



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Comunità Europea
Fondo Sociale Europeo

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

TESI DI DOTTORATO, 2007

**CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE E MOLECOLARE
DEL FATTORE DI ALLUNGAMENTO G DA
*PSEUDOALTEROMONAS HALOPLANKTIS***

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

**RELATORE: PROF. PAOLO ARCARI
CORRELATORE: PROF. MARIOROSARIO MASULLO**

COORDINATORE: PROF. GIUSEPPE D'ALESSIO

RINGRAZIAMENTI

Questi 6 anni trascorsi nel laboratorio mi hanno forgiato sia dal punto di vista professionale che caratteriale. Ho avuto la fortuna di convivere con persone splendide che hanno diviso con me momenti di gioia e di dolore dandomi tanto affetto.

Un ringraziamento va al mio docente guida il Prof. Paolo Arcari che mi ha seguito in tutti questi anni e che mi ha accompagnato (spesso anche a casa!) in questo percorso scientifico. Ringrazio tantissimo, e le parole non sono sufficienti, il Prof. Mariorosario Masullo per il quale nutro una profonda stima ed affetto per quanto mi ha insegnato in questi anni di dottorato e per la sua costante presenza e disponibilità. Ringrazio il Prof. De Vendittis che è stato un buon consigliere nei momenti di necessità, il Prof. Raimo per la sua preparazione scientifica e simpatia, il Prof. Dello Russo per avermi dato la possibilità di fare esperienza di didattica ed il Prof. Corso per la sua discreta vicinanza. Inoltre, ringrazio la controrelatrice Dott.ssa Cafaro per i suoi utili consigli e la disponibilità dimostratami.

Inoltre, voglio ringraziare la Dott.ssa Annalisa Lamberti che mi sono ritrovata sempre nei momenti “topici” della mia vita con molto calore, Dott.ssa Rippa che con il suo sorriso minimizza i problemi, Dott.ssa Ruocco che mi dà sempre consigli utili e pratici.

Ringrazio le “Ruggiero-girls”: Margherita, Angela e Anna, la mia ex-tesista Sara, Roberta, una ragazza positiva e solare, Giovanna che ho scoperto da poco, affettuosissima, sincera e propositiva che spesso mi ha dato tanto affetto che io ricambio con la stessa intensità, Carmen, una simpatica dottoranda “online”, Imma, Pierluigi, Ivano, Claudia, Pasquale, il Sig. Enzo, Maria, Alba,

Rita, Fiammetta, Simona, Ilaria, Giusy, le due Francesca, Angela e Monica (la dolce sposina del laboratorio).

Dedico questa tesi a mio padre ed a mia nonna che mi hanno sempre amato e che io amo tanto, nonostante non siano più con me. A mia madre (donna dolcissima ed unica), mio nonno e mio fratello che mi hanno dato in passato e tutt'ora mi investono di tanto amore e stima, Leo che ogni giorno arricchisce le mie giornate con il suo amore e tanta comprensione. Ringrazio tutti i miei zii triestini e romani e rispettivi cugini, Valentina, la mia cognatina, Olimpia, Leonardo, Teresa, Lorenzo, Melania, Davide, Gianluigi e tutti quanti gli altri.

Grazie a tutti!

RIASSUNTO

Nel seguente lavoro di tesi sono state studiate le proprietà funzionali e molecolari del fattore di allungamento EF-G dell'eubatterio psicrofilo Antartico *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Ph). PhEF-G, anche a bassa temperatura, catalizza la sintesi proteica *in vitro* che è inibita dall'acido fusidico, un antibiotico steroideo. PhEF-G interagisce con il GDP in presenza dei ribosomi isolati da *P. haloplanktis* e dell'acido fusidico con un'affinità simile a quella riscontrata con EF-G di *Escherichia coli*. Inoltre, esso possiede un'attività GTPasica ribosoma-dipendente che è inibita in modo competitivo dal GDP, dal GppNHp un analogo non idrolizzabile del GTP e dall'inibitore della sintesi proteica, il ppGDP. Esperimenti di termofilicità hanno dimostrato che le attività di sintesi proteica *in vitro* e GTPasica ribosoma-dipendente raggiungono un valore massimo a temperature di circa 16-26°C superiori a quella di crescita del micro-organismo (4-20°C). Lo studio della termostabilità ha dimostrato invece che il profilo di inattivazione al calore dell'attività GTPasica di PhEF-G ha una temperatura di semi-inattivazione pari a 46°C, un valore più basso di quello ottenuto dal profilo di denaturazione termica agli UV (57°C) o in fluorescenza (62°C). La significativa differenza tra le temperature di semi-inattivazione e semi-denaturazione indicano che il dominio catalitico dell'enzima è molto più sensibile all'inattivazione termica rispetto agli altri quattro domini di regolazione che costituiscono la proteina. Questo comportamento, comune anche in altri enzimi psicrofili, ne conferma la loro flessibilità. Infine, un modello 3D di PhEF-G, basato sulla struttura di EF-G di un eubatterio termofilo, ha permesso di evidenziare differenze a livello di alcune anse di collegamento tra strutture secondarie della proteina.

SUMMARY

In this work the molecular and functional properties of the elongation factor EF-G from psychrophilic Antarctic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Ph) were studied. PhEF-G catalyzed protein synthesis *in vitro* even at low temperature that was inhibited by fusidic acid, a steroidal antibiotic. PhEF-G interacted with GDP only in the presence of *P. haloplanktis* ribosome and fusidic acid with an affinity similar to that displayed by *Escherichia coli* EF-G. The psychrophilic translocase elicited a ribosome-dependent GTPase that was competitively inhibited by GDP, the slowly-hydrolyzable GTP analog GppNHp, and the protein synthesis inhibitor ppGDP. The thermophilicity of PhEF-G reached its maximum at least 16-26°C beyond the growth temperature of *P. haloplanktis* (4-20°C). The heat inactivation profile of the ribosome-dependent GTPase of PhEF-G gave a temperature for half inactivation (46°C), significantly lower than that for half denaturation measured by either UV- (57°C) or fluorescence-melting (62°C). Therefore, the significant difference between the temperature for half inactivation and half denaturation could be reminiscent of the finding that the catalytic domain of the enzyme is more prone to heat inactivation than the other four domains constituting the elongation factor. This behaviour is common to other psychrophilic enzymes, and is known as local flexibility. Finally, a model of the tridimensional structure of PhEF-G is obtained using as template the 3D-structure of EF-G isolated from the thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus* (TtEF-G). Only few differences are found, localized at the level of loops connecting some secondary structure elements of the protein.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 <i>Scopo ed oggetto della ricerca</i>	5
2. MATERIALI E METODI	7
2.1 <i>Materiali</i>	7
2.2 <i>Metodi di analisi per le proteine</i>	8
2.3 <i>Purificazione del DNA genomico da P. haloplanktis</i>	9
2.4 <i>Espressione eterologa di PhEF-G</i>	10
2.5 <i>Dosaggio di sintesi proteica in vitro</i>	11
2.6 <i>Dosaggio dell'attività GTPasica</i>	12
2.7 <i>Dosaggio del legame di [³H]GDP</i>	13
2.8 <i>Stabilità termica</i>	14
2.9 <i>Purificazione dei ribosomi da P. haloplanktis</i>	14
2.10 <i>Analisi mediante Northern blotting</i>	15
2.11 <i>Metodi di bioinformatica</i>	16
3. RISULTATI	17
3.1 <i>Clonaggio del gene codificante per il fattore di allungamento PhEF-G</i>	17
3.2 <i>Espressione e purificazione di PhEF-G ricombinante</i>	22
3.3 <i>Proprietà molecolari e funzionali di rPhEF-G</i>	25
3.4 <i>rPhEF-G catalizza la sintesi di poli(Phe) diretta da poli(U)</i>	25
3.5 <i>rPhEF-G catalizza un'attività GTPasica ribosoma-dipendente</i>	27
3.6 <i>rPhEF-G lega il GDP in presenza di acido fusidico e ribosomi</i>	30
3.7 <i>Effetto della temperatura sull'attività enzimatica di rPhEF-G</i>	31
3.8 <i>Effetto della temperatura sulla stabilità di rPhEF-G</i>	32
3.9 <i>Modello della struttura 3D di PhEF-G</i>	33
4. DISCUSSIONE	35
5. BIBLIOGRAFIA	40

INDICE DELLE FIGURE E TABELLE

Figura 1. <i>Ruolo schematico di EF-G nel ciclo di allungamento della sintesi proteica</i>	4
Figura 2. <i>Gene codificante per PhEF-G</i>	18
Figura 3. <i>Northern blotting dell'RNA totale di P. haloplanktis</i>	19
Figura 4. <i>Dendrogramma</i>	20
Figura 5. <i>Cromatogramma ottenuto dalla cromatografia per affinità</i>	23
Figura 6. <i>Analisi mediante SDS-PAGE delle frazioni eluite dalla colonna di Ni²⁺-Agarosio</i>	23
Figura 7. <i>Analisi mediante Western blotting dei campioni 1 e 2 provenienti dalla cromatografia per affinità</i>	24
Figura 8. <i>Attività GTPasica ribosoma-dipendente dei campioni 1 e 2 provenienti dalla cromatografia per affinità</i>	24
Figura 9. <i>Sintesi proteica catalizzata da rPhEF-G</i>	26
Figura 10. <i>Inibizione della sintesi proteica catalizzata da rPhEF-G da parte dell'acido fusidico</i>	26
Figura 11. <i>Specificità per il substrato nell'attività trifosfatase di rPhEF-G</i>	27
Figura 12. <i>Effetto della concentrazione dei ribosomi da P. haloplanktis sull'attività GTPasica di rPhEF-G</i>	28
Figura 13. <i>Effetto della concentrazione dell'acido fusidico sull'attività GTPasica ribosoma-dipendente di rPhEF-G</i>	29
Figura 14. <i>Legame dell'acido fusidico ad rPhEF-G</i>	30
Figura 15. <i>Termofilicità della sintesi proteica catalizzata da rPhEF-G</i>	31
Figura 16. <i>Termofilicità della GTPasi catalizzata da rPhEF-G</i>	32
Figura 17. <i>Termostabilità di rPhEF-G</i>	33
Figura 18. <i>Modello della struttura tridimensionale di rPhEF-G</i>	34
Tabella 1. <i>Parametri cinetici e di inibizione della GTPasi ribosoma-dipendente catalizzata da rPhEF-G</i>	29

1. INTRODUZIONE

Gli estremofili sono organismi capaci di colonizzare, con enorme successo, ambienti in cui si riscontrano condizioni di vita estreme. Infatti, essi sono in grado di crescere e sopravvivere, utilizzando meccanismi specifici di adattamento, in presenza di condizioni estreme di pH (acidofili ed alcalofili), di concentrazione salina (alofili), di pressioni idrostatiche (barofili) o di temperatura (ipertermofili, termofili e psicrofili) (Herbert e Sharp, 1992). Negli ultimi anni è stato studiato l'effetto del processo di adattamento di questi micro-organismi attraverso l'analisi delle proprietà strutturali e funzionali delle loro macromolecole biologiche, quali le proteine e gli enzimi (Zuber 1988; Jaenicke e Zavodsky, 1990; D'Amico et al., 2006; Siddiqui e Cavicchioli, 2006; Feller et al., 1996). I risultati ottenuti suggeriscono che la temperatura ottimale dell'attività enzimatica di tali macromolecole rappresenta un compromesso tra la loro inattivazione termica e la velocità della reazione da esse catalizzata. Non esiste, inoltre, una correlazione assoluta fra attività e stabilità; ma, in generale, si può affermare che, ad alte temperature, gli enzimi termofili, sono più stabili e meno efficienti cataliticamente, mentre gli enzimi mesofili sono meno termostabili, ma molto più attivi (Zuber, 1998). Recentemente molti studiosi si sono interessati in modo particolare agli enzimi isolati da micro-organismi psicrofili. Questi ultimi sono caratterizzati da un'alta attività catalitica in un intervallo di temperatura ben definito (4-15°C), nel quale gli enzimi mesofili e termofili presentano una bassa attività (Zuber, 1998; D'Amico et al., 2006; Siddiqui e Cavicchioli, 2006; Feller et al., 1996; Feller e Gerday, 1997; Violot, 2005). Gli enzimi psicrofili sono anche soggetti a cambiamenti conformazionali che favoriscono la loro interazione con il

substrato compensando così la lenta velocità catalitica dovuta alle basse temperature (Feller et al., 1996; Violot, 2005). Tale flessibilità è responsabile della loro instabilità termica, proprietà comune a tutte le proteine psicrofile (D'Amico et al., 2006; Siddiqui e Cavicchioli, 2006; Feller et al., 1996; Feller e Gerday, 1997; Violot, 2005; Hoyoux et al., 2004). La capacità degli psicrofili di sopravvivere e riprodursi alle basse temperature è favorita da “strategie” che hanno permesso il loro insediamento in ambienti molto freddi, dalle profondità marine alle zone polari dove si riscontrano climi più rigidi. Le loro caratteristiche principali sono le seguenti: ridotta fluidità della membrana cellulare; bassa velocità di trascrizione, traduzione e divisione cellulare; denaturazione a freddo delle proteine; “folding” proteico non appropriato e ridotta attività enzimatica (D'Amico et al., 2006). D'altra parte, si è riscontrato che le forze che permettono di conservare la struttura funzionale delle proteine sono le interazioni deboli come i legami a idrogeno, le interazioni elettrostatiche con il solvente ed idrofobiche, nonché una rete di ponti salini. Infatti, negli “enzimi freddi” il numero minore di legami deboli, raffrontato al numero degli stessi legami presenti negli enzimi termofili e mesofili, conferisce alle proteine isolate da organismi psicrofili maggiore flessibilità (Feller e Gerday, 1997).

In linea generale, le caratteristiche biochimiche peculiari che consentono a queste molecole enzimatiche di adattarsi in tali habitat con temperature moderatamente basse sono l'alta efficienza catalitica, la bassa stabilità, l'elevata flessibilità (Georlette et al., 2004) ed una significativa termolabilità (Feller et al., 1996).

