



**UNIVERSITÀ DI PARMA**

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DEL FARMACO, DELLE  
BIOMOLECOLE E DEI PRODOTTI PER LA SALUTE  
CICLO XXX

# **DINAMICA E REGOLAZIONE ALLOSTERICA DELL'ENZIMA UMANO SERINA RACEMASI**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Marco Mor

Tutore:

Chiar.ma Prof.ssa Barbara Campanini

Dottoranda: Andrea Valeria Canosa

Anno 2014/2017



# Sommario

<i>INTRODUZIONE</i> .....	7
I recettori NMDA.....	9
Struttura.....	10
Sito di legame dell'ATP.....	13
Meccanismo catalitico.....	15
Modulazione dell'attività.....	17
L'effetto dell'ATP.....	18
Modulazione dell'attività da parte di ioni.....	19
Nitrosilazione.....	20
Fosforilazione e traslocazione in membrana.....	20
Interazione con altre proteine.....	21
Glicina e malonato.....	23
Localizzazione.....	23
Inibizione di hSR.....	25
Proteolisi limitata.....	26
<i>SCOPO DEL LAVORO</i> .....	29
<i>MATERIALI E METODI</i> .....	33
Materiali.....	35
Elettroforesi di proteine in condizioni denaturanti (SDS-PAGE).....	35
Proteolisi limitata.....	36
Protocollo di digestione in gel.....	36
Analisi di spettrometria di massa.....	37
Espressione e purificazione.....	38
Mutagenesi.....	41
Trasformazione, estrazione e analisi del DNA.....	44
Elettroforesi su gel di agarosio.....	45
Misure di dicroismo circolare.....	45
Spettroscopia di assorbimento.....	46
Saggi di attività.....	46
Reazione di $\beta$ -eliminazione.....	46
Reazione di racemizzazione.....	47

Spettroscopia di fluorescenza.....	48
Analisi dei dati .....	48
Cristallizzazione .....	49
Allineamenti di sequenza .....	52
Elenco abbreviazioni .....	54
<i>EFFETTO DI LIGANDI ED EFFETTORI ALLOSTERICI SULLA DINAMICA DI hSR</i> .....	55
Risultati.....	57
Proteolisi limitata di hSR.....	57
Identificazione delle bande.....	65
Discussione .....	69
<i>IDENTIFICAZIONE DI RESIDUI COINVOLTI NELLA COMUNICAZIONE ALLOSTERICA TRA SITO ATTIVO E SITO DI LEGAME DELL'ATP</i> .....	73
Risultati.....	77
Mutanti di hSR.....	77
Preparazione dei mutanti.....	83
Espressione e purificazione di Q89M-hSR.....	88
E283A-hSR.....	101
Discussione .....	104
<i>CONCLUSIONI</i> .....	109
<i>ANALISI FILOGENETICA</i> .....	113
<i>BIBLIOGRAFIA</i> .....	119
<i>APPENDICE-OTTIMIZZAZIONE DI SAGGI ENZIMATICI PER ROCK1 E ROCK2 UMANE</i> .....	129
Introduzione .....	133
Struttura.....	133
Meccanismo catalitico .....	134
Funzioni cellulari.....	135
Regolazione dell'attività .....	136
Espressione e localizzazione.....	138
Implicazioni terapeutiche .....	139
Scopo del lavoro .....	141
Materiali e metodi .....	143
Materiali.....	143

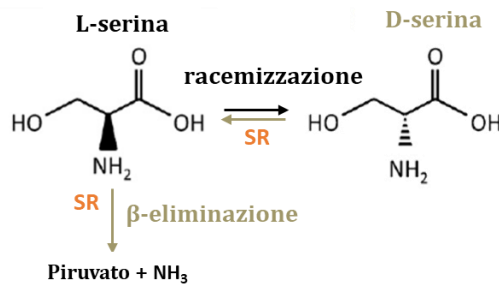
Espressione e purificazione .....	143
Elettroforesi di proteine in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) .....	144
Immunoblot.....	145
Saggio d'attività continuo accoppiato.....	146
Stabilità dell'enzima in diversi tamponi.....	150
Elenco abbreviazioni .....	151
Risultati e discussione .....	153
Applicazione di un saggio immunochimico allo studio dell'attività di ROCK durante l'espressione e la purificazione.....	153
Applicazione del saggio continuo accoppiato alla determinazione dei parametri cinetici di ROCK.....	158
Stabilità delle proteine in diversi tamponi ed effetto dell'acqua deuterata.....	161
Studio della stabilità in DMSO .....	164
Sviluppo di un metodo fluorimetrico per lo studio dell'attività di ROCK1 e ROCK2.....	164
Conclusioni .....	167
Bibliografia .....	169



# ***INTRODUZIONE***



La serina racemasi umana (hSR) è un enzima piridossal 5'-fosfato (PLP)- dipendente, che catalizza la racemizzazione reversibile della L-serina a D-serina e la  $\beta$ -eliminazione irreversibile di L/D-serina a piruvato e ammoniaca, (Figura 1). È stato proposto che entrambe le reazioni siano fisiologicamente rilevanti, infatti la prima porta alla produzione della D-serina e la seconda alla sua degradazione [1].



*Figura 1* Reazioni catalizzate da SR

La D- serina è il principale co-agonista dei recettori per l’N-metil-D-aspartato (NMDA) che mediano la neurotrasmissione, la plasticità sinaptica, la migrazione cellulare e il potenziamento a lungo termine [2].

## I recettori NMDA

I recettori NMDA sono recettori ionotropici del glutammato, permeabili a ioni sodio, potassio e calcio. Sono complessi tetrameric, costituiti da differenti tipologie di subunità: GluN1, GluN2 A-D e GluN3A-B [3]. L’attivazione dei recettori NMDA richiede l’interazione con due agonisti in differenti siti di legame: il glutammato e la glicina o la D-serina [4].

Inizialmente si pensava che solo la glicina fosse in grado di attivare tali recettori, ma grazie a studi basati sull’utilizzo di specifici enzimi in grado di degradare i singoli co-agonisti è stato dimostrato che i recettori NMDA presenti nelle sinapsi della via collaterale dell’ippocampo di ratto (SC-CA1), sono attivati da glicina in età giovanile e da D-serina nell’adulto. Questa variazione è una conseguenza della differente composizione delle subunità GluN2 dei recettori NMDA, che cambiano da GluN2B a GluN2A con lo sviluppo. I meccanismi molecolari per tale preferenza non sono ancora stati chiariti [5].

L’attivazione dei recettori NMDA causa un incremento della concentrazione di calcio intracellulare e determina una variazione della plasticità sinaptica, cioè avvia una serie di eventi a cascata che modificano l’efficienza sinaptica e

la morfologia neuronale [3]. Inoltre la funzione di questi recettori è alla base anche dei meccanismi cellulari di potenziamento e depressione a lungo termine.

Nonostante i recettori NMDA siano estensivamente espressi nel sistema nervoso centrale, il loro numero, localizzazione e composizione delle subunità sono strettamente regolati e differiscono in maniera cellula- e sinapsi-specifica. I meccanismi molecolari che controllano la funzione delle singole subunità includono la regolazione della trascrizione/traduzione, modifiche post-trascrizionali come la fosforilazione e interazioni proteina-proteina [3]. La composizione delle subunità dei recettori cambia durante la maturazione sinaptica e in risposta ad attività ed esperienze [6]. Quindi si tratta di recettori che svolgono un ruolo centrale in processi quali l'apprendimento, la memoria e lo sviluppo neuronale [3].

Una iper- o ipo-attivazione dei recettori NMDA a causa di alterazioni dei normali livelli di D-serina, è stata associata a differenti neuropatologie e disordini psichiatrici. In particolare alti livelli di D-serina sono stati correlati alla malattia di Alzheimer e di Parkinson, alla distrofia laterale amiotrofica e all'ischemia, mentre una bassa concentrazione è stata associata a schizofrenia [2]. Inoltre un'eccessiva stimolazione dei recettori NMDA è stata associata anche ad eccitotossicità e danni ossidativi, a causa della produzione di radicali liberi [7].

Farmaci diretti contro i recettori NMDA causano effetti secondari che non sono compatibili con il trattamento a lungo termine di tali patologie. Per questa ragione la modulazione farmacologica indiretta dei recettori attraverso il controllo della sintesi e degradazione della D-serina da parte di SR è stata proposta come una strategia promettente [4]. Questo approccio richiede una conoscenza approfondita della funzione, della regolazione e della struttura di SR.

## Struttura

Dal punto di vista strutturale SR appartiene al gruppo degli enzimi PLP-dipendenti di fold-type II, che comprende anche altre proteine, tra cui l'*O*-acetilserina sulfidrilasi (OASS) e la triptofano sintasi (TS) [2].

Dal confronto con altri enzimi PLP-dipendenti si può osservare un'alta identità di struttura con la SR di lievito e la treonina deidratasi degradativa batterica (TdcB). Si ha anche una percentuale di identità del 27 % con la cistationina- $\beta$ -sintasi (CBS) e con la serina deidratasi umana (SDH). Nonostante la struttura simile, le funzioni catalizzate da tali proteine sono

differenti. Ad esempio l'SDH è in grado di compiere la reazione di  $\beta$ -eliminazione ma non la racemizzazione della L-serina [4].

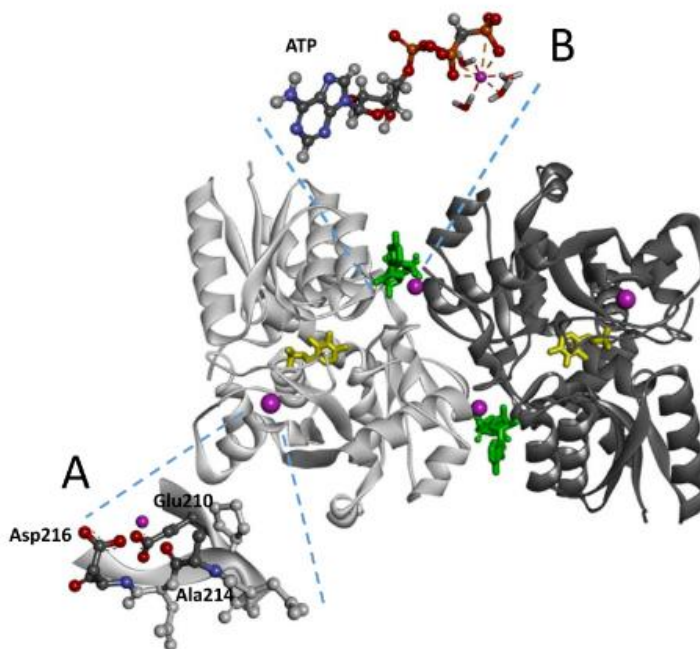
Fino ad oggi sono state depositate in PDB nove strutture di SR eucariotiche, di cui solo due relative alla proteina umana in presenza di malonato come ligando (Tabella 1). Le uniche due strutture di hSR (3L6B e 3L6R) sono state ottenute da una proteina recante la doppia mutazione C2D e C6D e legano entrambe l'inibitore malonato, oltre a  $Mn^{2+}$  [8]. L'unica SR di mammifero cristallizzata in presenza e assenza di ligandi del sito attivo è quella di ratto [8]. Inoltre solo una struttura di SR è stata ottenuta con l'analogo dell'ATP  $\beta$ ,  $\gamma$ -metilenadenosina-5'-trifosfato (AMP-PCP) ed è di *Schizosaccharomyces pombe* (SpSR) [9].

**Tabella 1** Strutture di SR di diverse specie depositate nella banca dati PDB.

PDB code	Specie	Ligandi	Lunghezza (aa)	Riferimento bibliografico
3L6B	<i>Homo sapiens</i>	malonato, $Mn^{2+}$ , PLP	346	[8]
3L6R	<i>Homo sapiens</i>	malonato, $Mn^{2+}$ , PLP	346	[8]
3L6C	<i>Rattus norvegicus</i>	PLP, malonato, $Mn^{2+}$	339	[8]
3HMK	<i>Rattus norvegicus</i>	PLP, $Mn^{2+}$	339	[8]
1V71	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	PLP, $Mg^{2+}$	323	[9]
2ZPU	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	PDD, $Mg^{2+}$	323	[9]
1WTC	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	PLP, $Mg^{2+}$ , AMP-PCP	323	[9]
2ZR8	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	PDD, serina, $Mg^{2+}$	323	[9]
5CVC	<i>Zea mays</i>	PLP, $Mg^{2+}$	346	[10]

Tutte le strutture di SR presentano un catione bivalente coordinato nel dominio maggiore, vicino al sito di legame del PLP. Vi è  $Mg^{2+}$  nelle strutture di lievito e pianta e  $Mn^{2+}$  in quelle di ratto e mammifero. Il sito di legame dei metalli è distinto da quello dell'ATP [9,11] e coinvolge i residui Glu210, Asp216 e Ala214 (numerazione SR umana), a circa 10Å di distanza dal sito

attivo e 25 Å di distanza dal sito di legame dell'ATP [12,13] (Figura 2). Altri residui quali Cys217 e Lys221 sono importanti per il legame dei metalli e anche per l'attività di SR, infatti in mutanti per questi singoli residui non è stata misurata alcuna attività [11]. Il sito di legame dei metalli è conservato in omologhi di mammifero, pianta e lievito [12].



**Figura 2** Modello di hSR in cui sono indicati  $Mg^{2+}$ , AMP-PCP e PLP, rappresentati rispettivamente in viola, verde e giallo. Il modello si basa sulla struttura di hSR 3L6B in cui la posizione del nucleotide è stata definita dalla sovrapposizione con la struttura di SpSR (codice PDB 1WTC). **A-** Dettaglio del sito di legame dei metalli. **B-** Dettaglio del sito di legame del complesso AMP-PCP  $\cdot Mg^{2+}$ . Figura tratta da [13].

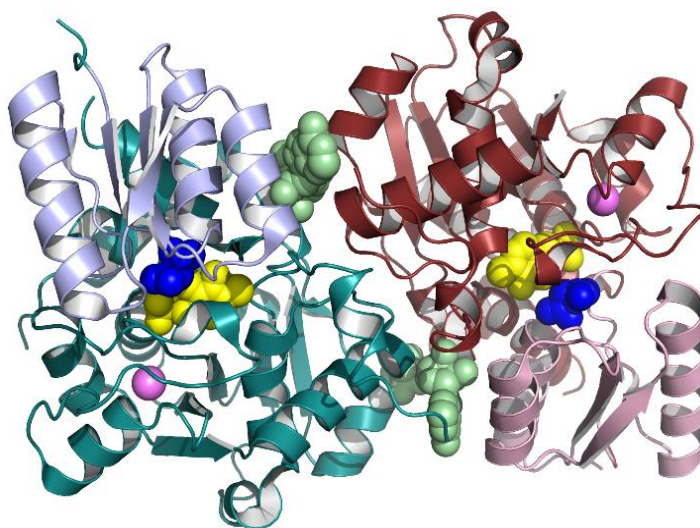
hSR è formata da un dominio maggiore e uno minore, entrambi con una tipica architettura aperta  $\alpha$ - $\beta$ . Il dominio maggiore comprende i residui 1-68 e 157-340 e contiene il cofattore PLP covalentemente legato alla Lys56 formando una base di Schiff (aldimina interna). Gli altri residui che interagiscono con il PLP includono il loop delle tetraglicine (Gly 185-188) e la Met189, che coordinano il gruppo fosfato con i loro atomi di azoto dello scheletro peptidico; Ser312 che è legata all'azoto della piridina e Asn86 che interagisce con il gruppo 5-OH [4]. Questi residui che legano il PLP sono conservati tra gli ortologhi di SR e tra altri enzimi PLP dipendenti. Il dominio minore è costituito invece dai residui amminoacidici 78-155. Tale dominio è

connesso al maggiore tramite una regione flessibile formata dagli aminoacidi 69-77 e 145-149.

Dall'analisi delle strutture di SR umana, di ratto e di lievito, si è potuto dedurre che i due domini proteici possono orientarsi in maniera differente l'uno rispetto all'altro. In particolare dal confronto tra la struttura di SR di ratto con e senza ligandi del sito attivo è stato ipotizzato che il legame di un substrato o di un inibitore possa causare il movimento del dominio minore verso il sito catalitico, che determina il corretto posizionamento del residuo di Ser84 rispetto a l'-serina, per permettere la reazione di racemizzazione [8].

## Sito di legame dell'ATP

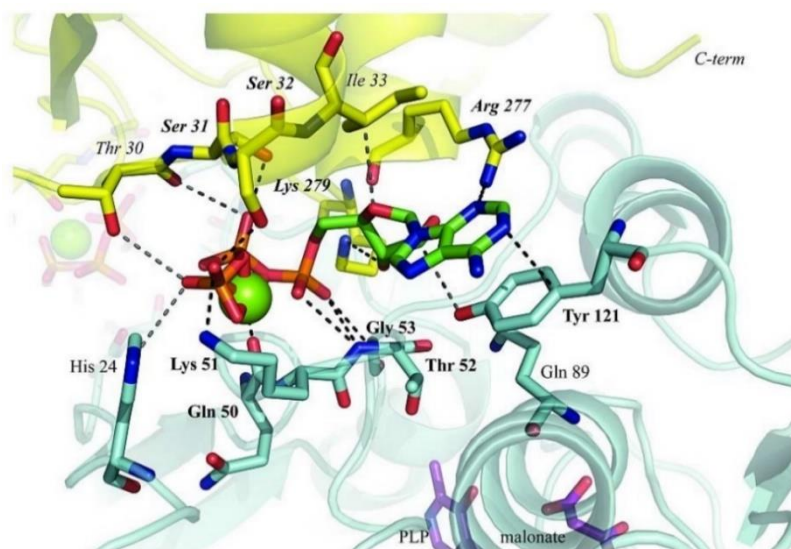
L'organizzazione del sito di legame dell'ATP è stata descritta in dettaglio da Goto *et al.* per la struttura di SpSR in complesso con l'AMP-PCP [9]. Il legame di  $Mg^{2+}$ -AMP-PCP a SpSR nella forma aperta non induce una variazione conformazionale delle subunità, ma cambia l'orientazione relativa tra le due. L'ATP si localizza in modo da posizionare i gruppi fosfato nell'interfaccia di dimerizzazione (Figura 3) con l'adenina rivolta verso la soluzione.



**Figura 3** Struttura di hSR (codice PDB 3L6B), in cui i domini maggiori sono in colori scuri e i domini minori in colori chiari. Il PLP è rappresentato in giallo, gli ioni  $Mn^{2+}$  in rosa scuro e il malonato in blu. L'AMP-PCP (in verde) è stato posizionato sulla base della sovrapposizione della struttura umana con quella di lievito (codice PDB 1WTC).

In SpSR il sito di legame dell'ATP è formato dall'Ala115 e dalla Tyr119 del dominio minore; Asn25, Phe50, Gln51, Lys52, Met53 e Asn311 del dominio maggiore e Ser32, Ser33, Thr34, Arg275, Met276 e Lys277 del dominio maggiore dell'altra subunità. L'anello dell'adenina dell'AMP-PCP è posto tra Ala115 e Arg275. L'O3' del ribosio interagisce con le catene laterali di Asn311 e la Lys277 dell'altra subunità. Di questi 14 residui che interagiscono con l'ATP, 11 sono conservati in SR umana e di ratto, mentre differiscono: Asn25, Thr34 e Met53 sostituiti rispettivamente da His, Ile e Thr. Questa osservazione ha fatto supporre una localizzazione dell'ATP simile in SR di mammifero.

Baumgart *et al.* hanno realizzato un modello della struttura di SR umana sulla base di quella di lievito e della treonina deaminasi di *Thermus thermophilus* (codice PDB 1VE5) e hanno definito la posizione di due molecole di AMP-PCP legate all'interfaccia di dimerizzazione [14]. Un'analisi più approfondita di docking di una molecola di ATP con coordinato uno ione  $Mg^{2+}$  nella struttura umana (codice PDB 3L6B) usando come modello solo quella di lievito contenente l'AMP-PCP (codice PDB 1WTC) è stata svolta da Jirásková *et al* [4]. L'anello purinico dell'adenina forma interazioni di tipo p-stacking con la Tyr121 (catena A) (Figura 4).



**Figura 4** Sito di legame dell'ATP in cui la molecola di ATP e il  $Mg^{2+}$  sono in verde e gli amminoacidi della subunità A in celeste e della subunità B in giallo. I legami sono rappresentati da linee tratteggiate (con le interazioni chiave in nero e le interazioni più deboli in grigio). I residui della subunità B sono indicati in corsivo. La posizione di  $ATP \cdot Mg^{2+}$  è stata definita tramite Autodock 4.0 usando come riferimento la posizione di AMP-PCP nel complesso in SpSR (codice PDB 1WTC). Figura tratta da [4].

Il  $Mg^{2+}$  viene coordinato da Gln50 e si ha la formazione di interazioni degli amminoacidi Lys51, Thr52 e Gly53 con i gruppi fosfato dell'ATP. Le interazioni della catena B invece includono diversi legami a idrogeno dell'Arg277 con l'adenosina, della Lys279 con il 3'OH dello zucchero e delle Ser31 e Ser32 con i gruppi fosfato rispettivamente in  $\beta$  e in  $\gamma$ . Il complesso ATP· $Mg^{2+}$  è stabilizzato da 10 interazioni, 4 delle quali sono con i fosfati. La partecipazione del fosfato in  $\gamma$  alle interazioni con diversi residui di SR suggerisce che non è idrolizzato, questo è in accordo con le osservazioni sperimentali per cui la proteina non sfrutta l'idrolisi dell'ATP per la sua attivazione.

La tasca di legame dell'ATP somiglia a quella di altre proteine che legano l'ATP [15]. Il monomero di hSR non presenta un numero sufficiente di interazioni, infatti solo la forma dimerica determina la formazione di interazioni tali da accomodare il complesso ATP· $Mg^{2+}$ . Un altro residuo importante per la stabilizzazione del sito dell'ATP è la Gln89, che potrebbe mantenere in posizione i residui Tyr121 e Thr52 [4] e inoltre è localizzato in una  $\alpha$ -elica che partecipa alla formazione del sito attivo. Anche se non c'è una connessione diretta tra il PLP e l'ATP, analisi strutturali su SpSR suggeriscono la formazione di un network di legami a idrogeno che potrebbe essere alla base della regolazione della dinamica del sito attivo e della stimolazione della catalisi. In particolare l'ATP potrebbe avere un effetto sulla transizione della struttura da aperta a chiusa che viene innescata dal legame di un substrato o un ligando [9].

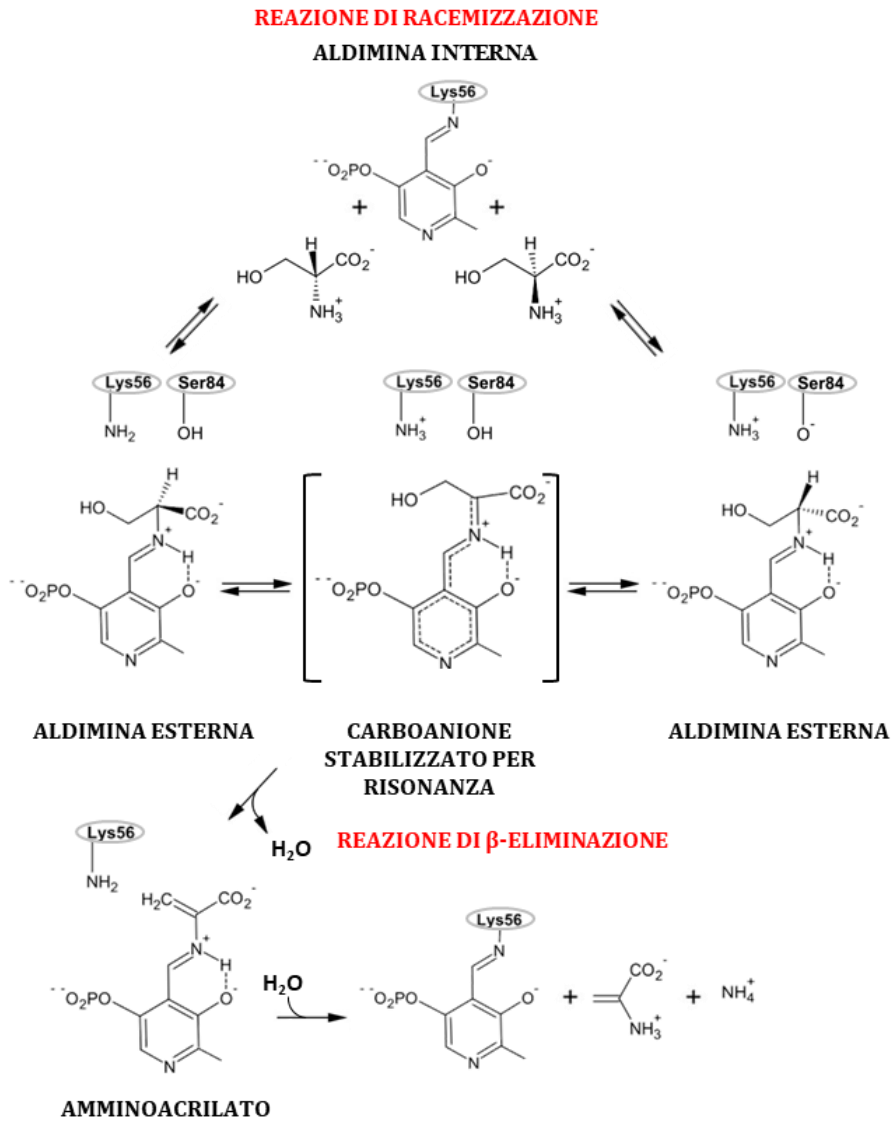
In soluzione la SR forma dimeri con tracce di tetrameri [17,8]. I dimeri sono stabilizzati dalla formazione di contatti idrofobici [12] senza il coinvolgimento di ponti disolfuro [11,14]. Dimeri legati covalentemente sono stati osservati in presenza di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto [17].

## Meccanismo catalitico

SR catalizza sia la reazione reversibile di racemizzazione della L-serina a D-serina sia la  $\beta$ -eliminazione irreversibile di entrambi gli enantiomeri per produrre piruvato e ammoniaca [16].

La racemizzazione segue un meccanismo a due basi (Figura 5). Il PLP lega hSR a livello della Lys56, formando un'aldimina interna. Nel caso della reazione di racemizzazione della L-serina, quando l'L-serina con un gruppo  $\alpha$ -amminico deprotonato attacca il C4 della base di Schiff dell'aldimina interna si ha la formazione di un'aldimina esterna, con il rilascio della Lys56 non protonata. Tale residuo amminoacidico rimuove un protone dall'L-serina e porta alla formazione di un carboanione planare stabilizzato per

risonanza dal PLP, che agisce come un “electron sink” e delocalizza la carica negativa nella piridina.



*Figura 5 Schema delle reazioni catalizzate da SR.*

A differenza delle transaminasi e di altri enzimi PLP-dipendenti però, l’azoto piridinico del PLP non è protonato e infatti nessun intermedio chinonide stabile è mai stato riportato per la reazione. La Ser84 cede un protone al carboanione dalla parte opposta e genera l’aldimina esterna con la D-serina, come intermedio. La D-serina è rilasciata tramite transimminazione con la

Lys56 rigenerando l'enzima libero. Quando il substrato di partenza è la D-serina gli amminoacidi coinvolti sono prima la Ser84 e poi la Lys56. Il carboanione è anche intermedio per la reazione di  $\beta$ -eliminazione. Infatti la disidratazione del carboanione porta alla formazione dell'intermedio amminoacrilato, che va incontro a rapida idrolisi non enzimatica per dare piruvato e ammoniaca [1].

Le reazioni di  $\beta$ -eliminazione e racemizzazione avvengono simultaneamente, anche se con una differente efficienza catalitica, che determina il diverso quantitativo relativo dei prodotti [9,16].

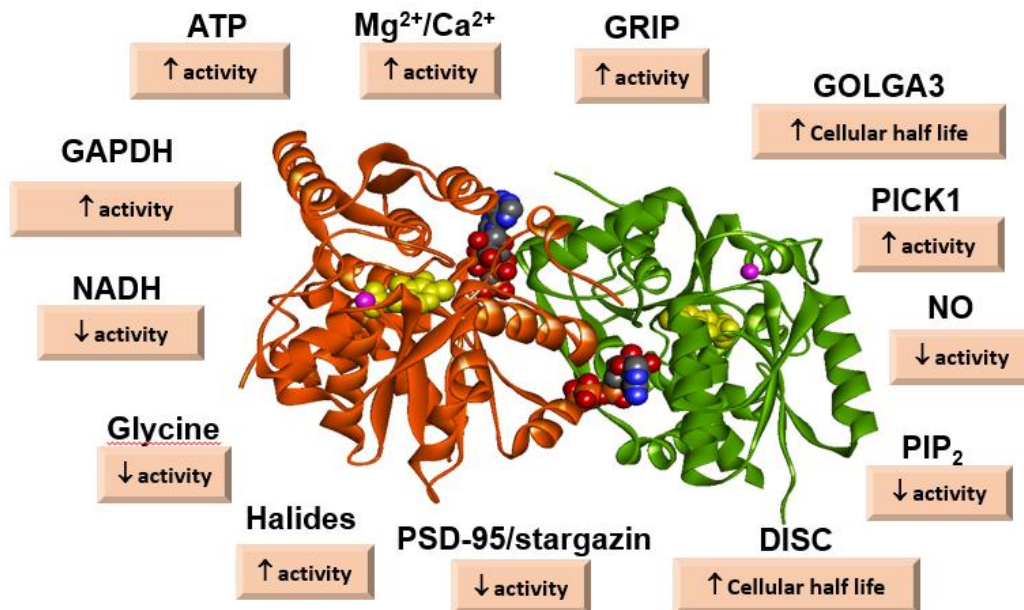
L'ATP e  $Mg^{2+}$  sono i principali effettori nel determinare la ripartizione tra la  $\beta$ -eliminazione e la racemizzazione, favorendo la prima reazione, con un aumento dell'efficienza catalitica di almeno 10 volte sia in vitro che in vivo [18,1,4]. A causa del ruolo dell'ATP nel determinare questo effetto, nei primi studi di hSR ricombinante non è stato possibile rilevare un'attività comparabile con quella osservata in vivo, poiché non era stato aggiunto nessun cofattore [18].

Le reazioni di racemizzazione della L-serina e di  $\beta$ -eliminazione della D-serina sono alla base della sintesi e degradazione della D-serina e si suppone che siano regolate affinché possano essere svolte con una velocità tale da limitare le concentrazioni massime di D-serina nel cervello [1]. Dal confronto delle attività di SR si può notare che la reazione  $\beta$ -eliminazione è comune a tutti gli orologi ed è la reazione principale degli omologhi strutturali serina deidratasi [4]. Questi dati suggeriscono che SR condivida un'origine comune con le serina deidratasi, ma che abbiano acquisito la capacità unica di catalizzare anche la reazione di racemizzazione [16].

Lo sbilanciamento dell'efficienza catalitica a favore della  $\beta$ -eliminazione non è una proprietà caratteristica di tutte le SR. Infatti in uno studio recente Kubota *et al.* hanno identificato un omologo di SR in batteri marini eterotrofi *Roseobacter litoralis* Och 149 [19], in grado di svolgere le reazioni di  $\beta$ -eliminazione e di racemizzazione, ma con un'efficienza catalitica 34 volte maggiore per la reazione di racemizzazione. Quindi tale enzima svolge prevalentemente la reazione di racemizzazione, probabilmente per favorire la produzione/accumulo di D-serina. Questa è l'unica SR fino ad oggi identificata con tale proprietà peculiare.

## Modulazione dell'attività

L'attività di hSR in vivo è modulata a differenti livelli che includono la catalisi, la localizzazione cellulare e la degradazione grazie all'azione di un elevato numero di interattori (Figura 6).



*Figura 6* Modulatori dell'attività di hSR.

## L'effetto dell'ATP

Il primo effettore allosterico descritto per SR è l'ATP [16], che in complesso con il Mg<sup>2+</sup>, è in grado di determinare un incremento dell'efficienza catalitica di β-eliminazione della L-serina di 25 volte e di aumentare l'efficienza catalitica della racemizzazione di 4 volte [15, 20]. La produzione di D-serina è stimolata dall'addizione di ATP e in misura minore dall'ADP, mentre l'AMP non ha nessun effetto [16]. L'affinità di SR per l'ATP è circa 30 volte maggiore che per l'ADP e questo indica che tale molecola non regola fisiologicamente SR. Inoltre la stimolazione dell'ATP non dipende dall'idrolisi poiché analoghi non idrolizzabili, quale l'AMP-PCP, sono ugualmente efficaci nell'attivazione di SR. Anche altri nucleotidi, come GTP, ITP, UTP e CTP stimolano SR, ma con una variazione di attività molto bassa. La modulazione allosterica da parte dell'ATP dell'attività di SR non è accompagnata da cambiamenti conformazionali della proteina visibili nella struttura cristallografica, quali apertura o chiusura del sito attivo e/o riorientazione del cofattore o di residui catalitici. Ciononostante, dallo studio della struttura di SpSR in assenza e in presenza di ATP si è osservata una variazione dell'orientazione relativa delle due subunità. La costante

apparente di dissociazione dell'ATP per hSR ( $EC_{50}$ ) è pari a circa 240  $\mu$ M, quindi, poiché la concentrazione di ATP nel citosol varia da 1 a circa 6 mM [20], è stato ipotizzato che questo nucleotide saturi SR in condizioni fisiologiche [9], risultando in un enzima sempre completamente attivato. Studi più recenti hanno dimostrato che il legame dell'ATP a SR è cooperativo, con un coefficiente di Hill di circa 2 [21]. La forma ad alta affinità per l'ATP di serina $\alpha$  racemasi presenta una costante di dissociazione ( $K_{DR}$ ) pari a circa 11  $\mu$ M, mentre la forma a bassa affinità presenta una costante di dissociazione ( $K_{DT}$ ) pari a circa 1.8 mM. Quest'ultimo valore cade esattamente nell'intervallo di concentrazione fisiologica dell'ATP.

In alcuni casi l'interazione con nucleotidi può indurre non solo variazioni nell'attività, ma anche nello stato di oligomerizzazione della proteina, come nel caso di omologhi procariotici di SR, quali le treonine deaminasi. In particolare le treonina deaminasi biodegradative (TdcBs) di *Escherichia coli* e di *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (da qui in avanti *Salmonella*), che hanno un'identità di sequenza del 99% tra loro e solo del 36% con hSR, sono regolate positivamente dall'AMP [22], che determina la stabilizzazione di una forma tetramerica [23]. Dall'analisi della struttura della TdcB di *Salmonella* è stato osservato che il legame del CMP all'interfaccia del dimero è essenziale per facilitare la tetramerizzazione e successiva attivazione dell'enzima [9, 23]. In un recente studio Bruno *et al.* hanno mostrato una variazione della conformazione di hSR dipendente da cationi divalenti e da fosfonucleotidi, in modo analogo alle treonine deaminasi [13]. In particolare  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  favoriscono la formazione di tetrameri di hSR, che sono ulteriormente stabilizzati dall'interazione con il complesso ATP· $Mg^{2+}$ . Quindi l'ATP sposterebbe l'equilibrio dimero a bassa attività/tetramero ad alta attività verso quest'ultimo. Sarebbe interessante poter stabilizzare la conformazione tetramerica, poco popolata in soluzione, nel cristallo, tenuto conto che non esistono strutture tridimensionali dell'enzima umano in complesso con l'ATP e che la modulazione della struttura quaternaria dipendente da nucleotidi potrebbe essere diversa o assente nel lievito.

## Modulazione dell'attività da parte di ioni

L'attività di SR è modulata sia da cationi divalenti che da anioni ma non da cationi monovalenti [12, 25, 26]. L'attivazione da parte di cationi divalenti è stata proposta inizialmente solo per il  $Ca^{2+}$  [25], in seguito si è preso in considerazione il  $Mg^{2+}$  che ha una maggiore concentrazione intracellulare e quindi è più probabile che sia un ligando fisiologico di hSR

[16]. Nello specifico la concentrazione intracellulare di  $Mg^{2+}$  libero nei neuroni è stimata nel range di 400-600  $\mu M$  [26], mentre la concentrazione media di  $Ca^{2+}$  è nel range nanomolare nel citosol neuronale [27]. A saturazione  $Mg^{2+}$  produce un'attivazione dell'enzima di 10 volte maggiore se confrontata con quella in assenza di metalli, il 20% più alta dell'attivazione a seguito dell'interazione con  $Ca^{2+}$  [13]. Inoltre l'attività di hSR viene aumentata ulteriormente dall'interazione con ATP insieme a tali cationi divalenti, con un effetto additivo quando si forma il complesso  $Mg^{2+}\cdot ATP$  [16]. La variazione dell'attività in presenza di ATP e  $Ca^{2+}$  è invece pari alla metà rispetto a quella in presenza di ATP e  $Mg^{2+}$ , probabilmente a causa della ridotta capacità del complesso con il  $Ca^{2+}$  di spostare l'equilibrio conformazionale verso la forma enzimatica totalmente attivata.

Un'incubazione della proteina con EDTA, un agente chelante, elimina quasi del tutto la sintesi di D-serina [4].

Gli alogenuri, come fluoruro e cloruro, causano un aumento dell'attività di hSR [24], indipendentemente dalla presenza o meno di ATP. Questo indica che gli alogenuri non influenzano il legame dell'ATP. L'effetto degli alogenuri potrebbe essere dovuto alla stabilizzazione di una conformazione dell'enzima maggiormente attiva.

## Nitrosilazione

SR è interessata da una reazione di S-nitrosilazione, che causa un'inibizione dell'attività enzimatica. In particolare l'NO causa nitrosilazione di SR in corrispondenza del residuo Cys113, impedendo il legame dell'ATP e quindi inattivando l'enzima [28]. Diverse ricerche supportano un modello di plasticità sinaptica dove i neuroni postsinaptici, attivati dalla neurotrasmissione di NMDA inviano un messaggero molecolare per diminuire l'attività glutammatergica [29]. L'NO è stato proposto come messaggero retrogrado per tale modulazione sinaptica, specialmente per il potenziamento a lungo termine [30].

## Fosforilazione e traslocazione in membrana

Poiché SR non ha nessun dominio transmembrana si supponeva fosse localizzata prevalentemente nel citosol, ipotesi supportata da frazionamenti di estratti cerebrali [31] e analisi immunocitochimiche di neuroni contenenti SR [32]. Tuttavia Demens *et al.*, hanno rilevato SR a livello delle membrane delle cellule epiteliali vestibolari di ratto [33] e uno studio del 2009 indica

che una piccola frazione di SR neuronale va incontro a traslocazione in membrana [34]. Poiché tali proteine sono inattive è stato ipotizzato che la traslocazione di SR alle membrane cellulari fosse legata al controllo della concentrazione di D-serina per prevenire un'eccessiva attivazione dei recettori NMDA.

Dato che SR non presenta nessun dominio transmembrana è stato ipotizzato che il legame in membrana potesse essere legato a modificazioni post-traduzionali, come l'acilazione che aumenta l'idrofobicità proteica [35]. Studi su colture cellulari neuronali di ratto hanno mostrato che le molecole di SR presenti in membrana sono acilate su residui di serina o treonina per addizione di acido palmitico [34]. La palmitoilazione aumenta in seguito a stimolazione dei recettori NMDA ed è associata ad inattivazione di SR con meccanismi non perfettamente compresi. La palmitoilazione e la conseguente traslocazione alla membrana cellulare sembra quindi essere un meccanismo messo in atto dai neuroni per evitare una pericolosa iperattivazione dei recettori NMDA [34].

La traslocazione in membrana di SR in seguito a palmitoilazione è legata anche alla fosforilazione di Thr227[34], responsabile soprattutto del legame di SR in membrana in condizioni basali, in assenza di alcuna stimolazione [34]. Nel ratto la fosforilazione di un altro residuo, Thr71, è stata osservata in SR presenti sia in membrana, sia nel citosol e tale modificazione comporta un aumento dell'attività dell'enzima [36]. Thr71 non è presente in SR umana, quindi potrebbe avere un ruolo specie-specifico. Queste fosforilazioni sono reversibili, le chinasi responsabili di tali modificazioni non sono ancora state identificate [35, 37].

Negli astrociti, Mustafa *et al.* hanno dimostrato l'associazione di SR in membrana a seguito del legame con fosfolipidi, in particolare con il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) presente in membrana [37]. Tale interazione determina inattivazione di SR, poiché il legame con PIP<sub>2</sub> avviene in corrispondenza di amminoacidi vicini al sito di legame dell'ATP. A differenza dell'acilazione, questo tipo di traslocazione in membrana è reversibile. È stato ipotizzato che fisiologicamente vi sono SR in membrana legate a PIP<sub>2</sub>, a seguito di stimolazione glutammatergica dei recettori NMDA si ha la stimolazione della fosfolipasi C che degrada PIP<sub>2</sub> e rilascia SR [37].

## **Interazione con altre proteine**

L'attività di hSR è regolata anche dall'interazione con altre proteine. Tra queste vi è GRIP (glutamate receptor interacting protein) associata ai recettori AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid).

L'attivazione di tali recettori causa la dissociazione di GRIP, che si lega a SR stimolando la produzione di D-serina [38]. Tale legame avviene grazie all'interazione tra un dominio PSD95/disc large/ZO-1 (PDZ) di GRIP. I domini PDZ sono formati da 80-90 amminoacidi e proteine contenenti tali domini sono state trovate in batteri, lieviti, piante e animali [39]. Si tratta di regioni implicate nelle interazioni proteina-proteina, favorendo il legame di motivi peptidici presenti nella porzione C-terminale di altre proteine [40]. Nello specifico GRIP, che presenta sette domini PDZ consecutivi, interagisce con SR in corrispondenza di PDZ6 [12] che lega la sequenza C-terminale Val-Ser-Cys (presente sia in SR umana che di topo). Tale interazione induce una variazione conformazionale che comporta un cambiamento sia della  $K_M$  sia della  $k_{cat}$  per la sintesi di D-serina [14].

Un altro effettore è PICK1 (protein interacting with C-kinase 1), che pure è caratterizzata dalla presenza di un dominio PDZ e che di conseguenza interagisce sempre in corrispondenza della porzione C-terminale di SR. Fujii *et al.* hanno mostrato che una delezione del gene che codifica per PICK1 in topi causa una riduzione dei livelli di D-serina suggerendo un suo ruolo nella regolazione della sintesi di D-serina da parte di SR [41].

La degradazione di SR tramite il sistema ubiquitina-proteasoma è mediata da GOLGA3 e DISC1. GOLGA3 (Golgin subfamily A member 3 o GCP70 o golgin-160) determina un aumento delle quantità di SR, favorendo il legame di SR alle membrane del Golgi [42]. Il ruolo di SR associata al Golgi non è chiaro, ma poiché la proteina risulta attiva potrebbe costituire un reservoir funzionale dell'enzima. Inoltre GOLGA3 interferisce con il legame dell'ubiquitina E3, favorendo una riduzione dei livelli di ubiquitinazione e degradazione in vivo. Un'azione simile viene svolta da DISC1 (Disrupted-in-schizophrenia-1), che rappresenta un'interessante target per il trattamento di schizofrenia e altri disordini psichiatrici. Studi su mutanti di DISC1 hanno chiarito il suo ruolo nel legare e stabilizzare SR, impedendo la sua degradazione tramite ubiquitinazione [43].

Ma *et al.* hanno mostrato un'interazione di SR con le proteine sinaptiche PSD-95 (post-synaptic density protein 95) e stargazin, con la formazione di un complesso ternario [44]. Stargazin facilita la localizzazione di SR a livello della membrana cellulare e ne inibisce l'attività. L'attivazione dei recettori AMPA favorisce la dissociazione di SR da stargazin e quindi dalle membrane, con conseguente aumento dell'attività catalitica.

