

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Caratterizzazione di un setup miniaturizzato
per studi di elettrofisiologia**

Elaborato in:

Biochimica

Relatore

Prof. Emanuele Domenico Giordano

Presentata da

Marta Tossici

Correlatori

Prof. Marco Tartagni

Dott. Michele Rossi

Dott. Federico Thei

III Sessione

Anno Accademico 2012/2013

*Puoi arrivare da qualsiasi parte,
nello spazio e nel tempo,
dovunque tu desideri.*

Indice

Introduzione.....	1
La membrana cellulare e i canali ionici	3
1.1	Struttura e funzione della membrana cellulare..... 3
1.2	Fosfolipidi..... 4
1.3	Proteine di membrana..... 9
1.3.1	<i>Gramicidina A</i> 11
1.3.2	<i>α-Emolisina</i> 14
1.4	Potenziale elettrico di membrana..... 17
1.4.1	<i>L'equazione di Nernst</i> 20
Planar Lipid Bilayer	23
2.1	Artificial bilayers 23
2.2	Painted bilayers 24
2.3	Analogo elettrico del sistema 25
2.4	Setup sperimentale 27
2.4.1	<i>Planar Lipid Bilayer Workstation</i> 28
2.4.2	<i>Amplificatore miniaturizzato singolo canale</i> 32
2.4.3	<i>Microfluidica multicanale come supporto per BLM</i> 34
Caratterizzazione del sistema miniaturizzato.....	37
3.1	Rumore a vuoto 40
3.2	Rumore con capacità di test 44

Risultati sperimentali.....	49
4.1 Preparazione delle soluzioni e dei bilayers	49
4.2 Formazione del bilayer.....	50
4.3 Stima della capacità e dell'estensione del bilayer	51
4.4 Test con bilayer.....	52
4.5 Inserimento del canale proteico e analisi delle ampiezze delle correnti .	54
4.5.1 <i>Acquisizioni di canali di gramicidina A mediante l'amplificatore miniaturizzato</i>	56
4.5.2 <i>Studio della conduttanza della gramicidina A</i>	65
4.5.3 <i>Studio della conduttanza dell'α-emolisina</i>	68
Conclusioni	73
Bibliografia	75
Ringraziamenti	77

Introduzione

La messa a punto di tecniche come il *patch clamp* e la creazione di doppi strati lipidici artificiali (*artificial bilayers*) ha permesso di effettuare studi su canali ionici per valutarne la permeabilità, la selettività ionica, la dipendenza dal voltaggio e la cinetica, sia in ambito di ricerca, per analizzarne il funzionamento specifico, sia in quello farmaceutico, per studiare la risposta cellulare a nuovi farmaci prodotti. Tali tecniche possono essere inoltre impiegate nella realizzazione di biosensori, combinando così i vantaggi di specificità e sensibilità dei sistemi biologici alla veloce risposta quantitativa degli strumenti elettrochimici.

I segnali in corrente che vengono rilevati con questi metodi sono dell'ordine dei pA e richiedono perciò l'utilizzo di strumentazioni molto costose e ingombranti per amplificarli, analizzarli ed elaborarli correttamente.

Il gruppo di ricerca afferente al professor Tartagni della facoltà di ingegneria di Cesena ha sviluppato un sistema miniaturizzato che possiede molte delle caratteristiche richieste per questi studi.

L'obiettivo della tesi riguarda la caratterizzazione sperimentale di tale sistema con prove di laboratorio eseguite in uno spazio ridotto e senza l'impiego di ulteriori strumentazioni ad eccezione del PC. In particolare le prove effettuate prevedono la realizzazione di membrane lipidiche artificiali seguita dall'inserimento e dallo studio del comportamento di due particolari canali ionici comunemente utilizzati per questa tipologia di studi: la gramicidina A, per la facilità d'inserimento nella membrana e per la bassa conduttanza del singolo canale, e l' α -emolisina, per l'attuale impiego nella progettazione e realizzazione di biosensori.

Il presente lavoro si sviluppa in quattro capitoli di seguito brevemente riassunti.

Nel primo vengono illustrate la struttura e le funzioni svolte dalla membrana cellulare, rivolgendo particolare attenzione ai fosfolipidi e alle proteine di

membrana; viene inoltre descritta la struttura dei canali ionici utilizzati per gli esperimenti.

Il secondo capitolo comprende una descrizione del metodo utilizzato per realizzare i doppi strati lipidici artificiali, con riferimento all'analogo elettrico che ne risulta, ed una presentazione della strumentazione utilizzata per le prove di laboratorio.

Il terzo e il quarto capitolo sono dedicati all'elaborazione dei dati raccolti sperimentalmente: in particolare vengono prima analizzati quelli specifici dell'amplificatore, quali quelli inerenti il rumore che si somma al segnale utile da analizzare e la variabilità inter-prototipo, successivamente si studiano le prestazioni dell'amplificatore miniaturizzato in reali condizioni sperimentali e dopo aver inserito i canali proteici all'interno dei bilayers lipidici.

CAPITOLO I

La membrana cellulare e i canali ionici

1.1 Struttura e funzione della membrana cellulare

La membrana citoplasmatica rappresenta la barriera che separa ogni cellula vivente dall'ambiente circostante, controllando il traffico di sostanze tra l'interno e l'esterno.

Generalmente le membrane si compongono di un doppio strato costituito da fosfolipidi e da altri lipidi nel quale sono immerse numerose proteine. Tuttavia, ogni membrana presenta un'unica e specifica composizione di lipidi e proteine adatta allo svolgimento delle sue peculiari funzioni.

Al pari delle altre membrane biologiche, la membrana plasmatica è caratterizzata da permeabilità selettiva, ossia consente ad alcune sostanze di attraversarla più facilmente di altre. La capacità della cellula di controllare gli scambi chimici con l'ambiente è un aspetto cruciale per la vita stessa ed è proprio la membrana con le sue molecole costitutive che rende possibile tale selettività^[1].

La composizione dei due foglietti, esterno e interno, della membrana cellulare presenta notevoli differenze, non solo nella componente proteica, ma anche nella stessa componente lipidica, per cui la membrana plasmatica è caratterizzata da una marcata asimmetria, che riflette le differenti funzioni dei due monostrati.

Il passaggio di piccole molecole e ioni attraverso la membrana citoplasmatica avviene costantemente in entrambe le direzioni. Gli zuccheri, gli amminoacidi e gli altri nutrienti penetrano all'interno della cellula, mentre i rifiuti metabolici si muovono in senso opposto. La cellula assume l'ossigeno necessario per la respirazione cellulare ed espelle il biossido di carbonio. Essa controlla, inoltre, le

concentrazioni interne di ioni organici, quali Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- , trasportando questi in un senso o nell'altro attraverso la membrana citoplasmatica.

Il modello attualmente accettato e più comunemente usato per descrivere la membrana cellulare, è quello a mosaico fluido, nel quale la membrana è rappresentata da una struttura fluida con un mosaico di proteine immerse in un doppio strato fosfolipidico.

Per la sua posizione di interfaccia, la membrana plasmatica, oltre alla funzione strutturale, svolge altre funzioni essenziali, tra le quali quella di isolamento fisico, separando l'ambiente intracellulare da quello extracellulare, la funzione di filtro selettivo e quella di superficie di comunicazione.

1.2 Fosfolipidi

La membrana cellulare è composta da tre tipi principali di molecole anfipatiche: i fosfolipidi, gli sfingolipidi ed il colesterolo. Tutte le molecole lipidiche presenti nelle membrane cellulari possiedono un'estremità polare e idrofila ed un'altra non polare e idrofobica.

La quota maggiore è costituita dai fosfolipidi, i quali possiedono un gruppo di testa polare legato a due code di acidi grassi idrofobiche. Queste ultime possono essere insature, se presentano uno o più doppi legami, o sature se non ne possiedono.

Come mostrato in figura, ciascun doppio legame crea una piccola piega nelle code; queste differenze di saturazione e di lunghezza degli acidi grassi influenzano la capacità delle molecole fosfolipidiche di compattarsi tra loro, e di conseguenza la fluidità della membrana.

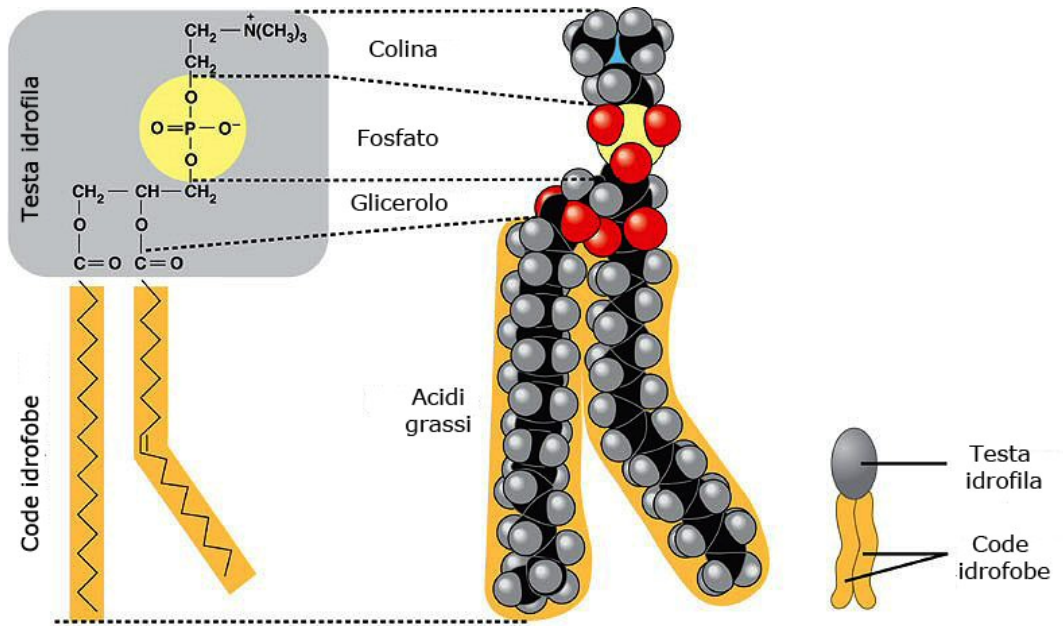


Figura 1.2.1 Struttura e simbolo di un fosfolipide, nel dettaglio si tratta di fosfatidilcolina.

In soluzione acquosa le molecole anfipatiche si orientano in modo che la testa polare interagisca con l'acqua, mentre le code apolari di acidi grassi si nascondano, mettendo le porzioni polari tra loro e l'acqua. L'associazione tra le molecole lipidiche è sostenuta da legami elettrostatici tra le teste e dai deboli legami di Van der Waals tra le catene alifatiche.

Tale disposizione porta alla formazione delle micelle, ovvero piccole gocce con un solo strato di fosfolipidi arrangiati in modo tale che l'interno sia riempito dalle code idrofobiche.

Una sospensione di fosfolipidi può dare luogo anche a liposomi, vescicole chiuse più grandi con una parete costituita da un doppio strato fosfolipidico. Questa disposizione lascia una cavità acquosa centrale, che può contenere molecole idrosolubili. I liposomi fungono, perciò, da modelli di membrane biologiche e possono essere utilizzati per veicolare e rilasciare farmaci all'interno di un organismo, in quanto possono essere assorbiti da numerose cellule, mediante fusione con la membrana plasmatica.

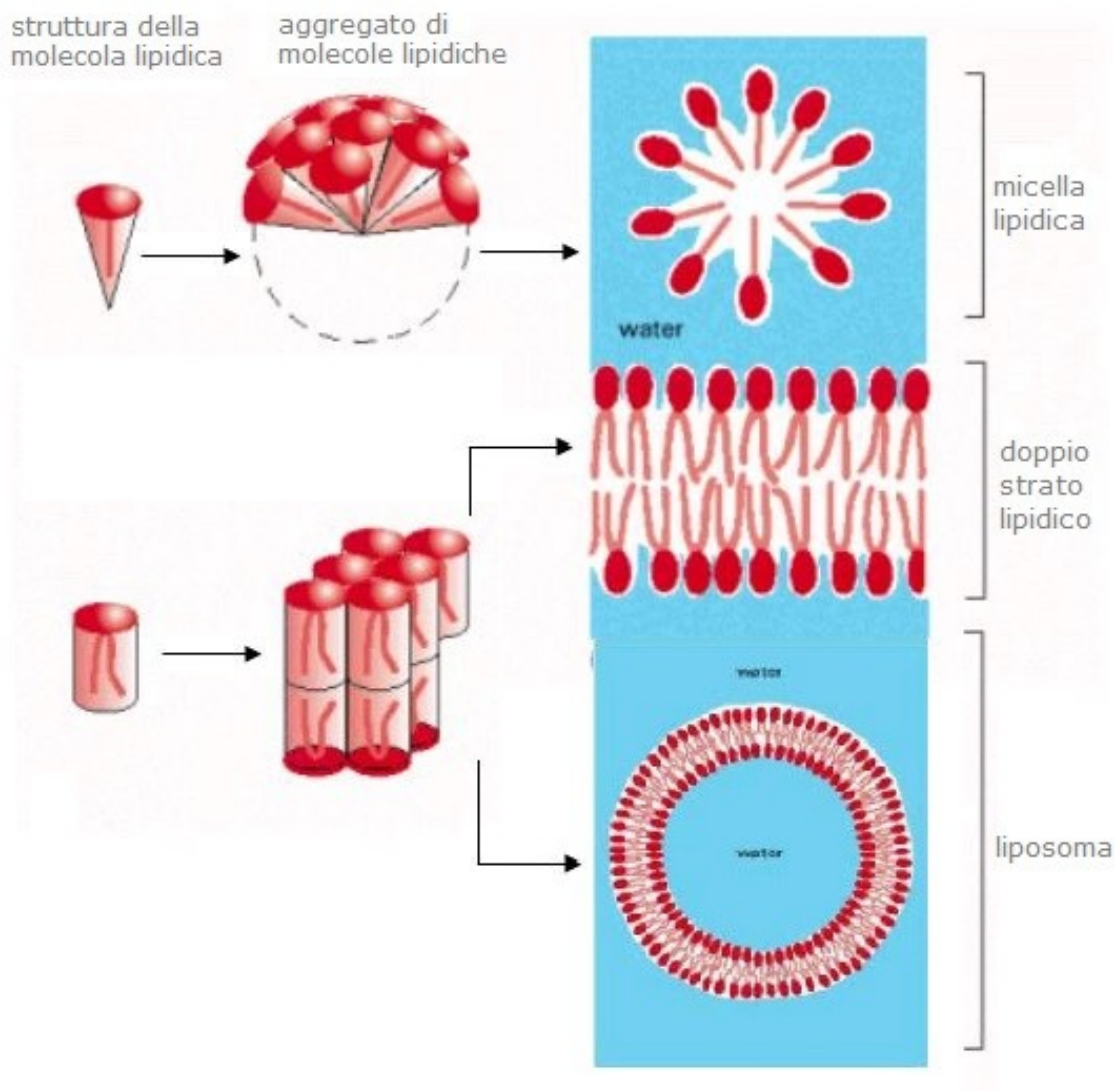


Figura 1.2.2 Tipologie di compattamento di lipidi in ambiente acquoso: micella lipidica e liposoma.

I principali fosfolipidi che predominano nelle membrane biologiche sono la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidilserina (PS), la fosfatidiletanolamina (PE) e la sfingomieline (fig. 1.2.3); complessivamente queste quattro specie lipidiche costituiscono oltre il 50% dei lipidi di membrana. A pH fisiologico le teste di fosfatidilserina e di fosfatidilinositolo hanno una carica complessiva negativa, mentre quelle di fosfatidilcolina, sfingomieline e fosfatidiletanolamina sono neutre. Nonostante queste differenze, le teste polari di tutti i fosfolipidi possono riunirsi insieme nella caratteristica struttura a doppio strato.

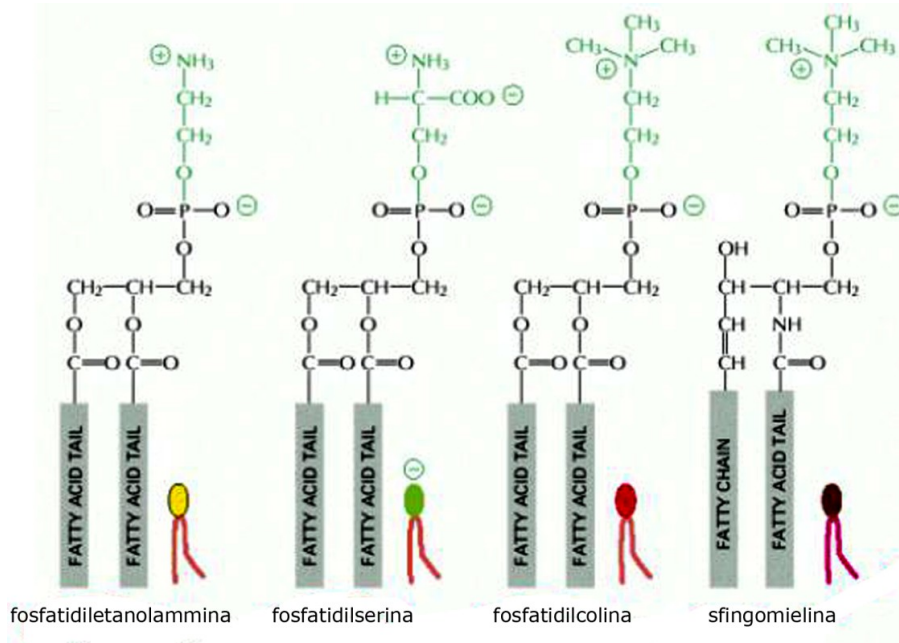


Figura 1.2.3 I quattro fosfolipidi principali presenti nelle membrane plasmatiche dei mammiferi, in ordine: fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, sfingomielina.

La stabilità di una membrana è dovuta principalmente alle interazioni idrofobe che sono molto più deboli rispetto ai legami covalenti. La maggior parte dei lipidi e alcune proteine possono spostarsi lateralmente, ossia nel piano della membrana (*diffusione laterale* in fig. 1.2.4). È tuttavia più difficile che una membrana si possa ribaltare trasversalmente (*flip-flop* in fig. 1.2.4), passando da uno strato fosfolipidico all'altro; questo tipo di spostamento prevede infatti che la porzione idrofila della molecola entri in contatto con il cuore idrofobo della membrana.

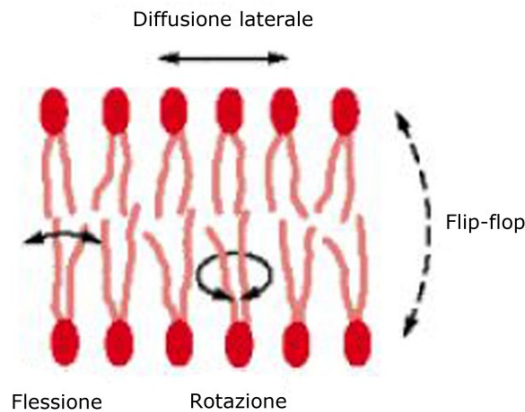


Figura 1.2.4 Mobilità dei fosfolipidi all'interno del bilayer.

La viscosità del doppio strato aumenta drasticamente nei pressi delle teste polari lipidiche, che hanno rotazioni limitate e mobilità più vincolata a causa delle interazioni tra le teste polari o cariche.

Le code idrofobiche dei lipidi non sono rigidamente organizzate, ma piuttosto si piegano e si interconnettono. Una tipica membrana biologica include numerose molecole lipidiche differenti, con code di lunghezza diversa oppure attorcigliate a causa della presenza di doppi legami. In condizioni fisiologiche, catene altamente mobili riempiono tutti gli spazi che si potrebbero formare tra i lipidi nella parte interna del doppio strato.

Quando un doppio strato lipidico viene raffreddato al di sotto di una temperatura di transizione caratteristica, va incontro ad una sorta di cambiamento di fase in cui si trasforma in un solido gelatinoso, con perdita della sua fluidità. Al di sopra della temperatura di transizione, i lipidi altamente mobili sono in uno stato noto come cristallo liquido poiché sono ordinati secondo alcune direzioni ma non rispetto ad altre. Solitamente, però, il doppio strato è più spesso nello stato di gel che in quello di cristallo liquido, per l'irrigidimento delle code idrocarburiche a temperature più basse.

La temperatura di transizione di un doppio strato aumenta con la lunghezza delle catene idrocarburiche e con il rispettivo grado di saturazione, per le medesime ragioni in base alle quali i punti di fusione degli acidi grassi aumentano con questa entità.

Le membrane plasmatiche eucariotiche contengono quantità particolarmente elevate di colesterolo, che ne regolano la fluidità: il suo sistema rigido ad anelli steroidei, infatti, interferisce con i movimenti delle catene idrocarburiche degli acidi grassi presenti negli altri lipidi di membrana (fig. 1.2.5).

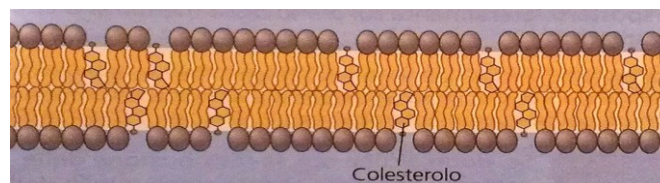


Figura 1.2.5 Il colesterolo all'interno della membrana riduce la fluidità del bilayer a temperature moderatamente elevate mediante diminuzione del movimento dei fosfolipidi. Al contrario, a temperature più basse impedisce la solidificazione della membrana, riducendo il regolare impaccamento dei lipidi.

Il colesterolo determina altresì un ampliamento dell'intervallo di temperatura della transizione di fase, e ciò grazie al fatto che inibisce la disposizione delle catene laterali di acido grasso inserendosi tra queste. Per questo motivo, il colesterolo ha un ruolo di modulatore della fluidità di membrana, opponendosi ai cambiamenti di fluidità indotti dalle variazioni di temperatura.

1.3 Proteine di membrana

Una membrana è un collage di proteine immerse nella matrice fluida del doppio strato fosfolipidico. Le esatte componenti lipidiche e proteiche, nonché il rapporto tra proteine e lipidi, variano con il tipo di membrana e con la relativa funzione da svolgere.

