

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Comunità Europea  
Fondo Sociale Europeo

**DOTTORATO IN BIOCHIMICA E BIOLOGIA  
CELLULARE E MOLECOLARE**

**TESI DI DOTTORATO  
2006**

**CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA DELLA  
SUPEROSSIDO DISMUTASI DALL'EUBATTERIO  
PSICROFILO *PSEUDOALTEROMONAS HALOPLANKTIS*:  
RUOLO REGOLATORIO DI UN RESIDUO DI CISTEINA  
MOLTO REATTIVO**

**DOTTORANDO: IMMACOLATA CASTELLANO**  
DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA E  
BIOTECNOLOGIE MEDICHE

**RELATORE PROF. EMMANUELE DE VENDITTIS**

**COORDINATORE: PROF. GIUSEPPE D'ALESSIO**

## RINGRAZIAMENTI

Questa tesi di dottorato è il frutto di quattro anni trascorsi lavorando e studiando su diversi progetti, affiancata da persone dotate di una notevole professionalità e di spiccate qualità umane.

Un ringraziamento particolare va al mio docente guida il Prof. Emmanuele De Vendittis, che mi ha accolto nel suo gruppo e che ha seguito l'intero progetto di tesi contribuendo con la sua esperienza e i suoi consigli alla mia crescita professionale. Ringrazio la Dott.ssa Maria Rosaria Ruocco, che da insegnante e collega è diventata anche confidente ed amica, il Prof. Mariorosario Masullo per il contributo scientifico e informatico e il Prof. Antonio Dello Russo che mi ha dato la possibilità di fare esperienza di attività didattica. Ringrazio il Prof. Paolo Arcari e il controrelatore Prof. Salvatore Sorrentino per la revisione critica della tesi. Ringrazio infine tutti coloro che hanno contribuito a rendere questi anni più lieti, condividendo con me gioie ma anche piccole delusioni: i miei colleghi di dottorato Pierluigi, Imma, Ivano e Roberta; Pasquale, Alba, Rita, Lia, Gaetano, Fiamma e Annalisa e tutte le "bimbe" che popolano il laboratorio Francesca, Ilaria, Simona, Maria, Margherita, Carmen, Claudia, Sara, Giovanna e Giusi. A tutti sono legata da un sincero sentimento di stima ed affetto.

Dedico questa tesi ai miei genitori Angela e Battista, a mia sorella Marina, che sono il punto di riferimento della mia vita qualunque strada essa prenda, a Raffaele che ha condiviso con me emozioni, ansie, successi e insuccessi.

Infine spero vivamente di lasciare un “pezzetto” di me a tutti coloro che hanno avuto o avranno in futuro la pazienza e/o la curiosità di leggere questa tesi.

## RIASSUNTO

La superossido dismutasi (SOD) è un enzima ubiquitario che dismuta l’anione superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare, svolgendo un ruolo chiave nei meccanismi di difesa cellulari dai radicali tossici dell’ossigeno (ROS). La SOD purificata dall’eubatterio psicrofilo *Pseudoalteromonas haloplanktis* (*PhSOD*) è stata oggetto di caratterizzazione biochimica e funzionale, al fine di estendere le conoscenze sull’adattamento delle SOD alle basse temperature e di approfondire alcuni aspetti della regolazione funzionale di tale enzima.

La *PhSOD* è un enzima omodimerico contenente Fe nel sito attivo, dotato di un’elevata attività specifica persino a basse temperature. La stabilità termica dell’enzima psicrofilo supera di molto la temperatura di crescita di *P. haloplanktis*, una caratteristica comune ad altre Fe- e Mn-SOD e che probabilmente riflette la tolleranza di tale enzima a vari tipi di stress ambientali. Tra le proprietà biochimiche della *PhSOD* quella che ha destato maggiore attenzione è stata l’elevata sensibilità al perossinitrito, un ROS che agisce da inattivatore fisiologico della Mn-SOD mitocondriale. Il bersaglio di tale ROS è la Tyr34, un residuo conservato in tutte le Fe- e Mn-SOD, situato nel canale di accesso al sito attivo dell’enzima. E’ stata determinata la struttura primaria della *PhSOD*, che mostra un’elevata percentuale di identità amminoacidica con la Fe-SOD di *E. coli* ed una significativa similarità anche con la Mn-SOD mitocondriale. Inoltre nella *PhSOD* è stato identificato un

unico residuo di cisteina altamente reattivo (Cys57), localizzato in una regione non conservata dell'enzima. Il modello tridimensionale della *PhSOD* ha evidenziato che l'organizzazione strutturale di tale regione è importante per discriminare tra SOD dimeriche o tetrameriche. In condizioni native la Cys57 forma un addotto covalente con il  $\beta$ -mercaptoetanololo, mentre in specifiche condizioni denaturanti è responsabile della formazione di un ponte disolfuro inter-subunità. La modifica da parte del  $\beta$ -mercaptoetanololo riduce di poco l'attività dell'enzima e la sua stabilità termica, ma ha un significativo effetto sulla sensibilità al perossinitrito e sul grado di nitratura delle tirosine, proteggendo l'enzima dall'inattivazione.

Proteine contenenti gruppi sulfidrilici molto reattivi sono bersaglio di modifica covalente da parte di tioli cellulari, come il glutathione, che giocano un ruolo chiave nella regolazione dello stato redox cellulare. Anche la Cys57 della *PhSOD* forma un ponte disolfuro con il glutathione e tale modifica riduce significativamente la sensibilità dell'enzima verso il perossinitrito. E' probabile che, in condizioni di stress ossidativo, la *PhSOD* sia glutathionilata anche *in vivo*, assumendo quindi un ruolo chiave nella regolazione dello stato redox cellulare.

## SUMMARY

Superoxide dismutase (SOD) is a metal enzyme playing a key role in the cell defence mechanism against the reactive oxygen species (ROS). The catalytic mechanism, conserved also in phylogenetically distant organisms, implies the dismutation of superoxide anion in hydrogen peroxide and molecular oxygen. SODs isolated from extremophilic sources represent appropriate models to study structure-function relationships of proteins adapted to extreme environments and the regulation of the antioxidant function of this enzyme.

This thesis describes the biochemical and functional characterization of superoxide dismutase from the psychrophilic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* (*PhSOD*). This enzyme is an iron-containing homodimer endowed with a high specific activity, even at low temperatures. *PhSOD* displays a thermal resistance well above the growth temperature of *P. haloplanktis*, a behaviour common to other Fe- and Mn-SODs, which probably reflects the tolerance of this enzyme to environmental stress. *PhSOD* is very sensitive to peroxyxynitrite, a physiological inactivator of mitochondrial Mn-SOD, causing the nitration of Tyr34, a highly conserved residue located near the active site.

The primary structure of *PhSOD*, determined by direct sequencing, has been aligned with other Fe- and Mn-SODs. The comparison showed a high amino acid identity with Fe-SOD from *E. coli* and a significant similarity even with mitochondrial Mn-SOD. *PhSOD* has an unique and highly reactive cysteine residue (Cys57) located in a less conserved region of the protein. The three-dimensional model of *PhSOD* indicates that the structural organization of this region discriminates between dimeric and tetrameric SODs. Cys57 forms a

disulfide bond with  $\beta$ -mercaptoethanol in native conditions, whereas in specific denaturing conditions, two subunits of *PhSOD* form a covalent dimer. The modification by  $\beta$ -mercaptoethanol has negligible effect on the enzyme activity, but significantly reduces tyrosine nitration, thus protecting the enzyme from inactivation.

Proteins containing highly reactive cysteines are targets of covalent modification by cellular thiols, such as glutathione, playing an essential role in the regulation of the cellular redox state. Indeed, we found that *PhSOD* is covalently modified by the oxidized form of glutathione *in vitro*. This type of modification improves the antioxidant function of the enzyme, preserving it from inactivation by peroxynitrite. Further investigation concerns the possible modification of *PhSOD* by glutathione in *P. haloplanktis* cells, upon induction of oxidative stress.

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<i>1.1 Le specie reattive dell'ossigeno</i>	1
<i>1.2 Le specie reattive dell'ossido nitrico</i>	2
<i>1.3 La nitrificazione dei residui di tirosina</i>	3
<i>1.4 Reattività dei residui di cisteina</i>	4
<i>1.5 S-nitrosazione e S-glutathionilazione</i>	4
<i>1.6 La superossido dismutasi</i>	6
<i>1.7 Classificazione delle superossido dismutasi</i>	7
<i>1.8 Ruolo biologico della superossido dismutasi</i>	8
<i>1.9 Le Fe- e Mn-SOD</i>	9
<i>1.10 Nitrificazione della Tyr34 nella mitSOD umana</i>	10
<i>1.11 SOD da organismi estremofili</i>	11
<i>1.12 Enzimi psicrofilo</i>	12
<b>OGGETTO DELLA RICERCA</b>	<b>13</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>14</b>
<i>2.1 Materiali</i>	14
<i>2.2 Purificazione del DNA genomico da <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i></i>	15
<i>2.3 Tecniche di DNA ricombinante</i>	16
<i>2.4 Reazione a catena della polimerasi (PCR)</i>	16
<i>2.5 Mutagenesi sito-specifica</i>	17
<i>2.6 Metodi per l'analisi di proteine</i>	17
<i>2.7 Dosaggio dell'attività superossido dismutasica</i>	19
<i>2.8 Purificazione della PhSOD nativa</i>	19
<i>2.9 Determinazione del peso molecolare in condizioni non denaturanti</i>	21
<i>2.10 Determinazione del contenuto metallico dei campioni di PhSOD</i>	21
<i>2.11 Metodi spettroscopici</i>	21
<i>2.12 Determinazione della struttura primaria della PhSOD ed     identificazione della modifica covalente</i>	22
<i>2.13 S-glutathionilazione della PhSOD</i>	23
<i>2.14 Modello tridimensionale della PhSOD</i>	23
<i>2.15 Produzione della PhSOD ricombinante</i>	23

<b>RISULTATI</b>	<b>25</b>
3.1 <i>Proprietà molecolari della PhSOD</i>	25
3.2 <i>Proprietà biochimiche della PhSOD</i>	26
3.3 <i>Effetto della temperatura sulla stabilità della PhSOD</i>	29
3.4 <i>Struttura primaria della PhSOD</i>	30
3.5 <i>Identificazione della modifica covalente della Cys57 in PhSOD</i>	32
3.6 <i>Effetti della modifica covalente di Cys57 sulla fluorescenza intrinseca di PhSOD</i>	34
3.7 <i>Modello tridimensionale di PhSOD</i>	35
3.8 <i>Espressione eterologa del gene della PhSOD</i>	37
3.9 <i>Proprietà molecolari e biochimiche della PhSOD<sub>ric</sub></i>	39
3.10 <i>Produzione di forme mutate C57S-PhSOD e C57R-PhSOD</i>	39
3.11 <i>Proprietà molecolari delle forme mutate C57S-PhSOD e C57R-PhSOD</i>	40
3.12 <i>Effetto del perossinitrito sulla PhSOD<sub>ric</sub> e sulle sue forme mutate</i>	41
3.13 <i>Reazione del glutatione con la PhSOD<sub>ric</sub></i>	42
3.14 <i>Effetto della glutationilazione di PhSOD sulla sensibilità dell'enzima verso il perossinitrito</i>	43
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>45</b>
4.1 <i>Caratterizzazione biochimica della PhSOD</i>	45
4.2 <i>Reattività del residuo Cys57 della PhSOD e suo ruolo regolatorio</i>	49
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>54</b>

## ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

$\beta$ me- <i>PhSOD</i>	<i>PhSOD</i> modificata dal $\beta$ -mercaptoetanololo
<i>C57S-PhSOD</i>	<i>PhSOD</i> contenente la mutazione Cys57Ser
<i>C57R-PhSOD</i>	<i>PhSOD</i> contenente la mutazione Cys57Arg
<i>EcSOD</i>	SOD da <i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamminotetraacetato
ESI/MS	spettrometria di massa/elettrospray
FPLC	cromatografia liquida delle proteine ad alta velocità
GSH	glutazione ridotto
GSSG	glutazione ossidato
GSNO	glutazione nitrosilato
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalattopiranoside
mitSOD	Mn-SOD mitocondriale
PBS	tampone sodio fosfato salino
PCR	reazione a catena della polimerasi
<i>PhSOD</i>	SOD da <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
<i>PhSOD</i> <sub>ric</sub>	<i>PhSOD</i> ricombinante
PMSF	fenilmetanosolfonil fluoruro
ROS	specie reattive dell'ossigeno
RNS	specie reattive dell'ossido nitrico
RP-HPLC	cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa
SDS-PAGE	elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS
SOD	superossido dismutasi
v <i>PhSOD</i>	vettore per l'espressione del gene della <i>PhSOD</i>
v <i>PhSOD</i> (C57S)	vettore per l'espressione del gene di <i>C57S-PhSOD</i>
v <i>PhSOD</i> (C57R)	vettore per l'espressione del gene di <i>C57R-PhSOD</i>

## INTRODUZIONE

### *1.1 Le specie reattive dell'ossigeno*

Con la comparsa dell'ossigeno atmosferico sulla terra, diversi organismi hanno sviluppato meccanismi in grado di utilizzare questo gas per i processi metabolici; nello stesso tempo si sono evoluti sistemi di difesa per tollerare i radicali tossici prodotti dall'incompleta riduzione dell'ossigeno ad acqua (Fridovich, 1978). Questa reazione infatti procede attraverso stadi di riduzione univalente con produzione di specie che hanno un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno; tali specie sono pertanto molto reattive e vengono denominate ROS (Reactive Oxygen Species). La prima tappa di riduzione dell'ossigeno comporta la formazione dell'anione superossido  $O_2^-$ , a cui segue quella del perossido di idrogeno  $H_2O_2$ , del radicale ossidrilico ed infine di acqua. L' $O_2^-$  è quindi un radicale tossico che può a sua volta dare origine a composti ancora più instabili, quali il radicale ossidrilico e il radicale idroperossido. La principale fonte di  $O_2^-$  è la catena di trasporto degli elettroni durante la respirazione cellulare; la citocromo ossidasi infatti, pur essendo dotata di alta efficienza catalitica, rilascia intermedi parzialmente ridotti, tra i quali  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Fridovich, 1989).

I ROS prodotti dalla cellula possono funzionare come mediatori del segnale durante il differenziamento, la proliferazione cellulare e l'apoptosi (Sauer et al, 2001). D'altra parte elevati livelli di ROS sono potenzialmente tossici per la cellula, poiché possono provocare danni molecolari irreversibili, quali l'ossidazione di polifenoli, catecolammine e tioli, l'inattivazione di enzimi, l'ossidazione di proteine, DNA e lipidi di membrana. Tali alterazioni sono

spesso alla base di stati patologici come la senescenza, l'aterosclerosi, la neurodegenerazione, l'ischemia ed il cancro (Finkel, 2003). Il controllo del livello intracellulare dei ROS è di fondamentale importanza per il mantenimento dell'omeostasi cellulare; pertanto la cellula ha sviluppato varie strategie di difesa, che includono sistemi di riparo del danno ossidativo, come quello della tioredossina/tioredoxina riduttasi (Ritz et al, 2000) o meccanismi antiossidanti che eliminano i ROS. Questi ultimi comprendono composti cellulari, come le vitamine A, E, C e il glutathione (GSH), o enzimi, come la superossido dismutasi, la catalasi e la glutathione perossidasi (Halliwell, 1999). L'omeostasi cellulare redox dipende quindi da una fine regolazione dell'equilibrio tra composti pro- e anti-ossidanti. Quando questo equilibrio viene alterato per l'eccessiva produzione di ROS e/o il mancato funzionamento dei meccanismi antiossidanti, la cellula entra in una condizione che viene definita di stress ossidativo.

### ***1.2 Le specie reattive dell'ossido nitrico***

In analogia allo stress ossidativo, lo stress nitrosativo indica l'eccessiva o non regolata produzione della molecola radicalica ossido nitrico (NO), e di specie reattive dell'azoto, indicate come RNS (Reactive Nitrogen Species; Hausladen & Stamler, 1999). La principale fonte di NO nelle cellule di mammifero è l'ossidazione enzimatica dell'arginina da parte della NO-sintasi. L'NO generato in modo controllato viene considerato una molecola del segnale ubiquitaria coinvolta nella regolazione di funzioni chiave in diversi sistemi cellulari (Bogdan et al, 2000). Come altri ROS, l'NO può limitare il danno ossidativo agendo come uno "scavenger" di radicali o provocare la morte

cellulare, riducendo la produzione di enzimi antiossidanti, inducendo la deplezione del GSH intracellulare e la degradazione delle proteine (Klatt & Lamas, 2000). Nella cellula infatti l'NO reagisce con l'ossigeno molecolare, i ROS, i metalli di transizione, i tioli, generando diversi RNS come gli S-nitrosotioli ed il perossinitrito, responsabili di processi infiammatori, neurotossicità e ischemia (Murphy, 1999). La protezione delle cellule dallo stress nitrosativo è affidata agli stessi sistemi antiossidanti coinvolti nella difesa dallo stress ossidativo.

### ***1.3 La nitratura dei residui di tirosina***

Lo stress ossidativo e/o nitrosativo può indurre modificazioni chimiche di proteine bersaglio, con conseguente regolazione o perdita irreversibile della loro funzione. L'accumulo di proteine ossidate è un importante segnale di invecchiamento biologico e di stati patologici associati allo stress. Il perossinitrito, formato dalla reazione dell' $O_2^-$  con l'NO (Beckman & Koppenol, 1996), è responsabile di modifiche covalenti su proteine bersaglio, come la formazione di di-tirosina e la nitratura di residui di tirosina o triptofano. Tali modificazioni sono spesso correlate a permanente perdita di funzione, a causa dell'ossidazione o nitratura di residui funzionalmente importanti, della formazione di ponti covalenti tra proteine, nonché della degradazione proteolitica delle proteine danneggiate. La nitratura consiste nel legame covalente di un gruppo  $-NO_2$  all'anello aromatico di un residuo di tirosina o di triptofano. La scoperta di nuovi enzimi che mediano la denitratura delle tirosine (Kamisaki et al, 1998; Kuo, et al, 1999) avvalorano l'ipotesi che la nitratura delle proteine potrebbe essere un meccanismo

dinamico e reversibile che modula la trasduzione del segnale (Berlett et al, 1996; Kong et al, 1996).

