



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

TESI DI DOTTORATO IN

SCIENZE CHIMICHE

XIX CICLO

**INDAGINI STRUTTURALI SU
METALLOPROTEINE MEDIANTE
DIFFRATTOMETRIA DEI RAGGI X**

DOTTORANDO
Dott.ssa Marisa Franzese

TUTORE
Prof. Lelio Mazzarella

RELATORE
Prof. Livio Paolillo

COORDINATORE DEL XIX CICLO
Prof.ssa Rosa Lanzetta

SUMMARY

STRUCTURAL ANALYSIS OF METALLOPROTEINS BY X-RAY DIFFRATTOMETRY

The Ph. D. research activity, carried out in collaboration with Dr. Pastore (MRC, London) and Prof. Peisach (AECOM, New York) groups, was focused on structural analysis of the two different metalloproteins: 1) Hemoglobin; 2) Frataxin.

1) Hemoglobin

Like all known dioxygen carriers via transition metals, the oxygenated forms of myoglobin and hemoglobins (Hbs) are oxidized easily to their met ferric forms, which cannot be re-oxygenated. Autoxidation is inevitable in nature for all oxygen-binding hemoproteins, and metHb content of freshly drawn blood is usually maintained within 1-2%, but by a strong reduction environment [Faivre, B., *et al.*, 1998]

Indeed, the autoxidation reaction are of clinical and of chemical interest, as for example it influences the lifespan of the erythrocyte [Waugh, S. M. & Low, P. S., 1985], or the feasibility of blood substitute [Faivre, B., *et al.*, 1998].

Autoxidation rate and products depend at least on the dioxygen pressure, pH and the globin moiety. Recent spectroscopic and crystallographic studies revealed that the oxidation of tetrameric hemoglobins (Hbs) from different species can lead to the formation of different products [Vitagliano, L., *et al.*, 2004]. Under physiological conditions, the oxidation of mammalian and temperate fish Hbs leads to the formation of the exogenous aquo-met hexa-coordinated form both at the α and β -subunits, whereas the oxidation of Antarctic teleost fish Hbs (AFHbs) leads to the formation of an aquo-met form at the α subunits and of an endogenous bis-histidine complex, denoted hemichrome, at the β subunits (β -hemichrome). EPR [Rachmilewitz, E.A., *et al.*, 1971], molecular dynamic [Mouawad, L., *et al.*, 2002] and crystallographic [Robinson, V. L., *et al.*, 2003] studies on mammalian Hbs showed that these proteins can form hemichromes under denaturing conditions, but mostly, at the α subunits (α -hemichrome) [Robinson, V. L., *et al.*, 2003]. Ferric form of Hbs are physiologically inactive to the oxygenation, but several subsequent

side reaction in the autoxidation of Hbs can cross other biochemical paths. Indeed, the physiological role of the hemichrome is disputed. The bis-imidazole complex can be involved in the ligand binding [Rifkind, J. M., *et al.*, 1994], in the *in vivo* reduction of met-hemoglobin [Rifkind, J. M., *et al.*, 1994], in the Heinz body formation [Rifkind, J. M., *et al.*, 1994] and in the NO scavenging [Arnold, E. V., 1999]. Recently, it has been suggested that hemichrome can be involved in the Hb protection from peroxidative attack [Feng, L., *et al.*, 2005]. Indeed, the α -hemichrome species of human hemoglobin complexed with the α helix stabilizing protein (AHSP) does not exhibit peroxidative activity [Feng, L., *et al.*, 2005].

The low resolution crystal structure of oxidized form of Hbs from *Trematomus bernacchii* (HbTb) [Vitagliano, L., *et al.*, 2004] and from the major component of *Trematomus newnesi* (Hb1Tn) [Riccio, A., *et al.*, 2001, 2002] provided some clues on the structure and formation of hemichrome in AFHbs. The α -aquo-met β -hemichrome forms of these proteins have similar quaternary structure, intermediate between the canonical Hb R and T state. The hemichrome formation is associated to a scissor-like movement of the E-F β helices, that makes the distance between the distal and proximal histidines close enough to form the endogenous hemichrome complex. The scissor-like movement of E-F β helices is also associated to a sliding of the β heme plane that moves out of the heme pocket, thus favoring the endogenous hexa-coordination.

In this context, my research activity consisted 1) in the identification of intermediate species along the oxidation pathway of AFHbs; 2) in the study of hemichrome stability as a function of the pH; 3) in the study of the AFHb reactivity with intent that verifies a hypothetical physiological role of hemichromes.

Therefore, here I report a) an EPR study on oxydized forms of five AFHbs (HbTb, Hb1Tn, the minor component of *Trematomus newnesi* (Hb2Tn), the cathodic component of *Trematomus newnesi* (HbCTn) and *Gymnodraco acuticeps* Hb, HbGa) at several pH values, b) the high resolution crystal structure (1.5 Å resolution) of the α -aquo-met β -hemichrome forms of HbTb and Hb1Tn, c) the crystal structure of HbTb in the ferric state at pH=6.0 to 1.7 Å resolution and finally, d) the peroxidative assays on the investigated AFHbs.

Electron Paramagnetic Resonance Spectra and X-ray analysis at physiological pH.

The EPR spectrum of the five investigated AFHbs carried out at pH 7.6 and 12 K, shows

the presence of both an axial high-spin ferric signal and three rhombic low-spin ferric signals. High-spin signals with identical g values were found for HbTb, Hb1Tn, Hb2Tn and HbGa, although the signal of HbCTn exhibits also a strong increase in rhombicity as compared to the other four AFHbs. Three low-spin signals were resolved for the five AFHbs. One of the three low-spin forms is clearly due to a hydroxy-met form (class O of the truth table [Blumberg, W. E. & Peisach, J., 1971]). The g values for the remaining two low spin signals fall into the B and C class of the truth table [Blumberg, W. E. & Peisach, J., 1971], and are similar to the values observed in EPR spectra of bovine liver cytochrome- b_5 and cytochrome-c hemichromes, respectively. In this respect it should be noted that the g tensor anisotropy of the two signals does not resemble that of the alkaline form of cytochrome b_5 or that of a heme with axial imidazolate ligands [Bois-Poltoratsky, R. & Ehrenberg, A., 1967]. Altogether, these data indicate that in solution of ferric AFHbs two distinct hemichromes (HI and HII) exist. HII is much less abundant than HI, with a 1:10 ratio in HbTb, Hb1Tn, Hb2Tn and HbGa.

Geometrical parameters that are relevant to correlate the g tensor anisotropy to the heme stereochemistry are the tilt angle of the distal or proximal imidazole formed with the heme plane, θ_d or θ_p , and the dihedral angle formed between the distal and proximal imidazole groups, ω [Walker, F. A., 2004]. In an ideal coordination θ_d and θ_p are 90° , and ω is 0° . Particularly, the Cytochrome-b-like hemichrome (HII) is ideally coordinated, and cytochrome-c-like hemichrome (HI) has a distorted geometry.

The high-spin signal in HbTb, Hb1Tn, Hb2Tn and HbGa corresponds to that of an aquo-met form. The rhombic distortion of the high-spin signal in HbCTn suggests the formation of an unliganded penta-coordinated Fe(III). Unliganded penta-coordinated Fe(III) forms have been already observed in monomeric Hbs [Ilari, A., *et al.*, 2002], in peroxidases [Berglund, G.I., *et al.*, 2002], in a giant Hb at acidic pH [Marmo Moreira, L., *et al.*, 2006], but this is the first spectroscopic evidence for an un-liganded ferric form in a tetrameric hemoglobin in a resting state. From the comparison of the EPR spectra of HbCTn with those of the other four AFHbs here investigated, it appears that the formation of the unliganded penta-coordinated Fe(III) species in HbCTn is associated to a lowering of the population of HI, and to an invariant population of the aquo-met-form. In fact, in HbCTn HII is more abundant than HI. A structural explanation for the HbCTn

behavior is suitable. The main difference in the β heme pocket between HbCTn and the other AFHbs is the substitution Ile67 β Val [D'Avino, R., *et al.*, 1994]. When Val67 β is mutated in the structure of HbTb, a tight contact appears between the bulky Ile side-chain and the distal His63 β .

To obtain a detailed characterization of the iron coordination stereochemistry in hemichromes of AFHbs, the structure of the α -aquo-met- β -hemichrome of HbTb (hr-oxHbTb), previously determined at low resolution (2.5 Å) and room temperature, has been refined using data up to 1.5 Å, collected at 100 K. At convergence, the model, that contains 360 water molecules and 7 residues modelled in alternative conformations (Arg-11 α , Glu-121 α , Ser-29 β , Asn-77 β , Ser-107 β , Ser-139 β , His-146 β), refines to a R-factor value of 0.199 (R-free 0.234). The quaternary structure of hr-oxHbTb is intermediate (H state) between the R and T states. In particular, the structural features that are considered diagnostic of an intermediate structure between the T and R state are conserved. In fact, the position of Tyr141 α side chain is invariant, and the dihedral angles between residues Pro51-Gly52 α are almost conserved. At the $\alpha_1\beta_2$ interface, a water molecule bridges the Asp95 α_1 and Asp101 β_2 , with a distance between the O $^\delta$ equal to 5.0 Å. In the T state, a tight direct Asp95 α_1 - Asp101 β_2 , hydrogen bond is present (2.5 Å) [Fermi, G., *et al.*, 1984], whereas in the R state the two Asp side chains are far apart (6.4 Å) [Camardella, L., *et al.*, 1992; Mazzarella, L., *et al.*, 1999]. The similarity between the ox-HbTb and the previously determined structure extends to the heme regions. The α heme is in a aquo-met/hydroxy-met state. In the β subunits a bis-histidine coordination of the irons is observed. The θ_d , θ_p and ω values (previously defined) have been calculated for the β hemes of hr-oxHbTb and for the other hemichromes of known structure. These comparative analyses of the heme stereochemistry for the 12 crystal structures of hemichromes in the Hb superfamily reveal that the bis-histidine coordination in hr-oxHbTb is highly distorted. The geometrical parameters θ_d , θ_p and ω are compared for ox-HbTb and for the 15 X-ray hemo-protein structures of bis-imidazole coordination with the corresponding EPR data. From this inspection appears that the different degree of distortion (particularly, the dihedral angle ω , and even more the distal tilt θ_d) are well correlated to the g anisotropy. Consistently,

the x-ray crystal structure of hr-oxHbTb can be confidently assigned to the most abundant C-like hemichrome (HI).

Furthermore, the high resolution of the hr-oxHbTb structure highlights novel structural details. Particularly, the low temperature crystal structure reveals more ordered regions, bad defined in the moderate resolution previous study ($\beta_1\beta_2$ interface and at the CD β residues 44, 50-52 β are visible). In particular, a π stacking interaction between the two terminal His146 β_1 (His146 β_2) stabilizes the $\beta_1\beta_2$ interface.

X-ray analysis and Electron Paramagnetic Resonance Spectra at acidic pH.

Antarctic fish hemoglobins exhibit a peculiar oxidation pathway. The exposure to air of AFHbs leads to the formation of a low-spin hexa-coordinated form, hemichrome. Crystal structure determined at pH=7.6 on HbTb has shown that α chains oxidize to the aquo-met form, and β chains to the hemichrome. This behavior is reversed in mammalian Hb, where hemichrome occurs at α subunit and it is stable only at acidic pH.

To investigate the structural determinant of the hemichrome formation in Hb β subunits and to verify its compatibility with a T quaternary structure, I also determined the crystal structure of HbTb in the ferric state at pH=6.0 (ac-HbTb), using a well-known propriety of this hemoglobin in the ferrous state, the Root effect (pronounced decrease in oxygen-carrying capacity at low pH) [Mazzarella, L., *et al.*, 2006]. Surprisingly, the structure of ac-HbTb to 1.7 Å resolution reveals a penta-coordinated Fe³⁺ form both in α and in β subunit and a T-like quaternary structure. This result was supported by EPR spectra to acidic pH. In fact, for the investigated hemoglobins with Root effect (HbTb and HbCTn) a penta-coordinated Fe³⁺ form is present in solution to acidic pH. Nonetheless, HI is still in solution to pH 6.0, probably in a H quaternary structure. The conclusion of this study is that the bis-histidine complex in HbTb is not compatible with a T quaternary structure.

Therefore, in AFHb the Root effect functions also in the ferric state modulating the hemichrome stability as a function of the pH.

Crystallographic study of Hb1Tn oxidized to air for thirty days. With the aim of characterizing intermediate species along the oxidation process of the major Hb component of *T. newnesi*, crystallization experiments were conducted in CO atmosphere on protein samples of the carbomonoxy derivative of Hb1Tn, previously exposed to air for thirty days. The inspection of the electron density maps to 1.5 Å resolution (hr-oxHb1Tn)

clearly indicates that the binding state of the heme iron of α and β chains is different. In fact, the electron density of α heme region provides convincing evidence that a water molecule is bound to the iron. A radically different picture emerges from the analysis of the electron density maps of the β heme region. The crystallographic data suggest that in the β subunit is a bis-histidine complex with a unusually long binding distance (His63 β -Fe³⁺ 2.3 Å). In this framework, the characterization of intermediate species of biological processes is of remarkable importance for elucidating the molecular events involved. This approach would require the application of non-standard techniques and rarely leads to a detailed characterization of the investigated system. The structure here presented represents a fortunate exception of this general rule. Indeed, the structure here determined, compared with other structures of Hb1Tn of several times of air exposure (three hours, seven days [[Ricci, A., et al., 2002](#)], one year (previously determined)), provides interesting clues on the oxidation process and on the functional R/T transition in a tetrameric hemoglobin. These novel data provide clear indications that in Antarctic Hbs α and β chains follow distinct but interdependent oxidation pathway. Interestingly, the oxidation of the β iron of the carbo-monoxy form leads to the formation of a penta-coordinated state which is rare among tetrameric Hbs but suitable in AFHbs. Increasing the time of air exposition (seven days), in α subunit the iron is oxidated and coordinates a water molecule. Therefore in β the distal histidine occupies the sixth coordination position of the metal (hemichrome, with a binding length His63 β -Fe³⁺ of 2.0 Å). When the time of air exposition increases, the binding His63 β -Fe³⁺ becomes unusually long, subsequently it breaks and the distal histidine shifts out of the heme pocket (one year). This study provides a strong indication that the EF corner of the β subunit in the tetramer have a remarkably intrinsic flexibility, demonstrated both by the hemichrome and by other two stable intermediates (to three hours and to thirty days) that displays the hemichrome quaternary structure but different tertiary structure. The main difference between the structure of hr-oxHb1Tn and the solved ferric form of HbTb (hr-oxHbTb) is at the $\beta_1\beta_2$ interface. At the C β terminal region Hb1Tn presents the typical position of Tyr-145 β , in a T-like state. On the contrary, the $\beta_1\beta_2$ interface is novel in the landscape of hemoglobins. It exhibits a π -stacking, observed also in the R2 structure, but in a different kind of $\beta_1\beta_2$ interface [[Silva, M. M., et al., 1992](#)]. Relevantly, this His (involved in the Bohr effect of mammalian Hb) is considered also relevant for the Root

effect in HbTb [Mazzarella, L., *et al.*, 2006]. This is the first evidence of a structural difference between these two Hbs with a very different functional activity in the ferrous state (HbTb endowed with Root effect [Camardella, L., *et al.*, 1992], and Hb1Tn without Root effect [D'Avino, R., *et al.*, 1994]).

Peroxidative activity. The accessibility of such a variety of ferric forms, typical of hemo-protein with redox properties, has suggested a possible functional role of the ferric AFHbs. Actually, as in the case of other Hbs, all the investigated AFHbs exhibit a peroxidative activity, in the ferric state. Particularly, both with dopamine and guaiacol as substrates, the HbTb peroxidative activity follows a Michaelis-Menten behavior. The peroxidative activity of AFHbs is much higher (ten times) than that of mammalian, and temperate fish Hbs [Fedeli, D., *et al.*, 2001]. The enhanced peroxidative activity of Antarctic fish Hbs compared to that of temperate fish Hbs could be related to the presence of a distorted bis-imidazole complex. This evidence is not necessarily in contrast to previous reports on other Hb systems. Indeed, for the α subunit of ferric HbA complexed with AHSP [Feng, L., *et al.*, 2005] or for the ferric myoglobin in the presence of linoleic acid [Baron, C. P. & Andersen, H. J., 2002], a H₂O₂-resistant hemichrome has been observed.

The finding that a distorted hemichrome can convert into an un-ligated ferric form, as observed in HbCTn, HbTb at acidic pH and Hb1Tn oxidized to air for three hours, could justify the discrepancy between our results and those obtained for the α subunit of HbA regarding the peroxidative activity [Feng, L., *et al.*, 2005]. Indeed, 5C-ferric form should have a high peroxidative activity, being the resting states of peroxidase. Furthermore, it should be considered that hemichrome in α subunit of HbA exhibits tilt angles very close to ideality [Feng, L., *et al.*, 2005]. Eventually, a distinct stereochemistry of hemichrome coordination could correspond to a different reactivity. Actually, evidences of different reactivity between the hemichromes (HI and HII) of HbTb are available.

According to our experimental evidence of a high peroxidative activity, a distinctive physiological role could be played by distorted hemichromes exchanging with a penta-coordinated form in Antarctic teleost fish Hbs. In fact, the mitochondria content of slow muscle fibers in Antarctic notothenioids is towards the upper end of the range reported for teleost fish with similar lifestyles [Richards, M. P. & Hultin, H. O., 2002]. As a consequence, slow muscle fibers in Antarctic teleost fish are characterized by an oxidative

stress higher than in temperate fish. Though with a content not as high as myoglobins, Hbs are present in muscle fibers, and there AFHbs might be a scavenger of HOO radicals.

2) Frataxin

Friedreich's ataxia (FRDA) is a severe neurodegenerative pathology, which affects the central nervous system and the myocardium and leads to progressive loss of voluntary muscle movement and, ultimately, to death. It is caused by deficiency of frataxin, a small mitochondrial protein [Campuzano, V., *et al.*, 1996], remarkably conserved throughout evolution, from purple bacteria to humans. Whatever the cellular role of frataxin is, the protein plays a vital role, as supported by the observation that frataxin knock-out mice die in utero shortly after implantation [Cossee, M., *et al.*, 2000]. Different and some time conflicting functions have proposed for frataxin. It has been suggested to act as an iron chaperon [Bou-Abdallah, F., *et al.*, 2004], as an iron storage protein with properties similar to those of ferritin [O'Neill, H. A., *et al.*, 2005] or to be involved in iron sulphur cluster assembly or in oxidative stress and iron homeostasis [Mühlenhoff, U., *et al.*, 2002]. While it remains unclear which of these hypotheses really reflects the cellular role of frataxin, their common denominator is a link between frataxin and iron. Interestingly, frataxin is itself an iron binding protein, although with features distinctly different from those of any other protein with this property. Knowledge of the frataxin fold from bacteria, yeast and humans has shown that the protein does not contain cavities or pockets which could host iron or a suitable prosthetic group. It also does not contain conserved histidines and/or cysteines which are the residues usually implicated in chelating iron. The iron binding surface has been mapped onto a semi-conserved negatively charged ridge which contains several glutamate and aspartate side chains. In agreement with the absence of features that are usually assumed to be essential in providing the correct geometry for iron chelation, the affinities of frataxins/iron complexes have been shown to be very weak, being at the very best in the micromolar range.

The characterization of iron coordination and the investigation of the selectivity and specificity of the interaction is probably the best way to understand the function of frataxin and eventually design suitable therapeutical actions to cure FRDA. A solution study by nuclear magnetic resonance (NMR) techniques on the bacterial (CyaY) [Nair, M., *et al.*, 2004] and yeast [He, Y., *et al.*, 2004] ortholog of human frataxin demonstrated that the

protein region involved in interaction with the metal includes the residues 19-44 while observed a perturbation of the region 104-106.

Here I has been done a crystallographic study to obtain a better description of the binding sites between CyaY and iron. The problem has been approached either performing co-crystallization trials in different conditions of iron/ protein ratio, pH and precipitant agent or by soaking experiments changing time of soaking, concentration of ligand and pH. All the experiments with Fe(II) were performed under anaerobic conditions in a glove box. In all cases the crystals were tested by collecting a full set of data. The presence of metal ions was checked by calculating anomalous difference maps and, as all the crystals were isomorphous, observed difference Fourier maps F_2-F_1 . None of these maps indicated the presence of iron in the crystals.

The binding of other positive ions were also been tried either by soaking or by co-crystallization experiments. In particular, Eu(III) (CyaY-Eu) was chosen to replace Fe(III), Ca(II) (CyaY-Ca) and Co(II) (CyaY-Co) were used to mimic Fe(II) as these ions were tested in the NMR experiments with results very similar to those obtained with Fe(III) an Fe(II), respectively. The three structures are overall similar to the wild type structure with very small RMSD values for the main chain atoms (0.2 Å for CyaY-Eu and CyaY-Co, 0.1 Å for CyaY-Ca).

In the case of the cobalt structure, the anomalous difference map and the observed difference Fourier map contain two strong peaks. The cobalt ion in the M1 site is bound to the Glu-33 (2.1 Å) and to four solvent molecules (2.3 , 2.1 , 1.8 , 2.3 Å) in a distorted octahedral geometry with the sixth ligand not well defined. Two water molecules are bridged to Gln-97 of a symmetry-related molecule.

The cobalt in the M2 site is coordinated to Asp-3 (2.1 Å) , His-58 (2.2 Å) and to four water molecules (2.1, 2.0, 2.1, 2.0 Å) and adopts approximate octahedral geometry. His-58 and three water molecules are coplanar, each interacting with the cobalt at distances between 1.80 and 2.30 Å. The angles between the two bonding atoms and the cobalt are all close to 90°. The apical Asp3-Co-water angle of 160.0°, also supports an octahedral geometry for the cobalt at the M2 site. Both side chains of the protein suffer only slightly shifts with respect to their positions in the wild type structure. The geometry of the two sites is in agreement with that expected for a cobalt ion.

Both the anomalous difference maps and the observed difference Fourier maps calculated for the Eu(III) complex contain five strong peaks. The CyaY-Eu structure confirm the binding sites M1 and M2 of the cobalt complex. The sites M1 of the two structures (CyaY-Co and CyaY-Eu) are very similar whereas the architecture of site M2 in Eu(III)-CyaY changes: the metal ion moves more close the protein surface, in this position it is not able to coordinate His-58 and comes in contact with Glu-55 (2.8 Å). With the two holo structures superimposed, Eu(III) is 1.9 Å from the cobalt ion.

In Eu(III)-CyaY a strong peak, site M3, was found near M1 with an ion-ion distance of 6.1 Å. Two water molecules make a bridge between the ions. The residues involved in binding this third metal ion are Asp-29 (2.7 Å) and Asp-31 (2.1 Å), which adopt a different conformation with respect to the apo-form. Water molecules occupy the other four coordination sites (1.6 , 2.2 , 2.0 , 1.8 Å). The other two sites involve residues whose side chain are not well defined in the apo structure. In particular Eu(III) in M4 is coordinated to Asp 23 (2.8 Å and 2.6 Å) and Glu 19 (2.7 Å) beyond that to two water molecules (1.7 Å, 1.9 Å). The binding in M5 is stabilized by the side chains of Asp 76 (1.9 Å and Asp 27 (2.4 Å) of a symmetry related molecule and by four water molecules (1.9 Å, 2.1 Å, 3.1 Å, 3.0 Å) with octahedral geometry.

Finally, in the case of CyaY-Ca no trace of a Ca²⁺ binding site was found.

Despite the experimental efforts, iron derivatives of the protein could not be obtained. This might have been caused by the crystallization conditions, which could interfere with the iron binding, characterized by a modest affinity constant.

On the basis of the crystallographic studies the interaction of CyaY with the metals involves few protein residues and many water molecules. The binding does not induce substantial main chain conformational variations and only three side chains change orientations to accommodate the cation. All these findings suggest a low specificity of these binding sites, which are all localized on the external protein surface. Nevertheless, the weak affinity for iron and the low ion specificity highlighted by our data question the effective biological meaning of the binding site. The iron binding constants measured for CyaY and human frataxin are in facts too low when compared with the free iron concentration in mitochondria (4.8-9.2 μM) [Petrat, F., *et al.*, 2001] and with the high concentration of other iron chelating agents, as citrate, that would compete with the frataxin monomer. In addition it seems improbable that the iron bound by the protein is not substituted by other

cations, present at higher concentrations in the cell, such as Mg^{2+} or Na^+ . A possible way to explain this paradox is that frataxin needs another partner to stabilize the interaction with iron [Layer, G., *et al.*, 2006].

References

- Arnold, E.V., Bohle, D.S., Jordan, P.A. (1999). *Biochemistry*, **38**(15), 4750.
- Baron, C.P. & Andersen, H.J. (2002). *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3887.
- Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Herinksen, A., Hajdu, J. (2002). *Nature*. **417**, 463.
- Blumberg, W.E., Peisach, J. (1971). *J. Adv. Chem. Ser.* **100**, 271.
- Bois-Poltoratsky, R. & Ehrenberg, A. (1967). *Eur. J. Biochem.* **2**, 361.
- Bou-Abdallah, F., Adinolfi, S., Pastore, A., Laue, T.M., Chasteen, N.D. (2004). *J. Mol. Biol.*, **341**, 605.
- Camardella, L., Caruso, C., D'Avino, R., di Prisco, G., Rutigliano, B., Tamburini, M., Fermi, G., Perutz, M.F. (1992). *J. Mol. Biol.* **224**, 449.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, P.F., *et al.* (1996). *Science* **271**, 1423.
- Cossée, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dollé, P. & Koenig, M. (2000). *Hum. Mol. Gen.* **9**, 1219.
- D'Avino, R., Caruso, C., Tamburini, M., Romano, M., Rutigliano, B., Polverino de Laureto, P., Camardella, L., Carratore, V. & di Prisco, G. (1994). *J. Biol. Chem.* **269-13**, 9675.
- Faivre, B., Menu, P., Labrude, P., Vigneron, C. (1998). *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **26**(1), 17.
- Fedeli, D., Tiano, L., Gabbianelli, R., Caulini, G.C., Wozniak, M., Falcioni, G. (2001). *Comparative Biochem. and Physiol. B.* **130**, 559.
- Fermi, G., Perutz, M.F., Shaanan, B. & Foume, R. (1984). *J. Mol. Biol.* **175** (2), 159.
- Feng, L., Zhou, S., Gu, L., Gell, D.A., Mackay, J.P., Weiss, M.J., Gow, A.J. & Shi, Y. (2005). *Nature*. **435**, 697.
- He, Y., Alam, S.L., Proteasa, S.V., Zhang, Y., Lesuisse, E., Dancis, A. & Stemmler, T.L. (2004). *Biochemistry*, **43**, 16254.
- Ilari, A., Bonamore, A., Farina, A., Johnson, K.A., Boffi, A. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 23725.
- Layer, G., de Choudens, S.O., Sanakis, Y. & Fontecave, M. (2006). *J. Biol. Chem.* **281**(23), 15727.
- Marmo Moreira, L., Lima Poli, A., Costa-Filho, A.J., Imasato, H. (2006). *Biophys. Chem.* **124**, 62.

- Mazzarella, L., D'Avino, R., di Prisco, G., Savino, C., Vitagliano, L., Moody, P.C., Zagari, A. (1999). *J. Mol. Biol.* **287**, 897.
- Mazzarella, L., Bonomi, G., Lubrano, M.C., Merlino, A., Riccio, A., Vergara, A., Vitagliano, L., Verde, C., di Prisco, G. (2006a). *Proteins* **62**(2), 316.
- Mazzarella, L., Vergara, A., Vitagliano, L., Merlino, A., Bonomi, G., Scala, S., Verde, C., di Prisco, G. (2006b). *Proteins* **65**(2), 490.
- Mouawad, L., Perahia, D., Robert, C.H., Guilbert, C. (2002). *Biophysical J.* **82**, 3224.
- Mühlenhoff, U., Richardt, N., Ristow, M., Kispal, G. & Lill, R. (2002). *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2025.
- Nair, M., Adinolfi, S., Pastore, C., Kelly, G., Temussi, P., Pastore, A. (2004) *Structure*, **12**, 2037.
- O'Neill, H.A., Gakh, O., Park, S., Cui, J., Mooney, S.M., Sampson, M., Ferreira, G.C. & Isaya, G. (2005). *Biochemistry* **44**, 537.
- Petrat, F., de Groot, H., Rauen, U. (2001). *Biochem. J.* **356**, 61.
- Rachmilewitz, E.A., Peisach, J. & Blumberg, W.E. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**, 3356.
- Riccio, A., Vitagliano, L., di Prisco, G., Zagari, A. & Mazzarella, L. (2001). *Acta Crystallogr. D* **57**, 1144.
- Riccio, A., Vitagliano, L., di Prisco, G., Zagari, A. & Mazzarella, L. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci* **99-15**, 9801.
- Richards, M.P. & Hultin, H.O. (2002). *J. Agric. Food Chem.* **50**, 555.
- Rifkind, J.M., Abugo, O., Levy, A. & Heim, J. (1994). *Methods Enzymol.* **231**, 449.
- Robinson, V.L., Smith, B.B. & Arnone, R. (2003). *Biochemistry* **42**(34), 10113.
- Silva, M.M., Rogers, P.H., Arnone, A. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 17248.
- Vitagliano, L., Bonomi, G., Riccio, A., di Prisco, G., Smulevich, G., Mazzarella, L. (2004). *European Journal of Biochemistry* **271**(9), 1651.
- Waugh, S.M. & Low, P.S. (1985). *Biochemistry*, **24**(1), 34.
- Walker, F. A. (2004). *Chem. Rev.* **104**, 589.

INDICE

PREMESSA	16
ABBREVIAZIONI E SIMBOLI	19
I PARTE: Le emoglobine di pesce antartico	
Capitolo 1	INTRODUZIONE
1.1	Emoglobine tetrameriche 22
1.2	Le emoglobine di pesce antartico 26
1.3	Effetto Root 28
1.4	Stati ferrici di emoglobine: formazione dell'emicromo 30
1.5	Obiettivi della tesi 39
Capitolo 2	MATERIALI E METODI
2.1	Preparazione dei campioni e registrazione degli spettri EPR 41
2.2	Risoluzione e affinamento cristallografico della struttura di HbTb ossidata con ferricianuro a pH acido (ac-HbTb) 42
2.3	Affinamento cristallografico delle strutture ad alta risoluzione di HbTb ossidata con ferricianuro (hr-oxHbTb) e Hb1Tn ossidata all'aria per 30 giorni (hr-oxHb1Tn) 47
2.4	Valutazione dell'accuratezza dei modelli 49
2.5	Analisi della reattività dell'emicromo mediante spettroscopia di assorbimento 51
Capitolo 3	RISULTATI E DISCUSSIONE
3.1	Caratterizzazione in soluzione delle forme ferriche ottenute per ossidazione con ferricianuro 53
3.1a	Descrizione degli spettri EPR registrati a pH 7.6 53
3.2	Analisi strutturale di complessi bis-istidinici in emoglobine tetrameriche 62
3.2a	Struttura a raggi X di cristalli cresciuti da una soluzione di HbTb ossidata con ferricianuro 63
3.2b	Descrizione della struttura ad alta risoluzione di Hb1Tn ossidata per esposizione all'aria per 30 giorni (hr-oxHb1Tn) 77
3.3	Analisi del processo di formazione dell'emicromo in Hb1Tn 85
3.4	Stabilità e reattività dell'emicromo 95
3.4a	Descrizione degli spettri EPR a vari pH 95
3.4b	Descrizione della struttura di HbTb ossidata con ferricianuro a pH acido (ac-HbTb) 100
3.4c	Attività perossidasi del complesso bis-istidinico 107
Capitolo 4	CONCLUSIONI E RISVOLTI BIOLOGICI 111
II Parte: La fratassina	
Capitolo 5	INTRODUZIONE
5.1	La lunga storia della piccola proteina fratassina 120
5.2	Ruolo biologico della fratassina 123
5.3	La fratassina e la formazione dei centri Fe/S 123
5.4	La fratassina e la biosintesi dell'eme 126
5.5	La fratassina e la disintossicazione dal ferro 126
5.6	Caratterizzazione strutturale 129
5.7	La fratassina da <i>E. coli</i> 131
5.8	Obiettivo della tesi 133

Capitolo 6	MATERIALI E METODI	
6.1	Forme legate di CyaY	135
6.1a	Cristallizzazione di CyaY in forma legata a Fe(II) e Fe(III)	135
6.1b	Cristallizzazione, raccolta dati di diffrazione e risoluzione della struttura di CyaY in forma legata a Co(II) E Eu(III)	136
6.2	Controllo della presenza degli ioni metallici	138
6.3	Affinamento delle strutture di CyaY	140
Capitolo 7	RISULTATI E DISCUSSIONE	
7.1	Controllo della presenza degli ioni Ca(II), Co(II) e Eu(III)	143
7.2	Densità elettronica e qualità dei modelli affinati	146
7.3	Descrizione delle strutture affinate	149
7.4	Coordinazione degli ioni Co(II) e Eu(III) nelle strutture di CyaY in forma legata	153
7.5	Discussione e conclusioni	160
	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	164

PREMESSA

IL FERRO: TOSSICO MA ESSENZIALE PER LA VITA. Gli ioni metallici possiedono delle caratteristiche chimiche, come l'attività redox e l'abilità di coordinazione, che permettono di aumentare le proprietà funzionali delle proteine altrimenti dipendenti solo dagli elementi C, H, O, N, S. D'altro canto i sistemi biologici devono anche competere con la chimica inorganica intrinseca degli ioni metallici e trovare il modo di assimilarli ed incorporarli. Quindi la relazione tra ioni metallici e proteine non condiziona solo il modo con cui le funzioni biologiche delle proteine sono modificate dalla presenza di un metallo nelle loro strutture tridimensionali, ma anche i meccanismi con cui i sistemi viventi prelevano dall'ambiente per poi utilizzarli metalli che altrimenti risulterebbero tossici.

Il ferro è il quarto elemento più abbondante sulla crosta terrestre, dopo l'alluminio è il secondo metallo. Essendo un metallo di transizione esso risulta molto utile per le sue proprietà di legame e redox. Come è noto il ferro ha la capacità di scambiare facilmente elettroni interconvertendosi tra le forme ferriche Fe^{3+} e le forme ferrose Fe^{2+} . Questa sua caratteristica lo rende un utile componente di citocromi, di proteine che legano l'ossigeno (emoglobine e mioglobine) e di una ampia varietà di enzimi. Quindi non è sorprendente che questo elemento venga virtualmente utilizzato da tutti gli esseri viventi come cofattore di una varietà di proteine con funzioni biologiche diverse. Tuttavia

queste sue proprietà chimiche fanno sì che esso sia anche particolarmente tossico. Infatti il ferro libero catalizza la reazione di Fenton producendo dalla H_2O_2 radicali liberi che risultano particolarmente dannosi in quanto attaccano le membrane cellulari, le proteine e il DNA. Inoltre in condizioni aerobiche *standard* il Fe^{3+} è termodinamicamente favorito rispetto al Fe^{2+} comportando problemi di solubilità. Per tutte queste ragioni i sistemi viventi hanno sviluppato dei sofisticati sistemi molecolari per la solubilizzazione, il sequestro, il trasporto e il rilascio del ferro.

Nel laboratorio dove ho svolto il mio dottorato è tuttora in corso una linea di ricerca finalizzata alla caratterizzazione strutturale mediante cristallografia di raggi X di sistemi proteici coinvolti, con ruoli diversi, nell'omeostasi intracellulare del ferro e nell'analisi dei processi metabolici ad essa connessi. In questo contesto si è inserito il mio lavoro di ricerca che è consistito nella caratterizzazione strutturale di due diversi sistemi di metallo-proteine, l'emoglobina e la fratassina. Nella prima il ferro è presente nel gruppo eme ed è funzionale coordinando nello stato ferroso l'ossigeno, ligando naturale dell'emoglobina, per trasportarlo dai polmoni ai vari tessuti. La fratassina invece è una proteina il cui ruolo biologico non è ancora chiaro, anche se esistono numerose evidenze sperimentali che sembrano provare una sua capacità di coordinare il ferro.

Per semplificare la lettura della seguente tesi di dottorato i due sistemi proteici su citati verranno trattati separatamente. Pertanto la tesi si articolerà in due parti: I) Le emoglobine di pesce antartico e II) La fratassina.