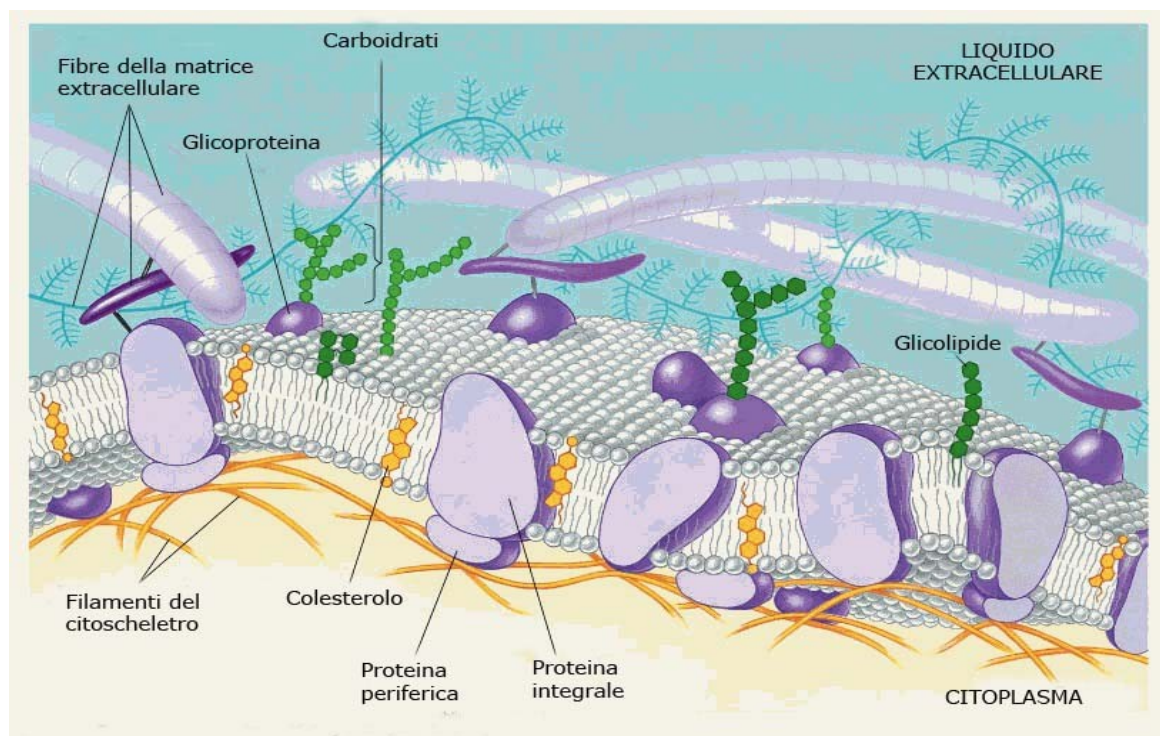


Figura 1.3.1 Modello a mosaico fluido della membrana plasmatica, con proteine integrali e periferiche

Come mostrato in figura 1.3.1, all'interno del doppio strato fosfolipidico, coesistono due popolazioni principali di proteine di membrana: le proteine integrali e quelle periferiche.

Le proteine *integrali* penetrano all'interno del cuore idrofobo del doppio strato lipidico. Molte di queste sono proteine transmembrana che attraversano tutto lo spessore della membrana; altre proteine integrali sono inserite solo parzialmente nel cuore idrofobo. Le regioni idrofobe di una proteina integrale sono costituite da uno o più segmenti ricchi di amminoacidi non polari, in genere avvolti a formare strutture ad α -elica. Le regioni idrofile della molecola sono esposte all'ambiente acquoso su entrambi i lati della membrana. Alcune proteine presentano centralmente un canale idrofilo che consente il passaggio di sostanze polari.

Le proteine *periferiche* non sono immerse nel doppio strato fosfolipidico; si tratta di appendici debolmente associate alla superficie della membrana, spesso ancorate alle regioni esposte delle proteine integrali.

In generale, il modo in cui la proteina di membrana si associa con il doppio strato lipidico riflette la funzione che essa svolge. Soltanto proteine transmembrana possono svolgere attività su entrambi i lati del doppio strato e trasportare molecole attraverso la membrana. I *recettori* della superficie cellulare sono proteine transmembrana che legano molecole di segnalazione nello spazio extracellulare e generano segnali cellulari differenti sul lato opposto della membrana plasmatica.

Nell'organismo la diffusione semplice attraverso le membrane è limitata alle molecole lipofile. La maggior parte delle molecole nell'organismo sono o lipofobiche o cariche elettricamente e quindi non possono attraversare le membrane per diffusione semplice. La grande maggioranza dei soluti attraversa i doppi strati lipidici con l'aiuto di proteine di membrana, un processo chiamato *trasporto mediato*. Se questo è passivo e sposta le molecole lungo il loro gradiente di concentrazione, e se il trasporto netto si arresta quando le concentrazioni sono uguali in entrambi i lati della membrana, il processo è noto come *diffusione facilitata*. Se, al contrario, è mediato da proteine e richiede energia dall'ATP o da un'altra fonte esterna spostando una sostanza contro il suo gradiente di concentrazione, allora viene detto *trasporto attivo*.

Le proteine di trasporto possono essere di due tipi: le proteine canale e i trasportatori. Le prime forniscono semplicemente dei corridoi idrofili che permettono ad uno specifico ione o molecola polare di attraversare molto

rapidamente la membrana da una parte all'altra, mentre le proteine trasportatrici si legano a substrati specifici e li trasportano attraverso il doppio strato cambiando conformazione ed evitando sempre una connessione diretta tra liquido intracellulare ed extracellulare.

I *canali ionici* funzionano come canali ad accesso regolato che si aprono o si chiudono in risposta ad uno stimolo elettrico o chimico. In quest'ultimo caso lo stimolo è dato da una sostanza diversa da quella che deve essere trasportata. I canali possono essere attivati transitoriamente da vari stimoli, come stress meccanici, ligandi, potenziale transmembrana. Di seguito è riportata l'immagine di canali attivati dai diversi stimoli.

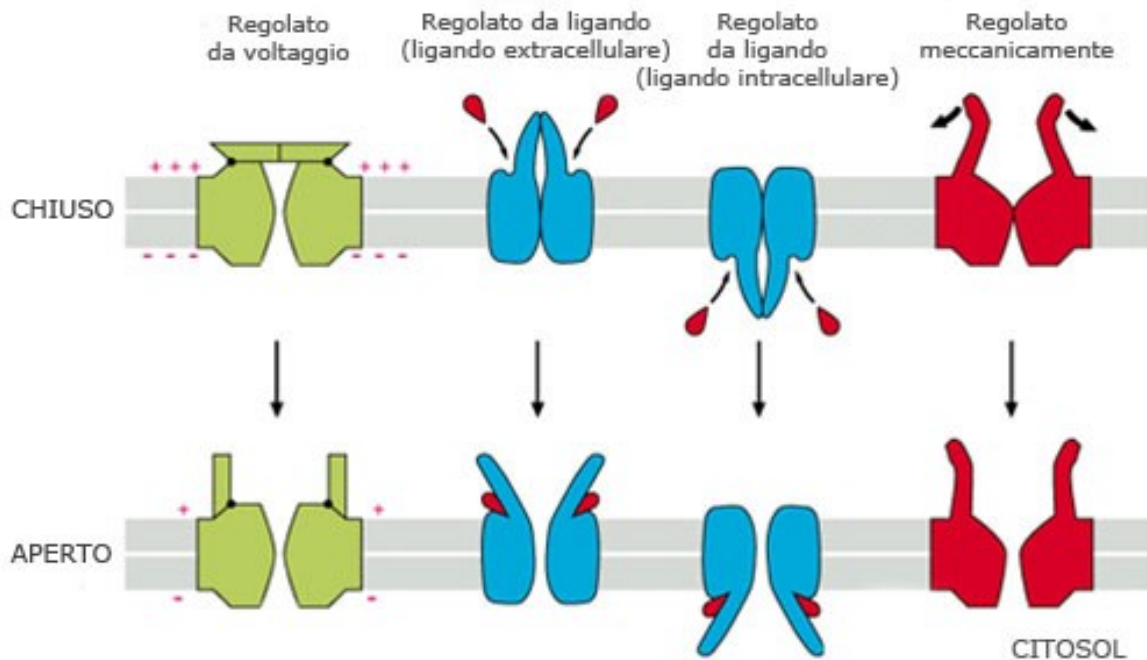


Figura 1.3.2 Diversi esempi di canali proteici: in verde, canale regolato da voltaggio; in azzurro, canale regolato da ligando extra ed intracellulare; in rosso, canale regolato meccanicamente.

1.3.1 Gramicidina A

L'inserimento di canali di membrana all'interno di doppi strati lipidici planari è una tecnica molto valida per la determinazione delle proprietà dei canali ionici quali la selettività ionica, la permeabilità, la dipendenza dal voltaggio e la cinetica. La

difficoltà principale nell'uso dei doppi strati lipidici planari nello studio dei canali ionici è l'inserimento di questi ultimi all'interno dei bilayers.

Alcuni canali ionici poco complessi, come la gramicidina A, si introducono spontaneamente all'interno del doppio strato lipidico, risultando in questo modo semplici da studiare e ben caratterizzati.

La gramicidina, grazie alla relativa facilità con cui si inserisce all'interno delle membrane per formare canali ed alla semplicità di estrazione dal *Bacillus Brevis*, rappresenta un modello ideale tramite il quale studiare le correnti che attraversano le proteine di membrana. Inoltre, la dimensione relativamente piccola del canale formato dalla gramicidina rende quest'ultima un eccellente sistema su cui effettuare simulazioni di dinamica molecolare.

I canali di gramicidina A sono proteine di piccole dimensioni composte da due subunità ricche di triptofano e stabilizzate da legami idrogeno tra le estremità N-terminali dei due monomeri che si trovano ciascuno in un distinto foglietto del doppio strato. La struttura dei canali è nota fino ad una risoluzione atomica e le caratteristiche di permeabilità del canale sono particolarmente ben studiate: i canali di gramicidina sono infatti specifici per il passaggio di cationi monovalenti, con una permeabilità non misurabile agli anioni o ai cationi polivalenti. La conduttanza del singolo canale e la selettività ai cationi variano in base alle sequenze amminoacidiche presenti nelle catene laterali^[3].

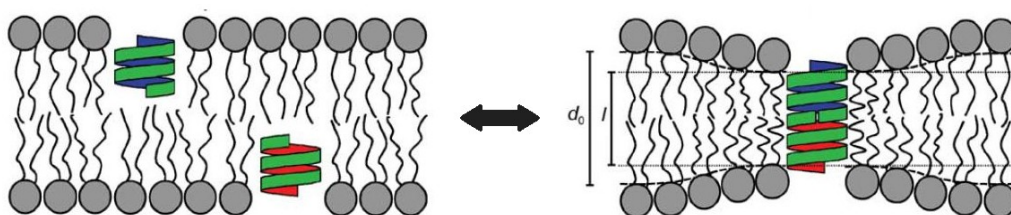


Figura 1.3.1.1 Quando la lunghezza (l) delle due subunità di gramicidina A è inferiore allo spessore medio del bilayer imperturbato, la formazione del canale ionico causa una compressione dei singoli strati lipidici.

La gramicidina è abbastanza insolubile in acqua, tendendo a formare una sospensione colloidale; è invece solubile in metanolo, etanolo, isopropanolo etc.

La struttura primaria della gramicidina A comprende una inusuale sequenza di L- e D- amminoacidi alternati; i cui residui terminali di alanina sono rivestiti

rispettivamente da NH_2 e da COOH . Le peculiarità della struttura primaria si riflettono sulla struttura tridimensionale e sulla sua funzione. In primo luogo, tutti i residui sono idrofobici, con catene laterali non cariche o idrofiliche. Inoltre, il fatto che entrambe le estremità terminali siano bloccate, previene la formazione di zwitterioni o cariche nette a qualunque pH, rinforzando la natura idrofobica del peptide. Per concludere, l'alternanza di L- e D- amminoacidi nella sequenza permette alla gramicidina di adottare conformazioni che sarebbero inaccettabili per un peptide contenente solo L- amminoacidi^[7].

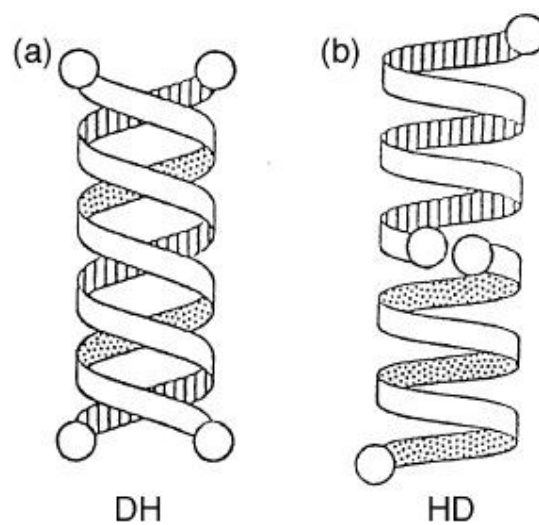


Figura 1.3.1.2 Struttura molecolare della gramicidina A: doppia elica nel caso (a) e canale dimerico elicoidale nel caso (b).

La gramicidina A è una molecola polimorfa che può adottare due diversi tipi di strutture: il poro a doppia elica DH ed il canale dimerico elicoidale HD (vedi figura 1.3.1.2).

Nel primo caso, il dimerico è formato da due monomeri avvolti l'uno nell'altro grazie a legami idrogeno intermolecolari, mentre il canale dimerico elicoidale è composto da due monomeri elicoidali, nei quali i legami idrogeno sono intramolecolari, uniti attraverso un'estremità^[6]. L'equilibrio tra queste due forme di gramicidina dipende da numerosi fattori fisici e principalmente dalla natura chimica dell'ambiente circostante.

Ad oggi, la gramicidina viene usata come antibiotico, il cui potente effetto è dovuto all'aumento di permeabilità della membrana cellulare batterica, che

determina la fuoriuscita di cationi monovalenti inorganici per mezzo della formazione di una serie di canali a livello del doppio strato lipidico^[3].

1.3.2 α -Emolisina

L' α -Emolisina (α HL) è una tossina solubile in acqua, secreta come monomero di 33.2 kDa dallo *Staphylococcus aureus*, un batterio patogeno. Dopo essersi legata alla membrana plasmatica delle cellule bersaglio, le subunità della proteina si autoassemblano, formando un canale proteico eptamerico attraverso il quale viene esercitata l'azione citotossica, che consiste in un aumento della permeabilità della membrana con conseguente passaggio di ioni, acqua e molecole a basso peso molecolare dentro e fuori dalla cellula, fino alla lisi della stessa^[8]. Tale azione citotossica è svolta da molti batteri che sfruttano le loro esotossine al fine di creare un varco attraverso la membrana plasmatica della cellula ospite oppure per ottenere rapidamente sostanze nutrienti dalle lesioni inferte alle cellule bersaglio. Grazie alle modeste dimensioni di ogni monomero, alla disponibilità di informazioni strutturali sull'eptamero ed alla capacità del polipeptide di auto-assemblarsi, l' α HL è un eccellente modello per lo studio dell'assemblamento di proteine canale^[12].

Nonostante ciò, l'interesse principale riguardo a questa proteina si ha sicuramente in ambito sensoristico: infatti, inserito in un bilayer artificiale, il singolo canale di α HL ha una conduttanza relativamente ampia rispetto ad altri canali proteici (circa 1 nS in 1M KCl) e piuttosto stabile per svariati minuti. Attraverso il canale possono passare agevolmente ioni, molecole organiche e acidi nucleici in conformazione lineare e ciò causa una diminuzione della corrente che lo attraversa. Diverse specie chimiche in grado di attraversare il canale potranno essere discriminate in base alla differente conduttanza del canale. Si può quindi pensare ad un sensore basato sull'impiego di un singolo canale di α HL, che riconosca le molecole, sulla base della variazione della conduttanza del canale e del tempo medio in cui esso rimane parzialmente occluso. Con questa metodologia è possibile inoltre quantificarne la concentrazione a partire dalla frequenza di accadimento dell'evento. Attraverso l'ingegneria genetica, che

permette di aggiungere al canale di α HL appositi siti di legame, è possibile riconoscere anche altri tipi di specie chimiche, come ioni metallici, molecole organiche o catene amminoacidiche e acidi nucleici^[9].

La struttura dell' α HL è stata determinata mediante cristallografia a raggi X con risoluzione di 1.9 Å. Il canale proteico eptamerico misura circa 100 Å di altezza e fino a 100 Å in diametro ed ha una forma simile a quella di un fungo.

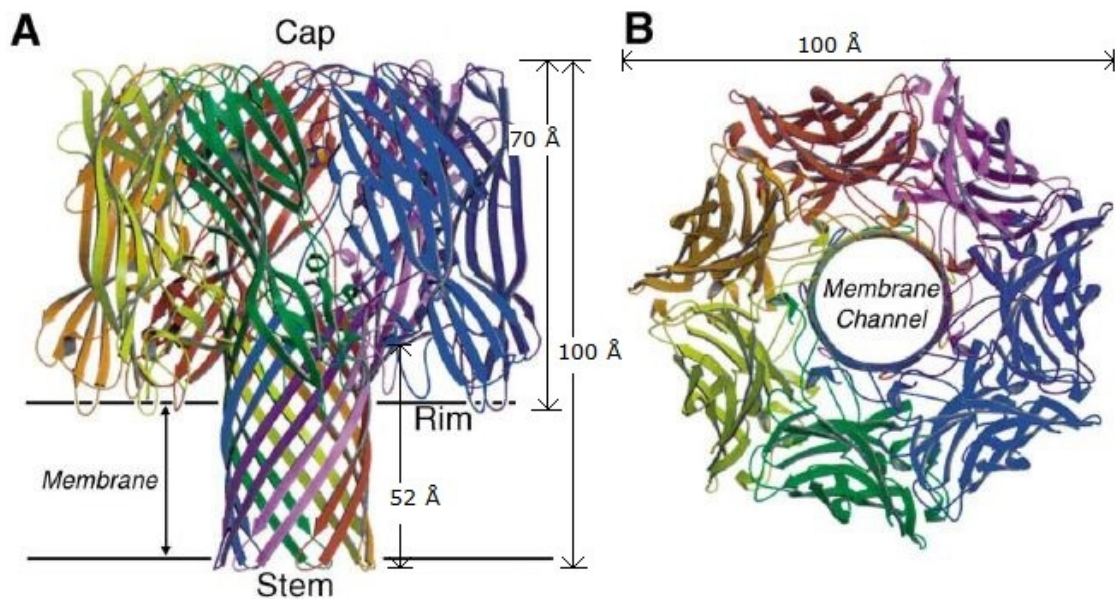


Figura 1.3.2.1 Struttura eptamerica dell'alfa-emolisina con vista frontale all'asse di simmetria(A) e lungo l'asse, dal basso(B). Sono indicate le sette sub unità in colori diversi e i tre domini della struttura.

L'asse di simmetria è allineato con l'apertura del canale pieno di acqua che si estende per tutta la lunghezza della molecola. Il lume del canale ha un diametro che varia tra i 16 Å (nella parte più alta del gambo) e 46 Å (all'interno del cappello). Nonostante possa sembrare un cilindro, in realtà il canale è di forma conica, con la base del gambo più larga (circa 26 Å) e con un restringimento (14 Å) nella zona in cui esso si inserisce nel cappello^[10].

L'intera proteina è suddivisa in 3 domini proteici come mostrato in figura 1.3.2.1: il cappello (Cap), il gambo (Stem) e la corona (Rim). Il cappello, alto circa 48 Å, è

principalmente idrofilico e, insieme alla corona, si proietta dalla superficie extracellulare della membrana.

Il cappello è composto da β -sandwiches e terminali amminici di ogni monomero. La corona si trova invece al di sotto del cappello in stretta prossimità, se non a diretto contatto con il lato esterno del doppio strato fosfolipidico. Una fessura ricca di amminoacidi basici e aromatici tra la corona ed il gambo forma, infatti, un sito di legame per le teste polari della membrana. Il gambo, infine, è formato da un barile β a 14 filamenti antiparalleli e definisce la porzione transmembrana del canale proteico; è alto circa 52 Å e largo 26 Å (distanza C_{α} - C_{α})^[10].

Come accennato in precedenza l' α HL è solitamente costituita da 7 monomeri identici (fig 1.3.2.2), il cui nucleo ha la forma di rene alto 70 Å, spesso 45 Å e largo 20 Å; è formato da 5+6 β -sandwiches e dalla corona che, a sua volta, è composta da 3 β -foglietti e da strutture non- β e non- α ^[12].

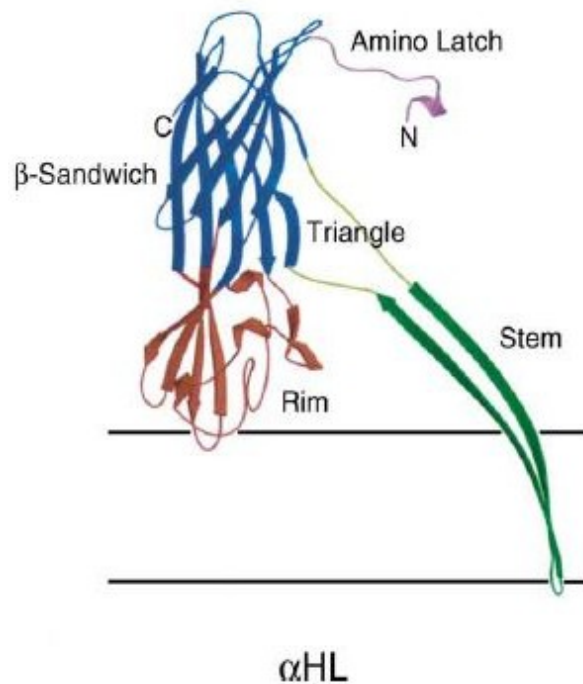


Figura 1.3.2.2 Modello a nastro del monomero rimosso dall'eptamero assemblato, con il legame alla membrana predetto ed i vari domini indicati.

Dal nucleo si protraggono due strutture (fig. 1.3.2.2): il terminale amminico, che crea estesi legami col monomero adiacente, e i due foglietti β , ricchi di glicina, che contribuiscono con gli altri monomeri alla formazione del gambo.

Infine la regione a forma di triangolo partecipa, con un ruolo chiave, alle interazioni tra i monomeri nell'avvicinare il gambo al nucleo. Mentre il dominio β -sandwich crea ampi legami intermonomero per formare il cappello ed i foglietti β compongono il gambo, la corona partecipa solamente a pochi contatti monomero-monomero. Nonostante quest'ultima sia connessa in modo continuo con il dominio β -sandwich, ci sono varie ragioni per definirla come una regione differente in termini di struttura, proprietà e funzione^[9].

Come ci si può aspettare, la superficie interna del canale risulta essere prevalentemente polare senza carica, all'esterno del gambo invece, c'è un gruppo di residui non polari che definiscono la porzione della proteina che attraversa ed interagisce con la porzione idrofobica della membrana^[12].

