



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA
E BIOCHIMICA DELL'UOMO E DELL'AMBIENTE**

(XXIII CICLO 2008-2010)

Settore scientifico disciplinare di afferenza
BIO/10

Coordinatore: Prof. Emanuele Sanna

**Nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi dal lattice di
Euphorbia characias e dai frutti di *Opuntia ficus indica*:
purificazione e caratterizzazione**

Tutor:

Prof.ssa Rosaria Medda

Tesi di dottorato

Dott.ssa Delia Spanò

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

Scuola di Dottorato di Ricerca in “Biologia e Biochimica dell’uomo e dell’ambiente”.

La Dott.ssa Spanò ha svolto la sua attività di studio e ricerca presso la sezione di Biochimica e Biologia Molecolare del Dipartimento di Scienze Applicate ai Biosistemi. In qualità di dottoranda è stata inserita in un gruppo di ricerca, diretto dal Prof. Giovanni Floris, che da diverso tempo studia enzimi estratti da fonti animali e vegetali. Gli studi recenti sono stati rivolti ad una pianta perenne presente nel bacino del mediterraneo, l'*Euphorbia characias* dal cui lattice sono stati estratti, purificati e caratterizzati due enzimi, una amino ossidasi (ELAO: *Euphorbia latex amine oxidase*) e una perossidasi (ELP: *Euphorbia latex peroxidase*) di cui sono state studiate le proprietà cinetiche e molecolari. Le sequenze nucleotidiche dei geni codificanti per i due enzimi e le relative sequenze aminoacidiche sono state depositate nella banca dati genica (GeneBank). Lo

studio sull'*Euphorbia characias* è proseguito con l'identificazione dei geni codificanti per altre proteine come una catalasi, una aldeide deidrogenasi e una calmodulina. La relazione tra queste proteine e il loro ruolo nel lattice della pianta sono stati oggetto dei primi studi della dottoranda (Pintus et al. 2010).

La dottoranda, nella sua prima fase di lavoro ha applicato le principali tecniche biochimiche di purificazione di proteine per ottenere, in forma pura e con una buona resa, l'amino ossidasi e la perossidasi dal lattice dell'*Euphorbia characias*. Inizialmente la Dott.ssa Spanò si è dedicata alla caratterizzazione cinetica di tali enzimi. Ha infatti studiato il ruolo degli ioni nichel nella modulazione dell'attività catalitica della ELP (Pintus et al. 2008), il ruolo della tiramina come substrato sia della ELAO che della ELP (Mura et al. 2008), il tiocianato come substrato della ELP che viene metabolizzato secondo due diverse vie in funzione della presenza o meno di ioni calcio (Pintus et al. 2010) e infine, il ruolo del

trifluoroetanolo sulla conformazione della ELP (Pintus et al. 2008). Inoltre, per quanto riguarda la ELAO, la dottoranda ha collaborato allo studio riguardante l'effetto di dialdeidi, prodotte dall'ossidazione di poliamine catalizzata dalla ELAO, su colture di leishmanie, mettendo in evidenza un loro ruolo inibitorio sulla crescita del parassita (Massa et al. 2010). Questo studio ha permesso di ampliare le conoscenze riguardanti il ruolo delle amino ossidasi a rame sul metabolismo delle amine biogene (Agostinelli et al. 2009).

La seconda fase della ricerca della Dott. Spanò ha riguardato l'individuazione di altre proteine enzimatiche nel lattice dell' *Euphorbia*. Avendo riscontrato attività fosfoesterasiche, la dottoranda ha messo a punto un protocollo di purificazione che ha permesso di isolare due nuovi enzimi:

- ✓ una nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi (ELNPP: *Euphorbia* latex nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) (Pintus et al.

2009), descritta nel lavoro di tesi, che è stata caratterizzata in termini di optimum di pH, di temperatura, substrati, inibitori, costanti cinetiche (K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M);

- ✓ una fosfatasi acida (Pintus et al. submitted) di cui è stata effettuata la caratterizzazione cinetica e molecolare (GeneBank accession number HM641814). I risultati preliminari di tale lavoro sono stati presentati sotto forma di poster al congresso “Proteine 2010” della società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare.

Nella terza fase di ricerca la dottoranda si è occupata dei frutti dell'*Opuntia ficus indica* nei quali è stata riscontrata l'attività pirofosfatasica/fosfodiesterasica. Tale attività enzimatica è stata misurata nei frutti in diversi stadi di maturazione. Dal confronto del contenuto di proteine, delle unità enzimatiche e dell'attività specifica nei frutti raccolti da giugno a settembre, si mette in evidenza un incremento dell'attività enzimatica con il progredire della

maturazione. Tale attività decresce poi con la maturazione eccessiva del frutto. Queste osservazioni iniziali hanno indotto la dottoranda a studiare dettagliatamente questo enzima. Ha quindi messo a punto un protocollo per estrarlo e purificarlo ed ha poi proseguito con la caratterizzazione cinetica: optimum di pH, di temperatura, substrati, inibitori, costanti cinetiche. Questo studio, descritto nel lavoro di tesi, è stato presentato sotto forma di poster al congresso “Proteine 2010” della società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare ed è stato oggetto di una pubblicazione (Spanò et al. 2010).

