



Università degli Studi di Parma

**Dipartimento di Bioscienze
Laboratorio di Biochimica e Biologia molecolare**

Dottorato in Biochimica e Biologia Molecolare XXV ciclo

**Studi di genomica comparativa e caratterizzazione biochimica
di enzimi coinvolti nel catabolismo delle purine.**

**Tutor
Prof. Riccardo Percudani**

**Dottorando
Dr. Vincenzo Puggioni**

**Coordinatore del dottorato
Prof. Andrea Mozzarelli**

2010 -2012

Sommario

Capitolo 1: Introduzione	3
Scopo del progetto	21
Capitolo 2: Studi di genomica comparativa per la ricerca di geni coinvolti nel catabolismo delle purine in microorganismi probiotici e nel microbioma umano.	23
Capitolo 3: Caratterizzazione biochimica di un nuovo enzima coinvolto nella degradazione dell'acido allantoico a ureidoglicolato.	51
Capitolo 4: Caratterizzazione biochimica dell'enzima allantoina racemasi di <i>Pseudomonas fluorescens</i>	71
Capitolo 5: Studio dei prodotti dell'ossidazione dell'acido urico da parte della perossidasi di rafano e determinazione della stereospecificità degli enzimi HIU idrolasi e OHCU decarbossilasi	87
Capitolo 6: Identificazione del cofattore utilizzato dall' enzima ureidoglicolato idrolasi (AIIA) di <i>E. coli</i>	103
Riassunto	115
Abbreviazioni	121
Bibliografia	127
Ringraziamenti	137

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Degradazione delle purine: Significato fisiologico del pathway

Negli ultimi anni la via metabolica di degradazione delle purine (**Figura 1**) è stata oggetto di numerosi studi mirati all'identificazione e alla caratterizzazione di nuovi enzimi coinvolti.

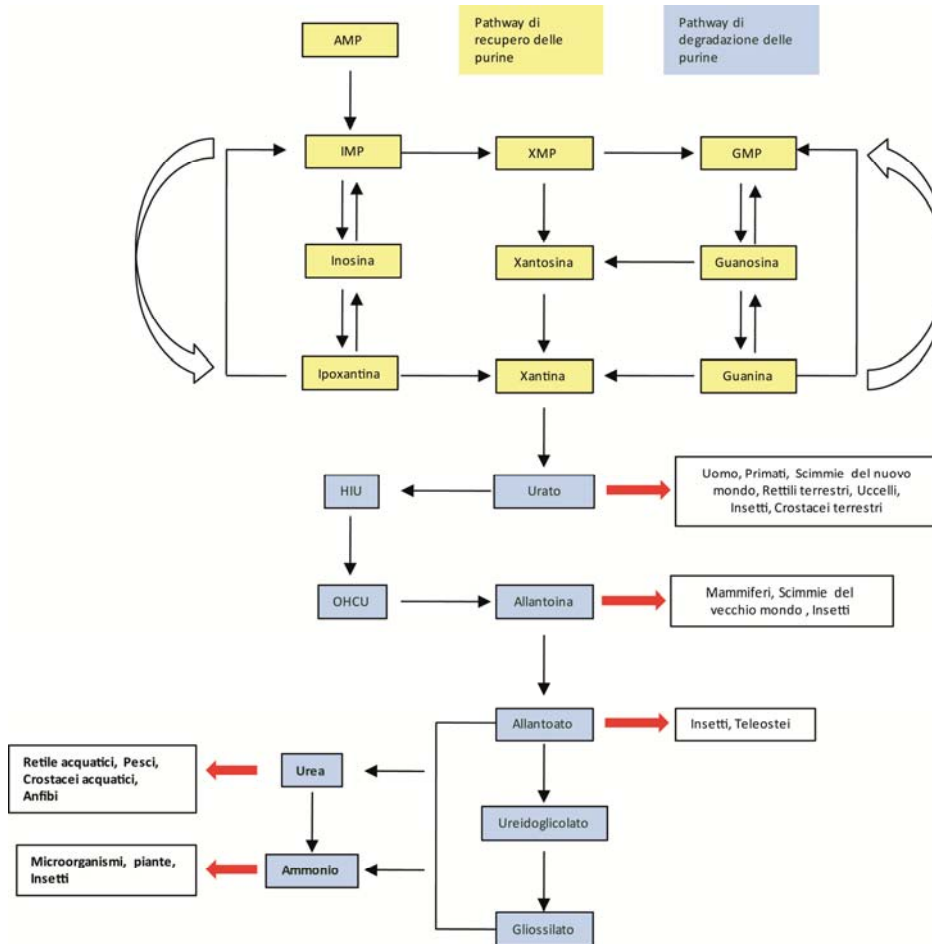


Figura 1. Principali molecole coinvolte nel pathway di degradazione delle purine e prodotti finali eliminati da diversi organismi.

Le purine, dopo essere state convertite in xantina possono intraprendere la via degradativa. Xantina, acido urico, allantoina, acido allantoico e urea rappresentano prodotti di scarto per molti organismi. L'urea o l'ammonio sono generati in diversi punti del pathway durante la conversione dell'allantoato a glicosilato. Alcuni organismi che producono urea durante la degradazione dell'acido allantoico sono dotati di ureasi che permette la liberazione di due molecole di ammonio e una di anidride carbonica. L'ammonio può essere riutilizzato per la sintesi di composti

azotati. Abbreviazioni: AMP (Adenosina mono fosfato) XMP (Xantosina monofosfato) GMP (guanosina monofosfato) HIU (Idrossisourato) OHCU (2-osso-4-idrossi-4-carbossi-5-ureidoimidazolina).

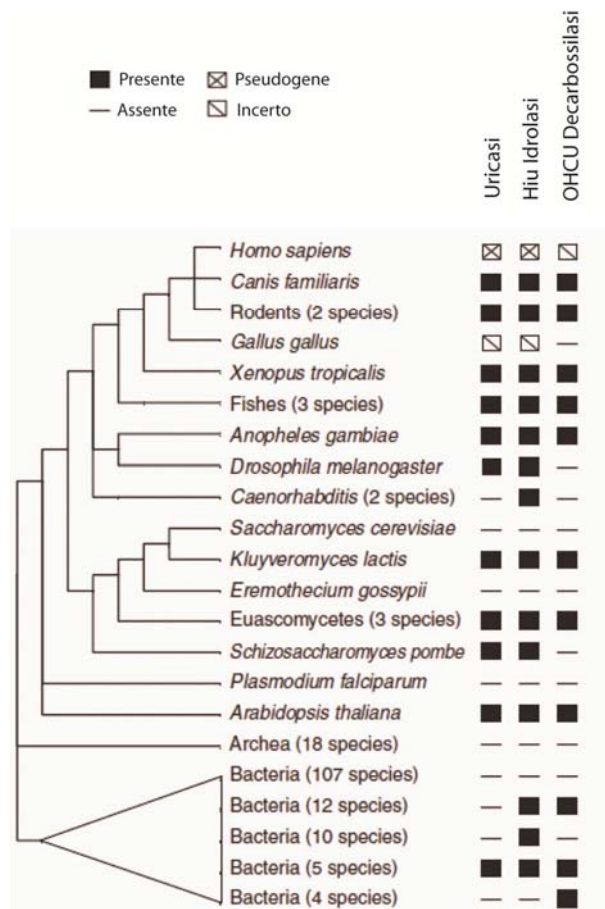


Figura 2. Distribuzione degli enzimi coinvolti nella degradazione dell'acido urico nei diversi organismi viventi.
(Figura adattata da Ramazzina et al 2006 [4]).

Il pathway risulta essere diversificato negli esseri viventi, in quanto gioca un ruolo cruciale nel metabolismo dell'azoto, che può essere considerato un composto limitante per la crescita di alcuni organismi e meno importante per altri. Per tale motivo piante, animali, e batteri hanno un metabolismo dell'azoto differente. Nelle piante l'azoto costituisce un fattore limitante per la crescita e la riproduzione. Gli organismi vegetali riescono a produrre l'energia necessaria per le

loro attività metaboliche durante il processo fotosintetico e sono C-autotrofe ma hanno bisogno di acquisire azoto dall'ambiente esterno per poter sintetizzare composti azotati. Gli animali, invece, introducendo composti azotati con la dieta possono utilizzarli per la sintesi delle macromolecole e dei metaboliti d'interesse. Questa differenza tra piante e animali si riflette nel catabolismo delle purine: le piante sono capaci di degradare completamente queste molecole a gliossilato per recuperare tutto l'azoto presente nell'anello purinico, oppure conservarlo trasportandolo nei vari tessuti sotto forma di ureidi (allantoina, acido allantoico). Gli animali, invece, degradano le purine solo parzialmente eliminandole come prodotto di scarto (xantina, acido urico, allantoina o acido allantoico, urea o ammonio) [2, 4]. **(Figura 2)** La perdita di funzione dell'urato ossidasi, nell'uomo, ha portato ad un aumento della concentrazione di acido urico nel sangue e alla manifestazione di alcune patologie quali la gotta e i calcoli renali.

Il significato evolutivo della perdita di funzione di alcuni geni importanti per la degradazione delle purine non è stato ancora ben chiarito, nonostante siano state formulate diverse ipotesi in grado di spiegare i potenziali benefici dell'aumento della concentrazione di acido urico nel sangue.

L'acido urico e l'allantoina sono considerati degli antiossidanti e pertanto possono svolgere un ruolo importante nella riduzione degli effetti dei radicali liberi. È stato dimostrato che l'acido urico, nell'uomo, è responsabile di più del 50% dell'attività antiossidante presente nel sangue [5, 6], grazie alla capacità di chelare alcuni metalli come ferro e rame rendendoli poco reattivi e prevenendo la formazione di radicali liberi. Per tale motivo è stato ipotizzato che l'acido urico agisca come fattore protettivo a livello cerebrale contro lo stress ossidativo e per tale motivo sia coinvolto nella prevenzione di alcune malattie neurodegenerative. È stato riscontrato, ad esempio, che alcune forme di sclerosi non sono mai state osservate in pazienti affetti da gotta [5, 6]. La formula chimica dell'acido urico è molto simile a quella della caffeina, e pertanto potrebbe essere coinvolto in qualche processo cognitivo. È stato infine dimostrato da differenti studi evolutivisti che la perdita di funzione dell'uricasi ha coinciso con un aumento delle dimensioni cerebrali degli ominidi [5, 6].

Tra i batteri questa via metabolica risulta essere molto diversificata. Studi di genomica comparativa tra diverse specie batteriche dimostrano che batteri aerobici e anaerobici utilizzano strategie diverse, comprendenti l'utilizzo di differenti intermedi di reazione, durante il catabolismo delle purine. La degradazione aerobica delle purine è stata estesamente studiata, rivelando la

coincidenza di alcuni enzimi e intermedi di reazione identificati negli organismi eucariotici. Rispetto agli organismi eucariotici, tra i batteri c'è una maggiore diversificazione degli enzimi, alcuni dei quali non sono stati tuttora identificati. La via di degradazione anaerobica non è stata ancora compresa e gli enzimi coinvolti sono tuttora sconosciuti a livello molecolare, nonostante siano stati identificati gli intermedi di reazione [7].

1.2 Degradazione delle purine: Pathway metabolico

Il pathway metabolico che riguarda le basi puriniche libere può essere suddiviso in due parti: nella prima parte sono presenti gli enzimi responsabili del riciclo delle purine, mentre nella seconda parte quelli responsabili della degradazione. Gli enzimi presenti nel primo gruppo catalizzano la conversione dei nucleosidi monofosfato purinici a composti intermedi che possono o essere trasformati in xantina e avviati verso la via di degradazione, oppure recuperati e convertiti nuovamente in nucleosidi monofosfato. **(Figura 3)** In generale i nucleosidi monofosfato sono inizialmente convertiti in nucleotidi da una nucleotidasi, e successivamente possono andare incontro a una deaminazione (adenosina deaminasi, guanosina deaminasi) per essere quindi convertiti in inosina (l'adenosina) o xantosina (la guanosina), seguita dall'idrolisi del legame con il ribosio per la liberazione di ipoxantina o xantina. L'ipoxantina può subire due destini diversi: essere riconvertita a inosina monofosfato ed essere riutilizzata, oppure essere ossidata a xantina dalla xantina ossido riduttasi (XOR). La guanosina può non essere deaminata ed essere convertita in guanina che può essere riutilizzata oppure degradata a xantina dalla guanina deaminasi [8, 9].

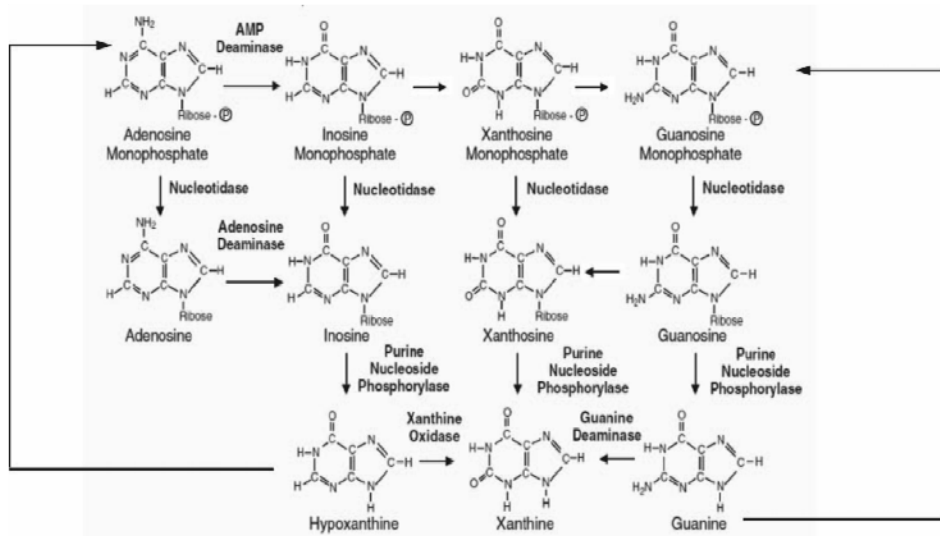


Figura 3 Biosintesi della Xantina e riciclo delle purine.
 (Figura adattata da Navolanic, et al. [10].)

Gli enzimi presenti nella seconda parte del pathway (**Figura 4**), sono coinvolti nella degradazione della xantina a glicosilato. In generale, specie appartenenti a gruppi tassonomici diversi hanno un set di enzimi comuni in alcune parti del pathway ma differente in altre. Numerosi studi sono stati condotti con l'obiettivo di delineare meglio il pathway nei diversi organismi. Nelle piante esso risulta essere suddiviso in tre diversi compartimenti cellulari: la xantina deidrogenasi è localizzata nel citoplasma ed è responsabile della sintesi dell'acido urico; l'acido urico viene successivamente trasportato nel perossisoma dove viene convertito ad allantoina dagli enzimi uricasi e allantoina sintasi [11]; l'allantoina è quindi convertita a glicosilato nel reticolo endoplasmatico [12]. Negli animali, non sono stati trovati enzimi coinvolti in questo pathway nel reticolo endoplasmatico. La localizzazione subcellulare risulta essere più variegata nelle diverse specie e si alterna tra citoplasma, mitocondrio e perossisoma [13].

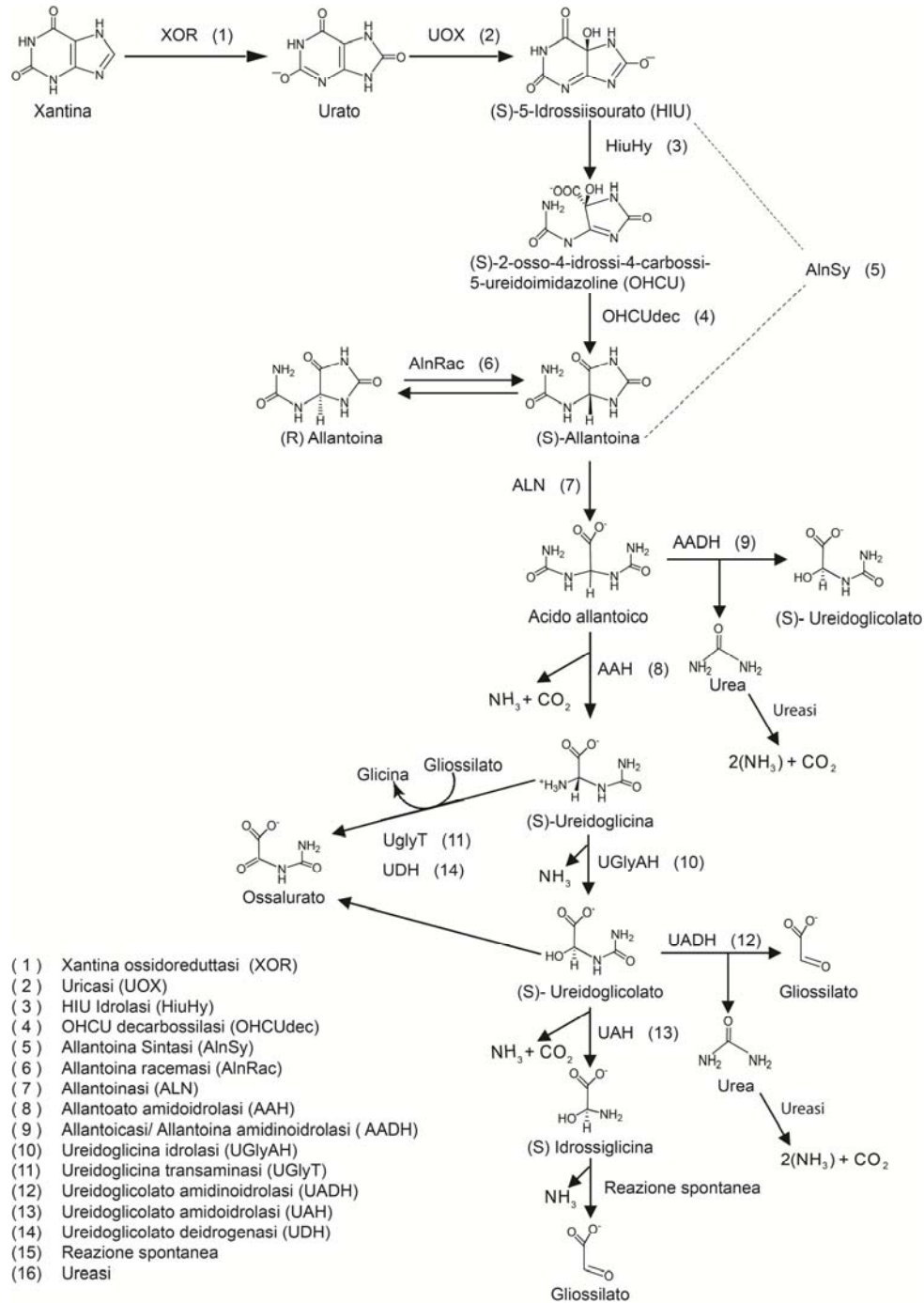


Figura 4 Pathway di degradazione delle purine.

1.2.1 Xantina ossidoreduttasi (XOR) (1)

La xantina ossidoreduttasi è un enzima chiave della degradazione delle purine ed è responsabile dell'ossidazione dell'ipoxantina a xantina e di quest'ultima ad acido urico. (Figura 5)

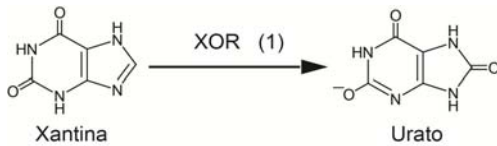


Figura 6. Reazione enzimatica della xantina ossidoreduttasi

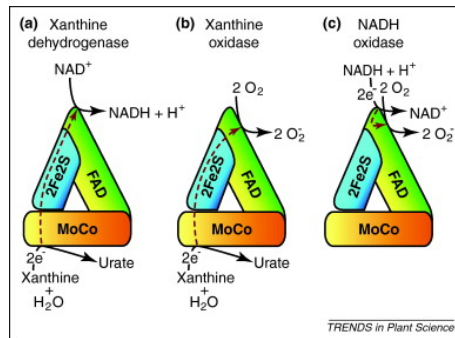


Figura 5. Dominio e meccanismo di reazione delle differenti attività enzimatiche catalizzate dalla Xantina ossido riduttasi.
Werner, A.K., and Witte, C.P. (2011)[2]

La xantina ossidoreduttasi è un enzima largamente studiato in quanto nell'uomo è bersaglio di alcuni farmaci per la terapia contro la gotta e l'iperuricemia [14]. L'enzima è composto da 2 centri ferro-zolfo (Fe-S), un sito di legame per il FAD, e un sito di legame per il molibdeno. (Figura 6) Esiste in tre forme: xantina deidrogenasi (XDH;EC1.17.1.4.), xantina ossidasi (XO;EC1.17.3.2), NADH ossidasi. XDH utilizza il NAD+ come accettore di elettroni, XO utilizza l'ossigeno mentre la NADH ossidasi il NADH. Negli animali l'enzima originale esiste nella forma XDH che può essere irreversibilmente convertita a XO, [15] mentre l'attività NADH ossidasi è stata riscontrata su entrambe le forme [16].

Al contrario degli animali, le piante mancano della forma XO [17]. E' stato dimostrato che gli enzimi di *Arabidopsis thaliana* e di pomodoro (*Solanum lycopersicon*) sono capaci di catalizzare la reazione in assenza di NAD+ utilizzando ossigeno [18] o NADH [19]. In generale le XDH eucariotiche sono composte da due subunità identiche.

Nei batteri la XOR è stata trovata solamente nella forma di XDH e per tanto non è in grado di utilizzare l'ossigeno come accettore di elettroni [20,21]. In alcuni batteri anaerobici (*Clostridium acidurici*, *Clostridium cylindrosporium*, *Clostridium purinilyticum*, *Enterococcus faecalis* ed *Eubacterium barkeri*) è stato dimostrato che il selenio è richiesto come cofattore indispensabile, in aggiunta al molibdeno, all'attività della XDH[22]. Le XDH batteriche sono molto eterogenee e possono essere composte da diverse subunità e da diversi cofattori [23].

Enzima	Organismo	Peso molecolare	Composizione subunità	Referenza
XDH	<i>Pseudomonas putida 86</i>	550 Kda	$\alpha_4 \beta_4$	[23]
XDH	<i>Comamonas acidovorans</i>	287 Kda	$\alpha_2 \beta_2$	[21]
XDH	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	275 Kda	$\alpha_2 \beta_2$	[24]
XDH	<i>Veillonella atypica</i>	125 Kda	$A\beta\gamma$	[25]
XDH	<i>Eubacterium Barkery</i>	530 Kda	$\alpha_4\beta_4 \gamma_4$	[26]
XDH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	290 Kda	α_2	[19]
XDH	<i>Solanum lycopersicon</i>	300 Kda	α_2	[27]
XDH	Animal	300 Kda	α_2	[15]

Tabella 1 Caratteristiche principali di alcune xantina ossidoreduttasi di batteri, animali, e piante.

1.2.2 Conversione dell'acido urico ad allantoina. (2-5)

Molti batteri e organismi eucariotici possono ossidare l'acido urico ad allantoina tramite l'utilizzo dell'uricasi o urato ossidasi (UOX; EC 1.7.3.3) ed altri due enzimi HIU idrolasi e OHCI decarbossilasi. Sono conosciuti tre tipi di enzimi diversi capaci di catalizzare questa reazione. L'uricasi classica catalizza l'ossidazione dell'acido urico a (S)-idrossiisourato (HIU) senza il bisogno di alcun cofattore, riducendo l'ossigeno a perossido d'idrogeno [28]. Una seconda forma meno diffusa (HpxO) è presente solo in alcuni batteri e utilizza il FAD come cofattore per catalizzare la stessa reazione [29]. Recentemente è stata identificata una terza forma che non presenta nessuna omologia con i precedenti enzimi studiati ed è NADH/NADPH dipendente (HpyO) {Magalie Michiel Nadia Perchat, 2012 #161}. Per lungo tempo si è ipotizzato che UOX catalizzasse direttamente la conversione ad allantoina, in quanto l'HIU è un composto instabile che si decompone spontaneamente in 2-ossido-4-idrossi-4-carbossi-5-ureido imidazolina (OHCU) che si degrada formando allantoina racemica. Il reale prodotto della reazione è stato identificato solo in seguito ad analisi ^{13}C -NMR [30]. L'enzima risulta essere sempre presente nelle piante, in alcuni batteri, in diversi mammiferi ma non nell'uomo. **(Figura 7)** La presenza dell'uricasi permette ad altri organismi di convertire l'acido urico a composti più solubili e facilmente eliminabili. Nell'uomo e negli altri primati il gene codificante l'uricasi è stato inattivato da due mutazioni che portano a una traduzione parziale della proteina [31]. E' stato osservato che con efficienza minore l'acido urico può essere degradato anche dalla perossidasi [32, 33].

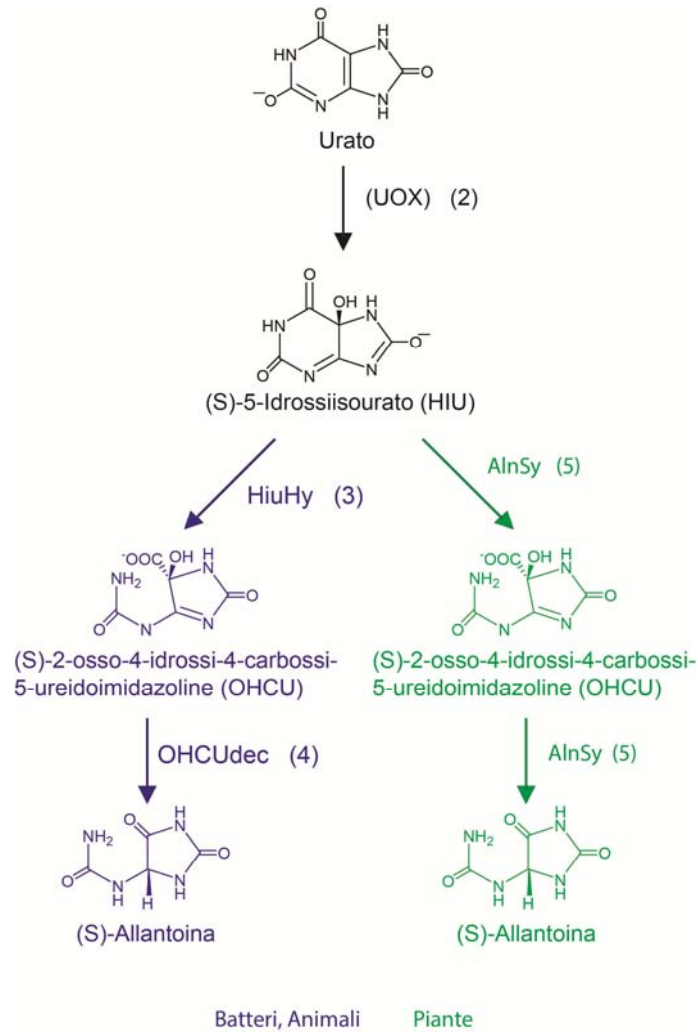


Figura 7. Degradazione da acido urico a Allantoina.

Nel 2006 sono stati identificati due nuovi enzimi eucariotici in grado di convertire enzimaticamente l'HIU a OCHU e l'OHCU ad S-allantoina. Il gene codificante per una HIU idrolasi (HiuHy; EC:3.5.2.17) è stato per la prima volta identificato in *Glycine max* [34] e successivamente in topo grazie a uno studio di genomica comparativa. Nello stesso studio è stato scoperto anche il gene codificante il gene per l'OHCU decarbossilasi (OHCUdec; EC 4.1.1.n1) che ha permesso di completare il pathway di degradazione da acido urico a allantoina [4]. Recentemente in *Arabidopsis thaliana* è stata identificata l'allantoina sintasi (ALNSy), un enzima

bifunzionale che contiene fusi tra loro entrambi i geni dell'HIU idrolasi e della OHCU decarbossilasi [11, 35, 36]. Studi condotti *in silico* e su colture cellulari dimostrano che piante e animali mostrano una localizzazione perossisomiale degli enzimi coinvolti nella degradazione dell'acido urico ad allantoina [4, 11, 37]. I geni codificanti per HIU idrolasi, OHCU decarbossilasi, e uricasi sono stati trovati anche in funghi, metazoi e batteri. Nei batteri sono stati studiati gli enzimi di *Salmonella dublin* [38] e *Klebsiella pneumoniae* [39, 40]. (**Figura 7**)

1.2.3 Allantoinasi e Allantoina racemasi (6, 7)

L'allantoinasi (ALN; EC 3.5.2.5) converte la (S)-allantoina ad acido allantoico. L'allantoina e l'acido allantoico sono classificati come ureidi e sono dei metaboliti di notevole importanza per le piante in quanto svolgono il ruolo di molecole di trasporto dell'azoto dai noduli radicali alle foglie, oppure per la mobilitazione dell'azoto nei vari tessuti.

Le ALN conosciute in seguito a studi di omologia possono essere distinte in due gruppi, uno simile alle diidroorotasi e idantoinasi metallo dipendente (Dal1 omologhi) e un secondo simile alle polisaccaride deacetilasi che non richiede alcun metallo come cofattore (puuE omologhi). Il primo gene identificato codificante l'enzima è DAL1 di *Saccharomyces cerevisiae* [41]. Appartenenti allo stesso gruppo sono stati studiati omologhi in insetti, anfibi e batteri [42-46]. Negli animali la localizzazione risulta essere varia: nei pesci è citosolica o perossisomiale mentre negli anfibi è mitocondriale [13]. Studi sulla metallo dipendenza condotti su *Escherichia coli* dimostrano che lo zinco è in grado di attivare e rendere stereospecifico l'enzima [47], altri studi col cobalto mostrano invece la capacità dell'enzima di degradare con minore efficienza anche la (R)-allantoina[46], mentre sulle piante è stato osservato che il manganese è in grado di stimolarne l'attività [2]. (**Figura 8**)

Il secondo gruppo, scoperto solo recentemente in *Pseudomonas fluorescens*, è molto diffuso tra i batteri (65% delle allantoinasi batteriche sono omologhi di puuE) e scarsamente rappresentato nei funghi (**Figura 8**) [48].

Alcuni microorganismi sono in grado di crescere su allantoina. L'allantoina è un composto che tende a racemizzare spontaneamente [49] e l'allantoinasi è stereospecifica per la (S)-allantoina. Questo porterebbe alcuni microorganismi a poter utilizzare solo una parte dell'allantoina presente in natura come fonte di

azoto. Per ovviare a questo problema alcuni microorganismi hanno presente nel genoma l'allantoina racemasi (AlnRac; EC 5.1.99.3) capace di convertire la (*R*)-allantoina in (*S*)-allantoina e viceversa [50] (**Figura 8**) Nelle piante è stato osservato un piccolo accumulo di (*R*)-allantoina dovuto alla racemizzazione spontanea di questo composto. La racemizzazione spontanea dell'allantoina è all'equilibrio. Pertanto la forma *R* viene spontaneamente convertita in *S* evitando un l'accumulo di elevate concentrazioni di (*R*)-allantoina [2].

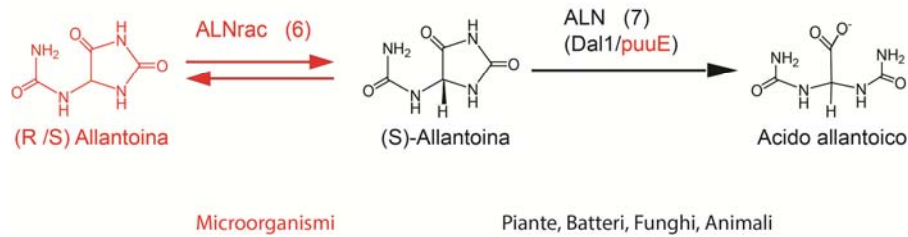


Figura 8. Schema delle reazioni catalizzate da allantoineasi e della allantoine racemasi e la distribuzione dei relativi enzimi nei diversi organismi.

1.2.4 Catabolismo delle ureidi e il recupero dell'azoto: conversione da acido allantoico ad ureidoglicolato (8-11)

Nella degradazione dell'acido allantoico a gliossilato si ha un graduale rilascio di ammonio, anidride carbonica o urea (degradata ad ammonio e anidride carbonica dall'ureasi) composti utilizzati da piante e batteri per incorporare l'azoto in nuove molecole.

L'idrolisi dell'acido allantoico può avvenire ad opera di due enzimi: allantoicasi e allantoato amidoidrolasi. L'allantoicasi (AADH; EC 3.5.3.4), chiamata anche allantoato amidinoidrolasi, porta alla sintesi di (*S*)-ureidoglicolato e urea [51]. È un enzima manganese dipendente (ma può essere attivato anche da altri ioni bivalenti) ed è in grado inoltre di idrolizzare l'*R*-ureidoglicolato a urea e gliossilato (in *Pseudomonas aeruginosa*) [7]. Risulta essere presente in batteri, pesci, anfibi, e funghi [52]. (**Figura 9**)

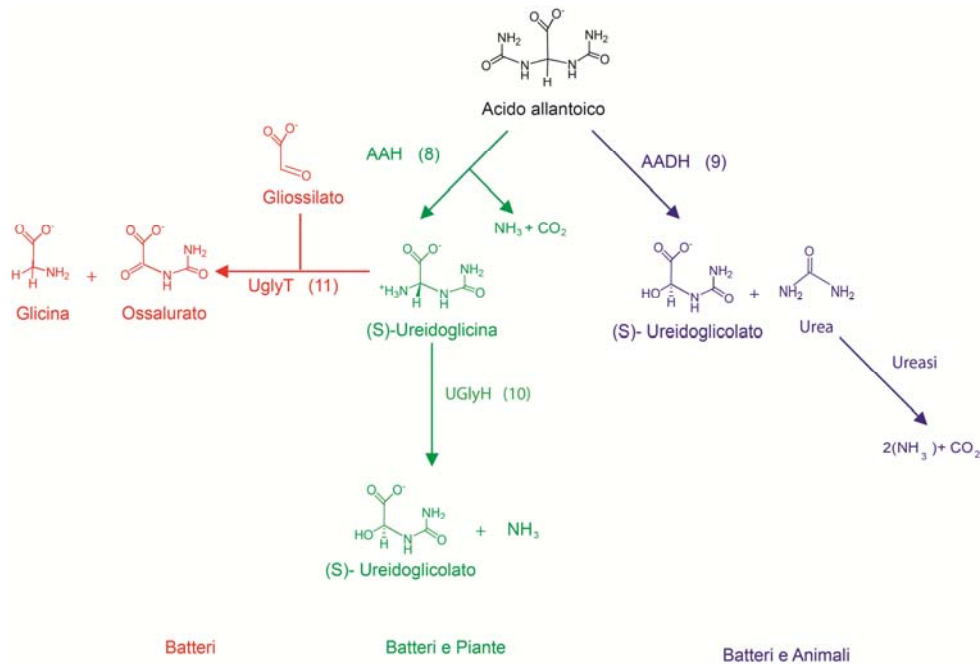


Figura 9 Degradazione dell'acido allantoico a ureidoglicolato. Distribuzione nei vari organismi.

Nelle piante e in numerosi batteri è presente l'allantoato amidoidrolasi (AAH; EC 3.5.3.9), un enzima manganese dipendente, che idrolizza l'acido allantoico a ureidoglicina rilasciando CO₂ e ammonio [2, 7, 53-55].

Negli organismi del regno vegetale la degradazione dell'allantoina a gliosilato è localizzata nel reticolo endoplasmatico [12, 56, 57]. Recenti studi suggeriscono che nelle piante *Glycine max* (Soia) e *Camellia sinensis* (Tea), potrebbe esserci un pathway alternativo coinvolto nella degradazione dell'allantoato che porterebbe al rilascio di urea e non di ammonio (reazione simile all'allantoicasi), attivo quando la crescita avviene con limitate risorse d'acqua. Il gene responsabile di questo metabolismo non è stato ancora identificato in quanto analisi *in silico* non mostrano proteine omologhe alla classica allantoicasi [54, 58, 59].

Studi di genomica comparativa dimostrano che l'allantoato amidoidrolasi nelle piante e in alcuni batteri è spesso associata all'ureidoglicina amidoidrolasi (YlbA, At_UGlyAH), un enzima manganese dipendente e localizzato nel reticolo endoplasmatico che catalizza l'idrolisi dell' (S)-ureidoglicina a (S)-Ureidoglicolato. L'(S)-ureidoglicina è una molecola instabile che si degrada spontaneamente a ureidoglicolato [12, 57].

Nei batteri è presente un'altra via alternativa che porta alla sintesi dell'ossalurato a partire da (S)-ureidoglicina. L'ureidoglicina transaminasi è tipica di batteri intestinali o del suolo e catalizza la transaminazione dell'ureidoglicina a gliossilato per produrre glicina e ossalurato [60].

1.2.5 Catabolismo delle ureidi e il recupero dell'azoto: conversione dell'ureidoglicolato a gliossilato. (12-14)

L'ureidoglicolato è un composto instabile che si degrada spontaneamente a gliossilato e urea.

Sono presenti tre enzimi capaci di degradare l'ureidoglicolato.

L'ureidoglicolato deidrogenasi (AIIID EC 1.1.1.154) catalizza l'ossidazione dell'ureidoglicolato a ossalurato. La reazione avviene utilizzando il NADH come cofattore [61, 62]; **(Figura 10)**

L'ureidoglicolato amidoidrolasi (UAH; EC 3.5.3.19) è un enzima manganese dipendente, localizzato nel reticolo endoplasmatico nelle cellule vegetali, capace di convertire l'ureidoglicolato in 2 molecole di ammonio e una di anidride carbonica passando per gli intermedi idrossiglicina e carbammato, composti che si degradano spontaneamente. L'enzima non è ancora stato trovato in organismi differenti dalle piante [2, 57]. **(Figura 10)**

L'ureidoglicolato amidinoidrolasi nota anche come ureidoglicolato urea liasi (AIIA; EC 4.3.2.3) è presente soprattutto nei batteri e nei funghi, è stata scoperta in seguito a degli studi genetici [62] e successivamente caratterizzata dal punto di vista biochimico e cristallizzata. L'enzima catalizza la conversione enzimatica dell'(S)-ureidoglicolato a gliossilato e urea [63, 64]. **(Figura 10)** Anche nelle piante, in particolare nei legumi, sono stati caratterizzati dal punto di vista biochimico degli enzimi che *in vitro* sono in grado rilasciare urea in seguito alla degradazione dell'ureidoglicolato [65, 66].

