

Università degli Studi di Padova  
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.  
Laurea Magistrale in Biologia Molecolare



**Analisi biochimica delle interazioni tra le proteine implicate  
nel processo di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi**

Relatore: Dott.ssa Paola Costantini  
Dipartimento di Biologia A. Vallisneri

Correlatore: Dott.ssa Francesca Vallese  
Dipartimento di Biologia A. Vallisneri

Laureanda: Martina Zilioli

Anno Accademico 2010/2011



*“I look upon you as a gem of the old rock”*

*Sir Thomas Browne (1605-1682)*

**A mia nonna Fedora**



## ABSTRACT

The reversible bio-reduction of protons to molecular H<sub>2</sub> is catalyzed by [FeFe]-hydrogenases through the *H-cluster* active site, consisting of a [4Fe-4S] cubane bridged to a 2Fe modified unit. The assembly of a catalytically competent *H-cluster* requires three ancillary, highly conserved proteins: HydE, HydG and HydF. The latter functions as a scaffold upon which HydG and HydE modify the bimetallic subcluster, which is then transferred by HydF to HydA.

In the first part of this work, we provide evidence that interactions mediated by the HydF scaffold function are essential and independent events, since HydF is able to interact with both HydE and HydG in a binary way. We also suggest that, although HydF GTPase activity is likely modulated by the two other maturases, it seems not involved in the HydG and HydE binding behaviour. The different oligomeric states in which HydF is found *in vivo* do not exhibit a differential ability to associate with each of the two maturases, restricting useful data to identify the scaffold active state of HydF. We finally tested the HydA-HydF interaction and suggest that HydG and HydE strongly modify the HydF binding properties, since HydF becomes able to bind HydA only when expressed in the presence of HydG and HydE.

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| INTRODUZIONE   | 1  |
| 1.1 La rivoluzione energetica  | 1  |
| 1.2 L'idrogeno come combustibile   | 1  |
| 1.2.1 La produzione biologica di idrogeno  | 2  |
| 1.3 Le idrogenasi  | 5  |
| 1.4 Le [FeFe]-idrogenasi   | 10 |
| 1.4.1 Struttura enzimatica e sito catalitico   | 10 |
| 1.4.2 La maturazione delle [FeFe]-idrogenasi   | 15 |
| 1.5 La maturasi HydF   | 21 |
| SCOPO  | 26 |
| RISULTATI E DISCUSSIONE (I)  | 27 |
| 1.1 Espressione in <i>E. coli</i> e co-precipitazione delle proteine ricombinanti HydF/Strep, HydG/His e HydE/His di <i>Clostridium acetobutylicum</i> | 27 |
| 1.2 Co-precipitazioni delle proteine ricombinanti HydF/Strep e HydG/His  | 33 |
| 1.3 Co-precipitazione delle proteine ricombinanti HydF/Strep e HydE/His  | 40 |
| 2.1 Co-precipitazione delle proteine ricombinanti HydF <sub>CaGly24Ala,Lys25Ser</sub> /Strep e HydE/His  | 42 |
| 2.2 Co-precipitazione delle proteine ricombinanti HydF <sub>CaGly24Ala,Lys25Ser</sub> /Strep ed HydG/His   | 44 |
| 3. Co-precipitazione delle forme dimerica e tetrameric di HydF/Strep con HydG/His e con HydE/His   | 47 |
| RISULTATI E DISCUSSIONE (II)   | 53 |
| 4.1 Co-precipitazione delle proteine ricombinanti HydF/His e HydA/Strep  | 53 |
| 4.2 Co-precipitazione delle proteine HydF/His, HydE, HydG e HydA/Strep   | 54 |
| CONCLUSIONI  | 58 |
| MATERIALI E METODI   | 61 |
| Ceppi Batterici  | 61 |

|  |    |
|--|----|
| Media di coltura per <i>Escherichia coli</i>                                   | 61 |
| Sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche della proteina HydFCa                 | 61 |
| Plasmidi di espressione  | 62 |
| METODI DI BIOLOGIA MOLECOLARE  | 65 |
| Digestione di DNA con enzimi di restrizione                                    | 65 |
| Corsa elettroforetica di DNA su gel di agarosio                                | 66 |
| Ligazione  | 66 |
| Trasformazione batterica   | 66 |
| 1. Trasformazione mediante elettroporazione (ceppi elettrocompetenti)          | 67 |
| 2. Trasformazione chimica  | 67 |
| Purificazione di DNA plasmidico da colture batteriche                          | 68 |
| 1. Metodo veloce – estrazione con etanolo                                      | 68 |
| 2. Metodo con colonnine  | 68 |
| METODI BIOCHIMICI  | 69 |
| Induzione della proteina ricombinante  | 69 |
| French Pressure Cell Press   | 69 |
| Sonicazione  | 69 |
| Preparazione dei campioni per l'analisi proteica                               | 70 |
| Purificazione delle proteine ricombinanti                                      | 70 |
| Cromatografia di affinità mediante resina HIS-Select™ Nickel Affinity          | 71 |
| Gel (SIGMA)  |    |
| Cromatografia di affinità mediante resina Strep-Tactin® (IBA)                  | 71 |
| Gel filtrazione in FPLC ( <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> )          | 72 |
| Determinazione del peso molecolare di una specie proteica                      | 73 |
| Elettroforesi di proteine in gel denaturante di poliacrilammide (SDS-<br>PAGE) | 74 |
| Western Blotting   | 75 |
| Saggio immunologico  | 75 |
| ABBREVIAZIONI  | 76 |
| BIBLIOGRAFIA   | 77 |

## **INTRODUZIONE**

### **1.1 La rivoluzione energetica**

La rivoluzione che sta investendo il settore energetico è dettata dalle problematiche che l'impiego di combustibili fossili ha implicato: il processo di combustione aumenta il contenuto di anidride carbonica nell'atmosfera, contribuendo al surriscaldamento terrestre; l'esauribilità dei giacimenti ne compromette le applicazioni a lungo termine. Per questo, l'individuazione di nuove forme di energia che impieghino risorse rinnovabili e il cui intero ciclo produttivo minimizzi le emissioni di CO<sub>2</sub> è posta al centro dell'attenzione scientifica e tecnologica.

Tra le “ecoenergie” emergenti, l'idrogeno molecolare rappresenta un combustibile ideale: può essere sfruttato per la generazione di energia elettrica e termica, come propellente per il trasporto e la sua combustione produce acqua pura come unico prodotto di scarto: questi connotati lo rendono oggetto di ricerche destinate allo sviluppo di sistemi che ne producano quantità consistenti utilizzando tecniche eco-compatibili.

### **1.2 L'idrogeno come combustibile**

Il primo problema con cui l'ingegneria energetica deve misurarsi riguarda la forma con cui l'idrogeno si presenta in natura: è sempre associato ad altri elementi ed è presente in quantità modeste allo stato gassoso, unico stato da cui è possibile sfruttare il suo potenziale energetico. Il secondo problema è dovuto al fatto che le tecnologie destinate alla produzione di idrogeno, come l'elettrolisi dell'acqua o la gassificazione e la pirolisi delle biomasse, pur riducendo il tasso inquinante degli scarti di produzione – poiché le emissioni di CO<sub>2</sub> provengono da risorse rinnovabili -, impiegano energia termica o elettricità, la cui estrazione richiede i combustibili dai quali è stata evidenziata la necessità di emanciparsi. Inoltre, l'impiego di biomasse per la produzione di biocarburante è accusato di



sottrarre la superficie coltivabile all'agricoltura.

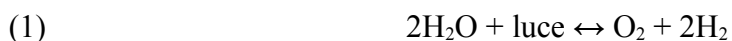
Il vantaggio di utilizzare energia biochimica per sviluppare idrogeno molecolare consiste nella possibilità di prescindere dall'impiego di risorse fossili in qualsiasi fase del ciclo di evoluzione del gas. Questo vantaggio è il principale promotore della ricerca di base sulla "bioproduzione di idrogeno", che pone come oggetto di indagine la capacità di alcuni microrganismi di rilasciare questo gas a partire da materia organica, acqua e, nei microrganismi fotosintetici, luce, utilizzando l'energia biochimica del loro metabolismo.

### 1.2.1 La produzione biologica di idrogeno

E' considerato "bioidrogeno" l'idrogeno molecolare prodotto a partire da risorse rinnovabili (biomassa, acqua, rifiuti organici) attraverso l'energia biochimica o foto-biochimica dei microrganismi (Balat et al., 2009). Nei sistemi biologici, l'evoluzione di idrogeno gassoso è subordinata alla presenza di nitrogenasi e idrogenasi, metalloenzimi condivisi da organismi procarioti ed eucarioti, approfonditi nel paragrafo 1.3. Attualmente sono noti diversi processi metabolici che implicano la produzione di idrogeno:

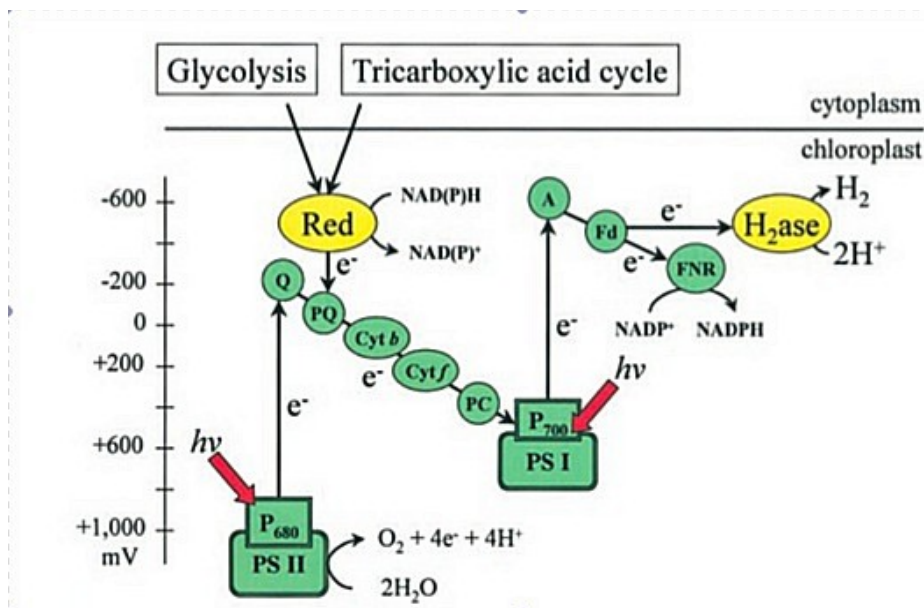
- biofotolisi diretta e indiretta;
- fotodecomposizione;
- fermentazioni al buio;
- sistemi ibridi.

La **biofotolisi diretta** conduce alla formazione di idrogeno attraverso la seguente reazione fotosintetica:



La reazione ha luogo negli organismi fotosintetici ossigenici (alghe verdi

unicellulari e cianobatteri) in quanto l'assorbimento di luce è essenziale per la produzione di idrogeno molecolare: l'energia luminosa permette l'ossidazione delle molecole d'acqua, il rilascio di protoni ed elettroni, e il trasporto di questi ultimi, attraverso il fotosistema II (PSII) e il fotosistema I (PSI), alla ferredossina (Melis and Happe, 2001). Come schematizzato in figura 1, gli elettroni, in misura minore, possono essere rilasciati anche dall'ossidazione di substrati endogeni (attraverso la glicolisi e il ciclo degli acidi tricarbossilici) a livello del *pool* del plastochinone.

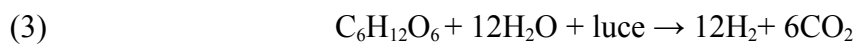
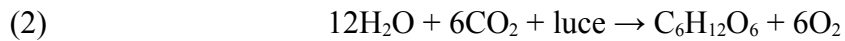


**Figura 1. Catena di trasporto degli elettroni correlata all'idrogenasi nelle alghe verdi.** Gli elettroni possono provenire dalla fotossidazione dell'acqua a livello del PSII, oppure da substrati endogeni a livello del *pool* del plastochinone. Gli elettroni sono trasferiti attraverso il PSI alla ferredossina, il donatore fisiologico di elettroni alla [FeFe]-idrogenasi. P680, centro di reazione del PSII; P700, centro di reazione del PSI; Q, accettore primario degli elettroni provenienti dal PSII; A, accettore primario degli elettroni provenienti dal PSI; PQ, plastochinone; Cyt, citocromo; PC, plastocianina; Fd, ferredossina; Red, NAD(P)H ossido-reduttasi; H<sub>2</sub>ase, [FeFe]-idrogenasi; FNR, ferredossina-NADP<sup>+</sup> reduttasi (fonte: Melis and Happe, 2001).

In condizioni fisiologiche, la ferredossina riduce il NADP<sup>+</sup> a NADPH, necessario potere riducente nel ciclo di Calvin-Benson: pertanto, l'attività delle idrogenasi in tali condizioni è solo transiente. In anaerobiosi vengono attivati i geni codificanti le idrogenasi, la cui attività è inibita dall'ossigeno, che esercita dunque un

ulteriore controllo negativo. Dunque, la ferredossina cede gli elettroni all'idrogenasi che, riducendo i protoni ad idrogeno gassoso, previene la sovra-riduzione dei componenti della catena di trasferimento elettronico.

La **biofotolisi indiretta** si articola in due distinte reazioni:



I cianobatteri sono gli unici organismi in grado di utilizzare direttamente l'anidride carbonica per produrre substrati energetici (reazione 2), utilizzati successivamente per la sintesi di idrogeno e anidride carbonica (reazione 3). Il vantaggio rappresentato da questo sistema consiste nella separazione temporale e spaziale (Manish, 2008) degli eventi di fotosintesi ossigenica e di produzione di idrogeno; in tale contesto, l'evoluzione del gas è catalizzata da una classe di enzimi altrettanto sensibili all'ossigeno, le nitrogenasi (Das et al., 2008). L'attività delle nitrogenasi, pur garantendo un'alta efficienza di conversione dell'acqua in idrogeno gassoso, rimane il limite principale all'applicazione biotecnologica a causa dell'elevata richiesta di ATP (Hallenbeck and Benemann, 2002).

La **foto decomposizione** dei composti organici coinvolge alcuni batteri fotosintetici, come i batteri rossi del genere *Rhodobacter*, o i batteri rossi non sulfurei, come *Rhodospseudomonas palustris*, capaci di impiegare luce e composti organici nel processo di fotosintesi non ossigenica. L'assenza di un sistema di fotoossidazione dell'acqua e la presenza di un solo fotosistema (PS) impone l'utilizzo di substrati ridotti alternativi all'acqua, come l'acido acetico; tuttavia, tale contesto fisiologico garantisce una condizione di anaerobiosi favorevole alla produzione di idrogeno, che impiega gli elettroni (secondo l'equazione 4, paragrafo 1.3) rilasciati durante il metabolismo fermentativo.

La **fermentazione al buio** è compiuta da batteri anaerobi, in assenza di luce e in presenza di substrati energetici. La degradazione dei composti organici (come i

carboidrati, ottimali per la bioproduzione di idrogeno), necessaria alla produzione di cataboliti ed energia metabolica, si articola in una serie di reazioni di ossidazione. Queste ultime liberano elettroni che devono essere catturati ai fini di mantenere l'elettroneutralità cellulare. In tali contesti anaerobici, i protoni sono eccellenti accettori nelle reazioni di riduzione, che convertono i primi ad idrogeno molecolare (Das et al., 2008).

Sebbene il metabolismo anaerobico dei batteri decompositori non evolva idrogeno con elevata efficienza, il vantaggio economico che si prospetta dal loro impiego nella decomposizione di rifiuti organici e biomasse, sostiene il potenziale applicativo di questo sistema.

I **sistemi ibridi** prevedono di accoppiare la fermentazione di carboidrati e rifiuti organici, catalizzata dai suddetti microrganismi anaerobici, alla conversione degli intermedi di decomposizione ad idrogeno gassoso, permessa dai batteri fotosintetici. La quantità di idrogeno prodotto dal sistema fermentativo verrebbe così implementata dalla seguente reazione fotosintetica, allestita in un fotobioreattore coniugato.

Ad oggi, la conoscenza dei processi di bioproduzione di idrogeno non ne implica automaticamente l'impiego nel settore energetico. Infatti, i fattori limitanti un'applicazione su larga scala sono rappresentati dalla sensibilità delle idrogenasi all'ossigeno e dalla competizione fotosintetica fra l'attività idrogenasica e l'organizzazione dell'anidride carbonica NADPH-dipendente, prioritaria in condizioni fisiologiche. Pertanto, l'analisi del contesto metabolico in cui la bioproduzione di idrogeno è operativa ricopre un'importanza centrale ai fini di rendere (industrialmente) funzionale l'intervento biotecnologico su questi processi.

### **1.3 Le idrogenasi**

In accordo con una recente teoria sull'origine della vita autotrofa (Nicolet

et al. 2009), è stato ipotizzato che il metabolismo più ancestrale si sviluppò in condizioni riducenti lungo le superfici minerali ricche di zolfo e ferro, indipendentemente perciò dall'energia solare. Pertanto, secondo tale ipotesi, l'idrogeno rappresentò la prima ed essenziale fonte di energia metabolica: abbondante nell'atmosfera primordiale, esercitò una pressione funzionale all'evoluzione di enzimi - le idrogenasi - in grado di impiegarlo nelle reazioni biologiche. Le idrogenasi catalizzano la semplice e antica reazione di ossidoriduzione:



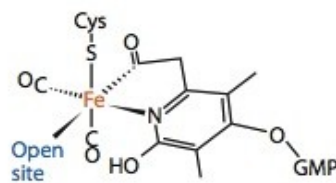
La reazione è reversibile e il relativo equilibrio dipende dal potenziale redox dei fattori capaci di interagire con l'enzima: in presenza di un accettore di elettroni, l'enzima catalizza l'ossidazione dell'idrogeno molecolare a protoni; in presenza di un donatore di elettroni, l'idrogenasi catalizza l'evoluzione del gas (Vignais et al., 2004). In questo modo, le idrogenasi ricoprono due funzioni essenziali: rimuovere l'eccesso di equivalenti riducenti attraverso la produzione di idrogeno, e ripristinare un *pool* elettronico attraverso l'ossidazione dell' $\text{H}_2$ . L'attività dell'enzima interviene quindi nel bilanciamento del potenziale redox della cellula (Lubitz et al., 2007), un *pathway* collaterale attivato in opportuni contesti fisiologici. Questi, come accennato nel paragrafo precedente, risultano determinanti nel definire il potenziale biotecnologico dell'enzima.

Altrettanto importante è la comprensione dei principi che regolano il metabolismo dell'idrogeno nei microrganismi, al fine di utilizzarli, direttamente, nell'industria energetica e, indirettamente, nella progettazione di catalizzatori biomimetici. Perciò, a partire dalla loro scoperta, compiuta da Stephenson and Stickland nel 1931, le idrogenasi sono state oggetto di approfondite indagini interdisciplinari. Dopo la seconda metà del secolo scorso, le idrogenasi sono state purificate e caratterizzate biochimicamente in numerosi microrganismi. Dalla metà del 1980, il sequenziamento e il clonaggio di un numero sempre crescente di idrogenasi ha permesso la classificazione e la razionalizzazione delle rispettive proprietà, in

seguito implementate dai dati forniti dalla risoluzione delle prime strutture cristalline e dalla scoperta di uno specifico apparato proteico di maturazione. Le idrogenasi sono state raggruppate in tre classi filogeneticamente distinte, discriminate in base alla composizione metallica del sito attivo: [Fe]-idrogenasi, [NiFe]-idrogenasi, [FeFe]-idrogenasi.

Le **[Fe]-idrogenasi** sono state isolate unicamente in alcuni archea metanogeni idrogenotrofici, ove vengono espresse, a partire dal relativo gene codificante *hmd*, in assenza di nichel (Thauer et al., 2010). Le [Fe]-idrogenasi si distinguono dalle [NiFe]-idrogenasi e dalle [FeFe]-idrogenasi per aspetti strutturali e funzionali.

La struttura cristallografica della [Fe]-idrogenasi di *Methanocaldococcus jannaschii* (Shima et al., 2008) evidenzia la presenza di una molecola di Fe-guanilipiridone (FeGP) per ciascuna delle subunità dell'apoenzima omodimerico, a cui il cofattore è legato covalentemente attraverso il tiolato di un residuo di cisteina (figura 2).



**Figura 2. Rappresentazione del sito metallico di una [Fe]-idrogenasi.** L'atomo di ferro è coordinato a due ligandi CO, alla funzione tiolica di un residuo di cisteina e agli atomi di N e C del ligando piridinolo, che unisce il ferro alla molecola di GMP. La sesta posizione di coordinazione è vacante. Abbreviazione: GMP, gruppo guanile (immagine tratta da Thauer et al., 2010).

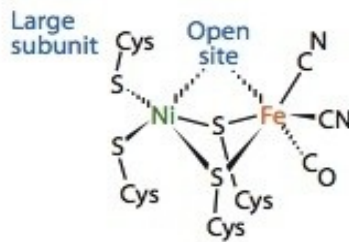
Le [Fe]-idrogenasi catalizzano uno *step* fondamentale nel processo di riduzione dell'anidride carbonica a metano: esso prevede l'*attivazione* dell'idrogeno gassoso nella seguente reazione reversibile:



Diversamente dalle restanti classi di idrogenasi, le [Fe]-idrogenasi non catalizzano

dunque la reazione indicata nell'equazione 4: infatti, la scissione eterolitica dell'idrogeno da parte dell'enzima dipende strettamente dalla presenza del substrato, in particolare del metenil- $\text{H}_4\text{MPT}^+$ , il cui gruppo carbocationico agisce da accettore di gruppi anidridi (Thauer et al., 2010).

Le **[NiFe]-idrogenasi** rappresentano la classe di idrogenasi più numerosa, la maggior parte delle quali catalizza preferenzialmente l'ossidazione dell'idrogeno gassoso, secondo la reazione 4. Le [NiFe]-idrogenasi sono limitate agli archeobatteri ed eubatteri (fra cui i cianobatteri), non essendo state isolate negli Eucarioti inferiori. La struttura cristallina ottenuta per la [NiFe]idrogenasi di *Desulfovibrio gigas* (Niviere et al., 1987) rivela la presenza di due subunità che interagiscono estensivamente, formando un eterodimero globulare. La subunità maggiore (60 kDa) contiene il sito attivo, la cui geometria è altamente conservata fra le [NiFe]-idrogenasi. Come indicato in figura 3, il sito attivo prevede un centro dimetallico, in cui gli atomi di ferro e nichel sono uniti tramite due legami organici tioestere. L'atomo di nichel è coordinato alla subunità maggiore dell'apoenzima tramite le funzioni tioliche di due residui di cisteina; in alcuni casi, una di queste è sostituita da una seleniocisteina, che assegna l'enzima ad una sottoclasse di idrogenasi: le [NiFeSe]-idrogenasi. L'atomo di ferro, invece, è stabilizzato da due molecole di  $\text{CN}^-$  e una di CO, due ligandi non proteici piuttosto insoliti per un enzima biologico. Nella proteina isolata in anaerobiosi, lo spazio interatomico Fe-Ni è occupato da una densità elettronica assegnata ad un terzo ligando, la cui natura non è stata ancora definita univocamente (McGlynn et al., 2009).



**Figura 3. Rappresentazione del sito metallico di una [NiFe]-idrogenasi.** L'atomo di ferro è stabilizzato da due molecole di CN<sup>-</sup> e da una molecola di CO; è inoltre legato all'atomo di nichel del centro dimetallico tramite le funzioni tioliche di due residui di cisteina. L'atomo di nichel media l'ancoraggio del sito attivo alla matrice proteica tramite due cisteine, i cui atomi di zolfo sono coinvolti nel legame con l'atomo di nichel (immagine tratta da Thauer et al., 2010).

La subunità minore (28 kDa) dell'enzima contiene fino a tre centri FeS, coinvolti nel trasferimento di elettroni verso e dal sito attivo: la direzione, infatti, varia a seconda della catalisi operata, che sembra implicare la sesta posizione di coordinazione del nichel (non indicata in figura 3) come primo sito di legame per l'idrogeno.

