente purificate tramite un nuovo passaggio in colonna semipreparativa.

Caratterizzazione

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso, 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 12 al 22% di B in 20 minuti; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 99,78% (figura 3.7);
- spettrometria di massa eseguita con uno strumento ESI-TOF. L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 1943,0 Da in seguito a deconvoluzione dello spettro (figura 3.8).

Risultati e Discussione: Sintesi e purificazione di peptidi

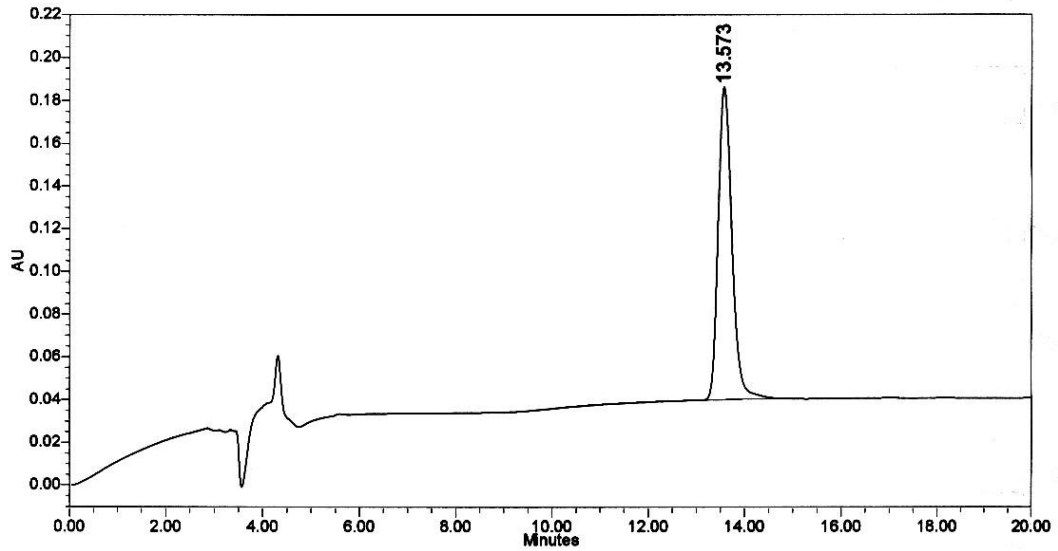


Figura 3.7. Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide RGD-EAK condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 μ m, 300 \AA , 4,6 \times 250 mm); flusso, 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 12 al 22% di B in 20 minuti; detector, 214 nm.

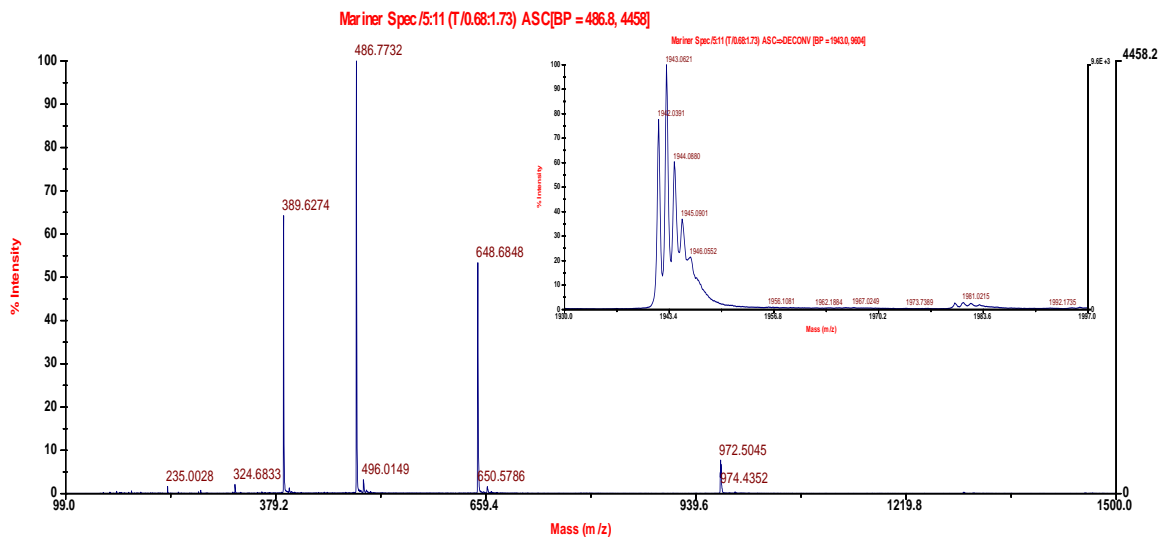


Figura 3.8. Analisi di massa della frazione migliore del peptide RGD-EAK eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

3.3.3 RGD-EAK sc

Sequenza:

PM: 1943,16 Da

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

Sintesi

Il peptide RGD-EAK sc è stato sintetizzato su fase solida con chimica Fmoc, utilizzando un sintetizzatore automatico MultiSynTech GmbH modello Syro-1. Si è scelto di utilizzare come supporto solido la resina Rink Amide MBHA (sostituzione 0,72 mmoli/g) e i seguenti gruppi a protezione delle catene laterali: OtBu per Asp e Glu, Pmc per Arg e Boc per Lys.

180 mg di resina Rink Amide MBHA (0,1296 mmoli) sono stati trasferiti in un reattore, deprotetti dal gruppo Fmoc e funzionalizzati tramite doppio *coupling* utilizzando ogni volta 5 eq di Fmoc-Lys(Boc)-OH. La resa della reazione è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil) piperidina, che assorbe a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%.

Si è continuata la sintesi effettuando dei *coupling* singoli per i successivi quattro amminoacidi, e tutti *coupling* doppi per i restanti amminoacidi; ogni condensazione ha una durata di circa 45 minuti. La condensazione è stata ottenuta trattando l'amminoacido N- α -Fmoc protetto (5 eq) sciolto in 1 mL di DMF con 1,2 mL di soluzione 0,5 M HBTU in DMF (5 eq) e 0,5 mL di DIEA 2,5 M in NMP (10 eq); mentre la rimozione del gruppo Fmoc, protettore della funzione N- α -amminica di ciascun residuo, è stata ottenuta trattando il peptide in crescita su resina con una soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti, e poi per ulteriori 12 minuti con una soluzione al 20% di piperidina in DMF.

Al termine della sintesi, il peptide protetto su resina, privato del gruppo Fmoc N-terminale, è stato lavato con DCM e seccato sotto vuoto per 2 ore.

Sblocco dalla resina

Tutto il peptide protetto su resina, posto in un pallone, è stato trattato con una soluzione così costituita: 95% TFA, 2,5% TES e 2,5% di H₂O MilliQ.

Si lascia reagire la miscela di sblocco per 2 ore, a temperatura ambiente, e sotto agitazione magnetica. Quindi, per filtrazione su gooch G3 si elimina la resina, e la

soluzione del peptide è portata a piccolo volume con evaporatore rotante. Il peptide si ottiene per precipitazione con etere dietilico freddo e successiva filtrazione su gooch G4; viene seccato, poi sciolto con H₂O MilliQ e liofilizzato. Sono stati ottenuti 253,01 mg di prodotto grezzo.

Analisi del grezzo

Una piccola aliquota del peptide grezzo sciolta in acqua prima della liofilizzazione è stata prelevata, diluita con H₂O MilliQ, filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 100 µL; gradiente, dal 10 al 25% di B in 30 minuti e 80% di B per 10 minuti; detector, 214 nm (figura 3.9).

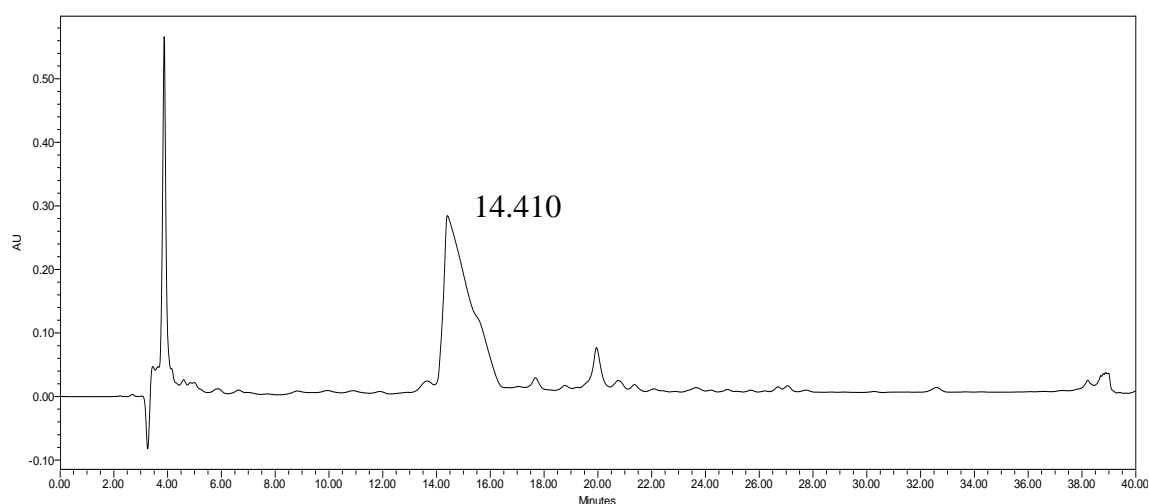


Figura 3.9. Cromatografia analitica del peptide RGD-EAK sc grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 100 µL; gradiente, dal 10 al 25% di B in 30 minuti e 80% di B per 10 minuti; detector, 214 nm.

L'analisi di massa (figura 3.10) condotta sul residuo essiccato del picco a $t_R = 14,410$ minuti ha confermato l'identità del prodotto desiderato (massa teorica: 1943,16 Da; massa sperimentale dopo deconvoluzione: 1943,0 Da).

Risultati e Discussione: Sintesi e purificazione di peptidi

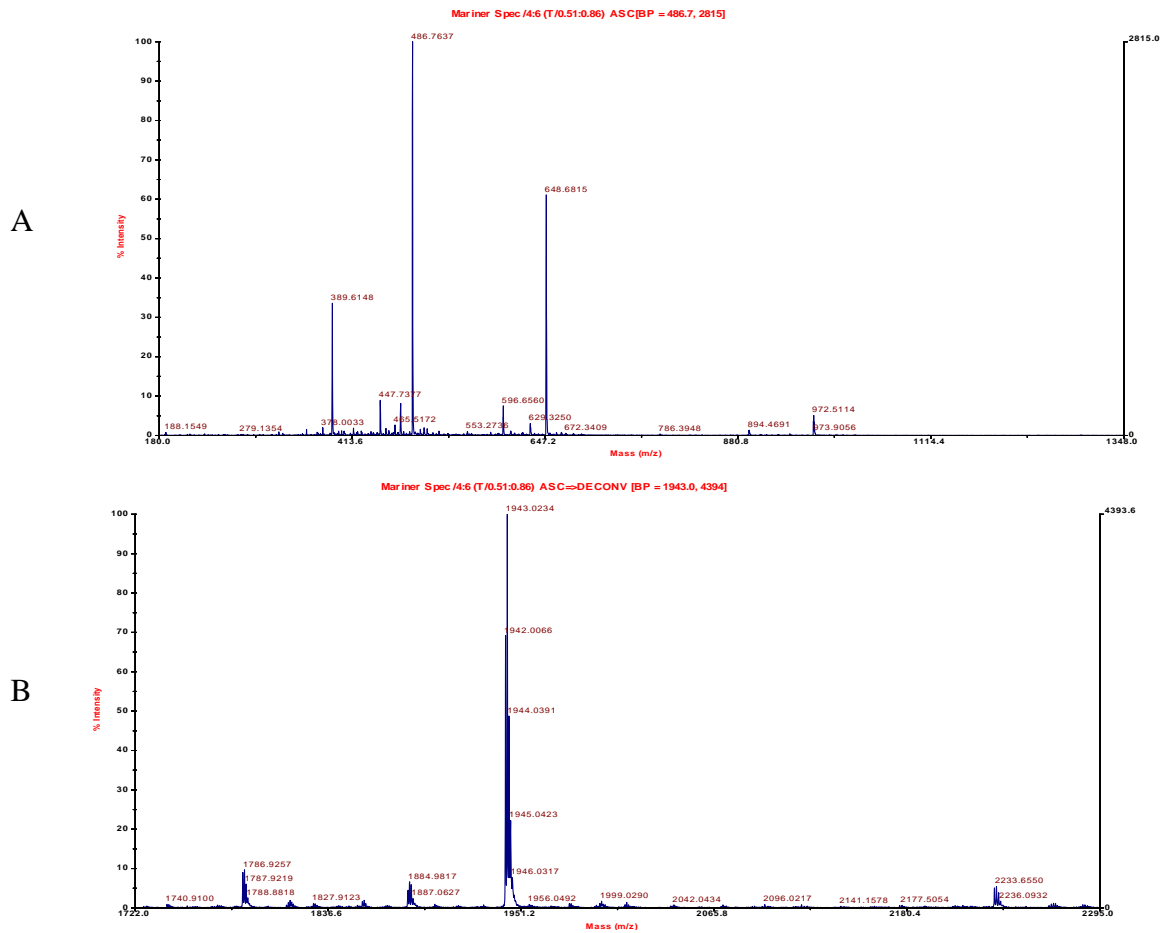


Figura 3.10. (A) Spettro di massa (ESI-TOF) della frazione corrispondente al picco a $t_R = 14,410$ minuti nel cromatogramma riportato in figura 3.9; (B) deconvoluzione dello spettro.

Purificazione

Tutto il peptide grezzo è stato purificato tramite cromatografia RP-HPLC. Circa 25 mg di grezzo per volta sono stati sciolti con 15-20 mL di eluente A, filtrati e passati in colonna semipreparativa nelle seguenti condizioni: colonna Nova-Pak HR C₁₈ SP (6 μm , 60 \AA , 7,8 \times 300 mm); flusso, 4,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente, dallo 0 al 5% di B in 1 minuto, 5% di B per 16 minuti e dal 5 al 14% di B in 32 minuti; detector, 214 nm.

Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite corse analitiche nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 μm , 100 \AA , 4,6 \times 250 mm); flusso, 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 20 μL ; gradiente, dal 10 al 20% di B in 20 minuti; detector, 214 nm.

Caratterizzazione

La caratterizzazione della frazione migliore del peptide purificato è stata eseguita tramite:

- cromatografia analitica in fase inversa, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 15 µL; gradiente, dal 10 al 20% di B in 20 minuti; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza pari al 99,14% (figura 3.11).

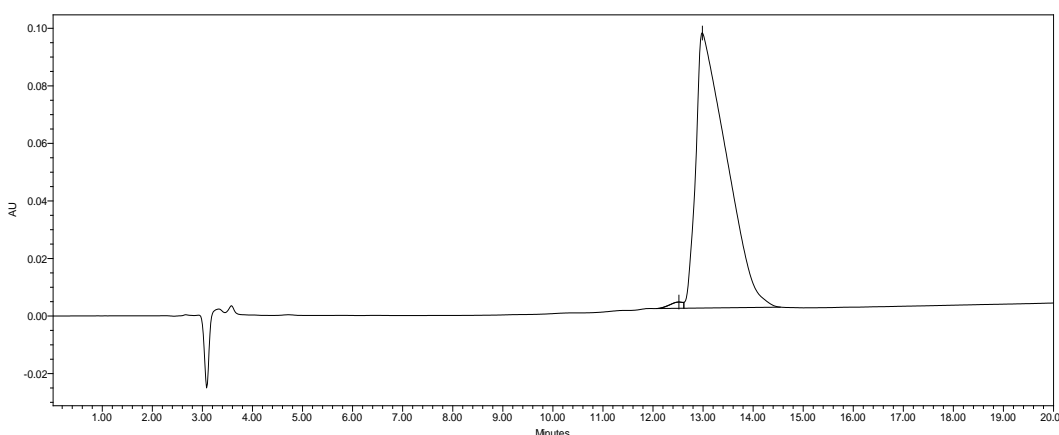


Figura 3.11. Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide RGD-EAK condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 15 µL; gradiente, dal 10 al 20% di B in 20 minuti; detector, 214 nm.

3.3.4 DAK

Sequenza:

PM: 1558,72 Da

H-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Lys-Ala-Lys-NH₂

Sintesi

Il peptide DAK è stato sintetizzato su fase solida con chimica Fmoc, tramite un sintetizzatore automatico MultiSynTech GmbH modello Syro-1. Sono stati usati 180,0 mg di resina Rink Amide MBHA (sostituzione 0,72 mmoli/g, per un totale di 0,1296 mmoli di gruppi funzionali) in un solo reattore. A protezione delle catene laterali sono stati scelti i seguenti gruppi protettori: OtBu per Asp e Boc per Lys.

