

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71- Tecnologie della Chimica Industriale

**Design, preparazione e caratterizzazione di
nanostrutture di DNA come candidati farmaci
per terapia a RNA**

Tesi Sperimentale

CANDIDATO

Enrico Temellini

RELATORE

Dott. Giampaolo Zuccheri

II Sessione

Anno Accademico 2021-2022

Abstract

Le terapie a RNA stanno attraendo interesse crescente vista la loro capacità di colpire target che venivano dapprima considerati *undruggable*. Uno degli ambiti di applicazione suggeriti della terapia a RNA è la neuroinfiammazione, una condizione patologica che accompagna e agisce da concausa nelle malattie neurodegenerative. In particolare, si è verificato che nei processi neuroinfiammatori, alcuni microRNA risultano sovra-regolati e tra questi miR-34a. Si è quindi proposto di sviluppare metodi atti a ridurre il contenuto cellulare di miR-34a soprattutto nelle cellule la cui attivazione causa maggiormente la neuroinfiammazione: la microglia. L'obiettivo del lavoro di tesi è stato di sviluppare una nanostruttura di DNA in grado di veicolare una sequenza catalitica (DNAzima) che porti al taglio del miR-34a, una volta internalizzata nelle cellule.

Durante il lavoro di tesi si sono sviluppati due diversi dendrimeri di DNA pensati per ridurre il contenuto di miR-34a. I sistemi sono stati progettati con l'ausilio di strumenti bioinformatici e poi realizzati in laboratorio e caratterizzati con tecniche biochimiche. Il sistema più promettente è stato caratterizzato per quanto riguarda la sua attività enzimatica di taglio di miR-34a e l'efficienza di internalizzazione da parte di cellule vive di microglia.

I risultati ottenuti confermano la solidità del metodo utilizzato per il design del sistema progettato. Le prove condotte sul dendrimero finale, contenente la sequenza attiva, dimostrano il mantenimento dell'attività catalitica del DNAzima e l'internalizzazione della nanostruttura nelle cellule bersaglio.

RNA therapies are attracting a growing interest due to their ability to tackle diseases that are caused by undruggable agents. Neuroinflammation is a pathologic condition that is always associated with neurodegenerative diseases. It was shown that some microRNAs are overregulated in neuroinflammation, amongst which miR-34a. It was suggested that strategies could be developed in order to reduce the cell content of mir-34a, with special reference to microglia cells: some of the main cell types involved in triggering neuroinflammation. The goal of this thesis project was to develop a DNA nanostructure bearing catalytic units (DNAzymes) that should lead to cutting miR-34a once inside live cells.

During this project, 2 different DNA dendrimers were developed. These were designed as tools to reduce the content of miR-34a. The dendrimers were designed with the aid of bioinformatics tools, then assembled in the lab and characterized. The more promising dendrimer was also characterized for its RNA-cleaving activity and the efficiency of its internalization by microglia cells.

The results confirm the robustness of the employed strategy for the design and preparation of the nanostructures. It was shown that the elected dendrimer exposes efficient DNAzyme structures and is internalized by live cells.

Indice

Abstract.....	I
Indice	III
1. Introduzione	1
1.1 Premessa sulle terapie basate su acidi nucleici.....	1
1.1.1 <i>I microRNA e il loro meccanismo di azione.....</i>	<i>2</i>
1.2 Microglia e il suo ruolo nella neuroinfiammazione.....	4
1.2.1 <i>Analisi dei miRNA coinvolti nell'infiammazione della microglia.....</i>	<i>5</i>
1.3 Strategie terapeutiche che utilizzano gli acidi nucleici per colpire miRNA.....	6
1.3.1 <i>ASO.....</i>	<i>8</i>
1.3.2 <i>miRNA sponges</i>	<i>8</i>
1.3.3 <i>DNAzimi</i>	<i>9</i>
1.3.4 <i>L'importanza di un sistema di trasporto</i>	<i>10</i>
1.4 Nanodelivery degli acidi nucleici	11
1.4.1 <i>Nanostrutture di DNA per il drug delivery</i>	<i>13</i>
1.5 Progettazione di nanostrutture di DNA	14
1.5.1 <i>NUPACK.....</i>	<i>15</i>
1.6 Tipologie di nanostrutture di DNA per il drug delivery	17
1.6.1 <i>Origami di DNA</i>	<i>17</i>
1.6.2 <i>Tetraedri di DNA.....</i>	<i>17</i>
1.6.3 <i>DNA nanoflower.....</i>	<i>18</i>
1.6.4 <i>Dendrimeri di DNA.....</i>	<i>19</i>
1.6.5 <i>Sintesi di dendrimeri con metodo self-assembly enzyme-free.....</i>	<i>21</i>
1.6.6 <i>Sintesi di dendrimeri con metodo catalytic self-assembly enzyme-free</i>	<i>22</i>
2. Scopo della Tesi.....	24
3. Materiali e Metodi	25

3.1	Design e analisi delle nanostrutture tramite NUPACK.....	25
3.1.1	<i>Design dei filamenti</i>	25
3.1.2	<i>Analisi dei filamenti</i>	26
3.2	Assemblaggio delle nanostrutture.....	26
3.2.1	<i>Appaiamento delle Y di DNA</i>	26
3.2.2	<i>Assemblaggio dei dendrimeri di DNA.....</i>	27
3.3	PAGE denaturante.....	28
3.3.1	<i>Protocollo gel di poliacrilamide denaturante al 10%</i>	28
3.4	PAGE nativa.....	29
3.4.1	<i>Protocollo gel di poliacrilamide al X%</i>	30
3.5	Elettroforesi su gel di agarosio.....	31
3.5.1	<i>Protocollo gel di agarosio al 1,5%.....</i>	31
3.6	Estrazione delle Y da gel di poliacrilamide.....	31
3.7	Attività enzimatica magnesio dipendente	32
3.7.1	<i>Attività enzimatica a 10mM e 0,5 mM di magnesio cloruro in funzione del tempo .</i>	32
3.7.2	<i>Attività enzimatica a concentrazioni decrescenti di magnesio cloruro.....</i>	32
3.8	Prove di Internalizzazione delle nanostrutture di DNA in sistemi cellulari	33
4.	Discussione e risultati	35
4.1	Analisi del sistema precedente	35
4.1.1	<i>Analisi del design e della metodica per la generazione delle sequenze.....</i>	35
4.1.2	<i>Analisi dell'appaiamento dei filamenti</i>	37
4.1.3	<i>Analisi dell'assemblaggio della nanostruttura</i>	43
4.1.4	<i>Purificazione di Y₀.....</i>	43
4.2	Analisi del design di Yang <i>et al.</i>	45
4.3	Impostazione del nuovo design.....	48
4.3.1	<i>Design di un sistema catalytic self-assembly e layer by layer</i>	48
4.4	Verifica della qualità dei filamenti mediante elettroforesi su gel	56

4.4.1	<i>Analisi dei filamenti progettati</i>	56
4.3.2	<i>Analisi dei filamenti del sistema riportato in letteratura</i>	57
4.5	Appaiamento delle Y di DNA	57
4.5.1	<i>Prove preliminari</i>	57
4.5.2	<i>Ottimizzazione della stechiometria</i>	59
4.5.3	<i>Assemblaggi in condizioni alternative</i>	60
4.6	Assemblaggio delle G1	61
4.6.1	<i>Prova preliminare</i>	61
4.6.2	<i>Prove di Assemblaggio di G1 in diverse condizioni</i>	62
4.7	Design della Y₂	66
4.8	Verifica dei filamenti ed assemblaggio della Y₂	69
4.8.1	<i>Analisi dei filamenti</i>	69
4.8.2	<i>Appaiamento per la formazione di Y₂</i>	69
4.9	Assemblaggio di G2	70
4.10	Verifica dell'attività enzimatica del DNAsima	72
4.11	Internalizzazione dei dendrimeri di DNA in sistemi cellulari	74
5.	Conclusioni	76
6.	Bibliografia	77

1.Introduzione

1.1 Premessa sulle terapie basate su acidi nucleici

La ricerca farmaceutica si può dividere in due ambiti distinti in base allo scopo che si prefiggono: scoprire nuovi bersagli terapeutici per andare a trattare le patologie o trovare nuove strategie terapeutiche per andare a colpire i bersagli in maniera più efficiente e sicura dei farmaci precedenti. La ricerca degli ultimi decenni incentrata sugli acidi nucleici ha fornito una notevole spinta in entrambi gli ambiti.

Le terapie basate su acidi nucleici si possono dividere in 2 differenti approcci: il primo che prevede la distribuzione di sequenze di DNA per esprimere il gene di interesse, sotto il controllo di un idoneo promotore, così da aumentare l'espressione della proteina bersaglio ad esempio tramite la produzione di una proteina terapeutica; il secondo metodo prevede l'espressione o il trasporto di sequenze di materiale genetico che vadano a ridurre la produzione delle proteine bersaglio tramite diverse strategie¹.

Per analizzare il funzionamento di quest'ultime si deve prima considerare come normalmente l'espressione dei geni: il DNA viene trascritto in mRNA che poi, grazie ai ribosomi, viene tradotto in proteina. I sistemi che si basano su acidi nucleici puntano nella maggior parte ad interagire con il mRNA operando una regolazione dell'espressione genetica o, nel caso degli aptameri, andando ad interagire con l'enzima già formato e quindi operando da veri e propri inibitori enzimatici².

Già alla fine degli anni '70 del secolo scorso è stato dimostrato come un oligonucleotide sintetico potesse andare ad influire sulla traduzione di un RNA bersaglio³ aprendo così le porte alla strategia terapeutica "antisense" che prevede l'utilizzo di brevi sequenze di DNA a singolo filamento, di circa 20 nucleotidi, denominati ASO (*antisense oligonucleotides*) per inibire l'espressione di un gene bersaglio. Il funzionamento prevede un appaiamento perfetto della sequenza di basi con il mRNA bersaglio e portando al taglio della sequenza ad opera della RNasi H e la conseguente degradazione del filamento⁴.

Successivamente nel 2001 si è scoperta la possibilità di indurre il meccanismo dell'RNA *interference* (RNAi) nelle cellule con l'introduzione di RNA artificiale. Questo fenomeno si basa sull'inibizione dell'espressione genica da parte di un corto dsRNA (21-23 nt), chiamato *short interfering RNA* (siRNA), che associandosi ad un complesso proteico va a formare il

RISC (*RNA induced silencing complex*). Con la perdita del filamento complementare si attiva il complesso che successivamente perfetta complementarità alle basi di un mRNA bersaglio grazie alla presenza del filamento di DNA all'interno. Il RISC, associato al mRNA bersaglio, porta poi taglio del secondo da un componente del complesso proteico RISC e successivamente degradato dall'ambiente⁵.

1.1.1 I microRNA e il loro meccanismo di azione

Un meccanismo simile, che rientra nella categoria dei RNAi, per la regolazione post-trascrizionale dei geni, viene attuato dai micro-RNA (miRNA). I miRNA sono corte sequenze di ssRNA (*single stranded RNA*) di circa 22 nt ed appartengono ad una classe di RNA definiti come non codificanti (ncRNA); sono infatti catene di RNA abbondantemente espresse in tutti i tessuti ma che presentano un importante ruolo nella regolazione dei geni su più livelli invece che come messaggeri nell'espressione genica.

I miRNA, in particolare, dopo essere trascritti e aver subito un processo di maturazione vanno a regolare l'espressione genica legandosi al RISC, formando quindi il complesso miRISC. In questo caso però la complementarità della sequenza rispetto al mRNA non è perfetta, presentano una regione di complementarità dal nucleotide 2 al 7 e quindi non provocando il taglio della sequenza come con i siRNA ma eseguendo una repressione genica tramite silenziamento del mRNA bersaglio. Questa piccola regione di complementarità viene definita come "*seed region*" ed è localizzata al 5' del miRNA⁶.

Questa caratteristica, essendo una piccola sequenza di appaiamento, permette ad un singolo miRNA di legare molti mRNA bersaglio e quindi entrare in diversi pathway metabolici. Infatti, si è scoperto negli anni che in quasi tutti processi biologici (90%) i miRNA presentano un ruolo chiave e una loro alterazione può portare allo sviluppo e alla progressione di diverse patologie⁷. Per questo motivo i miRNA sono dei validi bersagli terapeutici che vanno ad ampliare i possibili bersagli farmacologici non limitandosi più solo a proteine e mRNA che codificano per esse (ASO), ma influenzando tutti quegli ncRNA che presentano un ruolo attivo nella loro regolazione⁸.

Tramite queste tecnologie è quindi possibile andare a colpire i bersagli direttamente a livello del mRNA potendo quindi indirizzare i miRNA virtualmente verso qualsiasi bersaglio, anche quelli definiti "*undruggable*" da parte delle *small molecules* per via delle loro caratteristiche chimico-fisiche e strutturali. Per l'utilizzo di queste tecnologie in ambito clinico risulta però necessario un attento studio sui vari pathway che vanno ad interagire con quello modificato,

oltre che sul profilo farmacodinamico e farmacocinetico delle molecole. Per questo, solo nel 1998 è stato approvato il primo farmaco per uso clinico che sfruttava la tecnologia ASO⁹.

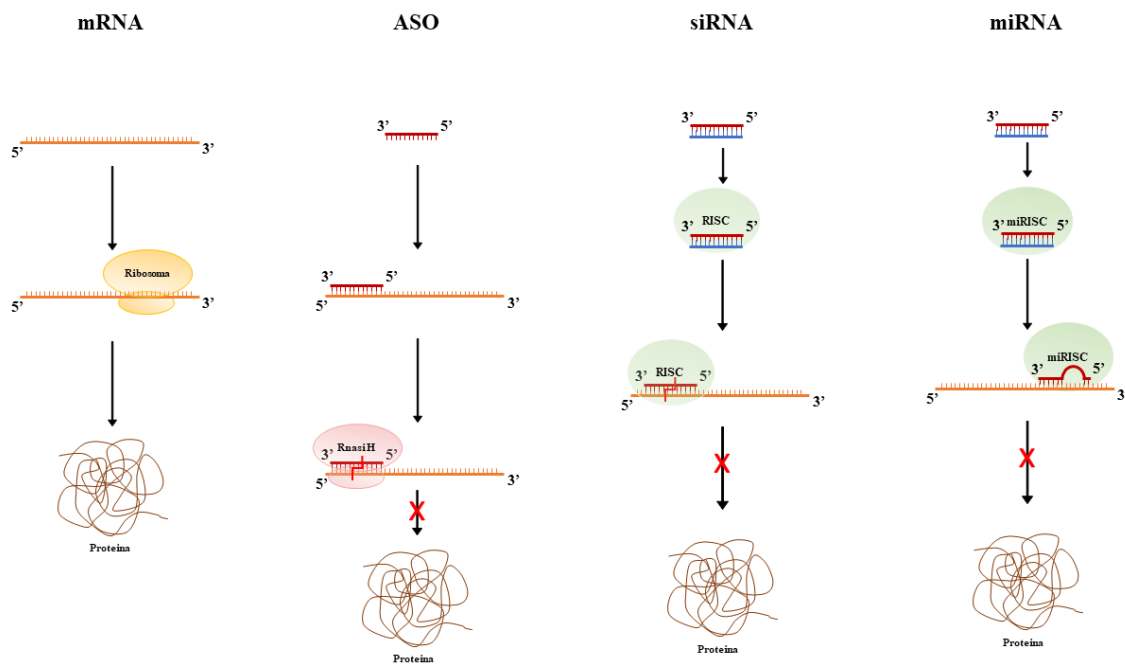


Figura 1.1 Schema degli approcci terapeutici basati sul RNA.

Durante questi decenni altri farmaci che sfruttano ASO e siRNA sono stati approvati dalla FDA per l'uso clinico¹⁰⁻¹³ ma risulta ancora impossibile trovare farmaci basati che focalizzano la loro azione sui miRNA².

Questo è dovuto all'abilità unica dei miRNA di colpire bersagli multipli che si presenta sia come una potenzialità ma anche come il loro punto di debolezza. Infatti, andare ad utilizzare come bersaglio un miRNA può sia risolvere una determinata patologia ma anche svilupparne una seconda visto i molti pathway regolati dalla stessa sequenza. Inoltre, bisogna considerare che molti dei pathway regolati da determinate sequenze risultano essere ancora ignoti vista la difficoltà di predire e dimostrare le interazioni miRNA-mRNA⁷.

Nonostante questo, la ricerca sui miRNA per sviluppare diverse strategie per la loro regolazione continua, visto le grandi potenzialità che offrono da un punto di vista terapeutico e considerato il ruolo chiave che ricoprono in importantissimi processi fisiologici e patologici.

1.2 Microglia e il suo ruolo nella neuroinfiammazione

La microglia è uno dei 4 principali tipi cellulari che vanno a costituire il sistema nervoso centrale (SNC) insieme a neuroni, astrociti e oligodendrociti, costituendo da sola il 5-20% delle cellule presenti¹⁴.

All'interno del SNC le cellule di microglia rivestono 2 importanti ruoli: la difesa immunitaria e la manutenzione. Come cellule immunitarie agiscono come sentinelle, andando a rilevare i primi segnali di invasione patogena o tessuti danneggiati nel delicato ambiente che risulta attivamente protetto dalla "barriera ematoencefalica"¹⁵. Sotto condizioni infiammatorie di un sistema immunitario attivo, la microglia deve moderare però i potenziali danni al SNC supportando la riparazione dei tessuti oltre che il rimodellamento dopo il periodo di infiammazione. Non sorprende quindi che un'infezione non controllata della microglia venga registrata in tutte le patologie cerebrali e, supportato da sempre più studi, si può correlare questa infiammazione con gli effetti diretti sui neuroni che portano infine alla progressione della malattia^{16,17}. In un SNC sano, invece, la microglia controlla la proliferazione neuronale, la differenziazione e la formazione delle connessioni sinaptiche,¹⁸ trovandosi in un fenotipo omeostatico¹⁹.

Per lo svolgimento delle sue funzioni, quindi, deve mantenere un continuo scambio di informazioni con le cellule circostanti, verificando tramite o un contatto fisico diretto o tramite una secrezione di fattori solubili e di vescicole extra cellulari²⁰ il corretto sviluppo del SNC.

In condizioni basali, cellule si presentano quindi con una morfologia estremamente ramificata con la presenza di tanti prolungamenti con i quali le cellule possono sondare l'ambiente circostante in maniera tale da ricevere i diversi stimoli. In base alle informazioni ricevute possono quindi trasformarsi assumendo un fenotipo differente per rispondere ai vari stimoli.

La microglia venne definita come il macrofago del SNC. I fenotipi che può assumere la microglia vengono nominati come M1 e M2. L'attivazione classica, o tipo M1, porta la cellula in un fenotipo pro-infiammatorio in risposta ad un tessuto danneggiato o ad un'infezione, il fenotipo M2, invece, descrive uno stato antinfiammatorio che induce la produzione di citochine antinfiammatorie e l'assorbimento di detriti portando alla risoluzione del processo infiammatorio e alla riparazione tissutale, favorendo l'omeostasi^{20,21}.

Considerando ora le malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer (AD), di Parkinson (PD), la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e la Sclerosi Multipla (MS), uno dei tratti distintivi che li accumuna risulta essere proprio la neuroinfiammazione, cioè l'infiammazione del SNC. In questi casi la microglia risulta essere una delle condizioni

scatenati, infatti, si nota dagli studi effettuati come sia presente uno sbilanciamento verso il fenotipo proinfiammatorio M1 e una mancata transizione verso il fenotipo M2 che permetterebbe al SNC di rigenerarsi. L'eccessiva esposizione alle specie reattive prodotte porta quindi ad una morte neuronale sviluppando una malattia neurodegenerativa^{20,22}.

Anche in caso di presenza di patogeni che si possono trovare durante la neuroinfiammazione, la comunicazione della microglia con l'esterno è essenziale. Infatti, tramite fattori solubili e vescicole extracellulari (EVs), che possono agire anche a lunga distanza, le cellule della microglia possono influenzare l'attivazione delle cellule riceventi circostanti. Quindi, oltre a provocare danni a livello neuronale nel caso del fenotipo M1, la singola cellula può modulare l'attivazione della microglia circostante, sia per assumere un fenotipo M1 che M2, a seconda dei casi e propagare la condizione nelle zone limitrofe^{20,23}.

1.2.1 Analisi dei miRNA coinvolti nell'infiammazione della microglia

Anche nel caso della infiammazione della microglia, i microRNA presentano un ruolo chiave nella sua regolazione. Infatti, considerando l'influenza che hanno i miRNA sulla fisiologia cellulare, non dovrebbe sorprendere che una regolazione non perfetta dei miRNA possa portare a questi tipi di patologie²⁴. Vari tipi di miRNA sono espressi in tutto il corpo ma la microglia presenta un profilo di espressione dei miRNA unico e caratteristico, permettendo quindi l'analisi di esso durante i vari fenotipi.

In questo caso è quindi possibile osservare come l'espressione di miRNA della microglia vari in base al fenotipo assunto e come una variazione induca repentine modificazioni nella cellula stessa. Di conseguenza una variazione dei miRNA nell'ambiente può modificare drasticamente gli esiti dei fenomeni infiammatori del SNC²¹.

Analizzando più nel dettaglio i miRNA espressi dalle cellule di microglia nella regolazione dei fenotipi è possibile dividere i miRNA la cui espressione ha un effetto proinfiammatorio e miRNA che invece hanno un effetto neuroprotettore.

Tra i miRNA che sono correlati all'attivazione delle cellule della microglia il più noto è il miR-155 che viene espresso durante un fenotipo M1. I bersagli di questo miRNA sono una serie di proteine antinfiammatorie, di cui inibendo la produzione va ad esercitare un effetto proinfiammatorio e neurotossico. Inoltre, il miR-155 è implicato nel pathway di p53, un fattore di trascrizione che regola il ciclo di vita delle cellule e l'apoptosi. Normalmente questo fattore viene degradato molto velocemente ma, sotto diversi stimoli, questo fattore può aumentare la sua attività rapidamente portando quindi alla morte cellulare. Da diversi studi si è dimostrato come questo regolatore all'interno delle cellule della microglia abbia un'influenza anche sul

fenotipo, esercitando un effetto proinfiammatorio. Quando prodotto, il p53 va infatti a regolare l'espressione di diversi miRNA che mirano ad inibire la formazione di un fattore di trascrizione, il C-Maf, che promuove la formazione di una differenziazione funzionale e una risposta antinfiammatoria. Più in particolare il p53 porta direttamente anche all'espressione di 2 miRNA: il miR-145 e il miR-34a che non agiscono direttamente sul C-Maf ma vanno ad inibire la formazione di Twist2, un attivatore della trascrizione del C-Maf. Inoltre, il p53 come detto in precedenza è coinvolto nel pathway del miR-155, infatti va ad attivare indirettamente la sua produzione attivando il suo fattore di trascrizione. Il miR-155 va poi direttamente ad inibire la formazione del c-Maf²⁵.

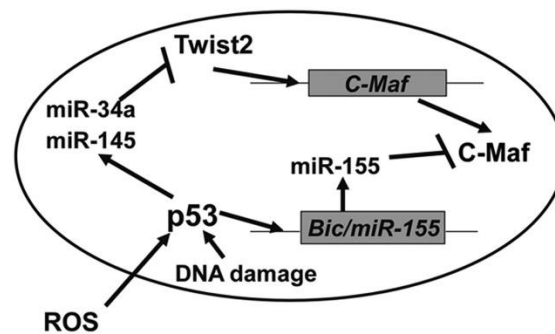


Figura 1.2 Modello proposto per la regolazione del C-Maf ad opera del fattore di trascrizione p53²⁵.

Tra i miRNA neuroprotettori il più noto risulta essere il miR-124, che gioca un ruolo chiave per mantenere l'omeostasi della microglia andando a sopprimere l'attivazione della microglia inibendo diversi pathways di segnalazione²¹.

Visto il ruolo chiave dei miRNA nella attivazione dei diversi fenotipi delle cellule della microglia, sempre più ricerche si stanno concentrando per trovare varie terapie utili per il controllo di questi particolari sistemi di comunicazione e regolazione.

1.3 Strategie terapeutiche che utilizzano gli acidi nucleici per colpire miRNA

Risulta dimostrato come la grande maggioranza delle patologie umane è causata dalla mancata regolazione di diversi geni e la moderna farmacologia punta ad uno approccio su più fronti per combattere queste malattie. Visti i loro modelli espressivi unici per andare ad attaccare numerose traduzioni di geni, i miRNA hanno la capacità da soli di regolare diversi geni in base al tessuto e tipologia cellulare specifica.

Questo loro grosso punto di forza è però, come detto in precedenza, anche il loro più grande svantaggio. Infatti, è possibile avere effetti *off-target* imprevisti e avversi derivante dalla loro limitata regione di complementarità sul target.

Questo difetto è quello che maggiormente sta frenando l'approvazione di terapie basate appunto su target di miRNA.

Per andare ad agire sui miRNA possono essere impiegati due approcci differenti. Si può recuperare la funzionalità del miRNA utilizzando sia un miRNA a doppia elica sintetico che viene trasportato direttamente dall'esterno (strategia chiamata RNA *mimics*) uguale a quello endogeno o infettare la cellula con un vettore virale per produrre lo specifico miRNA direttamente all'interno della cellula. Per andare invece ad inibire le funzionalità del miRNA si possono usare degli antimir che presentano il compito di sequestrare i miRNA desiderati. In questo caso possiamo andare quindi a regolare positivamente o negativamente l'espressione delle proteine target del miRNA²⁶.

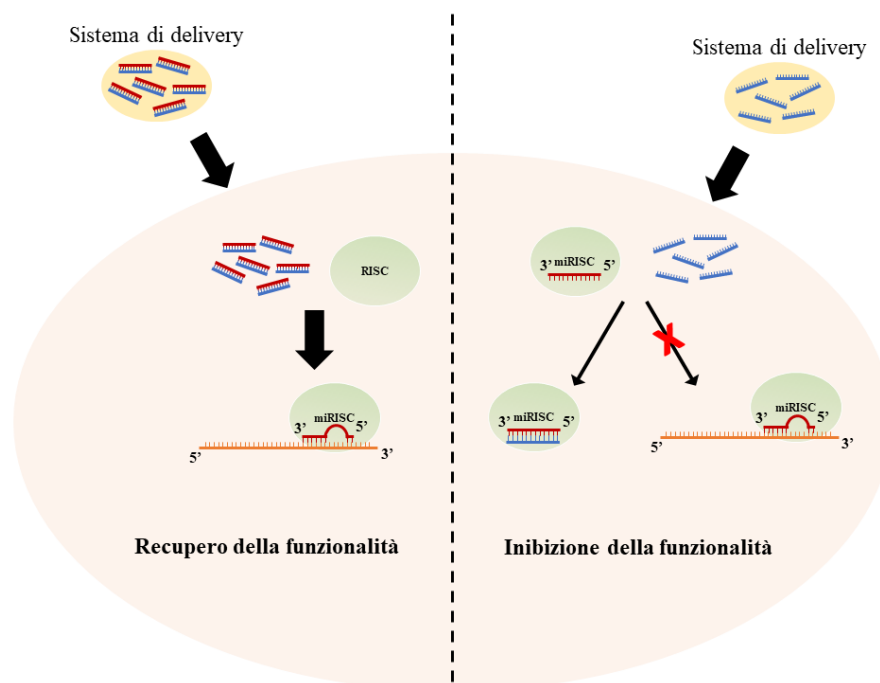


Figura 1.3 Rappresentazione dei due approcci differenti per la regolazione dei miRNA.

Trattando le metodologie di sottrazione dei miRNA dall'ambiente cellulare la più comunemente utilizzata è quella che sfrutta l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso (ASO) che sono complementari al filamento associato al miRISC, andando quindi ad inattivare il complesso introducendo un sito di complementarità competitivo con quello sul mRNA²⁷. Altre tecniche, meno utilizzate, prevedono l'utilizzo di miRNA sponges e DNazimi.

1.3.1 ASO

Gli ASO sviluppati per andare ad inibire il complesso miRISC prendono solitamente il nome di antimiRs e vengono progettati per andare a bloccare un singolo miRNA o una determinata famiglia²⁸. In questo caso, per creare dei filamenti che vadano a competere con l'appaiamento dei miRNA al mRNA bersaglio, è necessaria la presenza di una perfetta complementarità oltre a rendersi necessaria la modifica chimica della catena di oligonucleotidi. Le trasformazioni chimiche attuate sulla catena servono sia a renderla più stabile nel tempo, per evitare la degradazione che andrebbe a rilasciare il miRISC attivo, sia per rendere ancora più forte l'appaiamento fra i 2 filamenti. Diverse modifiche possono essere attuate, ma la più comune prevede la modifica degli zuccheri sullo scheletro del filamento inducendo sia l'aumento di stabilità dell'appaiamento sia aumentando la resistenza dei antimiRs alla nucleasi. Solitamente si va a sostituire il gruppo ossidrilico in posizione 2' del ribosio con un *-O-Me*, *-O-Methoxyethyl*, *-F* o costruendo un ulteriore ciclo creando i *bicyclic locked nucleic acid (LNA)*²⁶.

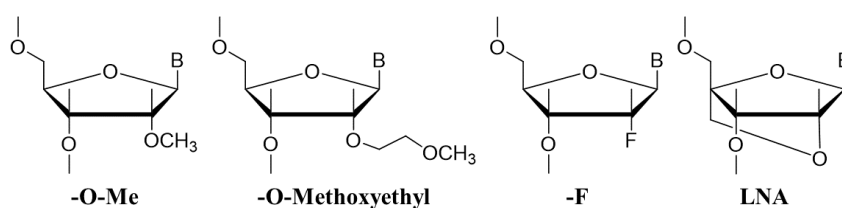


Figura 1.4 Alcune delle modifiche che possono essere effettuate sul ribosio per aumentare la stabilità dei filamenti.

Queste modifiche, aumentando la stabilità dell'appaiamento rendono anche il filamento molto più specifico, diminuendo anche eventuali appaiamenti con altri miRNA *off-target*.

Questi tipi di vantaggi hanno portato allo sviluppo degli ultra-short LNA *oligonucleotides* che presentano poche basi che vanno ad appaiarsi direttamente alla *seed region* dei miRNA andando quindi a silenziare tutta la famiglia dei miRNA con quello specifico seed²⁹.