Le **[FeFe]-idrogenasi** risultano assenti negli archeobatteri e nei cianobatteri, ma sono state isolate in numerosi Eubatteri, fra cui organismi anaerobi obbligati come *Clostridium* e *Desulfovibrio*, in alcune alghe verdi unicellulari e in numerosi protisti, come *Trichomonas*. Le [FeFe]-idrogenasi, a differenza delle [NiFe]-idrogenasi, sono spesso coinvolte nella riduzione di protoni ad idrogeno (Vignais et al., 2007). Precisamente, risultano associate ad un ampio spettro di *partners* redox, che sono determinati da una serie di variabili, fra cui: le proprietà strutturali (domini di legame) e funzionali dell'enzima; la sua specificità metabolica e le condizioni nutrizionali della cellula; la localizzazione subcellulare e l'organismo d'appartenenza (Das et al., 2006). Pertanto, la complessità delle interazioni, e del meccanismo di trasferimento elettronico che



ne deriva, produce un'alta eterogeneità funzionale nella classe delle [FeFe]-idrogenasi, che impone dettagliate indagini ai fini di valutare le implicazioni biochimiche, fisiologiche e biotecnologiche del singolo enzima.

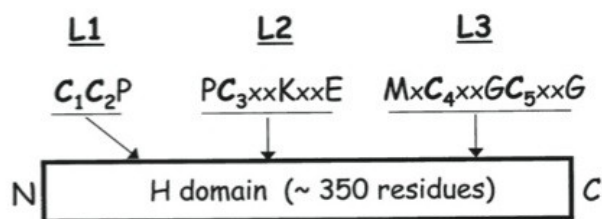
L'aspetto forse più complesso delle reazioni redox gas-dipendenti è la comprensione del loro meccanismo (Nicolet et al., 2009). Risulta tuttavia chiaro che un tratto condiviso dagli enzimi che operano questo tipo di catalisi è la composizione del sito attivo, un residuo di strutture minerali contenenti elementi FeS, sicuramente abbondanti nelle ere primordiali dell'origine del pianeta. A tal proposito, le diverse classi di idrogenasi, pur non essendo filogeneticamente correlate in termini di struttura primaria e di apparato di maturazione, condividono un'unità catalitica  $\text{Fe}(\text{CO})_n$ , affermandosi perciò come un caso esemplare di evoluzione convergente. Altrettanto importanti risultano le differenze catalitiche che distinguono le classi di idrogenasi, differenze in grado di concentrare l'interesse bioenergetico sulle [FeFe]-idrogenasi, più attive e specifiche delle [NiFe]-idrogenasi per un fattore di  $10^2$  in termini di evoluzione di idrogeno gassoso (Frey, 2002).

## 1.4 Le [FeFe]-idrogenasi

### 1.4.1 Struttura enzimatica e sito catalitico

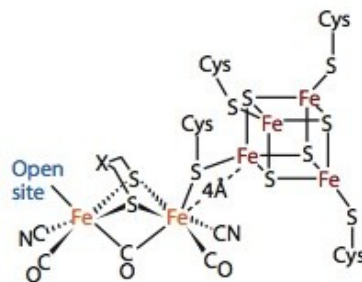
Le [FeFe]-idrogenasi sussistono sia in forma monomerica che eteromericamente; tuttavia, la modularità della singola struttura, indipendente dalla sua associazione oligomerica, risulta essere un connotato comune. Infatti, la sequenza primaria è caratterizzata da un numero variabile di domini *accessori*, i domini F, e da un *core* funzionale, il dominio H, la regione C-terminale dell'enzima deputata ad ospitare il *cluster H*. Quest'ultimo rappresenta il sito attivo implicato nella reazione catalitica, che risulta conservata fra le [FeFe]-idrogenasi. A dimostrazione di ciò, l'allineamento multiplo delle sequenze amminoacidiche di diverse [FeFe]-idrogenasi ha individuato i motivi L1, L2, L3 (indicati in figura 4), sequenze conservate a livello del dominio H, coinvolte nella coordinazione degli atomi che

compongono il *cluster H*.



**Figura 4. Rappresentazione del dominio H.** Il dominio H risiede nella coda C-terminale della sequenza polipeptidica e si estende per una lunghezza di circa 350 residui. I motivi L1, L2 ed L3 sono sequenze definite dalle rispettive posizioni conservate, indicate in figura per ciascun motivo. Le cisteine C2-C5 sono ligandi del centro [4Fe4S], la C5 media il legame [FeFe] – [4Fe4S]. La C1 sembra ricoprire una funzione acido/base vicino al sito attivo (immagine tratta da Meyer et al., 2007).

Il *cluster H*, comune ai membri delle [FeFe]-idrogenasi, si compone di un'unità [4Fe4S], detta cubano, i cui atomi di ferro sono ancorati all'apoenzima dalle funzioni tioliche di tre cisteine, che occupano le posizioni altamente conservate rispettivamente nel motivo L1, L2 ed L3. Il gruppo tiolico di una seconda cisteina, presente nel motivo L3, è implicato nel collegamento fra il cubano e l'unità catalitica [FeFe] del *cluster H*. In quest'ultima l'atomo di ferro prossimale è coordinato a due ligandi CO e un ligando CN<sup>-</sup>, e risulta connesso all'atomo di ferro distale mediante un ponte ditioloico, recentemente attribuito ad un ligando ditiometilamminico (Peters et al., 2011). L'atomo di ferro distale è anch'esso stabilizzato in uno stato di ossidazione opportuno alla catalisi e/o al trasferimento di elettroni da ligandi CO e CN<sup>-</sup> (Nicolet et al., 1998), come mostrato in figura 5.



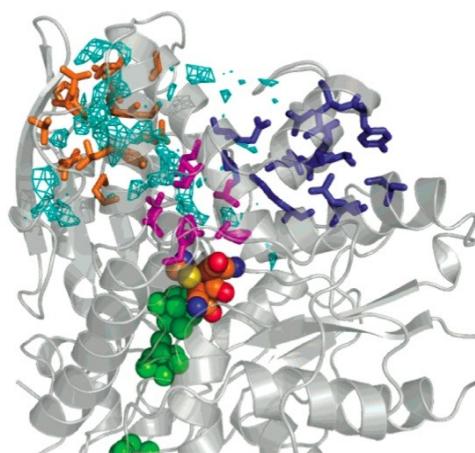
**Figura 5. Rappresentazione del *cluster H* di una [FeFe]-idrogenasi.** Il sito attivo delle [FeFe]-idrogenasi è composto da un centro [FeFe], collegato ad un centro [4Fe4S] tramite un legame tioestere fra l'atomo di ferro prossimale del centro bimetallico e un atomo di ferro della molecola di cubano (immagine tratta da Thauer et al., 2010)

L'atomo di ferro distale possiede una posizione vacante di coordinazione, occupata, rispettivamente, dal CO, nella forma inibita dell'enzima; dall' $H^+/H_2$ , nello stato attivo dell'enzima; da una molecola d'acqua, nello stato inattivo dell'enzima (Vignais and Colbeau, 2004).

Il trasferimento intra- ed intermolecolare di elettroni verso il sito attivo è necessario alla catalisi operata dalle [FeFe]-idrogenasi, che avviene secondo l'equazione 4 (vedi paragrafo 1.3). Gli elettroni sono ceduti da un opportuno *partner* redox, e vengono trasferiti dal relativo dominio di interazione al sito bimetallico del *cluster H* attraverso una catena di centri [4Fe4S] (Vignais and Colbeau, 2004). Ciascun centro [4Fe4S] è coordinato ad un dominio F, il cui numero è variabile all'interno della sequenza amminoacidica delle [FeFe]-idrogenasi ed è totalmente assente nell'enzima dell'alga verde unicellulare *Chlamydomonas reinhardtii*, la più piccola [FeFe]-idrogenasi ad oggi nota. Il trasferimento dei protoni provenienti dalla soluzione esterna avviene invece attraverso un *pathway* non ancora determinato univocamente, che sembrerebbe coinvolgere alcuni residui chiave presenti lungo un putativo canale (Fontecilla-Camps et al., 2007). In aggiunta al trasporto di protoni ed elettroni, sono stati descritti i meccanismi di diffusione dei gas idrofobici, come l'idrogeno, prodotto per attività catalitica; l'ossigeno e il CO, inibitori rispettivamente irreversibili e reversibili della funzione idrogenasica.

Inizialmente, l'analisi dei dati cristallografici ottenuti per le [FeFe]-idrogenasi di

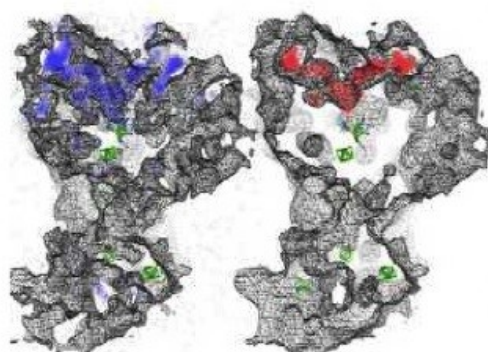
*Clostridium pasteurianum* e di *Desulfovibrio desulfuricans* rivelò in entrambe la presenza di un canale idrofobico esteso tra la superficie della proteina e la posizione vacante dell'atomo di ferro del centro [2Fe2S]. La presenza di tale canale (definito *pathway A*) venne confermata da successive indagini computazionali condotte sulla [FeFe]-idrogenasi di *C. pasteurianum*, che caratterizzarono una seconda struttura di diffusione dei gas (definita *pathway B*), determinata, come la prima, dalle fluttuazioni di densità della matrice proteica. I risultati ricavati dalle simulazioni di dinamica molecolare dimostrarono come piccole molecole idrofobiche diffondano all'interno dell'enzima sfruttando cavità di *packing defects* (Cohen et al., 2005), non sempre esplorabili per la staticità della struttura cristallina, ma predicibili dai moti molecolari che le producono. Entrambi i *pathways* convergono in una larga cavità adiacente al sito attivo, come è possibile apprezzare in figura 6.



**Figura 6. Rappresentazione del *pathway A* (residui arancioni) e del *pathway B* (residui blu).** La cavità comune ai due pathways è indicata da residui magenta, mentre la densità azzurra indica il canale idrofobico isolato nella struttura cristallina. Le sfere verdi indicano i centri FeS, il sito attivo corrisponde alle sfere colorate (fonte: Fontecilla-Camps et al., 2007).

In questo modo, gli studi di Cohen e collaboratori hanno permesso di ottenere, attraverso opportune simulazioni di dinamica molecolare, le mappe di diffusione dei gas idrofobici. Come è possibile apprezzare in figura 7, la diffusione

dell'idrogeno si estende anche alle regioni limitrofe i *pathways A* e *B*, mentre l'espansione dell'ossigeno è strettamente limitata a questi ultimi. La facilità con cui l'idrogeno si muove all'interno dell'enzima è probabilmente dovuta alle dimensioni del gas, minori rispetto a quelle dell'ossigeno. Pertanto, a parità di moti molecolari, la frequenza di formazione di cavità transienti accessibili all'idrogeno è alta, permettendo a quest'ultimo una diffusione più semplice.



**Figura 7. Rappresentazione delle mappe di di diffusione delle molecole di H<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>.** I due gas diffondono preferenzialmente attraverso due *pathways* comuni. Come si può apprezzare dalle mappe di diffusione dei gas all'interno dell'enzima, l'H<sub>2</sub> (in blu), molecola più piccola rispetto all'O<sub>2</sub> (in rosso), ha un'accessibilità maggiore alle cavità transienti che si formano durante i moti molecolari dell'enzima (fonte: Cohen et al., 2005).

L'ossigeno, invece, si espande più lentamente, anche a causa del peculiare carattere idrofobico (Fontecilla-Camps et al., 2007). Ciò contribuisce a determinarne l'irreversibilità dell'azione inibitoria, che potrebbe coinvolgere il legame dell'ossigeno alla posizione vacante dell'atomo di ferro distale: la conseguente ossidazione del centro bimetallico a Fe(III) provocherebbe la perdita dei ligandi CO e CN<sup>-</sup>, causando la disgregazione del *cluster H* (Lubitz et al., 2007). Un'ipotesi differente prevede che alcuni residui del dominio H siano implicati nel legame all'ossigeno, sottolineando in questo modo la criticità di questa sequenza nel meccanismo di protezione del sito attivo (Volbeda et al., 2005).

I regolatori della sensibilità all'ossigeno non sono ancora stati individuati. A tal

proposito, analisi bioinformatiche condotte sulla [FeFe]-idrogenasi di *Thermotoga neapolitana* ipotizzano che la presenza di residui meno carichi ma più polari posti all'entrata dei canali idrofobici possa aumentare la tolleranza all'ossigeno (Tosatto et al., 2008). Come altri microrganismi appartenenti all'ordine dei *Thermotogales*, *T. neapolitana* presenta un'insolita capacità di produrre idrogeno in condizioni di microaerobiosi. Lo studio delle [FeFe]-idrogenasi di questi organismi offrirebbe quindi un contributo importante alla comprensione dei meccanismi di sensibilità all'ossigeno. *T. neapolitana*, ad esempio, è in grado di crescere e produrre efficientemente idrogeno ed anidride carbonica in condizioni di microaerobiosi (6-8% v/v O<sub>2</sub>). La comprensione di meccanismi di tolleranza all'ossigeno permetterebbe di apportare opportune modifiche a sistemi, come le alghe verdi unicellulari, le cui attività fisiologiche ossigeniche risultano incompatibili con la produzione di idrogeno molecolare. Sebbene i meccanismi di sensibilità all'ossigeno non siano ancora stati univocamente descritti, la centralità della funzione del *cluster H* sembra evolutivamente controllata concentrando nel relativo dominio di legame alcuni meccanismi di sensibilità e protezione dall'ossigeno (Cohen et al., 2005).

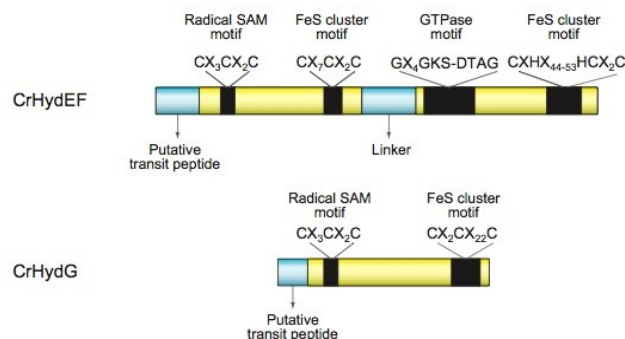
Pari importanza rivestono i meccanismi di assemblaggio del sito attivo, imposti dalla sua complessità e straordinarietà. Sebbene non siano ancora stati caratterizzati nei molteplici dettagli, essi risultano associati ad un adeguato apparato di maturazione.

#### **1.4.2 La maturazione delle [FeFe]-idrogenasi**

L'inconsueta architettura del *cluster H* è sicuramente dovuta alla presenza di un *cluster* [6Fe6S] combinato in due *subcluster* e di ligandi CO e CN<sup>-</sup>, generalmente tossici per i sistemi biologici. L'impiego e l'assemblaggio di tali cofattori richiede un apparato proteico specializzato che diriga, in modo coordinato e regolato, molecole e atomi che, liberi in soluzione acquosa, risulterebbero dannosi per il metabolismo cellulare. Studi condotti negli ultimi anni stanno velocemente ricomponendo il meccanismo di attivazione delle

[FeFe]-idrogenasi, che prevede l'assemblaggio del *cluster H* in corrispondenza del dominio H.

L'attivazione delle [FeFe]-idrogenasi prevede due fasi: la sintesi del centro [4Fe4S] mediata da un apparato aspecifico presente nell'organismo ospite (Mulder et al., 2009), e la conseguente formazione, processamento ed inserzione del centro [2Fe2S], cui vengono coordinati i ligandi non proteici, attraverso un apparato proteico specializzato. Quest'ultimo è rappresentato dalle maturasi HydEF ed HydG, isolate inizialmente in *C. reinhardtii* (Posewitz et al., 2004). Gli esperimenti condotti da Posewitz e collaboratori dimostrarono che la prerogativa imprescindibile alla funzionalità della [FeFe]-idrogenasi di *C. reinhardtii* (HydA) espressa in *Escherichia coli*, che possiede solo [NiFe]-idrogenasi, prevede la co-espressione degli enzimi HydEF ed HydG dell'alga stessa (Posewitz et al., 2004). Risulta evidente, dunque, la specificità dell'azione di HydEF ed HydG, dal momento che esse non possono essere sostituite dall'apparato di maturazione delle [NiFe]-idrogenasi di cui l'organismo ospite è dotato. L'ottimizzazione del sistema di espressione eterologa ha permesso inoltre di verificare che [FeFe]-idrogenasi diverse possono essere attivate attraverso sistemi di maturazione distinti da quello del relativo organismo d'appartenenza (King et al., 2006): le maturasi di *C. acetobutylicum* si sono rivelate, infatti, un eccellente apparato di attivazione per diverse [FeFe]-idrogenasi espresse in contesti non nativi. L'universalità del meccanismo di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi è stata in seguito confermata da analisi genomiche circoscritte ai microrganismi dotati dell'enzima. Queste hanno rivelato un alto grado di conservazione tra le sequenze omologhe ai geni *hydEF* ed *hydG*, particolarmente in corrispondenza dei putativi domini funzionali (indicati in figura 8). Inoltre, i domini HydE ed HydF della proteina HydEF di *C. reinhardtii* risultano ripartiti fra due geni distinti nel genoma dei procarioti, denominati *hydE* ed *hydF*.



**Figura 8. Rappresentazione schematica, rispettivamente, della sequenza amminoacidica di HydEF ed HydG di *C. reinhardtii*.** I motivi Radical-SAM e i motivi leganti centri FeS sono rappresentati in maggiore dettaglio. Le aree azzurre corrispondono a peptidi di traslocazione, inserzioni e peptidi di collegamento: non sono state identificate nelle sequenze omologhe isolate negli organismi procarioti (fonte: Posewitz et al., 2007).

Le proteine HydG ed HydE sono state caratterizzate biochimicamente e, nel caso di HydE, anche strutturalmente, in organismi procarioti. Tali maturasi condividono il motivo conservato  $CX_3CX_2C$ , che le assegna funzionalmente alla superfamiglia delle proteine Radical SAM. Questo insieme di proteine catalizza una composta serie di reazioni, fra cui l'inserimento di atomi di zolfo nelle molecole organiche, la sintesi di ligandi organici e di complessi cofattori metallici. Generalmente, le reazioni radical-SAM prevedono l'accoppiamento fra la riduzione del centro  $[4Fe_4S]$ , coordinato al dominio  $CX_3CX_2C$ , e la generazione del 5'-deossiadenosil-radical, una specie altamente reattiva. In particolare, è stata recentemente caratterizzata la catalisi della proteina HydG: questa sfrutta la suddetta chimica nel meccanismo di cianogenesi ( $HCN^-$ ,  $CN^-$ ), che impiega l'amminoacido ubiquitario tirosina come substrato (Driesener et al., 2010). Dati recenti implicano quest'ultima reazione nella sintesi del ligando CO (Peters and Broderick, 2011), confermando il ruolo di HydG nella biosintesi dei ligandi CO e  $CN^-$  del centro bimetallico del *cluster H*. HydG esibisce inoltre un secondo motivo accessorio ( $CX_2CX_{22}C$ ), strettamente conservato nella regione C-terminale: le



cisteine conservate sono deputate alla coordinazione di un secondo centro FeS non ancora caratterizzato (Pilet et al., 2009). Esperimenti di mutagenesi hanno dimostrato l'essenzialità del motivo nella formazione del ligando CO, suggerendo che il centro FeS ad esso legato possa essere coinvolto nell'ancoraggio dei ligandi CO e CN<sup>-</sup>, prima che questi vengano ceduti alla proteina HydF. Altrettanto necessario all'attivazione della [FeFe]-idrogenasi è il motivo radical-SAM CX<sub>3</sub>CX<sub>2</sub>C, isolato nella proteina HydE e coinvolto nel legame di un centro [4Fe4S]; al contrario, il motivo accessorio CX<sub>2</sub>CX<sub>7</sub>C legante un secondo centro [4Fe4S] risulta meno conservato e non determinante nell'assemblaggio del *cluster H*. A tal proposito, la biosintesi dei ligandi CN<sup>-</sup> e CO mediata da HydG implicherebbe HydE nella formazione del ligando ditiolamminico del centro bimetallico del *cluster H*. Si ipotizza che la sintesi di tale ligando coinvolga una reazione radical-SAM, forse eseguita da HydE in corrispondenza di un centro FeS della proteina HydF (Shepard et al., 2010).

Come accennato in precedenza, l'attività delle proteine HydE ed HydG appare strettamente associata alla proteina HydF, il terzo componente dell'apparato di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi. L'annotazione genomica della proteina HydF ne individua l'attività GTPasica, indicata dal motivo C-terminale GX<sub>4</sub>GKS, e rivela la presenza di un dominio conservato N-terminale CXHX<sub>46-53</sub>HCGGC, le cui cisteine sono coinvolte nella coordinazione di un centro [4Fe4S] (Shepard et al., 2010).

Il percorso biochimico che coinvolge le maturasi HydE, HydF ed HydG nell'attivazione delle [FeFe]-idrogenasi non è ancora stato descritto univocamente; ciò nonostante, negli ultimi cinque anni, la complementarietà delle analisi condotte ha permesso di definire con crescente chiarezza il ruolo di ciascuna proteina. Parallelamente ai dati di caratterizzazione biochimica e strutturale delle tre maturasi, gli esperimenti di co-espressione eterologa in *E. coli* coniugati a saggi di attività *in vitro* stanno ricostruendo la sequenza temporale degli eventi in cui si articola l'assemblaggio del *cluster H*. La natura non catalitica di tale processo venne inferita, nel 2007, dagli esperimenti di McGlynn e collaboratori.

Gli estratti ottenuti da ceppi di *E. coli* esprimenti HydE, HydF ed HydG risultavano sufficienti ad attivare *in vitro* una [FeFe]-idrogenasi purificata separatamente; tuttavia, gli stessi estratti, filtrati o pretrattati ad una temperatura denaturante, si rivelarono inattivi. Pertanto, si concluse che l'attivazione *in vitro* della [FeFe]-idrogenasi non fosse mediata da piccole molecole - resistenti alla denaturazione delle maturasi e separate da queste ultime tramite frazionamento - in grado di associarsi spontaneamente all'enzima, bensì si ritenne necessaria un'azione diretta di ciascuna maturasi, capace di compiersi attraverso una reazione veloce (McGlynn et al., 2007). Successivamente si profilò il ruolo di *scaffold* di HydF, dal momento che la proteina risultò sufficiente all'attivazione *in vitro* della [FeFe]-idrogenasi, purchè la prima venisse purificata a partire da un ceppo di *E. coli* coesprimente HydE ed HydG (McGlynn et al., 2008). Venne quindi avanzata l'ipotesi secondo cui HydF attiverrebbe la [FeFe]-idrogenasi trasferendo all'enzima un precursore del *cluster H*, la cui natura è stata descritta solamente nel 2010.

La caratterizzazione strutturale della [FeFe]-idrogenasi di *C. reinhardtii* espressa in un *background* genetico privo delle rispettive proteine di maturazione (HydA<sup>ΔEFG</sup>), ha rivelato la presenza del centro [4Fe4S] in corrispondenza del sito attivo (Mulder et al, 2010). Inoltre, sottraendo il centro [4Fe4S] ad HydA<sup>ΔEFG</sup>, la proteina viene convertita in un apoenzima incapace di essere attivato *in vitro* dalle maturasi (Mulder et al. 2009). Ciò suggerisce che HydF possa ospitare e cedere il centro [2Fe2S] all'idrogenasi, completando l'assemblaggio del *cluster H*, probabilmente avviato da un sistema aspecifico in grado di formare il centro [4Fe4S] a livello di HydA in un evento precedente l'attivazione mediata da HydF (Mulder D.W. 2009). Analisi FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) ed EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) condotte su HydF hanno confermato la presenza di un centro [2Fe2S] nella proteina HydF<sup>EG</sup>, distinto per proprietà simili a quelle esibite dal centro bimetallico delle [FeFe]-idrogenasi (Shepard et al., 2010).

