

Riassunto della tesi di laurea magistrale

(Sessione novembre-dicembre 2022)

Studio di un prototipo di biosensore mirato allo *screening* di farmaci antitumorali

Candidato: Lorena Elena Bobeica

Relatori: prof. Marco Piumetti
prof.ssa. Valentina Alice Cauda

La lattato deidrogenasi (*h*LDH) è un importante enzima della via metabolica anaerobica umana che appartiene alla classe delle ossidoreduttasi. Le isoforme dell'enzima, da *h*LDH-1 a *h*LDH-5, ognuna delle quali caratterizzata da diverse subunità, vengono espresse diversamente nei vari tessuti. Molti farmaci antitumorali concentrano la loro azione sull'inibizione delle subunità e degli isoenzimi di LDH responsabili dell'effetto Warburg. Si tratta di un fenomeno ricorrente nelle cellule tumorali dove, a differenza di un organismo sano, si verifica una "glicolisi aerobica", ovvero una glicolisi che opera nonostante la presenza di sufficiente ossigeno, a causa di una sovra espressione di *h*LDH-5. In particolare, la funzione principale di questa isoforma dell'enzima, costituita da quattro subunità A, è quella di catalizzare la conversione reversibile del piruvato in lattato con l'ossidazione del NADH in NAD⁺.

Lo scopo di questa tesi è l'elaborazione e lo studio di una tecnica di immobilizzazione e delle condizioni operative ottimali al fine di progettare un prototipo di biosensore in grado di fornire informazioni sull'attività dell'enzima e sull'efficienza dei farmaci antitumorali.

Le prime informazioni necessarie per confrontare l'enzima libero con quello immobilizzato riguardano la temperatura ed il pH operativi ottimali. Questi sono testati in un intervallo da 25 a 65°C e pH da 5 a 11. Un metodo efficiente per valutare la massima attività dell'enzima consiste nel misurare la conversione di NADH a NAD⁺ attraverso la variazione di assorbanza in 60 s a una lunghezza d'onda di 340 nm. Il saggio si svolge in presenza di una concentrazione di piruvato 1,63 mM e di NADH 0,23 mM. Il passaggio successivo è l'immobilizzazione dell'*h*LDH-A al fine di migliorarne la stabilità e consentire il riutilizzo del biocatalizzatore. *h*LDH-A è stato immobilizzato su una silice mesoporosa (MCM-41) precedentemente funzionalizzata con gruppi amminici e/o gliossilici al fine di consentire un'adeguata interazione chimica con legami covalenti tra i gruppi funzionali sulla superficie del supporto ed i terminali amminoacidici dell'enzima. Questo materiale è stato scelto per la sua elevata superficie specifica e per la presenza di gruppi silanolici che consentono il processo di funzionalizzazione post-sintesi. Nel processo di etero-funzionalizzazione, i reagenti GPTMS e APTES sono stati utilizzati per la formazione di gruppi funzionali sia aldeidici che amminici, mentre per il processo di mono-funzionalizzazione si è utilizzato il solo reagente APTES, determinando la formazione di soli gruppi amminici. Il primo step, che implica una reazione di 5 ore in eccesso di toluene, è comune ad entrambe le tecniche, mentre sono necessari due ulteriori passaggi nel processo di etero-funzionalizzazione: uno in soluzione acquosa di H₂SO₄ 0,1 M per la formazione di dioli ed in seguito in soluzione di NaIO₄ 0,1 M dove i dioli vengono ossidati a gruppi aldeidici. Per entrambi i supporti funzionalizzati è stato sviluppato un processo di caratterizzazione che prevede una valutazione quantitativa dei gruppi effettivi generati sulla matrice; i gruppi aldeidici sono stati analizzati attraverso l'interazione di periodato di sodio con KI, ottenendo un valore di 1,44 mmol/g di supporto, mentre i gruppi amminici sono stati fatti reagire con una soluzione di CuSO₄ in modo da sfruttare l'interazione dei gruppi NH₂ con gli ioni rame, ottenendo un valore di 0,95 mmol/g di supporto. Ulteriori analisi mediante fisisorbimento di azoto a 77 K, XRD, FTIR e microscopia elettronica a trasmissione (HR-TEM) sono state effettuate per caratterizzare i supporti ottenuti.