1.3.2 miRNA sponges

Il funzionamento delle miRNA *sponges* risulta essere il medesimo degli ASO. Infatti, si propone di andare a sottrarre i miRNA tramite l'introduzione di un sito di appaiamento diverso e con maggiore complementarità rispetto a quello del mRNA. Nelle miRNA *sponges*, però, sono presenti molti più siti di appaiamento ripetuti.

Comunemente vengono codificate da vettori di espressione che una volta trascritti in mRNA possono legare molteplici miRNA bersaglio e quindi sottrarli dal sistema²⁸.

1.3.3 DNAzimi

I DNAzimi sono sequenze di *single-stranded* DNA (ssDNA) dotate di una attività catalitica ottenute artificialmente e non presenti in natura³⁰.

Presentano diverse attività: dal taglio o creazione di legami fosfodiesterici fino alla modifica dei gruppi laterali degli amminoacidi³¹ e grazie alla loro versatilità e alla loro relativa economicità sono eccellenti opzioni per una grande varietà di applicazioni sia in ambito biotecnologico sia in ambito farmaceutico.

La possibilità di andare a tagliare un RNA bersaglio li rende ottimi candidati per la regolazione dell'espressione dei ncRNA, in particolare attuando una *downregulation* terapeutica dei miRNA sovraespressi nella cellula³². Uno dei più noti e usati RNA-cleaving DNAzima è l'8-17 grazie alla sua struttura secondaria relativamente di semplice comprensione, all'elevata velocità di reazione, al fatto che solo quattro dei 15 nucleotidi del suo core catalitico sono strettamente conservati e alla possibilità di ottenere varianti in grado di tagliare tutte le possibili combinazioni di dinucleotidi, a seconda del bersaglio, anche se con diversa efficienza (il DNAzima 8-17 canonico taglia la giunzione AG)³³.

Nonostante la semplicità del DNAzima 8-17, il meccanismo di reazione e la risoluzione della struttura secondaria devono ancora essere validati. I primi indizi portano a pensare ad un meccanismo catalitico che impiega una strategia α -catalitica (ottenendo un allineamento in linea dei gruppi reagenti), una strategia primaria γ (mediata da G14 che agisce come base generale) e una catalisi secondaria δ (operata da una molecola d'acqua legata al metallo, che agisce come acido generale)³².

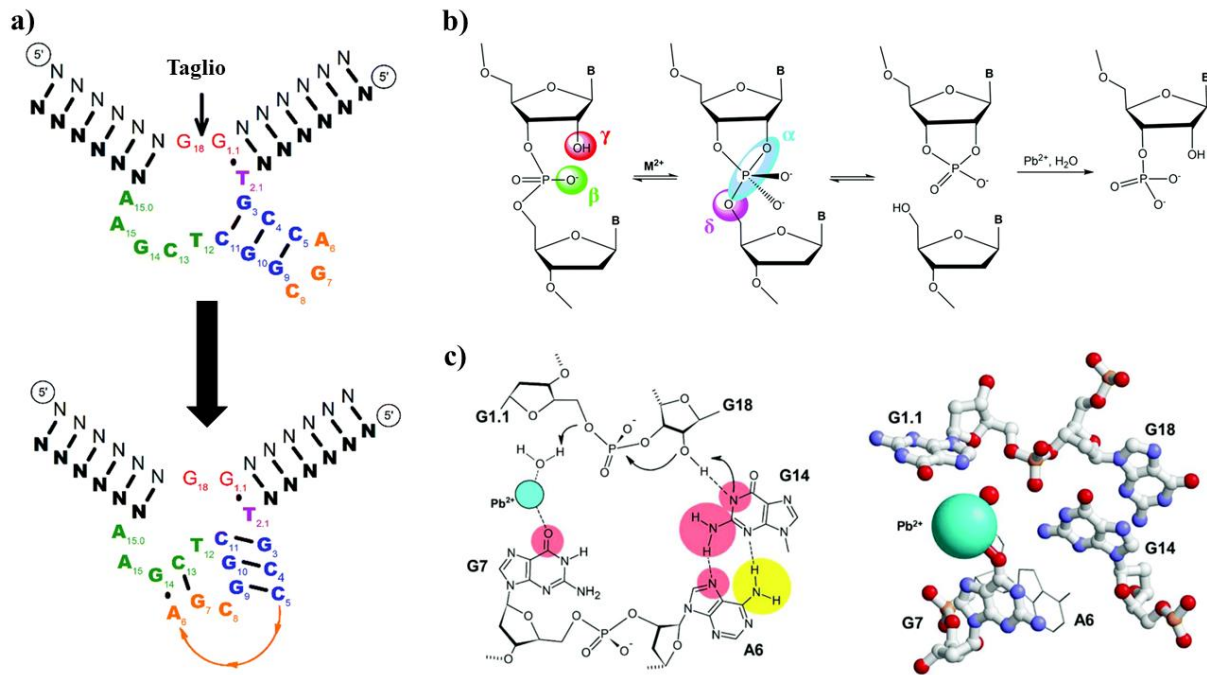


Figura 1.5 Rappresentazione del DNAzima 8-17: a) sequenza DNAzima 8-17 e disposizione prima e dopo il riarrangiamento per il taglio b) meccanismo di reazione proposto per il taglio del legame fosfodiesterico c) Struttura secondaria del complesso DNAzima-Pb²⁺-filamento bersaglio.

La versatilità, quindi, del DNAzima 8-17 permette di avere un qualsiasi bersaglio grazie alla possibilità di assegnare una qualsiasi sequenza ai lati del core catalitico.

L'unica accortezza che bisogna mantenere è durante la fase di design. È infatti necessario utilizzare delle sequenze laterali al sito di taglio che siano abbastanza corte così che, una volta che il taglio è avvenuto, le estremità possano dissociarsi e lasciare libero il DNAzima per agire un'altra sequenza.

Il loro utilizzo come agenti terapeutici è stato proposto e attentamente studiato per diverse patologie quali il cancro, infezioni virali e malattie genetiche. Anche in questo caso, come per gli ASO, i DNAzimi risentono delle nucleasi presenti e per mantenere più a lungo la loro attività si possono adottare le stesse strategie. In questo caso bisogna però stare attenti a non andare ad intaccare il sito catalitico che altrimenti potrebbe perdere la sua attività.

1.3.4 L'importanza di un sistema di trasporto

Per tutte le strategie terapeutiche sopra elencate, è necessario mettere l'accento sull'importanza di un corretto sistema di veicolazione. Nonostante alcuni di essi possano entrare nelle cellule "nudi" ("gymnotic delivery"), non risulta conveniente. Infatti, per avere l'effetto desiderato bisogna inserirne molti di più del necessario (dalle 10 alle 50 volte in più)³⁴. Inoltre, le sequenze non supportate da un sistema di trasporto possono essere attaccate dalle nucleasi anche se

l'emivita può essere aumentata andando a modificare chimicamente la struttura come descritto precedentemente.

Diventa quindi necessario un sistema di trasporto che possa sia proteggere il filamento attivo sia veicolarlo fino al tipo cellulare su cui si voglia agire. Infatti, prendendo in considerazione i miRNA che hanno la possibilità di andare a colpire diversi bersagli e quindi potendo influenzare diversi pathway metabolici, è necessario che l'intervento del farmaco sia estremamente mirato sul bersaglio desiderato nelle cellule desiderate riducendo al minimo la dispersione.

1.4 Nanodelivery degli acidi nucleici

Il trasporto degli acidi nucleici verso la zona di funzionamento desiderata, come accennato in precedenza, risulta essere un'enorme sfida vista la loro bassa stabilità e la rapida degradazione attuata dall'organismo. In aggiunta, gli acidi nucleici sono estremamente poco permeabili attraverso la membrana cellulare vista la loro carica negativa, il loro alto peso molecolare e la loro idrofilicità. È quindi necessario, non solo sviluppare un sistema di trasporto che permetta la stabilizzazione del filamento, ma che vada ad aiutare anche l'assorbimento all'interno della cellula bersaglio per svolgere la sua attività³⁵.

Solitamente le tecniche di trasporto degli acidi nucleici possono essere divise in virali e non virali. Nelle prime si utilizza un vettore virale che va ad infettare le cellule bersaglio permettendo quindi un'alta efficienza di trasfezione a scapito di una risposta immunitaria e possibili effetti collaterali dovuti all'aspecificità³⁶.

Tecniche non virali comprendono sistemi basati su lipidi, polimeri, peptidi, composti inorganici e acidi nucleici. Per tutti i sistemi si utilizzano particelle di dimensioni nanometriche, perché sono il range di dimensioni più adatto per un sistema di trasporto. Infatti, si riesce ad evitare di essere filtrati dal glomerulo renale viste le dimensioni troppo grandi ma si riesce comunque a sfruttare, in caso di terapie antitumorali, il meccanismo di targeting passivo dato dall'effetto del EPR (*enhanced permeability and retention*), che consiste nella concentrazione di particelle di dimensioni nanometriche nel microambiente tumorale grazie alla particolare conformazione e permeabilità dei vasi sanguigni vicini al tumore.

Le nanoparticelle (NP) a base lipidica comprendono vari sottoinsiemi di strutture e sono le più comunemente usate grazie alla loro facilità di produzione. Sono in genere piattaforme sferiche che comprendono almeno un *bilayer* lipidico che circonda un compartimento acquoso interno. Come sistema di rilascio, le NP a base lipidica offrono molti vantaggi, tra cui la semplicità di

formulazione, l'autoassemblaggio, la biocompatibilità, l'elevata biodisponibilità e la capacità di trasportare grandi carichi. Inoltre, possiedono una serie di proprietà fisico-chimiche che possono essere controllate per modulare le loro caratteristiche biologiche. Per questi motivi, le NP a base lipidica sono la classe più comune di nanomedicine approvate dalla FDA. Idealmente i lipidi dovrebbero essere ionizzabili (con una $pK_a=6,4$) e una superficie relativamente neutra così da prevenire una rapida distruzione da parte del sistema immunitario³⁷.

I *nanocarriers* polimerici possono essere sintetizzati a partire da materiali naturali o sintetici, nonché da monomeri o polimeri preformati, consentendo un'ampia varietà di strutture e caratteristiche possibili. Come i lipidi, sono carichi positivamente contengono, infatti, gruppi con ammine ionizzabili così da poter interagire con lo scheletro del filamento creando una struttura nano dimensionale che viene denominata "*polyplexes*". Naturalmente, in base al polimero scelto in fase di design, capacità di loading, assorbimento cellulare e tossicità varieranno. Come polimeri possono essere usati polimeri naturali, come ciclodestrine, chitosano o destrano, o polimeri sintetici, come PLL, PEI o PAMAM.³⁸

Le strutture basate su peptidi sono solitamente formate da 5-30 amminoacidi che vanno a legare in maniera covalente o non-covalente il filamento così da poterlo indirizzare verso il bersaglio e aiutarlo nell'internalizzazione³⁹.

I nanotrasportatori, a base di composti inorganici, vanno a fornire una piattaforma molto versatile per il trasporto di acidi nucleici, possono essere infatti studiati per ricercare una specifica cellula e allo stesso tempo portare un alto carico di acidi nucleici. Vari studi sono già stati eseguiti con discreti risultati.

Le nanoparticelle metalliche, in particolare, possono essere ingegnerizzate in maniera tale da avere una bassa polidispersività, con una struttura e una geometria definita³⁷. Studi hanno dimostrato come, in base alla funzionalizzazione della superficie della nanoparticella, la risposta immunitaria può essere alterata. Infatti, andando a controllare dimensioni, solubilità e modificazioni superficiali si può regolare la biocompatibilità delle nanoparticelle⁴⁰.

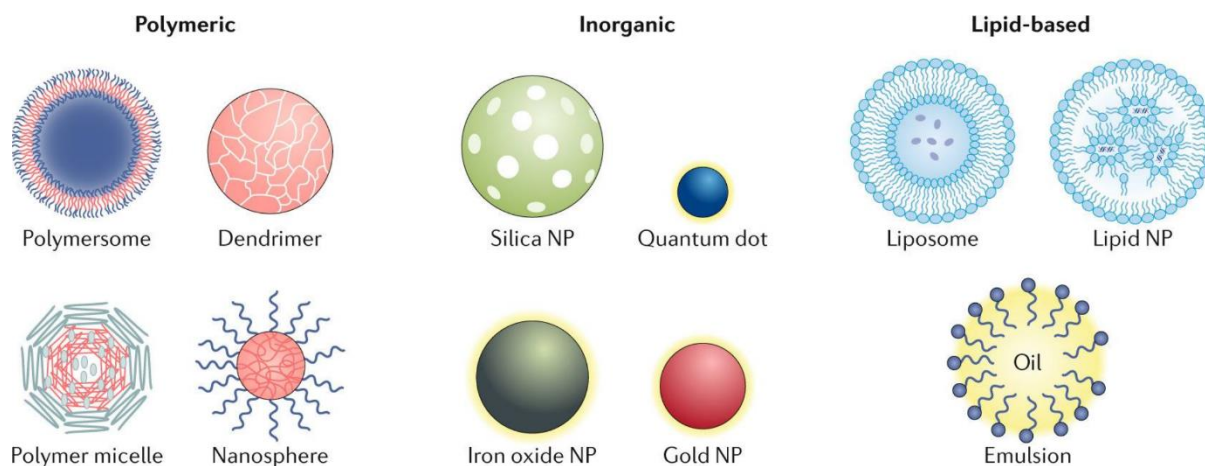


Figura 1.6 Esempi di nanotrasportatori a base polimerica, inorganica e lipidica³⁷.

1.4.1 Nanostrutture di DNA per il drug delivery

Ultime, ma non meno importanti, sono le nanostrutture di DNA. Le nanostrutture di DNA sono state esplorate per la prima volta da Seeman nel 1982 che, sfruttando la profonda conoscenza delle caratteristiche strutturali del DNA, riuscì a programmarlo in maniera tale da assemblarlo successivamente in struttura sia bidimensionali che tridimensionali. Sfruttando la complementarità di Watson e Crick e grazie all'attenta progettazione, è infatti possibile andare a disegnare filamenti in grado di autoassemblarsi in maniera precisa con una dimensione e geometria prestabilita⁴¹. In questo caso, ci si discosta dall'utilizzo del DNA solo come materiale genetico ma lo si sfrutta come polimero in grado di fare specifiche interazioni con sé stesso in maniera prevedibile e riproducibile⁴².

Un altro vantaggio è l'estrema biocompatibilità in quanto sono composti già presenti in natura all'interno del corpo e, con le dovute accortezze, è possibile evitare infiammazioni dovute ad una risposta immunitaria dell'organismo, che andrebbe a riconoscere sostanze esogene all'interno del corpo⁴². Inoltre, le nanostrutture di DNA, presentano una maggiore resistenza alle nucleasi dovuta all'assemblaggio in strutture non comunemente adottate dal DNA, che solitamente si trova come un filamento lungo di *double-stranded* DNA (dsDNA). Questo tipo di conformazione in nanostrutture compatte non permette l'attacco da parte delle nucleasi che non riuscendo, in conclusione, ad interagire con la catena⁴³.

Le nanostrutture di DNA evidenziano anche un'estrema flessibilità dal punto di vista delle funzionalizzazioni. Infatti, risulta estremamente facile modificare i design preesistenti in maniera tale ad adsorbire/legare un diverso farmaco. Risulta possibile coniugare covalentemente piccole molecole, peptidi o proteine, caricare molecole antitumorali intercalanti il DNA (come la doxorubicina) direttamente per interposizione fra le basi, o, nel caso di farmaci a base di DNA, come ASO e DNAzimi, farli ibridare ai filamenti che compongono il carrier o

semplicemente integrare la loro sequenza nel design della nanostruttura. Inoltre, le quantità caricate sono decise in precedenza in base al design adottato e quindi è possibile andare ad eseguire dosaggi molto più precisi in ambiti in cui risulta essere necessario.

Oltre al carico del farmaco, la nanostruttura di DNA può essere funzionalizzata con elementi che forniscano un targeting attivo del sistema per un determinato tessuto o cellula tramite sia aptameri che proteine.

Riguardo all'internalizzazione, essendo nanostrutture e non filamenti lineari sfruttano meccanismi differenti e più efficienti. Studi su una tipologia di nanostruttura di DNA, i tetraedri, hanno evidenziato come strutture con una dimensione inferiore di 100 nm vengano prevalentemente internalizzate tramite endocitosi mediata da recettori, mentre per dimensioni superiori intervengono altri meccanismi^{44,45}.

Un ultimo vantaggio, legato all'uso di nanostrutture di DNA come piattaforme per il trasporto di farmaci, è che questi sono sistemi modulari. Perciò, una volta ottenuto un sistema nanostrutturato con determinate forma e dimensioni, manterrà presumibilmente le stesse caratteristiche anche sostituendo gli elementi funzionali con altri. Per questo motivo, una volta caratterizzata e ottimizzata una determinata nanostruttura per la terapia di una malattia, è presumibile che lo stesso sistema possa essere facilmente traslato per l'uso in un contesto patologico diverso e in maniera relativamente rapida.

1.5 Progettazione di nanostrutture di DNA

Come detto in precedenza, Seeman fu il primo, nel 1982, a pubblicare un'osservazione sul fatto che il DNA potesse essere utilizzato a scopo strutturale per sistemi nanometrici e successivamente a dimostrarlo. Il suo sistema si basava sull'utilizzo di un'unità ripetuta, collegata grazie a ssDNA, chiamate *sticky ends*, che andavano ad appaiarsi con i loro complementari. Le strutture così ottenute, chiamate con il termine di DNA *lattices*, furono utilizzate per costruire le prime strutture 1D e 2D di DNA⁴¹. L'ottenimento di questi risultati e di tutti quelli successivi è reso possibile grazie alle caratteristiche chimico-fisiche ben note del DNA, rendendo quindi possibile l'organizzazione spaziale in maniera controllata e prevedibile. Partendo quindi da una fase preliminare di progettazione molto attenta dei singoli filamenti di DNA e considerando gli appaiamenti, sulla base della complementarità di Watson e Crick, è possibile costruire una grande varietà di strutture con dimensioni, forma e proprietà definite.

Nei primi anni, il design delle sequenze era sviluppato tutto manualmente. Successivamente sono stati creati diversi software che permettono di sviluppare il diversi design aprendo così la strada a strutture sempre più complicate.

Uno dei software che oggi viene utilizzato per la progettazione di strutture di piccole-medie dimensioni è NUPACK.

1.5.1 NUPACK

NUPACK è un software che permette di progettare nanostrutture di DNA e RNA, focalizzato su lavori di design e analisi di strutture create da filamenti interagenti. Tramite NUPACK è possibile determinare la struttura secondaria termodinamicamente più stabile creata dai filamenti interagenti.

Alcune delle caratteristiche più importatati sono:

- calcolo della funzione di partizione e del minimo di energia libera per una struttura secondaria derivate dall'interazione di un numero arbitrario di filamenti di DNA/RNA;
- calcolo della concentrazione all'equilibrio delle specie presenti nella soluzione;
- uso della funzione di partizione e della concentrazione delle specie per andare a determinare l'equilibrio degli appaiamenti fra le basi azotate;
- design delle sequenze di uno o più filamenti per costruire una struttura secondaria desiderata.

L'ultimo punto è quello che lo distingue dagli altri software precedenti. Infatti, NUPACK può costruire un sistema tramite le indicazioni di una struttura secondaria.

Il software permette di fare esperimenti di Analisi⁴⁶⁻⁴⁹, dove si va ad analizzare le proprietà termodinamiche di una soluzione diluita di acidi nucleici interagenti, o esperimenti di Design⁵⁰⁻⁵³, dove cerca di creare filamenti interagenti che possano dare una determinata struttura secondaria all'equilibrio. Se, invece, risulta necessario solo valutare alcune proprietà all'equilibrio e visualizzare il filamento è possibile utilizzare la funzionalità delle Utilities.

NUPACK può essere utilizzato in due diverse modalità:

- tramite web server, permettendo tramite un'interfaccia grafica di compiere i lavori di analisi, design e utilities⁵⁴;
- tramite il download del pacchetto python, permettendo una maggiore flessibilità nella gestione degli input con lo svantaggio della mancanza dell'interfaccia grafica oltre alla necessità di conoscere il linguaggio di programmazione.

In fase di design del sistema, NUPACK permette di avere funzionalità aggiuntive tramite l'utilizzo locale del software che vanno a modificare le caratteristiche sul filamento (o filamenti) che si vuole ottenere:

- Forzare uno o più domini ad essere identici ad un dominio specificato,
- Forzare uno o più domini ad essere complementari ad un dominio specificato,
- Definire una percentuale, o un range, di similitudine ad una sequenza da rispettare,
- Forzare una concatenazione di domini ad avere una sequenza che è una porzione di una sequenza di origine,
- Prevenire la formazione di pattern che si ripetano durante il filamento,
- Forzare un certo grado di diversità lungo tutto il filamento.

Nonostante l'estrema flessibilità che presenta, il software non permette ancora la progettazione e la visualizzazione di quadruplex di DNA e di sistemi circolari. Questa mancanza va anche a peggiorare la sua precisione in fase di design, infatti, non prendendoli in considerazione, non permette un'analisi reale dei vari sistemi. Inoltre, è importante considerare che questo software riguarda l'analisi di sistemi all'equilibrio, basando i suoi calcoli sulla stabilità termodinamica delle strutture che si formano (intra o intermolecolari). Questo non permette di dare informazioni riguardo l'evoluzione di un sistema e i fattori cinetici che potrebbero contribuire a favorire o sfavorire la formazione di una struttura desiderata nella realtà.

Entrambi questi svantaggi possono essere arginati da un'attenta programmazione dell'input, come mostrato da Yin et al.⁵⁵, con lo sviluppo di sistemi catalitici che permettono di evolversi solo in presenza di un filamento. In questo caso NUPACK viene utilizzato andando a scomporre l'assemblaggio in vari step cinetici, assicurandosi ad ogni passaggio che i filamenti interagiscano nella maniera desiderata e che non diano sottoprodotti.

Il design delle sequenze, tramite l'utilizzo del software locale, può essere operato tramite due sistemi: un *multi-complex ensemble*, dove un numero definito di filamenti interagiscono per dare le strutture desiderate, o un *multi-tube ensemble*, dove un numero definito di *test tube* contenenti differenti filamenti introdotti ad una determinata concentrazione interagiscono. Per lo sviluppo di un *kinetic design*, come quello sopra citato, è consigliato l'utilizzo di un *multi-tube ensemble* che permette di verificare contemporaneamente il funzionamento di tutti gli step, permettendo all'algorithm di design di ottimizzare le sequenze per tutti i passaggi dell'assemblaggio.

Dopo il design delle sequenze dei filamenti, è necessario per verificare la corretta esecuzione dell'algorithm, eseguire un lavoro di analisi. In questo caso, si vanno ad inserire i filamenti con

le sequenze ottenute dal design in un test tube per l'analisi. L'algoritmo calcola i vari appaiamenti possibili eseguendo un calcolo dell'energia libera per determinare la concentrazione all'equilibrio e le proprietà dell'appaiamento delle basi. Il risultato, una volta analizzato, potrà confermare la solidità del sistema e degli step dell'assemblaggio.

1.6 Tipologie di nanostrutture di DNA per il *drug delivery*

Esistono diverse tipologie di nanostrutture di DNA, con diversi design e diverse caratteristiche. L'evoluzione dei programmi, inoltre, permette la realizzazione di sempre più complessi sistemi, con sempre più filamenti coinvolti nella fase di assemblaggio.

1.6.1 Origami di DNA

Per origami di DNA si intende la rilegatura e la diffusione di un lungo filamento di DNA in una determinata forma, come se si trattasse di un foglio di carta, grazie all'appaiamento con diversi corti filamenti di DNA. Il filamento più lungo viene definito come *scaffold* mentre i filamenti più corti vengono definiti come *auxiliary*. Il metodo ha un'alta resa ed affidabilità ma, per ogni design si rende necessario sintetizzare più di 200 filamenti che, nell'insieme, vanno ad espandere la complessità e i costi dell'esperimento in maniera esponenziale. In questo caso, il farmaco viene inserito all'interno della struttura tramite delle "graffe", fino ad un massimo 200, per nanostruttura o per semplice intercalazione all'interno delle doppie eliche di DNA⁵⁶.

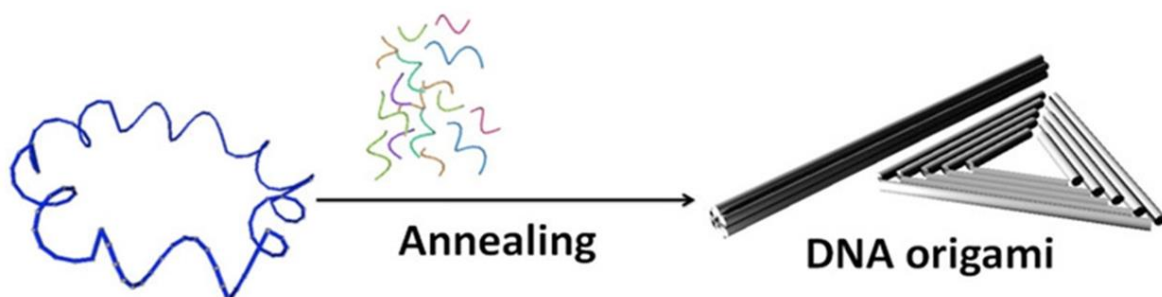


Figura 1.7 Rappresentazione della formazione di origami di DNA a partire da un unico filamento scaffold e tanti filamenti auxiliary⁵⁷.

1.6.2 Tetraedri di DNA

Una delle nanostrutture che per prime è stata generata e caratterizzata è il tetraedro di DNA⁵⁸. In questa struttura, gli angoli presenti sono formati da doppie eliche di DNA, che forniscono rigidità alla struttura. La struttura finale si autoassembla in presenza di quattro filamenti opportunamente studiati, richiedendo quindi un numero limitato di sequenze e un metodo di sintesi *one-step* con un'alta resa di assemblaggio e un'estrema facilità di esecuzione. Grazie

alla sua elevata rigidità possiede una resistenza alle nucleasi e non presenta effetti collaterali, oltre al vantaggio derivante dalla permeabilità delle membrane cellulare per questi tipi di strutture.

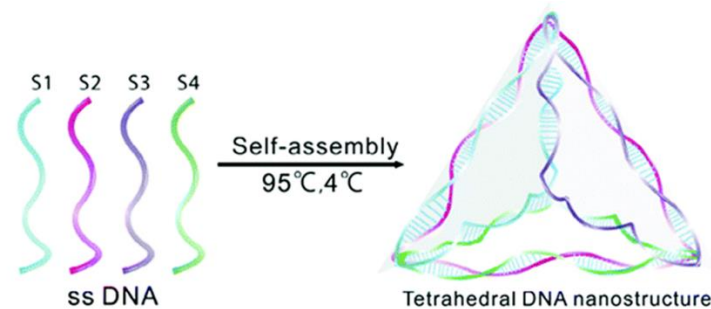


Figura 1.8 Rappresentazione della formazione di un tetraedro di DNA tramite un meccanismo di self-assembly a partire da 4 filamenti⁵⁹.

Essendo di così facile assemblaggio è stato estensivamente studiato ed utilizzato per le più disparate applicazioni. Le parti funzionali possono essere inserite sia nei vertici che negli spigoli rendendolo quindi estremamente versatile e con un'alta capacità di loading⁵⁶.

1.6.3 DNA nanoflower

Un approccio diverso per costruire delle nanostrutture di DNA è quello che si basa sulla RCA (*Rolling Circle Amplification*) che è una reazione enzimatica isoterma operata dalla DNA polimerasi del fago Phi29 ($\Phi 29$), nella quale un corto filamento di DNA (*primer*) viene utilizzato per elongare un filamento di DNA circolare a singola catena in maniera estremamente efficiente⁶⁰.

Il primer viene progettato per appaiarsi con il filamento lineare in maniera tale da chiudere le 2 estremità così da creare un filamento circolare e, dopo una reazione di ligazione delle 2 estremità, il primer viene elongato dalla polimerasi $\Phi 29$ in presenza di dNTPs. La particolarità dell'enzima è che una volta copiato l'intero filamento stampo riesce ad operare uno *strand displacement*, per scalzare il DNA neosintetizzato, e continuare la sua reazione di polimerizzazione.

Grazie alle caratteristiche della polimerasi $\Phi 29$, il filamento stampo può essere replicato fino a migliaia di volte, così da creare un filamento estremamente lungo che si raggomitola su sé stesso. La forma globulare irregolare (DNA *nanoflower*) che assume non permette l'attacco da parte della nucleasi e risulta essere facilmente controllabile dimensionalmente in base al tempo e alle condizioni di reazione⁶¹.

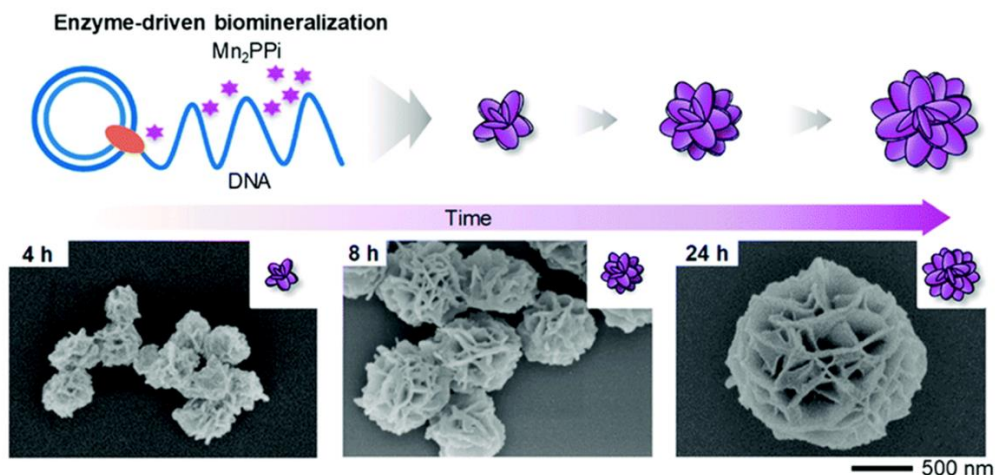


Figura 1.9 Schema di formazione di nanoflowers e immagini SEM correlate⁶².

