



Proteomica e beni culturali: nuove prospettive per il restauro e la storia dell'arte *

GENNARO MARINO

1. Summary

The identification of proteinaceous components in paintings remains a challenging task for several reasons. In addition to the minute amount of sample available, complex and variable chemical composition of the paints themselves, possible simultaneous presence of several binders and contaminants, and degradation of the original materials due to aging and pollution are complicating factors. We proposed proteomic strategies for the identification of proteins in binders of paintings that can be adapted to overcome the requirements and difficulties presented by specific samples. In particular, we worked on:

- a) the development of a minimally invasive method based on the direct tryptic cleavage of the sample without protein extraction;
- b) the use of microwave to enhance the enzymatic digestion yield, followed by the analysis of the peptide mixtures by nanoLC–MS/MS with electrospray ionization (ESI).

Moreover, as an additional tool to tackle the problem of contaminating proteins, we exploited the possibility of generating an exclusion list of the mass signals that in a first run had been fragmented and that the mass spectrometer had to ignore for fragmentation in a subsequent run. The methods, tested on model samples, allowed the identification of milk proteins in a sample from paintings attributed to Cimabue and Giotto, thirteenth-century Italian masters, decorating the vaults

* Prolusione tenuta durante l'inaugurazione del 229° anno accademico. Roma, 14 aprile 2011 presso la biblioteca dell'Accademia.

of the upper church in the Basilica of St. Francis in Assisi, Italy. Proteomic strategies have been instrumental in the characterization of the aging and deterioration phenomena occurring to proteinaceous materials in works-of-art. Furthermore proteomic analysis identified deamidation at Asn and Gln as a further major deteriorating event occurred in the frescoes from the Camposanto Monumentale in Pisa. This work paves the way to the exploitation of proteomic strategies for the investigation of the molecular effects of aging and deterioration in historical objects. Results show that proteomic searches for deamidation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) could constitute a routine analysis for paintings or any artistic and historic objects where proteins are present.

2. Proteomica e beni culturali: nuove prospettive per il restauro e la storia dell'arte

I progetti di sequenziamento dei genomi hanno posto le basi per lo studio dei fenomeni biologici con metodologie globali, in generale descritte dal suffisso “omica”. Lo studio della globalità delle proteine, nella loro attualità funzionale, viene ormai comunemente indicato con la denominazione di “proteomica”. La proteomica si può definire lo studio *en ensemble* delle proteine mediante l'utilizzazione di tecniche analitiche avanzate e metodologie bioinformatiche.

Si riconosce al ricercatore australiano Marc Wilkins il merito di aver coniato nel 1994 il vocabolo “proteoma”, un acronimo di proteine e genoma, volendo con tale vocabolo intendere il complemento proteico espresso da un genoma, cioè l'intero complesso dei prodotti dell'espressione di un genoma. La proteomica pertanto può essere definita come lo studio, nella loro complessità, dei proteomi.

La proteomica si basa essenzialmente su due differenti passaggi analitici consecutivi costituiti dalla separazione delle proteine che costituiscono il proteoma e dalla loro successiva identificazione individuale. I primi studi, ora definibili di proteomica, si possono far risalire alla metà degli anni '70, tuttavia la nascita della moderna proteomica coincide con la possibilità d'accesso alle banche dati conseguenti al sequenziamento dei genomi e con l'evoluzione della spettrometria di massa che ha radicalmente cambiato i tempi ed i metodi d'analisi

dei proteomi. L'elevatissima sensibilità e l'ampio intervallo dinamico di analisi di questo tipo di strumentazione risponde, pienamente, alle esigenze delle analisi di specifiche proteine presenti solo in tracce in sistemi estremamente complessi quale è ad esempio il siero umano.

L'elettroforesi bidimensionale è stata la prima tecnica di separazione ortogonale, che sfrutta essenzialmente le due principali caratteristiche chimico-fisiche delle proteine, vale a dire la carica netta e il peso molecolare. Appare evidente che il sistema di separazione richiede un sistema d'identificazione rapida, sensibile ed affidabile delle specie proteiche così separate.