Nel lavoro di tesi la dottoranda descrive quindi la purificazione e la caratterizzazione dei due enzimi nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi, estratti da due fonti diverse e discute le proprietà comuni e le differenze, ipotizzando i loro possibili ruoli fisiologici che potranno essere puntualizzati solo mediante ulteriori indagini sulla composizione

biochimica dell'ambiente in cui tali enzimi esplicano la loro attività catalitica.

La dottoranda Delia Spanò, spinta da un entusiasmo e una operosità notevoli, ha proficuamente attinto dall'esperienza del gruppo di lavoro con cui ha collaborato, esprimendo ottime capacità di ricerca individuale e di gruppo, documentata dalla ampia e qualificata produzione scientifica. Le spiccate attitudini relazionali sono emerse anche dalle sue esperienze didattiche con gli studenti e con i tirocinanti che ha coinvolto nella sua attività di ricerca.

Il Direttore

A handwritten signature in blue ink on a light green rectangular background. The signature is stylized and appears to be 'D. Spanò'.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	- 9 -
1.1. Classificazione delle nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi	- 9 -
1.2. Domini strutturali e sequenze consenso delle NPP	- 14 -
1.3. Meccanismo catalitico delle NPP.....	- 22 -
1.4. Substrati e inibitori delle NPP.....	- 26 -
1.5. Autofosforilazione	- 30 -
1.6. Funzioni fisiologiche e patofisiologiche delle nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi.....	- 32 -
<i>a) Controllo della mineralizzazione.</i>	- 32 -
<i>b) Riciclo dei nucleotidi.</i>	- 35 -
<i>c) Motilità delle cellule tumorali.</i>	- 36 -
<i>d) NPP1 nel diabete mellito.</i>	- 37 -
<i>e) Ruolo intracellulare.</i>	- 39 -
1.7. Nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi vegetali	- 41 -
<i>a) Ruoli delle NPP vegetali.</i>	- 51 -
1.8. Scopo della ricerca.....	- 53 -
2. MATERIALI E METODI.....	- 61 -
2.1. Saggio enzimatico.....	- 61 -
2.2. L'elettroforesi	- 62 -
2.3. Gel filtrazione e determinazione della massa molecolare -	63 -
2.4. Determinazione della concentrazione delle proteine.....	- 64 -
2.5. Determinazione del fosfato inorganico	- 65 -
2.6. Spettroscopia.....	- 66 -
2.7. Deglicosilazione.....	- 66 -
2.8. Analisi dei prodotti di reazione utilizzando diversi substrati	- 68 -
2.9. Lo stopped flow	- 69 -
3. RISULTATI.....	- 77 -

3.1. Purificazione, determinazione della massa molecolare e del contenuto in carboidrati della ELNPP	- 77 -
3.2. Purificazione, determinazione della massa molecolare e del contenuto in carboidrati della ONPP	- 86 -
3.3. Parametri cinetici della reazione della ELNPP e della ONPP	- 99 -
3.4. Altri substrati idrolizzati dalla ELNPP	- 101 -
3.5. Altri substrati idrolizzati dalla ONPP	- 107 -
3.6. Effetto del pH	- 113 -
3.7. Effetto della temperatura	- 122 -
3.8 . Contenuto dei metalli ed effetto dell'EDTA.....	- 129 -
3.9. Studio dello stato pre-stazionario	- 135 -
3.10. Determinazione dei residui di istidina e dei gruppi sulfidrilici della ELNPP	- 140 -
4. CONCLUSIONI	- 144 -
BIBLIOGRAFIA	- 149 -
ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI	- 168 -
SEQUENZE DEPOSITATE NELLA BANCA DATI NCBI	- 172 -

1. INTRODUZIONE

1.1. Classificazione delle nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi

Le fosfodiesterasi idrolizzano il diestere dell'acido fosforico formando un fosfomonoestere (Razzell, 1963). Questi enzimi possono essere classificati, in accordo con la natura del loro substrato, in nucleotide e lipide fosfodiesterasi (Stefan, 1999).

Le nucleotide fosfodiesterasi si distinguono in:

- ✓ nucleotide-ciclico fosfodiesterasi,
- ✓ acidi nucleici fosfodiesterasi (ribonucleasi e deossiribonucleasi),
- ✓ nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi o NPP.

Le NPP rappresentano un gruppo di proteine ampiamente distribuito e filogeneticamente

conservato. *In vitro* questi enzimi idrolizzano sia il legame pirofosforico (ad esempio nell'ATP) che quello fosfodiesterico (ad esempio negli oligonucleotidi) formando nucleosidi 5'-monofosfato. La nomenclatura “nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi” è stata proposta recentemente e si riferisce sia ai substrati (nucleotidi e loro derivati), che alla reazione catalizzata da questi enzimi (idrolisi del legame pirofosforico o fosfodiesterico) (Zimmermann et al., 2000).

