



scienza attiva®

## BIOFISICA ALLA NANOSCALA

Paolo Facci

Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

### Introduzione

Con l'espressione *Biofisica alla nanoscala* si intende comunemente l'attività di studio scientifico avente per oggetto entità biologiche caratterizzate da dimensioni nanometriche (1 nanometro = 1 miliardesimo di metro = 1 nm) e fenomeni la cui estensione spaziale rilevante per la loro descrizione quantitativa è tipicamente  $\leq 100$  nm.

Esistono varie definizioni possibili di Biofisica; noi adotteremo quella di Fisica della materia di origine biologica, della sua strutturazione spaziale, della sua funzionalità fisiologica, delle interazioni che hanno luogo al suo interno.

Com'è facilmente intuibile, una tale definizione identifica uno spettro assai ampio di entità (e di fenomeni correlati) che spaziano dalla biosfera stessa, agli organismi superiori, a quelli più semplici, alle cellule, agli organi subcellulari fino alle singole componenti molecolari che costituiscono appunto la materia di origine biologica.

Specificando il termine *Biofisica* con la locuzione "*alla nanoscala*", riduciamo però immediatamente tale vastissimo panorama per focalizzarci su entità nanometriche e fenomeni biologici i cui parametri caratteristici variano in modo rilevante entro ambiti dimensionali tipicamente nanometrici.

La *Biofisica alla nanoscala* o *nanobiofisica* è, in tale accezione, una branca delle più generali *nanoscienze*. Con esse condivide da un lato alcune tecniche di indagine, dall'altro riconosce nella dimensione nanometrica una estensione spaziale critica, atta a determinare fenomeni la cui manifestazione è evidente anche a livello macroscopico.

Possiamo raggruppare le attività di ricerca nanobiofisiche in due principali filoni, l'uno che si serve di tecniche prese in prestito dalle nanoscienze per investigare struttura e funzione della materia di origine biologica, l'altro che studia fenomeni che avvengono nella materia biologica su scala nanometrica.

Vedremo, a titolo di esempio, alcuni casi tratti da entrambi questi filoni.

### Alcuni esempi

Immaginiamo, innanzitutto, di poter osservare della materia di origine biologica, sia essa un muscolo, un nervo, una foglia, una colonia di microorganismi, o qualsiasi altro tipo di struttura, tramite un'ipotetica lente che sia in grado di ingrandire, diciamo, 1 milione di volte ciò che osserviamo. Ciò che noteremmo allora sarebbe la struttura molecolare della materia, cioè il fatto che qualsiasi tipo di materia, inclusa quella di origine biologica, è costituita da molecole che in un tale "esperimento mentale" vedremmo come oggetti di qualche millimetro. Ora, è importante sottolineare che una tale lente non esiste (né lo può, a causa dei limiti imposti dalla legge della diffrazione dell'ottica), ma vedremo che esistono strumenti, come i microscopi a scansione di sonda, che sono in grado di compiere qualcosa di simile.



*Quindi, il primo messaggio importante è che la materia biologica è formata da molecole e che la loro dimensione è tipicamente nanometrica.*

Tra queste molecole riconosciamo sicuramente gli acidi nucleici (DNA ed RNA), responsabili dell'immagazzinamento e della trasmissione dell'informazione genetica, le proteine, vere e proprie braccia operative degli organismi viventi, i fosfolipidi, molecole più semplici di cui sono ricche le membrane che avvolgono la cellula, il nucleo cellulare, organelli subcellulari quali ad esempio i mitocondri, e molte altre.