#### ***1.4 Reattività dei residui di cisteina***

Anche i residui di cisteina sono bersaglio di modificazioni covalenti durante lo stress ossidativo e/o nitrosativo. In particolare il gruppo tiolico può essere ossidato in sulfenico ( $-SOH$ ), sulfinico ( $-SO_2H$ ) o sulfonico ( $-SO_3H$ ) (Klatt & Lamas, 2000). Mentre le proteine sulfinate e sulfonate sono relativamente stabili e non sono ridotte nuovamente a cisteine in condizioni fisiologiche, i residui sulfenati sono generalmente instabili e facilmente ossidati a sulfinati e sulfonati, oppure eliminati dai tioli cellulari e dal GSH per formare ponti disolfuro intramolecolari o misti. La capacità delle cisteine di oscillare tra stato ossidato e ridotto rende tali residui candidati alla regolazione funzionale delle proteine. I ponti disolfuro intra- e inter-molecolari possono essere prontamente ridotti da cambiamenti del potenziale redox intracellulare o attraverso l'azione enzimatica di specifiche riduttasi come la tioredossina e la glutaredossina (Hurd et al, 2006). Pertanto la formazione di ponti disolfuro rappresenta un meccanismo di regolazione, che può causare sia la perdita che il guadagno di funzione della proteina, mediando la risposta cellulare allo stress ossidativo.

#### ***1.5 S-nitrosazione e S-glutathionilazione***

La S-nitrosazione o S-nitrosilazione consiste nella formazione di un legame tra il gruppo  $-NO$  ed il gruppo tiolico della cisteina. L'instabilità e la reversibilità della S-nitrosazione rende anche questo tipo di modifica un ulteriore meccanismo di regolazione proteica (Biswas et al, 2006). L' $NO$  può essere

rimosso dai residui di cisteina S-nitrosati da reazioni enzimatiche di trans-nitrosazione o dal metabolismo degli S-nitrosotioili. Comunque l'effetto di tale modifica sulla funzione proteica può essere eliminato dall'azione di forti riducenti come il ditionitrito.

La S-glutationilazione o S-glutatioilazione consiste nella formazione reversibile di ponti disolfuro misti tra residui di cisteina e GSH (Thomas et al, 1995; Cotgreave & Gerdes, 1998). Il GSH è il composto antiossidante di basso peso molecolare più abbondante nelle cellule di tutti gli eucarioti dotati di mitocondri e cloroplasti, nonché di alcuni batteri, come *E. coli* (Masip et al, 2006). La concentrazione fisiologica di GSH oscilla tra 0,1 e 10 mM nei batteri e tra 1 e 10 mM nei mammiferi (Klatt & Lamas, 2000). Il GSH gioca un ruolo chiave nella difesa cellulare dallo stress ossidativo e nitrosativo; esso è infatti capace di eliminare l'NO e i prodotti di ossidazione potenzialmente tossici, nonché di ridurre i gruppi tiolici ossidati o nitrosilati delle proteine.

Nelle cellule in quiescenza il GSH è circa 100 volte in eccesso rispetto alla sua forma ossidata GSSG. Durante lo stress ossidativo, l'alterazione transiente del rapporto tra GSH e GSSG da 100 a 10 o persino 1 è stata correlata con la formazione di disolfuri misti (Thomas et al, 1995). E' stato ipotizzato che la glutatioilazione delle proteine possa avvenire tramite due tipi di meccanismi: reazione di residui di cisteina ridotti col GSSG, o alternativamente reazione di proteine con gruppi tiolici ossidati col GSH (Rahaman et al, 2005). Il primo meccanismo comporta uno scambio tiolo-disolfuro che permette di riciclare il GSH; il secondo comporta l'ossidazione diretta da parte dei ROS dei residui di cisteina, che poi reagiscono con il GSH senza variazioni significative del rapporto GSH/GSSG (Chai et al, 1994).

La reazione di detiolazione di proteine glutationilate, tramite riduzione non enzimatica o ad opera di enzimi come la tioredossina, la glutaredossina, la sulfiredossina (Findlay et al, 2005) e le disolfuro isomerasi, induce a considerare la glutationilazione come una vera e propria modifica post-traduzionale, coinvolta in una serie di eventi cellulari, quali la risposta allo stress ossidativo, la stabilizzazione di proteine extracellulari, la protezione delle proteine dall'ossidazione irreversibile di critici residui di cisteina ed infine la regolazione dell'attività enzimatica (Biswas et al, 2006).

La glutatiolazione delle proteine può anche essere indotta dall'NO e da altri RNS, che provocano l'ossidazione del GSH a GSSG e la sua conversione a GSNO (Luperchio et al, 1996; Clancy et al, 1994). La glutationilazione delle proteine viene pertanto considerata un meccanismo di trasduzione del segnale redox-mediato e/o NO-mediato, come pure una risposta cellulare adattativa che protegge le proteine con ruoli regolatori chiave dalla permanente perdita di funzione come conseguenza dello stress ossidativo e/o nitrosativo.

### ***1.6 La superossido dismutasi***

La superossido dismutasi (SOD) è un enzima ubiquitario, che svolge un ruolo chiave nei meccanismi di difesa della cellula dai ROS e RNS prodotti durante il metabolismo cellulare. La SOD catalizza la dismutazione dell'anione superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare mediante un meccanismo conservato anche in organismi filogeneticamente distanti, come gli eubatteri e gli archeobatteri. L'isolamento e la caratterizzazione di SOD anche da organismi anaerobi (Hatchikian & Henry, 1977; Dos Santos et al, 2000; Meier et al, 1982; Gregory & Dapper, 1983) fanno ritenere che le SOD

siano enzimi con una funzione essenziale per l'evoluzione della respirazione aerobia a partire da un'antica forma di vita insensibile all'ossigeno.

### ***1.7 Classificazione delle superossido dismutasi***

Le SOD sono classificate in almeno tre famiglie distinte sulla base del cofattore metallico contenuto nel sito attivo, nonché delle similarità di sequenza e di struttura tridimensionale (Bannister et al, 1987). Alla prima di queste famiglie appartengono le Cu/Zn-SOD, che per ogni subunità comprendono sia lo ione  $\text{Cu}^{2+}$ , con ruolo catalitico, che lo ione  $\text{Zn}^{2+}$ , con ruolo strutturale. Le Cu/Zn-SOD sono presenti nel citoplasma degli eucarioti, nei cloroplasti e nel periplasma di alcuni procarioti Gram-negativi (Kroll et al, 1995). La seconda famiglia include sia le Fe-SOD che le Mn-SOD, contenenti rispettivamente Fe o Mn come cofattore metallico nel sito attivo. Esse sono molto simili per struttura primaria e terziaria e sono considerate in relazione evolutiva. Le Fe-SOD sono presenti sia nei batteri aerobi che in quelli anaerobi, negli archaea e nei cloroplasti di alcune piante. Le Mn-SOD sono presenti in alcuni procarioti, in archaea alofili e metanogeni e nella matrice mitocondriale. Nei batteri le Fe-SOD e le Mn-SOD sono esclusivamente localizzate nel citoplasma, dove la loro azione riduce lo stress della membrana e ne conserva la funzione, proteggendo alcuni enzimi citosolici dall'inattivazione ad opera dei ROS.

La terza famiglia comprende alcune SOD presenti solo in *Streptomyces* e contenenti Ni come cofattore metallico (Youn et al, 1996; Chun et al, 1997).

Infine in alcuni eucarioti sono state ritrovate SOD extracellulari contenenti la coppia metallica Cu/Zn; tali forme subiscono modifiche post-traduzionali, come la glicosilazione, e sono preposte alla dismutazione di un eccesso di  $\text{O}_2^-$ .

extracellulare prodotto dall'azione fagocitica degli eosinofili nel corso di infezioni parassitarie (Fridovich, 1997). Inoltre, sono state isolate anche SOD secrete in batteri (Gerlach et al, 1998) o archaea (Cannio et al, 2000).

Riassumendo negli eucarioti superiori coesistono tre forme di SOD, con diversa localizzazione cellulare: la Cu/Zn-SOD citosolica, la Mn-SOD mitocondriale e la Cu/Zn-SOD extracellulare. Negli eucarioti inferiori, nei batteri e negli archaea esiste in genere un'unica SOD contenente alternativamente Fe, Mn o Ni. In alcuni microorganismi coesistono Fe- e Mn-SOD e talvolta anche una Cu/Zn-SOD periplasmatica. Infine sono state ritrovate SOD di tipo cambialistico, ossia che funzionano sia con Fe che con Mn nel sito attivo (Meier et al, 1982).

Le famiglie di SOD possono inoltre essere funzionalmente distinte in base ai diversi tipi di inibitori e/o inattivatori (Bannister et al, 1987). Le Cu/Zn-SOD sono inibite da cianuro e inattivate da perossido di idrogeno; le Fe-SOD sono inattivate da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ed inibite da sodio azide; le Mn-SOD sono insensibili all'inattivazione da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e vengono inibite da sodio azide anche se in misura inferiore rispetto alle Fe-SOD.

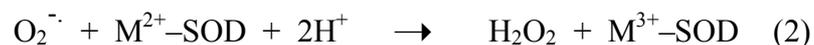
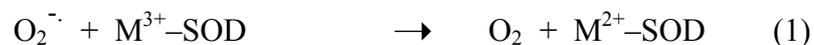
### ***1.8 Ruolo biologico della superossido dismutasi***

Diversi esperimenti dimostrano che la SOD riveste un ruolo importante nella protezione cellulare contro l'invecchiamento e il cancro (Halliwell & Gutteridge, 1988). La riduzione dei livelli di SOD, infatti, è stata associata allo sviluppo di diverse patologie nell'uomo, come la cataratta, l'invecchiamento, l'infiammazione cronica, alcune neoplasie, l'aterosclerosi e diverse malattie neurodegenerative (Berlett & Stadtman, 1997). Ceppi di *E. coli* privi di SOD

presentano un' aumentata frequenza di mutazioni del DNA e una parallela diminuzione della sopravvivenza (Farr et al, 1986). Diversi studi su topi “knock-out” per la SOD hanno dimostrato che la Mn-SOD mitocondriale (mitSOD) è indispensabile per la sopravvivenza, al contrario della Cu/Zn-SOD citosolica. In particolare topi “knock-out” per la Cu/Zn-SOD appaiono normali e mostrano differenze solo dopo traumi; invece topi “knock-out” per la mitSOD manifestano diverse patologie, quali danni al miocardio e al fegato, perossidazione lipidica, disfunzioni mitocondriali e non sopravvivono per più di tre settimane (Li et al, 1995). Viceversa l' incremento della produzione di SOD in ceppi mutati o transgenici di *Caenorhabditis elegans* (Vanfleteren, 1993) e *Drosophila melanogaster* (Reveillaud et al, 1991) determina un aumento della tolleranza allo stress ossidativo e quindi della longevità. Inoltre l' iperproduzione della mitSOD inibisce la proliferazione di diversi tipi di tumore (Oberley, 2005).

### **1.9 Le Fe- e Mn-SOD**

Sia le Fe- che le Mn-SOD catalizzano la dismutazione dell' anione superossido in una reazione a due stadi (Bull & Fee, 1985):



dove M indica il metallo (Fe o Mn) nel sito attivo. La reazione complessiva è:



Le Fe- e Mn-SOD hanno la stessa organizzazione strutturale sia del monomero che del sito attivo. In particolare, la subunità (20-24 kDa) presenta una struttura

mista  $\alpha + \beta$  e può essere suddivisa in due domini, collegati da un tratto non strutturato abbastanza variabile. Il dominio N-terminale contiene due segmenti strutturati come  $\alpha$ -eliche e fornisce due ligandi del metallo (H26 e H73 in *E. coli*); invece, il dominio C-terminale è formato da un foglietto  $\beta$  con 3 filamenti antiparalleli circondato da alcune  $\alpha$ -eliche e fornisce altri due ligandi del metallo (D156 e H160 in *E. coli*). Con il quinto ligando (un  $\text{OH}^-$  fornito dal solvente) la sfera di coordinazione del metallo assume una geometria di tipo bipiramidale trigonale distorta con la molecola di solvente e una delle istidine in posizione assiale. Il tipo di metallo è specifico e la sua sostituzione comporta in genere la perdita dell'attività enzimatica. Per l'organizzazione strutturale del sito attivo e la catalisi enzimatica assume un ruolo importante la seconda sfera di coordinazione del metallo, situata alla base del canale di accesso del substrato al sito attivo. In questa sfera sono localizzati due residui molto conservati (H30 e Y34 in *E. coli*), che controllano l'ingresso delle molecole di substrato o di inibitore al sito attivo (Lah et al, 1995). In questa seconda sfera gioca un ruolo chiave anche un residuo di glutammina o istidina, la cui posizione nella sequenza tridimensionale assicura l'esatta geometria di interazioni con gli altri residui del sito attivo, stabilizzandone la conformazione. Ad esempio, nella Fe-SOD di *E. coli* il suddetto residuo Q69 forma un ponte idrogeno sia con il solvente che coordina il metallo, che con l'ossidrile della Y34 (Lah et al, 1995).

### ***1.10 Nitrazione della Tyr34 nella mitSOD umana***

I mitocondri sono seriamente danneggiati da un'eccessiva produzione di perossinitrito. Infatti questo ROS si forma quando l'NO diffonde attraverso la

membrana mitocondriale e inibisce reversibilmente la citocromo ossidasi. Tale inibizione blocca la catena respiratoria mitocondriale, incrementando il rilascio di  $O_2^-$  e favorendo quindi la produzione di perossinitrito (Brookes et al, 2002). D'altra parte la mitSOD, che elimina  $O_2^-$  dalla matrice mitocondriale, è a sua volta modificata e inattivata proprio dal perossinitrito (MacMillan-Crow et al, 1996). Tale inattivazione favorisce l'accumulo di perossinitrito nei mitocondri, agendo negativamente sul metabolismo energetico e segnalando la morte cellulare per apoptosi.

Il bersaglio principale di tale modificazione è la Y34, conservata in tutte le Fe- e Mn-SOD e nitrata dal perossinitrito in posizione 3 dell'anello tirosinico (Yamakura et al, 1998). La suscettibilità della Y34 all'azione del perossinitrito sembra dovuta alla vicinanza del manganese, che come altri metalli di transizione, catalizza la decomposizione del perossinitrito, producendo lo ione nitronio ( $NO_2^+$ ), che a sua volta reagisce con la Y34 (Quijano et al, 2001). A pH fisiologici la nitratura di Y34 causa la riduzione del  $pK_a$  del gruppo fenolico e quindi la deprotonazione dello stesso e la rottura del "network" di legami ad idrogeno nel sito attivo; d'altra parte, la presenza del gruppo  $NO_2$  sulla Y34 può essere di ingombro sterico per l'accesso di  $O_2^-$  al sito attivo.

Studi sui mutanti in Y34 della Fe-SOD di *E. coli* (Hunter et al, 1997; Sorkin et al, 1997) hanno confermato l'importanza della Y34 per l'organizzazione strutturale del sito attivo e/o per il controllo dell'accessibilità del substrato.

### ***1.11 SOD da organismi estremofili***

Nel corso dell'evoluzione diversi micro-organismi si sono adattati a vivere in ambienti estremi di pH (alcalofili e acidofili), pressione (barofili) o temperatura

(termofili e psicrofili) (Fujiwara, 2002). Tra i micro-organismi adattati a diverse temperature, i termofili e gli ipertermofili sono stati ampiamente studiati, e numerose sono le SOD isolate e caratterizzate, come la Fe-SOD dall'archeobatterio ipertermofilo *Sulfolobus solfataricus* (Dello Russo et al, 1997; Ursby et al, 1999) e la Fe-SOD dal batterio ipertermofilo *Aquifex pyrophilus* (Lim et al., 1997), che hanno contribuito a chiarire i requisiti strutturali alla base dell'adattamento di tale enzima alle alte temperature.

Gli organismi psicrofili, ossia adattati a basse temperature, hanno solo di recente ricevuto più attenzione. Essi vengono distinti in stenopsicrofili, se crescono in un ristretto intervallo di temperatura, o euripsicrofili, se tollerano anche più alte temperature (Cavicchioli, 2006). Sono stati identificati vari meccanismi di adattamento alle basse temperature, che includono la produzione costitutiva di proteine dello shock e di acclimatazione al freddo, la presenza di proteine anti-congelanti, nonché la produzione di enzimi adattati a funzionare a basse temperature o l'iperproduzione di questi per far fronte ad una eventuale ridotta efficienza catalitica a basse temperature (D'Amico et al, 2006).

### ***1.12 Enzimi psicrofili***

Gli enzimi psicrofili differiscono dalle controparti mesofile perchè sono in genere dotati di una più bassa termostabilità e di una più elevata attività specifica a basse e moderate temperature. Gli studi finora condotti indicano che tali enzimi sono dotati di una maggiore flessibilità, che consente i cambi conformazionali necessari per l'attività, anche a bassi costi energetici (Georlette et al, 2004). Comunque non esistono ancora regole generali per l'adattamento delle proteine al freddo. L'isolamento e la caratterizzazione di

nuovi enzimi psicrofili potrebbe non solo chiarire i meccanismi alla base dell'adattamento alle basse temperature, ma anche aprire nuove prospettive per eventuali applicazioni biotecnologiche.

