



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN Biochimica e Biologia Molecolare

Ciclo XXII

Promiscuità enzimatica ed evoluzione molecolare:
studio di una lattonasi da *Sulfolobus solfataricus*
in grado di degradare agenti nervini.

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. GianLuigi Rossi

Tutor:
Chiar.mo Dott. Giuseppe Manco

DOTTORANDO: LUIGIA MERONE

INDICE

CAPITOLO I: INTRODUZIONE

I 1 PROMISCUITÀ ENZIMATICA	7
I 1.1 Teorie evolutive.....	9
I 1.2 Promiscuità enzimatica e vantaggio applicativo.....	11
I 2 PROMISCUITÀ ENZIMATICA NELLA SUPERFAMIGLIA DELLE AMIDOIDROLASI	13
I 2.1 La famiglia delle PTE.....	16
I 2.1.1 PTE da <i>Pseudomonas diminuta</i>	18
I 2.1.2 Struttura della pPTE.....	19
I 2.1.3 Meccanismo di reazione.....	22
I 2.2 Il gruppo delle Fosfotriesterasi-Lattonasi simili (PLL).....	23
I 2.2.1 AhlA da <i>R. erythropolis</i> e PPH da <i>M. tuberculosis</i>	26
I 2.2.2 SsoPox: una PLL da <i>Sulfolobus solfataricus</i>	26
I 2.2.3 Potenziale ruolo delle PLLs.....	29
I 3 SCOPO DELLA TESI	31

CAPITOLO II: MATERIALI E METODI

II 1 MICROBIOLOGIA	32
II 1.1 Materiali.....	32
II 1.2 Ceppi batterici.....	32
II 1.3 Terreni di coltura e antibiotici.....	33
II 1.4 Crescita di <i>Sulfolobus solfataricus</i>	34
II 1.5 Preparazione di cellule <i>E. coli</i>	35
II 1.6 Trasformazione cellulare di <i>E. coli</i>	36
II 2 BIOCHIMICA DEL DNA (BIOLOGIA MOLECOLARE)	36
II 2.1 Metodiche.....	36
II 2.1.1 Materiali.....	36
II 2.1.2 Preparazione di DNA plasmidico.....	37
II 2.1.3 Estrazione e precipitazione del DNA.....	37
II 2.1.4 Elettroforesi su gel d'agarosio.....	38

II 2.1.5 Estrazione del DNA da gel di agarosio.....	38
II 2.1.6 Determinazione della concentrazione di DNA.....	38
II 2.1.7 Idrolisi del DNA catalizzata da enzimi di restrizione.....	38
II 2.1.8 Reazione di defosforilazione del DNA.....	39
II 2.1.9 Reazione catalizzata da DNA ligasi.....	39
II 2.1.10 Vettori di clonaggio e d'espressione eterologa.....	39
II 2.2 Applicazioni.....	39
II 2.2.1 Materiali.....	39
II 2.2.2 Produzione di una libreria di varianti di <i>SsoPox</i>	40
II 2.2.2.1 Mutagenesi <i>random</i>	40
II 2.2.2.2 Mutagenesi sito-diretta e di saturazione.....	41
II 2.2.2.3 Produzione di una chimera <i>SsoPox-pPTE</i>	42
II 2.2.2.4 Ricombinazione mediante DNA StEP.....	44
II 2.2.3 Analisi per sequenza.....	45
II 2.2.4 Analisi delle colonie su piastra a 96 pozzetti.....	46
II 3 BIOCHIMICA DELLE PROTEINE.....	47
II 3.1 Produzione delle proteine.....	47
II 3.1.1 Materiali.....	47
II 3.1.2 Espressione delle proteine ricombinanti.....	47
II 3.1.3 Lisi cellulare.....	47
II 3.1.4 Termoprecipitazioni.....	48
II 3.1.5 Cromatografia a scambio ionico.....	48
II 3.1.6 Cromatografia ad esclusione molecolare.....	48
II 3.1.7 Elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide.....	48
II 3.1.8 Determinazione della concentrazione proteica.....	49
II 3.2. Analisi cinetica degli enzimi.....	50
II 3.2.1 Materiali.....	50
II 3.2.2 Saggi enzimatici su paraoxon.....	50
II 3.2.2.1 Valutazione della costante di inibizione da EBP.....	51
II 3.2.3 Saggi enzimatici su carbossilesteri.....	51
II 3.2.4 Saggi enzimatici su TBBL.....	51

II 3.2.5 Saggi enzimatici su HSL.....	52
II 3.2.5.1 Valutazione della costante di inibizione da C10-HTL.....	
II 3.2.6 Determinazione del pH ottimale per la catalisi.....	53
II 3.2.7 Termofilia.....	53
II 3.2.8 Termostabilità cinetica.....	54
II 3.2.9 Stabilità cinetica in presenza di solventi e agenti denaturanti.....	
II 4 CHIMICA DEI COMPOSTI ORGANOFOSFORICI (Ops).....	54
II 4.1 Materiali.....	54
II 4.2 Misure di sicurezza.....	54
II 4.3 Quantizzazione.....	55
II 5 BIOINFORMATICA.....	55
II 5.1 Materiali.....	55
II 5.2 Docking e visualizzazione grafica delle strutture.....	55

CAPITOLO III: RISULTATI

III 1 CARATTERIZZAZIONE DI <i>SsoPox</i>.....	56
III 1.1 Struttura.....	56
III 1.1.1 Struttura ottenuta con analogo di substrato.....	59
III 1.2 Funzione.....	60
III 1.2.1 Attività su Acil-omoserina lattoni (HSL).....	60
III 1.2.1.1 Studi di inibizione enzimatica da HTL.....	61
III 1.2.2 Attività fosfotriesterasica.....	62
III 1.2.2.1 Studi di inibizione enzimatica da OPs.....	63
III 1.2.3 Promiscuità catalitica di <i>SsoPox</i>	65
III 1.2.3.1 Considerazioni cinetiche.....	65
III 1.2.3.2 Studi strutturali di simulazione di legame.....	65
III 1.2.4 Ruolo nel quorum sensing.....	67
III 2 EVOLUZIONE DELL'ATTIVITÀ FOSFOTRIESTERASICA DI <i>SsoPox</i>.....	69
III 2.1. Produzione di varianti enzimatiche.....	69
III 2.1.1 Mutagenesi sito-diretta.....	69
III 2.1.2 Mutagenesi casuale.....	71

III 2.1.3 Mutagenesi di saturazione.....	72
III 2.1.4 Ricombinazione sito-diretta.....	72
III 2.1.5 Produzione di una chimera.....	73
III 2.1.6 Ricombinazione di SyntPox con <i>SsoPoxwt</i>	75
III 2.2 Purificazione delle varianti enzimatiche.....	77
III 2.2.1 Varianti casuali, sito dirette e loro combinazione.....	77
III 2.2.2 Variante SyntPox e PoxC258L-I261F-W263A	78
III 2.3 Caratterizzazione biochimica dell'attività fosfotriesterasica.....	79
III 2.3.1 Varianti casuali, sito diretti e loro combinazione.....	80
III 2.3.1.1 Determinazione pH e temperatura ottimale.....	80
III 2.3.1.2 Determinazione dei parametri cinetici.....	82
III 2.3.1.3 Parametri cinetici di W263F in presenza di SDS..	83
III 2.3.1.4 Caratterizzazione della stabilità termica.....	85
III 2.3.2 Variante tripla PoxC258L-I261F-W263A.....	86
III 2.3.2.1 Determinazione pH e temperatura ottimale.....	86
III 2.3.2.2 Determinazione dei parametri cinetici.....	87
III 2.3.2.3 Parametri cinetici in presenza di SDS.....	88
III 2.3.2.4 Caratterizzazione della stabilità termica.....	89
III 2.4 Caratterizzazione biochimica dei mutanti per attività lattonasica....	90
III 2.4.1 Varianti casuali, sito dirette e loro combinazione.....	90
III 2.4.2 Variante tripla.....	92
III 2.5 Ruolo della Cisteina258 nella promiscuità catalitica di <i>SsoPox</i>	93
III 2.5.1 Attività fosfotriesterasica.....	93
III 2.5.2 Attività su TBBL.....	95
III 2.5.3 Attività su HSL.....	96
III 3 APPLICAZIONI.....	97
III 3.1 Attività fosfotriesterasica in diverse condizioni di stress.....	97
III 3.2 Studi di stabilità in diverse condizioni di stress.....	99
CAPITOLO IV: DISCUSSIONE.....	101

CAPITOLO V: CONCLUSIONI.....	108
BIBLIOGRAFIA.....	110
ELENCO PUBBLICAZIONI PRODOTTE.....	119

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

Il seguente capitolo si suddivide in tre paragrafi: il primo, che introduce il concetto promiscuità enzimatica analizzata sia da un punto di vista delle teorie evolutive attualmente discusse (1.1) che del suo utilizzo come punto di partenza per approcci evolutivi *in vitro* (1.2); il secondo in cui si analizza la promiscuità enzimatica nel caso della superfamiglia delle amidoidrolasi con particolare riferimento a due diversi gruppi: le fosfotriesterasi (2.1) e le PLL (2.2); il terzo, che riporta lo scopo del seguente lavoro di tesi.

I 1 PROMISCUITÀ ENZIMATICA

La relazione univoca “una sequenza - una struttura - una funzione” è un paradigma della biochimica classica tutt'oggi discusso. Questa relazione, infatti, non spiega come, a livello strutturale alcune proteine siano in grado di organizzarsi in diverse conformazioni funzionalmente produttive e, a livello funzionale, possano svolgere molteplici ruoli. Nel caso degli enzimi, in particolare, la varietà conformazionale, o plasticità, può comportare variazioni importanti nelle proprietà catalitiche nei confronti di uno stesso substrato o di substrati diversi. Nel 1999 O'Brien definendo in modo chiaro la possibilità di funzionalità multiple di un enzima, introdusse il concetto di “promiscuità enzimatica”, che da allora è divenuto uno dei più importanti argomenti della biocatalisi moderna (O'Brien, 1999).

Si definisce promiscuità enzimatica la capacità di catalizzare reazioni aggiuntive che possono essere più o meno lontane dal ruolo principale dell'enzima. Questa definizione comprende sia il concetto di promiscuità di substrato (catalisi di substrati di natura diversa), che di promiscuità catalitica (uso di differenti meccanismi di reazione e/o diversi siti catalitici) (Copley SD, 2003; Bornscheuer, 2004, O'Brien PJ, 1999). In maniera meno rigorosa, anche la capacità di agire in differenti condizioni chimico-fisiche (pH, temperatura, ecc.) è stata considerata una “condizione di promiscuità catalitica” (Hult K, 2007). Nel caso in cui le reazioni avvengono nella stessa tasca enzimatica la funzione promiscua non può essere

dissociata dalla funzione principale perché i siti di legame e/o catalisi della proteina contribuiscono ad entrambe le funzioni (Fernandez A, 2005). Tuttavia, mentre il legame del substrato “non-nativo” avviene mediante interazioni idrofobiche guidate primariamente da un vantaggio entropico, il legame del substrato nativo, o ligando, coinvolge diverse ed indipendenti interazioni guidate dall'entalpia (ad es. legami idrogeno) (Fernandez A, 2005).

Uno dei primi lavori che mise in evidenza sperimentalmente un fenomeno di promiscuità catalitica fu quello di Pocker in cui si mostrò la debole attività esterasica della anidrasi carbonica II, il cui ruolo fisiologico è catalizzare l'addizione di acqua alla CO₂ (Pocker Y, 1965; Pocker Y, 1978). Con gli anni il sequenziamento di numerosi genomi e l'utilizzo esponenziale delle tecniche di biologia molecolare a supporto della biochimica classica hanno consentito la produzione e la caratterizzazione *in vitro* di un'infinità di enzimi, mettendo in evidenza capacità catalitiche nuove e aggiuntive a quelle fisiologiche. Nell'analisi di attività promiscue, è importante sottolineare la differenza tra fenotipo osservabile e ruolo fisiologico. Molte funzioni promiscue osservate *in vitro*, infatti, sono spesso non utilizzate dalla cellula, risultando, *in vivo*, fisiologicamente non rilevanti. Tuttavia, la loro presenza fa pensare ad una rete di reazioni chimiche “sotterranee” che, in un qualche modo, possono incidere sulla salute della cellula (Nobeli I, 2009). Per comprendere qual è il limite di promiscuità catalitica osservabile *in vitro* fisiologicamente rilevante, in uno studio molto recente si dimostra che in una specie mancante di un gene vitale (Δtrp), la marginale attività promiscua di un enzima omologo era in grado di compensare l'assenza di funzione (Matsumura I, 2008).

L'enorme importanza del concetto di promiscuità enzimatica è sostanzialmente duplice. Da un punto di vista “teorico” è connesso con il riconoscimento molecolare, e, a più ampio raggio, con la biochimica degli organismi viventi. Questo ha conseguenze considerevoli nell'ambito dell'evoluzione delle specie. Da un punto di vista “pratico”, invece, la comprensione della promiscuità può facilitare il progresso della ingegneria proteica sia per applicazioni biomediche che industriali.

I 1.1 Teorie evolutive

L'esistenza della promiscuità catalitica comporta un effettivo vantaggio cellulare per la sopravvivenza della specie e per la sua evoluzione. *In vivo*, infatti, la capacità di catalizzare molteplici reazioni enzimatiche consente alla cellula di recuperare dall'ambiente nuovi metaboliti favorendo delle vie metaboliche che possono diventare importanti, qualora le condizioni ambientali cambino. Inoltre, in presenza di una pressione selettiva esterna, la cellula può reclutare catalizzatori biologici che già possiede, anche se con minima attività, dando un vantaggio alla specie. Infatti, come suggerisce O'Brien, in termini di “potenziale evolucionistico” enzimi con attività promiscua hanno un vantaggio selettivo in quanto “l'evento di specializzazione catalitica di un'attività promiscua è più probabile che partire da zero” (O'Brien PJ, 1999). Una teoria vuole che questo evento possa avvenire in maniera sostanzialmente duplice: o si ha la completa ri-specializzazione dell'enzima in seguito a modificazioni che fanno perdere completamente e subito la funzione originale (è questo il caso di forti pressioni selettive o eventi di selezioni multiple) oppure, se la pressione selettiva non è stringente, l'enzima acquisisce nuove funzionalità senza perdere la funzione originale passando per una fase di “generalista” (enzima che catalizza molteplici reazioni con la stessa specificità) (Peisajovich SG, 2006). In questo caso le sequenze amminoacidiche in cui si possono riprodurre nuove attività enzimatiche (secondarie e promiscue) che subentrano alla attività principale, definiscono un ideale spazio di sequenze chiamato “campo di neutralità”. La “neutralità” enzimatica è, quindi, tutto il campo di varianti amminoacidiche possibili che una proteina/enzima può sperimentare/sopportare senza subire modificazioni significative a livello strutturale e della sua funzione primaria.

Questo concetto era già *in nuce* nell'opera di Darwin che, nel “L'origine delle specie” scriveva: «Variazioni non utili né dannose non saranno coinvolte nella selezione naturale e saranno lasciate come un elemento fluttuante» (Darwin C, 1859). Nelle teorie moderne questi “elementi fluttuanti” diventano il fulcro dell'evoluzione molecolare. Già nel 1968, infatti, Motoo Kimura riportava in un lavoro su *Nature* le sue considerazioni sulla “neutralità” delle proteine e quindici anni dopo scrive un testo “The neutral theory”, dal quale attingono ancora i biochimici dei nostri giorni (Kimura M, 1968; Kimura M, 1983). Numerosi studi susseguiti da allora fino ad oggi hanno dimostrato questa teoria e ne stanno affinando i contenuti scientifici, in particolare per gli enzimi. In uno di questi è stato suggerito che l'evoluzione di

una funzione nuova avviene mediante mutazioni che hanno un piccolo effetto sulla funzione principale (Tokuriki N, 2008). Studi sperimentali hanno confermato la possibilità di esistenza *in vitro* di diverse varianti *neutre* di uno stesso enzima che, mantenendo lo stesso livello di espressione cellulare ed attività fisiologica, modificano esclusivamente le proprietà catalitiche promiscue (Khersonsky O, 2006).

L'aver dimostrato che sequenze enzimatiche che differiscono di pochi aminoacidi possano catalizzare le stesse reazioni acquisendo nuove funzionalità, ha una conseguenza notevole nel campo della evoluzione delle famiglie e superfamiglie di enzimi. Infatti, la specializzazione o differenziazione di enzimi in famiglie e superfamiglie può essere attribuita ad antenatori comuni che potrebbero aver creato/mantenuto differenti reazioni collaterali residuali (Gerlt JA, 1998; Bugg TD, 2004). Le proteine ancestrali sarebbero state capaci di catalizzare tutto uno spettro di attività a bassi livelli al fine di successive specializzazioni (Babbitt PC, 1997).

A favore di questa ipotesi sono una serie di osservazioni di carattere cinetico e strutturale e di risultati sperimentali, ottenuti mediante evoluzione molecolare *in vitro*. Da un punto di vista cinetico si è osservato che: 1. Alcune attività promiscue sono condivise da più di un membro della stessa famiglia; 2. L'ordine di grandezza di un'attività promiscua (in termini di specificità di substrato) può differire fino a uno-due ordini di grandezza rispetto alla funzione principale. 3. La funzione nativa di un membro di una famiglia è spesso identificata come attività promiscua di altri membri della famiglia (Roodvelt C, 2005). E' stato inoltre dimostrato *in vitro* che l'evoluzione di un'attività promiscua comporta la comparsa di altre attività a loro volta promiscue (Khersonsky O, 2006).

Da un punto di vista strutturale, invece, il numero piuttosto limitato di “fold” noti di più di 30,000 proteine con le più svariate funzionalità ha fatto pensare che la diversità funzionale sia emersa a partire da un piccolo numero di proteine progenitrici, ciascuna con una differente struttura, che successivamente hanno acquisito, in seguito a pressione selettiva, differenti funzionalità specifiche. A supporto di questa ipotesi è anche il fatto che le modifiche ritrovate nella maggior parte di proteine “generaliste” sono localizzate all'interno del sito attivo in regioni strutturalmente mobili (*loops*). (Peisajovich SG, 2006). E' stato dimostrato inoltre che rimpiazzando diversi elementi mobili di struttura (*loops*) del sito attivo all'interno di un enzima e mantenendo di quest'ultimo l'impalcatura (*fold*) e i residui del sito catalitico, si genera un membro di una nuova famiglia con nuova specificità di reazione (Park HS, 2006).

Ciò suggerisce che in natura la struttura portante e il sito catalitico rappresentano due parti di una proteina che “interscambiandosi” (a livello genetico) possono generare nuove attività e quindi nuovi membri di altre famiglie. A sostegno di questa ipotesi è stato dimostrato che il semplice evento di mutazione puntiforme non basta a spiegare la globalità degli eventi evolutivi, ma la specializzazione di un enzima è strettamente connessa con tutta una serie di modificazioni che hanno origine, ovviamente, da modificazioni a livello genetico (duplicazione, ricombinazione, mutazione). E' ormai convinzione comune che l'evento di duplicazione genica sia alla base dei processi di evoluzione molecolare. In questo modo proteine ancestrali possono essersi evolute in modi divergenti: una continuando la sua funzione nativa, l'altra evolvendosi mediante successive modificazioni guidate dalla pressione selettiva. E' stato addirittura proposto un approccio di simulazione “gerarchica” di eventi mutagenici che progressivamente comportano la modificazione e quindi la evoluzione da un membro di una famiglia in un altro (Bogard LD, 1999).

Nel caso degli enzimi una ipotesi vuole che l'evento di duplicazione genica sia nella fase di “esplorazione” della cellula, a livello della produzione del generalista (Tokuriki N, 2008; Levin KB, 2009); un'altra, invece, sostiene che la fase di duplicazione genica avvenga a monte di qualsiasi evento mutagenico (Serres MH, 2009). Certo è che in presenza di una forte pressione selettiva la cellula deve essere in grado di fronteggiare nel più breve tempo possibile le variazioni ambientali subite.

Dati recenti mostrano che il genoma umano comprende un grande insieme di elementi neutrali che sono biochimicamente attivi ma che l'evoluzione non ha mantenuto nei mammiferi (Birney E, 2007). Probabilmente molti di questi provengono da duplicazione genica e sono così una fonte di versatilità funzionale che potrebbe essere attinta, se la necessità dovesse sopraggiungere.

I 1.2 Promiscuità enzimatica e vantaggio applicativo

Negli ultimi 15-20 anni il numero di lavori prodotti sulla evoluzione molecolare di attività promiscue di enzimi è stato esponenziale. Infatti, l'utilizzo di enzimi come catalizzatori biocompatibili e altamente specializzati per i processi industriali e il crescente interesse nell'ambito biomedico verso più specifici inibitori molecolari, ha accelerato l'interesse verso la produzione di varianti enzimatiche/proteiche altamente performanti nelle condizioni

desiderate. In particolare gli enzimi presenti in natura non posseggono tutte le caratteristiche (specificità, stabilità) necessarie per un loro diretto utilizzo nei sistemi sintetici (alta temperatura, alti o bassi pH, presenza di solventi, etc.) (Eijsink VG, 2004). Per queste ragioni negli ultimi anni tecniche di evoluzione molecolare *in vitro* sono state ampiamente usate per produrre forme mutate che garantissero un loro utilizzo nelle condizioni desiderate. In questo senso l'obiettivo di recente interesse per l'evoluzione molecolare *in vitro* ha riguardato la modificazione della stabilità strutturale, delle proprietà catalitiche e di enantioselettività. Nel caso in cui la prestazione d'interesse sia di tipo catalitico e l'attività non è direttamente disponibile in natura, sono attualmente oggetto di scelta enzimi che promiscuamente catalizzano reazioni omologhe. Per questo motivo la ricerca attuale è focalizzata sulla scoperta di proteine che possano essere dei buoni “punti di partenza” da cui evolvere le caratteristiche di interesse. Tuttavia, studi sempre più recenti dimostrano che le sole proprietà catalitiche non sono l'unico parametro di scelta per l'evoluzione *in vitro*, ma l’“evoluzionabilità” di una proteina (cioè la capacità di evolvere, di tollerare mutazioni) è correlata con la sua extra-stabilità strutturale. Gli estremozimi, cioè enzimi resistenti a condizioni estreme come pH (acido/basifilici), temperatura (termostabili) o forza ionica (alofilici) ecc, possedendo strutturalmente una loro intrinseca stabilità in diverse condizioni, dipendenti dall'ambiente da cui provengono, rappresentano degli ottimi punti di partenza per un processo di evoluzione molecolare *in vitro* (Bloom JD, 2004). Infatti la tolleranza a fattori de-attivanti come acidi/basici pH, alte o basse temperature ecc, è un requisito per la robustezza mutazionale (Bloom JD 2006). Inoltre, l'intrinseca stabilità minimizza l'effetto delle mutazioni consentendo anche un più vasto spettro di analisi/sperimentazioni delle sequenze proteiche possibili (Eijsink VGH, 2005). Diversamente, mutazioni in proteine meno stabili spesso implicano un collasso strutturale. In questo senso enzimi provenienti da microorganismi “estremofili”, che possiedono l'attività di interesse come funzione principale o promiscua, sono da considerarsi degli ottimi punti di partenza per l'evoluzione molecolare. Di tutti i fattori chimico-fisici “estremi”, la temperatura, in particolare l'elevata temperatura, è quello meglio studiato. Questo perché è stato dimostrato che enzimi termostabili possiedono anche un'elevata stabilità nei confronti di altre condizioni estreme (presenza di solventi organici, surfattanti, ecc) (Van den Burg B, 1998; D'Amico S, 2003; Wang LJ, 2000). Inoltre la stabilità alla temperatura di un catalizzatore (in questo caso di un enzima) ha dei risvolti

significativi nell'ambito dei processi industriali/economici perché l'utilizzo della alta temperatura migliora le condizioni di solubilità dei reagenti, incide sulla velocità di reazione, e quindi di produzione, e limita le contaminazioni microbiche (Robertson DE, 2004).

Diversi lavori sono stati fatti e sono attualmente in corso per incrementare la stabilità, in particolare la termostabilità di differenti enzimi (Hecky J, 2005). In alcuni di questi lavori mediante un approccio di evoluzione razionale si è riusciti ad irrigidire la struttura della proteina incrementando le interazioni idrofobiche, accorciando gli elementi di struttura mobile (loops) e mutagenizzando altri residui (Giver L, 1998; Cherry J R, 1999; Acharya P, 2004).

In approcci di evoluzione molecolare di un enzima è stata inoltre proposta una fase preliminare di irrigidimento della struttura (modifica della stabilità strutturale intrinseca) prima di procedere all'evoluzione catalitica, in modo da poter sperimentare a livello cinetico un maggior numero di varianti (Bloom JD, 2006).

I 2 PROMISCUITÀ ENZIMATICA NELLA SUPERFAMIGLIA DELLE AMIDOIDROLASI

Holm e Sanders definirono la superfamiglia delle amidoidrolasi in seguito alla risoluzione della struttura tridimensionale dell'ureasi, delle fosfotriesterasi e delle amidasi (Holm L, 1997; Seibert CM, 2005)

Quando è stata pubblicata la classificazione erano note solo 16 strutture di questa nuova superfamiglia, oggi sono 425 provenienti da 1400 specie. Le caratteristiche strutturali comuni ai membri della superfamiglia sono il fold $(\alpha/\beta)_8$ -barrel (TIM-barrel) e un centro metallico mono o bi-nucleare.

Nella classificazione originaria i membri delle famiglie furono divisi in sette sottogruppi in base alle caratteristiche strutturali comuni. In particolare i gruppi si distinguevano per il numero di atomi di metallo presenti nel sito attivo, per la posizione da essi occupata (localizzazione dello “*strand*”) e per il numero e tipo di amminoacidi di coordinazione, come riportato nella tabella.

Tabella I.1. Classificazione della Superfamiglia delle amidoidrolasi secondo Sanders

Gruppo	Metalli	Posizione	Strand							
			1	2	3	4	5	6	7	8
I	Zn, Ni	α , β	HxH			K	H	H		D
II	Zn	α , β	HxH			E	H	H		D
III	Zn, Fe	α	HxH				H	H		D
IV	Fe	β	HxH		E		H	H		D
V	Zn	β	HxH	C			H	H		D
VI	Zn	α , β	HxH		E		H	H		D
VII							H			D

La caratteristica strutturale più importante di questa superfamiglia è la presenza del centro metallico mono o bi-nucleare che serve ad attivare una molecola d'acqua per l'attacco nucleofilo. In alcuni casi serve anche per incrementare il carattere elettrofilo del substrato. In tutti i membri di questa superfamiglia il centro metallico si trova all'estremità C-terminale della struttura. Nel caso in cui il centro sia bi-nucleare distinguiamo un metallo meno esposto al solvente (definito α) e un metallo più esposto (definito β). Per tutti i membri della superfamiglia quattro istidine e un aspartico coordinano i metalli. Il sesto legante può essere una lisina, carbossilata, o un glutammico che si trova a ponte tra i due metalli. La carbossilazione della lisina è una modifica post-traduzionale il cui significato funzionale ancora non è chiaro. Potrebbe servire per regolare l'attività catalitica o essere semplicemente un residuo dell'evoluzione. Studi *in vitro* hanno dimostrato, nel caso della fosfotriesterasi da *Pseudomonas diminuta* (PTE), che il sito catalitico in presenza di bicarbonato e di un opportuno catione divalente si riassume spontaneamente, suggerendo che il ruolo del carbossile (più che del carbammato) sia anche strutturale, oltre che catalitico (Shim H, 2000). Anche nel caso della carbossilesterasi fosfotriesterasi-like da *Mesorizobium loti* (MloPLC) è stato recentemente dimostrato, mediante approcci mutagenici, il ruolo sia catalitico che strutturale del carbossile in quella posizione (Mandrich L, 2009)

La struttura TIM barrel (8 foglietti β paralleli alternati da 8 α eliche) è una delle più comuni strutture note nel PDB (Protein Data Bank) infatti è presente in circa 25 superfamiglie di proteine, in particolare enzimi, funzionalmente distinti. I gruppi funzionali del sito attivo così

collocati sono strutturalmente indipendenti, rendendo questa struttura ottimizzata per l'evoluzione di nuove funzioni. Inoltre l'ampia rappresentatività strutturale sostiene la teoria che enzimi diversi, strutturalmente correlati, possano essersi evoluti in modo divergente da antecessori comuni.

Gli enzimi appartenenti a questa superfamiglia sono idrolasi che catalizzano la rottura di un legame estere attraverso una reazione di addizione o sostituzione nucleofila di una molecola d'acqua opportunamente attivata. I substrati trasformati da questo gruppo di enzimi sono carbossil-esteri, fosfo-esteri, ammidi e lattoni di diversa natura (zuccheri, organofosfati, amminoacidi, acidi nucleici, ecc), chimicamente distinti, che condividono la presenza di un centro elettrofilo di fosforo tetraedrico o carbonio trigonale. Una lista parziale dei substrati riconosciuti dai membri di questa famiglia è riportata nella **Fig.I.1**.

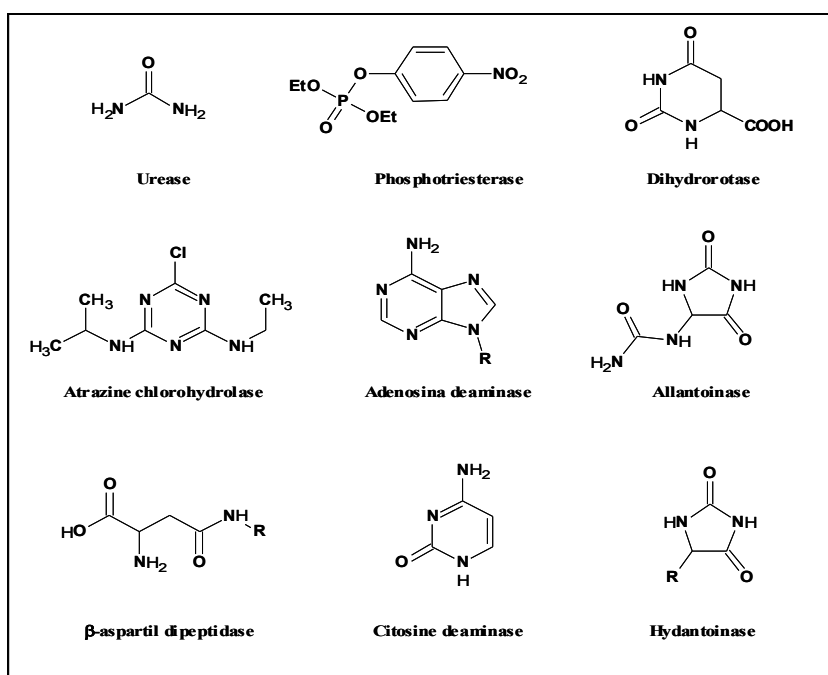


Fig.I.1 Strutture di alcuni substrati della superfamiglia delle amidoidrolasi

Questa super-famiglia comprende 10 famiglie: deaminasi, peptidasi, fosfotriesterasi, Rnasi, polimerasi, Dnasi, ureasi e tre amidoidrolasi (diidrorotasi, decarbossilasi, ecc).

Funzionalmente è stato dimostrato per tre membri della superfamiglia (specializzate diidrorotasi, fosfotriesterasi e carbossilesterasi) che le loro attività catalitiche principali sono

presenti, come attività promiscue, anche negli altri membri. Questa correlazione è stata dimostrata anche per altri enzimi specializzati della superfamiglia che, mediante approcci mutagenici, acquisiscono attività promiscue, che sono funzioni principali di altri membri (Roodvelt C, 2005).

I 2.1 La famiglia delle PTE

Così definite per la loro capacità di degradare i composti organofosforici triestere, le fosfotriesterasi (PTE) fanno parte del primo gruppo della classificazione di Sanders. Per le loro caratteristiche strutturali, oltre che funzionali, sono state successivamente classificate dalla IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) come arildialchilfosfatasi (E.C. 3.1.8.1) provenienti dal generico gruppo della fosforo-triestere idrolasi (E.C. 3.1.8.-) che comprende anche altre famiglie in grado di degradare organofosfato triesteri.

I composti organofosforici (OPs) sono fosfoesteri di molecole generalmente aromatiche. Gli OPs contenenti tre legami fosfo-estere sono chiamati fosfotriesteri. La struttura di tali composti può essere generalizzata come riportato schematicamente in **Fig.I.2.**

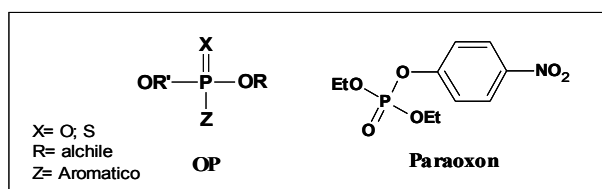


Fig.I.2. Strutture di un generico organofosfato (OP) e del Paraoxon

Si definiscono osso-organofosfati i derivati in cui l'atomo legato al fosforo col doppio legame è un ossigeno e tio-organofosfati quelli in cui è uno zolfo. Il gruppo indicato nella figura con la lettera "Z" è generalmente un gruppo aromatico. Come esempio è mostrato il pesticida dietil *p*-nitrofenil fosfato, noto come Paraoxon (**Fig.I.2**).

I composti organofosforici costituiscono la più larga classe di pesticidi attualmente usati nei paesi industrializzati (Mulbry WW, 1989). Essi si sono diffusi a partire dalla fine della seconda guerra mondiale raggiungendo un sostanziale successo commerciale come componente chiave degli insetticidi agricoli. La FAO stima che la maggior parte dei pesticidi

obsoleti stoccati nel mondo arriva a circa 200 mila tonnellate, con il conseguente rischio, maggiore nei paesi in via di sviluppo, di contaminazione del suolo, delle acque di irrigazione e delle acque potabili (World Health Organization 1986, 1990). Le proprietà tossiche degli organofosforati sono state sfruttate anche per lo sviluppo di agenti chimici di interesse militare e uso terroristico, come sarin, soman e VX (Munro N, 1994) (**Fig.I.3**).

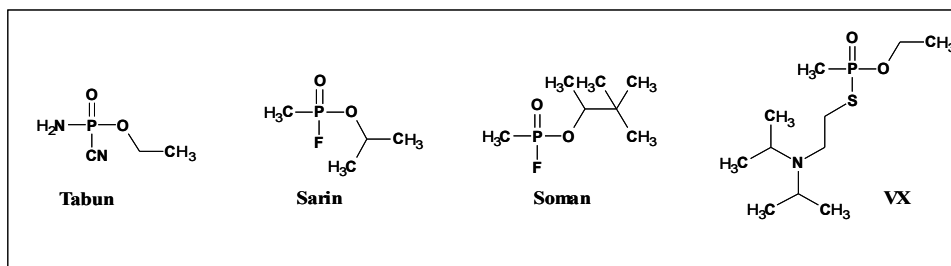


Fig.I.3 Strutture di alcuni gas nervini

La tossicità degli OPs è dovuta sostanzialmente alla capacità di inattivare l'acetilcolinesterasi (AChE), l'enzima responsabile dell'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina (Ecobichon DJ, 2001) (**Fig.I.4**).

In questa reazione, un residuo di serina del sito attivo opera un attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico dell'acetilcolina per formare un intermedio covalente acetilenzima, insieme al rilascio di colina dal sito attivo. L'enzima attivo viene poi rigenerato attraverso un attacco idrolitico da parte dell'acqua, e il rilascio dell'acetato.

È stato provato che gli organofosforati mimano il substrato naturale. Studi cinetici hanno dimostrato che la prima parte della reazione (formazione dell'intermedio enzima fosforilato) è veloce, ma che la rigenerazione dell'enzima libero mediante attacco nucleofilo dell'acqua sull'intermedio fosfoenzima è estremamente lenta (Millard CB, 1999). L'enzima fosforilato è perciò incapace di funzionare come un effettivo catalizzatore per l'idrolisi dell'acetilcolina.