A partire dagli anni '90, grazie anche all'introduzione di nuovi accorgimenti strumentali, la spettrometria di massa si è imposta come strumentazione elettiva per l'identificazione delle proteine. L'identificazione di una proteina mediante spettrometria di massa avviene attraverso l'analisi dei peptidi generati utilizzando proteasi specifiche. In questo caso tuttavia i peptidi sono caratterizzati dalla loro massa attraverso la determinazione, effettuata dallo spettrometro di massa, dei loro pesi molecolari.

Il principio dell'identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa è abbastanza semplice e si basa sull'osservazione che proteine con una diversa sequenza amminoacidica, in seguito all'azione di una proteasi, generano un insieme discreto di peptidi, definiti dalla loro massa, che è unico per quella proteina.

Questi valori di massa sono paragonati, per mezzo di opportuni programmi facilmente disponibili in rete, con le masse teoriche dei peptidi ottenuti simulando una digestione proteica dello stesso tipo di quella utilizzata dallo sperimentatore su tutte le sequenze proteiche presenti nelle banche-dati. Il programma fornisce il risultato come punteggio di probabilità statistica, punteggio che risulterà tanto più elevato quanto maggiori ed accurati saranno i dati sperimentali. Per questo tipo d'analisi è utilizzato come sistema di ionizzazione il MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) in cui si sfrutta la radiazione laser per indurre la produzione di ioni molecolari protonati degli analiti opportunamente incorporati in matrici di natura organica.

Di solito le sorgenti MALDI sono accoppiate con analizzatori a tempo di volo (Time Of Flight, TOF) che misurano il rapporto massa/carica degli ioni generati nella sorgente sulla base del tempo che questi impiegano nel percorrere uno spazio definito in assenza di

campi elettrici e magnetici. Utilizzando spettrometri di massa dotati di un secondo analizzatore, è possibile ottenere uno spettro di massa dei frammenti dei peptidi separati con il primo analizzatore e quindi dallo spettro di frammentazione risalire alla sequenza amminoacidica. La successione degli eventi analitici può essere considerata la seguente:

- a) il primo analizzatore dello spettrometro di massa separa i peptidi, ottenuti per proteolisi della banda proteica di interesse, nella loro forma ionizzata;
- b) il secondo analizzatore separa i frammenti ottenuti da ciascun peptide ionizzato la cui frammentazione viene indotta in un'opportuna camera di collisione che, fisicamente, lo precede;
- c) dallo spettro di massa dei frammenti peptidici si deduce la sequenza del peptide.

Gli spettri di frammentazione si possono far risalire a frammentazioni statistiche del legame ammidico con la conseguente generazione di almeno due serie di ioni che ritengono la carica o sulla parte N-terminale o su quella C-terminale e che consentono la ricostruzione non ambigua della sequenza.

Gli spettrometri di massa che ora consentono analisi di questo tipo si sono nel tempo evoluti in termini di complessità, e quindi di costi e di dimensioni, e di sensibilità. Dagli strumenti dotati di due analizzatori magnetici (tandem MS) della metà degli anni '80, si è passato a quelli dotati di più analizzatori di tipo quadrupolo (Q), di trappola ionica (IT o FT-ICR), di quadrupolo e TOF ortogonale (Q-TOF) e di due analizzatori a tempo di volo (TOF-TOF). Occorre notare che negli strumenti dotati di analizzatori quadrupolari si usa la sorgente a ionizzazione per elettro-nebulizzazione o "Electro-Spray Ionization" (ESI). In questo tipo di sorgente gli analiti in soluzione vengono introdotti attraverso un capillare nella sorgente stessa che, per effetto combinato del vuoto spinto e di un'opportuna differenza di potenziale, genera dal campione nebulizzato ioni a carica multipla. Questo tipo di sorgente è stata successivamente ottimizzata con l'introduzione del sistema "nanospray" che, facendo uso di un microcapillare con flussi di qualche nl/min, consente un tempo di residenza in sorgente dell'analita dell'ordine dei minuti con un notevole incremento del rapporto segnale/rumore. Gli spettrometri ES-nanospray con i doppi analizza-

