

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

DISPOSITIVI PER LA DIAGNOSTICA
BASATI SU
BIOMEMBRANA LIPIDICA ARTIFICIALE

Elaborato in:

BIOCHIMICA

Relatore

Dott. Emanuele D. Giordano

Presentata da

Michele Fesani

Sessione III

Anno Accademico 2012/2013

A mio nonno Ennio.

Indice

Sinossi	7
----------------------	----------

CAPITOLO 1.

Membrana lipidica cellulare	9
1.1. Struttura della membrana lipidica cellulare	9
1.1.1. Il doppio strato lipidico	10
1.1.2. Le proteine di membrana e le loro funzioni	11
1.2. Trasporto di soluti attraverso le membrane	12
1.2.1. Il trasporto passivo	12
1.2.2. I canali ionici.....	13
1.2.3. Il trasporto attivo.....	14

CAPITOLO 2.

Biomembrane lipidiche artificiali e loro caratteristiche	15
2.1. Membrane lipidiche nere.....	15
2.1.1. Caratterizzazione di membrane lipidiche artificiali	17
2.1.2. Membrane lipidiche nere come strumento per la caratterizzazione di proteine..	20
2.2. Doppi strati lipidici con supporto solido	21
2.2.1. Meccanismi di formazione di SLB	22
2.2.2. Membrane lipidiche con supporto stabili in aria.....	35
2.3. Doppi strati lipidici ibridi.....	36
2.3.1. Formazione di membrane a doppio strato ibride.....	37
2.3.2. Vantaggi delle membrane a doppio strato ibride	39
2.4. Doppi strati lipidici con ammortizzatore polimerico	40
2.4.1. Fabbricazione di film compositi polimero-lipide stratificati	42
2.4.2. Principali classi di ammortizzatori polimerici	44

2.5. Tecniche per l'incorporazione di proteine di membrana.....	46
2.5.1. Proteine solubilizzate nel detergente.....	46
2.5.2. Le proteine transmembrana possono essere ricostituite dopo la purificazione nei liposomi.....	46
2.5.3. Altri metodi di incorporazione delle proteine di membrana	47
2.6. Stabilizzazione della membrana e piattaforme sensorizzate di membrana	48
2.6.1. Approcci di stabilizzazione della membrana.....	48
2.6.2. Tecnologie LOC.....	49

CAPITOLO 3.

Applicazioni di biomembrane lipidiche artificiali	53
Ringraziamenti	63
Bibliografia.....	65

Sinossi

Il presente elaborato ha lo scopo di descrivere le principali caratteristiche e applicazioni delle biomembrane lipidiche artificiali utilizzate nel campo biochimico e biomedico.

Nel Capitolo 1. viene presentata una panoramica generale della membrana cellulare, descrivendo la sua struttura a “mosaico fluido” e i principali componenti che la costituiscono, cioè i lipidi e le proteine transmembrana. Viene quindi descritto uno dei ruoli fondamentali della membrana cellulare, ovvero il trasporto di soluti all'interno e all'esterno della cellula. Vengono schematizzate le tipologie di trasporto, attivo e passivo, e la funzione dei canali ionici, un particolare tipo di proteina transmembrana che permette il passaggio selettivo di ioni dall'esterno all'interno della cellula o viceversa.

Il Capitolo 2. si focalizza sui principali modelli di biomembrane lipidiche artificiali. Infatti, a seconda del tipo di metodo e di materiale utilizzato, è possibile ottenere dei prototipi che differiscono per caratteristiche e funzionalità. Verranno illustrate le membrane lipidiche nere (BLM), i doppi strati lipidici (bilayer) con supporto solido (SLB), i bilayer lipidici ibridi e i doppi strati con ammortizzatore polimerico. Per ognuna di queste biomembrane artificiali verranno analizzati i metodi di formazione e gli utilizzi in campo biomedico. Verranno poi descritti i metodi di incorporazione delle proteine nel doppio strato lipidico e le tecniche per stabilizzare il bilayer e realizzare una piattaforma sensoriale.

Nel Capitolo 3 verranno presentate le principali applicazioni che utilizzano membrane artificiali, sia per lo studio dei principali processi cellulari di membrana e screening dei farmaci sia per la realizzazione di piattaforme sensorizzate.

Infine nel Capitolo 4. si considereranno le innovazioni attese nel campo delle biomembrane artificiali anticipando le loro potenziali applicazioni future. Infatti, le prospettive in questo campo sono molto promettenti soprattutto per quel che riguarda lo screening di nuovi farmaci.

CAPITOLO 1.

Membrana lipidica cellulare

La membrana plasmatica definisce i confini esterni delle cellule e regola il traffico di molecole ai suoi capi; inoltre, nelle cellule eucariotiche, le membrane lipidiche dividono lo spazio interno in compartimenti discreti, segregando al loro interno specifici componenti e processi. Le membrane organizzano complesse sequenze di reazioni e hanno una funzione determinante sia nella conservazione dell'energia biologica, sia nella comunicazione tra cellule. Sono resistenti ma flessibili, autosigillanti e selettivamente permeabili a soluti polari. La loro flessibilità consente le modificazioni nella forma della cellula che hanno luogo durante la crescita e il movimento. La loro capacità di interrompersi e di autosigillarsi permette a due membrane di fondersi, come avviene nell'esocitosi [1]. Poiché le membrane sono selettivamente permeabili, esse consentono di mantenere alcuni composti o ioni all'interno della cellula e di escluderne altri. Le membrane contengono inoltre una serie di proteine specializzate che promuovono o catalizzano un gran numero di processi cellulari. Sono composte da due strati di molecole e sono molto sottili, quindi possiamo essenzialmente considerarle bidimensionali. All'interno delle cellule le membrane rappresentano l'ambiente di supporto per un gran numero di processi cellulari, come la sintesi dei lipidi e di alcune proteine.

1.1. Struttura della membrana lipidica cellulare

Lipidi e proteine sono i costituenti fondamentali delle membrane. I lipidi presenti in maggior quantità nelle strutture membranose sono i fosfolipidi, molecole anfipatiche, costituite da una regione idrofila (testa) e da una idrofoba (code). Le proteine maggiormente presenti nelle membrane cellulari sono provviste,

anch'esse, di regioni idrofile e idrofobe [2]. Il modello attualmente accettato per la struttura delle membrane biologiche è il cosiddetto **modello a mosaico fluido** (Figura 1.1). I fosfolipidi formano un doppio strato (bilayer) nel quale le regioni non polari dei lipidi sono disposte all'interno della struttura e le teste polari guardano invece verso l'esterno interagendo con la fase acquosa su entrambi i capi. Le proteine sono immerse in questo foglietto lipidico a doppio strato a intervalli irregolari e sono mantenute nella posizione corretta da interazioni idrofobiche tra i lipidi di membrana e i domini idrofobici delle loro catene laterali. Alcune proteine sporgono solo da un lato o dall'altro della membrana; altre hanno domini esposti su entrambi i lati del foglietto lipidico. L'orientamento delle proteine nel doppio strato è asimmetrico, rendendo la membrana altrettanto asimmetrica; i domini di una proteina esposti su un lato della membrana sono diversi da quelli esposti sull'altro lato, generando così un'asimmetria anche funzionale. Le subunità proteiche e lipidiche presenti in una membrana formano un mosaico fluido che è libero di modificarsi continuamente. La fluidità del mosaico di membrana è data dal fatto che le interazioni tra i suoi componenti sono non covalenti, lasciando libera ogni singola molecola lipidica e proteica di spostarsi lateralmente nel piano della membrana [1].

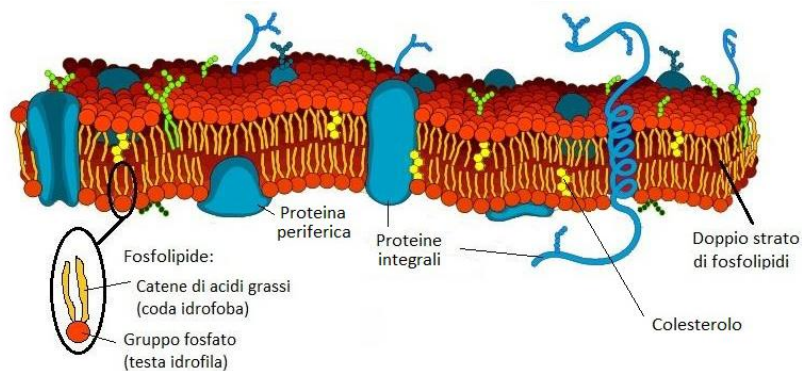


Figura 1.1 Modello a mosaico fluido della struttura della membrana [3].

1.1.1. Il doppio strato lipidico

A seconda delle condizioni e della natura chimica dei lipidi, quando in un ambiente acquoso sono dispersi lipidi anfipatici si possono formare tre tipi di

aggregati (Figura 1.2). Le **micelle** sono strutture sferiche, dove molecole lipidiche sono disposte con le regioni idrofobiche raggruppate all'interno della sfera e quindi isolate dall'acqua, e con le teste polari idrofiliche esposte sulla superficie, in contatto con l'acqua. Un secondo tipo di aggregato lipidico è il **doppio strato**, dove due monostrati (foglietti) formano un foglio bidimensionale. La formazione del doppio strato avviene molto rapidamente quando le aree della superficie di una sezione trasversale della testa e delle catene aciliche della molecola lipidica sono circa uguali. In ogni monostrato le parti idrofobiche escluse dall'acqua interagiscono le une con le altre. Le teste polari idrofiliche sono in contatto con l'acqua in entrambe le superfici del doppio strato. Poiché il doppio strato ha i bordi ancora esposti all'acqua, questa struttura risulta instabile e forma spontaneamente un terzo tipo di aggregato lipidico: si ripiega su se stessa generando una sfera, detta vescicola o **liposoma**. In questo modo il doppio strato perde i bordi idrofobici esposti e acquista la massima stabilità nell'ambiente acquoso [1,2].

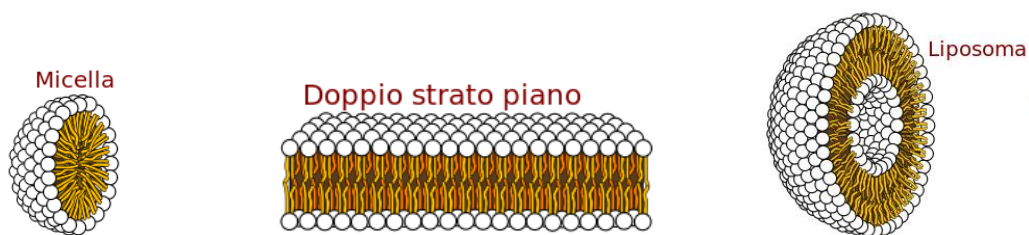


Figura 1.2 Aggregati di lipidi anfipatici che si formano in acqua [4].

1.1.2. Le proteine di membrana e le loro funzioni

Si possono riconoscere tre tipi di proteine che differiscono tra loro per il modo nel quale sono associate alla membrana. Esse sono responsabili della maggior parte delle funzioni svolte dalla membrana.

Le **proteine integrali** sono strettamente associate al doppio strato lipidico e possono essere rimosse solo per trattamento con agenti che interferiscono con le interazioni idrofobiche, come i detergenti e i solventi organici. Molte di queste sono *proteine transmembrana* che attraversano il doppio strato lipidico affacciandosi alle due facce della membrana con le loro estremità; altre sono inserite solo parzialmente nel core 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 [2].

Le **proteine periferiche** si associano alla membrana tramite interazioni elettrostatiche e legami idrogeno con i domini idrofilici delle proteine integrali e con le teste polari dei lipidi di membrana. Esse possono essere rilasciate per trattamenti blandi che interagiscono con le interazioni elettrostatiche e rompono i legami idrogeno; una volta rimosse dal legame debole con la membrana sono solubili. Un agente di uso comune è una soluzione di carbonato a pH elevato [1,2]. Le **proteine anfitropiche** si trovano sia nel citosol sia in associazione con le membrane. In alcuni casi la loro affinità per le membrane è dovuta all'interazione non covalente con una proteina o un lipide di membrana, mentre in altri casi è dovuta alla presenza di una o più molecole di lipidi legati alla proteina anfitropica. In generale l'associazione reversibile della proteina anfitropica con la membrana è regolata [1].

1.2. Trasporto di soluti attraverso le membrane

Pochi composti non polari possono dissolversi nel doppio strato lipidico e attraversare la membrana non assistiti, ma per i composti polari o carichi, o per gli ioni, una proteina è necessaria per il movimento transmembrana. In alcuni casi la proteina facilita il trasporto in favore del gradiente di concentrazione della molecola, ma accade spesso che il trasporto avvenga contro un gradiente di concentrazione, di cariche elettriche o di entrambi; i soluti cioè vengono "pompati" mediante un processo che richiede energia in forma di ATP [2].

1.2.1. Il trasporto passivo

Quando due compartimenti acquosi contenenti concentrazioni diverse di un composto solubile o di uno ione sono separati da un setto permeabile (membrana), il soluto si muove per **diffusione semplice** dalla regione ad alta concentrazione verso quella a bassa concentrazione, fino a che i due compartimenti non raggiungono una concentrazione di soluto uguale.

Per passare attraverso un doppio strato lipidico, un soluto polare o carico deve prima perdere le sue molecole d'acqua di idratazione; l'energia usata per eliminarle e per condurre il soluto polare attraverso la membrana viene riguadagnata quando il composto lascia la membrana stessa dall'altro lato e viene reidratato. La tappa intermedia del passaggio transmembrana rappresenta uno stato altamente energetico. In ogni caso bisogna superare una barriera di attivazione per raggiungere la fase intermedia. Le proteine di membrana che abbassano l'energia di attivazione necessaria per il trasporto di composti polari e ioni hanno la capacità di facilitare questa **diffusione** o **trasporto passivo**, rendendo più agevole lo spostamento dei loro "substrati" da un comportamento all'altro senza modificarli chimicamente. Esse vengono chiamate trasportatori.

Ci sono due categorie di trasportatori: i **carrier** (che legano i loro substrati con alta stereospecificità, catalizzano il trasporto e sono saturabili alla stessa maniera degli enzimi) e i **canali** (che permettono il movimento transmembrana a velocità più elevata e si avvicinano al limite della libera diffusione; sono non saturabili e meno stereospecifici dei trasportatori) [1,2].

1.2.2. I canali ionici

Un **canale ionico** è una proteina transmembrana che permette il passaggio di determinati ioni dall'esterno all'interno della cellula o viceversa. Essi sono selettivi per una o poche specie ioniche [5].

I canali ionici sono costituiti da molecole proteiche disposte in modo da formare pori ripieni d'acqua che attraversano le membrane, e sono in grado di passare da uno stato aperto a uno chiuso. L'intensità e la direzione del movimento ionico attraverso il poro sono governate dal gradiente elettrochimico per lo ione in questione. Questo fattore dipende dalla concentrazione dello ione ai due lati della membrana e dal potenziale di membrana. I canali ionici sono caratterizzati:

- dalla loro **selettività** per particolari specie ioniche, che dipende dalla dimensione del poro e dalla natura del suo rivestimento interno
- dalle loro proprietà di **cancello** (cioè dal meccanismo che controlla la transizione tra stato aperto e stato chiuso del canale)
- dalla loro **architettura molecolare**.

1.2.3. Il trasporto attivo

Nel trasporto passivo la specie trasportata segue sempre la direzione del gradiente elettrochimico e non si ha accumulo oltre la concentrazione di equilibrio. Il **trasporto attivo**, al contrario, accumula il soluto su un lato della membrana oltre il punto di equilibrio. Il trasporto attivo è termodinamicamente sfavorito (endoergonico) e si verifica soltanto quando è accoppiato (direttamente o indirettamente) a un processo esoergonico, come l'assorbimento della luce solare, una reazione di ossidazione, la demolizione di ATP. Nel **trasporto attivo primario** l'accumulo del soluto è accoppiato direttamente a una reazione esoergonica, come la conversione di ATP in ADP+P e l'energia rilasciata dall'idrolisi dell'ATP guida il movimento del soluto contro un gradiente elettrochimico. Il **trasporto attivo secondario** avviene quando il trasporto endoergonico (contro il gradiente) di un soluto è accoppiato a un flusso esoergonico (nella direzione del gradiente) di un soluto diverso che era stato in precedenza accumulato su un lato della membrana [1].

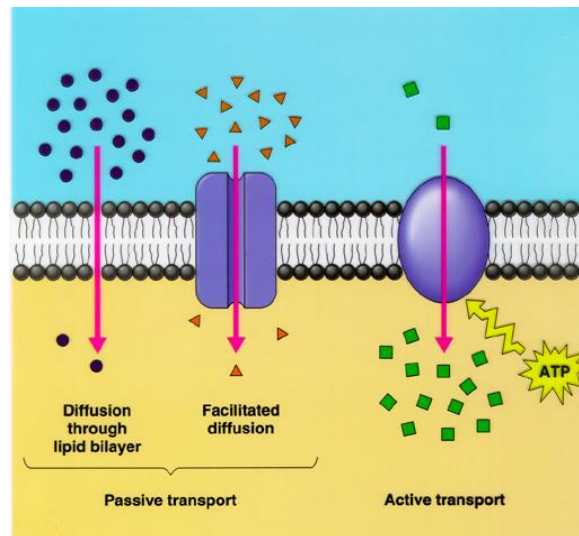


Figura 1.3 Trasporto di soluti attraverso le membrane [6].