## Glicina e malonato

La glicina è un co-agonista dei recettori NMDA in grado di formare una base di Schiff reversibile con SR. La glicina presenta una  $K_i$  per SR di 0.15-1.6 mM [45]. La glicina è presente nel cervello a concentrazioni che variano significativamente a seconda della localizzazione, da 8-12  $\mu$ M a livello extracellulare a circa 0.6 mM nelle cellule neuronali [46]. Poiché la concentrazione intracellulare di glicina è simile o maggiore ai valori di  $K_i$ , l'inibizione di SR potrebbe essere fisiologicamente rilevante per il controllo dell'omeostasi della D-serina e quindi nell'attività dei recettori NMDA [4]. L'interazione di hSR con la glicina ha permesso l'identificazione di un cross-talk tra il sito attivo e il sito di legame dell'ATP. Infatti il legame della glicina comporta un aumento dell'affinità di legame per l'ATP e viceversa il legame dell'ATP aumenta l'affinità per la glicina [21].

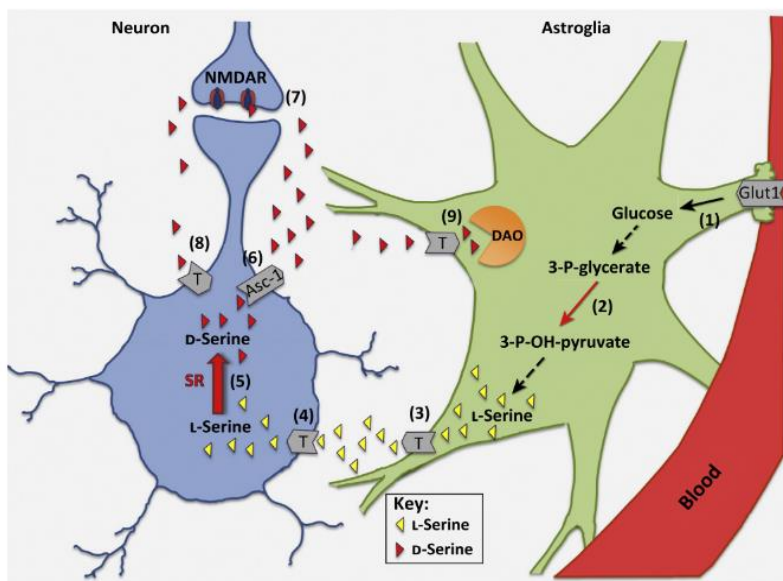
Il cross-talk tra il sito attivo e il sito dell'ATP è stato confermato anche dall'analisi di un altro inibitore di hSR quale il malonato. Si tratta di uno dei più potenti inibitori competitivi identificati fino ad oggi [44, 45], con una  $K_i$  di 33  $\mu$ M per SR di topo e 71  $\mu$ M per hSR [4]. Anche il legame del malonato determina un aumento dell'affinità di hSR per l'ATP e quest'ultimo favorisce il legame del malonato, diminuendo la  $K_D$  [24].

## Localizzazione

La SR è stata scoperta per la prima volta nella crisalide del baco da seta *Bombyx mori* [47], in seguito è stata purificata dal cervello di ratto nel 1999 [18]. L'mRNA di SR umana è stato identificato nel cuore, nei muscoli scheletrici, nei reni e nel fegato [48], ma è localizzato prevalentemente a livello cerebrale. Studi di immunofluorescenza basati sulla colocalizzazione di SR con markers gliali hanno suggerito che SR fosse espressa negli astrociti e nella microglia [49]. Successivamente analisi immunoistochimiche e di ibridizzazione in situ hanno identificato tale proteina nei neuroni [31]. Dato confermato anche da studi su topi knockout per il gene di SR, che hanno identificato la proteina principalmente nei neuroni piramidali della corteccia cerebrale e nella regione ippocampale CA1 [50]. Inoltre esperimenti di doppia immunofluorescenza hanno rivelato una colocalizzazione di SR con una proteina nucleare specifica dei neuroni (NeuN), nel cervelletto e nelle cellule del Purkinje. Queste analisi indicano che SR è espressa nella popolazione neuronale in diverse regioni del cervello, indipendentemente dalla loro tipologia. Ipotesi confermata nel 2014 da Balu *et al.* che ha mostrato

l'espressione di SR in neuroni sia di tipo inibitorio che eccitatorio, ma non negli astrociti [51].

Nonostante sembri essere smentita del tutto una localizzazione di SR a livello degli astrociti, è stato ipotizzato che i neuroni non possano produrre l' L-serina, quindi dipendono dagli astrociti per tale substrato [53, 54]. Dati recenti suggeriscono la presenza di uno "shuttle della serina" (Figura 7) che consente il trasporto di L-serina dagli astrociti ai neuroni.



**Figura 7** Schema dello shuttle della serina, proposto da Wolosker et al. Figura tratta da [53].

Il meccanismo prevede diverse fasi. Inizialmente gli astrociti ottengono glucosio dal sangue tramite il trasportatore GLUT1 e lo convertono in L-serina attraverso diverse reazioni catalizzate da enzimi espressi negli astrociti. In seguito l'L-serina viene trasportata nei neuroni mediante trasportatori di amminoacidi neutri (in Figura 7 indicati con T). La SR neuronale converte l'L-serina in D-serina che viene rilasciata dai neuroni da trasportatori Asc-1 (trasportatori alanina/serina/cisteina 1) o altri trasportatori e permette l'attivazione dei recettori NMDA. La segnalazione della D-serina può terminare attraverso la riacquisizione da parte dei neuroni o l'internalizzazione a livello degli astrociti e successivo metabolismo ad opera dell'enzima D-amminoacido ossidasi (DAO) [53].

## Inibizione di hSR

hSR è un target emergente per il trattamento dell'iperattivazione dei recettori NMDA, una condizione che è alla base di una varietà di patologie neurodegenerative acute e croniche. Inibitori di SR potrebbero offrire un'alternativa agli antagonisti dei recettori NMDA con intollerabili effetti secondari. Nonostante la rilevanza clinica di una possibile azione farmacologica nei confronti di hSR il numero di studi per lo sviluppo di inibitori o effettori è limitato. Questo potrebbe esser dovuto alla difficoltà nell'identificazione di molecole specifiche e all'assenza di una conoscenza approfondita sulla regolazione funzionale e conformazionale di hSR. Tutti i composti identificati fino ad oggi, che hanno come target il sito attivo di hSR, presentano costanti di inibizione nel range millimolare o micromolare.

Tutti gli amminoacidi proteinogenici, ad eccezione di Phe, Trp e Tyr, sono stati testati come inibitori di SR. L'alanina non interagisce per nulla con SR, mentre L'aspartato, ma non il D-aspartato, inibisce SR. Il glutammato ha un effetto di riduzione dell'attività di SR minimo, invece il D-glutammato non ha nessun effetto. Questi risultati suggeriscono che le forme L abbiano una maggiore affinità per SR rispetto alle forme D [55, 56]. L' L-asparagina è un inibitore competitivo di SR con un valore di  $K_i$  di 1.1 mM [55], un altro inibitore competitivo è l'L-eritro-3-idrossiaspartato (L-EHA) che presenta una  $K_i$  di 11  $\mu$ M per hSR e 40  $\mu$ M per SR di topo. Tale inibitore è stato utilizzato con successo in un recente studio di neurofisiologia per l'analisi del ruolo della D-serina nella neurotrasmissione [56]. Diversi composti derivati dalla serina sono stati testati come inibitori, tuttavia nella maggior parte dei casi le modificazioni hanno causato una perdita di affinità. Per esempio l'L-serina ammido o l'L-serina metilestere non inibiscono SR [54].

Mustafa *et al.* hanno mostrato un'inibizione di SR da parte dell'inibitore non competitivo fosfatidilinositolo(4,5)-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), a seguito dell'interferenza con il legame dell'ATP, con una IC<sub>50</sub> di 13  $\mu$ M [37].

Uno dei più potenti inibitori di hSR fino ad oggi individuato è il malonato [58, 56], che tuttavia ha un effetto anche su altri enzimi come la succinato deidrogenasi [58]. Sono stati prodotti diversi analoghi del malonato, ma presentano tutti una bassa affinità [4]. L'unica eccezione è rappresentata dal 2,2-dicloromalonato, per cui è stata misurata una  $K_i$  di 19  $\mu$ M [59].

Al fine di individuare nuovi composti in grado di interagire con hSR, Dellaflora *et al.* hanno svolto uno studio di in silico screening che ha permesso di identificare quattro composti con valori di  $K_i$  nel range mM [60]. Inoltre, sulla base della struttura del malonato, sono stati prodotti e testati anche

diversi composti derivati del ciclopropano [61], ma anche in questo caso le costanti di dissociazione erano nell'alto micromolare/millimolare.

Recentemente è stato riportato un effetto inibitorio da parte del NADH e alcuni analoghi quali l'1-metil-1,4-diidronicotinammide (MNA) e l'1,4-diidronicotinammide mononucleotide (NMN) [62]. In particolare NMN mostra una  $K_i$  di circa 18  $\mu\text{M}$ , paragonabile quindi a quella dell'inibitore più potente finora identificato e con il vantaggio di legarsi ad un sito allosterico, quindi, in principio più specifico per serina racemasi.

Una diversa strategia volta a modulare, senza inibirla completamente, l'attività dell'enzima si basa sulla regolazione delle attività di  $\beta$ -eliminazione dell'L- e della D-serina e della racemizzazione della L-serina. Ad esempio composti in grado di favorire solo la reazione di  $\beta$ -eliminazione della D-serina potrebbero essere più efficienti nella riduzione dei livelli di D-serina nel cervello. Infatti un'azione sulle attività sia di  $\beta$ -eliminazione sia di racemizzazione bloccherebbe la sintesi di D-serina, ma la rimozione della D-serina formata in precedenza avverrebbe lentamente a causa dell'assenza dell'attività dell'enzima DAAO in alcune aree del cervello. Al contrario per aumentare i livelli di D-serina occorrerebbero ligandi in grado di stimolare la racemizzazione e sfavorire la  $\beta$ -eliminazione [1].

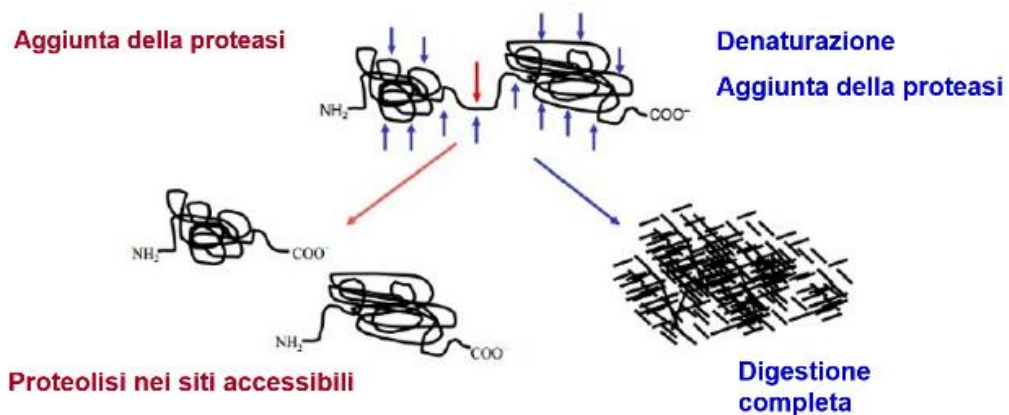
## Proteolisi limitata

hSR è in grado di interagire con numerosi effettori allosterici che alterano le sue proprietà catalitiche. Al fine di studiare i cambiamenti della conformazione di hSR che si verificano in soluzione a seguito dell'interazione con diversi ligandi in questo lavoro è stato svolto uno studio di proteolisi limitata.

Le variazioni conformazionali delle proteine possono essere analizzate mediante differenti tecniche che includono il dicroismo circolare, la spettroscopia Raman a infrarossi, l'NMR o la cristallografia a raggi X. Ognuna presenta vantaggi e limitazioni, per esempio il quantitativo di proteina richiesto potrebbe essere molto elevato o vi potrebbero essere difficoltà nella cristallizzazione. Un approccio alternativo per ottenere informazioni strutturali consiste nel definire le aree maggiormente esposte all'interazione con il solvente o con altre molecole. Per investigare tale l'accessibilità proteica superficiale vi sono diverse procedure come la modificazione chimica di specifici residui [63], reazioni di scambio idrogeno/deuterio [64] o l'idrolisi enzimatica [65]. In quest'ultimo caso la digestione della proteina di interesse avviene in condizioni native (Figura 8). I passaggi successivi

sono la separazione e l'identificazione dei frammenti proteici, tramite SDS-PAGE o cromatografia liquida e spettrometria di massa.

In questo modo è possibile determinare i siti accessibili al taglio da parte di una proteasi su una proteina ripiegata. La conformazione nativa delle proteine può fornire delle barriere steriche per l'attacco enzimatico, lasciando le regioni maggiormente esposte e flessibili accessibili al taglio proteolitico e impedendo o rallentando la degradazione delle regioni più strutturate della proteina [66]. Quindi si ha una proteolisi limitata che porta alla formazione di grandi frammenti proteici che possono poi essere degradati in peptidi di dimensioni minori [65].



**Figura 8** Schema delle fasi di una reazione di digestione enzimatica. In blu sono descritti i passaggi per ottenere una degradazione totale delle proteine di interesse, in rosso le fasi per una proteolisi solo parziale al fine di individuare le regioni maggiormente esposte della proteina di interesse.

L'utilizzo della proteolisi limitata per studiare la dinamica e la struttura di proteine prevede che sia proprio l'accessibilità del sito e non la specificità di taglio della proteasi a determinare l'evento proteolitico. Ovviamente però la proteasi può essere scelta in un gruppo relativamente limitato di enzimi idrolasici in quanto l'attività deve essere compatibile con condizioni (pH, temperatura, forza ionica) che garantiscano il mantenimento della struttura nativa della proteina d'interesse. Subtilisina, termolisina, proteinasi K, pepsina e tripsina sono state utilizzate in studi di proteomica [65]. Hubbard *et al.* hanno condotto uno studio dei cambiamenti conformazionali richiesti per il taglio proteolitico e hanno osservato che i siti per la proteolisi limitata sono quelli caratterizzati da un elevato grado di destrutturazione locale della proteina fino a 12 amminoacidi [67]. Una possibile spiegazione del fatto che i domini strutturati, comprendenti ad

esempio le  $\alpha$ -eliche, non sono facilmente idrolizzabili dalle proteasi può derivare anche da considerazioni energetiche. Se la proteolisi avviene al centro di un' $\alpha$ -elica, questa viene distrutta e di conseguenza anche tutti i legami a idrogeno che la stabilizzano. Mentre la scissione di una porzione proteica in un sito non correttamente ripiegato non causa grandi cambiamenti energetici, poiché l'idrolisi del peptide può facilmente essere compensata da legami idrogeno con l'acqua [68]. Quindi la proteolisi degli elementi rigidi della struttura secondaria è termodinamicamente svantaggiosa. Dall'analisi dei peptidi ottenuti si possono identificare le regioni più suscettibili alla digestione, che potrebbero essere diverse a causa di variazioni conformazionali, ad esempio indotte dall'interazione con effettori o altre proteine.

Per svolgere una reazione di proteolisi limitata per analizzare la conformazione di una proteina è necessario che il taglio enzimatico sia correlato alla flessibilità della proteina di interesse [69]. Quindi bisogna scegliere una specifica proteasi, definire un rapporto proteasi:substrato ottimale e tenere conto della temperatura e del tempo di incubazione [65]. Si tratta di parametri che devono essere determinati in base al tipo di proteina da analizzare. Nello specifico si devono definire delle condizioni per digerire la proteina di interesse e permettere l'identificazione dei domini stabili, evitando la degradazione totale. La proteolisi può essere controllata usando una bassa concentrazione di proteasi, tempi di reazione brevi e basse temperature.

# ***SCOPO DEL LAVORO***



Nonostante il ruolo fondamentale di hSR nel sistema nervoso centrale dei mammiferi, la caratterizzazione delle sue proprietà dinamiche e funzionali rimane ancora incompleta. In particolare, le basi molecolari della relazione tra la funzione e la dinamica di SR non sono ancora state chiarite, specialmente in riferimento al controllo allosterico dell'attività enzimatica.

L'attività di hSR è modulata dall'interazione con numerosi effettori, tra cui i principali sono  $Mg^{2+}$  e ATP. Quest'ultimo causa un incremento dell'efficienza catalitica della reazione di  $\beta$ -eliminazione della L-serina di almeno 25 volte, con un effetto molto minore, circa 4 volte, sulla reazione di racemizzazione. L'effetto sull'attività della proteina potrebbe essere dovuto ad effetti sulla dinamica di hSR. La struttura di SR infatti subisce un cambiamento da una conformazione aperta a una chiusa a seguito dell'interazione con un substrato o inibitore, mentre non sono state rilevate variazioni della struttura terziaria causate dal legame dell'ATP. Tuttavia la presenza di glicina o malonato nel sito attivo induce una diminuzione nella  $K_D$  di hSR per l'ATP, stabilizzando una conformazione ad alta affinità per tale nucleotide. Quindi è stata ipotizzata l'esistenza di un cross talk tra il sito attivo e quello allosterico. Inoltre dall'analisi della struttura di SpSR è stato rilevato un network di legami a idrogeno, formato da cinque residui amminoacidici Thr52, Asn86, Gln89, Glu283 e Asn316 (numerazione di hSR) e da molecole di acqua, che potrebbe essere alla base di una comunicazione tra il PLP e l'ATP. Al fine di chiarire il ruolo degli amminoacidi presenti nel putativo network di legami a idrogeno che collega il PLP con l'ATP, sono state individuate due posizioni da sottoporre a mutagenesi sito specifica, quali Q89 e E283. La scelta è stata dettata da criteri di conservazione dei residui, di conservazione della conformazione in strutture di serina racemasi e omologhi strutturali di organismi diversi e dalla interazione o meno del residuo con l'ATP o il PLP. Sono stati quindi progettati 3 mutanti, Q89M-hSR, Q89A-hSR e E283A-hSR. Sono stati ottenuti i ricombinanti di Q89M-SR e E283A-hSR, ma solo la variante Q89M-hSR si è espressa in forma solubile in quantità sufficienti per le analisi successive. La caratterizzazione biochimica della proteina Q89M-hSR ha permesso di definire Q89 un residuo chiave nel controllo dell'attività enzimatica di SR ad opera dell'ATP. La comprensione dei meccanismi che controllano la funzione e la dinamica dell'enzima potrebbe avere interessanti conseguenze da un punto di vista farmaceutico e permettere di progettare molecole in grado di modulare la produzione di D-serina.

In quest'ottica, il numero limitato di conformazioni isolate tramite cristallografia a raggi X non rappresenta l'attuale spazio conformazionale di hSR. Per studiare la dinamica in soluzione di SR e di come questa è modificata dall'interazione con diversi modulatori è stato svolto uno studio di proteolisi limitata usando tripsina. Lo scopo è stato quello di identificare regioni della

proteina che mostrassero una stabilità differenziale in presenza e assenza di ligandi e quindi mappare le regioni della proteina maggiormente coinvolte in eventi dinamici indotti da attivatori, inibitori e effettori allosterici.

# ***MATERIALI E METODI***

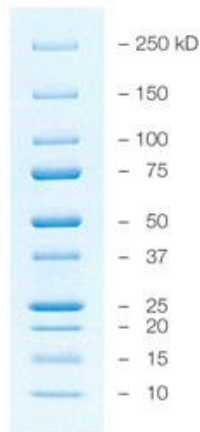


## Materiali

Tutti i reattivi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA) con l'eccezione di: Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP), che è stato acquistato da Apollo Scientific (Denton, Manchester, UK); ditionitrotolo (DTT) e iodoacetammide (IAA) acquistati da Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

## Elettroforesi di proteine in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

Il gel di poliacrilammide è stato preparato utilizzando Acrylamide/Bis solution 40%, 29:1 (PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany). Il running gel è stato preparato utilizzando una soluzione di acrilammide/bisacrilammide al 12% in tampone 0.6 M Tris/HCl M, 1% SDS, 0.8% APS e 0.2% TEMED, pH 8.8. Lo stacking gel è stato preparato con una soluzione di acrilammide/bisacrilammide al 5% in tampone 0.05 M Tris/HCl, 1% SDS, 3% APS e 0.1% TEMED, pH 6.8. I gel sono stati posti in una cella Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La corsa elettroforetica è stata svolta a voltaggio costante (200 V) nel tampone di corsa costituito da 10 mM Tris, 76.8 mM glicina, 0.04% SDS, pH 8.3. Ai campioni da analizzare è stato aggiunto Sample Buffer 1X, formato da 0.1 M Tris/HCl, pH 6.8, 4 % SDS, 4%  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0.5% blu di bromofenolo, 24% glicerolo. Le bande proteiche sono state evidenziate per colorazione con Coomassie Blue, formato da 0.5 g di Coomassie Brilliant Blue R-250 (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA), 50% etanolo e 7% acido acetico. Le immagini dei gel sono state acquisite utilizzando l'apparato ChemiDoc Image System™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e il quantitativo di proteina in ogni banda è stato calcolato mediante confronto con il marker Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), rappresentato in Figura 9, e utilizzando il software ImageLab™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).



**Figura 9** Marker di massa molecolare utilizzato per SDS-PAGE, per ogni banda è indicata la massa in kD.

## Proteolisi limitata

hSR, ad una concentrazione pari a 0.9 mg/ml, è stata digerita nel tampone 50 mM TEA, pH 8, con tripsina. I siti di taglio della proteasi per la sequenza di hSR sono stati predetti tramite programma on-line *Peptide Cutter* ([http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)). È stato utilizzato un rapporto proteasi: proteina pari a 1:5000 (peso/peso). La reazione è stata svolta a 20°C. Per valutare la cinetica di digestione sono stati eseguiti dei prelievi della miscela di reazione a differenti tempi, bloccando la digestione per aggiunta di SDS-PAGE Sample Buffer (in rapporto 1:1) e ponendo i campioni a 100°C per 5'. I tempi analizzati sono stati: 0-2'-5'-10'-15'-20'-30'-60'. I prodotti della digestione sono stati separati tramite SDS-PAGE.

## Protocollo di digestione in gel

Il protocollo di digestione in gel prevede tre fasi.

La prima è la decolorazione, in cui le bande di interesse sono state tagliate e poste in eppendorf a cui si è aggiunta una soluzione formata per il 10% da acido acetico e per il 20% da etanolo. Le bande sono state poste in agitazione per 16 ore.

In seguito sono stati effettuati i passaggi di riduzione, alchilazione e digestione. Dopo aver effettuato due lavaggi con acqua, è stato aggiunto l'agente riducente DTT all'1 % (peso/volume). La riduzione è stata svolta per 30'. A questa è seguita una fase di alchilazione tramite IAA al 4%, posta a contatto con le bande per 30' al buio. Sono stati svolti due lavaggi di 20' con la soluzione 20 mM ammonio bicarbonato-acetonitrile 50:50, successivamente è stato addizionato 100% acetonitrile per 5'. I campioni sono stati portati a secco in SpeedVac RVC 2-18 CD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germania) per circa 15' e poi sono stati reidratati in presenza di 50 µl di tripsina per 30'. La tripsina utilizzata per la digestione in gel è stata solubilizzata in una soluzione formata da 1 mM HCl, 20 mM ammonio bicarbonato e acetonitrile. Per la digestione è stata diluita 1:2 con la stessa soluzione utilizzata per la solubilizzazione. L'eccesso di tripsina è stato rimosso e si è aggiunto 20 mM di ammonio bicarbonato. La digestione è stata fatta proseguire a 37°C per 16 ore.

L'ultimo passaggio è stato il recupero dei peptidi digeriti. Il surnatante della reazione è stato raccolto e alle bande è stata aggiunta una soluzione di acetonitrile: acido trifluoroacetico (TFA) 0.1% in rapporto 50:50. Si sono posti i campioni nuovamente a 37°C per 45 minuti. Il surnatante è stato aggiunto al precedente. Questo passaggio è stato ripetuto un'altra volta e alla fine tutti i surnatanti, contenenti i peptidi ottenuti dalla digestione, sono stati portati a secco in SpeedVac RVC 2-18 CD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germania).

Per l'analisi in massa i campioni sono stati risolubilizzati in 20 µl di acqua + 0.1% acido formico (F.A.).

## Analisi di spettrometria di massa

Per l'analisi di spettrometria di massa sono stati utilizzati: MALDI-TOF/TOF™ Analyzer 4800 Plus (AB Sciex, Old Connecticut Path Framingham, MA, USA) e ESI-LTQ Orbitrap XL™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) collegato ad un HPLC (Ultra 3000 Dionex Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

I campioni per analisi MADI-TOF sono stati diluiti 1:1 con la matrice formata dall'acido α-ciano-4-idrossi cinnaminico (HCCA) e caricati su una piastra MALDI secondo il metodo "dry droplet". I dati ottenuti sono stati analizzati tramite il programma *Protein Prospector* (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>). Per l'identificazione dei frammenti proteici si sono considerate alcune possibili modificazioni

amminoacidiche che possono interessare i frammenti proteici durante la preparazione dei campioni (Tabella 2).

Il calcolo della massa molecolare dei frammenti proteici è stato eseguito con programma *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>).

**Tabella 2** Modificazioni amminoacidiche considerate.

<b>Modificazione</b>	<b>Differenza di massa (kDa)</b>
Carboamidometilazione (Cys)	57
Ossidazione (Met)	16
Deamidazione (Asn o Gln)	1

Per l'analisi con l'HPLC-Orbitrap i campioni sono stati separati con una colonna Phenomenex Aeris Peptide (3.6  $\mu$ , XB-C18, 150\*4.6 mm), impostando il gradiente indicato in Tabella 3. Sono state utilizzate le fasi mobili A formata da H<sub>2</sub>O + 0.1% F.A. e B costituita da acetonitrile + 0.1 % F.A. Il flusso è stato impostato a 200  $\mu$ l/min. I dati sono stati analizzati mediante il programma *Proteome Discoverer*<sup>TM</sup> (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

**Tabella 3** Gradiente delle due fasi mobili.

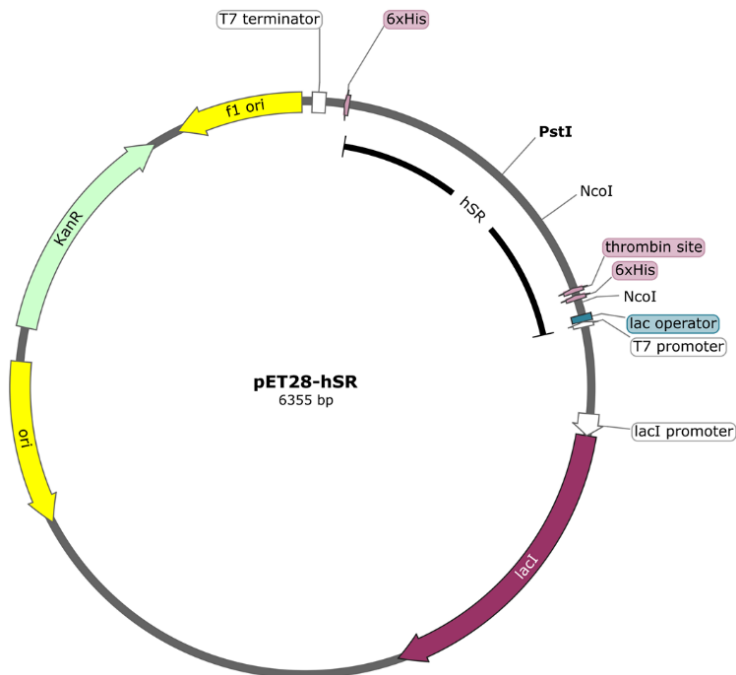
<b>Tempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
0	98	2
5	98	2
54	50	50

La rappresentazione della topologia della struttura di hSR è stata realizzata tramite programma on-line *PDB Sum* EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>), utilizzando la struttura proteica con codice PDB 3L6B.

## Espressione e purificazione

La serina racemasi umana è stata espressa in forma ricombinante come proteina di fusione con una coda di sei istidine codificata nel vettore di espressione pET28a (EMD Millipore, Darmstadt, Germany) (Figura 10). La sequenza della proteina espressa è indicata in Figura 11.

Il plasmide è stato trasformato in cellule *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3) -RIL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) che sono state precedentemente trasformate con i plasmidi codificanti chaperonine GroEL e GroES. Queste ultime sono espresse da un plasmide del kit Chaperone Plasmid set, Takara®. Il plasmide reca la resistenza al cloramfenicol e l'induzione delle chaperonine dipende da arabinosio. La scelta della tipologia di chaperonine da utilizzare è stata fatta a seguito di diverse prove di espressione svolte dalla Dott.ssa Serena Faggiano, Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma (dati non pubblicati). Si tratta di un protocollo ottimizzato al fine di aumentare la resa proteica finale, favorendo il corretto ripiegamento della proteina.



**Figura 10** Mappa del plasmide utilizzato per esprimere hSR.

La crescita batterica è stata svolta a 37°C nel terreno LB addizionato di kanamicina 50 µg/ml e cloramfenicol 50 µg/ml. Quando le cellule hanno raggiunto una densità ottica a 600 nm di circa 0.5, è stato aggiunto arabinosio 0.5 mg/ml e alcol benzilico 1 ml/L. Le colture sono state trasferite a 20°C per 20' e poi indotte con 0.05 mM di Isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside (IPTG). A questo punto le colture sono state incubate a 20°C per circa 16 ore. In seguito le cellule sono state centrifugate e il pellet è stato risospeso nel

tampone di lisi contenente: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 150 mM NaCl, addizionato di: 5 mM TCEP, 50 μM PLP, 0.2 mM PMSF, 0.2 mM benzamidina, 1.5 μM pepstatina, pH 8. Le pareti cellulari sono state distrutte per aggiunta di lisozima 1 mg/ml e poste in incubazione a 4°C per 30'. In seguito la sospensione è stata sonicata. La sospensione ottenuta è stata centrifugata e il sopranatante è stato incubato con 4 ml resina TALON® (Clontech, Mountain View, CA, USA), per un'ora a 4°C. Dopo aver effettuato dei lavaggi della resina con 120 ml di tampone di lavaggio (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8), la proteina è stata recuperata sospendendo la resina in un tampone contenente 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 250 mM imidazolo, pH 8. A questo è seguito un passaggio di desalting e scambio del tampone in 50 mM trietanolamina (TEA) a pH 8, tramite colonna HiTrap™ Desalting (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Regno Unito). hSR è stata concentrata in Amicon® (Merck/Millipore, Burlington, MA, USA). La proteina ottenuta è stata aliquotata e conservata a -80 °C. La purezza è stata verificata tramite elettroforesi SDS-PAGE e analisi densitometrica svolta tramite ChemiDoc Image System™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

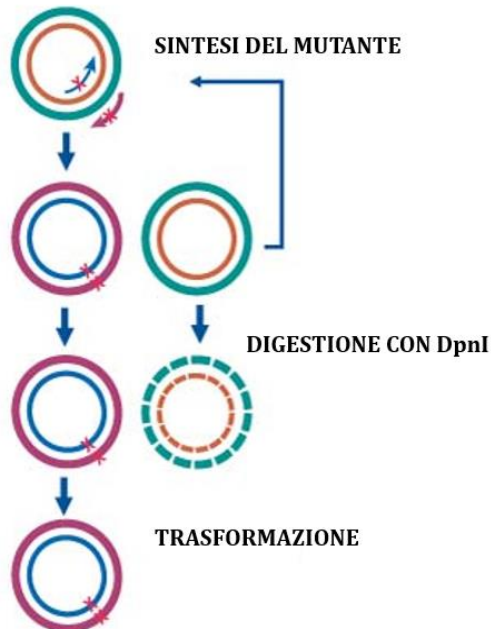
10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MCAQYCISFA	DVEKAHINIR	DSIHLTPVLT	SSILNQLTGR
70	80	90	100	110	120
NLFFKCELFQ	KTGSFKIRGA	LNAVRSLVPD	ALERKPKAVV	THSSGNHGQA	LTYAAKLEGI
130	140	150	160	170	180
PAYIVVPQTA	PDCKKLAIQ	YGASIVYCEP	SDESRENVAK	RVTEETEGIM	VHPNQEPAVI
190	200	210	220	230	240
AGQGTIALEV	LNQVPLVDAL	VVPVGGGML	AGIAITVKAL	KPSVKVYAAE	PSNADDCYQS
250	260	270	280	290	300
KLKGLMPNL	YPPETIADGV	KSSIGLNTWP	IIRDLVDDIF	TVTEDEIKCA	TQLVWERMKL
310	320	330	340	350	360
LIEPTAGVGV	AAVLSQHFT	VSPEVKNICI	VLSGGNVDLT	SSITVWKQAE	RPASYQSVSV

**Figura 11** Sequenza di hSR. È formata da 360 amminoacidi, con una massa molecolare di 38.7 kDa e pI teorico 6.67

# Mutagenesi

I mutanti di hSR sono stati ottenuti applicando il metodo di mutagenesi sito specifica QuikChange® sviluppato da Stratagene e adattato nel nostro laboratorio, in modo da introdurre variazioni della sequenza nucleotidica per ottenere proteine che differissero dal wt solo per un amminoacido. Si sono disegnati due primers (forward e reverse) in grado di appaiarsi in corrispondenza della posizione dove si è deciso di introdurre la mutazione.

Il plasmide che codifica per il gene di interesse viene isolato da ceppi batterici di *E. coli* che metilano il DNA. Tale plasmide viene denaturato, i primers si appaiano al DNA e sono utilizzati da una polimerasi per generare nuovi plasmidi contenenti la mutazione. Queste nuove molecole di DNA conterranno un nick e non saranno metilate. A questo punto si esegue una digestione con una endonucleasi in grado di degradare il DNA metilato o emimetilato (DpnI), quindi non mutato, e il prodotto della reazione si utilizza per trasformare cellule batteriche elettrocompetenti, in cui i nick saranno riparati (Figura 12).



**Figura 12** Schema della reazione di mutagenesi, in verde e giallo è rappresentato il DNA parentale e in blu e rosa quello di nuova sintesi

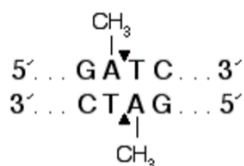
La lunghezza dei primers è stata definita in modo da non eccedere le 45 basi e tale da avere una temperatura di fusione ( $T_m$ ) maggiore o uguale a 78°C. Per il calcolo della  $T_m$  si è utilizzata la formula:

$$T_m = 81.5 + 0.41 \cdot (\%GC) - \left(\frac{675}{N}\right) - \%mismatch$$

dove  $N$  è la lunghezza in basi dei primers,  $\%GC$  indica il contenuto di guanine e citosine,  $\%mismatch$  è un valore che serve per considerare il contributo negativo delle sequenze non appaiate. Un elevato contenuto di GC contribuisce alla stabilità dell'appaiamento. Per favorire la rapida identificazione delle colonie batteriche che hanno acquisito il DNA mutato è stata introdotta anche una mutazione silente, che comportava l'introduzione o rimozione di un sito di taglio per un enzima di restrizione. In Tabella 4 sono riportate le sequenze dei primers che sono stati sintetizzati da Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany).

Nella miscela di mutagenesi sono stati mescolati: 5  $\mu$ l del tampone della polimerasi 10X, 1.25  $\mu$ l (125 ng) di primer forward, 1.25  $\mu$ l (125 ng) di primer reverse, 1  $\mu$ l dNTP, 2  $\mu$ l (50 ng) plasmide e acqua per raggiungere un volume finale di 50  $\mu$ l. A questa è stato aggiunto 1  $\mu$ l della DNA polimerasi Pfu® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 2.5 U/ $\mu$ l. In Tabella 5 è indicato il protocollo di sintesi del DNA mutato. La reazione è stata condotta in un termociclatore MyCycler Thermal Cycler System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Il prodotto della reazione è stato digerito con 1  $\mu$ l di DpnI® (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA) a 37°C per un'ora. In Figura 13 è rappresentato il sito di taglio riconosciuto dall'enzima.



**Figura 13** Sito di taglio riconosciuto da DpnI.

**Tabella 4** Primers utilizzati per la mutagenesi. In grassetto sono indicate le basi mutate per variare il singolo amminoacido, mentre le basi cambiate per introdurre/rimuovere un sito di taglio per un enzima di restrizione sono sottolineate.

Mutante	Primer forward	Primer reverse	Sito enzimi di restrizione	N	Tm	%GC
Q89M	GCA GTG GAA ACC ACG GCA <b>TGG</b> <u>CTC</u> TCA CCT ATG CTG	CAG CAT AGG TGA <u>GAG</u> <b>CCA</b> TGC CGT GGT TTC CAC TGC	-NcoI	36	78.35	57.7
E283A	GGA TGA AAC TAC TCA TTG CTC CTA <b>CTG</b> CAG <u>GTG</u> TTG GAG TGG C	GCC ACT CCA ACA CCT <u>GCA</u> GTA <b>GGA</b> GCA ATG AGT TTC ATC C	+PstI	43	78.4	53.5
Q89A	GCA TAG GTG AGA GCC <b>GCG</b> <u>CCG</u> TGG TTT CCA CTG	CAG TGG AAA CCA <u>CGG</u> <b>CGC</b> GGC TCT CAC CTA TGC	-NcoI	33	78	63.6
	GCA TAG GTG AGA GCC <b>GCG</b> CCG TGG TTT CCA CTG	CAG TGG AAA CCA CGG <b>CGC</b> GGC TCT CAC CTA TGC	/	34	77	59

**Tabella 5** Parametri del termociclatore utilizzati per la mutagenesi.

Segmento	Cicli	Temperatura	Tempo
1	1	95°C	30"
2	18	95°C	30"
		55°C	1'
		68°C	6'40"

## Trasformazione, estrazione e analisi del DNA

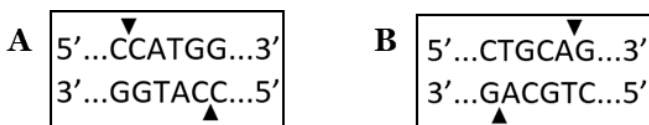
Il DNA ottenuto dalla reazione di mutagenesi e digestione con DpnI è stato trasformato in cellule di *E. coli* XL1-Blue elettrocompetenti. Le cellule sono state piastrate su un terreno LB con agar, in presenza degli antibiotici kanamicina 50 µg/ml e tetraciclina 10 µg/ml. Le piastre sono state incubate a 37°C per 16 ore. Il giorno seguente sono state selezionate alcune colonie e si è svolto un inoculo in terreno liquido LB con gli stessi antibiotici, al fine di ottenere delle colture pure per l'isolamento del DNA plasmidico. Il DNA plasmidico di ciascuna preparazione è stato estratto con il kit GeneElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), adatto ad estrazioni da piccoli volumi (miniprep), seguendo il protocollo descritto dal kit. Il DNA è stato eluito con 100 µl di acqua sterile e quantificato in seguito a separazione delle bande per elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

Per identificare i plasmidi contenenti la mutazione è stata svolta una digestione con enzimi di restrizione per cui è stato rimosso o introdotto il sito di taglio. In particolare nel caso di Q89A e Q89M è stato utilizzato l'enzima NcoI®, mentre per E283A l'enzima PstI®, entrambi della New England Bio Labs, Inc. (Ipswich, MA, USA). In Figura 14 sono rappresentati i siti riconosciuti dai due enzimi.

La digestione è stata svolta aggiungendo a 17 µl di DNA plasmidico, 2 µl di tampone 10 X (relativo a ciascun enzima) e 1 µl di NcoI o PstI. il risultato della reazione è stato valutato tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

La corretta incorporazione delle mutazioni è stata verificata tramite sequenziamento svolto dalla ditta Microsynth AG (Vienna, Austria).

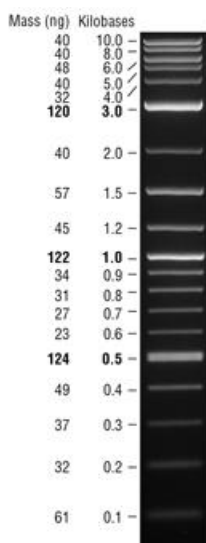
Il DNA plasmidico contenente il gene codificante per il mutante è stato utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* BL21 contenenti il plasmide in grado di esprimere le chaperonine e si sono seguiti gli stessi protocolli di espressione e purificazione proteica utilizzati per SR wild-type (wt-hSR). Nel caso di E283A-hSR è stato aggiunto 1 mM malonato nel brodo di coltura batterico durante l'espressione della proteina oppure sia durante l'espressione che durante la lisi, al fine di favorire la stabilizzazione proteica e aumentare le rese in termini di proteina solubile.



**Figura 14** Siti di taglio riconosciuti a NcoI (A) e PstI (B).

## Elettroforesi su gel di agarosio

Per preparare un gel di agarosio all'1% 0.5 g di agarosio sono stati aggiunti a 50 ml di TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM acido acetico, 1 mM EDTA). La soluzione è stata scaldata e si è aggiunto 1 µl di colorante Redsafe™ (iNtRON Biotechnology, Corea del Sud). La soluzione è stata colata nell'apposito supporto e, a polimerizzazione avvenuta, il gel è stato posto in una cella elettroforetica Mini-Sub Cell GT Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). I campioni da sottoporre alla corsa elettroforetica sono stati preparati aggiungendo al DNA il Loading Buffer® (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) Per verificare il peso dei plasmidi è stato caricato un Marker 2-Log DNA Ladder® (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), rappresentato in Figura 15. La corsa è stata effettuata nel tampone TAE e le bande sono state visualizzate tramite transilluminatore o ChemiDoc Image System™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).



**Figura 15** Marker 2-Log DNA in cui sono indicate le lunghezze in kb dei frammenti e i rispettivi quantitativi (in ng) calcolati per un volume di caricamento di 6 µl.

## Misure di dicroismo circolare

Le misure di dicroismo circolare sono state effettuate tramite Spettropolarimetro J715 (Jasco, Oklahoma City, Oklahoma, USA). Gli spettri sono stati acquisiti da 260 a 180 nm, ad una temperatura di 25°C. I parametri

sperimentali impostati sono stati: Data pitch 0.5 min, Scanning mode continue; Scanning speed 20 nm/min; Response 4 sec; Band width 1 nm; Accumulation 3.

Per l'analisi della stabilità termica è stato acquisito il segnale di ellitticità da 15 a 90°C, ad una lunghezza d'onda di 220 nm. I parametri sperimentali impostati sono stati: data pitch 5; data points 16; band width 1 nm; temperature slope 2°C/min.

Le proteine sono state studiate ad una concentrazione di 4 µM in 20 mM fosfato, pH 7.6. Il tampone in cui sono state analizzate le proteine è stato cambiato mediante l'utilizzo di mini Quick Spin Oligo Columns (Roche, Basilea, Svizzera), seguendo il protocollo indicato dal venditore.

Il contenuto di struttura secondaria è stato calcolato tramite server *Dichroweb* (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>).

## Spettroscopia di assorbimento

Gli spettri di assorbimento sono stati acquisiti tramite uno spettrofotometro Cary 4000 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Le soluzioni contenevano 32 µM hSR in 50 mM TEA, pH 8. Gli spettri sono stati sottratti del bianco.

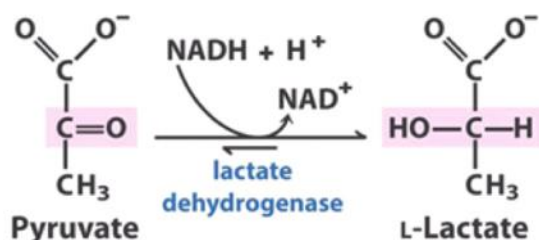
## Saggi di attività

### Reazione di β-eliminazione

La velocità della reazione di β-eliminazione dell'L- o D-serina è stata monitorata attraverso un saggio continuo accoppiato con la reazione di conversione del piruvato a lattato ad opera dell'enzima lattico deidrogenasi (LDH), usando la nicotinammide adenin dinucleotide ridotta (NADH) (Figura 16).

