



UNIVERSITA' DI NAPOLI FEDERICO II

**DOTTORATO DI RICERCA
BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE
XXI CICLO**

***PROPRIETA' MOLECOLARI E FUNZIONALI DEL
SISTEMA DELLA TIOREDOSSINA NELL'EUBATTERIO
PSICROFILO PSEUDOALTEROMONAS HALOPLANKTIS***

**Dottoranda
Roberta Cotugno**

Relatore
Prof. Emmanuele De Vendittis

Coordinatore
Prof. Giuseppe D'Alessio

Anno Accademico 2007/2008

RINGRAZIAMENTI

.... e anche questa è fatta!!!!

Desidero ringraziare il mio docente guida il Prof. Emmanuele De Vendittis, che per me è stato maestro non solo di scienza ma anche di vita;

il Prof. Mario Masullo, che con la sua esperienza scientifica ed informatica mi ha soccorso molte volte.

La Dott.ssa Rosaria Ruocco, per la sua esperienza nel campo della ricerca e per essere diventata un'amica e una confidente.

Ringrazio i Prof. Arcari, Dello Russo e Corso sempre pronti a dispensare consigli.

Salvatore e Ilaria che sono stati non solo validi collaboratori ma anche amici di "merenda".

Le Dott.sse Annalisa Lamberti e Lia Ripa per la loro disponibilità mostratami quotidianamente.

Tutti i colleghi del VI piano passati e presenti, Imma R, Pierluigi, Giovanna, Francesca, Carmen, Imma C, Angela, Monica, Stefano, Rosalba, Anna, Angela (a'secc), Annarita, Claudia, Nunzia, Rosa, Alberto e Alba per aver allietato i momenti di pausa tra risate e caffè.

Infine ringrazio tutta la mia famiglia, Massimiliano e tutti i miei amici per avermi supportato e sopportato!

RIASSUNTO

Il sistema della tioredossina, preposto al controllo dello stato ridotto delle proteine citoplasmatiche, è costituito da tioredossina (Trx) e tioredossina riduttasi (TrxR). All'interno del sito attivo entrambe le proteine possiedono una sequenza CXXC conservata, in cui le due cisteine formano un ponte disolfuro reversibile essenziale per l'attività. Il meccanismo d'azione del sistema Trx/TrxR prevede l'oscillazione tra forma ossidata e ridotta del motivo CXXC di entrambe le proteine ed include il donatore iniziale di elettroni NADPH, nonché una molecola di FAD legata al sito attivo della TrxR, anch'essa oscillante tra forma ossidata e ridotta. La riduzione del ponte disolfuro in una proteina bersaglio avviene grazie ad una sequenza ciclica di reazioni che inizia con la cessione di equivalenti riducenti dal NADPH al FAD, poi al ponte disolfuro della TrxR, ed infine a quello della Trx. Il ciclo termina quando dal sito attivo della Trx gli equivalenti riducenti sono trasferiti ad un legame S-S presente nella proteina bersaglio.

Sono state studiate le proprietà molecolari e funzionali del sistema della tioredossina da *Pseudoalteromonas haloplanktis*, un eubatterio psicrofilo isolato dal mare antartico ed adattato alla crescita nell'intervallo di temperatura 4 - 20°C. L'approccio seguito per lo studio dei componenti di tale sistema è stato quello della produzione di forme ricombinanti di entrambe le proteine, utilizzando come sistema di espressione eterologa il ceppo BL21(DE3) di *Escherichia coli*. Dopo aver verificato che il genoma

di *P. haloplanktis* contenesse copie uniche dei geni putativi codificanti *PhTrxR* e *PhTrx*, si è passati all'amplificazione e successivo clonaggio dei suddetti geni in opportuni vettori di espressione. Le forme ricombinanti dei componenti del sistema della tioredossina (*rPhTrxR* e *rPhTrx*) sono state prodotte come proteine di fusione con una coda di istidine, che consentiva la loro purificazione all'omogeneità mediante un'unica cromatografia per affinità.

Dallo studio delle proprietà molecolari delle proteine purificate è emerso che la *rPhTrxR* è un flavoenzima di tipo II a basso peso molecolare (35 kDa/subunità) organizzato come omodimero. Durante la sua purificazione è stato necessario aggiungere FAD all'omogenato cellulare per ottenere un rapporto FAD/subunità prossimo a quello teorico unitario; la presenza di una quantità stechiometrica di FAD è essenziale per la completa funzionalità del flavoenzima. La *rPhTrx* è invece una piccola proteina monomericamente di 12 kDa. Il dosaggio di Ellman, eseguito sulle forme ossidate e ridotte di entrambe le proteine, ha consentito di determinare il numero totale di cisteine libere ed i ponti disolfuro. I dati ottenuti hanno evidenziato in entrambe le proteine la presenza del ponte disolfuro canonico tra le due cisteine della sequenza CXXC, nonché di altre tre cisteine con gruppi tiolici liberi nella *rPhTrxR*.

La funzionalità dei due componenti del sistema della tioredossina è stata analizzata singolarmente mediante dosaggi spettrofotometrici. Il dosaggio di riduzione del DTNB in presenza di NADPH e quello di riduzione dell'insulina in presenza di DTT sono stati usati per misurare

rispettivamente l'attività di *rPhTrxR* e *rPhTrx* nell'intervallo di temperatura 10 – 40°C. In tal modo si è valutato l'adattamento psicrofilo delle due proteine attraverso lo studio dei parametri cinetici, nonché delle energie di attivazione delle specifiche reazioni catalizzate. Dai dati ottenuti è emerso il maggiore carattere psicrofilo della *rPhTrxR* rispetto alla *rPhTrx*.

È stata quindi studiata la funzionalità del sistema completo della tioredossina di *P. haloplanktis* mediante il dosaggio di riduzione dell'insulina, utilizzando il NADPH come donatore di elettroni. Tale sistema ricostituito si è rivelato pienamente efficiente anche a basse temperature. Inoltre, è stata valutata la reversibilità della riduzione della *rPhTrx* catalizzata dalla *rPhTrxR* in presenza di NADPH, per ricavare il potenziale redox della tioredossina. Il valore calcolato (-0,276 V) è simile a quello di altre tioredossine batteriche.

La stabilità termica di entrambe le proteine è stata studiata mediante dosaggi di inattivazione termica e profili di denaturazione termica. La *rPhTrxR* possiede una discreta resistenza al calore; infatti, dal suo profilo di inattivazione termica è stata calcolata una temperatura di semi-inattivazione di circa 60°C. Sono stati inoltre ricavati i profili di denaturazione termica della *rPhTrxR* mediante misure di fluorescenza, valutando l'emissione sia nella regione dei residui aromatici che in quella del FAD. La temperatura di fusione è risultata simile a quella di semi-inattivazione; pertanto, il processo di inattivazione sembra essere concomitante a quello di denaturazione. Questi dati indicano che la *rPhTrxR*, pur essendo un enzima psicrofilo, è

dotata di una buona resistenza al calore, superiore alla massima temperatura di crescita di *P. haloplanktis*.

La termostabilità della *rPhTrx* è sorprendentemente maggiore. Infatti, il tempo di dimezzamento nella cinetica di inattivazione della *rPhTrx* è di circa 4 ore a 95°C. Inoltre, mediante spettrofotometria UV non è stata evidenziata alcuna significativa denaturazione termica fino a 95°C. A questa resistenza al calore, eccezionale per una proteina di origine psicrofila, dà un notevole contributo il ponte disolfuro intracatena presente nello stato nativo (ossidato) della *rPhTrx*. Infatti, se tale proteina viene previamente trattata con l'agente riducente DTT, in grado di rompere il ponte disolfuro, si ottiene un tipico profilo di denaturazione termica, da cui è stata ricavata una temperatura di denaturazione di 74°C.

La presenza di tre cisteine con gruppi tiolici liberi in *rPhTrxR* ha stimolato l'analisi di un loro possibile coinvolgimento in reazioni redox con tioli cellulari. Infatti, studi recenti dimostrano che proteine con gruppi sulfidrilici molto reattivi sono bersaglio di tioli cellulari, come ad esempio il glutatione, che gioca un ruolo essenziale nella regolazione dello stato redox cellulare. Per tale motivo, la *rPhTrxR* è stata incubata con concentrazioni crescenti della forma ossidata del glutatione; dall'analisi di tali campioni mediante Western blotting con anticorpi anti-glutatione è emersa la presenza di una banda immunoreattiva di massa coincidente a quella della *rPhTrxR*. Quindi, come del resto già evidenziato per la superossido dismutasi di *P. haloplanktis*, la *rPhTrxR* sembra essere bersaglio di una modifica covalente su residuo/i di cisteina ad opera del glutatione. Per identificare il/i residuo/i

di cisteina bersaglio della modifica covalente, sono stati costruiti tre mutanti di *rPhTrxR*, in cui sono state realizzate le sostituzioni amminoacidiche $C_7 \rightarrow S$, $C_{106} \rightarrow S$ e $C_{303} \rightarrow S$. La banda immunoreattiva è presente solo nei mutanti $C_7 \rightarrow S$ e $C_{106} \rightarrow S$, mentre scompare nel mutante $C_{303} \rightarrow S$. Pertanto, il bersaglio specifico della modifica covalente del glutatione sembra essere il residuo C_{303} , che sulla base di un modello tridimensionale dell'enzima, è localizzato in una regione esposta al solvente.

SUMMARY

Thioredoxin and thioredoxin reductase from the psychrophilic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* were obtained as recombinant His-tagged proteins (*rPhTrx* and *rPhTrxR*, respectively). *rPhTrxR* is organised as a homodimeric flavoenzyme, whereas *rPhTrx* is a small monomeric protein. Both proteins contain the typical functional disulfide bridge. However, three additional cysteines are present as free thiols in purified *rPhTrxR*. When individually tested in specific assays, *rPhTrxR* and *rPhTrx* display a full activity at low temperatures, an indispensable requirement for cold-adapted proteins. In particular, *rPhTrxR* catalyses the NADPH dependent reduction of DTNB, whereas *rPhTrx* provokes the insulin precipitation in the presence of DTT. The analysis of the effect of temperature on these reactions points to the best cold-adaptation of *rPhTrxR*, because of its lower thermophilicity, compared to *rPhTrx*. The combined activity of *rPhTrxR* and *rPhTrx*, tested in a reconstituted assay containing NADPH as electrons donor and human insulin as the thioredoxin substrate, demonstrates a direct functional interaction between the purified recombinant components of the thioredoxin system of *P. haloplanktis*. Furthermore, the NADPH-dependent reduction of *rPhTrx* catalysed by *rPhTrxR* is fully reversible and allows the determination of its redox potential, whose value is in the range of other bacterial and archaeal thioredoxins. The analysis of the thermostability of *rPhTrxR* points to its discrete heat resistance. However, *rPhTrx* is much more heat resistant, with

a half-inactivation time of about 4 hours at 95°C. This exceptional heat resistance for a psychrophilic protein is significantly decreased by the reduction of the disulfide bridge of *rPhTrx*.

When *rPhTrxR* is incubated with increasing concentration of oxidized glutathione, a dose-dependent S-glutathionylation of the flavoenzyme is observed, as discovered by an immunoblotting analysis using anti-glutathione antibodies. The site-directed mutagenesis on the three free cysteines possessed by *rPhTrxR* allowed the identification of Cys303 as the target residue carrying the glutathione adduct.

Functionality, thermophilicity and thermostability of the *P. haloplanktis* thioredoxin system point to the relevance of this key mechanism for the preservation of the reduced state of cytoplasmic proteins even in a cold-adapted source. The S-glutathionylation of Cys303 in *rPhTrxR*, as well as of a highly reactive cysteine in superoxide dismutase of *P. haloplanktis*, drives future research on the role of the sulphur metabolism in this cold-adapted microorganism.

INDICE

	Pag.
INTRODUZIONE	1
1.1 Controllo del potenziale redox cellulare	1
1.2 Il sistema tioredossina/tioredoxina riduttasi	4
1.3 Proprietà di <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC 125	8
1.4 Il sistema della tioredossina in <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	9
1.5 Reattività dei residui di cisteina	10
OBIETTIVO DELLA RICERCA	12
MATERIALI E METODI	13
2.1 Materiali, enzimi e tamponi	13
2.2 Tecnologia del DNA ricombinante	14
2.3 Reazione a catena della polimerasi (PCR)	15
2.4 Vettori per l'espressione dei geni codificanti TrxR e Trx di <i>P. haloplanktis</i>	15
2.5 Espressione eterologa a purificazione delle proteine ricombinanti	17
2.6 Produzione di forme mutate di <i>PhTrxR</i> contenenti le sostituzioni C ₇ S, C ₁₀₆ S e C ₃₀₃ S	18
2.7 Determinazione del contenuto di FAD legato alla <i>rPhTrxR</i>	20
2.8 Determinazione delle cisteine mediante dosaggio di Ellman	21
2.9 Dosaggi enzimatici	22
2.9.1 <i>Attività tioredossina riduttasica</i>	22
2.9.2 <i>Funzionalità della tioredossina</i>	23
2.9.3 <i>Attività del sistema completo della tioredossina</i>	23
2.10 Potenziale redox del sistema della tioredossina	24
2.11 Inattivazione termica	25
2.12 Denaturazione termica	26
2.13 Analisi di Spettrometria di massa	27
2.14 S-glutationilazione della <i>PhTrxR</i>	28
2.15 Analisi mediante Western blotting	28
2.16 Altri metodi	29
RISULTATI	31

3.1	Espressione e purificazione di <i>rPhTrxR</i> e <i>rPhTrx</i>	31
3.2	Proprietà molecolari di <i>rPhTrxR</i> e <i>rPhTrx</i>	34
3.3	Determinazione del contenuto di FAD nella <i>rPhTrxR</i>	36
3.4	Determinazione delle cisteine mediante dosaggio di Ellman	39
3.5	Attività tioredossina riduttasica della <i>rPhTrxR</i>	40
3.6	Attività della <i>rPhTrx</i>	42
3.7	Termofilicità di <i>rPhTrxR</i> e <i>rPhTrx</i>	44
3.8	Attività del sistema completo della tioredossina	45
3.9	Potenziale redox della tioredossina	47
3.10	Inattivazione termica di <i>rPhTrxR</i> e <i>rPhTrx</i>	48
3.11	Denaturazione termica di <i>rPhTrxR</i> e <i>rPhTrx</i>	51
3.12	Reazione del glutatione con la <i>rPhTrxR</i>	54
	DISCUSSIONE	57
	BIBLIOGRAFIA	65

INDICE DI FIGURE E TABELLE

	Pag.
Fig. 1 Meccanismo di funzionamento del sistema della tioredossina	6
Fig. 2 SDS-PAGE di estratti proteici totali da colture di BL21(DE3) trasformate con o pET-22b(+) o <i>vPhTrxR</i> ; induzione con IPTG	31
Fig 3 SDS-PAGE di estratti proteici totali da colture di BL21(DE3) trasformate con o pET-22b(+) o <i>vPhTrx</i> ; induzione con IPTG	33
Fig 4 SDS-PAGE di <i>rPhTrxR</i> e <i>rPhTrx</i> purificate	34
Fig 5 Analisi mediante spettrometria di massa ESI/Q-TOF di <i>rPhTrxR</i> (A) e <i>rPhTrx</i> (B) desalificate mediante RP-HPLC	35
Fig 6 Spettri di fluorescenza di <i>rPhTrxR</i> eccitando a 280 nm (A) e 375 (B)	37
Fig 7 Dosaggio del contenuto di FAD in <i>rPhTrxR</i>	39
Tab 1 Effetto della temperatura sui parametri cinetici della riduzione del DTNB da parte di <i>rPhTrxR</i>	42
Fig 8 Dosaggio di riduzione dell'insulina a 10°C da parte della <i>rPhTrx</i> in presenza di DTT	43
Fig 9 Plot di Arrhenius delle attività di <i>rPhTrxR</i> (A) e <i>rPhTrx</i> (B)	45
Fig 10 Dosaggio di riduzione dell'insulina a 10°C da parte del sistema completo ricostituito della tioredossina	46
Fig 11 Reversibilità della reazione nel sistema completo ricostituito della tioredossina a 10°C (A) e 25°C (B)	48
Fig 12 Profilo di inattivazione termica di <i>rPhTrxR</i>	49
Fig 13 Cinetica di inattivazione a 95°C della <i>rPhTrx</i>	50
Fig 14 Profili di denaturazione termica di <i>rPhTrxR</i> ottenuti da misure di fluorescenza	52
Fig 15 Profili UV di denaturazione termica di <i>rPhTrx</i> in assenza ed in presenza di DTT	53
Fig 16 Immunoblotting con anticorpi anti-glutatione di campioni di <i>rPhTrxR</i> trattati con glutatione ossidato (GSSG)	55
Fig 17 Immunoblotting con anticorpi anti-glutatione di campioni di <i>rPhTrxR</i> e sue forme mutate trattate con glutatione ossidato (GSSG)	56

INTRODUZIONE

1.1 Controllo del potenziale redox cellulare

Lo stato redox cellulare è una condizione che misura il potenziale elettrochimico della cellula e che dipende dalla concentrazione delle varie coppie redox in essa presenti. I meccanismi preposti al controllo di tale stato sono cruciali per la sopravvivenza e sviluppo della cellula, in quanto le normali attività fisiologiche possono provocare continui sbilanciamenti del potenziale redox cellulare.