CAPITOLO 2.

Biomembrane lipidiche artificiali e loro caratteristiche

La complessità delle membrane biologiche ha motivato lo sviluppo di una vasta varietà di sistemi modello più semplici con dimensioni, geometria e composizione adattabile con grande precisione. I doppi strati lipidici con supporto solido rappresentano un ottimo sistema per lo studio della chimica di superficie della cellula. Inoltre, sono accessibili a un'ampia varietà di tecniche analitiche specifiche per la superficie. Ciò rende possibile indagare sia processi come la comunicazione cellulare, l'interazione ligando-recettore, le reazioni enzimatiche che si verificano sulla superficie cellulare, sia processi come l'attacco patogeno. Gli approcci elaborati descritti nella trattazione che segue includono le membrane lipidiche nere, i doppi strati lipidici con supporto solido, i doppi strati lipidici ibridi e i doppi strati lipidici con ammortizzatore polimerico.

2.1. Membrane lipidiche nere

La **membrana lipidica nera (black lipid membrane, BLM)** deriva il suo nome dal suo aspetto al microscopio ottico. Infatti, la formazione di uno strato lipidico artificiale bimolecolare con uno spessore di pochi nanometri crea fenomeni di interferenza della luce che viene riflessa dalle due facce. Questo effetto di interferenza che si realizza durante l'assottigliamento della massa di lipidi inizialmente presente a livello del foro quando viene utilizzata la tecnica della "spennellatura" viene praticamente utilizzato come indice della formazione della membrana bistrato (Figura 2.1).

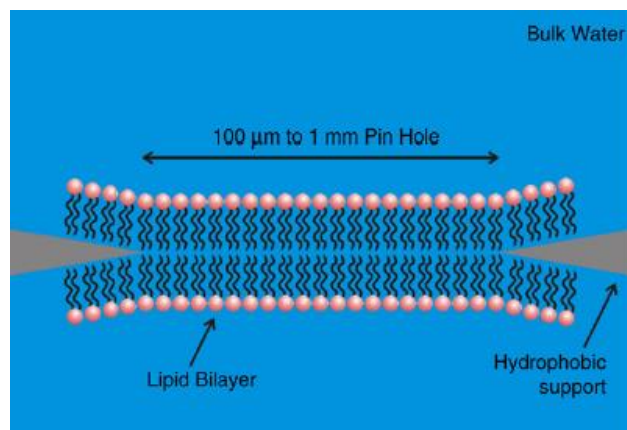


Figura 2.1 Membrana lipidica nera: la membrana fosfolipidica si estende in un foro di fissaggio di 100 μm – 1 mm nel supporto idrofobo [7].

Esistono diversi metodi per produrre membrane lipidiche nere: tutti comportano la formazione della membrana su una piccola apertura, di solito con diametro di 0,1 mm. Il foro è realizzato su materiale idrofobico, come polietilene o Teflon, e di solito fa parte di un setto che separa due compartimenti riempiti con soluzione acquosa, ciascuna contenente un elettrodo di riferimento. I principali metodi per la formazione di BLM coinvolgono la “spennellatura” della soluzione lipidica sull’apertura, ovvero la metodica di ripiegamento di due monostrati tipica del metodo Montal-Mueller.

L’applicazione dei lipidi viene eseguita con una piccola spatola intinta in una soluzione fosfolipidica all’ 1-2% in solvente organico, come n-decano o squalene, a livello del foro in una soluzione acquosa. La massa lipidica depositata si assottiglia mentre diffonde, formando la membrana lipidica nera. Questa metodologia è rimasta sostanzialmente invariata nel corso dei decenni [7]. Le membrane realizzate in questo modo appaiono leggermente più flessibili rispetto a quelle ottenute con il metodo delle membrane prive di solvente (*solvent-free*).

La formazione di doppi strati ottenuti dal ripiegamento di monostrati lipidici richiede invece una cella con due compartimenti, separati da una piccola apertura, e i livelli di soluzione in ogni scomparto devono essere controllati indipendentemente. Entrambi i compartimenti sono riempiti con la soluzione acquosa desiderata, e un monostrato di materiale fosfolipidico viene sviluppato sulla superficie di uno dei due compartimenti. Il livello della soluzione nel

compartimento contenente il monostrato lipidico viene lentamente abbassato sotto il livello dell'apertura e nuovamente innalzato. Questo movimento permette il deposito di due monostrati e la formazione del bilayer (Figura 2.2).

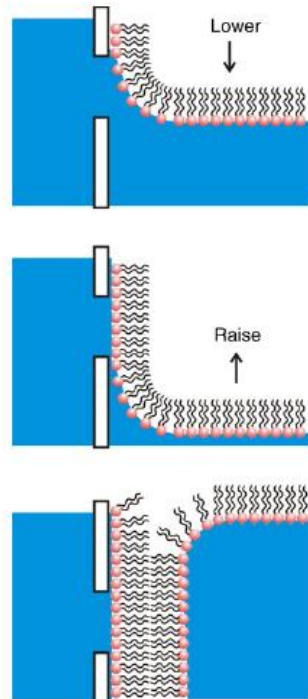


Figura 2.2 Formazione di un doppio strato lipidico ripiegato [7].

Un grande vantaggio di questa tecnica è la possibilità di formare una membrana asimmetrica. Anche se questo metodo è spesso chiamato **senza solvente**, *solvent-free*, parte del solvente organico è ancora presente.

2.1.1. Caratterizzazione di membrane lipidiche artificiali

La tensione superficiale laterale di una membrana a doppio strato lipidico ha una diretta influenza sulla stabilità del film e sulla funzione delle proteine di membrana. Se ne può dare una stima solo una stima applicando un gradiente definito di pressione idrostatica e misurando il rigonfiamento del film e il conseguente incremento della sua superficie. La dispersione dinamica della luce in una serie di misurazioni, caratterizza la fluttuazione delle BLM, a sua volta determinata dalla tensione superficiale, che può quindi essere misurata in modo

non invasivo. Quando la membrana viene modificata mediante adsorbimento di proteine superficiali (S-layer) della parete del batterio *Bacillus sphaericus*, la loro presenza determina una riduzione della tensione superficiale e una viscosità superficiale non trascurabile [8]. Le proteine S-layer sono in genere proteine o glicoproteine che partecipano come singola varietà specie-specifica alla costituzione dell'involucro cellulare più esterno di un ampio spettro di batteri; esse presentano una simmetria reticolare quadrata o esagonale, con dimensione unitaria nell'intervallo di 3-30 nm. Membrane di microfiltrazione con pori di una dimensione media di 400 nm, che sono state pre-rivestite con proteine S-layer stabilizzano la formazione di doppi strati lipidici continui mediante la tecnica di Langmuir-Blodgett (vedi seguito). Valutati in spettroscopia di impedenza, i doppi strati lipidici mostrano una durata di vita notevolmente prolungata da 22 a 72 ore. Il denso strato di proteine fornisce quindi una forte stabilità che prolunga il tempo di vita della membrana lipidica artificiale, così come avviene per la membrana del batterio *Bacillus Sphaericus*. Diversi canali ionici possono essere inseriti con successo nel doppio strato. È stato anche dimostrato che, rispetto alle membrane lipidiche piane, le membrane lipidiche con supporto S-layer hanno una ridotta tendenza alla rottura, soprattutto in presenza di ionofori o proteine formanti pori [9].

La membrana a doppio strato lipidico può essere esposta a un campo magnetico esterno e la variazione di conduttanza che si osserva di conseguenza suggerisce che l'anisotropia magnetica causa un riorientamento dei lipidi.

La membrana lipidica è un isolante perfetto e il minimo difetto della sua continuità, in caso un canale di membrana, può essere facilmente rilevato da un salto di conduttanza di una corrente applicata. Nella Figura 2.3, si mostra lo schema di un tale sistema di rilevazione: da una parte, di solito chiamata *cis-side*, viene applicata una tensione U_m ; la corrente attraverso la membrana o il canale viene rilevata da un amplificatore corrente-tensione. R_f è la resistenza di retroazione e determina l'amplificazione. Il segnale amplificato $V(t)$ viene ulteriormente trattato, sia da un convertitore AD e un adeguato software, sia da un oscilloscopio avanzato.

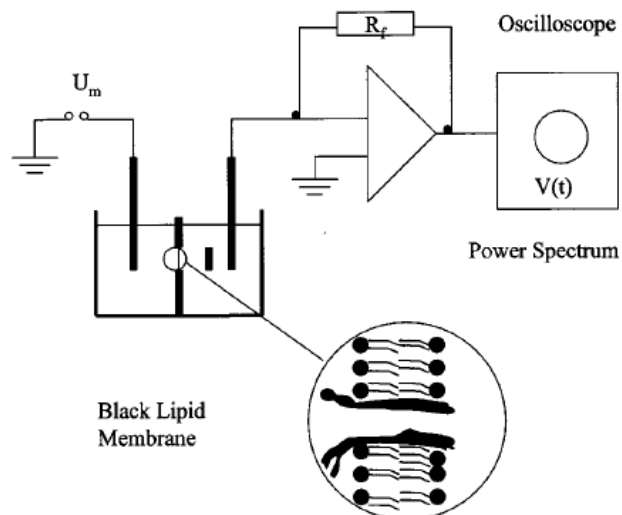


Figura 2.3 Modello per misurare la conduttanza di un bistrato lipidico planare [8].

Questa tecnica è utilizzata con successo per studiare sostanze attive in membrana. Infatti l’inserimento o l’adsorbimento di sostanze attive in membrana, modifica il suo potenziale risultante dall’intera distribuzione di carica derivante dalle cariche dissociate, dai loro contro ioni, e dai componenti dipolari. È possibile quantificare i rispettivi effetti utilizzando diversi sistemi modello per separare i contributi differenti. Per quanto riguarda le cariche superficiali della superficie lipidica, per spiegare l’interazione carica-carica in un elettrolita viene di solito applicata la teoria di Gouy-Chapman [10]. Le BLM sono, in linea di principio, un sistema adeguato per questo tipo di quantificazione.

La stabilità della membrana lipidica viene caratterizzata applicando brevi impulsi di campo elettrico che provocano, sopra una soglia critica, forze di Maxwell, che determinano la rottura irreversibile della membrana. Aumentando progressivamente l’impulso, gradualmente si inducono difetti singoli, che si allargano fino alla rottura completa di tutto il film.

La mobilità di molecole lipidiche marcate nella membrana viene studiata eseguendo il recupero di fluorescenza dopo gli esperimenti di “sbiancamento” selettivo indotto dall’illuminazione (fotobleaching) (Figura 2.4): per questo viene utilizzata una maschera per sbiancare selettivamente aree di dimensioni diverse; dopo la mescolazione all’interno di ogni recinto, si osserva la matrice di concentrazione.

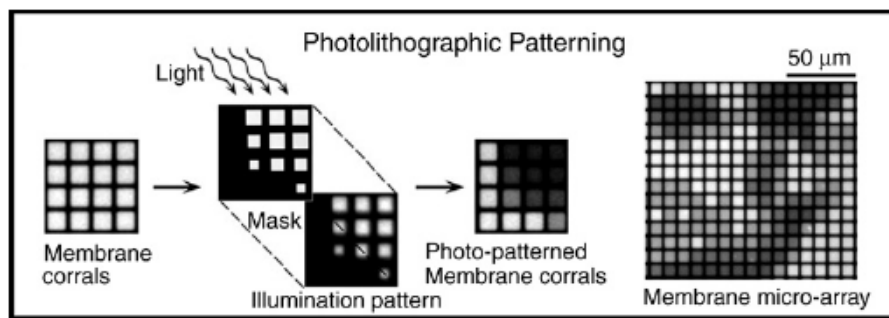


Figura 2.4 Array generato da fotobleaching [7].

Il coefficiente di diffusione è maggiore nelle membrane lipidiche nere. Lo stesso approccio è stato utilizzato per sondare l'effetto di una sostanza attiva di membrana sulla mobilità laterale e sull'effetto permeabilizzante [8].

2.1.2. Membrane lipidiche nere come strumento per la caratterizzazione di proteine

Le membrane lipidiche nere sono state utilizzate per studiare vari processi biofisici. Uno dei più importanti è la formazione di canali ionici in bistrati fosfolipidici da parte di peptidi, proteine, antibiotici e altre molecole formanti pori. Di particolare interesse per la creazione di nano-dispositivi è l'inserimento in membrana di pori proteici singoli da usare come sensori stocastici (Figura 2.5), per esempio attraverso l'utilizzo di **α -emolisina geneticamente modificata** [11]. L' α -emolisina, che è composta da sette subunità identiche, è una esotossina prodotta dai batteri *Staphylococcus aureus*. Attraverso l'uso di tecniche per indurre modificazioni genetiche, sono state create molecole mutanti di α -emolisina che possono legare in modo non covalente una molecola di ciclodestrina nel proprio poro. In condizioni di tensione costante, l'inserimento nel canale di una molecola di ciclodestrina determina una variazione della corrente a tensione fissa a causa di una restrizione della sezione trasversale del poro. La corrente può essere ulteriormente attenuata dal legame della ciclodestrina con una molecola ospite. Attraverso questo processo l'associazione e la dissociazione di piccole molecole organiche all'interno del poro

ciclodestrina/ α -emolisina può in definitiva essere misurata a livello di singola molecola.

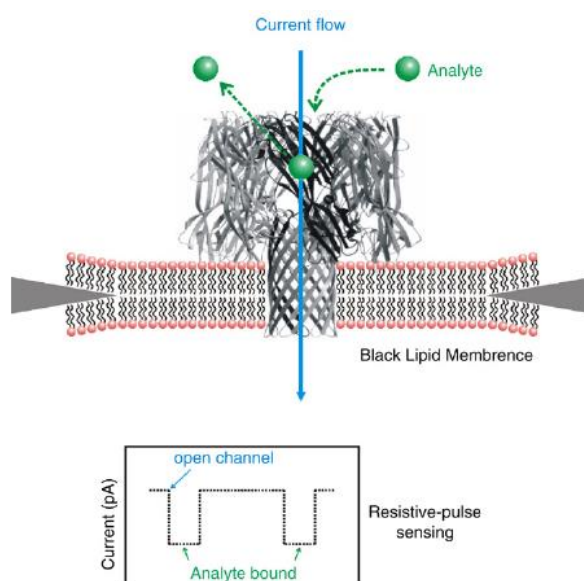


Figura 2.5 Sensore stocastico realizzato con membrane lipidiche nere che utilizzano α -emolisina [7].

Le membrane lipidiche nere sospese nella soluzione non subiscono interferenze indesiderate da parte di un supporto sottostante. L'assenza di supporto significa anche che le proteine transmembrana sospese nel doppio strato fosfolipidico rimangono completamente mobili e attive. Tuttavia, questo limita anche la durata di vita del doppio strato a causa della scarsa stabilità della membrana.

2.2. Doppi strati lipidici con supporto solido

I doppi strati lipidici con supporto solido (solid supported lipid bilayers, o solid SLB), sono molto più robusti e stabili delle membrane lipidiche nere descritte nel paragrafo precedente. I supporti solidi aprono anche la porta all'utilizzo di specifiche tecniche di analisi superficiali non possibili per le BLMs. Nei sistemi con supporto solido la fluidità di membrana è mantenuta da uno strato (10-20 Å)

di acqua intrappolata tra il substrato e il bistrato. Un diagramma schematico di un doppio strato lipidico con supporto è mostrato in Figura 2.6.

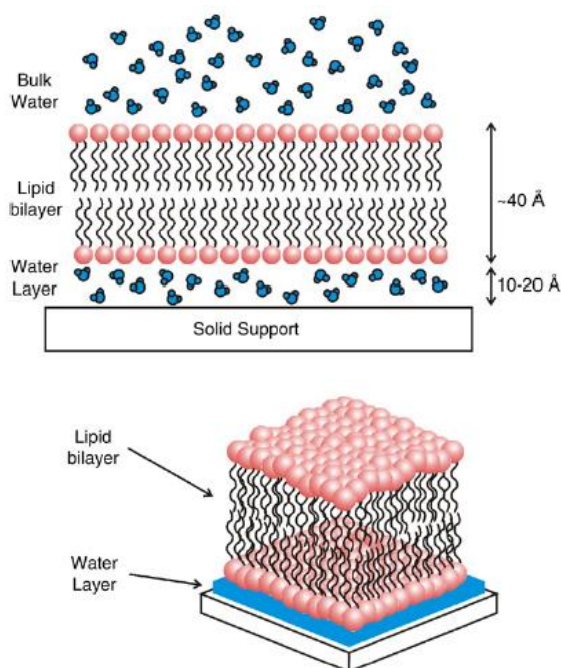


Figura 2.6 Doppio strato lipidico con supporto solido [7].