La diminuzione della concentrazione di NADH in soluzione è stata determinata per via spettrofotometrica, tramite spettrofotometro Cary 400 (Varian, Palo Alto, CA, USA) usando il coefficiente di estinzione molare a 340 nm pari a  $6,220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Il saggio è stato svolto in una soluzione tampone formata da: 50 mM TEA, 150 mM NaCl, 50 µM PLP, 5 mM DTT, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 U/ml LDH, 0.3 mM NADH, L-serina o D-serina a concentrazioni variabili a seconda del saggio, pH 8. I parametri catalitici sono stati determinati in assenza o in presenza di 2 mM ATP. Le reazioni sono state iniziate

aggiungendo hSR a una concentrazione 0.4-3.1  $\mu\text{M}$ . I saggi di attività sono stati svolti a 37°C.

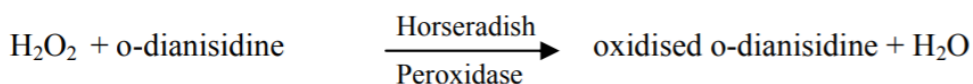


**Figura 16** Reazione di conversione del piruvato in lattato ad opera di LDH.

## Reazione di racemizzazione

La velocità di formazione della D-serina a partire da L-serina è stata determinata utilizzando un saggio discontinuo basato sull'ossidazione della D-serina da parte dell'enzima D-amminoacido ossidasi (DAAO, Sigma Aldrich, A55222), in presenza di flavina adenina dinucleotide (FAD, Sigma Aldrich). Questa reazione è associata alla formazione di perossido di idrogeno che viene utilizzato dalla perossidasi di rafano per ossidare l'o-dianisidina e portare alla formazione di un prodotto colorato (Figura 17). La concentrazione della o-dianisidina ossidata, seguito di aggiunta di acido solforico può essere misurata a 550 nm. È stata utilizzata una miscela di reazione composta da: 50 mM TEA, 150 mM NaCl, 50  $\mu\text{M}$  PLP, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.5  $\mu\text{M}$  hSR e concentrazioni variabili di L-serina, pH 8. Nelle reazioni svolte in presenza di ATP è stata utilizzata una concentrazione pari a 2 mM.

L'L-serina è stata purificata da eventuali contaminazioni di D-serina tramite incubazione per 48 ore con 400  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$  di DAAO e 100  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$  di catalasi, che sono state poi inattivate termicamente.



**Figura 17** Schema della reazione di rivelazione per la reazione di racemizzazione della L-serina.

La miscela di reazione è stata incubata a 37°C e si sono effettuati prelievi a diversi tempi per valutare la cinetica di racemizzazione. Le concentrazioni assolute di D-serina sono state determinate utilizzando rette di calibrazione ottenute mediante l'utilizzo di D-serina a concentrazioni note. Il segnale di assorbimento a 550 nm è stato acquisito tramite un lettore di piastre Halo LED 96 (Dynamica Scientific Ltd, Newport Pagnell, Regno Unito).

## Spettroscopia di fluorescenza

Gli spettri di emissione fluorescenza sono stati acquisiti utilizzando uno spettrofluorimetro FluoroMax<sup>®</sup>-3 (HORIBA Jobin Yvon, Longjumeau Cedex, France) a 20°C. Sono state utilizzate soluzioni tampone formate da: 50 mM TEA, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM TCEP, 2.7 μM hSR, pH 8. Gli spettri sono stati acquisiti per eccitazione a 412 nm in un range di emissione da 425 a 650 nm. L'ampiezza delle slits è stata definita per ottimizzare il rapporto segnale/rumore. Gli spettri sono stati sottratti del bianco.

L'affinità di legame dei ligandi ad hSR è stata valutata monitorando l'aumento dell'emissione di fluorescenza a seguito di eccitazione a 412 nm. L'emissione del PLP è sensibile allo stato di legame del PLP in termini di intensità e lunghezza d'onda del picco di emissione, come è stato dimostrato sia per serina racemasi [24] che per altri enzimi PLP-dipendenti, come l'o-acetilserina sulfidrilasi [71, 72, 73].

## Analisi dei dati

La dipendenza dell'attività di hSR dalle concentrazioni di L-serina e D-serina è stata analizzata usando l'equazione di Michaelis-Menten (1):

$$1) v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

dove  $v_0$  è la velocità iniziale della reazione,  $V_{max}$  è la velocità massima a concentrazioni saturanti di substrato,  $[S]$  è la concentrazione di substrato,  $K_M$  è la costante di Michaelis-Menten.

La dipendenza dell'attività dalla concentrazione di ATP è stata analizzata usando l'equazione:

$$2) \frac{v_i}{v_0} = v_0 + a \cdot \frac{[L]}{EC_{50} + [L]}$$

dove  $v_i$  è la velocità della reazione catalizzata dall'enzima in presenza di una data concentrazione di ATP,  $v_0$  è la velocità della reazione catalizzata dall'enzima in assenza di ATP,  $a$  è la differenza tra l'attività massima e quella basale,  $[L]$  è la concentrazione di ligando,  $EC_{50}$  è la concentrazione di ATP a cui si ha metà dell'attivazione massima.

Le costanti di dissociazione ( $K_D$ ) sono state determinate con la formula:

$$3) y = y_0 + a \cdot \frac{[L]}{K_D + [L]}$$

dove  $y$  è l'intensità di emissione di fluorescenza,  $[L]$  è la concentrazione di ligando,  $y_0$  è un offset e  $a$  è l'ampiezza.

## Cristallizzazione

Le preparazioni di SR, sia wild type che mutanti, contengono proteina con un'His-tag all'N-terminale. Il mutante Q89M-hSR destinato alle prove di cristallizzazione è stato digerito con trombina per rimuovere il tag di istidine, utilizzando 15 U di trombina per ogni mg di Q89M-hSR. La reazione è stata svolta a 22°C per 16 ore.

Le condizioni di cristallizzazione sono state inizialmente definite prendendo come riferimento quelle utilizzate da Smith *et al.* per ottenere le uniche strutture di hSR presenti su PDB [8]. La proteina è stata cristallizzata con il metodo "sitting drop". Le gocce sono state preparate mescolando 1  $\mu$ l della soluzione proteica (a concentrazioni variabili da 4 a 10 mg/ml) in 50 mM TEA, 8 mM AMP-PCP, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH 8, con un eguale volume di soluzione reservoir ed equilibrate contro 500  $\mu$ l della stessa soluzione. Quest'ultima è stata preparata con 50 mM TEA, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8, PEG 3350 in percentuali variabili dal 22 a 27%.

Lo screening di 96 condizioni di cristallizzazione è stato svolto tramite kit *The classic suite* (Nextal Quiagen, Hilden, Germania), la composizione dei tamponi utilizzati è riportata in Tabelle 6 e 7.

**Tabella 6** Elenco delle soluzioni usate per lo screening di cristallizzazione (Prima parte).

Numero	Composizione
1	0.01 M cloruro di cobalto 0.1 M acetato di sodio pH 4.61.0 M 1,6-esanediolo
2	0.1 M tri-citrato di sodio pH 5.62.5 M 1,6-esanediolo
3	0.2 M cloruro di magnesio 0.1 M TRIS pH 8.53.4 M 1,6-esanediolo
4	2.0 M solfato di ammonio 5 % (v/v) isopropanolo
5	0.1 M HEPES sale sodico pH 7.510 % (v/v) isopropanolo 20 % (w/v) PEG 4000
6	0.2 M cloruro di calcio 0.1 M acetato di sodio pH 4.620 % (v/v) isopropanolo
7	0.1 M tri-citrato di sodio pH 5.620 % (v/v) isopropanolo 20 % (w/v) PEG 4000
8	0.2 M tri-citrato di sodio 0.1 M HEPES sale sodico pH 7.520 % (v/v) isopropanolo
9	0.2 M tri-citrato di sodio 0.1 M cacodilato di sodio pH 6.530 % (v/v) isopropanolo
10	0.2 M cloruro di magnesio 0.1 M HEPES sale sodico pH 7.530 % (v/v) isopropanolo
11	0.2 M acetato di ammonio 0.1 M TRIS.HCl pH 8.530 % (v/v) isopropanolo
12	1.5 M cloruro di sodio 10 % (v/v) etanolo
13	0.1 M TRIS pH 8.520 % (v/v) etanolo
14	25 % (v/v) glicole etilenico
15	0.02 M cloruro di calcio 0.1 M acetato di sodio pH 4.630 % (v/v) MPD
16	0.2 M cloruro di sodio 0.1 M acetato di sodio pH 4.630 % (v/v) MPD
17	0.2 M acetato di ammonio 0.1 M tri-citrato di sodio pH 5.630 % (v/v) MPD
18	0.2 M acetato di magnesio 0.1 M cacodilato di sodio pH 6.530 % (v/v) MPD
19	0.2 M tri-citrato di sodio 0.1 M HEPES sale sodico pH 7.530 % (v/v) MPD
20	0.5 M solfato di ammonio 0.1 M HEPES pH 7.530 % (v/v) MPD
21	0.2 M fosfato di ammonio 0.1 M TRIS pH 8.550 % (v/v) MPD
22	0.1 M HEPES pH 7.570 % (v/v) MPD
23	0.1 M TRIS pH 8.525 % (v/v) alcol terziar-butilico
24	0.1 M tri-citrato di sodio pH 5.635 % (v/v) alcol terziar-butilico
25	0.4 M fosfato di ammonio
26	0.1 M tri-citrato di sodio pH 5.61.0 M fosfato di ammonio
27	0.1 M TRIS.HCl pH 8.52.0 M fosfato di ammonio
28	0.1 M HEPES pH 7.52.0 M formiato di ammonio
29	0.1 M acetato di sodio pH 4.62.0 M solfato di ammonio
30	0.1 M TRIS.HCl pH 8.52.0 M solfato di ammonio
31	2.0 M solfato di ammonio
32	0.1 M cloruro di sodio 0.1 M HEPES pH 7.51.6 M solfato di ammonio
33	0.01 M cloruro di cobalto 0.1 M MES pH 6.51.8 M solfato di ammonio
34	0.2 M tartrato di K/Na 0.1 M tri-citrato di sodio pH 5.62.0 M solfato di ammonio
35	1.0 M Imidazolo pH 7.0
36	0.4 M tartrato K/Na
37	0.1 M HEPES sale sodico pH 7.50.8 M tartrato K/Na
38	0.1 M Imidazolo pH 6.51.0 M acetato di sodio
39	0.05 M solfato di cadmio 0.1 M HEPES pH 7.51.0 M acetato di sodio
40	0.1 M cacodilato di sodio pH 6.51.4 M acetato di sodio
41	0.1 M acetato di sodio pH 4.62.0 M cloruro di sodio
42	0.1 M fosfato di sodio 0.1 M fosfato di potassio 0.1 M MES pH 6.52.0 M cloruro di sodio
43	0.1 M HEPES pH 7.54.3 M cloruro di sodio
44	0.1 M HEPES sale sodico pH 7.51.4 M tri-citrato di sodio
45	1.6 M tri-citrato di sodio pH 6.5
46	0.1 M HEPES sale sodico pH 7.50.8 M fosfato di sodio 0.8 M fosfato di potassio
47	0.1 M acetato di sodio pH 4.62.0 M formiato di sodio
48	4.0 M formiato di sodio

**Tabella 7** Elenco delle soluzioni usate per lo screening di cristallizzazione (Seconda parte).

Numero	Composizione
49	0.1 M BICINA pH 9.02 %(v/v) diossano 10 %(w/v) PEG 20000
50	
51	35 %(v/v) diossano
52	0.5 M cloruro di sodio 0.1 M tri-citrato di sodio pH 5.62 %(v/v) polimero di etilen-immina
53	1.5 M solfato di ammonio 0.1 M TRIS pH 8.512 %(v/v) glicerolo
54	0.5 M cloruro di sodio 0.01 M cloruro di magnesio 0.01 M CTAB
55	0.01 M cloruro ferrico 0.1 M tri-citrato di sodio pH 5.610 %(v/v) Jeffamine M-600
56	0.1 M HEPES pH 7.520 %(v/v) Jeffamine M-600
57	0.5 M solfato di ammonio 0.1 M tri-citrato di sodio pH 5.61.0 M solfato di litio
58	0.01 M cloruro di nickel 0.1 M TRIS pH 8.51.0 M solfato di litio
59	0.1 M HEPES sale sodico pH 7.51.5 M solfato di litio
60	0.1 M BICINA pH 9.02.0 M cloruro di magnesio
61	0.2 M formiato di magnesio
62	0.1 M MES pH 6.51.6 M solfato di magnesio
63	0.1 M TRIS.HCl pH 8.58 %(w/v) PEG 8000
64	0.1 M HEPES pH 7.510 %(w/v) PEG 8000
65	0.5 M solfato di litio 15 %(w/v) PEG 8000
66	0.2 M acetato di zinco 0.1 M cacodilato di sodio pH 6.518 %(w/v) PEG 8000
67	0.2 M acetato di calcio 0.1 M cacodilato di sodio pH 6.518 %(w/v) PEG 8000
68	0.2 M acetato di magnesio 0.1 M cacodilato di sodio pH 6.520 %(w/v) PEG 8000
69	0.05 M fosfato di potassio 20 %(w/v) PEG 8000
70	0.2 M solfato di ammonio 0.1 M cacodilato di sodio pH 6.530 %(w/v) PEG 8000
71	0.2 M acetato di sodio 0.1 M cacodilato di sodio pH 6.530 %(w/v) PEG 8000
72	0.2 M solfato di ammonio 30 %(w/v) PEG 8000
73	2.0 M solfato di ammonio 0.1 M HEPES sale sodico pH 7.52 %(v/v) PEG 400
74	0.2 M cloruro di calcio 0.1 M HEPES sale sodico pH 7.528 %(v/v) PEG 400
75	0.1 M cloruro di cadmio 0.1 M acetato di sodio pH 4.630 %(v/v) PEG 400
76	0.2 M cloruro di magnesio 0.1 M HEPES sale sodico pH 7.530 %(v/v) PEG 400
77	0.2 M tri-citrato di sodio 0.1 M TRIS.HCl pH 8.530 %(v/v) PEG 400
78	0.1 M cloruro di sodio 0.1 M BICINA pH 9.020 %(w/v) PEG 550 MME
79	0.01 M solfato di zinco 0.1 M MES pH 6.525 %(w/v) PEG 550 MME
80	10 %(w/v) PEG 1000 10 %(w/v) PEG 8000
81	30 %(w/v) PEG 1500
82	0.01 M cloruro di nickel 0.1 M TRIS pH 8.520 %(w/v) PEG 2000 MME
83	0.2 M solfato di ammonio 0.1 M acetato di sodio pH 4.630 %(w/v) PEG 2000 MME
84	0.1 M acetato di sodio pH 4.68 %(w/v) PEG 4000
85	0.2 M solfato di ammonio 0.1 M acetato di sodio pH 4.625 %(w/v) PEG 4000
86	0.2 M acetato di ammonio 0.1 M acetato di sodio pH 4.630 %(w/v) PEG 4000
87	0.2 M acetato di ammonio 0.1 M tri-citrato di sodio pH 5.630 %(w/v) PEG 4000
88	0.2 M cloruro di magnesio 0.1 M TRIS.HCl pH 8.530 %(w/v) PEG 4000
89	0.2 M solfato di litio 0.1 M TRIS.HCl pH 8.530 %(w/v) PEG 4000
90	0.2 M acetato di sodio 0.1 M TRIS.HCl pH 8.530 %(w/v) PEG 4000
91	0.2 M solfato di ammonio 30 %(w/v) PEG 4000
92	0.2 M solfato di ammonio 0.1 M MES pH 6.530 %(w/v) PEG 5000 MME
93	0.1 M HEPES pH 7.510 %(w/v) PEG 6000 05 %(v/v) MPD
94	2.0 M cloruro di sodio 10 %(w/v) PEG 6000
95	0.1 M HEPES pH 7.520 %(w/v) PEG 10000 08 %(v/v) Glicole etilenico
96	0.1 M MES pH 6.512 %(w/v) PEG 20000

# Allineamenti di sequenza

Gli allineamenti strutturali e le figure sono state realizzate con *Pymol* 1.3 (<https://pymol.org/>).

Le sequenze di serina racemasi analizzate sono state ottenute a seguito di ricerche di omologia svolte con *UniProt* (<http://www.uniprot.org/>) e *BLAST protein* ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=&LINK\\_LOC=blasttab&LAST\\_PAGE=blastp](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastp)). In quest'ultimo caso sono state effettuate ricerche utilizzando come query la sequenza di hSR (Q9GZT4), Database: Reference proteins (refseq\_protein); Organism: Eukarya, Prokaryota, Plants, Metazoa, Fungi. Al fine di ricercare eventuali organismi che presentassero amminoacidi differenti al posto della glutammina in posizione 89 sono state svolte delle ricerche con PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST), con il pattern S-X-G-N-X-X-{Q}.

Gli allineamenti delle sequenze di SR sono stati svolti tramite programma on-line *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

L'albero filogenetico è stato realizzato tramite programma MEGA 7 [73], con metodo Neighbor-Joining; Model: Poisson. Sono state selezionate 118 sequenze di SR sulla base dell'identità con la proteina umana e della distanza evolutiva.

La ricostruzione delle sequenze ancestrali per ogni nodo è stata effettuata con il programma *Codeml* del pacchetto *PAML* [74], utilizzando l'allineamento e l'albero ottenuti precedentemente.

Gli allineamenti delle sequenze di SR umana, di *Schizosaccharomyces pombe*, *Mus musculus* e di pianta, con omologhi strutturali e funzionali sono stati svolti sempre con *Clustal Omega*. I punteggi di somiglianza sono stati calcolati con il programma *ESPrpt* usando *Blosum62* come matrice e un valore di "global score" di 0.25.

Il calcolo dell'entropia associata ai singoli residui amminoacidici è stato svolto tramite programma *Protein Variability Server* (<http://imed.med.ucm.es/PVS/>), considerando l'entropia di Shannon definita dalla formula:

$$H = - \sum_{i=1}^M P_i \log_2 P_i$$

dove  $H$  è il valore dell'entropia di Shannon,  $P_i$  è la frazione di residui amminoacidici di tipo  $i$ ,  $M$  è il numero di amminoacidi (20). Il valore di  $H$  varia da 0 a 4.3, residui con  $H \leq 2$  sono considerati conservati.

I sequence logos delle probabilità di presenza in sequenza degli amminoacidi del network di legami a idrogeno sono stati eseguiti tramite programma *WebLogo3* (<http://weblogo.threeplusone.com/>).

## Elenco abbreviazioni

AMP-PCP:  $\beta$ ,  $\gamma$ -metilenadenosina-5'-trifosfato  
APS: ammonio persolfato  
CMP: citidina monofosfato  
DTT: ditionitrosolo  
FA: acido formico  
GOLGA 3: Golgin subfamily A member 3 o GCP70 o golgin-160  
GRIP: glutamate receptor interacting protein  
hSR: serina racemasi umana  
IAA: iodoacetammide  
LDH: lattico deidrogenasi  
NADH: nicotinammide adenin dinucleotide ridotto  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
PEG: polietilenglicole  
PICK1: protein interacting with C-kinase 1  
PLP: piridossal 5'-fosfato  
PSD-95: post-sinaptic density protein 95  
SDH: serina deidratasi  
SDS: sodio dodecil solfato  
SDS-PAGE: elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti  
SpSR: serina racemasi da *Schizosaccharomyces pombe*  
StTdcB: treonina deidratasi degradativa di *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (indicata come *Salmonella*)  
TCEP: tris (2-carbossietil) fosfina  
TEA: trietanolammia  
TEMED: tetrametiletilendiammina  
TFA: acido trifluoroacetico

***EFFETTO DI LIGANDI ED  
EFFETTORI  
ALLOSTERICI SULLA  
DINAMICA DI hSR***



# Risultati

## Proteolisi limitata di hSR

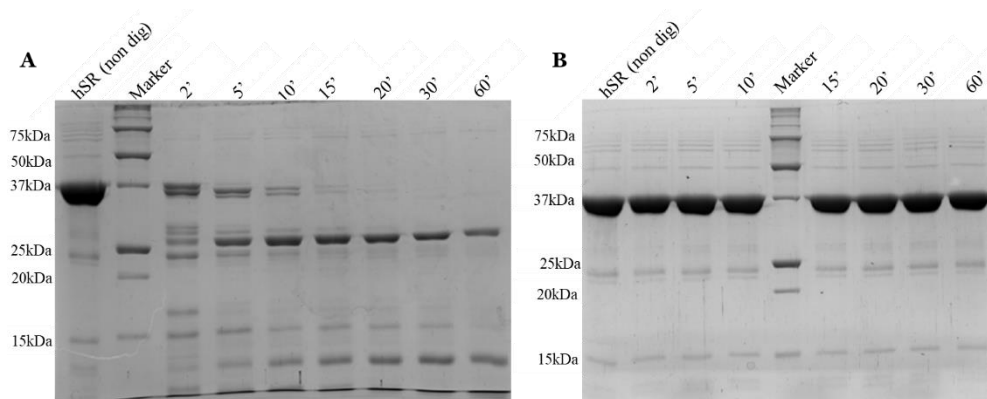
Le informazioni sulla dinamica conformazionale di SR derivano solo da analisi strutturali, che hanno mostrato la presenza di due differenti conformazioni a seguito dell'interazione con ligandi o effettori. Fino ad oggi è stato possibile ottenere strutture di hSR solo in presenza di  $Mn^{2+}$  e malonato (codici PDB 3L6B e 3L6R). Dal confronto di tali strutture con quella di ratto ottenuta in assenza (codice PDB 3HMK) o in presenza (codice PDB 3L6C) di malonato e con cui hSR ha un'omologia di circa il 90% è stato possibile identificare due diverse conformazioni proteiche. In particolare a seguito dell'interazione con l'inibitore il dominio minore va incontro ad una variazione dell'orientazione, alla base della transizione da una forma aperta ad una forma chiusa. Dal punto di vista fisiologico tale meccanismo potrebbe essere importante per riorganizzare il sito attivo a seguito dell'interazione con la serina, infatti si suppone sia fondamentale per posizionare la Ser84 vicino al substrato, ad una distanza ideale per la deprotonazione necessaria per l'isomerizzazione [8]. Al fine di studiare la dinamica di hSR in soluzione, è stato messo a punto uno studio di proteolisi limitata.

La proteina ricombinante hSR utilizzata per questo studio è stata espressa da un plasmide pET28a, contenente il gene di interesse, in cellule di *E. coli*. Successivamente è stata purificata tramite cromatografia di affinità e l'attività è stata valutata tramite saggi descritti in materiali e metodi. La reazione di proteolisi limitata è stata svolta con tripsina, che possiede 29 siti di taglio teorici sulla sequenza di hSR (Tabella 8).

**Tabella 8** Siti di taglio della tripsina predetti sulla base della sequenza di hSR.

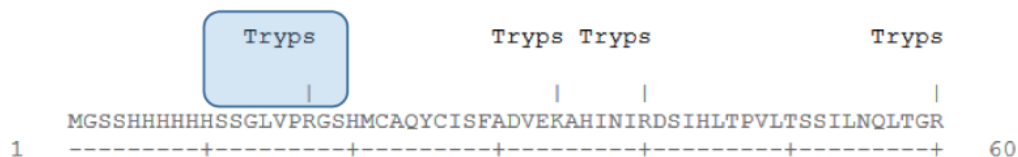
Trypsin	29	17 34 40 60 65 71 76 78 85 94 97 116 134 135 155 160 161 218 225 241 243 245 261 273 288 297 299 326 347
---------	----	---

È stata utilizzata una concentrazione di hSR pari a 0.9 mg/ml in 50 mM TEA, pH 8. In parallelo è stata valutata la stabilità della proteina nelle stesse condizioni di digestione, incubando hSR assenza di proteasi (Figura 18). Questo controllo ha permesso di confermare che la proteina non andava incontro a processi di precipitazione o degradazione spontanea. Dall'analisi della digestione con tripsina è stata osservata una migrazione della proteina intatta in corrispondenza di una massa molecolare di circa 37 kDa (36.6 kDa), leggermente inferiore rispetto a quello predetto dalla sequenza amminoacidica (38.7 kDa).



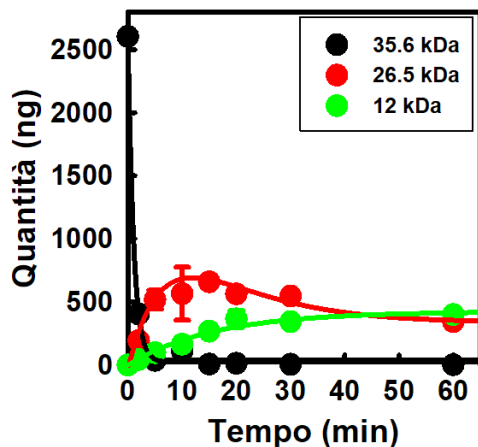
**Figura 18** Cinetica di proteolisi di hSR in presenza di tripsina in 50 mM TEA, pH 8. (A). La stabilità della proteina nelle stesse condizioni è stata monitorata nello stesso intervallo temporale (B).

A seguito di digestione si sono formate differenti bande con una massa molecolare inferiore rispetto alla proteina intatta. In particolare già dopo 2' è stato rilevato un frammento con una massa di 35.6 kDa, che potrebbe derivare dalla rapida rimozione della sequenza N-terminale esposta. Infatti nella sequenza di hSR ricombinante usata in questo studio, vi è un sito riconosciuto sia dalla tripsina sia dalla trombina che è stato introdotto in fase di clonaggio al fine di facilitare la rimozione del tag di istidine (Figura 19).



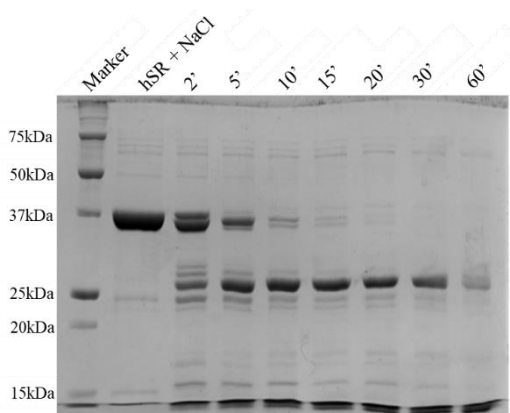
**Figura 19** Sequenza della regione N-terminale e siti di taglio della tripsina. In blu è indicato il sito di taglio per la tripsina riconosciuto anche dalla trombina, introdotto durante il clonaggio ma assente nella proteina naturale. Il taglio a livello di questo sito libera un frammento N-terminale di 1.9 kDa.

È stata osservata una riduzione nel tempo della quantità rilevabile del frammento di 35.6 kDa in parallelo ad un aumento di bande con una massa molecolare inferiore. Nello specifico sono stati identificati due gruppi di frammenti da 28 a 25 kDa e da 20 a 15 kDa. Dall'analisi della cinetica della variazione della quantità di proteina contenuta nelle bande nel tempo (Figura 20) è stato possibile notare un aumento di intensità della banda a 26.5 kDa fino a 15', seguita da una lenta degradazione. Mentre la banda a 12 kDa aumenta lentamente d'intensità fino a 60'.



**Figura 20** Cinetica di formazione/degradazione di tre bande rappresentative della proteolisi limitata di hSR in assenza di ligandi.

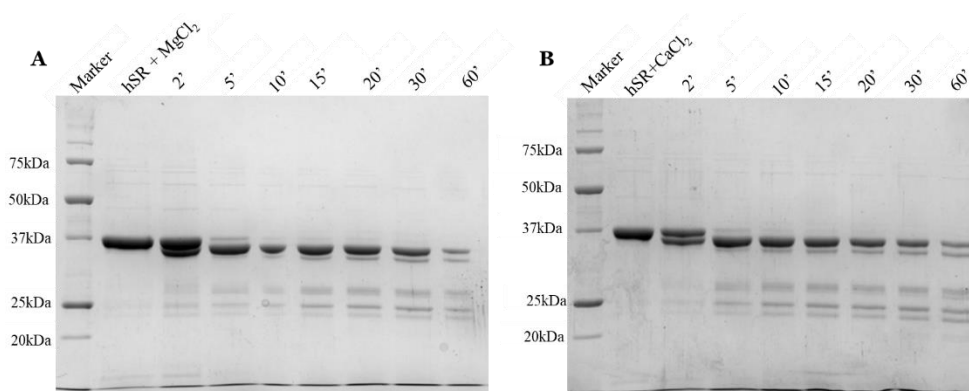
La stessa reazione è stata effettuata in presenza di 150 mM NaCl, in quanto nel tampone in cui si misura l'attività della proteina è normalmente presente questa concentrazione di cloruro di sodio. È stato ottenuto un profilo di digestione simile al precedente sia per l'identità delle bande sia per le quantità (Figura 21).



**Figura 21** Cinetica di digestione di hSR+ 150 mM NaCl in 50 mM TEA, pH 8.

## Il legame di metalli e dell'ATP stabilizza hSR

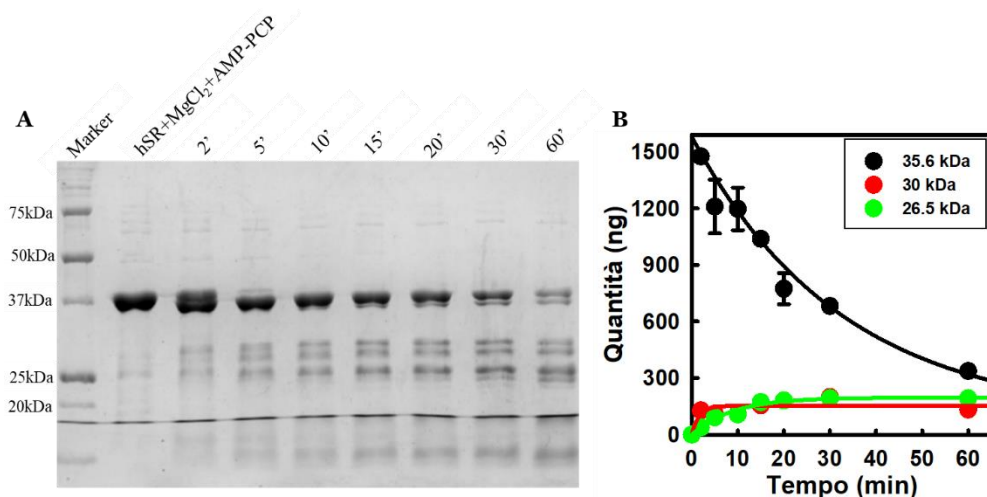
L'aggiunta di  $MgCl_2$  o  $CaCl_2$  nella miscela di reazione ha determinato un rilevante cambiamento del profilo di digestione e della cinetica di formazione dei frammenti (Figura 22). È stato ottenuto un pattern di digestione simile sia in presenza di  $MgCl_2$  sia di  $CaCl_2$ . In entrambi i casi, la banda a 35.6 kDa ha mostrato un'intensità elevata fino a 20' di reazione ed è stato ottenuto un basso accumulo del frammento a 26.5 kDa. Sono invece presenti numerose bande intorno a 29 kDa che si differenziano poco come massa molecolare e questo rende difficoltosa l'identificazione e soprattutto la quantificazione di bande specifiche in questa regione. Nonostante ciò è stato possibile rilevare una banda con una massa molecolare di circa 30 kDa, non osservata in assenza di ioni metallici che si accumula nel tempo. Complessivamente, si può concludere che il legame dei metalli causa un effetto stabilizzante di hSR, indipendente dal tipo di ione presente nella miscela di reazione.



**Figura 22** Digestione di hSR+ 2 mM  $MgCl_2$  (A) o 2 mM  $CaCl_2$  (B) in 50 mM TEA, pH 8.

In seguito la reazione di proteolisi limitata di hSR è stata valutata in presenza di  $MgCl_2$  e di un noto effettore dell'attività della proteina quale l'ATP. Alcune reazioni di digestione sono state svolte in presenza di  $MgCl_2$  e AMP-PCP. Quest'ultimo è un analogo non idrolizzabile dell'ATP, utilizzato per la cristallizzazione di proteine, studi di meccanismo o la determinazione di parametri cinetici. Considerando solo la reazione di digestione dopo 20' non sono state riscontrate differenze nelle quantità e intensità delle bande rilevate in presenza di solo  $MgCl_2$ ,  $MgCl_2$ +ATP o  $MgCl_2$ +AMP-PCP (dato non mostrato). Quindi si è proceduto con una valutazione della cinetica di digestione nel tempo di hSR in presenza di  $MgCl_2$ +AMP-PCP (Figura 23). Il profilo di digestione osservato è stato simile rispetto a quello della digestione

svolta in assenza di AMP-PCP. Il fitting delle cinetiche con un'equazione monoesponenziale ha permesso il calcolo delle costanti di velocità (Tabella 9).

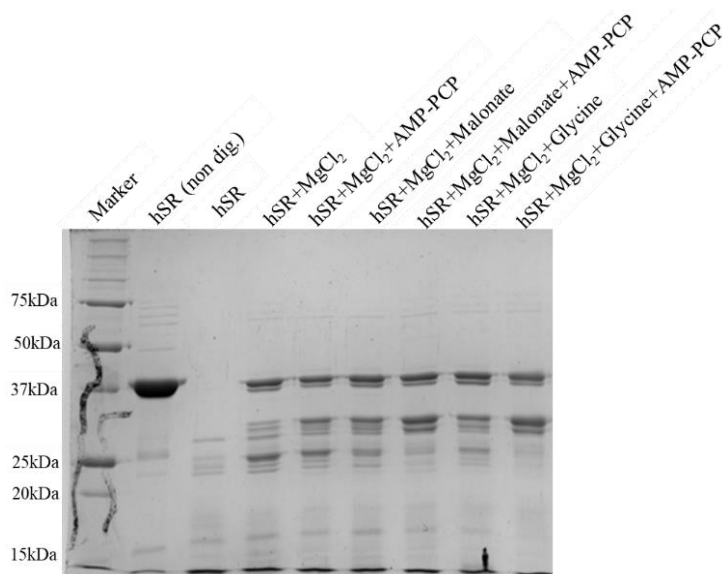


**Figura 23** A- Cinetica di digestione di hSR+ 2 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 mM AMP-PCP in 50 mM TEA 50 mM, pH 8. B- Cinetica di formazione/degradazione di tre bande rappresentative della proteolisi limitata di hSR in presenza di 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 mM AMP-PCP.

## Glicina e malonato modificano la conformazione di hSR

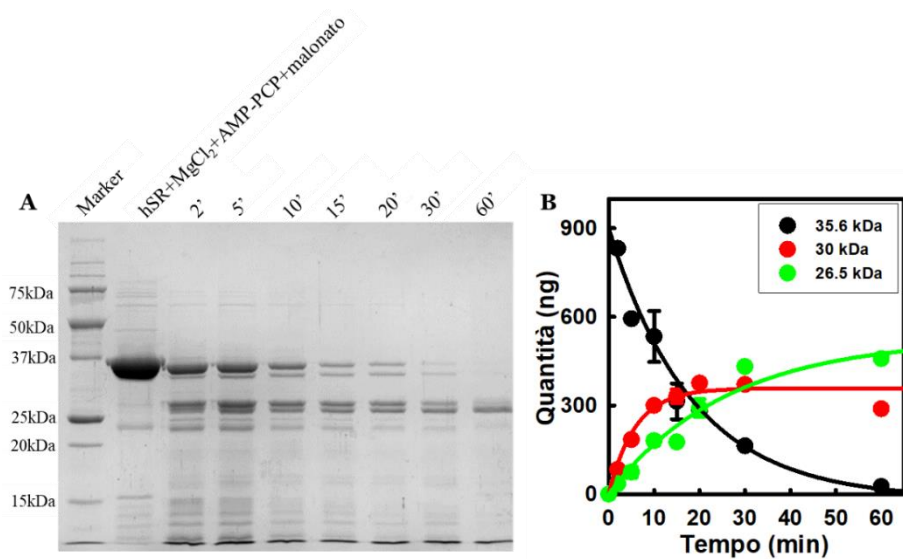
Al fine di indagare eventuali variazioni conformazionali di hSR a seguito dell'interazione con inibitori che si legano nel sito attivo, sono stati presi in considerazione la glicina e il malonato. La reazione di proteolisi limitata dopo 20' è stata analizzata per diverse condizioni (Figura 24). L'aggiunta di malonato in una miscela di reazione in cui erano presenti anche MgCl<sub>2</sub> e AMP-PCP ha portato alla formazione di un numero minore di frammenti proteici. Infatti sono state osservate principalmente due bande a 30 e 26.5 kDa, con un'intensità elevata nonostante la reazione sia stata valutata dopo 20'. La banda a 25 kDa presente nella reazione svolta con solo MgCl<sub>2</sub> e AMP-PCP, è stata rilevabile in quantità minime in presenza di malonato nella miscela di reazione. In aggiunta sono state osservate anche altre bande relative a peptidi con una bassa massa molecolare, ma in quantità molto basse. Questo dato ha suggerito una variazione della struttura di hSR a causa del legame del malonato insieme ad AMP-PCP, che ha determinato un cambiamento significativo del numero e del tipo di siti disponibili per il taglio

della tripsina. Un effetto simile è stato osservato anche nel caso dell'aggiunta della glicina alla miscela di reazione.



**Figura 24** Digestione di hSR in presenza di diversi ligandi e modulatori, fermata dopo 20' di reazione. Sono stati utilizzati 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM AMP-PCP, 7 mM malonato e 7 mM glicina.

Per analizzare più nel dettaglio l'effetto del malonato è stata svolta una cinetica di reazione di digestione di hSR in presenza di MgCl<sub>2</sub>, AMP-PCP e malonato (Figura 25). In questo modo è stato possibile confermare il pattern visto in precedenza, con le bande a 30 e 26.5 kDa rilevabili anche dopo 60' di reazione. Dal fitting delle cinetiche di reazione sono stati calcolati valori di  $k_{obs}$  per la variazione dell'intensità delle bande a 35.6, 30 e 26.5 kDa (Tabella 9). In presenza di malonato la banda a 35.6 kDa viene degradata più velocemente e la banda a 30 kDa si accumula più rapidamente rispetto alle cinetiche in presenza di solo AMP-PCP. Per quanto riguarda invece la banda a 26.5 kDa, è più lento in presenza di inibitore, rispetto alla reazione svolta con solo MgCl<sub>2</sub> e AMP-PCP.



**Figura 25** A-Cinetica della digestione di hSR + 2 mM MgCl<sub>2</sub>+ 1 mM AMP-PCP+ 7 mM malonato in tampone 50 mM TEA, pH 8. B-Cinetica di formazione/degradazione di tre bande rappresentative della proteolisi limitata di hSR in presenza dei tre ligandi.

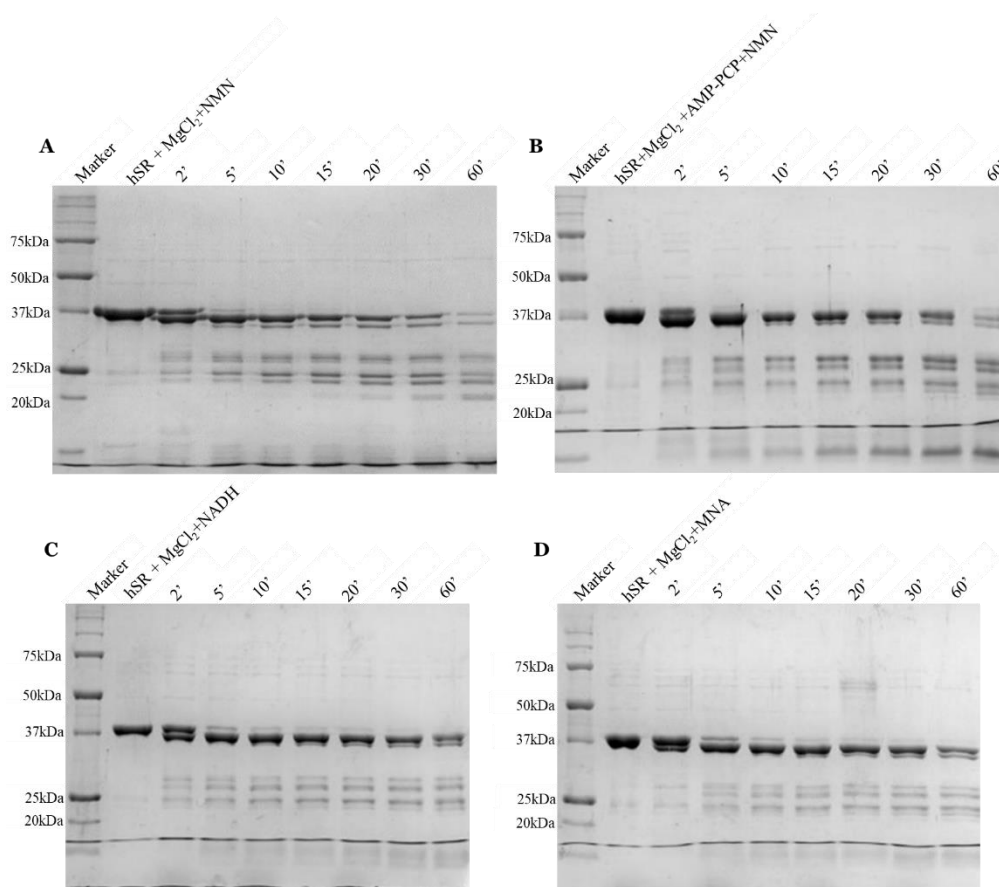
**Tabella 9** Analisi cinetica delle bande ottenuta dalla digestione di hSR in diverse condizioni.

Banda (kDa)	hSR	hSR+MgCl <sub>2</sub>	hSR+MgCl <sub>2</sub> +AMP-PCP	hSR+MgCl <sub>2</sub> +AMP-PCP+malonato	
	k <sub>obs</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>obs</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>obs</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>obs</sub> (min <sup>-1</sup> )	
35.6	0.95 ± 0.06	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	↓
30	/	0.57 ± 0.38	0.60 ± 0.37	0.20 ± 0.04	↑
26.5	0.32 ± 0.12	0.17 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.04 ± 0.01	↑
12	0.06 ± 0.01	/	/	/	↑

## NADH e derivati non causano variazioni in hSR

È stata svolta una cinetica di digestione di hSR in una miscela di reazione in cui erano stati aggiunti NADH, MNA e NMN, tutti inibitori allosterici di hSR [62]. NMN è stato testato in presenza o in assenza di AMP-

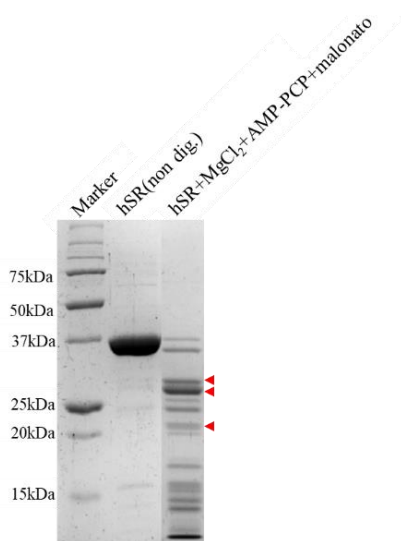
PCP, poiché è stato ipotizzato un legame di tale molecola a livello dell'interfaccia coinvolta nella formazione dei dimeri, in una posizione che parzialmente si sovrappone al sito di legame dell'ATP. Tuttavia la presenza di AMP-PCP nella miscela di reazione, non ha comportato variazioni del profilo di digestione, tranne per una banda a circa 20 kDa osservabile solo in presenza di NMN e in assenza del ligando (Figura 26). Inoltre non sono state notate differenze nel caso della digestione svolta in presenza di NADH e MNA. Nel complesso i risultati sembrano segnalare che l'occupazione del sito del NADH non abbia effetti significativi sulla dinamica dell'enzima.