Le proteine e gli enzimi psicrofili rappresentano quindi una classe importante di macromolecole nelle quali il rapporto struttura-funzione può essere approfondito anche attraverso il confronto delle loro proprietà con quelle delle omologhe controparti in organismi mesofili e termofili. Tale confronto permette di ampliare le conoscenze riguardo i meccanismi di adattamento degli enzimi psicrofili (D'Amico et al., 2006; Siddiqui e Cavicchioli, 2006) ed inoltre potrebbe fornire, come per gli enzimi termofili, indicazioni sul loro possibile utilizzo in campo biotecnologico (Marx et al., 2004).

Al fine di dare un ulteriore contributo alle conoscenze relative alle proteine psicrofile, si è focalizzata l'attenzione sulle macromolecole coinvolte nel ciclo di allungamento del processo di sintesi proteica ed in particolare sul fattore di allungamento G (EF-G negli eubatteri; EF-2 negli eucarioti ed archeobatteri). EF-G è un enzima ubiquitario e le sue proprietà funzionali e strutturali sono state ampiamente studiate in organismi sia mesofili che termofili (Lucas-Lenard, 1971; Miller e Weissbach, 1977; Kaziro 1978; Stark et al., 2000). EF-G appartiene alla famiglia delle proteine che legano il GTP (Dever et al., 1987) la cui attività è regolata dal passaggio da una forma attiva, legata al GTP, ad una inattiva, complessata con il GDP. Come schematizzato nella Figura 1, il fattore di allungamento catalizza la traslocazione del peptidil-tRNA appena formato dal sito A al sito P del ribosoma, il rilascio del tRNA deacilato dal sito P al sito E (Rheinberger, 1991) ed il contestuale movimento dell'mRNA di un codone. Il processo è reso irreversibile dall'idrolisi del GTP legato ad EF-G e porta al ripristino allo stato libero del sito A in modo che il complesso mRNA-ribosoma ritorni disponibile per l'inizio di un nuovo ciclo

di allungamento (Miller e Weissbach, 1977; Kaziro, 1978; Stark et al., 2000). EF-G è una proteina multifunzionale in quanto, nello svolgimento della sua funzione biologica, interagisce con i nucleotidi guanilici (Lucas-Lenard, 1971;

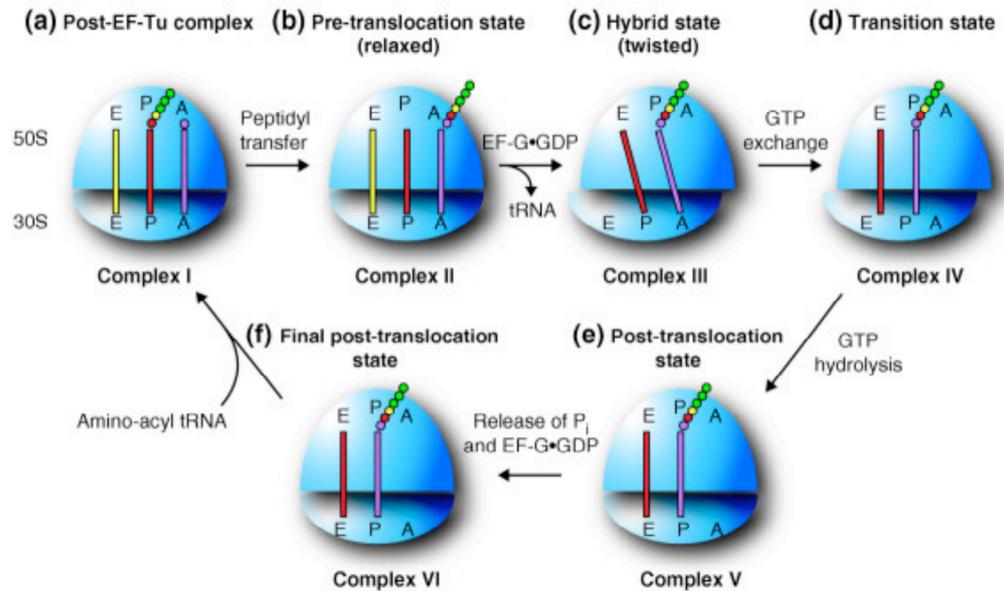


FIGURA 1. Ruolo schematico di EF-G nel ciclo di allungamento della sintesi proteica. Adattata da Fraser e Hershey, 2005.

Klink, 1985) e con il complesso ribosoma-mRNA (Baca et al., 1976; Kaziro, 1978; Klink, 1985; Stark et al., 2000; Peske et al., 2004); inoltre, esplica una attività GTPasica ribosoma-dipendente (Parmeggiani e Sander, 1981; Raimo et al., 1995) e possiede il sito catalico per l'idrolisi del GTP (De Vendittis et al., 1986; Masullo et al., 1989, Raimo et al., 1996). Inoltre, si è riscontrato che antibiotici appartenenti alla famiglia dei fusidani interagiscono in modo specifico con EF-G ed EF-2 (Bodley et al., 1969; Wille et al., 1975; De Vendittis et al., 2002). Tra l'altro, il confronto tra le sequenze amminoacidiche di EF-G ed EF-2 è stato utilizzato per stabilire le relazioni filogenetiche negli

organismi viventi (Creti et al., 1994; Bocchetta et al., 2000). Infine, è stato già condotto un studio approfondito sulle proprietà molecolari e funzionali di EF-2 dall'archeobatterio ipertermofilo *Sulfolobus solfataricus* (Raimo et al., 1992, 1995, 1996; De Vendittis et al., 1999, 2002) e sono stati riportati solo studi preliminari riguardo le proprietà di EF-2 da un archeobatterio psicrofilo (Thomas e Cavicchioli, 2000).

1.1 Scopo ed oggetto della ricerca

La ricerca descritta in questa tesi di dottorato riguarda il processo di sintesi proteica in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125 (*Ph*), un eubatterio Gram-negativo, isolato da sedimenti marini dell'Antartico in grado di crescere nell'intervallo di temperatura 4-20°C (Birolo et al., 2000).

P. haloplanktis ha un genoma costituito da due repliconi di 2700 e 800 kb (Lanoil et al., 1996) e presenta sequenze UP regolanti l'attività trascrizionale (Duilio et al., 2004). Questo batterio ha la capacità di rispondere agli shock termici mediante la produzione di proteine inducibili "GroEL-simili" (Tosco et al., 2003) e proteine "AFPs" capaci di legarsi ai cristalli di ghiaccio (Tosco et al., 2003; D'Amico et al., 2006;). D'altra parte, in questo batterio la sensibilità alle diverse temperature di crescita influenza la sintesi di lipooligosaccaridi ed esopolisaccaridi e determina alterazioni chimiche a carico di alcuni componenti lipidici della membrana (Corsaro et al., 2002, 2004). Inoltre, molti tetralosi ed esopolisaccaridi (EPSs) potrebbero essere dei buoni crioprotettori prevenendo, in tal modo, fenomeni di aggregazione e denaturazione a freddo (D'Amico et al., 2006). Infine, sono stati condotti studi sulle proprietà funzionali e biochimiche delle proteine enzimatiche β -galattosidasi (Hoyoux et al., 2001),

aspartato amminotransferasi (D'Amico et al., 2003) ed α -amilasi (Tutino et al., 2002; Srimathi et al., 2007).

L'oggetto della presente tesi è stata la caratterizzazione molecolare e funzionale del fattore di allungamento EF-G di questo eubatterio. Questa indagine rappresenta un ordinario proseguimento di ricerche pregresse, condotte nello stesso laboratorio, che hanno riguardato la caratterizzazione molecolare e funzionale degli altri due fattori di allungamento EF-Tu ed EF-Ts isolati dallo stesso micro-organismo (Masullo et al., 2000; Raimo et al., 2005). I risultati ottenuti hanno permesso di ampliare le conoscenze sul ciclo di allungamento della sintesi proteica in *P. haloplanktis*.

2. Materiali e Metodi

2.1 Materiali

Gli enzimi di restrizione e di modificazione del DNA sono stati forniti dalla GE Healthcare o dalla Promega. L'isopropil- β -D-tiogalattopiranoside è stato acquistato presso l'Inalco. I nucleotidi e l'acido fusidico (sale sodico) sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich. Il $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (5000 Ci/mmol), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (10000 Ci/mmol) e $[^3\text{H}]\text{GDP}$ (12,4 Ci/mmol) sono stati acquistati presso GE Healthcare. La resina Ni-NTA Agarosio è stata acquistata presso la Qiagen. Le pellicole fotografiche sono della Fuji. Il kit Qiagen, per la purificazione dei plasmidi, è stato acquistato presso la M-Medical; l'Ampli*Taq* DNA polimerasi ed i dNTP sono della Perkin Elmer; la *Pfu* DNA polimerasi è della Promega. Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati dalla Primm.

Nelle trasformazioni con plasmidi sono stati utilizzati i ceppi DH5 α e BL21 (DE3) di *E. coli*. Sono stati utilizzati i seguenti terreni di coltura sterili per la crescita batterica: LB, costituito da estratto di lievito 0,5% (p/v), caseina 1% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), pH 7,2; LB-Agar, costituito da agar 1,5% (p/v), estratto di lievito 0,5% (p/v), caseina 1% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,2. Sono stati, inoltre, usati i seguenti tamponi:

Tampone A: Tris•HCl 20 mM pH 7,8, MgCl₂ 5 mM, β -mercaptoetanolo 7 mM, 10% glicerolo;

Tampone B: Tris•HCl 20 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, KCl 50 mM, β -mercaptoetanolo 7 mM, 10% glicerolo;

Tampone C: Tris•HCl 20 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, β -mercaptoetanolo 7 mM;

RWB: Tris•HCl 20 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, β -mercaptoetanolo 7 mM,

NH₄Cl 500 mM;

RSB: Tris•HCl 20 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, β-mercaptoetanol 7 mM, NH₄Cl 50 mM;

Tampone PBS 10X: sodio monoidrogenofosfato 70 mM, potassio diidrogenofosfato 14,6 mM, NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, pH 7,2;

Tampone TAE: Tris-acetato 40 mM pH 7,9, sodio acetato 6,6 mM, Na₂EDTA 1 mM.

Per il clonaggio sono stati utilizzati i plasmidi pGEM-T Easy (Promega) per il clonaggio dei prodotti di PCR e pET-22b(+) (GE Healthcare) come vettore di espressione. Le cellule di *P. haloplanktis* per la preparazione del DNA e per la purificazione dei ribosomi, [³H]Phe-EctRNA^{Phe} e PhEF-Tu sono stati preparati come riportato (Masullo et al., 2000; Raimo et al., 2005).

2.2 Metodi di analisi per le proteine

La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Bradford (Bradford, 1976), impiegando un kit commerciale (BIO-RAD) e l'albumina di siero bovino come standard. La purezza dei campioni proteici è stata analizzata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 10% in presenza di SDS (SDS-PAGE) e sono stati colorati con Coomassie Brilliant Blue R-250. I campioni proteici sono stati risospesi in Tris•HCl 25 mM pH 8,8, contenente SDS 1% (p/v), β-mercaptoetanol 0,7 M, glicerolo 5% (v/v) e blu di bromofenolo 0,01% (p/v) e, poi, bolliti per 5 min prima di essere caricati sul gel, secondo la procedura descritta da Laemmli (1970). Per la determinazione della massa molecolare dei campioni analizzati sono state impiegate le seguenti proteine di riferimento: transferrina umana (78 kDa), albumina di siero bovino

(66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) ed anidrasi carbonica (29 kDa).

Per l'analisi mediante Western blotting, i campioni proteici separati su SDS-PAGE sono stati elettro-trasferiti su membrana Immobilon P (Millipore) in tampone Tris•HCl 20 mM, glicina 160 mM, pH 8,3, contenente metanolo 10% (v/v). Il filtro è stato incubato prima per 1 h a 25°C in tampone PBS contenente latte in polvere 5% (p/v) e poi per 20 h a 4°C con un anticorpo monoclonale anti-His (Santa-Cruz), diluito 1:500 in PBS, contenente latte 2% (p/v). Il filtro è stato lavato più volte in PBS contenente Tween-20 0,05% (v/v) ed, infine, incubato per 1 h a 25°C con un anticorpo secondario per chemiluminescenza. Il segnale è stato visualizzato mediante il kit SuperSignal West Pico (Pierce).

La massa molecolare delle proteine, in condizioni native, è stata determinata mediante gel-filtrazione su SuperdexTM 75 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrata con tampone B e collegata ad un sistema FPLC operante a 25°C ad un flusso di 0,5 ml/min. La colonna è stata calibrata effettuando corse, in un volume di 250 µl, con 100 µg di BSA (69 kDa), ovoalbumina (46 kDa), anidrasi carbonica (29 kDa), inibitore della tripsina (20 kDa), ribonucleasi A (13 kDa), citocromo C (12 kDa) ed apoprotina (6 kDa), analizzate sia separatamente che in combinazione. Il volume vuoto della colonna è stato misurato utilizzando Blu destrano 2000.

2.3 Purificazione del DNA genomico da *P. haloplanktis*

Per la purificazione del DNA genomico, le cellule di *P. haloplanktis* sono state risospese in un tampone contenente Tris•HCl 10 mM pH 7,8, LiCl 100 mM, Na₂EDTA 10 mM, SDS 1% (p/v) ed omogenizzate con un potter.

Successivamente, sono state eseguite diverse estrazioni in fenolo/cloroformio/alcol isoamilico (25:24:1, v/v) ed i componenti cellulari insolubili sono stati allontanati mediante centrifugazione a 3000 rpm per 15 min a 25°C. Al sovrantante sono stati aggiunti 2,5 volumi di etanolo assoluto e la miscela è stata centrifugata a 3000 rpm per 10 min a 4°C. Il “pellet” di DNA, lavato con etanolo al 70%, è stato lasciato ad asciugare e poi risospeso in acqua sterile. Dopo aggiunta di 1 µg/ml di RNasi A e 50 µg/ml di Proteinasi K, la soluzione è stata incubata a 37°C per 30 min.