L' α HL può anche formare esameri in doppi strati lipidici: questa conformazione, caratterizzata da un diametro del foro inferiore rispetto a quello eptamerico, ma con altezza circa identica, sembra avere sub unità con struttura differente da quella precedentemente descritta, ma non ancora esattamente determinata.

Il polimorfismo nella stechiometria dell' α HL è stato dimostrato, ma l'esatto meccanismo di formazione dei due diversi oligomeri non è stato tuttora compreso^[11].

1.4 Potenziale elettrico di membrana

Il potenziale di membrana è la differenza di potenziale che sussiste tra le due facce della membrana cellulare ed è quindi legato alla distribuzione di carica netta degli ioni in soluzione.

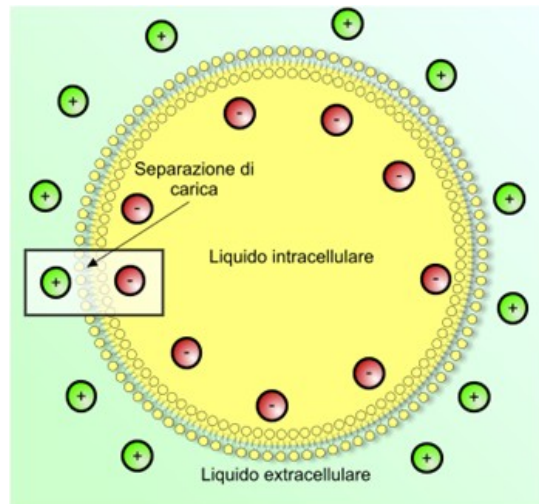


Figura 1.4.1 Separazione delle cariche a ridosso della membrana cellulare

È proprio grazie ai canali ionici, citati nei paragrafi precedenti, che gli ioni si muovono da una parte all'altra della membrana cellulare, generando così un flusso di cariche, che determina una differenza di potenziale tra le due facce della membrana.

Il potenziale di membrana di una cellula può essere mantenuto a valori non nulli solo se la tendenza delle diverse specie ioniche a diffondere attraverso la membrana viene contrastata da processi di pompaggio ionico che, ovviamente, consumano energia. Contemporaneamente la velocità ed il grado di trasporto, attraverso i doppi strati fosfolipidici, sono influenzati non solo dalle concentrazioni ioniche ai due lati della membrana, ma anche dal voltaggio, ovvero dal potenziale elettrico transmembrana.

Normalmente, la specifica composizione ionica del citosol differisce fortemente da quella del mezzo circostante. Praticamente in tutte le cellule il pH del citosol è mantenuto ad un valore di 7.2 e la concentrazione citosolica di K^+ è molto più elevata di quella dell' Na^+ .

Oltre alle pompe che trasportano gli ioni contro i loro gradienti di concentrazione, la membrana plasmatica contiene proteine con funzione di canale che permettono ai principali ioni cellulari (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) di attraversarla a velocità variabili secondo i loro gradienti di concentrazione. Questi ultimi ed i movimenti selettivi degli ioni attraverso i canali creano una differenza di voltaggio attraverso la membrana plasmatica. L'ampiezza di questo potenziale elettrico è di circa

70mV, con l'interno della cellula sempre negativo rispetto all'esterno. La membrana plasmatica, come tutte le membrane biologiche può essere modellata come un condensatore, in cui il nucleo idrofobico funge da materiale isolante mentre le teste polari del doppio strato lipidico e gli ioni del mezzo acquoso circostante fungono da materiale conduttore. Quindi la membrana è in grado di immagazzinare cariche positive su un lato e cariche negative sull'altro. I gradienti ionici e il potenziale elettrico attraverso la membrana plasmatica forniscono l'energia per molti processi biologici.

Le membrane contengono in generale molti canali aperti per il K^+ , ma pochi canali aperti per l' Na^+ o per il Ca^{2+} . Ne risulta che il principale flusso ionico attraverso la membrana plasmatica è quello del potassio. Pertanto il flusso di ioni K^+ attraverso i relativi canali aperti è la principale causa del potenziale negativo misurato all'interno della cellula.

Il gradiente di concentrazione del K^+ che determina il flusso ionico attraverso i canali passivi per il K^+ , è generato da una pompa ionica Na^+/K^+ -ATPasi che trasporta gli ioni K^+ dal mezzo extracellulare al citosol mentre espelle ioni Na^+ . La pompa elettrogenica sodio-potassio trasporta 3 ioni sodio fuori dalla cellula e 2 ioni potassio dentro la cellula per ogni molecola di ATP idrolizzata, con conseguente trasferimento netto di una carica positiva dal citosol al liquido extracellulare. Questa attività di pompaggio, presente in tutte le cellule animali, determina considerevoli aumenti del sodio extracellulare e del potassio intracellulare e la conseguente formazione di una differenza di potenziale tra i due lati della membrana. In assenza di questa pompa il gradiente di concentrazione del potassio non potrebbe essere mantenuto e alla fine il potenziale di membrana scomparirebbe. Un secondo tipo di trasporto mediato da canale, questa volta passivo, sfrutta l'elevata concentrazione relativa di sodio extracellulare, causata dalle pompe sodio-potassio, per introdurre nella cellula il glucosio necessario per la sintesi dell'ATP. Questo canale lascia passare uno ione sodio solo se questo si trova associato ad una molecola di glucosio.

1.4.1 L'equazione di Nernst

Tutte le cellule viventi hanno un potenziale di membrana a riposo che deriva dalla distribuzione asimmetrica di ioni ai due lati della membrana cellulare. I fattori principali che influiscono sul potenziale di membrana sono due:

- i gradienti di concentrazione degli ioni a cavallo della membrana;
- la permeabilità della membrana a questi ioni.

L'Equazione di Nernst descrive il potenziale di membrana che un singolo ione produrrebbe se la membrana fosse permeabile solo a quello ione. Per qualsiasi ione questo potenziale di membrana viene definito potenziale di equilibrio dello ione:

$$E_{ione} = \frac{R T}{Z F} \log \frac{[ione]_{est}}{[ione]_{int}}$$

Dove R è la costante universale dei gas, T è la temperatura assoluta, Z è la valenza dello ione ed F è la costante di Faraday, mentre $[ione]_{est}$ e $[ione]_{int}$ stanno ad indicare le concentrazioni dello ione rispettivamente all'esterno e all'interno della membrana cellulare.

Quando nell'equazione di Nernst usiamo le concentrazioni intra ed extracellulari stimate per il K^+ , l'equazione predice un potenziale di equilibrio $E_K = -90mV$ (tab. 1.4.1.1). Tuttavia, un valore medio per il potenziale di membrana a riposo è di -70 mV (con l'interno della cellula negativo rispetto all'esterno), quindi più positivo di quanto previsto dal potenziale di equilibrio per il potassio. Questo significa che ci deve essere il contributo di altri ioni al potenziale di membrana: la leggera permeabilità agli ioni Na^+ e la loro entrata nella cellula rende il potenziale di membrana a riposo leggermente più positivo di quanto sarebbe se la cellula fosse permeabile al solo K^+ .

Ione	Liquido extracellulare	Liquido intracellulare	E_{ione} a 37 °C
K^+	5 mM	150 mM	-90 mV
Na^+	145 mM	15 mM	+60 mV
Cl^-	108 mM	10 mM	-63 mV

Tabella 1.4.1.1 Concentrazioni molari dei principali ioni presenti nel liquido intracellulare ed in quello extracellulare; in quarta colonna viene indicato il potenziale di membrana generato dal singolo ione e calcolato mediante l'equazione di Nernst.

L'equazione di Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) viene utilizzata per calcolare il potenziale di membrana a riposo risultante dal contributo di tutti gli ioni che possono attraversare la membrana. L'equazione GHK include i valori di permeabilità della membrana perché la permeabilità di uno ione influisce sul suo contributo al potenziale di membrana. Se la membrana non è permeabile ad uno ione questo non influirà sul potenziale complessivo.

In merito alle cellule dei mammiferi, supponiamo che Na^+ , K^+ e Cl^- siano i tre ioni che influiscono sul potenziale di membrana nelle cellule a riposo. Il contributo di ogni ione al potenziale di membrana è proporzionale alla sua capacità di attraversare la membrana. L'equazione GHK per le cellule permeabili al Na^+ , al K^+ e al Cl^- è:

$$V_m = \frac{RT}{F} \log \frac{P_K[K^+]_{est} + P_{Na}[Na^+]_{est} + P_{Cl}[Cl^-]_{int}}{P_K[K^+]_{int} + P_{Na}[Na^+]_{int} + P_{Cl}[Cl^-]_{est}}$$

dove V_m è il potenziale di membrana a riposo a 37 °C in mV, R è la costante universale dei gas, T è la temperatura assoluta ed F è la costante di Faraday.

P_K , P_{Na} , P_{Cl} rappresentano le permeabilità della membrana relative rispettivamente agli ioni Na^+ , K^+ e Cl^- ; mentre $[ione]_{int}$ e $[ione]_{est}$ sono le concentrazioni dello ione indicato in parentesi quadra, rispettivamente all'interno e all'esterno della cellula.

Sebbene questa equazione possa sembrare complessa, si può riassumere nel modo seguente: il potenziale di membrana a riposo è determinato dai contributi combinati del gradiente di concentrazione moltiplicato per la permeabilità della membrana, per ogni ione. Se la membrana è impermeabile a uno ione, il valore

di permeabilità per quello ione sarà uguale a zero, perciò questo non comparirà nell'equazione.

L'equazione GHK predice i potenziali di membrana a riposo sulla base delle varie concentrazioni ioniche e sulle permeabilità di membrana e spiega come la debole permeabilità della cellula al Na^+ renda il potenziale di membrana a riposo più positivo dell' E_K calcolato con l'equazione di Nernst^[2].

CAPITOLO II

Planar Lipid Bilayer

2.1 Artificial bilayers

Nonostante quello del doppio strato lipidico artificiale sia un modello estremamente semplice, molte delle sue proprietà fisico-chimiche sono assai simili a quelle delle membrane biologiche, quindi esso rappresenta uno schema sperimentale che permette la semplificazione del sistema naturale senza un'eccessiva perdita di generalità. Le proprietà che più avvicinano un bilayer artificiale ad una biomembrana sono la flessibilità, la fluidità, lo spessore sottile, la capacità elettrica e la tensione superficiale^[13].

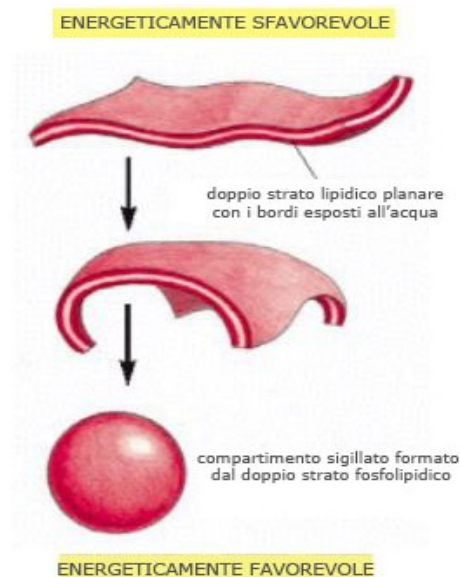


Figura 2.1.1 Chiusura spontanea di un doppio strato lipidico in ambiente acquoso, che dà origine ad un compartimento sigillato.

Una singola specie di fosfolipidi o una miscela di fosfolipidi con composizione simile a quella delle membrane naturali, tende a formare spontaneamente doppi strati planari, liposomi o micelle se dispersa in una soluzione acquosa. Le micelle sono strutture sferiche con l'interno idrofobico, costituito completamente da catene di acidi grassi; i liposomi hanno, invece, una struttura a doppio strato di forma sferica, più larga di una micella e con una cavità acquosa all'interno.

Costruite artificialmente, le membrane lipidiche bimolecolari planari (Planar Lipid Bilayer) sono state utilizzate originariamente come modello per lo studio della struttura della membrana cellulare. La loro area ampia e la loro geometria planare rendono i bilayers artificiali modelli adatti a rappresentare le membrane biologiche per misurazioni elettriche e meccaniche.

I doppi strati lipidici planari sono attualmente usati per indagare la funzione e la regolazione di canali ionici impiantati a livello molecolare, questi risultano essere facilmente accessibili rispetto al caso dei liposomi^[14].

2.2 Painted bilayers

Il metodo *Painting* prevede che la miscela di lipidi disciolta in un solvente non polare (decano) venga dispersa a ridosso di un'apertura che mette in comunicazione due camere riempite con un fluido. Prima della formazione del doppio strato lipidico il foro su cui si andrà a depositare il bilayer può essere trattato con una piccola quantità di soluzione di fosfolipidi "a secco" (pre-coating), procedendo poi con il riempimento delle camere con la soluzione elettrolitica. Successivamente si procede con la stesura dei lipidi sul foro, con l'aiuto di una sottile spatola di borosilicato o di un pennello.

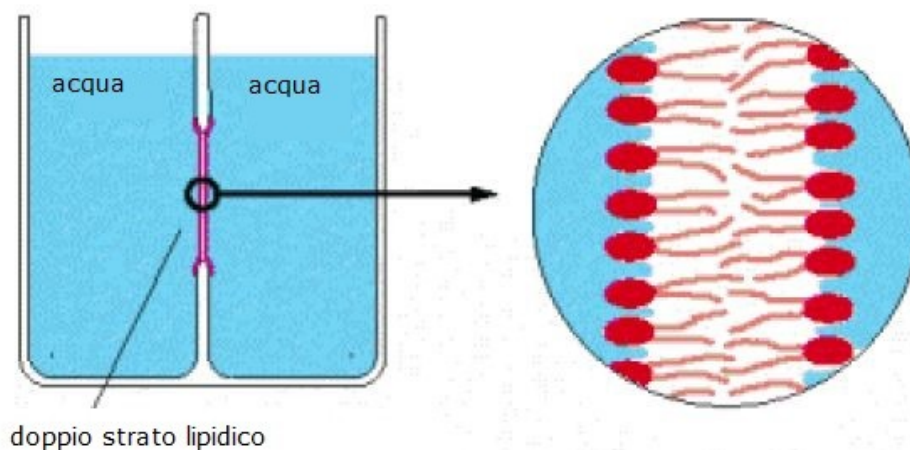


Figura 2.2.1 Doppio strato lipidico formato con il metodo di painting a ridosso del foro che separa le due camere.

Grazie alle loro proprietà anfifiliche i fosfolipidi tendono ad auto-assemblarsi per formare un bilayer, che rappresenta la struttura più favorevole dal punto di vista energetico: in corrispondenza del foro si viene a formare un doppio strato sempre più sottile man mano che il decano diffonde all'esterno del nucleo idrofobico, mentre le code apolari delle molecole più esterne si legano al setto lipofilo, generando così un bilayer a tutti gli effetti^[13].

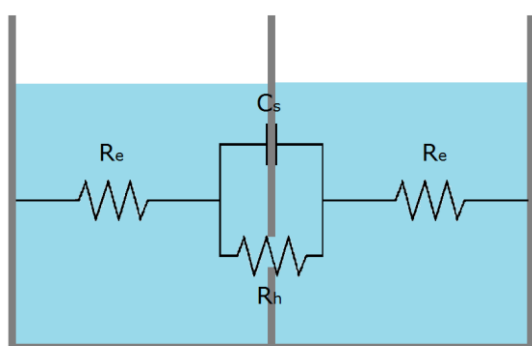
La geometria dell'apertura è importante per la stabilità della membrana. Se il diametro del foro è troppo grande, la membrana sarà rumorosa, dal punto di vista elettrico, e fragile dal punto di vista meccanico. D'altra parte un diametro troppo piccolo se, per un verso, riduce il rumore e aumenta la robustezza meccanica della membrana, rende molto più difficoltoso l'inserimento di canali proteici nel bilayer. Il diametro del foro costituisce quindi un compromesso tra queste due esigenze.

2.3 Analogo elettrico del sistema

I due compartimenti e la membrana che li separa possono essere rappresentati mediante un analogo elettrico a costanti concentrate che prende in considerazione i contributi legati agli effetti resistivi e capacitivi dovuti alla

soluzione elettrolitica, alle reazioni che avvengono all'interfaccia con essa e a tutto ciò che avviene nei pressi del setto forato. Tenendo conto di un range di frequenza limitato, è possibile descrivere il sistema attraverso i soli contributi legati alla presenza del setto forato^[16].

Il modello in assenza di membrana è costituito semplicemente dal parallelo tra la resistenza che il foro oppone al passaggio degli ioni R_h e la capacità del setto dielettrico C_s .



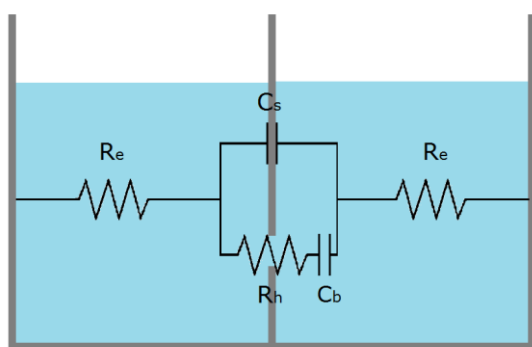
R_e = resistenza elettrodo

R_h = resistenza foro

C_s = capacità setto

Figura 2.3.1 Analogo elettrico del sistema in assenza di membrana.

In seguito alla formazione della membrana, nel modello viene inserita una capacità C_b in serie alla resistenza del setto, per rappresentare il bilayer.



R_e = resistenza elettrodo

R_h = resistenza foro

C_s = capacità setto

C_b = capacità bilayer

Figura 2.3.2 Analogo elettrico del sistema in presenza di bilayer.

2.4 Setup sperimentale

Il principio di funzionamento della tecnica del *voltage-clamp* è di applicare una differenza di potenziale nota V_p ai capi della membrana in esame e misurare la corrente che scorre attraverso di essa conseguentemente all'applicazione dello stimolo in tensione.

In assenza di membrana formata il sistema può essere schematizzato attraverso l'analogo elettrico riportato nel paragrafo precedente, dove R_e rappresenta la resistenza all'interfaccia elettrodo-soluzione elettrolitica, R_h è la resistenza che il foro oppone al passaggio degli ioni, C_s è la capacità del setto del dielettrico.

Imponendo un segnale in tensione dato da un'onda triangolare a frequenza non troppo elevata, la risposta in corrente del sistema è evidentemente ancora di tipo triangolare e quindi tale risulta la tensione in uscita dall'amplificatore.

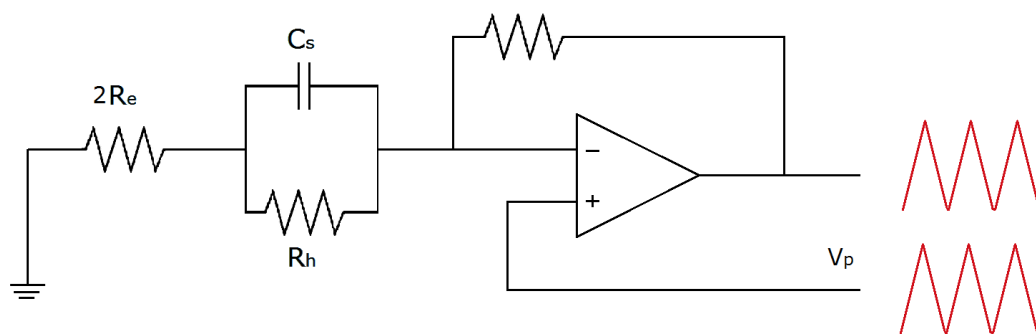


Figura 2.4.1 Risposta del sistema in assenza di membrana.

La presenza del bilayer comporta l'inserimento di una capacità C_b posta in serie alla resistenza R_h : sottoposto ad un'onda triangolare, il sistema risponde in questo caso con un'onda quadra (fig. 2.4.2), la cui ampiezza è proporzionale alla somma di C_s e C_b e fornisce quindi una stima dell'estensione e dello spessore del bilayer.

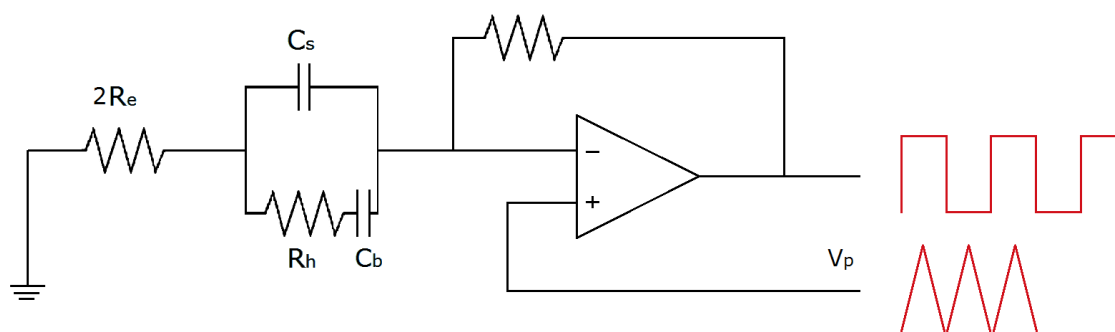


Figura 2.4.2 Risposta del sistema in presenza di membrana.

2.4.1 Planar Lipid Bilayer Workstation

Il setup sperimentale utilizzato per comparare le specifiche dell'amplificatore miniaturizzato è costituito da un sistema commercializzato dalla Warner Instruments che comprende:

- una gabbia di Faraday che scherma il sistema dalle interferenze elettromagnetiche;
- una cup e una chamber, due contenitori in delrin che rappresentano i compartimenti intra ed extra-cellulare;
- un piano antivibrante per lo smorzamento del rumore di origine meccanica;
- uno stirplate per l'accensione e lo spegnimento della lampada all'interno della gabbia.

Per acquisire il segnale sono stati utilizzati l'amplificatore Axopatch 200B, l'headstage CV-203BU ed il convertitore A/D Digidata 1322 della Axon Instruments, interfacciati con un pc con software di acquisizione ed elaborazione PClamp9 (anch'esso della Axon Instruments). Per monitorare la creazione della membrana sono stati utilizzati un generatore di segnali (Sony Tektronix AFG310) e un oscilloscopio (Tektronix TDS 3034B).