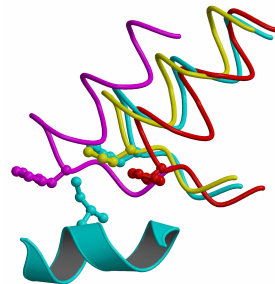
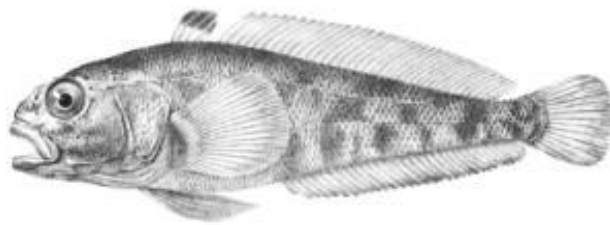
Abbreviazioni e simboli

Hb	emoglobina/e
HbA	emoglobina tetramerică umana in forma nativa
pO₂	pressione parziale di ossigeno in equilibrio con la soluzione
n	indice di Hill
p₅₀	pressione di semisaturazione
R	struttura quaternaria ad alta affinità per l'ossigeno
T	struttura quaternaria a bassa affinità per l'ossigeno
AFHb	emoglobina/e estratta/e da pesci antartici
AFGP	Glicoproteine antigelo
Hb1Tn	emoglobina estratta da <i>Trematomus newnesi</i> , componente maggioritaria
Hb2Tn	emoglobina estratta da <i>Trematomus newnesi</i> , componente minoritaria
HbCTn	emoglobina estratta da <i>Trematomus newnesi</i> , componente catodica
HbTb	emoglobina estratta da <i>Trematomus bernacchii</i>
HbGa	emoglobina estratta da <i>Gymnodraco acuticeps</i>
EPR	spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica
hr-oxHbTb	struttura ad alta risoluzione di HbTb ossidata con ferricianuro a pH 7.6
hr-oxHb1Tn	struttura ad alta risoluzione di Hb1Tn ossidata all'aria per 30 giorni a pH 7.6
ac-HbTb	struttura di HbTb ossidata con ferricianuro e cristallizzata a pH 6.0
Å	0.1 nm
R_{merge}	indicatore di consistenza interna dei dati raccolti più volte
FID	diffusione libera all'interfaccia
R_{fac}	indice di disaccordo cristallografico calcolato sull'insieme di lavoro dei dati
R_{free}	indice di disaccordo cristallografico calcolato sull'insieme <i>test</i> dei dati
σ(ρ)	rapporto tra densità elettronica e rumore di fondo
B	fattore termico
F_o	fattore di struttura osservato
F_c	fattore di struttura calcolato
HbLt	emoglobina estratta da <i>L. tunicatus</i>
HbBe	emoglobina estratta da <i>B. eatoni</i>
HbRh	emoglobina estratta da <i>R. hyperarborea</i>
HbCg	emoglobina estratta da <i>C. gobio</i>
HbPu	emoglobina estratta da <i>P. urvilli</i>

HI	emicromo distorto di tipo I
HII	emicromo con geometria ideale di tipo II
θ_d	angolo di <i>tilt</i> tra il piano imidazolico dell'istidina distale e il piano dell'eme
θ_p	angolo di <i>tilt</i> tra il piano imidazolico dell'istidina prossimale e il piano dell'eme
ω	angolo diedro tra il piano imidazolico dell'istidina distale e il piano imidazolico dell'istidina prossimale
R_{cen}	distanza tra i centri degli anelli di due residui aromatici
R_{clo}	distanza di minimo contatto tra gli anelli di due residui aromatici
γ	angolo compreso tra i vettori normali alle superfici degli anelli di due residui aromatici
θ	angolo compreso tra il vettore R_{cen} e il vettore normale alla superficie di uno degli anelli di due residui aromatici
RMSD	radice quadrata delle deviazioni quadratiche medie
AF	Atassia di Friedreich
CyaY	analogo della fratassina umana da <i>E. coli</i>
Yfh1	analogo della fratassina umana da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Hfr	fratassina umana
$F_{o(nativa)}$	fattore di struttura osservato per la proteina in forma nativa
$F_{o(legata)}$	fattore di struttura osservato per la proteina in forma legata
CyaY-Ca	struttura di CyaY in forma nativa cristallizzata in presenza di Ca(II)
CyaY-Co	struttura di CyaY in forma legata a Co(II)
CyaY-Eu	struttura di CyaY in forma legata a Eu(III)

I PARTE

**LE EMOGLOBINE DI PESCE
ANTARTICO**



CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1. EMOGLOBINE TETRAMERICHE

Le emoglobine (Hb) sono proteine appartenenti alla famiglia delle globine il cui ruolo fisiologico, come è noto, è quello di trasportatori di ossigeno. Ogni globina contiene una cavità idrofobica, che ospita un sistema macrociclico chiamato gruppo eme che è una protoporfirina IX, contenente come sostituenti quattro gruppi metilici, due propionici e due vinilici. Le Hb esistono anche in organismi invertebrati, in una varietà di stati di aggregazione che in parte dipendono dalla presenza o assenza del ligando [Riggs, A.F., 1991; Vinogradov, S.N., *et al.*, 1992, 1993; Ownby, D.W., *et al.*, 1993]. Gli invertebrati primitivi hanno quattro catene globiniche, due delle quali si assemblano in omo- ed etero-dimeri. Le forme legate sono dimeriche ma dissociano in monomeri durante l'ossidazione [Garlick, R. L., *et al.*, 1979]. La maggior parte degli studi sulle Hb sono stati tuttavia condotti su emoglobine di organismi vertebrati. Tali Hb sono tipicamente tetrameri, formati da quattro catene, uguali a due a due, denominate α e β : ognuna delle quali è costituita

rispettivamente da 7 e 8 α -eliche, chiamate A...H, ma non sono presenti elementi di struttura secondaria di tipo β .

Le Hb possono trovarsi in uno stato deossigenato [Fermi, G., *et al.*, 1984], in cui il Fe(II) risulta pentacoordinato dai quattro atomi di azoto dell'anello porfirinico e da un quinto atomo di azoto appartenente all'istidina della catena F in posizione 8, detta istidina prossimale. In questo stato di coordinazione l'atomo di ferro è ad alto spin e fuori dal piano porfirinico, verso il lato prossimale. In seguito all'ossigenazione, l'O₂ si lega al ferro dal lato opposto all'istidina prossimale (lato distale) trascinando l'atomo di Fe(II) all'interno del piano porfirinico e trasmettendo a sua volta questo movimento anche alle altre subunità, mediante interazioni $\alpha\beta$ [Derewenda, Z., *et al.*, 1990].

Le emoglobine tetrameriche sono dei sistemi ottimali per lo studio della cooperatività del legame proteine-ligando [Perutz, M.F., 1970]. La cooperatività dell'emoglobina appare evidente dalla forma sigmoideale della sua curva di ossigenazione (grafico della frazione di Hb ossigenata (Y) in funzione della pressione parziale dell'ossigeno (pO₂) in equilibrio con la soluzione) (fig.1.1) [Antonini, E. & Brunori, M., 1971].

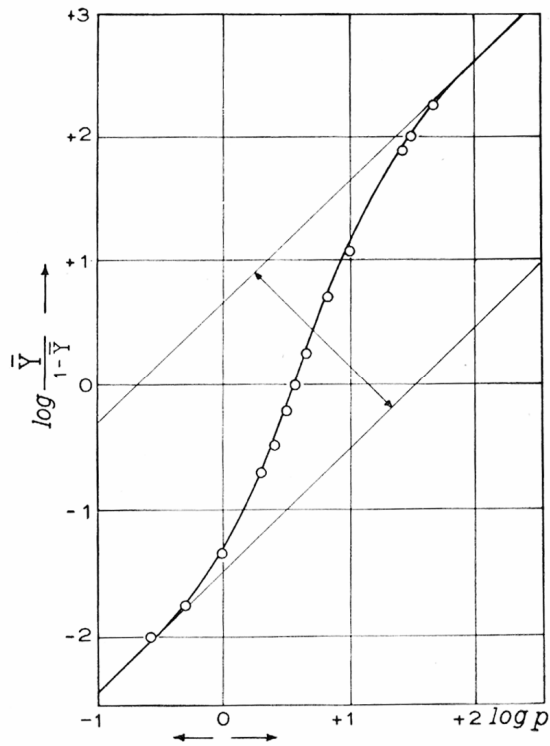


Fig. 1.1- Curva di Hill riferita all'equilibrio della Hb di pecora con l'ossigeno a pH 9.1, a 19° C. Grafico tratto da Antonini, E. & Brunori, M., 1971.

Tale curva ha un'importanza fisiologica fondamentale in quanto descrive come sia permesso al sangue di trasportare più ossigeno ai tessuti (in media 20 cc di O₂ ogni 100 cc di sangue) di quanto non potrebbe se la Hb avesse una curva di dissociazione dell'ossigeno di tipo iperbolico (in tal caso la quantità di O₂ trasportata sarebbe in media di 0.2 cc di O₂ ogni 100 cc di sangue).

La cooperatività può essere valutata quantitativamente dal valore dell'indice di Hill (n) [Hill, A.V., 1910] che è descritto da una relazione (eq. 1) in cui compaiono: 1) la frazione di siti occupati dall'O₂ (Y), 2) la pressione parziale

dell'O₂ (pO₂) e 3) la sua pressione di semisaturazione (p₅₀), che è definita come la pressione dell'ossigeno che serve a saturare il 50% dei siti di legame di una Hb.

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = n \log\left(\frac{pO_2}{p_{50}}\right) \quad (1)$$

Ad un valore di n>1 corrisponde una cooperatività positiva, cioè il legame del primo ligando fa aumentare l'affinità per l'O₂ dei siti ancora liberi nella stessa molecola.

Quando n<1, la cooperatività risulta essere negativa, e quindi l'affinità per il ligando delle altre subunità diminuisce al crescere della pO₂.

Per n tendente al numero di siti di legame per il ligando presenti nella proteina (per la Hb umana e di pesci n_{max}=4), si ha una cooperatività infinitamente positiva.

Secondo il modello stereochimico di Perutz (fig.1.2) [Perutz, M.F., 1970], la cooperatività nelle emoglobine è generata dalla transizione di Hb da una struttura quaternaria a bassa affinità per l'ossigeno (chiamata T, tesa), costretta da ponti salini tra i C-terminali delle 4 subunità, e una struttura più affine per l'ossigeno (denominata R, rilassata), mancante di questi ponti. La tensione esercitata dai ponti salini nella struttura T è trasmessa alle istidine legate ai gruppi eme e frena il movimento degli atomi di Fe verso il piano della porfirina, la qual cosa è necessaria per il legame dell'ossigeno.

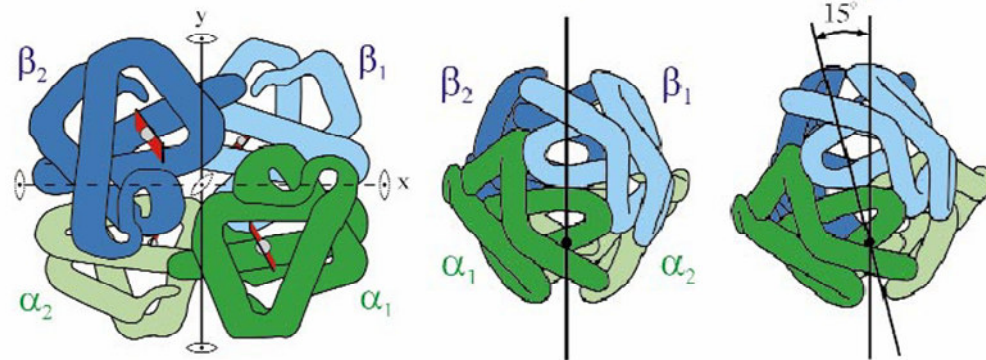


Fig. 1.2- Rappresentazione a bassa risoluzione degli assi di simmetria pseudobinari e delle due strutture quaternarie di emoglobine tetrameriche. Immagine tratta da Root, R.W., 1931.

Secondo il modello di Monod-Wyman-Changeau [Monod, J., *et al.*, 1965], MWC, l'allosteria delle Hb è basata sulla conversione concertata tra questi due stati conformazionali R-T. L'equilibrio conformazionale in assenza di O₂ è quantificato dal valore della costante di equilibrio allosterico R-T, molto spostata verso la forma T, che può essere influenzata da effettori quali il protone, i fosfati organici, i sali.

1.2. LE EMOGLOBINE DI PESCE ANTARTICO

Le emoglobine estratte da differenti organismi hanno un meccanismo generale d'azione comune. Tuttavia, dal momento che costituiscono un legame diretto tra le condizioni dell'ambiente esterno e le esigenze interne dell'organismo, le Hb hanno acquisito proprietà funzionali specifiche in risposta all'adattamento all'ambiente e all'occupazione da parte dell'animale di

nicchie ecologiche differenti. In questo contesto lo studio delle Hb estratte da pesci antartici (AFHb) può risultare di notevole interesse. Infatti i pesci antartici vivono in un ambiente, l'Antartide, che si estende per oltre 13'000'000 kmq e che si è separato dal resto del continente, con pochi contatti esterni e ridottissime migrazioni. Pertanto alcune specie che non sono riuscite ad adattarsi a questo ambiente isolato piuttosto estremo, in cui la temperatura dell'acqua è costantemente di $-1.8\text{ }^{\circ}\text{C}$, si sono estinte. Inoltre le AFHb sono un ottimo sistema per comprendere le relazioni tra struttura e funzione, in quanto le AFHb mostrano una elevata identità di sequenza, malgrado una spiccata differenza delle proprietà funzionali (Tabella 1.1).

Gli organismi che meglio si sono adattati a vivere in tale ambiente sono alcuni pesci teleostei della famiglia dei *Notothenioidei* che presentano delle glicoproteine antigelo (AFGP) nel sangue in modo da proteggerlo dalla formazione di cristalli di ghiaccio. Tuttora, non si conosce alcun meccanismo con cui questi pesci compensano il costo energetico di biosintesi di tali glicoproteine. Oltre a contenere le AFGP, il loro sangue è anche caratterizzato dalla presenza di una minore quantità di eritrociti ed una minore concentrazione di emoglobine, rispetto ai pesci che vivono nei mari temperati, in modo da alleviare il lavoro del cuore dovuto ad un aumento della viscosità ematica. La minore concentrazione di emoglobina viene a sua volta

compensata dal fatto che alla temperatura in cui vivono, l'O₂ ha una maggiore solubilità.

In questa tesi verranno principalmente esaminate due proprietà delle AFHb:

1) l'effetto Root; 2) la formazione dell'emicromo in seguito ad autossidazione.

Organismo	AFHb	Effetto Root	Formazione di emicromo
<i>T. bernacchii</i>	HbTb	sì	sì
<i>T. newnesi</i>	Hb1Tn	no	sì
	Hb2Tn	no	sì
	HbCTn	sì	sì
<i>G. acuticeps</i>	HbGa	no	sì

Tabella 1.1. Confronto tra le proprietà funzionali di cinque diverse AFHb appartenenti a tre organismi differenti.

1.3. EFFETTO ROOT

Le emoglobine della maggior parte dei pesci teleostei hanno sviluppato una proprietà caratteristica, definita effetto Root, dal nome del suo scopritore [Root, R.W., 1931; Manwell, C., 1960; Brittain, T., 1987]: allo stato ferroso il pH influenza significativamente il valore di n . In seguito alla diminuzione del pH, alla perdita di cooperatività intersubunità, si accompagna una considerevole diminuzione dell'affinità per l'ossigeno. L'effetto Root può essere inteso, in un certo senso, come un effetto Bohr amplificato. Infatti, in un Hb con effetto Root l'effetto del pH sul p_{50} è sensibilmente più marcato di quanto rilevabile per l'emoglobina umana (HbA), a tal punto che le Hb con effetto Root mostrano a pH acidi un'affinità per l'ossigeno talmente bassa da non poter raggiungere la saturazione neanche a pressioni parziali di ossigeno

molto elevate. Nelle emoglobine che esibiscono l'effetto Root, quindi, la curva di equilibrio con l'ossigeno cambia forma con l'abbassamento del pH, diventando meno sigmoideale, e a $\text{pH} < 6.5$ il valore di n alla semisaturazione può essere minore di 1, indicando la probabile presenza di un certo grado di eterogeneità, esaltata dal pH, legato alle due diverse catene polipeptidiche costituenti il tetramero [Binotti, I., 1971]. L'effetto Root gioca un ruolo fondamentale nella fisiologia dei pesci in cui è presente, in quanto consente il rilascio dell' O_2 anche contro pressioni esterne elevate, come accade per avere un'efficiente ossigenazione della retina oculare oppure, ove presente, della vescica natatoria, fondamentale per il galleggiamento [Bunn, H.F. & Forget, B.G., 1986].

Per stabilire quali fossero le caratteristiche strutturali che determinano l'effetto Root sono stati condotti diversi studi cristallografici per la maggior parte sulle Hb di pesce antartico [di Prisco, G., 1998]. In particolare, tale effetto è forte nella Hb del pesce antartico *Trematomus bernacchi*, HbTb [Camardella, L., *et al.*, 1992], ma non è presente nella componente maggioritaria dell'emoglobina del *Trematomus newnesi*, Hb1Tn [D'Avino, R., *et al.*, 1994] ed in quella del *Gymnodraco acuticeps*, HbGa [Tamburrini, M., *et al.*, 1992].

Tali studi hanno portato alla formulazione, negli ultimi due decenni, di una larga serie di ipotesi sui determinanti strutturali dell'effetto Root

[Bonaventura, C., 2004; Brittain, T., 2005] che saranno più ampiamente discusse quando verranno esaminati i risultati di questa tesi. In generale l'ipotesi tuttora dominante è che la diminuzione del pH stabilizza la forma T rispetto a quella R. Un recente studio sulla componente catodica del *Trematomus newnesi*, HbCTn [Mazzarella, L., *et al.*, 2006a], nella forma deossi, ha mostrato che il requisito strutturale necessario per la presenza dell'effetto Root, è la formazione a pH acidi di un legame ad idrogeno inter-aspartico all'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ ($\alpha_2\beta_1$), che si rompe in seguito all'ossigenazione.

1.4. STATI FERRICI DI Hb: FORMAZIONE DELL'EMICROMO

Considerando la differenza tra le subunità α e β e supponendo l'inesistenza di cooperatività si può ipotizzare che la transizione da emoglobina tetramericamente ridotta ($\alpha\text{Fe}^{2+}\beta\text{Fe}^{2+}$)₂ a emoglobina completamente ossidata ($\alpha\text{Fe}^{3+}\beta\text{Fe}^{3+}$)₂, avvenga per gradi mediante la formazione di intermedi del tipo $\alpha_2^{2+}\beta_2^{3+}$ ($\alpha_2^{2+}\beta_2^{3+}$), chiamati ibridi di valenza. Tali intermedi possono costituire modelli molto utili per lo studio della cooperatività tra subunità e dei meccanismi di controllo allosterico tra subunità. Inoltre, la comprensione dei meccanismi responsabili dell'ossidazione dell'emoglobina è fondamentale per la determinazione dei

processi di degradazione di questa proteina, e riveste quindi notevole importanza dal punto di vista clinico.

In seguito ad ossidazione di emoglobine tetrameriche, il Fe^{2+} passa a Fe^{3+} , tipicamente legando l'acqua e producendo una specie esacoordinata ad alto spin (aquo-met). In particolari condizioni, il Fe^{3+} può anche coordinare in sesta posizione un ligando endogeno producendo il cosiddetto emicromo [Rachmilewitz, E.A., 1974]. Nel caso delle Hb il ligando endogeno è un'istidina dell'elica E (istidina distale), ovvero l'emicromo è un complesso bis-istidinico.

Gli emicromi sono complessi molecolari funzionali in molte proteine recanti un gruppo eme, come ad esempio il citocromo c [Brautigan, D.L., *et al.*, 1977]. Studi fatti invece sull'emoglobina di mammiferi, in particolare sull'emoglobina umana, hanno portato per molti anni a considerare la formazione dell'emicromo come un precursore del processo di denaturazione in quanto la formazione del complesso bis-istidinico è accelerata dalla presenza di agenti denaturanti [Rachmilewitz, E.A., *et al.*, 1971]. Più di recente è stato messo in evidenza che lo stato di emicromo (complesso bis-istidinico) può essere compatibile con uno stato nativo della emoglobina [Levy, A., *et al.*, 1982, 1985; Rifkind, J. M., *et al.*, 1994]. Questi stati di emicromo si distinguono dalle forme in via di denaturazione per la loro capacità di riconversione agli stati ridotti (Fe^{2+}) funzionali e per l'assenza di reazioni di precipitazione e di dissociazione

dell'eme. Per il complesso bis-istidinico sono ipotizzabili eventuali ruoli funzionali. In particolare sono cinque le ipotesi avanzate: l'emicromo 1) si potrebbe legare al dominio citoplasmatico della banda 3, proteina di membrana dell'eritrocita, trasmettendo a quest'ultimo un segnale di morte, con conseguente formazione di copolimeri emicromo-banda 3 che precipitano formando i corpi di Heinz, accumulati in patologie ematiche [Waugh, S.M. & Low, P.S., 1985]; 2) potrebbe essere coinvolto nel processo di riduzione *in vivo* della Hb ad opera dell'enzima met-Hb reduttasi [Rifkind, J.M., *et al.*, 1994]; 3) potrebbe essere un intermedio nel processo di legame che passa da una specie pentacoordinata ad una esacoordinata con ligando esogeno [Rifkind, J.M., *et al.*, 1994]; 4) proteggerebbe l'eme dall'attacco perossidasi [Feng, L., *et al.*, 2005]; potrebbe fungere da ligando per l'NO [Arnold, E.V., 1999].

Presso il gruppo in cui ho svolto il mio lavoro di dottorato, sono stati precedentemente analizzati, mediante spettroscopia UV, i processi di ossidazione di emoglobine estratte da pesce antartico (AFHb), sia per semplice esposizione all'aria che con un $K_3Fe(CN)_6$ [Vitagliano, L., *et al.*, 2004]. Sono state investigate cinque AFHb appartenenti a tre diverse specie di pesci antartici (*Trematomus bernacchii*, *Gymnodraco acuticeps*, *Trematomus newnesi*). Si sono inizialmente esaminate le soluzioni delle forme CO esposte all'aria. Lo spettro UV-VIS di partenza mostra la tipica banda Soret a 418 nm, e le bande Q a 538 e 568 nm. Una lunga esposizione all'aria di questo complesso

produce 1) una diminuita banda Soret spostata a 407 nm; 2) un picco a 630 nm, relativo alla banda a trasferimento di carica dell'aquo-met, e 3) una sostanziale modifica delle bande Q verso la regione del rosso (575 e 530 nm), come mostrato in fig. 1.3. Queste bande Q sono tipiche dell'emicromo.

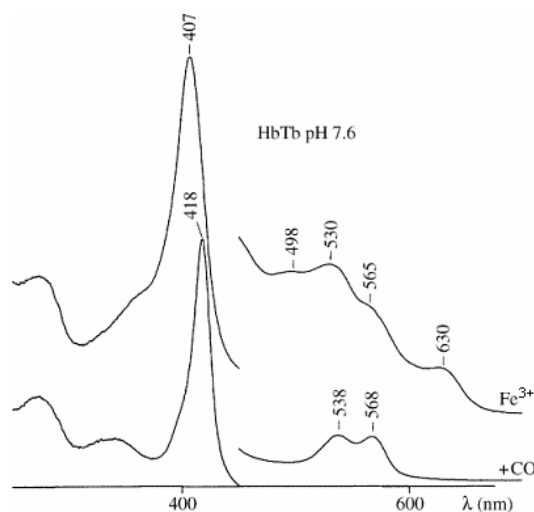


Fig. 1.3- Spettro UV/VIS di HbTb in forma ridotta carbomonossio (in basso) ed ossidata in forma emicromo (in alto). Spettro tratto da Vitagliano, L., *et al.*, 2004.

Per evitare la concorrente denaturazione durante la lunga esposizione all'aria, alternativamente si è ossidata l'AFHb con $K_3Fe(CN)_6$. Lo spettro UV-VIS delle cinque emoglobine così ossidate è praticamente identico a quello ottenuto dalle emoglobine ossidate all'aria, sia alla temperatura di 4° C che di 20° C. Gli studi spettroscopici da soli⁽¹⁾ non danno alcuna informazione sulla possibilità che le due forme ferriche (aquo-met ed emicromo) siano presenti in

¹ A meno di usare forme ibride di emoglobine con subunità bloccate usando Zn.

molecole diverse oppure entrambe sullo stesso tetramero. Lo studio cristallografico, combinato con lo studio in soluzione, ha chiarito ogni dubbio. Sono state infatti risolte le strutture delle forme ossidate all'aria a pH 7.6 della componente maggioritaria di Hb da *Trematomus newnesi* (Hb1Tn) (codice PDB: 1LA6) [Riccio, A., *et al.*, 2001, 2002] e di Hb da *Trematomus bernacchii* (HbTb) (codice PDB: 1S5X e 1S5Y) [Vitagliano, L., *et al.*, 2004] a moderata risoluzione (2.0, 2.4 e 2.5 Å rispettivamente) e a temperatura ambiente (T_{amb}). E' risultato che le catene α e β seguono percorsi di ossidazione differenti. In particolare, la formazione del complesso bis-istidinico ha luogo solo sul ferro del gruppo eme delle subunità β , mentre sulla catena α si rivela la presenza di una molecola d'acqua legata al ferro del gruppo eme. Sull'eme β dove è presente il complesso bis-istidinico (fig.1.4), si riscontra una significativa deviazione dalla linearità dell'angolo $N^{e2}-Fe-N^{e2}$ [Riccio, A., *et al.*, 2002] a differenza di quanto riscontrato nelle strutture cristalline di altre emo-proteine, in cui è presente il complesso bis-istidinico funzionale, che mostrano spesso una geometria quasi ideale (molto meno piegata), come verrà discusso in questa tesi.

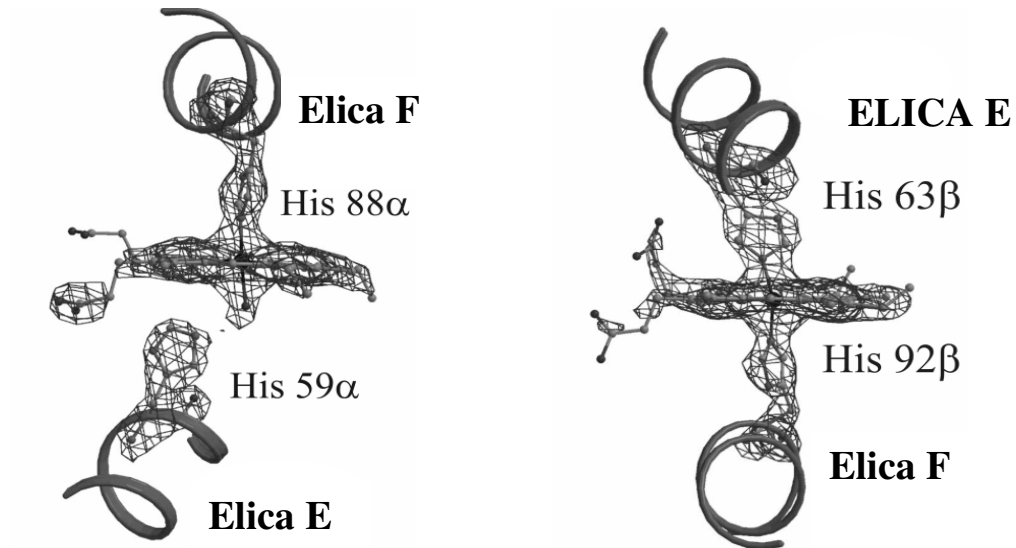


Fig. 1.4- Densità elettronica sull'eme α , in forma aquo-met (sinistra), e β , in forma emicromo (destra), della HbTb ossidata con ferricianuro. Immagine tratta da Vitagliano, L., *et al.*, 2004.

Inoltre è stato visto che alla formazione dell'emicromo è associato il movimento a forbice del frammento EF β (fig.1.5) che si propaga ad altri elementi della struttura terziaria della subunità β , con leggera rotazione dell'eme β ed un suo slittamento di circa 1.0 Å verso l'esterno della propria tasca, rispetto alla struttura CO nello stato R. La formazione dell'emicromo produce anche modificazioni rilevanti dell'angolo FG, il quale è un segmento chiave dell'interfaccia $\alpha_1\beta_2$, critica nelle regolazioni allosteriche di emoglobine tetrameriche. Questa regione è direttamente connessa all'elica C della subunità α , pertanto i suoi movimenti si trasmettono facilmente anche alle subunità α

del tetramero. La proteina si trova in una struttura quaternaria intermedia tra le forme native R e T, definita H [Riccio, A., *et al.*, 2002].

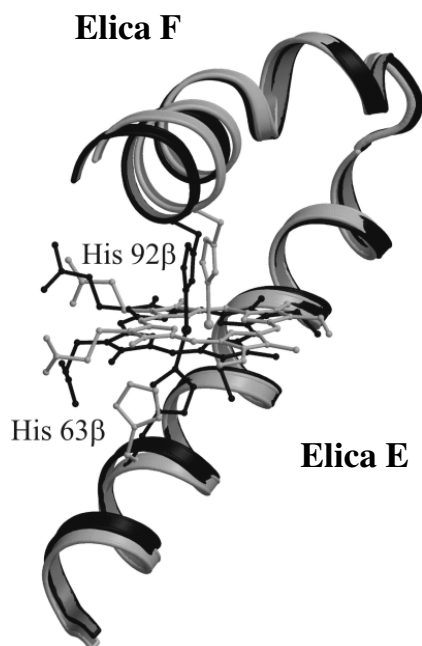


Fig. 1.5- Spostamento dell'eme e movimento a forbice delle eliche EF β in seguito alla formazione del legame bis-istidinico in HbTb. Immagine tratta da Vitagliano, L., *et al.*, 2004.

La struttura di HbTb ferrica a pH 7.6 è identica sia che venga ossidata all'aria che con $K_3Fe(CN)_6$ [Vitagliano, L., *et al.*, 2004].

Una delle ipotesi fatte su quale fosse il determinante strutturale per la formazione dell'emicromo sull'eme β nelle AFHb coinvolge il residuo di Tyr-85 nell'elica F β . La catena laterale di tale amminoacido, come si evince dalle

strutture cristallografiche, interrompe un giro dell'elica E β sostituendosi ai legami ad idrogeno interni all'elica. Questa interazione spezza l'elica E β e la rende più prona al movimento a forbice che permette la formazione dell'emicromo in AFHb. L'ipotesi appena descritta giustificherebbe anche la difficoltà delle Hb da mammiferi di formare il complesso bis-istidinico sull'eme β dato che qui al posto della Tyr-85 β c'è una Phe (fig.1.6b). La formazione dell'emicromo può inoltre essere anche favorita dalla sostituzione di Ala-70 β dell'emoglobina umana (HbA) con il residuo di Gly-70 β nelle AFHb. Infatti in HbA il gruppo metilico di Ala-70 β è posizionato tra due sostituenti del gruppo eme e probabilmente previene lo slittamento dell'eme richiesto per la formazione del complesso bis-istidinico [Riccio, A., *et al.*, 2002].

T. bernacchii HbTb	SLSDKDKA AVRALW SKIGKSADAI GNDALSRMIVVYPQTKYF SHWPDVTPGSPHIKAHG60
T. newnesi Hb1Tn	SLSDKDKA AVRALW SKIGKSSDAI GNDALSRMIVVYPQTKIYF SHWPDVTPGSPNIKAHG60
Homo Sapiens HbA	VLSPADKTNVKA AWGKVG AHAGEYGA EALERMF LSFPTTKYFPHF-DLSHGSAQVKGHG59
T. bernacchii HbTb	KKVMGGIALAVSKIDDLK TGLMELSEQHAYKLRVDPANFKILNH CILVVI STMFPKEFTP120
T. newnesi Hb1Tn	KKVMGGIALAVSKIDDLK TGLMELSEQHAYKLRVDP SNFKILNH CILVVI STMFPKEFTP120
Homo Sapiens HbA	KKVADALTNVAHVDDMPNALSALSDLH AHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTP119
T. bernacchii HbTb	EAHVSLDKFLSGVALALAE RYR142
T. newnesi Hb1Tn	EAHVSLDKFLSGVALALAE RYR142
Homo Sapiens HbA	AVHASLDKFLASVSTVLTSKYR141

Fig. 1.6a- Allineamento di sequenza delle catene α di HbTb, Hb1Tn e Hb umana (HbA).

T. bernacchii HbTb	VEWTDKERSIISDIFSHMDYDDIGPKALSRLIVYPWTQRHFSGFNLYNAEAIIGNANV60
T. newnesi Hb1Tn	VEWTDKERTIISDIFSHMDYDDIGPKALSRLIVYPWTQRHFSGFNLYNAEAIIGNANV60
Homo Sapiens HbA	VHLTPEKSAVLTALWGKVNVDVGGEGALGRLLVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPKV60
T. bernacchii HbTb	AAHGKIVLHGLDRGVKNMDNIAATYADLSTLHSEKLVDPDNFKLLSDCITIVLAAKMGH120
T. newnesi Hb1Tn	AAHGKIVLHGLDRGMKNMDNIAADAYTDLSTLHSEKLVDPDNFKLLSDCITIVLAAKMGH120
Homo Sapiens HbA	KAHGKIVLGAFAFDGLAHLNLDLKTFTLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHHFGK120
T. bernacchii HbTb	AFTAETQGAFQKFLAVVVSALGKQYH146
T. newnesi Hb1Tn	AFTAETQGAFQKFLAAVVSALGKQYH146
Homo Sapiens HbA	EFTPPVQAAVQKVVAGVANALAHKYH146

Fig. 1.6b- Allineamento di sequenza delle catene β di HbTb, Hb1Tn e Hb umana (HbA).

L'emicromo nei mammiferi si forma in α . per un altro meccanismo che rende l'elica $E\alpha$ mobile. A questo proposito, è stata risolta la struttura dell'emoglobina di cavallo da parte di Arnone *et al.* in forma emicromo in α [Robinson, V.L., *et al.*, 2003]. Tale complesso è stato ottenuto facendo variare progressivamente il pH da 7.1 fino a 5.4 direttamente su cristallo partendo dalla forma met-Hb in conformazione T. A pH 7.1 su entrambe le catene α e β i ligandi assiali del ferro sono l'istidina prossimale ed una molecola di H_2O , (forma aquo-met), ma riducendo il pH fino al valore di 5.4 il gruppo eme della subunità α si converte nella forma emicromo, mentre il gruppo eme della catena β continua ad esistere nella forma aquo-met. Il meccanismo molecolare proposto per la Hb di cavallo consiste nella formazione di un ponte His-45- H_2O -His-50 (Pro-50 in HbTb e Hb1Tn, fig.1.6a) che provoca una ristrutturazione del tratto $CD\alpha$ rendendo più prona le catene $E\alpha$ a fare il solito movimento a forbice che permette l'avvicinamento delle due His distale e prossimale [Robinson, V.L., *et al.*, 2003].

Infine si ricorda che l'emicromo si forma anche in emoglobine troncate di alcuni invertebrati [Mitchell, D.T., *et al.*, 1995] ed inoltre è ben noto che il complesso bis-istidinico è funzionale, con attività reduttasica in citocromi e perossidasi.

1.5. OBIETTIVI DELLA TESI

Gli obiettivi da perseguire nell'ambito dello svolgimento di questa tesi di dottorato consistono in un esteso studio del processo di ossidazione delle emoglobine estratte da pesce antartico al fine di 1) caratterizzare da un punto di vista strutturale tutte le specie intermedie che si formano in soluzione, 2) comprendere il meccanismo di formazione dell'emicromo, 3) studiare al variare del pH la stabilità dell'emicromo e 4) analizzare la reattività del complesso bis-istidinico per verificare eventuali suoi ruoli fisiologici. Per raggiungere tali obiettivi è stato utilizzato un approccio misto su proteine allo stato solido (cristallografia di raggi X) e in soluzione (spettroscopia UV/VIS ed EPR).

Si è proceduto quindi nel seguente modo:

- con la registrazione e l'analisi di spettri EPR di 5 emoglobine estratte da pesce antartico ossidate con ferricianuro a vari pH;

- con l'affinamento ad alta risoluzione e l'analisi comparata delle strutture cristallografiche di HbTb (hr-oxHbTb) e Hb1Tn (hr-oxHb1Tn) ossidate a pH fisiologico;
- con la risoluzione e l'affinamento della struttura cristallografica di una forma ossidata di HbTb a pH acido (ac-HbTb);
- con lo studio della reattività dell'emicromo in presenza di H_2O_2 con la spettroscopia di assorbimento elettronico nella regione del visibile.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E REGISTRAZIONE DEGLI SPETTRI EPR

Per la preparazione delle AFHb in forma ossidata si è partiti dalle emoglobine in forma carbomonossi in tampone Tris/HCl 5 mM pH=7.6. A tali campioni è stato aggiunto, come ossidante, ferricianuro di potassio ($K_3Fe(CN)_6$), in eccesso del 10% rispetto al ferro dell'eme. Quindi è stata effettuata una corsa su colonna cromatografica ad esclusione molecolare Sefadex G25 allo scopo di allontanare il reattivo in eccesso, ed eventualmente di cambiare il pH. A questo punto si è determinata la concentrazione dei campioni leggendo l'assorbanza alla lunghezza d'onda (λ) di 540 nm a cui corrisponde un coefficiente di estinzione molare (ϵ) di $13.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

I campioni di emoglobine allo stato ferrico da *Trematomus bernacchii*, *Trematomus newnesi* (componenti 1, 2, C) e *Gymnodraco acuticeps* sono stati esaminati alla concentrazione di 30 mg/ml e a pH 6.0 (50 mM MES), a pH 7.6 (50 mM Hepes), a pH 9.0-10.4 (50 mM bicina).

Gli spettri EPR sono stati registrati presso la Yeshiva University (AECOM) di New York alla temperatura di 12 K, ad una frequenza di 9.29 GHz, una potenza di 10mW, una modulazione di frequenza di 100 KHz e una

modulazione di ampiezza di 5 G, mediante l'utilizzo di uno spettrometro Varian E112 equipaggiato con un contatore di frequenza Systron-Donner e un programma di acquisizione dati.

2.2. RISOLUZIONE E AFFINAMENTO CRISTALLOGRAFICO DELLA STRUTTURA DI HbTb OSSIDATA CON FERRICIANURO A pH ACIDO (ac-HbTb)

I cristalli di HbTb in forma ossidata a pH acido sono stati preparati in precedenza a partire dalla HbTb in forma T deossi ossidata a pH 6.0 con ferricianuro di potassio (paragrafo 2.1) e successivamente cristallizzata alla concentrazione finale di 6 mg/mL in MPEG 5K (concentrazione finale: 8% w/v). La raccolta dati è stata fatta alla temperatura di 100 K al sincrotrone ELETTRA di Trieste a 1.7 Å di risoluzione. Il gruppo spaziale è monoclinico $P2_1$. I dati registrati sono stati elaborati con i programmi DENZO e SCALEPACK [Otwinowski, Z. & Minor, W., 1997], in modo da associare intensità e indici di Bragg (hkl) a ciascun riflesso (processo di indicizzazione). Successivamente sono stati mediati i valori delle intensità dei riflessi raccolti più volte o dei riflessi correlati per simmetria. La consistenza interna dei dati raccolti più volte è misurata dal seguente indicatore:

$$R_{merge} = \frac{\sum_{ij} |I_{ij} - \langle I_i \rangle|}{\sum_j I_j}$$

dove $I_i(hkl)$ è l'intensità del riflesso i -esimo hkl , j si riferisce alle diverse misure dello stesso riflesso e $\langle I_i(hkl) \rangle$ è l'intensità media di tutte le misure per quel riflesso hkl . Il valore di R_{merge} è tanto più basso quanto più simili sono le differenti misure dell'intensità per uno stesso riflesso. R_{merge} è pertanto una misura della bontà della raccolta dati di diffrazione.