Risultati e Discussione: Sintesi e purificazione di peptidi

La resina, dopo deprotezione del gruppo Fmoc, è stata funzionalizzata tramite doppio *coupling* (ossia due condensazioni da 45 minuti ciascuna) con l'amminoacido Fmoc-Lys(Boc)-OH. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%. Le successive quattro inserzioni sono state eseguite in *coupling* singolo utilizzando ogni volta le condizioni di condensazione prima riportate, mentre le rimanenti undici in *coupling* doppio. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta trattando il peptide in crescita su resina con una soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti, e poi per ulteriori 12 minuti con una soluzione al 20% di piperidina in DMF. La reazione di condensazione o *coupling* è stata realizzata utilizzando ogni volta 5 eq di amminoacido N- α -Fmoc-protetto sciolto in DMF (1 mL), 5 eq di HBTU (1,2 mL di una soluzione 0,5 M HBTU/DMF) e 10 eq di DIPEA (500 μ L di una soluzione 2,5 M di DIPEA in NMP), per 45 minuti a temperatura ambiente.

Al termine della sintesi il peptide protetto su resina, privo del gruppo Fmoc N-terminale è stato lavato con DCM e seccato sotto vuoto per 2 ore.

Sblocco dalla resina

Tutto il peptide protetto su resina è stato trattato con una miscela di sblocco composta di 95% TFA, 2,5% TES e 2,5% H₂O MilliQ, che permette la concomitante deprotezione da resina e gruppi protettori in catena laterale. Si lascia reagire per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente sotto blanda agitazione magnetica. Al termine, per filtrazione su gooch G3 si elimina la resina, e la soluzione del peptide è concentrata a piccolo volume tramite evaporatore rotante. Il peptide si ottiene per precipitazione con etere dietilico freddo e successiva filtrazione su gooch G4; viene seccato, poi sciolto in H₂O MilliQ e liofilizzato. Sono stati ottenuti 251,73 mg di peptide grezzo.

Analisi del grezzo

Parte della soluzione di grezzo preparata per la purificazione del prodotto, è stata filtrata ed utilizzata per una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 μ m, 300 Å, 4,6 \times 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 30 μ L; gradiente, dal 4 al 14% di B in 20 minuti; detector, 214 nm (figura 3.12).

Risultati e Discussione: Sintesi e purificazione di peptidi

L'analisi di massa (figura 3.13) effettuata sul campione essiccato, ha confermato l'identità del prodotto desiderato (massa teorica: 1558,72 Da; massa sperimentale dopo deconvoluzione: 1558,8 Da).

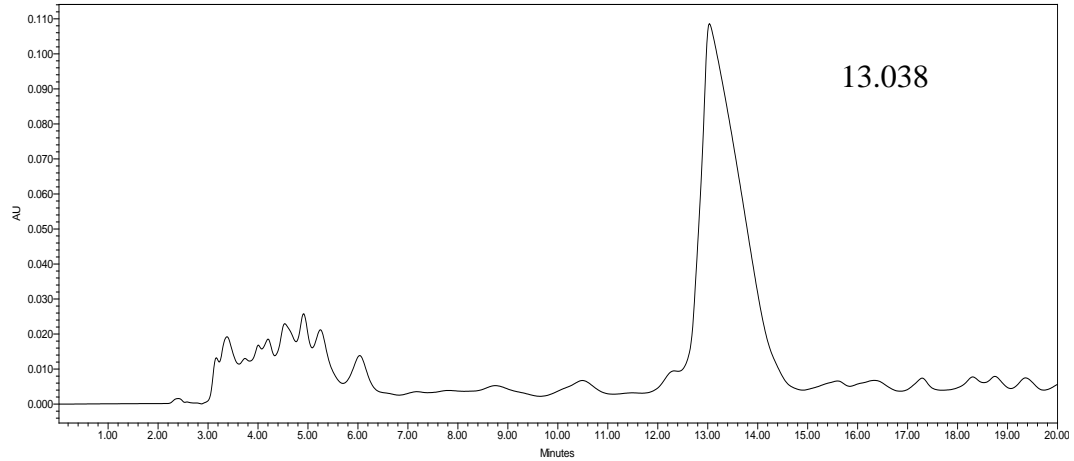


Figura 3.12. Cromatografia analitica del peptide DAK grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 μ m, 300 \AA , 4,6 \times 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 30 μ L; gradiente, dal 4 al 14% di B in 20 minuti; detector, 214 nm.

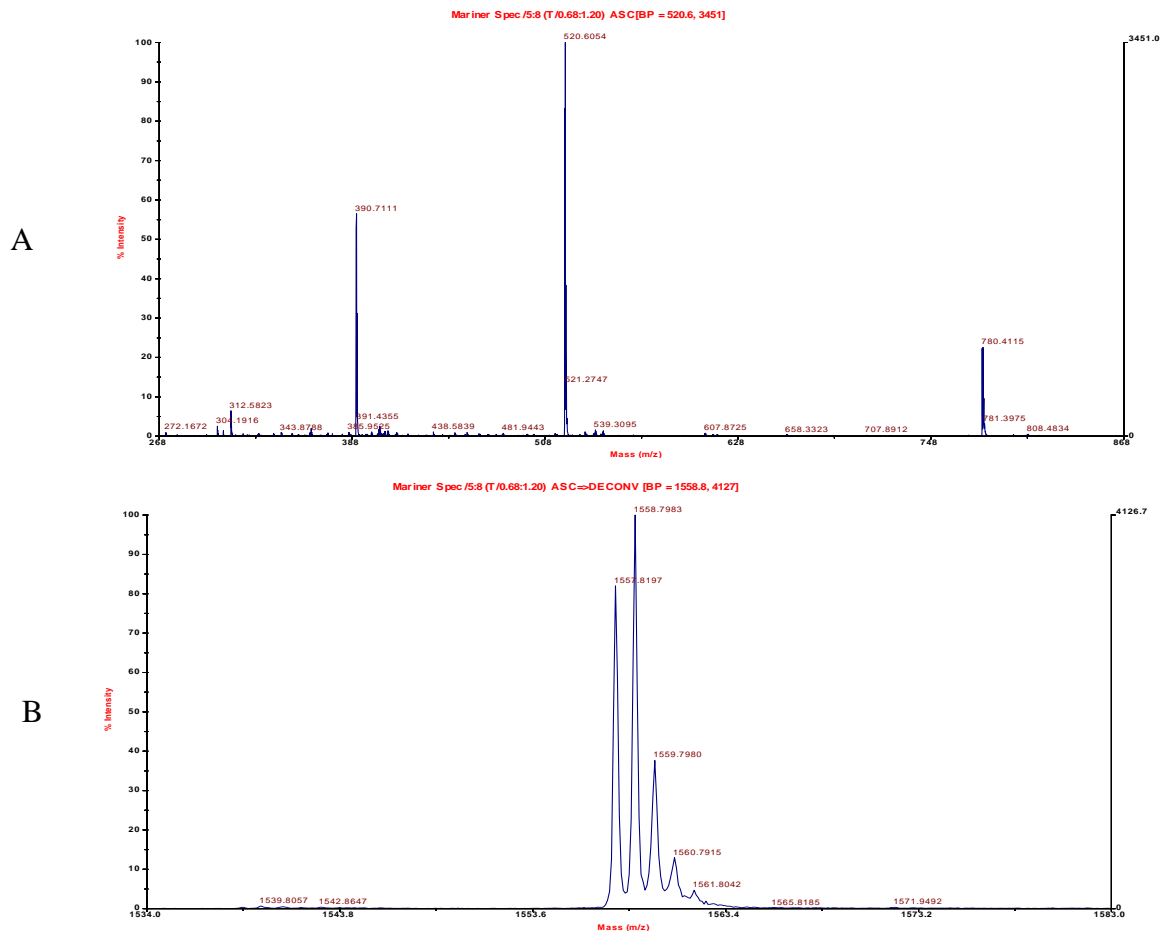


Figura 3.13. (A) Spettro di massa (ESI-TOF) della frazione corrispondente al picco a $t_R = 13,038$ minuti nel cromatogramma riportato in figura 3.12; (B) deconvoluzione dello spettro.

Purificazione

Sono stati purificati 144,74 mg di prodotto grezzo tramite cromatografia semipreparativa in RP-HPLC. Circa 30 mg di peptide grezzo per volta sono stati sciolti con 20-25 mL di eluente A, filtrati e purificati in colonna semipreparativa nelle seguenti condizioni: colonna, Nova-Pak HR C₁₈ SP (6 µm, 60 Å, 7,8 × 300 mm); flusso, 4,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente, dallo 0 al 3% di B in 1 minuto, 3% di B per 10 minuti e dal 3 all'11% di B in 32 minuti; detector 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite cromatografia analitica utilizzando la colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm) con gradiente dal 4 al 14% di B in 20 minuti, e riunite secondo il loro grado di purezza.

Caratterizzazione

La caratterizzazione della frazione migliore del peptide purificato è stata eseguita tramite:

- cromatografia analitica in fase inversa, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 10 µL; gradiente, dal 4 al 14% di B in 20 minuti; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza pari al 99,42% (figura 3.14).

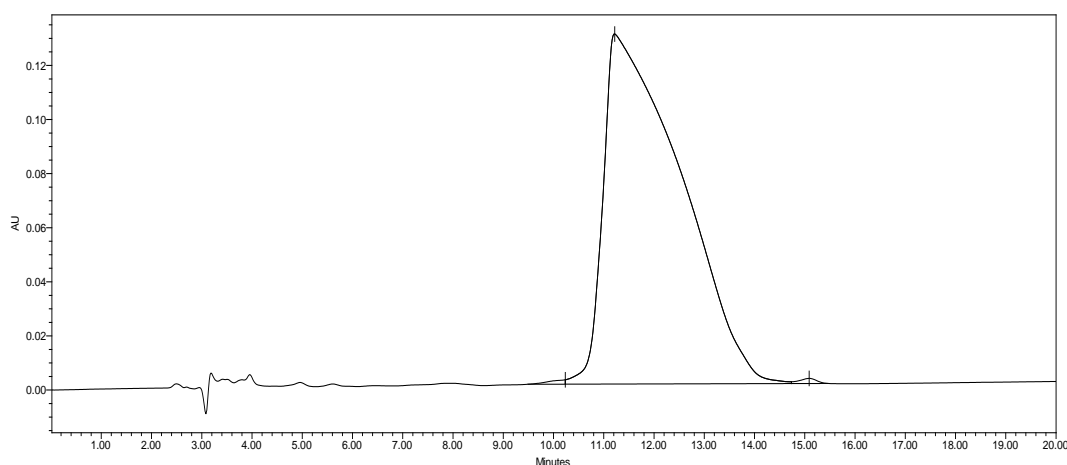


Figura 3.14. Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide DAK condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 10 µL; gradiente, dal 4 al 14% di B in 20 minuti; detector, 214 nm.

3.3.5 EAbuK

Sequenza:

PM: 1727,05 Da

H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-NH₂

Sintesi

Il peptide EAbuK è stato ottenuto tramite SPPS con chimica Fmoc, mediante un sintetizzatore automatico MultiSynTech GmbH modello Syro-1. Per la sintesi, come supporto solido sono stati impiegati 180,0 mg (pari a 0,1296 mmoli) di resina Rink Amide MBHA (sostituzione 0,72 mmoli/g), in un unico reattore.

Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: OtBu per Glu e Boc per Lys.

La resina, dopo deprotezione del gruppo Fmoc, è stata funzionalizzata tramite doppio *coupling* con l'amminoacido Fmoc-Lys(Boc)-OH. La resa della reazione è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil) piperidina, che assorbe a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%.

Si è continuata la sintesi effettuando dei *coupling* singoli per i successivi quattro amminoacidi, e tutti *coupling* doppi per i restanti amminoacidi; ogni condensazione ha una durata di circa 45 minuti.

La condensazione è stata ottenuta trattando l'amminoacido N- α -Fmoc protetto (5 eq) sciolto in 1 mL di DMF con 1,2 mL di soluzione 0,5 M HBTU in DMF (5 eq) e 0,5 mL di DIEA 2,5 M in NMP (10 eq); mentre la rimozione del gruppo Fmoc, protettore della funzione N- α -amminica di ciascun residuo, è stata ottenuta trattando il peptide in crescita su resina con una soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti, e poi per ulteriori 12 minuti con una soluzione al 20% di piperidina in DMF.

Al termine della sintesi, il peptide protetto su resina, privato del gruppo Fmoc N-terminale, è stato lavato con DCM e seccato sotto vuoto per 2 ore.

Sblocco dalla resina

Al peptide protetto su resina è stata addizionata una miscela di sblocco costituita da 95% TFA, 2,5% TES e 2,5% H₂O MilliQ. Si lascia reagire per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente sotto blanda agitazione magnetica. Al termine, per filtrazione su gooch G3 si elimina la resina, e la soluzione del peptide è portata a piccolo volume tramite evaporatore rotante.

Il peptide si ottiene per precipitazione con etere dietilico freddo e successiva filtrazione su gooch G4; viene seccato, poi sciolto in H₂O MilliQ e liofilizzato. Sono stati ottenuti 198,66 mg di peptide grezzo.

Analisi del grezzo

Una piccola aliquota del peptide grezzo sciolta in acqua prima della liofilizzazione è stata prelevata, diluita con H₂O MilliQ, filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 50 µL; gradiente, dal 12 al 27% di B in 30 minuti; detector, 214 nm (figura 3.15).

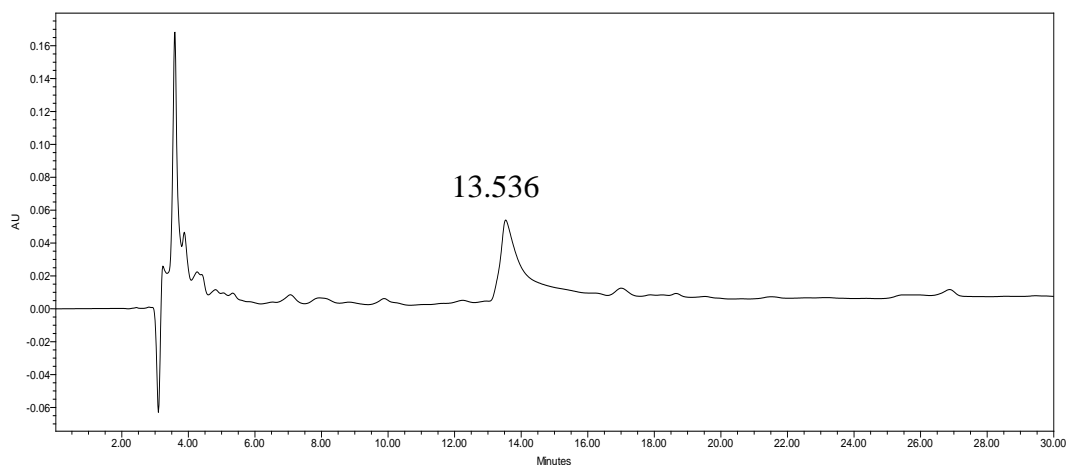


Figura 3.15. Cromatografia analitica del peptide EAbuK grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 50 µL; gradiente, dal 12 al 27% di B in 30 minuti; detector, 214 nm.

Il picco principale a $t_R = 13,536$ minuti è stato raccolto. L'analisi di massa (figura 3.16) condotta su un campione dello stesso ha confermato l'identità del prodotto desiderato (massa teorica: 1727,05 Da; massa sperimentale dopo deconvoluzione: 1726,9 Da).

