





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOTECNOLOGIE INDUSTRIALI



**Analisi conformazionale di HydF, proteina di  
maturazione delle [FeFe]-idrogenasi, in risposta al  
legame con GTP**

**Relatore:** Prof.ssa Donatella Carbonera  
Dipartimento di Scienze Chimiche

**Correlatore:** Prof.ssa Paola Costantini  
Dipartimento di Biologia

**Correlatore:** Dott. Lorenzo Maso  
Dipartimento di Biologia

**Controrelatore:** Prof.ssa Elisabetta Bergantino  
Dipartimento di Biologia

**Laureando:** Luca Moro

ANNO ACCADEMICO 2015 / 2016







# SOMMARIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUZIONE</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1. L'idrogeno molecolare come combustibile ideale e metodi di produzione</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. Bioproduzione di idrogeno</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>3. Le idrogenasi</b> .....  | <b>4</b>  |
| 3.1. [FeFe]-Idrogenasi, struttura enzimatica e sito catalitico .....   | 7         |
| 3.2. La maturazione delle [FeFe]-idrogenasi .....  | 9         |
| <b>4. La maturasi HydF</b> .....   | <b>11</b> |
| 4.1. Il dominio II di HydF .....   | 13        |
| 4.2. Il dominio III di HydF .....  | 14        |
| 4.3. Il dominio I di HydF .....  | 14        |
| <b>5. La spettroscopia EPR</b> .....   | <b>16</b> |
| 5.1. Principi generali .....   | 17        |
| 5.2. <i>Spin labeling</i> .....  | 19        |
| 5.3. L'apparato sperimentale.....  | 20        |
| 5.4. CW-EPR.....   | 21        |
| <b>SCOPO DELLA TESI</b> .....  | <b>23</b> |
| <b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>1. Analisi biochimiche della proteina HydF espressa in <i>Escherichia coli</i> ..</b>   | <b>24</b> |
| 1.1. ITC .....   | 26        |
| 1.2. Analisi dello stato di oligomerizzazione, in presenza o assenza di GTP, di HydFTn mediante cromatografia per gel filtrazione..... | 28        |
| 1.3. Dicroismo circolare (CD).....   | 30        |
| <b>2. <i>Spin labeling</i> di HydFTn e analisi spettroscopiche CW-EPR</b> .....  | <b>31</b> |
| 2.1. Scelta dei mutanti per l'indagine spettroscopica.....   | 31        |
| 2.2. Mutagenesi sito-specifica di HydFTn, espressione in <i>E. coli</i> e purificazione dei mutanti di HydFTn.....                     | 33        |
| 2.3. <i>Spin labeling</i> dei mutanti di HydFTn e analisi CW-EPR in presenza ed in assenza di GTP.....                                 | 34        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RIASSUNTO DEL LAVORO DI TESI E CONCLUSIONI.....</b>             | <b>46</b> |
| <b>MATERIALI E METODI.....</b>                                     | <b>49</b> |
| 1. <b>Ceppi batterici (<i>E. coli</i>).....</b>                    | <b>49</b> |
| 2. <b>Media di coltura batterici.....</b>                          | <b>49</b> |
| 3. <b>Sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche di HydFTn .....</b> | <b>50</b> |
| 4. <b>Plasmidi utilizzati .....</b>                                | <b>55</b> |
| 5. <b>Metodi di biologia molecolare .....</b>                      | <b>55</b> |
| 6. <b>Metodi biochimici.....</b>                                   | <b>57</b> |
| 7. <b>Metodi calorimetrici.....</b>                                | <b>61</b> |
| 8. <b>Metodi spettroscopici .....</b>                              | <b>62</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>   | <b>65</b> |







# INTRODUZIONE

## 1. L'idrogeno molecolare come combustibile ideale e metodi di produzione

Nel panorama delle energie rinnovabili l'idrogeno molecolare ( $H_2$ ) spicca come combustibile ideale, grazie all'alto contenuto di energia rispetto alla massa (circa tre volte superiore a quello del comune diesel) e alla capacità di liberare energia producendo solo acqua nella reazione con ossigeno molecolare ( $O_2$ ), senza sottoprodotti tossici.

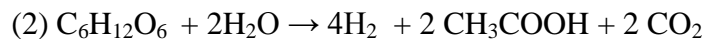
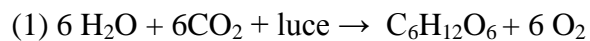
Allo stato della tecnica attuale, tuttavia, l'utilizzo dell'idrogeno molecolare rimane limitato al settore petrolchimico dove viene utilizzato come materia prima per la produzione di ammoniaca, metanolo, grassi alimentari e carburanti sintetici. Ciò è imputabile al fatto che, nonostante le eccellenti caratteristiche come combustibile, i costi dei processi di produzione e di immagazzinamento sono ancora troppo elevati. Nonostante l'idrogeno sia un elemento presente in grandissima abbondanza sul nostro pianeta, esso è praticamente assente nella sua forma molecolare a causa della forte tendenza a reagire con ossigeno e carbonio, motivo per cui lo si trova quasi esclusivamente come componente di acqua e di composti organici. Attualmente si scindono i legami chimici che lo legano a questi composti con metodologie (elettrolisi dell'acqua, *steam reforming* del metano, gassificazione del carbone, gassificazione e pirolisi delle biomasse e ossidazione parziale non catalitica degli idrocarburi) alimentate dagli stessi carburanti che si vorrebbero sostituire o con tecnologie ancora energeticamente inefficienti ed economicamente svantaggiose. Un'origine alternativa e molto promettente dell'idrogeno potrebbe essere la "bioproduzione" ad opera di microorganismi che la accoppiano a diversi processi metabolici, a seconda del tipo di microorganismo, sfruttando energia biochimica e partendo da materia organica o acqua e luce.

## 2. Bioproduzione di idrogeno

I processi della bioproduzione di H<sub>2</sub> operano per lo più a pressione e temperatura ambiente, e richiedono molta meno energia rispetto a metodi termochimici, inoltre, possono avvalersi di una moltitudine di substrati come fonte di carbonio per sostenere i microorganismi, permettendo anche di accoppiare il processo ad altre applicazioni interessanti, come ad esempio la bonifica di inquinanti.

Svariati microorganismi, dagli archea fino anche ad alghe unicellulari, accoppiano la produzione di H<sub>2</sub> a diversi percorsi metabolici:

- Organismi fotosintetici ossigenici come le alghe verdi, in condizioni di anaerobiosi, esprimono enzimi (le idrogenasi, si veda paragrafo 3) che catalizzano la riduzione di protoni a idrogeno molecolare impiegando gli elettroni in eccesso derivanti dalla biofotolisi diretta dell'acqua; in condizioni di aerobiosi gli elettroni derivanti transitano dai fotosistemi I e II fino alla ferrodossina (in parte vi arrivano anche quelli derivanti dall'ossidazione dei nutrienti attraverso la glicolisi e il ciclo di Krebs), la quale riduce NADP<sup>+</sup> a NADPH per fornire il potere riducente necessario al metabolismo del microorganismo; in anaerobiosi, invece, vengono espresse le idrogenasi che utilizzano gli elettroni forniti dalla ferrodossina per ridurre protoni a H<sub>2</sub> (Melis A. and Happe T., 2001).
- Organismi fotoautotrofi, come i cianobatteri, praticano la biofotolisi indiretta dell'acqua, separando lo step di acquisizione dell'energia luminosa (e fissazione della CO<sub>2</sub>) da quello di produzione di idrogeno in due reazioni distinte:



Queste reazioni sono tipiche di cianobatteri azoto fissatori e non azoto fissatori, che utilizzano l'ATP per sintetizzare idrogeno gassoso mediante le nitrogenasi. Questo sistema ha il vantaggio di separare nello spazio e nel tempo le due reazioni, evitando l'inibizione della nitrogenasi da parte dell'ossigeno (Manish S., 2008; Das D. et al., 2008); tuttavia, nonostante l'alta efficienza di conversione dell'acqua in idrogeno, l'alto consumo di

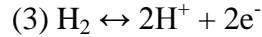
ATP dell'enzima risulta un fattore limitante per un eventuale sfruttamento biotecnologico.

- Batteri rossi sulfurei e non sulfurei, dotati di un solo fotosistema, mettono in atto la fotodecomposizione dei composti organici fotoossidando substrati ridotti alternativi all'acqua, come l'acido acetico, che garantiscono un ambiente anaerobico ideale per la sintesi dell'idrogeno, la quale avviene utilizzando elettroni provenienti dalla fermentazione.
- Microorganismi non fotosintetici, tipicamente batteri anaerobi, producono idrogeno come mezzo per mantenere l'elettroneutralità durante la fermentazione al buio, impiegando l'eccesso di elettroni liberato dall'ossidazione di substrati organici (Das D. et al., 2008); il processo in sé non è molto efficiente, ma la possibilità di accoppiarlo alla decomposizione di biomasse e rifiuti organici ne favorisce l'applicazione biotecnologica.
- Sono anche stati ideati sistemi ibridi che accoppiano in fotobioreattori coniugati batteri anaerobi che effettuano la fermentazione al buio a batteri fotosintetici che, metabolizzando gli intermedi di decomposizione provenienti dalla fermentazione, implementano la produzione di idrogeno dei primi.

Gli enzimi effettivamente responsabili della bioproduzione di idrogeno sono dunque le nitrogenasi e le idrogenasi (come già accennato in ogni caso le nitrogenasi non hanno un grande interesse biotecnologico). Attualmente, l'applicazione biotecnologica a livello industriale della bioproduzione di idrogeno è ancora fortemente limitata da due fattori principali: la sensibilità delle idrogenasi all'ossigeno e la competizione fotosintetica tra l'attività idrogenasica ed altri processi metabolici fondamentali per i microorganismi. Per questo motivo, sono in corso studi riguardanti la produzione di idrogeno da parte di idrogenasi isolate dal contesto del microorganismo, come ad esempio in celle fotoelettrochimiche che sfruttano l'enzima idrogenasi immobilizzato su un supporto solido grazie a nanotubi di carbonio (Svedružić D. et al., 2011) o solfuro di cadmio (Brown K. A. 2012). Risulta evidente, quindi, come sia necessario approfondire le conoscenze biochimiche e strutturali di questi enzimi dalle applicazioni molto promettenti.

### 3. Le idrogenasi

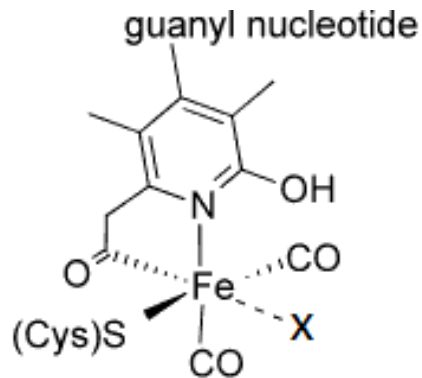
Le idrogenasi sono metallo-proteine che catalizzano la reazione:



La reazione è reversibile e dipende dal potenziale redox cellulare; il ruolo di questi enzimi consiste proprio nel mantenere il potenziale a livelli fisiologici costanti, catalizzando, in presenza di un eccesso di elettroni, la sintesi dell'idrogeno gassoso, mentre, in presenza di un accettore di elettroni, l'ossidazione del gas a protoni, ripristinando così il *pool* elettronico (Lubitz W. et al., 2007).

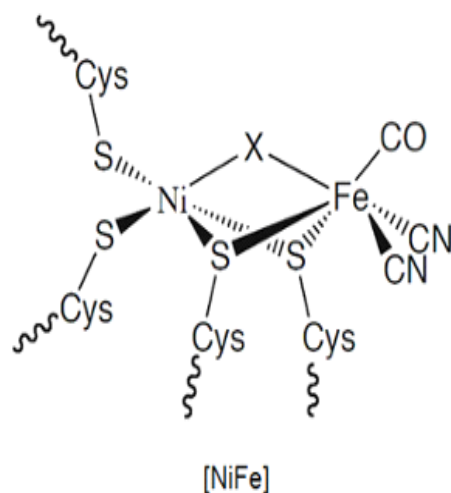
Questi enzimi sono stati individuati per la prima volta da Stephenson e Stickland nel 1931 (Stephenson M. and Stickland L.H., 1931) ed in seguito sono stati purificati e caratterizzati in diversi microorganismi. Grazie al sequenziamento ed al clonaggio di un ingente numero di geni codificanti per idrogenasi, a partire dalla seconda metà degli anni '80 è stato possibile classificare questi enzimi in tre classi filogeneticamente distinte, in base alle caratteristiche del loro sito attivo: [Fe]-idrogenasi, [NiFe]-idrogenasi e [FeFe]-idrogenasi.

Le [Fe]-idrogenasi sono quelle meno diffuse, presenti solo in alcuni archea metanogeni che le utilizzano per sfruttare l'idrogeno gassoso come fonte di energia per la produzione di metano. Strutturalmente differiscono dalle idrogenasi appartenenti alle altre due classi per avere un solo atomo di metallo (ferro) nel sito catalitico e per non presentare alcun centro ferro-zolfo (Shima S. et al., 2008). Inoltre, per il suo funzionamento, questo enzima richiede la presenza di methenyl-H4MPT<sup>+</sup> al fine di fornire gli intermedi riducenti necessari a ridurre l'anidride carbonica a metano (Thauer R. K. et al., 2010). La struttura del sito attivo delle [Fe]-idrogenasi è mostrata in dettaglio in figura 1.



**Figura 1. Rappresentazione del sito attivo di una [Fe]-idrogenasi.** L'unico atomo di ferro presente nel sito attivo è legato alla sequenza peptidica dal gruppo tiolico di una cisteina, oltre ad essere coordinato a due CO e all'N e al C di un ligando piridinolo che collega il metallo ad un guanil-nucleotide. X rappresenta il ligando nel sito attivo (immagine modificata da Bowen H. et al., 2014).

La classe delle [NiFe]-idrogenasi è quella che comprende il maggior numero di proteine, presenti in archeobatteri ed eubatteri. Queste, attraverso la reazione (3), catalizzano preferenzialmente l'ossidazione dell'idrogeno molecolare piuttosto che la sua sintesi. Sono state ottenute diverse strutture cristallografiche di [NiFe]-idrogenasi di diversi batteri solfato-riduttori, che hanno permesso di individuare la presenza di due subunità che formano un eterodimero di forma globulare nel quale il centro nichel-ferro fa parte del sito attivo ed è situato nella subunità maggiore (circa 60 kDa), mentre in quella minore (circa 30 kDa) sono presenti tre centri ferro-zolfo coinvolti nel trasporto elettronico. La geometria del sito attivo è altamente conservata in tutte le idrogenasi di questa classe, che presentano un centro bimetallico formato da un atomo di ferro e uno di nichel uniti mediante due legami tioestere, grazie ai gruppi tiolici di due cisteine del sito attivo. La struttura del sito attivo delle [NiFe]-idrogenasi è mostrata in dettaglio in figura 2.



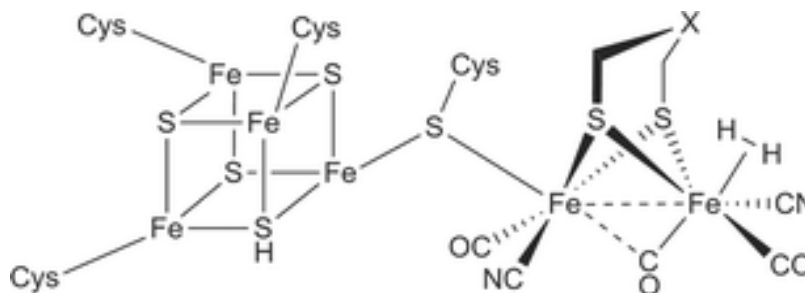
**Figura 2. Rappresentazione del centro metallico di una [NiFe]-idrogenasi.** L'atomo di nichel è immobilizzato dal legame con i gruppi tiolici di due cisteine, oltre ai due che lo collegano all'atomo di ferro, che a sua volta è legato anche a due molecole di CN<sup>-</sup> ed una di CO. X rappresenta il ligando (H<sub>2</sub>) nel sito attivo (immagine modificata da Allakhverdiev S. I. et al., 2010).

Le [FeFe]-idrogenasi sono enzimi presenti in diversi eubatteri, alghe verdi unicellulari e protisti e, a differenza delle [NiFe]-idrogenasi, sono prevalentemente coinvolte nella riduzione dei protoni ad idrogeno gassoso (Vignais P. et al., 2007). L'attività catalitica di questi enzimi, in termini di produzione di idrogeno gassoso, è 100 volte maggiore rispetto alle altre due classi di idrogenasi (Frey M., 2002). Questo fa sì che le [FeFe]-idrogenasi destino un maggiore interesse biotecnologico. Inoltre, presentando una grande variabilità nelle proprietà strutturali e nella distribuzione subcellulare all'interno dei vari microorganismi, nonché un'alta eterogeneità funzionale, gli studi riguardanti la singola proteina e la sua maturazione ad enzima cataliticamente attivo risultano particolarmente stimolanti.



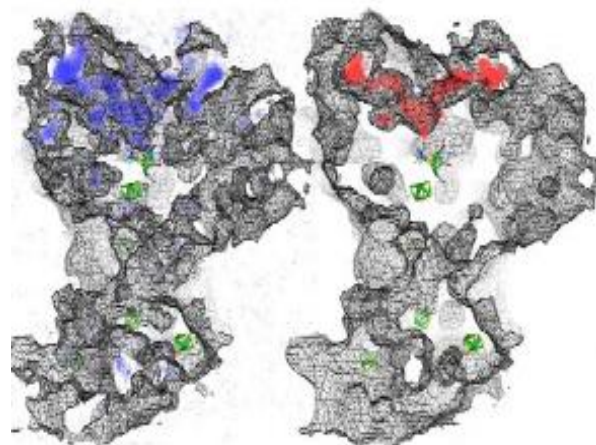
### 3.1. [FeFe]-Idrogenasi, struttura enzimatica e sito catalitico

Le [FeFe]-idrogenasi esistono in diverse forme, sia monomeriche che eterodimeriche e con diverse localizzazioni subcellulari, conservando tuttavia un'organizzazione modulare che comprende un *core* funzionale, il dominio H, e alcuni centri ferro-zolfo accessori (domini F) volti principalmente al trasferimento elettronico inter- e intramolecolare (Fontecilla-Camps J. C. et al., 2007). Il dominio H, costituito da circa 350 amminoacidi e situato al C-terminale, prende il nome dal sito attivo ospitato, il cosiddetto *H-cluster*, a livello del quale viene catalizzata la reazione (3). L'allineamento delle sequenze amminoacidiche di diverse [FeFe]-idrogenasi ha permesso di individuare in questo dominio tre motivi altamente conservati: L1 ( $C_1C_2P$ ), L2 ( $PC_3xxKxxE$ ) ed L3 ( $MxC_4xxGC_5xxG$ ). Questi motivi comprendono gli amminoacidi coinvolti nella coordinazione degli atomi del *H-cluster*, in particolare le cisteine 2, 3, 4 e 5 sono coinvolte nel legame con il centro [4Fe4S], detto cubano, e in particolare la cisteina 5 media il legame tra quest'ultimo e l'unità catalitica 2Fe (Meyer J. et al., 2007). La struttura del sito attivo delle [FeFe]-idrogenasi è illustrata in dettaglio in figura 3.



**Figura 3. Rappresentazione della struttura del *cluster H* di una [FeFe]-idrogenasi.** Il centro [4Fe4S] è legato alla proteina da quattro cisteine presenti nei motivi L1 ( $C_1$ ), L2 ( $C_3$ ) e L3 ( $C_4$  e  $C_5$ ). La cisteina 5 media inoltre il legame tra il cubano e il centro 2Fe. Gli altri ligandi dei due atomi di Fe del centro 2Fe sono due  $CN^-$ , tre CO (di cui uno condiviso dai due atomi di Fe) e due S (probabilmente appartenenti ad un ligando ditiometilamminico (Peters J. V. et al., 2012)) formanti un ponte ditiolico tra i due atomi di Fe. L'ultima posizione di coordinazione rimasta vacante nell'atomo di Fe distale è il sito attivo in cui si trova, a seconda della forma dell'enzima attivo, inattivo o inibito, rispettivamente  $H/H_2$ ,  $H_2O$  e CO (Vignais P. and Colbeau A., 2004) (immagine tratta da Hu M. Q. et al., 2010).

Per catalizzare la reazione (3), le [FeFe]-idrogenasi necessitano di elettroni e protoni. I primi, ceduti da opportuni *partners* redox, vengono forniti al centro 2Fe attraverso un trasferimento intra- ed intermolecolare mediato da una catena di centri [4Fe4S] (Vignais P. and Colbeau A., 2004), ognuno dei quali è associato ad un dominio F, il cui numero può variare a seconda dell'organismo, fatta eccezione per la più piccola [FeFe]-idrogenasi ad oggi nota, appartenente all'alga verde unicellulare *Chlamydomonas reinhardtii*, che non presenta alcun dominio F all'interno della sequenza amminoacidica. I protoni, invece, giungono al sito attivo dall'ambiente attraverso un *pathway* non ancora ben caratterizzato, che coinvolgerebbe alcuni residui situati in un ipotetico canale (Fontecilla-Camps J. C. et al., 2007). I gas come l'idrogeno prodotto dall'enzima e gli inibitori, rispettivamente irreversibili e reversibili, O<sub>2</sub> e CO, possono diffondere dall'esterno fino al sito attivo e viceversa, attraverso due brevi canali idrofobici (*pathway* A e B) individuati grazie a studi cristallografici e computazionali. Attraverso simulazioni di dinamica molecolare, quindi, sono state ottenute mappe di diffusione di gas all'interno dell'enzima, che hanno rivelato come l'ossigeno possa diffondere più lentamente ed esclusivamente attraverso questi canali, e come l'idrogeno possa invece farlo in maniera più estesa anche in regioni limitrofe grazie alle sue dimensioni ridotte, che gli permettono di sfruttare più cavità transienti formatesi in seguito ai moti molecolari, come rappresentato in figura 4 (Cohen J. et al., 2005).



