

ABBREVIAZIONI.....	3
SUMMARY.....	4
1. INTRODUZIONE.....	10
1.1 La struttura tridimensionale delle proteine e la relazione "struttura funzione"	10
1.2 Caratterizzazione strutturale a bassa risoluzione: il ruolo della spettrometria di massa	11
1.3 Scopo del progetto di tesi	14
2. ANALISI CONFORMAZIONALE DI PROTEINE AMILOIDI.....	16
2.1 Il problema del folding	16
2.2 Una manifestazione del misfolding proteico: la fibrillogenesi.....	17
2.3 Patologie amiloidi connesse ad alterazioni dell'Apolipoproteina A1 (Apo-A1)	21
2.3.1 Materiali e metodi	22
2.3.2 RISULTATI	24
2.3.2a Cromatografia ad esclusione molecolare	24
2.3.2b Saggi di attività enzimatica	25
2.3.2c Esperimenti di proteolisi limitata	26
Idrolisi con tripsina.....	27
Idrolisi con chimotripsina	29
Idrolisi con subtilisina	31
Idrolisi con elastasi	33
Idrolisi con endoproteasi V8	35
2.3.3 DISCUSSIONE.....	36
2.4 L'acilfosfatasi da <i>Sulfolobus solfataricus</i> (SsAcP)	38
2.4.1 Materiali e metodi	39
2.4.2 RISULTATI	41
2.4.2a Cromatografia ad esclusione molecolare.....	41
2.4.2b Saggi di attività enzimatica	42
2.4.2c Esperimenti di proteolisi limitata	42
Idrolisi con tripsina.....	43
Idrolisi con chimotripsina	45
Idrolisi con subtilisina	46
Idrolisi con elastasi	49

Idrolisi con termolisina	49
Idrolisi con Glu-C	51
2.4.2d Esperimenti di scambio Idrogeno/Deuterio	52
2.4.3 DISCUSSIONE	53
2.5 Caratterizzazione strutturale di mutanti fibrillogenici della mioglobina	58
2.5.1 Materiali e metodi	59
2.5.2 RISULTATI	61
2.5.2a Esperimenti di proteolisi limitata	61
2.5.2b Esperimenti di scambio Idrogeno/Deuterio sulle proteine intatte	63
2.5.2c Flessibilità conformazionale delle regioni proteiche	65
2.5.3 DISCUSSIONE	67
3. ANALISI STRUTTURALE DI COMPLESSI PROTEICI	70
3.1 Caratterizzazione strutturale della proteina IF ₁ e del complesso IF ₁ -Calmodulina	70
3.1.1 Materiali e Metodi	72
3.1.2 RISULTATI della caratterizzazione strutturale di IF ₁	74
3.1.2a Analisi dello stato oligomerico di IF ₁ mediante ESMS in condizioni native	74
3.1.2b Caratterizzazione strutturale di (IF ₁) ₂ mediante strategie di proteolisi limitata	75
Idrolisi con tripsina	75
Idrolisi con Glu-C	77
Idrolisi con chimotripsina	77
3.1.2c Crosslinking di (IF ₁) ₂	78
3.1.3 RISULTATI della caratterizzazione strutturale di IF ₁	80
3.1.3a Analisi della stechiometria del complesso IF ₁ -CaM mediante cromatografia ad esclusione molecolare ed ESMS	80
3.1.3b Crosslinking del complesso IF ₁ -CaM	81
3.1.4 DISCUSSIONE	85
BIBLIOGRAFIA	90

ABBREVIAZIONI

ESI	Electrospray Ionization
ES/MS	Spettrometria di Massa ESI
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MALDI/MS	Spettrometria di Massa MALDI
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
TFA	Acido trifluoroacetico
TFE	2,2,2-trifluoroetanolo
TOF	Tempo di volo (Time Of Flight)
UV	Ultra Violetto
AmAc	Tampone ammonio acetato
TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminometano
m/z	rapporto massa/carica
HDX	scambio idrogeno/deuterio
α -ciano	acido α -ciano-4-idrossicinnamico
sinapinico	acido 3,5-Dimetossi-4-idrossicinnamico
Apo-A1	Apolipoproteina A1
SsAcP	Acilfosfatasi da <i>Sulfolobus solfataricus</i>
IF ₁	Inhibitor Factor 1
CaM	Calmodulina
EDAC	(1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide).

SUMMARY

Proteins carry out their biological role by adopting particular conformations. The physico-chemical properties of a protein molecule are dictated by its three-dimensional structure and are quite different from those predicted by the sum of the properties of individual aminoacids. The three-dimensional structure of a protein, called tertiary structure, is given by the three dimensional arrangement of the secondary structure elements (α -helix, β -sheets and β -turns), together with the aminoacids side chains spatial distribution. The achievement of the native protein three-dimensional structure, which is essential to the proper function of the molecule, is obtained through a complex path called folding. The structural approach to studying this process is based on characterization of the largest possible number of intermediate and partially structured conformations adopted by the protein during the process. Moreover, these intermediates are often metastable and are therefore not suitable to analysis. When analysis with high resolution techniques (nuclear magnetic resonance or X-ray diffraction) is prevented, a sufficiently accurate "picture" of the three-dimensional structure of a protein can still be obtained by using a different approach based on biochemical techniques, like complementary proteolysis crosslinking and hydrogen/deuterium exchange experiments combined with mass spectrometry analysis. Although these methods do not provide high-resolution data, they allow to investigate both surface exposure and the structuring degree of the different regions of a protein molecule isolated and/or involved in the formation of molecular complexes.

Complementary proteolysis is based on the evidence that the three-dimensional structure of a protein acts as a barrier against the enzymatic hydrolysis, which occurs only on exposed and flexible regions of the backbone. In order to grant stability of the target protein, controlled experimental conditions (pH, T, time, Ionic strength, E/S ratio) are used, since they will produce a single hydrolysis on the exposed/flexible region of the protein and the mass of the two resulting complementary peptides will be easily determined by ES/MS, even when they are present in trace amounts. By using a wide range of proteases, it will then become possible to obtain a detailed picture of the exposed protein backbone. The use of identical proteolysis conditions for different protein states will allow comparison of different conformations.

Amide H/D exchange experiments allow to elucidate the structural level, flexibility and stability of the protein target. At pH 7, the exchange rate of amide hydrogens in a polypeptide chain can range from milliseconds to months. This depends on the exchanging protons being located in regions stabilized or not by hydrogen bonding, and on accessibility to solvents. As a consequence, availability of the protein's amide protons to isotopic exchange is a useful parameter for performing structural analysis.

The isotopic exchange process has been observed either by NMR, or, more recently, by mass spectrometry. NMR is able to provide an average measure of the exchange rate of a single amide hydrogen. It gathers information on the degree of freedom of the single aminoacid residues and on their solvent exposition, allowing the detailed observation of specific protein regions. Mass spectrometric techniques, on the other way, are able to measure the total number of exchanged protons, which is a direct function of the secondary structure content, and to evaluate the exchange kinetics, related to protein flexibility. Besides, this technique allows to point out possible heterogeneities and to assess the behavior of different conformations in the mixture, which is impossible using NMR. To compensate for the lack of structural details of the mass spectrometry approach to H/D exchange, another method has been developed by using enzymatic hydrolysis of the protein after the isotopic exchange.

Another highly informative approach is the crosslinking strategy; by using the bifunctional chemical reagents it is possible to freeze the weak interactions that stabilize the three-dimensional structure of the protein or the quaternary structure of protein complexes into covalent bonds. Chemical crosslinking experiments followed by enzymatic digestion and identification by mass spectrometry of chemically related peptides can give low-resolution structural informations on interaction regions involved in protein-protein complexes.

This PhD thesis focuses on application of the above strategies to the conformational analysis of amyloid intermediates and to the identification of protein regions involved in the formation of fibrils, both for proteins involved in pathological phenomena and for model systems. Furthermore, this kind of approach was used to describe the surface topology of proteins and protein complexes.

Several diseases, such as Alzheimer, Parkinson's, prion disease, DRA etc. are related to the presence of ordered aggregates, named "amyloid fibrils", at different tissue levels. These aggregation phenomena are often triggered by pathological conditions and involve a partial unfolding of the native conformation leading to the formation of "amyloid intermediates", with a high aggregation tendency. In many cases, it was shown that the disease is caused by a mutation in the gene that encodes the protein, but for many others, in which the primary structure of the protein is perfectly preserved, the reasons are still unknown. Although these syndromes are generated from the aggregation of a precursor protein specific for each disease, amyloid fibrils generated show, in all cases, only elements of β -strand secondary structure organized in a supersecondary structure called β -cross. The molecular study of this phenomenon requires characterization of transient intermediate oligomers and fibrils.

The Apolipoprotein A1 is a high-density lipoprotein composed of 243 aminoacids, associated with a form of systemic amyloidosis caused by mutations carried by the

coding gene. In all cases of amyloidosis associated with ApoA-I, amyloid fibrils essentially consist of a 90 amino acid peptide released from the N-terminus of the intact protein. In Leu174Ser amyloidosis, the main constituent of fibrils is the 1-93 peptide which, based on circular dichroism (CD) data obtained in physiological conditions, seems to have a highly disordered structure. At acid pH it collapses in a more compact transient state, with a low proportion of helical structure that rapidly converts into a fibrillary form. The helical conformation can be induced and stabilized by 2,2,2- trifluoroethanol (TFE). The conformational changes that occur in ApoA-I in absence and in presence of TFE were characterized by size exclusion chromatography and by limited proteolysis experiments combined with mass spectrometry analysis, which enabled identification of the generated fragments. The gel filtration experiments performed on the 1-93 fragment in absence and in presence of 20% TFE showed that the fragment undertook different quaternary structures in the two conditions. In the absence of cosolvent, the 1-93 peptide showed a homodimeric structure, while in 20% TFE the fragment became a monomer. The limited proteolysis experiments, performed in absence and in presence of 20% TFE using several proteases, showed an almost identical distribution of preferential hydrolysis sites; in both conditions, the 1-93 peptide displayed accessibility to the N-terminus and to the central region, while the C-terminus it was completely resistant to protease. These results indicated that in native conditions the 1-93 peptide has a flexible dimeric structure, stabilized by intermolecular interactions. Probably, the region involved in the oligomerization is the C-terminus of the molecule, since it is completely resistant to protease in the limited proteolysis experiments; this observation is supported by secondary structure predictions generated through appropriate algorithms, which suggest the propensity of this portion to form coiled coil structures. The presence of TFE induces the 1-93 peptide conformational transition, which leads to dissociation of the dimer; this conformational change seems to involve the C-terminal region, which remains protected by protease activity, although probably because of the conversion to a more compact structure which could remember the helical transient intermediate structure induced and stabilized by TFE.

In recent years, it has been demonstrated that many proteins not directly involved in disease may generate amyloid fibrils in appropriate conditions; It is therefore important to study model systems in which the aggregation process can be induced *in vitro*, allowing characterization and isolation of the amyloid intermediates. One of these proteins is Acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus* (*Ss.AcP*). Preliminary studies conducted by CD and by interaction with specific dyes showed the ability of this protein to aggregate. In particular, in the presence of 15-25% TFE, *Ss.AcP* quickly converts into fibrillar aggregates. The size exclusion chromatography experiments performed at 0% and 25% TFE showed that the protein is a monomer in both cases. The elution volume

observed at 25% TFE was lower than the one observed at 0% TFE, suggesting the occurrence of a conformational change affecting the hydrodynamic properties. Limited proteolysis experiments at 0% TFE showed exposure of both N-terminus and C-terminus regions of the protein. At 25% TFE, the preferential hydrolysis site distribution remained essentially unchanged, although the kinetics of hydrolysis in the N-terminus and C-terminus of the protein were slower than the experiments in native conditions. The curves obtained from the H/D exchange experiments performed at 0% and 25% TFE showed very quick exchange kinetics in both cases. Furthermore, the conformation adopted by *SsAcp* in the presence of 25% TFE incorporated more deuterium, suggesting that it is more flexible than the native one.

It can be concluded that the TFE determines a general increase in the overall flexibility of a protein without introducing substantial changes, except for a local structural condensation and stabilization of the N-terminus and C-terminus regions of the protein. The absence of substantial conformational changes suggests that *SsAcp* adopts a native-like conformation in the presence of TFE.

Another useful model protein for studying amyloidosis is sperm-whale myoglobin, a small, alpha helical protein that contains two highly conserved tryptophanyl residues located at positions 7 and 14 in the N-terminal region of the molecule. The folding pathway of this protein goes through the formation of a well defined heme-free intermediate conformation, that shows "molten globule" structural characteristics where only three of the eight helices (A, G and H) are structured as in the native state. This sperm-whale apo-myoglobin (apoMb) intermediate, stable at pH 4, is of particular interest for folding analysis.

The simultaneous replacement of both tryptophanyl residues in position 7 and 14 with two phenylalanine residues (W7FW14F) influences the folding pathway of the apoMb: in physiological conditions, this mutant aggregates in amyloid-like fibrils. This suggests that these residues play a key role in the folding process of the sperm-whale myoglobin. The mutant W7FW14F assumes a partially folded structure at pH 4 (molten globule state), but it forms aggregates at increasing pH values, ranging from 4 to 7.

The limited proteolysis experiments combined with mass spectrometry analysis show that at pH 4 the AGH domain of the double mutant is organized differently from the wild type protein; In particular, helix G is accessible to protease, while helix E is partially protected, suggesting that the W7FW14F folding intermediate differs from the wild type one. The HDX experiments performed on the double mutant, on the two single mutants (W7F and W14F) and on the wild type protein show that W7FW14F exhibit a significant increase in flexibility compared to the wild type protein; single mutants show similar curves compared with W7FW14F; this means that one mutation is sufficient to increase protein flexibility. Local exchange profiles show that the replacement in position 14

produces a drastic effect on flexibility of N-terminal region; on the contrary, replacement in position 7, which contributes to an increase in local hydrophobicity, promotes the aggregation process. It is therefore conceivable that the double mutation destabilizes the AGH domain interactions, leading to an alternative folding process which promotes the formation of interchain interactions and, consequently, the amyloid aggregation process.

The methods described above may also provide an effective approach to the characterization of non-covalent complexes, in a manner similar to the complex formed between the ATPsynthase inhibitor of the mitochondrial membrane (IF₁) and calmodulin. IF₁ exists in two pH-dependent oligomeric states: at < pH 6.5 it exists as a biologically active dimer, whereas at pH > 6.5 it forms a tetramer and is no longer able to inhibit F₁. Several structural studies have been performed on various IF₁ fragments; in particular, NMR analysis revealed that in acidic conditions IF₁ is a dimer, and forms an α -helix coiled coil structure involving the C-terminal end of the molecule. The N-terminal region becomes available for binding ATPsynthase or other partners. Recently, the interaction between IF₁ and calmodulin (CaM), a very abundant 148 aa protein present in all higher organisms cytoplasm and highly conserved during evolution, has been suggested. CaM regulates a multitude of processes, including metabolism, apoptosis, muscle contraction and the immune response. Characterization of IF₁ oligomeric state and of the complex formation with CaM can be performed through topological investigation strategies, such as limited proteolysis and chemical crosslinking experiments combined with mass spectrometry analysis. A structural study was performed on IF₁ oligomeric state at pH 5. This protein was analyzed by electrospray mass spectrometry in native conditions. This ionization mode provides the great advantage of preserving the non-covalent complex in gaseous phase. Multiply charged ion ESMS spectrum allowed to confirm the dimeric form at pH 5. Limited proteolysis experiments highlighted IF₁ surface topology, which showed a strong accessibility at the N-terminal region and its extreme protection in the C-terminal portion, confirming that this region is involved in dimerization as indicated in the literature. Interaction regions at the omodimeric interface of IF₁ were analyzed by crosslinking reaction. The covalent bond between the two subunits was generated by reaction with EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), an eterobifunctional reagent forming a zero-length isopeptidic bond between the carboxylic group of a Glutamic residue side chain and the ϵ amino group of a Lysine residue, or the end of a free N-terminal protein. MALDIMS analysis of the peptide mixture obtained as a result of the enzymatic digestion of the reaction product identified the formation of a covalent bond between the C-terminal peptide of one unit and a peptide protein localized in the central portion of the other IF₁ unit.

The stoichiometry of the complex IF₁-CaM was observed using a variety of approaches; size exclusion chromatography showed a single peak with an elution volume indicative of the presence of a single species having an apparent molecular weight of 26kDa, corresponding to the association of a CaM molecule with a monomer of IF₁. ESMS in native conditions showed the multiply charged ion distribution of the complex, whose molecular weight indicated the association of one molecule of CaM with one monomer of IF₁, coordinated to 4 Ca²⁺ ions. The interaction regions between these two molecules were investigated by chemical crosslinking experiments followed by chemical and enzymatic hydrolysis and mass spectrometry analysis. These experiments allowed identification of the residues directly involved in the interaction between the two proteins; these residues are located at the CaM C-terminal and at the N-terminal region of IF₁, respectively. According to the observation that IF₁ inhibits the F₁ subunit by its N-terminal region, it is possible to envisage a role of Calmodulin on ATPsynthase regulation.

1. INTRODUZIONE

1.1 La struttura tridimensionale delle proteine e la relazione "struttura funzione"

Le proteine, probabilmente le molecole più importanti e versatili esistenti in natura, svolgono il loro ruolo biologico grazie alla particolare conformazione che assumono. Le proprietà chimico-fisiche di una molecola proteica sono infatti dettate dalla sua struttura tridimensionale e sono ben diverse da quelle prevedibili in base alla somma delle proprietà dei singoli amminoacidi che la costituiscono.

La struttura tridimensionale di una proteina, detta struttura terziaria, è data dall'arrangiamento nelle tre dimensioni degli elementi di struttura locale o secondaria (α -eliche, foglietti β e ripiegamenti β), insieme con la disposizione spaziale delle catene laterali degli amminoacidi in esse presenti. La struttura terziaria è stabilizzata da diverse interazioni, covalenti e non: ponti disolfurici, legami idrogeno, interazioni elettrostatiche e interazioni idrofobiche; esse si realizzano anche, e soprattutto, tra atomi lontani tra loro nella sequenza lineare e la struttura proteica è il risultato dell'equilibrio che si instaura tra queste forze. Le interazioni idrofobiche sono le principali responsabili dell'avvio del processo di ripiegamento (*foldig*) di una proteina (Dill, 1990): una catena polipeptidica posta in un mezzo acquoso tende infatti ad avvolgersi in modo da formare un nucleo interno di gruppi idrofobici "nascosti" al solvente. Ai legami idrogeno si deve gran parte della stabilità degli elementi di struttura secondaria, ma non solo: la complessa rete di legami idrogeno che si instaura tra i gruppi $-NH$ e $-CO$ della catena polipeptidica, le molecole d'acqua e le catene laterali degli amminoacidi non alifatici fornisce un guadagno entalpico che contribuisce in modo determinante alla stabilità della struttura terziaria. I ponti disolfurici, unici legami covalenti tra atomi lontani in sequenza, conferiscono particolare rigidità ad alcune proteine e dettano il corretto ripiegamento della catena polipeptidica durante il *foldig*. Infine, le interazioni elettrostatiche che si vengono a creare tra gruppi ionizzati all'interno del nucleo idrofobico della struttura proteica forniscono un contributo stabilizzante, sia entalpico che entropico, talora essenziale al mantenimento della conformazione nativa.

Il risultato è l'ottenimento di una proteina strutturata e biologicamente attiva, in grado di interagire con effettori e riconoscere correttamente substrati, trasmettere segnali o catalizzare le più svariate reazioni; risulta quindi evidente la stretta correlazione esistente tra la struttura tridimensionale di una proteina ed il ruolo che essa è chiamata a svolgere. Tuttavia, mentre la soluzione della struttura dell'acido deossiribonucleico (DNA) ha consentito di delucidare i diversi meccanismi nei quali il DNA è coinvolto (Watson, Crick, 1953), la determinazione della struttura tridimensionale di mioglobina (Kendrew et al., 1960) ed emoglobina (Perutz et al., 1960) non ha fornito spiegazioni

semplici e di applicabilità generale che correlino la struttura di una proteina con la funzione che essa esplica. Una causa di tale difficoltà sta probabilmente nel fatto che le numerose funzioni biologiche che una proteina è chiamata a svolgere richiedono una discreta complessità strutturale. Inoltre, la grande complessità di cui sono dotate queste molecole fa sì che la struttura nativa di una molecola proteica sia solo parzialmente univoca, in quanto la conformazione può cambiare in risposta alle condizioni chimico-fisiche del mezzo in cui è posta.

1.2 Caratterizzazione strutturale a bassa risoluzione: il ruolo della spettrometria di massa

Le uniche tecniche in grado di descrivere strutture tridimensionali di proteine con elevata risoluzione sono la diffrazione ai raggi X, realizzata irradiando proteine ottenute in forma cristallina, e la risonanza magnetica nucleare (NMR), condotta in soluzione.

Tuttavia il successo nella cristallizzazione del campione e l'accumulo di esso in elevate quantità sono caratteristiche essenziali per l'ottenimento di informazioni dalla diffrazione ai raggi X. Un altro limite a questa tecnica risiede nella natura empirica dei metodi di cristallizzazione, che sono basati su alterazioni di parametri chimico-fisici della soluzione proteica. È importante notare che la proteina nel cristallo risente di forze ben diverse da quelle presenti in condizioni fisiologiche. Ciò implica che la struttura della proteina all'interno del cristallo potrebbe non essere quella presente nella cellula vivente; infine se la funzione di una proteina è dovuta alla coesistenza di differenti conformazioni in equilibrio tra loro, potrebbe accadere che solo una di queste cristallizzi (Piccoli et al., 1992). In ogni caso questa tecnica è l'unica che consenta un'analisi diretta della struttura tridimensionale di proteine, garantendo una risoluzione dell'ordine di pochi Å.

L'NMR costituisce un valido approccio alternativo, ma non è in grado di analizzare proteine costituite da più di 200/250 amminoacidi. Il principale vantaggio di questa tecnica risiede nel fatto che l'analisi NMR viene eseguita in soluzione e descrive quindi una condizione meno lontana da quella fisiologica; inoltre, potendo studiare le proteine in assenza delle forze di impacchettamento proprie del reticolo cristallino, questa indagine consente di avere informazioni circa la flessibilità della proteina analizzata (Dyson, Wright, 1998). Il recente sviluppo di strumenti per l'analisi NMR ha potenziato la sensibilità di questa tecnica; tuttavia i principali limiti risiedono ancora nell'ammontare di campione necessario a questo tipo di analisi e nel grado di solubilità delle proteine nei solventi adoperati.

Come accennato in precedenza, una delle caratteristiche più rilevanti delle strutture proteiche è la loro flessibilità; la capacità delle proteine di andare incontro a variazioni conformazionali "indotte" è, d'altra parte, alla base di moltissimi processi di

riconoscimento ed attivazione. Inoltre lo stesso processo di *fold*ing costituisce il più noto ed estremo esempio di processo dinamico che coinvolge le proteine.

L'approccio strutturale allo studio di questi processi consiste nel caratterizzare il maggior numero possibile di conformazioni intermedie e parzialmente strutturate assunte dalla proteina durante il processo stesso. Tuttavia tali intermedi risultano metastabili e, quindi, difficilmente analizzabili. Una soluzione parziale di questo problema è costituita dallo studio degli stati parzialmente strutturati di proteine, che possono spesso essere ottenuti ponendo le proteine in condizioni di blanda denaturazione (pH acido, basse concentrazioni di denaturanti chimici, ecc); tali stati mostrano infatti proprietà molecolari molto simili a quelle di alcune conformazioni intermedie. Inoltre è sempre più evidente che l'analisi delle caratteristiche strutturali degli stati non-nativi può fornire importanti informazioni sul *fold*ing proteico, sulla stabilità delle proteine ed il loro *turnover* all'interno delle cellule (Walsh et al, 1999). Infine le conformazioni metastabili assunte in alcune condizioni dalle proteine *in vivo* giocano un ruolo primario nell'interazione e nell'aggregazione proteica, alla base di numerose patologie.

Nei casi in cui non sia possibile ricorrere all'analisi ad alta risoluzione, si può ottenere un'"immagine" accurata della struttura tridimensionale di una proteina utilizzando un approccio basato sull'integrazione di tecniche biochimiche, quali proteolisi complementare, esperimenti di *crosslinking* e scambio idrogeno/deuterio con l'analisi mediante spettrometria di massa. Sebbene questi metodi non siano in grado di fornire dati ad alta risoluzione, essi consentono di investigare sia l'esposizione superficiale che il grado di strutturazione delle diverse regioni di una molecola proteica isolata (Scaloni et al., 1998; Orrù et al., 1999) e/o coinvolta nella formazione di complessi molecolari solubili (De Lorenzo et al., 1998; Scaloni et al., 1999).

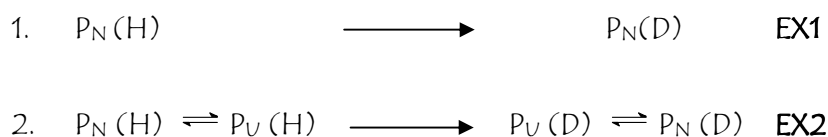
La proteolisi complementare è basata sull'evidenza che la struttura tridimensionale di una proteina costituisce una vera e propria barriera stereochimica all'idrolisi enzimatica; tale barriera rallenta, e talora impedisce, l'idrolisi dei legami peptidici a livello dei residui amminoacidici ubicati nel nucleo della proteina o all'interfaccia di complessi proteici, mentre consente l'accessibilità in corrispondenza di regioni esposte e dotate di una certa flessibilità perché non vincolate da interazioni intramolecolari (Fontana et al., 1986; Zappacosta et al., 1996).

Al fine di indirizzare l'attività degli enzimi proteolitici esclusivamente a livello dei legami peptidici localizzati in zone esposte ed ottenere un unico evento proteolitico con rilascio di peptidi complementari, gli esperimenti di proteolisi sono condotti in condizioni controllate di pH, tempo, temperatura e rapporto enzima/substrato. La determinazione del peso molecolare accurato dei due peptidi rilasciati consente di risalire univocamente al residuo amminoacidico a carico del quale è avvenuta l'idrolisi;

utilizzando inoltre un'ampia gamma di proteasi e combinando i risultati ottenuti in ciascun esperimento, è possibile definire l'accessibilità di intere regioni della proteina ed ottenere informazioni sulla topologia superficiale della molecola studiata.

Lo studio del processo di scambio isotopico a cui vanno soggetti gli atomi di idrogeno di una proteina posta in un solvente deuterato fornisce informazioni relative al livello di strutturazione di una molecola proteica in determinate condizioni (native o meno), alle variazioni conformazionali a cui è soggetta ed ai processi dinamici in cui è coinvolta. A pH 7 la velocità di scambio dei protoni ammidici può variare da pochi millisecondi ad alcuni mesi; questa enorme differenza tra i vari protoni è dettata da due fattori: la localizzazione dei protoni in regioni stabilizzate o meno da elementi di struttura secondaria e l'accessibilità al solvente (Englander SW et al., 1984). Pertanto, la disponibilità allo scambio isotopico dei protoni ammidici di una proteina costituisce un parametro utile per la sua analisi strutturale.

Il processo di scambio isotopico a carico degli idrogeni ammidici di una proteina, infatti, può procedere attraverso due vie (Bai Y et al., 1994):



Dove con P_N e P_U si indicano rispettivamente la proteina nella sua forma nativa e destrutturata, mentre la lettera tra parentesi si riferisce alla presenza di atomi di idrogeno (H) o di deuterio (D).

Il processo di scambio isotopico viene seguito sia mediante NMR (Englander, 2000) sia, più recentemente, mediante spettrometria di massa *electrospray* (Yan et al, 2004): la prima consente di stabilire la tendenza media allo scambio dei singoli protoni ammidici, fornendo informazioni dettagliate sul grado di libertà conformazionale di cui gode ciascun residuo amminoacidico e sulla sua esposizione al solvente, consentendo di osservare in dettaglio le caratteristiche di mobilità di specifiche regioni della proteina. Le tecniche di spettrometria di massa, d'altro canto, permettono sia di misurare l'incremento di massa associato all'incorporazione di deuteri, da cui si ricava il numero totale di protoni scambiabili, funzione diretta del contenuto in struttura secondaria, sia di stimare, effettuando prelievi a tempi diversi, la cinetica del processo stesso, fornendo così informazioni sulla flessibilità complessiva della proteina in esame.

Con questa tecnica è, inoltre, possibile evidenziare eventuali eterogeneità conformazionali della proteina: non essendo i dati MS mediati sull'intera popolazione, è possibile rivelare la presenza di specie coesistenti e monitorarne le proprietà di scambio in modo individuale (Miranker, 2000).

Per ovviare alla mancanza di dettaglio strutturale dei risultati che si possono ottenere mediante gli esperimenti di HDX accoppiati con tecniche analitiche di spettrometria di massa, sono state sviluppate strategie che prevedono un'idrolisi enzimatica della proteina successiva allo scambio isotopico (Wu Y, 2004): in questo modo è possibile individuare le regioni della proteina maggiormente coinvolte nel processo.

Un altro approccio altamente informativo è la strategia del *crosslinking*; l'utilizzo di reagenti bifunzionali consente di "congelare" deboli interazioni che stabilizzano la struttura tridimensionale di una proteina o la struttura quaternaria di complessi proteici, formando dei legami covalenti. Esperimenti di crosslinking chimico seguiti da digestione enzimatica ed identificazione mediante spettrometria di massa dei peptidi collegati chimicamente, possono dare informazioni strutturali a bassa risoluzione sui complessi proteina-proteina, fornendo un quadro di quali residui interagiscono e di come e dove si stabiliscono i contatti.

1.3 Scopo del progetto di tesi

Questo progetto di dottorato è volto all'applicazione delle strategie combinate descritte in precedenza all'analisi conformazionale di intermedi fibrillogenici e all'identificazione delle regioni proteiche coinvolte nella formazione delle fibrille, sia in proteine implicate in fenomeni patologici, che in sistemi modello. Inoltre questo tipo di approccio è stato impiegato per descrivere la topologia superficiale di proteine e di complessi proteici.

