

COMPITI E SUDDIVISIONE FONDI TRA LE UNITÀ DI RICERCA  
prot. 2005091492

<b>Coordinatore Scientifico</b>	Marco SAMPIETRO
<b>Ateneo</b>	Politecnico di MILANO
<b>Titolo della Ricerca</b>	Strumentazione elettronica integrata per lo studio di variazioni conformazionali di proteine tramite misure elettriche
<b>Finanziamento assegnato</b>	Euro 52.000
<b>Durata</b>	24 Mesi

## Obiettivo della Ricerca

*Il progetto di ricerca si propone di realizzare uno strumento di misura integrato su singolo chip costituito da un amplificatore a transimpedenza a bassissimo rumore e larga banda per la caratterizzazione elettrica di biomolecole e per la rilevazione del segnale elettrico che una biomolecola, ed in particolare una proteina, producono nel momento in cui svolgono una precisa funzione biologica.*

*Tale obiettivo, innovativo nel panorama scientifico internazionale, si giustifica con l'estremo interesse che la comprensione dei meccanismi biologici ha non solo per l'aumento della conoscenza di base ma anche per lo sviluppo di applicazioni tecnologiche nei campi più disparati, come il farmaceutico, il medicale o l'agronomico tramite la realizzazione di biosensori, che traggano vantaggio dal mimare la materia vivente utilizzandone alcune parti. L'accentuato interesse verso questi biosensori risiede proprio nelle (spesso) impareggiabili ed originali caratteristiche che le molecole biologiche, ed in particolare le proteine, hanno. Si pensi ad esempio alla possibilità di sfruttare l'estrema selettività e sensibilità che un recettore olfattivo, anch'esso una proteina, ha per la realizzazione di un "naso" artificiale, rilevando un segnale elettrico dal recettore in corrispondenza dell'interazione con uno specifico odorante.*

*Per rendere credibile questo innovativo scenario tecnologico, bisognerà non solo mettere a punto tutti gli aspetti chimici (funzionalizzazione degli elettrodi, sintesi e stabilità dei leganti), fisico-elettronici (studio della struttura elettronica di una proteina, simulazione delle modifiche conformazionali, predizione dei segnali elettrici, analisi della mobilità dei portatori) e tecnologici (materiali dei contatti, topologie degli elettrodi, tecniche di deposizione della membrana contenente proteine, ecc.), ma anche sviluppare e realizzare una opportuna elettronica di misura dei segnali elettrici che abbia una sensibilità elevatissima e permetta l'ottenimento di informazioni sulla corrente, la capacità, l'impedenza ed il rumore del campione biologico.*

*L'assoluta complementarietà delle competenze tra le tre istituzioni partecipanti (progetto di circuiti elettronici integrati di misura ad elevatissima sensibilità da parte dell'unità di Milano; manipolazione delle proteine e caratterizzazione strutturale delle sue variazioni conformazionali da parte dell'unità di Roma; studio e simulazione delle proprietà fisico ed elettriche delle proteine da parte dell'unità di Lecce) evita sovrapposizioni e concentra ogni unità sul proprio compito specifico.*

*L'attività di ricerca verrà organizzata attorno ai seguenti punti fondamentali:*

- i) lo studio e la simulazione dei meccanismi di trasporto della carica all'interno delle biomolecole di interesse, con particolare riguardo alle proteine, in modo da ottenere informazioni predittive sul loro comportamento elettrico ed interpretative dei risultati sperimentali;*
- ii) la preparazione di membrane fosfolipidiche contenenti proteine ed il loro ancoraggio su superfici conduttive mediante opportuni anticorpi;*
- iii) il progetto, la fabbricazione e la caratterizzazione sperimentale di una adatta strumentazione elettronica per la misura con estrema sensibilità delle proprietà elettriche delle biomolecole;*

*Da ultimo, e nei limiti resi possibili dal ridotto finanziamento concesso, si intende iniziare la caratterizzazione delle variazioni conformazionali delle proteine sia con misure strutturali che con misure elettriche per correlarle con l'interazione delle proteine con molecole esterne ed investigare la possibilità di realizzare biosensori con lettura elettrica diretta.*