**Figura 26** Cinetiche di digestione di hSR in presenza di 0.2 mM NMN in assenza (A) o in presenza (B) di 1 mM AMP-PCP, in 50 mM TEA, pH 8. In basso cinetiche di proteolisi di hSR in presenza di 2 mM NADH (C) o 2 mM MNA (D).

## Identificazione delle bande

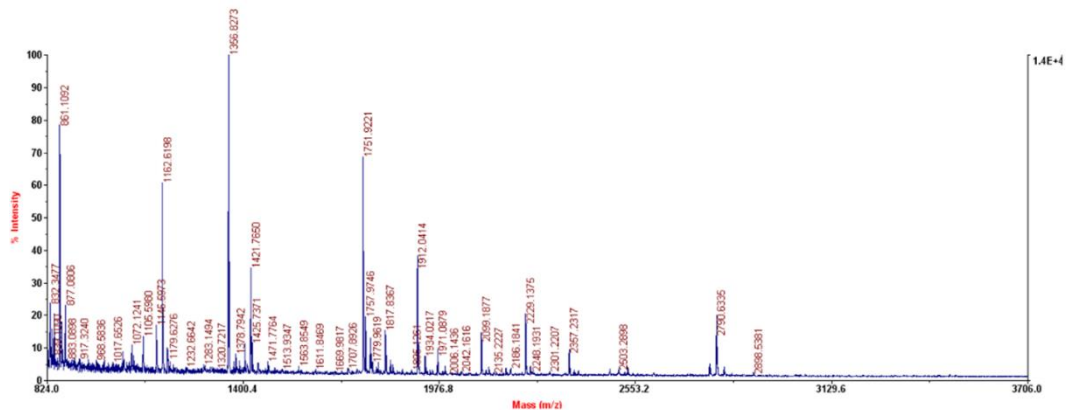
La reazione che ha causato la maggiore variazione del profilo di digestione di hSR è quella svolta in presenza di  $MgCl_2$ , AMP-PCP e malonato. Quindi per identificare le sequenze dei peptidi ottenuti è stata svolta una digestione in gel di alcune bande. Nello specifico sono state selezionate le due bande con pesi molecolari di 30 e 26.5 kDa (Figura 27), per cui è stata osservata una cinetica di accumulo nel tempo. Inoltre si tratta di frammenti molto resistenti, rilevabili anche dopo 60' di reazione, in presenza di malonato. È stata analizzata anche una banda con una massa molecolare di circa 22 kDa, che è stata osservata solo in presenza di  $MgCl_2$ , AMP-PCP e malonato. Tale frammento peptidico è interessato da una cinetica di rapida formazione e degradazione, infatti è rilevabile già dopo 2' di reazione, si accumula fino a 5' e poi la sua intensità diminuisce gradualmente nel tempo, ma rimane sempre rilevabile (Figura 25).



**Figura 27** Gel in cui è stata caricata hSR non digerita e digerita con tripsina in presenza di 2 mM  $MgCl_2$ + 1 mM AMP-PCP+ 7 mM malonato in 50 mM TEA, pH 8, dopo 15' di reazione.

I peptidi ottenuti dalla digestione in gel della banda con peso 30 kDa sono stati analizzati tramite MALDI-TOF/TOF ed è stato ottenuto uno spettro in cui è stato possibile distinguere diversi picchi (Figura 28). Per identificare i peptidi è stato utilizzato il programma *Protein Prospector* e si sono rilevati frammenti proteici relativi a diverse regioni della proteina, con una copertura di sequenza del 42 %. Quindi è stata calcolata la massa molecolare teorica dei frammenti proteici. Considerando solo le regioni identificate è

stata stimata una massa pari a 16.4 kDa, molto inferiore rispetto a quella predetta tramite analisi SDS-PAGE. Al contrario includendo anche le porzioni proteiche centrali (amminoacidi da 116 a 135 e da 155 a 225) è stata definita una massa molecolare di 29.2 kDa, più vicina al valore previsto dall'analisi SDS-PAGE. Dato che nella regione non identificata non vi sono molti siti di taglio per la tripsina è ragionevole supporre che si formino peptidi di grandi dimensioni o in quantità molto basse, non rilevabili tramite analisi MALDI/TOF.



```

1  MGSSHHHHH SGLVPRGSH MCAQYCISFA DVEKAHINIR DSIHLTPVLT SSILNQLTGR
61  NLFFKCELFQ KTGSKIRGA LNAVRSLVPD ALERKPKAVV THSSGNHGQA LTYAAKLEGI
121 PAYIVVPQTA PDCKKLAIQAYGASIVYCEP SDESRENVAK RVTEETEGIM VHPNQEPAVI
181 AGQGTIALEV LNQVPLVDAL VVPVGGGML AGIAITVKAL KPSVKVYAAE PSNADDCYQS
241 KLKGGKMPNLYYPETIADGV KSSIGLNTWP IIRDLVDDIF TVTEDEIKCA TQLVWERMKL
301 LIEPTAGVGV AAVLSQHFQT VSPEVKNICIVLSGGNVDLT SSITWVKQAE RPASYQSVSV

```

**Figura 28** Spettro di massa ottenuto da analisi MALDI-TOF e sequenza di hSR in cui sono evidenziate le regioni identificate.

Quindi la stessa banda è stata analizzata anche con un altro spettrometro di massa accoppiato ad HPLC, l'ESI-LTQ Orbitrap XL. Questo strumento, rispetto al MALDI consente di svolgere delle analisi con una maggiore risoluzione e sensibilità, in modo da permettere la rilevazione anche di frammenti proteici presenti in quantità minime nel campione da analizzare. In questo caso è stata ottenuta una copertura di sequenza molto maggiore, del 68%, anche se alcune attribuzioni presentavano una confidenza di identificazione più bassa (Figura 29).

La massa molecolare della regione che include le sequenze rilevate è stata stimata a 30.7 kDa, leggermente superiore a quella calcolata da gel. Da entrambe le analisi di spettrometria di massa sono stati ottenuti dati che suggeriscono che la porzione iniziale e terminale della molecola siano digerite dalla tripsina, lasciando una parte centrale maggiormente stabile.

```

1  MGSSHHHHHH SSSLVPRGSH MCAQYCISFA DVEKAHINIR DSIHLTPVLT SSILNQLTGR
61  NLFFKCELFQ KTGSFKIRGA LNAVRSLVDP ALERKPKAVV THSSGNHGQA LTYAAKLEGI
121 PAYIVVPQTA PDCKKLAIQA YGASIVYCEP SDESRENVAK RVTEETEGIM VHPNQEPAVI
181 AGQGTIALEV LNQVPLVDAL VVPVGGGGML AGIAITVKAL KPSVKVYAAE PSNADDCYQS
241 KLKGLMPPNL YPPETIADGV KSSIGLNTWP IIRDLVDDIF TVTEDEIKCA TQLVWERMKL
301 LIEPTAGVGV AAVLSQHFQT VSPEVKNICI VLSGGNVDLT SSITWVKQAE RPASYQSVSV

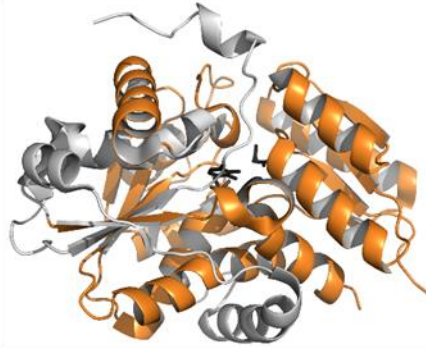
```



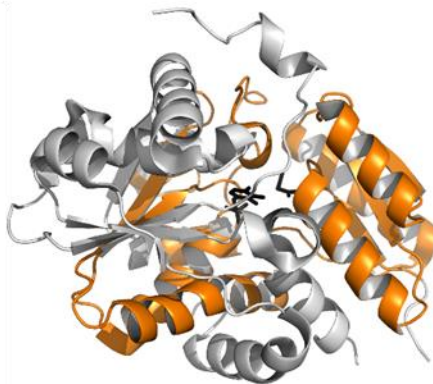
**Figura 29** Sequenza di hSR in cui sono evidenziati i peptidi identificati nel frammento di 30 kDa, in arancione chiaro le attribuzioni con bassa confidenza. In basso struttura di hSR (codice 3L6B) in cui in arancione vi sono le regioni della proteina corrispondenti ai peptidi identificati includendo anche le porzioni proteiche centrali, in stick neri il PLP e il malonato.

Tramite Orbitrap si sono quindi analizzate le bande di interesse (Figura 27). Dalla digestione in gel della banda corrispondente ad una massa molecolare di 26.5 kDa è stata ottenuta una copertura di sequenza del 56 % (Figura 30 A). Anche in questo caso la porzione proteica identificata è stata relativa alla regione centrale della sequenza, dal residuo 61 al 239. Un altro peptide analizzato è stato quello con una massa molecolare di circa 22 kDa, per cui è stata ottenuta una copertura di sequenza del 46% includendo, anche in questo caso, la porzione centrale della proteina (Figura 30 B).

**A** 1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MCAQYCISFA DVEKAHINIR DSIHLTPVLT SSILNQLTGR  
 61 NLFFK**C**ELFQ KTGSFKIRGA LNAVRSLVPD ALERKPK**AVV** THSSGNHGQA LTYAAKLEGI  
 121 **P**AYIVVPQTA **P**DCKK**L**AIQA YGASIVYCEP SDESRENVAK **R**VTEETEGIM VHPNQEP**A**VI  
 181 **A**GQGTIALEV LNQVPLVDAL VVPVGGGGML AGIAITVKAL KPSVK**V**YAAE PSNADDCYQS  
 241 **K**LKGK**L**MPNL YPPETIADGV KSSIGLNTWP IIRDLVDDIF TVTEDEIKCA TQLVWERMKL  
 301 LIEPTAGVGV AAVLSQHFQT VSPEVKNICI VLSGGNVDLT SSITWVKQAE RPASYQSVSV



**B** 1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MCAQYCISFA DVEKAHINIR DSIHLTPVLT SSILNQLTGR  
 61 NLFFK**C**ELFQ KTGSFKIRGA LNAVRSLVPD ALERKPK**AVV** THSSGNHGQA LTYAAKLEGI  
 121 **P**AYIVVPQTA **P**DCKK**L**AIQA YGASIVYCEP SDESRENVAK **R**VTEETEGIM VHPNQEP**A**VI  
 181 **A**GQGTIALEV LNQVPLVDAL VVPVGGGGML AGIAITVKAL KPSVK**V**YAAE PSNADDCYQS  
 241 **K**LKGK**L**MPNL YPPETIADGV KSSIGLNTWP IIRDLVDDIF TVTEDEIKCA TQLVWERMKL  
 301 LIEPTAGVGV AAVLSQHFQT VSPEVKNICI VLSGGNVDLT SSITWVKQAE RPASYQSVSV

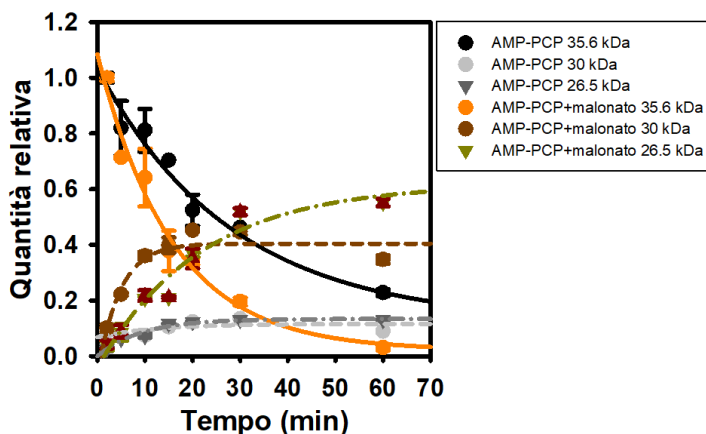


**Figura 30** Sequenze di hSR in cui sono evidenziati i peptidi identificati nei frammenti di 26.5 kDa (**A**) e 22 kDa (**B**). Per entrambe le sequenze in arancione chiaro le attribuzioni con bassa confidenza. Per ciascuna analisi è mostrata una rappresentazione dei peptidi identificati sulla struttura di hSR (codice PDB 3L6B), in arancione vi sono le regioni della proteina corrispondenti ai peptidi identificati includendo anche le porzioni proteiche centrali, in stick neri il PLP e il malonato.

## Discussione

Dall'analisi di proteolisi limitata di hSR è stato osservato che in assenza di ligandi la proteina è estremamente suscettibile alla proteolisi, anche se una banda con una massa molecolare di circa 26.5 kDa è ancora presente dopo un'ora di incubazione con tripsina. L'aggiunta di ioni  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  ha causato un effetto marcato nella stabilizzazione della proteina, infatti sono state osservate un numero maggiore di bande per tutta la cinetica di reazione, fino a 60'. Questo effetto è stato confermato anche a seguito di aggiunta di nucleotidi quali ATP e AMP-PCP. Dall'analisi dell'unica struttura di SR ottenuta in presenza di questi due effettori, cioè SpSR (codice PDB 1WTC) non è stata osservata alcuna variazione conformazionale globale della proteina [9]. L'analisi di proteolisi limitata conferma questo dato, indicando che il solo AMP-PCP in aggiunta al magnesio non sia in grado di modificare l'esposizione di siti suscettibili al taglio. È noto che il magnesio e l'ATP infatti stabilizzano una struttura tetramericata ad alta attività [13]. Nelle condizioni di proteolisi limitata non è stato possibile apprezzare nessuna variazione della struttura quaternaria, forse a causa della bassa concentrazione di proteina utilizzata (che potrebbe essere inferiore alla costante di dissociazione del tetramero) o dell'assenza di siti di taglio per la tripsina nell'interfaccia tra dimeri. Quando sono stati aggiunti alla miscela di reazione glicina o malonato si è osservata un'ulteriore variazione del tipo e del numero di peptidi rilevabili. Se si confrontano le intensità relative di tre bande rappresentative (vedi figure 23 e 25) a diversi tempi di incubazione con tripsina (Figura 31), è possibile notare che, nel caso in cui si ha malonato nella miscela di reazione, oltre ad un aumento della velocità di degradazione del frammento maggiore (35.6 kDa), si registra anche un incremento della velocità di formazione del frammento a 30 kDa e una diminuzione della velocità di formazione del frammento a 26.5 kDa. Dopo 60' di incubazione in presenza di AMP-PCP e malonato, entrambi i frammenti proteici sono presenti in quantitativi relativi pari ad almeno 4 volte rispetto alla digestione condotta in assenza di malonato. Questi dati suggeriscono che il malonato sia in grado di stabilizzare un nucleo compatto della proteina, notoriamente caratterizzata da elevata flessibilità conformazionale. È interessante notare come solo l'associazione tra malonato (o glicina) e AMP-PCP sia in grado di stabilizzare questa conformazione compatta, mentre il malonato da solo non è altrettanto efficace. Inoltre in presenza di solo AMP-PCP si registra una banda intensa intorno a 25 kDa che è assente, o poco intensa, quando anche il malonato è presente nella miscela di reazione. Questa osservazione è rilevante, se si considera che non esiste in PDB una struttura di hSR in

complesso con l'ATP e un ligando del sito attivo, che dovrebbe essere invece la conformazione funzionalmente rilevante.



**Figura 31** Confronto delle cinetiche di formazione/degradazione i tre bande rappresentative della proteolisi limitata di hSR in presenza di  $MgCl_2$  e AMP-PCP o  $MgCl_2$ , AMP-PCP e malonato. Le quantità relative sono state calcolate dall'analisi densitometrica dell' SDS-PAGE, utilizzando come riferimento la quantità presente a 2' di incubazione nel frammento di 35.6 kDa.

Tramite identificazione dei peptidi svolta mediante spettrometria di massa è stato possibile rilevare una regione compresa tra i residui amminoacidici 97-273 per tutte e tre le bande a 30, 26.5 e 21 kDa. Si tratta di una regione proteica che include tutto il dominio minore e parte del dominio maggiore, nello specifico la porzione di tale dominio che si trova vicino al sito di legame del malonato. I siti della tripsina che delimitano tali regioni sono presenti sia in regioni destrutturate sia in corrispondenza delle regioni terminali di  $\alpha$ -eliche (Figura 32). È probabile che il taglio proteolitico proceda inizialmente a livello delle regioni destrutturate (posizione 61 e 347), formando un frammento di circa 30 kDa e solo successivamente nelle regioni strutturate che, conseguentemente al taglio, potrebbero essersi parzialmente destrutturate e essere diventate più accessibili alla proteasi. Ad esempio il taglio in posizione 97 del frammento di circa 30 kDa può generare un frammento di circa 26 kDa.

Questi dati suggeriscono che il dominio minore rimanga integro in presenza di malonato e AMP-PCP, in quanto interessato dalla rotazione che porta alla chiusura del sito attivo [8]. È stato quindi possibile ipotizzare un taglio progressivo ad opera della tripsina in regioni adiacenti ad una porzione di proteina che, in presenza di ATP e malonato, rimane stabile anche dopo 60' di reazione. Il processo di mappatura peptidica, ancora in corso, ci permetterà di confrontare la sequenza dei frammenti ottenuti nelle diverse





***IDENTIFICAZIONE DI  
RESIDUI COINVOLTI  
NELLA COMUNICAZIONE  
ALLOSTERICA TRA SITO  
ATTIVO E SITO DI  
LEGAME DELL'ATP***



Manoscritto sottomesso alla rivista *Scientific Reports*,

“Glutamine 89 is a key residue in the allosteric modulation of human serine racemase activity by ATP”

Andrea V. Canosa, Serena Faggiano, Stefano Bruno, Riccardo Percudani,  
Barbara Campanini, Andrea Mozzarelli  
(SREP-18-04208)



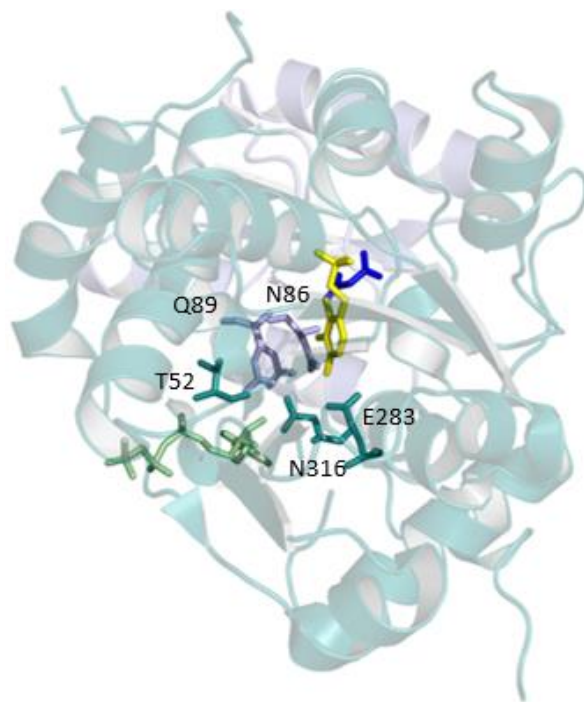
# Risultati

## Mutanti di hSR

Lo studio della modulazione dell'attività in seguito ad interazione con diversi effettori è particolarmente rilevante per la comprensione delle variazioni conformazionali di hSR. Nello specifico il legame dell'ATP ha un ruolo nella stimolazione di entrambe le attività di hSR, anche se in maniera differente. Infatti l'efficienza della  $\beta$ -eliminazione della L-serina viene aumentata di almeno 25 volte, quella di racemizzazione di solo 4 volte [21]. Il legame del nucleotide all'enzima umano è cooperativo, come atteso per un ligando che ha un effetto sulla struttura quaternaria [21]. Dall'analisi dell'unica struttura di SR ottenuta in presenza di AMP-PCP, cioè SpSR, è stato osservato che l'interazione con il nucleotide non causa cambiamenti significativi nell'orientamento del cofattore o nel sito attivo. Tuttavia, l'O3' del PLP è legato al gruppo idrossile del ribosio e al fosfato in  $\gamma$  dell'AMP-PCP attraverso un network di legami a idrogeno formato da Met53, Asn84, Gln87, Glu218, Asn311 e molecole di acqua [9]. In hSR i residui corrispondenti sono: Thr52, Asn86, Gln89, Glu283 e Asn316 (Figura 33). Questi residui potrebbero essere importanti per la modulazione specifica dell'attività di  $\beta$ -eliminazione rispetto a quella di racemizzazione, attraverso modificazioni a livello della struttura terziaria non ancora identificate. E' stato ipotizzato che il controllo sulle due attività passi per la modulazione della transizione conformazionale aperto/chiuso del sito attivo [4, 9]. In assenza di una struttura di hSR in complesso ternario con ATP e un ligando del sito attivo questa rimane una ipotesi.

Al fine di comprendere se gli amminoacidi che costituiscono tale network sono presenti anche in altre SR, oltre a quelle di lievito e umana, è stato effettuato un allineamento multiplo di 118 sequenze di tale enzima, considerando sia SR eucariotiche che procariotiche (vedi paragrafo "Analisi filogenetica", pag. 126-129).

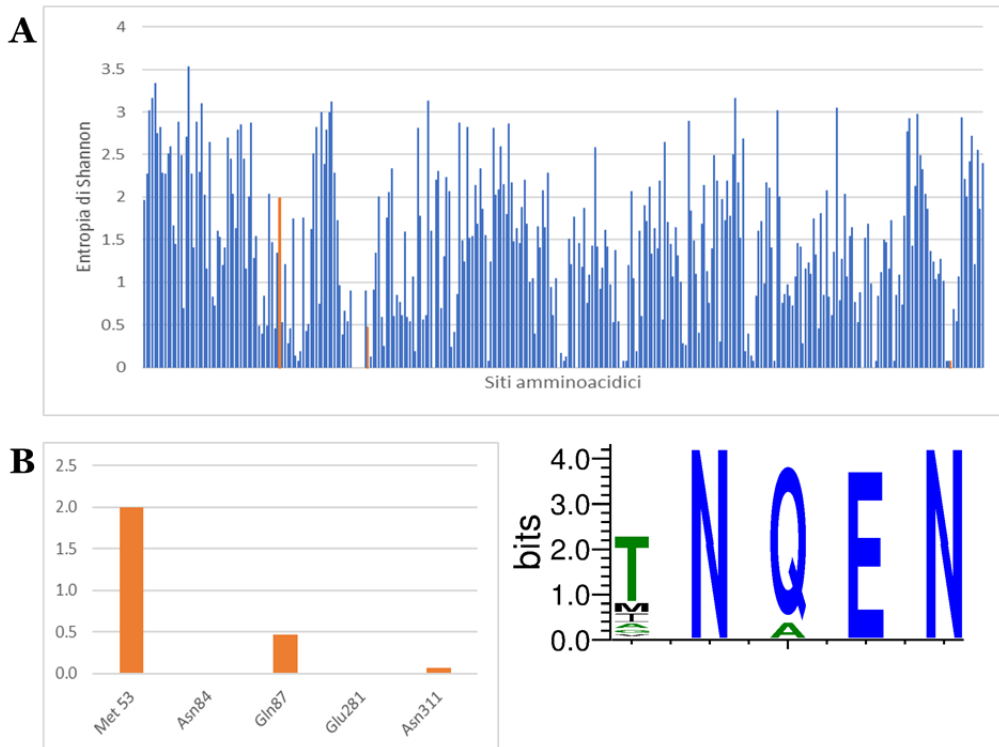
Inoltre per quantificare l'informazione qualitativa fornita da tale analisi è stata calcolata l'entropia di Shannon associata ad ogni singolo residuo. Quest'ultima è un'analisi statistica che può essere utilizzata per definire il grado di conservazione delle diverse posizioni di un allineamento [74,75]. L'entropia raggiunge il suo valore minimo quando lo stesso amminoacido è sempre presente in una posizione, mentre il valore massimo è ottenuto quando tutti i residui sono presenti con la stessa frequenza. In genere posizioni con un'entropia maggiore a 2 sono considerate variabili, mentre valori inferiori a 2 sono considerati conservati.



**Figura 33** Struttura di hSR 3L6B, in stick sono rappresentati i residui del network di legami a idrogeno, in giallo il PLP, in blu il malonato. Il dominio minore, e i relativi amminoacidi, sono colorati in celeste chiaro. L'AMP-PCP (in verde) è stato posizionato per sovrapposizione della struttura umana con quella di lievito (codice PDB 1WTC).

Da questo studio è stato possibile osservare che tutti gli amminoacidi del network sono altamente conservati, con valori di entropia sempre inferiori a 2 (Figura 34). Nelle posizioni 84 e 281 sono stati sempre osservati i residui Asn e Glu, inoltre è stata calcolata un'entropia molto bassa, 0.1, per la posizione 311 in cui si ha prevalentemente un'Asn. L'elevato grado di conservazione potrebbe essere dovuto al fatto che tali amminoacidi possono essere coinvolti anche in altre funzioni. Infatti dall'analisi della struttura di SpSR in presenza di AMP-PCP è stato osservato che Asn84 è in grado di interagire direttamente con il PLP [9]. Mentre Glu281 e Asn311 potrebbero assolvere anche un ruolo strutturale. Una situazione differente si ha in corrispondenza della posizione 53, dove il residuo amminoacidico maggiormente presente non è una Met, come nel caso di SpSR, ma una Thr, come in hSR. In aggiunta in tale posizione sono stati osservati anche altri amminoacidi quali Val, Ala, Pro, Gly e Ile. Si tratta quindi di un sito maggiormente variabile rispetto agli altri. Per quanto riguarda invece la posizione 87 il valore di entropia di Shannon calcolato è stato pari a 0.5 e i

residui osservati a seguito dell'allineamento di sequenza sono stati solo una glutammina o un'alanina.

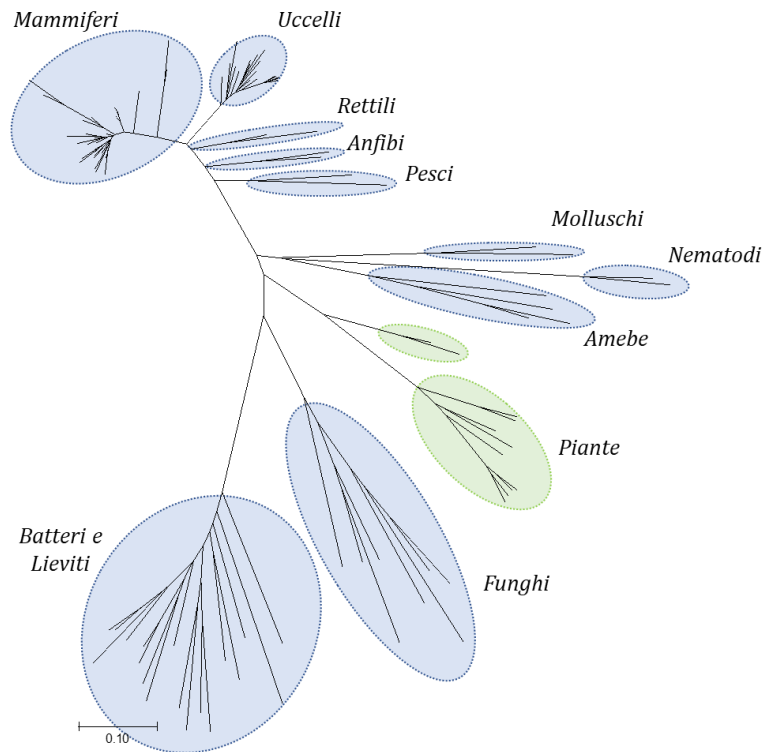


**Figura 34** **A-** Istogramma relativo ai valori di entropia per ogni sito amminoacidico delle sequenze analizzate, le barre rosse sono relative a residui del network di legami a idrogeno. **B-** Istogramma degli amminoacidi del network di legami a idrogeno e a fianco logo delle probabilità degli stessi.

Da un'analisi approfondita delle singole sequenze è stato possibile notare che l'alanina è presente solo in SR di piante, mentre in tutte le altre sequenze di organismi eucariotici e batteri si ha sempre una glutammina. Le SR delle piante sono state caratterizzate solo recentemente e il controllo allosterico svolto dall'ATP su tali enzimi non è ben chiaro. Infatti la proteina in *Arabidopsis thaliana* [75], *Hordeum vulgare* [76] e *Zea mais* [77] non è attivata dall'interazione con l'ATP, mentre SR di *Oryza sativa* è leggermente inattivata da tale nucleotide [77]. Gli enzimi presenti nelle piante sembrano costituire un gruppo distinto di serina racemasi eucariotiche [10] e questo spiegherebbe come mai la loro attività non è influenzata dall'interazione con nucleotidi. La presenza dell'alanina al posto della glutammina potrebbe essere rilevante per l'assenza della modulazione da parte dell'ATP.

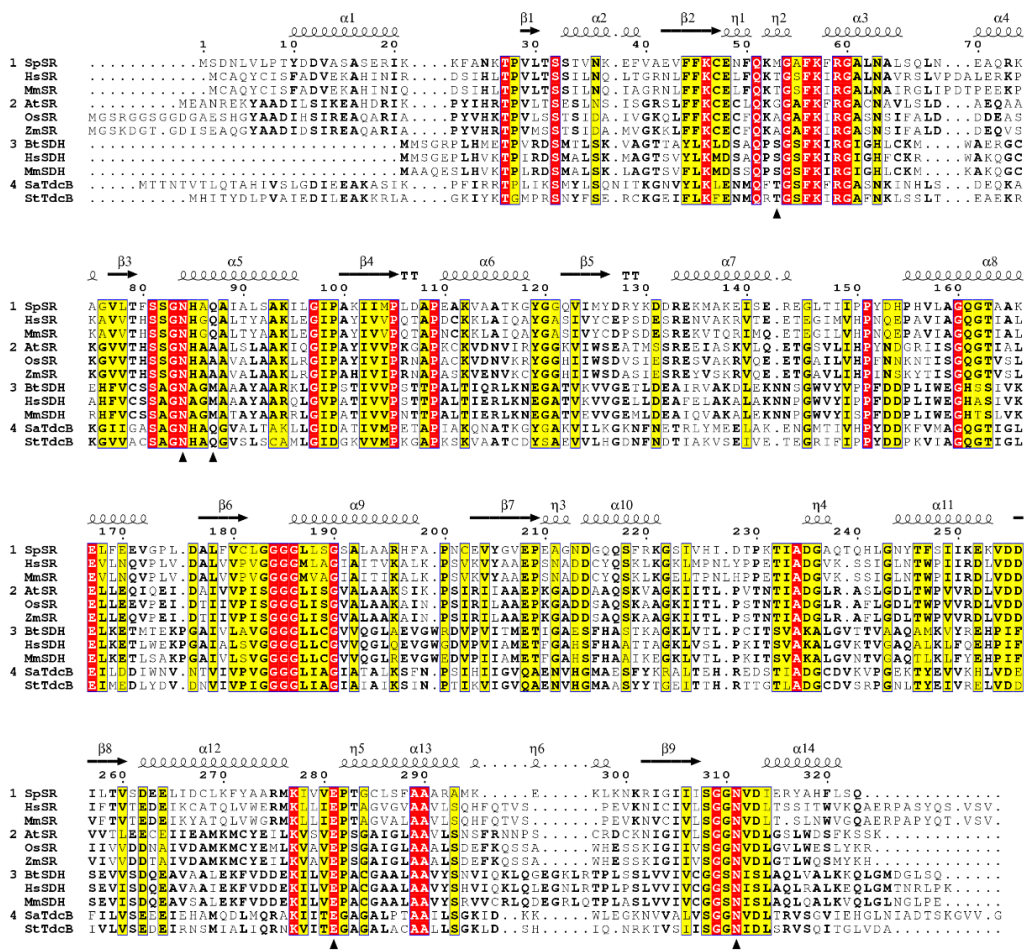
Le sequenze di SR sono state anche utilizzate per studiare le correlazioni evolutive tra le diverse proteine tramite la realizzazione di un

albero filogenetico (Figura 35). Tramite software *PAML* è stato possibile ricostruire le sequenze delle proteine ancestrali per ogni nodo dell'albero. Da questa analisi è stato possibile dedurre che la glutammina in posizione 87 è presente in quasi tutti i nodi e solo in quelli relativi ad alghe verdi e alle piante è stata predetta la presenza di un'alanina. Si tratta quindi di un amminoacido conservato nell'evoluzione e caratterizzato da una singola transizione.



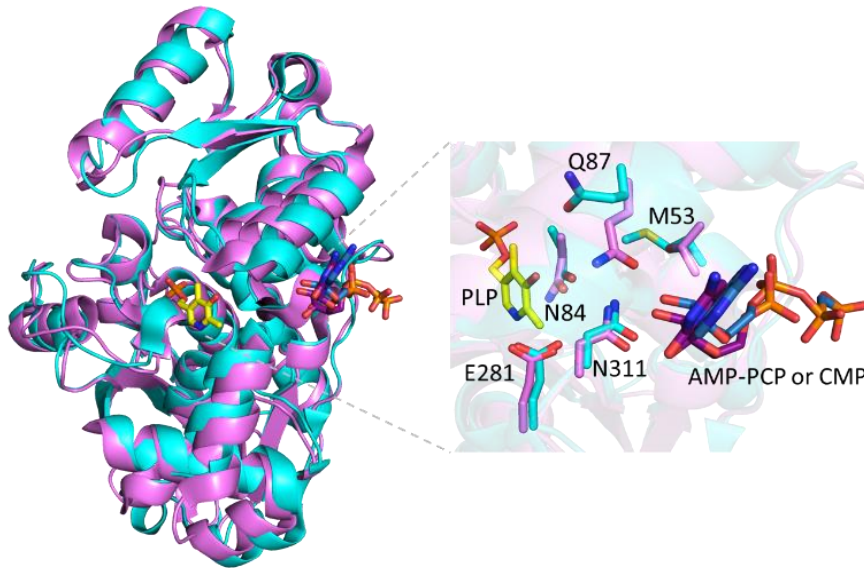
**Figura 35** Albero filogenetico di differenti serine racemasi. In blu sono raggruppati i rami relativi a proteine che presentano una glutammina in corrispondenza della posizione 87 di SpSR, in verde gli organismi che presentano un'alanina.

A questo punto lo studio delle sequenze è stato ampliato considerando omologhi strutturali di SR quali le serine e le treonine deidratasi. hSR presenta un'identità di sequenza del 23% con la serina deidratasi umana (hSDH) [8] e del 36% con la treonina deidratasi biodegradativa di *Salmonella* (StTdcB) [13]. Tali proteine presentano una somiglianza strutturale maggiore del 90% con hSR [8], tuttavia mentre l'attività di StTdcB è regolata da nucleotidi [23] per le serine deidratasi non vi è nessuna evidenza di tale modulazione. Dall'allineamento di queste sequenze amminoacidiche è stato possibile osservare che anche in omologhi strutturali sono presenti Asn84, Glu281 e Asn311, mentre gli altri due residui sono differenti (Figura 36).



**Figura 36** Le sequenze di SR di mammifero (gruppo 1), SR di pianta (gruppo 2), SDH da mammiferi (gruppo 3) e TdcB da batteri (gruppo 4) sono state allineate usando Clustal Omega. Residui identici sono indicati con caratteri bianchi su sfondo rosso; residui simili sono scritti in grassetto su sfondo giallo; amminoacidi simili all'interno di uno stesso gruppo sono indicati in grassetto. I residui coinvolti nel network di legami a idrogeno sono indicati da triangoli neri posti sotto l'allineamento. Gli elementi di struttura secondaria, indicati sopra all'allineamento, derivano dalla struttura di SpSR.

Dal confronto della struttura di SpSR in presenza di AMP-PCP (codice PDB 1WTC) con quella di StTdcB in presenza di CMP (codice PDB 2GN2), è stata osservata una completa sovrapposizione dell'orientazione di tutti i residui del network di legami a idrogeno tranne per il residuo Gln87 (Figura 37).



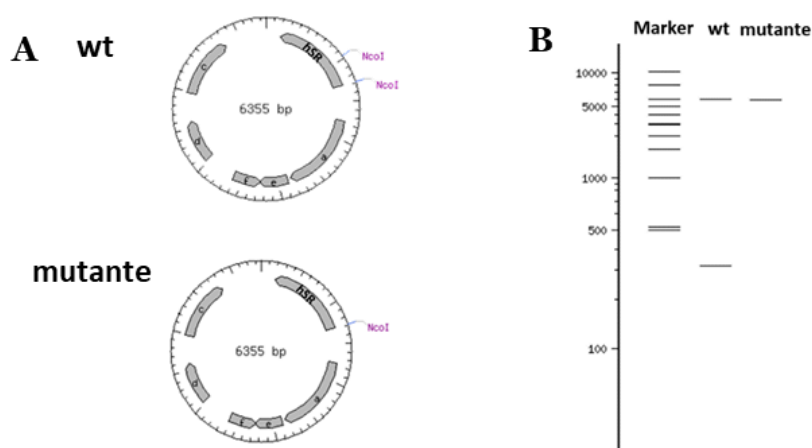
**Figura 37** Allineamento strutturale di SpSR in complesso con l'AMP-PCP (codice PDB 1WTC) in celeste con la StTdcB (codice PDB 2GN2) in rosa. A destra zoom del sito di legame del nucleotide e del sito attivo in cui sono evidenziati i residui del network. I residui sono tutti identici, tranne la Met53 che è sostituita in StTdcB con una treonina.

È stato quindi ipotizzato che il residuo Gln87 potrebbe svolgere un ruolo importante per la comunicazione allosterica e in questo lavoro è stato mutato nella sequenza di SR umana. La scelta dell'aminoacido da sostituire alla glutammina è stata fatta sulla base delle sequenze degli altri organismi considerati. In particolare è stato prodotto un mutante con una metionina, residuo presente nelle serine deidratasi, e uno con un'alanina, residuo presente nelle SR di piante. Sia per le serine deidratasi sia per le SR di piante l'attività proteica non è regolata dall'interazione con i nucleotidi, quindi è stato valutato l'effetto della mutazione della Gln87 sull'attività e la struttura di hSR.

Un altro amminoacido che potrebbe avere un ruolo rilevante nel network di legami a idrogeno è Glu283. Si tratta di un residuo conservato in tutte le SR e anche negli omologhi strutturali, indipendentemente dalla capacità di interazione con nucleotidi. Glu283 forma legami a idrogeno con altri due amminoacidi del network quali Asn84 e Asn311. È stato prodotto un mutante con un'alanina al posto dell'acido glutammico al fine di interrompere il network di legami a idrogeno mediante l'introduzione di un amminoacido non polare.

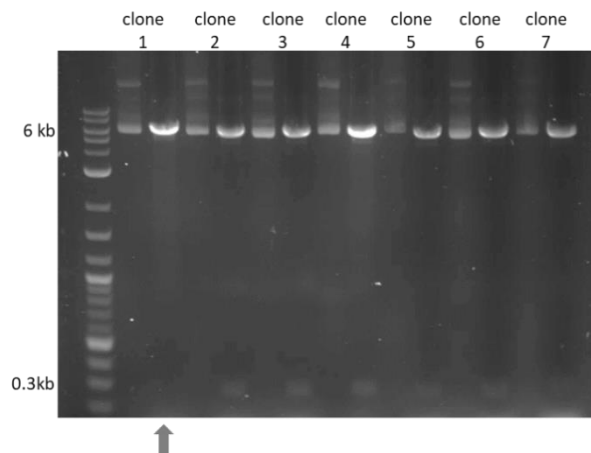
## Preparazione dei mutanti

Per ottenere i plasmidi codificanti per i mutanti Q89M e Q89A-hSR è stata svolta una mutagenesi sito specifica utilizzando primers contenenti la sequenza nucleotidica codificante per l'amminoacido differente rispetto al wt e una mutazione silente che consentisse lo screening dei mutanti. Nello specifico per questi due mutanti è stato rimosso un sito di taglio per l'enzima NcoI. Tramite il software *Neb Cutter* è stata effettuata una digestione virtuale del gene di hSR con tale enzima di restrizione. Nel caso del wt la digestione con NcoI porta alla formazione di due frammenti di 6036 e 319 bp; mentre per il DNA mutato si ha la linearizzazione del plasmide, 6355 bp (Figura 38).



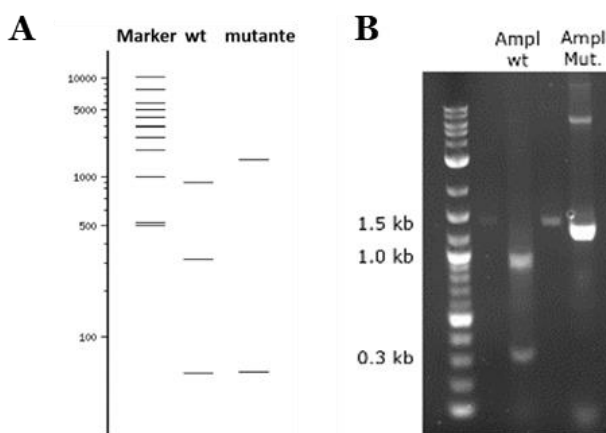
**Figura 38** A- Rappresentazione dei plasmidi di wt-hSR e dei mutanti, con evidenziati i siti di taglio di NcoI. B- Profilo di digestione con NcoI predetto tramite reazione di digestione virtuale.

Per discriminare i cloni recanti il gene mutato sono state analizzate diverse colonie, poiché il processo di mutagenesi non ha un'efficienza del 100%. Per il mutante Q89M-hSR dall'analisi di sette cloni è stato possibile osservare un plasmide con un pattern di digestione differente rispetto a wt-hSR (Figura 39).



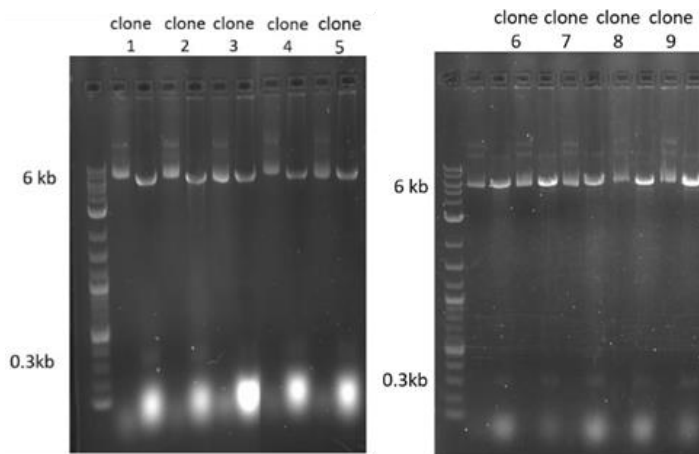
**Figura 39** Analisi di restrizione con *NcoI* dei plasmidi estratti da diversi cloni cellulari. Nella lane 1 è stato caricato il marker, nelle lanes successive sono caricati i plasmidi non digeriti e dopo la digestione. È stato ottenuto un pattern di digestione differente relativo al clone 1, infatti manca una banda a circa 300 bp.

Al fine di confermare l'avvenuta mutazione nel plasmide codificante per Q89M-hSR è stata svolta anche una amplificazione del gene di hSR, seguita da digestione con lo stesso enzima di restrizione. Anche in questo caso è stata svolta una digestione virtuale, quindi per il wt i frammenti attesi sono di 896, 319 e 21 bp mentre per il mutante di 1215 e 21 bp (Figura 40 A). La reazione di digestione è stata caricata su gel di agarosio (Figura 40 B) e l'incorporazione della mutazione è stata confermata. Il plasmide codificante il mutante è stato sequenziato e poi utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* BL21(DE3) che esprimono le chaperonine GroEL e GroES.



