

ATTIVAZIONE AD ARTICOLO SPERIMENTALE DI UNA *FACILITY* DI BIOCRISTALLOGRAFIA PRESSO L'ISTITUTO DI BIOLOGIA E PATOLOGIA MOLECOLARI DEL CNR IN COLLABORAZIONE CON IL DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOCHIMICHE DELLA SAPIENZA E L'*EUROPEAN SYNCHROTRON RADIATION FACILITY*.

INDICE DEI CONTENUTI

Razionale ed obiettivi
Articolazione della *Facility*
Competenze, risorse e capacità
Comitato scientifico
Modalità di accesso alla *Facility*
Disseminazione
Utenza e interazioni

RAZIONALE E OBIETTIVI

La biologia strutturale è un ambito di ricerca multidisciplinare, al confine tra biofisica, biochimica, biologia molecolare e bioinformatica con fondamentali applicazioni in ambito biomedico e biotecnologico.

La tecnologia fondamentale nel campo della biologia strutturale è la **cristallografia di macromolecole**. Grazie a significativi avanzamenti tecnologici nel campo delle sorgenti di luce di sincrotrone, dell'espressione di proteine ricombinanti e di automazione per la crescita di cristalli di proteine, essa è **alla portata dei gruppi di ricerca in ambito di biologia molecolare**. In pratica tuttavia l'accesso a queste tecnologie ed alle grandi *Facilities* internazionali a disposizione della comunità scientifica italiana è **attualmente inferiore alle disponibilità**, soprattutto nella prospettiva di programmi europei strategici quali *Horizon 2020*.

E' quindi di fondamentale importanza che vengano poste in essere delle **strutture di raccordo tra le grandi strutture di biologia strutturale e l'utenza scientifica potenziale italiana**, allo scopo di **incrementare l'utilizzo** da parte di ricercatori nel campo delle scienze della vita a tali *Facilities*. Tali strutture dovranno **collaborare con gli utenti nei passaggi del processo di determinazione della struttura** (scelta del costrutto, produzione della proteina, cristallizzazione, raccolta ed analisi dati). E' necessario inoltre ampliare la comunità di utenti delle grandi *Facilities* di biologia strutturale mediante una funzione di **training e di disseminazione**.

Nel quadro del Progetto FareBio di Qualità è stata attivata una **Facility di biocristallografia** che offre alla rete scientifica del CNR l'accesso facilitato a costi molto bassi alla generazione ed interpretazione di biocristalli. L'obiettivo e' quello di **aumentare la comunità di utenti italiani** di *Facilities* europee quali l'*European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF), *Instruct* e *Partnership for*

Structural Biology, e quindi **l'impatto del CNR stesso nel campo della biologia strutturale**. Verrà perseguita una stretta **collaborazione con ESRF**, anche effettuando *training* congiunto a livello dottorale e post-dottorale presso le strutture ESRF, *Partnership for Structural Biology, Instruct* e *BioStruct-X*. Tale azione si inquadra nell'ambito della linea *Horizon 2020* che si propone di stimolare l'accesso alle infrastrutture Europee di ricerca avanzata.

La *Facility* funzionerà presso l'Istituto di Biologia e Patologia Molecolari (IBPM) del CNR, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Biochimiche "A. Rossi Fanelli" della Sapienza Università di Roma. Nella fase di avvio la *Facility* sarà rivolta alla rete scientifica del CNR ed in particolare ai gruppi che afferiscono al progetto FaReBio di Qualità.

ARTICOLAZIONE DELLA FACILITY

L'articolazione della *Facility* proposta si basa su un'attività di consulenza pratica e teorica nelle fasi critiche fondamentali di progetti di biologia strutturale, e di disseminazione e *training*.

1. Inquadramento del progetto biomedico o biotecnologico nell'ambito della biologia strutturale: definizione delle finalità e delle questioni puntuali.
2. Consulenza nella produzione e purificazione di proteine.
3. Prove di cristallizzazione robotizzate, loro analisi ed ottimizzazione in una prima fase presso la *Facility*, successivamente presso centri *Instruct* attualmente non ancora aperti all'utenza esterna.
4. Raccolte dati di diffrazione di raggi-X presso sorgenti di luce di sincrotrone (ESRF).
5. Determinazione della struttura tridimensionale e sua analisi (in collaborazione scientifica).
6. Assistenza e formazione di personale, in collaborazione con ESRF e con i gruppi di biologia molecolare, per la determinazione ed analisi della struttura tridimensionale di proteine e loro complessi funzionali.