## **Imaging di singola biomolecola**

Una prima esemplificazione dell'attività nanobiofisica consiste nello studio della materia biologica a livello della singola molecola. Lo studio di singola molecola è una prerogativa delle nanoscienze, le quali hanno sviluppato le tecniche necessarie allo scopo. La sua rilevanza risiede nel consentire l'indagine sulle proprietà della materia attingendo direttamente alle informazioni sui costituenti ultimi di questa e non già dovendole "derivare" dall'osservazione del comportamento "medio" di un numero enorme di costituenti elementari. Per far ciò esistono vari approcci possibili a seconda del tipo di informazioni che si cercano. È indubbio, però, che uno degli esempi più calzanti di strumento che consente lo studio di singola molecola è quello fornito dal microscopio a forza atomica - AFM, immagine di sinistra in figura 1. Questo strumento, tipico delle *nanoscienze*, consente di ottenere informazioni sulla morfologia di una molecola o di aggregati molecolari adesi a una superficie solida. Si chiama microscopio ma in realtà non assomiglia affatto ad un microscopio ottico, forse più familiare. Basa il suo funzionamento su una punta estremamente acuminata (di dimensioni pari a pochi nanometri), che viene fatta scorrere sul campione da analizzare, sia esso una superficie o una molecola ivi depositata. La punta è collegata a una molla in grado di misurare la forza di interazione che la punta esercita sul campione sottostante. Facendo scorrere la punta lungo il campione è possibile correggerne la posizione verticale in modo che la compressione della molla resti costante, cioè che la forza esercitata dalla punta sul campione sia costante. Associando poi la correzione verticale della posizione della punta a ciascun punto della superficie del campione, si ottiene la sua morfologia sotto forma di immagine (detta immagine topografica), con risoluzione spaziale (sub)nanometrica.

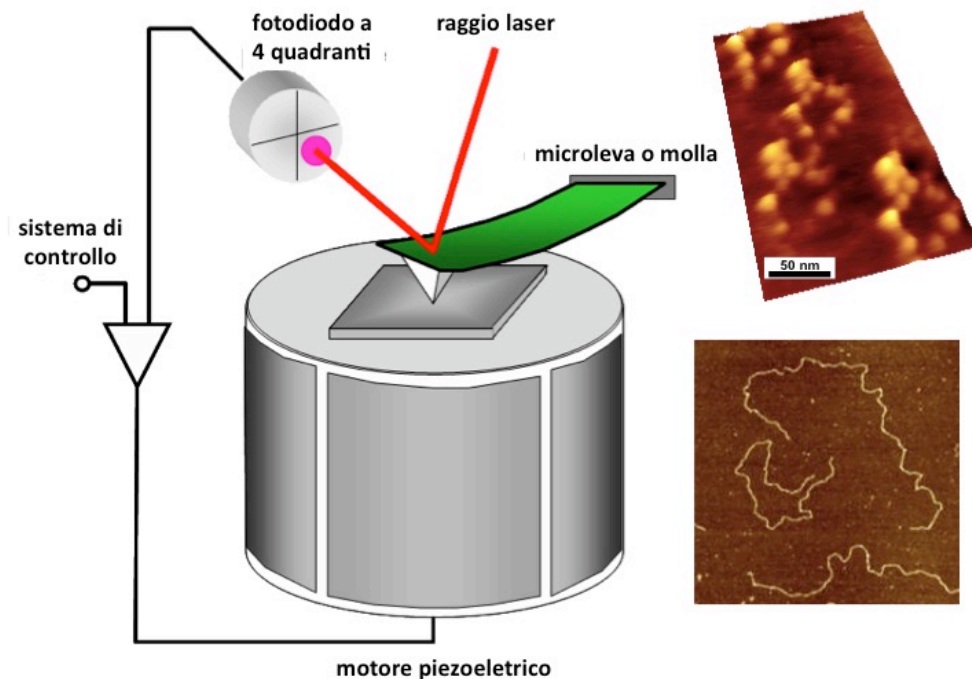


Figura 1

Con un tale strumento è possibile visualizzare agevolmente una singola molecola di DNA (2 nanometri di diametro, immagine in basso a destra in figura 1) o una proteina (pochi nanometri immagine in alto a destra in figura 1) su una superficie. Si tratta di un risultato sensazionale! Prima dell'avvento di tali microscopi, le uniche informazioni precise sulla morfologia di tali molecole potevano provenire soltanto da esperimenti di diffrazione di raggi X realizzati su strutture molecolari periodiche estese (cristalli molecolari) difficili da realizzare e ancor più da analizzare o, in molto particolari, da misure di microscopia elettronica in trasmissione - TEM. Inoltre le informazioni così ottenute, anche se spesso molto accurate, rappresentano la struttura media di molecole in condizioni a volte lontane da quelle fisiologiche.