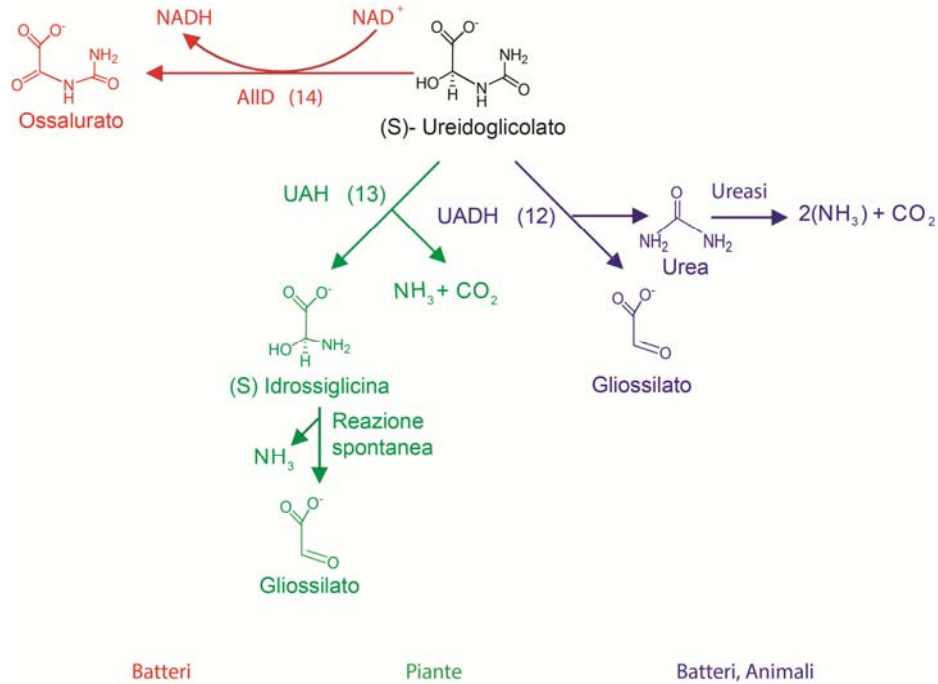


Figura 10. Degradazione dell'acido Allantoico a gliossilato , distribuzione nei diversi organismi viventi.

Come descritto in precedenza, in alcuni organismi, durante la degradazione delle ureidi è prodotta urea, che può essere escreta o convertita in ammonio e anidride carbonica da un enzima chiamato ureasi. Gli organismi ureolitici si dividono in due gruppi: un primo gruppo utilizza l'ureasi, un enzima nichel dipendente capace di idrolizzare l'urea, comprende organismi come le piante, organismi superiori, la maggior parte dei batteri e dei funghi [67]. Un secondo gruppo, meno comune del precedente, è presente in alcuni tipi di alghe, funghi e batteri, ed utilizza gli enzimi urea carbossilasi e allofanato idrolasi responsabili rispettivamente della reazione di carbossilazione ATP dipendente che trasforma l'urea in allofanato e della successiva idrolisi dell'allofanato ad ammonio e anidride carbonica [68]. **(Figura 11)**

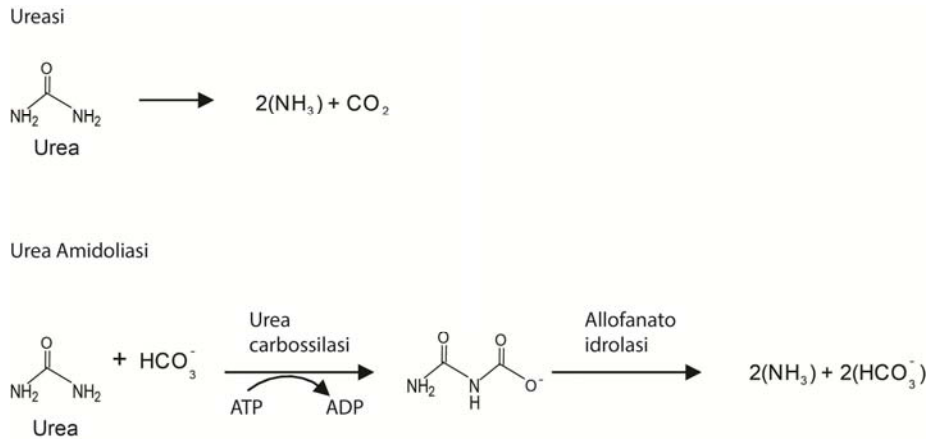


Figura 11. Differenti strategie per la degradazione dell'urea.

1.2.6 Degradazione anaerobica delle purine

E' stato dimostrato che differenti batteri intestinali, o batteri anaerobici stretti, sono in grado di utilizzare le purine come fonte di azoto e carbonio con una strategia differente rispetto alla via aerobica. I geni coinvolti in questo pathway non sono ancora stati identificati, ma sono stati scoperti alcuni degli intermedi coinvolti in questa nuova via di degradazione. I primi esperimenti per l'identificazione degli intermedi che si originano da questa via metabolica sono stati effettuati su *Clostridium acidurici* e *Clostridium cylindrosporium*, batteri mancanti di attività uricasica ma capaci di crescere in acido urico. E' stato dimostrato che la xantina deidrogenasi di questi organismi converte l'acido urico a xantina che viene successivamente degradata ad altri intermedi diversi da quelli noti nella via aerobica. Gli intermedi, 4-Ureido-5-imidazolo-acido carbossilico, 4-amino-5-imidazolo-acido carbossilico, 4-aminoimidazolo, 4-imidazolone e formiminoglicina sono stati rilevati utilizzando dei composti marcati durante la crescita batterica e con saggi di attività condotti sugli estratti [7, 69-73]. **(Figura 12)**

Gli studi su questa via metabolica non sono stati ancora approfonditi e i geni coinvolti non sono stati ancora identificati.

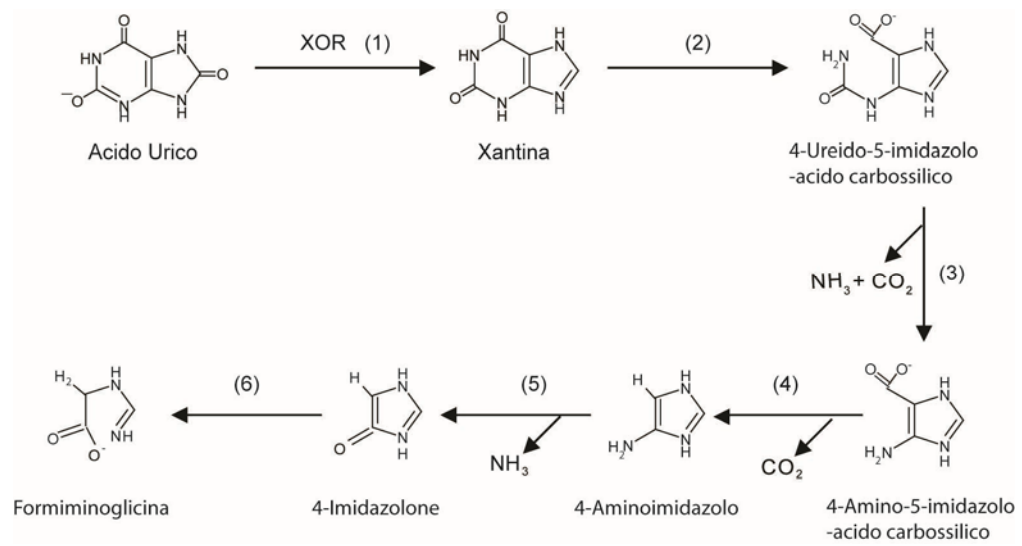


Figura 12 Composti coinvolti nella degradazione anaerobica delle purine.

1.3 Scopo del progetto

L'obiettivo di questo lavoro è comprendere alcuni aspetti non ancora chiariti del pathway di degradazione delle purine.

1. L'acido urico è un composto che viene degradato per 1/3 a livello intestinale mentre il resto viene escreto a livello renale. Il lavoro ha come obiettivo quello di identificare microorganismi da utilizzare come probiotici per la prevenzione dell'iperuricemia. Tramite ricerche *in silico* sono stati ricercati geni codificanti per enzimi e trasportatori coinvolti nel catabolismo delle purine in microorganismi tradizionalmente usati come probiotici e nel microbioma umano. Infine, è stata testata la capacità di *E.coli* di degradare l'acido urico in anaerobiosi.
2. La perossidasi di *Armoracia rusticana* (rafano) è in grado di degradare l'acido urico a composti simili a quelli documentati per l'uricasi[33]. Ci si è chiesti se la reazione catalizzata dalla perossidasi fosse stereospecifica come quella dell'uricasi, e se gli enzimi HIUhy (3) e OHCUdec (4) di *Danio rerio*, recentemente caratterizzati dal punto di vista biochimico [4], sono stereospecifici o sono in grado di degradare entrambi gli enantiomeri.
3. Si è caratterizzato l'enzima allantoina racemasi di *Pseudomonas fluorescens*. L'enzima risulta essere omologo all'enzima di *Klebsiella pneumoniae* [50] ma presenta alcune differenze nel sito attivo.
4. Si è caratterizzato l'enzima allantoina idrolasi di *Agrobacterium tumefaciens* e comparazione dell'attività con l'enzima UGlyAH(10) di *Arabidopsis thaliana* [12].
5. Si è studiata la metallo dipendenza dell'enzima ureidoglicolato amidinoidrolasi UADH (12) di *Escherichia coli* [62, 64].

Capitolo 2:

Studi di genomica comparativa per la ricerca di geni coinvolti nel catabolismo delle purine in microorganismi probiotici e nel microbioma umano.

2.1 Introduzione

Nell'intestino umano sono presenti tra 500 e 1000 differenti microorganismi (per la maggior parte batteri anaerobici) responsabili della degradazione o sintesi di sostanze utili. I batteri contribuiscono alla sintesi di alcune vitamine, amminoacidi e alla degradazione di alcuni xenobiotici giocando un ruolo cruciale per il miglioramento della salute umana [74]. Per tale motivo oggi sono molto diffusi preparati contenenti microorganismi vivi (probiotici) che hanno l'obiettivo di modificare parzialmente la flora batterica intestinale, apportando dei benefici alla salute dell'uomo. Per tale motivo potrebbe essere interessante studiare la capacità di microrganismi probiotici e residenti nell'intestino umano di metabolizzare l'acido urico col fine di utilizzarli nella prevenzione dell'iperuricemia.

L'acido urico nell'uomo è eliminato per 2/3 per via renale e per 1/3 per via intestinale [75, 76, 77]. Attualmente gli approcci terapeutici per la cura dell'iperuricemia della gotta e della sindrome di lisi tumorale sono differenti:

- Inibitori della XDH (1) come l'allopurinolo e il Febuxostat (farmaci uricostatici) evitano la sintesi dell'acido urico e ne riducono il livello nel sangue. Questa classe di farmaci presenta problematiche in pazienti affetti da insufficienza renale, possibili forme di ipersensibilità, attacchi di gotta in acuto e altri effetti collaterali.
- L'uricasi UOX (2), (Rasburicasi di lievito) degrada l'acido urico portando alla formazione di allantoina, un composto più solubile e facilmente eliminabile (farmaci uricolitici). Il vantaggio di questa classe di farmaci è che riducono rapidamente le concentrazioni di acido urico nel sangue ma, trattandosi di proteine non umane, possono dare gravi reazioni allergiche e il trattamento ripetuto non è consigliabile.
- Inibitori dei trasportatori coinvolti nel riassorbimento dell'acido urico a livello renale (farmaci uricosurici) ne favoriscono l'eliminazione tramite le urine. Questa classe di farmaci presenta delle problematiche nella somministrazione a pazienti che soffrono di insufficienza cardiaca, causando l'acutizzarsi di fenomeni di gotta e di calcoli renali nelle prime fasi di trattamento ed effetti collaterali come nausea, vomito, diarrea, dolore epigastrico ed altri disturbi meno frequenti.

Le strategie comunemente utilizzate risultano essere efficaci per il trattamento della gotta, dell'iperuricemia e della sindrome da lisi tumorale, ma in base alla patologia e ai pazienti trattati sono stati riscontrati degli effetti collaterali.

Un'altra strategia che non è stata ancora considerata è quella di potenziare l'eliminazione dell'acido urico per via intestinale. In questo distretto, una parte dell'acido urico viene eliminato nelle feci, mentre l'altra parte è degradata dai batteri intestinali [75].

Oggi, gli organismi probiotici sono spesso utilizzati per la prevenzione e cura di diverse patologie; per tale motivo la conoscenza approfondita del microbiota intestinale unita a quella del catabolismo delle purine potrebbe portare alla selezione di nuovi ceppi probiotici e allo sviluppo di un buon metodo per lo *screening* di nuovi batteri utilizzabili per la prevenzione dell'iperuricemia. Al fine di raggiungere lo scopo è di cruciale importanza conoscere sia gli enzimi coinvolti nelle diverse reazioni del pathway che i trasportatori in quanto sono le porte d'ingresso dell'acido urico e altri intermedi del catabolismo delle purine all'interno dei microorganismi.

2.1.3 Trasportatori per le purine e le ureidi.

I trasportatori per le purine sono stati identificati per la prima volta nei funghi ma presentano omologhi in piante, batteri e organismi superiori. Attualmente sono conosciuti 6 tipi differenti di trasportatori per gli intermedi del metabolismo delle purine: Azga è specifico per l'ipoxantina e adenina, ma ha una ridotta affinità per guanosina e guanina; FcyB specifico per ipoxantina, guanina, adenina, citosina; UAPA specifico per acido urico e xantina; UAPC abile a trasportare tutte le purine; Dal4 per l'allantoina; infine Dal5 per l'acido allantoico.

FcyB appartiene alla famiglia NCS1 (*nucleobase-cation-symport-1*) nei genomi batterici risulta spesso essere associato a enzimi coinvolti nel salvataggio dei nucleotidi [78-80].

Le permeasi UAPA, UAPC e Azga sono classificati come NAT (*Nucleobase-ascorbate-transporter*) o NCS2 (*nucleobase-cation-symport-2*). (**Figura 13**)

La famiglia è rappresentata in tutte le specie e contiene tre tipi di trasportatori: purine e purine ossidate, pirimidine e L-ascorbato presente solamente nei

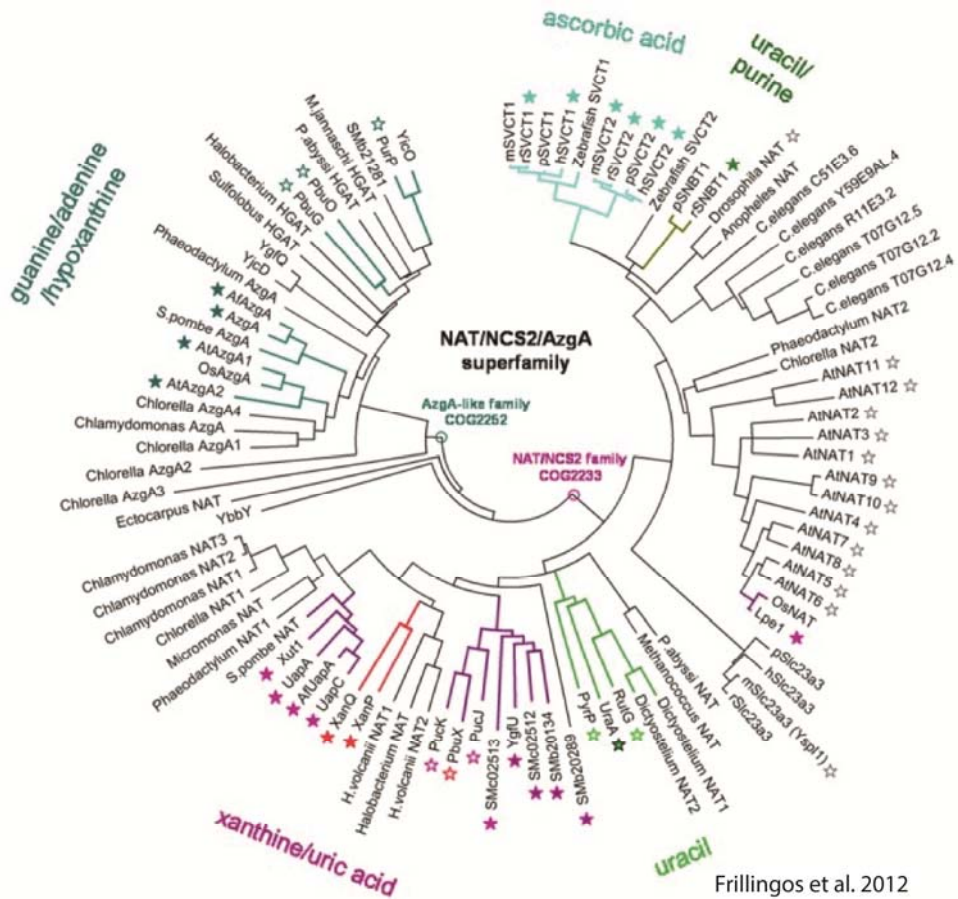
mammiferi. Permeasi appartenenti a questa famiglia sono stati studiati in numerosi organismi *Aspergillus nidulans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.

In *Escherichia coli*, uno dei batteri in cui i trasportatori sono maggiormente studiati, sono stati identificati diversi geni appartenenti a questa famiglia:

- UraA e RutG sono dei trasportatori per l'uracile inseriti in due contesti genomici differenti ma entrambi coinvolti nel catabolismo delle purine [81, 82].
- Xanq (YgfO) e XanP(YicE) sono delle permeasi per la xantina. Studi su contesti genomico mostrano che Xanq è vicino a geni codificanti per XDH mentre YicE è localizzato in prossimità di proteine ipotetiche [3, 83].
- UacT (YgfU) è un trasportatore a grande efficienza per l'acido urico e bassa efficienza per la xantina ed è localizzato nello stesso contesto genomico di YgfO [84]. Studi di mutagenesi condotti su Xanq e UacT hanno messo in evidenza dei motivi importanti per la selettività dei trasportatori.
- likeAzga sono dei trasportatori per ipoxantina e adenina che non sono stati molto studiati in *E.coli*, ma per omologia sono stati identificati i geni YgfQ e Yjcd.

In lievito e in altri organismi sono stati identificati i geni Dal4 (un trasportatore per l'allantoina) e Dal 5 (un trasportatore per l'acido allantoico) [85, 86].

Una parte di questo lavoro comprenderà la classificazione dal punto filogenetico dei trasportatori col fine di riuscire a classificarli e prevederne la funzione mediante analisi bioinformatiche. Tali indagini sono state svolte su trasportatori presenti sia nei microorganismi residenti nell'intestino tramite l'analisi del microbiota umano che su organismi probiotici.



Frillingos et al. 2012

Figura 13 Filogenesi dei trasportatori NAT/NCS2. (Frillingos) [87].

L'albero filogenetico mostra una varietà di funzioni che sono attribuibili ai trasportatori appartenenti alla famiglia NAT. In particolare possono essere distinte due diverse grandi famiglie le *AzgA-like* (COG2252) e le NAT/NCS2 (COG2233). Entrambe le famiglie condividono lo stesso folding. L'albero è stato costruito utilizzando tre tipi differenti di sequenze: trasportatori la cui attività è stata determinata l'attività sperimentalmente indicate con gli asterischi colorati; trasportatori dei quali l'attività è stata dedotta in seguito a studi genetici o genomici indicati con gli asterischi vuoti; i trasportatori omologhi a *Drosophila melanogaster* e *Arabidopsis thaliana* nei quali sono stati condotti degli studi genetici ma la loro funzione rimane sconosciuta sono indicati con un asterisco grigio vuoto; infine trasportatori trovati tramite una ricerca di omologia rappresentanti i maggiori *taxa*. Sono stati utilizzati diversi colori per indicare la funzione dei trasportatori noti: i trasportatori per acido urico/ xantina sono indicati in porpora, quelli specifici per la xantina in rosso, uracile in verde, uracile/purine verde scuro, L-ascorbato in celeste e adenina/guanina/ipoxantine in blu.

2.1.2 Probiotici

I probiotici sono definiti come dei microorganismi che causano benefici agli ospiti. Oggi, il loro effetto benefico è stato ampiamente documentato per diverse patologie riguardanti il tratto gastro-intestinale, il sistema immunitario, protezione contro tumori al colon, riduzione del colesterolo, controllo della pressione arteriosa, intolleranza al lattosio ecc.

Dal punto di vista tassonomico si dividono in batteri lattici (es. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), batteri non lattici e lieviti [88]. I batteri commercialmente usati come probiotici spesso sono comuni ceppi presenti abitualmente nell'intestino per cui sono state sviluppate delle tecniche di produzione industriale. Ad esempio il ceppo Nissle *Escherichia coli* uno dei primi batteri che colonizzano l'intestino nei bambini, è utilizzato per ridurre il numero d'infezioni e sviluppare il sistema immunitario; *Saccharomyces boulardii* e alcuni bacilli sono invece utilizzati come spore e danno benefici contro le infezioni batteriche. Altri possono metabolizzare composti tossici o evitare l'accumulo di alcune sostanze introdotte con la dieta che potrebbero risultare pericolose ad elevate concentrazioni. Ultimamente sono stati effettuati diversi studi con l'obiettivo di comprendere le caratteristiche dei batteri presenti nel microbioma umano che hanno permesso di identificare *Bacteroides dorei*, un microorganismo capace di ridurre i livelli di colesterolo nel sangue [89]. Questo tipo di approccio potrà essere utilizzato in futuro per identificare nuovi ceppi probiotici e sviluppare nuove strategie per il metabolismo di alcune sostanze pericolose per l'uomo.

Durante questo lavoro mi sono occupato di investigare, mediante analisi *in silico*, la presenza di geni coinvolti nel metabolismo dell'acido urico, col fine di comprendere se tra i batteri tradizionalmente usati come probiotici o residenti nell'intestino è presente un buon candidato per lo sviluppo futuro di un prodotto per la prevenzione dell'iperuricemia. La ricerca è stata condotta ricercando su genomi batterici di organismi tradizionalmente utilizzati come probiotici e sulle sequenze del microbioma, recentemente rese disponibili, [74] trasportatori e geni noti essere coinvolti nel catabolismo delle purine dell'acido urico.

2.2 Metodi

2.2.1 Geni, sequenze, batteri e database utilizzati per la ricerca *in silico*

La ricerca *in silico* è stata eseguita utilizzando come “query” le sequenze amminoacidiche di enzimi e trasportatori provenienti da organismi eucariotici o procariotici rappresentativi di tutto il pathway metabolico precedentemente descritto (**Tabella 2**). Le sequenze eucariotiche prese in considerazione come query, non sono esclusive di organismi eucariotici, ma sono state trovate per omologia in diversi batteri noti essere capaci di degradare l'acido urico e i suoi intermedi.

Abbrev.	Funzione	Gene	Organismo	Accession Number	Ref.
Azga	Trasportatore Ipxantina, Adenina, Guanina	Azga	<i>Aspergillus nidulans</i>	CAE00849.1	[90]
fcyB	Trasportatore Purine, Citosina	fcyB	<i>Aspergillus nidulans</i>	ACA81792.1	[80]
UAPA	Acido urico xantina permeasi	UAPA	<i>Aspergillus nidulans</i>	Q07307.3	[91]
UAPC	Acido urico xantina permeasi	UAPC	<i>Aspergillus nidulans</i>	P48777.2	[91]
Dal4P	Allantoina permeasi	Dal4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_012294.1	[85]
Dal5p	Allantoato permeasi	Dal5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_012686.1	[86]
XDH	Xantina deidrogenasi	hxA	<i>Aspergillus nidulans</i>	Q12553.2	[92]
Uox	Uricasi	UaZ	<i>Aspergillus flavus</i>	XP_002377871.1	[93, 94]
Uox perox	Uricasi perossidasi	puLM	<i>Bacillus subtilis</i>	YP_006631346	-
UoxFAD	Uricasi FAD	HpxO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ACF60813.1	[29]
HIUhy	HIU idrolasi	UraH	<i>Mus musculus</i>	NP_084097	[4]
OHCUdec	OHCU decarbossilasi	UraD	<i>Mus musculus</i>	NP_001034767	[4]
ALN	Allantoinasi	Dal1/AlIB	<i>Escherichia coli</i>	ZP_03033830.1	[62]
ALN	Allantoinasi	PuuE	<i>P. fluorescens</i>	ACA50280.1	[48]
AlnRac	Allantoina racemasi	HpxA	<i>P. fluorescens</i>	GQ168939.1	-
AAH	Allantoato amidoidrolasi	AiIC	<i>Escherichia coli</i>	AP_001164.1	[12]
AADH	Allantoicasi	AiC	<i>P. aeruginosa</i>	NP_250206	[7]
UGlyAH	Ureidoglicina idrolasi	Ylba	<i>Escherichia coli</i>	NP_415048.1	[12]
UGlyT	Ureidoglicina amino transferasi	Pucg	<i>Bacillus subtilis</i>	YP_006631354	[60]
UDH	Ureidoglicolato deidrogenasi	AlID	<i>Escherichia coli</i>	BAE76295.1	[62]
UADH	Ureidoglicolato idrolasi	AlIA	<i>Escherichia coli</i>	BAE76283	[62]

Tabella 2. Sequenze query utilizzate durante le ricerche *in silico*

Lo *screening* è stato condotto su 51 genomi di batteri e lieviti completamente sequenziati che sono tradizionalmente utilizzati come probiotici. La ricerca di questi ceppi è stata condotta nella letteratura mentre la ricerca di genomi completi sulla sezione *genome* della banca dati di NCBI disponibile nel sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>. I genomi analizzati appartengono a differenti famiglie e generi di organismi probiotici classificati come Lattobacilli, Bifido batteri, Enterococchi, Leuconstoc, Sporolattobacilli, Streptococchi, Lactococchi, Bacilli, Propionibatteri, *Escherichia coli* e Lieviti. I ceppi utilizzati e la loro classificazione sono riassunti nella **Tabella 3**.

Per la ricerca sul microbioma umano è stato utilizzato il database recentemente disponibile nel sito:

http://genome.wustl.edu/pub/organism/Microbes/Human_Gut_Microbiome/

[74].

Batteri lattici	Bifidobacterium (14 specie)	Streptococcus (3 specie)
	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	<i>S. thermophilus</i> CNRZ1066
Lactobacillus (18specie)	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> ATCC 25527	<i>S. thermophilus</i> LMD-9
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4796	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> AD011	<i>S. thermophilus</i> LMG 18311
<i>L. amylovorus</i> DSM 16698,	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12	Enterococcus (2 specie)
<i>L. amylovorus</i> Nakamura	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BI-04	<i>E. faecalis</i> V583,
<i>L. casei</i> ATCC 334	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 10140	<i>E. faecium</i> DO
<i>L. casei</i> BL23	<i>B. bifidum</i> BGN4	Batteri non lattici
<i>L. crispatus</i> 125-2-CHN	<i>B. bifidum</i> PRL2010	Propionibacterium (1 specie)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	<i>B. bifidum</i> S17	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> CIRM-BIA1
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC BAA-365	<i>B. breve</i> ACS-071-V-Sch8b	Bacillus (6 specie)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i> CFS1	<i>B. breve</i> UCC2003	<i>B. cereus</i> Q1
<i>L.gasseri</i> ATCC 33323	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697	<i>B. cereus</i> ATCC 14579
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 8700:2	<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A	<i>B. clausii</i> KSM-K16
<i>L. plantarum</i> JDM1	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168
<i>L.reuteri</i> 100-23	Lactococcus (4 specie)	<i>B. subtilis</i> Bsn5
<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	Escherichia (1 specie)
<i>L.rhamnosus</i> Lc 705	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	(<i>Eschrichia coli</i> K12) strain Nissle
<i>L.rhamnosus</i> LMS2-1	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403	Saccharomyces (1 specie)
<i>L. rhamnosus</i> MSUIS1	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KF147	<i>S. cerevisiae</i> S288c ; <i>boluwardii</i>
<i>L. salivarius</i> UCC118)	Leuconstoc (1 specie)	Bacteroides (1 specie)
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	<i>Bacteroides dorei</i> CL02T00C15

Tabella 3 Genomi probiotici utilizzati per la ricerca in silico. Nella ricerca sono stati analizzati 42 specie di batteri lattici e 9 specie di batteri non lattici.

2.2.2 Ricerca di geni codificanti per gli enzimi coinvolti nella degradazione dell'acido urico in microorganismi probiotici.

La ricerca dei geni coinvolti nel catabolismo dell'acido urico e delle permeasi è stata effettuata con il programma Blastp disponibile sul sito <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, utilizzando i parametri di default e ricercando genoma per genoma le sequenze d'interesse. Questo metodo può portare all'identificazione di falsi positivi, in quanto proteine omologhe possono aver accumulato differenze tali da giustificare un cambiamento di attività. Per escludere eventuali falsi positivi sono stati pianificati alcuni controlli:

- 1) Ripetere la ricerca di omologia utilizzando come query la sequenza trovata e come banca dati l'organismo della prima query. Se il *match* migliore trovato dal programma è lo stesso della query originale è possibile che la funzione sia conservata (Test del miglior hit reciproco).
- 2) Studio del contesto genomico con *microbesonline* <http://www.microbesonline.org/> per vedere se il gene trovato risultasse essere vicino ad altri geni presenti nel pathway, e se l'associazione tra i geni viene conservata in altri organismi.
- 3) Allineamenti per la ricerca di motivi noti essere importanti per l'attività di enzimi e trasportatori. Gli allineamenti sono stati eseguiti con *ClustalW* e visualizzati con *GeneDoc*.
- 4) La costruzione degli alberi filogenetici è stata realizzata con l'algoritmo di neighbor-joining implementato in *ClustalW*. Gli alberi sono stati visualizzati con *Figtree* [95, 96].

2.2.3 Ricerca di geni codificanti per gli enzimi coinvolti nella degradazione dell'acido urico nel microbioma umano.

Il database contenente le sequenze del microbioma è stato analizzato utilizzando un programma progettato nel nostro laboratorio che permette di automatizzare la procedura di ricerca delle sequenze d'interesse.

Il metodo d'indagine è composto da diversi fasi (**Figura 14**):

- 1) Le sequenze proteiche presenti nel pathway (**Tabella 3**) sono state scontrate utilizzando il programma *tBlastn* con il database del microbioma contenente circa 3.3 milioni di sequenze appartenenti a batteri intestinali. E' stato impostato un valore soglia di E value $<10^{-3}$. In questo modo sono state identificate 3340 sequenze omologhe.
- 2) I geni candidati sono stati sottoposti a un nuovo *Blast* con set di sequenze di riferimento ritenute essere coinvolte nel pathway (set "in-pathway") e con un set di sequenze di riferimento ritenute non essere coinvolte nel pathway (set "out-pathway"). La soglia del valore di E viene diminuita a $<10^{-6}$ e lo score assegnato alle sequenze in-pathway deve essere maggiore di quello out-pathway. Alla fine di questa analisi sono state ottenuti 1367 geni codificanti proteine assegnate al pathway.
- 3) Realizzazione automatica di allineamenti multipli, alberi filogenetici con lo scopo di ricercare motivi funzionali e osservare se vi è una corretta separazione tra le sequenze outgroup e in group [97].

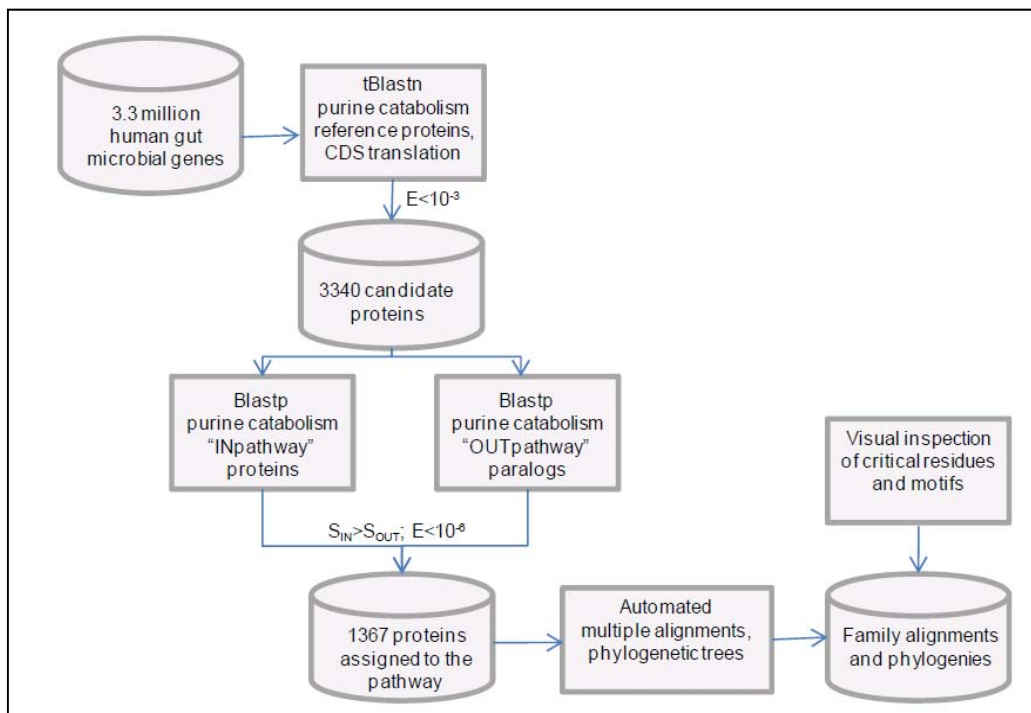


Figura 14 Outline delle analisi bioinformatiche utilizzate per l'identificazione dei geni batterici residenti nell'intestino umano coinvolti nel catabolismo delle purine. (R. Percudani e V. Puggioni, 2010) [97]

2.2.4 Crescita di *Escherichia coli* in xantina e acido urico, e analisi.

Il ceppo AG1 di *Escherichia coli* è stato fatto crescere a 37°C per 5 giorni in anaerobiosi parziale in terreno liquido. L'anaerobiosi parziale è stata ottenuta riempiendo la provetta utilizzata per la crescita sino all'orlo.

Il terreno di coltura è composto da: Na₂HPO₄ (12,8 g/L), KH₂PO₄ (0,123 g/L), NaCl (0,5 g/L), diverse concentrazioni di NH₄Cl (18,7mM (1g/L); 7,5 mM (0,4 g/L); 3,5 mM (0,2g/L), MgSO₄ (1,7 mM), CaCl₂ (0,3 mM), FeSO₄ (1,58 mM), tiamina (0,015 mM); glucosio (1,5%), Na₂MoO₄ (0,9μM), Na₂SeO₃ (0,9 μM).

La fonte di azoto contenuta nel terreno standard è l'ammonio alla concentrazione di 1g/L. In alcuni esperimenti l'ammonio è stato totalmente o parzialmente sostituito con acido urico (1 mM) o Xantina (3 mM) col fine di testare l'abilità di *E.coli* di consumare l'acido urico. Il terreno viene preparato sterilizzando tramite autoclave una soluzione contenente Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NH₄Cl; a parte viene sterilizzata tramite filtrazione una soluzione 80 X contenente MgSO₄, CaCl₂, FeSO₄, tiamina, glucosio, Na₂MoO₄, Na₂SeO₃. Le soluzioni contenenti l'acido urico o la xantina sono sterilizzate in autoclave separatamente.

Sono state condotte diverse analisi sulle cellule in coltura e sul terreno:

- Misurazione della crescita batterica: OD₆₀₀
- Rilevazione della concentrazione di ammonio presente nel terreno mediante il saggio della glutammato deidrogenasi. Un tipico saggio per la misurazione dell'ammonio contiene: Potassio fosfato pH 7.6 (100 mM), α-chetogltarato (2,5 mM), NADH (0,4 mM), Glutammato deidrogenasi(EDH) (420 μg/mL)
- Misura della concentrazione di acido urico o della xantina presente nel terreno. La misura viene eseguita allo spettrofotometro raccogliendo uno spettro compreso tra 200 e 300 nm.

Tutte le misure sono state eseguite con lo spettrofotometro cary 50.

2.3 Risultati

2.3.1 Analisi bioinformatica delle strategie utilizzate da microorganismi probiotici per il catabolismo delle purine.

Le sequenze amminoacidiche di enzimi e trasportatori coinvolti nel catabolismo delle purine (**Tabella 2**) sono state utilizzate come query per identificare sequenze omologhe presenti in genomi batterici tradizionalmente utilizzati come probiotici (**Tabella 3**). I probiotici sono classificati in due grandi gruppi: batteri lattici e non lattici. Le analisi *in silico* mostrano che i due gruppi hanno sviluppato delle strategie differenti per la degradazione delle purine.

Batteri lattici

41 genomi di batteri lattici appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lecunostoc* e *Streptococcus*, sono stati analizzati con *Blast*. Dalle analisi emerge che sono presenti numerose sequenze omologhe di trasportatori della classe NAT/NCS2, ma pochissimi enzimi noti essere coinvolti nel catabolismo delle purine.

I trasportatori UAPA/UAPC-like (xantina/acid urico) trovati con un E value significativo $> 10^{-10}$ sono 68. In seguito a una ricerca di specificità del substrato e allo studio del contesto genomico, è emerso che il 50% dei trasportatori precedentemente identificati è riconducibile al metabolismo delle pirimidine mentre l'altra metà si trova in prossimità di geni coinvolti nel riciclo delle purine. Le sequenze associate ai trasportatori purinici risultano essere adiacenti a geni codificanti per adenilsuccinato liasi e adenina/guanina fosforibosil-transferasi.

Un altro gruppo di trasportatori appartenente sempre alla classe NAT/NCS2 chiamato Azga-like (ipoxantina/adenina/guanina) è presente 42 volte nel genoma dei microorganismi analizzati. Nei genomi le permeasi risultano presenti in multicopia (3 o 4) e il 28% di questi è associato alla deossadenosina/deossiguanosina chinasi, mentre gli altri hanno un contesto genomico variabile, spesso associati con proteine a funzione sconosciuta.

Le sequenze amminoacidiche provenienti da entrambi i gruppi di trasportatori sono state allineate e utilizzate per la realizzazione degli alberi filogenetici. Sugli allineamenti sono stati ricercati i motivi funzionali noti essere implicati nelle selettività del substrato. Le tre analisi sono coerenti tra loro e permettono di

classificare le sequenze in base alla loro ipotetica funzione fisiologica. (Figura 15, Figura 16, Figura 17 e Figura 18)

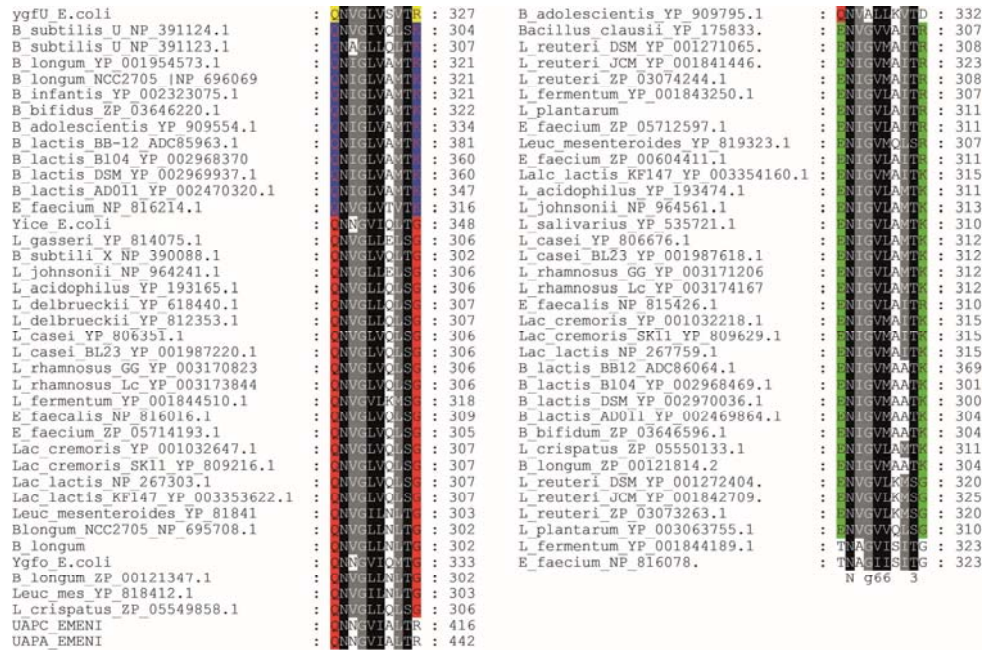


Figura 15 Allineamento del motivo coinvolto nella selettività del substrato nelle sequenze appartenenti alla famiglia NAT/NCS2 presente negli organismi probiotici.