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

rilascia intermedi parzialmente ridotti, tra i quali $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (Fridovich, 1989).

I ROS sono generalmente prodotti durante il normale metabolismo cellulare, ma la loro formazione può essere incrementata da particolari condizioni dell'ambiente esterno, quali ad esempio l'esposizione a radiazioni ionizzanti, l'incremento della pressione dell'ossigeno o la presenza nel mezzo di agenti ossidanti. Uno dei meccanismi che *in vivo* genera l'anione superossido ed il perossido di idrogeno è la perdita di elettroni durante la catena di trasporto degli elettroni mitocondriale. In particolare essi si formano quando elettroni "fuoriescono" accidentalmente da questo processo a causa del malfunzionamento dei complessi enzimatici in esso coinvolti. Inoltre $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 si formano anche per autossidazione di diverse flavoproteine o durante il meccanismo di azione di alcuni enzimi (NADH ossidasi).

A causa del consumo di ossigeno atmosferico durante i normali processi metabolici, gli organismi aerobi sono continuamente esposti ad uno sbilanciamento dello stato redox. In particolare, i prodotti intermedi derivanti dalla riduzione incompleta dell'ossigeno risultano estremamente dannosi a causa della loro grande reattività e potere ossidante. I più dannosi sono i radicali liberi che, anche se dotati di un'emivita molto breve, possiedono una estrema reattività nei riguardi di numerosi componenti cellulari; essi infatti si legano a macromolecole quali DNA, lipidi e proteine, creando nuovi radicali instabili e dando inizio a reazioni a catena che finiscono per danneggiare in maniera irreversibile le strutture cellulari.

Per arginare gli effetti dannosi dei ROS, la cellula ha evoluto diverse strategie di difesa, che includono sistemi antiossidanti enzimatici e non-enzimatici. In particolare, nell'ambito degli enzimi antiossidanti, alcuni svolgono la loro funzione di prevenzione eliminando direttamente i ROS. In tale ambito, la superossido dismutasi rappresenta la prima "linea di difesa", eliminando l'anione superossido, il ROS originato dalla prima riduzione univalente dell'ossigeno. Altri enzimi antiossidanti svolgono invece una funzione di riparo del danno ossidativo, come ad esempio il sistema della tioredossina (Ritz et al, 2000).

L'azione distruttiva dei ROS è indirizzata su vari componenti cellulari: in particolare, sono bersaglio della loro azione deleteria: i grassi delle membrane biologiche (che subiscono la reazione di lipoperossidazione); i carboidrati e le proteine attraverso modificazioni covalenti che ne alterano la funzionalità; gli acidi nucleici, da cui deriva anche un'alterazione delle informazioni genetiche. L'azione continua dei ROS si evidenzia soprattutto nel precoce invecchiamento delle cellule e nell'insorgere di varie patologie gravi come cancro, malattie dell'apparato cardiovascolare, diabete, sclerosi multipla, artrite reumatoide, enfisema polmonare, cataratta, morbo di Parkinson e Alzheimer, dermatiti, ecc.

Tuttavia, negli ultimi anni diversi studi hanno attribuito a questi agenti ossidanti anche un ruolo fondamentale nella fisiologia cellulare. I ROS, infatti, agiscono da mediatori di numerosi processi quali il differenziamento, la proliferazione, l'apoptosi e la risposta all'infezione. In condizioni fisiologiche vi è quindi un equilibrio finemente regolato tra la produzione

endogena di ROS e la loro neutralizzazione da parte dei meccanismi anti-ossidanti. Pertanto, l'effetto tossico dei ROS è conseguenza di una perturbazione di tale equilibrio, che a sua volta deriva o da una eccessiva produzione di tali specie tossiche o da un'alterazione dei sistemi preposti al loro controllo. Si può quindi definire "stress ossidativo" la perturbazione dell'equilibrio tra pro-ossidanti ed anti-ossidanti a favore dei primi, con conseguente danno a livello cellulare.

1.2 Il sistema tioredossina/tioredossina riduttasi

Le proteine nell'ambiente extracellulare o sulla superficie cellulare sono ricche di disolfuri stabilizzanti, che riflettono le condizioni ossidanti dell'ambiente extracellulare. Al contrario, l'interno della cellula è mantenuto ridotto e nelle proteine contenenti residui di cisteina, questi ultimi sono presenti come gruppi sulfidrilici liberi (Gilbert, 1990). Il mantenimento delle proteine nel loro stato ridotto è assicurato dal sistema della tioredossina, uno dei più importanti per la difesa cellulare contro il danno ossidativo.

Tutti i membri della superfamiglia delle tioredossine possiedono un'attività tiolotrasferasica basata sulla presenza di una sequenza conservata contenente due residui di cisteina, che oscillano tra forma ridotta (con i gruppi SH liberi) e ossidata (formanti quindi un ponte disolfuro S-S). Nel citosol di eucarioti e procarioti il mantenimento dello stato ridotto dei residui di cisteina delle proteine è assicurato dall'attività disolfuro riduttasica del sistema della tioredossina/tioredossina riduttasi attraverso un

meccanismo che prevede l'uso del NADPH come substrato donatore di equivalenti riducenti. Nello spazio periplasmico di procarioti agiscono invece proteine denominate Dsb (*disulfide bond*), che con la loro attività tiolo disolfuro ossidasica, provvedono alla formazione di ponti disolfuro intracatena ed alla loro successiva isomerizzazione, in modo da far assumere la corretta struttura tridimensionale alle proteine bersaglio. Analoghi eucariotici delle Dsb sono le PDI (*protein disulfide isomerase*), che provvedono sia alla formazione che all'isomerizzazione dei corretti ponti disolfuro. In alcuni archeobatteri termofili sono state inoltre identificate proteine citosoliche denominate PDO (*protein disulfide oxidoreductase*) che provvedono alla formazione di ponti disolfuro su alcune specifiche proteine bersaglio.

Il sistema della tioredossina è costituito dall'enzima tioredossina riduttasi (TrxR) e dal suo substrato proteico, la tioredossina (Trx) ed usa come equivalenti riducenti il NADPH (Holmgren, 1985; Arner and Holmgren, 2000). Le reazioni enzimatiche di tale sistema, distribuito in maniera ubiquitaria in tutti gli organismi viventi dagli archeobatteri all'uomo, sono schematizzate in Fig. 1. Le TrxR sono flavo-disolfuro-ossidoreduttasi e funzionano come omodimeri con ciascun monomero avente un gruppo prostetico FAD, un sito di legame per il NADPH ed un sito attivo comprendente il disolfuro coinvolto nella reazione di ossidoriduzione (Williams et al., 2000). La TrxR catalizza il trasferimento degli elettroni dal NADPH al FAD e poi al disolfuro del sito attivo, formatosi all'interno della sequenza conservata contenente due cisteine

separate da 2 o 4 residui amminoacidici. La riduzione di tale legame comporta la formazione di due gruppi SH liberi, che trasferiscono i relativi equivalenti riducenti alla Trx, lo specifico substrato proteico della TrxR, anch'essa contenente un ponte disolfuro all'interno di un'analogha sequenza CXXC. La Trx viene quindi convertita anch'essa nella sua forma ridotta (con i due gruppi SH) e la sua funzione è quella di ridurre gli eventuali ponti disolfuro formatisi in specifiche proteine citosoliche in seguito a condizioni di stress ossidativo. La Trx si riconverte quindi nella sua forma ossidata, in tal modo contribuendo alla preservazione dell'omeostasi redox cellulare. L'attività del sistema della tioredossina è coinvolta nel metabolismo dei ribonucleotidi, nella regolazione dell'attività trascrizionale e nel ripiegamento delle proteine.

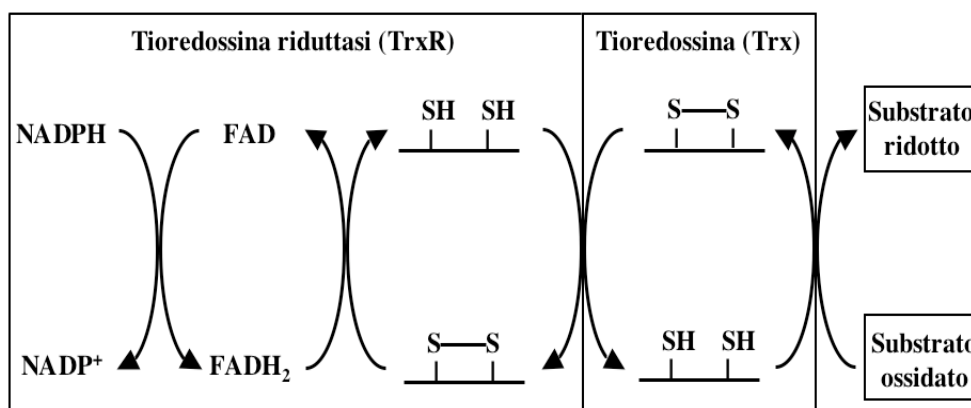


Fig. 1. Meccanismo di funzionamento del sistema della tioredossina

Esistono due tipi di TrxR in base ad alcune differenze strutturali e di meccanismo catalitico (Williams et al., 2000; Gromer et al., 1999). La TrxR

di tipo I ha un peso molecolare più elevato (~55 kDa, chiamata H-TrxR) ed è ritrovata in eucarioti superiori, incluso *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* (Gasdaska et al., 1999; Gladyshev et al., 1999; Kanzok et al., 2001) nonché nel protozoo parassita della malaria *Plasmodium falciparum* (Muller et al., 1996). La TrxR di tipo II ha basso peso molecolare (~35 kDa, chiamata L-TrxR) ed è presente in archaea, batteri ed eucarioti inferiori come i funghi, le piante ed il parassita intestinale protozooario *Entamoeba* (Becker et al., 2000). Tra L-TrxR e H-TrxR c'è solo il 20% d'identità di sequenza. Inoltre, le H-TrxR hanno il centro attivo redox (con il motivo CXXXXC) nel dominio di legame del FAD, che non ha equivalenti nel dominio di legame del FAD delle L-TrxR. In L-TrxR il disolfuro redox attivo (con il motivo CXXC) è localizzato invece nel dominio del NADPH. Inoltre, le H-TrxR possiedono un sito attivo redox aggiuntivo, assente in L-TrxR, che in alcuni casi è caratterizzato dalla presenza di un residuo di selenocisteina. Questo sito attivo è localizzato nel dominio C-terminale (il dominio interfaccia), responsabile della dimerizzazione e coinvolto anche nella catalisi. Le differenze strutturali tra le TrxR dei vari organismi appartenenti ai diversi regni filogenetici dimostrano che le cellule si sono evolute secondo modalità differenti per far fronte alle diverse condizioni di stress ossidativo alle quali esse sono esposte.

La Trx è una piccola proteina ubiquitaria di 10-12 kDa, che svolge un ruolo chiave nel controllo dello stato redox della cellula, influenzando altri processi cellulari quali la proliferazione, l'apoptosi e la regolazione

trascrizionale. Anche se le Trx non sembrano molto conservate tra i vari organismi, esse comunque contengono un motivo strutturale denominato “*thioredoxin fold*”, presente anche in altri membri della superfamiglia delle tioredossine, come ad esempio la glutatione riduttasi. Inoltre, nel sito attivo delle Trx si ritrova la sequenza consenso CXXC in cui lo stato redox dei due residui di cisteina è alla base dell’attività biologica della Trx (Holmgren, 1985).

1.3 Proprietà di *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125

Pseudoalteromonas haloplanktis TAC 125 è un gammaproteobatterio Gram-negativo, aerobio, di forma bastoncellare. Il ceppo è stato isolato nei mari antartici, presso la stazione francese di Dumont d’Urville ed è stato messo a disposizione dal Prof. Charles Gerday dell’Università di Liegi (Belgio). In particolare, *P. haloplanktis* cresce tra 4 e 20° C (Birolo et al, 2000), con una temperatura ottimale intorno ai 15°C (Corsaro et al, 2004); per tali sue caratteristiche questo microrganismo è definito come euripsicrofilo, anche se esso viene comunemente indicato come uno psicrofilo. A causa del suo adattamento al freddo, *P. haloplanktis* costituisce un organismo utile per l’estrazione di proteine ed enzimi da utilizzare eventualmente in processi biotecnologici in cui è richiesta la funzionalità di tali macromolecole a basse temperature (Medigue et al., 2005). Inoltre, in seguito anche al sequenziamento dell’intero genoma di questo euripsicrofilo (Medigue et al, 2005), tale microrganismo costituisce un modello per lo studio di enzimi adattati a basse temperature. *P. haloplanktis* TAC125

crebbe in presenza di concentrazioni di NaCl che vanno dall'1.5% al 3.5%. D'altra parte questo batterio deve sopportare anche l'aumento di solubilità a basse temperature dei gas disciolti nell'ambiente marino, in particolare dell'ossigeno molecolare. Pertanto *P. haloplanktis* è potenzialmente più esposto all'azione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), sia per l'aumentata solubilità di O₂, da cui i ROS derivano, sia per l'aumentata emivita dei ROS a basse temperature. Per contrastare l'effetto deleterio dei ROS, alcuni organismi psicrofili hanno evoluto un'aumentata capacità antiossidante, esprimendo più geni codificanti per superossido dismutasi e catalasi. Altri organismi, come *P. haloplanktis*, hanno invece soppresso una serie di attività cellulari da cui scaturisce la sintesi di queste specie tossiche; ad esempio, l'intero metabolismo dipendente dalla molibdotterina, una delle maggiori fonti endogene di ROS, è del tutto assente in *P. haloplanktis* (Medigue et al., 2005). Inoltre, dati recentemente pubblicati hanno evidenziato che *P. haloplanktis* contiene una Fe-SOD dotata di un'elevata attività catalitica anche a basse temperature, indispensabile per l'efficiente difesa contro i ROS (Castellano et al., 2006; Castellano et al., 2008).

1.4 Il sistema della tioredossina in *Pseudoalteromonas haloplanktis*

Nel genoma di *P. haloplanktis* sono stati identificati i singoli componenti del sistema della tioredossina, deputato al mantenimento delle proteine nel loro stato ridotto. In particolare sul cromosoma I di *P. haloplanktis* (Medigue et al., 2005) sono state identificate copie uniche di entrambi i geni strutturali per tale sistema: il gene TrxB (ID: 3710321) e il

gene TrxA (ID: 3710320). TrxB codifica per una TrxR, qui di seguito indicata come *PhTrxR*, avente massa molecolare di 33,8 kDa e contenente la canonica sequenza di consenso CXXC necessaria per svolgere la sua funzione catalitica, nonché i siti di legame per il FAD ed il NADPH. TrxA codifica per una Trx, qui di seguito indicata come *PhTrx*, una piccola proteina di 11,9 kDa, che possiede anch'essa nel sito attivo la sequenza consenso CXXC e che agisce da substrato proteico della *PhTrxR*.

1.5 Reattività dei residui di cisteina

Uno dei possibili bersagli delle modificazioni covalenti provocate durante lo stress ossidativo e/o nitrosativo è rappresentato dai residui di cisteina. In particolare, i gruppi tiolici possono essere ossidati nei corrispondenti sulfossidi: sulfenico ($-\text{SOH}$), sulfinico ($-\text{SO}_2\text{H}$) e sulfonico ($-\text{SO}_3\text{H}$) (Klatt & Lamas, 2000). Mentre le proteine sulfinate e sulfonate sono relativamente stabili e non vengono ridotte nuovamente a cisteine in condizioni fisiologiche, i residui sulfenati sono generalmente instabili e facilmente ossidati a sulfinati e sulfonati o eliminati dai tioli cellulari e dal GSH per formare ponti disolfuro intramolecolari o misti. La capacità delle cisteine di oscillare tra stato ossidato e quello completamente ridotto rende tali residui candidati alla regolazione funzionale delle proteine. I ponti disolfuro intra- e inter-molecolari possono essere prontamente ridotti da cambiamenti del potenziale redox intracellulare o attraverso l'azione enzimatica di specifiche riduttasi come la tioredossina e la glutaredossina (Biswas et al, 2006). Pertanto la formazione di ponti disolfuro rappresenta

un meccanismo di regolazione, che può causare sia la perdita che il guadagno di funzione della proteina, mediando la risposta cellulare allo stress ossidativo.

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

OBIETTIVO DELLA RICERCA

Nella presente tesi è riportata la caratterizzazione del sistema della tioredossina isolata dal ceppo TAC 125 di *Pseudoalteromonas haloplanktis*, un eubatterio aerobio, gram-negativo isolato da sedimenti marini antartici. Tale ceppo è adattato a crescere tra 4 e 20°C, con una temperatura ottimale intorno a 15 °C. Recentemente è stata resa disponibile la sequenza dell'intero genoma di tale organismo (Medigue et al, 2005), che pertanto è diventato un modello per lo studio dell'adattamento di sistemi enzimatici ubiquitari a basse temperature.