La varietà dei substrati in grado di sostenere i doppi strati fosfolipidici è tuttavia limitata. Al fine di sostenere una membrana di alta qualità (cioè pochi o niente difetti e alta mobilità dei lipidi), la superficie deve essere idrofila, liscia e pulita. I migliori substrati sono la silice fusa, il vetro borosilicato, la mica e il silicio ossidato. Possono essere anche usati come supporto solido, film sottili di TiO_2 , ossido di indio-stagno, oro, argento e platino.

2.2.1. Meccanismi di formazione di SLB

Per descrivere in modo soddisfacente il meccanismo di formazione dei doppi strati lipidici con supporto, devono essere compresi due passaggi critici di questo processo: (i) l'adesione al supporto di vescicole e la successiva rottura (ii) l'evoluzione dei *patch* di doppio strato così formati nel SLB completo. La Figura 2.7 fornisce una panoramica dei meccanismi di rottura delle vescicole, che verranno descritti meglio di seguito.

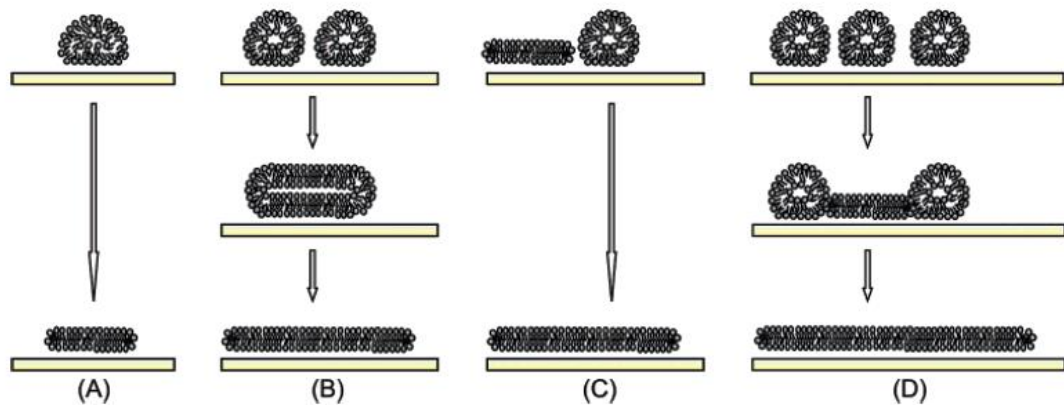


Figura 2.7 Meccanismi di rottura delle vescicole: (A) vescicola isolata adsorbita che si rompe spontaneamente; (B) vescicole confinanti adsorbite che si fondono e infine si rompono; (C) il bordo attivo di un patch di un bistrato con supporto induce la rottura di una vescicola vicina; (D) l'azione cooperativa di diverse vescicole vicine che porta alla rottura di una prima vescicola. Il bordo attivo così esposto innesca la rottura delle vescicole adiacenti [12].

Esistono tre metodi generali per la formazione di SLBs in supporti planari per applicazioni sensoristiche.

Il primo metodo comporta il trasferimento di un foglietto iniziale di lipidi dall'interfaccia aria-acqua con la tecnica di Langmuir-Blodgett (Figura 2.8a), seguito dal trasferimento del foglietto sostenuto dal substrato alla superficie di un secondo monostrato.

Un secondo metodo di formazione del doppio strato con supporto è l'adsorbimento di vescicole da una sospensione acquosa alla superficie del substrato e la loro successiva fusione (Figura 2.8b).

Infine, una combinazione dei due metodi può essere impiegata per trasferire prima un monostrato con la tecnica Langmuir-Blodgett e quindi introdurre la fusione di vescicole per formare il bistrato (Figura 2.8c).

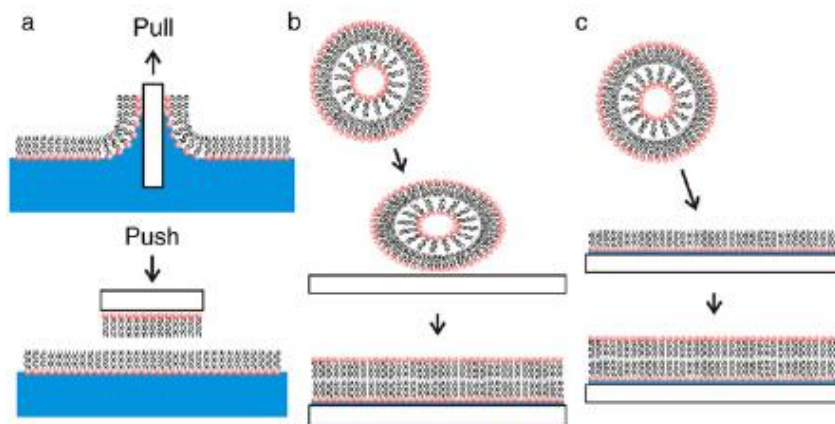


Figura 2.8 Comuni tecniche per la formazione di SBLs. (a) Tecnica di Langmuir-Blodgett. (b) Fusione di vescicole. (c) Combinazione dei due metodi [7].

(a) Tecnica di Langmuir-Blodgett

Il metodo di Langmuir-Blodgett è una tecnica basata sulla capacità di molecole anfifiliche (molecole che posseggono regioni a comportamento alternativamente polare o apolare) di orientarsi all'interfaccia aria/acqua in modo da minimizzare la loro energia libera e formare un monolayer (monostrato), detto film di Langmuir-Blodgett, che costituisce un valido strumento per lo studio dell'organizzazione dei fosfolipidi di membrana.

Le principali fasi del processo di formazione del film Langmuir-Blodgett sono formazione, compressione e trasferimento del monostrato molecolare. Analizziamo in dettaglio questi processi.

I film di Langmuir-Blodgett si formano quando le molecole anfifiliche, come i tensioattivi, interagiscono con l'aria in una interfaccia aria-acqua. Esse sono infatti disciolte in solvente volatile e insolubile in acqua (cloroformio, esano, ecc.) e sono posizionate, p. es. con una micro siringa su una superficie liquida. I tensioattivi (o agenti ad azione di superficie) sono molecole con "code" idrofobe, e "teste" idrofile. Quando la concentrazione del tensioattivo è inferiore alla concentrazione micellare critica (CMC), le molecole di tensioattivo si dispongono come illustrato in Figura 2.9. Questa tendenza può essere spiegata da considerazioni "superficie-energia". Poiché le code sono idrofobiche, la loro esposizione all'aria piuttosto che all'acqua risulta favorita. Allo stesso modo, poiché le testine sono idrofile, l'interazione testa-acqua è più favorevole

dell'interazione aria-acqua. L'effetto complessivo è la riduzione dell'energia superficiale (o, equivalentemente, della tensione superficiale dell'acqua) [13].

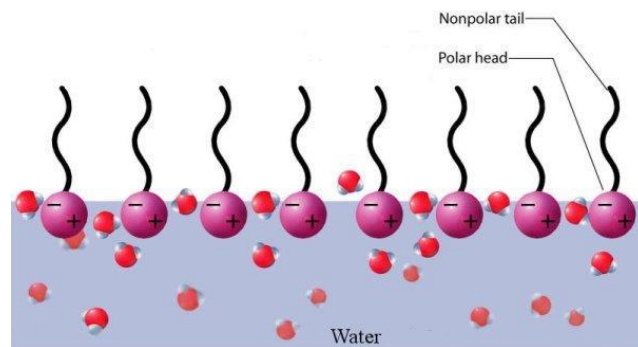


Figura 2.9 Molecole di tensioattivo disposte su un'interfaccia aria-acqua [14].

Per concentrazioni molto piccole, molto minori della concentrazione micellare critica, le molecole tensioattive eseguono un movimento casuale sull'interfaccia acqua-aria. Questo movimento può essere considerato molto simile al movimento molecolare di un gas ideale racchiuso in un contenitore. Le corrispondenti variabili termodinamiche del sistema tensioattivo sono pressione superficiale (Π), area superficiale (A) e il numero di molecole di tensioattivi (N). La densità di molecole di tensioattivo e la pressione superficiale aumentano riducendo la superficie A . Un'ulteriore compressione delle molecole di tensioattivo sulla superficie mostra un comportamento simile alla transizione di fase: il "gas" diviene "liquido" e infine viene compresso sulla superficie in un array di molecole di tensioattivo chiuso e compresso perfettamente, corrispondente allo stato "solido". Il solvente evapora e si forma il monolayer.

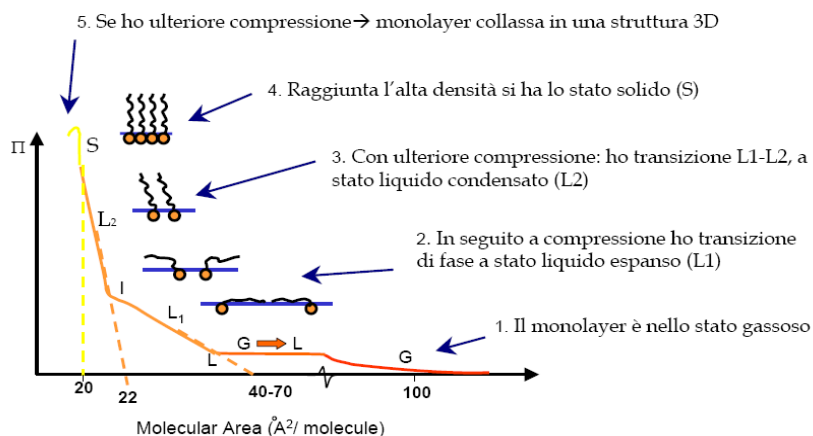


Figura 2.10 Trasformazione del monolayer dovuta all'aumento di pressione superficiale [15].

Per quantificare tali fenomeni possono essere utilizzati strumenti come la bilancia per film di Langmuir, costituita da un trogolo termostato (in teflon) contenente la sottofase. La bilancia viene infatti utilizzata per comprimere monostrati di molecole sulla superficie di una data sottofase (di solito acqua) e per misurare fenomeni superficiali dovuti a questa compressione. Può anche essere usata per depositare monostrati singoli o multipli su un substrato solido. La struttura dell'apparecchiatura è schematizzata in Figura 2.11. Il sistema presenta una barriera mobile (8), in materiale idrofilo e pesante, che riduce l'area superficiale disponibile al film. Al sistema è connessa un'elettrobalancia (7) con una piastrina di Wilhelmy (6) per misurare la pressione superficiale (Π) [13].

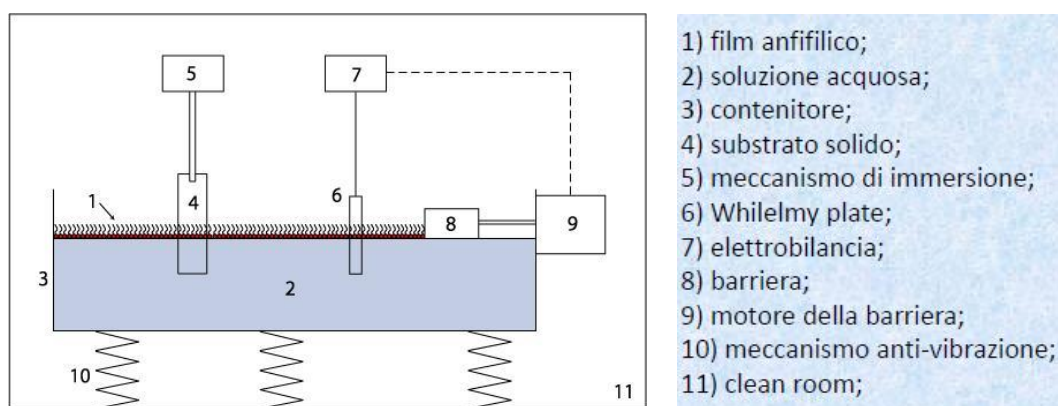


Figura 2.11 Schematizzazione di una Langmuir film balance [13].

La barriera spinge lentamente le molecole del film compattandole e guidandole verso il substrato solido (4). Il substrato solido (idrofilo) viene calato all'interno del liquido e lentamente estratto (oppure, al contrario, viene lentamente calato all'interno del trogolo). Lo strato di molecole anfifiliche viene quindi trasferito sul substrato solido (Figura 2.12).

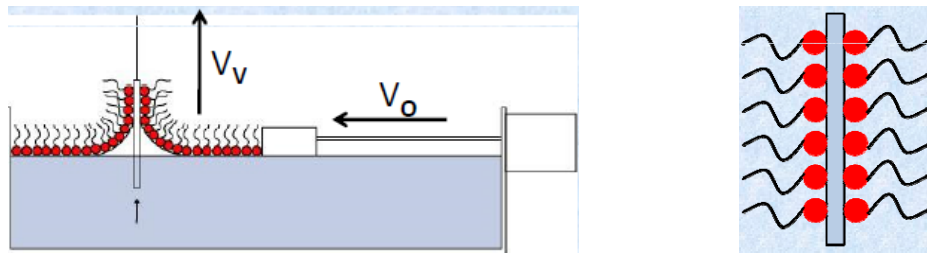


Figura 2.12 Meccanismo della Langmuir film Balance per la formazione del film Langmuir-Blodgett [13].

I parametri fondamentali alla base della tecnica sono quindi: la tensione superficiale (quantità di lavoro richiesta per aumentare l'estensione della superficie di un liquido di un'unità, mantenendo costante la temperatura del sistema. La tensione superficiale viene misurata quindi, come una forza per unità di lunghezza [mN/m]), la pressione superficiale ($\Pi = \gamma - \gamma_0$, γ = tensione superficiale in assenza di monolayer, γ_0 = tensione superficiale in presenza di monolayer), il tipo di molecole adoperate.

La tecnica di Langmuir-Blodgett garantisce: un preciso controllo dello spessore del monostrato e dell'architettura molecolare, la deposizione omogenea su grandi aree del substrato, la possibilità di ottenere strutture multistrato anche di diversa composizione, l'applicazione a una vasta classe di materiali, la deposizione del monolayer su diversi tipi di substrato.

(b) Fusione di vescicole

Il metodo di fusione della vescicola è una tecnica protein-friendly utilizzata per la formazione di membrane lipidiche con supporto solido [16]. La formazione della membrana dalla fusione di vescicole su una superficie idrofila è un processo in tre

fasi comprendente adesione, rottura e diffusione (Figura 2.13a): quando i substrati sono immersi in una soluzione acquosa di vescicole lipidiche, queste ultime aderiscono alla superficie, si rompono, e diffondono andando a formare un doppio strato sulle superfici idrofile, e un monostrato su superfici idrofobiche. Un processo di adesione stabile è necessario per la formazione della membrana.

Un esempio di questo processo è la formazione della membrana lipidica a due strati con il metodo di fusione della vescicola su coesistenti domini idrofili e idrofobi con dimensioni nell'ordine di centinaia di nanometri. In questo caso, membrane di dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), maggior costituente del surfattante polmonare, nelle superfici di SiO₂ modificate da isole monostrato auto-assemblate (self-assembled monolayer, SAM) di octadeciltriclorosilina (OTS) possono essere osservate mediante il microscopio a forza atomica (AFM). Una combinazione di ossidazione termica e trattamento chimico per preparare le superfici di SiO₂ permette di ottenere OTS-SAM con vari formati e varia copertura.

La membrana a doppio strato si può quindi formare, attraverso il processo illustrato nella Figura 2.13, su una superficie di SiO₂ modificata con isole di OTS, quando le regioni di SiO₂/OTS, sufficientemente estese, sono ottenute nella soluzione tampone dopo la deposizione di vescicole filtrate, p. es., a 100 nm. Invece, quando le regioni di SiO₂ considerate sono troppo ravvicinate, le isole OTS impediscono l'adesione stabile delle vescicole a causa della repulsione fra i compartimenti idrofilo e idrofobo (Figura 2.13b), e di conseguenza la membrana a doppio strato non riesce a formarsi (come nel caso di regioni SiO₂/OTS ottenute nella soluzione tampone dopo la deposizione di vescicole filtrate a 200 nm).

Il contatto *edge-to-edge* delle vescicole assorbite accelera la formazione bistrato. L'interruzione dell'adesione da parte delle isole OTS non solo impedisce l'adesione stabile, ma causa anche il processo intervescicolare che si verifica meno frequentemente. E' stato constatato inoltre che una vescicola più piccola si trasforma in una membrana a doppio strato più facilmente di una più grande, a causa di tensione superficiale maggiore [17,18].

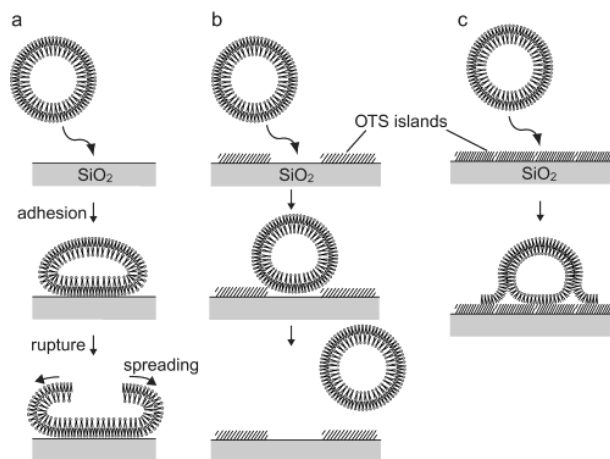


Figure 2.13 Rappresentazione schematica della formazione di membrana da vescicole (a) in superfici di SiO₂ lisce o sufficientemente estese, (b) in aree di SiO₂ limitate tra le isole OTS, e (c) OTS-SAMs [19].