## OGGETTO DELLA RICERCA

Nella presente tesi è riportata la caratterizzazione biochimica e funzionale della SOD isolata dal ceppo TAC 125 di *Pseudoalteromonas haloplanktis*, un eubatterio aerobio, gram-negativo isolato da sedimenti marini antartici e adattato a crescere tra 4 e 20°C (Birolo et al, 2000), con una temperatura ottimale intorno a 15 °C (Corsaro et al, 2004). Il sequenziamento dell'intero genoma di questo euripsicrofilo (Medigue et al, 2005) ha reso tale micro-organismo un modello per lo studio di enzimi adattati a basse temperature.

Lo scopo della ricerca è quello di chiarire le relazioni struttura/funzione della SOD e di estendere le conoscenze sull'adattamento di tale enzima anche alle basse temperature. Inoltre, poichè la SOD è ampiamente studiata come potenziale agente terapeutico in diverse patologie correlate allo stress ossidativo, la ricerca ha mirato all'approfondimento di alcuni aspetti della funzione antiossidante dell'enzima.

Il lavoro di tesi ha compreso: la purificazione della SOD da *P. haloplanktis* (*PhSOD*); la caratterizzazione biochimica dell'enzima; l'identificazione di una modifica su un residuo di cisteina molto reattivo; lo studio del ruolo regolatorio di tale residuo sulla funzione antiossidante dell'enzima.

## MATERIALI E METODI

### *2.1 Materiali*

Gli enzimi di restrizione sono stati forniti dalla Amersham o dalla Promega. L'isopropil- $\beta$ -D-tiogalattopiranoside (IPTG) è stato acquistato presso l'Inalco. Ampicillina, xantina, xantina ossidasi, citocromo *c*, fenilmetanosolfonil fluoruro (PMSF), glutatione ridotto (GSH), glutatione ossidato (GSSG) e glutatione nitrosilato (GSNO) sono della Sigma-Aldrich. La soluzione madre di PMSF è stata preparata in etanolo assoluto per evitare la sua idrolisi in soluzione acquosa. La concentrazione della soluzione madre di perossinitrito, determinata spettrofotometricamente ( $\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), è stata preparata al momento come riportato da Beckman et al, 1994 ed oscillava tra 8 e 16 mM. Per valutare l'effetto del perossinitrito, la soluzione madre è stata diluita in 100 mM NaOH, per evitare la decomposizione del composto in ambiente acido. L'endoproteinasi Asp-N e la tripsina sono rispettivamente della Roche Diagnostics e della Sigma. I reagenti per la degradazione automatica di Edman sono stati forniti dalla Applera Italia. Tutti gli altri reagenti sono di grado analitico. Le colonne cromatografiche sono della Pharmacia Biotech. Le pellicole fotografiche sono della Fuji. Il kit Qiagen per la purificazione dei plasmidi è della M-Medical; l'Ampli*Taq* DNA polimerasi ed i dNTP sono della Perkin Elmer; la *Pfu* DNA polimerasi è della Promega; il kit di mutagenesi sito-specifica QuikChange è della Stratagene. Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati dalla PRIMM. Per il clonaggio sono stati utilizzati i plasmidi pGEM-T Easy (Promega) e pET-28 (Amersham). Nelle trasformazioni con plasmidi sono stati utilizzati i ceppi DH5 $\alpha$  e BL21 (DE3) di

*E. coli*. Sono stati utilizzati i seguenti terreni di coltura sterili per la crescita batterica: LB-Agar, costituito da agar A 1,5% (p/v), estratto di lievito 0,5% (p/v), caseina 1% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,2; LB, costituito da estratto di lievito 0,5% (p/v), caseina 1% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), pH 7,2.

Per l'elettroforesi su gel di agarosio è stato usato il tampone TAE, composto da Tris•acetato 40 mM pH 7,9, sodio acetato 6,6 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM. Sono stati inoltre usati i seguenti tamponi: tampone A, 20 mM Tris•Cl pH 7,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (v/v) glicerolo; tampone B, 20 mM Tris•Cl pH 7,8; tampone C, potassio fosfato 100 mM pH 7,8, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM; tampone D, Tris•Cl 20 mM, pH 7,8, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM; tampone PBS 10X, sodio fosfato 0,1 M pH 7,2, NaCl 1,5 M.

Per le misure di attività in funzione del pH, il tampone C è stato sostituito con uno dei seguenti tamponi, contenenti Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM: MES•KOH 50 mM pH da 5,5 a 6,35; Imidazolo•Cl 50 mM, pH da 6,4 a 7,45; Tris•Cl 50 mM, da pH 7,4 a 8,4; Glicina•Cl 50 mM, pH da 8,6 a 9,85; CAPS•KOH 50 mM, pH da 10,05 a 10,85.

## ***2.2 Purificazione del DNA genomico da *Pseudoalteromonas haloplanktis****

Per la purificazione del DNA genomico, le cellule di *P. haloplanktis* sono state risospese in un tampone contenente Tris•Cl 10 mM pH 7,8, LiCl 100 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM, SDS 1% (p/v) e omogeneizzate con un Potter. Successivamente sono state eseguite diverse estrazioni in fenolo/cloroformio/alcol isoamilico (25: 24: 1, v/v). I componenti cellulari insolubili sono stati allontanati mediante centrifugazione a 3000 rpm per 15 min a temperatura ambiente. Al soprannatante sono stati aggiunti 2,5 volumi di

etanolo assoluto; la miscela è stata quindi centrifugata a 3000 rpm per 10 min a 4 °C. Il “pellet”, lavato con etanolo al 70%, è stato lasciato ad asciugare e quindi risospeso in acqua sterile. Dopo aggiunta di 1 µg/ml di RNasi A e 50 µg/ml di Proteinasi K, la soluzione è stata incubata a 37°C per 30 min. Il DNA genomico così ottenuto è stato analizzato su gel di agarosio 1% in TAE per verificarne la purezza e l'integrità.

### ***2.3 Tecniche di DNA ricombinante***

Le metodiche connesse con la tecnologia del DNA ricombinante sono descritte in Sambrook et al (1989). La digestione del DNA plasmidico con endonucleasi di restrizione è stata realizzata in un volume di 20-100 µl, utilizzando 5-10 U di enzima per µg di DNA. Dopo incubazione a 37°C per almeno 2 ore, la miscela di reazione è stata analizzata su gel di agarosio all'1% in tampone TAE.

Per la costruzione di nuovi plasmidi, i frammenti di DNA da clonare, aggiunti nel rapporto molare di 10:1 rispetto al vettore plasmidico opportunamente digerito, sono stati ligati con l'enzima T4 DNA ligasi in un volume finale di 20-100 µl. La miscela di reazione è stata incubata a 4°C per almeno 16 ore e poi impiegata per la trasformazione batterica. A tale scopo i ceppi DH5α e BL21(DE3) di *E. coli* sono stati resi competenti mediante trattamento con una soluzione di CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Dalle colture batteriche cresciute a 37°C fino alla fase stazionaria il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il kit Qiagen.

### ***2.4 Reazione a catena della polimerasi (PCR)***

La PCR (Mullis & Faloona, 1987) è stata effettuata nel DNA Thermal Cycler della Perkin Elmer. Una tipica miscela di amplificazione conteneva, in un

volume finale di 50  $\mu$ l, dNTP 200  $\mu$ M, 50 pmoli di ciascun oligonucleotide di innesco, 10-100 ng di DNA stampo e 2,5 U di *AmpliTaq* DNA polimerasi. I cicli di amplificazione prevedevano: 1 minuto a 94°C, 1 minuto ad una temperatura di 2-4°C inferiore a quella di fusione degli oligonucleotidi, 1 minuto a 72°C ed un'incubazione finale a 72°C per 10 minuti per completare l'estensione delle catene polinucleotidiche. La temperatura di fusione degli oligonucleotidi è stata calcolata considerando un contributo di 2°C per ogni coppia A/T e di 4°C per ogni coppia C/G. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel di agarosio all'1%. Il frammento di interesse è stato purificato mediante il QIAquick PCR purification kit della Qiagen.

### ***2.5 Mutagenesi sito-specifica***

Per ottenere i plasmidi mutati è stato utilizzato il protocollo di amplificazione del kit di mutagenesi sito-specifica della Stratagene, sfruttando le proprietà della *Pfu* DNA polimerasi, che replica i filamenti di DNA con alta fedeltà. Alla fine dei cicli di amplificazione sono stati ottenuti principalmente plasmidi mutati non circolarizzati. L'endonucleasi *Dpn* I, specifica per il DNA metilato o semi-metilato, ha consentito di eliminare il DNA parentale *dam*-metilato in quanto proveniente da ceppi di *E. coli*. La miscela risultante è stata utilizzata per trasformare le cellule supercompetenti Epicurian Coli XL1-Blue.

### ***2.6 Metodi per l'analisi di proteine***

La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Bradford (Bradford, 1976), impiegando il BIO-RAD Protein Assay e l'albumina di siero bovino come standard. I campioni proteici sono stati analizzati mediante

elettroforesi su gel di poliacrilammide al 14% in presenza di SDS 0,1% (p/v), sia in condizioni riducenti che non riducenti. I campioni proteici sono stati risospesi in 25 mM Tris•Cl, pH 8,8, contenente SDS 1% (p/v), 0,7 M  $\beta$ -mercaptoetanololo, glicerolo 5% (v/v) e bromofenolo blu 0,01% (p/v) e poi bolliti per 5 min prima di essere caricati su gel, secondo la procedura descritta da Laemmli (1970). Per la SDS-PAGE in condizioni non riducenti, i campioni sono stati risospesi nello stesso tampone, mancante del  $\beta$ -mercaptoetanololo e contenente urea 2 M come agente denaturante caotropico. Per la determinazione della massa molecolare dei campioni analizzati sono state impiegate le seguenti proteine di riferimento: transferrina (80 kDa), albumina di siero bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrasi carbonica (29 kDa) e citocromo *c* (12 kDa).

Per l'analisi mediante Western blot, i campioni proteici separati mediante SDS-PAGE sono stati trasferiti su membrana Immobilon P (Millipore) mediante il sistema Mini Trans Blot (Bio-Rad) in tampone Tris•Cl 20 mM, glicina 160 mM, pH 8,3, contenente metanololo 10% (v/v). Il filtro è stato incubato prima per 1 ora a temperatura ambiente in tampone PBS contenente latte in polvere 5% (p/v), e poi per tutta la notte a 4 °C con l'anticorpo monoclonale anti-nitrotirosina (Upstate), o con l'anticorpo monoclonale anti-glutatione (Chemicon), entrambi diluiti 1:1000 in PBS, contenente latte 2% (p/v). Il filtro è stato quindi lavato più volte in PBS contenente Tween-20 0.05% (v/v) ed infine incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (diluizione 1:20000 di goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz). Il segnale di chemioluminescenza è stato visualizzato mediante il kit SuperSignal West Pico (Pierce).

### ***2.7 Dosaggio dell'attività superossido dismutasica***

L'attività della SOD è stata determinata mediante il metodo indiretto della xantina/xantina ossidasi (McCord & Fridovich, 1969). La xantina ossidasi ossida la xantina producendo l'anione superossido, che a sua volta riduce il citocromo *c*. Tale riduzione viene seguita spettrofotometricamente attraverso l'aumento dell'assorbanza a 418 nm. Quando nella miscela di reazione viene aggiunta la SOD, questa sottrae l'anione superossido inibendo la riduzione del citocromo *c*, determinando quindi un minore incremento di assorbanza a 418 nm. Le misure sono state eseguite con uno spettrofotometro Thermo, mod. Biomate 3. La velocità di riduzione del citocromo *c* è lineare nei primi minuti di reazione e la pendenza della retta diminuisce all'aumentare della quantità di SOD presente nella miscela di reazione. Una unità di attività superossido dismutasica si definisce come la quantità di enzima necessaria per ottenere il 50% di riduzione di pendenza della retta. I valori di attività specifica dei campioni enzimatici sono stati ottenuti dividendo le unità per la concentrazione proteica. Il dosaggio di attività è stato effettuato in triplicato su diverse diluizioni del campione enzimatico, utilizzando il tampone C, in cui sono stati aggiunti citocromo *c* 12,5  $\mu\text{M}$  e xantina 62,5  $\mu\text{M}$ . La reazione inizia con l'aggiunta di xantina ossidasi ad una concentrazione finale di 0,1-0,2 mg/ml. I dosaggi sono stati effettuati a 25°C, la temperatura normalmente utilizzata con il metodo della xantina ossidasi.

### ***2.8 Purificazione della PhSOD nativa***

Le cellule del ceppo TAC 125 di *P. haloplanktis* sono state cresciute in mezzo liquido LB a 4°C e raccolte come precedentemente descritto (Masullo et al,

2000). In una tipica procedura di purificazione, 32g di cellule sono state risospese in 80 mL di tampone A. Il campione è stato poi lisato in un distruttore cellulare (Constant Systems Ltd, mod. Z) ad una pressione di 1,5 kbar ed, immediatamente dopo la lisi, è stato aggiunto PMSF 100  $\mu$ M. I detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione a 30000 x g e successiva ultracentrifugazione a 100000 x g, che ha permesso di ottenere il sopranatante post-ribosomale. La frazione S-100 (120 mL) è stata poi dializzata contro il tampone A e caricata su una colonna di DEAE-sepharose fast flow (1,6 x 40 cm) equilibrata a 120 mL/h con tampone A. Dopo aver lavato la colonna con tampone A, è stato applicato un gradiente lineare di 0-400 mM KCl in tampone A (1,2 L di volume totale). L'attività superossido dismutasica eluiva in un intervallo di concentrazione di 100-150 mM KCl. Le frazioni attive sono state raccolte (70 mL di volume totale) e dializzate contro il tampone B, a cui è stato poi aggiunto ammonio solfato 1 M. Il campione è stato poi caricato su una colonna di Phenyl-Sepharose fast flow (1 x 25 cm) equilibrata a 60 mL/h con lo stesso tampone. L'attività superossido dismutasica eluiva nel volume escluso, mentre le altre proteine legate alla resina eluivano lavando la colonna con tampone B. Le frazioni attive sono state raccolte, concentrate con Aquacide IIA (Calbiochem), e conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$  in tampone B, contenente 50% glicerolo. La concentrazione finale del campione di *PhSOD* purificata era di 1,7 mg/mL. In una procedura di purificazione modificata, al tampone di lisi A è stato aggiunto  $\beta$ -mercaptoetanololo 7 mM. In questo caso il campione di *PhSOD* purificata è stato nominato  $\beta$ me-*PhSOD*.

### ***2.9 Determinazione del peso molecolare in condizioni non denaturanti***

Il peso molecolare dei campioni purificati è stato determinato anche in condizioni native mediante gel-filtrazione, eseguita su colonna Superdex 75 HR 10/30 equilibrata con il tampone D e collegata ad un sistema FPLC operante a temperatura ambiente ad una velocità di flusso di 0,5 ml/min. La colonna è stata calibrata caricando le seguenti quantità di proteine di massa molecolare nota disciolte in un volume finale di 100 µL: 85 µg del fattore di allungamento G di *E. coli* (77,6 kDa), 100 µg di ovoalbumina (45 kDa), 50 µg di anidrasi carbonica (29 kDa), 18 µg di citocromo *c* (12,2 kDa).

### ***2.10 Determinazione del contenuto metallico dei campioni di PhSOD***

Il contenuto metallico dei campioni purificati è stato determinato in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica dell'Università di Catanzaro "Magna Graecia" mediante spettrometria per assorbimento atomico, utilizzando uno spettrometro Varian SpectrAA 220Z, completo di forno di grafite GTA 110Z e di correttore con effetto Zeeman. Per valutare l'accuratezza delle misure è stato utilizzato un campione di controllo, Seronorm<sup>TM</sup> Trace Elements Serum (Sero, Norway).

### ***2.11 Metodi spettroscopici***

I profili di denaturazione UV sono stati ottenuti con uno spettrofotometro Cary 1E (Varian) collegato ad un dispositivo elettronico di controllo Peltier della temperatura, misurando l'assorbanza dei campioni a due diverse lunghezze d'onda, 286 e 274 nm. La differenza di assorbanza ( $A_{286} - A_{274}$ ) è stata

registrata ad ogni incremento di 0,5°C nell'intervallo di temperatura tra 20 e 60°C, come precedentemente descritto (Lapanje, 1978; Arcari et al, 1999).

Le misure di fluorescenza sono state condotte mediante lo spettrofotofluorimetro Cary Eclipse (Varian).

### ***2.12 Determinazione della struttura primaria della PhSOD ed identificazione della modifica covalente***

Gli esperimenti descritti in questa sezione sono stati condotti in collaborazione con il Dipartimento di Scienze della Vita della II Università di Napoli. La massa molecolare relativa ( $M_r$ ) della PhSOD è stata determinata mediante lo spettrometro di massa Q-TOF *Micro* (Waters, Milford, MA, USA) collegato ad un sistema CapLC. I campioni di proteina sono stati desalificati mediante RP-HPLC, prima di procedere all'analisi per ESI/MS. L'acquisizione e la deconvoluzione dei dati sono state effettuate su un PC Mass Lynx Windows NT. La determinazione della struttura primaria della PhSOD è stata effettuata grazie all'uso di due endopeptidasi (Asp-N e tripsina) ed alla combinazione di degradazione di Edman e spettrometria di massa. I peptidi ottenuti dall'idrolisi con Asp-N sono stati separati mediante RP-HPLC e direttamente sequenziati mediante degradazione automatica di Edman. I peptidi triptici sono stati separati con un sistema modulare CapLC direttamente connesso ad una sorgente Z-spray del Q-TOF *Micro*. Per l'identificazione della modifica covalente sul residuo Cys57, il campione di PhSOD è stato ridotto e S-piridilettilato con 4-vinilpiridina (Di Maro et al., 2001). Tutti i dati ESI/MS e MS/MS sono stati acquisiti come descritto da Di Maro et al, 2001.

Per l'allineamento multiplo di strutture primarie della SOD, è stato adoperato il programma BLAST disponibile on-line ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

### ***2.13 S-glutathionilazione della PhSOD***

Il campione di *PhSOD* (3-4 µg) è stato incubato a temperatura ambiente per 1 ora in presenza di diverse concentrazioni di GSH, GSSG e GSNO. L'eccesso di reagente libero è stato allontanato mediante ultrafiltrazione utilizzando Microcon-3 (Amicon). I campioni sono stati poi sottoposti a dosaggio di attività e Western blotting.

