

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA IN  
FISICA

Studio dell'interazione tra lipidi e DNA mediante  
spettroscopia FT-IR su strati di Langmuir-Blodgett

Relatore:

Prof. Luigi Cristofolini

Correlatrice:

Prof.ssa Tatiana Berzina

Laureanda:

Daniela

Delfi

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

# Indice

<b>I. Introduzione</b>	pag. 1
<b>1. Motivazioni teoriche</b>	pag. 2
1.1 Modelli di membrane studiati con le isoterme $\Pi$ -A e spettroscopia FT-IR.....	pag. 2
<b>2. Materiali</b>	pag. 4
2.1 DNA nativo.....	pag. 4
2.2 Lipidi cationici.....	pag. 6
<b>3. Le tecniche usate</b>	pag 9
3.1 La tecnica Langmuir-Blodgett.....	pag 9
3.1.1 <i>Film di Langmuir</i> .....	pag 9
3.1.2 <i>Isoterme <math>\Pi</math>-A</i> .....	pag 10
3.1.3 <i>Trasferimento dei film su substrato solido</i> .....	pag 11
3.1.4 <i>Lo strumento: Trough</i> .....	pag 13
3.2 Spettroscopia FT-IR.....	pag 15
3.2.1 <i>Spettroscopia infrarossa</i> .....	pag 15
3.2.2 <i>Modalità operative: Spettroscopia d'assorbimento e ATR</i> .....	pag 17
3.2.3 <i>Lo strumento: Spettrofotometro a trasformata di Fourier</i> .....	pag 19

<b>4.    Analisi sperimentale</b>	pag. 23
<b>4.1</b> Formazione del complesso DNA-lipide valutata mediante le isoterme $\Pi$ -A .....	pag 23
4.1.1 <i>Il complesso DNA-ODA</i> .....	pag 23
4.1.2 <i>Il complesso DNA-DODAB</i> .....	pag 25
<b>4.2</b> Struttura e interazioni nei complessi valutate mediante FT-IR.....	pag 29
4.2.1 <i>Discussione spettri FT-IR di DNA nativo, ODA e DODAB</i> .....	pag 29
4.2.2 <i>Discussione spettri FT-IR dei complessi ODA-DNA</i> .....	pag 33
4.2.3 <i>Discussione spettri FT-IR dei complessi DODAB-DNA</i> .....	pag 35

<b>5. Conclusioni</b>	pag. 38
-----------------------	---------

## Introduzione

Negli ultimi quindici anni è stato promosso lo studio dei sistemi di DNA e surfactanti cationici all'interfaccia aria-acqua. Essi sono potenzialmente utilizzabili come veicoli per la distribuzione dei geni, come materiali biofunzionali e biosensori.

In questo elaborato è descritta la creazione di monostrati lipidici insolubili in acqua mediante la tecnica di Langmuir-Blodgett, proprio al fine di immobilizzare gli acidi nucleici in complessi con i surfactanti cationici. I film così prodotti si possono usare come semplici modelli per l'interfaccia lipidico-acquosa delle membrane cellulari e in questo modo è possibile indagare i processi che avvengono sulle superfici delle membrane [Cardenas et al.(2005)]. Una volta formati i complessi con i lipidi è interessante cercare di identificare, mediante tecniche di indagine fisiche, lo stato del DNA, i gruppi atomici e i tipi di interazione determinanti la formazione dei film LB ottenuti.

In questo lavoro si è studiato in particolare l'interazione tra dimetildioctadecilammonio bromuro (DODAB) e DNA confrontata all'interazione tra octadecilamina (ODA) e DNA. Si è impiegato la spettroscopia vibrazionale FT-IR e lo studio delle isoterme  $\Pi$ -A in modo da chiarire la struttura secondaria del DNA nei complessi, valutando l'eventuale trasformazione nelle molecole di DNA da doppia a singola elica durante le interazioni con le molecole di lipidi cationici nei monostrati, e da definire le specifiche caratteristiche molecolari e i meccanismi responsabili della possibile denaturazione. [Berzina, Cristofolini et al], [Sukhorukov (1996)].

Una prima parte introduttiva di questo elaborato è dedicata ad alcuni brevi cenni riguardanti la modellizzazione di membrane cellulari e le tecniche usate per studiarle, utili per inquadrare il contesto teorico delle misure eseguite, successivamente sono stati presentati i materiali e la

tecnica Langmuir-Blodgett per formare i complessi oggetto di studio e alcune brevi nozioni sulla spettroscopia infrarossa e sull'apparato strumentale.

Quindi sono stati illustrati i risultati conseguiti, osservando le proprietà dei film prodotti in laboratorio e le bande caratteristiche dei complessi confrontate con quelle delle sostanze pure che li formano.

## Capitolo 1

### Motivazioni teoriche

#### 1.1 Modelli di membrane studiati con le isoterme $\Pi$ -A e spettroscopia FT-IR

Nel nucleo cellulare il DNA, legato ad alcune proteine, è racchiuso da una membrana lipidica e ciò ne può influenzare la conformazione e la stabilità. In laboratorio possiamo modellizzare questo fenomeno valutando l'interazione del DNA ad un'interfaccia lipidico-acquosa..

Il nostro studio si concentra proprio sui monostrati lipidici su subfase acquosa. Essi, infatti, si possono interpretare come membrane lipidiche artificiali. A onor del vero però queste strutture eterogenee, formate ponendo una goccia di lipide in solvente volatile su subfase acquosa, mediante la tecnica di Langmuir-Blodgett, hanno una complessità notevolmente inferiore rispetto alle membrane biologiche. Le membrane biologiche, a differenza delle artificiali, non sono composte da un solo tipo di anfifile, contengono altre molecole come il colesterolo che le modifica, sono abbinate a diverse proteine e inoltre all'esterno hanno polisaccaridi mentre all'interno sono legate al citoscheletro; comunque, nonostante le diversità, per entrambe valgono ancora gli stessi principi fisici di base. [Jones (2002)].

Utilizziamo il metodo di Langmuir-Blodgett proprio perché permette l'investigazione dell'interazione tra monostrati di molecole anfifiliche e biopolimeri ed è usato per delucidare l'influenza dei lipidi sulla conformazione delle membrane biologiche. In effetti l'organizzazione di un film di Langmuir può essere fortemente modificata dai composti

presenti in subfase: il comportamento e le proprietà di molti sistemi biochimici stabilizzati da surfactanti è governato dalle interazioni agenti all'interno e con gli strati di surfactante.

I film preparati con la tecnica di Langmuir-Blodgett e contenenti acidi nucleici in complessi con molecole anfifiliche cationiche si possono depositare su diverse superfici con proprietà idrofobiche o idrofile. [Sukhorukov et al. (1996)]. Questi monostrati possono, quindi, essere studiati sia dove si sono formati sia su altri supporti.

Le isoterme pressione di superficie su area per molecola ( $\Pi-A$ ) rilevate su subfase contenente DNA hanno mostrato valori di area per molecola nettamente maggiori rispetto alle subfasi prive di DNA indicando potenzialmente la formazione di un complesso. Lo studio con il microscopio ad angolo di Brewster (BAM) mostra che la presenza del DNA in subfase acquosa cambia la morfologia del monostrato a qualunque pressione di superficie. [Cardenas et al.(2005)]. La tecnica del BAM non è stata usata direttamente in questo lavoro ma i risultati ottenuti, presenti in letteratura, sono stati usati come supporto e ulteriore approfondimento allo studio delle caratteristiche del monostrato effettuato con le isoterme  $\Pi-A$ .

Una volta trasferiti i monostrati su substrato solido è possibile effettuarne lo studio mediante diverse tecniche tra le quali la spettroscopia infrarossa. Questo ci permette di valutare quali siano le interazioni determinanti la formazione del complesso tra lipidi e biomolecole, descrivendo così lo stato degli acidi nucleici impiegati. Le bande IR che si ritrovano in diverse regioni di frequenza forniscono un'istantanea di diverse porzioni della struttura dell'acido nucleico, dando informazioni sull'accoppiamento delle basi il loro impilamento e sulla natura dell'elica. Le bande rispondono infatti a cambi nello stato dell'acido nucleico mediante cambi nella posizione e nell'intensità. [Banyay et al. (2003)].

In letteratura, in base ai risultati ottenuti con riflettività ai raggi X (XRR), ellissometria e altre tecniche, troviamo che il DNA nativo a doppia elica si denatura nei complessi con ammine alifatiche come l'ODA. Si ritiene che i legami a idrogeno tra le basi complementari del DNA si rompano per formare legami intermolecolari tra le basi nucleiche e gli

amminogruppi delle ammine alifatiche. Sempre in letteratura troviamo che potenzialmente nei complessi tra DNA e alchilderivati delle ammine alifatiche, come il DODAB, il DNA potrebbe rimanere nella sua conformazione nativa dal momento che questi derivati delle ammine non sono in grado di formare legami idrogeno con le basi nucleiche. [Montrel et al. (1997)]. Inoltre si ritiene che l'interazione primaria lipide-DNA si abbia tra i gruppi fosfato carichi negativamente dello scheletro del DNA e le teste amminiche dei lipidi cariche positivamente [Braun et al.(2003)].

## Capitolo 2

### Materiali

#### **2.1 DNA nativo**

Nel nostro lavoro abbiamo utilizzato DNA in forma nativa (DNA-n) da sperma di aringa. La sua struttura primaria è una sequenza di residui nucleotidici connessi da legami fosfodiesteri, vale a dire da “ponti” covalenti tra gruppi fosforici, in cui il gruppo ossidrilico 5' di un'unità nucleotidica è unito al gruppo 3' di quella successiva.

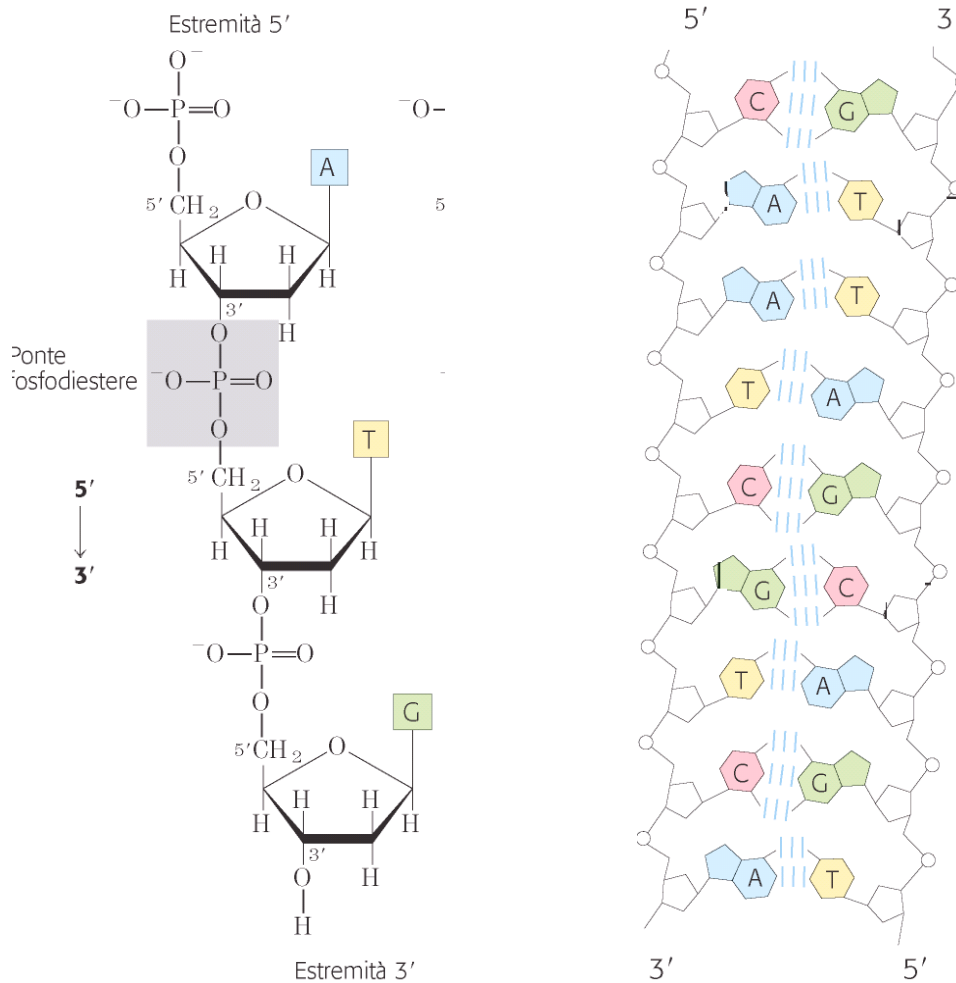


Fig 2.1: (a) Struttura primaria del DNA (b) Modello di Watson e Crick [Nature, 1953]

Tutti i monomeri all'interno della catena polinucleotidica hanno lo stesso orientamento e la catena ha una direzionalità dall'estremità 5', con un gruppo fosforico non legato ad alcun nucleotide, all'altra estremità 3' in cui vi è un gruppo ossidrilico libero (vedi 2.1).

Lo scheletro covalente degli acidi nucleici è quindi costituito da un'alternanza di gruppi fosforici e di residui di pentosio, mentre le basi azotate caratteristiche di questi composti possono essere considerate come gruppi laterali uniti allo scheletro a intervalli regolari. Lo scheletro covalente del DNA è idrofilico. I gruppi ossidrilici degli zuccheri formano legami idrogeno con l'acqua.

I gruppi fosfato, presenti nella nostra catena, sono carichi negativamente, anche se all'interno della cellula sono generalmente neutralizzati da ioni  $Mg^{2+}$  o da proteine cationiche, le quali formano complessi con il DNA. Questo indica una buona predisposizione del DNA, a pH fisiologico, a formare complessi con molecole cationiche; teniamo conto proprio di questo nel creare gli strati di Langmuir-Blodgett.

Le basi possiedono una varietà di proprietà chimiche tali da determinare la struttura, e in ultima analisi la funzione, degli acidi nucleici. Le comuni basi puriniche e pirimidiniche del DNA sono molecole altamente coniugate, una proprietà che ha importanti effetti, tanto da far assumere al DNA nello spazio una struttura tridimensionale a doppia elica. L'appaiamento delle basi dà luogo a una struttura regolare nella quale ciascun filamento è lo stampo dell'altro; l'appaiamento avviene mediante legami a idrogeno, direzionali e con energie tra i 10-40 kJ/mole. In particolare si hanno due legami a idrogeno fra le coppie di basi adenina e timina e tre tra guanina e citosina, quindi servirà più energia per separare queste ultime (vedi Fig 2.1). L'interazione tra le coppie di basi adiacenti le spinge l'una vicino all'altra creando un interno idrofobico e distorcendo lo scheletro zucchero-fosfato in modo da formare la doppia elica. Questo impilamento delle basi insieme alle interazioni idrofobiche rende il doppio filamento molto più stabile rispetto alla molecola a filamento singolo.

Come possiamo notare in Fig 2.2 gli scheletri idrofili zucchero-fosfato stanno a contatto con l'acqua all'esterno dell'elica mentre le basi impilate, relativamente idrofobiche, sono posizionate all'interno dell'elica [S. Folloni (2007)].