I microscopi a sonda di scansione, invece, consentono agevolmente di visualizzare singole molecole in un ambiente piuttosto simile a quello fisiologico. Infatti, questi possono essere utilizzati per studiare i campioni molecolari di interesse in soluzioni acquose saline come quelle tipicamente presenti negli organismi biologici (ad es. acqua di mare).

Ma i microscopi a sonda di scansione sono strumenti estremamente versatili e la loro applicabilità assai varia. A seconda del parametro chimico-fisico misurato dalla sonda di scansione, essi possono fornire informazioni morfologiche, come abbiamo visto, o addirittura funzionali, quale è il caso del prossimo esempio.

### **Imaging funzionale su metalloproteine**

Impiegando un altro tipo di microscopio a scansione di sonda, il *microscopio elettrochimico a effetto tunnel*- ECSTM, che utilizza una punta metallica, acuminata fino a terminare con un singolo atomo, per misurare la corrente che fluisce tra di essa e una superficie conduttiva all'interno di una cella elettrochimica, è possibile addirittura osservare il flusso di elettroni che



transitano, uno alla volta, attraverso una singola metalloproteina (immagine di sinistra di figura 2). Nel caso specifico, si tratta di una biomolecola che possiede al suo interno uno ione rame -  $\text{Cu}^{2+}$  - che è in grado di cambiare reversibilmente il suo stato ossidativo (divenendo  $\text{Cu}^+$ ) per accettare un elettrone da un'altra molecola e cederlo ad un'altra ancora nella catena respiratoria di un particolare batterio (*Pseudomonas aeruginosa*), immagine di destra di figura 2. Numerose altre metalloproteine condividono un simile meccanismo di funzionamento. Il microscopio ECSTM consente di osservare ciascuna di queste molecole, di solo 3 miliardesimi di metro di diametro, in azione, mentre una fila di elettroni sotto forma di corrente di tunnel, fluisce attraverso di loro **(1)**. Da questo tipo di studi è possibile ottenere una comprensione quantitativa del meccanismo con il quale gli elettroni fluiscono attraverso le metalloproteine.

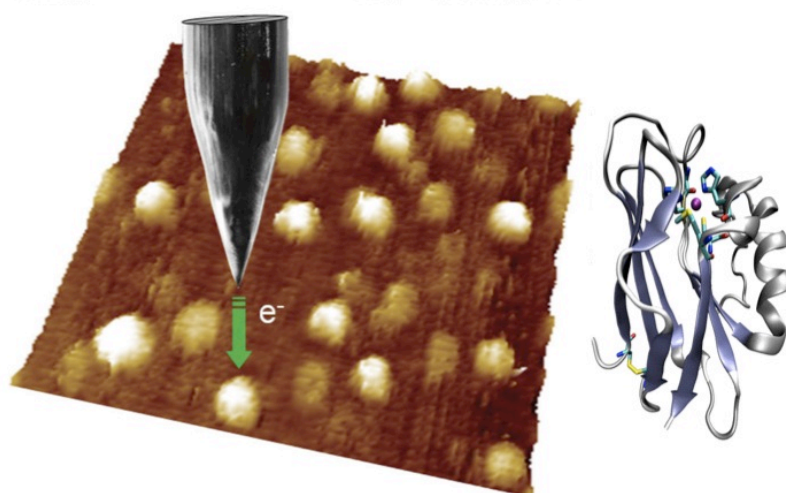


Figura 2

*L'effetto tunnel (1)* è un fenomeno prettamente "quantistico" per il quale una particella (ad es. un elettrone) possiede una probabilità finita di superare una barriera energetica data, anche se la sua energia è inferiore a quella che sarebbe necessaria per superarla secondo la fisica classica. Questo fenomeno è alla base del passaggio di una corrente elettrica tra due conduttori, la punta e il substrato, nel microscopio a effetto tunnel. Pur non trovandosi in contatto ma essendo separati da una distanza (sub)nanometrica, tra i due elettrodi si instaura una corrente elettrica se ad essi viene applicata una piccola differenza di potenziale. L'intensità di tale corrente è estremamente sensibile alla distanza tra i due conduttori e si annulla rapidamente per distanze appena maggiori di quelle interatomiche. Questa caratteristica fornisce alla tecnica di microscopia a effetto tunnel un'estrema sensibilità alla distanza e quindi una risoluzione spaziale elevatissima, tale da poter visualizzare singoli atomi.