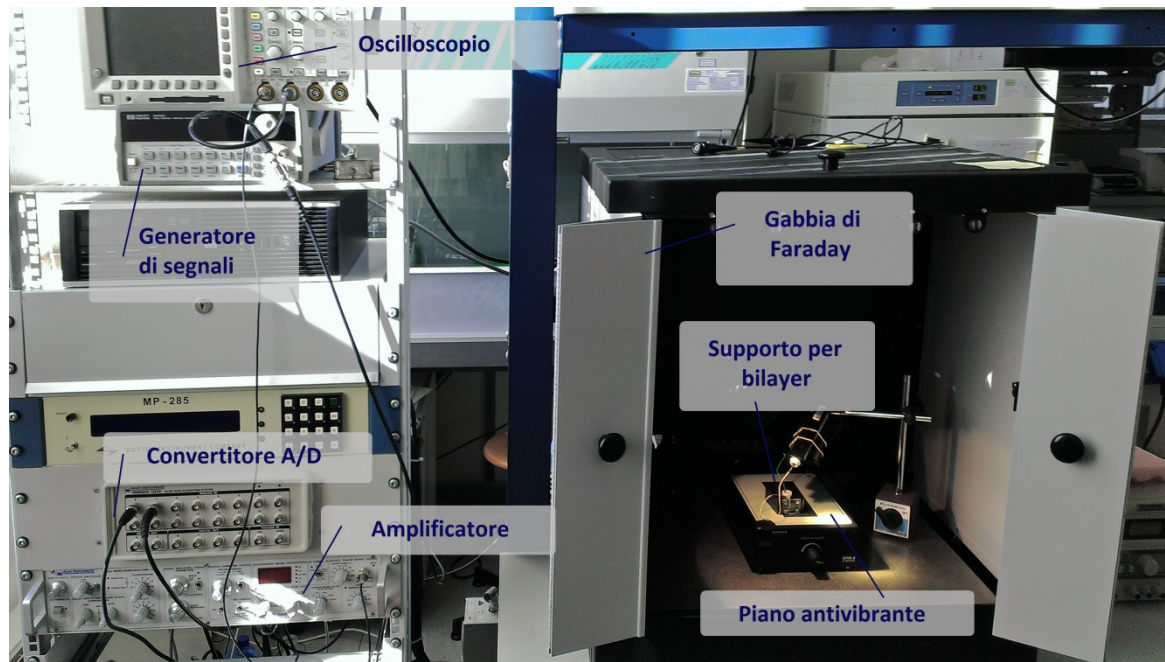


Figura 2.4.1.1 Planar Lipid Bilayer workstation.

L'amplificatore Axopatch 200B può essere settato per lavorare in due configurazioni: resistiva (whole cell configuration) o capacitiva (patch configuration) a seconda del tipo di feedback desiderato^[18].

Nella configurazione con headstage resistivo (fig. 2.4.1.2) si può individuare il convertitore corrente-tensione, costituito da un amplificatore operazionale e da un resistore collegato tra l'output e l'ingresso invertente dello stesso. È possibile commutare tra le due resistenze di feedback ottenendo due diversi valori di transresistenza (0.05 mV/pA e 0.5 mV/pA, identificati rispettivamente da $\beta=0.1$ e $\beta=1$). A causa del cortocircuito virtuale all'ingresso dell'amplificatore operazionale, la tensione applicata ai capi della membrana è la tensione controllata V_p . In cascata è posto un sottrattore che rimuove V_p dall'output del convertitore.

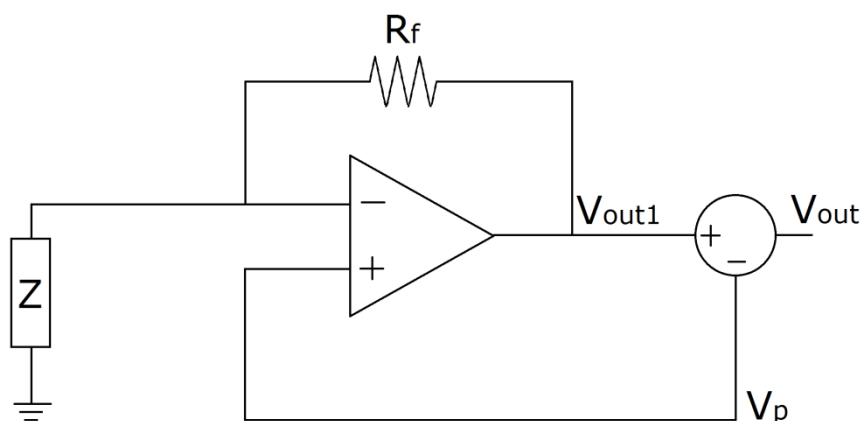


Figura 2.4.1.2 Headstage in configurazione resistiva.

La V_{out} nel caso di headstage in configurazione resistiva è data da:

$$V_{out} = V_{out1} - V_p = V_p \frac{R_f}{Z}$$

$$V_{out1} = V_p \left(1 + \frac{R_f}{Z} \right) = V_p + V_p \frac{R_f}{Z}$$

Quando l'headstage è configurato per usare un condensatore come elemento di feedback, esso diventa un integratore. In questo secondo caso è necessario che sia seguito da un derivatore (e anche da un amplificatore differenziale) per poter ottenere una funzione di trasferimento simile a quella della configurazione precedente (fig. 2.4.1.3).

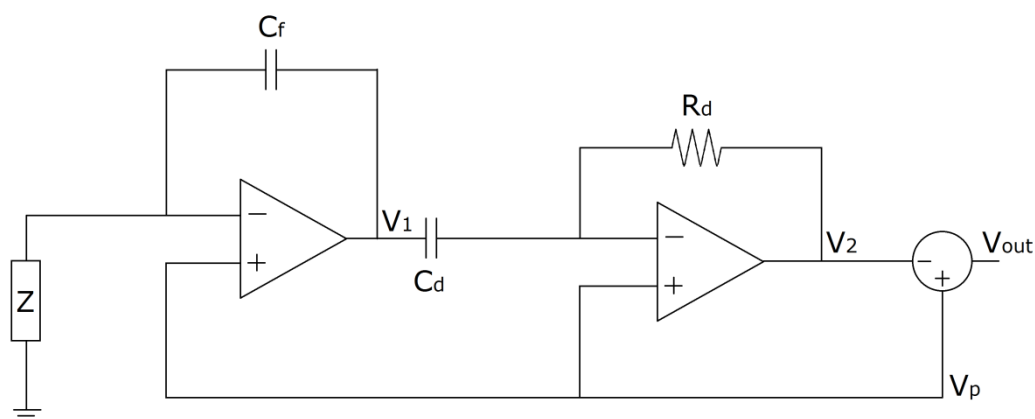


Figura 2.4.1.3 Headstage in configurazione capacitiva.

In questa configurazione si hanno la V_1 e la V_2 , calcolate con la sovrapposizione degli effetti:

$$V_1 = V_p \left(1 + \frac{1}{j\omega_f C_f Z} \right)$$

$$V_{2a} = -V_1 j\omega_d C_d R_d$$

$$V_{2b} = V_p (1 + j\omega_d C_d R_d)$$

$$V_2 = V_{2a} + V_{2b} = V_p + j\omega_d C_d R_d V_p - j\omega_d C_d R_d V_1$$

La V_{out} risulta perciò essere:

$$V_{out} = V_p - V_2 = \left(\frac{C_d R_d}{C_f Z} \right) V_p$$

La formazione del bilayer artificiale avviene all'interno di un supporto formato da due contenitori che rappresentano i compartimenti intra ed extra-cellulare. Tali contenitori sono realizzati in delrin, un materiale idrofobico che facilita il legame con le code apolari dei fosfolipidi.



Figura 2.4.1.2 Cup e chamber utilizzati come supporto per la formazione dei bilayers.

All'interno della camera più grande è posta una cup sulla cui parete è presente un foro il cui diametro rispetti il giusto compromesso tra robustezza meccanica e stabilità della membrana e probabilità di inserire proteine canale all'interno del bilayer, come già ampiamente descritto nel paragrafo 2.2.

2.4.2 Amplificatore miniaturizzato singolo canale

Questo sistema si basa su un microchip creato appositamente per studi di elettrofisiologia, combinato con un FPGA (Field Programmable Gate Array – circuito integrato le cui funzionalità sono programmabili via software) ed un'interfaccia USB verso il computer. La corrente di canale ionico è acquisita mediante ASIC (Application-Specific Integrated Circuit), che comprende un front-end a basso rumore e un convertitore analogico-digitale che fornisce un flusso di bits ad una frequenza molto maggiore rispetto a quella di campionamento.

I dati in formato digitale vengono letti dall'FPGA, che opera un filtraggio a quattro differenti bande settabili mediante comandi digitali nell'interfaccia software, ed inviati mediante connessione USB al pc.



Figura 2.4.2.1 Amplificatore miniaturizzato utilizzato per gli esperimenti.

Il sistema miniaturizzato, inoltre, possiede:

- due ranges di corrente ($\pm 200\text{pA}$ e $\pm 20\text{nA}$);
- quattro larghezze di banda per il filtraggio digitale;
- range di tensione generata tra -355mV e $+355\text{mV}$, con risoluzione di 1mV ;
- semplice applicazione software con formato dei dati in uscita compatibile con i più comuni software commercializzati;
- cavo coassiale SMB per la connessione degli elettrodi;
- piccole dimensioni ($30\times 15\times 74\text{mm}$).

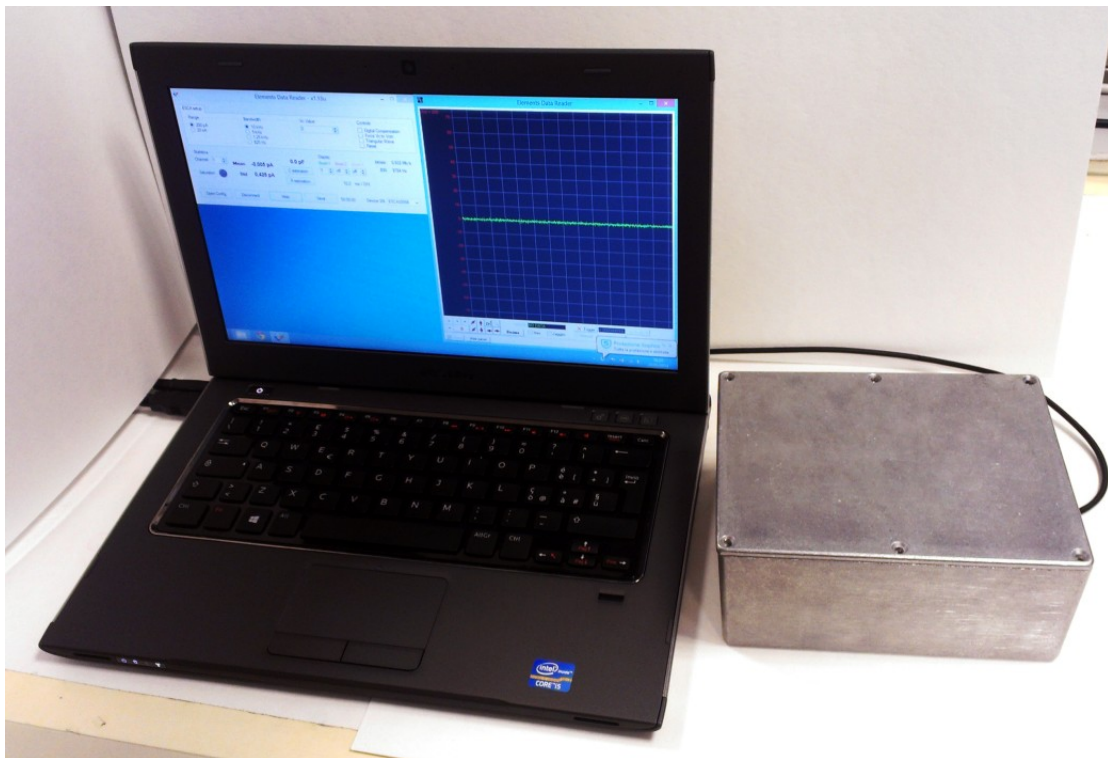


Figura 2.4.2.2 Postazione per gli esperimenti utilizzando l'amplificatore miniaturizzato.

L'amplificatore viene inserito all'interno di una piccola gabbia di Faraday, che schermata il sistema dalle interferenze elettromagnetiche provenienti dall'esterno, e associato al supporto per la formazione del doppio strato lipidico. Il setup miniaturizzato può essere collegato alla microfluidica multicanale (rif. par. 2.4.3) connessa allo switch per la selezione del canale da osservare o in alternativa può essere utilizzato con la Warner cup (fig 2.4.2.3).

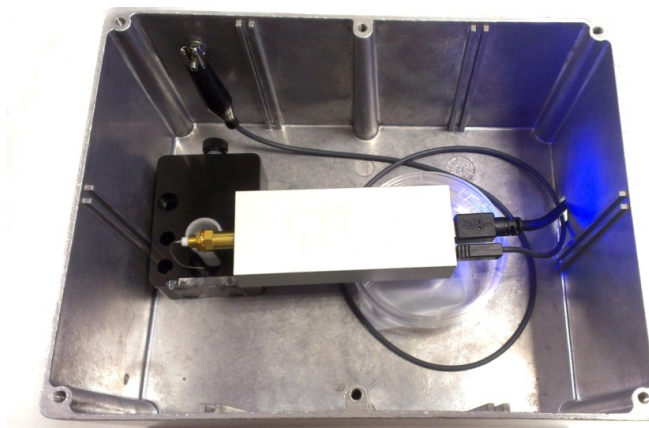


Figura 2.4.2.3 Dettaglio dell'amplificatore miniaturizzato con connettore contenente elettrodi in Ag/AgCl per utilizzo con cup e chamber in delrin per la formazione del bilayer, posizionati all'interno della gabbia di Faraday.

2.4.3 Microfluidica multicanale come supporto per BLM

La maggior parte delle misure effettuate sono state eseguite con l'utilizzo di questo supporto per la formazione di doppi strati lipidici.

Nel dettaglio si tratta di una microfluidica compatta, che permette di formare e monitorare quattro bilayers in parallelo, grazie alla presenza di microcavità formate attraverso fotolitografia. Ogni apertura per la formazione dei bilayers ha un diametro che può variare dai $20\mu\text{m}$ ai $100\mu\text{m}$ ^[20], a seconda della microfluidica che si sceglie di adoperare: negli esperimenti effettuati sono stati usati fori da $75\mu\text{m}$ perché ritenuti più idonei alla formazione dei bilayers e al conseguente inserimento di canali ionici.

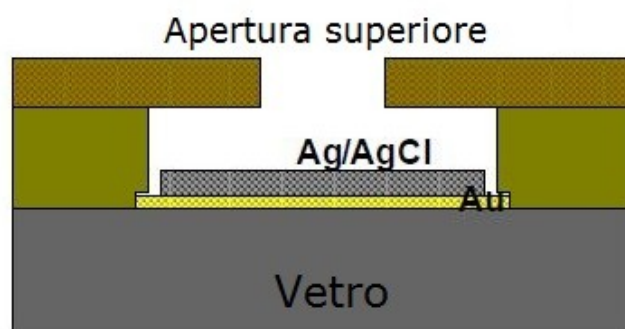


Figura 2.4.3.1 Schema della cavità in cui è presente il microelettrodo; il bilayer viene formato in corrispondenza dell'apertura superiore.

La struttura (fig. 2.4.3.1) è composta da uno strato di vetro, ricoperto da due sottili strati di film resistivo, nel quale sono formati i cinque fori: quattro di questi contengono i microelettrodi di Ag/AgCl di diametro pari a $100 \div 200 \mu\text{m}$, mentre il foro più grande rappresenta l'elettrodo di riferimento^[20].

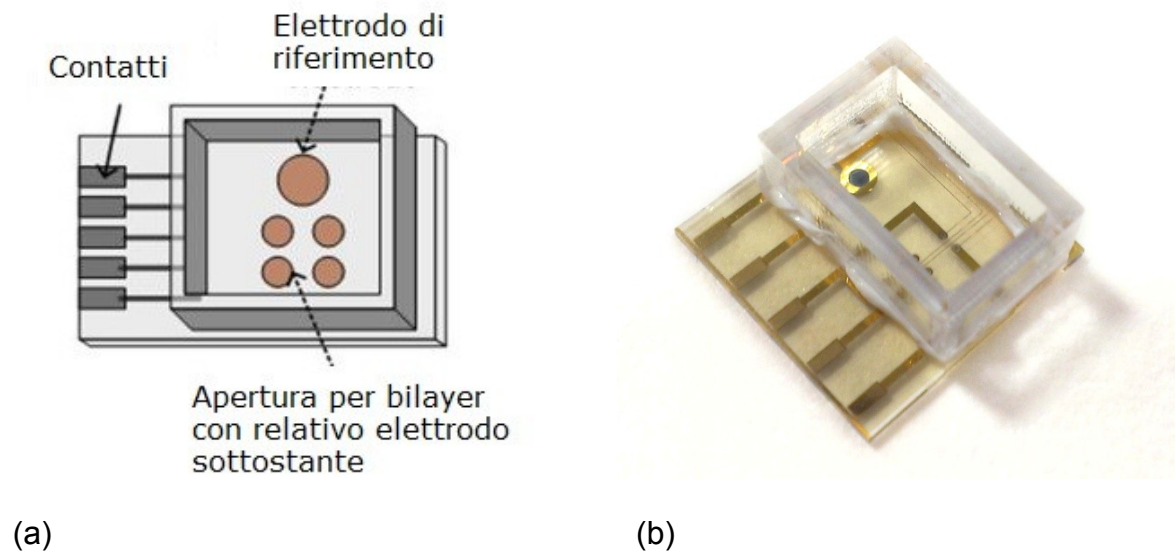


Figura 2.4.3.2 Schema del chip contenente quattro bilayers separati ed un elettrodo di riferimento. Sulla sinistra della figura (a) sono visibili i contatti per le acquisizioni dei dati. (b) foto della microfluidica utilizzata.

I contatti degli elettrodi sono presenti sulla parte superiore del chip, questo permette di collegare direttamente l'amplificatore per la lettura dei dati in corrente, evitando così la presenza di ulteriori fili elettrici, rendendo il sistema molto più compatto e riducendo il rumore elettrico durante l'acquisizione dei dati^[20].

CAPITOLO III

Caratterizzazione del sistema miniaturizzato

Se si prende in considerazione un qualsiasi circuito elettronico e si analizza il valore di una grandezza elettrica (tensione o corrente) in un punto, è possibile osservare come questa non sia stabile nel tempo ma fluttui attorno al valore atteso $s(t)$. La fluttuazione casuale attorno al segnale atteso $s(t)$ è chiamata rumore e viene indicata con $n(t)$. Nel caso ad esempio della tensione $V(t)$ all'uscita di un circuito, è possibile considerarla come

$$V(t) = s(t) + n(t)$$

Il rumore, rendendo l'identificazione del segnale meno nitida, porta a commettere un errore più o meno grande nella misura di $s(t)$, e in alcuni casi può addirittura rendere impossibile il riconoscimento del segnale utile.

La componente $n(t)$ non è caratterizzata da uno specifico andamento nel tempo perché per sua natura è diversa da una osservazione all'altra e perché non è possibile predire quale sarà il valore $n(t + dt)$ presente all'istante successivo all'osservazione. Il rumore bianco è infatti un particolare tipo di rumore caratterizzato dall'assenza di periodicità nel tempo e da ampiezza costante su tutto lo spettro di frequenze. Essendo una grandezza aleatoria, $n(t)$ può essere unicamente caratterizzata da valori che ne sintetizzino la distribuzione statistica. In particolare, analizzando la distribuzione delle ampiezze delle fluttuazioni, se ne può ricavare il valore medio μ ed il valore quadratico medio σ^2 .

Nella grande maggioranza dei casi la distribuzione delle fluttuazioni ha una forma ben approssimabile ad una gaussiana centrata proprio sul livello di segnale idealmente presente in quel punto se non ci fosse rumore.

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

Questo equivale a dire che il valore medio μ , in cui è centrata la gaussiana corrisponde al valore ideale della grandezza elettrica che si sta misurando.

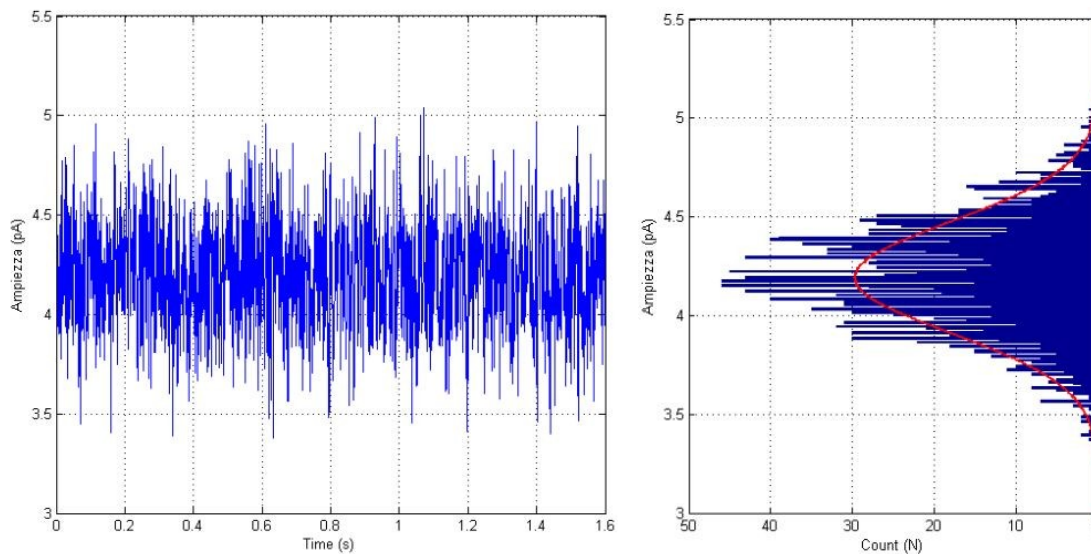


Figura 3.1 L'andamento del segnale non è stabile perché è presente del rumore che si somma al contenuto utile della misura. Analizzando la distribuzione delle ampiezze delle fluttuazioni, si ottiene una gaussiana, caratterizzata da un specifica deviazione standard σ .

Se la misura è prossima allo zero il valore medio sarà di conseguenza nullo e la distribuzione si riduce a

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}}$$

La distribuzione del rumore è quindi descrivibile tramite la sola varianza σ^2 , perciò l'entità delle fluttuazioni viene caratterizzata dalla deviazione standard σ della distribuzione, la cui dimensione sarà il Volt, se si sta misurando un segnale di tensione, o l'Ampère, se si sta misurando un segnale di corrente. Il risultato della deviazione standard è un valore che ha quindi le stesse dimensioni del segnale e permette perciò un immediato confronto diretto con l'ampiezza del segnale utile.

In una distribuzione gaussiana circa il 63% delle fluttuazioni totali del segnale sono contenute nell'intervallo $\pm\sigma$, si userà perciò la deviazione standard σ come valore efficace RMS del rumore.