In particolare il progetto è stato focalizzato sullo studio dei processi dinamici che avvengono a carico di un frammento dell'Apolipoproteina A-I (Apo 1-93), coinvolto, *in vivo*, in processi fibrillogenici. Apo A-1 è una lipoproteina ad alta densità, associata ad una forma di amiloidosi sistemica dovuta a mutazioni nel gene che per essa codifica. Analisi condotte mediante tecniche di dicroismo circolare sembrano suggerire un effetto del pH sulla compattezza e sulla struttura secondaria del peptide: in soluzione acquosa a pH neutro, il peptide 1-93 si presenta in una forma non strutturata, mentre l'acidificazione della soluzione provocherebbe un collasso in una conformazione elicoidale più compatta, uno stato intermedio transiente, che rapidamente converte in una struttura stabile, prevalentemente β -sheet, che è poi quella riscontrata nelle fibrille degli aggregati. Spettri CD del peptide a pH neutro, hanno inoltre evidenziato che la struttura dell'intermedio fibrillogenico può essere indotta e stabilizzata da 2,2,2-trifluoroetanolo (TFE). Sono state quindi caratterizzate le variazioni conformazionali che avvengono in ApoA-I, in assenza ed in presenza di TFE; esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare ed esperimenti di proteolisi limitata abbinati ad analisi di

spettrometria di massa, hanno infatti consentito di delineare la topologia superficiale dell'intermedio fibrillogenico.

Sono state inoltre analizzate le variazioni conformazionali che avvengono a carico dell'acilfosfatasi da *Sulfolobus solfataricus* (*SsAcP*) in presenza di TFE (2-2-2 Trifluoroetano); studi recenti hanno dimostrato che *SsAcP*, in presenza del 15-25% (v/v) di TFE, forma aggregati fibrillari in grado di legare coloranti specifici quali Tioflavina T e Congo Red. Tale proteina, quindi, pur non essendo associata *in vivo* ad alcuna forma di amiloidosi, in opportune condizioni sperimentali si comporta come proteina modello nello studio del processo di fibrillogenesi. Allo scopo di indagare sui meccanismi molecolari che a partire dalla proteina nativa, attraverso intermedi solubili, portano alla formazione di fibrille amiloidi, sono stati condotti esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare, proteolisi limitata e scambio idrogeno/deuterio abbinati ad analisi di spettrometria di massa.

Queste metodologie hanno inoltre consentito di analizzare il processo di *folding* che avviene a carico di un doppio mutante della mioglobina da capodoglio (W7FW14F), che a pH 7 risente di variazioni conformazionali così drastiche da indurre la formazione di fibrille amiloidi. Ciò suggerisce che questi due residui giochino un ruolo chiave nel processo di *folding* di questa proteina. Gli esperimenti effettuati hanno consentito di investigare la topologia superficiale del doppio mutante, le variazioni conformazionali a cui è soggetto ed i processi dinamici in cui è coinvolto. Tutte le analisi sono state condotte a pH4, condizione in cui W7FW14F è stabile, monomero e parzialmente strutturato.

E' stata inoltre effettuata una caratterizzazione strutturale della proteina IF₁, l'inibitore naturale dell' ATP sintetasi mitocondriale, il cui stato oligomerico varia in funzione del pH. Lo studio è stato realizzato a pH acido, condizione in cui la proteina esplica, *in vivo*, la sua funzione inibitrice. Gli esperimenti di proteolisi limitata e *crosslinking* chimico abbinati ad analisi di spettrometria di massa hanno consentito di descrivere la topologia superficiale della molecola in esame e di definire le regioni di interazione nella struttura oligomerica prevalente nelle condizioni esaminate.

Studi recenti hanno suggerito una possibile interazione tra IF₁ e la calmodulina (CaM). L'ultima parte di questo progetto di tesi è stata quindi indirizzata alla caratterizzazione strutturale di tale complesso attraverso esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare e *crosslinking* chimico abbinati ad analisi di spettrometria di massa. Acquisire informazioni strutturali sul complesso IF₁-CaM, correlandole a quelle di IF₁, che allo stesso tempo, sotto forma di dimero deve esplicare il ruolo di inibitore della sintesi di ATP, potrebbe fornire delucidazioni sul ruolo funzionale alla base dell' interazione tra IF₁ e CaM.

2. ANALISI CONFORMAZIONALE DI PROTEINE AMILOIDI

2.1 Il problema del folding

Il processo secondo il quale una catena polipeptidica neo-sintetizzata acquista una determinata struttura tridimensionale è noto con il termine di *folding*. Studiare questo processo comporta, oltre alla caratterizzazione dello stato nativo e di quello denaturato della proteina in esame, l'identificazione e l'analisi strutturale delle conformazioni intermedie che la proteina assume durante il processo stesso.

Fra i modelli più importanti che descrivano il processo di *folding* ricordiamo il modello di nucleazione, il modello *framework* e di collasso idrofobico. Secondo il modello di nucleazione (Wetlaufer, 1973) il *folding* presenta uno stadio iniziale lento (nucleazione) che indirizza la proteina verso uno o più percorsi caratterizzati da un numero limitato di intermedi. Secondo il modello *framework* (Baldwin, 1979; Kim e Baldwin, 1990) negli stadi iniziali del *folding* si ha la formazione di elementi di struttura secondaria caratterizzati da una notevole stabilità. La conformazione nativa si ottiene dall'"impacchettamento" di tali strutture secondarie, stadio lento del processo. Secondo l'ultimo modello (Dill, 1985) la catena polipeptidica subisce un collasso idrofobico nei primi istanti del processo, che porta alla formazione di una specie intermedia, definita *molten globule*, caratterizzata da strutture secondarie simili a quelle presenti nello stato nativo, ma da interazioni terziarie fluttuanti. Lo stadio lento del processo è la conversione di tale intermedio nella forma nativa. Questi tre modelli sono comunque lontani dal dare una visione completa ed esauriente del processo del *folding*: il ripiegamento di una proteina potrebbe infatti racchiudere vari aspetti dei modelli analizzati.

Nonostante le catene polipeptidiche possedano un numero molto elevato di gradi di libertà e quindi di conformazioni possibili, il raggiungimento della struttura biologicamente attiva, associabile ad un minimo di energia libera tra quelli cinematicamente più favoriti, è, e deve essere, straordinariamente veloce ed efficiente. *In vivo*, il processo di *folding* ha luogo quasi completamente all'interno del reticolo endoplasmatico, dove la neo-sintetizzata catena polipeptidica trova un ambiente estremamente controllato, in termini di temperatura, pH, forza ionica, ecc., tutti parametri che influenzano la cinetica e l'efficienza del processo di ripiegamento. Quest'ultimo può seguire differenti percorsi passando attraverso la formazione di specie solo parzialmente strutturate detti intermedi di *folding*. Data la complessità del processo e soprattutto la necessità di ottenere proteine funzionali in tempi compatibili con la sopravvivenza della cellula, il ripiegamento della catena polipeptidica, sebbene sia un processo spontaneo, è assistito *in vivo* da numerosi enzimi e da altre proteine denominate *chaperones* molecolari.

Gli *chaperones* molecolari, normalmente agiscono impedendo l'aggregazione di proteine che non hanno ancora raggiunto la loro struttura definitiva, o perché sono ancora in via di sintesi, o perché devono essere traslocate attraverso le membrane prima di ripiegarsi.

Gli *chaperones* oltre ad assistere il processo di *foldng*, riconoscono le proteine che non hanno raggiunto la conformazione corretta all'interno del ER giocando un ruolo fondamentale in quello che è il meccanismo di controllo di qualità (QC) della cellula (Ellgaard et al., 2003).

Questo sistema di controllo è estremamente efficace e garantisce che solo le proteine correttamente ripiegate possano lasciare il ER e raggiungere le locazioni intra o extra cellulari dove sono deputate a svolgere la loro specifica funzione; invece, le catene polipeptidiche che non hanno superato il controllo qualità sono, in seguito a poliubiquitinazione, traslocate nel *citofosol* dove subiscono una degradazione proteosomiale (Lee S. et al., 2005).

2.2 Una manifestazione del misfolding proteico: la fibrillogenesi

Nonostante il sistema di controllo qualità sia estremamente efficiente, può capitare che la velocità di degradazione proteosomiale non sia commisurata alla necessità di eliminare tutte le catene polipeptidiche che, a causa di mutazioni genetiche o eventi proteolitici, non riescono a raggiungere il proprio stato nativo. Questi prodotti non funzionali danno luogo a fenomeni di aggregazione con formazione di corpi di inclusione all'interno del reticolo endoplasmatico (Ellgaard et al., 2003). Tali fenomeni possono coinvolgere anche proteine extracellulari che avendo acquisito una conformazione nativa o "*native-like*" superano il QC e sono secrete dalla cellula secondo le normali vie di secrezione. Qualora, però, esse vengano a trovarsi in particolari condizioni di microambiente, tali da indurre una parziale denaturazione, si può verificare un processo irreversibile, denominato fibrillogenesi, con formazione di aggregati proteici ordinati noti come fibrille amiloidi.

Entrambi i processi descritti, sia di carattere intra che extra cellulare, rientrano in un fenomeno più ampio noto con il termine di *misfolding* proteico.

Molte patologie degenerative, quali ad esempio il morbo d'Alzheimer e di Parkinson, il diabete di II tipo e l'encefalopatia spongiforme sono accomunate dalla presenza di questi peculiari aggregati fibrillari (Fig. 1) che hanno la caratteristica di depositarsi ed accumularsi in maniera invasiva in tessuti di vari organi quali, ad esempio, il cervello, il fegato e la milza (Chiti et al., 2004). Tali malattie, sono comunemente note come amiloidosi.

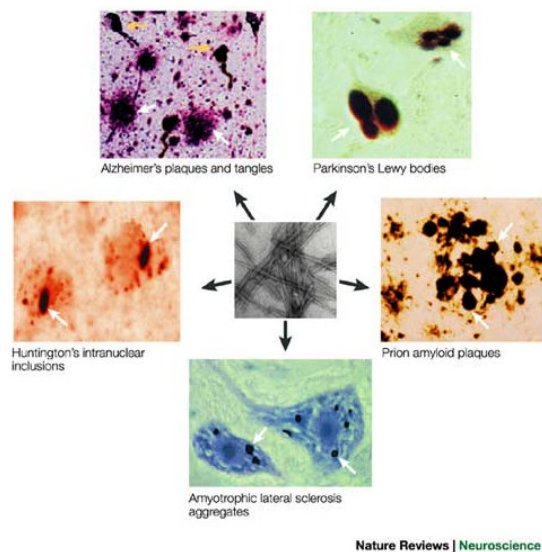


Figura 1: Placche amiloide in malattie neurodegenerative.

Studi effettuati su ciascuna manifestazione amiloide hanno permesso di isolarne il precursore proteico. In alcuni casi, la patologia ha un'origine genetica (Amiloidosi familiari) perchè imputabile ad una mutazione del gene codificante per la proteina (ad es. Amiloidosi da transtiretina); in altri (Amiloidosi sporadiche) la struttura primaria è perfettamente conservata tanto nell'individuo sano quanto nel malato (ad es. Amiloidosi reattiva) e, pertanto, le cause della malattia restano ancora oscure.

Sebbene le proteine coinvolte nelle diverse patologie amiloide non condividano struttura primaria, né secondaria generano, sorprendentemente, fibrille caratterizzate da una comune struttura supramolecolare detta β -cross, ricca di β -sheets che si dispongono paralleli tra loro e perpendicolari all'asse di accrescimento.

Il fatto che proteine tanto diverse diano luogo a fibrille tanto simili ha portato a ipotizzare un comune e del tutto generale meccanismo molecolare del processo di fibrillogenesi (Fig. 2).

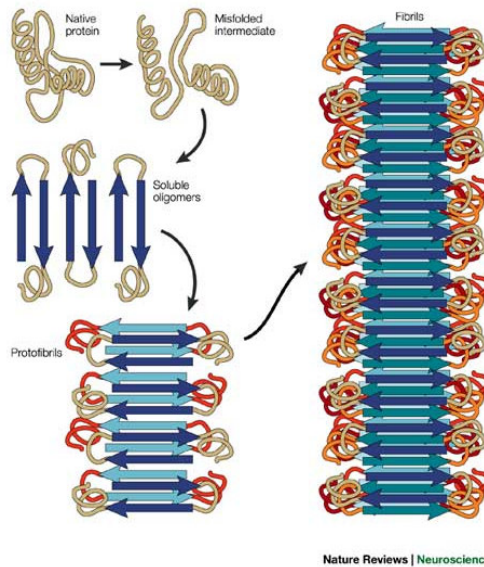


Figura 2: Rappresentazione schematica del processo di misfolding ed aggregazione in amiloidosi

Questo processo avviene prevalentemente nello spazio extra cellulare in presenza di specifiche condizioni di stress chimico-fisico quali variazioni di pH, forza ionica, temperatura etc., e procede attraverso una prima fase lenta in cui la proteina va incontro ad una parziale denaturazione formando intermedi caratteristici, detti appunto fibrillogenici: regioni che nella conformazione nativa erano poste nel *core* della proteina, si trovano esposte al solvente determinando, di conseguenza, l'instaurarsi di interazioni intermolecolari. Tali intermedi, pur conservando un certo contenuto di struttura secondaria e terziaria simile alla proteina nativa, possiedono una più alta percentuale di strutture β . È noto, inoltre, che la fibrillogenesi è concentrazione e nucleazione dipendente pertanto, la presenza di una piccola quantità di proteina nello stato fibrillogenico, può innescare immediatamente il processo di aggregazione a carico della proteina nella conformazione nativa (Nilsson M. R., 2004).

Il processo va avanti attraverso la formazione di oligomeri solubili, detti protofibrille, fino alla reazione irreversibile con la formazione di fibrille insolubili. La caratteristica struttura a β -cross, unitamente alla presenza di altri componenti quali SAP (serum amyloid protein), peptidoglicani ecc. (Merlini et al., 2003) fa sì che esse risultino *in vivo* estremamente resistenti all'azione proteolitica e, quindi, difficilmente eliminabili da parte dei comuni sistemi di difesa dell'organismo; nel tempo, perciò, le fibrille si accumulano inesorabilmente producendo le cosiddette placche amiloidi che si depositano in maniera estremamente invasiva in diversi tessuti (Dobson C. M. et al., 2003).

La struttura β -cross conferisce la capacità di legare coloranti specifici come Congo Red e Thioflavina T entrati oggi nell'uso comune per la diagnosi delle amiloidosi (Chiti et al., 2004).

Il processo di formazione delle fibrille amiloidi non è, ad oggi, ancora noto nei dettagli, soprattutto a causa dei problemi che si incontrano nella caratterizzazione dell'intermedio fibrillogenico la cui natura di proteina parzialmente destrutturata, particolarmente prona all'aggregazione, ne rende difficile l'isolamento e la caratterizzazione mediante i classici approcci quali NMR, diffrazione a raggi X, ecc.

La descrizione delle caratteristiche comuni a tutti gli intermedi fibrillogenici derivanti da proteine diverse, potrebbe essere d'aiuto per la comprensione del complesso meccanismo di aggregazione in cui essi sono coinvolti e costituire la base per la progettazione di comuni strategie terapeutiche, preventive o curative per le malattie di tipo amiloide.

Recenti studi hanno dimostrato che numerose proteine, non coinvolte in malattie di tipo amiloide, in opportune condizioni sperimentali sono in grado di convertire rapidamente in aggregati fibrillari (Chiti et al., 1999); ciò ha provato che la propensione a formare fibrille probabilmente è una capacità intrinseca della maggior parte delle proteine. Pertanto, risulta di fondamentale importanza studiare in dettaglio sistemi modello in cui la fibrillogenesi sia innescabile *in vitro* e in cui sia possibile isolare e caratterizzare l'intermedio fibrillogenico o la popolazione di stati intermedi.

Studi di mutazioni sito specifiche su proteine amiloidi hanno messo in relazione la capacità di una catena polipeptidica di formare fibrille con la sua stabilità termodinamica: è stato osservato che la tendenza a formare strutture ordinate è inversamente proporzionale alla stabilità termodinamica del mutante in esame (Chiti et al., 2001, Ramirez-Alvarado et al., 2000). Quindi, una possibile strategia curativa o preventiva per le malattie degenerative potrebbe basarsi sulla stabilizzazione, in condizioni patogene, della forma nativa rispetto all'intermedio fibrillogenico (Chiti et al., 2001).

2.3 PATOLOGIE AMILOIDI CONNESSE AD ALTERAZIONI DELL'APOLIPOPROTEINA A1 (APO-A1)

L'Apolipoproteina A1 (Apo-A1), principale rappresentante delle lipoproteine ad alta densità (HDL), è una proteina di secrezione della lunghezza di 243 amminoacidi. Prodotta nel fegato e nell'intestino tenue, essa lega e trasporta lipidi plasmatici, incrementando l'efflusso di colesterolo dai tessuti periferici. Tale "trasporto inverso del colesterolo" è consentito dalla struttura dinamica della proteina, che le permette di effettuare i cambiamenti conformazionali necessari per il passaggio dallo stato in cui essa è legata ai lipidi a quello completamente delipidato (Merlini et al., 2003).

In particolare l'analisi della sequenza di Apo-A1 ha indicato la presenza di eliche anfipatiche ripetute, lunghe 11 o 22 amminoacidi, probabilmente costituenti la regione che la proteina impiega per legare i lipidi; all'interno di tali eliche, il *pattern* dei residui idrofobici è simile a quello delle canoniche eptadi ripetute riscontrate per proteine *coiled-coil* (Merlini et al, 2003).

Fibrille amiloidi derivanti da Apo-A1 sono state riscontrate in pazienti affetti da una forma di amiloidosi sistemica associata a mutazioni nel gene che per essa codifica. Gran parte delle mutazioni identificate sono singole sostituzioni amminoacidiche che portano ad un'alterazione della carica proteica globale (+1) e presentano una localizzazione N-terminale. Per questa ragione si era inizialmente ipotizzato che un'alterazione nella distribuzione e/o nel numero delle cariche totali potesse essere una delle cause coinvolte nell'amiloidogenicità delle varianti di Apo-A1. Tuttavia, sebbene il principale costituente di queste fibrille sia effettivamente il frammento N-terminale della proteina (1-80/93), negli ultimi anni sono state riscontrate mutazioni anche in punti diversi della sequenza, non strettamente localizzati, cioè nella porzione iniziale. Alcune di esse (Leu174Ser, Arg173Pro), pur non apportando modifiche alla carica globale della proteina, si sono dimostrate ugualmente patogene.

Analisi condotte mediante tecniche di dicroismo circolare (CD) sembrano suggerire un effetto del pH sulla compattezza e sulla struttura secondaria del peptide: in soluzione acquosa a pH neutro, il peptide 1-93 si presenta in una forma non strutturata, mentre l'acidificazione della soluzione provocherebbe un collasso in una conformazione elicoidale più compatta, uno stato intermedio transiente, che rapidamente converte in una struttura stabile, prevalentemente β -sheet, che è poi quella riscontrata nelle fibrille degli aggregati. L'effetto del pH sulla conformazione del peptide è stato giustificato sulla base della sua sequenza amminoacidica: dei 93 residui, 20 sono carichi negativamente (10 Asp e 10 Glu), mentre 11 sono residui carichi positivamente (4 Arg e 7 Lys). La protonazione dei residui acidi sembra essere l'evento che porta alla conversione verso la struttura elicoidale transiente e, quindi, verso la conformazione a foglietto β . A pH neutro, infatti, i residui acidi inducono un fenomeno di repulsione di carica, responsabile

della struttura *random coil* osservata, mentre la neutralizzazione degli stessi residui operata dall'acidificazione della soluzione, eliminando la repulsione, favorirebbe il raggiungimento dell' α -elica. Lo stesso tipo di approccio (analisi CD) è stato poi utilizzato per determinare gli effetti dell'aggiunta di 2,2,2-trifluoroetanolo (TFE) o fosfolipidi alla miscela di reazione: i dati suggeriscono che entrambe le specie siano in grado di favorire la conformazione elicoidale caratteristica dell'intermedio (Merlini et al., 2003).

Questa parte del lavoro di tesi è stata quindi volta allo studio della topologia superficiale del frammento 1-93 dell'Apolipoproteina A1, sia in condizioni native, che in presenza di TFE. Lo scopo perseguito è stato quello di determinare, mediante le suddette metodiche di proteolisi limitata accoppiate a tecniche avanzate di spettrometria di massa, la conformazione assunta dal peptide 1-93 nelle due condizioni di reazione, evidenziando eventuali differenze conformazionali indotte sul peptide dall'aggiunta del cosolvente.

2.3.1 Materiali e Metodi

I campioni liofilizzati del frammento 1-93 dell'Apo-A1 estratti *ex vivo* da fibrille del miocardio sono stati gentilmente forniti dal Dipartimento di Biochimica dell'Università di Pavia.

La tripsina TPCK treated, la chimotripsina, Glu-C, la subtilisina, l'elastasi e le matrici acido α -ciano-4-idrossicinnamico e acido 3,5-Dimetossi-4-idrossicinnamico (acido sinapinico) sono state acquistate dalla Sigma.

La colonna per HPLC a fase inversa C₁₈ *narrow bore* (250 x 2.00 mm, 5 μ m) è della Phenomenex. L'acetonitrile impiegato nell'eluizione della colonna e l'acido trifluoroacetico (TFA) sono del tipo "HPLC grade": il primo è stato acquistato dalla Baker, mentre il secondo è della Carlo Erba.

Il 2,2,2-trifluoroetanolo è stato comprato dalla Fluka.

Gli esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare condotti su Apo-A1 hanno richiesto una colonna Superdex 75 pc 3,2/30, fornita dalla Pharmacia Biotech.

I substrati sintetici utilizzati per i saggi di attività enzimatica della chimotripsina e della subtilisina (N-succinyl-Gly-Gly-Phe-pNitroanilide), quello per la tripsina (N-Benzoyl-DL-Arginine-pNitroanilide) e per l'elastasi (N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-pNitroanilide) sono stati acquistati dalla Sigma.

Tutti gli altri solventi, sali e reagenti utilizzati sono prodotti ad alto grado di purezza della Carlo Erba.

Gli esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare sono stati condotti su un apparecchio SMART-System fornito dalla Pharmacia Biotech. La colonna utilizzata è la Superdex 75 pc 3,2/30 volume 2,4 ml equilibrata in tampone sodio fosfato 50mM, NaCl 150mM pH 7,5 per l'esperimento in condizioni native; lo stesso tampone ma contenente

20% TFE è stato utilizzato per gli esperimenti volti a verificare lo stato oligomerico della proteina in presenza del trifluoroetanolo. La velocità di flusso a cui è stata condotta la cromatografia è di 75 $\mu\text{l}/\text{min}$. La proteina (4 μg) è stata sciolta in 40 μl di sodio fosfato 12mM pH 7,5, quindi filtrata a 7000rpm e portata alla concentrazione finale di 0,12mg/ml per aggiunta di fosfato e/o TFE. Allo scopo di correlare i volumi di eluizione con i logaritmi delle masse molecolari è stata realizzata una retta di taratura costruita effettuando gli esperimenti nelle medesime condizioni con proteine in un ampio *range* di peso molecolare.

Gli esperimenti di proteolisi limitata in condizioni native sono stati condotti incubando la proteina con una serie di proteasi con alta specificità di substrato, come tripsina e endoproteasi V8, oltre che meno specifiche come chimotripsina, o in grado di catalizzare l'idrolisi a livello di qualunque coppia di amminoacidi come subtilisina e l'elastasi. I rapporti enzima/substrato utilizzati sono compresi tra 1/800 e 1/4000 (w/w). Le reazioni sono state condotte in tampone sodio fosfato 12mM pH 7,5, a 25°C, utilizzando una concentrazione proteica pari a 7 μM . L'andamento delle reazioni di idrolisi è stato seguito prelevando aliquote da 150 μl dalla miscela di reazione a tempi prestabiliti (15, 30 e 60 minuti). I prodotti dell'idrolisi sono stati successivamente separati mediante un sistema cromatografico HP 1100 (Agilent technologies) equipaggiato con un rivelatore UV/VIS. La fase mobile è costituita da una soluzione di TFA 0.1% (eluente A) e una soluzione TFA 0.07% in 95% acetonitrile (eluente B), mentre la colonna impiegata è una C18 *narrow bore* (250 x 2.1 mm, 300 Å diametro dei pori) a fase inversa (Phenomenex). Al fine di ottimizzare il processo di separazione i peptidi sono stati eluiti mediante un gradiente che prevede due passaggi lineari: un primo passaggio dal 10% al 30% di B in 12 minuti e un secondo passaggio dal 30% al 52% di B in 32, ad un flusso di 0.2 ml/min. L'eluizione è stata seguita misurando l'assorbimento alla lunghezza d'onda di 220nm. Le specie così isolate sono state caratterizzate ed identificate mediante ESMS, utilizzando uno spettrometro di massa Quattro Micro (Waters) dotato di un analizzatore a triplo quadrupolo. Il campione da analizzare è stato introdotto all'interno della sorgente utilizzando una siringa Hamilton da 100 μl ad un flusso di 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ e, lo spettro di massa è stato acquisito ad una velocità di 10 secondi per scansione (10 sec/scan) in un intervallo di m/z compreso tra 700 e 1600. Per l'elaborazione dei risultati è stato utilizzato il programma di gestione Masslynx fornito dalla casa produttrice. Lo spettrometro di massa è stato calibrato utilizzando come standard la distribuzione a ioni multicarica della mioglobina da cuore di cavallo (peso molecolare medio 16951.5 Da).

Gli esperimenti in presenza di TFE sono stati condotti alla stessa concentrazione proteica in tampone sodio fosfato 12mM pH 7,5 contenente 20% di TFE (v/v) a 25°C.

Sono stati scelti gli enzimi tripsina, chimotripsina, subtilisina ed elastasi (in quanto gli unici ad aver mostrato un'attività enzimatica residua in 20% di TFE) con rapporti

enzima/substrato compresi tra 1/100 e 1/2000. Le quantità di enzima utilizzate negli esperimenti di proteolisi sono state calcolate mediante saggi di attività, in modo tale che l'attività enzimatica della proteasi in assenza di TFE fosse uguale all'attività dello stesso enzima in presenza di cosolvente.

L'attività enzimatica è stata saggiata per gli enzimi tripsina, chimotripsina, elastasi e subtilisina utilizzando uno spettrofotometro Beckman mod. DU 645.

Per la determinazione dell'attività enzimatica della tripsina sono state preparate due soluzioni di N α -Benzoyl-DL-Arginine-pNitroanilide in tampone sodio fosfato 12mM pH 7,5 contenenti rispettivamente 0 e 20% di TFE. Alla soluzione di substrato è stata aggiunta tripsina, che, idrolizzando il legame tra l'arginina e la p-nitroanilide, libera p-nitroanilina, che ha un caratteristico assorbimento a $\lambda=405\text{nm}$. La reazione di idrolisi è stata seguita spettrofotometricamente misurando l'aumento di assorbimento a tale lunghezza d'onda ad intervalli di 3 secondi per 2 minuti. Per ogni saggio è stata fatta la media di tre misure.

Il valore della velocità di reazione $v=\Delta A_{405\text{nm}}/\Delta t$ è stato poi ricavato estrapolando l'andamento delle assorbanze a 405nm in funzione del tempo.

L'attività proteolitica degli altri enzimi, è stata misurata utilizzando la procedura appena descritta in presenza di diversi substrati sintetici. Il saggio sull'elastasi è stato realizzato utilizzando come substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-pNitroanilide, mentre sia per la chimotripsina che per la subtilisina è stata seguita l'idrolisi di N-Succinyl-Gly-Gly-Phe-pNitroanilide.

Dai dati ottenuti, sono state calcolate le attività percentuali relative di ciascun enzima nelle soluzioni contenenti il trifluoroetanolo e i relativi rapporti enzima/substrato, considerando pari al 100% l'attività dell'enzima in assenza di TFE.

2.3.2 RISULTATI

2.3.2.a Cromatografia ad esclusione molecolare

Allo scopo di verificare lo stato oligomerico del peptide 1-93 in presenza del trifluoroetanolo, sono stati eseguiti esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare con le modalità descritte nella sezione Materiali e Metodi; i dati ottenuti sono riepilogati in Figura 3 e in Figura 4 è riportata la retta di taratura utilizzata per l'estrapolazione dei pesi molecolari.

Il volume di eluizione registrato per Apo 1-93 in condizioni native corrisponde ad una struttura dimerica, mentre in presenza di cosolvente la proteina si comporta come una specie monomerica.

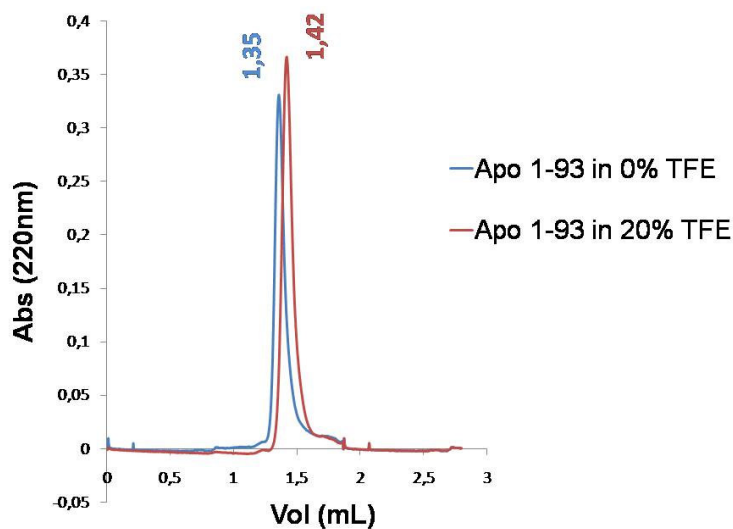


Figura 3 Analisi mediante cromatografia ad esclusione molecolare di Apo 1-93

In celeste la curva dell'esperimento in condizioni native

In bordeaux la curva dell'esperimento in presenza del 20%TFE

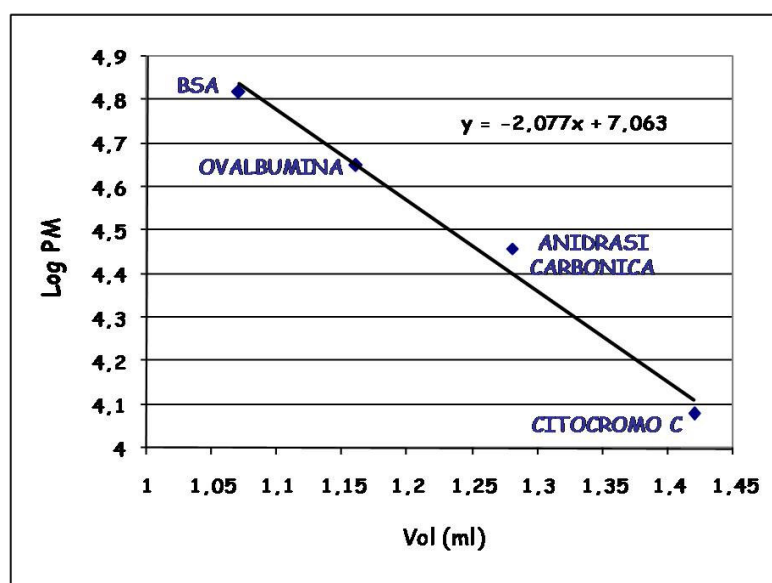


Figura 4 Retta di taratura utilizzata per l'estrapolazione dei pesi molecolari.