La selettività dei trasportatori appartenenti alla famiglia NAT/NCS è dovuta alla presenza di alcuni residui amminoacidici tra cui pare avere particolare importanza il motivo conservato rappresentato nell'allineamento. (vedi Figura 16) Sono noti 4 tipi differenti di combinazioni che permettono di effettuare una previsione sulla selettività del trasportatore. Le quattro combinazioni sono state evidenziate nel seguente modo: in giallo sono stati colorati i residui identificati in YgfU coinvolti nella selettività per l'acido urico; in blu sono indicati i residui Q e K responsabili della selettività per acido urico o xantina o purine in generale; in rosso sono indicati i residui Q e G responsabili della selettività per xantina/acidourico; infine in verde sono indicati i residui E e R ed E e K spesso trovati associati con il trasporto delle pirimidine. Le due colonne rappresentano lo stesso motivo.

Abbreviazioni: L. (*Lactobacillus*), B. (*Bifidus*) Lac. (*Lactococcus*) Leuc. (*Leuconstoc*) E. (*Enterococcus*).

La ricerca *in silico* condotta sugli enzimi ha mostrato che tra tutti i batteri lattici analizzati è sempre stata trovata una sequenza omologa all'allantoinasi, ma quasi mai sono presenti gli altri enzimi del pathway. Analisi successive relative al contesto genomico hanno messo in evidenza che il gene che presenta omologia con l'allantoinasi è spesso associato al metabolismo delle pirimidine e presenta una maggiore somiglianza con la diidroorotasi.

SVCT1_ <i>R.norvegicus</i>	491	P	N	I	G	V	L	G	I	T	K	500	(ascorbate)
PyrP_ <i>L.lactis</i>	306	E	N	I	G	V	M	A	I	T	K	315	(uracil)
YedG_ <i>E.coli</i>	333	E	N	I	G	V	M	A	V	T	K	340	
UraA_ <i>E.coli</i>	290	E	N	I	G	V	M	A	I	T	R	299	(uracil)
Lpe1_ <i>Z.mays</i>	346	E	N	A	G	L	L	A	V	T	R	355	(uric acid/ xanthine)
UapA_ <i>A.nidulans</i>	445	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	R	458	(uric acid/ xanthine)
UapC_ <i>A.nidulans</i>	407	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	R	416	(uric acid/ xanthine)
Xut1_ <i>C.albicans</i>	386	Q	N	N	G	V	I	S	I	T	K	395	(uric acid/ xanthine)
YgfO_ <i>E.coli</i>	324	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G	333	xanthine
YicE_ <i>E.coli</i>	336	Q	N	N	G	V	I	Q	L	T	G	345	xanthine
PbuX_ <i>B.subtilis</i>	293	Q	N	V	G	L	V	Q	L	T	G	302	(xanthine)
PucJ_ <i>B.subtilis</i>	298	Q	N	A	G	L	L	Q	L	T	K	307	(uric acid)
YcpX_ <i>C.perfringens</i>	169	Q	N	I	G	I	I	S	L	T	K	178	(purine)
YgfU_ <i>E.coli</i>	341	Q	N	V	G	L	V	S	V	T	R	350	
YbbY_ <i>E.coli</i>	306	S	S	I	G	L	L	T	Q	T	G	315	
YgfQ_ <i>E.coli</i>	328	E	S	A	A	G	T	A	A	G	G	337	
YjcD_ <i>E.coli</i>	322	E	S	A	A	G	T	A	A	G	G	331	
YicO_ <i>E.coli</i>	345	E	S	T	S	G	V	A	V	G	G	354	
YieG_ <i>E.coli</i>	318	E	S	S	S	G	V	S	V	G	G	327	

Figura 16 Motivi coinvolti nella selettività del substrato nei trasportatori appartenenti alla famiglia NAT/NCS2. (Karatz et .al 2005)[3].

La diidrorotasi è un enzima coinvolto nella sintesi *de novo* di uracile, citosina e timina. Un'eccezione è rappresentata dalle specie *L. fermentum* e *E. faecalis*. Nel genoma di *L.fermentum*, sono presenti i geni codificanti per enzimi (AAH, UGlyAH e UDH). AAH è responsabile della conversione dell'acido allantoico a ureidoglicina, UGlyAH catalizza quella dell'uridoglicina a ureidoglicolato e UDH converte l'ureidoglicolato a ossalurato. I geni risultano essere localizzati l'uno in prossimità dell'altro insieme ad altre proteine a funzione sconosciuta. In questo genoma non sono stati trovati trasportatori specifici per l'allantoina, ma solamente alcune permeasi appartenenti alla famiglia NAT/NCS2. Le analisi condotte sull'allineamento, mirate a individuare il motivo funzionale selettivo per il trasporto di acido urico e xantina, evidenziano che il trasportatore con codice YP_001844510.1 ha un motivo compatibile con il trasporto di xantina e acido urico mentre gli altri due sono coinvolti nel trasporto delle pirimidine. Non sono stati trovati trasportatori omologhi ad Azga-like. Nel genoma di *E. faecalis*, al contrario di *L. Fermentum*, i geni codificanti per gli enzimi AAH, UGlyAH e UDH, UglyT (responsabili della degradazione dell'acido allantoico a ossalurato) risultano essere vicino sia a un trasportatore omologo a Dal4p (allantoina) sia a un trasportatore purinico generico appartenente alla famiglia NAT/NCS2.

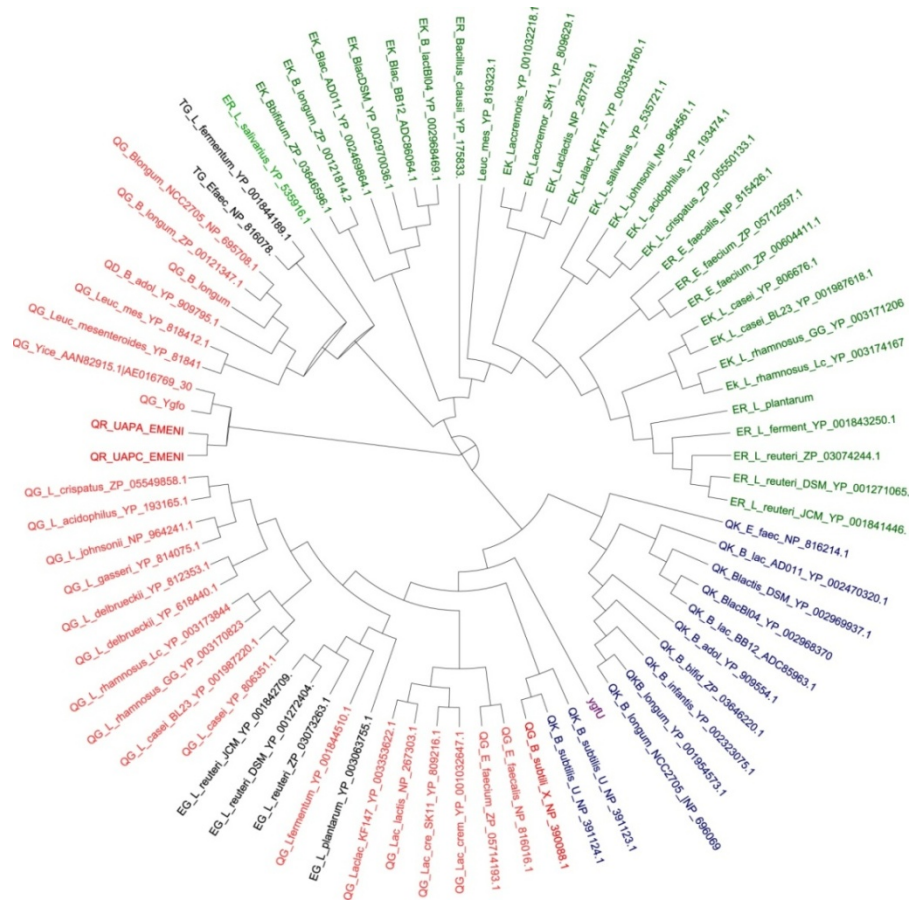


Figura 17. Albero filogenetico di sequenze omologhe a UAPA/UAPC provenienti da genomi di organismi probiotici. La barra indica il numero di sostituzioni per sito. Rosso (QG) specificità per la xantina, Blu (QK/QR) xantina/acido urico, Verde (ER/EK) pirimidine, Nero motivo non identificato. (correggere da rosso a blu QR UAPA UAPC)

che *E.coli Nissle 1917* e *S.boulardii* hanno alcuni effetti benefici sulla salute umana.

I genomi analizzati di *Bacterioide dorei* e *Propionibacterium freudenreichii* non presentano sequenze amminoacidiche di trasportatori ed enzimi omologhe a quelle conosciute per il pathway di degradazione delle purine.

Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus clausii

Le analisi condotte sul genoma di *B.subtilis* mostrano che il batterio è in grado di degradare completamente l'acido urico a glutammato e ossalurato. In particolare sono stati trovati i seguenti enzimi: xantina deidrogenasi (pucC, pucD, pucB, pucA), uricasi (pucL), allantoinasi (pucH), allantato amidoidrolasi (pucF) ureidoglicina transaminasi (pucG). Mancano invece gli enzimi UGlyAH che portano alla degradazione dell'ureidoglicina a ureidoglicolato e di UDH o UADH per l'idrolisi dell'ureidoglicolato a gliossilato. La ricerca sui trasportatori ha messo in evidenza che *B.subtilis* dispone delle seguenti permeasi in grado di internalizzare composti purinici: allantato permeasi (ywoE), xantina permeasi (PbuX), acido urico permeasi (pucJ, pucK). Analisi condotte sul contesto genomico mostrano che i geni sono tutti localizzati nello stesso operone. Sono presenti degli studi sulla caratterizzazione genetica e/o biochimica di questi geni in cui è stato dimostrato che questo organismo può metabolizzare l'acido urico [60, 98, 99].

Una situazione analoga a quella di *B.subtilis* è stata riscontrata *B.cereus* e *B.clausii*, con l'eccezione che in entrambi i genomi mancano i trasportatori per l'acido Allantoico, e acido urico. In *B.cereus* è presente il gene pubX che è omologo a una xantina permeasi ma non è inserito nello stesso cluster dove sono codificati i geni codificanti per gli enzimi che portano ALLA degradazione della xantina a ossalurato. Il gene risulta essere vicino a geni codificanti per la xantina fosforibosil transferasi un enzima coinvolto nel riciclo delle purine che converte la xantina monofosfato (XMP) in xantina. In *B.clausii*, invece, non è stato trovato alcun gene codificante per una xantina permeasi.

Escherichia coli

Le analisi condotte sul genoma di *E. coli* mostrano la presenza di due cluster per la degradazione delle purine. In un operone sono presenti i geni codificanti per l'allantoinasi (AlIB) [62] allantato amidoidrolasi (AlIC) [12] ureidoglicina idrolasi

(Ylba) [12], l'ureidoglicolato urea liasi (AllA) [62], ureidoglicolato deidrogenasi (AllD) e il trasportatore per l'allantoina (YbbW). Il cluster è stato recentemente studiato e la caratterizzazione degli enzimi completata, inoltre è stato dimostrato che *E.coli* può crescere in anaerobiosi utilizzando l'allantoina come unica fonte di azoto [12, 62].

All'interno di un'altro operone sono, invece, presenti i geni codificanti per la xantina deidrogenasi (xdhA, xdhB, xdhC) e per i trasportatori acido urico (YgfU) [84], ipoxantina (ygfQ) e xantina (yfgO) [3, 83] e la guanina deaminasi. Tra il gene xdhA e ygfU sono presenti geni la cui funzione non è stata ancora ben caratterizzata, ad esempio una probabile xantina deidrogenasi molibdeno/selenio dipendente (xdhD, ygfM, ygfK), altre ossidoriduttasi, idrossilasi e una serie di altri geni a funzione sconosciuta. **(Figura 19)**

La sequenza amminoacidica di questi geni presenta interessanti somiglianze con quella di altri enzimi conosciuti che potrebbero suggerirne la reale funzione:

- hyuA presenta un'omologia con l'allantoinasi. E' predetta essere un'idrolasi metallo dipendente, ed è stato dimostrato che può idrolizzare la fenil-idantoina, ma non è stato ancora identificato il suo substrato fisiologico.[100]
- ygeY presenta un'omologia con l'idrolasi N-acetil-ornitina deacetilasi (argE) [101]
- ygeW e yqeA presentano omologia rispettivamente per l'ornitina carbamil transfersi e una chinasi. In molti genomi batterici si ha un'associazione tra queste due classi di enzimi in quanto il primo porta alla sintesi di carbammil fosfato che può essere utilizzato come substrato dalla chinasi per la sintesi di ATP. YgeW è stata recentemente cristallizzata ma è stata trovata priva dell'attività transcarbamilasica per i seguenti substrati: i 20 amminoacidi, allantoina, ossamato, N-acetil-L-ornitina, N-succinil-L-ornitina, L-ornitina, β -alanina e putrescina [102].
- Diaminopropionato ammonio-liasi (YgeX), è un enzima PLP dipendente recentemente caratterizzato dal punto vista biochimico che potrebbe prestarsi alla catalisi di altre reazioni[103, 104].
- SsnA dalle analisi sulla sequenza potrebbe essere un' idrolasi ma non son presenti dati in letteratura su questo gene.

Le funzioni enzimatiche predette in base alla somiglianza con altre proteine note, la presenza nel cluster della xantina deidrogenasi e di trasportatori per l'acido urico e per la xantina portano ad ipotizzare che *E.coli* disponga di un cluster per utilizzare l'acido urico dall'ambiente esterno come fonte di azoto.

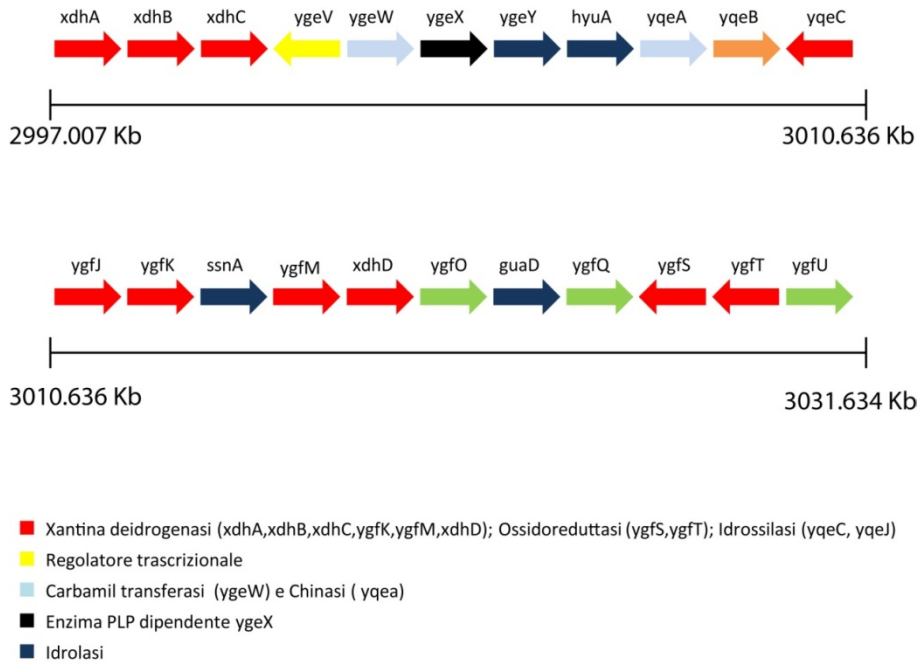


Figura 19 Localizzazione nel genoma di *Escherichia coli* di un ipotetico cluster per la degradazione dell'acido urico.

Sono rappresentati su due linee due blocchi consecutivi di geni. Il cluster rappresentato inizia con il gene XdhA in posizione 2997.007 Kb del genoma e termina con il gene YgfU in posizione 3031.634 Kb.

I geni di questo cluster sono stati confrontati con quelli di altri batteri e si è osservato che molti di questi geni risultano essere conservati. **(Figura 20)** Recentemente è stato reso disponibile in banca dati il genoma di *Clostridium acidurici*, batterio capace di utilizzare l'acido urico come unica fonte di azoto passando attraverso intermedi differenti rispetto a quelli classici, [69-73] ed è stato confrontato con l'ipotetico cluster presente in *E.coli*. I due genomi presentano molte differenze tra gli enzimi individuati in prossimità dei trasportatori e della xantina deidrogenasi.

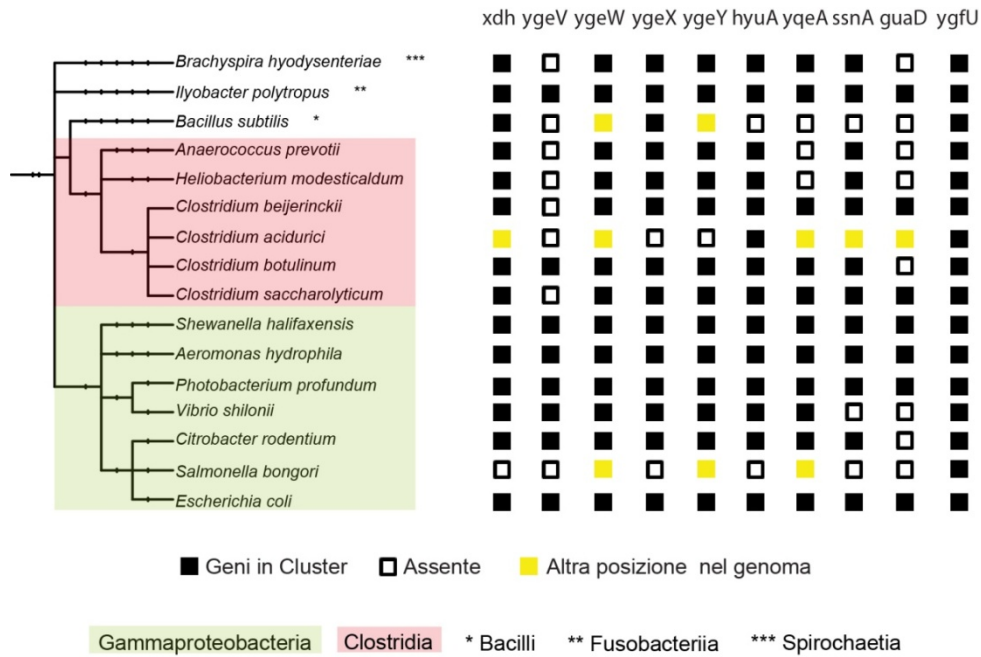


Figura 20 Albero filogenetico di microorganismi aventi un possibile cluster per la degradazione dell'acido urico.

I batteri sono stati selezionati mediante studi di genomica comparativa effettuati con Microbesonline. L'albero è stato costruito con Itol (<http://itol.embl.de/index.shtml> [105]). Il cluster è stato cercato anche in *Clostridium acidurici* in quanto è noto avere una via alternativa per la degradazione dell'acido urico, in *Salmonella bongori* organismo filogeneticamente vicino a *E.coli* e *Bacillus subtilis* un organismo lontano a quelli precedentemente inseriti nell'albero. La distribuzione del cluster non rispecchia l'andamento filogenetico delle specie.

Saccharomyces cerevisiae

Le analisi *in silico* svolte sul genoma di *S.cerevisiae* per la ricerca dei trasportatori mostrano che è presente il trasportatore FcyB (Fcy2p) per le purine e per la citosina [106], Dal4 per allantoina e Dal5 per l'acido allantoico [85, 86], ma non sono stati trovati i geni codificanti per trasportatori di xantina e acido urico. L'analisi *in silico* condotta sugli enzimi ha mostrato la presenza di geni codificanti per l'allantoina racemasi (Dcg1p) [107], l'allantoinasi (Dal1p) [41], l'allantoicasi (Dal2p) [108] e l'ureidoglicolato idrolasi (Dal3p) [109] ma l'assenza di tutti gli enzimi coinvolti nella degradazione della xantina ad allantoina.

2.3.2 Analisi bioinformatica del microbioma umano.

Tramite l'uso di un programma, il cui funzionamento è stato schematizzato nella **Figura 14**, sono stati ricercati nella banca dati del microbioma umano contenente 3.3 milioni di geni, sequenze codificanti enzimi e trasportatori coinvolti nel catabolismo delle purine. Alla fine della ricerca sono state trovate 1300 sequenze non ridondanti. L'analisi dimostra che sono assenti alcuni enzimi chiave coinvolti nel catabolismo delle purine come l'urato ossidasi, l'HIU idrolasi e l'OHCU decarbossilasi, sono mediamente rappresentati gli enzimi coinvolti nella degradazione dell'allantoina a ossalurato e infine sono spesso presenti i trasportatori per guanina, adenina, ipoxantina, xantina e acido urico e gli enzimi per trasformazione delle purine a xantina e la xantina deidrogenasi. (**Figura 21**)

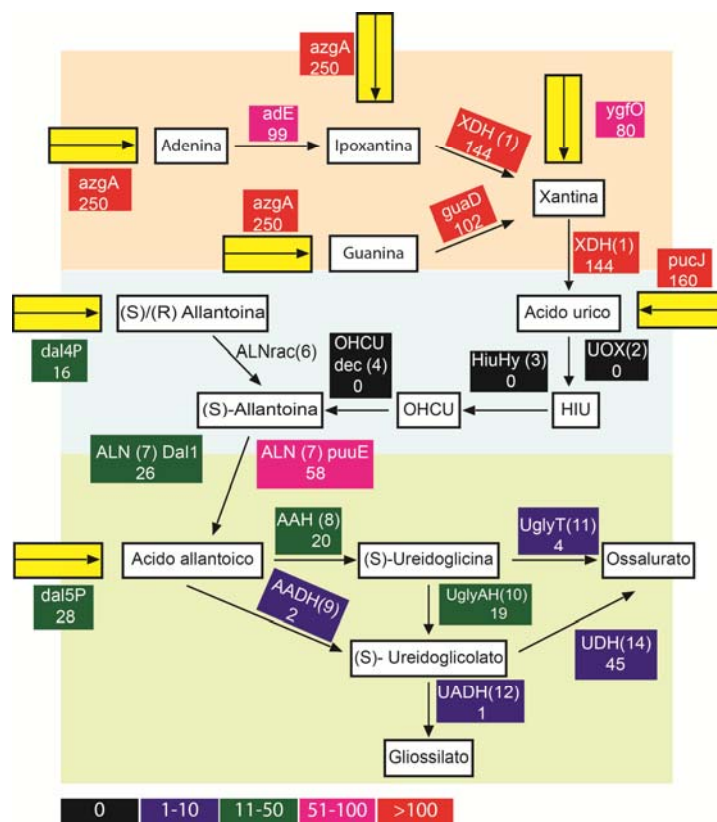


Figura 21 Presenza nel microbioma umano di geni codificanti per enzimi coinvolti nel catabolismo delle purine.

Il rettangolo giallo con la freccia indica i trasportatori. Sotto il nome dell'enzima o del trasportatore sono indicate il numero di sequenze trovate. In base ai risultati ottenuti il pathway può essere diviso in tre parti. In rosa è indicata la parte più rappresentata del microbioma che comprende i

trasportatori e gli enzimi responsabili della conversione delle purine a xantina. La parte celeste mostra le sequenze meno rappresentate responsabili della conversione dell'acido urico ad allantoina. La parte in verde chiaro invece rappresenta la parte terminale del pathway, gli enzimi che portano alla formazione dell'ossalurato sono più presenti rispetto a quelli per la sintesi del glicosilato come ultimo prodotto del catabolismo.

2.3.3 Crescita anaerobia di *E. coli*

La presenza del trasportatori YgfU (selettivo per l'acido urico) e YgfO (selettivo per la xantina) in un cluster genomico contenente la xantina deidrogenasi e altri geni che codificano per proteine a funzione sconosciuta ha portato a indagare sulla capacità di *E. coli* di crescere in presenza di queste sostanze come unica fonte di azoto. Gli esperimenti sono stati condotti in terreno minimo M9 eliminando NH₄Cl come fonte di azoto e sostituendolo con Xantina (3 mM) e acido urico (3 mM).

Le prove di crescita hanno dimostrato che il ceppo AG1 di *E. coli* non può utilizzare tali derivati purinici come unica fonte di azoto. Gli esperimenti sono stati ripetuti utilizzando diverse concentrazioni di ammonio 18.75 mM, 7.5 mM e 3.75 mM rispettivamente il 100% 40% e 20% di un M9 standard. I risultati mostrano che AG1 può consumare l'acido urico ma non la xantina in presenza di un'altra fonte di azoto. (Figura 22) Il consumo di acido urico è stato anche osservato misurando allo spettrofotometro la concentrazione di questo composto nel terreno prima e dopo la crescita di *E. coli*. Lo spettro dell'acido urico risulta essere assente nel terreno dopo 5 giorni di crescita anaerobia delle colture di *E. coli*.

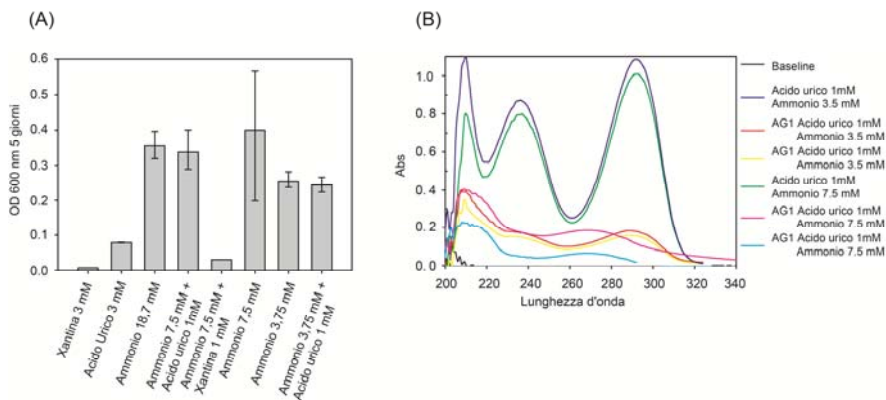


Figura 22 Crescita in anaerobiosi di *E. coli* a diverse concentrazioni di ammonio, acido urico e xantina. (A) L'istogramma rappresenta l'OD₆₀₀ di cellule AG1 cresciute in anaerobiosi a 37°C per 5

giorni in diversi terreni di coltura. Le barre rappresentano la deviazione standard di esperimenti effettuati in triplicato. (B) Gli spettri dell'acido urico sono stati raccolti su campioni di terreno di coltura M9 contenente ammonio e acidourico. Il terreno è stato incubato per 5 giorni in anaerobiosi a 37°C con le cellule AG1. La concentrazione iniziale di acido urico è stata calcolata incubando il terreno nelle stesse condizioni ma in assenza di batteri. La misura degli spettri in presenza delle cellule è stata effettuata due volte. Lo stesso esperimento è stato condotto per la xantina ma lo spettro misurato risulta identico a quello di controllo. (dati non mostrati)

I risultati mostrano che l'acido urico può essere utilizzato parzialmente come fonte di azoto. La xantina, al contrario, sembra invece inibirne la crescita anche in presenza di ammonio. Il motivo di questo comportamento risulta di difficile spiegazione in quanto l'ammonio presente nel terreno di coltura dovrebbe garantire un apporto di azoto sufficiente per la crescita. La sostanza potrebbe influire negativamente sulla regolazione genica e interferire in qualche modo con la crescita del batterio. Lo studio sulla crescita di *E.coli* in tali condizioni aveva lo scopo di comprendere se questo organismo potesse utilizzare queste sostanze in condizioni di anaerobiosi e non di studiarne la fisiologia, per tale motivo l'argomento non è stato approfondito.

3.4 Discussione

Le ricerche, condotte *in silico* sui microrganismi probiotici e sul microbioma dell'intestino umano sono state svolte con lo scopo di comprendere meglio come avviene la degradazione dell'acido urico nell'intestino umano e se è possibile utilizzare dei probiotici per abbassarne la concentrazione nel sangue.

Tra i probiotici, gli organismi a fermentazione lattica analizzati non contengono trasportatori noti essere coinvolti nell' internalizzazione di acido urico e xantina. Alcuni di questi organismi possiedono dei trasportatori generici per le purine, ma il loro metabolismo probabilmente è più orientato verso il riciclo di queste sostanze piuttosto che verso la loro degradazione. In questa classe di organismi raramente sono stati trovati enzimi coinvolti nel catabolismo purinico. Un'eccezione è rappresentata dagli organismi *L. fermentum* e *E. faecalis* che possiedono i geni per la degradazione dell'allantoina a ossalurato, ma solo in *E. faecalis* è presente il classico trasportatore per l'allantoina. I dati relativi ai genomi mostrano che i batteri lattici risultano essere poco adatti per la riduzione dell'acido urico a livello ematico. *E.faecalis* potrebbe essere adatto per la degradazione dell'allantoina.

I batteri non lattici analizzati, con l'eccezione di *Bacterioide dorei* e *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii CIRM-BIA1*, mostrano in modo eterogeneo, la presenza di enzimi e trasportatori coinvolti nel catabolismo delle purine. Il candidato migliore è *B.subtilis*, in quanto nel suo genoma sono presenti enzimi e trasportatori coinvolti nel catabolismo delle purine; oltre a ciò è stata

dimostrata la sua capacità di crescita su differenti fonti di azoto a derivazione purinica: adenina, guanina, guanosina, ipoxantina, xantina, acido urico, allantoina, acido allantoico e urea. Recentemente sono stati anche identificati i geni, e caratterizzati biochimicamente alcuni enzimi e trasportatori coinvolti in questo pathway [60, 98, 99]. *B.subtilis* è già noto per le sue proprietà probiotiche, in quanto ha degli effetti protettivi contro alcuni batteri patogeni come *Helicobacter pylori* [110] potenziando la risposta immunitaria [111] e nel trattamento di manifestazioni diarroiche. Per tale motivi potrebbe essere un buon candidato da essere valutato *in vivo* per studiarne gli effetti positivi sulla diminuzione della concentrazione di acido urico nel sangue. *B. cereus* e *B. clausii* hanno gli stessi enzimi omologhi trovati *B.subtilis* ma nell'operone non risultano essere presenti geni codificanti per i trasportatori delle purine o per gli intermedi prodotti durante questa via metabolica. Questo suggerisce che *B.cereus* e *B.clausii* non riescono a metabolizzare intermedi purinici provenienti dall'ambiente esterno, o utilizzano un differente sistema di trasporto.

Dalla ricerca *in silico* e da alcune recenti evidenze sperimentali emerge che *E.coli* possiede geni codificanti per i trasportatori di acido urico, xantina e allantoina, e gli enzimi per la degradazione dell'allantoina a gliossilato o ossalurato ma manca di quelli chiave per la conversione dell'acido urico ad allantoina (uricasi, Hiu Idrolasi e Ohcu decarbossilasi). Un'analisi sulla localizzazione dei geni nel genoma mostra che i trasportatori per acido urico e xantina sono stati trovati in prossimità della xantina deidrogenasi e ad altri geni a funzione sconosciuta, mentre quelli per il trasporto e il catabolismo dell'allantoina sono posizionati in un'altra parte del genoma. E' stato dimostrato che *E.coli* può crescere su allantoina in condizioni anaerobiche [62], ma non riesce a utilizzare l'acido urico e altre fonti puriniche come unica fonte di azoto [112]. L'incapacità di *E.coli* di crescere in acido urico e altri terreni contenenti derivati purinici è in contrasto con la presenza nel genoma di geni come la xantina deidrogenasi in prossimità di un efficiente trasportatore per l'acido urico. Durante questo lavoro, per spiegare questa anomalia, è stato confermato che *E.coli* non è in grado di utilizzare acido urico e xantina come unica fonte di azoto, ma risulta capace di consumare l'acido urico in presenza di cloruro d'ammonio e glucosio, in anaerobiosi parziale.

La mancanza dell'urato ossidasi, la presenza nel cluster della guanina deaminasi (GuaD), e il consumo di acido urico in presenza di ammonio può far ipotizzare che *E.coli* utilizzi l'acido urico per il riciclo delle purine, in quanto è stato scoperto in *Clostridium acidurici* [71] che la xantina deidrogenasi può catalizzare anche la

reazione inversa da acido urico a xantina. Uno studio più approfondito del cluster mostra che non sono presenti enzimi che catalizzano reazioni per la sintesi di adenosina o guanosina monofosfato ed altri enzimi coinvolti nel riciclo perciò è improbabile che questa sia la spiegazione più plausibile al fenomeno osservato. Nel cluster sono stati trovati diversi geni a funzione sconosciuta che catalizzano per 4 idrolasi, di cui una molto simile all'allantoinasi (Hyua), diverse ossidoriduttasi e idrossilasi selenio e/o molibdeno dipendenti, una transaminasi PLP dipendente e una carbamil transferasi associata a una chinasi. La presenza di questi enzimi vicino a XDH e ai trasportatori per acido urico e xantina permettono di ipotizzare la presenza di una via alternativa per la degradazione dell'acido urico in *E.coli*. In letteratura sono pubblicati diversi studi su clostridi e batteri anaerobici capaci di crescere su acido urico ma nessuno di questi organismi utilizza gli enzimi classici noti essere coinvolti nel catabolismo delle purine. È stato dimostrato che l'acido urico convertito a xantina può essere degradato a formiminoglicina, portando al recupero di due moli di ammonio e una di anidride carbonica. Di questa via metabolica sono stati identificati solamente alcuni composti, ma mai i geni codificanti gli enzimi [70-73]. Il genoma di *Clostridium acidurici* è stato reso disponibile solo recentemente mentre *Clostridium cylindrosporium* non è stato ancora sequenziato. L'ipotetico cluster di *E.coli* è stato confrontato con il genoma di altri batteri utilizzando MicrobesOnline e Blast ed è stata osservata la conservazione del blocco di enzimi a funzione sconosciuta in diversi organismi, ma non in *C.acidurici*. In *C.acidurici* alcuni dei geni risultano sparsi in altre parti del genoma mentre altri sono assenti. **(Figura 20)** Le differenze riscontrate durante la comparazione genomica di *E.coli* e *C.acidurici* non escludono la possibilità da parte di *E.coli* (o almeno di alcuni particolari ceppi di questa specie) di degradare l'acido urico, utilizzando però una strategia diversa da quella identificata in clostridio. Nella via nota del catabolismo delle purine è stata osservata una grande variabilità degli enzimi coinvolti, che potrebbe essersi riscontrata anche nella via anaerobica. I geni presenti nel cluster ipotizzato potrebbero quindi essere ritenuti responsabili del catabolismo dell'acido urico in *E.coli*. Le funzioni attribuibili per omologia a questi geni sono compatibili con le reazioni proposte per la via di degradazione anaerobica. I risultati ottenuti da questa indagine portano a inserire *E.coli* come un possibile candidato tra gli organismi probiotici da utilizzare per la realizzazione di un possibile prodotto probiotico per la prevenzione dell'iperuricemia. Altri possibili microorganismi candidati per lo sviluppo di un nuovo prodotto potrebbero emergere da un'approfondita conoscenza del

microbioma umano. La ricerca *in silico* ha dimostrato che: nei genomi di batteri residenti nell'intestino sono presenti numerosi trasportatori per xantina e acido urico oltre che la xantina deidrogenasi; risultano assenti i geni codificanti per gli enzimi noti essere coinvolti nella degradazione da acido urico ad allantoina; infine sono mediamente rappresentati quelli responsabili della degradazione dell'allantoina a ureidoglicolato. I dati suggeriscono, come precedentemente ipotizzato in *E.coli*, che questi organismi potrebbero avere una via alternativa non ancora studiata per degradare l'acido urico. In futuro, da uno studio più approfondito dei batteri residenti nell'intestino umano potrebbero emergere nuovi organismi candidati per la realizzazione di un prodotto contenente un mix efficace di batteri che possano aiutare nella prevenzione dell'iperuricemia. In parallelo sarebbe di notevole importanza riuscire a identificare i geni coinvolti nella degradazione anaerobica delle purine, in quanto permetterebbe di trovare con più efficacia nuovi organismi probiotici e di comprendere meglio una via metabolica che ha un ruolo cruciale sul metabolismo dell'azoto dei batteri residenti nell'intestino.

Capitolo 3

Caratterizzazione biochimica di un nuovo enzima coinvolto nella degradazione dell'acido allantoico a ureidoglicolato.

3.1 Introduzione

L'acido allantoico è un composto che si origina durante il catabolismo delle purine. In particolare è il prodotto della conversione della (*S*)-allantoina da parte dell'allantoinasi. In alcuni organismi, soprattutto nei lieviti, l'acido allantoico può essere importato dall'ambiente esterno mediante la permeasi Dal5, [86, Hellborg, 2008 #130, 113]. La sua conversione prima a ureidoglicolato e successivamente a gliossilato, è una fase molto importante del catabolismo purinico, in quanto permette il rilascio diretto di ammonio o urea, molecole importanti per la sintesi di nuovi composti organici azotati. Studi sulla degradazione di questo composto sono stati condotti in piante, batteri, lieviti, pesci e anfibi e hanno portato all'identificazione di due tipologie di enzimi capaci di degradare l'allantoato. (**Figura 23 B**)

L'allantoicasi è un enzima manganese dipendente, che può essere attivato anche da altri ioni bivalenti, capace di catalizzare sia la conversione diacido allantoico a urea e (*S*)-ureidoglicolato, che la conversione di (*R*)-ureidoglicolato a gliossilato e urea. Organismi che contengono l'allantoicasi solitamente possiedono l'ureasi o gli enzimi necessari per convertire l'urea in allofanato e recuperare così l'ammonio [7]. L'enzima risulta presente prevalentemente in alcuni microorganismi e negli organismi eucariotici. Tra gli organismi superiori ne è stata dimostrata la presenza in anfibi e pesci e l'assenza in mammiferi, uccelli, rettili e qualche pesce questi suggerendo che la capacità di degradare l'acido allantoico sia andata persa durante l'evoluzione dei cordati [52].