La famiglia delle NPP consiste di 7 ecto-enzimi strutturalmente correlati che sono numerati in accordo con l'ordine con cui sono stati scoperti (NPP1-7) e tra questi enzimi, quelli meglio caratterizzati sono gli ecto-enzimi NPP1 (PC-1), NPP2 (autotassina) e NPP3.

La **NPP 1** è stata inizialmente scoperta come marker di superficie degli anticorpi secreti dai linfociti B, da cui deriva il nome di Plasma cellule-1 o PC-1 (Takahashi et al., 1970).

La **NPP2** si presenta in 3 diverse forme α , β , γ . La **NPP2 α** o autotassina è una glicoproteina che viene secreta dalle cellule del melanoma umano e stimola la motilità di queste cellule già a concentrazioni molto basse (Stracke et al., 1992). Recentemente la **NPP2 β** , è stata clonata dal teratocarcinoma umano (Lee et al., 1996). La NPP2 β differisce dalla NPP2 α per l'assenza di 52 residui nella porzione centrale. Infine la **NPP2 γ** è stata clonata dal cervello di topo e differisce dalla NPP2 β per la presenza di 25 residui in più nel dominio C-terminale del polipeptide (Narita et al., 1994).

La **NPP3** è una glicoproteina di 130 kDa associata alla membrana plasmatica (Deissler et al., 1995).

Le **NPP4-5** sono state descritte come nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi putative sulla base dell'omologia del loro dominio catalitico con quello delle NPP1-3. Infatti i residui che sono noti essere essenziali per l'attività catalitica delle NPP1-3, sono conservati nelle NPP4-5, ma è ancora da stabilire se

quest'ultime siano dotate di una vera e propria attività nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi.

La sequenza della **NPP6** codifica per una proteina transmembrana contenente un dominio catalitico che mostra una significativa omologia con quello delle NPP4, 5 e 7. La proteina ricombinante NPP6 idrolizza efficacemente il substrato classico per la fosfolipasi C, cioè la fosforilcolina *p*-nitrofenolo, ma non idrolizza il classico substrato delle NPP, timidina 5'-monofosfato 4-nitrofenil estere (T-5'-*p*NPP). Inoltre, la NPP6 mostra un'attività lisofosfolipasi.

La **NPP7** è il membro della famiglia delle nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi identificato più recentemente (Sakagami et al., 2005). La NPP7, nota anche come sfingomielinasi alcalina, è stata inizialmente scoperta, nel 1960, nel tratto intestinale di ratto.

Ultimamente sono stati condotti degli studi sull'omologia che intercorre tra le NPP provenienti dai batteri e dalle piante, e i risultati hanno rivelato

che queste proteine condividono una significativa somiglianza nella struttura e nell'attività catalitica con le NPP di mammifero (Gijsbers et al., 2001).

Le NPP sono codificate nell'uomo da cinque geni, indicati con il codice di quattro lettere "ENPP", seguito dallo stesso numero utilizzato per la proteina codificata. ENPP1 e ENPP3 sono stati mappati entrambi sul cromosoma 6q22-23 (Buckley et al., 1990; Funakoshi et al., 1992; Jin-Hua et al., 1997), suggerendo che questi due geni siano stati originati dalla duplicazione di un gene antenato comune. Coerentemente con questa visione, NPP1 è più strettamente correlata a NPP3 (con una omologia di struttura del 50 %) rispetto che a NPP2 (con una omologia di struttura di circa il 40 %). Allo stesso modo, ENPP4 e ENPP5 probabilmente si sono evoluti dalla duplicazione di un gene antenato comune in quanto sono entrambi localizzati sul cromosoma 6p11.2-21.1 (Bollen et al., 2000).

1.2. Domini strutturali e sequenze consenso delle NPP

Le NPP1-3 sono proteine della membrana plasmatica, tuttavia una frazione di NPP1 si trova anche associata al reticolo endoplasmatico. Le NPP1-3 associate alla membrana plasmatica sono omodimeri, uniti da ponti disolfuro, con un comprovato orientamento di tipo II, cioè consistono di un piccolo dominio intracellulare N-terminale, di un singolo dominio transmembrana e di un grande dominio C-terminale extracellulare. Per contro, le NPP4-5 dovrebbero avere un orientamento di tipo I, cioè con un dominio C-terminale transmembrana. La parte extracellulare delle NPP1-3 è costituito da due domini somatomedina-B-simili consecutivi, un dominio catalitico e un dominio C-terminale nucleasi-simile (Figura 1). Le NPP4-5 non presentano i domini somatomedina-B-simili e

nucleasi-simile, infatti queste NPP hanno dimensioni minori.