tori, in particolare quadrupolo e tempo di volo ortogonale, collegati ad un cromatografo capillare hanno rivoluzionato la pur breve storia della proteomica. E' da sottolineare che, una volta riconosciuta l'enorme potenzialità di questo sistema, molti ricercatori hanno valutato l'opportunità di non utilizzare più l'elettroforesi bidimensionale come sistema di separazione ed hanno suggerito e messo a punto nuove metodologie di separazione che meglio si integrano con questo potente sistema di analisi. Occorre dire che il campo è soggetto a frequenti, direi frenetiche, innovazioni sia nel campo strumentale che nelle metodologie chimiche e biochimiche che consentono di affrontare, con sempre più sensibili e raffinati metodi, importanti problematiche non solo di carattere biologico.

Il mio gruppo di ricerca ha iniziato ad impegnarsi in questo campo fin dal 1968 ed in questa occasione mi piace ricordare un episodio che mi riguarda personalmente e che ha costituito le premesse per la creazione di una scuola di proteomica molto apprezzata non solo in Italia.

Grazie all'intuizione del professore Alessandro Ballio, di cui oggi festeggiamo con letizia di tutta l'Accademia il novantesimo compleanno, l'Università di Napoli Federico II si dotò alla fine degli anni '60 di uno degli spettrometri di massa più avanzati allora disponibili sul mercato. Il prof. Ballio, allora professore di chimica delle Sostanze naturali, mi comunicò nell'ottobre del 1966 la notizia del finanziamento ottenuto dal CNR e mi invitò anche a studiare i principi e le applicazioni di questa tecnica, allora limitate a sostanze organiche a basso peso molecolare. Qualche mese dopo mi informò di aver saputo da Edgar Lederer, direttore dell' Institut de Chimie des Substances Naturelles del C.N.R.S., che presso questo istituto, usando una macchina simile a quella che stava per arrivare a Napoli, avevano ottenuto la sequenza di un peptide e aggiunse che forse sarebbe stato utile un mio soggiorno presso il laboratorio di Gif-sur-Yvette. Non accolsi la notizia con eccessivo entusiasmo e gli ricordai il mio interesse per lo studio della sequenza delle proteine con metodi chimici. Ballio intuì questa mia perplessità e sbloccò le mie esitazioni con un lapidario: «E chi glielo dice che tra dieci anni non sarà possibile sequenziare anche una proteina con lo spettrometro di massa?».

Da allora il mio gruppo di ricerca coniugando lo studio della chimica delle proteine con strumentazioni sempre più aggiornate e sempre

più avanzate costituisce un punto di riferimento, non solo nel nostro paese, negli studi di proteomica. Abbiamo affrontato e risolto problemi riguardanti la validazione di proteine ricombinanti, la scoperta di nuove varianti dell'emoglobina umana, la messa a punto di metodi per lo studio di modifiche post-traduzionali, la definizione di aspetti strutturali non facilmente affrontabili con altre tecniche chimico-fisiche, etc.

Recentemente abbiamo rivolto la nostra attenzione alla definizione dei materiali di natura proteica, come le proteine del latte, delle uova, delle ossa, usate per fissare nell'imprimitura che nella rifinitura di affreschi e, soprattutto, di tempere da parte dei Maestri delle nostre grandi tradizioni pittoriche. Un tale studio può avere un'importanza storica di per sé per consentire una corretta definizione della scuola pittorica ma ha anche al fine di indirizzare con rigore scientifico l'eventuale opera di restauro indicando quali di questi leganti/collanti sono stati usati ed eventualmente in quali proporzioni

Come in qualsiasi esperimento di proteomica si procede essenzialmente come è stato descritto sopra in dettaglio, tuttavia l'applicazione della proteomica alla scienza della conservazione necessita di considerazioni specifiche legate alla natura intrinseca dei campioni stessi. Queste considerazioni comprendono l'esiguità dei campioni disponibili, la necessità che l'analisi sia quanto meno invasiva possibile, la complessità e la variabilità della composizione chimica, per la possibile co-presenza di diversi ligandi e di contaminanti, e per il possibile deterioramento del materiale di partenza. I campioni provenienti da opere d'arte, che sicuramente non si prestano ad analisi in replicato, hanno sperimentato nel corso dei secoli possibili contaminazioni e l'invecchiamento del materiale organico, incrementando così cospicuamente la complessità del campione e la difficoltà dell'identificazione delle componenti chimiche, in generale, e quelle di natura proteica, in particolare.