Risultati e Discussione: Sintesi e purificazione di peptidi

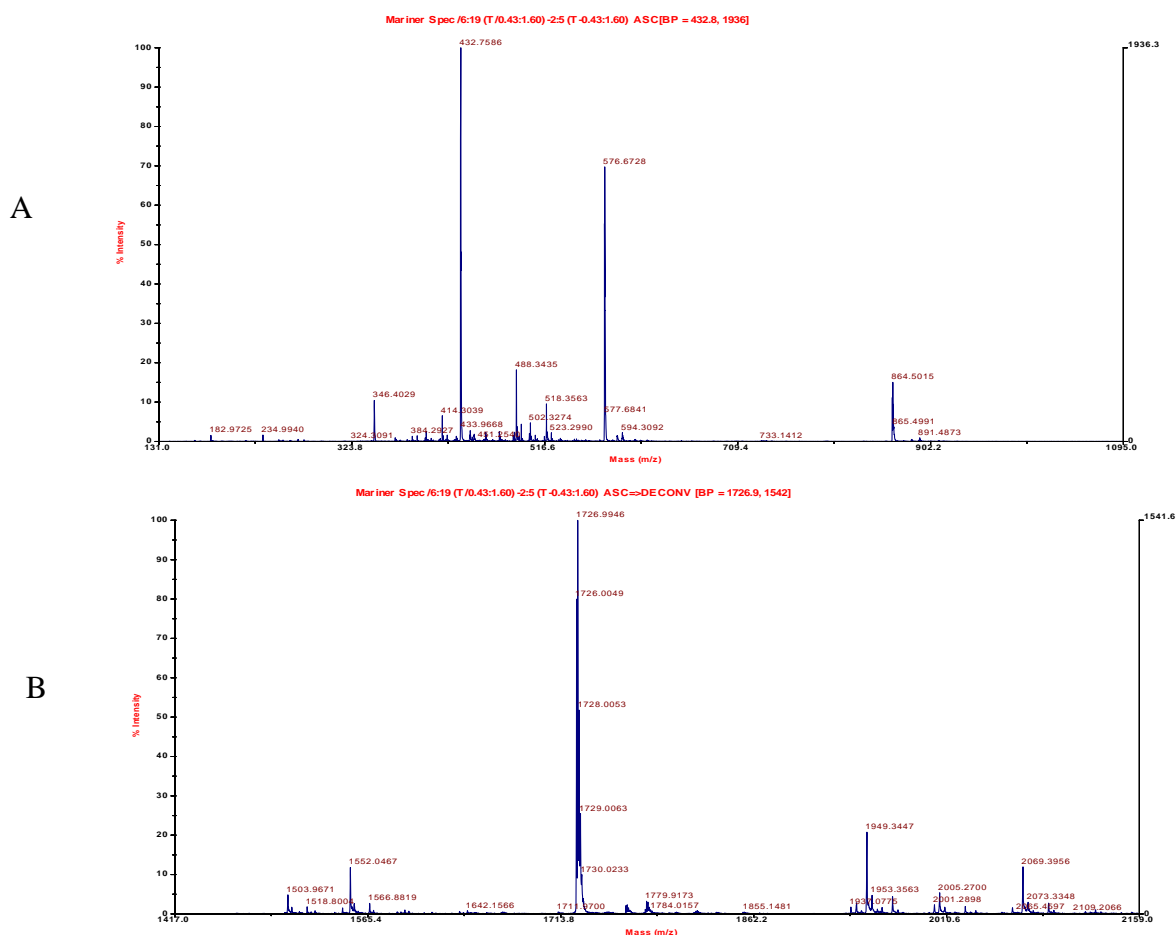


Figura 3.16. (A) Spettro di massa (ESI-TOF) della frazione corrispondente al picco a $t_R = 13,536$ minuti nel cromatogramma riportato in figura 3.15; (B) deconvoluzione dello spettro.

Purificazione

Tutto il peptide grezzo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia semipreparativa in fase inversa. Circa 20 mg di peptide grezzo per volta sono stati sciolti con 20 mL di eluente A, filtrati e caricati in colonna semipreparativa nelle seguenti condizioni: colonna, Vydac C₁₈ 238TP510 (5 μm , 300 \AA , 10 \times 250 mm); flusso, 4,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente, dallo 0 al 10% di B in 2 minuti e dal 10 al 50% di B in 40 minuti; detector 214 nm. Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite cromatografia analitica utilizzando la colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 μm , 300 \AA , 4,6 \times 250 mm) con gradiente dal 12 al 22% di B in 20 minuti, e riunite secondo il loro grado di purezza.

Caratterizzazione

La caratterizzazione della frazione migliore del prodotto purificato è stata effettuata tramite le seguenti tecniche:

Risultati e Discussione: Sintesi e purificazione di peptidi

- cromatografia analitica in fase inversa eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Luna C₁₈ analitica (5 µm, 100 Å, 4,6 × 250 mm); flusso, 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 minuti; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza del 98,79% (figura 3.17);
- spettrometria di massa eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220). L'analisi ha fornito un valore di massa pari a 1727,0 Da in seguito a deconvoluzione dello spettro (figura 3.18).

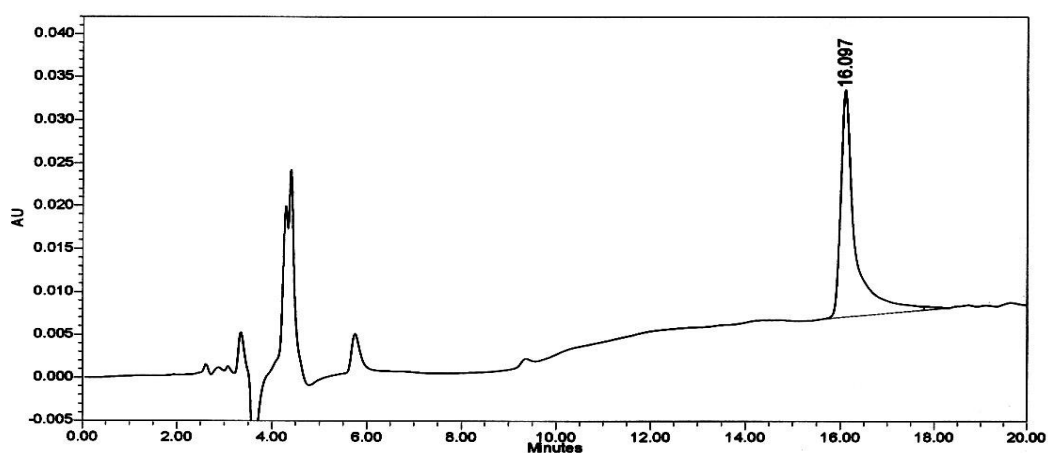


Figura 3.17. Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide EAbuK purificato condotta nelle seguenti condizioni: colonna Luna C₁₈ analitica (5 µm, 100 Å, 4,6 × 250 mm); flusso, 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente, dal 13 al 23% di B in 20 minuti; detector, 214 nm.

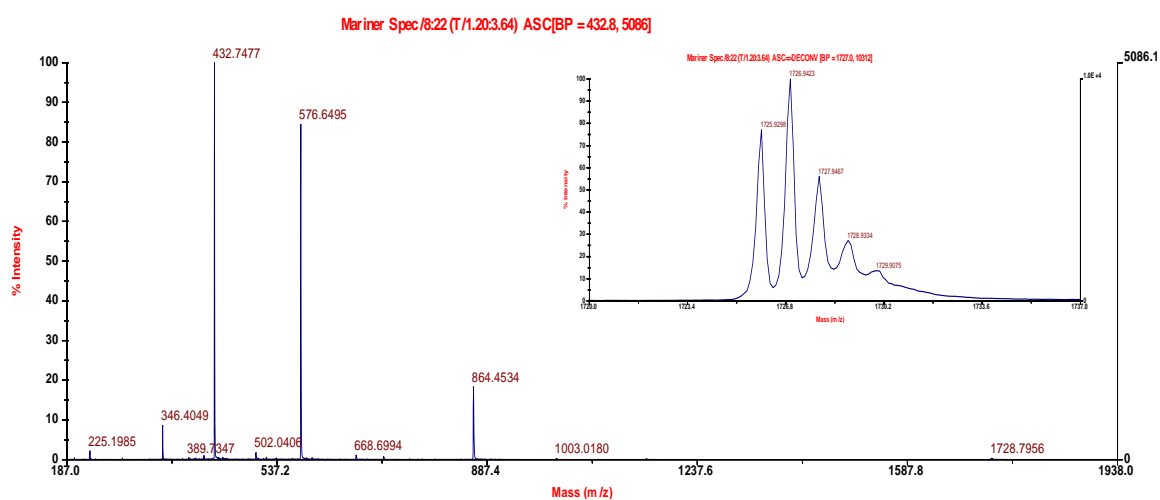


Figura 3.18. Analisi di massa della frazione migliore del peptide EAbuK purificato eseguita con uno strumento ESI-TOF (Applied Biosystems Mariner System 5220); nel riquadro è riportata la deconvoluzione dello spettro.

3.3.6 EYK

Sequenza:

PM: 2351,62 Da

H-Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-NH₂

Sintesi

Il peptide EYK è stato sintetizzato su fase solida con chimica Fmoc, utilizzando un sintetizzatore automatico MultiSynTech GmbH modello Syro-1. Per la sintesi, come supporto solido, sono stati usati 360,0 mg (0,2592 mmoli) di resina Rink Amide MBHA (sostituzione 0,72 mmoli/g), suddivisi in due reattori di circa 180 mg ciascuno (0,1296 mmoli). Sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori in catena laterale: tBu per Tyr, OtBu per Glu e Boc per Lys.

La deprotezione del gruppo Fmoc è stata ottenuta trattando il peptide in crescita su resina con una soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti, e poi per ulteriori 12 minuti con una soluzione al 20% di piperidina in DMF. La reazione di condensazione o *coupling* è stata realizzata utilizzando ogni volta 5 eq di amminoacido N- α -Fmoc-protetto sciolto in DMF (1 mL), 5 eq di una soluzione 0,5 M HBTU/DMF (1,2 mL) e 10 eq di una soluzione 2,5 M di DIPEA in NMP (500 μ L), per 45 minuti.

La resina, dopo deprotezione del gruppo Fmoc, è stata funzionalizzata tramite doppio *coupling* (ossia due condensazioni da 45 minuti ciascuna) con l'amminoacido Fmoc-Lys(Boc)-OH. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite quantificazione spettrofotometrica del derivato solubile N-(9-fluorenilmetil)piperidina, con lettura di assorbanza a 301 nm, ed è risultata essere pari al 100%. Le successive quattro reazioni di condensazione sono state eseguite in *coupling* singolo utilizzando ogni volta le condizioni di condensazione prima riportate, mentre le rimanenti undici in *coupling* doppio. Al termine della sintesi, dopo deprotezione del terminale amminico e lavaggio con DCM, il peptide protetto su resina è stato seccato per 2 ore sotto vuoto.

Sblocco dalla resina

Lo sblocco di tutto il peptide dalla resina, e la concomitante deprotezione delle catene laterali, sono stati ottenuti utilizzando una soluzione composta di 95% TFA, 2,5% TES, 2,5% H₂O MilliQ e qualche cristallo di fenolo. Si lascia reagire la miscela di sblocco per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente sotto blanda agitazione magnetica. Al

termine, per filtrazione su gooch G3 si elimina la resina, e la soluzione del peptide è concentrata a piccolo volume tramite evaporatore rotante. Il peptide si ottiene per precipitazione con etere dietilico freddo e successiva filtrazione su gooch G4; viene seccato, poi sciolto in H₂O MilliQ e liofilizzato. Sono stati ottenuti 545,34 mg di peptide grezzo.

Analisi del grezzo

Una piccola aliquota del peptide grezzo sciolta in acqua prima della liofilizzazione è stata prelevata, diluita con H₂O MilliQ, filtrata ed utilizzata per eseguire una corsa analitica in RP-HPLC nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 100 µL; gradiente, dal 16 al 31% di B in 30 minuti e poi 80% B per 10 minuti; detector, 214 nm (figura 3.19).

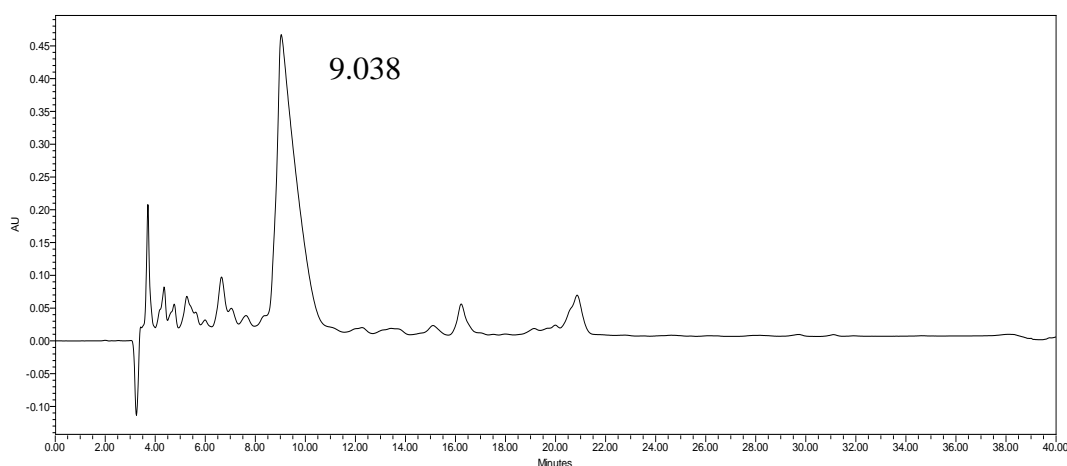


Figura 3.19. Cromatografia analitica del peptide EYK grezzo condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 100 µL; gradiente, dal 16 al 31% di B in 30 minuti e poi 80% B per 10 minuti; detector, 214 nm.

L'analisi di massa (figura 3.20) condotta sul residuo essiccato del picco a $t_R = 9,038$ minuti ha confermato l'identità del prodotto desiderato (massa teorica: 2351,62 Da; massa sperimentale dopo deconvoluzione: 2351,1 Da).

Risultati e Discussione: Sintesi e purificazione di peptidi

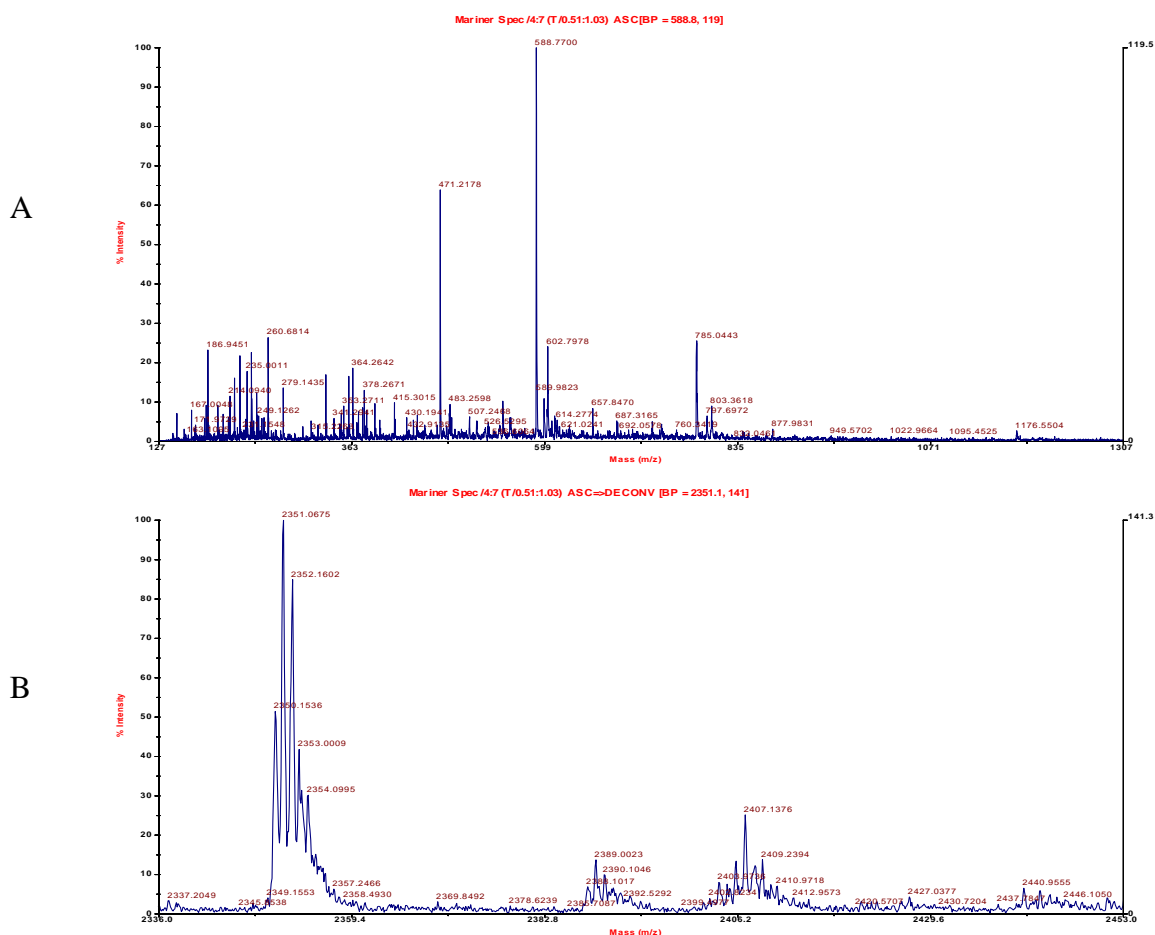


Figura 3.20. (A) Spettro di massa (ESI-TOF) della frazione corrispondente al picco a $t_R = 9,038$ minuti nel cromatogramma riportato in figura 3.19; (B) deconvoluzione dello spettro.