Il DNA in forma nativa può andare incontro a denaturazione, vale a dire alla separazione dei due filamenti che formano la doppia elica di DNA, per rottura dei legami idrogeno tra le basi complementari. Questo avviene solitamente per riscaldamento del DNA ma può essere osservato anche nella formazione di complessi, dove l'interazione dell'acido nucleico in forma nativa con altre molecole può portare alla formazione di legami idrogeno intermolecolari con conseguente trasformazione del DNA da double stranded a single stranded. Il DNA denaturato è in grado di rinaturarsi, cioè i filamenti separati sono in grado di riaccoppiarsi (fenomeno di annealing).

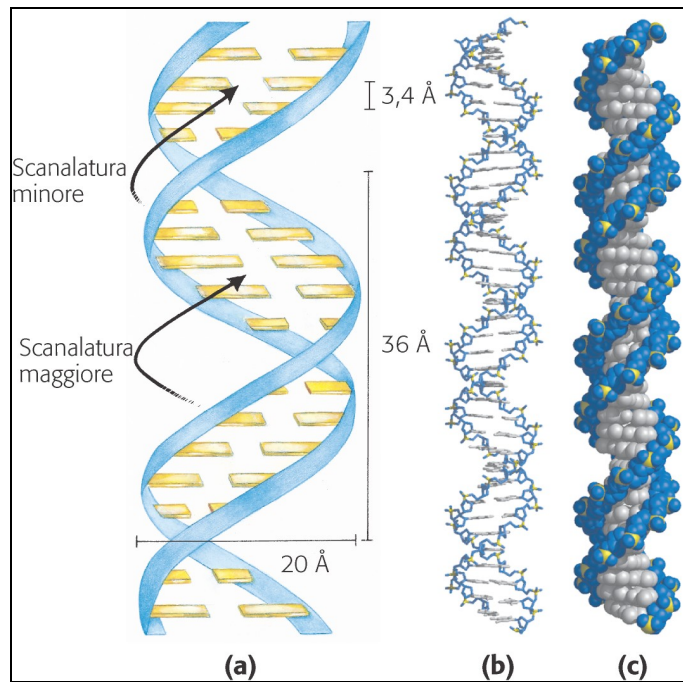


Fig 2.2: (a) Dimensioni dell'elica. (b) e (c) Struttura dell'elica

## 2.2 Lipidi cationici

Si può praticare la tecnica Langmuir-Blodgett per formare un monostrato soltanto se le molecole dissolte possiedono un'elevata attività di superficie [Shabarchina et al.(2003)]; in effetti abbiamo utilizzato due surfactanti: l' octadecilamina (ODA) e il dioctadecilammonio bromuro (DODAB). Entrambi sono lipidi cationici, molecole anfifiliche con una regione lipofila, comprendente dei gruppi idrocarburici ed una regione idrofila con una testa polare carica positivamente. Se dissolti in acqua le teste sono attratte mentre le code, idrofobiche, tendono a stare dalla parte opposta rispetto al liquido e a compattarsi tra loro risentendo dell'interazione idrofobica. Questo tentativo di soddisfare le due tendenze opposte delle molecole porta alla costruzione dei monostrati, per il bisogno di minimizzare l'energia libera del sistema, minimizzando il grado di mixing tra le code idrofobiche dell'anfile e l'acqua e mantenendo le teste idrofile in contatto con l'acqua. La presenza delle code idrofobiche in soluzione porterebbe infatti ad un maggiore ordine tra le molecole d'acqua con conseguente diminuzione dell'entropia e quindi aumento dell'energia libera. Le code, che non sono in

grado di formare legami idrogeno, indurrebbero una riorganizzazione nella rete di legami idrogeno già esistenti tra le molecole d'acqua per massimizzare il numero di legami idrogeno possibili. Questo restringerebbe il numero di configurazioni delle molecole d'acqua vicine al soluto, diminuendo così il loro contributo all'entropia. [Jones (2002)]

L'ODA è una molecola anfifilica ad una coda (vedi Fig 2.3), un'ammina alifatica primaria. Le ammine sono composti organici contenenti azoto; si possono considerare composti derivati dall'ammoniaca per sostituzione di uno, due o tre atomi di idrogeno con altrettanti gruppi alchilici. In base al numero di idrogeni sostituiti vengono classificate in primarie, secondarie o terziarie. L'ODA è una base e quindi diventa cationica a contatto con l'acqua. In aggiunta, coerentemente con l'utilizzo che ne vogliamo fare, è una molecola insolubile in acqua. Nelle ammine alifatiche, infatti, la solubilità viene meno con catene idrocarburiche troppo lunghe (oltre 6 atomi di carbonio): le code idrofobiche di eccessive dimensioni non riescono ad insinuarsi tra le molecole d'acqua e a rompere i legami idrogeno tra di esse. Inoltre l'ODA come tutte le ammine alifatiche primarie può formare legami idrogeno tra la coppia di elettroni dell'atomo di azoto estremamente elettronegativo e un'atomo di idrogeno positivo presente in un'altra molecola e risente delle forze di Van der Waals e di interazioni dipolo-dipolo.

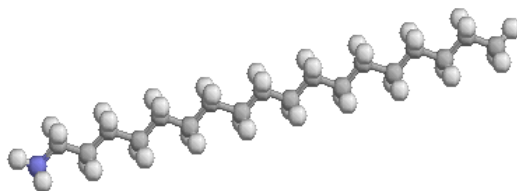
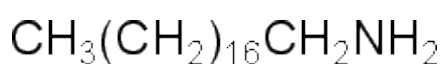


Fig 2.3 Formula molecolare e struttura tridimensionale dell'ODA

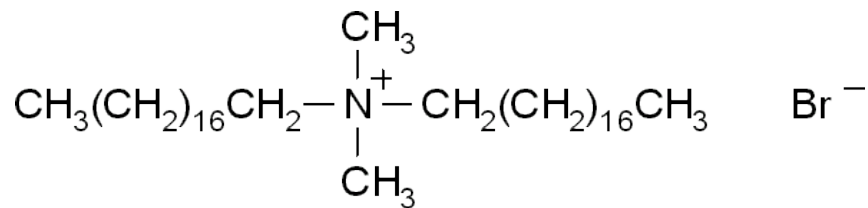
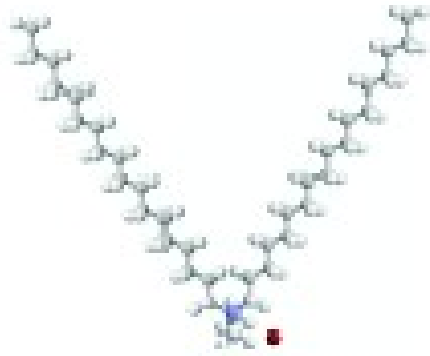


Fig 2.4: Formula molecolare e struttura tridimensionale del DODAB

In particolare abbiamo dedicato la nostra attenzione al DODAB (dimetildioctadecilammonio bromuro) (vedi Fig 2.4), che è una molecola anfifilica a due code, un derivato alchilico dell'ammina alifatica ODA. Esso non può formare legami idrogeno dal momento che l'atomo di azoto non ha elettroni disponibili ed è una molecola insolubile in acqua.

## Capitolo 3

### Le tecniche usate

#### 3.1 La tecnica Langmuir-Blodgett

##### 3.1.1 Film di Langmuir

L'acqua e le sue soluzioni sono le subfasi maggiormente favorite per la formazione degli strati di Langmuir. In particolare noi studiamo l'interazione tra una subfase acquosa contenente DNA e un monostrato lipidico insolubile (studio all'interfaccia aria-acqua). La superficie di un liquido presenta sempre un eccesso di energia libera, a causa della differente situazione tra le molecole di superficie e quelle all'interno (dovuta alla diversa disposizione

dei legami idrogeno). La tensione superficiale  $\gamma$  per un'interfaccia piana è  $\gamma = \left( \frac{\partial G}{\partial S} \right)_{T,P,n_i}$ ,

dove G, l'energia libera di Gibbs, S, l'area del sistema; T la temperatura, P la pressione e  $n_i$  la composizione sono mantenuti costanti. Quando una soluzione di molecole anfifiliche in un

solvente immiscibile è dispersa sulla superficie acquosa, la soluzione si sparge per coprire tutta l'area disponibile. In laboratorio si utilizza come solvente una miscela costituita da una parte di cloroformio, polare, e due di esano, che migliora lo spreading permettendo di disperdere in modo più efficace le molecole sull'acqua; una volta evaporato il solvente si forma un monostrato come dettato dalla natura anfifilica.

La tecnica di Langmuir-Blodgett ci permette quindi di formare uno strato orientato con le molecole anfifiliche aventi le teste polari idrofile in contatto con la soluzione acquosa e le catene alchiliche idrofobiche dalla parte opposta (vedi fig. 3.1). Come ci renderemo conto l'organizzazione del film di Langmuir, all'interfaccia aria-acqua, dipende da parametri ben noti, quali temperatura e pressione di superficie ma può anche essere fortemente modificato dai composti presenti in subfase.

Se utilizziamo un sistema di barriere per ridurre l'area per molecola disponibile, le molecole avvicinandosi si orientano, determinando un aumento della pressione di superficie,  $\pi = \gamma - \gamma_0$  pari alla differenza tra la tensione superficiale in assenza e in presenza del monostrato [Roberts (1990)]. Il film si forma man mano che la distanza tra le barriere e, quindi, anche l'area per molecola diminuisce ed aumenta la pressione misurata.

Essendo nota la dipendenza dalla temperatura scegliamo di mantenerci sempre a 20°C mediante un bagno termostato.

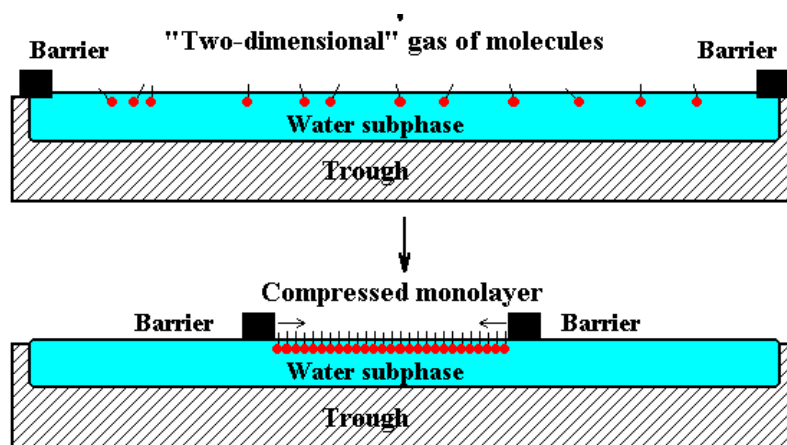


Fig. 3.1 Formazione del monostrato [Troitsky et al. (1997)].

### 3.1.2 Isotherme $\Pi$ -A

Un modo semplice per valutare gli strati di Langmuir-Blodgett, così formati, è quello di registrare la tensione interfacciale al variare dell'area per molecola a temperatura costante. Possiamo così valutare le proprietà del monostrato registrando un'isoterma di pseudoequilibrio.

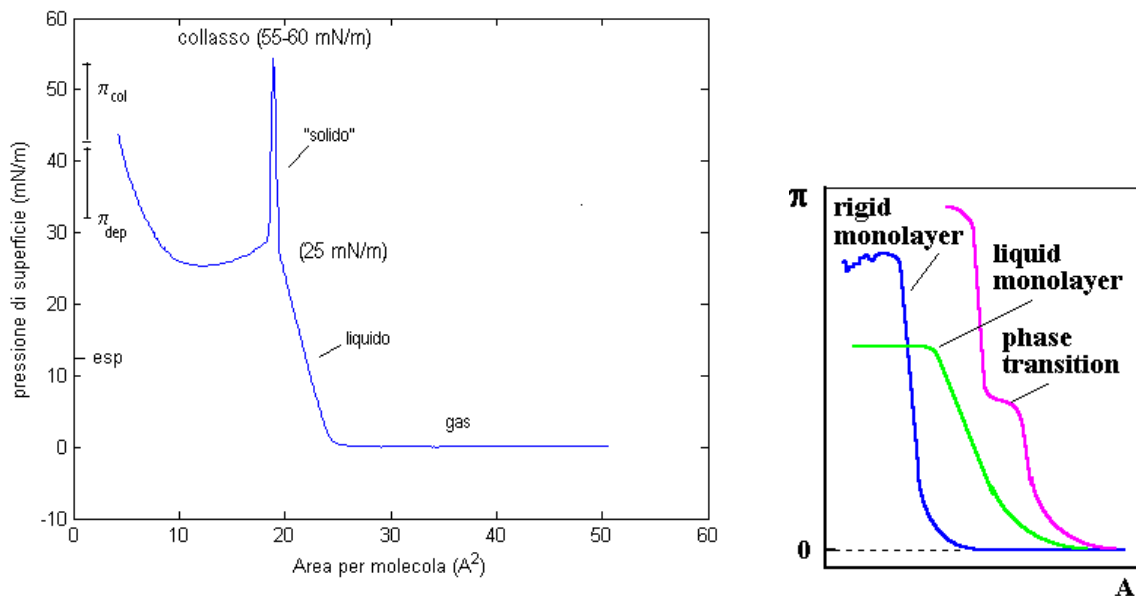


Fig. 3.2 (a) Isotherma  $\Pi$ -A di acido stearico su acqua (b) esempi di altre isoterme  $\Pi$ -A

Nelle isoterme sono evidenti alcune regioni: fase gassosa, liquida, solida e collasso, come si può notare nella prova fatta in laboratorio con un materiale standard: l'acido stearico. (vedi Fig 3.2)

Dapprima riducendo l'area per molecola notiamo una regione orizzontale, in cui le catene idrofobiche inizialmente vicine alla superficie dell'acqua se ne allontanano. Se la distanza tra le molecole di surfactante è grande, le loro interazioni sono piccole come se formassero un gas bidimensionale senza tanti effetti sulla tensione superficiale dell'acqua. Quindi abbiamo una transizione ad una regione lineare leggermente inclinata (fase liquida) e in seguito un brusco incremento di pendenza indicativo di un ordinamento di tipo solido nello strato di

molecole. Ad aree per molecola ancora più piccole si ha il collasso, dovuto alla formazione di centri di nucleazione o alla rottura del film un po' come succede nei laghi ghiacciati al disgelo. [Roberts (1990)].

Grazie alle isoterme possiamo quindi caratterizzare il monostrato valutandone le fasi e le transizioni di fase in corrispondenza dell'area per molecola e possiamo scegliere quale sia la più opportuna pressione di superficie per la deposizione, compresa tra l'ESP (pressione di equilibrio tra l'interno della materia e il monostrato) e la pressione di collasso.

### 3.1.3 Trasferimento dei film su substrato solido

Come abbiamo appena visto si possono ottenere informazioni sui monostrati lipidici compiendo degli studi all'interfaccia aria-acqua mediante le isoterme  $\Pi$ -A o il microscopio ad angolo di Brewster (BAM). Un'ulteriore possibilità per ottenere informazioni sui monostrati è quella di trasferirli dalla superficie dell'acqua su di un substrato solido (silicio silanizzato) in modo da sottoporli ad ulteriori indagini mediante spettroscopia infrarossa, oltre ad altre tecniche come la diffrazione a raggi X.

Esistono due tecniche di deposizione: la Langmuir-Blodgett (LB) o vertical lifting e la Langmuir-Schaefer (LS) o horizontal lifting. In entrambi i casi il substrato viene messo in contatto con il monostrato che vi aderisce. Nel primo caso il substrato è immerso mediante verticalmente mentre nel secondo viene adagiato orizzontalmente sulla superficie della subfase. Noi abbiamo scelto questo secondo metodo perchè dà migliori risultati per il trasferimento del nostro film.