Il modello più recente di attivazione delle [FeFe]-idrogenasi è stato proposto da Peters e collaboratori nel 2011. Il modello (rappresentato schematicamente in

figura 9) riassume e integra i dati raccolti nell'ultimo decennio, sebbene sia ancora soggetto ad approfondimenti e variazioni.



**Figura 9. Schema di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi.** I modelli *ball and stick* rappresentano gli intermedi nella biosintesi del *cluster H*. Si ritiene che il precursore del centro [2Fe2S] risieda su HydF. La proteina Radical SAM HydE potrebbe catalizzare inizialmente la sintesi del ligando ditiometilamminico a livello del precursore, a cui seguirebbe la sintesi dei ligandi CO e CN<sup>-</sup> mediata da HydG. Questo evento promuoverebbe il trasporto e l'inserimento del centro [2Fe2S] su HydA, la [FeFe]-idrogenasi (immagine tratta da Peters and Broderick, 2011).

Il modello sottointende che le maturasi HydE, HydF ed HydG siano coinvolte nel processamento e trasferimento del centro [2Fe2S] al *cluster H* della [FeFe]-idrogenasi, mediandone l'attivazione. Secondo questa formulazione, HydE potrebbe catalizzare la sintesi del ligando ditiolamminico in corrispondenza del precursore del centro [2Fe2S], che si ipotizza essere localizzato su HydF. L'evento produrrebbe un cambiamento conformazionale nella proteina HydF, esponendo il precursore ai ligandi CO e CN<sup>-</sup> sintetizzati da HydG. Una volta avvenuta la coordinazione dei ligandi agli atomi di ferro, il precursore risulterebbe convertito nella forma funzionale e quindi trasferito da HydF alla tasca occupata dal centro [4Fe4S] nella [FeFe]-idrogenasi: in questo modo verrebbe generato il *cluster H* a livello dell'enzima, così attivato.

Il modello suppone che HydF interpreti un duplice ruolo, agendo da “traghettatore” per il centro bimetallico, e come struttura *scaffold* su cui le maturasi processano il precursore del *cluster H*. L'evidente centralità della

proteina la rende attualmente oggetto di molteplici indagini volte a rivelare lo *step* terminale e determinante nell'attivazione delle [FeFe]-idrogenasi.

### 1.5 La maturasi HydF

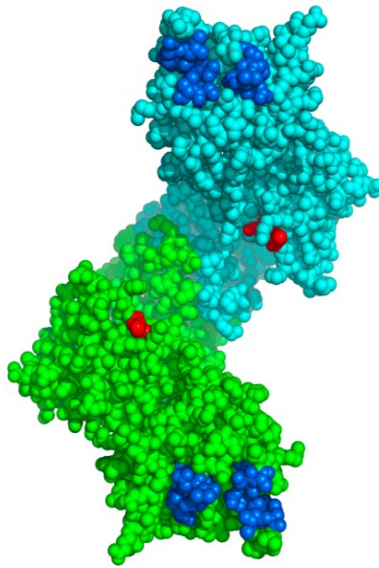
Come accennato nel paragrafo precedente, la caratterizzazione biochimica della maturasi HydF di *Thermotoga maritima* (Brazzolotto et al., 2006) ne ha rivelato l'attività GTPasica e la capacità di legare un centro [4Fe4S]. Successivamente, l'allineamento delle sequenze omologhe codificanti HydF ha permesso di identificare cinque sequenze conservate (King et al., 2006). Precisamente, in corrispondenza dell'estremità N-terminale, sono stati individuati tre motivi che caratterizzano il dominio GTPasico: la sequenza *P-loop* (Walker A), la sequenza legante Mg<sup>2+</sup> (Walker B) e la sequenza distale per il legame specifico al GTP. In corrispondenza della sequenza C-terminale è stata invece isolata la sequenza consenso per il legame al centro FeS. La conservazione amminoacidica dei domini principali definisce pertanto l'essenzialità e l'universalità di queste funzioni nel meccanismo di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi. Sebbene esperimenti di mutagenesi rivelino il ruolo essenziale dell'attività GTPasica nel meccanismo di maturazione (mutazioni nel Walker A *P-loop* prevengono l'attivazione dell'idrogenasi *in vitro* – King et al., 2006), questa non sembra essere coinvolta nel trasferimento del centro [2Fe2S] (McGlynn et al., 2008). Alla luce dei risultati sperimentali riportati in questa tesi, è interessante notare che è stato ipotizzato che l'attività GTPasica potrebbe invece essere richiesta negli *steps* che precedono il trasferimento del sito bimetallico alla [FeFe]-idrogenasi, ad esempio nelle interazioni con le altre maturasi. A tal proposito, la presenza di HydE ed HydG incrementa del 50% il tasso di attività GTPasica di HydF, che invece non risulta influenzata dalla presenza di HydA: questo risultato suggerisce che il legame/idrolisi del GTP sia associato alle interazioni tra HydF e le altre proteine di assemblaggio, piuttosto che alle interazioni con la proteina HydA. L'attività GTPasica potrebbe essere coinvolta nelle reazioni interproteiche destinate a formare il centro su HydF, forse innescando modificazioni strutturali nell'enzima che alterano le interazioni con le

altre proteine accessorie, o perturbando l'ambiente in cui il precursore del *cluster H* viene assemblato (Shepard et al., 2010). Tuttavia, manca ad oggi un'analisi approfondita di tali interazioni.

Comparazioni di spettri EPR ed FTIR per le proteine HydF<sup>EG</sup> ed HydF<sup>ΔEG</sup> hanno inoltre dimostrato che le caratteristiche dei segnali per il centro FeS variano a seconda del *background* genetico di espressione: in particolare, un centro [2Fe2S] diventa silente nello spettro EPR per la proteina HydF<sup>EG</sup>; inoltre, HydF<sup>EG</sup> presenta ligandi CO e CN<sup>-</sup>, i cui segnali sono assenti nello spettro FTIR della proteina HydF<sup>ΔEG</sup> (Shepard et al., 2010). Questo dimostra che HydE ed HydG sono necessarie per convertire il centro [2Fe2S] di HydF nel precursore del *cluster H*, probabilmente aggiungendo i ligandi CO e CN<sup>-</sup>. Inoltre, poiché la presenza di GTP modifica il segnale EPR dei centri FeS (Shepard et al., 2010), si ritiene che i rispettivi domini di legame dei cofattori interagiscano durante l'attività di HydF.

La prima struttura cristallina di HydF, fattore chiave nella maturazione delle [FeFe]-idrogenasi, è stata recentemente determinata ad una risoluzione pari a 3 Å (Cendron et al., manoscritto in corso di revisione). Le informazioni strutturali aggiungono nuovi dettagli alla descrizione del suo ruolo di *ferrier* del centro [2Fe2S], e offrono molti spunti per l'analisi delle interazioni che questa proteina stabilisce con le altre maturasi e con la [FeFe]-idrogenasi HydA.

È stata ottenuta la struttura cristallina di HydF di *Thermotoga neapolitana* in forma tetrameric, una conformazione quaternaria che si ritiene generata dalla dimerizzazione di due dimeri, ciascuno prodotto dalla dimerizzazione di due monomeri (figura 10). L'unità biologica della proteina è rappresentata dal dimero o dal tetramero, forme altresì individuabili tramite purificazione per esclusione dimensionale.



**Figura 10. Rappresentazione della forma dimerica di *TnHydF*.** Ciascun monomero è definito da un colore diverso (azzurro e verde). I residui cisteinici che definiscono il motivo di legame al centro FeS sono rappresentati in rosso; i residui probabilmente coinvolti nel legame al GTP sono invece colorati in blu.

Il monomero occupa invece l'unità asimmetrica della cella cristallina, definendo l'unità polipeptidica, composta da tre domini principali. Il dominio I corrisponde al dominio di legame/idrolisi del GTP, che si ripiega in una struttura comune fra le GTPasi. I motivi conservati mappano all'interno di questa sequenza, in cui lo *stretch* di amminoacidi responsabile del legame al GTP forma un *loop* flessibile all'interno della struttura, priva del guanosil-nucleotide. Il dominio II è responsabile della dimerizzazione della proteina, la cui stabilità è dovuta ad un'estesa superficie di interazione, che si articola in un continuo  *$\beta$ -sheet* condiviso dai due monomeri. Il dominio III ospita i tre residui altamente conservati (Cys302, Cys353 e Cys356) che definiscono il motivo di legame per il centro FeS, motivo che si estende comprendendo i residui His352 ed His304. Il motivo si ripiega in due *loops* che esibiscono la flessibilità richiesta per il legame e il trasferimento del centro FeS ad HydA. Tuttavia, gli stessi residui sono coinvolti nella stabilizzazione della struttura tetramerica, come dimostra la drastica riduzione del

processo di oligomerizzazione in esperimenti di mutagenesi diretta ai suddetti residui. La forma tetramerică è infatti stabilizzata da un ponte disulfuro che si stabilisce fra coppie di Cys302, appartenente ciascuna ad una coppia di dimeri; questo legame non risulta tuttavia sufficiente per la tetramerizzazione, che probabilmente implica una modalità di associazione più complessa. Il coinvolgimento dei residui cisteinici nel processo di tetramerizzazione è compatibile con l'assenza del centro FeS nella struttura cristallina, i cui siti di coordinazione risultano impegnati nell'organizzazione tetramerică. Questa osservazione sostiene il modello secondo cui il tetramero è la forma inattiva dell'enzima, ipotesi rafforzata dall'assenza del GTP in corrispondenza del dominio di legame nella medesima conformazione. Il tetramero di HydF è una struttura estremamente compatta, radicalmente diversa dalla forma dimerica, che espone al solvente sia i domini di legame al precursore del centro [2Fe2S] sia il dominio di legame/idrolisi del GTP (figura 10). Questi domini risultano pertanto accessibili ai *partners* di maturazione, probabilmente coinvolti nel legame del GTP (v. paragrafo 1.5). Pertanto, se il legame del GTP coordina le interazioni di HydF con le altre maturasi, la perdita del GTP che segue l'associazione con HydE/G potrebbe facilitare alcuni riarrangiamenti strutturali che promuovono sia le interazioni con HydA che il trasferimento del centro [2Fe2S]. A tal proposito, la struttura di HydA<sup>AEFG</sup>, anch'essa determinata da indagini di cristallografia a raggi X, ha rivelato la presenza di un'interfaccia di legame che probabilmente interagisce con HydF durante il trasferimento del centro [2Fe2S].

Il modello avanzato da Cendron e collaboratori per il processo di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi prevede che la forma dimerica di HydF interagisca con HydG/E legando il GTP. In seguito all'interazione con le maturasi, il GTP viene idrolizzato e si dissocia dall'enzima, innescando cambiamenti conformazionali e promuovendo l'interazione con HydA. Il labile centro [2Fe2S] sarebbe pertanto ceduto a due molecole di HydA - una per ciascun monomero -, in un meccanismo che sfrutta le caratteristiche biochimiche dei residui glicinici. L'assenza del centro [2Fe2S] potrebbe quindi promuovere la dimerizzazione dei dimeri con la conseguente formazione dei ponti disulfuro osservati nella struttura cristallina,

responsabili dell'inattivazione di HydF per tetramerizzazione.

Lo studio del processo di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi solleva ancora molte domande, alcune delle quali cercano di definire la natura del complesso FeS ospitato da HydF. Una di queste focalizza l'attenzione sulle associazioni che HydF stabilisce con le altre maturasi, dalle quali dipendono le caratteristiche del precursore chiave del *cluster H*. Pertanto, sebbene la ricostruzione del processo di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi si stia progressivamente arricchendo attraverso numerosi dati emergenti, la caratterizzazione strutturale e biochimica delle maturasi non riesce a spiegare nella sua completezza e complessità il meccanismo di attivazione delle [FeFe]-idrogenasi, la cui conoscenza, per ora incompleta, richiede anche l'analisi delle interazioni tra le proteine implicate, sostenuta dalla natura dinamica del processo.



## SCOPO DELLA TESI

Un evento cruciale nel meccanismo di attivazione delle [FeFe]-idrogenasi, enzimi alla base della bioproduzione di idrogeno gassoso, è l'assemblaggio del loro complesso e insolito sito attivo, definito *cluster H*, che si articola in un centro [4Fe4S], che viene sintetizzato da parte di un sistema molecolare aspecifico, unito ad un centro [2Fe2S], la cui sintesi e il cui trasferimento richiede le funzioni concertate di tre distinte maturasi: HydE, HydG ed HydF. I dati emergenti hanno individuato nella proteina HydF il fattore chiave per l'attivazione delle [FeFe]-idrogenasi, a causa del duplice ruolo che essa esplica. Infatti, HydF funge da *scaffold*, sul quale HydE ed HydG modificano il centro [2Fe2S] aggiungendo alcuni ligandi non proteici. HydF funge quindi da *ferrier*, trasferendo il centro bimetallico opportunamente modificato alla apo-[FeFe]-idrogenasi. La duplice azione di HydF la rende soggetto di una serie di interazioni proteina-proteina che - sebbene suggerite da diversi dati riportati in letteratura, fra cui quelli relativi alla recente caratterizzazione strutturale di HydF- non sono ancora state descritte attraverso un'analisi biochimica. La comprensione delle modalità con cui queste interazioni si sviluppano nello spazio e nel tempo che definiscono l'evoluzione del processo sono di fondamentale importanza al fine di ottenere un modello opportuno all'applicazione biotecnologica di [FeFe]-idrogenasi funzionalmente attive.

Pertanto, la prima parte di questo lavoro si propone di indagare le interazioni proteina-proteina fra HydF, HydE ed HydG, che coinvolgono HydF in quanto fattore *scaffold* per l'assemblaggio e il processamento del centro bimetallico; la seconda parte è stata invece dedicata ad analizzare l'interazione determinante tra HydF ed HydA, che sottointende l'azione di *ferrier* della proteina HydF.

## RISULTATI E DISCUSSIONE (I)

Come accennato nella sezione introduttiva, numerose evidenze indirette suggeriscono l'interdipendenza funzionale delle tre maturasi coinvolte nel *folding* delle [FeFe]-idrogenasi e nell'assemblaggio del loro sito attivo; tuttavia, le interazioni fra queste ultime non sono state verificate attraverso saggi biochimici, né la recente caratterizzazione strutturale di HydF è in grado di spiegare le fondamentali relazioni che si stabiliscono fra questa, HydE ed HydG durante l'assemblaggio del centro [2Fe2S], di cui HydF ospita il precursore. Pertanto, la prima parte del lavoro presentato intende verificare e analizzare le interazioni delle maturasi HydG ed HydE con la maturasi *scaffold* HydF.

### 1.1 Espressione in *E. coli* e co-precipitazione delle proteine ricombinanti HydF/Strep, HydG/His e HydE/His di *Clostridium acetobutylicum*

Gli esperimenti condotti da King e collaboratori nel 2006 hanno dimostrato l'efficienza del sistema di maturazione di *C. acetobutylicum*. Il sistema, espresso in *E. coli*, è molto stabile e le maturasi HydE, HydF ed HydG che lo compongono non sono risultate passibili di riarrangiamenti, dimostrando di conservare la propria integrità funzionale e catalitica (King et al., 2006). Pertanto, allo scopo di descrivere le interazioni che si stabiliscono fra le maturasi e ridurre la probabilità di ottenere artefatti, abbiamo scelto il suddetto sistema di co-espressione eterologa: questo permette di purificare le proteine in quantità opportune per i successivi saggi immunologici, e rappresenta un contesto che, preservando le funzioni degli enzimi, potrebbe risultare indirettamente capace di favorirne le corrette interazioni.

Le sequenze codificanti per le tre maturasi sono state clonate in tre distinti vettori di espressione:

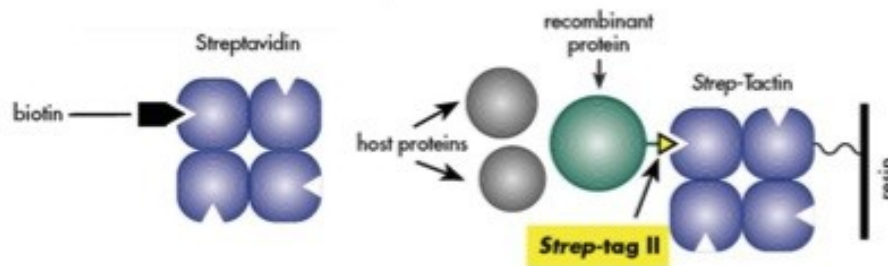
| <b>Plasmide</b>                           | <b>Proteina Espressa</b>  |
|---|---------------------------|
| pACYC-Duet 1, cloramfenicolo <sup>R</sup> | HydE <sub>Ca</sub> /His   |
| pCDF-Duet 1, streptomycin <sup>R</sup>    | HydF <sub>Ca</sub> /Strep |
| pRSF-Duet 1, kanamicina <sup>R</sup>      | HydG <sub>Ca</sub> /His   |

Il sistema pDuet permette l'impiego simultaneo di diversi plasmidi, consentendo la co-espressione di diverse proteine ricombinanti, offrendo inoltre la possibilità di clonare, direzionalmente, le sequenze dei geni *target in frame* alle sequenze codificanti epitopi utili nei successivi saggi cromatografici e immunologici, in modo da evitare che interferiscano con il corretto *folding* proteico. Nell'esperimento riportato, la sequenza *hydE<sub>Ca</sub>* è stata clonata in fusione alla sequenza *his-tag*, già presente nel vettore, al 5'; la sequenza *hydF<sub>Ca</sub>* risulta fusa, anche in questo caso al 5', alla sequenza *strep-tag II*, che era stata aggiunta mediante PCR precedentemente al lavoro presentato; la sequenza *hydG<sub>Ca</sub>* risulta infine fusa al 5' alla sequenza *his-tag*. Nel sistema pDuet l'espressione della sequenza ricombinante è regolata da un forte promotore del batteriofago T7, che viene attivato dalla T7 RNA polimerasi: questo sistema assicura la sintesi delle proteine in largo eccesso. Il gene codificante la T7 RNA polimerasi è integrato nel genoma del ceppo BL21(DE3) di *E. coli*, utilizzato per la trasformazione chimica, ed è posto sotto il controllo del promotore inducibile lacUV5, attivabile dalla dissociazione del repressore lacI che lo rende inaccessibile. L'aggiunta dell'induttore isopropil-tio-β-D-galattopiranoside (IPTG) rimuove il repressore lacI dal rispettivo sito bersaglio e attiva quindi l'espressione della T7 RNA polimerasi, innescando a cascata la trascrizione del gene che codifica per la proteina ricombinante di interesse. L'impiego dello stesso sistema per ciascuno dei geni *target* rende uniforme il sistema di induzione, semplificando la procedura di co-espressione. Inoltre, come indicato in tabella, ciascuno dei diversi plasmidi ospita un gene che conferisce resistenza ad un antibiotico distinto. Questo consente di selezionare positivamente solo i cloni che sono stati trasformati contemporaneamente con i tre plasmidi, addizionando ai terreni di crescita i tre diversi antibiotici.

Cellule di *E. coli* del ceppo BL21(DE3) sono state co-trasformate, come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*, con i tre plasmidi indicati in tabella. Quindi è stato scelto un clone positivo, selezionato fra quelli cresciuti su terreni solidi LB addizionati con cloramfenicolo, streptomicina e kanamicina alle opportune concentrazioni. La colonia è stata inoculata in un volume di terreno LB liquido pari a 25 ml, caratterizzato dalla medesima selettività di quello solido (LB<sub>CSK</sub>), e la coltura è stata lasciata crescere durante la notte in modo da ottenere una sospensione batterica satura. Il giorno seguente è stata inoculata una frazione della coltura in un volume di terreno liquido LB<sub>CSK</sub> pari a 300 ml, e la crescita della sospensione è stata monitorata attraverso misurazioni allo spettrofotometro. La coltura è stata lasciata crescere sino al raggiungimento di un valore di OD<sub>600</sub> pari a 0.5: sono stati quindi aggiunti Fe-citrato ed L-cisteina, ciascuno alla concentrazione di 2 mM, allo scopo di favorire la formazione dei centri FeS, presenti nelle tre maturasi. Quindi, è stato prelevato 1 ml di coltura che, previo trattamento descritto in dettaglio nella sezione *Materiali e Metodi*, ha costituito il “campione non indotto” da sottoporre successivamente a SDS-PAGE. Dopo una breve incubazione a 37°C per 15 minuti, è stato aggiunto IPTG alla concentrazione di 1 mM per indurre l’espressione delle proteine ricombinanti. Questo momento, infatti, è il più opportuno per ottenere un’elevata quantità di proteina in quanto, poiché l’andamento della crescita cellulare ricalca l’andamento dell’espressione, quando il valore di OD<sub>600</sub> è pari a 0.5 il numero di cellule indotte ad esprimerla crescerà esponenzialmente. La coltura indotta è stata lasciata crescere per tutta la notte ad una temperatura di 30°C e il giorno successivo è stato prelevato 1 ml che, previo opportuno trattamento, ha costituito il “campione indotto” per l’analisi SDS-PAGE. La coltura indotta è stata quindi centrifugata, il pellet batterico risospeso nel tampone di lisi e la sospensione sottoposta a frammentazione meccanica, come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. Una volta separata la frazione solubile - che si suppone contenere le proteine correttamente ripiegate, - dalla frazione insolubile - contenente i detriti cellulari - è stata allestita una co-precipitazione, mediante il sistema cromatografico Strep-Tactin/Strep-Tag II.

Il principio che regola la co-precipitazione prevede che le proteine ricombinanti prive di epitopi oppure dotate di epitopi incapaci di interagire con la resina utilizzata in una cromatografia d'affinità, possano co-eluire con la proteina immobilizzata alla matrice solo nel caso in cui, se co-espresse, le prime interagiscano con quest'ultima. Attraverso questa tecnica non è possibile dedurre il tipo di legame che si stabilisce fra le proteine; tuttavia, la condizione necessaria per la co-purificazione prevede che il legame sia sufficientemente stabile affinché il tampone di lavaggio non interrompa l'associazione.

In questo caso è stata allestita una cromatografia per affinità che impiega una resina costituita da una matrice di sefarosio a cui è stata accoppiata una forma ingegnerizzata di streptavidina, nota come Strep-Tactin, in grado di immobilizzare la proteina ricombinante espressa in fusione con l'epitopo Strep-Tag II (si veda *Materiali e Metodi* per il principio alla base di questa cromatografia).



**Figura 11.** Sistema Strep-Tag II/Strep-Tactin, IBA Protein TAGnologies (Göttingen, Germany)

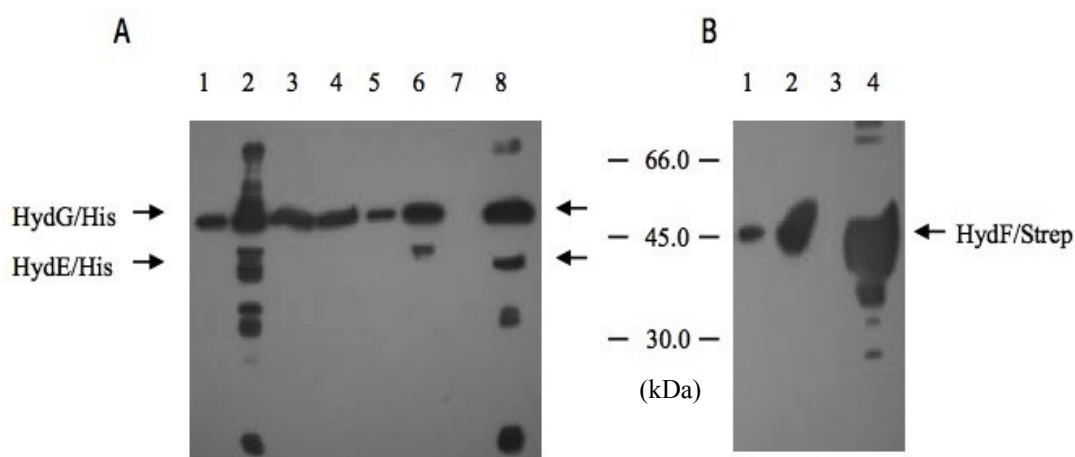
Come illustra la figura 11, la presenza dell'epitopo Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys, espresso in fusione alla proteina HydF, è in grado di mediare una forte interazione fra le molecole di Strep-Tactin e quelle di HydF/Strep, permettendo l'ancoraggio dell'enzima.