Le statistiche della riduzione dati sono riportate in tabella 2.1.

Gruppo Spaziale	a(Å)	b(Å)	c(Å)	β (°)	Risoluzione	Completezza (%)	N° riflessi totali	N° riflessi unici	R_{merge}	I/σ
P2 ₁	60.82	93.40	60.82	90.08	1.71-30.00 (1.71- 1.76) ⁽²⁾	95.1 (88.1) ⁽²⁾	259,018	69,821	4.3 (17.5) ⁽²⁾	31.6 (5.1) ⁽²⁾

Tabella 2.1. Statistiche della riduzione dati di ac-HbTb.

Malgrado il buon valore di R_{merge} (tabella 2.1) dalle immagini di diffrazione risulta chiaro che i cristalli utilizzati sono affetti da geminazione pseudomeroedrica. Di conseguenza si ha un diagramma di diffrazione che può essere interpretato in termini di due reticoli compenetrati, collegati da un'operazione di rotazione di 180° intorno alla diagonale a^*+c^* . Poiché per HbTb $a^*=c^*$ (non per simmetria cristallina, in quanto il sistema cristallino è monoclinico, non tetragonale) i riflessi h,k,l di un reticolo, in seguito ad una rotazione intorno alla diagonale a^*+c^* , si sovrappongono esattamente ai riflessi

² Riferito all'ultimo guscio di risoluzione.

l,-k,h del secondo reticolo. Inoltre dato che nella simmetria monoclinica $I_{h,k,l}=I_{h,-k,l}$ gli unici riflessi non affetti dalla geminazione appartengono alla classe di riflessi con $h=1$, per tutti gli altri riflessi le intensità osservate includono il contributo di una coppia di riflessi secondo le seguenti equazioni:

$$I_{h,k,l}^{obs}=(1-\alpha)I_{h,k,l}^v+\alpha I_{l,k,h}^v \quad (a)$$

$$I_{l,k,h}^{obs}=(1-\alpha)I_{l,k,h}^v+\alpha I_{h,k,l}^v \quad (b)$$

dove α è il grado di geminazione (compreso tra 0 e 0.5), $I_{h,k,l}^{obs}$ ($I_{l,k,h}^{obs}$) sono le intensità osservate (misurate) dei riflessi h,k,l (l,k,h), $I_{h,k,l}^v$ ($I_{l,k,h}^v$) sono le intensità vere (incognite) dei riflessi h,k,l (l,k,h). Questo porta ad una riduzione delle informazioni: per un cristallo formato da due individui, di peso uguale ($\alpha=0.5$), il numero di osservazioni indipendenti si dimezza in quanto risulta che $I_{h,k,l}^{obs}=I_{l,k,h}^{obs}$ (a meno degli errori sperimentali).

La determinazione della struttura ha tenuto esplicitamente conto della geminazione, come descritto in dettaglio in seguito.

La struttura è stata risolta mediante il metodo della sostituzione molecolare usando il programma AmoRE [Navaza, J., 1994] e la struttura della forma $\alpha(H_2O)\beta$ (emicromo) di HbTb (codice PDB: 1S5Y) come modello di partenza. Il modello iniziale è stato sottoposto ad un affinamento a corpo rigido, effettuato con il programma XPLOR [Brunger, A.T., *et al.*, 1998] che utilizza il metodo dei gradienti coniugati come algoritmo di minimizzazione.

Successivamente i cicli di affinamento sono stati condotti mediante affinamenti posizionali atomici e ottimizzazioni del fattore di spostamento atomico medio mediante l'uso del programma SHELX [Sheldrick, G. Göttingen University, Germany], in modo da tener conto esplicitamente della geminazione del cristallo.

Infatti il residuo cristallografico che viene minimizzato mediante il metodo dei minimi quadrati in SHELX [Sheldrick, G. Göttingen University, Germany] dipende dalle intensità ed è il seguente:

$$\sum w(I_{\text{obs}} - I_{\text{calc}})^2$$

dove w sono i pesi statistici, I_{obs} sono le intensità osservate e I_{calc} sono le intensità calcolate, per un generico riflesso. In questo caso per tener conto della geminazione SHELX [Sheldrick, G. Göttingen University, Germany] calcola intensità I_{calc} definite da:

$$c_1 I_{\text{hkl}}^{\text{calc}} + c_2 I_{\text{lkh}}^{\text{calc}}$$

dove $I_{\text{hkl}}^{\text{calc}}$ e $I_{\text{lkh}}^{\text{calc}}$ sono le intensità calcolate dei riflessi hkl e lkh. Sulla base di tali espressioni SHELX [Sheldrick, G. Göttingen University, Germany] durante l'affinamento calcola le intensità dei singoli riflessi coniugati da confrontare con i valori osservati. Il grado di geminazione α viene affinato ciclo per ciclo nella procedura di minimizzazione. Nel corso dell'affinamento α è risultato praticamente costante convergendo ad un valore finale di 0.5.

Ogni affinamento è stato intervallato da interventi manuali guidati dal calcolo, mediante il programma SHELX [Sheldrick, G. Göttingen University, Germany], di mappe di densità elettronica di tipo OMIT. L'utilizzo delle mappe OMIT in zone ristrette del modello, nelle quali dal calcolo delle intensità I_{calc} è stato omissa il frammento in esame, permette di ridurre l'inevitabile condizionamento dal modello di partenza. L'esame delle mappe di densità elettronica e le modifiche manuali alla struttura del modello sono state effettuate mediante il programma di grafica molecolare O [Jones, T.A., *et al.*, 1991]. Negli stadi finali dell'affinamento, sono state identificate dalle mappe di densità elettronica le molecole d'acqua coinvolte in legami idrogeno con gruppi polari della proteina (solvente ordinato). La maggior parte del solvente è però disordinato e contribuisce in misura minore alla diffrazione. In prima approssimazione il contributo del solvente non strutturato è stato trascurato considerando solo i dati ad alta risoluzione (1.7-8.0 Å). Per estendere l'affinamento anche ai dati a bassa risoluzione, che maggiormente risentono del contributo del solvente disordinato, è stata effettuata nella fase finale della procedura di affinamento la correzione del solvente continuo.

2.3. AFFINAMENTO CRISTALLOGRAFICO DELLE STRUTTURE AD ALTA RISOLUZIONE DI HbTb OSSIDATA CON FERRICIANURO (hr-oxHbTb) E DI Hb1Tn OSSIDATA ALL'ARIA PER 30 GIORNI (hr-oxHb1Tn)

Il percorso di ossidazione delle AFHb è stato analizzato determinando le strutture cristalline ad alta risoluzione degli stati ossidati di HbTb e Hb1Tn. HbTb è stata ossidata in soluzione per trattamento con ferricianuro di potassio (paragrafo 2.1) mentre Hb1Tn, allo stato cristallino, per lunga esposizione all'aria (30 giorni). I cristalli sono stati ottenuti, come riportato in letteratura, con la tecnica della diffusione libera all'interfaccia (FID) in capillare: HbTb è stato cristallizzato con le seguenti condizioni finali: in 9% w/v M-PEG 5K/Tris-HCl 50 mM pH 7.6 e Hb1Tn in 14% w/v M-PEG 5K/Tris-HCl 50mM pH 7.6 (concentrazione finale delle proteine = 6mg/mL) a temperatura ambiente. I dati di diffrazione sono stati registrati per entrambe le strutture alla risoluzione di 1.5 Å, su cristalli congelati (T= 100 K) sottoposti a luce di sincrotrone (ELETTRA, Trieste e ESRF, Grenoble). I risultati e le statistiche della elaborazione dei dati, effettuate col programma DENZO [Otwinowski, Z. & Minor, W., 1997], sono riportati nella tabella 2.2.

	Gruppo Spaziale	a(Å)	b(Å)	c(Å)	β (°)	Risoluzione	Completezza (%)	N° riflessi unici	R _{merge}	I/ σ
hr-oxHbTb	C2	87.16	87.74	55.38	97.66	1.5-30.0	99.4	74,461	3.5	28.9
hr-oxHb1Tn	C2	87.25	87.32	55.49	98.26	1.5-30.0	98.7	65,850	3.2	33.2

Tabella 2.2. Statistiche della riduzione dati di hr-oxHbTb e hr-oxHb1Tn.

La risoluzione delle strutture è stata fatta con il metodo della sostituzione molecolare (programma AMore [Navaza, J., 1994]) scegliendo le strutture, a

bassa risoluzione (2.5 e 2.0 Å), $\alpha(\text{H}_2\text{O})$ - β (emicromo) di HbTb e $\alpha(\text{CO})$ - β (emicromo) di Hb1Tn rispettivamente (codice PDB: 1S5Y, 1LA6) come modelli di riferimento di partenza.

La procedura di affinamento utilizzata è stata uguale per entrambe le strutture proteiche. La posizione globale della molecola è stata inizialmente affinata mediante una minimizzazione a corpo rigido. Successivamente, le singole catene sono state affinate come unità rigide distinte. I cicli di affinamento a corpo rigido sono stati condotti mediante affinamenti posizionali atomici e ottimizzazioni del fattore di spostamento termico medio mediante l'uso del programma XPLOR [Brunger, A.T., *et al.*, 1998]. Ogni affinamento è stato intervallato da interventi manuali mediante il programma di grafica molecolare O [Jones, T.A., *et al.*, 1991] per correggere eventuali errori nella posizione delle catene laterali. Negli stadi finali dell'affinamento sono state identificate le molecole d'acqua ed incluse nei modelli in corso di raffinamento. Infine è stata applicata la correzione del solvente continuo (paragrafo 2.2).

2.4. VALUTAZIONE DELL'ACCURATEZZA DEI MODELLI

La misura più comune della qualità di una struttura cristallina è il fattore di disaccordo cristallografico R_{fac} , che è strettamente collegato all'informazione cristallografica:

$$R_{fac} = \frac{\sum_{hkl} w_{hkl} \|F_o\| - k \|F_c\|}{\sum_{hkl} \|F_o\|}$$

dove w_{hkl} è il peso attribuito al singolo riflesso, k è il fattore di scala e $F_o(\cdot)$ ed $F_c(\cdot)$ sono, rispettivamente, i moduli dei fattori di struttura osservati e calcolati dal modello. Va tuttavia sottolineato che il valore di questo indice può essere reso arbitrariamente piccolo, aumentando il numero di parametri descrittivi del modello al di là di quello che può essere fisicamente significativo.

Un modo più efficace per controllare la qualità della struttura è rappresentato dal fattore R_{free} che non è condizionato dall'affinamento:

$$R_{free} = \frac{\sum_{hkl(test)} w_{hkl} \|F_o\| - k \|F_c\|}{\sum_{hkl(test)} \|F_o\|}$$

L'applicazione dell' R_{free} prevede la suddivisione dei riflessi raccolti in due parti, un insieme "test" ed un insieme di lavoro. L'insieme "test" è costituito dal 5-10% dei riflessi osservati, scelti in maniera casuale tra tutti i riflessi unici.

³ Il programma SHELX [Sheldrick, G. Göttingen University, Germany] non utilizza per l'affinamento i fattori di struttura ma le intensità.

L'affinamento viene effettuato sfruttando solo i dati dell'insieme di lavoro. Alla fine di ogni ciclo di affinamento l' R_{free} è confrontato con l' R_{fac} ed entrambi devono diminuire. L' R_{free} è sempre un po' più alto dell' R_{fac} poiché è calcolato sui riflessi che la procedura di affinamento non utilizza.

Un altro metodo per controllare l'accuratezza del modello utilizzato si basa sull'ispezione delle mappe di densità elettronica seguendo la continuità della catena principale e la connettività tra la catena principale e quella laterale dei vari residui. Un'indagine parallela all'ispezione delle mappe di densità elettronica viene fornita dall'andamento dei valori assunti dal fattore di spostamento atomico B per la catena principale e le catene laterali dei residui che formano la proteina.

Una stima definitiva della qualità del modello viene ottenuta considerando la stereochimica del modello stesso. La qualità stereochimica dei modelli proposti nella tesi è stata analizzata mediante l'impiego dei programmi PROCHECK [Laskowski, R.A., *et al.*, 1993] e WHATCHECK [Hoof, R.W., *et al.*, 1996] con i quali, partendo dalle coordinate del modello, si ottengono una serie di diagrammi nei quali è riassunta la qualità stereochimica della struttura ed un elenco, residuo per residuo, di ogni parametro stereochimico con le rispettive deviazioni dai valori di riferimento. La stereochimica del modello viene confrontata con quella risultante da un'analisi statistica su

strutture cristallografiche di proteine ben affinate e determinate ad una risoluzione prossima a quella della proteina in esame.

2.5. ANALISI DELLA REATTIVITA' DELL'EMICROMO MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO

Per saggiare l'attività perossidasi degli emolisati di tre pesci (*Trematomus bernacchii*, *Trematomus newnesi* e *Gymnodraco acuticeps*) rispetto a quella dell'emoglobina umana (HbA) è stato utilizzato, secondo il metodo di Everse [Everse, J., *et al.*, 1994], la dopamina come substrato. La dopamina è un idrossichinone che può essere perossidato al corrispondente chinone ed eventualmente formare melanina insolubile.

Le Hb sono state previamente ossidate con ferricianuro di potassio come descritto nel paragrafo 2.1.

Quindi sono stati preparati campioni di 0.9 mL contenenti tampone sodio fosfato citrato 50 mM pH 5.4, emoglobina in diverse concentrazioni (0-0.4 mg/ml) e dopamina 4 mM. La reazione di perossidazione è cominciata per addizione di 0.1 mL di una soluzione di perossido di idrogeno (H_2O_2) 176 mM e monitorata dal cambiamento di assorbanza alla lunghezza d'onda di 475 nm (A_{475}). Il cambiamento di A_{475} è dovuto all'ossidazione del substrato da parte del perossido di idrogeno catalizzata dall'emoglobina.

Gli spettri di assorbimento elettronico nel visibile sono stati registrati con uno spettrofotometro Jasco 560 a temperatura ambiente.

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. CARATTERIZZAZIONE IN SOLUZIONE DELLE FORME FERRICHE OTTENUTE PER OSSIDAZIONE CON FERRICIANURO

Allo scopo di ottenere un panorama completo di tutte le specie ferriche che si formano in soluzione in seguito al processo di ossidazione è stato innanzitutto effettuato uno studio spettroscopico di tipo EPR su cinque AFHb (Hb1Tn, Hb2Tn, HbCTn, HbTb e HbGa) di pesci teleostei ossidate per trattamento con ferricianuro a pH 7.6. A scopo comparativo si è effettuata l'analisi anche su Hb da pesci artici teleostei, *L. tunicatus* (HbLt), da pesci polari cartilaginei, *B. eatonii* (HbBe) e *R. hyperarborea* (HbRh), e da pesci teleostei evolutivamente legati agli antartici, *C. gobio* (HbCg).

3.1.a DESCRIZIONE DEGLI SPETTRI EPR REGISTRATI A PH 7.6

Dall'analisi degli spettri EPR registrati (fig.3.1) è chiaro che in soluzione sono presenti sia un segnale di tipo assiale corrispondente ad una forma ferrica ad alto spin, che tre segnali di tipo rombico relativi ad altrettante forme ferriche a basso spin. I valori di g delle specie ad alto e basso spin sono elencati in tabella 3.1. Si sono trovati segnali ad alto spin con valori identici di g (5.88 e 2.01) per HbTb, Hb1Tn, Hb2Tn e HbGa (fig.3.1, spettri HbTb,

Hb1Tn, Hb2Tn e HbGa). Nel caso di HbCTn il segnale ad alto spin, sebbene presenti un $g=5.87$ mostra un notevole aumento di rombicità (fig.3.1, spettro HbCTn) rispetto a quello delle altre quattro AFHb. Per i tre segnali a basso spin si trovano valori di g_{\max} e g_{medio} rispettivamente di 3.2 e 2.3, 2.9 e 2.2, 2.6 e 2.2 per le cinque AFHb esaminate (solo un valore di g_{\min} pari a 1.8 è stato risolto).

Una delle tre forme a basso spin è sicuramente interpretabile con una specie idrossi-met alla quale è assegnato un valore di g_{\min} di 1.8. In particolare, il contenuto di idrossi-met a pH 7.6 è diverso per le cinque AFHb esaminate, essendo più basso per HbGa e HbCTn rispetto alle altre tre Hb.

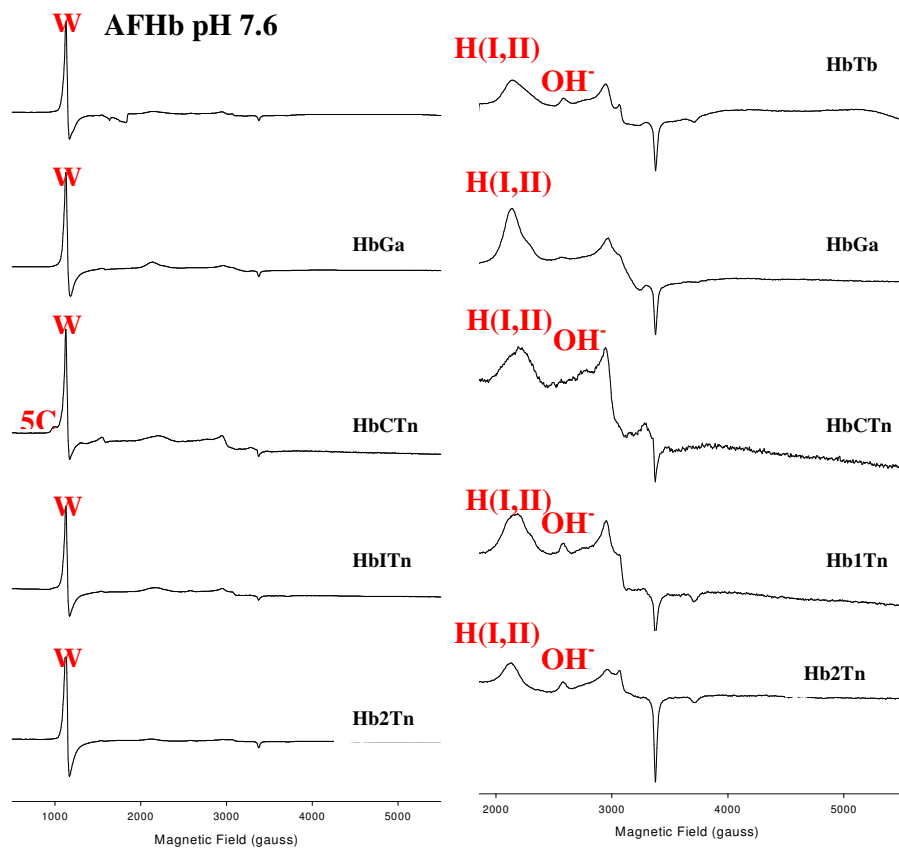


Fig. 3.1- Spettri EPR ad onda continua (banda X) a 12 K di cinque diverse AFHb (1.5 mM eme) ossidate con ferricianuro a pH 7.6 in HEPES 50 mM. A destra sono espanse le zone di basso spin (2000-4000 Gauss).

I valori 3.2 e 2.9 di g_{\max} degli altri due segnali a basso spin corrispondono ai campi tipici di risonanza di complessi bis-istidinici, simili rispettivamente a quelli assegnati all'emicromo del citocromo c (emicromo di tipo I, HI) e del citocromo b_5 (emicromo di tipo II, HII).

Quindi in soluzione in seguito all'ossidazione, per trattamento con ferricianuro, di AFHb coesistono due forme bis-istidiniche (HI, HII).

L'abbondanza dei due emicromi è diversa: risulta maggioritaria la forma emicromo I con un rapporto di circa 1:10 per HbTb, Hb1Tn, Hb2Tn e HbGa. La diversa anisotropia del tensore g dei due emicromi può essere dovuta: 1) ad un diverso stato di carica dell'imidazolo dell'istidina prossimale; 2) ad una diversa stereochimica dell'eme. La possibilità che uno o entrambi i ligandi assiali di AFHb sia imidazolato è esclusa dall'interpretazione degli spettri EPR registrati in dipendenza del pH (paragrafo 3.3a). Quindi i diversi segnali EPR a basso spin si possono spiegare solo suggerendo una diversa geometria di coordinazione dei ligandi imidazolici nei due emicromi I e II.

Hb	HI			HII			idrossi-met		
	gz	gy	(gx) ⁽⁴⁾	g1	g2	(g3) ⁽⁵⁾	gz	gy	(gx)
HbTb	3.15	2.26	0.98	2.91	2.17	1.47	2.62	2.19	1.82
HbGa	3.16	2.23	1.02	3.01	2.23	1.47	-	-	-
HbCTn	3.18	2.26	0.88	3.06	2.40	1.47	-	-	-
Hb1Tn	3.13	2.24	1.09	2.95	2.24	1.47	2.62	2.19	1.82
Hb2Tn	3.17	2.24	0.97	2.86	2.23	1.47	2.62	2.18	1.82
HbBe	-	-	-	2.80	2.23	1.47	2.61	2.18	1.82
HbRh	-	-	-	-	-	1.47	-	-	-
HbCg	3.17	2.26	0.92	2.90	2.26	1.47	-	-	-
HbLt	3.19	2.27	0.82	3.02	2.17	1.47	2.64	2.19	1.83

Tabella 3.1. Elenco dei valori di g delle specie ad alto e basso spin per le nove emoglobine esaminate.

I parametri geometrici rilevanti per avere una correlazione tra l'anisotropia del tensore g e la stereochimica dell'eme sono gli angoli di *tilt* che l'anello imidazolico dell'istidina distale o prossimale formano con il piano dell'eme (θ_d

⁴ (gx) è stato calcolato come $g(x)=16-gz^2-gy^2$

⁵ (g3) è stato imposto uguale a 1.47 come per il citocromo b₅.

o θ_p) e l'angolo diedro formato tra il piano dell'anello imidazolico distale e quello prossimale (ω) [Walker, F.A., 2004]. In una coordinazione ideale θ_d e θ_p sono di 90° , ω è 0° . In accordo con l'interpretazione stereochimica della diversa anisotropia dei segnali di HI e HII, l'emicromo HII avrebbe una geometria più vicina all'idealità (tipo citocromo b_5) dell'emicromo HI che dovrebbe risultare distorto.

La struttura cristallografica ad alta risoluzione di HbTb, ossidata per trattamento con ferricianuro (paragrafo 3.2a), fornirà un'analisi accurata del grado di distorsione della geometria dell'eme in un emicromo di tipo HI, come discusso in seguito.

Il valore di g per il segnale ad alto spin corrisponde alla forma aquo-met presente all'eme α delle AFHb e in equilibrio con la forma idrossi-met.

In HbCTn, la distorsione rombica del segnale ad alto spin suggerisce la formazione di Fe(III) pentacoordinato (5C). Nonostante forme 5C siano conosciute per Hb monomeriche [Ilari, A., *et al.*, 2002] e per ossidasi [Berglund, G.I., *et al.*, 2002], questa è la prima evidenza sperimentale della presenza di una forma ferrica pentacoordinata in una emoglobina tetrameric. Dal confronto dello spettro EPR di HbCTn con quelli delle altre AFHb risulta che la formazione della forma 5C in HbCTn è correlata alla scomparsa di buona parte di HI, a parità di contenuto della forma aquo-met. Infatti, in

HbCTn, diversamente dalle altre AFHb, l'emicromo II è più abbondante di HI. Quindi, la forma 5C dovrebbe sostituire sull'eme β la maggior parte di HI presente nelle altre AFHb. Una spiegazione strutturale a questo comportamento di HbCTn è ipotizzabile. La principale differenza nella tasca dell'eme β tra HbCTn e le altre AFHb è la sostituzione Val-67 β →Ile [D'Avino, R., *et al.*, 1994]. L'esperimento di *modelling* molecolare, effettuato sostituendo Val-67 β →Ile nella struttura di Hb1Tn α (carbomonossi) β (emicromo) ([Riccio, A., *et al.*, 2001, 2002] codice PDB: 1LA6), ha infatti dimostrato che la formazione della forma 5C in HbCTn può essere dovuta alla destabilizzazione del complesso bis-istidinico a causa del maggiore ingombro sterico che si viene a creare all'interno della tasca dell'eme β come mostrato in fig.3.2.

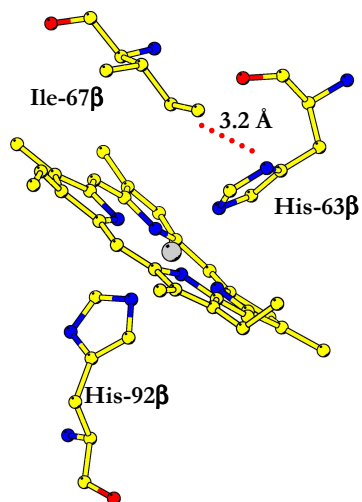


Fig. 3.2- La mutazione di Val-67 β →Ile nella struttura di Hb1Tn α (carbomonossio) β (emicromo) [Riccio, A., *et al.*, 2001, 2002] crea un'interazione aggiuntiva tra la catena laterale dell'Ile-67 β e l'istidina distale His-63 β che potrebbe ostacolare la formazione dell'emicromo I.

A scopo comparativo si è effettuata l'analisi anche su Hb da pesci artici teleostei, *L. tunicatus* (HbLt), da pesci polari cartilaginei, *B. eatonii* (HbBe) e *R. hyperarborea* (HbRh), e da pesci teleostei evolutivamente legati agli antartici, *C. gobio*. In figura 3.3 si riportano gli spettri EPR di tali sistemi da cui risulta che:

- 1) anche emoglobine da pesci teleostei artici (HbLt) formano diversi tipi di complessi bis-istidinici e una forma pentacoordinata ad alto spin in seguito al processo di ossidazione;
- 2) le Hb da pesci cartilaginei (HbBe e HbRh), sia artici che antartici, mostrano in soluzione, in seguito al trattamento con ferricianuro, la sola forma aquo-met (idrossi-met), ed un trascurabile

contenuto di forme bis-istidiniche; 3) la Hb da *C. gobio* (HbCg), analogamente a quanto osservato da uno studio su Hb da *P. urvilli* (HbPu), esibisce la presenza di forme bis-istidiniche.

Dall'insieme dei dati su riportati si può concludere che: 1) la tendenza a formare il complesso bis-istidinico è una caratteristica comune a tutte le specie adattate al freddo e non è tipica solo di quelle antartiche, sottolineando che questa risposta funzionale al freddo si è verificata anche in organismi sviluppati in ambienti meno rigidamente controllati di quell'antartico; 2) la presenza di una forma 5C ad alto spin in HbLt conferma l'ipotesi, precedentemente avanzata per HbCTn, circa il ruolo destabilizzante della Ile-67 β nella formazione dell'emicromo; 3) l'assenza di forme bis-istidiniche in Hb da pesci cartilaginei (HbBe e HbRh), in cui è assente l'elica D β , suggerisce l'importanza di questa regione nella formazione dell'emicromo. Infine da un punto di vista evolutivo, i risultati sulle Hb da pesci di acque temperate HbCg e HbPu, geneticamente correlate alle specie antartiche, sembrano indicare che le caratteristiche strutturali, che influenzano positivamente la formazione dell'emicromo, siano state acquisite precedentemente alla loro migrazione fuori dal fronte circumpolare.

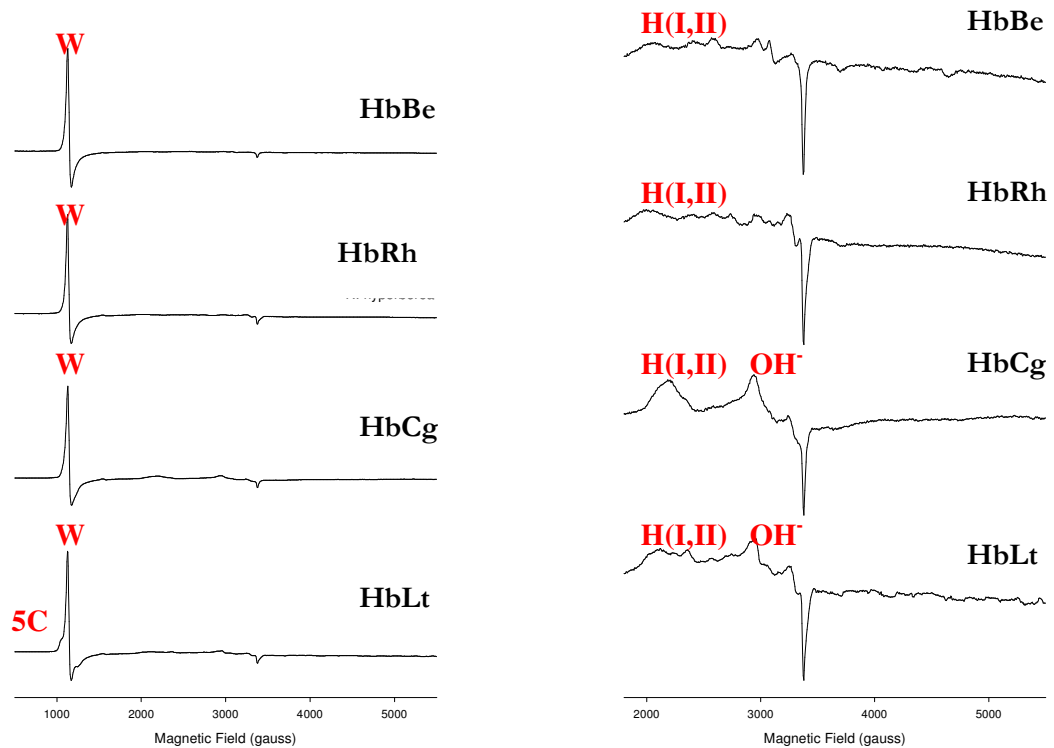


Fig. 3.3- Spettri EPR ad onda continua (banda X) a 12 K di emolisati di pesci artici teleostei, *L. tunicatus* (HbLt), di pesci polari cartilaginei, *B. eatonii* (HbBe) e *R. hyperarborea* (HbRh), e di pesci teleostei evolutivamente legati agli antartici, *C. gobio* (HbCg). Prima della registrazione degli spettri gli emolisati sono stati trattati con ferricianuro a pH 7.6 in HEPES 50 mM. A destra sono espanso le zone di basso spin (2000-4000 Gauss).

3.2. ANALISI STRUTTURALE DI COMPLESSI BIS-ISTIDINICI IN EMOGLOBINE TETRAMERICHE

L'analisi spettroscopica EPR di cinque Hb isolate da pesci antartici, Hb1Tn, Hb2Tn, HbCTn, HbTb e HbGa, differenti in origine, funzione e/o sequenza, ha rivelato un andamento caratteristico che le accomuna. Infatti, gli spettri EPR delle cinque AFHb, ossidate per trattamento con ferricianuro, evidenziano la presenza di due diversi emicromi (HI e HII), di forme aquo-met e idrossi-met a pH 7.6 (fig.3.1). In particolare, la presenza di due emicromi EPR-distinti per tutte le AFHb investigate ha fatto nascere l'esigenza di una più approfondita indagine cristallografica. E' pertanto stata determinata la struttura, ad alta risoluzione, di cristalli (cfr. paragrafo 2.3) ottenuti dalla soluzione di HbTb ossidata con ferricianuro (hr-oxHbTb). Si fa notare che una precedente analisi cristallografica [Vitagliano, L., *et al.*, 2004] a bassa risoluzione (2.5 Å) e a temperatura ambiente aveva rivelato la presenza, nel cristallo di questa Hb, di una forma α (aquo-met)- β (emicromo). In questo caso l'obiettivo centrale della caratterizzazione strutturale ad alta risoluzione di HbTb consisteva in una più accurata definizione della stereochimica dell'eme β . Contemporaneamente, al fine di caratterizzare in dettaglio la formazione di complessi bis-istidinici in emoglobine tetrameriche è stata risolta e affinata la struttura di Hb1Tn ad alta risoluzione ossidata per 30 giorni di esposizione all'aria (hr-oxHb1Tn).

3.2.a STRUTTURA A RAGGI X DI CRISTALLI CRESCIUTI DA UNA SOLUZIONE DI HbTb OSSIDATA CON FERRICIANURO (hr-oxHbTb)

La struttura di hr-oxHbTb è stata affinata fino ad un fattore di accordo (R_{factor}) del 19.9% (R_{free} 23.4%) utilizzando dati di diffrazione (74'461 riflessi unici) nell'intervallo di risoluzione 1.5-30.0 Å. Il modello finale include 360 molecole d'acqua per dimero e 7 residui in doppia conformazione (Arg-11 α , Glu-121 α , Ser-29 β , Asn-77 β , Ser-107 β , Ser-139 β , His-146 β). La densità elettronica è piuttosto ben definita sia per la catena principale che per le catene laterali della maggior parte dei residui. Rispetto alla struttura a moderata risoluzione (2.5 Å, codice PDB: 1S5Y) [Vitagliano, L., *et al.*, 2004], in questa struttura ad alta risoluzione sono ben visibili: 1) l'interfaccia $\beta_1\beta_2$; 2) i residui 44 e 50-52 del *loop* CD β anche se, come frequentemente riportato per gli stati R delle Hb, per i residui 45-49 non è stato possibile costruire un modello ragionevole. I parametri stereochimici della struttura affinata (tabella 3.2) sono in stretto accordo con quelli ottenuti su strutture di proteine ben affinate alla stessa risoluzione.

$R_{\text{fac}}/R_{\text{free}}$ (%)	N° residui in doppia conformazione	N° molecole di acqua	RMSD lunghezze di legame (Å)	RMSD angoli di legame (°)	B(Proteina) (Å ²)	B(Acque) (Å ²)	B(Eme) (Å ²)
19.9/23.4	7	360	0.009	0.90	16.4	27.2	18.4

Tabella 3.2. Statistiche finali dell'affinamento della struttura di hr-oxHbTb calcolate con il programma WHATCHECK [Hoof, R.W., *et al.*, 1996].

La struttura quaternaria di hr-oxHbTb può essere valutata con l'ausilio di diversi diagnostici. Il più rilevante consiste nel determinare l'angolo di cui bisogna ruotare il dimerò $\alpha_2\beta_2$ per sovrapporlo al dimerò $\alpha_2\beta_2$ di HbTb in forma deossi, dopo aver preliminarmente sovrapposto le due forme utilizzando il dimerò $\alpha_1\beta_1$. Tale angolo è di circa 7° , pressoché identico a quello della forma emicromo di HbTb risolta a bassa risoluzione (2.5 Å) [Vitagliano, L., *et al.*, 2004] e pertanto intermedio tra la forma deossi (T) [Fermi, G., *et al.*, 1984] e quella carbomonossi (R) [Camardella, L., *et al.*, 1992; Mazzearella, L., *et al.*, 1999].

Altri diagnostici della struttura quaternaria sono:

1. angolo torsionale tra i residui peptidici Pro-51 α / Gly-52 α ,
2. presenza o assenza di ponti salini nelle regioni CD α ed E β ,
3. l'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ ($\alpha_2\beta_1$),
4. posizione della catena laterale del residuo Tyr-145 β .

In hr-oxHbTb la coppia di residui Pro-51 α /Gly-52 α è di tipo R. Inoltre i ponti salini nel tratto CD α (Asp-48 α -His-55 α) ed E β (Asp-72 β -His-69 β) sono rotti. Tuttavia i gruppi carbossilici di Asp-95 α_1 e Asp-101 β_2 sono molto più vicini rispetto alla forma R e interagiscono attraverso una molecola d'acqua. In hr-oxHbTb infine la catena laterale della Tyr-145 β_1 adotta un'orientazione diversa sia dalla forma R [Camardella, L., *et al.*, 1992; Mazzearella, L., *et al.*,

1999] che dalla forma T [Fermi, G., *et al.*, 1984], essa infatti è diretta verso l'interno della proteina e interagisce tramite una molecola di acqua, che fa da ponte, con l'ossigeno carbonilico di Val-35 α_2 .

Rispetto alla carbomonossio emoglobina le regioni maggiormente interessate dalla reazione di ossidazione con ferricianuro sono i due gruppi eme α e β e le interfacce $\alpha_1\beta_2$ ($\alpha_2\beta_1$) e $\beta_1\beta_2$ ($\beta_2\beta_1$).

La densità elettronica dell'eme α risulta ben definita e mostra chiaramente la presenza di un ligando esogeno nella sesta posizione di coordinazione del Fe(III). La distanza del Fe(III) dal centro della densità del ligando è di 2.0 Å mentre la distanza dello stesso ione dall'NE dell'His-59 α è 4.1 Å. Pertanto sull'eme α (fig.3.4) la struttura va considerata come una forma aquo-met o meglio una forma mista aquo-met/idrossi-met considerando anche il pH del mezzo di cristallizzazione (pH 7.6) e le evidenze EPR.