## Le “pinzette ottiche” e il ripiegamento di singole proteine

Esiste una stretta connessione tra la struttura di una biomolecola e la sua funzione. Molecole chimicamente identiche ma dotate di struttura (posizione spaziale mutua dei vari atomi che la compongono) differente, possiedono, in generale, proprietà funzionali diverse. Più precisamente, piccole alterazioni della organizzazione spaziale degli atomi che compongono una proteina sono sufficienti a farle perdere la sua funzionalità, cioè la capacità di compiere il proprio compito fisiologico.

Un importante problema della Biofisica consiste nello studiare come una proteina possa raggiungere la sua conformazione spaziale funzionale, cioè il suo cosiddetto “folding”, a partire da uno stato amorfo di partenza e come, di converso, possa perdere il suo folding nativo e raggiungere uno stato “denaturato” non più funzionalmente attivo. Si tratta di un problema ancora aperto, cui le tecniche classiche possono fornire soltanto risposte medie, ossia relative al comportamento medio di enormi numeri di molecole (dell’ordine di grandezza del numero di Avogadro,  $6.02 \cdot 10^{23}$  mol/M). Le tecniche della nanobiofisica consentono invece di studiare questo fenomeno, nonché gli effetti generati su di esso dall’ambiente (caratteristiche della soluzione quali temperatura, pH, concentrazione salina, presenza di eventuali altre molecole), a livello della singola proteina. In particolare, la tecnica che va sotto il nome di *pinzette ottiche*, consente di studiare il fenomeno di denaturazione (e rinaturazione) proteica a seguito dell’applicazione di una forza di trazione tra due punti specificati della proteina stessa.

La possibilità in questione è assai rilevante poiché consente di mettere in luce meccanismi, connessi alla singola molecola, che non si potrebbero altrimenti evidenziare con misure medie e studiare il fenomeno della denaturazione dovuta ad una forza applicata lungo una precisa (e arbitrariamente scelta dallo sperimentatore) direzione spaziale.

Tale tecnica si serve da un lato della possibilità di realizzare una cosiddetta “trappola ottica” **(2)** in cui imprigionare oggetti micrometrici quali sferette plastiche o di altri materiali, dall’altro delle risorse messe a disposizione dalla biologia molecolare per poter manipolare una singola proteina.