Come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*, la frazione solubile del lisato totale è stata incubata con la suddetta resina per 60 minuti in leggera agitazione a 4°C. Successivamente è stato raccolto il *flow through*, ovvero la frazione contenente le proteine che non hanno interagito con la resina o in modo insufficientemente stabile con HydF/Strep. La resina è stata quindi lavata con 5

volumi di tampone di lavaggio, al fine di rimuovere le proteine che hanno interagito con essa in modo aspecifico. Infine, la dissociazione di HydF/Strep è stata realizzata lavando la resina con un tampone di eluizione contenente (desthio)biotina, un competitore per il sito di legame dello Strep-tag II. In questo modo, nella frazione di eluizione verranno raccolte, insieme ad HydF/Strep, le proteine eventualmente a questa associate. Quindi, un volume di tampone di eluizione pari a 3 ml è stato fatto passare attraverso la resina, e il volume filtrato frazionato in unità da 0.5 ml: 25 µl di ognuna di queste, e identici volumi di *flow through* e lavaggio, sono stati impiegati, previo trattamento, come campioni per l'analisi SDS-PAGE. Le frazioni di eluizione sono state raccolte in un unico *pool*, concentrato a 100 µl utilizzando filtri con *cut off* di peso molecolare pari a 10 kDa. Venticinque microlitri di questi sono stati utilizzati per l'analisi in SDS-PAGE, che ha previsto la corsa elettroforetica dei campioni in doppio, in due gel di poliacrilammide 12% in presenza di SDS. Una volta terminata la corsa, le proteine sono state trasferite mediante Western Blot su due distinte membrane di nitrocellulosa, come riportato dettagliatamente nella sezione *Materiali e Metodi*.

Allo scopo di verificare l'interazione fra la proteina HydF/Strep e le proteine HydE/His ed HydG/His, ciascuna delle membrane di nitrocellulosa è stata sottoposta ad un saggio immunologico che ha impiegato, per ognuna, un anticorpo monoclonale differente, capace di riconoscere selettivamente gli epitopi espressi in fusione alle proteine. L'esposizione differenziale delle due membrane era destinata a verificare 1) la presenza delle proteine HydE/His ed HydG/His nelle frazioni di eluizione - come atteso per l'interazione fra le maturasi - utilizzando l'anticorpo primario anti His-tag; 2) la presenza della proteina HydF/Strep in corrispondenza delle frazioni di eluizione - allo scopo di allestire un controllo positivo - utilizzando l'anticorpo primario anti Strep-tag II. Infatti, la presenza della proteina HydF/Strep nelle corsie di eluizione suggerisce l'interazione di HydE/His ed HydG/His con HydF/Strep, pur non escludendo l'eventualità di una loro interazione aspecifica con la matrice.

Come è possibile osservare nel pannello A della figura 12, le bande rilevate nelle corsie 6 e 8, corrispondenti rispettivamente alle *lanes* di caricamento per la frazione eluita e concentrata, sono assegnate alle proteine HydG/His (53.6 kDa) ed HydE/His (40 kDa), confrontandone il posizionamento rispetto ai *markers* di peso molecolare. Mentre HydE/His si stacca dalla colonna solamente durante l'eluizione, HydG/His si dissocia dalla resina anche durante il lavaggio (corsia 5). Queste osservazioni non permettono tuttavia di inferire la natura dell'associazione tra HydG/His, HydE/His ed HydF/Strep, con la quale co-precipitano, come conferma la presenza di HydF/Strep nelle corsie 2 e 4 del pannello B (figura 12).



**Figura 12. Co-purificazione di HydF/Strep con HydG/His e HydE/His.** *Pannello A: Western Blot con anticorpo anti His-tag condotto sulle frazioni della cromatografia Strep-Tactin.* Corsia 1: campione non indotto, 5  $\mu$ l; corsia 2: campione indotto, 5  $\mu$ l; corsia 3: frazione solubile del lisato totale; corsia 4: *flow through*; corsia 5: frazione di lavaggio; corsia 6: frazione eluita 2; corsia 7: vuota; corsia 8: *pool* di frazioni eluite e concentrate. *Pannello B: Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II condotto sulle frazioni della cromatografia Strep-Tactin.* Corsia 1: frazione solubile del lisato totale; corsia 2: frazione eluita 2; corsia 3: vuota; corsia 4: *pool* di frazioni eluite e concentrate. Sono stati caricati 25  $\mu$ l di ciascuna frazione cromatografica.

L'efficienza del sistema di rilevamento immunologico è dedotta dall'assenza, nelle corsie 3-6, di segnali aspecifici. Probabilmente, i segnali aspecifici rilevati in corrispondenza della corsia 8 del pannello A e della corsia 4 del pannello B

potrebbero essere dovuti ad un fenomeno di degradazione durante lo *step* di concentrazione, come suggerisce la differenza tra i profili di concentrazione e quelli di semplice eluizione, in cui risulta assente lo *smear* che caratterizza le corsie 8 (pannello A) e 4 (pannello B). L'efficienza del sistema di purificazione è inoltre dedotta dalla presenza delle proteine ricombinanti nelle corsie ottenute dalla cromatografia di affinità condotta sulla frazione solubile del lisato totale. La solubilità delle proteine è un indicatore abbastanza attendibile della bontà del *folding* proteico, importante prerequisito perchè la simulazione delle interazioni in un sistema eterologo ricalchi in modo verosimile le condizioni del sistema nativo.

Sebbene il risultato ottenuto confermi l'interazione tra HydE, HydF ed HydG, non è possibile concludere che le interazioni siano dirette: infatti, è possibile che le maturasi co-precipitino anche nel caso in cui l'interazione tra HydE (o HydG) ed HydF avvenga in modo ternario, grazie alla mediazione di HydG (o di HydE) allo *scaffold* HydF. A tal proposito, i dati di McGlynn e collaboratori (2008) riportano che solamente il 10% della preparazione di HydF<sup>EG</sup> è in grado di attivare HydA, suggerendo l'esistenza di molteplici intermedi del centro [2Fe2S], corrispondenti a differenti stadi di maturazione del centro FeS su HydF. L'osservazione indica che il meccanismo di maturazione sia un processo *multisteps*, che potrebbe prevedere interazioni sequenziali e binarie tra le proteine di maturazione. Pertanto, al fine di ottenere nuovi dati con cui descrivere il ruolo delle tre maturasi durante il processo di maturazione del centro [2Fe2S] su HydF, sono state allestite co-precipitazioni binarie.

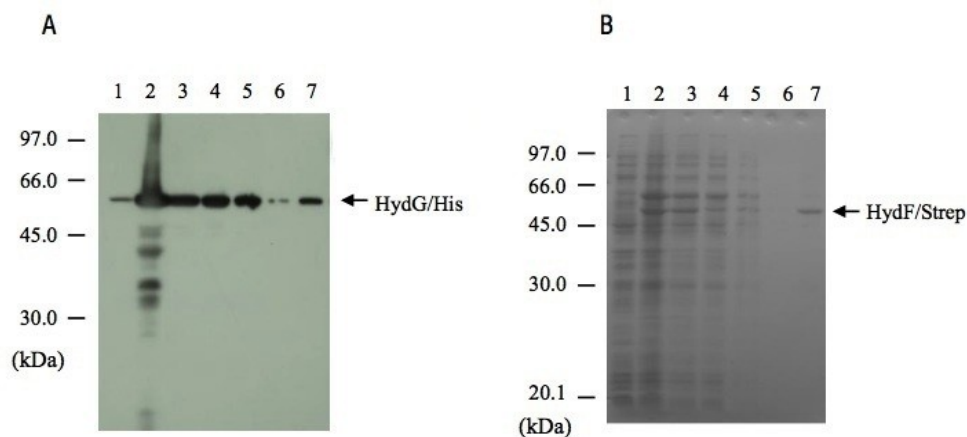
## 1.2 Co-precipitazioni delle proteine ricombinanti HydF/Strep e HydG/His

Come accennato nella sezione introduttiva, sono stati recentemente ottenuti importanti risultati che completano le informazioni in merito al ruolo svolto dalla proteina HydG nel meccanismo di maturazione del centro [2Fe2S]. Nonostante le ipotesi riportate nel paragrafo precedente, il fattore deputato al meccanismo di sintesi del ligando ditiometilamminico a livello del centro [2Fe2S] non è ancora stato definito univocamente, ma è comune considerare questo *step*



un passaggio precedente la catalisi operata da HydG, destinata a sintetizzare i ligandi CO e CN<sup>-</sup> (Driesener et al., 2010). La nota tossicità di questi composti impone un sistema regolato di sintesi e coordinazione dei ligandi agli atomi di ferro, suggerendo l'esistenza di una solida interazione tra le proteine HydF ed HydG.

Pertanto, i seguenti esperimenti sono stati destinati a valutare l'esistenza di un'associazione binaria tra le maturasi HydF ed HydG. Ancora una volta, la frazione solubile del lisato totale di cellule di *E. coli* co-trasformate con i vettori pRSF-*hydG/his* e pCDF-*hydF/strep* è stata incubata con la resina Strep-Tactin per verificare la co-precipitazione delle corrispondenti proteine ricombinanti, seguendo lo stesso protocollo utilizzato negli esperimenti precedenti. I risultati del successivo saggio immunologico vengono riportati nei pannelli della figura 13.



**Figura 13. Co-purificazione mediante cromatografia di affinità Strep-Tactin di HydF/Strep con HydG/His.** Pannello A: Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II. Corsia 1: campione non indotto, 5  $\mu$ l; corsia 2: campione indotto, 5  $\mu$ l; corsia 3: frazione solubile del lisato totale; corsia 4: *flow through*; corsia 5: frazione di lavaggio; corsia 6: frazione eluita 1; corsia 7: *pool* di frazioni eluite e concentrate. Pannello B: la stessa membrana di nitrocellulosa, colorata con rosso Ponceau. Sono stati caricati 25  $\mu$ l di ciascuna frazione cromatografica.

Il pannello A illustra i risultati dell'Immunoblot condotto con l'anticorpo anti His-tag, attraverso cui è possibile confermare la presenza di HydG/His in

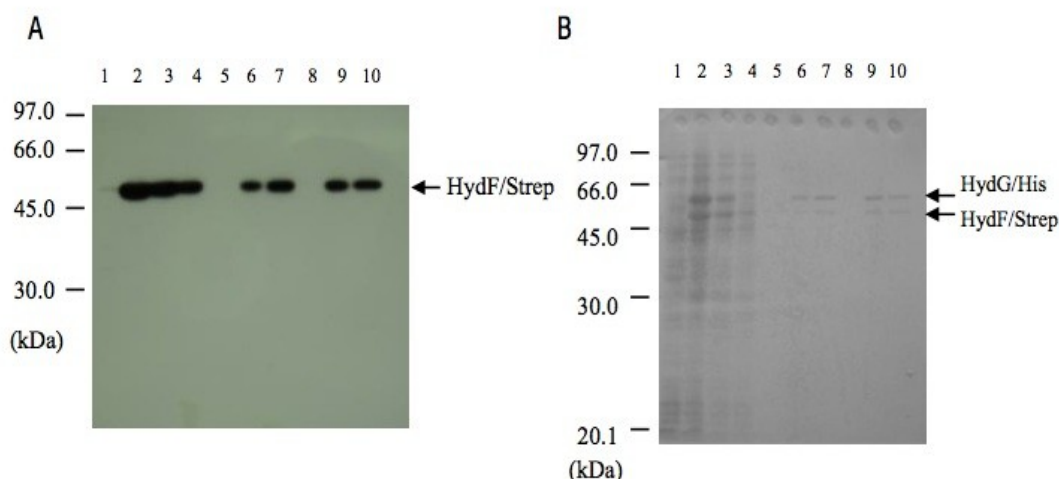
corrispondenza dei campioni ottenuti dalle frazioni eluite (corsie 6-7). Poiché HydF/Strep è stata immobilizzata alla resina, solamente nel caso in cui la proteina interagisca direttamente con HydG/His quest'ultima co-precipiterà durante l'eluizione di HydF/Strep. La presenza del segnale nella corsia 7, ad un livello compreso fra i *markers* di peso molecolare pari a 66 kDa e 45 kDa, conferma la presenza di una proteina di circa 50 kDa, come atteso per HydG/His. Il pannello B nella figura 13 corrisponde all'immagine della membrana di nitrocellulosa, colorata con rosso Ponceau, prima che venisse sottoposta al saggio immunologico. È possibile dedurre l'efficienza del sistema di purificazione dall'assenza di proteine aspecifiche in corrispondenza della corsia 7 della membrana esposta al rosso Ponceau. In tale corsia, corrispondente al *pool* delle frazioni di eluizione unite e concentrate, è possibile apprezzare bandeggi deboli rispetto a quelli delle corsie precedenti, attraverso le quali si può seguire la progressiva purificazione delle frazioni mediante cromatografia per affinità.

Il risultato presentato suggerisce in modo attendibile l'interazione tra le proteine HydG ed HydF, qualificandosi come metodo utile per saggiare l'interazione binaria tra le due maturasi. Inoltre, indica chiaramente che lo *scaffold* HydF interagisce con HydG indipendentemente dalla presenza della terza maturasi.

Al fine di confermare questo dato, è stata condotta una co-precipitazione tramite cromatografia di affinità con ioni metallici (IMAC), impiegando il campione analizzato nel paragrafo precedente e immobilizzando in questo caso la proteina HydG/His. Il sistema IMAC prevede l'impiego di una matrice di gel di agarosio a cui si trovano legati covalentemente gruppi chelanti NTA (acido nitriltriacetico), in grado di immobilizzare ioni metallici, in questo caso nichel Ni<sup>2+</sup>. Il principio di questa tecnica sfrutta la capacità delle catene laterali dell'amminoacido istidina di comportarsi da donatori di elettroni ad opportune condizioni di pH. In particolare, per valori di pH superiori a 7.0, i gruppi imidazolici del *tag* esaistidinico della proteina dotata dell'epitopo His-tag, deprotonandosi, stabiliscono legami di coordinazione con gli ioni Ni<sup>2+</sup>,

permettendo l'ancoraggio della proteina ricombinante alla matrice. È possibile quindi eluire la proteina dalla resina in due modi: 1) mediante l'utilizzo di soluzioni contenenti concentrazioni crescenti di imidazolo, la cui struttura compete per il legame agli ioni  $\text{Ni}^{2+}$  con i gruppi imidazolici deprotonati dell'epitopo esaistidinico; 2) mediante l'utilizzo di tamponi di eluizione con valori di pH decrescenti, in corrispondenza dei quali i gruppi imidazolici della coda istidinica della proteina si protonano, rompendo il legame con gli ioni  $\text{Ni}^{2+}$ .

La co-precipitazione è stata allestita utilizzando una parte della frazione solubile del lisato totale ottenuto nell'esperimento precedente. La soluzione è stata incubata con 100  $\mu\text{l}$  di resina NiNTA, e la sospensione posta in leggera agitazione a 4°C per un'ora al fine di far interagire HydG/His con la resina. Quindi la sospensione è stata trasferita in una colonnina cromatografica, e il *flow through* raccolto per semplice filtrazione e conservato per la successiva analisi in SDS-PAGE. La resina è stata inizialmente lavata con 10 volumi di tampone di lavaggio, al fine di dissociare le proteine contaminanti che hanno interagito con la resina. Quindi, sono stati fatti passare attraverso la resina 5 volumi di tampone di lavaggio addizionato con imidazolo 20 mM. L'eluizione è stata eseguita con 5 volumi di tampone di eluizione, contenente una concentrazione di imidazolo pari a 200 mM. L'eluato è stato raccolto in frazioni di 0.5 ml e un'aliquota da 25  $\mu\text{l}$  di ognuno è stata trattata per la corsa elettroforetica. Come negli esperimenti precedenti, i campioni sono stati sottoposti ad un'analisi SDS-PAGE, a cui è seguito un saggio immunologico. La membrana di nitrocellulosa è stata esposta ad una soluzione contenente l'anticorpo primario anti Strep-tag II al fine di verificare la presenza di HydF/Strep insieme a HydG/His nelle corsie di eluizione, come atteso per un evento di co-precipitazione. La figura 14 riporta nel pannello A il risultato del saggio immunologico condotto con l'anticorpo anti Strep-tag II.



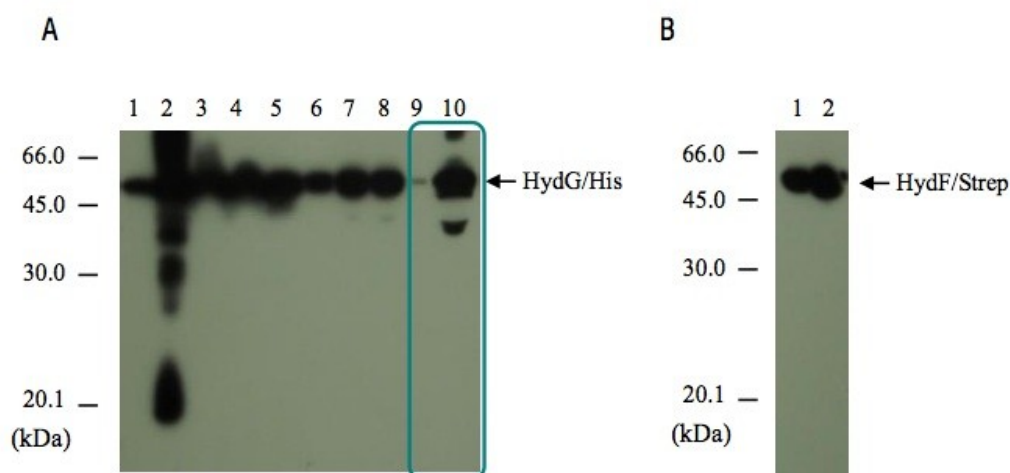
**Figura 14. Co-purificazione mediante cromatografia di affinità NiNTA di HydG/His con HydF/Strep.** *Pannello A: Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II.* Corsia 1: campione non indotto, 5  $\mu$ l; corsia 2: campione indotto, 5  $\mu$ l; corsia 3: frazione solubile del lisato totale; corsia 4: *flow through*; corsia 5: frazione di lavaggio; corsia 6: prima frazione di lavaggio con 20 mM imidazolo; corsia 7: frazione finale di lavaggio 20 mM imidazolo; corsia 8: vuota; corsia 9: frazione di eluizione 1; corsia 10: ultima frazione di eluizione. *Pannello B:* la stessa membrana di nitrocellulosa, colorata con rosso Ponceau. Sono stati caricati 25  $\mu$ l di ciascuna frazione cromatografica.

Nelle corsie 9 e 10 sono stati caricati i campioni relativi alle frazioni di eluizione, in cui è possibile apprezzare il segnale emesso dall'anticorpo all'altezza corrispondente ad un peso di circa 45 kDa, coerentemente con quanto atteso per la proteina HydF. Il segnale di HydF/Strep in corrispondenza del secondo lavaggio suggerisce che la concentrazione di imidazolo pari a 20 mM è sufficiente a rilasciare la proteina HydG/His. Infatti, non si osserva alcun segnale in corrispondenza della frazione del primo lavaggio (corsia 5), suggerendo che il primo lavaggio non è sufficiente ad interrompere la solida interazione fra HydF/Strep ed HydG/His, quest'ultima specificamente ancorata alla matrice. Il pannello B della figura 14 riporta l'immagine relativa alla membrana colorata con il rosso Ponceau. Anche in questo caso, l'efficienza del sistema cromatografico è alta, data l'assenza di bandeggi aspecifici in corrispondenza delle corsie 6-10.

I risultati ottenuti suggeriscono la solidità dell'interazione tra le proteine HydF ed HydG, che appaiono co-eluire in modo altamente specifico. Infatti,

l'analisi della membrana di nitrocellulosa colorata con rosso Ponceau rivela che le corsie corrispondenti alle eluizioni sono estremamente pulite, suggerendo interazioni molto specifiche fra queste due proteine. Per confermare la solidità dell'interazione tra HydF/Strep ed HydG/His e per valutare la possibilità di purificare in un secondo momento il complesso per sottoporlo a cristallizzazione ed analisi strutturali, è stata allestita una doppia purificazione che ha previsto due diverse cromatografie per affinità sequenziali.

La co-espressione eterologa di HydF/Strep e HydG/His, e la relativa co-induzione, sono state condotte come descritto nei paragrafi precedenti, a partire da un volume maggiore (pari a 400 ml) di coltura. Una volta ottenuta la frazione solubile del lisato totale, questa è stata incubata con 400 µl di resina Strep-Tactin in lieve agitazione, per un'ora a 4°C. Il complesso è stato quindi purificato facendo passare attraverso la resina 4 ml di tampone di eluizione. Il volume eluito è stato frazionato in campioni da 0.5 ml, ognuno dei quali è stato impiegato per allestire i campioni da analizzare tramite SDS-PAGE. Successivamente, le diverse frazioni eluite sono state raccolte in un unico *pool* e incubate con 400 µl di resina NiNTA. I successivi passaggi cromatografici hanno previsto l'impiego di 10 volumi di tampone di lavaggio e di 5 volumi di tampone di eluizione, contenente 200 mM di imidazolo. Le frazioni in cui è stato suddiviso il volume di eluizione sono state in parte trattate per l'analisi in SDS-PAGE, e in parte concentrate con filtri di opportuno *cut off*. I campioni sono stati sottoposti a saggio immunologico con anticorpo anti His-tag per analizzare le frazioni ottenute dalla prima cromatografia, al fine di verificare l'associazione di HydG/His (rivelata) ad HydF/Strep (trattenuta) nelle corsie di eluizione. I campioni ottenuti dal secondo passaggio cromatografico sono stati invece trattati con l'anticorpo anti Strep-tag II, al fine di verificare se l'eventuale associazione stabilitasi precedentemente è sufficientemente solida da garantire la purificazione di un complesso trattenuto dalla resina NiNTA in un secondo passaggio cromatografico. La figura 15 riporta i risultati di questa doppia purificazione.



**Figura 15. Doppia purificazione del complesso HydF:HydG mediante cromatografie di affinità Strep-Tactin e NiNTA. Western Blot con anticorpo anti His-tag.** Pannello A: saggio immunologico con anticorpo anti His-tag. Le corsie 1-8 sono relative ai campioni ottenuti dalla prima cromatografia; le corsie 9 e 10 sono relative ai campioni ottenuti dalla seconda cromatografia (racchiusi nella cornice azzurra). Corsia 1: campione non indotto, 5  $\mu$ l; corsia 2: campione indotto, 5  $\mu$ l; corsia 3: frazione solubile del lisato totale; corsia 4: *flow through* della prima cromatografia; corsia 5: frazione iniziale di lavaggio; corsia 6: frazione finale di lavaggio; corsia 7: frazione 1 di eluizione; corsia 8: frazione 2 di eluizione; corsia 9: *flow through* della seconda cromatografia; corsia 10: *pool* di frazioni eluite e concentrate. Pannello B: saggio immunologico con anticorpo anti Strep-tag II. Corsia 1: frazione eluita dalla prima cromatografia; corsia 2: *pool* di frazioni eluite nella seconda cromatografia e concentrate. Sono stati caricati 25  $\mu$ l di ciascuna frazione cromatografica.

In particolare, le corsie 7 ed 8 del pannello A sono state caricate con i campioni ottenuti dalla eluizione relativa alla prima cromatografia, in cui ci aspettavamo di rivelare HydG/His con l'anticorpo anti His-tag, a causa dell'interazione con HydF/Strep (sistema Strep-Tactin). L'esito positivo è confermato dalla co-presenza di HydF/Strep nello stesso campione (rivelazione con anti Strep-tag II, corsia 1, pannello B) e dal livello in corrispondenza del quale si posiziona il segnale emesso da HydG/His (fra il *marker* pari a 66 kDa e il *marker* pari a 45 kDa). La forte interazione che coniuga stabilmente le proteine è confermata dalla co-presenza di HydG/His ed HydF/Strep in corrispondenza del campione caricato nelle corsie 10, pannello A, e 2, pannello B. Tale campione corrisponde alla frazione concentrata, derivata sottoponendo ad una seconda purificazione (sistema NiNTA) il *pool* di eluiti ottenuti dal primo passaggio cromatografico.