Lo scopo della ricerca è stato quello di chiarire le relazioni struttura/funzione dei componenti proteici che costituiscono il sistema della tioredossina, estendendo le conoscenze sull'adattamento di tale sistema anche a basse temperature. Il lavoro di tesi è suddiviso in tre fasi che comprendono: la produzione di forme ricombinanti sia della tioredossina che della tioredossina riduttasi di *P. haloplanktis*; la caratterizzazione molecolare e funzionale di tali proteine al fine di studiarne la termofilicità e termostabilità; l'identificazione della reazione di S-glutationilazione su un residuo di cisteina molto reattivo della tioredossina riduttasi.

MATERIALI E METODI

2.1 Materiali, enzimi e tamponi

Gli enzimi di restrizione sono stati forniti dalla Amersham o dalla Promega. L'isopropil- β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) è stato acquistato presso l'Inalco. Ampicillina, FAD, NADPH, NADP⁺, acido 5',5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), insulina umana in forma ossidata 10 mg/mL, ditioneitololo (DTT) e glutatione ossidato (GSSG) sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich. I kit Qiagen per la purificazione dei plasmidi e dei frammenti di DNA sono della M-Medical; l'AmpliTaq DNA polimerasi ed i dNTP sono della Perkin Elmer; la Pfu DNA polimerasi è della Promega. Le pellicole fotografiche sono della Fuji. Il kit di mutagenesi sito-specifica QuikChange è della Stratagene. Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati dalla PRIMM.

Per il clonaggio sono stati utilizzati i plasmidi pGEM-T Easy (Promega) e pET-22 (Novagen). Nelle trasformazioni con plasmidi sono stati utilizzati i ceppi DH5 α e BL21(DE3) di *E. coli*. La resina Ni-NTA agarosio è della Qiagen. Tutti gli altri reagenti erano di grado analitico.

Sono stati utilizzati i seguenti terreni di coltura sterili per la crescita batterica: LB-Agar, costituito da agar A 1.5% (p/v), estratto di lievito 0.5% (p/v), caseina 1% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7.2; LB, costituito da estratto di lievito 0.5% (p/v), caseina 1% (p/v), NaCl 0.5% (p/v), pH 7.2.

Sono stati inoltre utilizzati i seguenti tamponi: tampone A, 20 mM Tris•Cl, pH 7.8; tampone B, 100 mM sodio fosfato, pH 7.8, 1 mM Na₂EDTA tampone C, 100 mM potassio fosfato, pH 7.8, 10 mM Na₂EDTA; tampone D, 100 mM potassio fosfato, pH 7.0, 10 mM Na₂EDTA; tampone PBS, 10 mM sodio fosfato, pH 7.2, 150 mM NaCl. Per l'elettroforesi su gel di agarosio è stato impiegato il tampone TAE, costituito da Tris•acetato 40 mM pH 7.9, sodio acetato 6.6 mM, Na₂EDTA 1 mM.

2.2 Tecnologia del DNA ricombinante

La tecnologia del DNA ricombinante è descritta in Sambrook et al (1989). La digestione del DNA plasmidico con endonucleasi di restrizione è stata realizzata in un volume di 20-100 µl, utilizzando 5-10 U di enzima per µg di DNA. Dopo incubazione a 37°C per almeno 2 ore, la miscela di reazione è stata analizzata su gel di agarosio all'1% in tampone TAE. Per la costruzione di nuovi plasmidi, i frammenti di DNA da clonare sono stati aggiunti nel rapporto molare di 10:1 rispetto al vettore plasmidico opportunatamente digerito, in un volume finale di 20-100 µl e ligati in presenza di 1.5 U di enzima T4 DNA ligasi. La miscela di reazione è stata incubata a 4°C per almeno 16 ore e poi impiegata per la trasformazione batterica. A tale scopo i ceppi DH5α e BL21(DE3) di *E. coli* sono stati resi competenti mediante trattamento con una soluzione di CaCl₂ 50 mM (Sambrook et al, 1989). I trasformanti sono stati selezionati su piastre di LB-Agar

contenenti ampicillina 0.1 mg/ml. Il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il protocollo del kit Qiagen.

2.3 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La reazione a catena della polimerasi (Mullis & Faloona, 1987) è stata effettuata in un DNA Thermal Cyclor della Perkin Elmer. Una tipica miscela di amplificazione conteneva, in un volume finale di 50 μ l, dNTP 200 μ M, 50 pmoli di ciascun oligonucleotide di innesco, 10-100 ng di DNA stampo e 2.5 U di *AmpliTaq* DNA polimerasi. I cicli di amplificazione prevedevano: 5 minuti a 94°C per la denaturazione del DNA stampo, 35 cicli ripetuti delle seguenti incubazioni: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 68°C; un'incubazione finale a 68°C per 10 minuti per consentire alla DNA polimerasi di completare l'estensione delle catene polinucleotidiche. La temperatura di fusione degli oligonucleotidi è stata calcolata considerando un contributo di 2°C per ogni coppia A/T e di 4°C per ogni coppia C/G. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel di agarosio all'1%. I frammenti di interesse sono stati purificati mediante il QIAquick PCR purification kit della Qiagen.

2.4 Vettori per l'espressione dei geni codificanti TrxR e Trx di *P. haloplanktis*

Il DNA genomico di *P. haloplanktis* è stato preparato come descritto (Masullo et al, 2000). Il gene codificante per la *PhTrxR*

(*trxB*; ID, 3710321) è stato amplificato mediante PCR, usando come stampo il DNA genomico di *P. haloplanktis* ed i seguenti oligonucleotidi sintetici disegnati sulla base delle sequenze nucleotidiche dei rispettivi geni:

5'd-A₋₁₁GGAAAACAT•ATG•ACT•GAA•GCA•AA₁₄-3' (*primer* diretto)

5'd-A₉₆₁CTTAACAGC•CTC•GAG•ATT•ATC•TAA•A₉₃₆-3' (*primer* inverso)

Negli oligonucleotidi sono stati inseriti sostituzioni nucleotidiche rispetto alla sequenza del genoma, in modo da creare i siti di restrizione *Nde* I nel *primer* dir. e *Xho* I nel *primer* inv. (le basi corrispondenti alle sostituzioni nucleotidiche sono sottolineate). Il prodotto di PCR ottenuto è stato clonato nel plasmide pGEM-T Easy e sequenziato per confermare l'identità con il gene della *PhTrxR*. In seguito a digestione del plasmide ricombinante con *Nde* I e *Xho* I, il frammento di 948 bp, contenente il gene della *PhTrxR*, è stato clonato nel vettore di espressione procariotico pET-22b(+) digerito con gli stessi enzimi di restrizione. Il nuovo costrutto (6312 bp) è stato controllato mediante analisi di restrizione e denominato *vPhTrxR*.

Una identica strategia è stata seguita per l'espressione eterologa del vettore del gene della *PhTrx* (*trxA*; ID 3710320). Gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione del DNA mediante PCR sono stati:

5'd-C₋₁₁GGAGAGCCCAT•ATG•AGC•GAG•AA₁₁-3' (*primer* diretto)

5'd-T₃₃₇•TGT•TTA•AAT•CTC•GAG•ATT•GTT•TTC•T₃₁₂3' (*primer* inverso)

Il frammento di DNA amplificato di 348 bp è stato subclonato nel plasmide pGEM-T Easy e poi clonato nel vettore di espressione procariotico pET-22b(+) utilizzando gli enzimi di restrizione *Nde* I e *Xho* I. Il nuovo costrutto di 5688 bp è stato denominato *vPhTrx*.

2.5 Espressione eterologa e purificazione delle proteine ricombinanti

Con i vettori *vPhTrxR* e *vPhTrx* è stato trasformato il ceppo BL21(DE3) di *E. coli*, contenente il gene della T7 RNA polimerasi sotto il controllo del promotore *lacUV5*. Con l'uso di tale sistema il gene eterologo viene espresso in seguito all'aggiunta nella coltura batterica di IPTG. I trasformanti sono stati cresciuti a 37 °C in due litri di LB contenente ampicillina 0.1 mg/ml fino ad una OD₆₀₀ di 0.6. Alla coltura batterica era poi aggiunto IPTG alla concentrazione di 100 µg/ml e la crescita proseguiva a 37°C fino ad un massimo di 3 ore. Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 5000 rpm per 15 min, risospese in tampone A e lisate nel distruttore cellulare (Constant System Ltd. UK) ad 1.5 kbar. All'omogenato cellulare ottenuto dalla coltura BL21(DE3)/*vPhTrxR* è stato aggiunto 50 µM FAD, per una completa incorporazione di tale cofattore nell'enzima ricombinante. L' omogenato cellulare è stato poi ultracentrifugato a 30000 x g per 1 ora ed il sovrantante (S-30) costituiva l'estratto proteico solubile da cui ottenere le proteine ricombinanti. Utilizzando questo sistema di espressione, l'extrapeptide E•H•H•H•H•H era direttamente fuso ai

residui C-terminali Leu₃₁₆ e Leu₁₀₈ di *P hTrxR* e *P hTrx*, rispettivamente. La presenza della coda di istidine nelle proteine ricombinanti consentiva la loro identificazione mediante immunoblotting con anticorpi anti-istidina nonché la loro rapida purificazione mediante cromatografia di affinità mediante resina Ni-agarosio.

A tale scopo dopo averla dializzata esaustivamente con tampone A, la frazione S-30 è stata incubata per 16 ore a 4°C con 8 ml di resina Ni-NTA Agarosio, precedentemente equilibrata con lo stesso tampone. Tale materiale è stato poi versato in una colonna e la frazione di proteine non legate è stata scartata. La resina è stata poi lavata con tampone A fino al completo azzeramento della OD₂₈₀ (circa 40 volumi di colonna). Successivamente le proteine legate alla resina sono state eluite applicando un gradiente discontinuo di 60 ml di 10 mM, 50 mM e 200 mM imidazolo in tampone A. Dopo aver analizzato le frazioni eluite mediante SDS-PAGE, quelle che contenevano la proteina di interesse in forma omogenea sono state riunite, eventualmente concentrate con Aquacide IIA (Calbiochem), dializzate contro il tampone A con aggiunta di glicerolo 50% (v/v) e conservate infine a -20 °C. Le forme ricombinanti di *PhTrxR* e *PhTrx* sono stata chiamate *rPhTrxR* e *rPhTrx*.

2.6 Produzione di forme mutate di *PhTrxR* contenenti le sostituzioni C₇S, C₁₀₆S e C₃₀₃S

Per mutagenizzare i residui di cisteina in posizione 7, 106 e 303 della *rPhTrxR*, è stato utilizzato il protocollo di amplificazione del kit di mutagenesi sito-specifica della Stratagene, che amplifica l'intero vettore *vPhTrxR* mediante la *Pfu* DNA polimerasi con alta fedeltà. In particolare sono state usate coppie di oligonucleotidi, che ibridizzano nella regione da mutagenizzare e che contengono il disaccoppiamento necessario per creare la mutazione. I codoni delle tre cisteine bersaglio sono stati mutagenizzati in codoni per serina. Qui di seguito sono riportati gli oligonucleotidi impiegati, in cui la base mutata è in carattere minuscolo:

5'-d-G₇AA•GCA•AAA•CAT•aGT•AAG•TTA•CTT•ATT•TTA•GGC₃₉-3'
(C₇S_{dir})

5'-d-G₃₉CC•TAA•AAT•AAG•TAA•CTT•ACT•ATG•TTT•TGC•TTC₇-3'
(C₇S_{rev})

5'-d-G₃₄₀GC•ACT•TAC•ACC•aGT•GAC•GCA•CTA•ATC•ATT•GC₃₇₂-3'
(C₁₀₆S_{dir})

5'-d-G₃₇₂C•AAT•GAT•TAG•TGC•GTC•ACT•GGT•GTA•AGT•GCC₃₄₀-3'
(C₁₀₆S_{rev})

5'-d-G₈₉₂CC•GGA•ACA•GGT•aGT•ATG•GCA•GCA•TTA•GAT•GC₉₂₃-3'
(C₃₀₃S_{dir})

5'-d-G₉₂₃C•ATC•TAA•TGC•TGC•CAT•ACT•ACC•TGT•TCC•GGC₈₉₂-3'
(C₃₀₃S_{rev})

Alla fine dei cicli di amplificazione si ottengono principalmente plasmidi mutati non circolarizzati. L'endonucleasi *Dpn* I, specifica per il DNA metilato o semi-metilato, consente di eliminare il DNA non

mutato in quanto proveniente da ceppi di *E. coli* e quindi dametilato. La miscela così ottenuta è stata utilizzata per trasformare prima le cellule supercompetenti DH5 α della Takara e poi quelle BL21(DE3) di *E. coli*. L'espressione e la procedura di purificazione delle proteine mutate è stata realizzata come già indicato per il vettore *vPhTrxR*.

2.7 Determinazione del contenuto di FAD legato alla *rPhTrxR*

La presenza del cofattore FAD in *rPhTrxR* è stata evidenziata mediante misure di fluorescenza realizzate con lo spettrofluorimetro Cary Eclipse (Varian). In particolare, gli spettri di fluorescenza, realizzati a due lunghezze d'onda di eccitazione (280 nm e 375 nm), sono stati eseguiti su campioni di *rPhTrxR* sia in forma nativa o denaturati in presenza di cloruro di guanidina, anche per verificare le variazioni dei massimi di emissione e delle intensità di fluorescenza.

Al fine di determinare la quantità di FAD legato a varie preparazioni di *rPhTrxR*, i campioni proteici (1.3 – 7.5 μ M) sono stati previamente denaturati mediante incubazione per 16 ore a temperatura ambiente in presenza di cloruro di guanidina 6 M in tampone A. Le misure di intensità di fluorescenza sui campioni proteici denaturati sono state realizzate impiegando come lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente 375 nm e 528 nm; entrambe le fenditure di eccitazione ed emissione erano regolate a 10 nm. La quantità di FAD legata alla proteina è stata determinata per

confronto con una curva standard di riferimento ottenuta da misure di fluorescenza su campioni contenenti concentrazioni note di FAD in soluzione.

2.8 Determinazione delle cisteine mediante dosaggio di Ellman

Per valutare la presenza di residui di cisteina liberi o impegnati in ponti disolfuro in *rPhTrxR* e *rPhTrx*, è stato adoperato il dosaggio di Ellman (Creighton, 1989). Al fine di ottenere la completa riduzione di tutti i residui di cisteina (5 in *rPhTrxR* e 2 in *rPhTrx*, come dedotto dalle sequenze nucleotidiche dei rispettivi geni), soluzioni di *rPhTrxR* e *rPhTrx* alla concentrazione 25 μM sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente in tampone B, contenente cloruro di guanidina 6 M e 50 mM DTT come agente riducente. Tali campioni sono stati poi dializzati contro una soluzione contenente 0.1 M acido acetico e cloruro di guanidina 6 M, sia per allontanare l'eccesso di DTT, sia per stabilizzare i gruppi tiolici liberi in ambiente acido. Per la titolazione del numero di cisteine libere allo stato nativo, i campioni proteici (25 μM) sono stati invece incubati per 30 minuti a temperatura ambiente in tampone B, contenente cloruro di guanidina 6 M. Aliquote di tutti questi campioni proteici sono state diluite a 2.5 – 9 μM di proteina in presenza di 0.15 mM DTNB (reattivo di Ellman) in tampone B contenente cloruro di guanidina 6 M. La determinazione del contenuto di cisteine è stata effettuata determinando l'aumento di assorbanza a

412 nm, dovuto alla formazione di acido 2-nitro-5-tiobenzico (TNB), avente una $\epsilon_M = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.9 Dosaggi enzimatici

Tutti i dosaggi enzimatici sono stati eseguiti con uno spettrofotometro Varian, mod. Cary 1E, corredato di sistema elettronico per il controllo della temperatura e portacelle fino a 12 posizioni.

2.9.1 Attività tioredossina riduttasica

L'attività tioredossina riduttasica della *rPhTrxR* è stata valutata attraverso la riduzione del DTNB, un substrato sintetico della *rPhTrxR* che, in presenza di NADPH come donatore di elettroni, viene ridotto a 2 molecole di TNB (Holmgren and Björnstedt, 1995). La miscela di reazione (volume finale 1 ml), contenente 5 mM DTNB e diverse aliquote di *rPhTrxR* in tampone C, era alloggiata in una cuvetta all'interno dello spettrofotometro termostato. La reazione iniziava con l'aggiunta di NADPH alla concentrazione finale di 200 μM , seguendo l'incremento di assorbanza a 412 nm nell'arco di tempo di due minuti. In tal modo era possibile determinare la velocità iniziale della reazione ($\Delta A_{412}/\text{min}$) nell'intervallo lineare dell'incremento. Una unità di attività tioredossina riduttasica è definita come l'ammontare di enzima che causa la conversione di 1 μmole di DTNB per minuto. L'attività specifica della *rPhTrxR* è quindi espressa come U/mg.

Per valutare i parametri cinetici della reazione di riduzione del DTNB da parte della *rPhTrxR*, nonché la termofilicità del flavoenzima psicrofilo, la reazione era effettuata a diverse temperature (10 – 40°C) ed in presenza di concentrazioni crescenti (0.4 – 5.0 mM) di DTNB. I valori di V_{\max} e di K_m per il substrato DTNB sono stati ricavati dall'allineamento dei dati di attività ottenuti alle varie temperature secondo “plots” dei doppi reciproci di Lineweaver-Burk.