Il metodo di fusione della vescicola ha diversi vantaggi rispetto al metodo Langmuir-Blodgett. Infatti, la zona dove la membrana è depositata può essere facilmente selezionata, limitando l'area dove viene collocata. Le membrane omogenee si formano anche su superfici non piane e la denaturazione a causa dei solventi organici può essere evitata, per la biofunzionalizzazione con molecole come le proteine e gli enzimi. Recenti studi che hanno utilizzato la microscopia a forza atomica (AFM), hanno fornito informazioni preziose sul meccanismo della formazione della membrana da fusione di vescicole. La dimensione delle vescicole efficace per la formazione della membrana è dell'ordine di decine o centinaia di nanometri, che è proprio l'obiettivo della nanofabbricazione e del patterning. Quindi, uno dei fattori più importanti nel processo di fusione di vescicole è proprio la dimensione delle vescicole e delle superfici idrofile.

L'assorbimento e la fusione di piccole vescicole unilamellari (small unilamellar vesicles, SUVs), in particolare, è uno dei mezzi più facili e più versatili per la formazione di doppi strati fosfolipidici con supporto. Le SUVs possono essere preparate mediante una grande quantità di metodi. Il più semplice prevede l'estrusione di vescicole multilaminari attraverso membrane porose in policarbonato ad alta pressione. Un altro metodo consiste nella sonicazione e nell'ultracentrifugazione di sospensioni lipidiche acquose. L'incorporazione di

proteine transmembrana nelle SUVs richiede un processo delicato quale la rimozione del detergente tramite dialisi.

La dialisi detergente è una tecnica per la realizzazione di una membrana lipidica che si svolge in due fasi: la dialisi vera e propria, e il “painting” con estrazione del solvente. Dalla formazione di micelle di lipidi mescolati al detergente, il materiale lipidico può essere depositato dalla soluzione acquosa a un’interfaccia solida. Il detergente è continuamente rimosso dalle micelle mediante la dialisi, il che porta alla decomposizione delle micelle e alla formazione di un doppio strato lipidico planare. Una goccia di solvente organico (le molecole di solvente sono indicate con colore verde nella membrana, in Figura 2.14), contenente lipidi disciolti, viene poi aggiunta a una superficie in una fase acquosa. I lipidi anfifilici si allineano quindi all’interfaccia del solvente. Quando il solvente viene estratto, i lipidi fondono per formare un doppio strato all’interfaccia della soluzione substrato-acqua [20].

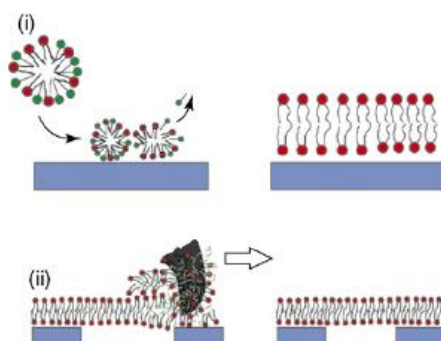


Figura 2.14 (i) Dialisi del detergente. (ii) Painting ed estrazione del solvente [21].

I fattori che influenzano l’assorbimento e la fusione delle piccole vescicole unilamellari sono: la composizione delle vescicole, la dimensione, la carica superficiale, la rugosità superficiale, la pulizia superficiale, il pH, la forza ionica e la pressione osmotica delle vescicole. Il processo ha inizio con l’assorbimento di vescicole, provenienti dalla soluzione sfusa, nel substrato (Figura 2.15). Nelle prime fasi, le SUVs possono fondersi tra loro. Le vescicole che si rompono e si fondono al substrato formano il doppio strato lipidico con supporto planare in un processo che dipende dalla composizione chimica dei singoli lipidi. Il processo di

assorbimento può essere accelerato dalla presenza di cationi bivalenti come Ca^{2+} e Mg^{2+} . La fusione delle SUVs al substrato può anche essere migliorata mediante riscaldamento, creando un gradiente osmotico attraverso la membrana della vescicola, e mediante l'aggiunta di agenti fusogenici come il glicole polietilenico. Sebbene l'esatto meccanismo di formazione del bistrato dall'assorbimento e dalla fusione delle SUVs non sia pienamente compreso, la modellazione matematica del sistema ha mostrato un buon accordo con i risultati sperimentali.

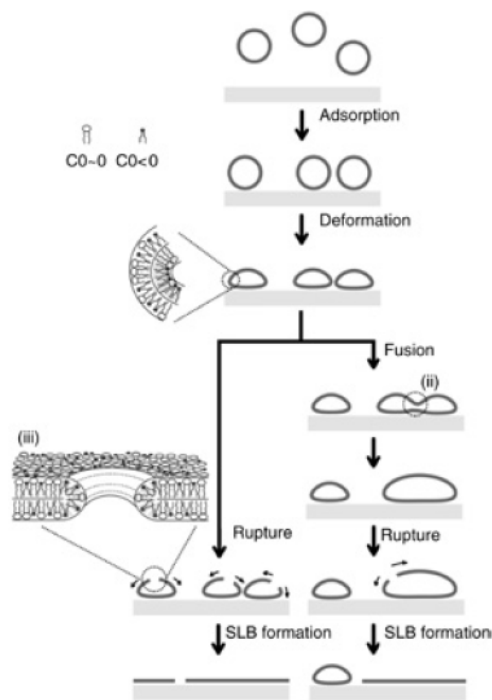


Figura 2.15 Metodo di fusione di vescicole [7].

(c) Combinazione dei due metodi

Una combinazione del monostrato di Langmuir-Blodgett e della fusione di vescicole può essere utilizzato per la formazione di un bistrato fosfolipidico con supporto. Questo metodo implica la fusione di piccole vescicole unilamellari in un monostrato fosfolipidico già depositato. Questo metodo è molto efficiente per la formazione di bilayer asimmetrici e per l'incorporazione di proteine transmembrana nei doppi strati lipidici con supporto solido.

Ognuno dei tre metodi di deposizione presenta dei particolare vantaggi e svantaggi. Il trasferimento di molecole anfifiliche dall'interfaccia aria-acqua al

substrato solido risale al 1920. Tamm e McConnell [22], furono i primi ad applicare questa tecnologia per formare doppi strati fosfolipidici con supporto mediante in trasferimento sequenziale del monostrato su substrati di quarzo e di silicio ossidato. Questo metodo è utile per formare bistrati asimmetrici, tuttavia, è difficile, se non impossibile, incorporare proteine transmembrana nel bilayer lipidico, perché, prima di trasferire porzioni di proteine all'interno del monostrato, esse sono esposte all'aria e possono denaturarsi irreversibilmente.

Al fine di mantenere la struttura sopramolecolare desiderata, un doppio strato fosfolipidico con supporto deve rimanere idratato in ogni momento. Questo crea una sfida importante per la realizzazione di matrici di doppi strati fosfolipidici con supporto.

Le barriere per la mobilità laterale nei bistrati fosfolipidici con supporto possono anche essere ottenute mediante la stampa a microcontatto di proteine sul substrato prima della fusione delle vescicole unilamellari (Figura 2.16), o facendo adsorbire proteine al supporto solido dopo che le aree selettive di una membrana con supporto solido sono state rimosse. La stampa a microcontatto è una forma di litografia *soft* che utilizza modelli in rilievo su un timbro di polidimetilsilossano (PDMS) per formare modelli di monostrati auto-assemblati sulla superficie di un substrato attraverso contatto. Dopo la stampa, lo spazio vuoto in ogni recinto è riempito con le SUVs. Questo determina la formazione di un doppio strato continuo in ogni recinto.

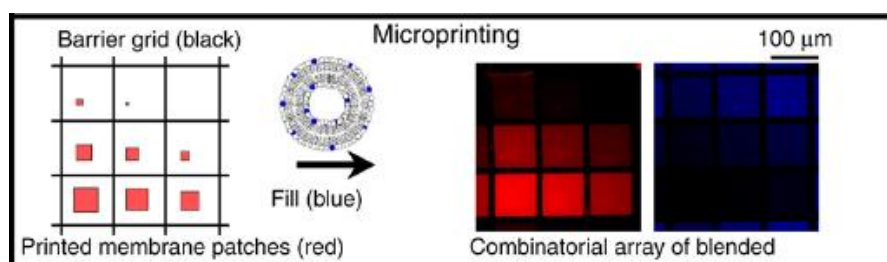


Figura 2.16 Stampa a microcontatto di pezzi di doppio strato di differenti dimensioni [7].

Gli array di membrane con supporto possono essere anche fabbricati da bistrati con supporto continuo. In questo caso UV ad alta intensità di illuminazione attraverso una fotomaschera in ambiente acquoso (Figura 2.17) generano in

regioni altamente localizzate, sia ozono sia ossigeno singoletto (molecola di O_2 in cui gli elettroni di legame hanno spin opposto e occupano lo stesso orbitale). Queste specie altamente reattive decompongono i lipidi e reagiscono con essi per formare componenti idrosolubili. I prodotti della reazione vengono liberati nella soluzione. Questo metodo permette la realizzazione di un doppio strato lipidico modellato e, di essere sfruttato per la produzione di membrane fosfolipidiche modello mediante riempimento delle regioni con lipidi differenti.

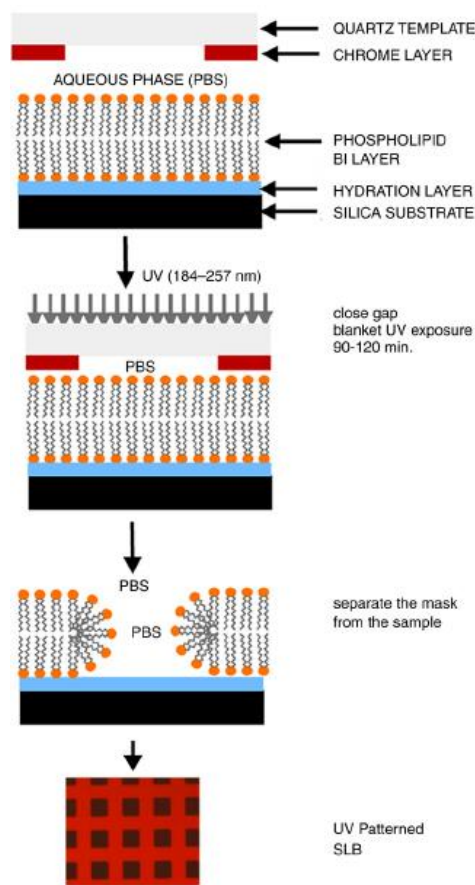


Figura 2.17 Metodo di formazione di doppi strati con supporto modellato che utilizza UV ad alta intensità [7].

Un altro metodo per la realizzazione di doppi strati fosfolipidici è il pipettaggio diretto di soluzioni di SUV in array modellati fotolitograficamente. Questa tecnica ha il vantaggio che ciascun doppio strato può contenere qualsiasi composizione desiderata di lipidi o proteine, indipendentemente dalla composizione chimica dei compartimenti vicini. La Figura 2.18 illustra questo metodo per creare array di

membrana trattati spazialmente, mediante l'inserimento per pipetta di SUVs, nella quale una punta di un microcapillare è utilizzata per trattare i singoli recinti su substrati pre-modellati.

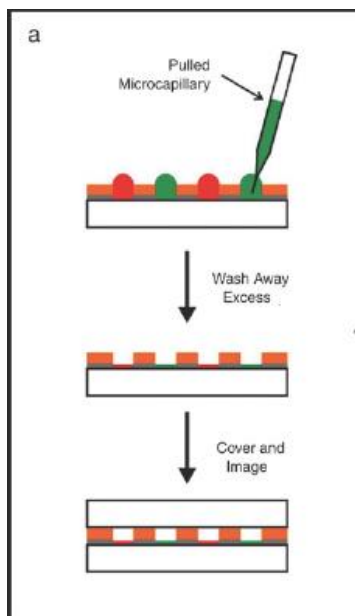


Figura 2.18 Trattamento spaziale di bistrati fosfolipidici con supporto [7].

L'utilizzo di un flusso laminare all'interno di canali microfluidici è un mezzo efficace per produrre array di doppi strati fosfolipidici con supporto, nel quale due elementi chimici distinti possono essere variati simultaneamente lungo un gradiente unidimensionale. Ciò consente il trattamento di substrati modellati dal flusso di gradiente di concentrazione di SUV, generato dal mescolamento di due differenti soluzioni di SUV. Un difetto di questo metodo è il numero limitato di elementi chimici distinti che possono essere simultaneamente trattati, così come la mancanza di controllo sul posizionamento finale dei doppi strati.

Un ultimo metodo per modellare le membrane fosfolipidiche su supporti solidi è stato realizzato grazie alla creazione di microcompartimenti trattabili individualmente sopra ad un array bistrato. Questo è stato ottenuto dallo spostamento di porzioni di una membrana con supporto solido con un timbro modellato con PDMS. In questo caso si può osservare lo spostamento delle regioni della membrana che entrano in contatto con il timbro. Il processo di rimozione può essere osservato in *real time* mediante microscopia a fluorescenza

nel corso di circa 90 minuti. Quasi tutto il materiale fosfolipidico spostato forma vescicole in soluzione e può essere facilmente risciacquato via. La soluzione in ogni micro-compartimento, successivamente, può essere trattata singolarmente.

2.2.2. Membrane lipidiche con supporto stabili in aria

Un campo interessante ed emergente nei doppi strati con supporto solido è lo sviluppo di membrane lipidiche stabili in aria. I bistrati lipidici con supporto solido non protetti sono noti per “delaminarsi” dal substrato di supporto nel passaggio attraverso un’interfaccia aria-acqua. Questo è problematico quando si sviluppano biosensori pratici basati su bistrati lipidici con supporto, perché la membrana deve essere tenuta costantemente idratata. Sarebbe altamente vantaggioso se il sistema potesse essere disidratato dopo la formazione e reidratato immediatamente prima dell’uso. Sistemi che offrono stabilità all’aria includono i doppi strati ibridi, che vedremo nel paragrafo successivo, i doppi strati stabilizzati con proteine e le membrane polimerizzate usando fosfolipidi contenenti di-acetilene sintetico. Tuttavia, questi sistemi possono soffrire di scarsa mobilità dei lipidi. Entrambi questi problemi impediscono di utilizzare la piattaforma nelle applicazioni di rilevamento. Recentemente, è stato sviluppato un sistema stabile all’aria che mantiene un’elevata mobilità dei lipidi e che è in grado di legare proteine, che devono essere determinate durante l’analisi chimica, a ligandi presenti nella superficie del bistrato lipidico. Questo risultato è ottenuto fondendo vescicole contenenti oligomeri di ossido di polietilene, congiunti a lipidi di fosfatidiletanolamina (PEG-PE), a substrati di vetro, come mostrato in Figura 2.19. I PEG-PE all’interno del doppio strato svolgono due funzioni: aumentano il modulo elastico della membrana e aumentano lo spessore dello strato di idratazione delle teste. Questa combinazione conferisce alla membrana stabilità all’aria. Lo strato PEG mostra anche di avere un effetto trascurabile sul legame delle proteine di piccola dimensione con i ligandi presenti nel doppio strato lipidico.

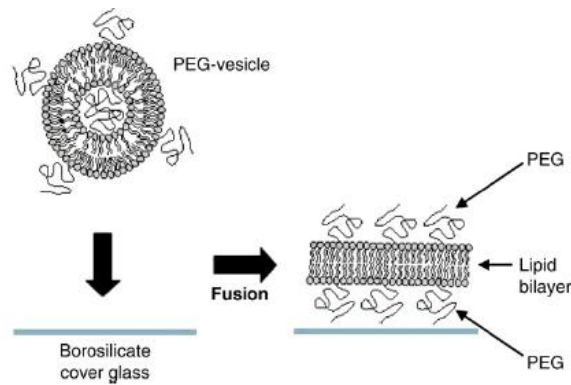


Figura 2.19 Formazione di un bistrato con supporto stabile all'aria [7].

Il vantaggio principale nell'uso di supporti solidi è chiaramente un aumento della robustezza e della stabilità della membrana a doppio strato fosfolipidico. Quasi altrettanto importante è la capacità di indagare sulle interazioni che avvengono sulla superficie di membrana con potenti tecniche analitiche che sono specifiche per la superficie (ad esempio, la microscopia a forza atomica, la microbilancia a cristalli di quarzo, la risonanza plasmonica di superficie, la spettroscopia di somma di frequenze vibrazionali, ecc.). Il loro principale svantaggio è che la membrana con supporto non è completamente separata dal substrato sottostante. Infatti, il sistema non può impedire che le proteine transmembrana interagiscano negativamente con il substrato sottostante. Tali interazioni con la superficie possono far sì che le proteine nella membrana diventino immobili e che la loro funzione venga ostacolata.