Il DNA genomico così ottenuto è stato analizzato su gel di agarosio all'1% in TAE per verificarne la purezza e l'integrità.

2.4 Espressione eterologa di PhEF-G

Il DNA genomico di *Pseudoalteromonas haloplanktis* è stato usato come stampo per l'amplificazione di un frammento di DNA contenente il gene codificante per il fattore PhEF-G, mediante la tecnica della PCR. Tale gene è compreso tra il gene codificante per la proteina ribosomale S7 (*rpS7*) e quello codificante per il fattore di allungamento Tu (PhEF-Tu, AJ249258). Gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione sono stati i seguenti: l'oligo diretto (EFG1) ATGGCiGAA(G)GCiAAC(T)AAA(G)GciTT, sintetizzato partendo dalla sequenza amminoacidica di una regione altamente conservata (*rpS7*) che corrisponde in *Escherichia coli* alla sequenza amminoacidica A₁₄₅EANKAF e l'oligo inverso (EFG2) GATACCACGTTTCGCGTC, corrispondente alla regione del gene sequenziato di PhEF-Tu che codifica per il frammento amminoacidico E₅₆RERGI (Masullo et al., 2000). Il prodotto della PCR (2,3 kb) è stato clonato nel vettore pGEM T-easy e sequenziato. Il

plasmide ricombinante è stato usato come stampo per una successiva amplificazione allo scopo di clonare PhEF-G nel vettore di espressione pET22b(+). L'amplificazione è stata eseguita utilizzando l'oligo diretto AGAGGATCAT(A)TGGCACGTAACAA (EFG3) e l'oligo inverso CAAGCTAAAAA(C)(T)(C)(G)A(G)TACAGCGCG (EFG4). Le basi tra parentesi indicano punti di sostituzione inseriti per creare, in corrispondenza della metionina iniziale, il sito di restrizione *NdeI* nell'oligo diretto e in corrispondenza del codone di stop il sito di restrizione *XhoI* nell'oligo inverso. Il frammento *NdeI-XhoI*, così amplificato, è stato clonato in pET22b(+) e quest'ultimo è stato poi utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* BL21 (DE3). Le cellule trasformate sono state cresciute fino a 0,6 OD₆₀₀ e indotte con 100 µg/ml di IPTG. Dopo centrifugazione a 3000g per 15 min, le cellule sono state risospese con il tampone A e rotte meccanicamente con un distruttore cellulare. L'omogenato grezzo ottenuto è stato centrifugato a 100000g per 2 h ed il sovranatante (S-100) è stato usato come materiale di partenza per la purificazione di PhEF-G ricombinante (rPhEF-G).

2.5 Dosaggio di sintesi proteica in vitro

La sintesi di poli-fenilalanina diretta da poli(U) è stata dosata come riportato (Bhargava et al., 2004). In dettaglio, la miscela di reazione conteneva: Tris•HCl 20 mM pH 7,8, MgCl₂ 5 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, GTP 440 µM, fosfoenolpiruvato 1,25 mM, piruvato chinasi 1,8 U/ml, poli(U) 0,1 mg/ml, ribosomi di *P. haloplanktis* 0,52 µM, [³H]Phe-EctRNA^{Phe} 0,32 µM (radioattività specifica 2100 cpm/pmol), PhEF-Tu 0,5 µM. La quantità di poli(Phe) sintetizzata è stata determinata come materiale insolubile in acido

tricloroacetico bollente. A questo scopo la reazione è stata seguita cineticamente effettuando, ad opportuni intervalli di tempo, prelievi di 30 μ l di miscela che sono stati applicati su filtri di fibra di vetro GFA (Millipore), immersi immediatamente, per bloccarne la reazione, in acido tricloroacetico (TCA) 10% (p/v) a 0°C. I filtri sono stati bolliti per 7 min in TCA 5% (p/v) e trasferiti in TCA 5% (p/v) a 25°C. I filtri sono stati lavati in etere etilico/etanolo (50:50, v/v) e successivamente solo con etere, prima di essere asciugati e contati per la radioattività.

2.6 Dosaggio dell'attività GTPasica

L'attività GTPasica è stata determinata in cinetica con il metodo del fosfomolibdato, misurando la quantità di $^{32}\text{P}_i$ rilasciato dal $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (Sander et al., 1975). La miscela di reazione conteneva rPhEF-G 0,1-0,2 μM , ribosomi 0,5 μM e $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ 75 μM (radioattività specifica 250-500 cpm/pmol) in Tampone C. La reazione è stata bloccata in ghiaccio aggiungendo un pari volume di HClO_4 1M contenente KH_2PO_4 1 mM. I campioni sono stati prima incubati a 0°C per 5 min e poi centrifugati per 10 min a 4°C in modo da rimuovere il precipitato ribosomale. Inoltre, una definita aliquota di sovrantante è stata miscelata con 3 volumi di sodio molibdato 20 mM e 4 volumi di isopropilacetato. I campioni sono stati agitati energicamente per pochi secondi e centrifugati velocemente a freddo. Dalla fase organica è stata prelevata un'aliquota della quale si è determinata la radioattività usando uno scintillatore in fase liquida (Packard). I parametri cinetici della reazione sono stati estrapolati da grafici di Lineweaver-Burk misurando l'idrolisi del GTP a diverse concentrazioni di $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (1-75 μM , radioattività specifica 16500-

220 cpm/pmol). I valori corrispondenti alle costanti di inibizione (K_i) sono stati ottenuti misurando i parametri cinetici relativi all'attività GTPasica ribosoma-dipendente catalizzata da rPhEF-G in presenza di diverse concentrazioni di inibitori.

2.7 Dosaggio del legame di [3 H]GDP

L'abilità di rPhEF-G di legare il GDP è stata messa in evidenza dalla sua capacità di legarsi ai ribosomi solo in presenza di acido fusidico, un antibiotico che blocca la sintesi proteica impedendo la rigenerazione della forma attiva di EF-G legata al GTP. Il complesso formato è stato separato dai reagenti non complessati mediante filtrazione su nitrocellulosa (Baca et al., 1976). La miscela di reazione (100 μ l) conteneva rPhEF-G 0,2-0,5 μ M, ribosomi 0,5-1,0 μ M, acido fusidico 1 mM e [3 H]GDP 5-10 μ M (radioattività specifica 500-700 cpm/pmol) in Tris•HCl 10 mM pH 7,8, magnesio acetato 10 mM, NH₄Cl 10 mM, β -mercaptoetanololo 5 mM. Dopo una incubazione di 15 min a 30°C per raggiungere l'equilibrio, le miscele di reazione sono state poste in ghiaccio e due aliquote di 45 μ l sono state filtrate su filtri di nitrocellulosa pre-equilibrati con il tampone sopra descritto nel quale, però, la concentrazione di acido fusidico era 100 μ M. I filtri sono stati lavati due volte con 1 ml di questo tampone, asciugati e poi ne è stata misurata la radioattività, utilizzando un liquido di scintillazione che diafanizzava i filtri. La costante di dissociazione all'equilibrio è stata ricavata da uno "Scatchard plot" ottenuto da esperimenti condotti a concentrazioni differenti di [3 H]GDP.

2.8 Stabilità termica

La stabilità termica di rPhEF-G è stata determinata sia mediante profili di inattivazione termica che con curve di fusione mediante analisi spettroscopica. Negli esperimenti di inattivazione termica, una soluzione proteica 0,2 mg/ml è stata incubata per 10 min a differenti temperature (30-60°C) e poi i campioni sono stati immediatamente raffreddati in ghiaccio per 30 min. Successivamente, i campioni trattati sono stati analizzati per la loro attività GTPasica ribosoma-dipendente residua, come riportato nel paragrafo 2.6, ad una concentrazione finale di rPhEF-G di 0,2 µM. Le curve di denaturazione agli UV sono state ottenute in un intervallo di temperature di 20-70°C usando lo spettrofotometro termostato con effetto Peltier Cary 1E (Varian). L'aumento della temperatura è stato fissato alla velocità di 0,2°C/min e la differenza di assorbanza a 286 nm e 274 nm è stata registrata ogni °C, normalizzata tra 0 e 100 e riportata in grafico in funzione della temperatura. Le curve di fusione in fluorescenza sono state ottenute fissando l'aumento della temperatura a 0,2°C/min e misurando il segnale della fluorescenza ogni °C. Le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione sono state fissate rispettivamente a 295 e 342 nm, mentre le fenditure di eccitazione ed emissione sono state regolate rispettivamente a 5 e 10 nm. I valori dell'intensità di fluorescenza sono stati corretti per l'effetto del "quenching" dovuto alla temperatura, normalizzati tra 0 e 100% e riportati in grafico in funzione della temperatura. La concentrazione di rPhEF-G, in entrambi gli esperimenti, è 0,2 mg/ml.

2.9 Purificazione dei ribosomi da *P. haloplanktis*

La purificazione dei ribosomi è stata eseguita adattando una procedura di

centrifugazione differenziale come già riportato per i ribosomi di *E. coli* (Sander et al., 1975; De Vendittis et al., 1986). Le cellule di *P. haloplanktis* sono state cresciute a 4°C in LB (Masullo et al., 2000) raccogliendole solo quando hanno raggiunto la fase esponenziale di crescita, ovvero dopo 2-3 giorni di incubazione. Le cellule ottenute da una coltura di 10 litri (35-40 g di pasta cellulare umida) sono state rotte meccanicamente mediante un distruttore cellulare operante a 1,5 kPa. L'omogenato cellulare è stato centrifugato a 30000g in modo da rimuovere i detriti cellulari e le cellule non lisate, mentre il sovrnatante è stato nuovamente ultracentrifugato a 100000g. Il pellet ottenuto dalla centrifugazione è stato usato per la purificazione dei ribosomi mediante procedura di lavaggio con NH₄Cl. A tal scopo, il pellet ribosomale è stato risospeso a 4°C con il tampone RWB sotto gentile agitazione e centrifugato a 30000g per 1,5 h. Il pellet è stato scartato ed il sovrnatante è stato ultracentrifugato a 100000g per 2 h. Il pellet ottenuto è stato risospeso come riportato sopra ed ultracentrifugato a 100000g per 3,5 h su un cuscino di saccarosio al 18% in RWB. Il pellet ottenuto da quest'ultima centrifugazione è stato sospeso in RSB, dializzato contro lo stesso tampone contenente 60% di glicerolo e conservato a -20°C. In questo campione, 1 A₂₆₀ corrisponde a 25 pmol di ribosomi. La purezza dei ribosomi è stata valutata mediante la determinazione della loro attività GTPasica intrinseca come descritto nel paragrafo 2.6.

2.10 Analisi mediante Northern blotting

L'estrazione dell'RNA totale da cellule di *Pseudoalteromonas haloplanktis* in fase stazionaria è stata effettuata utilizzando la metodica del

Trizol (Life technologies) secondo la procedura riportata dal fornitore e descritta in un manuale di tecniche di laboratorio di biologia molecolare (Maniatis et al., 1982). La metodica del Northern blotting prevede la denaturazione dell'RNA mediante incubazione a 65°C, la separazione su gel d'agarosio all'1% ed il trasferimento su membrana di Nytran. Il filtro è stato successivamente ibridato con una sonda molecolare radioattiva specifica.

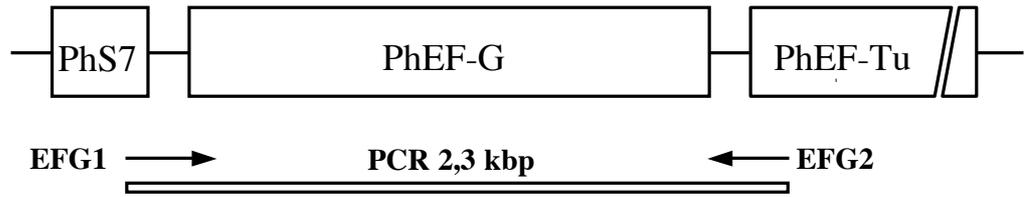
2.11 Metodi di bioinformatica

Gli allineamenti multipli di sequenze amminoacidiche sono stati effettuati usando il software CLUSTALW, disponibile in rete al sito www.expasy.ch. Il modello della struttura tridimensionale di PhEF-G è stato realizzato mediante il server in rete SwissModel (Peitsch, 1996; Guez e Peitsch, 1997) utilizzando come stampo la struttura tridimensionale di EF-G isolato dall'eubatterio termofilo *Thermus thermophilus* (codice PDB 1FNM). Inoltre, la visualizzazione delle molecole proteiche è stata effettuata con il programma *iMol* (<http://www.pirx.com/iMol>).