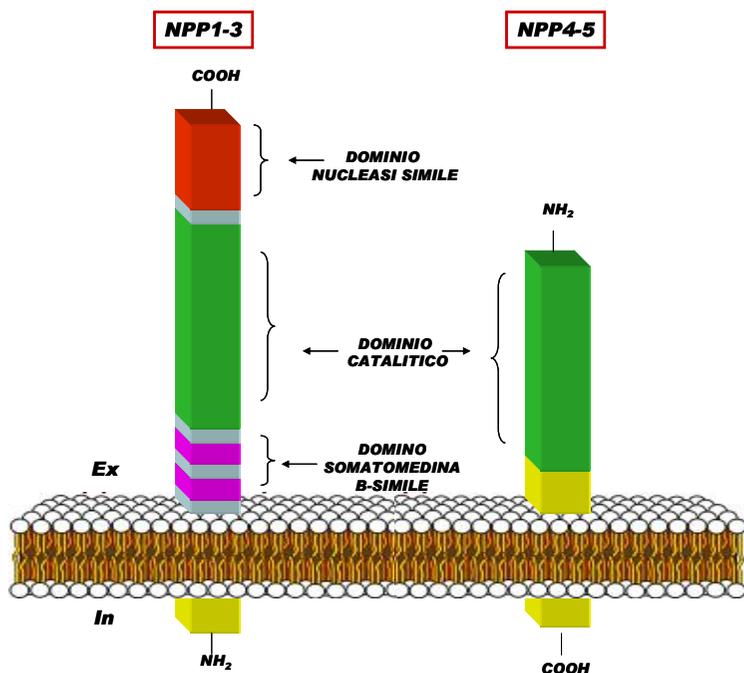


Figura 1. Domini e orientamento delle NPP1-5.

Il dominio intracellulare delle NPP, che è N-terminale per le NPP1-3 e presumibilmente C-terminale per le NPP4-5 (Figura 1), è piuttosto breve (11-77 residui) ed è diverso per ogni isoenzima.

Le NPP 1-3 presentano inoltre un dominio con attività assimilabile alla somatomedina-B. La somatomedina-B è un peptide che è stato inizialmente ritenuto un fattore di crescita. Tuttavia, è ormai noto che la sua attività mitogenica sia dovuta a un fattore di crescita dell'epidermide contaminante (Heldin et al. 1991). La somatomedina-B deriva proteoliticamente dalla vitronectina, una proteina della matrice extracellulare che è coinvolta nei processi di adesione cellulare. La vitronectina contiene vicino al proprio dominio somatomedina-B un tripeptide RGD (arginina, glicina, aspartato) che media l'interazione con i recettori delle integrine (Schvartz et al., 1999). Allo stesso modo, NPP2 e NPP3 contengono un motivo RGD nei domini somatomedina-B-simili che, anche in questo caso

può mediare l'interazione con le integrine. Inoltre, è noto che i domini somatomedina-B-simili siano ricchi di cisteina e quindi possono partecipare alla dimerizzazione delle NPP mediante la formazione di ponti disolfuro.

Utilizzando la bioinformatica, recentemente è emerso che il dominio catalitico delle NPP sia strutturalmente correlato a quello della superfamiglia dei fosfo/sulfo metallo enzimi che include le arilsulfatasi, le fosfopentosomutasi, la fosfoglicerato mutasi e le fosfatasi alcaline (Galperin et al., 1998; Gijbsbers et al., 2001). Sorprendentemente, un modello ipotetico della struttura del sito catalitico delle NPP suggerisce che i metalli e i residui presenti nel sito attivo siano sovrapponibili a quelli delle fosfatasi alcaline e della fosfoglicerato mutasi (Gijbsbers et al., 2001). Così, i sei residui che sono noti per coordinare i due metalli nel sito catalitico delle fosfatasi alcaline e della fosfoglicerato mutasi sono conservati nelle NPP. Infatti, come previsto,

una mutazione di ciascuno di questi sei residui nella NPP1 di topo ne causa l'abolizione dell'attività enzimatica, ma l'attività può essere parzialmente o totalmente ripristinata con l'aggiunta di un eccesso di un catione bivalente come lo Zn^{2+} . Le NPP1 e 3 contengono, nei loro domini catalitici il motivo GXGXXG, che rappresenta una sequenza consenso per il legame di dinucleotidi (Bossemeyer 1994). L'importanza di questo motivo per la catalisi è sottolineata dai risultati ottenuti dalla mutazione di queste tre glicine in alanine che induce la perdita dell'attività enzimatica della NPP1 (Gijsbers et al., 2003).

L'analisi strutturale ha inoltre rivelato una sorprendente somiglianza tra il dominio carbossiterminale delle NPP1-3 e una famiglia di DNA/RNA endonucleasi aspecifica (Gijsbers et al., 2003). Le somiglianze comprendono sia la struttura primaria che il folding delle proteine. Secondo questo modello *il dominio nucleasi-simile* delle