A questo scopo abbiamo prodotto alcuni protocolli sperimentali finalizzati a ridurre la quantità di materiale necessaria e a superare le problematiche derivanti dalle possibili contaminazioni proteiche ambientali, si pensi alle notevoli quantità di cheratine rilasciate dal tocco delle mani e dalle setole dei pennelli. In particolare, abbiamo sviluppato, utilizzando opportuni provini, un protocollo minimamente invasivo basato sulla digestione enzimatica del campione senza

estrazione del materiale proteico, e l'utilizzo delle microonde per migliorare le rese della reazione di idrolisi, seguito dall'analisi della miscela peptidica ottenuta mediante nanoLC-MSMS, nonché la creazione di liste di esclusione per depurare l'analisi dai segnali dovute alle cheratine. Il passaggio successivo all'applicazione della metodica a campioni "reali", ovvero a frammenti provenienti da opere d'arte, è stato estremamente emozionante sia dal punto di vista umano che scientifico.

Su frammenti microscopici provenienti dalla volta della Basilica di Assisi dopo il crollo in seguito al terremoto del 1997, è stata, ad esempio, definita la presenza di latte bovino, in alcuni, e di rosso d'uovo, in altri, tra i leganti che i grandi maestri del trecento, Giotto e Cimabue, avevano utilizzato nella realizzazione dei loro capolavori.

La metodologia proteomica applicata al campo dei beni culturali, di per sé certo non innovativa, tuttavia richiede numerosi "adattamenti" proprio resi necessari dalla tipologia del campione, ma si apre anche a prospettive che, sulla scia dell'ovvia osservazione che se in un composto qualcosa si modifica, questo praticamente sempre comporta un cambiamento del valore di massa, consentiranno di andare a dettagliare molecularmente i cambiamenti indotti dal deterioramento/invecchiamento del materiale proteico. In questo contesto, recentemente, ci è stato possibile valutare il deterioramento dovuto sia a cause naturali che ambientali degli affreschi del 13° secolo del Camposanto Monumentale di Pisa, dipinti da Benozzo Gozzoli, Taddeo Gaddi, Spinello Aretino e Buonamico Buffalmacco.

L'analisi LC-MS/MS ci ha consentito di evidenziare nei processi di deammidazione dei residui di asparagina e, soprattutto, di glutamina, presenti nelle proteine del latte e della colla animale usati come leganti, gli eventi chimici che meglio caratterizzano la tipologia del deterioramento. La deammidazione comporta una variazione di 0,94 Da rispetto ai segnali attesi per i due amminoacidi ammidati e pertanto è possibile stabilire l'entità di questo processo dall'intensità dei segnali che differiscono per questo valore di massa. La deammidazione può essere così correlata sia all'invecchiamento naturale del legante proteico sia a imprudenti interventi di restauro con materiale che ne ha accelerato il processo.

In una prospettiva di assoluta novità, questi studi potranno essere estesi a caratterizzazioni molecolari del deterioramento di opere d'arte

e di oggetti storici che potranno essere utili anche per successivi interventi di restauro.

Le sinergie tra scienza, arte ed archeologia, di cui questa ricerca è un esempio, sono sempre più auspicabili in una realtà come quella del nostro Paese, ricca di opere d'arte uniche al mondo, la cui conoscenza e conservazione per le generazioni future costituisce una fonte inestimabile non solo di ricchezza culturale, quanto mai in questo momento negletta, ma anche, in una visione certamente più lungimirante, di rilevanti risorse economiche.

Gennaro Marino

Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Scienze chimiche

Socio XL

gmarino@unina.it