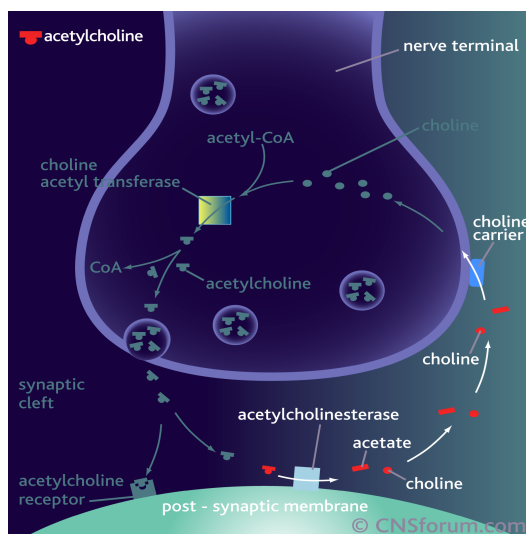


Fig.I.4 Idrolisi dell'acetilcolina catalizzata dall'acetilcolinesterasi sulla sinapsi colinergica. La figura è disponibile al CNSforum al seguente indirizzo(http://www.cnsforum.com/imagebank/item/rcpt_sys_ACH_esterases/default.aspx)

Non si conoscono al momento dati che testimonino l'esistenza di organofosfato triesteri di origine naturale. Si è notata però una certa perdita di persistenza di questi pesticidi nel suolo, osservazione, questa, attribuita alla loro suscettibilità a trasformazioni microbiche (Reddy BR, 1983). Sono stati infatti isolati alcuni microrganismi capaci di utilizzare tali composti organofosforici come fonte di carbonio e fosforo (Dumas DP, 1989; Cheng TC, 1996). Data la natura sintetica di questi substrati, questa attività idrolitica è considerata ancillare (e/o innaturale) o di recente evoluzione.

I 2.1.1 PTE da *Pseudomonas diminuta*

L'enzima più efficiente e più studiato in grado di degradare i composti fosfotriesteri come il paraoxon è stato isolato dal batterio del suolo *Breviundomonas (Pseudomonas) diminuta* e prende il nome di pPTE (PhosphoTriEsterase)(Serdar CM, 1982, Dumas DP, 1989). Il suo gene, denominato *opd* (*organo phoshate degrading*), è localizzato su un plasmide extracromosomale di circa 66 kb e codifica una proteina di circa 35 kDa. Questo gene è stato subclonato in diversi sistemi di espressione, tra cui *E. coli* (Serdar CM, 1989), *Streptomyces* (Steiert JS, 1989), cellule di insetto (Dumas DP, 1990) e sistemi sintetici di compartimentazione *in vitro* (Griffiths AD, 2003). Il suo substrato naturale rimane

sconosciuto, tuttavia l'enzima è in grado di degradare il pesticida paraoxon con una velocità di catalisi prossima al limite di diffusione del substrato (2100 s^{-1}), con un corrispondente valore di specificità di $4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (**Fig.I.5**).

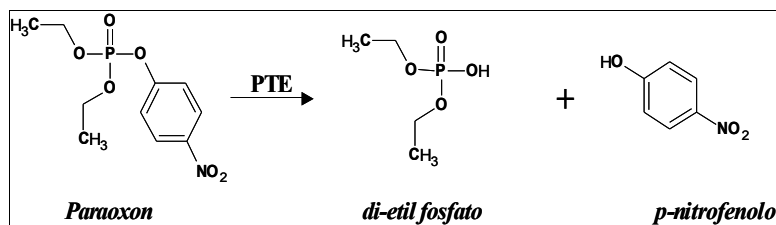


Fig.I.5 Schema di reazione per l'idrolisi del paraoxon

L'enzima catalizza anche l'idrolisi di tutta una serie di altri fosfotriesteri (parathion, malathion ecc) e di alcuni agenti nervini (sarin, soman e VX), ma l'efficienza catalitica per quest'ultimi è molto più bassa.

Dal momento che la sintesi del paraoxon è stata riportata per la prima volta nel 1950 (Schrader G, 1950) è molto probabile che la *p*PTE sia evoluta fino a questa efficienza catalitica in un tempo relativamente breve (Dumas DP, 1990; Kolakowski JE, 1997).

Fino ad ora non è stata riscontrata attività verso fosfati monoesteri o di-esteri né con substrati tipici di esterasi e proteasi *in vitro* (Dumas DP, 1989; Dumas DP, 1990; Donarski WJ, 1989). E' stata invece recentemente evidenziata una debole attività carbossilesterasica e una considerevole attività lattonasica promiscua, con valori di specificità (k_{cat}/K_M) che vanno da 6.5 a $160 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, in dipendenza del tipo di lattone (Roodvelt C, 2005). Se queste attività siano correlate ad un qualche ruolo fisiologico resta da stabilirlo.

I 2.1.2 Struttura della *p*PTE

Come altri membri della superfamiglia delle amidoidrolasi, l'enzima *p*PTE si organizza in una struttura "TIM" barrel (α/β)₈, come riportato nella **Fig.I.6** che mostra il cristallo ottenuto dalla diffrazione a raggi X. Nella struttura *p*PTE cristallizza come dimero (Benning MM, 2001), ma è risultata essere monomerica (Dumas DP, 1989) o dimerica (Benning MM, 1994) in soluzione.

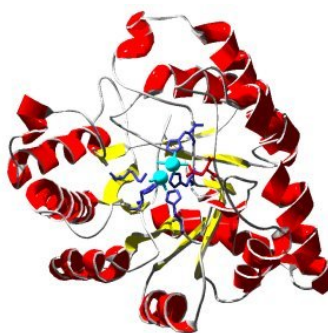


Fig.I.6 Struttura 3D di PTE da *P. diminuta*

Dall'analisi della struttura e dai dati NMR, è stato dimostrato che ciascuna subunità dell'enzima dimerico contiene due metalli bivalenti (due ioni zinco) nel sito attivo localizzato all'estremità C-terminale del *barrel* (Benning MM, 1994; Benning MM, 2001). In particolare i due ioni metallici sono legati alla proteina tramite le catene laterali di un aspartato (Asp301) e di quattro istidine (His 55, His 57, His 201, His 230), e legati a ponte da una lisina carbossilata (Lys 169) e una molecola d'acqua (o uno ione idrossido) del solvente (Benning MM, 2001), come rappresentato in figura (**Fig.I.7**).

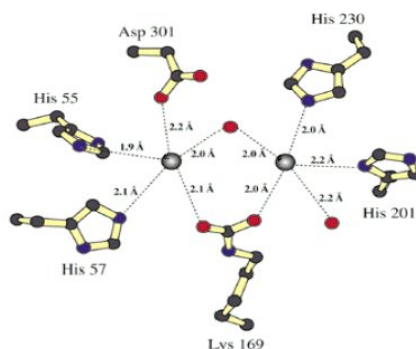


Fig.I.7 Rappresentazione schematica del centro metallico binucleare dell'enzima PTE. I due ioni zinco sono indicati come due sfere rosa, e la molecola d'acqua è indicata con una sfera rossa, che rappresenta l'atomo di ossigeno.

Il metallo α è più nascosto ed è in diretta coordinazione con l'His55, His57 e Asp301. Il metallo β è, invece, più esposto al solvente ed è coordinato all'His201 e His230.

I due metalli hanno mostrato avere un importante ruolo catalitico; la rimozione degli ioni zinco infatti, tramite aggiunta di agenti chelanti come EDTA o *o*-fenantrolina, causa la completa inattivazione dell'enzima che è così nella forma di apo-enzima. L'apoenzima

ricostituito con altri metalli (Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+}) recupera l'attività catalitica (Omburo GA, 1992).

Nonostante l'abbondante letteratura sulla PTE, non è ancora completamente chiaro il ruolo specifico di ciascuno ione metallico nel sito attivo (Shim H, 2000). Le potenziali funzioni catalitiche di uno o entrambi i metalli sembrerebbero essere legate alla polarizzazione del legame $\text{P}=\text{O}$ o $\text{P}=\text{S}$ del substrato per aumentare il carattere elettrofilico del centro fosforo; all'attivazione della molecola d'acqua idrolitica (per abbassare il pK_a); infine alla neutralizzazione della carica negativa che si sviluppa sul gruppo uscente durante la rottura del legame $\text{P}-\text{O}$ (Aubert SD, 2004).

La struttura a raggi X della fosfotriesterasi ottenuta con l'analogo di substrato dietil, 4-metilbenzilfosfonato rivela la presenza di tre sottositi in cui si accomodano i tre sostituenti legati al centro fosforico: il piccolo (*small*), il largo (*large*) e la tasca del gruppo uscente (*leaving group pocket*) (**Fig.I.8**).

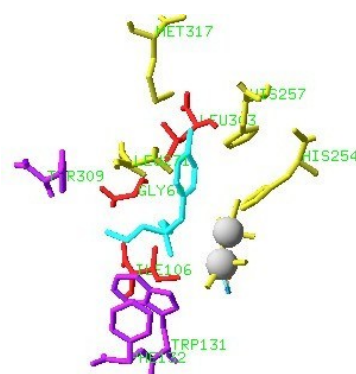


Fig.I.8 Particolare strutturale del sito attivo di *pPTE* in complesso con dietil-4metilbenzil fosfonato. I diversi sottositi sono raggruppati per colore.

Il sottosito *large* è costituito dai residui His-254, His-257, Leu-271, e Met-317. Il sottosito *small* è definito dai residui Gly-60, Leu-303, Ser-308, e Ile-106. Il sottosito idrofobico del *leaving group* contiene i residui Phe-306, Phe-132, Trp-131, e Tyr-309 (Vanhooke JL, 1996). E' stato dimostrato che le catene laterali di questi venti residui dettano la stereoselettività di substrato dell'enzima.

I 2.1.3 Meccanismo di reazione

Il meccanismo di reazione dell'idrolisi del paraoxon catalizzata dalla fosfotriesterasi PTE (**Fig.I.9**) è stato estensivamente studiato. Tale idrolisi avviene mediante un meccanismo di reazione tipo-S_N2, con inversione di configurazione al centro fosforo (Lewis VE, 1988). In particolare, in seguito al legame del substrato orientato verso il metallo β del sito attivo, l'idrossido legato a ponte tra i due cationi divalenti opera un attacco nucleofilo sul centro fosforo del substrato con il conseguente trasferimento del protone dell'OH all'Asp301. Il legame P=O (o P=S) si rompe e si forma un intermedio enzima-prodotto come anione fosfato che lega i due metalli. Il protone viene allontanato dal sito attivo grazie all'intervento dell'His254. Viene quindi rilasciato il prodotto, e il centro bimetallico idrossilato viene rigenerato probabilmente con l'entrata di una molecola d'acqua. Di notevole importanza è l'azione dell'His254 che attrae il protone dall'aspartico 301 e lo porta via dal sito attivo; tale azione è importante per substrati “veloci” quali il paraoxon (diethyl *p*-nitrofenilfosfato), il cui gruppo uscente non richiede protonazione, a differenza di substrati cosiddetti “lenti” quali il diethyl *p*-clorofenilfosfato che necessita di protonazione del gruppo uscente per velocizzare la reazione (Aubert SD, 2004). Studi di dinamica molecolare hanno proposto che la catena laterale della Tyr309 potrebbe stabilizzare, mediante legame idrogeno, la carica negativa del *p*-nitrofenolo rilasciato in seguito all'idrolisi del substrato (Koca J, 2001). Comunque la mutazione Y309F non ha un significativo effetto sull'idrolisi dell'organofosfato, quindi questa potenziale interazione non contribuisce alla catalisi (Aubert SD, 2004).

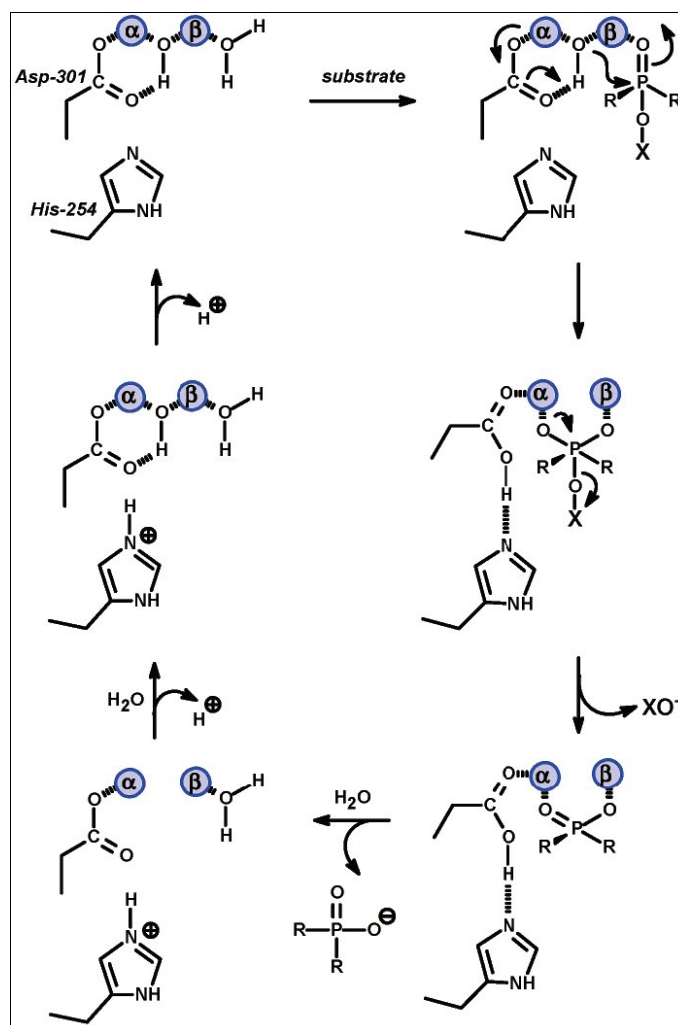


Fig.I.9 Meccanismo d'azione proposto per pPTE

I 2.2 Il gruppo delle Fosfotriesterasi-Lattonasi simili (PLL)

Una ricerca per geni omologhi al gene *opd* di *Pseudomonas diminuta* su BLAST ha portato all'identificazione di geni ad esso correlati con diversa identità di sequenza: geni ad elevata identità di sequenza (86-96% d'identità) descritti come “*opd*” e dei geni a più bassa identità di sequenza (<40%). I geni *opd* sono stati identificati in organismi isolati da diverse aree geografiche, dalle Filippine (Sethunathan N, 1973) agli Stati Uniti (Chaudhry GR, 1988) e Australia (Harcourt RL, 2002). Inoltre essi sono stati trovati in quattro organismi tassonomicamente distinti ed è presumibile che questi geni siano stati acquisiti dallo stesso organismo ancestrale. Dal momento che geni *opd*-simili sono stati identificati in diversi organismi presi in esame nei progetti di sequenziamento del genoma, l'ospite nativo di questo

gene potrebbe essere un organismo del suolo ubiquitario. In *Flavobacterium sp.*, ad esempio, esiste un gene *opd* che risulta identico a quello di *Pseudomonas* e in *Agrobacterium radiobacter* è stato identificato il gene *opdA* altamente omologo a *opd* da *Pseudomonas diminuta* (90%) (Horne I, 2002). E' interessante notare che mentre il gene *opdA* è localizzato sul cromosoma in *Agrobacterium radiobacter*, non è stato identificato lo stesso gene in altre specie di *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* C58) suggerendo che il gene *opdA* sia stato recentemente acquisito attraverso un meccanismo laterale di trasferimento genico (Horne I, 2002). Ciò non è strano, visto che altri geni situati su plasmidi sono stati trovati anche su cromosoma, suggerendo per essi un evento di trasposizione (Sinclair MI, 1986).

Questo potrebbe essere il meccanismo attraverso cui i geni *opd*, aventi la stessa sequenza di DNA e codificanti la stessa proteina, sono stati acquisiti da *P. diminuta* e dal ceppo ATCC 27551 di *Flavobacterium sp.* (Harper LL, 1988).

I geni che mostrano un'identità di sequenza del 26-66% con *opd* da *P. diminuta* sono stati suddivisi in due gruppi, in base alle caratteristiche delle corrispondenti sequenze amminoacidiche (Afriat L, 2006). Il primo gruppo contiene geni codificanti per proteine che mostrano un accorciamento delle strutture mobili (loops) 1, 7 e 8 rispetto a PTE. A questo gruppo afferiscono organofosfato idrolasi come PHP da *E.coli*. Il secondo gruppo contiene geni le cui proteine condividono una discreta identità di sequenza (32-66% d'identità e 48-81% di similarità) e differiscono solo per un elemento di struttura mobile, il loop 7, più corto della *pPTE*. In questo secondo gruppo sono stati inclusi in particolare cinque differenti specie di *Mycobacterium*, due geni di *Sulfolobus* e geni singoli di altri vari batteri (Afriat L, 2006).

Quattro membri di questo secondo gruppo, annotate come “putative parathion idrolasi” o “proteine omologhe a *pPTE*”, sono stati isolati geneticamente e le rispettive proteine analizzate per le loro proprietà cinetiche e descritte come: AhlA da *Rhodococcus erythropolis*, PPH da *Mycobacterium tuberculosis*, SsoPox da *Sulfolobus solfataricus* e SacPox da *Sulfolobus acidocaldarius*. Le proteine mostrano rispettivamente il 28%, 34%, 31% e il 30% d'identità di sequenza con *pPTE* (**Fig.I.10**). Data la loro similarità strutturale e delle proprietà cinetiche, queste proteine sono state raggruppate in un nuovo gruppo di enzimi.

AhlA	-----MSSVQ--TVRGPVDTADLGKVL MHEHVF
PPH	-----MPELN--TARGPIDTADLGVTLM MHEHVF
SacPox	-----MTKIPLVGKGEISPGEMGFTL IHEHLR
SsoPox	-----MRIPLVGKDSIESKDIGFTL IHEHLR
PTE	MQTRRVVLKSA AAAA AGTLLGGLAGCASVAGSIGTGDRINTVRGP-ITISEAGFTL THEHIC
AhlA	VLGEELRQNPDPYEPW--DEEVRVADAVAKLTEVKSRGISTIVDPTVIGLGRYIPIV-RI
PPH	IMTTEIAQNYPEA---WGDEDKRVAGAIARLGELKARGVDTIVDLTVIGLGRYIPRIARV
SacPox	VFSEPVRYQWPHLY---NEDEELKNAVNEVKTIMSYGVKTIVDPTVMGLGRDIRFSEKV
SsoPox	VFSEAVRQQWPHLY---NEDEEFRAVNEVKRAMQFGVKTIVDPTVMGLGRDIRFMEKV
PTE	GSSAGFLRAWPEFFG---SRKALAEKAVRGLRRARAAGVRTIVDVSTFDIGRDVSLLAEV
AhlA	NEQVDLNIIVATGIYTYNDIPFQFHYTGPGLLFDGPEPMVELFVKDIREGIAGTGVRASF
PPH	AAATELNIVVATGLYTYNDVPFYFHYLGPGAQLDGPEINTDMFVRDIEHGIADTGIKAGI
SacPox	VKETGINVIAATGLYTYTDLPFFFN--GR-----SLEEIAELLIHDIKKGIQGTNNRAGF
SsoPox	VKATGINLVAGTGIYIYIDLPHYFL--NR-----SIDEIADLFIHDIKEGIQGTLNKAGF
PTE	SRAADVHIVAATGLWF--DPPLSMR-----LRSVEELTQFFLREIQYGIEDTGIRAGI
AhlA	LKCAIEEPGLTPGVERVMRAVGQ-SVETGVPITVHTNPHTESGLVAQKVLAEEGADLTK
PPH	LKCATDEPGLTPGVERVLRVAQAHKRTGAPISTHTHAGLRRGLDQQRIFAEEGVDLSR
SacPox	IKVAADEPGITRDVERAIRAAAAIAQKETNPVITHTSNAHNGTGLEQQRILMEEGVDPGR
SsoPox	VKIAADEPGITKDVEKVIRAAAIAKETNPVITHTSNAHNTGTEQQRILTEEGVDPGK
PTE	IKVATTGKA--TPFQELVLKAAARASLATGVPVTTHTAASQRDGEQQAIFESGLSPSR
AhlA	VVIGHSGD TTD LDLYCALADAGSLLGMDRFGLEPF-----LSFEDRVNTVV
PPH	VVIGHCGDSTDVGYLEELIAAGSYLGMDRFGVDVI-----SPFQDRVNIIV
SacPox	VLIGHLGDTDNVDYIKKIADKGSFVGLDRYGLDLF-----LPIDKRNEVLL
SsoPox	ILIGHLGDTDNIDYIKKIADKGSFIGLDRYGLDLF-----LPVDKRNETTL
PTE	VCIGHSD DD TDLSYLTALAARGYLIGLDHIPSAIGLEDNASASALLGIRSWQTRALLIK
Loop 7	
AhlA	EMARGYAEKMLAHDASCFIDY---FPSAAREVALNW-NYTHISDDVIPALLERGVTDE
PPH	RMCE R GHADKMVLSDACCYFDA--LPEELVPVAMPNW-HYLHIHNDVIPALKQHGV T DE
SacPox	KLKDGYLDRIMVSQDYCCTIDWGIAPKPEYKPKLAPKW-SMSLIFTDVIPSIKRAGVTDE
SsoPox	RLIKDGYSKIMISHDYCCTIDWGTAKPEYKPKLAPRW-SITLIFEDTIPFLKRNQVNEE
PTE	ALIDQGYMKQILVSN D WLF G SSSYVTNIM-DVMDRVNPDMAFIPLRVIPFLREKGV PQ E
AhlA	QVKAMLV D NPRRYFES-----
PPH	QLHTMLV D NPRRIFERQGGYQ
SacPox	QLHVIFVKNPARLFS-----
SsoPox	VIATIFKENPKKFFS-----
PTE	TLAGITVTNPARFLSPTLRAS

Fig.I.10 Allineamento di sequenza tra AhlA, PPH, SsoPox, SacPox e PTE. In grassetto sono mostrati i residui che coordinano i metalli.

Dall'allineamento di sequenza si osserva che i residui che in *pPTE* coordinano i metalli sono interamente conservati: quattro istidine, un aspartico e la lisina (che in *pPTE* è risultata carbossilata). C'è una piccola differenza nella lunghezza del loop 1 (di 1-2 residui), ma risulta evidente la differenza strutturale del loop 7, più corto nelle quattro omologhe.

L'enzima *SsoPox* era stato già precedentemente identificato, clonato e caratterizzato per le proprietà chimico-fisiche e cinetiche di attività fosfotriesterasica, nel laboratorio dove è stata svolta la presente tesi (Merone L, 2005). L'enzima da *Sulfolobus acidocaldarius* non era stato ancora descritto e non è stato considerato in un primo momento nella caratterizzazione biochimica del gruppo delle PLLs.

I 2.2.1 AhlA da *R. erythropolis* e PPH da *M. tuberculosis*

E' stato condotto uno studio per valutare le proprietà cinetiche e l'origine evolutiva di queste due proteine. A tale scopo AhlA e PPH sono state caratterizzate per le loro proprietà catalitiche nei confronti di carbossil esteri, fosfotriesteri e lattoni (Afriat L, 2006). Da questa indagine è emerso che gli enzimi sono delle lattonasi, con una preferenza verso i lattoni idrofobici, includendo gli N-acil-homoserina lattoni. Le specificità (k_{cat}/K_M) registrate per l'attività lattonasica sono nell'ordine di 6×10^4 - 1.7×10^6 $M^{-1}s^{-1}$ per entrambe le proteine, con valori di specificità (K_M) piuttosto bassi (10-230 μM). Diversamente l'attività fosfotriesterasica non solo risulta più bassa (10^2 - 10^6 volte), ma è anche molto variabile da proteina a proteina ($k_{cat}/K_M = 0.5$ - $4000 M^{-1}s^{-1}$). Da questi dati cinetici si è concluso che le proteine possono essere considerate lattonasi con attività fosfotriesterasica “promiscua”. Anche in questo caso l'attività catalitica è metallo dipendente, suggerendo che il sito catalitico strutturalmente risulta simile agli altri membri della superfamiglia. E' per questa ragione cinetica e per le differenze strutturali descritte, che queste proteine sono state ascritte ad un nuovo gruppo, quello appunto delle lattonasi-fosfotriesterasi simili o PLLs (Phosphotriesterase Like Lactonases).

I 2.2.2 SsoPox: una PLL da *Sulfolobus solfataricus*

Il gene *opd simile* (SSO2522) codificante una putativa fosfotriesterasi nel genoma dell'*archaeon* ipertermofilo *Sulfolobus solfataricus* P2 (She Q, 2001) era stato identificato e clonato, precedentemente ai due omologhi descritti nel paragrafo precedente, dalla specie *S. solfataricus* MT4 (Merone L, 2005). Il gene, espresso in *E.coli*, codifica una proteina di circa 34kDa, tuttavia studi in soluzione per comprendere lo stato oligomerico della proteina (cromatografia ad esclusione molecolare) hanno portato alla valutazione di una massa apparente di 50kDa, valore intermedio tra un monomero e un dimero. Questo risultato è compatibile con una serie di ipotesi fatte quali la possibilità di una migrazione anomala di un monomero asimmetrico o la presenza di un equilibrio dinamico monomero-dimero in soluzione estremamente rapido (Merone L, 2005). Analisi condotte in diverse condizioni (diverse matrici e forza ionica) non hanno consentito la sicura attribuzione del suo stato oligomerico. È utile notare che PTE/OPD è stata cristallizzata come dimero ed è risultata

essere monomerica (Dumas DP, 1989) o dimerica (Benning MM, 1994) in soluzione.

Dall'analisi della sequenza primaria si trova che i residui coinvolti nel legame dei cationi bivalenti in *p*PTE sono strettamente conservati in *SsoPox* (**Fig.I.10**) e corrispondono ai residui His22, His24, Lys136, His169, His198 e Asp254. E' stata condotta un'analisi a livello cinetico per determinare la presenza di metalli nel sito catalitico e l'attività è risultata metallo-dipendente, con una preferenza verso gli ioni Cd^{2+} e Co^{2+} , confermando la presenza di questi atomi nel centro catalitico. Inoltre, esperimenti di ricostituzione del centro metallico dopo formazione dell'apoenzima (cataliticamente inattivo), mostravano una dipendenza dell'attività anche dal tipo di metallo, in particolare: $\text{Cd}^{2+} \approx \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$. Per *p*PTE esiste una dipendenza simile, ma l'ordine è diverso: $\text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (Omburo GA, 1992).

Ciò che rende particolarmente interessante lo studio di questa proteina sono le sue proprietà chimico-fisiche legate alla resistenza alle elevate temperature, come atteso dato l'ambiente del microrganismo da cui deriva. *S. solfataricus*, infatti, è considerato un iper-termo-acidofilo; esso cresce a temperature di 80-85°C e a valori di pH 3.5-4.0. La stabilità termica dell'enzima *SsoPox* è stata misurata come attività catalitica residua dopo incubazione per tempi diversi (fino a 4 h) a temperatura tra 75-100°C. Ciò che si è osservato è che dopo 4h di incubazione a temperature tra 75 e 85°C, l'attività risulta inalterata. Una leggera diminuzione si ha a 90°C, mentre il dimezzamento dell'attività catalitica si registra solo dopo 4h a 95°C e dopo 1h e 30min a 99°C (**Fig.I.11a**). Questa intrinseca termostabilità di *SsoPox* è una proprietà di notevole interesse per studi strutturali e per applicazioni industriali. Infatti è noto che l'alta stabilità termica è legata ad una elevata resistenza ad altre condizioni drastiche come la presenza di solventi, detergenti, proteasi ecc. Nel caso della *p*PTE mesofila, i dati sulla termostabilità indicano perdita di attività tra 35-55°C e la completa inattivazione a 60°C (Rochu D, 2004). Anche se è stato riportato che l'immobilizzazione della PTE migliora notevolmente la stabilità dell'enzima (LeJeune KE, 1997), tali procedure comportano costi elevati e alterazioni delle proprietà cinetiche.

L'attività enzimatica è anche dipendente dalla temperatura (termofilia), infatti essa risulta crescente fino a 95°C (massima temperatura analizzata per limiti strumentali)(**Fig.I.11b**).

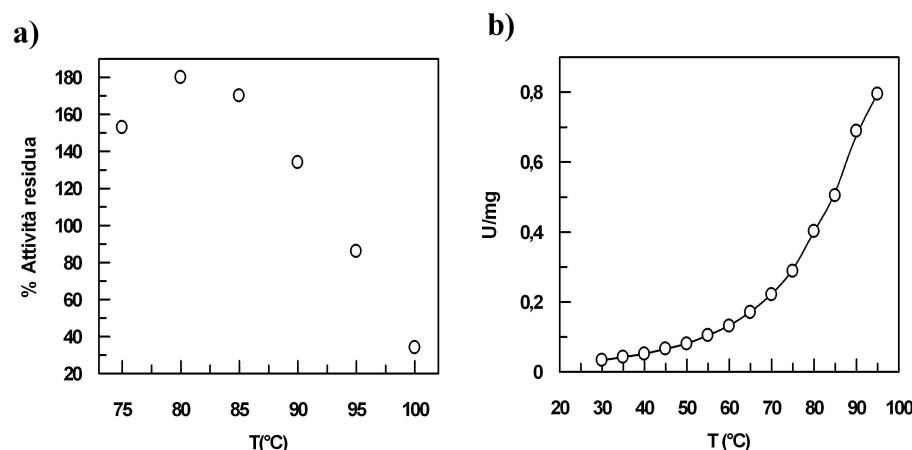


Fig.I.11 a) Termostabilità di *SsoPoxwt* (dopo 4h di incubazione alle T indicate)
b) Termofilia di *SsoPoxwt*

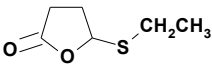
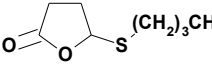
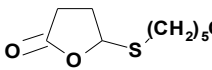
La proteina *SsoPox*, è stata, in un primo momento, caratterizzata esclusivamente per le proprietà catalitiche nei confronti di organofosfato triesteri, come il paraoxon. L'attività nei confronti del paraoxon risulta circa 10,000 inferiore a quella valutata per l'enzima *pPTE*, tuttavia con valori di affinità comparabili ($k_{cat}=0.24 \pm 0.01 \text{ sec}^{-1}$; $K_M= 0.060 \pm 0.009 \text{ mM}$) (Merone L, 2005). Tale proporzione non si conserva nel caso del metil-paraoxon (che differisce dal paraoxon solo per un metile sulle catene laterali) per il quale l'enzima *SsoPox* mostra maggiore attività (5 volte più attivo che sul paraoxon), diversamente dai dati ottenuti sulla *pPTE* (3% dell'attività sul paraoxon) risultando in una differenza in termini di k_{cat} di solo 100volte (Merone L, 2005). Questo dato suggerisce non solo che la *pPTE* si sia evoluta specificamente per l'idrolisi dell'etil-paraoxon, ma che le modalità di legame dei substrati OPs di *SsoPox* sono considerevolmente diverse rispetto alla *pPTE*. Inoltre, data la bassa attività catalitica fosfotriesterasica, si può ipotizzare che *SsoPox* non si sia evoluta per questi substrati e che questa attività sia da considerarsi promiscua. Questa considerazione è supportata anche dall'analisi di tutta una serie di substrati pesticidi organofosfato, (parathion, metil-parathion, dursban, coumaphos, diazinon) per i quali l'enzima mostra attività catalitica ancora inferiore rispetto al paraoxon, ma rilevabile (Merone L, 2005).

SsoPox mostra anche attività su carbossilesteri (esteri del *p*-nitrofenolo); essa diminuisce all'aumentare della lunghezza della catena acilica (*pNP-C_n* con $n=2$ a 6), e non è inibita da paraoxon come accade per altre carbossilesterasi (Oosterban RA, 1965). Ciò suggerisce che tale attività carbossilesterasica ha luogo nello stesso sito attivo di quella paraoxonasica

(Merone L, 2005). Tuttavia l'ordine di grandezza della attività carbossilesterasica risulta inferiore o uguale a quello valutato per l'attività paraoxonasica, suggerendo, anche in questo caso, l'ipotesi di un'attività promiscua.

Studi successivi hanno portato a conoscenza della elevata proficienza catalitica dell'enzima *SsoPox* verso i lattoni (Afriat L, 2006). In particolare sono stati analizzati una serie di lattoni sintetici (derivati del butirrolattone) verso i quali l'enzima mostrava elevata affinità e attività catalitica. I dati specifici sono riportati nella seguente tabella (**Tabella I.2**).

Tabella I.2 Parametri cinetici di *SsoPox* verso lattoni sintetici

	 TEBL 5-thioethyl- γ -butyrolactone	 TBBL 5-thiobutyl- γ -butyrolactone	 THBL 5-thiohexyl- γ -butyrolactone
$k_{cat} (s^{-1})$	9.00 ± 0.07	29 ± 7	6.00 ± 0.06
$K_M (\mu M)$	15 ± 1	80 ± 3	70 ± 2
$k_{cat}/K_M (s^{-1}M^{-1})$	$(7.00 \pm 0.03) \times 10^5$	$(3.6 \pm 0.9) \times 10^5$	$(8.00 \pm 0.06) \times 10^4$

Studi preliminari condotti a livello qualitativo per verificare l'attività anche su acil-omoserina lattoni naturali (HSL), mostravano elevata attività (Afriat L, 2006). Per questo motivo, e per le ragioni strutturali descritte prima, *SsoPox* è stata ascritta al gruppo delle fosfotriesterasi lattonasi simili.

I 2.2.3 Potenziale ruolo delle PLLs

Gli acil-omoserina lattoni (AHSLs) sono molecole naturali coinvolte nei meccanismi di attivazione/disattivazione di segnali cellulari che definiscono la funzione biologica del “*quorum sensing*” (Schauder S, 2001). Attualmente sono noti tre diversi tipi di autoinduttori specie-specifici: acil-homoserina lattoni, oligo peptidi e furanoni. Attraverso questi segnali molecolari prodotti o acquisiti le cellule esprimono comportamenti di “gruppo” attivando contemporaneamente vie metaboliche specifiche. Questo perché l'azione regolativa è dipendente dalla concentrazione dell'autoinduttore nell'ambiente circostante. Molti comportamenti dei batteri come la simbiosi, la virulenza o patogenicità, la produzione di antibiotici e la formazione di biofilm, sono regolati da *quorum sensing* (Camilli A, 2006). E'

stato dimostrato che la modulazione o perturbazione di questi meccanismi molecolari sono una efficace strategia anti-microbica (Dong YH, 2001).

A controllare la concentrazione di questi segnali molecolari nell'ambiente, a livello microbico, è l'azione di specifiche attività “*quorum-quencher*” prodotte da altri microorganismi. Queste attività, riconducibili ad azioni enzimatiche specifiche, da un lato controllano il livello di colonizzazione degli altri batteri dell'ambiente e dall'altro sono funzionali al recupero di metaboliti (fonti di C, P, N ecc.) utili per la produzione di energia per l'opportunistica crescita cellulare. Molti di questi enzimi attualmente noti sono N-acil-homoserina lattonasi che sono secrete nell'ambiente per degradare le molecole del *quorum* prodotte da specie microbiche competitive. L'utilizzo di questi specifici enzimi per bloccare la crescita di microorganismi patogeni non determina una pressione selettiva, come nel caso dello sviluppo di resistenze antibiotiche, suggerendo, così, un'alternativa attraente nel loro possibile uso terapeutico.

Segnali del tipo AHLs sono stati riportati nel regno degli archaea a cui anche *Sulfolobus* appartiene (Paggi RA, 2003).

Date le peculiari caratteristiche di questi composti, e data l'elevata specificità di substrato che mostrano gli enzimi PLLs verso substrati lattonici di questo tipo, è stato proposto che il loro ruolo fisiologico sia quello di lattonasi coinvolte nel “*quorum-quenching*”. Data la loro distribuzione negli archaea e nei batteri, le PLLs molto probabilmente si sono evolute diversi milioni di anni fa, ben prima delle PTE. Sono note altre lattonasi “*quorum quenching*”, ad esempio AiiA da *Bacillus thuringensis*. Questo enzima appartiene ad una superfamiglia completamente differente, quella della metallo β -lattamasi (Liu D, 2005; Thomas PW, 2005). Le paraoxonasi di siero umano (PONs) che appartengono ancora ad un'altra famiglia di “ β -propellers” calcio-dipendenti, possono idrolizzare, sebbene con bassa efficienza, AHLs del *quorum-sensing* (Draganov DI, 2005). E' interessante notare che tutti questi enzimi mostrano attività fosfotriesterasica promiscua. Poichè queste tre famiglie sono così diverse per la struttura e il meccanismo catalitico, la promiscua attività fosfotriesterasica potrebbe dipendere da una certa sovrapposizione tra gli stati di transizione nell'idrolisi del lattone e del fosfotriestere. Così come diverse altre cross-reattività, questa può essere inerente ad una particolare chimica del sito attivo.

I 3 SCOPO DELLA TESI

L'oggetto di studio del seguente lavoro di tesi è l'enzima SsoPox da *Sulfolobus solfataricus*. L'obiettivo del lavoro è stato quello di comprendere da un lato il suo ruolo fisiologico *in vivo* e dall'altro di sfruttare le sue proprietà di stabilità strutturale (connesse con l'evoluzionabilità) e di promiscuità catalitica per la sua evoluzione verso la produzione di varianti a specializzata attività fosfotriesterasica. L'interesse verso questo tipo di approccio evolutivo è duplice. Infatti, la comprensione dei meccanismi catalitici in grado di garantire molteplici attività enzimatiche coesistenti contribuisce scientificamente allo studio della evoluzione degli organismi viventi. D'altra parte, la ri-specializzazione dell'enzima verso i substrati tossici organofosfato triestere può essere di vantaggio per applicazioni industriali.