2.3.2.b Saggi di attività enzimatica

Affinché le mappe proteolitiche realizzate in assenza ed in presenza di TFE siano paragonabili, è necessario che l'attività enzimatica delle proteasi utilizzate negli

esperimenti a diversa concentrazione di cosolvente, sia la stessa. A tale scopo è stato realizzato uno studio preventivo dell'attività catalitica di tali enzimi in presenza di 20% di TFE (v/v), mentre l'attività misurata in assenza di trifluoroetano è stata presa come riferimento. I risultati sono riassunti in Tabella I; i valori ottenuti a ciascuna percentuale di TFE, sono la media di almeno tre determinazioni.

Enzima	0%TFE	20%TFE	
Tripsina	0,456	0,821	$\Delta A/\text{min.}$
Chimotripsina	0,593	0,688	
Subtilisina	0,939	0,206	
Elastasi	0,682	0,082	
Tripsina	100	180	Attività percentuale
Chimotripsina	100	116	
Subtilisina	100	22	
Elastasi	100	12	

Tabella I Risultati dei saggi di attività enzimatica

Come si può osservare, in presenza di 20% TFE l'attività catalitica di tripsina e chimotripsina subisce un leggero incremento, mentre quella di subtilisina ed elastasi risente fortemente dell'aggiunta di cosolvente.

2.3.2.c Esperimenti di proteolisi limitata

Gli esperimenti di proteolisi limitata sono stati condotti su Apo 1-93 utilizzando diversi enzimi proteolitici.

Durante tutti gli esperimenti, parametri quali temperatura, pH, forza ionica, rapporto enzima/substrato e tempo, sono stati attentamente disposti e controllati. Le condizioni scelte sono tali che la proteina da analizzare rimanesse in soluzione, prevenendo cioè la sua aggregazione, e che l'idrolisi fosse indirizzata solo a carico dei residui più esposti e/o flessibili. I siti d'idrolisi preferenziali sono stati individuati attraverso l'identificazione dei peptidi complementari rilasciati a seguito dell'attività proteasica. In quest'ottica, sono stati presi in considerazione solo i siti d'idrolisi generati da un unico evento proteolitico a carico della proteina intatta, escludendo tutti quelli attribuibili a subdigestioni, che non risulterebbero informativi per l'indagine topologica. Le idrolisi sono state effettuate alla temperatura di 25°C in tampone fosfato 12mM, pH=7.5 e ad una concentrazione di TFE pari allo 0% e 20% in volume. Per ogni esperimento condotto in assenza di TFE, sono

state effettuate delle idrolisi preliminari al fine di identificare l'ideale rapporto enzima/substrato.

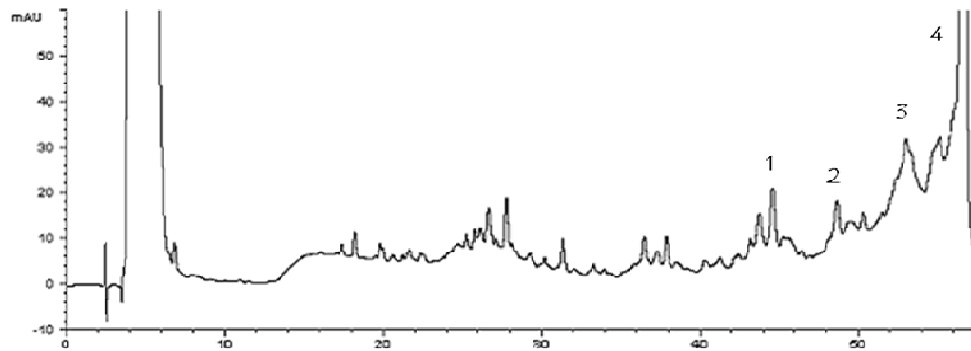
➤ **Idrolisi con tripsina**

L'idrolisi con l'endoproteasi tripsina è stata condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato pari a 1/2500 (w/w). Aliquote della miscela di reazione sono state prelevate a 15, 30 e 60 minuti, acidificate ed analizzate mediante RP-HPLC. Nella Figura 5 (pannelli A e B) sono mostrati rispettivamente il cromatogramma relativo al prelievo effettuato dopo 60 minuti e la Tabella in cui sono riassunti i risultati. L'analisi ESMS delle specie eluite ha permesso di identificare i peptidi 1-45 e 46-93 (picchi 1 e 3), suggerendo che la K45 sia un residuo particolarmente esposto della catena, e quindi suscettibile di idrolisi da parte dell'enzima. Nel picco 2 eluisce invece il frammento 1-61. Non potendo esso derivare da alcuna subdigestione, si genera evidentemente per idrolisi della tripsina sul residuo K61 nella proteina intatta e può quindi essere considerato un sito d'idrolisi primario.

L'idrolisi di Apo 1-93, opportunamente preincubato con TFE 20% (v/v), con l'endoproteasi tripsina è stata condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato pari ad 1/100 ed effettuando prelievi dalla miscela di idrolisi a 15, 30 e 60 minuti. Analogamente all'idrolisi condotta in condizioni native, K45 sembra essere un residuo particolarmente esposto della catena, mentre l'identificazione dei peptidi 1-40 e 41-93 suggerisce l'accessibilità a K40.

I risultati ottenuti dall'analisi cromatografica dell'aliquota a 60 minuti e da quella di spettrometria di massa sono riportati in Figura 6.

A

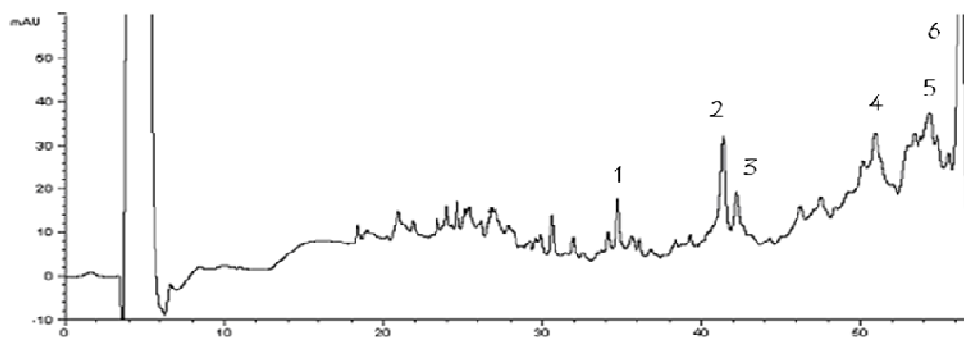


B

N° picco	Peso molecolare misurato (Da)	Peptide assegnato	Peso molecolare teorico (Da)
1	5065.42 ± 0.23	1-45	5065.62
2	6928.68 ± 0.56	1-61	6929.71
3	5670.99 ± 1.32 10619.65 ± 1.53	46-93 1-92	5672.23 10620.71
4	10719.54 ± 0.19	1-93	10719.84

Figura 5 Cromatogramma dell'aliquota prelevata dopo 60min di idrolisi (A) e relativa Tabella (B).

A



B

N° picco	Peso molecolare misurato (Da)	Peptide assegnato	Peso molecolare teorico (Da)
1	4469.02±0.26	1-40	4468.90
2	5065.40±0.35	1-45	5065.62
3	6284.96±0.39	41-93 Ox	6284.96
	5688.08±0.61	46-93 Ox	5688.23
4	5673.91±0.56	46-93	5672.23
5	6269.08±0.45	41-93	6268.95
6	10719.71±1.34	1-93	10719.84

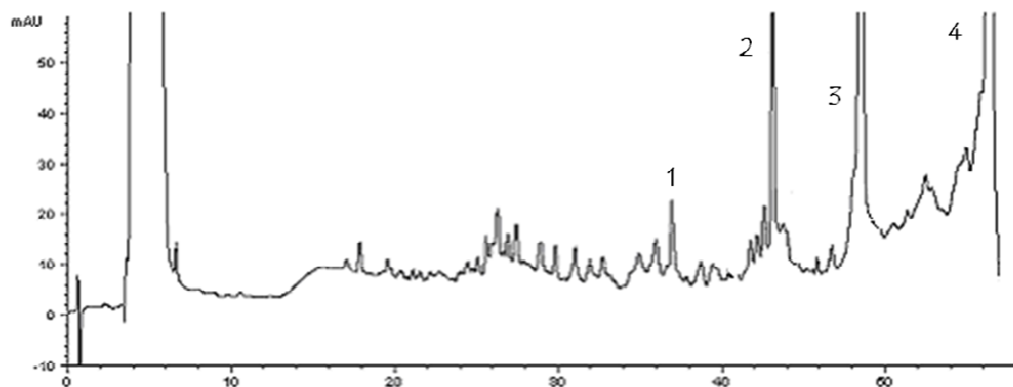
Figura 6 Cromatogramma dell'aliquota prelevata dopo 60min di idrolisi (A) e relativa Tabella (B).

➤ Idrolisi con chimotripsina

Gli esperimenti con la chimotripsina sono stati effettuati utilizzando un rapporto enzima/substrato di 1/2500 (w/w). In Figura 7 sono mostrati rispettivamente il cromatogramma relativo al prelievo effettuato dopo 60 minuti (pannello A), e la Tabella in cui sono riassunti i risultati (pannello B). In particolare il picco 3 all'analisi ESMS si è dimostrato contenere il peptide 1-57, mentre il suo complementare (58-93) è eluito nel picco 2. nelle altre frazioni vengono invece eluite specie derivanti da subdigestioni di frammenti più grandi o il peptide 1-93 intatto (picco 4).

L'idrolisi di Apo 1-93 in TFE 20% è stata condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato pari a 1/100. Dall'analisi dei picchi cromatografici si identificano come siti primari i residui F57 e Y18. I risultati ottenuti dall'analisi cromatografica dell'aliquota a 60 minuti e da quella di spettrometria di massa sono riportati in Figura 8.

A

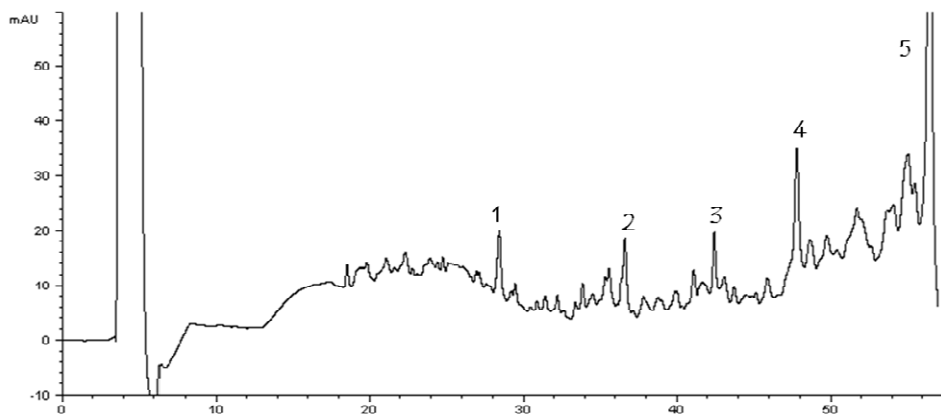


B

N° picco	Peso molecolare misurato (Da)	Peptide assegnato	Peso molecolare teorico (Da)
1	4308.96 ± 0.15	58-93 Ox	4308.74
2	4293.29 ± 0.20	58-93	4292.74
3	6445.32 ± 0.43	1-57	6445.11
4	10719.66 ± 1.14	1-93	10719.84

Figura 7 Cromatogramma dell'aliquota prelevata dopo 60min di idrolisi (A) e relativa Tabella (B).

A



B

N° picco	Peso molecolare misurato (Da)	Peptide assegnato	Peso molecolare teorico (Da)
1	2115.67±0.08	1-18	2116.31
2	4308.35±0.07	58-93 Ox	4308.74
3	6444.57±0.39	1-57	6445.11
4	8637.00±0.66	19-93 Ox	8637.54
	8537.93±0.94	19-92 Ox	8538.41
5	10719.57±0.22	1-93	10719.84
	10620.28±0.90	1-92	10620.71

Figura 8 Cromatogramma dell'aliquota prelevata dopo 60min di idrolisi (A) e relativa Tabella (B).

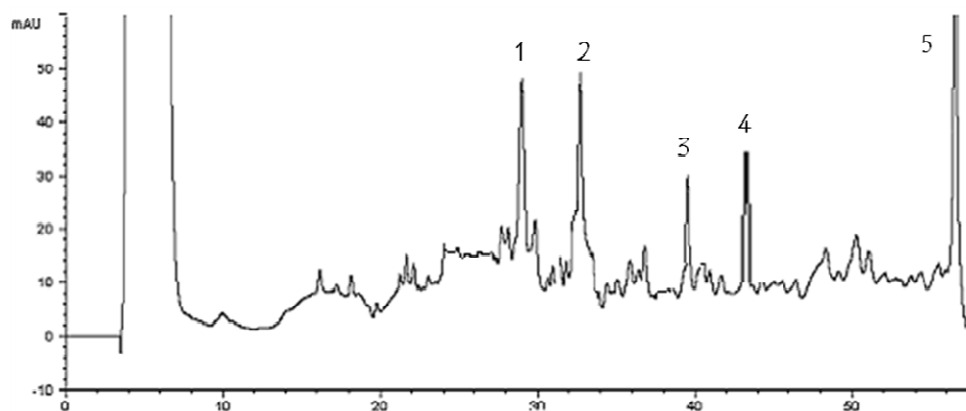
➤ Idrolisi con subtilisina

L'idrolisi con subtilisina è stata condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato di 1/4000. Il risultato dell'analisi cromatografica del prelievo a 60 minuti e le attribuzioni dei picchi d'interesse sono riportati nella Figura 9.

L'impiego della subtilisina ha consentito di identificare almeno due siti di idrolisi primari: i residui Y18 e L38.

L'esperimento in presenza di cosolvente è stato effettuato utilizzando un rapporto enzima/substrato di 1/4000 sulla base delle indicazioni fornite dai saggi di attività enzimatica. I risultati dell'idrolisi, riportati in Figura 10, indicano come unico sito di idrolisi primario il residuo F57.

A

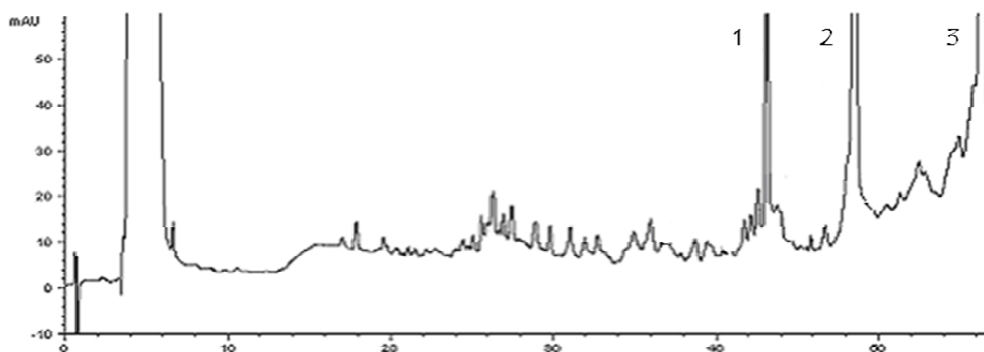


B

N° picco	Peso molecolare misurato (Da)	Peptide assegnato	Peso molecolare teorico (Da)
1	2115.60±0.12	1-18	2116.31
2	4283.83±0.02	1-38	4283.67
3	6453.70±0.70	39-93	6454.18
4	8620.10±0.70	19-93	8621.54
5	10719.90±0.30	1-93	10719.84

Figura 9 Cromatogramma dell'aliqota prelevata dopo 60min di idrolisi (A) e relativa Tabella (B).

A



B

N° picco	Peso molecolare misurato (Da)	Peptide assegnato	Peso molecolare teorico (Da)
1	4292.59±0.30	58-93	4292.74
2	6445.75±0.58	1-57	6445.11
3	10620.10±0.85 10719.22±0.79	1-92 1-93	10620.71 10719.84

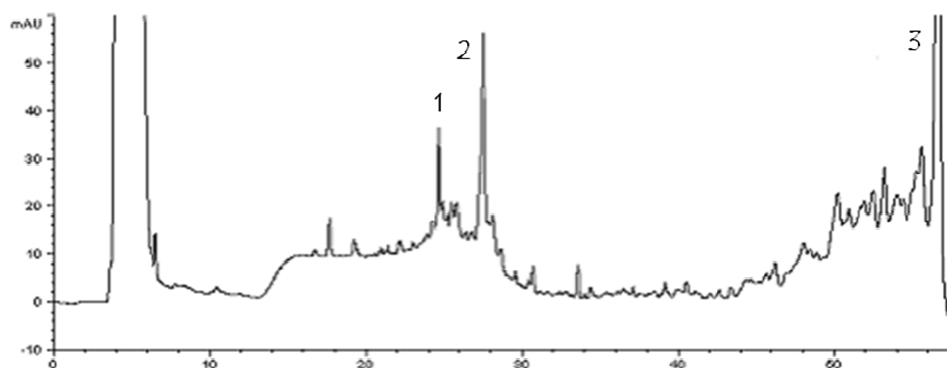
Figura 10 Cromatogramma dell'aliquota prelevata dopo 60min di idrolisi (A) e relativa Tabella (B).

➤ Idrolisi con elastasi

L'idrolisi con elastasi è stata condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato di 1/800. Ancora una volta sono stati effettuati prelievi a 15, 30 e 60 minuti e sottoposti ad analisi cromatografica mediante RP-HPLC. Il risultato dell'analisi cromatografica del prelievo a 60 minuti e le attribuzioni dei picchi d'interesse (Figura 11), indicano che V17 è il sito cineticamente e stericamente favorito all'azione dell'enzima.

In presenza di TFE utilizzando un rapporto enzima/substrato di 1/100, si osserva come unico taglio primario significativo quello a carico del residuo F57 (Figura 12).

A

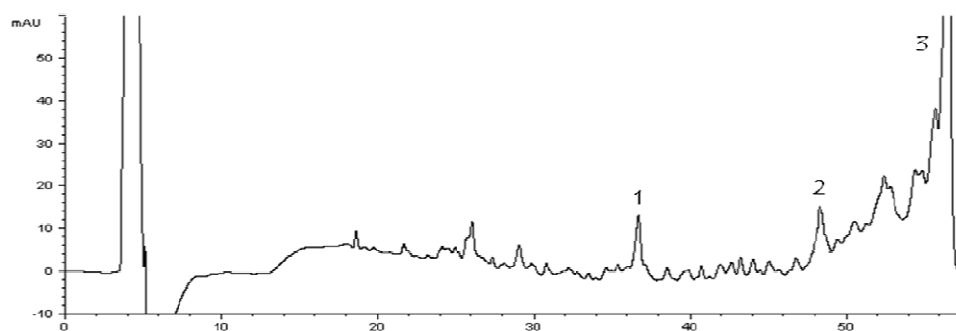


B

N° picco	Peso molecolare misurato (Da)	Peptide assegnato	Peso molecolare teorico (Da)
1	1953.69±0.20	1-17	1953.13
2	8802.75±1.77	18-93 Ox	8800.7
3	10718.46±1.55	1-93	10719.84

Figura 11 Cromatogramma dell'aliquota prelevata dopo 60min di idrolisi (A) e relativa Tabella (B).

A



B

N° picco	Peso molecolare misurato (Da)	Peptide assegnato	Peso molecolare teorico (Da)
1	4308.74±0.20	58-93 Ox	4308.74
2	6445.58±0.80	1-57	6445.11
3	10719.12±0.67	1-93	10719.84

Figura 12 Cromatogramma dell'aliquota prelevata dopo 60min di idrolisi (A) e relativa Tabella (B).

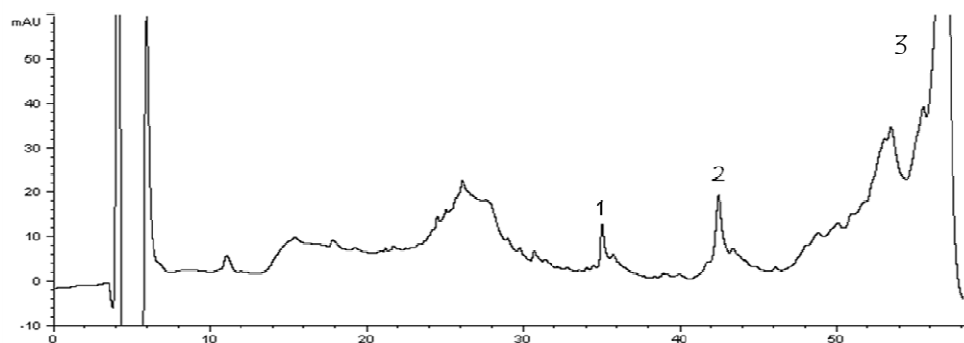
➤ Idrolisi con endoproteasi V8

La reazione di idrolisi di Apo A1 con la proteasi V8 è stata condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato pari a 1/2000. Aliquote di soluzione sono state prelevate a 15, 30 e 60min e successivamente analizzate per RP-HPLC.

Nella Figura 13 sono mostrati i risultati dell'analisi cromatografia del prelievo dopo 60min di idrolisi e la Tabella dei relativi dati ES. Appare subito evidente che è unico il sito di idrolisi (E34).

A causa della notevole riduzione di attività enzimatica della Glu-C, valutata dai saggi di attività descritti in precedenza, non è stato possibile effettuare la proteolisi comparativa in presenza di cosolvente.

A



B

N° picco	Peso molecolare misurato (Da)	Peptide assegnato	Peso molecolare teorico (Da)
1	3955.55 ± 0.24	1-34	3955.30
2	6782.19 ± 0.40	35-93 _{ox}	6782.55
3	10719.84 ± 0.71 10619.26 ± 1.30	1-93 1-92	10719.84 10619.71

Figura 13 Cromatogramma dell'aliquota prelevata dopo 60min di idrolisi (A) e relativa Tabella (B).

2.3.3 DISCUSSIONE

La porzione N-terminale dell'Apolipoproteina A1, corrispondente ai primi 93 residui amminoacidici, è stata identificata come il principale componente degli aggregati fibrillari riscontrati in una forma di amiloidosi sistemica. Dati di dicroismo circolare (CD) suggeriscono la prevalenza di una struttura *random coil* (40% circa) in tampone fosfato a pH neutro; l'acidificazione della soluzione sembrerebbe invece essere accompagnata dall'acquisizione di una struttura elicoidale instabile, che rapidamente collassa, determinando il deposito di materiale insolubile dalle tipiche caratteristiche fibrillari. L'aggiunta di fosfolipidi (ligandi naturali dell'Apolipoproteina A1) o di un alcol fluorurato come il TFE, determina in CD un segnale con due punti di minimo (222 e 208 nm) indicativi di conformazioni elicoidali (Mangione et al., 2001).

Le variazioni conformazionali che avvengono in Apo 1-93, in assenza ed in presenza di TFE sono state caratterizzate mediante cromatografia ad esclusione molecolare ed esperimenti di proteolisi limitata abbinati ad analisi di spettrometria di massa, che hanno consentito l'identificazione dei frammenti generati.

Gli esperimenti di *gel filtration* condotti sul frammento 1-93 in assenza ed in presenza di 20% TFE suggeriscono che il frammento assuma differente struttura quaternaria nelle due condizioni. In assenza del cosolvente il peptide 1-93 mostra struttura omodimerica, mentre in 20% TFE il frammento diventa monomero.

Gli esperimenti di proteolisi limitata, effettuati in assenza ed in presenza di 20% TFE utilizzando proteasi a diversa specificità, hanno mostrato una distribuzione di siti preferenziali di idrolisi quasi identica; in entrambe le condizioni, infatti, il peptide 1-93 esibisce accessibilità all'estremità N-terminale e nella regione centrale, mentre il C-terminale è completamente resistente all'azione delle proteasi (Figura 14).

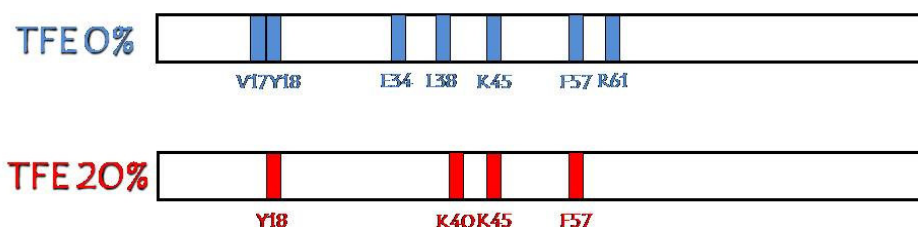


Figura 14 Mappe proteolitiche di Apo 1-93 ottenute allo 0% e 20% di TFE.

Questi risultati consentono di ipotizzare che in condizioni native il peptide 1-93 sia organizzato in una struttura dimerica flessibile, stabilizzata da interazioni intermolecolari che interesserebbero la regione C-terminale della molecola, che infatti resta inaccessibile alle proteasi; tale osservazione è supportata da predizioni di struttura secondaria: secondo

l'algoritmo di Chou e Fasman (1974), infatti, la regione di Apo più prona ad acquisire la conformazione coiled coil sarebbe la porzione C-terminale della catena. La dimerizzazione nella regione C-terminale di Apo A1 potrebbe rappresentare infatti una barriera sterica all'attacco delle proteasi impiegate, dando così spiegazione del fatto che in quella regione nessun residuo amminoacidico venga specificamente riconosciuto.

In presenza di TFE il peptide 1-93 sembra risentire di una transizione conformazionale che porta alla dissociazione del dimero. Tale variazione riguarderebbe prevalentemente la regione C-terminale, che resta pur sempre protetta all'azione delle proteasi, ma probabilmente a causa di una strutturazione in tale regione. Questo conformero potrebbe rappresentare l'intermedio fibrillogenico, osservato al CD, caratterizzato da una struttura elicoidale più compatta. L'ipotesi della strutturazione indotta dal TFE viene sostenuta dal valore dei rapporti enzima/substrato impiegati nelle singole idrolisi: se è vero che in condizioni native il valore di tali rapporti veniva determinato empiricamente, in presenza del cosolvente il rapporto E/S di riferimento era stato calcolato mediante i risultati ottenuti dai saggi di attività enzimatica. Particolarmente sorprendenti sono state le quantità di tripsina e chimotripsina utilizzate, notevolmente superiori a quelle calcolate, allo scopo di ottenere una buona cinetica di reazione in presenza di TFE. Il dato evidenzia un'aggregabilità di Apo A1 sensibilmente minore in presenza del cosolvente, indice di una maggiore strutturazione da esso indotta a carico del peptide.

2.4 L'ACILFOSFATASI DA *Sulfolobus solfataricus* (SsAcP)

L'SsAcP è una proteina globulare di 101 aa espressa da un archeobatterio ipertermofilo, *Sulfolobus solfataricus*, che vive a temperature di circa 80 °C.

L'analisi di questa proteina si aggiunge a precedenti studi su altre acilfosfatasi come AcP da muscolo umana (*hmAcP*), la *human common-type acilfosfatase* (*ctAcP*) ed il dominio acilfosfatasi N-terminale di *E. Coli* HypF che, *in vitro*, in presenza di TFE, danno luogo a fibrille del tipo osservato nel caso delle malattie amiloidi (Chiti F. et al., 2000).

La struttura terziaria nativa di SsAcP, recentemente risolta sia mediante diffrazione ai raggi X che attraverso spettroscopia NMR, è organizzata in 5 β -*strands* antiparalleli che si affacciano su 2 α -eliche anch'esse antiparallele (Corazza A. et al., 2006).

SsAcP mostra una stabilità conformazionale maggiore rispetto alle altre acilfosfatasi da organismi mesofili finora studiate. Questa caratteristica delle proteine da ipertermofili è dovuta a diversi meccanismi adattativi quali un alto contenuto in amminoacidi idrofobici e carichi (rispetto ai polari non carichi) e un'elevata stabilità di elementi di struttura secondaria (Bemporad F. et al., 2004).

Recentemente è stata data particolare importanza all'alto contenuto dei residui carichi e al *network* di coppie ioniche sulla superficie delle proteine (Karshikoff A. et al., 2001). SsAcP contiene un alto numero sia di residui carichi (32% per SsAcP contro il 25,5% di *hmAcP*) che idrofobici (56% per SsAcP contro il 43% di *hmAcP* e il 48% per *ctAcP*), a riprova dell'importanza di queste differenze in contenuto amminoacidico tra organismi mesofili e termofili.

Inoltre è stato dimostrato che l'incremento di stabilità di SsAcP è effetto di una minore velocità dell'*unfolding* piuttosto che di un incremento di quella di *folding*. Ciononostante, in accordo con l'analisi comparativa condotta sulle *cold-shock proteins* di diversi organismi, che provano che proteine particolarmente stabili non necessariamente si strutturano più velocemente, la velocità del *folding* di SsAcP è simile a quella di *ctAcP* e più bassa di quella di HypF-N.

Gli studi precedenti su queste acilfosfatasi hanno dimostrato che alle diverse concentrazioni di TFE la tendenza ad aggregare è inversamente proporzionale alla stabilità della conformazione nativa. Il TFE è un cosolvente spesso utilizzato nello studio *in vitro* dei meccanismi dell'amiloidosi, in quanto è capace, destabilizzando le interazioni idrofobiche della proteina, di determinarne una parziale denaturazione con la formazione dell'intermedio fibrillogenic.

Studi condotti in presenza del 15-25% (v/v) di TFE hanno dimostrato che SsAcP (0.4 mg/mL, 25 °C, pH 5.5) forma aggregati fibrillari in grado di legare coloranti specifici quali Tioflavina T e Congo Red. In queste condizioni, inoltre, i primi aggregati solubili conservano attività enzimatica (Plakoutsi G. et al., 2004): questi risultati suggeriscono

che ad aggregare sia SsAcP in una conformazione di poco distorta rispetto alla nativa, lasciando supporre un ulteriore meccanismo di fibrillogenesi. Quest'ultimo però, non esclude il meccanismo che ha origine dall'intermedio parzialmente destrutturato che invece avviene, con una cinetica più veloce, a concentrazioni di TFE superiori al 40% (v/v) (Plakoutsi G. et al., 2004).

La seconda parte di questo progetto di tesi è stata quindi indirizzata allo studio delle variazioni conformazionali che avvengono a carico di SsAcP in presenza di TFE e che a partire dalla proteina nativa, attraverso intermedi solubili, portano alla formazione di fibrille del tutto simili a quelle riscontrate nel caso di malattie amiloide.