Solitamente la deposizione avviene nella fase solida; il migliore valore di pressione di superficie a cui depositare dipende dalla natura del monostrato ed è stabilito empiricamente in modo da evitare problemi di collasso e avere un certo spazio per appoggiare sul monostrato una griglia di plastica. [Roberts (1990)]. Una volta raggiunta la pressione di superficie opportuna (nel nostro caso 40 mN/m) fermiamo le barriere nella posizione raggiunta e appoggiamo la griglia di plastica sul monostrato, dividendo in varie parti delle

dimensioni circa del substrato e facendo attenzione a non strisciarla, per non disintegrare o lacerare il film. (vedi Fig 3.3 a ). Per depositare, dobbiamo inclinare leggermente il substrato, in modo che le eventuali gocce d'acqua, possano scivolare lungo il campione. Lo strato d'acqua presente tra il substrato e il monostrato depositato impedisce il legame del film, perciò soffiame via i residui di acqua con un getto d'aria e ripetiamo l'operazione di deposizione per tutti i riquadri della griglia.

Disperdiamo 100  $\mu$ l di una soluzione con lipide 0.33 mg/ml in una parte di cloroformio e due di esano. Preferiamo usare come solvente una miscela perché da un canto il cloroformio permette di sciogliere bene il lipide in soluzione e dall'altro l'esano permette di ottenere spreading migliore. Utilizziamo come subfase la soluzione NaCl  $10^{-2}$  M, pH 6, DNA 0,005 mg/ml (il pH 6 e NaCl  $10^{-2}$  M servono per preservare le condizioni ottimali per il DNA) e comprimiamo fino ad una pressione di 40 mN/m; lavoriamo in vasca di teflon termostata a 20°C e depositiamo su silicio idrofobico il film ottenuto. In presenza del DNA il lasso di tempo tra dispersione del monostrato e inizio della compressione non è di una decina di minuti bensì di circa un'ora: non dobbiamo attendere tanto l'evaporazione del solvente quanto il raggiungimento dell'equilibrio del sistema [Sukhorukov et al. (1996)]. Trascorso questo tempo misuriamo le isoterme comprimendo il film in modo non lineare con due barriere ad una velocità di compressione di 10 mm/min. I campioni così preparati per le misure spettroscopiche contengono tra i 24 e i 64 monostrati depositati su silicio.

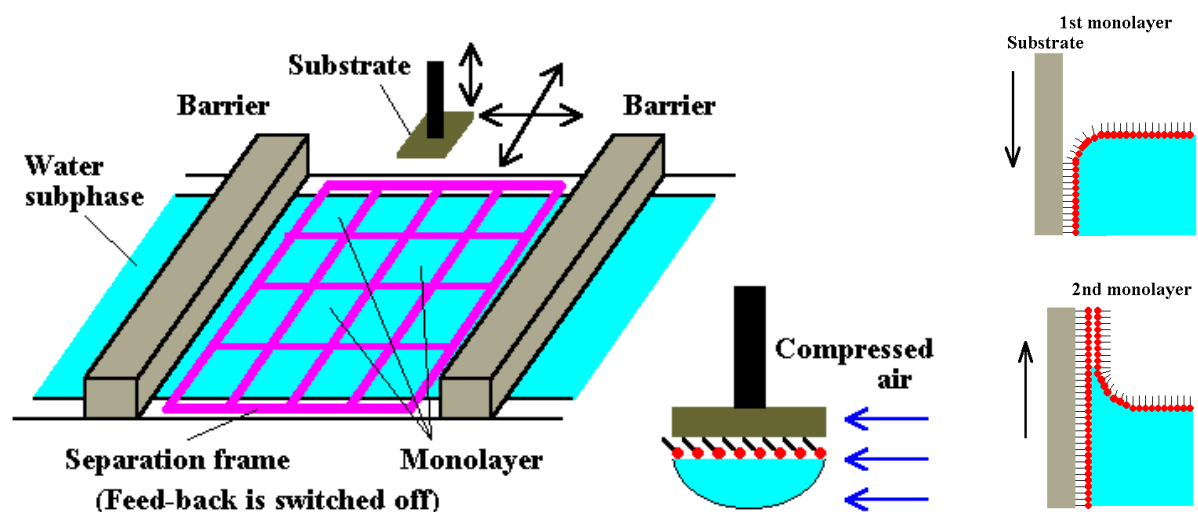


Fig. 3.3 (a) Schema della deposizione LS (b) Formazione del multistrato di tipo Y su substrato idrofobico [Troitsky et al. (1997)].

I film multistrato ottenuti hanno proprietà dipendenti pure dal tipo di interazione che si crea fra molecole del film e del substrato solido, ed in seguito, dalle interazioni che si creano tra parti delle molecole del film stesso. Trasferendo su substrato idrofobico (vedi Fig. 3.3 b) è più semplice raggiungere una buona qualità di deposizione perché l'interazione tra il primo e l'ultimo monostrato è praticamente indipendente dalle proprietà del materiale usato come substrato, inoltre su substrato idrofobico possiamo trasferire un numero pari di strati. La nostra deposizione è di tipo Y cioè i monostrati si depositano in entrambe le direzioni. Dato un substrato idrofobico il primo monostrato attaccato ha le code rivolte verso il substrato e le teste idrofiliche all'esterno quindi nel secondo strato sono le teste ad attaccarsi alle teste del primo strato lasciando le code all'esterno e così nel terzo strato le code si attaccheranno alle code del secondo e così via . In genere sono noti oltre a questo altri due tipi di deposizione che avvengono in una sola direzione detti X e Z, a seconda che al substrato si attacchino le code o le teste.

### **3.1.4 Lo strumento: Trough**

L'apparato necessario per la formazione di monostrati e per ottenere le isoterme  $\Pi$ -A pressione di superficie-area per molecola all'interfaccia aria-acqua consiste in un trough KSV System 5000 (vedi fig. 3.4) interamente in Teflon, su cui possono scorrere due barriere anche queste in Teflon, controllate automaticamente. Nel nostro trough è adottata la compressione simmetrica del monostrato, racchiuso tra le due barriere; esercitiamo così su di esso una sollecitazione uniforme, comprimendolo ad una velocità di 10 mm/min.

Il trough ha un'area totale di 400000 mm<sup>2</sup> e per rilevare la pressione di superficie utilizza il metodo del piatto di Wilhelmy (nel nostro caso una bandierina rettangolare di carta); questo metodo si basa sulla misurazione dell'aumento del peso, dovuto al menisco formato trascinando le barriere, del piatto ( $w$ ), parzialmente sommerso nel liquido. L'aumento del

peso si calcola come  $\Delta w = \gamma P \cos\theta$ , dove  $\gamma$  è la pressione di superficie,  $P$  il perimetro del piatto e  $\theta$  l'angolo di contatto. Approssimando l'angolo a zero perché la bandierina è bagnata e tenendo conto di uno spessore minimo, possiamo misurare la forza per unità di lunghezza del piatto. Qualora l'angolo di contatto cambi durante il corso di un esperimento si otterrà un'erronea lettura della pressione di superficie. Per questo durante la misura spegniamo il ventilatore presente nel laboratorio che farebbe oscillare la nostra bandierina ed evitiamo di far vibrare il tavolo di lavoro anche per non inficiare la formazione del film. Tale bilancia permette di conoscere la pressione di superficie e regolare il movimento delle barriere, le quali si fermano una volta raggiunta la pressione superficiale impostata su PC.

Usiamo un termostato a circolazione esterna con cui possiamo mantenere la subfase alla temperatura costante di  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ . La qualità dell'acqua è molto importante perché anche le minime impurezze possono dare problemi con il surfactante. Tutte le subfasi sono state preparate con acqua depurata con il sistema Millipore che riduce la presenza di sali minerali di circa 1000 volte rispetto all'acqua (resistività maggiore di  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ); il menisco formato dalle subfasi sopra alla vaschetta deve essere convesso, in modo che le barriere possano comprimerne la superficie.

Affinché il film sia di buona qualità e non abbia collassi la pulizia è di fondamentale importanza. Ogni residuo di polvere o di tensioattivi come i saponi utilizzati per pulire la vasca, può costituire un nucleo, intorno al quale il film collassa. Così la vaschetta viene pulita con sapone neutro, sciacquata con acqua depurata e quindi riempita sempre con acqua Milli-Q. Si attende una decina di minuti, così che le sostanze affiorino, e, grazie alla terza barriera in teflon, si elimina la superficie del menisco. Si ripete l'operazione tre volte, assicurando una buona pulizia. Un altrettanto accurato

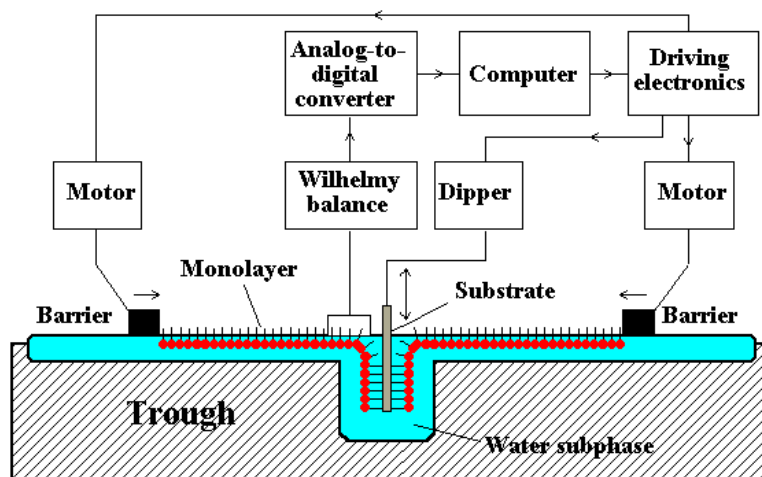


Fig. 3.4 schema semplificato di un trough per deposizione LB: noi abbiamo eseguito una deposizione LS per cui nel nostro caso il substrato non è immerso verticalmente in una tasca mediante dipper control ma è appoggiato orizzontalmente.

trattamento si riserva alle barriere le quali vengono appoggiate sull'interfaccia aria-acqua e alla bandierina di carta che ad ogni riempimento della vasca è immersa in acqua eliminando i possibili residui di sostanze indesiderate. Per un'ultima verifica della pulizia prima di dissolvere, si può riempire il trough con acqua purificata Milli-Q e fare una compressione controllando che la pressione rimanga a zero, infatti un aumento di pressione a piccola distanza tra le barriere significherebbe che la vaschetta non è pulita e si potrebbero trovare in superficie sostanze da eliminare.

Terminata la procedura di pulizia si distribuiscono le gocce in soluzione lipidica sulla superficie della subfase con una microsiringa in modo che non affondino in essa e si aspetta una decina di minuti, in modo che le sostanze volatili presenti evaporino lasciando sulla superficie dell'acqua solo le molecole del lipide. Quindi si tara a zero la pressione di superficie del sistema all'equilibrio e si inizia la compressione.

Il movimento delle barriere è controllato mediante un programma di acquisizione che ci permette di conoscere l'area per molecola corrispondente ad un dato valore della coordinata della barriera sulla base dei dati forniti al software circa peso molecolare, concentrazione e volume della soluzione dispersa. Impostata la pressione che vogliamo raggiungere, le barriere possono, o fermarsi rimanendo fisse in una posizione o mantenere la pressione raggiunta,

spostandosi attorno a tale configurazione regolate dal sistema elettronico. Se si tenta di mantenere la pressione raggiunta le barriere, dopo la deposizione dello strato, si avvicinano, tentando di ricreare un film omogeneo ma noi preferiamo mantenere fisse le barriere per avere sempre lo spazio per la griglia. [Troitsky et al. (1997)].

## 3.2 Spettroscopia FT-IR

### 3.2.1 Spettroscopia infrarossa

La spettroscopia infrarossa si è rivelata utile per investigare la struttura e l'interazione, di diversi gruppi funzionali, nei film LB. L'utilizzo dei moderni strumenti operanti in Trasformata di Fourier basati sul principio dell'interferometro di Michelson è ideale per studi sistematici degli acidi nucleici poiché è veloce (consente di raccogliere e mediare una quantità elevata di spettri ad alta risoluzione in tempi ragionevolmente brevi), non distruttiva e richiede piccole quantità di campione [Banyay et al. (2003)].

Questa tecnica permette di caratterizzare una sostanza attraverso la misura dell'energia assorbita dalle molecole nel passaggio tra stati vibrazionali diversi. I nuclei in una molecola possono vibrare attorno alle loro posizioni di equilibrio e questo moto è quantizzato: ha luogo ad una determinata frequenza, caratteristica della molecola e della particolare vibrazione. In accordo con la meccanica quantistica, solo alcune energie vibrazionali sono possibili. Se la molecola, inizialmente ad un livello vibrazionale di energia  $\mathcal{E}_i$ , è investita da un'onda elettromagnetica, può transire ad un livello vibrazionale permesso  $\mathcal{E}_f$ , se:  $\mathcal{E}_i - \mathcal{E}_f = h\nu$  con  $\nu$  frequenza dell'onda elettromagnetica.

Le frequenze richieste per causare una transizione tra livelli vibrazionali sono comprese tra 150 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ ; le corrispondenti lunghezze d'onda appartengono quindi al vicino e medio infrarosso. Il sistema viene sondato sulla scala spaziale della dimensione o separazione molecolare media, ossia 3-10 Å. La scala temporale corrispondente è dei picosecondi per cui è necessario usare una risoluzione spettrale dei  $\text{cm}^{-1}$ .

I moti vibrazionali caratteristici dei legami sono definiti come stretching (stiramento) e bending (piegamento). Come illustrato in Figura 3.5, lo stiramento è il risultato di una continua variazione delle distanze di legame tra due atomi e può essere simmetrico o antisimmetrico; il piegamento, invece, si riferisce alla modifica dell'angolo di legame sullo stesso piano o fuori dal piano su cui sono situati gli atomi considerati. L'apporto di energia necessario per produrre ciascun tipo di moto vibrazionale dipende direttamente dalla forza e dalla polarità dei legami tra gli atomi della molecola analizzata.

È possibile dare una spiegazione qualitativa del fenomeno alla base della spettroscopia infrarossa. Sia che alle molecole sia associato un momento di dipolo permanente o che la molecola all'equilibrio abbia dipolo nullo, un modo normale di vibrazione induce un momento di dipolo perché sposta la molecola dalla sua posizione di equilibrio. L'assorbimento del raggio infrarosso, oscillante alla corretta frequenza di vibrazione

molecolare, provoca un momento di transizione  $M_i = \frac{\partial}{\partial x_i} \vec{\mu}$  del dipolo fluttuante indotto  $\mu$ .

Un particolare modo vibrazionale si dice quindi IR-attivo, cioè assorbe radiazione infrarossa, se il moto vibrazionale associato produce un cambiamento del momento di dipolo. Spesso troviamo picchi corrispondenti allo stesso legame in una molecola, questo perché il legame può vibrare in tanti modi differenti IR attivi. Non si vedono picchi, per esempio, per N<sub>2</sub> o O<sub>2</sub> perché i legami tra loro non risentono di un cambio netto nel dipolo come risultato della loro vibrazione.