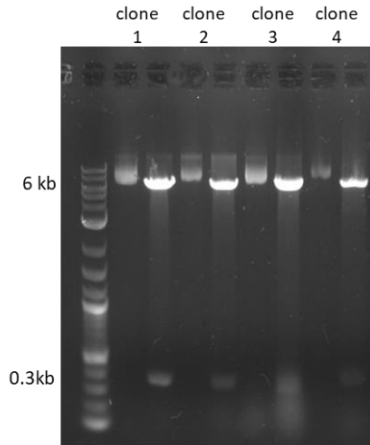
**Figura 40 A-** Digestione virtuale del gene di wt e Q89M-hSR con *NcoI*. **B-** Analisi di restrizione con *NcoI* dei prodotti della PCR del clone positivo alla prima analisi di restrizione (lane 4 e 5) e di wt-hSR (lane 2 e 3).

Per il mutante Q89A-hSR è stata seguita la stessa procedura, utilizzando sempre l'enzima NcoI per discriminare i plasmidi recanti la mutazione. Tuttavia in questo caso non è stato possibile ottenere un plasmide recante la mutazione (Figura 41), infatti in tutti i cloni analizzati è sempre stato ottenuto un pattern relativo a wt-hSR.



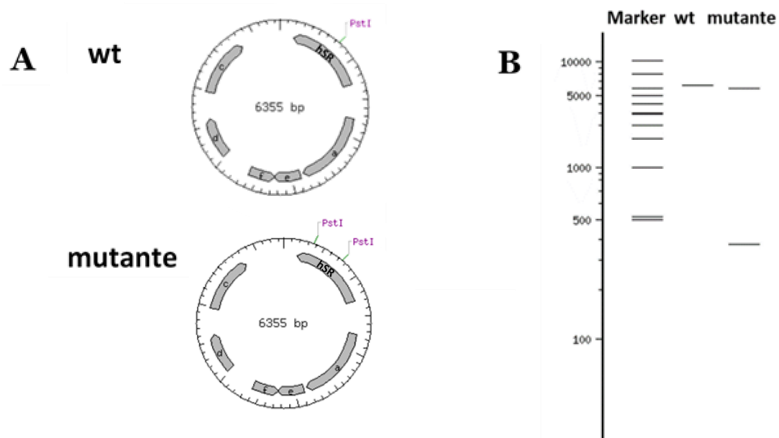
**Figura 41** Analisi di restrizione con NcoI dei plasmidi estratti da diversi cloni cellulari. Nella lane 1 è stato caricato il marker per entrambi i gel, nelle lanes successive sono caricati i plasmidi non digeriti e a seguito della digestione.

Quindi sono state svolte delle reazioni di mutagenesi utilizzando altri primers contenenti solo le basi codificanti per l'alanina e non la rimozione del sito di taglio per NcoI, in modo tale da ridurre il numero di mutazioni presenti nei primer. Una digestione con NcoI è stata comunque effettuata per confermare l'identità del plasmide (Figura 42). Il sequenziamento ha però rilevato assenza di mutazioni.



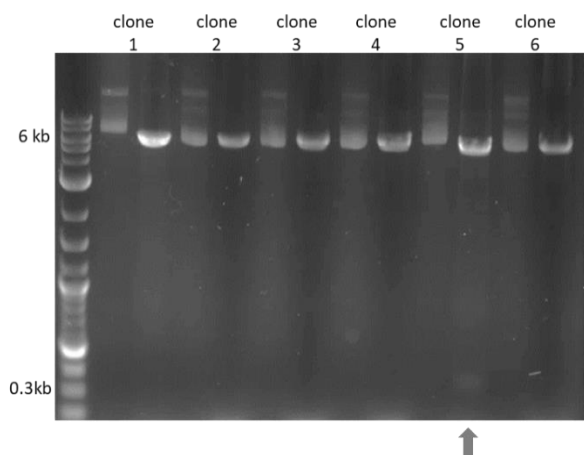
**Figura 42** Analisi di restrizione con *NcoI* dei plasmidi estratti da diversi cloni cellulari. Nella lane 1 è stato caricato il marker, nelle lanes successive sono caricati i plasmidi non digeriti e dopo la digestione.

È stata svolta una mutagenesi sito specifica anche per sostituire l'acido glutammico in posizione 283 con un'alanina. In questo caso i primer per la mutagenesi introducevano il sito di restrizione per *PstI*. Sulla base della digestione virtuale nel caso del wt la reazione con *PstI* porta alla formazione di un solo frammento di 6355 bp, mentre per il plasmide mutato i frammenti attesi sono di 5971 e 384 bp (Figura 43).



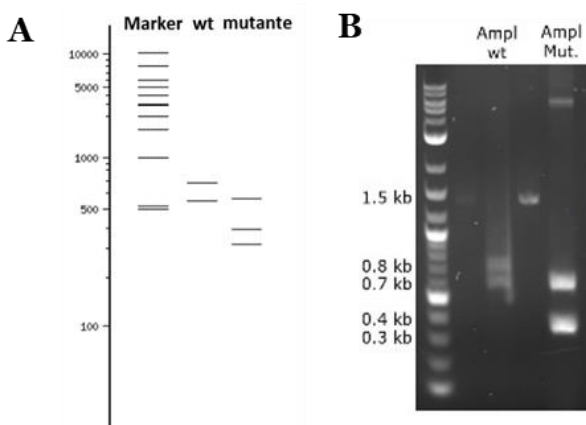
**Figura 43 A-** Rappresentazione dei plasmidi di wt-hSR e dei mutanti, con evidenziati i siti di taglio di *PstI*. **B-** Profilo di digestione con *PstI* predetto tramite reazione di digestione virtuale

Sono state analizzate diverse colonie, ma solo una ha mostrato il profilo di digestione atteso per il mutante (Figura 44).



**Figura 44** Analisi di restrizione con *Pst*I dei plasmidi estratti da diversi cloni cellulari. Nella lane 1 è stato caricato il marker, nelle lanes successive sono caricati i plasmidi non digeriti e dopo la digestione. Per il clone 5 è stata osservata una banda a circa 300 bp non visibile negli altri, indice della presenza di un sito di taglio in più nella sequenza.

La presenza della mutazione è stata confermata mediante reazione di amplificazione del gene di hSR e digestione con *Pst*I. La digestione virtuale indica che per il wt si ha la formazione di due frammenti a 688 e 548 bp, mentre per E283A-hSR i frammenti sono tre: 548, 384 e 304 bp (Figura 45 A). L'analisi di restrizione ha confermato la presenza della mutazione (Figura 45 B).

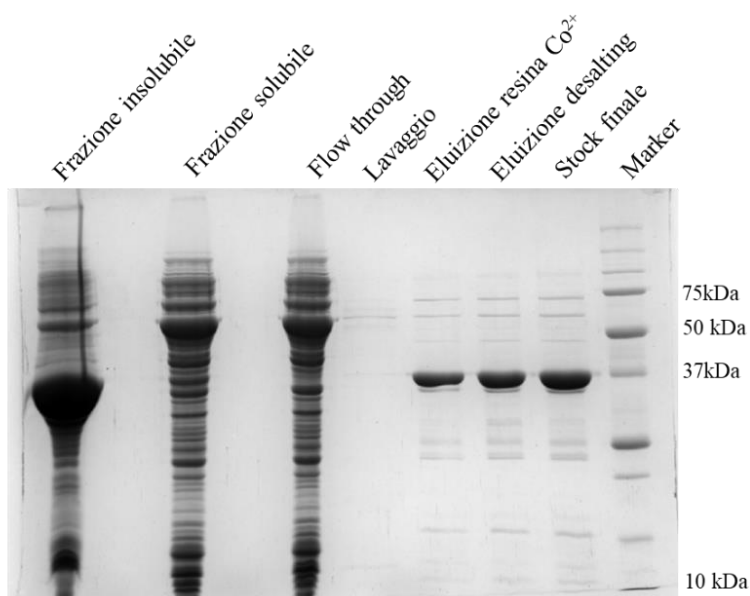


**Figura 45** Digestione virtuale del gene di wt e E283A-hSR con *Pst*I. **B**-Analisi di restrizione con *Pst*I dei prodotti della PCR del clone positivo alla prima analisi di restrizione (lane 4 e 5) e di wt-hSR (lane 2 e 3).

Il plasmide recante la mutazione E283A-hSR è stato sequenziato e poi trasformato in cellule di *E. coli* contenenti il plasmide che codifica per le chaperonine.

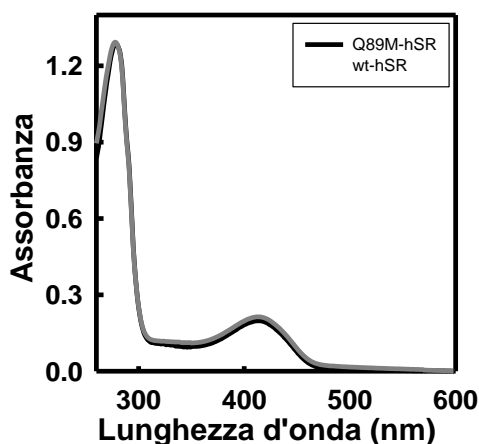
## Espressione e purificazione di Q89M-hSR

La proteina è stata espressa e purificata tramite cromatografia di affinità, secondo il protocollo descritto in Materiali e metodi. La resa ottenuta è stata di circa 4 mg/l, comparabile con il wt per cui sono stati ottenuti 6 mg/l, inoltre la purezza stimata da gel di poliaccrilammide è stata del 90 % (Figura 46), paragonabile a quella di wt-hSR.



**Figura 46** SDS-PAGE in cui sono stati caricati campioni relativi alle diverse fasi di purificazione.

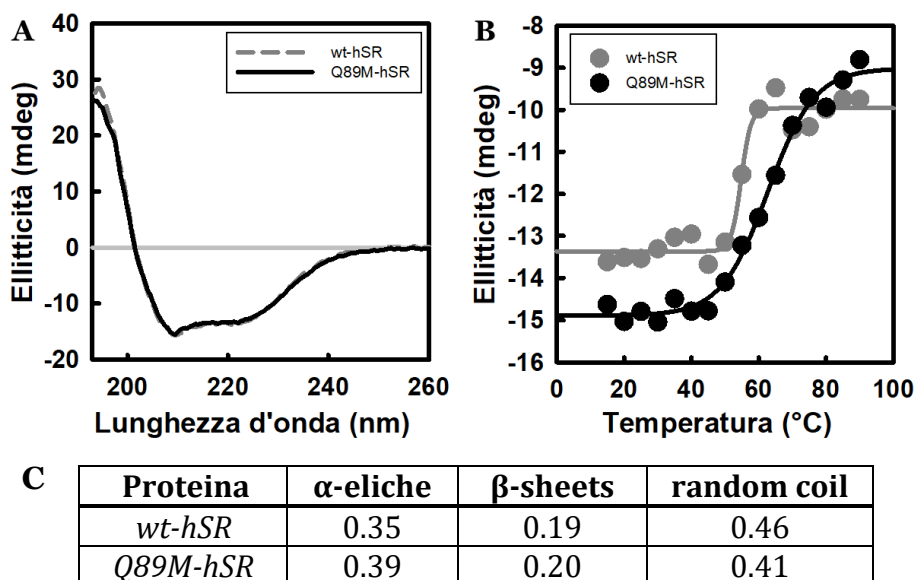
Lo spettro di assorbimento di Q89M-hSR è identico a quello della proteina wild-type, indice che il grado di saturazione della proteina con PLP è paragonabile (Figura 47).



*Figura 47* Spettri di assorbimento di wt e Q89M-hSR.

Per valutare eventuali effetti della mutazione sulla struttura secondaria sono stati raccolti spettri di dicroismo circolare nel far-UV (Figura 48 A), che hanno permesso di confermare il corretto ripiegamento del mutante. Da analisi di deconvoluzione sono state ottenute percentuali di  $\alpha$ -eliche e  $\beta$ -sheets comparabili con il wild-type. Inoltre è stato eseguito un esperimento di denaturazione termica di Q89M-hSR per verificare se la mutazione avesse effetti sulla stabilità della proteina (Figura 48 B). Anche in questo caso i risultati sono paragonabili per il mutante e la proteina wild-type, nonostante la non-reversibilità della denaturazione renda impossibile il calcolo di valori di  $T_m$  affidabili.

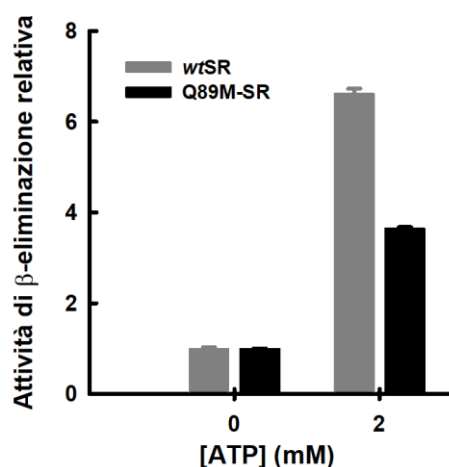
È possibile notare che la pendenza della curva di denaturazione del mutante è minore rispetto a quella del wild-type. La pendenza è indice della cooperatività della denaturazione termica e della variazione di entalpia tra lo stato nativo e lo stato denaturato [78]. Questo diverso andamento termico non è in disaccordo con l'analisi precedente, che ha mostrato un'identica composizione in struttura secondaria del wild-type e del mutante. Infatti la variazione della pendenza potrebbe essere dovuta a modificazioni della struttura terziaria del mutante e, conseguentemente, del grado di esposizione al solvente di superfici interne in seguito a denaturazione [79].



**Figura 48** **A**-Spettri di dicroismo circolare nel far-UV di Q89M-SR e wt-SR. Le proteine sono state analizzate ad una concentrazione pari a  $4 \mu\text{M}$  in tampone  $20 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.5. **B**- Studio della stabilità termica di Q89M-SR e wt-hSR. **C**- Risultato della deconvoluzione degli spettri svolta tramite programma Dichroweb.

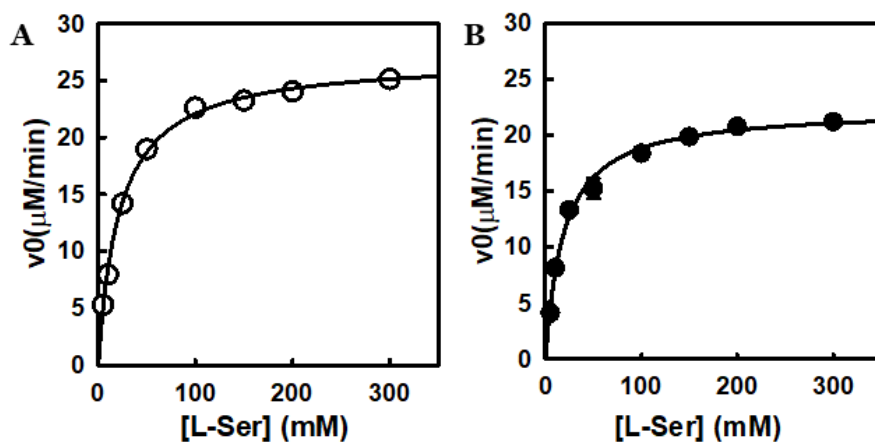
## Interazione dell'ATP con Q89M-hSR

L'attività di Q89M-hSR è stata saggiata per la reazione di  $\beta$ -eliminazione della L-serina. È stato riscontrato un aumento di 3.8 volte di tale attività a seguito dell'aggiunta di  $2 \text{ mM ATP}$ , anche se con un effetto ridotto rispetto a wt-SR che, nelle medesime condizioni, mostrava un aumento di 7 volte dell'attività (Figura 49). L'aumento della concentrazione di ATP fino a  $10 \text{ mM}$  non ha causato un aumento dell'attività del mutante (dati non mostrati) e questo suggerisce che la ridotta attivazione osservata per il mutante non è dovuta ad una diminuzione dell'affinità dell'ATP per il suo sito di legame.



**Figura 49** Effetto di 2 mM ATP-Mg sull'attività di  $\beta$ -eliminazione della L-serina di wt-hSR e Q89M-hSR

Poiché cambiamenti nel sito di legame dell'ATP possono avere effetti sulla  $K_M$  della L-serina sono state calcolate le dipendenze della velocità iniziale della reazione di  $\beta$ -eliminazione dalla concentrazione di L-serina in assenza o in presenza di ATP (Figura 50).

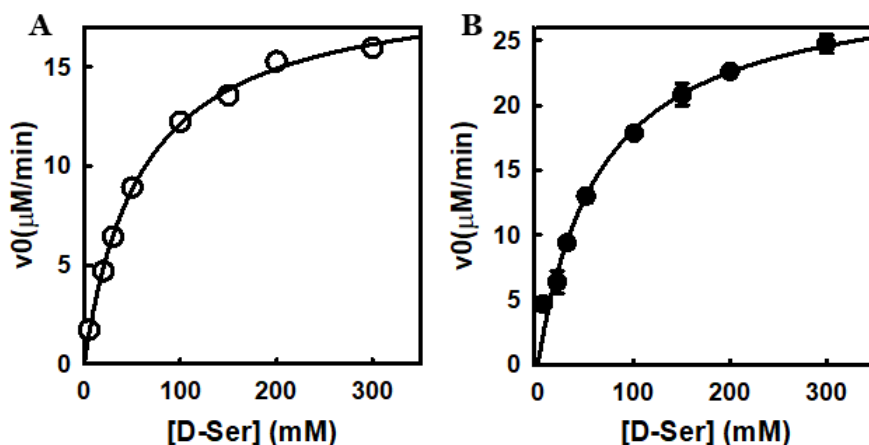


**Figura 50** Dipendenza della velocità iniziale di  $\beta$ -eliminazione della L-serina dalla concentrazione di substrato in assenza (A) o in presenza (B) di 2 mM ATP.

Dall'analisi dei valori di  $K_M$  e  $k_{cat}$  ottenuti (Tabella 10) è stato possibile osservare che il legame dell'ATP non comporta una variazione significativa della  $K_M$  per il substrato, che è stata calcolata  $22 \pm 1$  mM in assenza di ATP e  $19 \pm 1$  mM quando il nucleotide è stato aggiunto nella miscela di reazione.

Mentre si ha un modesto, seppure significativo, aumento della  $k_{cat}$ , da  $17 \pm 1 \text{ min}^{-1}$  a  $56 \pm 1 \text{ min}^{-1}$  a seguito di aggiunta di ATP.

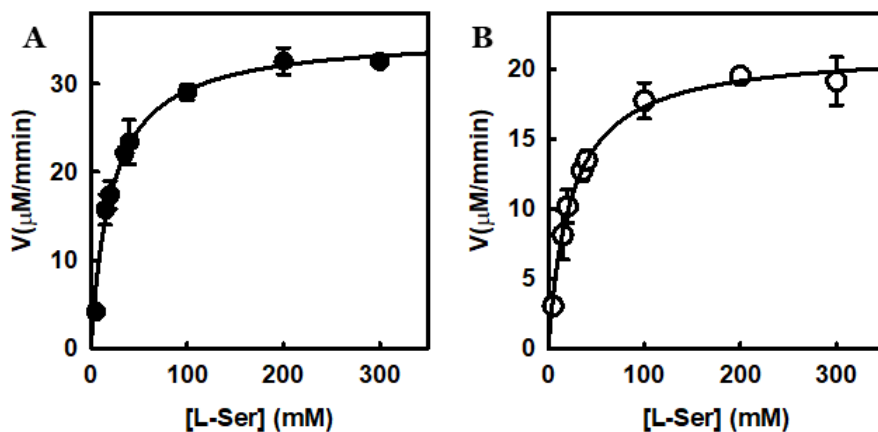
Sono state considerate le altre reazioni catalizzate da SR. Anche per quanto riguarda la  $\beta$ -eliminazione della D-serina (Figura 51) non è stato misurato un effetto significativo sulla  $K_M$  a seguito di interazione con l'ATP. Infatti si è ottenuta una  $K_M$  di  $60 \pm 2 \text{ mM}$  in assenza di ATP e  $65 \pm 7 \text{ mM}$  quando tale ligando è stato aggiunto nella miscela di reazione. Le  $k_{cat}$  misurate sono state rispettivamente di  $3 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$  e  $10 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ .



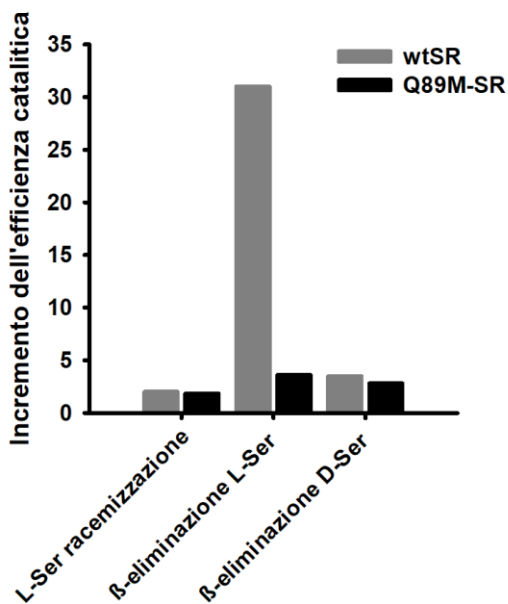
**Figura 51** Dipendenza della velocità iniziale di  $\beta$ -eliminazione di D-serina dalla concentrazione di substrato in assenza (A) o in presenza (B) di 2 mM ATP.

Per quanto riguarda la reazione di racemizzazione della L-serina le  $K_M$  calcolate sono state rispettivamente di  $24 \pm 2$  e  $22 \pm 2 \text{ mM}$  in assenza o in presenza di ATP (Figura 52). Anche in questo caso la variazione delle  $k_{cat}$  è stata minima,  $14 \pm 1 \text{ min}^{-1}$  quando non è stato aggiunto ATP nella miscela di reazione e  $24 \pm 1 \text{ min}^{-1}$  a seguito di addizione del nucleotide.

Nel complesso è stato possibile osservare che le variazioni di efficienza catalitica delle reazioni di  $\beta$ -eliminazione della D-serina e di racemizzazione della L-serina in assenza o presenza di ATP di Q89M-hSR sono state comparabili con il wild-type. Infatti è stata calcolata una variazione di efficienza catalitica di 3 volte per la prima e di 2 volte per la reazione di racemizzazione. Mentre la differenza più rilevante è stata misurata per la  $\beta$ -eliminazione della L-serina che nel caso del mutante è stata di solo 3.8 volte, mentre nel wild-type di 31 volte (Figura 53).



**Figura 52** Dipendenza della velocità iniziale di racemizzazione della L-serina dalla concentrazione di substrato in assenza (A) o in presenza (B) di 2 mM ATP.



**Figura 53** Incremento dell'efficienza catalitica a seguito del legame dell'ATP per tutte le reazioni catalizzate da wt-hSR e Q89M-hSR.

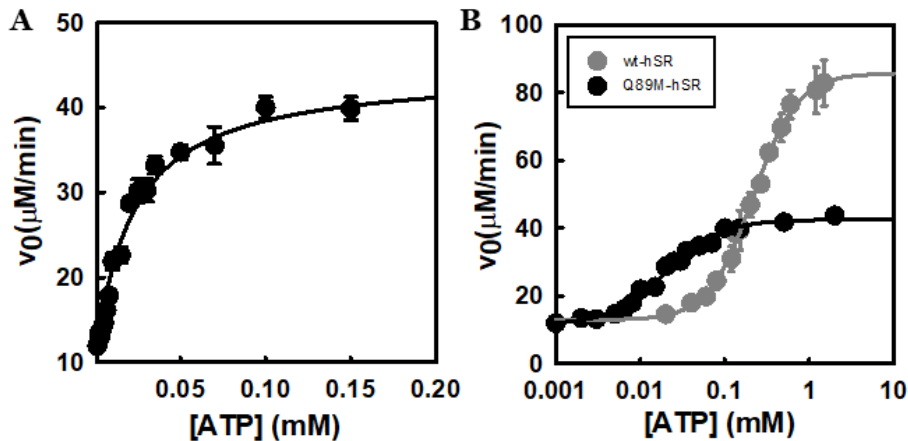
**Tabella 10** Parametri catalitici per la  $\beta$ -eliminazione e la racemizzazione di L-serina e D-serina da parte di wt-hSR o Q89M-hSR. I dati per il wt sono stati presi da [21] e controllati nelle stesse condizioni sperimentali utilizzate per Q89M-hSR.

Reazione	SR	$K_M$ (mM)		$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )		$k_{cat}/K_M$ (min <sup>-1</sup> ·mM <sup>-1</sup> )	
		-ATP	+ATP	-ATP	+ATP	-ATP	+ATP
Racemizzazione (L-Ser)	wt	35 ± 5	34 ± 4	19 ± 1	35 ± 1	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.2
	Q89M	24 ± 2	22 ± 2	14 ± 1	24 ± 1	0.6 ± 0.5	1.1 ± 0.5
$\beta$ -eliminazione (L-Ser)	wt	76 ± 10	12 ± 1	37 ± 4	183 ± 3	0.5 ± 0.1	15. ± 3.0
	Q89M	22 ± 1	19 ± 1	17 ± 1	56 ± 1	0.8 ± 0.1	3 ± 0.6
$\beta$ -eliminazione (D-Ser)	wt	46 ± 3	167 ± 16	2 ± 0.1	23 ± 1	0.04 ± 0.02	0.14 ± 0.06
	Q89M	60 ± 2	65 ± 7	3 ± 0.1	10 ± 0.3	0.05 ± 0.02	0.14 ± 0.04

## Il legame dell'ATP a Q89M-hSR non è cooperativo

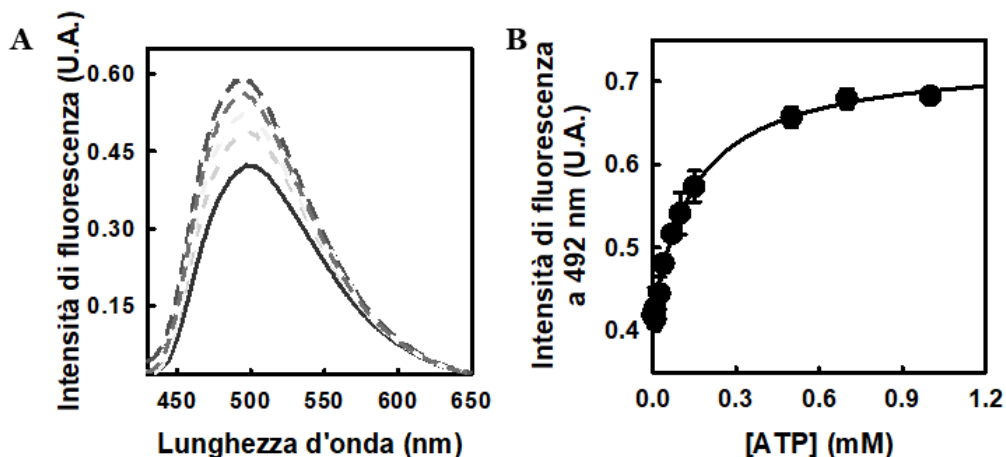
I parametri catalitici calcolati per la reazione di  $\beta$ -eliminazione della L-serina sono stati utili per definire le condizioni sperimentali necessarie per misurare il legame dell'ATP a Q89M-hSR tramite saggi di attività a concentrazioni saturanti di L-serina. Si è deciso di lavorare a 300 mM di L-serina, concentrazione saturante sia in assenza che in presenza di ATP. In queste condizioni l'aumento d'attività in funzione della concentrazione di ATP dipende solo dal legame del nucleotide e non da effetti allosterici dell'ATP sulla  $K_M$  del substrato.

Il fitting dei dati sperimentali è stato inizialmente svolto utilizzando l'equazione di un'iperbole ed in seguito l'equazione di Hill, come è stato effettuato per la titolazione dell'ATP di wt-hSR [21]. Quest'ultimo fitting è risultato migliore solo a basse concentrazioni di ATP, probabilmente a causa di differenze minime nei valori di velocità misurati per cui l'errore commesso risulta essere maggiore. Inoltre poiché si sono ottenuti valori di  $r^2$  comparabili per entrambi i fitting, cioè 0.98, è stato utilizzato il fitting più semplice e cioè con l'equazione di un'iperbole, che indica un legame di tipo non cooperativo. Da questa analisi è stato ottenuto un valore di  $EC_{50}$  pari a  $21 \pm 2 \mu\text{M}$  (Figura 54).



**Figura 54** A-Dipendenza della velocità iniziale di  $\beta$ -eliminazione della L-serina dalla concentrazione di ATP in presenza di 300 mM L-serina. B-Confronto con wt-hSR (in grigio).

Per determinare l'affinità dell'ATP in assenza di substrato, sono state svolte misure fluorimetriche, sfruttando la fluorescenza emessa dal PLP quando viene eccitato a 412 nm. Infatti è noto che per alcuni enzimi PLP-dipendenti appartenenti al fold-type II l'occupazione del sito attivo o di un sito allosterico determini un aumento dell'emissione di fluorescenza del cofattore, verosimilmente come conseguenza di una chiusura del sito attivo o di un cambiamento della sua polarità [22, 25, 81]. Come atteso anche per Q89M-SR il legame dell'ATP ad hSR causa un incremento dell'emissione di fluorescenza del cofattore, accompagnato da uno spostamento verso il blu della centratura del picco (Figura 55). È stato osservato un aumento del segnale di emissione di 1.65 volte a seguito di aggiunta di ATP e la costante di dissociazione, ottenuta dal fitting della dipendenza del segnale misurato dalla concentrazione di ATP, è stata pari a  $125 \pm 15 \mu\text{M}$ . Anche questa analisi ha confermato un legame di tipo non cooperativo.

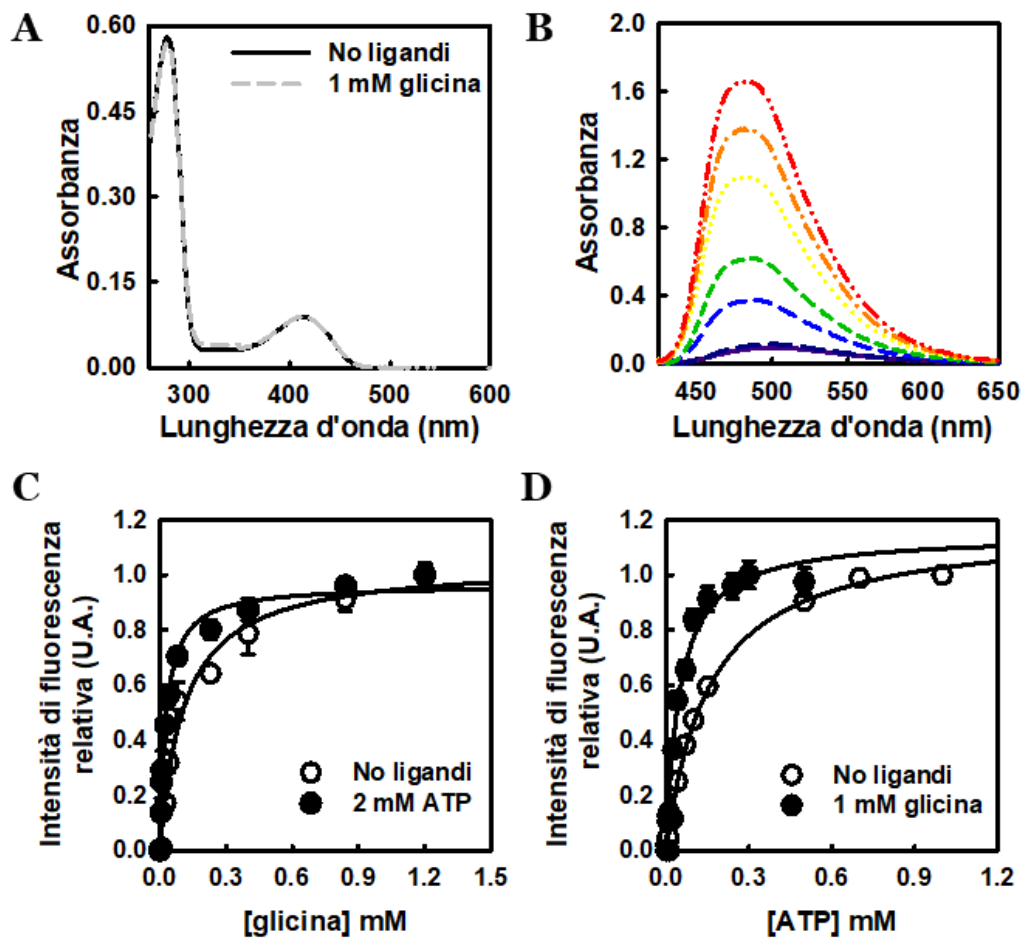


**Figura 55** A- Spettri di emissione di fluorescenza per eccitazione a 412 nm, di una soluzione contenente Q89M-hSR e concentrazioni crescenti di ATP. B-Dipendenza dell'intensità di emissione di fluorescenza a 492 nm dalla concentrazione di ATP.

## Effetto della mutazione Q89M sulla comunicazione allosterica

Al fine di verificare possibili effetti della mutazione sulla comunicazione allosterica tra il sito attivo e quello dell'ATP è stato analizzato l'effetto del legame con la glicina. Tale ligando non comporta variazioni dello spettro di assorbimento, a differenza di molti enzimi PLP-dipendenti che sono in grado di formare con la glicina un'aldimmina esterna che solitamente presenta un massimo d'assorbimento a lunghezze d'onda più elevate rispetto all'aldimmina interna (Figura 56 A). La formazione di un'aldimmina esterna con la glicina è dimostrata dall'elevato incremento della fluorescenza emessa dal cofattore per eccitazione a 412 nm (Figura 56 B).

Sfruttando questa proprietà è possibile stimare l'affinità della glicina per il sito attivo dell'enzima. In presenza di concentrazioni saturanti di glicina l'ATP è comunque in grado di determinare un ulteriore aumento dell'intensità di emissione di fluorescenza dell'enzima. È stata calcolata una  $K_D$  dell'ATP per Q89M-SR in condizioni saturanti di glicina (1 mM) pari a  $48 \pm 5 \mu\text{M}$  (Figura 56 e Tabella 11), comparabile con l' $EC_{50}$  misurata tramite saggio di attività e di sole tre volte inferiore rispetto alla  $K_D$  calcolata in assenza di glicina. In presenza di ATP nella miscela contenente l'enzima è stata misurata una diminuzione della  $K_D$  per la glicina, da  $110 \mu\text{M}$  a  $28 \mu\text{M}$  (Tabella 11).



**Figura 56** *A*-Spettri di assorbimento di Q89M-hSR in presenza e in assenza di 1 mM glicina. *B*-Spettri di emissione di fluorescenza per eccitazione a 412 nm, di una soluzione contenente Q89M-hSR e concentrazioni crescenti di glicina, da 0.01 a 1.2 mM. *C*-Dipendenza dell'intensità di emissione di fluorescenza dalla concentrazione di glicina in assenza (cerchi bianchi) e in presenza (cerchi neri) di 2 mM ATP. Il segnale è stato valutato al massimo del picco corrispondente a 483 nm senza ligandi e 490 nm in presenza di ATP. *D*- Dipendenza dell'intensità di emissione di fluorescenza dalla concentrazione di ATP senza ligandi (cerchi bianchi) o in presenza di 1 mM glicina (cerchi neri). Anche in questo caso si è preso in considerazione il segnale al massimo del picco, cioè 492 nm senza glicina e 478 nm nel secondo caso.

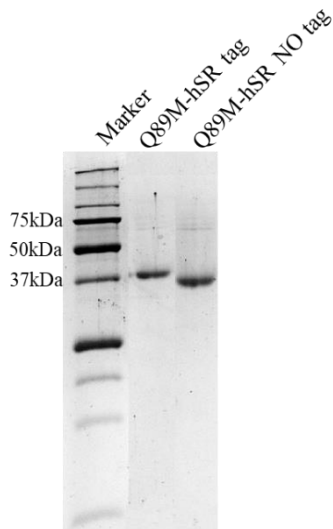
**Tabella 11** Costanti di dissociazione per i ligandi di hSR

Ligando ortosterico	Ligando allosterico	wt-SR	Q89M-SR
		K <sub>D</sub> (μM)	K <sub>D</sub> (μM)
ATP	/	250 ± 4	125 ± 15
	Glicina	4.9 ± 0.6	48 ± 5
Glicina	/	7000 ± 300	110 ± 2
	ATP	470 ± 30	28 ± 3

## Cristalli di Q89M-hSR

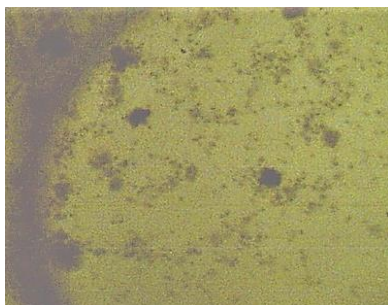
L'unica struttura presente in Protein Data Bank di serina racemasi in complesso con un analogo dell'ATP è quella di *Schizosaccharomyces pombe*, mentre l'unica struttura di serina racemasi umana è quella in complesso con il malonato. Questo limita notevolmente la nostra capacità di comprensione dei meccanismi allosterici che regolano l'attività dell'enzima umano e ci ha spinto a cristallizzare il mutante Q89M-hSR in presenza di AMP-PCP. È interessante sottolineare come la struttura dell'enzima umano depositata in PDB sia stata ottenuta su una proteina con un His-tag C-terminale e mutata su due cisteine esposte. Il nostro approccio è stato di procedere a prove di cristallizzazione della proteina non modificata a livello delle cisteine ma alla quale è stato rimosso il tag N-terminale. In questa forma serina racemasi presenta solo 10 aminoacidi in più rispetto alla proteina naturale. La rimozione della coda di istidine, poiché si tratta di una porzione esposta e non strutturata, potrebbe favorire la formazione dei cristalli diminuendo l'eterogeneità conformazionale della proteina. La rimozione dell'His-tag è stata verificata tramite SDS-PAGE (Figura 57).

Nell'unica struttura di hSR depositata fino ad oggi è stato utilizzato come agente precipitante PEG 3350 al 25% [8], nel caso del mutante sono state utilizzate percentuali di precipitante dal 22 al 27% per individuare le condizioni ottimali per la cristallizzazione.



**Figura 57** SDS-PAGE in cui è stata caricata Q89M-hSR con il tag di istidine e a seguito della rimozione del tag, tramite digestione con trombina.

La concentrazione di proteina nella goccia è di 5 mg/ml cui viene aggiunto 8 mM AMP-PCP. Nel reservoir è stata utilizzata una soluzione costituita da 50 mM TEA, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8 e percentuali variabili di PEG 3350. In queste condizioni non è stato possibile osservare la formazione di cristalli dopo 15 giorni di incubazione a 25°C, ma è stato possibile osservare la formazione di aggregati di precipitati amorfi (Figura 58). Poiché tali aggregati potrebbero essere dovuti alla proteina oppure al precipitante sono state testate diverse concentrazioni di Q89M-hSR, da 4 a 10 mg/ml nella goccia. Inoltre sono state analizzate differenti percentuali di PEG 3350, escludendo quelle superiori al 26 %, per limitare la precipitazione.



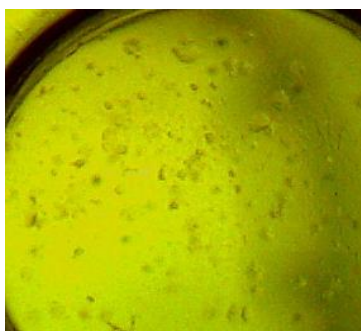
**Figura 58** Foto di una goccia contenete aggregati di Q89M-SR in presenza di 23 % PEG 3350.

Poiché in nessun caso è stato possibile osservare cristalli è stato svolto uno screening in 96 condizioni differenti. I risultati dello screening di cristallizzazione dopo 7 giorni di incubazione a 25 °C sono mostrati in Figura 59. Le soluzioni (riportate nelle Tabelle 6 e 7 di Materiali e metodi) sono state caricate da 1 a 96 a partire dalla fila A dalla colonna 1 a12, proseguendo allo stesso modo fino alla fila H.

Nonostante nella maggior parte delle condizioni analizzate sia stata osservata la formazione di precipitati, dopo altri 7 giorni di incubazione, sempre a 25°C, è stato possibile visualizzare dei microcristalli nella condizione n° 96, 12% PEG 20000, 0.1 M MES, pH 6.5 (Figura 60).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Red	Red	Grey	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Blue
B	Grey	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red
C	Red	Red	Red	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
D	Red	Red	Red	Red	Red	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red
E	Red	Red	Red	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue
F	Grey	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
G	Red	Red	Red	Blue	Grey	Grey	Blue	Red	Red	Red	Red	Red
H	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Grey	Red	Red	Blue

**Figura 59** Risultati dello screening di cristallizzazione, in blu sono indicati i pozzetti in cui è stata osservata la formazione di sferoidi o probabili cristalli, in grigio i pozzetti contenenti soluzioni limpide e in rosso i pozzetti dove si è avuta la formazione di precipitati.

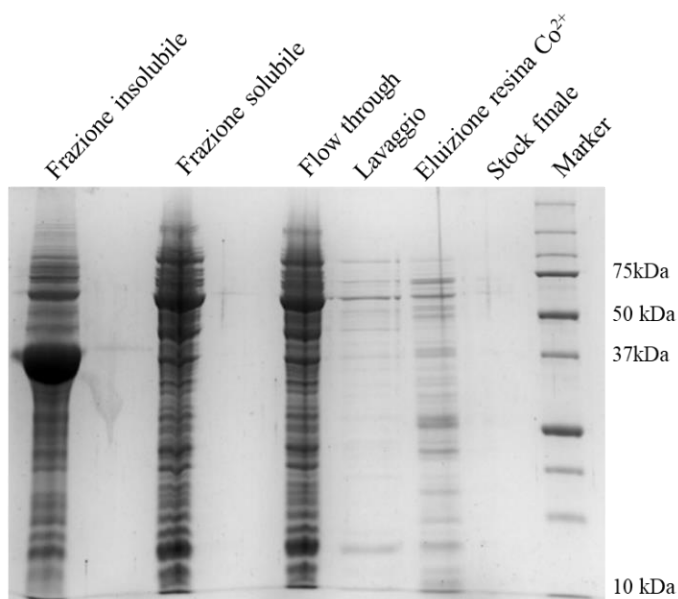


**Figura 60** Foto della goccia contenete microcristalli di Q89M-hSR in presenza di 12% PEG 20000, 0.1 M MES, pH 6.5.

Questo studio ha permesso di definire delle condizioni idonee per ottenere dei cristalli di Q89M-hSR, che dovranno essere ottimizzate per poter osservare cristalli di dimensioni maggiori.

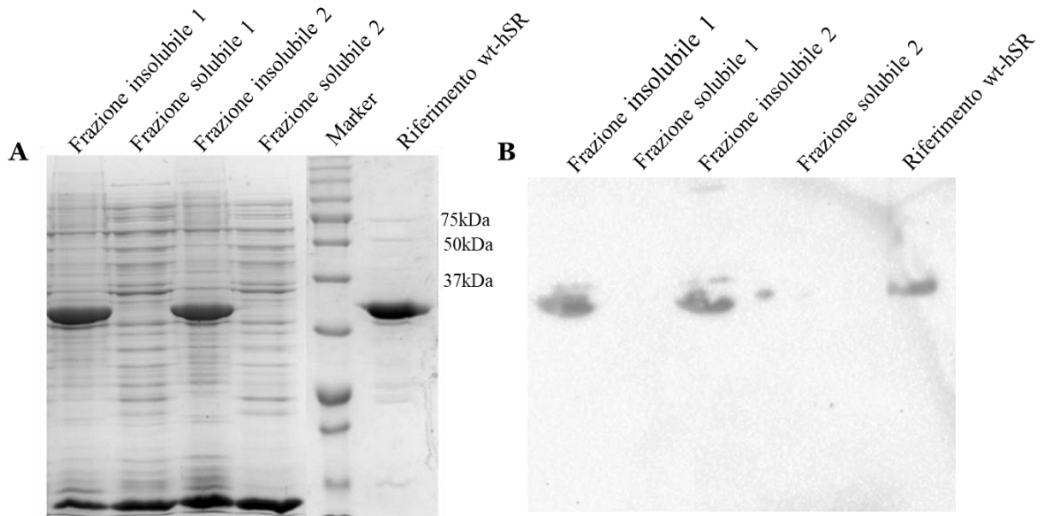
## E283A-hSR

Il plasmide recante la mutazione E283A è stato trasformato in cellule di *E. coli* contenenti le chaperonine. L'analisi SDS-PAGE della espressione e purificazione del mutante (Figura 61) ha rivelato che la proteina viene espressa a livelli elevati, paragonabili a quelli di wt-SR. Analogamente alla proteina wild type però, la maggior parte dell'enzima rimane nella frazione insolubile.