2.3. Doppi strati lipidici ibridi

L'utilizzo della tecnologia a monostrato auto-assemblato di alcantioli è il punto di partenza per realizzare membrane a doppio strato stabili, robuste e biomimetiche. Infatti gli alcantioli sono molto utilizzati per formare monostrati auto-assemblati (self-assembled monolayers, SAM) su oro e altre superfici ampiamente utilizzate per la realizzazione di elettrodi, come l'argento e il mercurio. Le membrane ibride a doppio strato (hybrid bilayer membranes, HBMs), rappresentano un mezzo per

stabilizzare un bistrato lipidico pur mantenendo la sua natura dinamica. I risultati dei diversi esperimenti suggeriscono, infatti, che tali costrutti forniscano un modo per organizzare le proteine di membrana in un ambiente molto simile a quello reale. Inoltre, le membrane, dipendenti dalle superfici metalliche, sono indirizzabili elettronicamente e otticamente, fornendo un rivestimento fisiologicamente compatibile. Nella sua forma più semplice, la membrana a doppio strato ibrido è costituito da un monostrato auto-assemblato con supporto metallico e un monostrato di fosfolipidi, come illustrato in Figura 2.20.

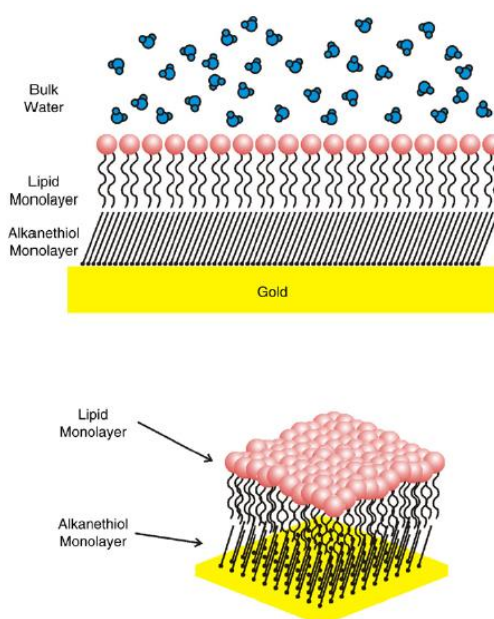


Figura 2.20 Doppio strato ibrido: un singolo monostrato fosfolipidico sovrastante a un SAM di alcantioli [23].

2.3.1. Formazione di membrane a doppio strato ibride

Quando le vescicole fosfolipidiche in mezzi acquosi sono esposti alla superficie idrofobica rivestita di alcantioli, le molecole lipidiche si assemblano spontaneamente in un secondo strato, sul monostrato di alcantioli. Il processo di aggiunta di lipidi al monostrato può essere seguito da diminuzione di capacità elettrica con il tempo. La forza motrice per l'auto-assemblaggio dei fosfolipidi in un monostrato di alcantioli, è, presumibilmente, l'effetto idrofobico, supponendo che il risultato di addizione dello strato fosfolipidico sia la riduzione dell'energia

libera dell'interfaccia alcantiolo/acqua. La dimostrazione diretta di questo concetto, è stata ottenuta esaminando l'effetto dell'aggiunta dello strato di fosfolipidi al monostrato di alcantioli utilizzando la spettroscopia Raman amplificata da superfici (SERS) e la spettroscopia infrarossa riflessione-assorbimento (RAIRS).

La SERS è eseguita su monostrati in contatto con l'acqua durante la formazione del doppio strato. Queste misurazioni consentono una valutazione dell'effetto della variazione del microambiente degli alcantioli, p. es. relativamente al modo con il quale l'acqua sia sostituita con uno strato fosfolipidico idrofobo. La SERS mostra poi che gli alcantioli a catena corta, che sono relativamente disordinati, sono molto più colpiti dall'aggiunta di uno strato fosfolipidico rispetto ai tioli a catena più lunga. Infatti, gli alcantioli a catena più lunga hanno mostrato un solo piccolo cambiamento strutturale dovuto all'aggiunta di fosfolipidi.

Le misurazioni RAIRS confrontano i monostrati di alcantioli in aria con gli alcantioli come componenti di HBMs in aria; il cambiamento dell'ambiente dello strato di alcantioli è meno drastico di quando i film sono esaminati in acqua. I piccoli cambiamenti nell'intensità dei picchi, che sono in linea anche con i cambiamenti negli alcantioli indotti dalle basse temperature, sono stati osservati sempre con la RAIRS.

Così, entrambi i risultati della SERS e della RAIRS suggeriscono che l'aggiunta dei fosfolipidi allo strato di alcantioli ha un effetto simile a quello della riduzione di temperatura. Questo è coerente con la proprietà di essere termodinamicamente favorevole e costituisce una prova diretta del ruolo dell'energia libera di superficie nella formazione del bistrato. È anche importante che questi cambiamenti spettrali siano piccoli, in particolare per i tioli a lunga catena, poiché indicano che la struttura del monostrato di alcantioli non varia significativamente, diventando parte del doppio strato. Ciò semplifica la caratterizzazione ottica ed elettrica della porzione fosfolipidica del doppio strato, perché il monostrato di fondo può essere trattato come un ottimo strato di riferimento.

È importante domandarsi cosa sia la forza motrice per l'auto-assemblaggio dello strato lipidico alla superficie del monostrato di alcantiolo. Poiché la vescicola lipidica è una struttura metastabile a lunga vita, la conversione di una vescicola bistrato in una superficie monostrato potrebbe implicare un significativo ostacolo per l'energia di attivazione. Da un punto di vista pratico, comprendere la

termodinamica del riordinamento potrebbe fornire strategie per migliorare la velocità di formazione del bilayer o la stabilità della struttura del doppio strato. Il primo passo per comprendere questo processo è individuare il fattore limitante nella formazione della membrana a doppio strato ibrido. Ci sono almeno due possibili meccanismi mediante i quali un bistrato potrebbe formarsi. L'aggiunta di uno strato lipidico al monostrato fosfolipidico potrebbe avvenire attraverso un processo vescicola-dipendente, mentre la formazione potrebbe verificarsi trasferendo singoli fosfolipidi dalle vescicole alla fase acquosa e da qui alla superficie idrofobica. Se il processo avviene per trasferimento di fase acquosa, la previsione della composizione finale della membrana ibrida è difficile.

Per studiare il meccanismo di formazione del doppio strato si utilizza la risonanza plasmonica di superficie (SPR). Le variazioni dell'indice di rifrazione dell'interfaccia metallica portano a cambiamenti nella dipendenza angolare della riflessione di un fascio di luce incidente alla superficie. Con la SPR, le aggiunte e le perdite di materiale dalla superficie possono essere monitorate direttamente. Esaminando la velocità di formazione del bistrato come funzione della concentrazione di vescicole fosfolipidiche notiamo che l'aumento tempo-dipendente in spessore ottico (una combinazione di spessore e indice di rifrazione) indica l'aggiunta di lipide alla superficie del monolayer. La velocità di formazione del doppio strato, quindi, aumenta con l'aumentare della concentrazione di vescicole [24].

2.3.2. Vantaggi delle membrane a doppio strato ibride

L'impiego di vescicole fosfolipidiche per rivestire spontaneamente uno strato idrofobico legato covalentemente su un metallo ad un monostrato di lipidi senza solventi, ha aperto una nuova era per la realizzazione di membrane modello biomimetiche. I doppi strati alcantioli/fosfolipidi si definiscono come "ibridi", perché consistono in due componenti naturali e sintetici. L'utilizzo di alcantioli fornisce un netto vantaggio rispetto a quello di altri modelli di membrana planari. Infatti, gli alcantioli possono formare uno strato completamente idrofobo in superfici metalliche e forniscono la forza motrice per la formazione di un doppio strato completo. Il legame covalente con la superficie è insensibile alle variazioni del tampone, del pH, della forza ionica o della composizione lipidica. La

fabbricazione è facile in quanto sia la preparazione del monolayer sia la formazione del doppio strato sono processi di auto-assemblaggio. Le membrane a doppio strato ibride possono essere mantenute integre e quindi possono essere studiate per mesi; hanno poi una stabilità meccanica molto più alta rispetto alle membrane lipidiche nere. Inoltre, poiché la HBM è formata su una superficie, molte tecniche, che generalmente non possono essere applicate alle membrane biologiche, sono ora accessibili. L'utilizzo di un supporto metallico, come l'oro, consente l'applicazione di tecniche elettrochimiche per esaminare il carattere isolante degli strati lipidici e per valutare l'attività dei pori delle proteine di membrana, degli enzimi, e degli ionofori. Inoltre, lo strato metallico consente l'uso della risonanza plasmonica di superficie per esaminare la formazione di queste membrane biomimetiche e l'associazione di molecole in fase-soluzione. La planarità e la stabilità di questi bistrati facilitano anche l'utilizzo della microscopia a forza atomica, della riflettività, dell'ellissometria, della spettroscopia ottica non lineare, della spettroscopia a infrarossi riflessione-assorbimento e, infine, delle tecniche del vuoto. L'applicabilità di una così ampia gamma di tecniche analitiche per membrane biomimetiche apre nuove strade per studiare la complessa struttura e funzione delle membrane biologiche [24].

Sono presenti però anche diverse limitazioni. Uno strato SAM di alcantioli è più tipicamente cristallino nella struttura rispetto a un normale foglietto di doppio strato fosfolipidico. Ciò è influenzato dalla densità di impacchettamento del sottostante strato SAM; questo può inibire il corretto funzionamento della membrana [7].

2.4. Doppi strati lipidici con ammortizzatore polimerico

Seppure i doppi strati fosfolipidici con supporto solido e i bistrati ibridi siano eccellenti piattaforme sensorizzabili per lo studio di molti processi cellulari, essi presentano difficoltà nel simulare un appropriato ambiente per le proteine transmembrana, in particolare per quelle che hanno grandi domini periferici. Lo strato d'acqua di 10-20 Å che risiede tra un doppio strato fosfolipidico e un supporto solido funge da lubrificante e mantiene sufficientemente mobilità per

molecole lipidiche; tuttavia non protegge le porzioni periferiche delle proteine transmembrana dall'immobilizzazione o dalla denaturazione se vengono a contatto con il substrato. La Figura 2.21 illustra questo problema e mostra anche lo stesso sistema in presenza di un supporto lipo-polimerico. Il desiderio di imitare correttamente la natura intrinsecamente complessa di membrane plasmatiche fluide bidimensionali è stata la forza trainante per lo sviluppo di tali sistemi a doppio strato con supporto polimerico.

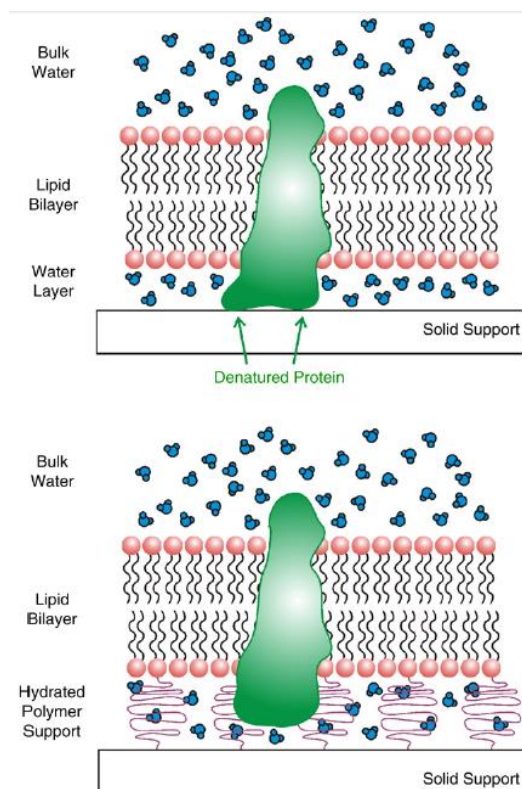


Figura 2.21 I domini periferici delle proteine transmembrana possono essere immobilizzati e denaturati dal supporto solido. Un ammortizzatore polimerico aiuta a proteggere la proteina dal substrato [7].

L'aggiunta di uno strato polimerico disaccoppia efficacemente la membrana dalla superficie e consente anche indagini mediante una serie di tecniche scientifiche di superficie. In linea di principio, tali sistemi dovrebbero resistere all'assorbimento non specifico di proteine transmembrana. Un altro vantaggio potenziale dei supporti polimerici è la capacità di evitare l'adsorbimento non specifico di proteine acquose dalla soluzione. In effetti, questo può generalmente verificarsi,

nei siti difettosi, nei doppi strati con supporto solido senza ammortizzatore polimerico. Un gran numero di tali siti contribuiscono ad alte risposte di fondo e a bassi rapporti segnale-rumore, soprattutto in schemi elettrici di rilevazione dove è monitorato il trasporto di elettroni o di ioni, nel e dal substrato.

Un ammortizzatore polimerico ben progettato dovrebbe comportarsi molto similmente a un citoscheletro, una matrice proteica presente nelle cellule che supporta il doppio strato lipidico e dà forma alla cellula. Nella progettazione di sistemi per i bistrati lipidici con supporto bisogna tenere in considerazione il bilanciamento delle forze di superficie. In generale, è auspicabile che il supporto polimerico sia morbido, idrofilo, non troppo carico e non ampiamente reticolato [7].

2.4.1. Fabbricazione di film compositi polimero-lipide stratificati

Per progettare film compositi polimero-lipide stabili termodinamicamente e meccanicamente su solidi (esposti ad aria o ad acqua), si devono controllare con attenzione le condizioni di bagnabilità. In particolare, le forze interattive tra membrane e solidi devono essere solo debolmente attrattive o debolmente repulsive per evitare che sia sfavorita la bagnabilità dei morbidi film stratificati che derivano dalla deposizione del bilayer. Una strategia utile per evitare la mancanza di bagnabilità è “piantare” chimicamente gli ammortizzatori polimerici alla superficie. Dopo aver trovato le condizioni di bagnabilità appropriate per un dato sistema, il film composito si forma per auto-assemblaggio.

I tre metodi per la preparazione di film compositi membrana-polimero stabili sono:

- impianto chimico di un film di un polimero naturale altamente solubile in acqua, come destrano o acido ialuronico, alla superficie solida e successiva deposizione dei bistrati lipidici;
- solubilizzazione di lipo-polimeri (lipidi con gruppi macromolecolari accoppiati alla “testa”) che formano *stealth*, separando così il bistrato dalla superficie solida;
- deposizione di morbidi multistrati idrofili o idrofobi di molecole astiformi con catene laterali di alchile (“*hairy rods*”) e successivo trasferimento di monostrati o doppi strati lipidici.

Un altro procedimento adottato per la formazione di morbidi film polimerici funzionalizzati (o ammortizzatori per membrane polimeriche) è la deposizione di film polimerici ultrasottili mediante polimerizzazione elettrochimica. Catene di polimeri sintetici (p. es. polietilenglicole) o oligopeptidi (p. es. epitopi di antigeni) sono accoppiati a derivati fenolici, che possono essere polimerizzati alla superficie dell'elettrodo anodico. Ciò consente una funzionalizzazione selettiva e diretta di singoli elettrodi di array multi-elettrodo.

La deposizione del bilayer può avvenire in tre modi:

- trasferimento del monolayer;
- fusione di vescicole;
- diffusione del singolo doppio strato.

Nel primo metodo, il trasferimento del monostrato dall'interfaccia aria-acqua di una bilancia di Langmuir (tecnica di Langmuir-Blodgett) è laborioso, ma consente la deposizione di bistrati asimmetrici; il metodo è fondamentalmente lo stesso mostrato in Figura 2.11 per la formazione dei doppi strati lipidici con supporto solido. Nel secondo metodo, le vescicole lipidiche sono depositate sul substrato da sospensioni vescicolari. Regolando la forte adesione al substrato (p. es. tramite forze elettrostatiche generate dalla ricostituzione del 10% dei lipidi carichi), le vescicole si aprono e formano doppi strati aderenti che fondono in bistrati continui dopo la ricottura a temperature elevate (50°C). Nel terzo metodo, la diffusione del singolo doppio strato è spontaneamente ottenuta depositando un serbatoio lipidico in un solido (da una soluzione organica). Dopo l'aggiunta di acqua, un singolo doppio strato è spontaneamente trattenuto sulla superficie da forze di adesione (se è idrofilo e sufficientemente attrattivo). Il doppio strato è continuo e autorimarginante perché i pori locali rimarginano rapidamente a causa della forte pressione di diffusione fornita dal serbatoio lipidico.

Per molti scopi, è auspicabile la formazione di un modello bifunzionale; questo può essere realizzato mediante printing molecolare o strutturazione fotolitografica di multistrati di *hairy rods*. I "polimeri *hairy-rod*" sono macromolecole astiformi (cellulosa o poliglutammato) a cui sono accoppiate catene alchiliche, e hanno diverse caratteristiche utili. Essi possono essere depositati con la tecnica Langmuir-Blodgett e manipolati come segue: (1) la fluidità delle superfici simili a una spazzola può essere controllata dalla lunghezza della catena alchilica e dalla pressione laterale, nella quale vengono trasferiti i multistrati *hairy rods*; (2) i film

possono essere stabilizzati dalla parziale reticolazione fotochimica; e (3) le catene alchiliche (accoppiate alla spina dorsale del polimero attraverso gruppi silani) possono essere spezzate per idrolisi dopo il trasferimento, con conseguente risultato di ammortizzatori idrofili dove i doppi strati possono diffondere. Quando i monostrati lipidici sono depositati nei modelli lateralmente strutturati, essi si auto-assemblano selettivamente sui domini idrofobi [24,25,26]. Questa tecnica è più difficile del printing molecolare, ma è molto più versatile e permette il controllo della densità e della mobilità dei recettori.

