

## TUTORIAL NANOMEDICINA

### **Dosaggio proteine:**

Una delle possibilità per valutare l'effetto di farmaci o di np veicolanti farmaci, è quello di monitorare i livelli di alcune proteine coinvolte nella crescita tumorale, per vedere se c'è stata una loro inibizione dopo trattamento. Si effettua quindi un dosaggio di proteine, come un dosaggio colorimetrico delle proteine basato su acido bicinconinico: l'estratto proteico da un campione bio viene posto a contatto con ioni rameici e acido bicinconinico. Le proteine riducono gli ioni rameici a rameosi in ambiente basico e questi reagiscono con l'acido BCA per formare un complesso viola porpora, la cui intensità di colore viene misurata come assorbanza ad una lunghezza d'onda di 562 nm. Grazie alla preparazione di una curva standard di BSA è possibile determinare una concentrazione proteica da microgrammi a 2 mg/ml, così da consentire il dosaggio di tutte le proteine nel campione. Serve per definire la quantità di proteine da caricare su gel di elettroforesi, fare western blot e identificare le proteine di interesse in modo specifico.

### **Resistenza trans endoteliale:**

Una modalità per caratterizzare il modello in vitro di BBB è la misura della TEER, ovvero la resistenza elettrica trans endoteliale, che consente di valutare la funzionalità del modello di BBB senza danneggiare le cellule in tempo reale.

Tale misura viene fatta su cell endoteliali seminate in un sistema transwell (con due compartimenti: apicale e baso laterali, comunicanti mediante monolayer cellulare)

La misura della TEER viene effettuata utilizzando uno strumento a due elettrodi posti a cavallo del sistema transwell: il più lungo viene immerso nel sistema baso-laterale, il più corto nel terreno di crescita apicale. Si misura la resistenza del monolayer al passaggio di corrente.

Si effettua un calcolo per correggere il valore misurato per l'area del filtro e viene sottratto al valore di resistenza nei pozzetti dove sono presenti le cellule, quello della resistenza indotta dal filtro stesso, così da calcolare la resistenza elettrica netta associata al monolayer. Più è alto questo numero più buono è il modello: le cellule hanno formato un monolayer compatto utile per testare i farmaci a base di nanoparticelle.

Si ottiene un grafico di TEER ( $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ ) nel tempo: questa aumenta con la crescita delle cellule e l'arrivo a confluenza, fino a raggiungere un plateau, che indica il momento in cui si possono effettuare screening per il passaggio di farmaci attraverso BBB.

### **Living cells imaging:**

Caratterizzazione di una linea cell immortalizzata (cellule umane endoteliali isolate da capillari cerebrali) usata per costruire modelli in vitro di BBB.

Si visualizza le cellule mediante microscopia confocale: le cellule vengono seminate in multiwell nere da 96 pozzette per proteggere la fluorescenza delle probe utilizzati.

Una volta piastrate vengono messe in incubazione per promuovere crescita e raggiungimento della confluenza. Si aggiunge un colorante detto falloidina, che consente di visualizzare i filamenti di actina nelle cellule: questo rende rossi i filamenti e permette di determinare la struttura citoscheletrica della cellula.

Finita l'incubazione si aggiunge il colorante DAPI utile per marcare i nuclei.

Si posiziona la piastra in uno strumento automatizzato che consente di distinguere falloidina e nuclei così da avere un'immagine delle cellule in vivo.

### **SDS PAGE e WB:**

Necessarie per identificare proteine diversi e valutare il loro livello semi quantitativo.

L'SDS page è un'elettroforesi denaturante, che si basa sulla capacità di SDS di conferire una carica e denaturare le proteine in modo da consentire la loro migrazione solo in base alla carica.

Vengono anche denaturate con beta-mercaptoetanolo.

Il campione proteico viene colorato con blu comassie per poterlo seguire su gel. Si usa un gel prepolimerizzato con pozzetti di caricamento % di acrilammide-bisacrilammide che varia da 4-12% per separare proteine da 250 kDa a 4 kDa.

In seguito a corsa, le proteine vengono trasferite su membrana di nitrocellulosa o PBF per effettuare la western e immunorivelare le proteine di interesse. Si usano strumenti automatizzati che sfruttano un campo elettrico per il trasferimento.

Una volta recuperata la membrana dallo strumento di western blot si procede ad una colorazione aspecifica mediante rosso Ponso per verificare la presenza di proteine su membrana e avere la conferma del trasferimento.

Si procede con immunodecorazione: fase di blocking (saturazione di tutti gli spazi liberi con proteine fisiologiche), fasi di lavaggio, incubazione con ab primario che riconosce la proteina di interesse e incubazione con ab secondario che riconosce l'ab primario, coniugato con perossidasi di rafano che consente di identificare mediante chemiluminescenza il legame di interesse.

Si può identificare con il marker di pesi molecolari la proteina di interesse e quantificando l'intensità di nero delle bande si può avere una misura semi-quantitativa della molecola.