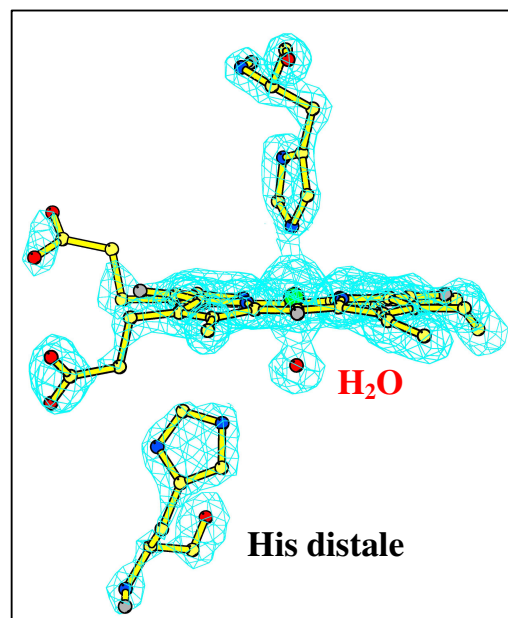


Fig. 3.4- Mappa di densità elettronica dell'eme α di hr-oxHbTb. La mappa è stata calcolata a 3.3σ (1.5 \AA). La figura è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

Un quadro completamente differente emerge dall'analisi delle mappe di densità elettronica corrispondenti all'eme β . L'atomo di ferro coordina, infatti, oltre che il residuo di istidina prossimale (His-92 β) anche quello di istidina distale (His-63 β) (fig.3.5). Si forma quindi sulla subunità β un complesso bis-istidinico del quale sono stati calcolati i parametri geometrici allo scopo di confrontarli con quelli degli altri emicromi della superfamiglia delle Hb, di cui sono note le strutture cristallografiche.

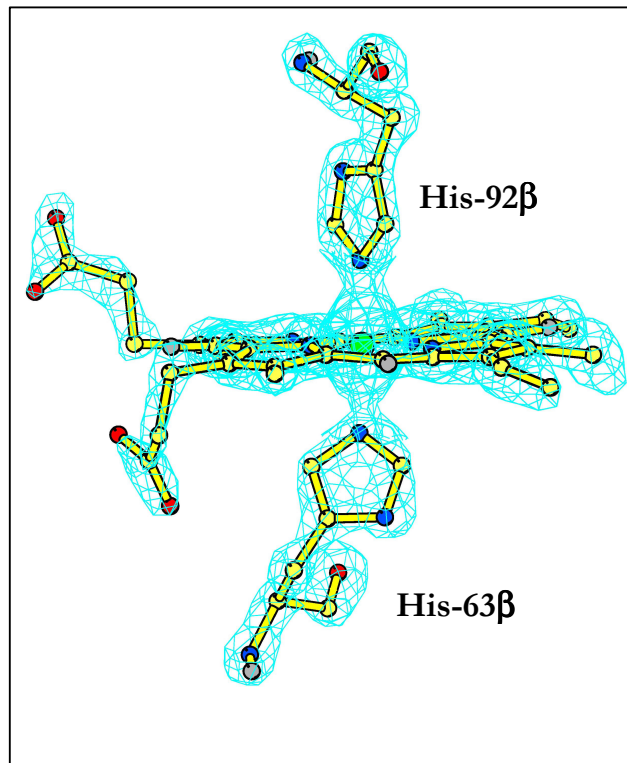


Fig. 3.5- Mappa di densità elettronica dell'eme β di hr-oxHbTb. La mappa è stata calcolata a 3.3σ (1.5 \AA). L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

In tabella 3.3 sono quindi riportati, per le 14 strutture a raggi X di emoproteine contenenti complessi bis-istidinici (compresa la struttura di hr-oxHbTb), i parametri geometrici θ_d , θ_p e ω , le componenti del tensore g, per quei sistemi dei quali sono disponibili dati EPR, e, a scopo comparativo, anche i valori relativi a 3 strutture di citocromi b_5 .

Emo-proteina	CODICE PDB	$\theta_p(^{\circ})$	$\theta_d(^{\circ})$	$\omega(^{\circ})$	gz	gy
<i>Trematomus bernacchii</i>	1S5X	83.3	71.2	54.3	-	-
	1S5Y	81.7	72.7	57.9	-	-
	hr-oxHbTb	86.1	77.4	60.4	3.15	2.26
<i>Trematomus newnesi</i>	1LA6	76.8	73.0	62.7	3.13	2.24
	hr-oxHb1Tn	87.7	73.5	53.8	-	-
<i>Equus caballus</i>	1NS6	83.1	67.6	22.7	-	-
<i>Oryza sativa</i>	1D8U	87.1	88.4	64.4	-	-
		87.9	87.2	63.8	-	-
<i>Homo sapiens</i>	1URV	83.4	82.4	67.4		
	1Z8U	83.2	85.1	89.1	2.80	2.20
		89.8	85.7	68.6		
	1OJ6	88.4	81.8	65.5	-	-
		89.3	78.1	67.3		
88.5		79.1	66.1			
88.8		79.4	60.9			
<i>Synechocystis sp.</i>	1RTX	79.0	72.7	77.0	-	-
<i>Mus Musculus</i>	1Q1F	89.5	79.6	61.1	3.12	2.15
<i>Drosophila Melanogaster</i>	2BK9	86.9	88.5	89.0	-	-
<i>Caudina Arenicola</i>	1HLB	89.3	77.0	65.0	-	-
Citocromi b₅						
<i>Bos Taurus</i>	1CYO	85.9	86.3	21.2	3.03	2.23
<i>Rattus norvegicus</i>	1B5M	89.1	81.3	11.8	3.07	2.22
<i>Homo sapiens</i>	1MJ4	87.0	86.3	0.7	-	-

Tabella 3.3. Parametri stereochimici della tasca dell'eme e valori di g per diverse forme di emicromo note.

La coordinazione del complesso bis-istidinico presenta un grado di distorsione che ha un'ampia distribuzione nell'ambito della superfamiglia delle Hb. In particolare i complessi bis-istidinici delle due AFHb, HbTb e Hb1Tn, e della Hb da *Synechocystis sp.* sono i più distorti.

Combinando queste osservazioni con i risultati spettroscopici EPR, la presente struttura $\alpha(\text{aquo-met})\beta(\text{emicromo})$ può essere confidentemente assegnata ad una forma emicromo di tipo I.

Per quanto riguarda la formazione dell'emicromo II, tipo citocromo b_5 , nelle AFHb sarebbe necessaria o un'ulteriore fuoriuscita dell'eme β dalla tasca del sito attivo o una diversa posizione delle eliche EF β . Entrambi questi percorsi prevedrebbero una rilevante variazione strutturale rispetto all'emicromo I. In effetti, presumibilmente l'emicromo II non può formarsi a partire dall'emicromo I ed eventualmente rappresenta un intermedio irreversibile verso la denaturazione della proteina. Infine non può essere esclusa la possibilità che HII sia presente in una forma monomeric, anche se la costante di associazione del tetramero in AFHb è anche più alta di quella dei mammiferi [Giangiaco, L., *et al.*, 2001]. Inoltre, alternativamente, non si può neanche escludere che derivi dalla formazione del complesso bis-istidinico sull'eme α , come succede nel caso degli emicromi da Hb di mammifero, malgrado i residui chiave della formazione in α (cfr. capitolo 1) siano assenti in AFHb.

La distanza di legame di His-92 β prossimale dallo ione Fe(III) è pari a 2.0 Å come nella struttura dell'emicromo a bassa risoluzione (2.5 Å) e a T ambiente

(1S5Y); anche l'istidina distale si trova a 2.0 Å da Fe(III) (2.1 Å in 1S5Y) [Vitagliano, L., *et al.*, 2004].

La posizione relativa dei C α delle His β prossimale e distale risulta di 12.4 Å. Il valore di questa distanza è di solito 14.0-14.5 Å nelle emoglobine tetrameriche in forma R [Camardella, L., *et al.*, 1992; Mazzarella, L., *et al.*, 1999] o T [Fermi, G., *et al.*, 1984]. Tale distanza risulta essere un buon *marker* della dimensione della tasca dell'eme β , parametro rilevante nel valutare la tendenza a formare il complesso bis-istidinico.

Una regione di rilevante interesse nell'organizzazione di emoglobine tetrameriche è l'interfaccia $\alpha_1\beta_2$. In hr-oxHbTb all'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ è presente una molecola di acqua a ponte tra gli O γ delle catene laterali dei residui Asp-95 α_1 e Asp-101 β_2 che in hr-oxHbTb distano 5.7 Å (6.0 Å in 1S5Y). All'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ è presente anche l'aspartico 99 β_2 che è legato da legami ad idrogeno con due molecole d'acqua (2.5 e 3.0 Å) e con Asn-98 β_2 attraverso l'O γ (3.0 Å). Una delle molecole d'acqua è legata ad un esteso *network* di solvente strutturato che protrude verso l'esterno (fig.3.6). L'assetto strutturale appena descritto non coincide con quello delle forme R [Camardella, L., *et al.*, 1992; Mazzarella, L., *et al.*, 1999] e delle forme T [Fermi, G., *et al.*, 1984], piuttosto risulta essere intermedio tra le due. Infatti nella forma T, i residui Asp-95(G1) α_1 e Asp-101(G3) β_2 si avvicinano così strettamente l'uno all'altro da formare un forte legame ad idrogeno diretto (2.3-2.7Å). Pertanto, nella

forma T, uno dei due Asp è protonato, esibendo un significativo aumento del proprio pK_a (dal valor medio di 4.3 a circa 8.0), la qual cosa è resa possibile anche dalla presenza del terzo residuo di Asp (Asp-99 β_2) nelle vicinanze. Nella forma T è quindi presente un legame ad idrogeno diretto tra Asp-95 α_1 e Asp-101 β_2 senza l'inserimento di alcuna molecola di acqua. Tale interazione non si osserva nella struttura R [Mazzarella, L., *et al.*, 1999], perché lo spostamento T/R dell'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ ($\alpha_2\beta_1$) allontana l'atomo C α di Asp-95 α di più di 2 Å dal residuo di Asp-101 β (la distanza O γ -O γ più piccola è pari a 6.5 Å).

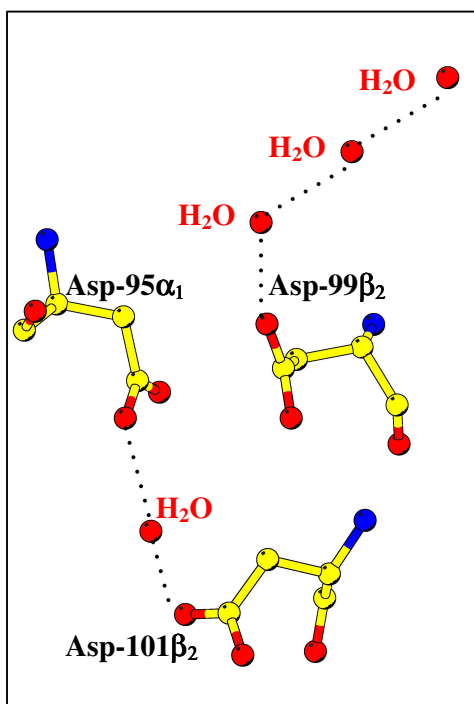


Fig. 3.6- In hr-oxHbTb all'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ è presente una molecola di acqua a ponte tra gli O γ delle catene laterali dei residui Asp-95 α_1 e Asp-101 β_2 . L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

Nella forma emicromo determinata a temperatura ambiente [Vitagliano, L., *et al.*, 2004], la zona del C β -terminale risultava piuttosto disordinata. Al contrario, in hr-oxHbTb determinata a 100 K, l'interfaccia $\beta_1\beta_2$ è molto ordinata, e mostra caratteristiche strutturali mai osservate in emoglobine tetrameriche di altri organismi. Tale interfaccia è stata osservata anche in altre forme di HbTb ferrica a pH=7.6 i cui dati di diffrazione sono stati raccolti alla temperatura di 100 K (dati non pubblicati).

La densità elettronica in questa zona ha richiesto un'interpretazione attenta dovuta alla presenza di conformazioni alternative prossime a posizioni speciali (passanti per elementi di simmetria). Infatti, l'interpretazione della mappa di densità elettronica in questa regione (fig.3.7 e 3.8), indica che la catena laterale del residuo His-146 β_1 è vicino all'asse binario cristallografico, il che implica che localmente la simmetria cristallografica non può essere rispettata se non in media. Pertanto, le catene laterali delle due His-146 riportate dall'asse di simmetria cristallografico debbono adottare due conformazioni alternative (His-146 β (A) e His-146 β (B)) con pari fattori di occupazione. Localmente la conformazione A di una istidina fa interazioni di *stacking* con la catena laterale in conformazione B della seconda istidina riportata dall'operazione di asse binario cristallografico (e viceversa) (fig.3.8).

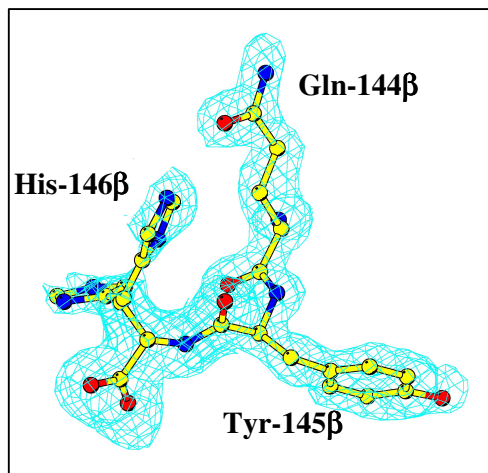


Fig. 3.7- Densità elettronica del tratto C β terminale di hr-oxHbTb a 2.5σ (1.5 Å). La densità elettronica della catena laterale di His-146 β può essere interpretata con una doppia conformazione. L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

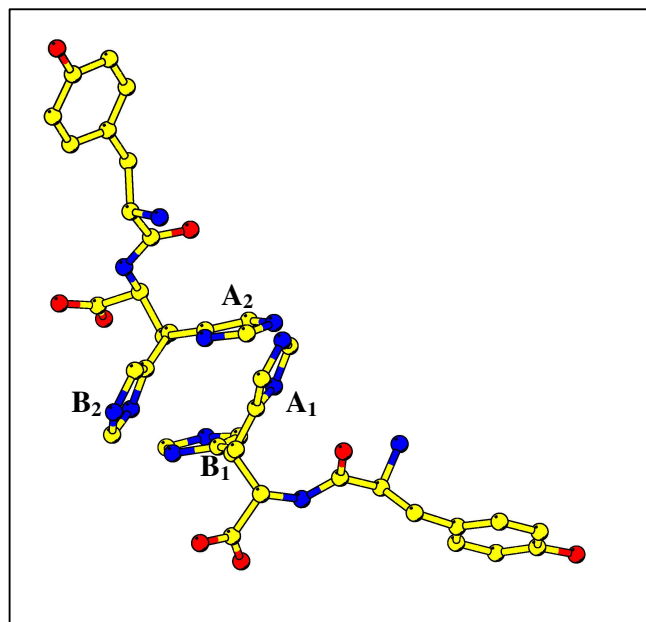


Fig. 3.8- Interfaccia $\beta_1\beta_2$. La conformazione A di una istidina (A $_1$) fa interazioni di *stacking* con la catena laterale in conformazione B (B $_2$) della seconda istidina riportata dall'operazione di asse binario cristallografico (e viceversa). L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

In generale, due istidine possono assumere una conformazione parallela (*stacking* π) o perpendicolare (forma a **T**) (fig.3.9). Schettino e collaboratori hanno estesamente investigato l'energetica e la geometria delle interazioni tra coppie di residui amminoacidici aromatici [Chelli, R., *et al.*, 2002; Gervasio, F. L., *et al.*, 2002]. Hanno studiato diverse possibili coppie, ma non His-His. La coppia più simile investigata è quella His-Trp. Questo lavoro ha mostrato che la struttura con forma a **T** è favorita in solventi apolari, mentre è completamente destabilizzata in solventi che formano legame ad idrogeno, come l'acqua. Questi risultati sono consistenti con il presente studio. Infatti, gli *stacking* π sono trovati in superfici esposte al solvente ($\beta_1\beta_2$). E' interessante notare che questo tipo di interazione di His146-His146, sebbene arrangiato diversamente, è stato osservato anche nel caso della forma R2 dell'HbA [Silva, M. M., *et al.*, 1992].

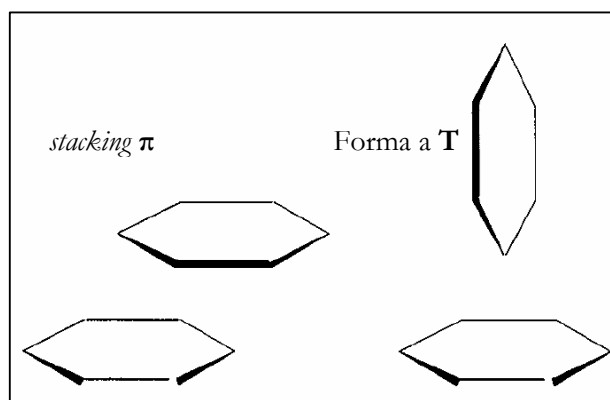


Fig. 3.9- Interazioni tra coppie di residui amminoacidici aromatici: conformazione parallela (*stacking* π) o perpendicolare (forma a T). Immagine tratta da [McGaughey, G. B., *et al.*, 1998].

L'orientazione relativa dei due anelli imidazolici può essere descritta più dettagliatamente da un punto di vista geometrico in termini di quattro parametri (fig.3.10): 1) distanza (R_{cen}) tra i centri dei due anelli; 2) distanza di minimo contatto tra i due anelli (R_{clo}); 3) angolo (θ) compreso tra il vettore che unisce i centri dei due anelli (R_{cen}) e il vettore normale alla superficie (superficie normale) di uno di essi; 4) angolo (γ) compreso tra i vettori normali alle superfici dei due anelli.

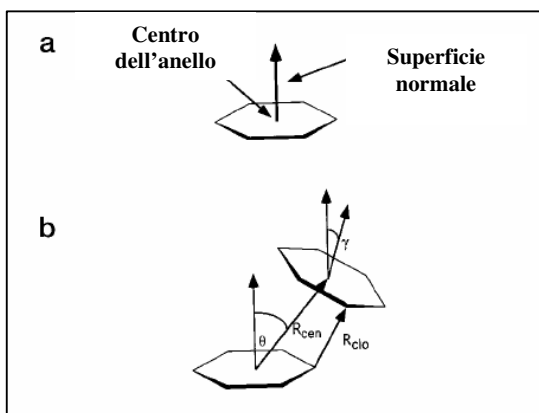


Fig. 3.10- a) Parametri geometrici del singolo anello: centro dell'anello (punto interno all'anello equidistante dai vertici), superficie normale (vettore passante per il centro dell'anello e perpendicolare al piano dell'anello stesso); b) Parametri geometrici che regolano l'orientazione relativa di due anelli: R_{cen} distanza tra i centri di due anelli; R_{clo} distanza di minimo contatto tra due anelli; θ angolo compreso tra il vettore che unisce i centri di due anelli (R_{cen}) e il vettore normale alla superficie (superficie normale) di uno di essi; γ angolo compreso tra i vettori normali alle superfici di due anelli. Immagine tratta da [McGaughey, G. B., *et al.*, 1998].

In tabella 3.4 sono riportati i parametri geometrici relativi ai due anelli imidazolici di His-146 β (A) e His-146 β (B) in confronto con l'intervallo dei valori assunti più frequentemente da tali parametri calcolati su un numero elevato (circa 13'000) di coppie di amminoacidi aromatici. La geometria osservata per His-146 β (A)-His-146 β (B) (Tabella 3.4) rientra nella distribuzione sperimentale di geometrie di *stacking* π osservate in altre strutture proteiche [McGaughey, G.B., *et al.*, 1998].

Alla doppia conformazione delle due istidine terminali è accoppiata un'altra coppia di conformazioni relativa al residuo di Ser-139 β , che cambia la sua conformazione a seconda dell'orientazione dell'His-146 β .

	Parametri geometrici di His-146β(A)-His-146β(B)	Distribuzione dei parametri geometrici
R_{cen} (Å)	4.3	3.5-12.0
R_{clo} (Å)	3.5	2.7-10.7
θ (°)	37	0-90
γ (°)	0	0-90

Tabella 3.4. Parametri geometrici di *stacking* tra gli anelli imidazolici di His-146 β (A) e His-146 β (B) confrontati con quelli registrati più frequentemente nei casi di *stacking* tra anelli aromatici di amminoacidi [McGaughey, G.B., *et al.*, 1998].

3.2.b DESCRIZIONE DELLA STRUTTURA AD ALTA RISOLUZIONE DI Hb1Tn OSSIDATA PER ESPOSIZIONE ALL'ARIA PER 30 GIORNI (hr-oxHb1Tn)

Per caratterizzare il processo di formazione dell'emicromo di Hb tetrameriche è stata determinata la struttura, ad alta risoluzione, di Hb1Tn ossidata esponendo all'aria i cristalli (cfr. paragrafo 2.3) della proteina in forma carbomonossi per 30 giorni (hr-oxHb1Tn). Si fa notare che la struttura di Hb1Tn ossidata per esposizione della proteina all'aria per sette giorni è stata invece precedentemente risolta a temperatura ambiente e a moderata risoluzione (codice PDB: 1LA6, [Riccio, A., *et al.*, 2002]). Tale struttura, risultata in forma α (aquo-met)- β (emicromo), verrà di seguito utilizzata come riferimento per la descrizione della struttura di hr-oxHb1Tn.

La struttura di hr-oxHb1Tn è stata affinata fino ad un fattore di accordo (R_{factor}) del 20.5% (R_{free} 23.4%) utilizzando dati di diffrazione (65'850 riflessi) nell'intervallo di risoluzione 1.5-30.0 Å. Il modello finale include 195 molecole d'acqua per dimero e 11 residui in doppia conformazione (Ser-21 α , Ser-72 α , Glu-83 α , Gln-87 α , Ser-9 β , Met-18 β , Met-55 β , Asp-72 β , Met-78 β , Ser-107 β , Ser-139 β). La densità elettronica è piuttosto ben definita sia per la catena principale che per le catene laterali della maggior parte dei residui tant'è che rispetto alla struttura a moderata risoluzione (2.0 Å, codice PDB: 1LA6 [Riccio, A., *et al.*, 2002]), in questa struttura ad alta risoluzione sono ben visibili

i residui sia del *loop* CD β , che del C- β terminale (tranne la catena laterale di His-146 β che risulta disordinata). I parametri stereochimici della struttura affinata (tabella 3.5 e fig.3.11) sono in stretto accordo con quelli ottenuti su strutture di proteine ben affinate alla stessa risoluzione.

$R_{\text{fac}}/R_{\text{free}}$ (%)	N° residui in doppia conformazione	N° molecole di acqua	RMSD lunghezze di legame (Å)	RMSD angoli di legame (°)	B(Proteina) (Å ²)	B(Acque) (Å ²)	B(Eme) (Å ²)
20.5/23.4	11	195	0.009	1.43	22.5	35.0	30.8

Tabella 3.5. Statistiche finali dell'affinamento della struttura di hr-oxHb1Tn calcolate con il programma WHATCHECK [Hoof, R.W., *et al.*, 1996].

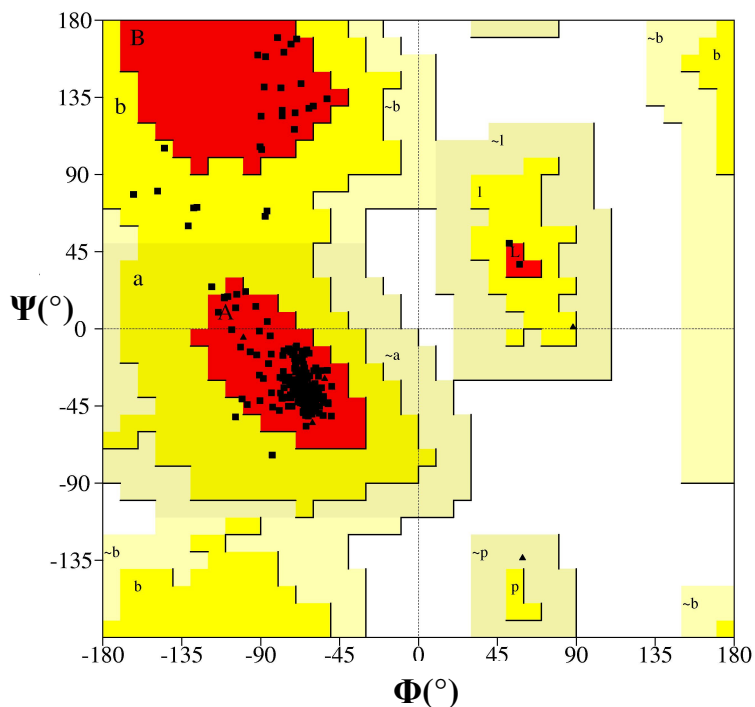


Fig.3.11- Diagramma di Ramachandran calcolato utilizzando il programma PROCHECK [Laskowski, R. A., *et al.*, 1993] per la struttura di hr-oxHb1Tn.

Dall'ispezione delle mappe di densità elettronica risultano chiare le differenze strutturali dei gruppi eme delle due subunità α e β . La struttura affinata mostra infatti che l'atomo di Fe(III) dell'eme α è esacoordinato con una molecola di acqua in sesta posizione di coordinazione alla distanza di 2.1 Å (fig.3.12a) e che il Fe(III) dell'eme β forma un complesso bis-istidinico caratterizzato da una distanza tra ione e istidina distale lunga, pari a 2.3 Å (fig.3.12b).

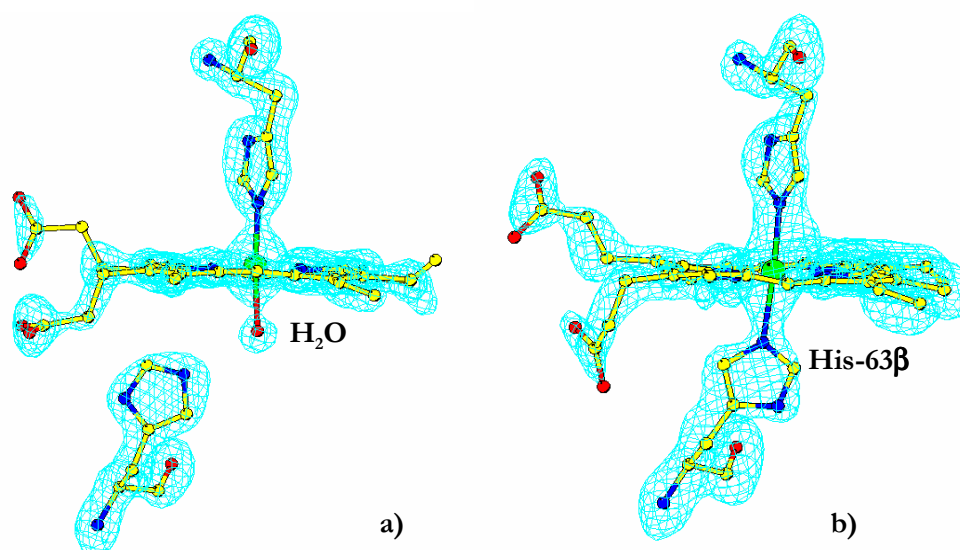


Fig. 3.12- Mappe di densità elettronica delle regioni eme dell'intermedio di ossidazione di Hb1Tn denominato hr-oxHb1Tn. a) eme α , b) eme β . Le mappe sono state calcolate a 3.3σ (1.5 Å). L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

La formazione del complesso bis-istidinico sull'eme β di AFHb è associata ad una significativa modificazione della posizione dell'eme β e delle eliche E β e F β .

L'analisi dei dati cristallografici di Hb1Tn dimostra che, come per la struttura precedentemente risolta (1LA6), anche la presente struttura possiede caratteristiche intermedie tra le forme R e T della Hb, sia a livello di struttura terziaria che quaternaria. Questo è particolarmente evidente se si considerano le posizioni relative del tratto FG di β_1 e C di α_2 .

Il tratto FG della catena β è uno dei segmenti chiave all'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ ($\alpha_2\beta_1$), la quale costituisce una regione critica per la regolazione allosterica delle Hb tetrameriche. Infatti, il segmento FG β interagisce con l'elica C della catena α e perciò ogni movimento del segmento FG β è trasmesso alle altre catene del tetramero. In particolare, le forme R e T delle Hb di vertebrati sono caratterizzate da posizioni differenti della catena laterale del residuo His-97 β relativamente all'elica C della catena α . Nella forma T deossi, l'anello imidazolico del residuo His-97 β è posizionato tra i residui 41 α e 44 α e l'interfaccia è ulteriormente stabilizzata dal legame idrogeno tra le catene laterali di Asp-99 β e Tyr-42 α . Nella forma R, l'interazione Asp-99 β ---Tyr-42 α è assente e l'interfaccia è caratterizzata da un legame idrogeno tra le catene laterali di Asp-95 α e Asn-102 β , e la catena laterale di His-97 β è invece

localizzata tra i residui 38α e 41α dell'elica C. Come mostrato in figura 3.13, in hr-oxHb1Tn la catena laterale di His-97 β occupa una posizione intermedia tra quella che questo residuo ha negli stati R e T e molto simile a quella trovata in 1LA6.

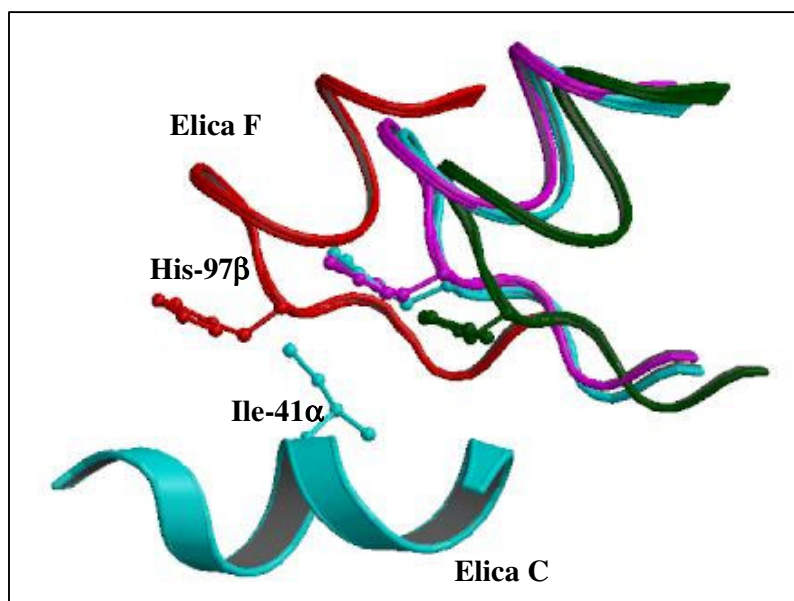


Fig. 3.13- Orientazione relativa della catena laterale di His-97 β e dell'elica C della catena α all'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ ($\alpha_2\beta_1$) delle Hb nelle forme legate e non legate. Hb1Tn-CO (codice PDB: 1T1N [Mazzarella, L., *et al.*, 1999]), la forma 1LA6 [Riccio, A., *et al.*, 2002], hr-oxHb1Tn e HbTb-deossi (codice PDB: 2H8D; 2H8F [Mazzarella, L., *et al.*, 2006b]) sono colorate in verde, magenta, ciano e rosso rispettivamente. I residui dell'elica C delle catene α (37-44) sono stati usati nelle sovrapposizioni. Per chiarezza, solo l'elica C di hr-oxHb1Tn è mostrata. L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

Un confronto tra le strutture Hb1Tn-CO (codice PDB: 1T1N [Mazzarella, L., *et al.*, 1999]) e hr-oxHb1Tn mostra che in quest'ultima anche piccole modifiche della posizione dell'elica C α generano una dislocazione della regione FG α a cui si accompagna il riarrangiamento della catena laterale della Tyr-141 α (fig.3.14), la quale assume una conformazione riscontrata tipicamente nelle Hb T-deossi.

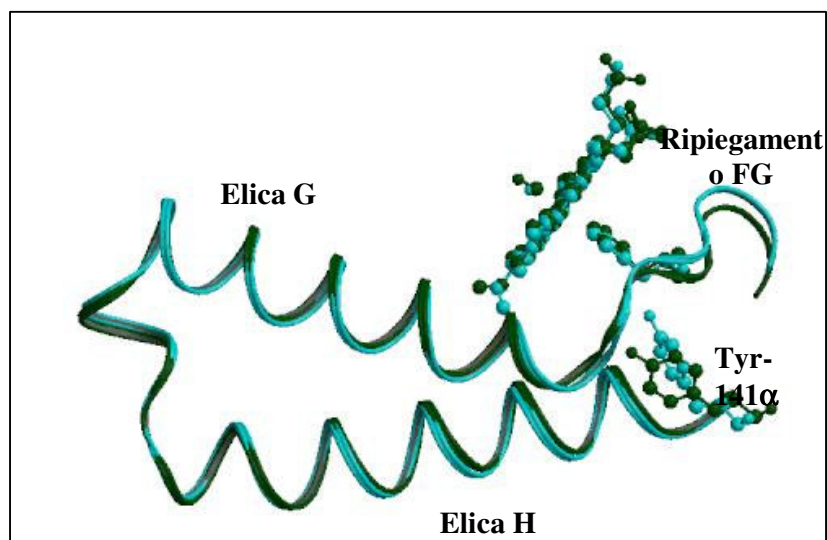


Fig. 3.14- Modifiche strutturali della catena α prodotte dalle variazioni strutturali della catena β . Hb1Tn-CO (codice PDB: 1T1N [Mazzarella, L., *et al.*, 1999]) e hr-oxHb1Tn sono colorate in verde e azzurro, rispettivamente. La figura è stata ottenuta in seguito a sovrapposizione del tratto 90-142 della catena β delle due Hb con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

Anche nella struttura in esame come in 1LA6 si verificano le modifiche di struttura terziaria a carico delle subunità α e β , innescate dal movimento

concertato “a forbice” delle eliche E ed F (fig.3.15). La distanza tra gli atomi C α dei residui di istidina prossimale e distale, appartenenti rispettivamente alle eliche E β ed F β , è pari a 12.7 Å in questa struttura, valore minore rispetto a quello che si riscontra nelle catene α e β delle Hb in una varietà di stati di legame (circa 14.5 Å) e leggermente superiore a quello misurato nella catena β della struttura di 1LA6 (12.4 Å) [Riccio, A., *et al.*, 2002].

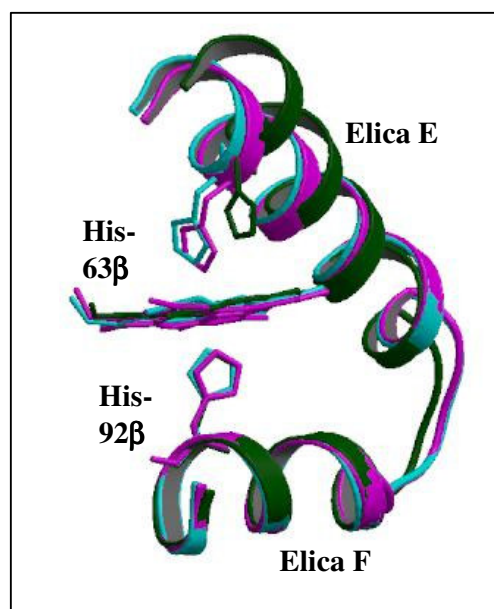


Fig. 3.15- Movimenti del motivo a V costituito dalle eliche EF della catena β nel passaggio R \rightarrow hr-oxHb1Tn. Hb1Tn-CO (codice PDB: 1T1N [Mazzarella, L., *et al.*, 1999]), 1LA6 [Riccio, A., *et al.*, 2002], hr-oxHb1Tn sono colorate in verde, magenta e ciano rispettivamente. Le regioni EF sono mostrate dopo sovrapposizione dell'elica F (residui 285-295). Per chiarezza i gruppi propionati e i ligandi dell'eme sono stati omessi. La figura è stata ottenuta con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

Infine, un'ulteriore indicazione del fatto che la struttura di hr-oxHb1Tn differisce notevolmente dalla forma R legata (codice PDB: 1T1N [Mazzarella, L., *et al.*, 1999]) e che, piuttosto, costituisce un intermedio R/T è fornita dal riordinamento della regione C-terminale della catena β . Questo segmento in alcuni casi è disordinato nella forma R e quindi non chiaramente definibile. Nella forma T (codice PDB: 2H8D; 2H8F [Mazzarella, L., *et al.*, 2006b]), invece, esso mostra solitamente una struttura ben definita perché lo spostamento del tratto FG β consente la formazione di una cavità che funge da punto di incastro della Tyr-145 β , contribuendo all'ancoraggio della regione C-terminale β al resto della catena. Molti elementi di struttura terziaria di hr-oxHb1Tn risultano quindi, molto simili a quella della forma T; invece, a livello di struttura quaternaria, questa regione mostra caratteristiche simili a quelle che si riscontrano nella forma R, infatti non si osserva l'interazione His-146 β -Lys-40 α all'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ ($\alpha_2\beta_1$), tipica della forma T.

E' interessante notare, che, diversamente da hr-oxHbTb, hr-oxHb1Tn non mostra la nuova interfaccia $\beta_1\beta_2$, stabilizzata dallo *stacking* π (fig.3.16). Questa è la prima evidenza sperimentale di una chiara differenza strutturale tra le due AFHb, profondamente diverse da un punto di vista funzionale nello stato ferroso (presenza dell'effetto Root in HbTb, ed assenza in Hb1Tn).

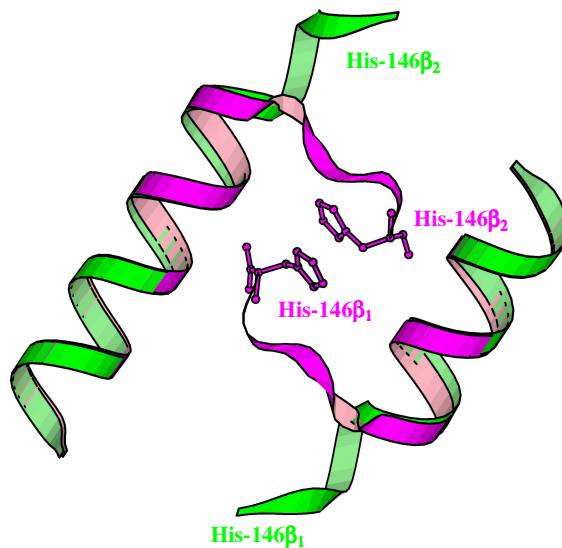


Fig. 3.16- Regione C-terminale della catena β di hr-oxHbTb (magenta) e hr-oxHb1Tn (verde) a confronto. L'immagine è stata ottenuta con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

3.3. ANALISI DEL PROCESSO DI FORMAZIONE DELL'EMICROMO IN Hb1Tn

Nell'ambito dello svolgimento di questa tesi è stato approfondito lo studio del processo di ossidazione delle AFHb mediante spettroscopia EPR e cristallografia ai raggi X al fine di caratterizzare il percorso di ossidazione di queste proteine e i possibili stati conformazionali accessibili ad una Hb tetramerica lungo la transizione R/T.

