

Titolo del Programma: “Sviluppo di metodologie innovative, basate sull’utilizzo di membrane polimeriche, per la cristallizzazione controllata di proteine”

Proponente: Dott. Gianluca Di Profio, iscritto al secondo anno del dottorato di ricerca presso il dipartimento di ingegneria chimica e dei materiali, UNICAL. Titolo del dottorato di ricerca: “*Processi avanzati di separazione molecolare per applicazioni chimiche, ambientali, agro alimentari, farmaceutiche e polimeriche: contattori a membrana*”, svolto nell’ambito del co-finanziamento INSTM e centro di eccellenza CEMIF.CAL.

Descrizione e obiettivi generali

La *cristallizzazione di proteine* riveste oggi un ruolo fondamentale in una vasta area delle scienze biochimiche, biologiche e biotecnologiche. Lo studio mediante diffrazione di raggi X della struttura tridimensionale di macromolecole biologiche, è divenuto negli ultimi decenni un potentissimo strumento per la comprensione di numerosi meccanismi biochimici per i sistemi viventi, spesso coinvolti con manifestazioni patologiche. La conoscenza della struttura tridimensionale di una proteina o di un complesso proteico rappresenta, infatti, un elemento essenziale per la ricerca di molecole in grado di modularne in maniera specifica l’attività biologica. In questo contesto, l’analisi della struttura tridimensionale di una proteina mediante diffrazione di raggi X, costituisce un ideale punto di partenza per la progettazione razionale su base strutturale di farmaci. Nell’ultimo decennio, nonostante le tecniche di diffrazione di raggi X su cristallo singolo abbiano visto significativi miglioramenti nelle metodologie di generazione dei raggi X, di raccolta dati, e nei metodi di raffinamento cristallografico, la produzione di cristalli singoli di macromolecole biologiche, adatti per un’indagine cristallografica, è diventata il principale ostacolo da superare in questo tipo di analisi: è necessario cioè disporre di cristalli proteici con caratteristiche opportune in termini di dimensioni e potere diffrangente, essendo questa ultima proprietà direttamente connesso alla regolarità strutturale del cristallo.

Un ulteriore importante aspetto riguardante la cristallizzazione di proteine, ed in particolare di enzimi, è strettamente legato al loro utilizzo in aree industriali biotecnologiche. Benché gli enzimi siano i più efficienti catalizzatori conosciuti, un loro efficace impiego su larga scala, anche in fase cristallina, è stato fino ad oggi impedito dalla loro scarsa resistenza in ambienti particolarmente sfavorevoli; temperatura e/o pressione elevata, valori estremi di pH, stress meccanico, presenza di agenti proteolitici, sono solo alcuni dei possibili fattori degradativi. Recentemente, lo sviluppo di nuove metodologie di *cross-linking* chimico di cristalli enzimatici, ha consentito di ottenere materiali particolarmente stabili anche in quegli ambienti in cui normalmente essi non potevano essere utilizzati, come ad esempio nella sintesi chimica, in applicazioni ambientali, in applicazioni biomediche e diagnostiche, per il rilascio controllato di farmaci, come materiali separativi per cromatografia, etc. La reale efficienza di tali materiali in applicazioni biotecnologiche, è però strettamente connessa alle caratteristiche morfologiche (intese come forma, dimensione, distribuzione delle dimensioni, polimorfismo e pseudo-polimorfismo) dei cristalli proteici prodotti. Per queste ragioni, lo sviluppo di nuove metodologie che consentano di controllare il processo di cristallizzazione macromolecolare, così da poter modulare le caratteristiche dei cristalli ottenuti, rappresenta un notevole contributo nel campo della biochimica e delle biotecnologie in genere. Obiettivo generale del presente progetto sarà quindi lo sviluppo di nuove metodologie di cristallizzazione, basate sull’impiego di membrane polimeriche, che rendano più agevole e controllabile il processo di cristallizzazione delle macromolecole biologiche. Lo sviluppo di tali metodologie renderà, da un lato, più agevole la caratterizzazione strutturale di bio-macromolecole, dall’ altro, ne estenderà le applicazioni in campo biotecnologico-industriale.

Contesto esterno

Il processo di cristallizzazione

La cristallizzazione è un processo in cui si verifica il passaggio di una sostanza da uno stato caratterizzato da una distribuzione disordinata delle particelle ad uno stato con struttura ordinata in cui le forze attrattive di legame hanno il sopravvento sui moti di agitazione termica [1]. Il concetto di cristallizzazione è fortemente legato a quello di solubilità: un soluto è in grado di rimanere in soluzione soltanto al di sotto della concentrazione corrispondente al limite di solubilità; se tale limite viene superato, e si passa quindi ad una condizione di non equilibrio, appare un nuovo stato termodinamico: lo stato di supersaturazione [2,3], contraddistinto dalla presenza di una fase solida. La fase solida può corrispondere ad una struttura cristallina, nel caso della cristallizzazione, o ad un precipitato amorfo, nel caso della precipitazione. Generalmente in un diagramma di fase è possibile distinguere tre zone [4] (Figura 1): (1) la zona stabile, in cui la soluzione è insatura e non si verifica né nucleazione, né crescita cristallina; (2) la zona metastabile dove non avviene la nucleazione spontanea, ma dove è permessa la crescita; (3) la zona di supersaturazione dove avviene una rapida e spontanea nucleazione.