3. RISULTATI

3.1 *Clonaggio del gene codificante per il fattore di allungamento PhEF-G*

La sequenza parziale codificante per il gene di PhEF-G è stata localizzata nel genoma di *P. haloplanktis* a monte del gene PhEF-Tu (*tufA*) e l'analisi mediante Southern blotting ha indicato la presenza di un'unica copia del gene di PhEF-G (Masullo et al., 2000). Quindi, per clonare e sequenziare l'intero gene di PhEF-G è stata effettuata una reazione di PCR usando come stampo il DNA genomico e come inneschi gli oligonucleotidi EFG1 e EFG2 (Fig. 2a). Il prodotto di PCR ottenuto di circa 2,3 kbp è stato clonato nel vettore pGEM T-easy e sequenziato. Il gene codificante per PhEF-G è costituito da 2115 bp incluso il codone di terminazione. La regione 5'-fiancheggiante è lunga 27 nucleotidi e contiene un potenziale sito di legame dei ribosomi (Shine e Dalgarno, 1974; Barrick et al., 1994), mentre, la regione 3'-fiancheggiante è lunga 62 nucleotidi e contiene un sequenza palindromica in posizione 2129-2140. Inoltre, è presente anche un possibile sito di legame per l'RNA polimerasi in posizione 2078-2085 e 2108-2113 (Pribnow, 1975). Come nel caso dei geni codificanti per PhEF-Tu (Masullo et al., 2000) e PhEF-Ts (Raimo et al., 2000), anche nel gene codificante per PhEF-G i codoni sinonimo più frequentemente usati sono quelli che terminano per A o T. Per determinare la lunghezza del trascritto contenente tale gene, l'RNA totale di *P. haloplanktis* è stato analizzato mediante Northern blotting, usando come sonda molecolare il prodotto di PCR di 2,1 kbp marcato con ³²P. Come riportato in Figura 3, sono stati identificati due trascritti principali corrispondenti a RNA di 3,4 e 1,3 kb, ed un trascritto meno abbondante di 7,5 kb. Entrambi gli RNA di 7,5 e 3,4 kb sono significativamente più lunghi del gene di PhEF-G, mentre il trascritto di

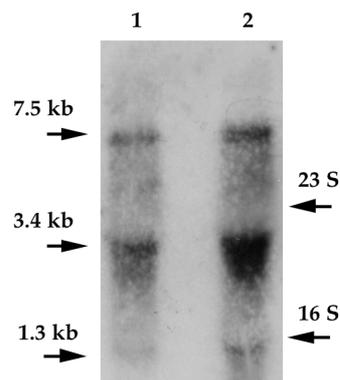
a**b**

PhS7
 -69 ATGGCGGAGGCGAACCAAGGCGTTCGCTCATTACCGTTGGTAATCTGCSCCTTAACCTTTAAGAGGATTTT

PhEF-G
 M A E A N K A F A H Y R W *
 1 ATGGCAGGTACAACCTCCACTTGAGCGGTATCGTAATATCGGATTTGCGCTCACGTAGATGCAGGCAAAACCACCACAACAGACGTATT 30
 M A R T T P L E R Y R N I G I C A H V D A G K T T T T E R I
 91 CTGTTTTACACAGGTCTTTCTCATAAGATCGGTGAAACGCATGATGGTCTGCAACTATGGACTGGATGGAGCAGGAACAAGAGCGTGGT 60
 L F Y T G L S H K I G E T H D G A A T M D W M E Q E Q E R G
 181 ATCACAATCACTTCTGCTGCAACTACGTGTTCTGGAAGGGATGGACGCTCAATTTGACGCTCATCGTATCAATATAAATGATACTCCA 90
 I T I T S A A T T C F W K G M D A Q F D A H R I N I I D T P
 271 GGACACCTTGATTTCACTATCGAAGTAGACCGTCTTTACGCGTATTAGATGGTGGTGTAGTTGTTCTTTGCTTCATCTGGTGTACAG 120
 G H V D F T I E V E R S L R V L D G A V V V L C A S S G V Q
 361 CCGCAAACTGAGACAGTTTGGCGTCAAGCGAACAAATACGAAGTTCGAAGAATGATCTTCGTAACAAAATGGATCGCACAGGCGGTGAC 150
 P O T E T V W R O A N K Y E V P R M I F V N K M D R T G A D
 451 TTCTTTGAGTGTGGACAGGTGAATCTCGTCTTGGAGCAACGCTGTTCCAATTCAGTTGCCAATAGGCGCTGAAGACGGCTTTAA 180
 F F A V V D Q V K S R L G A T P V P I Q L P I G A E D G F K
 541 GGTGTTATTGACCTGATTAAGATGAAAGCTATTAACCTGGAACGAAGCGGACAGGGAATGACTTTCATATGAGGCAATACCGGCAGAA 210
 G V I D L I K M K A I N W N E A D Q G M T F T Y E A I P A E
 631 CTTCAAGAAATAGCCGATGAATGGCGTCTCATTTAGTTGAAAGTCTGCTGAAGCTACTGAAGAATAATGGATAAATACTTAGAGGGT 240
 L Q E L A D E W R S H L V E S A A E A T E E L M D K Y L E G
 721 GAAGAGTTAAGTGAAGCTGAAATAAAGAAGCTTTACGCCAACGTACATTAGCAAACGACATTGTTCTCATGACGTGGTAGCGCATT 270
 E E L S E A E I K E A L R Q R T L A N D I V P M T C G S A F
 811 AAAAACAAGGTGTTCAAGCAGTCTTGGATTGCGTGTGTAATACATGCCTGCTCCTACGCAAGTAAATCAAGGTATCCTTAGAA 300
 K N K G V Q A V L D C V V E Y M P A P T Q V K Q I Q G I L E
 901 GATGGTACCGAAGAAGCGTCTGCTGATGATAAAGCGCGTGTGCTGCACTTGCATTTAAATTTGCAACGGACCCGTTTGTGGCACC 330
 D G T E E E R P A D D K A P F A A L A F K I A T D P F V G T
 991 TTAACCTTTTCCGTGTTACTCTGGTACTGTTAAACAGGGTGACCGGTATACAACCCAGTTAAAGTAAGCGTGGCGCTTGGTCTGT 360
 L T F F R V Y S G T V K Q G D A V Y N P V K S K R E R L G R
 1081 ATCGTACAGATGCATTCAAACCTCAGTGAAGATCAAAGAAGTCTTCGCGAGCGACATCGCGGCGCTATTGGTCTCAAAGACGTAAAC 390
 I V Q M H S N S R E E I K E V F A G D I A A A I G L K D V T
 1171 ACAGGTGAAACACTGTGTGATCCGAAATCCATTATTACGCTTGAGCGTATGGAATTTCCGTAACCCAGTAAATCTGTTGCGGTTGAGCCT 420
 T G E T L C D P K S I I T L E R M E F P E P V I S V A V E P
 1261 CGCACAATCCGTGACCAAGATAAGATGGGGATCGCGCTGGGTAACCTAGCGGCTGAAGTCCATCTTTTCGTGACAAACCGACGAGAA 450
 R T I A D Q D K M G I A L G K L A A E D P S F R V Q T D E E
 1351 TCGGGTCAGATTATAATATCTGGCATGGTGAACCTCACCTCGATATCCCTCGTCGAGCGTATGAAACGTGAATTCAGTGTGAATGTAAC 480
 S G Q I I I S G M G E L H L D I L V E R M K R E F S V E C N
 1441 GTTGGTAAGCCGAGGTTGCATACCGAGAAGCTATCCGTTCAACTGTTAAAGTTGAAGTAAAGTTTAAACGTAATCAGTGGTGGTGGT 510
 V G K P Q V A Y R E A I R S T V K V E G K F I R Q S G G R G
 1531 CAATATGGTCAAGTCTGGCTTAAACTTGAACCGATGGATATTACGGATGACGAAGCACCATTACGAGTTCGTTAACGAAACTGTAGGT 540
 Q Y G H V W L K L E P M D I T D D E A P I Y E F V N E T V G
 1621 GGTTCATTTCCAAAGAATACGTCCCTGCGGTAGACAAAGGCATCCAAGAGCAAATGCTCAAGGTGCTGCTGGCAGGTACCCATTACTT 570
 G S I P K E Y V P A V D K G I Q E Q M S Q G V L A G Y P L L
 1711 GCGGTTAAAGCGACTTTATATGATGGTTCATTCCATGATGATGACTCGAATGAAATGGCATTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 600
 G V K A T L Y D G S F H D V D S N E M A F K I A G S L A M K
 1801 CAAGCGCGCTGCAAGCGAGCCCGTACTTTTAGAGCCAGTAATGAAGTTGAAGTACTCACTCCTGAAGCAACATGGGTGATGTAGTT 630
 Q G A L Q A S P V L L E P V M K V E V L T P E A N M G D V V
 1891 GGTGACTTAAACCGTCGCCGCGCATGATCGAAGGCATGGAAGTATGATGAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAG 660
 G D L N R R R G M I E G M E D A L G G L K Q I N A Q V P L S
 1981 GAAATGTTGGTTATGCTACTGACTTACGATCTGCAACACAGGGTCTGCTTCATACTCTATGGAGTTTGAAGTACGCCGAGCATCG 690
 E M F G Y A T D L R S A T Q G R A S Y S M E F L K Y A E A S
 2071 AAACATGTTGCGAGACAATAATTTCAAGTCCGCTGTAATAATGATTTTACCTCAATAGTGAGTTGAGCTTAAATTTCTT 704
 K H V A E T I I S A R A V I o
 2161 TATAGGAATTTTTAAG-PhEF-Tu

FIGURA 2. Gene codificante per PhEF-G. (a) Strategia di sequenza. Le frecce indicano gli inneschi utilizzati per effettuare la PCR. (b) Sequenza nucleotidica del gene con le regioni fiancheggianti e la sequenza amminoacidica dedotta. I nucleotidi sottolineati rappresentano un putativo sito di legame per i ribosomi ed un segnale simmetrico di terminazione a forcina, rispettivamente, nelle regioni 3'- e 5'-fiancheggianti. Gli amminoacidi sottolineati corrispondono ai residui coinvolti nel legame al nucleotide.

FIGURA 3. Northern blotting dell'RNA totale di *P. haloplanktis*. Sono stati analizzati 10 µg (pozzetto 1) e 20 µg (pozzetto 2) di RNA totale di *P. haloplanktis*, utilizzando il frammento di 2,1 kbp riportato nel paragrafo 3.1, marcato con ^{32}P . La posizione di migrazione degli rRNA 23S e 16S è riportata sulla destra, mentre la grandezza degli mRNA visualizzati è riportata sulla sinistra.



1,3 kb è più piccolo del gene di PhEF-G e, probabilmente, corrisponde ad un RNA codificante per PhEF-Tu. Infatti, la sonda molecolare utilizzata di 2,1 kbp conteneva anche una regione di DNA codificante per PhEF-Tu.

La sequenza amminoacidica dedotta (Fig. 2b) è di 704 residui includendo la metionina iniziale. In essa è possibile identificare tre sequenze di consenso per il legame del nucleotide, caratteristiche delle proteine che legano i nucleotidi guanilici (Dever et al., 1987), ed, inoltre, altre due sequenze di consenso specifiche del gruppo delle GTPasi coinvolte nel processo di traduzione (Al-Karadaghi et al., 1996).

Il dendrogramma ottenuto dall'allineamento multiplo tra 127 sequenze di EF-G (Fig. 4) indica che il più alto grado di identità di sequenza (78%) si riscontra con EF-G di *Idiomarina loihiensis* (Q5QWB4), un micro-organismo appartenente all'ordine delle *Alteromonadales* della classe dei *Gammaproteobacteria*. L'identità di sequenza amminoacidica tra rPhEF-G ed EF-G da *Thermus thermophilus* (TtEF-G), l'unico EF-G di cui è stata

n.	Cod.	<i>Eubacterio</i>
1	ACIAD	<i>Acinetobacter</i> sp. (strain ADP1)
2	AGRT5	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (C58)
3	AQUPY	<i>Aquifex pyrophilus</i>
4	SPIPL	<i>Arthrospira platensis</i>
5	AZOSE	<i>Azoarcus</i> sp. (strain EbN1)
6	AZOVI	<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP
7	BURP1	<i>B. pseudomallei</i> (str. 1710b)
8	BACAN	<i>Bacillus anthracis</i>
9	BACCI	<i>Bacillus cereus</i>
10	BACFR	<i>Bacteroides fragilis</i>
11	BARHE	<i>Bartonella henselae</i>
12	BARQU	<i>Bartonella quintana</i>
13	BDEBA	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> .
14	BLOFL	<i>Blochmannia floridanus</i>
15	BLOPB	<i>Blochmannia pennsylvanicus</i> (str BPEN)
16	BORAV	<i>Bordetella avium</i> (strain 197N)
17	BORBR	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
18	BORPA	<i>Bordetella parapertussis</i>
19	BORPE	<i>Bordetella pertussis</i>
20	BORBU	<i>Borrelia burgdorferi</i>
21	BORGA	<i>Borrelia garinii</i>
22	BUCAI	<i>Buchnera aphidicola</i> subsp. <i>Ac. pisum</i>
23	BUCAP	<i>Buchnera aphidicola</i> sub. <i>Sch. graminum</i>
24	9BURK2	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD
25	9BURK1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054
26	9BURK	<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424
27	BURMA	<i>Burkholderia mallei</i>
28	BURPS	<i>Burkholderia pseudomallei</i> .
29	BURS3	<i>Burkholderia</i> sp. (strain 383)
30	CHRVO	<i>Chromobacterium violaceum</i>
31	CHRSL	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043
32	CLOTE	<i>Clostridium tetani</i>
33	CORDI	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
34	COREF	<i>Corynebacterium efficiens</i>
35	COXBU	<i>Coxiella burnetii</i>
36	DECAR	<i>Dechloromonas aromatica</i> (strain RCB)
37	DESPS	<i>Desulfotalea psychrophila</i> .
38	DESVH	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
39	ERWCT	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>
40	ECOLI	<i>Escherichia coli</i>
41	ECOL6	<i>Escherichia coli</i> O6
42	FRATT	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>
43	GEOKA	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
44	GEOSL	<i>Geobacter sulfurreducens</i> .
45	GLUOX	<i>Gluconobacter oxydans</i>
46	HAEDU	<i>Haemophilus ducreyi</i>
47	HAEI8	<i>Haemophilus influenzae</i>
48	HAEIN	<i>Haemophilus influenzae</i>
49	HAHCH	<i>Hahella chejuensis</i>
50	HELPI	<i>Helicobacter pylori</i>
51	IDILO	<i>Idiomarina loihiensis</i>
52	LACLA	<i>Lactococcus lactis</i>
53	LEGPH	<i>Legionella pneumophila</i>
54	LEGPA	<i>Legionella pneumophila</i>
55	LEGPL	<i>Legionella pneumophila</i>
56	LISMF	<i>Listeria monocytogenes</i>
57	LISIN	<i>Listeria innocua</i>
58	MANSM	<i>Mannheimia succiniciproducens</i>
59	METCA	<i>Methylococcus capsulatus</i>
60	MYCBO	<i>Mycobacterium bovis</i>
61	MYCLE	<i>Mycobacterium leprae</i>
62	MYCH	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
63	MYCPU	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
64	NITOC	<i>Nitrosococcus oceani</i>