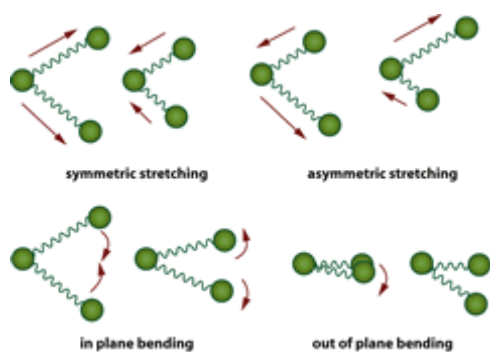


Fig 3.5 Moti vibrazionali di stiramento simmetrico o antisimmetrico e di piegamento sul piano e fuori dal piano.

La principale applicazione della spettroscopia FTIR riguarda l'analisi qualitativa di composti organici. Ogni composto organico, infatti, presenta uno spettro infrarosso caratteristico che dipende dalla corrispondente struttura molecolare. Un comune metodo di interpretazione di spettri FTIR consiste nel considerare due regioni spettrali del medio infrarosso: la zona dei gruppi funzionali (4000-1250 cm<sup>-1</sup>) e la zona caratteristica detta impronta digitale (1250-700 cm<sup>-1</sup>). La combinazione tra l'interpretazione della regione dei gruppi funzionali e il confronto della regione caratteristica con quelle contenute in librerie spettrali permette di identificare un composto o studiarne le interazioni e la struttura.

### 3.2.2 Modalità operative: Spettroscopia d'assorbimento e ATR

La spettroscopia di trasmissione misura la trasmittanza ad una certa lunghezza d'onda confrontando l'intensità della radiazione trasmessa attraverso il campione con quella emessa dalla sorgente. Lo spettro è così dato dalla percentuale della luce trasmessa dal campione verso la frequenza della luce infrarossa incidente espressa in cm<sup>-1</sup>. La trasmittanza T è

definita come  $\%T = \frac{I}{I_0}$ , dove I è l'intensità dello spettro uscente dal campione e I<sub>0</sub> è

l'intensità dello spettro di background. In realtà è maggiormente impiegata la spettroscopia d'assorbimento: lo spettro si può calcolare da quello in trasmittanza applicando l'equazione  $A = -\log_{10} T$ , dove A è l'assorbanza.

La spettroscopia d'assorbimento è maggiormente utilizzata per lo studio di solidi a bassa assorbanza, infatti noi l'abbiamo utilizzata per ottenere gli spettri di KBr pellet. Un campione solido in polvere, come i nostri ODA, DODAB e DNA nativo, può essere mescolato assieme a bromuro di potassio (KBr) in un mortaio e pressato in una pastiglia all'interno di un bullone, precedentemente pulito con cloroformio. La compressa deve essere sottile e

trasparente, per non assorbire la radiazione. In questo modo non si presentano assorbimenti interferenti ma la fragilità della pastiglia costituisce un problema. Il bromuro di potassio trasmette dai 400  $\text{cm}^{-1}$  in giù, è utilizzato con i materiali organici perché è poco igroscopico e soprattutto non presenta stretching IR attivi nella regione del medio e vicino infrarosso; così lo spettro della pellet contenente in parte il campione in polvere e il KBr è in realtà lo spettro della sostanza pura sull'intero range infrarosso.

Per ottenere spettri di film sottili si lavora in riflettanza, senza che il campione venga attraversato dalla radiazione infrarossa. Si raccoglie lo spettro della luce riflessa dal campione usando la riflessione totale attenuata (ATR). In questa tecnica non è richiesta una particolare preparazione del campione se non la deposizione sulla superficie del cristallo di Germanio. Il campione con un certo indice di rifrazione  $n_2$  è posto a contatto diretto con il cristallo, trasparente sui 5500-800  $\text{cm}^{-1}$ , di indice di rifrazione  $n_1$  più alto dell'indice di rifrazione del campione  $n_2$ .

La radiazione incidente all'interfaccia potrà essere totalmente riflessa, se l'angolo di incidenza è maggiore di un certo valore critico, funzione delle parti reali degli indici di

rifrazione del campione e del cristallo ATR:  $\theta_c = \text{sen}^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$ . Durante il processo di

riflessione il raggio si comporta come se penetrasse per un piccolo tratto nel campione. Per essere più precisi l'onda evanescente decade esponenzialmente nel campione a una distanza dalla superficie del cristallo di pochi micron. La profondità di penetrazione dell'onda evanescente  $d$  è collegata al decadimento dell'intensità ed è data da:

$$d = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \left[ \text{sen}^2 \theta - \left( \frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}}$$

. La profondità di penetrazione e il numero totale di riflessioni si

possono controllare variando il cristallo o l'angolo di incidenza; l'intensità dipende dal contatto, dal numero di riflessioni e dal cristallo utilizzato.

Abbiamo quindi visto che l'onda evanescente penetra quindi per pochi micron nel film. Quando si raggiunge una lunghezza d'onda a cui avviene l'assorbimento, l'indice di rifrazione  $n_2$  del film cambia rapidamente e maggiore è il cambiamento, maggiore è il grado di attenuazione della radiazione. Quindi l'intensità della luce riflessa varia con la lunghezza d'onda in modo simile ad uno spettro di assorbimento. In pratica le riflessioni multiple interne sono usate per aumentare l'attenuazione. Giunto all'estremità del cristallo il raggio torna sul normale cammino ottico dello spettrofotometro.

Effettivamente possiamo notare dalle fig. 3.6 e 3.7 che, per quanto riguarda il rumore, la qualità degli spettri dei film LB da noi creati è nettamente superiore in ATR rispetto a quella in trasmissione, per questo abbiamo deciso di utilizzare soltanto i primi.

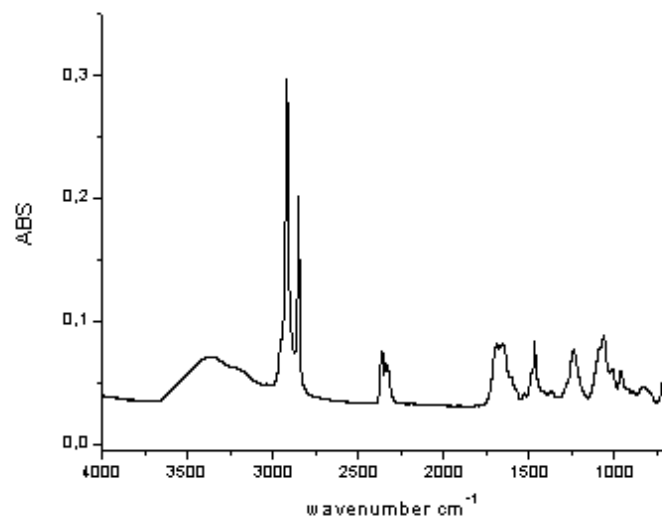


Fig. 3.6 spettri FT-IR del complesso DODAB-DNA ATR (23 strati)

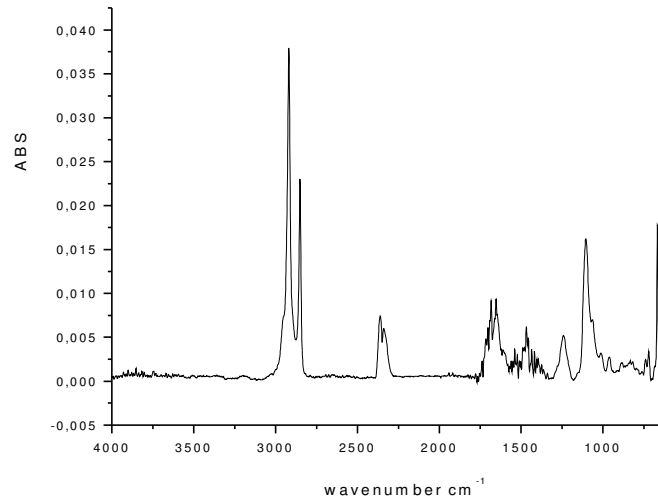


Fig. 3.7 spettri FT-IR del complesso DODAB-DNA in trasmissione (64 strati)

### 3.2.3 Lo strumento: Spettrofotometro a trasformata di Fourier

L'apparato sperimentale utilizzato per le misure è uno spettrofotometro a trasformata di Fourier Jasco FT-IR 420, il cui schema essenziale è illustrato in Fig. 3.8.

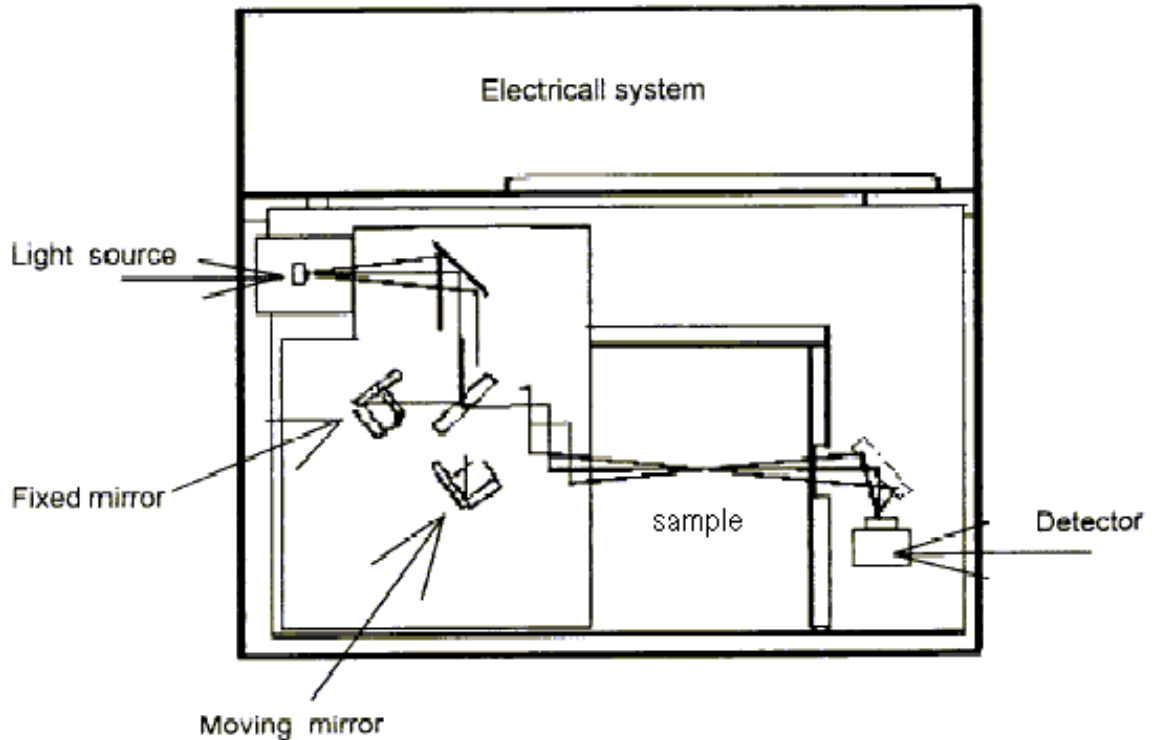


Fig. 3.8: Schema dello spettrofotometro a Trasformata di Fourier

È usata come sorgente una spira di ceramica, che emette fortemente nel vicino infrarosso emulando un corpo nero. Le frequenze del vicino infrarosso sono così alte che non è possibile registrare direttamente in funzione del tempo. È per questo che si utilizza un interferometro di Michelson e lo spettro viene registrato nel dominio delle lunghezze invece che in quello delle frequenze.

Così la luce proveniente dalla sorgente viene inviata all'interferometro, in cui uno dei due specchi è fisso mentre l'altro è mobile, come illustrato in Fig. 3.8. Il raggio emesso colpisce il primo piatto del beam splitter e si divide in un raggio parzialmente riflesso che va allo specchio fisso e uno parzialmente rifratto che va allo specchio mobile. I due raggi riflessi successivamente dai rispettivi specchi passano attraverso il campione e poi nel beam splitter che ricombina la luce inviandola, sulla destra, ad un detector. Il beam splitter è costituito da un sottile film di Germanio (Ge) depositato su substrato di bromuro di potassio (KBr) e dotato di un secondo piatto di KBr per la compensazione dei cammini ottici, introdotto in modo che il raggio riflesso e il rifratto

passino entrambi due volte attraverso lo stesso tratto di materiale di cui sono composti i due piatti del beam splitter.

Raggiunto il detector DLATGS, costituito da un sensore piroelettrico, cioè il Triglicin Solfato (TGS), deuterato per alzarne la temperatura di Curie e drogato con Alanina che ne assicura la polarizzazione permanente, i due raggi hanno compiuto cammini differenti con un ritardo tra i due legato alla posizione dello specchio mobile. Si possono misurare variazioni di intensità del fascio combinato in funzione del diverso percorso compiuto dai due fasci. Se il ritardo tra i due raggi è un multiplo di  $\lambda$  si avrà interferenza costruttiva, se è un multiplo di  $\lambda/2$  avremo interferenza distruttiva; così al variare del ritardo tra i due raggi avremo un andamento dell'intensità come una funzione cosinusoidale. (vedi fig. 3.9) Così a causa dell'interferenza costruttiva e distruttiva tra le radiazioni delle varie lunghezze d'onda si avrà un andamento variabile dell'intensità in funzione della posizione dello specchio mobile.

Il segnale così ottenuto è un interferogramma in cui è rappresentata l'intensità della luce misurata dal detector in funzione della posizione dello specchio, lo spettro è così registrato in funzione della lunghezza e non delle frequenze. Esso non assomiglierebbe ai soliti spettri studiati e la sua modifica richiede l'uso della trasformata di Fourier. Infatti l'interferogramma registrato corrisponde alla Trasformata di Fourier della composizione spettrale della luce incidente in funzione del numero d'onda (spazio e numero d'onda sono due variabili

coniugate di Fourier). L'intensità rilevata è della forma  $I(\delta) = \int_0^{\infty} B(\nu) \cos(2\pi\nu\delta) d\nu$ , dove  $\nu$  è

il numero d'onda della radiazione e  $B(\nu)$  è l'intensità della sorgente in quel numero d'onda. Un grafico di  $B(\nu)$  è proprio la distribuzione spettrale della sorgente e si ottiene

mediante trasformata di Fourier  $B(\nu) = 2 \int_0^{\infty} I(\delta) \cos(2\pi\nu\delta) d\delta$ . Questo può essere intuito

considerando il comportamento del fascio separato e poi ricombinato dal beam splitter.