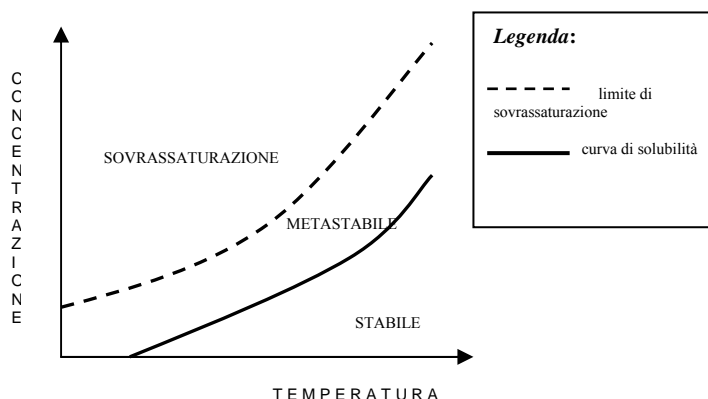


Figura 1. Diagramma di fase di un sistema “cristallizzabile”.

Sia piccole molecole inorganiche o composti organici caratterizzati da una bassa massa molare, sia macromolecole biologiche, quali proteine, DNA ed RNA, possono essere cristallizzati. Il processo di cristallizzazione risulta simile e caratterizzato da 3 fasi: nucleazione; crescita del cristallo; cessazione della crescita cristallina.

La **nucleazione** consiste nella costituzione, per aggregazione di molecole, di nuclei stabili aventi le stesse proprietà chimico-fisiche del composto che si formerà [1]. Affinché inizi il processo di nucleazione è necessario un livello di supersaturazione adeguato [3] e, una volta verificatosi, affinché il nucleo risulti stabile e tenda a crescere è necessario che esso superi una “dimensione critica”, al di sotto della quale si osserva instabilità e tendenza alla dissoluzione [1,5]. Il tempo che intercorre tra il momento del raggiungimento del livello di supersaturazione e la comparsa dei nuclei di dimensione critica nella soluzione sovrassatura viene definito tempo di induzione. Esso risulta inversamente proporzionale sia alla frequenza di formazione dei nuclei cristallini sia al grado di sovrassaturazione della soluzione considerata. Il processo di nucleazione porta alla formazione di aggregati molecolari, inizialmente particolarmente instabili, la cui probabilità di accrescere o di dissolvere dipende dalle forze di coesione coinvolte nella formazione dell’embrione cristallino.

La **crescita** consiste nella deposizione di strati successivi su nuclei precedentemente formati [1]. Questo processo consiste di un meccanismo composto di due stadi: il trasporto di molecole fino alla superficie di ciascun cristallo, fondamentalmente regolata dal gradiente di concentrazione, e l’inserimento in maniera ordinata all’interno del reticolo cristallino in accrescimento [5]. La velocità con cui si verifica tale processo viene definita velocità di crescita; essa risulta dipendere dal

grado di sovrassaturazione della soluzione considerata e, quindi, conseguentemente da tutti i fattori che influenzano la solubilità: temperatura, pH, presenza di impurezze, concentrazione del soluto, pressione, presenza di cofattori e ioni metallici, etc. [1].

Il cristallo, dopo un certo periodo di tempo variabile, raggiunge una particolare fase corrispondente alla *cessazione della crescita*. Le cause responsabili di tale interruzione sono varie: introduzione di impurezze all'interno del reticolo cristallino, eccessiva nucleazione, drastiche variazioni di temperatura e pressione, forti alterazioni del pH, etc. [1].

La cristallizzazione di proteine

La cristallizzazione proteica è una tecnica sviluppata nella tarda metà del 19th secolo [6]. E' un processo estremamente complesso rispetto alla cristallizzazione di composti a bassa massa molare [7]. La cristallizzazione di proteine viene realizzata per diversi motivi: (1) estrazione di proteine pure da brodi di fermentazione; (2) determinazione della struttura tridimensionale e studio del polimorfismo mediante tecniche di diffrazione su singolo cristallo; (3) applicazioni di catalisi eterogenea in processi industriale e biotecnologici;

La cristallizzazione è un efficiente mezzo di *purificazione* che, benché attualmente soppiantato da tecniche come quelle cromatografiche, per la produzione di quantità limitate di materiali ad elevato grado di purezza [8], è ancora ampiamente impiegato quando si lavora con protidi su larga scala. La purificazione per cristallizzazione permette infatti di raggiungere sufficienti livelli di purezza in un unico *step*, ma anche una resa molto alta [7]; soprattutto, però, risulta economicamente accessibile e tecnicamente molto semplice. Le varie tecniche di cristallizzazione permettono di ottenere cristalli da sottoporre a *studi di cristallografia* per acquisire informazioni sulla struttura tridimensionale della proteina in esame. La comprensione della struttura 3D di un protide permette di decifrare i meccanismi della sua funzione biologica, che è strettamente connessa alla disposizione nello spazio dei gruppi di atomi, e quindi consente di progettare e sintetizzare nuovi farmaci capaci di agire su particolari siti attivi, così da attivare maggiormente o inibire del tutto o solo parzialmente l'attività proteica in processi patologici ([6], Figura 2). Il metodo di scelta per determinare la struttura di una proteina è la diffrazione ai raggi X su singolo cristallo; essa richiede l'utilizzo di cristalli di adeguate dimensioni (> 50-100 μm , [9]) ed elevato potere diffrangente. Ad oggi, più di 18.000 strutture proteiche, determinate grazie all'analisi di diffrazione ai raggi X, sono presenti nel *Protein Data Bank* (PDB) [10,11].