n.	Cod.	<i>Eubacterio</i>
65	NITEU	<i>Nitrosomonas europaea</i>
66	9PROT	<i>Nitrosomonas eutropha</i> C71
67	NITMU	<i>Nitrosospora multiformis</i>
68	OCEIH	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>
69	PASMU	<i>Pasteurella multocida</i>
70	PELCD	<i>Pelobacter carbinolicus</i> .
71	PHOPR	<i>Photobacterium profundum</i> .
72	PHOLL	<i>Photorhabdus luminescens</i> sub <i>laumondii</i>
73	PROMA	<i>Prochlorococcus marinus</i>
74	PROAC	<i>Propionibacterium acnes</i>
75	ALTAT	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> T6c
76	PSEHT	<i>Pseudoalteromonas haloplank.</i>
77	PSEAE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
78	PSEF5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
79	PSEPF	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
80	PSEPK	<i>Pseudomonas putida</i>
81	PSEPU	<i>Pseudomonas putida</i> F1
82	PSE14	<i>Pseudomonas syringae</i>
83	PSEU2	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
84	PSESM	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
85	PSYAR	<i>Psychrobacter arcticus</i>
86	RALEJ	<i>Ralstonia eutropha</i> .
87	RALME	<i>Ralstonia metallidurans</i>
88	RALSO	<i>Ralstonia solanacearum</i> .
89	RHOPA	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
90	RICFE	<i>Rickettsia felis</i>
91	SALTY	<i>Salmonella typhimurium</i>
92	SALCH	<i>Salmonella choleraesuis</i>
93	SALPA	<i>Salmonella paratyphi-a</i>
94	9GAMM	<i>Shewanella denitrificans</i> OS217
95	SHEON	<i>Shewanella oneidensis</i>
96	9GAMM1	<i>Shewanella</i> sp. ANA-3
97	9GAMM2	<i>Shewanella</i> sp. MR-4
98	SHIBS	<i>Shigella boydii</i> serotype 4)
99	SHIDS	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1
100	SHIFL	<i>Shigella flexneri</i>
101	SHISS	<i>Shigella sonnei</i>
102	SODGL	<i>Sodalis glossinidius</i>
103	STAAU	<i>Staphylococcus aureus</i>
104	STAIN	<i>Staphylococcus intermedius</i>
105	STASI	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
106	STRP1	<i>Streptococcus pyogenes</i> (M1)
107	STRCO	<i>Streptomyces coelicolor</i> .
108	SYNY3	<i>Synechocystis</i> sp. (strain 6803).
109	THEMA	<i>Thermotoga maritima</i>
110	THETH	<i>Thermus thermophilus</i>
111	THIDA	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
112	THICR	<i>Thiomicrospira crunogena</i>
113	TREDE	<i>Treponema denticola</i> .
114	TREPA	<i>Treponema pallidum</i> .
115	VIBF1	<i>V. fischeri</i> (ATCC 700601).
116	VIBVY	<i>V. vulnificus</i> (strain YJ016).
117	VIBCH	<i>Vibrio cholerae</i> .
118	VIBPA	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> .
119	VIBVU	<i>Vibrio vulnificus</i>
120	XANAC	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
121	XANC8	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Camp</i> .
122	XANCP	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>camp</i> .
123	XANC5	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesic</i> .
124	XANOM	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
125	XANOR	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
126	YERPE	<i>Yersinia pestis</i>
127	YERPS	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

Elenco sequenze amminoacidiche utilizzate per ottenere il dendrogramma riportato in **Figura 4**.

determinata la struttura tridimensionale (Al-Karadaghi et al., 1996), è del 60%.

3.2 *Espressione e purificazione di PhEF-G ricombinante*

Per la produzione di PhEF-G ricombinante sono stati condotti esperimenti preliminari allo scopo di identificare le migliori condizioni di espressione della proteina in forma solubile. La crescita delle cellule trasformate BL21 (DE3) è stata effettuata sia a 25°C che a 37°C ed è stato riscontrato un livello di espressione significativamente maggiore alla temperatura di 37°C, ma con l'accumulo di rPhEF-G nei corpi di inclusione. Inoltre, la rinaturazione della proteina mediante l'utilizzo di urea o guanidina ha permesso di ottenere rPhEF-G solubile, ma con una bassissima attività. Utilizzando invece una temperatura di crescita di 25°C si è riscontrato un ridotto livello di espressione di rPhEF-G, ma l'ottenimento dell'enzima in forma attiva e solubile. Pertanto, le cellule trasformate BL21 (DE3) sono state cresciute a 25°C fino a 0,6 OD₆₀₀ a cui ha fatto seguito un'induzione con IPTG per 20 h. rPhEF-G è stato purificato dall'estratto S-100 mediante cromatografia di affinità su Ni²⁺-Agarosio (Fig. 5). L'analisi su gel SDS-PAGE (Fig. 6) ha mostrato, sia a 20 mM che a 50 mM imidazolo, l'eluizione di una proteina con massa molecolare simile a quella calcolata per PhEF-G (circa 78 kDa). Le frazioni eluite a 20 e 50 mM imidazolo, contenenti una singola banda della proteina, sono state riunite in due campioni diversi (rispettivamente, campione 1 e 2), dializzati contro il tampone A contenente 50% di glicerolo (v/v) e conservati a -20°C. L'identificazione di rPhEF-G nei campioni eluiti dalla cromatografia su Ni²⁺-Agarosio è stata effettuata mediante Western blotting utilizzando anticorpi anti-His tag (Fig. 7).

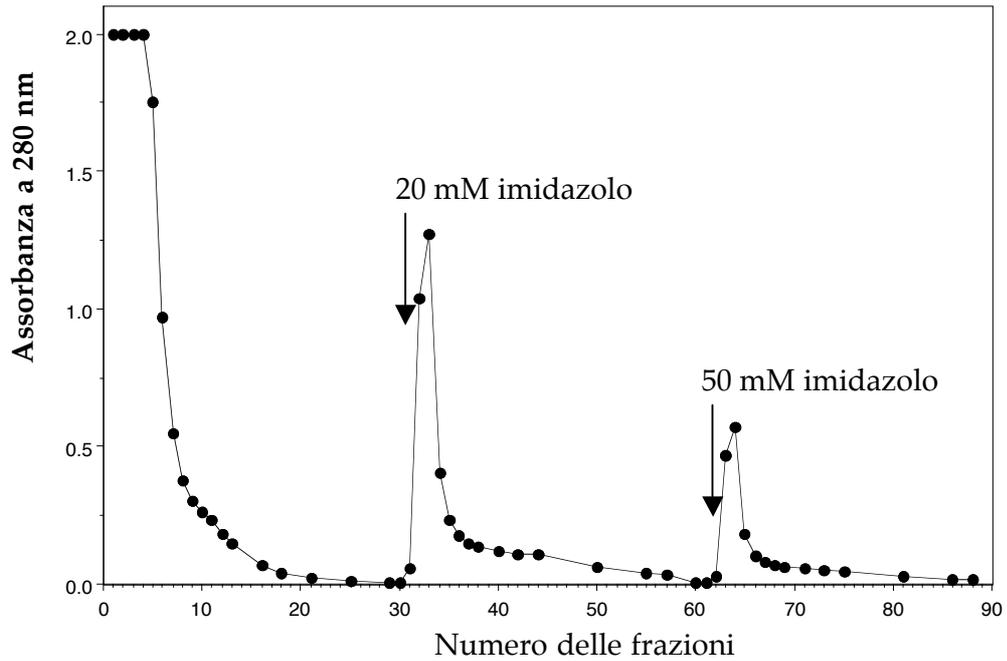


FIGURA 5. Cromatogramma ottenuto dalla cromatografia per affinità. Il campione di S-100, preparato come descritto nel paragrafo 2.4, è stato incubato per 2 h a 4°C con 10 ml di Ni²⁺-Agarosio equilibrato nel Tampone A. La sospensione è stata versata su una colonna di vetro (1,5 cm di diametro) per impaccare la resina. Dopo il lavaggio della colonna con il Tampone A, le proteine legate sono state eluite mediante un gradiente discontinuo alle concentrazioni indicate di imidazolo e sono state raccolte frazioni da 5 ml.

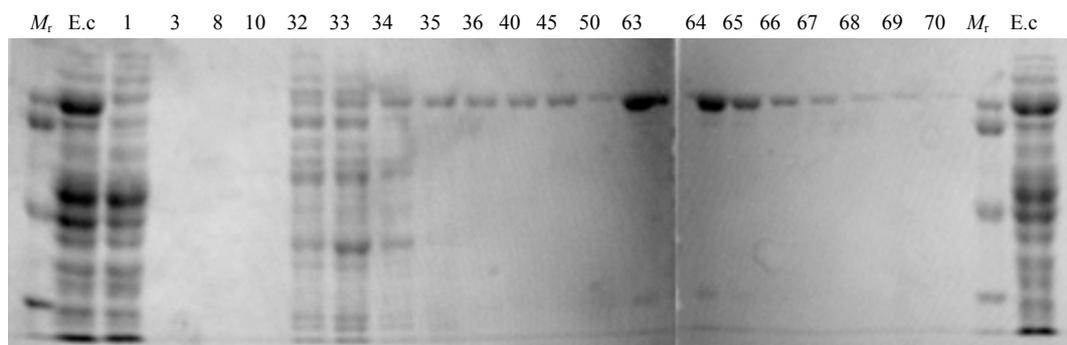
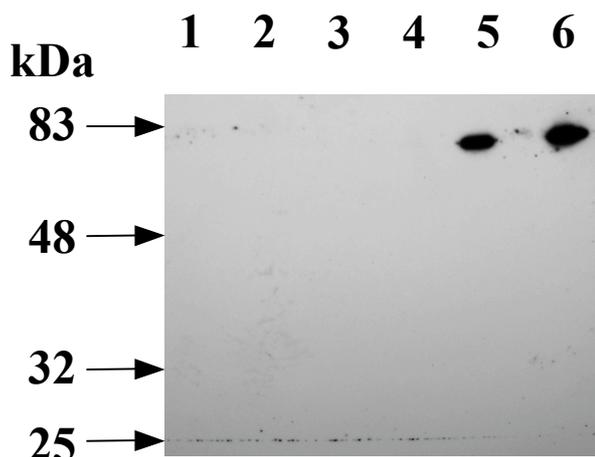


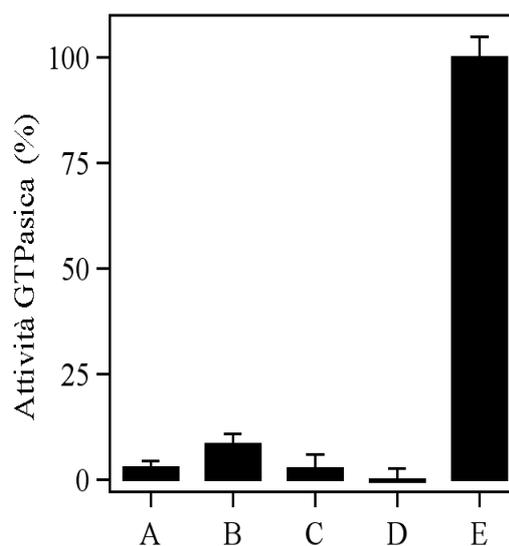
FIGURA 6. Analisi mediante SDS-PAGE delle frazioni eluite dalla colonna di Ni²⁺-Agarosio. Sono stati analizzati 20 µl delle frazioni indicate su gel di poliaccrilamide al 10% in condizioni denaturanti e riducenti. Lo standard di massa molecolare conteneva 2 µg di ciascuna di queste proteine: transferrina umana (78 kDa), albumina di siero bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), ed anidrasi carbonica (29 kDa). E.c. corrisponde all'estratto cellulare S-100.

FIGURA 7. Analisi mediante Western blotting dei campioni 1 e 2 provenienti dalla cromatografia per affinità. Pozzetto 1, standard di massa molecolare; pozzetto 2, EF-G purificato da E. coli; pozzetti 3 e 4, 1 e 2 μg del campione eluito a 20 mM imidazolo; pozzetti 5 e 6, 1 e 2 μg del campione eluito a 50 mM imidazolo. Ulteriori dettagli sono riportati nel paragrafo 2.2.



Gli anticorpi hanno dato una reazione positiva solo per il campione eluito a 50 mM imidazolo. Questo dato è stato confermato dalla determinazione dell'attività GTPasica ribosoma-dipendente, i cui risultati sono riportati in Figura 8.

FIGURA 8. Attività GTPasica ribosoma-dipendente dei campioni 1 e 2 provenienti dalla cromatografia per affinità. A) ribosomi 0,5 μM da soli; B) 18 μg di proteine totali del campione 1 da solo; C) 18 μg di proteine totali del campione 1 in presenza di ribosomi 0,5 μM ; D) 18 μg di proteine totali di campione 2 da solo; E) 18 μg di proteine totali di campione 2 in presenza di ribosomi 0,5 μM . L'attività è stata determinata come descritto nel paragrafo 2.6 ed è stata riportata come % dell'attività massima (46 pmoli $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ idrolizzato per minuto).



Entrambi i campioni eluiti dalla cromatografia per affinità presentano un'attività GTPasica intrinseca molto bassa, una caratteristica mostrata anche dai ribosomi purificati da *P. haloplanktis*. Invece, dopo l'aggiunta dei ribosomi ai campioni proteici si riscontra un incremento dell'attività GTPasica solo in presenza del campione 2. I risultati riportati nelle Figure 7 e 8 indicano che il campione eluito a 20 mM imidazolo non corrisponde a rPhEF-G. Quindi, il campione eluito a 50 mM imidazolo è stato utilizzato per la caratterizzazione funzionale e molecolare di rPhEF-G.

3.3 Proprietà molecolari e funzionali di rPhEF-G

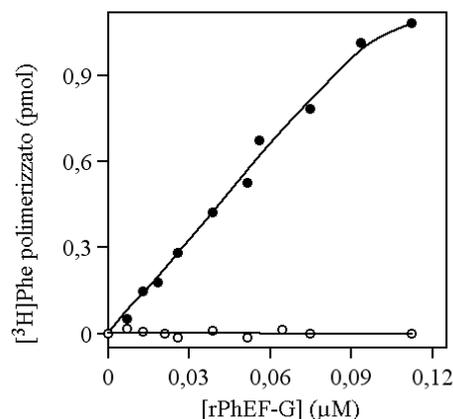
rPhEF-G purificato mostra, sia in condizioni native (gel-filtrazione su Superdex 75), sia in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), una massa molecolare di circa 78 kDa, suggerendo, così, una struttura monomerica (risultati non mostrati).