Per ottenere il valore di picco del segnale occorre moltiplicare σ per un coefficiente chiamato *fattore di cresta (fc)*, generalmente si usa un $fc=3$, che corrisponde al 99,7% di probabilità che l'evento casuale ricada in tale intervallo di valori.

Per esprimere quanto un segnale sia distinguibile dal rumore si definisce il rapporto segnale rumore SNR (Signal to Noise Ratio) come

$$SNR = \frac{P_{segnale}}{P_{rumore}}$$

dove $P_{segnale} = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^{+T} |s(t)|^2 dt$ indica la potenza del segnale utile, mentre $P_{rumore} = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^{+T} |n(t)|^2 dt$ quella del rumore.

Nel caso del segnale in corrente che si andrà ad analizzare, è possibile esprimere il rapporto segnale rumore come

$$SNR = 10 \log \left(\frac{\mu^2}{\sigma^2} \right) \quad [dB]$$

dove μ indica il valor medio del segnale, mentre σ la sua deviazione standard.

Passando al dominio delle frequenze, se si considera un rumore con densità spettrale $V_{n,in}^2(f)$ e un filtro generico con funzione di trasferimento $H(f)$, il segnale in uscita dal filtro avrà densità spettrale $V_{n,out}^2(f) = |H(f)|^2 V_{n,in}^2(f)$.

Se perciò valutiamo del rumore bianco in ingresso ad un filtro, quello in uscita sarà caratterizzato da una densità spettrale di potenza sagomata dalla funzione di trasferimento del filtro stesso.

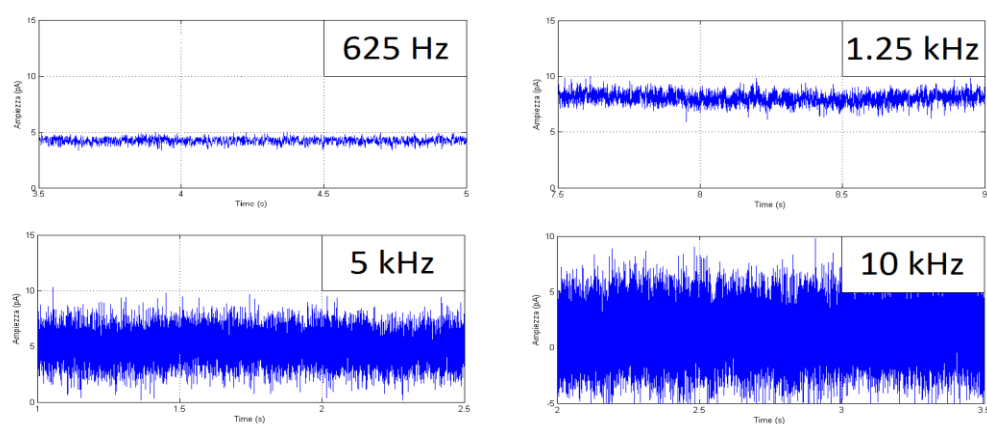


Figura 3.2 Esempio di segnale filtrato a bande diverse settabili del front-end dell'amplificatore miniaturizzato.

Concludendo, il rumore intrinseco è dovuto alle fluttuazioni casuali che avvengono nei componenti costituenti il sistema elettronico in questione ed è importante in quanto limita la risoluzione di un sensore, la cui ampiezza minima è definita proprio in funzione del rumore tramite il SNR.

3.1 Rumore a vuoto

Il primo test che viene effettuato sull'amplificatore miniaturizzato, oggetto dello studio, riguarda il rumore rilevato a vuoto, ovvero eliminando la connessione con la microfluidica multicanale usata come supporto per la formazione dei doppi strati lipidici ma lasciando collegato all'amplificatore lo switch per la scelta del canale. Tale valore viene confrontato con quello del noto e comune amplificatore Axopatch 200B, usato in abbinamento all'headstage CV-203BU ed al convertitore A/D Digidata 1322 della Axon Instruments. Il segnale in quest'ultimo caso viene prodotto e monitorato utilizzando il generatore di segnali Sony Tektronix AFG310 e l'oscilloscopio Tektronix TDS 3034B e visualizzato su pc mediante il software di acquisizione ed elaborazione PClamp9.

Nel caso dell'amplificatore miniaturizzato, si nota subito l'utilizzo intuitivo, ma soprattutto la semplice connessione al supporto per creazione di doppi strati lipidici e l'interfacciamento con il pc tramite il solo cavo USB. Il segnale viene generato direttamente dal software di elaborazione, attraverso il quale è possibile

impostare l'onda triangolare o un valore costante di V_c (corrispondente alla V_p dell'Axopatch 200B) compreso nel range ± 355 mV.

Viene così selezionata l'onda triangolare, caratterizzata da una frequenza di 48 Hz e da un'ampiezza di 118 mV_{pp}, che verrà visualizzata come quadra perché gli elettrodi posti a contatto con l'aria circostante rilevano una capacità costante (per il valore rif. tabella 3.2.1). Quest'ultima viene stimata tramite l'apposito comando presente sul front-end ad una banda di acquisizione di 625 Hz che chiaramente permette di filtrare meglio il rumore bianco che si somma al segnale utile da misurare, come già descritto nel paragrafo precedente. Tale concetto verrà ripreso e approfondito con esempi pratici nei paragrafi che seguono e nello studio dell'apertura dei canali di gramicidina A che verrà ampiamente trattato nel IV capitolo.

Per valutare l'errore si impone una V_c costante pari a 0 mV: il software di acquisizione è in grado di calcolare automaticamente il rumore del segnale rilevato dagli elettrodi attraverso la determinazione del valore della deviazione standard σ .

Numero amplificatore testato	C stimata a vuoto	Banda di acquisizione	Deviazione standard σ
#1	10.7 pF	625 Hz	0.21 pA
		1.25 kHz	0.31 pA
		5 kHz	0.68 pA
		10 kHz	1.07 pA
#2	11.0 pF	625 Hz	0.21 pA
		1.25 kHz	0.32 pA
		5 kHz	0.72 pA
		10 kHz	1.15 pA

#4	10.9 pF	625 Hz	0.19 pA
		1.25 kHz	0.28 pA
		5 kHz	0.66 pA
		10 kHz	1.02 pA
#5	10.9 pF	625 Hz	0.22 pA
		1.25 kHz	0.33 pA
		5 kHz	0.70 pA
		10 kHz	1.07 pA
#6	11.1 pF	625 Hz	0.21 pA
		1.25 kHz	0.31 pA
		5 kHz	0.70 pA
		10 kHz	1.07 pA
#7	10.9 pF	625 Hz	0.21 pA
		1.25 kHz	0.30 pA
		5 kHz	0.69 pA
		10 kHz	1.03 pA
#8	11.2 pF	625 Hz	0.21 pA
		1.25 kHz	0.30 pA
		5 kHz	0.67 pA
		10 kHz	1.05 pA
#9	11.1 pF	625 Hz	0.21 pA
		1.25 kHz	0.30 pA
		5 kHz	0.67 pA
		10 kHz	1.04 pA

Tabella 3.2.1 Misura del rumore tramite deviazione standard del segnale (colonna 4) alle diverse bande di acquisizione (indicate in colonna 3). In seconda colonna è espressa la capacità a vuoto stimata a 625 Hz mediante l'apposito pulsante presente sul software di acquisizione.

Dai dati raccolti è possibile notare come alle diverse bande di acquisizione corrisponda il rumore medio

Banda di acquisizione	Deviazione standard media
625 Hz	0.21 pA
1.25 kHz	0.31 pA
5 kHz	0.69 pA
10 kHz	1.07 pA

Tabella 3.2.2 Valori medi di rumore degli amplificatori miniaturizzati, alle diverse bande di acquisizione.

Per quanto riguarda l'amplificatore Axopatch 200B, i valori di rumore vengono determinati per due configurazioni di guadagno differenti: resistiva o capacitiva, a seconda del tipo di feedback desiderato (rif. par. 2.4.1).

Configurazione di guadagno	Banda di acquisizione	Deviazione standard σ
$\alpha=50$ $\beta=1$ resistiva	1 kHz	0.26 pA
	5 kHz	0.80 pA
	10 kHz	1.79 pA
$\alpha=50$ $\beta=1$ capacitiva	1 kHz	0.16 pA
	5 kHz	0.58 pA
	10 kHz	1.22 pA

Tabella 3.2.3 Rumore riferito all'Axopatch 200B stimato a vuoto alle diverse bande, ipotizzando che l'aria rappresenti una capacità di 10.7pF (misurata attraverso l'amplificatore miniaturizzato #2).

Il valore della capacità stimato dal front-end del software di acquisizione relativo al setup miniaturizzato indica la presenza di capacità parassite all'interno del sistema elettronico e del connettore, che allontanano il comportamento reale dell'amplificatore da quello ideale.

Come si può notare dai dati contenuti in tabella 3.2.2 i valori di rumore medi riferiti all'amplificatore miniaturizzato rilevati a vuoto, considerando come capacità

quella stimata mediante il software (ca 11pF), sono quasi sempre inferiori a quelli determinati con l'Axopatch 200B in configurazione resistiva alle stesse bande di acquisizione.

Alle alte frequenze l'amplificatore miniaturizzato risulta essere migliore dell'Axopatch 200B in configurazione capacitiva, mentre alle bande di 1 kHz e 5 kHz i valori di deviazione standard del primo sono comunque accettabili e simili alle corrispondenti del comune amplificatore della Axon Instruments.

3.2 Rumore con capacità di test

Al fine di effettuare test sul rumore anche in condizioni che simulino il comportamento del doppio strato lipidico, si sostituisce il supporto per la formazione del bilayer con un analogo elettrico corrispondente ad una capacità, in modo tale da simulare l'avvenuta formazione della membrana in corrispondenza dell'ipotetico foro, come già ampiamente spiegato nel paragrafo 2.3.

Nell'analisi del rumore vengono utilizzate capacità di test con valori differenti per determinare e verificare come questo sia direttamente proporzionale alla capacità stessa.

Il segnale inviato è sempre una $V_c=0$ mV costante, mentre le capacità di test prese in considerazione hanno dei valori nominali di 5pF, 10pF e 15pF che con l'aggiunta del connettore vengono stimati, tramite il software, in 16pF, 21pF e 26pF.

I dati relativi agli amplificatori miniaturizzati sono visualizzabili nella tabella che segue.

Numero amplificatore testato	Banda di acquisizione	Std σ con capacità test C=16 pF	Std σ con capacità test C=21 pF	Std σ con capacità test C=26 pF
#1	625 Hz	0.26 pA	0.32 pA	0.34 pA
	1.25 kHz	0.36 pA	0.43 pA	0.51 pA
	5 kHz	0.82 pA	0.90 pA	1.04 pA
	10 kHz	1.33 pA	1.38 pA	1.68 pA
#2	625 Hz	0.27 pA	0.27 pA	0.29 pA
	1.25 kHz	0.45 pA	0.40 pA	0.43 pA
	5 kHz	0.98 pA	0.90 pA	0.93 pA
	10 kHz	1.73 pA	1.42 pA	1.50 pA
#4	625 Hz	0.22 pA	0.25 pA	0.27 pA
	1.25 kHz	0.34 pA	0.36 pA	0.39 pA
	5 kHz	0.74 pA	0.79 pA	0.86 pA
	10 kHz	1.12 pA	1.17 pA	1.32 pA
#5	625 Hz	0.29 pA	0.30 pA	0.35 pA
	1.25 kHz	0.40 pA	0.42 pA	0.48 pA
	5 kHz	0.82 pA	0.88 pA	0.97 pA
	10 kHz	1.26 pA	1.36 pA	1.48 pA
#6	625 Hz	0.29 pA	0.34 pA	0.45 pA
	1.25 kHz	0.42 pA	0.51 pA	0.67 pA
	5 kHz	0.93 pA	1.20 pA	1.40 pA
	10 kHz	1.47 pA	1.95 pA	2.30 pA
#7	625 Hz	0.26 pA	0.27 pA	0.34 pA
	1.25 kHz	0.37 pA	0.39 pA	0.48 pA
	5 kHz	0.81 pA	0.96 pA	0.96 pA
	10 kHz	1.25 pA	1.40 pA	1.29 pA

#8	625 Hz	0.24 pA	0.27 pA	0.32 pA
	1.25 kHz	0.34 pA	0.38 pA	0.46 pA
	5 kHz	0.73 pA	0.80 pA	0.95 pA
	10 kHz	1.13 pA	1.23 pA	1.45 pA
#9	625 Hz	0.25 pA	0.32 pA	0.45 pA
	1.25 kHz	0.36 pA	0.44 pA	0.67 pA
	5 kHz	0.81 pA	0.94 pA	1.38 pA
	10 kHz	1.17 pA	1.39 pA	2.09 pA

Tabella 3.3.1 Misura del rumore del segnale alle diverse bande di acquisizione con tre differenti capacità di test (16pF, 21pF, 26pF)

Effettuando una media del rumore alle diverse bande di acquisizione, gli amplificatori miniaturizzati con capacità di test risultano avere i seguenti valori RMS

Banda di acquisizione	Std media con $C_{\text{test}}=16$ pF	Std media con $C_{\text{test}}=21$ pF	Std media con $C_{\text{test}}=26$ pF
625 Hz	0.26 pA	0.29 pA	0.35 pA
1.25 kHz	0.38 pA	0.42 pA	0.51 pA
5 kHz	0.83 pA	0.92 pA	1.06 pA
10 kHz	1.31 pA	1.41 pA	1.64 pA

Tabella 3.3.2 Valori medi di rumore degli amplificatori miniaturizzati con capacità di test alle diverse bande di acquisizione.

La stessa misura viene effettuata anche per l'amplificatore Axopatch 200B nelle due differenti configurazioni di guadagno, per il quale si osservano i seguenti risultati.

Configurazione di guadagno	Banda di acquisizione	Std media con $C_{test}=16$ pF	Std media con $C_{test}=21$ pF	Std media con $C_{test}=26$ pF
$\alpha=50$	1 kHz	0.2673 pA	0.2644 pA	0.2643 pA
$\beta=1$	5 kHz	0.8223 pA	0.8300 pA	0.8426 pA
resistiva	10 kHz	1.8525 pA	1.8782 pA	1.9069 pA
$\alpha=50$	1 kHz	0.1544 pA	0.3564 pA	1.1616 pA
$\beta=1$	5 kHz	0.6046 pA	1.3904 pA	6.9714 pA
capacitiva	10 kHz	1.3081 pA	2.8340 pA	20.4820 pA

Tabella 3.3.3 Rumore riferito all’Axopatch 200B calcolato con tre diverse capacità di test alle diverse bande.

Confrontando i valori ottenuti sperimentalmente con l’uso delle capacità di test, si può affermare che mediamente l’amplificatore miniaturizzato possiede una deviazione standard inferiore alle alte frequenze rispetto ai corrispondenti valori RMS determinati tramite Axopatch 200B. Alle bande di 1 kHz e 5 kHz i risultati dei rumori di quest’ultimo sono buoni per la configurazione resistiva e confrontabili con quelli dell’amplificatore miniaturizzato, mentre la deviazione standard della configurazione capacitiva risulta essere molto elevata, soprattutto all’aumentare della frequenza.

Normalizzando i valori di rumore dell’amplificatore miniaturizzato ad una banda di 1kHz si ottiene 0.30 pA con $C_{test}=16$ pF, 0.34 pA con $C_{test}=21$ pF e 0.41 pA con $C_{test}=26$ pF. In questo modo è possibile effettuare un confronto diretto con i dati di rumore relativi all’Axopatch 200B alla stessa banda e concludere come questi siano mediamente inferiori a quelli della configurazione capacitiva e leggermente superiori a quelli determinati con l’headstage in configurazione resistiva.

In generale è possibile notare come la deviazione standard del segnale rilevato aumenti in modo direttamente proporzionale al valore della capacità misurata e all’aumentare della banda di acquisizione, come già anticipato all’inizio del paragrafo corrente.

CAPITOLO IV

Risultati sperimentali

Lo studio dei canali ionici e di altre proteine di membrana e il loro potenziale utilizzo come biosensori richiede la loro purificazione e la loro ricostituzione in bilayers artificiali.

L'inserimento di canali di membrana all'interno di doppi strati lipidici planari è una tecnica molto valida per la determinazione delle proprietà dei canali ionici, quali la selettività ionica, la permeabilità, la dipendenza dal voltaggio e la cinetica. La difficoltà principale nell'uso dei doppi strati lipidici planari per lo studio dei canali ionici è l'inserimento di questi ultimi all'interno dei bilayers.

Alcuni canali ionici poco complessi, come la gramicidina A, si inseriscono spontaneamente all'interno del doppio strato lipidico, risultando così facili da studiare e ben caratterizzabili. Altri canali, come nel caso dell' α -emolisina, sono costituiti da diverse subunità, le quali necessitano di tempo per legarsi al doppio strato fosfolipidico ed autoassemblarsi tra loro per formare il canale proteico.

4.1 Preparazione delle soluzioni e dei bilayers

Si procede prima di tutto con la preparazione della soluzione lipidica e di quella elettrolitica. Per la prima si usano lipidi puri DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) in polvere, acquistati dalla Avanti Polar Lipids, che vengono disciolti in decano ad ottenere una concentrazione di 10 mg/ml. Questa soluzione viene applicata sul foro del supporto sul quale si andranno a formare i bilayers, utilizzando la tecnica del *painting*, già descritta nel paragrafo 2.2.

La soluzione elettrolitica contiene una concentrazione 1M di KCl in H₂O, con l'aggiunta di HEPES 10mM ed EGTA 1mM, il tutto ad un pH di 7.48; questa servirà a riempire le camere che separano il setto forato con il doppio strato lipidico e permetterà di visualizzare le correnti ioniche che attraverseranno i canali di gramicidina A o di α -emolisina che verranno successivamente inseriti nel bilayer, simulando il reale comportamento dei compartimenti intra- ed extracellulare.

4.2 Formazione del bilayer

Per poter rilevare l'avvenuta formazione del bilayer a ridosso del setto forato, è stato imposto in ingresso al sistema un segnale in tensione dato da un'onda triangolare con frequenza di 48 Hz e ampiezza 118 mV_{pp}. La risposta in corrente che si ottiene dal sistema sarà nei due casi differente a seconda della presenza o meno della membrana.

Come già anticipato del paragrafo 2.4, la risposta del sistema ad un'onda triangolare in presenza di bilayer è un segnale approssimativamente quadro, la cui ampiezza dipende dal valore della capacità che si è creata nel foro o meglio dall'estensione del doppio strato lipidico.

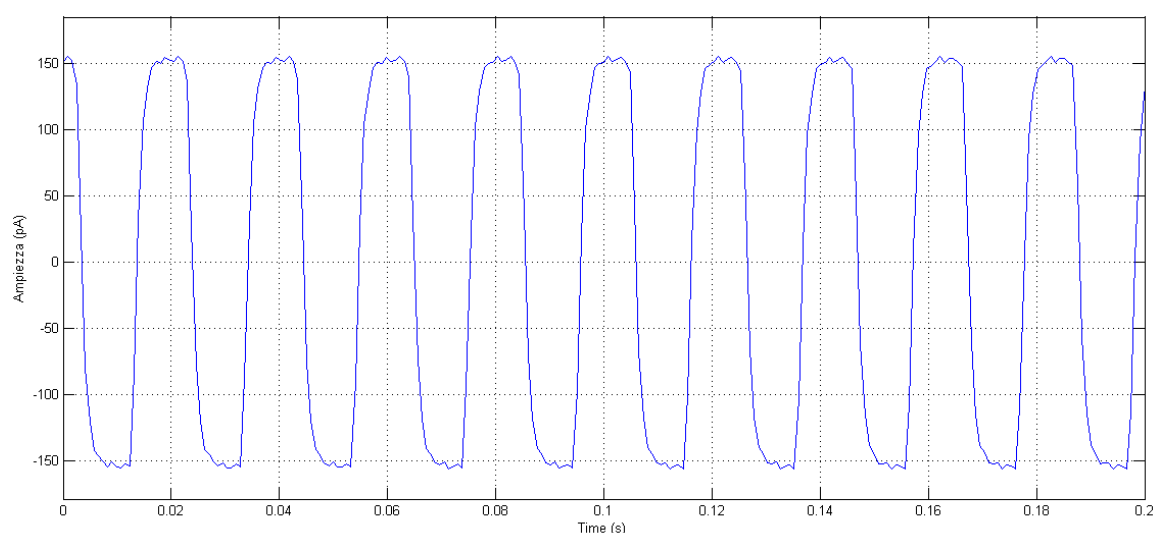


Figura 4.1.1 Onda quadra tipica del segnale rilevato dagli elettrodi in presenza di bilayer a 625 Hz, quando si impone in ingresso un'onda triangolare di ampiezza 118 mV_{pp} e frequenza 48 Hz.

L'estensione del doppio strato lipidico cambia nel tempo, ma in particolare la sua dimensione varia negli istanti successivi alla dispersione della soluzione lipidica sul supporto per formazione di membrane lipidiche. Osservando il segnale per mezzo del software di acquisizione, relativo all'amplificatore miniaturizzato, si nota che la triangolare si trasforma in onda quadra quando i lipidi occludono il foro e, man mano che questi si orientano correttamente, si osserva aumentare l'ampiezza della forma d'onda.

4.3 Stima della capacità e dell'estensione del bilayer

A regime una membrana è spessa quanto due molecole di lipidi ed è ancorata a tutti i bordi da un toro di materiale più spesso. Il toro è il confine tra la membrana e l'orlo del foro ed è composto per lo più da decano con un monostrato di lipidi ad ogni interfaccia con la soluzione.

Misurando la capacità della membrana che è proporzionale all'area della membrana, è possibile calcolare quale percentuale della superficie del foro sia effettivamente ricoperta dalla membrana e quale sia lo spessore del toro. Un bilayer di norma risulta sufficientemente esteso quando la capacità misurata per la membrana è pari almeno al 50% della capacità attesa per una membrana con dimensioni pari esattamente a quelle del foro. Le dimensioni del foro sono fisse ed è nota la capacità specifica per membrane realizzate con le tipologie di fosfolipidi ed il solvente utilizzati durante gli esperimenti, perciò, a partire dalla relazione esistente tra capacità ed estensione della membrana, è possibile calcolare quest'ultima e rapportarla alle dimensioni del foro. Infatti risulta che la capacità di membrana misurata C_m è uguale al prodotto fra l'area della membrana A_m e la capacità specifica c_s , che per membrane contenenti decano vale $0,5\mu F/cm^2$:

$$C_m = c_s A_m$$

Da questa relazione si ricava

$$A_m = \frac{C_m}{c_s}$$

di conseguenza, la percentuale di superficie del foro effettivamente ricoperta dal membrana è data dal rapporto tra l'area del bilayer e l'area del foro

$$A_{\%} = \frac{A_m}{A_h} 100$$

dove A_h rappresenta l'area del foro.