Purificazione

Sono stati purificati 92,01 mg di peptide grezzo. Circa 30 mg di prodotto grezzo per volta sono stati sciolti in circa 25 mL di eluente A, filtrati e purificati tramite cromatografia semipreparativa in RP-HPLC, nelle seguenti condizioni: colonna, Nova-Pak HR C₁₈ SP (6 μm , 60 \AA , 7,8 \times 300 mm); flusso, 4,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente, dallo 0 al 10% di B in 2 minuti e dal 10 al 20% di B in 40 minuti; detector 214 nm.

Le varie frazioni raccolte sono state analizzate tramite cromatografia analitica utilizzando la colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 μm , 300 \AA , 4,6 \times 250 mm) con gradiente dal 15 al 25% di B in 20 minuti, e riunite secondo il loro grado di purezza.

Caratterizzazione

La caratterizzazione della frazione migliore del peptide purificato è stata eseguita tramite:

- cromatografia analitica in fase inversa, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dall'11 al 23% di B in 24 minuti; detector, 214 nm. L'integrazione del tracciato cromatografico ha fornito un valore di purezza pari al 99,51% (figura 3.21).

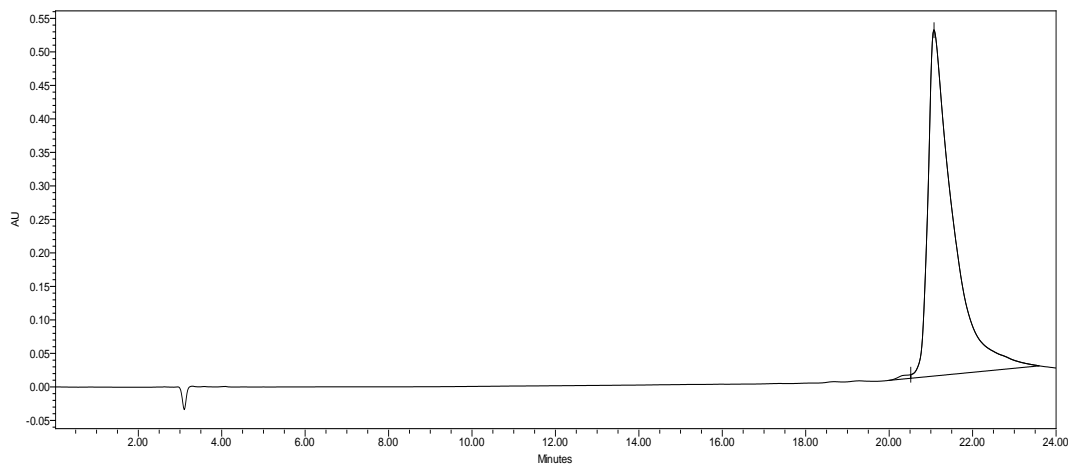


Figura 3.21. Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione migliore del peptide EYK condotta nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C₁₈ monomeric 238TP54 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm); flusso 1,0 mL/min; eluente A, 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B, 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione, 20 µL; gradiente, dall'11 al 23% di B in 24 minuti; detector, 214 nm.

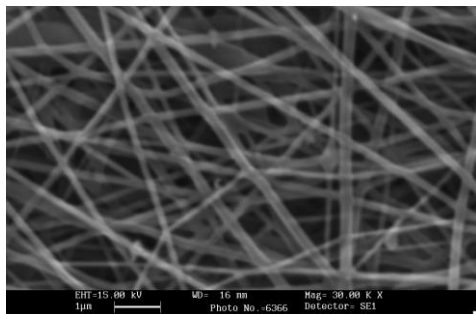
3.4 CARATTERIZZAZIONE DEGLI SCAFFOLD

3.4.1 Morfologia degli *scaffold* elettrofilati

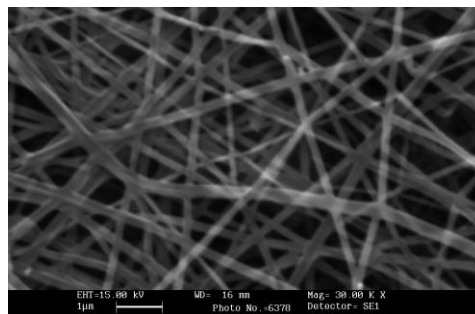
La morfologia delle fibre delle matrici tridimensionali ottenute per elettrofilatura di solo PCL o di una soluzione di PCL/peptide è stata osservata al SEM (figura 3.22).

All'analisi microscopica tutti gli *scaffold* presentavano fibre lisce e senza la presenza di gocce: questo ha suggerito che i parametri utilizzati per l'*electrospinning* (concentrazione della soluzione, tipo di solvente, voltaggio, distanza ago-collettore, velocità di flusso) e mantenuti invariati per tutte le elettrofilature, fossero opportuni. La scelta di questi parametri è stata effettuata sulla base di una ricerca in letteratura e con successive prove di ottimizzazione, eseguite prima sul solo polimero, poi su una soluzione arricchita con uno dei peptidi (PCL/DAK).

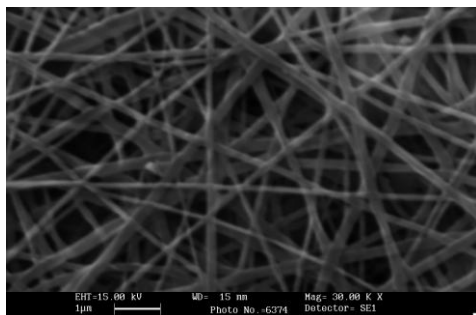
Le fibre, distribuite randomicamente, presentavano diametri che variavano tra i 100-200 nm in tutti gli *scaffold*: il campione di PCL/RGD-EAK era caratterizzato, mediamente, da fibre più sottili. In ogni caso, la distribuzione dei diametri era, per tutti i campioni, all'interno del *range* delle fibre della ECM naturale (50-500 nm).



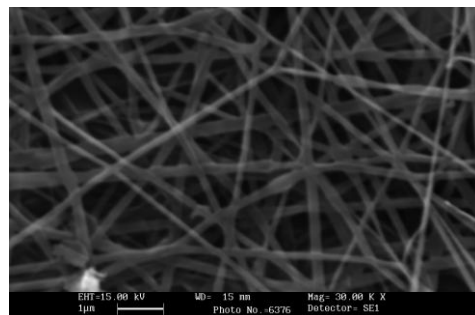
(a) PCL/EAK



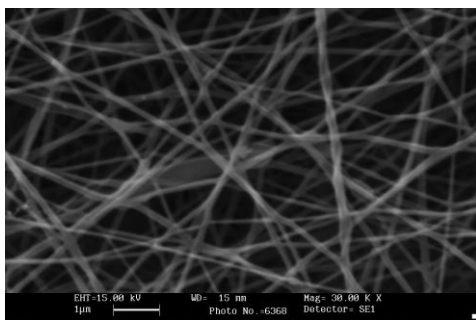
(b) PCL/DAK



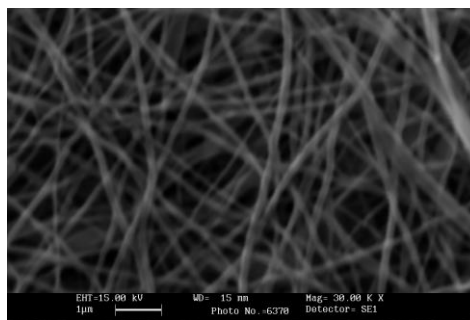
(c) PCL/EAbuK



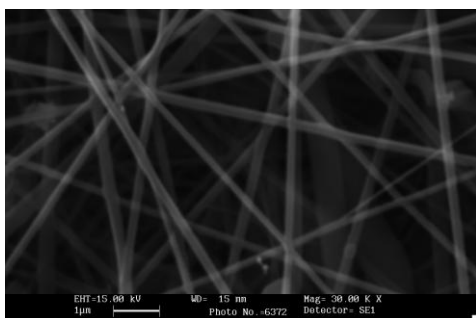
(d) PCL/EYK



(e) PCL/RGD-EAK



(f) PCL/RGD-EAK sc



(g) PCL

Figura 3.22. Micrografie SEM degli *scaffold* elettrofilati a partire da soluzioni di PCL/peptide (95/5) in HFIP, o di PCL in HFIP. Ricopertura in grafite.

3.4.2 Spettroscopia infrarossa

Gli spettri FT-IR, per tutti i campioni investigati, sono stati registrati in riflessione nel *range* $1800\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$.

In tutti gli spettri si riconosceva la tipica banda *stretching* del gruppo carbonilico (C=O) presente nel gruppo estereo del PCL a 1730 cm^{-1} . Nelle matrici ibride PCL/peptide rimanevano comunque ben distinguibili da quest'ultima le bande caratteristiche del gruppo peptidico presenti come bande ammidi I tra $1620\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$, e bande ammidi II attorno a 1540 cm^{-1} .

La posizione della banda ammidi I era particolarmente interessante per la possibilità di ottenere informazioni sulla struttura secondaria dei peptidi: in strutture di tipo α -elica o *random coil* la banda ammidi I si trovava a $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, mentre per strutture di tipo β -*sheet* la banda ammidi I si trovava tra 1620 e 1640 cm^{-1} , risultando la frequenza tanto più bassa quanto più forte era il legame idrogeno intercatena. Gli spettri dei peptidi in β -*sheet* avrebbero dovuto fornire anche un'altra banda ammidi I a $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$, ma nel nostro caso tale banda non era evidenziabile a causa dello scodamento della banda molto intensa del C=O del PCL.

In figura 3.23, sono riportati gli spettri di alcune matrici nel *range* 1800-1500 cm^{-1} . Si vede come la banda ammidica I si modificava nei diversi *scaffold*: PCL/EAK (nero), PCL/EAbuK (blu), PCL/RGD-EAK (verde) e PCL/RGD-EAK sc (rosso).

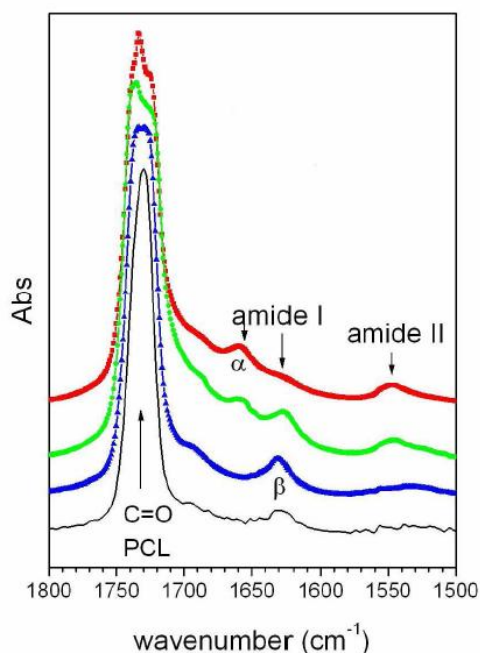


Figura 3.23. Spettri FT-IR di alcune delle matrici elettrofilate PCL/peptide nel *range* 1800-1500 cm^{-1} . PCL/EAK (nero), PCL/EAbuK (blu), PCL/RGD-EAK (verde) e PCL/RGD-EAK sc (rosso).

Per ottenere una stima della percentuale di peptide in conformazione β -sheet o α -elica/*random coil*, è stata effettuata un'analisi di *curve fitting*, calcolando il rapporto tra le aree dei picchi a 1630 cm^{-1} (β -sheet) e a 1660 cm^{-1} (α -elica o *random coil*).

La tabella 3.1 riporta le percentuali relative ai vari conformeri.

Tabella 3.1. Struttura secondaria dei peptidi all'interno degli *scaffold* elettrofilati: stime percentuali di β -sheet e α -elica/*random coil*.

	EAK	DAK	EAbuK	EYK	RGD-EAK	RGD-EAK sc
<i>β-sheet</i>	89%	85%	90%	88%	57%	30%
<i>α-elica/ random coil</i>	11%	15%	10%	12%	43%	70%

Gli spettri relativi alle matrici contenenti EAK, DAK, EAbuK e EYK indicavano la presenza dei peptidi quasi esclusivamente in struttura β -sheet, mentre l'RGD-EAK sc, peptide non auto-assemblante, si trovava prevalentemente in α -elica o *random coil*.

Comportamento inatteso, invece, quello del peptide RGD-EAK che negli *scaffold* elettrofilati si trovava prevalentemente in α -elica o *random coil*, disattendendo i risultati

di precedenti studi dove la sua conformazione era prevalentemente β -sheet, sia in soluzione (Gambaretto et al., 2008), sia nel liofilizzato e su film depositati su TiO₂ (Di Foggia et al., 2009).

Come noto dalla letteratura (Zhang et al., 1993), la presenza di cationi monovalenti favorisce la formazione di strutture ordinate tridimensionali di peptidi auto-assemblanti, per cui si è pensato di immergere il campione RGD-EAK in tampone salino (150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) per tre giorni e di ripetere l'analisi FT-IR e il *curve fitting*. Con questa prova si voleva in particolare verificare se vi fossero i gradi di libertà necessari per modificare la struttura secondaria di RGD-EAK e indurre quindi una stabilizzazione della struttura β -sheet e l'auto-aggregazione.

Dopo il trattamento con soluzione salina, la percentuale di peptide RGD-EAK in conformazione β -sheet aumentava decisamente (75% β -sheet, 25% α -elica/random coil).

La maggior percentuale di β -sheet indica la stabilizzazione indotta dallo ione monovalente positivo della conformazione che permette di ordinare le molecole in strati tramite legami a ponti di H. Tali strati presentano una faccia idrofilica e una idrofobica che permette il processo di auto-aggregazione e la formazione, infine, di strutture tridimensionali.

3.4.3 Bagnabilità

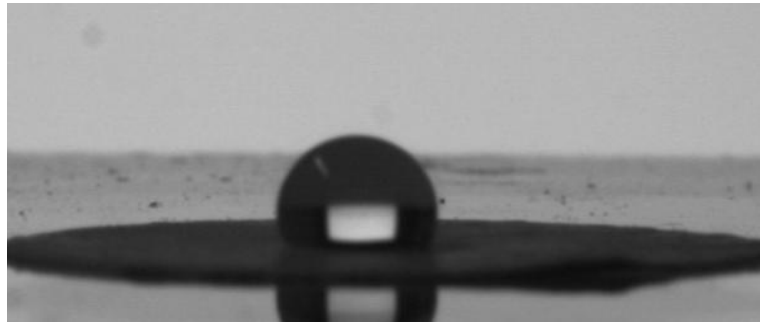
La valutazione della bagnabilità degli *scaffold* elettrofilati è stata realizzata tramite misure di angolo di contatto per deposizione di una goccia d'acqua sulla superficie delle matrici. Dopo la deposizione, lo strumento effettua normalmente tre misurazioni dell'angolo di contatto, ma sui campioni ibridi PCL/peptide, a causa del veloce appiattimento della goccia, è stato possibile eseguire una sola misura.

Tabella 3.2. Misure di angolo di contatto per le matrici di PCL e di PCL/peptidi.