Le proprietà funzionali del fattore di allungamento sono state valutate mediante: a) capacità di promuovere la sintesi di poli(Phe) diretta da poli(U); b) dosaggio dell'attività GTPasica ribosoma-dipendente; c) capacità di legare GDP in presenza di acido fusidico (Bodley et al., 1969; Willie et al., 1975).

3.4 rPhEF-G catalizza la sintesi di poli(Phe) diretta da poli(U)

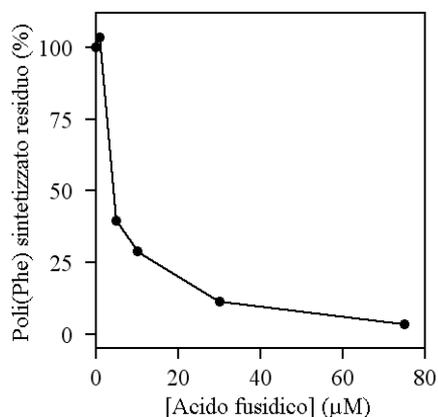
La capacità di promuovere la sintesi di poli(Phe) è stata dosata in un sistema cellulare ricostituito *in vitro* di *P. haloplanktis*. Come riportato in Figura 9, in assenza di PhEF-Tu, anche ad elevate concentrazioni di rPhEF-G non si osserva la sintesi di poli(Phe) diretta da poli(U). Invece, la concomitante presenza dei due fattori di allungamento determina un incremento della

FIGURA 9. Sintesi proteica catalizzata da rPhEF-G. L'attività di sintesi di poli(Phe) diretta da poli(U), condotta come riportato nel paragrafo 2.5, è stata valutata in assenza (○) o in presenza (●) di PhEF-Tu 0,5 μM alle concentrazioni indicate di rPhEF-G.



quantità di poli-fenilalanina sintetizzata, i cui livelli dipendono dalla quantità di rPhEF-G aggiunto. L'andamento dell'incorporazione è lineare fino ad un rapporto molare di 1:5 tra rPhEF-G e PhEF-Tu. L'aggiunta di acido fusidico alla miscela di reazione ha come effetto una significativa riduzione della quantità di poli(Phe) sintetizzato, i cui livelli diminuiscono in dipendenza della concentrazione dell'antibiotico (Fig. 10). La concentrazione di acido fusidico necessaria per ottenere un'inibizione del 50% dell'attività catalitica di rPhEF-G è 3,4 μM (IC₅₀).

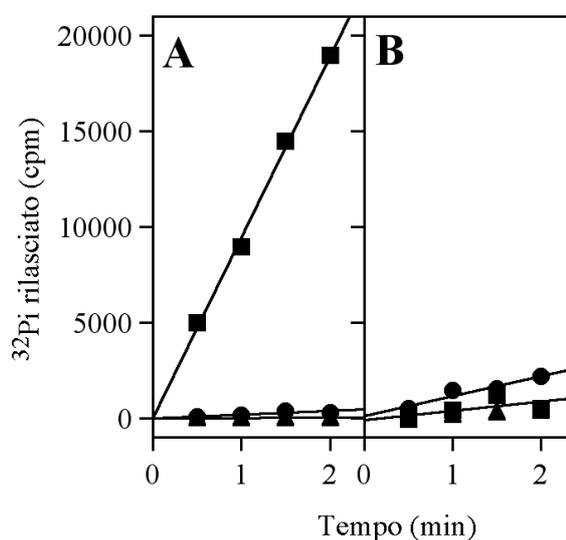
FIGURA 10. Inibizione della sintesi proteica catalizzata da rPhEF-G da parte dell'acido fusidico. L'attività di sintesi di poli(Phe) diretta da poli(U), condotta come riportato nel paragrafo 2.5, è stata determinata in presenza delle concentrazioni indicate di acido fusidico.



3.5 *rPhEF-G* catalizza un'attività GTPasica ribosoma-dipendente

In una prima caratterizzazione delle proprietà funzionali dell'enzima è stata analizzata la specificità per il nucleotide trifosfato nella reazione di idrolisi usando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ come substrato. Sia i ribosomi isolati da *P. haloplanktis* sia *rPhEF-G* da soli presentano una bassa attività trifosfatase intrinseca usando entrambi i substrati (Fig. 11).

FIGURA 11. Specificità per il substrato nell'attività trifosfatase di *rPhEF-G*. La miscela di reazione, preparata come riportato nel paragrafo 2.6, conteneva ribosomi $0,5\ \mu\text{M}$ (\blacktriangle), *rPhEF-G* $0,25\ \mu\text{M}$ (\bullet) o la combinazione di entrambi i componenti (\blacksquare) in presenza di $50\ \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (radioattività specifica $486\ \text{cpm}/\text{pmol}$, pannello A) o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (radioattività specifica $450\ \text{cpm}/\text{pmol}$, pannello B). La reazione è stata condotta a 30°C e, ai tempi indicati, il $^{32}\text{P}_i$ rilasciato è stato determinato su aliquote di $50\ \mu\text{l}$.



Invece, la contemporanea presenza dei ribosomi e di *rPhEF-G* provoca un significativo aumento dell'attività idrolitica solo in presenza di $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ come substrato (Fig. 11A). Viceversa, utilizzando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ come substrato, il livello dell'attività idrolitica resta molto basso (Fig. 11B).

La massima attività GTPasica dell'enzima si osserva utilizzando una concentrazione di ribosomi di $1\ \mu\text{M}$ (Fig. 12).

L'attività GTPasica ribosoma-dipendente catalizzata da rPhEF-G è stata ulteriormente analizzata valutando i parametri cinetici della reazione di idrolisi del GTP sia in assenza che in presenza di diversi nucleotidi guanilici. I risultati mostrati in Tabella 1 indicano che l'efficienza catalitica è molto simile a quella riportata per EF-G da *E. coli* (Arai et al., 1977; Parmeggiani e Sander, 1981). Inoltre, si può osservare che il GDP, il GppNHp, un analogo non idrolizzabile del GTP e la guanosina tetrafosfato (ppGDP), un inibitore della sintesi proteica, sono inibitori competitivi dell'attività GTPasica ribosoma-dipendente di rPhEF-G. Infatti, mentre la k_{cat} resta sostanzialmente invariata, i valori di K_m aumentano per tutti gli inibitori utilizzati. L'effetto di inibizione più alto è stato osservato per il GDP, seguito dal ppGDP e GppNHp, nell'ordine. Infine, dal confronto tra il valore di K_m per il GTP (7,5 μM) e di K_i per il GDP (2,7 μM) si può dedurre che l'affinità per il nucleotide difosfato è superiore a quella per il GTP. Tale proprietà è comune a tutte le proteine che legano i nucleotidi guanilici.

FIGURA 12. *Effetto della concentrazione dei ribosomi da P. haloplanktis sull'attività GTPasica di rPhEF-G. La reazione, preparata come riportato nel paragrafo 2.6, è stata condotta alla temperatura di 15°C in presenza delle indicate concentrazioni di ribosomi P. haloplanktis purificati da come riportato nel paragrafo 2.9.*

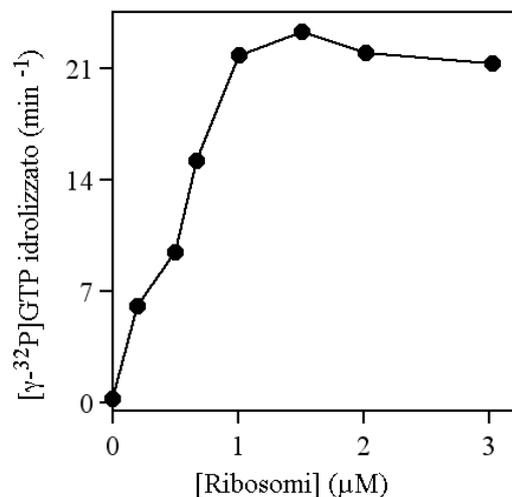
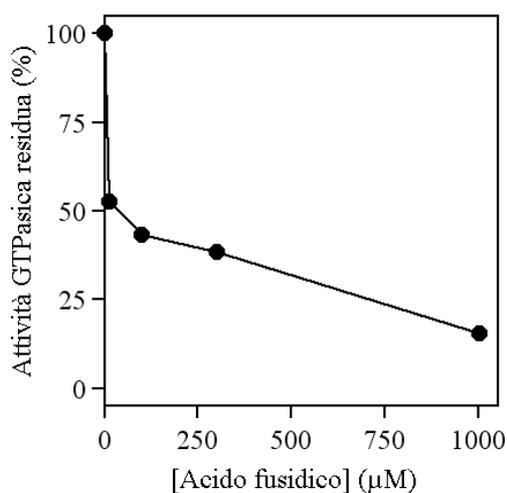


TABELLA 1. *Parametri cinetici e di inibizione della GTPasi ribosoma-dipendente catalizzata da rPhEF-G. I parametri sono stati determinati alla temperatura di 30°C, come descritto nel paragrafo 2.6, in assenza o in presenza di 25 μM dei nucleotidi indicati.*

Nucleotide	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$)	K_i (μM)
-	15,8	7,3	2,2	---
GDP	18,3	75,2	0,2	2,7
GppNHp	15,0	9,3	1,6	91,5
ppGDP	18,0	37,1	0,5	4,9

L'effetto dell'acido fusidico sull'attività GTPasica ribosoma-dipendente di rPhEF-G è mostrato in Figura 13. L'antibiotico inibisce l'attività trifosfatase del fattore di allungamento in funzione della concentrazione di acido fusidico. La concentrazione di antibiotico necessaria per ottenere un'inibizione del 50% dell'attività è 70 μM (IC_{50}).

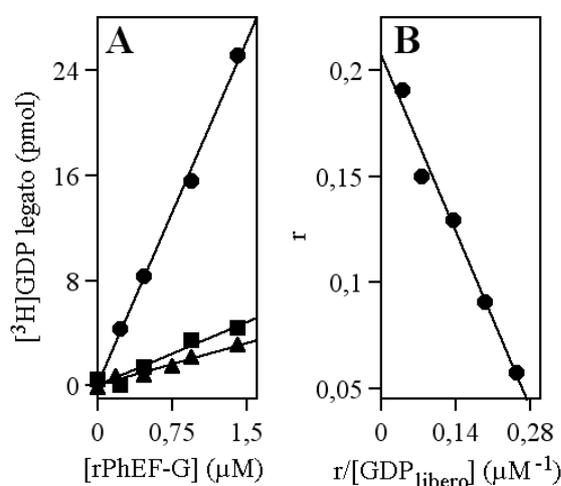
FIGURA 13. *Effetto della concentrazione dell'acido fusidico sull'attività GTPasica ribosoma-dipendente di rPhEF-G. La reazione, preparata come riportato nel paragrafo 2.6, è stata condotta alla temperatura di 30°C in presenza delle indicate concentrazioni di acido fusidico. La quantità di nucleotide idrolizzato è stato determinato in cinetica e la velocità di idrolisi è riportata come percento di quella ottenuta in assenza di antibiotico.*



3.6 *rPhEF-G* lega il GDP in presenza di acido fusidico e ribosomi

L'interazione tra *rPhEF-G*, GDP e ribosomi è stata messa in evidenza in presenza di acido fusidico. I risultati riportati in Figura 14A mostrano che in assenza dei ribosomi la capacità di *rPhEF-G* di formare un complesso con [³H]GDP è trascurabile sia in assenza sia in presenza di acido fusidico. Invece, l'aggiunta dei ribosomi isolati da *P. haloplanktis* determina un incremento della quantità di complesso quaternario formato *rPhEF-G*•[³H]GDP•ribosoma•acido fusidico. Comunque, la quantità massima di complesso formato risulta corrispondere a circa il 25% della quantità di *rPhEF-G* aggiunto (Fig. 14B). Risultati simili sono stati anche ottenuti in presenza di concentrazioni differenti sia del fattore di allungamento che dei ribosomi. L'affinità per il nucleotide è stata ricavata dalla pendenza del grafico ottenuto dall'analisi dei dati secondo l'equazione di Scatchard (Fig. 14B). Quest'ultimo ha fornito una costante di dissociazione del complesso pari a 0,6 μM , un valore simile a quello ottenuto per l'analogo complesso formato da *EcEF-G* (Baca et al., 1976).

FIGURA 14. Legame dell'acido fusidico ad *rPhEF-G*. (A) La miscela di reazione, preparata come descritto nel paragrafo 2.7 conteneva, la quantità di *rPhEF-G* indicata in assenza (\blacktriangle) o in presenza di acido fusidico (\blacksquare) o in combinazione con i ribosomi (\bullet). (B) La miscela di reazione conteneva *rPhEF-G* 0,47 μM , ribosomi 0,5 μM , acido fusidico 1 mM e [³H]GDP 0,13-4,72 μM (radioattività specifica 3706 cpm/pmol). I controlli in presenza dell'acido fusidico e dei ribosomi sono stati sottratti ed i dati sono stati analizzati mediante l'equazione di Scatchard.



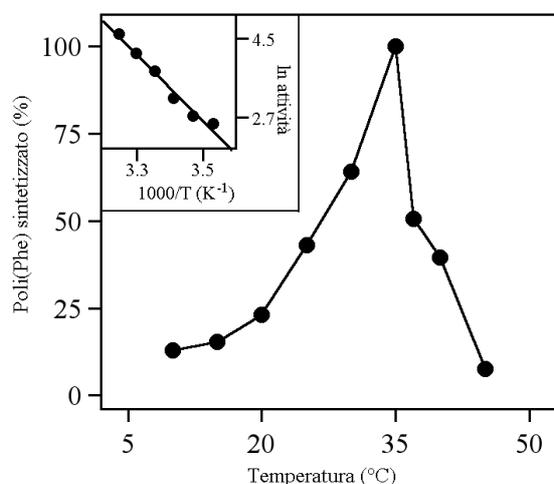
3.7 Effetto della temperatura sull'attività enzimatica di rPhEF-G

La termofilicità di rPhEF-G è stata determinata a diverse temperature analizzando sia la sua capacità di promuovere la sintesi proteica sia la sua attività GTPasica residua.