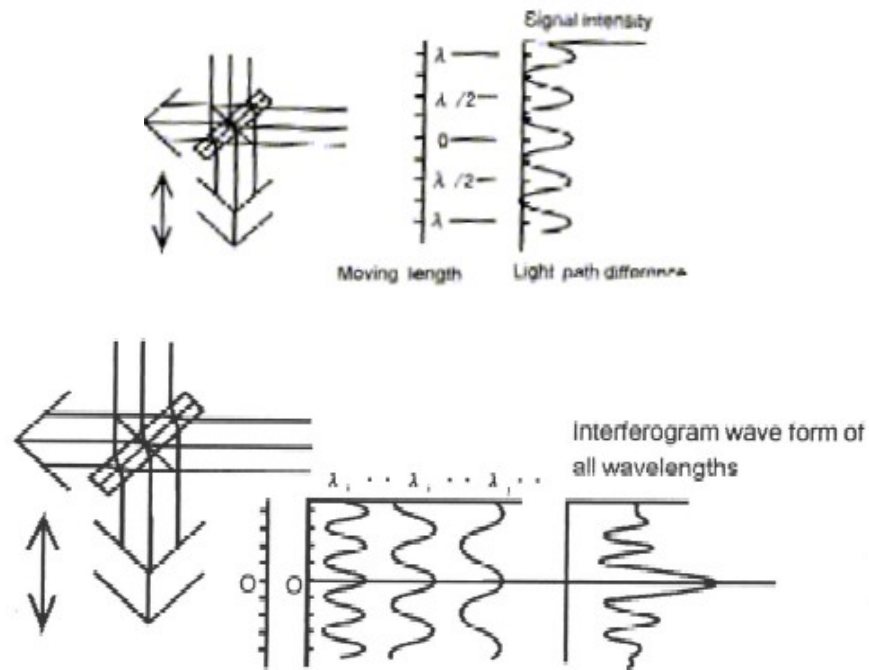


Fig. 3.9 Andamento variabile dell'interferogramma

L'interferogramma è digitalizzato per poter essere trasformato mediante computer nello spettro da studiare. La risposta del detector è rappresentata nello spettro come assorbanza in ordinata su numero d'onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) in ascissa ed è proporzionale all'intensità della radiazione IR che raggiunge il detector dopo aver attraversato il campione, indicando il grado di interazione della radiazione IR con il campione. Impostiamo da pc la misura della distribuzione spettrale nella regione più interessante per avere informazioni sul nostro complesso, scegliendo il numero di interferogrammi e la risoluzione. La risoluzione è sempre determinata da quale porzione dell'interferogramma si possa osservare, il che è legato al massimo spostamento possibile dello specchio mobile.

Il risultante spettro in assorbanza dovrà essere privo di ogni contributo sperimentale o ambientale e presentare unicamente le caratteristiche del campione. In uno strumento a singolo fascio, come il nostro, valutiamo prima lo spettro in trasmittanza senza campione (background). Il background verrà effettuato a seconda delle diverse tecniche di campionamento su compressa di solo bromuro di potassio, su silicio silanizzato e sul cristallo di Germanio senza campione. La radiazione nel suo cammino dalla sorgente al detector

viaggia in aria, in cui è presente vapore d'acqua, con bande caratteristiche attorno a  $3500\text{ cm}^{-1}$  e  $1630\text{ cm}^{-1}$ , e anidride carbonica, con bande caratteristiche a  $2350\text{ cm}^{-1}$  and  $667\text{ cm}^{-1}$ . Possiamo ridurre l'effetto dell'assorbimento di queste due sostanze "flussando" lo spettrofotometro ad azoto; inoltre la radiazione è riflessa da specchi su cui sono presenti tracce di materiali organici contenti catene alchiliche  $-(\text{CH}_2)_n$ . Tutti questi gruppi molecolari assorbono la radiazione IR a ben determinate lunghezze d'onda, disturbando la misura accurata dei "picchi" per noi interessanti, relativi ai complessi dei film LB. Per ovviare al problema sottraiamo allo spettro del campione, rilevato in assorbanza, il background. Se le concentrazioni di gas come il vapore acqueo e l'anidride carbonica nello strumento erano gli stessi quando si è rilevato il background e lo spettro del campione, allora non dovranno comparire bande relative ad essi. Perciò, per uniformare la quantità di gas presenti nella camera dello spettrofotometro, decidiamo di attendere sempre una decina di minuti prima di effettuare un qualunque spettro. [Cristofolini (2005)]

## Capitolo 4

### Analisi Sperimentale

#### 4.1 Formazione del complesso DNA-lipide valutata mediante le isoterme $\Pi$ -A

Per un confronto disperdiamo anche su soluzione NaCl  $10^{-2}$  M, pH 6 senza l'aggiunta di DNA. Inoltre il DODAB è disperso anche su acqua pura.

##### 4.1.1 Il complesso DNA-ODA

Le isoterme  $\Pi$ -A di ODA sulle subfasi con e senza DNA sono mostrate in fig. 4.1. L'isoterma su subfase con DNA ha un'area per molecola maggiore dell'isoterma su subfase senza DNA, ma nella fase solida esse presentano la stessa area per molecola pari a  $21 \text{ \AA}^2$ . Questo andamento indica la formazione dei complessi DNA-ODA e la stessa area per molecola nella fase solida può indicare che le molecole dell'ODA non sono "rivestite" dal DNA allo stesso modo del DODAB che presenta un'area per molecola maggiore anche nella fase solida, come spiegheremo nel prossimo paragrafo. Inoltre, sempre diversamente da quanto osserveremo per il DODAB, nell'isoterma del lipide su subfase salina non appare evidente un "ginocchio" ad indicare la transizione di fase da liquido espanso a liquido condensato (transizione LE-LC).

È interessante paragonare il lavoro fatto nella compressione del monostrato di solo ODA e del complesso DNA-ODA. Per fare ciò dobbiamo considerare la differenza tra gli integrali delle loro relative isoterme  $\Pi$ -A. Questa differenza è circa di  $1,44 \times 10^{-20}$  J per ogni molecola, valore paragonabile a quello dell'energia di interazione tra due basi nella doppia elica di

DNA ( $1,2-2,4 \times 10^{-20}$  J). Il risultato suggerisce che la differenza tra le isoterme sia dovuta all'interazione DNA-ODA, che sembra essere dovuta a legami di tipo idrogeno.[Erokhina, Berzina, Cristofolini et al. (2007)]. Tuttavia questo non è un argomento molto forte: è un fenomeno comune che l'area sotto le isoterme  $\Pi$ -A abbia il valore di alcuni KT.

Dall'analisi delle curve di riflettività X emerge che per tutti i valori di pressione di superficie lo spessore dello strato, corrispondente all'impacchettamento delle catene idrocarburiche, è risultato essere molto meno per l'ODA su DNA rispetto al monostrato formato su subfase senza DNA, in buon accordo con la maggiore area per molecola misurata nelle isoterme. Infatti l'aumento di area per molecola richiede l'inclinazione delle catene idrocarburiche per il loro stretto impacchettamento.

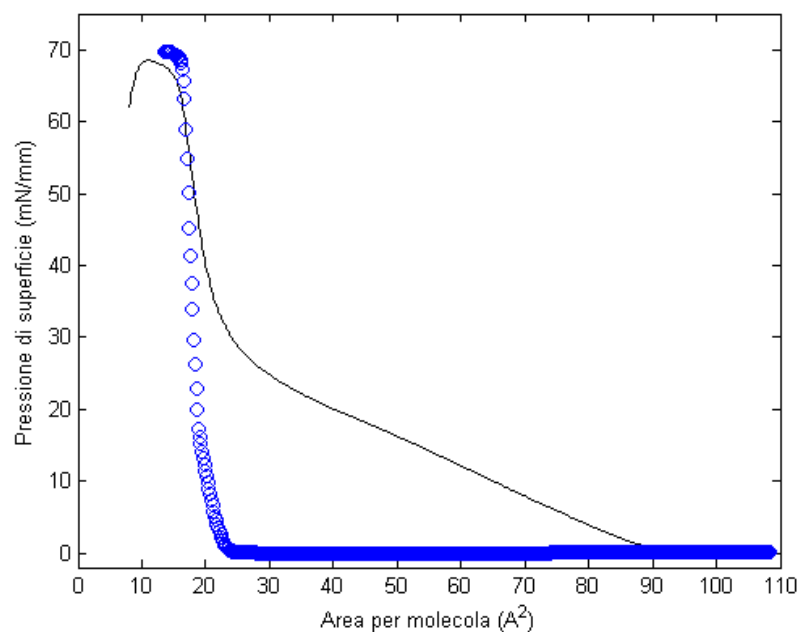


Fig 4.1 Isotherme  $\Pi$ -A per i monostrati di ODA su subfase NaCl  $10^{-2}$  M, pH 6 (cerchi); NaCl  $10^{-2}$  M, pH 6, DNA 0,005 mg/ml (linea)

Il basso valore dello spessore delle molecole di DNA permette di suggerire che siano nella forma a singolo filamento già all'interfaccia aria-acqua. Alternativamente una parziale intercalazione delle molecole di ODA nell'elica dell'acido nucleico può spiegare lo spessore osservato del substrato di DNA, piccolo anche per la conformazione a singolo filamento. In

particolare il decremento del parametro di spessore delle code idrocarburiche dell'ODA alle più basse pressioni su subfase con DNA indica una disomogeneità del film, cioè le molecole di ODA formano complessi su strati di DNA, ma ci sono aree vuote tra gli strati. All'aumentare della pressione di superficie aumenta l'impacchettamento e quindi l'omogeneità.

L'aumento dell'area per molecola nel monostrato contenente DNA implica un'inclinazione delle catene idrocarburiche in modo da ottenere un buon impacchettamento. Quanto ottenuto con l'ellissometria, i cui risultati corrispondono a quanto osservato nelle isoterme, permette di notare una maggiore inclinazione iniziale delle code idrofobiche su subfase con DNA (da  $78^\circ$  a  $58^\circ$  rispetto alla verticale).

Il miglior fit per i dati ottenuti coi raggi X si ottiene considerando la coesistenza di un monostrato di puro ODA e di un monostrato con DNA attaccato, le molecole di ODA non sono dunque rivestite dal DNA ma abbiamo uno strato sopra all'altro.

Lo schema dell'organizzazione del monostrato complesso di DNA e ODA mostrato in fig. 4.2. Una tale organizzazione è molto probabilmente mantenuta nei film multistrato depositi su substrato solido. [Erokhina, Berzina, Cristofolini et al. (2007)]

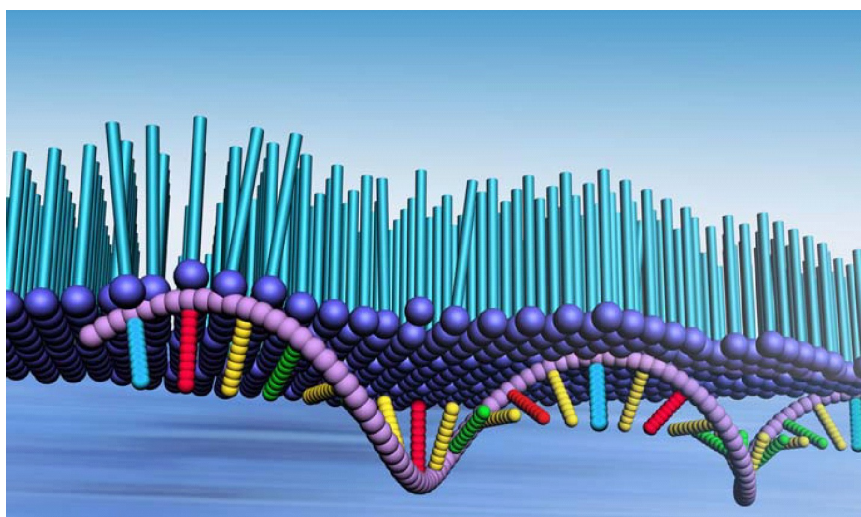


Fig. 4.2 Modello del monostrato del ODA-DNA all'interfaccia aria-acqua

Una possibile interpretazione dell'interazione tra ODA e DNA può essere questa. A causa della protonazione (acquisto di ioni  $H^+$ ) delle teste di gruppo dell'ODA ai valori di pH usati negli esperimenti, avviene una modificazione locale delle proprietà dell'acqua in uno strato di superficie molto sottile. Ciò causa una certa disomogeneità (su scala mesoscopica) nel pH locale, che viene spostato verso valori basici. Il moto termico delle molecole di DNA nella subfase fa sì che esse arrivino in superficie. Se prendiamo in considerazione il fatto che il DNA si denatura in soluzioni a carattere basico, quando le molecole raggiungono le teste di gruppo dell'ODA avvengono due processi. Innanzitutto il DNA si denatura parzialmente a causa del pH basico nello strato di superficie, quindi il DNA parzialmente denaturato in filamento singolo si attacca elettrostaticamente alle teste di gruppo positive dell'ODA.

Comunque noi non possiamo ignorare un altro meccanismo che può essere responsabile della formazione del monostrato con il DNA a filamento singolo. Una piccola percentuale del DNA si può trovare nella forma a filamento singolo per l'azione combinata della repulsione elettrostatica e dei legami a idrogeno. Il meccanismo di formazione del complesso del DNA a doppio o singolo filamento con l'ODA nel monostrato può essere diverso. Ovviamente entrambe le forme interagiscono elettrostaticamente. Comunque nel caso di DNA a filamento singolo è possibile che si formino legami che coinvolgono parti idrofobiche delle molecole di ODA, legami simili a quelli che si creano nel DNA a doppia elica. Queste interazioni sono più forti e più specifiche rispetto alle elettrostatiche. Perciò possiamo suggerire che le interazioni elettrostatiche forniscano un attaccamento dinamico del DNA al monostrato. Comunque statisticamente il DNA a filamento singolo si attacca più fortemente al monostrato e quindi resta legato allo strato.

#### 4.1.2 Il complesso DNA-DODAB

Possiamo osservare le isoterme  $\Pi$ -A di DODAB su subfase con DNA, su subfase salina e su acqua pura in Fig 4.3.

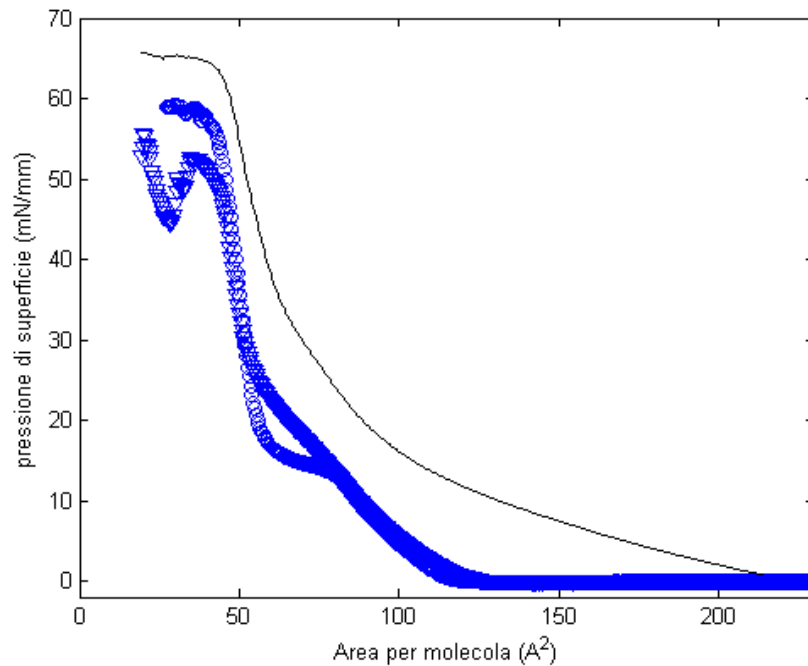


Fig 4.3 Isoterme  $\Pi$ - $A$  per i monostrati di DODAB su subfase acqua (triangoli); NaCl  $10^{-2}$  M, pH 6 (cerchi); NaCl  $10^{-2}$  M, pH 6, DNA 0,005 mg/ml (linea)

Il DODAB dissolto su acqua forma un monostrato ordinato, così come quello con subfase NaCl  $10^{-2}$  M, pH 6. A bassa pressione di superficie il monostrato di DODAB è in fase gassosa. Notiamo un netto incremento nella pressione di superficie a circa  $120 \text{ \AA}^2$  per molecola, che indica l'inizio della fase liquida espansa. La differenza rispetto all'acqua è che su subfase NaCl  $10^{-2}$  M, pH 6, in presenza di ioni monovalenti, a circa  $80 \text{ \AA}^2$  per molecola appare una netta transizione di fase quasi del primo ordine LE-LC (un "ginocchio"). Cardenas e i suoi collaboratori [Cardenas et al. (2003)] hanno osservato nelle immagini al microscopio ad angolo di Brewster (BAM), in corrispondenza a questa transizione di fase per la subfase salina, piccoli centri di nucleazione che diventano rapidamente domini dendritici. Le molecole di DODAB sulla subfase salina si neutralizzano con gli ioni monovalenti della subfase formando molecole, che si aggregano e vengono compresse dalle barriere. Il DODAB su acqua pura presenta dei domini cristallini con grande momento di dipolo che danno origine ad un'attrazione dipolo-dipolo forte e a lungo range. In effetti con il BAM

possiamo osservare la transizione di fase LE-LC anche per il DODAB su acqua pura, cosa che invece non si può notare nelle isoterme. Sembra che nel DODAB la forte repulsione tra le teste polari nel monostrato impedisca un elevato grado di impacchettamento e induca gli importanti effetti cinetici che tendono a “lisciare” l’isoterma di DODAB su acqua pura.