**Figura 4. Rappresentazione delle mappe di diffusione delle molecole di H<sub>2</sub> (in blu) e di O<sub>2</sub> (in rosso) in una [FeFe]-idrogenasi (Cohen J. et al., 2005).**

Queste caratteristiche fanno sì che l'ossigeno possa inibire l'attività enzimatica occupando la posizione vacante dell'atomo di ferro distale del sito attivo, portando il suo stato di ossidazione a Fe(III) e provocando la perdita dei ligandi CO e CN<sup>-</sup>, con conseguente disgregazione del H-*cluster* (Lubitz W. et al., 2007). Non tutte le idrogenasi di questa classe hanno la stessa sensibilità all'ossigeno, che ad esempio nelle alghe verdi unicellulari impedisce addirittura la trascrizione dei geni codificanti per l'enzima (Florin L. et al., 2001; Happe T. and Kaminski A., 2002).

In *Thermotoga neapolitana* l'attività idrogenasica è attiva anche in condizioni di microaerobiosi (6-12 % v/v O<sub>2</sub>) (Van Ooteghem S. A., 2004), caratteristica molto interessante per la produzione biotecnologica dell'idrogeno che ha portato a ulteriori studi grazie ai quali è stato possibile ipotizzare che la maggiore tolleranza all'ossigeno sia dovuta alla presenza, all'entrata dei canali idrofobici, di amminoacidi meno carichi ma più polari, rispetto alle idrogenasi di altri organismi (Tosatto S. C. et al., 2007).

La peculiarità della [FeFe]-idrogenasi è comunque il suo centro 2Fe-[4Fe4S]. L'elevata complessità di questo *cluster* ha richiesto studi riguardanti il suo assemblaggio, i quali hanno portato all'individuazione di un particolare apparato proteico specificamente dedicato a questa funzione.

### **3.2. La maturazione delle [FeFe]-idrogenasi**

Il centro [4Fe4S] è presente nella [FeFe]-idrogenasi anche in assenza del complesso di maturazione, come dimostrato da uno studio di cristallografia a raggi X (Mulder D. W. et al., 2010). Questa evidenza ha portato all'ipotesi di una formazione sequenziale del sito catalitico: in un primo momento il *cluster* [4Fe4S] viene sintetizzato e inserito nell'idrogenasi da parte di un macchinario *housekeeping* per la sintesi dei centri FeS, successivamente avviene la biosintesi e il trasferimento del centro 2Fe, completo di ligandi non proteici (CO e CN<sup>-</sup>), ad opera di uno specifico sistema di maturazione. Questo sistema comprende tre diverse proteine scoperte in *C. reinhardtii* durante lo *screening* di mutanti incapaci di generare H<sub>2</sub> (Posewitz et al., 2004): i ceppi mostravano mutazioni nei geni *hydEF* e *hydG*, codificanti tre diverse proteine (HydE, HydF, HydG), successivamente risultate essere conservate in tutti gli organismi capaci di

esprimere una [FeFe]-idrogenasi funzionale. Tali proteine sono infatti necessarie alla maturazione di un centro 2Fe completo, come dimostrato dal fatto che l'assenza di una sola delle tre impedisce l'espressione di una [FeFe]-idrogenasi cataliticamente attiva (McGlynn S. E. et al., 2008). Ulteriori analisi di sequenza su HydE e HydG hanno permesso di attribuire entrambe alla famiglia delle radical-SAM (radical S-adenosilmetionina), accomunate dal motivo conservato C-X<sub>3</sub>-C-X<sub>2</sub>-C (Sofia H. J. et al., 2001). La struttura di HydE di *Thermotoga maritima* è stata risolta (Nicolet Y. et al., 2008), confermando ulteriormente la presenza di elementi strutturali tipici delle proteine radical-SAM, spesso coinvolte in processi chimici complessi come la biosintesi di cofattori, l'attivazione di enzimi, la formazione del *cluster* di metalloproteine. Tutti questi dati confermerebbero il ruolo di HydE e HydG nel sistema di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi; HydE sarebbe coinvolta nella sintesi del ponte ditiolato (Silakov A. et al., 2009), anche se il substrato utilizzato da questo enzima e gli intermedi di reazione non sono ancora stati determinati, mentre è stato dimostrato che HydG è coinvolta nella sintesi dei ligandi CO e CN<sup>-</sup> a partire da una tirosina (Kuchenreuther et al., 2014).

Lo studio di HydF, invece, ha consentito di individuare nella sua regione N-terminale alcune sequenze conservate tipiche delle *small-GTPases* e nella regione C-terminale un dominio per il legame di un centro ferro-zolfo (C<sub>x</sub>H<sub>x</sub><sub>46-53</sub>HC<sub>x</sub>C) (Brazzolotto X. et al., 2006). Nell'assemblaggio del H-*cluster* è richiesta una proteina che funga da piattaforma per la sua sintesi, legandolo in maniera transitoria per trasferirlo poi all'apoproteina: caratteristiche che sono state attribuite a HydF, sulla base di studi funzionali e strutturali riportati al paragrafo successivo, conferendole un ruolo chiave nel processo di maturazione. Secondo il modello corrente HydF interagirebbe con le altre maturasi in eventi distinti e sequenziali: dapprima HydE interagirebbe con HydF grazie alla sua maggiore affinità (Vallese F. et al., 2012) dando inizio alla modificazione chimica del centro 2Fe, dopodichè le due si dissocerebbero consentendo ad HydG di legarsi a sua volta allo *scaffold*. Completata la biosintesi del cluster precursore 2Fe, HydF lo trasferirebbe all'apoidrogenasi, già contenente il gruppo cubano ([4Fe4S]), portando alla formazione dell'oloenzima funzionale (schema riassuntivo del processo in figura 5).

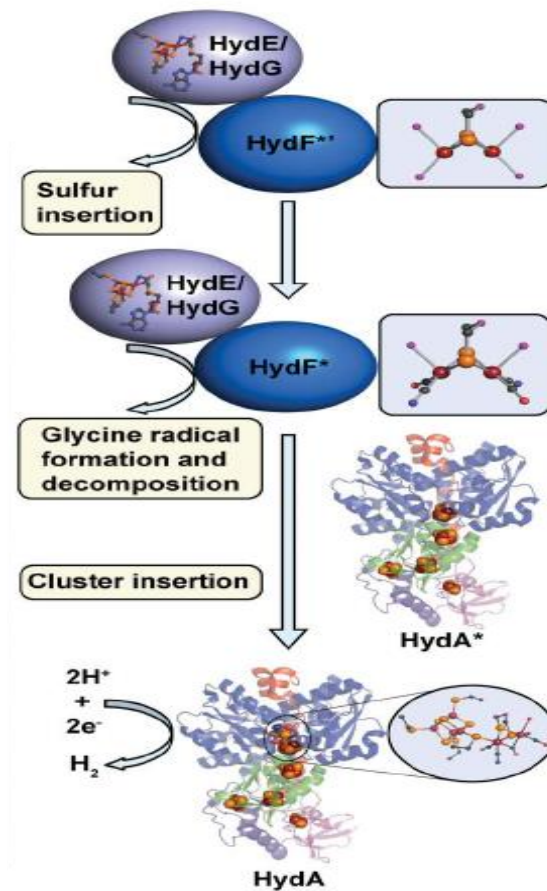


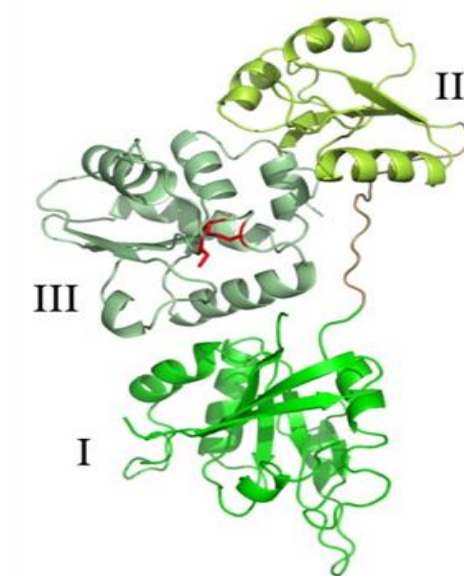
Figura 5. Rappresentazione schematica della maturazione di HydA da parte di HydEFG (McGlynn S. E. et al., 2009).

#### 4. La maturasi HydF

Il ruolo chiave di HydF nella maturazione del sito attivo della [FeFe]-idrogenasi è stato confermato da esperimenti svolti *in vitro* con proteine ricombinanti purificate, i quali hanno dimostrato la sua capacità di attivare la [FeFe]-idrogenasi anche in assenza di HydE e HydG, purchè precedentemente espressa in loro presenza (Mc Glynn S. E. et al., 2008). Tuttavia il meccanismo molecolare della sua azione non è stato ancora delucidato.

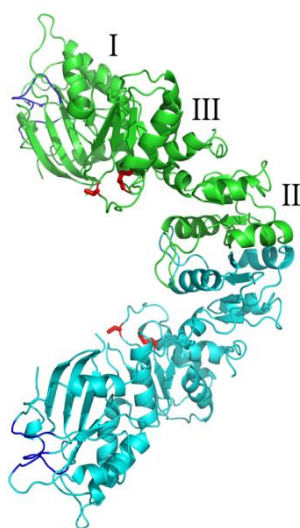
La caratterizzazione biochimica di HydF di *T. maritima* ha confermato la capacità della proteina di legare un *cluster* [4Fe4S] e di idrolizzare GTP, anche se con una bassa efficienza (Brazzolotto X. et al., 2006; Shepard E. M. et al., 2010).

Nel nostro laboratorio è stata risolta, mediante cristallografia a raggi X, la struttura tridimensionale della proteina HydF di *T. neapolitana* in forma ricombinante *apo*, completamente priva sia di GTP che di centri FeS legati, e dunque inattiva (Cendron L. et al., 2011). Il modello molecolare ottenuto suggerisce, tuttavia, che la forma funzionale della proteina sia un omodimero, in cui ciascun monomero presenta tre differenti domini (figura 6): un dominio per il *binding* del GTP (I), un dominio di dimerizzazione (II) e un dominio di legame del *cluster* metallico (III), tutti caratterizzati da un comune *fold*ing, *i.e.* un foglietto- $\beta$  parallelo fiancheggiato su entrambi i lati da  $\alpha$ -eliche.



**Figura 6. Il monomero di HydF visto in *cartoon drawing*, con i tre domini indicati con I, II, e III. I corrisponde al dominio GTPasico legato con un lungo *loop* (in marrone) al dominio di dimerizzazione II e il dominio III di legame del centro [4Fe4S], con le tre cisteine della sequenza consenso CXHX<sub>(44-53)</sub>HCXXC evidenziate in rosso (Cendron L. et al., 2011).**

La forma dimerica di HydF si presenta come una struttura aperta, con i vari domini esposti ed è stato ipotizzato che questa conformazione sia quella funzionalmente attiva nell'interazione con le altre maturasi e per il successivo trasferimento del *cluster* all'idrogenasi (figura 7).



**Figura 7. Dimero di HydF.** I due monomeri sono colorati in blu e in verde, mentre sono indicati con I, II e III, rispettivamente, il dominio GTPasico, il dominio di dimerizzazione e il dominio di legame del centro FeS (Cendron L. et al., 2011).

Tale modello è stato il punto di partenza per ulteriori studi biochimici sulla proteina in soluzione, la cui forma predominante è risultata essere dimerica, che si è vista conservare la capacità di legare sia un centro FeS che il GTP. In particolare, mediante analisi di spettroscopia EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) e HYSORE (*hyperfine sublevel correlation spectroscopy*) è stata confermata la presenza di un centro  $[4Fe4S]$  e il ruolo fondamentale delle tre cisteine conservate della sequenza consenso  $CXHX_{(44-53)}HCXXC$  nel legame del centro alla proteina, inoltre è stata evidenziata la variabilità del quarto ligando, che è risultato essere facilmente scambiabile e diverso a seconda delle HydF appartenenti a specie distinte (Berto P. et al., 2012; Albertini M. et al., 2014). Questa quarta posizione nel legame del centro potrebbe essere determinante, vista la labilità del legando nel processo catalitico di assemblaggio del precursore 2Fe del H-cluster.

#### 4.1. Il dominio II di HydF

Il dominio II, che comprende la porzione centrale della sequenza, è connesso al dominio I tramite un lungo tratto di amminoacidi (dal 172 al 185) che passa a lato del dominio III. Il dominio II è responsabile della dimerizzazione di HydF ed

è composto da un foglietto- $\beta$  a quattro *strands* paralleli e da tre  $\alpha$ -eliche, due da un lato del foglietto e una dal lato opposto. Il  $\beta$ -*strand* 4 del foglietto si appaia in maniera antiparallela all'equivalente  $\beta$ -*strand* di un altro monomero, dando vita a un foglietto continuo di 8 *strands*. La superficie totale che viene sepolta nella dimerizzazione è di circa 1800 Å<sup>2</sup>/monomero, numero che indica l'esistenza di un dimero stabile in condizioni fisiologiche.

#### 4.2. Il dominio III di HydF

Il dominio III, che comincia subito dopo il dominio II nella porzione C-terminale del monomero, contiene il sito di legame per il centro [4Fe4S], e rappresenta il dominio catalitico di formazione del precursore 2Fe dell'idrogenasi. Nella struttura tridimensionale occupa la posizione centrale, fra il dominio I e il dominio II. In questa porzione si trova la sequenza CXHX<sub>(44-53)</sub>HCXXC che include le tre cisteine conservate coinvolte nel legame del centro [4Fe4S].

#### 4.3. Il dominio I di HydF

La porzione N-terminale di HydF, corrispondente al dominio I, è responsabile del legame al GTP e la sua struttura è molto simile a quella di altre GTPasi, tanto che la sovrapposizione con queste porta a valori di RMSD (*root-mean-square-deviation*) di poco più di 2 Å (Cendron L. et al., 2011). È infatti ricorrente in tali proteine l'estesa struttura formata da cinque  $\beta$ -*strands* paralleli ed uno antiparallelo, fiancheggiata in un lato da tre  $\alpha$ -eliche e due dall'altro. Altro elemento strutturale comune è la presenza di amminoacidi conservati e distribuiti in cinque sequenze consenso, importanti per il legame e l'idrolisi del GTP, riportate nella figura 8.



MLEDPARRYTMRLPDAGFRRYIVVAGRRNVGKSSFMNALVQGQNVSIIVSDYAGTTTD  
 PVYKSMELHPIGPVTLVDTPGLDDVGELGRLRVEKARRVIFYRADCGILVTSAPTP  
 YEDDVVNLFKEMEIPFVVVVNKIDVLGEKAEELKGLYESRYEAKVLLVSALQKKG  
 FDDIGKTISEILPGDEEI

**Figura 8. Sequenze consenso del dominio GTPasico di HydFTn implicate nel legame e nell'idrolisi del GTP. (G/A)X<sub>4</sub>GK(T/S):** sequenza responsabile del legame coi fosfati  $\alpha$  e  $\beta$  del GTP (*P-loop*); **TTT:** uno di questi tre residui corrisponde alla treonina conservata del *G2-loop* coinvolto nel legame con il  $Mg^{2+}$ ; **DXXG:** forma il *G3-loop* coinvolto nell'interazione con il fosfato  $\gamma$  del GTP e con il  $Mg^{2+}$ ; **(N/T)(K/Q)XD:** *G4-loop*, che si suppone interagisca con il GTP; **(T/G/C)(C/S)A:** *G5-loop*, riconosce la base (guanina) del GTP.

Le NTPasi sono spesso coinvolte nell'assemblaggio di cofattori metallici di proteine con centri FeS, nel corso del quale partecipano al trasferimento del centro all'apoproteina oppure all'inserimento del metallo nel sito attivo. Nel caso della [FeFe]-idrogenasi, esperimenti di mutagenesi sito-specifica hanno dimostrato l'assoluta necessità del dominio GTPasico di HydF per un corretto processo di maturazione dell'enzima in forma attiva (King P. W. et al., 2006), senza tuttavia chiarire in modo definitivo quale ne sia il contributo preciso nel processo di maturazione. È stato dimostrato che l'attività GTPasica di HydF *in vitro* aumenta in presenza delle altre due maturasi, suggerendo un ruolo nell'interazione tra queste proteine ma è stato escluso un suo specifico coinvolgimento nel passaggio del precursore del *H-cluster* dallo *scaffold* all'idrogenasi (Shepard E. M. et al., 2010). La struttura tridimensionale di HydF indica che il suo dominio GTPasico possiede un lungo *loop* estremamente flessibile che potrebbe andare incontro a riarrangiamento in seguito al legame con il nucleotide (Cendron L. et al., 2011). Questo evento potrebbe facilitare modificazioni strutturali utili alla dinamica di associazione/dissociazione tra le diverse proteine che partecipano alla maturazione della [FeFe]-idrogenasi.

Alla luce di questi dati, e per approfondire le proprietà di GTPasi di HydF e il suo ruolo chiave nel processo di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi, nel laboratorio in cui è stata svolta questa tesi sono stati condotti studi attraverso la tecnica di *spin labeling* accoppiata alla risonanza magnetica di *spin* elettronico - EPR, sia nella modalità *continuous wave* (CW) che *double electron-electron*

*resonance* (DEER), sul dominio I isolato dal resto della proteina nel tentativo di mettere in luce variazioni conformazionali del dominio stesso indotte dal legame o dall'idrolisi del nucleotide. Il risultato più significativo ottenuto dall'applicazione esplorativa della tecnica sul dominio isolato è stata l'osservazione di una possibile diminuzione della mobilità di un elemento di struttura secondaria vicino al lungo *loop* mobile che collega il dominio GTPasico a quello di dimerizzazione (Maso L. et al., 2015) ma non sono state osservate variazioni strutturali importanti. Tuttavia l'interazione con domini II e III a cui il dominio GTPasico è associato potrebbe svolgere un ruolo importante nelle variazioni strutturali indotte dal GTP.

Nel lavoro riportato in questa tesi si è deciso quindi di estendere gli studi con la stessa tecnica spettroscopica all'intera proteina HydF, con lo scopo di ottenere risultati più significativi nella definizione della funzione dell'idrolisi del GTP nel meccanismo d'azione della proteina.

## **5. La spettroscopia EPR**

La spettroscopia di risonanza magnetica di spin elettronico EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) è una tecnica che permette di rilevare e caratterizzare specie contenenti elettroni spaiati, come ad esempio radicali liberi, stati foto eccitati con spin non nullo, complessi metallici in particolari stati di ossidazione. La tecnica è largamente utilizzata in campo biologico ed è applicabile anche allo studio di sostanze intrinsecamente non paramagnetiche, mediante l'utilizzo di *spin labels* inseriti opportunamente nelle macromolecole di interesse. Un aspetto particolarmente utile per lo studio di proteine ed altri sistemi complessi, è che la tecnica può essere impiegata per l'analisi di struttura e conformazionale in condizioni non denaturanti, in soluzione, senza la necessità di processi limitanti e complessi come la cristallizzazione e in macromolecole di qualsivoglia dimensione .

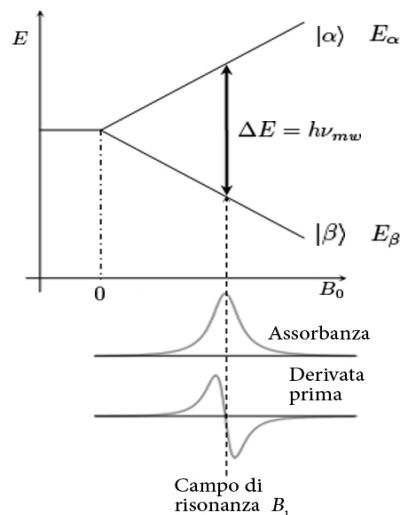
Esistono diverse tecniche di spettroscopia EPR, più o meno avanzate, che permettono di ottenere numerose informazioni sui campioni in esame. Per gli scopi di questo lavoro di tesi verrà illustrata la tecnica EPR in onda continua, o *Continuous Wave EPR* (CW-EPR). In questo tipo di tecnica, il campione viene

irradiato con radiazione elettromagnetica a microonde a frequenza fissa, mentre un campo magnetico statico viene variato in intensità in modo continuo. Le condizioni di risonanza vengono raggiunte quando la differenza di energia tra livelli di *spin* elettronico determinata dal campo magnetico statico e dalle caratteristiche del campione eguaglia l'energia associata alla radiazione a microonde (figura 9).

### 5.1. Principi generali

I principi della spettroscopia EPR sono simili a quelli della spettroscopia NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*), con la sostanziale differenza che, come indicano i nomi, con la prima si osserva lo *spin* elettronico, mentre con la seconda quello nucleare. Affinché si possa osservare un segnale EPR, è necessario che vi sia un'interazione tra la radiazione elettromagnetica e i momenti magnetici associati allo *spin* elettronico della specie in analisi, in presenza di un campo magnetico esterno. Come detto in precedenza, per fare ciò è necessario che la specie possieda un momento angolare di *spin* elettronico  $S$  non nullo, il quale genera un momento di dipolo magnetico  $\mu$  antiparallelo ad esso. Nel caso, ad esempio, di una specie radicalica con  $S=1/2$  immersa in un campo magnetico statico e uniforme  $B$ , il momento magnetico  $\mu$  interagisce con questo (interazione Zeeman), modificando l'energia dei due possibili stati di *spin* elettronico  $\alpha$  ( $+1/2$ ) e  $\beta$  ( $-1/2$ ), facendole perdere la degenerazione. Per far sì che avvenga il passaggio da uno stato di *spin* all'altro è necessario che il sistema assorba un quanto di energia pari alla differenza di energia tra di essi, in modo da rispettare la condizione di risonanza ( $h\nu = \Delta E$ ). Questa condizione può essere ottenuta sia mantenendo costante il campo magnetico e variando la frequenza della radiazione elettromagnetica, sia mantenendo fissa la frequenza e variando il campo in maniera continua, come avviene nella tecnica CW-EPR (Figura 9). I due stati di *spin*  $\alpha$  e  $\beta$  sono popolati secondo la distribuzione di equilibrio di Boltzmann, quindi a temperatura ambiente, vista la differenza di energia tra i due stati, lo stato a minore energia è più popolato rispetto allo stato a maggiore energia. Nelle misure EPR, aumentando l'intensità del campo magnetico esterno, la differenza di energia tra gli stati di *spin*  $\alpha$  e  $\beta$  tende ad aumentare, fino al raggiungimento del valore di risonanza con la radiazione elettromagnetica a frequenza fissa

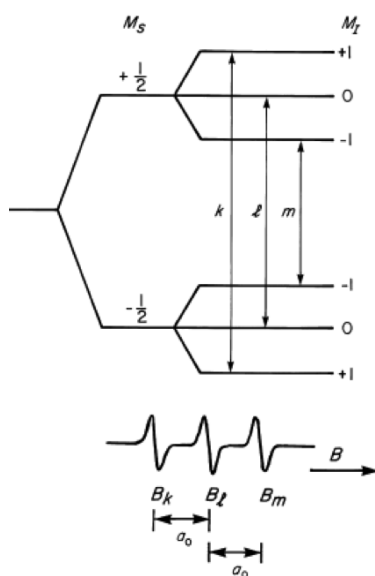
(microonde), in corrispondenza del quale si genera un picco di assorbimento (riga nello spettro EPR) dovuto alla maggiore popolazione presente allo stato energetico inferiore.