2.9.2 Funzionalità della tioredossina

L'attività della *rPhTrx* è stata valutata mediante dosaggio nefelometrico di riduzione dell'insulina umana in presenza di DTT come donatore di elettroni (Holmgren, 1979a). Il dosaggio si basa sulla rottura del ponte disolfuro che lega le catene α e β dell'insulina e che causa il rilascio della catena β insolubile. Ciò provoca torbidità nella soluzione, che può essere valutata spettrofotometricamente misurando la velocità con cui aumenta l'assorbanza del campione a 650 nm. La miscela di reazione (volume finale 1 ml), contenente 0.13 mM insulina umana e 0.5 – 10 μ M *rPhTrx*, anche in questo caso era alloggiata in una cuvetta all'interno dello spettrofotometro termostato. La reazione iniziava con l'aggiunta di DTT ad una concentrazione finale di 200 μ M. L'attività era poi direttamente espressa attraverso il valore $\Delta A_{650}/\text{min}$.

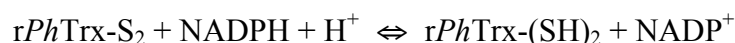
2.9.3 Attività del sistema completo della tioredossina

Per valutare la funzionalità del sistema ricostituito della tioredossina contenente *rPhTrxR* e *rPhTrx* è stato adoperato il

dosaggio nefelometrico di riduzione dell'insulina in presenza di NADPH come donatore di elettroni (Holmgren, 1979b; Spyrou et al., 1997). In questo caso la *rPhTrxR* accetta gli elettroni dal NADPH e li dona poi alla *rPhTrx*, che a sua volta li trasferisce all'insulina, provocando la riduzione del ponte disolfuro e la conseguente precipitazione. La miscela di reazione (volume finale 1 ml) conteneva 0.13 mM insulina umana, 1 μ M *rPhTrxR* e 1 – 10 μ M *rPhTrx* in tampone C ed era contenuta in una cuvetta alloggiata nello spettrofotometro termostato. La reazione iniziava con l'aggiunta di NADPH alla concentrazione finale di 200 μ M. L'attività, misurata seguendo la precipitazione dell'insulina, è direttamente espressa dal valore $\Delta A_{650}/\text{min}$.

2.10 Potenziale redox del sistema della tioredossina

Per determinare il potenziale redox del sistema ricostituito della tioredossina, è stata verificata la reversibilità della riduzione della *rPhTrx* in assenza di insulina. Lo schema di reazione catalizzata dalla *rPhTrxR* in presenza di NADPH è qui di seguito riportato:



in cui *rPhTrx-S₂* e *rPhTrx-(SH)₂* corrispondono rispettivamente allo stato ossidato e ridotto della *rPhTrx*. Il dosaggio, realizzato secondo quanto descritto in Jeon et al., 2002, è stato eseguito sia a 10°C che a 25°C. La miscela di reazione (volume finale 1 ml) conteneva 10 – 25 μ M *rPhTrx* (nella sua forma iniziale *rPhTrx-S₂*) e 50 μ M NADPH in

tampone C. La reazione iniziava con l'aggiunta di 50 nM *rPhTrxR* ed era seguita spettrofotometricamente mediante misure di assorbanza a 340 nm del NADPH ($\epsilon_M = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Nel primo stadio della reazione si verificava un decremento di A_{340} dovuto al consumo di NADPH, che era stechiometricamente equivalente alla quantità di *rPhTrx*-(SH)₂ formata. Quando la reazione raggiungeva un equilibrio, si aggiungeva un eccesso di NADP⁺ (1200 μM), che dava inizio alla reazione inversa di riformazione di *rPhTrx*-S₂, misurata attraverso la rigenerazione del NADPH. Dopo alcuni minuti, si raggiungeva un nuovo equilibrio e le concentrazioni di *rPhTrx*-S₂, *rPhTrx*-(SH)₂, NADPH e NADP⁺ presenti all'equilibrio sono state utilizzate per calcolare il potenziale redox della tioredossina secondo l'equazione di Nernst:

$$E_{0'}^{(rPhTrx)} = E_{0'}^{(NADP^+)} + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \times \ln \frac{[NADP^+] \cdot [rPhTrx-(SH)_2]}{[NADPH] \cdot [rPhTrx-S_2]}$$

utilizzando -0.324 V come valore di $E_{0'}^{(NADP^+)}$ (Loach, 1976).

2.11 Inattivazione termica

La termostabilità delle proteine ricombinanti è stata valutata mediante profili di inattivazione termica. Aliquote di 100 μl di una soluzione 0.3 mg/ml di *rPhTrxR* o *rPhTrx* in tampone A sono state incubate per 10 min a diverse temperature comprese tra 0 e 75°C per la *rPhTrxR* e tra 0 e 95°C per la *rPhTrx*. I campioni proteici sono poi stati rapidamente raffreddati in ghiaccio e, dopo aver atteso almeno 30

minuti, è stata dosata la loro attività residua a 25°C. In particolare per la rPhTrxR è stato utilizzato il dosaggio di riduzione del DTNB, mentre per la rPhTrx si è adoperato il dosaggio di riduzione dell'insulina in presenza di DTT come donatore di elettroni. I valori di attività residua sono stati confrontati con quelli di campioni proteici non trattati ed espressi come percentuale. I valori di attività residua sono stati riportati in grafico in funzione della temperatura di incubazione per costruire un profilo di inattivazione termica. La temperatura di semi-inattivazione ($T_{1/2}$), ricavata mediante estrapolazione grafica, è la temperatura a cui l'attività residua si riduceva al 50%.

Per la rPhTrx è stata anche effettuata una cinetica di inattivazione termica alla temperatura di 95°C. A tale scopo una soluzione di rPhTrx 0.3 mg/ml è stata incubata a 95°C in tampone A; da questa soluzione sono state prelevate aliquote di 100 µl a tempi crescenti sulle quali, dopo averle raffreddate in ghiaccio, è stata misurata l'attività residua mediante il dosaggio di riduzione dell'insulina in presenza di DTT.

2.12 Denaturazione termica

La termostabilità di rPhTrxR e rPhTrx è stata valutata anche mediante profili di denaturazione termica realizzati attraverso misure di assorbanza o fluorescenza, adoperando la strumentazione ottica previamente descritta. Il profilo di denaturazione termica della

rPhTrxR è stato eseguito mediante misure di fluorescenza, adoperando diverse combinazioni di lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione. La cuvetta da 500 μ l, contenente una soluzione di *rPhTrxR* 0.13 mg/ml in tampone A, era alloggiata nello spettrofluorimetro e l'incremento di temperatura era regolato a 0.2°C/min; i valori di fluorescenza erano registrati ad ogni incremento di 0.5°C; l'intervallo di temperatura utilizzato è stato di 10 – 75°C.

Per la *rPhTrx* il profilo di denaturazione termica è stato realizzato attraverso misure di assorbanza UV, considerando la differenza $A_{286}-A_{274}$, secondo quanto precedentemente riportato (Lapanje, 1978; Arcari et al., 1999). A tale scopo si preparavano due aliquote di una soluzione di *rPhTrx* 0.13 mg/ml disciolte in 1 ml rispettivamente di tampone A o tampone A contenente 0.2 mM DTT. Dopo aver incubato per 30 min a temperatura ambiente in cuvette da 1 ml, la denaturazione termica dei due diversi campioni era analizzata nell'intervallo di temperatura 10 – 95°C; incremento di temperatura e registrazione dei valori di assorbanza erano come già descritti per la *rPhTrxR*.

2.13 Analisi di Spettrometria di massa

Gli esperimenti sono stati condotti in collaborazione con il Dipartimento di Scienze della Vita della II Università di Napoli. La massa molecolare relativa (M_r) della *rPhTrxR* e *rPhTrx* sono state determinate mediante lo spettrometro di massa Q-TOF *Micro* (Waters,

Milford, MA, USA) collegato ad un sistema CapLC. I campioni di proteina erano desalificati mediante RP-HPLC, prima di procedere all'analisi. Acquisizione e deconvoluzione dei dati sono state effettuate su un PC Mass Lynx Windows NT.

2.14 S-glutationilazione della *PhTrxR*

Campioni di r*PhTrxR* o di sue forme mutate (0.23 mg/ml in tampone A) sono stati incubati a temperatura ambiente per 1 ora in presenza di diverse concentrazioni delle tra forme del glutatione (ridotto, GSH; ossidato, GSSG; nitrosilato, GSNO). L'eccesso di reagente e il glutatione ridotto formatosi durante la reazione erano allontanati mediante ultrafiltrazione con Microcon-3 (Amicon). I campioni erano poi sottoposti a dosaggio di attività ed analisi mediante Western blotting.

2.15 Analisi mediante Western blot

I campioni proteici, incubati con glutatione e purificati mediante Microcon-3, erano analizzati mediante SDS-PAGE e poi trasferiti su membrana Immobilon P (Millipore) mediante il sistema Mini Trans Blot (Bio-Rad) in tampone Tris•Cl 20 mM, glicina 160 mM, pH 8,3, contenente metanolo 10% (v/v). Il filtro era incubato per 1 ora a temperatura ambiente in tampone PBS contenente latte in polvere 5% (p/v) e poi per tutta la notte a 4 °C con l'anticorpo monoclonale anti-glutatione (Chemicon), diluito 1:3000 in PBS, contenente latte 2%

(p/v). Il filtro era quindi lavato più volte in PBS contenente Tween-20 0.05% (v/v) ed infine incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (diluizione 1:20000) "goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz). Il segnale di chemiluminescenza è stato visualizzato mediante il kit SuperSignal West Pico.

2.16 Altri metodi

La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante il metodo di Bradford (Bradford 1976), utilizzando come riferimento l'albumina di siero bovino. La purezza delle proteine è stata valutata mediante SDS-PAGE come descritto in Laemmli 1970. Gli esperimenti di immunoblotting per l'identificazione delle proteine ricombinanti con la coda di istidine sono stati eseguiti mediante l'utilizzo di anticorpi anti-istidina (Santa-Cruz). La struttura quaternaria della *rPhTrxR* è stata valutata mediante cromatografia per gel filtrazione su colonna Superdex 75 10/300.

RISULTATI

3.1 Espressione e purificazione di *rPhTrxR* e *rPhTrx*

I geni codificanti *PhTrxR* e *PhTrx* sono stati espressi nel ceppo ospite di *E.coli* BL21(DE3), utilizzando come vettore di espressione pET-22b(+). Entrambi i componenti del sistema della tioredossina sono stati prodotti come proteine ricombinanti fuse ad una coda di sei istidine.

Da colture di BL21(DE3)/*vPhTrxR*, cresciute come descritto nei Materiali e Metodi, sono stati preparati gli estratti proteici totali ed analizzati mediante SDS-PAGE (Fig. 2).

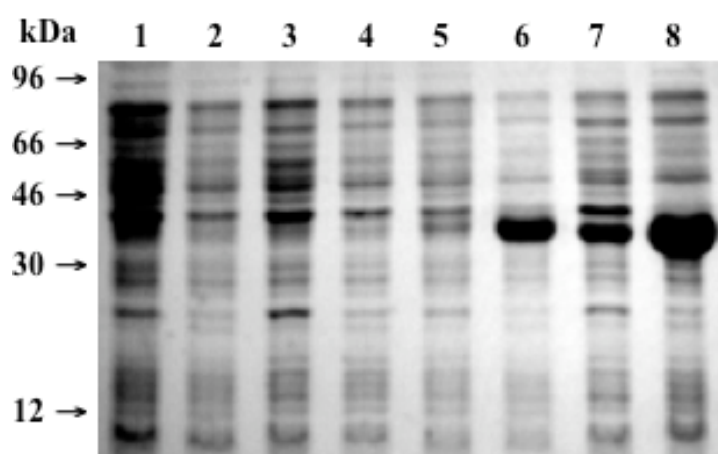


Fig. 2. SDS-PAGE di estratti proteici totali da colture di BL21(DE3) trasformate con *pET-22b(+)* o *vPhTrxR*; induzione con IPTG

1, BL21(DE3)/pET-22b(+) (1h); 2, BL21(DE3)/pET-22b(+) + IPTG (1h); 3, BL21(DE3)/pET-22b(+) (3h); 4, BL21(DE3)/pET-22b(+) + IPTG (3h); 5, BL21(DE3)/*vPhTrxR* (1h); 6, BL21(DE3)/*vPhTrxR* + IPTG (1h); 7, BL21(DE3)/*vPhTrxR* (3h); 8, BL21(DE3)/*vPhTrxR* + IPTG (3h).

Dalla Fig. 2 emerge che la massima espressione del gene della *PhTrxR* si osserva dopo 3 ore di induzione con IPTG, anche se la maggiore differenza tra campione indotto e non indotto si evidenzia già dopo 1 ora di induzione. Quest'ultimo tempo è stato preferito nella preparazione della *rPhTrxR* in forma omogenea, in quanto parte del prodotto di espressione dopo induzione per 3 ore veniva ritrovato nella frazione proteica insolubile; inoltre, anche la successiva procedura di purificazione risultava più efficace partendo dall'estratto proteico dopo induzione per un'ora.

La purificazione della *rPhTrxR* dalla frazione proteica solubile S-30 della coltura di BL21(DE3)/*vPhTrxR* indotta per un'ora con IPTG è stata realizzata mediante cromatografia per affinità su Ni-NTA Agarosio, come descritto in Materiali e Metodi. In particolare, parte della proteina ricombinante era già eluita dalla colonna con 10 mM imidazolo•Cl in tampone A, ma presentava alcune proteine contaminanti ad alto peso molecolare. Invece, la maggior parte di *rPhTrxR* era eluita in forma omogenea con 50 mM imidazolo•Cl in tampone A. Le frazioni omogenee sono state riunite e dializzate contro tampone A, contenente 50% (v/v) glicerolo. La quantità di *rPhTrxR* purificata da 2 litri di coltura batterica è stata di circa 25 mg.

Una strategia simile è stata utilizzata per la purificazione della *rPhTrx*. Anche in questo caso dalle colture cresciute a tempi diversi dall'induzione (1 o 3 ore) sono stati preparati gli estratti proteici totali per l'analisi mediante SDS-PAGE (Fig. 3). La maggiore quantità di prodotto di espressione era ottenuta dopo 3 ore di induzione con IPTG, ma la maggiore

differenza tra coltura indotta e non indotta si aveva dopo 1 ora di induzione. Tuttavia, diversamente da *rPhTrxR*, per la purificazione della *rPhTrx* si è preferito partire dalla coltura indotta per 3 ore, in quanto in questo caso il prodotto di espressione rimaneva essenzialmente nella frazione proteica solubile.

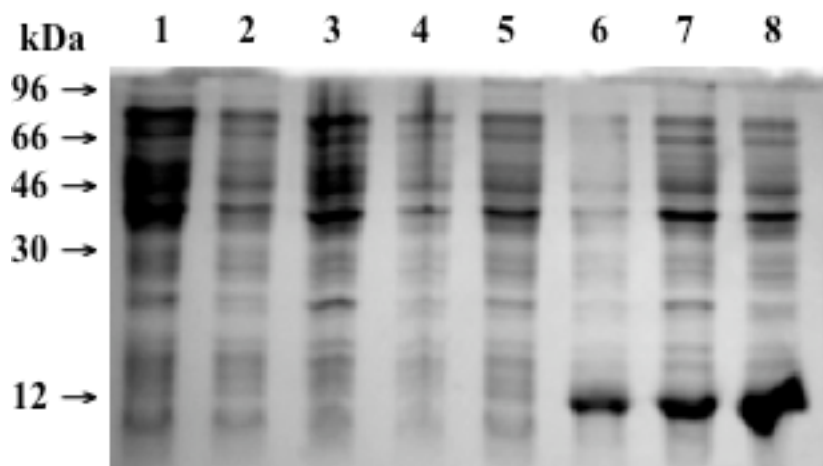


Fig. 3. SDS-PAGE di estratti proteici totali da colture di BL21(DE3) trasformate con o pET-22b(+) o vPhTrx; induzione con IPTG

1, BL21(DE3)/pET-22b(+) (1h); 2, BL21(DE3)/pET-22b(+) + IPTG (1h); 3, BL21(DE3)/pET-22b(+) (3h); 4, BL21(DE3)/pET-22b(+) + IPTG (3h); 5, BL21(DE3)/vPhTrx (1h); 6, BL21(DE3)/vPhTrx + IPTG (1h); 7, BL21(DE3)/vPhTrx (3h); 8, BL21(DE3)/vPhTrx + IPTG (3h).

Anche la purificazione della *rPhTrx* è stata realizzata mediante cromatografia su Ni-NTA agarosio; in questo caso la proteina ricombinante è stata eluita completamente con 20 mM imidazolo•Cl in Tampone A. La quantità totale di *rPhTrx* ottenuta da 2 L di coltura è risultata essere di circa 15 mg.

3.2 Proprietà molecolari di *rPhTrxR* e *rPhTrx*

L'analisi mediante SDS-PAGE di tre diverse quantità dei campioni di *rPhTrxR* e *rPhTrx* purificati è mostrata in Fig. 4. Entrambi i prodotti purificati sono risultati omogenei a questo tipo di analisi; essi inoltre possiedono una mobilità elettroforetica di 34 kDa per la *rPhTrxR* e di 12 kDa per la *rPhTrx*.

