## CHIMICA & ISA 2008



Michele lafisco<sup>1,2,</sup> Barbara Palazzo<sup>1,2,</sup> Norberto Roveri<sup>1</sup> <sup>1</sup>Laboratorio di Strutturistica Chimica Biologica e Ambientale (LEBSC) Dipartimento di Chimica "G. Ciamician" Università di Bologna <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Università del Piemonte Orientale (NO) michele.iafisco@unibo.it barbara.palazzo2@unibo.it norberto.roveri@unibo.it

## **INTERAZIONE TRA PROTEINE** E SUBSTRATI INORGANICI BIOMIMETICI

Un aspetto fondamentale per la realizzazione di materiali e "device" biomedici è un'ottima conoscenza di come queste strutture interagiscono con l'organismo. Le proteine rappresentano dei "probes" efficaci per testare questa interazione su scala nanometrica.

tessuti biologici sono i soli sistemi in grado di agire appieno come "materiali funzionali" [1]. Solo recentemente si è cominciato a realizzare "bio-inspired materials" sintetici in grado di riprodurre, seppure in parte, le specifiche funzionalità dei tessuti biologici [2].

Le funzioni di questi ultimi, caratterizzati da un'alta gerarchia strutturale, non possono essere facilmente comprese e quindi riprodotte senza doverne studiare la struttura nei vari livelli gerarchici fino all'ordine di nanometri. La nanodimensione dei componenti strutturali più piccoli dei tessuti biologici è alla base della loro capacità di auto-organizzarsi ed auto-assemblarsi, per cui è di fondamentale importanza riprodurla ai fini della sintesi di strutture biomimetiche con un'organizzazione gerarchica controllata [3]. In quest'ambito, una delle linee di ricerca del Laboratorio di Strutturistica Chimica Ambientale e Biologica (LEBSC) dell'Università di Bologna è focalizzata sulla sintesi di biomateriali inorganici e polimerici nanostrutturati che possano agire come trasportatori di farmaci e come "scaffolds" biomimetici per l'ingegneria tissutale [4-6].

In particolare, tra i materiali osseo-sostitutivi l'idrossiapatite nanometrica ( $Ca_5(PO_4)_3OH$ ), che è la fase inorganica caratteristica delle ossa e dei denti dei mammiferi, rappresenta uno dei materiali che apre maggiori prospettive applicative [7]. Le dimensioni, la morfologia, il grado di cristallinità e le proprietà superficiali sono i parametri chimico-fisici più importanti che devono essere modulati per ottimizzare le specifiche applicazioni biomediche dell'apatite sintetica. Il LEBSC negli ultimi anni ha realizzato sintesi di idrossiapatite ottimizzata in tutte queste proprietà ed in grado di mimare in tutti questi aspetti l'idrossiapatite naturale (Fig. 1) [8]. La realizzazione di biomateriali e di "device" biomedicali non può essere effettuata senza un'appropriata conoscenza di come questi materiali interagiscano con i tessuti e con gli organi biologici. L'interazione superficiale del biomateriale con l'ambiente biologico, ed in particolare con la componente proteica, è il primo e più importante evento nell'integrazio-



Fig. 1 - Immagini ottenute mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) di nanocristalli apatitici con diverse caratteristiche dimensionali e morfologiche (A-C). Le scale bar sono rispettivamente 50 nm (A), 200 nm (B), e 20 nm (C). Immagini ad alta risoluzione (HRTEM) di nanocristalli sintettici con caratteristiche simili alla fase apatitica del tessuto osseo (particolare a C e D)

ne di un dispositivo biomedico nell'organismo [9]. Diventa perciò fondamentale lo studio *in vitro* dell'interazione dei biomateriali di sintesi con le proteine del siero. A questo scopo le tecniche spettroscopiche, quali UV-Vis, Raman, FT-IR e dicroismo circolare, hanno una notevole potenzialità al fine di analizzare le eventuali modificazioni conformazionali delle biomolecole indotte dall'interazione con il biomateriale [10, 11].

In particolare, il LEBSC si è dedicato allo studio di come la mioglobina, la seconda proteina più abbondante nel siero, interagisca con l'idrossiapatite nanostrutturata [10].