Un'altra strategia per metabolizzare questa sostanza consiste nell'utilizzo di due enzimi manganese dipendenti capaci di convertire l'acido allantoico a (*S*)-ureidoglicolato passando per la formazione di ureidoglicina. L'allantoato amidoidrolasi (AAH) è presente sia nei microorganismi che nelle piante e recentemente ne sono stati identificati i geni in *Escherichia coli* e *Arabidopsis thaliana*. Nelle piante, specialmente nelle leguminose, l'allantoina e l'acido allantoico sono dei composti utilizzati per lo stoccaggio e il trasporto dell'azoto fissato nei noduli radicali verso le regioni aeree della pianta [2]. AAH catalizza la reazione di conversione dell'acido allantoico a (*S*)-ureidoglicina. Tale composto è convertito dall'enzima ureidoglicina idrolasi (UGlyAH) in (*S*)-ureidoglicolato. Durante la reazione catalizzata da AAH si ha il rilascio del carbammato (NH_2COOH) che viene rapidamente convertito spontaneamente in ammonio e anidride

carbonica in soluzione acquosa. La formazione di carbammato e il seguente decadimento non enzimatico è stato osservato anche in altre reazioni biochimiche come ad esempio nell'ureasi [114]. La reazione catalizzata da UGlyAH porta al rilascio di una mole di ammonio. La stessa reazione può avvenire spontaneamente con una minore velocità. Questo non rappresenta un caso isolato in questo pathway ma è stato osservato un comportamento simile anche per altri composti come ad esempio l'HIU e l'OHCU che decadono spontaneamente formando allantoina; l'ureidoglicolato che decade spontaneamente per formare urea e gliossilato [12, 57, 115]. Le reazioni catalizzate AADH, AAH e UGlyAH sono schematizzate nella **Figura 23 (B)** Le analisi filogenetiche e di genomica comparativa recentemente condotte su questo enzima portano all'identificazione di due gruppi classificati come classe I classe II [12, 57]. (**Figura 23 A**)

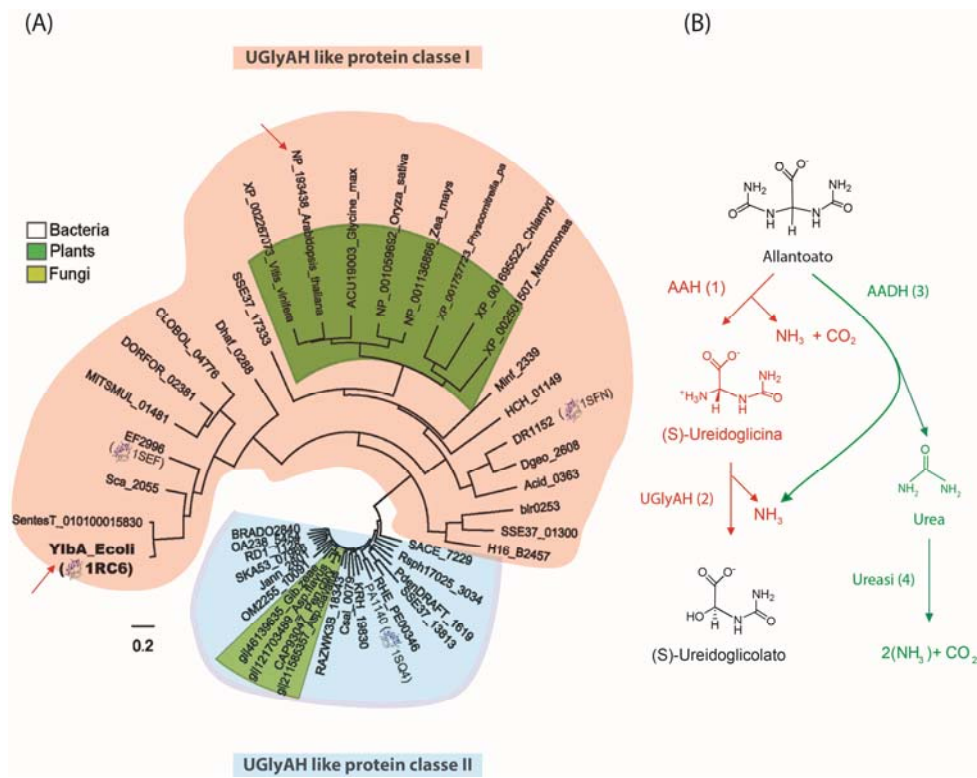


Figura 23 Enzimi coinvolti nella degradazione dell'acido allantoico

A) Albero filogenetico di proteine appartenenti alla famiglia UGlyAH. Tra parentesi sono indicate le strutture disponibili in banca dati. Con la freccia rossa gli enzimi precedentemente studiati. Le sequenze presenti nell'albero sono identificabili con gli accession number di *Gene Bank* o *Microbesonline*.

L'immagine è stata modificata dall'articolo di Serventi et al. 2010 [12].

B) Sono rappresentate le due diverse strategie note essere utilizzate per la conversione dell'allantoato a ureidoglicolato. In rosso è rappresentata la reazione catalizzata dagli enzimi allantoato amidoidrolasi (1) e ureidoglicina idrolasi (2), mentre in verde è indicata la reazione catalizzata dall'allantoicasi (3) e dall'ureasi (4).

Tra gli enzimi appartenenti alla classe I sono stati recentemente studiati quelli di *E.coli* e di *A.thaliana*, ma non sono presenti studi su enzimi appartenenti alla classe II. In questo lavoro è stato effettuato uno studio di genomica comparativa tra gli organismi appartenenti ai due gruppi che ha suggerito una probabile differenza di substrato tra gli enzimi appartenenti alla classe I e alla classe II. Per verificare questa ipotesi è stato clonato, purificato e saggiato dal punto di vista biochimico l'enzima codificato dal gene *atu3205* (*Atu_UGlyAH**) di *Agrobacterium tumefaciens* appartenente alla classe II e i dati raccolti sono stati comparati con l'enzima di *Arabidopsis thaliana* (*At_UGlyAH*) appartenente alla classe I.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Analisi bioinformatiche

Le ricerche di comparazione dei cluster genici contenenti l'ureidoglicina amidoidrolasi sono stati condotti con *Microbesonline* (<http://microbesonline.org/>). Le sequenze utilizzate per la creazione degli alberi filogenetici e degli allineamenti avevano tutte un *e* value significativo in *Blast*. La versione locale di *Blast* è reperibile nel sito <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. La ricerca è stata fatta utilizzando la sequenza *At_UGlyAH* come query. Le sequenze sono state prese dalla banca dati di *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) oppure da *Microbesonline*. Gli allineamenti sono stati fatti con *ClustalW* [95] e visualizzati con *GenDoc*. Gli alberi filogenetici sono stati costruiti usando l'algoritmo neighbor-joining [96] e visualizzati con *FigTree* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). Le analisi delle strutture sono state fatte con *Pymol* (<http://www.pymol.org/>)

3.2.2 Clonaggio, e espressione in forma ricombinante dell'enzima Atu_UGlyAH*

Il DNA genomico di *Agrobacterium tumefaciens* ceppo *GV3101* è stato estratto utilizzando il protocollo precedentemente descritto da Kalia et al nel 1999. Il pellet ottenuto da 20 mL di coltura è stato risospeso in STET (8% saccarosio 5% triton X-100 50mM Tris-HCl pH 8 50 mM EDTA pH 8) lisozima e RNasi e incubato per 60 minuti a 4°C e successivamente per 2 minuti a 100°C . La soluzione è stata centrifugata a 4°C per 15 minuti recuperato il surnatante e estratto in fenolo saturato. In fine il DNA viene precipitato con isopropanolo in un rapporto di 1:1 e in seguito lavato con etanolo 80% [116].

La sequenza codificante del gene *atu_3204* presente in banca dati non parte dalla prima metionina disponibile in seguito alla sequenza di Shine-Dalgarno, un allineamento dei batteri più vicini a *Agrobacterium tumefaciens* ha permesso di scegliere il corretto punto d'inizio della proteina. La sequenza codificante per Atu_UGlyAH è stata amplificata a partire da DNA genomico mediante PCR. Il mix di PCR contiene 100 ng di DNA genomico, 2U di deep Vent, 300 µM dNTP, 0.625 µM di ciascun primer forward 5'- ATGGCTGAAATGAAGAGATATTATTC e reverse 5'- TTACCAGAGCTTCACGTGGCG-3', buffer thermopol 10x e il 5% DMSO. La PCR viene effettuata con 2 min a 94°C per la denaturazione iniziale, seguita da 30 cicli 45 secondi 94°C, 45 secondi 50°C, 1 min 72°C e infine un allungamento finale di 3 minuti a 72°C. Il prodotto di PCR è stato clonato direttamente all'interno del vettore di espressione pET28-SnaBI. Il vettore, rispetto al pet 28 classico, presenta l'inserimento del sito di restrizione SnaBI in *frame* con la sequenza codificante l'HisTag ed è stato gentilmente reso disponibile da A. Bolchi. Il clonaggio è stato effettuato utilizzando il metodo "one-step" descritto da Bolchi et al. nel 2005 [117]. Il metodo consiste nel far avvenire contemporaneamente la reazione di taglio e ligazione dell'inserito all'interno del vettore. Un mix per il clonaggio è composto da: 30 ng di vettore chiuso e 360 ng del prodotto di PCR, 2.5 U dell'enzima di restrizione SnaBI Promega, 2 U della ligasi T4 USB, e il buffer 4 NEB. Il mix viene incubato per 3h a 30°C [117] Il prodotto del clonaggio è stato utilizzato per la trasformazione di cellule BL21 (DE3)-RIL *E. coli* (Stratagene). Le colonie positive sono state sottoposte a screening mediante una prova d'induzione. Il plasmide estratto dalle colonie che erano in grado di esprimere la proteina ricombinante ad alti livelli è stato sequenziato per verificarne la

sequenza. L'induzione del gene *Atu_UGlyAH** avviene quando le cellule raggiungono un OD 600 di 0.6 con isopropil-1-tio- β -D-galactopiranoside (IPTG) 1 mM a 30°C per 3 ore. Quindi, le cellule sono state pellettate e risospese in un volume pari a 1/10 del volume iniziale di coltura nel buffer di lisi (50mMsodium fosfato, 0.3M NaCl, 10% glicerolo, 1mg/mL lisozima, pH 7.6), e sono state incubate per 30 min a temperatura ambiente. Le cellule sono state lisate mediante sonicazione (10 colpi della durata di 15 secondi ciascuno). La purificazione è stata effettuata per cromatografia di affinità con la resina Talon al cobalto (Clontech Sigma). Il surnatante è stato incubato per 1 ora a 4°C con la resina, poi viene caricato su colonna, lavato col buffer di lisi eccetto lisozima (50mMsodium fosfato, 0.3M NaCl, 10% glicerolo), wash buffer (buffer di lisi + 5 mM imidazolo) e infine la proteina è stata eluita in 100 mM di imidazolo. La proteina è stata stoccata con l'elution buffer a -20°. Per gli esperimenti al dicroismo circolare la proteina è stata dializzata con 50 mM sodium fosfato e 0.3M NaCl. Per i saggi di attività sono stati purificati anche gli enzimi AAH di *E.coli* e *At_UGlyAH* i protocolli relativi al clonaggio e alla purificazione di questi enzimi sono ampiamente documentati nell'articolo di Serventi et al 2010 [12].

3.2.3 Saggio per la determinazione dell'attività di *Atu_UGlyAH**

L'acido allantoico, substrato di *Atu_UGlyAH** non è un composto facilmente reperibile in commercio; è stato quindi sintetizzato tramite idrolisi basica a partire dall'allantoina (Sigma). 5mg/mL di allantoina sono stati incubati con 0.36 mM e fatti bollire vigorosamente per 7 minuti, poi portato a pH 8.4 con HCl.

L'urea rilasciata dalla conversione dell'acido allantoico a ureidoglicolato da parte di *Atu_UGlyAH** è convertita in ammonio dall'ureasi. La rilevazione dell'ammonio avviene tramite il monitoraggio della reazione a 340 nm allo spettrofotometro mediante il saggio della glutammato deidrogenasi (GDH). La glutammato deidrogenasi è un enzima capace di convertire l' α -chetoglutarato, l'ammonio e il NADH in glutammato e NAD⁺. Il NADH ha un assorbimento a 340 nm, mentre il NAD⁺ non assorbe a questa lunghezza d'onda. Escludendo l'ammonio dalla reazione l'attività di *Atu_UGlyAH** può essere monitorata osservando un calo dell'assorbimento a 340 nm. Un saggio di attività tipico viene svolto in un volume finale di 1 mL con 0.1 M potassio fosfato pH 7.6, 0.35 mM NADH, 2.5 mM α -chetoglutarato, 19.36 U di GDH di fegato di bovino (Sigma), 3 U di ureasi tipo c-3

di fagiolo (Sigma), 0.085 mM acido allantoico. La reazione viene fatta iniziare con l'aggiunta di 12 µg di At_u_UGlyAH* o di At_UGlyAH.

L'attività ureidoglicina idrolasica è stata valutata escludendo l'ureasi dal tipico mix di reazione e aggiungendo 1.6 µg/mL di AAH di *E.coli* per sintetizzare la (S)-ureidoglicina.

La capacità di At_u_UGlyAH* di rilasciare ammonio in presenza di acido allantoico è stata valutata escludendo l'ureasi dal mix standard. I dati relativi alle cinetiche sono stati analizzati con il software SigmaPlot.

3.2.4 Analisi sulla metallo dipendenza di At_u_UGlyAH*

E' stato studiato l'effetto di alcuni chelanti come inibitori dell'attività di At_u_UGlyAH*. L'enzima è stato incubato o/n a 4°C a concentrazioni 1, 2, 3, 4, 5, 10 mM con CDTA (trans-1,2-Diaminociclohesano-N,N,N',N'- acido tetra-acetico-monoidrato), DTPA (Acido dietilenetri- aminopentaacetico), EDTA (Acido etilenediaminotetraacetico) e HQSA (acido 8-idrossiquinolina-5-sulfonico). L'effetto dei chelanti sull'attività di At_u_UGlyAH* è stata valutata con il saggio precedentemente descritto. La condizione migliore per rimuovere l'attività dell'enzima è l'incubazione o/n a 4°C in presenza di HQSA 1 mM. L'enzima inattivato è stato incubato per 30 minuti in presenza di 5 mM di metallo e la sua attività è stata saggiata in triplicato. Per ridurre l'errore sperimentale è stato preparato un unico mix contenente tutti i composti necessari per il saggio di attività e la lettura è stata effettuata su un volume finale di 200 µL. I metalli utilizzati sono Zn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺ e Mg²⁺. La concentrazione finale del metallo nel saggio è di 0.1 mM. La deviazione standard e grafici a barre sono stati realizzati con SigmaPlot

3.2.5 Analisi sulla stereospecificità di At_u_UGlyAH*

La formazione di composti otticamente attivi in seguito alla reazione catalizzata dall' enzima At_u_UGlyAH* è stata rilevata utilizzando lo spettro polarimetro Jasco-715. La cuvetta utilizzata per effettuare le misure ha un cammino ottico di 10 mm. Per quest'analisi la proteina è stata precedentemente dializzata per rimuovere l'imidazolo. Una soluzione di acido allantoico 2.8 mM è stata incubata a temperatura ambiente con 24 µg di At_u_UGlyAH* per 60 minuti in potassio fosfato 20 mM pH7.6. L'enzima è stato rimosso con un vivaspin cut-off 3 KDa.

L'ultra filtrato è stato diluito 1:2 con 20mM di potassio fosfato pH 7.6, e lo spettro è stato raccolto tra 200-300 nm.

E' stata testata anche la capacità dell'enzima di sintetizzare l' (R)-ureidoglicolato a partire da gliossilato e urea. 1,25 M di urea è stato incubato con 1.25 M di gliossilato e 60 µg di enzima in un volume finale di 1 mL di 20 mM potassio fosfato pH 7.6. L'enzima è stato rimosso con un vivasppin cut-off 3 KDa. L'ultra filtrato è stato diluito 1:500 con 20mM di potassio fosfato pH 7.6, e lo spettro è stato raccolto tra 200-300 nm. I parametri utilizzati per la raccolta degli spettri sono *Band width* 2.0 nm, *Response* 8 sec, *Sensitivity* standard, *Data pitch* 0.025 nm, *scanning speed* 50 nm/min e *Accumulation* 10.

3.2.6 Mutagenesi sitospecifica di *Atu_UGlyAH** L243M

La mutagenesi è svolta seguendo il protocollo QuikChange® Site-Directed reperibile nel sito

<http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Stratagene%20Quikchange%20mutagenesis.pdf>

I primer utilizzati sono: forward

5'-CCGGTCCGTTACCTGATGTATAAGGATGTGAACCG-3' e reverse

5'-CGGTTACATCCTTATACATCAGGTAACGGAACCGG-3'. Un tipico mix di PCR contiene: PFU buffer, 50 ng DNA plasmidico, 126 ng primer forward, 126 ng primer reverse, dNTP , 0.3 mM, DMSO 2% e Pfu turbo 2.5 U. Le condizioni utilizzate per la PCR sono: 95°C 30 secondi per la denaturazione iniziale del DNA, 19 cicli 95° 30 secondi, 55°C 60 secondi e 68°C 7 minuti. L'allungamento finale è di 5 minuti. Il DNA è digerito con DpnI per eliminare il DNA parentale. Il DNA è precipitato in sodio acetato e usato per trasformare cellule XL1B di E.coli. La mutagenesi è stata verificata tramite sequenziamento.

3.3 Risultati

3.3.1 Identificazione di At_UGlyAH* di *Agrobacterium tumefaciens* una probabile allantoato idrolasi.

Gli enzimi UGlyAH di *A.thaliana* (At_UGlyAH) e di *E.coli* (Ec_UGlyAH) appartengono alla classe I e sono responsabili della conversione dell'(S)-ureidoglicina a (S)-ureidoglicolato. L'ureidoglicina è un composto che si origina dalla degradazione dell'acido allantoico ad opera di AAH. Non sono conosciute altre vie metaboliche che portano alla sintesi di questo composto [7].

Le analisi di genomica comparativa condotte tramite l'utilizzo dei programmi *Blast* e *Microbesonline* su genomi di organismi aventi come omologhi di UGlyAH enzimi appartenenti a entrambe le classi, mostrano delle differenze sulla presenza o assenza di alcuni geni tradizionalmente coinvolti nel pathway di degradazione delle purine. In particolare ci si è focalizzati sullo studio dell'associazione dei geni omologhi UGlyAH(2) appartenenti a entrambe le classi con AAH (1) AADH(3) e l'ureasi (4). (**Figura 24**) Da tale analisi emerge che nei genomi in cui sono presenti i geni codificanti per gli enzimi appartenenti alla classe I, sono sempre stati identificati per omologia geni codificanti per AAH, mentre risulta sempre assente AADH e l'ureasi è presente nel 40% dei 20 genomi analizzati. Nella classe II la situazione è diversa, in quanto AAH è presente solo nel 12.9% dei 31 genomi analizzati, l'allantoicasi il 16.1% mentre l'ureasi il 100%. (**Figura 24**)

Nella maggior parte dei genomi in cui è stato trovato per omologia il gene appartenente alla classe II si osserva l'assenza di un gene noto codificare per un enzima che può sintetizzare l'ureidoglicina, a suggerire che questa classe di enzimi catalizzi una reazione differente, come ad esempio l'idrolisi dell'acido allantoico a ureidoglicolato.

Gli enzimi di classe I sono stati trovati nelle piante e in alcuni batteri mentre quelli di classe II nei funghi e in alcuni batteri. Tra gli enzimi appartenenti alla classe I sono disponibili le strutture di *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Deinococcus radiodurans* e *Arabidopsis thaliana* mentre della classe II è presente in banca dati solo quella di *Pseudomonas aeruginosa*.

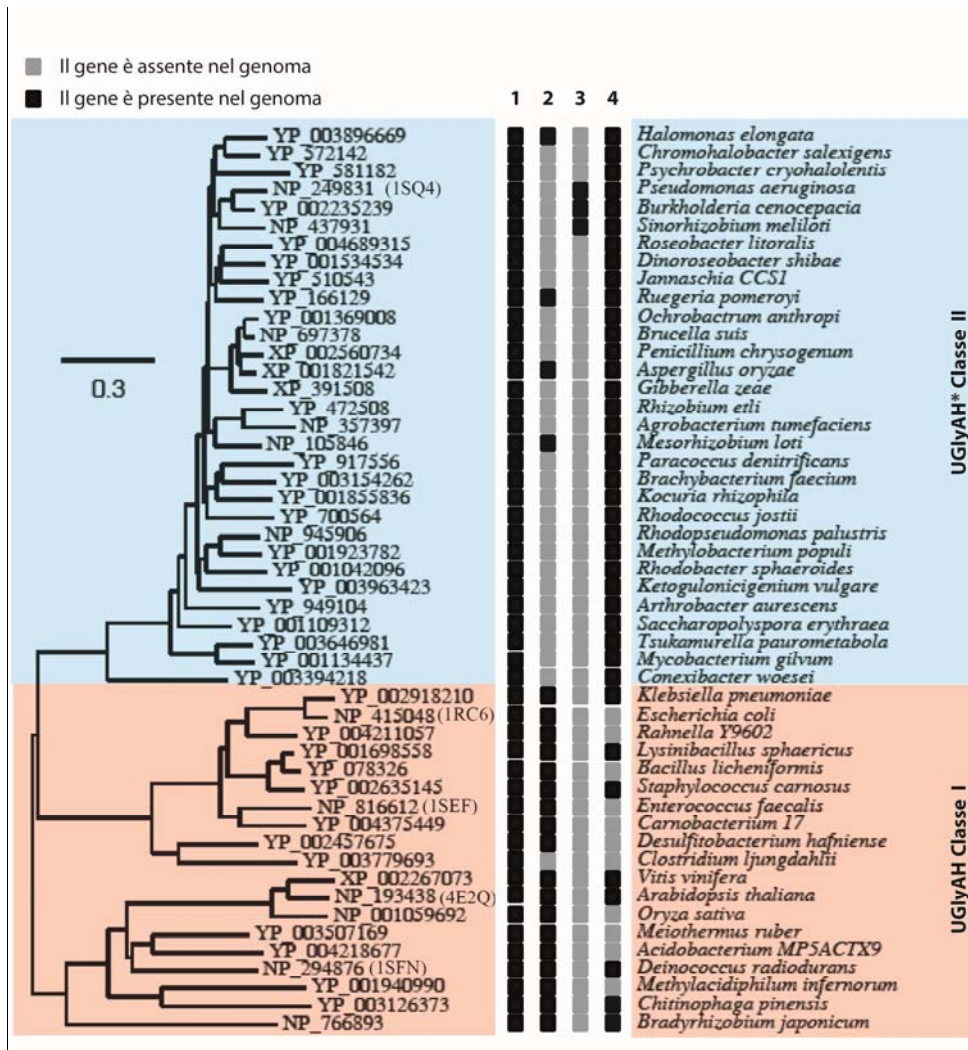


Figura 24 Albero filogenetico di geni omologhi a UGlyAh (2) e rappresentazione grafica della ricorrente associazione di questo gene con UGlyAh (2) AAH (1) AADH(3) Ureasi (4). Tra parentesi sono indicati gli accession number delle sequenze di cui è nota la struttura.

3.3.2 Caratterizzazione biochimica dell'enzima At_u_UGlyAH*

Il gene *atu3205*(At_u_UGlyAH*) di *A.tumefaciens* codifica per una proteina di 274 aa, con un peso molecolare di 30.9 kDa e un coefficiente di estinzione molare di 60515 M⁻¹ cm⁻¹.

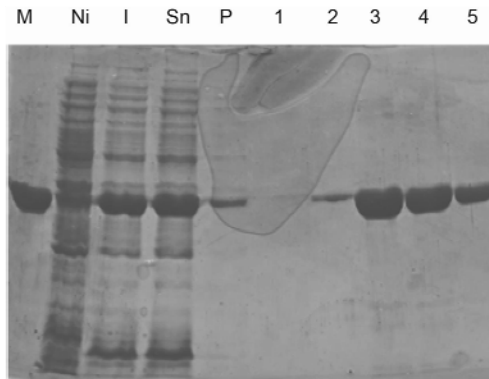


Figura 25 Purificazione dell'enzima At_u_UGlyAH*.

M= Marker At_u_UGlyAH precedentemente purificata; Ni =non indotto; I = Indotto; Sn = Surnatante (frazione solubile in seguito ALLA sonicazione) P= Pellet (frazione insolubile inseguito a sonicazione) 1;-2;-3;-4;-5 = Frazioni eluite con imidazolo.

La proteina risulta avere un buon grado di purezza e pertanto non sono stati inseriti altri step di purificazione.

L'enzima è stato clonato nel vettore pET28, espresso in forma ricombinante, e purificato tramite HisTag. L'HisTag è stato aggiunto nel dominio N-terminale e non è stato rimosso per la caratterizzazione biochimica.

Le caratteristiche biochimiche di At_u_UGlyAH* sono state comparate con l'enzima At_u_UGlyAH di *Arabidopsis thaliana*. Il rilascio di ammonio in seguito alla reazione catalizzata da At_u_UGlyAH* è rilevato con il saggio accoppiato della glutammato deidrogenasi, monitorando la riduzione di assorbimento del NADH a 340 nm. Con questo saggio è stato stabilito che non si genera nessuna mole di ammonio incubando l'enzima con l'acido allantoico. La diminuzione dell'assorbimento corrispondente al rilascio di due moli di ammonio per ogni mole di acido allantoico è osservata solo in seguito all'aggiunta dell'ureasi al mix di reazione. (Figura 26)

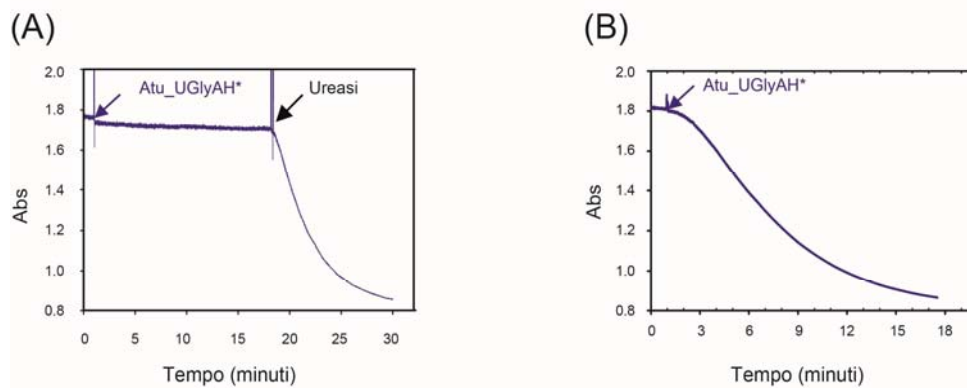


Figura 26 Saggi di attività dell'enzima Atu_UGlyAH utilizzando come substrato l'acido allantoico (0.085 mM).

(A) È stata saggiata la capacità dell'enzima di rilasciare ammonio o urea. Il primo minuto del grafico mostra che non è presente ammonio nel mix di reazione (α -chetoglutarato, NADH, EDH, acido allantoico), l'aggiunta dell'enzima Atu_UGlyAH* non causa nessun rilascio di ammonio in quanto non si osserva una diminuzione dell'assorbimento a 340 nm, l'aggiunta dell'ureasi causa un rapido calo di assorbimento dovuto al rilascio di urea che testimonia l'avvenuta conversione dell'acido allantoico a ureidoglicolato. (B) Il primo minuto rappresentato nel grafico mostra l'assenza di urea nel mix di reazione (α -chetoglutarato, NADH, EDH, Ureasi, acido allantoico) l'aggiunta dell'enzima Atu_UGlyAH mostra una diminuzione dell'assorbimento a 340 nm. Comparando le due curve si può osservare che se l'urea è già presente nel mix di reazione grafico (A) il calo dell'assorbimento è più rapido di quello osservato quando l'ammonio è rilasciato accoppiando la reazione con l'ureasi nel grafico (B). Questa è una condizione ottimale per condurre saggi cinetici.

Il prodotto della reazione è stato successivamente analizzato al dicroismo circolare e lo spettro raccolto risulta essere lo stesso di quello dell'(S)-ureidoglicolato (**Figura 27**) presente in letteratura dalla reazione catalizzata da AAH + e At_UGlyAH [12]. Parallelamente è stata testata anche la capacità dell'enzima At_UGlyAH di staccare urea a partire da acido allantoico e non è stato osservato alcun rilascio di ammonio in seguito all'aggiunta dell'ureasi nel mix di reazione.

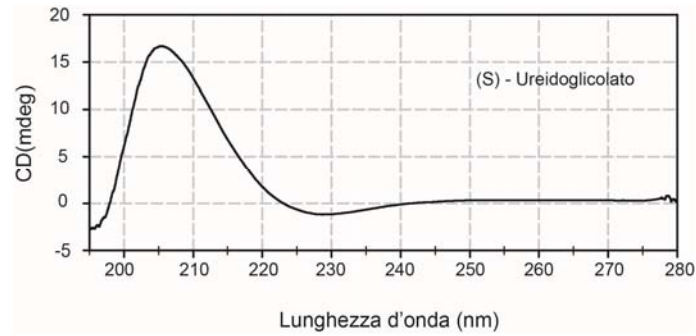


Figura 27 Spettro al dicroismo circolare del (S)-Ureidoglicolato (1.4 mM).

L'ureidoglicina è il substrato fisiologico identificato per l'enzima At_UGlyAH. E' stata quindi testata l'attività dell'enzima di *A.tumefaciens* su questo substrato[12]. L'ureidoglicina è stata sintetizzata enzimaticamente con AAH di *E.coli*, la reazione viene monitorata allo spettrofotometro e una volta terminata vengono aggiunti nel mix di reazione o At_UGlyAH o AtU_UGlyAH* alla medesima concentrazione. E' stato osservato che entrambi gli enzimi sono abili a catalizzare la reazione di conversione dell'ureidoglicina a ureidoglicolato con una velocità paragonabile.

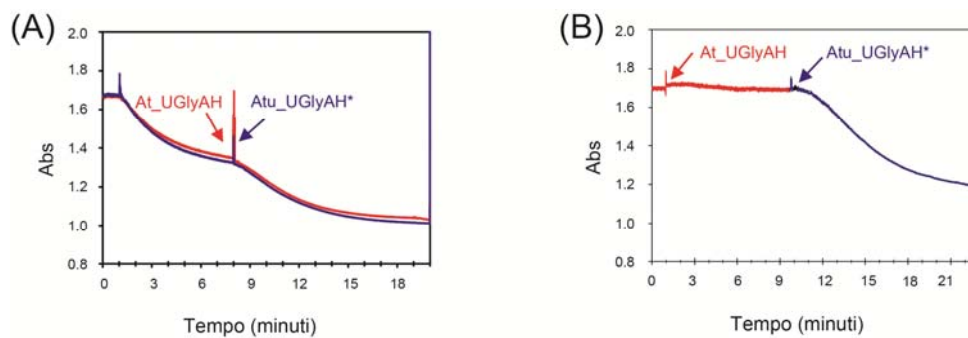


Figura 28 Comparazione dell'attività ureidoglicina idrolasica e allantoato amidino idrolasica di At_UGlyAH e AtU_UGlyAH*.

(A) Attività ureidoglicina idrolasica. La diminuzione dell'assorbimento osservata tra i minuti 2 e 7 è imputabile alla reazione sintesi dell'ureidoglicina da parte di AAH di *E.coli*. Una pari diminuzione è stata osservata dalla degradazione dell'uridoglicina da parte di entrambi gli enzimi. A parità di concentrazione di enzima la pendenza calcolata è simile tra i due enzimi. (B) Nella prima parte del

grafico (rosso) si può osservare che At_UGlyAH non è abile a degradare l'acido allantoico mentre la reazione viene catalizzata efficientemente da ATU_UHlyAH*

At_UGlyAH è un enzima manganese dipendente la cui attività è parzialmente recuperata in aggiunta di cobalto. E' stata studiata la metallo dipendenza anche sull'enzima di *A.tumefaciens*. L'enzima è stato incubato a differenti concentrazioni (1, 2, 3, 4, 5 e 10 mM) con diversi chelanti (EDTA, CDTA, DPTA e HQSA). La perdita di attività in seguito alla rimozione del metallo è stata riscontrata unicamente con HQSA 1 mM. L'attività viene completamente recuperata con l'incubazione dell'apoenzima con manganese; si osserva un'attività maggiore rispetto a quella di riferimento con il cobalto; infine avviene un recupero parziale dell'attività con il nichel. Zinco, rame, calcio e magnesio non presentano alcun effetto sul recupero dell'attività dell'enzima.

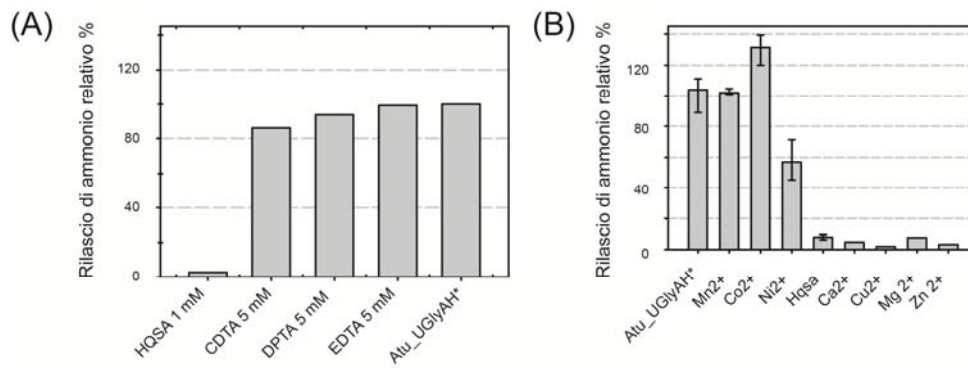


Figura 29 Analisi sulla metallo dipendenza di AtU_UGlyAH.

(A) Inibizione dell'attività di AtU_UGlyAH da parte di sostanze chelanti. (B) Identificazione del metallo capace a recuperare l'attività standard misurata per l'enzima. I dati sono stati misurati in triplicato e le barre rappresentano la deviazione standard dei dati.

L'allantoicasi (3), enzima che catalizza la reazione di conversione diretta dell'acido allantoico a (S)-ureidoglicolato rilasciando urea, può convertire l'(R)-ureidoglicolato in urea e gliossilato [7]. Questa attività è stata testata incubando AtU_UGlyAH* con gliossilato e urea. Il prodotto è stato separato dall'enzima e analizzato al dicroismo circolare. Lo spettro ottenuto è quello dell' R)-ureidoglicolato .

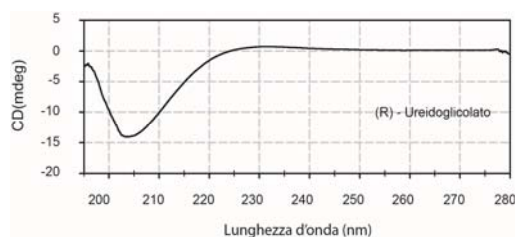


Figura 30 Spettro al dicroismo circolare del (R)-Ureidoglicolato (1.25 mM).

3.3.3 Analisi strutturale dell'enzima Pa_UGlyAh* di *Pseudomonas aeruginosa* appartenente alla classe II

L'unico enzima appartenente alla classe II di cui è disponibile la struttura cristallografica nella banca dati PDB è quello di *Pseudomonas aeruginosa* (codice PDB 1SQ4). La struttura dell'enzima è stata ottenuta in seguito a un lavoro di genomica strutturale, ha una risoluzione di 2.7Å ed è stata depositata in banca dati nel 2004 [118]. La struttura monomerica è formata da due domini cupinici (barili) ognuno dei quali è composto da 2 foglietti beta. Il dominio N-terminale è composto dal foglietto 1 costituito da 4 filamenti β ($\beta 7$, $\beta 6$, $\beta 9$ e $\beta 4$) e dal foglietto 2, composto da 6 filamenti β ($\beta 11$, $\beta 8$, $\beta 5$, $\beta 10$, $\beta 4$ e $\beta 3$). Il dominio C-terminale, risulta essere composto dal foglietto 3 formato da 6 filamenti β ($\beta 12$, $\beta 13$, $\beta 14$, $\beta 21$, $\beta 16$, e $\beta 19$) e dal foglietto 4 costituito da 4 filamenti β ($\beta 15$, $\beta 20$, $\beta 17$ e $\beta 18$). La struttura tridimensionale mostra una forte similarità tra i domini N- e C-terminale, indicando che la struttura di Pa_UGlyAH* può essersi originata per un'ancestrale duplicazione di un singolo dominio cupinico. Questo tipo di organizzazione risulta essere descritta anche per altre proteine a struttura nota appartenenti alla classe I [12]. (Figura 31 A)

Sulla base dei dati ottenuti dai cristalli si può osservare che le strutture quaternarie dell'enzima di *Pseudomonas aeruginosa* e quello di *Arabidopsis thaliana* sono entrambi degli ottameri. E' stata recentemente risolta la struttura di At_UGlyAH con legato il metallo e il substrato ed identificati per la prima volta i residui amminoacidici Glu 235, His 237, His 241 e Gln 275 coinvolti nella coordinazione del metallo [115]. (Figura 31 A,B)

Un allineamento tra i due domini, effettuato su enzimi appartenenti a entrambe le classi, mostra che i residui importanti per il legame del metallo sono conservati e localizzati nel dominio C-terminale mentre risultano essere sempre mutati nel dominio N-terminale. Mutanti in questi residui sono cataliticamente inattivi. (Figura 31 C)

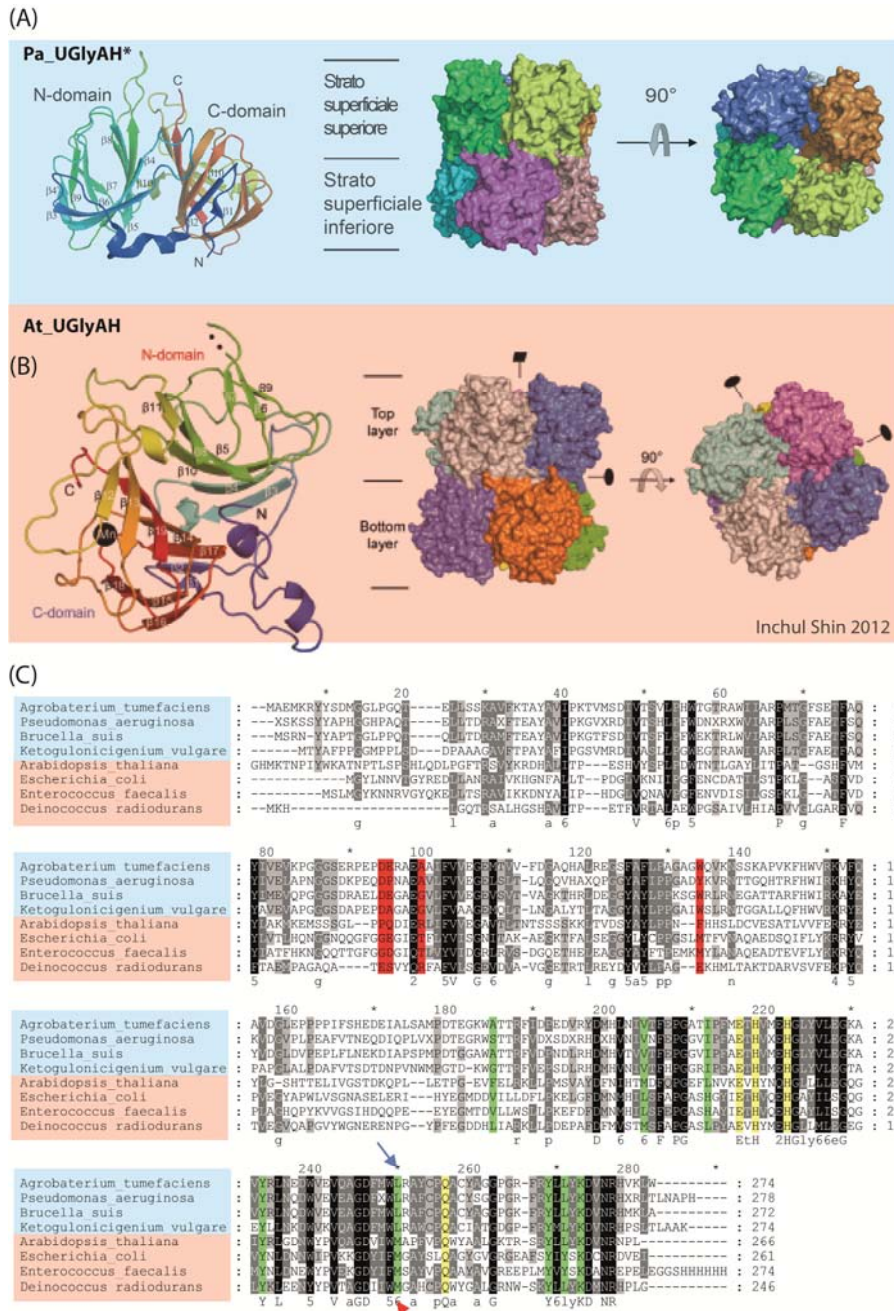


Figura 31 Comparazione della sequenza aminoacidica, la struttura terziaria e quaternaria tra gli enzimi appartenenti alla classe I e alla classe II. (A) A sinistra sono rappresentati i due domini cupinici di PA_UGlyAH* classe II e a destra la struttura quaternaria ottamerica. (Le immagini sulla

struttura sono state create il programma Pymol). (B) L'immagine è stata presa dall'articolo pubblicato da Shin nel 2012 [115] e mostra a sinistra i domini cupinici di AT_UGlyAH e a destra la struttura quaternaria. Le due strutture mostrano una stretta somiglianza. (C) Allineamento tra gli enzimi provenienti da entrambe le classi. Per la classe I sono stati allineati tutti gli organismi di cui è nota la struttura, mentre per classe II sono state scelte *Pseudomonas aeruginosa*, e altre due sequenze omologhe a *Agrobacterium tumefaciens*. In rosso sono indicati posizioni nel dominio N-terminale corrispondenti alle posizioni coinvolti nel legame con il metallo nel dominio C-terminale. Le mutazioni accumulate in questa regione non sono compatibili con il legame di uno ione metallico. In verde sono segnati i residui individuati in AT_UGlyAH importanti per il legame del substrato. In giallo i residui noti per essere importanti per il legame del metallo nel dominio C-terminale. La freccia rossa indica la metionina 269 di AT_UGlyAH conservata in tutti gli enzimi di classe I e la freccia blu la leucina 243 in Atu_UGlyAH che è presente in tutti gli enzimi di classe II. Il colore del pannello rosso o azzurro applicato sopra i nomi degli organismi indica rispettivamente l'appartenenza alla classe I o alla classe II.