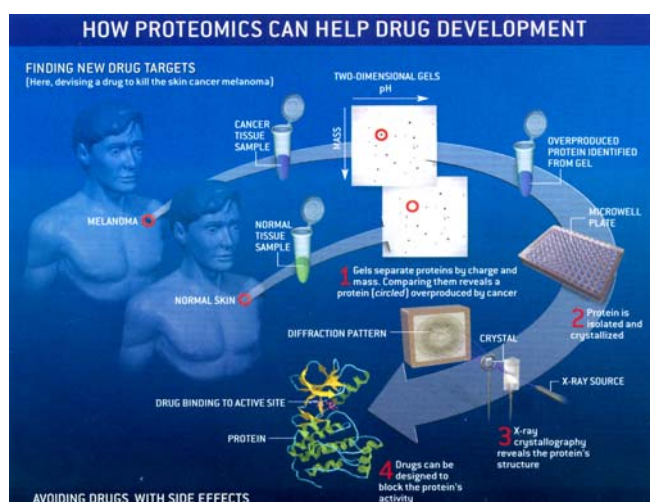


Figura 2. Relazione tra *proteomica* e *structural drug design*: sviluppo di farmaci per la cura del melanoma basato su studi di tipo strutturale.

Tale approccio risulta efficace anche nello studio e nella prevenzione del meccanismo di *aggregazione delle proteine in vivo*, fenomeno spesso associato all'insorgenza di gravi patologie.

Ad esempio, la cataratta [16], è un disturbo a carico del cristallino (una lente la cui trasparenza è una condizione necessaria per la visione degli oggetti) causato da diversi fattori [17]: età, errori congeniti del metabolismo, malattie infettive o immunologiche, l'utilizzo di farmaci, etc.. Un'ulteriore causa è però rappresentata dalla cristallizzazione delle γ -cristalline mutate. Le γ -cristalline sono proteine normalmente presenti all'interno del cristallino insieme alle α e β -cristalline, il cui ruolo fisiologico è quello di contribuire al mantenimento della trasparenza della lente. Le γ -cristalline mutate sono risultate meno solubili e nello stesso tempo maggiormente inclini a cristallizzare rispetto alla forma proteica normalmente presente all'interno dell'organismo. Inoltre, la velocità di nucleazione delle γ -cristalline mutate è considerevolmente accresciuta rispetto alla proteina sana [16]. **Il polimorfismo** è quel fenomeno in base al quale una sostanza, al variare delle condizioni in cui avviene il fenomeno, cristallizza in due o più forme diverse [12]. Il problema del polimorfismo riguarda non soltanto composti proteici ma anche altri prodotti di origine farmaceutica. I polimorfi, presentando reticoli cristallini differenti, sono caratterizzati da proprietà chimico-fisiche diverse, tanto da influenzare la loro stabilità e il loro comportamento biofarmaceutico: a causa della diversa velocità di assorbimento determinata dalla rapidità della dissoluzione della forma polimorfa, si osserva una differenza nella biodisponibilità del prodotto farmaceutico [13]. Anche in questo caso, un'analisi di diffrazione ai raggi X consente di individuare le forme polimorfe in cui una sostanza cristallizza nelle diverse condizioni operative. La cristallizzazione rappresenta un'importante fase nella produzione di **cristalli enzimatici cross-linked** (CLECs), o più in generale di cristalli proteici *cross-linked* (CLPCs) [8]. La tecnologia CLECs nasce come una tecnica di immobilizzazione e stabilizzazione di enzimi che ha il vantaggio di conservare pienamente l'attività dell'enzima considerato [13]. Il processo di produzione degli agenti CLECs può essere distinto in due fasi [13,14]: cristallizzazione dell'enzima e formazione di legami crociati all'interno dei cristalli prodotti. Mentre la cristallizzazione crea un preciso arrangiamento spaziale delle molecole, la successiva formazione dei *cross-linking* all'interno del cristallo determina la "chiusura" della proteina in uno stato cristallino che permette un elevato grado di stabilità, mantenendo la struttura cristallina in ambienti differenti rispetto alla soluzione di cristallizzazione, prevenendo, quindi, la denaturazione [8]; tale stato permette inoltre il riutilizzo del catalizzatore per più processi, una maggiore maneggevolezza (poiché il cristallo risulta più stabile), un controllo dell'attività enzimatica, ed elevata attività per unità di volume [15]. Caratteristica principale dei CLECs, necessaria affinché si abbia un'elevata efficienza, è un estremo controllo delle loro proprietà morfologiche, intese come dimensioni, distribuzione delle dimensioni e forma.

Difficoltà nella cristallizzazione di proteine

Riuscire a cristallizzare proteine è, ad oggi, un'impresa abbastanza ardua. Le motivazioni che impediscono il processo di cristallizzazione sono molteplici ma tutte riconducibili a caratteristiche strutturali proprie delle proteine. In particolare, la principale difficoltà nella cristallizzazione di macromolecole risiede nella faticosa ricerca di specifiche condizioni necessarie al cristallo per nucleare e crescere, che siano, nel contempo, compatibili con le caratteristiche strutturali del protide analizzato. Tali condizioni (adatta temperatura, giusto pH, appropriata pressione, etc.) sono spesso inconciliabili con la maggior parte delle applicazioni, soprattutto industriali [8]. Per di più, poiché per la cristallizzazione di sistemi proteici è necessario che si verifichi un'interazione proteina-proteina: la presenza di fattori che introducono eterogeneità nel sistema, come la presenza di siti di glicosilazione, le differenti conformazioni che una proteina può assumere nello spazio, la denaturazione, la degradazione, etc. [7], possono alterare l'intero processo. Per di più, le interazioni proteina-proteina, che vengono generate all'interno della soluzione proteica, non sempre sono adatte alla formazione cristallina e soltanto poche interazioni sono in grado di produrre quelle interazioni necessarie per l'innescare del processo di cristallizzazione [15], mentre in altri casi si potrebbero ottenere aggregati amorfi [18]. Anche nel momento in cui il processo di cristallizzazione fosse avvenuto, non è detto che i cristalli ottenuti siano caratterizzate dai requisiti necessari rispetto alle applicazioni previste: infatti, molto spesso, si ottengono strutture cristalline estremamente