Il confronto tra le mappe proteolitiche della proteina allo stato nativo ed al 25% di TFE, fornisce informazioni sulle regioni che, subendo variazioni strutturali al variare della caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente circostante, risultano verosimilmente coinvolte nella formazione degli aggregati di tipo amiloide.

Infine sono stati effettuati esperimenti di scambio idrogeno-deuterio, che hanno consentito di ottenere informazioni sull'esposizione superficiale e la flessibilità della proteina nelle varie conformazioni.

2.4.1 Materiali e Metodi

I campioni liofilizzati di SsAcP in forma ricombinante sono stati forniti dal Dipartimento di Biochimica dell'Università di Firenze.

Tutti i reattivi, i solventi e gli enzimi impiegati sono quelli già descritti nel paragrafo 2.3.1.

Gli esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare sono stati condotti su un apparecchio SMART-System fornito dalla Pharmacia Biotech. La colonna utilizzata è la Superdex 75 pc 3,2/30 volume 2,4 ml equilibrata in tampone sodio fosfato 50mM, NaCl 150mM pH 7,5 per l'esperimento in condizioni native; lo stesso tampone ma contenente 25%TFE è stato utilizzato per gli esperimenti volti a verificare lo stato oligomero della proteina in presenza del trifluoroetanolo. La velocità di flusso a cui è stata condotta la cromatografia è di 75 μ l/min. La proteina (6 μ g) è stata sciolta in 40 μ l di tris 100mM pH 7,5, quindi filtrata a 7000rpm e portata alla concentrazione finale di 0,12mg/ml per aggiunta di H₂O e TFE, in modo da riprodurre 25% di cosolvente. Nell'esperimento condotto al 25% di TFE, inoltre, prima dell'iniezione, il campione è stato incubato per un'ora a 25°C.

Allo scopo di correlare i volumi di eluizione con i logaritmi delle masse molecolari è stata realizzata una retta di taratura costruita effettuando gli esperimenti nelle medesime condizioni con proteine in un ampio *range* di peso molecolare.

Gli esperimenti di proteolisi limitata sono stati condotti incubando la proteina con una serie di proteasi con alta specificità di substrato, come tripsina e Glu-C, oltre che meno specifiche come chimotripsina, o in grado di catalizzare l'idrolisi a livello di qualunque coppia di amminoacidi come subtilisina, termolisina e l'elastasi. I rapporti enzima/substrato utilizzati sono compresi tra 1/20 e 1/3000 (w/w). Le reazioni sono state condotte in tampone TRIS-HCl 20mM, pH=7,5 a 25°C, utilizzando una concentrazione proteica pari a 20µM. Il procedere dell'idrolisi è stato seguito attraverso prelievi, a tempi prestabiliti, di 1 µl dalla miscela peptidica che è stato istantaneamente miscelato in 5µl di matrice acido 3,5-Dimetossi-4-idrossicinnamico (acido sinapinico) 5mg/ml (70% ACN, 30% TFA 0,2%); 2µl di tale soluzione sono stati, infine, caricati sulla piastra portacampioni in acciaio. Gli spettri sono stati acquisiti con uno spettrometro di massa Voyager DE della Applied Biosystem con sorgente a ionizzazione laser, equipaggiato con analizzatore a tempo di volo (TOF). L'intervallo di massa analizzato è stato calibrato utilizzando come standards interni la specie monoprotonata di SsAcP, con segnale ad m/z 11781.4 Da, e la sua mezza massa ad m/z 5891.2 Da.

Gli esperimenti in presenza di TFE sono stati condotti alla stessa concentrazione proteica in tampone TRIS-HCl 20mM pH=7.5, 25% TFE (v/v). Per tutti gli esperimenti in presenza dell'alcol è stata prevista una pre-incubazione di 1 ora a 25°C della proteina nel tampone di reazione al fine di consentire il raggiungimento della conformazione più stabile in tali condizioni.

Sono stati scelti gli enzimi tripsina, chimotripsina, subtilisina ed elastasi, in quanto gli unici ad aver mostrato un'attività enzimatica residua in presenza di TFE, con rapporti enzima substrato compresi rispettivamente tra 1/30 e 1/60. Le quantità di enzima utilizzate negli esperimenti di proteolisi sono state calcolate mediante saggi di attività, in modo tale che l'attività enzimatica della proteasi in assenza di TFE fosse uguale all'attività dello stesso enzima nei vari tamponi contenenti il trifluoroetano.

L'attività enzimatica è stata saggiata allo 0, ed al 25% di TFE per gli enzimi tripsina, chimotripsina, elastasi e subtilisina seguendo la procedura indicata nel paragrafo 2.3.1.

Negli esperimenti di scambio isotopico sulla proteina nativa, 2nmol di SsAcP sono stati sciolti in 50µl AmAc 10mM pH 7.5 e, dopo aver condizionato tale soluzione per 5 minuti a 25°C, la reazione è stata fatta partire diluendo dieci volte il campione proteico con un tampone analogo ma preparato in D₂O.

Gli esperimenti al 25% di TFE sono stati effettuati sciogliendo la proteina in AmAc 10mM 25% TFE pH 7,5 e diluendola nello stesso tampone questa volta preparato con D₂O e TFE deuterato (C₂H₂DF₃O).

L'andamento della reazione di scambio è stato seguito nel tempo, prelevando aliquote dalla miscela di reazione a tempi determinati (compresi tra 15 secondi e 60 minuti) e analizzandole mediante LC-MS: è stata utilizzata una precolonna Phenomenex dotata di

fase stazionaria C_4 e un sistema eluente costituito da una soluzione di TFA 0.1% (eluente A) e una soluzione TFA 0.1% in acetonitrile (eluente B) tenuti in ghiaccio. L'eluizione è stata effettuata ad una velocità di flusso pari a 200 μ l/min con un gradiente veloce del solvente B da 0 a 95% in 10 secondi. In questo modo, la proteina deuterata incontra una soluzione a pH2 a circa 0 °C, che determina il retroscambio degli atomi di idrogeno delle catene laterali e contemporaneamente, minimizza un eventuale e più lento scambio degli idrogeni del legame peptidico. I valori di massa ottenuti vengono normalizzati rispetto al valore teorico dei protoni scambiabili (99), ottenuto sottraendo al numero di amminoacidi totale della proteina (103) il numero di proline (3) ed il protone del gruppo amminico all'N-terminale.

Per quest'analisi è stato utilizzato lo spettrometro dotato di sorgente *electrospray* descritto in precedenza (paragrafo 2.3.1). La misura esatta della massa della proteina dopo l'incubazione in tamponi deuterati ha, pertanto, consentito di determinare direttamente il numero di atomi di deuterio incorporati. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in un intervallo di m/z da 700 a 1400, con un tempo di scansione di 3 secondi ed, infine, elaborati con il supporto di un software specifico (Masslynx).

2.4.2 RISULTATI

2.4.2a Cromatografia ad esclusione molecolare

Allo scopo di verificare lo stato oligomerico di SsAcP in presenza del trifluoroetanolo, sono stati eseguiti esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare con le modalità descritte nella sezione Materiali e Metodi; i dati ottenuti sono riepilogati in Figura 15.

Il volume di eluizione registrato per SsAcP in condizioni native corrisponde ad un peso molecolare apparente di ~12000 Da in accordo con quello calcolabile sulla base della sequenza amminoacidica (11780,4 Da).

Il volume di eluizione riscontrati invece nell'esperimento al 25%TFE corrisponde ad un peso molecolare di ~ 14000 Da.

Questi risultati dimostrano che SsAcP, sia in assenza che in presenza di TFE, è caratterizzata da una struttura monomerica. La leggera differenza nel volume di eluizione riscontrata al 25% di trifluoroetanolo potrebbe derivare da una piccola variazione dello stato conformazionale correlabile con un aumento del raggio di Stokes che, pertanto, ne influenza le proprietà idrodinamiche.

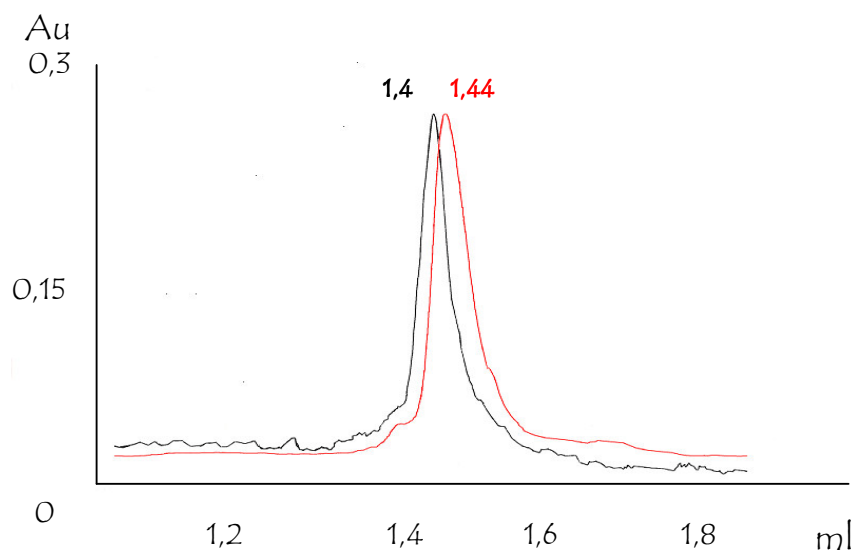


Figura 15 Analisi mediante cromatografia ad esclusione molecolare di *SsAcP*

In rosso la curva dell'esperimento in condizioni native

In nero la curva dell'esperimento in presenza del 25%TFE

2.4.2b Saggi di attività enzimatica

Analogamente a quanto descritto nei precedenti paragrafi, è stato realizzato uno studio preventivo dell'attività catalitica degli enzimi utilizzati negli esperimenti di proteolisi limitata; ciò è necessario al fine di rendere l'efficienza catalitica indipendente dalla presenza di TFE.

Sono stati effettuati saggi a concentrazione di TFE pari allo 0% e 25% (v/v) e, l'attività misurata in assenza di trifluoroetanolo è stata presa come riferimento.

2.4.2c Esperimenti di proteolisi limitata

Gli esperimenti di proteolisi limitata sono stati condotti sull'*SsAcP* utilizzando diversi enzimi proteolitici.

Le idrolisi sono state effettuate alla temperatura di 25°C in tampone TRIS-HCl a pH=7.5 e ad una concentrazione di TFE pari allo 0% e 25% in volume. Per ogni esperimento condotto in assenza di TFE, sono state effettuate delle idrolisi preliminari al fine di identificare l'ideale rapporto enzima/substrato.

Sin dai primi esperimenti di proteolisi la natura particolarmente idrofobica di *SsAcP* ha imposto la necessità di impiegare un protocollo sperimentale alternativo per l'analisi della miscela di idrolisi che escludesse il passaggio cromatografico.

L'analisi diretta della miscela di idrolisi per spettrometria di massa MALDI/MS, è stata risolutiva nel ridurre i fenomeni di aggregazione di peptidi idrofobici e, pertanto, non cromatografabili. Ha consentito, inoltre, di condurre esperimenti di *time course* utilizzando bassissime quantità di campione. Sono stati, infatti, realizzati una serie di prelievi, a tempi anche molto ravvicinati tra loro, permettendo di seguire l'andamento della reazione nel suo evolversi nel tempo.

I diversi *patterns* proteolitici ottenuti in presenza ed in assenza di TFE sono stati confrontati per ottenere informazioni riguardanti i siti esposti e mascherati, nelle diverse condizioni sperimentali: tale confronto ci ha consentito una descrizione generale delle variazioni conformazionali dell'SsAcP indotte dalla presenza del trifluoroetanolo.

► Idrolisi con tripsina

L'idrolisi con l'endoproteasi tripsina è stata condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato pari a 1/100 (w/w). Nelle figure 16 e 17 sono mostrati gli spettri relativi ai prelievi effettuati dopo 1 min. e 5 min. dall'inizio della reazione di idrolisi, con i relativi ingrandimenti delle regioni più significative e, in Tabella II sono riassunti i risultati.

Al primo minuto di idrolisi (fig. 16) oltre ai segnali relativi alla proteina intatta e alla specie 4-103, già presente nel campione di partenza, compare il segnale relativo peptide 5-103 che dopo 5 min. (fig. 17) continua ad accumularsi insieme al segnale attribuito al 6-103, consentendo di riconoscere nei residui Lys 4 e 5 i siti d'idrolisi primari. Dopo 5min. di idrolisi si manifesta un nuovo sito in corrispondenza della Lys 49, chiaramente identificabile come sito di idrolisi secondario, sulla base della presenza del peptide 1-49 e del suo complementare 50-103.

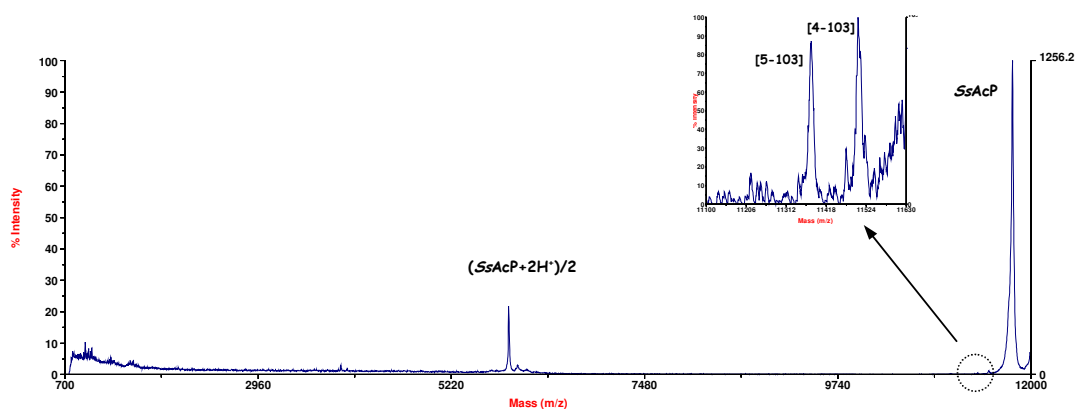


Figura 16 Spettro MALDI-MS relativo ad 1min di idrolisi condotta con tripsina e suo ingrandimento

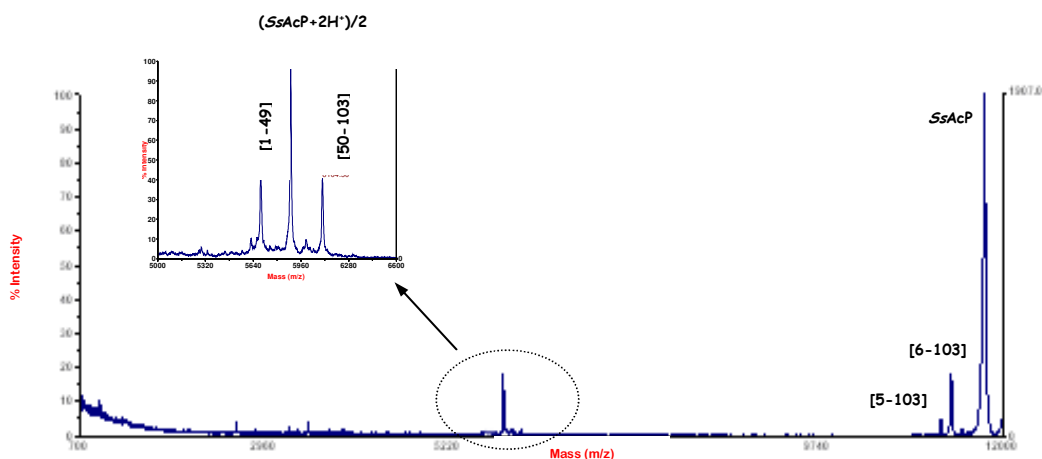


Figura 17 Spettro MALDI-MS relativo ad 5min di idrolisi condotta con tripsina e suo ingrandimento

Valore di massa misurato (MH ⁺ in Da)	Peptide	Peso molecolare teorico (M in Da)
11781,4	SsAcP+H ⁺	11780,5
5890,9	[SsAcP+2H ⁺]/2	5891,2
11376,5	5-103	11376,9
11248,2	6-103	11248,8
5691,8	1-49	5694,8
6100,9	50-103	6100,7

Tabella II assegnazione delle masse dei prodotti dell'idrolisi con la tripsina in condizioni native

Una cinetica più veloce rispetto all'esperimento in assenza di TFE si riscontra nell'idrolisi condotta sulla proteina incubata al 25% di trifluoroetano, utilizzando un rapporto enzima/substrato pari a 1/60 (w/w). In Figura 18, è riportato lo spettro relativo ad 1min. di idrolisi. Dei peptidi rilasciati durante questa idrolisi è possibile riconoscere la Lys49 come sito di idrolisi primario e i residui Lys 4 e 5 come siti secondari. Pertanto, dopo l'incubazione al 25% (v/v) di TFE, il residuo 49 diviene più accessibile all'enzima di quanto non sia negli esperimenti condotti in assenza di TFE.

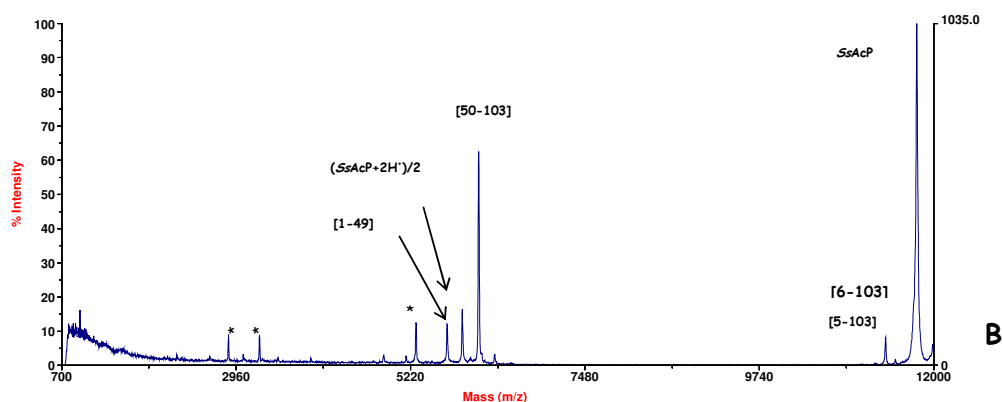


Figura 18 Spettro MALDI-MS relativo ad 1min di idrolisi condotta con tripsina al 25%TFE. Tutti i segnali m/z contrassegnati con * si riferiscono a peptidi derivanti da subdigestioni.

➤ Idrolisi con chimotripsina

Gli esperimenti con la chimotripsina sono stati effettuati utilizzando un rapporto enzima/substrato di 1/400 (w/w).

In Figura 19 è mostrato lo spettro del prelievo a 30min., quando compaiono i segnali relativi ai peptidi 7-103 (m/z 11062,6), 1-88 (m/z 9921,5) e 89-103 (m/z 1879.9) rilasciati dalle idrolisi contemporanee ai residui Trp 6 e Tyr 88.

Gli esperimenti condotti con la chimotripsina in presenza di TFE sono stati effettuati utilizzando un rapporto enzima/substrato di 1/90 (w/w).

In Figura 20 è riportato lo spettro relativo al prelievo dopo 5min. di idrolisi in presenza del 25% (v/v) di trifluoroetanolo: in esso sono riportati i segnali ad m/z 5490.9 e 6298.7 che corrispondono rispettivamente ai peptidi 1-47 e 48-103 e che evidenziano un evento proteolitico in corrispondenza del residuo Tyr47.

Si osserva, inoltre, un segnale poco intenso ad m/z 11063 attribuito alla specie 7-103 anch'esso già presente nell'analisi in assenza di TFE. Tali dati indicano che il Trp6 costituisce un sito di idrolisi secondario rispetto alla Tyr47. Pertanto è possibile affermare che in presenza di trifluoroetanolo il residuo 47, mascherato all'azione proteolitica nella idrolisi in condizioni native, viene ad essere esposto al solvente, mentre la Tyr88, prima esposta, risulta inaccessibile in queste nuove condizioni.

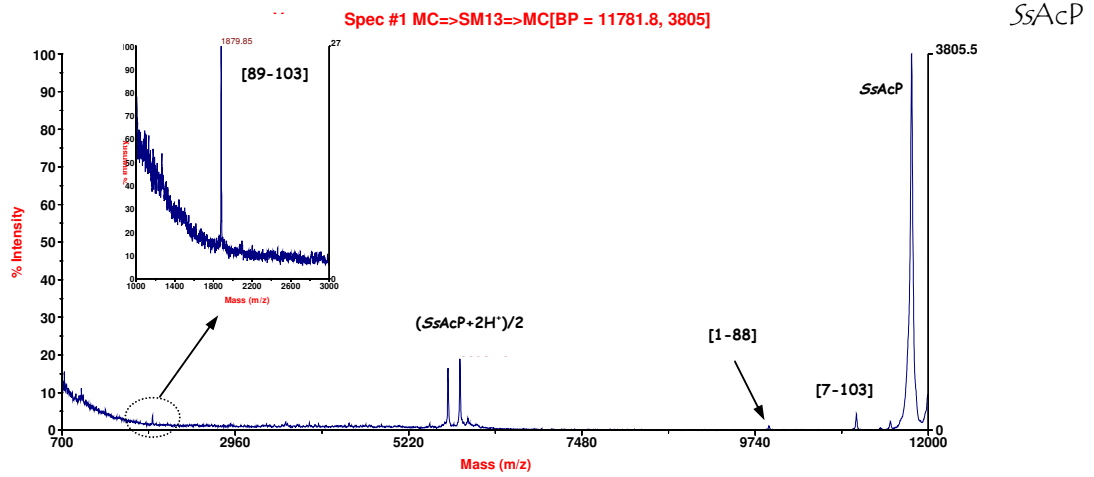


Figura 19 Spettro MALDI-MS relativo ai 30min dell'idrolisi condotta con chimotripsina

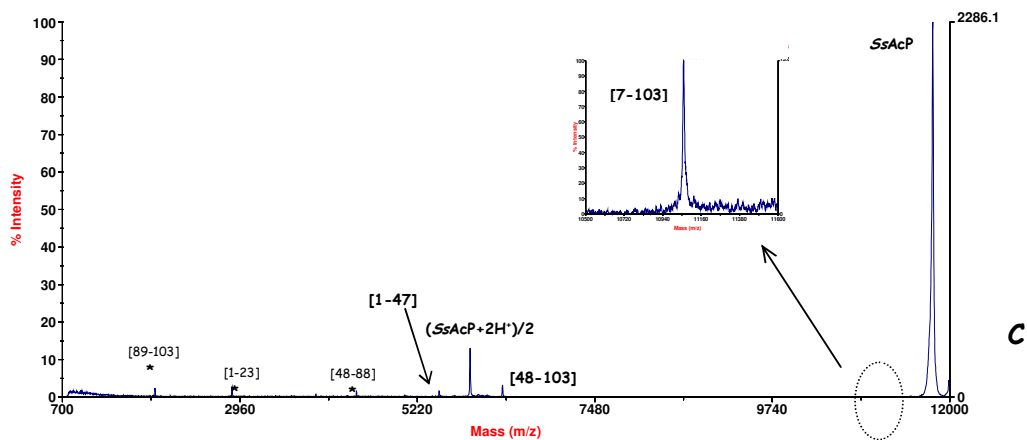


Figura 20 Spettro MALDI-MS relativo ai 5min dell'idrolisi condotta con chimotripsina in 25% TFE

➤ Idrolisi con subtilisina

L'idrolisi con la subtilisina è stata condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato pari a 1/3000 (w/w).

Dagli spettri (fig. 21) si evincono i risultati riportati nella Tabella III, che indicano la presenza di quattro siti di idrolisi: Trp6, Ser91, Glu61, Phe12.

L'idrolisi con la subtilisina in presenza del 25%TFE (v/v), invece, è stata condotta con un rapporto enzima/substrato 1/380 (w/w) e lo spettro del prelievo a 10min. è riportato in Figura 22. Il peptide 62-103 (m/z 4894.3) e il suo complementare 1-61 (m/z 6906.2), permettono di indicare il Glu61 come sito di idrolisi primario. Lo spettro relativo ai 60min. (fig 23) mostra invece che l'accessibilità in corrispondenza del Trp6 avviene con una cinetica di idrolisi più lenta.

Possiamo perciò concludere che in queste condizioni sperimentali, la proteina espone ancora la regione centrale e N-terminale ma, rispetto all'esperimento in assenza di TFE, l'estremità C-terminale risulta protetta dall'azione enzimatica.

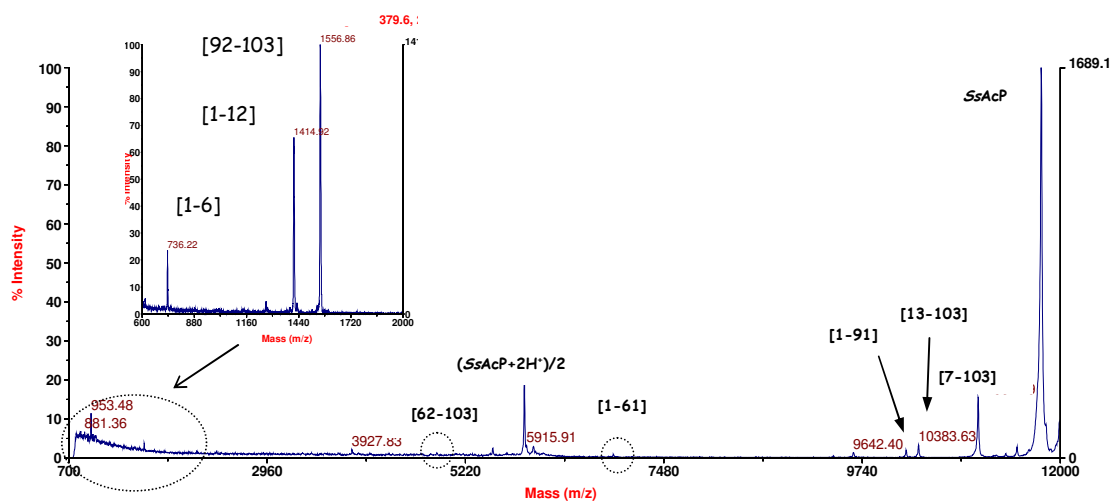


Figura 21 Spettro MALDI-MS relativo a 2h di idrolisi condotta con subtilisina e suo ingrandimento

Valore di massa misurato (MH ⁺ in Da)	Peptide	Peso molecolare teorico (M in Da)
10241,5	1-91	10241,8
1556,9	92-103	1556,6
6906	1-61	6905,1
4893,9	62-103	4893,3
10383,6	13-103	10383,9
1414,9	1-12	1414,6
11062,9	7-103	11062,6
736,3	1-6	735,9

Tabella III Risultati dell'idrolisi condotta con subtilisina in condizioni native

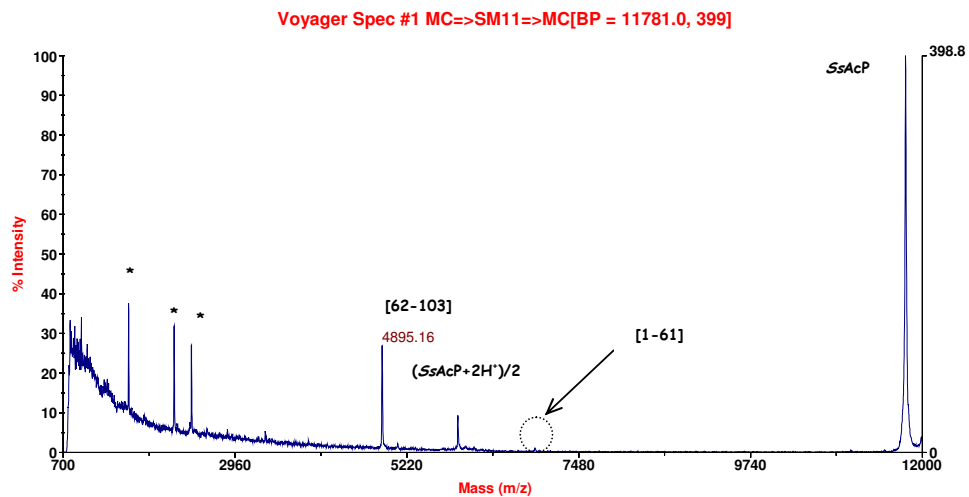


Figura 22 Spettro MALDI-MS relativo a 10min di idrolisi condotta con subtilisina in 25% TFE

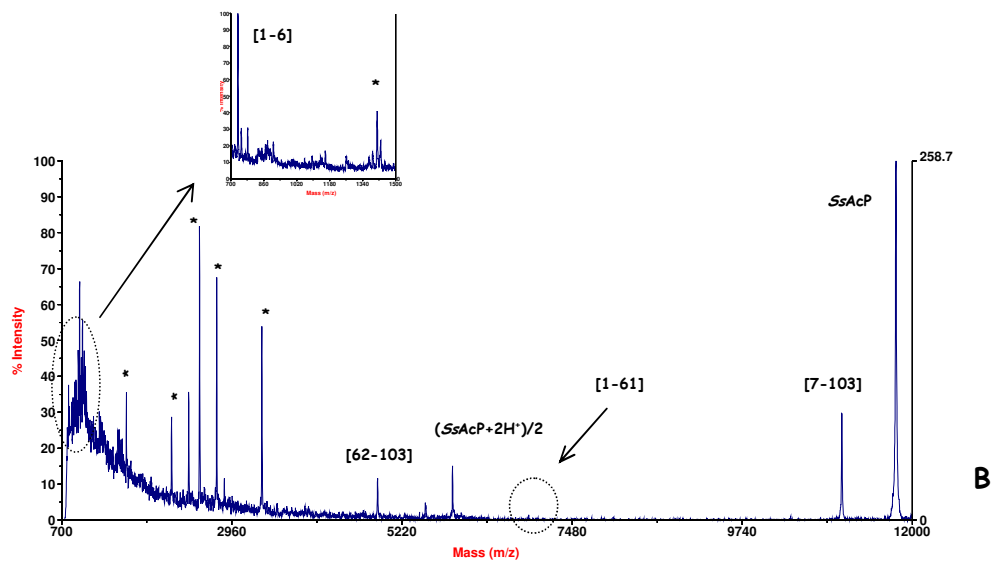


Figura 23 Spettro MALDI-MS relativo a 60min di idrolisi condotta con subtilisina in 25% TFE

➤ Idrolisi con elastasi

In Figura 24 è mostrato lo spettro ottenuto da idrolisi con l'elastasi utilizzando il rapporto enzima/substrato di 1/500 (w/w). L'unico sito d'idrolisi riscontrato è in corrispondenza della Val86: i frammenti 1-86 (m/z 9642,4) e 87-103 (m/z 2157,2) appaiono sin dai 5min.