NPP1-3 consiste di un β -foglietto posto tra α -eliche e due filamenti β incrociati. Non è sorprendente che le NPP e le endonucleasi aspecifiche abbiano in comune caratteristiche strutturali, poiché entrambe catalizzano reazioni simili. È piuttosto inaspettato, tuttavia, il fatto che il dominio nucleasi-simile si trovi al di fuori del dominio catalitico delle NPP, infatti, è altamente improbabile che le NPP1-3 contengano un secondo sito catalitico nel dominio nucleasi simile, in quanto nessuno dei residui che sono essenziali per la catalisi endonucleasica sono conservati nelle NPP. Si ipotizza dunque che, il dominio nucleasi-simile delle NPP1-3 funzioni come una regione vincolante o specifica per il substrato. Questo dominio delle NPP1-3 contiene la sequenza DXD/NXDGXXD, che è stata proposta come motivo EF hand (Andoh et al., 1999). Questo motivo è responsabile del legame del Ca^{2+} ed è presente anche in proteine come la calmodulina. Tuttavia, per quanto la sequenza DXD/NXDGXXD appare essenziale per

l'attività enzimatica di NPP1 (Gijsbers et al., 2003) è molto improbabile che questo motivo agisca come un EF hand, poiché un classico EF hand presenta una struttura elica-gomito-elica, e la sequenza DXD/NXDGXXD corrisponde solo alla regione loop, che non è sufficiente per il legame del Ca^{2+} (Strynadka and James, 1989). Un'altra possibile regione responsabile del legame del Ca^{2+} è rappresentata dal dominio catalitico di NPP1 (Belli et al., 1994). Tuttavia l'importanza di questo motivo EF hand può anche essere messo in discussione, perché non si conserva nelle NPP2-5.

Le NPP1-5 contengono da 4 a 10 sequenze consenso (Asn-X-Ser/Thr) per la glicosilazione (Gijsbers et al., 2003). *In vivo*, la mobilità elettroforetica delle NPP1-3 è inferiore rispetto a quella prevista in funzione della loro massa calcolata, e tale mobilità può essere aumentata con un trattamento con glicosidasi (Hosoda et al., 1999). Quindi le NPP risultano essere proteine glicosilate ma il ruolo biologico di tale

glicosilazione rimane da stabilire dato che la rimozione delle catene di oligosaccaridi non interferisce con la loro funzione (Stracke et al., 1995).

1.3. Meccanismo catalitico delle NPP

Gli enzimi che appartengono alla superfamiglia delle fosfatasi alcaline catalizzano una grande varietà di reazioni di trasferimento di fosforili e solforili. Tra i membri di questa superfamiglia possono essere citate le fosfatasi, le fosfodiesterasi, la fosfoglicerato mutasi, le fosfopentamutasi e le sulfatasi. La fosfatasi alcalina (AP) preferenzialmente catalizza l'idrolisi del fosfato monoestere, presumibilmente per ottenere fosfato utile per gli acidi nucleici e altri metaboliti. Le AP, oltre a quest'ultima reazione, catalizzano anche l'idrolisi del diestere, ma quest'ultima attività è decisamente minore e ciò è stato importante per l'evoluzione di nuovi enzimi, più attivi nei confronti del diestere, come le nucleotidi pirofosfatasi/fosfodiesterasi. Le NPP sono membri della superfamiglia delle AP e negli eucarioti si trovano nella superficie delle cellule, sia come proteine transmembrana che come proteine di

secrezione. Anche se non ci sono risultati sperimentali relativi alla struttura delle NPP, il loro sito attivo sembra essere sorprendentemente simile a quello delle AP, costituito cioè da due ioni metallici, sei residui che coordinano i metalli e un residuo di Thr che ha una posizione analoga a quella della Ser presente nelle AP (Zalatan 2006).

La somiglianza strutturale del sito catalitico delle NPP con quello delle fosfatasi alcaline, suggerisce un meccanismo comune di catalisi e la trasposizione del meccanismo catalitico delle fosfatasi alcaline, ormai ben noto, alle NPP permette di ottenere un'immagine più chiara del meccanismo di azione delle NPP stesse (Gijsbers et al. 2001).

È stato proposto che il sito catalitico delle NPP sia dotato di due metalli bivalenti essenziali (Me) e che la catalisi avvenga mediante due fasi (Figura 2).

Nella prima fase, il Me₂ attivato dall'idrossile della treonina presente nel sito catalitico, attacca il fosfato del substrato in arrivo, con conseguente formazione

di un intermedio nucleotidilato. Nella seconda fase il MeI, attivato da una molecola di acqua, attacca l'intermedio nucleotidilato liberando la treonina nel sito attivo e generando un nucleoside 5'-monofosfato. Il meccanismo di reazione proposto fornisce una spiegazione per l'optimum di pH alcalino delle NPP, in quanto in analogia con ciò che è noto per le fosfatasi alcaline (Holtz and Kantrowitz, 1999), si propone che un pH basico promuova la ionizzazione del MeI coordinato con l'H₂O, che funge da nucleofilo nell'idrolisi degli intermedi nucleotidilati. A valori di pH acido questa seconda fase di catalisi diventa limitante.