Diversi tentativi di immobilizzazione sono stati eseguiti su supporto eterofunzionale in presenza e assenza di agenti stabilizzanti. In particolare, sono state utilizzate concentrazioni dello 50 ppm, 500 ppm, 1% e 5% w/v di Polietilenglicole (PEG) ed una soluzione di Trealosio 300 mM. Il processo di immobilizzazione consiste nella dispersione del supporto funzionalizzato in carbonato buffer pH 9 25 mM in presenza delle concentrazioni di PEG o Trealosio precedentemente citate e con una carica enzimatica di 1 mg_{enzima}/g_{supporto}. Una soluzione di NaBH₄ 0,1 M è stata utilizzata per ridurre le basi di Schiff a legami covalenti singoli.

L'immobilizzazione su supporto monofunzionale implica una fase di pre-attivazione con glutraldeide, sperimentata in concentrazioni di GA dell'1% e del 2,5% v/v al fine di valutare il più conveniente tra questi due. L'immobilizzazione in questo secondo caso è avvenuta in buffer sodio fosfato pH 7 25 mM con un carico

enzimatico di $2 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{supporto}}$. In entrambi i casi il processo di immobilizzazione è avvenuto ad una temperatura compresa tra i 4 ed i 10°C .

Sono state valutate la resa di immobilizzazione percentuale (I) e l'Attività residua (R_{act}), ottenendo dei valori compresi tra il 77% ed il 99% e tra il 7,2% ed il 24,8% rispettivamente. Una combinazione ottimale di questi due parametri è stata ottenuta per l'immobilizzazione con PEG 50 ppm su supporto eterofunzionale.

Una volta scelta la tecnica di immobilizzazione ottimale, la sua stabilità termica insieme a quella delle LDH libero è stata determinata in un lasso di tempo totale di 72 ore. La temperatura e il pH ottimali di esercizio ($\sim 40^{\circ}\text{C}$ e pH 5) sono stati misurati in modo simile all'enzima libero descritto in precedenza ed è stata eseguita un'immobilizzazione in fluorescenza, osservando come l'enzima sia evidenziato e facilmente distinguibile dal supporto nel canale del verde. Infine, sia l'enzima libero che quello immobilizzato in presenza di PEG 50 ppm sono stati testati per il processo di inibizione dovuto al farmaco antitumorale NHI-2 ottenendo percentuali di inibizione rispettivamente del 89,4% e del 35%.

Un ulteriore passo verso la progettazione del biosensore è il meccanismo applicato per valutare le informazioni sui farmaci antitumorali testati. Una delle possibili soluzioni potrebbe essere costituita da un biosensore elettrochimico in grado, grazie ad un elettrodo appositamente studiato, di sfruttare le reazioni redox che avvengono durante la conversione di piruvato a lattato e del NADH a NAD^{+} . Questa serie di reazioni di riduzione ed ossidazione porta a una quantità di elettroni trasferiti all'elettrodo di lavoro, direttamente proporzionale alla concentrazione di lattato ottenuto dalla reazione sopra citata nella soluzione analizzata e può quindi essere convertita in informazioni sull'efficienza con cui agisce l'inibitore di LDH. Per migliorare le prestazioni del biosensore è vantaggioso apportare alcune modifiche alla superficie dell'elettrodo impiegato. A tal fine sono state confrontate due strategie: una buona soluzione sembra essere costituita da un elettrodo di carbonio vetroso (GCE) modificato con Nafion: il primo di un gruppo di polimeri sintetici noti come ionomeri aventi proprietà ioniche. Il biosensore deve presentare un elettrodo contatore ed uno di riferimento costituiti rispettivamente da Pt e Ag/AgCl; una seconda soluzione potrebbe essere costituita da una matrice enzimatica intrappolata tra due membrane di policarbonato in serie ad un elettrodo di lavoro in Pt trattato anch'esso con Nafion. Come nel caso precedente è presente anche un elettrodo di riferimento in Ag/AgCl. Il segnale elaborato dal trasduttore elettrochimico viene amplificato ed infine processato su un display che ne permette la lettura.

Se il processo di immobilizzazione è stato studiato da un punto di vista sperimentale e sicuramente deve ancora essere ottimizzato, consistenti approfondimenti devono essere effettuati per il prototipo teoricamente studiato. Tuttavia, questa strategia potrebbe costituire uno spunto per future ricerche più dettagliate al fine di poter raggiungere lo scopo iniziale di questa tesi. Possedere questo tipo di informazioni sull'efficacia dei farmaci antitumorali potrebbe essere un punto di svolta nella ricerca farmaceutica e oncologica.