Come riportato nella Figura 15, la massima capacità di PhEF-G nel promuovere l'incorporazione di poli(Phe) si osserva a 35°C, mentre, a temperature superiori si riscontra una drastica diminuzione. Inoltre, l'analisi della parte crescente della curva mediante l'equazione di Arrhenius (Fig. 15, inserto) ha permesso di calcolare l'energia di attivazione della reazione di 62,4 kJ/mol.

L'attività GTPasica ribosoma-dipendente di rPhEF-G, in funzione della temperatura, è riportata in Figura 16A. La massima attività si riscontra in questo caso a 45°C, a temperature superiori si osserva un decremento probabilmente dovuto all'inattivazione termica dell'enzima. In questo caso, l'analisi della parte crescente della curva (5-45°C), mediante l'equazione di

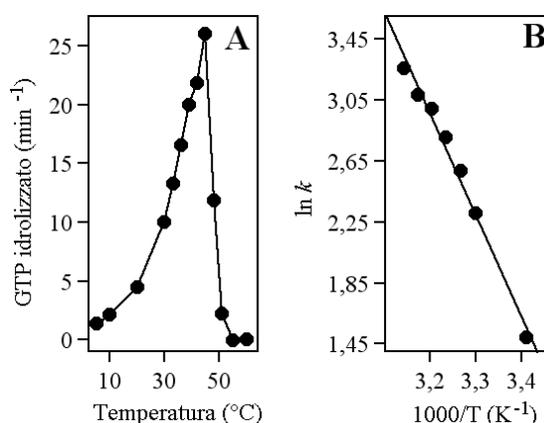
FIGURA 15. Termofilicità della sintesi proteica catalizzata da rPhEF-G. La miscela di reazione è stata preparata, come riportato nel paragrafo 2.5, alle temperature indicate. I risultati sono stati riportati come percentuale del valore massimo ottenuto a 35°C (11 mmoli di [³H]Phe incorporato per mole di PhEF-G per minuto). Inserto: i dati, nell'intervallo di temperatura 10-35°C, sono stati trattati in accordo con l'equazione di Arrhenius.



Arrhenius (Fig. 16B), ha fornito un'energia di attivazione di 55,3 kJ/mol, un valore molto vicino a quello determinato per l'incorporazione di poli(Phe).

La linearità dei due grafici di Arrhenius e l'assenza di punti di discontinuità nella retta tracciata può far escludere l'ipotesi di eventuali cambi conformazionali indotti dalla temperatura sulla proteina.

FIGURA 16. Termofilicità della GTPasi catalizzata da rPhEF-G. (A) L'attività GTPasica ribosoma-dipendente catalizzata da rPhEF-G determinata come riportato nel paragrafo 2.6, è stata valutata alle temperature indicate. (B) I dati, nell'intervallo di temperatura 5-45°C, sono stati trattati secondo l'equazione di Arrhenius.



3.8 Effetto della temperatura sulla stabilità di rPhEF-G

L'effetto della temperatura sulla stabilità di rPhEF-G è stato valutato sia mediante inattivazione termica che con curve di fusione spettroscopiche.

Il profilo di inattivazione termica dell'attività GTPasica di rPhEF-G (Fig. 17A) mostra che la temperatura di semi-inattivazione è di 45,9°C, dopo 10 min di esposizione, un valore molto simile a quello di massima attività GTPasica ribosoma-dipendente (Fig. 16A).

La denaturazione termica di rPhEF-G è stata invece analizzata sia mediante curve di fusione nell'UV (Fig. 17B) sia in fluorescenza (Fig. 17C). Tali esperimenti forniscono una temperatura di semi-denaturazione rispettivamente di 57,3°C nell'UV e di 61,6°C in fluorescenza. Inoltre,

l'andamento bifasico della curva di fusione in fluorescenza potrebbe indicare un comportamento differenziale delle diverse porzioni della struttura proteica in risposta alla variazione di temperatura.

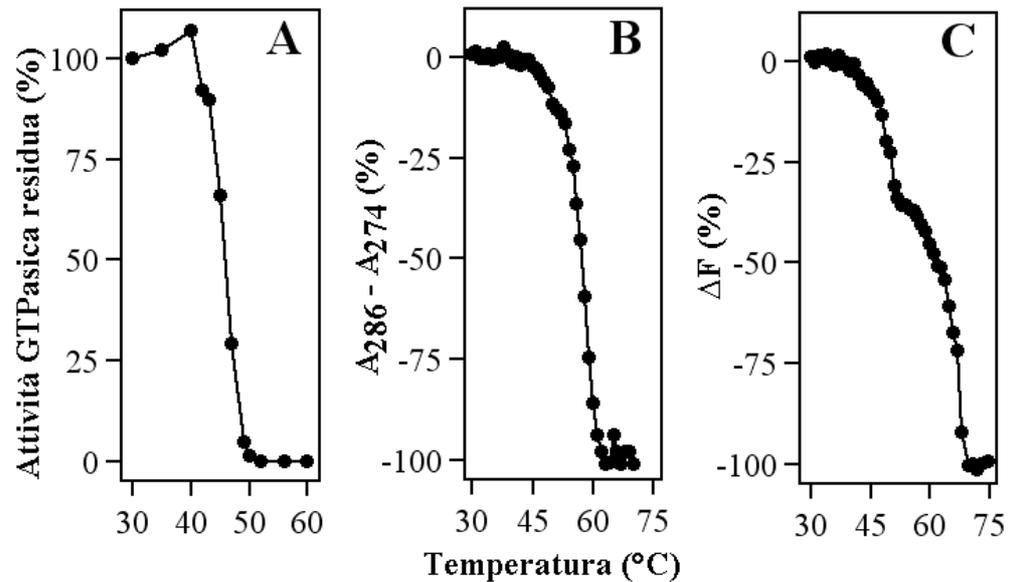


FIGURA 17. Termostabilità di rPhEF-G. (A) Inattivazione termica dell'attività GTPasica ribosoma-dipendente. (B) Profilo di denaturazione agli UV (C). Profilo di denaturazione mediante analisi della fluorescenza. Altri dettagli sono stati riportati nel paragrafo 2.8.

3.9 Modello della struttura 3D di PhEF-G

Allo scopo di correlare i risultati ottenuti negli esperimenti di inattivazione e denaturazione termica anche da un punto di vista strutturale è stato costruito un modello della struttura 3D di PhEF-G utilizzando un servizio disponibile in rete (Swiss-Model). Come riferimento sono state utilizzate le coordinate atomiche della struttura tridimensionale di EF-G dall'eubatterio termofilo *Thermus thermophilus*. Il modello riportato in Figura 18 indica che, come per gli altri EF-G, anche PhEF-G è costituito da 5 domini strutturali.

Inoltre, rispetto alla struttura di riferimento, le uniche differenze sono state localizzate in alcune regioni di collegamento tra segmenti di struttura secondaria della proteina.

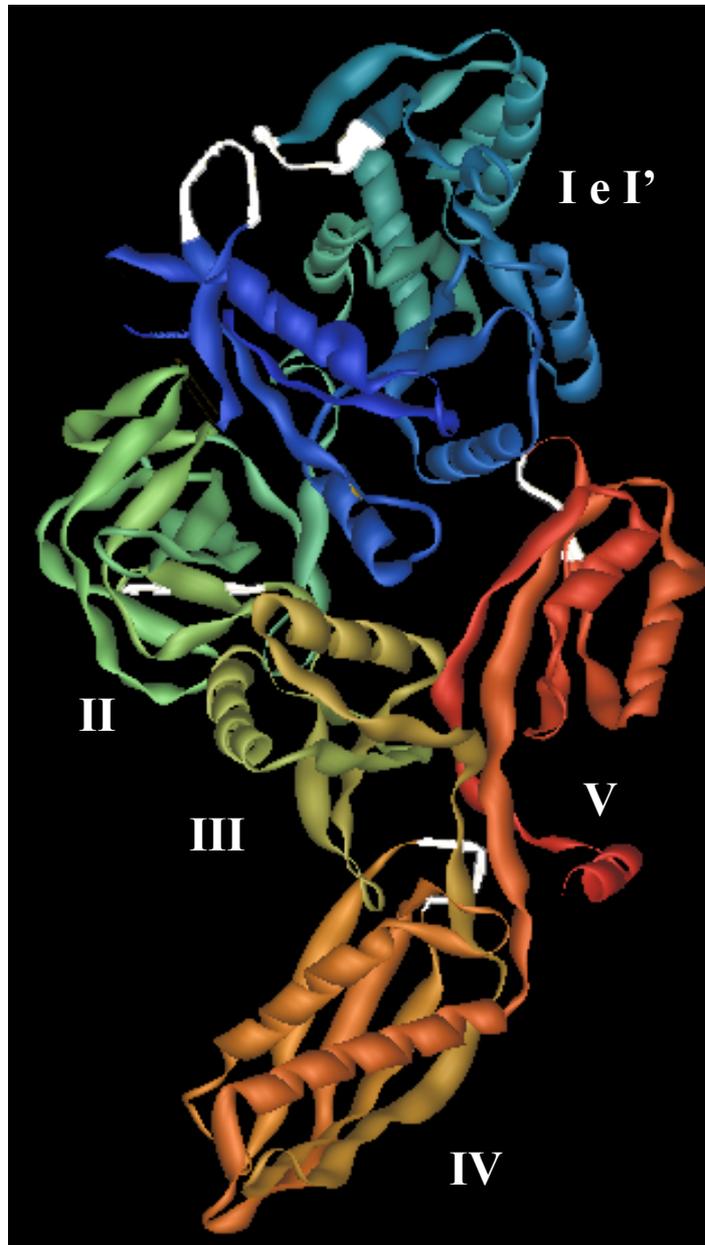


FIGURA 18. *Modello della struttura tridimensionale di rPhEF-G. Il modello è stato ottenuto mediante il servizio Swiss-Model disponibile in rete, attraverso la metodica “alignment mode”, dopo aver effettuato un allineamento tra le sequenze amminoacidiche di TtEF-G e PhEF-G. Le differenze tra il modello ed il riferimento (1FNM) sono evidenziate in bianco. I domini di rPhEF-G sono stati riportati in colori diversi ed indicati con numeri romani.*

4. DISCUSSIONE

Questa tesi di dottorato riporta le proprietà molecolari e funzionali del fattore di allungamento EF-G dall'eubatterio psicrofilo Antartico *Pseudoalteromonas haloplanktis*. I risultati ottenuti riguardano la determinazione dell'organizzazione strutturale del gene codificante PhEF-G, la sua espressione eterologa in *Escherichia coli*, la purificazione e la caratterizzazione funzionale della corrispondente proteina ricombinante. PhEF-G è stato ottenuto sotto forma di proteina fusa ad una coda di sei istidine che ha consentito la sua identificazione, una veloce procedura di purificazione e la separazione dall'analogo fattore endogeno presente in *E. coli*.

In *P. haloplanktis* l'organizzazione strutturale della regione del genoma contenente il gene codificante PhEF-G è simile a quella dell'operone *str* di *E. coli* (Post e Nomura, 1980). Infatti, anche in questo micro-organismo PhEF-G (*fusA*) è compreso tra il gene codificante per la proteina ribosomale S7 (*rpS7*) e quello codificante per EF-Tu (*tufA*). L'analisi mediante Northern blotting dell'RNA totale di *P. haloplanktis* indica che *fusA* fa parte di un'unità trascrizionale ad alto peso molecolare che non include *tufA*, come anche indicato dalla presenza di un putativo promotore nella regione 3'-fiancheggiante *fusA* (Masullo et al., 2000). L'unità trascrizionale contenente *fusA* probabilmente include altri geni localizzati nella regione più a monte. La lunghezza del trascritto (3,4 kb), infatti, corrisponde ad un'unità trascrizionale che potrebbe contenere nell'ordine le proteine ribosomali S12 (*rpS12*), S7 (*rpS7*) e PhEF-G (*fusA*). Questa osservazione è stata anche avvalorata dall'analisi della sequenza nucleotidica del genoma di *P. haloplanktis* che in

questa regione ha mostrato la presenza di un potenziale promotore e di una sequenza palindromica solo nella regione intragenica a monte di *rpS12*. Inoltre, il trascritto più grande ritrovato, ma meno abbondante (7,5 kb), potrebbe corrispondere ad un'unità trascrizionale diversa che comprende anche il gene codificante per una subunità dell'RNA polimerasi (*rpoC*) localizzato nel genoma di *P. haloplanktis* a monte del gene *rpS12*, come suggerito dalla presenza di un potenziale promotore nella regione 5' del gene stesso.

La sequenza nucleotidica di *fusA*, determinata nella presente tesi (accession number AJ249258), è identica alla sequenza dello stesso gene identificato più recentemente nel genoma di *P. haloplanktis* (accession number CAI85329) (Medigue et al., 2004), eccetto che per una sostituzione silente di una base (G invece di T) in posizione 663. Nella sequenza nucleotidica codificante per PhEF-G i codoni sinonimi più frequentemente usati sono quelli che terminano con A o T, essendo, rispettivamente, la percentuale per ogni base in questa posizione pari a 29,6, 35,8, 17,4 e 17% per A, T, G, C. Queste caratteristiche sono anche riscontrate nei geni codificanti PhEF-Tu (Masullo et al., 2000), PhEF-Ts (Raimo et al., 2005), l'aspartato amminotransferasi (Birolo et al., 2000) e lo "chaperon" molecolare GroEL (Tosco et al., 2003). Inoltre, la percentuale della base usata in terza posizione assomiglia al contenuto A/T (57%) dell'intero genoma (Medigue et al., 2004). Quindi, si può ipotizzare che, in questo organismo, la composizione delle basi potrebbe rappresentare uno dei meccanismi attraverso cui il patrimonio genetico "risponde" alla pressione adattativa esercitata dalla temperatura.