Come ampiamente riportato in letteratura [Riccio, A., *et al.*, 2002; Vitagliano, L., *et al.*, 2004], sia Hb1Tn che HbTb formano rapidamente emicromi bis-

istidinici in soluzione in condizioni di ossidazione della proteina all'aria e l'organizzazione terziaria e quaternaria di queste strutture mostra caratteristiche intermedie tra gli stati R e T dell'emoglobina. Tali studi rivestono, quindi, notevole interesse nell'ambito degli sforzi tesi all'individuazione di eventuali stati intermedi lungo la transizione R/T. In generale, informazioni dettagliate sui passaggi che conducono da R a T e viceversa provengono da indagini cristallografiche, termodinamiche e spettroscopiche; inoltre, negli ultimi anni sono state identificate strutture quaternarie alternative della Hb nello stato legato, come ad esempio la struttura R2 [Tame, J. R., 1999; Mueser, T. C., *et al.*, 2000], il cui ruolo in soluzione è ancora discusso. Nonostante i numerosi studi, comunque, i percorsi che conducono dalla forma deossi alla forma totalmente ossigenata sono ben lungi dall'essere compresi.

In questo paragrafo si riportano i risultati di uno studio riguardante il processo di ossidazione di Hb1Tn in funzione del tempo.

La struttura affinata di hr-oxHb1Tn si inserisce infatti in un progetto di ricerca, a cui da tempo si lavora nel laboratorio del professore Mazzarella, finalizzato all'identificazione dei determinanti strutturali che portano alla formazione dell'emicromo.

La struttura di hr-oxHb1Tn è stata pertanto confrontata con quelle relative ad altre forme di Hb1Tn ossidate a diversi tempi di esposizione all'aria affinate in precedenza:

- 1) Struttura di Hb1Tn in forma carbomonossi (R, [Mazzarella, L., *et al.*, 1999]) a 2.2 Å di risoluzione e a temperatura ambiente.
- 2) Struttura di Hb1Tn ossidata all'aria per tre ore (Hb1Tn-3h, dati non pubblicati) a 1.2 Å di risoluzione.
- 3) Struttura di Hb1Tn ossidata all'aria per sette giorni (Hb1Tn-7g⁽⁶⁾, [Riccio, A., *et al.*, 2002]) a moderata risoluzione (2.0 Å) e a temperatura ambiente.
- 4) Struttura di Hb1Tn ossidata all'aria per 30 giorni (Hb1Tn-1m⁽⁶⁾, questa tesi) a 1.5 Å di risoluzione.

Il confronto dello stato di coordinazione e di ossidazione e lo studio delle variazioni di struttura terziaria e quaternaria di queste forme, riassunti in tabella 3.6, relativamente agli stati canonici R [Mazzarella, L., *et al.*, 1999] e T [Mazzarella, L., *et al.*, 2006b], consentono una prima interessante ipotesi sul probabile meccanismo di formazione del complesso bis-istidinico.

⁶ Le strutture di Hb1Tn ossidate all'aria per 7 giorni e 1 mese finora sono state indicate con i simboli 1LA6 e hr-oxHb1Tn, rispettivamente. D'ora in poi in questo paragrafo invece saranno indicate con i simboli Hb1Tn-7g e Hb1Tn-1m per analogia con le altre strutture di Hb1Tn ossidate a diversi tempi di esposizione all'aria della proteina.

	R (t= 0)	Hb1Tn-3h (t= 3ore)	Hb1Tn-7g (t= 7 giorni)	Hb1Tn-1m (t= 1 mese)
Struttura quaternaria	R	H	H	H
eme α	Fe(II)--CO	Fe(II)--CO	Fe(III)--H ₂ O	Fe(III)-- H ₂ O
eme β	Fe(II)--CO	Fe(III) (5C)	emicromo	emicromo (2.3 Å)
Cα(His-92β)- Cα(His-63β)	14.6 Å	13.9 Å	12.4 Å	12.7 Å
Pro51α / Gly52α	Tipo R	Tipo T	Tipo T	Tipo T
CDα(Asp-48α-Asn- 55α)	assente	assente	assente	assente
Eβ (Asp-72β-His- 69β)	assente	presente	assente	presente/assente
Interfaccia $\alpha_1\beta_2$ (Asp-101β_1-Asp- 95α_2)	assente	Asp-101 β_1 -H ₂ O-Asp- 95 α_2	assente	assente
Tyr-145β	Tipo R	Tipo T	disordinata	Tipo T

Tabella 3.6. Confronto delle caratteristiche strutturali delle strutture R (tempo zero) [Mazzarella, L., *et al.*, 1999], Hb1Tn-3h, Hb1Tn-7g [Riccio, A., *et al.*, 2002], Hb1Tn-1m ordinate in base al tempo crescente di esposizione all'aria della proteina.

La struttura affinata di Hb1Tn-3h mostra che a differenza di quanto accade nelle altre due strutture (Hb1Tn-7g, Hb1Tn-1m) in cui il Fe(III) ossidato coordina una molecola di acqua (aquo-met).

Il ferro(III) dell'eme β di Hb1Tn-3h presenta una coordinazione inusuale: esso appare pentacoordinato, con la sesta posizione occupata da una molecola di H₂O a 2.8 Å di distanza dal ferro. Questa molecola di H₂O forma un legame ad idrogeno con il gruppo imidazolico dell'istidina distale (His-63 β) che dista dal Fe(III) 4.4 Å (fig.3.17). Studi spettroscopici Raman (dati non pubblicati) confermano in soluzione la formazione di una specie pentacoordinata ferrica per esposizione breve della proteina all'aria. In Hb1Tn-7g il Fe(III) dell'eme β forma un complesso bis-istidinico

caratterizzato dalla tipica distanza Fe(III)-His-63 β di 2.0 Å; nell'emicromo di Hb1Tn-1m si ha una distanza lunga tra Fe(III) e istidina distale (2.3 Å (paragrafo 3.2a)).

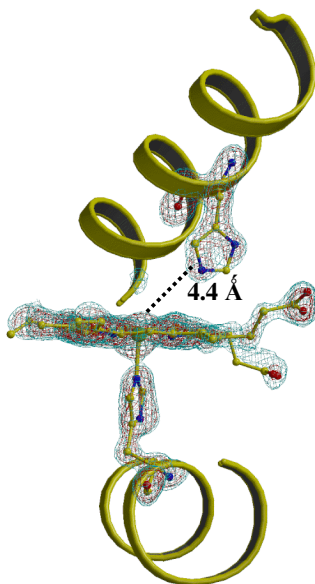


Fig. 3.17- Mappe di densità elettronica delle regioni eme β dell'intermedio di ossidazione di Hb1Tn denominato Hb1Tn-3h. La mappa è stata calcolata a 3.3 σ (1.25 Å). L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

L'analisi dei dati cristallografici dimostra che tutte le strutture esaminate posseggono caratteristiche intermedie tra le forme R e T della Hb a livello di struttura quaternaria e terziaria.

In tutte le strutture analizzate la coppia di residui Pro51 α /Gly52 α è di tipo T.

D'altra parte il ponte salino nel tratto $CD\alpha$ (Asp-48 α -Asn-55 α) è rotto, come nella forma R, in tutte le strutture esaminate. Per quanto riguarda il ponte salino nel tratto $E\beta$ (Asp-72 β -His-69 β), è presente in Hb1Tn-3h come nella forma T, in Hb1Tn-7g è rotto come nella forma R, infine in Hb1Tn-1m il residuo Asp-72 β adotta una doppia conformazione, una di tipo R e l'altra di tipo T (conservando in questo caso il ponte salino nel tratto $E\beta$).

Per quanto riguarda l'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ come è noto il residuo Asp-101 β_1 adotta una diversa conformazione tra la forma R in cui non fa interazioni e la T in cui esiste un legame ad idrogeno tra Asp-101 β_1 e Asp-95 α_2 . In Hb1Tn-3h all'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ è presente una molecola di acqua a ponte tra Asp-101 β_1 e Asp-95 α_2 , mentre in Hb1Tn-7g e Hb1Tn-1m l'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ è come quella della forma R.

L'ultimo diagnostico della struttura quaternaria è la posizione del residuo Tyr-145 β che punta verso l'interno della proteina in Hb1Tn-3h e Hb1Tn-1m come nella forma T. In Hb1Tn-7g (temperatura ambiente e bassa risoluzione) il tratto $C\beta$ terminale è disordinato.

Nel passaggio dalla forma R alle tre strutture ossidate esaminate l'eme β subisce sostanziali modifiche, sia nella posizione dell'eme tra le eliche $E\beta$ ed $F\beta$, che nella geometria di coordinazione. Infatti, in Hb1Tn-3h l'eme β risulta traslato di poco (circa 0.2 Å), rispetto alla sua posizione nella forma R. La

direzione di questa traslazione corrisponde ad un rientro dell'eme β verso la tasca proteica. Va sottolineato che, questa nuova posizione dell'eme β è incompatibile con la formazione dell'emicromo. L'eme β è invece spostato verso l'esterno della tasca dell'eme di 0.6 Å e 0.5 Å in Hb1Tn-7g e Hb1Tn-1m rispetto alla forma R.

La distanza $C\alpha - C\alpha$ tra le His distali e prossimali nella struttura degli emicromi è particolarmente stretta. Infatti, la distribuzione sperimentale degli emicromi a struttura nota è centrata intorno a 12 Å, ben lontana dal valore di 14.6 Å osservato nelle diverse strutture R e T. Il valore di 12 Å è la distanza necessaria per poter avere l'istidina distale vicina all'eme tanto da poter indurre la coordinazione endogena con il ferro e formare l'emicromo. In Hb1Tn-3h la distanza $C\alpha - C\alpha$ è di 13.9 Å, intermedia tra quella degli emicromi e quella delle forme consuete R-T, mentre in Hb1Tn-7g e in Hb1Tn-1m è rispettivamente di 12.4 e 12.7 Å.

L'analisi, qui illustrata, delle strutture cristalline di tre stati intermedi del processo di ossidazione di Hb1Tn ha fornito una chiave di lettura molto interessante anche se preliminare sia sui probabili meccanismi di formazione dell'emicromo che sugli eventi che inducono la transizione R/T.

L'intermedio ossidato ottenuto in condizioni di breve esposizione della proteina all'aria (tre ore), qui definito Hb1Tn-3h, costituisce un probabile precursore dello stato di emicromo in quanto mostra, rispetto alle forme R e

T, variazioni a livello di struttura terziaria e quaternaria del tutto paragonabili a quelle riscontrate nelle forme emicromo [Riccio, A., *et al.*, 2002; Vitagliano, L., *et al.*, 2004] (paragrafo 3.1b). Dunque, combinando questi dati con quelli relativi al prodotto di ossidazione completo (Fe(III) sia sull'eme α che β) di Hb1Tn (Hb1Tn-7g), si può tentare di ricostruire un possibile percorso di ossidazione di Hb1Tn (fig.3.18): a tre ore di esposizione all'aria, il ligando è rilasciato dall'eme β , con formazione di ferro β pentacoordinato con una molecola di H₂O a circa 3.0 Å; una molecola di CO è invece ancora legata al Fe(II) dell'eme α . I primissimi eventi del processo di ossidazione sono associati al cambiamento di struttura quaternaria che passa da R ad una struttura intermedia tra R e T (H), mantenuta identica anche a tempi più lunghi (quando si forma l'emicromo). Solo dopo giorni di esposizione all'aria, successivamente all'ossidazione del Fe α (all'eme α si lega una molecola di acqua (aquo-met)) si ha la comparsa sulla subunità β del complesso bis-istidinico [Riccio, A., *et al.*, 2002]. Rispetto alla forma CO, la formazione del complesso bis-istidinico in β è indotta dallo slittamento dell'eme di circa 0.5 Å verso l'esterno della tasca della proteina ed un movimento a forbice delle eliche E β e F β in modo da restringere la tasca dell'eme β e ridurre la distanza C α (His-92 β)--C α (His-63 β). Infine, prolungando i tempi di esposizione all'aria della proteina (Hb1Tn-1m) si verifica un'ulteriore spostamento dell'eme verso

l'esterno della tasca proteica e allungamento della distanza Fe(III)-His-63 β (fino a 2.3 Å). Infine, da un affinamento preliminare su una struttura di Hb1Tn esposta all'aria per tempi lunghi (circa un anno), è risultato che l'istidina distale sulla subunità β perde l'interazione con il Fe(III) sporgendo verso l'esterno della tasca proteica (fig.3.19) mentre l'eme, in seguito alla rottura del complesso bis-istidinico, si sposta in una posizione più rientrata nella tasca della proteina.

Ad ogni modo, dai dati raccolti si deduce che il tratto EF è dotato di elevata flessibilità dimostrata dall'esistenza oltre che dell'emicromo anche di altri due intermedi stabili (Hb1Tn-3h e Hb1Tn-1m) che possiedono le caratteristiche dell'emicromo a livello di struttura quaternaria ma non a livello di struttura terziaria.

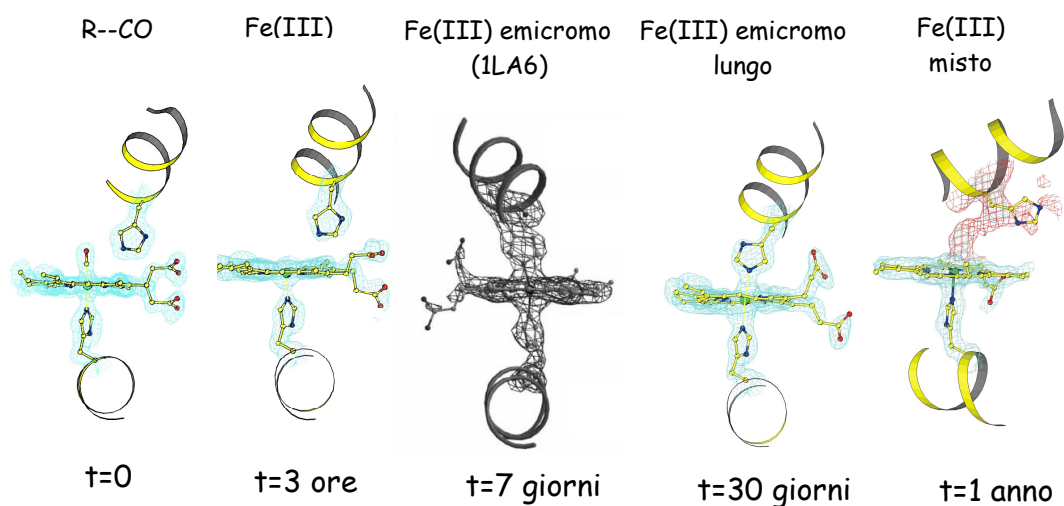


Fig. 3.18- Mappe di densità elettronica delle regioni eme β della forma R [Mazzarella, L., *et al.*, 1999] e degli intermedi di ossidazione di Hb1Tn [Riccio, A., *et al.*, 2002]. L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

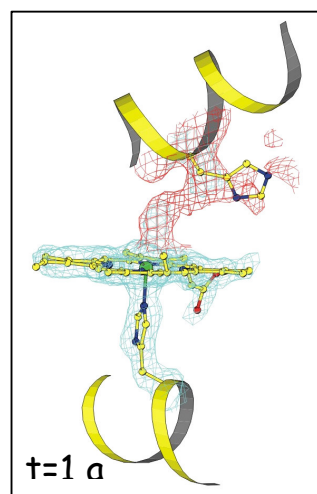


Fig. 3.19- Mappe di densità elettronica dell'eme β dell'intermedio di ossidazione di Hb1Tn esposto all'aria per circa un anno. In rosso è evidenziata la mappa di densità elettronica OMIT dell'istidina distale che risulta essere disordinata. L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

3.4. STABILITA' E REATTIVITA' DELL'EMICROMO

3.4.a DESCRIZIONE DEGLI SPETTRI EPR A VARI PH

L'analisi spettroscopica EPR del processo di ossidazione di cinque diverse Hb isolate da pesci antartici, Hb1Tn, Hb2Tn, HbCTn, HbTb e HbGa ha rivelato un andamento caratteristico che le accomuna. Infatti, gli spettri EPR, prima descritti, delle cinque AFHb, registrati a pH 7.6, evidenziano inequivocabilmente la presenza di due distinti emicromi in soluzione quando trattate con ferricianuro. Al contrario, le Hb estratte da pesci che vivono nei mari temperati, come ad esempio la spigola, mostrano una forma aquo-met come stato finale di ossidazione [Vitagliano, L., *et al.*, 2004]. Allo scopo di verificare la stabilità del complesso bis-istidinico in funzione del pH si sono registrati per HbTb, ossidata con ferricianuro, oltre allo spettro EPR a pH 7.6 (descritto nel paragrafo 3.1a) spettri EPR a pH 4.5, 6.0, 9.0 e 10.4. Inoltre lo spettro di HbTb a pH 6.0 è stato confrontato con quelli registrati, allo stesso pH, per altre quattro AFHb diverse (Hb1Tn, Hb2Tn, HbCTn e HbGa), ossidate con ferricianuro.

Dall'analisi degli spettri EPR di HbTb, registrati a vari pH (fig.3.20), è chiaro che in soluzione sono presenti sia segnali di tipo assiale, corrispondenti a forme ferriche ad alto spin, che segnali di tipo rombico relativi a forme ferriche a basso spin. I valori di g delle specie ad alto e basso spin sono elencati in tabella 3.7. Sia per pH=6 che per pH \geq 9 si sono registrate

distorsioni rombiche del segnale ad alto spin (fig.3.20). Tale distorsione del segnale ad alto spin a pH 6.0, 9.0 e 10.4 suggerisce la formazione di Fe(III) pentacoordinato (5C) [Boffi, A., *et al.*, 1994].

AFHb	pH	Alto spin (aquo-met)		Basso spin (emicromo)		Basso spin (idrossi- met)	
		gz	gy	Gz	gy	gz	gy
HbTb	6.0	5.87	2.00	3.15(2.91)	2.25 (2.17)	-	-
	7.6	5.88	2.00	3.15 (2.91)	2.26 (2.17)	2.62	2.19
	9.0	5.88	2.00	3.16 (3.30)	2.27	2.61 (2.42)	2.19 (2.27)
	10.4	5.77	2.01	-	-	2.42	2.26
HbGa	6.0	5.88	2.01	3.15 (3.00)	2.24	-	-
	7.6	5.87	2.01	3.16 (3.01)	2.23	2.61	2.15
Hb1Tn	6.0	5.88	2.00	3.17 (2.96)	2.22	-	-
	7.6	5.89	2.01	3.13 (2.95)	2.24	2.62	2.19
Hb2Tn	6.0	5.89	2.01	3.17 (2.86)	2.23	-	-
	7.6	5.88	2.01	3.17	2.24	2.62	2.18
HbCTn	6.0	5.85	2.00	3.17 (3.06)	2.26 (2.40)	-	-
	7.6	5.87	2.00	3.18 (3.06)	2.26 (2.40)	-	-

Tabella 3.7. Elenco dei valori di g delle specie ad alto e basso spin per le cinque emoglobine esaminate a vari pH.

I valori di g dei due segnali a basso spin a pH 6.0 corrispondono a campi tipici di risonanza di complessi bis-istidinici, simili rispettivamente agli emicromi HI e HII già evidenziati nello spettro registrato a pH 7.6 (paragrafo 3.1a). Nello spettro a pH 7.6 è presente anche un terzo segnale a basso spin sicuramente interpretabile con una specie idrossi-met che a pH 6.0 è assente.

A pH 9.0 il segnale a basso spin relativo alla specie idrossi-met cresce, mentre i segnali delle forme HI e HII diminuiscono, con un contestuale aumento

della rombicità del segnale di alto spin. Infine, a pH 10.4, una forma parzialmente denaturata mostra un segnale ad alto spin, con forte distorsione rombica, ed un solo segnale a basso spin, diverso da HI, da HII e dall'idrossi-met (attribuibile a qualche coordinazione endogena della forma denaturata).

Pertanto, le AFHb sono stabili fino a pH=9, ed in questa regione le forme HI e HII sono sempre presenti. La forma aquo-met è osservata nell'intervallo $6 < \text{pH} < 9$, quella idrossi-met tra $7.6 < \text{pH} < 9$, e le forme 5C sono stabili ai pH estremi ($\text{pH} < 6$ e $\text{pH} > 9$).

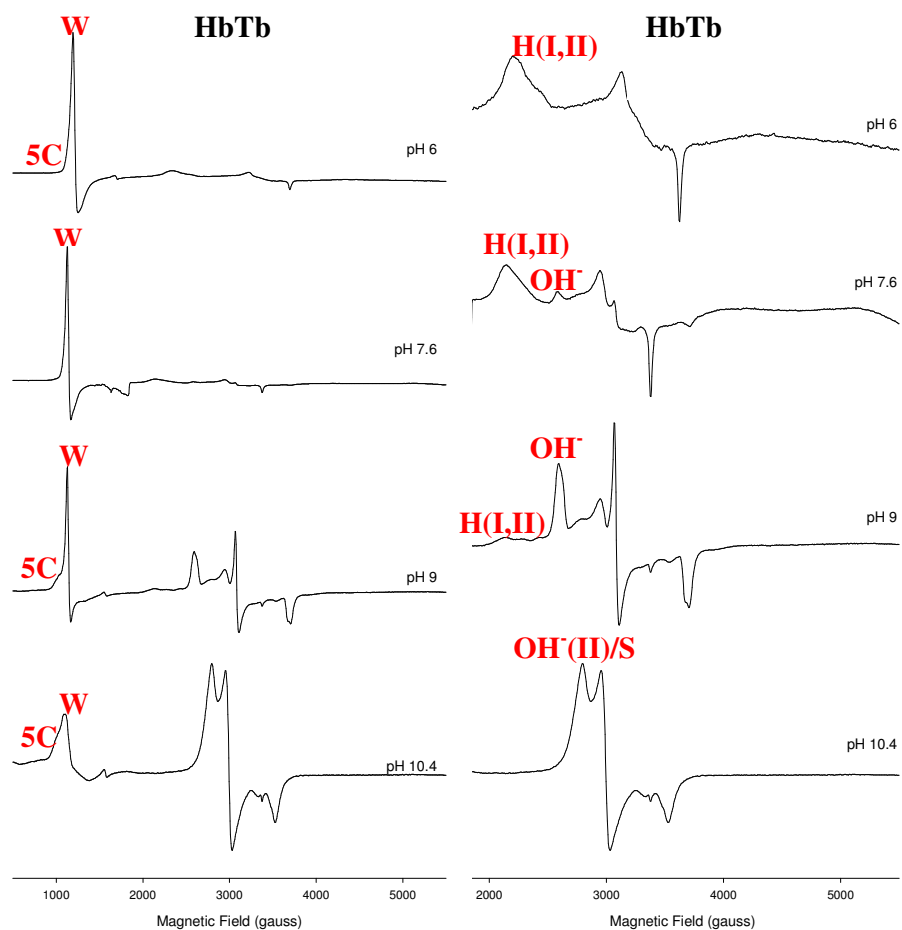


Fig. 3.20- Spettri EPR ad onda continua (banda X) a 12 K di HbTb (1.5mM eme) ossidate con ferricianuro a vari pH (6.0, 7.6, 9, 10.4) in tampone 50 mM (paragrafo 2.1). A destra sono espanse le zone di basso spin (2000-4000 Gauss).

Confrontando lo spettro di HbTb a pH 6.0 (fig.3.21) con quello delle altre quattro AFHb esaminate risulta che la forma ferrica pentacoordinata è presente in soluzione sia per HbTb che HbCTn. Tali Hb esibiscono l'effetto Root, suggerendo qualche correlazione tra la stabilizzazione della forma T e la presenza di forme 5C.

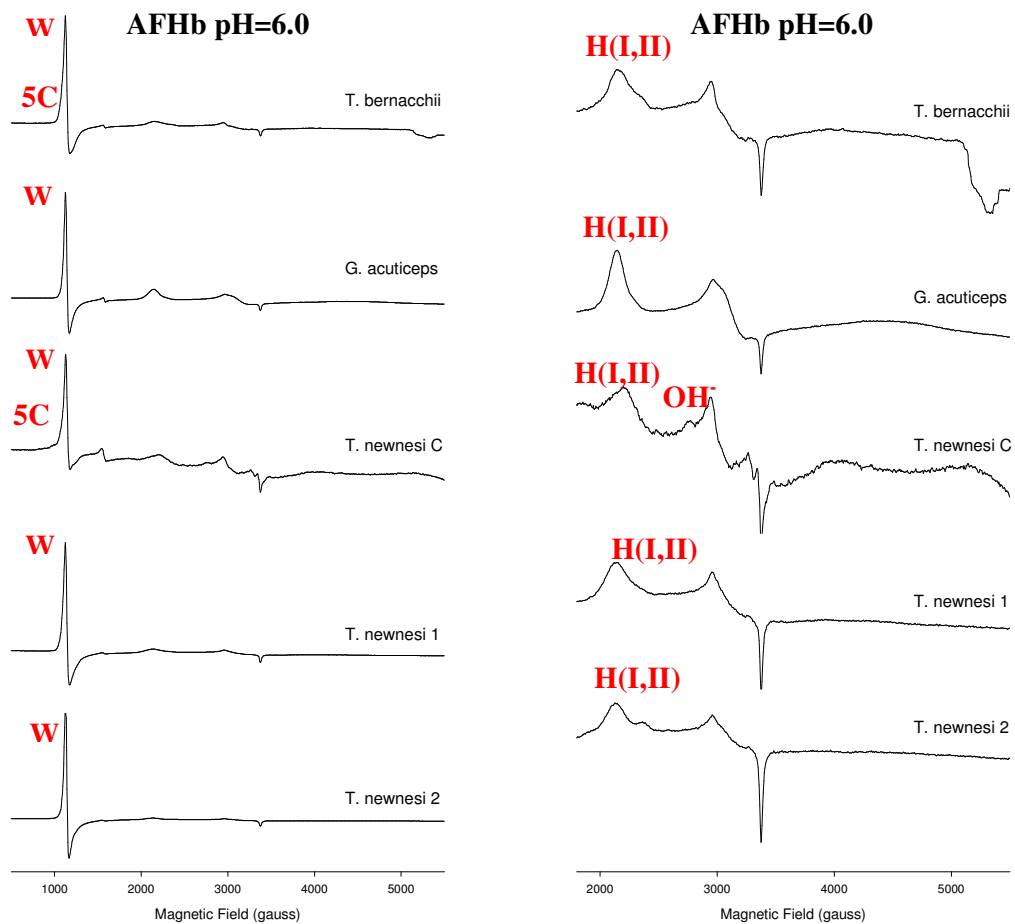


Fig. 3.21- Spettri EPR ad onda continua (banda X) a 12 K di cinque diverse AFHb (1.5mM eme) ossidate con ferricianuro a pH 6.0 in MES 50 mM. A destra sono espanse le zone di basso spin (2000-4000 Gauss).

3.4.b DESCRIZIONE DELLA STRUTTURA DI HbTb OSSIDATA CON FERRICIANURO A pH ACIDO (ac-HbTb)

L'emicromo di HbTb a pH 7.6 mostra una struttura quaternaria molto simile a quella riscontrata per la forma R da cui è stato ottenuto [Camardella, L., *et al.*, 1992]. Per verificare la compatibilità dell'emicromo con una struttura quaternaria di tipo T, si è pensato di ottenere cristalli (cfr. paragrafo 2.2) di HbTb in forma ossidata a pH acido (ac-HbTb), sfruttando una nota proprietà di questa proteina nella forma ferrosa, l'effetto Root, che consiste appunto in una sovra-stabilizzazione della forma T a bassi valori di pH.

La struttura di ac-HbTb è stata risolta a 1.7 Å di risoluzione. Il modello finale ($R_{\text{fac}}=16.0\%$, $R_{\text{free}}=22.7\%$) include 278 molecole d'acqua e nessun residuo in doppia conformazione. In tabella 3.8 si riportano i parametri stereochimici di ac-HbTb che risultano in pieno accordo con quelli relativi a strutture di altre proteine affinate alla stessa risoluzione.

$R_{\text{fac}}/R_{\text{free}}$ (%)	N° residui in doppia conformazione	N° molecole di acqua	RMSD lunghezze di legame (Å)	RMSD angoli di legame (°)	B(Proteina) (Å ²)	B(Acque) (Å ²)	B(Eme) (Å ²)
16.0/22.7	-	278	0.004	1.26	21.2	25.5	22.3

Tabella 3.8. Statistiche finali dell'affinamento della struttura di ac-HbTb calcolate con il programma WHATCHECK [Hoof, R.W., *et al.*, 1996].

La struttura quaternaria di ac-HbTb è di tipo T. È noto che le strutture quaternarie della forma deossi e delle forme legate differiscono per una sostanziale rotazione del dimero $\alpha_2\beta_2$ rispetto al dimero $\alpha_1\beta_1$ [Perutz, M. F., *et*

al., 1998]. Precisamente l'ammontare della variazione della struttura quaternaria è indicato dall'operazione di rotazione che bisogna compiere sul dimerò $\alpha_2\beta_2$ della forma R per sovrapporlo allo stesso dimerò nella forma T, dopo la sovrapposizione dei corrispondenti dimeri $\alpha_1\beta_1$ [Baldwin, J. & Chothia, C., 1979]. Queste sovrapposizioni vengono fatte utilizzando il *core* BGH di ogni catena, ovvero la regione strutturalmente più conservata nella struttura terziaria delle subunità α e β . Per HbA questa operazione corrisponde essenzialmente ad una rotazione di circa 14° , mentre per ac-HbTb è di circa 12° come quella di HbTb allo stato ridotto in forma T. La struttura quaternaria di ac-HbTb è stata confrontata con quella di HbTb ridotta a pH 6.2 [Mazzarella, L., *et al.*, 2006b]. Sovrapponendo le due strutture, considerando tutti gli atomi della catena principale, risulta una deviazione quadratica media (RMSD) degli atomi corrispondenti dei due tetrameri di 0.38 Å.

La geometria dell'eme, per le quattro subunità, è quella tipica di una Hb in forma deossi ma l'atomo di Fe^{3+} è situato nel piano formato dai 24 atomi del *core* porfirinico. Si è osservato, per la prima volta nella struttura cristallografica di una emoglobina tetramerica, che il Fe è pentacoordinato e nel piano emico, sia in α che in β . Mediante i soli dati cristallografici non è possibile stabilire lo stato di ossidazione del ferro, dato che non si può escludere la possibilità di

una riduzione del Fe^{3+} in β indotta dalla radiazione di sincrotrone, come riportato già per la mioglobina [Della Longa, S., *et al.*, 2003]. La questione è stata risolta mediante l'analisi EPR a pH 6.0 su cinque AFHb (HbTb, Hb1Tn, HbCTn, Hb2Tn, HbGa) ossidate con ferricianuro da cui è risultato che, già in soluzione, a pH 6.0 per le due AFHb con effetto Root esaminate (HbTb, HbCTn) è evidente la comparsa di una specie pentacoordinata, in accordo con l'inusuale struttura cristallografica di ac-HbTb (paragrafo 3.2b).

In figura 3.22 si riporta la densità elettronica relativa al gruppo eme delle subunità α_1 e α_2 . Come si può notare in entrambe le subunità α è presente una molecola di acqua nel lato distale che però si trova ad una distanza dal ferro (in α_1 : 2.4 Å; in α_2 : 2.9 Å) lunga rispetto all'intervallo medio di distanze Fe-H₂O (1.9-2.1 Å) presente in altre forme aquo-met di altre Hb [Scheidt, W. R. & Gouterman, M., 1983]. Tali molecole di acqua sono bloccate nella cavità dell'eme α_1 e α_2 non dall'interazione con il ferro piuttosto grazie alla formazione di un legame idrogeno con l'istidina distale (in α_1 : 2.7 Å; in α_2 : 3.0 Å).

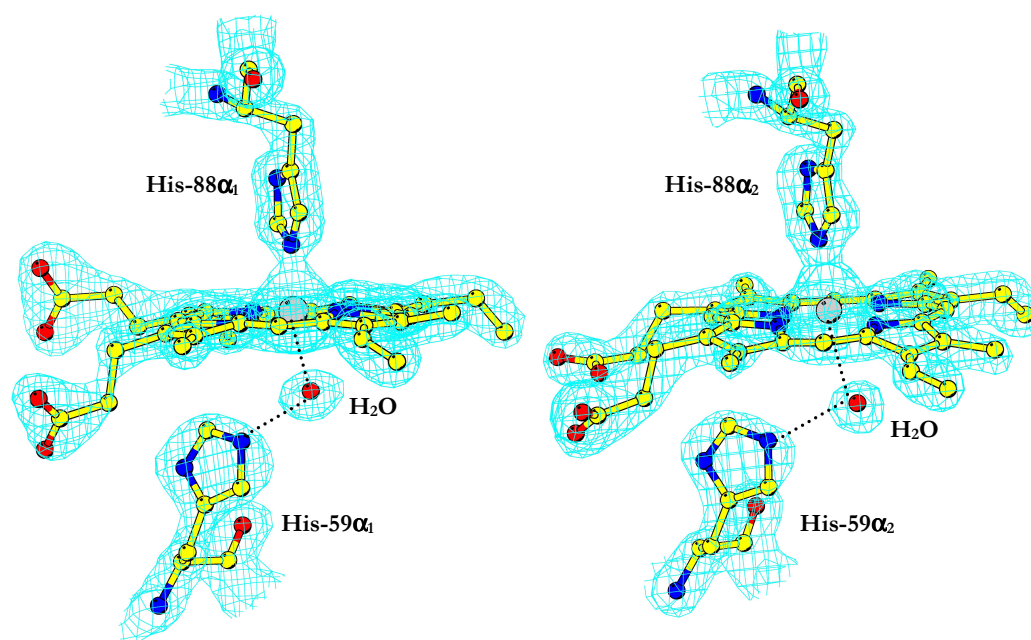


Fig. 3.22- Densità elettronica dell'eme delle subunità α_1 e α_2 di ac-HbTb. La mappa è stata calcolata a 2.4σ (1.7 \AA). L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

In figura 3.23 viene riportata la densità elettronica dell'eme delle subunità β con l'istidina prossimale e l'istidina distale. Come si può vedere la densità elettronica dell'eme risulta essere ben definita, sono infatti abbastanza visibili anche le catene laterali dei gruppi propionici, esposte al solvente.

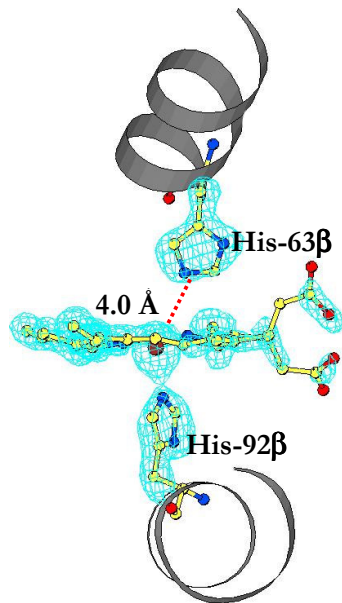


Fig. 3.23- Densità elettronica dell'eme della subunità β di ac-HbTb. La mappa è stata calcolata a 2.3σ (1.7 \AA). L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

Come nella forma T anche in ac-HbTb i residui Asp95(G1) α_1 e Asp101(G3) β_2 si avvicinano così strettamente l'uno all'altro da formare un legame ad idrogeno. Tale interazione è ritenuta responsabile di parte dell'effetto Root in questa emoglobina [Ito, N., *et al.*, 1995; Mazzarella, L., *et al.*, 2006a].

Nella struttura di ac-HbTb, la triade di aspartici risulta ottimamente definita (fig.3.24). La struttura locale è fortemente impacchettata, come si evince dall'estesa ed intricata rete di molecole di acqua e di legami ad idrogeno che si diramano dalla triade circondandola strettamente. In particolare, la distanza di

legame tra i residui di Asp95(G1) α e Asp101(G3) β (la distanza $O^{\gamma}-O^{\gamma}$ è di 2.4 Å sia all'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ che $\alpha_2\beta_1$) è tale da permettere la formazione di un forte legame idrogeno tra i due residui. Tale interazione non si osserva nella struttura R perché lo spostamento T/R dell'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ ($\alpha_2\beta_1$) allontana l'atomo C_{α} di Asp 95 α di più di 2 Å dal residuo di Asp101 β (la distanza $O^{\gamma}-O^{\gamma}$ più piccola è pari a 6.5 Å).