I dati ottenuti hanno evidenziato la possibilità di ottenere un complesso

HydF:HydG con un buon grado di purezza, poiché l'interazione fra le due proteine è sufficientemente robusta da sostenere un doppio passaggio cromatografico. L'analisi del complesso tramite cromatografia ad esclusione dimensionale potrebbe inoltre rappresentare il punto di partenza di una serie di esperimenti destinati ad ottimizzarne le condizioni di purificazione ed eventualmente di cristallizzazione.

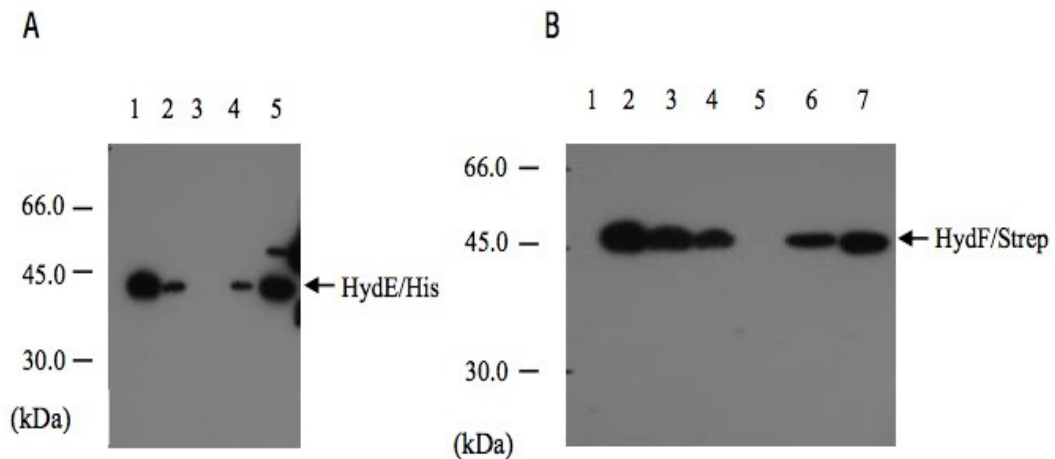
### **1.3 Co-precipitazione delle proteine ricombinanti HydF/Strep e HydE/His**

La struttura cristallografica di HydE di *T. maritima* è stata ottenuta da Y. Nicolet e collaboratori nel 2008, ma sono state raccolte poche informazioni in merito alla relativa caratterizzazione biochimica. HydE ha un'elevata similarità di sequenza e strutturale con la proteina BioB di *E. coli*, coinvolta nell'inserimento di atomi di zolfo in centri FeS durante la sintesi della biotina. Entrambe appartengono alla famiglia delle proteine radical-SAM e la catalisi radicalica condotta da HydE risulta necessaria all'attivazione delle [FeFe]-idrogenasi. Dati strutturali suggeriscono che una regione simile al dominio di dimerizzazione di BioB possa essere coinvolta nell'interazione eterodimerica tra HydE ed HydF nella formazione di un complesso ternario durante la maturazione delle [FeFe]-idrogenasi (Nicolet Y. 2008).

Anche in questo caso, è stata allestita una co-precipitazione binaria utilizzando la stessa procedura sperimentale descritta al paragrafo 1.1, allo scopo di valutare l'interazione tra le proteine HydE ed HydF di *C. acetobutylicum*. In particolare, la frazione solubile del lisato totale di cellule di *E. coli* co-trasformate con i vettori pACYC-*hydE/his* e pCDF-*hydF/strep* è stata incubata con la resina Strep-Tactin al fine di verificare la co-precipitazione delle proteine ricombinanti HydE/His ed HydF/Strep. HydF/Strep risulterà immobilizzata alla resina, e solamente nel caso in cui la proteina interagisca direttamente con HydG/His, quest'ultima co-precipiterà durante l'eluizione di HydF/Strep.

La figura 16 riporta nel pannello A l'immagine relativa all'Immunoblot condotto

con l'anticorpo monoclonale anti His-tag, che conferma la presenza di HydE/His nelle frazioni di eluizione con des(thio)biotina (corsie 5 e 6).



**Figura 16. Co-purificazione mediante cromatografia di affinità Strep-Tactin di HydF/Strep con HydG/His.** *Pannello A: Western Blot con anticorpo anti His-tag.* Corsia 1: campione indotto, 5  $\mu$ l; corsia 2: frazione solubile del lisato totale; corsia 3: frazione di lavaggio; corsia 4: prima frazione eluita; corsia 5: *pool* di frazioni eluite e concentrate. *Pannello B: Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II.* Corsia 1: campione non indotto, 5  $\mu$ l; corsia 2: campione indotto, 5  $\mu$ l; corsia 3: frazione solubile del lisato totale; corsia 4: *flow through*; corsia 5: frazione di lavaggio; corsia 6: prima frazione eluita; corsia 7: *pool* di frazioni eluite e concentrate. Sono stati caricati 25  $\mu$ l di ciascuna frazione cromatografica.

Poichè HydE/His non possiede l'epitopo che ne permetterebbe l'eluizione, è giustificabile pensare che la proteina ricombinante interagisca direttamente con HydF/Strep, la cui presenza è confermata nelle corsie 6 e 7 dell'Immunoblot del pannello B (controllo) della figura 16, che corrispondono rispettivamente ai campioni preparati a partire dalla prima frazione eluita e dal *pool* di frazione eluite e concentrate, in cui è inequivocabilmente presente HydF/Strep. L'efficienza del sistema di espressione è deducibile dalla differenza fra il segnale rilevato in corrispondenza della corsia 1 (campione non indotto) e quella in corrispondenza della corsia 2 (campione indotto). Come nel caso di HydG, dunque, lo *scaffold* HydF è in grado di interagire con HydE indipendentemente dalla presenza della terza maturasi. Sono attualmente in corso di svolgimento, come per HydG, esperimenti finalizzati alla purificazione del complesso HydF:HydE



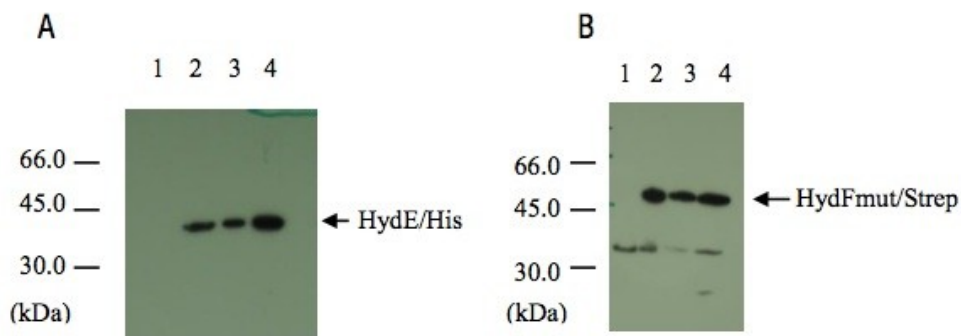
I risultati ottenuti sembrano implicare HydF nelle interazioni dirette e binarie con le maturasi HydE ed HydG, che risultano essere sufficientemente stabilizzate sullo *scaffold* da essere rivelate attraverso saggi di co-precipitazione. E' possibile concludere che ciascuna interazione sia un evento indipendente e necessario nel processo di maturazione del precursore del *cluster H* su HydF. Tuttavia, per la natura intrinseca della tecnica adottata, non è possibile isolare il dominio di HydF coinvolto in ciascuna interazione. A tal proposito, come affrontato nella sezione introduttiva, evidenze strutturali e funzionali sembrano implicare il dominio GTP-asico nelle interazioni con le altre maturasi. Si ritiene che la putativa conformazione funzionale di HydF sia la forma dimerica (vedi paragrafo 1.5, *Introduzione*), nella quale i domini di specificità GTPasica sono esposti ai poli dell'enzima, a livello dell'estremità N-terminale di ciascun monomero (Cendron et al., 2011). L'accessibilità del dominio è compatibile con le osservazioni che ne ipotizzano il legame con le altre maturasi, come dimostrano l'incremento dell'attività GTPasica di HydF in presenza di HydG ed HydE, e l'aumento di intensità dei segnali EPR per i centri FeS in presenza di GTP (Shepard et al., 2010). I due dati sono fortemente correlati, in accordo con il modello secondo cui HydG ed HydE sarebbero implicate nella modificazione e conversione del centro FeS ospitato da HydF nel precursore definitivo del centro bimetallico del *cluster H*. È plausibile quindi ipotizzare un'azione reciproca tra i domini di legame al centro FeS e quello di specificità GTPasica, forse mediata dalle maturasi HydG ed HydE. Tuttavia, non esiste ancora una prova diretta in grado di dimostrare un'interazione, funzionale e/o strutturale, tra HydG, HydE e il dominio di specificità del GTP di HydF.

## **2.1 Co-precipitazione delle proteine ricombinanti HydF<sub>CaGly24Ala,Lys25Ser</sub>/Strep e HydE/His**

L'analisi della sequenza amminoacidica N-terminale di HydF rileva la presenza di cinque sequenze consenso a livello del dominio di specificità GTPasica, simili a quelle isolate nelle piccole proteine G. Il primo motivo -

definito *P-loop*: (G/A)X<sub>4</sub>KG(T/S) – è coinvolto nel legame dei gruppi  $\alpha$ - e  $\beta$ -fosfato del nucleotide. Una delle tre treonine conservate, Thr46, Thr47 e Thr48, che definiscono la seconda sequenza consenso *G2-loop* potrebbe corrispondere al residuo legante Mg<sup>2+</sup>; la terza sequenza consenso è DX<sub>2</sub>G, e costituisce il *G3-loop*, implicato nel legame al Mg<sup>2+</sup> e al gruppo  $\gamma$ -fosfato. Il *G4-loop* definisce invece la quarta sequenza consenso (N/T)(K/Q)XD, che si suppone interagire con il nucleotide. La sequenza *G5-loop* (T/G/C)(C/S)A è implicata nel riconoscimento della base guaninica. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che le mutazioni mappanti nei residui di glicina conservati del *P-loop* provocano una severa abolizione della capacità di attivazione delle [FeFe]-idrogenasi (King et al. 2006); inoltre, nel laboratorio in cui è stata svolta questa tesi è stata riportata una drastica riduzione dell'attività GTPasica di due forme mutanti per i medesimi residui (dato non mostrato).

Allo scopo di verificare se il dominio GTPasico sia implicato nelle interazioni con le altre maturasi - come atteso per le interazioni tra le piccole proteine G e i rispettivi modulatori - è stata dunque valutata la capacità di una forma di HydF, mutante nella sequenza consenso *P-loop*, di replicare le stesse interazioni osservate per la forma *wild type*. Precedentemente al lavoro condotto, è stato generato il doppio mutante HydF<sub>CaGly24Ala,Lys25Ser</sub>, in cui il residuo conservato Gly24 della sequenza Walker A *P-loop* è stato sostituito da un residuo di alanina, e il residuo conservato Lys25 della medesima sequenza è stato convertito in un residuo di serina. Questa doppia mutazione comporta una riduzione dell'80% dell'attività GTPasica di HydF (dati non mostrati). Al fine di verificare l'interazione fra la nuova forma ricombinante e la proteina HydE, è stato allestito un esperimento di co-precipitazione, condotto secondo lo stesso protocollo impiegato negli esperimenti precedenti. L'analisi ha previsto la co-espressione delle forme ricombinanti HydF<sub>CaGly24Ala,Lys25Ser</sub>/Strep e HydE/His; la successiva co-precipitazione è stata condotta utilizzando il sistema Strep-Tactin/Strep-tag II. La figura 17 mostra il risultato ottenuto dagli Immunoblot condotti impiegando, separatamente, l'anticorpo anti His-tag e l'anticorpo anti Strep-tag II (controllo).



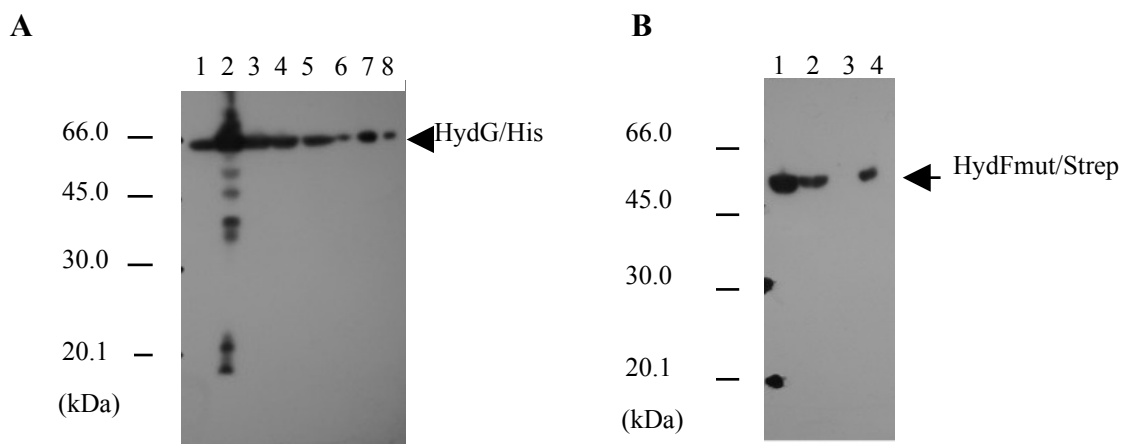
**Figura 17. Co-purificazione mediante cromatografia di affinità Strep-Tactin di HydF<sup>CaGly24Ala,Lys25Ser</sup>/Strep con HydE/His.** Pannello A: Western Blot con anticorpo anti His-tag. Corsia 1: campione non indotto, 5  $\mu$ l; corsia 2: campione indotto, 5  $\mu$ l; corsia 3: frazione solubile del lisato totale; corsia 4: pool di frazioni eluite e concentrate. Pannello B: Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II. Corsia 1: campione non indotto, 5  $\mu$ l; corsia 2: campione indotto, 5  $\mu$ l; corsia 3: frazione solubile del lisato totale; corsia 4: pool di frazioni eluite e concentrate. Sono stati caricati 25  $\mu$ l di ciascuna frazione cromatografica.

La presenza della proteina ricombinante HydE/His in corrispondenza della corsia 4, relativa alla frazione concentrata dell'eluizione (Pannello A), è apprezzabile per il segnale specifico rilevato dall'anticorpo anti His-tag in corrispondenza del peso relativo alla proteina HydE. Come atteso per un evento di co-precipitazione, HydF<sup>CaGly24Ala,Lys25Ser</sup>/Strep è stata correttamente trattenuta dalla resina durante la cromatografia per affinità e viene rilasciata durante l'eluizione (corsia 4, Pannello B). Questo risultato suggerisce che la mutazione in corrispondenza del *P-loop* non sia coinvolta nell'interazione con HydE, dal momento che quest'ultima viene mantenuta dalla forma mutante di HydF.

## 2.2 Co-precipitazione delle proteine ricombinanti HydF<sup>CaGly24Ala,Lys25Ser</sup>/Strep ed HydG/His

Dal momento che gli esperimenti condotti hanno dimostrato l'indipendenza delle interazioni di HydG ed HydE con HydF, è stata valutata la capacità di HydF<sup>CaGly24Ala,Lys25Ser</sup>/Strep-tag II di interagire con HydG/His, al fine di poter escludere il coinvolgimento della sequenza *P-loop* nell'interazione con ciascuna delle due maturasi. È stato allestito un esperimento di co-precipitazione,

condotto secondo lo stesso protocollo impiegato negli esperimenti precedenti. L'esperimento ha previsto la co-espressione delle forme ricombinanti pCDF-*hydF*<sub>CaGly24Ala,Lys25Ser</sub>/*strep* e pRSF-*hydG*/*his*; la successiva co-precipitazione è stata condotta utilizzando il sistema Strep-Tactin/Strep-tag II. La figura 18 mostra il risultato ottenuto dagli Immunoblot condotti impiegando, separatamente, l'anticorpo anti His-tag e l'anticorpo anti Strep-tag II (controllo).



**Figura 18. Co-purificazione mediante cromatografia di affinità Strep-Tactin di HydF<sub>CaGly24Ala,Lys25Ser</sub>/Strep con HydG/His.** Pannello A: Western Blot con anticorpo anti His-tag. Corsia 1: campione non indotto, 5 µl; corsia 2: campione indotto, 5 µl; corsia 3: frazione solubile del lisato totale; corsia 4: *flow through*; corsia 5: frazione iniziale di lavaggio; corsia 6: frazione finale di lavaggio; corsia 7: prima frazione di eluizione; corsia 8: *pool* di frazioni eluite e concentrate. Pannello B: Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II. Corsia 1: campione indotto, 5 µl; corsia 2: frazione solubile del lisato totale; corsia 3: frazione finale di lavaggio; corsia 4: *pool* di frazioni eluite e concentrate. Sono stati caricati 25 µl di ciascuna frazione cromatografica.

Anche in questo caso, il risultato suggerisce l'interazione tra le due proteine analizzate, indicata dalla co-eluzione di HydG/His (corsie 7 e 8, Pannello A) e di HydF<sub>CaGly24Ala,Lys25Ser</sub>/Strep, che viene trattenuta alla resina (corsia 4, Pannello B).

I risultati ottenuti hanno dimostrato che il mutante HydF<sub>CaGly24Ala,Lys25Ser</sub> e le maturasi HydG ed HydE stabiliscono le stesse interazioni osservate per la forma *wild type* di HydF, indebolendo l'ipotesi secondo cui la funzione GTPasica possa mediare il legame alle maturasi. È più probabile, dunque, che l'attività GTPasica

perturbi il microambiente in cui il precursore del *cluster H* viene assemblato su HydF. Questa possibilità è direttamente analoga al caso della GTPasi MnmE, attivata da cationi monovalenti: essa ha un sito attivo separato per modificare il tRNA, che risulta perturbato dal legame e dall'idrolisi del GTP (Scrima et al., 2006). Anche le Fe-nitrogenasi forniscono un altro caso confrontabile, in cui il legame al MgATP induce delle alterazioni nel microambiente intorno al centro [4Fe4S], distante circa 15 Å (Jang et al., 2004). La recente caratterizzazione strutturale di HydF ha quantificato la distanza fra il dominio di specificità GTPasica e il dominio di legame FeS: nella conformazione dimerica, la distanza intra-monomero è pari a 30 Å; la distanza inter-monomero è pari a 60 Å. Questo dato, coniugato all'osservazione per cui il GTP, HydE ed HydG, in modo diverso, contribuiscono a modificare le caratteristiche del precursore del *cluster H*, suggeriscono che la correlazione reciproca fra i due domini funzionali di HydF potrebbe essere mediata dalle maturasi, attraverso un sistema di regolazione dell'attività GTPasica diverso dalla semplice interazione, o forse attraverso una sequenza consenso differente da quella mutata in questa sede, mappante nella regione flessibile del dominio III.

La struttura ottenuta per la forma tetramerică di HydF ha rivelato la collocazione dei domini attraverso cui il monomero (dominio II) e il dimero (dominio III) dimerizzano, dando origine rispettivamente a un dimero e ad un tetramero della proteina (Cendron et al., 2011). La struttura cristallina di HydF è stata ottenuta esprimendo l'enzima in un *background* genetico privo delle maturasi HydG ed HydE: il tetramero è risultato privo dei centri FeS, che sono stati invece rilevati – sebbene in quantità sub-stechiometriche - da analisi EPR condotte per la forma dimerica e tetramerică di HydF<sup>ΔEG</sup> in soluzione, separate per gel filtrazione (dati non mostrati, ottenuti dalla Prof. Carbonera del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova). Pertanto, è stato ipotizzato che i centri FeS ospitati da HydF siano presenti prima che l'enzima interagisca con le maturasi e che l'evento di dissociazione a cui sono soggette le forme in soluzione potrebbe essere dovuto alla labilità dei centri FeS, giustificata dalla loro natura dinamica. A questo proposito, l'analisi della struttura cristallina ha suggerito che il

trasferimento del centro [2Fe2S] possa essere favorito da riarrangiamenti strutturali generati dal dominio di specificità del GTP. Infatti, nella struttura tetramerica, il *loop* flessibile privo di GTP si ripiega in modo disorganizzato in corrispondenza del dominio III; invece, nella forma dimerica, potrebbe orientarsi in modo ordinato in presenza di GTP. L'interazione dello *scaffold* con HydE ed HydG innescherebbe l'attività GTPasica e la conseguente dissociazione del GTP, che potrebbe posizionare il *loop* in modo da favorire 1) il rilascio del centro FeS (per esempio modificandone il microambiente), 2) le interazioni con HydA e 3) l'inattivazione della proteina per tetramerizzazione. Come è stato accennato nella sezione introduttiva, la conformazione inattiva della proteina sembra essere rappresentata dal tetramero, mentre la conformazione dimerica, più aperta e accessibile, risulta più funzionale a stabilire interazioni con i *partners* di maturazione.

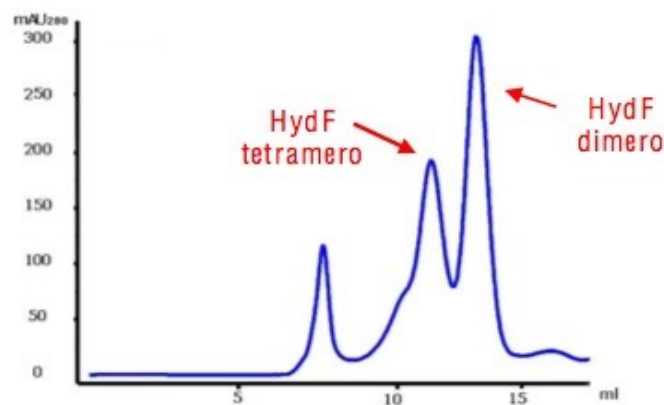
Il processo di maturazione del *cluster H* su HydF appare più complesso e regolato se analizzato considerando la natura estremamente dinamica di HydF, dovuta al duplice stato oligomerico in cui sussiste *in vivo*. Pertanto, è stata separatamente valutata la capacità di ciascuna forma oligomerica di interagire con le altre maturasi, nella prospettiva di verificare quale delle due conformazioni espliciti la funzione di *scaffold*.

### **3. Co-precipitazione delle forme dimerica e tetramerica di HydF/Strep con HydG/His e con HydE/His**

La struttura cristallina di HydF e le differenti specie in cui essa viene purificata attraverso gel filtrazione hanno sollevato interrogativi volti a chiarire quale sia la forma oligomerica più idonea a cedere ad HydA il centro [2Fe2S] maturo. A tale scopo, sono stati allestiti esperimenti di co-precipitazione che hanno previsto di saggiare, separatamente, l'interazione stabilita tra HydG e HydE e ciascuna delle due specie in cui HydF oligomerizza. Il risultato potrebbe chiarire la sequenza temporale di eventi che conducono all'attivazione delle [FeFe]-idrogenasi, individuando, attraverso l'interazione di HydF con HydG e HydE,

quale delle forme oligomeriche in cui è presente in soluzione sia coinvolta nel processo di maturazione del centro FeS.

La proteina HydF/Strep è stata purificata tramite cromatografia di attività Strep-Tactin e successivamente sottoposta a cromatografia ad esclusione dimensionale tramite FPLC, allo scopo di separare la forma dimerica da quella tetrameric. La cromatografia ad esclusione dimensionale è una tecnica di purificazione che permette di discriminare i diversi stati oligomericici di una proteina e prevede l'impiego di una resina costituita da un reticolo uniforme di pori di diametro tale da trattenere le molecole del campione caricato, che verranno separate in base al loro peso e alle loro dimensioni. Le macromolecole più grandi verranno eluite per prime, in quanto non sono trattenute dai pori del filtro. L'eluizione viene monitorata continuamente attraverso un cromatogramma, che riporta gli spettri di assorbimento a 280 nm delle specie proteiche presenti in soluzione. Ciascun picco è descritto in ordinata dal valore dell'assorbanza, e in ascissa dalla posizione dell'eluuto. La figura 19 illustra il cromatogramma ottenuto per il campione utilizzato.