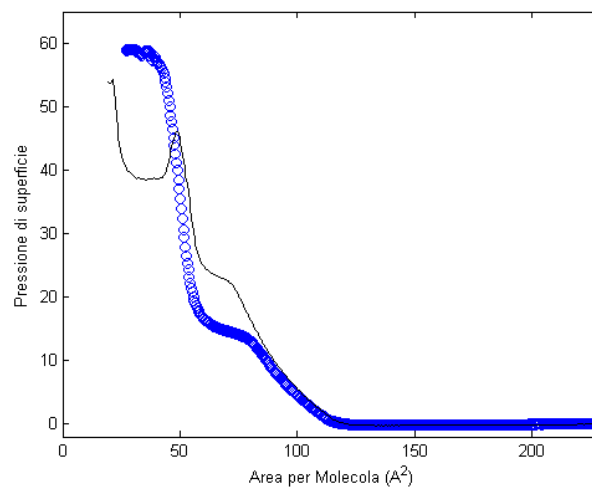
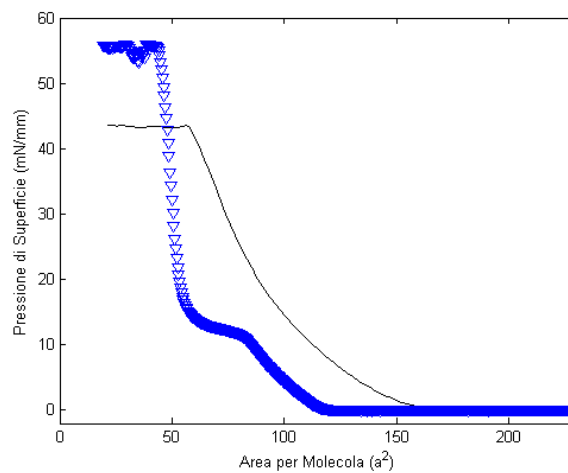


Fig 4.4 (a) Isoterme  $\Pi$ -A per i monostrati di DODAB su subfase acetato di bario  $10^{-4}$  M (linea);  $\text{CaCl}_2$   $0,5 \times 10^{-2}$  M,  $\text{NaCl}$   $10^{-3}$  M, pH 6 (triangoli). (b) Isoterme  $\Pi$ -A per i monostrati di DODAB su subfase  $\text{NaCl}$   $10^{-3}$  M, pH 6 (linea);  $\text{NaCl}$   $10^{-2}$  M, pH 6 (cerchi).

A circa  $60 \text{ \AA}^2$  per molecola la pressione di superficie aumenta notevolmente al diminuire dell'area e le isoterme su subfase acquosa e salina tornano a corrispondere, cioè sia nel monostrato su acqua che su subfase salina l'area per molecola nella fase solida, ottenuta comprimendo, è la stessa (circa  $40 \text{ \AA}^2$  per molecola).

È stata dimostrata [Claesson et al. (1989)] la dipendenza delle isoterme e quindi delle forze all'interno del monostrato di DODAB dal tipo di ioni presenti in subfase (vedi fig. 4.4a). Per esempio con ioni acetato la forza repulsiva all'interno del monostrato è nettamente superiore rispetto alla subfase con  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{NaCl}$  (predominante è il contributo del secondo sale).

Possiamo notare che l'isoterma del DODAB dissolto su di una subfase contenente polianioni si sposta verso aree per molecola più piccole e si inclina maggiormente. Inoltre osserviamo anche una diminuzione dell'area per molecola all'aumentare della concentrazione di  $\text{NaCl}$  (vedi fig. 4.3b). C'è quindi una tendenza del DODAB a formare aggregati più grandi all'aumentare della concentrazione salina.. Siccome l'andamento delle isoterme dipende dalla temperatura noi la abbiamo sempre mantenuta costante a  $20^\circ\text{C}$  tramite l'uso di un bagno termostato.

Ma torniamo a commentare la fig. 4.3 e in particolare dopo aver commentato e confrontato il comportamento del DODAB su acqua pura e su subfase salina valutiamo l'isoterma del DODAB su subfase con DNA. L'aggiunta di DNA  $0,005 \text{ mg/ml}$  alla subfase acquosa  $\text{NaCl}$   $10^{-2} \text{ M}$ , pH 6 fa sì che il "ginocchio" sembri scomparire (il film sembra rimanere nella fase liquida espansa) e la pressione di superficie aumenti considerevolmente per qualunque area media per molecola.

È stato osservato che la morfologia del film cambia drammaticamente in presenza di DNA: i grandi aggregati di tipo dendritico osservati per i monostrati di DODAB puro svaniscono. Il film si trova ad essere isotropo già a basse pressioni di superficie e grandi domini allungati che alla fine fondono a pressioni più alte sono stati osservati in alcune zone della superficie.

Effettivamente le molecole di DODAB e DNA interagiscono dando luogo a molecole neutre di grandi dimensioni che, riunite in domini, si aggregano molto rapidamente sotto

compressione. Poichè la molecola formata nell'interazione è costituita da DODAB "rivestito" dal DNA l'area media per molecola risulta maggiore.

Si presume, anche grazie ai dati ottenuti mediante diffrazione ai raggi X, che gli effetti osservati nell'isoterma in presenza di DNA siano dovuti all'interazione elettrostatica tra film cationico e le macromolecole negativamente cariche e non alla fissazione del DNA all'interfaccia aria-acqua. La pressione di superficie si equilibra quando l'interfaccia è saturata con il DNA e per la diminuzione del potenziale elettrico del film, il che avviene nell'ora di attesa prima di comprimere il monostrato. L'accoppiamento elettrostatico del DNA al monostrato lipidico interferisce con la formazione degli aggregati condensati di surfactante e induce un cambio nell'impacchettamento delle catene idrofobiche in una conformazione più fluida [Cardenas et al.(2005)]. È proposto quindi un modello per il complesso in cui, differentemente dall'ODA, il DNA resta nella sua forma nativa.

## **4.2 Struttura e interazioni nei complessi valutate mediante FT-IR**

Sulla base dei risultati ottenuti combinando lo studio di isoterme, ellisometria e riflettività X sono stati proposti due modelli diversi per l'interazione di ODA con DNA e di DODAB con DNA: mentre si presume che il primo formi complessi in cui il DNA è denaturato, cioè a singola elica, il secondo sembra formare complessi in cui il DNA conserva la struttura nativa a doppia elica ed è attaccato solo per via elettrostatica.

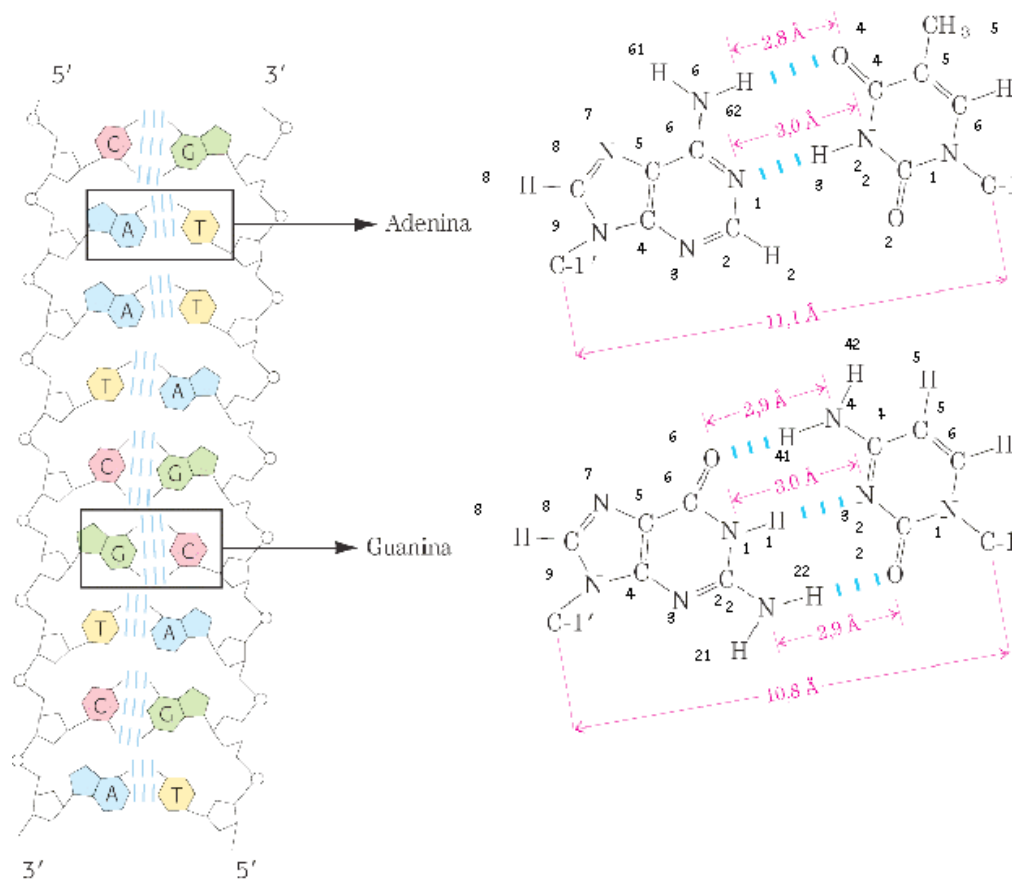
Abbiamo cercato di confermare questi due modelli facendo uso della spettroscopia IR acquisendo spettri IR mediante lo spettrofotometro a trasformata di Fourier Jasco FT-IR 420 nel range  $4000-600\text{ cm}^{-1}$ , accumulando 128 interferogrammi, con una risoluzione di  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### **4.2.1 Discussione spettri FT-IR di DNA nativo, ODA e DODAB**

Innanzitutto, analizziamo lo spettro del DNA nativo, incluso in una compressa di KBr, (fig. 4.5) e lo studiamo ponendo l'attenzione sulle bande caratteristiche della doppia elica, in particolare evidenziamo con il carattere in grassetto i valori delle bande considerate dei marcatori per la conformazione a doppia elica. Nel trattare gli spettri del DNA facciamo riferimento a fig. 4.5 dove ad ogni gruppo nelle basi azotate è associato un numero.

Le bande IR che si ritrovano a diverse regioni di frequenza forniscono un'istantanea di diverse porzioni della struttura degli acidi nucleici, dando informazioni riguardo l'accoppiamento e l'impilamento delle basi. Le bande rispondono ai cambi nello stato dell'acido nucleico mediante cambi nella posizione, nell'intensità e nella polarizzazione.

Nella regione  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$  rileviamo le vibrazioni delle basi dell'acido nucleico, che agiscono come marcatori estremamente sensibili riguardo all'accoppiamento o meno delle basi. La presenza delle strutture delle basi accoppiate si può rivelare dall'ispezione delle posizioni dei picchi e dai rapporti delle bande in queste regioni, le quali sono legate soprattutto alle vibrazioni di doppi legami come lo stretching di  $C=C$ ,  $C=N$ ,  $C=O$ . Lo spettro del DNA nativo asciutto, presenta una banda di assorbimento attorno a  **$1690\text{ cm}^{-1}$**  relativa alle vibrazioni del gruppo carbonilico delle basi impilate. Il fatto che la guanina sia accoppiata è riflesso da una vibrazione di  $C6=O6$  a  $1689-1678\text{ cm}^{-1}$  e da una banda ad intensità non elevata della vibrazione dell'anello di guanina a circa  $1590-1564\text{ cm}^{-1}$ . L'accoppiamento delle basi di timina è riflesso da un decremento di intensità nella vibrazione  $C2=O2$  della timina a circa  $1690\text{ cm}^{-1}$  rispetto a quando è libera e dallo spostamento delle vibrazione dell'anello di timina da  $1632\text{ cm}^{-1}$  a  $1645-1641\text{ cm}^{-1}$ .



EMBED PBrush

Fig 4.5: Modello di Watson e Crick e appaiamento delle basi complementari Adenina e Timina, Guanina e Citosina, con l'indicazione delle posizioni degli atomi all'interno dei nucleotidi, utile per il successivo studio della conformazione del DNA all'interno dei complessi mediante spettroscopia FT-IR [Nature, 1953]

Possiamo studiare la denaturazione del DNA osservando gli spettri IR. Una transizione dalla conformazione a doppio filamento a quella a singolo filamento si traduce in una diminuzione in intensità della banda attorno ai  $1690\text{ cm}^{-1}$  in concomitanza all'aumento in intensità della banda attorno ai  $1660\text{ cm}^{-1}$ . La banda attorno ai  $1690\text{ cm}^{-1}$ , come già detto, è dovuta allo stretching  $\text{C6}=\text{O6}$  della base appaiata di guanina assieme allo stretching  $\text{C2}=\text{O2}$  della timina (in forma libera e appaiata). La banda attorno ai  $1660\text{ cm}^{-1}$  è dovuta soprattutto alle vibrazioni

C6=O6 della guanina libera, C2=O2 della citosina libera e C2=O2 della timina libera. Proprio il rapporto tra le intensità di queste due bande è usato per farsi un'idea dell'andamento della denaturazione. Inoltre per studiare la denaturazione possono anche essere monitorate le variazioni nelle bande attorno ai  $1630\text{ cm}^{-1}$  e  $1590\text{ cm}^{-1}$  relative alle vibrazioni di adenina e guanina.

Nella regione  $1500\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$  possiamo rilevare vibrazioni riguardanti l'accoppiamento zucchero-base dando specifiche informazioni circa la rotazione del legame glicosidico, la conformazione dello scheletro e la piega dello zucchero. Le bande verso i  $1330\text{ cm}^{-1}$ , per esempio, riguardano lo stretching dell'ammina aromatica della timina.