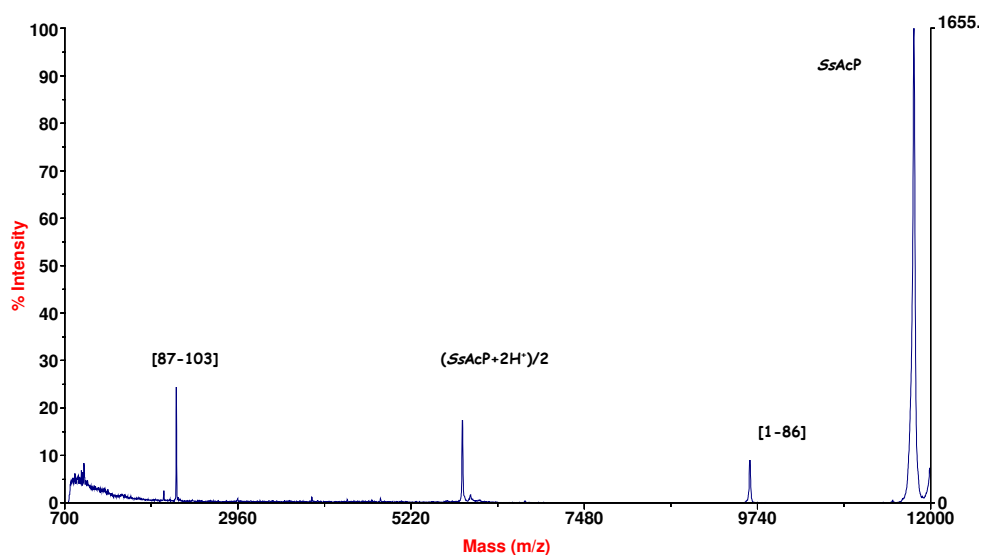


Figura 24 Spettro MALDI-MS relativo ai 5min. di idrolisi condotta con elastasi

Gli esperimenti condotti dopo aver incubato la proteina al 25% di TFE e utilizzando un rapporto enzima/substrato di 1/30 (w/w), hanno mostrato gli stessi segnali già identificati in assenza di TFE. Pertanto, è possibile concludere che anche in queste condizioni, l'unico sito accessibile all'azione dell'enzima è in corrispondenza del residuo Val86.

➤ Idrolisi con termolisina

Nell'esperimento condotto con termolisina è stato utilizzato un rapporto enzima/substrato pari a 1/600 (w/w).

Gli unici siti d'idrolisi riscontrati dall'analisi dei diversi tempi di idrolisi sono uno primario, in corrispondenza della Ser 89, e un secondario sulla Ser2. I prodotti dell'idrolisi al sito primario (frammenti 1-89 m/z 1010,74 e 90-103 m/z 1793,5) sono riscontrabili sin dai 15min. (fig. 25) di reazione mentre il peptide 3-103 (m/z 11637,1), che indica la Ser2 come sito di idrolisi secondaria, compare solo dai 45min. (fig. 26).

Data la notevole riduzione di attività enzimatica riscontrata in TFE, non è stato possibile effettuare l'esperimento comparativo in presenza del cosolvente.

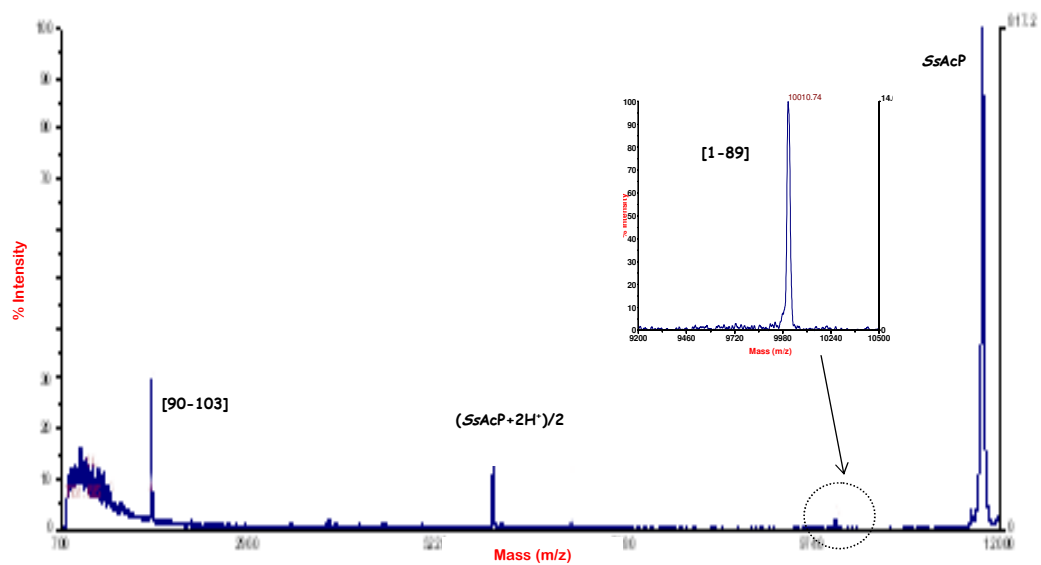


Figura 25 Spettro MALDI-MS relativo a 15min di idrolisi condotta con termolisina

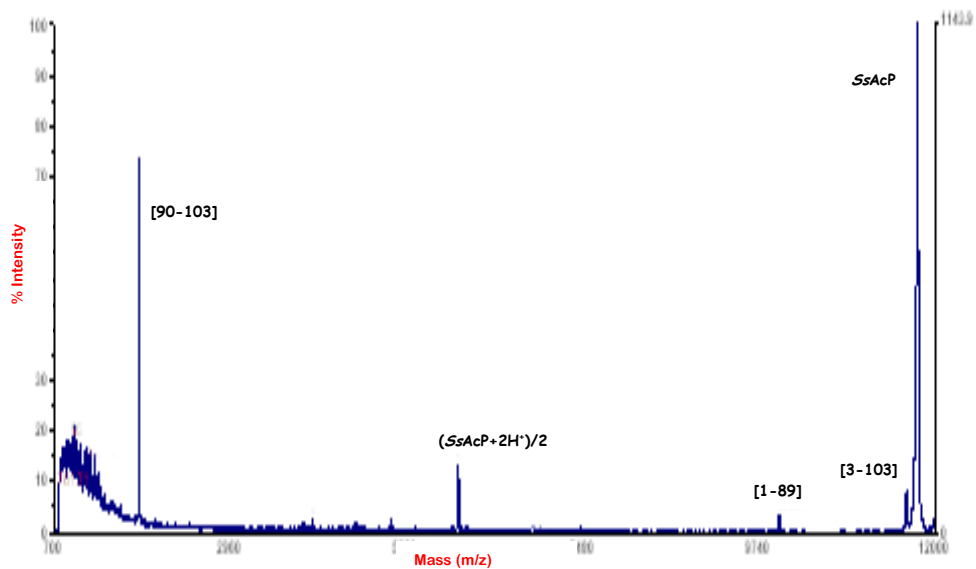


Figura 26 Spettro MALDI-MS relativo ai 45min. di idrolisi condotta con termolisina

➤ Idrolisi con Glu-C

L'idrolisi con endoproteasi Glu-C, condotta con un rapporto enzima/substrato 1/20 (w/w), mostra che il legame peptidico in corrispondenza del Glu in posizione 10 sia il solo che l'enzima è in grado di idrolizzare sulla proteina in conformazione nativa: il segnale del peptide 1-10 (m/z 1169.3) e quello del 11-103 (m/z 10631.7) compaiono, infatti, sin dai 10min. di reazione (fig.27).

Anche in questo caso, l'enzima non è attivo in TFE e pertanto non è stato possibile effettuare la proteolisi in tale condizione.

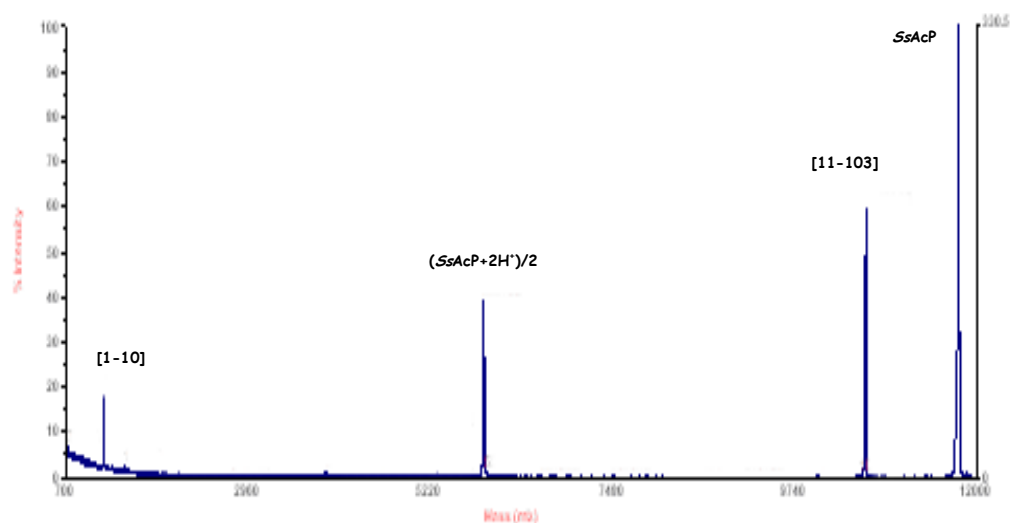


Figura 27 Spettro MALDI-MS relativo ai 10min di idrolisi condotta con l'endoproteasi Glu-C

2.4.2d Esperimenti di scambio Idrogeno/Deuterio

Gli esperimenti di scambio isotopico sono stati effettuati al fine di studiare il grado di strutturazione e la flessibilità di SsAcP, valutando, in paragone, le variazioni conformazionali cui va soggetta la proteina in presenza del 25% di TFE (v/v).

Gli esperimenti sono stati condotti a 25°C incubando la proteina in un opportuno tampone deuterato, e prelevando dalla miscela aliquote a tempi determinati (compresi tra 15 secondi e 60 minuti) analizzandole mediante LC-MS.

In Figura 28 sono mostrate le curve relative allo scambio isotopico in cui il numero di atomi di idrogeno scambiati è riportato in funzione del tempo: si evince che le cinetiche di scambio sono molto rapide e che la proteina nativa, così come al 25% di TFE, raggiunge il plateau in tempi brevissimi; da ciò si deduce che gli atomi di idrogeno ammidici disponibili allo scambio sono localizzati sulla superficie proteica o comunque facilmente accessibili al solvente.

Si evidenzia, inoltre, che SsAcP in condizioni native è meno disponibile allo scambio isotopico di quanto non sia in presenza del 25% di trifluoroetanolo: infatti, dopo un'ora di incubazione la massa della proteina nativa aumenta da 11780.5 ± 0.5 Da a 11824.5 ± 2.1 Da con un incremento di 44 Da. Questi dati suggeriscono che la proteina nativa ha scambiato circa il 40% dei 99 idrogeni ammidici totali. In TFE, dopo lo stesso tempo, SsAcP ha una massa di 11850.7 ± 0.9 Da avendo incorporato un numero di deuteri pari al 70% degli scambiabili. Questi dati indicano perciò che in presenza di trifluoroetanolo la proteina acquista flessibilità pur mantenendo una buona strutturazione dei legami peptidici non coinvolti nello scambio isotopico.

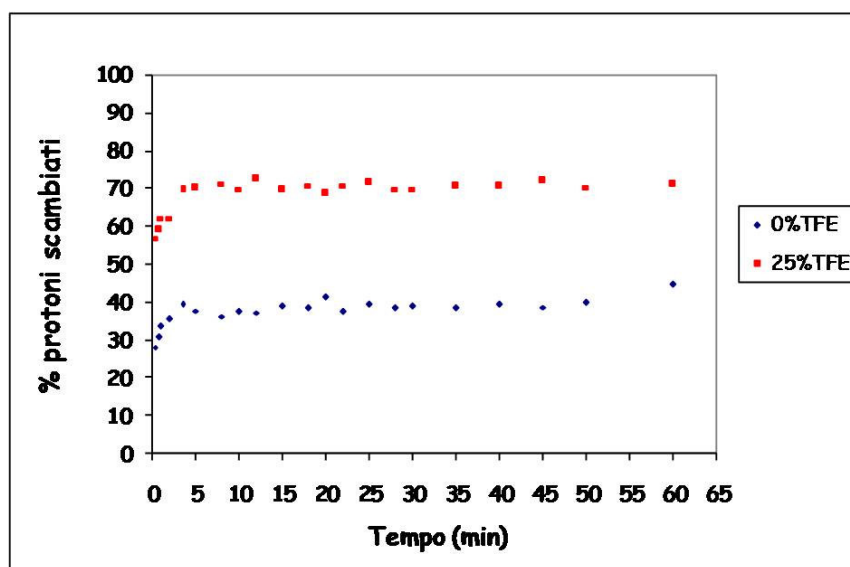


Figura 28 Profili di scambio isotopico allo 0% e al 25% (v/v) TFE

2.4.3 DISCUSSIONE

Il processo fibrillogenico è oggetto di molteplici studi sia in campo medico che biochimico, poiché numerose malattie degenerative sono state collegate alla formazione di aggregati fibrillari che si accumulano in maniera invasiva in diversi organi e tessuti (Chiti et al. 2000), generando una situazione patologica che, a lungo termine, risulta letale per il paziente.

È stato dimostrato che la formazione di un intermedio fibrillogenico particolarmente pronò all'aggregazione è capace di innescare il processo di precipitazione delle placche amiloidi (Nilsson M. R., 2004), e che inoltre, la struttura di tali placche, indipendentemente dalla proteina che le ha generate, è caratterizzata da un elevato contenuto in β -sheets disposti in maniera perpendicolare all'asse della fibrilla in una struttura nota come β -cross.

La propensione a formare fibrille è in realtà comune a numerose proteine, che sebbene non coinvolte in malattie di tipo amiloide possono formare fibrille in opportune condizioni sperimentali; è quindi importante studiare dei sistemi modello in cui il processo di aggregazione ordinata sia innescabile *in vitro* ed in cui sia possibile isolare e caratterizzare l'intermedio fibrillogenico o la popolazione di stati intermedi. Una di queste proteine modello è l'acilfosfatasi da *Sulfolobus solfataricus* (SsAcP) il cui comportamento fibrillogenico in presenza di TFE (2-2-2 trifluoroetanolo) è stato ampiamente caratterizzato presso l'università di Firenze (Plakoutsi G. et al., 2004).

Allo scopo di chiarire ed approfondire dal punto di vista strutturale il processo amiloidogenico che vede coinvolta l'Acilfosfatasi da *Sulfolobus solfataricus*, in questo lavoro di tesi, sono state applicate strategie di proteolisi limitata e di scambio H/D abbinata ad analisi di spettrometria di massa.

La struttura terziaria nativa di SsAcP (fig. 29), recentemente risolta sia mediante diffrazione ai raggi X che attraverso spettroscopia NMR, è organizzata in 5 β -strands antiparalleli che si affacciano su 2 α -eliche anch'esse antiparallele (Corazza A. et al., 2006).

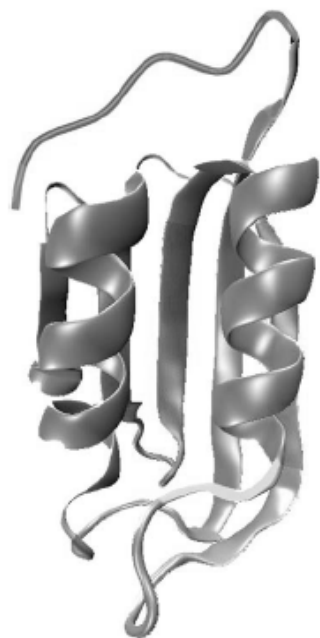


Figura 29 Struttura tridimensionale di SsAcP in condizioni native

L'interesse nei confronti dell'AcP da *Sulfolobus solfataricus* deriva dalla considerazione che sebbene SsAcP mostri una composizione in amminoacidi idrofobici e una stabilità conformazionale maggiore rispetto alle altre acilfosfatasi da organismi mesofili, anch'essa in presenza di TFE dà luogo ad aggregati fibrillari in grado di legare coloranti specifici quali Tioflavina T e Congo Red. Tuttavia, il dato più rilevante e peculiare risiede nel fatto che, tra il 15 e il 25% (v/v) di TFE, i primi aggregati conservano attività enzimatica e non contengono elementi di struttura β -cross. Questi risultati suggeriscono che SsAcP formi aggregati sopramolecolari conservando una conformazione molto prossima alla nativa, lasciando ipotizzare un meccanismo di fibrillogenesi diverso rispetto a quello comunemente ipotizzato per proteine amiloidi.

Gli esperimenti di proteolisi limitata (Zappacosta et al. 1996) hanno consentito di delineare la mappa topologica della proteina nelle varie condizioni sperimentali (pH, temperatura, % di TFE) scelte in modo da assicurare la stabilità della struttura proteica in esame (Orru' et al., 1999). Sono state individuate le zone di SsAcP suscettibili all'attacco proteolitico in assenza ed in presenza di TFE e dal confronto diretto dei *pattern* proteolitici, sono state ottenute informazioni sulla conformazione delle specie coinvolte nella formazione di intermedi solubili destinati a generare fibrille.

Data l'elevata idrofobicità di SsAcP è stato necessario sviluppare per gli esperimenti di proteolisi una nuova procedura alternativa alla separazione HPLC dei peptidi, che ha previsto l'analisi diretta dei prodotti di idrolisi mediante spettrometria di massa MALDI/TOF.

L'analisi diretta della miscela di idrolisi per spettrometria di massa MALDI/TOF, non solo è stata risolutiva nel ridurre i fenomeni di aggregazione di peptidi particolarmente

idrofobici, ma ha consentito di condurre esperimenti di *time course* utilizzando bassissime quantità di campione. Sono stati, infatti, realizzati una serie di prelievi, a tempi anche molto ravvicinati tra loro, permettendo di seguire l'andamento della reazione nel suo evolversi nel tempo.

In Figura 30 sono stati riportati i siti d'idrolisi preferenziali ottenuti dagli esperimenti condotti sulla proteina nativa. I risultati ottenuti sulla proteina nativa sono stati riportati sulla struttura risolta ed evidenziati in Figura 31.

I risultati ottenuti negli esperimenti condotti in assenza di TFE rivelano una forte accessibilità in corrispondenza delle estremità N e C-terminale, mentre la maggior parte della proteina risulta mascherata all'azione proteolitica.

Gli esperimenti in presenza del cosolvente hanno mostrato che a parità di attività enzimatica la SsAcP è localmente più aggredibile di quanto verificato in assenza di TFE: i primi eventi proteolitici sono molto evidenti già dai primissimi minuti di idrolisi. La distribuzione dei siti preferenziali d'idrolisi è rimasta sostanzialmente inalterata sebbene la cinetica di idrolisi nelle regioni N- e C-terminale sia più lenta rispetto agli esperimenti in condizioni native.

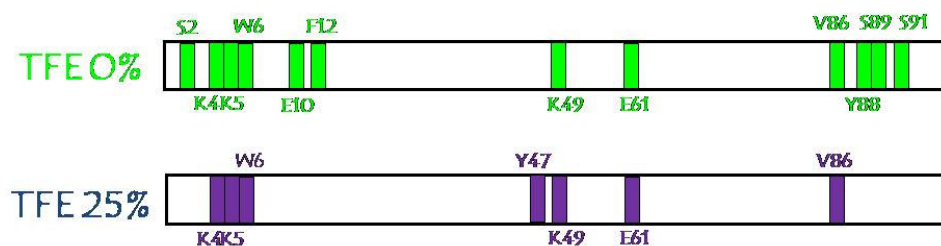


Figura 30 Mappe proteolitiche dell'SsAcP incubata allo 0% e 25% di TFE.



Figura 31 Struttura tridimensionale di SsAcP. Le regioni di SsAcP nativa più esposte al solvente, o soggette ad una maggiore flessibilità, sono indicate in rosso.

Alla luce di tali risultati è possibile concludere che il TFE determina un generale aumento della flessibilità globale della proteina senza sostanziali variazioni conformazionali, a meno di una maggiore strutturazione e stabilizzazione locale delle regioni N- e C-terminali, come dimostrato da una cinetica di reazione più lenta in tale regioni. L'assenza di variazioni conformazionali sostanziali suggerisce che SsAcP in presenza di trifluoroetanolo adotti una conformazione *native-like*.

Gli esperimenti di scambio isotopico hanno permesso studiare il grado di compattezza e flessibilità di SsAcP, valutando, in paragone, le variazioni conformazionali a cui va soggetta la proteina ed i processi dinamici in cui è coinvolta tra lo 0% e il 25% di TFE (v/v). Le curve ottenute indicano che SsAcP in condizioni native è meno disponibile allo scambio isotopico di quanto non sia in presenza del 25% di trifluoroetanolo: SsAcP in condizioni native incorpora fino ad un massimo del 40% di deuteri rispetto ai protoni ammidici totali, mentre al 25% (v/v) di cosolvente il grado di scambio sale al 70%. Questi dati sono in perfetto accordo con quanto mostrato dagli esperimenti di proteolisi limitata, in quanto confermano che in presenza di trifluoroetanolo la proteina acquista globalmente una maggiore flessibilità, pur mantenendo una buona strutturazione localizzata nel 30% dei legami peptidici, che non sono coinvolti nello scambio isotopico.

La maggiore flessibilità globale in presenza di TFE è, inoltre, confermata dal diverso comportamento idrodinamico riscontrato negli esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare. SsAcP al 25% di TFE eluisce, infatti, ad un volume inferiore rispetto a quello misurato in condizioni native, indice di aumento del raggio di Stokes e quindi del volume totale della proteina, che risulta evidentemente meno compatta.

I risultati ottenuti in questo progetto di tesi sono in perfetto accordo con dati pubblicati recentemente (Plakoutsi G. et al., 2005), frutto di esperimenti di *light*

scattering, fluorescenza e saggi di attività che hanno consentito di ipotizzare un meccanismo di fibrillogenesi alternativo riportato in Figura 32.

In particolare, l'aggregazione di SsAcP indotta da TFE sembrerebbe procedere attraverso l'associazione di molecole proteiche in conformazione essenzialmente nativa, che generano "aggregati iniziali" con proprietà sostanzialmente diverse da quelle delle specie amiloidi: questi aggregati, enzimaticamente attivi, non legano infatti coloranti specifici, quali Tioflavina T e Congo Red.

Le protofibrille, complessi che invece possiedono caratteristiche tipiche delle specie amiloidi, appaiono solo in seguito ad un riarrangiamento degli aggregati iniziali. La formazione delle fibrille quindi non passa attraverso la produzione di oligomeri solubili parzialmente destrutturati perché la velocità di *unfolding* è inferiore a quella del processo di fibrillogenesi. La presenza dei primi aggregati catalizza infatti efficientemente la formazione delle protofibrille il cui ruolo nelle patologie neurodegenerative è ormai conclamato (Plakoutsi G. et al., 2005).

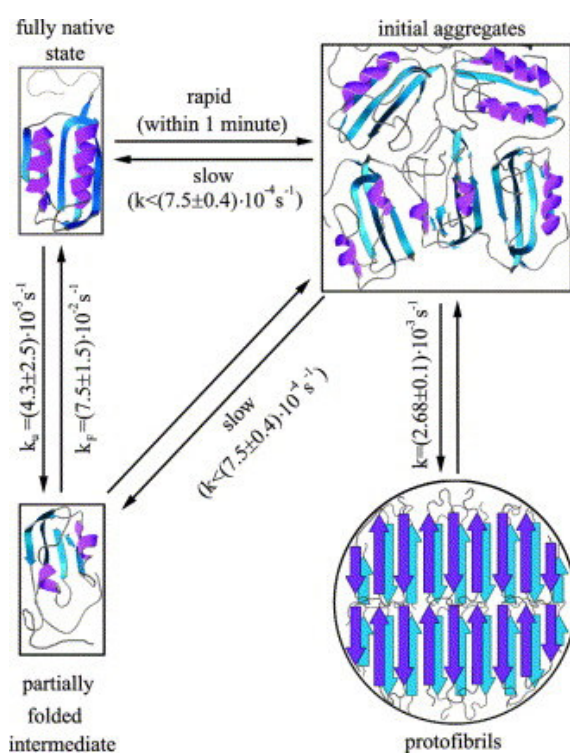


Figura 32 Rappresentazione del meccanismo di aggregazione di SsAcP in protofibrille amiloidi

Questi risultati suggeriscono che per alcune proteine non occorra una sostanziale destrutturazione per la formazione di protofibrille e fibrille amiloidi, ma è sufficiente avere condizioni in grado di promuovere una maggiore flessibilità dell'intera impalcatura proteica.

2.5. CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DI MUTANTI FIBRILLOGENICI DELLA MIOGLOBINA

La mioglobina da capodoglio è una proteina piccola, di struttura elicoidale (Figura 33), che reca due residui di triptofano in posizione 7 e 14 altamente conservati.

Grazie alla sua semplicità strutturale la mioglobina è stata negli ultimi anni un eccellente sistema modello per studi di *fold*ing. E' una proteina priva di ponti disolfuro e in assenza del gruppo eme conserva la struttura nativa nota come apo-mioglobina (apoMb). Si suppone che il gruppo eme non influenzi il processo di *fold*ing, ma abbia solo la funzione di stabilizzare la struttura dello stato nativo, proteggendola da un eventuale *un*fold*ing* (Hargrove MS et al., 1996).

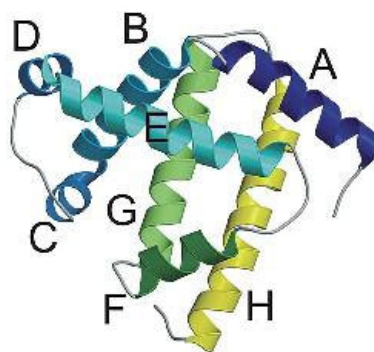


Figura 33 Mioglobina da capodoglio

Il processo di *fold*ing di questa proteina si svolge attraverso la formazione di un intermedio privo del gruppo eme, in cui solo l'elica A (all'interno della quale sono presenti i residui 7 e 14), l'elica G e ed H e parte della B sono strutturate come nello stato nativo, mentre il resto della molecola sembra essere del tutto disordinato (Hughson FM et al., 1990). Più recentemente Użawa et al. (2004) hanno dimostrato che l'elevato contenuto di struttura elicoidale nell'intermedio suggerisce la presenza di regioni elicoidali esterne al cosiddetto *core* A(B)GH. Inoltre gli autori ipotizzavano che l'incremento di struttura elicoidale osservato nei successivi avanzamenti del *fold*ing fosse dovuto ad un allungamento delle eliche preesistenti.

Questa conformazione intermedia dell'apoMb, stabile a pH 4, è di particolare interesse nello studio del *fold*ing. La sostituzione simultanea di entrambi i residui di triptofano in posizione 7 e 14 con due residui di fenilalanina (W7FW14F) influenza il processo di *fold*ing dell'apoMb al punto tale che la proteina raggiunge a pH 4 una struttura stabile parzialmente strutturata, ma l'aumento di pH da 4 a 7 non consente il raggiungimento della struttura nativa, in quanto si osserva la formazione di fibrille del tutto simili a quelle

di tipo amiloide (Sirangelo I et al., 2003). Ciò suggerisce che questi due residui giochino un ruolo chiave nel processo di *fold*ing della mioglobina da capodoglio.

Esperimenti di simulazioni di dinamica molecolare hanno mostrato alcune distorsioni nel sottodominio AGH, che sembrerebbero influenzare i successivi passaggi del processo di *fold*ing (Sirangelo I et al., 2000). Questo doppio mutante può quindi rappresentare un sistema modello attraverso cui studiare, a livello molecolare, *fold*ing e *misfold*ing ed entrare nel dettaglio di specifiche interazioni coinvolte nella formazione delle fibrille amiloidi.

Il percorso di *fold*ing del doppio mutante dalla sua struttura solubile alla forma aggregata è associata alla formazione di un intermedio che presenta struttura secondaria predominante di tipo β . L'evoluzione strutturale che si manifesta a partire dall'intermedio segue meccanismi diversi dalla proteina nativa, pertanto la caratterizzazione di W7FW14F a pH 4 potrebbe chiarire a livello molecolare le motivazioni per cui si innesca il processo di aggregazione.

Allo scopo di valutare il contributo fornito dalla sostituzione di ciascuno dei due residui di triptofano sono state condotte analisi di dicroismo circolare sui singoli mutanti W7F e W14F. I risultati hanno indicato che questi mutanti seguono un meccanismo di *fold*ing simile a quello della Mb nativa (Mb WT), tranne che per una ridotta affinità di legame verso il gruppo eme ed un'inferiore stabilità della struttura a pH 7. Esperimenti di simulazioni di dinamica molecolare hanno mostrato che nei singoli mutanti le eliche A, G e H conservano simili posizioni relative rispetto alla Mb WT, pur avendo un contenuto elicoidale inferiore (Sirangelo I et al., 2000).

Questa parte del lavoro di tesi è stata quindi focalizzata sulla caratterizzazione dell'intermedio del *fold*ing del doppio mutante W7FW14F.

L'analisi combinata mediante strategie di proteolisi complementare, scambio H/D e spettrometria di massa hanno consentito di investigare la topologia superficiale del doppio mutante, le variazioni conformazionali a cui è soggetto ed i processi dinamici in cui è coinvolto. Tutte le analisi sono state condotte a pH 4, condizione in cui W7FW14F è stabile, monomero e parzialmente strutturato, in paragone con la proteina *wild-type* e con i singoli mutanti W7F e W14F.

2.5.1 Materiali e Metodi

I campioni di W7F, W14F e W7FW14F sono stati forniti dal Dipartimento di Biochimica e Biofisica della Seconda Università degli studi di Napoli. La proteina *wild-type* è stata acquistata dalla Fluka.

Tutti i reattivi, i solventi e gli enzimi impiegati sono quelli già descritti nel paragrafo 2.3.1.