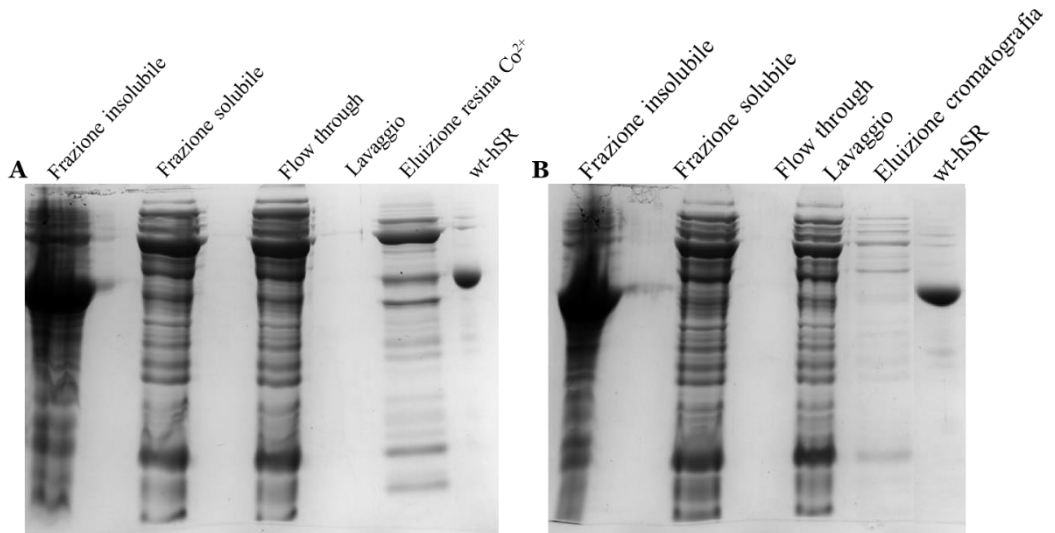
**Figura 61** SDS-PAGE in cui sono stati caricati campioni relativi alle diverse fasi di purificazione del mutante E283A.

Al fine di confermare l'effettiva presenza di E283A-hSR anche se in quantitativi estremamente ridotti, nella frazione solubile e di verificare se esistesse un'eterogeneità di espressione tra cloni differenti, si sono considerate le frazioni solubile e insolubile da due colonie batteriche distinte. Dato che E283A-hSR è stata espressa con una coda di istidine per favorire la purificazione, è stato eseguito un western blot con anticorpi monoclonali diretti contro le His-tag. Questa analisi ha confermato la presenza di proteina solo nella frazione insolubile e non in quella solubile (Figura 62).



**Figura 62** **A**-SDS-PAGE in cui sono state caricate le frazioni insolubili e solubili di due colonie trasformate con il plasmide per l'espressione di E283A-hSR. **B**- Western Blot eseguito utilizzando gli stessi campioni caricati su gel, nello stesso ordine.

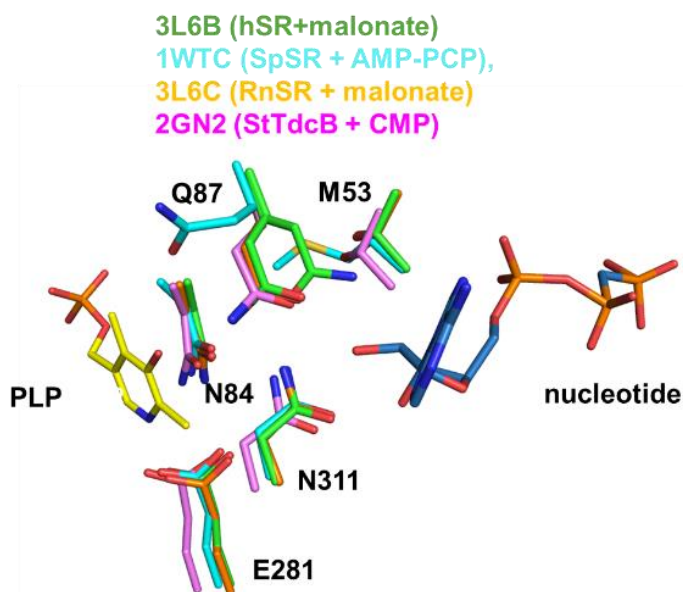
Per favorire la stabilità della proteina e quindi il recupero nella frazione solubile, è stato aggiunto malonato sia solamente nella fase di lisi dei batteri (Figura 63 A) oppure sia durante l'espressione che nella fase di lisi (Figura 63 B). Il malonato, legandosi al sito attivo, permette la formazione di una conformazione chiusa e verosimilmente maggiormente stabile di hSR. Tuttavia in entrambi in casi la maggior parte della proteina è stata rilevata nuovamente nella frazione non solubile. La ridotta quantità di proteina d'interesse nell'estratto è confermata dal comportamento alla purificazione: in seguito ad eluizione dalla resina al cobalto si raccoglie una soluzione contenente numerose proteine contaminanti che competono efficacemente con E238A-SR per il legame alla resina. Questi dati hanno permesso di dedurre che l'acido glutammico in posizione 283 riveste un ruolo non solo nella formazione del network di legami a idrogeno, ma anche nella stabilità strutturale della proteina.



**Figura 63** SDS-PAGE di campioni ottenuti dalla purificazione di E283A-hSR, in cui è stato aggiunto 1 mM malonato solo durante la lisi (A) o nelle fasi di espressione e lisi (B). In entrambi i casi nell'ultima lane è stata caricata wt-hSR come riferimento di massa molecolare.

## Discussione

Dall'analisi della struttura di hSR ottenuta in presenza di malonato (codice PDB 3L6B) è stato osservato che il residuo 89 non ha una posizione definita, ma presenta il 50% di occupancy in due possibili orientazioni. Questo potrebbe essere indice di una elevata flessibilità a livello della catena laterale amminoacidica (Figura 64).



**Figura 64** Sovrapposizione dei residui del network di legami a idrogeno in SR umana, di lievito, in presenza o assenza di AMP-PCP e di treonina deidratasi con CMP.

Si tratta dell'unica struttura di SR che presenta tale variabilità. Inoltre dalla sovrapposizione della struttura di hSR con SpSR in presenza o in assenza di AMP-PCP e con StTdcB con CMP è stato possibile notare che l'orientazione di Gln89 è variabile e non correlata alla presenza di nucleotide. Infatti nella struttura di StTdcB la glutammina si sovrappone esattamente ad una delle due posizioni di tale residuo della struttura umana ottenuta senza l'aggiunta di nucleotidi. Invece la glutammina di SpSR ha un'orientazione completamente differente. Queste osservazioni suggeriscono che Gln89 è un residuo mobile che, a differenza degli altri amminoacidi coinvolti nel network di legami a idrogeno, adotta conformazioni variabili a seconda della proteina e del legame o meno di effettori. Il residuo potrebbe adottare due diverse conformazioni in base al legame o meno con l'ATP e tale informazione

strutturale potrebbe essere trasmessa al sito attivo attraverso il network di legami idrogeno.

L'ATP favorisce tutte le reazioni catalizzate da SR, ma in maniera differente, causando un rilevante incremento di efficienza catalitica soprattutto per la  $\beta$ -eliminazione della L-serina [1]. Questa differenza è stata dimostrata per la prima volta da studi in cellule trasfettate con SR, che producevano alti livelli di piruvato insieme alla D-serina, ma il rapporto piruvato/D-serina era di circa 4, indice che la reazione di  $\beta$ -eliminazione prevaleva su quella di racemizzazione [16]. La diversa modulazione dell'attività di SR potrebbe essere rilevante da un punto di vista fisiologico perché la reazione di  $\beta$ -eliminazione compete con quella di racemizzazione per regolare la concentrazione intracellulare di D-serina, specialmente in aree del prosencefalo in cui manca l'attività di degradazione di tale amminoacido da parte dell'enzima DAAO [1]. Le modificazioni molecolari alla base dell'effetto dell'ATP non sono ancora chiare. Dal momento che non si ha una variazione della conformazione globale di SR [9], si può ipotizzare che la variazione dell'attività sia dovuta a cambiamenti nel microambiente del sito attivo [16]. Questa ipotesi è confermata dall'esistenza di un network di legami a idrogeno tra il PLP e l'ATP [9] e di un cross talk tra il sito attivo e quello dell'ATP [22, 25]. La caratterizzazione del ruolo svolto dai singoli amminoacidi coinvolti nella modulazione dell'attività di hSR potrebbe essere rilevante per una maggiore comprensione della dinamica di tale proteina in soluzione e per aiutare ad investigare maggiormente il significato fisiologico della reazione di  $\beta$ -eliminazione della L-serina.

In questo lavoro è stato espresso e caratterizzato da un punto di vista biochimico un mutante di hSR, in cui la Glu89 è stata sostituita da una metionina. La variazione di un singolo amminoacido ha avuto effetti rilevanti sulla regolazione dell'attività enzimatica, infatti per la reazione di  $\beta$ -eliminazione della L-serina l'aggiunta di ATP ad una concentrazione nota per essere saturante per il wild-type (2 mM), ha causato un incremento di efficienza catalitica di solo 3.8 volte. Invece nel wild-type è stato misurato un aumento di 31 volte nelle condizioni sperimentali utilizzate in questo lavoro. Tale variazione di modesta entità si è osservata anche aggiungendo concentrazioni più elevate di ATP, fino a 10 mM. Questo ha suggerito che la minore attivazione osservata per il mutante non è stata causata da una diminuzione dell'affinità per l'ATP. Si tratta di un'osservazione rilevante perché il residuo Q89 è situato abbastanza vicino alla tasca di legame dell'ATP e l'analisi comparata della struttura di hSR in assenza di nucleotide con quella di SpSR con AMP-PCP suggerirebbe che la catena laterale è in grado di formare legami con l'ATP. Quindi la sua mutazione avrebbe in principio potuto influenzare negativamente l'affinità del nucleotide per la proteina.

In aggiunta è stata misurata una  $EC_{50}$  di Q89M-hSR per l'ATP di circa 20  $\mu\text{M}$ , da paragonare ad una  $EC_{50}$  10 volte maggiore nel wild type. In realtà, un paragone diretto tra le due  $EC_{50}$  non è possibile, in quanto nel caso del wt il legame dell'ATP è fortemente cooperativo, con un coefficiente di Hill di 1.7, molto vicino al valore massimo possibile per una proteina con due siti di legame per il ligando. Invece nel caso del mutante la dipendenza dell'attività relativa dalla concentrazione di ATP è ben descritta dall'equazione di un'iperbole. La cooperatività osservata in wt-hSR ha suggerito che l'enzima esistesse in un equilibrio di almeno due conformazioni, con costanti di dissociazione microscopiche differenti per l'ATP [21]. Quindi la perdita di cooperatività di legame nel mutante associata ad un'elevata affinità per l'ATP potrebbe essere causata dalla stabilizzazione della conformazione ad alta affinità per il nucleotide.

Il legame cooperativo dell'ATP al suo sito di legame in wt-SR è accompagnato da modificazioni delle proprietà funzionali del sito attivo e viceversa, il legame di ligandi quali la glicina al sito attivo, modifica le proprietà di legame del sito dell'ATP [21]. Per la proteina wt era stato quindi evidenziato un cross-talk tra il sito attivo e il sito dell'ATP; in particolare, il legame della glicina a wt-hSR causa la perdita della cooperatività di legame e un aumento dell'affinità apparente per l'ATP. Viceversa il legame dell'ATP comporta una diminuzione della  $K_D$  della glicina di 15 volte (Tabella 11 e [21]). Questi dati hanno permesso di dedurre che il legame della glicina sposta l'equilibrio delle conformazioni di hSR verso uno stato ad alta affinità per l'ATP. Tramite analisi del legame dell'ATP a wt-hSR con il modello di Monod-Wyman-Changeux è stata calcolata una costante di dissociazione microscopica per lo stato ad alta affinità pari a 11.5  $\mu\text{M}$  e per quello a bassa affinità pari a 1.8 mM [21]. Nel caso del mutante è stato osservato un effetto molto ridotto della glicina, infatti è stato misurato una diminuzione della  $K_D$  per l'ATP di solo 3 volte, da 125  $\mu\text{M}$  a 48  $\mu\text{M}$ . Inoltre la  $K_D$  della glicina in presenza di ATP diminuisce di 4 volte, da 110  $\mu\text{M}$  a 28  $\mu\text{M}$ . Questi dati hanno permesso di ipotizzare che la mutazione Q89M-hSR abbia stabilizzato uno stato conformazionale che è funzionalmente simile a quello di wt-hSR legato alla glicina, quindi ad alta affinità per l'ATP.

Per quanto riguarda invece il residuo E283 non è stato possibile ottenere un mutante che presentasse un'alanina al posto dell'acido glutammico, probabilmente perché tale amminoacido potrebbe essere implicato non solo nella formazione del network di legami a idrogeno ma anche in altre funzioni. Infatti dall'analisi filogenetica è stato possibile osservare che tale amminoacido è presente in tutte le SR analizzate, con un valore di entropia di Shannon pari a 0. È sempre presente anche in omologhi strutturali, quali serina e treonina deidratasi. Inoltre durante le fasi di purificazione è stato rilevato solo nella frazione insolubile. Questa

osservazioni permettono di ipotizzare un ruolo strutturale dell'acido glutammico, che viene completamente perso nel caso in cui venga sostituito da un'alanina.



# ***CONCLUSIONI***



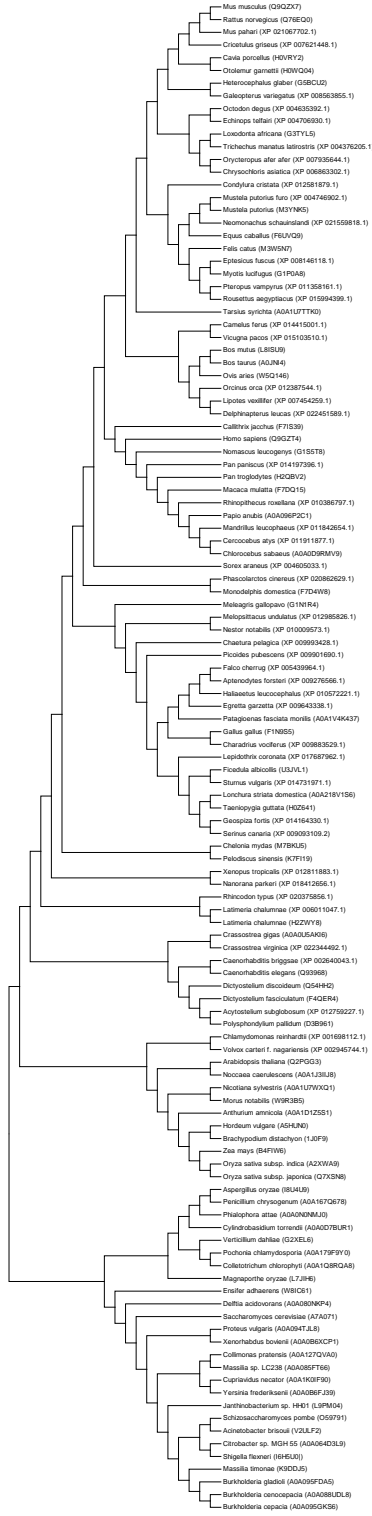
hSR è un potenziale target farmacologico per il trattamento di numerose neuropatologie per cui, fino ad oggi, sono disponibili solo farmaci con gravi effetti collaterali. Tuttavia la caratterizzazione biochimica e strutturale di tale enzima è ancora incompleta. L'attività catalitica di hSR è modulata dall'interazione con numerosi effettori, tra cui l'ATP che causa un aumento selettivo dell'efficienza della  $\beta$ -eliminazione della L-serina. I meccanismi molecolari alla base di tale regolazione non sono noti, così come il suo significato evolutivo e funzionale, e le uniche informazioni disponibili derivano dalla struttura di SpSR ottenuta in presenza di AMP-PCP, un analogo non idrolizzabile dell'ATP. Per l'enzima umano, che è stato cristallizzato solo in presenza di malonato, non è disponibile una struttura in complesso con l'ATP. I dati strutturali suggeriscono che l'enzima vada incontro solo a limitate modificazioni strutturali, a carico specialmente dell'organizzazione della struttura quaternaria, in seguito a legame dell'ATP. Al contrario il legame al sito attivo dell'inibitore malonato determina ampie variazioni conformazionali, specialmente a carico del dominio N-terminale, che riorientandosi causa la parziale chiusura dell'accesso al sito attivo dell'enzima. Al fine di studiare la dinamica dell'enzima in soluzione, è stato messo a punto un protocollo di proteolisi limitata, che ha permesso di indagare lo spazio conformazionale di hSR in presenza di attivatori e inibitori dell'attività enzimatica. Sono stati ottenuti profili di digestione differenti per le diverse condizioni analizzate, a dimostrazione della capacità della proteina di adottare conformazioni differenti in funzione del suo stato di legame. L'interazione con attivatori come  $MgCl_2$  o AMP-PCP causa la stabilizzazione della proteina nei confronti dell'idrolisi enzimatica. L'associazione di AMP-PCP e malonato modifica ulteriormente il pattern di digestione, con la formazione di due frammenti stabili che rimangono in soluzione anche dopo 60' di incubazione con la tripsina. Il pattern si modifica in presenza di solo malonato o solo AMP-PCP. Dalla mappatura peptidica dei due frammenti, è stato possibile definire una regione di hSR che comprende tutto il dominio minore e parte del dominio maggiore che è particolarmente resistente al taglio proteolitico. Questi dati suggeriscono l'esistenza di una conformazione di hSR in presenza dei due ligandi differente rispetto a quelle finora risolte cristallograficamente e probabilmente rilevante per lo studio delle basi molecolari della regolazione allosterica dell'enzima.

Per meglio comprendere i dettagli molecolari della comunicazione allosterica tra sito attivo e sito dell'ATP si è partiti dall'osservazione, pubblicata da Goto et al [9], per cui esisterebbe un network di legami a idrogeno che collega il PLP all'ATP, formato da cinque amminoacidi Met53, Asn84, Gln87, Glu281 e Asn311 (numerazione di SpSR) e molecole di acqua. Al fine di verificare il grado di conservazione di questi residui in serina racemasi da organismi differenti, è stato costruito un allineamento multiplo

tra 118 sequenze di SR eucariotiche e procariotiche. Questa analisi ha permesso di definire che tre residui, Asn84, Glu281 e Asn311, sono presenti in tutte le proteine analizzate, Met53 è molto variabile e Gln87 è presente in quasi tutte le SR, ma nelle piante è sostituita con un'alanina. L'attività di SR di pianta non è regolata dall'interazione con i nucleotidi. Questo studio è stato esteso anche a omologhi strutturali di SR regolati da nucleotidi, quali le treonine deaminasi batteriche per cui in corrispondenza di tale residuo è stata osservata una glutammina, o non regolati come le serine deidratasi di mammifero. Per queste ultime si è osservata una metionina in corrispondenza di tale posizione. Il residuo Gln87 (89 secondo la numerazione di hSR) si è rivelato particolarmente interessante anche a seguito dell'osservazione delle diverse orientazioni che può assumere in presenza o in assenza di ligandi, come è stato osservato sovrapponendo strutture tridimensionali di serina racemasi da diversi organismi in presenza e assenza di ATP e malonato. Quindi per indagare il ruolo di tale residuo, il mutante Q89M-hSR è stato espresso e caratterizzato. La mutazione causa la stabilizzazione di una conformazione ad alta affinità per l'ATP e in cui si ha una quasi completa perdita della stimolazione dell'attività di  $\beta$ -eliminazione dell'L-serina da parte dei nucleotidi. Inoltre in Q89M-hSR la comunicazione bidirezionale tra il sito attivo e il sito dell'ATP è quasi completamente interrotta, come dimostrato dall'assenza di effetti rilevanti del legame della glicina sull'affinità per l'ATP. Questi dati suggeriscono che la glutammina in posizione 89 svolga un ruolo chiave per la comunicazione allosterica tra il sito attivo e il sito di legame dell'ATP di hSR, alla base delle variazioni conformazionali che consentono la modulazione dell'attività enzimatica.

# **ANALISI FILOGENETICA**





**Figura 65** Albero filogenetico di serina racemasi appartenenti a differenti organismi

**Tabella 12** Elenco delle specie analizzate per lo studio filogenetico (Parte 1 di 3).

No.	Specie
1	<i>Loxodonta africana</i> (G3TYL5)
2	<i>Bos mutus</i> (L8ISU9)
3	<i>Bos taurus</i> (AOJN14)
4	<i>Ovis aries</i> (W5Q146)
5	<i>Orycteropus afer afer</i> (XP_007935644.1)
6	<i>Chrysochloris asiatica</i> (XP_006863302.1)
7	<i>Sorex araneus</i> (XP_004605033.1)
8	<i>Cavia porcellus</i> (HOVRY2)
9	<i>Camelus ferus</i> (XP_014415001.1)
10	<i>Vicugna pacos</i> (XP_015103510.1)
11	<i>Lipotes vexillifer</i> (XP_007454259.1)
12	<i>Orcinus orca</i> (XP_012387544.1)
13	<i>Delphinapterus leucas</i> (XP_022451589.1)
14	<i>Mus pahari</i> (XP_021067702.1)
15	<i>Mus musculus</i> (Q9QZX7)
16	<i>Cricetulus griseus</i> (XP_007621448.1)
17	<i>Rattus norvegicus</i> (Q76EQ0)
18	<i>Trichechus manatus latirostris</i> (XP_004376205.1)
19	<i>Callithrix jacchus</i> (F7IS39)
20	<i>Nomascus leucogenys</i> (G1S5T8)
21	<i>Homo sapiens</i> (Q9GZT4)
22	<i>Pan paniscus</i> (XP_014197396.1)
23	<i>Pan troglodytes</i> (H2QBV2)
24	<i>Macaca mulatta</i> (F7DQ15)
25	<i>Rhinopithecus roxellana</i> (XP_010386797.1)
26	<i>Papio anubis</i> (A0A096P2C1)
27	<i>Mandrillus leucophaeus</i> (XP_011842654.1)
28	<i>Cercocebus atys</i> (XP_011911877.1)
29	<i>Chlorocebus sabaues</i> (A0A0D9RMV9)
30	<i>Octodon degus</i> (XP_004635392.1)
31	<i>Heterocephalus glaber</i> (G5BCU2)
32	<i>Echinops telfairi</i> (XP_004706930.1)
33	<i>Otolemur garnettii</i> (HOWQ04)
34	<i>Eptesicus fuscus</i> (XP_008146118.1)
35	<i>Myotis lucifugus</i> (G1P0A8)
36	<i>Condylura cristata</i> (XP_012581879.1)
37	<i>Equus caballus</i> (F6UVQ9)
38	<i>Tarsius syrichta</i> (A0A1U7TTK0)
39	<i>Galeopterus variegatus</i> (XP_008563855.1)
40	<i>Felis catus</i> (M3W5N7)
41	<i>Mustela putorius furo</i> (XP_004746902.1)
42	<i>Mustela putorius</i> (M3YNK5)
43	<i>Neomonachus schauinslandi</i> (XP_021559818.1)
44	<i>Pteropus vampyrus</i> (XP_011358161.1)
45	<i>Rousettus aegyptiacus</i> (XP_015994399.1)
46	<i>Phascolarctos cinereus</i> (XP_020862629.1)
47	<i>Monodelphis domestica</i> (F7D4W8)
48	<i>Xenopus tropicalis</i> (XP_012811883.1)
49	<i>Nanorana parkeri</i> (XP_018412656.1)
50	<i>Latimeria chalumnae</i> (XP_006011047.1)

**Tabella 13** Elenco delle specie analizzate per lo studio filogenetico (Parte 2 di 3).

No.	Specie
51	<i>Rhincodon typus</i> (XP_020375856.1)
52	<i>Chelonia mydas</i> (M7BKU5)
53	<i>Pelodiscus sinensis</i> (K7FI19)
54	<i>Gallus gallus</i> (F1N9S5)
55	<i>Meleagris gallopavo</i> (G1N1R4)
56	<i>Egretta garzetta</i> (XP_009643338.1)
57	<i>Lepidothrix coronata</i> (XP_017687962.1)
58	<i>Lonchura striata domestica</i> (A0A218V1S6)
59	<i>Ficedula albicollis</i> (U3JVL1)
60	<i>Sturnus vulgaris</i> (XP_014731971.1)
61	<i>Taeniopygia guttata</i> (H0Z641)
62	<i>Geospiza fortis</i> (XP_014164330.1)
63	<i>Serinus canaria</i> (XP_009093109.2)
64	<i>Picoides pubescens</i> (XP_009901690.1)
65	<i>Patagioenas fasciata monilis</i> (A0A1V4K437)
66	<i>Charadrius vociferus</i> (XP_009883529.1)
67	<i>Haliaeetus leucocephalus</i> (XP_010572221.1)
68	<i>Falco cherrug</i> (XP_005439964.1)
69	<i>Aptenodytes forsteri</i> (XP_009276566.1)
70	<i>Chaetura pelagica</i> (XP_009993428.1)
71	<i>Melopsittacus undulatus</i> (XP_012985826.1)
72	<i>Nestor notabilis</i> (XP_010009573.1)
73	<i>Magnaporthe oryzae</i> (L7JIH6)
74	<i>Pochonia chlamydosporia</i> (A0A179F9Y0)
75	<i>Colletotrichum chlorophyti</i> (A0A1Q8RQAB)
76	<i>Verticillium dahliae</i> (G2XEL6)
77	<i>Phialophora attae</i> (A0A0N0NMJ0)
78	<i>Cylindrobasidium torrendii</i> (A0A0D7BUR1)
79	<i>Aspergillus oryzae</i> (I8U4U9)
80	<i>Penicillium chrysogenum</i> (A0A167Q678)
81	<i>Caenorhabditis briggsae</i> (XP_002640043.1)
82	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Q93968)
83	<i>Delftia acidovorans</i> (A0A080NKP4)
84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A7A071)
85	<i>Proteus vulgaris</i> (A0A094TJL8)
86	<i>Xenorhabdus bovienii</i> (A0A0B6XCP1)
87	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (O59791)
88	<i>Acinetobacter brisouii</i> (V2ULF2)
89	<i>Citrobacter</i> sp. MGH 55 (A0A064D3L9)
90	<i>Shigella flexneri</i> (I6H5U0)
91	<i>Janthinobacterium</i> sp. HH01 (L9PM04)
92	<i>Massilia timonae</i> (K9DDJ5)
93	<i>Burkholderia gladioli</i> (A0A095FDA5)
94	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (A0A088UDL8)
95	<i>Burkholderia cepacia</i> (A0A095GKS6)
96	<i>Ensifer adhaerens</i> (W8IC61)
97	<i>Collimonas pratensis</i> (A0A127QVA0)
98	<i>Massilia</i> sp. LC238 (A0A085FT66)
99	<i>Cupriavidus necator</i> (A0A1K0IF90)
100	<i>Yersinia frederiksenii</i> (A0A0B6FJ39)

**Tabella 14** Elenco delle specie analizzate per lo studio filogenetico (Parte 3 di 3).

No.	Specie
101	<i>Crassostrea gigas</i> (A0A0U5AKI6)
102	<i>Crassostrea virginica</i> (XP_022344492.1)
103	<i>Dictyostelium discoideum</i> (Q54HH2)
104	<i>Dictyostelium fasciculatum</i> (F4QER4)
105	<i>Acytostelium subglobosum</i> (XP_012759227.1)
106	<i>Polysphondylium pallidum</i> (D3B961)
107	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (XP_001698112.1)
108	<i>Volvox carteri f. nagariensis</i> (XP_002945744.1)
109	<i>Hordeum vulgare</i> (A5HUN0)
110	<i>Brachypodium distachyon</i> (1J0F9)
111	<i>Oryza sativa subsp. indica</i> (A2XWA9)
112	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i> (Q7XSN8)
113	<i>Zea mays</i> (B4FIW6)
114	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Q2PGG3)
115	<i>Noccaea caerulescens</i> (A0A1J3IJJ8)
116	<i>Nicotiana glauca</i> (A0A1U7WXQ1)
117	<i>Anthurium amnicola</i> (A0A1D1Z5S1)
118	<i>Morus notabilis</i> (W9R3B5)

# **BIBLIOGRAFIA**



- [1] V. N. Foltyn, I. Bendikov, J. De Miranda, R. Panizzutti, E. Dumin, M. Shleper, P. Li, M.D. Toney, E. Kartvelishvily, H. Wolosker, "Serine racemase modulates intracellular D-serine levels through an  $\alpha,\beta$ -elimination activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 3, pp. 1754–1763, 2005.
- [2] B. Campanini, F. Spyraakis, A. Peracchi, and A. Mozzarelli, "Serine racemase: a key player in neuron activity and in neuropathologies," *Front. Biosci.*, vol. 18, pp. 1112–1128, 2013.
- [3] A. Sanz-Clemente, R. A. Nicoll, and K. W. Roche, "Diversity in NMDA receptor composition: Many regulators, many consequences," *Neuroscientist*, vol. 19, no. 1, pp. 62–75, 2013.
- [4] J. Jirásková-Vaničková, R. Ettrich, B. Vorlová, H.E. Hoffman, M. Lepšík, P. Jansa, J. Konvalinka, "Inhibition of human serine racemase, an emerging target for medicinal chemistry," *Curr. Drug Targets*, vol. 12, no. 7, pp. 1037–1055, 2011.
- [5] M. Le Bail, M. Martineau, S. Sacchi, N. Yatsenko, I. Radzishevsky, S. Conrod, K. Ait Ouares, H. Wolosker, L. Pollegioni, J. Billard, J. Mothet, "Identity of the NMDA receptor coagonist is synapse specific and developmentally regulated in the hippocampus," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 2, pp. E204–E213, 2015.
- [6] M. A. Henson, A. C. Roberts, I. Pérez-Otaño, and B. D. Philpot, "Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions," *Prog. Neurobiol.*, vol. 91, no. 1, pp. 23–37, May 2010.
- [7] C. Pietá Dias, M. N. Martins de Lima, J. Presti-Torres, A. Dornelles, V. A. Garcia, F. Siciliani Scalco, M. Rewsaat Guimarães, L. Constantino, P. Budni, F. Dal-Pizzol, N. Schröder, "Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats," *Neuroscience*, vol. 146, no. 4, pp. 1719–1725, 2007.
- [8] M. A. Smith, V. Mack, A. Ebneith, I. Moraes, B. Felicetti, M. Wood, D. Schonfeld, O. Mather, A. Cesura, J. Barker, "The structure of mammalian serine racemase: Evidence for conformational changes upon inhibitor binding," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 17, pp. 12873–12881, 2010.
- [9] M. Goto, T. Yamaouchi, N. Kamiya, I. Miyahara, T. Yoshimura, H. Mihara, T. Kurihara, K. Hirotsu, N. Esaki, "Crystal structure of a homolog of mammalian serine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 38, pp. 25944–25952, 2009.
- [10] L. Zou, Y. Song, C. Wang, J. Sun, L. Wang, B. Cheng, J. Fan, "Crystal structure of maize serine racemase with pyridoxal 5'-phosphate," *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.*, vol. 72, pp. 165–171, 2016.
- [11] H. E. Hoffman, J. Jirásková, M. Zvelebil, and J. Konvalinka, "Random mutagenesis of human serine racemase reveals residues important for the enzymatic activity," *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, vol. 75, no. 1, pp. 59–79, 2010.

- [12] F. Baumgart and I. Rodríguez-Crespo, "D-Amino acids in the brain: The biochemistry of brain serine racemase," *FEBS J.*, vol. 275, no. 14, pp. 3538–3545, 2008.
- [13] S. Bruno, M. Margiotta, F. Marchesani, G. Paredi, V. Orlandi, S. Faggiano, L. Ronda, B. Campanini, A. Mozzarelli, "Magnesium and calcium ions differentially affect human serine racemase activity and modulate its quaternary equilibrium toward a tetrameric form," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1865, no. 4, pp. 381–387, 2017.
- [14] F. Baumgart, J. M. Mancheño, and I. Rodríguez-Crespo, "Insights into the activation of brain serine racemase by the multi-PDZ domain glutamate receptor interacting protein, divalent cations and ATP," *FEBS J.*, vol. 274, no. 17, pp. 4561–4571, 2007.
- [15] M. Kubala, J. Teisinger, V. Ettrich, Rüdiger; Hofbauerová, Kateřina; Kopecký, Vladimír; Baumruk, R. Krumscheid, J. Plášek, and E. Schoner, Wilhelm; Amler, "Eight Amino Acids Form the ATP Recognition Site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase," *Biochemistry*, vol. 42, pp. 6446–6452, 2003.
- [16] J. De Miranda, R. Panizzutti, V. N. Foltyn, and H. Wolosker, "Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, pp. 14542–14547, 2002.
- [17] C. Y. Wang, S. C. Ku, C. C. Lee, and A. H. J. Wang, "Modulating the function of human serine racemase and human serine dehydratase by protein engineering," in *Protein Engineering, Design and Selection*, 2012, vol. 25, no. 11, pp. 741–749.
- [18] H. Wolosker, K. N. Sheth, M. Takahashi, J. P. Mothet, R. O. Brady, C.D. Ferris, S. H. Snyder, "Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 2, pp. 721–5, 1999.
- [19] T. Kubota, S. Shimamura, T. Kobayashi, T. Nunoura, and S. Deguchi, "Distribution of eukaryotic serine racemases in the bacterial domain and characterization of a representative protein in *Roseobacter litoralis* Och 149," *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 162, no. 1, pp. 53–61, 2016.
- [20] E. K. Ainscow, S. Mirshamsi, T. Tang, M. L. J. Ashford, and G. a Rutter, "Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K(+) channels.," *J. Physiol.*, vol. 544, no. Pt 2, pp. 429–445, 2002.
- [21] M. Marchetti, S. Bruno, B. Campanini, A. Peracchi, N. Mai, and A. Mozzarelli, "ATP binding to human serine racemase is cooperative and modulated by glycine," *FEBS J.*, vol. 280, no. 22, pp. 5853–5863, 2013.
- [22] G. H. Luginbuhl, J. G. Hofler, C. J. Decedue, and R. O. Burns, "Biodegradative L-threonine deaminase of *Salmonella typhimurium*," *J.*

- Bacteriol.*, vol. 120, no. 1, pp. 559–61, 1974.
- [23] D. K. Simanshu, H. S. Savithri, and M. R. N. Murthy, “Crystal structures of *Salmonella typhimurium* biodegradative threonine deaminase and its complex with CMP provide structural insights into ligand-induced oligomerization and enzyme activation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 51, pp. 39630–39641, 2006.
- [24] M. Marchetti, S. Bruno, B. Campanini, S. Bettati, A. Peracchi, and A. Mozzarelli, “Regulation of human serine racemase activity and dynamics by halides, ATP and malonate,” *Amino Acids*, vol. 47, no. 1, pp. 163–173, 2015.
- [25] S. P. Cook, I. Galve-Roperh, Á. M. Del Pozo, and I. Rodríguez-Crespo, “Direct calcium binding results in activation of brain serine racemase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 31, pp. 27782–27792, 2002.
- [26] W. Jahnen-Dechent and M. Ketteler, “Magnesium basics,” *CKJ Clin. Kidney J.*, vol. 5, no. SUPPL. 1, 2012.
- [27] M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman, “The versatility and universality of calcium signalling,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 1, no. 1, pp. 11–21, Oct. 2000.
- [28] A. k. Mustafa, M. Kumar, B. Selvakumar, G. P.H. Ho, J.T. Ehmsen, R. K. Barrow, L. M. Amzel, S. H. Snyder, “Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 8, pp. 2950–5, 2007.
- [29] T. V. P. Bliss and G. L. Collingridge, “A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus.pdf,” *Nature*, vol. 361, no. 7. pp. 31–39, 1993.
- [30] D. Boehning and S. H. Snyder, “NOVEL NEURAL MODULATORS,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 26, no. 1, pp. 105–131, 2003.
- [31] E. Kartvelishvily, M. Shleper, L. Balan, E. Dumin, and H. Wolosker, “Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 20, pp. 14151–14162, 2006.
- [32] Y. Dun, J. Duplantier, P. Roon, P. M. Martin, V. Ganapathy, and S. B. Smith, “Serine racemase expression and D-serine content are developmentally regulated in neuronal ganglion cells of the retina,” *J. Neurochem.*, vol. 104, no. 4, pp. 970–978, 2008.
- [33] D. Dememes, J. P. Mothet, and M. T. Nicolas, “Cellular distribution of D-serine, serine racemase and D-amino acid oxidase in the rat vestibular sensory epithelia,” *Neuroscience*, vol. 137, no. 3, pp. 991–997, 2006.
- [34] L. Balan, V. N. Foltyn, M. Zehl, E. Dumin, E. Dikopolitsev, D. Knoh, Y. Ohno, A. Kihara, O. N. Jensen, I. S. Radzishovsky, H. Wolosker, “Feedback inactivation of D-serine synthesis by NMDA receptor-elicited translocation of serine racemase to the membrane.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A.*, vol. 106, no. 18, pp. 7589–94, 2009.
- [35] M. E. Linder and R. J. Deschenes, “Palmitoylation: policing protein stability and traffic,” vol. 8, p. 74, Jan. 2007.
- [36] V. N. Foltyn, M. Zehl, E. Dikopoltsev, O. N. Jensen, and H. Wolosker, “Phosphorylation of mouse serine racemase regulates d-serine synthesis,” *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 13, pp. 2937–2941, 2010.
- [37] A. K. Mustafa, D. B. van Rossum, R. L. Patterson, D. Maag, J. T. Ehmsen, S. K. Gazi, A. Chakraborty, R. K. Barrow, L. M. Amzel, S. H. Snyder, “Glutamatergic regulation of serine racemase via reversal of PIP2 inhibition,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 8, pp. 2921–6, 2009.
- [38] P. M. Kim, H. Aizawa, P. S. Kim, A. S. Huang, S. R. Wickramasinghe, A. H. Kashani, R. K. Barrow, R. L. Huganir, A. Ghosh, S. H. Snyder, “Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 6, pp. 2105–2110, 2005.
- [39] O. Sakarya, K. A. Armstrong, M. Adamska, M. Adamski, I. F. Wang, B. Tidor, B. M. Degnan, T. H. Oakley, K. S. Kosik, “A Post-Synaptic Scaffold at the Origin of the Animal Kingdom,” *PLoS One*, vol. 2, no. 6, 2007.
- [40] E. Kim and M. Sheng, “PDZ domain proteins of synapses,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 5, no. 10, pp. 771–781, 2004.
- [41] K. Fujii, K. Maeda, T. Hikida, A. K. Mustafa, R. Balkissoon, J. Xia, T. Yamada, Y. Ozeki, R. Kawahara, M. Okawa, R. L. Huganir, H. Ujike, S. H. Snyder, A. Sawa, “Serine racemase binds to PICK1: potential relevance to schizophrenia,” *Mol. Psychiatry*, vol. 11, no. 2, pp. 150–7, 2006.
- [42] E. Dumin, I. Bendikov, V. N. Foltyn, Y. Misumi, Y. Ikehara, E. Kartvelishvily, H. Wolosker, “Modulation of D-serine levels via ubiquitin-dependent proteasomal degradation of serine racemase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 29, pp. 20291–20302, 2006.
- [43] T. M. Ma, S. Abazyan, B. Abazyan, J. Nomura, C. Yang, S. Seshadri, A. Sawa, S. H. Snyder, M. V. Pletnikov, “Pathogenic disruption of DISC1-serine racemase binding elicits schizophrenia-like behavior via D-serine depletion,” *Mol. Psychiatry*, vol. 18, no. 5, pp. 557–67, 2013.
- [44] T. M. Ma, B.D. Paul, C. Fu, S. Hu, H. Zhu, S. Blackshaw, H. Wolosker, S. H. Snyder, “Serine racemase regulated by binding to stargazin and PSD-95: Potential N-methyl-D-aspartate- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (NMDA-AMPA) glutamate neurotransmission cross-talk,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 43, pp. 29631–29641, 2014.
- [45] A. Neidle and D. S. Dunlop, “Allosteric Regulation of Mouse Brain Serine Racemase,” *Neurochem. Res.*, vol. 27, no. 12, pp. 1719–1724, 2002.
- [46] C. Choi, S. K. . Ganji, R. J. DeBerardinis, I. E. . Dimitrov, J. P. M., and E. A. Bachoo, Robert; Mickey, Bruce E.; Malloy, Craig R.; Maher, “Measurement of glycine in the human brain in vivo by 1 H-MRS at 3T: Application in

- brain tumors," *PMC*, vol. 66, pp. 609–618, 2012.
- [47] T. Uo, T. Yoshimura, S. Shimizu, and N. Esaki, "Occurrence of pyridoxal 5'-phosphate-dependent serine racemase in silkworm, *Bombyx mori*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 246, no. 1, pp. 31–4, 1998.
- [48] M. Xia, Y. Liu, D. J. Figueroa, C. S. Chiu, N. Wei, A. M. Lawlor, P. Lu, C. Sur, K. S. Koblan, T. M. Connolly, "Characterization and localization of a human serine racemase," *Mol. Brain Res.*, vol. 125, no. 1–2, pp. 96–104, 2004.
- [49] R. F. Miller, "D-serine as a glial modulator of nerve cells," *GLIA*, vol. 47, no. 3, pp. 275–283, 2004.
- [50] M. Yoshikawa, N. Takayasu, A. Hashimoto, Y. Sato, R. Tamaki, H. Tsukamoto, H. Kobayashi, S. Noda, "The serine racemase mRNA is predominantly expressed in rat brain neurons," *Archives of histology and cytology*, vol. 70, pp. 127–134, 2007.
- [51] D. T. Balu, S. Takagi, M. D. Puhl, M. A. Benneyworth, and J. T. Coyle, "D-serine and serine racemase are localized to neurons in the adult mouse and human forebrain," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 34, no. 3, pp. 419–435, 2014.
- [52] H. Wolosker and I. Radzishevsky, "The serine shuttle between glia and neurons: implications for neurotransmission and neurodegeneration," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 41, pp. 1546–50, 2013.
- [53] H. Wolosker, D. T. Balu, and J. T. Coyle, "The Rise and Fall of the D - Serine-Mediated Gliotransmission Hypothesis," *Trends Neurosci.*, vol. xx, pp. 1–10, 2016.
- [54] A. Neidle and D. S. Dunlop, "Regulation of serine racemase activity by amino acids," *Mol. Brain Res.*, vol. 133, no. 2, pp. 208–214, 2005.
- [55] K. Štrfšovský, J. Jirásková, A. Mikulová, L. Rulíšek, and J. Konvalinka, "Dual Substrate and Reaction Specificity in Mouse Serine Racemase: Identification of High-Affinity Dicarboxylate Substrate and Inhibitors and Analysis of the  $\beta$ -Eliminase Activity," *Biochemistry*, vol. 44, pp. 13091–13100, 2005.
- [56] E. R. Stevens, E. C. Gustafson, S. J. Sullivan, M. Esguerra, and F. Robert, "Light-evoked NMDA receptor-mediated currents are reduced by blocking D -serine synthesis in the salamander retina," *Neuroreport*, vol. 21, no. 4, pp. 239–244, 2010.
- [57] H. E. Hoffman, J. Jirásková, M. Ingr, and M. Zvelebil, "Recombinant human serine racemase: Enzymologic characterization and comparison with its mouse ortholog," *Protein Expr. Purif.*, vol. 63, no. 1, pp. 62–67, 2009.
- [58] E. Tomitsuka, H. Hirawake, Y. Goto, M. Taniwaki, S. Harada, and K. Kita, "Direct Evidence for Two Distinct Forms of the Flavoprotein Subunit of Human Mitochondrial Complex II (Succinate-Ubiquinone Reductase)," *J.*

- Biochem.*, vol. 134, no. 2, pp. 191–195, 2003.
- [59] B. Vorlová, D. Nachtigallová, J. Jirásková-Vaníčková, H. Ajani, P. Jansa, J. Řezáč, J. Fanfrlík, M. Otyepka, P. Hobza, J. Konvalinka, M. Lepšík, “Malonate-based inhibitors of mammalian serine racemase: Kinetic characterization and structure-based computational study,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 89, pp. 189–197, 2015.
- [60] L. Dellafiora, M. Marchetti, F. Spyarakis, V. Orlandi, B. Campanini, G. Cruciani, P. Cozzini, A. Mozzarelli, “Expanding the chemical space of human serine racemase inhibitors,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 25, no. 19, pp. 4297–4303, 2015.
- [61] C. Beato, C. Pecchini, C. Cocconcelli, B. Campanini, M. Marchetti, M. Pieroni, A. Mozzarelli, G. Costantino, “Cyclopropane derivatives as potential human serine racemase inhibitors: unveiling novel insights into a difficult target,” *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 6366, no. September 2017, pp. 1–8, 2015.
- [62] S. Bruno, F. Marchesani, L. Dellafiora, M. Margiotta, S. Faggiano, B. Campanini, A. Mozzarelli, “Human serine racemase is allosterically modulated by NADH and reduced nicotinamide derivatives,” *Biochem. J.*, 2016.
- [63] D. Suckau, M. Mak, and M. Przybylski, “Protein surface topology-probing by selective chemical modification and mass spectrometric peptide mapping,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 12, pp. 5630–4, 1992.
- [64] L. Konermann, J. Pan, and Y.-H. Liu, “Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 3, pp. 1224–1234, 2011.
- [65] A. Fontana, P. P. De Laureto, B. Spolaore, E. Frare, P. Picotti, and M. Zambonin, “Probing protein structure by limited proteolysis,” in *Acta Biochimica Polonica*, 2004, vol. 51, no. 2, pp. 299–321.
- [66] F. Zappacosta, A. Pessi, E. Bianchi, S. Venturini, M. Sollazzo, A. Tramontano, G. Marino, P. Pucci, “Probing the tertiary structure of proteins by limited proteolysis and mass spectrometry: the case of Minibody,” *Protein Sci.*, vol. 5, no. 5, pp. 802–13, 1996.
- [67] S. J. Hubbard, “The structural aspects of limited proteolysis of native proteins,” *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 1382, no. 2, pp. 191–206, 1998.
- [68] I. Krokoszyńska and J. Otlewski, “Thermodynamic Stability Effects of Single Peptide Bond Hydrolysis in Protein Inhibitors of Serine Proteinases,” *J. Mol. Biol.*, vol. 256, no. 4, pp. 793–802, 1996.
- [69] A. Fontana, P. Polverino de Laureto, V. De Filippis, E. Scaramella, and M. Zambonin, “Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis,” *Fold. Des.*, vol. 2, no. 2, pp. R17–R26, 1997.