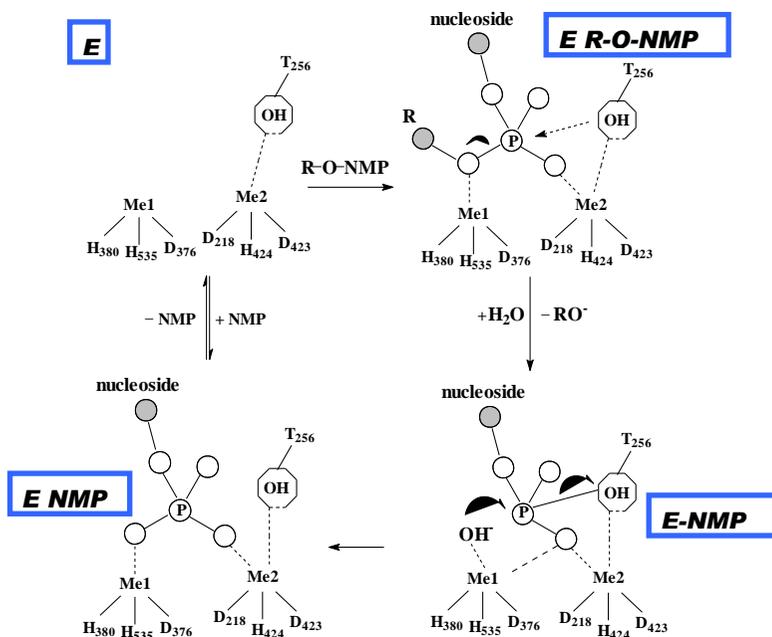


Figura 2. Meccanismo di reazione delle nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi.

I cerchi vuoti rappresentano il gruppo OH e l'atomo di O. **R** si riferisce alle diverse componenti dei substrati, come nucleosidi monofosfato o pirofosfato. Nell'enzima libero (**E**) il gruppo ossidrilico della treonina presente nel sito catalitico è stabilizzato dal Me2. "**E·R-O-NMP**" indica il complesso enzima substrato, mentre "**E-NMP**" si riferisce all'intermedio nucleotidilato.

1.4. Substrati e inibitori delle NPP

Le NPP hanno una specificità di substrato molto più ampia delle pirofosfasi intracellulari e delle fosfodiesterasi. Questi enzimi idrolizzano il legame fosfodiesterico (ad esempio negli oligonucleotidi, ma anche nei substrati artificiali come nella T-5'-*p*NPP) e il legame pirofosfato (ad esempio in (d)NTP, (d)NDP, NAD, FAD, di-adenosina polifosfato e UDP-zuccheri) generando nucleosidi 5'-monofosfato (Figura 3). Le NPP sono anche in grado di idrolizzare il legame solfato-fosfato in 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosolfato. Quest'ultimo, nonché la T-5'-*p*NPP sono utilizzati di routine per i saggi enzimatici. Le reazioni delle NPP mostrano valori di K_m che variano da 50 a 500 μM e valori di V_{max} da 5 a 300 $\mu mol/min/mg$ di enzima (Hosoda et al., 1999). Una eccezione è stata presentata da alcuni autori (Gasmi et al., 1998), i quali hanno riportato che la NPP1 idrolizza la diadenosina polifosfato con una

K_m di 2 mM e una V_{max} che è circa 50 volte inferiore rispetto a quelle in genere riportate. Per contro, Kelly et al. (1975) hanno dimostrato che le NPP idrolizzano gli esteri del fosfonato con grande efficienza, ma con un'affinità molto bassa. L'elevato valore di K_m per l'idrolisi dell'estere del fosfonato può essere eventualmente spiegato dalla mancanza di un nucleoside, che sembrerebbe aumentare l'affinità delle NPP per i loro substrati (Gijssbers et al., 2001). Il 3', 5'-cAMP sembra non essere un buon substrato (Kelly et al., 1975) e ciò può essere spiegato dall'ingombro sterico causato dal legame ciclico fosfodiesterico.

Alcuni lavori hanno riportato la capacità delle NPP di convertire l'AMP in adenosina e Pi, ma ciò era dovuto in realtà alla contaminazione di tali enzimi con 5'-nucleotidasi, come è stato dimostrato per la NPP1 purificata da fegato di ratto (Uriarte et al., 1995).

Infatti come intuibile dalla mancanza del legame fosfodiesterico o pirofosforico, l'AMP non è un substrato delle NPP, bensì un inibitore competitivo. Le NPP sono inibite competitivamente dai substrati e dai prodotti della reazione (Moe and Butler, 1983) nonché dai glicosaminoglicani eparina ed eparan solfato (Hosoda et al., 1999). Agenti riducenti come ditionitrito o 2-mercaptoetanololo sono inibitori della NPP1 (Uriarte et al., 1995). Dal momento che i monomeri delle NPP sono cataliticamente attivi (Hosoda et al., 1999), l'inibizione indotta da agenti riducenti deve essere causata dalla rottura di ponti disolfuro all'interno dei monomeri. Mentre l'imidazolo è un inibitore non competitivo che può legare sia l'enzima libero che il complesso enzima-substrato (Moe and Butler, 1983).