I residui identificati nell'enzima di *A.thaliana* noti essere coinvolti nel legame dell'ureidoglicina sono 8 K291, L289, Y287, M269,Y252,L231,M 223 e F204 [115]. L'allineamento effettuato su 39 specie di cui 19 di classe I e 20 di classe II, mostra che i residui Tyr 252,Tyr 287e Lys 291 sono conservati in entrambe le classi.

La Leu 289 è presente nelle sequenze di pianta e di alcuni batteri appartenenti alla classe I e in tutte quelle della classe II. In altri batteri appartenenti alla classe I è invece presente una treonina.

La Met 269 è coinvolta nel legame del gruppo ureidico dell'ureidoglicina e risulta essere sempre presente tra gli enzimi di classe I, ma sempre sostituita tra gli enzimi di classe II dalla leucina.

La Leu 231 è l'aminoacido più presente in questa posizione per gli enzimi di classe I anche se talvolta può essere sostituita dalla fenilalanina o dall'istidina, nella classe II è sempre conservata l'isoleucina.

La Met 223 non risulta essere molto conservata tra gli enzimi di classe I, in quanto è spesso sostituita da altri amminoacidi idrofobici come la valina e la fenilalanina; tra gli enzimi di classe II invece è sempre presente la valina.

La Phe 204 nella classe I è sostituita da altri amminoacidi idrofobici quali leucina, valina, isoleucina e alanina anche nella classe II in questa posizione la fenilalanina è sostituita nella maggior parte dei casi da amminoacidi idrofobici come alanina, glicina e valina ma in alcune sequenze sono stati trovati amminoacidi polari come serina e treonina.

3.4 Discussione

Questo lavoro è un esempio di come analisi combinate svolte sui genomi *in silico*, seguite dalla caratterizzazione biochimica, hanno permesso di identificare la funzione di enzimi appartenenti alla classe II omologhi a UGlyAH. Questa metodologia è stata recentemente utilizzata per l'identificazione di altri enzimi coinvolti nel pathway di degradazione delle ureidi HIU idrolasi, OHCU

decarbossilasi, (S)-Ureidoglicina gliossilato aminotransferasi e Ureidoglicina idrolasi [4, 12, 60]. La caratterizzazione biochimica dell'enzima ha permesso di definire la reazione catalizzata dagli enzimi di classe II. Questi enzimi possono catalizzare la conversione dell'acido allantoico e dell' (S)-ureidoglicina a (S)-ureidoglicolato e di convertire (R)-ureidoglicolato a gliossilato e urea. L'attività dell'enzima di *A.tumefaciens* viene perduta in seguito alla rimozione del metallo e ripristinata da Mn^{2+} e Co^{2+} e parzialmente dal Ni^{2+} . Probabilmente il manganese è il metallo incluso fisiologicamente anche negli enzimi di classe II, in quanto i dati cinetici ottenuti mostrano un'attività simile con quella misurata nell'enzima purificato fresco. L'EDTA è stato dimostrato essere un inibitore degli enzimi appartenenti alla classe I in *E.coli* e *A.thaliana* in quanto rimuove il metallo dal sito attivo. EDTA, CDTA e DPTA non hanno alcuna proprietà inibitoria sull'enzima. L'unico chelante testato capace di inibire l'enzima è HQSA. Questa molecola è più piccola rispetto alle altre sostanze testate e probabilmente riesce ad interagire più facilmente con il sito di coordinazione del metallo degli enzimi di classe II consentendo in questo modo la rimozione del metallo.

I dati raccolti mediante le analisi biochimiche e *in silico* suggeriscono che il substrato fisiologico per questi enzimi è l'acido allantoico in quanto in questi genomi è assente un gene noto o un possibile candidato capace di sintetizzare l'(S)-ureidoglicina. La presenza della seconda attività trovata nell'enzima *Atu_UGlyAH** è coerente con la similarità dell'organizzazione della struttura terziaria e quaternaria osservata tra i due gruppi, unita alla somiglianza delle due reazioni catalizzate. L'albero filogenetico e l'allineamento mostrano che gli enzimi di classe I hanno una conservazione della sequenza inferiore rispetto a quelli di classe II. Questo dato potrebbe far ipotizzare che gli enzimi di classe I siano più antichi e che la separazione con gli enzimi di classe II sia recente. Un'altra ipotesi è che tra i due organismi ci sia una pressione selettiva diversa. Una mutazione che inattiva un enzima appartenente alla classe II porta a un blocco della degradazione delle purine ad acido allantoico e abolendo il recupero di azoto da i composti purinici. Un mutante dell'enzima di classe I riuscirebbe comunque ad ottenere una mole di ammonio dalla degradazione enzimatica dell'acido allantoico e l'ureidoglicina è un composto instabile che decade spontaneamente a ureidoglicolato, anche se con una velocità molto inferiore rispetto a quella enzimatica. Il mutante di questo enzima potrà quindi in ogni caso recuperare immediatamente una mole di ammonio e successivamente le altre tre.

Entrambe le classi di enzimi mostrano una struttura bicupinica. Il dominio cupinico è stato identificato in 20 famiglie differenti ed è compatibile con diversi tipi di funzione sia enzimatica che non enzimatica. In molti enzimi bicupinici conosciuti solo uno dei due risulta essere attivo e capace di legare il metallo. Enzimi appartenenti a questa famiglia sono solitamente Mn^{2+} , Fe^{2+} o Zn^{2+} dipendenti. Coerentemente con questa caratteristica degli enzimi bicupinici l'allineamento tra i due domini di At_UGlyAH rileva che solo in quello C-terminale si ha la conservazione dei residui importanti per la catalisi mentre il dominio N-terminale è meno conservato. Non essendo disponibile la struttura cristallografica di At_UGlyAH* le analisi della comparazione strutturale sono state svolte tra l'enzima di *Pseudomonas aeruginosa* (Pa_UGlyAH*) e At_UGlyAH.

Il confronto tra le due strutture mostra che le sequenze non differiscono per gli amminoacidi noti essere coinvolti nel legame col metallo ma c'è qualche differenza tra quelli coinvolti nel legame del substrato. In particolare in tutti gli enzimi di classe I nella posizione 269 dell'enzima At_UGlyAH è sempre presente una metionina che è sempre sostituita nella posizione equivalente da una leucina negli enzimi appartenenti alla classe II. Questo aminoacido potrebbe essere importante per il legame del gruppo ureidico del substrato all'enzima, la differenza di dimensione tra i residui potrebbe discriminare il legame specifico per l'ureidoglicina negli enzimi di classe I. Questa ipotesi verrà testata in futuro con la creazione del mutante At_UGlyAH L269M. Ci si attende che il mutante possa perdere la capacità di convertire l'acido allantoico a ureidoglicolato ma mantenere l'abilità di convertire l'ureidoglicina a ureidoglicolato.

Capitolo 4

**Caratterizzazione biochimica dell'enzima allantoina racemasi di
Pseudomonas fluorescens.**

4.1 Introduzione

L'ossidazione enzimatica dell'acido urico ad allantoina e la sua successiva conversione a gliossilato od ossalurato, tramite diverse reazioni enzimatiche, è il passaggio finale del catabolismo delle purine. Nelle piante e in alcuni batteri quest'ultima fase può essere di notevole importanza in quanto permette il recupero dell' azoto contenuto nell'anello purinico e lo rende disponibile per la sintesi di nuovi composti azotati. Alcuni batteri possono assorbirla dall'ambiente esterno sotto forma di racemo e utilizzarla come fonte di azoto.

La conversione stereospecifica dell'acido urico ad (S)-allantoina avviene ad opera di tre enzimi Uricasi, HIU-idrolasi e OHCU decarbossilasi [4].

L'allantoinasi è l'enzima coinvolto nella conversione dell'allantoina ad acido allantoico, un importante composto di questo pathway da cui, tramite successive reazioni, sarà recuperato l'azoto. Sono stati identificati due differenti tipi di allantoinasi una metallo dipendente e l'altra che non richiede l'utilizzo di alcun cofattore[47, 48, 119]. Nonostante i due enzimi siano un esempio di evoluzione convergente in quanto presentano sequenza, struttura e meccanismi di catalisi differenti, entrambi hanno evoluto una stereospecificità solamente per la (S)-allantoina e pertanto non possono degradare la (R)-allantoina.

E' possibile che i microorganismi riescano per diverse cause ad entrare in contatto con allantoina racemica. La sintesi di un mix racemico di allantoina può essere ottenuto in diversi modi: ossidazione non enzimatica dell'acido urico da parte di radicali liberi [120]; ossidazione enzimatica dell'acido urico da parte dell'uricasi, seguita dallo spontaneo decadimento ad allantoina [4]; rilascio di allantoina da parte di molti organismi animali e la racemizzazione spontanea di questo composto (tempo di dimezzamento maggiore di 10h a pH fisiologico). [121].

Considerando la stereospecificità delle allantoinasi ed i meccanismi che portano alla formazione di allantoina racemica, l'efficiente utilizzo di questa molecola come fonte di azoto richiede la presenza di una racemasi abile a convertire rapidamente questa sostanza nell'enantiomero S e renderla così immediatamente disponibile all'attacco da parte dell'allantoinasi.

Questa reazione enzimatica è stata descritta per la prima volta negli anni '70 [122-124].

I primi studi sono stati condotti su *Pseudomonas* e dall'analisi delle diverse specie di questo gruppo di organismi è emerso che *P.testosteroni*, *P.putida* e 5 diversi tipi di *P.fluorescens* possiedono attività allantoina racemasica. Altre 3 specie di *Pseudomonas* invece mancano di questa attività [124]. Recentemente è stata risolta la prima struttura cristallografica della allantoina racemasi di *Klebsiella pneumoniae*. In questo studio inoltre è stato identificato il gene codificante questo enzima e ne viene spiegato il meccanismo di reazione [39].

In questo lavoro mi sono occupato di definire le proprietà della racemasi di *P.fluorescens* (Pf_AlnRac). Pf_AlnRac differisce dall'enzima recentemente caratterizzato per via di una parziale conservazione del sito attivo.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Mutagenesi sito specifica Pf_AlnRac E78Q e E78D

La mutagenesi è svolta seguendo il protocollo QuikChange® Site-Directed mutagenesis reperibile nel sito <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Stratagene%20Quikchange%20mutagenesis.pdf>

I primer utilizzati per la realizzazione dei mutanti sono i seguenti:

- Fw_E78Q 5' GGCCGGCTATGGCCAACATGGCCGTGAAG 3';
- Rev_E78Q 5' CTTCACGGCCATGTTGGCCATAGCCGGCC 3' ;
- Fw_E78D 5'GGCCGGCTATGGCGATCATGGCCGTGAAG 3'
- Rev_E78D 5'CTTCACGGCCATGATCGCCATAGCCGGCC 3'

Un tipico mix di PCR contiene: PFU buffer, 50 ng DNA Plasmidico, 126 ng primer forward, 126 ng primer reverse, dNTP ,0,3 mM, DMSO 2% e Pfu turbo 2.5 U. Le condizioni utilizzate per la PCR sono: 95°C 30 secondi per la denaturazione iniziale del DNA, 16 cicli 95° 30 secondi, 55°C 60 secondi e 68°C 7 minuti. L'allungamento finale è di 5 minuti. Il DNA è digerito con DpnI per eliminare il DNA parentale, successivamente precipitato in sodio acetato e in fine usato per trasformare cellule XL1B di E.coli. L'avvenuta mutagenesi è stata verificata tramite sequenziamento.

4.2.2 Purificazione ed espressione delle proteine

Purificazione Pf_AlnRac wt e mutanti. L'induzione avviene quando le cellule raggiungono un OD 600 di 0.6 con isopropil-1-tio-β-D-galactopiranoside (IPTG)1 mM a 28°C per 5 ore. Quindi, le cellule sono pellettate e risospese in un volume pari a 1/16.7 del volume iniziale di coltura nel buffer di lisi (50mMsodium fosfato pH 7.6, 0.3M NaCl, 10% glicerolo, 1mg/mL lisozima , β-mercaptoetanol 1 mm, Leupeptina 1 μM, PMSF 100μM), e incubato per 30 min a temperatura ambiente.

Le cellule sono lisate mediante sonicazione (10 colpi della durata di 15 secondi ciascuno). Il surnatante viene concentrato in amicon riducendone il volume di 12 volte.

La proteina viene dializzata con 100 mM di potassio fosfato pH 7.6 per rimuovere il sale.

La purificazione avviene per cromatografia a scambio anionico (Q-sepharose Pharmacia). Una volta caricata la proteina, si lava la colonna con buffer potassio fosfato 100 mM sino ad eliminare tutta la proteina non legata alla resina e si eluisce con un gradiente di sale 0-0.5 mM NaCl in Kp 100 mM. La proteina è stoccata a -20°C nel buffer di eluizione. Prima di procedere all'attività sono stati raccolti gli spettri al dicroismo circolare col fine di verificare che la struttura dei mutanti non è variata rispetto al wt.

Per la sintesi del substrato sono stati purificati l'allantoinasi di *Pseudomonas fluorescens* [48], HIU idrolasi [125] e OHCU decarbossilasi di *Danio rerio* [126]. I protocolli usati sono descritti negli articoli citati.

4.2.3 Sintesi dei substrati e saggi di attività enzimatica.

L'attività dell'allantoina racemasi di *Pseudomonas fluorescens* è stata monitorata al dicroismo circolare sia osservando il cambiamento dello spettro tra 200 e 300 nm, sia eseguendo delle cinetiche in continuo. Tutte le reazioni sono state svolte in buffer potassio fosfato 100 mM pH 7.6 L'attività dell'enzima è stata testata sia sulla S che sulla (R)-allantoina. Entrambi i composti non sono disponibili commercialmente come enantiomero puro.

La (S)-allantoina è sintetizzata enzimaticamente incubando per 3 ore a temperatura ambiente 10 mL di Kp 100 mM pH 7.6, acido urico 5 mg/mL (29.7 mM) con HIU idrolasi di *Danio rerio* 90 µg, OHCU decarbossilasi di *Danio rerio* 99 µg, Uricasi di *Candida sp* (Sigma) 10 mg, catalasi (Sigma) 25 mg. L'acido urico viene solubilizzato mediante sonicazione in potassio fosfato 100 mM pH7.6. Al termine della reazione si raccoglie uno spettro tra 200 e 340 nm per osservare la scomparsa del picco a 290 nm tipico dell'acido urico. Le proteine usate per la reazione sono rimosse in amicon usando una membrana con un cutoff di 10kDa mentre l'ultra filtrato viene aliquotato e congelato a -80°C.

La (*R*)-allantoina è sintetizzata enzimaticamente eliminando la (*S*)-allantoina con l'allantoinasi di *P. fluorescens*. Il mix di reazione contiene 10mg/mL di allantoina racemica (63,24 mM) 178 µg/mL potassio fosfato 100 mM pH 7.6 in un volume finale di 10 mL. La reazione è incubata per 60 minuti a temperatura ambiente. Il termine della reazione è valutato con il prelievo di un aliquota e una misura spettrofotometrica tra 200 e 260 nm. E' attesa la riduzione del 50% del picco intorno a 210 nm. L'allantoinasi usata per la reazione è rimossa mediante amicon usando una membrana con un cutoff di 10 kDa mentre l'ultra filtrato viene aliquotato e congelato a -80°C. (Figura 32)

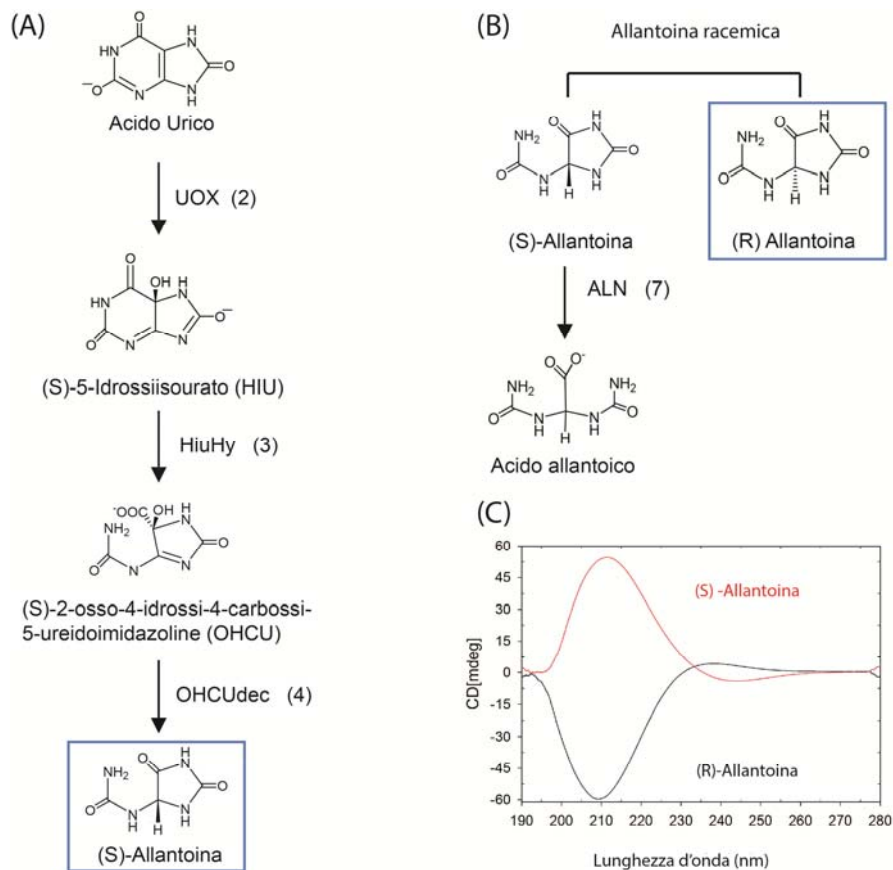


Figura 32 Schema delle reazioni coinvolte nella sintesi degli enantiomeri *S* ed (*R*)-allantoina.

(A) Sintesi (*S*)-allantoina (B) sintesi (*R*)-allantoina.

La composizione della (*R*)-allantoina contiene anche acido allantoico un composto che non ha alcun assorbimento al dicromismo circolare ed è stato dimostrato non inibire l'attività allantoina racemica in KpHpxA [50].

(C) Spettro della (*S*)-allantoina rosso. Spettro della (*R*)-allantoina nero.

I saggi enzimatici sono stati svolti con lo spettropolarimetro. Un tipico mix di reazione ha un volume finale di 1 mL, differenti concentrazioni di allantoina comprese tra 0.1 e 8 mM, 1.8 μg (6.7×10^{-5} mM) di racemasi wt o mutante. La reazione è monitorata seguendo la variazione dell'assorbimento a 220 nm (per concentrazioni di allantoina sino 0.5 mM) o a 240 nm (per concentrazioni di allantoina maggiori di 0.6 mM). Per ogni cinetica è stato raccolto uno spettro iniziale di allantoina e utilizzato per calcolare l'esatta concentrazione di allantoina presente nel mix, quindi la cinetica è monitorata per cinque minuti. La pendenza della retta è stata calcolata tra il secondo e il terzo minuto. Per avere un'ottimale conversione sulla concentrazione iniziale a 220 nm e a 240 nm si è costruita una retta di taratura alle due diverse lunghezze d'onda utilizzando degli stock a concentrazione nota. I dati sono stati raccolti con lo spettro polarimetro Jasco-715, utilizzando una cuvetta in quarzo con cammino ottico di 10 mm. I parametri usati per la raccolta dati sono i seguenti: *Band width* 2.0 nm, *Response* 8sec, *Sensitivity* standard e *Data pitch* 0.2 sec. I grafici sono stati ottenuti utilizzando il programma SigmaPlot.

4.3 Risultati

4.3.1 Identificazione del gene codificante per l'allantoina racemasi di *Pseudomonas fluorescens* (Pf_AlnRac) e comparazione con l'omologo KpHpxA di *Klebsiella pneumoniae*.

Le analisi bioinformatiche condotte sui genomi di *Pseudomonas* mostrano che 5 geni risultano essere sempre presenti nei genomi dei ceppi classificati da Van der Drift come organismi aventi attività allantoina racemasica e risultano sempre assenti negli altri ceppi classificati come mancanti di questa proprietà. Tra i geni trovati con tale metodica, Pf_AlnRac appare essere l'unico candidato possibile, in quanto appartiene alla superfamiglia degli enzimi classificati come glutammato/aspartato racemasi; ed è inserito in un contesto genomico compatibile con il catabolismo delle purine.

Pf_AlnRac è un enzima di 25.9 kDa, con un coefficiente di estinzione molare di $16055 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ed è omologo all'enzima di *Klebsiella pneumoniae* KpHpxA recentemente cristallizzato e caratterizzato dal punto di vista biochimico [40]. **(Figura 33 A e B)**

La comparazione tra le sequenze amminoacidiche dei due enzimi mostra, un 40% di identità e un 61% di somiglianza, ma una non perfetta conservazione del sito

catalitico. In particolare la cisteina 79 di KpHpxA risulta sostituita da una glicina 75 in Pf_AlnRac. (Figura 33 A)

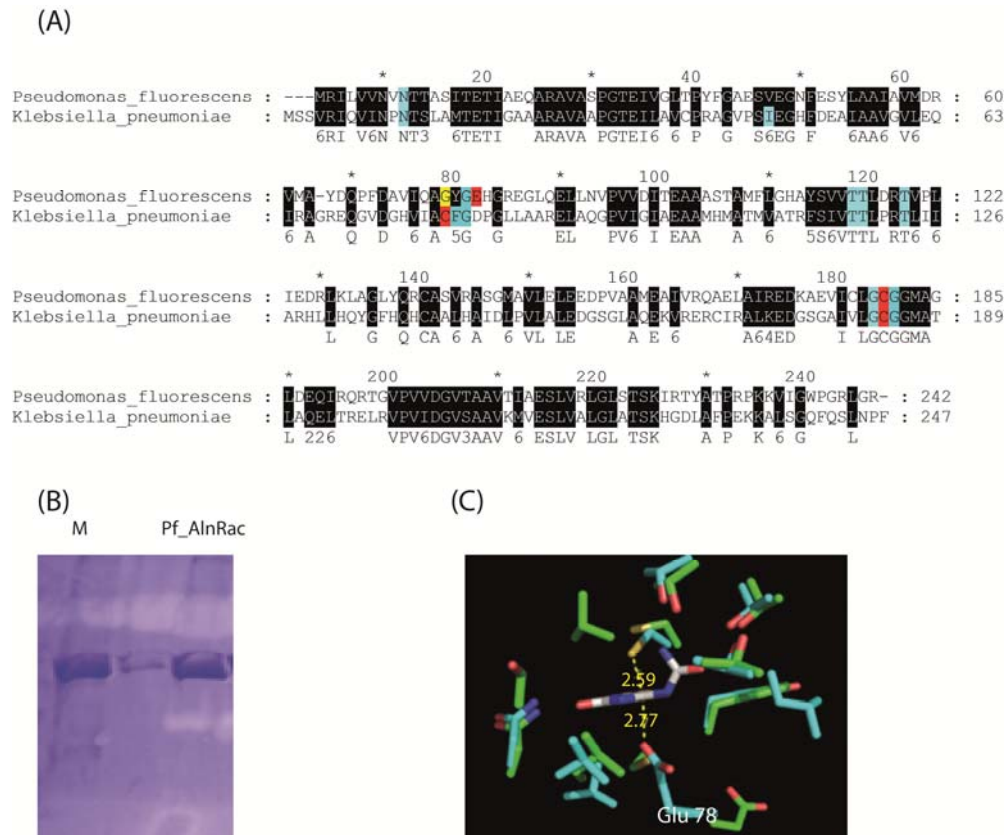


Figura 33 Allineamento, purificazione e sito attivo di Pf_AlnRac.

(A) L'allineamento tra la proteina Pf_AlnRac di *Pseudomonas fluorescens* e KpHpxA di *Klebsiella pneumoniae* è stato fatto con Clustalw e visualizzato con GeneDoc. In nero sono indicati gli aa conservati, in rosso gli aa catalitici, in celeste gli aa coinvolti nel legame col substrato e in giallo la glicina che occupa la stessa posizione della Cys catalitica di KpHpxA. (B) SDS-Page (M) marker Pf_AlnRac non solubile, Pf_AlnRac purificata e attiva. (C) Sovrapposizione del sito attivo dell'allantoina racemasi di *Pseudomonas fluorescens* con quello di *Klebsiella pneumoniae*: In rosso è indicato l'ossigeno, in blu l'azoto, in giallo la cisteina, in verde il carbonio dei residui aa dell'enzima KpHpxA, in grigio il carbonio del substrato e in celeste il carbonio dei residui aa di Pf_AlnRac. In giallo sono scritte le distanze tra l'ossegeno dell'acido glutammico 78 con il C in posizione 4 dell'allantoina e dello zolfo della cisteina 180.

Tramite una collaborazione con il gruppo del Prof.G. Zanotti dell'Università di Padova è stata ottenuta la struttura cristallografica dell'enzima di *P. fluorescens* e

ci è stato suggerito che il ruolo catalitico svolto dalla cisteina 79 di KpHpxA può essere sostituito in Pf_AlnRac dal glutammato 78. La sovrapposizione grafica dei siti attivi di KpHpxA e Pf_AlnRac è rappresentata nella **Figura 33 (C)** e mostra che nella struttura dell'enzima di *P.fluorescens* la cisteina 180 ed il glutammato 78 sono disposti su due lati opposti dell'allantoina, così come accade per le due cisteine di KpHpxA[50]. La distanza con il substrato è di 2.59 Å per la cisteina e di 2.77 Å per il glutammato. Le distanze calcolate sono comparabili con quelle misurate in KpHpxA e quindi compatibili con la catalisi. Per dimostrare l'implicazione del glutammato 78 nella catalisi sono stati costruiti i mutanti E78D ed E78Q. La mutazione E78D conserva le proprietà chimiche del residuo ma non le dimensioni. La mutazione E78Q conserva la dimensione ma non le proprietà chimiche.

4.3.2 Analisi cinetiche sulla racemizzazione della (S)- e (R)-allantoina da parte di Pf_AlnRac.

E' stata saggiata la capacità dell'enzima Pf_AlnRac di convertire soluzioni pure dell'enantiomero S o dell'enantiomero R dell'allantoina in una miscela racemica dello stesso composto. Lo spettro dell'allantoina presenta due picchi, uno attorno a 220 nm di maggiori dimensioni e uno attorno a 240 nm più ridotto. (**Figura 32 C**) Il saggio di attività utilizzato permette di monitorare la variazione dello spettro in seguito all'azione della racemasi. Al dicroismo circolare i due enantiomeri hanno uno spettro rappresentato da una curva avente la stessa forma ma segno opposto, quindi la conversione di un enantiomero puro dalla forma (S) a quella R o viceversa porta a una diminuzione del segnale che si riduce sino alla sua scomparsa quando tutto il composto è convertito in una miscela racemica costituita dal 50% di una specie e dal 50% dell'altra. L'allantoina è un composto che può andare incontro a racemizzazione spontanea, ma i tempi calcolati per questo processo sono molto più lenti rispetto a quelli misurati durante la reazione enzimatica.

Sono stati condotti degli studi volti a ottenere la curva di Michaelis-Menten. La velocità della reazione per le diverse concentrazioni di substrato è stata ottenuta monitorando la variazione di assorbimento a 220 nm per concentrazioni inferiori a 0.6 mM e a 240 nm per concentrazioni superiori. La pendenza è stata calcolata in mdeg/sec e poi convertita in mM/sec per calcolare la Michaelis-Menten. La conversione da mdeg a mM è stata effettuata utilizzando la pendenza della retta di taratura costruita su concentrazioni note di S o (R)-allantoina.

Il fitting dei dati raccolti è stato effettuato utilizzando l'equazione $f=(a*x)/(b+x)$, funzione che descrive la curva di Michaelis-Menten. I dati ottenuti in seguito a

questa operazione sono indicati dal programma come statisticamente rilevanti. Ciononostante, osservando i grafici prodotti ci si accorge che il fitting non è ottimale pertanto non si può avere la massima fiducia sui valori di K_{cat} e K_M calcolati in quanto non è stato possibile determinare sperimentalmente con accuratezza la V_{max} dell'enzima e dei mutanti. La determinazione della V_{max} è risultata problematica poiché la concentrazione di substrato richiesta è saturante per lo strumento. Tuttavia è stato possibile stimare il rapporto K_{cat}/K_M in 3 differenti modi per poter confermare così l'attendibilità del dato. I metodi utilizzati sono i seguenti:

- Metodo 1: Fitting dei dati con la curva dell'iperbole e calcolare i valori di K_{cat} e K_M e infine fare il rapporto tra i valori trovati. **(Figura 34 (A- D))**
- Metodo 2: Calcolo di una retta di regressione lineare dei valori ottenuti sperimentalmente per le concentrazioni di substrato comprese tra 0.1 e 1.5 mM. Le concentrazioni di substrato utilizzate per l'analisi sono state scelte in un tratto della curva di Michaelis-Menten che assume un andamento lineare. Il coefficiente angolare calcolato in questo tratto di curva esprime il rapporto K_{cat}/K_M . **(Figura 34 E)**
- Metodo 3: Calcolo della derivata prima della funzione alla concentrazione di 0.4 mM di substrato. **(Figura 34 A)**

I risultati ottenuti con questi metodi sono stati riassunti nella **Tabella 4**. Le stesse analisi con le medesime metodologie sono state condotte sia per il mutante E78D che nel wt.

			K_{cat}/K_M 1/mMs ⁻¹ Metodo 1	K_{cat}/K_M 1/mMs ⁻¹ Metodo 2	K_{cat}/K_M 1/mMs ⁻¹ Metodo 3	Valore medio 1/mMs ⁻¹
Pf_AlnRac Allantoina	Wt	(S)	33.0	34.8	60.0	42.7
Pf_AlnRac Allantoina	Wt	(R)	26.0	34.3	45.4	35.3
Pf_AlnRac Allantoina	E78D	(S)	5.9	13.1	11.0	10.0
Pf_AlnRac Allantoina	E78D	(R)	9.1	13.6	13.2	12.0

Tabella 4 K_{cat}/K_M della Pf_AlnRac Wt e Pf_AlnRac E78D calcolate con i 3 metodi.

Con il metodo 1 sono state calcolate anche i seguenti valori per K_{cat} e K_M .

Per Pf_AlnRac Wt sono state calcolate una K_{cat} di $138.9 \text{ s}^{-1} \pm 30.9$ e K_M $4.2 \text{ mM} \pm 1.8$ per la (S)-allantoina; sono state calcolate una K_{cat} di $72.7 \text{ s}^{-1} \pm 10.7$ e una K_M di $2.8 \text{ mM} \pm 0.8$ per la (R)-allantoina.

Per Pf_AlnRac E78D sono state calcolate una K_{cat} di $85.6 \text{ s}^{-1} \pm 39.6$ e una K_M di $14.6 \text{ s}^{-1} \pm 8.7 \text{ mM}$ per la (S)-allantoina; sono state calcolate una K_{cat} di $21.0 \text{ s}^{-1} \pm 3.5$ e una K_M di $2.3 \text{ mM} \pm 0.7$ per la (R)-allantoina.

Le attività del wt e dei due mutanti E78D e E78Q sono state monitorate a 220 nm incubando l'enzima con 200 μM di allantoina. I dati ottenuti sono stati sottoposti a regressione lineare e sono stati così calcolati i mdeg consumati da 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di enzima per secondo. Questo dato è stato poi convertito in μM al minuto e rappresentato nella **Figura 34(C)**. Dal grafico si può notare che il mutante E78 Q non risulta essere cataliticamente attivo, mentre si osserva una riduzione dell'attività nel mutante E78D.

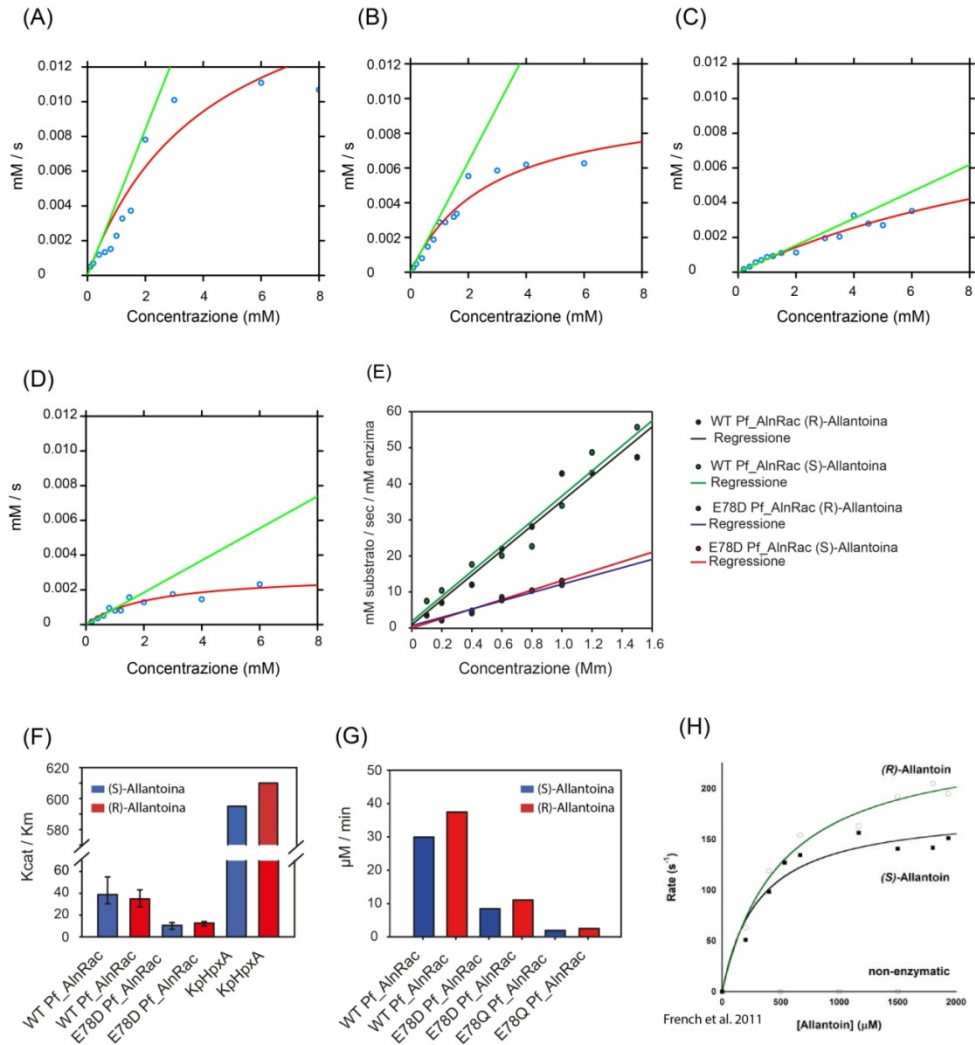


Figura 34 Dati cinetici relativi all'attività di Pf_AlnRac.

(A-D) rappresentano i dati cinetici raccolti per Pf_AlnRac wt e per il mutante E78D (metodo 1 e 3).

I cerchi azzurri rappresentano le cinetiche di racemizzazione dell'allantoina raccolte sperimentalmente, la linea rossa la curva fittata utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten, la retta in verde è stata disegnata utilizzando come coefficiente angolare il valore calcolato per la derivata prima della curva di Michaelis-Menten a una concentrazione di substrato di 0.4 mM. (A) Pf_ALNrac wt (S)-allantoina, (B) Pf_AlnRac Wt (R)-allantoina, (C) Pf_AlnRac E78D (S)-allantoina, (D) Pf_AlnRac E78D (R)-allantoina. (E) Rette di regressione utilizzate per il calcolo della K_{cat}/K_M (metodo 2) (F) Rappresentazione del rapporto K_{cat}/K_M sia per la (S)-allantoina (blu) che per la (R)-allantoina. I dati sono stati raccolti per il wt, per il mutante E78D di Pf_AlnRac e comparati con i dati riportati in letteratura per KpHpxA. I dati sono stati analizzati con i 3 metodi precedentemente descritti. Le barre rappresentano la deviazione standard dei risultati ottenuti con i tre metodi. (G) La misura dell'attività racemica è stata ottenuta monitorando il calo di assorbimento a 220 nm, utilizzando l'allantoina 200 mM come substrato e 1.8 µg/mL di proteina. (H) Studi cinetici della racemizzazione dell'allantoina da parte di KpHpxA. I quadrati neri rappresentano i dati cinetici raccolti per la (S)-allantoina, i cerchi grigi per la (R)-allantoina. La curva nera e la curva verde rappresentano i dati fittati con l'equazione di Michaelis-Menten. L'immagine e i dati relativi sono stati presi dall'articolo pubblicato da French et al nel 2011 [50].

4.4 Discussione

Durante questo lavoro è stata dimostrata l'attività allantoina racemica dell'enzima Pf_AlnRac di *P.fluorescens* appartenente alla superfamiglia delle Aspartato/Glutammato racemasi. La superfamiglia delle Asp/Glu racemasi comprende i seguenti tipi di enzimi: aspartato racemasi, maleato isomerasi, glutammato racemasi, idantoina racemasi e arilmalonato decarbossilasi. Le proprietà cinetiche di questi enzimi presentano una certa variabilità e sono state riassunte nella **Tabella 4**.