**Figura 9. Livelli energetici per un sistema con un elettrone isolato con  $S = \frac{1}{2}$  ( $\alpha = \frac{1}{2}$  e  $\beta = -\frac{1}{2}$ ) in funzione del campo magnetico statico applicato  $B_0$ .**

Nei sistemi molecolari gli elettroni spaiati possono interagire magneticamente con vari nuclei. Infatti, alcuni nuclei possiedono anch'essi un momento angolare di *spin* ( $I$ ), a cui corrisponde un momento magnetico che porta l'energia dello *spin* nucleare ad essere influenzata dal campo (effetto Zeeman nucleare). Lo *spin* elettronico, in presenza di uno *spin* nucleare, risente di un campo aggiuntivo dato dal momento magnetico nucleare che influenza le condizioni di risonanza. Questa interazione tra nucleo ed elettrone è detta interazione iperfine, analoga all'accoppiamento  $J$  della tecnica NMR, e provoca la separazione del segnale di risonanza EPR in  $2nI + 1$  picchi (dove  $n$  è il numero di nuclei equivalenti e  $I$  il momento angolare associato allo *spin* nucleare). Nel caso dei nitrossidi (NO), specie paramagnetiche largamente utilizzate come *spin label* di macromolecole biologiche (come descritto nel paragrafo successivo), l'elettrone spaiato è accoppiato ad un nucleo  $^{14}\text{N}$ . In questo caso le configurazioni di *spin* sono 6, date dalle combinazioni dei momenti angolari elettronici ( $+\frac{1}{2}$  e  $-\frac{1}{2}$ ) e nucleari ( $+1$ ,  $0$  e  $-1$ , essendo  $I=1$ ). Secondo le regole di selezione sono permesse solo le transizioni  $\Delta M_I = 0$  e  $\Delta M_S = \pm 1$ , ossia solo 3 delle possibili, dando vita a 3 picchi nello spettro EPR (illustrato in figura 10), rispettando infatti

l'equazione  $2nI + 1 =$  “numero di picchi”, che per un nucleo di  $^{14}\text{N}$  ( $I = 1$ ) è appunto 3. La separazione delle righe EPR è determinata dall'accoppiamento iperfine ( $a_0$ ), che per specie in soluzione contiene solo il termine isotropo di contatto, o di Fermi. Se il moto in soluzione non è veloce, oppure in campioni congelati, la separazione tra le righe è determinata anche da un accoppiamento dipolare tra i momenti di *spin* elettronico e nucleare.



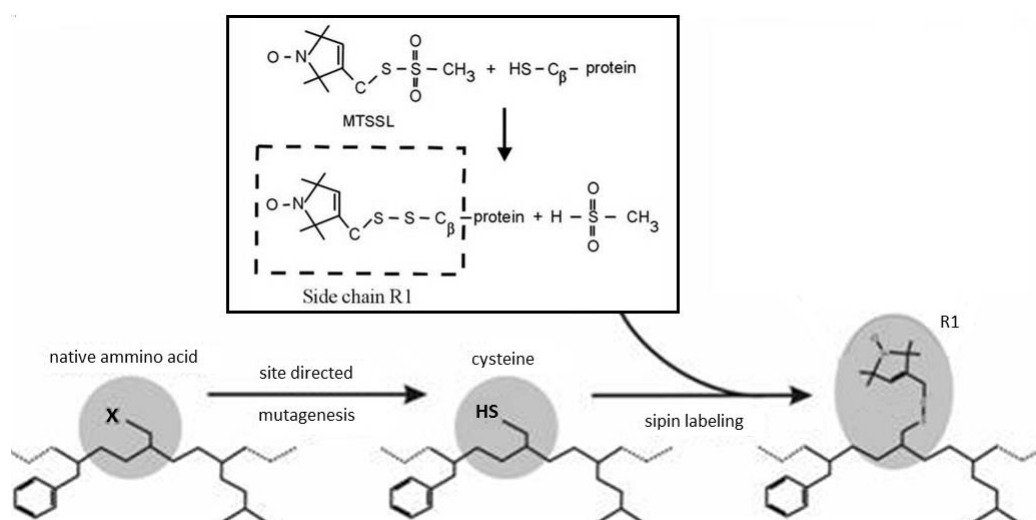
**Figura 10.** Livelli energetici per un sistema a campo costante con  $S = 1/2$  e  $I = 1$ .

Dall'analisi delle forme di riga dello spettro EPR dovute all'interazione iperfine e ad altri parametri, si possono ricavare informazioni riguardanti l'intorno e la mobilità della specie osservata, e inoltre in sistemi *multispin* le distanze tra diversi *spin*.

## 5.2. Spin labeling

Come accennato in precedenza, affinché proteine intrinsecamente non paramagnetiche siano osservabili con la spettroscopia EPR, è necessario inserirvi specie contenenti elettroni spaiati: gli *spin probes*. Questo procedimento, denominato *spin labeling*, può essere effettuato principalmente in due modi. Uno di questi consiste nell'incorporazione all'interno della proteina di amminoacidi paramagnetici, il che prevede però la sintesi chimica della proteina di interesse, rendendo così il processo molto dispendioso e complicato, e difficilmente

applicabile a proteine di grandi dimensioni. La tecnica più versatile e più utilizzata è invece quella che consiste nell'utilizzo del gruppo tiolico di residui di cisteina, presenti naturalmente nelle proteine o inseriti mediante mutagenesi sito-specifica, per legarvi successivamente, mediante legame disolfuro, diversi tipi di nitrossidi, specie contenenti un elettrone spaiato localizzato nel gruppo NO, in modo da ottenere residui marcati con uno *spin probe*. Questo processo richiede che nella proteina in esame siano presenti solamente le cisteine nei siti desiderati, mentre le eventuali altre cisteine presenti nella proteina vanno eliminate, sostituendole solitamente con serine o alanine. Il nitrossido più utilizzato per questo scopo è l'MTSSL ((1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrroline-3-methyl) methanethiosulfonate) (figura 13), vista la sua specificità per il gruppo tiolico, il suo volume compatto, simile a quello di una catena laterale di un residuo di triptofano, e la sua flessibilità che permette alle proteine marcate con questo *spin probe* di mantenere la conformazione nativa. Il procedimento e la reazione dello *spin labeling* sito-specifico sono illustrati in figura 11.

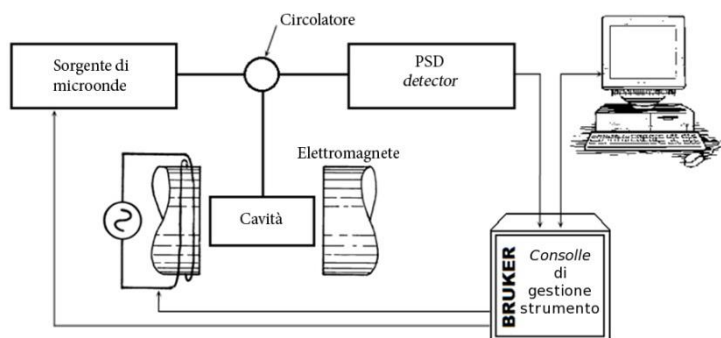


**Figura 11. Schema rappresentativo della procedura di *spin labeling* sito-specifico.** Nel riquadro in alto il particolare dello *spin probe* MTSSL e la sua reazione di legame alla cisteina.

### 5.3. L'apparato sperimentale

Lo strumento utilizzato per la spettroscopia EPR consiste indicativamente in: un magnete, che genera il campo necessario per separare i livelli di *spin* elettronici, una cavità risonante, dove vengono inviate le microonde e dove viene

posto il campione, un ponte a microonde, nel quale si trovano la sorgente di radiazione e il rivelatore, e una *consolle*, per la gestione elettronica dell'esperimento e l'elaborazione dei dati. L'apparato è schematizzato in figura 12.



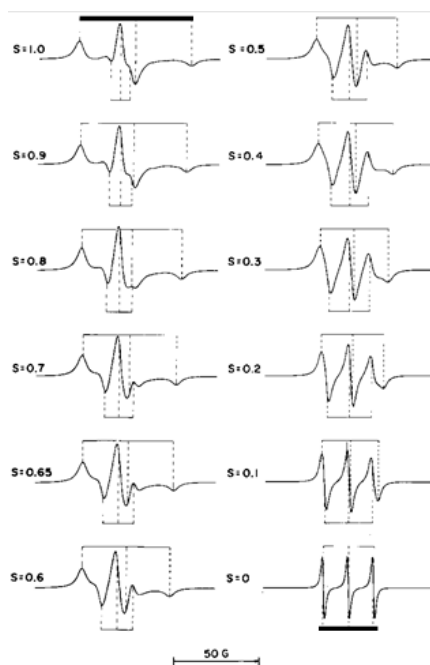
**Figura 12. Schema a blocchi di uno strumento EPR in onda continua.**

#### 5.4. CW-EPR

Solitamente queste analisi vengono condotte in banda X, ossia con le microonde all'interno della cavità risonante ad una frequenza di circa 9 GHz. Queste, una volta emesse dal generatore, passano poi ad un attenuatore, necessario per regolarne la potenza ed evitare la saturazione del segnale. Una volta attenuate, le microonde vengono convogliate, grazie ad un circolatore, verso la cavità in cui è inserito il campione e successivamente, in uscita dalla cavità, al rivelatore, che ne misura l'intensità. Come accennato in precedenza, è il campo magnetico esterno a variare, mentre le microonde sono ad una frequenza fissa. Ogni cavità ha una propria frequenza di risonanza. In questo modo, a tale frequenza, le onde elettromagnetiche della radiazione rimangono all'interno della cavità, amplificandosi per riflessione sulle pareti conduttrici. Al fine di minimizzare l'assorbimento non risonante via campo elettrico e la conseguente dissipazione di energia, si dispone il campione al centro della cavità, in corrispondenza del massimo della componente magnetica del campo elettromagnetico associato alla radiazione e del minimo di quello della componente elettrica. Le microonde arrivano o escono dalla cavità mediante un foro, detto iris, la cui ampiezza può essere regolata, al fine di raggiungere un valore di impedenza della guida d'onda

uguale a quello della cavità, ottenendo così il massimo passaggio di radiazione alla cavità. Con l'assorbimento di radiazione da parte del campione, quando viene raggiunta la condizione di risonanza, l'impedenza cambia e si ha riflessione delle microonde verso il rivelatore (proporzionale all'assorbimento), evento che dà origine al segnale EPR. Per ragioni strumentali di amplificazione del segnale, quest'ultimo viene rivelato nella forma di derivata dello spettro di assorbimento.

Come già accennato, grazie a questa tecnica si possono, in particolare, ottenere informazioni sulla dinamica degli *spin probes* presenti nella specie di interesse. La forma dello spettro ottenuto, infatti, è fortemente influenzata dal moto orientazionale dello *spin probe*, e di conseguenza dalla sua mobilità e dal suo intorno. I nitrossidi si sono rivelati specie radicaliche particolarmente adatte agli studi conformazionali e dinamici di macromolecole. Gli spettri associati agli *spin probes* risultano più allargati, e con variazioni marcate sull'intensità relativa dei picchi, man mano che i nitrossidi perdono mobilità, allontanandosi dallo spettro più simmetrico e con tre picchi stretti tipico dello *spin probe* libero di ruotare in soluzione, come mostrato in figura 13. Molto spesso il moto della proteina in soluzione avviene su una scala dei tempi molto lenta e lo spettro EPR dello *spin probe* è dominato dalla dinamica locale.



**Figura 13. Variazioni nello spettro EPR in onda continua di un nitrossido al diminuire del parametro d'ordine  $S$ , indice della mobilità della sonda nel sito in cui si trova. Essendo una misura della costrizione del moto,  $S$  ha valore = 1 quando la sonda è immobile, mentre  $S = 0$  quando la sonda è completamente libera di muoversi.**



## SCOPO DELLA TESI

Le [FeFe]-idrogenasi sono metallo-enzimi che catalizzano la riduzione di protoni a idrogeno molecolare ( $H_2$ ), considerati molto promettenti in termini di bioproduzione di idrogeno. Comprenderne il meccanismo di funzionamento è di vitale importanza per progettare fonti di energia pulita e rinnovabile che si basino su questi enzimi. Tale comprensione è complicata dal fatto che questa classe di idrogenasi contiene un *cluster* 2Fe-[4Fe4S], tanto complesso da richiedere un sistema di maturazione apposito per il suo assemblaggio, composto dalle proteine HydE, HydF e HydG. Fra queste HydF svolge il ruolo chiave di *scaffold*. La struttura tridimensionale di HydF in forma di apoproteina è stata risolta nel nostro laboratorio, mostrando la presenza di tre diversi domini: uno in grado di legare un centro [4Fe4S], uno di dimerizzazione e uno GTPasico. Il contributo dell'attività GTPasica di HydF rimane oscuro, nonostante la struttura tridimensionale di HydF suggerisca che il legame con il nucleotide possa introdurre modificazioni strutturali potenzialmente importanti per l'attività di *scaffold* della proteina. Studi biochimici svolti in precedenza nel nostro laboratorio su HydF in soluzione suggeriscono che il legame del GTP potrebbe essere coinvolto nella dinamica delle interazioni tra le tre maturasi. In un lavoro precedente questa tesi sono stati pertanto svolti studi spettroscopici sul dominio GTPasico isolato di HydF, valutando le eventuali modificazioni conformazionali indotte dal legame col GTP.

Tali studi sul dominio isolato si sono, tuttavia, rivelati poco significativi e sono stati il punto di partenza del mio lavoro di tesi, che è volto invece alla valutazione delle variazioni conformazionali subite dall'intera proteina HydF in seguito al legame del GTP. A tale scopo la proteina è stata espressa e purificata in forma ricombinante e ne è stata valutata l'affinità per il nucleotide. In particolare con il mio lavoro si è cercato di localizzare e definire molecularmente i cambi conformazionali della proteina. Come metodo principale si è utilizzata l'analisi spettroscopica CW-EPR, attraverso la tecnica SDSL (*site directed spin labeling*) che consiste nell'inserimento di cisteine in posizioni ritenute diagnostiche mediante mutagenesi sito-specifica e successiva marcatura tramite *spin labeling*.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

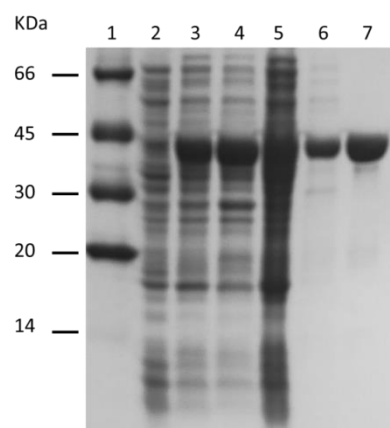
Come riportato nell'introduzione, l'effetto del GTP sulla maturasi HydF (proteina chiave nella maturazione della [FeFe]-idrogenasi con il suo duplice ruolo di *scaffold* e *carrier* del centro metallico) non è stato ancora definito chiaramente. Un ostacolo alla comprensione di tale effetto si è presentato nell'impossibilità di cristallizzare la proteina in presenza del GTP nel suo sito attivo. È comunque stata dimostrata la capacità della proteina in soluzione di legare il nucleotide e di idrolizzarlo, ed evidenze sperimentali precedentemente ottenute in laboratorio, combinate al modello strutturale dell'apoproteina, hanno suggerito che il legame del GTP al dominio I di HydF possa introdurre nella proteina variazioni conformazionali potenzialmente importanti per il suo ruolo nel processo di maturazione e attivazione dell'idrogenasi. I risultati ottenuti tramite tecniche spettroscopiche avanzate in questo laboratorio sul dominio GTPasico isolato di HydF, hanno stimolato l'estensione dello studio alla proteina intera, nel tentativo di definire meglio le ipotesi sull'effetto strutturale indotto dal legame del nucleotide.

### 1. Analisi biochimiche della proteina HydF espressa in *Escherichia coli*

La proteina HydF di *T. neapolitana* (HydFTn) è stata espressa in *E. coli* in forma ricombinante, in fusione con un epitopo esaistidinico, necessario alla sua successiva purificazione mediante cromatografia di affinità, utilizzando le stesse condizioni sperimentali precedentemente messe a punto per l'espressione del dominio GTPasico isolato. A questo scopo, un ceppo di *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS, particolarmente utilizzato per l'espressione di proteine codificate da geni contenenti codoni rari, come quelli di *T. neapolitana*, è stato trasformato chimicamente mediante *shock* termico, come descritto in dettaglio nella sezione Materiali e metodi, con il plasmide pET-15b/HydFTn6his.

Da una delle numerose colonie di batteri risultati positivi alla trasformazione, selezionati con gli appositi antibiotici, è stata ottenuta una coltura in sospensione, nella quale l'espressione della proteina d'interesse è stata indotta tramite l'aggiunta di IPTG, come descritto nella sezione Materiali e metodi.

È stata scelta la modalità di espressione risultata più efficace nel lavoro precedente, ovvero a 30 °C per tutta la notte (figura 14, corsia 3). Successivamente, le cellule sono state lisate mediante French Press e la frazione solubile del lisato totale, contenente la proteina HydF in soluzione (figura 14, corsia 4) è stata sottoposta a cromatografia di affinità NiNTA, allo scopo di purificarla sfruttando l'epitopo esaistidinico presente alla sua estremità N-terminale, come descritto in maggiore dettaglio nella sezione Materiali e metodi. La proteina purificata, caricata nella corsia 6, è stata in seguito sottoposta ad un ulteriore passaggio cromatografico di gel filtrazione, descritto nella sezione Materiali e metodi, allo scopo di eliminare le proteine contaminanti ed ottenere la proteina di interesse nella forma più pura possibile (corsia 7).



**Figura 14. Espressione e purificazione della proteina HydF.** Corsia 1, marcatori di peso molecolare (5  $\mu$ l); corsia 2, campione non indotto (15  $\mu$ l); corsia 3, campione indotto (15  $\mu$ l); corsia 4, frazione solubile del lisato totale (10  $\mu$ l); corsia 5, frazione insolubile del lisato totale (5  $\mu$ l); corsia 6, proteina purificata per affinità (10  $\mu$ l); corsia 7, proteina ulteriormente purificata per gel filtrazione (10  $\mu$ l). SDS-PAGE, colorazione con Coomassie Brilliant Blue.

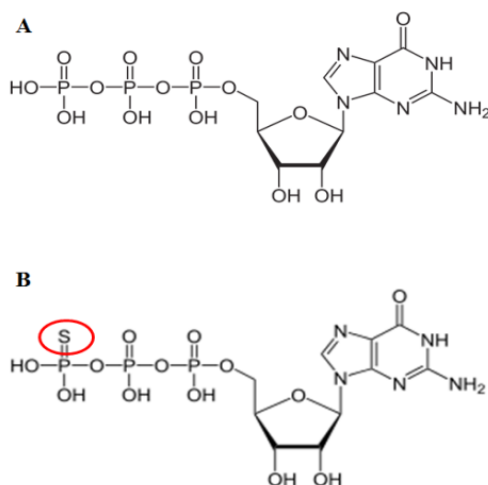
Dato l'interesse principale di questo lavoro, ovvero lo studio dell'effetto del legame del GTP alla proteina, è stata condotta una caratterizzazione biochimica preliminare, che ha previsto 1) la determinazione della costante di affinità per il nucleotide della proteina ricombinante e 2) l'analisi del suo stato di oligomerizzazione, in presenza e in assenza di GTP. La capacità di HydFTn di legare e idrolizzare il GTP, come riportato nell'introduzione, era stata già valutata in studi precedenti che hanno portato alla determinazione della costante  $k_{cat}$  (parametro cinetico che indica la velocità di conversione del substrato da parte

dell'enzima), fornendo un valore pari a  $1,135 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$  (Shepard E. M. et al., 2010; Vallese F. et al., 2012), ma non della costante di affinità per il GTP. Si è deciso pertanto di calcolare il suddetto parametro per valutare le condizioni ottimali di legame del GTP (da utilizzare nei successivi esperimenti) mediante la tecnica dell'*isothermal titration calorimetry* (ITC).

### 1.1. ITC

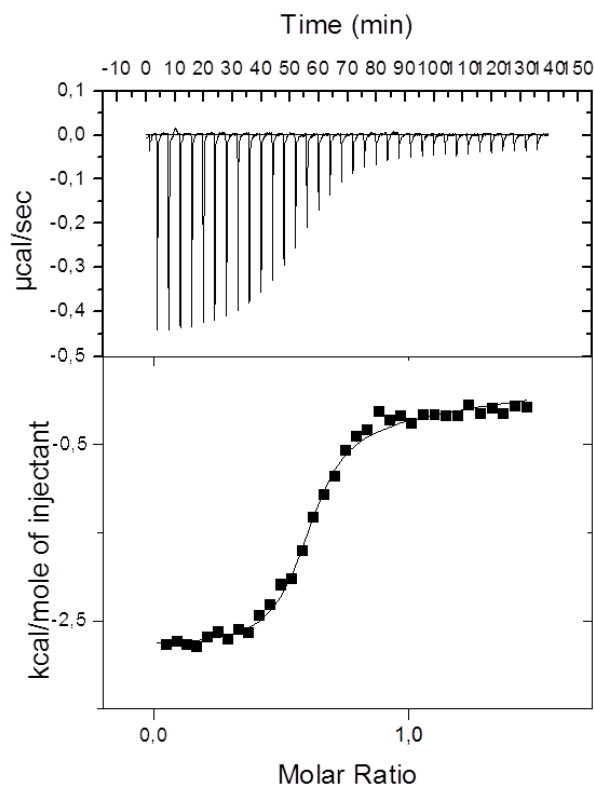
La metodologia ITC (descritta in dettaglio in Materiali e metodi) permette di determinare il profilo termodinamico completo (stechiometria, costante di affinità, variazione di entalpia e variazione di entropia) di una reazione ligando-recettore in un singolo esperimento *label-free*, caratterizzando quindi nello specifico l'interazione tra HydF e GTP.