PCL	PCL/ EAK	PCL/ DAK	PCL/ EAbuK	PCL/ EYK	PCL/RGD -EAK	PCL/RGD -EAK sc
112,4°	34,3°	57,35°	49,3°	76,5°	70,1°	86,8°
115,9°	<i>spreading</i> forte	<i>spreading</i> molto forte	<i>spreading</i> molto forte	<i>spreading</i> lieve	<i>spreading</i> forte	<i>spreading</i> forte
115,0°	-	-	-	-	-	-

Risultati e Discussione: Caratterizzazione degli *scaffold*

(a)
PCL



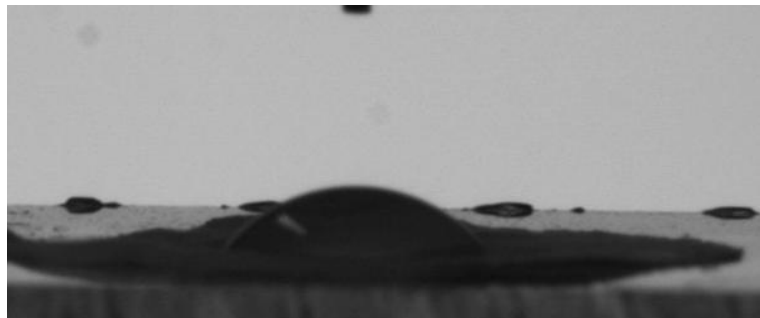
(b)
PCL/EAK



(c)
PCL/DAK



(d)
PCL/EAbuK



(e)
PCL/EYK



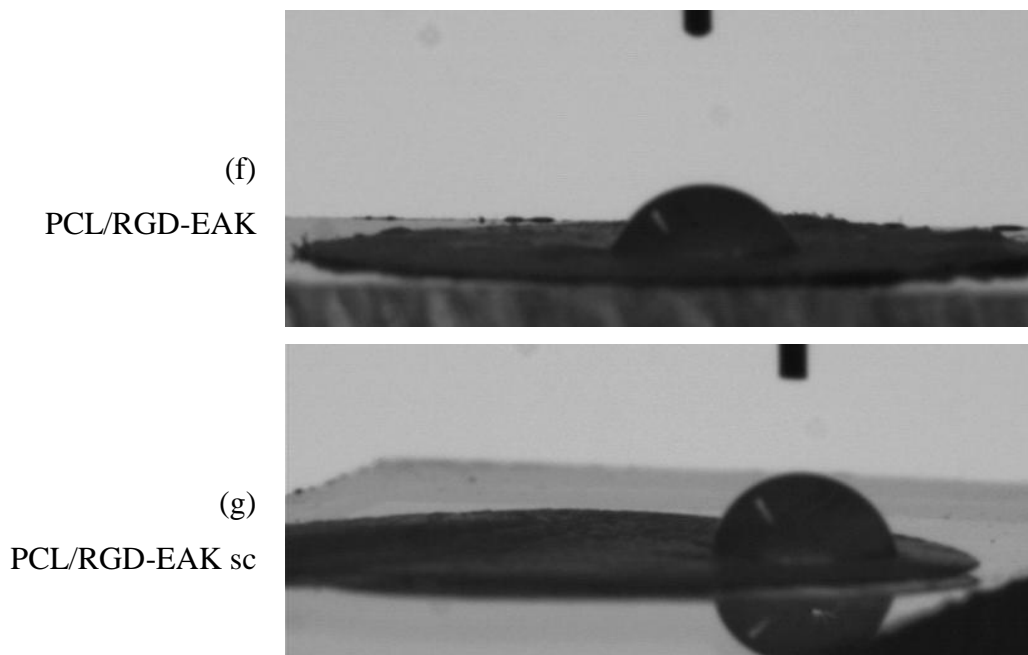


Figura 3.24. Immagini relative alla misurazione di angolo di contatto dopo deposizione di una goccia d'acqua sulla superficie delle matrici elettrofilate.

L'osservazione delle immagini (figura 3.24) della goccia d'acqua depositata su ogni *scaffold*, ha consentito di apprezzare, anche visivamente, il forte *spreading* dato dalle superfici arricchite con i peptidi, rispetto al solo PCL che, al contrario, era fortemente idrofobico ($\theta > 90^\circ$).

Tutti gli *scaffold* contenenti peptidi, siano essi auto-assemblanti (ad esempio, EAK, EAbuK, EYK) o meno (RGD-EAK sc), presentavano angoli di contatto $< 90^\circ$. In ogni caso si può sottolineare come nel caso di sequenze auto-aggreganti l'idrofilicità della superficie sia risultata maggiore.

Nel seguito si riportano gli *scaffold* in ordine decrescente di idrofobicità:

PCL > PCL/RGD-EAK sc > PCL/EYK > PCL/RGD-EAK >

PCL/DAK > PCL/EAbuK > PCL/EAK

Le misure dell'angolo di contatto sono interessanti in quanto offrono la possibilità di predire la compatibilità rispetto al sangue e ad altri fluidi biologici dei materiali polimerici (Bogdanova et al., 2008). Nel caso in esame percentuali modeste (5%) di peptidi auto-assemblanti modificavano la bagnabilità dello *scaffold* polimerico elettrofilato nella direzione di una migliore biocompatibilità.

Ulteriori approfondimenti saranno richiesti per valutare come una maggior idrofilicità possa incidere sulla velocità di degradazione degli *scaffold*.

3.5 SAGGI BIOLOGICI *IN VITRO*

3.5.1 Valutazione dell'adesione

L'adesione cellulare è stata valutata dopo due ore dalla semina di osteoblasti umani sugli *scaffold* tramite il saggio dell'MTT.

Tutte le matrici arricchite con peptidi incrementavano l'adesione degli osteoblasti, eccezion fatta per RGD-EAK sc. Il peptide che d'altra parte, forniva i migliori risultati in termine di adesione era RGD-EAK. L'aggiunta della sequenza RGD non spiegherebbe, quindi, da sola l'adesione cellulare. Dai risultati ottenuti sembra, infatti, giocare un ruolo fondamentale anche l'auto-aggregazione che permette di ottenere strutture tridimensionali.

Anche il PCL migliorava l'adesione rispetto al polistirene per colture tessutali (*tissue culture* polistirene = TCPS). Questo fatto ribadisce, evidentemente, che la presenza di una struttura fibrosa e articolata simile alla ECM, induce un'adesione più pronta rispetto a supporti di polistirene, in ogni caso trattati per ottimizzare l'adesione cellulare.

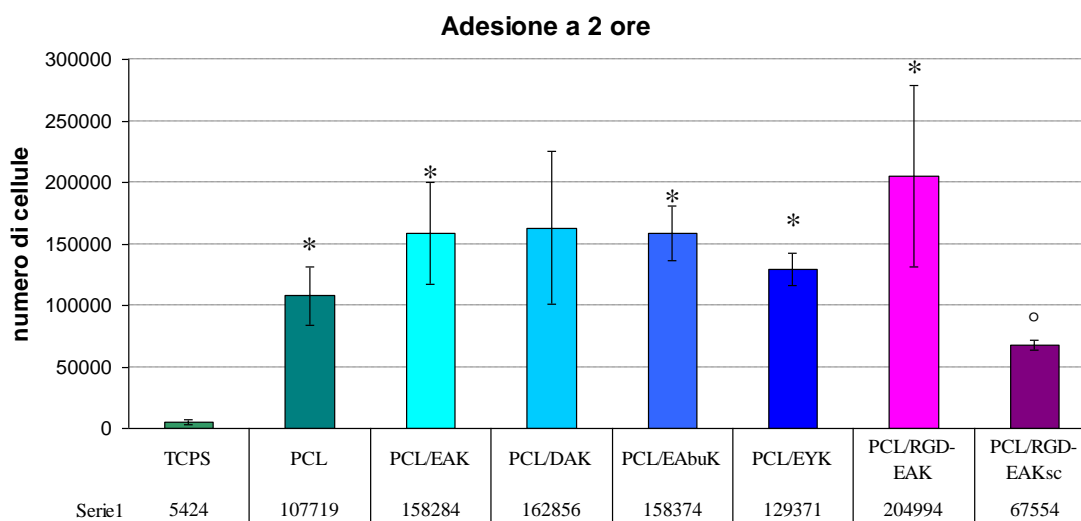


Figura 3.25. Adesione di osteoblasti umani sugli *scaffold* determinata a 2 ore dalla semina tramite MTT test. Seminate 2×10^5 cell/*scaffold*. I risultati, media di tre esperimenti, sono espressi come valore medio del numero di cellule adese \pm deviazione standard. * = $p < 0,05$ vs PCL/RGD-EAK sc, ° = $p < 0,05$ vs PCL, t-test di *Student*. I risultati registrati sono tutti significativi verso TCPS.

In particolare gli *scaffold* arricchiti con i peptidi auto-assemblanti inducevano incrementi di adesione dal 20% (PCL/EYK) fino al 90% (PCL/RGD-EAK) rispetto al PCL (figura 3.26).

Risultati e Discussione: Saggi biologici *in vitro*

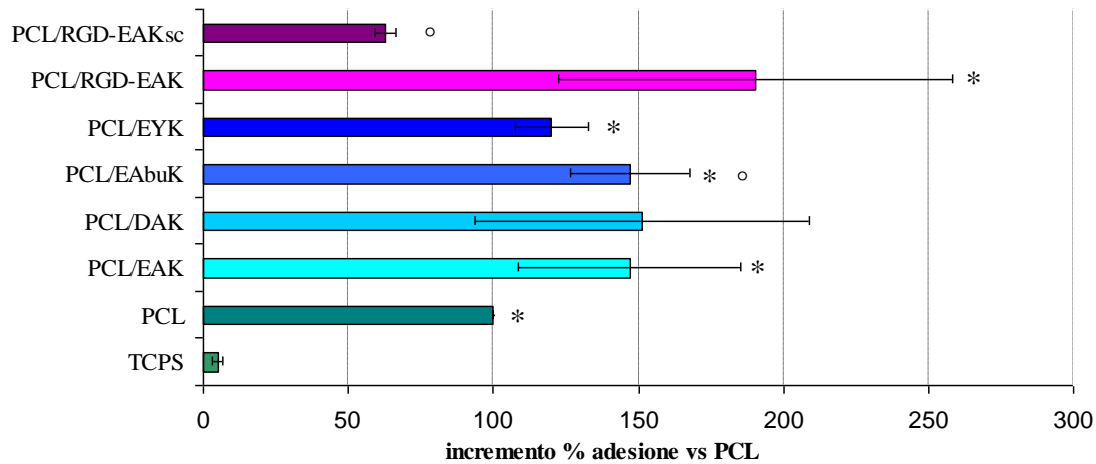


Figura 3.26. Adesione di osteoblasti umani sugli *scaffold* determinata a 2 ore dalla semina tramite MTT test. Seminate 2×10^5 cell/*scaffold*. I risultati, media di tre esperimenti, sono espressi come variazione percentuale media \pm deviazione standard rispetto al controllo PCL (assunto come valore 100). * = $p < 0,05$ vs PCL/RGD-EAK sc, ° = $p < 0,05$ vs PCL, t-test di *Student*. I risultati registrati sono tutti significativi verso TCPS.

La valutazione della vitalità cellulare è stata eseguita anche su *scaffold* elettrofilati a 5 mesi di distanza (i campioni sono stati tenuti in frigorifero a 4°C tra un esperimento e l'altro). Come si vede chiaramente dai dati riportati, l'adesione risultava molto diminuita in termini di numero di cellule presenti all'incirca di un ordine di grandezza (figura 3.27).

Adesione a 2 ore *scaffold* di 5 mesi

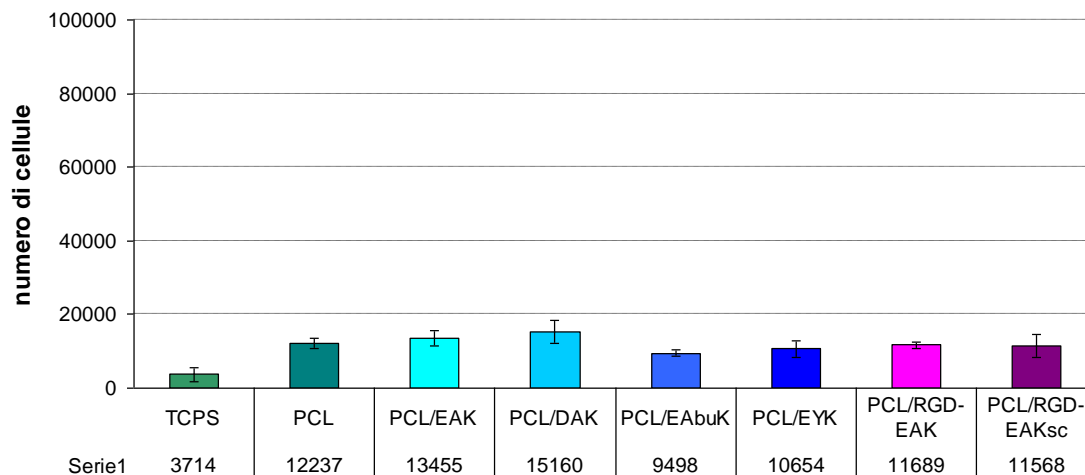


Figura 3.27. Adesione di osteoblasti umani sugli *scaffold* elettrofilati 5 mesi prima e conservati a 4°C, determinata a 2 ore dalla semina tramite MTT test. Seminate 2×10^5 cell/*scaffold*. I risultati, derivati da un singolo esperimento in triplicato, sono espressi come valore medio di numero di cellule adese \pm deviazione standard.

Sembrerebbe, quindi, che il polimero vada incontro nel tempo a variazioni tali da non sostenere un miglioramento dell'adesione cellulare. Essendo i peptidi, come visto dagli

spettri IR, intimamente legati al PCL, un eventuale cedimento della struttura del polimero potrebbe vanificare l'apporto delle proprietà osteo-induttive dei peptidi stessi. Questo spiegherebbe il profilo di adesione uguale per tutte le matrici elettrofilate, indipendentemente dalla presenza o meno dell'arricchimento peptidico.

Non vi sono dati in letteratura attestanti una degradazione del PCL nelle condizioni da noi riportate. Tali indagini dovranno essere comunque eseguite per ricercare un riscontro a quanto ipotizzato.

I dati indicano che le sequenze che auto-assemblano promuovono l'adesione rispetto al solo PCL e alla matrice polimerica che contiene un peptide che non auto-aggrega anche se contiene una sequenza pro-adesiva (PCL/RGD-EAK sc). Un caso particolare è quello del peptide DAK che, in soluzione acquosa sembra preferire la struttura α -elicoidale a quella β -sheet che è alla base della formazione di strutture tridimensionali gradite alle cellule: studi recenti (Gambaretto et al., 2008) e anche i dati qui riportati di assorbimento IR hanno permesso di constatare come anche questa sequenza depositata su superfici e, quindi allo stato solido, assuma conformazioni di tipo β -sheet. Ciò consente di affermare che in questo contesto anche DAK è un peptide auto-assemblante e che tutte le matrici polimeriche elettrofilate arricchite con sequenze auto-assemblanti promuovono l'adesione di osteoblasti umani. I dati sono risultati significativi rispetto al riferimento RGD-EAK sc ovvero a una matrice arricchita con un peptide che non auto-aggrega.

3.5.2 Determinazione del calcio nella matrice

La determinazione del calcio nella matrice è stata eseguita a 7 giorni dalla semina di osteoblasti umani sugli *scaffold*, tramite metodo *o*-CPC. In parallelo è stato effettuato il saggio dell'acido bicinconinico che ha permesso di misurare la concentrazione proteica e quindi di normalizzare i dati ottenuti in base alla densità cellulare.

Dall'analisi dei risultati, anche in questo caso è possibile affermare che tutti i peptidi aumentavano i livelli di calcio nello *scaffold*: come prima, soltanto RGD-EAK sc mostrava risultati del tutto simili a quelli del PCL privo di arricchimento peptidico. Spiccano tra gli altri i peptidi RGD-EAK e EAbuK, che dimostravano di favorire notevolmente la mineralizzazione della matrice, registrando dati significativi verso TCPS, PCL e PCL/RGD-EAK sc. Questo fatto potrebbe essere dovuto nel caso di EAbuK al tipo di struttura offerta da questo peptide: esso forma, infatti, già in soluzione

strutture β -sheet particolarmente stabili, in grado di promuovere la struttura tridimensionale. Per RGD-EAK potrebbe essere dovuta ad un sinergismo dovuto alla presenza di un motivo di adesione inserito in un contesto strutturato dato dall'auto-assemblante EAK.

Infatti, dal confronto tra RGD-EAK e RGD-EAK sc, anche in questo caso, è evidente che la sola presenza di motivi di adesione non riesce a spiegare un aumento della capacità proliferativa e di mineralizzazione da parte degli osteoblasti.