### ***2.14 Modello tridimensionale della PhSOD***

La sequenza amminoacidica della *PhSOD* è stata inviata al Server SwissModel (Peitsch, 1996), utilizzando le strutture tridimensionali note della Fe-SOD di *E. coli* (Lah et al, 1995; PDB: 1ISC) e della Mn-SOD mitocondriale umana (Borgstahl et al, 1992; PDB: 1MSD) come strutture di riferimento. Il modello tridimensionale del monomero della *PhSOD* è stato visualizzato utilizzando il programma SwissPdbViewer (Guex & Peitsch, 1997) e il software RasMol (Bernstein, 2000).

### ***2.15 Produzione della PhSOD ricombinante***

Per la produzione eterologa della proteina, il ceppo BL21(DE3) è stato trasformato con un vettore di espressione contenente il gene della *PhSOD* (*vPhSOD*) e cresciuto a 37 °C in LB contenente kanamicina 0,3 mg/ml fino a 0,6 OD<sub>600</sub>. Dopo induzione con IPTG 100 µg/ml per 3 ore, le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 15 min, risospese in tampone A, e lisate nel

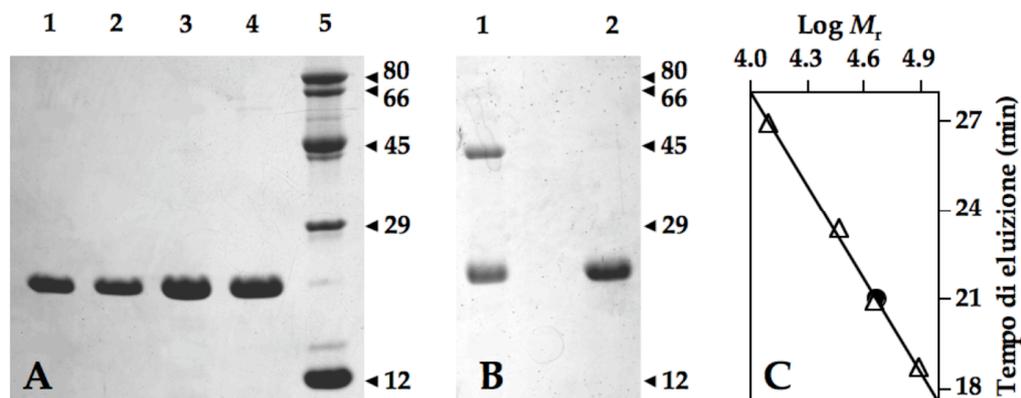
distruttore cellulare. Il lisato cellulare è stato poi centrifugato a 30000 x g per 30 min, e il sopranatante, dializzato con tampone A, è stato incubato per una notte a 4 °C con 2 ml di resina Ni-agarosio, precedentemente equilibrata con lo stesso tampone. Dopo aver raccolto la frazione di proteine non legate, la resina è stata lavata con tampone A. Successivamente le proteine legate sono state eluite applicando un gradiente discontinuo di 20 mM, 50 mM e 250 mM imidazolo in tampone A. Le frazioni eluite sono state quindi analizzate mediante SDS-PAGE; quelle raccolte con imidazolo 20 mM mostravano un'unica banda proteica di peso molecolare atteso (22 kDa) e pertanto sono state riunite e dializzate contro il tampone A, contenente glicerolo 50% (v/v) e conservate a -20 °C.

## RISULTATI

### ***3.1 Proprietà molecolari della PhSOD***

La quantità di *PhSOD* e di  $\beta$ me-*PhSOD* ottenuta sia in assenza che in presenza di  $\beta$ -mercaptoetanolo era di 0,37 mg/g di cellule fresche. L'arricchimento dell'attività specifica della *PhSOD* è risultato di 50 volte rispetto alla frazione S-100, con una resa totale di circa il 90%. Per valutarne la purezza, la *PhSOD* e la  $\beta$ me-*PhSOD* sono state analizzate mediante SDS-PAGE. In condizioni riducenti, ossia in presenza di  $\beta$ -mercaptoetanolo, entrambi i campioni risultavano omogenei e mostravano una mobilità elettroforetica corrispondente alla massa molecolare di 22 kDa del monomero della *PhSOD* (Fig. 1A). In condizioni non riducenti ed in presenza di urea 2 M appariva anche una banda di 45 kDa solo nel campione di *PhSOD* (Fig. 1B). La massa molecolare di tale banda suggeriva la formazione di un legame covalente tra due subunità della *PhSOD*. Le misure di densitometria per scansione su gel hanno evidenziato che la banda più pesante rappresenta in queste condizioni circa il 40% del campione totale.

La massa molecolare della *PhSOD* e della  $\beta$ me-*PhSOD* è stata anche determinata in condizioni native mediante cromatografia su gel-filtrazione, utilizzando una Superdex 75 HR 10/30 calibrata con proteine a peso molecolare noto (Fig. 1C). Entrambi i campioni proteici eluivano come singoli picchi simmetrici con una massa molecolare apparente di 46 kDa, un valore che approssima la massa teorica di due subunità. Questi dati indicano che la *PhSOD* in condizioni native è organizzata come omodimero.



**Fig. 1:** Proprietà molecolari della *PhSOD*. (A) SDS/PAGE in condizioni non riducenti. *Pozzetti*: 1, 3  $\mu\text{g}$  *PhSOD*; 2, 3  $\mu\text{g}$   $\beta\text{me-PhSOD}$ ; 3, 6  $\mu\text{g}$  *PhSOD*; 4, 6  $\mu\text{g}$   $\beta\text{me-PhSOD}$ ; 5,  $M_r$  Marcatori di peso molecolare (peso indicato a destra). (B) SDS/PAGE in condizioni non riducenti. *Pozzetti*: 1, 6  $\mu\text{g}$  *PhSOD*; 2, 6  $\mu\text{g}$   $\beta\text{me-PhSOD}$ . (C) Gel-filtrazione su colonna Superdex 75. Il tempo di eluizione è indicato con un triangolo vuoto per i marcatori di peso molecolare e con un cerchio pieno per la *PhSOD*. Il tempo di eluizione della  $\beta\text{me-PhSOD}$  è uguale a quello della *PhSOD*

Il contenuto metallico dei campioni proteici è stato analizzato mediante spettrometria ad assorbimento atomico. Il campione di *PhSOD* conteneva 0,75 atomi di ferro per subunità. Una quantità leggermente più bassa di 0,65 atomi per subunità è stata riscontrata nella  $\beta\text{me-PhSOD}$ . In entrambi i casi non sono state riscontrate tracce di manganese. Questi dati dimostrano che la SOD isolata da *P. haloplanktis* appartiene alla classe delle Fe-SOD.

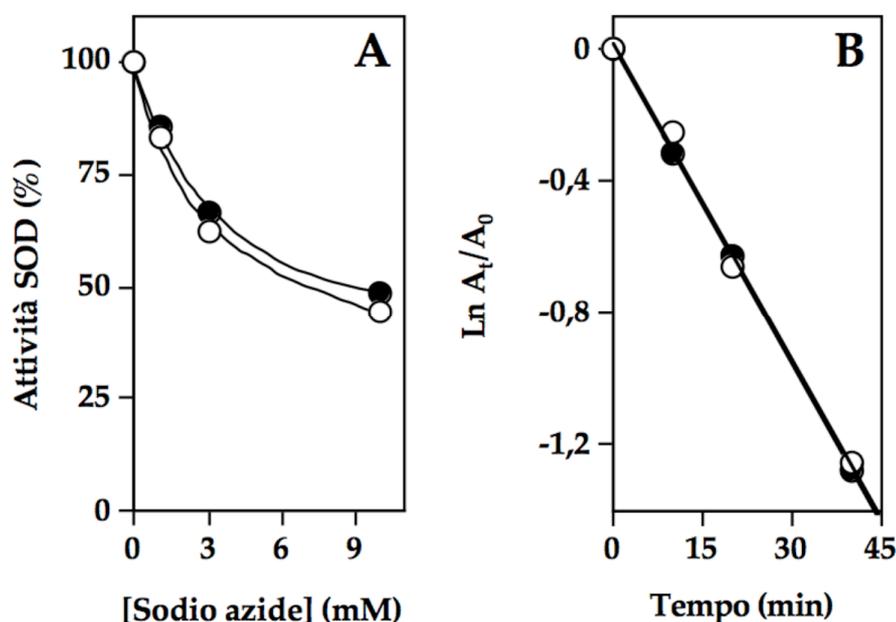
### 3.2 Proprietà biochimiche della *PhSOD*

L'attività specifica dell'enzima è stata misurata e riferita al proprio contenuto metallico. La *PhSOD* ha un'attività specifica di  $14000 \text{ U} \cdot \text{mg proteina}^{-1} \cdot \text{mole Fe}^{-1} \cdot \text{mole subunità}^{-1}$ . Per la  $\beta\text{me-PhSOD}$  è stato calcolato un valore più basso di  $10000 \text{ U} \cdot \text{mg proteina}^{-1} \cdot \text{mole Fe}^{-1} \cdot \text{mole subunità}^{-1}$ .

L'attività della *PhSOD* è stata misurata tra 5 e 30 °C ed a differenti valori di pH, ma né la temperatura né il pH influenzano l'attività specifica dell'enzima psicrofilo (dati non mostrati), suggerendo che la reazione enzimatica è apparentemente indipendente da questi due fattori.

Successivamente è stato studiato l'effetto di tipici inibitori e inattivatori delle Fe-SOD, quali la sodio azide e il perossido di idrogeno. L'attività di *PhSOD* e  $\beta$ me-*PhSOD*, misurata in presenza di concentrazioni crescenti di sodio azide, mostrava simili profili di inibizione dose-dipendente per entrambe le preparazioni di enzima (Fig. 2A). Il valore della concentrazione di inibitore che causa una riduzione del 50% di attività enzimatica ( $IC_{50}$ ) calcolati per *PhSOD* e  $\beta$ me-*PhSOD* è rispettivamente di 6,9 e 9,0 mM.

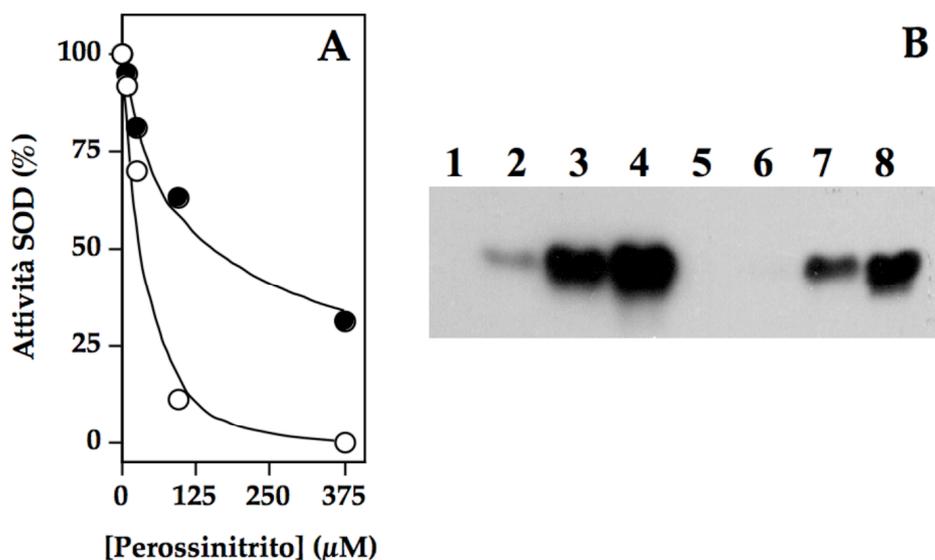
L'effetto del perossido di idrogeno su *PhSOD* e  $\beta$ me-*PhSOD* è stato valutato trattando i due campioni a 25°C con  $H_2O_2$  0,25 mM e misurando poi l'attività residua a tempi diversi. I dati seguono una tipica cinetica di inattivazione di primo ordine (Fig. 2B). Il tempo di semi-inattivazione calcolato sia per la *PhSOD* che per la  $\beta$ me-*PhSOD* è di 22 min.



**Fig. 2.** Effetto di sodio azide e perossido di idrogeno sull'attività. (A) Profilo di inibizione in presenza di sodio azide. L'attività di  $6 \cdot 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  *PhSOD* (cerchi vuoti) o  $\beta$ me-*PhSOD* (cerchi pieni) è stata misurata in presenza delle concentrazioni indicate di sodio azide ed espressa come percentuale rispetto a quella misurata in assenza di inibitore. (B) Cinetica di inattivazione in presenza di  $H_2O_2$ . Una soluzione  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  di *PhSOD* (cerchi vuoti) o  $\beta$ me-*PhSOD* (cerchi pieni) in tampone C è stata incubata a 25°C in presenza di 0.25 mM  $H_2O_2$ . Ai tempi indicati aliquote delle reazioni di 3  $\mu\text{l}$  (*PhSOD*) o 10  $\mu\text{l}$  ( $\beta$ me-*PhSOD*) sono state dosate per l'attività residua. I dati sono trattati come una cinetica di primo ordine, in cui  $A_0$  o  $A_t$  sono le attività misurate al tempo zero o  $t$

Altri studi sono stati condotti per valutare l'effetto di altri inattivatori, come il perossinitrito e il PMSF, che modificano covalentemente la Tyr34 di alcune Fe- e Mn-SOD. A tale scopo la *PhSOD* e la  $\beta$ me-*PhSOD* sono state trattate per 30 min a temperatura ambiente con concentrazioni crescenti di perossinitrito e sui campioni trattati è stata poi misurata l'attività residua. Come mostrato in Fig. 3A, entrambi i campioni sono inattivati dal perossinitrito, ma la *PhSOD* mostra una maggiore sensibilità rispetto alla  $\beta$ me-*PhSOD*. Infatti dai rispettivi profili di inattivazione sono stati estrapolati i valori di  $IC_{50}$  di 32  $\mu$ M e 153  $\mu$ M rispettivamente per la *PhSOD* e la  $\beta$ me-*PhSOD*. Il perossinitrito è un potente inattivatore della mitSOD umana ed il principale residuo bersaglio è la Tyr34, la cui modificazione in 3-nitrotirosina causa l'inattivazione irreversibile dell'enzima. Per verificare se anche la *PhSOD* è nitrata in tirosina dal perossinitrito, aliquote della miscela di reazione, in cui *PhSOD* e  $\beta$ me-*PhSOD* sono state trattate con concentrazioni crescenti di tale composto, sono state sottoposte ad analisi per Western blotting, utilizzando un anticorpo monoclonale che riconosce specificamente le tirosine ntrate. Per entrambi i campioni si osservano bande di riconoscimento antigene-anticorpo (Fig. 3B), ma il segnale di chemiluminescenza, che aumenta in maniera dose-dipendente, risulta comunque significativamente ridotto nella  $\beta$ me-*PhSOD* rispetto alla *PhSOD*.

Il PMSF è un agente modificante specifico della Fe-SOD dell'archeobatterio ipertermofilo *S. solfataricus* (De Vendittis et al, 2001). Quando è stato valutato l'effetto di tale composto sull'enzima psicrofilo, non è stata osservata alcuna inattivazione sia nei campioni di *PhSOD* che di  $\beta$ me-*PhSOD* fino alla concentrazione di 5 mM PMSF.



**Fig. 3.** Effetto del perossinitrito sulla *PhSOD* (A) Profilo di inattivazione. Una soluzione di *PhSOD*  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (cerchi vuoti) o  $\beta\text{me-PhSOD}$  (cerchi pieni) in tampone C è stata incubata a  $25^\circ\text{C}$  per 30 min in presenza delle concentrazioni indicate di perossinitrito. Dopo il trattamento, aliquote delle reazioni di  $3 \mu\text{l}$  (*PhSOD*) o  $10 \mu\text{l}$  ( $\beta\text{me-PhSOD}$ ) sono state saggiate per l'attività residua. I risultati sono espressi come percentuale rispetto a campioni non trattati. (B) Western blotting con anticorpi anti-nitrotirosina. Una soluzione di *PhSOD* o  $\beta\text{me-PhSOD}$   $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in tampone C è stata incubata con concentrazioni crescenti di perossinitrito come sopra indicato. Aliquote di  $30 \mu\text{l}$  sono state poi sottoposte a Western blotting utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-nitrotirosina  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Pozzetti 1-4: *PhSOD* dopo trattamento con 0, 35  $\mu\text{M}$ , 175  $\mu\text{M}$  e 875  $\mu\text{M}$  perossinitrito; pozzetti 5-8:  $\beta\text{me-PhSOD}$  dopo trattamento con le stesse concentrazioni di perossinitrito.