2.4.2. Principali classi di ammortizzatori polimerici

Ci sono diversi tipi di ammortizzatori polimerici che sono stati studiati per sostenere doppi strati fosfolipidici. Questi includono destrano [27], cellulosa, chitosano, polielettroliti e legami lipo-polimerici. Due classi di polimeri, i polielettroliti e i lipo-polimeri, sono quelli più comunemente utilizzati come materiale per l'ammortizzatore. Nel caso degli ammortizzatori polielettrolitici, il materiale può essere direttamente adsorbito dalla soluzione per una varietà di substrati mediante la deposizione *layer-by-layer*, fornendo un grande controllo dello spessore del film risultante. La polietilenimina (PEI) è stata utilizzata per sostenere i bistrati fosfolipidici su mica e quarzo. Nei substrati metallici come l'oro, i polielettroliti possono essere adsorbiti dai monostrati auto-assemblanti carichi. L'acido mercaptoundecanoico nell'oro è in grado di adsorbire strati alternati di polidialildimetilammonio (PDDA) e polistirene sulfonato di sodio (PSS) per utilizzarli come ammortizzatore polimerico [28].

Gli ammortizzatori polielettrolitici si basano su interazioni elettrostatiche che contribuiscono a tenere insieme il sistema. Qui, le cariche alternate hanno un ruolo principale. L'attrazione elettrostatica tra il substrato e l'ammortizzatore polimerico li lega assieme. A sua volta, le forze di Van der Waals, il legame idrogeno e le interazioni elettrostatiche legano lo strato lipidico al polimero. Quando uno strato polielettrolitico viene depositato su un substrato, la carica sulla superficie accumula materiale aggiuntivo repellente con la stessa carica, distante dall'interfaccia. Sotto opportune condizioni di deposizione, un film altamente uniforme è formato con una relazione lineare tra lo spessore e il numero di strati assorbiti. Dall'altra parte, la necessità di utilizzare cariche elettrostatiche per

mantenere gli ammortizzatori polielettrolitici nel loro posto, presenta alcune limitazioni. Troppa carica può influenzare negativamente la funzione e la mobilità dei costituenti di membrana e può alterare le interazioni tra le proteine e l'ammortizzatore di sostegno. Le alte forze attrattive sono anche direttamente influenzate dall'ambiente di soluzione, vale a dire dalla forza ionica e dal pH. Questo può essere problematico, poiché i processi biologici avvengono in differenti ambienti di soluzione.

I lipo-polimeri sono un'altra classe molto usata per gli ammortizzatori polimerici. Sono costituiti da un morbido strato polimerico idrofilo che presenta in superficie molecole simili a lipidi che possono inserirsi in una membrana fosfolipidica e legarsi al distanziatore polimerico. Il legame ha il vantaggio di essere molto meno influenzato dalle caratteristiche della soluzione come il pH e la forza ionica. Tuttavia, un elevato grado di legame può interferire con la mobilità dei singoli componenti all'interno della membrana con supporto. Tipicamente il lipo-polimero è legato covalentemente al substrato. Questo fornisce un supporto aggiuntivo per il sistema di membrana. L'attaccamento del lipo-polimero al substrato è effettuato mediante accoppiamento fotoreattivo, formazione di legame zolfo-metallo, collegamento del gruppo epossidico, o legame silanico. Alcune catene polimeriche comunemente utilizzate nella sintesi dei lipo-polimeri sono l'acrilamide, i peptidi e l'etilenglicole. È importante che l'ammortizzatore polimerico abbia la capacità di gonfiarsi in un ambiente acquoso e abbia minime interazioni distruttive con il doppio strato e con qualsiasi altro componente della membrana. Il grado con il quale l'ammortizzatore polimerico si gonfia in un ambiente acquoso o umido è una buona indicazione della sua capacità di essere impiegato come supporto. È stato osservato che la qualità della membrana con supporto può anche essere influenzata dal grado del rigonfiamento dello strato polimerico prima della deposizione del bistrato. Il rigonfiamento è tipicamente monitorato in una camera umida e può essere facilmente analizzato con ellissometria o spettroscopia di risonanza plasmonica di superficie.

2.5. Tecniche per l'incorporazione di proteine di membrana

Le membrane biologiche sono formate mediante l'inserimento di proteine o polipeptidi in membrane pre-esistenti. L'incorporazione di proteine transmembrana in una nuova biomembrana artificiale formata con uno dei metodi descritti nel capitolo precedente, rappresenta una delle maggiori sfide per le “*sensing platforms*” (piattaforme sensorizzate) di membrana. Poche sono infatti le informazioni disponibili circa il meccanismo effettivo di incorporazione di queste proteine. La ricerca su questo problema è stata limitata dalla mancanza di un adeguato sistema *in vitro*, nel quale la composizione dei componenti interagenti possa essere variata a piacimento. La ricostituzione di proteine di membrana intrinseca nei liposomi ha in passato coinvolto l'uso di detergenti o di sonicazione. Queste procedure non consentono l'inserimento sequenziale di proteine e sono state pertanto di scarsa utilità per gli studi di interazioni selettive tra le proteine di membrana [29]. Di seguito saranno illustrati alcuni dei principali metodi per l'incorporazione di queste proteine in biomembrane artificiali.

2.5.1. Proteine solubilizzate nel detergente

Il più comune e semplice metodo per introdurre proteine transmembrana (in particolare, canali ionici) all'interno del doppio strato lipidico è aggiungere direttamente **proteine solubilizzate nel detergente** proprio di fronte alla membrana artificiale. Questa tecnica però non può essere applicata a una vasta maggioranza di proteine di membrana ed è comunque dannosa per i doppi strati lipidici poiché il detergente può causare la rottura della membrana bistrato. Inoltre questo primo approccio, a differenza di quelli descritti in seguito, non può essere combinato con un sensore elettrochimico.

2.5.2. Le proteine transmembrana possono essere ricostituite dopo la purificazione nei liposomi

Questo processo, sebbene difficile, è stato dimostrato per membrane con supporto. La fusione di proteo liposomi, sia formando la membrana con supporto, sia

fondendoli a una membrana con supporto o *free-spanning* (libera espansione) già formata, è considerato l'approccio più promettente per la funzionalizzazione con proteine di piattaforme di membrana *surface-based*. Questo metodo è stato dimostrato su membrane *free-spanning* da Morgan et al. utilizzando un gradiente salino attraverso la membrana e una coppia antibiotico-steroli per indurre la fusione: i proteo-liposomi fondono spontaneamente nelle membrane a doppio strato e la creazione di gradienti salini differenti in due compartimenti opposti ne facilita la fusione, generando una pressione. L'integrazione dei proteo-liposomi, permette alle proteine di inserirsi nel doppio strato lipidico preparato. L'uso di proteo-liposomi va incontro a numerose complicazioni tecnologiche, tra le quali la purificazione e la ricostituzione della proteina di membrana desiderata [21,30].

2.5.3. Altri metodi di incorporazione delle proteine di membrana

Un'ulteriore tecnica è l'incorporazione di proteine in doppi strati lipidici che utilizza monostrati nei quali sono inserite le proteine. Tali monostrati possono essere accoppiati a un monostrato lipidico puro, realizzato su un altro versante di una camera sperimentale. Questo porta all'incorporazione delle proteine nel doppio strato lipidico [30].

Bayley et al. hanno sviluppato metodi per l'inserimento di proteine canale in doppi strati lipidici *free-spanning* pre-formati. Questo evita anche la ricostituzione, ma è compatibile con qualsiasi piattaforma sensorizzata di membrana. Singole proteine purificate sono inserite nella membrana *free-spanning* per mezzo dell'uso di una cupola di agarosio al termine di un punta ad azionamento manuale, che viene portata a contatto con il doppio strato lipidico. Questo metodo è stato successivamente raffinato per incorporare l'uso di una punta di vetro tagliente (circa 5-50 mm di diametro), con la quale le proteine canale presenti nella membrana esterna dell'E-coli possono essere prelevate e trasferite direttamente nella membrana del sensore. Sebbene la durata del sensore non sia stata determinata, usando questo metodo è stato dimostrato il rapido screening di 100 colonie di proteine, il che dimostra che il rapido trasferimento dei canali ionici dalle membrane cellulari alle piattaforme di rilevamento è possibile senza ricostituzione. Tuttavia, questo metodo non è probabilmente adatto per proteine transmembrana grandi e meno robuste [21].

2.6. Stabilizzazione della membrana e piattaforme sensorizzate di membrana

I doppi strati lipidici formati mediante le tecniche convenzionali non sono stabili e ogni operazione richiede manodopera specializzata. Le attuali tecnologie fanno uso di dispositivi su piccola scala, o tecnologie LOC (Lab-on-a-Chip), per creare la piattaforma per la formazione di doppi strati lipidici che possono aumentare la stabilità del bistrato e facilitarne il processo di formazione. In questo capitolo analizzeremo gli approcci per stabilizzare la membrana lipidica e classificheremo i dispositivi LOC per la formazione di doppi strati lipidici nelle tre tipologie principali, secondo la struttura e l'aspetto della forma del doppio strato.

2.6.1. Approcci di stabilizzazione della membrana

Oltre alla già descritta tecnica delle proteine S-layer, un differente approccio per stabilizzare le membrane lipidiche è far attraversare larghe aperture da di idrogel (Figura 2.22). Dopo la formazione di una membrana lipidica da una soluzione gelificante contenente agarosio attraverso un'apertura di 100 μm di diametro, la membrana è inserita tra due film anch'essi costituiti da gel di agarosio. L'auto-inserimento dei canali ionici può avvenire aggiungendoli alla soluzione dopo la formazione della membrana ma prima della gelificazione. Le misurazioni del poro possono essere ottenute fino a tre settimane dopo la formazione della membrana, e le membrane stabili possono essere "tagliate" e trasferite in altre configurazioni di sensing.

Questi progressi sono passi importanti verso la realizzazione di piattaforme di membrane sensorizzate, con sensibilità e longevità necessarie per varie applicazioni commerciali, come lo screening di farmaci [21].

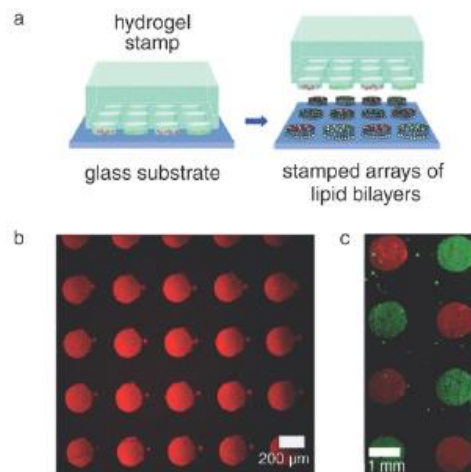


Figura 2.22 Matrici di bistrati con supporto solido modificato con un gel contenente agarosio. (a) Illustrazione della tecnica di stampa. (b) Pezzi di 1 micron di doppio strato lipidico con supporto, stampati con una matrice ad alta densità. (c) Dimostrazione delle capacità di questa tecnica di indirizzamento spaziale, per una matrice a bassa densità [7].

2.6.2. Tecnologie LOC

Le tecniche di microfabbricazione sono in grado di rimpicciolire le complicate procedure di laboratorio in piccoli chip generalmente indicati come Lab-on-a-Chip, o tecnologie LOC. Queste tecnologie sono emerse come un aspetto importante in elettrofisiologia e nelle indagini per la scoperta di nuovi farmaci. La crescente tendenza ad applicare tecnologie LOC nelle piattaforme a doppio strato lipidico offre metodi alternativi per i test di screening dei farmaci. Hanno infatti il potenziale per cambiare completamente il campo dello screening dei farmaci in termini di costi e produttività.

Il doppio strato lipidico *free-standing* (senza supporto) rappresenta lo scenario più vicino all'ambiente naturale di come la membrana può stare da sola, indipendentemente dai supporti dati alla regione del bistrato, e, in esso, entrambi i lati della membrana sono esposti a serbatoi ionici acquosi intercambiabili. Similmente ai metodi convenzionali, alcune tecnologie LOC per doppi strati lipidici fanno uso di una singola micro-apertura per formare un doppio strato senza supporto. Tuttavia, a differenza dei metodi convenzionali, la maggior parte delle aperture fabbricate sono orientate verticalmente (anziché lateralmente)

causando la formazione di bistrati lipidici in un piano orizzontale (Figura 2.23a). Il doppio strato lipidico risultante separa la camera sperimentale in due compartimenti, uno superiore e uno inferiore. Un'alternativa all'apertura singola è la matrice di micro-aperture (30 μm di diametro) che facilita la formazione del doppio strato lipidico e ne aumenta la stabilità (Figura 2.23b). Tuttavia, lo svantaggio di questa tecnica è che i bistrati lipidici devono essere formati in tutte le micro-aperture della matrice, altrimenti essa non può essere utilizzata per la misurazione dell'attività delle proteine transmembrana. In generale, le aperture sono connesse ai canali microfluidici allo scopo di scambiare soluzioni e per valutare le misurazioni elettriche. Sebbene il silicio, grazie ai suoi affermati usi nella microfabbricazione, sia spesso utilizzato come materiale per fabbricare le aperture, è stato dimostrato che le aperture realizzate in lamiera di parilene, e altri materiali idrofobi, compresi polimetilmetacrilato (PMMA), Teflon e Delrin, creano un bistrato più stabile. Inoltre, si è osservato che si ha una maggiore riduzione del rumore elettrico fabbricando aperture relativamente piccole; tuttavia nelle aperture più piccole di 40 μm , il rumore proveniente dalle altre fonti esterne, domina sul sistema bistrato lipidico [30,31].

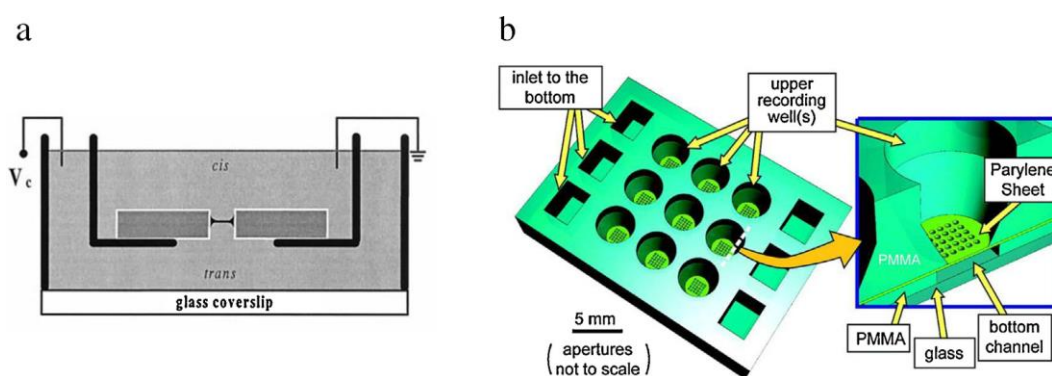


Figura 2.23 Dispositivi micro-apertura per la formazione di doppi strati lipidici *free-standing*. (a) Un bistrato lipidico formato attraverso apertura verticale separa la camera sperimentale in due compartimenti. (b) Matrice di micro-aperture per la formazione di bistrati lipidici [30].

Il doppio strato ad interfaccia di goccia, o DIB (*droplet interface bilayer*), è invece una tecnica dove il bistrato lipidico è creato dal contatto di due goccioline

acquose rispettivamente delimitate da un monostrato lipidico in una miscela lipidi/solvente. I DIBs possono essere formati da due tecniche differenti, la tecnica “*lipid-out*” e quella “*lipid-in*”. Nella tecnica *lipid-out*, due goccioline acquose indipendenti sono depositate in una miscela lipide-solvente (Figura 2.24a), mentre nella tecnica *lipid-in*, le goccioline acquose contenenti vescicole lipidiche sono depositate in una soluzione con solvente organico (Figura 2.24b). In entrambi i casi, il monostrato lipidico circonda spontaneamente le superfici acquose in modo tale che le teste polari si leghino alla superficie acquosa e le code lipidiche si affaccino nella soluzione con il solvente organico. Un doppio strato lipidico può quindi essere formato mettendo le due goccioline in contatto, lasciandole cadere direttamente una accanto all’altra, manipolando gli elettrodi che sono collegati alle goccioline, o usando l’elettrowetting (modificazione delle proprietà di umidità della superficie utilizzando un campo elettrico applicato) [30]. Entrambi i metodi poi richiedono un periodo di stabilizzazione, che è molto più breve per la tecnica *lipid-in*, minore di 5 minuti, che per quella *lipid-out*, minore di 30 minuti [32].