La proteina *wild type* è stata purificata per affinità e gel filtrazione come descritto in precedenza, portata alla concentrazione adeguata per l'esperimento e posta in cella, mentre in siringa è stato caricato GTP in soluzione acquosa a concentrazione nota. Per le finalità dell'esperimento è stata utilizzata una variante non idrolizzabile del nucleotide, il GTP $\gamma$ S, in modo che non fosse presente una componente di idrolisi e poter così determinare l'affinità di legame (figura 15).



**Figura 15. Struttura di GTP (A) e GTP $\gamma$ S (B).** Il GTP $\gamma$ S (guanosina 5'-O-[gamma-tio]trifosfato) è caratterizzato dalla sostituzione di uno degli atomi di ossigeno che legano l'atomo di fosforo distale (detto  $\gamma$ ) con un atomo di zolfo (cerchiato in rosso in figura), impedendo l'idrolisi dell'ultimo fosfato che convertirebbe il nucleotide alla forma difosfato (GDP).

L'output grafico risultante dall'esperimento di ITC è mostrato in figura 16.

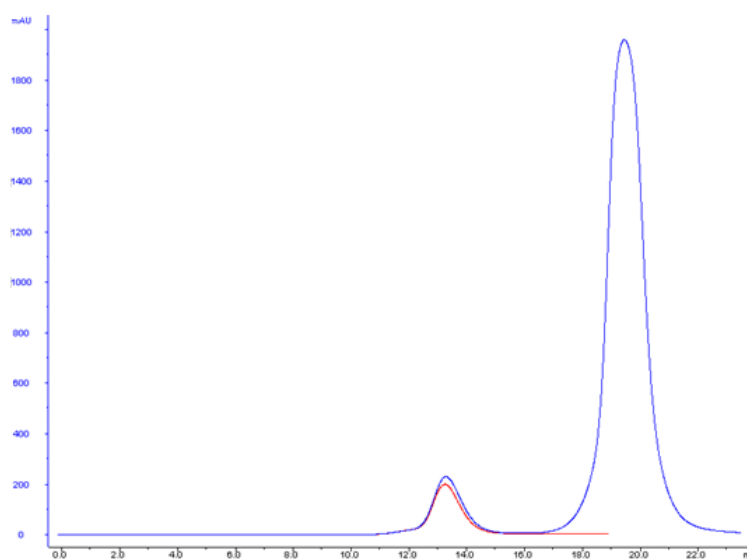


**Figura 16. Profilo della titolazione calorimetrica isoterma.** In alto sono riportati i dati grezzi, in basso sono riportati i dati integrati ed interpolati. Dal punto di flesso della sigmoide è possibile stabilire il rapporto stechiometrico dei due componenti nel complesso, dalla pendenza si deriva la costante di affinità e dal salto tra il piede ed il plateau della sigmoide si determina l'entalpia del processo.

Da questo esperimento è stata ricavato il valore della  $K_D$  (costante di dissociazione), pari a  $0,5 \mu\text{M}$  ed il rapporto stechiometrico pari a  $0,625$  (ovvero circa il  $62,5\%$  della proteina nel campione lega il GTP). Un tale valore di  $K_D$  indica una forte affinità con il nucleotide, essendo il rapporto fra la costante di dissociazione e la costante di associazione, ma la stechiometria (non pari ad  $1:1$  diversamente da quanto atteso) suggerisce la compresenza in soluzione di conformazioni proteiche ad alta/bassa affinità per il nucleotide.

## 1.2. Analisi dello stato di oligomerizzazione, in presenza o assenza di GTP, di HydFTn mediante cromatografia per gel filtrazione

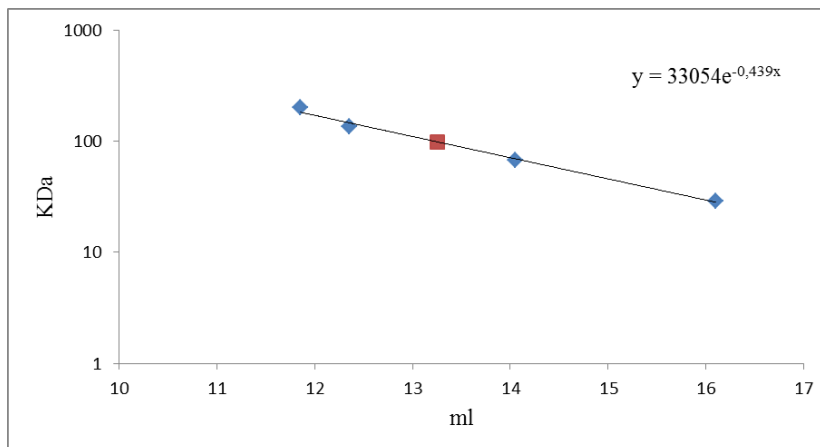
Un possibile effetto del legame del GTP alla proteina che è stato valutato è l'eventuale intervento nello stato di aggregazione della stessa. Infatti è noto che la proteina in soluzione è presente prevalentemente in forma dimerica; tuttavia, sulla base dei risultati di cristallizzazione è stato ipotizzato che uno stato tetramerico potrebbe avere distinte funzioni *in vivo* (Cendron L. et al., 2011). Per valutare se il legame con GTP è in grado di alterare lo stato di aggregazione della proteina è stata eseguita una cromatografia per gel filtrazione di HydFTn (precedentemente purificata per affinità), sia in presenza che in assenza di GTP. Come per l'esperimento di ITC è stato utilizzato l'analogo non idrolizzabile GTP $\gamma$ S, in modo da evitare eventuali effetti prodotti dall'idrolisi del nucleotide durante la misura e valutare l'effetto del solo legame. Il confronto tra i due cromatogrammi ottenuti è mostrato in figura 17.



**Figura 17. Profili cromatografici di gel filtrazione di HydFTn incubata in presenza (curva blu) e in assenza di GTP (curva rossa).** Il picco relativo al volume di eluizione di circa 20 ml corrisponde al GTP, il quale, date le piccole dimensioni eluisce ad un volume circa uguale a quello della colonna.

Dalla sovrapposizione dei cromatogrammi risulta evidente come sia presente una sola specie in entrambi i casi. Il confronto con la retta di taratura realizzata con proteine di peso molecolare noto (figura 18 e tabella 1) indica

chiaramente che i volumi di eluizione ottenuti nelle due condizioni (in presenza e in assenza di GTP) corrispondono ad una forma dimerica di HydFTn, il cui peso è di circa 94 kDa. In entrambe le condizioni, dunque, la proteina si presenta in forma prevalentemente dimerica senza che il nucleotide determini cambiamenti significativi nello stato di aggregazione.



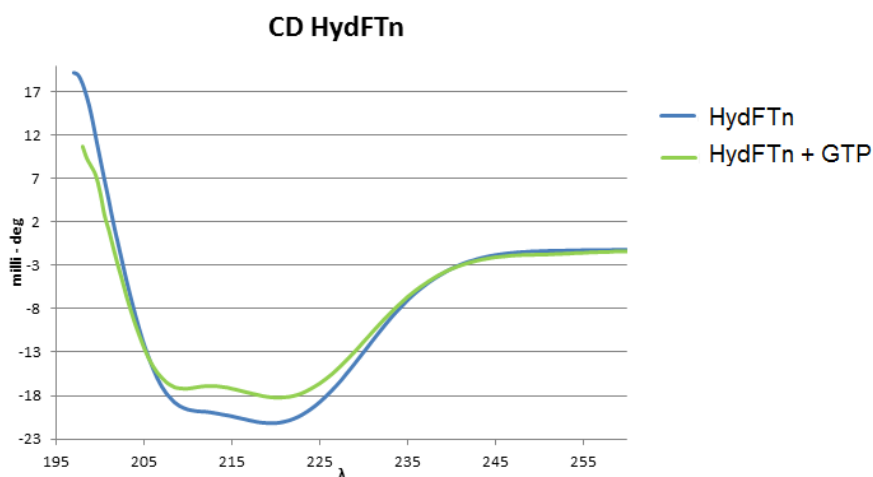
**Figura 18. Retta di taratura per la colonna Superdex 200 GL (GE).** La retta è stata realizzata con i volumi di eluizione delle seguenti molecole di peso noto: anidrasi carbonica, 29 kDa; albumina, 67 kDa; dimero di albumina, 134 kDa; β-amilasi, 200 kDa. Il quadrato rosso corrisponde a HydFTn.

**Tabella 1. Proteine di peso molecolare noto utilizzate per la realizzazione della retta di taratura e volume di eluizione delle stesse.** Nell'ultima riga della tabella è riportato il volume di eluizione delle specie in esame e il peso molecolare calcolato grazie all'equazione della retta di taratura ottenuta: il valore è 98,4 ragionevolmente simile a 94 kDa corrispondenti alla forma dimerica.

| Proteina           | ml    | PM (kDa) |
|--------------------|-------|----------|
| β-amilasi          | 11,85 | 200      |
| Dimero albumina    | 12,35 | 134      |
| Albumina           | 14,05 | 67       |
| Anidrasi carbonica | 16,1  | 29       |
| HydFTn             | 13,25 | 98,4     |

### 1.3. Dicroismo circolare (CD)

Un'ulteriore analisi è stata eseguita mediante la metodologia del dicroismo circolare (CD) per valutare possibili effetti sulla struttura secondaria della proteina indotti dal legame del GTP ad HydFTn (figura 19).



**Figura 19.** Sovrapposizione degli spettri CD di HydFTn *wild type* prima e dopo l'aggiunta del GTP come indicato.

Dal confronto degli spettri, risulta evidente che il legame del nucleotide produce un effetto sulla struttura secondaria che è stato quantificato mediante ricostruzione degli spettri con il programma *open source* CDNN (tabella 2). E' interessante notare come il GTP induca una variazione strutturale significativa con perdita di  $\alpha$ -elica e acquisto di struttura  $\beta$ .

**Tabella 2.** Cambiamenti indotti sulla struttura secondaria di HydFTn. Alla percentuale di struttura del campione incubato con GTP è stata sottratta la componente strutturale corrispondente del campione non incubato con GTP.

| Componente struttura secondaria | Differenza (tra campione con GTP e campione senza GTP) |
|---------------------------------|--|
| $\alpha$ -elica                 | -3,20%   |
| $\beta$ -strand                 | 2,20%  |
| Random Coil                     | 1,00%  |



Da queste prime analisi sembra dunque che il legame del nucleotide non comporti conseguenze sullo stato oligomerico della proteina, ma piuttosto induca una variazione significativa in elementi di struttura secondaria. Sulla base di queste indicazioni è stata pertanto intrapresa un'indagine più approfondita mirata a localizzare le variazioni conformazionali subite da HydF. Per far questo, come anticipato nell'Introduzione, si è fatto ricorso alla tecnica SDSL accoppiata alla spettroscopia CW-EPR.

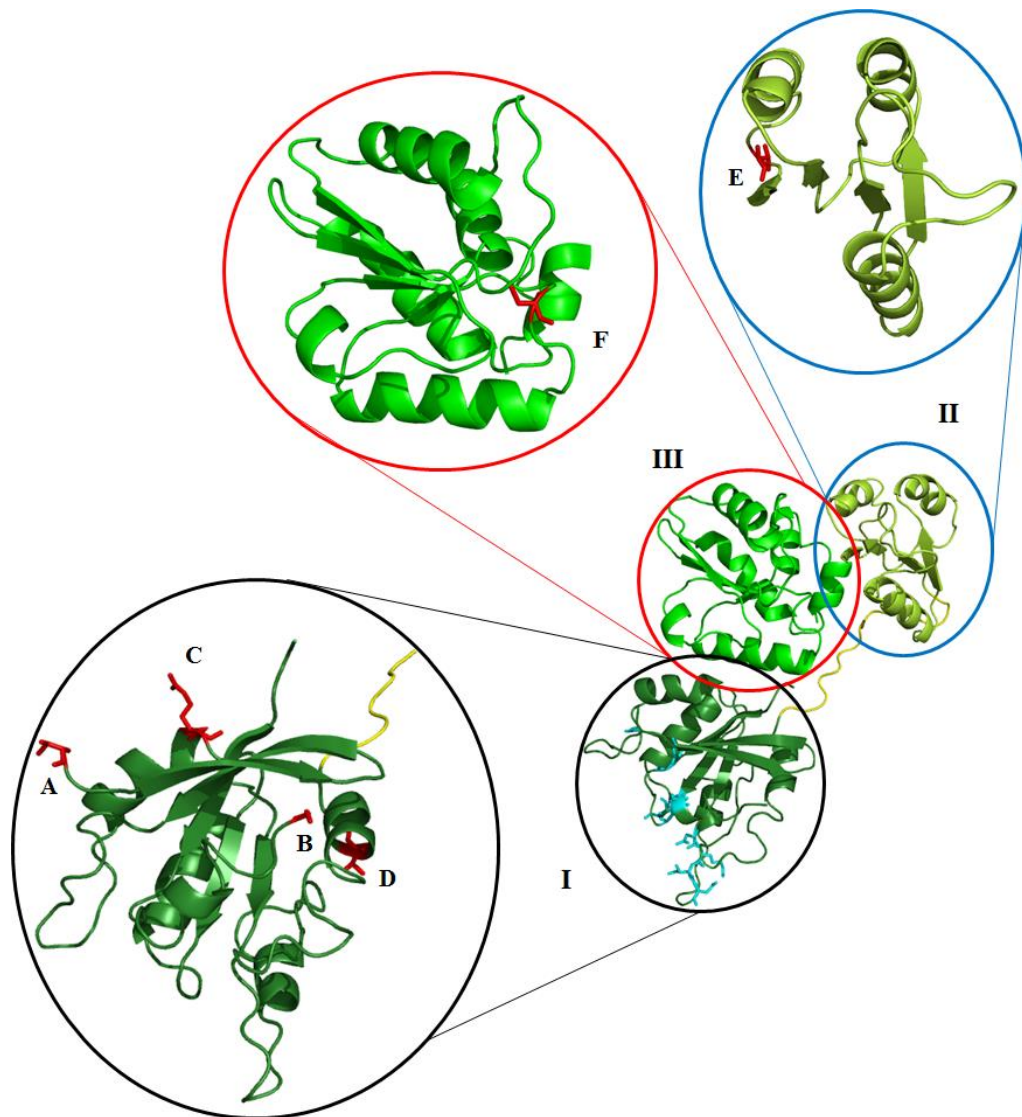
## 2. *Spin labeling* di HydFTn e analisi spettroscopiche CW-EPR

### 2.1. Scelta dei mutanti per l'indagine spettroscopica

Per valutare l'effetto strutturale determinato dal legame del GTP alla proteina sono stati scelti, nel lavoro esplorativo iniziale che rappresenta lo scopo della presente tesi, alcuni amminoacidi nella sequenza di HydFTn in posizioni ritenute diagnostiche sulla base dell'analisi della struttura ai raggi X. Questi amminoacidi sono stati mutagenizzati in cisteine e successivamente marcati con nitrossidi per l'analisi EPR. Se ne riporta di seguito l'elenco, la posizione nella struttura (figura 20) e la ragione della scelta.

- **T44:** residuo compreso in un *loop* che non è risolto nella struttura cristallina a raggi X (compreso fra A e B in figura 20) probabilmente a causa dell'alta mobilità. E' interessante notare che dal confronto strutturale con altre GTPasi questo amminoacido potrebbe appartenere ad una regione cosiddetta di “*switch*”.
- **R88:** residuo che si trova in una regione di cerniera fra il dominio I e il dominio III; la mobilità dello *spin label* potrebbe risultare modificata se il legame del nucleotide inducesse dei riarrangiamenti all'interfaccia tra i domini (residuo C in figura 20).
- **T164:** residuo che si trova alla base del lungo *loop* che collega il dominio I al dominio II; tale *loop* potrebbe andare incontro a variazioni di struttura secondaria che potrebbero a loro volta trasmettere cambiamenti conformazionali in regioni distali dal sito di legame del GTP (residuo D in figura 20).

- **V261**: residuo del dominio II, utile come marcatore di potenziali riarrangiamenti nella zona di dimerizzazione (residuo E in figura 20).
- **C356**: cisteina appartenente al sito di legame del *cluster* [4Fe4S] (assente nell'apoproteina), scelta per valutare se il GTP possa perturbare l'intorno del sito di legame del *cluster* nel centro catalitico, con riarrangiamenti a lunga distanza trasmessi a partire dal sito di legame del nucleotide (residuo F in figura 20).

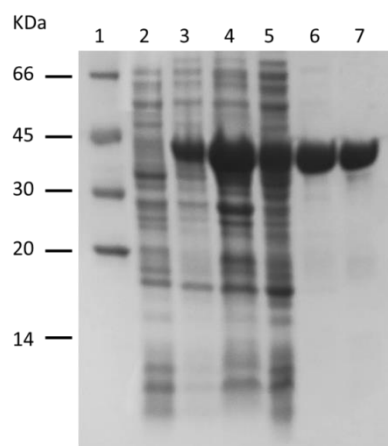


**Figura 20. Monomero di HydFTn e ingrandimenti dei singoli domini.** I tre domini sono indicati con diverse sfumature di verde, con il *loop* di collegamento fra il dominio I e II in giallo; i residui coinvolti nel legame col GTP sono evidenziati in azzurro, mentre i residui scelti per la mutagenesi (quelli che comprendono il *loop* non determinato nel caso di T44) sono evidenziati in rosso: A e B comprendono il *loop* non determinato nella struttura cristallina laddove è situato T44, C il residuo R88, D il residuo T164, E il residuo V261, F il residuo C356.

## 2.2. Mutagenesi sito-specifica di HydFTn, espressione in *E. coli* e purificazione dei mutanti di HydFTn

La proteina, nella sua forma *wild type*, possiede quattro cisteine che verrebbero marcate indifferentemente nella procedura di *spin-labeling*, rendendo difficili da interpretare i dati ottenuti dall'esperienza di CW-EPR sui residui specifici scelti per l'analisi. Per questo la prima parte del mio lavoro è consistita nella mutagenesi di HydFTn allo scopo di ottenere la sostituzione di tutte le cisteine native con serine (mutante C91S, C302S, C353S, C356S *noCys*), come descritto in dettaglio nella sezione Materiali e metodi. Questo preclude naturalmente la possibilità di assemblare il *cluster* [4Fe4S] e di poter considerare l'oloenzima nella sua completezza. Tuttavia si ritiene che il lavoro sull'apoproteina possa fornire comunque indicazioni significative sulle variazioni indotte a partire dal dominio GTP-asico.

L'espressione in *E. coli* e la solubilità di ogni mutante intermedio e di quello finale senza cisteine (*noCys*) sono state valutate come già descritto nel paragrafo 1, sempre inducendo l'espressione nelle condizioni ottimali (incubazione con IPTG per tutta la notte a 30 °C), mediante SDS-PAGE. La figura 21 riporta il risultato della duplice purificazione (cromatografia di affinità combinata a gel filtrazione) del mutante di HydFTn in cui tutti residui di cisteina sono stati sostituiti da una serina.



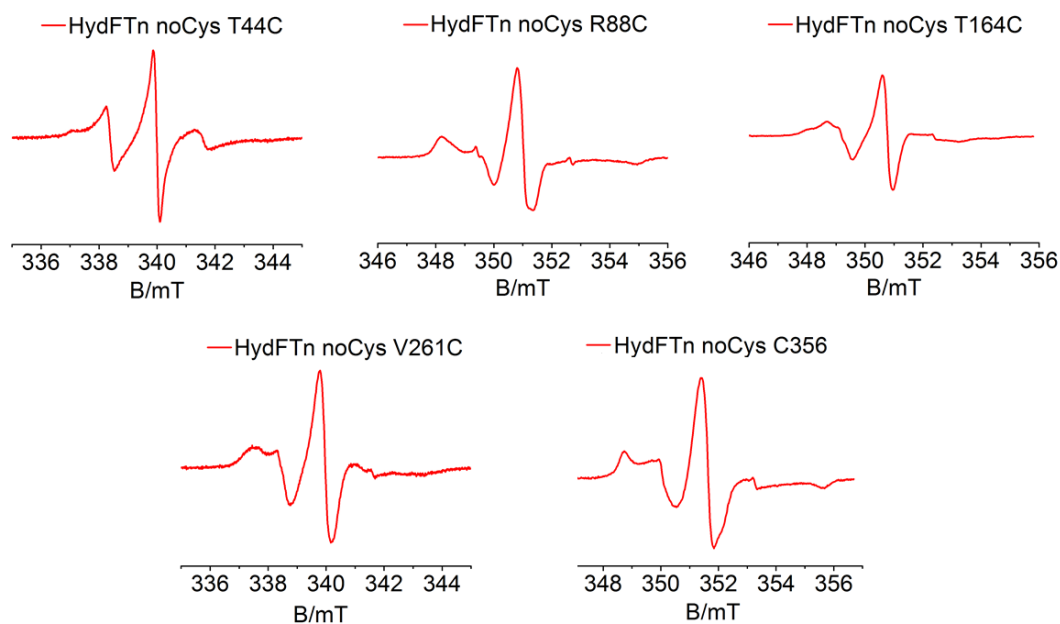
**Figura 21. Espressione e purificazione della proteina HydFTn-*noCys*.** *Corsia 1*, marcatori di peso molecolare (5  $\mu$ l); *corsia 2*, campione non indotto (15  $\mu$ l); *corsia 3*, campione indotto (15  $\mu$ l); *corsia 4*, frazione solubile del lisato totale (10  $\mu$ l); *corsia 5*, frazione insolubile del lisato totale (5  $\mu$ l); *corsia 6*, proteina purificata per affinità (10  $\mu$ l); *corsia 7*, proteina ulteriormente purificata per gel filtrazione (10  $\mu$ l). SDS-PAGE, colorazione con Coomassie Brilliant Blue.