Inoltre, questa ripetizione di un singolo filamento permette un ottimo sistema di *delivery*; in quanto, se si inserisce il complementare della sequenza attiva all'interno del filamento stampo verrà ripetuto moltissime volte. Se si va, quindi, ad inserire un ASO o un DNAzima questo, all'interno della nanostruttura, sarà presente centinaia o migliaia di volte. Se il filamento stampo ha una zona di autoappaiamento, allora la struttura finale avrà porzioni in cui è presente un dsDNA e sarà quindi possibile operare un *drug delivery* tramite semplice intercalazione.

1.6.4 Dendrimeri di DNA

I dendrimeri di DNA sono una nanostruttura che negli ultimi decenni ha attratto molti studi. Infatti, le particolarità dei dendrimeri di DNA è facilità di modellazione, la dimensione definita, l'eccellente stabilità, la forma globulare e una struttura altamente ramificata e porosa⁶³. A queste caratteristiche peculiari se ne possono aggiungere altre quali la rilevazione di filamenti di DNA, rilevazione ultrasensibile, alta capacità di trasporto e una visualizzazione multivalente delle proteine.

Prendendo spunto dai dendrimeri creati con i polimeri, i primi dendrimeri formati da strutture di DNA sono stati sintetizzati nel 1993, anche se con delle problematiche riguardanti la purezza e la mancanza di immagine per limitazioni tecnologiche. Negli anni successivi, si è poi riusciti a sintetizzare con estrema purezza ed efficacia i vari dendrimeri e applicarli nei più svariati campi biotecnologici. In confronto con i dendrimeri polimerici, i dendrimeri di DNA possiedono non solo architetture altamente ramificate ma anche monodisperse, con dimensioni maggiori e biocompatibili, possedendo una miglior capacità di internalizzazione nelle cellule e

una biodegradabilità naturale. Inoltre, lo sfruttamento di filamenti di DNA, per la costruzione delle strutture permette di avere un rapido e facile assemblaggio tramite un metodo di self-assembly che può essere personalizzato in base alle proprie richieste⁶⁴.

I dendrimeri di DNA possono essere divisi in diverse categorie in base ai componenti, alla struttura tridimensionale e al metodo di assemblaggio oltre che in base alla funzione svolta.

I dendrimeri possono essere divisi in dendrimeri di DNA puri o ibridi.

Nel caso dei puri all'interno del dendrimero è presente solo DNA che può però subire modifiche successive, come delle modificazioni chimiche per andare a collegare i blocchi o layer adiacenti. Inoltre, rientrano in questa categoria anche dendrimeri con strutture speciali, come quelli sintetizzati da Zhou et al., dove tetraedri di DNA sono assemblanti per sfruttare la loro rigidità e i loro spazi vuoti⁶⁵.

Nei dendrimeri ibridi, invece, sono utilizzati altri materiali oltre il DNA, come ad esempio peptidi o nanoparticelle inorganiche.

Oltre che come *nanocarriers*, i dendrimeri di DNA possono essere utilizzati in altre applicazioni biotecnologiche quali il *biosensing* e l'ingegneria proteica. Questa versatilità deriva dalla capacità dei dendrimeri di legare simultaneamente diversi componenti come molecole bersaglio e molecole di segnale grazie alla sua struttura altamente ramificata. Come *nanocarriers*, i dendrimeri non solo possono legare piccole molecole, ma possono anche andare a veicolare geni o acidi nucleici funzionali (quali ASO, miRNA o DNazimi) in maniera precisa grazie alla possibilità di inserire anche aptameri all'interno dell'assemblaggio.

In base ai *building blocks*, i dendrimeri possono essere sintetizzati tramite diversi metodi. Per i dendrimeri di DNA puri è possibile raggrupparli in due gruppi distinti: per coniugazione chimica o per appaiamento di basi.

Per coniugazione chimica si intende la connessione di filamenti tramite reazioni chimiche effettuate sulle estremità dei filamenti.

Per appaiamento di basi si intende invece una procedura che si basa sulla complementarità dei filamenti per andare a costruire una struttura, diventando quindi una tecnica *bottom-up* per la costruzione di nanostrutture, dove piccole unità si assemblano in maniera quasi indipendente per andare a creare una struttura più grande. Risulta essere la serie di metodi più utilizzata vista la sua semplicità.

In base al tipo di connessione che si instaura tra le varie unità si possono distinguere due ulteriori approcci: tramite una *enzymatic ligation* o un metodo *enzyme-free*.

Il metodo di *enzymatic ligation* si distingue dal secondo per l'utilizzo di un enzima per legare le *sticky ends* dei monomeri che compongono il dendrimero. Questa metodologia, nonostante la sua robustezza, risulta essere estremamente lenta oltre a sollevare una problematica per l'utilizzo del dendrimero come *drug carrier*. Infatti, non si riesce a separare in maniera ottimale il dendrimero di DNA dall'enzima una volta finita la ligazione che, quindi, all'interno dell'organismo potrebbe sviluppare una risposta immunitaria.

Per risolvere questa problematica si è sviluppato il metodo *enzyme-free* in cui le *sticky ends* delle varie unità interagiscono per appaiamento delle basi azotate, costruendo il dendrimero finale senza l'utilizzo dell'enzima⁶⁴.

1.6.5 Sintesi di dendrimeri con metodo *self-assembly enzyme-free*

I primi a sviluppare un approccio *enzyme-free* per la sintesi di un dendrimero di DNA, ispirato dalla *enzymatic ligation*, furono Zhou e i suoi collaboratori, nel 2012, con la creazione di un dendrimero con dimensione variabile in base al pH⁶⁶.

La strategia utilizzata per la preparazione del dendrimero prevede un assemblaggio *layer-by-layer* di un monomero di DNA (che viene chiamato Y-DNA) formato da tre bracci che contiene alla fine di ogni braccio una *sticky-end*. Un assemblaggio *layer-by-layer* viene eseguito tramite generazioni di monomeri inseriti a step con un rapporto, in questo caso, di 1:3ⁿ dove n è il numero della generazione. Questo tipo di approccio risulta essere estremamente versatile per la formazione di strutture con dimensione definita. È, infatti, possibile decidere le dimensioni a priori, in base a quante generazioni sono inserite all'interno del dendrimero.

In questi tipi di assemblaggio, la *sticky end* ricopre un ruolo molto importante, infatti, rappresenta il legante tra le varie generazioni ed è quindi necessario uno studio approfondito per determinare la lunghezza del filamento di ssDNA, per donare un'adeguata stabilità al dendrimero. Come riportato in un lavoro precedente⁶⁷, già una *sticky end* di 8 nucleotidi riporta risultati soddisfacenti a temperatura ambiente; ma non risulta estremamente stabile nelle condizioni operative adottate da Zhou et al.. Inoltre, una *sticky end* di 13 nucleotidi, una volta che si associa alla sua sequenza complementare, per formare il dendrimo G_n, presenta una rotazione del Y_n di 90° rispetto a Y_{n-1}, rendendo quindi il dendrimero 3D e le *sticky ends* finali distanziate il più possibile⁶⁶.

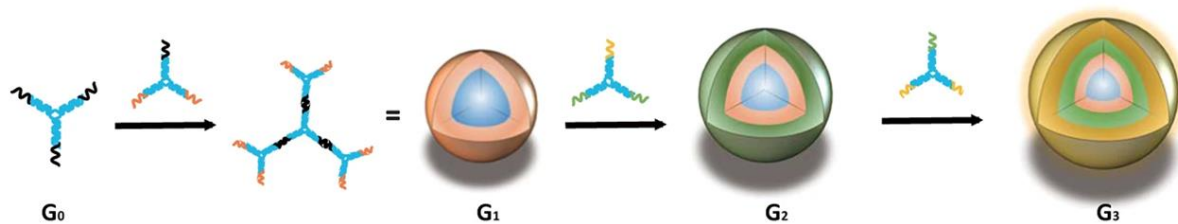


Figura 1.10 Assemblaggio delle Y-DNA nel dendrimero finale attraverso le varie generazioni⁶⁸.

Su questo tipo di design, vari esperimenti sono stati eseguiti: il trasporto di antitumorali in maniera sito specifica grazie ad aptameri⁶⁸, il trasporto di catene di DNA attive⁶⁹, il trasporto di un sistema di monitoraggio basato su acidi nucleici⁷⁰.

Un altro metodo per la sintesi di nanostrutture di DNA per la formazione di dendrimeri sfrutta il *catalytic self-assembly*, una diretta evoluzione del *self-assembly enzyme-free*.

1.6.6 Sintesi di dendrimeri con metodo catalytic self-assembly enzyme-free

Questo sistema si basa su un processo di formazione delle Y-DNA che può essere definito catalitico. Infatti, non basta solo inserire in soluzione i tre filamenti che andranno poi a comporre la struttura finale a “Y” ma è necessario inserire un quarto filamento per far procedere la reazione. Come presentato da Yin et al.⁵⁵, il sistema si basa sulla progettazione di filamenti che presentano una struttura secondaria definita “*harpin*”. L’*harpin* ha il compito di nascondere parzialmente il sito di appaiamento dei vari filamenti, così che, in assenza di un evento che vada a scoprire il sito, le sequenze non possano formare la struttura finale. Una volta inserito il filamento “catalizzatore”, la prima *harpin* interagisce con il primo filamento che aprendosi crea un evento a cascata, che porterà come risultato alla formazione della Y-DNA oltre a rendere nuovamente disponibile il filamento catalizzatore pronto ad aprire un altro *harpin*.

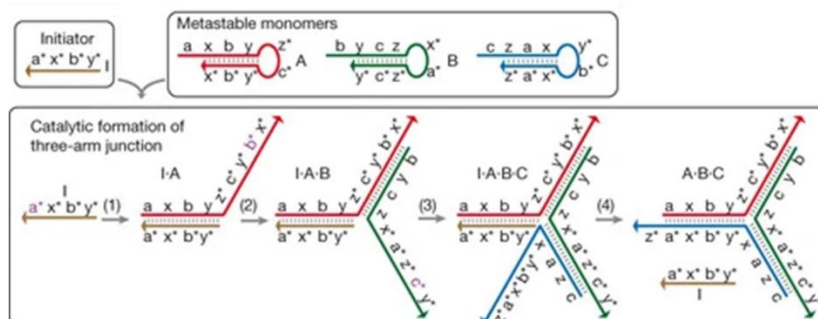


Figura 1.11 Rappresentazione della formazione di una Y-DNA tramite l'utilizzo di un sistema catalytic self-assembly enzyme free⁵⁵.

Questo tipo di sistema permette di andare a migliorare notevolmente la resa del dendrimero finale grazie alla possibilità di nascondere parte della sequenza contenuta nel filamento. Infatti, si potrebbe ipotizzare di non rendere disponibile la *sticky end* se il filamento non partecipa alla formazione della Y-DNA. Questo tipo di meccanismo evita che un filamento non appaiato possa interagire con le Y delle generazioni successive per dare dei sottoprodotti dimensionalmente differenti da quelli desiderati.

Alcuni lavori in questa direzione sono stati condotti per la produzione di dendrimeri in determinate condizioni⁷¹, ma nessuno che utilizzi i dendrimeri ottenuti per un *drug delivery*.

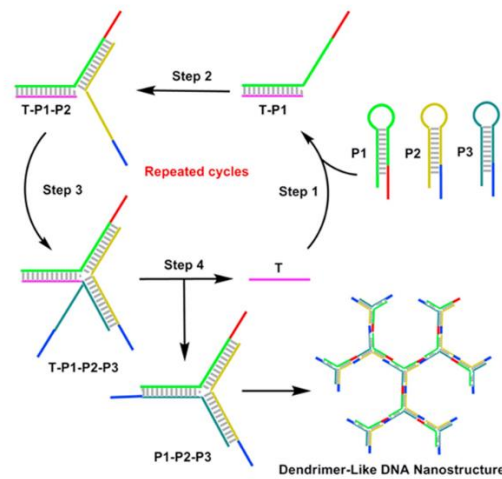


Figura 1.12 Dendrimero assemblato tramite catalytic self-assembly enzyme free⁷¹.

2.Scopo della Tesi

Questa tesi si propone di sviluppare una nanostruttura di DNA con effetto farmacologico per il trattamento di malattie neurodegenerative associate all'infiammazione del sistema nervoso centrale, in particolar modo, quando causato dall'attivazione della microglia. Si propone di agire tramite la soppressione del miR-34a con l'utilizzo di un DNAzima 8-17.

Ci si concentra nello sviluppo di un nuovo design, nell'assemblaggio e nella successiva caratterizzazione di una nanostruttura di DNA, che veicolerà acido nucleico funzionale all'interno della cellula.

Lo studio, qui riportato, ha avuto inizio con l'analisi del sistema precedentemente sviluppato per cercare eventuali errori di progettazione o la presenza di eventuali filamenti difettosi che possano interferire nell'assemblaggio e quindi nell'evitarli nelle fasi successive.

Questo studio preliminare, affiancato alle ricerche bibliografiche, ha aiutato nello sviluppo di un metodo di analisi e design per le nanostrutture di DNA, oltre a permettere di apprendere e consolidare le tecniche biochimiche di caratterizzazione. Queste conoscenze saranno poi utilizzate per la progettazione di due sistemi per la formazione di dendrimeri di DNA: il primo sviluppato a partire dal lavoro di Yang et al. con un meccanismo *self-assembly* e *layer-by-layer*, il secondo con un meccanismo rivisitato del *catalytic self-assembly* e *layer-by-layer*.

Infine, il sistema migliore verrà funzionalizzato tramite l'aggiunta di un livello successivo e verranno condotte prove di attività catalitica nei confronti del taglio del miR-34a e di internalizzazione in un sistema cellulare di riferimento.

3. Materiali e Metodi

3.1 Design e analisi delle nanostrutture tramite NUPACK

3.1.1 Design dei filamenti

Per il design dei filamenti, necessari per la costruzione dei dendrimeri di DNA si è utilizzato il software NUPACK; mentre come ambiente di sviluppo degli input e la visualizzazione dei risultati si è utilizzato invece Jupyter lab.

Per il design delle sequenze dei filamenti sono state definite delle sottosequenze per definire le regioni di appaiamento. Risulta quindi necessario studiare in un primo momento la struttura secondaria che si vuole ottenere per i filamenti per poi integrare le regioni di appaiamento intra-filamento con quelle tra i diversi filamenti per la costruzione delle Y-DNA. Una volta definite le strutture desiderate si può quindi procedere con la costruzione dell'input per NUPACK.

Il software si occupa di definire le sequenze di nucleotidi in base alla struttura secondaria che gli si impone e agli appaiamenti specificati, eseguendo poi una verifica per testare un certo livello di fedeltà, che può essere controllato. Più la fedeltà sarà alta più il tempo di calcolo richiesto aumenterà.

Una delle potenzialità di NUPACK, oltre alla definizione in principio di una determinata struttura secondaria, è la possibilità di definire regioni all'interno della struttura con caratteristiche definite.

In particolare, in tutti i design proposti in questa tesi sono stati adottati diversi accorgimenti:

- la presenza di due basi forti (G o C, indicate da S= "strong") in posizione immediatamente adiacente alla giunzione per ogni braccio;
- evitare successioni di 4 nt uguali in tutta la struttura quando possibile;
- evitare la presenza di successioni di tre o più G che potrebbero dare la formazione di G-quadruplex che non possono essere rilevati da NUPACK e quindi portare ad un errore durante la fase di assemblaggio.

Inoltre, per aumentare la precisione nella definizione delle sequenze, vengono considerati diversi "TargetTube" per tenere in considerazione non solo la formazione della Y di DNA ma anche la formazione di strutture secondarie all'interno dei singoli oligonucleotidi e della formazione dei dimeri. Questo porta ad evitare la formazione di strutture non previste che potrebbero ridurre la resa di assemblaggio. Tramite questo metodo è possibile anche analizzare appaiamenti che procedono per via cinetica (*kinetic design*), nonostante il programma lavori

calcolando la conformazione termodinamicamente più stabile e quindi non tenga in considerazione la cinetica che porta alla loro formazione. Per ogni struttura vengono create diverse sequenze per poi analizzare e scegliere la migliore.

3.1.2 Analisi dei filamenti

Le sequenze sono testate tramite la parte di analisi del programma per determinare le concentrazioni all'equilibrio e verificare i corretti appaiamenti.

Questo tipo di processo permette un controllo approfondito delle sequenze riportate oltre che allo studio di sequenze con caratteristiche ignote. Nel nostro caso si sono sviluppati input che sfruttavano le piene potenzialità di NUPACK andando a verificare contemporaneamente più sequenze insieme, oltre che a calcolare in ogni esperimento assemblaggi di maggiori dimensioni di quelli richiesti per la formazione dell'assemblaggio desiderato. Questo tipo di soluzione permette di trovare eventuali sovrastrutture stabili che possono influenzare la resa. Questo tipo di tecnica è però limitato dal tempo di calcolo, l'aumento del tempo è infatti esponenziale.

Gli oligonucleotidi scelti sono stati ordinati da IDT (Integrated DNA Technology) in forma non purificata (desalted) e in soluzione (100 μ M in IDTE pH=8.0). Al loro arrivo sono stati suddivisi in aliquote da 50 o 30 μ l e quelle non in uso sono state riposte e conservate a -20°C.

3.2 Assemblaggio delle nanostrutture

3.2.1 Appaiamento delle Y di DNA

Per le prove di stechiometria e di assemblaggio delle Y se non diversamente specificato si è utilizzato la seguente metodica: i vari filamenti, nei determinati rapporti stechiometrici, sono stati inseriti all'interno di tubi PCR nel buffer di assemblaggio ((Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 300 mM, KCl 2 mM, pH 8 in acqua ultrapura (Milli-Q®)).

Il processo di appaiamento è avvenuto in un termociclatore (PCR Sprint, Thermo Fisher Scientific), con un programma che consiste nei seguenti passaggi:

1. 95 °C per 5 minuti, per denaturare ogni eventuale struttura secondaria formatasi inter e intra-catena;
2. diminuzione lenta e costante della temperatura (velocità= 0,02 °C/s= 1,2 °C/min) fino a 20 °C, per consentire la graduale formazione degli appaiamenti corretti e la stabilizzazione delle strutture;
3. ritorno a temperatura ambiente (T= 25°C).

Per quanto riguarda la concentrazione degli oligonucleotidi per le prove di assemblaggio le concentrazioni finali variano in base all'esperimento tra 0,5-1-2-20 μM . Il cambio di concentrazione è atto a verificare la stabilità degli assemblaggi e la formazione di eventuali errori derivanti dalla concentrazione.

Altre metodiche per l'appaiamento delle Y di DNA sono state eseguite per valutare la stabilità del metodo:

I. appaiamento in bagno maria:

1. I vari filamenti, nei determinati rapporti stechiometrici, sono inseriti all'interno di eppendorf tube da 0,5 mL nel buffer di assemblaggio;
2. In un beker da 2 litri si è scaldato un litro di acqua fino alla temperatura di 95°C
3. I campioni preparati sono stati inseriti nel bagno termico a 95°C
4. Si è aspettato che il bagno maria si raffreddasse fino a temperatura ambiente ($T=25^{\circ}\text{C}$)
5. Campioni a $T=4^{\circ}\text{C}$ tutta la notte

II. Appaiamento con termociclatore fino a 4°C

1. I vari filamenti, nei determinati rapporti stechiometrici, sono inseriti all'interno di tubi da PCR nel buffer di assemblaggio;
2. 95°C per 5 minuti;
3. diminuzione lenta e costante della temperatura (velocità= $0,02^{\circ}\text{C/s}$ = $1,2^{\circ}\text{C/min}$) fino a 4°C ;
4. ritorno a temperatura ambiente ($T= 25^{\circ}\text{C}$).

III. Appaiamento a temperatura ambiente

1. I vari filamenti, nei determinati rapporti stechiometrici, sono inseriti all'interno di eppendorf tube da 0,5 mL nel buffer di assemblaggio;
2. Sono stati lasciati assemblare per 2 h a temperatura ambiente ($T=25^{\circ}\text{C}$)

3.2.2 *Assemblaggio dei dendrimeri di DNA*

Una volta ottenute le varie Y dai diversi filamenti a diverse concentrazioni sono successivamente assemblate.

La metodica normalmente utilizzata in questa tesi prevede l'inserimento delle Y_0 all'interno di un eppendorf tube da 0,5 mL in quantità ben definite in base all'esperimento e la successiva aggiunta di Y_1 in rapporto 1:3 per ottenere la struttura denominata G_1 .

Dopo l'aggiunta stechiometrica delle 2 Y si lasciano in incubazione i campioni per un'ora ad una temperatura di 40°C per una corretta formazione del dendrimero.

Per l'assemblaggio dei dendrimeri con layer maggiori si è seguita la generalizzazione che per ottenere la nanostruttura G_n si aggiunge ad una definita quantità di G_(n-1) una quantità 1:3x2ⁿ di Y_n per poi lasciargli il tempo di assemblarsi.

Altre metodiche sono state esplorate per definire le temperature e i tempi ottimali per l'assemblaggio delle nanostrutture:

- I. per un'ora a temperatura ambiente (T=25°C);
- II. per 2 ore a temperatura ambiente (T=25°C);
- III. per 2 ore a T=45°C;
- IV. per 5 ore a T=45°C.

Se non specificato le concentrazioni delle Y utilizzate nell'assemblaggio sono di 0,5 μM ma sono state provati assemblaggi con concentrazioni superiori atte a determinare eventuali imperfezioni nell'assemblaggio della struttura finale.

3.3 PAGE denaturante

Il controllo della qualità degli oligonucleotidi è stato eseguito mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide (PAGE) denaturante. Il buffer usato per il casting e la corsa dei gel è TAE 1X (Tris base 89 mM, acido borico 89 mM, EDTA 2 mM, pH=8). Per ogni oligonucleotide è stato caricato un pozzetto di un gel (poliacrilamide 10% + urea 8.3M), con circa 20 ng di DNA. Prima del caricamento, i campioni, già diluiti nel Loading Buffer denaturante (blu di bromofenolo 0,05% w/v, xilene cianolo 0,05% w/v, formammide 45% v/v, NaOH 5 mM ed EDTA 0,5 mM), sono stati scaldati a 90 °C per 5 minuti e posti subito dopo in ghiaccio. La corsa elettroforetica è stata eseguita a temperatura ambiente per 75 min a voltaggio costante pari a 70V, dopo di che i gel sono stati colorati con SYBR™ Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) e visualizzati al transilluminatore (Gel Doc X+, Bio-Rad). Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato il Marker pBR322/BsuRI (HaeIII, 5) (Thermo Scientific™).

Le immagini ottenute sono state elaborate con il software ImageJ.

3.3.1 Protocollo gel di poliacrilamide denaturante al 10%

1. Montare l'apparato per il casting del gel di poliacrilamide.
2. Calcolare il volume di acrilamide necessario in funzione della concentrazione del gel.
3. Per 7 mL di soluzione, raccogliere in un cilindro graduato 1,4 mL di TBE 5x.

4. Aggiungere 3,49 g di urea
5. Sotto cappa, aggiungere alla soluzione il volume di acrilamide calcolato (1,75 mL di acrilamide al 40%) e portare a volume con acqua bi-distillata per avere una soluzione finale di TBE 1x con la concentrazione di acrilamide desiderata.
6. Aggiungere 43,75 μ L di Ammonio Persolfato e 4,37 μ L di TEMED, mescolare con attenzione la soluzione con una Pasteur di vetro e versare soluzione nell'apparato di casting preparato in precedenza. Inserire infine un pettine da 10 pozzetti e lasciare polimerizzare il gel per circa 30 min

3.4 PAGE nativa

Per tutte le analisi mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide (PAGE) nativa è stato utilizzato il TBE 1X per il casting e la corsa dei gel. I campioni sono stati preparati diluendoli in Loading Buffer (blu di bromofenolo 0,04% w/v, xilene cianolo 0,04% w/v, glicerolo 10% v/v). La percentuale di acrilamide dei gel e le condizioni della corsa elettroforetica per le varie prove sono riportate nella tabella sottostante. Sono stati utilizzati due diversi marcatori di peso molecolare: il Marker pBR322/BsuRI (HaeIII, 5), indicato come M, e il Marker pUC9 DNA/MspI (HpaII) (Thermo Scientific™), indicato come Mx.

Prova	% Acrilamide	Condizioni di corsa (Vtaggio, Tempo, Temperatura)
Analisi dei filamenti precedenti (Figura 4.4)	10	85 V, 50 min, T amb
Analisi della costruzione di G1 derivante dai filamenti precedenti (Figura 4.8a)	10	85 V, 50 min, T amb
Gel per estrazione della Y (Figura 4.9a)	10	85 V, 50 min, T amb
Confronto Y estratte (Figura 4.9c)	10	85 V, 50 min, T amb
Primo appaiamento delle Y (Figura 4.21, Figura 4.22)	10	80 V, 60 min, T amb
Titolazione degli oligo H (Figura 4.23)	10	80 V, 60 min, T amb
Titolazione oligo Y (Figura 4.24)	10	80 V, 60 min, T amb
Confronto assemblaggio con ciclo termico (Figura 4.25)	10	80 V, 60 min, T amb
Confronto assemblaggio G1 (Figura 4.26a)	10	80 V, 60 min, T amb

Assemblaggio sequenziale di G1 (Figura 4.28)	8	70V, 60 min, T amb
Assemblaggio sequenziale di Y0 e H20 (Figura 4.29)	8	70V, 60 min, T amb
Confronto assemblaggio G1 (Figura 4.30)	8	70V, 60 min, T amb
Confronto assemblaggio G1 (Figura 4.31a)	8-15	70 V, 100 min, T amb
Primo appaiamento dei filamenti per Y₂ (Figura 4.35)	10	80 V, 60 min, T amb
Titolazione dei filamenti per Y₂ (Figura 4.36)	10	80 V, 60 min, T amb
Test di attività DNazima a 10mM di Mg²⁺ (Figura 4.39)	10	80 V, 50 min, T amb

Per la formazione dei gel di poliacrilamide bicomponenti che prevedono una prima parte di corsa ad una percentuale di 8 e poi una di 15 si è seguita una metodica particolare.

Si va a posare una prima metà di poliacrilamide al 15% e si ricopre lo strato di gel con isobutanolo saturo di TBE 1X per far polimerizzare il gel senza farlo seccare e producendo un'interfaccia lineare. Dopo la polimerizzazione si svuota l'iso-butanolo e si mette il gel di poliacrilamide al 8% così da creare un secondo livello ad una concentrazione inferiore.

I gel sono stati colorati con SYBR™ Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) e visualizzati al transilluminatore (Gel Doc X+, Bio-Rad) e le immagini ottenute sono state elaborate con il software ImageJ per la visualizzazione.

3.4.1 Protocollo gel di poliacrilamide al X%

1. Montare l'apparato per il casting del gel di poliacrilamide.
2. Calcolare il volume di acrilamide necessario in funzione della concentrazione del gel.
3. Per 7 mL di soluzione, raccogliere in un cilindro graduato 1,4 mL di TBE 5x.
4. Sotto cappa, aggiungere alla soluzione il volume di acrilamide calcolato e portare a volume con acqua bi-distillata per avere una soluzione finale di TBE 1x con la concentrazione di acrilamide desiderata.
5. Aggiungere 43,75 µL di Ammonio Persolfato e 4,37 µL di TEMED, mescolare con attenzione la soluzione con una Pasteur di vetro e versare soluzione nell'apparato di casting preparato in precedenza. Inserire infine un pettine da 10 pozzetti e lasciare polimerizzare il gel per circa 30 min

3.5 Elettroforesi su gel di agarosio

Le prove di elettroforesi su gel di agarosio sono state fatte utilizzando un buffer TAE 1X (Tris base 40 mM, acido acetico 20 mM, EDTA 1 mM, pH=8). I campioni sono stati diluiti in Loading Buffer 1X prima del caricamento. Sono stati utilizzati due diversi marcatori di peso molecolare: il Marker pBR322/BsuRI (HaeIII, 5), indicato come M1, e il Marker Lambda DNA/EcoRI + HindIII (Thermo Scientific™), indicato come M2. Tutte le prove sono state condotte con un gel al 1,5% di agarosio e con un tempo di corsa di 110 min a 35 V.

3.5.1 Protocollo gel di agarosio al 1,5%

1. Montare l'apparato per il casting del gel di agarosio.
2. Calcolare il peso di agarosio necessario in funzione della concentrazione del gel.
3. Per 25 mL di soluzione, raccogliere in una beuta 0,5 mL di TAE 50x e 24,5 mL di H₂O bi-distillata.
4. Aggiungere alla soluzione il peso di agarosio calcolato (0,38 g).
5. Coprire la beuta con un tappo e sciogliere l'agarosio scaldando la soluzione.
6. Aspettare che la soluzione diventi tiepida e versare nell'apparato di casting con il pettine da 8 pozzetti ed aspettare il completo raffreddamento con la conseguente gelificazione della soluzione.

3.6 Estrazione delle Y da gel di poliacrilamide

Per l'estrazione della Y da un gel di poliacrilamide si è eseguita una PAGE nativa utilizzando TBE 1X per il casting e la corsa dei gel. Il campione è stato preparato tramite un appaiamento dei filamenti, a concentrazione iniziale di 0,5 μ M, con la metodica classica illustrata in precedenza. Dopo l'esecuzione del programma il campione è stato diluito in Loading Buffer ed è stato fatto correre in un gel di poliacrilamide al 10% in cui era presente solo una unica grande lane per aumentare la quantità di massima di prodotto caricato.

Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato colorato con SYBR™ Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) e visualizzata al transilluminatore (Gel Doc X+, Bio-Rad). Una volta verificata l'effettiva separazione delle bande si è ritagliata la banda associata a Y₀ con un bisturi cercando di evitare le altre bande. Una volta ritagliata completamente la banda si è inserita in un tubo da dialisi insieme a del tampone TAE 1X. Si è poi eseguita l'estrazione dal gel di poliacrilamide inserendo il tubo da dialisi nella vaschetta per la corsa del gel di agarosio

riempita di TAE 1X e impostando una differenza di potenziale di 100V per 1h così da far migrare le strutture fuori dal gel di poliacrilamide. Dall'analisi eseguita si è poi deciso di eseguire un altro ciclo di estrazione a 150V per 30 min.

Dopo l'estrazione si è svuotato il tubo da dialisi e avendo cura di rimuovere tutti i pezzi di poliacrilamide per poi eseguire una ultrafiltrazione con un filtro Microcon™ YM-3.