## Innovazione rispetto allo stato dell'arte nel campo

*L'integrazione di materia biologica con circuiti elettronici è uno dei campi di ricerca più interessanti ed avanzati del panorama scientifico odierno. L'enorme riduzione delle dimensioni dei circuiti integrati ha infatti reso possibile lo sviluppo di dispositivi ibridi, in cui biomolecole siano integrate insieme ai componenti elettronici a scala nanometrica [1]. Lo scopo principale di questi dispositivi è la misura elettrica dell'attività biologica.*

*Tra le tante biomolecole, le proteine sono quelle di maggior interesse ed in letteratura si trova l'idea di servirsi delle particolari*

proprietà delle proteine, in particolare del riconoscimento specifico tra anticorpo e proteina, per realizzare dispositivi elettronici più intelligenti, come ad esempio sensori biologici con una caratteristica specificità e sensibilità [2,3]. Nel nostro caso specifico l'attività della proteina è caratterizzata da un cambiamento di conformazione, dovuto alla cattura di una specifica molecola legante [4,5]. Inoltre, è stato evidenziato il ruolo fondamentale giocato dalle fluttuazioni degli atomi che compongono la proteina intorno alla loro posizione di equilibrio. Queste fluttuazioni, hanno per origine il movimento termico e le interazioni, in parte di tipo stocastico, con le molecole della soluzione circostanze [6].

Le grandezze elettriche misurabili e utili alla caratterizzazione della proteina sono la conduttanza, la capacità, l'impedenza al variare della frequenza ed eventualmente il rumore elettronico. A nostra conoscenza, misure di tali grandezze elettriche su proteine non sono ancora state effettuate. La difficoltà sta nell'esigenza di una strumentazione di misura ad elevata sensibilità (nell'ordine dei TeraOhm per la resistenza e di attoFarad per la capacità) con piccole tensioni applicate alla proteina (centinaia di mV al massimo) per evitare che campi elettrici troppo elevati ne condizionino l'attività biologica. Inoltre, sono richiesti tempi di risposta inferiori al millisecondo per poter seguire opportunamente le variazioni di segnale corrispondenti all'attività della proteina, quali ad esempio i cambiamenti di conformazione. Si tratta di specifiche molto esigenti, ed ancora di più quando devono essere soddisfatte da un unico strumento. A nostra conoscenza, non è ancora stato sviluppato uno strumento integrato con tale flessibilità.

Per misure DC, esistono strumenti commerciali e amplificatori "custom" [7-9], basati su una topologia a transimpedenza con resistenza di retroazione di decine di GigaOhms, che sono in grado di misurare correnti inferiori al femtoAmpere. Tuttavia, richiedono tempi molto lunghi per filtrare il rumore ed hanno tempi di risposta estremamente lenti (centinaia di millisecondi). Sempre amplificatori a transimpedenza sono utilizzati come stadi di ingresso nei circuiti per misure AC, obbligando così però ad una scelta di compromesso tra sensibilità e larghezza di banda. Una soluzione circuitale alternativa per le misure AC è stato adottata da uno strumento commerciale [10], mediante la configurazione integratore-derivatore che permette di estendere la banda senza compromettere la sensibilità di misura, ma ha lo svantaggio di dover periodicamente scaricare l'integratore tramite un reset. Per quel che concerne le misure di impedenza, gli Impedance Network Analyzers in commercio hanno una risoluzione limitata all'ordine di femtoFarad [11] nel caso migliore. Per misure puramente capacitive, è senza dubbio più vantaggioso usare circuiti integrati su singolo chip. Grazie alla riduzione delle capacità parassite di interconnessione, le tecniche integrate, tipicamente a capacità commutate, raggiungono risoluzioni di pochi attoFarad. Per migliorare ulteriormente la sensibilità, è necessario mediare nel tempo il rumore in eccesso. Utilizzando la tecnica lock-in, tempi di media di pochi secondi permettono di ottenere risoluzioni inferiori all'attoFarad. Variando inoltre la frequenza del segnale forzante, è possibile realizzare una spettroscopia di impedenza su larga banda. E' questa, infatti, un tipo di caratterizzazione elettrica fondamentale allo studio dettagliato delle proprietà delle proteine e dell'interfaccia proteina/elettronica [12]. Attualmente ciò è effettuato solo da strumentazioni esterne, basate sulle tecniche di lock-in, che però limitano la spettroscopia di impedenza a campioni biologici su dimensioni microscopiche e non nanometriche.