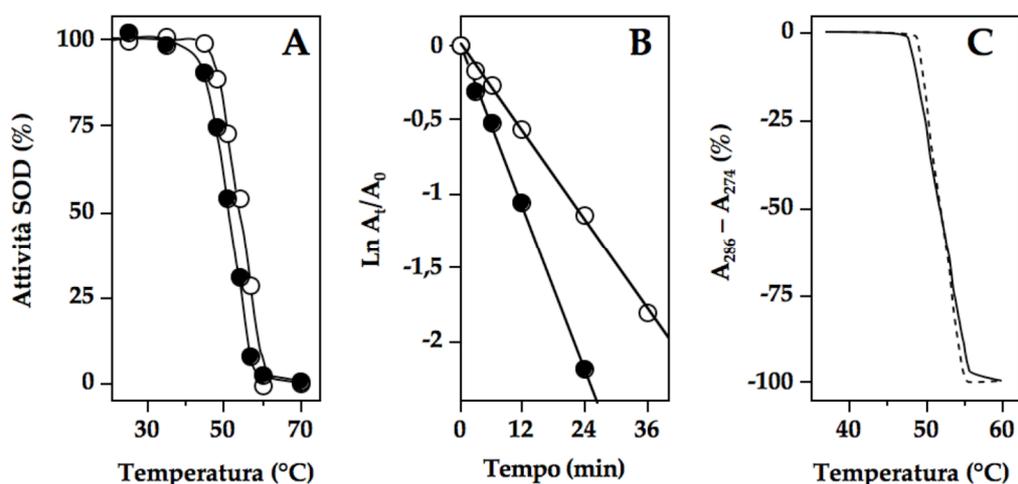
### 3.3 Effetto della temperatura sulla stabilità della *PhSOD*

Per valutare l'effetto della temperatura sulla stabilità dell'enzima psicrofilo sono stati usati diversi approcci sperimentali. In un primo momento è stata misurata l'attività residua sui campioni di *PhSOD* e  $\beta\text{me-PhSOD}$  incubati per 10 min a diverse temperature. I profili di inattivazione termica sono mostrati in Fig. 4A; le temperature di semi-inattivazione sono risultate di  $54,2^\circ\text{C}$  e  $51,4^\circ\text{C}$  rispettivamente per *PhSOD* e  $\beta\text{me-PhSOD}$ . La lieve differenza nei profili di inattivazione suggerisce che la *PhSOD* è dotata di una resistenza al calore leggermente superiore a quella di  $\beta\text{me-PhSOD}$ .

La stabilità termica dell'enzima psicrofilo è stata anche valutata mediante cinetiche di inattivazione al calore condotte a  $50^\circ\text{C}$  (Fig. 4B). Entrambi i

campioni seguono una cinetica di primo ordine ed i tempi di semi-inattivazione sono risultati di 14,2 e 7,7 min per *PhSOD* e  $\beta$ me-*PhSOD* rispettivamente.

Per valutare l'effetto della temperatura sulla struttura dell'enzima psicrofilo, sono stati ottenuti i profili di denaturazione al calore della *PhSOD* e  $\beta$ me-*PhSOD* mediante spettroscopia UV. La *PhSOD* e la  $\beta$ me-*PhSOD* mostrano profili di denaturazione quasi sovrapponibili (Fig. 4C) e la temperatura di semi-denaturazione è risultata di 51,9 °C per entrambi i campioni. Questo valore conferma la stabilità termica dell'enzima psicrofilo ed indica che l'effetto della temperatura sulla struttura proteica è simile per entrambi i campioni.

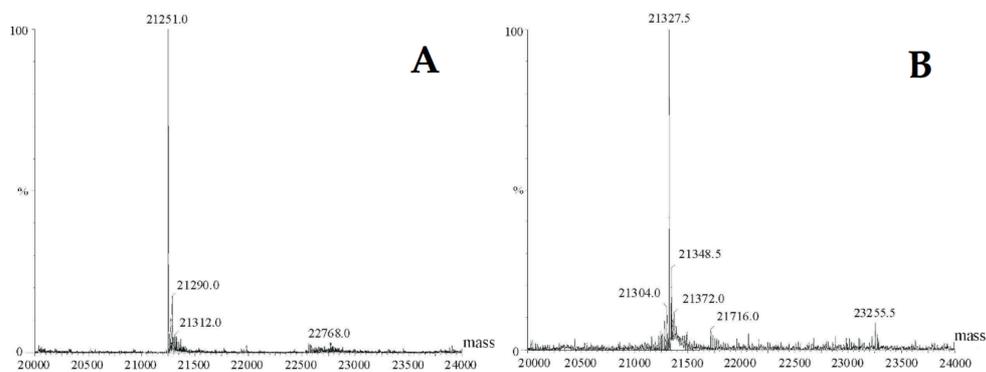


**Fig. 4.** Effetto della temperatura sulla stabilità della *PhSOD*. (A) Profilo di inattivazione termica. Campioni di *PhSOD* (cerchi vuoti) o  $\beta$ me-*PhSOD* (cerchi pieni)  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in tampone C sono stati incubati per 10 minuti alle temperature indicate e poi messi in ghiaccio. Aliquote delle incubazioni di  $3 \mu\text{l}$  (*PhSOD*) o  $10 \mu\text{l}$  ( $\beta$ me-*PhSOD*) sono state saggiate per l'attività residua. I risultati sono espressi come percentuale dell'attività misurata su campioni non trattati. (B) Cinetiche di inattivazione a  $50^\circ\text{C}$ . Una soluzione di *PhSOD* (cerchi vuoti) o  $\beta$ me-*PhSOD* (cerchi pieni)  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in tampone C è stata incubata a  $50^\circ\text{C}$ . Ai tempi indicati aliquote delle reazioni di  $3 \mu\text{l}$  (*PhSOD*) o  $10 \mu\text{l}$  ( $\beta$ me-*PhSOD*) sono state saggiate per l'attività residua. I dati seguono una cinetica di primo ordine, dove  $A_0$  o  $A_t$  rappresentano l'attività misurata al tempo 0 o  $t$ . (C) Profilo di denaturazione termica. Curve di fusione UV di  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  *PhSOD* (linea continua) o  $\beta$ me-*PhSOD* (linea tratteggiata) in tampone C

### 3.4 Struttura primaria della *PhSOD*

La massa molecolare di *PhSOD* e  $\beta$ me-*PhSOD* è stata determinata mediante spettrometria di massa. I valori di  $M_r$  di  $21251,0 \pm 0,4$  per *PhSOD* (Fig. 5A) e

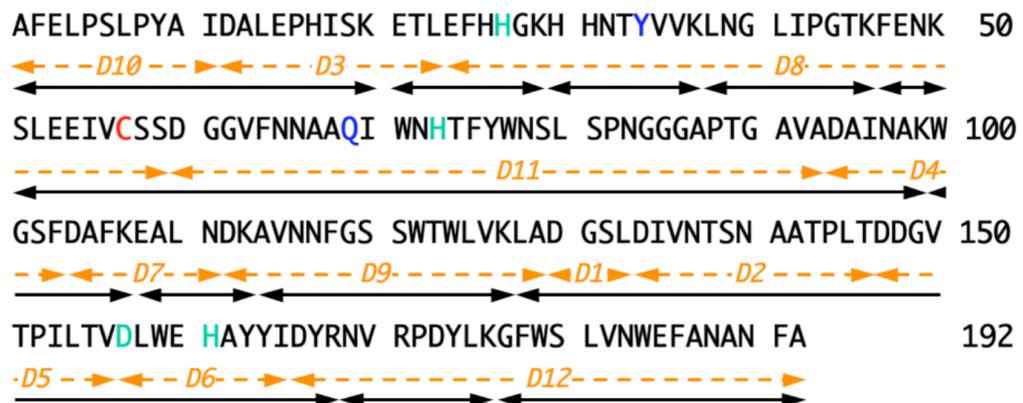
21327,5 ± 0,4 per  $\beta$ me-*PhSOD* (Fig. 5B) evidenziano una differenza di 76,5 Da in più nel campione di  $\beta$ me-*PhSOD*. Entrambi i campioni non mostrano alcun valore di massa corrispondente ad un eventuale legame covalente tra due subunità di *PhSOD*.



**Fig. 5.** Analisi mediante spettrometria di massa ESI/Q-TOF dei campioni di *PhSOD* (A) e  $\beta$ me-*PhSOD* (B)

Successivamente è stata determinata la struttura primaria dell'enzima psicrofilo mediante combinazione di degradazione di Edman e spettrometria di massa. Sono stati prima analizzati i peptidi ottenuti dalla digestione enzimatica con Asp-N ed è stato realizzato un primo allineamento mediante ricerca per omologia con il software BLAST, che ha evidenziato la notevole similarità con la Fe-SOD da *Vibrio cholerae* (AC: AAF95193). Alcune incertezze, riguardanti tra l'altro la posizione 57 nel peptide D8 (Fig. 6), sono state risolte mediante l'analisi per spettrometria di massa in tandem (ESI-MS/MS) dei peptidi ottenuti dalla digestione con tripsina. Tale analisi ha permesso di identificare il residuo in posizione 57 (Cys57) e di determinare quindi la sequenza completa della *PhSOD* (Fig. 6). L'allineamento con altre Fe- e Mn-SOD ha mostrato la più alta identità amminoacidica con le SOD del genere *Vibrionaceae* (77-79%) e con la Fe-SOD di *E. coli* (*EcSOD*, 70%). La percentuale scende al 41-44%, quando la *PhSOD* è comparata con la mitSOD,

la Fe-SOD archeobatterica di *S. solfataricus* e la Mn-SOD di *E. coli*. In un recente studio, basato sull'allineamento di 261 sequenze di Fe- e Mn-SOD e di 12 strutture cristallografiche, sono stati identificati i residui essenziali per l'organizzazione strutturale e funzionale di tale enzima (Wintjens et al, 2004). In particolare la *PhSOD* contiene i seguenti residui altamente conservati: residui della prima sfera di coordinazione del metallo (H26, H73, D157, H161); residui localizzati nella seconda sfera (H30, H31, Y34, W77, W122, W159); residui vicini all'interfaccia dimerica (H30, Y34, S120, W159, E160, H161, A162, Y163, Y164, N169); residui tipici delle Fe-SOD dimeriche (F64, A68, Q69, F75, A141); residui comuni a tutte le SOD omodimeriche (T22, N65, F118, P144). Tale confronto conferma che la *PhSOD* appartiene alla classe delle Fe-SOD omodimeriche.



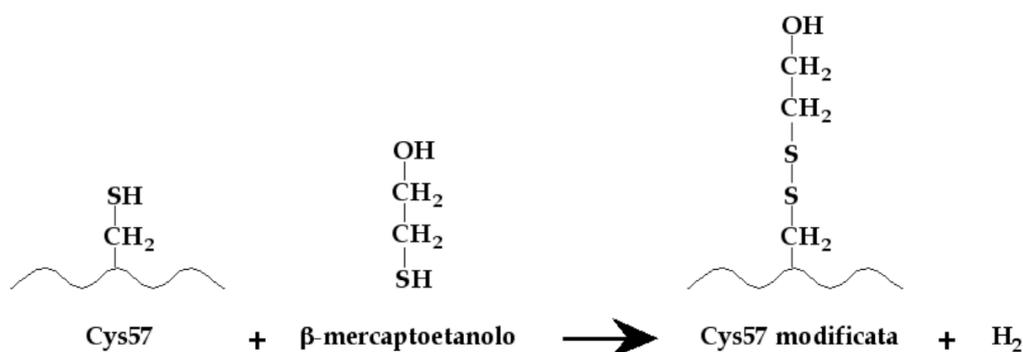
**Fig. 6.** Sequenza amminoacidica della *PhSOD*. I residui coinvolti nella coordinazione del metallo e nell'organizzazione strutturale del sito attivo sono rispettivamente evidenziati in verde o in azzurro. Il residuo di Cys57 bersaglio di modifica covalente da parte del  $\beta$ -mercaptoetanolo in *PhSOD* è evidenziato in rosso. I peptidi ottenuti dalla digestione con Asp-N, numerati secondo il tempo di eluizione dalla colonna sono indicati con frecce tratteggiate in arancione. I peptidi ottenuti dalla digestione con tripsina sono indicati con frecce continue in nero

### 3.5 Identificazione della modifica covalente della Cys57 in *PhSOD*

La massa teorica dell'enzima psicrofilo è di 21250,62 Da, in accordo con il valore sperimentale di 21251,0 Da determinato per il campione di *PhSOD*

analizzato mediante spettrometria di massa ESI/QTOF (Fig. 5A). Si è pertanto ipotizzato che la massa extra di 76,5 Da determinata per la  $\beta$ me-*PhSOD* (Fig. 5B) corrispondesse a quella di un residuo modificato. Per tale motivo anche il campione di  $\beta$ me-*PhSOD* è stato sottoposto a digestione enzimatica con Asp-N e tripsina. Tale analisi ha permesso di identificare che i peptidi E24→S59 e S51→K99 (Fig. 6), ottenuti rispettivamente da Asp-N e tripsina, avevano entrambi una massa aggiuntiva di 76,5 Da rispetto a quelli analizzati dalla *PhSOD*. Tali peptidi contengono il residuo C57, un probabile candidato per la modificazione covalente della *PhSOD*. E' noto infatti che proteine con gruppi tiolici altamente reattivi possono formare ponti disolfuro con reagenti riducenti comunemente usati nelle procedure di purificazione delle proteine, come il  $\beta$ -mercaptoetanolo o il ditiotreitolo (Packman & Berry, 1995). Per verificare la presenza di tale modifica, il campione di  $\beta$ me-*PhSOD* è stato sottoposto a riduzione e successiva S-piridiletilazione. La massa sperimentale del derivato S-piridiletilato è risultata di  $21356,0 \pm 0,4$  Da, in perfetto accordo con la massa teorica di 21355,89 Da, calcolata tenendo conto della modifica di C57 con 4-vinilpiridina (dati non mostrati). In un esperimento di controllo, il campione di *PhSOD* ridotto e S-piridiletilato mostrava un valore di  $M_r$  molto simile di  $21356,1 \pm 0,4$ . E' quindi probabile che, nelle condizioni sperimentali di S-piridiletilazione, l'eccesso di  $\beta$ -mercaptoetanolo rimuova il primo addotto dal campione di  $\beta$ me-*PhSOD*. Questi dati suggeriscono la formazione di un ponte disolfuro tra la Cys57 di *PhSOD* e il  $\beta$ -mercaptoetanolo (Fig. 7). Anche se la modifica covalente è localizzata in una regione non conservata della *PhSOD*, è interessante osservare che la struttura dell'addotto è molto simile per dimensioni alla catena laterale del residuo corrispondente in *E. coli* (Arg57) e

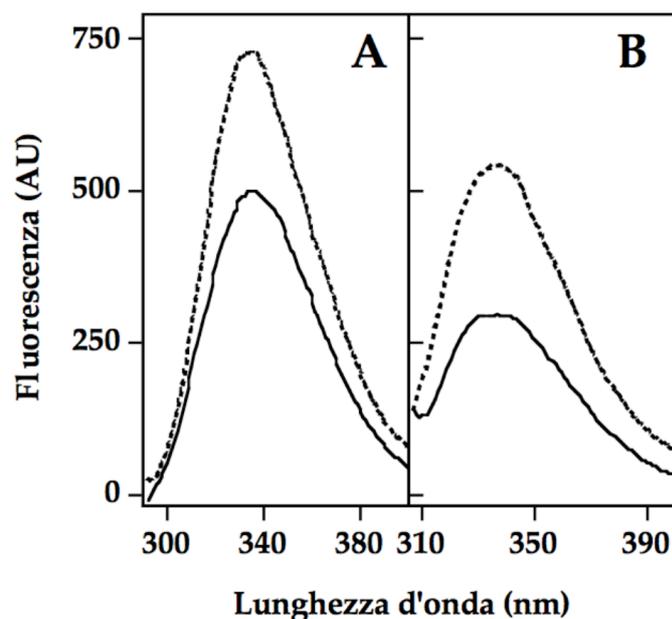
in *V. cholerae* (Lys58). L'elevata reattività della Cys57 spiega anche la comparsa della banda di 45 kDa in SDS-PAGE in condizioni non riducenti (Fig. 1B). In questo caso la reattività della Cys57 porta alla formazione di un ponte disolfuro tra due subunità di *PhSOD*.



**Fig. 7.** Rappresentazione schematica della reazione tra  $\beta$ -mercaptoetanol e Cys57 di *PhSOD*

### ***3.6 Effetti della modifica covalente di Cys57 sulla fluorescenza intrinseca di PhSOD***

Nella sequenza amminoacidica di *PhSOD* sono presenti otto residui di triptofano e sette di tirosina, responsabili della fluorescenza intrinseca dell'enzima psicrofilo. In Fig. 8 sono mostrati gli spettri di fluorescenza di *PhSOD* e  $\beta$ me-*PhSOD*, registrati alle lunghezze d'onda di eccitazione di 280 nm (Fig. 8A) e 295 nm (Fig. 8B). Per entrambi i campioni e con entrambe le lunghezze d'onda la massima emissione era ottenuta a circa 335 nm. Inoltre il campione di  $\beta$ me-*PhSOD* mostrava un'intensità di emissione significativamente aumentata rispetto a *PhSOD*, senza variazione della lunghezza del massimo di emissione. Tali dati indicano che la modifica covalente sulla Cys57 altera l'emissione di alcuni residui coinvolti nella fluorescenza intrinseca dell'enzima psicrofilo.