In seguito, si sono eseguiti i test per determinare il miglioramento della purezza del Y estratta tramite PAGE nativa.

3.7 Attività enzimatica magnesio dipendente

3.7.1 Attività enzimatica a 10mM e 0,5 mM di magnesio cloruro in funzione del tempo

Per testare l'attività di cleavage del DNAzima sul miRNA bersaglio in vitro, si esegue un test in funzione del tempo. Assemblate le nanostrutture contenenti il DNAzima ad una concentrazione pari a 500 nM si sono posti in un eppendorf da PCR 2 μ L di soluzione contenete le nanostrutture, 1 μ L di una soluzione 100 mM di $MgCl_2$ e 6 μ L di MM buffer (140 mM KCl, 10 mM NaCl, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4). Per avviare la reazione si inserisce 1 μ L di soluzione contenete miR34a ad una concentrazione di 10 μ M.

Successivamente, seguendo la stessa procedura, sono stati eseguiti dei test ad una concentrazione di magnesio di 0,5 mM inserendo, al posto di 1 μ L di una soluzione 100 mM di $MgCl_2$, 1 μ L di una soluzione 5 mM.

Le eppendorf sono state incubate in un bagno termico a 37°C per 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, e 24 h. Terminato il tempo di reazione si è eseguita una PAGE nativa per andare a verificare l'attività dell'enzima.

3.7.2 Attività enzimatica a concentrazioni decrescenti di magnesio cloruro

Per testare l'effettiva attività del DNAzima sul miRNA bersaglio in ambienti poveri di magnesio, come l'ambiente cellulare, si sono eseguiti test di attività in funzione della concentrazione di magnesio.

Assemblate le nanostrutture contenenti il DNAzima ad una concentrazione pari a 500 nM si sono posti in un eppendorf da PCR 2 μ L di soluzione contenete le nanostrutture, la quantità adeguata di una soluzione di magnesio cloruro 100 mM o 5 mM e il volume rimanente di MM buffer. Per avviare la reazione si inserisce 1 μ L di soluzione contenete miR34a ad una concentrazione di 10 μ M.

Le concentrazioni di magnesio che si testano sono:

- 0,1 mM,
- 0,5 mM,
- 1 mM,
- 5 mM,
- 10 mM.

Test di confronto sono stati eseguiti per valutare l'effettivo funzionamento del DNAzima:

- Test di controllo contenente solo miR34a ad una concentrazione di magnesio di 10mM,
- Test di controllo contenente miR34a e tutti i filamenti eccetto quello contenente il DNAzima ad una concentrazione di magnesio di 10mM,
- Test di confronto con l'intero dendrimero assemblato ad una concentrazione finale di 17 nM per la valutazione dell'attività rispetto al DNAzima nella Y-DNA ad una concentrazione di magnesio di 0,5 mM

Le eppendorf sono state incubate in un bagno termico a 37°C per 24 h. Terminato il tempo di reazione si è eseguita una PAGE nativa per andare a verificare l'attività dell'enzima.

3.8 Prove di Internalizzazione delle nanostrutture di DNA in sistemi cellulari

Per le prove di internalizzazione dei dendrimeri di DNA si sono utilizzate le cellule N9 (RRID: CVCL_0452), linea immortalizzata di cellule della microglia murina, coltivate in 2D. Le cellule sono state trattate con le nanostrutture di DNA ricavate da un assemblaggio eseguito a 37°C con un tempo di assemblaggio per ogni *layer* di 1:30 h.

Dalla piastra contenente le cellule in coltura si elimina il terreno, si effettua un lavaggio in PBS 1X pH=7,4 (Tampone fosfato salino), si aggiunge tripsina 1X per il distacco e si lascia in incubazione a 37°C per 5 min.

Una volta eseguito il distacco delle cellule si aggiunge 1 mL di DMEM completo (DMEM HG +Q + FBS 10% + P/S 1%) per inattivare la tripsina e poi prelevare il contenuto ed inserirlo in un Falcon Tube da 15 mL. Si centrifuga per 5 min a 1000 rpm e si rimuove il surfattante, per successivamente risospingere il pellet con un 1mL di DMEM. Si esegue la conta cellulare nella camera di Neubauer.

I vetrini utilizzati per la visualizzazione al microscopio ottico vengono sterilizzati tramite l'utilizzo di etanolo puro e per ogni vetrino vengono seminate circa 20000 cellule usando 400 μ L di DMEM completo.

Vengono incubati a 37°C per 24 ore e successivamente vengono messe in contatto con 400 μ L di una soluzione contenete le nanostrutture ad una concentrazione di 50 nM (soluzione di DMEM + P/S 1% senza FBS).

Si incubano per 4 ore a 37°C, si cambia il terreno con una soluzione di DMEM + P/S 1% senza FBS che non contiene nanostrutture e si osserva al microscopio.

Le cellule N9 sono state osservate da vive a temperatura ambiente al microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse 80i, equipaggiato con telecamera sCMOS Hamamatsu Flash 4 per l'acquisizione delle immagini, sul canale di Cy3 e FITC con un obiettivo 100X a immersione in olio (NA=1.3). Le immagini sono state elaborate con il software ImageJ, applicando un algoritmo per la sottrazione dello sfondo in tutte quelle registrate sul canale di Cy3 e FITC.

4. Discussione e risultati

4.1 Analisi del sistema precedente

Nell'ambito del mio stesso, ma prima di questo lavoro, altri sistemi per il *downregulation* del miRNA-34a, un microRNA coinvolto nell'induzione della neuroinfiammazione da parte della microglia, tramite nanostrutture di DNA erano già state investigate. In particolare, era già stato sviluppato un sistema per la formazione di un dendrimero di DNA, non funzionalizzato, atto a porre le basi di una struttura che poteva successivamente essere modificata in base alle esigenze. I risultati ottenuti mostravano però una difficoltà nell'assemblaggio. Infatti, dai lavori precedenti, si nota come l'assemblaggio delle Y-DNA sia solo parziale. Questo errore, che nella formazione della Y risulta quasi trascurabile, porta però nell'assemblaggio della nanostruttura finale ad un grosso errore. Infatti, i filamenti parzialmente associati o liberi possono ancora legarsi alla Y successiva creando una moltitudine di sottoprodotti, non rendendo possibile la formazione di strutture di dimensioni e forma prevedibili.

Lo studio qui riportato è cominciato con l'analisi del sistema precedentemente sviluppato per cercare eventuali errori di progettazione o la presenza di filamenti difettosi che potessero interferire nell'assemblaggio e quindi evitarli nella progettazione della struttura successiva.

Questo studio preliminare, affiancato alla ricerca bibliografica, è servito per lo sviluppo di un metodo di analisi e design per le nanostrutture di DNA oltre a permettere di apprendere e consolidare le tecniche biochimiche di caratterizzazione. Queste conoscenze verranno poi utilizzate per la progettazione di 2 sistemi per la formazione di dendrimeri di DNA, il primo sviluppato a partire dal lavoro di Yang et al. con un meccanismo *self-assembly* e *layer-by-layer*, il secondo con un meccanismo rivisitato del *catalytic self-assembly* e *layer-by-layer*.

4.1.1 Analisi del design e della metodica per la generazione delle sequenze

Per prima cosa si è analizzato il metodo utilizzato per ottenere il design per andare a verificarne eventuali punti forti e punti deboli. Il design utilizzato prevede l'appaiamento dei tre filamenti per la formazione di una struttura a Y che include una *three-way junction* nel centro e ogni braccio è formato da un segmento a doppio filamento nella parte prossimale rispetto alla giunzione, che possiamo definire "*core*", e una porzione a singolo filamento nella parte distale, che possiamo definire come "*sticky end*".

La formazione delle Y era stata pensata con un meccanismo *self-assembly enzyme-free*: durante l'assemblaggio i filamenti si auto assemblano e non è necessario l'utilizzo di una DNA ligasi, mentre l'assemblaggio dei dendrimeri avviene con un meccanismo *layer-by-layer*, in cui ogni generazione (G_n) si ottiene aggiungendo alla generazione precedente dei “mattoni” (Y_n).

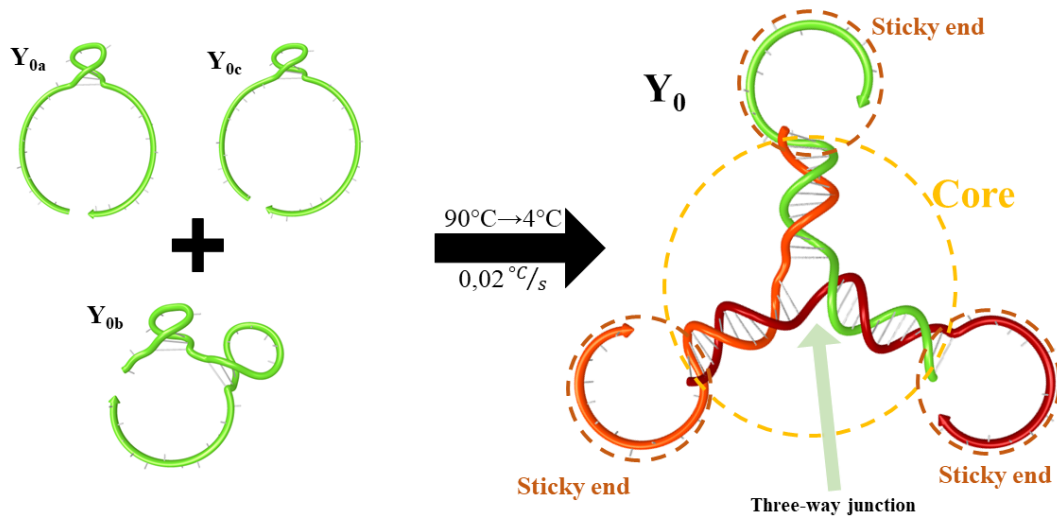


Figura 4.1 Rappresentazione dell'assemblaggio della Y a partire dai 3 filamenti, inoltre nella figura vengono esplicitate le varie sezioni della Y: three-way junction, core e sticky end.

Le sequenze dei singoli filamenti, dopo aver imposto la struttura finale e il metodo di assemblaggio, sono state ottenute suddividendo gli oligonucleotidi in sottosequenze in base alle regioni di complementarità, che sono state catalogate tramite lettere dell'alfabeto.

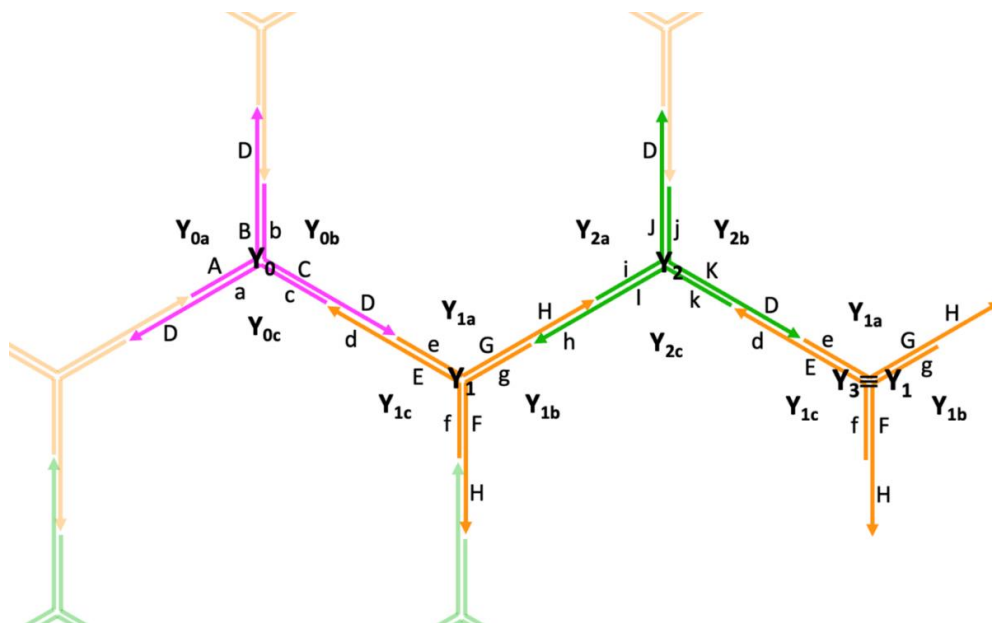


Figura 4.2 Design dendrimeri con espressi i nomi dei filamenti e delle sottosequenze.

Inoltre, in questo sistema si definisce $Y1 \equiv Y3$ in modo tale da semplificare il design ed ottenere dendrimeri con alto numero di generazioni con solo tre diverse Y.

Altre caratteristiche sono state imposte durante la fase di design:

- la presenza di due basi “forti” (G o C) in posizione immediatamente adiacente alla giunzione per ogni braccio, in modo tale che appaiandosi con le loro complementari dessero origine a interazioni abbastanza forti da mantenere chiusa stabilmente la *three-way junction*;
- la *sticky-end* di un filamento di Y_1 (Y_{1a}) risulti complementare alla sonda fluorescente Cy3-F2;
- evitare successioni di 4 nt uguali o 4 basi forti di fila, per rendere più equilibrata la composizione in basi delle sequenze;
- sequenze in output in cui ognuno dei filamenti avesse una percentuale in GC intorno al 50%.

Le sequenze sono poi generate dal software NUPACK tramite l’applicazione web di design.

Tabella 4.1 Sequenze generate da NUPACK che sono state scelte per le trattazioni successive

Filamento	Sequenza	Lunghezza
Y_{0a}	GAAAGGCAATTGCGGTCGTGTGACCTGATTCCACTACCC	39
Y_{0b}	AGGTCACACGACCCGAAAGCACATCGGATTCCACTACCC	39
Y_{0c}	CGATGTGCTTTCGGCAATTGCCTTTCGATTCCACTACCC	39
Y_{1a}	AGCGTCTGTCTGCCGAGGTCGAAATGTCTTTTGATAGCG	39
Y_{1b}	CATTCGACCTCGCCACTGTACGACGCTTTTGATAGCG	39
Y_{1c}	CGTCGTACAGTGGGCAGACAGACGCTGGGTAGTGGAATC	39
Y_{2a}	AGCTTGTAATCGGCTGAGGATACACGATTCCACTACCC	39
Y_{2b}	GTGTATCCTCAGCCGTCCACGACCATGATTCCACTACCC	39
Y_{2c}	ATGGTCGTGGACGCGATTACCAAGCTCGCTATCAAAAGA	39

4.1.2 Analisi dell’appaiamento dei filamenti

Per analizzare l’assemblaggio del dendrimero come obiettivo finale, in primo luogo si è partiti osservando i risultati ottenuti precedentemente dalle PAGE, sia denaturanti che native, per andare a visualizzare il comportamento reale dei filamenti. Per prima cosa si è analizzata la purezza dei singoli filamenti tramite PAGE denaturante. La PAGE è stata condotta con campioni più o meno concentrati per andare a visualizzare meglio eventuali bande poco visibili nell’analisi normalmente condotta

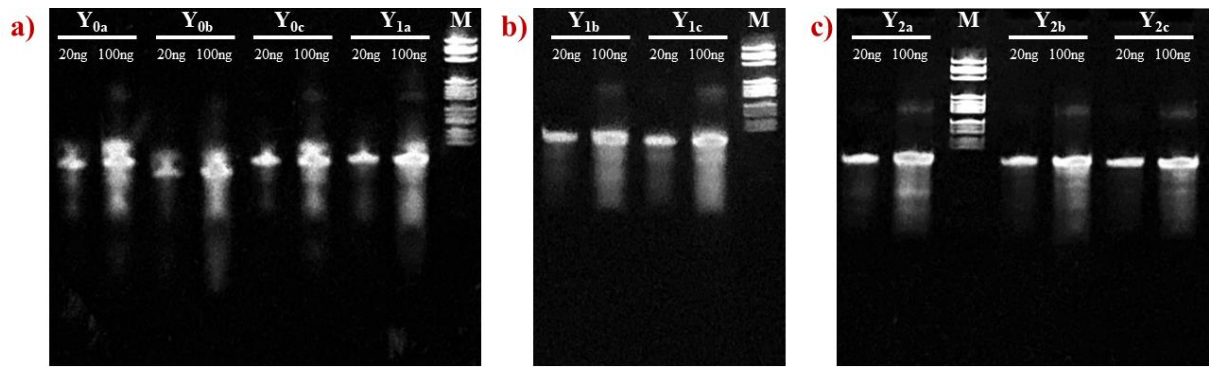


Figura 4.3 PAGE denaturante per verificare la purezza dei filamenti condotta con 2 campioni: uno meno concentrato contenente 20 ng di DNA e uno contenente 100 ng di DNA

In questo esperimento è possibile osservare uno striscio importante sotto ogni filamento, oltre alla presenza di un composto a peso molecolare superiore. Questi risultati risultano anomali per filamenti relativamente corti (39 nt) e indicano probabilmente problematiche da parte dell'azienda produttrice (Biofab research s.r.l.) durante la fase di sintesi causate dall'alto contenuto di GC nella sequenza.

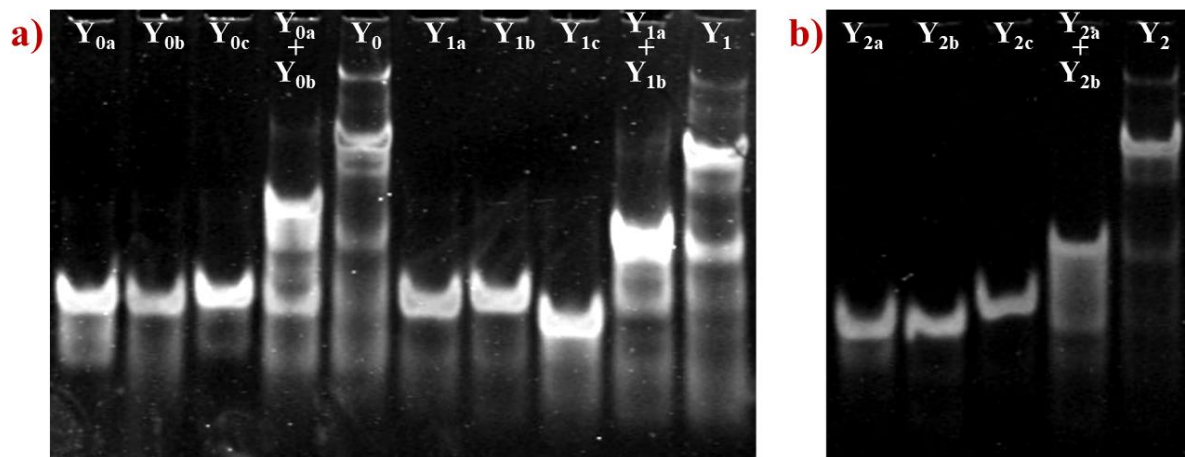


Figura 4.4 PAGE nativa per l'analisi degli appaiamenti dei vari filamenti e costruzione delle Y di DNA per una valutazione della resa di assemblaggio

Analizzando invece i gel ottenuti tramite PAGE nativa si nota come la resa di appaiamento delle singole Y sia effettivamente carente e presenti una serie di bande a peso molecolare superiore e inferiore. La banda a peso molecolare superiore è probabilmente derivante dalla formazione di un esamero, mentre le bande inferiori sono quasi tutte riconducibili a dimeri e monomeri che non vengono assemblati nella struttura finale. La presenza di molti strisci sotto le bande potrebbero indicare sottoprodotti derivanti dalla scarsa purezza dei filamenti.

Per l'analisi delle sequenze e del loro assemblaggio teorico si è utilizzato il programma NUPACK. Questa analisi è condotta per evidenziare un eventuale sequenza errata che non permette il corretto appaiamento dei filamenti.

Tutte le simulazioni sono eseguite ad una temperatura di 25°C e una concentrazione di Na⁺ di 0,5 M, i filamenti sono tutti considerati ad una concentrazione di 1 μM. Per le raffigurazioni degli appaiamenti delle sequenze si è utilizzato l'applicazione web di NUPACK. Per andare a eseguire le varie simulazioni di appaiamento si è utilizzata la funzione del software *analisi* NUPACK che valuta le strutture possibili tramite l'interazione dei filamenti posti all'interno del campione da analizzare andando prima a calcolare l'energia libera della struttura e, in un secondo momento, la concentrazione in soluzione.

Per ogni generazione vengono analizzati 7 *test tube* differenti per verificare ogni possibile appaiamento errato, non solo nella Y finale ma anche nella formazione dei dimeri che porterebbe ad un abbassamento della resa. Come detto in precedenza, NUPACK lavora con le energie calcolate in maniera termodinamica per valutare le stabilità e le concentrazioni delle strutture e ciò comporta che eventuali impedimenti cinetici per la formazione della struttura finale vengano ignorati. Si rende quindi necessario valutare ogni possibile passaggio nella reazione di appaiamento della struttura così da verificarne eventuali percorsi alterativi.

In conclusione, si sono analizzati *test tube* contenenti:

1. Y_{na}
2. Y_{nb}
3. Y_{nc}
4. Y_{na}- Y_{nb}
5. Y_{na}- Y_{nc}
6. Y_{nb}- Y_{nc}
7. Y_{na}- Y_{nb}- Y_{nc}

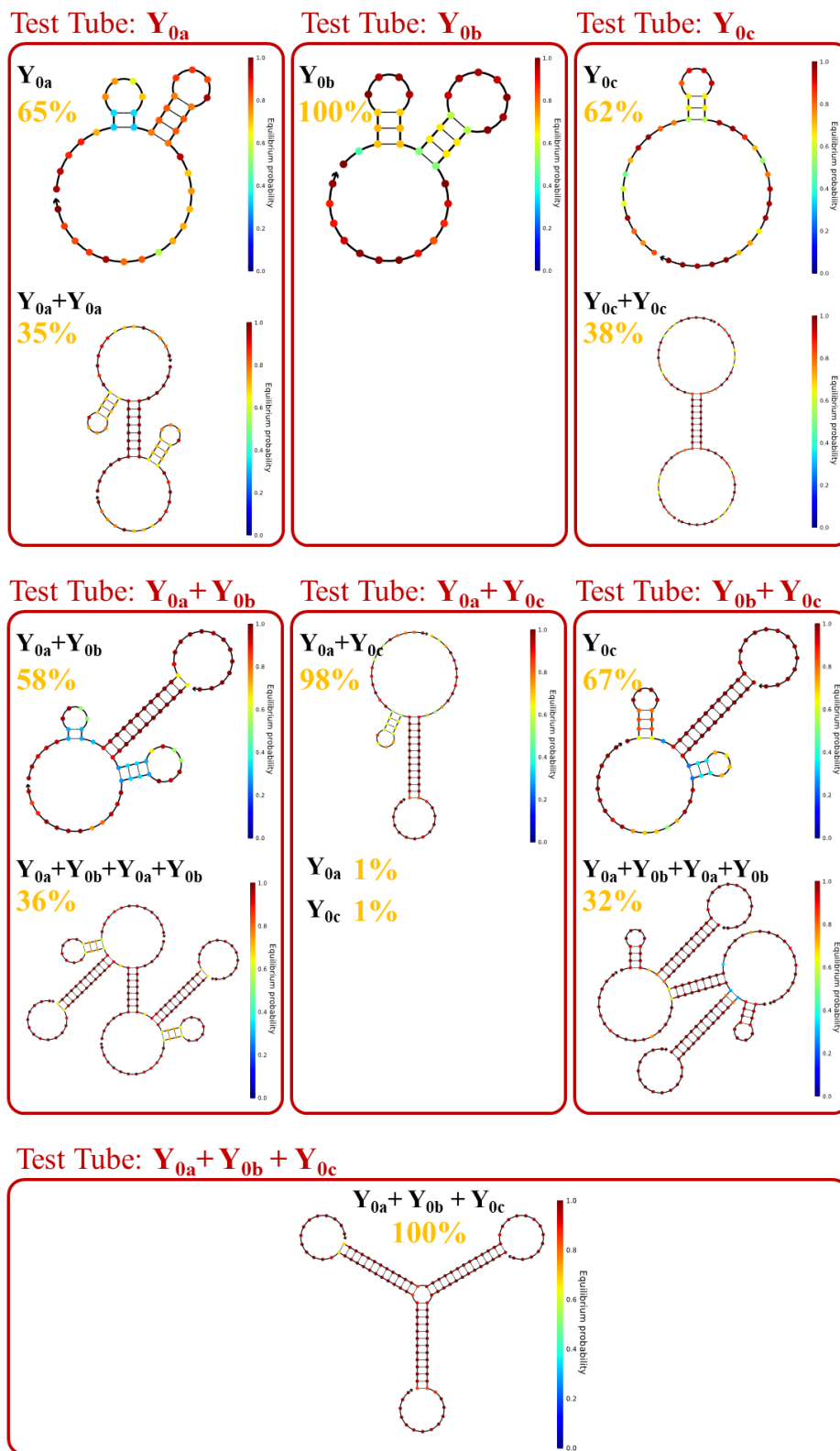


Figura 4.5 Rappresentazione dei risultati ottenuti dalla sezione analisi di NUPACK per la generazione 0 in cui sono mostrati i filamenti appaiati, la percentuale dell'appaiamento all'interno della soluzione e una rappresentazione della struttura secondaria in cui viene anche espressa la probabilità all'equilibrio dei nucleotidi appaiati in quella configurazione all'interno della struttura

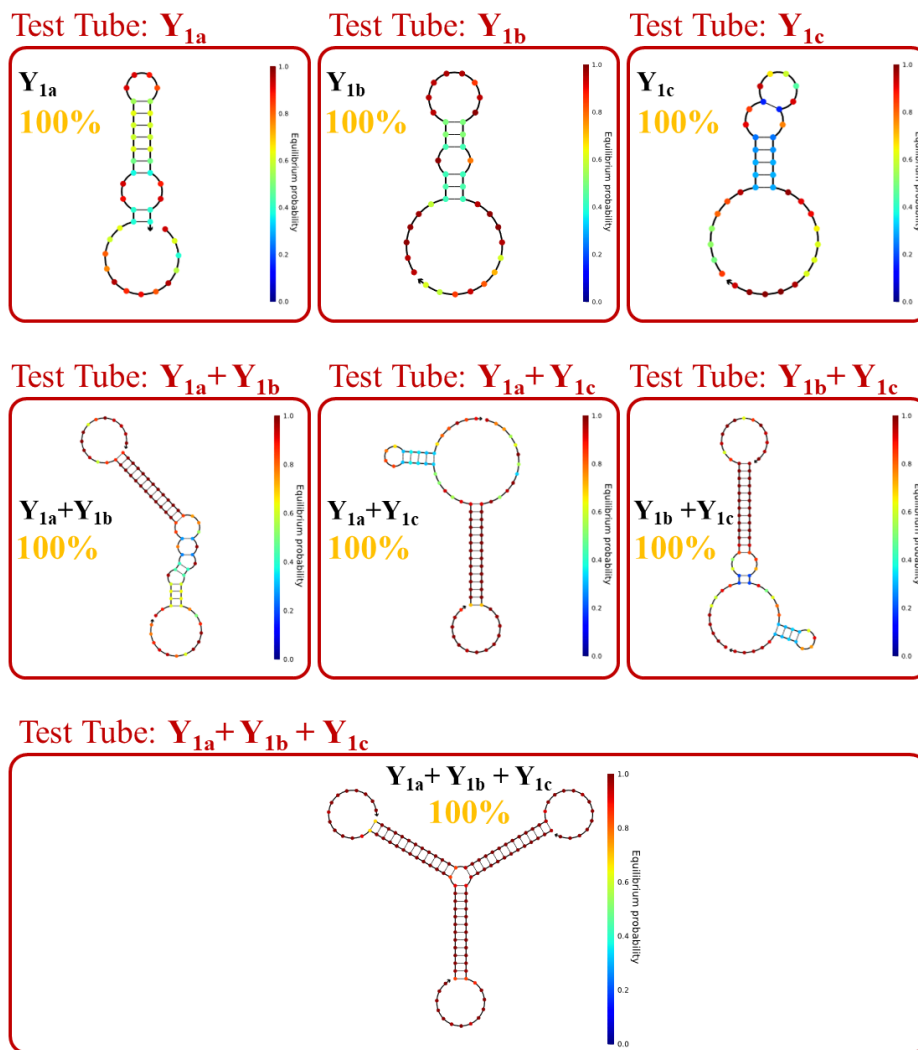


Figura 4.6 Rappresentazione dei risultati ottenuti dalla sezione analisi di NUPACK per la generazione 1

Nei test condotti in presenza di tutti e 3 i filamenti dell' Y_n corrispondente (Y_{na} , Y_{nb} , Y_{nc}) si ha la formazione della struttura con una resa del 100% indice di una sequenza che non presenta errori di complementarità. Analizzando i risultati relativi alle Y si nota come il sottoprodotto principale sia presente solo in quantità minime, circa 8 ordini di grandezza in meno rispetto alla concentrazione di Y . Analizzando invece i singoli filamenti e le interazioni per la formazione dei dimeri, si nota la presenza auto-appaiamenti. I filamenti che presentano maggiormente questo comportamento sono Y_{0a} e Y_{0b} .

Questo fenomeno potrebbe portare successivamente alla formazione di strutture differenti da quelle pensate per il sistema e che possano presentare una stabilità inferiore del Y finale, e quindi essere ignorate da NUPACK, ma comunque abbastanza stabili da formarsi in un assemblaggio reale.