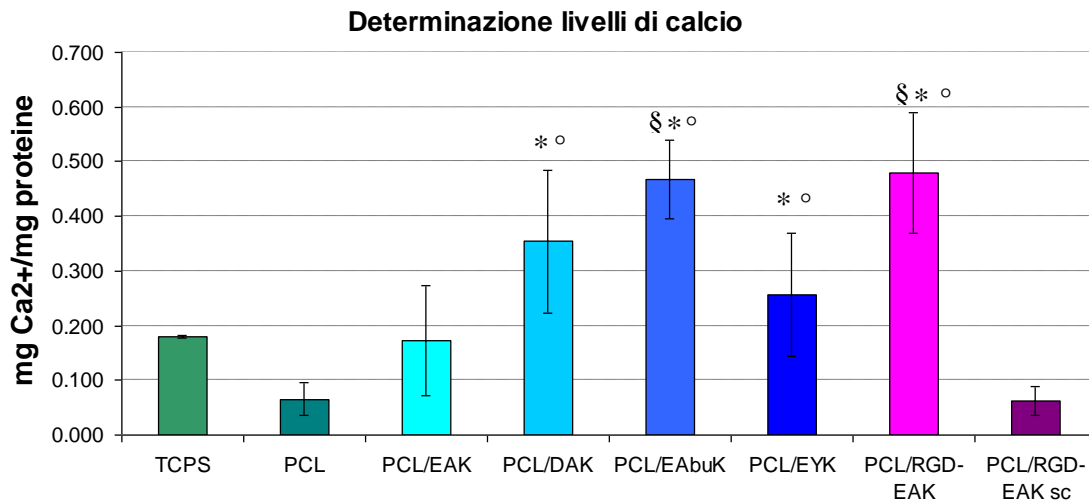


Figura 3.28. Determinazione dei livelli di calcio a 7 giorni dalla semina di osteoblasti umani mediante metodo *o*-CPC e normalizzazione dei dati con saggio dell'acido bicononinico. Seminate 2×10^5 cell/scaffold. I risultati, media di tre esperimenti, sono espressi come media \pm deviazione standard. * = $p < 0,05$ vs PCL/RGD-EAK sc, ° = $p < 0,05$ vs PCL, § = $p < 0,05$ vs TCPS, t-test di Student.

3.5.3 Espressione genica di ALP, OPN e BSP

La valutazione dell'espressione genica di proteine, ritenute significative ai fini della produzione della matrice ossea, è stata effettuata a 24 ore dalla semina di osteoblasti umani sugli *scaffold*, tramite q-PCR.

Molte delle sequenze utilizzate risultavano incrementare l'espressione del gene della fosfatasi alcalina. Si tratta di un enzima non specifico per l'osso e comune ad altri tessuti: nell'uomo si distinguono tre forme enzimatiche tessuto-specifiche (intestino, placenta, linea germinale) codificate da tre geni diversi, e una non tessuto-specifica (fegato/ossa/reni) codificata da un quarto gene. Quest'ultima è ritenuta un eccellente indicatore di osteodifferenziazione e mineralizzazione (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al., 2005). L'esatto meccanismo d'azione non è noto, probabilmente ALP idrolizzando esteri fosforici organici, produce un eccesso di fosfato inorganico libero che avvia il processo di biomineralizzazione (Porter et al., 2009).

Una maggiore espressione di ALP dovrebbe, quindi, essere correlata ad una maggior produzione di calcio: questo trova conferma nei saggi sugli *scaffold* contenenti DAK e EAbuK in cui si sono riscontrati i più elevati livelli di calcio, ma non concorda con il comportamento della matrice arricchita con RGD-EAK che aumentava la produzione di calcio ma non in modo particolarmente significativo l'espressione di ALP.

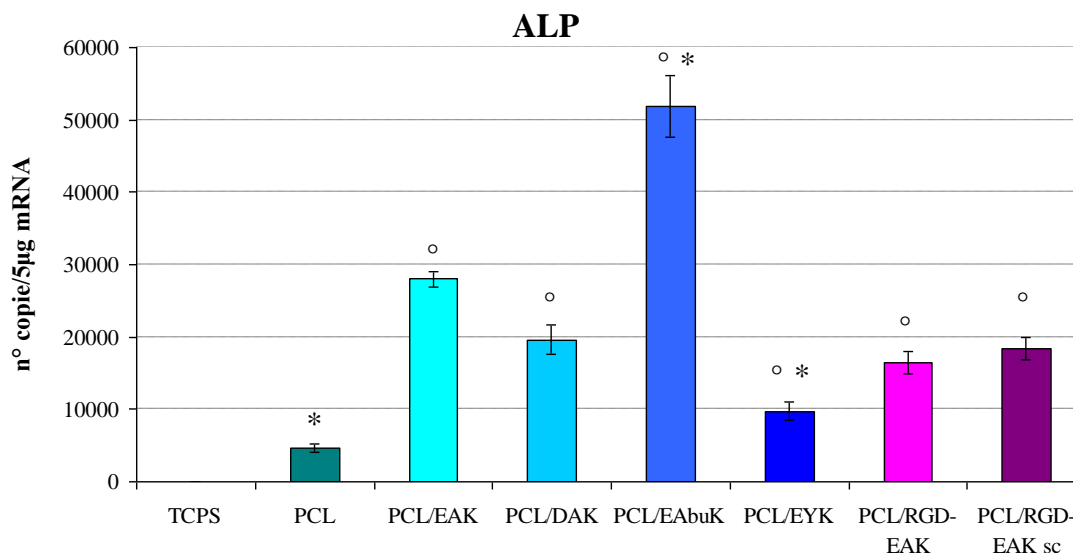


Figura 3.29. Espressione del gene ALP codificante per la fosfatasi alcalina mediante q-PCR, dopo 24 ore dalla semina di osteoblasti umani sugli *scaffold*. Seminate 2×10^5 cell/*scaffold*. I risultati, media di tre esperimenti, sono normalizzati rispetto al GADPH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) ed espressi in n° copie/5 µg di mRNA \pm deviazione standard. * = $p < 0,05$ vs PCL/RGD-EAK sc, ° = $p < 0,05$ vs PCL, t-test di *Student*. I risultati registrati sono tutti significativi verso TCPS.

OPN e BSP sono sialoproteine, contenenti residui glicosidici di acido sialico, appartenenti alle SIBLING (*Small Integrin-Binding Ligand with N-linked Glycoproteins*), ossia ad una famiglia di glicoproteine acide fosforilate in grado di legarsi alle integrine tramite la sequenza RGD (Ermakov et al., 2010). Sebbene solo BSP sia specifica per l'osso, entrambe sono considerate indice della presenza di una popolazione di osteoblasti maturi. Poiché tendono ad accumularsi a livello delle linee cementali (*cement lines*), sia all'interfaccia dei tessuti mineralizzati, sia all'interfaccia impianto-tessuto mineralizzato, si ritiene possano svolgere un ruolo chiave nel processo rigenerativo osseo, in parte mediando l'adesione cellulare, ma soprattutto guidando la formazione e deposizione di cristalli di idrossiapatite (Bilezikian et al., 2008).

Per quanto riguarda l'osteopontina, i dati indicano che l'espressione genica veniva notevolmente incrementata per le matrici contenenti DAK, EAbuK e RGD-EAK, tre peptidi in grado di auto-assemblare. I dati risultavano significativi sia rispetto allo *scaffold* di solo PCL, sia verso quello di PCL/RGD-EAK sc.

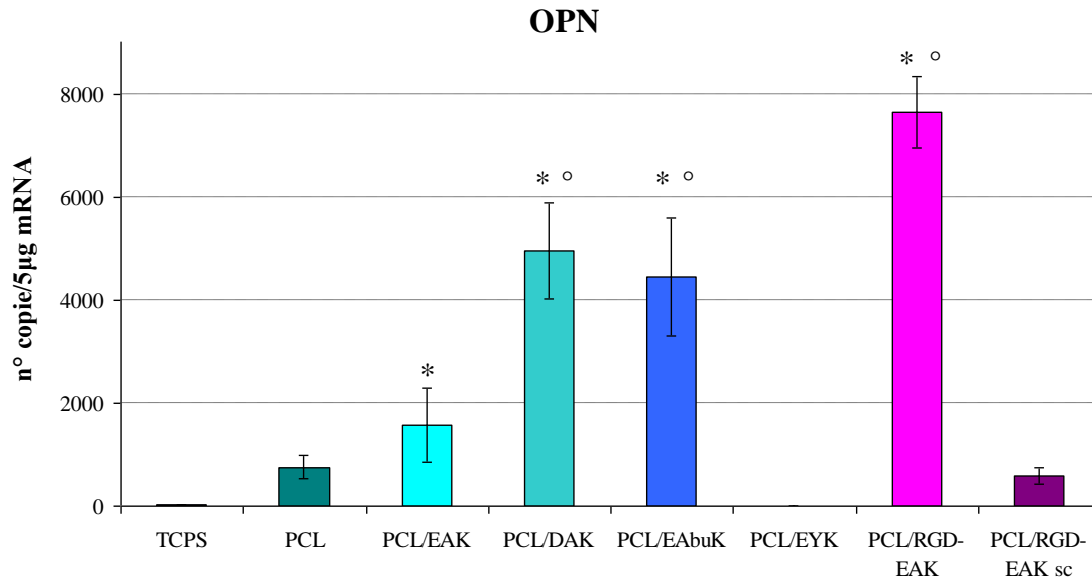


Figura 3.30. Espressione del gene OPN codificante per l'osteopontina mediante q-PCR, dopo 24 ore dalla semina di osteoblasti umani sugli *scaffold*. Seminate 2×10^5 cell/*scaffold*. I risultati, media di tre esperimenti, sono normalizzati rispetto GADPH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) ed espressi in n° copie/5 µg di mRNA \pm deviazione standard. * = $p < 0,05$ vs PCL/RGD-EAK sc, ° = $p < 0,05$ vs PCL, t-test di *Student*. I risultati registrati sono tutti significativi verso TCPS.

I dati relativi all'espressione genica di sialoproteina ossea hanno evidenziato un incremento significativo per le matrici arricchite con EAK, EAbuK, DAK e RGD-EAK.

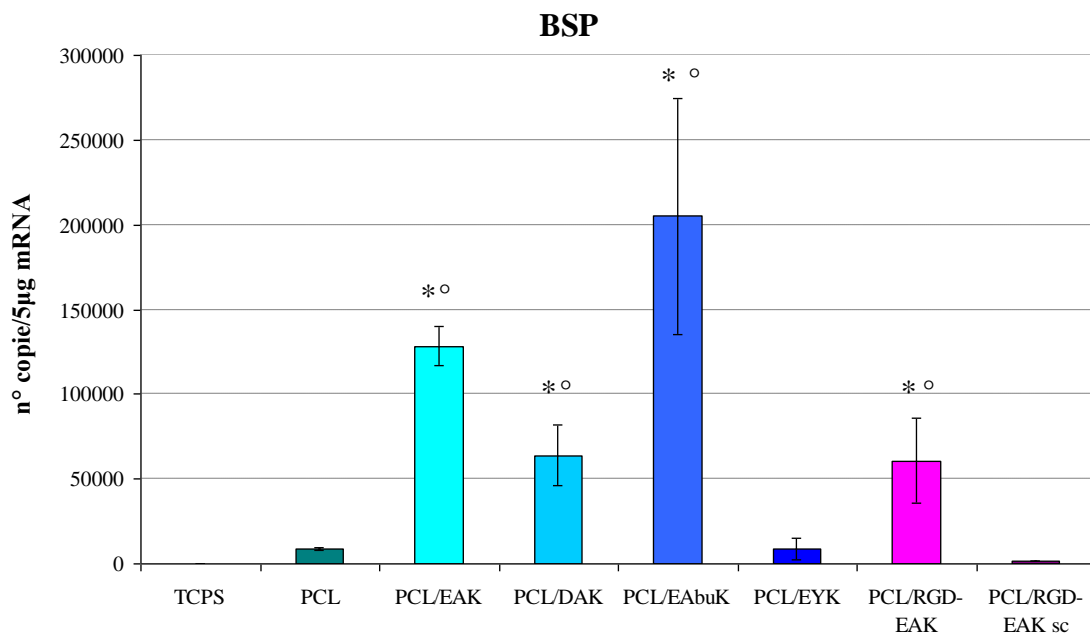


Figura 3.31. Espressione del gene BSP codificante per la sialoproteina ossea mediante q-PCR, dopo 24 ore dalla semina di osteoblasti umani sugli *scaffold*. Seminate 2×10^5 cell/*scaffold*. I risultati, media di tre esperimenti, sono normalizzati rispetto GADPH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) ed espressi in n° copie/5 µg di mRNA \pm deviazione standard. * = $p < 0,05$ vs PCL/RGD-EAK sc, ° = $p < 0,05$ vs PCL, t-test di *Student*. I risultati registrati sono tutti significativi verso TCPS.

Risultati e Discussione: Saggi biologici *in vitro*

Nonostante gli *scaffold* elettrofilati abbiano, in generale, mostrato una certa variabilità verso l'espressione delle tre proteine considerate, i risultati hanno dimostrato che tra di essi lo *scaffold* che promuove in entità maggiore l'espressione genica di tutte e tre le proteine, fosfatasi alcalina, osteopontina e sialoproteina ossea, e quindi la mineralizzazione, è quello composto da PCL/EAbuK.

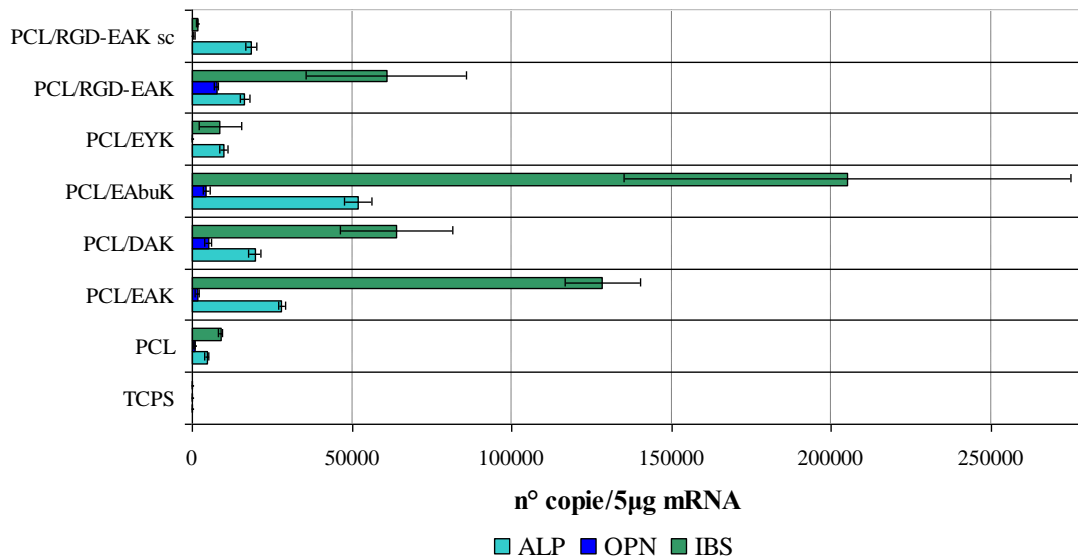


Figura 3.32. Espressione genica di ALP, OPN e BSP a confronto.

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha riguardato lo studio di *scaffold* elettrofilati ibridi con una componente polimerica (PCL) e una componente biomimetica di natura peptidica (peptidi auto-assemblanti).

La caratterizzazione delle matrici, fatta mediante indagini SEM, FT-IR, e valutazione della bagnabilità, ha permesso di evidenziare alcuni aspetti interessanti.

Innanzitutto la natura fibrosa di tutti gli *scaffold* realizzati, con diametri di fibra tra i 100 e i 200 nm, rende queste matrici mimetiche dell'ECM.

Inoltre, la presenza dei peptidi negli *scaffold*, aumenta significativamente l'idrofilicità superficiale delle matrici, rendendole così più gradite alle cellule. Le analisi FT-IR hanno dimostrato che i peptidi auto-assemblanti all'interno delle matrici elettrofilate si trovano prevalentemente in conformazione β -sheet e che mediante pre-trattamento con una soluzione salina, è possibile incrementare la conformazione β -sheet del peptide auto-assemblante RGD-EAK e quindi migliorare la capacità di formazione di strutture tridimensionali.

I saggi biologici indicano che mediamente le cellule gradiscono la presenza di peptidi auto-assemblanti rispetto al solo PCL o all'arricchimento dello stesso con un peptide che non forma strutture tridimensionali (RGD-EAK sc).