Nel nostro caso la microfluidica multicanale utilizzata come supporto per la formazione dei doppi strati lipidici ha fori con diametro di 75 μm , mentre la capacità che si stima tramite software dopo l'avvenuta formazione del bilayer è mediamente di 15 pF. Sostituendo tali valori nelle formule appena viste si ottiene

$$A_{\%} = \frac{A_m}{A_h} 100 = 67.9\%$$

Questo valore di $A_{\%}$ è indicativo di una buona estensione e stabilità della membrana, si prosegue perciò l'esperimento con l'inserimento dei canali proteici all'interno del bilayer.

4.4 Test con bilayer

L'ultimo test effettuato sul rumore riguarda la stima di questo attraverso l'amplificatore miniaturizzato connesso alla microfluidica multicanale per la realizzazione di doppi strati lipidici con relativo bilayer formato (fig. 4.4.1).

Tramite uno switch si seleziona uno dei quattro fori della microfluidica sul quale formare il doppio strato lipidico e si procede con il metodo di painting già descritto in precedenza. Una volta realizzato il bilayer si provvede a stimarne la capacità, e quindi l'estensione, attraverso il comando presente sul software di acquisizione. Una volta verificata l'avvenuta formazione del bilayer secondo il metodo descritto nel par. 4.2, si impone una $V_c=0$ costante per individuare il valore di rumore che si somma al segnale utile che si intende misurare.

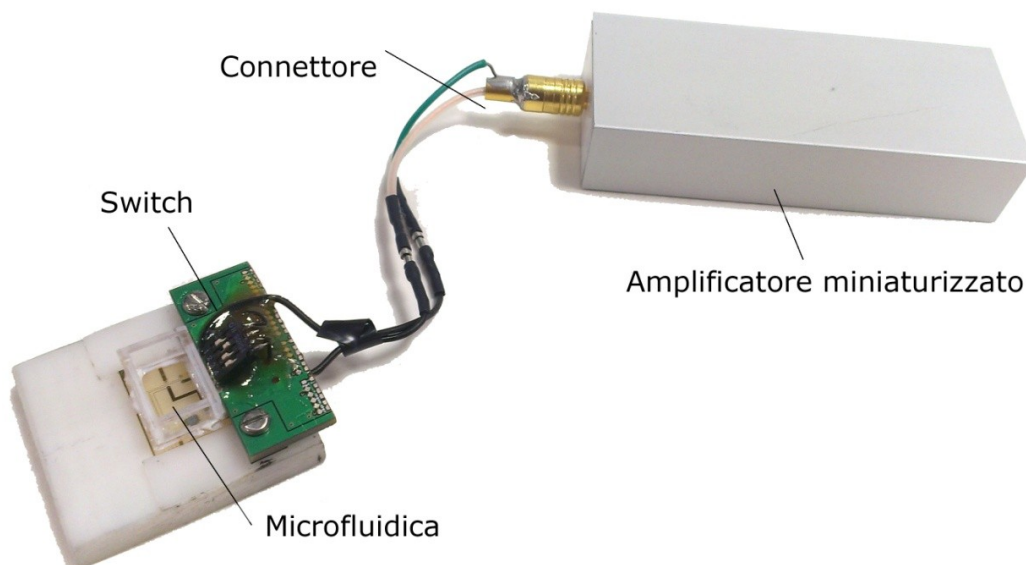


Figura 4.4.1 Setup per la formazione di bilayer con amplificatore miniaturizzato usato in abbinamento alla microfluidica multicanale.

I risultati ottenuti sono osservabili nella tabella che segue.

Banda di acquisizione	Std σ con bilayer da C=11.7 pF	Std σ con bilayer da C=13.6 pF	Std σ con bilayer da C=15.0 pF
625 Hz	0.21 pA	0.23 pA	0.21 pA
1.25 kHz	0.30 pA	0.34 pA	0.35 pA
5 kHz	0.67 pA	0.77 pA	0.83 pA
10 kHz	1.07 pA	1.21 pA	1.30 pA

Tabella 4.4.1 Misura del rumore del segnale alle diverse bande di acquisizione con tre bilayers con differenti capacità stimate (11.7 pF, 13.6 pF, 15.0 pF).

Per le prime tre bande di acquisizione il rumore è ampiamente al di sotto del pA e aumenta leggermente in modo direttamente proporzionale al valore della capacità stimata. Per la frequenza di 10 kHz la deviazione standard del segnale rilevato è dell'ordine del pA, risultato sicuramente accettabile se si considera che i canali ionici più piccoli, come quelli di K^+ , Na^+ e gramicidina A hanno una conduttanza rispettivamente di 80 pS^[22], 20 pS^[23] e 21 pS^[19].

4.5 Inserimento del canale proteico e analisi delle ampiezze delle correnti

Dopo la formazione della membrana, ottenuta con il metodo ed i materiali descritti all'inizio del capitolo 4, è possibile passare alla fase degli esperimenti in cui si prevede l'inserimento dei canali proteici all'interno del bilayer.

Per la gramicidina si utilizzano aliquote da 50µg/ml in etanolo, di cui si preleva una quantità tale da ottenere una concentrazione finale di 40pg/ml nella camera della microfluidica impiegata per la realizzazione dei bilayers.

L'α-emolisina, essendo una tossina solubile in acqua, è presente in aliquote da 10 µg/ml in H₂O: se ne estrae una quantità tale da raggiungere una concentrazione finale di 30pg/ml al fine di poter analizzare correttamente la conduttanza dei singoli canali.

L'analisi dell'ampiezza di una corrente di singolo canale permette la classificazione del canale stesso sulla base della conduttanza. Il modo più semplice per visualizzare le ampiezze delle correnti in una registrazione è quello di calcolare l'istogramma delle correnti. Il range di misura del segnale in corrente viene suddiviso in un insieme di bin di ugual misura. Per ciascun campione I_i , nel segnale registrato è allocato un bin j ottenuto dall'equazione

$$j = \left\lceil \frac{(I_i - I_{lo})n_b}{I_{hi} - I_{lo}} \right\rceil + 1$$

dove I_{hi} e I_{lo} sono i limiti del range di corrente misurabile e n_b è il numero di bin dell'istogramma. Quest'ultimo è cumulato attraverso l'applicazione dell'equazione per ogni campione nella traccia e incrementando i bin dell'istogramma.

In generale un istogramma delle ampiezze conterrà una serie di picchi ciascuno corrispondente ad un livello di corrente: ciò sarà dovuto alla presenza di uno stato di chiusura e più stati di conduzione dello specifico canale o all'apertura simultanea di più canali. L'area sotto ciascun picco rappresenta la percentuale di tempo riferita alla durata di acquisizione in cui il canale si è trovato in quello stato conduttivo. L'ampiezza del picco è una misura della variabilità delle fluttuazioni di corrente all'interno di ciascuno stato conduttivo.

Queste sono dovute a diversi fattori:

- il rumore di strumentazione;
- il rumore termico del sistema e in particolare della membrana;
- l'effetto della distorsione legata al filtraggio del segnale;
- la variabilità della corrente di canale all'interno di uno stesso stato conduttivo.

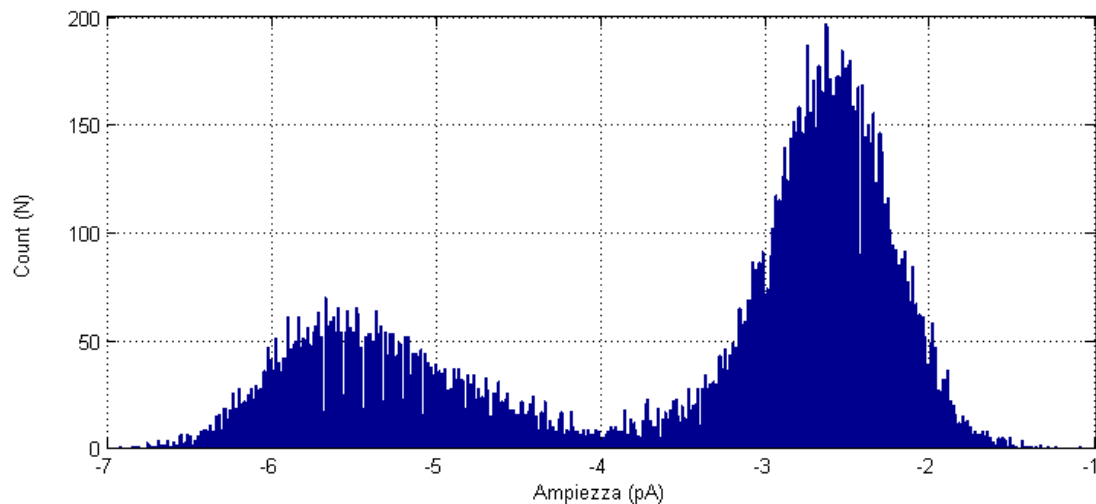


Figura 4.5.1 Esempio di istogramma delle ampiezze di un segnale in corrente rilevato dall'amplificatore miniaturizzato, in cui è possibile osservare due diversi livelli conduttivi.

La distribuzione delle ampiezze delle correnti può essere descritta dalla somma di una serie di funzioni gaussiane, una per ciascun picco, e ognuna caratterizzata da un proprio valor medio ed una propria deviazione standard

$$f(x) = \sum_{i=1}^n A_i \frac{e^{-\frac{(x-\mu_i)^2}{2\sigma_i^2}}}{\sigma_i \sqrt{2\pi}}$$

In figura 4.5.2 viene mostrato un esempio di applicazione della procedura di fitting che consente di ottenere le distribuzioni gaussiane a partire dall'istogramma delle ampiezze per mezzo dell'equazione prima descritta con $n = 5$.

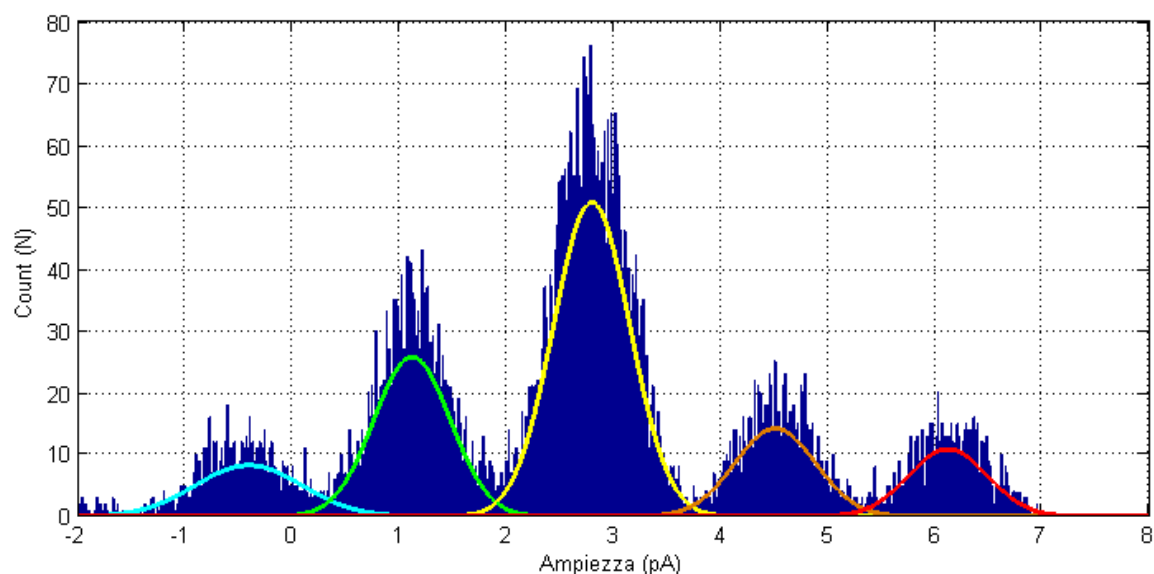


Figura 4.5.2 Applicazione della procedura di fitting di un segnale in corrente che presenta cinque diversi livelli conduttivi, identificabili dal numero di gaussiane presenti nel grafico.

I valori medi delle cinque gaussiane rappresentano i diversi livelli di conduzione registrati durante l'acquisizione del segnale, di conseguenza la differenza dei μ_i di due gaussiane adiacenti può essere utile, insieme al valore di tensione V_c imposto, per determinare la conduttanza del corrispondente canale che ha generato la variazione di corrente. Dall'analisi delle funzioni ricavate per fitting è possibile notare come tutte le cinque curve abbiano valori di deviazione standard, e quindi di rumore, simili tra loro.

4.5.1 Acquisizioni di canali di gramicidina A mediante l'amplificatore miniaturizzato

Tale studio si propone di analizzare il comportamento del setup miniaturizzato durante l'acquisizione di segnali provenienti da piccoli canali ionici che si inseriscono facilmente e spontaneamente all'interno del bilayer. I canali di gramicidina A (rif. par. 1.3.1) permettono per le loro proprietà di caratterizzare il sistema miniaturizzato in condizioni sperimentali e alle diverse bande di funzionamento.

Di seguito verranno mostrate e confrontate le risposte in corrente di bilayers in cui si sono inseriti diversi canali di gramicidina A, con acquisizioni effettuate alle diverse bande che è possibile settare dal front-end del software dell'amplificatore miniaturizzato. Quest'analisi permetterà di individuare fino a quale banda di funzionamento è possibile identificare l'apertura dei piccoli canali proteici presenti nel bilayer, i quali determinano una variazione del livello conduttivo. Si vedrà di seguito come tale riconoscimento sia attuabile fino ad un valore di rapporto segnale rumore (SNR rif. cap. 3) superiore a zero dB.

Per ciascuna banda che verrà analizzata di seguito verrà osservata la risposta in corrente di un bilayer contenente canali di gramicidina A ad un potenziale transmembrana imposto pari a $V_c=100$ mV.

Dati relativi alla banda di acquisizione a 625 Hz

Il primo tracciato che si osserva è quello meno affetto da rumore perché filtrato ad una banda di frequenza minore: in questo caso è possibile distinguere chiaramente le aperture dei canali di gramicidina A presenti nella membrana.

Nella figura 4.5.1.1 si osservano le aperture di tre differenti canali che variano il livello conduttivo del segnale rispetto alla linea di riferimento posizionata sugli 8 pA, il cui spostamento rispetto al livello conduttivo nullo è dovuto a precedenti aperture di diversi canali di gramicidina A: risulta evidente l'individuazione dell'ampiezza dei singoli gradini anche dal seguente diagramma contenente la diretta risposta in corrente del sistema nel tempo.

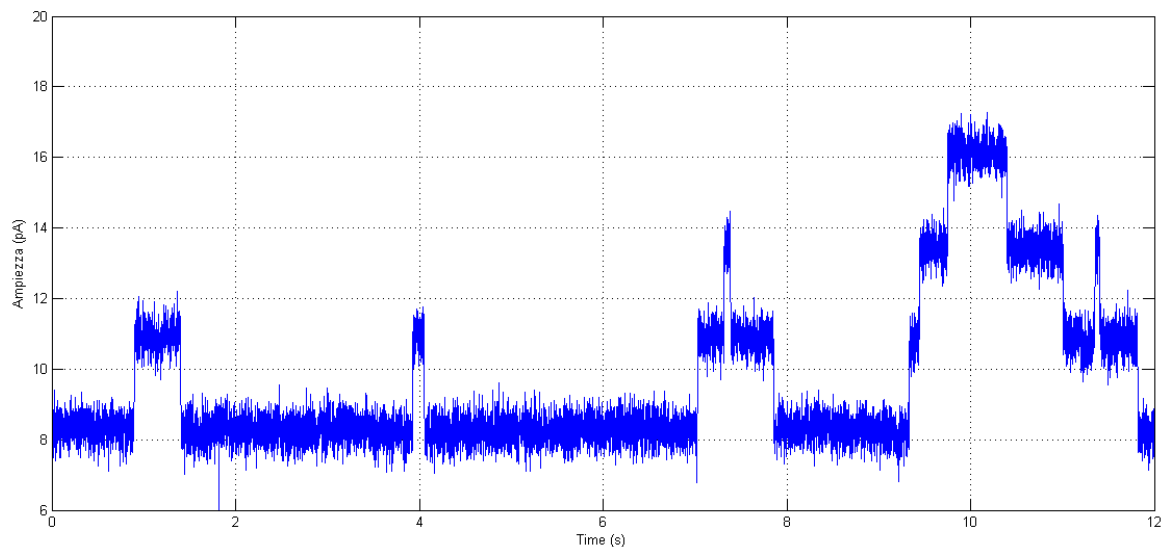


Figura 4.5.1.1 Risposta in corrente di canali di gramicidina A all'interno del bilayer con imposizione di $V_c=100$ mV e banda di acquisizione a 625 Hz.

I diversi livelli di conduzione possono essere evidenziati nell'istogramma delle ampiezze del segnale mostrato in figura 4.5.1.2. Si notano quattro gaussiane, la prima delle quali corrisponde alla linea base di conduzione, mentre le altre tre sono caratteristiche della durata di apertura dei diversi canali di gramicidina A. La differenza dei valori medi di due gaussiane adiacenti identifica il salto di ampiezza di corrente causato dall'apertura del canale, mentre la deviazione standard σ di ognuna di esse indica il rumore che si sovrappone al segnale utile rilevato dall'amplificatore.

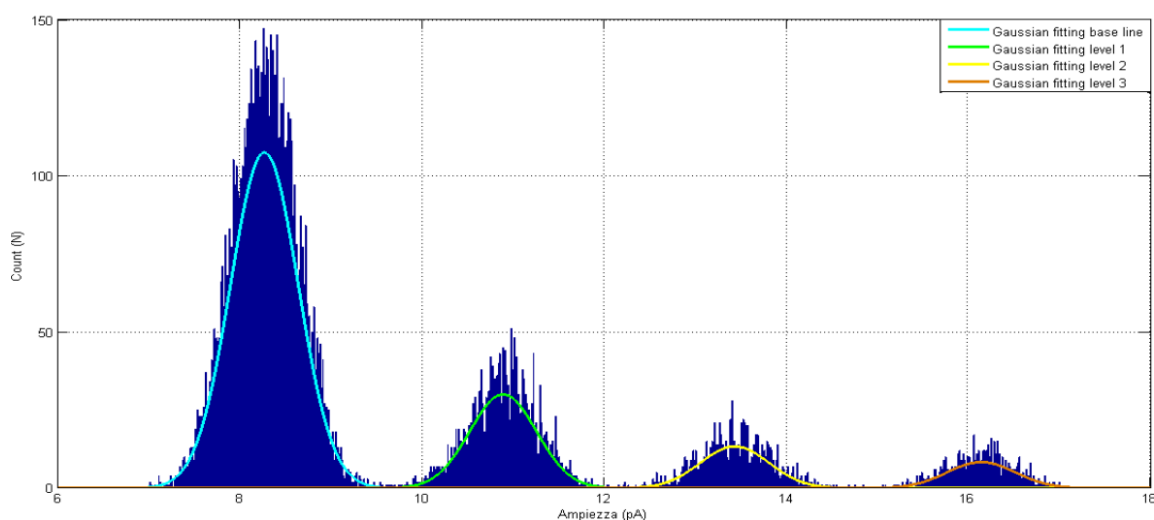


Figura 4.5.1.2 Iistogramma delle ampiezze del segnale visualizzato in figura 4.5.1.1, con applicazione della procedura di fitting.

I valori medi dei diversi livelli conduttivi e l'errore relativo ad ognuno di essi sono riassunti nella seguente tabella

Gaussiana	Valor medio μ	Deviazione standard σ
Linea base	8.27 pA	0.52 pA
Livello 1	10.89 pA	0.52 pA
Livello 2	13.43 pA	0.53 pA
Livello 3	16.13 pA	0.53 pA

Tabella 4.5.1.1 Valori riassuntivi relativi al fitting dell'istogramma delle ampiezze di figura 4.5.1.2, corrispondente ad una banda di 625 Hz.

L'errore RMS, corrispondente al valore di σ , risulta essere molto simile per i quattro livelli conduttivi in quanto dipende dal rumore del sistema elettronico e non dal salto di corrente che si osserva nel tracciato. Inoltre anche la differenza dei valori medi μ di due gaussiane adiacenti, che identifica il salto di corrente dovuto all'apertura del canale, risulta mediamente pari a 2.62 pA e sarà determinante per calcolare il valore della conduttanza del canale di gramicidina A nel par. 4.5.2. Il rapporto segnale rumore per la banda a 625 Hz è pari a 14.05 dB, valore sufficientemente maggiore di uno e segno di un'ottima capacità di identificazione del segnale utile rispetto introdotto dal sistema.

Dati relativi alla banda di acquisizione a 1.25 kHz

In figura 4.5.1.3 si osserva la risposta in corrente del bilayer contenente canali di gramicidina A: è possibile notare come siano ancora ben identificabili i diversi livelli conduttivi ed i gradini in ampiezza dovuti all'apertura dei canali.

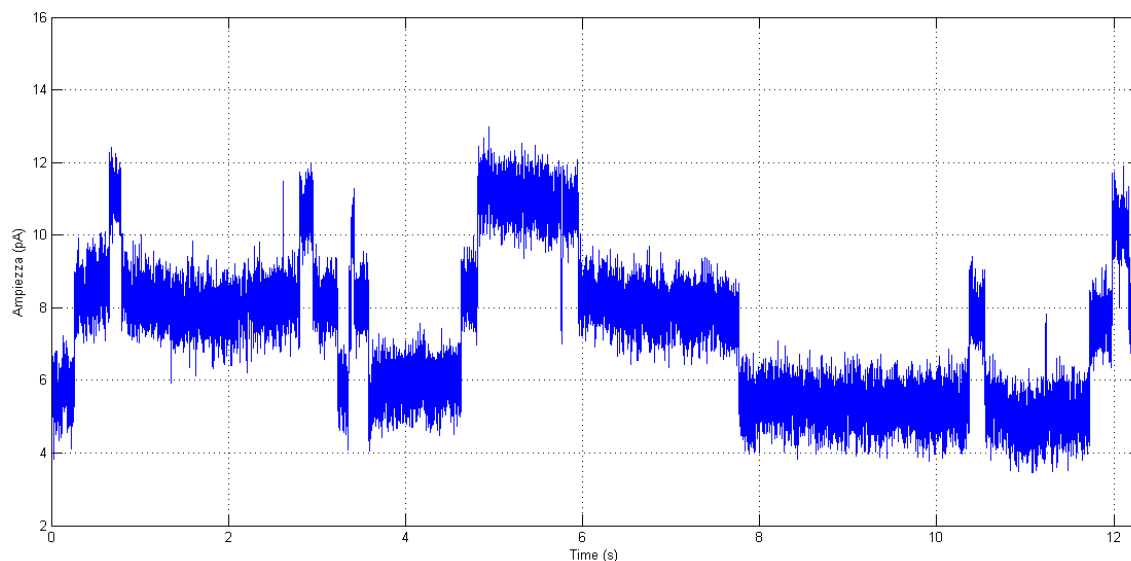


Figura 4.5.1.3 Risposta in corrente di canali di gramicidina A all'interno del bilayer con imposizione di $V_c=100$ mV e banda di acquisizione a 1.25 kHz.