fragili, tendenti alla dissoluzione o alla frantumazione anche in condizioni che vengono considerate favorevoli [8], o caratterizzate da proprietà morfologiche non adeguate. Un'ulteriore motivazione della grande difficoltà che caratterizza il processo di cristallizzazione proteica può essere spiegato da un naturale processo evolutivo [19] finalizzato proprio ad evitare il fenomeno di aggregazione che, in vivo, risulterebbe estremamente dannoso generando, come detto, numerose patologie: basta pensare ad alcune forme di cataratta, causata dalla cristallizzazione di forme mutate delle γ -cristalline [16], o ad alcune forme di anemia causate dalla cristallizzazione di forme mutate di emoglobina [20].

Le tecniche ad oggi sviluppate per cristallizzare una proteina, sono molteplici [6,21,22]; alcune di queste sono: *vapor diffusion (sitting drop, hanging drop, sandwich drop)*; *free interface diffusion*; *batch*; *microbatch*. Nonostante l'elevato accrescimento ed il notevole miglioramento osservato negli ultimi anni nello sviluppo di tecniche di cristallizzazione proteica, ad oggi non esiste un processo che possa essere considerato il migliore in assoluto: la cristallizzazione viene ancora considerata un processo empirico ed operatore-dipendente [23]. Ogni tecnica, pur presentando delle caratteristiche positive in particolari condizioni, presenta una serie di svantaggi che la rendono poco efficace. La tecnica *batch* ad esempio, se pur considerata la più semplice e veloce ed essendo quella maggiormente utilizzata a livello industriale per la produzione di elevate quantità di composti cristallini, risulta poco controllabile. Il mancato controllo comporta la produzione di cristalli poco stabili dal punto di vista strutturale e, nel contempo, caratterizzati da forme e dimensioni variabili, proprietà che non permettono di poter sfruttare la tecnica in processi in cui il controllo della morfologia del cristallo è di fondamentale importanza (produzione di cristalli *cross-linked*). La tecnica *vapor diffusion*, pur essendo la tecnica maggiormente adoperata per la produzione di singoli cristalli da utilizzare negli studi di cristallografia, risulta un approccio abbastanza complicato ed attuabile solo per minime quantità di soluzione proteica [24].

Cristallizzazione mediante tecniche a membrana

Il ruolo delle *membrane*, concepite in passato semplicemente come barriere selettive tra due fasi, si è oggi notevolmente ampliato in molti campi tecnologici ed industriali. Parlando di membrane, non ci si riferisce più solo a strutture statiche, il cui ruolo primario è quello di impedire il passaggio di sostanze da un lato all'altro della membrana stessa, ma a sistemi che, pur agendo tramite un meccanismo concettualmente semplice, rappresentano strutture altamente complesse, in grado di regolare il passaggio di materia in maniera estremamente selettiva ed efficiente. Negli ultimi decenni, i vantaggi derivanti dall'applicazione delle tecnologie a membrana nei processi produttivi, ha conferito a tale disciplina un ruolo centrale rispetto a tematiche quali la realizzazione di cicli industriali ispirati alla strategia dell'intensificazione di processo [25].

Tra le varie operazioni a membrana, particolare ruolo rivestono dispositivi noti come *contattori a membrana* [26]. Un contattore a membrana è un dispositivo che viene utilizzato per facilitare il trasferimento di materia tra due fasi messe a contatto attraverso la membrana (liquido/liquido o gas/liquido) senza dispersione di una delle due fasi nell'altra. Attraverso l'introduzione di contattori basati sull'utilizzo di membrane, è stato infatti possibile superare limitazioni presenti per decenni nelle industrie chimiche dove si fa, o si fatto uso, di colonne, miscelatori o altri tradizionali contattori fluido/fluido, liquido/liquido, gas/liquido, per operazioni di trasferimento di materia.

La *cristallizzazione a membrana* [27] rappresenta un esempio delle varie operazioni a membrana appartenenti alla categoria dei contattori. Il sistema di cristallizzazione a membrana si basa sull'utilizzo di membrane microporose e idrofobe, generalmente di natura polimerica, per la produzione di cristalli a partire da una soluzione insatura. Questa duplice caratteristica della membrana fa sì che le soluzioni acquose messe "in contatto" non invadano i pori in fase liquida, come normalmente avviene nella dialisi, ma consentano l'instaurarsi di una duplice interfaccia liquido/vapore su entrambi i lati della membrana stessa. La presenza di queste due interfacce dà luogo ad un meccanismo di evaporazione – migrazione – condensazione, che si manifesta attraverso l'allontanamento di molecole di solvente in fase vapore dall'interfaccia a contatto con la soluzione

contenente la specie da cristallizzare (soluzione proteica), la migrazione delle stesse attraverso la struttura porosa, la ricondensazione sulla seconda interfaccia, in contatto con una soluzione di estrazione (o di *stripping*) (Figura 3). La soluzione proteica contiene generalmente la proteina, uno o più agenti precipitanti ed eventuali altri additivi, disciolti in un apposito tampone; la soluzione di estrazione consiste normalmente di una soluzione saturata di sali inorganici (es. CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl , etc.).