Attraverso l'uso di tecniche spettroscopiche quali UV-Vis e SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) si è evidenziato che a causa dell'interazione con i nanocristalli di idrossiapatite, lo stato di spin del ferro dell'eme, la parte prostetica della mioglobina, passa da esa-coordinato alto spin a esa-coordinato basso spin, nonostante lo stato di ossidazione del ferro rimanga inalterato. Lo stato di spin dell'eme della mioglobina è una proprietà di notevole rilevanza in campo biologico, essendo responsabile dell'attività catalitica della proteina. Le modificazioni conformazionali della mioglobina appaiono rilevanti a tempi di interazione con l'idrossiapatite superiori alle 72 ore. Infatti la concentrazione di mioglobina alterata raggiunge valori rilevabili tramite spettroscopia UV solo dopo tre giorni di interazione. Questi cambiamenti sembrano essere irreversibili fintanto che la mioglobina è in soluzione con i nanocristalli. La proteina torna alla propria conformazione nativa quando perde il contatto con il substrato inorganico. Questo ci ha permesso di evidenziare come i cambiamenti conformazionali siano di tipo dinamico. Il tempo impiegato dalla proteina per tornare allo stato nativo è dell'ordine di qualche ora, tempo sufficiente ad effettuare le analisi spettroscopiche per studiarla nella conformazione modificata.

L'interazione mioglobina-idrossiapatite si suppone essere di tipo elettrostatico. Grazie alla ricostruzione della mappa di potenziale elettrostatico della mioglobina, calcolata a pH fisiologico (Fig. 2) è stato possibile individuare una zona con cui molto probabilmente la proteina stessa interagisce con i nanocristalli di idrossiapatite. In tale zona, caratterizzata da un potenziale elettrostatico fortemente positivo, è ubicato il gruppo eme della proteina. Tale zona viene probabilmente attratta dalla superficie dei nanocristalli di apatite che, essendo poco cristallini e disordinati superficialmente, sono altamente reattivi, con un potenziale superficiale negativo. Sulla base di ciò, il meccanismo di interazione ipotizzato è di tipo preferenziale mentre quelli osservati su altri supporti inorganici sono meccanismi casuali [12].

Si è reso evidente quindi come la superficie dei nanocristalli sia uno degli aspetti cruciali ai fini della loro interazione con l'ambiente biologico. Alla luce di ciò, questi studi potrebbero essere di fondamentale importanza non solo nell'ambito dei biomateriali ma anche nell'ambito della catalisi eterogenea per valutare l'idrossiapatite sintetica nanostrutturata come potenziale materiale per il supporto di enzimi ed in ambito analitico per utilizzare i nanocristalli in colonne cromatografiche per la separazione di proteine.



Fig. 2 - Rappresentazione grafica della distribuzione delle cariche superficiali della mioglobina a pH 7,4. Gli atomi del gruppo eme sono rappresentati come sfere. I valori di potenziale elettrostatico sono rappresentati in scala da +10 kT/e (blu), 0 kT/e (bianco) a -10 kT/e (rosso)

## **Bibliografia**

- H.A. Lowestan, S. Weiner, On Biomineralization, Oxford University Press, New York, 1989.
- [2] C. Sanchez et al., Nat. Mater., 2005, 4, 277.
- [3] N. Roveri, B. Palazzo, Nanotechnologies for the Life Science, Challa S.S.R. Kumar (Ed.), Wiley-VCH, 2006, 9, 283.
- [4] B. Palazzo et al., Adv. Funct. Mater., 2007, 17, 2180.
- [5] D. Tigani et al., J. Mater. Sci. Mater. Med., 2008, 19, 1325.

- [6] I. Foltran et al., Macromol. Symp., 2008, 269, 111.
- [7] S.V. Dorozhkin, M. Epple, Angew. Chem. Int. Ed., 2002, 41, 3130.
- [8] N. Roveri et al., Expert Opin. Drug Deliv., 2008, 8, 861.
- [9] J.J. Gray, Curr. Opin. Struct. Biol., 2004, 14, 110.
- [10] M. lafisco et al., Langmuir, 2008, 24, 4924.
- [11] P. Sabatino et al., J. Colloid Interface Sci., 2007, 314, 389.
- [12] A. Kondo, J. Mihara, J. Colloid Interface Sci., 1996, 177, 214.

## Interaction between Proteins and Biomimetic Inorganic Substrates

Biomimetic hydroxyapatite nanocrystals represent an ideal bone-substitute material; the clarification of their interaction with proteins is fundamental to understanding the integration of an implanted device or biomaterial with a tissue. Investigations of nano-materials/protein interaction could find application in heterogeneous catalysis and chromatographic protein separation. This study has pointed out how apatitic nanostructured biomimetic substrates affect the conformation of myoglobin.

81