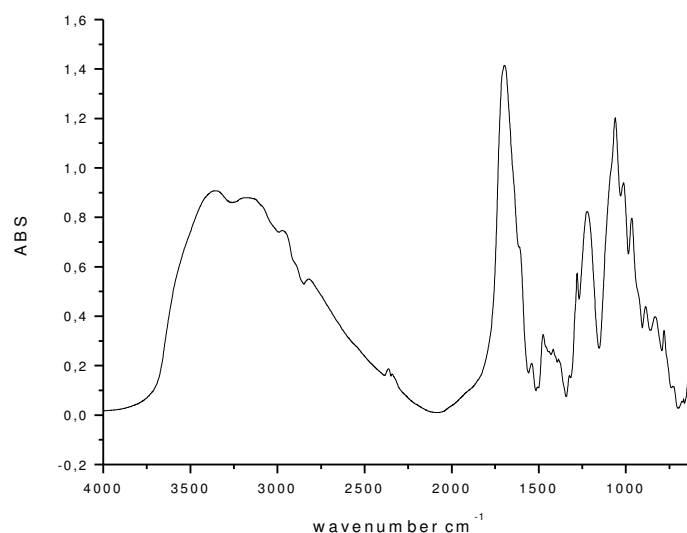


Fig. 4.6 Spettro di assorbimento IR di DNA nativo in KBr nella regione  $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$

Maggiori informazioni si possono poi ottenere nella regione  $800\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$  circa le vibrazioni dello zucchero e del gruppo fosfato in modo da poter conoscere la conformazione dello scheletro del DNA. Così un altro criterio IR per riconoscere la struttura del DNA nativo asciugato è la presenza di due bande intense e strette nel range delle vibrazioni  $1150\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  relative allo scheletro zucchero-fosfato. Una di esse, quella a  $1062\text{ cm}^{-1}$ , è attribuita alle vibrazioni di stretching simmetrico di  $\text{PO}_2^-$  e l'altra, a  $1030\text{ cm}^{-1}$ , è attribuita alle vibrazioni

del complesso  $O_5-C_4-C_5-O_4$  che fa parte dello scheletro zucchero-fosfato. Quando il DNA si denatura entrambe queste due bande si allargano e diminuiscono in intensità, in special modo quella relativa allo stretching simmetrico di  $PO_2^-$ . La banda attorno a  $1280\text{ cm}^{-1}$  rappresenta le vibrazioni di stretching antisimmetrico di  $PO_2^-$ .

Le bande verso gli  $800\text{ cm}^{-1}$  sono relative alle vibrazioni degli zuccheri, in particolare attorno ai  $950\text{ cm}^{-1}$  abbiamo un segnale indicativo di un forte accoppiamento zucchero-fosfodiesteri [Sukhorukov et al. (1996)] [Banyay et al. (2003)] [Braun et al. (2003)].

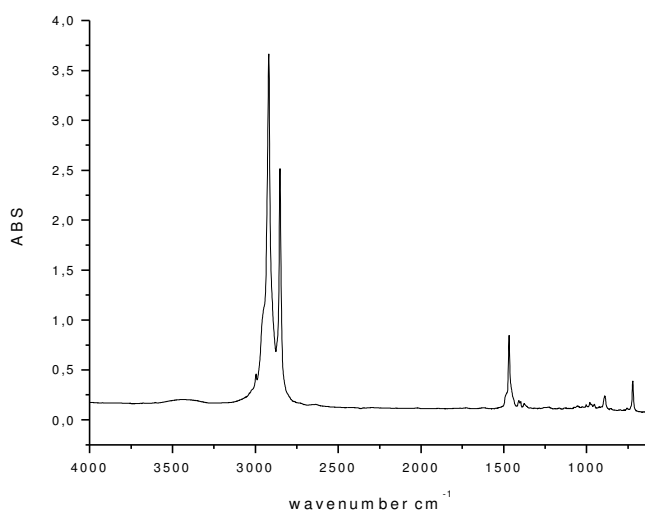


Fig. 4.7 Spettro di assorbimento FT-IR del DODAB in KBr nella regione  $4000-600\text{ cm}^{-1}$

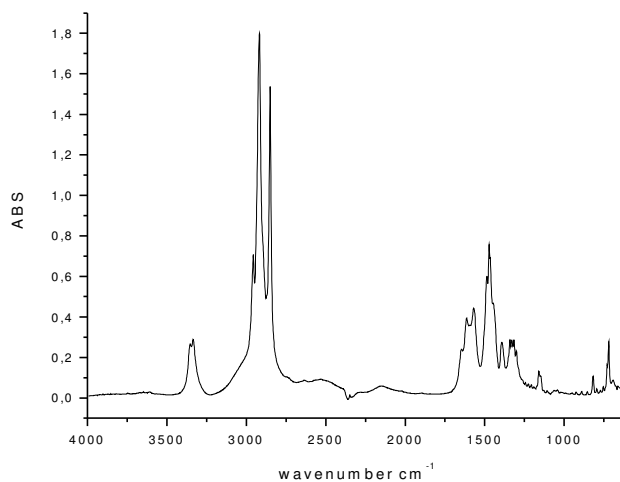


Fig. 4.8 Spettro di assorbimento FT-IR di ODA in KBr nella regione 4000-600  $\text{cm}^{-1}$

Come possiamo osservare nelle figure 4.7 e 4.8 rappresentanti gli spettri di ODA e DODAB in forma pura, i due lipidi cationici oggetto del nostro studio non presentano assorbimento IR nel range 1250-950  $\text{cm}^{-1}$  e nella regione del doppio legame del gruppo carbonilico attorno ai 1700  $\text{cm}^{-1}$  [Montrel et al.]. Nello spettro del DODAB in fig. 4.7 appaiono evidenti i due picchi a 2920 e 2851  $\text{cm}^{-1}$  indicatori dello stretching delle code, così come possiamo anche notare in fig. 4.8 nello spettro dell'ODA. Inoltre appaiono delle bande nella regione 1700-1250  $\text{cm}^{-1}$  relative a vibrazioni di bending per il legame C-H, di stretching per C-N e di bending per il legame N-H nell'ODA e nella regione 900-600  $\text{cm}^{-1}$  relative alle vibrazioni di bending fuori dal piano e rocking del legame C-H, di rocking del legame N-H nell'ODA e di stretching del legame C-C.

Un andamento del genere degli spettri dei lipidi ci permette di usare il criterio spettrale appena descritto per analizzare la conformazione del DNA nei film LB dei complessi. Infatti negli spettri dei complessi sarà comunque possibile vedere le bande significative del DNA nativo, non soggette a sovrapposizione.

#### **4.2.2 Discussione spettri FT-IR dei complessi ODA-DNA**

Lo spettro IR del DNA-ODA, come si può vedere dalla figura 4.9 presenta sia le bande del DNA che dell'ODA: questo significa che le molecole di DNA sono incluse nel complesso. Possiamo notare che gli spettri del film LB multistrato ha due intense e nette bande a 2920 e 2852  $\text{cm}^{-1}$  attribuite alle vibrazioni di stretching del  $\text{CH}_2$  dell'ODA e la banda a 1472  $\text{cm}^{-1}$  delle vibrazioni del bending del  $\text{CH}_2$ . I valori delle frequenze di vibrazioni dell'ODA nei film LB sono gli stessi che nelle compresse in KBr. Possiamo quindi escludere che le parti idrofobiche dell'ODA interagiscono con le molecole degli acidi nucleici.

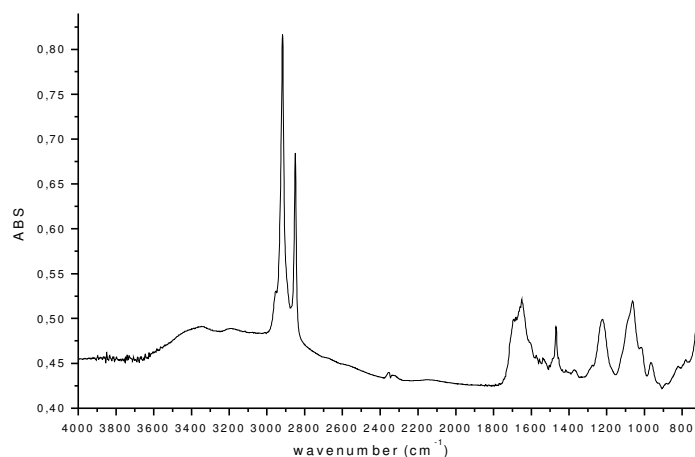


Fig. 4.9 spettri FT-IR del complesso ODA-DNA nella regione 4000-600  $\text{cm}^{-1}$

Lo spettro del film LB DNA-ODA (vedi fig. 4.8) però non ha la banda a  $1692 \text{ cm}^{-1}$  caratteristica del DNA nativo ma presenta la banda attorno a  $1660 \text{ cm}^{-1}$  attribuibile al DNA ss, dovuta soprattutto alle vibrazioni di stretching di C6=O6 della guanina libera, C2=O2 della timina libera e C4=O4 della timina. Inoltre le bande di assorbimento del gruppo  $\text{PO}_2^-$  e di  $\text{O}_5\text{-C}_4\text{-C}_5\text{-O}_4$  sono allargate e leggermente spostate rispetto allo spettro del DNA nativo e l'intensità e la frequenza delle vibrazioni antisimmetriche di  $\text{PO}_2^-$  diminuisce, in analogia allo spettro del DNA denaturato [Sukhorukov et al. (1996)].

Gli amminogruppi dell'ODA interagiscono con le molecole dell'acido nucleico e influenzano la loro struttura. Prima di tutto dobbiamo notare che gli amminogruppi di ODA si trasformano nella forma  $\text{NH}_3^+$  durante la formazione del complesso con l'acido nucleico, cosa che si riflette nei cambi spettrali: appare una banda di assorbimento larga a bassa intensità dei gruppi  $\text{NH}_3^+$  nella regione  $3500\text{-}2200 \text{ cm}^{-1}$  e le nette bande dell'ODA per le vibrazioni di stretching simmetrico e asimmetrico, correlate a  $\text{NH}_2$ , a  $3336$  e  $3150 \text{ cm}^{-1}$  scompaiono nello spettro del film LB DNA-ODA (vedi fig. 4.10). Questi cambi spettrali si hanno quando i gruppi  $\text{NH}_2$  di ammine alifatiche si trasformano in  $\text{NH}_3^+$ . La banda a  $1488 \text{ cm}^{-1}$  attribuibile alle vibrazioni di bending di  $\text{NH}_2$  scompare e appare una nuova banda a circa  $1535 \text{ cm}^{-1}$ . Questa banda è assente nello spettro del DNA nativo, così possiamo assegnarla alle vibrazioni di bending dei gruppi dell'ODA  $\text{NH}_3^+$ .

Di conseguenza i gruppi  $\text{PO}_2^-$  del DNA sono legati con gruppi  $\text{NH}_3^+$  degli strati di ODA. Il legame tra questi due gruppi è molto forte perché è dovuto ad interazioni elettrostatiche ma anche a legami idrogeno. Possiamo notare uno spostamento della banda relativa alle vibrazioni di stretching antisimmetrico di  $\text{PO}_2^-$  da 1280 a 1220  $\text{cm}^{-1}$ . Quindi la costruzione del complesso DNA-ODA è dovuta ai forti legami tra  $\text{PO}_2^-$  e i gruppi  $\text{NH}_3^+$  e anche ai legami idrogeno tra i gruppi C=O degli acidi nucleici e i gruppi  $\text{NH}_3^+$  delle ammine alifatiche.

Arriviamo a questa conclusione perché la frequenza delle vibrazioni di C=O nel DNA (1660  $\text{cm}^{-1}$ ) è più alta della corrispondente frequenza nei film LB del complesso DNA-ODA. Tale spostamento della frequenza per la vibrazione di stretching dei gruppi C=O degli acidi nucleici mostra che essi partecipano ai legami idrogeno con le molecole di ODA. Come si può vedere gli spettri delle bande del film multistrato del complesso differiscono fortemente dallo spettro del DNA nativo nelle regioni delle vibrazioni dei gruppi fosfato (1250-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) e delle vibrazioni delle basi nucleiche (1550-1720  $\text{cm}^{-1}$ ).

Il fatto che lo spettro DNA-ODA sia simile a quello del DNA single stranded ci permette di confermare il fatto che il DNA nativo si dispieghi durante la fabbricazione del film LB e non abbia più una struttura secondaria. La ragione dello stato dispiegato del DNA in questo complesso sono i legami idrogeno tra i gruppi  $\text{NH}_3^+$  delle ammine alifatiche e i gruppi C=O delle basi nucleiche, tutto ciò interferisce con l'accoppiamento delle basi nucleiche [Sukhorukov et al. (1995)], [Sukhorukov et al. (1996)].

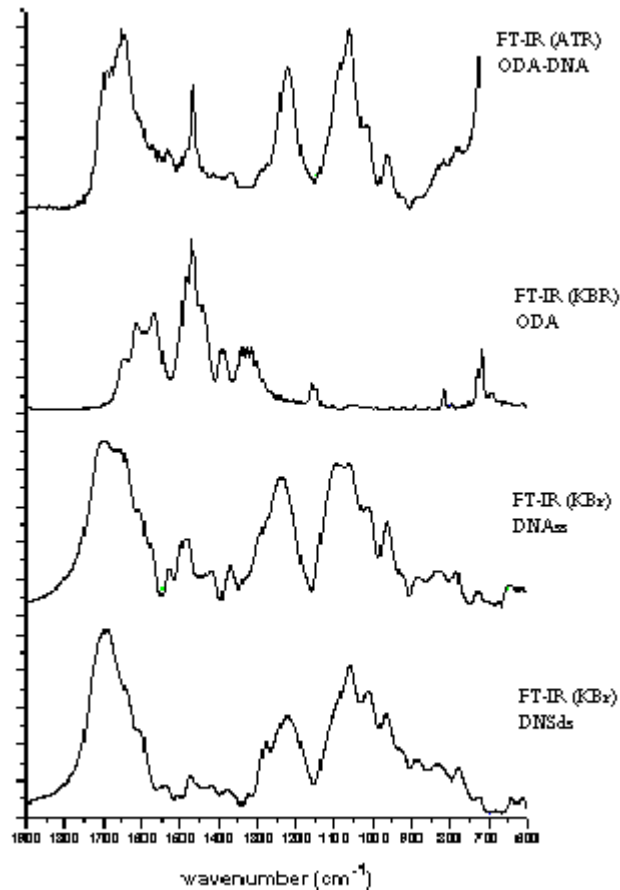


Fig. 4.10 spettri FT-IR di (dal basso verso l'alto) DNA ds, DNA ss, ODA e del complesso ODA-DNA nella regione 1800-600 cm<sup>-1</sup>

### 4.2.3 Discussione spettri FT-IR dei complessi DODAB-DNA

Da fig. 4.11 notiamo che nel complesso DODAB-DNA appaiono ancora i due picchi a 2920 e 2851 cm<sup>-1</sup> indicatori dello stretching delle code proprio come nel DODAB puro, le due code idrofobiche non vengono quindi modificate nell'interazione con il DNA. Possiamo quindi intuire che le parti idrofobiche del lipide non interagiscono con le molecole degli acidi nucleici.

Lo spettro IR del film multistrato (vedi fig. 4.12) per il complesso DNA-DODAB ha una distinta banda a circa 1690 cm<sup>-1</sup> relativa alle vibrazioni del gruppo carbonilico delle basi impilate, dovuta allo stretching di C=O delle coppie appaiate di guanina assieme allo

stretching di C2=O2 di timina. È mantenuta la forma specifica del doppietto di bande di assorbimento nella regione 1200-1000  $\text{cm}^{-1}$  in corrispondenza delle vibrazioni dello scheletro zucchero-fosfato (quella attorno a 1060  $\text{cm}^{-1}$  è attribuita alle vibrazioni di stretching simmetrico di  $\text{PO}_2^-$  e l'altra, a 1030  $\text{cm}^{-1}$ , è attribuita alle vibrazioni del complesso  $\text{O}_5\text{-C}_4\text{-C}_5\text{-O}_4$  che fa parte dello scheletro zucchero-fosfato). Notiamo però assieme alla banda tipica del DNA nativo attorno ai 1690  $\text{cm}^{-1}$  anche una banda attorno a 1650  $\text{cm}^{-1}$  attribuibile allo stretching di C2=O2 della citosina accoppiata (potrebbe anche essere libera ma la banda dovrebbe essere molto intensa).