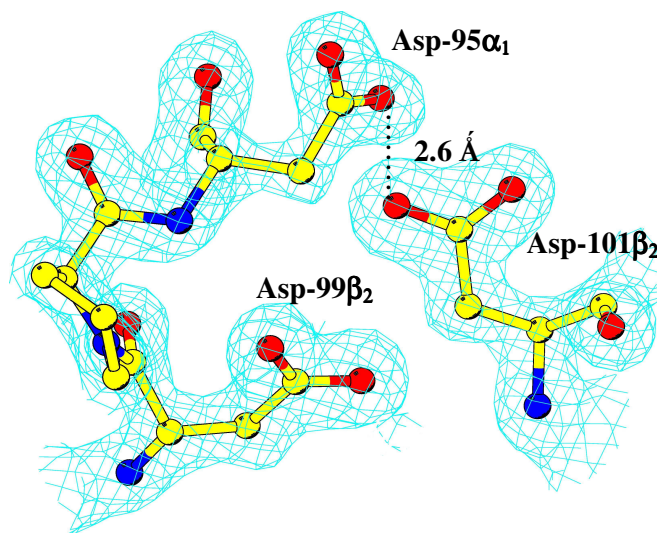


Fig. 3.24- Densità elettronica della triade di aspartici all'interfaccia $\alpha_1\beta_2$ di ac-HbTb. La mappa è stata calcolata a 2.0σ (1.7 Å). L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

All'estremità C β terminale risiede il residuo di His-146 β , ritenuto responsabile dell'effetto Bohr per HbA, in quanto nell'uomo forma un ponte salino con la catena laterale di Asp-94 β (Glu-94 β in HbTb). In figura 3.25 è riportato il comportamento di ac-HbTb per la subunità β_2 . Infatti, malgrado non sia

impedito in nessuna delle due subunità β , questo legame si forma solo in β_2 (2.9 Å).

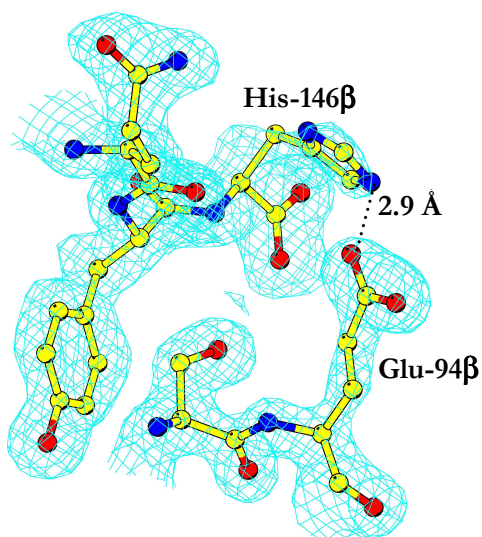


Fig. 3.25- Densità elettronica della estremità $C\beta_2$ terminale di ac-HbTb. La mappa è stata calcolata a 2.2σ (1.7 Å). L'immagine è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

Dal confronto di ac-HbTb con la struttura di hr-oxHbTb risulta che la variazione del pH da 6.0 a 7.6 comporta diversi cambiamenti di tipo strutturale di HbTb: il ferro β passa da pentacoordinato a esacoordinato (emicromo), la struttura quaternaria passa da T a H, l'interazione $\alpha_1\beta_2$ viene mediata da una molecola d'acqua, la distanza His-146 β_1 -His-146 β_2 all'interfaccia $\beta_1\beta_2$ passa da più di 10 Å a circa 4 Å.

Le conclusioni più significative che si possono trarre sia dai risultati dello studio cristallografico che dai dati EPR sono che in HbTb il bis-istidinico non è compatibile con una struttura quaternaria di tipo T. L'evidenza

cristallografica di ac-HbTb e gli spettri EPR di AFHb a pH acidi indicano che una qualche memoria dell'effetto Root, tipico delle forme ferrose di HbTb, stabilizza anche nello stato ferrico la struttura quaternaria T.

Una conclusione che se ne può trarre è che in AFHb l'effetto Root nella stato ferroso modula la affinità per l'ossigeno e nello stato ferrico modula la stabilità della forma emicromo.

3.4.c ATTIVITA' PEROSSIDASICA DEL COMPLESSO BIS-ISTIDINICO

Come riportato nell'introduzione alla tesi, di recente [Vitagliano, L., *et al.*, 2004] è stato dimostrato che, a differenza dell'emoglobina umana e delle Hb tetrameriche di altri mammiferi, le AFHb evolvono rapidamente verso specie ossidate esacoordinate a basso spin (emicromi) quando esposte all'aria. Il ruolo fisiologico della forma bis-istidinica è ancora molto discusso. In particolare sono quattro le ipotesi avanzate. 1) In seguito alla formazione dell'emicromo questo si legherebbe al dominio citoplasmatico della banda 3, proteina di membrana dell'eritrocita, trasmettendo a quest'ultimo un segnale di morte, con conseguente formazione di copolimeri emicromo-banda 3 che precipitano formando i corpi di Heinz, accumulati in patologie ematiche [Waugh, S.M. & Low, P.S., 1985]; 2) l'emicromo potrebbe essere coinvolto nel processo di riduzione *in vivo* dell'Hb ad opera della met-Hb reduttasi [Robinson, V.L., *et al.*, 2003]; 3) la forma bis-istidinica potrebbe essere un

intermedio nel processo di legame che passa da una specie pentacoordinata ad una esacoordinata con ligando esogeno [Robinson, V.L., *et al.*, 2003]; 4) l'emicromo proteggerebbe l'eme dall'attacco perossidasi [Feng, L., *et al.*, 2005].

Al fine di verificare quest'ultima e più recente ipotesi sul ruolo fisiologico dei complessi bis-istidinici sono stati effettuati saggi perossidasi su AFHb provenienti da tre diversi sistemi (*T. bernacchii* (HbTb), *G. acuticeps* (HbGa), emolisato di *T. newnesi* (HbTn)). Per essere sicuri della riproducibilità di questi esperimenti è stato ripetuto anche il saggio perossidasi su HbA riportato in un precedente studio [Fedeli, D., *et al.*, 2001].

Tutte le AFHb investigate mostrano attività perossidasi. In particolare in figura 3.26 si riporta a confronto l'attività perossidasi in funzione della concentrazione della Hb per AFHb (questa tesi), per emoglobine estratte da pesci di acque temperate (TrI e TrIV) e per Hb di mammifero (HbA) [Fedeli, D., *et al.*, 2001]. Le AFHb esibiscono un'attività perossidasi nettamente superiore rispetto a HbA (circa 10 volte in più) e maggiore rispetto all'emoglobine da pesce di acque temperate.

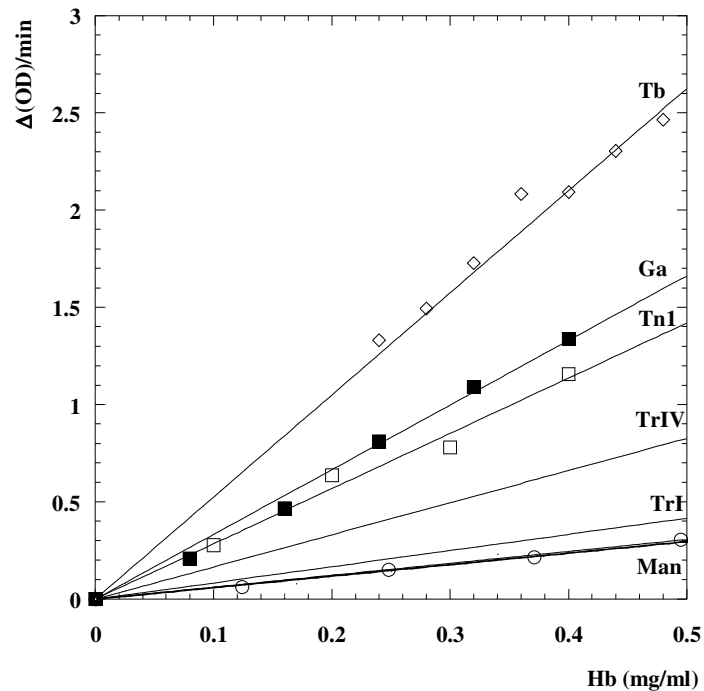


Fig. 3.26- Attività perossidasi di diverse emoglobine determinata utilizzando la dopamina come substrato e monitorando l'assorbimento alla lunghezza d'onda di 475 nm (paragrafo 2.5).

Questo comportamento delle AFHb rispetto alle Hb dei pesci di acque temperate potrebbe essere relazionato alla presenza, nelle emoglobine estratte da pesce antartico, del complesso bis-istidinico sull'eme β , risultato questo in disaccordo con precedenti studi su altri sistemi emoglobinici. Infatti gli emicromi della subunità α di HbA ferrica, complessata con AHSP [Feng, L., *et al.*, 2005], e della mioglobina ferrica, in presenza di acido linoleico [Baron, C. P. & Andersen, H. J., 2002], sembrano proteggere le proteine dall'attacco dell'acqua ossigenata (autoprotezione).

D'altra parte l'abilità riscontrata in molte e diverse condizioni sperimentali di AFHb a formare facilmente emicromi e/o specie ferriche pentacoordinate (come evidenziato, in questa tesi, dalle strutture di ac-HbTb e Hb1Tn ossidata per esposizione all'aria di 3 ore, dagli studi EPR su HbCTn a pH 7.6) potrebbe giustificare la loro elevata attività perossidasi rispetto ad altre Hb tetrameriche. Vale la pena osservare che esiste una correlazione tra presenza dell'emicromo, alta attività perossidasi e alto contenuto mitocondriale nelle fibre muscolari lisce di pesci antartici teleostei, che potrebbe suggerire un coinvolgimento del complesso bis-istidinico nella protezione di tali fibre dallo stress ossidativo [Richards, M. P. & Dettmann, M. A., 2003; De Vries, A. L., 1983].

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI E RISVOLTI BIOLOGICI

Nel lavoro di ricerca, descritto in questa tesi, si è studiato il processo di ossidazione delle AFHb e in particolare si è focalizzata l'attenzione su due aspetti, la formazione e il ruolo fisiologico dell'emicromo.

Al fine di caratterizzare in dettaglio la formazione di complessi bis-istidinici in una emoglobina tetramerică è stata risolta e affinata la struttura di Hb1Tn ad alta risoluzione ossidata per 30 giorni di esposizione all'aria (hr-oxHb1Tn). Inoltre per ricostruire da un punto di vista strutturale il processo di formazione dell'emicromo, la struttura di hr-oxHb1Tn è stata poi confrontata con altre strutture, precedentemente affinate, di Hb1Tn-CO (codice PDB: 1T1N [Mazzarella, L., *et al.*, 1999] e di Hb1Tn ossidata a diversi tempi (3 ore, 7 giorni, 1 anno) di esposizione della proteina all'aria (codice PDB: 1LA6 [Riccio, A., *et al.*, 2002] e dati non pubblicati). A tre ore di esposizione all'aria, il ligando viene rilasciato dall'eme β , con formazione di ferro β pentacoordinato con una molecola di H₂O a circa 3.0 Å; una molecola di CO è invece ancora legata al Fe(II) dell'eme α . I primissimi eventi del processo di ossidazione sono associati al cambiamento di struttura quaternaria che passa da R ad una struttura intermedia tra R e T' (H), mantenuta identica

anche a tempi più lunghi (quando si forma l'emicromo). Solo dopo giorni di esposizione all'aria, successivamente all'ossidazione del Fe α (all'eme α si lega una molecola di acqua) si ha la comparsa sulla subunità β del complesso bis-istidinico [Riccio, A., *et al.*, 2002]. Rispetto alla forma CO, la formazione del complesso bis-istidinico in β è indotta dallo slittamento dell'eme di circa 0.5 Å verso l'esterno della tasca della proteina ed un movimento a forbice delle eliche E β e F β in modo da restringere la tasca dell'eme β e ridurre la distanza C α (His-92 β)-C α (His-63 β). Infine, prolungando i tempi di esposizione all'aria della proteina (hr-oxHb1Tn) si verifica un ulteriore spostamento dell'eme verso l'esterno della tasca proteica e allungamento della distanza Fe(III)-His-63 β (fino a 2.3 Å). Infine, da un affinamento preliminare su una struttura di Hb1Tn, esposta all'aria per tempi lunghi (circa un anno), è risultato che l'istidina distale sulla subunità β perde l'interazione con il Fe(III) sporgendo verso l'esterno della tasca proteica mentre l'eme, in seguito alla rottura del complesso bis-istidinico, si sposta in una posizione più rientrata nella tasca della proteina. Ad ogni modo, dai dati raccolti si deduce che il tratto EF è dotato di elevata flessibilità dimostrata dall'esistenza oltre che dell'emicromo anche di altri due intermedi stabili (Hb1Tn-3h e hr-oxHb1Tn) che possiedono le caratteristiche dell'emicromo a livello di struttura quaternaria ma non a livello di struttura terziaria.

L'analisi EPR condotta su cinque diverse AFHb (HbTb, Hb1Tn, Hb2Tn, HbCTn, HbGa), ossidate con ferricianuro, ha rivelato che tutte le emoglobine studiate formano in soluzione a pH fisiologico una varietà di forme ferriche. Il segnale ad alto spin negli spettri EPR di HbTb, Hb1Tn, Hb2Tn e HbGa corrisponde ad una forma aquo-met. Uno dei tre segnali a basso spin è invece dovuto ad una forma idrossi-met. I risultati dello studio cristallografico su Hb1Tn e HbTb [Riccio, A., *et al.*, 2001, 2002; Vitagliano, L., *et al.*, 2004; questa tesi] hanno suggerito che la forma aquo-met è in equilibrio con quella idrossi-met sull'eme della subunità α . Altri due segnali a basso spin sono inoltre presenti negli spettri EPR registrati. Tali segnali corrispondono a due diversi complessi bis-istidinici (HI e HII) in cui l'istidina prossimale presenta l'anello imidazolico neutro. I parametri geometrici che sono rilevanti per correlare l'anisotropia del tensore g alla stereochemica dell'eme sono l'angolo di *tilt* tra il piano imidazolico prossimale o distale e il piano dell'eme, θ_d o θ_p , e l'angolo diedro formato tra il piano imidazolico dell'istidina prossimale e quello dell'istidina distale, ω [Walker, F. A., 2004]. In una coordinazione ideale θ_d e θ_p sono di 90° , ω è di 0° . In particolare, in accordo con l'interpretazione stereochemica della diversa anisotropia dei segnali di HI e HII, l'emicromo HII, meno abbondante, avrebbe una geometria più vicina all'idealità (tipo citocromo b_5) dell'emicromo HI che dovrebbe presentare una geometria distorta. La determinazione della struttura cristallografica ad alta

risoluzione di HbTb, ossidata con ferricianuro (hr-oxHbTb), ha permesso di analizzare accuratamente il grado di distorsione del complesso bis-istidinico sulla subunità β di questa proteina. Confrontando infatti i parametri geometrici dell'emicromo di hr-oxHbTb con quelli di complessi bis-istidinici di altre emo-proteine, di cui è nota la struttura cristallografica, si può confidentemente assegnare la struttura di hr-oxHbTb α (aquo-met)- β (emicromo) alla forma emicromo I.

Per quanto riguarda la formazione dell'emicromo II, di tipo citocromo b_5 , nelle AFHb sarebbe richiesta o un'ulteriore fuoriuscita dell'eme β dalla tasca del sito attivo o una differente posizione delle eliche EF β . Entrambi questi percorsi prevedrebbero una rilevante variazione strutturale rispetto all'emicromo I. In effetti, presumibilmente l'emicromo II non può formarsi a partire dall'emicromo I ed eventualmente rappresenta un intermedio irreversibile verso la denaturazione della proteina. Infine non può essere esclusa la possibilità che HII sia presente in una forma monomerica o sulla subunità α del tetramero come nel caso di emoglobine da mammifero [Robinson, V.L., *et al.*, 2003]. D'altra parte si fa presente che la costante di associazione del tetramero in AFHb è anche più alta di quella di HbA [Giangiacomo, L. *et al.*, 2001] e che i residui chiave indicati come determinanti

per la formazione dell'emicromo sulla subunità α di emoglobina da cavallo [Robinson, V.L., *et al.*, 2003] sono assenti nelle AFHb.

Diversamente dalle altre quattro AFHb studiate in HbCTn l'emicromo II è più abbondante dell'emicromo I ed è presente in soluzione anche una forma ferrica pentacoordinata (5C). Presumibilmente tale forma 5C sostituisce nella subunità β la maggior parte dell'emicromo I delle altre AFHb. Una spiegazione strutturale dell'atipico comportamento di HbCTn può essere ipotizzata. La differenza principale nella tasca dell'eme β tra HbCTn e le altre AFHb studiate è la sostituzione Ile-67 β →Val [D'Avino, R., *et al.*, 1994]. Quando la Val-67 β è mutata nella struttura di Hb1Tn, un'interazione aggiuntiva si forma tra la catena laterale dell'Ile e l'istidina distale His-63 β che potrebbe ostacolare la formazione dell'emicromo I.

La differenza principale tra la struttura di hr-oxHbTb e quella di Hb1Tn (codice PDB: 1LA6; Riccio, A., *et al.*, 2001, 2002) è l'interfaccia $\beta_1\beta_2$. Infatti nella regione C β terminale di Hb1Tn la Tyr-145 β adotta la tipica posizione della forma T, al contrario in hr-oxHbTb è presente un'interfaccia $\beta_1\beta_2$ completamente nuova, stabilizzata dallo *stacking* di tipo π tra His-146 β_1 e His-146 β_2 . Tale risultato è molto interessante perché rappresenta la prima evidenza sperimentale di una chiara differenza strutturale tra queste due emoglobine che hanno un'attività funzionale molto diversa allo stato ferroso

(HbTb ha effetto Root [Camardella, L., *et al.*, 1992], Hb1Tn non ha effetto Root [D'Avino, R., *et al.*, 1994]).

L'emicromo di HbTb a pH 7.6 mostra una struttura quaternaria molto simile a quella riscontrata per la forma R da cui è stato ottenuto [Camardella, L., *et al.*, 1992; Mazzarella, L., *et al.*, 1999]. Per verificare la compatibilità dell'emicromo con una struttura quaternaria di tipo T, si è pensato di ottenere cristalli di HbTb in forma ossidata a pH acido (ac-HbTb), sfruttando una nota proprietà di questa proteina nella forma ferrosa, l'effetto Root, che consiste appunto in una sovra-stabilizzazione della forma T a bassi valori di pH. Inoltre allo scopo di verificare la stabilità del complesso bis-istidinico in funzione del pH si sono registrati per HbTb, ossidata con ferricianuro, oltre allo spettro EPR a pH 7.6 spettri EPR a pH 6.0, 9.0 e 10.4. Quindi lo spettro di HbTb a pH 6.0 è stato confrontato con quelli registrati, allo stesso pH, per altre quattro AFHb diverse (Hb1Tn, Hb2Tn, HbCTn e HbGa), ossidate con ferricianuro. Dallo studio cristallografico è risultato che a pH 6.0 HbTb adotta una struttura quaternaria di tipo T con Fe(III) pentacoordinato sia in α che in β . Si può pertanto concludere che il bis-istidinico non è compatibile con una struttura quaternaria di tipo T. Dagli spettri EPR a pH 6.0 è evidente che già in soluzione sia HbTb che HbCTn formano specie ferriche pentacoordinate. Seppure l'emicromo persiste in soluzione, la comparsa dei derivati ferrici pentacoordinati di HbTb e HbCTn a pH 6.0 è imputabile ad una qualche

memoria della stabilizzazione della forma T dovuta all'effetto Root, tipico delle forme ferrose di queste due emoglobine.

L'accessibilità ad una grande varietà di forme ferriche, tipica di emoproteine con proprietà ossido-riduttive, ha portato ad ipotizzare un possibile ruolo funzionale delle AFHb allo stato ferrico. E' risultato che le AFHb ossidate mostrano un'attività perossidasiica molto più alta (di circa dieci volte) rispetto a HbA e maggiore rispetto a Hb estratte da pesci di acque temperate (trota). La maggiore attività perossidasiica delle AFHb rispetto alle Hb da trota può essere relazionata alla loro capacità di formare complessi bis-istidinici distorti (emicromo I). Questo risultato però è in contraddizione rispetto a precedenti lavori su altri sistemi emoglobinici. Infatti per la subunità α di HbA allo stato ferrico complessata con AHSP [Feng, L. *et al.*, 2005] o per la mioglobina ferrica in presenza di acido linoleico [Baron, C. P. & Andersen, H. J., 2002] è stato dimostrato che l'emicromo protegge la proteina dall'attacco dell' H_2O_2 .

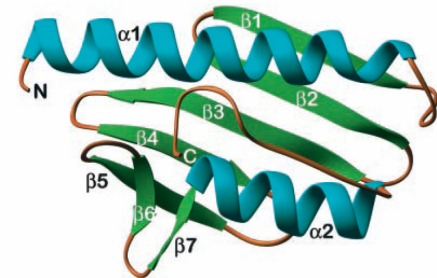
La possibilità che nel caso delle AFHb un emicromo distorto possa interconvertirsi in una forma ferrica pentacoordinata (5C), come osservato più volte in questa tesi (dalle strutture 3D di ac-HbTb e Hb1Tn ossidata per esposizione all'aria di 3h, dagli studi EPR su HbCTn a pH 7.6 e a pH 6.0, dagli spettri EPR di HbTb a pH 6.0, 9.0, 10.4), potrebbe giustificare la discrepanza tra i risultati di questo lavoro e quelli dei lavori precedenti [Feng,

L. *et al.*, 2005; Baron, C.P. & Andersen, H.J., 2002]. La forma 5C, che è la forma a riposo delle perossidasi, potrebbe essere responsabile dell'attività perossidasi delle AFHb. Se così fosse si dovrebbe ipotizzare che l'emicromo della subunità α di HbA abbia una geometria molto vicina all'idealità. Eventualmente una differente stereochimica di coordinazione dell'emicromo corrisponderebbe ad una differente reattività. A questo proposito esistono evidenze sperimentali di una diversa reattività degli emicromi HI e HII di HbTb in presenza di CN^- (dati non mostrati).

In accordo con i risultati di questa tesi di una maggiore attività perossidasi, un ruolo fisiologico potrebbe essere ipotizzato per gli emicromi distorti delle AFHb. Infatti il contenuto mitocondriale delle fibre muscolari lente dei *Notothenoidei* antartici è superiore rispetto a quello di altri pesci teleostei con simili stili di vita [Richards, M.P. & Hultin, H.O., 2002]. Di conseguenza le fibre muscolari lente dei pesci teleostei antartici sono caratterizzate da uno stress ossidativo più alto di quello di pesci di acque temperate. Sebbene con un contenuto minore rispetto alla mioglobina, anche le emoglobine sono presenti nelle fibre muscolari lisce. La formazione di un emicromo distorto in condizioni native potrebbe essere un meccanismo per la cattura dei radicali HOO e per compensare parte del costo energetico per la biosintesi delle glicoproteine antigelo presenti nel sangue dei pesci antartici.

II PARTE

LA FRATASSINA



CAPITOLO 5

INTRODUZIONE

5.1. LA LUNGA STORIA DELLA PICCOLA PROTEINA FRATASSINA

Nell'era post-genomica, contributi di grande interesse per la medicina sono attesi dalla Biologia Strutturale che interpreta la funzione delle proteine e degli acidi nucleici sulla base della loro struttura tridimensionale. Uno strumento importante per la determinazione della struttura delle macromolecole e delle loro interazioni è fornito dalla biocristallografia. Il rapido aumento delle strutture cristallografiche di proteine ha fornito e fornisce le basi strutturali per la comprensione di specifiche patologie e per lo sviluppo di molecole rilevanti dal punto di vista medico quali farmaci, proteine terapeutiche e vaccini.

L'atassia di Friedreich (AF) è stata descritta per la prima volta dal dottor Nikolaus Friedreich nel 1863 ed è una malattia ereditaria autosomica recessiva, caratterizzata da una progressiva disabilità neurologica, da una cardiopatia ipertrofica e da un rischio elevato di diabete mellito [Durr, A., *et al.*, 1996; Lodi, R., *et al.*, 1999]. Come per quasi tutte le malattie neurodegenerative, non esiste attualmente alcuna terapia capace di arrestare la progressione dell'AF.

Inoltre, purtroppo, a differenza per esempio della malattia di Parkinson, non esistono terapie efficaci neppure per i sintomi della AF.

La AF è dovuta ad una mutazione di un gene (FRDA) che codifica per una proteina di 210 amminoacidi, chiamata fratassina, con una sequenza *target* mitocondriale di 55 amminoacidi [Campuzano, V., *et al.*, 1996]. Il gene FRDA è espresso in tutte le cellule, ma il suo livello varia nei differenti tessuti e durante lo sviluppo. L'AF è la conseguenza di un difetto di fratassina. Infatti la mutazione, causa della malattia nella maggior parte dei pazienti, è l'espansione di una sequenza ripetuta di triplette GAA nel primo introne del gene [Campuzano, V., *et al.*, 1996]. La sequenza di queste basi nucleotidiche, che ha un massimo di quaranta triplette negli individui normali (di solito 8-9), si espande fino ad alcune centinaia nelle persone malate. Essendo la malattia recessiva, gli individui affetti sono omozigoti per questa espansione mentre i portatori sani sono eterozigoti. Gli alleli espansi mostrano instabilità sia nella trasmissione da genitore a figlio che nei diversi tessuti durante lo sviluppo. L'espansione GAA arresta l'espressione del gene della fratassina [Campuzano, V., *et al.*, 1997] perché distorce la struttura del DNA, bloccando la sintesi del corrispondente RNA messaggero [Sakamoto, N., *et al.*, 1999]. Il DNA, in corrispondenza dell'espansione GAA, tende a ripiegarsi su se stesso in una struttura complicata a tripla elica che non permette lo scorrimento dell'RNA polimerasi. La tripla elica è più stabile quando l'espansione è più grande, per

cui l'espressione della frataxina diminuisce con l'aumentare del numero delle triplette GAA. Conseguentemente, la gravità e l'età di esordio della malattia sono almeno in parte determinate dalla lunghezza dell'espansione delle triplette GAA. La maggior parte dei malati ha livelli di frataxina intorno al 5-10% del normale, i casi più leggeri e ad esordio più tardivo nell'età adulta hanno il 20-25% del normale, i portatori eterozigoti hanno poco più del 50% del normale e sono perfettamente sani. Se si distrugge il gene della frataxina nel topo, l'animale completamente privo di questa proteina muore durante lo sviluppo embrionario, dimostrando l'importanza essenziale della piccola quantità residua prodotta dai malati di AF.

La frataxina è una proteina mitocondriale altamente conservata in tutti gli eucarioti ed anche in molti procarioti. Tutti gli omologhi della frataxina presentano un elevato numero di residui acidi che sono concentrati nel dominio C-terminale, che è di circa 120 amminoacidi. Questo dominio negli eucarioti è preceduto da una catena peptidica di lunghezza variabile, parte della quale viene eliminata durante la maturazione post-traduzionale della proteina [Knight, S.A., *et al.*, 1998; Koutnikova, H., *et al.*, 1998; Gordon, D.M., *et al.*, 1999]. Le frataxine batteriche, naturalmente, non presentano il segnale di localizzazione mitocondriale. Mentre la regione N-terminale è poco conservata, il dominio C-terminale ha un'omologia di circa il 60% nell'ambito della famiglia.

5.2. RUOLO BIOLOGICO DELLA FRATASSINA

Per lungo tempo la funzione biologica della fratassina è rimasta oscura impedendo lo sviluppo di terapie mirate. Negli ultimi anni l'interesse per questa proteina è notevolmente aumentato e i risultati degli studi finora condotti suggeriscono che la sua funzione biologica sia legata al ruolo chiave che i mitocondri rivestono nel metabolismo del ferro. Il ferro viene, infatti, utilizzato in questi organelli subcellulari per sintetizzare due tipi di strutture chimiche, entrambe essenziali per la cellula: i centri ferro-zolfo [2Fe-2S] e l'eme. I risultati degli studi fatti per identificare il ruolo della fratassina nella biosintesi dei centri Fe/S [Mühlenhoff, U., *et al.*, 2002] e dell'eme [Lesuisse, E., *et al.*, 2003; Yoon, T. & Cowan, J.A., 2004] suggeriscono che tale proteina *in vivo* funge da trasportatore del ferro.

5.3. LA FRATASSINA E LA FORMAZIONE DEI CENTRI FE/S

I centri ferro-zolfo sono cofattori essenziali per il funzionamento di vari enzimi, in particolare l'aconitasi e i complessi I, II e III della catena respiratoria. Essi sono assemblati mediante meccanismi molecolari complessi in cui sono coinvolte una varietà di proteine specializzate (proteine ISC) [Lill, R. & Kispal, G., 2000] che nei procarioti vengono codificate da geni appartenenti allo stesso operone (*nif*, *isc*, *csd*, *suf*, etc.).

Uno degli operoni, codificante per proteine ISC in *Escherichia coli*, maggiormente studiato è l'operone isc (fig.5.1) dato che esso rappresenta un sistema semplice per la comprensione del complicato meccanismo di assemblaggio dei centri Fe/S e inoltre le proteine da esso prodotte presentano degli omologhi altamente conservati sia nei procarioti che negli eucarioti [Zheng, L., *et al.*, 1998].

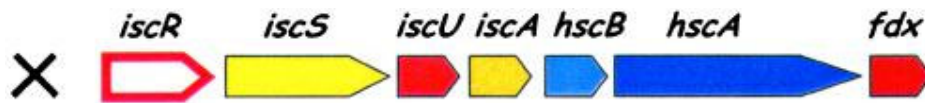


Fig. 5.1- Rappresentazione schematica dell'operone isc da *E.coli*.

L'operone isc è costituito da 8 geni, sette dei quali codificanti per proteine con una funzione biologica nota (IscS, IscU, IscA, Hsc20, Hsc66, IscR e ferredossina) (fig.5.2).

L'enzima IscS è una cisteina desulfurasi che catalizza la rimozione del solfuro dalle L-cisteine con conseguente formazione di L-alanine [Flint, D. H., 1996].

Il solfuro resta su IscS dove viene ridotto, possibilmente dalla ferredossina, per poi essere trasferito su IscU che funge da piattaforma sulla quale il centro Fe/S viene assemblato [Agar, J. N., *et al.*, 2000; Urbina, H.D., *et al.*, 2001]. Una volta che il centro Fe/S si è formato esso viene trasferito da IscU o da IscA alla proteina bersaglio finale [Ding, H., *et al.*, 2004; Mansy, C., 2002; Krebs, C.,

et al., 2001]. Le chaperonine Hsc20 e Hsc66 assistono la formazione del centro Fe/S, stabilizzando la proteina IscU o contribuendo al successivo trasferimento del centro dalla proteina IscU sulla quale esso è stato assemblato [Hoff, K. G., *et al.*, 2000]. Infine la proteina IscR funge da regolatore della trascrizione dell'operone *isc* [Zheng, L., *et al.*, 1998; Schwartz, C. J., *et al.*, 2001]. In questo schema manca la proteina che dovrebbe trasferire il ferro a IscU.

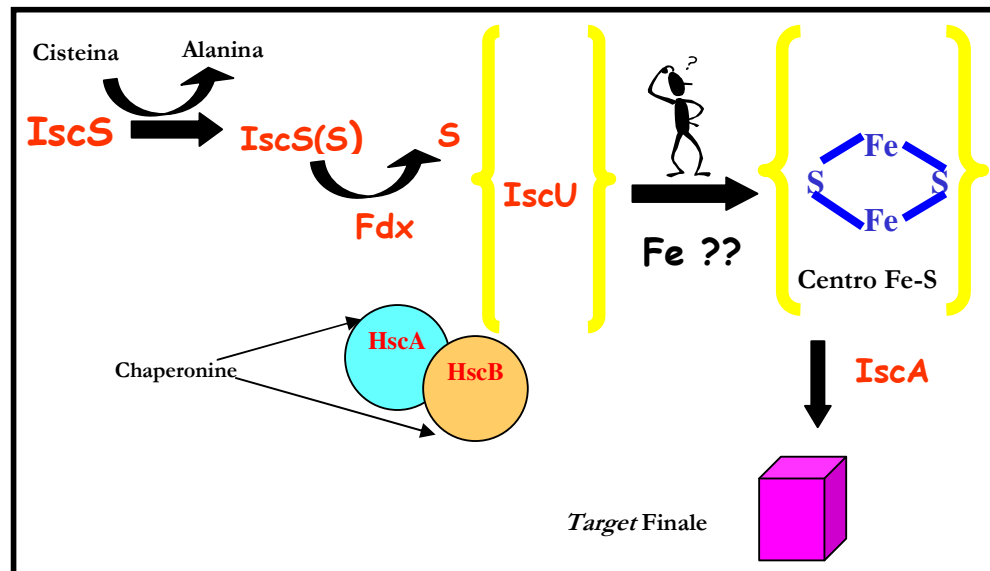


Fig. 5.2- Meccanismo proposto per la sintesi dei centri Fe/S ad opera delle proteine codificate dall'operone *isc* da *E. coli*.

E' stato ipotizzato che questo ruolo di donatore di ferro venga svolto dalla fratassina e in particolare in *E. coli* dal suo omologo, la proteina CyaY. Studi *in vitro* infatti indicano che CyaY, la fratassina umana e il suo omologo in lievito (Yfh1) sono in grado di interagire rispettivamente con IscU, gli omologhi di

IscU in eucarioti (proteine ISU) e Isup1 (omologo di IscU in lievito) (Yoon, T. & Cowan, J. A., 2003; Ramazzotti, A., *et al.*, 2004; Layer, G., *et al.*, 2006).

5.4. LA FRATASSINA E LA BIOSINTESI DELL'EME

Diversi studi condotti su lievito hanno messo in evidenza la dipendenza del processo biosintetico dell'eme dai livelli di espressione della fratassina. Lesuisse e collaboratori [Lesuisse, E., *et al.*, 2003] hanno dimostrato che i livelli di Fe-protoporfirina IX sono ridotti nei mutanti in cui è stata fatta una delezione del gene *yfh1* (*Dyfh1*), codificante per l'omologo della fratassina in lievito. Gli esperimenti fatti da Lange [Lange, H., *et al.*, 2004] hanno mostrato che nelle cellule di lievito mutate in vari componenti della macchina biosintetica ISC, incluso *Dyfh1*, si verifica una riduzione del processo di sintesi dell'eme. Infine studi sull'omologo della fratassina in lievito hanno evidenziato che essa è in grado di interagire con l'enzima ferrochelatasi che nello stadio finale del meccanismo di formazione dell'eme incorpora il ferro nella protoporfirina IX (He, Y., *et al.*, 2004).

5.5. LA FRATASSINA E LA DISINTOSSICAZIONE DAL FERRO

In presenza di elevate quantità di ferro la fratassina da *Escherichia coli* (*CyaY*) [Adinolfi, S., *et al.*, 2002], *Saccharomyces cerevisiae* (*Yfh1*) [Adamec, J., *et al.*, 2000] e quella umana (*Hfr*) [Cavadini, P., *et al.*, 2002] sono capaci di

associarsi, formando complessi che legano il ferro e lo conservano in una forma solubile. Studi addizionali hanno mostrato che la perdita parziale o totale di fratassina comporta nell'uomo un danno ossidativo [Schultz, J. B., *et al.*, 2000]. Sembra quindi che la disintossicazione dal ferro sia un'altra funzione della fratassina aggregata che è rilevante nella difesa antiossidante delle cellule [O'Neill, H. A. *et al.*, 2005] (fig.5.3).

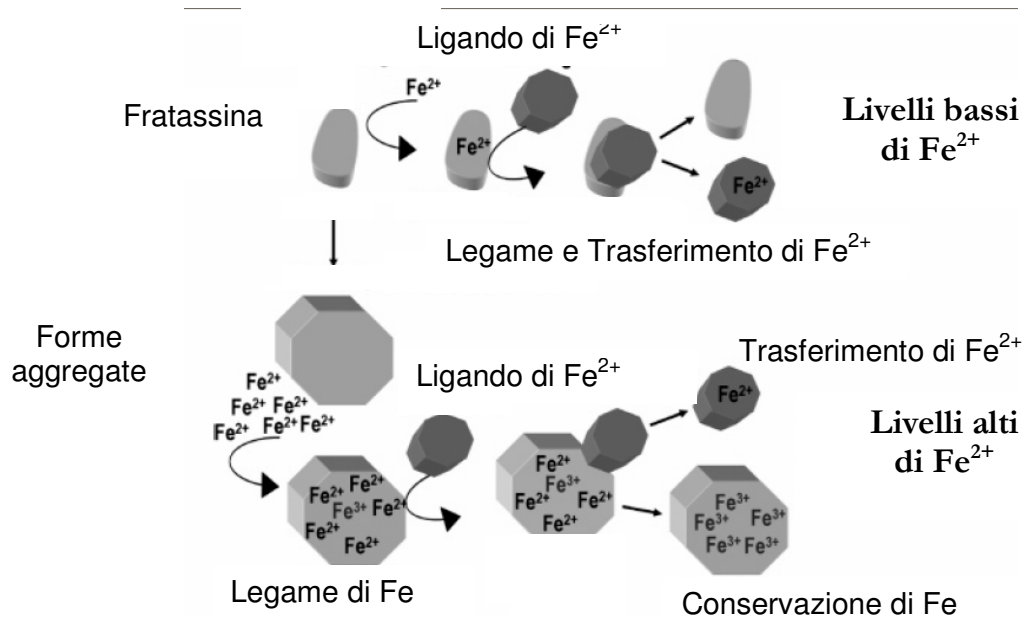


Fig. 5.3- Meccanismo di funzionamento proposto per la fratassina umana. Un ipotetico ligando del Fe (II) viene mostrato (ad esempio ISU) con un sito di legame per il Fe²⁺. Quando i livelli di ferro mitocondriale sono limitati, il monomero della fratassina umana può agire come trasportatore di Fe²⁺; ogni ione legato viene rapidamente e quantitativamente trasportato sul ligando. In presenza di elevate concentrazioni di ferro si formano gli aggregati di fratassina che sequestrano il ferro per promuovere la sua ossidazione e incorporazione in un minerale stabile. Immagine tratta da O'Neill, H. A., *et al.*, 2005.

Analisi comparative tra le tre proteine Yfh1, CyaY e Hfr hanno evidenziato che esse hanno una differente tendenza all'aggregazione in risposta ad elevate concentrazioni di ferro.