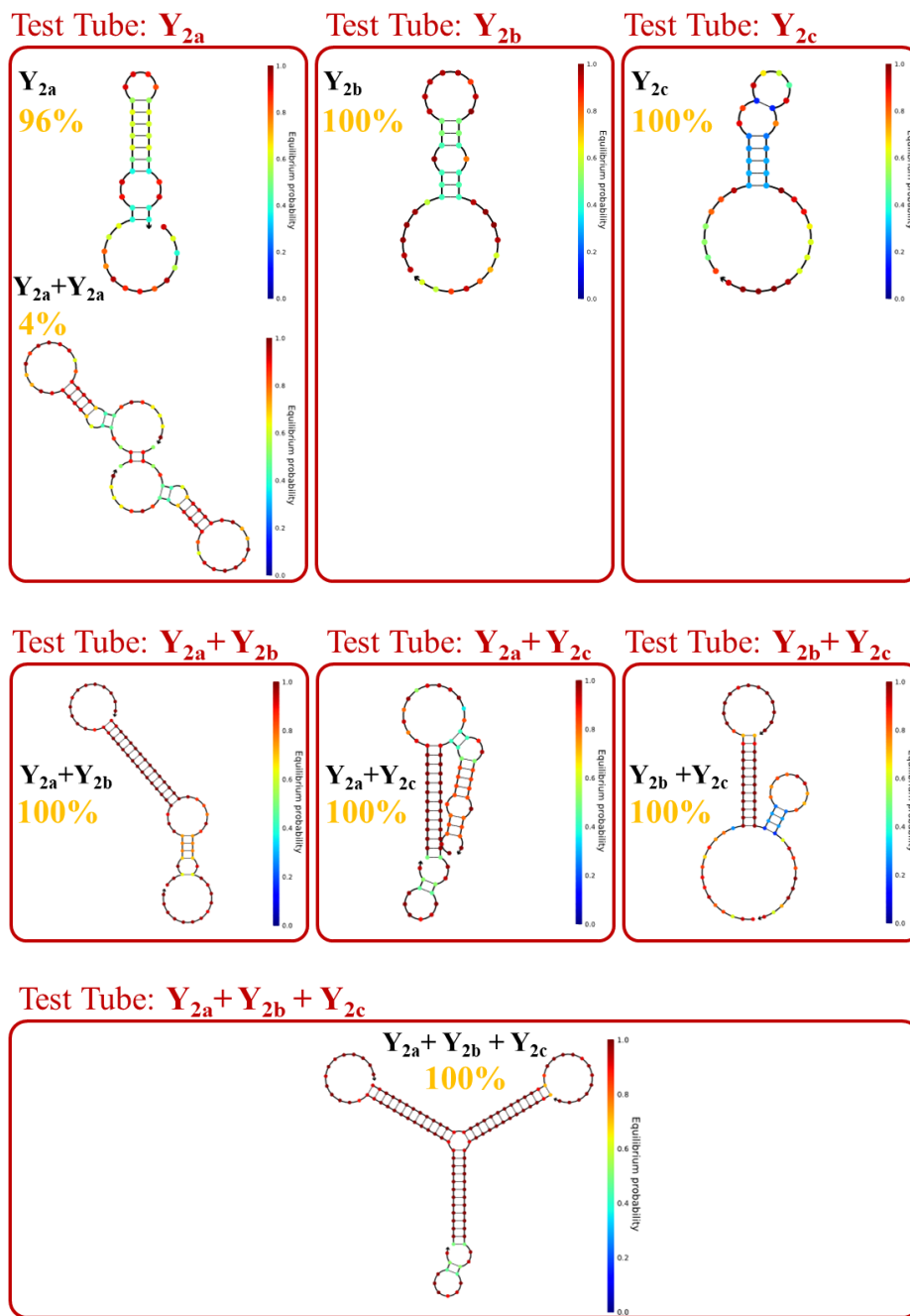


Figura 4.7 Rappresentazione dei risultati ottenuti dalla sezione analisi di NUPACK per la generazione 2

Considerando la presenza di assemblaggi non previsti ma stabili all'interno della soluzione derivanti dagli assemblaggi errati dei dimeri, il risultato finale può, in conclusione, non essere quello definito dal design e portare quindi ad un abbassamento della resa di formazione della Y. Questa previsione derivante dal software non presenta un riscontro dai dati ottenuti dai gel mostrati in precedenza. Infatti, in quel caso, sono i filamenti che tendono a non appaiarsi e non, come previsto da NUPACK, la formazione di dimeri errati o strutture superiori. Infatti, non sono presenti dimeri o trimeri differenti da quelli previsti dal design. Potrebbe quindi trattarsi di impurezze presenti nei filamenti che impediscono il corretto appaiamento

4.1.3 Analisi dell'assemblaggio della nanostruttura

Una volta formate le Y con la massima resa possibile si è tentato di assemblare il dendrimero di DNA. Già nella formazione della prima generazione si nota, tramite i gel ottenuti dalla PAGE, la difficoltà dell'assemblaggio fra Y₀ e Y₁.

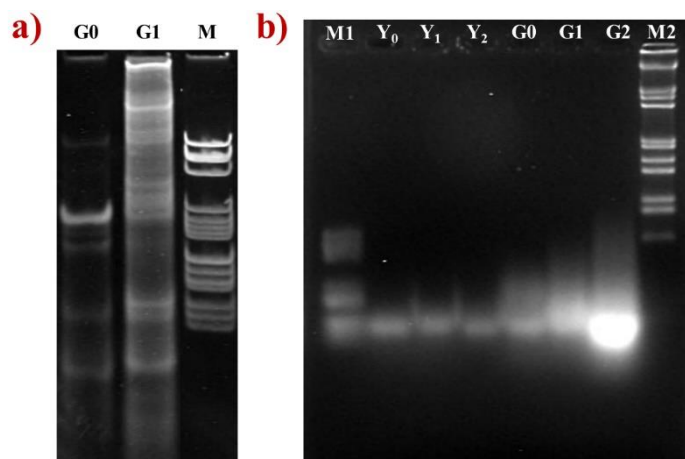


Figura 4.8 a) PAGE nativa per la valutazione della resa di assemblaggio di G1 e b) elettroforesi su gel di agarosio per la valutazione dell'assemblaggio fino a G2

Nonostante questo, si è proseguito all'assemblaggio di G2. Per l'analisi di queste strutture si è eseguita un'elettroforesi su gel di agarosio perché i dendrimeri analizzati presentano dimensioni troppo elevate per migrare in un gel di poliacrilamide, come si nota in figura, G1 riesce a malapena ad entrare nel gel di poliacrilamide.

I risultati non sono però valutabili a causa dell'instabilità della struttura. Infatti, si può notare come le uniche bande presenti siano a livello della singola Y indicando quindi una debole interazione fra le *sticky end* delle varie generazioni che quindi tendono a dissociarsi molto rapidamente durante la corsa elettroforetica.

4.1.4 Purificazione di Y₀

Con lo scopo di verificare che la causa della difficoltà degli appaiamenti non fosse la presenza di filamenti con sequenze errate, si è tentata la purificazione di Y₀ tramite un'estrazione dal gel di poliacrilamide.

Dopo l'assemblaggio di Y₀ è stata eseguita una PAGE e dal gel ottenuto è stata ritagliata la banda corrispondente a Y₀ cercando di evitare una qualsiasi banda secondaria. Dopo l'estrazione con una parte dell'estratto è stato eseguito un nuovo ciclo termico e poi si sono confrontati i risultati con l'assemblaggio pre-estrazione.

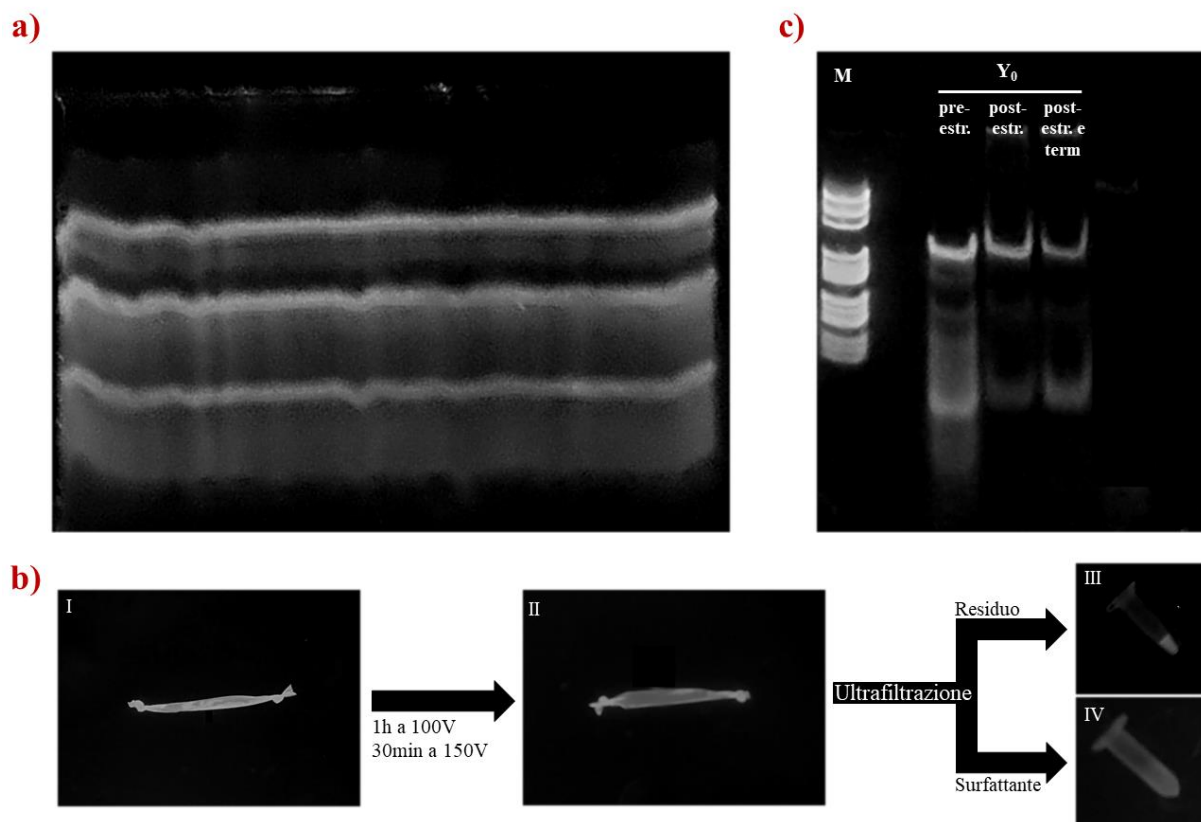


Figura 4.9 a) Gel ottenuto dalla PAGE monolane da cui si è ritagliato la banda associata a Y_0 b) Varie fasi dell'estrazione dal gel di poliacrilamide dove: I) tubo di dialisi prima dell'estrazione dove è possibile vedere i pezzi di poliacrilamide contenenti il campione, II) tubo da dialisi dopo estrazione dove non si vedono più i pezzi di poliacrilamide perché Y_0 è migrato all'esterno, III) residuo dopo ultra centrifugazione dove si è raccolto Y_0 , IV) Surfattante dell'ultracentrifugazione c) Elettroforesi PAGE di confronto fra i vari campioni

Come si può vedere dai risultati, il processo di estrazione porta a campioni più puliti con la presenza di meno bande secondarie, indicando che la purificazione porta effettivamente ad una soluzione contenente meno impurezze. Si può infatti notare la scomparsa della banda appena sottostante alla Y e lo striscio presente sotto al dimero.

Questo tipo di esperimento mostra però la presenza di un equilibrio tra la Y , i dimeri e monomeri. Dai risultati si può vedere come questo equilibrio, o instabilità, non permetterà mai di ottenere un completo assemblaggio a favore della Y . Infatti, la presenza di monomeri dopo l'estrazione indica che la struttura della Y non è stabile e tende a dissociarsi per dare i monomeri in soluzione.

Il confronto tra i 2 campioni purificati, di cui uno ha subito un ulteriore ciclo termico evidenzia e conferma l'affermazione precedente secondo cui si può ipotizzare la presenza di un equilibrio tra la Y e i suoi componenti.

4.2 Analisi del design di Yang *et al.*

Insieme al sistema sopra descritto, si è analizzato anche un sistema descritto in letteratura da Yang *et al.*⁶⁸ in cui viene riportato un assemblaggio perfetto del dendrimero.

In questo caso, il metodo per la formazione del dendrimero è lo stesso di quello precedentemente progettato in laboratorio, cioè un *self-assembly* e *layer-by-layer*. Inoltre, presenta filamenti molto simili a quelli analizzati in precedenza. Per le analisi dei filamenti e lo studio della struttura si è deciso di studiare solo i primi 2 livelli del dendrimero.

Tabella 4.2 Sequenze dei filamenti utilizzati da Yang *et al.*⁶⁸

Filamento	Sequenza	Lunghezza
Y_{0a}	GACCGATGGATGACCTGTCTGCCTAATGTGCGTCGTAAG	39
Y_{0b}	GACCGATGGATGACTTACGACGCACAAGGAGATCATGAG	39
Y_{0c}	GACCGATGGATGACTCATGATCTCCTTTAGGCAGACAGG	39
Y_{1a}	GAAGCCACTCTGACCTGTCTGCCTAATGTGCGTCGTAAG	39
Y_{1b}	GAAGCCACTCTGACTTACGACGCACAAGGAGATCATGAG	39
Y_{1c}	TCATCCATCGGTCTCATGATCTCCTTTAGGCAGACAGG	39

In una prima analisi svolta queste sequenze, si può notare come il *core* delle Y sia costante in entrambe e cambi solo la parte relativa alle *sticky end*. In questo sistema il filamento appartenente a Y₁ che si lega con Y₀ viene scelto come Y_{1c}.

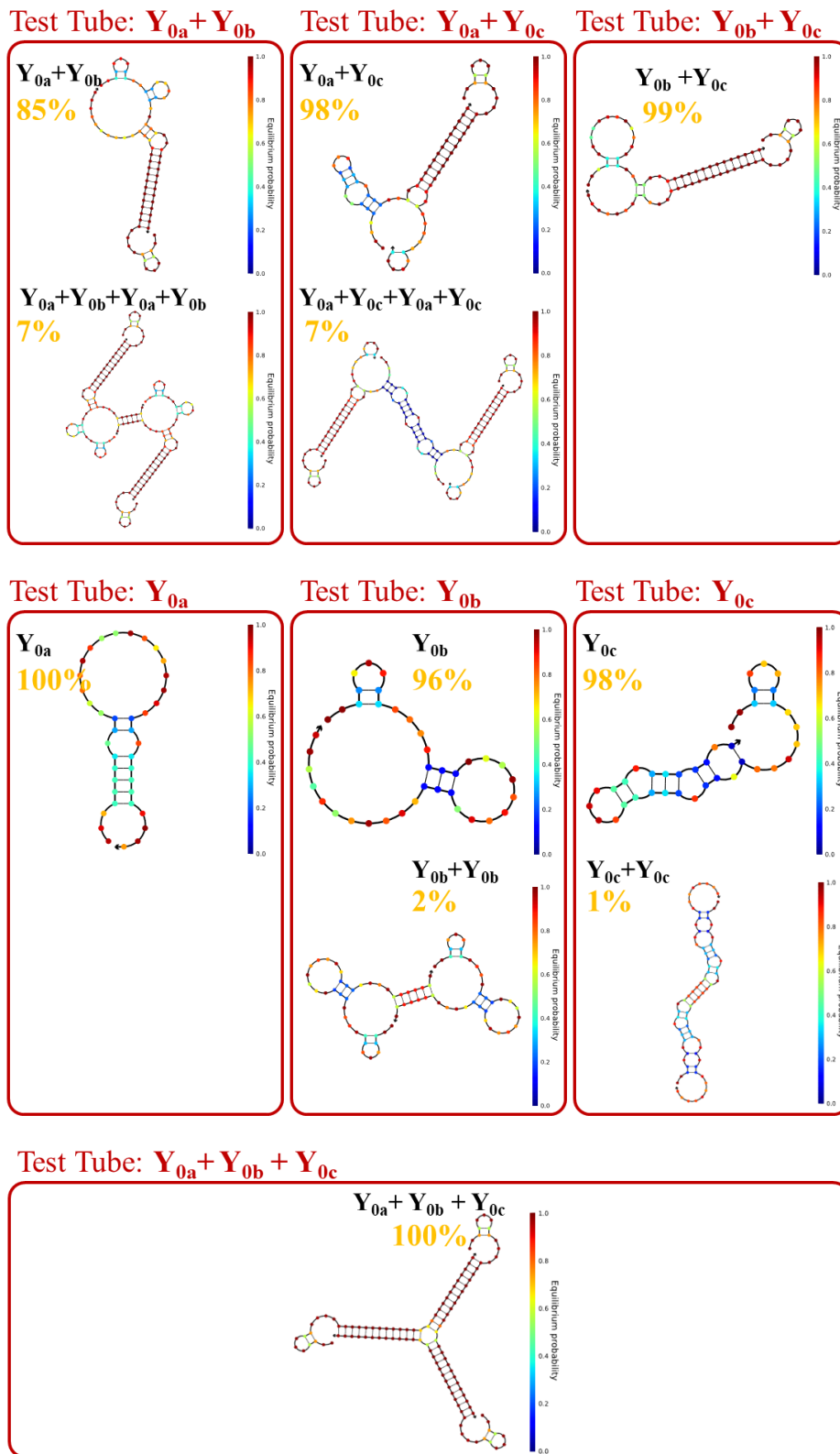


Figura 4.10 Rappresentazione dei risultati ottenuti dalla sezione analisi di NUPACK per la generazione 0

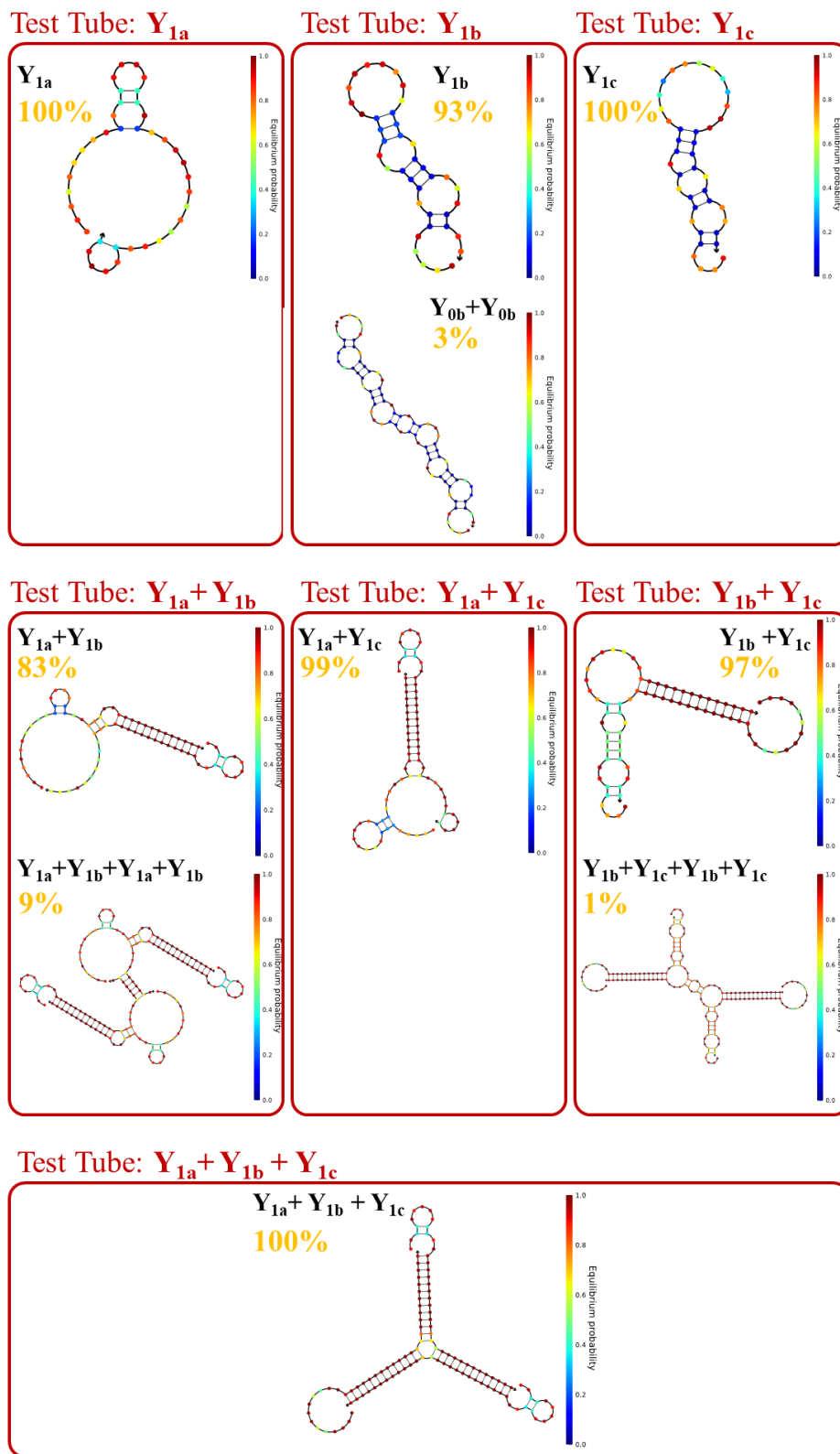


Figura 4.11 Rappresentazione dei risultati ottenuti dalla sezione analisi di NUPACK per la generazione 1

Dalle analisi tramite NUPACK si ricavano risultati interessanti, soprattutto se si confrontano con quelli ottenuti da altri lavori trovati in letteratura. Infatti, si può notare come l'appaiamento dei filamenti avvenga in maniera sequenziale.

Tabella 4.3 Energia di appaiamento delle sotto sequenze del core

Accoppiamento	$Y_{na}-Y_{nb}$	$Y_{na}-Y_{nc}$	$Y_{nb}-Y_{nc}$
$\Delta G(\text{kcal/mol})$	-21,632	-20,268	-18,925

Dai risultati, si può vedere come appunto alcuni dimeri abbiano una stabilità decrescente, nell'ordine:

- 1) $Y_{na}-Y_{nb}$
- 2) $Y_{na}-Y_{nc}$
- 3) $Y_{nb}-Y_{nc}$

Questo tipo di sequenzialità sembra sia una caratteristica comune dei vari sistemi che in letteratura vengono riportati come funzionanti. Infatti, anche nel caso di Yin et al. si può riscontrare un comportamento simile: infatti, al posto di una maggiore stabilità di appaiamento dei dimeri c'è in una apertura sequenziale dei *seed*.

Per studiarli in maniera più approfondita e stabilire un riferimento per il design sviluppato si è quindi pensato di andare a verificarli anche tramite esperimenti condotti in laboratorio.

4.3 Impostazione del nuovo design

Una volta raccolti tutti i dati appartenenti ai design precedenti, si è proceduto a svilupparne uno nuovo. Vari tipi di design sono stati valutati e sviluppati per ricercare l'assemblaggio che desse maggiore stabilità a quello finale.

4.3.1 Design di un sistema catalytic self-assembly e layer by layer

Ispirandosi al design proposto e sviluppato da Yin et al.⁵⁵ si è tentato di costruire filamenti per un meccanismo di assemblaggio “*catalytic self-assembly*”. Questo tipo particolare di design prevede un minimo di 4 filamenti di cui 3 destinati alla formazione della *three-way junction* e uno al ruolo di iniziatore. In questo design i monomeri possiedono una loro struttura secondaria definita che impedisce l'assemblaggio tra loro in assenza del filamento iniziatore. Quando all'interno della soluzione viene inserito l'iniziatore, si innesca una reazione a catena in cui l'apertura del primo filamento permette l'apertura del secondo e così via. L'obiettivo era quello di sviluppare un design leggermente differente da quello proposto nell'articolo per creare un sistema in cui l'assemblaggio delle singole Y sfruttasse il *catalytic self-assembly* e l'assemblaggio del dendrimero avvenisse tramite un meccanismo *layer by layer*.

In partenza ci si è concentrati sul diminuire il numero di basi per filamento e creare una *sticky end* di lunghezza adeguata. Dai dati raccolti dal design precedentemente sviluppato in laboratorio, è osservabile come l'appaiamento con solo 13 nt per l'unione di 2 Y non mostri stabilità, risultato in contrasto con tutti i dati presenti in letteratura che mostrano un'eccellente stabilità delle nanostrutture assemblate. Si è deciso di produrre diversi sistemi per valutare teoricamente, tramite NUPACK, la loro stabilità.

Inoltre, si è cercato di sviluppare un sistema in cui i singoli filamenti, se non appaiati a formare la Y, avessero la *sticky end* non disponibile per un eventuale appaiamento con un filamento del livello successivo. Questo tipo di accorgimento eviterebbe che la presenza di un errore nella sequenza del filamento, dovuto alla sintesi difettosa o al mancato appaiamento derivante da altri motivi, andasse ad influenzare la resa di assemblaggio dei dendrimeri.

La lunghezza dei filamenti è invece limitata in prima battuta dalla densità finale del dendrimero, infatti, se il filamento risulta troppo lungo, il dendrimero finale presenta molti spazi vuoti portando ad una maggiore velocità di degradazione dovuta all'azione della nucleasi. In secondo luogo, un filamento troppo lungo in fase di sintesi porterebbe ad una maggiore possibilità di errori influenzando la resa di assemblaggio.

Per eseguire il design della sequenza, il monomero viene suddiviso in tre parti principali in base alla sua struttura secondaria:

- Un "punto di appoggio" (*seed*) che crea un sito di nucleazione iniziale per l'apertura della struttura secondaria del monomero (minimo 3-4 nt);
- Una "*harpin*", che può essere divisa in 2 sottoparti: la sottoparte a ssDNA e la sottoparte a dsDNA, che va a "nascondere" la sequenza di basi evitando gli appaiamenti;
- Una coda a singola elica.

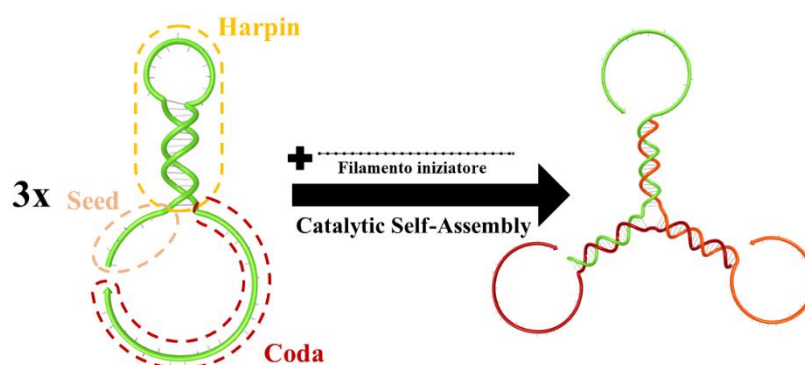


Figura 4.12 Rappresentazione del monomero con espresse le sue parti principali e rappresentazione dell'appaiamento per la formazione del Y

Oltre a questa divisione è possibile dividere la sequenza in altre tre diverse sottosequenze che vanno a identificare i vari appaiamenti programmati. Considerando Y_{0a} come esempio avremo le 3 diverse regioni di appaiamento:

- 1) $Y_{0a}-Y_{0b}$
- 2) $Y_{0a}-Y_{0c}$
- 3) $Y_{0a}-Y_{1b}$

Queste sottosequenze possono essere loro stesse divise in 2 parti: un *seed* per una prima interazione e una seconda parte che lega effettivamente i 2 filamenti.

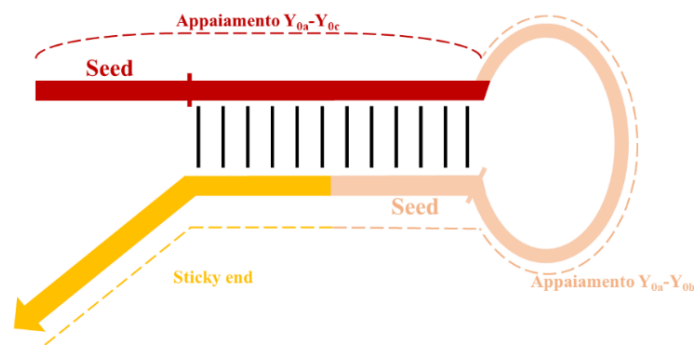


Figura 4.13 Sequenze di appaiamento con espressione delle sotto sequenze

Sullo stesso tipo di design sono stati creati, quindi, differenti sistemi di diverse lunghezze per valutarne la stabilità e la fattibilità.