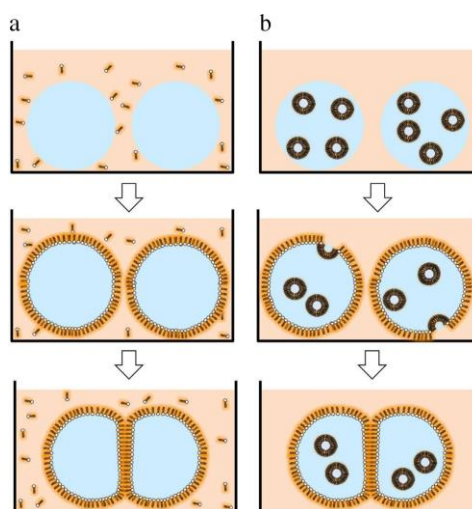


Figura 2.24 Droplet interface bilayer (DIB). La figura illustra due differenti tecniche per creare DIB, (a) tecnica *lipid-out*, (b) tecnica *lipid-in* [30].

Spesso il DIB viene integrato con altre tecniche per formare doppi strati lipidici. Ad esempio sono stati sviluppati dispositivi microfluidici costituiti da due compartimenti, uno superiore e l’altro inferiore. Questi compartimenti sono

collegati da una micro-apertura realizzata in Delrin o PMMA. I canali microfluidici inferiori sono riempiti con una soluzione acquosa mentre quelli superiori con miscele lipidiche. Le goccioline acquose (2-3 μl) vengono eliminate dal compartimento superiore dalle aperture dove l'interfaccia tra la gocciolina e la soluzione, ciascuna costituita da un monostrato lipidico, diventa un doppio strato. Il vantaggio di utilizzare il DIB e le tecniche per realizzare il doppio strato è che il bistrato può essere facilmente formato grazie al contatto di due monostrati. Un possibile svantaggio della tecnica DIB, invece, è che tutte le soluzioni acquose sono racchiuse all'interno delle goccioline rendendo difficile lo scambio delle soluzioni stesse. Molti sforzi sono stati fatti per risolvere questo problema, tuttavia non è ancora stato trovato un modo efficace di scambio delle soluzioni [30].

CAPITOLO 3.

Applicazioni di biomembrane lipidiche artificiali

Le differenti biomembrane lipidiche artificiali descritte nel capitolo precedente possono essere utilizzate per svariate applicazioni. Esse svolgono, infatti, un ruolo fondamentale nello sviluppo di sensori e nano-dispositivi che sono la base per la ricerca di nuovi farmaci e metodi terapeutici. Inoltre, le loro caratteristiche, molto simili a quelle delle membrane lipidiche reali, hanno permesso lo studio dei principali processi della membrana cellulare.

Per lo studio delle attività dei canali ionici, misure da singolo canale possono essere ottenute in doppi strati senza supporto e dai doppi strati ad interfaccia di goccia o DIB (Tabella 1). L'informazione cruciale che può essere estratta dalle misurazioni di un solo canale ionico includono la cinetica del *gating* del canale (durata di chiusura e di apertura del canale ionico, probabilità di apertura e chiusura), e le proprietà elettriche del canale ionico e del modello di membrana (conduttanza del singolo canale, curva corrente-tensione I-V del canale, conduttanza del modello di membrana e curva I-V del modello di membrana).

Ion channels	Type of lipid bilayer	Techniques used for ion channel activity recordings	Lipid bilayer life time	Material of the aperture (if applicable)	Number of bilayer array (if applicable)	Note
Gramicidin	Free standing lipid bilayer	Single channel recordings	15 h	Parylene	9	50% yeild bilayer formation
	Free standing lipid bilayer	Single channel recordings	15–40 h	Silicon	12	
	Free standing lipid bilayer	Single channel recordings	2–3 h	PTFE, PMMA		
	Free standing lipid bilayer	Single channel recordings		Plastic sheet	9	
	DIB/contacting lipid monolayer	Single channel recordings	2 h w/o protein insertion 30–60 min w/protein insertion	PMMA		
	DIB/contacting lipid monolayer	Single channel recordings				
	DIB	Single channel recordings	Several hours		9	
	tBLM	EIS				
	tBLM	EIS				
	nBLM (sBLM + free standing lipid bilayer)	EIS, single channel recordings	Several days	Aluminium		
Free standing lipid bilayer	Single channel recordings		Teflon	96		
Free standing lipid bilayer	Single channel recordings		Silicon			
Free standing lipid bilayer	Single channel recordings		Parylene			
α -Hemolysin	Free standing lipid bilayer	Single channel recordings		Plastic sheet	16	Automated system, 81% ion channel signals detected
	DIB on hydrogel support	Single channel recordings	72 h–several weeks			
	DIB/contacting lipid monolayer	Single channel recordings	7 h			
	Contacting lipid monolayer	Single channel recordings				
	Free standing lipid bilayer	Single channel recordings	Up to 8 h	Silicon		
	DIB	Single channel recordings	Up to 8 h			
Alamethicin	DIB/contacting lipid monolayer	Single channel recordings	More than 1 h		96	9
	Free standing lipid bilayer	Single channel recordings				
	Free standing lipid bilayer	Single channel recordings				
	Free standing lipid bilayer	Single channel recordings	1–5 h	Teflon		
Outer membrane protein F (OmpF)	DIB/contacting lipid monolayer	Single channel recordings	2 h w/o protein insertion 30–60 min w/protein insertion	PMMA	16	
	nBLM (sBLM + free standing lipid bilayer)	EIS, single channel recordings	8–10 h	Aluminium		
Potassium cytolysin channel (KscA)	DIB/contacting lipid monolayer	Single channel recordings	120 min w/o protein insertion 30–60 min w/protein insertion	PMMA		
Durg discharge outer membrane protein (OprM)	DIB on hydrogel support	Single channel recordings				
Outer membrane protein G (OmpG)	Free standing lipid bilayer	Single channel recordings				
Viral potassium channel (Kcv)	DIB	Single channel recordings	Several hours–days		16	
Large conductance mechanosensitive channel (MscL)	tBLM	Single channel recordings (using conventional patch clamp)				
Synthetic ion gated channel (SLIC)	tBLM	EIS				

Tabella 1 Misurazioni di canali ionici da dispositivi LOC di doppi strati lipidici [30].

La spettroscopia elettrochimica di impedenza (electrochemical impedance spectroscopy, EIS) è una tecnica molto potente utilizzata intensamente nel campo dei biosensori. È normalmente utilizzata per monitorare il trasferimento di carica

dalla soluzione dove è immerso un elettrodo, alla superficie dell'elettrodo, misurando l'impedenza. Per le misurazioni dei canali ionici, l'informazione ottenuta dall'EIS include sia i distinti segnali di carica trasferiti nella superficie, nei canali ionici e nel dispositivo stesso, sia la conduttanza del modello di membrana. Tuttavia la cinetica del *gating* del canale ionico non può essere misurata perché l'EIS funziona a tensione alternata a bassa frequenza [33].

La maggior parte dei dispositivi LOC sviluppati per la formazione del doppio strato lipidico utilizza la formazione di pori da parte dell'antibiotico gramicidina o della tossina batterica α -emolisina per dimostrare il *proof-of-concept*. La gramicidina e l' α -emolisina sono di solito preferibili grazie alle loro ben caratterizzate funzioni di canale ionico. Inoltre, l'inserimento di queste proteine nelle membrane a bistrato lipidico è relativamente più facile rispetto ai canali ionici eucariotici.

Singole misurazioni da canale, ottenute da complessi canali ionici eucariotici, sono state dimostrate in diversi dispositivi LOC a doppio strato lipidico, in particolare sul bistrato senza supporto e sui sistemi DIB. I dati provenienti da queste misurazioni, suggeriscono lo sviluppo di dispositivi LOC a doppio strato per misurazioni di canale ionici che possono essere applicati per monitorare l'attività dei canali più complessi.

Sistemi ad alta capacità analitica (cioè rapidi), sono necessari per screening convenienti e rapidi di grandi quantità di composti. Considerevoli sforzi sono stati fatti per portare su scala industriale la piattaforma del bilayer lipidico per le misurazioni dei canali ionici, in molti casi applicando al sistema canali microfluidici.

Doppi strati lipidici senza supporto. In diversi studi sono stati dimostrati array di 9-12 doppi strati lipidici senza supporto per misurazioni simultanee delle attività dei canali ionici. Viene fabbricata un'apertura di dimensione μ -metrica per la formazione del bilayer, in ogni unità da misurare. Ciascuna unità è collegata a canali microfluidici per caricare e scambiare la soluzione. Una tecnica per migliorare la stabilità del doppio strato senza supporto consiste nell'utilizzare un gruppo di aperture per formare un array di doppi strati lipidici per ogni singola unità da misurare. Un aumento della stabilità della membrana sembra provenire anche da un sottile foglietto di parilene utilizzato per fabbricare array con piccole aperture.

DIB e monostrati lipidici a contatto. In array di DIB sono stati proposti DIB-chip a 16 elementi per un rapido screening del singolo canale. Il chip è costituito da 16 goccioline che stazionano in 16 pozzetti differenti collegati agli elettrodi Ag/AgCl e da una gocciolina collegata a un elettrodo Ag/AgCl mobile. Tutte le goccioline sono immerse in una miscela lipide-solvente. Ciò provoca la formazione di un monostrato lipidico intorno alle goccioline. Infine, un doppio strato lipidico si viene a formare mettendo in contatto il monostrato attorno alla gocciolina mobile con ogni altra gocciolina stazionaria.

A causa dei dati di alta qualità ottenuti dal patch clamp convenzionale, che è una tecnica usata in elettrofisiologia per misurare le correnti che attraversano singoli canali ionici presenti nella membrana cellulare, gli sforzi per istituire uno screening basato su tecniche di patch clamp ha portato allo sviluppo e all'utilizzo di sistemi *Automatic Patch Clamp* (APC). La tecnica del patch clamp consiste nel bloccare la differenza di potenziale elettrico in una piccola area della membrana cellulare o dell'intera cellula. È quindi possibile analizzare le modalità attraverso le quali i canali ionici influiscono sia sulla differenza di potenziale a livello di membrana, sia su processi cellulari come la secrezione e la contrazione. L'estremità di una pipetta di vetro, con diametro di 1 micrometro e resistenza di 1-10 Mega Ohm, viene riempita di una soluzione simile a quella presente nel liquido extracellulare e viene fatta aderire perfettamente a una membrana cellulare permettendo così di isolare una piccola area della membrana stessa e i canali ionici in essa presenti. La punta della micropipetta viene fatta aderire alla superficie della membrana della cellula fino ad ottenere una saldatura ad elevata resistenza (*Gigaseal*) che impedisce la fuga di corrente dalla pipetta verso il mezzo esterno. La corrente che fluisce attraverso i canali ionici che si trovano nel tratto di membrana compreso nella punta della micropipetta, viene misurata da un apposito circuito elettronico (amplificatore operazionale) connesso con l'elettrodo metallico (Ag/AgCl) immerso nella soluzione elettrolitica della micropipetta. A questo punto è possibile modificare e manipolare chimicamente o elettricamente i canali stessi in modo da studiarne le proprietà. Esempi popolari di sistemi APC ad alta capacità di trasmissione, nel mercato, sono Dynaflo HT, IonFlux HT [34], IonWorks Barracuda [35], SyncroPatch 96 e il QPatch HTX [36,37]. Gli sviluppi dell'APC hanno un grande impatto nel campo dello screening dei farmaci dei canali ionici perché essi sono automatizzati, forniscono dati di alta qualità e

possono effettuare misurazioni parallele fino a 384 campioni che possono ridurre notevolmente il tempo necessario per i processi di screening dei farmaci. Tuttavia, lo svantaggio del sistema APC è il relativo alto costo. Ciò dà spazio allo sviluppo di piattaforme alternative ad elevata capacità di trasmissione che offrono dati di alta qualità e a basso costo.

Sebbene le misurazioni dei canali ionici siano ben conosciute nella tecnica del doppio strato lipidico, la piattaforma con dispositivi LOC con array ad alta capacità di trasmissione, è nuova nel mercato. Attualmente ci sono tre prodotti commerciali disponibili: il sistema di membrana con legame (Tethered Membrane Systems), da eDAQ (array di 6) [38], il chip array di doppi strati per la formazione di bistrati di goccioline da Librede (array di 32 e 128) [39], e la piattaforma a doppio strato senza supporto, l'Orbit 16, da Nanion (array di 16) [40].

In particolare, il tethered membrane systems si basa sulla realizzazione di membrane tethered, che sono bilayer fosfolipidici con supporto planare poste sopra un elettrodo d'oro da un insieme di catene idrofiliche di glicole polietilenico (PEG) legate covalentemente alla superficie d'oro da ancore di disolfuro organico (Figura 3.1). L'insieme dell'ancora di disolfuro e della PEG viene indicata come un tether molecolare perché lega la membrana alla superficie d'oro. I tether sono separati gli uni dagli altri da molecole simili, chiamate spacer, e rivestono l'intera superficie d'oro. Il rapporto tra tether e spacer può essere variato durante la fabbricazione della membrana. La tethaPlate standard utilizza un rapporto di 1:10 che normalmente fornisce il miglior compromesso tra stabilità e flessibilità. Rapporti piccoli come 1:100 sono utilizzati se si vuole una maggiore flessibilità, ma se non necessaria, è meglio evitare per non indebolire l'integrità della membrana. Viceversa rapporti fino al 100% possono essere utilizzati se è necessaria stabilità eccezionale. Le membrane Tethered sono estremamente robuste perché hanno una durata di vita tipica di mesi dopo la preparazione (se sono conservate a 4°C tra un esperimento e l'altro). Sono anche molto resistenti agli impulsi elettrici e possono sopportare potenziali nell'intervallo da -500 a +800 mV, che sono di gran lunga superiori di quelli che possono essere applicati nei tradizionali esperimenti di patch clamp.

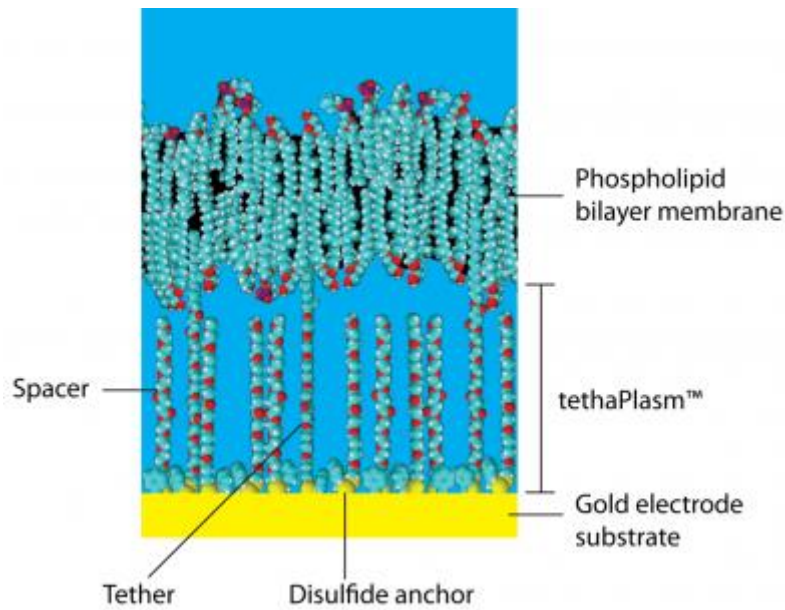


Figura 3.1 Componenti del tethered membrane systems [41].

Questo genere di biomembrana artificiale può essere realizzata mediante un tethaPlate (Figura 3.2). Questo comprende sei camere ognuna con un elettrodo d'oro (superficie 2,1 mm², 3,0x0,7 mm), che è pre-rivestito con molecole tether e spacer. L'aggiunta di una adatta miscela di fosfolipidi con micropipetta forma spontaneamente la membrana. Il tethaPlate ha dimostrato di essere un "alloggiamento" estremamente robusto per la preparazione di membrane tethered, le quali risultano stabili per mesi se conservate a temperatura di 4°C. La preparazione dei canali ionici, da inserire nella membrana artificiale, dura settimane (o più). I canali ionici di dimensioni ridotte sono disponibili in commercio in forma pura. Le proteine di medie dimensioni possono essere disponibili in forma di detergente o matrice lipidica. Le proteine più grandi, invece, devono essere realizzate su misura con coltura batterica, utilizzando tecniche genomiche.



Figura 3.2 Il tethaPlate [41].