La titolazione della forma matura della frataxina da lievito (mYfh1) in presenza di quantità crescenti di Fe(II) in condizioni aerobiche porta alla formazione di multimeri costituiti da 48 subunità che contengono 50 atomi di ferro ciascuna con una massa molecolare apparente di ~1.1 MDa [Adamec, J., *et al.*, 2000](fig.5.4).

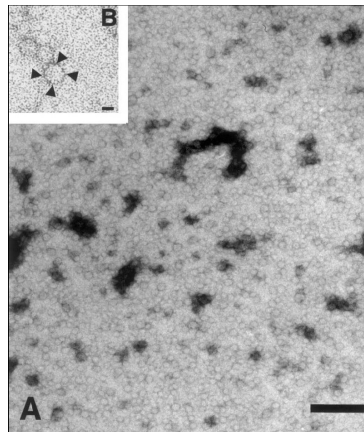


Fig. 5.4- Microscopia elettronica di multimeri isolati di Fe-mYfh1. Immagine tratta da Adamec, J., *et al.*, 2000.

Nel caso di CyaY la proteina forma aggregati in presenza di ferro similmente a Yfh1. Questo è evidente in figura 5.5 in cui è mostrato l'effetto del legame di Fe(II) sul cromatogramma di CyaY e Yfh1 [Adinolfi, S., *et al.*, 2002].

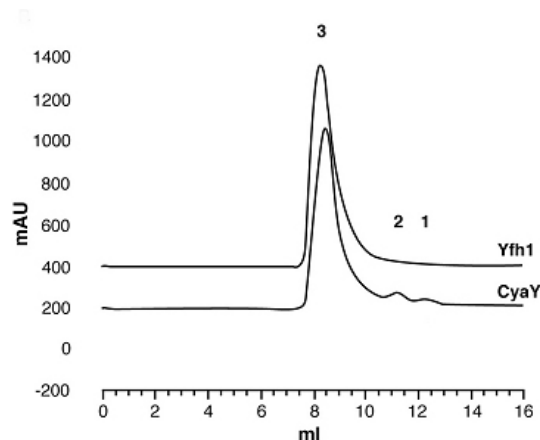


Fig. 5.5- Cromatogramma (gel filtrazione) di CyaY e Yfh1 in presenza di Fe(II) nel rapporto 1:20. Il picco 3 è relativo ad aggregati della proteina. Immagine tratta da Adinolfi, S., *et al.*, 2002.

Per quanto riguarda la fratassina umana, la proteina matura produce un omopolimero stabile che approssimativamente lega 10 atomi di ferro per molecola di fratassina [Cavadini, P., *et al.*, 2002].

Al momento non è ancora chiaro se la forma rilevante nelle condizioni fisiologiche sia quella monomerica, quella associata o entrambe (fig.5.3). Per questo scopo è importante caratterizzare l'interazione della fratassina con il ferro.

5.6. CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE

Finora sono state determinate le strutture delle forme native monomeriche di CyaY [Cho, S. J., *et al.*, 2000; Nair, M., *et al.*, 2003], Yfh1 [He, Y., *et al.*, 2004] e Hfr [Musco, G., *et al.*, 2000; Dhe-Paganon, S., *et al.*, 2000]. In particolare nel caso della fratassina matura umana (residui 88-210) e di quella

da *Escherichia coli* (CyaY) sono note sia la struttura cristallografica che quella NMR. Solo il modello NMR è invece stato determinato per Yfh1. Informazioni strutturali sulle forme monomeriche legate delle proteina da *E. coli* [Nair, M., *et al.*, 2004] e da lievito [Cook, J. D., *et al.*, 2006] sono state ottenute via NMR.

Tutte le strutture degli omologhi (fig.5.6) sono caratterizzate dalla presenza di motivi α - β *sandwich* con due α -eliche (H1 e H2) N- e C-terminali (piano dell'elica) e cinque β -*strands* (S1 a S5) antiparalleli (piano dei β -*sheet*). Un sesto (e un settimo nella fratassina umana) β -*strands* interseca il piano dell'elica e dei β -*sheet* [Cho, S. J., *et al.*, 2000].

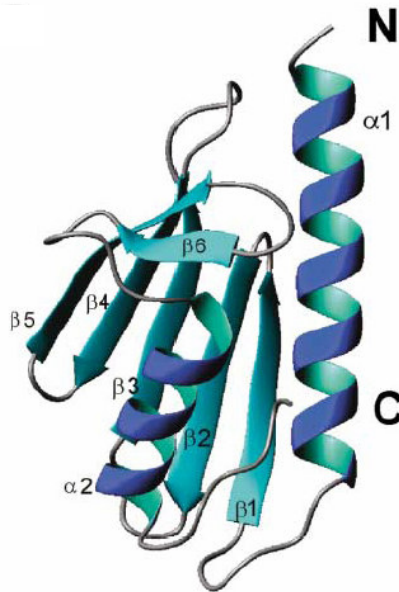


Fig. 5.6- Rappresentazione a nastri della struttura tridimensionale di CyaY. Immagine tratta da Nair, M., *et al.*, 2004.

Come già menzionato, una caratteristica strutturale comune di tutti gli omologhi della fratassina è la natura acida della proteina. Le catene laterali dei residui di aspartico e glutammico rendono la regione H1-S1 della fratassina carica negativamente (fig.5.7). Tale superficie carica che si estende fino all'elica H2 dovrebbe essere ideale per il legame di ioni carichi positivamente.

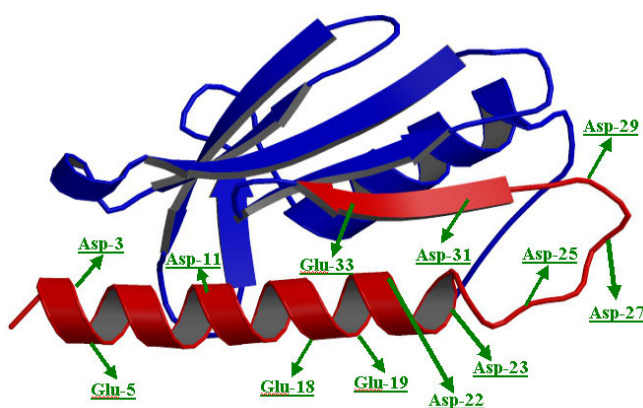


Fig. 5.7- Struttura tridimensionale a nastri di CyaY in cui sono stati evidenziati in verde i residui acidi appartenenti alla regione $\alpha 1$ -L1- $\beta 1$ che è colorata in rosso. La figura è stata realizzata con il programma MOLSCRIPT.

5.7. LA FRATASSINA DA *E. coli*

CyaY è una proteina di 106 amminoacidi (MW = 12 231) che mostra il 29.6% e il 34.2% di identità di sequenza con le regioni C-terminali della fratassina umana (residui 122-192) e di Yfh1 (residui 89-164), rispettivamente (fig.5.8). CyaY è una proteina molto acida con un pI di 4.2, similmente ai domini C-terminali di Yfh1 e della fratassina umana i cui pI sono rispettivamente 4.0 e 4.6.

Per caratterizzare la capacità di questa proteina di interagire con il ferro e l'influenza di tale interazione sull'aggregazione proteica nel gruppo della dott.ssa A. Pastore sono stati fatti diversi studi. Innanzitutto per determinare il numero di siti di legame del ferro alla proteina nativa monomerica sono state effettuate misure calorimetriche a scansione e titolazioni fluorimetriche sia in condizioni aerobiche con Fe(III) che anaerobiche con Fe(II) [Bou-Abdallah, F., *et al.*, 2004].

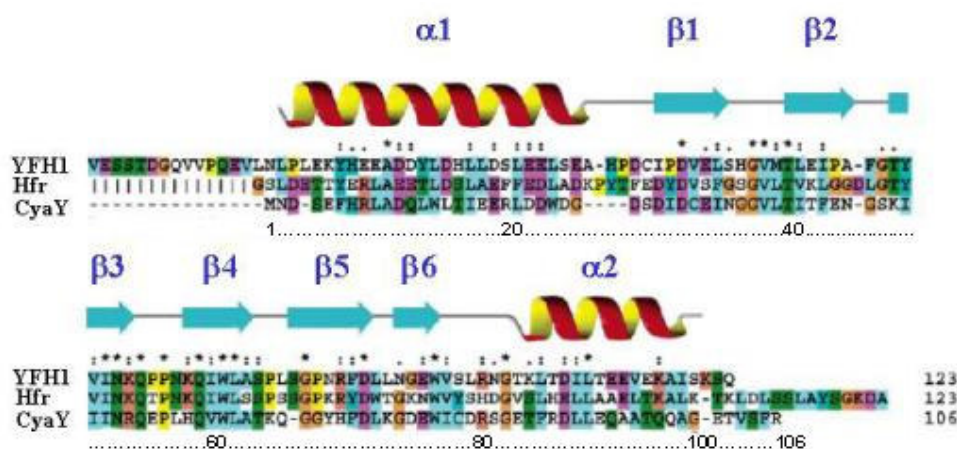


Fig. 5.8- Allineamento di sequenza della fratassina da lievito (Yfh1), della fratassina umana (Hfr) e della fratassina da *E. coli* (CyaY). La numerazione e gli elementi di struttura secondaria si riferiscono a CyaY. Immagine tratta da He, Y., *et al.*, 2004.

I risultati di questi esperimenti sono stati in accordo con quelli condotti da Cowan e collaboratori [Yoon, T. & Cowan, J. A., 2004] sulla fratassina umana e hanno mostrato che CyaY lega 6 ioni Fe(III) e 2 ioni Fe(II) per monomero. Successivamente al fine di evidenziare le regioni della proteina coinvolte nell'interazione con il metallo è stata determinata tramite NMR la struttura

della forma legata monomerica di CyaY in presenza di concentrazioni crescenti di Fe(II) e Fe(III) [Nair, M., *et al.*, 2004]. Per un rapporto 1:2 CyaY-Fe(II) le maggiori perturbazioni dei *chemical shift* si sono registrate per la regione 20-23 che corrisponde alla parte terminale dell'elica H1. A rapporti più alti proteina/ferro l'intero spettro NMR risulta perturbato e questo è dovuto alla presenza di elevate concentrazioni di Fe(II) paramagnetico non legato.

La titolazione fatta con Fe(III) ha evidenziato un coinvolgimento dei residui 20-31 della proteina per un rapporto Fe(III)/CyaY di 1:2 e dei residui 19-35 per un rapporto di 1:6.

5.8. OBIETTIVO DELLA TESI

Gli studi NMR sulla forma monomerica della proteina legata al ferro oltre che su CyaY sono stati condotti anche su Yfh1 dando pressochè gli stessi risultati. Tali risultati Essi hanno permesso di individuare i residui che risultano perturbati dalla presenza del ferro e che potrebbero essere coinvolti nell'interazione con il metallo in soluzione. Una descrizione dettagliata dei siti di legame del ferro e del tipo di coordinazione può essere ottenuta solo mediante studi di diffrazione dei raggi X su cristallo singolo. In questo contesto si è inserito il mio lavoro di ricerca il cui obiettivo è quello di

identificare, mediante diffrazione dei raggi X, i siti di interazione della proteina da *E. coli* (CyaY) allo ione metallico. A tal fine si è operato nel seguente modo:

- Preparazione di cristalli di forme monomeriche della proteina legate a diversi tipi di ioni metallici (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Eu^{3+}).
- Raccolta e riduzione dei dati di diffrazione.
- Determinazione dei siti di legame dei metalli nella proteina.

CAPITOLO 6

MATERIALI E METODI

6.1. FORME LEGATE DI CYAY

6.1.a CRISTALLIZZAZIONE DI CYAY IN FORMA LEGATA A FE(II) E Fe(III)

Inizialmente la proteina è stata cristallizzata in forma nativa utilizzando le condizioni di cristallizzazione riportate in letteratura (PEG 4K 30% w/v, HAc/NaAc 0.1 M pH 5, 2-mercapto-etanolo 4 mM, MgCl₂ 0.2 M, proteina 15mg/mL), è stata quindi provata una cocristallizzazione di CyaY con ioni ferro (rapporti CyaY/Fe 1:2, 1:4, 1:6) in entrambi gli stati di ossidazione. Tutti gli esperimenti condotti con Fe(II) sono stati fatti in condizioni anaerobiche all'interno di una *glove-box*. Usando le condizioni di cristallizzazione riportate in letteratura, si è avuta una percentuale di successo di crescita di cristalli in presenza di Fe(III) molto bassa. Quindi si sono ricercate delle nuove condizioni di cristallizzazione, provando diversi tipi di agenti precipitanti a vari pH. E' risultato che la proteina cristallizza in un ristretto intervallo di pH (tra 4.0 e 5.0) e oltre che da PEG 4K anche da ammonio solfato 2.0 M.

Si è contemporaneamente tentato di far diffondere in cristalli della proteina nativa, cresciuti sia da PEG 4K che da ammonio solfato, il Fe(III) a vari rapporti con CyaY. Questi esperimenti sono stati condotti sia a pH 5 (pH di cristallizzazione) che a pH fisiologico, previa equilibratura dei cristalli a tale

pH, che è normalmente utilizzato negli studi in soluzione ma al quale la proteina non cristallizza. La solubilità dei sali di ferro nelle soluzioni di cristallizzazione è stata controllata mediante il metodo colorimetrico con fenantrolina.

I cristalli così ottenuti sono stati utilizzati per effettuare raccolte dati di diffrazione sia presso il Centro di Bioimmagini e Biostrutture del CNR di Napoli che presso il Sincrotrone ELETTRA di Trieste (dati non riportati). Nessun esperimento ha prodotto cristalli di proteina in forma legata (paragrafo 6.2).

Si è quindi deciso di utilizzare altri cationi, il Ca(II) e il Co(II) al posto del Fe(II) e l'Eu(III) al posto del Fe(III) su suggerimento della dottoressa A. Pastore che negli esperimenti NMR ha osservato un comportamento molto simile di CyaY in presenza di questi cationi e di Fe.

6.1.b CRISTALLIZZAZIONE, RACCOLTA DATI DI DIFFRAZIONE E RISOLUZIONE DELLA STRUTTURA DI CYAY IN FORMA LEGATA A Co(II) E Eu(III)

CyaY è stata cristallizzata in presenza di Ca(II) e Co(II) sostituendo nelle condizioni di cristallizzazione, riportate in letteratura, il MgCl₂ con CaCl₂ e CoCl₂, rispettivamente. La proteina in forma legata ad Eu(III) allo stato solido è stata invece ottenuta per diffusione di EuCl₃ (soluzione satura) per 45 minuti su cristalli di proteina in forma nativa. I dati di diffrazione di CyaY

legata a Co(II) e Eu(III) sono stati registrati sia presso il Centro di Bioimmagini e Biostrutture del CNR di Napoli (CyaY-Co(II) *in house* e CyaY-Eu(III) *in house*) utilizzando un generatore di raggi X ad anodo rotante che presso il sincrotrone ELETTRA di Trieste (CyaY-Co(II) *Elettra* e CyaY-Eu(III) *Elettra*) per migliorare la risoluzione. I dati di diffrazione della forma legata a Ca(II) sono stati invece raccolti presso il Centro di Bioimmagini e Biostrutture del CNR di Napoli (CyaY-Ca(II) *in house*). L'indicizzazione dei diagrammi di diffrazione per le cinque raccolte dati è stata effettuata con il programma DENZO [Otwinowski, Z. & Minor, W., 1997] per lo scalaggio si è invece utilizzato il programma SCALEPACK [Otwinowski, Z. & Minor, W., 1997]. Nella tabella 6.1 sono riportate le statistiche della riduzione dati relative alle cinque raccolte fatte.

	CyaY-Ca(II) <i>in-house</i>	CyaY-Co(II) <i>in-house</i>	CyaY-Co(II) <i>Elettra</i>	CyaY-Eu(III) <i>in-house</i>	CyaY-Eu(III) <i>Elettra</i>
Dimensioni della cella (Å) a=b,c	43.99, 98.72	43.83, 98.60	43.91, 98.60	43.84, 98.68	43.74, 98.52
Gruppo spaziale	P322(1)	P322(1)	P322(1)	P322(1)	P322(1)
Risoluzione (Å)	20.0-1.87 (1.91-1.87)	20.0-2.01 (2.06-2.01)	30.0-1.75 (1.78-1.75)	20.00-2.00 (2.05-2.00)	30.0-1.42 (1.44-1.42)
No. di osservazioni	65259	39265	59856	52453	114772
No. di riflessi unici	8790	7409	11626	7861	20848
Completezza (%)	90.8 (93.1)	95.5 (78.5)	99.2 (99.6)	99.5(100.0)	97.2(99.9)
<I>/<σ(I)>	20.9 (6.4)	28.1 (7.5)	29.7 (6.9)	20.3(11.3)	15.9(3.1)
Molteplicità	7.4	5.3	5.2	6.7	5.0
R_{merge} (%)	6.8 (17.4)	5.4 (20.7)	5.7 (21.2)	10.5 (17.8)	8.6 (41.9)

Tabella 6.1. Statistiche della riduzione dati.

Per la risoluzione delle strutture è stato utilizzato il metodo della sostituzione molecolare (programma AMore [Navaza, J., 1994]) a partire dal modello affinato della proteina in forma nativa alla risoluzione di 1.4 Å [Cho, S. J. *et al.*, 2000].

6.2. CONTROLLO DELLA PRESENZA DEGLI IONI METALLICI

Come stadio preliminare dell'affinamento si è verificata la presenza di ioni metallici legati alla proteina utilizzando due diversi tipi di mappe di

densità elettronica, mappe Fourier $F_{o(\text{legata})} - F_{o(\text{nativa})}$ e mappe di differenza anomala.

La mappa Fourier $F_{o(\text{legata})} - F_{o(\text{nativa})}$ è una mappa differenza tra i fattori di struttura osservati della presunta forma legata e di quella nativa; essa può essere utilizzata quando i cristalli delle due forme sono isomorfi. In particolare, la procedura utilizzata è stata quella di selezionare i riflessi comuni nell'intervallo di risoluzione tra 2.0 e 8.0 Å e di scalarli sullo stesso modello della forma nativa. E' stata così calcolata la mappa $(|F_{o(\text{legata})} - F_{o(\text{nativa})}|) \exp(i\varphi_{\text{calc}})$ dove φ_{calc} sono le fasi calcolate dal modello della forma nativa. La densità elettronica residua che emerge da questa mappa è particolarmente chiara e indica la presenza di ioni nella presunta forma legata laddove essi siano eventualmente presenti. Per il calcolo di questo tipo di mappa è stato usato il programma CNS [Brunger, A. T., *et al.*, 1998].

La mappa di differenza anomala viene invece calcolata utilizzando come modulo la differenza tra le coppie di Bijvoet dei riflessi osservati per la presunta forma legata e come fase quella ottenuta dal modello della forma nativa con uno sfasamento di 90°. La differenza anomala è determinata dalla parte immaginaria dello *scattering* ($\Delta f''$) e quindi solo gli atomi con un significativo $\Delta f''$ appaiono in densità. Per gli atomi pesanti (come Fe, Co, Eu) il contributo immaginario allo *scattering* anomalo è sufficientemente grande da rendere possibile la loro localizzazione. Questo secondo tipo di mappa è stato

calcolato con programmi appartenenti al pacchetto ccp4 [Navaza, J., 1994]; rispetto al primo offre il vantaggio di confrontare dati provenienti da un unico cristallo (isomorfismo perfetto).

6.3. AFFINAMENTO DELLE STRUTTURE DI CYAY

A questo punto si è proceduto all'affinamento (programmi CNS [Brunger, A. T., *et al.*, 1998] e SHELX [Sheldrick, G. Göttingen University, Germany]) delle strutture di CyaY. Prima di cominciare il processo di affinamento della struttura il 10% dei riflessi osservati è stato selezionato per l'insieme "test" da usare per controllare la significatività del processo stesso. Il modello di partenza di CyaY è stato sottoposto ad una serie di cicli di affinamento iniziali in cui sono stati utilizzati solo i riflessi ad alta risoluzione che presentavano un valore di F_o almeno pari a $2\sigma(F_o)$. Dall'interpretazione della distribuzione elettronica, in termini di posizione di atomi, si sono ottenute utili indicazioni per la modifica del modello e quindi per il calcolo di un nuovo insieme di fasi. Questa procedura è stata iterata fino a raggiungere un modello molecolare finale, che interpreti al meglio il diagramma di diffrazione osservato.

In particolare la struttura è stata analizzata calcolando mappe "OMIT" con coefficienti $(F_o - F'_c)\exp(\alpha'_c)$ su regioni ristrette della proteina. In queste mappe i fattori di struttura F'_c , come detto in precedenza (paragrafo 2.2), sono

calcolati da un modello da cui è stato ommesso il frammento di proteina che si vuole esaminare, evitando così in questa zona i problemi di condizionamento del modello. In questa fase è stata variata la conformazione di alcuni tratti di catena principale e di alcune catene laterali. Ogni intervento manuale nella struttura, guidato dall'interpretazione della densità elettronica, è stato seguito da cicli di affinamento che minimizzano l'errore sulle coordinate atomiche modificate. La riduzione della differenza tra i dati calcolati e quelli osservati fornisce indicazioni sulla correttezza delle modifiche apportate.

Il modello affinato è stato quindi utilizzato per calcolare una mappa $F_o - F_c$ che nel caso delle raccolte dati relative alle forme risultate legate ha permesso non solo di identificare le molecole di H_2O ma anche di confermare la posizione degli ioni metallici, già individuati con la mappa $F_{o(\text{legata})} - F_{o(\text{nativa})}$ e con la mappa di differenza anomala (procedura descritta nel paragrafo 6.2). Ogni massimo, così trovato, è stato esaminato sul *display* grafico (programma di grafica molecolare O [Jones, T. A., *et al.*, 1991]) per analizzare il profilo di densità e controllare la geometria dei legami idrogeno delle possibili molecole d'acqua da inserire nella struttura in corso di affinamento.

Le molecole di acqua sono state aggiunte al modello in stadi successivi a partire da quelle che presentavano una densità più forte e meglio definita e per le quali non vi era ambiguità di interpretazione.

Come ultima operazione sono stati considerati tutti i riflessi estendendo la risoluzione fino a 20.0 Å e considerando anche l'affinamento con il solvente continuo (paragrafo 2.2).

La validazione delle strutture è stata effettuata con i programmi PROCHECK [Laskowski, R. A., *et al.*, 1993] e WHATCHECK [Hoof, R.W., *et al.*, 1996] (paragrafo 2.4).

CAPITOLO 7

RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1. CONTROLLO DELLA PRESENZA DEGLI IONI Ca(II), Co(II) E Eu(III)

Al fine di identificare i siti di legame degli ioni metallici nei cristalli di proteina ottenuti in presenza di ioni calcio (CyaY-Ca), cobalto (CyaY-Co) ed europio (CyaY-Eu) sono state calcolate la mappa Fourier differenza osservata $F_{O_{(legata)}} - F_{O_{(nativa)}}$ e la mappa di differenza anomala (paragrafo 6.2) per ciascuna raccolta dati. La densità elettronica residua che emerge da queste mappe è particolarmente chiara per le raccolte dati effettuate presso il CNR di Napoli ed è confermata dai dati registrati presso il sincrotrone ELETTRA di Trieste. Tali mappe indicano la presenza di due ioni cobalto (M1 e M2) nella struttura di CyaY-Co e di cinque ioni europio (S1 a S5) in quella di CyaY-Eu di cui uno (S1) in una posizione molto simile a quella occupata dal cobalto in uno dei due siti di coordinazione (M1) (fig. 7.1, 7.2.1 e 7.2.2). Non sono invece presenti siti di interazione del metallo con la proteina nella struttura di CyaY ottenuta per cocristallizzazione con Ca(II).

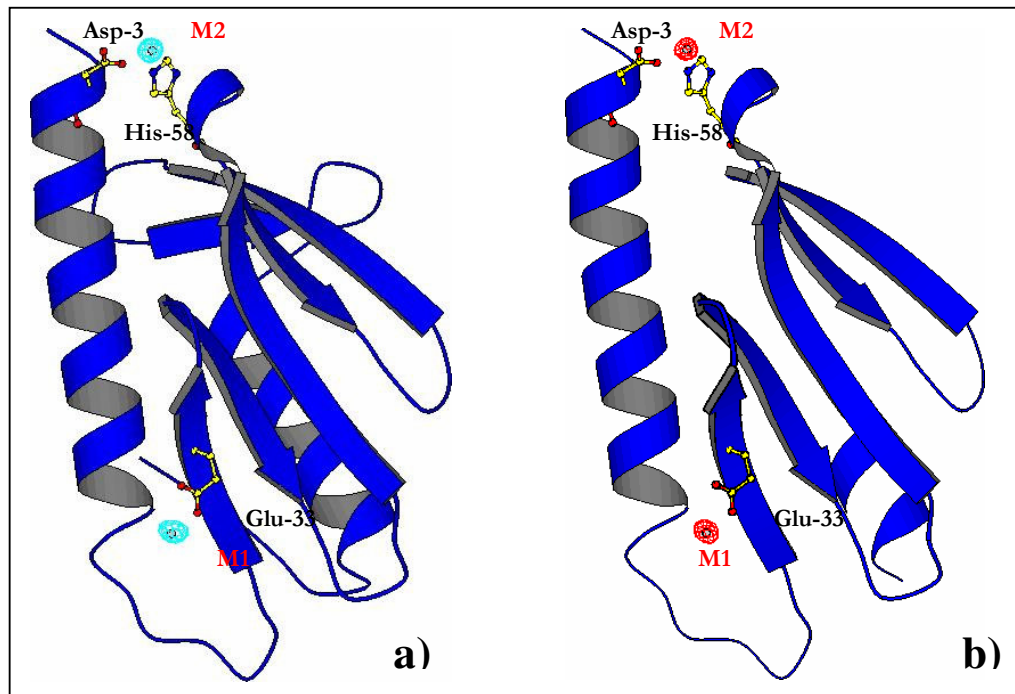


Fig.7.1- Struttura a nastri di CyaY-Co con evidenziati i due siti di coordinazione del metallo nell'intorno dei residui Glu-33 (M1), Asp-3 e His-58 (M2) individuati mediante a) la mappa Fourier differenza osservata $F_{O(\text{legata})} - F_{O(\text{nativa})}$ (in ciano) visualizzata ad un livello di $3.0 \sigma(\rho)$ e b) la mappa di differenza anomala (in rosso) visualizzata ad un livello di $5.0 \sigma(\rho)$; la figura è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

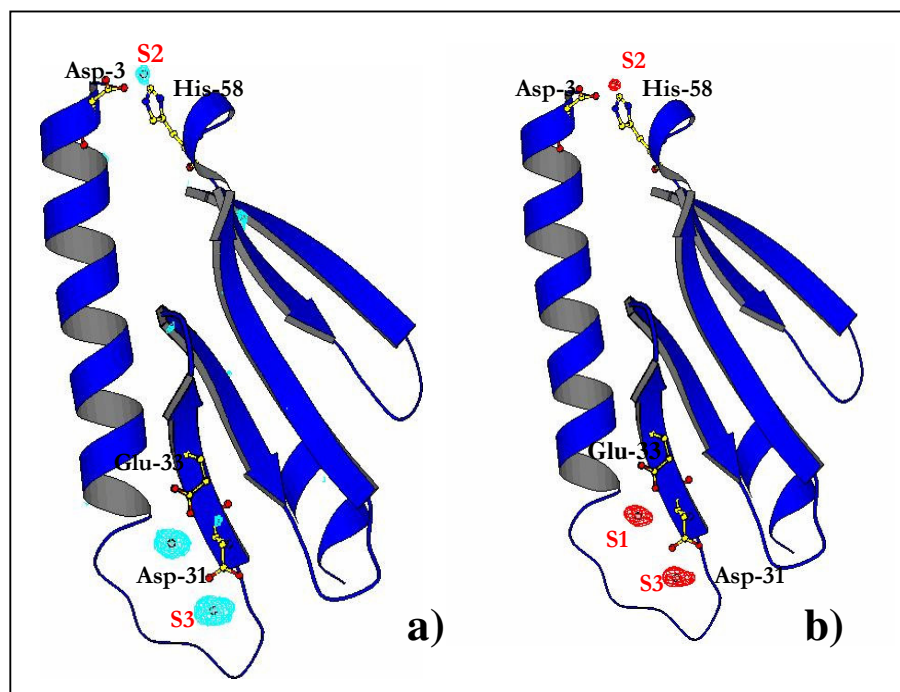


Fig.7.2.1- Struttura a nastri di CyaY-Eu con evidenziati tre dei cinque siti di coordinazione del metallo nell'intorno dei residui Glu-33 (S1), Asp-3 e His-58 (S2), Asp-29 e Asp-31 (S3), individuati mediante a) la mappa Fourier differenza osservata $F_{O(\text{legata})} - F_{O(\text{nativa})}$ (in ciano) visualizzata ad un livello di $5.0 \sigma(\rho)$ e b) la mappa di differenza anomala (in rosso) visualizzata ad un livello di $6.0 \sigma(\rho)$; la figura è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

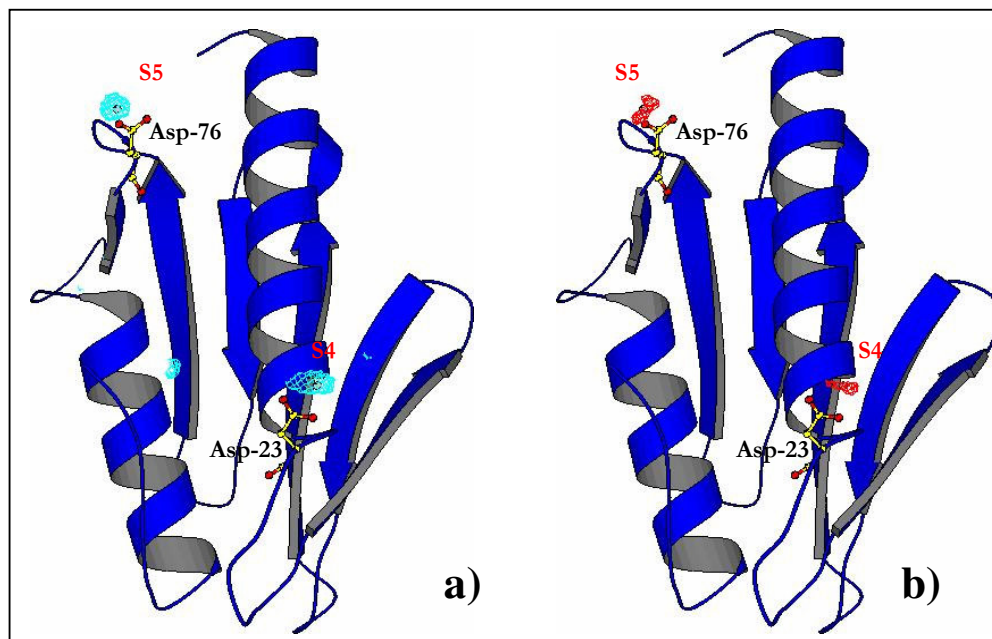


Fig.7.2.2- Struttura a nastri di CyaY-Eu con evidenziati due dei cinque siti di coordinazione del metallo nell'intorno dei residui Glu-19 e Asp-23 (S4), Asp-76 (S5) individuati mediante a) la mappa Fourier differenza osservata $F_{O(\text{legata})}-F_{O(\text{nativa})}$ (in ciano) visualizzata ad un livello di $5.0 \sigma(\rho)$ e b) la mappa di differenza anomala (in rosso) visualizzata ad un livello di $6.0 \sigma(\rho)$; la figura è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

7.2. DENSITA' ELETTRONICA E QUALITA' DEI MODELLI AFFINATI

Le mappe di densità elettronica delle strutture affinate sono risultate di buona qualità: la densità sulla catena principale è quasi ovunque continua ad un livello di $2.0 \sigma(\rho)$ e solo circa il 10% di residui presenta una densità povera su parte della catena laterale. La maggior parte di queste catene non chiaramente definite sono quelle molto flessibili di amminoacidi come lisina,

arginina, glutammina o anche asparagina, situati in *loop* esterni a contatto con il solvente. Per dare un'idea della buona qualità delle mappe Fourier e del dettaglio che riescono ad evidenziare si riporta in fig.7.3 la mappa $2F_o - F_c$ “OMIT” per il residuo Phe-6 appartenente all'elica $\alpha 1$ della struttura di CyaY-Co in cui è evidente il tipico aspetto a “ciambella” della densità elettronica dell'anello fenilico.

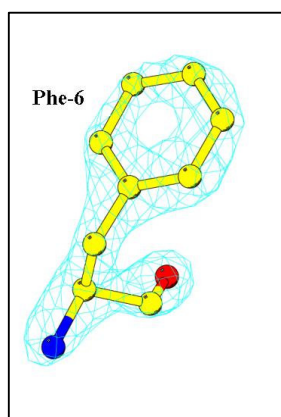


Fig.7.3- Densità elettronica (mappa $2F_o - F_c$ “OMIT”) del residuo Phe-6 di CyaY-Co appartenente all'elica $\alpha 1$ della struttura visualizzata ad un livello di $5.0 \sigma(\rho)$. La figura è stata realizzata con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

Nel grafico di Ramachandran, calcolato utilizzando il programma PROCHECK [Laskowski, R. A., et al., 1993], per tutti i modelli affinati più del 90% degli amminoacidi si trova nelle regioni più favorite indicate con le lettere A, B e L mentre la restante quantità presenta valori di ψ e Φ compresi in regioni permesse (a,b, l e p) (fig.7.4).

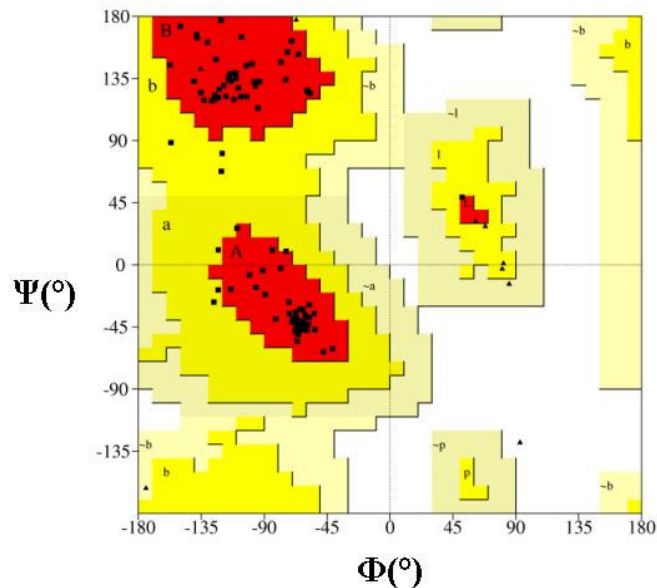


Fig.7.4- Diagramma di Ramachandran calcolato utilizzando il programma PROCHECK [Laskowski, R. A., *et al.*, 1993] per la struttura di CyaY-Co.

Il programma PROCHECK [Laskowski, R. A., *et al.*, 1993] permette inoltre di confrontare la stereochimica del modello con quella di strutture cristallografiche di proteine ben affinate (indice R_{fac} inferiore al 20%) e determinate ad una risoluzione prossima a quella in esame. Tale confronto ha evidenziato che nelle strutture in esame sia i parametri stereochimici della catena principale che di quelle laterali rientrano tra quelli medi (tabella 7.1).

	CyaY-Ca(II) <i>in-house</i>	CyaY-Co(II) <i>in-house</i>	CyaY-Co(II) <i>Elettra</i>	CyaY-Eu(III) <i>in-house</i>	CyaY-Eu(III) <i>Elettra</i>
Rfac,Rfree (%)	20.7, 23.6	19.8, 28.0	18.7, 23.0	23.3, 27.3	20.5, 23.2
Numero di atomi della proteina	860	860	860	860	860
Numero di molecole di acqua	94	71	75	60	165
Numero di ioni	-	2	2	5	5
DEVIAZIONI QUADRATICHE MEDIE					
Lunghezze di legame (Å)	0.24	0.97	0.43	0.30	0.58
Angoli di legame (°)	0.58	1.0	1.3	1.0	1.3
B MEDI (Å²)					
Proteina	13.9	27.1	30.0	21.9	22.0
Ioni	-	34.8	25.8	32.0	27.7
FATTORI DI OCCUPAZIONE IONICI					
M1, M2	-	0.5, 0.5	0.6, 0.7	-	-
S1, S2, S3, S4, S5	-	-	-	0.8, 0.5, 0.7, 0.3, 0.3	0.9, 0.4, 0.9, 0.5, 0.5

Tabella 7.1. Statistiche finali dell'affinamento delle strutture di CyaY calcolate con il programma PROCHECK [Laskowski, R. A., *et al.*, 1993].

7.3. DESCRIZIONE DELLE STRUTTURE AFFINATE

Le strutture delle forme legate di CyaY (CyaY-Co e CyaY-Eu) sono, nei limiti degli errori sperimentali, molto simili tra loro e alla struttura affinata della proteina libera cristallizzata in presenza di Ca(II) (CyaY-Ca). Il confronto tra i quattro modelli delle forme legate, tra il modello delle forme legate e di

CyaY-Ca in forma nativa e tra i cinque modelli affinati e la struttura di CyaY riportata in letteratura (codice PDB: 1EW4) [Cho, S. J., *et al.*, 2000] è stato effettuato sovrapponendo gli atomi C α degli amminoacidi che si trovano nelle regioni con struttura secondaria α o β . Il risultato di tali sovrapposizioni in termini di deviazioni medie quadratiche (RMSD), misurate in Å, è riportato in tabella 7.2.