Riguardo lo studio teorico e la modellizzazione della proteina, il complesso legame tra struttura e funzioni delle proteine viene generalmente studiato tramite simulazioni, utilizzando tecniche sia di dinamica molecolare classica che di dinamica molecolare quantica "ab initio". Quest'ultima tecnica, inizialmente applicata con grande successo a sistemi fisici e chimici, è stata solo recentemente applicata anche allo studio di molecole biologiche [13] composte da centinaio di atomi. Molecole più grandi possono essere simulate tramite tecniche ibride, che combinano lo studio quantico di un limitato numero di atomi e la trattazione classica degli atomi rimanenti. Una tecnica alternativa è rappresentata dall'approccio a rete, in cui la proteina è descritta come un insieme di grani [14]. Questo metodo, nato recentemente come sviluppo della teoria dei grafi, si è dimostrato straordinariamente efficace nello studio di sistemi complessi di vario tipo ed in particolare di quelli biologici [15].

[1] A. Ishijima et al. "Single molecule nanobioscience", *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.26 No.7 July 2001

[2] S. Firestein, "How the olfactory systems makes sense of scents", *Nature*, 413, 211 (2001).

[3] G. Gomila et al. "Production, immobilization and electrical characterization of olfactory receptors for olfactory nanobiosensor development", *Proc. of Int. Conf. Nanobiotechnologies III*, France, June 7, 2005.

[4] T. Hessa et al. "Membrane insertion of a potassium channel voltage sensor", *Science*, 307, 1427 (2005).

[5] H. Yang et al., "Protein conformational dynamics probed by single-molecule electron transfer", *Science*, 302, 262, 2003.

[6] M. Tirion, "Large Amplitude Elastic Motions in Proteins from a Single-Parameter, Atomic Analysis", *Phys. Rev. Lett.*, 77, 1905 (1996).

[7] Sub-Femtoamp Remote SourceMeter, Model 6430, Keithley Instrumentations Inc.

and Modular Semiconductor Parameter Analyzer, Model 4157B, Agilent Technologies Inc.

[8] J. Yao et al. "Low-noise electrometer and its low-noise cryogenic probe with completely guarded sample chamber" *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 71, 1776-1780 (2000).

[9] R. Heer et al. "Floating electrometer for scanning tunneling microscope applications in the femtoampere range", *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 68, 4488-4491 (1997)

[10] Capacitor-Feedback Patch Clamp Axopatch 200B, Axon Instruments Inc.

[11] Precision Impedance Analyzer, Model 4294A, Agilent Technologies Inc.(2003).

[12] H.G.L. Coster et al. "Impedance spectroscopy of interfaces, membranes and ultrastructures", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 40, 79-98 (1996)

[13] P. Carloni et al. "Self Assembled peptide nanotubes from first principles", *Phys. Rev. Lett.*, 79, 761 (1997)

[14] X. Song "An inhomogeneous model of protein dielectric properties: intrinsic polarizability of amino acids", *J. Chem. Phys.* 116, 9359 (2002).

[15] A. L. Barabasi and Z. N. Oltvai, "Network biology: understanding the cell's functional organization", *Nature Review*, 5, 101 (2004).