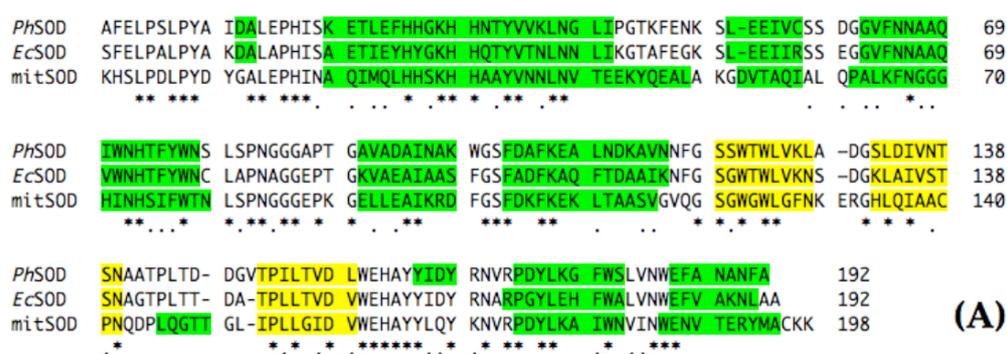


**Fig. 8.** Effetto della modificazione covalente in Cys57 sulle proprietà fluorescenti della *PhSOD*. Spettri di fluorescenza di una soluzione contenente  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  di *PhSOD* (linea continua) o  $\beta\text{me-PhSOD}$  (linea tratteggiata) in tampone B, contenente 5% (v/v) glicerolo. Le lunghezze d'onda di eccitazione sono 280 nm (A) o 295 nm (B)

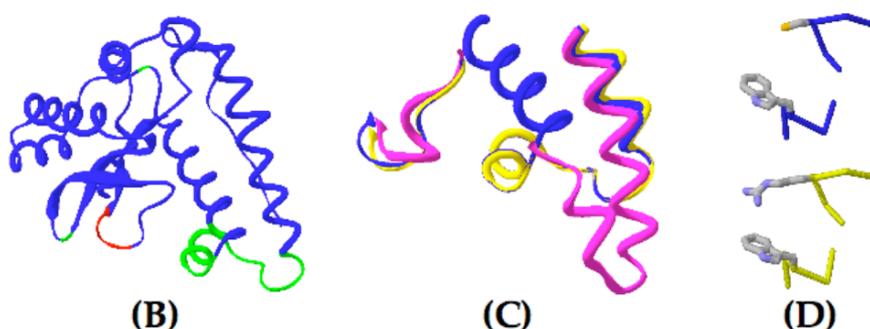
### 3.7 Modello tridimensionale di *PhSOD*

Sulla base di un allineamento strutturale tra *PhSOD*, *EcSOD* (Lah et al, 1995) e *mitSOD* (Borgstahl et al, 1992) mostrato in Fig. 9A, è stato costruito un modello tridimensionale del monomero della *PhSOD* (Fig. 9B). In tale modello la *PhSOD* mostra la tipica organizzazione strutturale delle Fe- e Mn-SOD, costituita da un dominio N-terminale ad  $\alpha$ -elica ed un dominio C-terminale con struttura  $\alpha + \beta$ . La sovrapposizione strutturale tra la *PhSOD* e le due strutture di riferimento è molto estesa, eccetto per due regioni: il segmento peptidico I42-D60 nel dominio N-terminale e il segmento D147-V150 nel dominio C-terminale. Nonostante il primo segmento, contenente la Cys57, rappresenti una sequenza non conservata nelle Fe- e Mn-SOD, la struttura di questa regione della *PhSOD* è sovrapponibile a quella di *EcSOD*, ma è significativamente differente da quella di *mitSOD*. In particolare, in *PhSOD* e *EcSOD* questa

regione è organizzata come una piccola  $\alpha$ -elica con un'orientazione diversa da quella della mitSOD (Fig. 9C). Infatti, mentre in *PhSOD* ed *EcSOD* la piccola  $\alpha$ -elica è ripiegata rispetto alla successiva lunga  $\alpha$ -elica ed è situata di fronte al dominio C-terminale, nella mitSOD essa precede e mantiene la stessa orientazione della successiva lunga  $\alpha$ -elica. Questa diversa organizzazione strutturale sembra una caratteristica discriminante tra SOD dimeriche, come *PhSOD* e *EcSOD*, o tetrameriche, come mitSOD.



(A)



**Fig. 9.** Modello tridimensionale della *PhSOD*. (A) Allineamento strutturale tra *PhSOD*, *EcSOD* e mitSOD. I residui organizzati come  $\alpha$ -eliche o  $\beta$ -foglietto sono evidenziate in verde o giallo, rispettivamente. (B) Rappresentazione a nastro del modello tridimensionale del monomero di *PhSOD*. Le regioni sovrapponibili a entrambe le strutture (*EcSOD* e mitSOD) sono colorate in blu. I segmenti sovrapponibili ad una sola delle strutture (*EcSOD*) o a nessuna delle due sono colorate in verde o rosso, rispettivamente. (C) Comparazione strutturale dei segmenti non sovrapponibili. La *PhSOD* è blu, la *EcSOD* è gialla, la mitSOD è magenta. (D) Residui nell'intorno della Cys57. Lo scheletro dei peptidi 55-59 e 143-147 è colorato in blu per la *PhSOD* (in alto) o in giallo per la *EcSOD* (in basso). Le catene laterali di Cys57 per *PhSOD*, Arg57 per *EcSOD* e Trp71 (per entrambe le strutture) sono mostrate in "wireframe" e colorate in CPK. Le figure sono state preparate usando il programma Swiss-Pdb Viewer (B e C) o il software Rasmol (D).

L'altra differenza strutturale nel modello concerne la posizione del segmento D147-V150 di *PhSOD*, non sovrapponibile a nessuna delle altre due strutture.

Tale segmento è incluso in un'altra regione non conservata delle SOD e contiene un residuo in più rispetto ad *EcSOD*. Inoltre, mentre la *PhSOD* e la *EcSOD* formano un'ansa in questa regione, il corrispondente segmento nella *mitSOD* è parte di una piccola  $\alpha$ -elica. Comunque le differenze strutturali osservate nel segmento D147-V150 sono molto meno drammatiche di quelle del segmento I42-D60.

Un'altra osservazione sul modello tridimensionale della *PhSOD* riguarda la posizione di alcuni residui intorno alla Cys57 (Fig. 9D). In *EcSOD* il residuo corrispondente Arg57 sembra avere un ingombro sterico simile a quello dell'addotto sulla cisteina in *PhSOD*. Lo stesso avviene nella Fe-SOD di *V. cholerae*, dove la posizione di Cys57 è occupata da una lisina.

### **3.8 Espressione eterologa del gene codificante la *PhSOD***

Nel genoma di *P. haloplanktis*, disponibile *on line* (Medigue et al, 2005) è stato identificato il gene codificante la *PhSOD*. Tale gene è stato amplificato mediante PCR dal DNA genomico di *P. haloplanktis*, utilizzando i seguenti oligonucleotidi di innesco:

*PhSOD*fw: 5'd-AGATGGAGATAAaccATGGCATTGGA-3'

*PhSOD*rev: 5'd-TTAAGGGCTAAcTcgagGAAGTTAGCGT-3'

Per clonare il gene della *PhSOD* nel vettore di espressione procariotico pET-28, nella sequenza degli oligonucleotidi sono state inserite mutazioni rispetto alla sequenza genomica in modo da creare nel prodotto di PCR il sito di restrizione per l'enzima *NcoI* a livello della metionina iniziale e il sito di restrizione per l'enzima *XhoI* a livello del codone di terminazione (le basi

mutate sono in carattere minuscolo). Il prodotto di amplificazione (587 bp) è stato inizialmente clonato nel plasmide pGEM T-easy, che offre il vantaggio di essere già linearizzato e di facilitare l'inserimento dei prodotti di PCR amplificati con la *Taq* DNA polimerasi. Il costrutto ottenuto dopo ligasi è stato trasformato in cellule di *E. coli* DH5 $\alpha$  e sequenziato per verificare l'identità del frammento clonato.

L'espressione eterologa del gene della *PhSOD* è stata realizzata utilizzando come vettore di espressione procariotico il plasmide pET-28, contenente il gene per la resistenza all'antibiotico kanamicina, e il ceppo di *E. coli* BL21(DE3). A valle del gene clonato, il plasmide pET-28 contiene una sequenza codificante 6 istidine seguita da un codone di terminazione. La presenza della coda di istidine permette di purificare la proteina ricombinante tramite cromatografia di affinità. Pertanto dal costrutto in pGEM T-easy è stato isolato, mediante digestione con *Nco*I e *Xho*I, il frammento contenente il gene della *PhSOD*. Tale frammento è stato poi clonato nel vettore pET-28 previamente digerito con *Nco*I e *Xho*I. Nel nuovo plasmide, chiamato *vPhSOD*, il gene della *PhSOD* è nella corretta cornice di lettura.

Per la produzione della *PhSOD* ricombinante (*PhSOD*<sub>ric</sub>), il ceppo BL21(DE3) è stato trasformato con il vettore *vPhSOD*. Dalla coltura batterica la proteina ricombinante è stata purificata mediante cromatografia su Ni-Agarosio. Il campione purificato è stato analizzato mediante Western blotting, utilizzando anticorpi commerciali che riconoscono specificamente proteine fuse ad una coda di istidine. La resa finale di *PhSOD*<sub>ric</sub> è stata di circa 6 mg di proteina da un litro di coltura batterica.

### **3.9 Proprietà molecolari e biochimiche della *PhSOD<sub>ric</sub>***

Le proprietà molecolari della proteina ricombinante sono state analizzate e confrontate con quelle della proteina nativa. L'analisi mediante SDS-PAGE ha evidenziato che, come l'enzima nativo, la *PhSOD<sub>ric</sub>* mostra in condizioni riducenti, un'unica banda con mobilità elettroforetica di 22 kDa, mentre in condizioni non riducenti presenta la banda aggiuntiva di 45 kDa. Inoltre, anche la *PhSOD<sub>ric</sub>* si comporta come un omodimero in esperimenti di gel-filtrazione su colonna Superdex 75. La *PhSOD<sub>ric</sub>* contiene 0,22 atomi di ferro per subunità e la sua attività specifica è di 13000 U•mg proteina<sup>-1</sup>•moli Fe<sup>-1</sup>•mole subunità, molto simile a quella della *PhSOD* nativa.

### **3.10 Produzione di forme mutate *C57S-PhSOD* e *C57R-PhSOD***

Per studiare il ruolo del residuo Cys57 nella regolazione della *PhSOD*, sono state preparate due forme mutate in cui tale residuo è stato sostituito da serina o arginina. Il metodo di mutagenesi adoperato sfrutta l'amplificazione dell'intero vettore *vPhSOD* mediante la *Pfu* DNA polimerasi e l'uso di due coppie di oligonucleotidi, che ibridizzano alla regione da mutagenizzare e che contengono il disaccoppiamento necessario per creare il codone mutato TCT per la serina o CGT per l'arginina al posto del codone TGT della Cys57. Nei seguenti oligonucleotidi la base mutata è in carattere minuscolo:

*C57S<sub>dir</sub>* 5'-d-G<sub>160</sub>AA•GAA•ATC•GTA•TcT•TCA•TCA•GAC<sub>183</sub>-3'

*C57S<sub>rev</sub>* 5'-d-G<sub>183</sub>TC•TGA•TGA•AgA•TAC•GAT•TTC•TCC<sub>160</sub>-3'

*C57R<sub>dir</sub>* 5'-d-G<sub>160</sub>AA•GAA•ATC•GTA•cGT•TCA•TCA•GAC<sub>183</sub>-3'

*C57R<sub>rev</sub>* 5'-d-G<sub>183</sub>TC•TGA•TGA•ACg•TAC•GAT•TTC•TCC<sub>160</sub>-3'

Dopo averne controllato la sequenza, i plasmidi mutati, indicati come *vPhSOD(C57S)* e *vPhSOD(C57R)* rispettivamente, sono stati utilizzati per trasformare le cellule BL21(DE3) di *E. coli*. L'espressione e la procedura di purificazione delle proteine mutate sono state realizzate come già indicato per il vettore *vPhSOD*. La resa finale di *C57S-PhSOD* e *C57R-PhSOD* è stata simile a quella ottenuta con la *PhSOD<sub>ric</sub>*.

### ***3.11 Proprietà molecolari delle forme mutate C57S-PhSOD e C57R-PhSOD***

Sono state determinate le proprietà molecolari di *C57S-PhSOD* e *C57R-PhSOD*, comparando i risultati con quelli della *PhSOD<sub>ric</sub>*. Entrambe le forme mutate, analizzate su SDS-PAGE, mostrano la stessa mobilità elettroforetica della *PhSOD<sub>ric</sub>*, con una massa molecolare del monomero di 22 kDa. Sia in condizioni riducenti che non riducenti la banda proteica è unica, come atteso dalla sostituzione della Cys57 e quindi dell'assenza del gruppo tiolico. E' stato anche determinato il peso molecolare in condizioni native mediante gel filtrazione su colonna Superdex 75. Per entrambe le forme mutate è stata calcolata una massa molecolare di 46 kDa. Tali valori sono uguali a quello della *PhSOD<sub>ric</sub>*; pertanto si può ritenere che anche *C57S-PhSOD* e *C57R-PhSOD* siano organizzati come omodimeri e che entrambe le sostituzioni amminoacidiche non influenzino l'organizzazione strutturale dell'enzima psicrofilo. Infine le due forme mutate contengono 0,46 atomi di ferro per subunità e la loro attività specifica è risultata di 12000 U•mg di proteina<sup>-1</sup>•moli di Fe<sup>-1</sup>•mole subunità, un valore simile a quello della *PhSOD<sub>ric</sub>*. Tale dato indica che l'attività dell'enzima non viene alterata nè dalla sostituzione del gruppo sulfidrilico con quello ossidrilico nè da quella con un gruppo che per

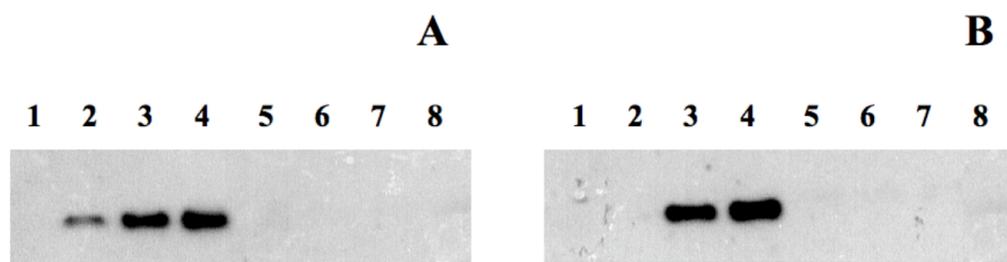
ingombro sterico è simile al  $\beta$ -mercaptoetanolo. Pertanto il residuo Cys57 sembra non essere direttamente coinvolto nel meccanismo di catalisi.

### ***3.12 Effetto del perossinitrito sulla $PhSOD_{ric}$ e sulle sue forme mutate***

La  $PhSOD$  è molto sensibile al perossinitrito e il profilo di inattivazione dell'enzima (Fig. 3A) correla con il livello di nitrurazione delle tirosine (Fig. 3B); invece la  $\beta me-PhSOD$  è meno sensibile al perossinitrito ed il livello di nitrurazione delle tirosine risulta significativamente ridotto. Per tale motivo si è deciso di verificare se la sostituzione della Cys57 in Ser o Arg potesse interferire con la sensibilità dell'enzima verso il perossinitrito e/o con la reattività di tale composto verso le tirosine. A questo proposito è interessante sottolineare che la  $EcSOD$ , che al posto della Cys57 contiene arginina, non è sensibile all'inattivazione da parte del perossinitrito, malgrado la Tyr34 sia bersaglio di nitrurazione (Soulere et al, 2001). Pertanto l'attività residua delle due forme mutate è stata dosata dopo trattamento con concentrazioni crescenti di perossinitrito ed i corrispondenti profili di inattivazione sono stati confrontati con quello della  $PhSOD_{ric}$  (dati non mostrati). I valori di  $IC_{50}$  calcolati per  $C57S-PhSOD$  e  $C57R-PhSOD$  sono risultati rispettivamente di 35  $\mu M$  e 38  $\mu M$ , simili a quello di 30  $\mu M$  della  $PhSOD_{ric}$ . Gli stessi campioni sono stati sottoposti ad SDS-PAGE e Western blotting con anticorpi anti-nitrotirosina. Il grado di nitrurazione delle tirosine aumenta a concentrazioni crescenti di perossinitrito in modo simile sia per la  $PhSOD_{ric}$  che per le sue forme mutate. Tali dati indicano che nè la sostituzione  $C57S$ , nè quella  $C57R$  mimano l'effetto della modifica da parte del  $\beta$ -mercaptoetanolo.

### ***3.13 Reazione del glutatione con la PhSOD<sub>ric</sub>***

Le proteine contenenti residui di cisteina molto reattivi sono bersaglio di modifica da parte di tioli cellulari, che giocano pertanto un ruolo chiave nel controllo dello stato redox cellulare. In particolare la glutationilazione delle proteine è una modifica che può essere indotta nelle cellule dallo stress ossidativo. Si è deciso pertanto di trattare la PhSOD<sub>ric</sub> e le sue forme mutate con concentrazioni crescenti di GSH, GSSG e GSNO fino a 5 mM. Le reazioni sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente ed i reagenti in eccesso sono stati allontanati mediante ultrafiltrazione. I campioni sono stati poi dosati per l'attività superossido dismutasica. L'attività specifica della PhSOD<sub>ric</sub> e delle forme mutate non varia significativamente all'aumentare della concentrazione dei reagenti. Aliquote degli stessi campioni sono stati poi analizzati per Western blotting, utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere specificamente proteine glutationilate. La PhSOD<sub>ric</sub> reagisce con GSSG, come evidenziato dalla comparsa di una banda proteica che aumenta di intensità a concentrazioni crescenti di GSSG (Fig. 10A). Un risultato analogo si ottiene trattando la PhSOD<sub>ric</sub> con GSNO (dati non mostrati). Viceversa, quando la PhSOD<sub>ric</sub> è trattata con GSH, non si evidenziano bande proteiche riconosciute dall'anticorpo (Fig. 10A). Ciò indica che la PhSOD<sub>ric</sub> non reagisce con GSH e che pertanto il glutatione ridotto non è in grado di formare un ponte disolfuro con Cys57. Quando trattata con GSSG la forma mutata C57S-PhSOD non mostra alcun segnale di riconoscimento (Fig. 10B) ed un risultato analogo è ottenuto anche con mutata C57R-PhSOD. Tutti questi dati indicano che il GSSG e il GSNO formano un ponte disolfuro con la Cys57 di PhSOD, ma che tale modifica non ha effetti significativi sull'attività dell'enzima.