CAPITOLO II

MATERIAI E METODI

I materiali e metodi qui riportati sono organizzati in cinque sezioni. **(II.1) MICROBIOLOGIA**, che include tutte le manipolazioni dei batteri, dalla crescita cellulare alle tecniche di trasformazione del DNA. **(II.2) BIOCHIMICA DEL DNA**, che si focalizza su differenti aspetti della manipolazione del DNA: isolamento, tecniche di clonaggio, reazione a catena con DNA polimerasi, produzione di librerie di geni mutati. **(II.3) BIOCHIMICA DELLE PROTEINE**, che riguarda le tecniche di produzione per via ricombinante, purificazione e caratterizzazione delle proteine di interesse. **(II.4) CHIMICA DEI SUBSTRATI**, che descrive i metodi e le misure di sicurezza adottate per la manipolazione degli organofosfati. **(II.5) BIOINFORMATICA**, che descrive i supporti informatici utilizzati per l'analisi dei dati cinetici, per la visualizzazione delle strutture proteiche e l'analisi delle energie di interazione ligando/recettore.

II 1 MICROBIOLOGIA

II 1.1 Materiali

Ampicillina, cloramfenicolo, iso-propil- β -tiogalatto-piranoside (IPTG), Bacto-triptone, estratto di lievito, Agar, Antifoam e Cloruro di Cobalto sono stati acquistati da SIGMA-Aldrich.

II 1.2 Ceppi batterici

E. coli TOP10: usato come ospite per il clonaggio (Invitrogen).

E. coli BL21(DE3): utilizzato per l'espressione di proteine ricombinanti (Studier FW, 1986) (Invitrogen). Tale ceppo è lisogenico per il fago λ DE3, contiene nel genoma una copia del gene I del batteriofago T7, che codifica l'RNA polimerasi T7, sotto il controllo del promotore *lac* UV5, inducibile con IPTG.

E.coli BL21(DE3)pLysS: differisce dal ceppo BL21(DE3) solo per la presenza di un plasmide, pLysS (Chl resistente), che porta il gene codificante il lisozima T7. (Davanloo P, 1984) (Promega). La presenza di tale enzima abbassa il livello di espressione basale dei geni di interesse che si trovano sotto il controllo del promotore T7, senza interferire con il livello di espressione a seguito dell'induzione con IPTG. Tale variante è utile per l'espressione di quelle proteine che risultano tossiche per l'organismo ospite.

Sulfolobus solfataricus ceppo MT4: gentilmente procurato dal laboratorio del Dr. Cannio R. è stato utilizzato per i saggi sui suoi terreni di coltura.

Tutti gli stock batterici sono stati conservati a -80°C in 10% (v/v) glicerolo, dopo rapido congelamento della sospensione batterica in azoto liquido. Tutte le procedure di manipolazione batterica sono state eseguite sotto cappa sterile a flusso laminare.

II 1.3 Terreni di coltura e antibiotici

Tutti i mezzi descritti di seguito (**Tabella II.1**) sono stati sterilizzati in autoclave (20' a 120°C) o per filtrazione (0.22µm) ove espressamente indicato. Nel caso di utilizzo di antibiotici ampicillina (Amp) (0.1g/L) o chloramfenicolo (Chl) (0.03g/L), l'aggiunta dell'antibiotico sterile è avvenuta dopo la fase di sterilizzazione del mezzo. Ove necessaria la solidificazione del mezzo di coltura, questo è stato supplementato con agar (1.5%) e sterilizzato mediante autoclave. Nella tabella (**Tabella II.1**) sono riportati i componenti e le concentrazioni relative alla preparazione dei mezzi e degli antibiotici utilizzati.

LB: terreno di coltura per la crescita delle cellule di *E.coli* a 37°C in liquido e in solido.

SOC: terreno di coltura per cellule di *E.coli* trasformate per elettroporazione.

AI: mezzo autoinduttore utilizzato per la crescita di *E.coli* e l'espressione di proteine poco espresse (Studier FW, 2005) . Generalmente la procedura richiede la preparazione di una coltura satura da diluire 1/10 per la coltura preparativa. Ad una densità ottica di 2OD circa, la coltura è incubata alla temperatura di espressione che risulta migliore (in questo caso 25°) e la crescita è lasciata per 16 ore. Questo mezzo di coltura cellulare utilizza α-lattosio come induttore dell'espressione.

M182: terreno di coltura utilizzato per la crescita di *Sulfolobus solfataricus* a T=80°C. Per la preparazione delle piastre solide, il mezzo è stato supplementato con gelrite 0.8% (w/v) prima della sterilizzazione in autoclave.

Tabella II.1. Soluzioni utilizzate nelle colture batteriche

Nome	Componenti
LB	1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Bacto triptone, 0.5% (w/v) Estratto di lievito, pH=7.0
AI	1 mM MgSO ₄ , 0.05% (w/v) Glucose, 0.5%(w/v) Glycerol, 0.2%(w/v) α-Lactose, 50 mM NH ₄ , 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 25 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM KH ₂ PO ₄ ,
SOC	2% (w/v) Bacto triptone , 0.5% (w/v) Bacto estratto di lievito , 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glucosio
M182	0.1%(w/v) Yeast extract (DIFCO), 0.1%(w/v) Casaminoacids (DIFCO), 0.3%(w/v) KH ₂ PO ₄ , 0.25% (w/v)(NH ₄) ₂ SO ₄ , pH = 3.7-3.8 aggiustato con acido solforico 10N. Dopo autoclave supplementato con 0.1% glucosio e soluzione metalli 1X sterilizzati per filtrazione. (Soluzione metalli 1000X: 20%(w/v) MgSO ₄ x7H ₂ O, 25% CaCl ₂ x2H ₂ O, 0.18% MnCl ₂ x4H ₂ O, 0.45% Na ₂ B ₄ O ₇ x10H ₂ O, 0.022% ZnSO ₄ x7H ₂ O, 0.005% CuCl ₂ x2H ₂ O, 0.003% Na ₂ MoO ₄ x10H ₂ O, 0.003% VOSO ₄ x2H ₂ O, 0.001% CoSO ₄ x7H ₂ O)
Ampicillina	100µg/mL. Stock 1000X in mH ₂ O conservato a -20°C
Cloramfenicolo	30µg/mL. Stock 1000X in EtOH conservato a -20°C
IPTG	1mM. Stock 1000X in mH ₂ O conservato a -20°C
Agar	1.5% (w/v)
Gelrite	0.8% (w/v)

II 1.4 Crescita di *Sulfolobus solfataricus*

Un'aliquota di cellule (70µL) conservate in glicerolo a -80°C, è caricata, come una macchia (*spot*) su una piastra M182/gelrite a 80°C per tre notti. La sospensione cellulare così ottenuta è inoculata in 50mL di mezzo di crescita M182 e lasciata crescere 16 ore a 80°C sotto agitazione (110rpm) in incubatore *Aquatron* (Infors-HT). La coltura cellulare così ottenuta (circa 0.5-0.6 OD) può essere utilizzata come pre-inoculo per una crescita più grande, o divisa e diluita in altre colture per ulteriori studi.

II 1.5 Preparazione di cellule *E. coli*

Competenti per trasformazione chimica – Dallo stock in glicerolo un'aliquota di sospensione batterica *E. coli* TOP10 è stata dispersa su una piastra LB/agar e cresciuta per 16h a 37°C. Da questa crescita è stata prelevata una singola colonia, inoculata in 2.5 ml di LB e incubata a 37°C sotto agitazione per 4h. Questa sospensione batterica è stata usata come pre-inoculo di una preparazione da 100 ml (LB, 37°C). Raggiunto il valore di densità ottica pari a 0.5 OD_{600nm} le cellule sono state raffreddate in ghiaccio e centrifugate per 5 min a 8000 rpm a 4°C (rotore Sorvall GSA). Rimosso il surnatante, sono state risospese in 30 ml di tampone sterile TFB1 (100 mM RbCl, 30 mM acetato di potassio, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 15% glicerolo, pH 5.8) e lasciate in ghiaccio per 90 min. Dopo aver centrifugato di nuovo per 5 min a 5000 rpm a 4°C (rotore Sorvall GSA), e allontanato il surnatante, le cellule sono state risospese in 4 ml di tampone sterile TFB2 (10mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% glicerolo, pH 8.0), divise in aliquote da 200 µl e conservate a -80°C.

Competenti per elettroporazione - Dallo stock in glicerolo un'aliquota di sospensione batterica *E. coli* BL21(DE3) è stata dispersa su una piastra LB/agar e cresciuta per 16h a 37°C. Una colonia singola è stata inoculata in 5 ml di LB e incubata per 16 h a 37°C sotto agitazione. Tale sospensione batterica è stata usata come pre-inoculo per 500 ml di coltura (in LB) e incubata a 37°C sotto agitazione. Raggiunto il valore di densità ottica pari a 0.6 OD_{600nm}, le cellule sono state raffreddate per 20 min in ghiaccio, poi centrifugate per 15 min a 6000 rpm a 4°C (rotore Sorvall GS3) e, rimosso il surnatante, riprese in 500 ml di acqua Milli Q sterile fredda. Dopo aver centrifugato per 15 min a 6000 rpm (rotore Sorvall GS3) a 4°C, le cellule precipitate sono state trattate allo stesso modo prima con 250mL di acqua milliQ sterile fredda e poi, dopo altra centrifugazione, con 125mL al fine di eliminare ogni traccia di sali presenti sulla parete cellulare che interferirebbero con l'efficienza di trasformazione. Dopo centrifugazione a 6000 rpm (rotore Sorvall GSA) per 15 min a 4°C, le cellule precipitate sono state riprese in 10 ml di glicerolo 10% sterile freddo. Le cellule sono state poi centrifugate per 15 min a 6000 rpm (rotore Sorvall SS34) a 4°C e, allontanato il supernatante, e infine risospese in 1.5 ml di 10% glicerolo sterile raffreddato in ghiaccio. Le cellule così preparate sono state divise in aliquote da 40 µl e conservate a -80°C.

II 1.6 Trasformazione cellulare di *E.coli*

Trasformazione chimica – Questo tipo di trasformazione prevede uno shock termico cellulare durante il quale il materiale nucleico di interesse è incorporato nel microorganismo. In particolare 100ng di DNA plasmidico sono aggiunti ad una aliquota di cellule *E.coli* (200µL) competenti per la trasformazione chimica. Le cellule sono incubate in ghiaccio per 30', dopodiché segue shock termico: 30" a 42°C e 1' in ghiaccio. Le cellule così trasformate sono riprese in LB (800µL) e incubate sotto agitazione a 37°C per 1h, prima di essere disperse su piastra LB/agar/antibiotici.

Trasformazione per elettroporazione – Questo tipo di trasformazione prevede l'applicazione di un campo elettrico transiente ad alto voltaggio alla miscela di cellule e DNA consentendo il passaggio di quest'ultimo attraverso la parete della membrana cellulare (Fiedler F, 1988). In particolare un'aliquota di cellule competenti per l'elettroporazione (40µL) è mischiata a 1µL di DNA. La miscela è inserita in una cella per elettroporazione (BioRad) da 2mm di spessore. L'elettroporazione è stata effettuata usando BioRad Gene PulserTMII a voltaggio di 2.5kV, resistenza 200 Ω e capacità 25µFD. 1 mL di SOC è subito aggiunto alla sospensione dopo l'avvenuta elettroporazione per neutralizzare le cariche generate sulla superficie cellulare. Segue incubazione a 37°C per 1h prima della dispersione su piastra LB/agar/antibiotici.

II 2 BIOCHIMICA DEL DNA (BIOLOGIA MOLECOLARE)

Questo secondo paragrafo si suddivide in due sezioni: una, **Metodiche**, dedicata all'analisi delle metodiche di biologia molecolare di base utilizzate; l'altra, **Applicazioni**, dedicata alle procedure di manipolazione del DNA per la produzione di varianti.

II 2.1 Metodiche

II 2.1.1 Materiali

Tutti gli enzimi e i corrispondenti tamponi sono stati acquistati da New England BioLabs (Beverly, MA, USA). I pacchetti di estrazione e purificazione del DNA sono stati forniti da QIAGEN (Hilden, Germany). Il marcatore di peso molecolare da 1 Kb è stato fornito da New England BioLabs (Beverly, MA, USA). Bromuro d'etidio fornito da SIGMA-Aldrich.

Agarosio ultrapuro fornito da Biogene Ltd (Kimolton, UK). Tutte le polveri utilizzate per la preparazione dei tamponi, ove non espressamente indicato, sono state fornite da SIGMA-Aldrich.

II 2.1.2 Preparazione di DNA plasmidico

Mini preparazione – Una colonia singola di cellule trasformate con il DNA di interesse è inoculata in 5 ml di LB/antibiotico e incubata a 37°C per 16 h sotto agitazione. Dopo centrifugazione a 10000 rpm per 30 sec utilizzando una microcentrifuga da banco, è allontanato il surnatante. Per estrarre il DNA plasmidico, è stato usato il kit commerciale “QIAprep Miniprep”. L'eluizione è stata eseguita con 50 µl di acqua sterile.

Midi preparazione - Una colonia singola di cellule trasformate con il DNA di interesse è inoculata in 3 ml di LB/antibiotico e incubata a 37°C per 5-6 h sotto agitazione. Questa sospensione batterica è utilizzata come pre-inoculo di una coltura da 100 ml, che è seguita a 37°C per 16 h sotto agitazione. La coltura cellulare è stata centrifugata a 5000 rpm (rotore Sorvall SS-34) per 10 min a 4°C, e, dopo aver rimosso il surnatante, il DNA plasmidico è stato estratto usando il kit commerciale “Plasmid Midi”. Il precipitato ottenuto dalla estrazione è stato lavato con 2 ml di etanolo 70% per eliminare i sali e centrifugato a 13000 rpm (microcentrifuga da banco Eppendorf) per 15 min a 4°C. Il precipitato è stato quindi asciugato e risospeso in 200 µl di acqua sterile.

II 2.1.3 Estrazione e precipitazione del DNA

L'estrazione in solventi organici viene realizzata aggiungendo alla miscela contenente il DNA un ugual volume di una soluzione fenolo-cloroformio-alcol isoamilico nel rapporto 25:24:1. Tutte le procedure di centrifugazione qui riportate sono state eseguite utilizzando una microcentrifuga da banco Eppendorf 5415D. Dopo agitazione e centrifugazione a 5000rpm per 3min, si recupera il DNA contenuto nella fase acquosa, che viene poi precipitato in etanolo 100% freddo (2 volumi di DNA), in presenza di 3M Sodio Acetato a pH 5.5 (1/10 del Volume di DNA). La miscela viene agitata bene, lasciata a -80°C per 20min e centrifugata a 13000rpm per 20min a 4°C. Il precipitato viene lavato con etanolo 70% per eliminare i sali presenti, centrifugato a 13000 rpm per 5min a 4°C, e lasciato asciugare sotto una fonte di calore. Infine viene risospeso in acqua sterile.

II 2.1.4 Elettroforesi su gel d'agarosio

Sia per scopo preparativo che per controllare la presenza di DNA, l'elettroforesi su gel di agarosio è stata effettuata con concentrazioni di agarosio tra 0.8-1.2% (peso/volume). Per la preparazione del gel, l'agarosio è sciolto in 100 ml di tampone TAE (40mM Tris-base, 1mM acido acetico, 10mM EDTA, pH 8.0); alla soluzione è aggiunto bromuro di etidio (1µg/ml) che permette la rilevazione del DNA per esposizione a radiazioni UV. Al campione di DNA da analizzare viene aggiunta 1/10 di volume della soluzione 0.25% blu di bromofenolo, 0.25% xilene cianolo FF, 30% glicerolo. Il marcatore di peso molecolare da 1 Kb è stato usato come riferimento. L'elettroforesi è stata condotta, nel tampone di corsa TAE ad un voltaggio costante di 100V.

II 2.1.5 Estrazione del DNA da gel di agarosio

L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il kit "QIAquick". Il sistema utilizzato si basa sull'adsorbimento di molecole di DNA, con dimensioni 40-50000 bp, a particelle di silice in presenza di un'elevata concentrazione di un sale caotropico. Il gel corrispondente alla banda di interesse evidenziata ai raggi UV tramite colorazione con bromuro di etidio, è stato tagliato con bisturi sterile. Il frammento di gel così ottenuto è pesato e opportunamente diluito, come descritto dalla procedura commerciale. Il DNA recuperato è eluito con acqua sterile e la sua concentrazione analizzata mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

II 2.1.6 Determinazione della concentrazione di DNA

La concentrazione del DNA plasmidico è stata determinata spettrofotometricamente, misurando l'assorbanza a 260nm del DNA di interesse opportunamente diluito in acqua (200 volte), tenendo presente che l'assorbanza di 50 ng/µl di DNA a doppio filamento è $A_{260nm} = 1$ OD.

II 2.1.7 Idrolisi del DNA catalizzata da enzimi di restrizione

Per allestire una reazione di idrolisi con endonucleasi di restrizione, una quantità nota di DNA plasmidico viene incubata con l'enzima d'interesse (5U per µg di DNA), in presenza del tampone specifico per l'enzima. La reazione è condotta alla temperatura ottimale per l'enzima, come riportato sulla guida commerciale. I tempi di incubazione e la quantità di DNA sono valutati in base al tipo di idrolisi (preparativa o analitica) da effettuare.

II 2.1.8 Reazione di defosforilazione del DNA

La reazione di defosforilazione del DNA è stata applicata a plasmidi a seguito della reazione di idrolisi catalizzata da endonucleasi di restrizione. Tale procedura, eliminando il gruppo fosfato alla estremità del DNA, abbassa la probabilità della reazione intramolecolare ad opera della DNA ligasi, incrementando la sua efficienza. La quantità di DNA di interesse è defosforilata all'estremità 5' con la fosfatasi alcalina di gambero (1U per 100 ng di DNA) in presenza dello specifico tampone (BioLabs). La reazione viene condotta a 37°C per 1h, e in seguito il DNA recuperato mediante procedura di estrazione e precipitazione.

II 2.1.9 Reazione catalizzata da DNA ligasi

L'enzima DNA ligasi catalizza la formazione del legame fosfodiesterico tra un gruppo fosfato all'estremità 5' ed un gruppo ossidrilico all'estremità 3' del DNA.

I frammenti di DNA ("vettore" e "inserto") da unire sono incubati con l'enzima DNA ligasi (Roche) del fago T4 (1U per 100ng di DNA) e il tampone specifico a 16°C per 16 h. Generalmente si allestiscono diverse reazioni con differenti rapporti molari tra inserto e vettore, al fine di individuare quello favorevole al processo bi-molecolare rispetto a quello mono-molecolare (chiusura del vettore su se stesso).

II 2.1.10 Vettori di clonaggio e d'espressione eterologa

pT7-7: plasmide di 2473 coppie di basi (bp), acquistato dalla Invitrogen, usato come vettore di clonaggio e di espressione. Esso appartiene ad una famiglia di vettori di espressione derivati dal plasmide pBR322 e consente di ottenere un'elevata espressione dei geni clonati in *E. coli*. Tali geni sono posti sotto il controllo del promotore $\phi 10$ e l'espressione è regolata positivamente dall'RNA polimerasi T7, prodotta dalla cellula ospite. Il vettore contiene inoltre il gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina.

II 2.2 Applicazioni

II 2.2.1 Materiali

Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati da PRIMM srl, Milano. Deossinucleotidi trifosfato sono stati forniti da QIAGEN (Hilden, Germany). Polimerasi: *Pfu Turbo* e *Vent* DNA

polimerasi acquistate da Stratagene, *Taq* polimerasi acquistata da New England BioLabs (Beverly, MA, USA). Tutte le polveri utilizzate per la preparazione dei tamponi, ove non espressamente indicato, sono state fornite da SIGMA-Aldrich.

II 2.2.2 Produzione di una libreria di varianti di *SsoPox*

La produzione di varianti dell'enzima *SsoPox* è stata condotta mediante reazioni di amplificazione guidate da DNA polimerasi (PCR). A seconda del tipo di approccio di mutagenesi, sono state utilizzate diverse condizioni di reazione e oligonucleotidi specifici per il tipo di mutagenesi. Nella seguente tabella sono riportate tutte le sequenze nucleotidiche degli oligo utilizzati (Tabella II.2).

Tabella II.2. Sequenze degli oligonucleotidi utilizzati nelle varie metodologie di PCR. In corsivo, i siti di taglio degli enzimi di restrizione (*NdeI* ed *EcoRI*), in grassetto, le triplette corrispondenti ai residui amminoacidici bersaglio

Oligonucleotide	Sequenza 5'-3'
Amplificazione	
<i>ssopox5'</i>	GATATACATATGAGAATACCATTAGTT
<i>ssopox3'</i>	CTTGGGGTCGACTTAGCTGAAGAACTTTTTTCGGA
Error prone PCR	
pT7-7 start (+)	GGTTTCCTCTAGAAATAATTTGTTTAAG
pT7-7 start (-)	CTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGAAACC
Mutagenesi sito-diretta	
Y97W (-)	AGAAAGGTAAGTCGATATATATC CAA ATCCCCGTCCCCGC
Y97W (+)	GCGGGGACGGGGATT TGG ATATATATCGACTTACCTTTCT
R223H (+)	ATTGGATTAGAT CATT ATGGTTTAG
R223H (-)	CTAAACCATA ATG ATCTAATCCAAT
Mutagenesi di saturazione	
Y97X (-)	TAAGTCGATATATATNN NA ATCCCCGTCCCC
Y97X (+)	GGGGACGGGGATTNN N ATATATATCGACTTA
W263X (-)	TGGTTTTGCAGTTCCNN NG TCGATTGTGCAACA
W263X (+)	TGTTGCACAATCGACNN NG GAAGTGCAAAACCA
C258X (-)	CCAGTCGATTGTGCANN N ATAATCGTGAGAGA
C258X (+)	TCTCTCACGATTATNN NT GCACAATCGACTGG

II 2.2.2.1 Mutagenesi random

La mutagenesi *random* è stata allestita in condizioni di PCR tali da indurre, durante l'amplificazione, delle mutazioni casuali nel gene *Ssopoxwt*. Il metodo di mutagenesi scelto è stato quello di *error-prone PCR* (*epPCR*) che si basa sulla amplificazione del gene di interesse in condizioni di reazione (scompenso di concentrazione di dNTP e Mn^{2+}) tali da

abbassare la fedeltà della DNA polimerasi. La miscela di reazione è stata allestita utilizzando lo stampo pT7-7poxwt (100 ng), gli oligonucleotidi pT7-start5' e pT7-start3' (2μM), MnCl₂ (0.4mM), MgCl₂ (2.5mM) (Euroclone), dGTP (0.16mM), gli altri tre deossinucleosidi trifosfato dATP, dCTP e dTTP (0.2mM), *Pfu Turbo* DNA polimerasi (0.5 unità), *Taq* polimerasi (2.5 unità). Le concentrazioni di oligonucleotidi e Mn²⁺ sono tali da introdurre statisticamente 1mutazione/1kb. In questa procedura l'utilizzo delle due DNA polimerasi garantisce da un lato la completa amplificazione dell'intero plasmide (ad opera della *PfuTurbo*) e dall'altro induce mutazioni casuali (operate da *Taq* polimerasi) date dallo scompenso di dGTP e dalla presenza di ioni Mn²⁺.

I campioni preparati come descritto sono stati sottoposti, con un *Thermal cycler*, al seguente programma di PCR: denaturazione (94°C/4min); 25 cicli di amplificazione (92°C/1min-58°C/2min-72°C/4min); 10min a 72°C.

Il prodotto di amplificazione del DNA è stata digerito con l'endonucleasi *DpnI* (a 37°C per 1h) per la degradazione del DNA metilato usato come stampo per la PCR.

II 2.2.2.2 Mutagenesi sito-diretta e di saturazione

La mutagenesi sito diretta e di saturazione è stata effettuata con la stessa procedura utilizzando il metodo di Hemsley (Hemsley A, 1989) che si basa sull'uso di coppie di oligonucleotidi mutagenici complementari per la replica dell'intero vettore ricombinante, mediante amplificazione per PCR. Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati sono indicate nella **Tabella II.2**.

La miscela di reazione preparata in 50μL contiene nel tampone di reazione ottimale per l'attività della polimerasi: DNA stampo pT7-7poxwt (200 ng), oligonucleotidi mutagenici (1μM), *PfuTurbo* DNA polimerasi (2.5 unità), dNTP (0.2μM).

I campioni così preparati sono stati sottoposti, con un *Thermal cycler* (Eppendorf), al seguente programma di PCR: denaturazione (94°C/4min), 30 cicli di amplificazione (94°C/2min- 45°C/1min-72°C/5min), seguiti da un ciclo a 72°C per 10min.

Al termine della PCR, il DNA parentale, usato come stampo, è stato allontanato dal DNA amplificato contenente la mutazione, mediante digestione con la endonucleasi *DpnI* (a 37°C per 1 h), che agisce solo sul DNA metilato. Trasformando cellule competenti di *E. coli* con il

prodotto così digerito, si ha la chiusura (per ricombinazione a livello delle sequenze complementari degli oligonucleotidi) e l'amplificazione del vettore ricombinante nella cellula batterica.

Rispetto alla procedura di *overlap extension* (Ho SN, 1989) utilizzata di solito per ottenere mutanti specifici, il metodo scelto richiede tempi di lavoro più brevi e presenta inoltre il vantaggio di evitare i problemi dovuti alla bassa resa della reazione di ligasi, necessaria nel caso in cui viene amplificato solo il gene (e non l'intero plasmide), e poi questo inserito successivamente nel vettore.

II 2.2.2.3 Produzione di una chimera *SsoPox-pPTE*

La produzione del gene sintetico *syntpox* (14 mutazioni) a partire da 14 oligonucleotidi (~90bp) tali da ricostruire l'intera sequenza nucleotidica del gene, ha previsto una serie di passaggi sommariamente così riassunti: 1) preparazione di oligonucleotidi da 150bp a doppio filamento; 2) riduzione della taglia degli oligonucleotidi; 3) Ricostruzione del gene; 4) Amplificazione. In **Fig.II.1** è riportata l'esemplificazione della procedura adottata.

Gli oligonucleotidi sono stati disegnati in modo da coprire in maniera alternata (5'-3' e 3'-5') l'intero gene con sovrapposizioni di un oligo con l'altro di circa 25bp. Nella **Tabella II.3** sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi, in grassetto i nucleotidi modificati (maiuscolo: nucleotide conservato, minuscolo: non conservato), sottolineate le parti di sovrapposizione tra oligonucleotidi e in corsivo i siti di clonaggio *NdeI* all'N-terminale e *EcoRI* al C-terminale della corrispondente sequenza proteica.

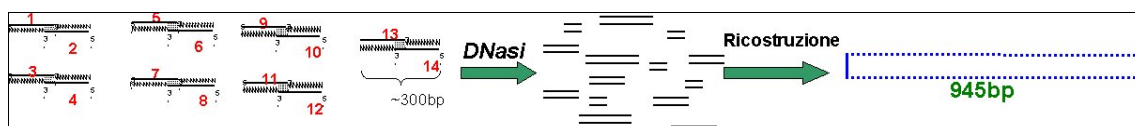


Fig. II.1 Strategia adottata per la costruzione del gene *syntpox*

Tabella II.3. Sequenze degli oligonucleotidi utilizzati nella preparazione di *ssosynpox*

Nome	Sequenza 5'-3'
1 for:	<u>GATATACATATGAGAATACCATTAGTTGGGAAAGATTCAATAGAATCTAAGGACATAGGATTTACGC</u> <u>TAATTCATGAACATTTAAGAGcT</u> <u>TTTAGCGAAGCG</u>
2 rev:	<u>CTTGTAATTTCTCgAAAAATCGCTTCGCCAGTCTGTTGTTACCGGGGTAGATATATTGCTTCTACTCC</u> <u>TCAAGTCTTTGCGACATTTACTCCAA</u>
3 for:	<u>GAGTTCAGAAACGCTGTAAATGAGGTTAAAAGGGCAATGCAATTTGGAGTAAAGACTATAGTAGATg</u> <u>tCtCTGTAATGGGAaTtGGTAGGGAC</u>
4 rev:	<u>TATCATCTAcaGaGACATTACCCTtAaCCATCCCTGTAGTCTAAATACCTTTTTACCAATTCCGAT</u> <u>GGCCCTATTTAAATCAACGCCCTGC</u>
5 for:	<u>ACCGGGATAAATTTAGTTGCGGGGACGGGGATTTgggATATtTATCGACTTACCTTTCTATTTCTTAA</u> <u>ATAGGTCAATTGATGAGATAGCTGAC</u>
6 rev:	<u>TTATCCAGTTAACTACTCTATCGACTGAACAAATAAGTACTATATTTTCTCCCTTATGTTCCATGAG</u> <u>AGTTATTTTCGACCGAAGCATTTCTAT</u>
7 for:	<u>CTCAATAAAGCTGGCTTCGTAAAGATAGCTGCAaCTGAACCTGGGATCACAAGGATGTGGAGAAGG</u> <u>TAATAAGGGCTGCTGCCATAGCAAAC</u>
8 rev:	<u>CATTATTCGACGACGGTATCGTTTGTCTCTGATTTTCATGGTTATTAATGGGTGTGTTTTCGAG</u> <u>TGTTATTGTGGCCTAATCTTGTCTGTT</u>
9 for:	<u>CACAATAACACCGGATTAGAACAGCAAAGAATATTGACTGAAGAAGGTGTTGATCCAGGGAAAATAT</u> <u>TAATAGGTCATTTAGGTGATACAGAT</u>
10 rev:	<u>AATTATCCAGTAAATCCACTATGTCTATTATATCTAATGTATTTCTTCTATCGTCTATTCCCTAGGA</u> <u>AATAACCTAATCTAgtaAaAggA</u>
11 for:	<u>TCCTTTATTGGATTAGATcatTtTccTcatGATTTATcCCTACCTGTTGATAAGAGAAATGAAACGA</u> <u>CCTTAAGACTAATCAAAGATGGTTATTCAGAT</u>
12 rev:	<u>TCTGATTAGTTTCTACCAATAAGTCTATTCTATTACTAGAGAGTGCTAATAAaTACGTGTaAGCTGc</u> <u>gaCCTTGACGTTTTGGTCTTATATTT</u>
13 for:	<u>gctGGAAC TGCAAAACCAGAATATAAACCTAAGCTTGCTCCAAGAattAGTATAACTCTAATATTTG</u> <u>AGGATACGATACCGTTCTTAAAGAGA</u>
14 rev:	<u>CTCCTATGCTATGGCAAGAATTTCTCTTTACCTCACTTACTTCTCCAATATCGATGTTATAAATTCC</u> <u>TTTTAGGCTTTTTCAAGAAGTCGATTCTTAAGCCCAAC</u>

La strategia utilizzata ha quindi previsto i seguenti quattro passaggi:

1) *preparazione di oligonucleotidi da 150bp a doppio filamento*; coppie di oligonucleotidi 1-2, 3-4, 5-6, ecc, sono stati incubati insieme (50ng) in una miscela di reazione ($V_{\text{finale}}=20\mu\text{L}$) tale da consentire alla polimerasi *Vent* di completare il doppio filamento (0.2mM dNTP,

BufferVent1X, 2mMMgCl₂). La reazione ha previsto due cicli così ottimizzati: denaturazione (95°C/10min), appaiamento (60°C/2min) e amplificazione (72°C/10min).

2) *riduzione della taglia degli oligonucleotidi*; i nucleotidi a doppio filamento ottenuti nel primo passaggio sono stati mischiati (2µL cd) e trattati insieme con *DnaseI* (0.01U) al fine d'ottenere frammenti più piccoli a doppio filamento. La reazione è stata fermata mediante incubazione in ghiaccio dopo 30".

3) *Ricostruzione del gene*; E' stata allestita una reazione di PCR per ricostruire l'intero gene a partire dai prodotti della digestione catalizzata da *DnaseI*. Dopo una fase di denaturazione (95°C/4min) Il ciclo, ripetuto 55 volte, ha previsto: denaturazione (95°/30sec), appaiamento (45°C(+0,1°C/ciclo)/30sec), amplificazione (72°C/30sec).

4) *Amplificazione*; Il gene "ricostruito" è stato amplificato con oligonucleotidi esterni (*ssopox5'* e *ssopox3'*) mediante una prima fase di denaturazione (94°C/4min) seguita da 30 cicli di amplificazione (94°C/2min- 45°C/1min-72°C/5min).

II 2.2.2.4 Ricombinazione mediante DNA StEP

Questa tecnica, la cui metodologia è stata attinta essenzialmente da Stemmer (Stemmer WP, 1995), è stata utilizzata per ricombinare il gene *syntpox* con *ssopoxwt*, al fine di produrre una libreria di geni che possedessero diverse combinazioni delle 14 mutazioni originarie. Questa tecnica viene utilizzata per la ricombinazione di geni altamente omologhi (>80% d'identità) perché si basa sul rapido appaiamento e breve amplificazione dei frammenti prodotti. In questo modo frammenti di DNA parzialmente amplificati, generati dalla copia di un gene, possono passare all'altro, dopo denaturazione. Uno schema che riassume sommariamente la tecnica è mostrato in **Fig II.2**.

Nella miscela di reazione sono stati quindi aggiunti i due stampi *ssopoxwt* (100ng) e *syntpox* (50ng), dNTP (200µM), oligonucleotidi esterni (100µM), DNA polimerasi *Vent* (1U). E' importante sottolineare che la DNA polimerasi scelta possiede attività 3'-5' esonucleasica quindi elimina i nucleotidi non correttamente appaiati sia nella fase di polimerizzazione che nella fase di appaiamento.

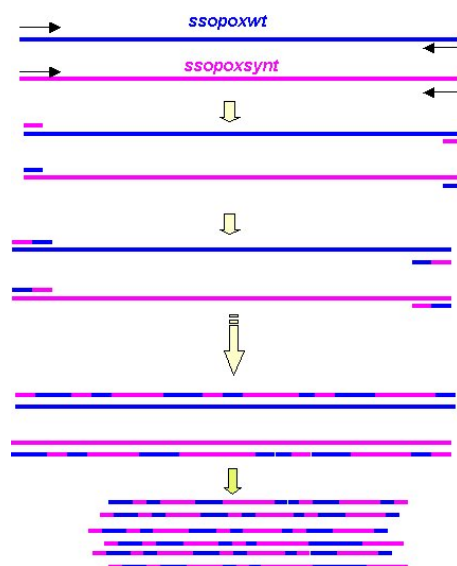


Fig II.2 Schema di ricombinazione genica mediante DNASTep. Le frecce nere rappresenta gli oligonucleotidi e le frecce gialle i passaggi di amplificazione (PCR).

Questo da un lato garantisce alta fedeltà all'amplificazione, ma dall'altro ha un'importante conseguenza nel numero di varianti e combinazioni possibili. Infatti, dato che in molti casi le mutazioni sono consecutive, queste sequenze di amminoacidi mutati sono conservate riducendo a 7 il numero regioni mutate che possono interscambiarsi e ricombinarsi con il gene *wt*. Il numero di varianti possibile diventa perciò $7!=5040$.

Dopo il ciclo di ricombinazione mediante StEP è seguita la fase di amplificazione con oligonucleotidi esterni, come descritto nel paragrafo precedente.

II 2.2.3 Analisi per sequenza

Tutti i DNA plasmidici isolati sono stati purificati e analizzati per sequenza nucleotidica presso il centro PRIMM IGB-TIGEM, al fine di verificare la presenza nel gene della/e mutazione/i desiderata/e su entrambi i filamenti ed escludere la possibilità di errori introdotti durante l'amplificazione del gene. Sono stati utilizzati gli oligonucleotidi universali *T7 start* e *T7term* le cui sequenze si trovano all'esterno del gene per l'analisi su doppio filamento di tutto il gene (Tabella II.2). Qualora necessario, sono stati utilizzati anche oligonucleotidi specifici interni alla sequenza del gene.

II 2.2.4 Analisi delle colonie su piastra a 96 pozzetti

Le librerie di geni modificati ottenute come descritto nel paragrafo sono state trasformate nelle cellule competenti per elettroporazione BL21(DE3) ed i cloni ottenuti (500/ng DNA) sono stati prelevati singolarmente dalla piastra di coltura e analizzati per la proprietà di interesse nelle procedure riportate di seguito.