Per gli studi di elettrofisiologia più sofisticati il tethaPlate può essere collegato a qualsiasi potenziostato tramite un tethaPatch (Figura 3.3) e offrire capacità aggiuntive. Assemblando un solo tipo di canale ionico in un ampio patch (area di 2,1 mm²) di una membrana artificiale tethered, possono essere studiati in parallelo più o meno tra gli 1 e i 10 milioni di canali. La corrente ionica misurata è la somma totale di tutti i canali ionici nel patch, così che i segnali nel range dei microampere sono ottenuti in concomitanza con bassi livelli di rumore. Poiché i canali ionici alloggiato spontaneamente nella membrana tethered, che è già legata all'elettrodo di lavoro, non vi è bisogno l'utilizzo della micropipetta come nel patch clamp. Le tecniche tethaPatch in genere forniscono risultati in pochi minuti al contrario delle tecniche convenzionali che invece impiegano ore. Grazie al fatto che le membrane tethered sono molto robuste, possono essere applicati impulsi di tensione maggiori, che al contrario, nella preparazione del patch clamp tradizionale, porterebbero alla rottura del seal. Quindi, i canali ionici voltaggio dipendenti e meccanosensitivi possono ora essere studiati in una vasta gamma di ampiezze di impulso (potenziale tra i -500 e +800 mV) rispetto a prima (tipicamente inferiore al ± 300 mV), portando a nuove conoscenze nel meccanismo di comportamento del canale ionico.



Figura 3.3 Il tethaPatch [41].

Nella Figura 3.4 viene rappresentato lo schema del circuito elettrico equivalente del tethaPatch. Gli ioni nella soluzione salina sono rappresentati dai due condensatori: C_1 , che rappresenta la barriera isolante della membrana e C_2 , che rappresenta gli ioni che affollano la superficie d'oro. Viene applicato un impulso AC di frequenza che varia da 10 a 50mV, nel range di frequenza da 1 a 100Hz e la corrente che passa attraverso C_1 e C_2 è misurata attraverso una resistenza di riferimento R . La tensione ai capi di R dovuta al flusso di corrente viene amplificato dall'amplificatore A e l'uscita grazie a una porta USB arriva al computer per essere elaborata e analizzata.

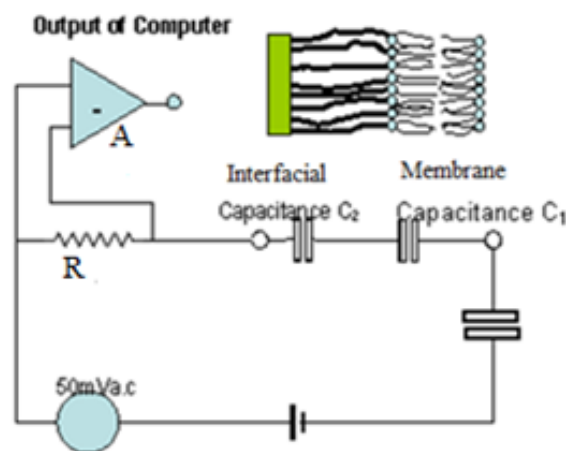


Figura 3.4 Circuito elettrico equivalente del tethaPatch [41].

In aggiunta a quanto sopra, è rilevante considerare che l'auto-assemblaggio non covalente di doppi strati lipidici sulla superficie di nanostrutture permette la convergenza tra una sofisticata piattaforma artificiale e un sistema funzionale di origine naturale che abilita all'indagine dei principali processi di membrana mediante l'utilizzo di tecniche di analisi di superficie. Per esempio, la risonanza plasmonica di superficie localizzata (localized surface plasmon resonance, LSPR), utilizzata per le strutture metalliche di dimensioni nanometriche e che descrive l'eccitazione del plasmon di superficie per mezzo della luce, è alla base di molti strumenti standard per la misurazione dell'adsorbimento di materiale su superfici metalliche planari (in genere oro e argento) o su superfici di nanoparticelle di metallo, e viene utilizzata come sistema di acquisizione di segnali in lab-on-a-chip basati su membrane lipidiche ricostituite[41]. Infatti, quando nanostrutture metalliche sono intimamente accoppiate a membrane fosfolipidiche (tipicamente con spessore di circa 5 nm), un cambiamento nella LSPR può sondarne l'alterazione mediante un cambiamento dell'indice di rifrazione all'interfaccia membrana-liquido.

Gli ultimi anni hanno visto sviluppi significativi nelle piattaforme sensorizzate basate su membrane biologiche, al punto che queste sembrano essere il candidato principale per la creazione di chip validi per le misurazioni funzionali di e attraverso proteine transmembrana. Ciò è stato reso possibile da progressi nella nanofabbricazione delle aperture sulle quali deporre le membrane lipidica artificiali per aumentarne la stabilità e la facilità di formazione. La dimensione ottimale dell'apertura sembra essere nell'intervallo di ~20-100 nm, laddove il limite inferiore deriva dallo scarso successo nell'utilizzo di substrati con fitti pori di soli pochi nm per misurazioni elettrochimiche di membrana [45,46]. Passi significativi sono stati fatti anche nella formazione di matrici stabilizzanti vicino alle membrane *free-spanning* e nell'esplorazione di nuovi modi per incorporare proteine di membrana nella struttura sensoriale. Questi progressi promettono dispositivi basati su membrana commerciali robusti e "sensori" con un'ampia varietà di recettori di membrana e canali ionici e/o trasportatori come componenti funzionali. Piccoli ma importanti passi sono stati fatti anche in termini di protocolli di funzionalizzazione di superficie per promuovere la formazione del doppio strato lipidico. Molti di questi sviluppi sono stati verificati sistemi ad hoc, ma restano da integrare in un'unica piattaforma.

Nell'immediato futuro si prevedono ulteriori progressi nella produzione a basso costo di substrati sensorizzati nanoporosi grazie ad alternative adeguate alle attuali

tecniche ingombranti e costose, come la litografia a fascio elettronico che potranno soddisfare i requisiti di miniaturizzazione e integrazione in chip con basse correnti di dispersione e ridotte capacità parassite. È anche probabile un'integrazione di tecniche di preparazione di membrane senza solventi e di tecniche di ricostituzione di proteine. Può essere previsto poi, un progresso nel rilevamento basato sugli array dove le differenti proteine di membrana auto-assemblate siano contemporaneamente coinvolte in misurazioni parallele.

A più lungo termine è infatti auspicabile che le piattaforme di sensing si evolvano per includere più di uno dei sistemi di membrana *in vivo*, per andare oltre allo studio delle funzioni delle singole proteine al comprendere le reti di segnalazione dove le interazioni proteina-proteina e proteina-lipide svolgono importanti funzioni di regolazione. Siccome le domande biologiche più complesse sono affrontate con strutture di membrana sempre più sofisticate, sarà sempre più importante utilizzare contemporaneamente tecniche di caratterizzazione per i processi di membrana. Per esempio, la codifica della segnalazione elettrochimica per la funzione, deve essere correlata con misurazioni di interazioni simultanee, che utilizzeranno metodi di microscopia a fluorescenza o tecniche ottiche sensibili alla superficie, come la spettroscopia in guide d'onda. Molti dei substrati porosi utilizzati sono infatti otticamente trasparenti e possono essere integrati in qualsiasi progetto basato su chip, che li rende compatibili con i protocolli più attualmente utilizzati e con le tecniche di caratterizzazione dei biosensori.

Ci si attende quindi che le tecnologie basate su doppi strati fosfolipidici svolgeranno un ruolo fondamentale nello sviluppo di sensori e nanodispositivi. Se sviluppati ad un livello commerciale, gli array di bistrati fosfolipidici con supporto hanno il potenziale di accelerare la ricerca nel campo della proteomica così come quello di accelerare la ricerca genomica.

Ringraziamenti

Le ultime pagine di questa tesi, sono dedicate a tutti coloro che, in un modo o nell'altro, mi hanno aiutato a realizzarla.

Innanzitutto vorrei ringraziare il mio relatore, il Prof. Giordano, per la sua grande disponibilità mostratami in questi mesi e per avermi permesso di approfondire l'interessante argomento delle biomembrane lipidiche artificiali.

Il più grande ringraziamento in assoluto va ai miei genitori, che mi hanno permesso di realizzare questo piccolo grande sogno. Anche in questa esperienza, mi siete sempre stati vicini, mi avete incoraggiato e sostenuto nelle mie scelte e mi avete permesso di studiare e conseguire una laurea. Vi devo tutto.

Ringrazio mio fratello Nicola, che è sempre stato un punto di riferimento per me e mi ha insegnato e dimostrato che chiunque può realizzare quello che ama fare, basta volerlo. Noi crediamo in quello che facciamo e portiamo avanti le nostre idee e i nostri progetti. La grande tenacia e la forte fiducia in noi stessi ci porterà in alto, ne sono certo.

Ringrazio nonna Giancarla, tutti gli zii e mio cugino Luca, che ad ogni esame mi hanno sempre dato il loro appoggio, felicitandosi con me per la prova superata.

Voglio ringraziare tutti i miei colleghi "ingegneri" con i quali ho condiviso questi anni di studio. Grazie a voi, il percorso è stato un po' meno duro e sicuramente molto più piacevole e divertente. Spero di continuare gli studi della specialistica al vostro fianco, perché oltre a dei compagni di studio ho trovato anche degli amici.

Un ringraziamento personale lo devo però al mio mentore e amico Luca "Faber" Fabbri. Mi hai sempre aiutato quando avevo bisogno e se sono riuscito a terminare tutti gli esami in tempo, è soprattutto grazie a te. Sono felice che anche tu oggi sia qui con me.

Ringrazio Demetrio, Emanuele e Nicola, i miei migliori amici, che oltre ad avermi sempre sostenuto, sono riusciti, con la loro allegria, ad alleggerire questi anni di studio a volte molto stressanti. Per me siete come fratelli.

Ringrazio Simona. Il tuo amore, la tua forza e la tua fiducia hanno reso meno difficile arrivare in fondo, facendomi guardare sempre al lato bello delle cose. Grazie per tutta la gioia che mi dai ogni giorno.

Voglio ringraziare, inoltre, tutti gli amici che mi sono stati vicini e che hanno creduto in me. Fare un elenco mi spaventa, mi dimenticherei sicuramente qualcuno, ma sappiate che il vostro affetto mi è stato molto di aiuto.

Un pensiero, infine, lo vorrei fare a mio nonno Ennio, a cui è dedicato questo elaborato. Tu nonno sei stato il primo a chiamarmi “ingegnere” e se adesso lo sono per davvero è anche grazie a te. Purtroppo oggi non puoi essere qui, ma so quanto saresti stato felice e orgoglioso di me in questo giorno. Mi manchi tanto e ti vorrò per sempre bene.

Grazie a tutti.

Michele

Bibliografia

[1] David L. Nelson, Michael M. Cox, (2010), “*I principi di biochimica di Lehninger*”, Zanichelli, Quinta edizione, 127-142.

[2] Neil A. Campbell, Jane B. Reece, (2009), “*Biologia – La chimica della vita e la cellula*”, Pearson Benjamin Cummings, Ottava edizione, 374-416.

[3] <http://www.oilproject.org/lezione/descrizione-struttura-della-membrana-cellulare-colesterolo-proteine-2739.html>

[4] <http://it.wikipedia.org/wiki/Utente:Anassagora/Sandbox02>

[5] Wikipedia, (2014), “*Canale ionico*”.

[6] <http://marconi2csa.blogspot.it/2013/05/funzioni-della-membrana-2-71-72-vol-ab.html>

[7] Edward T. Castellana, Paul S. Cremer, (2006), “*Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design*”, Elsevier, Surface Science Reports 61, 429–444.

[8] Mathias Winterhalter, (2000), “*Black lipid membranes*”, Elsevier, Current Opinion in Colloid & Interface Science 5, 250-255.

[9] Dietmar Pum et al, (2000), “S-layer proteins as basic building blocks in a biomolecular construction kit”, Nanotechnology, 11, 100, doi:10.1088/0957-4484/11/2/310.

[10] G. M. Torrie, and J. P. Valleau, (1982), “Electrical Double Layers. Limitations of the Gouy-Chapman Theory”, J. Phys. Chem., 86 (16), 3251–3257, doi: 10.1021/j100213a035.

- [11] Gu L.Q., Braha O., Conlan S. et al., (1999), “Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter”, *Nature* 398, 686-690; doi:10.1038/19491.
- [12] Ralf P. Richter, Rémi Bérat and Alain R. Brisson, (2006), “Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View”, *Langmuir*, 22 (8), 3497–3505, doi: 10.1021/la052687c.
- [13] Giorgio Mattana, “I film di Langmuir-Blodgett”, Seminario per il corso di Bioelettronica.
- [14] http://en.wikipedia.org/wiki/Langmuir%E2%80%93Blodgett_film
- [15] <http://www.docstoc.com/docs/119621449/Presentazione-Dottorato-Dott-Dorotea-Micieli>
- [16] Eric E. Ross, Bruce Bondurant et al., (2001), “*Formation of Self-Assembled, Air-Stable Lipid Bilayer Membranes on Solid Supports*”, *Langmuir* 17, 2305-2307.
- [17] Z.V. Leonenko, A. Carnini, D.T. Cramb, (2000), “*Supported planar bilayer formation by vesicle fusion*”, Elsevier, *Biochimica et Biophysica Acta* 1509, 131-147.
- [18] Peter Nollert, Hans Kiefer, and Fritz Jahnig, (1995), “*Lipid Vesicle Adsorption versus Formation of Planar Bilayers on Solid Surfaces*”, *Biophysical Journal* Vol. 69, 1447-1455.
- [19] Ryugo Tero, Morio Takizawa, Yan-Jun Li, Masahito Yamazaki, and Tsuneo Urisu, (2004) “*Lipid Membrane Formation by Vesicle Fusion on Silicon Dioxide Surfaces Modified with Alkyl Self-Assembled Monolayer Islands*”, *Langmuir* 20, 7526-7531.
- [20] Victor K. La Mera and Max L. Robbins, (1958), “The effect of the spreading solvent on the properties of monolayers”, *Effect of spreading solvent on properties of monolayer*, Vol. 62, 1291-1295.

- [21] Erik Reimhult, Karthik Kumar, (2008) “*Membrane biosensor platforms using nano- and microporous supports*”, Trends in Biotechnology, Vol. 26, 82-89.
- [22] Lukas K. Tamm, Harden M. McConnell, (1985), “Supported phospholipid bilayers”, Biophysical Journal, 47 (1), 105-113.
- [23] Young Kwang Lee, Hyojin Lee, Jwa-Min Nam, (2013), “Lipid-nanostructure hybrids and their applications in nanobiotechnology”, NPG Asia Materials 5, e48, doi:10.1038/am.2013.13.
- [24] Anne L. Plant, (1999), “Supported Hybrid Bilayer Membranes as Rugged Cell Membrane Mimics”, Langmuir 15 (15), 5128–5135, doi: 10.1021/la981662t.
- [25] J. Majewski, J. Y. Wong, et al., (1998), “Structural Studies of Polymer-Cushioned Lipid Bilayers”, Biophysical Journal, Vol. 75, 2363-2367.
- [26] Erich Sackmann, Motomu Tanaka, (2000), “Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications”, Trends in Biotechnology, Vol. 18, 58-64.
- [27] G. Elender, M. Kuhner, E. Sackmann, (1996), “Functionalisation of Si/SiO₂ and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayers”, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 11, 565-577.
- [28] L.Q. Zhang, M.L. Longo, P. Stroeve, (2000), “Mobile phospholipid bilayers supported on a polyion/alkylthiol layer pair”, Langmuir, Vol. 16 (11), 5093–5099, doi: 10.1021/la9913405.
- [29] Gera D. Eytan, Efraim Racker, (1977), “Selective Incorporation of Membrane Proteins into Proteoliposomes of Different Compositions”, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 252, 3208-3213.
- [30] Patthara Kongsuphol et al., (2013), “Lipid bilayer technologies in ion channel recordings and their potential in drug screening assay”, Elsevier, Sensors and Actuators B 185, 530-542.

- [31] Han X. et al., (2007), “Nanopore Arrays for Stable and Functional Free-Standing Lipid Bilayers”, *Advanced Materials*, Vol. 19, 4466-4470, doi: 10.1002/adma.200700468.
- [32] Hagan Bayley et al., (2009), “Droplet interface bilayers”, *Mol. BioSyst.*, 4, 1191-1208, doi: 10.1039/B808893D.
- [33] M. Mayer, S. Terrettaz, L. Giovangrandi, T. Stora, H. Vogel, (2003), “*Functional analysis of ion channels: planar patch clamp and impedance spectroscopy of tethered lipid membranes*”, J. Cooper, A. Cass (Eds.), *Biosensors: A Practical Approach*, vol. 1, 2nd ed., 153–184.
- [34] <http://www.moleculardevices.com/Instruments/Automated-Electrophysiology/IonFlux-Systems.html>
- [35] <http://www.moleculardevices.com/Instruments/Automated-Electrophysiology/IonWorks-Barracuda.html>
- [36] C. Farre, N. Fertig, (2012), “*HTS techniques for patch clamp-based ion channel screening – advances and economy*”, *Expert Opinion on Drug Discovery*, Vol. 7, No. 6, 515-524, doi:10.1517/17460441.2012.682056.
- [37] J. Dunlop, M. Bowlby, R. Peri, D. Vasilyev, R. Arias, (2008), “*High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology*”, *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 358-368, doi:10.1038/nrd2552.
- [38] http://wiki.edaq.com/index.php/Tethered_Membranes
- [39] <http://www.librede.com/>
- [40] <http://www.nanion.de/products/orbit-16.html>
- [41] <http://www.edaq.com/sdx-tethered-membrane-systems>