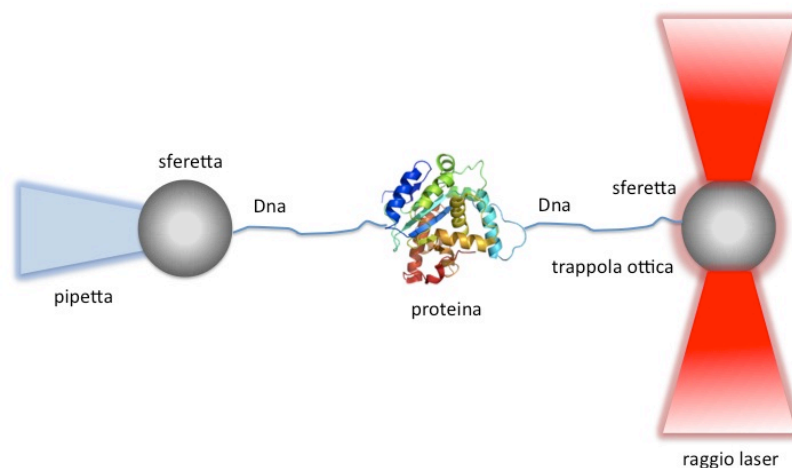


Figura 3



La figura 3 esemplifica il sistema sperimentale delle pinzette ottiche. Una proteina viene “mutata” con tecniche di biologia molecolare dette di “mutagenesi sito specifica” in modo da presentare, lungo la sua superficie e nelle posizioni desiderate, degli opportuni gruppi chimici (di solito sulfidrilici - SH) utilizzati per il collegamento della proteina con due filamenti di Dna a doppia elica. Questi sono a loro volta connessi a due sferette plastiche. Le sferette vengono intrappolate quindi in (una o più) trappole ottiche (nella figura, una sferetta è immobilizzata in una trappola ottica, un'altra tramite una pipetta aspirante) e consentono la manipolazione della proteina che può essere soggetta ad una forza di trazione (agendo sulla pipetta o sulla posizione della trappola). Si può in tal modo studiare l'effetto dell'applicazione di una forza sulla stabilità del folding proteico e rispondere a domande quali: a che forza si denatura una certa proteina in un certo ambiente (soluzione)? Secondo quali modalità avviene tale denaturazione? Si tratta di un fenomeno reversibile o irreversibile (cioè cosa accade se “rilasciamo” la forza di trazione)? Le risposte a queste domande consentono di raggiungere una comprensione molto approfondita delle modalità di formazione della struttura delle proteine.

Una *trappola ottica* **(2)** è una regione spaziale micrometrica in cui vengono focalizzati uno (o più) raggi laser e che a causa della pressione di radiazione esercitata dai raggi focalizzati, è in grado di catturare oggetti dalle opportune proprietà ottiche (indice di rifrazione) in modo simile a come una pallina rotola in una buca e non riesce più ad uscirvi. La trappola ottica è alla base della possibilità di manipolare singole proteine. La forza applicata alla proteina (dell'ordine di pochi piconewton -  $10^{-12}$  N) viene misurata seguendo il movimento della sferetta immobilizzata nella trappola tramite una videocamera. Dalla misura dello spostamento della sferetta dalla posizione di equilibrio, si ricava la forza applicata alla proteina. Per far ciò, la cui forza di richiamo della trappola ottica deve essere preventivamente misurata con analoga tecnica.

### **Imaging di sistemi biologici alla nanoscala: effetto della transizione di fase solido-liquido in modelli di membrana biologica**

Un ulteriore, ultimo esempio di biofisica alla nanoscala riguarda, come preannunciato, lo studio di sistemi molecolari interagenti e l'effetto che l'ambiente molecolare circostante ha sul comportamento di biomolecole.

Consideriamo questa volta proteine di transmembrana, cioè proteine che sono localizzate nella membrana cellulare di vari tipi di cellule. Un caso paradigmatico è quello dei canali ionici. Queste complesse molecole proteiche hanno il compito di consentire il passaggio di ioni selezionati attraverso la membrana biologica (formata in gran parte da fosfolipidi organizzati in “doppio strato”) che altrimenti sarebbe completamente impermeabile ad essi. Un dato tipo di ione, ad



esempio lo ione potassio -  $K^+$ , potrà attraversare la membrana, spinto dalla differenza di concentrazione tra l'interno e l'esterno della cellula, allorché un canale ionico per esso specifico si apra a seguito della variazione di parametri chimico-fisici (pH, potenziale elettrico di transmembrana, temperatura, etc). Tali molecole sono estremamente importanti poiché sono, ad esempio, alla base della generazione e propagazione del segnale nervoso nei neuroni.

La microscopia a forza atomica viene utilizzata, in questo esempio, per studiare l'effetto di cambiamenti chimico-fisici dell'ambiente su scala nanometrica a carico dell'organizzazione spaziale dei canali ionici che si trovano all'interno della membrana. Per poter far ciò, è conveniente usare un modello "semplificato" di membrana biologica, in cui è presente solo un numero limitato di molecole di interesse. Questi modelli manifestano tutte le principali caratteristiche delle membrane biologiche esibendo, tuttavia, una complessità minore e in particolare consentendo una più agevole identificazione degli elementi molecolari presenti e comprensione dei meccanismi biologici in atto.