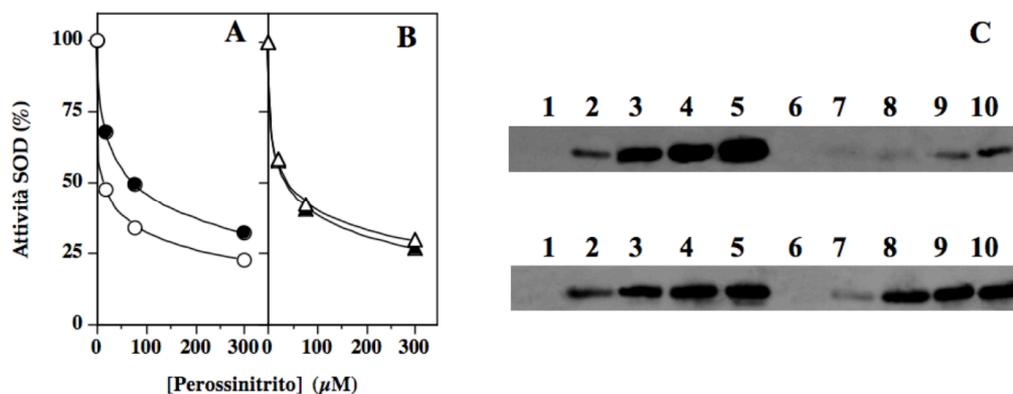


**Fig. 10.** S-glutathionilazione della *PhSOD*. Soluzioni di *PhSOD*<sub>ric</sub> o *C57S-PhSOD*  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in tampone B sono state incubate a  $25^\circ\text{C}$  per 1 ora in presenza di concentrazioni crescenti di GSSG o GSH. I campioni trattati sono stati sottoposti a Western blotting utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-glutazione  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ . (A) Reazione di *PhSOD*<sub>ric</sub> con GSSG e GSH. *Pozzetti* da **1** a **4**: *PhSOD*<sub>ric</sub> in presenza di 0, 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM GSSG; *pozzetti* da **5** a **8**: *PhSOD*<sub>ric</sub> in presenza di 0, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM GSH. (B) Reazione di *PhSOD*<sub>ric</sub> o *C57S-PhSOD* con GSSG. *Pozzetti* da **1** a **4**: *PhSOD*<sub>ric</sub> in presenza di 0, 0,2 mM, 1mM, 5mM GSSG; *pozzetti* da **5** a **8**: *C57S-PhSOD* in presenza di 0, 0,2 mM, 1mM, 5mM GSSG.

### 3.14 Effetto della glutathionilazione di *PhSOD* sulla sensibilità dell'enzima verso il perossinitrito

Per verificare se la modifica di *PhSOD* da parte del glutathione influenza la sensibilità dell'enzima nei riguardi del perossinitrito, come avviene per la  $\beta$ -*PhSOD*, la *PhSOD*<sub>ric</sub> e le sue forme mutate sono state prima incubate per 1 ora con GSSG e, dopo l'allontanamento del reagente in eccesso, sono state incubate per 30 min con concentrazioni crescenti di perossinitrito. Aliquote delle reazioni sono state dosate per l'attività residua. Come mostrato in Fig. 11A, i profili di inattivazione differiscono tra il campione di *PhSOD*<sub>ric</sub> non trattato e quello trattato con GSSG (*PhSOD*<sub>ric</sub>-SG). In particolare il valore di  $\text{IC}_{50}$  della *PhSOD*<sub>ric</sub> è di 17  $\mu\text{M}$  e quello della *PhSOD*<sub>ric</sub>-SG di 74  $\mu\text{M}$ . Per la forma mutata *C57S-PhSOD* invece l' $\text{IC}_{50}$  non varia in presenza o in assenza di trattamento con GSSG (Fig. 11B). Aliquote degli stessi campioni sono stati poi analizzati per Western blotting, utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere specificamente tirosine nitate (Fig. 11C). Il livello di nitratura di *PhSOD*<sub>ric</sub>-SG è significativamente inferiore rispetto a quello di *PhSOD*<sub>ric</sub>;

viceversa, non si evidenziano differenze nei livelli di nitrurazione dei campioni di C57S-PhSOD trattati o non con GSSG. Tali dati suggeriscono che la glutationilazione di PhSOD protegge l'enzima dall'effetto inattivante del perossinitrito.



**Fig. 11.** Effetto del perossinitrito sulla PhSOD glutationilata. Una soluzione di PhSOD<sub>ric</sub> o C57S-PhSOD 50 μg•mL<sup>-1</sup> in tampone B è stata incubata a 25°C per 1 ora in assenza o in presenza di GSSG 1 mM. L'eccesso di GSSG è stato eliminato mediante Microcon-3 e i campioni sono stati poi incubati a 25°C per 30 min con le concentrazioni indicate di perossinitrito. (A) Profilo di inattivazione da parte del perossinitrito della PhSOD<sub>ric</sub> non trattata (*cerchi vuoti*) o trattata con GSSG (*cerchi pieni*). (B) Profilo di inattivazione della C57S-PhSOD non trattata (*triangoli vuoti*) o trattata con GSSG (*triangoli pieni*). (C) Western blotting utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-nitrotirosina 1 μg/ml dei campioni di PhSOD<sub>ric</sub> o C57S-PhSOD trattati come già indicato. *Pozzetti da 1 a 5: PhSOD<sub>ric</sub> (sopra) o C57S-PhSOD (sotto) incubati con 0, 15 μM, 45 μM, 135 μM, 405 μM perossinitrito; pozzetti da 6 a 10: PhSOD<sub>ric</sub> (sopra) o C57S-PhSOD (sotto) entrambe trattate con GSSG e incubate con 0, 15 μM, 45 μM, 135 μM, 405 μM perossinitrito.*

## DISCUSSIONE

### ***4.1 Caratterizzazione biochimica della PhSOD***

*Pseudoalteromonas haloplanktis* è un eubatterio gram-negativo isolato da sedimenti marini antartici ed adattato a crescere in un intervallo di temperatura tra 4 e 20 °C (Birolo et al, 2000). L'aumentata solubilità dell'ossigeno alle basse temperature rende tale micro-organismo più esposto all'azione dei ROS prodotti durante il metabolismo cellulare; inoltre il metabolismo dipendente dalla molibdotterina, una delle maggiori fonti di produzione di ROS, è assente in *P. haloplanktis* (Medigue et al, 2005); pertanto il ruolo degli enzimi coinvolti nella difesa della cellula dai ROS è cruciale per la sopravvivenza di tale ceppo. Lo studio delle proprietà della SOD isolata da *P. haloplanktis* contribuisce ad approfondire alcuni aspetti sull'adattamento di tale enzima alle basse temperature. Un'altra SOD psicrofila è stata recentemente identificata dal batterio antartico *Marinomonas* sp. NJ522 (Zheng et al, 2006).

La *PhSOD* è un enzima contenente Fe come cofattore metallico; il rapporto stechiometrico incompleto di un atomo di Fe per mole di subunità è comune ad altre SOD purificate da fonti diverse. L'enzima psicrofilo ha un'organizzazione strutturale come omodimero, simile ad altre Fe- e Mn-SOD mesofile, come quelle isolate da *E. coli* (Lah et al, 1995; Whittaker & Whittaker, 1997). Tuttavia altre Fe- e Mn-SOD eubatteriche isolate sia da micro-organismi mesofili che (iper)termofili sono organizzate come omotetrameri. Il fatto che le SOD (iper)termofile siano solitamente organizzate in omotetrameri, indipendentemente dal contenuto metallico e dalle relazioni filogenetiche, suggerisce un meccanismo di adattamento della struttura proteica alle alte

temperature. In particolare, le interazioni dimero-dimero potrebbero migliorare la resistenza dell'enzima, quando esso è esposto a temperature elevate. D'altra parte, a basse temperature, l'organizzazione dimerica dell'enzima potrebbe favorirne una maggiore flessibilità.

La *PhSOD* è dotata di un'elevata attività specifica persino a basse temperature, comparata ad altre Fe- e Mn-SOD mesofile (Sorkin et al, 1997; Whittaker &, Whittaker, 1997). L'attività inoltre sembra essere indipendente dalla temperatura nell'intervallo tra 5 e 30 °C, una caratteristica già riportata per alcuni enzimi psicrofili, la cui energia di attivazione è prossima allo zero; un comportamento simile è mostrato anche da enzimi dotati di attività catalitica controllata dalla diffusione di un substrato o prodotto (Georlette et al, 2004). A questo proposito è interessante notare che la *PhSOD* appartiene ad entrambe le categorie. Tuttavia, non è stato possibile valutare con accuratezza l'effetto della temperatura sulla termofilicità della *PhSOD*, poiché il comune dosaggio indiretto dell'attività non consente di escludere che la velocità di catalisi sia influenzata dalla rapida comparsa di una forma inattiva di SOD (Bull et al, 1991; Hsu et al, 1996). L'apparente indipendenza dell'attività della *PhSOD* anche dal pH potrebbe essere spiegata allo stesso modo.

La sensibilità della *PhSOD* verso i tipici inibitori e inattivatori di tale enzima è simile a quella di altre Fe-SOD, in quanto sia la sodio azide che il perossido di idrogeno riducono l'attività dell'enzima psicrofilo. È stato poi valutato l'effetto sull'attività dell'enzima anche di inattivatori che agiscono specificamente sul residuo di Tyr34, conservato in tutte le Fe- e Mn-SOD. Tra i composti considerati, il perossinitrito ha mostrato un forte potere inattivante sulla *PhSOD*, causando la nitratura in tirosina. Questa caratteristica estende lo

spettro di azione di questo composto fisiologico anche ad una SOD eubatterica psicrofila, oltre che alla mitSOD umana (MacMillan-Crow et al, 1998; Yamakura et al, 1998) e alla Fe-SOD ipertermofila dell'archeobatterio *S. solfataricus* (Ruocco et al, 2004). D'altra parte, la EcSOD non viene inattivata dal perossinitrito, anche se la Tyr34 è bersaglio di nitrificazione da parte di tale composto (Soulere et al, 2001).

Pur essendo un enzima psicrofilo la *PhSOD* è dotata di una significativa stabilità termica. L'enzima infatti risulta semi-inattivato dopo 10 min di esposizione a 54,2 °C. Il processo di inattivazione segue una cinetica di primo ordine ed è probabile che sia concomitante al processo di denaturazione della struttura proteica, in quanto la temperatura di semi-denaturazione di 51,9 °C è molto vicina a quella di semi-inattivazione. Questi valori di temperatura sono di almeno 30°C più elevati rispetto alla massima temperatura di crescita di *P. haloplanktis*. Tale resistenza termica è comune ad altre SOD appartenenti alla stessa famiglia; infatti la mitSOD mesofila ha una temperatura di semi-denaturazione di 89 °C (Guan et al, 1998) e la Fe-SOD ipertermofila di *S. solfataricus* viene semi-inattivata solo dopo 2 ore a 99 °C (Dello Russo et al, 1997; De Vendittis et al, 2001). E' probabile quindi che nel corso dell'evoluzione le SOD abbiano sviluppato una notevole tolleranza a vari tipi di stress ambientale.

La determinazione della massa molecolare dell'enzima psicrofilo eseguita mediante ESI/MS sui campioni di *PhSOD* e  $\beta$ me-*PhSOD* indicava una differenza di massa di 76,5 Da tra i due campioni, che suggeriva la presenza di una modificazione covalente sulla  $\beta$ me-*PhSOD*. Per tale motivo si è deciso di determinare la struttura primaria della *PhSOD*, mediante sequenziamento

diretto della proteina endogena. Il monomero della *PhSOD*, costituito da 192 residui, è molto simile a quello di altre Fe-SOD eubatteriche e condivide una significativa similarità anche con Fe- e Mn-SOD isolate da organismi filogeneticamente distanti. I residui coinvolti nella coordinazione del metallo, nell'organizzazione strutturale e funzionale del sito attivo e nelle interazioni intersubunità sono conservati nella *PhSOD*; l'enzima inoltre possiede tutti i residui amminoacidici tipici di Fe-SOD omodimeriche (Wintjens et al, 2004). Nel tentativo di chiarire i meccanismi di adattamento della proteina alle temperature estreme, la composizione amminoacidica dell'enzima psicrofilo è stata comparata con quella di altre Fe- e Mn-SOD mesofile e (iper)termofile. E' interessante notare che nella *PhSOD* i parametri medi correlati alla composizione amminoacidica, come massa, idrofobicità, volume e superficie accessibile per residuo, siano leggermente o significativamente ridotti, se comparati con le controparti mesofile e (iper)termofile (Tabella 1).

**Tabella 1.** Parametri correlati alla composizione amminoacidica di Fe- e Mn-SOD in organismi adattati a differenti temperature

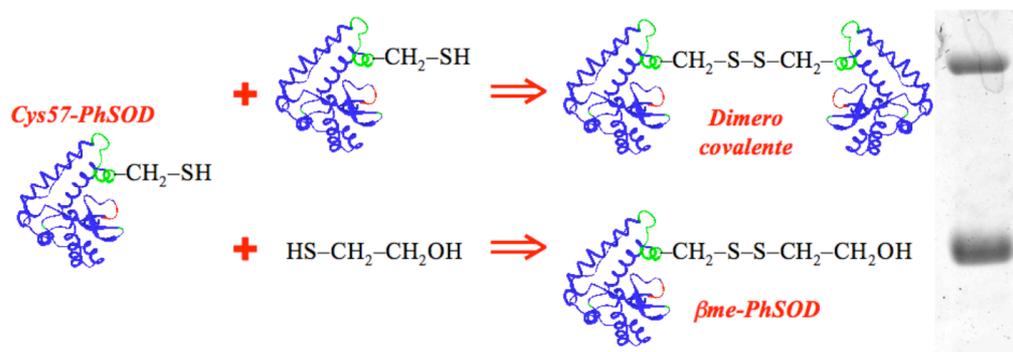
Proteina	Numero di sequenze	Valore medio per residuo amminoacidico			
		massa (Da)	idrofobicità (J/mol)	volume (Å <sup>3</sup> )	superficie (Å <sup>2</sup> )
<i>PhSOD</i>		110.7	4.83	133.5	159.8
SOD psicrofile	3	111.1 ± 0.6	4.77 ± 0.05	134.3 ± 0.8	160.8 ± 0.9
SOD mesofile	13	111.2 ± 0.9	4.77 ± 0.13	134.5 ± 1.4	161.4 ± 1.5
SOD termofile	11	115.1 ± 2.2	5.00 ± 0.19	139.4 ± 2.8	167.1 ± 3.0
SOD ipertermofile	5	115.2 ± 0.4	5.10 ± 0.10	140.4 ± 0.3	167.7 ± 0.7

Tali caratteristiche confermano precedenti osservazioni su SOD (Dello Russo et al, 1997), tioredossine riduttasi (Ruocco et al, 2004), o proteine non correlate (De Vendittis et al, 1996), e probabilmente riflettono un semplice meccanismo di adattamento dell'enzima a basse temperature: le interazioni deboli che stabilizzano la struttura quaternaria e che sono responsabili della

flessibilità/stabilità dell'enzima potrebbero quindi dipendere dalla presenza di residui meno ingombranti e idrofobici nella struttura primaria della *PhSOD*.

#### 4.2 Reattività del residuo Cys57 della *PhSOD* e suo ruolo regolatorio

Dall'analisi per MS/MS del campione di  $\beta$ me-*PhSOD* è emerso che l'enzima purificato è covalentemente modificato dal  $\beta$ -mercaptoetanololo. Il residuo bersaglio è la Cys57, che forma un ponte disolfuro con il  $\beta$ -mercaptoetanololo. Residui reattivi di cisteina sono stati identificati anche nella Cu/Zn-SOD di pollo e di eritrociti umani (Schininà et al, 1996; de Beus et al, 2004) e nella mitSOD umana (Matsuda et al, 1990). La reattività della Cys57 è anche responsabile della formazione di un ponte disolfuro tra due subunità della *PhSOD* come osservato mediante SDS/PAGE in condizioni non riducenti (Fig. 12). La quantità di dimero covalente aumenta col trattamento del campione proteico con urea, suggerendo che l'interazione tra le regioni identiche delle due subunità richiede lo scompaginamento della struttura proteica. Il dimero covalente non si forma in altre condizioni denaturanti, come quelle del trattamento dei campioni in HPLC. Pertanto, quando l'enzima mantiene la corretta organizzazione strutturale, la Cys57 è probabilmente accessibile solo a piccole molecole, come il  $\beta$ -mercaptoetanololo.



**Fig. 12.** Schema di reattività della Cys57 della *PhSOD*

Il modello tridimensionale della *PhSOD* mostra che la Cys57 fa parte di un segmento peptidico, la cui organizzazione strutturale differisce tra SOD dimeriche e tetrameriche, per un ripiegamento significativo di una piccola  $\alpha$ -elica nella *PhSOD* e nella *EcSOD*, entrambe dimeriche, rispetto alla mitSOD tetramerica. E' probabile che questa differenza sia cruciale per l'assemblaggio strutturale dell'enzima in omodimero o omotetramero. Non è stato osservato nessun coinvolgimento della Cys57 nell'assemblaggio dell'enzima in soluzione; comunque è interessante osservare che il residuo corrispondente nella mitSOD umana (Ile58) gioca un ruolo strutturale nella formazione dell'omotetramero, tramite interazioni intersubunità all'interfaccia (Borgstahl et al, 1992). Inoltre nella variante polimorfica I58T della mitSOD l'omotetramero è destabilizzato e l'enzima ha una termostabilità significativamente più bassa (Borgstahl et al, 1996). Nelle Fe-SOD di *E. coli* e *V. cholerae* invece, la posizione corrispondente alla Cys57 della *PhSOD* è occupata da una arginina o una lisina, rispettivamente. Tali residui sono simili per ingombro sterico all'addotto formato dal  $\beta$ -mercaptoetanololo con la Cys57. La fluorescenza della *PhSOD* eccitata a 280 nm dipende principalmente dall'emissione dei residui di triptofano ( $\lambda_{\max} = 335$  nm); non si osservano infatti spalle apprezzabili intorno a 310, dovute all'emissione delle tirosine. Inoltre l'emissione della *PhSOD* eccitata a 295 nm non è molto diversa da quella ottenuta eccitando a 280 nm. La modifica covalente sulla Cys57 aumenta significativamente la resa quantica della fluorescenza dell'enzima psicrofilo ad entrambe le lunghezze d'onda di eccitazione, senza alcuno spostamento del massimo di emissione. Questo comportamento potrebbe essere

dovuto ad una variazione conformazionale della regione che circonda la Cys57 in seguito alla modificazione. Tale perturbazione sembra coinvolgere la fluorescenza dei residui di triptofano ed un possibile candidato è Trp71, poiché la sua catena laterale è molto vicina all'addotto sulla cisteina (Fig. 9D). La modifica della Cys57 potrebbe ridurre l'esposizione di Trp71, aumentando la sua intensità di emissione.