- [70] F. Spyraakis, P. Felici, A. S. Bayden, E. Salsi, R. Miggiano, G. E. Kellogg, P. Cozzini, P. F. Cook, A. Mozzarelli, B. Campanini, "Fine tuning of the active site modulates specificity in the interaction of O-acetylserine sulfhydrylase isozymes with serine acetyltransferase," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1834, no. 1, pp. 169–181, 2013.
- [71] E. Salsi, A. S. Bayden, F. Spyraakis, A. Amadasi, B. Campanini, S. Bettati, T. Dodatko, P. Cozzini, G. E. Kellogg, P. F. Cook, S. L. Roderick, A. Mozzarelli, "Design of O-acetylserine sulfhydrylase inhibitors by mimicking Nature," *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 1, pp. 345–356, Jan. 2010.
- [72] E. Salsi, B. Campanini, S. Bettati, S. Raboni, S. L. Roderick, P. F. Cook, A. Mozzarelli, "A Two-step Process Controls the Formation of the Bienenzyme Cysteine Synthase Complex," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 17, pp. 12813–12822, Apr. 2010.
- [73] S. Kumar, G. Stecher, and K. Tamura, "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874, 2016.
- [74] Z. Yang, "PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 24, no. 8, pp. 1586–1591, 2007.
- [75] Y. Fujitani, N. Nakajima, K. Ishihara, T. Oikawa, K. Ito, and M. Sugimoto, "Molecular and biochemical characterization of a serine racemase from *Arabidopsis thaliana*," *Phytochemistry*, vol. 67, no. 7, pp. 668–674, 2006.
- [76] Y. Fujitani, T. Horiuchi, K. Ito, and M. Sugimoto, "Serine racemases from barley, *Hordeum vulgare* L., and other plant species represent a distinct eukaryotic group: Gene cloning and recombinant protein characterization," *Phytochemistry*, vol. 68, no. 11, pp. 1530–1536, 2007.
- [77] Y. Gogami, K. Ito, Y. Kamitani, Y. Matsushima, and T. Oikawa, "Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase," *Phytochemistry*, vol. 70, no. 3, pp. 380–387, 2009.
- [78] M. B. Jackson, *Molecular and Cellular Biophysics*. Cambridge University Press, 2006.
- [79] J. H. Carra and P. L. Privalov, "Thermodynamics of denaturation of staphylococcal nuclease mutants: an intermediate state in protein folding," *FASEB J.*, vol. 10, no. 1, pp. 67–74, 1996.
- [80] B. Campanini, F. Speroni, E. Salsi, P. F. Cook, S. L. Roderick, B. Huang, S. Bettati, A. Mozzarelli, "Interaction of serine acetyltransferase with O-acetylserine sulfhydrylase active site: evidence from fluorescence spectroscopy," *Protein Sci.*, vol. 14, no. Kredich 1992, pp. 2115–2124, 2005.



**APPENDICE-  
OTTIMIZZAZIONE DI  
SAGGI ENZIMATICI PER  
ROCK1 E ROCK2  
UMANE**



*Il lavoro presentato in Appendice 1 è frutto di una collaborazione con Chiesi Farmaceutici S.p.A. Si ringrazia in particolar modo la Dott.ssa Barbara Pioselli, Biomolecules Structural Characterization Unit -Preclinical R&D, Analytics and Early Formulations Department, per il costante supporto.*



## Introduzione

Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs) sono delle serina/treonina chinasi scoperte inizialmente come effettori di piccole GTPasi della famiglia RhoA [1]. Fanno parte della famiglia AGC (cAMP-dependent protein kinase/protein Kinase G/protein kinase C) e condividono il 40% di omologia con altre chinasi del citoscheletro, come la dystrophin myotonic protein kinase (DMPK), la myotonic dystrophy kinase related-Cdc42 related kinases (MRCK) e la citron Rho-interacting kinase (CRIK) [2]. Nei mammiferi vi sono due isoforme identificate come ROCK1 (conosciuta anche come ROK $\beta$  o p160ROCK) e ROCK2 (o ROK $\alpha$  o Rho kinase).

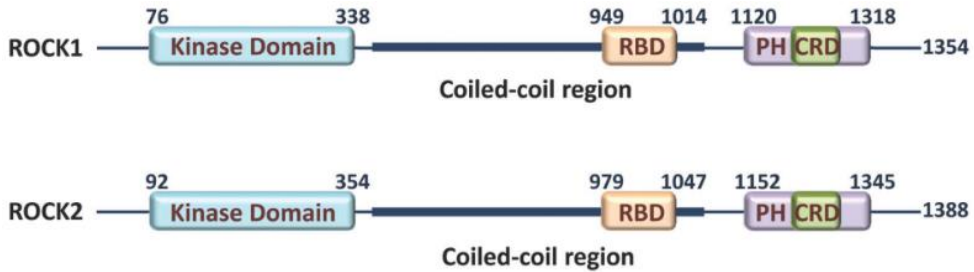
Le proteine ROCK sono coinvolte in molteplici funzioni cellulari, infatti una loro disregolazione è stata associata a differenti patologie, come aterosclerosi e disturbi cerebrovascolari [3].

## Struttura

ROCK1 è formata da 1354 aminoacidi e ha un peso di 158,2 kDa, mentre ROCK2 è composta da 1388 aminoacidi, con un peso di 160,9 kDa. Entrambe le isoforme sono costituite da un dominio chinasi, localizzato nella porzione N-terminale, seguito da una regione coiled-coil che contiene un dominio per il legame di Rho (RBD) e un dominio omologo della Pleckstrin (PH) nella regione C-terminale (Figura 1). Quest'ultimo include un dominio ricco di cisteine (CRD) e si pensa sia coinvolto nella localizzazione proteica [1]. Fino ad oggi sono state determinate solo le strutture dei domini chinasi delle due isoforme [4,5,6].

Da studi strutturali e d'interazione con specifici anticorpi monoclonali, si è osservato che le proteine ROCK formano degli omodimeri mediante interazioni idrofobiche ed elettrostatiche in corrispondenza di residui amminoacidici presenti nei domini chinasi e coiled-coil [7].

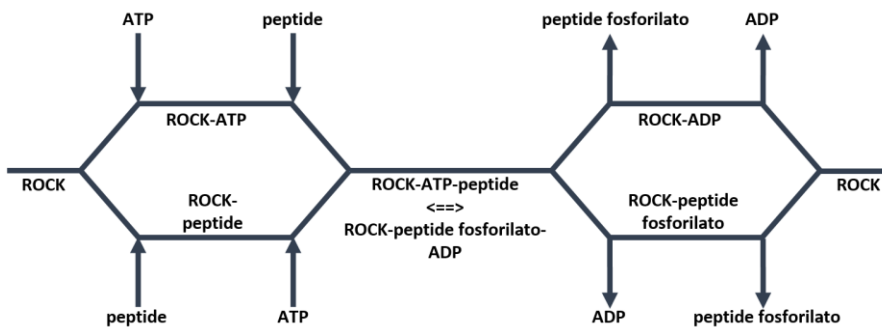
Le due isoforme di ROCK presentano il 64% di identità nella loro sequenza amminoacidica, con un'omologia del 92% a livello del dominio chinasi, mentre i domini coiled-coil presentano minore identità di sequenza (omologia del 55%).



**Figura 1** Domini funzionali di ROCK 1 e ROCK 2 (Tratto da Julian *et al.*[1]).

## Meccanismo catalitico

La reazione catalizzata da ROCK è una fosforilazione ad opera dell'ATP di un substrato proteico a livello di una sequenza consenso R/KXXS/T o R/KXS/T (X qualsiasi aminoacido) [5, 6]. Generalmente nei saggi d'attività in vitro il substrato proteico è costituito da una proteina fisiologicamente riconosciuto dalle chinasi o da un oligopeptide. La reazione è di tipo sequenziale random [8] (Figura 2).



**Figura 2** Schema della reazione catalizzata da ROCK.

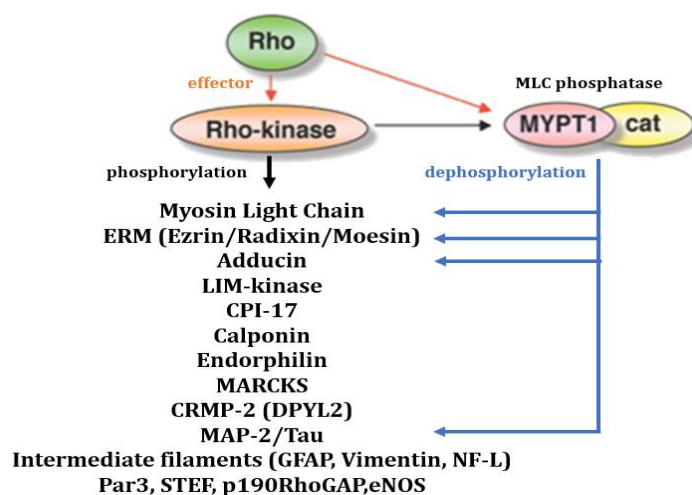
In un meccanismo di questo tipo i substrati si legano al sito attivo in ordine casuale e sempre con ordine casuale vengono rilasciati i prodotti. Si differenzia dalle reazioni sequenziali ordinate, in cui invece vi è un ordine preciso di associazione dei substrati con l'enzima e anche del rilascio dei prodotti [9]. Lo studio del meccanismo di reazione è stato svolto tramite l'utilizzo di inibitori. In particolare Trauger *et al.* hanno descritto un meccanismo sequenziale random per il dominio catalitico di ROCK2 ricombinante, utilizzando, gli inibitori l'AMP-PCP, un analogo non idrolizzabile dell'ATP, Y-27632 e S6-AA [8]. Successivamente un'analisi

analoga è stata svolta anche per ROCK1 [10], confermando un identico meccanismo di reazione.

## Funzioni cellulari

Le proteine ROCK attive fosforilano molteplici target coinvolti in differenti processi biologici. Per alcuni substrati si hanno evidenze della fosforilazione solo da parte di una isoforma, ma dato l'elevato grado di identità nel dominio chinasi è ragionevole supporre che siano riconosciuti sia da ROCK1 sia da ROCK2 [1]. Inoltre fino ad ora non ci sono evidenze di funzioni diverse svolte dalle due isoforme [3].

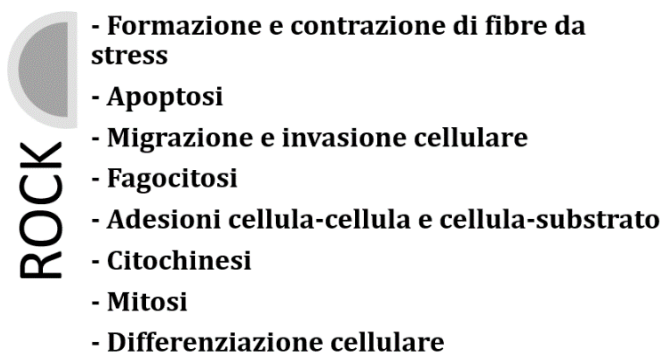
La maggior parte dei substrati che vengono fosforilati sono implicati in processi cellulari di formazione e contrazione di fibre da stress, cioè fasci contrattili di filamenti di actina e miosina II che terminano in corrispondenza della membrana plasmatica, dove si localizzano gruppi di proteine transmembrana quali le integrine. Queste ultime sono glicoproteine integrali di membrana che legano proteine della matrice extracellulare, quali le fibronectine [7, 8]. In questo modo è possibile stabilire un collegamento tra la cellula e la matrice extracellulare. Quindi l'azione di ROCK è correlata alla migrazione e invasione cellulare [2]. L'attività di ROCK è anche alla base dell'assemblaggio del citoscheletro di actina e della contrazione cellulare tramite la fosforilazione di una varietà di proteine, tra cui le chinasi LIM, le adducine, le proteine ERM (ezrin-radixin-moesin) e la catena leggera della miosina (MLC) (Figura 3).



**Figura 3** Principali substrati riconosciuti da ROCK (Modificata da Amano et al.[11]).

La fosforilazione di quest'ultimo substrato è favorita anche dall'inattivazione tramite fosforilazione della fosfatasi della catena leggera della miosina (MLCP). Il risultato è la contrazione delle cellule muscolari lisce.

Altri substrati includono le proteine dei filamenti intermedi come la vimentina, la proteina fibrillare acida della glia (GFAP) e neurofilamenti, la cui fosforilazione ne causa la depolarizzazione [12]. Le proteine ROCK sono coinvolte anche in altri processi cellulari elencati in Figura 4.



*Figura 4* Elenco delle funzioni cellulari regolate da ROCK

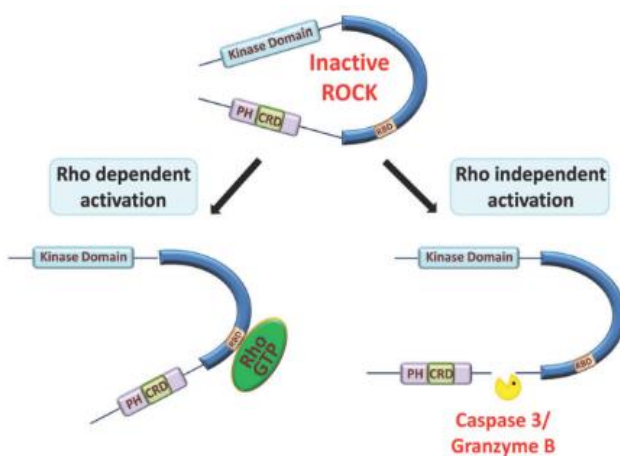
L'azione di ROCK non comporta sempre l'attivazione di processi cellulari, ma in alcuni casi può esercitare un ruolo inibitorio. Infatti ROCK attive possono indurre la proliferazione in alcune tipologie cellulari come i fibroblasti [13] o le cellule epiteliali corneali e cellule gastriche [14], ma hanno azione antiproliferativa per i cheratinociti [15].

## **Regolazione dell'attività**

Fisiologicamente le proteine ROCK si trovano in uno stato inattivo, in cui il dominio C-terminale interagisce con il dominio chinamico formando un loop auto-inibitorio. Si ha inibizione sia perché il sito attivo è bloccato da interazioni con diverse regioni all'interno della proteina, sia a causa della stabilizzazione di una conformazione cataliticamente incompetente [1]. I domini RBD o il PH possono legare singolarmente e indipendentemente la regione chinamica e bloccare l'attività di ROCK. L'interazione di proteine Rho attivate, cioè legate al GTP, con il sito di legame presente in ROCK (RBD) induce cambiamenti conformazionali che indeboliscono le interazioni regolatorie negative e attivano ROCK. Si tratta di una attivazione enzimatica che si ha in risposta a segnali extracellulari, come ad esempio quelli mediati

da agonisti di una famiglia di recettori accoppiati alle proteine G. Vi sono anche altre molecole implicate nella regolazione dell'attività tra cui messaggeri lipidici, come l'acido arachidonico o la sfingosina fosforilcolina. Si suppone che questi effettori interagiscano con il dominio PH [16].

Durante l'apoptosi si può verificare la rimozione della porzione inibitoria ad opera della caspasi-3 nel caso di ROCK1 o dalla proteasi Granzima B per ROCK2 (Figura 5). In entrambi i casi si ottengono frammenti chinasi costitutivamente attivi, che portano alla formazione di corpi apoptotici. Inoltre nelle cellule endoteliali la trombina attiva la caspasi-2 e determina un incremento nell'attivazione di ROCK2, con conseguente formazione di microparticelle [17].



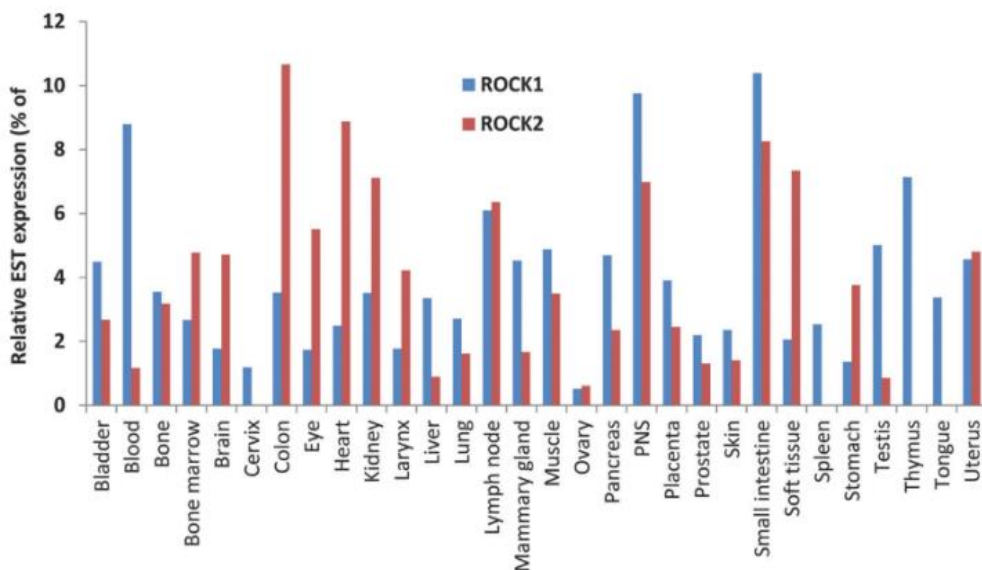
**Figura 5** Modello di attivazione dell'enzima ad opera di Rho-GTP o Caspase3/Granzyme B (Tratto da Julian et al. [1])

A differenza di altre proteine della famiglia AGC l'attivazione di ROCK non è regolata da fosforilazione a livello del dominio chinasi. Tuttavia sono stati riportati degli esempi di autofosforilazione di ROCK2 in corrispondenza del residuo S1366 e di ROCK1 per l'aminoacido S1333. Questi processi non sono stati correlati ad una variazione dell'attività proteica, ma potrebbero avere una rilevanza per la localizzazione subcellulare [18]. Mediante studi di fosfoproteomica su larga scala sono stati identificati numerosi siti fosforilati in entrambe le isoforme proteiche, che potrebbero suggerire anche un altro significato fisiologico che fino ad oggi non è ancora stato determinato [1]. Vi sono anche dei regolatori negativi dell'attività di ROCK che però differiscono per le due isoforme. La proteina Gem è in grado di interagire con ROCK1 a livello della regione coiled-coil adiacente al sito RBD, inibendo l'attività chinasi nei confronti della catena leggera della miosina (MLC) [19]. Un altro

effettore che riconosce solo l'isoforma 1 è Rho E, che però si lega in corrispondenza del dominio N-terminale [2]. L'attivazione di ROCK2 è invece inibita dall'interazione con Rad 1 e con la proteina Coronin 1B [20].

## Espressione e localizzazione

In un primo momento si pensava che l'espressione delle proteine ROCK fosse ubiquitaria sia durante l'embriogenesi sia nei tessuti adulti. In realtà tramite analisi di espressione genica e regolazione tessuto-specifica si è scoperto che le due isoforme presentano una distribuzione simile, ma ci sono organi e tessuti specifici in cui il livelli di espressione sono molto differenti [1]. Per esempio vi è un'espressione molto elevata di ROCK1 a livello del timo e della milza, dove non è stata rilevata ROCK2 (Figura 6). Quest'ultima sembra maggiormente presente a livello del colon e del cuore. Per quanto riguarda la localizzazione subcellulare, ROCK2 è stata rilevata soprattutto a livello citosolico [7], nel solco di taglio durante la mitosi [21] e associata alle fibre da stress di actina. L'identificazione subcellulare di ROCK1 si è dimostrata maggiormente difficoltosa, anche se uno studio del 2002 ha mostrato una colocalizzazione con i centrosomi [22].



**Figura 6** Distribuzione tissutale dell'espressione di ROCK 1 e ROCK 2 determinata dai tag di sequenza espressi (EST). I livelli di espressione relativi sono stati ottenuti tramite Tissue-specific Gene Expression and Regulation (TIGer) database. (Figura tratta da [1]).

## Implicazioni terapeutiche

Un crescente numero di studi mostra che un'anormale attività di ROCK contribuisce a differenti condizioni patologiche. Un'eccessiva stimolazione dell'attività di tali chinasi è stata correlata a ipertrofia cardiaca e successivo sviluppo della fibrosi cardiaca [23], ipertensione polmonare, ictus e aterosclerosi [24].

Dato che ROCK media la contrazione della muscolatura liscia, un'elevata attivazione può essere alla base delle alterazioni di tale meccanismo osservate in vasospasmi cerebrali e coronarici. Inoltre studi su possibili inibitori dell'azione delle proteine ROCK hanno mostrato efficacia in modelli animali con danni al midollo spinale, Alzheimer o dolore neuropatico [12].

A causa del ruolo di ROCK nella regolazione delle alterazioni del citoscheletro, come la formazione di contatti e la migrazione cellulare, una disfunzione di tali proteine è strettamente correlata con le variazioni nel comportamento che si verificano in cellule cancerose. Sia RhoA che ROCK sono richiesti nell'endotelio e nelle cellule che migrano per attraversare l'epitelio vascolare. Diversi studi hanno mostrato un elevato aumento dell'espressione di ROCK in diverse tipologie di cancro, come il carcinoma del colon-retto, il cancro al seno, il cancro polmonare e cervicale [25].



## Scopo del lavoro

Questo lavoro di collaborazione all'attività di ricerca industriale di Chiesi Farmaceutici S.p.A, ha avuto come obiettivo l'ottimizzazione di saggi di attività dei domini catalitici di ROCK1 e ROCK2 prodotte in forma ricombinante da collaboratori esterni di Chiesi Farmaceutici.

Il primo obiettivo è stato l'applicazione di un saggio commerciale ROCK Activity Immunoblot Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) per la valutazione della presenza di proteine attive e correttamente ripiegate in tutte le fasi di espressione e purificazione.

Il secondo obiettivo è stato l'ottimizzazione di un saggio d'attività enzimatico accoppiato alla determinazione dell'attività specifica e dei parametri cinetici delle proteine purificate. Grazie a questo saggio, veloce e versatile, è stato anche possibile valutare l'influenza delle condizioni di saggio sull'attività dell'enzima.



# Materiali e metodi

## Materiali

Tutti i reattivi sono stati forniti da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA).

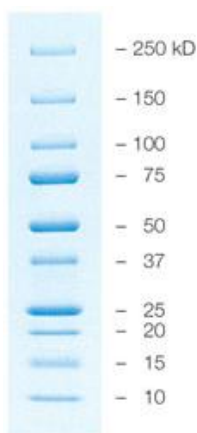
## Espressione e purificazione

Il dominio chinasi delle due isoforme ROCK1 e ROCK2 è stato espresso in forma ricombinante in cellule di insetto H5 e Sf9 infettate con baculovirus dal laboratorio di Biologia Strutturale di Elettra-Sincrotrone (Trieste). In particolare, il costrutto di ROCK1 comprende i residui amminoacidici 6-415, mentre quello di ROCK2 gli amminoacidi 9-417. I pesi molecolari sono 47.4 kDa per ROCK1 e 45.7 kDa per ROCK2.

La quantificazione è stata effettuata tramite saggio Bradford, utilizzando il colorante Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). È stata seguita la procedura standard indicata dal protocollo del reagente. Il colorante concentrato è stato diluito 1:4 e 200  $\mu$ l sono stati aggiunti in una piastra da 96 pozzetti cui vengono aggiunti successivamente 5  $\mu$ l di soluzione di proteina. È stata realizzata una retta di taratura usando BSA, utilizzando le concentrazioni 0, 0.2, 0.5, 0.7, 1.2 mg/ml ed è stato acquisito il segnale di assorbimento a 550 nm, tramite lettore di piastre Halo LED 96 (Dynamica Scientific Ltd, Newport Pagnell, Regno Unito). La quantificazione è stata svolta anche per via spettrofotometrica utilizzando uno spettrofotometro Cary 4000 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) sfruttando l'assorbimento degli amminoacidi aromatici. Le concentrazioni proteiche sono state calcolate utilizzando i coefficienti di estinzione a 280 nm, calcolati sulla base delle sequenze delle proteine tramite programma *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Per ROCK1 è stato utilizzato il valore 66,810  $M^{-1}\cdot cm^{-1}$  e per ROCK2 62,340  $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ . Le analisi che hanno previsto l'utilizzo di proteine commerciali sono state effettuate usando ROCK2 (Cell Biolabs e Invitrogen).

## Elettroforesi di proteine in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

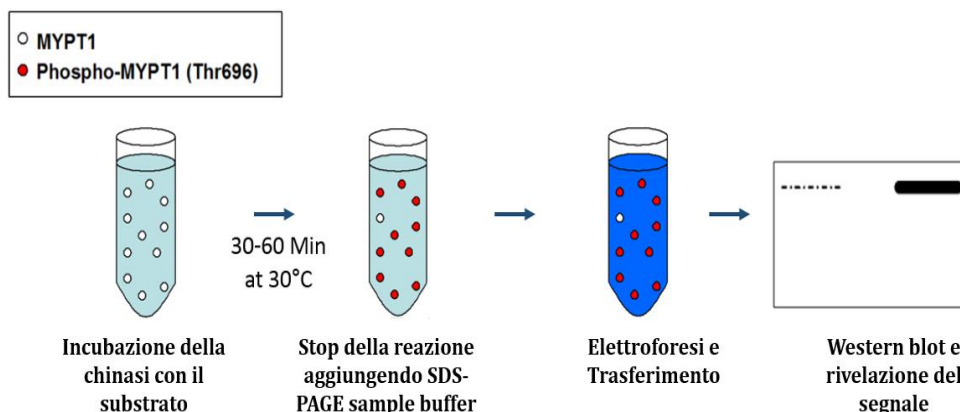
Il gel di poliacrilammide è stato preparato utilizzando Acrylamide/Bis solution 40%, 29:1 (PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany). Il running gel è stato preparato utilizzando una soluzione di acrilammide/bisacrilammide al 12% in tampone 0.6 M Tris/HCl M, 1% SDS, 0.8% APS e 0.2% TEMED, pH 8.8. Lo stacking gel è stato preparato con una soluzione di acrilammide/bisacrilammide al 5% in tampone 0.05 M Tris/HCl, 1% SDS, 3% APS e 0.1% TEMED, pH 6.8. I gel sono stati posti in una cella Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La corsa elettroforetica è stata svolta a voltaggio costante (200 V) nel tampone di corsa costituito da 10 mM Tris, 76.8 mM glicina, 0.04% SDS, pH 8.3. Ai campioni da analizzare è stato aggiunto Sample Buffer 1X, formato da 0.1 M Tris/HCl, pH 6.8, 4 % SDS, 4%  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0.5% blu di bromofenolo, 24% glicerolo. Le bande proteiche sono state evidenziate per colorazione con Coomassie Blue, formato da 0.5 g di Coomassie Brilliant Blue R-250 (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA), 50% etanolo e 7% acido acetico. Le immagini dei gel sono state acquisite utilizzando l'apparato ChemiDoc Image System™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e il quantitativo di proteina in ogni banda è stato calcolato mediante confronto con il marker Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), rappresentato in Figura 7, e utilizzando il software ImageLab™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).



**Figura 7** Marker di massa molecolare utilizzato per SDS-PAGE, per ogni banda è indicata la massa in kD.

## Immunoblot

Per valutare l'attività delle chinasi è stato utilizzato il ROCK Activity Immunoblot kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA), basato sull'impiego di un substrato riconosciuto sia da ROCK1 sia da ROCK2. Si tratta di un peptide ricombinante corrispondente ad una subunità (MYPT-1) della fosfatasi della catena leggera della miosina (MLCP), target fisiologico di queste chinasi. La subunità MYPT-1 viene riconosciuta dalle chinasi ROCK in corrispondenza di diversi amminoacidi, tra cui la Thr696. Nel kit si utilizza un peptide che include solo la subunità MYPT-1, che viene incubato con l'estratto cellulare o la proteina purificata. La fosforilazione del substrato viene rilevata tramite western blot utilizzando anticorpi monoclonali diretti contro il prodotto fosforilato (Figura 8).



**Figura 8** Schema del saggio svolto tramite ROCK Activity Immunoblot kit

La miscela di reazione (75  $\mu$ l) contenente il peptide ricombinante e l'ATP viene incubata con un lisato cellulare o la chinasi purificata a 30°C in agitazione per 30-60'. Si ferma la reazione aggiungendo l'SDS-PAGE sample buffer e facendo bollire i campioni a 100°C per 5'. Successivamente i campioni sono centrifugati a 12,000 x g per 10" e caricati su un gel SDS-PAGE. Alla fine della corsa elettroforetica il gel viene posto in acqua e si trasferiscono le proteine su membrana PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) tramite Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Per far questo si posiziona la membrana e il bottom ion reservoir stack sul fondo della cassetta, si rimuovono eventuali bolle e si avvia il trasferimento tramite programma STANDARD SD per 30'. Finito questo tempo si separano il gel e la membrana. Il gel viene colorato con Coomassie blue, mentre la membrana

si pone in una soluzione al 5% di latte in TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) a temperatura ambiente in agitazione per un'ora. Dopo aver eseguito tre lavaggi di 5' con TBST viene aggiunto l'anticorpo anti-phospho-MYPT 1 (Thr<sup>696</sup>) diluito 1:1000 con 5% latte in TBST. Si pone la membrana in agitazione a temperatura ambiente per due ore. In seguito, dopo altri tre lavaggi in TBST, si aggiunge l'anticorpo secondario anti-IgG di coniglio prodotto in capra coniugato con la perossidasi di rafano, diluito 1:1000 con 5% latte in TBST. La membrana viene messa in agitazione a temperatura ambiente per un'ora. Infine dopo tre lavaggi con TBST, si è sviluppata la reazione colorimetrica aggiungendo un substrato cromogenico o chemiluminescente. Nel primo caso è stato utilizzato il 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for Membranes (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). Per la chemiluminescenza invece è stato usato il Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Il risultato è stato visualizzato usando un ChemiDoc Image System™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

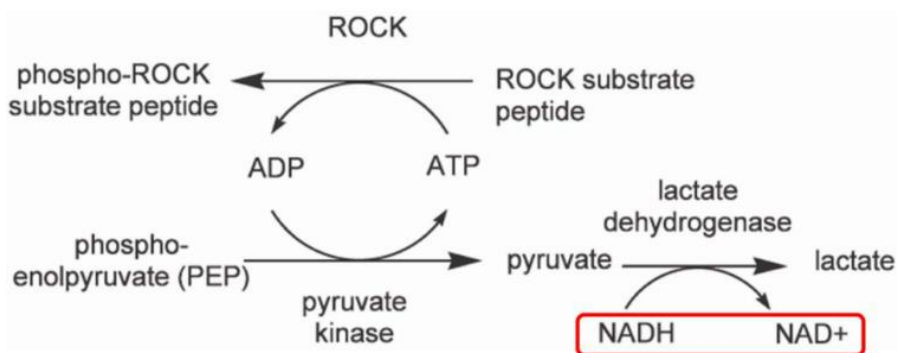
## **Dot blot**

Il protocollo di dot blot è simile a quello di western blot, ma è omessa la fase di elettroforesi. Un frammento di membrana di nitrocellulosa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) viene condizionato con metanolo e poi con TBST. Su questa si carica 1 µl di ogni campione. Le fasi di incubazione in 5% latte in TBST, incubazione con anticorpo primario e secondario e la rivelazione sono le stesse del protocollo di western blot.

## **Saggio d'attività continuo accoppiato**

Per valutare la specifica attività delle chinasi di interesse e i parametri cinetici è stato utilizzato un saggio accoppiato con una reazione rilevabile per via spettrofotometrica. Tale saggio è stato messo a punto sulla base del protocollo proposto da Doran e Jacobs [29] e accoppia la produzione dell'ADP da ATP con l'ossidazione del NADH (Figura 9). Quando la chinasi catalizza il trasferimento di fosfato da una molecola di ATP al substrato, si ha la formazione di ADP come secondo prodotto. Quest'ultimo viene fosforilato dal piruvato chinasi (PK) utilizzando fosfoenolpiruvato (PEP) come substrato e portando alla formazione di piruvato. Dal piruvato si ha la formazione di lattato ad opera della lattico deidrogenasi (LDH), usando la nicotinammide adenina dinucleotide ridotta (NADH) come cofattore. La concentrazione di

NADH presente nella miscela di reazione può essere misurato per via spettrofotometrica, usando il coefficiente di estinzione molare a 340 nm che è pari a  $6,220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Il  $\text{NAD}^+$  non assorbe a 340 nm, quindi si può seguire un decremento della concentrazione di NADH mentre procede la reazione. Se le due reazioni accoppiate non sono limitanti per la velocità di catalisi, la velocità dell'ossidazione di NADH a  $\text{NAD}^+$  è pari a quella di formazione di ADP dall'ATP. Pertanto il numero di moli di ADP formate corrisponde al numero di moli di NADH ossidate nell'unità di tempo.



**Figura 9** Schema della reazione del saggio accoppiato. Modificata da [26].

Per svolgere il saggio è stata utilizzata una miscela di reazione composta da: 100 mM HEPES, pH 7.6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.5 mM PEP, 0.2 mM NADH, 2 mM DTT, 3 U PK, 5 U LDH, 100 nM ROCK1 o ROCK2 in un volume finale di 55  $\mu\text{l}$ . Il saggio è stato iniziato con uno dei due substrati ATP o il peptide ricombinante KKRNRRLSV (prodotto dalla Peptide Facility del Centro di Ricerca Interdipartimentale per le Biotecnologie Innovative dell'Università degli Studi di Padova). Tale peptide è stato quantificato in acqua tramite analisi spettrofotometrica, acquisendo i valori di assorbanza alle lunghezze d'onda: 205, 210, 225 e 280 nm. La concentrazione ( $C$ ) è stata calcolata mediando il valore ottenuto dalle formule [27]:

$$1) \quad C \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{A_{205}}{27 + 120 \cdot \left( \frac{A_{280}}{A_{205}} \right)}$$

$$2) \quad C \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{A_{210}}{20.5}$$

$$3) C \left( \frac{mg}{ml} \right) = 0.144 \cdot (A_{215} - A_{225})$$

Il PEP è instabile in soluzione, quindi è stato preparato ogni volta fresco. L'esatta concentrazione è stata determinata per via spettroscopica utilizzando il coefficiente di estinzione a 240 nm di  $1,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [28].

Il saggio accoppiato è stato svolto a 30°C. La miscela di reazione contenente tutti i componenti ad eccezione di uno dei due substrati è stata termostata per 5' e poi si è raccolta una cinetica a 340 nm, per poter calcolare la velocità di ossidazione del NADH indipendente dall'attività chinasi. Questa può derivare dalla sola auto-ossidazione del cofattore. Quando però la reazione è iniziata per aggiunta del peptide, e quindi nella miscela di reazione è presente ATP, allora comprende anche la velocità di idrolisi dell'ATP ad opera dell'attività ATPasica di ROCK. Nel calcolo finale la velocità di questa prima parte di cinetica è stata sottratta a quella misurata sulla reazione chinasi, in quanto l'entità dell'ossidazione del NADH indipendente dall'attività chinasi non è trascurabile.

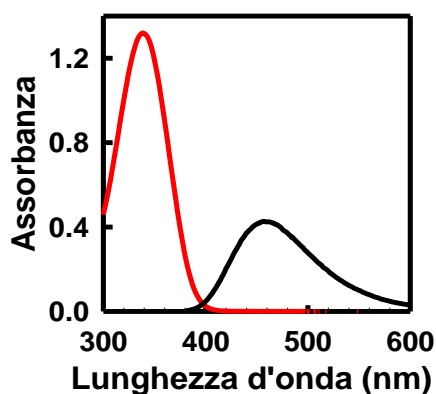
Le cinetiche sono state acquisite utilizzando uno spettrofotometro Cary 4000 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La velocità delle reazioni è stata misurata in condizioni di stato stazionario, dove la concentrazione di enzima è molto inferiore a quella di substrato e la deplezione di entrambi i substrati è  $< 10\%$ .

Al fine di poter applicare questo saggio allo studio di molecole in grado di inibire ROCK, è stato messo a punto un metodo per valutare l'effetto di inibitori sulle reazioni accoppiate. Infatti poiché si tratta di inibitori diretti contro chinasi, è ragionevole supporre che possano avere un effetto anche sulla chinasi della reazione accoppiata, cioè la PK. Quindi è stato messo a punto un saggio per analizzare solo la reazione accoppiata a quella di ROCK tramite l'aggiunta del substrato della PK che è l'ADP. È stato svolto un saggio in cui a 100 mM Hepes, pH 7.6, si sono aggiunti: 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.5 mM PEP, 0.2 mM NADH, 3 U PK, 5 U LDH, 2 mM DTT, 0.3 mM ADP, e 5  $\mu\text{M}$  inibitore. La reazione è stata iniziata con l'ADP. Dato che tali composti sono disciolti in DMSO si è valutato anche l'effetto di tale componente sull'attività chinasi di ROCK, aggiungendo DMSO nella miscela di saggio in diverse percentuali.

Il saggio accoppiato è stato anche ottimizzato per la determinazione della concentrazione di NADH per via spettrofluorimetrica. È stato utilizzato un fluorimetro FluoroMax®-3 (HORIBA Jobin Yvon, Longjumeau Cedex, France). Il NADH emette un segnale di fluorescenza a 460 nm a seguito di eccitazione a 370 nm (Figura 10). Il  $\text{NAD}^+$  non assorbe a 370 nm, quindi come per la reazione svolta tramite spettrofotometro è possibile osservare una riduzione della concentrazione di NADH nel tempo associata alla reazione.

Dato che la sensibilità di un'analisi svolta per via fluorimetrica è generalmente maggiore rispetto a quella per via spettrofotometrica, sarebbe potenzialmente possibile utilizzare quantitativi di enzima inferiori e rilevare comunque un buon segnale. Sono state raccolte delle cinetiche di reazione seguendo la variazione del segnale a 460 nm in seguito ad eccitazione a 370 nm (slits 3 nm) per 10 minuti, a 30°C. Anche in questo caso la pendenza della prima parte della cinetica è stata sottratta a quella ottenuta a seguito di aggiunta del secondo substrato.

Gli spettri di emissione per eccitazione a 370 nm, sono stati raccolti in un intervallo compreso tra 380 e 650 nm, con slits di eccitazione e di emissione 2.5 a 30 °C.



**Figura 10** Spettro di assorbimento (rosso) ed emissione (nero) di una soluzione 0.2 mM di NADH. Lo spettro di emissione è stato raccolto per eccitazione a 370 nm, usando slits di eccitazione ed emissione di 3 nm.

I parametri cinetici sono stati calcolati usando l'equazione di Michaelis-Menten:

$$4) v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

dove  $v_0$  è la velocità iniziale della reazione,  $V_{max}$  è la velocità massima a concentrazioni saturanti di substrato,  $[S]$  è la concentrazione di substrato,  $K_M$  è la costante di Michaelis-Menten.

## **Stabilità dell'enzima in diversi tamponi**

Si è valutata l'attività delle proteine a seguito di incubazione a 25°C nei tamponi: 100 mM HEPES, pH 7.6, 10 mM tampone fosfato, pH 7.4 preparato in acqua o in acqua deuterata. Ad intervalli di tempo è stata prelevata un'aliquota di proteina e misurata l'attività tramite saggio accoppiato.