-Crescita cellulare - Le singole colonie provenienti dalla trasformazione sono state prelevate, separate in una piastra a 96 pozzetti (Corning) e incubate in 200 μ l LB/amp. Le cellule sono state incubate a 37°C per 16 h e, successivamente, indotte con una soluzione 1mM IPTG, addizionate con 0.2 mM CoCl₂, e incubate per 3h a 37°C.

-Lisi cellulare - Una parte della coltura cellulare (80 μ l dei 200 μ l totali) di ciascun pozzetto è stata trasferita in pozzetti corrispondenti di un'altra piastra, dove le cellule sono state sottoposte a lisi per aggiunta di 20 μ l di tampone di lisi 5X (100 mM Tris/HCl pH 7.9, contenente SDS 0.25% e 1 mM CoCl₂) e lasciate a 4°C per 1h. Le cellule lise così ottenute sono state divise in due (50 μ L per pozzetto) per consentire un'analisi in duplicato.

-Analisi delle colonie mediante saggi di attività in situ – Gli estratti proteici totali così ottenuti sono stati diluiti con 150 μ L di soluzione di saggio. Tale saggio è stato effettuato in duplicato su piastre multipozzetto. I saggi spettrofotometrici sono stati monitorati con uno spettrofotometro *Labsystem Multiscan UV/Vis*, rilevando l'assorbimento della soluzione alla lunghezza d'onda desiderata. I saggi d'attività sono stati condotti misurando la variazione di assorbanza ad intervalli regolari (da 1min a 10min) fino ad un tempo massimo di 90 minuti. A seconda del tipo di analisi effettuata, la piastra è stata tenuta a temperatura ambiente o incubata ad alta temperatura (da 50 a 75°C) durante l'intervallo dell'analisi.

L'attività corrispondente a ciascun pozzetto, quindi a ciascuna coltura cellulare distinta, è stata calcolata dalla pendenza della migliore interpolazione lineare dei punti corrispondenti ai dati acquisiti. La variazione dell'assorbimento (ΔA) è quindi convertita in attività enzimatica come descritto nel paragrafo a seconda del saggio effettuato. Le colonie che mostravano l'attività di interesse rispetto al lisato cellulare *wt*, o ad altri di riferimento, sono state prelevate dalla piastra madre e cresciute in 5 ml di LB/amp al fine di estrarne il DNA plasmidico per ulteriori studi di sequenziamento e caratterizzazione.

II 3 BIOCHIMICA DELLE PROTEINE

Si intendono per tecniche di biochimica delle proteine tutte le procedure utilizzate per l'espressione ricombinante, la purificazione e la caratterizzazione cinetica delle proteine di interesse. Per chiarezza di organizzazione del lavoro questa sezione è stata suddivisa in due parti: la prima (3.1) riguarda l'aspetto della produzione delle proteine di interesse e la seconda (3.2) riporta le tecniche per l'analisi cinetica degli enzimi.

II 3.1 Produzione delle proteine

II 3.1.1 Materiali

Resina a scambio anionico *Q Sepharose fast flow* acquistata da Amersham Bioscience. Colonna per cromatografia a esclusione molecolare *High Load 16/60 Superdex 75* acquistata da Amersham Bioscience. Tutti le polveri per la preparazione dei tamponi utilizzati nelle procedure qui descritte sono stati acquistati da SIGMA Aldrich, se diversamente non specificato. I tamponi utilizzati sono stati tutti filtrati con filtro 0.22µm e degasati. Marcatore di peso molecolare per elettroforesi denaturante e Coomassie Brilliant Blue G250 acquistati da BioRad.

II 3.1.2 Espressione delle proteine ricombinanti

La produzione eterologa delle proteine è stata ottenuta in cellule di *E. coli* BL21(DE3) o *E.coli* BL21(DE3)pLysS. Tali cellule, trasformate con i diversi costrutti, sono state cresciute in 5 litri di LB contenenti ampicillina (100 µg/ml) per tutta la notte sotto vigoroso flusso di aria sterile. La mattina seguente, le cellule sono state indotte con 1 mM IPTG addizionato con 0.2 mM CoCl₂, e dopo 3 h recuperate per centrifugazione (3000 rpm per 15 min a 4°C - Sorvall GSA) e conservate a -20°C.

II 3.1.3 Lisi cellulare

Un volume di cellule, ottenute come *pellet* (circa 30 e 40 g per crescita cellulare), è stato risospeso con 3 volumi di tampone A (20 mM Hepes pH 8.5, 0.2 mM CoCl₂) (30 ml di tampone per 10 g di cellule). La lisi cellulare è stata effettuata mediante “*French Press*” (AMINCO Co), utilizzando una pressione di 1200 Pa. I detriti cellulari sono stati rimossi

mediante centrifugazione a 30000 rpm per 20 min a 4°C (ultracentrifuga *Beckmann* rotore 70Ti).

II 3.1.4 Termoprecipitazioni

Per allontanare le proteine mesofile mediante denaturazione al calore, il surnatante recuperato in seguito alla rottura delle cellule è stato sottoposto ad incubazioni progressive ad alta temperatura (60°-70°-80°). Solo nel caso del mutante SyntPox è stata condotta un'unica termoprecipitazione a 50°C. Le incubazioni sono state effettuate per 20 min sotto gentile agitazione in un bicchiere di vetro immerso in un bagnetto termostato alla temperatura d'interesse. Dopo ciascuna incubazione, le proteine denaturate sono precipitate e allontanate dalla frazione proteica termosolubile mediante ultracentrifugazione a 30000 rpm per 20 min a 4°C (ultracentrifuga *Beckmann* rotore 70Ti).

II 3.1.5 Cromatografia a scambio ionico

Il surnatante recuperato dall'ultimo passaggio di termoprecipitazione, è stato frazionato su una resina a scambio anionico (*Q Sepharose FastFlow*) precedentemente equilibrata con tampone A ad un flusso di 2 ml/min. Dopo caricamento del campione di interesse, è stato applicato un gradiente lineare di NaCl (da 0 a 0.5M). Le frazioni in cui è stata riscontrata attività enzimatica, sono state riunite e sottoposte ad un ulteriore passaggio di purificazione, mediante cromatografia ad esclusione molecolare.

II 3.1.6 Cromatografia ad esclusione molecolare

Un volume di circa 2 ml del campione di interesse è stato frazionato su resina ad esclusione molecolare (*High Load 16/60 Superdex 75*) precedentemente equilibrata con tampone 20mM Hepes pH 8.5, 0.2mM CoCl₂, 0.2M NaCl (tampone Gf) ad un flusso di 0.5 ml/min. Le frazioni in cui era presente l'attività enzimatica, sono state riunite ed eventualmente concentrate. La purezza della proteina è stata poi verificata tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide.

II 3.1.7 Elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)

L'elettroforesi in condizioni denaturanti è stata eseguita con il metodo di Laemmli (Laemmli

UK, 1970). Un gel per la corsa elettroforetica è composto di due parti: una inferiore separativa (acrilammide 12,5%, bis-acrilammide 0,5%, Tris/HCl 375mM pH 8.5, sodiododecilsolfato (SDS) 0,1%, ammonio persolfato (APS) 0,05%, TEMED 0,1%) e una superiore di caricamento (acrilammide 7,5%, bis-acrilammide 0,5%, Tris/HCl 125mM pH 6.8, SDS 0,1%, APS 0,06%, TEMED 0,24%). Il marcatore di peso molecolare utilizzato (*Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range*) contiene le seguenti proteine di peso molecolare noto: miosina (200 kDa), β -galattosidasi (115 kDa), albumina di siero bovino (BSA) (96 kDa), ovo-albumina (52 kDa), anidrasi carbonica (38 kDa), inibitore della tripsina di soia (29 kDa), lisozima (20 kDa), aprotinina (7 kDa).

La soluzione di denaturazione riducente è stata aggiunta ai campioni di interesse dopo diluizione 1:3 (soluzione di denaturazione: Tris/HCl 185mM pH 6.8, glicerolo 30%, SDS 15%, β -mercaptoetanolo 15%, Blu BromoFenolo 0.05%), le proteine sono state denaturate incubandole a 95°C per 10 min, e caricate sul gel. La corsa elettroforetica è stata condotta a voltaggio costante di 100 V, nel tampone di corsa 25mM Tris/HCl, 0.2M glicina, SDS 0.1%. Le proteine sono state rilevate mediante colorazione con Comassie Brilliant Blue G250 (Comassie G250 0.25%, isopropanolo 25%, acido acetico 10%).

II 3.1.8 Determinazione della concentrazione proteica

Saggio colorimetrico - La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il saggio proteico con il metodo di Bradford . Tale metodo colorimetrico si basa sulla variazione di assorbanza di un colorante commerciale (ProteinStain-Biorad), in seguito all'interazione con proteine. In particolare si osserva uno spostamento del massimo di assorbanza da 464 a 595 nm proporzionale alla concentrazione delle proteine che reagiscono con la miscela. Le proteine sono incubate con 200 μ l del colorante in un volume finale di 1 ml, agitate e incubate per 5 min a temperatura ambiente; in seguito si effettua la lettura spettrofotometrica a 595nm. Come bianco, si utilizza la miscela di reazione in assenza di proteine. Il valore della concentrazione proteica di un campione viene calcolato sulla base di una retta di taratura, ottenuta riportando l'assorbanza a 595nm di campioni di albumina di siero bovino (BSA) a concentrazione nota, in funzione della concentrazione.

Metodo spettroscopico – La concentrazione della proteina di interesse purificata è stata

valutata misurando spettrofotometricamente l'assorbanza a 280nm secondo la legge di Lambert-Beer. Il coefficiente d'estinzione molare (ϵ_{280}) è stato calcolato per ogni variante dalla sequenza amminoacidica con il programma *ProtParam tool* da www.expasy.org.

II 3.2 Analisi cinetica degli enzimi

II 3.2.1 Materiali

Paraoxon, metil paraoxon, sono stati forniti da SIGMA Aldrich. 4-(tiobutil)- γ -butirrolattone (TBBL) gentilmente fornito dal laboratorio del Dr D. Tawfik. N-octanoil omoserina lattone (HSL-C8) fornito da SIGMA. Acido ditio-nitrobenzoico (DTNB) fornito da SIGMA. Dietil 4-metil benzil fosfonato fornito da SIGMA.

II 3.2.2 Saggi enzimatici su paraoxon

-Saggio standard. Per determinare l'attività catalitica su paraoxon secondo la reazione riportata nel capitolo I (Fig.I.5). è stato utilizzato un saggio spettrofotometrico in cui si registra la produzione del *p*-nitrofenolo prodotto in seguito all'idrolisi del substrato. La reazione è stata seguita registrando la variazione di assorbanza a 405nm (lunghezza d'onda di assorbimento massimo del *p*-nitrofenolo), utilizzando lo spettrofotometro a doppio raggio *Cary 100*, con lampada UV-vis (Varian), in una cella da 1 ml e cammino ottico pari a 1 cm. Un saggio definito “*standard*” è condotto a 70°C in tampone 20mM Tris/HCl (se non diversamente indicato) pH=8.0, 1mM paraoxon. L'idrolisi spontanea del substrato è stata sottratta dalle misure usando come bianco la miscela di reazione in assenza di proteina.

La velocità iniziale è stata calcolata, con il metodo dei minimi quadrati, come la pendenza della migliore retta tangente alla curva ottenuta riportando l'aumento dell'assorbanza a 405 nm in funzione del tempo (min). La variazione di assorbimento (ΔA_{405nm}) è quindi convertita in attività enzimatica noto l' ϵ molare del *p*-nitrofenolo nelle condizioni di saggio indicate ($\epsilon=22.8$ a 70°C).

Una unità di attività enzimatica è definita come la quantità di enzima che produce/rilascia una μ mole di *p*-nitrofenolo/min. I saggi sono stati eseguiti in duplicato o triplicato e il risultato finale è la media di più esperimenti indipendenti.

-Determinazione di k_{cat} e K_M . Le velocità iniziali dell'idrolisi del paraoxon sono state misurate

a concentrazioni comprese tra 10 μ M e 5mM (se non diversamente indicato) utilizzando lo stesso ammontare di enzima per saggio, nelle condizioni di pH ottimale e T=70°C, se non diversamente indicato. I parametri cinetici k_{cat} e K_M sono stati ottenuti mettendo in grafico le concentrazioni del substrato *versus* le velocità iniziali. I dati sono stati interpolati attraverso l'equazione di Michaelis-Menten ($v/[E_0]=[S]k_{cat}/[S]+K_M$) usando il programma GraFit 5.0 (Leatherbarrow RJ, 1992).

II 3.2.2.1 Valutazione della costante di inibizione da EBP

E' stato valutato l'effetto del dietil 4-metil benzil fosfonato (EBP) sull'attività paraoxonastica dell'enzima *SsoPoxwt*. Dopo aver valutato il tipo di inibizione (irreversibile o reversibile) e aver stabilito che l'inibizione è di tipo reversibile competitivo, sono state eseguite quattro curve di Michaelis Menten in presenza di differenti concentrazioni di inibitore (0, 80, 160, 240 μ M) e valutate le pendenze derivate dal grafico dei doppi reciproci (1/V vs 1/S) mediante il programma Grafit 5.0. Tali pendenze sono state messe in funzione della concentrazione di inibitore, così da calcolare il valore della costante di inibizione, come intersezione all'asse. I saggi sono stati condotti a 70°C in cuvette da 1mL nelle condizioni di saggio del paraoxon riportate precedentemente.

II 3.2.3 Saggi enzimatici su carbossilesteri

L'attività carbossilesterasica è stata valutata sul substrato p-nitrofenil butanoato (C4-*p*NP) misurando la variazione di assorbanza del p.nitrofenolo a 405nm in soluzione tampone 20mM TrisHCl pH=8.0 e 4% acetonitrile. Lo stock di C4-*p*NP è 10-20mM in 100% acetonitrile.

II 3.2.4 Saggi enzimatici su TBBL

L'attività enzimatica sul substrato 4-(tiobutil)- γ -butirrolattone è stata determinata spettrofotometricamente mediante un saggio accoppiato, come precedentemente descritto (Khersonsky O, 2006). In dettaglio, dall'idrolisi del lattone sintetico, dopo riarrangiamento intramolecolare, si ha la produzione di un tio-alcol che, riducendo l'acido ditio-nitrobenzoico (DTNB), produce una molecola di acido nitrobenzoico che assorbe a 412nm. Lo stock di substrato (10 e 100mM in acetonitrile 100%) e il DTNB (stock 10mM in 50mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) sono diluiti nel tampone di reazione immediatamente prima di iniziare l'analisi. La miscela di reazione comprende: 50mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH8.0 a 70°C, 2mM DTNB, 1%Acetonitrile , DMSO 0.5%. Il coefficiente d'estinzione molare utilizzato per la valutazione dell'attività è $\varepsilon_{412\text{nm}}=7000\text{M}^{-1}$. Per la determinazione dei parametri cinetici k_{cat} e K_{M} , l'attività lattonasica degli enzimi di interesse è stata saggiata nell'intervallo da 20 μM a 1mM, mettendo in grafico le concentrazioni del substrato *versus* le velocità iniziali. Una unità di attività enzimatica è definita come la quantità di enzima che produce/rilascia una μmole di acido nitrobenzoico/min. I dati sono stati interpolati attraverso l'equazione di Michaelis-Menten ($v/[E_0]=[S]k_{\text{cat}}/[S]+K_{\text{M}}$) usando il programma GraFit 5.0. I saggi sono stati eseguiti in duplicato o triplicato, e il risultato finale è la media di più esperimenti indipendenti.

II 3.2.5 Saggi enzimatici su HSL

L'attività enzimatica su acil-homoserina lattoni naturali è stata valutata spettrofotometricamente mediante saggio accoppiato con l'indicatore di pH rosso cresolo (Chapman E, 2002). A pH 8.05 l'indicatore si trova nel suo punto di viraggio, quindi la sua sensibilità verso la variazione di pH è massima e corrisponde ad una variazione di assorbanza dal rosso (In^-) al giallo (HIn) analizzabile spettrofotometricamente a 572nm. L'idrolisi del lattone comporta l'abbassamento di pH della soluzione spostando l'indicatore verso la forma protonata (gialla). Per valutare quantitativamente il rapporto tra le moli di H^+ prodotte rispetto alla variazione di assorbimento registrate, è stata costruita una retta di taratura misurando la variazione di $A_{572\text{nm}}$ dell'indicatore in funzione della concentrazione di $[\text{HCl}]$ note nelle condizioni del saggio. La pendenza della retta ottenuta rappresenta il fattore che converte la variazione di assorbimento ($\Delta A_{572\text{nm}}$) nel tempo (min) con le micromoli (μmol) di substrato trasformate. I saggi con C8-HSL sono stati condotti in tampone tricina 1mM pH8.05 ($\text{pH}=\text{pK}_a$), 1% DMSO, Rosso cresolo 200 μM a 25°C. Le concentrazioni di substrato per la determinazione dei parametri cinetici sono state stimate nell'intervallo 20 μM -600 μM . Lo stock di substrato (500 e 50mM in 100% (v/v) DMSO) è stato diluito immediatamente prima del saggio (5mM in 10%DMSO).

La velocità iniziale per l'idrolisi del substrato è stata interpolata con la trasformazione di Lineaweaver-Burk dell'equazione di Michaelis-Menten con il metodo dei minimi quadrati

utilizzando il programma GraFit 5.0 (Leatherbarrow RJ, 1992).

L'attività enzimatica (U) è definita come la quantità di enzima (mg) necessari per degradare una μ moles di substrato al minuto.

II 3.2.5.1 Valutazione della costante di inibizione da C10-HTL.

E' stato valutato l'effetto sull'attività sul C8HSL in presenza di C10HTL. Sono state eseguite quattro curve di Michaelis Menten in presenza di differenti concentrazioni di inibitore (0, 90, 180, 360 μ M) e valutate le pendenze derivate dal grafico dei doppi reciproci ($1/V$ vs $1/S$) mediante il programma GraFit 5.0. Tali pendenze sono state messe in funzione della concentrazione di inibitore, così da calcolare il valore della costante di inibizione, come intersezione all'asse. I saggi sono stati condotti a 25°C in piastre a multipozzetto a 96 in un volume finale di 200 μ L nelle condizioni di saggio del C8HSL riportate precedentemente.

II 3.2.6 Determinazione del pH ottimale per la catalisi

La dipendenza della velocità iniziale dal pH è stata determinata seguendo l'assorbanza a 348nm, punto isosbastico (pH-indipendente) del *p*-nitrofenolo e dello ione *p*-nitrofenossido. A tale lunghezza d'onda un aumento dell'assorbanza è ascrivibile solo all'idrolisi del substrato mediata dall'enzima, e non all'equilibrio che si viene a stabilire tra i due composti ai diversi pH. Il coefficiente di estinzione molare utilizzato a tale lunghezza d'onda è 5300 M⁻¹cm⁻¹. I tamponi utilizzati sono stati 20mM sodio fosfato nell'intervallo 5.0-7.5; 20mM Tris/HCl nell'intervallo 7.5-8.5 e 20mM Gly/NaOH nell'intervallo 8.5-9.5. Per ciascun enzima la determinazione del pH ottimale è stata eseguita a 70°C.

II 3.2.7 Termofilia

La termofilia, ovvero la dipendenza dell'attività enzimatica dalla temperatura, è stata determinata nell'intervallo di temperatura tra 30 e 95°C, usando come substrato il paraoxon (1mM), in tampone al valore di pH ottimale per ciascun enzima, corretto opportunamente alle varie temperature. La degradazione enzimatica del paraoxon è stata seguita registrando l'assorbimento del *p*-nitrofenolo a 405nm. Il coefficiente d'estinzione molare del *p*-nitrofenolo è stato valutato per ogni temperatura nelle condizioni di tampone utilizzate nel saggio.

II 3.2.8 Termostabilità cinetica

La stabilità termica è stata determinata cineticamente valutando l'attività catalitica residua nel tempo. In particolare, l'enzima purificato (0.2mg/mL) è incubato a diverse temperature (70, 80, 90, 95 e 99°C) e a vari tempi di incubazione (fino ad un massimo di 4h), è saggiata la sua attività residua su paraoxon mediante *saggio standard* (II.3.2.2).

II 3.2.9 Stabilità cinetica in presenza di solventi e agenti denaturanti

La stabilità cinetica in presenza di solventi è stata valutata sia su proteine purificate che su estratti proteici totali solubili. In entrambi i casi, le stesse unità enzimatiche sono state incubate in piastre a multipozzetto a 96 in differenti soluzioni (volume finale 150µL) di tampone TrisHCl 25mM pH 8.5 in presenza di: Metanolo (10%), Acetonitrile (10%), Isopropanolo (10%), Etanolo (10%), SDS (1%, 0.1%, 0.01%), GuHCl (0.5, 3M). Le incubazioni proteina/solvente sono state eseguite per diversi tempi (0-1h-3h-16h-40h) e l'attività residua è stata saggiata a temperatura ambiente per aggiunta di una soluzione di paraoxon (15µL di 5mM) utilizzando il lettore di piastre a 96 *Labsystem Multiscan UV/Vis* a 405nm e la variazione di assorbimento registrata rielaborata come descritto precedentemente (II.3.2.2).

II 4 CHIMICA DEI COMPOSTI ORGANOFOSFORICI (OPs)

II 4.1 Materiali

Coumaphos, Paraoxon, Parathion sono stati ottenuti da SIGMA-Aldrich (Dorset UK). Piastre a 96 pozzetti acrilico UV-trasparenti sono state fornite da Corning Incorporated (Aberdeen, UK). Dimetil Formammide (DMF) fornito da Fluka.

II 4.2 Misure di sicurezza

La manipolazione dei composti OPs è stata eseguita sotto cappa chimica. Durante le manipolazioni sono stati indossati guanti in nitrile e camice. Tutto il materiale entrato in contatto diretto con OPs è stato incubato per più di 24 ore con una soluzione di NaOH 5M. Il materiale consumabile così trattato è stato smaltito come “rifiuti speciali”.

II 4.3 Quantizzazione

La concentrazione del paraoxon è stata determinata spettrofotometricamente considerando che la sua assorbanza a 274nm in DMF (100% v/v) è $\epsilon_{274} = 8.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

II 5 BIOINFORMATICA

II 5.1 Materiali

GraFit 5.0 (Leatherbarrow RJ, 1992) per l'analisi dei dati cinetici. Swiss-PdbViewer DeepView v4.0 (Guex, N 1997) per la visualizzazione delle strutture proteiche. Programma Insight II su Silicon Graphics per la realizzazione delle immagini relative al docking. ChemDraw (CambridgeSoft Corporation) per la costruzione delle strutture riportate.

II 5.2 Docking e visualizzazione grafica delle strutture

I modelli molecolari di alcuni mutanti sono stati realizzati utilizzando il modulo Homology del programma Insight II (version 2000.1; Accelrys, San Diego) su una Silicon Graphics Octane 2+ workstation equipaggiata di processore 360 MHz R12000, IRIX (version 6.5).

Per gli studi di docking i substrati TBBL e C8HSL sono stati costruiti e ottimizzati con il programma Builder di InsightII. E' stato utilizzato come recettore la catena A della molecola 2VC7.pdb senza metalli. E' stato definito un sottoinsieme centrato sulla Lys139 con raggio di 8Å.

500 step di minimizzazione sono stati eseguiti per ogni posizione ottenute dal posizionamento del ligando rispetto al recettore fino a valori di derivata (rms) inferiori a 0.001. La Griglia è stata impostata a 0.5 Å. I risultati sono stati analizzati in base al valore delle energie di proteina e ligando e alla energia intermolecolare. Solo le strutture con valori di energia <-10KJ/mol sono stati presi in considerazione.

Le strutture qui riportate sono state costruite con il programma di visualizzazione grafica in InsightII, utilizzando I modelli in formato “.pdb” delle strutture di interesse e sovrapponendole secondo le esigenze. Il valore di rms per sovrapposizione delle strutture è risultato sempre <0.05Å .

CAPITOLO III

RISULTATI

Il seguente capitolo si suddivide in tre paragrafi: **(III.1)** “Caratterizzazione di *SsoPox*” suddivisa a sua volta nelle sezioni “struttura”(III.1.1) e “funzione”(III.1.2); **(III.2)** “Evoluzione dell'attività fosfotriesterasica”; **(III.3)** “Applicazioni”.

III 1 CARATTERIZZAZIONE DI *SsoPox*

III 1.1 Struttura

In collaborazione con l'equipe francese del Prof. E. Chabrière dell'Université de la Méditerranée (Marseille-Francia) è stato possibile ottenere il cristallo dell'enzima *wt* e risolvere la struttura tridimensionale ad una risoluzione di 2.6 Å. La proteina è stata da me purificata in quantità e purezza opportune secondo la procedura precedentemente pubblicata (Merone L, 2005) e inviata in Francia in forma solubile ad una concentrazione di 5mg/mL in tampone 20mM Hepes, 0.2mMCoCl₂ pH8.0. La cristallizzazione è stata effettuata con il metodo della goccia pendente in diverse condizioni; nella migliore condizione ottenuta, la proteina cristallizza in una settimana. Il cristallo è stato analizzato presso l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) in Grenoble (Francia).

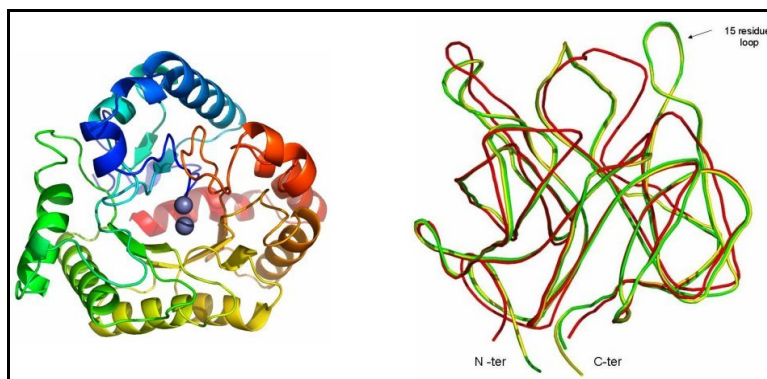


Fig. III.1 **a)** Struttura del monomero di *SsoPox*; **b)** Sovrapposizione strutturale di *SsoPox* (rosso) con OPD da *A.radiobacter* (verde) e PTE *P. diminuta* (giallo).

La risoluzione della struttura è stata ottenuta per “molecular replacement” usando le coordinate della PTE di *Pseudomonas* come riferimento. La proteina cristallizza come dimerico i cui monomeri hanno forma globulare con dimensioni $40\text{\AA}\times 54\text{\AA}\times 46\text{\AA}$ (**Fig. III.1**). La struttura si può definire come un $(\alpha/\beta)_8$ barrel distorto, simile a quello della PTE di *P.diminuta*. Le maggiori differenze strutturali che si osservano rispetto alla *pPTE*, che a sua volta è perfettamente sovrapposta a quella di *A.radiobacter*, sono l'accorciamento delle estremità N e C terminali che rendono la struttura più compatta in *SsoPox* e l'assenza di 15 residui nel loop 7. L'accorciamento di questo tratto di sequenza amminoacidica, già messo in evidenza dall'allineamento di sequenza primaria mostrato per il gruppo delle PLL (**Fig.I.10**), è probabilmente il fattore responsabile della differente specificità di substrato tra le fosfotriesterasi e le PLLs. La risoluzione della struttura di *SsoPox* consente di definire il gruppo delle fosfotriesterasi lattonasi simili (PLLs) come una nuova famiglia.

L'assenza di questo tratto di sequenza amminoacidica ha sicuramente un vantaggio in termini di stabilità strutturale, tuttavia le maggiori differenze rispetto alla controparte mesofilica a sostegno dell'elevata stabilità strutturale, si possono osservare per la struttura dimerica (**Fig.III.2**).

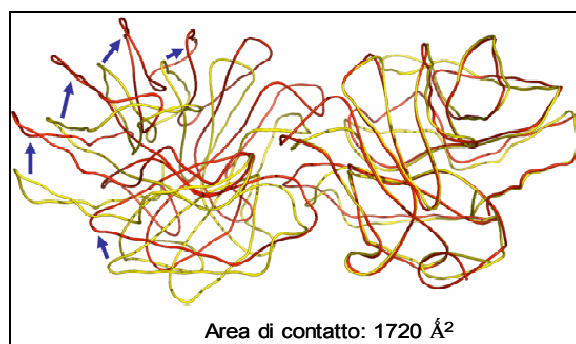


Fig. III.2 Confronto strutturale tra *SsoPox* (rosse) e *pPTE* (giallo). I monomeri a destra sono ben sovrapposti, mentre si può osservare uno spostamento del monomero a sinistra indicato dalle frecce blu.

L'area di contatto dei due monomeri della mesofilica *pPTE* è di circa $1350\text{\AA}^2$, di cui, lungo l'interfaccia, si estendono il 62,5% di interazioni idrofobiche e 25 legami idrogeno. Nella struttura di *SsoPox* il numero di legami idrogeno è lo stesso della controparte termofila (25), tuttavia l'area di contatto tra i due monomeri risulta incrementata dalla inter-penetrazione

delle due catene polipeptidiche. L'area di contatto risulta così di 1720 Å² dove l'aggiuntiva area di contatto rispetto alla pPTE (370 Å²) è coinvolta principalmente in interazioni idrofobiche.

L'abbassamento del contenuto di residui polari non carichi (Thr, Ser, Gln, Asn) e l'incremento del numero di residui carichi (Asp, Glu, Lys, Arg) collocati principalmente sulla superficie dei monomeri, risultano in una superficie proteica altamente carica organizzata in 25 ponti salini per monomero che contribuiscono all'elevata stabilità.

Il sito attivo consiste di una cavità collocata al C terminale del β barrel contenente il centro metallico binucleare. A coordinare i due metalli sono 4 istidine (22, 24, 170, 199) l'aspartico 256 e la lisina 137 che è risultata carbossilata, come nel caso della fosfotriesterasi di *P. diminuta*. Il metallo più interno alla struttura è definito α, mentre quello più esposto β. Entrambi adottano una geometria a bipyramide trigonale; tuttavia mentre il metallo α è coordinato da quattro aminoacidi e una molecola d'acqua a ponte tra i due metalli, il metallo β è coordinato da tre residui e due molecole d'acqua, come riportato nella **Fig.III.3**.

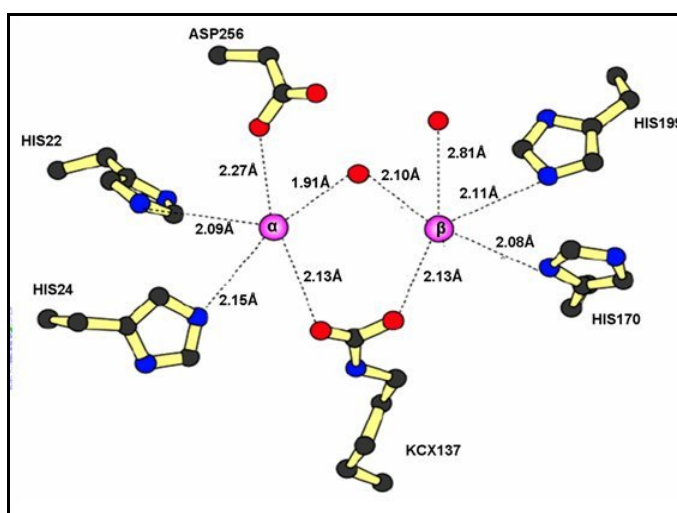


Fig.III.3 - Sito attivo di *SsoPox*. Le sfere rosa rappresentano i metalli, le sfere rosse gli atomi di ossigeno. La molecola d'acqua a ponte tra i due metalli è rappresentata come una sfera rossa.

La natura chimica dei due metalli è stata analizzata dall'istituto francese mediante spettrometria tridimensionale a raggi X che ha messo in evidenza in posizione α il Ferro e in β il Cobalto. La composizione metallica non omogenea del sito catalitico può essere dovuta

da un lato alla diversa affinità del metallo per il sito catalitico, e dall'altro sicuramente alla possibilità di inter-scambio del metallo più esposto (β) col solvente. La preparazione della proteina, infatti, è stata condotta in presenza di CoCl_2 , come precedentemente riportato (Merone L, 2005).

III 1.1.1 Struttura ottenuta con analogo di substrato

La struttura di *SsoPox* è stata ottenuta oltre che nella forma libera, anche in presenza dell'analogo di substrato N-decanoil-L-omocisteina tiolattone (C10-HTL, **Fig.III.6**) ad una risoluzione di 2.05 Å (**Fig.III.4**). Questa molecola è risultata un inibitore competitivo rispetto a C8-HSL (III 1.2.1.1). La lunga catena acilica dell'inibitore si va ad accomodare in un tunnel idrofobico generato dai loops 7 e 8. Questo canale, assente nell'analogo *pPTE*, ci permette di definire due siti: uno largo, che accomoda la catena acilica del substrato, e uno piccolo, che posiziona l'anello lattonico. Le catene laterali di Phe229, Leu228, Leu226, Trp278, Ala266, Thr265, Ala275, Leu274 e Lys271 interagiscono direttamente con la catena laterale dell'analogo di substrato attraverso interazioni di Van der Waals. I residui di Arg223, Leu72, Val27, Ile261 e Trp263 posizionano l'anello lattonico.

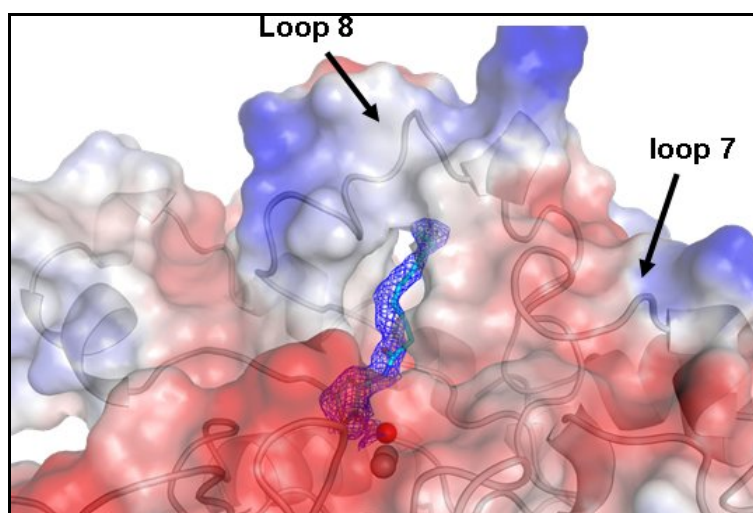


Fig. III.4 Particolare strutturale di *SsoPox* in complesso con C10-HTL

La molecola d'acqua a ponte tra i due metalli, nella proteina in complesso con HTL non si trova più in una posizione equidistante, ma risulta più vicina al Fe (metallo α , 2.06 Å) che al

Co (β , 2.61 Å), risultando così in una posizione ottimale per l'attacco nucleofilo.

III 1.2 Funzione

In questa sezione sono riportati i risultati relativi all'attività lattonasica su substrati sintetici e naturali, all'attività fosfotriesterasica su organofosfati, considerazioni sulla coesistenza delle due attività e meccanismo di reazione.

III 1.2.1 Attività su Acil-omoserina lattoni (HSL)

Sono stati valutati i parametri cinetici dell'enzima sul substrato C8HSL. I saggi di attività sono stati condotti come descritto nei materiali e metodi (II.3.2.5), seguendo la variazione di pH (diminuzione) mediante l'utilizzo di un indicatore. Infatti la reazione di idrolisi dell'HSL è del tipo:

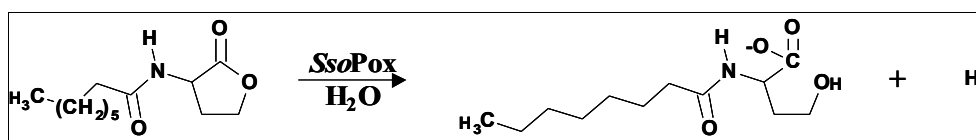


Fig. III.5 Schema di reazione per l'idrolisi di C8HSL catalizzata da *SsoPox*

In questo tipo di saggio “indiretto” le condizioni scelte sono fondamentali per garantire efficienza enzimatica e buona sensibilità. Di seguito riporto l'analisi effettuata per la scelta delle condizioni di saggio.

1) *Il tampone di saggio.* La scelta del tampone di saggio è legata alla scelta del pH di esercizio. Nella fattispecie, avendo *SsoPox* un pH ottimale pari a 8.0 (Merone L, 2005), s'è deciso di lavorare a questo valore. Poiché il pH deve essere pari al pK_a del tampone (per aumentare la sensibilità del saggio) è stato scelto il tampone Tricina che ha $\text{pK}_a^{25^\circ\text{C}}=8.05$. La concentrazione del tampone di saggio è un parametro importante ai fini della forza tampone, in particolare, abbassando la concentrazione del tampone, aumenta la sensibilità del saggio ($\Delta A_{572\text{nm}}$ nel tempo). Tuttavia, saggi enzimatici condotti in assenza di effetto tampone (in sola acqua) comportano la rapida inattivazione dell'enzima che si trova in pochi istanti a pH acido. Poiché i saggi per valutare l'affinità di substrato sono condotti a concentrazioni variabili di substrato, s'è deciso di porsi ad una concentrazione di $[\text{tampone}]=2\times[\text{S}]_{\text{max}}$, così che,

valutando sempre e solo la pendenza del primo tratto rettilineo della cinetica enzimatica registrata, si potesse considerare l'enzima sempre nelle stesse condizioni iniziali.