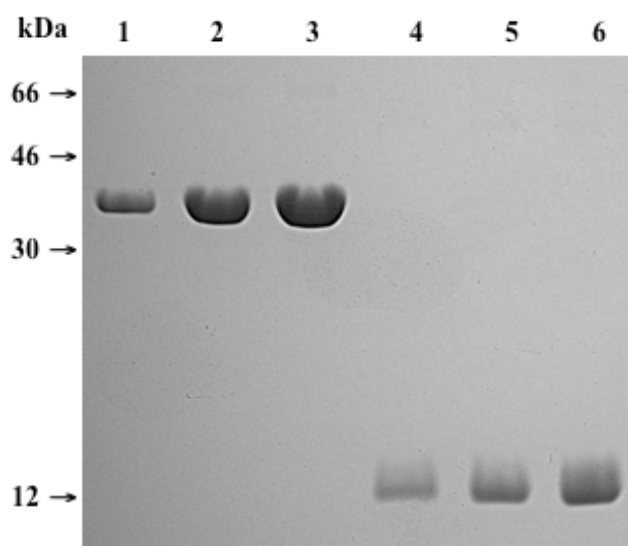


Fig. 4. SDS-PAGE di *rPhTrxR* e *rPhTrx* purificate

Pozzetti 1–3, rispettivamente 2, 4 e 6 μg di *rPhTrxR*; pozzetti 4–6, rispettivamente 5, 10 e 15 μg di *rPhTrx*.

In collaborazione con la Seconda Università di Napoli, la massa molare dei due prodotti di espressione è stata anche determinata mediante spettrometria di massa/elettrospray (Fig. 5). In particolare per la *rPhTrxR* sono stati ottenuti due picchi (Fig. 5A). Quello con massa maggiore

(34732,39 Da) è in ottimo accordo con la massa molare teorica (34731,94 Da) della *rPhTrxR* dedotta dalla sua sequenza amminoacidica, considerando sia l'extrapeptide fuso al residuo C-terminale che un ponte disolfuro; l'altro picco (34601,17 Da) è spiegabile con la perdita della metionina iniziale (132 Da) in parte del campione ricombinante.

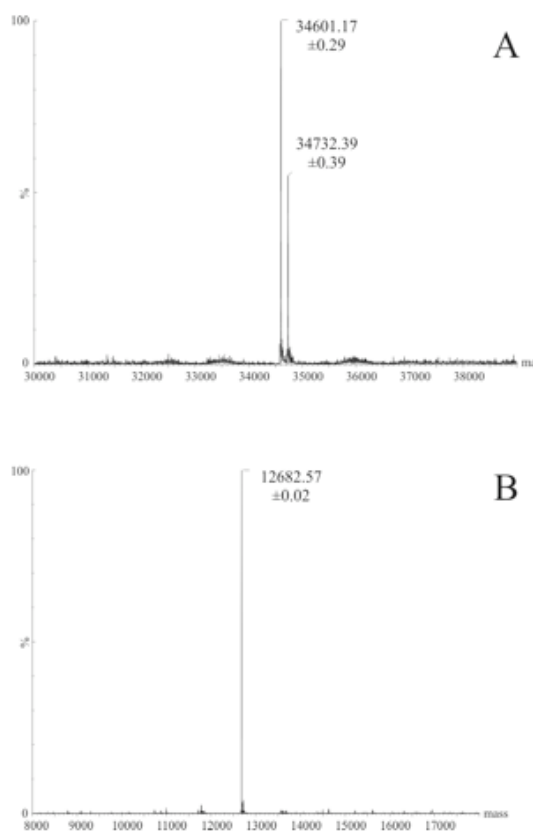


Fig. 5. Analisi mediante spettrometria di massa ESI/Q-TOF di *rPhTrxR* (A) e *rPhTrx* (B) desalificate mediante RP-HPLC

Per la *rPhTrx* si è invece ottenuto un unico picco di massa molare 12682,57 Da; tale massa è essenzialmente coincidente con quella teorica di 12683,43 Da, incluso l'extrapeptide ed il ponte disolfuro, ma senza metionina iniziale (Fig. 5B). Nonostante la microeterogeneità riscontrata nel campione di *rPhTrxR*, questi dati confermano che i prodotti di espressione purificati costituiscono le forme ricombinanti dei due componenti del sistema della tioredossina in *P. haloplanktis*.

La massa molare di *rPhTrxR* e *rPhTrx* è stata anche determinata in condizioni native mediante gel-filtrazione su colonna di Superdex 75. *rPhTrxR* eluiva come un singolo picco di massa molare apparente di 70 kDa; si è pertanto concluso che *rPhTrxR* possiede un'organizzazione omodimerica, tipica di tutte le tioredossine riduttasi. Viceversa, il tempo di eluizione di *rPhTrx* corrispondeva ad una massa molare di 12 kDa; quindi la *rPhTrx* si comporta come monomero.

3.3 Determinazione del contenuto di FAD nella *rPhTrxR*

Le tioredossine riduttasi sono flavoenzimi in quanto possiedono una molecola di FAD strettamente legata a ciascuna subunità proteica. Al fine di verificare la presenza di questo coenzima anche nella *rPhTrxR*, sono stati eseguiti spettri di fluorescenza su varie preparazioni di campione proteico purificato, usando come lunghezze d'onda di eccitazione sia 280 nm che 375 nm. La presenza di FAD in *rPhTrxR* è provata dall'emissione con massimo a 519 nm, caratteristico delle flavoproteine.

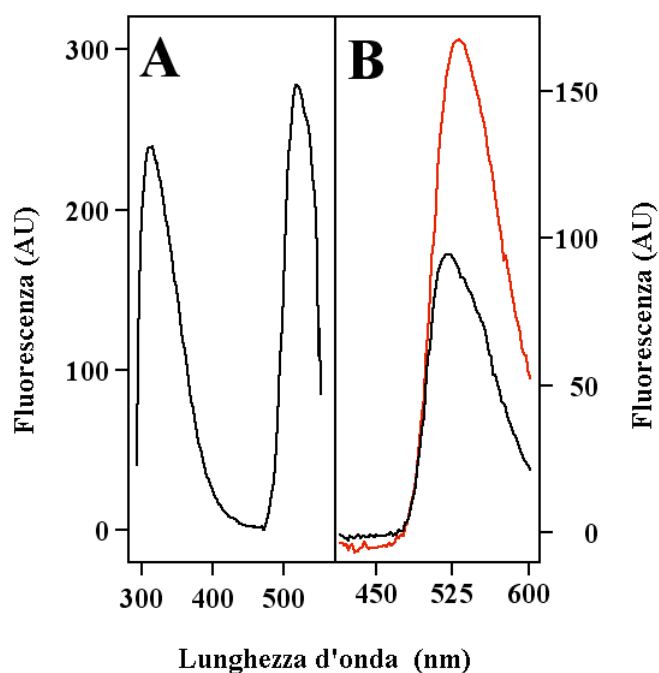


Fig. 6. Spettri di fluorescenza di rPhTrxR eccitando a 280 nm (A) e 375 nm (B)

La fluorescenza della soluzione 0,19 mg/ml di rPhTrxR in tampone A è stata misurata prima (linea nera) o dopo denaturazione con guanidina•Cl 6 M (linea rossa).

L'emissione flavinica è riscontrata, anche se con diversa intensità, eccitando il campione sia a 280 nm (Fig. 6A) che a 375 nm (Fig. 6B). È noto che le tipiche lunghezze d'onda per l'eccitazione del FAD sono 375 o 450 nm, mentre quella per l'eccitazione dei residui aromatici delle proteine è di 280 nm. Dal momento che l'emissione a 519 nm è ottenuta anche eccitando a 280 nm, si può concludere che all'interno della rPhTrxR avvenga un "fluorescence resonance energy transfer" tra i residui aromatici

ed il FAD legato alla proteina. La fluorescenza di *rPhTrxR* è stata valutata anche dopo denaturazione del campione proteico a temperatura ambiente per 16 ore in presenza di cloruro di guanidina 6 M. In particolare, dallo spettro di fluorescenza del campione denaturato eccitando a 375 nm, è emerso che il massimo di emissione si spostava da 519 a 528 nm, con un significativo incremento dell'intensità di fluorescenza rispetto al campione non denaturato (Fig.6B). La posizione del massimo di emissione dopo denaturazione indica la completa esposizione del FAD al solvente; infatti, una soluzione di FAD libero possiede proprio un massimo di emissione a 528 nm.

Al fine di determinare il contenuto di FAD in varie preparazioni di *rPhTrxR*, aliquote contenenti diverse concentrazioni di tali campioni sono state denaturate in presenza di cloruro di guanidina 6 M. Sui campioni denaturati è stata poi misurata l'intensità di emissione a 528 nm, eccitando a 375 nm. In Fig. 7 è mostrata l'emissione di concentrazioni crescenti di tre diverse preparazioni di *rPhTrxR*, nonché quella di concentrazioni note di FAD libero. Per tutti i campioni proteici l'emissione risultava direttamente proporzionale alla concentrazione proteica. Pertanto, dal confronto con la curva del FAD libero di riferimento, è stato possibile determinare la quantità di FAD legato alle tre preparazioni di *rPhTrxR*. Il rapporto FAD/subunità (mol/mol) è stato di 0.39 per la preparazione proteica ottenuta senza aggiunta di FAD esogeno durante la lisi cellulare. Invece gli altri due campioni proteici, ottenuti in seguito all'aggiunta di 50 μ M FAD durante la lisi cellulare, mostravano un rapporto FAD/subunità di 0.92 e 0.98, valori

prossimi a quello teorico unitario. Per tale motivo l'aggiunta di FAD esogeno si è rivelato un passaggio critico per la completa incorporazione del cofattore nel flavoenzima eterologo purificato.

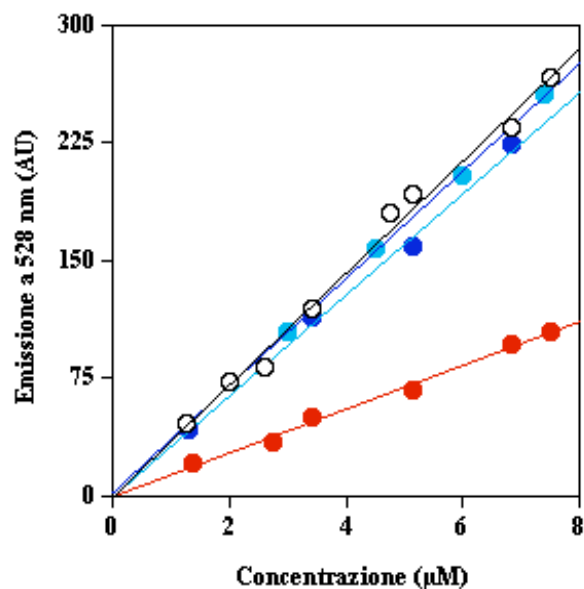


Fig.7. Dosaggio del contenuto di FAD in rPhTrxR

Intensità di fluorescenza a 528 nm di concentrazioni crescenti di FAD libero (○) e di tre diverse preparazioni di rPhTrxR (●, ●, ●) denaturate con guanidina•Cl 6 M in tampone A. ●, rPhTrxR purificata in assenza di FAD esogeno; ● e ●, campioni di rPhTrxR purificati con aggiunta di 50 µM FAD esogeno.

3.4 Determinazione delle cisteine mediante dosaggio di Ellman

Nella sequenza amminoacidica di rPhTrxR e rPhTrx ci sono rispettivamente 5 e 2 residui di cisteina (Medigue et al., 2005). Durante il processo di purificazione non sono stati utilizzati agenti riducenti e quindi i prodotti ricombinanti sono stati putativamente purificati nel loro stato nativo

con il ponte disolfuro intracatena all'interno della canonica sequenza di consenso CXXC. Nel loro stato ossidato *rPhTrxR* e *rPhTrx* si trovano in forma attiva, che può essere convertita nella corrispondente forma inattiva attraverso la riduzione del ponte disolfuro a due residui di cisteina. L'alternanza tra stato ossidato (S—S) e stato ridotto (SH)₂ è cruciale per l'attività di entrambe le proteine. Per determinare il contenuto totale di cisteine e la presenza di ponti disolfuro, si è impiegato il dosaggio di Ellman determinando il numero di cisteine nello stato ossidato e ridotto di entrambe le proteine. I risultati ottenuti sulle forme ossidate indicano la presenza di 2.8 cisteine/subunità per *rPhTrxR* e nessuna cisteina per *rPhTrx*. Invece nello stato ridotto sono state evidenziate 4.7 cisteine/subunità per *rPhTrxR* e 1.7 cisteine/subunità per *rPhTrx*. Questi dati sono in accordo con il numero totale di residui di cisteina posseduto dalle due proteine ricombinanti e suggeriscono la formazione di un unico ponte disolfuro nella *rPhTrxR*. Le rimanenti 3 cisteine sono quindi presenti sotto forma di gruppi tiolici liberi.

3.5 Attività tioredossina riduttasica della *rPhTrxR*

L'attività tioredossina riduttasica della *rPhTrxR* è stata determinata mediante il dosaggio di riduzione del DTNB, un substrato sintetico delle tioredossine riduttasi. L'attività specifica di un campione proteico era determinata da misure in triplicato effettuate con concentrazioni crescenti di *rPhTrxR* (0.07 – 0.2 μM) in presenza di 5 mM DTNB. In tali condizioni la velocità di riduzione del DTNB era proporzionale alla concentrazione di flavoenzima. Dal confronto delle attività specifiche di diverse preparazioni

di *rPhTrxR*, si è constatato che il contenuto di FAD legato all'enzima influenza notevolmente l'attività specifica della *rPhTrxR*. Infatti, la preparazione con il rapporto FAD/subunità proteica di 0.39 aveva un'attività specifica circa 5 volte inferiore a quelle di campioni proteici con un rapporto prossimo all'unità. Per tale motivo negli esperimenti successivi è stato utilizzato il campione con il rapporto FAD/subunità di 0.98, preparato con l'aggiunta di FAD esogeno durante la lisi cellulare.

Per determinare i parametri cinetici della reazione di riduzione del DTNB da parte della *rPhTrxR*, tale reazione è stata eseguita in presenza di concentrazioni crescenti di DTNB. Inoltre, per valutare la termofilicità del flavoenzima psicrofilo, la reazione è stata effettuata nell'intervallo di temperatura 10 – 40°C. A tutte le temperature i dati di attività seguivano l'equazione di Michaelis & Menten, un requisito indispensabile per ricavare i parametri cinetici della reazione. Dai "plots" dei doppi reciproci ottenuti alle varie temperature sono stati ricavati i valori di V_{\max} (U/mg) e di K_m (mM) per il substrato DTNB (Tabella 1). Dai dati si evidenzia la significativa attività del flavoenzima già a 10°C. Inoltre i valori di V_{\max} aumentano lievemente fino a circa 30°C per poi diminuire al di là di tale temperatura; la scarsa dipendenza dalla temperatura è anche rilevabile dal rapporto V_{\max} a 30°C/ V_{\max} 10°C uguale a 2.1. Per quanto riguarda l'affinità dell'enzima per il substrato DTNB, si nota che i valori di K_m sono abbastanza costanti, almeno nell'intervallo 10 – 30°C. Dai valori di V_{\max} sono stati poi calcolati le k_{cat} , da cui è stato possibile ricavare l'efficienza catalitica della *rPhTrxR*, misurata attraverso il rapporto k_{cat}/K_m . Anche in

questo caso l'efficienza catalitica è solo debolmente influenzata dalla temperatura; infatti il rapporto tra i valore ottenuto a 30°C e quello a 10°C è solo 1.9. La significativa attività misurata a basse temperature e la scarsa termofilicità della *rPhTrxR* sono una tipica caratteristica relativa all'adattamento psicrofilo del flavoenzima.

Temperatura (°C)	V _{max} (U/mg)	K _m per il DTNB (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ •mM ⁻¹)
10.0	3.26	1.39	3.78	2.72
12.5	3.53	1.01	4.09	4.03
15.0	4.43	1.82	5.13	2.81
17.5	5.74	2.18	6.65	3.05
20.0	5.96	1.90	6.90	3.64
22.5	5.83	2.27	6.74	2.97
25.0	6.27	1.73	7.26	4.19
27.5	6.90	2.33	7.99	3.42
30.0	6.99	1.61	8.10	5.04
35.0	6.43	1.44	7.44	5.17
40.0	5.34	0.94	6.18	6.58

Tab. 1. Effetto della temperatura sui parametri cinetici della riduzione del DTNB da parte di *rPhTrxR*

3.6 Attività della *rPhTrx*

La funzionalità della *rPhTrx* è stata valutata mediante il dosaggio nefelometrico di riduzione dell'insulina nell'intervallo di temperatura 10 – 40 °C, utilizzando DTT come donatore di elettroni e insulina umana come substrato. In Fig. 8 è riportato il decorso della reazione di precipitazione

dell'insulina a 10°C in presenza di concentrazioni crescenti di rPhTrx. La velocità di riduzione dell'insulina aumenta al crescere della concentrazione di rPhTrx; inoltre, in concomitanza con l'aumento di velocità, decresce il tempo di latenza per osservare l'inizio della precipitazione dell'insulina.