In particolare si possono trarre le seguenti conclusioni:

1. EAbuK risulta incrementare sia l'adesione cellulare sia il deposito di calcio a 7 giorni, e, inoltre, induce un'espressione genica maggiore sia del gene dell'OPN che di quelli di ALP e di BSP. La risposta particolarmente positiva dello *scaffold* ottenuto con il peptide EAbuK in tutti i saggi biologici, potrebbe essere ascritta alla capacità marcata del peptide di formare strutture β -sheet dovuta all'incremento dell'idrofobicità del residuo Abu rispetto ad Ala;
2. promettenti risultano anche i dati della matrice che contiene il peptide RGD-EAK. In questo caso si ha un incremento marcato di adesione cellulare che può essere dovuto alla cooperazione tra motivo RGD e struttura tridimensionale, un incremento di deposito di calcio e un'espressione genica marcata di OPN, a fronte di una meno incisiva induzione di BSP e di ALP. Se confrontiamo i dati

Conclusioni

con quelli ottenuti per EAK, si può pensare che nel caso del peptide RGD-EAK vi possa essere una sorta di cooperazione tra il motivo adesivo e la sequenza auto-assemblante con un esito positivo. Il solo motivo RGD inserito in una sequenza conformazionalmente incapace di formare strutture tridimensionali (RGD-EAK sc) incide solamente nell'espressione genica di ALP;

3. il peptide DAK sembra incrementare l'adesione, la produzione di calcio e l'espressione genica di OPN e ALP (meno quella di BSP);
4. la sequenza EAK, pur incrementando l'adesione e l'espressione di ALP e BSP, produce poco deposito di calcio e poco incremento dell'espressione genica di OPN, la quale, comunque, risulta essere un marcatore essenziale del processo di ossificazione.
5. meno promettente il profilo di EYK, che incrementa di poco l'adesione e la quantità di calcio rispetto allo *scaffold* di solo PCL, ed inoltre presenta un incremento scarso o nullo dell'espressione dei geni dei marcatori proteici della mineralizzazione.

Dai risultati ottenuti si può pensare di applicare questi materiali in svariati campi della medicina rigenerativa: per esempio, nel “*coating*” di superfici implantari, nel *drug-delivery* e nella produzione di *scaffold* per *tissue engineering*.

A completamento della ricerca svolta sono in corso studi di caratterizzazione meccanica (rigidezza, tensione ed eventuali sforzi viscosi) sulle matrici realizzate; si pensa poi alla possibilità di progettare nuove sequenze peptidiche: ad esempio una modifica interessante potrebbe essere costituita dall'introduzione di una sequenza adesiva RGD al terminale del peptide EAbuK, oppure si potrebbero condensare ai peptidi auto-assemblanti sequenze adesive più estese (ad es: GRGDSP).

ABBREVIAZIONI

AA / aa = amminoacido

A / Ala = alanina

C / Cys = cisteina

D / Asp = acido aspartico

E / Glu = acido glutammico

F / Phe = fenilalanina

G / Gly = glicina

H / His = istidina

Hyl = idrossilisina

I / Ile = isoleucina

K / Lys = lisina

L / Leu = leucina

M / Met = metionina

N / Asn = asparagina

P / Pro = prolina

Q / Gln = glutammina

R / Arg = arginina

S / Ser = serina

T / Thr = treonina

V / Val = valina

Y / Tyr = tirosina

W / Trp = triptofano

ABC = *Avidin Biotin Blocking Kit*

Abs = assorbanza

Abu = acido 2-amminobutirrico

AEC = 3-amino-9-etil-carbazolo

ALP= fosfatasi alcalina

BCA = acido bicinconinico

Boc = vedi *t*-Boc

BrdU = bromodeossiuridina

BSA = siero albumina bovina

BSP = sialoproteina ossea
cDNA = *complementary DNA*
cell = cellule
DAB = 3,3'-diaminobenzidina
DCM = diclorometano
DIPEA = N,N-diisopropiletilammina
DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMEM/F12 = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Nutrient Mixture F12*
DMF = N,N-dimetilformammide
DNA = acido deossiribonucleico
DNase / DNasi = desossiribonucleasi
dNTP = deossiribonucleotidi trifosfato
DSA = *DNase Stop Solution*
ECM = *ExtraCellular Matrix*
eq = equivalenti
ESI = *ElectroSpray Ionization*
FAM = 6-carbossifluorescina
FBS = *Fetal Bovine Serum*
FITC = fluoresceina isotiocianato
Fmoc = 9-fluorenilmetilossicarbonile
FT-IR = *Fourier Transform - Infrared Radiation*
GAPDH = gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi
GAG = glicosamminoglicani
GS = *Normal Goat Serum*
HBTU = 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HFIP = 1,1,1,3,3,3-esafluoroisopropanolo
HOBt = 1-idrossibenzotriazolo
HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*
HS = *Horse Serum*
IR = *Infrared Radiation*
MTT = 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromuro
M-MuLV = *Moloney Murine Leukemia Virus*
mRNA = RNA messaggero
NMP = N-metil-2-pirrolidone

o-CPC = *o*-cresoltaleina complessone
OPN = osteopontina
OtBu = *ter*-butilossi
PAN = *Biotinylated Pan-specific antibody*
PBS = soluzione tampone fosfato
PCL = poli(ϵ -caprolattone)
PCR = *Polymerase Chain Reaction*
PGA = acido poliglicolico
PLA = acido polilattico
Pmc = 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonile
Pz = pozzetto
q-PCR = PCR quantitativa o rt-PCR
RDA = *RNA Dilution Buffer*
RLA = *RNA Lysis Buffer*
RNA = acido ribonucleico
RNAsi = ribonucleasi
RP-HPLC = *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*
rt-PCR = *real time*-PCR o q-PCR
RWA = *RNA Wash Solution*
sc = *scrambled*
SEM = *Scanning Electron Microscope*
SDS = sodio dodecilsolfato
SIBLING = *Small Integrin-Binding Ligand with N-linked Glycoproteins*
SPPS = *Solid Phase Peptide Synthesis*
TAMRA = 6- carbossitetrametilrodamina
t-Boc = *terz*-butilossicarbonile (abbreviato Boc)
t-Bu = *terz*-butile
TCA = acido tricloroacetico
TCPS = *tissue culture* polistirene
TES = trietilsilano
TIPS = *Thermal Induced Phase Separation*
TFA = acido trifluoroacetico
TOF = *Time Of Flight*
UPL = *Universal Probe Library*, sonde oligonucleotidiche

UV = Ultravioletto

UV/VIS = Ultravioletto/visibile

zF = zona fascicolata

zG = zona glomerulare

zR = zona reticolare

zU = *undifferentiated zone* / zona indifferenziata intermedia

BIBLIOGRAFIA

Albert B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Biologia molecolare della cellula*. Edizioni Zanichelli, V edizione.

Andrews K.D., Hunt J.A., *Developing smaller-diameter biocompatible vascular grafts*, in: "Cellular response to biomaterials" Lucy Di Silvio (ed), Woodhead Publishing Limited, CRC Press 2009.

Arlt W., Allolio B., *Adrenal insufficiency*. Lancet 2003, 361: 1881-1893.

Arrondo J.L.R., Muga A., Castresana J., Goni F.M., *Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy*. Prog. Biophys. Mol. Biol. 1993, 59(1): 23-56.

Ashammakhi N., Ndreu A., Yang Y., Ylikauppila H., Nikkola L., *Nanofiber-based scaffolds for tissue engineering*. Eur. J. Plast. Surg. 2008 (DOI 10.1007/s00238-008-0217-3).

Ayres C.E., Shekhar Jha B., Sell S.A., Bowlin G.L., Simpson D.G., *Nanotechnology in the design of soft tissue scaffolds: innovations in structure and function*. Nanomed. Nanobiotechnol. 2010, 2: 20-34.

Babensee J.E., McIntire L.V., Mikos A.G., *Growth factor delivery for tissue engineering*. Pharm. Res. 1999, 17: 497-504.

Badamia A.S., Krekea M.R., Thompson M.S., Riffle J.S., Goldsteina A.S., *Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates*. Biomaterials 2006, 27: 596-606.

Bagno A., Piovan A., Dettin M., Chiarion A., Brun P., Gambaretto R., Fontana G., Di Bello C., Palù G., Castagliuolo I., *Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides*. Bone 2007, 40: 693-699.

Ball H.L., Mascagni P., *Chemical synthesis and purification of protein: a methodology*. Int. J. Peptide Protein Res. 1996, 48: 31-47.

Bilezikian J. P., Raisz L.G., Martin T.J (ed.), *Principles of Bone Biology*, III edizione, Academic press, Elsevier Sci. 2008.

- Bogdanova Y.G.**, Dolzhikova V.D., Belov G.P., Golodkov O.N, Chalykh A. E., *Prediction of Biocompatibility of Olefin-Carbon Monoxide Alternating Copolymers from Their Surface Energy Parameters*. Moscow University Chemistry Bulletin 2008, 63, No. 5, (DOI: 10.3103/S0027131408050064).
- Bokhari M.A.**, Akay G., Zhang S., Birch M.A., *The enhancement of osteoblast growth and differentiation in vitro on a peptide hydrogel-polyHIPE polymer hybrid material*. Biomaterials 2005, 26: 5198-5208.
- Boland E.D.**, Matthews J.A., Pawlowski K.J., Simpson D.G., Wnek G.E., Bowlin G.L. *Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering*. Front. Biosci. 2004, 9: 1422-32.
- Byler M.D.**, Susi H., *Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra*. Biopolymers 1986, 25(3): 469-487.
- Carpino L.A.** Han G.Y., *The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group*. J. Org. Chem. 1972, 37: 3404-3409.
- Chapman J.**, Miles P.D., Ofrecio J.M., Neels J.G., Yu J.G., Resnik J.L., Wilkes J., Talukdar S., Thapar D., Johnson K., Sears D.D., *Osteopontin Is Required for the Early Onset of High Fat Diet-Induced Insulin Resistance in Mice*. PloS. ONE 2010, 5(11): e13959 (Doi: 10.1371/journal.pone.00139559).
- Chen P.**, *Self-assembly of ionic-complementary peptides: a physicochemical viewpoint*. Coll. Surf. A 2005, 261: 3-24.
- Chester-Jones I.**, *Variation in the mouse adrenal cortex with special reference to the zona reticularis and to brown degeneration together with discussion of the "cell migration" theory*. Q. J. Microsc. Sci. 1948, s3-89: 53-73.
- Chew S.Y.**, Wen Y., Dzenis Y., Leong K.W., *The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine*. Curr. Pharm. Des. 2006, 12(36): 4751-4770.
- Clarke B.**, *Normal Bone Anatomy and Physiology*. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2008, 3: S131-S139.
- Cui W.**, Zhou Y., Chang J., *Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery*. Sci. Technol. Adv. Mater. 2010, 11(1), 014108 (doi:10.1088/1468-6996/11/1/014108).

- D'Auria G.**, Vacatello M., Falcigno L., Paduano L., Mangiapia G., Calvanese L., Gambaretto R., Dettin M., Paolillo L., Self-assembling properties of ionic-complementary peptides. *J. Pept. Sci.* 2009, 15: 210-219.
- Davies J.E.**, *Mechanisms of endosseous integration*. *International J. of Prosthodontics* 1998, 11: 391-401.
- Davis M.E.**, Motion M., Narmoneva D.A., Takahasci T., Hakuno D., Kamm R.D., Zhang S., Lee R.T., *Injectable self-assembly peptide nanofibers create intramyocardial microenvironments for endothelial cells*. *Circulation* 2005, 111: 442-450.
- Dee K.C.**, Andersen T.T., Bizios R., *Osteoblast population migration characteristics on substrates modified with immobilized adhesive peptides*. *Biomaterials* 1999, 20: 221-227.
- Dettin M.**, *Bioactive surfaces using peptide grafting in tissue engineering*, in: "Cellular response to biomaterials" Lucy Di Silvio (ed), Woodhead Publishing Limited, CRC Press 2009
- Di Foggia M.**, Taddei P., Fagnano C., Torreggiani A., Dettin M., Sanchez-Cortes S., Tint A., *Vibrational characterization of self-assembling oligopeptides for tissue engineering on TiO2 surfaces*. *Journal of Molecular Structure* 2009, 924-926: 120-126.
- Dong A.**, Huang P., Caughey S., *Protein Secondary Structures in Water from Second-Derivative Amide I Infrared Spectra*. *Biochemistry* 1990, 29(13): 3303-3308.
- Dunn J.C.Y.**, Chu Y., Qin H.H., Zupkan T., *Transplantation of Adrenal Cortical Progenitor Cells Enriched by Nile Red*. *Journal of Surgical Research* 2009, 156: 317-324.
- Ermakov S.**, Leonov A., Trofimov S., Malkin I., Livshits G., *Quantitative genetic study of the circulating osteopontin in community-selected families*. *Osteoporos. Int.* 2010, (DOI 10.1007/s00198-010-1451-7)
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I.**, Alobera Gracia M.A., del Canto Pingarrón M., Blanco Jerez L., *Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue*. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* 2006, 11: E47-51.
- Fields C.G.**, Lloyd D.H., Macdonald R.L., Ottenson K.M., Noble R.L., *HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis*. *Peptide Research* 1991, 4: 95-101.

Fields G.B., Noble R.L., *Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids*. Int. J. Pept. Prot. Res. 1990, 35: 161-214.

Fields G.B., Tian Z., Barany G., *Synthetic Peptides: A User's Guide*, Grant G.A. (ed), W.H. Freeman and Company, New York, 1992

Firth A., Aggeli A., Burke J. L., Yang X., Kirkham J., *Biomimetic self-assembling peptides as injectable scaffolds for hard tissue engineering*. Nanomedicine 2006, 1(2): 189-199.

Folch A., Toner M., *Microengineering of cellular interactions*. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2000, 2: 227-256.

Fujihara K., Kotakib M., Ramakrishna S., *Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers*. Biomaterials 2005, 26: 4139-4147.

Fung S.Y., Keyes C., Duhamel J., Chen P., *Concentration Effect on the Aggregation of a Self-Assembling Oligopeptide*. Biophys. J. 2003, 85: 537-548.

Gambaretto R., Tonin L, Di Bello C., Dettin M., *Self-Assembling Peptides: Sequence, Secondary Structure in solution and Film Formation*. Biopolymers 2008, 89: 906-915.

Gelain F., Bottai D., Vescovi A., Zhang S., *Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds for Adult Mouse Neural Stem Cell 3-Dimensional Cultures*. Plos One 2006, 1: e119.

Gottschau M., *Struktur und Embryonale Entwicklung der Nebennieren bei Säugetieren*. Archiv Fur Anatomie und Entowicklungsgeschichte, Anatomischer Abteilung 1883, 9: 412-458.

Grant G.A., *Synthetic peptides A User's Guide*, II ed, Oxford University Press, 2002.

Griffiths P.R., de Haseth J.A., *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, Elving P.J., Winefordner J.D., Kolthoff I.M. (ed), Chemical Analysis vol 83, Wiley Interscience Publication, New York, 1986.

Hamada K., Hirose M., Yamashita T., Ohgushi H., *Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold*. J. Biomed. Mater. Res. 2008, 84A: 128-136.

Hering J.A., Innocent P.R., Haris P.I., *Automatic amide I frequency selection for rapid quantification of protein secondary structure from Fourier transform infrared spectra of proteins*. Proteomics 2002, 2(7): 839-849.

Hersel U., Dahmen C., Kessler H., *RDG modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond*. Biomaterials 2003, 24: 4385-4415.

Hesse M., Meier H., Zeeh B., *Metodi spettroscopici nella chimica organica*, V ed. EdiSES 1996.

Holmes T., de Lacalle S., Su X., Liu G., Rich A., Zhang S., *Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97: 6728-6733.

Hong Y., Legge R.L., Zhang S., Chen P., *Effect of Amino Acid Sequence and pH on Nanofiber Formation of Self-Assembling Peptides EAK16-II and EAK16-IV*. Biomacromolecules 2003, 4: 1433-1442.

Horii A., Wang X., Gelain F., Zhang S., *Biological Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds Significantly Enhance Osteoblast Proliferation, Differentiation and 3-D Migration*. PLoS ONE 2007, 2(2): e190 (doi:10.1371/journal.pone.0000190).

Houseman T., Mrksich M., *The microenvironment of immobilized Arg-Gly-Asp peptides is an important determinant of cell adhesion*. Biomaterials, 22: 943-955.

Hu Z.M., Peel S.A.F., Ho S.K.C., Sándor G.K.B., Su Y., Clokie C.M.L., *The expression of bone matrix proteins induced by different bioimplants in a rabbit sinus lift model*. J. Biomed. Mater. Res. Part A 2010, 95A(4): 1048-1054.

Huang J.C-C., Miyagawa S., Matsumaru D., Parker K.L., Yao H.H-C., *Progenitor Cell Expansion and Organ Size of Mouse Adrenal Is Regulated by Sonic Hedgehog*. Endocrinology 2010, 151: 1119-1128.

Idelman I., *The structure of the mammalian adrenal cortex*, in: "General, Comparative and Clinical Endocrinology of the Adrenal Cortex", Chester-Jones I., Henderson I.W. (Ed.), vol. 2, Academic Press, New York, 1978, pp. 1-199.