2) *La scelta dell'indicatore.* Si è scelto come indicatore il Rosso cresolo che ha punto di viraggio a quei valori di pH. La concentrazione dell'indicatore è un altro parametro importante nell'allestimento del saggio, in quanto deve essere abbastanza bassa per aumentare la sensibilità della rilevazione, ma sufficientemente alta da garantire il monitoraggio di tutti i protoni rilasciati nei primi istanti della reazione. La concentrazione scelta è il risultato di questo compromesso.

3) *La scelta del solvente.* Questa è legata alla solubilità del substrato e alla sua eventuale interferenza con l'enzima. Sono stati esclusi tutti i solventi di tipo carbossil estere (es. etil acetato) in quanto substrati dell'enzima.

4) *Temperatura d'esercizio.* I saggi sono stati condotti a 25°C. Questo per due ragioni: la prima legata alla conoscenza del pK_a del tampone che varia in funzione della temperatura e risulta noto e tabulato fino ad un massimo di 37°C, e la seconda legata all'eccessivo incremento di assorbanza dell'indicatore (A_{572nm}) che, come tutte le molecole, aumenta all'aumentare della temperatura.

Definendo 1U come la quantità di enzima (mg) necessaria ad idrolizzare una μ mole di substrato in 1min, e tenendo conto del peso molecolare di SsoPox, sono stati valutati i seguenti valori di attività (k_{cat}) e affinità (K_M) e specificità (s).

Tabella III.1. Parametri cinetici su C8-HSL a 25°C

Enzima	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($mM^{-1}s^{-1}$)
<i>SsoPoxwt</i>	2.49 ± 0.26	174.4 ± 39.2	14.2 ± 4.6

III 1.2.1.1 *Studi di inibizione enzimatica da HTL*

Lo studio dell'inibizione enzimatica è di fondamentale importanza per la conoscenza delle proprietà di un enzima. Il ligando non idrolizzato che alloggia con una buona affinità nel sito attivo, infatti, ci permette di comprendere lo spazio cinetico in cui si può muovere il substrato,

di prevedere il comportamento dell'enzima con altri possibili substrati e può dare spunti importanti nello studio del meccanismo di reazione. Inoltre, la conoscenza di analoghi di substrato ha conseguenze concrete nelle applicazioni biotecnologiche, ad esempio nella biosensoristica, o nel disegno e produzione di farmaci. Tra gli analoghi di substrato dell'omoserina lattone, saggi d'attività condotti con l'*N*-decanoil-L omocisteina tiolattone (C10-HTL) non rivelavano alcuna attività idrolitica. Un'analisi cinetica più fine, condotta a concentrazioni subsaturanti e saturanti di C8-HSL, hanno messo in evidenza la natura “competitiva” dell'inibitore C10-HTL, la cui struttura è riportata di seguito (**Fig.III.6**):

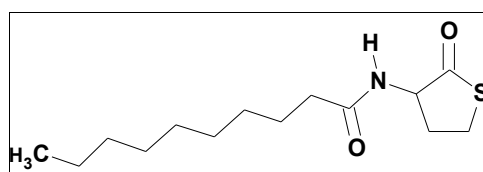


Fig. III.6: Struttura di C10-HTL

Come si può osservare, la molecola si differenzia dall'analogo omoserina per la presenza di uno zolfo nell'anello lattonico e della catena acilica di 10 anziché 8 atomi di carbonio. Sono state valutate le curve di inibizione enzimatica a diverse concentrazioni di C10-HTL (90-180-360 μ M). L'analisi cinetica dell'andamento tipo Michaelis-Menten in presenza delle diverse concentrazioni di inibitore, mostrava un progressivo abbassamento della K_M all'aumentare della concentrazione di inibitore. Analizzando i dati ottenuti come riportato nel paragrafo II.3.2.5 è stato calcolato un valore per la costante di inibizione K_i pari a $443.7 \pm 53.2 \mu$ M.

Per valutare se l'effetto di inibizione enzimatica fosse legato alla lunga catena acilica che poteva in qualche modo causare un ingombro nel sito attivo o forzare la posizione dell'anello in una posizione scorretta per l'idrolisi, sono stati condotti saggi d'attività enzimatica sull'analogo C10-omoserina Lattone nei quali si è riscontrata attività idrolitica. Questo risultato rafforza l'ipotesi che l'inibizione enzimatica sia legata alla tiofilicità dell'enzima dipendente dallo Zolfo dell'anello eterociclico.

III 1.2.2 Attività fosfotriesterasica

L'attività fosfotriesterasica dell'enzima *SsoPox* è stata già descritta precedentemente su

paraoxon a metil paraoxon (Merone L, 2005). Tale attività è risultata termofilica (cresce con la temperatura)(Fig.I.11b). L'enzima mostra capacità idrolitiche anche verso tutta una serie di organofosfati come parathion, coumaphos, diazinon, dursban, anche se si nota un abbassamento delle capacità idrolitiche con i substrati del tipo tio-OPs.

In collaborazione col il prof. Worek del Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology di Munich (Germany) sono stati condotti saggi di attività sul gas nervino ciclosarin con l'enzima *SsoPox*. L'enzima mostra attività idrolitica sia verso l'enantiomero (+) che (-) con preferenza verso la forma (+) come riportato in **Fig. III.7**.

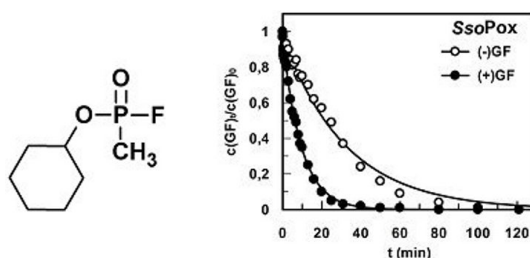


Fig. III.7 Saggio d'attività di *SsoPox* su reale Ciclosarin (GF)

Queste curve cinetiche consentono di calcolare un valore di k_{cat} pari a $6.25 \pm 0.15 \text{ s}^{-1}$ per la forma GF(+) e $1.85 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$ per l'enantiomero (-) a 25°C .

Tali informazioni sono importanti ai fini della considerazione che l'analisi dell'attività sul fosfotriestere paraoxon è compatibile con l'attività sui più potenti agenti nervini.

III 1.2.2.1 Studi di inibizione enzimatica da OPs

Per l'enzima *SsoPox* sono stati scoperti analoghi di substrato di natura fosfotriesterasica.

Fensulfothion. Tra gli inibitori del tipo organofosfato precedentemente a questo lavoro di tesi è stato valutato l'effetto di inibizione del fensulfothion (Merone L.2005) sull'attività paraoxonastica. Questa molecola è un tio-organofosfato fosfotriestere, di struttura simile a quella riportata per il paraoxon (Fig.III.8). L'enzima è inibito nella sua attività idrolitica verso il paraoxon da questa molecola con una costante di affinità $K_i = 120 \mu\text{M}$.

Dietil-p-metilbenzilfosfonato (EBP). Con lo scopo di trovare un ossorganofosfato fosfoestere

capace di inibire l'attività di *SsoPox*, è stato valutato l'effetto sull'attività del Dietil-*p*-metilbenzilfosfonato, la cui struttura, come si osserva dalla **Fig.III.8** si diversifica da quella del paraoxon per l'assenza dell'ossigeno esterificato con l'anello benzenico ed il gruppo nitro in posizione *para*.

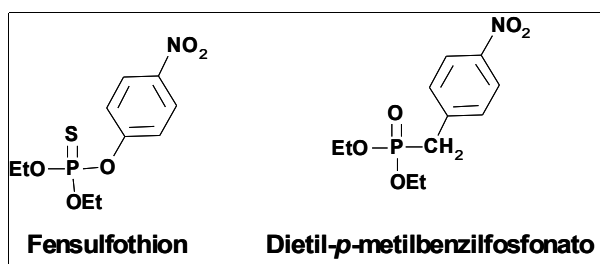


Fig. III.8 Strutture degli inibitori fosfoesteri di *SsoPox*

Per valutare se l'inibizione dell'attività fosse irreversibile o reversibile, e in questo caso competitiva o non competitiva, sono state fatte diverse prove. Innanzitutto, pre-incubando l'enzima con quantità molari di inibitore pari a 10 volte le moli di enzima, si è visto che l'attività paraoxonasi in concentrazione saturante di substrato non variava fino a tempi di incubazione pari a 16h. Questo ha escluso l'ipotesi dell'inibizione irreversibile. Per quanto riguarda l'analisi dell'inibizione reversibile, si ha inibizione dell'attività solo in condizioni non saturanti di substrato e in eccesso di inibitore ($[I] \geq 2 \times [S]$). E' stata valutata questa inibizione a concentrazioni di inibitore pari a 80, 160 e 320 μM . L'inibizione è risultata di tipo non competitivo, e dal grafico dei doppi reciproci ($1/V$ vs $1/[S]$), riportando le pendenze delle rette ottenute in funzione della concentrazione di inibitore, si è calcolata una $K_i = 83.05 \pm 10.46 \mu\text{M}$. Questo valore, che è dello stesso ordine di grandezza di quello valutato per l'affinità di substrato per il paraoxon, era in un certo senso atteso, data la struttura dell'inibitore.

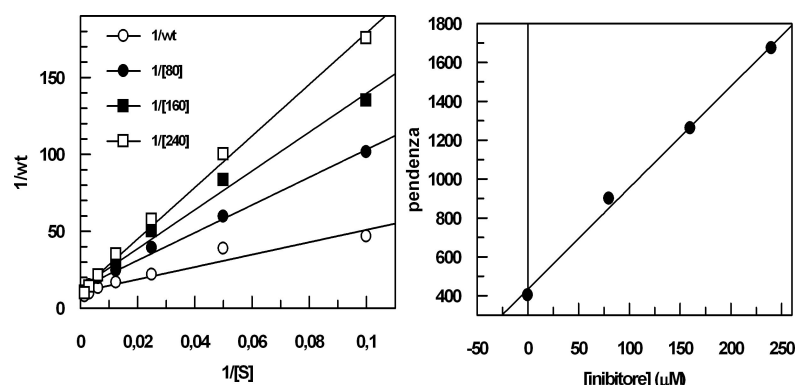


Fig. III.9 Curve di inibizione con EBP su paraoxon. Nel riquadro a destra è riportata l'interpolazione delle pendenze delle rette ottenute in funzione della concentrazione di EBP.

III 1.2.3 Promiscuità catalitica

III 1.2.3.1 Considerazioni cinetiche

La capacità dell'enzima di degradare molteplici substrati è stata valutata sia da un punto di vista cinetico che strutturale. Sono stati valutati e confrontati i parametri chimico-fisici pH e Temperatura ottimale per i substrati TBBL, paraoxon e il carbossil estere *p*-nitrofenil butanoato (*p*NP-C4). Il massimo di attività catalitica per i tre substrati è risultato uguale per tutti e pari a 8.0. Sono state misurate le curve di termofilia e, come si può vedere dal grafico in **Fig.III.10** l'andamento delle tre curve risulta simile. Questi dati cinetici suggeriscono che le tre attività sono dipendenti dallo stesso sito catalitico.

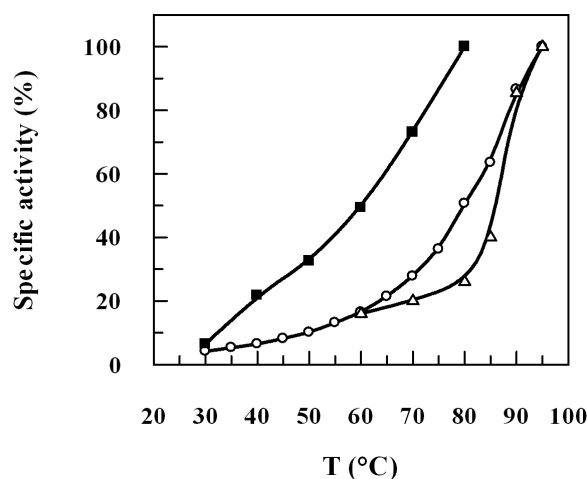


Fig. III.10 Curve dell'attività lattonasica su TBBL (■), fosfotriesterasica su paraoxon (○) e carbossil esterasica su *p*NP-C4 (△).

III 1.2.4.2 Studi strutturali di simulazione di legame

Da un punto di vista strutturale, nota la struttura ottenuta con l'analogo di substrato C10-HTL, è stata fatta una simulazione di legame (II.5.2) con i substrati TBBL e C8HSL per valutare il loro posizionamento nel sito attivo. La curiosità verso questo tipo di informazione è scaturita dalla differenza strutturale dei due substrati lattonici che portano la catena acilica su due carboni differenti dell'anello lattonico (C2, C4), come evidente dalla rappresentazione schematica di **Fig.III.11**.

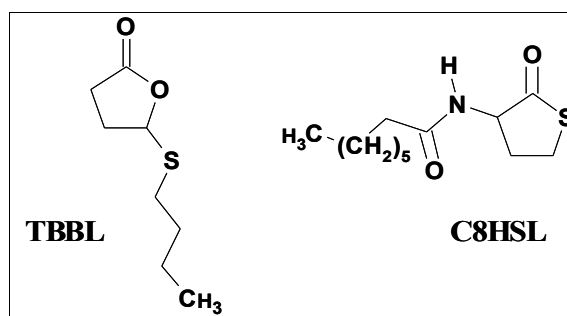


Fig. III.11 Strutture del TBBL e del C8HSL

Sono state ottenute alcune strutture possibili in termini di energia, ma tutte simili fra loro. Quelle scelte sono state valutate per la presenza di legami idrogeno tra il ligando e la proteina e per la ridotta distanza dal centro metallico binucleare ($<3\text{\AA}$) compatibile con un legame di tipo “produttivo”. Come si può vedere dalla **Fig.III.12** che mostra la sovrapposizione delle due proteine ottenute con i due substrati, il C8HSL si accomoda perfettamente nel canale idrofobico come l'analogo C10HTL, mentre il TBBL volge la catena acilica in una tasca completamente differente, separata dal canale idrofobico dalla Phe229. Nel caso dei due lattoni, il posizionamento dell'anello lattonico è completamente invertito, invertendo di conseguenza i ruoli dei due metalli. Il metallo α polarizza nel C8HSL l'ossigeno dell'anello, mentre nel TBBL quello del carbossile, mentre il metallo β fa l'inverso. In entrambi i casi la Tirosina 97 forma un legame idrogeno con uno dei due ossigeni legati al carbonio del centro elettrofilo.

Le distanze di interazione tra ligando e metalli sono tutte intorno a $4\text{\AA}$ ad eccezione della distanza tra l'ossigeno del C8HSL con il metallo β ($2.7\text{\AA}$). Questa ridotta distanza di questi due atomi chiave per la catalisi conferma la differenza strutturale della tasca enzimatica per il

lattone naturale e per quello sintetico.

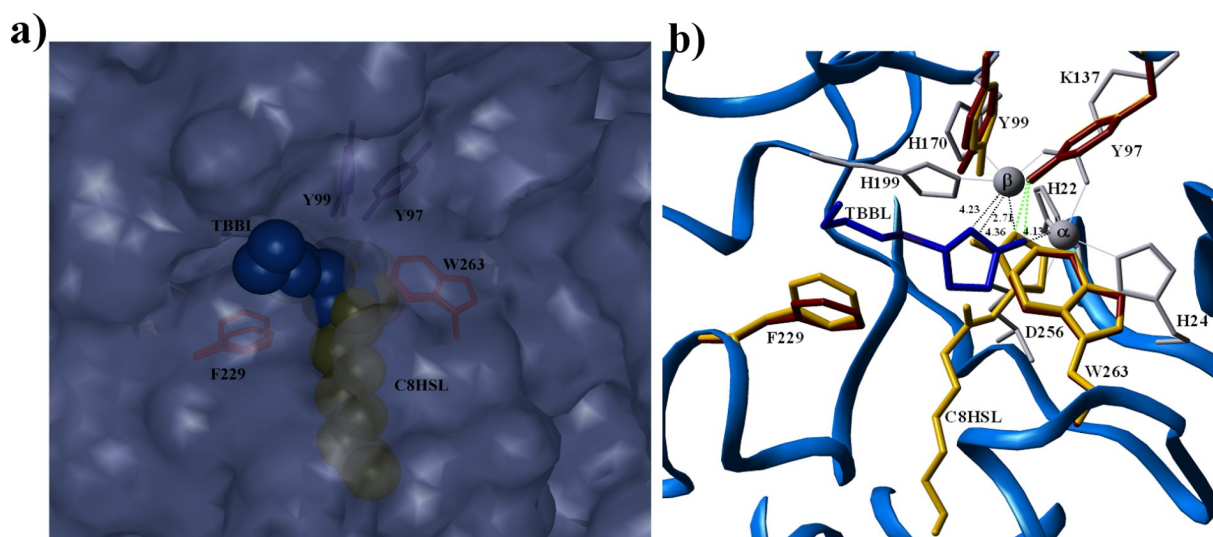


Fig. III.12 Sovrapposizione delle due strutture di *SsoPox* ottenute mediante simulazione di legame (docking) con TBBL e C8HSL mostrando la superficie della proteina (a) e i particolari del sito catalitico con la distanza dai metalli (b).

III 1.2.4 Ruolo nel quorum sensing – *SsoPox* è una lattonasi *quorum quencher*?

Nota l'attività lattonasica di *SsoPox* e ipotizzando un suo potenziale ruolo come *quorum quencher*, per valutare se *Sulfolobus solfataricus* utilizzasse segnali molecolari dettati da un comportamento di gruppo (*quorum sensing*) del tipo omoserina lattoni, sono state allestite crescite di *Sulfolobus solfataricus* in presenza di *SsoPox* ricombinante (esogeno), in modo da valutare se fosse capace di interferire con la crescita dell'archaeon. Questo sarebbe stato un modo indiretto per dimostrare la presenza di lattoni nel mezzo e l'attività di *SsoPox*.

La preparazione della coltura cellulare è descritta nei materiali e metodi (II 1.4). Un inoculo di *SsoMt4* è stato aggiunto al terreno liquido M182 (50mL) e cresciuto a 80°C sotto agitazione. Dopo 16h la coltura è stata diluita in tre parti in modo da avere tre colture alla stessa densità ottica (0.2 O.D.). L'aggiunta dell'enzima *SsoPox* e del controllo, BSA, è avvenuta dopo il primo ciclo di duplicazione cellulare (4 ore), dopo aver opportunamente verificato che la densità ottica di entrambe le colture fosse uguale (0.4OD). Sono stati aggiunti 200µg di proteina e la curva di crescita è stata seguita a prelievi di circa 2h, per quanto possibile, fino a un massimo di 50h (3giorni). Le proteine sono state aggiunte ad ogni

prelievo fino ad incubazione di 30 ore. Come si può dedurre facilmente, l'allestimento e la riproducibilità di questo esperimento è complessa, per questo motivo l'esperimento è stato ripetuto diverse volte con colture cellulari indipendenti partendo da spot cellulari diversi, in modo da valutare in maniera quanto più indipendente possibile gli effetti sulle crescite. Il grafico riportato di seguito mostra i valori ottenuti mediando tre esperimenti indipendenti con le relative barre di errore (**Fig.III.13**).

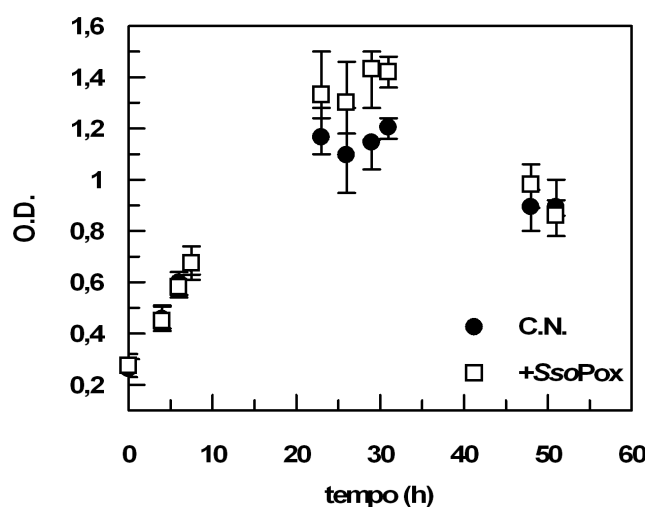


Fig. III.13 Curve di crescita cellulare di *S.solfataricus* in presenza e assenza di *SsoPox*.

Come si può osservare le maggiori differenze si possono osservare a partire dalle 10 ore di crescita di *Sulfolobus*. In particolare mentre la curva del controllo (senza proteine) si mantiene bassa, raggiungendo come O.D. massimo il valore di 1.2, le crescite contenenti *SsoPox* arriva a valori di O.D.=1.5. Le curve si incontrano nuovamente nella fase finale, dove le OD cellulari si abbassano fino a ciclo completato. Che l'incremento osservato nella fase stazionaria sia dovuto all'attività dell'enzima *SsoPox* e non alla presenza di un ulteriore nutriente proteico, sembra essere chiaro, non essendoci lo stesso effetto per le colture contenenti la BSA (controllo negativo). Tuttavia, che l'attività lattonasica su acil-omoserina lattoni sia effettivamente ascrivibile a questi risultati, è forse una conclusione un pò azzardata, essendo *SsoPox* una idrolasi con funzioni promiscue di vario genere (anche carbossil esterasica), che quindi è capace di idrolizzare anche substrati diversi favorendo così la disponibilità nel mezzo di piccole molecole idrolizzate dall'enzima. Da questo esperimento

non si può quindi accertare la produzione di lattoni perchè l'effetto che vediamo, sebbene riproducibile, è limitato alla crescita (incremento del 20%), non suggerendo così una effettiva interferenza con i meccanismi di replicazione cellulare del microorganismo. Per questo motivo sarà necessaria l'analisi di estratti organici del mezzo di crescita di *Sulfolobus* per avere un test diretto della eventuale presenza di lattoni nel mezzo.

III 2 EVOLUZIONE DELL'ATTIVITÀ FOSFOTRIESTERASICA DI *SsoPox*

Per studiare la promiscuità catalitica di *SsoPox* nei confronti dei fosfotriesteri e utilizzarla come punto di partenza per la sua evoluzione, sono stati intrapresi diversi approcci mutagenici per incrementare l'attività dell'enzima senza compromettere la sua termostabilità, una proprietà di notevole interesse per qualsivoglia applicazione. Tutte le varianti enzimatiche di interesse ottenute sono state analizzate per sequenza, e le corrispondenti proteine, espresse e purificate all'omogeneità, caratterizzate cineticamente.

III 2.1 Produzione di varianti enzimatiche

Gli approcci utilizzati per la produzione di varianti del gene *SsoPox* sono stati: mutagenesi sito-diretta, mutagenesi casuale e mutagenesi diretta alla produzione di un ibrido *SsoPox-pPTE* chiamato SyntPox.

III 2.1.1 Mutagenesi sito-diretta

La mutagenesi sito-diretta fa parte di quello che si definisce l'approccio “razionale” dell'evoluzione molecolare di attività enzimatiche, in quanto prevede la conoscenza di proteine omologhe alla proteina di interesse e la modificazione di quest'ultima in base alla loro comparazione a livello di sequenza o struttura.

Essendo stato ampiamente caratterizzato l'enzima PTE da *P.diminuta*, ed essendo stati fatti su di esso molti studi di mutagenesi, mediante allineamento di sequenza amminoacidica primaria, è stato possibile verificare similitudini e diversità di queste due proteine.

Come già descritto nell'introduzione, le due proteine condividono solo il 30% di identità di sequenza, tuttavia alcuni residui importanti e caratteristici del *fold* sono conservati, come i residui deputati al legame ai metalli del sito attivo.

Da dati riportati in letteratura, sono stati identificati dei residui chiave per l'attività di *pPTE*,

non presenti in *SsoPox*, in particolare il residuo H256 e un gruppo di residui localizzati nella regione del gruppo uscente (Aubert SD, 2004).

Il residuo His 256 è riportato essere coinvolto in *pPTE* in un trasferimento protonico durante la catalisi. L'istidina, in questo caso, funziona in cooperazione con due Aspartici (202 e 256) e fungerebbe da donatore/accettore di un protone (Aubert SD, 2004). In *SsoPox* i due aspartici sono conservati (Asp233 e Asp301), mentre, secondo l'allineamento di sequenza, l'His è sostituita da un'arginina (R223) (Fig.I.10). Ipotizzando che il meccanismo d'azione sul paraoxon fosse simile per *SsoPox* rispetto alla *PTE*, si è proceduto alla produzione del mutante R223H. La procedura adottata, come descritto dettagliatamente nel paragrafo II.2.2.2.2, ha previsto l'amplificazione dell'intero plasmide (pT7-7*ssopoxwt*) utilizzando due oligonucleotidi complementari che portavano nella loro sequenza la modifica del codone della arginina con quello della istidina. Il prodotto di amplificazione così ottenuto è stato purificato dallo stampo metilato (*ssopoxwt*) e, dopo verifica per analisi di sequenza, utilizzato per la produzione dell'enzima ricombinante.

Analogamente un'altra regione è risultata importante ai fini della catalisi di *P.diminuta* *PTE*. Questa regione è quella deputata alla interazione con il gruppo uscente dell'organofosfato, e consta, in *pPTE*, di una serie di residui di natura idrofobica importanti per la specificità di substrato. Infatti, studi di mutagenesi in questa regione provocavano sempre alterazione di specificità sul paraoxon (Watkins LM, 1997). In particolare fanno parte della regione i residui W131, F132, F306, Y309 in *pPTE*. In *SsoPox* questi residui corrispondono a Y97, I98, I261, W263. Come si può osservare le uniche posizioni conservate (amminoacidi di natura idrofobica) tra *SsoPox* e *pPTE* sono la posizione 97 (Y_{Pox}/W_{PTE}) e la 263 (W_{Pox}/Y_{PTE}). Quest'ultimo, in particolare, non è stato preso in considerazione negli studi di mutagenesi sito diretta in quanto dati di letteratura su mutagenesi di *pPTE*Y309 non ne evidenziavano un importante ruolo (Aubert SD, 2004). Per quel che riguarda invece la posizione 97 dall'analisi della struttura per diffrazione ai raggi X di *pPTE* complessata con un inibitore (Raushel FM, 2002), e da esperimenti di mutagenesi sito diretta su vari residui coinvolti nella specificità di substrato (Watkins LM, 1997) è emerso che il triptofano 131 in *pPTE* ha un ruolo nella definizione della tasca 3 del sito attivo, quella dove alloggia il gruppo uscente del substrato.

Nel laboratorio dove ho svolto il seguente lavoro di tesi la produzione di 7 mutanti contenenti le altre tre mutazioni (97-98-261 per la produzione di 3 singoli, 3 doppi, e uno triplo) è stato

oggetto di un altro lavoro di tesi. Di seguito richiamerò solo al mutante Y97W per il quale ho condotto un'ulteriore caratterizzazione cinetica.

III 2.1.2 Mutagenesi casuale

La mutagenesi casuale (o *random*) si colloca nell'ambito di un approccio di "evoluzione guidata" di un enzima *in vitro*, il cui obiettivo è quello di introdurre mutazioni casuali progressive nel gene di interesse che comportino sostituzioni vantaggiose a livello amminoacidico, in grado cioè di migliorare una o più proprietà della proteina.

Per ottenere una libreria di cloni modificati del gene *ssopox*, è stato utilizzato il metodo di mutagenesi *epPCR* (II.2.2.2.1) a partire dallo stampo *pT7-7ssopoxwt*. Dal primo ciclo di evoluzione molecolare, dall'analisi di circa 200 cloni, è stato isolato un clone che mostrava un'attività catalitica su paraoxon (*saggio standard* II.3.2.2) doppia rispetto alla proteina wild-type, nelle condizioni di saggio utilizzate. Questa prima analisi dell'attività è stata condotta a temperatura ambiente. Il DNA del clone scelto è stato estratto e l'analisi di sequenza ha rivelato una mutazione A→G (AUG→GUG) che comportava, nella sequenza amminoacidica, la sostituzione della metionina 79 con una valina. Tale variante è stata indicata come M79V.

Analisi preliminari su estratti totali di cellule trasformate con il clone *ssopoxM79V*, mostravano una temperatura ottimale a valori più bassi dell'enzima *wt*. Per questo motivo, nel successivo passaggio di evoluzione molecolare, l'analisi dell'attività è stata condotta a temperature più alte (65°C).

Nel dettaglio, il DNA plasmidico corrispondente al primo passaggio ottenuto, *pT7-7poxM79V*, è stato sottoposto ad un secondo ciclo di evoluzione molecolare al fine di aggiungere ulteriori mutazioni casuali significative, non silenti, nel gene. Ripetendo le stesse procedure, dopo aver analizzato circa 300 nuovi cloni, è stata identificata una seconda variante dell'enzima che sembrava più attiva del *wt* di circa 3 volte. L'analisi per sequenza di questo clone ha evidenziato che, in aggiunta alla prima mutazione, ne erano presenti due (TGG→CAG), che comportavano, a livello amminoacidico, la sostituzione del triptofano 263 con una glutammina. Tale variante è stata denominata M79V-W263Q.

Per valutare il contributo specifico della mutazione W263Q apportato all'enzima M79V-W263Q, tale mutazione è stata separata dalla prima. Nel dettaglio, il vettore *pT7-7poxM79V-W263Q* è stato digerito con l'enzima di restrizione *PstI* (II 2.1.7), che in due tagli specifici, a

420bp nel gene e uno esterno sul *polylinker*, genera due frammenti, di cui uno contenente la mutazione desiderata (W263Q). Tale frammento di DNA è stato purificato tramite estrazione da gel d'agarosio (II 2.1.5) e inserito, mediante reazione catalizzata da DNA ligasi (II 2.1.9), nel vettore pT7-7*poxwt* digerito precedentemente con lo stesso enzima di restrizione.

Tutte le proteine corrispondenti ai cloni isolati ottenuti con questa tecnica sono state prodotte in *E.coli*, purificate all'omogeneità (III 2.2) e caratterizzate per valutarne le proprietà cinetiche (III 2.3).

III 2.1.3 Mutagenesi di saturazione

Al fine di ottimizzare il residuo amminoacidico nella posizione 263 di *ssopox*, si è proceduto all'approccio di mutagenesi di saturazione su quella posizione. Utilizzando la procedura descritta nella parte sperimentale, e operando lo stesso tipo di analisi dei cloni ricombinanti ottenuti, dopo un'analisi di 300 cloni, numero capace di garantire la copertura di tutte le possibili triplette in quella posizione ($\sim 5 \times 64$ codoni), sono stati isolati due cloni che mostravano un marcato incremento dell'attività paraoxonastica nelle condizioni di saggio (5 e 10 volte il *wt*). I cloni così isolati sono stati sottoposti a sequenziamento rivelando in quella posizione una leucina (W263L) o una fenilalanina (W263F). Poiché l'incremento d'attività nel caso del mutante W263F era molto più marcato, si è pensato di focalizzare l'attenzione sulla caratterizzazione di questo mutante anche per i successivi approcci di ricombinazione sito diretta.

III.2.1.4 Ricombinazione sito-diretta

Con l'obiettivo di valutare l'eventuale effetto additivo delle mutazioni provenienti dalla mutagenesi sito diretta e da quella casuale, i migliori cloni ottenuti dalle due tecniche sono stati ricombinati per ottenere due doppi mutanti. In particolare, i cloni *pT7-7ssopoxW263Q* e *pT7-7ssopoxW263F* sono stati ricombinati con il clone *pT7-7ssopoxY97W* ottenendo i due cloni *pT7-7ssopoxY97W-W263Q* e *pT7-7ssopoxY97W-W263F*. Per ottenere questi doppi mutanti la procedura utilizzata è stata sostanzialmente simile a quella adottata per separare le mutazioni nella mutagenesi casuale. In dettaglio i cloni *pT7-7ssopoxY97W-W263Q/F* sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *PstI* (che determina un taglio nel gene a 420bp e uno esterno sul *polylinker*), al fine di recuperare i frammenti contenenti le mutazioni desiderate da 500bp (*W263Q/W263F*). Tali frammenti di DNA sono stati purificati e inseriti, mediante

reazione di ligasi, nel vettore pT7-7poxY97W digerito precedentemente con lo stesso enzima di restrizione.

III 2.1.5 Produzione di una chimera

Nota la struttura terziaria dell'enzima *SsoPox*_{wt} sulla base della sovrapposizione strutturale di *SsoPox* con *pPTE*, e sulla base di modelli strutturali ottenuti in presenza di analoghi di substrato, abbiamo individuato 5 regioni da mutare nella proteina termofilica, corrispondenti a 14 residui amminoacidici in diretto contatto con l'analogo di substrato C10HTL.

Le sostituzioni erano in termini di amminoacidi uguali a quelli della *pPTE* o di tipo conservativo, come riportato di seguito (**Fig.III.14**).

Le sostituzioni progettate erano in grado sostanzialmente di aumentare il raggio di apertura dell'ingresso al substrato che, come si evince dal confronto delle superfici di ingresso delle due proteine, immagine gentilmente fornita da Elias M., è più ampio in *pPTE* che in *SsoPox* (**Fig.III.15**). Tali sostituzioni vanno ad interferire sostanzialmente con il legame al substrato, minimizzando, quindi, l'effetto sulla termostabilità dell'enzima dovuto sostanzialmente ad interazioni di cariche di superficie.

<i>SsoPox</i>	MRIPLVGKDS	IESKDIGFTL	IHEHLRVFSE	AVRQQWPHLY
<i>SyntPox</i>	MRIPLVGKDS	IESKDIGFTL	IHEHLRAFSE	AVRQQWPHLY
<i>SsoPox</i>	NEDEEFRNAV	NEVKRAMQFG	VKTIVDPTVM	GLGRDPTVMG
<i>SyntPox</i>	NEDEEFRNAV	NEVKRAMQFG	VKTIVDV SVM	GIGRDVSVMG
<i>SsoPox</i>	LGRDIRFMEK	VVKATGINLV	AGTGIYIYID	LPFYFLNRSI
<i>SyntPox</i>	IGRDIRFMEK	VVKATGINLV	AGTGIIWIFID	LPFYFLNRSI
<i>SsoPox</i>	DEIADLFIHD	IKEGIQGTIN	KAGFVKIAAD	EPGITKDVEK
<i>SyntPox</i>	DEIADLFIHD	IKEGIQGTIN	KAGFVKIAAT	EPGITKDVEK
<i>SsoPox</i>	VIRAAAIANK	ETKVPIITHS	NAHNNTGLEQ	QRILTEEGVD
<i>SyntPox</i>	VIRAAAIANK	ETKVPIITHS	NAHNNTGLEQ	QRILTEEGVD
<i>SsoPox</i>	PGKILIGHLG	DTDNIDYIKK	IADKGSFIGL	DRYGLDLFLP
<i>SyntPox</i>	PGKILIGHLG	DTDNIDYIKK	IADKGSFIGL	DHFPHDL SLP
<i>SsoPox</i>	VDKRNETTLR	LIKDGYSKI	MISHDYCCTI	DWG TAKPEYK
<i>SyntPox</i>	VDKRNETTLR	LIKDGYSKI	MISHDY LCTF	DAG TAKPEYK
<i>SsoPox</i>	PKLAPRWSIT	LIFEDTIPFL	KREDTIPFLK	RNGVN EEVIA
<i>SyntPox</i>	PKLAPRISIT	LIFEDTIPFL	KREDTIPFLK	RNGVN EEVIA
<i>SsoPox</i>	TIFKENPKKF	FS	stop	
<i>SyntPox</i>	TIFKENPKKF	FS	stop	

Fig.III.14 Allineamento tra *SsoPox* e SyntPox. In grassetto sono riportati i residui mutati

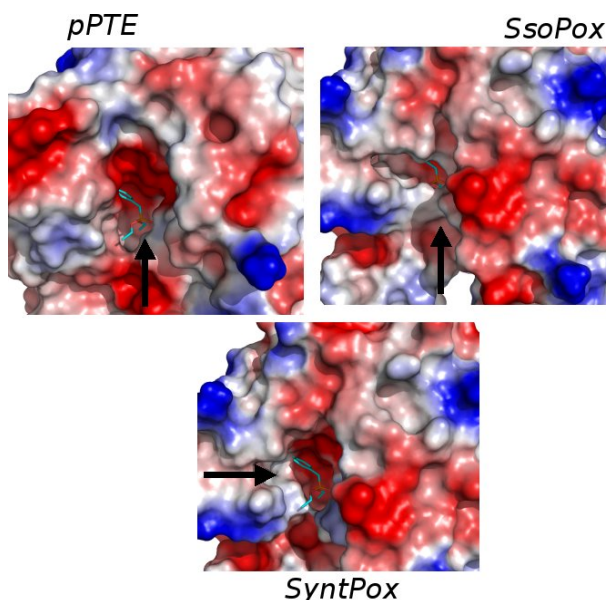


Fig.III.15: Particolari delle superfici di *pPTE*, *SsoPox* e modello di *SyntPox*. Le frecce indicano l'accesso al substrato

La strategia adottata per ottenere SyntPox, ha previsto la costruzione dell'intero gene desiderato a partire da 14 oligonucleotidi di circa 90bp che riportavano nelle loro sequenze le mutazioni desiderate. Gli oligonucleotidi sono stati progettati in modo da ricostituire i due filamenti del gene per appaiamento alternato di 25bp. La strategia di costruzione del gene è riportata nel paragrafo II.2.2.2.3 e in Fig. II.1.