## **Elenco abbreviazioni**

APS: ammonio persolfato

HDX: scambio idrogeno-deuterio

NADH: nicotinammide adenina dinucleotide (ridotta)

NAD<sup>+</sup>: nicotinammide adenina dinucleotide (ossidata)

PVDF: polivinildenfluoruro

ROCK: chinasi Rho-associated coiled-coil-forming kinases

SDS-PAGE: elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti

TEMED: tetrametiletilendiammina

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

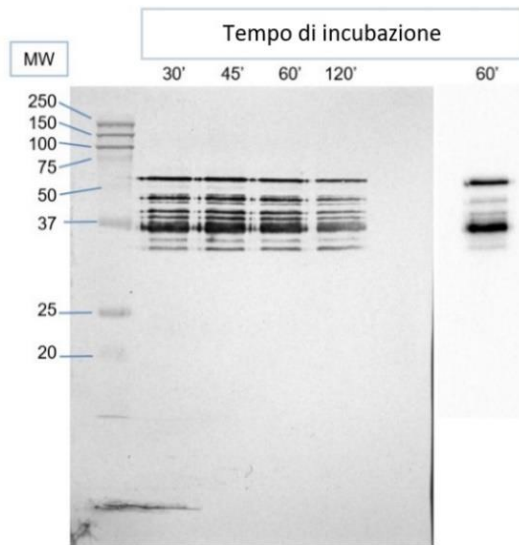


## **Risultati e discussione**

### **Applicazione di un saggio immunochimico allo studio dell'attività di ROCK durante l'espressione e la purificazione**

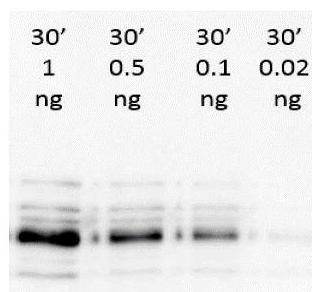
Gli enzimi ricombinanti ROCK1 e ROCK2 sono stati prodotti in cellule di insetto al fine di ottenere proteine correttamente ripiegate e con una buona resa. Per analizzare la presenza di proteine attive durante le fasi di espressione in cellule di insetto e purificazione è stato utilizzato un saggio basato sul kit commerciale ROCK Activity Assay Immunoblot (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA). Tale saggio è stato ottimizzato per definire delle condizioni di reazione adatte agli enzimi oggetto di studio e per ottenere, se possibile, una riduzione dei tempi di analisi e della quantità di reagenti utilizzati rispetto al protocollo fornito dalla ditta. Inizialmente è stata analizzata la reazione svolta da una proteina ricombinante commerciale ROCK2 (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA). Secondo il protocollo del kit il campione da analizzare può essere incubato con i substrati, ATP e polipeptide ricombinante, per un tempo variabile da 30 a 60'. Quindi sono state svolte delle reazioni che sono state fermate a diversi tempi per valutare un'eventuale variazione del segnale rilevabile. Non si sono riscontrate delle differenze in reazioni fermate dopo 30', 45', 60' e 120' (Figura 11).

Di conseguenza si è definito 30' come tempo di reazione sufficiente affinché tutto il substrato sia fosforilato da ROCK. Il western blot è stato sviluppato tramite l'utilizzo di un substrato colorimetrico o chemiluminescente. In entrambi i casi è stato possibile ottenere un segnale sufficientemente intenso, tuttavia si sono osservate diverse bande, a causa della scarsa purezza del substrato fornito dal kit. Il rapporto segnale/rumore osservato nel caso della rivelazione per chemiluminescenza è stato maggiore, quindi tale metodo è stato adottato per tutte le misure successive.



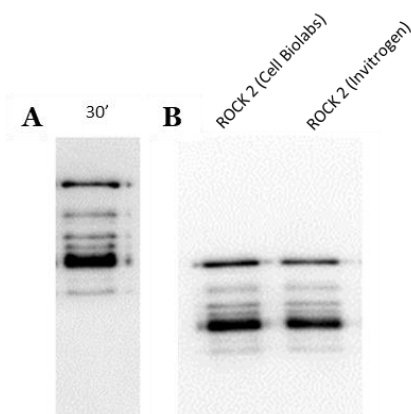
**Figura 11** Effetto del tempo di incubazione e del tipo di substrato di rivelazione sulla sensibilità del saggio. Immunoblot svolto utilizzando 1 ng di proteina commerciale ROCK 2. Il prelievo dopo 60' è stato caricato su due diverse corsie del gel al fine di poter valutare la reazione con due diversi metodi di rivelazione. A sinistra la rivelazione colorimetrica e a destra quella ottenuta tramite chemiluminescenza.

Con lo scopo di definire il quantitativo minimo di proteina attiva rilevabile con questo kit, il saggio è stato effettuato variando le concentrazioni di enzima. È stato possibile acquisire un buon segnale anche usando 0.1 ng di enzima, invece che 1 ng come consigliato nel protocollo del kit (Figura 12). Nel caso di 0.02 ng è stato ancora osservato il prodotto della reazione, ma difficilmente distinguibile dal background. Questo ha permesso di stabilire che il limite di sensibilità del ROCK Activity Assay Immunoblot kit è molto elevato, e addirittura 3000 volte maggiore di quello raggiungibile con saggi continui (vedi dopo).



**Figura 12** Determinazione del limite di sensibilità del saggio Immunoblot. Le quantità indicate corrispondono alla massa di enzima utilizzata nella miscela di saggio.

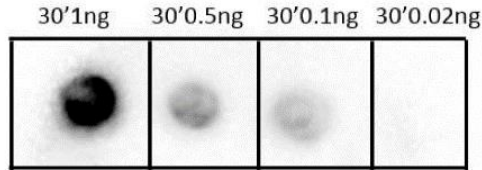
Il ROCK Activity Immunoblot Kit presenta due svantaggi: il basso numero di saggi che si possono eseguire per singolo kit e il tempo necessario per ottenere un risultato, che è di almeno sei ore. Per studiare la possibilità di svolgere un numero maggiore di saggi con un singolo kit è stato variato il quantitativo di substrato richiesto per ogni singola reazione o è stato riutilizzato a seguito di scongelamento. Dall'analisi di una reazione svolta con una concentrazione di substrato ricombinante pari alla metà di quella indicata da protocollo e a seguito di un ciclo di congelamento e scongelamento si è osservato un segnale comparabile con quello ottenuto nell'analisi precedente (Figura 13). Un risultato confermato anche dall'utilizzo di proteine commerciali differenti.



**Figura 13** *A-Immunoblot svolto con 3 ng/ $\mu$ l di substrato sottoposto a un ciclo di congelamento/scongelamento. B-Confronto dell'Immunoblot eseguito con due differenti proteine commerciali.*

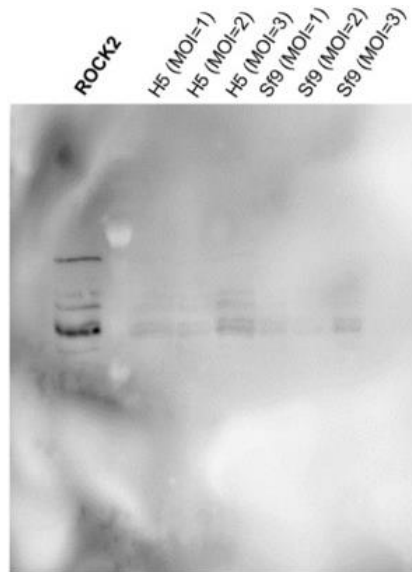
Al fine di ridurre i tempi di reazione è stato messo a punto un saggio di dot blot, utilizzando gli stessi reagenti forniti dal kit. In questo caso il campione è stato aggiunto direttamente su una membrana evitando il passaggio di elettroforesi.

Le potenzialità del dot blot sono state testate valutando l'intensità del segnale ottenuto a diverse concentrazioni di enzima (Figura 14). Il limite di sensibilità del dot blot è confrontabile con quello ottenuto attraverso la procedura standard, quindi è adatto per svolgere il saggio riducendo i tempi di svolgimento di almeno due ore.



**Figura 14** Determinazione del limite di sensibilità del saggio dot blot, le quantità indicate corrispondono alla massa di enzima utilizzata nella miscela di saggio.

Il saggio Immunoblot ottimizzato è stato usato per valutare se le proteine ricombinanti presenti in estratti cellulari fossero attive. Sono stati analizzati estratti ottenuti dall'infezione di due diverse linee cellulari, H5 e Sf9, usando ROCK2 (Cell BioLabs, San Diego, CA, USA) come controllo (Figura 15).

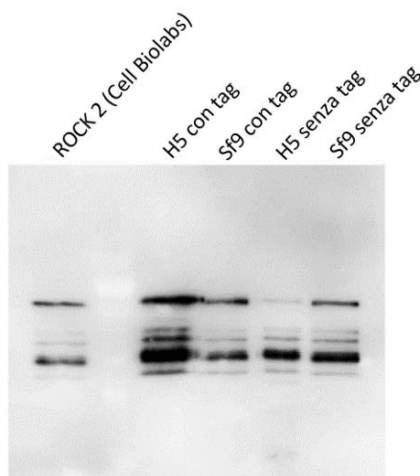


**Figura 15** Immunoblot degli estratti cellulari di H5 e Sf9 ottenuti a seguito di infezione con diversi titoli virali. Sono stati usati 25 $\mu$ l di estratto per ogni saggio

Per garantire una resa elevata nella produzione di proteine ricombinanti in cellule di insetto è necessario utilizzare un valore di MOI (multiplicity of infection) ottimale. Quest'ultimo è un parametro che indica il numero di particelle virali per cellula. Grazie all'elevata sensibilità del saggio è stata dimostrata una produzione di proteina attiva anche in corrispondenza dei MOI più bassi, nonostante l'intensità del segnale sia appena rilevabile. Il valore di MOI pari a 2 è stato scelto per le espressioni successive. Grazie alla rilevazione di proteine attive è stato possibile ottimizzare il metodo di

espressione, che ha permesso la successiva purificazione delle proteine ricombinanti.

Queste ultime sono state analizzate con lo stesso saggio (Figura 16). Sono state analizzate entrambe le isoforme, cui è stata o meno rimossa la coda di istidine, in modo da valutare se il taglio proteolitico necessario per la rimozione della coda di istidine avesse effetto sull'attività enzimatica. In questo caso sono stati osservati segnali intensi e facilmente distinguibili dal background per tutti i campioni.



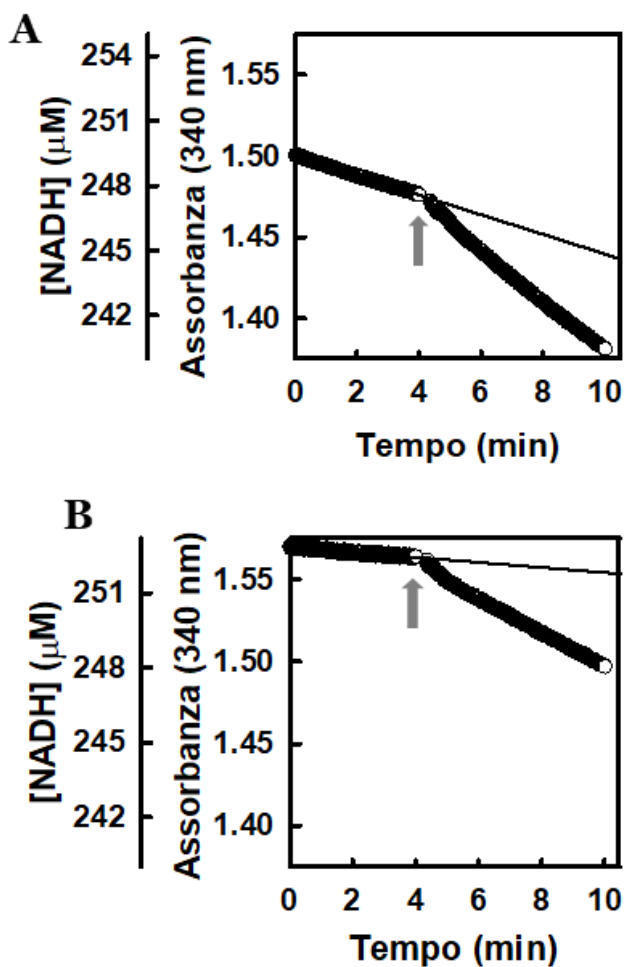
**Figura 16** Immunoblot di ROCK 1 e purificate. Sono state analizzate due preparazioni di ROCK1 per ogni linea cellulare, contenenti o meno il tag di istidine. Il controllo positivo è costituito da ROCK 2 commerciale (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA).

La migliore qualità del segnale osservato è dovuta alla maggiore concentrazione di proteina presente nei campioni. È stato rilevato un segnale di elevata intensità nel caso di ROCK1 purificata da H5 con il tag di istidine, mentre la rimozione del tag ha causato una riduzione del quantitativo di proteina attiva nel campione. Al contrario nel caso di ROCK1 espressa in Sf9 si è ottenuto un segnale più intenso nel caso della proteina senza tag, anche se l'intensità del segnale è stata inferiore rispetto a quella ottenuta dalla purificazione da cellule H5. Questi dati hanno permesso di dimostrare che vi erano proteine attive sia in estratti cellulari sia alla fine delle fasi di purificazione. Siccome la differenza di attività tra le preparazioni con e senza tag non è elevata, si è preferito procedere con la rimozione del tag in modo da ottenere proteine con una sequenza più vicina a quella presente in natura.

## **Applicazione del saggio continuo accoppiato alla determinazione dei parametri cinetici di ROCK**

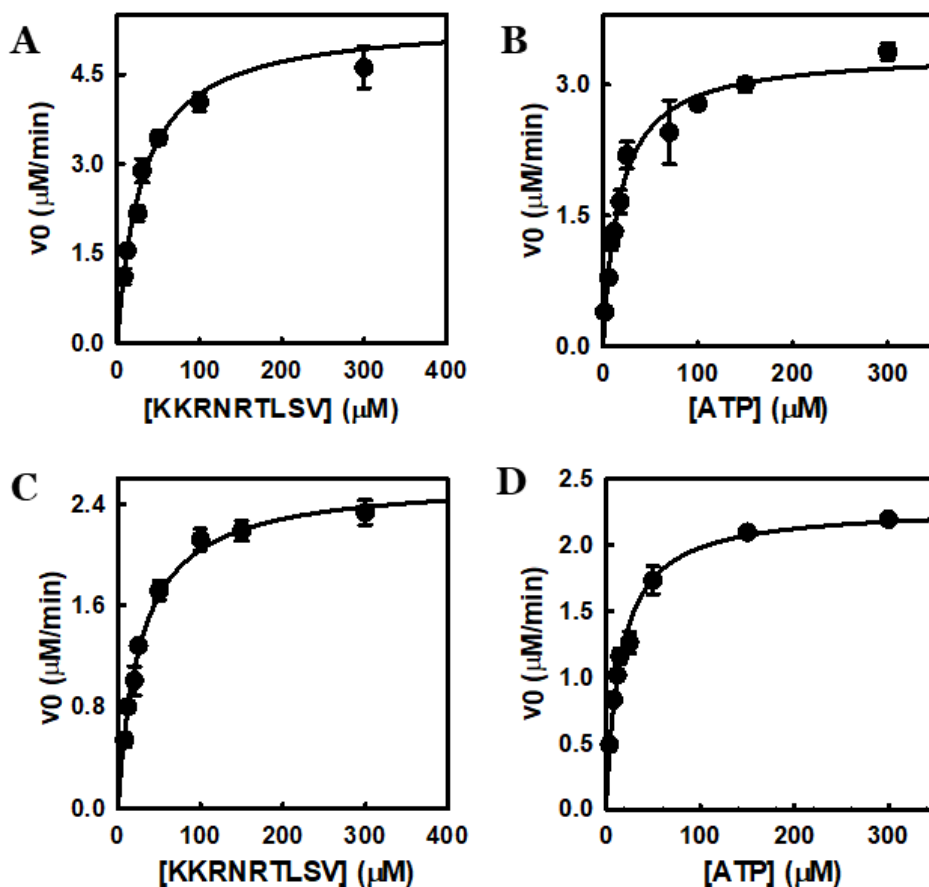
Con lo scopo di caratterizzare ROCK1 e ROCK2 purificate e di studiare l'interazione di queste chinasi con potenziali inibitori è stato utilizzato un saggio spettrofotometrico continuo accoppiato. Si tratta di un saggio ampiamente utilizzato per studiare chinasi, come ad esempio le proteine chinasi A e C [29], ERK 2 (extracellular signal-regulated kinases) [30] o PGK (phosphoglycerate kinase (PGK) [31]. In particolare le condizioni di reazione di ROCK sono state definite da Doran e Jacobs [26] che hanno descritto un saggio di attività messo a punto tramite l'utilizzo di una proteina ricombinante ROCK1. Si tratta di un saggio che per cui è necessario utilizzare quantitativi elevati di proteina, 0.3  $\mu\text{g}$ , se confrontati con quelli richiesti per altri kit commerciali utilizzati per la valutazione dei parametri catalitici delle chinasi, come ad esempio l'ADP Glo kit (Promega corporation, Madison, Wisconsin, USA). Tuttavia il saggio accoppiato è più versatile, rapido ed economico.

La reazione enzimatica viene svolta in presenza di ATP e un peptide ricombinante, come descritto in materiali e metodi e, in principio, può iniziare per aggiunta di uno dei due substrati indifferentemente. Dal confronto delle cinetiche iniziate con l'ATP (Figura 17 A) o il peptide (Figura 17 B) si è osservata una pendenza della prima parte della cinetica di 0.97  $\mu\text{M}/\text{min}$  nel caso in cui la reazione sia iniziata con il peptide e di 0.25  $\mu\text{M}/\text{min}$ , se iniziata con l'ATP. Tale differenza è verosimilmente dovuta all'esistenza di un'attività ATPasica. Si tratta di una attività presente in molte chinasi, ma fino ad oggi poco studiata per ROCK. La pendenza iniziale nel caso della reazione iniziata con l'ATP è stata calcolata come circa il 10% rispetto alla velocità in presenza di entrambi i substrati, mentre se la reazione è stata iniziata con il peptide è stata misurata una velocità pari a circa il 40% del totale. Quindi è fondamentale sottrarre il contributo della prima parte di cinetica, poiché non è trascurabile rispetto alla pendenza totale della reazione. Poiché nel presente lavoro viene studiata l'attività chinasica, le reazioni sono state iniziate per aggiunta del peptide, tenendo conto dell'attività ATPasica mediante sottrazione della velocità della prima parte della cinetica dalla seconda parte.



**Figura 17** Confronto della cinetica enzimatica in presenza di 100 nM ROCK 1, 50  $\mu\text{M}$  peptide e 1 mM ATP, iniziata per aggiunta di peptide (**A**) o di ATP (**B**). La freccia indica l'aggiunta del substrato che determina l'avvio della reazione chinasi. La velocità della prima parte è pari a 0.97  $\mu\text{M}/\text{min}$  (**A**) e 0.25  $\mu\text{M}/\text{min}$  se iniziata con l'ATP (**B**). La pendenza calcolata per la seconda parte è stata 2.56  $\mu\text{M}/\text{min}$  nel primo caso e 1.75 nel secondo.

La dipendenza dell'attività di ROCK dalla concentrazione dei due substrati è stata costruita mantenendo costante la concentrazione di ATP o di peptide (rispettivamente di 1 mM e 50  $\mu\text{M}$ ) e variando la concentrazione del secondo substrato (Figura 18).



**Figura 18** Dipendenza della velocità iniziale della reazione catalizzata da ROCK 1 e ROCK 2 dalla concentrazione di peptide (A e C) o di ATP (B e D). I pannelli in alto si riferiscono a ROCK 1, quelli in basso a ROCK 2. La linea continua rappresenta il fitting con l'equazione di Michaelis-Menten. I parametri ottenuti dal fitting sono riportati in Tabella 1.

Le dipendenze delle velocità iniziali dalla concentrazione di substrato sono state analizzate con l'equazione di Michaelis-Menten (equazione 4 in materiali e metodi) in modo tale da calcolare  $K_M$  per il peptide e l'ATP e  $k_{cat}$ . I valori ottenuti sono in accordo con quelli pubblicati precedentemente per i domini chinasi di ROCK1 e ROCK in condizioni sperimentali simili ma non identiche [31,8,10] (Tabella 1).

**Tabella 1** Parametri cinetici di ROCK1 e ROCK2

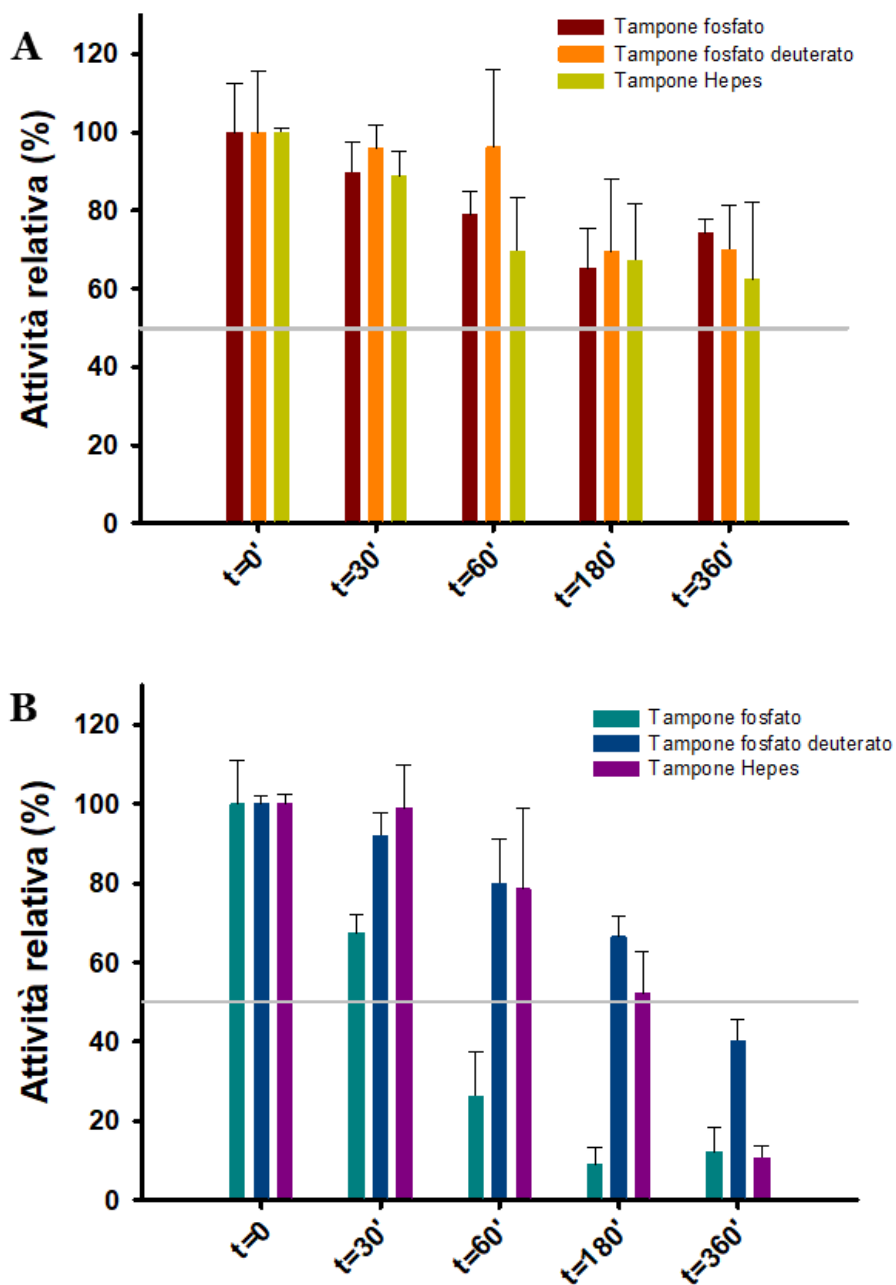
Proteina	$K_M$ peptide ( $\mu\text{M}$ )	$K_M$ ATP ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ peptide ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ATP ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_M$ peptide ( $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_M$ ATP ( $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
ROCK1	$30 \pm 4$	$17 \pm 2$	$0.90 \pm 0.04$	$0.60 \pm 0.02$	$0.030 \pm 0.010$	$0.032 \pm 0.008$
ROCK2	$27 \pm 2$	$16 \pm 1$	$0.40 \pm 0.01$	$0.41 \pm 0.01$	$0.012 \pm 0.004$	$0.023 \pm 0.006$

## Stabilità delle proteine in diversi tamponi ed effetto dell'acqua deuterata

Il saggio accoppiato è stato utile non solo per definire le costanti cinetiche dei domini chinasi di ROCK1 e ROCK2 prodotti in forma ricombinante, ma anche per studiare l'interazione delle due chinasi con potenziali inibitori. Si tratta di un'analisi che fa parte di un insieme più vasto di esperimenti, in cui è inclusa anche un'analisi tramite HDX, per cui il saggio accoppiato è stato svolto in condizioni comparabili con quelle richieste dallo scambio idrogeno-deuterio. Dal momento che per svolgere uno studio HDX è necessario porre le proteine di interesse in un tampone preparato con acqua deuterata, si è valutato l'effetto di tamponi fosfato preparati in acqua o acqua deuterata sulla stabilità di ROCK. Inoltre per le analisi HDX i campioni sono incubati a 25°C per tempi variabili, minimo 30', quindi è stato svolto il saggio a seguito di incubazione delle chinasi per tempi variabili. Tale studio è stato utile anche per verificare il meccanismo di inibitori di tipo slow-binding. Questi ultimi sono composti che richiedono un tempo maggiore per esprimere completamente il loro potenziale inibitorio [33], in quanto l'equilibrio tra le forme di enzima libero o legato viene stabilito lentamente [34]. Quindi è necessario valutare l'effetto dopo un congruo tempo di incubazione, che consenta il raggiungimento della conformazione finale della proteina ad alta affinità per l'inibitore. La stabilità delle due chinasi è stata determinata analizzando l'attività di ROCK a seguito di incubazione a 25°C per tempi differenti, fino a sei ore in tampone 100 mM HEPES, pH 7.6 e tampone 10 mM fosfato, pH 7.6, preparato in acqua o in acqua deuterata (Figura 19). Per ROCK1 è stata osservata un'attività superiore al 50% rispetto a quella iniziale per tutte le condizioni considerate, invece per ROCK2 si è ottenuta una stabilità significativamente inferiore in tampone fosfato preparato in acqua per tempi di incubazione superiori a 30'. Al contrario la stabilità in HEPES e in tampone deuterato è risultata maggiore,

poiché l'attività misurata è stata sempre superiore al 40% anche dopo sei ore di incubazione.

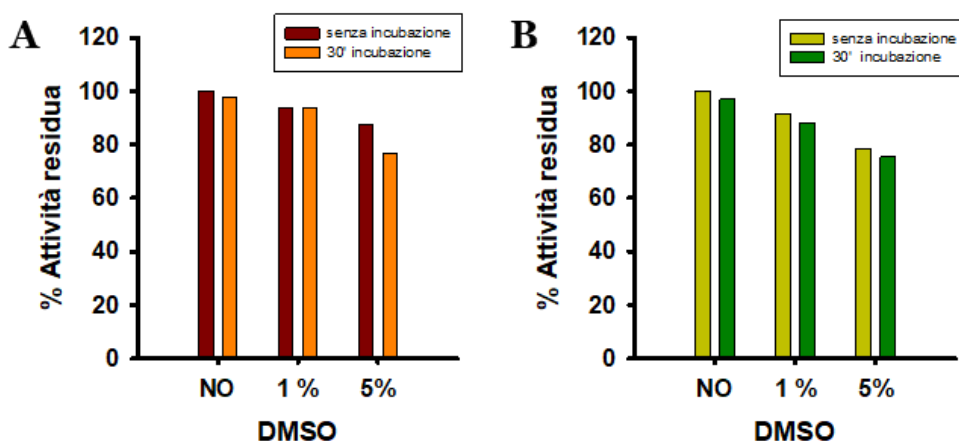
Questa analisi ha permesso di chiarire che a seguito di incubazione in tampone fosfato deuterato a 25°C fino ad un'ora, le proteine ROCK mantengono la loro attività. Quindi studi HDX svolti fino a un'ora di incubazione non risultano essere compromessi dalla inattivazione dell'enzima. In aggiunta, la stabilità delle proteine in tampone Hepes è comparabile con quella in fosfato deuterato fino a 60', quindi è stato possibile confermare il suo utilizzo per l'incubazione della proteina durante i saggi di attività in vitro.



**Figura 19** Effetto dell'incubazione di ROCK 1 (A) e ROCK 2 (B) in diversi buffer. L'attività ai diversi tempi di incubazione viene espressa come percentuale rispetto all'attività al tempo zero.

## Studio della stabilità in DMSO

Gli inibitori di ROCK analizzati sono stati disciolti in DMSO. L'eventuale effetto di questo composto sulla stabilità e sull'attività di ROCK è stato studiato aggiungendo DMSO in quantità variabili e a seguito di incubazione a 25°C. In particolare il DMSO è stato aggiunto nella miscela di saggio in percentuali variabili dall'1 al 5% rispetto al volume totale, per valutare la possibilità di analizzare composti anche a concentrazioni molto alte. L'incubazione è stata effettuata per distinguere un eventuale effetto sull'attività proteica da quello sulla stabilità, poiché il DMSO potrebbe avere un effetto differente a seguito di incubazione. Dall'analisi dei dati si è osservato che l'effetto del DMSO all'1% è stato trascurabile per entrambe le isoforme (Figura 20).



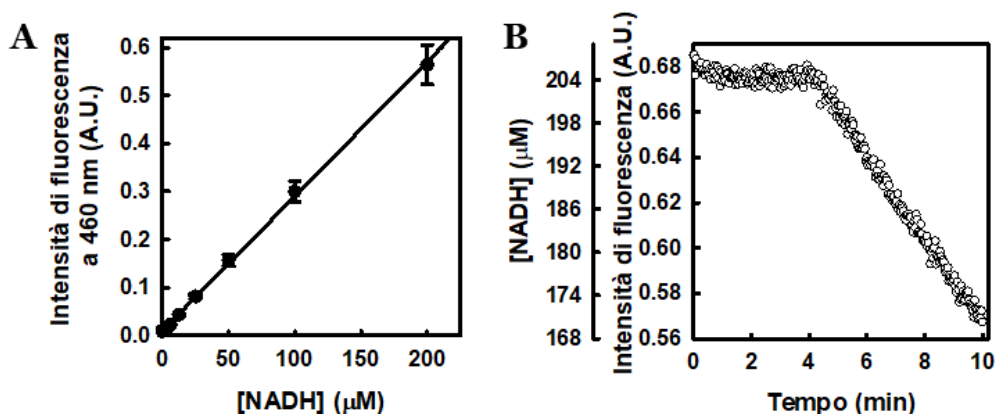
*Figura 20* Effetto del DMSO sull'attività di ROCK1 (A) e ROCK2 (B). Il DMSO è stato aggiunto alla miscela di saggio e l'attività è stata valutata senza incubazione o dopo 30' di incubazione a 25°C.

## Sviluppo di un metodo fluorimetrico per lo studio dell'attività di ROCK1 e ROCK2

La quantità di enzima necessaria per il saggio spettrofotometrico continuo accoppiato descritto in precedenza è elevata (0.3 µg per ogni saggio). Si è voluta esplorare quindi la possibilità di ridurre la quantità di enzima utilizzata seguendo la cinetica di ossidazione del NADH per via spettrofluorimetrica, generalmente più sensibile di quella

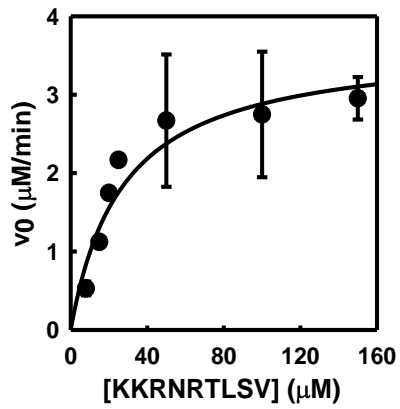
spettrofotometrica. In questo caso per quantificare il NADH ossidato nella reazione accoppiata è stato necessario allestire una retta di taratura e si è ottenuta una dipendenza lineare fino a 200  $\mu\text{M}$  NADH (Figura 21 A). La pendenza della retta è pari a  $2.60 \pm 0.02$  A.U./mM.

Sono state raccolte cinetiche di reazione a concentrazioni di enzima inferiori rispetto al saggio analizzato per via spettroscopica, fino a 35 nM (Figura 21 B). Tuttavia il minimo quantitativo di enzima necessario per avere risultati ripetibili e al di sopra del limite di sensibilità per concentrazioni basse di substrati (fino a 8  $\mu\text{M}$  di peptide) è stato 70 nM.



**Figura 21** A- Esempio di una retta di taratura. La linea continua rappresenta il fitting con l'equazione di una retta con pendenza pari a  $2.60 \pm 0.02$  A.U./mM. B- Esempio di cinetica enzimatica seguita per via fluorimetrica. La miscela di reazione contiene 1 mM ATP, 50  $\mu\text{M}$  peptide, 35 nM ROCK2.

Variando la concentrazione di peptide, mantenendo la concentrazione di ATP a 1 mM e utilizzando una concentrazione pari a 70 nM di ROCK2 sono state calcolate una  $K_M$  pari a  $23 \pm 7$   $\mu\text{M}$  e una  $k_{\text{cat}}$  di  $1.68 \pm 0.16$   $\text{s}^{-1}$  (Figura 22). Si sono ottenuti valori in accordo con quelli misurati attraverso il saggio spettrofotometrico. Tuttavia l'analisi fluorimetrica non ha permesso un rilevante risparmio di proteina e inoltre richiede tempi di analisi maggiori a causa della necessità di calcolare una retta di taratura per quantificare il NADH.



**Figura 22** Dipendenza della velocità iniziale della reazione catalizzata da ROCK2 dalla concentrazione di peptide. L'enzima è stato utilizzato a una concentrazione di 70 nM e nella miscela di reazione è stato aggiunto 1 mM ATP. Il fitting è stato eseguito tramite l'equazione di Michaelis- Menten.

## Conclusioni

In questo lavoro sono stati ottimizzati due saggi enzimatici per lo studio dell'attività dei domini chinasici di ROCK1 e ROCK2 ricombinanti.

Il primo saggio è basato su un kit commerciale (ROCK Activity Assay Immunoblot) che sfrutta il riconoscimento specifico per via immunochimica del prodotto della reazione catalizzata da ROCK, cioè una proteina fosforilata su un residuo specifico. Si tratta di una metodica molto sensibile e specifica, ma che ha richiesto l'ottimizzazione di alcune condizioni, quali il tempo di reazione, il substrato da utilizzare per la rivelazione del segnale e la quantità di enzima e di substrato da utilizzare. Nelle condizioni ottimizzate il limite di sensibilità del saggio è di 0.1 ng di ROCK, cioè 0.02 nM nella miscela di reazione. Si è inoltre dimostrato che, diversamente da quanto indicato nel protocollo del saggio, il substrato, particolarmente costoso, può essere riutilizzato anche dopo essere stato ricongelato. È stata sviluppata anche una procedura di dot blot che consente di ottenere risultati paragonabili a quelli ottenuti con la procedura consigliata dal produttore ma in tempi più rapidi. Questo saggio ha consentito di verificare che gli enzimi ricombinanti prodotti in cellule di insetto fossero attivi in estratti cellulari e che si mantenessero attivi anche dopo la purificazione. Sulla base di questi dati è stato possibile definire le migliori condizioni di espressione e purificazione delle proteine, basandosi sulla sola frazione di proteina attiva. In questo modo l'ottimizzazione della procedura è stata più rapida e soprattutto senza l'incognita di ottenere, alla fine di un processo lungo e costoso, una proteina solubile ma inattiva.

Il secondo saggio ha permesso di procedere alla caratterizzazione funzionale delle proteine purificate. Si tratta di un'analisi rapida e quantitativa, ma che può essere utilizzata solo con proteine pure poiché presenta una bassa specificità. Tramite queste analisi si sono ottenuti valori di  $K_M$  e  $k_{cat}$  confrontabili con quelli di letteratura a conferma della buona qualità delle proteine prodotte. Il saggio è stato utilizzato anche per uno studio della stabilità delle proteine in diversi tamponi e in presenza di DMSO. Un limite del saggio spettrofotometrico continuo è dato dalla elevata quantità di proteina che è necessario utilizzare, cioè 0.3  $\mu$ g. Per cercare di ridurre i quantitativi di proteina utilizzati si è sfruttata la possibilità di misurare la cinetica di ossidazione del NADH nel saggio accoppiato per via fluorimetrica. È stato possibile ottenere dei parametri cinetici confrontabili con quelli ottenuti per via spettroscopica. Tuttavia, la sensibilità di questo saggio non è significativamente superiore a quella del saggio spettrofotometrico, infatti la quantità di proteina necessaria è solo 1.4 volte inferiore e ha lo svantaggio di basarsi sulla costruzione di una retta di taratura per ogni set di dati raccolti.

Quindi l'utilizzo di un saggio fluorimetrico non si è mostrato vantaggioso per l'analisi delle proteine di interesse.

## Bibliografia

- [1] L. Julian and M. F. Olson, "Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions.," *Small GTPases*, vol. 5, no. 1, p. e29846, 2014.
- [2] K. Riento, R. M. Guasch, R. Garg, B. Jin, and A. J. Ridley, "RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 12, pp. 4219–4229, 2003.
- [3] Q. Zhou, C. Gensch, and J. K. Liao, "Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): Potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 32, no. 3, pp. 167–173, 2011.
- [4] M. Jacobs, K. Hayakawa, L. Swenson, S. Bellon, M. Fleming, P. Taslimi, and J. Doran, "The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 1, pp. 260–268, 2006.
- [5] H. Yamaguchi, M. Kasa, M. Amano, K. Kaibuchi, and T. Hakoshima, "Molecular mechanism for the regulation of rho-kinase by dimerization and its inhibition by fasudil," *Structure*, vol. 14, no. 3, pp. 589–600, 2006.
- [6] D. Tu, Y. Li, H. K. Song, A. V. Toms, C. J. Gould, S. B. Ficarro, J. A. Marto, B. L. Goode, and M. J. Eck, "Crystal structure of a coiled-coil domain from human ROCK I," *PLoS One*, vol. 6, no. 3, pp. 1–9, 2011.
- [7] X. Q. Chen, I. Tan, C. H. Ng, C. Hall, L. Lim, and T. Leung, "Characterization of RhoA-binding kinase ROK $\alpha$  implication of the pleckstrin homology domain in ROK $\alpha$  function using region-specific antibodies," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 15, pp. 12680–12688, 2002.
- [8] J. W. Trauger, F. F. Lin, M. S. Turner, J. Stephens, and P. V. LoGrasso, "Kinetic mechanism for human Rho-Kinase II (ROCK-II)," *Biochemistry*, vol. 41, no. 28, pp. 8948–8953, 2002.
- [9] I. Segel, *Enzyme kinetics*. Toronto, 1975.
- [10] O. Futer, A. R. Saadat, J. D. Doran, S. A. Raybuck, and S. Pazhanisamy, "Phosphoryl transfer is not rate-limiting for the ROCK I-catalyzed kinase reaction," *Biochemistry*, vol. 45, no. 25, pp. 7913–7923, 2006.
- [11] M. Amano, M. Nakayama, and K. Kaibuchi, "Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity," *Cytoskeleton*, vol. 67, no. 9, pp. 545–554, 2010.
- [12] B. K. Mueller, H. Mack, and N. Teusch, "Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, no. 5, pp. 387–398, 2005.

- [13] D. R. Croft and M. F. Olson, "The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 12, pp. 4612–27, 2006.
- [14] J. Chen, E. Guerriero, K. Lathrop, and N. SundarRaj, "Rho/ROCK signaling in regulation of corneal epithelial cell cycle progression.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, no. 1, pp. 175–83, 2008.
- [15] R. McMullan, S. Lax, V. H. Robertson, D. J. Radford, S. Broad, F. M. Watt, A. Rowles, D. R. Croft, M. F. Olson, and N. A. Hotchin, "Keratinocyte Differentiation Is Regulated by the Rho and ROCK Signaling Pathway," *Curr. Biol.*, vol. 13, no. 24, pp. 2185–2189, 2003.
- [16] J. Feng, M. Ito, Y. Kureishi, K. Ichikawa, M. Amano, N. Isaka, K. Okawa, A. Iwamatsu, K. Kaibuchi, D. J. Hartshorne, and T. Nakano, "Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 6, pp. 3744–3752, 1999.
- [17] C. Sapet, S. Simoncini, B. Lloriod, D. Puthier, J. Sampol, C. Nguyen, F. Dignat-george, F. Anfosso, and W. Dc, "Thrombin-induced endothelial microparticle generation : identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2 Thrombin-induced endothelial microparticle generation : identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by c," vol. 108, no. 6, pp. 1868–1876, 2014.
- [18] T. Ishiuchi and M. Takeichi, "Willin and Par3 cooperatively regulate epithelial apical constriction through aPKC-mediated ROCK phosphorylation.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 7, pp. 860–6, 2011.
- [19] Y. Ward, S. F. Yap, V. Ravichandran, F. Matsumura, M. Ito, B. Spinelli, and K. Kelly, "The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway," *J. Cell Biol.*, vol. 157, no. 2, pp. 291–302, 2002.
- [20] M. K. Rana and R. A. Worthylake, "Novel mechanism for negatively regulating Rho-kinase (ROCK) signaling through coronin 1B protein in neuregulin 1 (NRG-1)-induced tumor cell motility," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 26, pp. 21836–21845, 2012.
- [21] H. Inada, H. Togashi, Y. Nakamura, K. Kaibuchi, K. Nagata, and M. Inagaki, "Balance between Activities of Rho Kinase and Type 1 Protein Phosphatase Modulates Turnover of Phosphorylation and Dynamics of Desmin / Vimentin Filaments \*," vol. 274, no. 49, pp. 34932–34939, 1999.
- [22] V. Chevrier, M. Piel, N. Collomb, Y. Saoudi, R. Frank, M. Paintrand, S. Narumiya, M. Bornens, and D. Job, "The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning," *J. Cell Biol.*, vol. 157, no. 5, pp. 807–817, 2002.
- [23] M. Higashi, H. Shimokawa, T. Hattori, J. Hiroki, Y. Mukai, K. Morikawa, T. Ichiki, S. Takahashi, and A. Takeshita, "Long-Term Inhibition of Rho-

- Kinase Suppresses Angiotensin II-Induced Cardiovascular Hypertrophy in Rats In Vivo: Effect on Endothelial NAD(P)H Oxidase System," *Circ. Res.*, vol. 93, no. 8, pp. 767–775, 2003.
- [24] A. Wirth, "Rho kinase and hypertension," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, vol. 1802, no. 12, pp. 1276–1284, 2010.
- [25] M. Morgan-Fisher, U. M. Wewer, and A. Yoneda, "Regulation of ROCK activity in cancer.," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 61, no. 3, pp. 185–98, 2013.
- [26] M. D. Doran, J.D., and Jacobs, "ROCK enzymatic assay," *Methods Mol. Biol.*, vol. 468, pp. 197–205, 2008.
- [27] Grazer, "Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology," G. D. Fasman, Ed. 1989, p. 567.
- [28] F. Wold and C. E. Ballou, "Studies on the enzyme enolase. I. Equilibrium studies.," *J. Biol. Chem.*, vol. 227, no. 1, pp. 301–312, 1957.
- [29] Z. Technikova-Dobrova, A. M. Sardanelli, and S. Papa, "Spectrophotometric determination of functional characteristics of protein kinases with coupled enzymatic assay," *FEBS Lett.*, vol. 292, no. 1–2, pp. 69–72, 1991.
- [30] T. Fox, J. T. Coll, X. Xie, P. J. Ford, U. A. Germann, M. D. Porter, S. Pazhanisamy, M. A. Fleming, V. Galullo, M. S. S. Su, and K. P. Wilson, "A single amino acid substitution makes ERK2 susceptible to pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAP kinase," *Protein Sci.*, pp. 72249–2255, 1998.
- [31] O. P. Malhotra, P. K. Ambasht, P. Prakash, K. L. Ashish, and A. M. KAYASTHA, "An Assay Procedure for Determining the Rate of an Enzyme Reaction Lacking an Optical Signal: Validity of Coupled Enzyme Assays," *Biochem. Educ.*, vol. 24, pp. 56–59, 1996.
- [32] J. D. DORAN, X. LIU, P. TASLIMI, A. SAADAT, and T. FOX, "New insights into the structure–function relationships of Rho-associated kinase: a thermodynamic and hydrodynamic study of the dimer-to-monomer transition and its kinetic implications," *Biochem. J.*, vol. 384, no. 2, pp. 255–262, 2004.
- [33] D. L. Purich, "Enzyme Kinetics: Catalysis & Control A Reference of Theory and Best-Practice Methods," D. L. Purich, Ed. Boston: Elsevier, 2010, pp. 287–334.
- [34] R. A. Copeland, *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and ohararmacologist.* 2005.