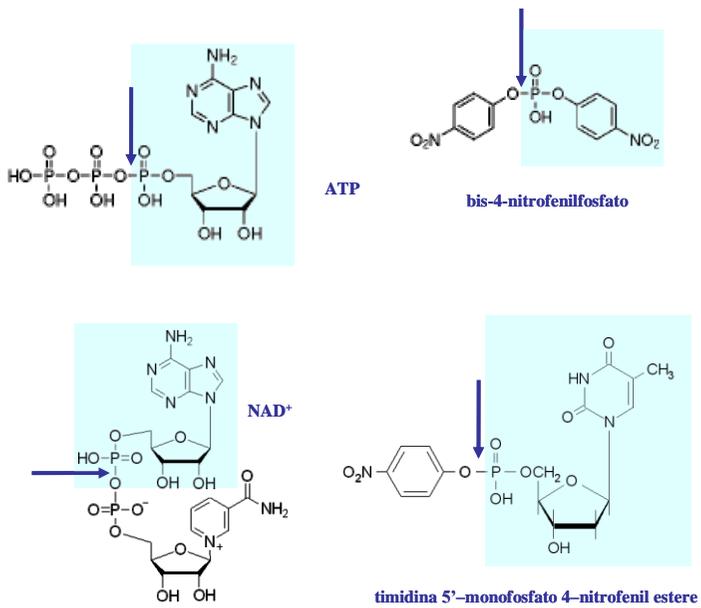


Figura 3. Alcuni substrati delle NPP.

1.5. Autofosforilazione

Le NPP sono capaci di effettuare un'autofosforilazione a livello del residuo di treonina presente nel sito catalitico. Sulla base delle analogie a livello del sito catalitico tra le NPP e le fosfatasi alcaline, è stato proposto che questa autofosforilazione sia il riflesso di una attività fosfatase intrinseca delle NPP. È noto infatti che le fosfatasi alcaline agiscono attraverso un intermedio fosforilato (Holtz and Kantrowitz, 1999), inoltre la mutazione della NPP1 nel topo, a livello dei residui che sono essenziali per il legame del Me1 e del Me2, causa la perdita sia dell'attività nucleotide pirofosfatase/fosfodiesterase che la capacità di effettuare l'autofosforilazione, suggerendo che entrambe le attività sono promosse dallo stesso sito catalitico (Gijsbers et al., 2001). Ciò potrebbe significare che le NPP fosforilate rappresentano gli intermedi catalitici dell'attività fosfatase.

D'altra parte non è sorprendente che le NPP possano anche avere una attività fosfatasica intrinseca, dato che le fosfatasi e le fosfodiesterasi catalizzano reazioni analoghe, cioè rispettivamente l'idrolisi del fosfomonoestere e del fosfodiesteri.

1.6. Funzioni fisiologiche e patofisiologiche delle nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi

Le NPP hanno un'ampia specificità di substrato da cui può dipendere il loro ruolo in una serie di processi fisiologici e biochimici, tra cui la mineralizzazione ossea, la calcificazione dei legamenti e delle capsule articolari, la modulazione del segnale dei recettori purinergici, il riciclo dei nucleotidi e la motilità cellulare. Un'espressione anormale delle NPP è coinvolta nella mineralizzazione patologica, nella formazione di cristalli a livello delle articolazioni, nella metastasi delle cellule tumorali e nel diabete di tipo 2 (Goding et al., 2003 e referenze ivi presenti).

a) Controllo della mineralizzazione.

Il processo di mineralizzazione è finemente regolato da un equilibrio ottimale tra pirofosfato (PPi) e ortofosfato (Pi). La NPP1 sembra avere un ruolo

nella mineralizzazione ossea, infatti è stata correlata sia alla produzione di PPi intravescicolare e extracellulare che all'attività delle vescicole della matrice organica presenti a livello degli osteoblasti. L'osteoblasto è una cellula che si trova nel tessuto osseo in formazione, la cui funzione è quella di produrre la matrice organica del tessuto osseo stesso, costituita da fibre collagene di tipo I, proteoglicani e glicoproteine. All'interno della matrice organica sono presenti numerose vescicole di secrezione che costituiscono i primi nuclei di mineralizzazione e contengono proteine che sequestrano il calcio, in più presentano enzimi con attività idrolitica tra cui fosfatasi alcaline, ATPasi e NPP1. Questi enzimi controllano il rilascio di Pi e PPi da ATP, nonché la conversione di PPi in Pi. Il calcio si trova come difosfato di calcio, depositato sotto forma di cristalli simili all'idrossiapatite e ancorati su un supporto fibroso di collagene. Il PPi regola anche la mineralizzazione mediante la soppressione dei

depositi di idrossiapatite. Tuttavia, elevati livelli di PPI spesso sfociano in calcificazione patologica caratterizzata dalla formazione di cristalli di calcio pirofosfato diidrato. Un equilibrio distorto di Pi/PPi a favore del Pi causa una anormale ossificazione, dal momento che il PPI funziona anche come risposta fisiologica che inibisce il processo stesso di ossificazione. I fattori di crescita e le interleuchine che regolano la espressione della NPP1 determinano la velocità e il grado di mineralizzazione, in quanto un modesto aumento di NPP1 è sufficiente per aumentare in modo significativo la concentrazione di PPI. Oltre alla NPP1, anche la NPP3 sembra essere implicata nel processo di mineralizzazione, infatti quest'ultima è in grado di compensare l'attività della NPP1 dato che hanno una diversa localizzazione subcellulare. Nei condrociti, la NPP1 è presente sia nel reticolo endoplasmatico che nell'apparato del Golgi, mentre la NPP3 è prevalentemente localizzato nel reticolo endoplasmatico e contribuisce

principalmente alla concentrazione di PPI intracellulare.

b) Riciclo dei nucleotidi.