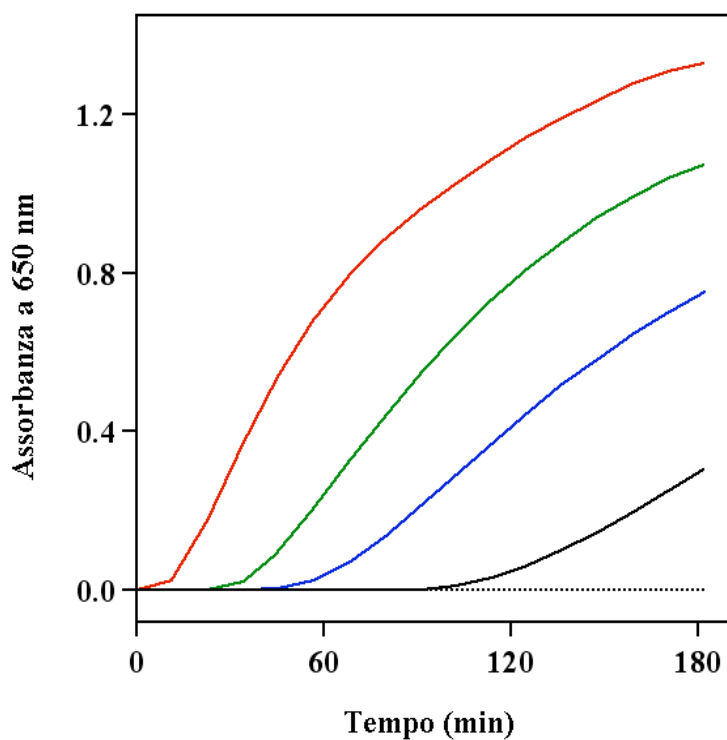


Fig. 8. Dosaggio di riduzione dell'insulina a 10°C da parte della rPhTrx in presenza di DTT

Decorso della reazione in presenza di rPhTrx alla concentrazione di 0.56 μM (linea nera continua), 1.12 μM (linea blu), 2.24 μM (linea verde), 5.60 μM (linea rossa); decorso della reazione in assenza di rPhTrx (linea nera tratteggiata).

I risultati ottenuti indicano che la *rPhTrx* possiede una significativa attività a basse temperature, un requisito indispensabile per una proteina psicrofila. Mediante “*plots*” dei doppi reciproci ($1/v$ vs. $1/[rPhTrx]$), è stata ricavata la V_{max} apparente della reazione. Tra 10 e 30 °C il valore di V_{max} aumenta progressivamente da $0.0295 \Delta A_{650} \cdot \text{min}^{-1}$ a $0.111 \Delta A_{650} \cdot \text{min}^{-1}$. La V_{max} continua ad aumentare fino a 35°C per poi diminuire. Il rapporto tra i valori a 30 e 10 °C è di 3.8, significativamente più alto rispetto a quello di 2,1 riferito all’attività della *rPhTrxR*. Appare quindi che la *rPhTrx* possieda una maggiore termofilicità rispetto alla *rPhTrxR*.

3.7 Termofilicità di *rPhTrxR* e *rPhTrx*

La differente termofilicità di *rPhTrxR* e *rPhTrx* è stata valutata attraverso il plot di Arrhenius (Fig. 9). A tale scopo, per la *rPhTrxR* i valori di k_{cat} ottenuti nell’intervallo di temperatura 10 – 40°C sono stati trattati secondo l’equazione di Arrhenius ($\ln k_{cat} = \ln A - E_a/R \times 1/T$) al fine di ricavare l’energia di attivazione (E_a) della reazione di riduzione del DTNB da parte della *rPhTrxR* (Fig. 9A). I dati mostrano un andamento lineare nell’intervallo 10 – 27.5°C, consentendo così di ricavare un valore di E_a pari a 30.3 kJ/mol. Sono stati calcolati anche i parametri termodinamici a 10°C ($\Delta H^* = 28.0$ kJ/mol; $\Delta S^* = -231$ J/mol·°K; $\Delta G^* = 93.3$ kJ/mol). Pertanto nell’attività di riduzione del DTNB catalizzata dalla *rPhTrxR* il fattore entalpico abbastanza favorevole è contrapposto ad un fattore entropico abbastanza sfavorevole.

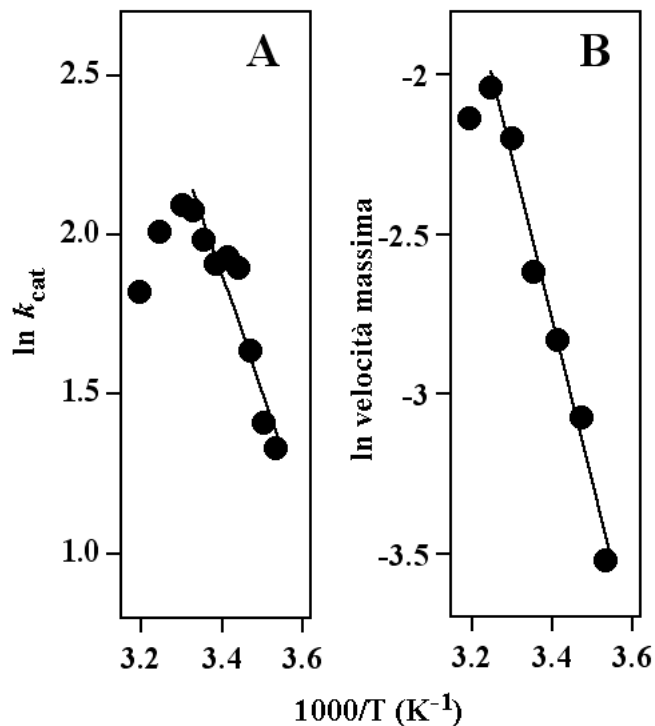


Fig. 9. Plot di Arrhenius delle attività di *rPhTrxR* (A) e *rPhTrx* (B)

Nel plot di Arrhenius di *rPhTrx* si evidenzia un andamento lineare dei valori di $\ln V_{max}$ nell'intervallo di temperatura 10 – 35°C (Fig. 9B). Il valore di E_a di *rPhTrx* (42.5 kJ/mol) è quindi più elevato rispetto a quello calcolato per *rPhTrxR*. Questo dato conferma la maggiore termofilicità della *rPhTrx*, che quindi sembra mostrare una minore caratteristica psicrofila.

3.8 Attività del sistema completo della tioredossina

Al fine di indagare sulla funzionalità del sistema completo della tioredossina, il dosaggio nefelometrico di riduzione dell'insulina da parte

della *rPhTrx* è stato realizzato in presenza di una concentrazione fissa di *rPhTrxR*, sostituendo il DTT con il NADPH come donatore di elettroni. In Fig. 10 è mostrata l'attività a 10°C del sistema ricostituito della tioredossina, da cui si evince che la velocità di precipitazione dell'insulina aumenta al crescere della [*rPhTrx*].

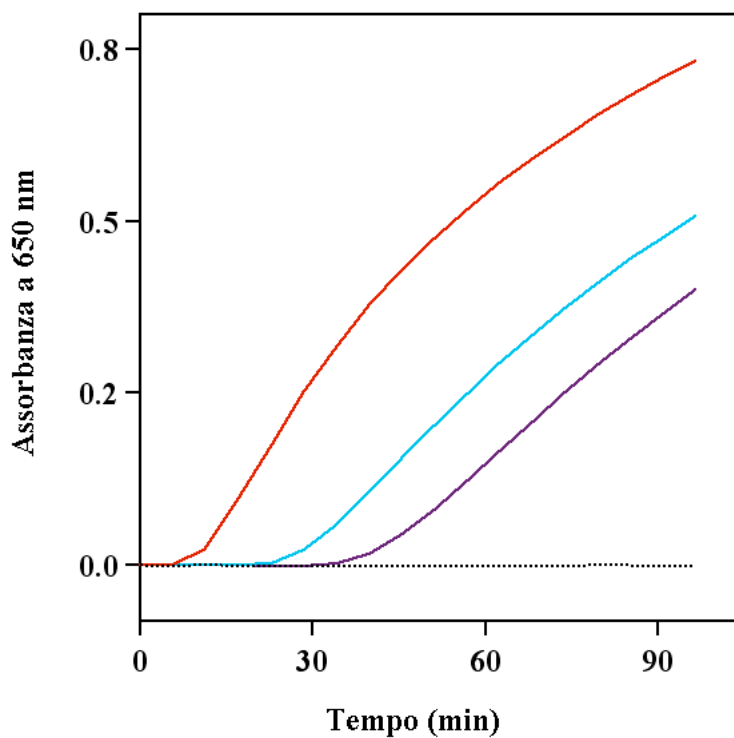


Fig. 10. Dosaggio di riduzione dell'insulina a 10°C da parte del sistema completo ricostituito della tioredossina

Decorso della reazione in presenza di *rPhTrx* alla concentrazione di 0.56 μM (linea viola), 0.84 μM (linea turchese), 2.24 μM (linea rossa); decorso della reazione in assenza di *rPhTrx* (linea nera tratteggiata).

Nel sistema ricostituito della tioredossina la riduzione dell'insulina avviene in tempi più brevi rispetto a quelli osservati con la sola *rPhTrx*, un dato che conferma la funzionalità del sistema ricostituito della tioredossina. Inoltre il dosaggio è stato realizzato anche ad altre temperature (fino a 40°C); in tutti i casi il sistema ricostituito della tioredossina nella sua forma eterologa si è rivelato pienamente efficiente.

3.9 Potenziale redox della tioredossina

Per la determinazione del potenziale redox della tioredossina, è stato necessario prima verificare la reversibilità della riduzione di *rPhTrx* in assenza di insulina nel sistema completo ricostituito della tioredossina. La miscela di reazione conteneva quindi solo *rPhTrx*, *rPhTrxR* e NADPH. Il dosaggio è stato realizzato a 10°C (Fig. 11A) e 25°C (Fig. 11B). La riduzione e riossidazione del ponte disolfuro nella *rPhTrx* era reversibile ad entrambe le temperature. Infatti, nella prima fase della reazione, l'aggiunta di *rPhTrxR* provocava un consumo di NADPH stechiometricamente equivalente alla quantità di *rPhTrx* convertita dalla sua forma ossidata a quella ridotta. Quando la reazione raggiungeva l'equilibrio, l'aggiunta di un eccesso di NADP^+ provocava la rigenerazione di NADPH e conseguentemente la riconversione di un ammontare equivalente di *rPhTrx* da forma ridotta ad ossidata. Tali dati confermano la reversibilità della reazione e consentono di calcolare il potenziale redox della coppia *rPhTrx*-(SH)₂/*rPhTrx*-S₂, utilizzando le concentrazioni di reagenti e prodotti all'equilibrio. Il valore di E_0' , riferito quindi a 25°C è stato di - 0.276 V.

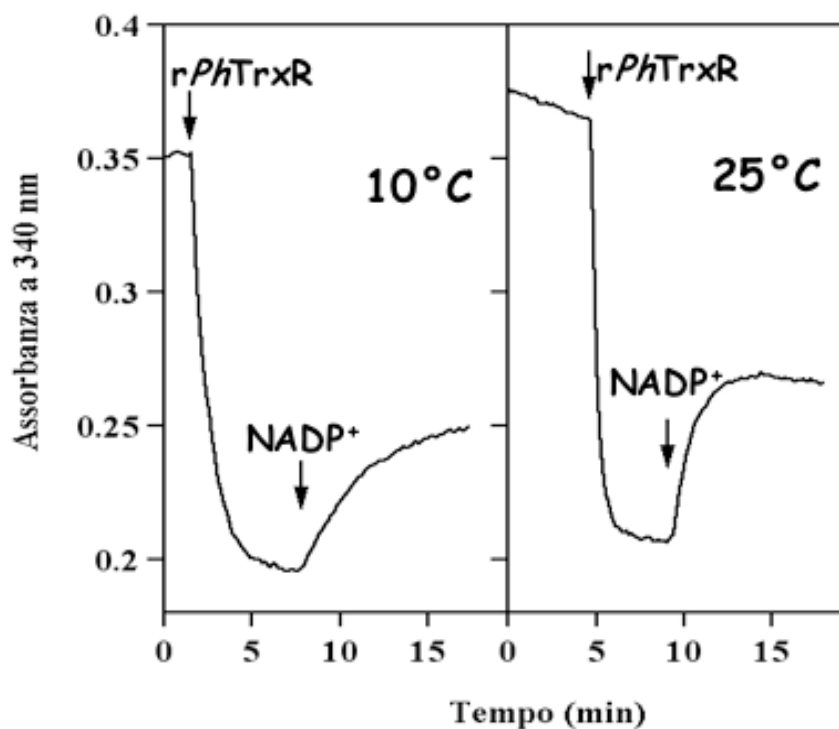


Fig.11. Reversibilità della reazione nel sistema completo ricostituito della tioredossina a 10°C (A) e 25°C (B)

La concentrazione di rPhTrx era 25 μ M; altri dettagli in Materiali e Metodi.

3.10 Inattivazione termica di rPhTrxR e rPhTrx

Le misure di attività specifica della rPhTrxR mediante il dosaggio di riduzione del DTNB avevano evidenziato un decremento di attività oltre 30°C (Tabella 1 e Fig. 9A). Pertanto si è deciso di valutare la resistenza al calore dell'enzima psicrofilo mediante un profilo di inattivazione termica. A tale scopo aliquote di una soluzione di rPhTrxR sono state incubate per 10

min a varie temperature e poi dosate a 25°C per l'attività residua mediante il dosaggio di riduzione del DTNB. I valori di attività residua sono poi riportati in grafico in funzione della temperatura di incubazione. Dal profilo di inattivazione termica è estrapolata una temperatura di semi-inattivazione di 59.5°C. Tale valore, di 40°C superiore alla massima temperatura di crescita di *P. haloplanktis*, indica la buona stabilità al calore di *rPhTrxR*.

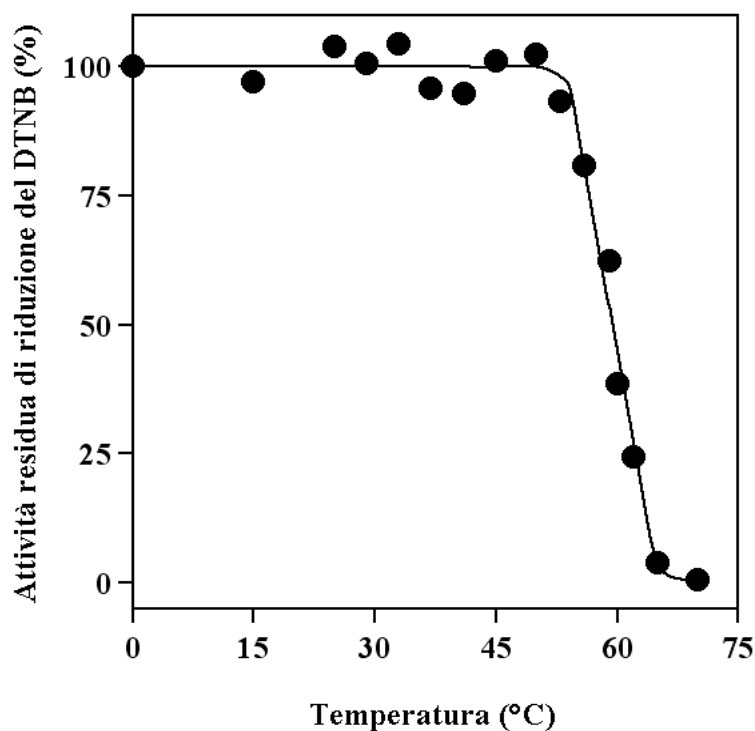


Fig. 12. Profilo di inattivazione termica di *rPhTrxR*

L'attività residua è espressa come per cento rispetto al campione di *rPhTrxR* non trattato.

Allo stesso modo è stata valutata l'inattivazione termica della *rPhTrx* nell'intervallo di temperatura compreso tra 0 e 95°C, misurando l'attività

residua con il dosaggio nefelometrico di riduzione dell'insulina in presenza di DTT. Tale proteina ha comunque evidenziato un'eccezionale resistenza al calore, poichè non si assisteva ad alcuna significativa inattivazione fino a 95°C. Per confermare la notevole termostabilità della rPhTrx, è stata anche realizzata una cinetica di inattivazione a 95°C (Fig. 13). L'inattivazione di rPhTrx avviene secondo una cinetica di primo ordine, da cui è stato possibile calcolare un tempo di semi-inattivazione di ben 220 min a 95°C. Tale valore conferma l'eccezionale resistenza all'inattivazione termica della rPhTrx, un dato sorprendente per una proteina psicrofila.