Sono state condotte diverse prove di amplificazione genica al fine di ottenere la costruzione dell'intero gene. La procedura finale che ha comportato la corretta amplificazione di tutto il gene d'interesse schematicamente ha previsto 4 stadi: 1- Completamento a due a due degli oligonucleotidi mediante una reazione di amplificazione a due cicli, in modo da eliminare tutte le sequenze a singolo filamento e ottenere doppi filamenti di circa 150bp; 2-Digestione con *Dnase I* dei doppietti ottenuti; 3-Ricostruzione dell'intero gene con tutti i prodotti della *Dnase I*; 4- Amplificazione finale. In questo modo si è riusciti a ricostituire l'intero gene e a verificarne la ricostituzione mediante analisi di sequenza.

Esperimenti condotti provando ad amplificare tutti gli oligonucleotidi assieme (a diverse

condizioni di temperatura di annealing e amplificazione) comportavano sempre o la parziale amplificazione, o la formazione di un prodotto a peso molecolare corretto ma che risultava, per analisi di sequenza, contenente diverse modificazioni. Analizzando il gene di *ssopox*, sono state identificate diverse sequenze ripetute nella regione del gene intorno a 700-850bp, corrispondenti alla parte che riportava il maggior numero di mutazioni non volute.

Per questo motivo si è pensato di adottare la differente strategia descritta sopra che ha previsto una riduzione della taglia degli oligo nucleotidi in modo da incrementare la specificità di legame.

L'amplificato così ottenuto è stato digerito con gli opportuni enzimi di restrizione e inserito nel vettore di espressione pT7-7 al fine d'ottenere, mediante reazione di ligasi, il costrutto pT7-7*syntpox*.

III 2.1.6 Ricombinazione di SyntPox con *SsoPoxwt*

Per eliminare le mutazioni svantaggiose a livello amminoacidico nella proteina SyntPox, si è pensato di adottare la tecnica del DNA StEP (Staggered Extension Process) in quanto l'identità di sequenza dei due stampi da ricombinare (il gene sintetico ed il wt) è maggiore di 80%. In altro caso, infatti, sarebbe stata più opportuna una ricombinazione mediante DNA shuffling. La ricombinazione con la procedura scelta avviene durante lo stesso ciclo di amplificazione dove i frammenti di nuova sintesi si appaiano indistintamente sui due stampi. Il ciclo di amplificazione che è stato utilizzato per ricombinare in modo efficiente i due stampi non ha previsto la fase di amplificazione, ma solo denaturazione ($94^{\circ}\text{C} \times 30''$) e rapido appaiamento ($55^{\circ}\text{C} \times 1''$), un ciclo ripetuto 50 volte (II 2.2.2.4). In questo modo la polimerasi amplifica solo nel tempo che va dalla denaturazione all'appaiamento e viceversa, un tempo stimato, per la strumentazione utilizzata, di circa 10-15" (velocità di riscaldamento/raffreddamento $3^{\circ}\text{C}/\text{sec}$). I rapporti molari scelti tra stampo *ssopoxwt* e *syntpox* sono stati di 2:1, in modo da favorire la retroversione delle mutazioni. Dopo questa amplificazione una banda a circa 1000bp era ben visibile su gel di agarosio. Gli stampi sono stati quindi eliminati per digestione enzimatica con *DpnI* e una successiva fase di amplificazione è seguita per incrementare il prodotto della reazione di ricombinazione. Il frammento da 940bp ottenuto è stato così purificato da gel, digerito con gli opportuni enzimi

di restrizione (*NdeI* e *EcoRI*), purificato e inserito, mediante reazione catalizzata da DNA ligasi (II 2.1.9), nel vettore di espressione pT7-7 digerito con gli stessi enzimi. Il prodotto della reazione di ligasi così ottenuto è stato direttamente trasformato in cellule competenti per l'elettroporazione (II 1.6) e i cloni ottenuti (circa 1000/ μ L DNA) analizzati per attività fosfotriesterasica su piastre a multipozzetto, come descritto nella sezione sperimentale (II 2.2.4).

Dall'analisi di 2000 cloni solo 50, circa, mostravano attività maggiore di almeno 4-5 volte il controllo *wt*, e solo 5 attività maggiore o uguale al controllo W263F. Come ulteriore controllo sono state aggiunte nelle piastre analizzate anche cellule trasformate con il plasmide pT7-7-*syntpox* che mostravano un'attività pari a circa la metà della corrispondente attività registrata per il *wt*. I saggi d'attività sono stati condotti ad alte temperature, proprio per recuperare le proprietà di termofilia perse dalla proteina SyntPox contenente le 14 mutazioni.

I cloni scelti per le proprietà di incrementata attività paraoxonasica ad alte temperature sono stati: poxV27A, poxV27A-D141T, poxD141T, poxC258L-I261F-W263A, poxV27A-Y97W-Y99F. Alcuni di questi cloni sono stati isolati due o tre volte.

Le condizioni di amplificazione/ricombinazione per DNASTEP scelte erano tali da non poter ricombinare mutazioni vicine tra loro (II.2.2.2.4). Questo perché nella reazione di amplificazione è stata utilizzata una DNA polimerasi con attività esonucleasica 3'-5' che, laddove ci fosse stato un appaiamento non perfetto (come nel caso di appaiamento di due mutazioni vicine sullo stampo che non le conteneva), prima di procedere all'amplificazione, procedeva con una correzione dovuta all'attività esonucleasica. Questo fatto da un lato, limitando il numero di combinazioni possibili dei mutanti ottenibili, ci ha permesso di valutare quali regioni sono importanti per l'attività, dall'altro, ovviamente, non ha consentito un'analisi completa dei contributi dei singoli amminoacidi. Il numero di "regioni" mutate del gene da ricombinare da 14 si è ridotto a 7. Quindi il numero di combinazioni possibili è risultato 7!, cioè 5040. Per avere un numero rappresentativo che ragionevolmente coprisse tutti i possibili cloni, generalmente si considera $3 \times n^{\circ}$ combinazioni (circa 15000 cloni). Durante il corso di questo studio è stato possibile analizzare fino a 3000 cloni. E' interessante notare però che la mutazione V27A è risultata e scelta come sostituzione vantaggiosa per 5/12 cloni scelti, sia come singola mutazione che in combinazione con altre. Le regioni contenenti,

invece, le mutazioni P67V-T68S-L72I e R223H-Y224F-G225P-L226H-F229S non sono mai state isolate. Ovviamente non essendo stato possibile condurre un'analisi che fosse rappresentativa, non è detto che queste varianti siano state mai analizzate. Tuttavia, da mutagenesi sito diretta, sappiamo che la sola modifica R223H comporta un crollo sostanziale dell'attività. Inoltre, in questo caso, 5 mutazioni in questa regione potrebbero interferire sulla stabilità della proteina.

Poiché rispetto al mutante W263F, il clone contenente la tripla mutazione, poxC258L-I261F-W263A, possedeva l'attività enzimatica più significativa, si è scelto, in prima analisi, di dedicarsi alla purificazione e caratterizzazione di questo clone.

III 2.2 Purificazione delle varianti enzimatiche

Questa sezione si suddivide a sua volta in due parti: **(2.2.1)** dedicata alla purificazione delle forme mutate di *SsoPox* provenienti da mutagenesi sito diretta, mutagenesi casuale e loro combinazione; e **(2.2.2)** dedicata alla produzione della proteina SyntPox e alla variante da essa derivata PoxC258L-I261F-W263A.

III 2.2.1 Varianti casuali, sito dirette e loro combinazione

Le forme mutate di *SsoPox* sono state purificate all'omogeneità come riportato in “Materiali e Metodi” (II 3.1), mediante una combinazione di termoprecipitazione, separazione per cromatografia a scambio anionico, e cromatografia ad esclusione molecolare.

Il primo passaggio di purificazione, ovvero la termoprecipitazione del lisato cellulare, si è potuto effettuare grazie alla peculiare proprietà della proteina da *S. solfataricus* di essere stabile e solubile in seguito a trattamento al calore (II 3.1.4). Considerando che la proteina *SsoPox wt* è completamente stabile e solubile dopo incubazione per 4h a 85°C (Merone L, 2005), si è proceduto a termoprecipitazioni successive del lisato cellulare di ciascuna proteina con singole mutazione a 60, 70 e 80°C, pensando che conservassero le stesse proprietà del *wt*; ciò è stato verificato effettuando prove preliminari su piccoli campioni di ciascun lisato. Per i mutanti doppi, sono stati eseguiti solo due passaggi di termoprecipitazione, a 60 e 70°C. Tramite i suddetti passaggi, è stata allontanata la maggior parte delle proteine di *E. coli* (cellula ospite usata per l'espressione eterologa della proteina *SsoPox*), le quali si denaturano

alle alte temperature e precipitano. La frazione solubile ottenuta dall'ultimo trattamento al calore, è stata sottoposta a separazione mediante cromatografia a scambio anionico (II.3.1.5). Tale resina presenta cariche positive e consente il legame di ciascuna proteina *SsoPox* che, avendo un pI intorno a 6.5 (considerato che per *SsoPox wt* il pI=6.5), nel tampone usato è carica negativamente. La proteina di interesse quindi, dopo essersi legata alla resina, è stata eluita con un gradiente lineare crescente di NaCl. Per l'ultimo passaggio di purificazione è stata effettuata una cromatografia ad esclusione molecolare che permette la separazione di proteine in base alla loro massa (II 3.1.6.). Tutte le proteine mutate di interesse venivano eluite ad un volume di 60 ml, corrispondente ad una massa molecolare di 50 kDa, come si osserva per la proteina *wt* (Merone L, 2005). Le frazioni cromatografiche che mostravano attività enzimatica nelle condizioni di saggio *standard* (II 3.2.2), sono state riunite ed eventualmente concentrate.

Le proteine *SsoPox* mutate sono state purificate all'omogeneità mediante la procedura appena descritta, e la loro purezza è stata verificata tramite analisi elettroforetica in condizioni denaturanti su gel di poliacrilammide 15% (*SDS-PAGE*) (II 3.1.7).

III 2.2.2 Variante SyntPox e PoxC258L-I261F-W263A

Le procedure di espressione e purificazione di SyntPox sono state essenzialmente quelle descritte per gli altri enzimi mutanti ottenuti in questo capitolo, con la differenza che, in questo caso, il passaggio di termoprecipitazione è stato eseguito solo a 50° e 60°C. Analogamente a quanto descritto, la proteina è stata purificata mediante le due separazioni cromatografiche descritte (III 2.2.1). Durante la procedura di purificazione, l'analisi elettroforetica ha messo in evidenza la progressiva comparsa di bande proteiche a basso peso molecolare, sintomatiche di un progressivo processo di degradazione. Questa ipotesi è stata verificata anche a livello di attività enzimatica, che progressivamente diminuiva nel tempo. Per questo motivo l'enzima SyntPox è stato preparato diverse volte, ma in nessun caso è stato possibile isolarne una conformazione stabile nel tempo. Con la frazione solubile più stabile ottenuta è stato possibile condurre alcune analisi cinetiche.

La produzione del mutante triplo C258L-I261F-W263A è stata condotta nel laboratorio dove è stata eseguita la seguente tesi sperimentale, ma anche nell'istituto francese CNRS dell'Università della Mediterranée presso i laboratori del Prof Chabriere E.

Grazie ad un finanziamento di mobilità (*Short-term mobility*) del CNR, infatti, è stato possibile in tre settimane procedere alla ottimizzare della procedura di espressione e purificazione di questa variante enzimatica poco prodotta (rese con metodo classico 0.5mg/L coltura), al fine ultimo di procedere alla cristallizzazione della proteina. Sono state fatte diverse prove di espressione della proteina di interesse. La procedura di espressione più vantaggiosa è risultata essere quella in cui le cellule di *E.coli* trasformate con il vettore d'interesse sono state cresciute in mezzo AI (*Autoinductor*) (Studier FW, 2005) a 25°C per tutta la notte (II 1.3). In questo modo si è ottenuto l'incremento dell'espressione della proteina con relativo miglioramento nella resa (5mg/L) anche durante le procedure di termoprecipitazione seguite.

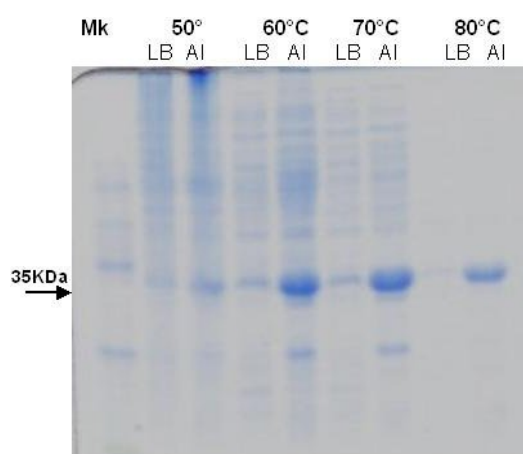


Fig.III.16 SDS Page estratti solubili ottenuti da cellule trasformate con *SsoPox* triplo cresciute in mezzo di coltura LB o in Autoinduttore (AI).

Nella **Fig.III.16** è stata riportata una elettroforesi in condizioni denaturanti in cui è possibile confrontare parallelamente i campioni del mutante triplo ottenuti mediante metodologia classica con quelli ottenuti con il metodo appena descritto.

I passaggi cromatografici successivi sono stati gli stessi descritti per le altre varianti proteiche e hanno consentito una purificazione della proteina d'interesse, valutata mediante SDS-PAGE, di circa il 95%.

III 2.3 Caratterizzazione biochimica dell'attività fosfotriesterasica

Dopo la purificazione, per ciascuna proteina mutata è stata determinata la concentrazione

proteica, le rispettive condizioni di pH e temperatura ottimali, la stabilità enzimatica alle alte temperature e la specificità di substrato. Per chiarezza espositiva dei risultati ottenuti, si è ritenuto opportuno, anche in questo caso, suddividere questo paragrafo in due sotto-paragrafi: l'uno (2.3.1) riguardante i mutanti provenienti dagli studi di evoluzione molecolare e l'altro (2.3.2) riguardante esclusivamente i dati relativi all'enzima SyntPox e al suo derivato C258L-I261F-W263A.

III 2.3.1 Varianti casuali, sito dirette e loro combinazione

III 2.3.1.1 Determinazione pH e temperatura ottimale

La dipendenza dell'attività enzimatica dal pH è stata valutata utilizzando come substrato il pesticida paraoxon, ad una temperatura di 70°C, nelle condizioni di saggio descritte precedentemente (II.3.2.2).

I valori di pH ottimale per ciascun enzima sono riportati nella **Tabella III.2** riassuntiva. Rispetto alla proteina *SsoPox wt*, le proteine mutate M79V e M79V-W263Q, W263Q, W263F e Y97W-W263Q hanno tutte un $pH_{ott}=8.0 - 8.5$ come quello dell'enzima *wt*, mentre per Y97W il pH ottimale è 7.5 e per R223H è 9.5. La temperatura ottimale di ciascun enzima è stata stimata seguendo la dipendenza dell'attività dalla temperatura della miscela di saggio, nell'intervallo compreso tra 30 e 95°C, utilizzando il paraoxon come substrato (II.3.2.2) nelle condizioni di tampone e pH ottimali per ciascuna variante enzimatica.

Generalmente si osserva un graduale aumento dell'attività all'aumentare della temperatura, dovuto al variare della costante cinetica secondo l'equazione di Arrhenius, seguito da un crollo causato dalla denaturazione e/o dalla sensibilità di determinati parametri cinetici alla temperatura. Per *SsoPox wild-type*, l'attività catalitica continua a crescere fino a 95°C (Merone L, 2005).

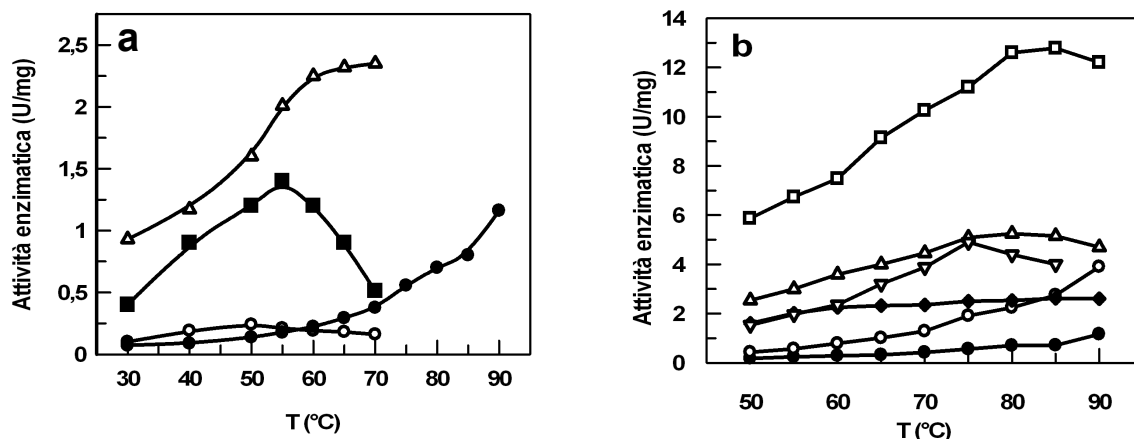


Fig. III.16. Curve di termofilia di: **a)** wt(●), M79V (○), W263Q (■), M79V-W263Q (△); **b)** wt(●), Y97W(○), W263Q(◆), W263F(□), Y97W-W263Q(△), Y97W-W263F(▽).

Nel caso delle varianti mutate, solo in due casi l'andamento risulta simile a quello registrato per l'enzima *wt*: Y97W e W263Q. Per tutti gli altri casi osserviamo massimi di attività e andamenti differenti all'aumentare della temperatura. In **Fig.III.16** sono mostrati tutti i profili di termofilia ottenuti. I valori di pH e temperatura ottimale per ciascun enzima mutato sono riportati nella tabella riassuntiva insieme all'attività registrata con saggio d'attività standard su paraoxon (II.3.2.2).

Le varianti più interessanti da un punto di vista della termofilia e delle attività cinetiche sono state ulteriormente caratterizzate per valutare i parametri cinetici (k_{cat} , K_M) e termostabilità cinetica.

E' interessante notare che l'effetto della mutazione M79V rappresenta un caso di epistasi fenotipica, dove il ruolo negativo della mutazione (abbassamento della termofilia) predomina nel doppio mutante (W263Q-M79V) mascherando l'effetto positivo della singola mutazione W263Q (**Fig.III.16a**). Il valore di termofilia ottenuto per questa variante singola è perfettamente in linea con le temperature di esercizio del primo ciclo di mutagenesi (temperatura ambiente) rispetto alle quali l'enzima mostrava attività più elevata rispetto al *wt*.

Tabella III.2 Parametri pH e T ottimali e attività misurata con saggio standard

Variante di <i>SsoPox</i>	pH _{ott}	T _{ott} (°C)	U/mg
<i>wt</i>	8.0-8.5	≥ 90	0.420 ± 0.02

M79V	8.5	50	0.16 ± 0.03
Y97W	7.5	≥ 90	1.19 ± 0.08
W263Q	8.0	≥ 90	2.20 ± 0.12
W263F	8.0-8.5	85	12.8 ± 0.3
R223H	9.5	65	0.037 ± 0.006
M79V-W263Q	8.5	55	0.51 ± 0.06
Y97W-W263Q	8.5	85	4.3 ± 0.4
Y97W-W263F	8.0	75	4.9 ± 0.3

La variante PoxR223H mostra un abbassamento della termofilia, accompagnato da un sostanziale incremento del pH ottimale con valori di attività calcolati mediante *saggio standard* (II.3.2.2) di 10 volte più bassi dell'enzima *wt*. Tutto ciò suggerisce che questa posizione (223) in *SsoPox* è fondamentale, la sua modificazione causa drammatici effetti sulla catalisi.

Tutti gli enzimi ottenuti per mutagenesi sito-diretta e casuale nelle posizioni 97 e 263 mostrano pH ottimale e profili di attività vs la temperatura simili all'enzima non modificato. In termini di attività tutti risultano in incrementi sostanziali (da 3 a 30 volte circa) suggerendo che queste due posizioni sono fondamentali per l'incremento dell'attività, come ampiamente discusso nei paragrafi successivi dove si analizzano i dati relativi alle curve cinetiche.

III 2.3.1.2 Determinazione dei parametri cinetici

Dei mutanti più interessanti ottenuti per mutagenesi casuale e sito diretta sono stati valutati i parametri cinetici verso il substrato paraoxon. I parametri cinetici ottenuti sono riassunti nella tabella (Tab.III.3)

Tabella3. Parametri cinetici di diverse varianti enzimatiche di *SsoPox* sul paraoxon

<i>SsoPox</i> enzimi	k_{cat}	K_M	$s=k_{cat}/K_M$	s_{mut}/s_{wt}
	(s^{-1})	(μM)	($s^{-1} mM^{-1}$)	
<i>wt</i>	0.24 ± 0.01	64 ± 10	3.75 ± 0.45	1
R223H^a	n.d.	n.d.	0.0037 ± 0.0002	0.001

Y97W	0.68 ± 0.04	75 ± 7	9.00 ± 0.30	2.4
W263Q^a	n.d.	n.d.	1.07 ± 0.03	0.3
W263F^b	3.76 ± 0.14	192 ± 26	19.7 ± 3.4	5.3
Y97W/W263Q	n.d.	n.d.	2.20 ± 0.02	0.6
Y97W/W263F^b	1.63 ± 0.18	272 ± 51	6.02 ± 0.35	1.6

n.d.: non determinabile

^a *s* è stata valutata come pendenza della retta tangente a concentrazioni di [S] <400μM poiché la curva mostrava un andamento lineare e crescente fino a 5mM paraoxon.

^b valutata come parametri apparenti fino a 400μM

Il singolo mutante R223H mostra un abbassamento di specificità di 1000 volte rispetto all'enzima non modificato, suggerendo un ruolo cruciale della arginina in quella posizione per la catalisi.

Il singolo mutante Y97W mostra un valore di k_{cat} circa 3 volte maggiore del *wt*, senza sostanziali cambi nel valore di K_M , risultando in un incremento di 3 volte anche sulla specificità (s_{Y97W}/s_{wt}); ciò suggerisce che questa posizione è coinvolta più che nel legame al substrato, nell'idrolisi o nel rilascio dei prodotti.

Riguardo i singoli mutanti nella posizione 263 ottenuta mediante mutagenesi casuale, il singolo mutante W263F risulta la variante migliore, ma effetti attivanti sono stati osservati per tutti i mutanti riportati in questo paragrafo, tuttavia è importante notare che attraverso la mutagenesi di saturazione si è riusciti a incrementare significativamente la specificità verso il paraoxon ($s_{Phe}/s_{Gln}=17.3$). Nel caso del mutante W263Q, la dipendenza dell'attività enzimatica con la concentrazione di paraoxon risultava in un incremento lineare dell'attività, senza riuscire a raggiungere la saturazione dell'enzima fino a valori di concentrazione pari a 5mM. E' stato perciò possibile solo valutare s (k_{cat}/K_M), dalla parte lineare della curva ottenuta in concentrazioni basse di substrato (0-200μM). Il mutante singolo W263F, invece, mostrava un classico profilo della curva di Michaelis-Menten fino a concentrazioni di 400μM, dopo la quale la curva riprendeva a salire con un andamento lineare, suggerendo un effetto attivato dal substrato. Il valore del rapporto s_{mut}/s_{wt} riportato in tabella e il rapporto $k_{cat}^{mut}/k_{cat}^{wt}$ (16volte) sono perciò sicuramente da considerarsi sottostimati.

Il comportamento di tutte le varianti ottenute in cui era coinvolta la posizione 263, mostravano un coinvolgimento cruciale della posizione 263 nel legame al substrato e nel rilascio del prodotto, un risultato non prevedibile data la letteratura sulla corrispondente

posizione 309 nell'omologo *pPTE*. Infatti il doppio mutante Y97W/W263Q risulta in un incremento dell'attività enzimatica rispetto alle due singole mutazioni, e in un effetto compensativo sulla specificità W263Q. Per il doppio mutante Y97W/W263F osserviamo un abbassamento della specificità rispetto ai singoli mutanti corrispondenti.

III 2.3.1.3 Parametri cinetici di W263F in presenza di SDS

Sono stati valutati i parametri cinetici della variante PoxW263F in presenza di Sodio Dodecil Solfato (SDS - 0.1%) a 25°C e a 70°C. Si è pensato d'analizzare l'attività in presenza di questo detergente perché dati preliminari condotti su estratti cellulari di cellule trasformate con l'enzima non modificato e con questa variante, risultavano in un effetto attivante dell'attività. La dipendenza dell'attività dalla concentrazione di substrato è stata valutata in un intervallo che va da 25μM a 5mM sia a 25°C che a 70°C. Dalle curve mostrate in **Fig.III.17** si evince chiaramente che l'attivazione dell'attività in presenza del detergente è ascrivibile, in entrambe le temperature, ad un effetto sull'affinità di legame, infatti le curve tendono ad arrivare prima a saturazione.

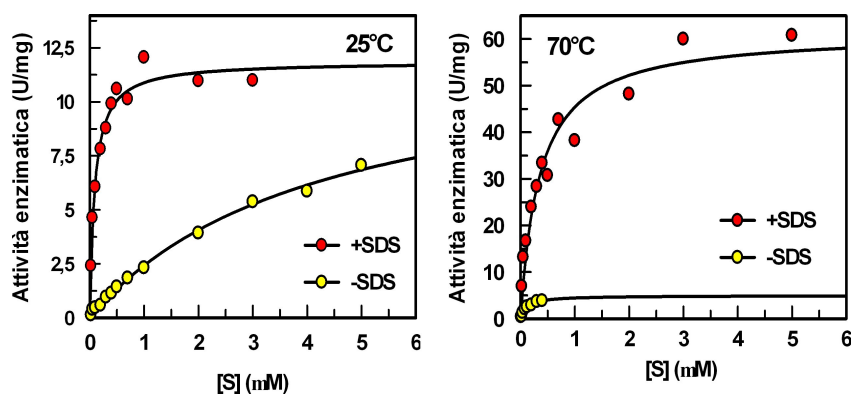


Fig.III.17 Curve di Michaelis-Menten di SsoPoxW263F su paraoxon a 25°C e 70°C in presenza (○-rosso) e assenza (○-giallo) di SDS (0,1%) nel saggio.

La tabella riportata di seguito riassume i parametri cinetici ottenuti estrapolati dall'interpolazione dell'equazione di Michaelis-Menten applicata alle curve mostrate.

Tabella III.4. Parametri cinetici valutati in assenza e in presenza di SDS su paraoxon per W263F

K_M	k_{cat}/K_M	s ($s^{-1}M^{-1}$)
-------	---------------	------------------------

	(μM)	($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	
W263F 25°C	4200 ± 480	1.77 ± 0.32	$\sim 2 \cdot 10^3$
W263F 25°C + SDS	89.73 ± 11.88	78.2 ± 12.3	$\sim 1 \cdot 10^5$
W263F 70°C	192 ± 26	19.7 ± 3.4	$\sim 2 \cdot 10^4$
W263F 70°C + SDS	354.4 ± 65.7	102.7 ± 25.3	$\sim 1 \cdot 10^5$

E' interessante notare che la specificità a 25°C incrementa di circa 50 volte rispetto alla specificità registrata in assenza di SDS, sostanzialmente a carico dell'affinità di substrato, risultando in un miglioramento anche rispetto alle condizioni ottimali di temperatura (70°C) in assenza di detergente. L'effetto attivante del SDS è meno marcato nelle curve ottenute ad alta temperatura (solo 5 volte). Questo probabilmente perché all'effetto positivo e attivante sull'affinità di substrato, si accompagna l'effetto denaturante del detergente che interferisce con la stabilità strutturale, più sensibile ad elevate temperature.

Rispetto all'enzima non modificato, comunque, assistiamo ad un incremento della attività catalitica e della specificità di 150- e 140-volte rispettivamente con SDS a 25°C.

III 2.3.1.4 Caratterizzazione della stabilità termica

Poiché molte delle mutazioni ottenute sono localizzate nel sito attivo dell'enzima, è stata valutata la stabilità alla temperatura come stabilità cinetica, cioè come variazione dell'attività catalitica in seguito ad incubazioni ad elevate temperature. Sono stati valutati i profili di attività residua in funzione della temperatura a 70, 80, 90 e 100°C fino a 4 ore di incubazione. Tutte le proteine mostrano elevata termostabilità, suggerendo che le mutazioni non hanno compromesso significativamente l'impalcatura proteica. I dati relativi ai valori di emivita (*half lifes*) ottenuti alle diverse temperature sono riportati nella tabella (Tabella III.5).

Tabella 5. Termostabilità di varianti di SsoPox a diverse temperature

SsoPox	<i>half life</i> (min)			
	70°C	80°C	90 °C	100 °C
<i>wt</i>	>> 240	> 240	150	30
Y97W	>> 240	> 240	80	10

W263Q	>> 240	> 240	80	10
W263F	200	90	60	15
Y97W/W263Q	>> 240	> 240	120	15
Y97W/W263F	>240	190	30	12

La tabella estrapola in maniera concisa i risultati ottenuti dai profili di attività in dipendenza del tempo riportati in figura (**Fig.III.18**) nei quali è possibile apprezzare l'andamento lineare della inattivazione al calore per tutti i mutanti e per tutte le temperature analizzate, indice, questo, che il processo al quale si assiste è di tipo monomolecolare.

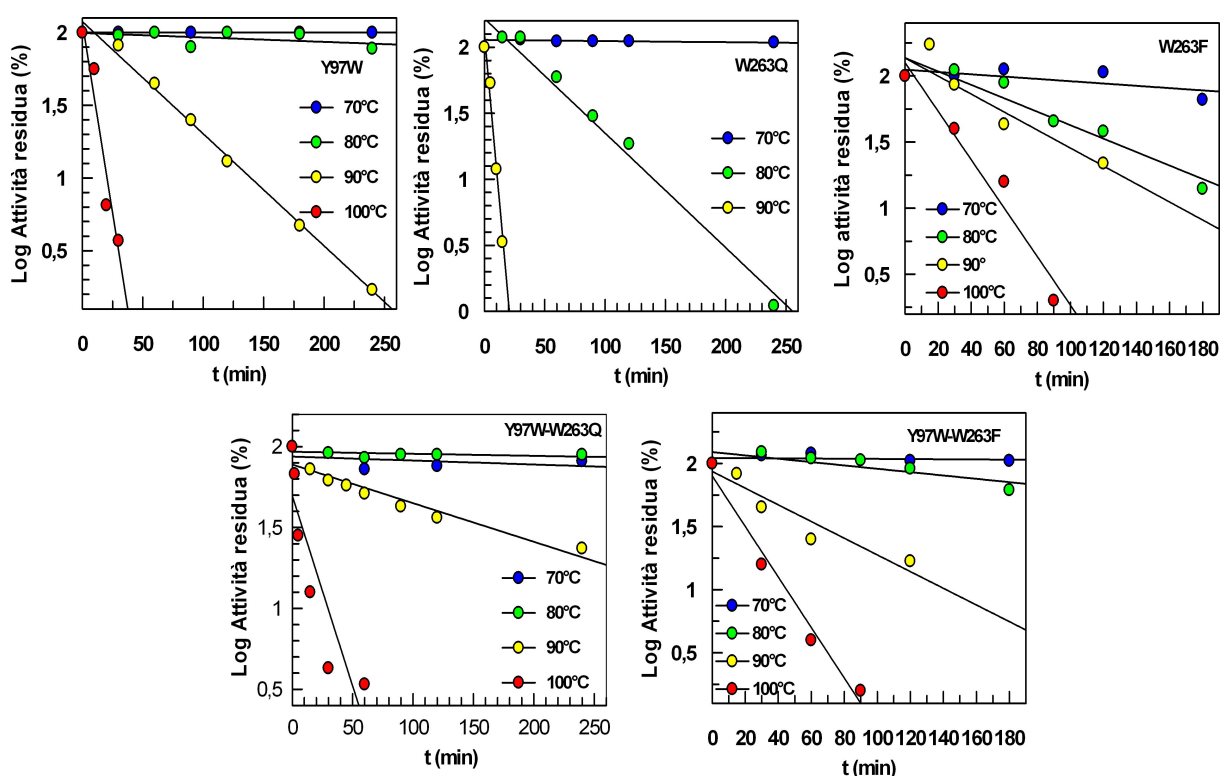


Fig.III.18 Inattivazione alla temperatura valutata come attività residua sul paraoxon dopo incubazioni a diverse temperature e tempi.

III 2.3.2 Variante tripla Pox C258L-I261F-W263A

III 2.3.2.1 Determinazione di pH e temperatura ottimale

La dipendenza dell'attività enzimatica dell'enzima SyntPox e del suo miglior derivato PoxC258L-I261F-W263A è stata valutata utilizzando come substrato il pesticida paraoxon, ad

una temperatura di 60°C, nelle condizioni di saggio descritte precedentemente (II 3.2.2). Il massimo di attività si registra per entrambi a valori di pH pari a 7.5-8.0. La dipendenza dell'attività dalla temperatura è stata valutata nell'intervallo 30-90°C per la variante tripla per la quale è stata rilevata una T ottimale di 65°C (**Fig.III.19**), mentre la temperatura ottimale dell'enzima SyntPox è risultata 50°C. L'attività di SyntPox è risultata dipendente dalla presenza di metalli nella soluzione di saggio.

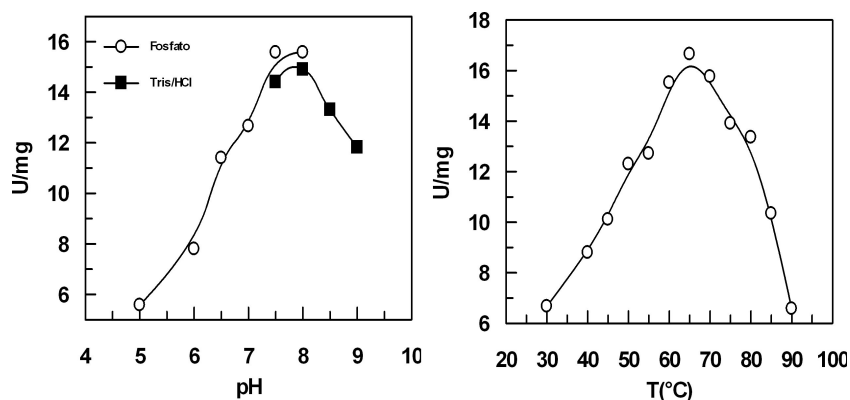


Fig.III.19 Curva di pH e termofilia di *SsoPox* C258L-I261F-W263A

III 2.3.2.2 Determinazione dei parametri cinetici

Data l'elevata instabilità dell'enzima *SyntPox*, non è stato possibile caratterizzarlo ulteriormente, ma i dati cinetici e le successive caratterizzazioni sono state condotte solo per la variante *PoxC258L-I261F-W263A*. In particolare è stata valutata l'attività fosfotriesterasica del triplo mutante sul paraoxon a 65°C in tampone fosfato a pH 7.8. La dipendenza della attività dalla concentrazione è stata valutata da una concentrazione di 25μM fino a 6mM. L'andamento della curva segue l'interpolazione di tipo Michaelis-Menten che ci permette di valutare i parametri cinetici riportati in tabella.