Gli esperimenti di proteolisi limitata sono stati condotti sul doppio mutante e per confronto sulla Mb WT, incubando il campione con una proteasi con alta specificità di substrato, quale l'endoproteasi V8, oltre che con un enzima del tutto aspecifico come la pepsina, in grado di catalizzare l'idrolisi a livello di qualunque coppia di amminoacidi. Il motivo per cui sono state scelte solo queste due proteasi risiede nella scarsa attività enzimatica degli altri enzimi proteolitici a pH 4. Le reazioni infatti sono state condotte in un tampone ammonio acetato 10mM, pH 4.0, a 37°C, utilizzando una concentrazione proteica pari a 10µM. L'andamento delle reazioni di idrolisi è stato seguito prelevando aliquote da 100µl dalla miscela di reazione a tempi prestabiliti (15, 30 e 60 minuti). I prodotti dell'idrolisi sono stati successivamente separati mediante un sistema cromatografico HP 1100 (Agilent technologies) equipaggiato con un rivelatore UV/VIS. La fase mobile è costituita da una soluzione di TFA 0.1% (eluente A) e una soluzione TFA 0.07% in 95% acetonitrile (eluente B), mentre la colonna impiegata è una C18 *narrow bore* a fase inversa (Phenomenex). I peptidi sono stati eluiti mediante un gradiente lineare dal 5 al 65% di eluente B in 60 minuti, ad una velocità di flusso di 0.2 ml/min. L'eluizione è stata seguita misurando l'assorbimento alla lunghezza d'onda di 220nm. Le specie così isolate sono state caratterizzate ed identificate mediante ESMS, utilizzando uno spettrometro di massa Quattro Micro (Waters), descritto nel paragrafo 2.3.1.

Gli esperimenti di scambio isotopico sono stati condotti sul doppio mutante e per confronto sulla Mb WT, W7F e W14F; il campione proteico (4 pmol/µl) è stato equilibrato per 5 minuti a 25°C in ammonio acetato 10mM, pH 4.0. La reazione di scambio è stata fatta partire diluendo cinque volte il campione proteico con un tampone analogo ma preparato in D₂O.

L'andamento della reazione di scambio è stato seguito nel tempo, prelevando aliquote da 0.5 nmol dalla miscela di reazione a tempi determinati (compresi tra 15 secondi e 60 minuti) e analizzandole mediante LC-MS: è stata utilizzata una precolonna Phenomenex dotata di fase stazionaria C₄ e un sistema eluente costituito da una soluzione di TFA 0.1% (eluente A) e una soluzione TFA 0.1% in acetonitrile (eluente B) tenuti in ghiaccio. L'eluizione è stata effettuata ad una velocità di flusso pari a 200µl/min con un gradiente veloce del solvente B da 0 a 95% in 10 secondi. In questo modo, la proteina deuterata incontra una soluzione a pH2 a circa 0 °C, che determina il retroscambio degli atomi di idrogeno delle catene laterali e contemporaneamente, minimizza un eventuale e più lento scambio degli idrogeni del legame peptidico. I valori di massa ottenuti vengono normalizzati rispetto al valore teorico dei protoni scambiabili. Lo spettrometro utilizzato, dotato di sorgente *electrospray* è stato descritto in precedenza (paragrafo 2.3.1). La misura esatta della massa di ciascuna proteina dopo l'incubazione in tamponi deuterati ha, pertanto, consentito di determinare direttamente il numero di atomi di deuterio incorporati. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in un intervallo di m/z da

700 a 1400, con un tempo di scansione di 3 secondi ed, infine, elaborati con il supporto di un software specifico (Masslynx).

Per la determinazione del profilo di scambio locale, le proteine sono state incubate nel tampone di scambio a 25 °C per tempi compresi tra 30 secondi e 60 minuti; la reazione di scambio è stata bloccata diluendo ciascun prelievo quattro volte in una soluzione di 0.1% TFA (pH 2.5), contenente pepsina (rapporto E/S 5/1, w/w) ed incubando per 3.5 minuti a 0°C (condizioni di retroscambio).

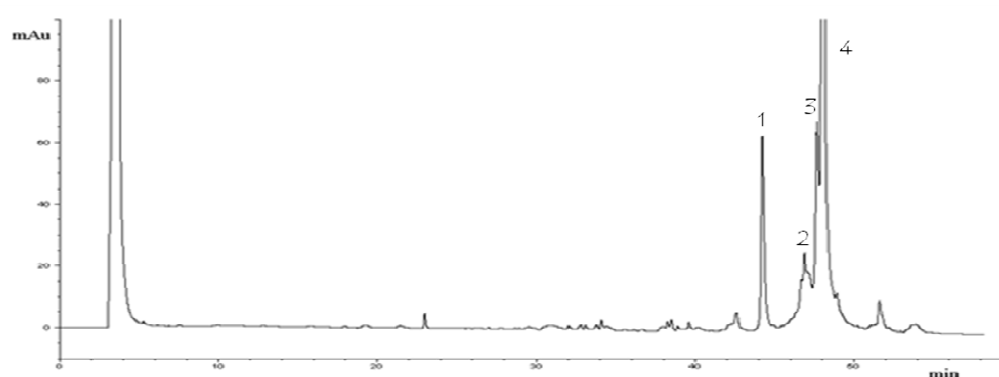
I peptidi sono stati analizzati mediante LC-MS, separandoli su una colonna a fase inversa C₁₈ X-TERRA (Waters). L'eluizione è stata effettuata ad una velocità di flusso pari a 0.2 ml/min, secondo un gradiente di eluente B dal 10 al 60% in 8 minuti. 2 nmol di campioni non deuterati sono stati digeriti con pepsina e frazionati su una colonna C₁₈ mediante un sistema HPLC interfacciato ad una trappola ionica lineare (LCQ, Finnigan Corp.) allo scopo di confermare l'assegnazione dei peptidi attraverso dati di frammentazione.

2.5.2 RISULTATI

2.5.2a Esperimenti di proteolisi limitata

L'esperimento di proteolisi complementare in presenza di pepsina è stato condotto seguendo un rapporto E/S pari a 1/500. L'evoluzione nel tempo della reazione di idrolisi è stata seguita effettuando prelievi a 15, 30 e 60 minuti. A titolo d'esempio in Figura 35 (pannelli A e B) sono riportati i cromatogrammi relativi alle aliquote prelevate a 30 minuti dall'inizio della reazione di idrolisi.

A



B

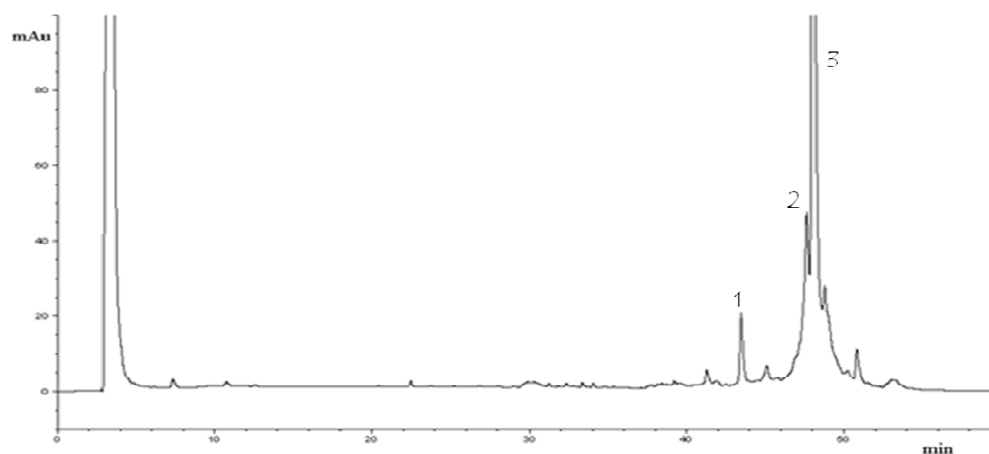


Figura 34 Cromatogramma dell'aliquota prelevata dopo 30min di idrolisi con pepsina della Mb WT (A) e del doppio mutante (B).

L'analisi ESMS dei picchi 1 e 3 del pannello A rivela la presenza, rispettivamente dei peptidi 1-29 e 30-153, suggerendo Leu29 come sito preferenziale e suggerendo che tale residuo sia particolarmente esposto nella catena. Lo stesso sito di idrolisi si è riscontrato anche dall'analisi delle frazioni cromatografiche del doppio mutante (picchi 1 e 2 del pannello B). Inoltre la Mb WT è idrolizzabile ulteriormente in corrispondenza del residuo Leu69, in quanto sono stati riscontrati i peptidi 1-69 e 70-153 (picchi 4 e 2 del pannello A); il residuo Leu69 è localizzato nell'elica E, che sembra invece essere mascherato all'azione enzimatica in W7FW14F.

L'idrolisi con l'endoproteasi V8 è stata invece condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato pari a 1/600 (w/w) sia sul campione Mb WT, che sul doppio mutante

W7FW14F. Aliquote di ciascuna miscela di reazione sono state prelevate a 15, 30 e 60 minuti, acidificate ed analizzate mediante RP-HPLC

L'analisi ESMS delle specie eluite nell'esperimento di proteolisi complementare a carico di Mb WT ha permesso di identificare i residui Glu38, Glu54, Glu85 e Glu136 come siti di idrolisi preferenziale. L'esposizione dei residui Glu38, Glu85 e Glu136 è stata riscontrata anche nella proteolisi condotta sul doppio mutante, ma in tal caso è stata osservata la formazione di un ulteriore taglio a carico di Glu109. A questo valore di pH, quindi l'elica H è accessibile in entrambe le proteine esaminate, mentre il taglio in corrispondenza di Glu109 denota una parziale esposizione dell'elica G in W7FW14F.

In Tabella IV sono riassunti i risultati di tutti gli esperimenti di proteolisi effettuati.

CAMPIONE	ENZIMA	SITO DI IDROLISI
Mb WT	Endoproteasi V8	Glu38 Glu54 Glu85 Glu136
	Pepsina	Leu29 Leu69
W7FW14F	Endoproteasi V8	Glu38 Glu85 Glu109 Glu136
	Pepsina	Leu29

Tabella IV Siti preferenziali di idrolisi di Mb WT e W7FW14F a pH 4.

2.5.2b Esperimenti di scambio Idrogeno/Deuterio sulle proteine intatte

Gli esperimenti di scambio H/D sono stati condotti su W7FW14F e per confronto sia sulla proteina WT, che sui singoli mutanti W7F e W14F nelle loro forme apo a pH 4.0. Aliquote dalla miscela di reazione sono state prelevate a tempi diversi ed analizzate mediante *fast* LC-MS. Poiché i deuteri incorporati dalle catene laterali degli amminoacidi e dalle estremità ammino- e carbossi-terminale della proteina sono rapidamente sostituiti da protoni nella fase di retroscambio, l'incremento di massa misurato riflette solo il numero di atomi di deuterio incorporati nel legame polipeptidico.

Gli spettri di massa ottenuti presentano un singolo inviluppo, indicando una cinetica di scambio di tipo EX2 (Bai Y et al., 1994) e confermando l'omogeneità di questi intermedi. Come valore di normalizzazione, corrispondente alla proteina deuterata al

100%, è stato calcolato per ciascuno dei casi il valore teorico di protoni scambiabili, ottenuto sottraendo al numero di amminoacidi totale della proteina il numero di proline ed il protone del gruppo amminico all'N-terminale.

Il paragone tra le curve di scambio è mostrato in Figura 35: dopo 60 minuti dall'inizio della reazione, il 55% dei protoni scambiabili di Mb WT (curva mostrata in blu) è stato sostituito da deuterio, in accordo con una parziale destrutturazione dovuta alla transizione dalla conformazione nativa alla specie intermedia. Tuttavia il 45% dei protoni ammidici è ancora schermato al solvente, indice di una significativa ritenzione di struttura secondaria e terziaria.

Dopo lo stesso tempo di incubazione, W7FW14F (curva in rosso) ha già scambiato il 60% dei protoni ammidici; ciò significa che la doppia mutazione comporta un incremento di flessibilità. I singoli mutanti mostrano comportamento analogo a W7FW14F, infatti le curve dei singoli mutanti sono praticamente sovrapponibili a quella del doppio mutante, a meno di una più veloce incorporazione da parte di quest'ultimo. Questo risultato suggerisce che la singola mutazione sia sufficiente ad incrementare la flessibilità dell'impalcatura proteica.

Questi dati indicano che l'intermedio che W7FW14F stabilisce a pH 4.0 è ancora caratterizzato da regioni strutturate e compatte, con un definito grado di flessibilità conformazionale, maggiore rispetto alla proteina *wild-type*.

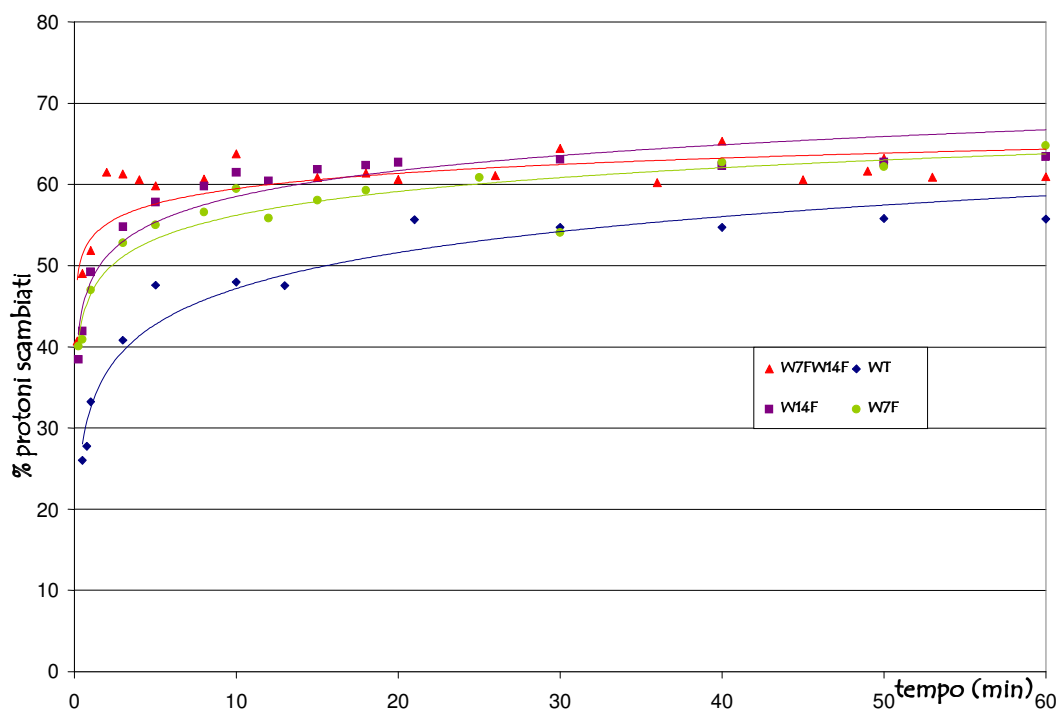


Figura 35 Profilo di scambio globale a pH4. In rosso è riportata la curva ottenuta per W7FW14F, in blu quella relativa alla proteina *wild-type*, ed in viola e verde rispettivamente la curva relativa a W14F ed a W7F.

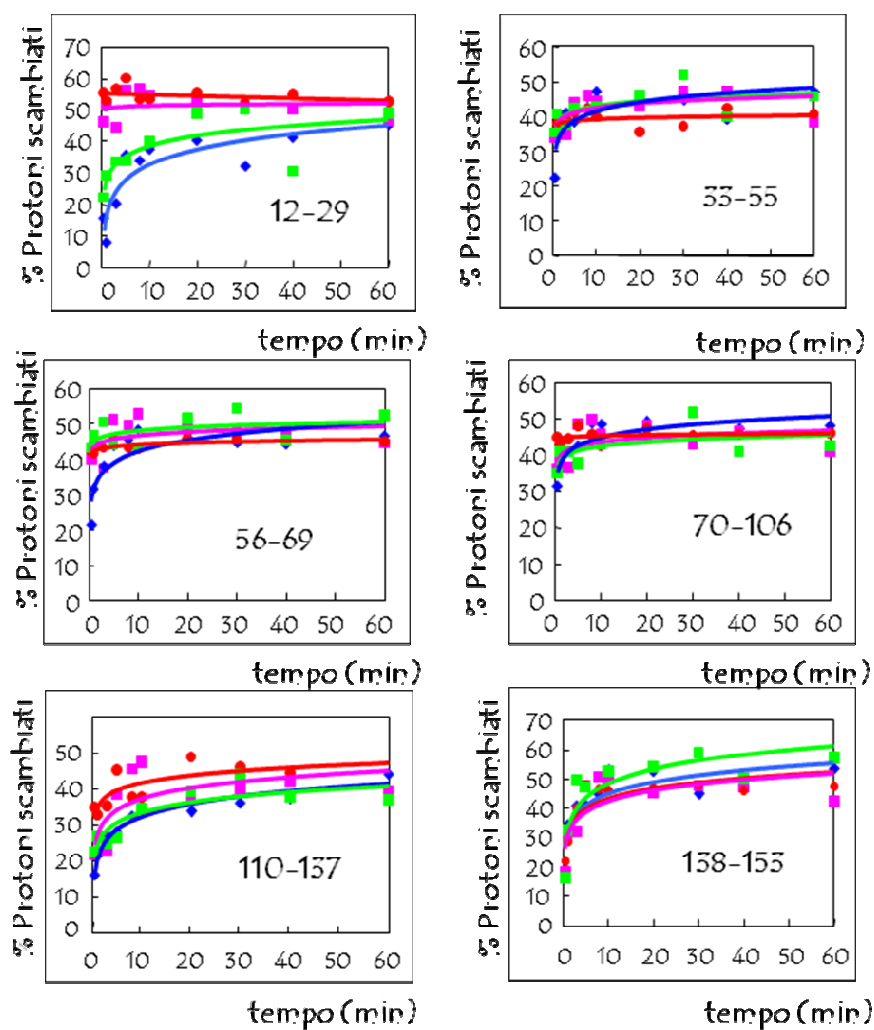
2.5.2c Flessibilità conformazionale delle regioni proteiche

Informazioni più dettagliate sulle variazioni conformazionali che avvengono a carico delle singole regioni delle proteine esaminate sono state ottenute mediante digestione proteolitica dei campioni deuterati. W7FW14F e per confronto la proteina WT ed i singoli mutanti W7F e W14F sono state equilibrate a pH 4.0 e sottoposte a reazione di scambio per intervalli di tempo compresi tra 30 secondi e 60 minuti, prima di essere incubate con pepsina in condizioni di arresto della reazione di scambio (0°C, pH 2.5). Le miscele peptidiche derivanti sono state analizzate mediante *fast* LCMS e l'attribuzione delle sequenze corrispondenti è stata condotta mediante misura del peso molecolare accurato e analisi MSMS della miscela non deuterata.

Nel digerito di ciascuna proteina esaminata sono stati osservati diversi peptidi corrispondenti alle stesse regioni, a causa della totale aspecificità di idrolisi della pepsina. L'analisi del profilo locale di scambio è stata pertanto condotta sulla serie minima di peptidi non ridondanti che coprono l'intera sequenza.

In Figura 36 sono riportate le curve di scambio dei peptidi selezionati (pannello A), ottenute in funzione dei vari tempi di incubazione, in tampone deuterato, delle proteine intatte. Il pannello B mostra, invece, la corrispondenza tra i peptidi selezionati per il profilo di scambio locale e l'organizzazione della struttura secondaria della Mb nelle 8 α -eliche.

A



B

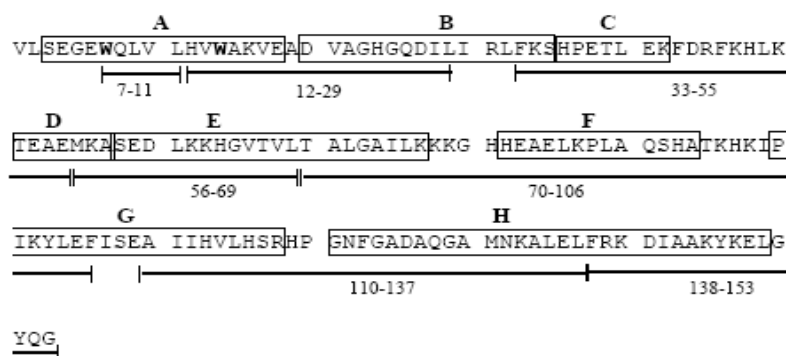


Figura 36 (A) Profilo di scambio locale a pH4. In rosso è riportata la curva ottenuta per W7FW14F, in bleu quella relativa alla proteina *wild-type*, ed in viola e verde rispettivamente la curva relativa a W14F ed a W7F. (B) Sequenza della Mb da capodoglio. Gli elementi di struttura secondaria sono indicati all'interno dei riquadri; al di sotto della sequenza sono riportati i frammenti selezionati per l'analisi dello scambio H/D locale.

Non si osservano sostanziali differenze tra i frammenti del doppio mutante e quelli della proteina wild-type, ad eccezione del frammento 12-29; In corrispondenza di tale frammento il doppio mutante, analogamente a W14F, esibisce una capacità di incorporare deuterio decisamente maggiore rispetto alla proteina *wild-type*, indice quindi di una maggiore flessibilità e libertà conformazionale.

La sostituzione in posizione 7, invece, ha solo un effetto marginale sul peptide 12-29, infatti il singolo mutante W7F genera una curva di scambio molto simile alla proteina wild type. Purtroppo non abbiamo alcuna informazione sul peptide N-terminale; tale peptide infatti non è mai stato rivelato né per il singolo mutante W7F, né per il doppio mutante, probabilmente perché la mutazione altera le proprietà chimico-fisiche del peptide, favorendone l'aggregazione.

2.5.3 DISCUSSIONE

Il percorso di *fold*ing della mioglobina si svolge attraverso il raggiungimento di una conformazione parzialmente strutturata, che mostra caratteristiche simili ad uno stato di *molten globule*, che contiene un *core* organizzato, formato dall'elica A, G e H e parte dell'elica B, mentre il resto della molecola è impaccato più debolmente, con eliche D ed E fluttuanti (Jennings and Wright, 1993; Nishimura et al., 2002; Weisbuch et al., 2005) (Figura 37).

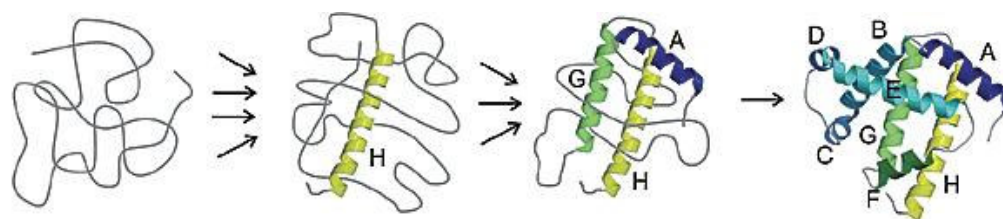


Figura 37 Illustrazione schematica del percorso di *fold*ing dell'apomioglobina

La sostituzione dei due residui di triptofano in posizione 7 e 14 con residui di fanilalanina induce un differente percorso di *fold*ing, che termina con la formazione di fibrille amiloidi. I singoli mutanti mostrano, invece, una minore stabilità sia a pH 7.0, che nell'intermedio parzialmente destrutturato (Bai Y et al., 1993; Kay MS et al., 1996).

La presenza di almeno uno dei due residui è quindi necessaria alla proteina per raggiungere la struttura dello stato nativo; d'altra parte i due residui di triptofano sono stati estremamente conservati nel corso dell'evoluzione ed è ovvio che selezionare e preservare residui chiave che interferiscano con lo stabilirsi di interazioni inter e/o intramolecolari non corrette previene fenomeni di aggregazione.

In questa parte del lavoro di tesi sono stati investigati gli effetti determinati dalla sostituzione simultanea dei due residui di triptofano sulle proprietà conformazionali dell'intermedio all'equilibrio a pH 4.0. I dati ottenuti sul doppio mutante sono stati quindi confrontati con quelli relativi alla proteina *wild-type* ed ai singoli mutanti W7F e W14F.

I dati di proteolisi limitata, schematizzati in Figura 38, hanno mostrato una accessibilità alle proteasi diversa nel doppio mutante rispetto alla proteina WT. In particolare le eliche D ed E dell'intermedio di W7FW14F sono completamente protette all'azione enzimatica, mentre l'elica G è esposta.

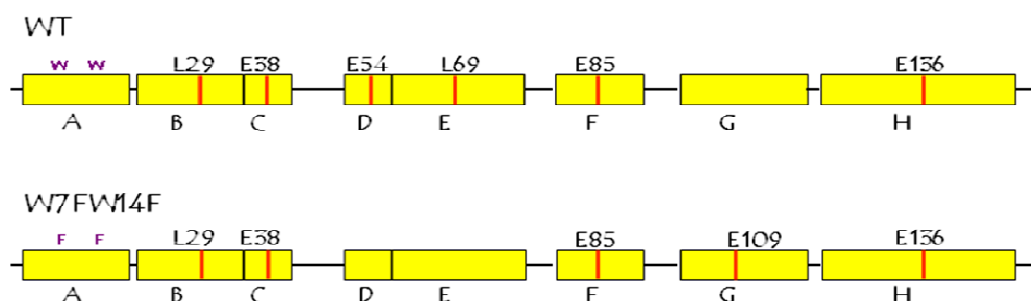


Figura 38 Rappresentazione schematica dei risultati ottenuti dalla proteolisi limitata condotta sulla proteina *wild-type* e sul doppio mutante a pH 4.0.

Gli esperimenti di scambio H/D condotti sulle proteine intatte (profilo di scambio globale) hanno mostrato che tutti i mutanti incorporano un numero di deuteri maggiore rispetto alla proteina WT, suggerendo che le sostituzioni dei residui di triptofano conferiscano maggiore flessibilità alla catena polipeptidica. I singoli mutanti mostrano comportamento analogo a W7FW14F, infatti le curve dei singoli mutanti sono praticamente sovrapponibili a quella del doppio mutante, a meno di una più veloce incorporazione da parte di quest'ultimo. Questo risultato suggerisce che la singola mutazione sia sufficiente ad incrementare la flessibilità dell'impalcatura proteica.

Un comportamento simile è stato riscontrato anche valutando il profilo di scambio locale, ottenuto per digestione delle proteine deuterate, in condizioni di arresto della reazione di scambio. Le uniche differenze evidenziate riguardano la flessibilità della regione N-Terminale: le proprietà chimico fisiche dell'estremità ammino-terminale della proteina sono così influenzate dalla presenza del residuo di fenilalanina in posizione 7 al punto che nell'analisi del profilo di scambio locale il frammento 7-11 non è stato rivelato né per W7F, né per W7FW14F, probabilmente perché la sostituzione, incrementando l'idrofobicità del peptide, è causa della sua tendenza all'aggregazione.

Per quanto riguarda la sostituzione in posizione 14, la flessibilità locale del microambiente circostante risente della mutazione, in quanto si osserva una maggiore tendenza allo scambio per i mutanti W14F e W7FW14 nella regione 12-29.

Il ruolo dell'elica E nelle prime fasi del ripiegamento della Mb è stato spesso oggetto di discussione (Nishimura et al., 2002, 2005), dovuta alle forti evidenze che un'eterogeneità strutturale negli intermedi del *fold*ing può essere associata a variabilità strutturale dell'elica E. È stata già discussa una reciproca influenza delle mutazioni nell'elica A sull'elica E e viceversa (Nishimura et al., 2006) a riprova del fatto che un punto cruciale del processo sia l'"ancoraggio" delle eliche A ed E.

I dati di scambio H/D sulla regione che contiene i residui corrispondenti all'elica E nella proteina nativa non rivelano alcuna differenza tra il doppio mutante e la proteina WT, suggerendo che in W7FW14F l'elica E sia strutturata analogamente alla proteina WT e indicando che il suo ripiegamento avvenga in modo indipendente dall'elica A.

Inoltre è possibile che la protezione, in W7FW14F, del residuo Leu69, la cui catena laterale si trova all'interfaccia tra le eliche A, B, E e G e media l'impaccamento dell'elica E sul *core* A(B)GH (Nishimura et al., 2006), derivi da un differente ancoraggio dell'elica E sul *core* idrofobico, in conseguenza della destabilizzazione dell'elica A dovuta alla presenza delle mutazioni. Perturbazioni nell'ancoraggio dell'elica A ed E sono già state osservate per altre mutazioni dell'elica A, in corrispondenza dei residui V10 e V17 (Nishimura et al., 2006), sebbene con effetti meno drammatici rispetto a W7FW14F, probabilmente perché queste posizioni sono collocate verso le estremità dell'elica A, non così centrali come W7 e W14, quest'ultima direttamente all'interfaccia con l'elica E.

In conclusione possiamo affermare che l'intermedio del *fold*ing del doppio mutante ha una conformazione diversa rispetto a quello della proteina wild type. La maggiore flessibilità che acquista la porzione N-terminale per la presenza delle mutazioni probabilmente previene lo stabilirsi delle interazioni che stabilizzano la struttura nativa, promuovendone delle altre, che portano ad un processo di ripiegamento alternativo, che culmina nella formazione delle placche amiloidi.

3. ANALISI STRUTTURALE DI COMPLESSI PROTEICI

3.1 Caratterizzazione strutturale della proteina IF₁ e del complesso IF₁-Calmodulina

IF₁ è una proteina mitocondriale basica, che svolge la funzione di inibitore dell'ATP sintetasi della membrana mitocondriale. La regolazione della attività dell'ATP sintetasi mitocondriale avviene a livello della fosforilazione ossidativa, durante la quale l'energia prodotta dalla pompa protonica transmembrana dà la spinta per la sintesi di ATP. In carenza di O₂, il gradiente elettrochimico attraverso la membrana interna mitocondriale collassa, inducendo l'attività dell'enzima verso l'idrolisi di ATP. La riduzione di pH attiva IF₁, che, legando il dominio F₁ dell'ATPase, inibisce l'idrolisi di ATP, preservando le riserve energetiche della cellula.

Come indicato dalla struttura cristallografica, IF₁ bovina è costituita da un monomero di 84 residui che si organizzano in un'unica, lunga, α -elica (Cabezon et al., 2001). In soluzione due molecole di IF₁ dimerizzano formando una struttura ad α -elica antiparallela *coiled coil* che coinvolge l'estremità C-terminale. La regione N-terminale diventa quindi disponibile per il legame di FoF₁ o di altri interattori.

Il dimerico è la forma predominante a pH acido, mentre a pH 6.5 è in equilibrio con una forma tetrameric, che diviene la più rappresentata a pH basico (Cabezon et al., 2000).

La calmodulina (CaM) è una proteina ubiquitaria, in grado di legare Ca²⁺, la cui struttura è caratterizzata da due domini globulari, ciascuno contenente due motivi elica-loop-elica (ogni motivo può legare due ioni Ca²⁺), uniti da una lunga α -elica, che sembra essere flessibile e destrutturata in soluzione (Persechini et al., 1988; Barbatto et al., 1992). CaM interagisce con un gran numero di proteine strutturalmente e funzionalmente non correlate, tra cui enzimi del metabolismo, proteine strutturali, fattori di trascrizione e pompe ioniche, modulando, inoltre, un ampio spettro di processi cellulari in risposta al calcio (Yamniuk A.P. et al., 2004). Le proteine bersaglio di CaM non condividono omologia di sequenza, ma presentano caratteristiche strutturali peculiari: esse hanno la capacità di *foldare* in un' α -elica anfifilica basica (O'Neil K.T. et al., 1990); inoltre, nella loro sequenza sono presenti residui idrofobici in posizioni conservate e che sporgono dalla stessa faccia dell' α -elica. La caratterizzazione dei complessi tra CaM-Ca²⁺ e peptidi sintetici indica che il peptide induce una profonda transizione conformazionale generando una struttura compatta, nella quale i due lobi di CaM si ritrovano spazialmente vicini, mentre il peptide viene generalmente alloggiato in un canale idrofobico (Ikura et al., 1992). Un *cluster* di residui basici nella sequenza dei peptidi che legano CaM può interagire con i numerosi residui carichi negativamente di CaM (Osawa et al., 1999).