1-Inquadramento del progetto biomedico o biotecnologico nell'ambito della biologia strutturale: definizione dei *target* e delle questioni puntuali.

Il gruppo di biocristallografia dispone di competenze multidisciplinari avanzate, atte ad inquadrare le linee di ricerca all'interno della biologia strutturale.

Come prima fase del progetto è necessario studiarne la **fattibilità**, definire i *target* potenziali ed individuare i **costrutti proteici ed i complessi cristallizzabili**.

Nell'ambito del gruppo di biocristallografia sono disponibili 9 unità di personale (in parte del CNR ed in parte dell'Università) in grado di effettuare tale opera fondamentale di consulenza, sostanziale per il successo della determinazione strutturale.

Verranno privilegiati canali di comunicazione telematica (teleconferenze, mail) per l'interazione tra gli esperti della *Facility* e gli utenti.

Lo scopo di questa fase sarà l'inquadramento del problema scientifico nell'ambito della biologia strutturale, evidenziandone le potenzialità e gli aspetti critici.

Nella nostra esperienza, è di fondamentale importanza avere un quadro quanto più possibile completo dei dati funzionali già esistenti sulla proteina prodotti dai richiedenti il servizio o disponibili in banche dati pubblicamente accessibili (stabilità, omogeneità, presenza di ligandi e caratteristiche della formazione di complessi).

Altrettanto importante è l'analisi preliminare della sequenza del *target* per individuarne l'appartenenza a famiglie strutturali già note ed ottenere informazioni circa l'architettura, ovvero la sua strutturazione in domini, ed anche riguardo alla presenza ed alla localizzazione di regioni in grado di assumere una struttura tridimensionale regolare e di quelle presumibilmente non strutturate nella proteina nativa.

In questo senso è un elemento di forza della *Facility* la presenza di competenze in ambito bioinformatico, grazie alle quali si possono ottenere informazioni dettagliate circa le proprietà suddette mediante ricerche in banche dati di sequenze e strutture effettuate con i metodi più sofisticati attualmente disponibili.

2-Consulenza nella produzione e purificazione di proteine.

Una volta scelto/i il/i costrutto/i, è in genere quasi sempre necessario definire strategie di clonaggio e purificazione specifiche per massimizzare l'espressione, la stabilità ed omogeneità del campione iniziale, così come conoscere parametri quali la stabilità nei confronti del pH e forza ionica per definire opportune strategie di cristallizzazione.

Definito il costrutto ed identificate le condizioni più idonee per la produzione e la purificazione della proteina *target*, la *Facility* richiederà agli utenti un quantitativo minimo di proteina per effettuare *screening* preliminari di cristallizzazione (1-2 mg), tali *screening* forniranno agli utenti le indicazioni necessarie per ottenere il campione nelle condizioni ottimali per le successive prove sistematiche di cristallizzazione.

3-Trials di cristallizzazione robotizzati e loro analisi ed ottimizzazione.

Gli utenti invieranno alla *Facility* un quantitativo iniziale di proteina, quantificabile in 5-10 mg, caratterizzata mediante gel elettroforesi, pura al 95-99%. Su tale campione verranno inizialmente eseguiti **screening di cristallizzazione a 20°C mediante piattaforma robotizzata** utilizzando 10 *screen* commerciali del tipo *sparse matrix*, per un totale di 960 condizioni indipendenti.

Tali prove verranno analizzate mediante un sistema di *imaging*, le immagini verranno anche trasmesse agli utenti e discusse con essi, allo scopo di **renderli indipendenti nella valutazione dei saggi di cristallizzazione.**

A seguito del primo *screening* di esplorazione ne verranno eseguiti altri, di ottimizzazione, per affinare le condizioni ed ottenere cristalli adatti alla raccolta di dati di diffrazione.

E' necessario sottolineare che **non è possibile prevedere con certezza se il *target* prescelto darà cristalli, anche dopo tentativi ripetuti**. Allo scopo di aumentare la probabilità che una proteina cristallizzi quasi sempre è necessario effettuare numerosi *screening* aggiuntivi in cui vengono esplorate variabili quali la temperatura e la concentrazione di proteina, l'aggiunta di ligandi. Inoltre verranno prese in considerazione l'omogeneità del campione di partenza (ritorno alla fase 2) e variazioni del costrutto genico iniziale (mutanti per delezione o sito-specifici, con un ritorno alla fase 1).