Il mutante *noCys* è stato successivamente utilizzato come template per ottenere i singoli mutanti previsti, tranne quello dotato della sola cisteina 356, amminoacido nativo (il triplo mutante C91S, C302S, C353S è uno dei mutanti intermedi per arrivare al *noCys*). Anche per questi mutanti è stata effettuata la valutazione dell'espressione e della solubilità come spiegato in precedenza. I gel di controllo ottenuti dopo SDS-PAGE e colorazione con Coomassie mostrano tutti il medesimo *pattern* di bande e un'elevata purezza dopo cromatografia di affinità/gel filtrazione (dato non mostrato).

Le frazioni cromatografiche ottenute per i vari mutanti caratterizzati dalla presenza di una sola cisteina opportunamente inserita nella sequenza a partire dal mutante *noCys* sono state concentrate fino ad un volume di circa 1 ml (con concentrazioni comprese tra 100  $\mu$ M e 400  $\mu$ M ), per poi essere marcate tramite *spin labeling* con MTSSL.

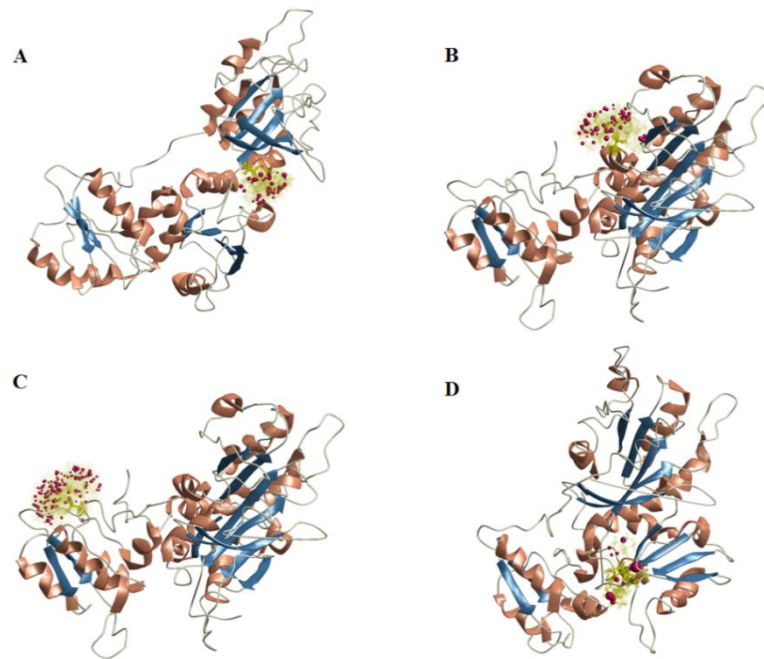
### **2.3. *Spin labeling* dei mutanti di HydFTn e analisi CW-EPR in presenza ed in assenza di GTP**

I mutanti ottenuti sono stati sottoposti alla procedura di *spin labeling* messa a punto nel precedente lavoro svolto in questo laboratorio sul dominio GTPasico (Materiali e metodi) e descritta in modo generale nell'Introduzione. Questa procedura, che ha previsto l'incubazione della proteina purificata con lo *spin label* MTSSL e i successivi passaggi permettono di ottenere la proteina marcata con lo *spin label* senza che quest'ultimo sia presente, in quantità significativa, in forma libera nel campione da analizzare. Una volta marcata, ogni proteina è stata analizzata, a temperatura ambiente e in soluzione, mediante CW-EPR, come descritto nella sezione Materiali e metodi, ottenendo gli spettri illustrati in figura 22.



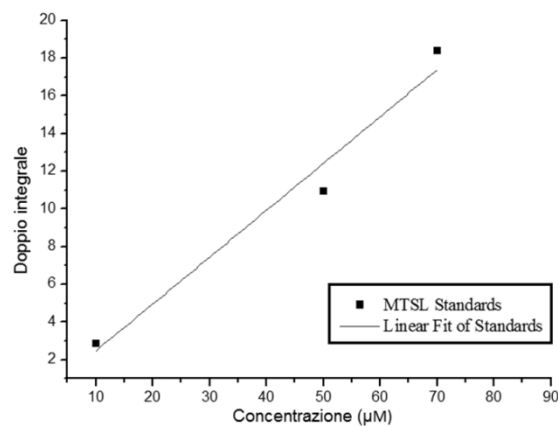
**Figura 22. Spettri ottenuti dagli esperimenti di CW-EPR dei mutanti di HydFTn dotati di una sola cisteina in posizioni selezionate.**

Da questi spettri risulta evidente come in ogni campione la procedura di *spin labeling* sia avvenuta con successo. Si possono apprezzare differenze nella forma degli spettri, che rispecchiano la mobilità dello *spin probe* nel sito di legame. Dalla forma spettrale, ed in particolare dalla larghezza dello spettro, si può vedere che il residuo T44 risulta essere particolarmente mobile come previsto, dato che si trova in un *loop* dotato di grande libertà di movimento (tanto che, come detto precedentemente, non è determinato nella struttura cristallografica). I residui 88 e 356 sono i più ristretti nel loro moto, mentre V261 e T164 presentano mobilità intermedie. Nella figura 23 sono riportati i rotameri dello *spin probe* per ogni mutante simulati con MMM2015, una routine di MATLAB (Polyhach Y. et al., 2015) (il rotamero di T44C non è riportato in quanto la sua conformazione non è risolta nella struttura). Questi rotameri rappresentano le possibili conformazioni locali assunte dagli *spin probes*, relativamente ai gradi di libertà rotazionali dei legami molecolari dello *spin probe* stesso e del legame con la proteina. Come si può notare dall'analisi della figura 23, gli spettri EPR risultano in buon accordo qualitativo con quanto atteso sulla base della struttura.



**Figura 23.** Rotameri (visualizzati con *sticks* gialli e pallini magenta) dello *spin probe* legato alle cisteine inserite mediante mutagenesi. A rotamero dello *spin probe* nel mutante R88C; B rotamero dello *spin probe* nel mutante T164C; C rotamero dello *spin probe* nel mutante V261C; D rotamero dello *spin probe* nel mutante C356. La dimensione delle sfere indica la popolazione relativa dei vari rotameri valutata a temperatura ambiente.

L'efficienza di marcatura dei singoli residui è stata calcolata eseguendo gli esperimenti di CW-EPR su soluzioni di MTSSL a concentrazioni note (10, 50 e 70  $\mu\text{M}$ ) in modo da determinare la retta di taratura. A questo scopo, è stato calcolato il doppio integrale degli spettri ottenuti (gli spettri vengono registrati come derivata del segnale di assorbimento), che è proporzionale alla quantità di *spin probe*, e con i valori ricavati è stata realizzata una retta di taratura (figura 24).



**Figura 24.** Retta di taratura realizzata con i doppi integrali di spettri EPR relativi a MTSSL libero 10, 50 e 70  $\mu\text{M}$ .

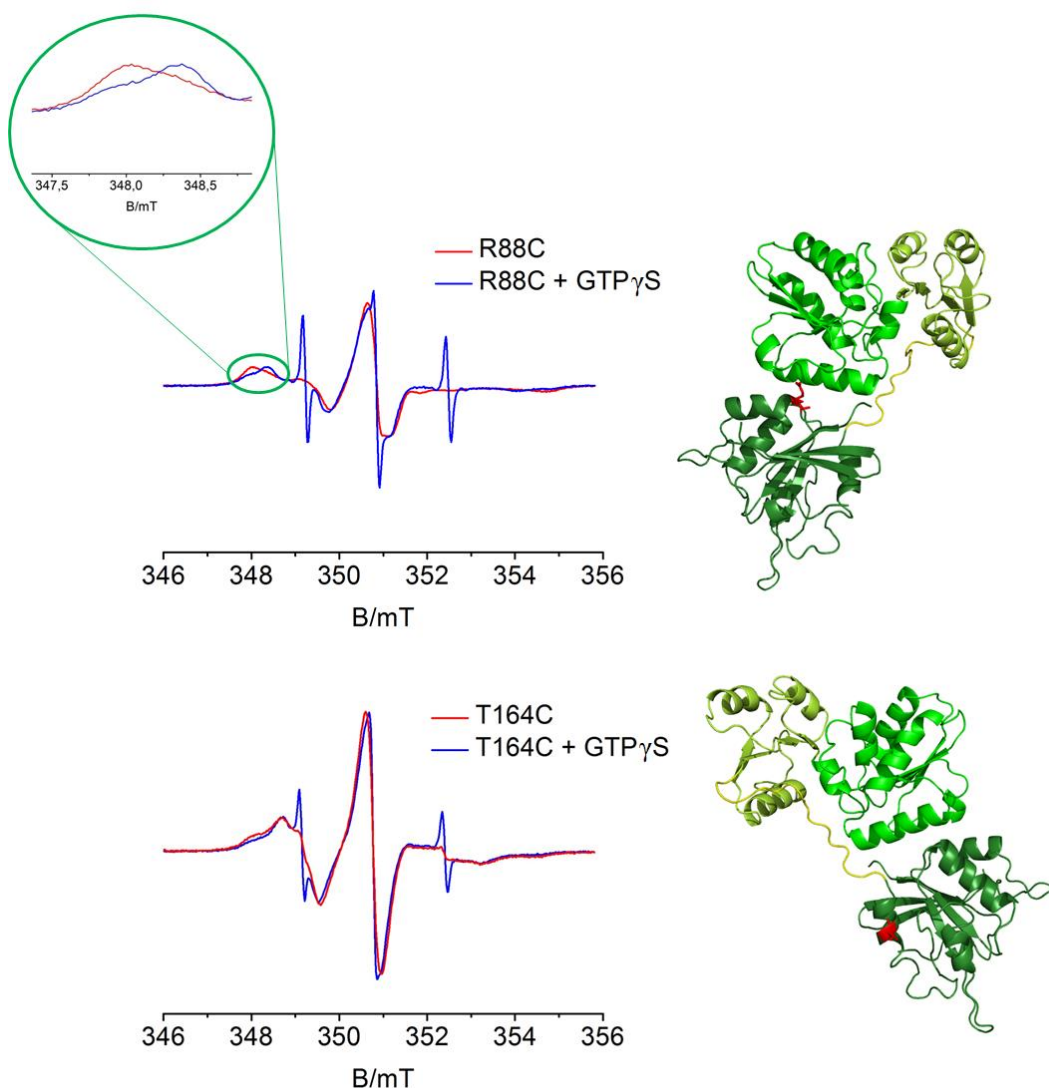
È stato quindi calcolato anche il doppio integrale degli spettri delle proteine marcate, permettendo così di estrapolare la concentrazione di *spin probe* legato alla proteina. Essendo nota la concentrazione di proteina analizzata, dal rapporto tra la concentrazione di *spin probe* osservato e la concentrazione di proteina analizzata, è stata ottenuta l'efficienza di marcatura, riportata in tabella 3.

**Tabella 3.** Efficienze di marcatura delle cisteine inserite nei mutanti.

| <b>Mutante</b>            | <b>Efficienza di marcatura</b> |
|---------------------------|--------------------------------|
| HydFTn <i>noCys</i> T44C  | 75%                            |
| HydFTn <i>noCys</i> R88C  | 85%                            |
| HydFTn <i>noCys</i> T164C | 70%                            |
| HydFTn <i>noCys</i> V261C | 75%                            |
| HydFTn <i>noCys</i> C356  | 65%                            |

Le analisi CW-EPR sono state ripetute sui campioni in presenza di GTP per ricercare le possibili variazioni negli spettri dovute a cambiamenti dell'intorno dei residui analizzati in seguito al legame del nucleotide. Per un confronto quantitativo, sono stati preparati campioni delle proteine con singola cisteina, marcati con lo *spin probe* e divisi in due aliquote alla stessa concentrazione. In una delle aliquote è stato quindi aggiunto un eccesso di GTP di circa 2:1 rispetto alla concentrazione della proteina prima di effettuare l'analisi spettroscopica. La concentrazione di GTP da aggiungere in soluzione è stata decisa sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi di ITC, utilizzando un eccesso del nucleotide rispetto alla costante di affinità ( $K_D = 0,5 \mu\text{M}$ ), per garantire che una parte consistente della proteina presente nel campione da analizzare legasse il GTP (data la bassa stechiometria riportata dall'esperimento di ITC).

Le prime analisi di CW-EPR condotte su campioni in presenza e in assenza di GTP sono state svolte sui due mutanti R88C e T164C, utilizzando l'analogo non idrolizzabile  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  per evitare l'idrolisi durante l'acquisizione degli spettri (figura 25).

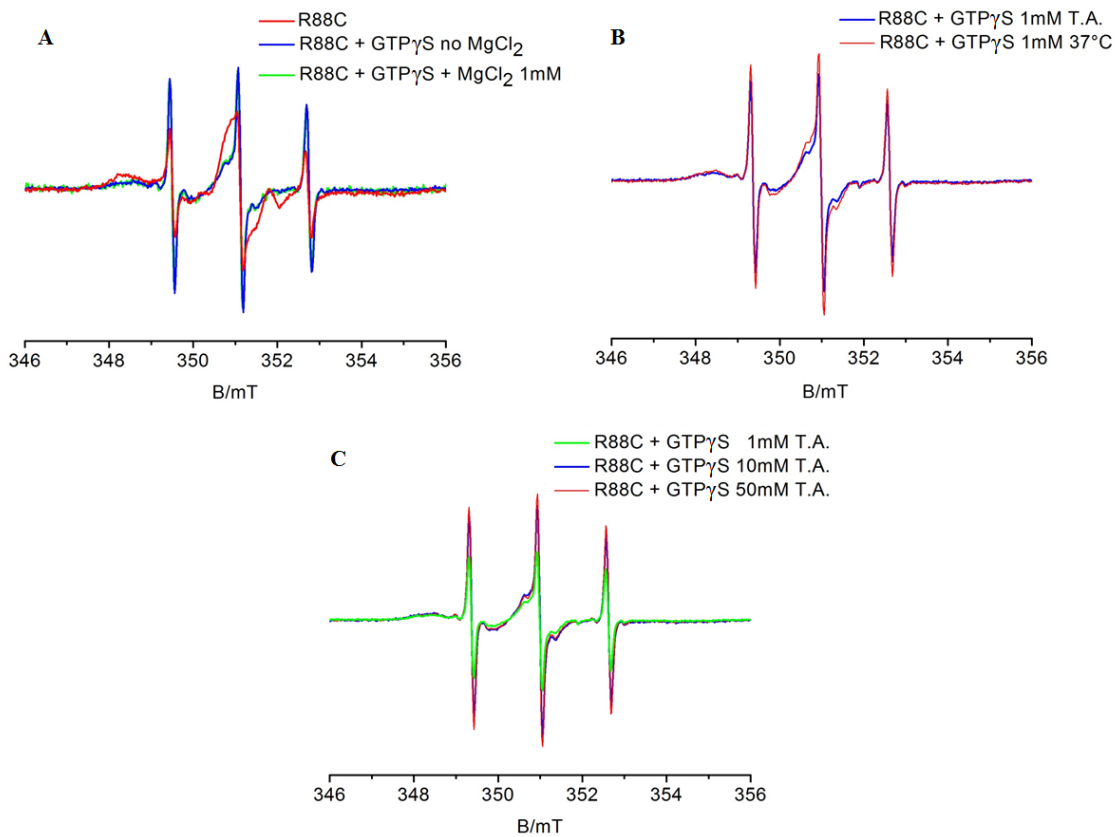


**Figura 25.** Sovrapposizione degli spettri in presenza e assenza di  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  per HydFTn *noCys* R88C e HydFTn *noCys* T164C con relativa posizione dell'amminoacido mutato evidenziata in rosso nella struttura a lato. I mutanti sono stati nominati per semplicità R88C e T164C. È evidenziato in verde, ed ingrandito, l'effetto indotto dal nucleotide sullo spettro di R88C.

Lo spettro di R88C in presenza di  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  mostra una variazione (segnalata in figura con l'ingrandimento) che indica una modificazione significativa della mobilità dello *spin probe* e quindi dell'intorno del residuo, (il picco in posizione più allargata nello spettro viene sostituito da un picco in posizione più ristretta, indicativo di una maggiore libertà di movimento), anche se la transizione non riguarda tutta la popolazione proteica presente in soluzione, come si evince dal fatto che una componente conserva la mobilità ristretta che caratterizza la proteina in assenza di GTP.



Il mutante T164C, invece, non mostra variazioni considerate rilevanti nello spettro. In entrambi i casi, tuttavia, si riscontra la presenza di *spin label* libero, in particolare nei campioni contenenti l'analogo del GTP (i picchi molto stretti in figura, simili alla forma dello spettro di MTSSL libero in soluzione). Poiché la presenza di *spin probe* libero altera significativamente l'analisi spettrale, abbiamo eseguito una serie di esperimenti allo scopo di identificare la causa della presenza di MTSSL libero in soluzione. A questo scopo, la proteina dopo lo *spin labeling* è stata suddivisa in numerose aliquote alla medesima concentrazione, in ognuna delle quali sono state testate condizioni sperimentali diverse. I risultati sono mostrati in figura 26.



**Figura 26. Sovrapposizione degli spettri CW-EPR raccolti in diverse condizioni sperimentali per il mutante R88C.**

- Il primo parametro considerato è la presenza di  $MgCl_2$ ; per valutare se questo potesse favorire il distacco dello *spin probe* dalla proteina sono stati effettuati tre esperimenti di CW-EPR su due diverse aliquote di R88C. Della prima aliquota è stato acquisito lo spettro CW-EPR prima e dopo l'incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente (T.A.) con un eccesso di concentrazione di  $GTP\gamma S$  (2:1) rispetto alla proteina. Al tampone della seconda aliquota, incubata nelle medesime condizioni con  $GTP\gamma S$ , è stato aggiunto  $MgCl_2$  in soluzione acquosa fino ad una concentrazione finale di 1 mM. Si osserva un notevole aumento di *spin probe* libero in entrambe le condizioni dopo l'aggiunta del nucleotide, ma della stessa entità, sia in presenza che in assenza di  $MgCl_2$  (figura 26, pannello A). Per questo motivo il sale è stato ritenuto influente nel distacco dello *spin probe* e nei successivi esperimenti è stato incluso normalmente nel tampone della proteina, in quanto lo ione  $Mg^{2+}$  insieme al motivo conservato *P loop* determinano il legame ad alta affinità del nucleotide guaninico alle *GTP binding proteins* (Vetter I. e Wittinghofer A., 2001), rispetto alle quali il dominio I di HydFTn conserva tutti i motivi strutturali atti al legame del nucleotide.
- Il secondo parametro valutato come possibile causa del distacco dell'MTSSL è la temperatura di incubazione del nucleotide prima dell'esperimento CW-EPR; due aliquote del mutante R88C sono state incubate con un eccesso di  $GTP\gamma S$  2:1 per 5 minuti, uno a T.A. e l'altro a 37 °C. Come evidenziato dalla sovrapposizione degli spettri, i picchi caratteristici dello *spin probe* libero sono più pronunciati nel caso dell'incubazione a 37 °C, anche se l'effetto non è determinante. Infatti, in entrambe le condizioni l'aumento di marcatore libero è notevole (figura 26 pannello B).
- Infine, è stato valutato l'effetto di  $GTP\gamma S$ . Per confermare il ruolo di quest'ultimo, sono stati eseguiti tre esperimenti di CW-EPR su tre diverse aliquote del mutante R88C dopo incubazione a T.A. con concentrazioni crescenti di  $GTP\gamma S$ . In effetti, seppur non in maniera proporzionale alla concentrazione del nucleotide, si osserva che l'aumento di concentrazione

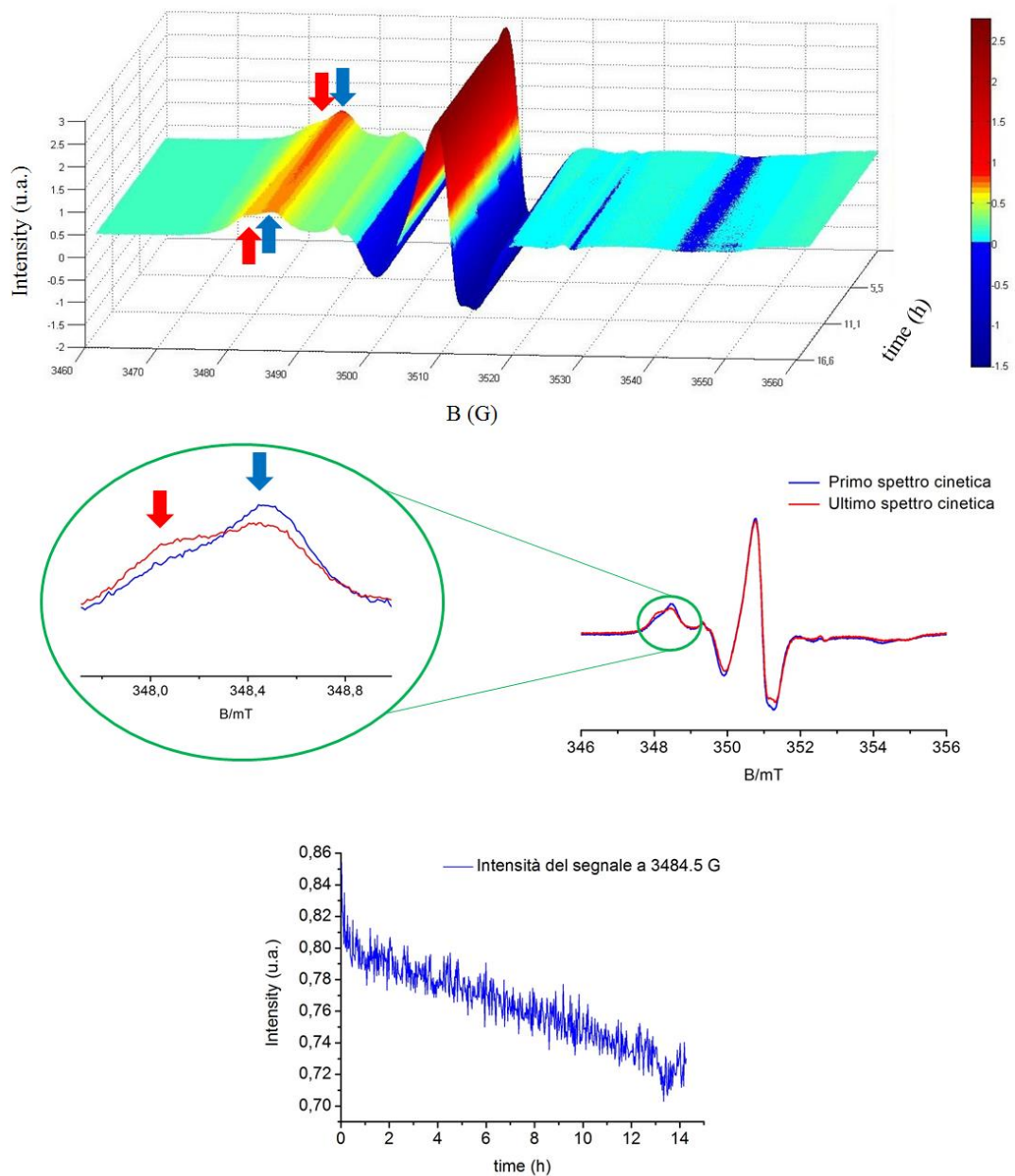
di questo determina un intensificarsi del segnale relativo al marcatore dissociato dalla proteina (figura 26, pannello C).