	CyaY-Co(II) <i>in-house</i>	CyaY-Co(II) <i>Elettra</i>	CyaY-Eu(III) <i>in-house</i>	CyaY-Eu(III) <i>Elettra</i>	CyaY-Ca(II) <i>in-house</i>
CyaY-Co(II) <i>in-house</i>	0	0.088	0.015	0.161	0.141
CyaY-Co(II) <i>Elettra</i>	0.088	0	0.140	0.091	0.149
CyaY-Eu(III) <i>in-house</i>	0.015	0.140	0	0.118	0.144
CyaY-Eu(III) <i>Elettra</i>	0.161	0.091	0.118	0	0.137
CyaY-Ca(II) <i>in-house</i>	0.141	0.149	0.144	0.137	0
1EW4	0.189	0.194	0.179	0.196	0.104

Tabella 7.2. Sovrapposizioni, in termini di deviazioni medie quadratiche, degli atomi C α degli amminoacidi appartenenti agli elementi di struttura secondaria delle forme legate CyaY-Co e CyaY-Eu, della forma nativa affinata (CyaY-Ca) e della forma nativa di CyaY riportata in letteratura [Cho, S. J., *et al.*, 2000] (codice PDB: 1EW4) calcolate con il programma O [Jones, T. A., *et al.*, 1991].

CyaY è una proteina monomerica piuttosto compatta (fig.7.5) ed appartiene alla classe dei motivi strutturali “ α - β sandwich”.

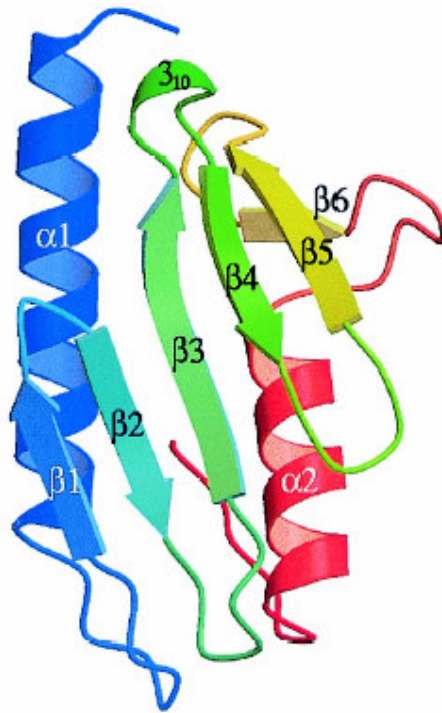


Fig.7.5- Rappresentazione a nastri della struttura di CyaY. Immagine tratta da Cho, S. J., *et al.*, 2000.

Questa struttura (fig.7.6) comprende un sistema di β -sheet antiparalleli formati da sei β -strands consecutivi (β 1- β 6), che sono fiancheggiati su un lato da una lunga α -elica (α 1) N-terminale (residui 1-21) e una piccola α -elica (α 2) C-terminale (residui 87-99). Le connessioni tra gli elementi di struttura secondaria regolari sono piccole, eccetto un *loop*, L1, dopo l'elica α 1, un altro *loop* dopo lo *strand* β 6 e un'elica 3_{10} (residui 55-57) tra gli *strand* β 3 e β 4. Cinque *strand* antiparalleli β 1 (residui 31-55), β 2 (residui 38-42), β 3 (residui 48-54), β 4 (residui 59-63) e β 5 (residui 68-73) formano un piano di foglietti beta. Le due eliche arrangiate in modo parallelo sono adagate su questo piano. Lo

strand $\beta 6$ (residui 78-80) e il *loop* (residui 81-86) che lo collega all'elica $\alpha 2$ formano un piccolo dominio a parte.

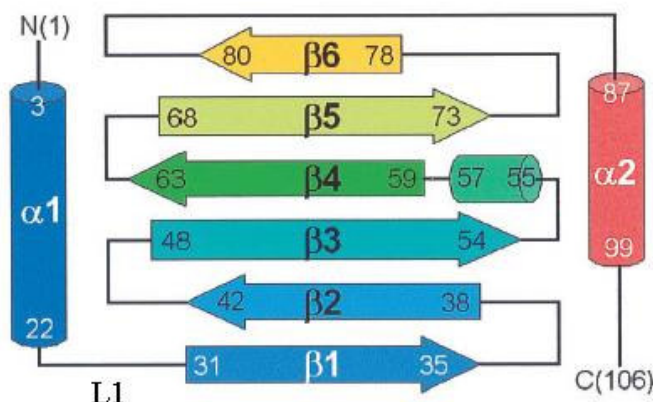


Fig 7.6- Diagramma topologico di CyaY. La figura è stata presa dalla letteratura [Cho, S. J., *et al.*, 2000] ed opportunamente modificata.

Nella struttura di CyaY i residui aromatici ed alifatici formano un *core* idrofobico ricco di interazioni: Phe-6, Ala-10, Leu-13, Trp-14, Ile-17, Leu-21, Ile-30, Leu-39, Ile-41, Phe-43, Ile-49, Ile-51, Val-60, Leu-62, Phe-71, Trp-78, Phe-87, Leu-90, Leu-91, Ala-94, Ala-95, Val-103 e Phe-105.

Di particolare importanza è la distribuzione di cariche negative sulla superficie esterna della proteina che è marcatamente asimmetrica essendo concentrata nella regione N-terminale. L'interfaccia tra l'elica $\alpha 1$ ed il *loop* L1 è composta da numerosi residui acidi esposti: Asp-3, Glu-5, Asp-11, Glu-18, Glu-19 e Asp-22, Asp-23 appartenenti all'elica, e Asp-25, Asp-27 e Asp-29,

appartenenti al *loop* L1. Due ulteriori residui carichi negativamente, Asp-31 e Glu-33 si trovano nello *strand* $\beta 1$. Nella regione centrale del beta *sheet*, $\beta 2$ – $\beta 5$, non ci sono, invece, gruppi acidi.

7.4. COORDINAZIONE DEGLI IONI Co(II) E Eu(III) NELLE STRUTTURE DI CYAY IN FORMA LEGATA

Dalla descrizione delle strutture affinate di CyaY si evince che la regione $\alpha 1$ -L1- $\beta 1$ possiede una distribuzione di carica negativa che dovrebbe favorire il legame di ioni carichi positivamente ed è infatti in questa regione che sono stati trovati gli ioni cobalto ed europio nei modelli affinati di CyaY in forma legata.

Per quanto riguarda la struttura di CyaY-Co il modello finale presenta due siti di legame con il cobalto (M1 e M2).

Lo ione cobalto in M1 è legato all'OE2 di Glu-33 (2.1 Å) e a quattro molecole di acqua (2.3 Å, 2.1 Å, 1.8 Å, 2.3 Å) in modo da formare una geometria ottaedrica distorta in cui la sesta posizione di coordinazione non è ben definita. Due delle quattro molecole di acqua fanno da ponte attraverso legami ad idrogeno con il carbonile di Gln-97 di una molecola riportata per simmetria (fig. 7.7). La conformazione della catena laterale del Glu-33 è molto simile a quella adottata nella forma nativa.

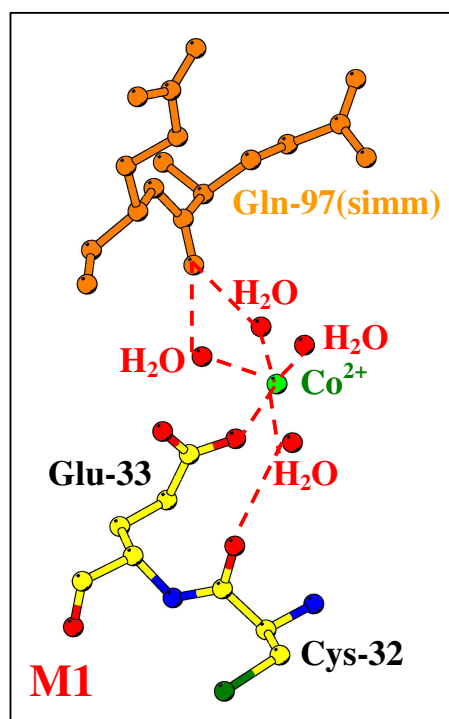


Fig.7.7- Sito di legame M1 in cui lo ione cobalto (in verde) è legato al residuo Glu-33 e a quattro molecole di acqua due delle quali sono a ponte con Gln-97 di una molecola riportata per simmetria (in arancio). Le interazioni tra atomi sono riportate in rosso. La figura è stata ottenuta con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

In M2 (fig.7.8) lo ione adotta una geometria approssimativamente ottaedrica essendo legato a due residui e a quattro molecole d'acqua: OD1 di Asp-3 (2.1 Å), NE2 dell'His-58 (2.2 Å), e quattro molecole di solvente che distano dal cobalto 2.1, 2.0, 2.1, 2.0 Å, rispettivamente. Queste interazioni sono confermate da una chiara densità elettronica calcolata a $2\sigma(\rho)$. His-58 e tre acque sono complanari. Gli angoli tra due atomi legati ed il cobalto sono tutti

prossimi a 90° . L'angolo apicale prossimo a 160° conferma la geometria ottaedrica di questo cobalto. I due residui che legano il metallo subiscono solo piccoli spostamenti rispetto alla loro posizione nella struttura della forma nativa.

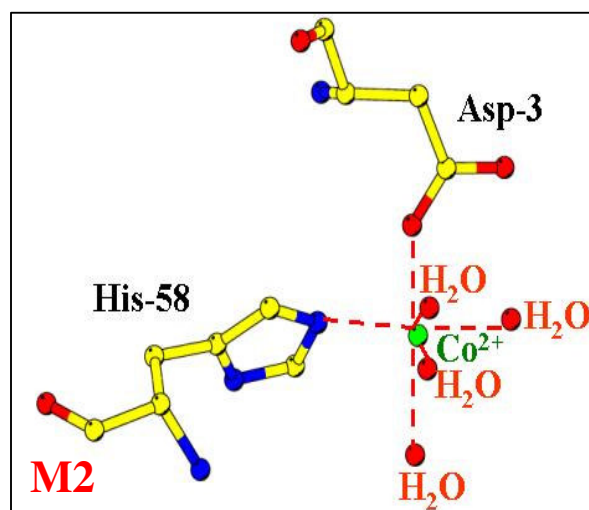


Fig.7.8- Sito di legame M2 in cui lo ione cobalto (in verde) è legato a Asp-3, His-58 e a quattro molecole di acqua. Le interazioni del cobalto sono riportate in rosso. La figura è stata ottenuta con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

Nelle strutture di CyaY-Eu è presente un sito di coordinazione (S1) in prossimità di Glu-33 molto simile al sito M1 trovato nel caso delle strutture di CyaY-Co (fig. 7.9) in cui lo ione Eu^{3+} è legato a Glu-33 (2.4 Å) e a quattro molecole di acqua (2.4 Å, 2.5 Å, 2.5 Å, 2.6 Å). La distanza tra le posizioni occupate dagli ioni Co(II) e Eu(III) nei rispettivi siti di coordinazione M1 e S1 è di 0.7 Å.

Le strutture di CyaY-Eu hanno inoltre rivelato anche altri quattro nuovi siti di interazione (S2, S3, S4, S5).

In particolare per quanto riguarda il sito S2 (fig. 7.10) in esso lo ione metallico (Eu^{3+}) è coordinato ad Asp-3 (2.4 Å) come Co^{2+} in M2 solo che in questo caso l'altro residuo della proteina coinvolto nell'interazione non è His-58 ma Glu-55 (2.8 Å) più due molecole di acqua (1.9 e 2.1 Å).

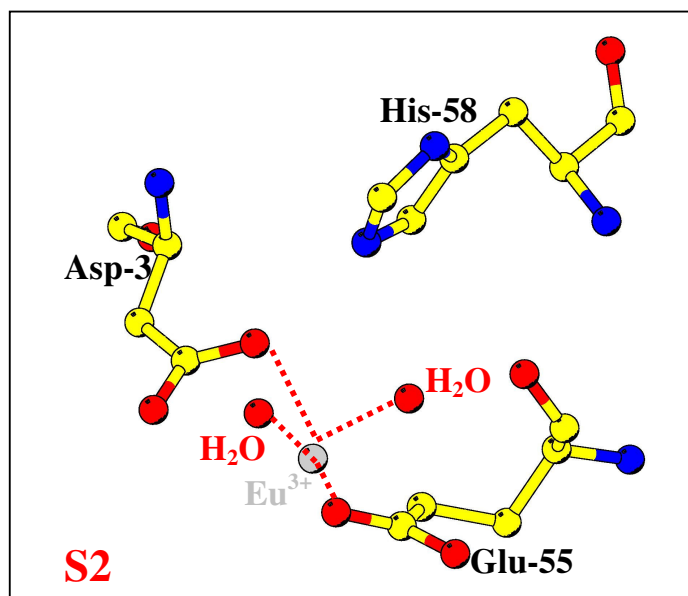


Fig.7.10- Sito di legame S2 in cui lo ione europio (in grigio) è legato a Asp-3, Glu-55 e a due molecole di acqua. Le interazioni dell'eurobio sono riportate in rosso. La figura è stata ottenuta con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

Questa diversa coordinazione dei due ioni metallici che coinvolge la stessa regione della proteina (in prossimità del residuo Asp-3) potrebbe essere dovuta a un diverso ingombro sterico da parte dei due cationi in esame (Co(II) e Eu(III)) che produrrebbe come conseguenza un diverso stato di

protonazione del residuo His-58 che cambia conformazione nelle due strutture considerate. La distanza tra Co(II) e Eu(III) nei rispettivi siti M2 e S2 è di 1.9 Å.

Un nuovo sito di legame (S3) è vicino al sito S1 con una distanza ione-ione di 6.1 Å e due molecole di acqua che fanno da ponte tra gli ioni (fig.7.11a). I residui della proteina coinvolti nell'interazione con il terzo ione metallico sono Asp-29 (2.7 Å) e Asp-31 (2.1 Å); quattro molecole di acqua completano la coordinazione (1.5 Å, 2.2 Å, 2.0 Å, 1.8 Å). Le catene laterali di Asp-29 e Asp-31 adottano una conformazione diversa rispetto a quella presente nella forma nativa (fig.7.11b).

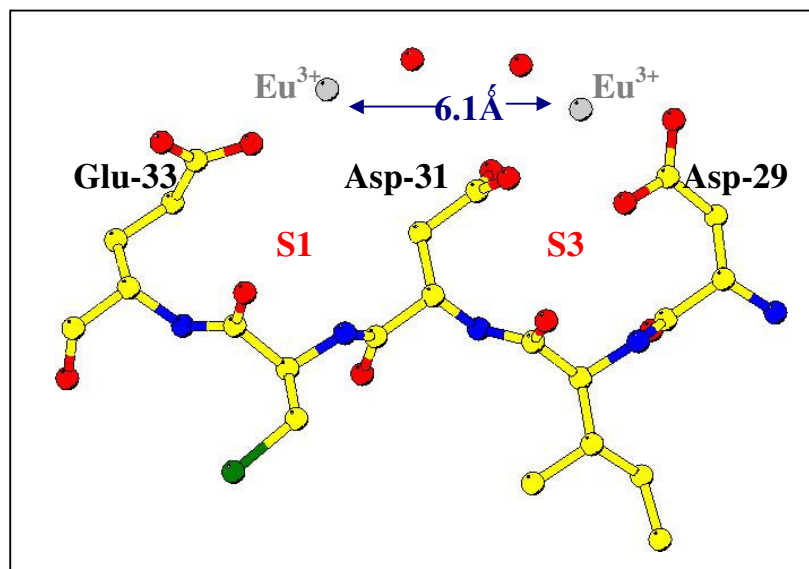


Fig.7.11a- Siti di legame S1 e S3 in cui i due ioni europio (in grigio) sono posti ad una distanza di 6.1 Å. La figura è stata ottenuta con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

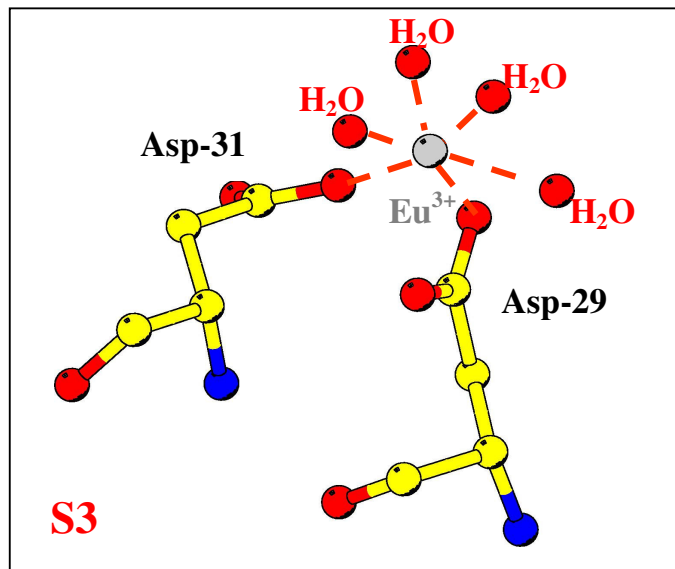


Fig.7.11b- Sito di legame S3 in cui lo ione europio (in grigio) è legato a Asp-29, Asp-31 e quattro molecole di acqua. Le interazioni dell'eurobio sono riportate in rosso. La figura è stata ottenuta con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

Gli altri due siti (S4 e S5) coinvolgono residui le cui catene laterali non hanno densità ben definite nella struttura di Ca-CyaY in forma nativa. In particolare Eu(III) è legato in S4 a Glu-19 (2.7 Å), Asp-23 (2.8 Å e 2.6 Å) e due molecole di acqua (1.7 Å, 1.9 Å) (fig.7.12).

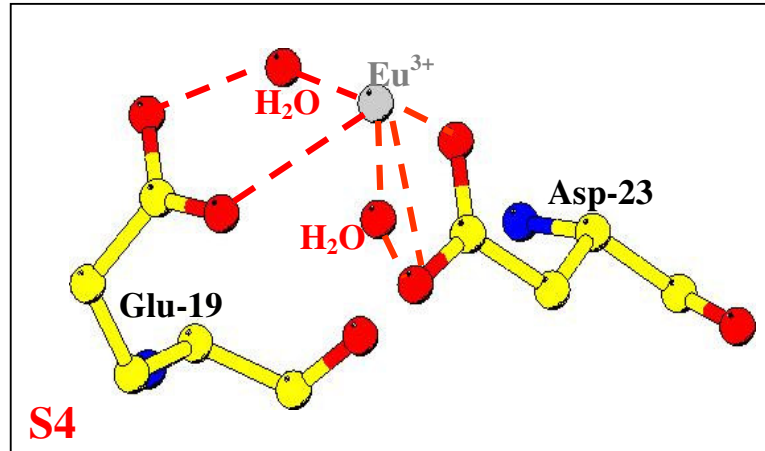


Fig.7.12- Sito di legame S4 in cui lo ione europio (in grigio) è legato a Glu-19, Asp-23 e due molecole di acqua. Le interazioni dell'europio sono riportate in rosso. La figura è stata ottenuta con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

In S5 lo ione europio fa invece da ponte tra il residuo Asp-76 (1.9 Å) e il residuo Asp-27 (2.4 Å) di una molecola riportata per simmetria; la geometria ottaedrica è completata da quattro molecole di acqua (1.9 Å, 2.1 Å, 3.1 Å, 3.0 Å) (fig.7.13).

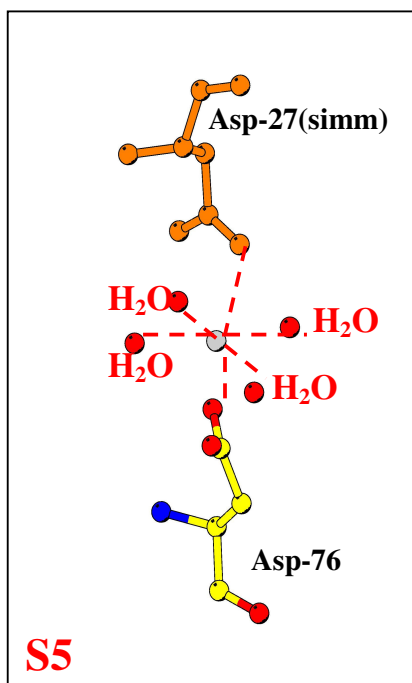


Fig.7.13- Sito di legame S5 in cui lo ione europio (in grigio) è legato a ponte a Asp-76 e a Asp-27 di una molecola riportata per simmetria e a quattro molecole di acqua. Le interazioni dell'europio sono riportate in rosso. La figura è stata ottenuta con il programma BOBSCRIPT [Esnouf, R. M., 1999].

7.5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Per quanto riguarda le geometrie di coordinazione trovate nei sei siti metallici identificati nelle strutture di CyaY in forma legata va innanzitutto sottolineato che nelle proteine spesso si trovano coordinazioni di ioni metallici atipiche. D'altro canto come si può notare anche nella tabella 7.3 nel caso degli ioni cobalto le distanze di legame ione-ligando nelle strutture di CyaY-Co sono prossime alle distanze medie trovate nelle strutture di altre proteine che

pure coordinano il cobalto depositate nel *Protein Data Bank* e nelle strutture di piccole molecole legate al Co(II) depositate nel *Cambridge Data Base*. Le strutture affinate di CyaY-Co confermano il numero di siti di legame del Fe(II) sulla proteina. La differenza tra i risultati di questo lavoro e i precedenti dati [Nair, M., *et al.*, 2004] sul legame del Fe(II) alla proteina riguardano essenzialmente i residui coinvolti nell'interazione. Infatti sulla base dei precedenti studi NMR [Nair, M., *et al.*, 2004] la presenza di ioni bivalenti perturba la regione 20-23 proteina in forma legata rispetto alla forma nativa. D'altra parte la localizzazione degli ioni fatta con i raggi X li posiziona comunque in regioni ad alta densità di carica negativa della proteina che sono conservate sia nei procarioti che negli eucarioti e che quindi possono rivestire un ruolo nella coordinazione dei cationi metallici.

	Distanza di legame (Å)	
M1		
Ossigeno	OD1(Asp-3)	2.2
	H2O	2.3
	H2O	1.8
	H2O	2.3
	H2O	2.1
Azoto	NE2(His-58)	2.1
M2		
Ossigeno	OE2(Glu-33)	2.1
	H2O	2.1
	H2O	2.3
	H2O	2.1
	H2O	2.1
Protein Data Bank		
Ossigeno	Min	1.7
	Med	2.1
	Max	2.5
Azoto	Min	1.9
	Med	2.1
	Max	2.3
Cambridge Data Base		
Ossigeno	Min	1.9
	Med	2.0
	Max	2.2
Azoto	Min	1.9
	Med	2.0
	Max	2.1

Tabella 7.3. Confronto tra le distanze di legame Co(II)-ligando nelle strutture di CyaY-Co (M1 e M2) e le distanze di legame minime, medie e massime Co(II)-ligando in strutture di proteine e piccole molecole che legano il cobalto depositate nel *Protein Data Bank* e nel *Cambridge Data Base* rispettivamente.

Molto poco si sa invece sulle geometrie dei siti di coordinazione dell'eurobio in proteine, pertanto non è possibile fare in questo caso un'analisi statistica analoga a quella condotta per le proteine che coordinano il cobalto. Comunque le poche strutture di proteine legate all'Eu(III) depositate nel *Protein Data Bank* contengono ioni con geometrie e distanze di legame simili a quelle trovate nei modelli affinati in questa tesi.

I risultati dello studio cristallografico mostrano chiaramente che CyaY può legare vari cationi con differenti caratteristiche come nel caso del cobalto e

dell'eurobio che per esempio hanno raggi ionici molto diversi (Co(II) 0.838 Å, Eu(III) 1.087 Å). Questo è possibile perché tutti i siti di legame sono sulla superficie esterna della proteina e la coordinazione coinvolge pochi residui di CyaY e molte molecole di acqua. Inoltre l'interazione della proteina con i metalli non induce cambiamenti nella catena principale di CyaY, solo le catene laterali di due residui coinvolti nel legame subiscono un riarrangiamento per far posto allo ione metallico.

Tutti questi risultati indicano che la proteina pur presentando siti specifici di legame nel caso di Co(II) e Eu(III) non presenta specificità per il legame con lo ione ferro. D'altra parte i numerosi tentativi fatti per ottenere complessi di Fe-CyaY allo stato cristallino non hanno dato risultati positivi. Questo può essere dovuto alle condizioni di cristallizzazione e di diffusione che potrebbero inibire il legame del ferro alla proteina che è caratterizzato da una modesta costante di affinità (3.8 μM). Un risultato analogo è stato ottenuto per lo ione calcio.

I risultati ottenuti da questo studio confermano la bassa affinità di CyaY per il ferro e sembrano indicare che la proteina non può esplicare il suo ruolo di trasportatore del ferro in forma monomeric. Il legame con il ferro potrebbe essere stabilizzato o dalla formazione di aggregati multimerici, come ipotizzato in un recente articolo [Layer, G., *et al.*, 2006], o dall'interazione con un'altra proteina.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W.G., Naylor, S., Benson, L.M., Gacy, A.M. Isaya, G.J. (2000). *Hum. Genet.*, **67**, 549.

Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A.S., Martin, S., Pastore, A. (2002). *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1865.

Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Hanh Huynh, B., & Dean, D.R. (2000). *Biochemistry* **39**, 7856.

Antonini, E. & Brunori, M. (1971). North-Holland Publ. Co, Amsterdam-London.

Arnold, E.V., Bohle, D.S., Jordan, P.A. (1999). *Biochemistry*, **38**(15), 4750.

Baldwin, J. & Chothia, C. (1979). *J. Mol. Biol.*, **129**, 175.

Baron, C.P. & Andersen, H.J. (2002). *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3887.

Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Herinksen, A., Hajdu, J. (2002). *Nature.* **417**, 463.

Bigotti, I., Giovenco, S., Giardina, B., Antonimi, E., Brunori, M. & Wyman, J. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* **142**, 274.

Boffi, A., Takahashi, S., Spagnuolo, C., Rousseau, D.L. & Chiancone, E. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 20437.

Bonaventura, C., Crumbliss, A.L. & Weber, R.E. (2004). *Acta Physiol. Scandinava*, **182**, 245.

Bou-Abdallah, F., Adinolfi, S., Pastore, A., Laue, T.M., Chasteen, N.D. (2004). *J. Mol. Biol.*, **341**, 605.

Brautigam, D.L., Feinberg, B.A., Hoffman, B.M., Margoliash, E., Peisach, J. & Blumberg, W.E. (1977). *J. Biol. Chem.* **252**, 574.

Brittain, T. (1987). *Comp. Biochem. Physiol.* **86B-3**, 473.

- Brittain, T. (2005). *Journal of Inorganic Biochemistry*, **99**, 120.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., De Lano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L. (1998). *Acta Crystallogr. D* **54**, 905.
- Bunn, H.F. & Forget, B.G. (1986). W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Camardella, L., Caruso, C., D'Avino, R., di Prisco, G., Rutigliano, B., Tamburini, M., Fermi, G., Perutz, M.F. (1992). *J. Mol. Biol.* **224**, 449.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, P.F., *et al.* (1996). *Science* **271**, 1423.
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S.J., Faucheux, B., Trouillas, P., Authier, F. J., Durr, A., Mandel, J.L., Vescovi, A., Pandolfo, M., Koenig, M. (1997). *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1771.
- Cavadini, P., O'Neill, H.A., Benada, O., Isaya, G. (2002). *Hum. Mol. Genet.*, **33**, 217.
- Chelli, R., Gervasio, F.L., Procacci, P., Schettino, V. (2002). *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6133.
- Cho, S.J., Lee, M.G., Yang, J.K., Song, H.K., Suh, S.W. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 8932.
- Cook, J.D., Bencze, K.Z., Jankovic, A.D., Crater, A.K., Busch, C.N., Bradley, P.B., Stemmler, A.J., Spaller, M.R. & Stemmler, T.L. (2006). *Biochemistry* **45**(25), 7767.
- D'Avino, R., Caruso, C., Tamburrini, M., Romano, M., Rutigliano, B., Polverino de Laureto, P., Camardella, L., Carratore, V. & di Prisco, G. (1994). *J. Biol. Chem.* **269-13**, 9675.
- Della Longa, S., Arcovito, A., Benfatto, M., Congiu-Castellano, A., Girasole, M., Hazemann, J.L. & Lo Bosco, A. (2003). *Biophys. J.* **85**(1), 549.

- Derewenda, Z., Dodson, G., Emsley, P., Harris, D., Nagai, K., Perutz, M. & Reynaud, J.P. (1990). *J. Mol. Biol.* **211**, 515.
- De Vries, A.L. (1983). *Annu. Rev. Physiol.* **45**, 245.
- Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.I., Ristow, M. & Shoelson, S.E. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 30753.
- Ding, H., Clark, R.J., & Ding, B. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 37499.
- di Prisco, G. (1998). Springer, Milan, Italy, pp. 339.
- Durr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J.L., Brice, A., Koenig, M. (1996). *N. Engl. J. Med.* **335**, 1169.
- Esnouf, R. M. (1999). *Acta Crystallog.*, D **55**, 938-940.
- Everse, J., Johnson, M.C., Marini, M.A. (1994). *Methods Enzymol.* **231**, 547.
- Fedeli, D., Tiano, L., Gabbianelli, R., Caulini, G.C., Wozniak, M., Falcioni, G. (2001). *Comparative Biochem. and Physiol. B.* **130**, 559.
- Feng, L., Zhou, S., Gu, L., Gell, D.A., Mackay, J.P., Weiss, M.J., Gow, A.J. & Shi, Y. (2005). *Nature.* **435**, 697.
- Fermi, G., Perutz, M.F., Shaanan, B. & Foume, R. (1984). *J. Mol. Biol.* **175** (2),159.
- Flint, D.H. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 16068.
- Garlick, R. L., Miller, B. J. & Riggs, A. F. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.* **194**, 13.
- Gervasio, F.L., Chelli, R., Procacci, P., Schettino, V. (2002). *Proteins.* **48**, 117.
- Giangiacomo, L., D'Avino, R., di Prisco, G. & Chiancone, E. (2001). *Biochemistry.* **40**, 3062.
- Gordon, D.M., Shi, Q., Dancis, A., Pain, D. (1999). *Hum. Mol. Genet.* **8**, 2255.

- He, Y., Alam, S.L., Proteasa, S.V., Zhang, Y., Lesuisse, E., Dancis, A. & Stemmler, T.L. (2004). *Biochemistry*, **43**, 16254.
- Hill, A. V. (1910). *J. Physiol.* **40**, 4P.
- Hoff, K.G., Silberg, J.J. & Vickery, L.E. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7790.
- Hooft, R.W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E.E. (1996). *Nature* (London) **381**, 272.
- Ilari, A., Bonamore, A., Farina, A., Johnson, K.A., Boffi, A. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 23725.
- Ito, N., Komiyama, N.H., Fermi, G. (1995). *J. Mol. Biol.* **250**, 648.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991). *Acta Crystallogr. A* **47**, 110.
- Knight, S.A., Sepuri, N.B., Pain, D. & Dancis, A. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 18389.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Koenig, M. (1998). *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1485.
- Krebs, C., Agar, J.N., Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., Hahn Huynh, B. & Johnson, M.K. (2001). *Biochemistry* **40**, 14069.
- Lange, H., Muehlenhoff, U., Denzel, M., Kispal, G. & Lill, R. (2004). *J. Biol. Chem.*, **279**, 29101.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M. (1993). *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283.
- Layer, G., de Choudens, S.O., Sanakis, Y. & Fontecave, M. (2006). *J. Biol. Chem.* **281**(23), 15727.
- Lesuisse, E., Santos, R., Matzanke, B.F., Knight, A.A.B., Camadro, J.M., Dancis, A. (2003). *Hum. Mol. Genet.* **12**, 879.
- Levy, A. Walker, J.C. & Rifkind, J.M. (1982). *J. Appl. Phys.* **53**, 2066.
- Levy, A. & Rifkind, J.M. (1985). *Biochemistry* **24**, 6050.

- Lill, R. & Kispal, G. (2000). *Trends Biochem. Sci.* **25**, 352.
- Lodi, R., Cooper, J.M., Bradley, J.L., Manners, D., Styles, P., Taylor, D.J., Schapira, A.H., (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11492.
- Mansy, S.S., Wu, G., Surerus, K.K. & Cowan, J.A. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 21397.
- Manwell, C. (1960). *Ann. Rev. Physiol.* **22**, 191.
- Mazzarella, L., D'Avino, R., di Prisco, G., Savino, C., Vitagliano, L., Moody, P.C., Zagari, A. (1999). *J. Mol. Biol.* **287**, 897.
- Mazzarella, L., Bonomi, G., Lubrano, M.C., Merlino, A., Riccio, A., Vergara, A., Vitagliano, L., Verde, C., di Prisco, G. (2006a). *Proteins* **62**(2), 316.
- Mazzarella, L., Vergara, A., Vitagliano, L., Merlino, A., Bonomi, G., Scala, S., Verde, C., di Prisco, G. (2006b). *Proteins* **65**(2), 490.
- McGaughey, G.B., Gagne', M. & Rappe', A.K. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 15458.
- Mitchell, D.T., Kitto, G.B. & Hackert, M.L. (1995). *J. Mol. Biol.* **251**, 421.
- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. (1965). *J. Mol. Biol.* **12**, 88.
- Mühlenhoff, U., Richardt, N., Ristow, M., Kispal, G. & Lill, R. (2002). *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2025.
- Musco, G., Stier, G., Kolmerer, B., Adinolfi, S., Martin, S., Frenkiel, T., Gibson, T., Pastore, A. (2000). *Structure (London)* **8**, 695.
- Mueser, T.C., Rogers, P.H. & Arnone, A. (2000). *Biochemistry* **39**, 15353.
- Nair, M., Adinolfi, S., Kelly, G., Frenkiel, T.A., Temussi, P., Pastore, A. (2003) *Journal of Biomolecular NMR* **27**, 403.
- Nair, M., Adinolfi, S., Pastore, C., Kelly, G., Temussi, P., Pastore, A. (2004) *Structure*, **12**, 2037.

- Navaza, J. (1994). *Acta Crystallogr. A* **50**, 157.
- O'Neill, H.A., Gakh, O., Park, S., Cui, J., Mooney, S.M., Sampson, M., Ferreira, G.C. & Isaya, G. (2005). *Biochemistry* **44**, 537.
- Otwinowski, Z. (1993). W. Wolf, P. R. Evans & A. G. W. Leslie, 80. Warrington: Daresbury Laboratory.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307.
- Ownby, D.W., Zhu, H., Schneider, K., Beavis, R.C., Chait, B.T. & Riggs, A.F. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 13539.
- Perutz, M.F. (1970). *Nature* **228**, 726.
- Perutz, M.F., Wilkinson, A.J., Paoli, M. & Dodson, G.G. (1998). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 1.
- Rachmilewitz, E.A., Peisach, J. & Blumberg, W.E. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**, 3356.
- Rachmilewitz, E.A. (1974). *Semin. Hematol.* **11**, 441.
- Ramazzotti, A., Vanmansart, V., Foury, F. (2004). *FEBS Letters* **557**, 215.
- Riccio, A., Vitagliano, L., di Prisco, G., Zagari, A. & Mazzarella, L. (2001). *Acta Crystallogr. D* **57**, 1144.
- Riccio, A., Vitagliano, L., di Prisco, G., Zagari, A. & Mazzarella, L. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci* **99-15**, 9801.
- Richards, M.P. & Hultin, H.O. (2002). *J. Agric. Food Chem.* **50**, 555.
- Richards, M.P. & Dettmann, M.A. (2003). *J. Agric. Food Chem.* **51**(13), 3886.
- Rifkind, J.M., Abugo, O., Levy, A. & Heim, J. (1994). *Methods Enzymol.* **231**, 449.
- Riggs, A.F. (1991). *Am. Zool.* **31**, 535.
- Robinson, V.L., Smith, B.B. & Arnone, R. (2003). *Biochemistry* **42**(34), 10113.

- Root R.W. (1931). *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.*, Woodshole **61**, 427.
- Sakamoto, N., Chastain, P.D., Parniewski, P., Ohshima, K., Pandolfo, M., Griffith, J.D., Wells, R.D. (1999). *Mol. Cell.* **3**, 465.
- Scheidt, W.R. & Gouterman, M. (1983). *Iron Porphyrins*, Part I, ed. A. B. P. Lever & H. B. Gray, Addison-Wesley, Reading, MA.
- Sheldrick, G.M. Göttingen University, Germany. <http://shelx.uni-ac.gwdg.de/SHELX/>.
- Schultz, J.B., Dehmer, T., Schols, L., Mende, H., Hardt, C., Vorgerd, M., Burk, K., Matson, W., Dichgans, J., Beal, M.F., Bogdanov, M.B. (2000). *Neurology*, **55**, 1719.
- Schwartz, C.J., Giel, J.L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F.J., Beinert, H. & Kiley, P.J. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14895.
- Silva, M.M., Rogers, P.H., Arnone, A. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 17248.
- Tamburrini, M., Brancaccio, A., Ippoliti, R. & di Prisco, G. (1992). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **292**(1), 295.
- Tame, J.R. (1999). *Trends Biochem. Sci.* **24-10**, 372.
- Vinogradov, S.N., Walz, D.A. & Pohajdak, B. (1992). *Comp. Biochem. Physiol. B*, **103**, 759.
- Vinogradov, S.N., Walz, D.A., Pohajdak, B., Moens, L., Kapp, O.H., Suzuki, T. & Trotman, C.N. (1993). *Comp. Biochem. Physiol. B*, **106**, 1.
- Vitagliano, L., Bonomi, G., Riccio, A., di Prisco, G., Smulevich, G., Mazzarella, L. (2004). *European Journal of Biochemistry* **271**(9), 1651.
- Urbina, H.D., Silberg, J.J., Hoff, K.G., & Vickery, L.E. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 44521.
- Walker, F.A. (2004). *Chem. Rev.* **104**, 589.
- Waugh, S.M. & Low, P.S. (1985). *Biochemistry*, **24**(1), 34.

Yoon, T., Cowan, J.A. (2003). *J. Am. Chem. Soc.*, 2003. **125**, 6078.

Yoon, T., Cowan, J.A. (2004). *J. Biol.Chem.* **279**, 25943.

Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H. & Dean, D.R. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 13264.