Tuttavia questa modalità di legame non è l'unica: negli ultimi anni, infatti, stanno venendo alla luce evidenze di conformazioni di legame alternative che CaM può assumere in presenza di alcuni peptidi *target*. Sono state riportate in letteratura nuove strutture di complessi in cui CaM non raggiunge una conformazione globulare e in alcuni casi lega un numero inferiore di ioni Ca²⁺ (Vetter S. W. and Leclerc E., 2003). Ad esempio, il legame di CaM al peptide N-terminale della pompa del Ca²⁺ della membrana plasmatica non induce transizione di CaM nella classica conformazione collapsata e coinvolge solo il lobo posto all'estremità C-terminale come conseguenza della mancanza di siti idrofobici di ancoraggio rispetto alla comuni sequenze dei peptidi *target* (Elshorst et al., 1999).

Secondo quanto è stato riportato anni fa dai gruppi di Pedersen e Carafoli (Pedersen et al., 1984; Schwerzmann et al., 1985), e più recentemente dal gruppo della Prof.ssa Mavelli di Udine (Contessi et al., 2005), l'inibitore naturale dell' FoF₁ ATP sintetasi, IF₁, è un possibile *target* di CaM. Analisi mediante spettroscopia di fluorescenza hanno dimostrato che IF₁ interagisce con CaM in maniera dipendente da Ca²⁺, secondo una stechiometria 1:1, su un'ampia scala di pH.

Studi recenti suggeriscono che IF₁, insieme a molte subunità del complesso FoF₁, sia localizzata non solo all'interno del mitocondrio, ma anche sulla superficie delle cellule endoteliali (Burwick et al., 2005) e cellule di epatocarcinoma HepG2 (Contessi *et al.*, in stampa), dove regola l'attività catalitica del complesso enzimatico FoF₁ ATP sintetasi ectoplasmatico. Inoltre, in cellule di epatocarcinoma HepG2, è stato visto che IF₁ colocalizza con Ca²⁺-CaM sulla membrana plasmatica suggerendo che il complesso IF₁-Ca²⁺-CaM possa formarsi sulla superficie cellulare, sequestrando IF₁ e modulando l'attività del complesso enzimatico FoF₁ ATP sintetasi. Considerando che IF₁ è codificato da un gene nucleare (Walker et al., 1987), queste osservazioni suggeriscono che IF₁ sia presente sia nel mitocondrio che sulla superficie cellulare, almeno in alcuni tipi cellulari.

Acquisire informazioni strutturali sul complesso IF₁-Ca²⁺-CaM, correlandole a quelle di IF₁, che allo stesso tempo, sotto forma di dimerico deve esplicare il ruolo di inibitore della sintesi di ATP, potrebbe fornire delucidazioni sul ruolo funzionale alla base dell'interazione tra IF₁ e CaM.

Lo scopo di quest'ultima parte del progetto di tesi è stato, pertanto, quello di analizzare la stechiometria e la topologia del complesso IF₁-Ca²⁺-CaM, focalizzandosi sulle condizioni sperimentali in cui prevale la forma dimerica di IF₁, cioè a pH5.

La stechiometria del complesso è stata determinata mediante cromatografia ad esclusione molecolare e analisi di spettrometria di massa con metodi a ionizzazione *soft*, tali da preservare la dissociazione di complessi non covalenti. Una dettagliata caratterizzazione delle regioni di interazione è stata poi ottenuta mediante esperimenti di *crosslinking* chimico seguiti da digestione enzimatica ed identificazione, mediante spettrometria di massa, dei residui amminoacidici di IF₁ e CaM collegati chimicamente.

Allo scopo di ottenere una più completa descrizione dei componenti del complesso, è stata inoltre effettuata un'analisi dettagliata, attraverso esperimenti di proteolisi limitata, *crosslinking* chimico e analisi ESMS in condizioni non denaturanti, della struttura dimerica che IF₁ assume a pH 5.0, condizione in cui è stato svolto l'intero lavoro di caratterizzazione.

3.1.1 Materiali e Metodi

I campioni liofilizzati di IF₁ bovina in forma ricombinante sono stati forniti dal Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Udine. La proteina calmodulina bovina ricombinante è stata acquistata presso la Sigma Aldrich, così come il reagente crosslinker EDAC (1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide).

Tutti i reattivi, i solventi e gli enzimi impiegati sono quelli già descritti nel paragrafo 2.3.1.

Gli esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare sono stati condotti su 50 μ L di campione 20 μ M in 50mM ammonio acetato, 150mM NaCl, 100 μ M CaCl₂, pH 5.0. La miscela proteica, dopo 30 minuti di incubazione a 37°C, è stata caricata su una colonna Superdex 75 pc 3,2/30 volume 2,4 ml, equilibrata nello stesso tampone, installata su un apparecchio SMART-System fornito dalla Pharmacia Biotech. L'eluizione è stata effettuata in modo isocratico ad una velocità di flusso pari a 75 μ L/min.

L'analisi dei complessi non covalenti in fase gassosa è stata effettuata utilizzando uno spettrometro di massa ibrido Q-TOF, equipaggiato con una sorgente nano *Z-spray* (Waters, Manchester, UK). La miscela proteica, 10 μ M in 10mM ammonio acetato, 100 μ M CaCl₂, pH 5.0, è stata iniettata all'interno della sorgente attraverso un capillare in silice ad una velocità di flusso pari a 1 μ L/min. I potenziali, il flusso e la temperatura dei gas sono stati opportunamente selezionati in modo da sfavorire la dissociazione dei complessi. Gli spettri di massa sono stati acquisiti ad una velocità di 1 secondo per scansione (1 sec/scan) in un intervallo di m/z compreso tra 1000 e 5000. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il programma di gestione Masslynx fornito dalla casa produttrice. Lo spettrometro di massa è stato calibrato utilizzando come standard la distribuzione a ioni multicarica del tripsinogeno da pancreas bovino.

Gli esperimenti di proteolisi limitata su (IF₁)₂ sono stati condotti incubando la proteina con una serie di proteasi con alta specificità di substrato, come tripsina e Glu-C, oltre che meno specifiche come chimotripsina. I rapporti enzima/substrato utilizzati sono compresi tra 1/400 e 1/1000 (w/w). Le reazioni sono state condotte in tampone 10mM ammonio acetato, 100 μ M CaCl₂, pH 5.0, a 37°C, utilizzando una concentrazione proteica pari a 10 μ M. Il procedere dell'idrolisi è stato seguito attraverso prelievi, a tempi prestabiliti, di 1 μ L dalla miscela peptidica che è stato istantaneamente miscelato in 4 μ L di

matrice acido 3,5-Dimetossi-4-idrossicinnamico (acido sinapico) 5mg/ml (70% ACN, 30% TFA 0,2%); 2 μ l di tale soluzione sono stati, infine, caricati sulla piastra portacampioni in acciaio. Gli spettri sono stati acquisiti con uno spettrometro di massa Voyager DE della Applied Biosystem con sorgente a ionizzazione laser, equipaggiato con analizzatore a tempo di volo (TOF). L'intervallo di massa analizzato è stato calibrato utilizzando come standards interni la specie monoprotonata di IF₁, con segnale ad m/z 9582.5 Da, e la sua mezza massa ad m/z 4791.75 Da.

Per la reazione di *crosslinking* chimico del dimerico (IF₁)₂, 3 aliquote da 0.5nmol di proteina sono state incubate ad una concentrazione pari a 20 μ M in 50mM MES, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, pH 5.0 a 37°C per 15 minuti e successivamente trattate con un eccesso rispettivamente di 10, 100 e 500 volte (mol/mol) di EDAC (1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide) per 30 minuti. La reazione è stata bloccata per aggiunta di tampone denaturante (50mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glicerolo, 0.1% blue di bromofenolo, 0.1M DTT). Ciascun campione è stato incubato a 100°C per 5 minuti e caricato su un gel al 15% di poliacrilammide. Oltre ai campioni suddetti è stata caricata una quantità equivalente di proteina non trattata, come controllo. A seguito della migrazione, il gel è stato colorato in Coomassie colloidale; le bande proteiche di interesse sono state escisse dal gel, ridotte e carbossiammidometilate con 10mM DTT e 55mM iodoacetammide in tampone 50mM ammonio bicarbonato, pH 8.0 e, dopo opportuni lavaggi, sottoposte ad idrolisi *in situ* con tripsina. La miscela peptidica derivante è stata direttamente analizzata mediante spettrometria di massa MALDI, utilizzando uno spettrometro di massa Voyager DE PRO della Applied Biosystem con sorgente a ionizzazione laser, equipaggiato con analizzatore a tempo di volo (TOF) in modalità *reflectron*.

Lo studio delle regioni di interazione del complesso IF₁-CaM per mezzo della strategia del *crosslinking* chimico è stato effettuato secondo una metodologia differente: 15 nmol di entrambe le proteine sono state incubate in 400 μ L di 50mM MES, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, pH 5.0 a 37°C per 15 minuti e successivamente trattate con un eccesso di 10 volte di EDAC (mol/mol) per 30 minuti. La reazione è stata bloccata mediante acidificazione della miscela con 1% TFA. Una piccola aliquota del prodotto di reazione è stata caricata su un gel analitico al 15% di acrilammide. La restante parte del campione è stato ulteriormente processato: la proteina *crosslinkata* è stata purificata attraverso HPLC a fase inversa utilizzando una colonna Phenomenex Jupiter C₄ (250 x 4.6 mm, 300 Å diametro dei pori) seguendo un gradiente lineare dal 5 al 65% di acetonitrile in 0.1% TFA in 40 minuti, ad una velocità di flusso di 1mL/min.

L'eluizione è stata monitorata a seguendo l'assorbimento a 220nm e le frazioni raccolte manualmente ed analizzate mediante spettrometria di massa *electrospray* utilizzando uno spettrometro di massa Quattro Micro a triplo quadrupolo (Waters).

La frazione proteica contenente le due proteine legate covalentemente è stata digerita chimicamente con CNBr in 70% TFA *overnight*, a temperatura ambiente, in atmosfera inerte, al buio, utilizzando un largo eccesso di reagente rispetto alla proteina. Il campione è stato poi diluito 10 volte in acqua e portato a secco in un concentratore Speed Vac (Savant). La miscela è stata quindi frazionata mediante HPLC a fase inversa sulla stessa colonna Phenomenex Jupiter C₄ (250 x 4.6 mm, 300 Å diametro dei pori) e le singole frazioni analizzate mediante ESMS.

Le frazioni contenenti la proteina IF₁ intatta legata a peptidi di CaM sono state digerite con tripsina in 50mM ammonio bicarbonato, pH 8.0 a 37°C (E/S, 1/50 (w/w)) *overnight* e direttamente analizzate mediante MALDIMS. 1 µL di ciascun campione è stato caricato sulla piastra portacampioni con un'uguale volume della soluzione contenente la matrice (acido α-ciano-4-idrossicinnamico 10 mg/ml di in una soluzione acetonitrile/50mM acido citrico, 7/3 v/v). Gli spettri sono stati acquisiti utilizzando uno spettrometro di massa Voyager DE PRO della Applied Biosystem. L'intervallo di massa analizzato è stato calibrato utilizzando una miscela di peptidi, forniti dalla casa produttrice, aventi m/z nella regione di interesse.

Le analisi LCMSMS sono state condotte su uno spettrometro di massa ibrido Q-TOF equipaggiato con una sorgente Z-*spray*, accoppiato ad un sistema di cromatografia liquida capillare CapLC (Waters, Manchester, UK). Dopo la fase di caricamento, 4 µL di miscela peptidica sono stati concentrati e desalificati su una precolonna a fase inversa; successivamente i peptidi sono stati frazionati su una colonna capillare a fase inversa C₁₈ (Nanoseparations) ad una velocità di flusso di 250 nL/min, utilizzando un gradiente lineare di eluente B (0.2% acido formico in 95% acetonitrile) in eluente A (0.2% acido formico in 5% acetonitrile), dal 7% al 50% in 40 minuti. Lo spettrometro di massa è stato impostato secondo la modalità MSMS *data-dependent*, in cui uno spettro di massa (con un intervallo di acquisizione compreso tra 400 e 1600 m/z) è seguito dagli spettri di MSMS (con un intervallo di acquisizione compreso tra 100 e 2000 m/z) dei tre ioni più intensi registrati nella fase precedente.

3.1.2 RISULTATI DELLA CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DI IF₁

3.1.2a Analisi dello stato oligomerico di IF₁ mediante ESMS in condizioni native.

L'esistenza del dimero a pH 5.0 è stata verificata attraverso l'analisi diretta della soluzione proteica mediante spettrometria di massa *electrospray* utilizzando uno spettrometro ibrido in condizioni di ionizzazione e potenziali tali da non dissociare complessi non covalenti.

La Figura 39 raffigura lo spettro ESMS degli ioni multicarica di IF₁ in cui si evidenzia la distribuzione dei segnali a valori m/z da z= +9 a z= +6 corrispondenti alla forma dimerica

di IF₁. Il peso molecolare misurato è 19166.28 ± 0.3 in eccellente accordo con il valore atteso ((IF₁)₂ = 19163 Da).

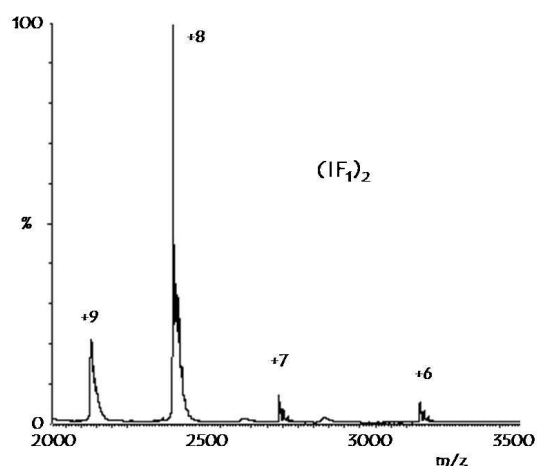


Figura 39 Analisi ESMS di (IF₁)₂ a pH 5.0

3.1.2b Caratterizzazione strutturale di (IF₁)₂ mediante strategie di proteolisi limitata

Per studiare la topologia superficiale di (IF₁)₂ sono stati effettuati esperimenti di proteolisi limitata. Poiché le porzioni proteiche coinvolte in regioni altamente strutturate o all'interfaccia tra più subunità sono protette all'azione delle proteasi, questi esperimenti sono in grado di delineare un profilo dei siti preferenziali di idrolisi della forma dimerica di IF₁. Il progredire della reazione è stato monitorato attraverso prelievi molto ravvicinati di aliquote della miscela di idrolisi, direttamente analizzate mediante spettrometria di massa MALDI, in modalità lineare.

➤ Idrolisi con tripsina

L'idrolisi con l'endoproteasi tripsina è stata condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato pari a 1/500 (w/w). Numerosi sono stati i siti di idrolisi preferenziali identificati, come è possibile osservare in Figura 40, in cui è mostrato lo spettro relativo al prelievo effettuato dopo 60 minuti dall'inizio della reazione di idrolisi; l'attribuzione dei siti di idrolisi preferenziali è stata effettuata in base alla misura accurata della massa di peptidi complementari. In Tabella V sono riassunti i risultati.

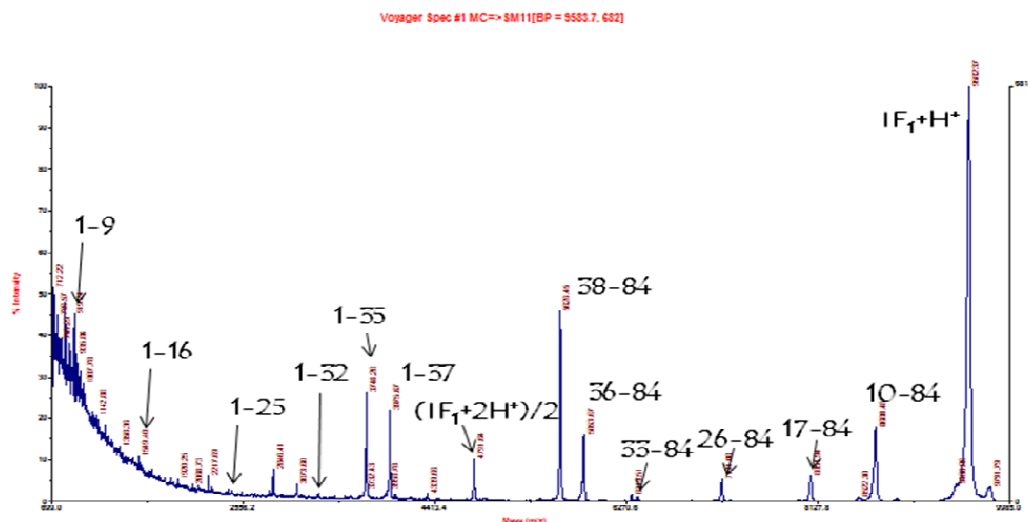


Figura 40 Spettro MALDI-MS relativo a 60min dell'idrolisi condotta con tripsina

PEPTIDE IDENTIFICATO	VALORE DI MASSA MISURATO [MH ⁺] (Da)	VALORE DI MASSA TEORICO [MH ⁺] (Da)
1-31	3125.69	3125.19
32-84	6476.55	6476.28
1-9	919.70	920.90
1-16	1548.81	1549.59
1-25	2409.17	2409.52
1-32	3281.35	3281.38
1-35	3748.26	3747.92
1-37	3975.7	3975.19
38-84	5626.54	5626.29
36-84	5853.75	5853.56
33-84	6319.74	6320.10
26-84	7191.11	7191.95
17-84	8051.82	8051.89
10-84	8680.66	8680.58

Tabella V Risultati ottenuti dalla proteolisi limitata condotta su (IF₁)₂ con tripsina.

➤ Idrolisi con Glu-C

L'idrolisi con l'endoproteasi Glu-C è stata condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato pari a 1/400 (w/w). In Figura 41 è mostrato lo spettro relativo al prelievo effettuato dopo 20 minuti dall'inizio della reazione di idrolisi. In esso sono riportati i segnali ad m/z 3125.69 e 6476.55, che corrispondono rispettivamente ai peptidi 1-31 e 32-84 e che evidenziano un evento proteolitico in corrispondenza del residuo Glu31.

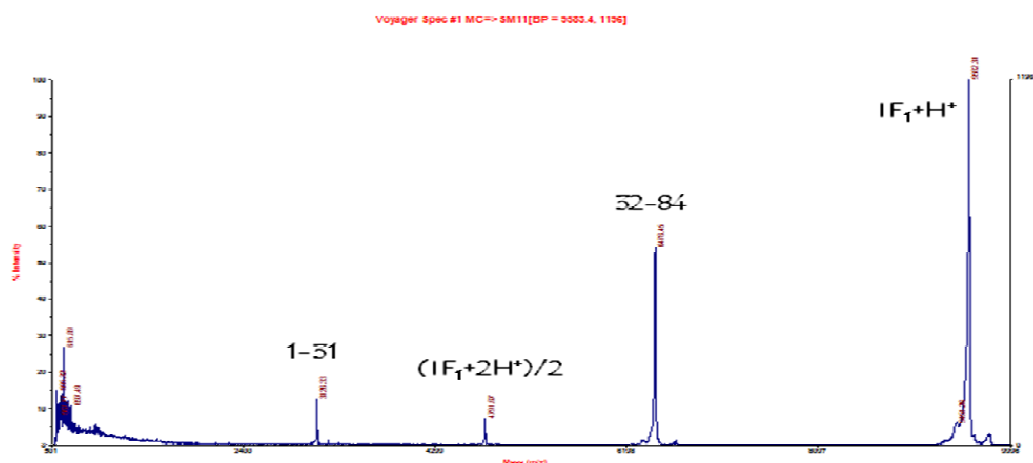


Figura 41 Analisi MALDIMS dei prodotti di idrolisi ottenuti dopo 20 minuti di incubazione con Glu-C

➤ Idrolisi con chimotripsina

L'idrolisi con chimotripsina è stata condotta utilizzando un rapporto enzima/substrato pari a 1/1000 (w/w). In Figura 42 è mostrato lo spettro relativo al prelievo effettuato dopo 30 minuti dall'inizio della reazione di idrolisi; in Tabella VI sono riassunti i risultati.

La combinazione dei risultati ottenuti in ciascun esperimento di proteolisi limitata sembra suggerire che i siti preferenziali di idrolisi si addensino all'estremità N-terminale di IF₁; in particolare la porzione compresa tra Glu31 e Arg37 ha rivelato una estrema aggredibilità all'azione delle proteasi, suggerendo che questi residui siano collocati in una regione della proteina particolarmente flessibile.

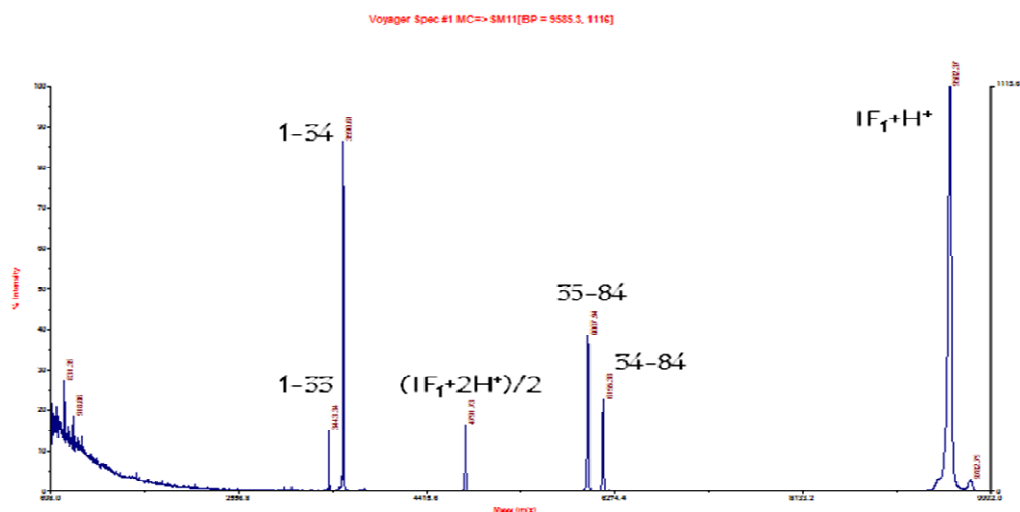


Figura 42 Analisi MALDIMS dei prodotti di idrolisi ottenuti dopo 30 minuti di incubazione con Chimotripsina.

PEPTIDE IDENTIFICATO	VALORE DI MASSA MISURATO [MH ⁺] (Da)	VALORE DI MASSA TEORICO [MH ⁺] (Da)
1-33	3444.10	3444.56
1-34	3591.45	3591.73
35-84	6009.01	6009.75
34-84	6156.44	6156.92

Tabella VI Risultati ottenuti dalla proteolisi limitata condotta su (IF₁)₂ con chimotripsina.

3.1.2c Crosslinking di (IF₁)₂

Le regioni di interazione nel complesso omodimerico di IF₁ sono state ulteriormente analizzate mediante reazione di crosslinking. Il legame covalente tra le due subunità è stato generato per reazione con EDAC (1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide), un reagente eterobifunzionale che forma un legame isopeptidico, a lunghezza zero, tra il gruppo carbossilico della catena laterale di un Glutammico ed il gruppo amminico in ε di un residuo di Lisina, o l'estremità N-terminale libera di una proteina.

(IF₁)₂ è stato incubato per differenti tempi di reazione con varie quantità di EDAC, selezionando accuratamente le condizioni finali allo scopo di evitare la formazione forzata di complessi oligomerici. La miscela di reazione è stata separata su elettroforesi monodimensionale in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) ed il gel è stato colorato con

Coomassie colloidale. In Figura 43 è mostrato il gel ottenuto per incubazione di IF₁ con un eccesso di 10, 100 e 500 volte (mol/mol) di agente *crosslinker*, per 30 minuti a 37°C.

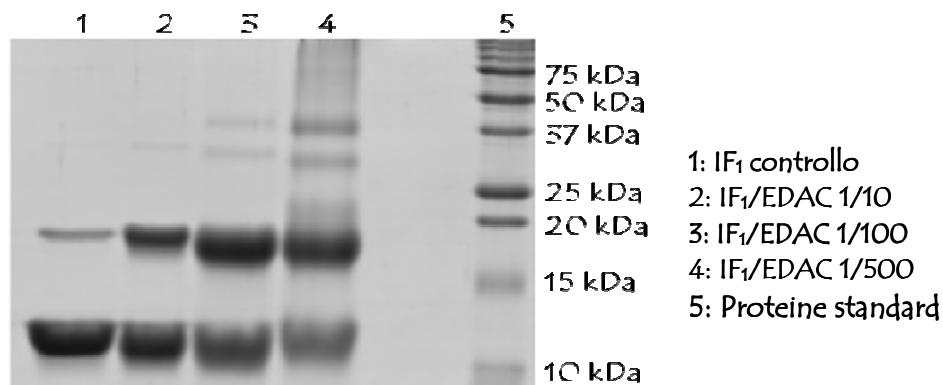


Figura 43 Gel elettroforesi dei campioni ottenuti da reazione di IF₁ con EDAC.

In tutte le corsie del gel si vede chiaramente una banda proteica ad un peso molecolare apparente di circa 19kDa, riconducibile al dimerico covalente (IF₁)₂. Le successive analisi sono state condotte sulla banda ottenuta per incubazione con un eccesso di 10 volte di EDAC, condizione soddisfacente per l'ottenimento della specie covalentemente legata, e tuttavia sufficientemente controllata da evitare bande a pesi molecolari superiori, indici di oligomerizzazione indotta da eccesso di reattivo.

La banda a 19 kDa è stata escissa dal gel, digerita enzimaticamente *in situ* con tripsina, e sottoposta ad analisi diretta mediante spettrometria di massa MALDI. Nello spettro sono stati riscontrati segnali, a valori di *m/z* pari a 2030.08, 2257.21 e 3349.70, non riconducibili a peptidi triptici derivanti da IF₁ monomero, ma interpretabili come frammenti delle due unità monomeriche di IF₁, legati tra loro in modo covalente. In Tabella VII sono riportati i valori di massa misurati e le corrispondenti attribuzioni.

VALORE DI MASSA MISURATO [MH ⁺] (Da)	VALORE DI MASSA TEORICO [MH ⁺] (Da)	INTERPRETAZIONE
2030.08	2030.08	38-47+77-84
2257.21	2257.22	36-47+77-84
3349.70	3349.69	38-58+77-84

Tabella VII Interpretazione dei risultati ottenuti dal *crosslinking* condotto su (IF₁)₂

3.1.3 RISULTATI DELLA CARATTERIZZAZIONE DEL COMPLESSO IF₁-CaM

3.1.3a Analisi della stechiometria del complesso IF₁-CaM mediante cromatografia ad esclusione molecolare ed ESMS.

La stechiometria del complesso IF₁-CaM è stata studiata sia mediante cromatografia ad esclusione molecolare, che attraverso analisi di spettrometria di massa *electrospray* in condizioni native. Come si può osservare in Figura 44, il cromatogramma ottenuto dalla gel filtrazione, mostra un unico picco, ad un volume di eluizione che corrisponde ad un peso molecolare apparente di circa 26kDa. Questo dato suggerisce la formazione di un complesso 1:1; più precisamente il peso molecolare estrapolato è riconducibile ad un complesso contenente una molecola di CaM, legata ad una unità monomericà di IF₁.

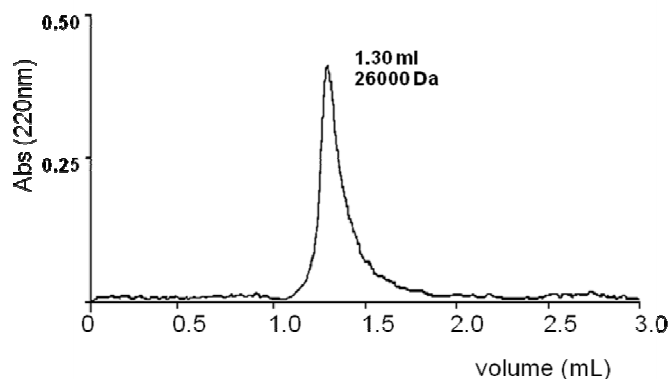


Figura 44 Cromatografia ad esclusione molecolare del complesso IF₁-CaM a pH 5.0

L'analisi diretta di una miscela equimolecolare delle due proteine mediante spettrometria di massa *electrospray* in condizioni non denaturanti, ha fornito dati accurati sulla composizione del complesso. In Figura 45 è mostrato lo spettro degli ioni multicarica generati dal complesso: nell'intervallo analizzato è visibile la distribuzione dei segnali con m/z da $z = +12$ a $z = +8$ degli ioni prodotti dal complesso IF₁-CaM contenente 4 ioni Ca^{2+} . La massa molecolare misurata per questa specie è 26527.3 ± 0.7 , in eccellente accordo con il valore atteso per una molecola di IF₁ legata ad una molecola di CaM, complessata a 4 ioni Ca^{2+} (valore teorico = 26528.0 Da). Questo risultato indica chiaramente una stechiometria 1:1 per il complesso.

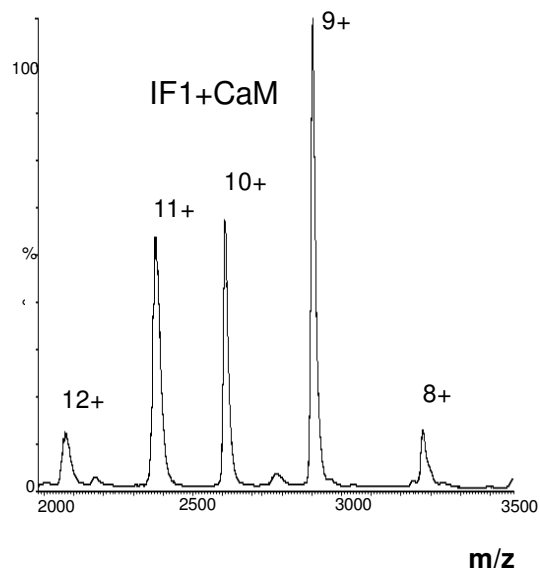


Figura 45 Analisi ESMS del complesso IF₁-CaM a pH 5.0.