Una possibile spiegazione del fenomeno potrebbe essere la competizione fra lo zolfo del gruppo fosfato  $\gamma$  dell'analogo non idrolizzabile e lo zolfo della cisteina che lega lo *spin label* nella proteina, che risulterebbe nel distacco di quest'ultimo dalla proteina e nel suo conseguente passaggio in soluzione legato al  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ; questo porterebbe alla rilevazione del segnale del marcatore in soluzione in forma praticamente libera, dato il basso peso molecolare del nucleotide.

Nella proteina in assenza dell'analogo del GTP, la presenza in entità generalmente limitata di *spin label* libero è risultata dipendere dalle condizioni di purificazione e di lavaggio della proteina precedenti la misura.

Appurato dunque che l'analogo non idrolizzabile avrebbe potuto essere un elemento di eccessivo disturbo per gli studi progettati, si è cercato di determinare se fosse possibile l'utilizzo della forma naturale del GTP, compatibilmente cioè con i tempi tecnici di acquisizione degli spettri rispetto ai tempi caratteristici dell'idrolisi del nucleotide catalizzata da HydF stessa. Per valutare la possibilità di utilizzare il nucleotide naturale, è stato definito un esperimento di cinetica, avvalendosi dell'effetto osservato nello spettro del mutante R88C in seguito al legame dell'analogo di GTP. Si sono registrati spettri CW-EPR del campione R88C a tempi successivi dopo l'aggiunta di GTP (2:1 rispetto alla proteina), fino al ritorno dello spettro alla forma iniziale, registrato cioè prima dell'aggiunta di nucleotide. Gli spettri sono riportati in figura 27. Nel grafico bidimensionale sono riportati i vari spettri in funzione del tempo, essendo il tempo zero rappresentato dallo spettro immediatamente prima dell'aggiunta di GTP.

Come si può osservare, l'effetto ottenuto con GTP nella modifica spettrale è lo stesso osservato precedentemente per l'analogo.

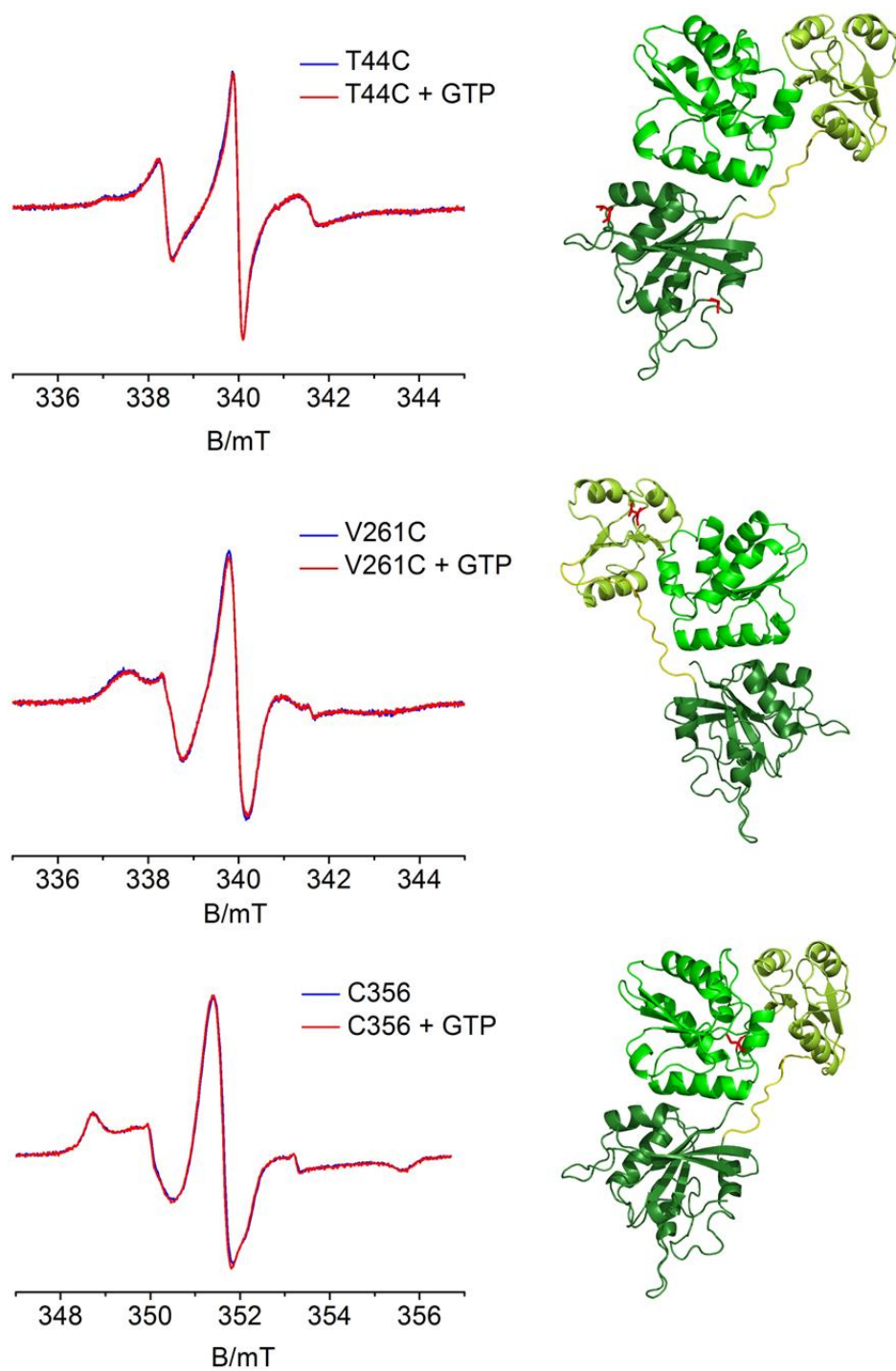


**Figura 27.** Parte superiore, visualizzazione in tre dimensioni di tutti gli spettri CW-EPR rilevati *over night* sullo stesso campione del mutante R88C dopo l'aggiunta di GTP in eccesso **2:1 rispetto alla concentrazione della proteina**. Le frecce blu indicano il picco caratteristico che si rileva conseguentemente all'aggiunta di GTP a 3484,5 G, mentre le frecce rosse indicano il picco tipico della proteina non incubata con GTP a circa 3480 G (1mT = 10G). **Parte centrale, primo e ultimo spettro rilevati nel corso della cinetica con relativo ingrandimento dello spettro fra 3478 e 3488 G.** Il picco relativo a 3484,5 G cala nel tempo ma non fino a livelli tipici della proteina in assenza di GTP, mentre il picco tipicamente più pronunciato in assenza di GTP a circa 3480 G aumenta nel tempo ma non fino al valore tipicamente osservato in assenza del nucleotide. **Parte inferiore, intensità del picco a 3484,5 G nel tempo nei vari spettri CW-EPR raccolti.**

Inoltre inaspettatamente la scala del tempo necessario alla proteina per tornare alla condizione iniziale è notevolmente superiore ai tempi dell'idrolisi del GTP. Questo dato suggerisce che il legame del GTP possa fungere da *trigger* per un cambio conformazionale ma che il ritorno alla condizione precedente richieda tempi lunghi, perlomeno in assenza di componenti cellulari non presenti nel sistema utilizzato in questi esperimenti. Alla luce di questi risultati, visti i tempi caratteristici delle cinetiche misurate rispetto ai tempi necessari per l'acquisizione di un singolo esperimento CW-EPR (tipicamente pochi minuti), è stato possibile effettuare gli esperimenti CW-EPR con la forma naturale del nucleotide GTP, senza cioè l'utilizzo dell'analogo non idrolizzabile.

Scartando dunque il mutante T164C (per il quale non ci sono state modificazioni dello spettro indotte dal legame del GTP $\gamma$ S ritenute significative), gli altri quattro mutanti sono stati espressi, purificati e sottoposti alla procedura di *spin labeling* come già spiegato e suddivisi ognuno in due aliquote alla stessa concentrazione, una delle quali è stata incubata con un eccesso di GTP 2:1 rispetto alla proteina a T.A., prima di effettuare la misura CW-EPR.

Come appare chiaramente per i mutanti T44C, V261C, T164 e C356 gli spettri non subiscono alcuna modifica in seguito al legame di GTP. In queste posizioni proteiche pertanto non vi sono variazioni significative della mobilità degli *spin label*, ad indicare o l'assenza del tutto di variazioni conformazionali che coinvolgano tratti della proteina cui essi appartengono, o variazioni che non comportano alterazioni della mobilità locale dello *spin probe* (figura 28).



**Figura 28. Sovrapposizione degli spettri CW-EPR acquisiti dal campione non incubato e dal campione incubato con GTP con relativa posizione del residuo di attacco dello *spin probe* evidenziato in rosso nella struttura, a lato (nel caso di T44C sono evidenziati i residui che comprendono il *loop* non risolto).**

In particolare, una possibile spiegazione di questa mancanza di cambiamenti spettrali dello *spin probe* in posizione 44, molto prossima al sito di legame di GTP e che per analogia con altre *GTP-binding proteins* dovrebbe far parte di una regione di *switch*, potrebbe essere una posizione molto superficiale e appartenente ad un *loop*. Il legame del GTP potrebbe comunque indurre una riorganizzazione del *loop* sul quale si trova il residuo ma essendo questo in una posizione completamente esposta al solvente esso conserverebbe un'elevata mobilità.

Si possono senz'altro escludere grandi riarrangiamenti per quanto riguarda il dominio di dimerizzazione testato dal residuo V261 posto all'interfaccia dei due monomeri.

Risultano molto improbabili sulla base dei risultati anche effetti strutturali ampi (che comportino variazione di accessibilità al sito) nei pressi del *cluster* [4Fe4S], dato che il legame del nucleotide non influisce sull'intorno di C356, come dimostrato dalla totale mancanza di cambiamenti nello spettro.

## RIASSUNTO DEL LAVORO DI TESI E CONCLUSIONI

Nel futuro delle energie rinnovabili il bioidrogeno suscita un grande interesse in quanto fonte di energia totalmente pulita, sostenibile e molto versatile. In questo contesto lo studio delle idrogenasi acquista sempre maggiore importanza, e in particolar modo quello sulle [FeFe]-idrogenasi, le più promettenti per applicazioni biotecnologiche in virtù della miglior resa di substrato in idrogeno molecolare rispetto alle altre classi di idrogenasi. Il centro catalitico delle [Fe-Fe] idrogenasi è un centro 2Fe complesso (*H-cluster*), recante cofattori piuttosto insoliti (come CO e CN<sup>-</sup>). La complessità molecolare di questo centro è tale da richiedere un apparato apposito per l'assemblaggio del sito attivo delle [FeFe]-idrogenasi, composto dalle proteine HydE, HydF e HydG. Fra queste, HydF è ritenuta ricoprire un ruolo centrale nel processo di maturazione. Studi cristallografici hanno consentito di definirne la struttura anche se nella forma *apo*, permettendo di individuare tre domini: GTPasico, di dimerizzazione e di legame di un centro [4Fe4S], non presente nella struttura risolta ai raggi X ma ritenuto svolgere un ruolo importante nella sintesi del precursore del *H-cluster*. L'attività GTPasica di HydF risulta d'altro canto essere necessaria per il corretto assemblaggio dell'idrogenasi funzionale, ma non è ancora stato chiarito il ruolo preciso che avrebbe tale attività nel processo.

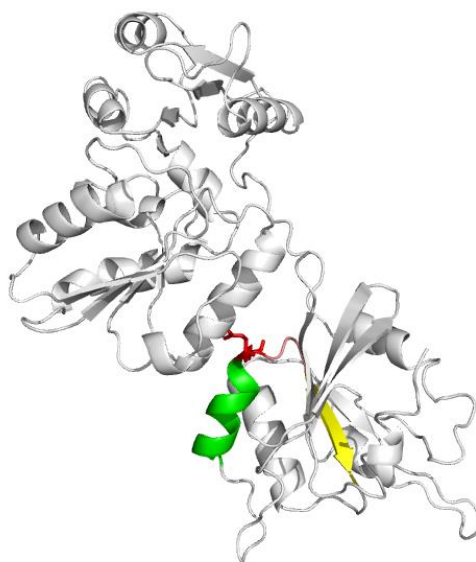
Gli studi svolti inizialmente nel nostro laboratorio sul dominio GTPasico di HydF isolato dal resto della proteina non hanno dato risultati particolarmente significativi sull'effetto di legame del GTP in termini di variazioni strutturali indotte sul dominio stesso, spingendo ad estendere questo studio alla proteina intera. Una volta definito il protocollo per l'espressione in buone quantità della proteina in forma ricombinante solubile, è stata determinata l'affinità ( $K_D$ ) per il GTP. Inoltre, è stato verificato come, sia in presenza che in assenza di GTP, la proteina rimanga in forma prevalentemente dimerica. È stata evidenziata inoltre la compresenza in soluzione di conformazioni proteiche ad alta/bassa affinità per il nucleotide.

Un risultato interessante è stato messo in evidenza dagli studi di CD, che hanno indicato un effetto di variazione strutturale indotto sulla proteina dal legame del GTP con perdita di  $\alpha$ -elica e acquisto di struttura  $\beta$ .



Al fine di meglio definire nella proteina tale cambio strutturale, sono stati individuati alcuni residui in posizioni ritenute diagnostiche sulla base dell'analisi della struttura di HydF. Tali residui sono stati sostituiti con cisteine mediante mutagenesi sito-specifica, per effettuarvi una marcatura di “*spin labeling*” in modo da utilizzare successivamente la tecnica EPR per rilevare possibili variazioni, nell'intorno molecolare degli *spin probes*, indotte dal legame di HydF con GTP. Infatti, gli *spin probes* presentano spettri EPR la cui forma di riga risulta influenzata in modo predominante dalla loro mobilità locale. Quest'ultima, come osservato in molti casi, può subire alterazioni in seguito ai riarrangiamenti proteici.

Le analisi spettroscopiche hanno portato all'individuazione di un effetto interessante sul mutante R88C, che in seguito al legame del GTP ha mostrato una variazione nello spettro EPR sintomatica di una maggiore libertà rotazionale dello *spin probe*. Vista la posizione di interfaccia del residuo fra il dominio I (GTPasico) e il dominio III (catalitico, contenente il centro [4Fe4S]), si può ipotizzare che il legame del nucleotide possa indurre un possibile aumento dello spazio tra domini. Inoltre, la posizione del residuo 88 nella zona di collegamento tra un  $\beta$ -strand e un tratto di  $\alpha$ -elica (figura 29) potrebbe essere in relazione alla variazione di struttura secondaria rivelata dalla spettroscopia CD.



**Figura 29.** Monomero di HydFTn in cui sono evidenziati l' $\alpha$ -elica, il  $\beta$ -strand e il loop contenente il residuo R88 che comprendono. L' $\alpha$ -elica è evidenziata in verde, il  $\beta$ -strand in giallo, il loop in arancione e il residuo R88 in rosso.

Dalla cinetica di evoluzione dello spettro EPR dopo l'aggiunta di GTP del mutante R88C si deduce che il fattore scatenante l'effetto strutturale risulta essere il legame del nucleotide e non la sua idrolisi, in quanto le scale dei tempi di idrolisi del GTP e del ritorno della proteina alla conformazione iniziale differiscono di ordini di grandezza. Tale dato suggerisce una possibile analogia con numerose *GTP-binding proteins* che utilizzano il legame del nucleotide come una sorta di interruttore per un cambio conformazionale funzionale, ma necessitano di ulteriori effettori o per l'idrolisi del GTP o per il ritorno a conformazioni precedenti il legame. Nel caso di HydF, effettori importanti potrebbero risultare proprio le altre maturasi HydE e/o HydG coinvolte nell'assemblaggio del sito attivo dell'idrogenasi.

Non sono stati rivelati effetti invece sulle mobilità degli altri residui scelti per l'indagine. Tuttavia, la mancanza di effetti locali non permette di escludere cambi conformazionali di più ampio respiro per la proteina nella sua interezza.

Per questo, in futuro potrebbe essere più indicativo compiere studi su marcatori di movimento molecolari con metodologie alternative come il DEER (*Double Electron-Electron Resonance*) o il FRET (*Forster Resonance Energy Transfer*). Entrambi i metodi consentono infatti di misurare distanze tra coppie di *probes* e potrebbero quindi consentire di individuare lo spostamento reciproco di residui, opportunamente marcati a seconda della metodologia, in seguito al legame con GTP.

Altra prospettiva interessante è lo studio della risposta di HydF nel contesto dell'apparato di maturazione completo, in presenza quindi anche delle proteine HydE e HydG, che, come si è detto, potrebbero essere effettori importanti nella mediazione dell'effetto prodotto dal GTP.

## MATERIALI E METODI

### 1. Ceppi batterici (*E. coli*)

**XL1-Blue:** genotipo F', *endA1*, *gyrA96*, (*nal*<sup>R</sup>), *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *lac*, *glnV44*, F'[ ::Tn10 *proAB*<sup>+</sup>, *lacI*<sup>q</sup> Δ(*lacZ*)M15], *hsdR17*, (*r*<sub>K</sub><sup>-</sup> *m*<sub>K</sub><sup>+</sup>)

**Rosetta(DE3)pLysS:** genotipo F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*(*R<sub>B</sub>*<sup>-</sup> *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>), *gal*, *dcm* λ; (DE3 [*lacI*:*lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]); (pLysSRARE [*Cam*<sup>R</sup> e geni per i tRNA: *argU*, *argW*, *ileX*, *glyT*, *leuW*, *proL*, *metT*, *thrT*, *tyrU* e *thrU*, che suppliscono ai codoni rari AGG, AGA, AUA, CUA, CCC e GGA])

### 2. Media di coltura batterici

#### Completo Luria-Bertani (LB)

##### Liquido

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| Bacto Triptone (Difco)      | 1 %   |
| Estratto di lievito (Difco) | 0.5 % |
| NaCl                        | 0.5 % |

Solido: come liquido con aggiunta di agar 1%

Quando necessario, sono stati aggiunti gli antibiotici ampicillina (50 µg/ml), per selezionare i batteri trasformati con il plasmide pET-15b che porta la resistenza all'ampicillina, e cloramfenicolo (34 µg/ml) per permettere la crescita esclusivamente alle cellule Rosetta(DE3)pLysS che portano la resistenza per questo antibiotico.

### 3. Sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche di HydFTn

- 1) Sequenza del gene *wild type* codificante la maturasi HydF di *T. neapolitana* (HydFTn), *in frame* con la sequenza codificante per un epitopo esaistidinico all'estremità 5'. I codoni di *start* e di *stop* sono indicati in rosso mentre in verde sono state sottolineate le basi modificate nei diversi mutanti (in nero sono sottolineate le restanti basi dei codoni coinvolti nella mutagenesi).

5' CATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT  
ATGCTCGAGGATCCAAGGAGATATACCATGAGACTGCCGGACGCCGGTTT  
CAGAAGATACATCGTTGTTGCGGGAAGAAGGAACGTTGGAAAATCCTCTT  
TCATGAACGCCTTAGTTGGTCAGAACGTGTCCATCGTGAGCGATTATGCG  
GGAACAACGACCGATCCCCTCTACAAATCCATGGAACCTCATCCTATCGG  
TCCCCTCACCCCTCGTGGACACCCCTGGACTCGACGACGTGGGAGAACTTG  
GAAGACTGAGGGTAGAGAAGGCAAGGAGGGTGTCTACAGGGCAGATTGT  
GGAATTCTCGTGACAGACAGCGCACCAACTCCCTACGAAGACGACGTTGT  
CAATCTTTTCAAAGAGATGGAAATTCCTTCGTAGTTGTCGTAAACAAAA  
TCGACGTTCTTGGAGAAAAGGCCGAAGAGCTGAAGGGACTCTACGAAAGC  
CGTTACGAAGCGAAAGTACTCCTTGTCTCGGCTTTGCAGAAAAGGGATT  
CGACGATATCGGGAAGACCATCTCCGAAATTCCTCCGGGTGATGAAGAGA  
TTCCTTACCTCGGTGATCTGATAGATGGCGGCGATCTTGTGATCCTCGTG  
GTCCTATAGATCTCGGTGCTCCAAAGGGGAGGCTCATCATGCCTCAGGT  
CCACGCGATCAGGGAAGCCCTCGACAGAGAAGCCATCGCCCTCGTGGTGA  
AGGAAAGAGAGCTCAGGTACGTGATGGAAAACATAGGGATGAAACAAAA  
CTCGTCATCACAGACTCTCAGGTGGTAATGAAAGTAGCGTCTGATGTCCC  
GGAAGACGTGGAACTCACCACCTTTTCCATTGTGGAGTCACGATATCGAG  
GCGATCTGGCCTACTTTGTGGAAAGCGTGAGAAAGATAGAAGAGCTGGAA  
GACGGAGACACTGTTGTCATCATGGAAGGCTGCACCCACAGACCTCTCAC  
CGAAGACATCGGAAGGGTGAAGATCCCAAGGTGGCTCGTGAACCACACGG  
GAGCGCAGCTCAACTTCAAGGTCATAGCCGGAAAAGATTTTCCTGATCTT  
GAGGAAATAGAAAACGAAAACCTTATCATCCACTGCGGTGGATTGTATTCT  
GAACCGTTCAGCGATGATGAGAAGGGTGAGGATGGCAAAAAGGCTCGGTA

TACCGATGACGAACTACGGTGTGACCATCTCTTACCTTCACGGTGTGCTA  
GAGCGGGCGATTTCGTCCATTCAGGGAGGAAGTGAGGGTTTAA 3'

**2) Sequenza amminoacidica di HydFTn, in fusione con sei residui di istidina all'estremità N-terminale. In verde sono stati sottolineati gli amminoacidi modificati nei diversi mutanti.**

5' HHHHHHSSGLVPRGSHMLEDPARRYTMRLPDAGFRRYIVVAGRRNVGKS  
SEMNALVQGQNSIVSDYAGTTDPVYKSMELHPIGPVTLVDTPLDDVGE  
LGRLRVEKARRVIFYRACGILVTD SAPTPYEDDVVNLFKEMEIPFVVVVN  
KIDVLGEKAEELKGLYESRYEAKVLLVSALQKKGFDDIGKTI SEILPGDE  
EIPYLGDLIDGGDLVILVVPIDLGAPKGR LIMPQVHAIREALDREAIALV  
VKERELRYVMENIGMKPKLVITDSQVAMKVASDVPEDVELTTFSIVESRY  
RGDLAYFVESVRKIEELEDGDTVVIMEGCTHRPLTEDIGRVKIPRWLVNH  
TGAQLNFKVIAGKDFPDLEEIENAKLIHC GGCI LNRSAMMRRVRMAKRL  
GIPMTNYGVTISYLHGVLERAIRPF 3'

**3) Sequenze nucleotidiche dei primer utilizzati e sequenze amminoacidiche dei mutanti ottenuti:**

• **C91S (preparazione noCys)**

*Primer forward (C91S)*

5' -TCTACAGGGCAGATTCTGGAATTCTCGTGAC-3'

*Primer reverse (C91S)*

5' -GTCACGAGAATTCCAGAATCTGCCCTGTAGA-3'

• **C302S (preparazione noCys)**

*Primer forward (C302S)*

5' -GTCATCATGGAAGGCAGCACCACAGACCTC-3'

*Primer reverse (C302S)*

5' -GAGGTCTGTGGGTGCTGCCTTCCATGATGAC-3'

• **C353S (preparazione noCys)**

*Primer forward (C353S)*

5' -CTTATCATCCACAGCGGTGGATGTATTCTG-3'

*Primer reverse (C353S)*

5' -CAGAATACATCCACCGCTGTGGATGATAAG-3'

- **C353S,C356S (preparazione *noCys*)**

*Primer forward* (C353S,C356S)

5' -CCACAGCGGTGGAAGTATTCTGAACCGTTC-3'

*Primer reverse* (C353S,C356S)

5' -GAACGGTTCAGAATACTTCCACCGCTGTGG-3'

- 4) **Sequenza amminoacidica mutata (C91S, C302S, C353S)(C356)**

5' HHHHHHSSGLVPRGSHMLEDPARRYTMRLPDAGFRRYIVVAGRRNVGKS  
SFMNALVGQNVSI VSDYAGTTTDPVYKSMELHPIGPVTLVDTPLGDDVGE  
LGRLRVEKARRVFYRADSGILVTD SAPTPYEDDVVNLFKEMEIPFVVVVN  
KIDVLGEKAEELKGLYESRYEAKVLLVSALQKKGFDIGKTI SEILPGDE  
EIPYLGDLIDGGDLVILVVPIDLGAPKGRIMPQVHAIREALDREAIALV  
VKERELRYVMENIGMKPKLVITDSQVAMKVASDVPEDVELTTF SIVESRY  
RGDLAYFVESVRKIEELEDGDTV VIMEGSTHRPLTEDIGRVKI PRWLVNH  
TGAQLNFKVIAGKDFPDLEEIENAKLI IHSGGC I LNRSAMMRRVRMAKRL  
GIPMTNYGVTISYLHGVLERAIRPF 3'

- 5) **Sequenza amminoacidica mutata (*noCys*):**

5' HHHHHHSSGLVPRGSHMLEDPARRYTMRLPDAGFRRYIVVAGRRNVGKS  
SFMNALVGQNVSI VSDYAGTTTDPVYKSMELHPIGPVTLVDTPLGDDVGE  
LGRLRVEKARRVFYRADSGILVTD SAPTPYEDDVVNLFKEMEIPFVVVVN  
KIDVLGEKAEELKGLYESRYEAKVLLVSALQKKGFDIGKTI SEILPGDE  
EIPYLGDLIDGGDLVILVVPIDLGAPKGRIMPQVHAIREALDREAIALV  
VKERELRYVMENIGMKPKLVITDSQVAMKVASDVPEDVELTTF SIVESRY  
RGDLAYFVESVRKIEELEDGDTV VIMEGSTHRPLTEDIGRVKI PRWLVNH  
TGAQLNFKVIAGKDFPDLEEIENAKLI IHSGG S I LNRSAMMRRVRMAKRL  
GIPMTNYGVTISYLHGVLERAIRPF 3'

- **T44C (singolo mutante su templat *noCys*)**

*Primer forward* (T44C)

5' -AGCGATTATGCGGGAACATGCACCGATCCCGTCTACAA-3'

*Primer reverse* (T44C)

5' -TTGTAGACGGGATCGGTGCATGTTCCCGCATAATCGCT-3'

**6) Sequenza amminoacidica mutata (*noCys* T44C)**

5' HHHHHHSSGLVPRGSHMLEDPARRYTMRLPDAGFRRYIVVAGRRNVGKS  
SFMNALVGQNVSI VSDYAGTCTDPVYKSMELHPIGPVTLVDTPLGDDVGE  
LGRLRVEKARRVIFYRADSGILVTDSAPTPYEDDVVNLFKEMEIPFVVVVN  
KIDVLGEKAEELKGLYESRYEAKVLLVLSALQKKGFFDDIGKTI SEILPGDE  
EIPYLGDLIDGGDLVILVVPIDLGAPKGRLIMPQVHAIREALDREAIALV  
VKERELRYVMENIGMKPKLVI TDSQVAMKVASDVPEDELTTFSIVESRY  
RGDLAYFVESVRKIEELEDGDTVVIMEGSTHRPLTEDIGRVKIPRWLVNH  
TGAQLNFKVIAGKDFPDLEEIENAKLI IHSGG SILNRSAMMRRVRMAKRL  
GIPMTNYGVTISYLHGVLERAIRPF 3'

• **R88C,C91S (singolo mutante su templat *noCys*)**

*Primer forward* (R88C,C91S)

5' -GGCAAGGAGGGTGTCTACTGCGCAGATTCTGGAATTCTCG-3'

*Primer reverse* (R88C,C91S)

5' -CGAGAATTCCA GAATCTGCGCAGTAGAACACCCTCCTTGCC-3'

**7) Sequenza amminoacidica mutata (*noCys* R88C):**

5' HHHHHHSSGLVPRGSHMLEDPARRYTMRLPDAGFRRYIVVAGRRNVGKS  
SFMNALVGQNVSI VSDYAGTTTDPVYKSMELHPIGPVTLVDTPLGDDVGE  
LGRLRVEKARRVIFYCADSGILVTDSAPTPYEDDVVNLFKEMEIPFVVVVN  
KIDVLGEKAEELKGLYESRYEAKVLLVLSALQKKGFFDDIGKTI SEILPGDE  
EIPYLGDLIDGGDLVILVVPIDLGAPKGRLIMPQVHAIREALDREAIALV  
VKERELRYVMENIGMKPKLVI TDSQVAMKVASDVPEDELTTFSIVESRY  
RGDLAYFVESVRKIEELEDGDTVVIMEGSTHRPLTEDIGRVKIPRWLVNH  
TGAQLNFKVIAGKDFPDLEEIENAKLI IHSGG SILNRSAMMRRVRMAKRL  
GIPMTNYGVTISYLHGVLERAIRPF 3'

• **T164C (singolo mutante su templat *noCys*)**

*Primer forward* (T164C)

5' -GATTCGACGATATCGGGAAGTGCATCTCCGAAATTCTTCCGGG-3'

*Primer reverse* (T164C)

5' -CCCGGAAGAATTCGGAGATGCACTTCCCGATATCGTCGAATC-3'

**8) Sequenza amminoacidica mutata (noCys T164C):**

5' HHHHHHSSGLVPRGSHMLEDPARRYTMRLPDAGFRRYIVVAGRRNVGKS  
SFMNALVGQNVSI VSDYAGTTTDPVYKSMELHPIGPVTLVDTPLDDVGE  
LGRLRVEKARRVFYRADSGILVTDSAPTPYEDDVVNLFKEMEIPFVVVVN  
KIDVLGEKAEELKGLYESRYEAKVLLVLSALQKKGFDIGKCI SEILPGDE  
EIPYLGDLIDGGDLVILVVPIDLGAPKGRLIMPQVHAIREALDREAIALV  
VKERELRYVMENIGMKPKLVI TDSQVAMKVASDVPELTTFSIVESRY  
RGDLAYFVESVRKIEELEDGDTVVIMEGSTHRPLTEDIGRVKIPRWLVNH  
TGAQLNFKVIAGKDFPDLEEIENAKLI I HSGGSILNRSAMMRRVRMAKRL  
GIPMTNYGVTISYLGVLERAIRPF 3'

• **V261C (singolo mutante su templat *noCys*)**

*Primer forward (V261C)*

5' -TGATGTCCCGGAAGACTTGC GA ACTCACCACCTTTT-3'

*Primer reverse (V261C)*

5' -AAAAGGTGGTGAGTTCGCA GTCTTCCGGGACATCA-3'

**9) Sequenza amminoacidica mutata (noCys V261C)**

5' HHHHHHSSGLVPRGSHMLEDPARRYTMRLPDAGFRRYIVVAGRRNVGKS  
SFMNALVGQNVSI VSDYAGTTTDPVYKSMELHPIGPVTLVDTPLDDVGE  
LGRLRVEKARRVFYRADSGILVTDSAPTPYEDDVVNLFKEMEIPFVVVVN  
KIDVLGEKAEELKGLYESRYEAKVLLVLSALQKKGFDIGKTI SEILPGDE  
EIPYLGDLIDGGDLVILVVPIDLGAPKGRLIMPQVHAIREALDREAIALV  
VKERELRYVMENIGMKPKLVI TDSQVAMKVASDVPELTTFSIVESRY  
RGDLAYFVESVRKIEELEDGDTVVIMEGSTHRPLTEDIGRVKIPRWLVNH  
TGAQLNFKVIAGKDFPDLEEIENAKLI I HSGGSILNRSAMMRRVRMAKRL  
GIPMTNYGVTISYLGVLERAIRPF 3'



## 4. Plasmidi utilizzati

### pET-15b

Il pET-15b è un vettore plasmidico per l'espressione di proteine in *E. coli*. Porta una resistenza all'ampicillina ( $Amp^r$ ) e il promotore del fago T7. Presenta la sequenza codificante per un His-Tag all'N-terminale seguito da un sito di taglio per la trombina (che non è stato utilizzato) e tre siti di clonaggio. La mappa del plasmide è riportata in figura 30.

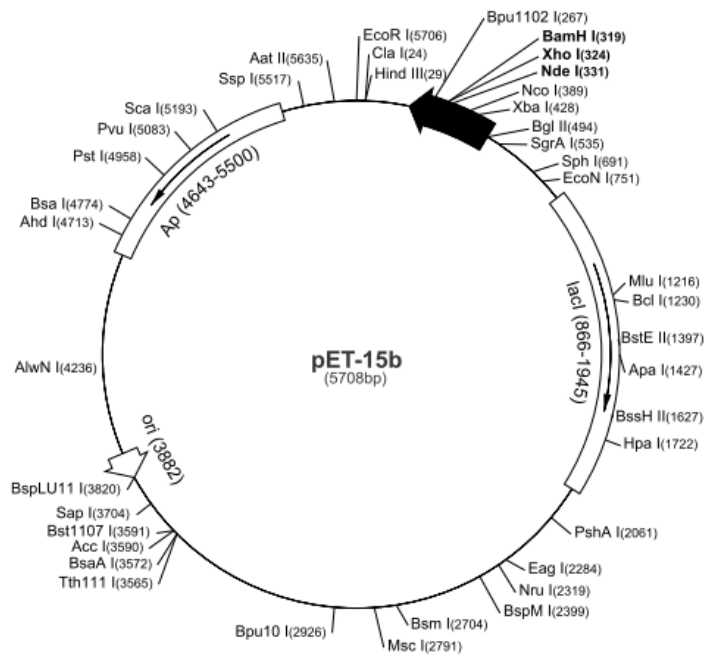


Figura 30. Mappa del plasmide pET-15b.

## 5. Metodi di biologia molecolare

### Mutagenesi della sequenza nucleotidica di HydFTn

La mutagenesi sito-specifica della sequenza codificante HydFTn è stata condotta con il kit QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies Stratagene), usando come template il plasmide *pET-15bHydFTn*, precedentemente ottenuto nel nostro laboratorio, secondo i protocolli messi a punto dalla ditta fornitrice. Gli oligonucleotidi, definiti secondo le linee guida del

protocollo, sono stati illustrati in precedenza. Tutti i costrutti mutanti sono stati controllati mediante sequenziamento nucleotidico.

### **Corsa elettroforetica di DNA su gel di agarosio**

(Sambrook K.J. et al., 1989) L'analisi del DNA a doppio filamento è stata eseguita attraverso elettroforesi in gel di agarosio all'1 % peso/volume (SIGMA). L'agarosio è stato sciolto in tampone TBE 0.5 % (Tris 90 mM, acido borico 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8) e addizionato di bromuro di etidio alla concentrazione finale di 0.5 µg/ml. Questa sostanza, che si intercala tra gli anelli planari della doppia elica del DNA, ha proprietà fluorescenti se esposta alla luce ultravioletta e permette quindi di rivelare i frammenti di DNA migrati nel gel. Il campione da analizzare è stato preparato aggiungendo Loading Buffer 10X (0.25 % blu di bromofenolo, 0.25 % xilene cianolo, 30% glicerolo) in quantità tali che la sua concentrazione finale sia 1X; questo favorisce il depositarsi del DNA nei pozzetti e permette la visualizzazione del fronte di corsa durante la migrazione elettroforetica dal polo negativo al polo positivo. Il gel, immerso nel tampone TBE 0.5 %, viene sottoposto ad un campo elettrico di 50-100 V, a seconda delle dimensioni, fino a quando il fronte del colorante raggiunge i 3/4 circa della lunghezza del gel. Il DNA può essere osservato con un transilluminatore a raggi UV. Le dimensioni dei frammenti di DNA si stimano per confronto con un marcatore di pesi molecolari, nel nostro caso è stato usato il 1kb ladder della Promega. Si possono stimare le concentrazioni dei campioni confrontando l'intensità delle bande ottenute con quella di un campione a concentrazione nota.

### **Trasformazione batterica mediante *shock* termico**

Con la tecnica di trasformazione chimica è possibile introdurre DNA plasmidico in cellule batteriche rese precedentemente chemiocompetenti (in seguito a pretrattamenti con CaCl<sub>2</sub> a 4 °C, che ne modificano le pareti e le membrane), associato poi ad un rapido sbalzo di temperatura (*shock* termico).

Ad un'aliquota di batteri chemiocompetenti viene aggiunta la soluzione contenente il plasmide con cui si intende trasformarli (2-5 µl) e la sospensione viene posta per 30 minuti in ghiaccio, quindi per 1 minuto a 42 °C, e trasferita nuovamente in ghiaccio, provocando in questo modo uno *shock* termico, che

rende le cellule batteriche permeabili al DNA. Vengono poi rapidamente aggiunti 300 µl di LB e la coltura batterica trasformata viene incubata per un'ora a 37 °C in agitazione. Infine, i batteri vengono piastrati su terreno solido selettivo (LB addizionato di antibiotico) e fatti crescere a 37 °C per tutta la notte.

### **Purificazione di DNA plasmidico da batteri**

Da una coltura di batteri *E. coli* XL1-Blue trasformati e fatti crescere per tutta la notte a 37 °C viene purificato il DNA plasmidico utilizzando il kit Gen Elute® Plasmid Miniprep Kit (SIGMA), seguendo i protocolli della ditta fornitrice.

## **6. Metodi biochimici**

### **Induzione dell'espressione genica in *E. coli***

L'induzione dell'espressione della proteina HydFTn è stata condotta nel ceppo Rosetta(DE3)pLysS (Cam<sup>r</sup>) di *E. coli*, precedentemente trasformato chimicamente con il vettore *pET-15bHydFTn* (*wild type* e tutti i diversi mutanti), contenenti la resistenza all'ampicillina. In terreno completo LB reso selettivo dall'aggiunta degli antibiotici ampicillina (25 µg/ml) e cloramfenicolo (17 µg/ml) vengono inoculate, con una diluizione di circa 1:50, cellule batteriche contenenti i plasmidi di interesse, da un precedente preinoculo lasciato crescere a saturazione a 37 °C per tutta la notte. La coltura viene incubata a 37 °C in agitazione fino al raggiungimento di una densità ottica (OD<sub>600</sub>) compresa tra 0.4 e 0.6. L'induzione avviene aggiungendo 1 mM IPTG (isopropil-tio-β-D-galattopiranoside). Le cellule vengono lasciate ad incubare in agitazione per tutta la notte a 30 °C.

### **French Pressure Cell Press**

Al termine dell'induzione la coltura viene centrifugata a 5000 x g, per 10 minuti, a 4°C. Il pellet viene risospeso (1/50 in volume) in un tampone Tris-HCl 25 mM, KCl 200 mM, pH 8, a cui vengono aggiunti gli inibitori di proteasi: Pepstatina A (1µg/ml), Leupeptina (1µg/ml), e 1mM PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro) (3,3 µg/ml). Il sistema French Pressure Cell Press è un dispositivo finalizzato alla

rottura meccanica della parete dei batteri. Lo strumento impiega una pompa idraulica esterna per guidare un pistone entro un cilindro contenente la sospensione cellulare. Il principio che regola la rottura meccanica consiste nel sottoporre le cellule ad una pressione inizialmente elevata, provocandone l'espansione. L'applicazione sequenziale di una pressione bassa evoca una differenza di pressione che frantuma le cellule. Nel caso di *E. coli*, per ogni campione viene eseguito un solo ciclo a 1,35 Kbar.

### **Purificazione delle proteine ricombinanti**

In seguito al passaggio alla French Pressure Cell Press, il lisato ottenuto viene centrifugato permettendo di separare il surnatante, corrispondente alla frazione proteica solubile, dal pellet, nel quale rimangono i resti di membrane, proteine precipitate e *debris* cellulari. Accertata la presenza della proteina di interesse nella frazione solubile del lisato totale (mediante SDS-PAGE, come descritto nei paragrafi successivi), essa viene purificata mediante una duplice cromatografia, che prevede due passaggi sequenziali: I) cromatografia di affinità, che sfrutta l'epitopo esaistidinico presente all'estremità N-terminale, e II) gel filtrazione.

### **Cromatografia di affinità mediante resina HIS-Select<sup>TM</sup> Nickel Affinity Gel (SIGMA)**

La cromatografia di affinità con ioni metallici (IMAC) si basa sulla capacità delle sei istidine, fuse alla catena polipeptidica della proteina di interesse (6HisTag), di comportarsi da donatori di elettroni e di legare reversibilmente lo ione metallico nichel ( $Ni^{2+}$ ), che si trova immobilizzato da un gruppo chelante NTA (acido nitriltriacetico) su una matrice di agarosio. La frazione solubile del lisato cellulare è stata aggiunta alla resina HIS-Select<sup>TM</sup> Nickel Affinity Gel (500  $\mu$ l per 500 ml di coltura batterica di partenza), precedentemente equilibrata con il tampone (Tris-HCl 25 mM, KCl 200 mM, pH 8) e lasciata in lenta agitazione per un'ora, a 4 °C. Al termine dell'incubazione, la sospensione viene trasferita in colonna e la resina lasciata impaccare per gravità. La resina viene lavata tre volte con 10 volumi di tampone di lavaggio (Tris-HCl 25 mM, KCl 200 mM, pH 8) e la proteina viene infine eluita con 8 volumi di tampone di eluizione (Tris-HCl 25 mM, KCl 200 mM e imidazolo 300 mM, pH 8).

### **Gel filtrazione in FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*)**

Per l'esclusione dimensionale è stata utilizzata la colonna Superdex 200 10/300 GL (*GE Healthcare Life Sciences*), le cui specifiche sono riportate in tabella:

| <b>Composizione della matrice</b> | <b>Particelle sferiche di agarosio e destrano <i>cross-linked</i></b> |
|-----------------------------------|---|
| Dimensione delle particelle       | 13 $\mu\text{m}$  |
| Volume del letto                  | 24 mL   |
| Intervallo di separazione         | 10 – 300 kDa  |
| Limite di esclusione              | $1,3 \times 10^6$   |
| Intervallo di pH                  | 3-12  |
| Pressione massima tollerata       | 1,5 MPa   |

La frazione eluita dalla cromatografia di affinità è stata concentrata ad un volume di poco inferiore ai 500  $\mu\text{l}$  mediante concentratori Amicon Ultra-4 con *cut-off* pari a 10000 PM (Millipore). Il campione è quindi stato caricato in *loop* e automaticamente iniettato nella colonna sopra descritta, precedentemente equilibrata in tampone. Le proteine uscenti sono state raccolte automaticamente da un frazionatore in aliquote da 500  $\mu\text{l}$ . I campioni di proteina purificata ottenuti dopo la gel filtrazione vengono concentrati nuovamente con concentratori Amicon Ultra-4 con *cut-off* pari a 10000 PM (Millipore) fino ad un volume di circa 200  $\mu\text{l}$  e infine quantificati.