## **Criteri di verificabilità**

### *1 MILESTONE 1.2 (1 anno, 2 trimestre)*

*Verra' progettato il circuito a transimpedenza, simulato il funzionamento con SPICE e realizzato il file delle maschere per inviare il lavoro per la fabbricazione alla ditta AMS. Le prestazioni richieste al circuito a transresistenza sono compatibili con una tecnologia CMOS e verra' pertanto realizzato nell'ambito di Europractice con una tecnologia a 0.35 micron. L'esigenza dell'integrazione nasce dalla necessita' di ridurre al minimo i parassiti per raggiungere la massima sensibilita' possibile : passare infatti da circa 10pF totali di capacita' al nodo di terra virtuale di un sistema a componenti discreti ad una capacita' di circa 100fF o meno di un sistema integrato porta ad una riduzione del rumore sostanzialmente dello stesso fattore e ad un equivalente aumento della minima corrente misurabile, assolutamente necessaria per raggiungere i nostri scopi.*

### *2 MILESTONE 1.3 (1 anno, 3 trimestre)*

*Verra' sviluppato un modello basato su una rete (statica) di impedenze per la descrizione delle proprietà elettriche della rodopsina. Il modello terrà conto anche della diversità dell'interazione fra coppie diverse di aminoacidi e dovrà fornire una valutazione degli effetti del cambiamento di conformazione indotto da un fotone sulle proprietà elettriche della proteina.*

### *3 MILESTONE 1.3 (1 anno, 3 trimestre)*

*Verranno studiate le possibili ed efficaci funzionalizzazioni delle superfici di substrati metallici atte a vincolare gli specifici anticorpi che a loro volta vincoleranno le proteine di interesse.*

### *4 MILESTONE 1.4 (1 anno, 4 trimestre)*

*Quando i primi prototipi di amplificatori a transimpedenza saranno resi disponibili da Europractice, si procederà alla loro completa caratterizzazione elettrica tramite misure di guadagno, di banda passante, di rumore di ingresso, di linearità, evidenziandone tutte le caratteristiche di rilevanza per il progetto.*

### *5 MILESTONE 2.1 (2 anno, 1 trimestre)*

*Verra' caratterizzato il circuito integrato dal punto di vista funzionale alle misure di impedenza previste, collegandolo ad un campione che simuli il dispositivo biologico e verificando le prestazioni ottenibili nelle misure di corrente, di capacita', di resistenze ed in generale di impedenza al variare della frequenza. In tale fase ci si appoggerà, se necessario, ad una collaborazione esistente per il montaggio del circuito sulla testa di un microscopio a forza atomica così da misurare dispositivi nanometrici aventi grandezze elettriche corrispondentemente piccole.*

### *6 MILESTONE 2.1 (2 anno, 1 trimestre)*

*Introduzione nel modello della proteina delle fluttuazioni termiche degli atomi nella catena peptidica. Partendo dall'approssimazione più semplice, cioè assumendo fluttuatori indipendenti, isotropi ed equivalenti, si stimerà il rumore elettrico prodotto dall'agitazione termica confrontandolo con la modifica del segnale elettrico prodotto dal cambio di conformazione.*

### *7 MILESTONE 2.2 (2 anno, 2 trimestre)*

*Verranno preparate le membrane fosfolipidiche contenenti le desiderate proteine e verra' provata la tecnica per l'ancoraggio di tali membrane biologiche ai substrati funzionalizzati.*

### *8 MILESTONE 2.3 (2 anno, 3 trimestre)*

*Ulteriore sviluppo del modello della proteina introducendo l'effetto delle fluttuazioni sia attraverso l'analisi del loro ruolo in funzione della temperatura che mediante l'introduzione di correlazioni fra le fluttuazioni dei diversi atomi.*

### *9 MILESTONE 2.3 (2 anno, 3 trimestre)*

*Revisione del progetto del circuito, realizzazione e caratterizzazione del secondo prototipo di circuito integrato a transimpedenza. Per concludere, il circuito integrato per la misura di segnali elettrici provenienti dalle biomolecole verra' connesso ai nanoelettrodi e verranno realizzate le prime misure dell'attività delle proteine.*

### *10 MILESTONE 2.4 (2 anno, 4 trimestre)*

*Validazione del circuito integrato a transimpedenza con prove sperimentali su campioni di molecole biologiche.*