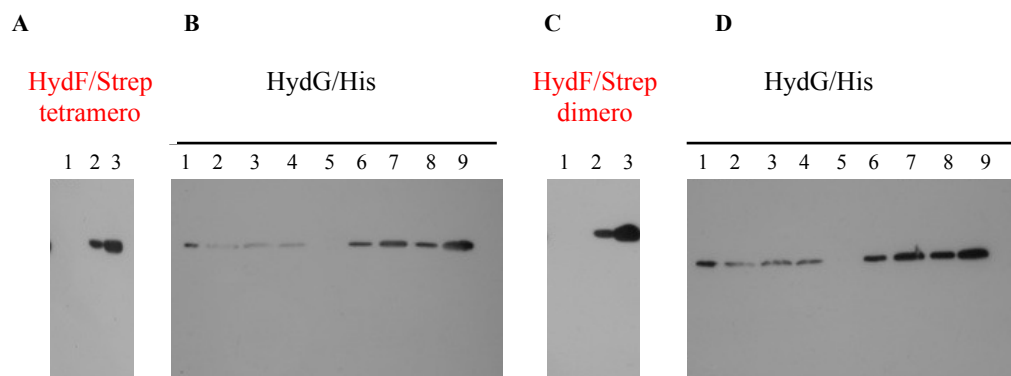


**Figura 19. Cromatogramma della gel filtrazione sulla proteina HydF/Strep.** Volumi di ritenzione: 11.47 ml: tetramero, 13.5 ml: dimero.

È possibile evincere a partire dal volume di eluizione relativo - utilizzando la retta

di taratura, come descritto nel dettaglio nella sezione *Materiali e Metodi* - che la proteina sussiste in effetti in due forme oligomeriche, che corrispondono rispettivamente ai pesi molecolari di 214 e 104 kDa, pari ad una forma tetrameric e dimerica della proteina; non è stata osservata invece alcuna forma monomeric. Le frazioni di eluizione relative al dimer e al tetramero sono state raccolte separatamente, e ciascuna di esse è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente con 2 ml della frazione solubile di lisati totali ottenuti da cellule sovraesprimenti HydG/His o HydE/His. Infatti, poiché è sufficiente unire la frazione solubile di ciascuna delle maturasi per attivare *in vitro* le [FeFe]-idrogenasi, non è necessario purificare le due maturasi per valutare la loro interazione con ciascuna delle due specie oligomeriche di HydF. Cinquecento microlitri di ognuna delle miscele proteiche (HydF/Strep dimer-HydG/His, HydF/Strep tetramero-HydG/His, HydF/Strep dimer-HydE/His, HydF/Strep tetramero-HydE/His) sono stati separatamente incubati, per un'ora a 4°C, con la resina Strep-Tactin, al fine di immobilizzare sulla colonna le due forme oligomeriche di HydF e condurre quindi la co-precipitazione delle proteine eventualmente interagenti attraverso un terzo passaggio cromatografico. Le diverse frazioni sono state raccolte e trattate come descritto nei paragrafi precedenti e quindi sottoposte ad analisi Western Blot, i cui risultati sono stati riportati nelle figure 20 e 21. In particolare, i pannelli B e D della figura 20 mostrano l'immagine relativa all'Immunoblot condotto con l'anticorpo anti His tag per i campioni ottenuti dalla co-precipitazione di HydG/His con le forme tetrameric e dimerica, rispettivamente, di HydF/Strep. Nella figura 20, per maggiore chiarezza e per poter affiancare i quattro pannelli, sono stati omessi i marcatori di peso molecolare ma, data l'elevata specificità dei due anticorpi utilizzati, è possibile ascrivere con certezza le singole bande osservate in ciascuna corsia a HydF/Strep o a HydG/His.

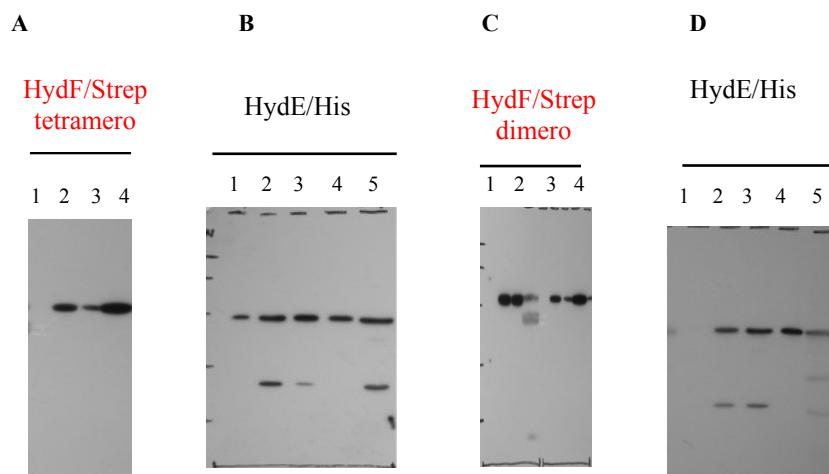




**Figura 20. Co-purificazione mediante cromatografia di affinità Strep-Tactin di HydF/Strep dimerica e tetramerica con HydG/His.** Pannello A: Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II condotto sulle frazioni di eluizione della cromatografia Strep-Tactin su HydF tetramero. Corsia 1: frazione finale di lavaggio; corsia 2: prima frazione di eluizione 3; corsia 3: pool di eluiti concentrati. Pannello B: Western Blot condotto con anticorpo anti His-tag per i campioni ottenuti dalla co-precipitazione per la forma tetramerica di HydF ed HydG. Corsia 1: frazione solubile del lisato totale; corsia 2: flow through; corsia 3: primo lavaggio; corsia 4: secondo lavaggio; corsia 5: ultimo lavaggio; corsie 7-8: eluizioni; corsia 9: pool di eluiti concentrati. Pannello C: Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II condotto sulle frazioni di eluizione della cromatografia Strep-Tactin su HydF dimero. L'ordine di caricamento è il medesimo per l'immagine riportata nel Pannello A. Pannello D: Western Blot con anticorpo anti His-tag condotto sulle frazioni di eluizione della cromatografia Strep-Tactin su HydF dimero. L'ordine di caricamento è il medesimo per l'immagine riportata nel Pannello B. In ogni pozzetto sono stati caricati 25  $\mu$ l di campione.

I risultati ottenuti indicano che la proteina ricombinante HydG/His è presente in corrispondenza delle frazioni di eluizione relative alla co-precipitazione condotta sia con il tetramero (corsie 6-9, pannello B) che con il dimero (corsie 6-9, pannello D). La presenza di HydF/Strep, in corrispondenza dei medesimi campioni, rivelati con anticorpi anti Strep-tag II (pannelli A e C, rispettivamente nella forma tetramerica e dimerica), conferma che l'eluizione di HydG/His si è verificata per associazione con entrambe le forme oligomeriche di HydF/Strep.

La figura 21 indica che sono stati ottenuti risultati esattamente sovrapponibili a quelli appena descritti nell'esperimento di co-purificazione di HydE/His con HydF/Strep dimero e tetramero. Come in figura 20, anche in questo caso sono stati omessi i marcatori di peso molecolare.



**Figura 21. Co-purificazione mediante cromatografia di affinità Strep-Tactin di HydF/Strep dimerica e tetramerica con HydE/His** Pannello A: Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II condotto sulle frazioni di eluizione della cromatografia Strep-Tactin su HydF tetramero. Corsia 1: frazione finale di lavaggio; corsia 2: prima frazione di eluizione 3; corsia 3: ultima frazione di eluizione; corsia 4: pool di eluiti concentrati. Pannello B: Western Blot condotto con anticorpo anti His-tag per i campioni ottenuti dalla co-precipitazione per la forma tetramerica di HydF ed HydE. Corsia 1: frazione finale di lavaggio; corsia 2: prima frazione di eluizione; corsia 3: seconda frazione di eluizione; corsia 4: terza frazione di eluizione; corsia 5: pool di eluiti concentrati. Pannello C: Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II condotto sulle frazioni di eluizione della cromatografia Strep-Tactin su HydF dimerico. L'ordine di caricamento è il medesimo per l'immagine riportata nel Pannello A. Pannello D: Western Blot con anticorpo anti His-tag condotto sulle frazioni di eluizione della cromatografia Strep-Tactin su HydF dimerico. L'ordine di caricamento è il medesimo per l'immagine riportata nel Pannello B. In ogni pozzetto sono stati caricati 25  $\mu$ l di campione.

Tuttavia, i risultati presentati in questo paragrafo non possono essere considerati sufficientemente attendibili. Infatti, l'analisi tramite colorazione con rosso Ponceau dell'efficienza di trasferimento delle proteine sulle membrane di nitrocellulosa ha rivelato la presenza di numerose bande aspecifiche a livello delle corsie di eluizione (dato non mostrato), diversamente da quanto osservato nelle cromatografie precedenti (si vedano le figure 13 e 14). È pertanto possibile che le forme tetramerica e dimerica di HydF risultino più reattive nell'intrattenere legami con le proteine, ed è altrettanto probabile che l'impiego della frazione solubile del lisato totale di HydE/His e di HydG/His sia una soluzione di eterogeneità tale da non permettere un'analisi affidabile della reale interazione che si stabilisce fra ciascuna maturasi e il singolo oligomero di HydF. I risultati ottenuti non

permettono pertanto di inferire una reattività differente per la forma tetramerică, ipotizzata inattiva, e per la forma dimerica, ritenuta attiva, della proteina HydF e andranno ulteriormente approfonditi.

I risultati descritti nei paragrafi precedenti, uniti ai dati di letteratura, hanno dimostrato che ciascuna interazione che lo *scaffold* HydF stabilisce con le maturasi è un evento indipendente e necessario nel processo di assemblaggio del precursore del *cluster H*. Tuttavia, non è stato possibile apprezzare la variabilità attesa nelle interazioni che ciascuna delle forme oligomeriche di HydF intrattiene con HydG ed HydE; possiamo invece affermare che l'attività GTPasica di HydF non sia coinvolta nelle interazioni con le altre maturasi, sebbene queste influenzino fortemente la velocità di idrolisi del GTP da parte di HydF (Shepard et al., 2010). Test di attività GTPasica condotti su HydF<sup>EG</sup> hanno dimostrato che HydA<sup>ΔEFG</sup> non determina il tasso di idrolisi del GTP, e che la capacità di HydF<sup>EG</sup> di attivare HydA è mantenuta in presenza di analoghi non idrolizzabili o in presenza di GDP. La catalisi non sembra pertanto implicata nel trasferimento del centro [2Fe2S] ad HydA, sebbene risulti indispensabile per attivarla. Come accennato nel capitolo precedente, è probabile che il legame e l'idrolisi del GTP promuova una serie di riarrangiamenti strutturali innescati dal relativo dominio di legame, capaci di favorire l'interazione tra HydF ed HydA e il rilascio a quest'ultima del centro bimetallico maturo.

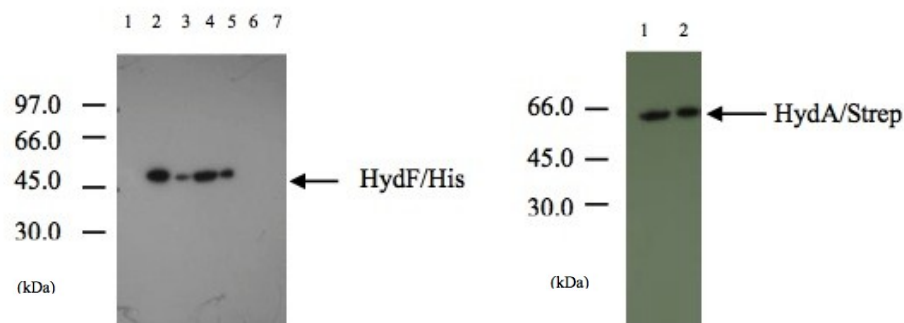
## RISULTATI E DISCUSSIONE (II)

La recente caratterizzazione strutturale di HydA<sup>ΔEFG</sup> (una apo-idrogenasi espressa in *E. coli* in assenza di maturasi, Mulder et al., 2010) ha permesso di confermare che lo *step* finale nel processo di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi è il trasferimento del centro [2Fe2S], facilitato dall'interazione fra quest'ultimo e alcuni residui critici, presenti all'interno di un canale carico positivamente che collega la superficie dell'idrogenasi alla cavità occupata dal centro [4Fe4S] precedentemente sintetizzato. L'analisi della struttura di HydA<sup>ΔEFG</sup> non suggerisce tuttavia la presenza di residui coinvolti nell'interazione con HydF; inoltre, data la labilità dei centri FeS (vedi paragrafo 2.2) e la flessibilità dei *loops* che definiscono il dominio III dello *scaffold* HydF, è possibile che l'interazione fra quest'ultima e HydA sia molto debole, e che le caratteristiche delle tasche di legame per i centri FeS siano sufficienti a garantirne il trasferimento attraverso un'interazione transiente. Pertanto, gli esperimenti presentati in quest'ultimo capitolo sono destinati a verificare ed approfondire l'interazione tra HydA e HydF, evento chiave nel processo di maturazione delle [FeFe]-idrogenasi.

### 4.1 Co-precipitazione delle proteine ricombinanti HydF/His e HydA/Strep

Al fine di verificare l'interazione tra la maturasi *scaffold* HydF e la [FeFe]-idrogenasi HydA è stata allestita una co-precipitazione che ha impiegato il sistema cromatografico Strep-Tactin/Strep-tag II. Dal momento che in laboratorio la sequenza codificante per la proteina HydA di *C. acetobutylicum* era disponibile solo in fusione con l'epitopo Strep-tag II (nel vettore pET-*hydA/strep*), si è reso necessario ottenere un nuovo vettore che ci consentisse di co-esprimere HydF in fusione con la sequenza His-tag (pCDF-*hydF/his*), indispensabile sia per l'approccio di co-precipitazione che per le successive analisi di Western Blot. Le proteine HydA/Strep e HydF/His sono state quindi co-espresse in *E. coli* seguendo lo stesso protocollo descritto nei paragrafi precedenti e la frazione solubile del lisato totale ottenuto è stata sottoposta a cromatografia di affinità Strep-Tactin e alle successive analisi di Western Blot, i cui risultati sono stati riportati nella

figura 22. Le corsie 6 e 7 del pannello A corrispondono rispettivamente alle corsie di caricamento dei campioni ottenuti dalla frazione finale del lavaggio e dalla prima frazione di eluizione, in cui è stato possibile rilevare, utilizzando l'anticorpo anti His-tag, l'assenza di HydF/His. Tuttavia essa è presente nelle frazioni relative ai passaggi cromatografici precedenti, e risulta fortemente espressa nel sistema eterologo (campione indotto, corsia 2, Pannello A).



**Figura 22. Co-purificazione mediante cromatografia di affinità Strep-Tactin di HydA/Strep con HydF/His** Pannello A: Western Blot con anticorpo anti His-tag. Corsia 1: campione non indotto, 5  $\mu$ l; corsia 2: campione indotto, 5  $\mu$ l; corsia 3: frazione solubile del lisato totale; corsia 4: *flow through*; corsia 5: frazione iniziale di lavaggio; corsia 6: frazione finale di lavaggio; corsia 7: *pool* di frazioni eluite e concentrate. Pannello B: Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II. Corsia 1: prima frazione di eluizione; corsia 2: *pool* di frazioni eluite e concentrate. Sono stati caricati 25  $\mu$ l di ciascuna frazione cromatografica.

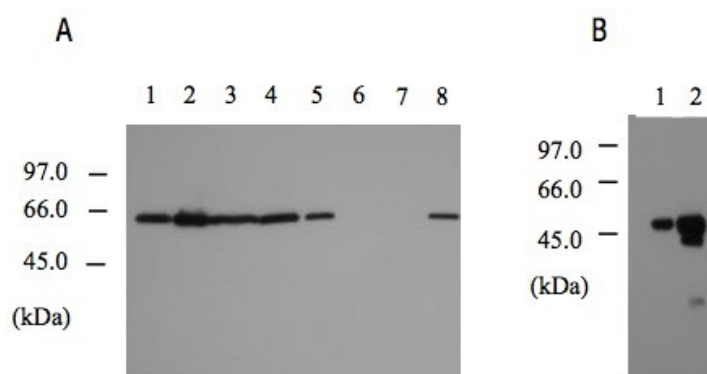
L'immagine relativa al Pannello B, indica d'altra parte la presenza di HydA/Strep nelle frazione di eluizione (corsie 1 e 2), suggerendo che l'assenza di HydF/His in corrispondenza del medesimo campione sia dovuta alla mancanza dell'interazione fra le due proteine ricombinanti.

#### 4.2 Co-precipitazione delle proteine HydF/His, HydE, HydG e HydA/Strep

Come descritto nei paragrafi precedenti, sono numerose le variazioni che subiscono le proprietà di HydF ed HydA in presenza dell'apparato di maturazione

integro. Pertanto, ai fini di verificare se l'assenza dell'interazione tra HydF ed HydA si possa modificare in un *background* di espressione diverso da quello precedentemente allestito, sono state separatamente trasformate due aliquote di cellule di *E. coli*: la prima con i plasmidi pCDF-*hydF/his*, pACYC-*hydE*, pRSF-*hydG* e la seconda con il plasmide pET-*hydA/strep*. L'obbiettivo dell'esperimento era quello di purificare HydF in un *background* di espressione comprendente anche le altre due proteine di maturazione, allo scopo di verificare se l'interazione di HydA con HydF possa risentire di un'eventuale modulazione delle proprietà dello *scaffold*, dipendente dalla presenza delle altre maturasi. Sono state utilizzate in questo esperimento proteine ricombinanti HydE e HydG prive di epitopi al fine di purificare la sola HydF/His.

Una colonia positiva di ciascuna delle due piastre di trasformanti è stata selezionata e pre-inoculata nel relativo terreno selettivo. Al termine dell'induzione con IPTG, sono state ottenute le rispettive frazioni solubili del lisato totale. La proteina HydF/His è stata purificata mediante cromatografia NiNTA e le frazioni di eluizione, concentrate in un unico *pool*, sono state poi incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con la frazione solubile del lisato totale ottenuto dalle cellule che sovraesprimevano HydA/Strep, per consentire l'eventuale interazione fra le due proteine. La miscela è stata in seguito unita alla resina NiNTA, la sospensione è stata mantenuta in leggera agitazione per un'ora a 4°C e poi sottoposta alla fase di eluizione con imidazolo, come descritto nei paragrafi precedenti. Gli eluiti sono stati raccolti e i campioni ottenuti sottoposti all'analisi Western Blot, i cui risultati sono riportati nella figura 23.



**Figura 23. Co-purificazione mediante cromatografia di affinità NiNTA di HydF<sup>EG</sup>/His con HydA/Strep.** *Pannello A. Western Blot con anticorpo anti Strep-tag II.* Corsia 1: campione non indotto, 5  $\mu$ l; corsia 2: campione indotto, 5  $\mu$ l; corsia 3: frazione solubile del lisato totale; corsia 4: *flow through*; corsia 5: frazione di lavaggio; corsia 6: prima frazione di eluizione; corsia 7: vuota; corsia 8: *pool* di frazioni eluite e concentrate. *Pannello B. Western Blot con anticorpo anti His-tag.* Corsia 1: prima frazione di eluizione; corsia 2: *pool* di frazioni eluite e concentrate. Sono stati caricati 25  $\mu$ l di ciascuna frazione cromatografica.

Diversamente da quanto osservato nel caso della proteina ricombinante HydF espressa in assenza di HydE e HydG (HydF/His<sup>ΔEG</sup>) (figura 22), la presenza di HydA/Strep nella frazione concentrata dell'eluizione (corsia 8, Pannello A) è un indicatore attendibile dell'avvenuta interazione con HydF/His<sup>EG</sup>, con cui HydA/Strep co-eluisce (corsie 3 e 4, Pannello B).

I risultati ottenuti sono in accordo con quanto già noto in letteratura: le proprietà di HydF sono fortemente influenzate dalla presenza dei componenti dell'apparato di assemblaggio, dimostrando ancora una volta l'interdipendenza delle rispettive funzioni. Alla luce dei dati disponibili e dei risultati raccolti in quest'ultimo capitolo, è ipotizzabile che le proteine HydG ed HydE intervengano, oltre che nel processo di maturazione del precursore del *cluster* H, probabilmente anche modulando alcune proprietà di HydF, forse modificandone l'abilità di interagire, nello *step* finale, con la [FeFe]-idrogenasi. Infatti, i risultati appena riportati dimostrano l'incapacità dello *scaffold*, espresso in assenza di HydG ed HydE, di interagire con l'idrogenasi. In questo modello, trova un'opportuna collocazione la regolazione dell'attività GTPasica mediata dalle maturasi HydG ed

HydE. È possibile che l'assenza delle maturasi privi HydF di quella serie di riarrangiamenti prodotti dall'attività GTPasica - e riportati nei paragrafi precedenti - che potrebbero facilitare l'interazione con HydA, e il rilascio del centro [2Fe2S] modificandone il microambiente chimico. La natura di questo ipotetico processo è compatibile con l'essenzialità dell'attività GTPasica nel processo di maturazione, e con la relativa dispensabilità nel trasferimento del centro FeS ad HydA da parte di HydF<sup>EG</sup>, in quanto quest'ultima riporta l'effetto dell'attività GTPasica. È pertanto chiaro come le proprietà di *ferrier* della maturasi HydF siano fortemente correlate alle sue proprietà di *scaffold*, in quanto da queste ultime dipendono le interazioni con HydE ed HydG che modulano l'interazione tra HydF e l'idrogenasi HydA.



## CONCLUSIONI

L'innovazione energetica riconosce nell'idrogeno molecolare un vettore di energia d'eccellenza, i cui vantaggi aumentano notevolmente data la possibilità di generarlo a partire da alcuni sistemi biologici. La bioproduzione di idrogeno pone come oggetto di indagine la più antica e semplice reazione biochimica, che si compie nella riduzione reversibile dei protoni ad idrogeno gassoso; tuttavia, gli enzimi implicati nella relativa catalisi - le [FeFe]-idrogenasi - sono caratterizzate da un sito attivo molto complesso, chiamato *cluster H*, costituito da un centro [4Fe4S] e un centro [2Fe2S] modificato. Quest'ultimo è assemblato dalle maturasi HydG ed HydE sullo *scaffold* HydF, deputato al trasferimento del centro bimetallico maturo alla apo-[FeFe]-idrogenasi, che risulta così attivata.

Sebbene la caratterizzazione biochimica e, in alcuni casi strutturale, di ciascuna maturasi abbia notevolmente arricchito la conoscenza del processo di attivazione delle [FeFe]-idrogenasi, numerosi e utili dettagli finalizzati all'applicazione biotecnologica di questa catalisi sono tutt'ora ignoti. In particolare, la natura dinamica del sistema di maturazione focalizza l'attenzione sulle interazioni che le maturasi stabiliscono, e in particolare sulla relazione chiave tra lo *scaffold* HydF e la [FeFe]-idrogenasi. Numerose informazioni sono state ottenute a partire dalla caratterizzazione strutturale di HydF, la cui attività GTPasica è stata recentemente correlata alle interazioni con le altre maturasi, le quali, come riportato in diversi studi, modificano le caratteristiche del centro bimetallico ospitato da HydF in modo essenziale e funzionale all'attivazione delle [FeFe]-idrogenasi. Nonostante HydF rivesta un ruolo centrale, sia in veste di *scaffold* su cui le altre maturasi modificano il centro [2Fe2S], sia in veste di *ferrier* del centro bimetallico destinato ad HydA, le interazioni proteina-proteina che queste funzioni impongono non sono ad oggi state studiate.