Tabella 4.4 Sequenze dei diversi sistemi raffigurati

Design	Filamento	Sequenza	Lunghezza
a)	H₁₀	CGCACGCGAACGCAACGCACTTCGCGTGCGTTGC GTTCGCCATTACTCCACTCCACTC	60
	H₂₀	GCGAACGCAACGCAACGCGAATTGCGTTGCGGTGC GTGCGCATTACTCCACTCCACTC	60
	H₃₀	CGCAACGCAACGCGAACGCAAGTGCCTGCGTTGCGTTGC CGTGCGCATTACTCCACTCCACTC	60
	I₀	GTGCGTTGCGTTGCGGTGCG	20
b)	H₁₀	ACGCCAGCCCTAGTCCGAGCCCAGCTGGGCTTGG ATCTGGGCTCGGACTAGGGCATACTCACTCACTTC ATCACTCAC	78
	H₂₀	GTCCGAGCCCAGATCCAAGCCCAGTAGGGCTGGC GTCTGGGCTTGGATCTGGGCATACTCACTCACTTC ATCACTCAC	78
	H₃₀	ATCCAAGCCCAGACGCCAGCCCTACTGGGCTCGG ACTAGGGCTGGCGTCTGGGCATACTCACTCACTTC ATCACTCAC	78
	I₀	CTGGGCTCGGACTAGGGCTGGCGT	24

c)	H₁₀	GGGCAGGGTAGGGTCGGGTATACCCGACTCTACC CGACCCTACCCTATGGATTGATGTTAGTTGA	65
	H₂₀	GGGTCGGGTAGAGTCGGGTATACCCTGCCCTACC CGACTCTACCCTATGGATTGATGTTAGTTGA	65
	H₃₀	GAGTCGGGTAGGGCAGGGTATACCCGACCCTACC CTGCCCTACCCTATGGATTGATGTTAGTTGA	65
	I₀	TACCCGACCCTACCCTGCC	20
d)	H₁₀	GATCCGCTGTGACGCTGCAGCGCTCCAGCGTCAC AGCGATAGCTAGGTTTCGTTT	54
	H₂₀	GTGACGCTGGAGCGCTGCAGCGGATCAGCGCTCC AGCGATAGCTAGGTTTCGTTT	54
	H₃₀	GGAGCGCTGATCCGCTGCAGCGTCACAGCGGATC AGCGATAGCTAGGTTTCGTTT	54
	I₀	CAGCGTCACAGCGGATC	17
e)	H₁₀	ACACGGACGAGGCTCGCACGCCTCGTCCATTAGG GCAGGTT	41
	H₂₀	ACGAGGCGTGCGATCCGTGTCGCACGCCATTAGG GCAGGTT	41
	H₃₀	CGTGCACACGGAGCCTCGTCCGTGTCGATTAGG GCAGGTT	41
	I₀	GCCTCGTCCGTGT	13

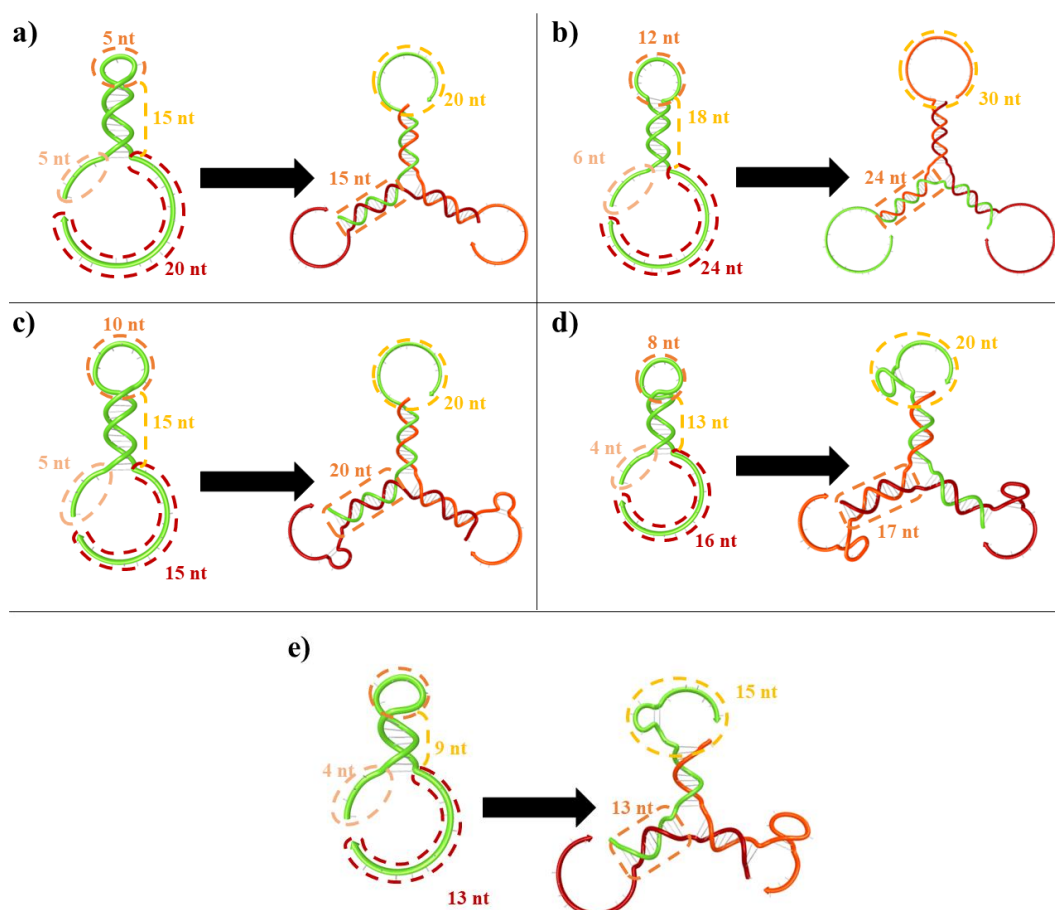


Figura 4.14 Diversi sistemi per lo stesso design dove variano le lunghezze dei filamenti, degli appaiamenti e delle Y per andare ad esplorare varie soluzioni e decidere la migliore.

Dall'analisi dei sistemi riportati, si osserva come per i sistemi più piccoli, aumenti la presenza di basi forti all'interno della sequenza. Questo è determinato dalle minori interazioni tra i

filamenti e di conseguenza, per rendere la Y stabile, risulta necessario aumentare la stabilità delle singole interazioni. Questo porta però delle complicazioni in fase di produzione, come visto in precedenza, oltre che ad una limitazione nella diversificazione delle varie sottosequenze, aumentando la possibilità della formazione di appaiamenti errati. La diversificazione viene ulteriormente limitata dalla presenza delle *harpin*, necessarie per il *catalytic self-assembly*. Infatti, la scelta di “nascondere” parte della *sticky end* all’interno della zona a dsDNA dell’harpin porta alla formazione di sequenze complementari che si ripetono in tutta la struttura, vista la presenza di zone dsDNA intra-filamento. Questo quindi porta ad una altissima ripetizione di una determinata sequenza che può dare, sommato alla problematica precedente, errori durante la fase di appaiamento dei filamenti. Questa criticità intrinseca del design può portare a prodotti non previsti e di conseguenza ha dissuaso nel continuare su questa strada.

Si è pensato ad un altro design, completamente nuovo, che si discostasse dal sistema proposto da Yin⁵⁵ ma che potesse sfruttare le caratteristiche del *catalytic self-assembly*.

Dopo vari test di sistemi differenti che cercavano di eseguire un’evoluzione del *catalytic self-assembly* sfruttando geometrie differenti, si è arrivati al risultato mostrato in figura.

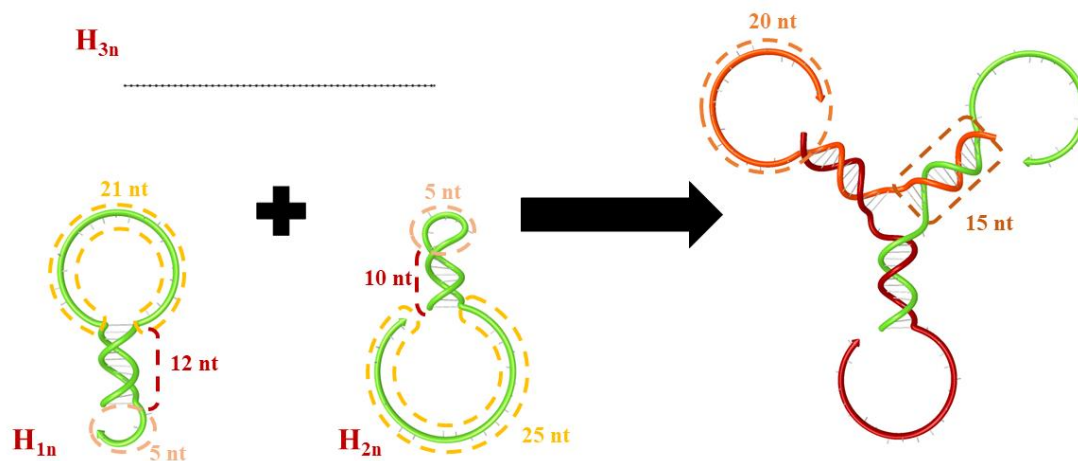


Figura 4.15 Immagine del design utilizzato

In questo sistema non è necessario l’utilizzo di un iniziatore perché il filamento H_{3n} , non presentando alcuna struttura secondaria, permette l’apertura del filamento H_{2n} che successivamente aprirà il filamento H_{1n} per l’assemblaggio di Y_n . Inoltre, nel design i 2 filamenti H_{1n} ed H_{2n} non dovrebbero interagire sia causa di impedimento delle sezioni a dsDNA che nascondono gli appaiamenti sia per motivi termodinamici. Infatti, le strutture secondarie due filamenti singoli sono più stabili del loro appaiamento in assenza di H_{3n} .

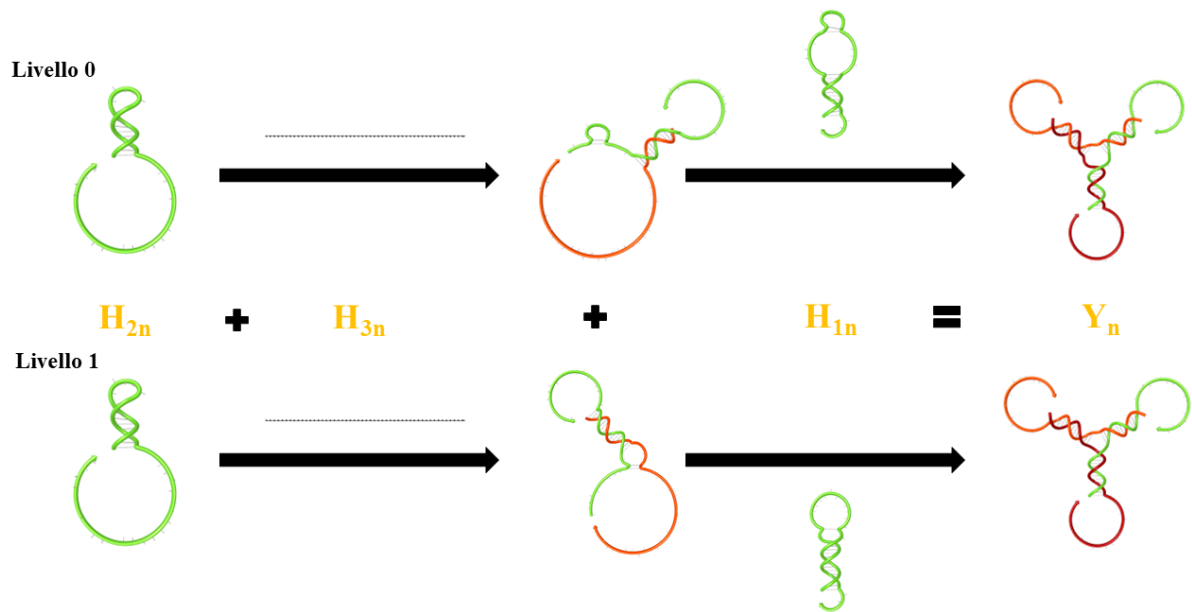


Figura 4.16 Reazioni di assemblaggio del livello 0 e del livello 1 progettati

In presenza del terzo filamento però si ha la formazione della Y-DNA dovuta all'apertura del filamento H_{2n} per portare ad una struttura finale che presenti un numero di basi associate tra di loro maggiore di quello dei filamenti separati. Questo risultato è possibile grazie all'attenta calibrazione delle basi appaiate sia nella struttura secondaria del monomero sia nella struttura della Y finale.

Su questo sistema sono state poi eseguite varie prove per creare le sequenze migliori per i filamenti.

Si sono scelti i 2 migliori sistemi secondo il programma NUPACK per andare a costruire i primi 2 livelli del dendrimero e quindi dimostrare il corretto funzionamento del design e solo una volta confermato, creare il terzo livello.

In questo caso la *sticky end* dell'Y₁ che si lega con Y₀ è stata costruita manualmente semplicemente come sequenza complementare della *sticky end* di Y₀. Dopo questo passaggio manuale si è comunque testato che il cambio della sequenza non andasse ad influire sull'assemblaggio finale.

Tabella 4.5 Sequenze generate da NUPACK per il sistema mostrato precedentemente e utilizzate per le trattazioni successive.

Filamento	Sequenza	Lunghezza
H₁₀	GTTTCATTAGTTAGTATTCGCATTCCGTCCTGAAACTAATGAAACTAAAC	50
H₂₀	GGACGGAATGCGAATCATTCCTGTCCTGGTGAAACTAATGAAACTAAAC	50
H₃₀	CCAGCGGACGGAATGACTAACTAATGAAACTGAAACTAATGAAACTAAAC	50
H₁₁	GTGAAGTGGAGTGAGCTGCCTGTAGTGATGATTACTCCACTTCACCTCAC	50
H₂₁	CATCACTACAGGCAGTGTAGTGATGTCGCCGTTTAGTTTCATTAGTTTCA	50
H₃₁	GGCGACATCACTACACTCACTCCACTTCACATTACTCCACTTCACCTCAC	50

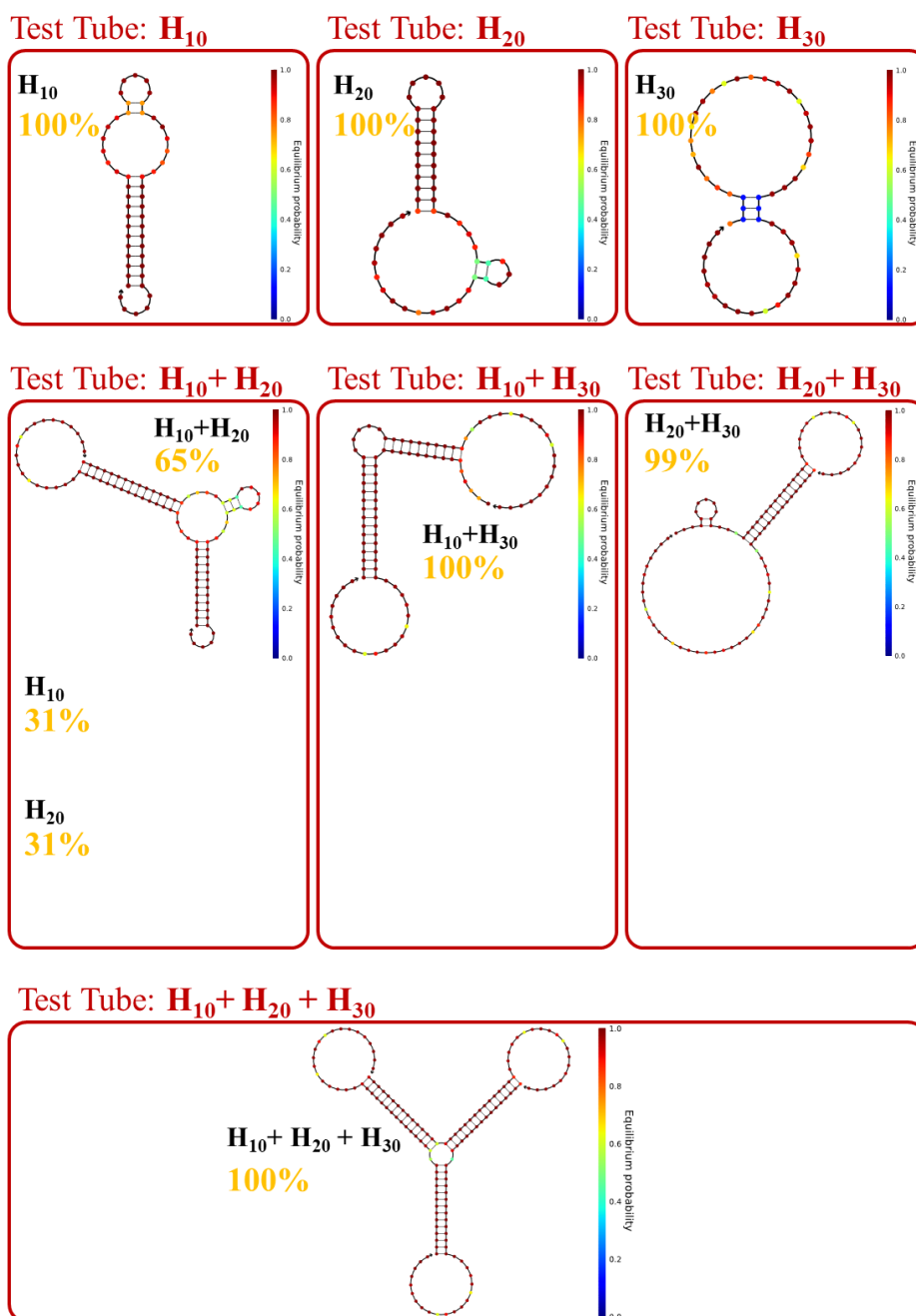


Figura 4.17 Rappresentazione del design per la generazione 0 da noi progettato e sviluppato. Le immagini sono ottenute dalla sezione analisi di NUPACK

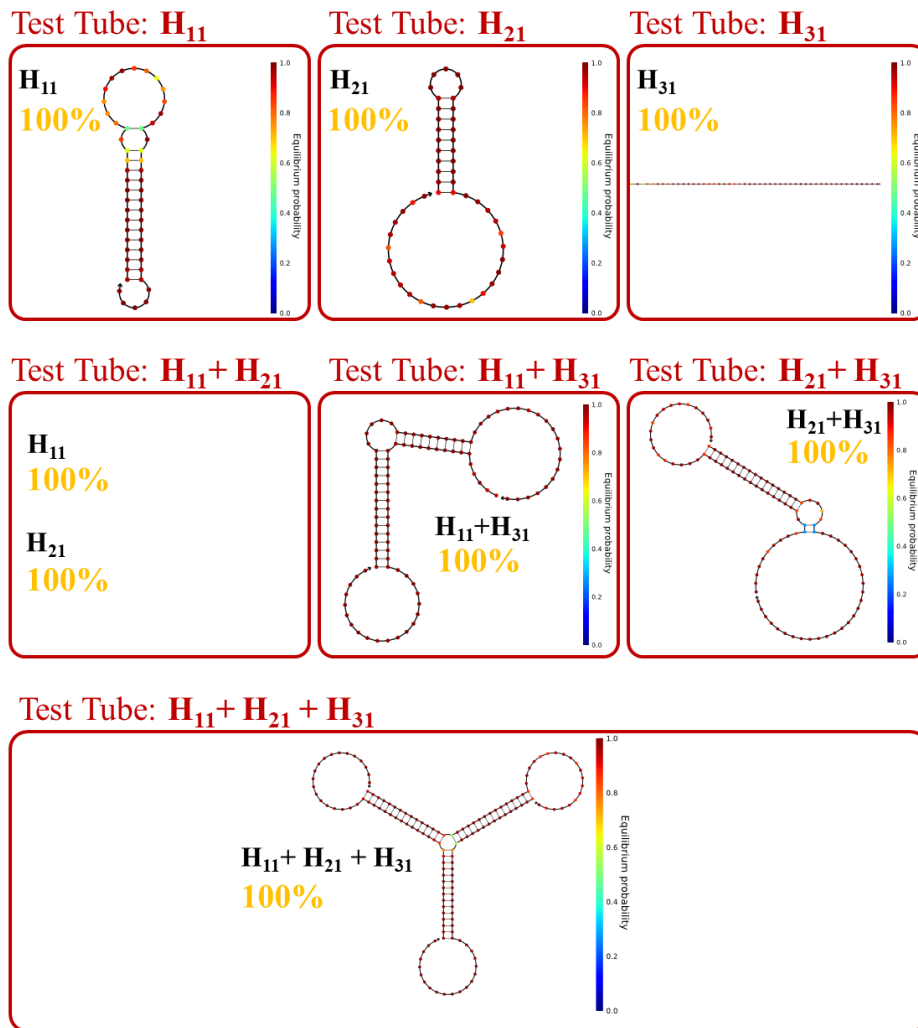


Figura 4.18 Rappresentazione del design per la generazione 1 da noi progettato e sviluppato. Le immagini sono ottenute dalla sezione analisi di NUPACK

Come si può notare dai risultati, H_{1n} e H_{2n} presentano una bassa, se non nulla, tendenza a formare il dimero mentre entrambi si appaiano con H_{3n} , indice che effettivamente la struttura secondaria imposta sui filamenti porti delle modifiche sul sistema interagente. Notiamo la presenza di basi si accoppiano non progettate in H_{10} , H_{20} e H_{11} ma sono poco interagenti e quindi, in una prima analisi, sono state considerate influenti sull'appaiamento finale della Y di DNA.

4.4 Verifica della qualità dei filamenti mediante elettroforesi su gel

4.4.1 Analisi dei filamenti progettati

Dopo la creazione del sistema e la definizione delle sequenze si è poi passati ad analizzare l'assemblaggio in laboratorio.

Per prima cosa si è eseguita una PAGE denaturante per controllare la purezza dei filamenti. In questo tipo di analisi, tutte le eventuali strutture secondarie formate dai filamenti di DNA vengono rotte e quindi la mobilità elettroforetica dipende esclusivamente dal loro peso molecolare. Per ogni filamento si è creato un campione con 20 ng di DNA per andare a visualizzare la presenza di eventuali bande secondarie corrispondenti a filamenti di lunghezze differenti che potrebbero interferire con la formazione delle nanostrutture.

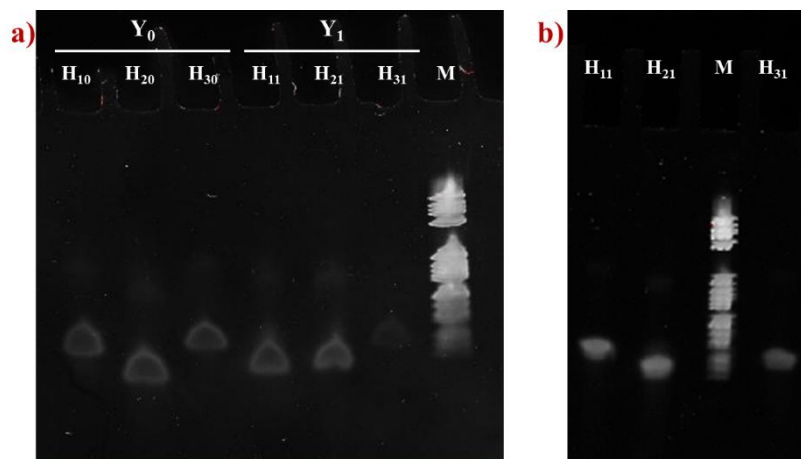


Figura 4.19 PAGE denaturate dei filamenti progettati a) di tutti i filamenti b) ripetizione dell'esperimento per controllare H31, M=marker

In questo caso i filamenti, nonostante la loro lunghezza, risultano avere una purezza notevole senza strisci importanti anche se presentano una macchia lieve a peso molecolare molto maggiore. È però anomala la differenza di altezza dei filamenti H₁₀, H₃₀ e H₃₁ nonostante abbiano tutte la stessa lunghezza.

La presenza della macchia a pesi molecolari superiori si può ricondurre ad un sottoprodotto derivante da problemi di sintesi dei filamenti. Non è stata eseguita un'analisi quantitativa dell'intensità del segnale dei vari campioni, ma dai gel si può apprezzare che nessun oligonucleotide ha un'intensità visibilmente diversa dagli altri a parte H₃₁ che invece è poco visibile. Analisi successive hanno però evidenziato come fosse semplicemente un malfunzionamento della strumentazione e che la concentrazione di filamento fosse identica a quella degli altri.

4.3.2 Analisi dei filamenti del sistema riportato in letteratura

Insieme alla verifica dei filamenti progettati si è eseguita l'analisi dei filamenti del design di Yang et al. nell'assemblaggio del dendrimero utilizzando la stessa procedura descritta per i campioni precedenti.

Dall'osservazione della PAGE denaturante, si può notare l'assenza di una qualsiasi forma di impurezza nonostante sintetizzati dalla stessa azienda e con lo stesso metodo di purificazione dei filamenti precedenti. Inoltre, si presentano tutte allo stesso livello al contrario di quelle precedenti. Questo alto grado di purezza potrebbe essere derivante dalla lunghezza inferiore dei filamenti.

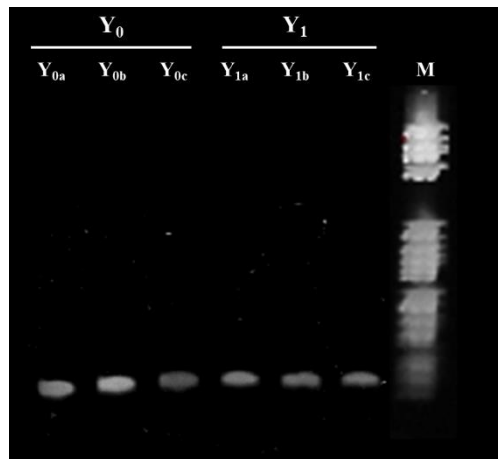


Figura 4.20 Page denaturante dei filamenti di controllo, M=marker

Poiché gli oligonucleotidi testati servivano per costruire dei dendrimeri da utilizzare per le prime fasi di caratterizzazione di questo tipo di nanostrutture, per capire se il design progettato potesse funzionare, è stato valutato che la qualità dei filamenti fosse sufficiente da consentirne l'utilizzo senza ulteriori fasi di purificazione.

4.5 Appaiamento delle Y di DNA

4.5.1 Prove preliminari

Una volta verificata la purezza dei filamenti e che non ci fossero grosse differenze di concentrazione tra loro, si sono eseguite delle prove preliminari di appaiamento per la formazione delle diverse Y.

In tutte queste prove preliminari si utilizza una concentrazione finale dei filamenti per l'assemblaggio di 0,5 μM .

Per primo si è deciso di analizzare il sistema sviluppato in laboratorio:

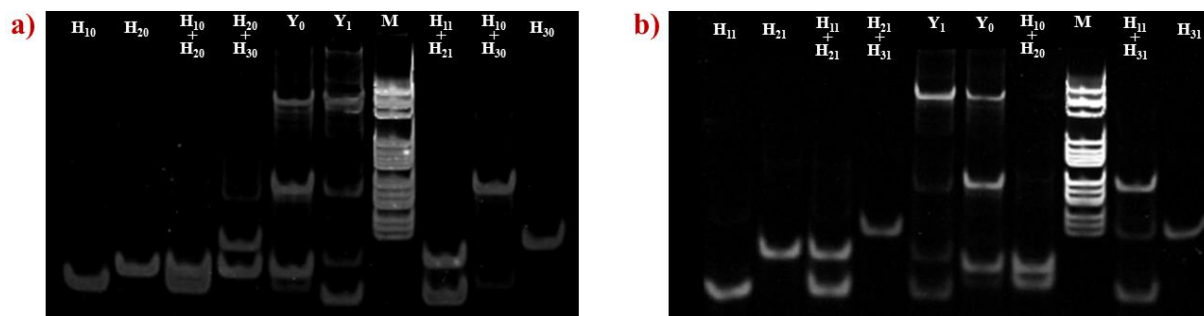


Figura 4.21 PAGE nativa a) test dell'appaiamento dei filamenti della generazione 0 in cui è anche inserito Y_1 e un suo dimero b) test dell'appaiamento dei filamenti della generazione 1 in cui è anche inserito Y_0 e un suo dimero

Dalla Figura 4.21 si può notare come le Y siano presenti, in particolare la formazione di Y_1 risulta migliore di quella di Y_0 . Infatti, confrontando i 2 gel, la maggiore differenza che potrebbe spiegare la più bassa resa di formazione di Y_0 rispetto a Y_1 è l'assenza del dimero $H_{20}-H_{30}$. L'appaiamento che non avviene tra H_{1n} e H_{2n} in assenza di H_{3n} evidenzia il funzionamento del design come pensato.

Nonostante Y_1 si formi meglio rispetto a Y_0 , l'appaiamento delle Y non è perfetto. Sono infatti presenti altre bande che è possibile associare a dimeri e monomeri che non si assemblano. In particolare, in Y_0 la banda del dimero $H_{20}-H_{30}$ è molto luminosa come quella all'altezza dei monomeri che per esclusione dovrebbe essere H_{10} . Un'ultima informazione può essere estratta da questi gel: è infatti possibile ricavare che le strutture di H_{1n} e H_{2n} sono più compatte rispetto a H_{3n} , caratteristica derivante dalla struttura secondaria come previsto dal design.

Passando ora al sistema ricavato da Yang et al.:

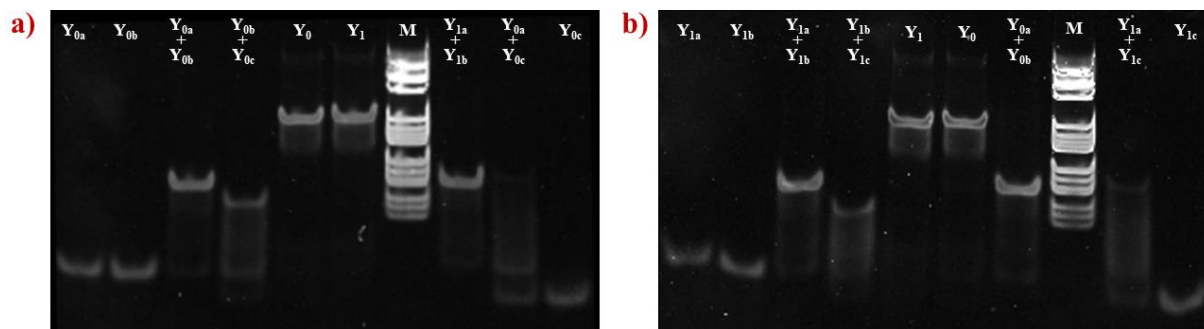


Figura 4.22 PAGE nativa per la valutazione dell'assemblaggio di a) Y0 e b) Y1

Quello che si nota fin da subito è l'estrema stabilità e la completa formazione di Y in entrambe le 2 Y.

Altre informazioni possono essere ricavate dall'osservazione dei gel.

Come prevista dall'analisi tramite NUPACK si nota la diversa stabilità dei dimeri, si può infatti osservare la formazione completa del dimero $Y_{na}-Y_{nb}$, la parziale formazione del dimero $Y_{nb}-Y_{nc}$ e la bassa formazione del dimero $Y_{na}-Y_{nc}$. Inoltre, si nota un piccolo striscio al di sotto di entrambe le Y. Questo potrebbe essere dovuto al riscaldamento del gel durante la corsa elettroforetica e di conseguenza portare alla destabilizzazione della Y ottenendo configurazioni leggermente differenti che corrono con una velocità diversa.

4.5.2 Ottimizzazione della stechiometria

Per cercare di migliorare la resa di formazione della Y finale, si va a compiere un lavoro di ottimizzazione della stechiometria dei filamenti per migliorare l'assemblaggio finale. Sono state eseguite varie prove di appaiamento cambiando i rapporti fra i filamenti per la formazione di Y e si sono poi osservati i risultati. Partendo dai risultati precedenti che erano già abbastanza buoni, si è deciso di variare le quantità di un massimo di $\pm 15\%$.