Introduction to Cleavage Techniques, "Strategies in Peptide Synthesis", Applied Biosystem (ed), 1990.

- Jackson M.**, Mantsch H.H., *The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1995, 30(2) 95-120.
- Jaiswal N.**, Haynesworth S.E., Caplan A.I., Bruder S.P., *Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro*. J. Cell. Biochem. 1997, 64(2): 295-312.
- Jang J-H.**, Castano O., Kim H-W., *Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineerin*. Advanced Drug Delivery Reviews 2009, 61: 1065-1083
- Jin H.J.**, Fridrikh S.V., Rutledge G.C., Kaplan D.L., *Electrospinning bombyx mori silk with poly(ethylene oxide)*. Biomacromolecules 2002, 3(6): 1233-9.
- Jin H.J.**, Chen J., Karageorgiou V., Altman G.H., Kaplan D.L., *Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats*. Biomaterials 2004, 25(6): 1039-1047.
- Jun S.**, Hong Y., Imamura H., Ha B.-Y., Bechhoefer J., Chenytesi P., *Self-Assembly of the Ionic Peptide EAK16: The Effect of Charge Distributions on Self-Assembly*. Biophys. J. 2004, 87: 1249-1259.
- Kashirina N.K.**, *The morphological and functional basis of the new conception about the suprarenal cortex regeneration*. Medicina 2003, 39(10): 951-954.
- Kebebew E.**, *Commentary: Nile Red Staining Hlps Select Cells with Adrenocortical Progenitors Cell-Like Phenotype*. J. of Surgical Research 2010, 161: 34-35.
- Kessler G.**, Wolfman M., *An automated procedure for the simultaneous determination of calcium and phosphorus*. Clin. Chem. 1964, 10(8): 686-703.
- Kim A.C.** , Hammer G.D., *Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: Recent advances*. Molecular and Cellular Endocrinology 2007, 265-266: 10-16.
- Kim A.C.**, Barlaskar F.M., Heaton J.H., Else T., Kelly V.R., Krill K.T., Scheys J.O., Simon D.P., Trovato A., Yang W-H., Hammer G.D., *In Search of Adrenocortical Stem and Progenitor Cells*. Endocrine Reviews 2009, 30(3): 241-263.
- Kim H-W.**, Yu H-S., Lee H-H., *Nanofibrous matrices of poly(lactic acid) and gelatin polymeric blends for the improvement of cellular responses*. J Biomed. Mater. Res. 2008, 87A: 25-32.

- Kim K.**, Yu M., Zong X., Chiu J., Fang D., Seo Y.S., Hsiao B.S., Chu B., Hadjiargyrou M., *Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(D,L-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications*. *Biomaterials* 2003, 24(27): 4977-85.
- King D.S.**, Fields C.G., Fields G.B. *A cleavage method which minimized side reaction following Fmoc solid phase peptide synthesis*. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1990, 36: 255-266.
- King P.**, Paulb A., Lauferb E., *Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages*. *PNAS* 2009, 106(50): 21185-21190.
- Kong J.**, Yu S., *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007: (39)8: 549-559.
- Kouvroukoglou S.**, Dee K.C., Bizios R, McIntire L.V., Zygourakis K., *Endothelial cell migration on surfaces modified with immobilized adhesive peptides*. *Biomaterials* 2000, 21: 1725-1733.
- Li W.J.**, Laurencin C.T., Caterson E.J., Tuan R.S., Ko F.K., *Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering*. *J Biomed. Mater. Res.* 2002, 60(4): 613-21.
- Li W.J.**, Tuli R., Okafor C., Derfoul A., Danielson K.G., Hall D.J., Tuan R.S., *A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using mesenchymal stem cells*. *Biomaterials* 2005, 26(6): 599-609.
- Lim S.H.**, Mao H. Q., *Electrospun scaffolds for stem cell engineering*. *Adv. Drug Delivery Reviews* 2009, 61: 1084-1096.
- Ma K.**, Chan C.K., Liao S., Hwang W.YK., Feng Q., Ramakrishna S., *Electrospun nanofiber scaffolds for rapid and rich capture of bone marrow-derived hematopoietic stem cells*. *Biomaterials* 2008, 29:2096-2103.
- Ma P.X.**, Zhang R., *Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix*. *J.Biomed. Mater. Res.* 1999, 46: 60-72.
- Mantsch H.H.**, Perczel A., Hollosi M., Fasman D., *Characterization of β -turn in cyclic hexapeptides in solution by fourier transform IR spectroscopy*. *Biopolymers* 1993, 33(2): 201-207.

Massia S.P., Hubbel J.A., *An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin $\alpha_v\beta_3$ -mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation.* J. Cell. Biol. 1991, 114 (5): 1089-1100.

Matthews J.A., Wnek G.E., Simpson D.G., Bowlin G.L., *Electrospinning of Collagen Nanofibers.* Biomacromolecules 2002, 3(2): 232-8.

Merrifield B., *Solid Phase Synthesis.* Science 1986, 232: 341-347.

Mesiano S., Jaffe R.B., *Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex.* Endocr. Rev. 1997, 18(3): 378-403.

Misawa H., Kobayashi N., Soto-Gutierrez A., Chen Y., Yoshida A., Rivas-Carrillo J.D., 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: 903-910.

Mitani F., Suzuki H., Hata J., Ogishima T., Shimada H., Ishimura Y., *A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role.* Endocrinology 1994, 135: 431-438.

Mitani F., Mukai K., Miyamoto H., Suematsu M., Ishimura Y., *The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex.* Biochimica et Biophysica Acta 2003, 1619: 317-324.

Moorehead W.R., Biggs H.G., *2-amino-2 methyl-1 propanol as the alkalizing agent in an improved continuous flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum.* Clin. Chem. 1974, 20: 1458-60.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. and Erlich H., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1986, 51(1): 263-273.

Murphy W.L., Mooney D.J., *Controlled delivery of inductive proteins, plasmid DNA and cells from tissue engineering matrices.* J. Periodontal Res. 1999, 34: 413-419.

Nakahara H., Misawa H., Yoshida A., Hayashi T., Tanaka M., Furumatsu T., Tanaka N., Kobayashi N., Ozaki T., *Bone Repair Using a Hybrid Scaffold of Self-Assembling Peptide PuraMatrix and Polyetheretherketone Cage in Rats.* Cell Transplantation 2010, 19: 791-797.

- Nie H.**, Wang C-H., *Fabrication and characterization of PLGA/HAp composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA*. Journal of Controlled Release 2007, 120: 111-121.
- Nisbet D.R.**, Forsythe J.S., Shen W., Finkelstein D.I., Horne M.K., *Review Paper: A Review of the Cellular Response on Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering*. J Biomater. Appl. 2009, 24: 7-29.
- Ogishima T.**, Suzuki H., Hata J., Mitani F., Ishimura Y., *Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P450 and cytochrome P45011h in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional Zonation*. Endocrinology 1992, 130: 2971-2977.
- Oha S.H.**, Parka I.K., Kimb J.M., Lee J.H., *In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method*. Biomaterials 2007, 28: 1664-1671.
- Okamoto M.**, Takemori H., Halder S.K., Hatano O., *Zona glomerulosa-specific factor: Cloning and function*. Steroids 1997, 62: 73-76.
- Park J.B.**, *The Effects of Dexamethasone, Ascorbic Acid, and b-Glycerophosphate on Osteoblastic Differentiation by Regulating Estrogen Receptor and Osteopontin Expression*. J. Surg. Res. 2010, Article in press.
- Pearson D.A.**, Blanchetteb M., Baker M.L., Guindon C.A., *Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis*. Tetrahedron Letters 1989, 30: 2739-2742.
- Pelton J.T.**, McLean L.R. *Review: Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure*. Analytical Biochemistry 2000, 277: 167-176.
- Perrone R.D.**, Bengel H.H., Alexander E.A., *Sodium retention after adrenal enucleation*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 1986, 250(1): E1-E12.
- Pham Q.P.**, Sharma U., Mikos A.G., *Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review*. Tissue Eng. 2006, 12(5): 1197-1211.
- Porter J.R.**, Ruckh T.T., Popat K.C., *Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies*. Biotechnol. Prog. 2009, 25: 1539-1560.
- Proff P.**, Römer P., *The molecular mechanism behind bone remodelling: a review*. Clin. Oral. Invest. 2009, 13: 355-362.

Rainey W.E., Saner K., Schimmer B.P., *Adrenocortical cell lines*. Mol. Cell. Endocr. 2004, 228: 23-38.

Rezania A., Thomas C.H., Branger A.B., Waters C.M., Healy K.E., *The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein*. J. Biomed. Mater. Res. 1997, 37: 9-19.

Rezania A., Healy K.E., *Biomimetic Peptide Surfaces That Regulate Adhesion, Spreading, Cytoskeletal Organization, and Mineralization of the Matrix Deposited by Osteoblast-like Cells*. Biotechnol. Prog. 1999, 15: 19-32.

Richardson T.P., Murphy W.L., Mooney D.J., *Polymeric delivery of proteins and plasmid DNA for tissue engineering and gene therapy*. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 2001, 11: 47-58.

Sakiyama-Elbert S.E., Hubbel J.A., *Functionals biomaterials: Design of novel biomaterials*. Annu. Rev. Mater. Res. 2001, 31: 183-201.

Salgado A.J., Coutinho O.P., Reis R.L., *Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends*. Macromol. Biosci. 2004, 4: 743-765.

Sarikaya M., Tamerler C., Jen A.K.-Y., Schulten K., Baneyx F., *Molecular biomimetics: nanotechnology through biology*. Nature Materials 2003, 2: 577-585.

Schachner M., *Nervous engineering*. Nature 2000, 405: 747-748.

Sell S.A., Francis M.P., Garg K., McClure M.J., Simpson D.G., Bowlin G.L., *Cross-linking methods of electrospun fibrinogen scaffolds for tissue engineering applications*. Biomed. Mater. 2008, 3: 045001 (doi:10.1088/1748-6041/3/4/045001).

Sell S.A., Wolfe P.S., Garg K., McCool J.M., Rodriguez I.A., Bowlin G.L., *The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues*. Polymers 2010, 2: 522-553.

Semino C.E., *Self-assembling Peptides: From Bio-inspired Materials to Bone Regeneration*. J Dent. Res. 2008, 87(7): 606-616.

Siber P., Riniker B., *Protection of histidine in peptide synthesis: a reassessment of trityl group*. Tetrahedron Letters 1987, 28: 6031-6034.

Siber P., Riniker B., *Protection of carboxamide functions by the trityl residue. Application to peptide synthesis*. Tetrahedron Letters 1991, 32: 739-742.

Siuzdak G., *The Emergence of Mass Spectrometry in Biochemical Research*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91: 11290-11297.

Skelton F.R., *Adrenal regeneration and adrenal-regeneration hypertension*. Physiol. Rev. 1959, 39(1): 162-182.

Smith I.O., Liu X.H., Smith L.A, Ma P.X., *Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine*. Nanomed. Nanobiotechnol. 2009, 1: 226-236.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analyt. Biochem. 1985, 150: 76-85.

Song J-H., Kim H-E., Kim H-W., *Electrospun fibrous web of collagen-apatite precipitated nanocomposite for bone regeneration*. J. Mater. Sci: Mater. Med. 2008, 19: 2925-2932.

Stulik K., Pacakova V., Suchankova J., Claessens H.A., *Stationary phase for peptide analysis by high performance liquid chromatography: a review*. Analytica Chimica Acta 1997, 352: 1-19.

Susi H., Byler D.M., *Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy of enzymes*. Methods Enzymol. 1986, 130(C): 290-311.

Teebken O.E., Scheumann G.F., *Differentiated corticosteroid production and regeneration after selective transplantation of cultured and noncultured adrenocortical cells in the adrenalectomized rat*. Transplantation 2000, 70: 836-843.

Thomas M., Northrup S.R., Hornsby P.J., *Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands*. Nat. Med. 1997, 3(9): 978-983.

Thomas M., Yang L., Hornsby P.J., *Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase*. Nat. Biotechnol. 2000, 18(1): 39-42.

Um I.C., Fang D., Hsiao B.S., Okamoto A., Chu B., *Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid*. Biomacromolecules 2004, 5(4): 1428-36.

User Bulletin 33, *FastMoc™ chemistry: HBTU activation in peptide synthesis on the model 431A*, model 431A Peptide Synthesizer, Applied Biosystem (ed.) 1990.

User Manual, Model 431A Peptide Synthesizer, versione 1.12, Applied Biosystem (ed.), 1990.

Vasita R., Katti D. S., *Nanofibers and their applications in tissue engineering*. Int. J. of Nanomed. 2006, 1(1): 15-30.

Venugopal J., Ma L.L., Yong T., Ramakrishna S., *In vitro study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices*. Cell Biol. Int. 2005, 29(10): 861-7.

Vinson G.P., *The adrenal cortex and life*. Mol. Cell. Endocr. 2009, 300: 2-6.

Wang H.S., Fu G.D., Li X.S., *Functional Polymeric Nanofibers from Electrospinning*. Recent Patents on Nanotechnology 2009, 3(1): 21-31.

Whitaker M.J., Quirk R.A., Howdle S.M., Shakesheff K.M., *Growth factor release from tissue engineering scaffold*. J.Pharm. Pharmacol. 2001, 54: 1427-1437.

Wnek G.E., Carr M.E., Simpson D.G., Bowlin G.L., *Electrospinning of nanofiber fibrinogen structures*. Nano Lett. 2003, 3(2): 213-6.

Xiong H., Buckwalter B.L., Shieh H.-M., Hecht M.H., *Periodicity of polar and nonpolar amino acids is the major determinant of secondary structure in self-assembling oligomeric peptides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92: 6349-6353.

Yanase T., Gondo S., Okabe T., Tanaka T., Shirohzu H., Fan W., Oba K., Morinaga H., Nomura M., Ohe K., Nawata H., *Differentiation and Regeneration of Adrenal Tissues: An Initial Step toward Regeneration Therapy for Steroid Insufficiency*. Endocrine Journal 2006, 53 (4): 449-459.

Yokose S., Ishizuya T, Ikeda T, Nakamura T, Tsurukami H, Kawasaki K, et al., *An estrogen deficiency caused by ovariectomy increases plasma levels of systemic factors that stimulate proliferation and differentiation of osteoblasts in rats*. Endocrinology 1996, 137: 69-78.

Yoo H.S., Kim T.G., Park T.G., *Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery*. Adv. Drug Delivery Reviews 2009, 61: 1033-1042.

- Yoshimoto H.**, Shin Y. M., Terai H., Vacanti J. P., *A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering*. *Biomaterials* 2003, 24: 2077-2082.
- Yu H-S.**, Jang J.-H., Kim T.-I., Lee H.-H., Kim H.-W., *Apatite-mineralized polycaprolactone nanofibrous web as a bone tissue regeneration substrate*. *J. Biomed. Mater. Res.* 2009, 88A: 747-754.
- Zajicek G.**, Ariel I., Arber N., *The streaming adrenal cortex: direct evidence of centripetal migration of adrenocytes by estimation of cell turnover rate*. *J. Endocrinol.* 1986, 111(3): 477-482.
- Zhang F.**, Shi G-S., Ren L-F., Hu F-Q, Li S-L., Xie Z-J., *Designer self-assembling peptide scaffold stimulates pre-osteoblast attachment, spreading and proliferation*. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 2009, 20: 1475-1481.
- Zhang Y.**, Ouyang H., Lim C.T., Ramakrishna S., Huang Z-M., *Electrospinning of Gelatin Fibers and Gelatin/PCL Composite Fibrous Scaffolds*. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2005, 72B: 156-165.
- Zhang Y.**, Venugopal J.R., El-Turki A., Ramakrishna S., Su B., Lim C.T., *Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering*. *Biomaterials* 2008, 29: 4314-4322.
- Zhang S.**, Holmes T., Lockshin C., Rich A., *Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 3334-3338.
- Zhang S.**, Lockshin C., Cook R., Rich A., *Unusually stable β -sheet formation in an ionic self-complementary oligopeptide*. *Biopolymers* 1994, 34: 663-672.
- Zhang S.**, *Molecular Self-assembly*, Encyclopedia of Materials: Science and Technology Ed. Elsevier Science Ltd. 2001, 5822-5829.
- Zhu J.**, Shao H., Hu X., *Morphology and structure of electrospun mats from regenerated silk fibroin aqueous solutions with adjusting pH*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2007, 41(4): 469-74.