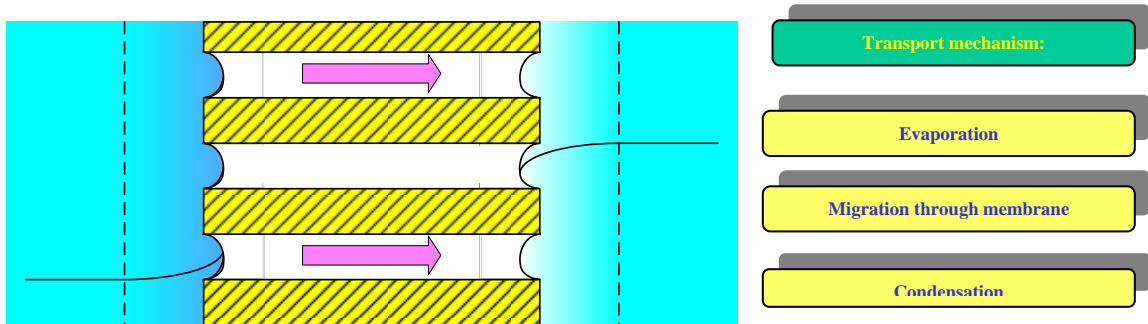


Figura 3. Principio di funzionamento di un cristallizzatore a membrana.

La forza spingente dell'intero processo è generata da un gradiente di potenziale chimico fra le due interfacce, dovuto ad una differenza di temperatura e/o di concentrazione [28]. Nel primo caso, il sistema viene definito come *cristallizzatore a membrana termico* mentre nel secondo caso come *cristallizzatore a membrana isoterma (o osmotico)*. Per la cristallizzazione di specie tremolabili come le proteine, viene utilizzato generalmente il sistema osmotico [29-32]. Il sistema di cristallizzazione a membrana può operare secondo due modalità:

(a) in condizioni statiche (*sistema statico*), la soluzione proteica e la soluzione di estrazione sono messe a contatto per mezzo della membrana senza che vi siano tuttavia moti convettivi generati dal ricircolo forzato delle soluzioni (Figura 4). Il sistema può far uso di membrane capillari o piane, in configurazione tale da consentire la realizzazione di più esperimenti in contemporanea, utilizzando piccoli volumi di soluzioni proteiche (poche decine di microlitri) come anche quantità di soluzione dell'ordine dei millilitri o delle decine di millilitri (con facilità di ulteriore *scale-up*), e in configurazione tale da consentire l'osservazione ottica del campione durante la crescita;

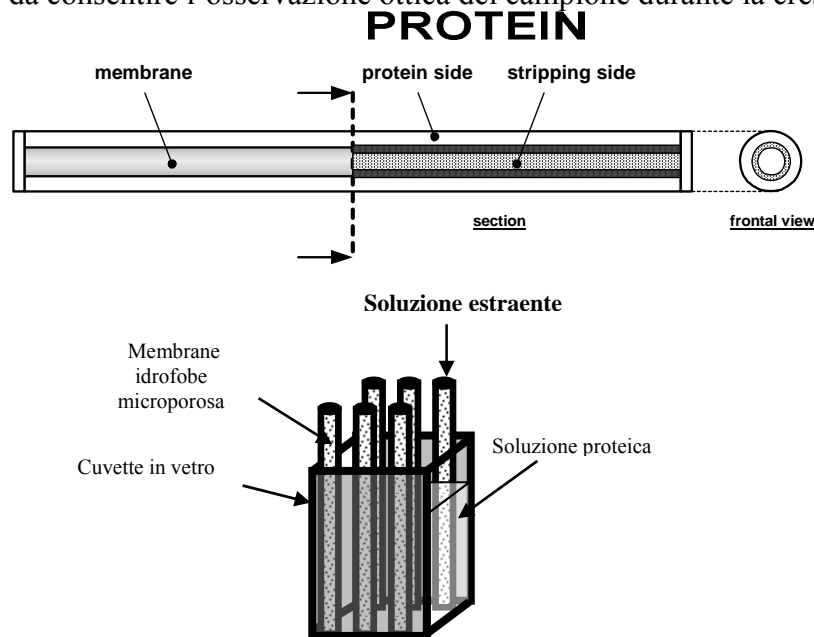


Figura 4. Sistema di cristallizzazione a membrana statico.

(b) in condizioni dinamiche (*sistema dinamico o in flusso forzato*, Figura 5), la soluzione proteica e la soluzione di estrazione sono messe a ricircolo. In tale configurazione, una condizione di flusso assiale, in regime laminare, fornisce un ambiente “anisotropo”, confrontabile a quello generato in presenza di campi elettrici, magnetici, o in presenza di substrati come *langmuir-blodget films*, in cui si ha una interazione privilegiata fra le macromolecole, consentendo una crescita più ordinata fin dalle prime fasi del processo di cristallizzazione, con conseguenti effetti migliorativi rispetto alle caratteristiche strutturali dei cristalli prodotti.