L'allantoina racemasi non è un enzima molto studiato e attualmente sono disponibili solamente i dati cinetici relativi a KpHpxA di *K.pneumoniae* [50]. La comparazione dei dati cinetici tra i due enzimi mostra che l'enzima di *K.pneumoniae*, rispetto all'enzima di *Pseudomonas fluorescens*, ha un valore di K_{cat}/K_M di circa 14 volte maggiore per la (S)-allantoina e di 16.8 volte maggiore per la (R)-allantoina. I valori calcolati nel nostro enzima, tuttavia, non risultano molto diversi se comparati con quelli noti per altre proteine appartenenti alla stessa famiglia. (**Tabella 5**)

Le due racemasi mostrano un alto valore di somiglianza (61%) e le differenze delle caratteristiche cinetiche che sono state misurate possono essere spiegate da una parziale conservazione del sito attivo. È stato dimostrato che le cisteine 79 e 184 sono importanti per l'attività catalitica dell'enzima KpHpxA, in quanto i mutanti per questi residui amminoacidici in serina sono privi di qualsiasi attività catalitica [50]. È stato dimostrato, inoltre, che le cisteine sono coinvolte nella deprotonazione e riprotonazione dell'allantoina in posizione C4. Questo meccanismo è comune ad altri enzimi appartenenti alla famiglia glutammato/aspartato racemasi.

Enzima	Organismo	Substrato1 K_{cat}/K_M $1/mMs^{-1}$	Substrato 2 K_{cat}/K_M $1/mMs^{-1}$	Referenze
Allantoina racemasi	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(S)- Allantoina 42.7	(R)- Allantoina 35.4	Questo lavoro
Allantoina racemasi	<i>Klebsiella pneumonia</i>	(S)- Allantoina 610	(R)- Allantoina 595	[40]
Aspartato racemasi	<i>Scapharca broughtonii</i>	D -aspartato 22.6	L.aspartato 7.9	[127]
Maleato isomerasi	<i>Nocardia farcinica</i>	Maleato 610		[128]
Glutamato racemasi	<i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum</i>	L-glutamato 15.1	D- glutamato 15.0	[129]
arilmalonate decarbossilasi	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Fenilmalonato 29.6 1		[131]

Tabella 5 Rapporto tra K_{cat} e K_M degli enzimi appartenenti alla superfamiglia Glu/Asp racemasi.

*Il valore riportato scaturisce da una media dei valori calcolati per i 3 metodi.

Comparando sia la sequenza amminoacidica che la struttura dei due enzimi emerge che la Cys 185 risulta essere conservata e può interagire con il C4 dell'allantoina mentre la Cys 79 è sostituita funzionalmente dal Glu78. Per dimostrare l'implicazione del residuo Glu 78 nella catalisi sono stati costruiti i mutanti E78D e E78Q. Il primo mutante, ha uno spettro al dicroismo circolare comparabile con il wt (dati non mostrati), ma non presenta alcuna attività catalitica. Questo dimostra che il residuo Glu 78 è importante per la catalisi e che avviene secondo il meccanismo acido/base descritto per KpHpxA. (**Figura 34**) Il secondo mutante inserisce un aminoacido che ha le stesse proprietà chimiche del glutammato ma una diversa dimensione della catena laterale. Il rapporto K_{cat}/K_M calcolato nel mutante risulta essere 4 volte inferiore a quella misurata per il wt. Il risultato prova che la dimensione dell'amminoacido (e quindi il preciso posizionamento del gruppo funzionale) è importante per avere un'ottimale catalisi della reazione. La presenza del glutammato nel sito attivo non cambia il meccanismo della reazione che rimane quello di una tipica catalisi acido/base, ma cambia la geometria del sito attivo il che potrebbe spiegare i risultati cinetici ottenuti in quanto l'idrogeno legato al carbonio chirale dell'allantoina interagisce in modo diverso con i residui catalitici a seconda che il substrato sia la S o la (R)-allantoina.

I valori di K_{cat} e K_M calcolati non sono ritenuti molto affidabili come valori assoluti in quanto gli errori standard calcolati sono elevati, ma possono aiutare a comprendere il funzionamento dell'enzima. In particolare i residui Glu 78 e Cys 79

sono sicuramente coinvolti nella catalisi come dimostrano i rapporti K_{cat} / K_M calcolati, ma le variazioni della K_{cat} e K_M calcolate nel mutante sono attribuibili a una implicazione dei residui nel legame e nella stabilizzazione del substrato. È stato calcolato un valore di K_M di 4.2 mM e un valore di K_{cat} di 138.9 s^{-1} quando è utilizzata la (S)-allantoina come substrato, mentre è stato calcolato un valore di 2.7 mM di K_M e una K_{cat} di 72.6 s^{-1} utilizzando la (R)-allantoina come substrato. Questi valori di K_M indicano che l'enzima lega più facilmente la (R)-allantoina rispetto alla (S)-allantoina. Nell'enzima di *K.pneumoniae* i valori di K_M sono simili per entrambi i substrati. Nel mutante Pf_AlnRac E78D utilizzando come substrato la (R)-allantoina si osserva una K_M simile a quella calcolata per il wt e una riduzione della K_{cat} di circa 4 volte al contrario utilizzando la (S)-allantoina come substrato invece si osserva che la K_M aumenta 14.6 mM (3.5 maggiore rispetto a quella calcolata per il wt) mentre la K_{cat} diminuisce di 1.6 volte. I valori di K_{cat} e K_M misurati suggeriscono che utilizzando la (R)-allantoina come substrato il glutammato agisca prevalentemente come responsabile della catalisi e la cisteina, invece, abbia un ruolo importante nel legame del substrato. Utilizzando invece la (S)-allantoina come substrato i ruoli dei due amminoacidi si invertono, l'acido glutammico pare ora essere coinvolto nel legame del substrato, questo è confermato da un aumento della K_M nel mutante e la cisteina è maggiormente implicata nella catalisi. Sia nel mutante che nel wt la K_{cat} calcolata utilizzando la (S)-allantoina come substrato risulta maggiore di quella calcolata utilizzando la (R)-allantoina come substrato questo potrebbe indicare che la cisteina è più abile nella catalisi della reazione rispetto al glutammato. Questa ipotesi potrà essere confermata in futuro costruendo un mutante E78C. Se l'ipotesi è corretta ci si attende che l'enzima abbia dei valori di K_{cat} e di K_M simili per entrambi i substrati.

Il confronto tra le due racemasi mostra che anche altri amminoacidi coinvolti nel legame del substrato appaiono conservati o sostituiti con amminoacidi simili che non dovrebbero influire sui parametri cinetici dell'enzima. Ad esempio la Phe coinvolta nella stabilizzazione dell'intermedio enolato tramite l'utilizzo del gruppo amminico presente in KpHpxA è sostituita in Pf_AlnRac da una tirosina. Entrambi gli amminoacidi presentano una componente aromatica e possono interagire con l'enolato allo stesso modo. (**Figura 34**)

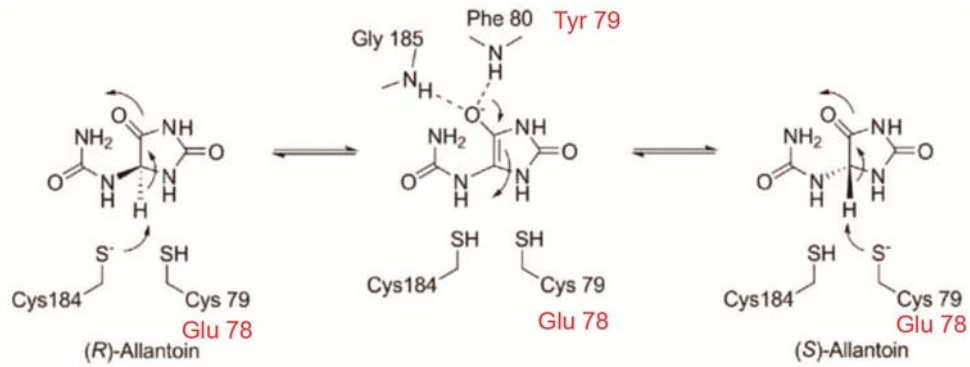


Figura 35 Schema del meccanismo di reazione dell'allantoine racemasi.

Uno dei due aminoacidi presenti nel sito attivo è deprotonato e può quindi strappare l'idrogeno dall'allantoine si forma così un intermedio enolato. L'altro aminoacido cede a sua volta il protone all'allantoine ponendolo nella posizione opposta e sintetizzando così l'enantiomero opposto. Lo schema è stato ipotizzato da French nel 2011 [50].

Capitolo 5

Studio dei prodotti dell'ossidazione dell'acido urico da parte della perossidasi di rafano e determinazione della stereospecificità degli enzimi HIU idrolasi e OHCU decarbossilasi

5.1 Introduzione

L'acido urico, in passato, è stato considerato per l'uomo solo come un composto di scarto, privo di attività biologica e responsabile di alcune patologie quali la gotta e l'iperuricemia. Uno studio condotto nel 1955 mette in evidenza che oltre all'uricasi sono presenti i seguenti enzimi capaci di ossidare l'acido urico a diversi composti: la catalasi in presenza di etanolo e acido urico rilascia urea, allantoina, acido ossalutico, acido parabanico, acido cianurico e CO_2 ; la lactoperoxidasi in presenza di perossido di idrogeno rilascia urea, allantoina, acido allossanico e altri composti non identificati; la perossidasi (HRP) di rafano rilascia allantoina e tracce di urea[33].

Le perossidasi sono enzimi presenti in piante, animali, lieviti e batteri e sono associati a diversi processi metabolici che vanno dalla sintesi di alcuni ormoni, alla risposta immunitaria, al controllo di alcuni processi biologici. Le perossidasi hanno un gruppo eme responsabile del trasferimento di elettroni da diversi composti donatori (D) al perossido d'idrogeno, rilasciando il composto ossidato e due molecole d'acqua. L'enzima nella forma nativa ha un gruppo prostetico contenente il Fe^{III} legato alla protoporfirina IX e 2 molecole di Ca^{2+} [32].

La perossidasi è un enzima capace di ossidare numerosi substrati che possono agire come donatori di elettroni (D) tra cui l'acido urico. I meccanismi di catalisi conosciuti con cui agisce questo enzima sono 3.

Il meccanismo di catalisi studiato per la prima volta con l'acido ascorbico è lo stesso che è stato osservato per l'acido urico e altri substrati[32]. La catalisi avviene in 3 diverse fasi che portano ad un cambiamento delle caratteristiche spettroscopiche dell'enzima tra 370 e 700 nm. Il cambiamento dello spettro della perossidasi permette di monitorare e distinguere le varie fasi e identificare così un composto come reale substrato dell'enzima.

In una prima fase il legame del perossido d'idrogeno all'enzima comporta il trasferimento all'enzima di entrambi gli equivalenti di ossidante del perossido. Un equivalente di ossidante è coinvolto nella rimozione di un elettrone dal Fe^{III} generando Fe^{IV} con la formazione di un gruppo ferrile. L'altro equivalente di ossidante porta alla formazione di un catione di natura radicalica sull'anello porfirinico. Questi processi portano alla formazione del composto I (CI) formato da $\text{Pr IX}^{\bullet} + \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. (**Figura 36**) [32]

Nella seconda fase l'aggiunta dell'acido urico, o di qualsiasi altro donatore di elettroni (DH₂) in una quantità stechiometrica del composto CI, porta al trasferimento di un singolo elettrone dal substrato al composto CI e si ha quindi la rimozione del catione radicalico (Pr IX) e la formazione del composto II (CII) formato da Pr IX e Fe^{IV}=O. In questo passaggio il substrato acquista un carattere radicalico(D[•]) [32]. **(Figura 36)**

Nella terza fase l'aggiunta stechiometrica al composto CII di acido urico o dello stesso donatore di elettroni (DH₂) porta nuovamente alla cessione di un elettrone da parte del substrato all'enzima che è riportato nello stato nativo mentre la molecola di donatore acquista proprietà radicaliche (D[•]). Le due molecole di substrato convertite nella forma radicalica reagiscono tra loro per formare una molecola ossidata e una riconvertita allo stato normale. Dopo la terza fase l'enzima è pronto per un nuovo ciclo di reazioni [32]. **(Figura 36)**

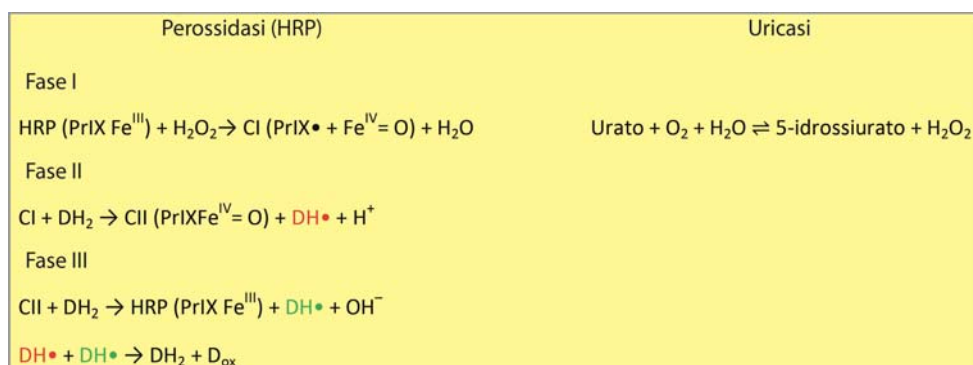


Figura 36 Due diverse strategie per l'ossidazione dell'acido urico.

L'ossidazione dell'acido urico catalizzata dalla perossidasi avviene in 3 fasi. Durante il processo di ossidazione si liberano 2 molecole di acqua per ogni molecola di acido urico e di perossido d'idrogeno utilizzate. L'uricasi catalizza la reazione in modo differente, non ha bisogno di alcun gruppo prostetico, e utilizza l'ossigeno disciolto in soluzione per produrre HIU e perossido d'idrogeno. Abbreviazioni: HRP perossidasi, PrIX[•] forma radicalica dell'anello porfirinico, DH₂ molecola donatrice di elettroni in forma ridotta, D[•] substrato in forma radicalica, D_{ox} substrato ossidato.

Un meccanismo di reazione differente è stato osservato per i solfiti. Per queste sostanze non si osserva la formazione di C II ma un diretto rilascio del prodotto ossidato senza alcuna rilevazione di composti radicalici. In questo caso il donatore cede entrambi gli elettroni contemporaneamente all'enzima[132].

L'ossidazione dei composti O-dianisidina e p-fenilenediamina avvengono con un meccanismo di reazione differente. Il meccanismo di questa reazione è una via di

mezzo tra i due precedentemente descritti [1, 133]. E' stato osservato che il C II che si origina dalla reazione di ossidazione della perossidasi ha uno spettro differente rispetto a quelli registrati per l'ossidazione di altri composti e non sono rilevabili specie radicaliche nell'ambiente di reazione [1, 133]. E' stato dimostrato tramite studi spettroscopici e di risonanza paramagnetica elettronica (EPR), che si forma un intermedio radicalico responsabile dello spettro CII che rimane legato al sito attivo. In una seconda fase, l'intermedio cede il secondo elettrone all'enzima formando il composto ossidato.

L'(S)-5-HIU, prodotto che si origina dall'ossidazione dell'acido urico da parte dell'uricasi decade spontaneamente formando allantoina. I tempi di incubazione enzima substrato utilizzati per l'identificazione di allantoina come unico prodotto della reazione catalizzata dalla perossidasi osservata nel 1955 da Canellakis [33] sono abbastanza lunghi e i risultati descritti sono dichiarati comparabili con quelli ottenuti con l'uricasi. E' quindi plausibile che come accade per l'uricasi l'allantoina misurata sia dovuta al decadimento spontaneo di composti intermedi ad allantoina.

In questo lavoro è stata studiata la reazione catalizzata dalla perossidasi utilizzando l'acido urico come donatore di elettroni e la dianisidina per rendere più rapida ed efficiente la reazione. Gli spettri ottenuti sono stati comparati con quelli raccolti dalla reazione catalizzata dall'uricasi. E' stato inoltre misurato e comparato sia il decadimento spontaneo dei composti originatisi dalla reazione della perossidasi con quelli dell'uricasi, sia quello enzimatico saggiato con gli enzimi HIU idrolasi e OHCU decarbossilasi. Lo schema contenente i composti che si originano dalla degradazione dell'acido urico ad allantoina sono stati riassunti nella **Figura 7**.

5.2 Materiali e Metodi

5.2.1 Saggi di attività.

Per tastare la capacità della perossidasi di ossidare l'acido urico sono stati eseguiti dei saggi di attività sia allo spettrofotometro Cary 50 che allo spettropolarimetro Jasco-715. Il materiale utilizzato per i saggi comprende: O-dianisidina(Sigma), perossidasi di rafano (Sigma), uricasi (Sigma), acido urico (Sigma) e gli enzimi HIU-idrolasi(HiuHy) e OHCU decarbossilasi (OHCUdec) di *Danio rerio* purificati come

descritto da Zanotti et al. nel 2006 [125] e da Cendron et al. nel 2007[126]. I saggi allo spettrofotometro sono stati realizzati raccogliendo i dati nella regione di assorbimento degli UV compresa tra 220 nm e 350 nm. La reazione dell'ossidazione dell'acido urico catalizzata dalla HRP contiene 6 U di perossidasi, 75 μM acido urico, 1.5 o 10 μM di O-dianisidina e potassio fosfato pH 7.6; 100 μM di perossido d'idrogeno sono utilizzati per far iniziare la reazione dopo aver registrato lo spettro dell'acido urico due volte. Per rilevare la presenza di 5-HIU come prodotto della reazione viene aggiunto 1 μg di HiuHy. La presenza di OHCU è stata monitorata inserendo nel mix di reazione sia l'HiuHy 1 μg che l'OHCUdec 5 μg . Lo stesso mix di reazione è stato utilizzato sia per esperimenti al dicroismo circolare che allo spettrofotometro. Tra i due esperimenti l'unica variabile introdotta è stata la concentrazione del tampone che è di 100 mM per gli esperimenti allo spettrofotometro e di 20 mM al dicroismo circolare. La reazione dell'uricasi, invece, è stata studiata aggiungendo 75 μM di acido urico in tampone Kp pH 7.6, raccolto lo spettro dell'acido urico, si prosegue col monitoraggio della reazione aggiungendo 150 μg di uricasi.

Le cinetiche per lo studio del decadimento spontaneo dei prodotti sono stati raccolti alla lunghezza d'onda di 312 nm per osservare la decomposizione dell'HIU e 256 nm per osservare quella dell' OHCU. La cinetica di decadimento è stata monitorata per 30 minuti. Il fitting delle curve è stato ottenuto con l'utilizzo del programma SigmaPlot . I dati sono stati fittati con una curva esponenziale.

5.3 Risultati

L'enzima più studiato responsabile dell'ossidazione dell'acido urico è l'uricasi (Uox). L'ossidazione dell'acido urico da parte questo enzima genera (S)-5-HIU che viene convertito a (S)-OHCU dalla HIU idrolasi (HiuHy). L'OHCU decarbossilasi (OHCUdec) converte (S)-OHCU ad (S)-allantoina. Entrambi i composti generati da questa reazione sono instabili e decadono spontaneamente formando allantoina racemica con un tempo di dimezzamento di circa 22 minuti per l'HIU e di 25-26 minuti per l'OHCU a pH fisiologico[35] [28]. L'allantoina, invece, è un composto stabile anche se tende a formare una soluzione racemica.

La reazione di ossidazione dell'acido urico da parte della perossidasi è stata inizialmente monitorata tra 200 e 700 nm. Gli spettri ottenuti sono simili a quelli

monitorati in seguito alla reazione catalizzata dall'uricasi. Per lo studio di questa reazione, e per la determinazione dei composti che si originano è molto importante che la velocità di ossidazione dell'acido urico sia molto rapida. Pertanto, sono state cercate delle condizioni nella quale la velocità della reazione di ossidazione da parte della perossidasi sia comparabile con quelle catalizzata dall'uricasi, in modo da distinguere chiaramente gli spettri dei reagenti e dei prodotti. Una velocità di ossidazione troppo lenta porterebbe a un decadimento spontaneo dell'HIU e a una sovrapposizione degli spettri del reale prodotto della reazione con quelli dell'acido urico e di altri prodotti dovuti alla degradazione spontanea dei composti, rendendo poco interpretabile il risultato ottenuto. Dalle prove effettuate *in vitro* la perossidasi risulta essere molto più lenta nella catalisi della reazione rispetto all'uricasi: è necessario, quindi, trovare un sistema per aumentare la velocità della reazione.

La O-dianisidina è un substrato della perossidasi ed è tipicamente utilizzato per effettuare dei saggi colorimetrici. Questo composto è stato utilizzato per la prima volta per monitorare l'ossidazione del glucosio da parte della glucosio ossidasi. I prodotti di questa reazione sono il perossido d'idrogeno e il gluconolattone; il perossido d'idrogeno viene poi utilizzato dalla perossidasi per ossidare la dianisidina e convertirla in un composto colorato. E' noto che a pH 7.5 composti azotati che si comportano da buoni nucleofili come la piridina, 2-6 metil-piridina, 2 metil imidazolo e l'imidazolo possono interagire con il radicale della O-dianisidina presente nel sito attivo facilitando l'ossidazione di questi composti da parte dell'enzima[133]. Si è osservato che piccole concentrazioni di questa sostanza (1.5 μM) sono sufficienti per aumentare notevolmente la velocità di reazione della perossidasi permettendo l'ossidazione di tutto l'acido urico presente in reazione (75 μM). La reazione risulta essere più rapida utilizzando 10 μM di O-dianisidina. E' stato anche dimostrato che in assenza della perossidasi la dianisidina e l'acqua ossigenata non hanno alcun effetto sull'acido urico. Lo stesso risultato è stato ottenuto incubando la perossidasi con la dianisidina o il perossido d'idrogeno con la dianisidina (dati non mostrati). Tali prove sono state eseguite col fine di escludere che l'ossidazione di questo composto avvenga ad opera di componenti presenti nel saggio e non dalla perossidasi. Nell'interpretazione dei dati però è da tener presente che la dianisidina potrebbe in parte modificare il reale prodotto finale della perossidasi. La dianisidina viene ossidata dalla perossidasi formando un semichinone come intermedio radicalico che viene successivamente convertito tramite la cessione del secondo elettrone all'enzima a dianisidina-chinonedimina.

In soluzione acquosa 2 molecole di questo composto reagiscono tra loro per formare un composto stabile chiamato bis-azo-bifenile. E' stato osservato che questo composto può reagire con altre sostanze come l'antiossidante butilidrossianisolo (BHA) per formare nuovamente O-dianisidina e dianisidina-quinonediiimine, questa reazione causa un cambiamento dello spettro finale del composto di ossidazione della dianisidina[1].

Gli spettri ottenuti dall'ossidazione dell'acido urico con la perossidasi e dianisidina 1.5 μM risultano essere molto simili a quelli ottenuti dall'uricasi, anche se la reazione della perossidasi è più lenta. Utilizzando dianisidina 10 μM l'ossidazione è più rapida. In tutte le reazioni si osserva il caratteristico spettro dell' HIU che presenta sia una diminuzione che uno spostamento del picco a 290 nm (caratteristico dell'acido urico) a 303 nm che di un picco a 220 nm. Entrambi i picchi vanno incontro a decadimento spontaneo. Nella reazione catalizzata dalla perossidasi e dianisidina 10 μM si osserva uno spostamento meno marcato intorno ai 298 nm. (Figura 38A,D,G)

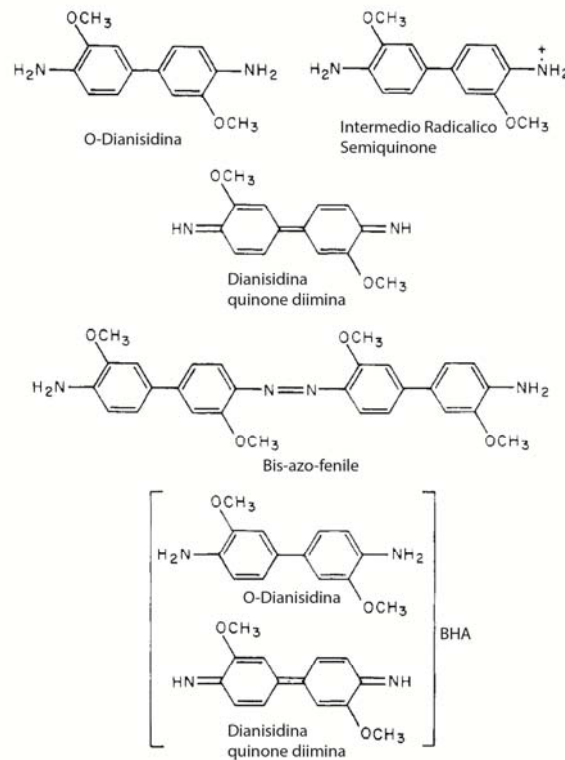


Figura 37 Ossidazione della dianisidina.

Lo schema è stato modificato dall'articolo di Claiborne et al del 1979 [1]

Per confermare che il composto osservato sia realmente HIU si aggiunge alla miscela iniziale di reazione l'HiuHy di *Danio rerio*[4]. Lo spettro ottenuto in seguito all'aggiunta di questo enzima al mix di reazione è differente da quello ottenuto solamente dalla perossidasi e risulta molto simile all'OHCU. In tutte le reazioni misurate si osserva una diminuzione del picco a 220 nm e una sparizione di quello compreso tra 290 e 320 nm rispetto allo spettro registrato precedentemente (perossidasi). La quantità di OHCU prodotta in seguito alla reazione del HiuHy è inferiore di circa il 18% nella reazione catalizzata da HRP e 1.5 μM di dianisidina. La curva dell'OHCU presenta un assorbimento prossimo allo zero alla lunghezza d'onda di 300 nm. La reazione catalizzata da HRP in presenza di dianisidina mette in evidenza, in questa regione di assorbimento, la formazione di un composto che non viene degradato dall' HIU idrolasi e in parte decade spontaneamente, mentre l'altra parte invece rimane stabile. Questo effetto risulta essere più marcato nella reazione in cui viene utilizzato dianisidina 10 μM . (**Figura 38 B, E, H**)

Infine, è stata misurata la capacità dell' OHCU decarbossilasi (OHCUdec) di *Danio rerio* di degradare l'OHCU prodotto dalla perossidasi ad allantoina. Gli spettri ottenuti da questa reazione non corrispondono a quelli dell'allantoina tipicamente ottenuti da una reazione di ossidazione dell'acido urico da parte dell'uricasi. Si osserva un calo inferiore dell'OHCU a 220 nm corrispondente a circa il 23% del prodotto nella reazione catalizzata da HRP e dianisidina 1.5 μM . Questo spettro suggerisce che l'OHCUdec riesce a convertire solamente una parte del prodotto di ossidazione della perossidasi ad allantoina. Nella reazione catalizzata da HRP e dianisidina 10 μM si osserva che permane il composto degradato dall'HIU idrolasi e un troncamento del segnale a 220 nm, probabilmente causato da un eccesso di disturbo a quella lunghezza d'onda; risulta comunque chiaro un effetto dell' OHCUdec sul composto originatosi dalla degradazione dell'acido urico da HRP, dianisidina 10 μM e HiuHy. (**Figura38 C, F e I**).

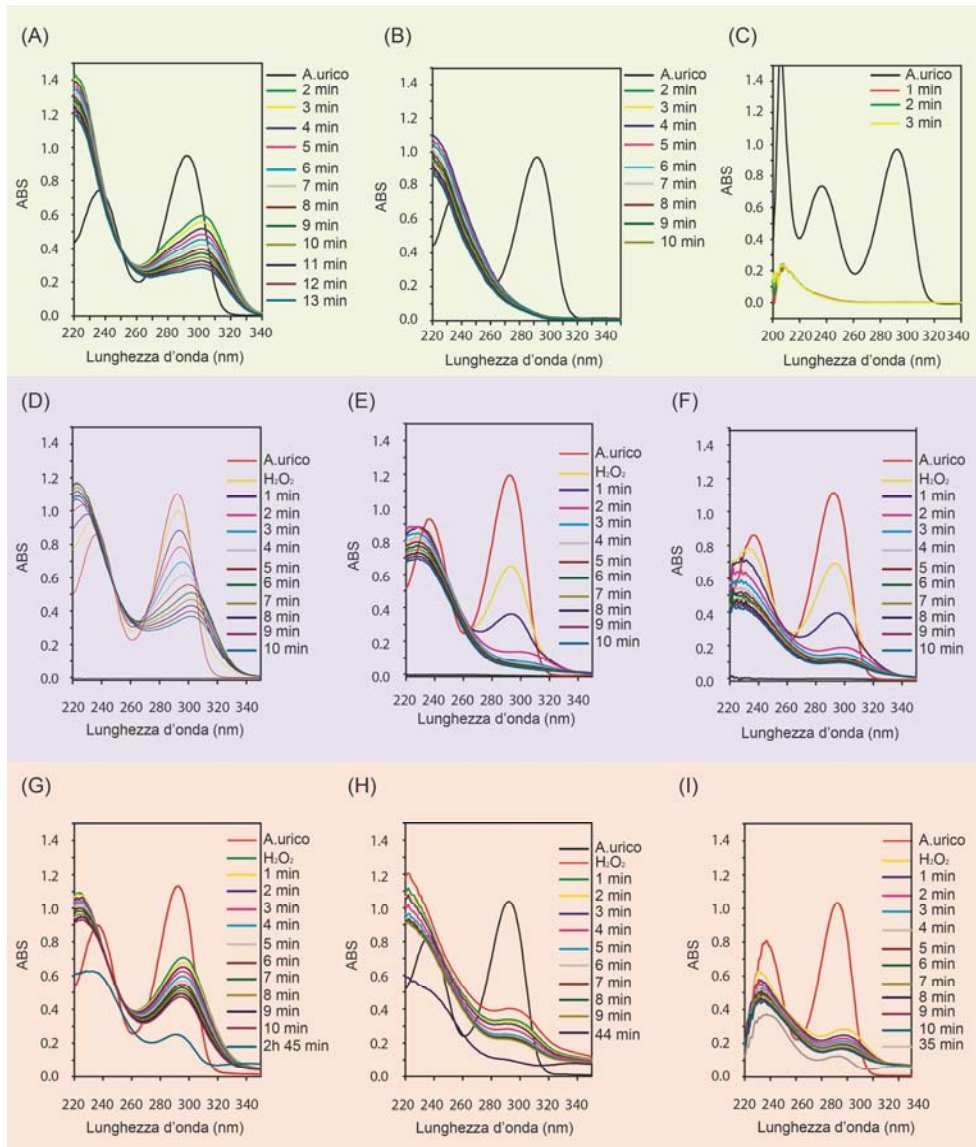


Figura 38 Prodotti di ossidazione dell'acido urico.

E' stata esaminata l'ossidazione dell'acido urico in tre diverse condizioni.

Pannello verde: è stata monitorata l'ossidazione dell'acido urico dall'uricasi (Uox). (A), Acido urico 75 μ M e Uox (B) Acido urico 75 μ M, Uox e HiuHy (C) Acido urico 75 μ M, Uox, HiuHy e OHCUdec.

Pannello viola: è stata monitorata l'ossidazione dell'acido urico con la perossidasi (HRP) e 1.5 μ M di O-dianisidina (D) HRP, 100 μ M perossido d'idrogeno, 1.5 μ M O-dianisidina e 75 μ M acido urico (E) HRP, 100 μ M perossido d'idrogeno, 1.5 μ M O-dianisidina 75 μ M acido urico, e HiuHy (F) HRP, 100 μ M perossido d'idrogeno, 1.5 μ M O-dianisidina 75 μ M acido urico, HiuHy e OHCU dec.

Pannello rosa: è stata monitorata l'ossidazione dell'acido urico con la perossidasi (HRP) e 10 μ M di O-dianisidina (D) HRP, 100 μ M perossido d'idrogeno, 10 μ M O-dianisidina e 75 μ M acido urico (E)

HRP, 100 μ M perossido d'idrogeno, 10 μ M O-dianisidina 75 μ M acido urico, e HiuHy (F) HRP, 100 μ M perossido d'idrogeno, 10 μ M O-dianisidina 75 μ M acido urico, HiuHy e OHCDec.

In letteratura sono note le costanti di decadimento spontaneo dell'HIU e dell'OHCDec [28] [4].

Il decadimento dell'HIU è stato monitorato registrando una cinetica a lunghezza d'onda 312 nm, mentre l'OHCDec a 256 nm.

Poiché il prodotto secondario risulta essere maggiormente accentuato con dianisidina 10 μ M, per poterne studiare meglio il decadimento spontaneo si è scelto di utilizzare questa condizione. (**Figura 38**) Sono state misurate sia a 312 nm che a 256 nm le seguenti cinetiche: perossidasi; perossidasi e HIU idrolasi; e in fine, perossidasi, HIU idrolasi e OHCDec decarbossilasi. Le cinetiche di decadimento spontaneo sono state fittate con la seguente equazione esponenziale: $f=y_0+a*\exp(-b*x)$ dove b rappresenta la costante di decadimento del composto. I risultati relativi al decadimento dei composti che si originano dalla reazione della perossidasi sono stati riassunti nella **Tabella 6**. Le costanti di decadimento sono coerenti con quelle presenti in letteratura[4].

Composti	Hrp	Hrp + HiuHy	Hrp +HiuHy+ OhcuDec
HIU (312 nm)	0.066	0.0989	0.0916
OHCDec (256nm)	Curva non fittabile	0.0333	0.0743

Tabella 6. Decadimento spontaneo dei prodotti di ossidazione dell'acido urico da parte della perossidasi (Hrp).

Il decadimento noto per l'HIU è 0.096 min^{-1} mentre per l'OHCDec è di 0.072 min^{-1} [4].

L'ossidazione dell'acido urico da parte dell'uricasi e la successiva degradazione enzimatica dell' HIU e dell'OHCDec porta alla sintesi di composti otticamente attivi quali (S)-HIU, (S)-OHCDec e (S)-allantoina.(**Figura 39 (A - C)**). La reazione catalizzata da HRP in presenza di dianisidina 10 μ M è stata studiata al dicroismo circolare per avere delle indicazioni sulla sintesi di molecole otticamente attive. La reazione catalizzata in presenza di HRP e dianisidina porta alla formazione di composti non otticamente attivi. Lo stesso risultato è stato ottenuto in presenza di HiuHy ma non in presenza dell'OHCDec. (**Figura 39 D e E**). Lo spettro ottenuto dalla reazione catalizzata dall'OHCDec non è quello della (S)-allantoina. (**Figura 39 F**). Monitorando per 25 minuti lo spettro relativo al prodotto della reazione si osserva un graduale calo dell'attività ottica in una regione compresa tra 240 e 280 nm.

Questo calo è imputabile alla degradazione spontanea dell' (R)-OHCU. (Figura 39 F)

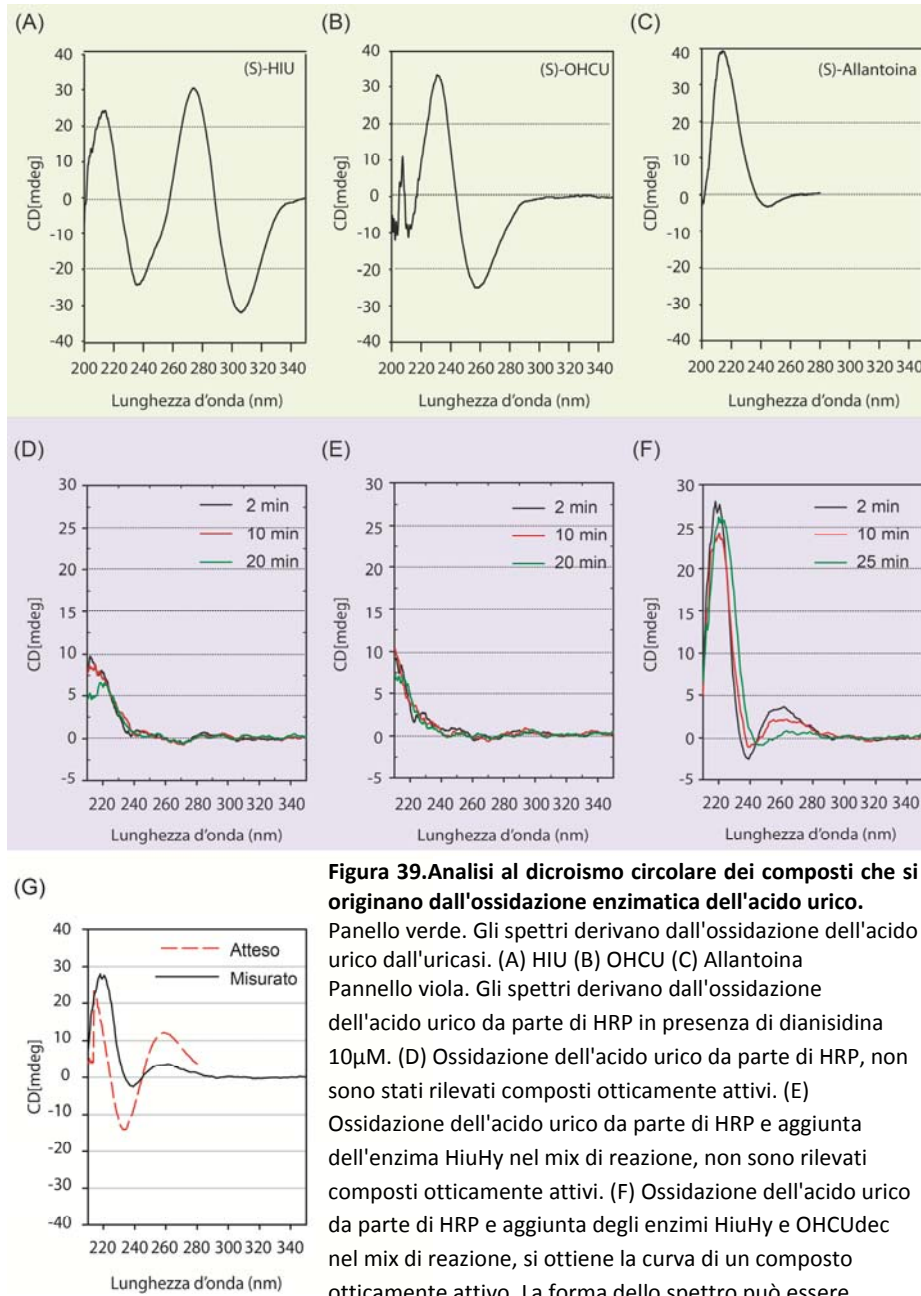


Figura 39. Analisi al dicroismo circolare dei composti che si originano dall'ossidazione enzimatica dell'acido urico.

Pannello verde. Gli spettri derivano dall'ossidazione dell'acido urico dall'uricasi. (A) HIU (B) OHCU (C) Allantoina
 Pannello viola. Gli spettri derivano dall'ossidazione dell'acido urico da parte di HRP in presenza di dianisidina 10 μ M. (D) Ossidazione dell'acido urico da parte di HRP, non sono stati rilevati composti otticamente attivi. (E) Ossidazione dell'acido urico da parte di HRP e aggiunta dell'enzima HiuHy nel mix di reazione, non sono rilevati composti otticamente attivi. (F) Ossidazione dell'acido urico da parte di HRP e aggiunta degli enzimi HiuHy e OHCUdec nel mix di reazione, si ottiene la curva di un composto otticamente attivo. La forma dello spettro può essere spiegata come somma delle (S)- Allantoina + (R)-OHCU. (G) Confronto della curva predetta (linea rossa tratteggiata) con quella ottenuta sperimentalmente (linea nera). La curva attesa è stata ottenuta dividendo per due le curve dell'(S)

La differenza dello spettro misurato con l'allantoina non è attribuibile alla genesi di un prodotto di reazione differente, ma l'andamento dello spettro può essere giustificato come una curva ibrida tra (*R*)-OHCU e (*S*)-allantoina. Ipotizzando che tutto l'acido urico sia convertito interamente a HIU racemo dalla perossidasi e successivamente a OHCU racemo dalla HiuHy, è stata effettuata una predizione della curva ibrida (*R*)-OHCU/(*S*)-allantoina. Confrontando la curva predetta con quella misurata si può osservare che i picchi predetti corrispondono a quelli osservati sperimentalmente. Si può quindi affermare che è stato ottenuto realmente un mix di (*R*)-OHCU e (*S*)-allantoina. La concentrazione del prodotto misurato è di circa 4 volte inferiore a quello atteso da una completa conversione dell'acido urico a HIU racemo.