Per primo prendiamo in considerazione il sistema da noi progettato

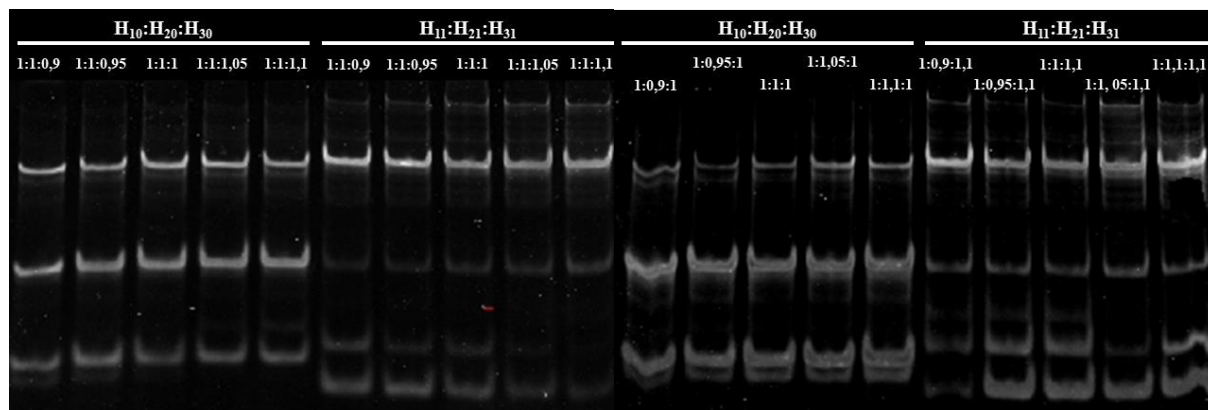


Figura 4.23 Titolazione dei filamenti per massimizzare la resa di appaiamento nella Y finale

Per quanto riguarda Y_0 si varia la quantità di H_{30} e si osserva la luminosità della banda corrispondente alla Y . Si può notare come l'intensità massima è raggiunta con la stechiometria iniziale. Grazie a questo esperimento è possibile anche osservare come al variare della quantità di H_{30} in soluzione si formino altre bande: a basse quantità si nota la formazione della banda appartenente ad H_{10} ; ad alte quantità si nota la formazione della banda appartenente ad H_{30} . Questo è indice di una bassissima forza di appaiamento di H_{20} con il sistema, probabilmente dovuta ad una struttura secondaria molto stabile.

Considerando sempre Y_0 e variando la quantità di H_{20} si nota come la massima intensità della Y si ottiene quando H_{20} è a +5% rispetto alla stechiometria iniziale.

Considerando Y_1 si inizia variando la quantità di H_{31} .

Si può notare come all'aumentare della quantità di H_{31} in soluzione c'è una diminuzione di H_{21} e H_{11} indice del fatto che H_{31} fosse in difetto in soluzione. Ad una quantità del +10% si nota la scomparsa di H_{21} .

Successivamente si varia la quantità di H_{11} e si nota come si raggiunga il massimo di intensità con il minimo residuo con un -10% di quantità in soluzione.

Prendendo ora in considerazione il sistema sviluppato da Yang et al.

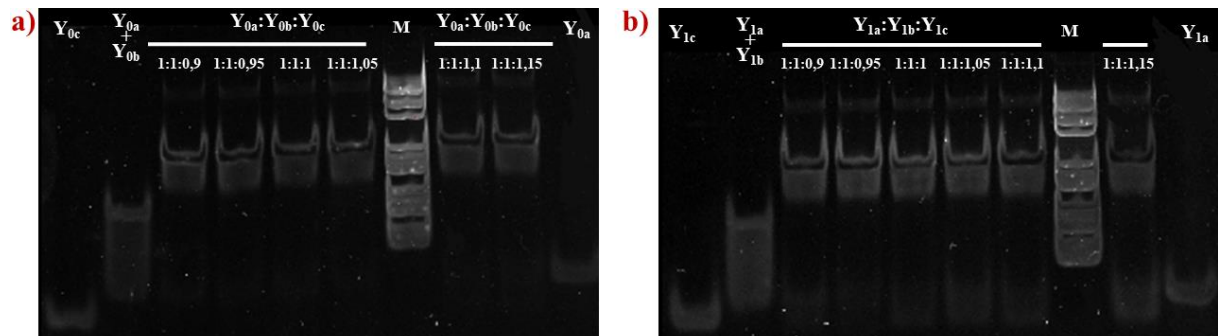


Figura 4.24 Titolazione dei filamenti per la massimizzazione della resa di appaiamento di a) Y_0 e b) Y_1

Considerando Y_0 e variando la quantità di Y_{0c} possiamo notare la scomparsa delle bande dei monomeri con un leggero eccesso (+5%). In questo caso non è necessario andare a variare nient'altro vista la scomparsa di tutte le bande sottostanti alla Y .

Considerando Y_1 e variando sempre la quantità di Y_{1c} si nota la scomparsa di bande sottostanti con un leggero difetto (-5%). Anche in questo caso non è necessario andare a controllare le variazioni degli altri monomeri vista la totale assenza di bande sottostanti.

4.5.3 Assemblaggi in condizioni alternative

Per cercare di ottimizzare l'assemblaggio delle Y si sono testate diverse condizioni di assemblaggio.

In particolare, in questo primo test, si è testato l'assemblaggio di H₂₀-H₃₀.

Si sono quindi confrontati i 2 assemblaggi in cui il primo è assemblato a temperatura ambiente, mantenendo le strutture secondarie dei monomeri intatte, mentre il secondo subisce un assemblaggio nel termociclatore classico (da 95°C a 20°C con una velocità di 0,02°C/s). Inoltre, si testa la sua ripercussione sull'assemblaggio finale.

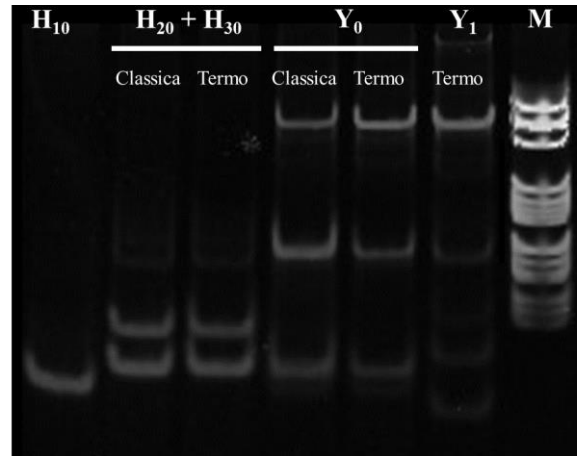


Figura 4.25 PAGE nativa per valutare la differenza di assemblaggio dei filamenti da noi progettati con l'utilizzo di un ciclo termico

Si nota fin da subito la differenza nell'assemblaggio finale con una maggiore intensità della banda relativa alla Y₀ con la live diminuzione delle bande dei monomeri e dimeri. La maggiore formazione della Y₀ non è però correlata da un aumento del dimero H₂₀-H₃₀ che si pensava infatti, non si nota nessuna differenza tra i due assemblaggi.

Questo risultato comunque fa supporre la presenza di una struttura secondaria non prevista la quale non permette un assemblaggio perfetto della struttura finale. Perciò risulta necessario aumentare la temperatura per eliminare le strutture e assemblare la Y al massimo delle sue potenzialità.

4.6 Assemblaggio delle G1

4.6.1 Prova preliminare

Una volta definite le condizioni migliori per l'appaiamento delle Y di DNA, queste sono state utilizzate come *building-blocks* per costruire la prima generazione dei dendrimeri. Questi esperimenti sono necessari per valutare e confrontare l'affidabilità dei sistemi, quello sviluppato in laboratorio e il sistema di Yang et al., e poi scegliere il migliore su cui sviluppare la Y successiva contenente il DNAzima.

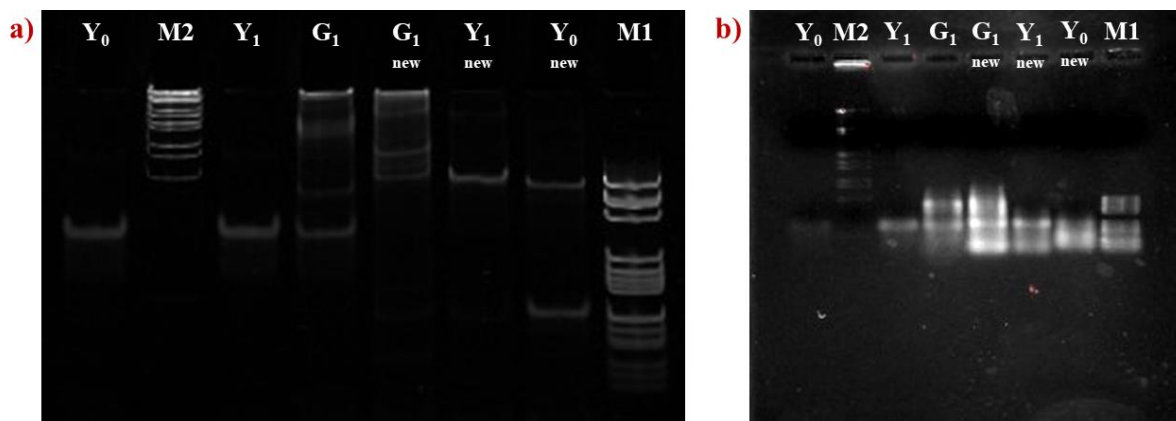


Figura 4.26 a) PAGE nativa in cui si va a valutare l'assemblaggio delle G1 dei 2 sistemi, b) Stessi campioni corsi in gel di agarosio. Con "new" si distingue il sistema progettato

Dai primi test di assemblaggio della G1 su può notare come per entrambi i sistemi non si ha una formazione univoca del dendrimero. Inoltre, il gel di agarosio non risulta ben definito ma lascia intendere la formazione di bande a diversi pesi molecolari.

In entrambi i sistemi è ancora visibile la banda associata alle 2 Y di partenza, indice dell'assemblaggio non completo. Si ritiene quindi necessario analizzare vari aspetti dell'assemblaggio per andare ad ottimizzarlo.

4.6.2 Prove di assemblaggio di G1 in diverse condizioni

Vari test sono stati eseguiti per determinare le condizioni operative ottimali, i rapporti stechiometrici e l'influenza della concentrazione delle Y durante l'assemblaggio.

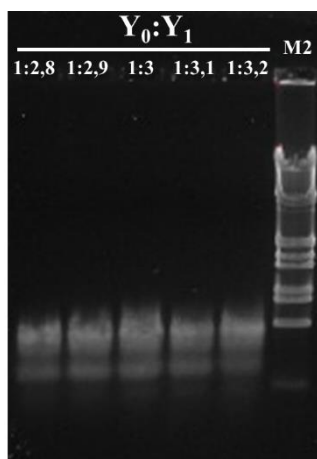


Figura 4.27 Variazione del rapporto fra le 2 Y per massimizzare la formazione di G1 analizzata tramite elettroforesi su gel di agarosio

Per prima cosa si è cercato di ottimizzare la resa di formazione di G1 per il sistema ideato da Yang et al., in questo gel di agarosio è possibile osservare come nonostante i diversi rapporti delle Y, non si noti una variazione apprezzabile dell'intensità della banda associata a G1. Questo problema potrebbe essere causato dalla bassa risoluzione che si ottiene dai gel di

agarosio. Si è quindi progettato l'esperimento successivo per andare a studiare in maniera più approfondita la costruzione della G1 in maniera sequenziale su gel di poliacrilamide. Si voleva infatti evidenziare, per analizzarlo, il meccanismo di costruzione del dendrimero al variare della quantità di Y_1 in soluzione.

In questo esperimento si è inserito in principio un rapporto 1:1 di $Y_0:Y_1$ con un assemblaggio di 1 h tra le due Y, successivamente è stata prelevata un'aliquota di campione per inserire Y_1 in quantità esatta per avere un rapporto 1:2. Dopo un'altra ora di assemblaggio si è prelevata un'aliquota dalla soluzione 1:2 per inserire il quantitativo giusto per arrivare ad un rapporto di 1:3. Inoltre, il campione è confrontato con altri due assemblaggi aventi fin da subito rapporti 1:2,9 e 1:3,1.

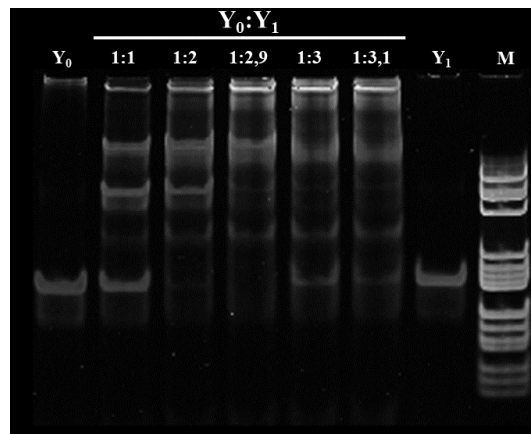


Figura 4.28 Inserimento graduale di Y_1 all'interno della soluzione per studiare il sistema di Yang et al., analizzato tramite PAGE nativa

Dall'analisi del gel ottenuto si può vedere come la banda a peso maggiore all'aumentare della quantità di Y_1 aumenti di luminosità. Per questo è opportuno pensare che sia la banda associata a G1 e di conseguenza, all'aumentare di Y_1 si ottenga un aumento della formazione del dendrimero. Si può notare anche la scomparsa di una banda che è possibile associare al complesso Y_0+Y_1 in rapporto 1:1 e la presenza di una banda a peso molecolare intermedia tra Y e Y_0+Y_1 che aumenta all'aumentare di Y_1 . Questa banda può essere associata all'esamero che si forma in fase di appaiamento dei filamenti per la formazione delle Y. L'aumento di intensità è causato dall'accumularsi in soluzione dell'esamero in seguito all'aumento di Y_1 , rendendo visibile la banda solo ad alte concentrazioni.

Dopo l'analisi del sistema di Yang et al. si è passati allo studio del sistema progettato tramite una tecnica leggermente differente. In questo caso, infatti, si è analizzato l'appaiamento di Y_0 con solo il filamento interagente del livello successivo, si è eseguito un test di appaiamento tra le 2 Y con ciclo nel termociclatore.

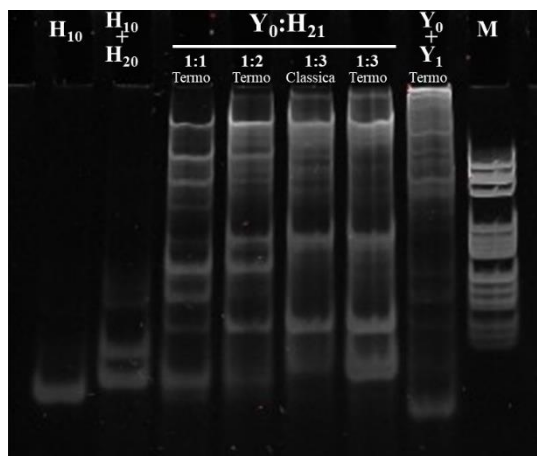


Figura 4.29 Inserimento graduale di Y_1 all'interno della soluzione per lo studio del sistema da noi utilizzato, analizzato tramite PAGE nativa.

Quest'ultimo test è svolto per verificare se la presenza di un appaiamento all'interno della struttura secondaria del filamento H_{20} , considerato influente durante la fase di design, sia la causa della mancata formazione di Y_0 . Questo appaiamento potrebbe rendere termodinamicamente svantaggiosa la formazione della Y . Infatti, la presenza di un abbinamento di basi maggiori di quelle previste nella struttura secondaria del filamento singolo potrebbe, in questo tipo di sistema, portare ad una bassissima resa di Y .

Nel caso si aggiungesse l' Y successiva, o anche solo il filamento interagente con la *sticky end*, andrebbe rendere complementari tutte le basi del filamento ottenendo la massima stabilizzazione e di conseguenza portando alla formazione della Y grazie all'apertura del filamento, vista la resa termodinamica.

Questa teoria è verificata dall'analisi del gel dove si osserva la scomparsa della banda associata a H_{20} e al dimero H_{10} - H_{30} quando in soluzione si raggiunge una quantità adeguata dell' Y successiva.

Alla luce di questo, si sono fatti ulteriori test per capire la temperatura ottimale di assemblaggio dei dendrimeri in maniera tale da evitare il completo disappaiamento delle Y durante l'assemblaggio del dendrimero.

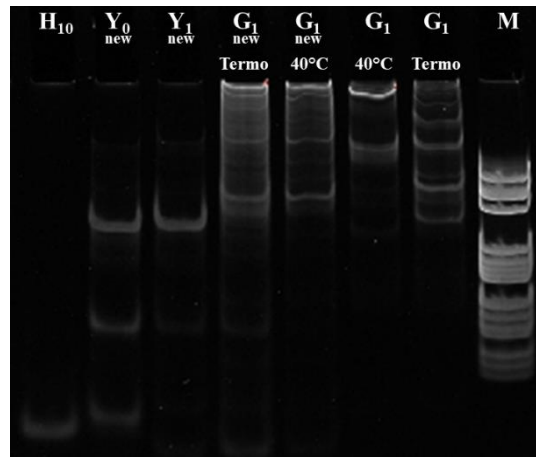


Figura 4.30 PAGE nativa in cui vengono corse prove di assemblaggio con ciclo in termociclatore e alla temperatura di 40°C

Come si può ben notare l'assemblaggio del dendrimero a 40°C (Figura 4.30) risulta migliore sia nel sistema progettato sia nel sistema di Yang et al.. Dopo quest'analisi vengono condotte prove per andare a massimizzare la resa di assemblaggio del dendrimero.

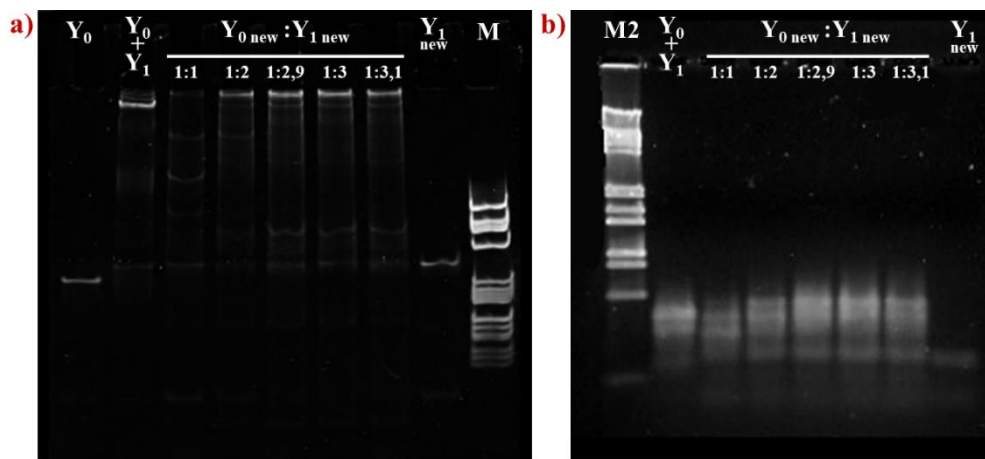


Figura 4.31 a) PAGE nativa corsa su un gel bicomponente (8-15% di poliacrilamide) per andare ad identificare tutte le bande ed eseguire una titolazione fra le strutture per massimizzare la resa, b) Elettroforesi su gel di agarosio per confronto e verificare che non sia presente nessun assemblaggio a peso molecolare molto superiore

Nonostante questi esperimenti abbiano condotto il nostro sistema ad una notevole resa di appaiamento per la formazione di Y, il sistema progettato da Yang et al. risulta essere più affidabile in fase di assemblaggio della G1. Risulta avere un assemblaggio molto spostato verso il dendrimero anche se non perfetto come mostrato dagli articoli. Sicuramente il sistema progettato in laboratorio necessita ancora di alcuni miglioramenti nonostante gli ottimi risultati ottenuti, considerando che risulta essere il primo sistema progettato in questa maniera. Infatti, il metodo di design si è dimostrato molto solido creando un sistema quasi funzionante già al

primo tentativo. Inoltre, l'errore era già possibile individuarlo durante la fase di design con le conoscenze acquisite durante i test, ma al tempo era stato ignorato.

Si è quindi deciso di continuare l'assemblaggio del dendrimero con il sistema di Yang et al. e quindi procedere a progettare la Y_2 adatta agli obiettivi di questo progetto.

4.7 Design della Y_2

Fin da subito si era deciso in laboratorio che Y_2 sarebbe stato l'ultimo *layer* del dendrimero, viste le dimensioni che ormai aveva raggiunto la nanostruttura.

Classicamente per questi tipi di oggetti la sequenza attiva viene fissata alla struttura solo ad una estremità del filamento.

In questo lavoro si è cercato di includere il DNAzima nella struttura che presentava già le sequenze del *core*, cercando di costruire una Y che legasse il filamento con la sequenza del DNAzima in entrambe le estremità libere per renderlo più resistente alle nucleasi presenti nell'organismo. In questo caso però la sequenza progettata si allunga notevolmente oltre ad andare a modificare radicalmente 2 filamenti (Y_{2c} e Y_{2a}) per permettere il giusto appaiamento del filamento contenente il DNAzima.

Si è quindi cambiato approccio includendo il filamento del DNAzima all'interno della struttura in maniera tale da diminuire sia il numero che la lunghezza dei filamenti necessari per la costruzione della Y_2 contenente il DNAzima.

Quindi si è trasformato Y_{2a} in maniera tale da includere il DNAzima. Per poter sviluppare questo sistema è stato però necessario apportare alcune modifiche:

- si sono aggiunte 2 basi forti alla fine delle sequenze di appaiamento di Y_{2c} - Y_{2a}^* e Y_{2b} - Y_{2a}^* in maniera da tale stabilizzare gli appaiamenti;
- si è reso necessario dividere il filamento al centro della *three way junction* perdendo quindi la rigidità data da essa;
- tra la fine della sequenza di appaiamento e la sequenza di riconoscimento del miR-34a sono state inserite due basi senza complementarità in modo tale da dare flessibilità ed evitare l'interferenza fra la struttura e il DNAzima.

Le sequenze del *core*, definite in precedenza, non sono state variate e la *sticky end* di Y_{2b} è stata rimossa in maniera tale da ridurre ulteriormente la lunghezza del filamento. La sequenza del DNAzima era già nota grazie a lavori eseguiti precedentemente in laboratorio e quindi le uniche sottosequenze da definire erano le 2 basi forti e le 2 basi per la flessibilità. Inoltre, si è cercato

di mantenere la sequenzialità nell'assemblaggio, anche in seguito l'aggiunta delle due basi forti. Questo accorgimento è atto al mantenimento di un'alta resa di assemblaggio.

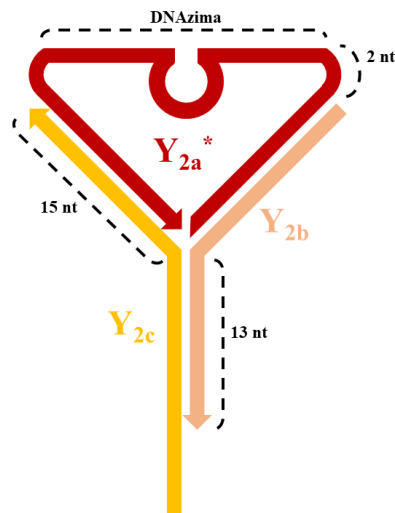


Figura 4.32 Rappresentazione della Y2

In questo caso per NUPACK non è possibile definire la struttura secondaria e quindi non è possibile testare la struttura nella sua interezza. Viene quindi suddivisa in più parti e vengono testati i vari appaiamenti ed eventuali interferenze nelle varie regioni della struttura.

Tabella 4.6 Sequenze dei filamenti per la formazione di Y2, in grassetto la sequenza appartenete al DNAzima

Filamento	Sequenza	Lunghezza
Y_{2a}^*	TGTGCGTCGTAAGCCAAACA ACCAGTGT CAGCGACTCGAAAA G ACTA ACGCCTGTCTGCCTAA	65
Y_{2b}	GGCTTACGACGCACAAGGAGATCATGAG	28
Y_{2c}	TCAGAGTGGCTTCCTCATGATCTCCTTTAGGCAGACAGGCG	41

Tabella 4.7 Energia di appaiamento delle sotto sequenze del core modificato, in maniera tale da mantenere comunque la sequenzialità

Accoppiamento	$Y_{2a}^* - Y_{2b}$	$Y_{2a}^* - Y_{2c}$	$Y_{2b} - Y_{2c}$
ΔG (kcal/mol)	-26,074	-24,965	-18,925

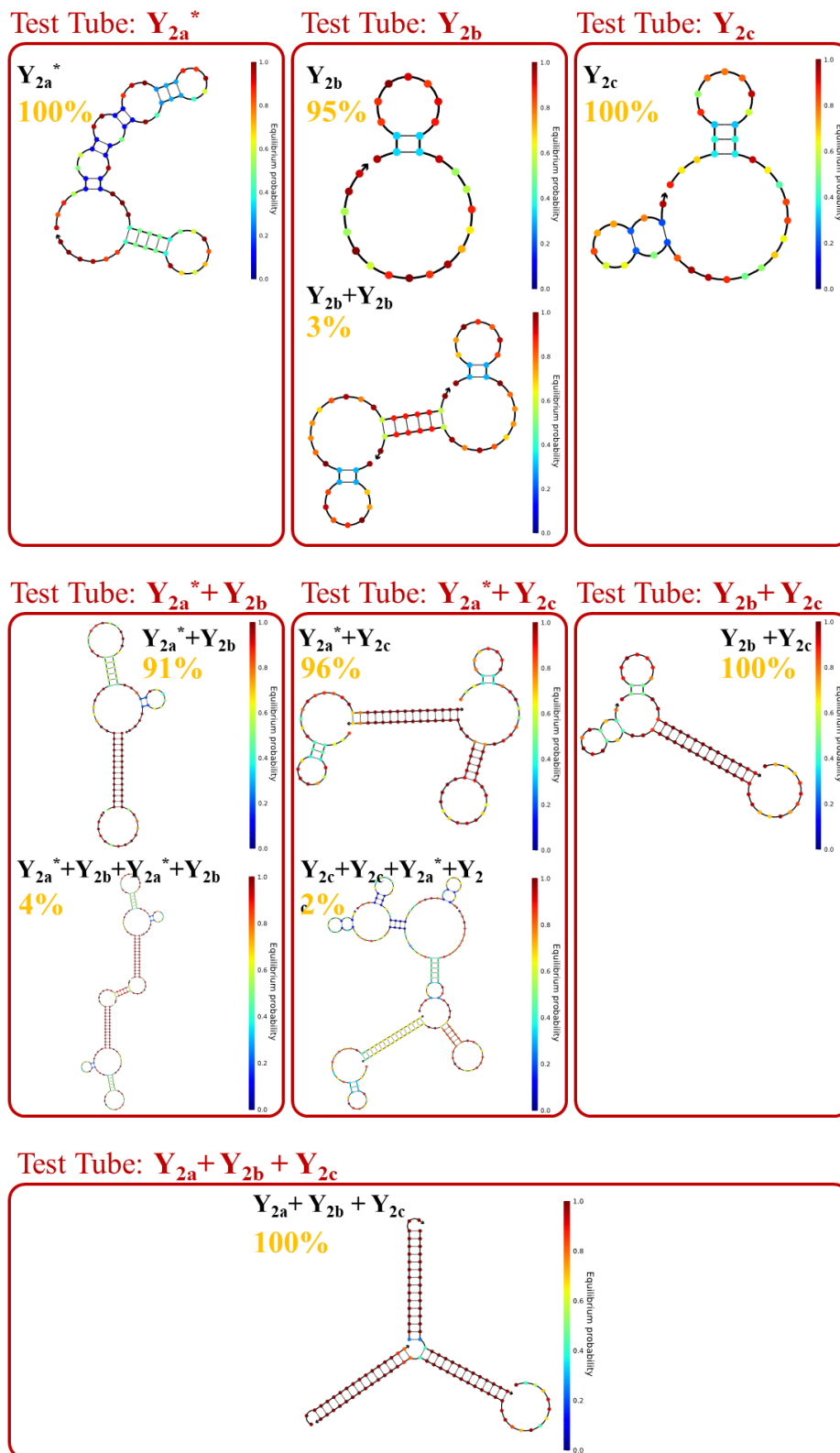


Figura 4.33 Rappresentazione dei risultati ottenuti dalla sezione analisi di NUPACK per la generazione 2 in cui nella Y_2 è stata tolta la parte del DNAzima

Una volta constatata la solidità del sistema si è passati all'assemblaggio della struttura nella pratica.

4.8 Verifica dei filamenti ed assemblaggio della Y_2

4.8.1 Analisi dei filamenti

Per prima cosa si è verificata la qualità dei filamenti tramite una PAGE denaturante per verificare che non fosse presente nessun tipo di impurezza.

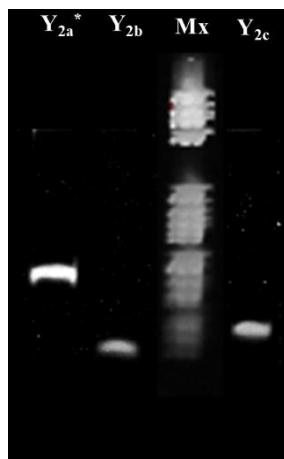


Figura 4.34 PAGE denaturante per andare a verificare la qualità dei filamenti

Come si può vedere dalla figura non si evidenzia nessun tipo di impurezza in tutti e 3 i filamenti, si vede però che le bande si trovano a 3 altezze differenti. Questo risultato è però atteso vista la loro diversa lunghezza.

4.8.2 Appaiamento per la formazione di Y_2

Valutata la purezza dei filamenti, si è continuato con la verifica del corretto appaiamento dei filamenti e della formazione della Y_2 .

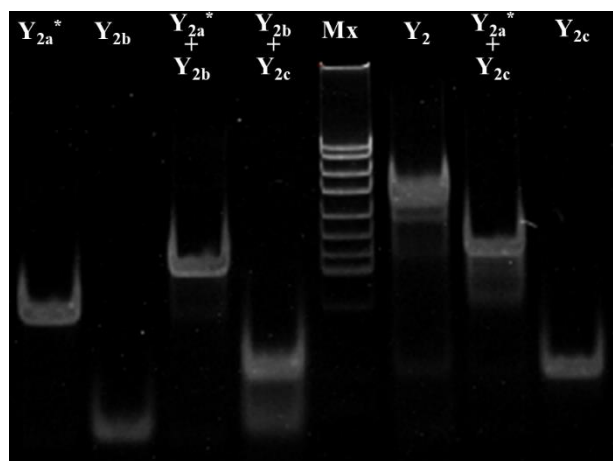


Figura 4.35 PAGE nativa eseguita come analisi preliminare per andare a verificare i corretti appaiamenti dei filamenti progettati

Anche in questo caso i risultati ottenuti risultano essere ottimi. Come si può notare la formazione della Y di DNA risulta quasi completa con solo un piccolo eccesso di Y_{2c} e del dimero $Y_{2a}^* - Y_{2c}$. Questo risultato probabilmente deriva da una mancanza di Y_{2b} in soluzione. Come nelle generazioni precedenti e come cercato di ottenere durante il design delle sequenze, si può notare che la formazione dei dimeri sia sequenziale. Infatti, si vede come l'assemblaggio tra i vari filamenti sia completo tra $Y_{2a}^* - Y_{2b}$, parziale per $Y_{2a}^* - Y_{2c}$ e che quasi non avvenga tra $Y_{2b} - Y_{2c}$.