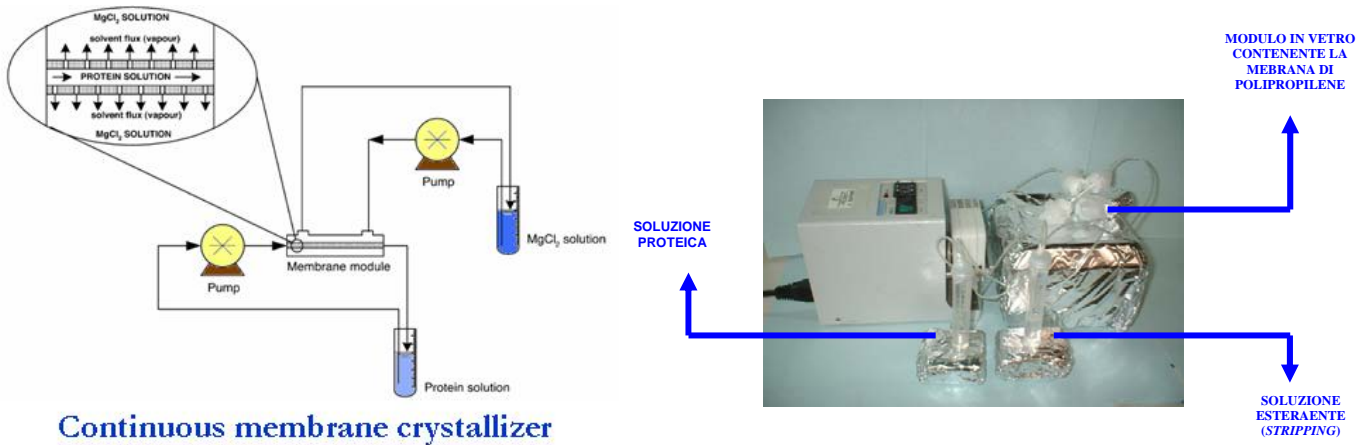


Figura 5. Sistema di cristallizzazione a membrana operante in regime di flusso forzato.

Il primo vantaggio del sistema a membrana, rispetto a tecniche tradizionali confrontabili, risiede nell’accelerazione del processo di cristallizzazione, come dimostrato dall’analisi delle principali grandezze cinetiche: tempo di induzione, velocità di nucleazione, e velocità di crescita [33]. Infatti, nel sistema di cristallizzazione a membrana, sia statico che dinamico, si combina la duplice natura idrofoba e porosa della superficie della membrana per indurre la cristallizzazione di proteine in condizioni di sovrassaturazione che altrimenti non sarebbero adeguate per l’innesco del processo di nucleazione. Tale duplice natura del substrato polimerico, che funge cioè da promotore di nucleazione eterogenea, consente di ottenere cristalli proteici utilizzando piccole quantità di sostanza (Figura 6). La comparsa di cristalli in tempi estremamente ridotti ha dimostrato l’efficacia delle interazioni macromolecola-superficie sul meccanismo di formazione e crescita dei nuclei cristallini.

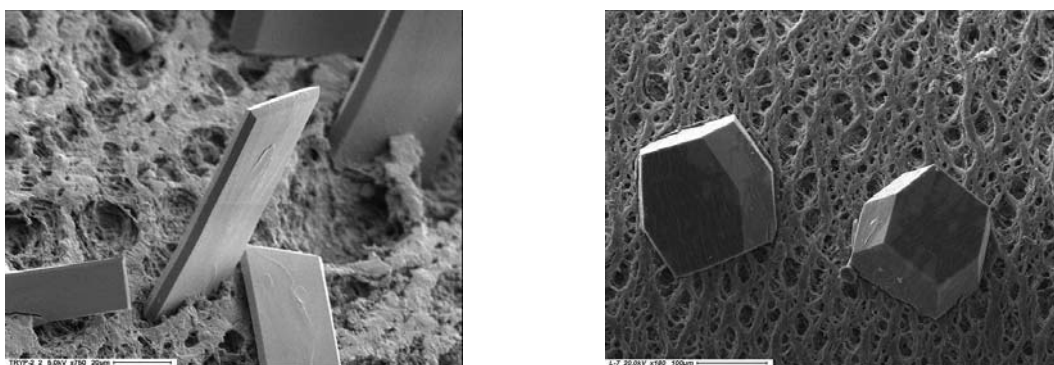


Figura 6. Cristalli proteici cresciuti sulla superficie di una membrana polimerica in un sistema di cristallizzazione a membrana.

Le interazioni superficie-macromolecola risultano quindi di fondamentale importanza nel processo di cristallizzazione condotto nel sistema a membrana, in quanto opportuni *constrains* di natura cinetica sono in grado di governare il meccanismo di cristallizzazione e indirizzare le interazioni macromolecola-macromolecola, con conseguenti effetti sulle proprietà finali dei cristalli. La possibilità di agire sulla soluzione di *stripping* consente inoltre di intervenire sulla velocità di estrazione del solvente e quindi, portando il sistema nelle differenti regioni del suo diagramma di fase corrispondenti a condizioni termodinamiche opportune, sulle cinetiche di crescita, controllando la morfologia del materiale cristallino prodotto [34,35]. Il sistema a membrana, nella configurazione dinamica, consente di orientare le macromolecole nella direzione del flusso, così da avere una più efficace interazione fra le stesse molecole, con la conseguente formazione di cristalli strutturalmente “migliori”. In tale configurazione è possibile ottenere cristalli dalle dimensioni notevolmente uniformi e di forma controllabile, agendo sulla fluidodinamica del processo. Ciò rende il sistema particolarmente interessante nella prospettiva di una sua applicazione su scala industriale per la produzione di catalizzatori biologici.