Tabella III. 6. Parametri cinetici su paraoxon per la variante *SsoPox* C258L-I261F-W263A

<i>SsoPox</i>	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	S_{mut}/S_{wt}
<i>wt</i>	0.24 ± 0.01	0.064 ± 0.010	3.75 ± 0.45	1
C258L-I261F-W263A	31.12 ± 2.2	1.52 ± 0.19	20.5 ± 3.9	5.5

Come si può osservare la costante catalitica è aumentata di circa 130 volte rispetto all'enzima non modificato, tuttavia, essendo anche aumentato di 25 volte il valore di K_M , la specificità di substrato risulta in un incremento di circa 6 volte. L'abbassamento dell'affinità di legame è un fenomeno che si ritrova in tutte le varianti in cui è coinvolta la sostituzione nella posizione 263. E' utile ricordare che mediante mutagenesi di saturazione su questa singola posizione è stato possibile incrementare di 17 volte il valore di specificità di substrato sul paraoxon ($s_Q/$

s_F), migliorando sostanzialmente l'affinità di legame. Ciò suggerisce che ulteriori studi di mutagenesi per ottimizzare gli amminoacidi di queste tre posizioni chiave per l'attività sul paraoxon di *SsoPox*, potrebbero risultare in un notevole vantaggio in termini di affinità di legame e quindi di specificità di substrato.

III 2.3.2.3 Parametri cinetici in presenza di SDS

Per valutare se l'affinità di legame al substrato paraoxon potesse essere migliorata con il detergente Sodio Dodecil Solfato, anche per questa variante sono stati valutati i parametri cinetici in presenza di SDS. Dati preliminari condotti ad elevate temperature (65°C) in presenza di SDS, non evidenziavano l'effetto attivante registrato per la variante singola W263F, probabilmente perché l'effetto denaturante dovuto alla presenza dei due fattori, detergente e temperatura, destabilizza la struttura. Per questa ragione, la dipendenza della concentrazione di substrato dall'attività enzimatica è stata condotta solo a 25°C in presenza di tre differenti concentrazioni di SDS (0.01%, 0.05% e 0.1%). Come si può osservare dal grafico (Fig. III.20) e dai valori dei parametri cinetici estrapolati dalle curve interpolate con l'equazione di Michaelis-Menten (Tabella III.7), l'effetto attivante rispetto all'enzima non trattato è limitato (da 3 a 6 volte) se paragonato all'effetto registrato sulla specificità del mutante singolo W263F.

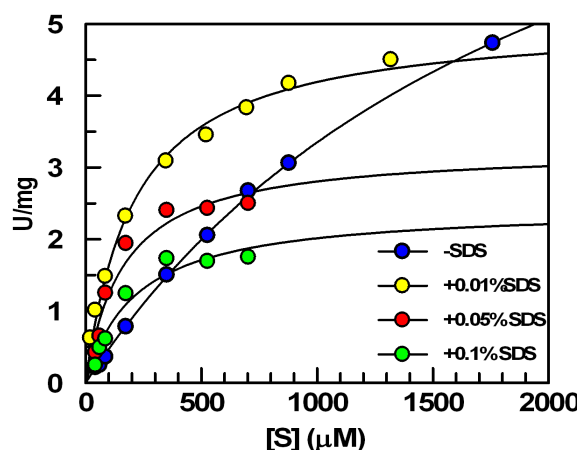


Fig. III.20 Curve di Michaelis-Menten in assenza e in presenza di SDS (0.01%, 0.05% e 0.1%).

Inoltre, diversamente dal mutante singolo, l'appiattimento della curva in presenza di SDS suggerisce un parallelo fenomeno di inibizione. A sostegno di questa ipotesi è il fatto che al

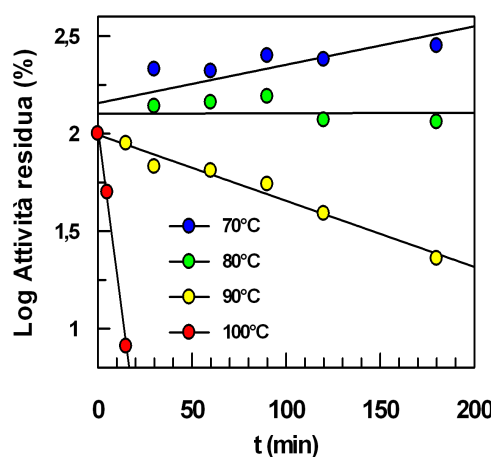
diminuire della concentrazione di SDS l'attività aumenta, risultando così in un effetto attivante più rilevante a più basse concentrazioni di SDS.

Tabella III.7. Parametri cinetici in assenza e in presenza di SDS per la variante *SsoPox* C258L-I261F-W263A

Paraoxon	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1}mM^{-1}$)	s ($s^{-1}M^{-1}$)
Triplo 25°C	n.d.	n.d.	2.5 ± 0.6	$\sim 2 \times 10^3$
Triplo 25°C + 0.01%SDS	3.0 ± 0.08	210 ± 19	14.3 ± 1.7	$\sim 1 \times 10^4$
Triplo 25°C + 0.05%SDS	1.93 ± 0.17	165 ± 41	11.0 ± 3.6	$\sim 1 \times 10^4$
Triplo 25°C + 0.1%SDS	1.45 ± 0.14	217 ± 63	6.7 ± 2.1	$\sim 7 \times 10^3$

III 2.3.2.4 Caratterizzazione della stabilità termica

E' stata valutata la dipendenza dell'attività di *SsoPox*C258L-I261F-W263A dalla temperatura. L'enzima mostra elevata stabilità alla temperatura. Le rette ottenute per ogni temperatura a cui è stato incubato l'enzima e i relativi tempi di dimezzamento (*half lifes*) da esse estrapolate sono riportate in figura (**Fig. III.21**).



<i>SsoPox</i>	half life (min)			
	70°C	80°C	90 °C	100 °C
<i>wt</i>	>> 240	> 240	150	30
C258L-I261F-W263A	>> 240	> 240	87	5

Fig.III.21. Termostabilit   della variante tripla di *SsoPox* a diverse temperature

La stabilità di questa variante ad elevate temperature è un dato molto interessante in quanto la presenza della tripla mutazione non ha comportato drastici effetti strutturali. Al contrario, incubazioni a 70°C e 80°C fino a 100' corrispondono ad un effetto attivante da temperatura, come riportato per *SsoPox* (Merone L, 2005). Ciò vuol significare non solo che le mutazioni apportate non modificano la stabilità cinetica del sito attivo, ma anche che l'enzima è ancora robusto a sufficienza per ulteriori approcci mutagenici.

III 2.4 Caratterizzazione biochimica dei mutanti per attività lattonasica

Per valutare come varia l'attività lattonasica rispetto alla attività fosfotriestrasica e comprendere così se gli effetti delle mutazioni ottenute sono equivalenti in entrambe le attività catalitiche, sono stati valutati i parametri cinetici delle varianti enzimatiche più significative ottenute per mutagenesi sito diretta o casuale (4.1) e per la variante PoxC258L-I261F-W263A (4.2). L'attività lattonasica è stata valutata sia su substrati naturali omoserina lattoni, che sul substrato sintetico TBBL.

III 2.4.1 Varianti casuali, sito dirette e loro combinazione

Tra i mutanti ottenuti per mutagenesi sito diretta sono stati scelti e valutati i parametri cinetici su TBBL delle varianti Y97W e R223H in quanto il primo mostra un incremento dell'attività verso il paraoxon, mentre il secondo un quasi completo annullamento della stessa. Come si può osservare dai dati della tabella (Tabella III.8), le due varianti mantengono lo stesso comportamento di quello mostrato per l'attività fosfotriesterasica.

Tabella III.8. Parametri cinetici su TBBL

TBBL	$V_{\max}$ (U/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
<i>wt</i> 70°C	49.0±11.2	29.0±6.6	80.0±3.0	$(3.6±0.9) \times 10^5$
R223H 70°C	0.71±0.06	0.420±0.004	273.0±59.0	$(1.54±0.31) \times 10^3$
Y97W 70°C	128.4±13.6	75.7±8.0	79.0±15.0	$(9.6±1.7) \times 10^5$
W263F 70°C	1021.1±93.0	604.1±7.5	58.6±12.6	$(1.03±0.02) \times 10^7$
W263F 25°C	173.2±8.5	102.5±5.0	26.3±5.4	$(3.94±1.0) \times 10^6$
C258L-I261F-W263A 70°C	n.d.	n.d.	n.d.	$(4.8±0.2) \times 10^4$

In particolare la variante PoxY97W mostra un incremento della costante catalitica di tre volte rispetto all'enzima non modificato, senza variazioni sulla costante di affinità, mantenendo così l'incremento anche nella specificità di substrato. Analogamente, la variante PoxR223H con il substrato di tipo lattonico mostra un abbassamento della costante catalitica e della affinità di substrato che comporta una riduzione di circa 250 volte la specificità di reazione verso questo substrato.

Per il miglior mutante ottenuto W263F, si osserva un incremento considerevole sia della costante catalitica che dell'affinità di substrato che risultano a 70°C in un incremento di circa 30 volte rispetto all'enzima non modificato; un valore, anche in questo caso, direttamente proporzionale all'incremento di specificità registrato con il substrato paraoxon. In tabella sono riportati anche i parametri cinetici della variante W263F ottenuti lavorando a 25°C, dove si ha la conferma dell'incremento d'attività registrato alle alte temperature. In particolare a 25°C si osserva un incremento dell'affinità (che migliora perché a basse temperature la struttura dell'enzima è più rigida) e un parallelo abbassamento della attività catalitica di circa 6 volte rispetto al valore ottenuto a 70°C, che risulta in un valore di specificità 3 volte inferiore rispetto al valore ottenuto a 70°C, ma comunque circa 10 volte più elevato di quello registrato per l'enzima *wt* ad alte temperature. Con questi risultati cinetici ottenuti con il substrato TBBL, osserviamo quindi un caso di convergenza evolutiva di attività promiscue.

Per valutare se l'effetto sull'attività registrata con l'analogo sintetico del lattone, fosse mantenuto anche con la molecola naturale C8-omoserina Lattone, è stata condotta una caratterizzazione cinetica solo sul mutante Pox W263F a 25°C.

Tabella III. 9. Parametri cinetici su C8HSL per W263F

C8HSL	$V_{\max}$ (U/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
wt 25°C	4.2±0.4	2.49±0.25	130.4±39.6	(1.9±0.7)×10 ⁴
W263F 25°C	1.12±0.44	0.66±0.22	142.3±21.5	(4.6±1.2)×10 ³

Come si osserva dalla tabella riportata (**Tabella III.9**), sebbene l'affinità di legame risulti sostanzialmente invariata, si registra per questa variante un abbassamento nella costante catalitica che comporta una riduzione di circa 3 volte sulla specificità di substrato. Ciò che osserviamo con l'attività lattonasica sul substrato sintetico TBBL non è conservato nel

substrato lattonico C8HSL. Questo dato è molto significativo per molteplici ragioni. Innanzitutto, conferma il dato strutturale del docking ottenuto con l'enzima *wt* (III.1.2.4.2 e Fig. III.12) in cui sono state messe in evidenza le due differenti tasche di legame dei substrati TBBL rispetto alla tasca di C8HSL. Questo avviene senza compromettere la funzione principale dell'enzima che, pur avvenendo nello stesso sito catalitico, comprende una tasca di legame differente.

Quindi, sebbene anche il TBBL sia un lattone, come riportato precedentemente dal confronto delle strutture chimiche, non è possibile considerare questa attività analoga alla funzione naturale, ma è ascrivibile ad un sito di legame di promiscuità catalitica e quindi è da considerarsi funzione promiscua.

III 2.4.2 Variante tripla

Analogamente sono stati valutati i parametri cinetici sull'attività lattonasica sulla variante PoxC258L-I261F-W263A su TBBL e C8HSL. L'andamento della dipendenza della attività rispetto alla concentrazione di TBBL è risultato sempre crescente e lineare sia a 70°C che a 25°C. Per questo, non essendo possibile arrivare a saturazione di substrato, il valore di specificità è stato calcolato alle due temperature dalla pendenza della retta tangente alla curva a basse concentrazioni di substrato. Il valore di specificità ottenuto, come riportato (Tabella III.10), è risultato circa 10 volte più basso di quello dell'enzima non modificato a 70°C e 30 volte a 25°C. Questo risultato suggerisce che, nel caso del triplo mutante, l'effetto su questo substrato si è avuto non solo sull'attività catalitica, ma anche e soprattutto sull'affinità di legame, in quanto, anche a basse temperature, l'effetto registrato non varia sostanzialmente. Ciò è comunque in pieno accordo con i dati strutturali nei quali si evince che la tasca di legame al substrato è aumentata di raggio, per somigliare più all'enzima *pPTE* (Fig. III.15).

Tabella III.10 Parametri cinetici su TBBL per triplo mutante *SsoPoxC258L-I261F-W263A*

TBBL	$V_{\max}$ (U/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
<i>wt</i> 70°C	49.0±11.2	29.0±6.6	80.0±3.0	(3.6±0.9) × 10 ⁵
C258L-I261F-W263A 70°C	n.d.	n.d.	n.d.	(4.8±0.2) × 10 ⁴
C258L-I261F-W263A 25°C	n.d.	n.d.	n.d.	(1.4±0.1) × 10 ⁴

n.d.: non determinabile, valore di *s* valutato come pendenza del tratto lineare della dipendenza di k_{cat} vs [S].

Con il substrato naturale C8HSL, invece, non è stato possibile rilevare alcuna attività enzimatica (fino a 15µg di enzima/saggio). Questo risultato è sua volta interessante perchè per *pPTE* non è possibile riscontrare attività lattonasica su HSL e la modifica di questi residui, adottata proprio in conformità con l'analogo mesofilico, può essere un suggerimento chiave importante per la definizione della regione coinvolta nella conversione tra lattonasi e fosfotriesterasi.

III 2.5 Ruolo della Cisteina258 nella promiscuità catalitica di *SsoPox*

Date le informazioni relative all'attività fosfotriesterasica e lattonasica del triplo mutante C258L-I261F-W263A e data la struttura ottenuta con C10HTL che evidenziava una interazione tipo legame idrogeno del residuo di Cisteina258 con l'analogo di substrato, si è pensato di analizzare il ruolo di questa singola posizione mediante mutagenesi di saturazione. Questo tipo di procedura è stato condotto sia sullo stampo *pT7-7ssopoxwt*, sia su *pT7-7ssopoxW263F*, per valutare gli eventuali effetti additivi. La procedura utilizzata è quella descritta nella sezione sperimentale (II 2.2.2). Sono stati analizzati gli estratti cellulari totali o gli estratti proteici termosolubili (II 2.2.4) e l'analisi è stata condotta su paraoxon mediante saggio standard (II.3.2.2), su TBBL 1mM (II 3.2.4) e su HSL 1mM (II 3.2.5). Questo approccio si colloca nell'ambito delle analisi preliminari per lo studio dei ruoli svolti dai residui in una posizione e ha un'importanza esclusivamente qualitativa. Ulteriori studi per valutare in dettaglio i parametri cinetici delle varianti più interessanti seguiranno a questo lavoro di tesi.

III 2.5.1 Attività fosfotriesterasica

Sono stati isolati e analizzati circa 600 cloni (300 per ogni stampo) per attività paraoxonasica e sono stati scelti per successivi studi di analisi di sequenza i cloni che mostravano o un marcato incremento dell'attività (>5volte) o un totale annullamento della stessa (~0).

In grafico sono riportati i dati ottenuti valutando le attività degli estratti proteici totali nelle condizioni di saggio dell'analisi e ponendo pari al 100% l'attività del clone con la Cisteina nella posizione 258.

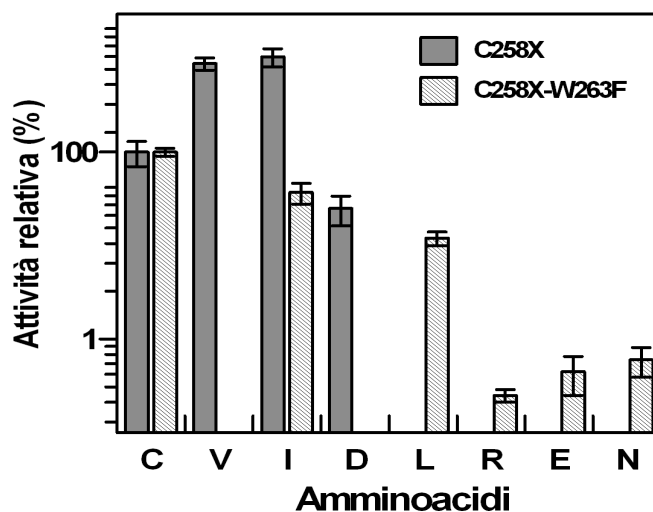


Fig.III.22 Attività su paraoxon degli estratti totali di mutanti C258X rispetto all'enzima *wt* (C258). In grigio sono le varianti su stampo *wt*, a righe le varianti doppie con la mutazione W263F. La scala utilizzata è di tipo log.

Come si può osservare dal grafico, rispetto all'enzima *wt* (in grigio) si osservano incrementi considerevoli dell'attività (fino a 10 volte l'attività enzimatica) per i mutanti di natura idrofobica C258V e C258I. E' importante sottolineare che su 300 cloni analizzati sono stati isolati 5 che portavano la mutazione C258V e 3 con C258I, segno che le analisi condotte sono state rappresentative e i risultati ottenuti attendibili. Mostra un abbassamento dell'attività fosfotriesterasica il mutante C258D, che si differenzia dalla Cisteina per la presenza della carica che può fungere da donatore di legame idrogeno. Questi risultati stabiliscono senza dubbio il ruolo idrofobico della Cisteina nella posizione 258 dissipando ogni ipotesi circa l'eventualità di questo residuo di essere donatore di legame idrogeno.

Per quel che riguarda i mutanti della C258 ottenuti sullo stampo *ssopoxW263F* (a righe) come si può osservare, non è stato trovato alcun mutante che mostri un incremento dell'attività significativamente superiore al singolo mutante W263F. Questo ci porta a concludere che nessun contributo dato all'enzima *wt* per incrementare l'attività fosfotriesterasica attraverso il miglioramento della posizione 258, è tale da risultare superiore o paragonabile al contributo che la singola fenilalanina nella posizione 263 opera sull'enzima.

Nello specifico si osserva che in tutti i mutanti doppi C258X-W263F per i quali si ha la sostituzione della Cisteina in amminoacidi carichi (C258E/R/N), si ha, anche in questo caso,

l'annullamento dell'attività catalitica nei confronti del paraoxon. Nel caso, invece, di sostituzione in amminoacidi idrofobici, i doppi mutanti C258I/L-W263F mostrano un'attività in termini assoluti superiore a quella dell'enzima *wt* (circa 5 volte) mentre, rispetto al singolo W263F, si osserva comunque un abbassamento dell'attività enzimatica. Le caratteristiche di questi doppi mutanti sembrerebbero suggerire che il contributo della posizione 258 è indipendente dalla posizione 263. Tutti i cloni scelti che sembravano mostrare un'attività marginalmente superiore al singolo W263F, per analisi di sequenza, sono risultati senza modificazioni nella posizione 258.

III 2.5.2 Attività su TBBL

Per valutare se il ruolo svolto dalla cisteina 258 nella catalisi del paraoxon fosse lo stesso per l'attività lattonasica, sono stati fatti dei saggi sul substrato sintetico TBBL con gli stessi cloni isolati e caratterizzati per l'attività paraoxonasica. Quello che emerge da analisi condotte con estratti cellulari di cloni trasformati con il DNA d'interesse è che l'andamento delle attività segue grossomodo quello della attività fosfotriesterasica (Fig.III.22).

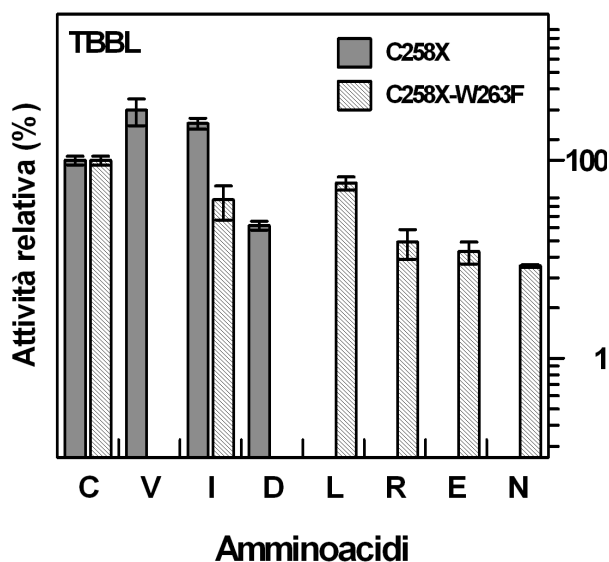


Fig. III.23. Attività su TBBL degli estratti totali di mutanti C258X rispetto all'enzima *wt* (C258). In grigio sono le varianti su stampo *wt*, a righe le varianti doppie con la mutazione W263F. La scala utilizzata è di tipo log.

In termini assoluti, invece, è interessante notare che nel caso dei mutanti provenienti da

W263F la perdita di attività registrata per i residui carichi (R, E, N) nella posizione 258 è meno importante (circa 70-75%) rispetto a quella osservata per il paraoxon (90-95%). La differenza di ruoli degli amminoacidi nella posizione 258 tra i due substrati sembra essere ascrivibile alla natura chimica dei substrati e ad un'interazione diretta con la catena laterale del residuo 258.

III 2.5.3 Attività su HSL

Per valutare il ruolo di questa posizione anche sull'attività idrolitica verso acil-omoserina lattoni, non essendo possibile valutare la variazione di attività su estratti cellulari totali e quindi condurre un'analisi ad ampio raggio su tutti i cloni ottenuti da mutagenesi di saturazione, sono stati scelti due casi limite su cui è analizzare la variazione di attività: PoxC258I e PoxC258D. In particolare gli estratti solubili provenienti da un'incubazione a 60°C (20min) (II 3.1.4) delle proteine totali delle cellule trasformate con i vettori di espressione di poxC258I e poxC258D, sono state saggiati per valutare nuovamente l'attività su paraoxon, TBBL e C8HSL (Fig. III.24).

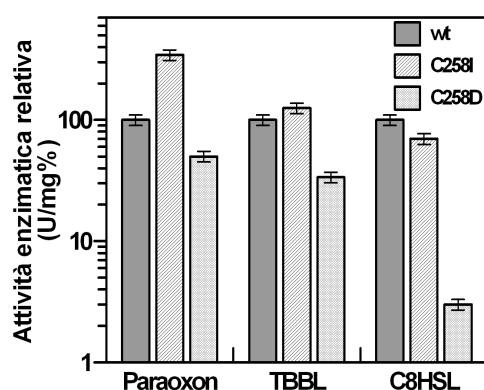


Fig.III.24 Attività su paraoxon, TBBL e C8HSL degli estratti totali di *SsoPoxwt* (grigio), *SsoPoxC258I* (righe), *SsoPoxC258D* (puntini). L'asse delle y è di tipo log.

I dati riportati si riferiscono all'attività normalizzata per la concentrazione dell'estratto termosolubile (risultati identici a quelli ottenuti per gli estratti totali), dopo aver valutato mediante SDS-PAGE e western blot che i livelli di espressione delle proteine d'interesse erano paragonabili e ponendo pari a 100% l'attività dell'enzima *wt*.

Come si può osservare il mutante C258I conferma l'incremento d'attività registrato precedentemente per l'attività fosfotriesterasica e lattonasica su TBBL che risulta per il substrato C8HSL sostanzialmente in una non variazione dell'attività. Ciò suggerisce che la cisteina svolge, molto probabilmente, un ruolo idrofobico nella catalisi sia degli OPs che dei lattoni.

Nel caso del mutante C258D, invece, si osserva un abbassamento dell'attività paraoxonasica e lattonasica su TBBL debolmente inferiore a quella dell'enzima *wt*, mentre l'annullamento totale dell'attività su substrati C8 è verificato anche su C10HSL (non mostrato). Questo dato sostiene l'ipotesi che il ruolo della Cisteina258 è quello idrofobico, e che la presenza di una carica in quella posizione crea uno squilibrio importante in particolare nell'attività catalitica su omoserina lattoni. In seconda analisi questo risultato ci permette di confermare che i meccanismi catalitici per l'idrolisi del TBBL e C8HSL sono diversi da quelli per gli HSLs, che quindi non possono essere presi come substrati modello per lo studio dell'attività lattonasica. Questa conclusione è in realtà stata confermata dagli studi di “docking” ottenuti con i substrati TBBL e C8HSL, che mostrano chiaramente i due differenti posizionamenti dei substrati. Tuttavia, nella struttura riportata con l'analogo di substrato C10HTL era stato messo in evidenza un legame idrogeno tra la C258 e la catena laterale dell'analogo. Tale interazione, sebbene possibile, non sembra avere un'importanza funzionale essenziale dato che la sostituzione con l'amminoacido idrofobico C258I non comporta drastici effetti sull'attività su C8HSL.

III 3 APPLICAZIONI

In questo paragrafo sono riportati gli esperimenti di attività e di stabilità in differenti condizioni di stress (detergenti e solventi) che mimano potenziali agenti utili alla decontaminazione delle superfici. Tali esperimenti sono stati condotti sull'enzima non modificato, sulla sua variante W263F e, per comparazione, sull'enzima *pPTE*.

III 3.1 Attività fosfotriesterasica in diverse condizioni di stress

E' ormai comunemente noto che la stabilità di una proteina alla temperatura è accompagnata da stabilità ad altre condizioni di stress, come la presenza di solventi organici e agenti

denaturanti. Per valutare se questa proprietà si conserva e possa costituire un vantaggio nelle applicazioni nell'ambito della decontaminazione da paraoxon, la variante enzimatica più attiva di *SsoPox* (W263F) è stata analizzata “sul campo” e confrontata con l'omologo *pPTE* in un test di decontaminazione *in vitro* su superfici. In particolare superfici di polistirene (0.19cm²) sono state contaminate con paraoxon (50nmoli) e lasciate asciugare. Gli enzimi di interesse purificati (2U, un ammontare in grado di degradare 50nmol di paraoxon in meno di 2min a 25°C) sono stati diluiti in differenti soluzioni tampone con diversi solventi (50μL finali di 20mM Hepes pH 8.0 e 50% EtOH/ 30%MeOH/ 50%MeOH/ 0.1%SDS) e applicati senza agitazione sulla superficie secca contaminata e lasciati agire per 15minuti a temperatura ambiente (circa 25°C). Dopo questo tempo, la soluzione enzimatica è stata diluita 2.5 volte con acqua (in modo da abbassare la concentrazione di solvente) e 2μL di ciascun saggio sono stati caricati su una matrice di nitrocellulosa precedentemente attivata con l'enzima EST2 da *A.acidocaldarius* (25pmol; EST2/paraoxon: 1/32). L'esterasi a serina EST2 è inibita irreversibilmente da paraoxon risultando così un rilevatore ottimale della concentrazione residua di paraoxon non degradato (Febbraio F, 2008). La costante di inibizione è dell'ordine di nMolare. Il filtro è stato lasciato asciugare per 30 min a temperatura ambiente e l'attività residua è stata valutata mediante saggio accoppiato con β-naphthyl acetato (Manco G, 2001).

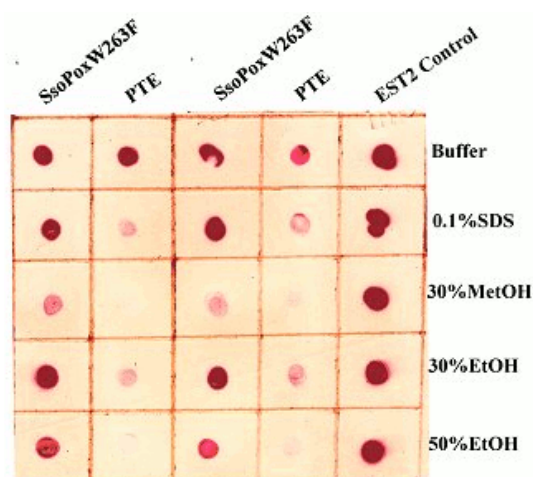


Fig.III.25 In verticale sono riportate le proteine, *SsoPoxW263F* e *pPTE* in duplicato, e il controllo EST2 nelle condizioni di saggio finali e in orizzontale le condizioni di estrazione.

Come si può osservare dal filtro, l'enzima EST2 è attivo in tutte le condizioni di solvente

analizzate. Per quanto riguarda il test, l'enzima mesofilico mostra attività idrolitica solo in 0.1%SDS e 30% EtOH, ma in entrambi i casi questa risulta inferiore a quella della controparte termofilica.

Alcune di queste condizioni mimano quelle utilizzate a livello industriale per l'estrazione di composti tossici dall'ambiente.

III 3.1 Studi di stabilità in diverse condizioni di stress

E' stata valutata la stabilità degli enzimi *SsoPoxwt*, *SsoPoxW263F* e *pPTE* misurando l'attività paraoxonatica residua nel tempo (da 1h fino a 40h) a temperatura ambiente in presenza di diverse condizioni di solventi organici e agenti denaturanti (II 3.2.9).

Tabella III.11 Stabilità cinetica nel tempo tra *SsoPox* e *pPTE* in diverse condizioni di stress da solvente

		ENZIMA											
		Pox wt				Pox W263F				pPTE			
		1h	3h	16h	40h	1h	3h	16h	40h	1h	3h	16h	40h
C O N D I Z I O N E	H ₂ O/buffer	100	100 ±1	77 ±1	69 ±4	100	82 ±7	80 ±9	81 ±8	100	82 ±7	40 ±18	39 ±9
	MeOH (10%)	99 ±1	123 ±23	77 ±2	123 ±38	77 ±3	101 ±15	99 ±2	100 ±9	25 ±5	41 ±15	16 ±2	15 ±1
	EtOH (10%)	69 ±2	162 ±24	92 ±22	138 ±45	36 ±4	39 ±6	85 ±5	109 ±12	37 ±11	48 ±9	46 ±5	48 ±1
	Acetonitrile (10%)	185 ±2	94 ±27	62 ±8	85 ±5	103 ±12	96 ±6	148 ±9	150 ±5	90 ±13	97 ±9	51 ±17	53 ±15
	Isopropanolo (10%)	85 ±5	107 ±4	100 ±1	92 ±4	45 ±5	63 ±9	89 ±12	172 ±15	28 ±4	30 ±4	27 ±6	22 ±6
	SDS (0.1%)	1180 ±65	900 ±70	623 ±31	930 ±10	303 ±26	98 ±15	6 ±2	6 ±4	0.2 ±0.1	0.4 ±0.2	0.4 ±0.4	0.1 ±0.05
	GuHCl (0.5M)	192 ±15	200 ±10	138 ±8	123 ±23	178 ±13	185 ±10	128 ±15	83 ±13	35 ±5	31 ±5	20 ±5	15 ±3

La tabella riportata (**Tabella III.11**) riassume tutti i risultati ottenuti dell'attività residua misurata con il substrato paraoxon (0.5mM), ponendo pari a 100% l'attività al tempo 1h in

presenza di tampone 20mM Hepes. Ciò che risulta evidente è l'elevata stabilità dell'enzima non modificato a tutte le condizioni di stress analizzate, segno che la struttura della proteina ipertermofila è davvero compatta e l'eccezionale stabilità valutata come inattivazione alla temperatura (Merone L, 2005) e si riflette in una stabilità a più ampio raggio. Di tutti le condizioni analizzate è interessante soffermarsi sull'effetto dell'SDS anche sull'enzima non modificato che risulta, nel saggio standard (II.3.2.2), in un incremento di 10 volte l'attività e tale attivazione è stabile nel tempo. La stabilità in SDS, i cui effetti attivanti sono stati analizzati nel singolo saggio (III 2.3.1.3), non si riflette nei campioni dell'enzima modificato W263F dove l'attività si mantiene inalterata solo fino a 3h di incubazione. Un effetto debolmente attivante che si conserva nel tempo si osserva anche per i campioni SsoPox*wt* e W263F incubati in Guanidinio idrocloruro. E' interessante notare che l'apparente effetto di attivazione osservato a 40h per le proteine incubate in presenza di solventi organici è ascrivibile alla possibilità di evaporazione del solvente nelle condizioni di incubazione (25°C), ciò indica indirettamente che il processo di inattivazione delle proteine da solventi organici è un fenomeno reversibile.

La controparte mesofilica tende a inattivarsi finanche per incubazione a temperatura ambiente nel solo tampone, come già descritto precedentemente (Rochu D, 2004). Tra i risultati ottenuti è interessante sottolineare l'inattivazione di *pPTE* in presenza di SDS, che risulta invece un attivante per l'attività fosfotriesterasica delle controparti termofiliche. Di tutti i solventi organici analizzati, solo l'acetonitrile ha un effetto minore sulla stabilità dell'enzima *pPTE*.

Questo esperimento è la prova definitiva che gli enzimi proposti in questo lavoro di tesi possono effettivamente sostituire quelli mesofilici attualmente in uso, per un loro utilizzo in presenza di solventi utili a processi di estrazione organica.

CAPITOLO IV

DISCUSSIONE

Oggetto del seguente lavoro di tesi è stato lo studio della promiscuità catalitica della Fosfotriesterasi-lattonasi simile (PLL) identificata nel microorganismo archaeon *Sulfolobus solfataricus*: SsoPox. L'enzima appartiene alla superfamiglia delle amidoidrolasi, nella quale diversi enzimi con attività principale differente (carbossilosterasica, ammidasica, lattonasica) mostrano proprietà idrolitiche ancillari verso tutta una serie di substrati naturali e sintetici, tra cui i fosfotriesteri. Recenti studi hanno messo in evidenza una proprietà generale di questa superfamiglia: l'attività principale di un enzima della superfamiglia risulta attività promiscua in un altro membro della superfamiglia (Roodvelt C, 2005). Questo è probabilmente da mettere in relazione alla plasticità del fold α/β barrel. E' su queste basi che è stata investigata l'attività paraoxonasica promiscua della lattonasi SsoPox, che risulta attività principale dell'enzima di recente evoluzione pPTE da *Pseudomonas diminuta*. L'analisi ha previsto prima un approfondimento dello studio dell'attività fosfotriesterasica (su paraoxon) e lattonasica su substrati sintetici (TBBL) e naturali (acil omoserina lattoni) e poi un approccio di evoluzione molecolare sfruttando differenti approcci di mutagenesi per provare ad incrementare l'attività ancillare e valutare relativamente l'effetto sull'attività principale. Per quest'ultima ragione è stato scelto come modello di studio un enzima proveniente da microorganismo ipertermofilo, poiché, data la sua intrinseca stabilità, la sua evolvibilità (capacità di sopportare molteplici mutazioni) risulta in uno spettro di mutazioni possibili più ampio (Bloom JD, 2006). Inoltre un enzima stabile e facilmente purificabile capace di degradare fosfotriesteri del tipo pesticidi organofosfato con elevata efficienza può trovare nel mercato internazionale una concreta applicazione.

In collaborazione con l'equipe francese diretta dal Prof. E. Chabrière, durante il seguente lavoro di tesi, è stato possibile ottenere il cristallo e risolvere la struttura tridimensionale dell'enzima SsoPox in assenza e in presenza di un analogo di substrato C10-omocisteina

tiolattone (C10-HTL). Ciò ha permesso da un lato di avere un'idea dei determinanti della stabilità termica e dall'altro di comprendere in maniera più precisa i ruoli potenziali dei singoli amminoacidi e delle varianti già ottenute, nonché progettare l'enzima SyntPox descritto. La struttura di SsoPox è sostanzialmente simile a quella di *P.diminuta* PTE; le maggiori differenze si ritrovano nell'accorciamento del loop 7 e nel riarrangiamento conformazionale del loop 8 che comportano la formazione di un canale idrofobico nel quale si accomoda la lunga catena acilica dell'analogo di substrato C10-HTL, lì collocato nella struttura in complesso. La risoluzione di questo primo membro del gruppo delle PLLs consente di definire una nuova famiglia. Studi strutturali di simulazione di legame condotti su Silicon Graphics con il substrato sintetico TBBL, mettono in evidenza la presenza di un'altra tasca di legame nella quale si accomoda il lattone sintetico, separata dalla prima dal residuo di F229. Questa tasca, sicuramente più piccola del canale idrofobico, permette al substrato di collocarsi in una posizione ottimale per l'attacco nucleofilo, tenendo conto che le posizioni dei due ossigeni dell'anello lattonico sono invertite rispetto all'analogo C10HTL. Ciò ci permette d'asserire che l'attività lattonasica su TBBL risulta in un certo senso un'attività promiscua in quanto i due substrati si trovano ad essere posizionati nell'enzima in due tasche diverse. Inoltre, supponendo che la molecola d'acqua utile per l'idrolisi dei substrati sia quella a ponte tra i due metalli, risultando così sotto il piano dei due anelli lattonici (Fig. III.12b), anche la stereochimica dell'idrolisi risulterebbe invertita: in un caso l'attacco avverrebbe sulla faccia *re* (C8HSL) e nell'altro caso *si* (TBBL). Ciò confermerebbe il fatto che la promiscuità enzimatica è da principio una promiscuità strutturale, che consente la possibilità di funzioni ancillari alla attività principale, anche con inversione di stereoselettività.