3.1.3b Crosslinking del complesso IF₁-CaM

Le regioni di interazione del complesso IF₁-CaM sono state investigate mediante reazioni di crosslinking, utilizzando il reattivo EDAC, analogamente al caso descritto in precedenza. Una miscela equimolecolare delle due proteine è stata incubata per 30 minuti a 37°C con un eccesso di 10 volte (mol/mol) di EDAC; separatamente ciascuna delle due proteine è stata incubata con lo stesso rapporto di *crosslinker* come controllo.

Le miscele di reazione sono state frazionate mediante SDS-PAGE ed il gel sottoposto a colorazione con Coomassie colloidale. Come si osserva dall'immagine del gel (Figura 46), esclusivamente nella corsia in cui è stata caricata la miscela delle due proteine dopo incubazione con EDAC è ben visibile una banda proteica ad un peso molecolare apparente di circa 26kDa. L'identità della specie contenuta in tale banda è stata definitivamente chiarificata mediante idrolisi della stessa e analisi MALDIMS. I segnali ottenuti sono stati attribuiti alle sequenze di entrambe le proteine; ciò ha dimostrato che nella banda fosse contenuto il complesso covalente tra IF₁ e CaM, confermandone la stechiometria 1:1.

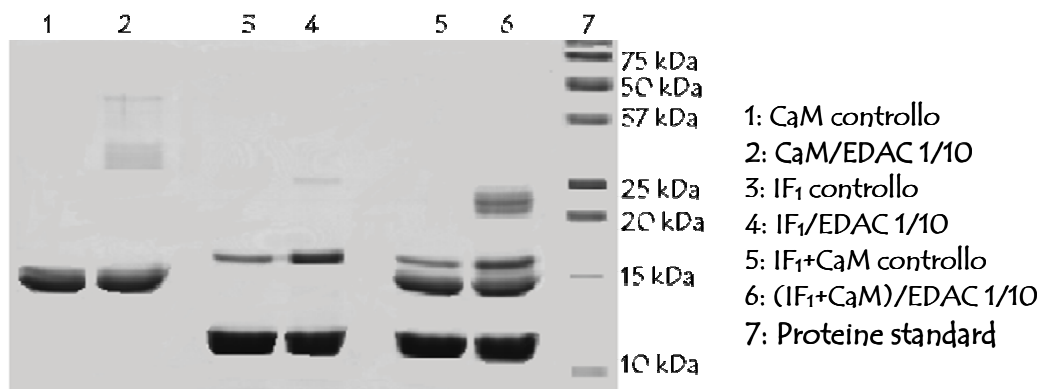


Figura 46 Gel elettroforesi analitica dei campioni ottenuti da reazione di IF₁/CaM con EDAC.

Un'analisi più dettagliata del complesso è stata effettuata a seguito di un esperimento preparativo di crosslinking. La stessa procedura è stata quindi condotta su quantitativi maggiori di proteine ed il prodotto della reazione di crosslinking è stato poi separato mediante cromatografia liquida a fase inversa. Il complesso IF₁-CaM è stato osservato in due frazioni contigue, che da analisi ESMS sono risultate di peso molecolare pari a 26353.5 ± 1.0 Da e 26336.1 ± 1.6 Da rispettivamente. Questi valori di massa corrispondono alla somma dei pesi delle due proteine meno 18.01 e 36.02 Da, indicando la presenza di un complesso 1:1 contenente rispettivamente uno e due legami isopeptidici. L'identificazione dei residui direttamente legati è stata possibile mediante la strategia indicata in Figura 47: la logica della procedura seguita sta nell'osservazione che IF₁, a differenza di CaM, è priva di residui di Metionina. L'idrolisi chimica con CNBr del complesso legato covalentemente ha quindi generato specie molecolari contenenti intatta IF₁ ed i peptidi di CaM ad essa legati. La miscela di idrolisi è stata poi separata mediante HPLC a fase inversa e le singole frazioni raccolte sono state analizzate mediante ESMS. In Tabella VIII sono riportati i risultati.

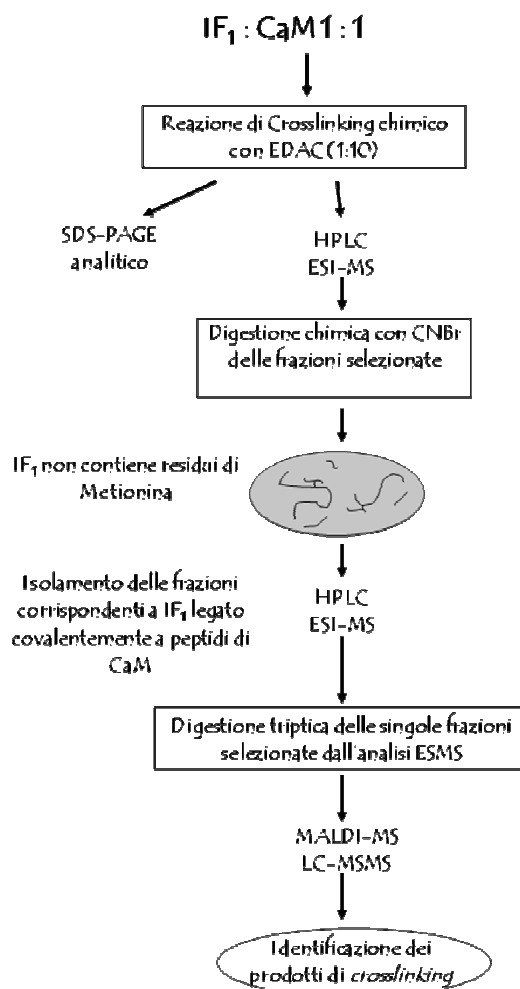


Figura 47 Strategia impiegata per l'identificazione delle regioni di contatto nel complesso IF₁-CaM

VALORE DI MASSA MISURATO [M] (Da)	VALORE DI MASSA TEORICO [M] (Da)	INTERPRETAZIONE
11280.16 ± 0.54	11280.34	IF ₁ +110-124 CaM
13560.30 ± 0.63	13560.81	IF ₁ +110-144 CaM
15063.04 ± 0.86	15061.49	IF ₁ +77-124 CaM

Tabella VIII Analisi delle frazioni da HPLC contenenti IF₁ legato a peptidi di CaM.

Questi risultati preliminari suggeriscono che IF₁ leghi essenzialmente la regione C-terminale di CaM.

I residui direttamente coinvolti nel legame isopeptidico sono stati individuati mediante digestione enzimatica della frazione contenente la specie avente peso molecolare pari a 11280.16 Da, essendo questa la specie più rappresentata, e sottoponendo poi la miscela derivante ad analisi nano-LCMSMS. L'isolamento selettivo e la frammentazione degli ioni di interesse ha consentito di individuare su IF₁ e CaM i residui direttamente coinvolti nella formazione del legame covalente mediato dall'EDAC (Tabella IX). A titolo d'esempio in Figura 48 è riportato lo spettro di frammentazione relativo al peptide avente MH⁺ pari a 2636.10.

VALORE DI MASSA MISURATO [MH ⁺] (Da)	VALORE DI MASSA TEORICO [MH ⁺] (Da)	PEPTIDI IDENTIFICATI	RESIDUI COINVOLTI NEL LEGAME COVALENTE
2636.10	2636.16	1-9 IF ₁ +110-124 CaM	N-Term IF ₁ /Glu123 CaM
2594.15	2594.20	17-25 IF ₁ +110-124 CaM	Lys24 IF ₁ /Glu123 CaM
3465.45	3465.57	17-32 IF ₁ +110-124 CaM	Lys24 IF ₁ /Glu123 CaM

Tabella IX Risultati dell'analisi degli spettri di frammentazione dei peptidi *crosslinkati*.

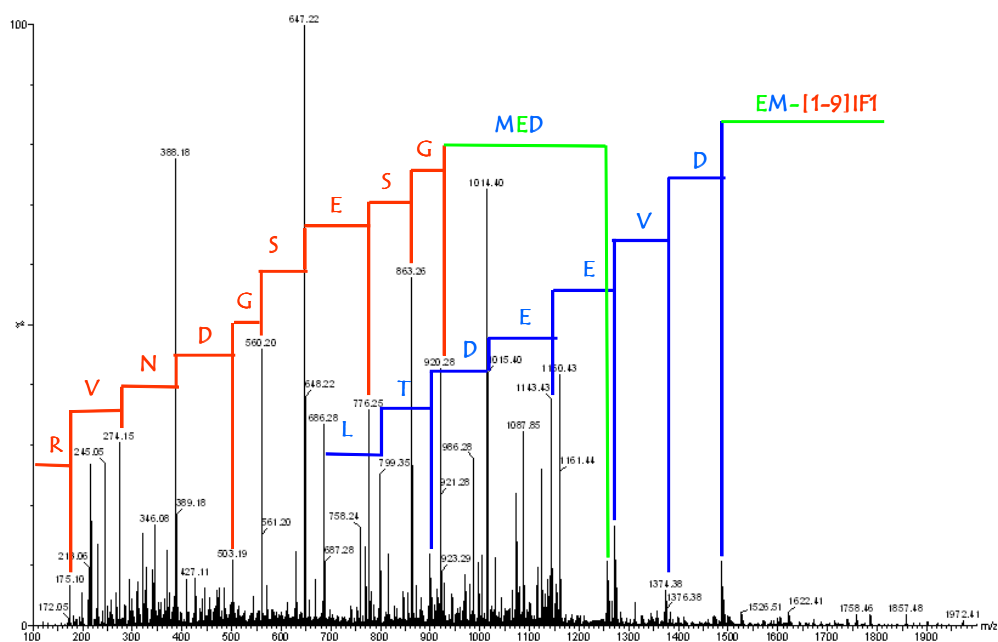


Figura 48 Spettro di frammentazione del peptide avente MH⁺ pari a 2636.10. In rosso è mostrata l'attribuzione dei segnali relativi al peptide 1-9, in bleu quella di parte del peptide 110-124 di CaM ed in verde i segnali che giustificano il residuo Glu123 quale punto di contatto tra le due sequenze.

Dal ΔM calcolato tra i segnali presenti nello spettro, si risale alla sequenza del peptide che è stato frammentato; l'interpretazione dello spettro mostrato in Figura 48 consente di confermare che il peptide 1-9 di IF1 è legato covalentemente al peptide 110-124 di CaM. Dall'interpretazione dello spettro di frammentazione è evidente il coinvolgimento di Glu123 di CaM nel legame con il peptide 1-9 di IF1. Tale peptide, non presenta residui di Lys, ma è legato alla sequenza di CaM mediante la sua estremità ammino-terminale.

3.1.4 DISCUSSIONE

Un passaggio critico verso la comprensione delle interazioni proteina-proteina consiste nella descrizione strutturale delle regioni di contatto all'interno del complesso. Questi studi sono generalmente effettuati mediante diffrazione ai raggi X e/o NMR, che forniscono dati ad alta risoluzione. Tuttavia, le difficoltà nella cristallizzazione del complesso, i limiti di solubilità delle macromolecole nei solventi acquosi, la necessità di elevati quantitativi di campione, possono risultare di ostacolo per un'indagine di successo.

Negli ultimi anni numerose strategie che sfruttano la spettrometria di massa come metodo analitico hanno fornito un valido approccio alternativo nell'analisi di sistemi proteici supramolecolari.

In particolare, la modalità di ionizzazione ad *electrospray* si è recentemente imposta nel campo della biologia strutturale per le sue enormi potenzialità: essendo, infatti, una tecnica di ionizzazione estremamente blanda, offre il grande vantaggio di preservare all'interno dello spettrometro le interazioni nei complessi non covalenti. La forza della tecnica ES deriva dal fatto che gli ioni sono prodotti direttamente da una soluzione. Il risultato è una serie di ioni multicaricati, che generano una distribuzione di segnali per ciascun componente presente nel campione. La formazione di specie altamente caricate consente l'individuazione di complessi, anche di grandi dimensioni, a rapporti m/z relativamente bassi.

Il *crosslinking* chimico in combinazione con l'analisi per spettrometria di massa può essere utilizzato con successo non solo per avere informazioni a bassa risoluzione sulla struttura tridimensionale delle proteine, ma si è anche dimostrato uno strumento utile per la determinazione dell'interfaccia molecolare di complessi proteici. Questa metodologia, ben conosciuta in chimica delle proteine, ha infatti trovato rinnovato vigore da quando l'analisi dei prodotti di reazione è condotta mediante digestione enzimatica e identificazione con spettrometria di massa dei peptidi "crosslinked". La spettrometria di massa, grazie alla sua elevata sensibilità, e vasta applicabilità, è infatti il metodo di analisi di elezione in questo tipo di esperimenti consentendo l'analisi di miscele anche molto complesse derivanti dalla digestione enzimatica del prodotto di reazione del *crosslink*. Lo sviluppo della spettrometria di massa tandem ha inoltre

consentito una più accurata identificazione dei peptidi e la determinazione non solo della regione, ma anche dei residui amminoacidici direttamente coinvolti nel *crosslink*.

Queste metodologie sono state applicate alla caratterizzazione della struttura oligomerica di IF₁ bovina, una proteina composta da 84 residui amminoacidici, che inibisce l'idrolisi di ATP formando un complesso 1:1 con l'ATP sintetasi.

In vitro, la forma attiva di IF₁ è quella dimerica, stabile a pH inferiore a 6.5, in cui le due unità sono associate mediante α -eliche coiled-coil antiparallele che si generano tra le estremità C-terminali dei monomeri (Cabezon et al., 2001; Gordon-Smith DJ et al., 2001). Questo arrangiamento posiziona la minima sequenza inibitrice 14-47 (Van Raaij MJ et al., 1996) in opposizione, consentendo al dimerico di legare due unità di F₁ contemporaneamente. Ogni monomero è organizzato in una singola α -elica anfifilica cationica, della lunghezza di circa 95 Å.

Gli esperimenti effettuati su IF₁ hanno permesso di caratterizzare dettagliatamente la struttura prevalente a pH 5.0. Gli spettri *electrospray* in condizioni native mostrano infatti la presenza del dimerico, la cui organizzazione è stata poi definita per mezzo degli esperimenti di proteolisi limitata e *crosslinking* chimico in combinazione con l'analisi per spettrometria di massa.

I risultati della proteolisi limitata, riportati in Figura 49, mostrano infatti che la porzione N-terminale, è estremamente aggredibile alle proteasi, a fronte di un'estremità C-terminale totalmente inaccessibile.

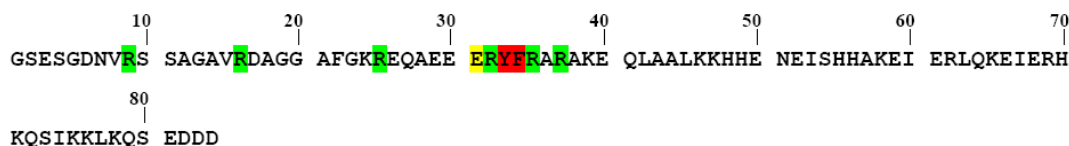


Figura 49 Mappa proteolitica di IF₁ a pH5.

Questi dati si giustificano chiaramente sulla base della struttura coiled-coil che coinvolge l'estremità C-terminale di ciascuno dei due monomeri, e che deve lasciare invece l'N-terminale disponibile per il legame di IF₁ all'ATP sintetasi. In particolare la porzione compresa tra Glu31 e Arg37 ha rivelato una estrema aggredibilità all'azione delle proteasi, suggerendo che questi residui siano collocati in una regione della proteina particolarmente flessibile. È interessante notare che questi residui costituiscono la zona centrale della minima sequenza inibitrice (14-47), che deve essere ovviamente estremamente flessibile per poter svolgere la sua funzione.

Maggiori dettagli strutturali sono stati ottenuti grazie agli esperimenti di *crosslinking* chimico: dalle analisi effettuate sono state individuate le regioni di interazione nel dimerico, che riguardano la porzione centrale della sequenza di IF₁ ed il peptide C-

terminale. Una rappresentazione schematica dei peptidi identificati è mostrata in Figura 50.

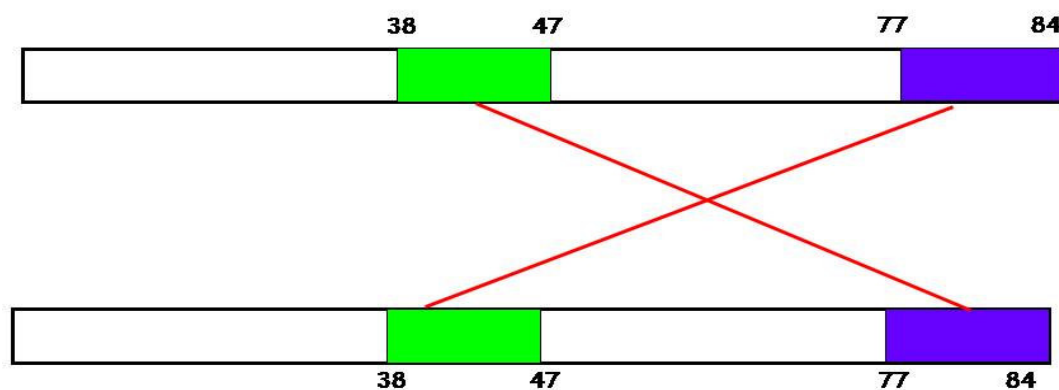


Figura 50 Rappresentazione schematica delle regioni di interazione nella molecola $(IF_1)_2$. Il box verde e quello bleu raffigurano i peptidi legati covalentemente a seguito della reazione di *crosslink*, mentre i segmenti incrociati indicano l'orientamento antiparallelo delle due unità monomeriche di IF_1 .

Analizzando la sequenza dei peptidi che hanno reagito con l'EDAC e considerando la specificità di reazione di questo reattivo unicamente verso i residui di Lys e Glu, sono possibili solo tre ipotesi di legame, riassunte in Figura 51.



Figura 51 Possibili combinazioni nel crosslink condotto sul dimero di IF_1 .

La Calmodulina è riconosciuta come uno dei maggiori sensori di Ca^{2+} e regolatori di processi cellulari. Queste sue molteplici funzioni sono esplicate attraverso l'interazione con svariate proteine cellulari. È caratterizzata da due domini globulari, ciascuno contenente due motivi elica-loop-elica (ogni motivo può legare due ioni Ca^{2+}), uniti da una lunga α -elica, che sembra essere flessibile e destrutturata in soluzione. A seguito dell'interazione con la proteina *target*, CaM risente di una drastica variazione conformazionale, assumendo, generalmente, una struttura globulare ed inserendo il *target* all'interno di un canale idrofobico, ma lasciando la struttura secondaria dei due domini essenzialmente inalterata.

Secondo diversi studi (Pedersen et al., 1984; Schwerzmann et al., 1985; Contessi et al., 2005) IF₁ è un possibile *target* di CaM.

Gli esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare e le analisi di spettrometria di massa *electrospray* in condizioni native confermano la formazione del complesso IF₁-CaM ed indicano chiaramente una stechiometria 1:1.

Lo studio delle regioni di interazione ha richiesto un'indagine accurata condotta mediante esperimenti di *crosslinking* chimico seguito da idrolisi chimiche ed enzimatiche accoppiate ad analisi di spettrometria di massa, che hanno consentito di acquisire gradualmente sempre maggiori dettagli strutturali. Ciò ha consentito non solo di individuare le interfacce interagenti, ma persino di identificare i residui direttamente coinvolti nel *crosslink*.

Dagli esperimenti effettuati risulta che sia Lys24 che il gruppo amminico all'estremità N-terminale di IF₁ hanno reagito chimicamente con il reattivo bifunzionale impiegato nel *crosslink*, legandosi covalentemente entrambi a Glu123 di CaM (Figura 52). Da ciò si deduce che le due posizioni reattive su IF₁ sono disposte spazialmente in stretta prossimità del residuo Glu123 di CaM. L'EDAC, infatti, è in grado di formare un legame isopeptidico, a lunghezza zero, solo se i residui si trovano realmente già in contatto l'uno con l'altro; inoltre il basso eccesso di reattivo utilizzato nella reazione, ne garantisce l'alta specificità.

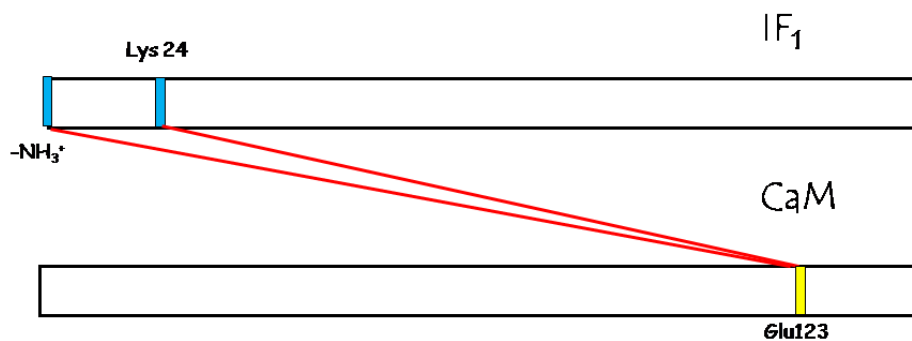


Figura 52 Rappresentazione schematica del risultato dell'esperimento di *crosslinking*, evidenziando i residui identificati come diretti interattori di IF₁ e CaM.

Questi risultati indicano che CaM lega IF₁ in una modalità diversa da quella classica; tuttavia sono molte le evidenze recenti che testimoniano di conformazioni alternative adottate da CaM in alcuni complessi. Sono state riportate in letteratura nuove strutture di complessi in cui CaM non raggiunge una conformazione globulare e in alcuni casi lega un numero inferiore di ioni Ca²⁺ (Vetter S. W. and Leclerc E., 2003). Ad esempio, il legame di CaM al peptide N-terminale della pompa del Ca²⁺ della membrana plasmatica non induce transizione di CaM nella classica conformazione collassata e coinvolge solo il

lobo posto all'estremità C-terminale come conseguenza della mancanza di siti idrofobici di ancoraggio rispetto alla comuni sequenze dei peptidi *target* (Elshorst et al., 1999).

E' interessante notare che la regione di interazione nel complesso si colloca, per quanto riguarda IF₁, nelle adiacenze della porzione che ha il compito di legare la subunità F₁ dell'ATP sintetasi; se l'interazione con CaM comporta la dissociazione del dimerico di IF₁, impedendone il legame all'ATP sintetasi, è possibile ipotizzare un ruolo di CaM nella regolazione di questo enzima.

BIBLIOGRAFIA

- Stigter D., Dill K.A. (1990) *Biochemistry* 29:1262-71.
- Watson JD, Crick FHC (1953) *Nature* 171:737-738.
- Kendrew J.C., Dickerson R.E., Strandberg B.E., Hart R.J., Daries D.R., Philips D.C., Shore V.C. (1960) *Nature* 185:422-427.
- Perutz M.F., Rossmann M.G., Collis A.F. Will G., North A.T. (1960) *Nature* 185:416-422.
- Piccoli R., Tamburrini M., Piccialli G., Di Donato A., Parente A., D'Alessio G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:1870-1874.
- Dyson H.J., Wright P.E., (1998) *Nature Struct. Biol. –NMR supplement*, 499-503.
- Walsh D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y., Fezoui Y., Condron M.M., Lomakin A., Benedek G.B., Selkoe D.J., Teplow D.B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:25945-25952.
- Scaloni A., Miraglia N., Orrù S., Amodeo P., Motta A., Marino G., Pucci P. (1998) *J Mol Biol* 277:961-964.
- Orrù S., Dal Piaz F., Cabarra A., Biasol G., De Francesco R., Steinkuhler C., Pucci P. (1999) *Prot Sci* 8:1445-1454.
- De Lorenzo C., Dal Piaz F., Piccoli R., Di Marò A., Pucci P., D'Alessio G. (1998) *Prot Sci* 7:2653-2658.
- Scaloni A., Monti M., Acquaviva R., Tell G., Damante G., Formisano S., Pucci P. (1999) *Biochemistry* 38:67-72.
- Fontana A., Fassino G., Vita C., Dalzoppo D., Zanai M., Zambonin M. (1986) *Biochemistry* 25:1847-1851.
- Zappacosta F., Pessi A., Bianchi E., Venturini S., Sollazzo M., Tramontano A., Marino G., Pucci P. (1996) *Protein Sci.* 5:802-813.
- Englander S.W., Kallenbach N.R. (1984) *Q. Rev. Biophys.* 16:521-655.
- Bai Y., Milne J., Mayne L., Englander S.W. (1994) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 20:4-14.
- Englander S.W. (2000) *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29:213-238.
- Yan X, Watson J., Ho P.S., Deinzer M.L. (2004) *Mol Cell Proteomics* 3:10-23.
- Miranker A.D. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14025-14027.
- Wu Y., Engen J.R. (2004) *Analyst.* 129:290-296.
- Wetlaufer D.B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:697-701.
- Dill K.A. (1985) *Biochemistry* 24:1501-1509.
- Ellgaard L., Helenius A. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:181-191.
- Lee S., Tsai F. T. (2005) *J. Biochem Mol Biol* 38:259-265.
- Bemporad F., Capannini C., Calamai M., Tutino M., L., Stefani M., Chiti F. (2004) *Biochemistry* 43:9116-9126.
- Nilsson M. R. (2004) *Methods* 34:151-160.
- Merlini G., Bellotti V. (2003) *N Engl J Med.* 349:1872-3.

- Chiti F., Stefani M., Taddei N., Ramponi G., Dobson C.M. (2003) *Nature* 424:805-808.
- Chiti F., Taddei N., White P.M., Bucciantini M., Magherini F., Stefani M and Dobson C.M. (1999) *Nature Structural Biology, Letters* 6:1005-1009.
- Chiti F., Taddei N., Stefani M., Dobson C. and Ramponi G. (2001) *Protein Science* 10:879-886.
- Ramirez-Alvarado M., Merkel J., Regan L. (2000) *PNAS* 16:8979-8984.
- Mangione P., Sunde M., Giorgetti S., Stoppini M., Esposito G., Gianelli L., Obici L., Asti L., Andreola A., Viglino P., Merlini G., Bellotti V. (2001) *Protein Science* 10:187-199.
- Chiti F., Taddei N., Bucciantini M., White P., Ramponi G., Dobson C. (2000) *The EMBO Journal* 19:1441-1449.
- Corazza A., Rosano C., Pagano K., Alverdi V., Esposito G., Capanni C., Bemporad F., Plakoutsi G., Stefani M., Chiti F. (2006) *Proteins* 62:64-79.
- Karshikoff A., Ladenstein, R. (2001) *Trends Biochem. Sci.* 26:550-556.
- Plakoutsi G., Taddei N., Stefani M., Chiti F. (2004) *J Biol Chem.* 279:14111-9.
- Plakoutsi G., Bemporad F., Calamai M., Taddei N., Dobson C.M., Chiti F. (2005) *J Mol Biol.* 351:910-922.
- Hargrove MS, Olson JS (1996) *Biochemistry* 35:11310-8.
- Hughson FM, Wright PE, Baldwin RL (1990) *Science* 249:1544-8.
- Uzawa, T., Akiyama, S., Kimura, T., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I. and Fujisawa, T. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:1171-1176.
- Sirangelo I., Iannuzzi C., Malmo C. Irace G. (2003) *Biopolymers* 70:649-54.
- Sirangelo I., Tavassi S., Martelli P.L., Casadio R., Irace G. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:3937-45.
- Jennings PA, Wright PE (1993) *Science* 262:892-6.
- Nishimura C., Dyson J., Wright P.E. (2002) *J. Mol. Biol.* 322:483-9.
- Weisbuch S., Gerard F., Pasdeloup M., Cappadoro J., Dupont Y., Jamin M. (2005) *Biochemistry* 44:7013-23.
- Bai Y, Milne JS., Mayne L., Englander S.W. (1993) *Proteins* 17:75-86.
- Kay MS, Baldwin RL (1996) *Nat. Struct. Biol.* 3:439-45.
- Nishimura C., Lietzow M.A., Dyson J., Wright P.E. (2005) *J. Mol. Biol.* 351:383-92.
- Nishimura C., Dyson J., Wright P.E. (2006) *J. Mol. Biol.* 355:139-56.
- Cabezon E, Runswick MJ, Leslie AG, Walker JE. (2001) *EMBO J.* 20:6990-6.
- Cabezon E, Butler PJ, Runswick MJ, Walker JE (2000) *J Biol Chem.* 275:25460-4.
- Persechini A., Kretsinger RH. (1988) *J Biol Chem.* 263:12175-8.
- Barbatto G., Ikura M., Kay LE, Pastor RW, Bax A (1992) *Biochemistry* 31:5269-78.
- Yamniuk AP, Vogel HJ (2004) *Mol Biotechnol.* 27:33-57.
- O'Neil KT, DeGrado WF. (1990) *Trends Biochem Sci.* 15:59-64.
- Ikura M, Clore GM, Gronenborn AM, Zhu G, Klee CB, Bax A. (1992) *Science* 256:632-8.

- Osawa M, Tokumitsu H, Swindells MB, Kurihara H, Orita M, Shibamura T, Furuya T, Ikura M. (1999) *Nat Struct Biol.* 6:819-24.
- Vetter SW, Leclerc E. (2003) *Eur J Biochem.* 270:404-14.
- Elshorst B, Hennig M, Försterling H, Diener A, Maurer M, Schulte P, Schwalbe H, Griesinger C, Krebs J, Schmid H, Vorherr T, Carafoli E. (1999) *Biochemistry* 38:12320-32.
- Pedersen PL, Hullihen J. (1984) *J Biol Chem.* 259:15148-53.
- Schwerzmann K, Müller M, Carafoli E. (1985) *Biochim Biophys Acta.* 816:63-7.
- Contessi S, Haraux F, Mavelli I, Lippe G. (2005) *J Bioenerg Biomembr.* 37:317-26.
- Burwick NR, Wahl ML, Fang J, Zhong Z, Moser TL, Li B, Capaldi RA, Kenan DJ, Pizzo SV. (2005) *J Biol Chem.* 280:1740-5.
- Walker JE, Gay NJ, Powell SJ, Kostina M, Dyer MR (1987) *Biochemistry* 26:8613-9.
- Van Raaij MJ, Orriss GL, Montgomery MG, Runswick MJ, Fearnley IM, Skehel JM, Walker JE (1996) *Biochemistry* 35:15618-25.
- Gordon-Smith DJ, Carbajo RJ, Yang JC, Videler H, Runswick MJ, Walker JE, Neuhaus D (2001) *J. Mol. Biol.* 308:325-39.