Per arrivare all'ottenimento di cristalli non è inusuale effettuare diverse migliaia di prove indipendenti oltre ad effettuare analisi mirate alla caratterizzazione del campione proteico quali spettrometria di massa, *light scattering*, HPLC analitico e dicroismo circolare.

Anche in questa fase è fondamentale un'interazione continua con gli utenti, che potranno effettuare analisi sulla proteina e condividere con gli esperti le informazioni sul sistema biochimico di interesse.

4-Raccolta dei dati di diffrazione di raggi-X presso sorgenti di luce di sincrotrone (ESRF).

La *Facility* prevede la raccolta di dati presso sorgenti di luce di sincrotrone, da effettuare da parte di personale della *Facility* alla quale potranno partecipare anche gli utenti, con cui si potrà effettuare un'apposita convenzione o altro accordo allo scopo di assicurare una rapida immissione in una *pipeline* di determinazione strutturale delle proteine *target* inviate dagli utenti.

La partecipazione degli utenti alle missioni presso il sincrotrone sarà strumentale per un'opera di *training* e di trasferimento di tecnologie, che incrementino l'accesso e la partecipazione del CNR alle strutture di ESRF.

Si sottolinea che il gruppo di biocristallografia fa già parte di un *Beamtime Allocation Group* (BAG) presso ESRF. Potrebbe essere necessario ridefinire l'accesso ad ESRF per assicurare regolarità nella raccolta dati.

L'*upgrade* "MASSIF" di ESRF prevede, tra l'altro, lo screening di prove direttamente su micropiastra di cristallizzazione che permetterà di guidare l'individuazione e l'ottimizzazione delle operazioni di *screening*, prima di passare a prove in macrovolumi da eseguire manualmente.

5-Determinazione della struttura tridimensionale e sua analisi (in collaborazione scientifica).

Questa fase di un progetto di biologia strutturale sarà svolta in una prima fase nell'ambito della *Facility*, ma nel caso in cui l'utilizzo della *Facility* da parte dell'utente sia continuativo, punta anche alla formazione di personale, in collaborazione con strutture europee che utilizzino sorgenti di luce di sincrotrone e con i gruppi di biologia molecolare, per la determinazione della struttura tridimensionale di proteine e loro complessi funzionali. Infatti, l'estrazione delle informazioni strutturali da tali dati è un processo complesso e non completamente automatizzabile, che richiede un *know-how* teorico approfondito e una conoscenza avanzata di *software* dedicati. E' necessario riempire questo *gap* di conoscenze specifiche che, insieme alla fase di ottenimento dei

cristalli, rappresenta il principale ostacolo alla diffusione delle metodologie di biologia strutturale nelle aree biologiche, biomediche e biotecnologiche.

Gli Utenti potranno effettuare la determinazione ed analisi della struttura anche indipendentemente o in collaborazione con altri gruppi, essendo esclusivi proprietari dei dati ottenuti ai punti 1-4.

6- Assistenza e formazione di personale, in collaborazione con ESRF e con i gruppi di biologia molecolare

Poiché il gruppo di biocristallografia del CNR-Sapienza potrà dedicarsi ad un numero ridotto di progetti, ci si propone di formare giovani ricercatori, a livello dottorale o post-dottorale alle metodologie esposte nei punti sopra elencati. Tale *training* potrà riguardare: a) personale inviato dagli utenti nell'ambito di specifici progetti; b) dottorandi o borsisti a livello post-dottorale che potranno anche trascorrere periodi presso i laboratori di ESRF; c) direttamente gli utenti (o loro borsisti) così da effettuare un trasferimento di tecnologie e competenze.

Verranno perseguiti l'istituzione di un programma di dottorato congiunto con ESRF ed il finanziamento di periodi di *secondment* presso ESRF, *Partnership for Structural Biology* e Centri *Instruct/Biostruct-X*.

COMPETENZE, RISORSE E CAPACITA'

Personale

Le attività saranno condotte dalle seguenti unità di personale strutturato, coordinate dalla Prof.ssa Beatrice Vallone.

CNR – IBPM

Prof.ssa Beatrice Vallone (Associato, Responsabile della Facility)

Prof. Alberto Boffi (Associato)

Dott. Andrea Ilari

Dott.ssa Carmelinda Savino

Dott.ssa Adele Di Matteo

Dott.ssa Veronica Morea

Dott. Gianni Colotti

Sapienza Università di Roma- Dip. Scienze Biochimiche

Prof.ssa Adriana Erica Miele

Dott.ssa Giovanna Boumis

Strumentazione

Piattaforma robotizzata Phoenix (Art Robbins) per effettuare prove di cristallizzazione con nanovolumi di proteina (Sapienza). Il robot di cristallizzazione è collocato in un ambiente a temperatura ed umidità controllata, dedicato esclusivamente alla cristallizzazione (20°C e 55%, rispettivamente).