La differenza tra il comportamento dei mutanti ottenuti rispetto all'attività lattonasica su TBBL e C8HSL conferma il differente posizionamento dei due substrati, suggerendo un coinvolgimento di residui differenti durante la catalisi.

Qui di seguito riporto le varie posizioni modificate in *SsoPox* al fine di comprendere il loro ruolo e di proporre un meccanismo di reazione per l'idrolisi dei fosfotriesteri come il paraoxon e degli omoserina lattoni.

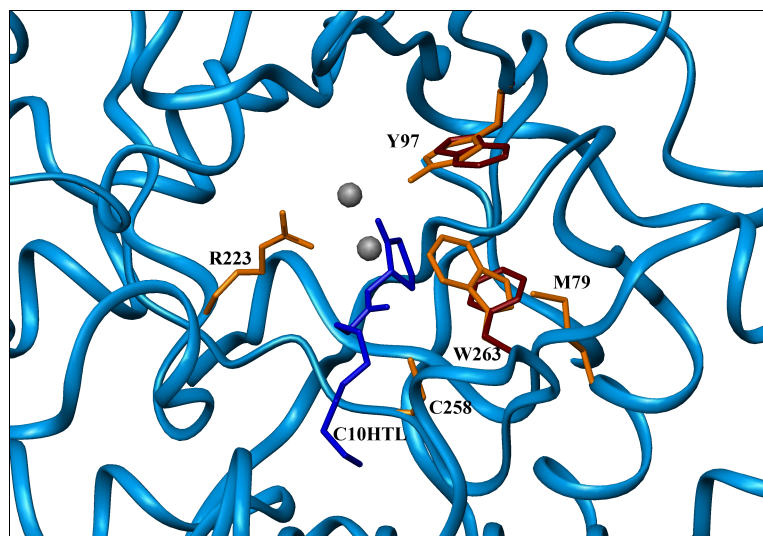


Fig. IV.1 Residui modificati nel sito attivo di *SsoPox*

M79: Questo residuo è stato messo in evidenza nella mutagenesi casuale dove la modificazione M79V è stata ottenuta per analisi dell'attività paraoxonasi. Inizialmente è stata valutata l'attività delle proteine mutate a temperatura ambiente. In tali condizioni, la proteina mutata M79V, ottenuta dal primo ciclo di mutagenesi casuale, risultava 1.3 volte più attiva rispetto alla proteina *wt*. Quando l'enzima è stato purificato e ne è stata valutata l'attività a 70°C, nelle condizioni di saggio *standard*, si è registrata un'attività più bassa di quella dell'enzima *wt*. Tale riduzione è correlata al fatto che la mutazione introdotta comportava un cambiamento della curva di termofilia rispetto al *wt*. Infatti, M79V ha una temperatura ottimale di 50°C, per cui risulta leggermente più attivo dell'enzima *wt* a temperature più basse. Questa caratteristica si conserva anche nella variante doppia M79V-W263Q che, pur mostrando attività catalitica maggiore dell'enzima *wt*, ha un massimo di temperatura di 55°C.

Y97: Questo residuo, insieme alla Y99, I261 e W263, fa parte di quei residui che, secondo l'allineamento di sequenza strutturale, in *pPTE* sono coinvolti nelle interazioni con il gruppo uscente (W131, F132, F306, Y309). E' per questo motivo che è stato scelto come residuo da modificare nella mutagenesi sito diretta e la sua modificazione nel corrispondente Triptofano comporta l'incremento dell'attività nei confronti dei substrati paraoxon e TBBL di circa tre volte, senza cambi sostanziali nella costante di legame (K_M). Ciò suggerisce che l'effetto

registrato su questo mutante è dovuto più alla catalisi o al rilascio del gruppo uscente, piuttosto che al legame al substrato. In effetti, un confronto accurato delle strutture di *pPTE* ottenuto con analoghi di substrato fosfotriestere (EBP) (Benning M, 2000) e *SsoPox* permette di ipotizzare che la tasca del gruppo uscente, pressochè assente in *SsoPox* sia riformata con questa mutazione (Y97W) e più ancora con la mutazione in posizione 263.

R223: La posizione 223 corrisponde alla His254 in *pPTE*. Tale residuo in *pPTE* è coinvolto in un trasferimento del protone dalla molecola d'acqua al gruppo uscente secondo il meccanismo proposto da Raushel (Aubert S, 2004). Supponendo anche per *SsoPox* un meccanismo simile, è stato modificato il residuo di arginina in istidina (R223H). L'analisi dell'attività di questa variante mostra un abbassamento dei valori di specificità catalitiche di circa 1000 volte per l'attività fosfotriesterasica e di circa 250 volte per l'attività lattonasica su TBBL, suggerendo un ruolo cruciale per l'arginina in quella posizione. E' interessante notare che l'*optimum* di pH per questa variante è 9.5, quindi di 1.5 unità di pH superiore a quello dell'enzima non modificato, risultando in una sorta di meccanismo di compensazione per la perdita dell'arginina. Ciò che rende non plausibile un meccanismo analogo tra *SsoPox* e *pPTE* è il pKa dell'arginina che nelle condizioni fisiologiche non riuscirebbe a fungere da donatore/accettore di protone. Dai dati cinetici ottenuti è dunque chiaro che il ruolo dell'arginina risulta fondamentale ai fini della catalisi sia su fosfotriesteri che lattoni sintetici, tuttavia il meccanismo in cui è coinvolto non sembrerebbe essere ascrivibile ad un trasferimento protonico, ma verosimilmente al corretto posizionamento del substrato.

W263: Questa posizione ottenuta mediante mutagenesi casuale, è risultata la migliore in assoluto in termini di miglioramento dell'attività fosfotriesterasica. Nella corrispondente controparte mesofilica, anche questo amminoacido, corrispondente alla tirosina 309 (Y309), è nella tasca 3 del gruppo uscente. Sulla base di studi di dinamica molecolare è stato dimostrato che la Y309 stabilizza la carica negativa del gruppo uscente *p*-nitrofenolo, rilasciato in seguito all'idrolisi del substrato paraoxon (Koca J, 2001). Sulla base di tale predizione, la Y309 era stata mutata in fenilalanina, ma non si era osservato nessun cambiamento nei valori di attività rispetto all'enzima *PTE wt*. Nel caso di *SsoPox* il triptofano 263 risulta invece in un ruolo chiave nella specializzazione della lattonasi in fosfotriesterasi. E' infatti interessante notare che all'incremento dell'attività fosfotriesterasica su paraoxon registrata per le varianti W263Q e W263F e per le varianti doppie (Y97W-W263Q e Y97W-W263F) e tripla (C258L-I261F-

W263A) contenenti questa mutazione, si registra un corrispondente incremento dell'attività lattonasica su TBBL, ma un abbassamento sostanziale dell'attività su acil-omoserina lattoni per la variante W263F, e il completo annullamento dell'attività per la variante tripla. Ciò potrebbe significare che il ruolo del W263 è specificamente collegato al posizionamento dei substrati sia di tipo lattonici che fosfotriesteri rappresentando un residuo chiave per la conversione delle due attività.

C258: Questo amminoacido si colloca all'interno del canale idrofobico di *SsoPox*. La cisteina in questa posizione non è un residuo conservato nella famiglia delle amidoidrolasi, ma essendo stata identificata la variante tripla (C258L-I261F-W263A) che conteneva questa mutazione, si è pensato di analizzarne il singolo ruolo. Come per le altre mutazioni osservate, l'attività lattonasica su TBBL e fosfotriesterasica su paraoxon segue lo stesso andamento per le varianti osservate. In particolare, il ruolo svolto da questo amminoacido per le due attività sembra essere di tipo idrofobico, come suggerito dal miglioramento dell'attività per sostituzione della C258 in Val e Ile. Inoltre la sua modificazione in Asp comporta riduzione dell'attività, segno che una carica in quella posizione non è consentita.

Nel caso invece dell'analisi condotta su substrati naturali tipo C8HSL, le due varianti C258I e C258D mostrano entrambe un abbassamento dell'attività, segno che la cisteina è in una posizione chiave per la catalisi di C8HSL e la sua modifica comporta variazioni importanti nella catalisi. Inoltre, la drammatica riduzione d'attività per la variante C258D, suggerisce anche per i substrati naturali, un ruolo idrofobico della cisteina 258.

Da queste informazioni ricavate dall'analisi cinetiche dei mutanti e dai dati strutturali ottenuti è possibile ricavare per *SsoPox* un'ipotesi di meccanismo catalitico per il paraoxon e per gli acil omoserina lattoni.

Attività fosfotriesterasica. *SsoPox* possiede un centro metallico eterobinucleare che può essere utilizzato per attivare la molecola d'acqua catalitica a ione idrossido, come per la mesofilica *pPTE*. Quando il substrato è in complesso con il centro binucleare, lo ione idrossido attacca il centro elettrofilo del fosforo attraverso un meccanismo SN_2 , formando uno stato di transizione pentacoordinato che lega a ponte i due metalli. Il centro binucleare compensa la carica negativa sviluppata sull'ossigeno del fosforile. La coppia elettronica dell'ossigeno del fosforile torna indietro al legame P-O, consentendo al gruppo uscente d'essere rilasciato. Il fosfato a ponte viene spiazzato dal sito attivo a seguito dell'ingresso di una nuova molecola

d'acqua, rigenerando l'enzima (FigIV.2a).

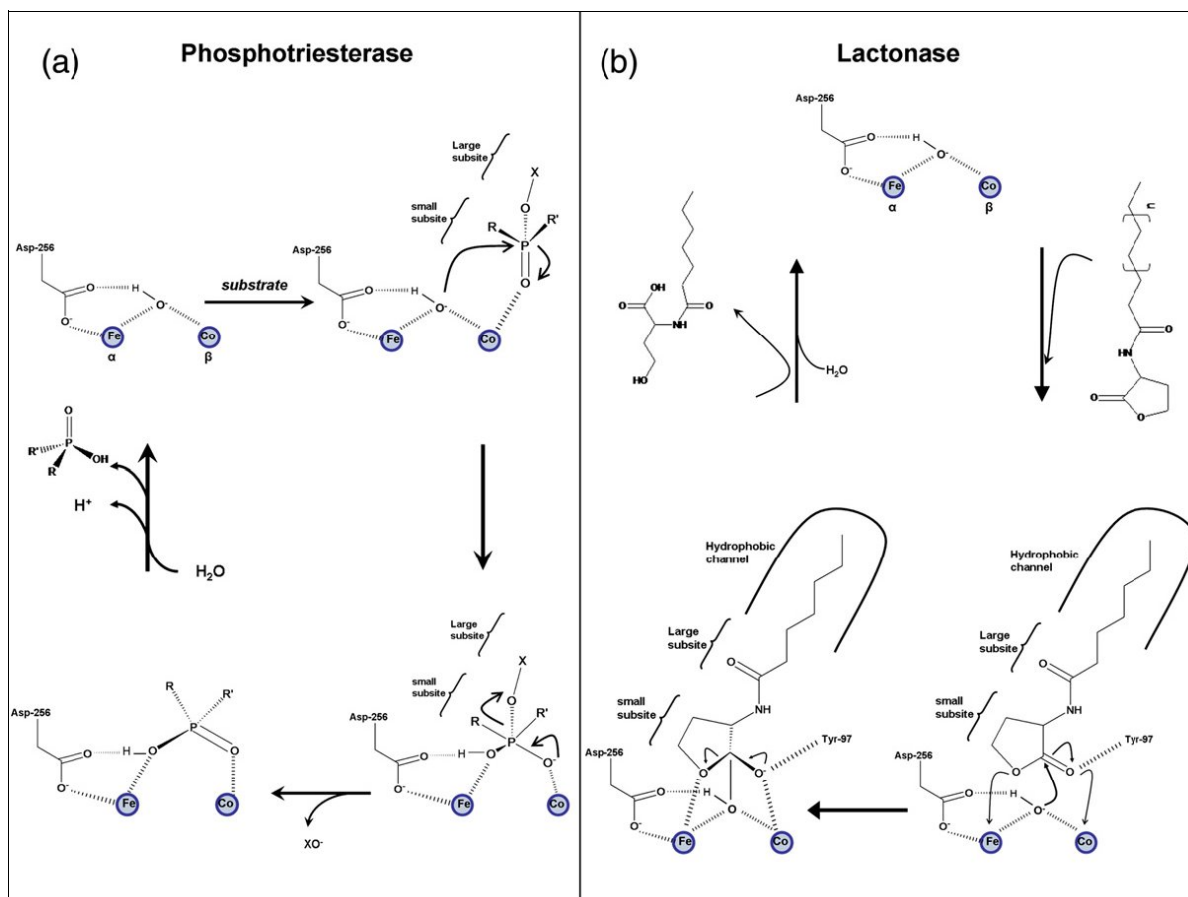


Fig.IV.2 a) Modello per l'idrolisi del paraoxon catalizzata da *SsoPox*. **b)** Modello per l'idrolisi di C8HSL catalizzata da *SsoPox*.

Attività lattonasica. Il canale idrofobico accomoda la catena acilica del substrato, mentre l'anello lattonico è posizionato sopra il centro metallico. La coordinazione dello zolfo dell'etero atomo e dell'ossigeno del carbossile con i metalli del centro binucleare incrementano la polarizzazione del legame rendendolo più suscettibile all'attacco nucleofilo. L'ossigeno del carbonile formando un legame idrogeno con la Y97, risulta in un aggiustamento dell'anello nella tasca enzimatica. Interessantemente anche nella idrolasi da *Bacillus thuringensis* la Y194 ha un ruolo simile nel posizionamento del substrato ed è conservata nella famiglia delle lattonasi. (Liu D, 2005) In *SsoPox* lo ione idrossido a ponte interagisce fortemente con il catione ferro e con l'D256, posizionandosi così in modo ideale per l'attacco nucleofilo, essendo quasi perpendicolare al piano dell'anello lattonico.

Dopo l'attacco nucleofilo, si genera un intermedio con geometria tetraedrica. Quindi, la coppia elettronica dell'ossigeno carbonilico tona indietro sul carbonio carbonilico, rompendo il legame C-O dell'anello. Il prodotto di idrolisi è rilasciato e l'enzima è rigenerato.

CAPITOLO V

CONCLUSIONI

La Fosfotriesterasi termostabile lattonasi simile *SsoPox* da *Sulfolobus solfataricus* idrolizza lattoni e, a bassa efficienza, esteri aromatici e composti organofosfato neurotossici (OPs). In questo lavoro di tesi è stata esplorata la possibilità di utilizzare *SsoPox* come “*starter*” per evolvere la sua ancillare capacità idrolitica. L'interesse è stato duplice: da un lato è legato all'esplorazione dello studio delle attività promiscue e ha conseguenze nell'ambito dell'evoluzione delle proteine, dall'altro è legato alla persistente domanda di sistemi di decontaminazione/detossificazione degli scarichi agricoli e della messa in sicurezza di aree teatro di atti antiterroristici. Una strategia di evoluzione diretta ha portato, in seguito alla caratterizzazione di diverse varianti, al mutante singolo W263F che mostra incrementata attività e specificità contro il fosfotriestere paraoxon di 30 e 16 volte rispettivamente, confrontata con l'enzima *wt*. Inoltre, è stata testata la stabilità strutturale in presenza di diversi agenti denaturanti fino a incubazioni di 40h a temperatura ambiente (25°C), e in nessun caso s'è registrato annullamento dell'attività degli enzimi termofili. Diversamente, in presenza di SDS l'enzima *wt* e la sua variante W263F mostrano un incremento della specificità di substrato verso il paraoxon, essenzialmente ascrivibile ad un incremento della affinità di substrato a 25°C. In tal modo la presenza del SDS nella miscela di saggio comporta per la variante *SsoPox*W263F un incremento di attività, in termini di k_{cat} , rispetto all'enzima non modificato di 150 volte. Questa interessante proprietà è stata sfruttata per l'allestimento di un saggio dove l'enzima mesofilico *pPTE* e il termofilico *SsoPox* sono stati sottoposti alle medesime condizioni di “stress da solventi organici e surfattanti” per avere la “prova di concetto” che l'attività promiscua di un enzima termostabile rappresenta un buon punto di partenza per lo sviluppo di un robusto e competitivo catalizzatore bio-compatibile. Parallelamente è stata ottenuta una variante tripla in seguito a disegno e ricombinazione dell'enzima *wt* per la produzione di un ibrido tra *SsoPox* e *pPTE*. Le mutazioni scelte sono

state progettate per ottenere un riarrangiamento della tasca catalitica dell'enzima, in modo da non modificare residui di superficie che potessero compromettere la stabilità strutturale. Delle 14 mutazioni ottenute, per ricombinazione con l'enzima non modificato, una variante tripla contenente anche la mutazione nella posizione W263 (C258L-I261F-W263A), risultava in un incremento significativo dell'attività. Questo risultato conferma che quella posizione ha un ruolo chiave per l'attività idrolitica nei confronti del paraoxon.

Inoltre è stata valutata la variazione dell'attività lattonasica per le varianti ottenute con incrementata attività fosfotriesterasica. Ciò che è risultato interessante è che mentre si osserva un parallelo incremento dell'attività lattonasica verso il lattone sintetico Tiobutil- γ -butirrolattone (TBBL), l'attività verso acilomoserina lattoni naturali risulta diminuita se non addirittura annullata, nel caso della variante tripla. Uno studio di simulazione di legame condotto su Silicon Graphics ha messo in evidenza la presenza di un'altra tasca di legame in cui si accomoderebbe il substrato TBBL. Questa tasca risulta distinta da quella identificata per il legame con un analogo di substrato tipo omocisteina lattone (C10HTL) ottenuto nella struttura di *SsoPox* qui riportata.

La conoscenza della struttura dell'enzima, degli effetti sulle attività enzimatiche principali e promiscue su tutta una serie di varianti dell'enzima qui ottenuti, ha permesso infine di formulare un'ipotesi sul differente meccanismo d'azione di *SsoPox* per spiegarne la promiscuità dell'enzima.

BIBLIOGRAFIA

- Acharya P, Rajakumara E, Sankaranarayanan R, Rao NM. *Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved Bacillus subtilis lipase*. J Mol Biol. 2004; 341:1271-81.
- Afriat L, Roodveldt C, Manco G, Tawfik DS. *The Latent Promiscuity of Newly Identified Microbial Lactonases Is Linked to a Recently Diverged Phosphotriesterase*. Biochemistry 2006; 45:13677-86
- Aubert SD, LiY, Raushel FM. *Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase*. Biochemistry 2004; 43: 5707-5715.
- Babbitt PC, Gerlt JA. *Understanding enzyme superfamilies. Chemistry As the fundamental determinant in the evolution of new catalytic activities*. J Biol Chem. 1997; 272:30591-4. Review.
- Benning MM, Hong SB, Raushel FM, Holden HM. *The binding of substrate analogs to phosphotriesterase*. J. Biol. Chem. 2000; 275:30556-30560.
- Benning MM, Kuo JM, Raushel FM, Holden HM. *Three-dimensional structure of phosphotriesterase: An enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents*. Biochemistry 1994; 33:15001-15007.
- Benning MM, Shim H, Raushel FM, Holden HM. *High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms of phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta*. Biochemistry 2001; 40:2712-2722.
- Birney E. *Double Dutch for duplications*. Nat Genet. 2007; 39:1303-4.
- Bloom JD, Labthavikul ST, Otey CR, Arnold FH. *Protein stability promotes evolvability*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2006; 103:5869-5874.
- Bloom JD, Wilke CO, Arnold FH, Adami C. *Stability and the evolvability of function in a model protein*. Biophys J. 2004; 86:2758-64.

-
- Bogarad LD, Deem MW. *A hierarchical approach to protein molecular evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96:2591-5.
- Bornscheuer UT, Kazlauskas RJ. *Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways*. Angew Chem Int Ed Engl. 2004; 43:6032-40.
- Bugg TD. *Diverse catalytic activities in the alphabeta-hydrolase family of enzymes: activation of H₂O, HCN, H₂O₂, and O₂*. Bioorg Chem. 2004; 32:367-75. Review.
- Camilli A, Bassler BL. *Bacterial small-molecule signaling pathways*. Science. 2006; 311:1113-6. Review.
- Chapman E, Wong CH. A pH sensitive colorimetric assay for the high-throughput screening of enzyme inhibitors and substrates: a case study using kinases, Bioorg. Med. Chem. 2002; 10:551-555.
- Chaudhry GR, Huang GH. *Isolation and characterization of a new plasmid from a Flavobacterium sp. which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate*. J Bacteriol. 1988; 170:3897-902.
- Cheng TC, Harvey SP, Chen GL. *Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme*. Appl Environ Microbiol. 1996; 62:1636-41.
- Cherry JR, Lamsa MH, Schneider P, Vind J, Svendsen A, Jones A, Pedersen AH. *Directed evolution of a fungal peroxidase*. Nat Biotechnol. 1999; 17:379-84.
- Copley SD. *Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity*. Curr Opin Chem Biol. 2003; 7:265-72.
- D'Amico S, Gerday C, Feller G. *Temperature adaptation of proteins: engineering mesophilic-like activity and stability in a cold-adapted alpha-amylase*. J Mol Biol. 2003; 332:981-8.
- Darwin C. *On the Origin of Species*. John Murray, London (1859).
- Davanloo P, Rosenberg AH, Dunn JJ, Studier FW. *Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984; 81: 2035-9.

-
- Donarski WJ, Dumas DP, Heitmeyer DH, Lewis VE, Raushel FM. *Structure-activity relationships in the hydrolysis substrates by the phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta*. Biochemistry 1989; 28:4650-5.
- Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. *Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase*. Nature 2001; 411:813-7.
- Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, and La Du BN *Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities*. J. Lipid Res. 2005; 46:1239-47.
- Dumas DP, Caldwell SR, Wild JR, Raushel FM. *Purification and properties of the phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta*. J Biol Chem 1989; 264:9659-66.
- Dumas DP, Durst HD, Landis WG, Raushel FM, Wild JR. *Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta*. Arch Biochem Biophys 1990; 277: 155-9.
- Ecobichon DJ. *In cassarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Pesticides; New York, Pergamon Press 2001; 580-592.
- Eijsink VG, Bjørk A, Gåseidnes S, Sirevåg R, Synstad B, van den Burg B, Vriend G. *Rational engineering of enzyme stability*. J Biotechnol. 2004; 113:105-20. Review.
- Eijsink VG, Gåseidnes S, Borchert TV, van den Burg B. *Directed evolution of enzyme stability*. Biomol Eng. 2005; 22:21-30. Review.
- Febbraio F, D'Andrea SE, Mandrich L, Merone L, Rossi M, Nucci R, Manco G. *Irreversible inhibition of the thermophilic esterase EST2 from Alicyclobacillus acidocaldarius*. Extremophiles 2008; 12:719-28.
- Fernández A, Tawfik DS, Berkhout B, Sanders R, Kloczkowski A, Sen T, Jernigan B. *Protein promiscuity: drug resistance and native functions--HIV-1 case*. J Biomol Struct Dyn. 2005; 22:615-24.
- Fiedler S, Wirth R. *Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation*. Anal Biochem. 1988; 170:38-44.
- Gerlt JA, Babbitt PC. *Mechanistically diverse enzyme superfamilies: the importance of chemistry in the evolution of catalysis*. Curr Opin Chem Biol. 1998; 2:607-12.

-
- Giver L, Gershenson A, Freskgard PO, Arnold FH. *Directed evolution of a thermostable esterase*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95:12809-13.
- Griffiths AD, Tawfik DS. *Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization*. EMBO J. 2003; 22:24-35.
- Guex N, Peitsch MC. *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis. 1997; 18:2714-23.
- Harcourt RL, Horne I, Sutherland TD, Hammock BD, Russell RJ, Oakeshott JG. *Development of a simple and sensitive fluorimetric method for isolation of coumaphos-hydrolysing bacteria*. Lett Appl. Microbiol. 2002; 34:263-8.
- Harper LL, McDaniel CS, Miller CE and J R Wild. *Dissimilar plasmids isolated from Pseudomonas diminuta MG and a Flavobacterium sp. (ATCC 27551) contain identical opd genes*. Appl Environ Microbiol. 1988; 54: 2586-2589.
- Hecky J, Müller KM. *Structural perturbation and compensation by directed evolution at physiological temperature leads to thermostabilization of beta-lactamase*. Biochemistry. 2005; 44:12640-54.
- Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, Cortopassi G, Galas DJ. *A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction*. Nucleic Acids Res. 1989; 17:6545-51.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. Gene 1989; 77:51-9.
- Holm L. and Sander C. *An Evolutionary Treasure: Unification of a Broad Set of Amidohydrolases Related to Urease*. Proteins: Struct., Funct., Genet. 1997; 28:72-82.
- Horne I, Sutherland TD, Harcourt RL, Russell RJ, Oakeshott JG. *Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an Agrobacterium isolate*. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68: 3371-3376.
- Hult K, Berglund P. *Enzyme promiscuity: mechanism and applications*. Trends Biotechnol. 2007; 25:231-8.

-
- Khersonsky O, Roodveldt C, Tawfik DS. . *Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects*. Curr. Opin. Chem. Biol 2006; 10:498–508.
- Kimura M. *Evolutionary Rate at the Molecular Level*. Nature 1968; 217: 624-26.
- Kimura M. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, 1983.
- Koca J, Zhan CG, Rittenhouse RC, Ornstein RL. *Mobility of the active site bound paraoxon and sarin in zinc-phosphotriesterase by molecular dynamics simulation and quantum chemical calculation*. J. Am. Chem. Soc. 2001; 123: 817- 826.
- Kolakowski JE, DeFrank JJ, Harvey SP, Szafraniec LL, Beaudry WT, Lai K, Wild JR. *Enzymatic hydrolysis of the chemical warfare agent VX and its neurotoxic analogues by organophosphorus hydrolase*. Biocatalysis Biotransform 1997; 15:297-312.
- Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 1970; 227:680-5.
- Leatherbarrow RJ. GraFit version 5.0 1992. Copyright © Erithacus Software Ltd, Staines Limited, 1989–2001.
- LeJeune KE, Mesiano AJ, Bower SB, Grimsley JK, Wild JR, Russell AJ. Dramatically stabilised phosphotriesterase polymers for nerve agent degradation. Biotech Bioeng 1997; 54:105–14.
- Levin KB, Dym O, Albeck S, Magdassi S, Keeble AH, Kleanthous C, Tawfik DS. *Following evolutionary paths to protein-protein interactions with high affinity and selectivity*. Nat Struct Mol Biol. 2009; 16:1049-55.
- Lewis VE, Donarski WJ, Wild JR, Raushel FM. *Mechanism and stereochemical course at phosphorus of the reaction catalyzed by a bacterial phosphotriesterase*. Biochemistry 1988; 27:1591-1597.
- Liu D, Lepore BW, Petsko GA, Thomas PW, Stone EM, Fast W, Ringe D. *Three-dimensional structure of the quorum-quenching N-acyl homoserine lactone hydrolase from Bacillus thuringiensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.2005; 102:11882-7. 45.
- Manco G, Mandrich L, Rossi M. *Residues at the active site of the esterase 2 from Alicyclobacillus acidocaldarius involved in substrate specificity and catalytic activity at high temperature*. J Biol Chem. 2001; 276:37482-90.

-
- Mandrich L, Manco G. *Evolution in the amidohydrolase superfamily: substrate-assisted gain of function in the E183K mutant of a phosphotriesterase-like metal-carboxylesterase*. Biochemistry 2009; 48:5602-12.
- Matsumura I, Ellington AD. *In vitro evolution of beta-glucuronidase into a beta-galactosidase proceeds through non-specific intermediates*. J. Mol. Biol. 2001; 305: 331–339.
- Merone L, Mandrich L, Rossi M, Manco G. *A thermostable phosphotriesterase from the archaeon Sulfolobus solfataricus: cloning, overexpression and properties*. Extremophiles 2005; 9:297-305.
- Millard CB, Kryger G, Ordentlich A, Greenblatt HM, Harel M, Raves ML, Segall Y, Barak D, Shafferman A, Silman I, Sussman JL. *Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level*. Biochemistry 1999; 38:7032-9.
- Mulbry WW, Karns JS. *Parathion hydrolase specified by the Flavobacterium opd gene: relationship between the gene and protein*. J Bacteriol. 1989; 171:6740-6.
- Munro N. *Toxicity of the organophosphate chemical warfare agents GA, GB, and VX: implications for public protection*. Environ Health Perspect. 1994; 102:18-38.
- Nobeli I, Favia AD, Thornton JM. *Protein promiscuity and its implications for biotechnology*. Nat Biotechnol. 2009; 27:157-67. Review.
- O'Brien PJ, Herschlag D. *Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities*. Chemistry and Biology 1999; 6:R91-R105.
- Omburo GA, Kuo JM, Mullins LS, Raushel FM. *Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase*. J. Biol. Chem. 1992; 267:13278-13283.
- Oosterban RA, Janz HS. In: Florkin M, Stotz EH (eds) Comprehensive. Biochemistry 1965; vol. 16. Elsevier, Amsterdam pp 1–54.
- Paggi RA, Martone CB, Fuqua C, De Castro R. *Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon natrococcus occultus*. FEMS Micr. Lett. 2003; 221:49-52.
- Park HS, Nam SH, Lee JK, Yoon CN, Mannervik B, Benkovic SJ, Kim HS. *Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold*. Science 2006; 311:535-8.

-
- Patrick WM, Matsumura I. *A study in molecular contingency: glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase is a promiscuous and evolvable phosphoribosylanthranilate isomerase*. J Mol Biol. 2008; 377:323-36.
- Peisajovich SG, Rockah L, Tawfik DS. *Evolution of new protein topologies through multistep gene rearrangements*. Nat Genet. 2006; 38:168-74.
- Pocker Y, Sarkanen S. *Oxonase and esterase activities of erythrocyte carbonic anhydrase*. Biochemistry. 1978; 17:1110-8.
- Pocker Y, Stone JT. *The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. The enzyme-catalyzed hydrolysis of rho-nitrophenyl acetate*. J Am Chem Soc. 1965; 87:5497-8.
- Reddy BR, Sethunathan N. *Mineralization of Parathion in the Rice Rhizosphere*. Appl Environ Microbiol. 1983;45:826-829.
- Robertson DE, Steer BA. *Recent progress in biocatalyst discovery and optimization*. Curr Opin Chem Biol. 2004; 8:141-9. Review.
- Rochu D, Viguié N, Renault F, Crouzier D, Froment MT, Masson P. *Contribution of the active-site metal cation to the catalytic activity and to the conformational stability of phosphotriesterase: temperature- and pH-dependence*. Biochem J. 2004; 380:627-33.
- Roodvelt C, Tawfik DS. *Shared promiscuous activities and evolutionary features in various members of amidohydrolase superfamily*. Biochemistry 2005; 44:12728-36.
- Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL. *The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule*. Mol Microbiol. 2001; 41:463-76.
- Schrader G. *Organische phosphor-verbindungen als neuartige insektizide (auszug)*. Angew. Chem. 1950; 62: 471–3.
- Seibert CM, Raushel FM. *Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily*. Biochemistry. 2005; 44:6383-91. Review.
- Serdar CM, Gibson DT, Munnecke DM, Lancaster JH. *Plasmid Involvement in Parathion Hydrolysis by Pseudomonas diminuta*. Appl Environ Microbiol. 1982; 44:246-9.

-
- Serdar CM, Gibson DT. *Isolation and characterization of altered plasmids in mutant strains of Pseudomonas putida NCIB 9816*. Biochem Biophys Res Commun. 1989; 164:764-71.
- Serres MH, Kerr AR, McCormack TJ, Riley M. *Evolution by leaps: gene duplication in bacteria*. Biol Direct. 2009; 4:46.
- Sethunathan N and T. Yoshida. *A Flavobacterium sp. that degrades diazinon and parathion*. Can. J. Microbiol. 1973; 19:873-875.
- She Q, Singh RK, Confalonieri F, et al *The complete genome of the crenarchaeon Sulfolobus solfataricus P2*. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 7835–40.
- Shim H, Raushel FM. *Self-assembly of the binuclear center of phosphotriesterase*. Biochemistry 2000; 39: 7357-64.
- Sinclair MI, Maxwell PC, Lyon BR, Holloway BW. *Chromosomal location of TOL plasmid DNA in Pseudomonas putida*. J Bacteriol. 1986;168:1302-8.
- Steiert, JS, Pogell BM, Speedie MK, Laredo J. *A gene coding for a membrane-bound hydrolase is expressed as a secreted soluble enzyme in Streptomyces lividans*. Bio/Technology 1989. 7:65-68.
- Stemmer WP, Cramer A, Ha KD, Brennan TM, Heyneker HL. *Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides*. Gene. 1995; 164:49-53.
- Studier FW, Moffatt BA. *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol. 1986; 189:113-30.
- Studier FW. *Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures*. Protein Expr. Purif. 2005; 41:207-234.
- Thomas PW, Stone EM, Costello AL, Tierney DL, Fast W. *The quorum-quenching lactonase from Bacillus thuringiensis is a metalloprotein*. Biochemistry 2005; 44: 7559-6.
- Tokuriki N, Stricher F, Serrano L, Tawfik DS. *How protein stability and new functions trade off*. PLoS Comput Biol. 2008; 4:e1000002.
- Van den Burg B, Vriend G, Veltman OR, Venema G, Eijssink VG. *Engineering an enzyme to resist boiling*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95:2056-60.

-
- Vanhooke JL, Benning MM, Raushel FM, Holden HM. *Three-dimensional structure of the zinc-containing phosphotriesterase with the bound substrate analog diethyl 4-methylbenzylphosphonate*. Biochemistry 1996; 35:6020-6025.
- Wang LJ, Kong XD, Zhang HY, Wang XP, Zhang J. *Enhancement of the activity of l-aspartase from Escherichia coli W by directed evolution*. Biochem Biophys Res Commun. 2000. 276:346-9.
- Watkins LM, Kuo JM, Chen-Goodspeed M, Raushel FM. *A combinatorial library for the binuclear metal center of bacterial phosphotriesterase*. Proteins. 1997; 29:553-61.
- World Health Organization 1986 (WHO, Geneva), WHO/VBC/86.926.
- World Health Organization 1990 (WHO, Geneva).World at Risk: The Report of the Commission on the Prevention of WMD Proliferation and Terrorism Inc. New York First Vintage Books Edition: December 2008.

PUBBLICAZIONI PRODOTTE DURANTE IL SEGUENTE LAVORO DI TESI:

- Merone L, Mandrich L, Rossi M, Manco G. *Enzymes with phosphotriesterase and lactonase activities in Archaea*. Current Chemical Biology 2008, 2:237-48 Review.
- Mandrich L, Merone L, Manco G. *Structural and kinetic overview of the carboxylesterase EST2 from Alicyclobacillus acidocaldarius: a comparison with the other members of the HSL family*. Protein Pept Lett. 2009;16(10):1189-200. Review
- Del Vecchio P*, Elias M*, Merone L*, Graziano G, Dupuy J, Mandrich L, Carullo P, Fournier B, Rochu D, Rossi M, Masson P, Chabriere E, Manco G. *Structural determinants of the high thermal stability of SsoPox from the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus*. Extremophiles 2009; 13:461-70. *contributo equivalente
- Febbraio F, D'Andrea SE, Mandrich L, Merone L, Rossi M, Nucci R, Manco G. *Irreversible inhibition of the thermophilic esterase EST2 from Alicyclobacillus acidocaldarius*. Extremophiles 2008; 12:719-28.
- Elias M, Dupuy J, Merone L, Mandrich L, Porzio E, Moniot S, Rochu D, Lecomte C, Rossi M, Masson P, Manco G, Chabriere E. *Structural basis for natural lactonase and promiscuous phosphotriesterase activities*. J Mol Biol. 2008; 379:1017-28.
- Elias M, Dupuy J, Merone L, Lecomte C, Rossi M, Masson P, Manco G, Chabriere E. *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the hyperthermophilic Sulfolobus solfataricus phosphotriesterase*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2007; 63:553-5.
- Porzio E*, Merone L*, Mandrich L, Rossi M, Manco G. *A new phosphotriesterase from Sulfolobus acidocaldarius and its comparison with the homologue from Sulfolobus solfataricus*. Biochimie 2007; 89:625-36. *contributo equivalente
- Merone L, Mandrich L, Porzio E, Rossi M, Müller S, Reiter G, Worek F, Manco G. *Turning a thermostable archaeal lactonase into a nerve agent hydrolase*. Submitted