Obiettivi programmatici e descrizione del lavoro

L'interazione tra le molecole proteiche e la superficie polimerica può dar luogo ad interazioni privilegiate che possono fornire “finestre cineticamente favorite” sì da indirizzare il meccanismo di cristallizzazione verso la formazione di particolari abiti cristallini o di specifiche forme polimorfe. Con la determinazione dell'energia di superficie (attraverso misure di tensione superficiale ed angolo di contatto soluzione/membrana) sarà possibile quantificare il contributo alla riduzione dell'energia di attivazione per il processo di nucleazione, dovuto al substrato eterogeneo (materiale poroso idrofobo), in dipendenza dalle proprietà del materiale di membrane utilizzato. Saranno quindi utilizzate membrane caratterizzate da differenti proprietà chimico-fisiche di superficie. Tali informazioni, in congiunzione con le caratterizzazioni morfologiche e strutturali relative ai differenti abiti cristallini ed alle differenti forme polimorfe ottenibili, consentirà di individuare il differente meccanismo di cristallizzazione di una proteina modello, nelle diverse condizioni sperimentali relative a: (i) composizione della soluzione proteica (livello di supersaturazione, tipo di additivi, proprietà e pH dei tamponi utilizzati, etc.); (ii) parametri di processo (portata assiale, flusso trans-membrana, viscosità, etc.); (iii) proprietà della superficie della membrana utilizzata. Tale studio sarà inoltre relazionato a possibili effetti degradativi potenzialmente agenti sul materiale proteico, quantificando l'attività biologica della proteina stessa tenendo conto di un suo possibile impiego in processi di catalisi eterogenea. Come proteina modello sarà utilizzata la tripsina pancreatica estratta sia da pancreas bovino che suino. Tali proteine sono commercialmente reperibili, di costo non elevato, sono cristallizzabili in condizioni sperimentali ampiamente note in letteratura, e rivestono un ruolo fondamentale in campo biochimico e biotecnologico. Inoltre, per la prima proteina (tripsina pancreatica bovina), sono note 3 forme polimorfe: ortorombica aperta, ortorombica chiusa e trigonale [36], ottenibili in differenti condizioni operative, mentre la seconda (tripsina pancreatica suina) cristallizza in un'unica forma.

Come accennato in precedenza, operando con il sistema di cristallizzazione a membrana dinamico, la condizione di flusso assiale in regime laminare, consente di creare un ambiente per l'aggregazione dei nuclei cristallini e per la loro successiva crescita attraverso una più regolare organizzazione delle macromolecole, con la conseguente formazione di cristalli con maggiore potere diffrangente e quindi strutturalmente “migliori”. Obiettivo del lavoro sarà quindi, utilizzando opportuni parametri diffrattometrici (es. massima risoluzione, $\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$, R_{merge}), ottenuti da analisi di diffrazione ai raggi X, confermare tali effetti migliorativi dovuti al flusso forzato e determinare la relazione esistente fra le proprietà fluidodinamiche maggiormente influenti sul processo di cristallizzazione a membrana, quali la portata assiale, il flusso trans-membrana, la viscosità delle

soluzioni, etc., e la qualità strutturale dei cristalli prodotti. Il sistema macromolecolare tripsina pancreatica rappresenta ancora un sistema modello da utilizzare a tale scopo.

La possibilità di combinare le proprietà di idrofobicità e porosità della superficie della membrana nel processo di cristallizzazione, sia statico che dinamico, consente di impiegare il supporto polimerico come promotore di nucleazione eterogenea. In questo modo, risulta possibile la cristallizzazione anche in condizioni operative lontane rispetto ai valori di supersaturazione normalmente richieste per la nucleazione e la crescita "spontanea". Sarà possibile quindi realizzare un ampio screening iniziale, con una quantità di materiale proteico ridotta rispetto a quella richiesta da altre tecniche convenzionali, per l'individuazione delle condizioni ottimali di cristallizzazione di altri sistemi proteici non ancora prodotti in fase cristallina o di particolare interesse bio-tecnologico. Il contributo della superficie polimerica al processo di cristallizzazione potrebbe coadiuvare il meccanismo di interazione macromolecolare già dalle prime fasi di aggregazione, consentendo di cristallizzare proteine non ancora cristallizzate e/o non cristallizzabili con tecniche convenzionali. Particolare attenzione verrà rivolto in tal senso allo studio della famiglia della anidraasi carboniche, che rappresenta un'interessante target per numerosi gruppi di ricerca, grazie ai numerosi processi fisiologici e fisiopatologici in cui questi enzimi sembrano essere coinvolti. Gli isoenzimi delle anidraasi carboniche compiono funzioni diverse nei vari organi, e la loro assenza o il loro cattivo funzionamento possono condurre a stati di malattia, che vanno dalla mancanza di produzione di acido nello stomaco, al blocco renale, al glaucoma. La caratterizzazione strutturale, mediante diffrazione di raggi X, delle diverse isoforme della CA umana potrebbe consentire l'identificazione delle differenze strutturali tra i diversi isoenzimi e costituire la base per la progettazione razionale di nuove molecole. La cristallizzazione con tecniche convenzionali di alcuni isoenzimi appartenenti a tale famiglia fino ad ora non ha portato a risultati. L'applicazione delle tecniche di cristallizzazione a membrana potrebbe quindi rivelarsi estremamente utile in questo caso.

Sintesi dei risultati attesi

Attraverso il presente programma di ricerca ci si propone di sviluppare nuove tecniche di cristallizzazione da applicarsi a macromolecole di interesse biologico e biotecnologico. Si procederà allo studio teorico-sperimentale del processo di cristallizzazione condotto in sistemi basati sull'impiego di membrane polimeriche microporose e idrofobe, operanti sia in condizione "statiche" che "di flusso forzato", analizzando le relazioni fra le varie grandezze maggiormente influenti sul processo e le cinetiche di cristallizzazione. Attraverso lo studio dei parametri sia fluidodinamici (quali la portata assiale, il flusso trans-membrana, la viscosità delle soluzioni) che relativi alle proprietà delle membrane (energia di superficie, dimensione dei pori, porosità, rugosità, etc.) si investigheranno gli effetti sul processo di cristallizzazione e, di conseguenza, sulle caratteristiche dei materiali cristallini prodotti. Si procederà quindi alla loro caratterizzazione morfologica attraverso analisi di microscopia ottica, microscopia elettronica, microscopia a forza atomica, che, in congiunzione con le attività di caratterizzazione strutturale e di attività biologica, consentiranno di sviluppare metodologie di cristallizzazione proteica altamente efficienti e controllabili.