La prima parte del lavoro è stata dedicata all'analisi delle interazioni che si compiono nella prima fase della sequenza di maturazione, ovvero le interazioni tra HydE, HydF ed HydG. La stabilità dell'apparato di maturazione di *C.*

*acetobutylicum* in *E. coli* ha permesso di allestire un ottimo sistema di espressione eterologa in cui le proteine potessero essere espresse in quantità e purezza idonee ai saggi di co-precipitazione a cui sono state sottoposte. L'analisi dei risultati ha permesso di inferire che l'interazione che HydF stabilisce con ognuna delle maturasi è un evento indipendente e necessario, che si traduce in una singola associazione, diretta e binaria, rispettivamente con HydG ed HydE. L'analisi biochimica condotta su una forma di HydF, mutata in corrispondenza di una sequenza consenso del dominio GTPasico, ha inteso confermarne il ruolo, fino ad ora ipotizzato, di mediatore delle interazioni verificate. Tuttavia, la capacità di HydF di associarsi a ciascuna maturasi è risultata inalterata per la forma mutante, suggerendo che l'attività GTPasica non sia coinvolta nelle interazioni con le maturasi, nonostante sia fortemente modulata da queste. Infine, non è stato possibile apprezzare una variabilità fra le interazioni intrattenute da ciascuna forma oligomerica – precisamente dimerica e tetrameric - in cui HydF sussiste *in vivo*, con ognuna delle maturasi. Non è stato pertanto dedotto se un preciso stato oligomerico, come suggerito dall'analisi strutturale, sia realmente più incline ad associarsi ai *partners* di maturazione. La seconda parte del lavoro ha invece analizzato il ruolo di *ferrier* di HydF, indagandone l'interazione con HydA. L'interazione chiave si è verificata solo nel caso in cui HydF venisse co-espressa con HydE ed HydG, suggerendo fortemente che la presenza delle maturasi potrebbe produrre una serie di riarrangiamenti strutturali che si traducono nell'interazione con l'idrogenasi, il rilascio del centro [2Fe2S] maturo, e forse in un'inattivazione dello *scaffold* per tetramerizzazione.

Sebbene le analisi condotte non abbiano permesso di riconoscere in una precisa forma oligomerica di HydF la conformazione più idonea ad interpretare il ruolo di *scaffold*, ciascuna delle due sezioni del lavoro ha permesso di dimostrare, in modo diretto la prima ed indiretto la seconda, l'essenzialità delle interazioni tra HydF e le altre maturasi. La prima sezione ha confermato inequivocabilmente le interazioni che fino ad ora erano solo state ipotizzate; la seconda sezione ne ha dimostrato l'essenzialità, che non risulta più circoscritta alla sola maturazione del centro [2Fe2S] come recentemente descritto in letteratura, poiché HydE ed HydG

condizionano le proprietà di interazione di HydF con HydA nello *step* finale di attivazione delle [FeFe]-idrogenasi.

## MATERIALI E METODI

### Ceppi batterici (*Escherichia coli*)

**TOP 10:** genotipo F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ m15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *recA1*, *end A1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub><sup>+</sup>*, *m<sub>k</sub><sup>+</sup>*), *pho A*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *tonA*

**Inv $\alpha$  F':** genotipo F', *end A1*, *rec A1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub><sup>+</sup>*, *m<sub>k</sub><sup>+</sup>*), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*,  $\Phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ m15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*.

**BL21(DE3):** genotipo F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdSB* (*r<sub>b</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>b</sub><sup>-</sup>*), *gal*, *dcm*, (DE3)

### Media di coltura per *E. coli*

#### Completo Luria-Bertani (LB)

##### Liquido:

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| Bacto Triptone (Difco) :    | 1 % (w/v)  |
| Estratto di lievito (Difco) | 0.5% (w/v) |
| NaCl                        | 0.5% (w/v) |

(pH a 7.5 NaOH 1 M)

Solido: come liquido con aggiunta di agar 1% (w/v)

#### Ricco SOC

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Bacto Triptone      | 2 %   |
| Estratto di lievito | 0.5%  |
| NaCl                | 0.5%  |
| Kcl                 | 2.5mM |
| MgCl <sub>2</sub>   | 10 mM |
| MgSO <sub>4</sub>   | 10 mM |
| Glucosio            | 20 mM |

Quando necessario, sono stati aggiunti gli antibiotici ampicillina (100  $\mu$ g/ml), kanamicina (50  $\mu$ g/ml), streptomomicina (100  $\mu$ g/ml) e cloramfenicolo (34  $\mu$ g/ml).

## Sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche della proteina HydF<sub>Ca</sub>

### Sequenze HydF<sub>Ca</sub> (*wild type* e mutanti)

1) Sequenza del gene *wild type* codificante per la maturasi HydF di *C. acetobutylicum*. Le regioni della sequenza nucleotidica indicate in blu corrispondono al *P-loop*, le basi evidenziati in grassetto e sottolineate vengono modificate nella sequenza mutante. In rosso sono stati riportati i siti di restrizione che sono stati aggiunti alla sequenza ricombinante per i passaggi di ligazione direzionale nei plasmidi di espressione.

```
5' CCATGGGCAATGAACTTAACTCAACACCCAAAGGTGAAAGACTTCACATTGCACTTTT
TGGAAAACTAATGTTGGAAAATCCAGTGAATAAATGCTCTTACTTCTCAAGAAATAGC
TCTTGTTCAAATGTAAGGTACAACAACGATCCTGTTTACAAAGCAATGGAAGTCT
CCCTCTGGACCAGTTATGCTTATAGATACTGCTGGTCTTGATGACATAAGTGATTTAGG
TGAGCTTAGACGTGGAAAACTCTCGAGGTTTATCAAAAACGATGTAGCAATTTTAGT
TTTTGATGTTGAAAGTGGAAATAACAGAATATGATAAAAATATTTACTCATTACTGCTTGA
AAAGAAAATTCCACTAATAGGAGTTTTAAATAAAATAGATAAAAAGGACTATAAGCTAGA
GGATTATACTTCTCAATTTAAAATACCTATAGTACCAATTTTCAGCTCTCAATAATAAAGG
CATAAATAATTTAAAAGATGAATTAATACGCTTAGCACCAGAAAATGATGATAAATTTAA
GATTGTTGGTGTATTACTTTCTCCTGGTGACATAGCAGTTTTAGTTACTCCAATAGACAA
AGCTGCTCCAAAGGGAAGATTAATACTTCTCAGCAGCAAACCTATAAGAGATATACTTGA
AAGTGACGCTATTGCTATGGTGACAAAGGAATTTGAACTTAGAGAAACCTTAGACAGCCT
TAGAAAAAACCTAAAATAGTAATAACAGATTCTCAAGTATTTTTAAAGGTAGCAGCAGA
CACACCTAAGGACATATTGATGACCTCATTTTCTATACTTATGGCAAGACATAAAGGAGA
TTTAATAGAACTTGCTCGTGGTGCAAGGGCAATTGAAGATTTAAAAGATGGTGATAAAAT
TTTAATAGCAGAAGCCTGCACCCACCACCGTCAATCTGATGATATAGGTAAAGTAAAAAT
ACCAAGATGGCTTAGACAAAAACCTGGTAAAAACCTAGAATTTGATTTTCAAGTGGCTT
TTCATTTCTCCAAATATAGAGGATTATGCACTTATAGTTCATTGTGCTGGCTGCATGCT
AAACAGACGTTCAATGCTTACAGAAATAGAAAAGTTTCAGTAAAAAACAAAATTCCTATAGT
AAATTACGGAGTTCTTATTGCCTACGTTCAAGGAATCTTCCAAGGGCATTAAGCCTTT
TCCATATGCTGATAGAATATTTAATCAATCGAGTAGGAACCTAAGGATCC 3'
```

2) Sequenza amminoacidica della maturasi *wild type* HydF di *C. acetobutylicum*. I residui amminoacidi evidenziati in blu corrispondono al motivo conservato Walker A *P-loop* del dominio GTPasico. I residui mutati sono evidenziati in grassetto e sottolineati.

```
MNELNSTPKGERLHIALFGKTNVGKSSVINALTSQEIALVSNVKGTTTDPVYKAMELLP
LGPVMLIDTAGLDDISDLGELRRGKTLEVLSTKTDVAILVFDVESGITEYDKNIYSLLE
KKIPLIGVLNKIDKKDYKLEDYTSQFKIPIVPIALNNGKINNLKDELIRLAPENDDKF
KIVGDLSPGDIAVLVTPIDKAAPKGRILIPQQQTIRDILESDAIAMVTKEFELRETLD
SLRKKPKIVITDSQVFLKVAADTPKDILMTSFSILMARHKGDLELARGARIAEDLKD
DKILIAEACTHHRQSDDIGKVKIPRWLRQKTGKKLEFDFFSSGFSPPNIEDYALIVHCA
GCMLNRRSMLHRIESSVKKQIPVNYGVLIAYVQGILPRALKPFYPYADRIFNQSSRN
```

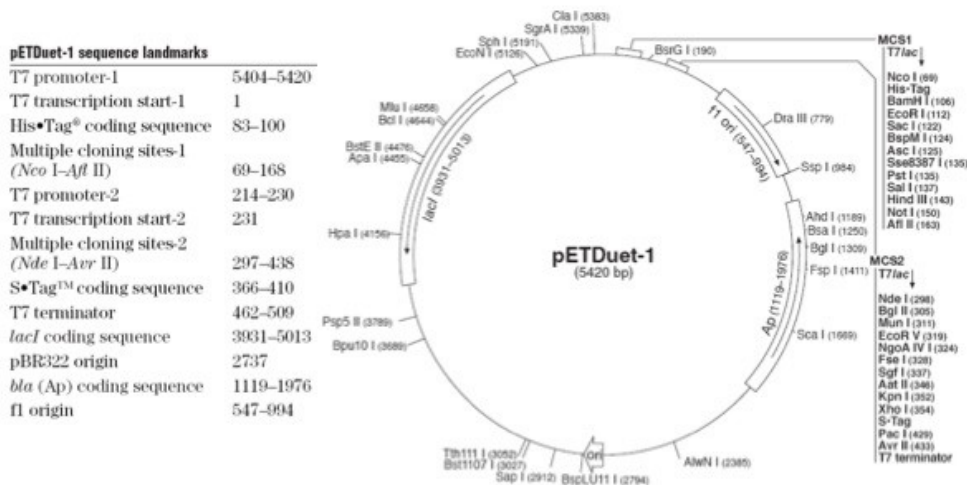
3) Singole mutazioni puntiformi con le rispettive sostituzioni amminoacidiche:

**Walker A P-loop**

wt: **G**GAAA**A**TCC → aa: **G**K**S**  
 mutGK: **G**CAAG**C**TCC → aa: **A**L**S**

**Plasmidi utilizzati  
 pETDuet-1 (Novagen)**

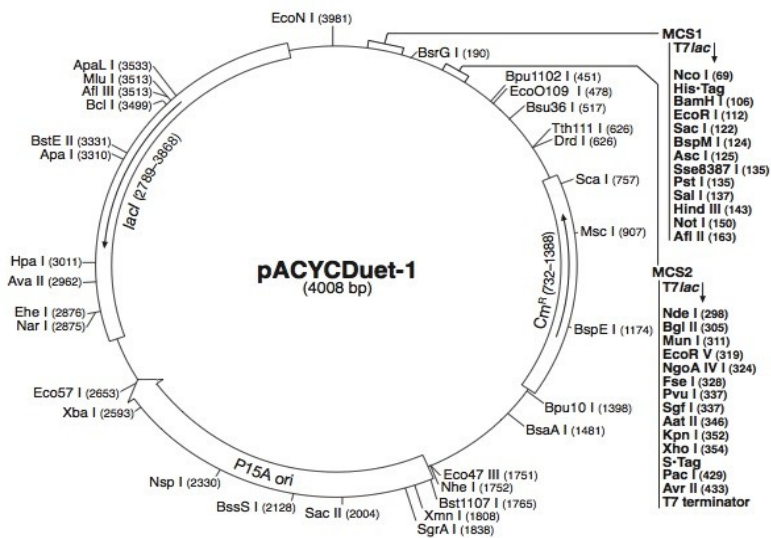
Il vettore pETDuet-1 è designato alla co-espressione di due geni *target*. Il vettore infatti contiene due siti di policloneggio (MCS1 e MCS2), ognuno dei quali è preceduto dall'operatore T7 promoter/lac e da un sito di legame per il ribosoma (RBS). Il vettore ospita anche il replicone ColE1 ed i geni *lacI* e *amp<sup>r</sup>*. Inoltre si può esprimere uno dei due geni *in frame* al 5' con la sequenza codificante per una coda di sei istidine (His•Tag), posta nel sito MCS1. Questo vettore può essere utilizzato in combinazione con altri vettori della serie Duet che presentino resistenze diverse agli antibiotici.



**pACYCDuet-1 (Novagen)**

pACYCDuet-1 permette la co-espressione di due geni, poiché è dotato di due MCS, ciascuno preceduto dall'operatore T7 promoter/lac e da un sito di legame per il ribosoma (RBS). Il vettore ospita inoltre un replicone P15A, il gene *lacI* e il gene codificante la resistenza al cloramfenicolo.

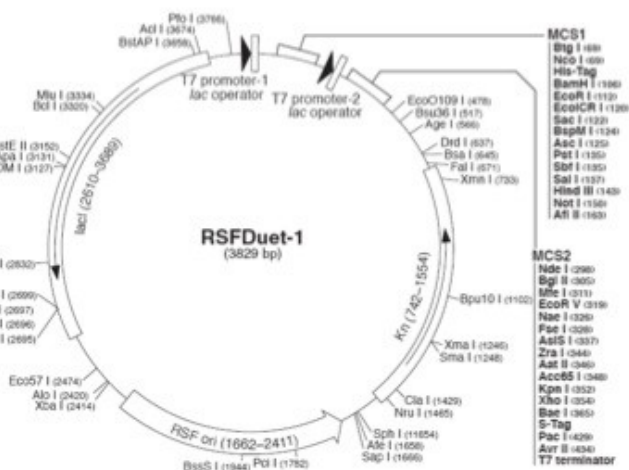
|  | Cat. No.  |
|--|-----------|
| pACYCDuet-1 DNA  | 71147-3   |
| <b>pACYCDuet-1 sequence landmarks</b>                      |           |
| T7 promoter-1  | 3992-4008 |
| T7 transcription start-1                                   | 1         |
| His•Tag <sup>®</sup> coding sequence                       | 83-100    |
| Multiple cloning sites-1<br>( <i>Nco</i> I- <i>Afl</i> II) | 69-168    |
| T7 promoter-2  | 214-230   |
| T7 transcription start-2                                   | 231       |
| Multiple cloning sites-2<br>( <i>Nde</i> I- <i>Avr</i> II) | 297-438   |
| S•Tag™ coding sequence                                     | 366-410   |
| T7 terminator  | 462-509   |
| P15A origin  | 1750-2662 |
| <i>cat</i> ( <i>Cm<sup>r</sup></i> ) coding sequence       | 732-1388  |
| <i>lacI</i> coding sequence                                | 2789-3868 |



## pRSFDuet-1 (Novagen)

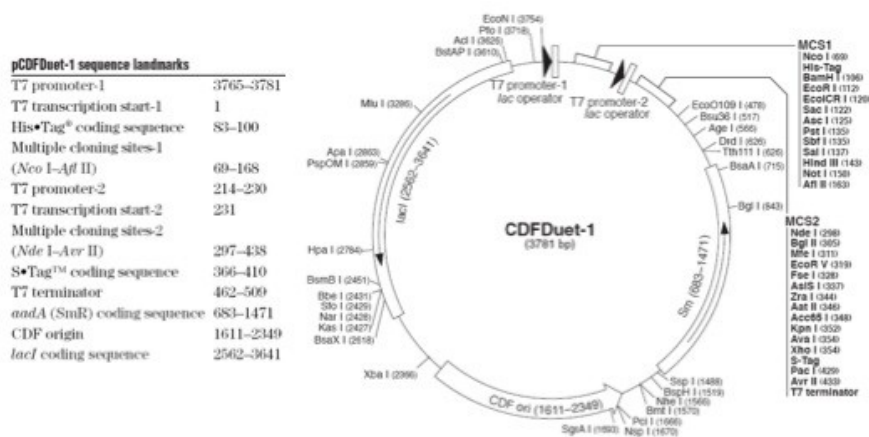
pRSFDuet-1 permette la co-espressione di due geni, poiché è dotato di due MCS - ciascuno preceduto dall'operatore T7 promoter/lac e da un sito di legame per il ribosoma (RBS) - che contengono rispettivamente le sequenze codificanti per (His•Tag) e (S•Tag), utilizzabili in fusione alle sequenze ricombinanti. Il vettore presenta inoltre il replicone RSF, derivato da RSF1030, i geni *lacI* e *Kn<sup>r</sup>*, per la resistenza alla kanamicina. Tale plasmide, in combinazione con altri vettori, può permettere l'espressione di 8 proteine contemporaneamente.

| <b>pRSFDuet-1 sequence landmarks</b>                       |           |
|--|-----------|
| T7 promoter-1  | 3582-3598 |
| T7 transcription start-1                                   | 1         |
| His•Tag <sup>®</sup> coding sequence                       | 83-100    |
| Multiple cloning sites-1<br>( <i>Nco</i> I- <i>Afl</i> II) | 69-168    |
| T7 promoter-2  | 214-230   |
| T7 transcription start-2                                   | 231       |
| Multiple cloning sites-2<br>( <i>Nde</i> I- <i>Avr</i> II) | 297-438   |
| S•Tag™ coding sequence                                     | 366-410   |
| T7 terminator  | 462-509   |
| kan ( <i>Kn<sup>r</sup></i> ) coding sequence              | 742-1554  |
| RSF origin   | 1662-2411 |
| <i>lacI</i> coding sequence                                | 2610-3689 |



## pCDFDuet-1 (Novagen)

pCDFDuet-1 è progettato per la co-espressione di due geni: ospita due MCS, preceduti ciascuno dal promotore T7lac, da un RBS, e contenenti rispettivamente le sequenze codificanti per (His•Tag) e (S•Tag). Il vettore porta inoltre un replicone CDF, derivante da CloDF13, il gene *lacI* e il gene *Sm<sup>r</sup>* per la resistenza all'antibiotico streptomicina/spectinomicina. Questo vettore può essere utilizzato in combinazione con altri vettori, per la co-espressione fino ad 8 proteine.



## METODI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

### Digestione di DNA con enzimi di restrizione

Le endonucleasi di restrizione sono enzimi di origine batterica che riconoscono specifiche sequenze di DNA e tagliano i legami fosfodiesterici interni del DNA lineare o circolare, esclusivamente in corrispondenza del sito di riconoscimento. Ognuno di questi enzimi ha un'attività ottimale a determinati valori di temperatura, salinità e pH, e la reazione richiede ioni  $Mg^{2+}$  come cofattore. In generale, le digestioni sono state effettuate a 37°C, utilizzando da 1 a 5 U di enzima per 1 µg di DNA ed il tampone consigliato dalla ditta fornitrice, in un volume finale di 10-40 µl.



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

L'analisi del DNA a doppio filamento è stata eseguita attraverso elettroforesi in gel di agarosio all'1% e allo 0.7% peso/volume (SIGMA), a seconda dell'analisi condotta. L'agarosio è stato sciolto in tampone TBE 0.5% (Tris 90 mM, acido borico 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8) e addizionato con 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 10 X (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 di seguire il fronte di corsa durante la migrazione elettroforetica. Il gel, immerso nel tampone TBE 0.5%, viene sottoposto ad una corrente compresa fra i 50-100V, a seconda delle dimensioni, fino a quando il fronte del colorante copre una lunghezza pari ai  $\frac{3}{4}$  della lunghezza del gel. Le dimensioni dei frammenti di DNA si stimano per confronto con un marcatore di peso molecolare, che nel nostro caso è il DNA del fago  $\lambda$  digerito con l'enzima di restrizione PstI (0.8 µg per corsa elettroforetica). Nel caso si allestisca una ligazione con uno dei digeriti sottoposti a corsa elettroforetica, il frammento di DNA selezionato viene purificato tagliando la banda di interesse dal gel e purificando il DNA tramite GenElute™ Gel Extraction Kit (SIGMA), seguendo il protocollo a questo allegato.

### **Ligazione**

L'inserimento dei frammenti di DNA nei diversi vettori di espressione – previa opportuna restrizione - è stato eseguito tramite l'uso dell'enzima T4 DNA ligasi. La ligasi del fago T4 è l'enzima più efficiente per clonare DNA, poiché è in grado di catalizzare la formazione di legami fosfodiesterici tra un terminale 3' ed uno 5' nel DNA a doppia elica. La reazione è stata effettuata nelle seguenti condizioni: 150 ng di vettore, una quantità di inserto tale da avere un rapporto molare 1:10 fra vettore e inserto, il tampone di reazione dell'enzima (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 225 µg/ml BSA), 5 U di T4 DNA ligasi, in un

volume finale di 10  $\mu$ l. L'incubazione è stata condotta per tutta la notte a 16°C.

## **Trasformazione batterica**

### **1. Trasformazione mediante elettroporazione (ceppi elettrocompetenti)**

L'elettroporazione è una tecnica che facilita la penetrazione di DNA esogeno in cellule batteriche. Queste, una volta rese elettrocompetenti, vengono sottoposte ad una corrente di breve durata che induce la formazione di pori transienti nelle membrane cellulari. Tale tecnica è la più indicata nel caso in cui il materiale plasmidico risulti complesso (soluzione di ligazione), in quanto garantisce la massima efficienza.

Ad un'aliquota di coltura batterica scongelata in ghiaccio viene aggiunto 1  $\mu$ l di soluzione di ligazione. La miscela viene trasferita in una apposita cuvetta da elettroporatore pre-raffreddata in ghiaccio. L'elettroporatore viene adeguatamente programmato e, dopo lo shock elettrico, vengono immediatamente aggiunti ai batteri 0.9 ml di SOC. La coltura batterica trasformata viene trasferita in una eppendorf sterile e incubata per un'ora a 37°C in agitazione a 180 rpm. Infine, i batteri vengono piastrati su terreno solido selettivo LB, in presenza dell'antibiotico opportuno e fatti crescere a 37°C per tutta la notte.

### **2. Trasformazione chimica**

La trasformazione chimica permette l'introduzione di DNA plasmidico in cellule precedentemente rese chemiocompetenti. Tale caratteristica è permessa da un pre-trattamento delle cellule con  $\text{CaCl}_2$ : la presenza di ioni bivalenti in una soluzione mantenuta in ghiaccio favorisce l'ingresso del DNA esogeno, una volta aggiunto alla sospensione batterica.

Pertanto, un'aliquota di batteri competenti viene addizionata con la soluzione di trasformazione, contenente il plasmide (1-5  $\mu$ l). La miscela viene incubata per 30 minuti in ghiaccio, quindi per 90 secondi a 42°C, e trasferita nuovamente in ghiaccio, provocando in questo modo uno shock termico, che rende le cellule batteriche permeabili al DNA. Vengono immediatamente aggiunti 800  $\mu$ l di SOC e la coltura batterica trasformata viene incubata per un'ora a 37°C in agitazione a 180 rpm. Infine, i batteri vengono piastrati su terreno solido selettivo LB in

presenza dell'antibiotico opportuno e fatti crescere a 37°C per tutta la notte.

## **Purificazione di DNA plasmidico da colture batteriche**

### **1. Metodo veloce – estrazione con etanolo**

Un campione di 2 ml di sospensione batterica satura viene centrifugato in una microcentrifuga per 2 minuti alla massima velocità. Il pellet viene risospeso in 100 µl di soluzione di risospensione (glucosio 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, pH 8). Si aggiungono quindi 200 µl della soluzione di lisi (NaOH 200 mM, SDS 1%), mescolando, delicatamente, per inversione; l'incubazione non deve superare i 5 minuti. Vengono poi aggiunti 150 µl di soluzione di neutralizzazione (potassio acetato 3 M, acido acetico 11,5%). Si centrifuga per 10 minuti alla massima velocità. In questo modo, il DNA genomico co-precipita con i detriti cellulari, lasciando il DNA plasmidico nel surnatante. Questo viene recuperato e centrifugato per 10 minuti alla massima velocità. Il surnatante viene nuovamente recuperato e trasferito in provette pulite nelle quali viene aggiunto un volume di etanolo 100% pari al doppio del volume del surnatante. La soluzione viene fatta quindi riposare almeno 20 minuti a -20°C. Il campione viene poi centrifugato per 15 minuti a 4°C alla massima velocità: il surnatante viene eliminato e il pellet lavato con 500 µl di etanolo 70%, senza risospenderlo. Si centrifuga nuovamente per 10 minuti a 4°C alla massima velocità.

Il surnatante viene aspirato e il pellet viene lasciato asciugare in condizioni di sterilità. Una volta asciutto, il pellet viene risospeso in 20 µl di acqua sterile e conservato a -20°C.