Lo studio sulle proprietà biochimiche della  $\beta$ me-*PhSOD* indica che la modifica della Cys57 da parte del  $\beta$ -mercaptoetanolo causa una lieve diminuzione dell'attività specifica dell'enzima, escludendo un effetto significativo sul sito attivo della *PhSOD*. D'altra parte la posizione della Cys57 sembra non molto vicina al sito attivo, come valutato dalla distanza di circa 16 Å per l'analogo residuo di Arg57 della *EcSOD*. Tuttavia la lieve riduzione della resistenza all'inattivazione termica della  $\beta$ me-*PhSOD* suggerisce un piccolo incremento della libertà di conformazione in seguito alla modifica covalente sulla Cys57.

Tra gli inibitori e inattivatori, di cui è stato studiato l'effetto, il perossinitrito attacca in modo significativamente più blando la forma modificata dell'enzima. Il principale bersaglio del perossinitrito nelle Fe- e Mn-SOD è la Tyr34, la cui nitratura sembra essere responsabile dell'inattivazione dell'enzima. Il grado di nitratura della *PhSOD* e della  $\beta$ me-*PhSOD*, osservato utilizzando anticorpi che riconoscono specificamente le tirosine nitate, indica ulteriormente che la Tyr34 è un residuo probabilmente accessibile, anche se in modo diverso, sia nella forma modificata che in quella non modificata della *PhSOD*. E' probabile che la modifica sulla Cys57 da parte del  $\beta$ -mercaptoetanolo ostacoli l'accesso del perossinitrito alla Tyr34, situata nel canale di accesso al sito attivo. Alternativamente il residuo libero di Cys57 nella *PhSOD* potrebbe essere

reattivo nei confronti del perossinitrito e portare alla formazione di un addotto nitrosilato, che altera la sensibilità dell'enzima verso l'inattivatore.

Allo scopo di chiarire il ruolo della Cys57 nella regolazione funzionale dell'enzima psicrofilo, sono state prodotte le due forme mutate C57S-*PhSOD* e C57R-*PhSOD*. La sostituzione della Cys57 con serina o arginina non altera significativamente l'attività, né la sensibilità dell'enzima al perossinitrito. Pertanto l'ingombro sterico dell'addotto tra Cys57 e  $\beta$ -mercaptoetanololo non è da solo sufficiente per spiegare la protezione della *PhSOD* dal perossinitrito, dal momento che un residuo con un ingombro sterico simile (Arg), presente anche nella *EcSOD*, non riproduce l'effetto. Probabilmente altri fattori, come interazioni con i residui circostanti e/o piccole variazioni conformazionali, sono responsabili degli effetti osservati.

Studi recenti dimostrano che proteine con gruppi sulfidrilici molto reattivi sono bersaglio di tioli cellulari. Il glutatione è il tiolo più abbondante sia nelle cellule eucariotiche che in quelle procariotiche e gioca un ruolo essenziale nella regolazione dello stato redox cellulare. Durante lo stress ossidativo alterati livelli di GSH/GSSG provocano la glutationilazione di proteine, alterandone le funzioni. Tale modifica post-traduzionale può avvenire sia per l'azione del GSH su proteine con gruppi tiolici previamente ossidati, sia per uno scambio tiolico tra la cisteina libera di una proteina e il GSSG o il GSNO (Biswas et al, 2006). In uno studio precedente era stata riportata la presenza di isoforme glutationilate della Cu/Zn-SOD di pollo (Schininà et al, 1996), ma la funzione di tale modifica non è stata ancora chiarita. Non sono note invece forme glutationilate nella famiglia delle Fe- e Mn-SOD. La *PhSOD* sembrerebbe quindi il primo esempio di Fe-SOD modificata dal glutatione. In effetti la

*PhSOD* forma un ponte disolfuro misto sia con GSSG sia con GSNO, mentre la  $\beta$ me-*PhSOD* non reagisce con nessuna delle tre forme del glutatione. Contrariamente a quanto avviene per la modifica della *PhSOD* da parte del  $\beta$ -mercaptoetanolo, quella indotta dal glutatione è eliminata da riducenti, quali il ditiotreitolo e il  $\beta$ -mercaptoetanolo (dati non mostrati). Pertanto la glutationilazione dell'enzima psicrofilo, come altre modifiche post-traduzionali, sembra un processo reversibile, che può essere finemente regolato. La glutationilazione della *PhSOD* non altera significativamente l'attività dell'enzima, ma influenza la sua sensibilità nei confronti del perossinitrito, riducendo la nitratura delle tirosine e salvaguardando la funzione antiossidante dell'enzima. Anche in questo caso l'addotto con il glutatione potrebbe ostacolare l'accesso del perossinitrito sulla Tyr34 o causare una lieve variazione conformazionale dell'enzima; tuttavia non si può escludere una funzione di regolatore redox per la *PhSOD* glutationilata. È noto infatti che l'abbondanza di GSH nelle cellule è indispensabile per mantenere le proteine cellulari nel loro stato ridotto e che durante lo stress ossidativo il rapporto GSH/GSSG può passare da 100 a 1, alterando l'omeostasi redox della cellula. È stato ipotizzato che in tali condizioni la glutationilazione delle proteine da parte del GSSG potrebbe rappresentare una strategia per ripristinare i livelli normali di GSH ridotto; pertanto le proteine glutationilate potrebbero essere considerate dei veri e propri regolatori redox. Per quanto riguarda la *PhSOD*, sia il glutatione legato alla Cys57, che quello ridotto liberato dalla reazione col GSSG, potrebbero a loro volta reagire con il perossinitrito e sottrarre NO, formando GSNO. In questo senso la *PhSOD* modificata continuerebbe da un lato a dismutare  $O_2^-$  e dall'altro a sottrarre NO,

riducendo così la formazione del perossinitrito e quindi la nitratura della Tyr34. D'altra parte il GSNO è in grado di glutationilare *PhSOD*, probabilmente liberando NO. Pertanto nella cellula la *PhSOD* potrebbe funzionare da regolatore dei livelli di GSH/GSSG e/o di NO e essere a sua volta finemente regolata da essi.

La mitSOD umana ha due residui di cisteina, di cui uno molto reattivo in posizione 196, e localizzato in una posizione accessibile della struttura dell'enzima. Poiché anche tale enzima sembra essere sensibile all'azione di agenti riducenti (Matsuda et al, 1990), non è da escludere che tale residuo possa essere modificato e regolato allo stesso modo della Cys57 della *PhSOD*. Inoltre l'esposizione di cellule di *E. coli* ad elevate concentrazioni di agenti ossidanti, come H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o diammidici è stata associata alla formazione di disolfuri misti (Hondorp & Matthews, 2004). In futuro sarà quindi interessante indagare sull'eventuale modifica della Cys57 in cellule di *P. haloplanktis* sottoposte a varie fonti di stress ossidativo e di estendere tali studi alla mitSOD in cellule di mammifero.

## BIBLIOGRAFIA

- Arcari P, Masullo M, Arcucci A, Ianniciello G, de Paola B, Bocchini V (1999) *Biochemistry* **38**, 12288-12295
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) *CRC Crit Res Biochem* **22**, 111-180
- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP (1994) *Methods Enzymol* **233**, 229-240
- Beckman JS, Koppenol WH (1996) *Am J Physiol Cell Physiol* **271**, C1424-1437
- Berlett BS, Friguet B, Yim MB, Chock PB, Stadtman ER (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 1776-1780
- Berlett BS, Stadtman ER (1997) *J Biol Chem* **272**, 20313-20316
- Bernstein HJ (2000) *Trends Biochem Sci* **25**, 453-455
- Birolo L, Tutino ML, Fontanella B, Gerday C, Mainolfi K, Pascarella S, Sannia G, Vinci F, Marino G (2000) *Eur J Biochem* **267**, 2790-2802
- Biswas S, Chida AS, Rahaman I (2006) *Biochem Pharmacol* **71**, 551-564
- Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A (2000) *Curr Opin Immunol* **12**, 64-76
- Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Beyer WF Jr, Hallewell RA, Tainer JA (1992) *Cell* **71**, 107-118
- Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Johnson MJ, Boissinot M, Hallewell RA, Lepock JR, Cabelli DE, Tainer JA (1996) *Biochemistry* **35**, 4287-4297
- Bradford M (1976) *Anal Biochem* **72**, 248-254
- Brookes PS, Levonen AL, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar VM (2002) *Free Radic Biol Med* **33**, 755-764
- Bull C, Fee JA (1985) *J Am Chem Soc* **107**, 3295-3304
- Bull C, Niederhoffer EC, Yoshida T, Fee JA (1991) *J Am Chem Soc* **113**, 4069-4076
- Cannio R, D'Angelo A, Rossi M, Bartolucci S (2000) *Eur J Biochem* **267**, 235-243
- Cavicchioli R (2006) *Nat Rev Microbiol* **4**, 331-343
- Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB, Thomas JA (1994) *Arch Biochem Biophys* **310**, 273-281
- Chun J, Youn HD, Yim YI, Lee H, Kim MY, Hah YC, Kang SO (1997) *Int J Syst Bacteriol* **47**, 492-498
- Clancy RM, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, Yegudin J, Abramson SB (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 3680-3684
- Corsaro MM, Lanzetta R, Parrilli E, Parrilli M, Tutino ML, Ummarino S (2004) *J Bacteriol* **186**, 29-34
- Cotgreave IA, Gerdes RG, (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **242**,1-9

- D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C (2006) *EMBO reports* **7**, 385-389
- de Beus MD, Chung J, Colon W (2004) *Protein Sci* **13**, 1347-55
- Dello Russo A, Rullo R, Nitti G, Masullo M, Bocchini V (1997) *Biochem Biophys Acta* **1343**, 23-30
- De Vendittis E, Bocchini V (1996) *Gene* **176**, 27-33
- De Vendittis E, Ursby T, Rullo R, Gogliettino MA, Masullo M, Bocchini V (2001) *Eur J Biochem* **268**, 1794-1801
- Di Maro A, Ferranti P, Mastronicola M, Polito L, Bolognesi A, Stirpe F, Malorni A, Parente A (2001) *J Mass Spectrom* **36**, 38-46
- Dos Santos WG, Pacheco L, Lin MY, Teixeira M, Xavier AV, LeGall J (2000) *J Bacteriol* **182**, 769-804
- Farr SB, D'Ari R, Touati D (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 8268-8272
- Findlay VJ, Tapiero H, Townsend DM (2005) *Biomed Pharmacother* **59**, 374-379
- Finkel T (2003) *Curr Opin Cell Biol* **15**, 247-254
- Fridovich I (1978) *Science* **201**, 875-880
- Fridovich I (1989) *J Biol Chem* **264**, 7761-7764
- Fridovich I (1997) *J Biol Chem* **272**, 18515-18517
- Fujiwara S (2002) *J Biosci Bioeng* **94**, 518-525
- Georgette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Hoyoux A, Marx JC, Sonan G, Feller G, Gerday C (2004) *FEMS Microbiol Rev* **28**, 25-42
- Gerlach D, Reichardt W, Vettermann S (1998) *FEMS Microbiol Lett* **160**, 217-224
- Gregory EM, Dapper AC (1983) *Arch Biochem Biophys* **220**, 293-300
- Guan Y, Hickey MJ, Borgstahl GE, Hallewell RA, Lepock JR, O'Connor D, Hsieh Y, Nick HS, Silverman DN, Tainer JA (1998) *Biochemistry* **37**, 4722-4730
- Guex N, Peitsch MC (1997) *Electrophoresis* **18**, 2714-23
- Halliwell B, (1999) *Free Radic Res* **31**, 261-272
- Halliwell B, Gutteridge JM (1988) *Hum Toxicol* **7**, 7-13
- Hatchikian EC, Henry YA (1977) *Biochimie* **59**, 153-161
- Hausladen A, Stamler JS (1999) *Methods Enzymol* **300**, 389-395
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) *Gene* **77**, 51-59
- Hondorp ER, Matthews RG (2004) *PLoS Biol* **2**, 1738-1753
- Hsu JL, Hsieh Y, Tu C, O'Connor D, Nick HS, Silverman DN (1996) *J Biol Chem* **271**, 17687-17691
- Hunter T, Ikebukuro K, Bannister WH, Bannister JV, Hunter GJ (1997) *Biochemistry* **36**, 4925-4933

- Hurd TR, Costa NJ, Dahm CC, Beer SM, Brown SE, Filipovska A, Murphy MP (2005) *Antioxid Redox Signal* **7**, 999-1010
- Kamisaki Y, Wada K, Bian K, Balabanli B, Davis K, Martin E, Behbod F, Lee YC, Murad F (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11584-11589
- Klatt P, Lamas S, (2000) *Eur J Biochem.* **267**, 4928-4944
- Kong SK, Yim MB, Stadtman ER, Chock PB (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 3377-3382
- Kroll JS, Langford PR, Wilks KE, Keil AD (1995) *Microbiology* **141**, 2271-2279
- Kuo WN, Kanadia RN, Shanbhag VP, Toro R (1999) *Mol Cell Biochem* **201**, 11-16
- Laemmli UK (1970) *Nature (London)* **227**, 680-685
- Lah MS, Dixon MM, Pattridge KA, Stallings WC, Fee JA, Ludwig ML (1995) *Biochemistry* **34**, 1646-60
- Lapanje, S (1978) *Physicochemical aspects of protein denaturation*, J. Wiley & Sons, New York
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ (1995) *Nat Genet* **11**, 376-381
- Lim JH, Yu YG, Han YS, Cho S, Ahn BY, Kim SH, Cho Y (1997) *J Mol Biol* **270**, 259-274
- Ludwig ML, Metzger AL, Pattridge KA, Stallings WC (1991) *J Mol Biol* **219**, 335-358
- Luperchio S, Tamir S, Tannenbaum SR (1996) *Free Radic Biol Med* **21**, 513-519
- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 11853-11858
- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA (1998) *Biochemistry* **37**, 1613-1622
- Masip L, Veeravalli K, Georgiou G (2006) *Antioxid Redox Signal* **8**, 753-762
- Masullo M, Arcari P, de Paola B, Parmeggiani A, Bocchini V (2000) *Biochemistry* **39**, 15531-15539
- Matsuda Y, Higashiyama S, Kijima Y, Suzuki K, Kawano K, Akiyama M, Kawata S, Tarui S, Deutsch HF, Taniguchi N (1990) *Eur J Biochem* **194**, 713-720
- McCord JM, Fridovich I (1969) *J Biol Chem* **244**, 6049-6055
- Meier B, Barra D, Bossa F, Calabrese L, Rotilio G (1982) *J Biol Chem* **257**, 13977-13980
- Medigue C, Krin E, Pascal G, Barbe V, Bernsel A, Bertin PN, Cheung F, Cruveiller S, D'Amico S, Duilio A, Fang G, Feller G, Ho C, Mangenot S, Marino G, Nilsson J, Parrilli E, Rocha EP, Rouy Z, Sekowska A, Tutino

- ML, Vallenet D, von Heijne G, Danchin A (2005) *Genome Res* **15**,1325-1335
- Mullis KB, Faloona FA (1987) *Methods Enzymol* **55**, 335-350
- Murphy MP (1999) *Biochim Biophys Acta* **1411**, 401-414
- Oberley LW (2005) *Biomed Pharmacother* **59**, 143-148
- Packman LC, Berry AA (1995) *Eur J Biochem* **227**, 510-515
- Peitsch MC (1996) *Biochem Soc Trans* **24**, 274-279
- Quijano C, Hernandez-Saavedra D, Castro L, McCord JM, Freeman BA, Radi R (2001) *J Biol Chem* **276**, 11631-8
- Rahaman I, Biswas SK, Jimenez LA, Torres M, Forman HJ (2005) *Antioxid Redox Signal* **7**, 42-59
- Reveillaud I, Niedzwiechki A, Bensch KG, Fleming JE (1991) *Mol Cell Biol* **11**, 632-640
- Ritz D, Patel H, Doan B, Zheng M, Åslund F, Storz G, Beckwith J (2000) *J Biol Chem* **275**, 2505-2512
- Ruocco MR, Arcari P, Castellano I, Masullo M, Raimo G, De Vendittis E (2004) in *Enzymes involved in the oxidative stress in Sulfolobus solfataricus* (Farina B, Faraone Mennella MR, eds) *Research Signpost*, Kerala (India), 81-103
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J (2001) *Cell Physiol Biochem.* **11**, 173-186
- Schininà ME, Carlini P, Polticelli F, Zappacosta F, Bossa F, Calabrese L (1996) *Eur. J. Biochem.* **237**, 433-439
- Sorkin DL, Duong DK, Miller AF (1997) *Biochemistry* **36**, 8202-8208
- Souler L, Claparols C, Perie J, Hoffmann P (2001) *Biochem J* **360**, 563-567
- Thomas JA, Poland B, Honzatko R (1995) *Arch Biochem Biophys* **319**, 1-9
- Ursby T, Adinolfi BS, Al-Karadaghi S, De Vendittis E, Bocchini V (1999) *J Mol Biol* **286**, 189-205
- Vanfleteren JR (1993) *Biochem J* **292**, 605-608
- Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K (1998) *J Biol Chem* **273**, 14085-14089
- Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang SO (1996) *Biochem J* **318**, 889-896
- Whittaker MM, Whittaker, JW (1997) *Biochemistry* **36**, 8923-8931
- Wintjens R, Noël C, May ACW, Gerbod D, Dufernez F, Capron M, Viscogliosi E, Rooman M (2004) *J Biol Chem* **279**, 9248-9254
- Zheng Z, Jiang YH, Miao JL, Wang QF, Zhang BT, Li GY (2006) *Biotechnol Lett* **28**, 85-88