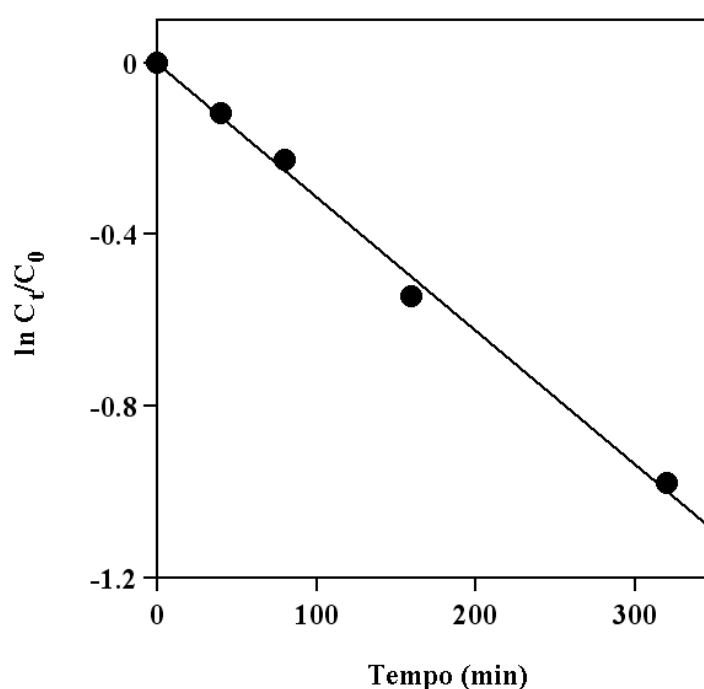


Fig. 13. Cinetica di inattivazione a 95°C della rPhTrx

C_t e C_0 sono rispettivamente le attività di rPhTrx al tempo t e 0 .

3.11 Denaturazione termica di rPhTrxR e rPhTrx

La resistenza al calore dei due componenti del sistema della tioredossina in *P. haloplanktis* è stata valutata anche attraverso misure spettroscopiche di assorbanza UV o fluorescenza. Tali misure consentono di avere informazioni sul processo di denaturazione, basate sulle diverse proprietà ottiche che una proteina assume in soluzione in seguito al processo di denaturazione. In particolare si ottengono profili di denaturazione termica da cui è possibile ricavare temperature di semi-denaturazione, chiamate anche temperature di fusione (T_F).

Il profilo di denaturazione termica della rPhTrxR ottenuto da misure UV è risultato di difficile interpretazione, in quanto probabilmente l'assorbanza del FAD interferiva con le lunghezze di assorbimento impiegate per valutare il processo di denaturazione. Invece con le misure di fluorescenza è stato possibile avere profili di denaturazione termica, ottenuti dalla combinazione di differenti lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione, in modo da seguire l'emissione sia dei residui aromatici della rPhTrxR sia del FAD legato all'enzima (Fig. 14). In Fig. 14A sono mostrate le curve di denaturazione ottenute dall'emissione nella regione dei residui aromatici. Tutte e tre i profili hanno lo stesso andamento, anche se con diverse intensità di emissione dovute all'uso di diverse combinazioni di lunghezza d'onda di eccitazione/emissione. Le temperature di denaturazione T_F estrapolate dai profili sono comprese tra 56°C e 57°C, valori molto simili alla temperatura di semi-inattivazione di 59.5°C ottenuta dal profilo di inattivazione termica (Fig. 12). In Fig. 14B sono invece mostrate le due

curve di denaturazione ottenute dall'emissione nella regione del FAD. Anche in questo caso l'emissione aumenta nello stesso intervallo di temperatura osservato per l'emissione nella regione dei residui aromatici; tuttavia, non è possibile estrapolare i valori di T_F , in quanto non si evidenzia il normale andamento sigmoidale, indispensabile per il calcolo della T_F .

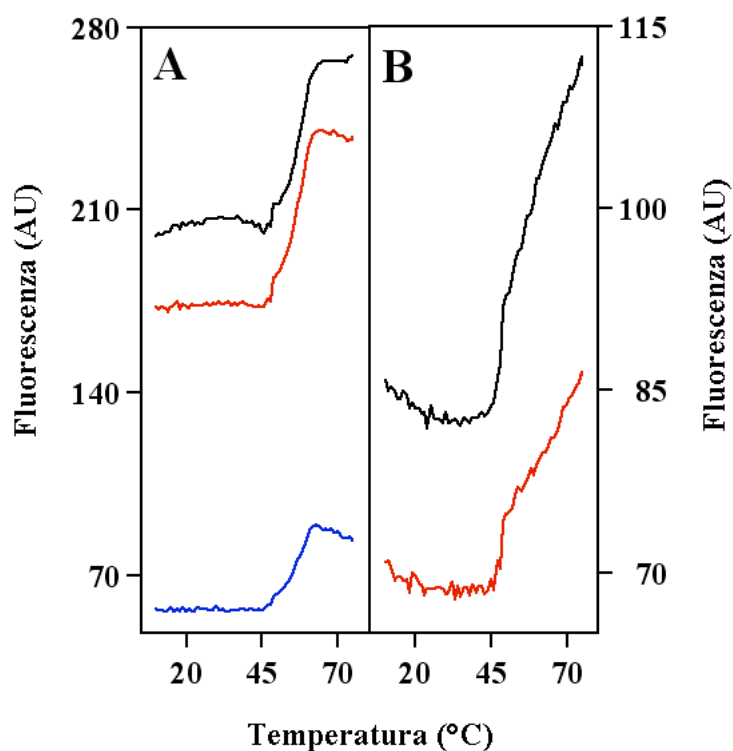


Fig. 14. Profili di denaturazione termica di rPhTrxR ottenuti da misure di fluorescenza

A: emissione dei residui aromatici. Linea nera, $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{ems} = 310 \text{ nm}$; linea rossa, $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{ems} = 330 \text{ nm}$; linea blu, $\lambda_{exc} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{ems} = 343 \text{ nm}$.

B: emissione del FAD. Linea nera, $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{ems} = 519 \text{ nm}$; linea rossa, $\lambda_{exc} = 375 \text{ nm}$, $\lambda_{ems} = 519 \text{ nm}$.

Per quanto riguarda la stabilità termica della *rPhTrx*, le misure UV hanno confermato l'eccezionale termostabilità di questa proteina psicrofila (Fig. 15). Infatti, non si osservano variazioni significative di assorbanza fino a 95°C (linea nera), un dato che indica l'assenza di denaturazione termica nella *rPhTrx*, quando tale proteina è analizzata nella sua forma ossidata.

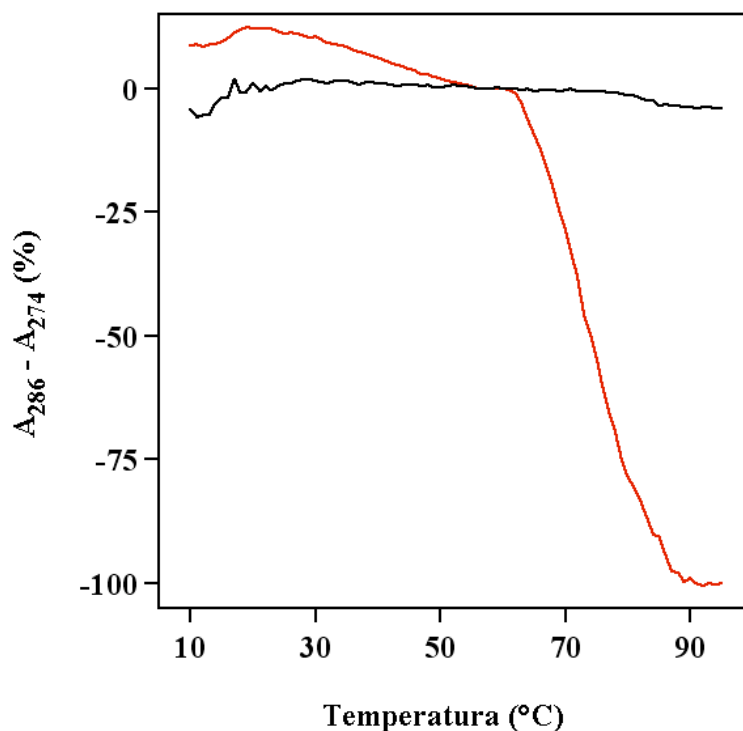


Fig. 15. Profili UV di denaturazione termica di *rPhTrx* in assenza ed in presenza di DTT

rPhTrx in tampone A (linea nera); *rPhTrx* previamente incubata in Tampone A contenente 0.2mM DTT (linea rossa).

La sorprendente resistenza al calore di *rPhTrx* è significativamente diminuita in seguito al trattamento di *rPhTrx* con un agente riducente.

Infatti, se la *rPhTrx* è convertita nella sua forma ridotta in seguito all'incubazione con DTT, si osserva un tipico profilo di denaturazione termica con una T_F estrapolata di 74°C (Fig. 15, linea rossa). Quindi lo stato ossidato della *rPhTrx* è sensibilmente più stabile di quello ridotto. Pertanto, il ponte disolfuro della *rPhTrx*, oltre ad avere un importante ruolo nel meccanismo di catalisi, sembra avere anche un ruolo rilevante per la strutturale di questa proteina psicrofila. Comunque, anche nel suo stato ridotto, la stabilità al calore della *rPhTrx* è significativamente superiore a quella della *rPhTrxR*.

3.12 Reazione del glutatione con la *rPhTrxR*

Le proteine contenenti residui di cisteina molto reattivi sono bersaglio di modifica da parte di tioli cellulari, che giocano pertanto un ruolo chiave nel controllo dello stato redox cellulare. In particolare la S-glutationilazione delle proteine è una modifica che può essere indotta nelle cellule dallo stress ossidativo. Siccome la *rPhTrxR*, nella sua forma ossidata nativa, possiede tre residui di cisteina liberi, si è deciso di valutare la loro eventuale reattività nei riguardi delle tre forme in cui si ritrova il glutatione nell'ambiente cellulare. Pertanto la *rPhTrxR* è stata incubata con concentrazioni crescenti di glutatione ridotto (GSH), ossidato (GSSG) o nitrosilato (GSNO) fino a 10 mM. Le miscele di reazione sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente ed i reagenti in eccesso sono stati allontanati con Microcon-3. Aliquote delle miscele di reazione sono state analizzate per Western blotting, utilizzando un anticorpo in grado di

riconoscere specificamente proteine glutationilate. In Fig. 16 sono mostrati i risultati ottenuti dai campioni trattati con GSSG.

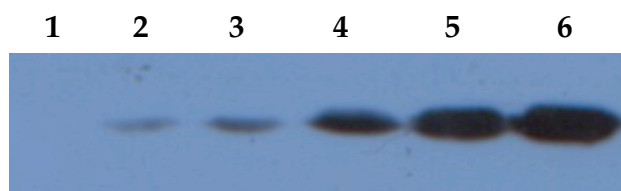


Fig. 16. Immunoblotting con anticorpi anti-glutazione di campioni di *rPhTrxR* trattati con glutazione ossidato (GSSG)

1, controllo negativo (- GSSG); 2, + 0.02 mM GSSG; 3, + 0.05 mM GSSG; 4, + 0.20 mM GSSG; 5, + 1 mM GSSG; 6, + 10 mM GSSG.

Già alla concentrazione 0.02 mM GSSG si nota la presenza di una banda immunoreattiva, che aumenta in maniera dose-dipendente al crescere della concentrazione di GSSG. Questo risultato suggerisce la formazione di un disolfuro misto tra il glutatione e la *rPhTrxR*; pertanto, il flavoenzima psicrofilo sembra essere bersaglio di una reazione di S-glutathionilazione. Un risultato analogo è stato ottenuto anche con GSNO, ma in questo caso l'immunoreattività era evidente solo a partire dalla concentrazione 1 mM GSNO; con GSH l'immunoreattività era inferiore, perché la banda immunoreattiva era evidenziata solo con 10 mM GSH (dati non mostrati).

Aliquote dei campioni trattati con GSSG sono state dosate per l'attività tioredossina reduttasica mediante il dosaggio con il DTNB. Dai risultati ottenuti è emerso che l'attività specifica della *rPhTrxR* non è significativamente influenzata dalla reazione di S-glutathionilazione (dati non mostrati). Pertanto, questa modifica covalente sembra non avere effetti

sull'attività del flavoenzima. Sarà necessario verificare se la reazione di S-glutathionilazione possa influenzare le altre proprietà del flavoenzima.

Il dosaggio di Elmann sulla *rPhTrxR* aveva evidenziato la presenza di due cisteine coinvolte nella formazione del ponte disolfuro, e di tre cisteine presenti in forma libera in posizione 7, 106 e 303. Allo scopo di identificare quali di queste cisteine libere fossero bersaglio della modifica covalente ad opera del glutathione, sono stati costruiti tre forme mutate della *rPhTrxR*, in cui i tre residui di cisteina sono stati sostituiti da serina. I mutanti sono stati denominati rispettivamente *C₇S-rPhTrxR*, *C₁₀₆S-rPhTrxR* e *C₃₀₃S-rPhTrxR*.

L'analisi mediante Western blotting di *rPhTrxR* e delle sue forme mutate incubate con 1 mM GSSG è mostrata in Fig 17. La banda immunoreattiva è presente alla stessa intensità, oltre che per *rPhTrxR*, anche per *C₁₀₆S-rPhTrxR*. Inoltre, anche *C₇S-rPhTrxR* sembra reagire con il GSSG, perché la banda immunoreattiva è presente, pur se di intensità significativamente inferiore. Invece nessuna reattività è evidenziata per la forma mutata *C₃₀₃S-rPhTrxR*. Questi dati sembrano indicare che la *C₃₀₃* sia il residuo bersaglio della reazione di S-glutathionilazione sulla *rPhTrxR*.

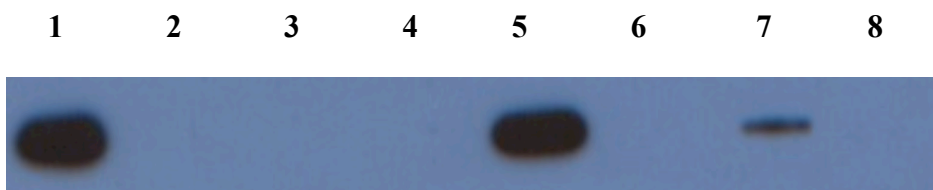


Fig. 17. Immunoblotting con anticorpi anti-glutathione di campioni di *rPhTrxR* e sue forme mutate trattate con glutathione ossidato (GSSG)

1, *rPhTrxR* + 1 mM GSSG; 2, *rPhTrxR* – GSSG; 3, *C₃₀₃S-rPhTrxR* + 1 mM GSSG; 4, *C₃₀₃S-rPhTrxR* – GSSG; 5, *C₁₀₆S-rPhTrxR* + 1 mM GSSG; 6, *C₁₀₆S-rPhTrxR* – GSSG; 7, *C₇S-rPhTrxR* + 1 mM GSSG; 8, *C₇S-rPhTrxR* – GSSG.

DISCUSSIONE

L'adattamento al freddo dell'eubatterio psicrofilo *Pseudoalteromonas haloplanktis* offre interessanti spunti di approfondimento scientifico correlati alla maggiore solubilità dell'ossigeno nelle acque fredde dei mari antartici, rendendo questo microrganismo maggiormente esposto all'azione dei ROS. A tal riguardo il sequenziamento completo del genoma di *P. haloplanktis* (Medigue et al., 2005) ha chiarito alcuni aspetti sulle modalità con cui questo psicrofilo si difende dai ROS. Ad esempio nel genoma di questo microrganismo non sono stati identificati i componenti dell'intero metabolismo della molibdopterina, una delle maggiori fonti per la produzione endogena di ROS. D'altra parte *P. haloplanktis* è comunque ben "attrezzato" per la "prima linea di difesa" contro i ROS, in quanto possiede un'unica Fe-SOD dotata di un'eccezionale attività catalitica, anche a basse temperature (Castellano et al., 2006); tuttavia, la modificazione covalente del residuo di cisteina C₅₇ da parte del β-mercaptoetanolo o glutatione ossidato migliora la resistenza della Fe-SOD al perossinitrito, un altro ROS altamente tossico (Castellano et al., 2006, 2008).

Nella presente tesi di dottorato è riportata la caratterizzazione del sistema della tioredossina isolato da *P. haloplanktis*, un importante meccanismo di riparo cellulare contro l'azione dei ROS. Infatti tale sistema è preposto al controllo dello stato redox cellulare, perché riduce i ponti disolfuro formati in proteine cellulari in seguito a condizioni di stress ossidativo. L'approccio seguito per lo studio dei componenti di tale sistema

in *P. haloplanktis* è stato quello della produzione di proteine in forma ricombinante, utilizzando un sistema di espressione eterologa in un ceppo ospite di *E. coli*. In particolare, *rPhTrxR* e *rPhTrx* sono state prodotte come proteine di fusione con una coda di 6 istidine che, oltre a consentire la purificazione all'omogeneità con un'unica cromatografia per affinità, ne assicurava la separazione dalle omologhe proteine del ceppo ospite di *E. coli*.

Per quanto riguarda lo studio delle sue proprietà molecolari, la *rPhTrxR* purificata appartiene alla famiglia di TrxR di tipo II batterico, avendo un basso peso molecolare (34 kDa/subunità). L'eluizione mediante gel-filtrazione della *rPhTrxR* in forma nativa ha chiarito che, come le altre TrxR procariotiche o eucariotiche (Hirt et al., 2002), tale enzima psicrofilo è organizzato come omodimero. L'analisi mediante spettrometria di massa della *rPhTrxR* ha evidenziato la perdita della metionina iniziale in parte del campione ricombinante; tuttavia, questa micro-eterogeneità nel campione purificato non ha effetti sugli studi biochimici.