*Sulla base di questi Milestones, si procederà con:*

- 1) Rapporti di avanzamento tecnico preparati dalle UdR ed inviati al coordinatore scientifico. Essi includeranno la descrizione del lavoro effettuato, con particolare riferimento ai risultati conseguiti rispetto agli obiettivi ed ai risultati attesi. I rapporti assisteranno il coordinatore nel monitoraggio dello svolgimento del Progetto e nell'individuazione di eventuali cambiamenti nelle attività previste successivamente che possano contribuire al un più efficace svolgimento del Progetto (mesi 6, 12, 18).*
- 2) Riunioni delle UdR sono previste come un regolare elemento nel corso del Progetto, dato che i compiti da svolgere implicano una stretta collaborazione tra le UdR. Se necessario, saranno tenute ulteriori riunioni in occasione della presentazione dei rapporti tecnici.*
- 3) Per permettere un'efficace valutazione dello svolgimento del Progetto, il MIUR può inoltre organizzare visite presso le UdR.*

## Elenco delle Unità di Ricerca

<b>Sede dell'Unità</b>	Politecnico di MILANO
<b>Responsabile Scientifico</b>	Marco SAMPIETRO
<b>Finanziamento assegnato</b>	<b>Euro</b> 18.000

### Compito dell'Unità

*Il compito del gruppo di ricerca di Milano è quello di progettare, realizzare e caratterizzare sperimentalmente il circuito elettronico integrato per misurare con elevata sensibilità le caratteristiche elettriche di molecole biologiche, in particolare di proteine, e loro eventuali variazioni in corrispondenza di cambiamenti nelle funzioni delle proteine. Inoltre, allo scopo di migliorare continuamente la strumentazione elettronica prodotta e di modificarla a seconda delle esigenze sperimentali, il gruppo di Milano intende partecipare attivamente agli esperimenti di caratterizzazione dei campioni biologici, in stretta collaborazione col gruppo di Roma. Oltre al chip con l'amplificatore integrato per misure di corrente, l'unità di Milano svilupperà anche il chip con i nanoelettrodi per contattare le biomolecole a scala nanometrica e collegarle al chip dell'amplificatore. Il disegno dei nanoelettrodi sarà realizzato con l'aiuto dei ricercatori dell'università di Barcellona (Spagna) e dell'INRA (Institut National de Recherche Agronomique, Paris - France), esperti nel campo dell'espressione e immobilizzazione di proteine su substrati metallici, con i quali l'unità di Milano collabora già da diversi anni.*

---

<b>Sede dell'Unità</b>	Università degli Studi di LECCE
<b>Responsabile Scientifico</b>	Cecilia PENNETTA
<b>Finanziamento assegnato</b>	<b>Euro</b> 15.000

### Compito dell'Unità

*L'obiettivo principale dell'unità di Lecce consiste nello studio teorico delle proprietà elettriche di grandi molecole di interesse biologico ed, in particolare, di proteine. Tale studio sarà basato sulla teoria delle reti complesse e su un approccio di tipo "coarse grain" e farà uso prevalentemente di tecniche computazionali e simulate. Ai fini dello sviluppo del modello teorico, e data la particolare complessità del sistema da studiare, saranno molto importanti anche le informazioni di tipo fenomenologico fornite dagli altri partner del progetto e, viceversa, le previsioni teoriche fornite da questo studio contribuiranno all'interpretazione dei dati sperimentali ed alla progettazione di nuove misure.*

---

<b>Sede dell'Unità</b>	Università degli Studi di ROMA "La Sapienza"
<b>Responsabile Scientifico</b>	Mario BARTERI
<b>Finanziamento assegnato</b>	<b>Euro</b> 19.000

### Compito dell'Unità

*Il compito dell'Unità di Ricerca di Roma è quello della preparazione dei substrati metallici tramite opportune funzionalizzazioni superficiali e l'uso di specifici anticorpi, della preparazione delle membrane fosfolipidiche contenenti le desiderate proteine, dell'ancoraggio delle membrane biologiche al substrato e dell'effettuazione delle misure sperimentali che correlino le variazioni conformazionali rilevate con un corrispondente segnale elettrico.*

---