### **2. Metodo con colonnine**

Da un campione di 2-4 ml di batteri trasformati fatti crescere tutta la notte viene purificato il DNA plasmidico utilizzando il kit GenElute® Plasmid Miniprep Kit (SIGMA), seguendo il protocollo della ditta fornitrice.

## METODI BIOCHIMICI

### **Induzione della proteina ricombinante**

Una colonia di cellule trasformate viene inoculata in terreno liquido selettivo e portata a saturazione ponendola in agitazione a 37°C per tutta la notte. Quindi viene inoculato il terreno completo LB con un'aliquota della coltura in modo da ottenere una diluizione 1:50 del campione. Mentre la coltura viene mantenuta in agitazione a 37°C, la crescita cellulare viene monitorata prelevando campioni di 1 ml, analizzati mediante lo spettrofotometro, e di questi viene registrato il valore di OD alla lunghezza d'onda di 600 nm. Una volta raggiunto un valore di OD<sub>600</sub> pari a 0.5, vengono addizionati alla coltura Fe-citrato, L-cisteina alle concentrazioni di 2 mM, a cui segue un'incubazione di 15 minuti a 37°C in agitazione. Viene poi aggiunto isopropil-tio-β-D-galattopiranoside (IPTG) alla concentrazione di 1 mM, al fine di indurre l'espressione della proteina ricombinante. La coltura viene quindi lasciata crescere in aerobiosi a 30°C per tutta la notte.

### **French Pressure Cell Press**

La coltura indotta viene centrifugata a 4°C per 10 minuti a 4500 x g e il pellet viene risospeso nell'opportuno tampone di lisi. Il sistema French Pressure Cell Press è un dispositivo finalizzato alla rottura meccanica delle membrane cellulari. 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. Generalmente vengono eseguiti due cicli per ogni campione ottenuto.

### **Sonicazione**

La coltura indotta viene centrifugata a 4°C per 10 minuti a 4500 x g e il pellet viene risospeso nell'opportuno tampone di lisi. La punta del sonicatore viene immersa nella sospensione cellulare e si generano onde sonore ad alta frequenza (>20 kHz). Queste onde provocano la distruzione dei batteri per forze taglienti e

cavitazione. La sonicazione avviene sottoponendo le cellule a 10 cicli di 30 secondi ciascuno, intervallati da un minuto di pausa in ghiaccio.

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

Al termine di ogni incubazione con IPTG e prima che questo venga aggiunto alla coltura, viene prelevato 1 ml di sospensione batterica e ne viene misurata l'OD a 600 nm. Le cellule vengono quindi centrifugate in una microcentrifuga per 2 minuti a velocità massima (14000 x g), e il pellet risospeso in tampone SB 1X (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS 2%, glicerolo 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, blu di bromofenolo 0.1%), in una quantità pari a 100  $\mu$ l per ogni unità di OD. I campioni vengono bolliti per 10 minuti prima di essere sottoposti ad elettroforesi. I campioni derivanti dalla lisi cellulare e da ciascuno degli *steps* di purificazione vengono trattati aggiungendo tampone SB 2X e bolliti per 10 minuti prima del caricamento per la gel elettroforesi.

### **Purificazione delle proteine ricombinanti**

Le proteine ricombinanti e i complessi che esse stabiliscono con le proteine co-espresse vengono purificati secondo diverse metodologie cromatografiche. In ogni caso, al termine di ogni incubazione con IPTG, le sospensioni cellulari sono state centrifugate a 4000 x g a 4°C per 10 minuti; il pellet ottenuto è stato risospeso in un tampone di lisi, ottenuto aggiungendo Fe-ammoniosolfato, solfuro di sodio e DTT alle concentrazioni di 2 mM - necessari a favorire la formazione dei centri FeS - e gli inibitori di proteasi Pepstatina A (1  $\mu$ g/ml), Leupeptina (1  $\mu$ g/ml), Antipaina (1  $\mu$ g/ml), PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro) 1mM- al fine di mantenere l'integrità del campione proteico – ad un tampone salino - di composizione variabile a seconda del tipo di cromatografia. La sospensione è quindi sottoposta a rottura meccanica mediante French Press o sonicazione, al termine delle quale la miscela (lisato totale) viene sottoposta a centrifugazione per 15 minuti a 14000 x g a 4°C. Le frazioni solubile ed insolubile ottenute da quest'ultimo passaggio vengono diversamente trattate per i saggi biochimici riportati in seguito.

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

La purificazione delle proteine ricombinanti espresse in fusione ad un *tag* esaistidinico è stata condotta utilizzando la resina *HIS-Select Nickel Affinity Gel (SIGMA)*. Tale sistema cromatografico prevede l'impiego di una matrice di gel di agarosio a cui si trovano legati covalentemente gruppi chelanti NTA (acido nitriltriacetico), in grado di immobilizzare ioni metallici, in questo caso nichel  $Ni^{2+}$ . Per valori di pH superiori a 7.0, i gruppi imidazolici del *tag* esaistidinico della proteina ricombinante, deprotonandosi, stabiliscono legami di coordinazione con gli ioni  $Ni^{2+}$ , permettendone l'ancoraggio alla matrice.

La resina viene equilibrata con 20 volumi di tampone salino specifico per la resina (Tris-HCl 25 mM, NaCl 0.2 M pH 8.0) per semplice filtrazione. La resina viene incubata nei rapporti previsti dal protocollo del sistema cromatografico con la frazione solubile del lisato totale all'interno di una provetta di vetro, mantenuta in leggera agitazione per un'ora a 4°C. Al termine dell'incubazione, la miscela (resina e frazione solubile del lisato totale) viene trasferita in una colonnina da cromatografia (Bio-Rad), e viene raccolto il *flow through*, la frazione contenente le proteine che non hanno interagito con la matrice, per semplice eluzione. La resina viene sottoposta ad un lavaggio utilizzando 10 volumi di tampone di lavaggio. L'eluzione è stata eseguita con 5 volumi di tampone salino specifico per la resina, contenente una concentrazione pari a 200 mM di imidazolo. L'eluato è stato raccolto in frazioni di 0.5 ml e un'aliquota da 50 µl di ognuno è stata trattata con tampone SB 2X per la corsa elettroforetica. Il tampone di lavaggio (Tris-HCl 25 mM, NaCl 0.2 M pH 8.0) contiene gli inibitori di proteasi: Pepstatina A (1 µg/ml), Leupeptina (1 µg/ml), Antipaina (1 µg/ml) e PMSF (fenil-metil- sulfonil-fluoruro) 1mM.

### **Cromatografia di affinità mediante resina Strep-Tactin® (IBA)**

La purificazione delle proteine ricombinanti espresse in fusione allo Strep-tag II è stata condotta utilizzando la resina Strep-Tactin® (IBA). Il sistema cromatografico Strep-Tactin/Strep-tag II sfrutta la nota e robusta interazione tra la biotina e la streptavidina. Il peptide Strep-tag II è ingegnerizzato in modo da inserirsi

stabilmente nella tasca di legame della streptoavidina: mimando l'interazione della biotina, permette l'ancoraggio della proteina ricombinante che ospita il *tag* opportuno per l'ancoraggio alla resina. Questa, è composta da una matrice di sefarosio a cui è stata accoppiata una forma di streptavidina, denominata Strep-Tactin, modificata in modo da ottimizzarne l'affinità per la biotina, che risulta circa cento volte superiore.

La resina viene equilibrata con 20 volumi di Buffer W (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM pH 8.0) per semplice filtrazione; quindi viene incubata con la frazione solubile del lisato totale, nei rapporti previsti dal protocollo del sistema cromatografico. La soluzione viene trasferita all'interno di una provetta di vetro, mantenuta in leggera agitazione per un'ora a 4°C. Al termine dell'incubazione, la miscela (resina e frazione solubile del lisato totale) viene trasferita in una colonnina da cromatografia (Bio-Rad), e viene raccolto il *flow through*, la frazione contenente le proteine che non hanno interagito con la resina, conservato per successive analisi. La cromatografia può quindi procedere con il lavaggio della colonna con 5 volumi di tampone di lavaggio, che ha la funzione di eliminare le proteine contaminanti che hanno interagito in modo aspecifico con la resina, e il volume filtrato viene in parte utilizzato per la successiva analisi SDS-PAGE. Infine, la resina viene eluita con 6 volumi di tampone di eluizione (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, (desthio)biotina 2,5 mM pH 8). L'eluato è stato raccolto in frazioni da 0.5 ml e un'aliquota da 50 µl di ognuno è stata trattata con tampone SB 2X per la corsa elettroforetica.

Il tampone di lavaggio (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM pH 8.0) contiene gli inibitori di proteasi: Pepstatina A (1µg/ml), Leupeptina (1µg/ml), Antipaina (1µg/ml), PMSF (fenil-metil- sulfonil-fluoruro) 1mM.

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

Per l'esclusione dimensionale è stata utilizzata la colonna Superdex 200 HR (*High Resolution*) 10/30 (*Amersham Pharmacia Biotech*), le cui specifiche sono riportate in tabella:

|                             |                                  |
|-----------------------------|----------------------------------|
| Composizione della matrice  | Destrano e Agarosio cross-linked |
| Dimensione delle particelle | 13 $\mu\text{m}$                 |
| Volume del letto            | 24 ml                            |
| Intervallo di separazione   | 10 000 - 600 000 Da              |
| Limite di esclusione        | 1 300 000 Da                     |
| Intervallo di pH            | 3 – 12                           |
| Pressione massima tollerata | 15 bar (1.5 mPa)                 |

Le frazioni eluite dalla cromatografia di affinità sono state raccolte in un unico *pool* e concentrate in un volume di tampone di lisi (NaCl 0.2 M, Tris-HCl 0.025 M, pH 8), variabile a seconda dell'esperimento condotto. Il campione è stato caricato in *loop* e automaticamente iniettato nella colonna contenente la resina scelta, la quale è stata precedentemente lavata con acqua per eliminare l'EtOH in cui viene conservata, ed equilibrata con il tampone che costituisce il solvente del campione proteico. Le proteine uscenti sono state raccolte automaticamente da un frazionatore, in aliquote di 2 ml.

### **Determinazione del peso molecolare di una specie proteica**

I cromatogrammi risultanti dalla cromatografia ad esclusione dimensionale sono costituiti da picchi corrispondenti a sostanze con pesi molecolari diversi. La posizione relativa di ciascun picco è espressa dal coefficiente di distribuzione ( $K_r$ ) del soluto fra la fase mobile e la fase stazionaria:

$$K_r = (V_r - V_0) / V_i$$

$V_r$  = volume di eluizione/ritenzione del picco;

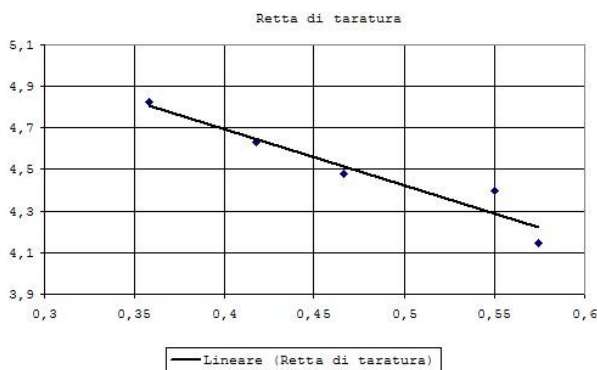
$V_0$  = volume della fase mobile al di fuori dei pori;

$V_i$  = volume della fase mobile contenuta entro i pori delle particelle di riempimento;

Poiché esiste una relazione lineare tra il volume di eluizione relativa di una certa sostanza e il logaritmo della sua massa molecolare, è possibile allestire una retta di taratura utilizzando i valori  $K_r$  registrati per proteine di peso molecolare noto, al fine di evincere il peso molecolare della specie in funzione del volume di



eluizione per essa registrato. Eseguendo una cromatografia di calibrazione si ottengono i valori Kr per le proteine di peso molecolare noto, e a partire da questi si ricava la retta di taratura, riportata nel grafico seguente:



| Proteina             | PM (Da) | Log (PM) | Kr     | Vr (ml) |
|----------------------|---------|----------|--------|---------|
| Ribonucleasi A       | 14000   | 4.1461   | 0.5742 | 17.2    |
| Chemiotripsinogeno A | 25000   | 4.3979   | 0.5498 | 16.81   |
| Anidraasi Carbonica  | 30000   | 4.4771   | 0.4659 | 14.47   |
| Ovoalbumina          | 43000   | 4.6335   | 0.4177 | 14.7    |
| Lattalbumina         | 67000   | 4.8261   | 0.3582 | 13.75   |

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

Le proteine sono state separate mediante una elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12%, in presenza di SDS. Il gel di separazione (*running gel*) è composto da acrilammide al 12%, Tris-HCl 0.37 M, pH 8.8, SDS 0.1%, TEMED e APS, aggiunti alla fine, che catalizzano la reazione di polimerizzazione dell'acrilammide. Lo *stacking gel* (in cui si trovano i pozzetti e in cui le bande si comprimono inizialmente prima dell'effettiva separazione) è composto da acrilammide al 4%, Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, SDS 0.1%, a cui vengono aggiunti TEMED e APS. Il tampone di corsa è composto da Tris 25 mM, glicina 192 mM, 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*.

## **Western Blotting**

Effettuata la corsa elettroforetica dei campioni in gel di poliacrilammide, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Nitrocellulose Blotting Membranes 0.50  $\mu$ m, PALL Life Science). La membrana viene immersa nel tampone di trasferimento e posta sopra un supporto di plastica contenente una spugnetta e due strati di carta assorbente; sopra la membrana viene posizionato il gel, alla quale viene fatto aderire con cura. A questo vengono sovrapposti nell'ordine altri 2 strati di carta assorbente e una spugnetta; il supporto viene poi chiuso e inserito nell'apposita apparecchiatura per il trasferimento, contenente il tampone ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3 mM,  $\text{NaHCO}_3$  10 mM, metanolo 10% volume/volume). Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana viene condotto per tutta la notte sotto agitazione magnetica a 4°C, applicando un voltaggio costante pari a 25 V. Diversamente, il trasferimento può avvenire in un tempo limitato di 90 minuti, sottoponendo il dispositivo ad un voltaggio costante di 40V.

## **Saggio Immunologico**

Le proteine, una volta trasferite sulla membrana di nitrocellulosa, possono essere rilevate in modo approssimativo eseguendo una colorazione reversibile con rosso Ponceau, che permette di verificare l'efficienza del trasferimento. In seguito, le proteine *target* vengono rilevate mediante l'utilizzo di anticorpi specifici. Si procede tagliando la membrana al fine di separare le corsie contenenti campioni che richiedono lo sviluppo con anticorpi diversi. A seconda dei casi, se si desidera verificare la presenza di proteine fuse allo Strep-tag II viene impiegato un anticorpo monoclonale anti Strep-tag II prodotto da IBA BioTAGnology, diluito nel tampone in tampone PBS 1X (*Phosphate Buffer Saline*: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2mM) fino alla concentrazione finale di 100% g/ml. Nel caso di proteine fuse con l'His-tag è stato impiegato un anticorpo monoclonale anti His-tag prodotto da SIGMA-Aldrich.

Il protocollo prevede il seguente trattamento della membrana di nitrocellulosa su cui sono state trasferite le proteine:

- saturazione dei siti non occupati da proteine: immersione della membrana per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione contenente latte

scremato in polvere 10% (peso/volume) sciolto in TBS 1X (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4);

- cinque lavaggi con TTBS 1X (TBS + TWEEN 20 2.5% v/v) per 20 minuti totali;
- incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo primario diluito 1:1000 in TTBS (TBS + TWEEN 20 2.5% v/v), nel caso in cui l'anticorpo monoclonale sia anti Strep-tag II; si utilizza, invece, una diluizione 1:2000 in TTBS nel caso si utilizzi l'anticorpo monoclonale anti His-tag;
- cinque lavaggi con TTBS per 20 minuti totali;
- incubazione per 1 ora con l'anticorpo secondario (anti-mouse IgG, coniugato alla perossidasi di rafano, *Kirkegaard & Perry Laboratory*), diluito 1:10000 in TTBS;
- cinque lavaggi con TTBS per 20 minuti totali;
- incubazione per 5 minuti con una soluzione contenente luminolo e perossido di idrogeno in proporzioni 1:1, substrati chemiluminescenti che vengono ossidati dalla perossidasi, producendo un segnale luminoso (*Super Signal®West Pico Chemiluminescent Substrate*, PIERCE). I reagenti, a contatto con la membrana, evocano una reazione di chemiluminescenza in corrispondenza della perossidasi, e perciò in corrispondenza del complesso antigene-anticorpo ove l'enzima è posizionato. La membrana viene sovrapposta ad una lastra autoradiografica, che viene impressionata dall'emissione di luce. I tempi di esposizione della membrana alla lastra sono variabili. La lastra viene quindi immersa nella soluzione di sviluppo (Kodak), lavata con acqua, e quindi mantenuta nella soluzione di fissaggio (Kodak) per un tempo arbitrario.

## ABBREVIAZIONI

APS: persolfato di ammonio  
BCA: acido bicinconinico  
BSA: albumina di siero bovino  
DMSO: dimetilsolfossido  
dNTP : deossiribonucleotidi  
DTT: ditioneitrato  
EDTA: acido etilen-diammino-tetraacetico  
IPTG: isopropil-tio- $\beta$ -D-galattopiranoside  
LB<sub>CSK</sub>: terreno Luria-Bertani addizionato di cloramfenicolo, streptomicina ed kanamicina;  
MPD: 2-metil-2,4-pentanodiolo  
NTA: acido nitriltriacetico  
PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoruro  
SDS: sodio-dodecil-solfato  
TBE: Tris-borato/EDTA  
TBS: Tris Buffered Saline  
TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diammina Tris: Tris-(idrossimetil)-metilammina  
TTBS: TWEEN 20-Tris Buffered Saline  
TWEEN 20: polyoxyethylene sorbitan monolaureate

## BIBLIOGRAFIA

- Balat M. (2009) *Production of Hydrogen via Biological Processes*. Energy Sources 31:1802–1812
- Brazzolotto X., Rubach J. K., Gaillard J., Gambarelli S., Atta M. and Fontecave M. (2006) *The [FeFe]-Hydrogenase Maturation Protein HydF from Thermotoga maritima Is a GTPase with an Iron-Sulfur Cluster*. The Journal of Biological Chemistry 281:769-774
- Cohen J., Kim K., King P., Seibert M., Schulten K. (2005) *Finding gas diffusion pathways in proteins: application to O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> transport in Cpl [FeFe]-hydrogenase and the role of packing defects*. Structure 13:1321-1329
- Cendron L., Berto P., D'Adamo S., Vallese F., Govoni C., Posewitz M. C., Giacometti G. M., Costantini P. and Zanotti G. (manoscritto in corso di revisione) *Crystal Structure of HydF Scaffold Protein provides Insights into [FeFe]-hydrogenases maturation*.
- Das D., Veziroglu T. N. (2008). *Advances in biological hydrogen production processes*. International Journal of Hydrogen Energy 33:6046-6057
- Das D., Dutta T., Nath K., Kotay S. M., Das A. K. and Veziroglu N. T. (2006) *Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production*. Current Science 90(12)
- Darensbourg M. Y., Bethel R. D., Singleton M. L. (2010) *The Modular Assembly of Clusters Is the Natural Synthetic Strategy for the Active Site of [FeFe]-Hydrogenase*. Angew. Chem. Int. Ed. 49:8567–8569
- Driesener R. C., Challand M. R., McGlynn S. E., Shepard E. M., Boyd E. S., Broderick J. B., Peters J. W. and Roach P. L. (2010) *[FeFe]-Hydrogenase Cyanide Ligands Derived From S-Adenosylmethionine-Dependent Cleavage of Tyrosine*. Angew. Chem. Int. Ed. 49:1687–1690
- Fontecilla-Camps J. C., Volbeda A., Cavazza C., Nicolet Y. (2007) *Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases*. Chemical Review 107 (10): 4273-4303
- Frey M. (2002) *Hydrogenases: hydrogen-activating enzymes*. Chem. Bio. 3:153-160
- Ghirardi M. L., Posewitz M. C., Maness P. C., Dubini A., Yu J., Seibert M. (2007) *Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms*. Annu. Rev. Plant. Biol. 58:71-91

Hallenbeck P. C., Benemann J. R. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 27:1185–1193

King P. W., Posewitz M. C., Ghirardi M. L., Seibert M. (2006) *Functional studies of [FeFe]-hydrogenase maturation in Escherichia coli biosynthetic system*. *J. Bacteriology* 188 (6):2163-2172

P. M. Vignais and A. Colbeau (2004) *Molecular Biology of Microbial Hydrogenases*. *Curr. Issues Mol. Biol.* 6:159-188

Lubitz W., Reijerse E., Van Gastel M. (2007) *[NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases studied by advanced magnetic resonance techniques*. *Chemical Reviews* 107:4331-4365

Manish S., Banerjee R. (2008) *Comparison of biohydrogen production processes* *International Journal of Hydrogen Energy* 33:279–286

McGlynn S. E., Mulder D. W., Shepard E. M., Broderick J. B., Peters J. M., (2009) *Hydrogenase cluster biosynthesis: organometallic chemistry nature's way*. *Dalton Transactions* 22:4274–4285

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

McGlynn S. E., Ruebush S. S., Naumov A. V., Nagy L. E., Dubini A., King P. W., Broderick J. B., Posewitz M. C., Peters, J. W. (2007) *In vitro activation of [FeFe]-hydrogenases: New insights into hydrogenase maturation*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12:443-447

Meyer J. (2007) *[FeFe]-hydrogenases and their evolution: a genomic perspective*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64:1063 – 1084

Melis A., Happe T. (2001) *Hydrogen production. Green algae as a source of energy*. *Plant Physiology* 127:740–748.

Mulder D. W., Ortillo D. O., Gardenghi J. D., Naumov A. V., Ruebush S. S., Szilagy R. K., Huynh B., Broderick J. B., Peters J. W. (2009) *Activation of HydA<sup>AEFG</sup> Requires a Preformed [4Fe-4S] Cluster*. *Biochemistry* 48:6240-6248

Mulder D. W., Boyd E. S., Sarma R., Lange R. K., Endrizzi J. A., Broderick J. B. and Peters J. W. (2010) *Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydA<sup>AEFG</sup>*. *Nature* 465:248-252

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(27):18861-72

Nicolet Y., Piras C., Legrand P., Hatchikian C. E., Fontecilla-Camps J. C. (1998) *Desulfovibrio desulfuricans iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center*. Structure 7:13-23

Nicolet Y., Fontecilla-Camps J. C., Amara P., Cavazza C., Volbeda A. (2009) *Structure-function relationships of anaerobic gas-processing metalloenzymes*. Nature 460: 814-822

Swanson K. D., Duffus B. R., Beard T. E., Peters J. W. and Broderick J. B (2011) *Cyanide and Carbon Monoxide Ligand Formation in Hydrogenase Biosynthesis*. Eur. J. Inorg. Chem. (935–947)

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. 279:25711-25720

Rubach J. K., Brazzolotto X., Gaillard J., Fontecave M. (2005) *Biochemical characterization of the HydE and HydG iron-only hydrogenase maturation enzymes from Thermotoga maritima*. FEBS Letters 579:5055–5060

Pilet E., Nicolet Y., Mathevon C., Douki T., Fontecilla-Camps J. C., Fontecave M. (2009). *The role of the maturase HydG in [FeFe]-hydrogenase active site synthesis and assembly*. FEBS Lett. 583:506-11

Shepard E. M., McGlynn S. E., Bueling, S. E., Grady-Smith 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. Nat. Acad. Sci. U S A 107(23):10448-53

Shima S., Pilak O., Vogt S., Schick M., Stagni M. S., Meyer-Klaucke W., Warkentin E., Thauer R. K., Ermeler U. (2008) *The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site*. Science 321: 572-575

Tosatto S. C. E., 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*. International journal of hydrogen energy 33:570-578

Thauer R. K., Kaster A., Goenrich M., Schick M., Hiromoto T. and Shima S. (2010) *Hydrogenases from Methanogenic Archaea, Nickel, a Novel Cofactor, and H<sub>2</sub> Storage*. Annual Review of Biochemistry 79:507–36