La sequenza nucleotidica del gene codificante per PhEF-G mostra il

61,5% di identità di sequenza nei confronti di un secondo gene putativo codificante per EF-G (EF-G2, accession number CAI87975) identificato nel genoma di *P. haloplanktis*. Sebbene questa caratteristica sia alquanto comune nel regno degli eubatteri, la presenza di un secondo gene putativo codificante per EF-G è stato ritrovato anche nel genoma di altri micro-organismi psicrofili di cui è stato sequenziato il genoma, quali *Desulfotalea psychrophila* (NC_006138), *Psychromonas ingrahamii* (NC_008709) e *Corwellia psychrerythraea* (NC_003910).

La sequenza amminoacidica dedotta di PhEF-G contiene le tre sequenze consenso tipiche delle “GTP binding proteins” (Dever et al., 1987), corrispondenti ai frammenti amminoacidici A₁₇HVDAGKT, D₈₈TPG e N₁₄₂KMD, ed inoltre, le due sequenze consenso aggiuntive, specifiche del gruppo delle GTPasi traduzionali, rispettivamente nelle posizioni G₅₉ITI e G₂₆₇SA. La struttura primaria di PhEF-G mostra un’alta identità di sequenza con altri EF-G eubatterici. In particolare, l’elevata identità amminoacidica (55%) tra PhEF-G ed TtEF-G, di cui è nota la struttura tridimensionale, ha consentito di costruire un modello molecolare per l’enzima psicrofilo che ha evidenziato la sua costituzione in 5 domini strutturali. Il modello 3D ha anche permesso di analizzare il legame dell’acido fusidico da un punto di vista strutturale. Infatti, l’interazione con l’antibiotico localizzata all’interfaccia tra i domini I, III e V di *T. thermophilus* coinvolge residui amminoacidici (Johanson e Hughes, 1994; Johanson et al., 1996; Martemyanov et al., 2001; Nagaev et al., 2001) molto conservati (27 su 30) tra PhEF-G e TtEF-G utilizzato come stampo.

L'espressione in *Escherichia coli* del gene codificante PhEF-G ha portato alla produzione di appropriate quantità della proteina ricombinante (rPhEF-G) in forma pura ed attiva. rPhEF-G è infatti funzionalmente attiva sia nel processo di sintesi proteica, valutata come capacità di incorporazione *in vitro* di poli(Phe), che come attività catalitica, valutata attraverso la sua attività GTPasica ribosoma-dipendente. Inoltre, rPhEF-G è anche capace di interagire con un classico inibitore della sintesi proteica in eubatteri, l'acido fusidico. Come per EF-G da *E. coli*, anche per rPhEF-G, questo antibiotico è in grado di inibire l'attività sia nell'incorporazione di poli(Phe) che nell'attività GTPasica ribosoma-dipendente. Tale inibizione è dovuta alla formazione di un complesso quaternario stabile rPhEF-G•GDP•ribosoma•acido fusidico che impedisce la riattivazione di rPhEF-G nella sua forma rPhEF-G•GTP.

L'analisi della termofilicità e della termostabilità di PhEF-G ha confermato l'elevata flessibilità che caratterizza gli enzimi psicrofili. Infatti, la temperatura a cui l'enzima mostra la massima attività catalitica è da 16 a 26°C superiore alla temperatura ottimale di crescita del batterio, in dipendenza del tipo di attività funzionale esaminata (sintesi di poli(Phe) ed attività GTPasica). Per quanto concerne la termostabilità, la differenza tra la temperatura di semi-inattivazione (46°C) e quella di semi-denaturazione (52°C) della proteina potrebbe essere spiegata da un diverso comportamento dei domini che costituiscono il fattore verso la denaturazione termica. Tali dati sono stati anche interpretati dall'analisi del modello della struttura tridimensionale di PhEF-G che ha messo in evidenza differenze strutturali con il fattore termofilo, utilizzato come modello di riferimento, solo in alcuni segmenti non strutturati di

collegamento tra regioni di struttura secondaria. Pertanto, i risultati ottenuti avvalorano l'ipotesi (Feller e Gerday, 1997; D'Amico et al., 2006; Siddiqui e Cavicchioli, 2006) secondo la quale gli enzimi psicrofili sono caratterizzati da una flessibilità localizzata in modo specifico solo in alcune porzioni della loro struttura proteica.

5. BIBLIOGRAFIA

- Al-Karadaghi S, Aevansson A, Garber M, Zheltonosova J, Liljas A (1996) The structure of elongation factor G in complex with GDP: conformational flexibility and nucleotide exchange. *Structure* 15: 555-565
- Arai K, Arai N, Nakamura S, Oshima T, Kaziro Y (1978) Studies on polypeptide-chain-elongation factors from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *Eur J Biochem* 92: 521-531
- Arai N, Arai K, Kaziro Y (1977) Further studies on the interaction of the polypeptide chain elongation factor G with guanine nucleotides. *J Biochem (Tokyo)* 82: 687– 694
- Arcari P, Masullo M, Arcucci A, Ianniciello G, de Paola B, Bocchini V (1999) A chimeric elongation factor containing the putative guanine nucleotide binding domain of archaeal EF-1 alpha and the M and C domains of eubacterial EF-Tu. *Biochemistry* 38: 12288-12295
- Baca OG, Rohrbach MS, Bodley JW (1976) Equilibrium measurements of the interactions of guanine nucleotides with *Escherichia coli* elongation factor G and the ribosome. *Biochemistry* 15: 4570-4574
- Barrick D, Villanueva K, Childs J, Kalil R, Schneider TD, Lawrence CE, Gold L, Stormo GD (1994) Quantitative analysis of ribosome binding sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 22: 1287-1295
- Bhargava K, Templeton P, Spremulli LL (2004) Expression and characterization of isoform 1 of human mitochondrial elongation factor G. *Protein Expr Purif* 37: 368-376
- Birolo L, Tutino ML, Fontanella B, Gerday C, Mainolfi K, Pascarella S, Sanna G, Vinci F, Marino G (2000) Aspartate aminotransferase from the

- Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. Cloning, expression, properties and molecular Modelling. *Eur J Biochem* 267: 2790-2802
- Bocchetta M, Gribaldo S, Sanangelantoni A, Cammarano P (2000) Phylogenetic depth of the bacterial genera *Aquifex* and *Thermotoga* inferred from analysis of ribosomal protein, elongation factor, and RNA polymerase subunit sequences. *J Mol Evol* 50: 366-80
- Bodley JW, Zieve FJ, Lin L, Zieve ST (1969) Formation of the ribosome-G factor-GDP complex in the presence of fusidic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 37: 437-443
- Bodley JW, Zieve FJ, Lin L, Zieve ST (1970) Studies on translocation. 3. Conditions necessary for the formation and detection of a stable ribosome-G factor-guanosine diphosphate complex in the presence of fusidic acid. *J Biol Chem* 245: 5656-5661
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Creti R, Ceccarelli E, Bocchetta M, Sanangelantoni AM, Tiboni O, Palm P, Cammarano P (1994) Evolution of translational elongation factor (EF) sequences: reliability of global phylogenies inferred from EF-1 alpha(Tu) and EF-2(G) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3255-3259
- D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep* 7: 385-389
- De Vendittis E, Adinolfi BS, Amatruda MR, Raimo G, Masullo M, Bocchini V (1999) The A26G replacement in the consensus sequence A-X-X-X-X-

- G-K-[T,S] of the guanine nucleotide binding site activates the intrinsic GTPase of the elongation factor 2 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Eur J Biochem 262: 600-605
- De Vendittis E, De Paola B, Gogliettino MA, Adinolfi BS, Fiengo A, Duvold T, Bocchini V (2002) Fusidic and helvolic acid inhibition of elongation factor 2 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Biochemistry 41: 14879-14884
- De Vendittis E, Masullo M, Bocchini V (1986) The elongation factor G carries a catalytic site for GTP hydrolysis, which is revealed by using 2-propanol in the absence of ribosomes. J Biol Chem 261: 4445-4450
- Dever TE, Glynias MJ, Merrick WC (1987) GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. Proc Natl Acad Sci USA 84: 1814-1818
- Feller G, Gerday C (1997) Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. Cell Mol Life Sci 53: 830-841
- Feller G, Narinx E, Arpigny JL, Aittaleb M, Baise E, Gerday C (1996) Enzymes from psychrophilic organisms. FEMS Microbiol Rev 18: 189-202
- Fraser CS, Herhey JW (2005) Movement in ribosome translocation. J Biol 4: 8-11
- Georlette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Hoyoux A, Marx JC, Sonan G, Feller G, Gerday C (2004) Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. FEMS Microbiol Rev 28: 25-42
- Gueux N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18: 2714-

- Hansson S, Singh R, Gudkov AT, Liljas A, Logan DT (2005) Structural insights into fusidic acid resistance and sensitivity in EF-G. *J Mol Biol* 348: 939-949
- Herbert RA, Sharp RS (1992) *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*, Blakie Press, New York, USA
- Hoyoux A, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Huston AL, Marx JC, Sonan G, Zeng Y, Feller G, Gerday C (2004) Extreme catalysts from low-temperature environments. *J Biosci Bioeng* 98: 317-330
- Jaenicke R, Zavodszky P (1990) Proteins under extreme physical conditions. *FEBS Lett* 268: 344-349
- Johanson U, Aevansson A, Liljas A, Hughes D (1996) The dynamic structure of EF-G studied by fusidic acid resistance and internal revertants. *J Mol Biol* 258: 420-432
- Johanson U, Hughes D (1994) Fusidic acid-resistant mutants define three regions in elongation factor G of *Salmonella typhimurium*. *Gene* 143: 55-59
- Kaziro Y (1978) The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. *Biochim Biophys Acta* 505: 95-127
- Klink F (1985) Elongation Factors. In: Woese CR, Wolfe R (eds) *The Bacteria* vol. 8. Academic Press, London, pp 379- 410
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Lucas-Lenard J (1971) Protein biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 40: 409-448
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular Cloning*. Cold Spring

Harbor Laboratory

- Martemyanov KA, Liljas A, Yarunin AS, Gudkov AT (2001) Mutations in the G-domain of elongation factor G from *Thermus thermophilus* affect both its interaction with GTP and fusidic acid. *J Biol Chem* 276: 28774-28778
- Marx JC, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Delille D, Gratia E, Hoyoux A, Huston AL, Sonan G, Feller G, Gerday C (2004) A perspective on cold enzymes: current knowledge and frequently asked questions. *Cell Mol Biol* 50: 643-655
- Masullo M, Arcari P, de Paola B, Parmeggiani A, Bocchini V (2000) Psychrophilic Elongation Factor Tu from the Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* Sp. TAC II 25. Biochemical characterization and cloning of the encoding gene. *Biochemistry* 39: 15531-15539
- Masullo M, Parlato G, De Vendittis E, Bocchini V (1989) Effect of propan-2-ol on enzymic and structural properties of elongation factor G. *Biochem J* 261: 725-731
- Miller DL, Weissbach H (1977) In *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis* (Weissbach H and Pestka S, eds), 323-373, Academic Press, New York
- Nagaev I, Bjorkman J, Andersson DI, Hughes D (2001) Biological cost and compensatory evolution in fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 40: 433-439
- Parmeggiani A, Sander G (1981) Properties and regulation of the GTPase activities of elongation factors Tu and G, and of initiation factor 2. *Mol Cell Biochem* 35:129-158

- Peitsch MC (1996) ProMod and Swiss-Model: internet-based tools for automated comparative protein modeling. *Biochem Soc Trans* 24: 274-279
- Peske F, Savelsbergh A, Katunin VI, Rodnina MV, Wintermeyer W (2004) Conformational changes of the small ribosomal subunit during elongation factor G-dependent tRNA-mRNA translocation. *J Mol Biol* 343: 1183-1194
- Post LE, Nomura N (1980) DNA sequences from the str operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 255: 4660-4666
- Pribnow D (1975) Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. *J Mol Biol* 99: 419-433
- Raimo G, Lombardo B, Masullo M, Lamberti A, Longo O, Arcari P (2005) Elongation factor Ts from the Antarctic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125: biochemical characterization and cloning of the encoding gene. *Biochemistry* 43: 14759-14766
- Raimo G, Masullo M, Bocchini V (1995) Studies on the polypeptide elongation factor 2 from *Sulfolobus solfataricus*. Interaction with guanosine nucleotides and GTPase activity stimulated by ribosomes. *J Biol Chem* 270: 21082-21085
- Raimo G, Masullo M, Parente A, Dello Russo A, Bocchini V (1992) Molecular, functional and structural properties of an archaeobacterial elongation factor 2. *Biochim Biophys Acta* 1132: 127-132
- Raimo G, Masullo M, Scarano G, Bocchini V (1996) The site for GTP hydrolysis on the archaeal elongation factor 2 is unmasked by aliphatic alcohols. *Biochimie* 78: 832-837

- Rheinberger HJ (1991) The function of the translating ribosome: allosteric three-site model of elongation. *Biochimie* 73: 1067-8
- Sander G, Marsh RC, Voigt J, Parmeggiani A (1975) A comparative study of the 50S ribosomal subunit and several 50S subparticles in EF-T-and EF-G-dependent activities. *Biochemistry* 14:1805-1814
- Shine J, Dalgarno L (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 1342-1346
- Siddiqui KS, Cavicchioli R (2006) Cold-adapted enzymes. *Annu Rev Biochem* 26: 403-433
- Stark H, Rodnina MV, Wieden HJ, van Heel M, Wintermeyer W (2000) Large-scale movement of elongation factor G and extensive conformational change of the ribosome during translocation. *Cell* 100: 301-309
- Thomas T, Cavicchioli R (2000) Effect of temperature on stability and activity of elongation factor 2 proteins from Antarctic and thermophilic methanogens. *J Bacteriol* 182: 1328-1332
- Willie GR, Richman N, Godtfredsen WO, Bodley JW (1975) Some characteristics of and structural requirements for the interaction of 24,25-dihydrofusidic acid with ribosome – elongation factor G complexes. *Biochemistry* 14: 1713-1718
- Zuber H (1988) Temperature and adaptation of lactate dehydrogenase. Structural, functional and genetic aspects. *Biophys Chem* 29: 171-179