



HIGHLIGHTS TECNOLOGIE INNOVATIVE

a cura di Pierfausto Seneci - Dipartimento di Chimica organica - Università di Milano

Riprendiamo lo studio di processi cellulari, con sensibilità fino a livello di singole cellule. Se prima ci eravamo concentrati sull'osservazione di processi cellulari, oggi trattiamo di manipolazione cellulare attraverso approcci sintetici o tecnologie coinvolgenti la superficie delle cellule, studiata per comprendere meccanismi di riconoscimento fra cellule e fra gruppi di esse, oppure usata come "strumento" biotecnologico (ligand display).

È stata riportata (D. Rabuka *et al.*, *JACS*, 2008, **130**, 5947) l'inserzione "passiva" di glicopolimeri sintetici (**1-4**, Fig. 1), mimanti i glicopeptidi mucinici, che dopo incubazione si ancorano nelle membrane cellulari tramite catene fosfolipidiche naturali (**1, 2**), o catene lipofile sintetiche (**3, 4**). Un frammento fluorescente (presente in piccole quantità) ne permette la visualizzazione in cellule viventi. Questi glicopolimeri diffondono nei compartimenti cellulari (**1 e 2** meglio dei più "artificiali" **3 e 4**) e partecipano a riconoscimenti di membrana come le mucine naturali: ad esempio, cellule incubate con **1** legano l'agglutinina di *Helix pomatia* tramite α -N-acetilgalattosammina (presente in **1**), ma la stessa proteina non si lega con cellule incubate con **2**, che contiene β -N-acetilgalattosammina.

Un altro articolo (R. Kamitani *et al.*, *ChemBioChem*, 2009, **10**, 230) ha presentato la sintesi e la caratterizzazione di polimeri cationici (**5, 6, 8-10**, Fig. 2) e neutri (**7**, Fig. 2) come supporti per "ligand display" cellulare.

La presenza in proporzioni minime di un gruppo fluorescente FITC in R_2 permette il monitoraggio del polimero nelle cellule; il pendaglio oleilammidico R_1 funge da "ancora" lipofila per diffondere nelle cellule HeLa, mentre la sua abrogazione (**9**) riduce sensibilmente la diffusione stessa. I risultati più interessanti, però, sono legati alla sostituzione in R_3 . Polimeri cationici come **5** (ammina primaria) vengono internalizzati dalle cellule; infatti, la fluorescenza dopo incubazione con **5** (10 minuti) si addensa rapidamente nel citoplasma ed è assente sulla membrana. Il polimero alcoolico neutro **7** dopo incubazione non produce fluorescenza nelle cellule, dimostrando l'importanza di una carica positiva per l'interazione polimero-cellula. Sorprendentemente, l'alchilazione dell'ammina primaria (polimeri **6 e 9**) origina un polimero che, dopo incubazione con cellule

HeLa per 10 minuti, si localizza solo sulla superficie senza penetrare nel citoplasma; ciò è dovuto all'alchile su N, piuttosto che al gruppo OH, come dimostrato dall'analogo comportamento osservato con il polimero etilammidico **8**. Si è poi proseguito con il polimero (**10**) che contiene la biotina, in rapporto 1/24 con le catene etanolammidiche, al posto del frammento FITC; dopo aver verificato che il polimero **10** a MW 51.900 si mantiene "esposto" sulla membrana per il 25% dopo 2 ore d'incubazione e per il 10% dopo 12 ore, e dopo aver dimostrato che a $t=10$ minuti una cellula "mostra" sulla sua superficie circa 10^9 molecole di biotina (completa ricopertura della cellula, senza effetti negativi sulla vitalità cellulare fino ad almeno 24 ore!), gli autori hanno supportato queste cellule su superfici solide funzionalizzate con streptavidina, il binding partner della biotina. L'immobilizzazione è efficiente e specifica (nessun legame con superfici non funzionalizzate, o funzionalizzate con altre proteine), e si potrà usare per immobilizzare ogni tipo di cellule vitali, e senza dover usare solo cellule che esprimano sequenze adesive specifiche (peptidi RGD, fibronectina).

Un altro lavoro (S. Nagrath *et al.*, *Nature*, 2007, **450**, 1235) ha presentato una piattaforma microfluidica chiamata CTC-chip in grado di separare ed isolare dal sangue le cellule tumorali circolanti (CTC), indizzate come responsabili dell'incorrere di processi metastatici non trattabili; il chip contiene un gran numero di microposti (micropali in italiano?), nell'esempio specifico ricoperti da un anticorpo selettivo per cellule CTC di tumori epiteliali, e l'uso di condizioni di flusso laminare controllate per il passaggio del sangue nel chip ha consentito l'isolamento di cellule CTC dal sangue di 115 su 116 pazienti (>99%!!) con tumori epiteliali: è ovvia l'utilità (seppur restino inconvenienti da risolvere) di tali chips, soprattutto in campo diagnostico per una precoce identificazione di processi metastatici. Per finire, una review (J. Dobson, *Nature Nanotech.*, 2008, **3**, 139) ha illustrato la manipolazione di processi cellulari attraverso il legame di nanoparticelle magnetiche sulla loro superficie; un excursus storico nell'argomento, a partire dagli anni Venti (!!), culmina fino all'uso e l'adesione a microchips attivati magneticamente, ad applicazioni in medicina rigenerativa, e all'attivazione selettiva di canali ionici.

Vi rimando ad un ultimo appuntamento per parlare di modifiche drastiche della struttura cellulare utilizzando metodi chimici ma anche nanostrumenti raffinati, e di "protocellule" artificiali.

Figura 1

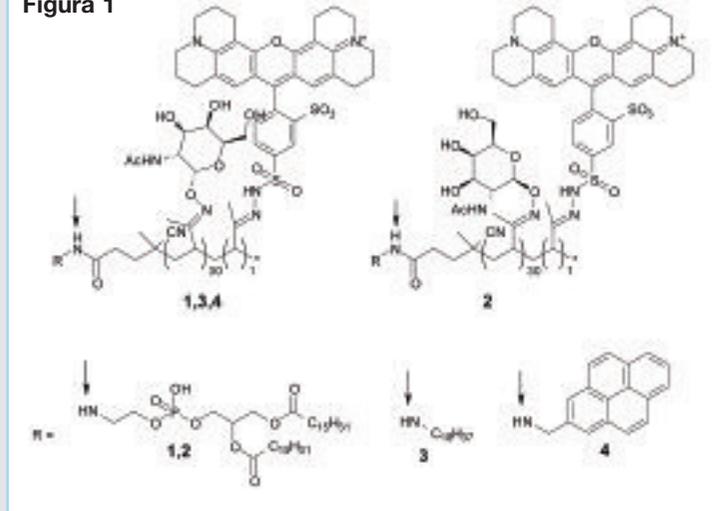


Figura 2