5.4 Discussione

L'analisi dei prodotti di ossidazione dell'acido urico da parte della perossidasi (HRP) ha permesso di comprendere meglio questa reazione e di ottenere informazioni aggiuntive sulla stereo selettività degli enzimi HIU idrolasi (HiuHy) e OHCU decarbossilasi (OHCUdec). La HRP da sola non è molto efficiente nel catalizzare la reazione di ossidazione dell'urato ed è stato necessario usare la O-dianisidina per rendere più rapida la reazione. L'O-dianisidina funziona da catalizzatore, in quanto sono sufficienti concentrazioni basse per aumentare la velocità della reazione come è documentato per l'interazione del radicale semiquinone con altri composti azotati[1, 133].

Lo spettro della O-dianisidina e del composto ossidato hanno un assorbimento nella regione UV tra 250 e 340 nm che può giustificare in parte gli spettri osservati. Questo potrebbe essere responsabile del parziale spostamento del picco dell'HIU a 298 nm invece che 303nm e l'accumulo di un prodotto stabile in questa lunghezza d'onda. (**Figura 38 G, H e I**) Il decadimento osservato da parte di alcuni composti potrebbe essere dovuto non solo ai composti che si originano dalla reazione dell'ossidazione dell'acido urico ma in parte anche da quella della dianisidina[1, 133].

La formazione di un composto oltre all'HIU e all'OHCU che decade spontaneamente può essere dovuta a un'ossidazione in un punto differente dell'acido urico. Questo composto non è un substrato della HIU idrolasi e può degradarsi spontaneamente. I tempi di decadimento misurati per questo prodotto

sono molto simili al 5-HIU. La sostanza più simile al 5-HIU è il 4- HIU. L'ossidazione dell'acido urico con il diossigeno può portare alla formazione di 4-HIU: la possibilità di formazione di questo composto è stata fatta sulla base di calcoli teorici, ma non è mai stato identificato[134].

I dati raccolti col dicroismo circolare permettono di completare le conoscenze note sull' HiuHy e l' OHCUdec e di comprendere un pò meglio l'attività della perossidasi sull'acido urico. In base ai dati raccolti al dicroismo circolare e allo spettrofotometro si può affermare che la HRP in presenza di dianisidina ossida l'acido urico formando più composti nessuno dei quali è otticamente attivo. La perossidasi di rafano è un enzima capace di catalizzare l'ossidazione di numerosi substrati anche con proprietà chirali. Ad esempio è noto che essa può ossidare sia la L che la D tirosina anche se con velocità differenti[135]. Non è inatteso ,quindi, che il prodotto di ossidazione della HRP non sia otticamente attivo. Nella maggior parte dei genomi gli enzimi HiuHy e OHCUdec sono associati all'uricasi e pertanto entrano in contatto solamente con (S)-5-HIU e con (S)-OHCU, per tale motivo non è mai stata determinata la loro stereospecificità. La reazione dell'HiuHy sul prodotto di ossidazione dell'acido urico tramite HRP non porta alla formazione di nessun composto otticamente attivo. L' HiuHy è un tetramero formato da quattro subunità identiche. In particolare l'enzima si presenta come di dimero di dimeri. Il sito attivo è localizzato nell'interfaccia presente tra le sub unità che compongono il dimero e non presenta alcuna simmetria . [125] La conformazione del sito attivo è quindi compatibile con l' abilità da parte dell'enzima di convertire sia l' (S)-HIU che l'(R)-HIU in una miscela racema di OHCU.

La reazione catalizzata dall'OHCU decarbossilasi in presenza di HRP, dianisidina 10 μ M e HiuHy porta alla formazione di un composto chirale la cui curva appare differente dalla (S)-allantoina. Il prodotto della reazione può essere interpretato come la somma di due curve (R)-OHCU e (S)-allantoina. Le curve dei prodotti ottenuti dall'ossidazione di acido urico 75 μ M con l'uricasi sono stati utilizzati per predire la curva (R)-OHCU/(S)-allantoina e compararla con quella raccolta sperimentalmente. Il dato mostra che dalla reazione catalizzata dalla perossidasi viene prodotto il 25% di HIU racemo che viene poi convertito in OHCU racemo di cui solo il 50 %

viene utilizzato per la sintesi di (S)-allantoina. Il restante (R)-OHCU decade spontaneamente. (**Figura 41**). L'acido urico è uno dei più abbondanti antiossidanti presenti nel sangue: questo tipo di saggio potrebbe essere utilizzato in futuro per indagare i composti che si generano da reazioni radicaliche per comprenderne meglio il meccanismo di reazione.

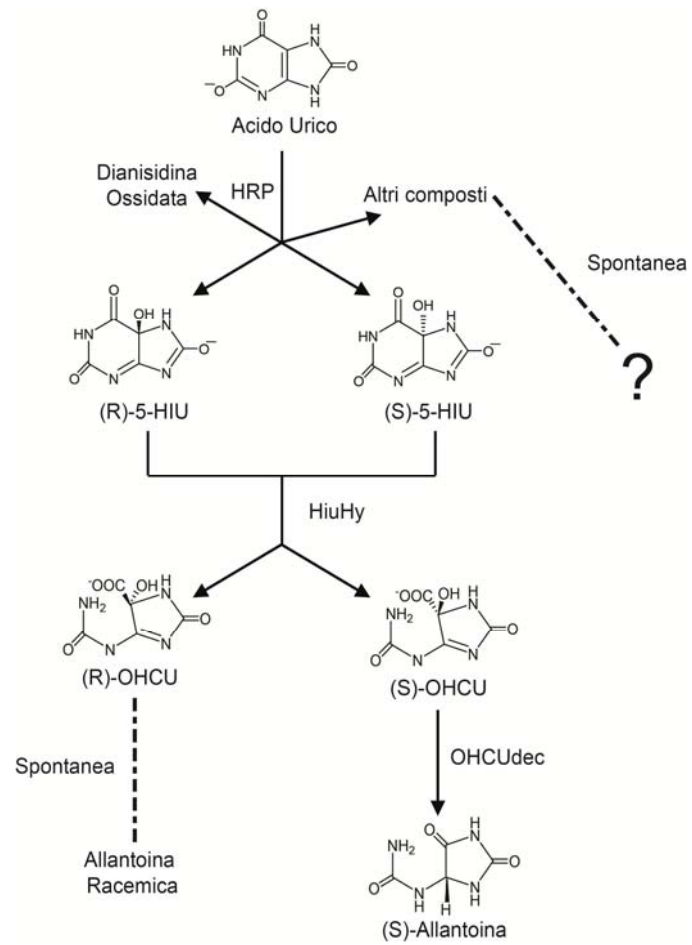


Figura 40 Schema ipotetico dei prodotti di degradazione dell'acido urico da parte della perossidasi e dianisidina 10 μ M.

Capitolo 6

Identificazione del cofattore utilizzato dall' enzima ureidoglicolato idrolasi (AIIA) di *E. coli*.

6.1 Introduzione

Nel genoma di *Escherichia coli* non sono mai stati identificati sperimentalmente o per omologia enzimi implicati nella degradazione dell'acido urico ad allantoina. Ciononostante è stato identificato un intero cluster contenente un trasportatore del tipo Dal4p per l'allantoina e gli enzimi necessari per convertirla a gliossilato o ossalurato [62]. È stato dimostrato che *E. coli* è abile a utilizzare questo composto come fonte di azoto, ma non come fonte di carbonio. Alcuni geni coinvolti in questo metabolismo, AllB allantoinasi, AllC allantoinato amidoidrolasi, AllD ureidoglicolato deidrogenasi, AllA ureidoglicolato idrolasi e AllR come regolatore trascrizionale sono stati identificati tramite degli studi genetici e ne è stata testata l'attività in vitro [62]. Questo tipo di analisi era stata già svolta in precedenza in *Saccharomyces cerevisiae* [136]. Agli studi genetici effettuati da Eva Cusa nel 1999 [62] sono susseguiti dei lavori di approfondimento sulla maggior parte dei geni identificati. Ad esempio è stato delineato meglio l'aspetto biochimico della reazione catalizzata da AllB ed è stata risolta la struttura cristallografica [100]; AllC è stato recentemente studiato e ne è stato identificato il vero prodotto finale della reazione [12]; AllD è stato recentemente cristallizzato e ne è stato delineato il meccanismo della reazione [137]; infine per AllA è stata risolta la struttura cristallografica [64], ma rimane ancora da chiarire il metallo coinvolto nella catalisi e il meccanismo di reazione.

Dalle analisi strutturali condotte dal gruppo di Raymond nel 2005 [62] emerge che l'enzima è un dimero e ha un folding riconducibile alle cupine (SCOP). Il sito attivo dell'enzima è localizzato nel monomero, ma sono stati trovati degli altri amminoacidi coinvolti nel legame di substrato che appartengono all'interfaccia tra i due monomeri. Dall'omologia con altre proteine appartenenti alla stessa famiglia come l'ossalato decarbossilasi [138] [139] e la quercetina 2,3-diossigenasi [140] si è ipotizzato che AllA fosse un enzima metallo dipendente, ma non è stato ancora identificato il metallo coinvolto nella catalisi [64].

Sono conosciute due diversi tipi di idrolasi che possono catalizzare la conversione dell'ureidoglicolato a gliossilato ma agiscono con meccanismi diversi. L'ureidoglicolato amidoidrolasi recentemente scoperta in *Arabidopsis thaliana* converte l'ureidoglicolato in idrossiglicina e ammonio. L'idrossiglicina è un composto instabile che si degrada spontaneamente per formare ammonio e gliossilato [57]. Un altro tipo di enzima invece l'ureidoglicolato amidinoidrolasi catalizza la reazione di conversione diretta dell'ureidoglicolato a gliossilato

rilasciando urea. Il primo gene a essere stato identificato codificare un enzima avente questa funzione è stato DAL3 di *Saccharomyces cerevisiae* nel 1985 [109, 136]. Nella pubblicazione di E.Cusa del 1999 l'enzima è considerato come una amidinoidrolasi mentre nel lavoro di Raymond del 2005 è presentato come una amidoidrolasi. Anche nelle banche dati gli enzimi omologhi ad AIIA sono identificati con nomi diversi. In questo lavoro si è espresso l'enzima in forma ricombinante, è stata monitorato il rilascio di ammonio e urea, per delineare con chiarezza i prodotti della reazione di AIIA e infine è stata studiata la metallo dipendenza dell'enzima.

6.2 Materiali e metodi

6.2.1 Espressione, purificazione.

Il clone che esprime in forma ricombinante l'enzima AIIA di *E.coli* K12 fuso con il tag di istidine è stato ottenuto dalla collezione ASKA.

L'induzione del gene AIIA avviene quando le cellule raggiungono un OD 600 di 0.6 con isopropil-1-tio- β -D-galactopiranoside (IPTG) 1 mM a 37°C per 3 ore. Quindi, le cellule sono pellettate e risospese in un volume pari a 1/10 del volume iniziale di coltura nel buffer di lisi (50mMsodium fosfato, 0.3M NaCl, 10% glicerolo, 1mg/mL lisozima, pH 7.6), e incubate per 30 min a temperatura ambiente. Le cellule sono lisate mediante sonicazione (10 colpi della durata di 15 secondi ciascuno). La purificazione avviene per cromatografia di affinità con la resina Talon al cobalto (Clonotech Sigma).

Il surnatante è incubato per 1 ora a 4°C con la resina, poi viene caricato su colonna, lavato col buffer di lisi eccetto lisozima (50mMsodium fosfato, 0.3M NaCl, 10% glicerolo), wash buffer (buffer di lisi + 5 mM imidazolo) e infine la proteina è eluita in 100 mM di imidazolo. La proteina è stoccata con l'elution buffer a -20°C. Per la sintesi del substrato sono stati purificati anche gli enzimi AAH di *E.coli* e At_UGlyAH i protocolli relativi al clonaggio e AIIA purificazione di questi enzimi sono ampiamente documentati nell'articolo di Serventi et al 2010[12].

6.2.2 Saggi di attività e metallo dipendenza.

L'ureidoglicolato, substrato di AllA non è un composto commerciale; a partire dall'allantoina (Sigma) come descritto in precedenza nel capitolo 3.2.3 è stato sintetizzato l'acido allantoico. L'ureidoglicolato non è un composto stabile ma tende a degradarsi spontaneamente per formare gliossilato e urea. La sintesi dell' (S)-uridoglicolato è monitorata allo spettrofotometro rilevando il rilascio di ammonio mediante il saggio della glutammato deidrogenasi precedentemente descritto. Un tipico mix di reazione per la sintesi dell' (S)-ureidoglicolato comprende: AAH di *E.coli* (1.6 µg /mL) e At_UGlyAH (6 µg), MnCl₂ 0.1 mM e 0.085 mM di acido Allantoico, 0.1 M potassio fosfato pH 8, 0.35 mM NADH, 2.5 mM α-chetoglutarato e 19.36 U di GDH di fegato di bovino (Sigma). La reazione è stata fatta partire con l'acido allantoico. Terminata la reazione per testare la capacità di AllA di liberare ammonio a partire da (S) ureidoglicolato si aggiunge nel mix di reazione l'enzima alla concentrazione di 0.9 µg/mL. Invece per testare la capacità dell' enzima di rilasciare urea si aggiunge l'ureasi una volta terminata la sintesi del substrato e una volta che l'assorbimento appare stabile l'enzima alla concentrazione di 0.9 µg/mL. I dati relativi alle cinetiche sono stati analizzati con il software SigmaPlot.

6.2.3 Studio sulla metallo dipendenza di AllA.

La rimozione del metallo dal sito attivo di AllA avviene incubando per 1h 0.16 µg/µL di proteina con 1 mM EDTA.

Durante la sintesi dell' (S) ureidoglicolato, precedentemente descritta, si utilizza il manganese come cofattore di AAH. Il metallo è stato rimosso utilizzando 1 mg di resina chelex20 per ogni mL di mix.

Per monitorare la rimozione del metallo è stato utilizzato il 4-(2-piridilazo)resorcinolo (PAR). Il PAR è una molecola capace di aumentare il suo spettro di assorbimento a $\lambda=500$ nm in presenza di cationi metallici. Un tipico saggio per testare la rimozione del metallo con la resina consiste nell'incubazione per 30 minuti di una soluzione contenente 20 mM HEPES pH 8 100 µM di PAR e una quantità del mix di reazione contenente 4µM di MnCl₂. L'assorbimento del PAR viene monitorato 480 e 520 nm. I dati ottenuti sono confrontati con 4 µM di

metallo $MnCl_2$ e con lo spettro del PAR registrato in assenza di metallo. Lo spettro raccolto in seguito al trattamento con la resina mostra una completa rimozione del metallo dalla soluzione.

Il materiale utilizzato per condurre gli esperimenti sulla metallo dipendenza di AIIA è il seguente:

- Soluzione I contenente (S)-ureidoglicolato tratta con la resina per la rimozione del manganese e i reagenti necessari per il saggio della glutammato deidrogenasi.
- Soluzione II contenente l'apoenzima più 3 mM di metallo ($MnCl_2$, $MgCl_2$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $CuCl_2$ e $FeSO_4$). Prima di effettuare il saggio l'enzima è stato incubato col metallo per 30 minuti.

Il saggio è eseguito prelevando 685 μL della soluzione I, attendere che l'assorbimento a 340 nm sia stabile per un minuto e aggiungere 15 μL della soluzione II. L'attività di AIIA è stata monitorata per 30 minuti.

6.3.3 Risultati e Discussione

Il gene *allA* di *E.coli* codifica per un idrolasi che utilizza l' (S)-ureidoglicolato come substrato. [62] Non è chiaro se l'enzima è una ureidoglicolato amidoidrolasi o una ureidoglicolato amidinoidrolasi. Le due classi di enzimi differiscono per il meccanismo di reazione e per i prodotti finali della reazione. Le amidoidrolasi sono enzimi manganese dipendenti e idrolizzano l'(S)-ureidoglicolato, a idrossiglicina rilasciando ammonio [57]. L'idrossiglicina è un composto instabile che si degrada spontaneamente a gliossilato rilasciando una mole di ammonio. Le ureidoglicolato amidinoidrolasi invece, sintetizzano direttamente il gliossilato rilasciando urea. AIIA è un omologo di Dal3 di *Saccharomyces cerevisiae*, [85, 109, 136] un ureidoglicolato amidinoidrolasi caratterizzata in precedenza, ma nelle banche dati e nell'articolo dove ne viene presentata la struttura [64] è definita come una amidoidrolasi. Per tale motivo si è deciso di esprimere l'enzima in forma ricombinante e di studiarne la reazione. AIIA è una proteina di 18.3 kDa con un coefficiente di estinzione molare di $17085 M^{-1} cm^{-1}$. L'enzima è stato purificato mediante His-tag che non è stato rimosso per i test di attività. Il grado di purificazione raggiunto era abbastanza soddisfacente e non sono stati introdotti altri step di purificazione. (Figura 41)

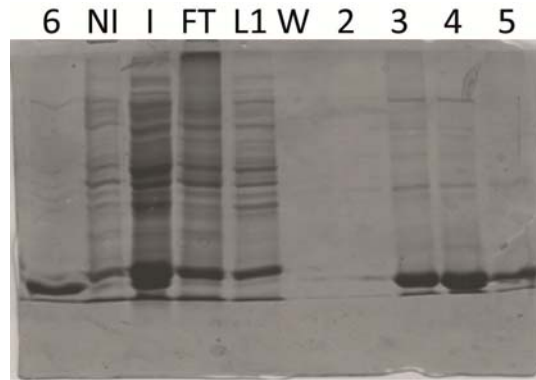


Figura 41 Purificazione di ALIA dopo His-Tag.

I campioni derivanti dai vari passaggi di purificazione sono stati caricati su un gel di poliacrilammide 12 % per SDS-Page.

Abbreviazioni NI = non indotto; I= indotto; Ft = *Flow through*; W = lavaggio 5 mM imidazolo. 2, 3 , 4, 5, 6 eluizioni in seguito a 100 mM di imidazolo.

L'attività dell'enzima è stata testata in presenza e assenza di ureasi col fine di identificare con chiarezza il prodotto della reazione. E' importante stabilire il prodotto esatto della reazione per comprendere meglio la fisiologia di alcuni microorganismi in quanto non tutti i batteri sono in grado di degradare l'urea per recuperare azoto. I dati ottenuti studiando la cinetica dell' enzima con il saggio accoppiato della glutammato deidrogenasi dimostrano chiaramente che l'enzima non è in grado di rilasciare ammonio in reazione in quanto in questa condizione l'assorbimento a 340 nm rimane costante. Invece solo aggiungendo l'ureasi al mix di reazione si osserva un calo dell'assorbimento che permette di affermare che ALIA è una amidinoidrolasi. (**Figura 42**)

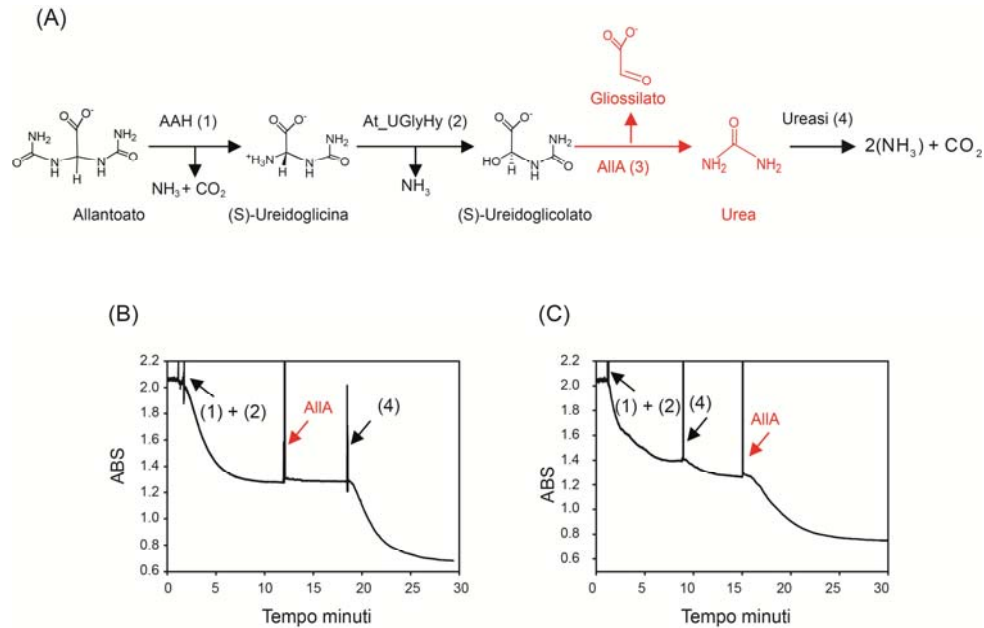


Figura 42 Conversione dell'ureidoglicolato a gliosilato catalizzata da AIIA.

(A) Lo schema rappresenta gli enzimi utilizzati per il saggio di attività di AIIA. La reazione catalizzata da AIIA è indicata in rosso. (B) Saggio di attività di AIIA effettuato per verificare il rilascio di ammonio da parte dell'enzima durante la conversione dell'ureidoglicolato gliosilato. L'enzima non rilascia ammonio in reazione. Si osserva un calo di assorbimento a 340 nm solo in seguito all'aggiunta dell'ureasi. (C) In seguito all'aggiunta dell'ureasi si osserva un leggero calo di assorbimento, ma la pendenza risulta aumentata in modo significativo dall'aggiunta di AIIA. In seguito a questi esperimenti si può quindi affermare che l'enzima catalizza la conversione dell'ureidoglicolato a gliosilato rilasciando urea in reazione. Gli enzimi indicati con i numeri (1), (2), (4) sono rispettivamente AIIA di *E.coli* (AAH), At_UGlyAH di *Arabidopsis thaliana* (omologa al gene ylba di *E.coli*) e l'ureasi (enzima commerciale Sigma estratto da *Canavalia ensiformis*).

Nel lavoro di Raymond del 2005 è documentato che il sito attivo di AIIA risulta essere molto simile a quello descritto per altri due enzimi aventi un folding cupinico, l'ossalato decarbossilasi di *Bacillus subtilis* e la quercetina 2,3 diossigenasi di *Aspergillus japonicus*, entrambi sono degli enzimi metallo dipendenti. L'ossalato decarbossilasi è un enzima manganese dipendente mentre la quercetina 2,3 diossigenasi è rame dipendente. Sovrapponendo la struttura di AIIA sia con la struttura di *B.subtilis* che con quella di *A.japonicus* è stato osservato che in entrambi i casi si ha una sovrapposizione del sito di legame del metallo con un gruppo di residui idrofili costituiti da Glu72, His 74, Gln79 e His 124 localizzati

in fondo a una tasca parzialmente esposta al solvente e conservati in tutte le sequenze omologhe ad AIIA [64]. (Figura 43)

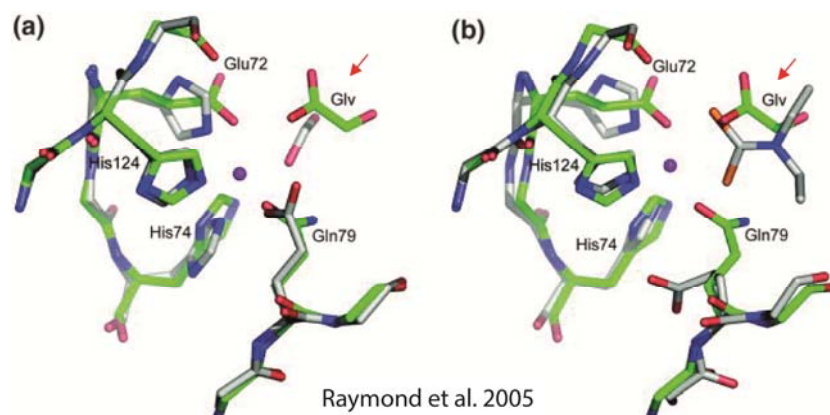


Figura 43 Sovrapposizione degli aminoacidi probabilmente coinvolti nella formazione del sito attivo di AIIA (Codice PDB 1YQC) con l'ossalato decarbossilasi (codice PDB 1J58) e la quercetina 2,3 diossigenasi (codice PDB 1GQG).

L'immagine è stata presa dal lavoro pubblicato da Raymond nel 2005 [64]. (a) Rappresentazione "Stick" dei residui aminoacidici probabilmente coinvolti nel legame del metallo sovrapposti alla ossalato decarbossilasi, i residui di AIIA hanno il carbonio colorato in verde, l'azoto in blu e l'ossigeno in rosso, mentre i carboni dell'ossalato decarbossilasi sono indicati in grigio. La molecola di gliossilato presente nella struttura di AIIA è indicata col freccia rossa e con la sigla Glv. Il gliossilato è localizzato nella stessa regione dove la decarbossilasi lega l'acido formico. In magenta è rappresentato il manganese legato dalla decarbossilasi. (b) Sovrapposizione della medesima regione di AIIA con il sito attivo della quercetina 2,3 diossigenasi. Il gliossilato è legato nella stessa posizione di del dietilditiocarbamato un inibitore della diossigenasi. In magenta è rappresentato il rame metallo identificato nel sito attivo della quercetina 2,3 diossigenasi.

Nel lavoro di Raymond però non viene indicato, nè fatta alcuna ipotesi, su quale metallo potrebbe essere coinvolto nella catalisi della reazione da parte di AIIA [64].

Durante gli esperimenti effettuati per studiare la metallo dipendenza ci si è assicurati di eliminare tutto il manganese presente in reazione. Il manganese è stato utilizzato per la sintesi dell' (S) ureidoglicolato substrato di AIIA. Lo scopo è stato raggiunto utilizzando la resina chelex 20 e escludendo la presenza di manganese residuo con il PAR. Inoltre è stato verificato che la concentrazione di EDTA presente in reazione, utilizzata per ottenere l'apoenzima, non inibiscono l'attività dell'ureasi un enzima nickel dipendente.

I risultati di quest'analisi confermano che AIIA è un enzima metallo dipendente in quanto è stata dimostrato che l'EDTA agisce da inibitore. I metalli Mn^{2+} , Mg^{2+} ,

Co^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} non hanno alcun effetto nel ripristinare l'attività dell'enzima, il Ni^{2+} è stato l'unico ione metallico in grado di ripristinare l'attività iniziale dell'enzima. (Figura 44)

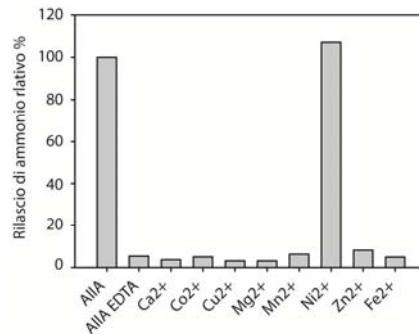


Figura 44 Studi sulla metallo dipendenza di AIIA.

Le barre sono state ottenute calcolando la pendenza delle cinetiche tra 2 e 4 minuti successivi all'aggiunta di AIIA. I dati ottenuti sono stati divisi per la pendenza calcolata con l'enzima fresco e moltiplicati per 100 col fine di ottenere i valori in percentuale.

Dai dati emerge che l'EDTA è un buon inibitore dell'enzima e che il nickel è il catione divalente implicato nella catalisi della reazione. Tutti gli altri ioni metallici testati non hanno avuto alcun effetto.

In *Arabidopsis thaliana* è stata recentemente caratterizzato dal punto di vista biochimico l'ureidoglicolato amidoidrolasi che converte l' (S) ureidoglicolato in idrossiglicina e ammonio come un enzima manganese dipendente. L'idrossiglicina decade poi spontaneamente rilasciando in soluzione ammonio e gliossilato [2, 57]. La ricerca degli enzimi noti essere coinvolti nella degradazione dell'urea, ureasi, urea carbossilasi e allofanato idrolasi non risultano presenti nel genoma di *E.coli*, pertanto il batterio non può recuperare l' ammonio dalla degradazione dell'uridoglicolato a gliossilato. Tuttavia, questo organismo può utilizzare l'enzima AIID per convertire l'ureidoglicolato in ossalurato. L'ossalurato può essere convertito a ossamato e carbammil fosfato dalla ossamato transcarbamilasi. Il carbamil fosfato è il substrato della carbammato fosfotransferasi che lo utilizza per produrre ATP e liberare ammonio.

AIIA può rappresentare la connessione tra il pathway del catabolismo delle purine e quello del D- glicerato [62]. La reazione di AIIA porta alla sintesi di gliossilato e urea. In questo caso l'urea funge da prodotto di scarto e il gliossilato può essere metabolizzato da due enzimi la malato sintasi G che lo utilizza per la sintesi del malato oppure dalla gliossilato carbolicasi che lo converte in tartronato semialdeide[62]. Questo composto in seguito all'azione di due enzimi la

tartronato semialdeide riduttasi e la glicerato chinasi viene convertito in 3-fosfoglicerato un intermedio della glicolisi [62]. **(Figura 45)**

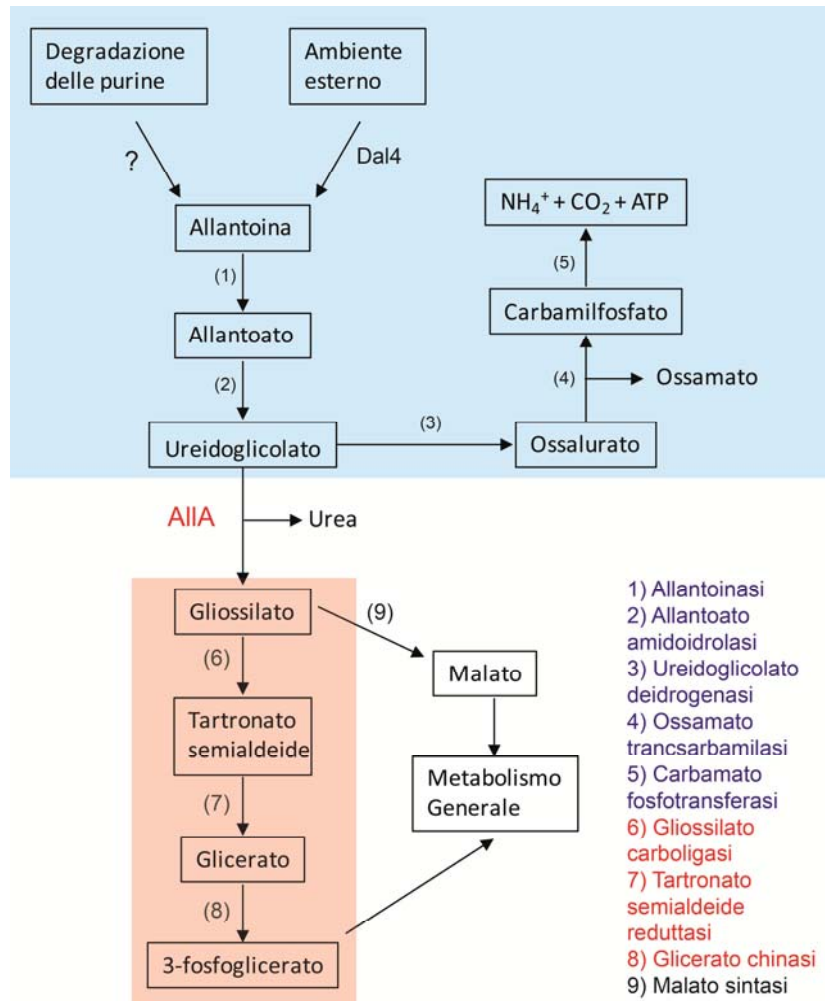


Figura 45 Ruolo fisiologico di AIIA in *E.coli*.

In *E.coli* non sono stati ancora identificati gli enzimi coinvolti nella sintesi dell'allantoina. *E.coli* ha nello stesso cluster, dove sono stati identificati i geni coinvolti nel metabolismo delle ureidi, un trasportatore per l'allantoina omologo a DAL4 di lievito che consente al batterio di ottenere allantoina dall'ambiente esterno. L'allantoina tramite diverse reazioni enzimatiche è degradata a ureidoglicolato permettendo così il recupero di due moli di ammonio. L'ureidoglicolato è una molecola che può essere degradata da due enzimi AIID (3) o AIIA. Se viene degradato da AIID il metabolismo viene orientato verso il recupero di un ulteriore molecola di azoto e alla sintesi di ATP molecola importante per l'economia energetica del batterio in quanto il consumo di allantoina avviene in anaerobiosi (riquadro azzurri). Invece se è AIIA a degradare l'ureidoglicolato si ha la sintesi di gliossilato e l'eliminazione di urea che non può essere metabolizzata in quanto il batterio manca degli appositi enzimi. Il gliossilato è convertito in altre sostanze che possono essere poi utilizzate nel metabolismo generale.

Riassunto

Riassunto

La degradazione delle purine è una via metabolica presente in tutti gli organismi viventi. Il pathway presenta una variabilità di enzimi e intermedi.

Questa caratteristica in parte è causata dall'evoluzione convergente di alcuni enzimi. Infatti, è frequente trovare all'interno del pathway enzimi che non presentano alcuna omologia tra loro, ma risultano implicati nella catalisi della stessa reazione.

I composti purinici contengono quattro atomi di azoto. In base alle esigenze metaboliche degli organismi alcuni hanno scelto di eliminare questi composti, come prodotti di scarto, altri di degradarlo completamente per recuperare ammonio.

Un'altra causa di variabilità è che alcuni organismi, capaci di recuperare l'azoto dalle basi puriniche, possono ricavare urea dai composti purinici e sono dotati di enzimi coinvolti nella degradazione dell'urea, altri mancano di questi enzimi e pertanto devono recuperare direttamente l'ammonio da questi composti. La variabilità riscontrata in questa via metabolica è presente soprattutto nei microorganismi. Pertanto, studi di genomica comparativa e dei cluster batterici permettono di identificare l'attività di enzimi a funzione sconosciuta. Spesso gli enzimi identificati nei batteri per omologia hanno permesso di trovare e caratterizzare enzimi coinvolti in questo pathway di organismi eucariotici. Questo tipo di approccio è stato utilizzato in questo lavoro sia per l'identificazione di nuovi enzimi coinvolti nel pathway sia per poter prevedere l'abilità di alcuni microorganismi di utilizzare composti purinici come fonte di azoto. In particolare il lavoro di dottorato può essere schematizzato in 7 differenti attività di cui solo le prime 5 sono state discusse in questa tesi.

1) Studi di genomica comparativa per la ricerca di geni coinvolti nel catabolismo delle purine in microorganismi probiotici e nel microbioma umano.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di investigare la capacità di microorganismi tradizionalmente usati come probiotici e residenti nell'intestino di degradare l'acido urico col fine di trovare dei batteri da includere in preparati probiotici per la prevenzione dell'iperuricemia. La ricerca bioinformatica è stata svolta cercando nei genomi di organismi tradizionalmente usati come probiotici e nel microbioma dell'intestino umano geni noti essere coinvolti nel trasporto o nella degradazione delle purine. L'analisi ha richiesto uno studio più approfondito sulla filogenesi dei trasportatori e l'analisi di un nuovo probabile cluster per la degradazione delle purine presente in *Escherichia coli*. I dati raccolti dimostrano che *B.subtilis* e *E.coli* possono essere dei b

uoni candidati. Questo progetto è stato finanziato da Spinner su interesse dell'azienda Stardea di Parma.

2) Caratterizzazione biochimica di un nuovo enzima coinvolto nella degradazione dell'acido allantoico a ureidoglicolato.

Sono stati recentemente studiati gli enzimi codificanti per l'ureidoglicina idrolasi (UGlyAH) di *E. coli* e *Arabidopsis thaliana*. L'albero filogenetico costruito utilizzando sequenze omologhe a entrambi gli enzimi risulta essere diviso in due famiglie ben distinte: enzimi di classe I e enzimi di classe II.

Sono stati analizzati i genomi di organismi aventi i geni appartenenti a entrambe le classi. Le analisi mostrano che gli enzimi di classe I risultano sempre essere associati all'allantoato amidoidrolasi, mentre in quelli di classe II non è presente alcun enzima coinvolto nella sintesi dell'ureidoglicina. I risultati ottenuti dall'analisi dei genomi permette di ipotizzare un'attività diversa tra gli enzimi appartenenti alle due classi. Il gene codificante l'enzima di *Agrobacterium tumefaciens* appartenente alla classe II, gruppo in cui non esistono enzimi caratterizzati, è stato clonato, purificato e caratterizzato dal punto di vista biochimico. Le proprietà di questo enzima sono state comparate con quelle dell'omologo di *A. thaliana* appartenente alla classe I.

3) Caratterizzazione biochimica dell'enzima allantoina racemasi di *Pseudomonas fluorescens*.

La (S)-allantoina è un composto che si origina durante il catabolismo delle purine. Alcuni organismi possono assorbire allantoina racemica dall'esterno e utilizzarla come fonte di azoto. L'allantoinasi, un enzima capace di convertire l'allantoina ad acido allantoico, è stereospecifico per la (S)-allantoina. La conversione dell'acido allantoico a gliossilato mediante l'utilizzo di differenti enzimi porta al recupero di ammonio che potrà essere poi riutilizzato per la sintesi di nuovi composti azotati. Per metabolizzare in modo efficace l'allantoina molti organismi possiedono l'allantoina racemasi. L'attività di questo enzima è conosciuta da tempo, ma solo recentemente è stata clonata e cristallizzata l'allantoina racemasi di *Klebsiella pneumoniae*. Independentemente, nel nostro laboratorio, è stata identificata, clonata e espressa l'allantoina racemasi di *Pseudomonas fluorescens* e tramite una collaborazione con il Prof. G. Zanotti la struttura della proteina è stata ottenuta per cristallografia a raggi X. Confrontando le due strutture emerge che l'enzima di *K. pneumoniae* presenta 2 cisteine nel sito attivo mentre quella di *P. fluorescens* un glutammato e una cisteina. Sono stati svolti dei saggi di attività per confermare l'attività di allantoina racemasi dell'enzima e costruiti dei mutanti per dimostrare l'importanza del glutammato nel sito attivo.

4) Studio dei prodotti della perossidasi di rafano durante l'ossidazione dell'acido urico e determinazione della stereospecificità degli enzimi HIU idrolasi e OHCU decarbossilasi.

La perossidasi, così come l'uricasi, è un enzima capace di ossidare l'acido urico. L'uricasi ossida l'acido urico a (S)-5-HIU, al contrario, i composti che si originano dalla reazione catalizzata dalla perossidasi non sono stati ancora identificati, anche se è noto che si degradano spontaneamente a formare allantoina. I due enzimi differiscono tra loro sia per il meccanismo di reazione che per proprietà cinetiche. L'indagine sui prodotti della reazione catalizzata dalla perossidasi è stata condotta sia allo spettrofotometro che allo spettropolarimetro. I prodotti di questa reazione non presentano alcuna attività ottica, nelle analisi condotte con lo spettropolarimetro, indicando così la formazione di composti racemi. Gli spettri raccolti allo spettrofotometro sono invece comparabili ai prodotti ottenuti dall'ossidazione dell'acido urico da parte dell'uricasi. I prodotti ottenuti da questa reazione sono stati utilizzati per testare la stereospecificità degli enzimi HiuHy e OHCUdec, coinvolti nella conversione del (S)-5-HIU a (S)-allantoina. I risultati preliminari suggeriscono che OHCUdec è un enzima stereospecifico, mentre HiuHy è in grado di convertire entrambi gli enantiomeri del 5-HIU.