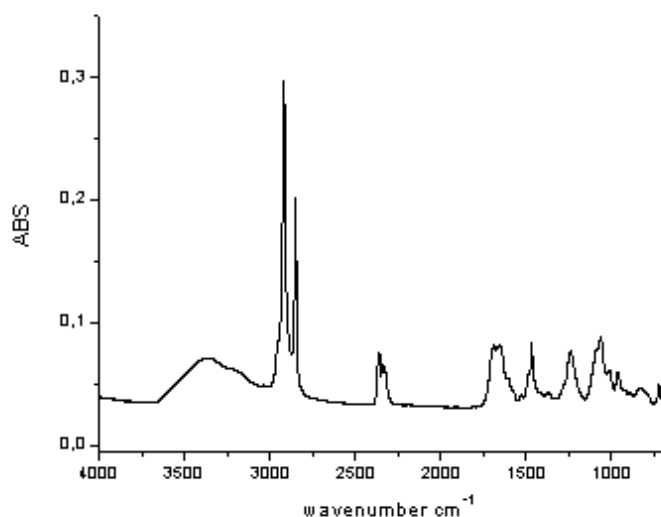


Fig. 4.11 spettri FT-IR del complesso DODAB-DNA nella regione 4000-600  $\text{cm}^{-1}$

Come già abbiamo detto una delle questioni interessanti è la conformazione del DNA all'interno del complesso, come si può vedere gli spettri delle bande del film multistrato del complesso indicano che le molecole di DNA mostrano le stesse caratteristiche spettrali del DNA nativo nel complesso DNA-DODAB, cioè il DNA presenta la conformazione a doppia elica nel complesso con il DODAB. [Sukhorukov et al. (1995)], [Sukhorukov et al. (1996)].

Le macromolecole di DNA non sembrano penetrare nella parte idrofobica del monostrato lipidico del DODAB come evidenziato dal fatto che l'area di gruppo limite per il lipide aumenta notevolmente soltanto in presenza del DNA (vedi fig. 4.3). Invece esso interagisce elettrostaticamente con il gruppo di testa del monostrato. La formazione dei legami idrogeno

in questo complesso è impossibile per questo il DNA mantiene la conformazione nativa. Il grande aumento nell'area di gruppo limite osservata in presenza del DNA può essere dovuta ad un aumento del disordine nel monostrato lipidico cationico. Interagendo con il DNA, il film di DODAB diventa sempre più fluido.

Si può quindi suggerire che l'interazione primaria tra l'acido nucleico, carico negativamente, e il DODAB, lipide cationico, nel complesso sia solamente di natura elettrostatica e avvenga tra i fosfati carichi negativamente costituenti lo scheletro dell'acido nucleico e le teste di gruppo cariche positivamente del lipide. La formazione di legami idrogeno in questo complesso non è possibile, così come non è possibile la protonazione del DODAB possiamo infatti notare in fig. 4.11 che non compare una grande banda a basso assorbimento nella regione  $3500-2200\text{ cm}^{-1}$  indicativa della presenza di gruppi  $\text{NH}_3^+$ .

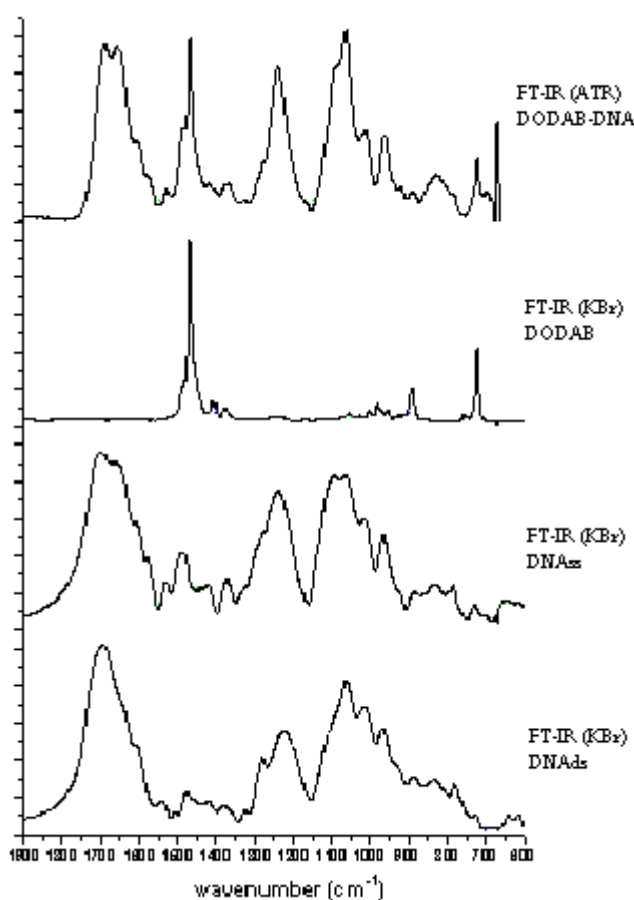


Fig. 4.12 spettri FT-IR di (dal basso verso l'alto) DNA ds, DNA ss, DODAB e del complesso DODAB-DNA nella regione  $1800-600\text{ cm}^{-1}$

Per questi motivi il DNA nell'impilamento delle basi. Per capire in modo più approfondito l'interazione tra DNA e DODAB possiamo studiare anche la regione degli spettri caratteristica per lo scheletro del DNA. Notiamo nel complesso un aumento in intensità della banda attorno ai  $1250\text{ cm}^{-1}$  rispetto allo spettro del DNA nativo e anche in quella attorno a  $1060\text{ cm}^{-1}$  oltre all'apparire di un picco attorno ai  $1100\text{ cm}^{-1}$ . Attorno ai  $650\text{ cm}^{-1}$  appare un picco. mantiene la sua conformazione a doppia elica

Sembra chiaro comunque che le interazioni DNA-lipide si estendano oltre l'accoppiamento elettrostatico tra la testa di gruppo lipidica e lo scheletro di fosfato, ad interazioni che possono produrre alterazioni

## Conclusioni

L'attività svolta in laboratorio mi ha permesso di prendere confidenza con la tecnica di Langmuir-Blodgett e con lo spettrofotometro IR a Trasformata di Fourier, consentendomi di approfondire le problematiche che possono insorgere nel formare un monostrato, nel depositarlo e nell'effettuarne lo studio IR. Ho così imparato gli accorgimenti più adeguati riguardo a pulizia del trough, dissoluzione del surfactante, scelta opportuna del substrato e della pressione di superficie, deposizione di Langmuir-Schaefer; oltre alle condizioni ottimali per effettuare gli spettri infrarossi dei film, preferendo la tecnica ATR a quella, usata inizialmente, in trasmissione.

È stata osservata la formazione dei complessi ODA-DNA e DODAB-DNA studiandone le isoterme  $\Pi$ -A e confrontandole a quelle del monostrato lipidico su subfase senza DNA. È stato così notato il diverso andamento delle isoterme: in presenza di DNA in subfase entrambe le isoterme diventano più soffici ed inoltre sviluppano pressione già a maggior area per molecola ma il monostrato di ODA su DNA nella fase solida torna ad avere la stessa area per molecola che aveva su subfase senza DNA, diversamente dal DODAB.

Sulla base dei risultati anche di altre tecniche (XRR) sono stati proposti due modelli diversi per l'interazione di ODA con DNA e di DODAB con DNA: mentre il primo forma complessi in cui il DNA è denaturato, cioè a singola elica, il secondo sembra formare complessi in cui il

DNA conserva la struttura nativa a doppia elica ed è attaccato solo per via elettrostatica.

Scopo primario del lavoro è stato di convalidare questi due modelli facendo uso della spettroscopia IR. Un'interpretazione possibile dei due diversi modi di interazione di ODA e DODAB con il DNA sta nella possibilità dell'ODA di protonazione e di formare legami idrogeno, diversamente dal DODAB che può soltanto interagire elettrostaticamente con il DNA. Per confermarla sono stati osservati negli spettri FT-IR del DODAB, ODA e DNA nativo i picchi caratteristici relativi a stretching delle code per i lipidi cationici e a stretching del doppio legame C=O nelle basi azotate e dei gruppi fosfato per l'acido nucleico. Quindi sono stati rilevati gli spettri dei complessi DNA-DODAB e DNA-ODA, osservando nel primo un sostanziale mantenimento dei picchi caratteristici dei componenti di partenza e nel secondo uno spostamento dei picchi caratteristici per il DNA-n, a indicare denaturazione, e per i gruppi fosfato in concomitanza alla comparsa di nuove bande relative al gruppo  $\text{NH}_3^+$  e alla scomparsa di bande per il gruppo di testa  $\text{NH}_2$ .

I nostri risultati supportano il modello in cui si ipotizza che il DNA conservi la sua struttura a doppia elica nei film LB con il DODAB e, viceversa, si denaturi nei film multistrato LB con ODA.

Tale risultato suggerisce che il DNA nei film dei complessi con il DODAB possa servire come un efficace biosensore capace di intercalazione nella doppia elica del DNA.

## Bibliografia

- [1] Roberts G. (1990), *Langmuir-Blodgett Films*, New York, Plenum Press
- [2] Cristofolini, L. *Densità spettrale dell'emissione di corpo nero.*  
<[http://www.fis.unipr.it/gigi/dida/Lab\\_Fis\\_Mod\\_I/lezione\\_corpo\\_nero.pdf](http://www.fis.unipr.it/gigi/dida/Lab_Fis_Mod_I/lezione_corpo_nero.pdf)>
- [3] Jones, R. A. L (2002) *Soft condensed matter*, New York, Oxford University Press
- [4] Troitski, V.I. (1999) "Methods of deposition of molecular organized thin films"

- [5] G.B. Sukhorukov, M.M. Montrel, A.I. Petrov, L.I. Shabarchina, B.I. Sukhorukov. Multilayer films containing immobilized nucleic acids. Their structure and possibilities in biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* vol. 1: 913-922 (1996)
- [6] M. Cardenas, T. Nylander, B. Jonsson, B. Lindman. The interaction between DNA and cationic lipid films at the air-water interface. *Journal of colloid and Interface Science* 286: 166-175 (2005).
- [7] G.B. Sukhorukov, L.A. Feigin, M.M. Montrel, B.I. Suchorukov X-ray and infrared study of Langmuir-Blodgett films of the complexes between nucleic acids and aliphatic amines *Thin solid films* 259:79-84 (1995)
- [8] T. Berzina, L. Cristofolini, S. Erokhina, V. Erokhin, M.P. Fontana Detection of DNA splitting after complexation with ODA and lipids by FT-IR spectroscopy (2007)
- [9] S. Folloni Lezione 20/06/07 sul DNA (2007)
- [10] Hollas J.M.(1993), *Modern Spectroscopy*, Chicester, John Wiley and Sons
- [11] S. Erokhina, T. Berzina, L. Cristofolini, O. Konovalov, V. Erokhin, M.P. Fontana Interaction of DNA Oligomers with Cationic Lipidic Monolayers: Complexation and Splitting. *Langmuir* 23:4414-4420 (2007)
- [12] J. Giermanska Kahn, F. Monroy, C. Mingotaud Adsorption of large inorganic polyanions under a charged Langmuir monolayer: an ellipsometric study. *PCCP* 5:2648-2652 (2003)

- [13]A. Tronin, V. Shapovalov Ellipsometric model for two-dimensional phase transition in Langmuir monolayers. *Thin solid films* 313-314:785-789 (1998)
- [14]L.G Tomas Eriksson, Per M. Claesson, S. Ohnishi, M. Hato Stability of dimethyldioctadecylammonium bromide Langmuir-Blodgett films on mica in aqueous salt solutions-implications for surface force measurements. *Thin solid films* 300:240-255 (1997)
- [15]Per Claesson, A.M Carmona-Ribeiro, K. Kurihara Dihexadecyl phosphate monolayers: intralayer and interlayer interactions. *Journal of Physical Chemistry* 93:917-922 (1989)
- [16]J. Marra Effects of Counterion Specificity on the interactions between quaternary ammonium surfactants in monolayers and bilayers. *Journal of physical Chemistry* 90:2145-2150 (1986)
- [17]M.M. Montrel, G.B. Sukhorukov, A.I. Petrov, L.I. Shabarchina, B.I. Sukhorukov Spectroscopic study of thin multiplayer films of the complexes of nucleic acids with cationic amphiphiles and polycations: their possible use as sensor elements. *Sensors and Actuators B* 42: 225-231 (1997)
- [18]C.S. Braun, G.S. Jas, S. Choosakoonkriang, G.S. Koe, J.G. Smith, C.R. Middaugh the structure of DNA within cationic Lipid/DNA Complexes. *Biophysical Journal* 84:1114-1123 (2003)
- [19]M. Banyay, M. Sarkar, A. Graslund A library of IR bands of nucleic acids in solution. *Biophysical Chemistry* 104:477-488 (2003)

[20]L.I. Shabarchina, M.M Montrel, G.B. sukhorukov, B.I. Sukhorukov The structure of multiplayer films of DNA-aliphatic amine is preparation technique dependent.

Thin solid films 440 217-222 (2003)

[21]L. Cristofolini, T. Berzina, S. Erokhina, O. Konovalov, V. Erokhin Structural study of the DNA Dipalmytoylphosphatidylcholine complex at the air-water

interface. Biomacromolecules 8:2270-2275 (2007)

## Ringraziamenti

Desidero in primo luogo ringraziare chi mi è stato di aiuto in laboratorio: il professor Luigi Cristofolini, la professoressa Tatiana Berzina e tutto il gruppo di ricerca di materia soffice e condensata dell'Università di Parma per la disponibilità, l'umanità e il supporto materiale e morale. Grazie anche a Matteo, mio compagno di tirocinio, per tutti i consigli e la compagnia.

Un GRAZIE enorme va ai miei genitori, che mi hanno sempre spinto e sostenuto, avvolgendomi di affetto, e assieme a loro grazie a tutta la mia numerosissima famiglia: nonna Gelsomina, zii, zie e cugini.

Grazie a Luca per tutta la pazienza di cui è capace, il bene che mi vuole e il modo in cui mi sta accanto.

Grazie a tutti gli amici con cui sono cresciuta e con cui continuerò a crescere per i bei momenti, le risate, le serate e le vacanze: di Castione, di Fidenza, del CLU e tutti gli altri; vorrei potervi nominare uno a uno ma per motivi di spazio non è possibile. Grazie ai coristi di Santa Margherita, il maestro Romano innanzitutto, i quali davvero mi hanno insegnato che “cantare è vivere”. Grazie a tutti i miei super compagni di corso: l'avventura non sarebbe stata così bella senza di voi. Grazie a Fabio, Eleonora, Frà e Chià,

Paolo G., Andrea, Alberto e Angelo, Fede e Davide, Elena e Marco; Paolo L.; Lollo e Sam. Grazie anche agli “amici STM”: Ago, Vale, Chiara, Veronica. Grazie infine a chi, studente più grande di me, mi ha dato consigli e supporto: Cilo, Giacomo G. e Valentina C. in primis assieme a tanti altri.