Nel corrispondente istogramma delle ampiezze, relativo al tracciato di figura 4.5.1.3, si distinguono tre livelli conduttivi con le relative gaussiane ottenute mediante applicazione della procedura di fitting: queste sono leggermente sovrapposte rispetto a quelle relative al tracciato ottenuto con banda a 625 Hz, ciò indica un valore di rumore maggiore, quindi una deviazione standard σ più alta in valore assoluto.

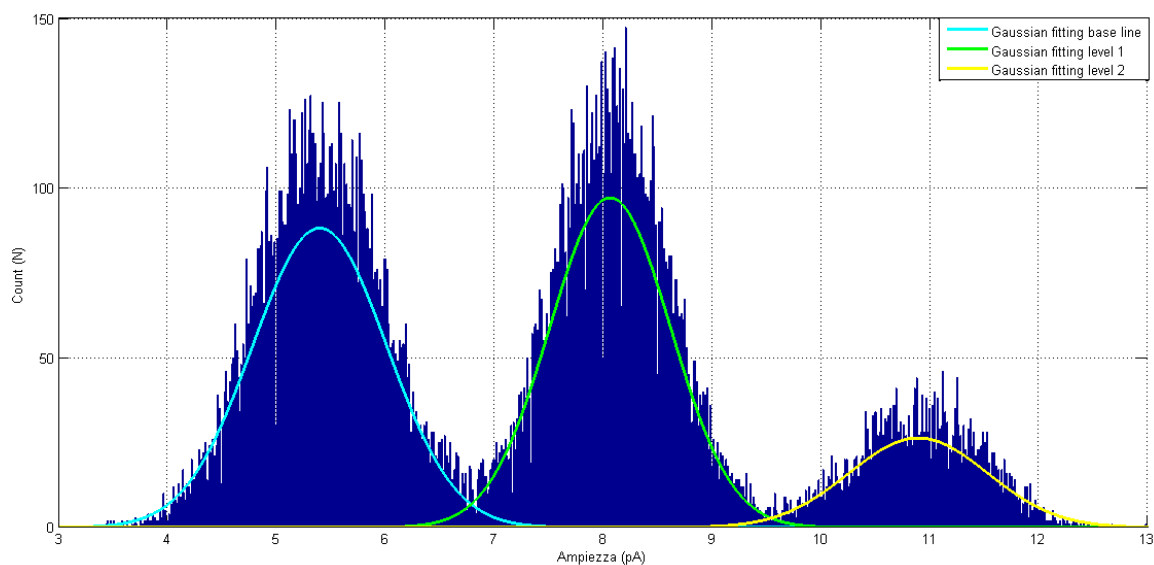


Figura 4.5.1.4 Istogramma delle ampiezze del segnale visualizzato in figura 4.5.1.3, con applicazione della procedura di fitting.

I dati delle gaussiane ottenute con il fitting dell'istogramma delle ampiezze del segnale, acquisito con un banda di 1.25 kHz sono riepilogati nella tabella seguente.

Gaussiana	Valor medio μ	Deviazione standard σ
Linea base	5.40 pA	0.87 pA
Livello 1	8.06 pA	0.78 pA
Livello 2	10.89 pA	0.90 pA

Tabella 4.5.1.2 Valori riassuntivi relativi al fitting dell'istogramma delle ampiezze di figura 4.5.1.4, corrispondente ad una banda di 1.25 kHz.

Il valore della deviazione standard σ dei tre livelli conduttivi risulta essere mediamente pari a 0.85 pA, maggiore quindi di quello ricavato a 625 Hz. Nonostante ciò si riescono ancora a distinguere i gradini di corrente dati dall'apertura dei canali di gramicidina A, la cui differenza tra i valori medi μ di due gaussiane adiacenti è mediamente pari a 2.75 pA. Se si calcola il SNR si ottiene un valore pari a 10.12 dB che dimostra una buona identificazione del segnale utile.

Dati relativi alla banda di acquisizione a 5 kHz

Nella figura 4.5.1.5 si osserva la risposta in corrente di un bilayer contenente canali di gramicidina A, in cui si riescono a distinguere le aperture di due differenti canali, che fanno variare il livello di corrente rispetto alla linea base posta sui 5 pA (livello non nullo a causa di precedenti aperture di canali proteici presenti nel bilayer).

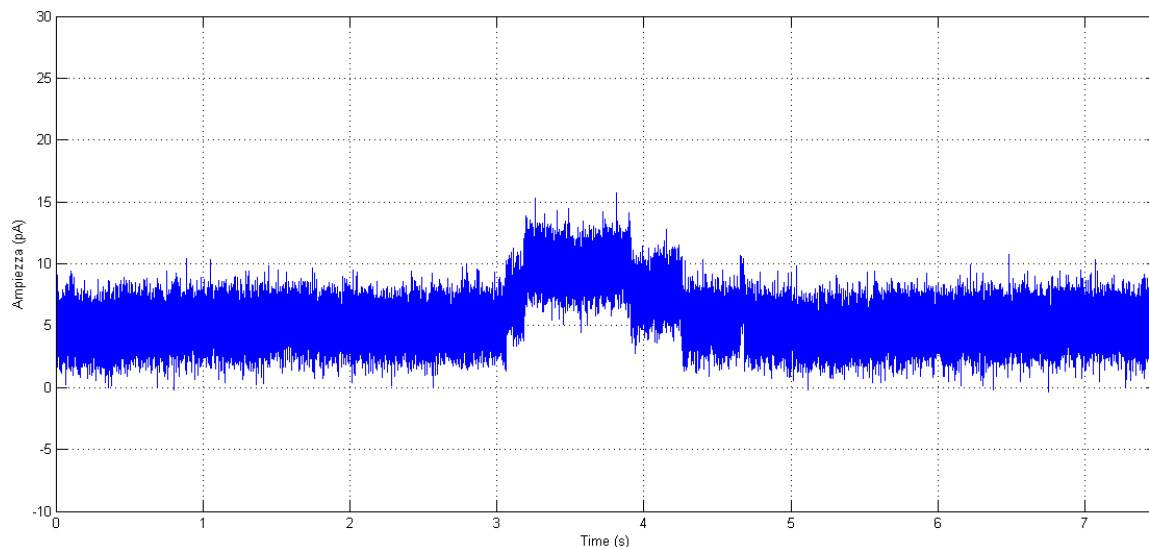


Figura 4.5.1.5 Risposta in corrente di canali di gramicidina A all'interno del bilayer con imposizione di $V_c=100$ mV e banda di acquisizione a 5 kHz.

I tre diversi livelli conduttivi osservabili in figura 4.5.1.5 non sono però identificabili nel diagramma delle ampiezze delle correnti di seguito riportato. In particolare dall'istogramma si riescono ad ottenere con la procedura di fitting solamente due delle tre gaussiane realmente presenti e rappresentative dei livelli conduttivi.

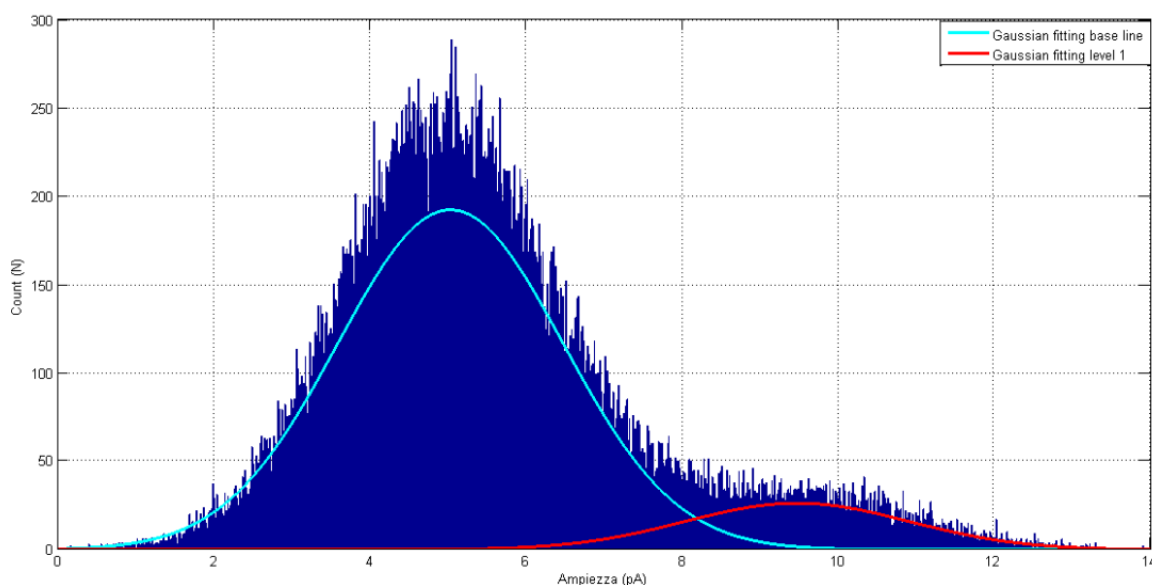


Figura 4.5.1.6 Istogramma delle ampiezze del segnale visualizzato in figura 4.5.1.5, con applicazione della procedura di fitting.

I coefficienti relativi alle gaussiane sono riepilogati di seguito

Gaussiana	Valor medio μ	Deviazione standard σ
Linea base	5.02 pA	2.03 pA
Livello 1	9.47 pA	2.03 pA

Tabella 4.5.1.3 Valori riassuntivi relativi al fitting dell'istogramma delle ampiezze di figura 4.5.1.6, corrispondente ad una banda di 5 kHz.

Si nota immediatamente come il valore di rumore RMS sia di molto maggiore rispetto alle precedenti bande di acquisizione analizzate, questo può essere constatato anche dalla netta sovrapposizione delle gaussiane ottenute per fitting. Altro aspetto da evidenziare è l'assenza di uno dei livelli conduttivi nell'istogramma delle ampiezze, che può essere rilevato analizzando la differenza tra i valori medi riportati in tabella 4.5.1.3: il salto di corrente non corrisponde ai valori relativi ai gradini visti per le bande a 625 Hz e 1.25 kHz, ciò fa intuire la presenza di un ulteriore livello di conduzione, intermedio rispetto ai due facilmente riconoscibili nel grafico in figura 4.5.1.6, che però risulta distinguibile nella risposta in corrente della figura 4.5.1.5.

Se si calcola il rapporto segnale rumore SNR considerando come segnale utile quello di 2.75 pA calcolato nella banda precedente, si ottiene un valore pari a 2.64 dB, risultato quasi al limite per il corretto riconoscimento del segnale utile.

Dati relativi alla banda di acquisizione a 10 kHz

Acquisendo ad una banda di 10 kHz si ottiene il seguente tracciato di risposta in corrente, in cui le aperture dei canali di gramicidina A non sono così facilmente riconoscibili come per le bande inferiori.

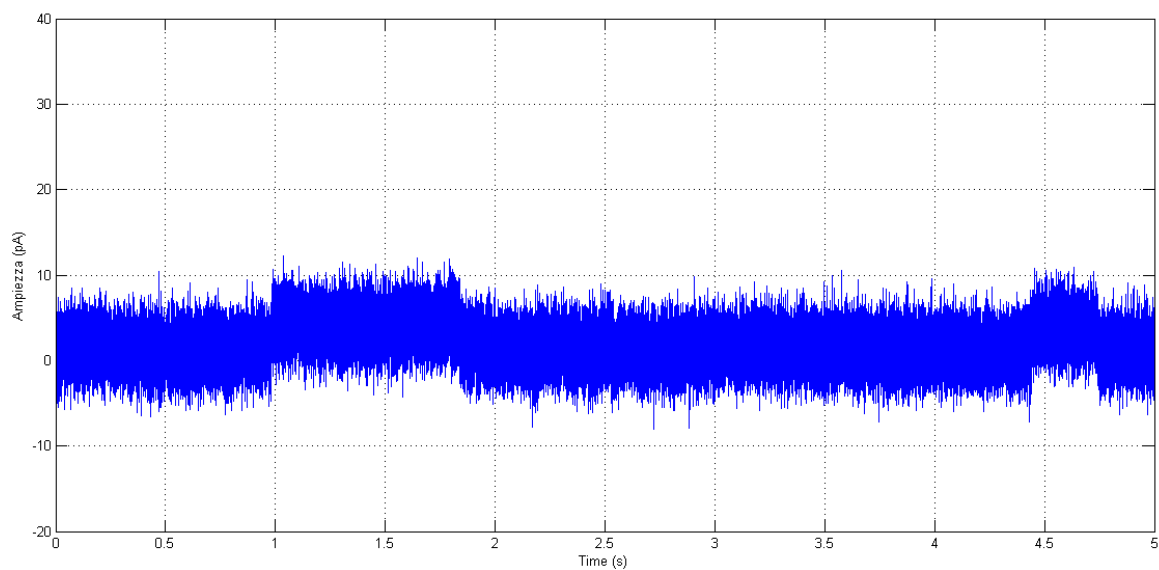


Figura 4.5.1.7 Risposta in corrente di canali di gramicidina A all'interno del bilayer con imposizione di $V_c=100$ mV e banda di acquisizione a 10 kHz.

Tale aspetto è ulteriormente confermato dall'istogramma delle ampiezze, in cui non si riescono in alcun modo a distinguere i due livelli di conduzione, uno relativo alla linea base e l'altro all'apertura di un canale di gramicidina A.

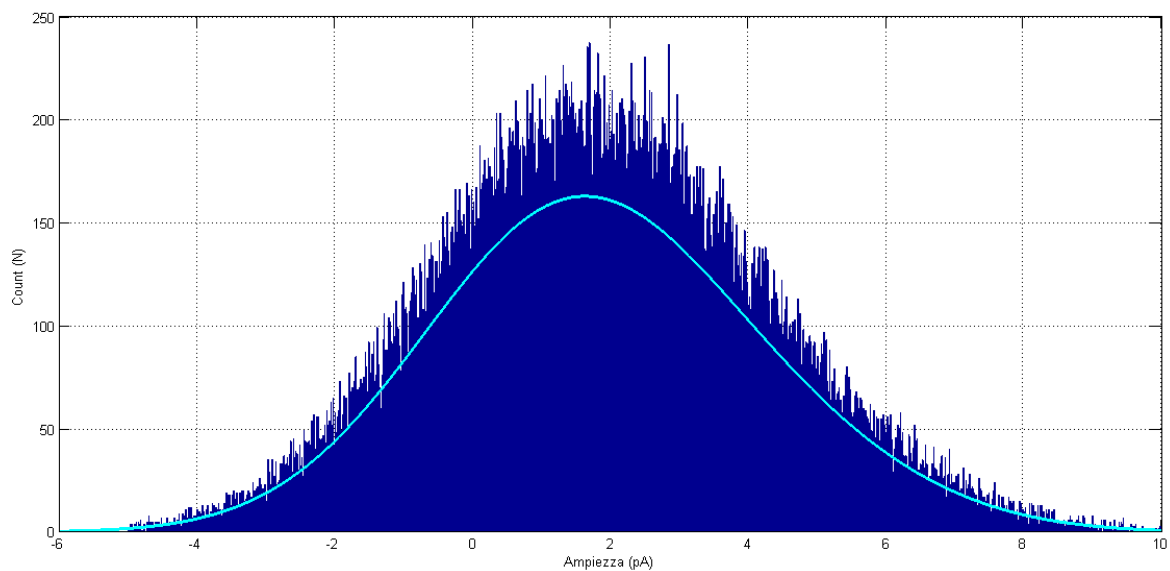


Figura 4.5.1.8 Iistogramma delle ampiezze del segnale visualizzato in figura 4.5.1.7, con applicazione della procedura di fitting.

Effettuando il fitting dell'istogramma si ottengono i coefficienti relativi a due gaussiane, che risultano nella pratica quasi del tutto sovrapposte (fig. 4.5.1.8).

Gaussiana	Valor medio μ	Deviazione standard σ
Linea base	1.32 pA	3.01 pA
Livello 1	4.25 pA	2.98 pA

Tabella 4.5.1.4 Valori riassuntivi relativi al fitting dell'istogramma delle ampiezze di figura 4.5.1.8, corrispondente ad una banda di 10 kHz.

L'errore RMS sul segnale, identificabile con il valore di deviazione standard σ , risulta essere molto elevato, segno anche della quasi completa sovrapposizione delle gaussiane ottenute per fitting dall'istogramma delle ampiezze.

La differenza tra i valori medi μ dei due livelli conduttivi è pari a 2.92 pA e se si calcola il rapporto segnale rumore si ottiene $SNR_{10kHz} = -0.23$ dB, valore che non consente assolutamente di distinguere il segnale utile nel tracciato che viene visualizzato.

4.5.2 Studio della conduttanza della gramicidina A

Un punto fondamentale nello studio di correnti di singolo canale è rappresentato dall'analisi dell'ampiezza delle correnti attraverso la generazione di curve corrente-tensione I-V e dalla determinazione della selettività ionica del canale. Quest'ultimo può quindi essere caratterizzato in base alla propria conduttanza che è specifica per ogni classe di canali.

Poiché le misure meno affette da rumore, ovvero con SNR maggiore, sono quelle realizzate a 625 Hz, si è scelta tale banda per effettuare misure quantitative sulla conduttanza dei canali di gramicidina A.

Per la determinazione della conduttanza viene analizzata la risposta del bilayer contenente i canali di gramicidina A a differenti valori di tensione imposta costante. In particolare si è esaminata la differenza tra i valori medi dei diversi livelli conduttivi, corrispondente al gradino di corrente causato dall'apertura del

canale, in un tracciato contenente la risposta a potenziali transmembrana costanti pari a -100 mV, -50 mV, 0 mV, $+50$ mV e $+100$ mV.

Come descritto nel par. 4.5.1 l'ampiezza del gradino di corrente causato dall'apertura di un canale in risposta ad una $V_c=100$ mV è mediamente pari a 2.62 pA, con un valore ottimo di rapporto segnale rumore di 14.05 dB.

Per gli altri potenziali transmembrana applicati i valori dei relativi salti di corrente osservati sono riportati di seguito.

Potenziale transmembrana applicato	Ampiezza gradino di corrente
-100 mV	-2.81 pA
-50 mV	-1.37 pA
0 mV	0 pA
$+50$ mV	$+1.06$ pA
$+100$ mV	$+2.62$ pA

Tabella 4.5.2.1 Ampiezza dei gradini di corrente dovuti alle aperture dei canali di gramicidina A in funzione del potenziale transmembrana applicato.

Quando al bilayer viene applicata una tensione $V_c=50$ mV, l'ampiezza dei gradini di corrente dovuti all'apertura dei canali di gramicidina A (fig. 4.5.2.1.a) risulta essere inferiore rispetto al valore rilevato durante l'applicazione dei 100 mV.

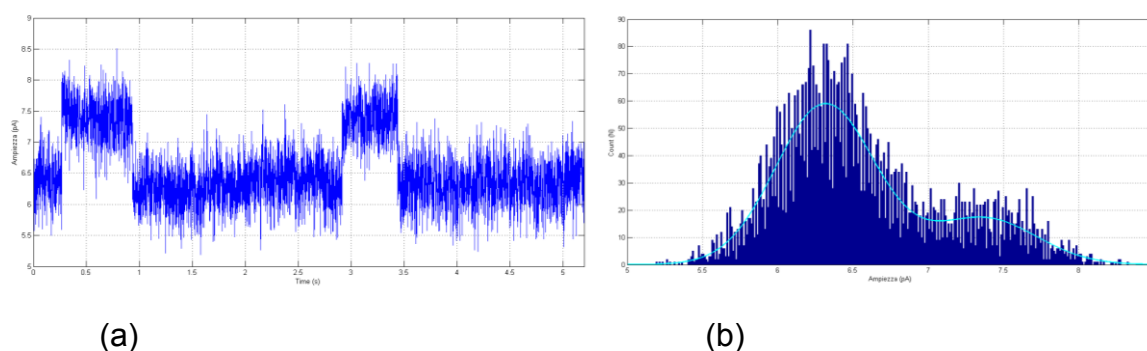


Figura 4.5.2.1 Risposta in corrente di canali di gramicidina A all'interno del bilayer con imposizione di $V_c=50$ mV e banda di acquisizione a 625 Hz (a) e relativo istogramma delle ampiezze (b).

Nel corrispondente istogramma delle ampiezze (fig. 4.5.2.1.b) è possibile osservare come le distribuzioni gaussiane si sovrappongono l'una sull'altra: tale aspetto è dovuto principalmente ad un salto di corrente relativamente basso tra i due livelli conduttivi, a causa del minore potenziale transmembrana applicato che determina un rapporto segnale rumore più basso e pari a $SNR_{50mV} = 6.88$ dB, valore inferiore al SNR_{100mV} (rif. par 4.5.1).

Riportando tutti i dati della tab. 4.5.2.1 in un unico grafico ed applicando il metodo dei minimi quadrati, con l'utilizzo di un polinomio di primo grado, si ottiene la seguente caratteristica I-V.