5) Identificazione del cofattore utilizzato dall'enzima ureidoglicolato idrolasi (AIIA) di *E.coli*.

L'idrolisi dell'ureidoglicolato a gliossilato è catalizzata da due diverse tipologie di enzimi: l'ureidoglicolato amidoidrolasi catalizza la conversione di questo composto ad anidride carbonica, ammonio e idrossiglicina, sostanza che si degrada spontaneamente a gliossilato rilasciando ammonio; l'ureidoglicolato amidinoidrolasi catalizza la conversione di questo composto direttamente a gliossilato e urea. I primi studi effettuati sull'enzima AIIA di *E.coli* indicano che l'enzima è una amidinoidrolasi. Studi successivi che ne presentano la struttura cristallografica la descrivono invece come amidoidrolasi. Tale confusione si riflette anche nell'annotazione di geni e proteine omologhe ad AIIA nelle banche dati. È stato confermato in questo lavoro che l'enzima è una amidino idrolasi ed è stata completata la caratterizzazione biochimica dell'enzima analizzandone la metallo dipendenza. L'enzima è risultato nichel dipendente.

Durante il dottorato ho trascorso 6 mesi presso la Freie Universität di Berlino presso il gruppo di ricerca del professor Claus Peter Witte dove ho partecipato alla realizzazione di due progetti, che non sono stati inseriti nella presente Tesi:

6) Accumulo delle ureidi durante stress osmotico e salino in *Arabidopsis thaliana*.
Durante questo progetto mi sono occupato di comprendere se l'accumulo delle ureidi acido allantoico e allantoina in condizioni di stress è un fattore protettivo per la pianta, oppure un sintomo causato dallo stress .

7) Metodo per la purificazione su larga scala della Guanina deaminasi di *A.thaliana*.
Sviluppo di un metodo su larga scala per la purificazione della guanosina deaminasi al fine di ottenerne una quantità sufficiente per effettuare i test per la cristallizzazione.

Abbreviazioni

Abbreviazioni e nomenclatura di enzimi, geni e trasportatori

AADH	Allantoato amidinoidrolasi
AAH	Allantoato amidoidrolasi
AlIA	Ureidoglicolato amidinoidrolasi <i>Escherichia coli</i> *
AlIB	Allantoinasi <i>Escherichia coli</i> *
AlIC	Allantoato amidoidrolasi <i>Escherichia coli</i> *
AlID	Ureidoglicolato deidrogenasi <i>Escherichia coli</i> *
ALN	Allantoinasi
AlnRac	Allantoina racemasi
ALNSy	Allantoina sintasi
At_UGlyAH	Ureidoglicina idrolasi <i>Arabidopsis thaliana</i>
Atu_UGlyAH*	Allantoato idrolasi (ureidoglicina idrolasi classe II) <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Azga	Trasportatore per ipoxantina, adenina, ganosina e guanina identificato per la prima volta nei funghi*
Dal 1	Allantoinasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> *
Dal 2	Allantoicasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> *
Dal 3	Ureidoglicolato idrolasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> *
Dal4	Trasportatore per l'allantoina <i>Saccharomyces cerevisiae</i> *

Dal5	Trasportatore acido allantoico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> *
Dcg1	Allantoina racemasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> *
Ec_UGlyAH*	Ureidoglicina idrolasi <i>Escherichia coli</i>
FcyB identificato	Trasportatore per ipoxantina, adenina, citosina e guanina per la prima volta nei funghi*
GuaD	Guanina deaminasi <i>Escherichia coli</i> *
HiuHy	HIU idrolasi
HRP	Perossidasi di rafano (<i>Horseradish peroxidase</i>)
hyuA	Idrolasi a funzione sconosciuta omologa all'allantoinasi
KpHpxA	Allantoina racemasi di <i>Klebsiella pneumoniae</i>
OHCUdec	OHCU decarbossilasi
Pa_UglyAH*	Allantoato idrolasi (ureidoglicina idrolasi classe II) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pf_AlnRac	Allantoina racemasi di <i>Pseudomonas fluorescens</i>
puuE	Allantoinasi <i>Pseudomonas fluorescens</i> *
RutG	Trasportatore per l'uracile <i>Escherichia coli</i> *
ssnA	Proteina a funzione sconosciuta di <i>Escherichia coli</i> * omologa a un idrolasi
UacT/YgfU*	Trasportatore per l'acido urico <i>Escherichia coli</i> *
UADH	Ureidoglicolato amidinoidrolasi
UAH	Ureidoglicolato amidoidrolasi
UAPA	Trasportatore per acidourico e xantina identificato per la prima volta nei funghi*

UAPC	Trasportatore per purine generico identificato per la prima volta nei funghi*
UDH	Ureidoglicolato deidrogenasi
UGly AH	Ureidoglicina idrolasi
UGly AH*	Allantoato idrolasi (ureidoglicina idrolasi classe II)
UGlyT	Ureidoglicina transferasi
UOX	Urato ossidasi
UraA	Trasportatore per l'uracile <i>Escherichia coli</i> *
Xanp/Yice*	Trasportatore per la xantina <i>Escherichia coli</i> *
Xanq/Ygfo*	Trasportatore per la xantina <i>Escherichia coli</i> *
XDH	Xantina deidrogenasi
XdhA/XdhB	Subunità putative della xantina deidrogenasi di <i>Escherichia coli</i> *
XdhC/XdhD	Subunità putative della xantina deidrogenasi di <i>Escherichia coli</i> *
XO	Xantina ossidasi
XOR	Xantina ossido reduttasi
ygeW	Proteina a funzione sconosciuta di <i>Escherichia coli</i> * omologa a ornitina carbamil transferasi
ygeX	Diaminopropionato ammonio liasi di <i>Escherichia coli</i> *
ygeY	Proteina a funzione sconosciuta di <i>Escherichia coli</i> * omologa a N-acetil-ornitina deacetilasi
ygfM/ygfK	Ossidoreduttasi di <i>Escherichia coli</i> *
YgfQ	Trasportatore like Azga <i>Escherichia coli</i> *

YjcD	Trasportatore like Azga <i>Escherichia coli</i> *
ylbA	Ureidoglicina idrolasi <i>Escherichia coli</i> *
yqeA	Proteina a funzione sconosciuta di <i>Escherichia coli</i> * omologa a una chinasi.

*La nomenclatura non deriva dalla funzione della proteina ma dal nome del gene

Altre abbreviazioni

4-HIU	4-idrossiisourato
5-HIU	(S)-5-idrossiisourato
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDTA	Trans-1,2-diaminocicloesano-N'N'N,'N,'- acido-tetra- acetico-monoidrato
CI	Composto I perossidasi
CII	Composto II perossidasi
D	Donatore di elettroni
D•	Donatore di elettroni forma radicalica
Dox	Donatore di elettroni ossidato
DPTA	Acido dietilene triamina pentaacetico
EDTA	Acido etilendiamminotetraacetico
EPR	Risonanza paramagnetica elettronica (Electron paramagnetic resonance)
HEPES	acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico

HIU	(S)-5-idrossiisourato
HQSA	Acido 8-idrossiquinolina-5-sulfonico
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalattopiranoside
KP	Buffer potassio fosfato
NAD ⁺	Nicotinammide adenina dinucleotide ossidata
NADH	Nicotinammide adenina dinucleotide ridotta
NAT	Nucleobase-ascorbate-transporter
NCS1	Nucleobase-cation -symport-1
NCS2	Nucleobase-cation -symport-2
NMR	Risonanza magnetica nucleare (Nuclear magnetic resonance)
OHCU	2-osso-4-idrossi-4-carbossi-5-ureidoimidazolina
Pr IX	Anello porfirinico
Pr IX•	Anello porfirinico forma radicalica

Bibliografia

- 1 Claiborne, A. and Fridovich, I. (1979) Chemical and enzymatic intermediates in the peroxidation of o-dianisidine by horseradish peroxidase. 1. Spectral properties of the products of dianisidine oxidation. *Biochemistry*. **18**, 2324-2329
- 2 Werner, A. K. and Witte, C. P. (2011) The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends Plant Sci.* **16**, 381-387
- 3 Karatza, P. and Frillingos, S. (2005) Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol Membr Biol.* **22**, 251-261
- 4 Ramazzina, I., Folli, C., Secchi, A., Berni, R. and Percudani, R. (2006) Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. *Nat Chem Biol.* **2**, 144-148
- 5 Keebaugh, A. C. and Thomas, J. W. (2010) The evolutionary fate of the genes encoding the purine catabolic enzymes in hominoids, birds, and reptiles. *Mol Biol Evol.* **27**, 1359-1369
- 6 Alvarez-Lario, B. and Macarron-Vicente, J. (2010) Uric acid and evolution. *Rheumatology (Oxford)*. **49**, 2010-2015
- 7 Vogels, G. D. and Van der Drift, C. (1976) Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriol Rev.* **40**, 403-468
- 8 Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U. and Boldt, R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **57**, 805-836
- 9 Zollner, N. (1982) Purine and pyrimidine metabolism. *Proc Nutr Soc.* **41**, 329-342
- 10 Navolanic, P. M., Pui, C. H., Larson, R. A., Bishop, M. R., Pearce, T. E., Cairo, M. S., Goldman, S. C., Jeha, S. C., Shanholtz, C. B., Leonard, J. P. and McCubrey, J. A. (2003) Elitek-rasburicase: an effective means to prevent and treat hyperuricemia associated with tumor lysis syndrome, a Meeting Report, Dallas, Texas, January 2002. *Leukemia*. **17**, 499-514
- 11 Lamberto, I., Percudani, R., Gatti, R., Folli, C. and Petrucco, S. (2010) Conserved alternative splicing of Arabidopsis transthyretin-like determines protein localization and S-allantoin synthesis in peroxisomes. *Plant Cell.* **22**, 1564-1574
- 12 Serventi, F., Ramazzina, I., Lamberto, I., Puggioni, V., Gatti, R. and Percudani, R. (2010) Chemical basis of nitrogen recovery through the ureide pathway: formation and hydrolysis of S-ureidoglycine in plants and bacteria. *ACS Chem Biol.* **5**, 203-214
- 13 Islinger, M., Cardoso, M. J. and Schrader, M. (2010) Be different--the diversity of peroxisomes in the animal kingdom. *Biochim Biophys Acta.* **1803**, 881-897
- 14 Becker, M. A., Schumacher, H. R., Jr., Wortmann, R. L., MacDonald, P. A., Eustace, D., Palo, W. A., Streit, J. and Joseph-Ridge, N. (2005) Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout. *N Engl J Med.* **353**, 2450-2461
- 15 Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B. T., Pai, E. F. and Nishino, T. (2008) Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Febs J.* **275**, 3278-3289
- 16 Sanders, S. A., Eisenthal, R. and Harrison, R. (1997) NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion. *Eur J Biochem.* **245**, 541-548

- 17 Mendel, R. R. and Kruse, T. (2012) Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochim Biophys Acta*. **1823**, 1568-1579
- 18 Hesberg, C., Hansch, R., Mendel, R. R. and Bittner, F. (2004) Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*: differential gene expression and enzyme activities. *J Biol Chem*. **279**, 13547-13554
- 19 Zarepour, M., Kaspari, K., Stagge, S., Rethmeier, R., Mendel, R. R. and Bittner, F. (2010) Xanthine dehydrogenase AtXDH1 from *Arabidopsis thaliana* is a potent producer of superoxide anions via its NADH oxidase activity. *Plant Mol Biol*. **72**, 301-310
- 20 Truglio, J. J., Theis, K., Leimkuhler, S., Rappa, R., Rajagopalan, K. V. and Kisker, C. (2002) Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *Structure*. **10**, 115-125
- 21 Ivanov, N. V., Trani, M. and Edmondson, D. E. (2004) High-level expression and characterization of a highly functional *Comamonas acidovorans* xanthine dehydrogenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expr Purif*. **37**, 72-82
- 22 Srivastava, M., Mallard, C., Barke, T., Hancock, L. E. and Self, W. T. (2011) A selenium-dependent xanthine dehydrogenase triggers biofilm proliferation in *Enterococcus faecalis* through oxidant production. *J Bacteriol*. **193**, 1643-1652
- 23 Parschat, K., Canne, C., Huttermann, J., Kappl, R. and Fetzner, S. (2001) Xanthine dehydrogenase from *Pseudomonas putida* 86: specificity, oxidation-reduction potentials of its redox-active centers, and first EPR characterization. *Biochim Biophys Acta*. **1544**, 151-165
- 24 Dietzel, U., Kuper, J., Doebbler, J. A., Schulte, A., Truglio, J. J., Leimkuhler, S. and Kisker, C. (2009) Mechanism of Substrate and Inhibitor Binding of *Rhodobacter capsulatus* Xanthine Dehydrogenase. *J Biol Chem*. **284**, 8768-8776
- 25 Gremer, L. and Meyer, O. (1996) Characterization of xanthine dehydrogenase from the anaerobic bacterium *Veillonella atypica* and identification of a molybdopterin-cytosine-dinucleotide-containing molybdenum cofactor. *Eur J Biochem*. **238**, 862-866
- 26 Schrader, T., Rienhofer, A. and Andreesen, J. R. (1999) Selenium-containing xanthine dehydrogenase from *Eubacterium barkeri*. *Eur J Biochem*. **264**, 862-871
- 27 Moshe Sagi, R. F., and S. Herman Lips. (1999) Aldehyde Oxidase and Xanthine Dehydrogenase in a flacca Tomato Mutant with Deficient Abscisic Acid and Wilty Phenotype. *Plant Physiology*. **Vol. 120**, 571-577
- 28 Kahn, K. and Tipton, P. A. (1998) Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction. *Biochemistry*. **37**, 11651-11659
- 29 O'Leary, S. E., Hicks, K. A., Ealick, S. E. and Begley, T. P. (2009) Biochemical characterization of the HpxO enzyme from *Klebsiella pneumoniae*, a novel FAD-dependent urate oxidase. *Biochemistry*. **48**, 3033-3035
- 30 Kahn, K. and Tipton, P. A. (1997) Kinetic mechanism and cofactor content of soybean root nodule urate oxidase. *Biochemistry*. **36**, 4731-4738
- 31 Wu, X. W., Muzny, D. M., Lee, C. C. and Caskey, C. T. (1992) Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol*. **34**, 78-84
- 32 Padiglia, A., Medda, R., Longu, S., Pedersen, J. Z. and Floris, G. (2002) Uric acid is a main electron donor to peroxidases in human blood plasma. *Med Sci Monit*. **8**, BR454-459
- 33 Canellakis, E. S., Tuttle, A. L. and Cohen, P. P. (1955) A comparative study of the end-products of uric acid oxidation by peroxidases. *J Biol Chem*. **213**, 397-404

- 34 Sarma, A. D., Serfozo, P., Kahn, K. and Tipton, P. A. (1999) Identification and purification of hydroxyisourate hydrolase, a novel ureide-metabolizing enzyme. *J Biol Chem.* **274**, 33863-33865
- 35 Pessoa, J., Sarkany, Z., Ferreira-da-Silva, F., Martins, S., Almeida, M. R., Li, J. and Damas, A. M. (2010) Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* transthyretin-like protein. *BMC Plant Biol.* **10**, 30
- 36 Kim, K., Park, J. and Rhee, S. (2007) Structural and functional basis for (S)-allantoin formation in the ureide pathway. *J Biol Chem.* **282**, 23457-23464
- 37 Hayashi, S., Fujiwara, S. and Noguchi, T. (2000) Evolution of urate-degrading enzymes in animal peroxisomes. *Cell Biochem Biophys.* **32 Spring**, 123-129
- 38 Hennebry, S. C., Law, R. H., Richardson, S. J., Buckle, A. M. and Whisstock, J. C. (2006) The crystal structure of the transthyretin-like protein from *Salmonella dublin*, a prokaryote 5-hydroxyisourate hydrolase. *J Mol Biol.* **359**, 1389-1399
- 39 French, J. B. and Ealick, S. E. (2011) Structural and kinetic insights into the mechanism of 5-hydroxyisourate hydrolase from *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **67**, 671-677
- 40 French, J. B. and Ealick, S. E. (2010) Structural and mechanistic studies on *Klebsiella pneumoniae* 2-Oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline decarboxylase. *J Biol Chem.* **285**, 35446-35454
- 41 Buckholz, R. G. and Cooper, T. G. (1991) The allantoinase (DAL1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England).* **7**, 913-923
- 42 Yang, J. and Han, K. H. (2004) Functional characterization of allantoinase genes from *Arabidopsis* and a nonureide-type legume black locust. *Plant Physiol.* **134**, 1039-1049
- 43 Webb, M. A. and Lindell, J. S. (1993) Purification of allantoinase from soybean seeds and production and characterization of anti-allantoinase antibodies. *Plant Physiol.* **103**, 1235-1241
- 44 Gaines, P. J., Tang, L. and Wisniewski, N. (2004) Insect allantoinase: cDNA cloning, purification, and characterization of the native protein from the cat flea, *Ctenocephalides felis*. *Insect Biochem Mol Biol.* **34**, 203-214
- 45 Hayashi, S., Jain, S., Chu, R., Alvares, K., Xu, B., Erfurth, F., Usuda, N., Rao, M. S., Reddy, S. K., Noguchi, T. and et al. (1994) Amphibian allantoinase. Molecular cloning, tissue distribution, and functional expression. *J Biol Chem.* **269**, 12269-12276
- 46 Mulrooney, S. B. and Hausinger, R. P. (2003) Metal ion dependence of recombinant *Escherichia coli* allantoinase. *J Bacteriol.* **185**, 126-134
- 47 Kim, K., Kim, M. I., Chung, J., Ahn, J. H. and Rhee, S. (2009) Crystal structure of metal-dependent allantoinase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **387**, 1067-1074
- 48 Ramazzina, I., Cendron, L., Folli, C., Berni, R., Monteverdi, D., Zanotti, G. and Percudani, R. (2008) Logical identification of an allantoinase analog (puuE) recruited from polysaccharide deacetylases. *J Biol Chem.* **283**, 23295-23304
- 49 Kalju Kahn, P. A. T. (2000) Kinetics and Mechanism of Allantoin Racemization. *Bioorganic Chemistry* **28**, 62-72
- 50 French, J. B., Neau, D. B. and Ealick, S. E. (2011) Characterization of the structure and function of *Klebsiella pneumoniae* allantoin racemase. *J Mol Biol.* **410**, 447-460
- 51 Trijbels, F. and Vogels, G. D. (1966) Allantoicase and ureidoglycolase in *Pseudomonas* and *Penicillium* species. *Biochim Biophys Acta.* **118**, 387-395

- 52 Wang, Y., Zhang, S., Liu, Z., Li, H. and Wang, L. (2005) Amphioxus allantoicase: molecular cloning, expression and enzymatic activity. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **141**, 237-243
- 53 Agarwal, R., Burley, S. K. and Swaminathan, S. (2007) Structural analysis of a ternary complex of allantoate amidohydrolase from *Escherichia coli* reveals its mechanics. *J Mol Biol.* **368**, 450-463
- 54 Todd, C. D. and Polacco, J. C. (2006) AtAAH encodes a protein with allantoate amidohydrolase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* **223**, 1108-1113
- 55 Xu, Z., de Windt, F. E. and van der Drift, C. (1995) Purification and characterization of allantoate amidohydrolase from *Bacillus fastidiosus*. *Arch Biochem Biophys.* **324**, 99-104
- 56 Werner, A. K., Sparkes, I. A., Romeis, T. and Witte, C. P. (2008) Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiol.* **146**, 418-430
- 57 Werner, A. K., Romeis, T. and Witte, C. P. (2010) Ureide catabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol.* **6**, 19-21
- 58 Todd, C. D., Tipton, P. A., Blevins, D. G., Piedras, P., Pineda, M. and Polacco, J. C. (2006) Update on ureide degradation in legumes. *J Exp Bot.* **57**, 5-12
- 59 Deng, W. W. and Ashihara, H. (2010) Profiles of purine metabolism in leaves and roots of *Camellia sinensis* seedlings. *Plant Cell Physiol.* **51**, 2105-2118
- 60 Ramazzina, I., Costa, R., Cendron, L., Berni, R., Peracchi, A., Zanotti, G. and Percudani, R. (2010) An aminotransferase branch point connects purine catabolism to amino acid recycling. *Nat Chem Biol.* **6**, 801-806
- 61 van der Drift, C., van Helvoort, P. E. and Vogels, G. D. (1971) S-ureidoglycolate dehydrogenase: purification and properties. *Arch Biochem Biophys.* **145**, 465-469
- 62 Cusa, E., Obradors, N., Baldoma, L., Badia, J. and Aguilar, J. (1999) Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **181**, 7479-7484
- 63 McIninch, J. K., McIninch, J. D. and May, S. W. (2003) Catalysis, stereochemistry, and inhibition of ureidoglycolate lyase. *J Biol Chem.* **278**, 50091-50100
- 64 Raymond, S., Tocilj, A., Ajamian, E., Li, Y., Hung, M. N., Matte, A. and Cygler, M. (2005) Crystal structure of ureidoglycolate hydrolase (AllA) from *Escherichia coli* O157:H7. *Proteins.* **61**, 454-459
- 65 Munoz, A., Piedras, P., Aguilar, M. and Pineda, M. (2001) Urea is a product of ureidoglycolate degradation in chickpea. Purification and characterization of the ureidoglycolate urea-lyase. *Plant Physiol.* **125**, 828-834
- 66 Munoz, A., Raso, M. J., Pineda, M. and Piedras, P. (2006) Degradation of ureidoglycolate in French bean (*Phaseolus vulgaris*) is catalysed by a ubiquitous ureidoglycolate urea-lyase. *Planta.* **224**, 175-184
- 67 Witte, C. P. (2011) Urea metabolism in plants. *Plant Sci.* **180**, 431-438
- 68 Kanamori, T., Kanou, N., Atomi, H. and Imanaka, T. (2004) Enzymatic characterization of a prokaryotic urea carboxylase. *J Bacteriol.* **186**, 2532-2539
- 69 Pricer, W. E., Jr. and Rabinowitz, J. C. (1956) Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. V. Formiminoglycine. *J Biol Chem.* **222**, 537-554
- 70 Rabinowitz, J. C. (1956) Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. III. 4-Amino-5-imidazolecarboxylic acid and 4-aminoimidazole. *J Biol Chem.* **218**, 175-187

- 71 Rabinowitz, J. C. and Barker, H. A. (1956) Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. II. Purine transformations. *J Biol Chem.* **218**, 161-173
- 72 Rabinowitz, J. C. and Barker, H. A. (1956) Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. I. Tracer experiments on the fermentation of guanine. *J Biol Chem.* **218**, 147-160
- 73 Rabinowitz, J. C. and Pricer, W. E., Jr. (1956) Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. IV. 4-Ureido-5-imidazolecarboxylic acid. *J Biol Chem.* **218**, 189-199
- 74 Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J. M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S. D. and Wang, J. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* **464**, 59-65
- 75 Hosomi, A., Nakanishi, T., Fujita, T. and Tamai, I. (2012) Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. *PLoS One.* **7**, e30456
- 76 Low, R. K. and Stoller, M. L. (1997) Uric acid-related nephrolithiasis. *Urol Clin North Am.* **24**, 135-148
- 77 Sorensen, L. B. (1965) Role of the intestinal tract in the elimination of uric acid. *Arthritis Rheum.* **8**, 694-706
- 78 Weyand, S., Shimamura, T., Yajima, S., Suzuki, S., Mirza, O., Krusong, K., Carpenter, E. P., Rutherford, N. G., Hadden, J. M., O'Reilly, J., Ma, P., Saidijam, M., Patching, S. G., Hope, R. J., Norbertczak, H. T., Roach, P. C., Iwata, S., Henderson, P. J. and Cameron, A. D. (2008) Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science.* **322**, 709-713
- 79 Kryptou, E., Kosti, V., Amillis, S., Myriantopoulos, V., Mikros, E. and Dhallinas, G. (2012) Modeling, Substrate Docking, and Mutational Analysis Identify Residues Essential for the Function and Specificity of a Eukaryotic Purine-Cytosine NCS1 Transporter. *J Biol Chem.* **287**, 36792-36803
- 80 Vlanti, A. and Dhallinas, G. (2008) The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. *Molecular microbiology.* **68**, 959-977
- 81 Parales, R. E. and Ingraham, J. L. (2010) The surprising Rut pathway: an unexpected way to derive nitrogen from pyrimidines. *J Bacteriol.* **192**, 4086-4088
- 82 Andersen, P. S., Frees, D., Fast, R. and Mygind, B. (1995) Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of *uraA* mutants and cloning of the gene. *J Bacteriol.* **177**, 2008-2013
- 83 Goudela, S., Karatza, P., Koukaki, M., Frillingos, S. and Dhallinas, G. (2005) Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. *Mol Membr Biol.* **22**, 263-275
- 84 Papakostas, K. and Frillingos, S. (2012) Substrate selectivity of YgfU, a uric acid transporter from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **287**, 15684-15695

- 85 Yoo, H. S., Cunningham, T. S. and Cooper, T. G. (1992) The allantoin and uracil permease gene sequences of *Saccharomyces cerevisiae* are nearly identical. *Yeast*. **8**, 997-1006
- 86 Rai, R., Genbauffe, F. S. and Cooper, T. G. (1988) Structure and transcription of the allantoin permease gene (DAL5) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **170**, 266-271
- 87 Frillingos, S. (2012) Insights to the evolution of Nucleobase-Ascorbate Transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ. *Int J Biochem Mol Biol.* **3**, 250-272
- 88 Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. and Schillinger, U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* **73**, 365S-373S
- 89 Maria Carmen Collado*, C. B. u. a. and rez-Martínez, G. P. (2012) Defining microbiota for developing new Probiotics. *Microbial Ecology in Health & Disease* 2012, 23: 18579 - **23: 18579**
- 90 Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C. and Drevet, C. (2004) The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J Biol Chem.* **279**, 3132-3141
- 91 Diallinas, G., Gorfinkiel, L., Arst, H. N., Jr., Cecchetto, G. and Scazzocchio, C. (1995) Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. *J Biol Chem.* **270**, 8610-8622
- 92 Glatigny, A. and Scazzocchio, C. (1995) Cloning and molecular characterization of hxA, the gene coding for the xanthine dehydrogenase (purine hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem.* **270**, 3534-3550
- 93 Laboureur, P. and Langlois, C. (1968) [Urate oxidase of *Aspergillus flavus*. II. Metabolism, inhibition, specificity]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*. **50**, 827-841
- 94 Laboureur, P. and Langlois, C. (1968) [Urate oxidase of *Aspergillus flavus*. I. Isolation, purification, properties]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*. **50**, 811-825
- 95 Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680
- 96 Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4**, 406-425
- 97 Riccardo Percudani*, V. P. (2010) Analysis of the Human Gut Microbiome reveals an Alternative Pathway for Urate Degradation.
- 98 Schultz, A. C., Nygaard, P. and Saxild, H. H. (2001) Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. *J Bacteriol.* **183**, 3293-3302
- 99 Christiansen, L. C., Schou, S., Nygaard, P. and Saxild, H. H. (1997) Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the xpt-pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J Bacteriol.* **179**, 2540-2550
- 100 Kim, G. J., Lee, D. E. and Kim, H. S. (2000) Functional expression and characterization of the two cyclic amidohydrolase enzymes, allantoinase and a novel phenylhydantoinase, from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **182**, 7021-7028

- 101 Meinnel, T., Schmitt, E., Mechulam, Y. and Blanquet, S. (1992) Structural and biochemical characterization of the *Escherichia coli* *argE* gene product. *J Bacteriol.* **174**, 2323-2331
- 102 Li, Y., Jin, Z., Yu, X., Allewell, N. M., Tuchman, M. and Shi, D. (2011)) The *ygeW* encoded protein from *Escherichia coli* is a knotted ancestral catabolic transcarbamylase. *Proteins.* **79**, 2327-2334
- 103 Kalyani, J. N., Ramachandra, N., Kachroo, A. H., Mahadevan, S. and Savithri, H. S. (2012) Functional analysis of the genes encoding diaminopropionate ammonia lyase in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* **194**, 5604-5612
- 104 Uo, T., Yoshimura, T., Nishiyama, T. and Esaki, N. (2002) Gene cloning, purification, and characterization of 2,3-diaminopropionate ammonia-lyase from *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **66**, 2639-2644
- 105 Letunic, I. and Bork, P. (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res.* **39**, W475-478
- 106 Weber, E., Rodriguez, C., Chevallier, M. R. and Jund, R. (1990) The purine-cytosine permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: primary structure and deduced protein sequence of the *FCY2* gene product. *Mol Microbiol.* **4**, 585-596
- 107 Pope, S. D., Chen, L. L. and Stewart, V. (2009) Purine utilization by *Klebsiella oxytoca* M5a1: genes for ring-oxidizing and -opening enzymes. *J Bacteriol.* **191**, 1006-1017
- 108 Yoo, H. S. and Cooper, T. G. (1991) Sequences of two adjacent genes, one (*DAL2*) encoding allantoinase and another (*DCG1*) sensitive to nitrogen-catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* **104**, 55-62
- 109 Yoo, H. S. and Cooper, T. G. (1991) The ureidoglycollate hydrolase (*DAL3*) gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **7**, 693-698
- 110 Pinchuk, I. V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I. B., Megraud, F. and Urdaci, M. C. (2001) In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**, 3156-3161
- 111 Hosoi, T., Hirose, R., Saegusa, S., Ametani, A., Kiuchi, K. and Kaminogawa, S. (2003) Cytokine responses of human intestinal epithelial-like Caco-2 cells to the nonpathogenic bacterium *Bacillus subtilis* (natto). *Int J Food Microbiol.* **82**, 255-264
- 112 Xi, H., Schneider, B. L. and Reitzer, L. (2000) Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage. *J Bacteriol.* **182**, 5332-5341
- 113 Chisholm, V. T., Lea, H. Z., Rai, R. and Cooper, T. G. (1987) Regulation of allantoin transport in wild-type and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **169**, 1684-1690
- 114 Blakeley, R. L., Hinds, J. A., Kunze, H. E., Webb, E. C. and Zerner, B. (1969) Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Demonstration of a carbamoyl-transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids. *Biochemistry.* **8**, 1991-2000
- 115 Shin, I., Percudani, R. and Rhee, S. (2012) Structural and functional insights into (S)-ureidoglycine aminohydrolase, key enzyme of purine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* **287**, 18796-18805
- 116 Kalia, A., Rattan, A. and Chopra, P. (1999) A method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. *Anal Biochem.* **275**, 1-5

- 117 Bolchi, A., Ottonello, S. and Petrucco, S. (2005) A general one-step method for the cloning of PCR products. *Biotechnol Appl Biochem.* **42**, 205-209
- 118 Forouhar, F., Chen, Y., Xiao, R., Acton, T.B., Montelione, G.T., Hunt, J.F., Tong, L. (2004) Crystal Structure of the Putative Glyoxylate Induced Protein from *Pseudomonas aeruginosa*, Northeast Structural Genomics Target PaR14. To be Published
- 119 G.D. Vogels, C. V. d. D. (1966) Allantoinases from bacterial, plant and animal sources II. Effect of bivalent cations and reducing substances on the enzymic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation.* **122** 497–509
- 120 Tolun, A. A., Zhang, H., Il'yasova, D., Sztaray, J., Young, S. P. and Millington, D. S. (2010) Allantoin in human urine quantified by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* **402**, 191-193
- 121 Tipton, K. K. a. P. A. (2000) Kinetics and Mechanism of Allantoin Racemization. *Bioorganic Chemistry* **27**, 62–721
- 122 Okumura, I., Kondo, K., Miyake, Y., Itaya, K. and Yamamoto, T. (1976) Stereospecificity of conversion of uric acid into allantoinic acid by enzymes of *Candida utilis*. *J Biochem.* **79**, 1013-1019
- 123 Okumura, I. and Yamamoto, T. (1978) Enzymic racemization of allantoin. *J Biochem.* **84**, 891-895
- 124 Van der Drift, L., Vogels, G. D. and Van der Drift, C. (1975) Allantoin racemase: a new enzyme from *Pseudomonas* species. *Biochim Biophys Acta.* **391**, 240-248
- 125 Zanotti, G., Cendron, L., Ramazzina, I., Folli, C., Percudani, R. and Berni, R. (2006) Structure of zebra fish HIUase: insights into evolution of an enzyme to a hormone transporter. *J Mol Biol.* **363**, 1-9
- 126 Cendron, L., Berni, R., Folli, C., Ramazzina, I., Percudani, R. and Zanotti, G. (2007) The structure of 2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline decarboxylase provides insights into the mechanism of uric acid degradation. *J Biol Chem.* **282**, 18182-18189
- 127 Shibata, K., Watanabe, T., Yoshikawa, H., Abe, K., Takahashi, S., Kera, Y. and Yamada, R. H. (2003) Purification and characterization of aspartate racemase from the bivalve mollusk *Scapharca broughtonii*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **134**, 307-314
- 128 Fisch, F., Fleites, C. M., Delenne, M., Baudendistel, N., Hauer, B., Turkenburg, J. P., Hart, S., Bruce, N. C. and Grogan, G. (2010) A covalent succinylcysteine-like intermediate in the enzyme-catalyzed transformation of maleate to fumarate by maleate isomerase. *J Am Chem Soc.* **132**, 11455-11457
- 129 Potrykus, J., Flemming, J. and Bearne, S. L. (2009) Kinetic characterization and quaternary structure of glutamate racemase from the periodontal anaerobe *Fusobacterium nucleatum*. *Arch Biochem Biophys.* **491**, 16-24
- 130 Watabe, K., Ishikawa, T., Mukohara, Y. and Nakamura, H. (1992) Purification and characterization of the hydantoin racemase of *Pseudomonas* sp. strain NS671 expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **174**, 7989-7995
- 131 Okrasa, K., Levy, C., Wilding, M., Goodall, M., Baudendistel, N., Hauer, B., Leys, D. and Micklefield, J. (2009) Structure-guided directed evolution of alkenyl and arylmalonate decarboxylases. *Angew Chem Int Ed Engl.* **48**, 7691-7694
- 132 Araiso, T., Miyoshi, K. and Yamazaki, I. (1976) Mechanisms of electron transfer from sulfite to horseradish peroxidase-hydroperoxide compounds. *Biochemistry.* **15**, 3059-3063

- 133 Claiborne, A. and Fridovich, I. (1979) Chemical and enzymatic intermediates in the peroxidation of o-dianisidine by horseradish peroxidase. 2. Evidence for a substrate radical--enzyme complex and its reaction with nucleophiles. *Biochemistry*. **18**, 2329-2335
- 134 Altarsha, M., Castro, B. and Monard, G. (2009) Intrinsic reactivity of uric acid with dioxygen: Towards the elucidation of the catalytic mechanism of urate oxidase. *Bioorg Chem*. **37**, 111-125
- 135 Bayse, G. S., Michaels, A. W. and Morrison, M. (1972) The peroxidase-catalyzed oxidation of tyrosine. *Biochim Biophys Acta*. **284**, 34-42
- 136 Yoo, H. S., Genbauffe, F. S. and Cooper, T. G. (1985) Identification of the ureidoglycolate hydrolase gene in the DAL gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **5**, 2279-2288
- 137 Kim, M. I., Shin, I., Cho, S., Lee, J. and Rhee, S. (2012) Structural and functional insights into (s)-ureidoglycolate dehydrogenase, a metabolic branch point enzyme in nitrogen utilization. *PLoS One*. **7**, e52066
- 138 Anand, R., Dorrestein, P. C., Kinsland, C., Begley, T. P. and Ealick, S. E. (2002) Structure of oxalate decarboxylase from *Bacillus subtilis* at 1.75 Å resolution. *Biochemistry*. **41**, 7659-7669
- 139 Tabares, L. C., Gatjens, J., Hureau, C., Burrell, M. R., Bowater, L., Pecoraro, V. L., Bornemann, S. and Un, S. (2009) pH-dependent structures of the manganese binding sites in oxalate decarboxylase as revealed by high-field electron paramagnetic resonance. *J Phys Chem B*. **113**, 9016-9025
- 140 Steiner, R. A., Meyer-Klaucke, W. and Dijkstra, B. W. (2002) Functional analysis of the copper-dependent quercetin 2,3-dioxygenase. 2. X-ray absorption studies of native enzyme and anaerobic complexes with the substrates quercetin and myricetin. *Biochemistry*. **41**, 7963-7968

Ringraziamenti

Sono molte le persone che devo ringraziare sia per questo lavoro sia per questi 3 anni di dottorato. È stata anche la loro presenza e i loro consigli che mi hanno permesso di raggiungere questo traguardo importante.

Innanzitutto desidero ringraziare il professor Riccardo Percudani per avermi aiutato e supportato durante tutto il periodo del dottorato nella progettazione degli esperimenti, nell'interpretazione dei risultati e nella ricerca di finanziamenti per la borsa di studio.

Ringrazio l'ufficio Spinner per avermi finanziato e seguito nella scrittura del progetto "probiotici-iperuricemia". Per questo progetto ringrazio anche la dottoressa Claudia Vignali dell'azienda Stardea di Parma che con entusiasmo si è interessata al progetto.

Ringrazio i miei tesisti che hanno collaborato alla realizzazione di questo progetto: Davide Carnevali e Cecilia Nolli per gli studi svolti su ALLA; Ambra Dondi e Anastasia Liuzzi per gli studi su Atu_UGluAH* Stefano Maggi per gli studi sulla Allantoina racemasi Marta Toschi e Sara Dalla Ghirarda per il loro lavoro svolto in laboratorio.

Ringrazio il professor Claus Peter Witte per avermi ospitato e finanziato per 6 mesi nel suo laboratorio della Freie Universität di Berlino e tutto il suo gruppo di ricerca per avermi aiutato nel lavoro e fatto vivere una bellissima esperienza.

Ringrazio Marialaura Marchetti, Alessandro Frau e Nicola Doniselli per il loro impegno meticoloso nella correzione della tesi.

Ringrazio tutti i Dottorandi, Borsisti, Postdoc del Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare dell'Università degli studi di Parma per tutti i consigli, suggerimenti e amicizia che mi hanno dato durante questi tre anni. Un ringraziamento particolare va a Ileana Ramazzina, Roberto Viscomi, Maria Cristina Bosio, Alice Dallatomasina, Davide Schirotti, Paolo Felici, Claudia Rasore, Paola Florio, Davide Cavazzini, Davide Amidani, Beatrice Fermi, Anastasia Conti, Martina Bonacini, Gloria Spagnoli e Andrea Santoni.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori Letizia e Giovanni, le mie sorelle Paola e Bonaria e mio fratello Carlo perchè mi hanno sempre sostenuto e aiutato durante i tre anni di dottorato, standomi sempre vicino, e supportandomi nelle mie scelte, il loro sostegno per me è stato molto importante e non smetterò mai

di ringraziarli per questo. Desidero infine ringraziare i miei amici conosciuti qua a Parma e della Sardegna per il loro supporto psicologico e morale, in quanto hanno contribuito a darmi serenità e gioia durante tutto questo periodo.