Per cercare di migliorare la resa di assemblaggio si va ad eseguire una titolazione dei filamenti.

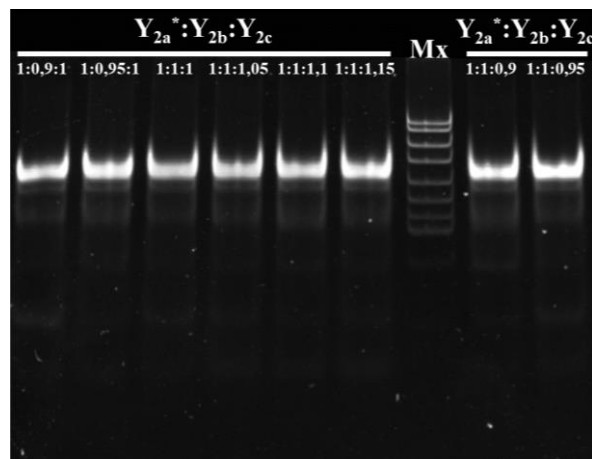


Figura 4.36 Ottimizzazione dei rapporti di assemblaggio per massimizzare la resa di Y_2

Dalla titolazione si nota come il massimo che della resa si ottiene utilizzando un rapporto 1:1,05:1 di filamenti in accordo con quanto ipotizzato in precedenza.

Non sono state testate condizioni di assemblaggio alternative visto che il sistema sembra rispondere come quelli precedenti e si è passati subito all'assemblaggio del dendrimero finale G2.

4.9 Assemblaggio di G2

In questo caso si può procedere alla visualizzazione del dendrimero solo tramite l'utilizzo di un gel di agarosio viste le grandi dimensioni della struttura formata che non riuscirebbe a correre in un gel di poliacrilamide.

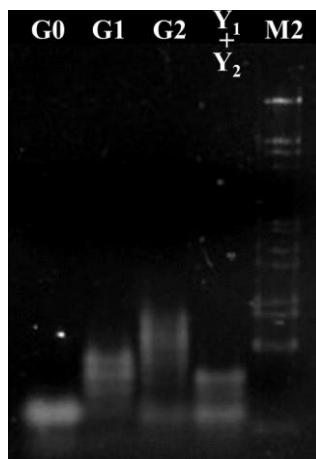


Figura 4.37 Primo tentativo di assemblaggio di G2 con test per verificare l'assemblaggio fra Y_1 e Y_2

Come si può apprezzare dalla corsa si ha un'effettiva formazione di G2 anche se in bassa resa. Si nota infatti come G0 e G1 si formino in maniera elevata, praticamente senza assenza delle Y, ma la formazione di G2 risulti molto inferiore. La possibile causa è da ricercare nell'assemblaggio fra Y_1 e Y_2 che non è perfetto, come evidenzia la corsa elettroforetica. In questo caso si rende necessario uno studio più approfondito.

Si è quindi testato la formazione del dendrimero ad una temperatura di 37°C che, come evidenziato dagli esperimenti condotti in precedenza, permette un migliore assemblaggio fra le Y.

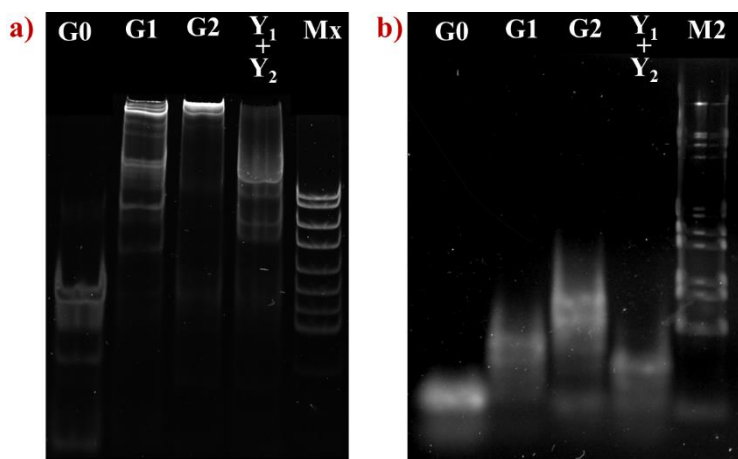


Figura 4.38 Assemblaggio di G2 ad una temperatura di 37°C a) analizzato tramite PAGE nativa e b) analizzato tramite elettroforesi su gel di agarosio

A 37°C c'è una resa maggiore di assemblaggio tra Y_1 e Y_2 che si traduce in una maggiore resa nella formazione di G2. Inoltre, la corsa in gel di poliacrilamide conferma la presenza di strutture ad alto peso molecolare che non riescono ad entrare nel gel come previsto.

4.10 Verifica dell'attività enzimatica del DNAzima

Una volta eseguito l'assemblaggio di G2 e verificato il corretto appaiamento fra i filamenti, si eseguono vari esperimenti per indagare l'attività catalitica del DNAzima all'interno della Y e della struttura finale.

L'esperimento è stato condotto inizialmente con la struttura Y_2 ad una concentrazione in soluzione di 100 nM, il miR-34a ad una concentrazione di 1 μ M e una concentrazione di magnesio di 10 mM. Si è inoltre valutato, oltre il funzionamento effettivo del DNAzima, anche la sua cinetica in funzione del tempo, analizzando il risultato dopo 1, 2, 4, 8 e 24 ore di incubazione. Al termine della reazione è stata eseguita una PAGE nativa per valutare se la struttura è attiva.

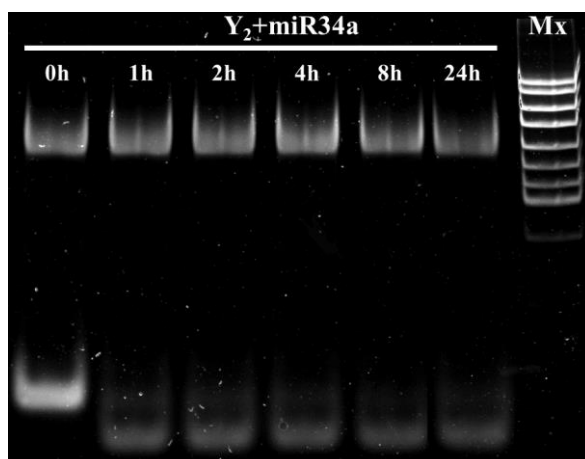


Figura 4.39 PAGE nativa per verificare l'avvenuto taglio del miR-34a ad una concentrazione di 10 mM di magnesio a tempi differenti

Da questo risultato è possibile osservare come il DNAzima sia attivo già dopo un'ora e come fino a 4 ore sia possibile osservare una leggera banda corrispondente al miR-34a che si affievolisce, mentre una banda a peso molecolare inferiore si intensifica. Dopo 8 ore, si può approssimare che non sia più presente miR-34a in soluzione.

Vista la conferma del funzionamento del DNAzima in condizioni di reazione ottimali (alta concentrazione di magnesio) si è passati a testare la sua attività in soluzioni contenenti concentrazioni di magnesio sempre inferiori per verificare che il DNAzima potesse funzionare anche in un ambiente contenente una concentrazione paragonabile a quella cellulare (0,5 mM). Inoltre, vengono eseguiti ulteriori test per verificare l'effettivo funzionamento del DNAzima e che i risultati non siano una conseguenza di interazioni con altre parti della nanostruttura. Viene anche condotta una verifica dell'attività enzimatica del dendrimero formato per andare a valutare l'attività del DNAzima contenuto nella nanostruttura finale.

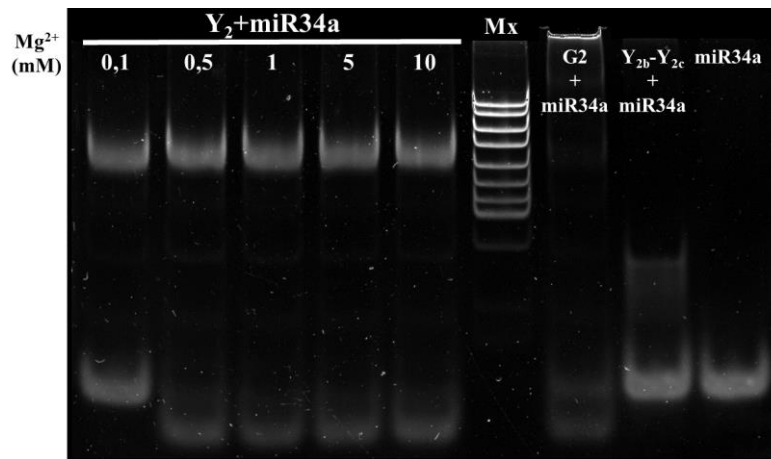


Figura 4.40 PAGE nativa per il test a varie concentrazioni di magnesio per un tempo di 24 h inoltre sono anche visibili i test di controllo e di confronto

Dai risultati ottenuti è possibile osservare come il DNazima riesca a lavorare anche a concentrazioni molto basse, fino a 0,5 mM di magnesio. A 0,1 mM di magnesio invece non riesce più ad esercitare la sua funzione catalitica per il taglio del miR-34a.

Inoltre, dai test eseguiti è possibile osservare come per G2, a parità di concentrazione di DNazima e di magnesio, eserciti un'attività catalitica leggermente inferiore rispetto a Y₂. Questo risultato risulta poco chiaro visto che il dendrimero non dovrebbe andare ad influenzare il DNazima. Potrebbe però essere causa delle manipolazioni eseguite per la costruzione di G2 che potrebbero aver degradato una parte di nanostruttura oppure un problema legato alla diffusione nella soluzione che limita la disponibilità del miR-34a nell'intorno del dendrimero che di conseguenza non riesce a svolgere l'azione di degradazione.

I test di controllo danno invece risultati perfettamente in linea con quanto ipotizzato; è infatti possibile osservare come in nessuno dei 2 controlli il miR-34a abbia subito la degradazione indice della stabilità del filamento nelle condizioni adottate e di conseguenza la degradazione che si osserva negli altri esperimenti è dovuta al taglio operato dal DNazima.

Successivamente si è eseguito un test come il precedente per andare a valutare l'attività del DNazima in funzione del tempo ma questa volta ad una concentrazione di magnesio 0,5 mM.

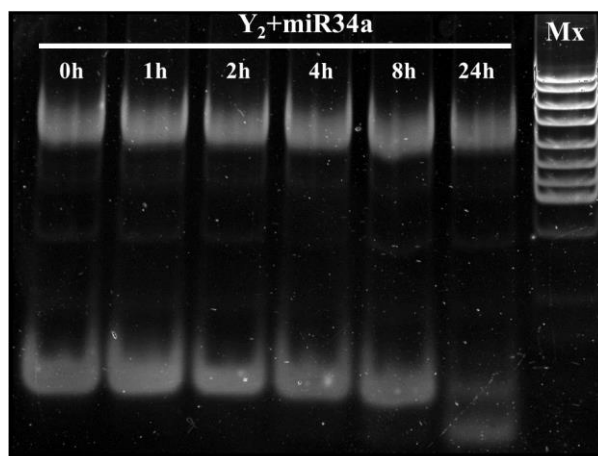


Figura 4.41 PAGE nativa per verificare l'avvenuto taglio del miR34a ad una concentrazione di 0,5 mM di magnesio a tempi differenti

Come è possibile osservare, il miR-34a scompare solo dopo 24 ore mentre nelle prove eseguite a tempi inferiori non è possibile constatare una significativa variazione di intensità nella banda associata al filamento.

4.11 Internalizzazione dei dendrimeri di DNA in sistemi cellulari

Per l'utilizzo di dendrimeri di DNA come veicolo per il *drug delivery*, è essenziale che le nanostrutture vengano internalizzate dalle cellule.

Per eseguire queste prove è possibile ancorare un fluoroforo a un filamento della nanostruttura per verificare successivamente, tramite microscopio a fluorescenza, se il dendrimero riesca effettivamente ad entrare nel sistema cellulare. Si è quindi utilizzato un filamento (Y_{2b}) che presentasse un fluoroforo ancorato all'estremità 5' della catena.

In caso il fluoroforo scelto è il Cy3, il quale presenta un massimo di assorbimento a 554 nm e un'emissione centrata a 568 nm. Come sorgente di eccitazione si utilizza una lampada alogena che copre in maniera piuttosto uniforme tutto lo spettro del visibile e la lunghezza d'onda d'eccitazione finale viene selezionata attraverso l'uso di un apposito filtro per il fluoroforo. Inoltre, viene eseguita anche un'analisi con un secondo filtro per determinare eventuali autofluorescenze caratteristiche della cellula, che potrebbero influenzare il risultato finale.

In fase di elaborazione delle immagini, è stato utilizzato un algoritmo per la rimozione dello sfondo.

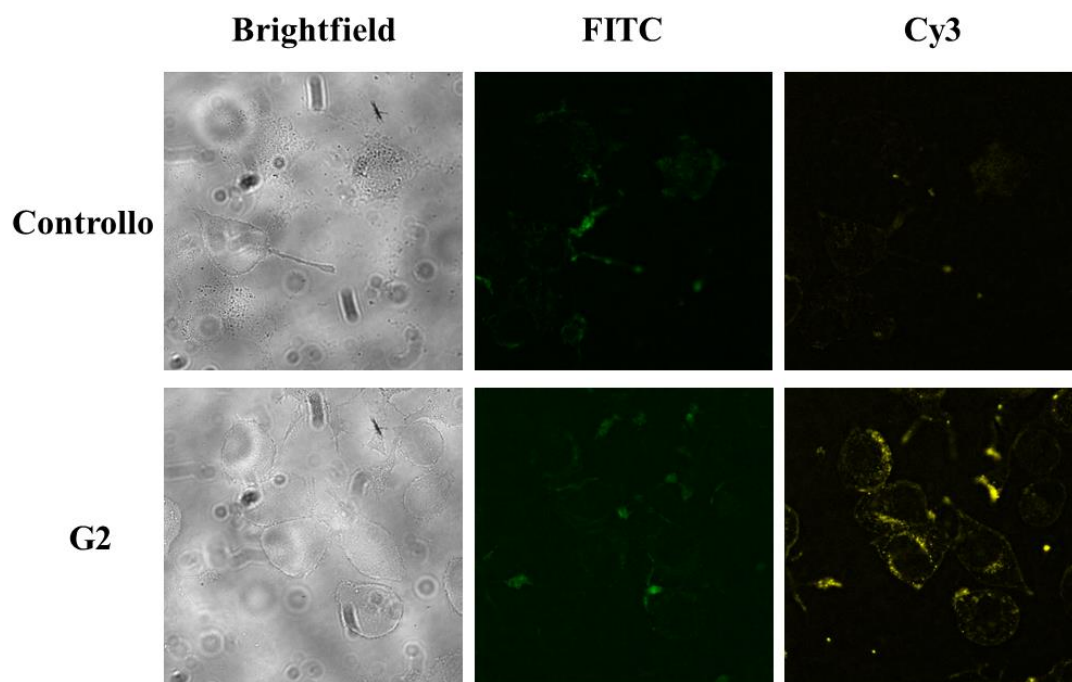


Figura 4.42 Immagini al microscopio a fluorescenza di cellule N9 trattate con i dendrimeri di DNA (G2) e non trattate (controllo).

Come è possibile osservare dalla figura, il controllo presenta una bassa autofluorescenza diffusa uniformemente in tutta la cellula. Questa è una caratteristica propria dei sistemi viventi e la si riscontra sia nell'immagine registrata con il filtro FITC sia in quella registrata con il filtro specifico per il Cy3. In entrambe le immagini registrate con il filtro FITC si nota la presenza di fluorescenza all'esterno della cellula. Questa intensità sembra essere determinata da sostanze prodotte dalle cellule durante in fase di apoptosi. Infatti, durante l'analisi delle cellule al microscopio a fluorescenza, si è sollevata la problematica della morte precoce delle cellule impedendo di eseguire osservazioni più approfondite.

Nelle cellule trattate con le nanostrutture è invece possibile osservare come la fluorescenza sia molto evidente. In particolare, la nanostruttura sembra concentrarsi in vescicole posizionate vicino al nucleo cellulare. Si può quindi concludere che i dendrimeri di DNA riescano ad entrare all'interno delle cellule di microglia, anche in assenza di eventuali elementi funzionali specifici per legare la superficie cellulare ed essere quindi internalizzati da meccanismi di endocitosi mediata da recettori.

5. Conclusioni

Come dimostrato da diversi studi, l'infiammazione del sistema nervoso centrale può portare alla morte cellulare dei neuroni contribuendo, nel tempo, allo sviluppo di malattie neurodegenerative. Si è evidenziato come uno dei fattori che porta all'attivazione della microglia, che può provocare l'infiammazione del sistema nervoso centrale, sia l'alto livello di miR-34a nell'ambiente cellulare. Si è quindi progettato un sistema di dimensioni nanometriche che potesse agire sull'infiammazione tramite la diminuzione specifica del miRNA.

Per ridurre la disponibilità cellulare del miR-34a si è utilizzato un DNAzima specifico, una sequenza di DNA attiva per il taglio del filamento di RNA che potesse essere internalizzato nella cellula bersaglio grazie allo sviluppo di una nanostruttura.

Nel lavoro di tesi si è progettato un nuovo sistema per la formazione delle Y-DNA tramite un meccanismo *catalytic self-assembly*. Inoltre, è stato analizzato il corretto funzionamento di un sistema riportato in letteratura e, confrontati i 2 sistemi, si è scelto di continuare con sviluppo del sistema riportato in letteratura. Si è quindi progettato un nuovo livello perché fosse utilizzato come *drug-delivery* di una sequenza attiva per il taglio del RNA. Infine, questo progetto ha confermato che la struttura progettata mantiene l'attività del DNAzima anche a basse concentrazioni di magnesio, paragonabili a quelle cellulari, e che la nanostruttura potesse essere internalizzata all'interno del sistema cellulare di riferimento.

Lavori futuri potrebbero concentrarsi su una ulteriore caratterizzazione del sistema utilizzato per determinarne la stabilità in un ambiente che contenga nucleasi e determinarne quantitativamente l'efficienza di internalizzazione. Occorrerà poi studiare l'effettiva regolazione dei miRNA e delle proteine collegate dovute alla nanostruttura presente all'interno di un sistema cellulare posto sotto stress.

6. Bibliografia

1. DUFES, C., UCHEGBU, I. & SCHATZLEIN, A. Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 2177–2202 (2005).
2. Prats, A.-C., Zogg, H., Singh, R. & Ro, S. Current Advances in RNA Therapeutics for Human Diseases. (2022) doi:10.3390/ijms23052736.
3. Stephenson, M. L. & Zamecnik, P. C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 285 (1978).
4. Chan, J. H. P., Lim, S. & Wong, W. S. F. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**, 533–540 (2006).
5. Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y. & Leung, S. W. S. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* **4**, e252 (2015).
6. Wilson, R. C. & Doudna, J. A. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys* **42**, 217–239 (2013).
7. Bajan, S. & Hutvagner, G. Regulation of miRNA processing and miRNA mediated gene repression in cancer. *Microna* **3**, 10–17 (2014).
8. Matsui, M. & Corey, D. R. Non-coding RNAs as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* **16**, 167–179 (2016).
9. Perry, C. M. & Balfour, J. A. B. Fomivirsen. *Drugs* **57**, 375–380 (1999).
10. Aartsma-Rus, A. FDA Approval of Nusinersen for Spinal Muscular Atrophy Makes 2016 the Year of Splice Modulating Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther* **27**, 67–69 (2017).
11. Won, J. I., Zhang, J., Tecson, K. M. & McCullough, P. A. Balancing Low-density Lipoprotein Cholesterol Reduction and Hepatotoxicity With Lomitapide Mesylate and Mipomersen in Patients With Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Rev Cardiovasc Med* **18**, 21–28 (2017).
12. de Paula Brandão, P. R., Titze-de-Almeida, S. S. & Titze-de-Almeida, R. Leading RNA Interference Therapeutics Part 2: Silencing Delta-Aminolevulinic Acid Synthase 1, with a Focus on Givosiran. *Mol Diagn Ther* **24**, 61–68 (2020).
13. Hoy, S. M. Patisiran: First Global Approval. *Drugs* **78**, 1625–1631 (2018).
14. Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P. & Gordon, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **39**, 151–170 (1990).

15. Daneman, R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol* **72**, 648–672 (2012).
16. Kingwell, K. Neurodegenerative disease: Microglia in early disease stages. *Nat Rev Neurol* **8**, 475 (2012).
17. Helmut, K., Hanisch, U. K., Noda, M. & Verkhratsky, A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* **91**, 461–553 (2011).
18. Graeber, M. B. Changing face of microglia. *Science* **330**, 783–788 (2010).
19. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**, 1314–1318 (2005).
20. Petralla, S. *et al.* Epigenetics and communication mechanisms in microglia activation with a view on technological approaches. *Biomolecules* **11**, 1–29 (2021).
21. Walsh, A. D., Nguyen, L. T. & Binder, M. D. miRNAs in Microglia: Important Players in Multiple Sclerosis Pathology. *ASN Neuro* **13**, (2021).
22. González, H., Elgueta, D., Montoya, A. & Pacheco, R. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol* **274**, 1–13 (2014).
23. Paolicelli, R. C., Bergamini, G. & Rajendran, L. Cell-to-cell Communication by Extracellular Vesicles: Focus on Microglia. *Neuroscience* **405**, 148–157 (2019).
24. Hébert, S. S. & de Strooper, B. Molecular biology: miRNAs in neurodegeneration. *Science (1979)* **317**, 1179–1180 (2007).
25. Su, W. *et al.* The p53 Transcription Factor Modulates Microglia Behavior through MicroRNA-Dependent Regulation of c-Maf. *The Journal of Immunology* **192**, 358–366 (2014).
26. Rooij, E. & Kauppinen, S. Development of micro RNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med* **6**, 851–864 (2014).
27. Rossor, A. M., Reilly, M. M. & Sleight, J. N. Antisense oligonucleotides and other genetic therapies made simple. *Pract Neurol* **18**, 126–131 (2018).
28. Ebert, M. S. & Sharp, P. A. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA* **16**, 2043–2050 (2010).
29. Obad, S. *et al.* Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nature Genetics* **2011 43:4** **43**, 371–378 (2011).
30. Liu, M., Chang, D. & Li, Y. Discovery and Biosensing Applications of Diverse RNA-Cleaving DNazymes. *Acc Chem Res* **50**, 2273–2283 (2017).

31. Silverman, S. K. Catalytic DNA: Scope, Applications, and Biochemistry of Deoxyribozymes. *Trends Biochem Sci* **41**, 595–609 (2016).
32. Cepeda-Plaza, M. & Peracchi, A. Organic & Biomolecular Chemistry Insights into DNA catalysis from structural and functional studies of the 8-17 DNAzyme †. *Org. Biomol. Chem* **18**, 1697 (2020).
33. Schlosser, K., Gu, J., Sule, L. & Li, Y. Sequence-function relationships provide new insight into the cleavage site selectivity of the 8-17 RNA-cleaving deoxyribozyme. *Nucleic Acids Res* **36**, 1472–1481 (2008).
34. Matsui, M. & Corey, D. R. Non-coding RNAs as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* **16**, 167–179 (2016).
35. Jones, C. H., Chen, C. K., Ravikrishnan, A., Rane, S. & Pfeifer, B. A. Overcoming nonviral gene delivery barriers: perspective and future. *Mol Pharm* **10**, 4082–4098 (2013).
36. Selot, R., Hareendran, S. & Jayandharan, G. Developing immunologically inert adeno-associated virus (AAV) vectors for gene therapy: possibilities and limitations. *Curr Pharm Biotechnol* **14**, 1072–1082 (2014).
37. Mitchell, M. J. *et al.* Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 101–124 (2021).
38. Mendes, B. B. *et al.* Nanodelivery of nucleic acids. *Nature Reviews Methods Primers* **2**, 24 (2022).
39. Hoyer, J. & Neundorff, I. Peptide vectors for the nonviral delivery of nucleic acids. *Acc Chem Res* **45**, 1048–1056 (2012).
40. Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol* **2**, 469–478 (2007).
41. Seeman, N. C. Nucleic acid junctions and lattices. *J Theor Biol* **99**, 237–247 (1982).
42. Seeman, N. C. & Sleiman, H. F. DNA nanotechnology. *Nature Reviews Materials* **3**, 1–23 (2017).
43. Conway, J. W., Mc Laughlin, C. K., Castor, K. J. & Sleiman, H. DNA nanostructure serum stability: greater than the sum of its parts. *Chemical Communications* **49**, 1172–1174 (2013).
44. Hamblin, G. D., Carneiro, K. M. M., Fakhoury, J. F., Bujold, K. E. & Sleiman, H. F. Rolling circle amplification-templated DNA nanotubes show increased stability and cell penetration ability. *J Am Chem Soc* **134**, 2888–2891 (2012).

45. Walsh, A. S., Yin, H., Erben, C. M., Wood, M. J. A. & Turberfield, A. J. DNA cage delivery to mammalian cells. *ACS Nano* **5**, 5427–5432 (2011).
46. Fornace, M. E., Porubsky, N. J. & Pierce, N. A. 2665–2678 Downloaded via CALIFORNIA INST OF TECHNOLOGY on November 30. *ACS Synth. Biol* **9**, 26 (2665).
47. Dirks, R. M. & Pierce, N. A. A Partition Function Algorithm for Nucleic Acid Secondary Structure Including Pseudoknots. *J Comput Chem* **24**, 1664–1677 (2003).
48. Dirks, R. M. & Pierce, N. A. An Algorithm for Computing Nucleic Acid Base-Pairing Probabilities Including Pseudoknots. *J Comput Chem* **25**, 1295–1304 (2004).
49. Dirks, R. M., Bois, J. S., Schaeffer, J. M., Winfree, E. & Pierce, N. A. Thermodynamic Analysis of Interacting Nucleic Acid Strands *. *Society for Industrial and Applied Mathematics* **49**, 65–88 (2007).
50. Dirks, R. M. Paradigms for computational nucleic acid design. *Nucleic Acids Res* **32**, 1392–1403 (2004).
51. Zadeh, J. N., Wolfe, B. R. & Pierce, N. A. Nucleic Acid Sequence Design via Efficient Ensemble Defect Optimization. *J Comput Chem* **32**, 439–452 (2011).
52. Wolfe, B. R. & Pierce, N. A. Sequence Design for a Test Tube of Interacting Nucleic Acid Strands. *ACS Synth. Biol* (2015) doi:10.1021/sb5002196.
53. Wolfe, B. R., Porubsky, N. J., Zadeh, J. N., Dirks, R. M. & Pierce, N. A. Constrained Multistate Sequence Design for Nucleic Acid Reaction Pathway Engineering. *J Am Chem Soc* **139**, 3134–3144 (2017).
54. Zadeh, J. N. *et al.* Software News and Updates NUPACK: Analysis and Design of Nucleic Acid Systems. *J Comput Chem* **32**, 170–173 (2011).
55. Yin, P., Choi, H. M. T., Calvert, C. R. & Pierce, N. A. Programming biomolecular self-assembly pathways. *Nature* **451**, 318–322 (2008).
56. Guan, C., Zhu, X. & Feng, C. DNA Nanodevice-Based Drug Delivery Systems. (2021) doi:10.3390/biom11121855.
57. Jiang, Q. *et al.* DNA origami as a carrier for circumvention of drug resistance. *J Am Chem Soc* **134**, 13396–13403 (2012).
58. Goodman, R. P. & Turberfield, A. J. The single-step synthesis of a DNA tetrahedron. *Chemical Communications* **4**, 1372–1373 (2004).
59. Shi, S. *et al.* Self-Assembled Tetrahedral DNA Nanostructures Promote Adipose-Derived Stem Cell Migration via lncRNA XLOC 010623 and RHOA/ROCK2 Signal Pathway. *ACS Appl Mater Interfaces* **8**, 19353–19363 (2016).

60. Zhao, W., Ali, M. M., Brook, M. A. & Li, Y. Rolling circle amplification: applications in nanotechnology and biodetection with functional nucleic acids. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**, 6330–6337 (2008).
61. Lv, Y. *et al.* Preparation and biomedical applications of programmable and multifunctional DNA nanoflowers. *Nat Protoc* **10**, 1508–1524 (2015).
62. Zhao, H. *et al.* Enzymatical biomineralization of DNA nanoflowers mediated by manganese ions for tumor site activated magnetic resonance imaging. *Biomaterials* **268**, 120591 (2021).
63. Astruc, D., Boisselier, E. & Ornelas, C. Dendrimers designed for functions: from physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine. *Chem Rev* **110**, 1857–1959 (2010).
64. Liu, L. *et al.* Multifunctional DNA dendrimer nanostructures for biomedical applications. *J Mater Chem B* **9**, 4991–5007 (2021).
65. Zhou, T. *et al.* Tetrahedron DNA dendrimers and their encapsulation of gold nanoparticles. *Bioorg Med Chem* **22**, 4391–4394 (2014).
66. Zhou, T. *et al.* PH-responsive size-tunable self-assembled DNA dendrimers. *Angewandte Chemie - International Edition* **51**, 11271–11274 (2012).
67. Xing, Y. *et al.* Self-assembled DNA hydrogels with designable thermal and enzymatic responsiveness. *Advanced Materials* **23**, 1117–1121 (2011).
68. Zhang, H. *et al.* A controllable aptamer-based self-assembled DNA dendrimer for high affinity targeting, bioimaging and drug delivery. *Sci Rep* **5**, (2015).
69. Mohri, K. *et al.* Self-Assembling DNA Dendrimer for Effective Delivery of Immunostimulatory CpG DNA to Immune Cells. *Biomacromolecules* **16**, 1095–1101 (2015).
70. Meng, H. M. *et al.* DNA dendrimer: An efficient nanocarrier of functional nucleic acids for intracellular molecular sensing. *ACS Nano* **8**, 6171–6181 (2014).
71. He, H. *et al.* Target-catalyzed autonomous assembly of dendrimer-like DNA nanostructures for enzyme-free and signal amplified colorimetric nucleic acids detection. *Biosens Bioelectron* **86**, 985–989 (2016).