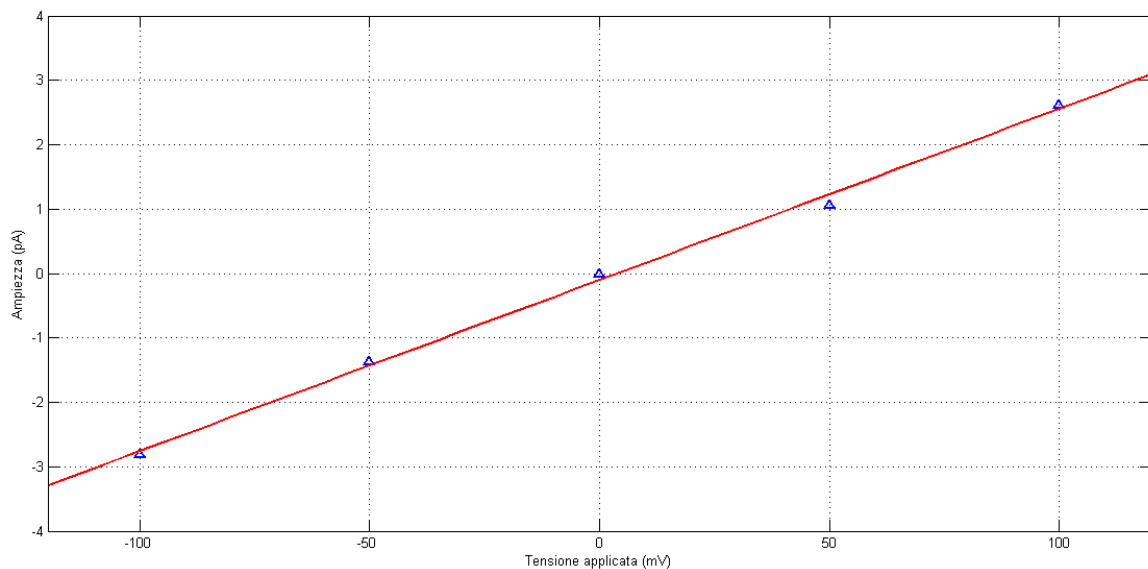


Figura 4.5.2.2 Caratteristica I-V delle risposte in corrente della gramicidina A ai diversi potenziali applicati.

La conduttanza del singolo canale di gramicidina A è identificabile con la pendenza della retta che interpola tutti i dati ottenuti sperimentalmente: essa corrisponde ad un valore di 26.6 pS, risultato in linea e confrontabile con quello di 21 pS presente in letteratura^[19].

4.5.3 Studio della conduttanza dell' α -emolisina

Come già accennato nel par. 1.3.2, l'interesse principale dell' α -emolisina riguarda la conduttanza che essa assume una volta inserita nel bilayer artificiale e che permette di discriminare le diverse specie chimiche che attraversano il canale in base alla variazione di conduttanza che determinano durante il loro passaggio e al tempo in cui questo rimane occluso.

I gradini che si osservano analizzando la risposta in corrente all'applicazione di una V_c costante di 50 mV (fig. 4.5.3.1) sono caratterizzati da una ampiezza maggiore rispetto a quelli di gramicidina A visti nei paragrafi precedenti. Ciò è dovuto alla maggiore conduttanza del canale di α -emolisina, che determina un salto di livello conduttivo di circa 49 pA con il potenziale transmembrana definito prima.

Nella seguente figura si osserva l'inserimento di due canali di α -emolisina all'interno del bilayer, riconoscibili mediante i due salti conduttivi; si può notare anche come il livello di conduzione base non sia prossimo allo zero ma più elevato: questo è dovuto all'inserimento di un altro canale di α HL prima dell'inizio del salvataggio del tracciato.

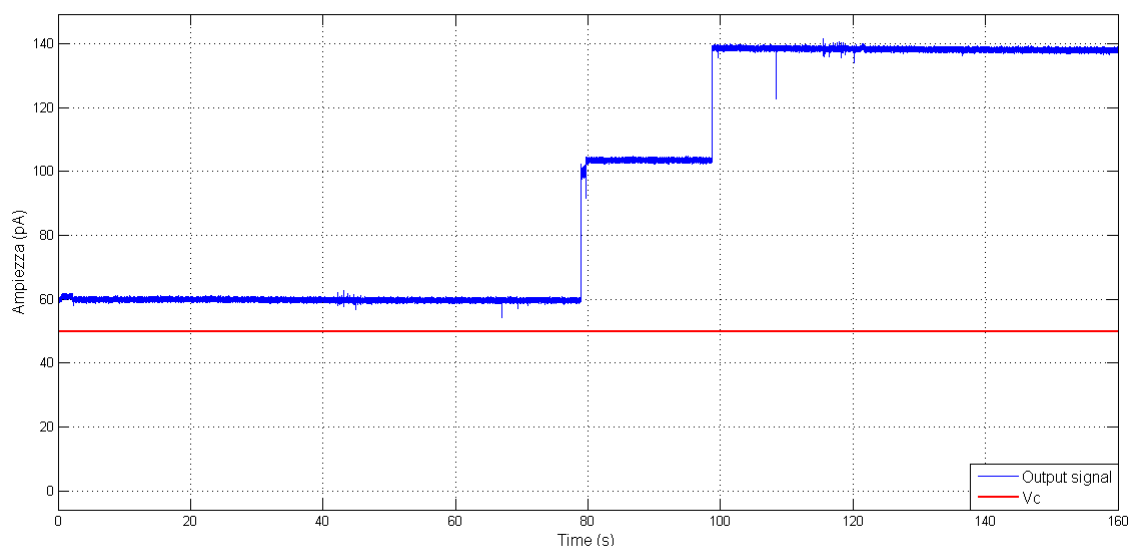


Figura 4.5.3.1 Risposta di un bilayer ad un potenziale transmembrana di 50 mV in cui si osserva l'inserimento di due canali di α -emolisina. Il primo canale si inserisce prima di iniziare a salvare il tracciato, quindi complessivamente sono presenti 3 canali di α HL.

Il canale di α -emolisina, a differenza della gramicidina A, è formato da sette monomeri che, una volta assemblati all'interno del bilayer, creano dei pori stabili che generalmente non si richiudono: il livello conduttivo rimane perciò costante nel tempo.

Lo studio completo della conduttanza di canale di α -emolisina è stato condotto esclusivamente per quei tracciati in cui il canale stesso è stato osservato per tutti i valori di potenziale applicati: -40mV, -30mV, -20mV, -10mV, +10mV, +20 mV, +30 mV, +40 mV. In particolare in figura 4.5.3.2 si può notare la risposta in corrente all'applicazione di impulsi di tensione costanti per la determinazione della conduttanza di canale: si mette in evidenza il tracciato subito dopo aver visto l'inserimento di tre canali di α -emolisina (fig. 4.5.3.1), identificabili tramite tre differenti gradini.

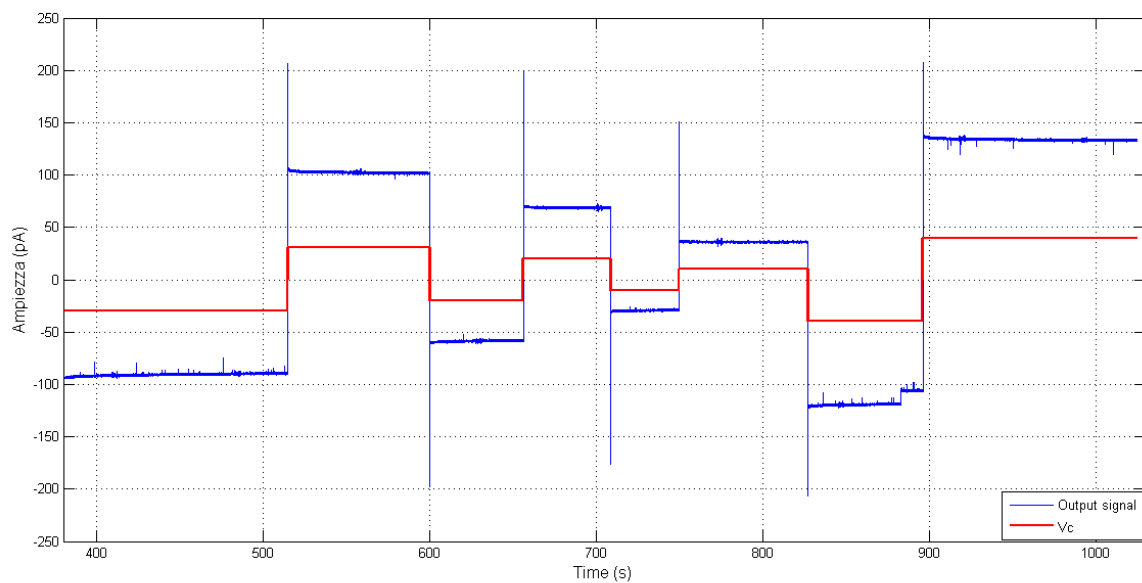


Figura 4.5.3.2 Risposta in corrente all'applicazione degli impulsi di tensione costante applicati per lo studio della conduttanza del canale di α -emolisina.

Per lo studio della conduttanza dei canali di α HL inseriti nel bilayer si è tenuto conto della presenza di tre canali proteici: i salti conduttivi osservabili in figura 4.5.3.2 hanno un'ampiezza complessiva che varia tra i -130 pA ed i +140 pA, in funzione della tensione che si impone al sistema. Ricordando che i canali di α HL presenti nella membrana sono tre ed interpolando i risultati della risposta in corrente ai vari gradini di tensione applicati con il metodo dei minimi quadrati

mediante l'utilizzo di un polinomio di primo ordine, si ottiene la caratteristica corrente-tensione presente in figura 4.5.3.3.

Facendo l'ipotesi di comportamento ohmico dei canali proteici e supponendo che la conduttanza dei tre canali inseriti in membrana sia la stessa, ovvero dividendo il valore assoluto di corrente per il numero di canali inseriti ($I_{\alpha HL} = I_{tot}/3$), è stato possibile stimarne il valore alle varie tensioni applicate. I risultati sono riassunti nella tabella che segue.

Potenziale applicato	Risposta in corrente	Valore di conduttanza $G=I/3V$
-40 mV	-119.43 pA	0.9961 nS
-30 mV	-90.73 pA	1.0156 nS
-20 mV	-58.60 pA	0.9969 nS
-10 mV	-29.38 pA	0.9476 nS
10 mV	36.10 pA	1.1988 nS
20 mV	68.86 pA	1.1350 nS
30 mV	102.49 pA	1.1234 nS
40 mV	133.88 pA	1.1249 nS

Tabella 4.5.3.1 Risposta in corrente ai diversi gradini di tensione applicati e relativo risultato di conduttanza $G=I/3V$ riferito al singolo canale.

I valori ottenuti sono in linea con quelli riportati in letteratura, che prevedono una conduttanza di circa 1 nS per una soluzione 1M di KCl^[20].

La leggera asimmetria del canale di α -emolisina è messa in risalto dal diverso comportamento del canale a stimoli in tensione positivi o negativi: il canale risulta essere più conduttivo quando vengono applicati potenziali positivi e meno conduttivo quando questi ultimi sono inferiori a 0 mV (tab. 4.5.3.1).

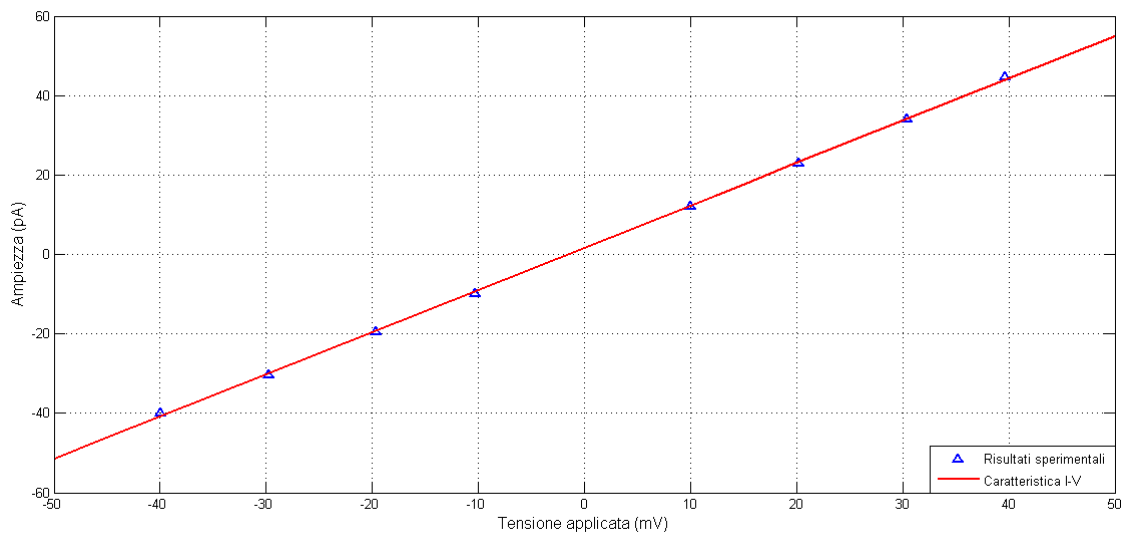


Figura 4.5.3.3 Caratteristica I-V delle risposte in corrente dell' α -emolisina ai diversi potenziali applicati.

Considerando la retta che interpola tutti i risultati contenuti in tabella 4.5.3.1 e identificabile in rosso nella figura 4.5.3.3, si può concludere che la conduttanza media del singolo canale di α HL è di 1064 pS, risultato in linea con il valore precedentemente indicato e presente in letteratura^[21].

Conclusioni

Questo lavoro di tesi ha permesso di caratterizzare, mediante misure sperimentali svolte nel laboratorio di ingegneria cellulare e molecolare (ICM) "Silvio Cavalcanti", un nuovo amplificatore miniaturizzato per elettrofisiologia cellulare progettato e realizzato dal gruppo di ricerca del Prof. Tartagni.

Grazie alle dimensioni del sistema è stato possibile condurre gli studi in uno spazio ridotto e senza il bisogno di ulteriori strumentazioni complesse da interfacciare all'amplificatore, al di fuori del computer sul quale è stato installato il software per l'acquisizione e l'elaborazione del segnale da osservare. Tale caratteristica rende il sistema particolarmente idoneo all'interfacciamento con diverse tipologie di setup sperimentali ed eventualmente anche al di fuori di laboratori di ricerca.

L'analisi sul rumore effettuata per valutare le prestazioni del sistema miniaturizzato ed il relativo confronto con le caratteristiche di un tipico amplificatore, l'Axopatch 200B della Axon Instruments, ha portato ad affermare come il primo dei due sia qualitativamente concorrente a quello convenzionale. Nel complesso i valori RMS del rumore in corrente alle bande di acquisizione comuni di 1 kHz, 5 kHz e 10 kHz, risultano essere simili per le due tipologie di amplificatori e, come previsto, questi aumentano in modo direttamente proporzionale al valore della capacità misurata e all'aumentare della banda di acquisizione. Generalmente i diversi test condotti durante gli esperimenti hanno portato a verificare come la variabilità dei risultati ottenuti per mezzo degli otto prototipi caratterizzati sia molto limitata, indice di una buona ripetibilità delle misure. In particolare i valori di RMS misurati a vuoto, considerando perciò solamente le capacità parassite del sistema e quella introdotta dal connettore, assumono valori che vanno mediamente da 0.21 pA, rilevato con la banda a 625

Hz, a quello di 1.07 pA determinato acquisendo il segnale con un filtraggio a 10 kHz.

Altra nota di merito riscontrata per il setup miniaturizzato, utilizzato durante le prove di laboratorio, riguarda l'intuitivo utilizzo del software che permette di elaborare il segnale: grazie alla valutazione automatica della deviazione standard e alla stima diretta della capacità, quando viene imposta una forma d'onda triangolare, e della resistenza in caso di applicazione di un potenziale costante, l'amplificatore miniaturizzato risulta essere appropriato e pratico per realizzare acquisizioni specifiche dell'elettrofisiologia.

Durante le prove di laboratorio che prevedevano la realizzazione di doppi strati lipidici artificiali per mezzo della microfluidica multicanale si è constatato come il giusto compromesso tra estensione della membrana e stabilità della stessa fosse presente nei supporti con fori di diametro pari a 75 μm ; dopo l'avvenuta formazione del bilayer si è potuto quindi proseguire con l'inserimento dei canali proteici.

L'analisi effettuata sui canali di gramicidina A all'interno del doppio strato lipidico ha consentito di osservare la risposta in corrente del canale alle varie bande di acquisizione tramite il setup miniaturizzato e di dimostrare le ottime capacità del sistema sperimentale anche nello studio di piccole correnti di canale, come nel caso di questo canale proteico, fino a bande di alcuni kHz.

Il successivo studio della conduttanza della gramicidina A e dell' α -emolisina ha permesso di verificare come i dati acquisiti per mezzo dell'amplificatore miniaturizzato siano in linea con quelli presenti in letteratura.

Concludendo le caratteristiche viste e le piccole dimensioni dell'amplificatore, oggetto del lavoro di tesi, lo rendono idoneo e appropriato per l'interfacciamento con biosensori e la realizzazione di dispositivi integrati per applicazioni in ambito biomedicale.

Bibliografia

- [1] Campbell, Reece, Urry, Cain, Wasserman, Minorsky, Jackson, *Biologia – 1 – La chimica della vita e la cellula*, Pearson.
- [2] Dee Unglaub Silverthorn, *Fisiologia umana – Un approccio integrato*, Quinta edizione, Pearson.
- [3] Olaf S. Andersen, Roger E. Koeppe, II, and Benoît Roux, *Gramicidin Channels*, IEEE transactions on nanobioscience, Vol. 4, No. 1, March 2005.
- [4] E. Bamberg and P. Läuger, *Channel Formation Kinetics of Gramicidin A in Lipid Bilayer Membranes*, J. Membrane Biol. 11, 177-194, Springer-Verlag New York Inc., 1973.
- [5] Benoit Roux and Martin Karplus, *Ion transport in a model gramicidin channel, Structure and thermodynamics*, Cambridge, Massachusetts, USA, 1991.
- [6] B. A. Wallace, *Structure of gramicidin A*, New York.
- [7] Toby P. Galbraith and B. A. Wallace, *Phospholipid chain length alters the equilibrium between pore and channel forms of gramicidin*, London, UK, 1998.
- [8] Michelle Montoya, Eric Gouaux, *β -Barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of α -hemolysin*, Elsevier, New York, 2002.
- [9] Hagan Bayley and Paul S. Cremer, *Stochastic sensors inspired by biology*, Texas, USA.
- [10] Eric Gouaux, *α -Hemolysin from Staphylococcus aureus: An Archetype of β -Barrel, Channel-Forming Toxins*, Journal of structural biology 121, 110-122, New York, 1998.
- [11] Daniel M. Czajkowsky, Sitong Sheng and Zhifeng Shao, *Staphylococcal α -Hemolysin Can Form Hexamers in Phospholipid Bilayers*, VA 22908, USA, 1998.
- [12] Rossi M., tesi di laurea specialistica, cap 3.
- [13] H. T. Tien and A. Ottova-Leitmannova, *Planar lipid bilayers (BLMs) and their application*, Elsevier.

- [14] M. Montal and P. Mueller, *Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of their electrical properties*, Proc. Nat. Acad. Sci, Vol. 69, No. 12, pp. 3561-3566, USA, 1972.
- [15] Rigo Pantoja, Daniel Sigg, Rikard Blunck, Francisco Bezanilla, and James R. Heath, *Bilayer Reconstitution of Voltage-Dependent Ion Channels using a Microfabricated Silicon Chip*, Biophysical Journal, Vol 81, pp. 2389-2394, USA, 2001.
- [16] A. Laisa, *Elettrochemical impedance spectroscopy and its applications. Modern aspect of elettrochemistry*, n. 32, New York, ed. B. E. Conway, J. O'M. Bockers, R.E. White, 1999.
- [17] Gianfranco Menestrina, *Ionic Channels Formed by Staphylococcus aureus Alpha-Toxin: Voltage-Dependent Inhibition by Divalent and Trivalent Cations*, J. Membrane Biol. 90, 177-190, Springer-Verlag New York Inc., 1986.
- [18] pClamp9, data acquisition and analysis for comprehensive electrophysiology, Axon Instruments Inc.
- [19] Toby W. Allen, Olaf S. Andersen and Benoît Roux, *Energetics of ion conduction through the gramicidin channel*, New York, 2003.
- [20] Shimul Chandra Saha, Federico Thei, Maurits R. R. de Planque and Hywel Morgan, *Scaleable BLM arrays for parallel ion channel recording*, 17th International Conference on Miniaturized, Freiburg, Germany, 2013.
- [21] Sergey M. Bezrukov, Oleg V. Krasilnikov, Liliya N. Yuldasheva, Alexander M. Berezhkovskii and Claudio G. Rodrigues, *Field-Dependent Effect of Crown Ether (18-Crown-6) on Ionic Conductance of α -Hemolysin Channels*, Biophysical Journal, Vol 87, pp. 3162-3171, USA, 2004.
- [22] M. LeMasurier, L. Heginbotham and C. Miller, *KcsA: It's a Potassium Channel*, J Gen Physiol, Vol 118(3), pp. 303–314, 2001.
- [23] Gerald W. Zamponi and Robert J. French, *Amine Blockers of the Cytoplasmic Mouth of Sodium Channels:A Small Structural Change Can Abolish Voltage Dependence*, Biophysical Journal, Vol 67, pp. 1015-1027, USA, 1994.

Ringraziamenti

Vorrei innanzitutto ringraziare il mio relatore, il Prof. Giordano, ed il Prof. Tartagni per la disponibilità mostratami in questi ultimi mesi. Un altro grande ringraziamento va al Dott. Rossi e al Dott. Thei, che proponendomi questo lavoro di tesi e seguendomi nelle prove di laboratorio e nella stesura dell'elaborato, mi hanno consentito di approfondire l'interessante argomento dell'elettrofisiologia, facendomi così appassionare al mondo dei biosensori.

Un grande saluto va a tutti i ricercatori incontrati in questo periodo trascorso nel laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare "Silvio Cavalcanti", che hanno reso questi mesi sereni e piacevoli nonostante lo studio per gli ultimi esami e l'impegno richiesto della tesi.

Il più grande ringraziamento in assoluto va ai miei genitori che con i loro sacrifici hanno reso economicamente possibile questa esperienza di vita lontana da casa e la realizzazione di questo piccolo grande sogno, che proseguirà in un'altra città con la speranza di arricchire ancora di più il mio bagaglio di conoscenza e di esperienze. Grazie per aver creduto in me.

A Mauro che ha fatto la parte del fratello maggiore, tenendosi sempre informato su ciò che facevo, forse come io non sono mai riuscita a fare con lui, e che mi è stato vicino nonostante i km che ci separavano.

A Marco, a cui devo tutto: il passato, il presente e soprattutto il nostro futuro! Con il tuo amore e la tua forza mi hai appoggiata e sostenuta in questa avventura, fatta di gioie e di dolori, facendomi guardare sempre al lato bello delle cose, mai a quello brutto.

Un grande ringraziamento e un malinconico saluto va a tutti coloro che ho incontrato in questo cammino di vita, cesenati e non, ai quali mi sono affezionata tantissimo e grazie ai quali non dimenticherò mai questi anni trascorsi insieme. Grazie per avermi fatta sentire a casa e per essermi stati vicini in ogni momento.

Ringraziamenti

Grazie per aver reso questo momento della mia vita indimenticabile. Che sia un arrivederci e non un addio. Vi voglio bene!

Marta