Tutti i risultati ottenuti saranno oggetto di pubblicazione su riviste scientifiche appropriate e/o presentati in congressi nazionali ed internazionali di interesse specifico sull'argomento.

Costi del progetto

Le risorse necessarie per l'esecuzione del progetto di ricerca sono descritte nella tabella sotto indicata:

Descrizione	Costo/Euro
Proteine commerciali	450
Agenti precipitanti; tamponi; additivi vari	400
Materiale bibliografico	100
Reagenti e materiali per la caratterizzazione dei cristalli, saggi enzimatici, elettroforesi, etc.	250
Materiale di uso comune da laboratorio: beakers, beute, cilindri, provette, etc.	250
Acquisto di un computer per l'elaborazione dei dati sperimentali	1216,66
Partecipazione ad un convegno internazionale su argomenti di interesse specifico	1.100
Membrane commerciali in configurazione piana e capillare	400
Totale	4.166,66

Referenze

- [1] Grande Dizionario Enciclopedico, UTET, vol. VI, 1993.
- [2] Mersmann, A., Crystallization Technology Handbook, II edizione, 2001, Ed. Marcel Dekker.
- [3] Mullin, J.M., Crystallization III edizione, 1993, Ed. Butterworth-Heinemann.
- [4] <http://dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/science/2005/j.dalmolen/c2.pdf>
- [5] Florence, A.T., Attwood, D., Le basi chimico-fisiche della tecnologia farmaceutica, 2002, EdiSES.
- [6] McPherson, A., Methods 2004, 34, 254-265.
- [7] Vuolanto, A., Technical Biochemistry Report 2004.
- [8] Margolin A. L., Navia, M. A., Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 2204-2222.
- [9] McPherson, A., Crystallization of Biological Macromolecules, 1999 Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [10] Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissing, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.N., Nucleic Acids Res. 2000, 28, 235-242.
- [11] <http://www.rcsb.org/pdb>
- [12] Balestrieri, C., Progetto chimica, 1997, Ed. Ferraro
- [13] Govardhan, C.P., Curr. Opin. Biotechnol. 1999, 10, 331-335.
- [14] Margolin, A.L., Trends Biotechnol. 1996, 14, 223-230.
- [15] Roy, J.J., Abraham, T.E., Chem. Rev. 2004, 104, 3705-3721.
- [16] Pande, A., Pande, J., Asherie, N., Lomakin, A., Ogun, O., King, J., Benedek, G.B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001, 98, 6116-6120.
- [17] Klassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J., Tossicologia, i fenomeni dell'azione delle sostanze tossiche quinta edizione italiana 2000, Ed E. M. S. I., Roma.
- [18] Braatz, R.D., Annu. Rev. Control 2002, 26, 87-99.
- [19] Doye, J.P.K., Louis, A.A., Vendruscolo M., Phys. Biol. 2004, 1, 9-13.
- [20] Vekilov, P.G., Feeling-Taylor, A.R., Petsev, D.N., Galkin, O., Nagel, R.L., Hirsch, R.E., Biophys. J. 2002, 83, 1147-1156.
- [21] Smatanová, I.K., Materials Structure 2002, 9, 14-15.
- [22] Wiencek, J.M., Annu. Rev. Biomed. Eng. 1999, 1, 505-534.
- [23] Lu, J., Wang, X.-J., Ching C.-B., Prog. Cryst. Growth 2002, 45, 201-217.
- [24] D'Arcy, A., Mac Sweeney, A., Haber A., Methods 2004, 34, 323-328.
- [25] Drioli, E., Di Profio, G., Fontananova, E., Fluid/Particle Sep. J. 2004, 16, 1-18.

- [26] Drioli, E., Curcio, E., Di Profio, G., Chem. Eng. Res. Des. 2005, 83, 223-233.
- [27] Curcio, E., Criscuoli, A., Drioli, E., Ind. Eng. Chem. Res. 2001, 40, 2679-2684.
- [28] Drioli, E., Curcio, E., Di Profio, G., Chem. Eng. Trans. 2002, 2, 927-932.
- [29] Curcio, E., Di Profio, G., Drioli, E., J. Crys. Growth 2003, 247, 166-176.
- [30] Curcio, E., Di Profio, G., Drioli, E., Desalination 2002, 145, 173-176.
- [31] Drioli, E., Curcio, E., Di Profio, G., Chem. Eng. Trans. 2002, 2, 933-938.
- [32] Curcio, E., Simone, S., Di Profio, G., Drioli, E., Cassetta, A., Lamba, D., J. Memb. Sci., 2005, 257, 134-143.
- [33] Di Profio, G., Curcio, E., Cassetta, A., Lamba, D., Drioli, E., J. Crys. Growth 2003, 257, 359-369.
- [34] Di Profio, G., Curcio, E., Drioli, E., J. Struct. Biol., 2005, 150, 41-49.
- [35] Di Profio, G., Perrone, G., Curcio, E., Cassetta, A., Lamba, D., Drioli, E., Ind. Eng. Chem. Res. 2005, 44, 10005-10012.
- [36] Rauh, D., Reyda, S., Klebe, G., Stubbs, M.T. Biol. Chem. 2002, 383, 1309-1314.

Rende, li

Dott. Gianluca Di Profio

Per presa visione - Il Direttore
del Dipartimento di Ingegneria
Chimica e dei Materiale, UNICAL