### **Quantificazione di proteine mediante spettrofotometria**

Per la quantificazione dei campioni provenienti da ciascun passaggio cromatografico, si è proceduto all'analisi dell'assorbanza a 280 nm attraverso uno spettrofotometro. E' possibile determinare la concentrazione (M,  $\text{mol L}^{-1}$ ) della proteina conoscendo la lunghezza del cammino ottico dello spettrofotometro e il coefficiente di estinzione molare della proteina (stimato sul contenuto in Trp e Tyr essere 26630 per HydFTn), grazie alla legge di Lambert Beer:  $A = \epsilon cl$  ( $\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare ( $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$ ),  $c$  = concentrazione della proteina ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $l$  = cammino ottico (cm)).

### **Preparazione dei campioni per l'analisi proteica**

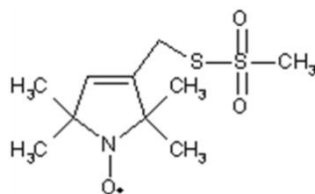
Da coltura liquida viene prelevato 1 ml di cellule, di cui si misura la densità ottica ( $OD_{600}$ ), ed il pellet che si ottiene dopo centrifugazione viene risospeso in tampone SB 1X (Tris-HCl 62.5 mM, SDS 2%, glicerolo 10%,  $\beta$ -mercaptoetanololo 5%, blu di bromofenolo 0.1%, pH 6.8) in una quantità pari a 100  $\mu$ l per ogni unità di OD. Il campione viene bollito per 10 minuti prima di essere sottoposto a elettroforesi. I campioni derivanti dalla lisi cellulare e da ciascuno dei passaggi di purificazione vengono trattati aggiungendo tampone SB 2X e bolliti per 10 minuti prima del caricamento per la gel elettroforesi.

### **Elettroforesi di proteine in gel denaturante di poliacrilamide (SDS-PAGE)**

Le proteine vengono separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide al 12 % in presenza di SDS. Il gel di separazione (*running gel*) è composto da acrilamide 12 % - bisacrilamide 0.4%, 0.37 M Tris-HCl, pH 8.8, SDS 0.1 %, e TEMED e APS come catalizzatori. Lo *stacking gel* è composto da acrilamide al 4 %, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, SDS 0.1 %, cui vengono aggiunti TEMED e APS. Il tampone di corsa è composto da 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, SDS 0.1 %. L'elettroforesi è stata eseguita applicando una corrente costante di 20 mA fino al superamento dello *stacking gel* e di 30-35 mA nel *running gel*. Le proteine, che migrano dal polo negativo al polo positivo, si separano sulla base del peso molecolare e vengono infine visualizzate su gel mediante colorazione con Coomassie Brilliant Blue. Le dimensioni delle bande proteiche si stimano per confronto con un marcatore di pesi molecolari.

### **Marcatura di proteine con *spin label* MTSSL**

Lo *spin label* utilizzato è il nitrossido MTSSL ((1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrroline-3-methyl) methanethiosulfonate) (Enzo Life Sciences) il quale reagisce (si veda Introduzione) con i gruppi tiolici delle cisteine legandovisi con un ponte disolfuro (figura 31).



**Figura 31. Rappresentazione grafica di una molecola di MTSSL**

Lo *spin label* viene dissolto in DMSO (dimetilsolfossido) e non in solvente acquoso per evitare la dimerizzazione dello stesso nella soluzione madre. Per la marcatura della proteina si procede preparando una miscela di proteina 80  $\mu\text{M}$  con un eccesso di MTSSL (400  $\mu\text{M}$ ) in tampone Tris-HCl 25 mM, KCl 200 mM, pH 8, e che viene lasciata ad incubare per tutta la notte in mescolamento a 4 °C. Lo *spin label* non legato viene rimosso al termine dell'incubazione durante ri-concentrazione del campione con concentratori Amicon Ultra-4 con *cut-off* pari a 10000 PM (Millipore).

## 7. Metodi calorimetrici

### ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*)

La calorimetria di titolazione isoterma (ITC) è una tecnica biofisica che permette di caratterizzare in maniera diretta l'energetica dell'interazione tra piccoli ligandi, proteine ed altre biomolecole. Tipicamente, un esperimento ITC è eseguito utilizzando il metodo della titolazione incrementale, ovvero un preciso volume di titolante è aggiunto ad intervalli di tempo regolari alla soluzione contenente, ad esempio, la macromolecola. Il calore generato o assorbito è registrato sotto forma di picchi. L'integrazione dell'area di ciascun picco, previa normalizzazione per mole di ligando aggiunto e successiva interpolazione mediante un opportuno modello, fornisce la costante di affinità, l'entalpia e la stechiometria del processo di *binding*. La tecnica ITC permette, anche, di valutare separatamente, a partire dall'energia libera di *binding*, il contributo entalpico ed entropico, fornendo ulteriori informazioni sulla natura delle forze che guidano il processo di interazione.

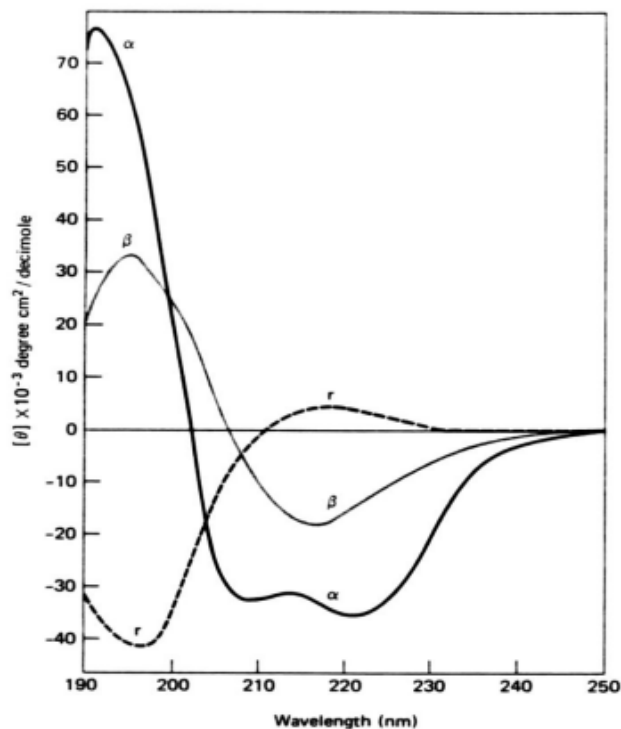
Gli esperimenti ITC sono stati effettuati a temperatura ambiente usando il microcalorimetro MicroCal VP-ITC (Malvern). Ad ogni iniezione è stato aggiunto un volume pari a 7  $\mu\text{L}$  di una soluzione contenente GTP (500  $\mu\text{M}$ ) (tranne la prima di 2  $\mu\text{l}$  per rimuovere eventuali bolle) ad una soluzione di HydFTn (250  $\mu\text{M}$ ) disciolta nello stesso tampone, per un volume totale di 2,5 mL. Per permettere al sistema di raggiungere l'equilibrio, tra ogni iniezione è stato programmato un tempo di 240 s. Il contributo al calore dovuto al puro mescolamento è stato stimato effettuando un esperimento in cui il ligando è stato aggiunto ad una soluzione contenente solo il tampone (cioè in assenza della proteina). Tale calore è stato poi sottratto alla misura calorimetrica effettuata in presenza della proteina. Il calore normalizzato in funzione del rapporto molare dei componenti ha fornito una isoterma di *binding*. I dati sono stati elaborati con Origin<sup>TM</sup>.

## 8. Metodi spettroscopici

### CD (*Circular Dichroism*)

Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica spettroscopica che permette di determinare la presenza ed il tipo di struttura secondaria in proteine e peptidi. Il metodo si basa sul fenomeno di assorbimento differenziale della luce polarizzata circolarmente da parte di molecole intrinsecamente chirali, o achirali, ma immerse in un rigido intorno asimmetrico. In particolare in proteine le componenti della luce polarizzata circolarmente vengono assorbite in maniera differenziale indipendentemente dalla struttura secondaria. L'effetto è misurato in termini di ellitticità ( $\theta$ ) della luce uscente dal campione. Gli spettri caratteristici di elementi di  $\alpha$ -elica,  $\beta$ -sheet e *random coil* sono illustrati in figura 32.





**Figura 32. Spettri di dicroismo circolare caratteristici delle differenti strutture secondarie:  $\alpha$ -elica ( $\alpha$ ), struttura  $\beta$ -antiparallela ( $\beta$ ) e *random coil* ( $r$ ).**

Gli spettri CD sono stati registrati con uno spettropolarimetro JASCO J-810. Per registrare lo spettro CD compreso tra 195 e 260 nm sono state utilizzate celle con un cammino ottico di 0.1 cm e una concentrazione di proteina pari a 0,3 mg/ml. Gli spettri sono stati acquisiti con una velocità di scansione di 10 nm/min e una *bandwidth* di 2 nm. Ad ogni spettro è stata sottratta la misura del tampone. Ai campioni è stata aggiunta la soluzione acquosa contenente GTP direttamente in cuvetta (1  $\mu$ l nei 400  $\mu$ l del volume della cuvetta contenente la proteina in tampone) dopo l'acquisizione dello spettro in assenza di GTP per minimizzare errori sistematici nella preparazione dei campioni. I dati sono stati analizzati mediante il programma *open source* CDNN, sia per ottenere l'ellitticità molare, sulla base della concentrazione della proteina utilizzata nelle misure, che per avere una stima delle componenti di struttura secondaria della proteina. L'ellitticità molare  $\theta$  (mdeg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) è stata calcolata dall'equazione  $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}}/10 \times L \times C$ , dove  $[\theta]_{\text{obs}}$  è l'ellitticità osservata, C è la concentrazione molare della proteina e L il cammino ottico.

### **EPR (Electron Paramagnetic Resonance)**

I principi della tecnica CW-EPR sono stati descritti in dettaglio nell'Introduzione. I campioni sono stati analizzati inizialmente in assenza ed in presenza dell'analogo non idrolizzabile del GTP, GTP $\gamma$ S (Jena Bioscience), ad una concentrazione doppia rispetto alla concentrazione della proteina e in presenza di MgCl<sub>2</sub> 1 mM, incubando per 5 minuti a temperatura ambiente, in agitazione, prima dell'analisi EPR. Successivamente è stato utilizzato GTP come spiegato nella sezione Risultati e discussione.

### **CW-EPR**

Le misure sono state eseguite al Dipartimento di Scienze Chimiche di Padova con uno strumento Bruker ELEXSYS E580 in banda X, con cavità ELEXSYS *Super High Sensitivity*, ad una frequenza di esercizio di 9.85 GHz, a temperatura ambiente. Gli spettri sono stati registrati con un'attenuazione di 15 dB, una modulazione di frequenza di 100 kHz e un'ampiezza di modulazione di 0.3 G. I capillari in quarzo utilizzati (0.6 mm di diametro interno e 0.84 mm di diametro esterno), sono stati riempiti con 20  $\mu$ L di campione. A loro volta questi capillari sono stati inseriti in un tubo in quarzo 3 x 4 mm posto direttamente in cavità.

## BIBLIOGRAFIA

- Albertini M., Vallese F., Di Valentin M., Berto P., Giacometti G. M., Costantini P., Carbonera D. (2014). *The proton iron-sulfur cluster environment of the [FeFe]-hydrogenase maturation protein HydF from Thermotoga neapolitana*. International Journal of Hydrogen Energy 39, 18574-18582;
- Allakhverdiev S. I., Tomo T., Shimada Y., Kindo H., Nagao R., Klimov V. V., Mimuro M. (2010). *Redox potential of pheophytin a in photosystem II of two cyanobacteria having the different special pair chlorophylls*. Proc Natl Acad Sci. 23, 3924-9:
- Berto P., Di Valentin M., Cendron L., Vallese F., Albertini M., Salvadori E., Giacometti G. M., Carbonera D., Costantini P. (2012). *The [4Fe-4S]-cluster coordination of [FeFe]-hydrogenase maturation protein HydF as revealed by EPR and HYSCORE spectroscopies*. Biochim Biophys Acta 1817, 2149-57;
- Bowen H., Dafa C., Xile H. (2014). *Synthesis and Reactivity of Mononuclear Iron Models of [Fe]-Hydrogenase that Contain an Acylmethylpyridinol Ligand*. Chemistry, A European Journal, 20, 1677-1682;
- Brazzolotto X., Rubach J. K., Gaillard J., Gambarelli S., Atta M., Fontecave M. (2006). *The [FeFe]-hydrogenase maturation protein HydF from Thermotoga maritima is a GTPase with an iron-sulfur cluster*. J. Biol. Chem. 281, 769-774;
- Brown K. A., Wilker M. B., Boehm M., Dukovic G., King P. W. (2012) *Characterization of photochemical processes for H<sub>2</sub> production by CdS nanorod-[FeFe] hydrogenase complexes*. J Am Chem Soc 134, 5627-36;
- Cendron L., Berto P., D'Adamo S., Vallese F., Govoni C., Posewitz M. C., Giacometti G. M., Costantini P., Zanotti G. (2011). *Crystal structure of HydF scaffold protein provides insights into [FeFe]-hydrogenase maturation*. J. Biol. Chem. 286, 43944-43950:

- Cohen J., Kim K., Posewitz M., Ghirardi M. L., Schulten K., Seibert M., King P. (2005). *Molecular dynamics and experimental investigation of H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> diffusion in [Fe]-hydrogenase*. *Biochem Soc Trans.* 33, 80-82;
- Das D., Veziroglu T. N. (2008). *Advances in biological hydrogen production processes*. *Int. J. hydrogen Energy.* 33, 6046-6057;
- Florin L., Tsokoglou A., Happe T. (2001). *A novel type of iron hydrogenase in the green alga Scenedesmus obliquus is linked to the photosynthetic electron transport chain*. *J Biol Chem.* 276, 6125-32;
- Fontecilla-Camps J. C., Volbeda A., Cavazza C., Nicolet Y. (2007). *Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases*. *Chem Rev.* 107, 4273-4303;
- Frey M. (2002). *Hydrogenases: hydrogen-activating enzymes*. *Chembiochem* 3, 152-160;
- Happe T. and Kaminski A. (2002). *Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem.* 269, 1022-32;
- Hu M. Q., Wen H. M., Ma C. B., Li N., Yan Q. Y., Chen H., Chen C. N. (2010). *Synthesis, structures and electrochemistry studies of 2Fe<sub>2</sub>S-Fe(ii)(S-2N)(2) models for H-cluster of [FeFe]-hydrogenase*. *Dalton Trans.* 39, 9484-6 ;
- King P. W., Posewitz M. C., Ghirardi M. L., Seibert M. (2006). *Functional studies of [FeFe]-hydrogenase maturation in an Escherichia coli biosynthetic system*. *J. Bacteriol.* 188, 2163-2172;
- Kuchenreuther J. M., Myers W. K., Suess D. L., Stich T. A., Pelmenschikov V., Shiigi S. A., Cramer S. P., Swartz J. R., Britt R. D., George S.J. (2014). *The HydG enzyme generates an Fe(CO)<sub>2</sub>(CN) synthon in assembly of the FeFe hydrogenase H-cluster*. *Science.* 6169, 424-7;
- Lubitz W., Reijerse E., van Gastel M. (2007). *[NiFe] and [FeFe] hydrogenases studied by advanced magnetic resonance techniques*. *Chem Rev.* 107, 4331-65;

Manish S. and Barenjee R. (2008). *Comparison of bio-hydrogen production processes*. Int. J. hydrogen Energy. 33, 279-268;

Maso L., Galazzo L., Vallese F., Di Valentin M., Albertini M., De Rosa E., Giacometti G. M., Costantini P., Carbonera D. (2015). *A conformational study of the GTPase domain of [FeFe]-hydrogenase maturation protein HydF by PELDOR spectroscopy*. Appl Magn Reson 46, 465-479;

MathWorks (2014). *MATLAB*. MathWorks, URL <http://www.mathworks.it/products/matlab/> (01/07/2014);

McGlynn S. E., Mulder D. W., Shepard E. M., Broderick J. B., Peters J. W. (2009). *Hydrogenase cluster biosynthesis: organometallic chemistry nature's way*. Dalton Trans. 22, 4274-85;

McGlynn S. E., Shepard E. M., Winslow M. A., Naumov A. V., Duschene K. S., Posewitz M. C., Broderick W. E., Broderick J. B., Peters J. W. (2008). *HydF as a scaffold protein in [FeFe] hydrogenase H-cluster biosynthesis*. FEBS Lett. 582, 2183-2187;

Melis A., Happe T. (2001). *Hydrogen production. Green algae as a source of energy*. Plant Physiol. 127, 740-748;

Meyer J. (2007). *[FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective*. Cell Mol Life Sci. 64, 1063-1084;

Mulder D. W., Boyd E. S., Sarma R., Lange R. K., Endrizzi J. A., Broderick J. B., Peters J. W. (2010). *Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydA( $\Delta$ EFG)*. Nature 465, 248-251;

Nicolet Y., Rubach J. K., Posewitz M. C., Amara P., Mathevon C., Atta M., Fontecave M., Fontecilla-Camps J. C. (2008). *X-ray structure of the [FeFe]-hydrogenase maturase HydE from Thermotoga maritima*. J. Biol. Chem. 283, 18861-18872;

Peters J.W., Broderick J.B. (2012). *Emerging paradigms for complex iron-sulfur cofactor assembly and insertion*. Annu. Rev. Biochem. 81, 429-450;

Polyhach Y., Bordignon E., Jeschke. (2011). *Rotamer libraries of spin labelled cysteines for protein studies*. G. Phys. Chem. Chem. Phys. 13, 2356-2366

Posewitz M. C., King P. W., Smolinski S. L., Zhang L., Seibert M., Ghirardi M. L. (2004). *Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase*. J. Biol. Chem. 279, 25711-20;

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press;

Shepard E. M., McGlynn S. E., Bueling A. L., Grady-Smit, C. S., George S. J., Winslow M. A., Cramer S. P., Peters J. W., Broderick J. B. (2010). *Synthesis of the 2Fe subcluster of the [FeFe]-hydrogenase H cluster on the HydF scaffold*. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 10448-10453;

Shima S., Pilak O., Vogt S., Schick M., Stagni M. S., Meyer-Klaucke W., Warkentin E., Thauer R. K., Ermler U. (2008). *The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site*. Science 321, 572-5;

Silakov A., Wenk B., Reijerse E., Lubitz W. (2009). *(14)N HYSCORE investigation of the H-cluster of [FeFe] hydrogenase: evidence for a nitrogen in the dithiol bridge*. Phys. Chem. Chem. Phys. 11, 6592-6599;

Sofia H. J., Chen G., Hetzler B. G., Reyes-Spindola J. F., Miller N. E. (2001). *Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods*. Nucleic Acids Res. 29, 1097-1106;

Stephenson M., and Stickland L. H. (1931). *Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen. I. The properties of the enzyme*. Biochem. J. 25, 205-214;

Svedružić D., Blackburn J. L., Tenent R. C., Rocha J. D., Vinzant T. B., Heben M. J., King P. W. (2011) *High-performance hydrogen production and oxidation electrodes with hydrogenase supported on metallic single-wall carbon nanotube networks*. J Am Chem Soc. 133, 4299-306;

Thauer R. K., Kaster A. K., Goenrich M., Schick M., Hiromoto T., Shima S. (2010). *Hydrogenase s from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H<sub>2</sub> storage*. *Annu Rev Biochem.* 79, 507-36;

Tosatto S. C., Toppo S., Carbonera D., Giacometti G. M., Costantini P. (2007). *Comparative analysis of [FeFe]-hydrogenase from Thermotogales indicates the molecular basis of resistance to oxygen inactivation*. *Int. J. hydrogen Energy.* 33, 570-578;

Vallese F., Berto P., Ruzzene M., Cendron L., Sarno S., De Rosa E., Giacometti G. M., Costantini P. (2012). *Biochemical analysis of the interactions between the proteins involved in the [FeFe]-hydrogenase maturation process*. *J Biol Chem.* 287, 36544-55;

Van Ooteghem S. A., Jones A., Van Der Lelie D., Dong B., Mahajan D. (2004). *H<sub>2</sub> production and carbon utilization by Thermotoga neapolitana under anaerobic and microaerobic growth conditions*. *Biotechnol Lett.* 15, 1223-32;

Vetter I. R. and Wittinghofer A. (2001). *The Guanine Nucleotide–Binding Switch in Three Dimensions*. *Science* 294, 1299

Vignais P. M., and Billoud B. (2007). *Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview*. *Chem. Rev.* 107, 4206-4272;

Vignais P. M. and Colbeau A. (2004). *Molecular biology of microbial hydrogenases*. *Curr Issues Mol Biol.* 6, 159-88;





## **RINGRAZIAMENTI**

A conclusione di questo lavoro di tesi vorrei ringraziare le professoresse Donatella Carbonera e Paola Costantini per l'opportunità che mi hanno concesso accogliendomi nei loro laboratori, per la disponibilità, costanza e dedizione che hanno avuto nel seguirmi, permettendomi di crescere molto sia dal punto di vista scientifico-accademico che dal punto di vista umano.

Vorrei ringraziare anche il dott. Lorenzo e la dott.ssa Edith per la loro gentilezza e pazienza con la quale sono sempre stati disposti ad aiutarmi nel lavoro, permettendomi di imparare e crescere molto; un sentito ringraziamento va anche alla dott.ssa Laura e a tutti i collaboratori del gruppo della professoressa Carbonera per il loro indispensabile aiuto nelle ricerche.

Ringrazio Giada per avermi accompagnato in questa esperienza di vita.

Ringrazio la mia famiglia che mi ha sostenuto in tutti questi anni di studio, senza la quale non avrei potuto arrivare a questo traguardo, che dedico loro.

Ringrazio tutti i miei amici, in particolare Daniele e Giulia, siete stati la mia forza e dedico anche a voi questo traguardo.