La presenza del coenzima FAD, essenziale per l'attività della *rPhTrxR*, è stata verificata mediante misure di fluorescenza. I dati ottenuti hanno indicato che, se la coltura batterica esprime il gene della *PhTrxR* era lisata senza aggiunta di FAD esogeno, il contenuto di tale cofattore nel flavoenzima ricombinante era significativamente inferiore a quello teorico. Pertanto, si è reso necessario aggiungere 50 μ M FAD durante la lisi cellulare, perché in tal modo è stato raggiunto un rapporto FAD/subunità proteica molto prossimo a quello teorico unitario. I bassi valori di attività

specifica ottenuti da preparazioni di *rPhTrxR* con un basso contenuto di FAD hanno confermato il ruolo critico di tale coenzima nella catalisi enzimatica.

Dalla sequenza nucleotidica del gene della *rPhTrxR* sono dedotte cinque residui di cisteina nella struttura primaria di questo enzima. I dosaggi di Ellman eseguiti sulla proteina ricombinante purificata nel suo stato nativo ossidato o ridotto con DTT hanno fornito informazioni sullo stato redox di tali residui. In particolare, la presenza di un unico ponte disolfuro nello stato ossidato della *rPhTrxR* faceva ritenere che i residui coinvolti in questo legame fossero quelli della sequenza C₁₃₆ATC, come del resto osservato in altre TrxR batteriche. Pertanto, i restanti tre residui di cisteina, C₇, C₁₀₆, C₃₀₃, sono presenti come gruppi tiolici liberi nella proteina ricombinante purificata nel suo stato nativo ossidato. Tali residui occupano posizioni non conservate all'interno della sequenza della *rPhTrxR*.

L'altro componente del sistema della tioredossina, la *rPhTrx*, è una piccola proteina monomericamente di 12 kDa, che non presenta microeterogeneità all'analisi mediante spettrometria di massa; infatti, la metionina iniziale è assente in tutte le molecole del campione analizzato. Il dosaggio di Ellman ha evidenziato che la *rPhTrx* possiede solo due cisteine impegnate nel ponte disolfuro canonico.

La funzionalità dei due componenti del sistema della tioredossina è stata analizzata, sia singolarmente che in combinazione, mediante dosaggi spettrofotometrici. In particolare, il dosaggio di riduzione del DTNB in presenza di NADPH e il dosaggio di riduzione dell'insulina in presenza di

DTT sono stati utilizzati per misurare l'attività rispettivamente della *rPhTrxR* e *rPhTrx*. I dati ottenuti indicano che *rPhTrxR* possiede una attività specifica confrontabile con quella di altri eubatteri alle rispettive temperature di crescita (Holmgren, 1979a; Prongay et al. 1989; Jeon & Ishikawa, 2002; Ruocco et al, 2004; Grimaldi et al., 2008;). Pertanto la proteina ricombinante è stata prodotta in forma attiva. In collaborazione con un altro gruppo di ricerca è stata avviata la purificazione della *PhTrxR* da cellule di *P. haloplanktis* ed i dati di attività ottenuti sulla proteina endogena sono sostanzialmente identici a quelli della proteina ricombinante.

Sono stati inoltre misurati i parametri cinetici della reazione di riduzione del DTNB catalizzata dalla *rPhTrxR* a diverse temperature, in modo da valutare l'effetto della temperatura sui valori di V_{max} e K_m per il substrato sintetico DTNB. I dati hanno evidenziato che *rPhTrxR* ha una significativa attività già a 10°C, un requisito indispensabile per un enzima psicrofilo. Quest'attività cresce solo moderatamente con la temperatura, come confermato dal lieve incremento causato dalla temperatura sia sui valori di velocità massima che di efficienza catalitica. Inoltre la temperatura non sembra influenzare significativamente neanche l'affinità per il substrato DTNB. Infine, lo scarso effetto della temperatura sull'attività della *rPhTrxR* è confermato dal basso valore di energia di attivazione misurato. La significativa attività a basse temperature e la scarsa termofilicità della *rPhTrxR* sono tipiche caratteristiche di enzimi adattati al freddo, perché riscontrate anche in altri enzimi isolati da organismi psicrofili (Georlette et al, 2004).

Un dato interessante, tuttora oggetto di studio, è il decremento di attività della *rPhTrxR* osservato a temperature superiori a 30°C. A tale scopo è stato realizzato un profilo di inattivazione termica della *rPhTrxR*, da cui è emersa però una temperatura di semi-inattivazione di circa 60°C. Pertanto il decremento di attività osservato oltre 30°C non è imputabile ad un semplice processo di inattivazione dell'enzima. Sono stati anche realizzati profili di denaturazione termica della *rPhTrxR* mediante misure di fluorescenza, valutando l'emissione sia nella regione dei residui aromatici che in quella del FAD. Le temperature di denaturazione così ottenute sono risultate simili a quelle per la semi-inattivazione dell'enzima. Pertanto il processo di inattivazione sembra essere concomitante con quello di denaturazione. I dati ottenuti indicano quindi che, pur essendo un enzima psicrofilo, la *rPhTrxR* è dotata di una buona resistenza al calore, molto al di là della massima temperatura di crescita di *P. haloplanktis*.

La funzionalità della *rPhTrx* è stata valutata mediante il dosaggio nefelometrico di riduzione dell'insulina usando il DTT come donatore di elettroni. I dati ottenuti indicano che la proteina ricombinante è attiva già a 10°C, in quanto la velocità di riduzione dell'insulina aumenta progressivamente con la concentrazione di *rPhTrx* presente nel dosaggio, mentre il tempo di latenza per osservare il fenomeno diminuisce. Entrambe queste osservazioni indicano che la proteina è pienamente attiva, in grado quindi di svolgere il suo ruolo di donare gli equivalenti riducenti ricevuti dal DTT ad una proteina bersaglio (insulina) anche a basse temperature. E' stato inoltre valutato l'effetto della temperatura sulla velocità massima della

reazione, da cui è emerso che la *rPhTrx* possiede una più elevata termofilicità rispetto alla *rPhTrxR*. Questa osservazione è confermata anche dal valore di energia di attivazione, significativamente superiore a quello della *rPhTrxR*. Pertanto, l'adattamento al freddo della *rPhTrx* sembra essere diverso da quello di altri enzimi isolati da organismi psicrofili (Georlette et al, 2004).

Gli studi sulla termostabilità della *rPhTrx* hanno inoltre evidenziato una sorprendente resistenza sia alla inattivazione che alla denaturazione termica. In particolare a 95°C il tempo di dimezzamento nella reazione di inattivazione della *rPhTrx* è risultato di circa 4 ore. Inoltre, mediante spettrofotometria UV non è stata evidenziata alcuna significativa denaturazione termica fino a 95°C. A questa resistenza al calore, eccezionale per una proteina di origine psicrofila, dà un notevole contributo il ponte disolfuro intracatena presente nello stato nativo (ossidato) della *rPhTrx*. Infatti, se tale proteina viene previamente trattata con un agente riducente (DTT) in grado di rompere il ponte disolfuro, è possibile calcolare una temperatura di denaturazione di 74°C. Questo valore di T_F è comunque elevato per una proteina psicrofila, in quanto è di oltre 50°C superiore alla temperatura di crescita di *P. haloplanktis*. La grande termostabilità della *rPhTrx* e la sua maggiore termofilicità confermano il suo minore carattere psicrofilo.

I due componenti del sistema della tioredossina di *P. haloplanktis* sono pienamente funzionali in combinazione, come dimostrato dal dosaggio di attività nel sistema completo ricostituito. La corretta interazione tra i due

fattori proteici è evidenziata anche dalla maggiore velocità di precipitazione osservata nel sistema completo rispetto a quello contenente la sola *rPhTrx*. Inoltre, la reazione di riduzione della *rPhTrx* catalizzata dalla *rPhTrxR* in presenza di NADPH è completamente reversibile, un'ulteriore prova della funzionalità del sistema ricostituito. È stato infine calcolato il potenziale redox della tioredossina E_0' ed il valore determinato (-0.276 V) è in buon accordo con quello misurato in alcuni organismi procariotici (Krause et al, 1991; Jeon & Ishikawa, 2002).

Studi recenti dimostrano che proteine con gruppi sulfidrilici molto reattivi sono bersaglio di tioli cellulari. Il glutatione è il tiolo più abbondante sia nelle cellule eucariotiche che in quelle procariotiche e gioca un ruolo essenziale nella regolazione dello stato redox cellulare. Durante lo stress ossidativo, alterati livelli di GSH/GSSG provocano la glutationilazione di proteine, spesso alterandone anche le funzioni. Tale modifica post-traduzionale può avvenire sia per l'azione del GSH su proteine con gruppi tiolici previamente ossidati, sia per uno scambio tiolico tra cisteina libera di una proteina e GSSG o GSNO, come descritto da Biswas et al, 2006. In letteratura è già nota la glutationilazione di un'enzima psicrofilo, la superossido dismutasi, su un residuo di cisteina molto reattivo (Castellano et al., 2008). Esperimenti di immunoblotting indicano che anche la *rPhTrxR* è bersaglio di una reazione di S-glutationilazione. In particolare, il flavoenzima psicrofilo sembra essere il primo esempio di tioredossina riduttasi ad essere glutationilata. Studi di mutagenesi sito-diretta hanno indicato che il bersaglio della S-glutationilazione è il residuo C₃₀₃. Tale

posizione amminoacidica non è conservata nelle altre TrxR e, sulla base di un modello tridimensionale sembra essere abbastanza esposta al solvente.

La S-glutathionilazione non altera apparentemente l'attività dell'enzima, anche se saranno necessari studi più approfonditi per studiare gli effetti della glutathionilazione sulle proprietà molecolari e funzionali dell'enzima. In ogni caso è interessante osservare che due enzimi che controllano lo stato redox di *P. haloplanktis* sono entrambi glutathionilati. Gli sviluppi della ricerca dovranno quindi approfondire il ruolo del metabolismo dello zolfo in questo microrganismo psicrofilo.

BIBLIOGRAFIA

Arcari P, Masullo M, Arcucci A, Ianniciello G, de Paola B, Bocchini V
A chimeric elongation factor containing the putative guanine nucleotide binding domain of archaeal EF-1 alpha and the M and C domains of eubacterial EF-Tu
Biochemistry **38** (1999) 12288–12295.

Arnér ES, Holmgren A
Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase
Eur. J. Biochem. **267** (2000) 6102–6109.

Birolo L, Tutino ML, Fontanella B, Marino G
Aspartate aminotrasferase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. Cloning, expression, properties and molecular modelling
Eur. J. Biochem. **267** (2000) 2790-2807.

Biswas S, Chida AS, Rahaman I
Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling
Biochem Pharmacol **71**, (2006) 551-564.

Bradford M
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. **72** (1976) 248–254.

Castellano I, Di Maro A, Ruocco MR, Chambery A, Di Martino MT, Parlato G, Masullo M, De Vendittis E
Psychrophilic superoxide dismutase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*: biochemical characterization and identification of a highly reactive cysteine residue
Biochimie. **88** (2006) 1377–1389.

Castellano I, Ruocco MR, Cecere F, Di Maro A, Chambery A, Michniewicz A, Parlato G, Masullo M, De Vendittis E
Glutathionylation of the iron superoxide dismutase from the psychrophilic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*
Biochim. Biophys. Acta **1784** (2008) 816–826.

Corsaro MM, Lanzetta R, Parrilli E, Tutino ML, Ammarino S
Influence of growth temperature on lipid and phosphate contents of surface polysaccharides from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125
J. Bacteriol. **186** (2004) 29-34.

Cotgreave IA, Gerdes RG

Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation?
Biochem. Biophys. Res. Commun. **242**, (1998) 1-9.

Creighton TE

Disulphide bonds between cysteine residues

in: T.E. Creighton (Ed.) *Protein Structure a Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, UK, 1989, pp 155-167.

D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C

Psychrophilic microorganisms: challenges for life

EMBO. Rep. **7** (2006) 385-389.

Fridovich I

The biology of oxygen radicals

Science **201**, (1978) 875-880.

Fridovich I

Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas

J Biol Chem **264**, (1989)7761-7764.

Gasdaska PY, Berggren MM, Berry MJ, Powis G

Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase

FEBS Lett. **442** (1999) 105-111.

Georlette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Hoyoux A, Marx JC, Sonan G, Feller G, Gerday C

Some like it cold: biocatalysis at low temperatures

FEMS Microbiol. Rev. **28** (2004) 25-42.

Gilbert HF

Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange

Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **63** (1990) 69-172.

Gladyshev VN, Krause M, Xu XM, Korotkov KV, Kriukov GV, Sun QA, Lee BJ, Wootton JC, Hatfield DL

Selenocysteine containing thioredoxin reductase in *C.elegans*

Biochem. Biophys. Res. Commun. **259** (1999) 244-249.

Grimaldi P, Ruocco MR, Lanzotti MA, Ruggiero A, Ruggiero I, Arcari P, Vitagliano L, Masullo M

Characterisation of the components of the thioredoxin system in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*

Extremophiles. **12** (2008) 553-562.

Gromer S, Schirmer RH, Becker K
New and views on thioredoxin reductase
Redox. Rep. **4** (1999) 221-228.

Hirt RP, Müller S, Embley TM, Coombs GH
The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives
Trends Parasitol. **18** (2002) 302–308.

Holmgren A
Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide
J. Biol. Chem. **254** (1979a) 9627–9632.

Holmgren A
Reduction of disulfides by thioredoxin
J. Biol. Chem. **254** (1979b) 9113–9119.

Holmgren A
Thioredoxin
Annu. Rev. Biochem. **54** (1985) 237–271.

Holmgren A
Thioredoxin and glutaredoxin systems
J. Biol. Chem. **264** (1989) 13963–13966.

Holmgren A, Björnstedt M
Thioredoxin and thioredoxin reductase
Methods. Enzymol. **252** (1995) 199–208.

Jeon SJ, Ishikawa K
Identification and characterization of thioredoxin and thioredoxin reductase from *Aeropyrum pernix* K1
Eur. J. Biochem. **269** (2002) 5423–5430.

Kanzok SM, Fechner A, Bauer H, Ulschmid JK, Muller HM, Botella-Munoz J, Schneuwly S, Schirmer R, Becker K
Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*
Science **291** (2001) 643-646.

Klatt P, Lamas S

Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress

Eur J Biochem. **267**, (2000) 4928-4944.

Lapanje S

Physicochemical aspects of protein denaturation, J. Wiley & Sons, New York, 1978.

Loach PA

Physical and chemical data

In: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd ed. (G.D. Fasman, Ed.) Vol 1, pp. 122–130 (1976) *CRC Press, Boca Raton, FL*.

Masip L, Veeravalli K, Georgiou G

The many faces of glutathione in bacteria

Antioxid. Redox. Signal. **8**, (2006) 753-762.

Masullo M, Arcari P, de Paola P, Parmeggiani A, Bocchini V

Psychrophilic elongation factor Tu from the Antarctic *Moraxella* sp. Tac II 25: biochemical characterization and cloning of the encoding gene

Biochemistry. **39** (2000) 15531–15539.

Medigue C, Krin E, Pascal G, Barbe V, Bernsel A, Bertin PN, Cheung F, Cruveiller S, D'Amico S, Duilio A, Fang G, Feller G, Ho C, Mangenot S, Marino G, Nilsson J, Parrilli E, Rocha EP, Rouy Z, Sekowska A, Tutino ML, Vallenet D, von Heijne G, Danchin G

Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125

Genome. Res. **15** (2005) 1325–1335.

Muller S, Gilberger TW, Farber PM, Becker K, Schirmer RH, Walter RD

Recombinant putative glutathione reductase of *Plasmodium falciparum* exhibits thioredoxin reductase activity

Mol. Biochem. Parasitol. **80** (1996) 215-219.

Mullis KB, Faloona FA

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction

Methods. Enzymol. **155** (1987) 3354-350.

Mustacich D, Powis G

Thioredoxin reductase

Biochem. J. **346** (2000) 1–8.

Ritz D, Patel H, Doan B, Zheng M, Åslund F, Storz G, Beckwith J

Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in *Escherichia coli*

J Biol Chem **275**, (2000) 2505-2512.

Ruocco MR, Ruggiero A, Masullo L, Arcari P, Masullo M
A 35 kDa NAD(P)H oxidase previously isolated from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*
is instead a thioredoxin reductase
Biochimie. **86** (2004) 883–892.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T
Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory
Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.

Spyrou G, Enmark E, Miranda-Vizuete A, Gustaffson J
Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin
J. Biol. Chem. **272** (1997) 2936–2941.

Thomas JA, Poland B, Honzatko R
Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation.
Arch. Biochem. Biophys. **319**, (1995) 1-9.

Williams CH, Arscott LD, Müller S, Lennon BW, Ludwig ML, Wang PF, Veine DM,
Becker K, Schirmer RH
Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved
Eur. J. Biochem **267** (2000) 6110–6117.