Stereoscopio Leica Z12 a luce fredda dotato di telecamera digitale e piattaforma scorrevole, per il controllo non automatizzato delle prove di cristallizzazione.

Armadi termostatati a 21°C, 4°C e 37°C , con motori a prova di vibrazioni (Angelantoni).

Apparato computerizzato per saggiare l'effetto della temperatura sulle condizioni di cristallizzazione, TG40 (Centeo), capace di saggiare contemporaneamente 5 temperature differenti tra 2° e 60°C in *miniscreen* da 40 pozzetti.

Capacità

Le attuali unità di personale possono garantire di accogliere un numero limitato di richieste esterne, da decidersi in base alla tipologia delle richieste e visto il parere del Comitato Scientifico.

Le produttività in strutture e cristalli dipende dalla complessità del progetto, ad esempio mutanti e complessi di proteine già note possono condurre a strutture con tempi, costi ed investimento in tempo/persona in misura molto diversa rispetto alla determinazione *ex-novo* di una struttura proteica.

La Facility prevede di fornire i seguenti servizi (per anno di attività):

- 18 Studi fattibilità
- 10 progetti di cristallizzazione all'anno
- 5 ottimizzazioni manuali cristalli e raccolta dati
- 1-3 strutture
- *Training* di 1 dottorando/anno.

COMITATO SCIENTIFICO

Un Comitato Scientifico verificherà la congruità delle proposte presentate dagli utenti. Esso sarà composto da un biologo strutturale (Prof. A. Tramontano, Dip. Fisica, Sapienza), da un biologo molecolare (Dr. A. Luini IBP-CNR) e dal Responsabile della *Facility* (Prof. B. Vallone, IBPM-CNR e Dip. Scienze Biochimiche, Sapienza).

MODALITA' DI ACCESSO

L'accesso sarà semplice e informale. Sarà diviso in due fasi. Nella prima ci sarà un contatto diretto a scopo orientativo con uno dei membri *senior* della (via email, telefono, o skype). Nella seconda l'utente riempirà un modulo con una sintetica descrizione del progetto, che sarà valutato del Comitato Scientifico.

I progetti accettati seguiranno l'iter descritto sopra. Ad ogni utente verrà assegnato un **responsabile scientifico** che si occuperà di redigere lo studio di fattibilità e di coordinare le operazioni di cristallizzazione e di raccolta dati.

La *Facility* interagirà con gli utenti mediante un apposito **sito web**, attraverso il quale saranno disponibili materiali relativi al singolo progetto quali immagini di

prove di cristallizzazione, dati di diffrazione e risultati di eventuali analisi di stabilità e monodispersione dei campioni proteici. Si privilegerà la modalità di **videoconferenza** per periodici aggiornamenti sull'andamento di ciascun processo di cristallizzazione.

DISSEMINAZIONE

E' essenziale che venga effettuata un'**attività di disseminazione** delle conoscenze relative alla biocristallografia e dell'attivazione della *Facility* ~~del~~ relativa, a questo scopo proponiamo che la *Facility* venga annunciata e descritta in **sedi istituzionali del CNR** (Convegni, Sito web, invio di documentazione agli utenti potenzialmente interessati) e che vengano organizzati **corsi** mirati all'evidenziazione delle potenzialità della biocristallografia nell'ambito degli specifici progetti di ricerca.

UTENZA ED INTERAZIONI

Saranno favorite le interazioni con altri Progetti del CNR, inclusi PON e POR. Previo assenso del Comitato Scientifico, è previsto l'accesso di gruppi della Sapienza. Verranno considerati anche altri Atenei e soggetti *no profit*, con la partecipazione alle spese di gestione dei singoli progetti. L'accesso a pagamento per altri tipi di utenza necessiterà di accordi specifici, anche relativamente all'accesso a *Facilities* di sincrotrone (ESRF).

VALUTAZIONE PERIODICA

Il funzionamento e le caratteristiche di uso della *Facility* verranno esaminati annualmente dal Comitato Scientifico che stilerà un *report* da sottomettere agli organi competenti del CNR.