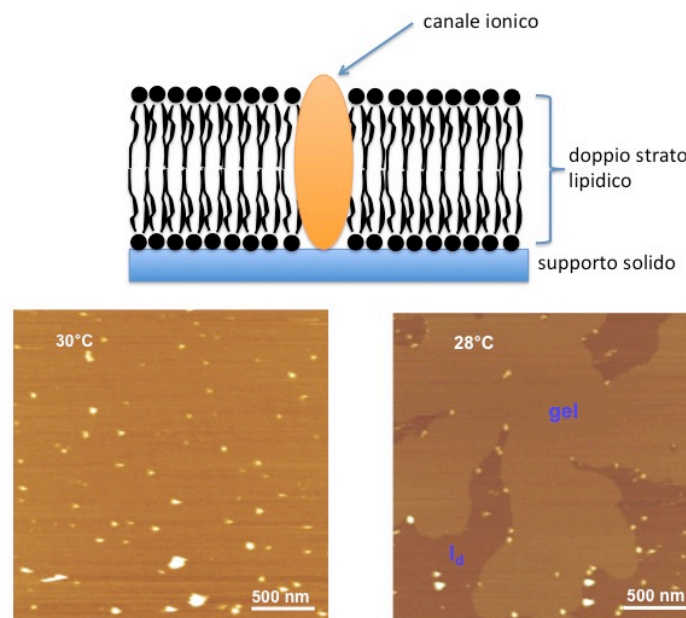


Figura 4

Se una membrana modello (immagine in alto della figura 4) viene esposta a una variazione di pH o ad un abbassamento della temperatura in un opportuno intervallo, essa subisce una *transizione di fase da solido a liquido*, in analogia, ad esempio, a un pezzo di ghiaccio che si liquefa.

Osservazioni tramite il microscopio AFM consentono di seguire cosa accade. Innanzi tutto si nota la formazione di "domini lipidici solidi" che appaiono nell'immagine in basso a destra di figura 4 come isole più chiare (cioè di altezza maggiore) indicate con "gel"; inoltre si nota che i canali che, a più alta temperatura (30°C), apparivano come protrusioni più chiare nell'immagine in basso a sinistra di figura 4, sono ora (28°C) quasi completamente confinati nelle regioni di membrana più scure, che ancora si trovano in fase liquida ( $I_1$ ). Questa osservazione, impossibile con qualsiasi altra tecnica sperimentale, è di estrema rilevanza per la comprensione del comportamento dei canali durante le transizioni di fase che avvengono fisiologicamente nelle membrane biologiche.

Tali osservazioni sono peraltro state utilizzate come punto di partenza per un approfondito studio sul comportamento di tali canali ionici e hanno consentito di connetterne il comportamento



funzionale con lo stato meccanico della membrana a livello nanometrico, dando forma concreta al concetto di *biologia dei sistemi*, per la quale non si possono considerare le varie componenti molecolari operanti in un sistema biologico come dotate di proprietà intrinseche avulse dal sistema stesso, bensì è necessario considerare il loro comportamento solo allorché inserite nel sistema biologico, di cui tutte le componenti molecolari presenti formano parte integrante e contribuiscono alla funzionalità.

### **Conclusioni**

Gli esempi riportati rappresentano soltanto alcune delle possibilità che la biofisica alla nanoscala offre all'investigazione di sistemi biologici. Tutti quelli riportati, assieme ai numerosissimi altri che non ho potuto citare per inevitabili limitazioni di spazio, qualificano la nanobiofisica come una disciplina in grado di abilitare lo studio della materia biologica su una scala dimensionale, quella nanometrica appunto, che è cruciale nel determinare le proprietà dei sistemi biologici anche a livello macroscopico. In questo condivide il suo approccio con le più generali nanoscienze.

### **Per approfondire:**

#### ***Bibliografia e Proposte per approfondimenti didattici***

Andrea Alessandrini and Paolo Facci "AFM: a versatile tool in biophysics" Meas. Sci. Technol. 16 (2005) R65-R92

#### ***Link utili***

- [http://www.youtube.com/watch?v=eCpkq\\_AeX50](http://www.youtube.com/watch?v=eCpkq_AeX50)
- <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=2786>.
- [http://it.wikipedia.org/wiki/Effetto\\_tunnel](http://it.wikipedia.org/wiki/Effetto_tunnel).
- "Pinze ottiche" luce per intrappolare le molecole:  
[http://oldphysicscom.unimore.it/index.php?page=laboratori\\_didattici](http://oldphysicscom.unimore.it/index.php?page=laboratori_didattici)
- <http://www.landesbioscience.com/journals/27/article/15073/>
- [http://it.wikipedia.org/wiki/Biologia\\_dei\\_sistemi](http://it.wikipedia.org/wiki/Biologia_dei_sistemi)





scienza attiva