La concentrazione dei nucleotidi a livello extracellulare è micromolare, circa tre ordini di grandezza inferiore rispetto alla loro concentrazione intracellulare (El-Moatassim et al., 1992; Lazarowski et al., 2000). Tuttavia sono apprezzabili i livelli extracellulari di nucleotidi (fino a 1 mM) che si possono accumulare a livello locale, ad esempio vicino alle terminazioni nervose. I nucleotidi (o i loro metaboliti) possono mediare i loro effetti interagendo con specifici recettori della membrana plasmatica, funzionando da substrato per proteine come le NPP, che sono implicate nella generazione, ripartizione e nel riciclaggio dei nucleotidi extracellulari.

Le NPP fanno parte di una cascata di attività idrolitiche che culmina nella conversione di nucleosidi monofosfati in nucleosidi ad opera della 5'

nucleotidasi. I nucleosidi vengono poi introdotti all'interno delle cellule attraverso trasportatori specifici di nucleosidi. È stato dimostrato che le NPP sono implicate in questa via di recupero dei nucleotidi nei linfociti T, negli epatociti e nell'intestino, quando la sintesi de novo viene inibita da azaserine.

Il fegato secerne nucleotidi nella bile come regolatori autocrini e paracrini della secrezione di bile. La NPP3, espressa sulla superficie apicale degli epatociti, è implicata nel riciclaggio di nucleotidi dalla bile nei roditori. Questo meccanismo appare improbabile negli esseri umani, dal momento che la NPP3 non è espressa nel fegato umano (Goding et al., 2003).

c) Motilità delle cellule tumorali.

È stato dimostrato che la NPP2 è in grado di aumentare il potenziale di invasività e di metastasi delle cellule tumorali. Inoltre stimola la formazione

dei vasi sanguigni nei tumori, indicando che la NPP2 ha proprietà angiogeniche.

Tuttavia una mutazione della Thr 210, presente nel dominio catalitico, sembra possa abolire la sua capacità di stimolare la motilità delle cellule, che viene attivamente promossa dalla defosforilazione della NPP2. Fino a tempi recenti tuttavia, era impossibile fare un collegamento tra l'attività della NPP2 e la stimolazione della motilità cellulare, in quanto vi erano poche prove che dimostrassero che questo effetto fosse mediato da nucleotidi. Ma la grande svolta si ebbe quando si scoprì un'attività lisofosfolipasica intrinseca della NPP2, tale attività è nota stimolare la motilità cellulare.

d) NPP1 nel diabete mellito.

Il diabete mellito è caratterizzato da una iperglicemia causata da un difetto nella secrezione e/o nella funzione dell'insulina. L'insulina è un ormone prodotto dalle cellule β del pancreas, che regola

l'utilizzo del glucosio da parte delle cellule dell'organismo. La sua azione metabolica si svolge a livello del fegato, muscolo e tessuto adiposo.

Il diabete di tipo 1 deriva dalla distruzione delle cellule β del pancreas che, può essere di origine infiammatoria e autoimmune.

Il diabete mellito di tipo 2 è caratterizzato da una resistenza all'azione dell'insulina.

I meccanismi molecolari che causano l'insulino-resistenza non sono ancora pienamente compresi. Tuttavia, recentemente la resistenza all'insulina è stata correlata alla sovraespressione di alcuni potenziali inibitori del recettore ad attività tirosin-chinasica dell'insulina.

La NPP1 è espressa in molti tessuti e sembra avere un ruolo importante nello sviluppo dell'insulino-resistenza. Questi risultati sono un po' controversi in quanto ci sono un numero considerevole di studi in cui non si trova un ruolo delle NPP nel diabete. Non è chiaro se i risultati rispecchiano diverse

eterogeneità di pazienti o, eventualmente, questioni metodologiche e tecniche (Goding et al. 2003 e referenze ivi presenti).

e) Ruolo intracellulare.

Le NPP sono ecto-enzimi che si trovano a livello della membrana plasmatica; una eccezione è rappresentata da un pool di NPP1 che è integrato nella membrana del reticolo endoplasmatico e ciò implica un possibile ruolo intracellulare della NPP1. Hickman et al. (1985) hanno proposto che la NPP1 sia in grado di controllare la disponibilità di zuccheri costitutivi dei nucleotidi che servono come precursori per la sintesi degli oligosaccaridi nel reticolo endoplasmatico. Inoltre, la 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosolfato (PAPS), che è il donatore di solfato per i glicosaminoglicani nel reticolo endoplasmatico (Uhlin-Hansen and Yanagishita, 1993), è un substrato delle NPP. Infatti è stato dimostrato che le NPP utilizzando la PAPS come substrato, limitano la sua

disponibilità come donatore di solfato (Yamashina et al., 1983).

1.7. Nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi vegetali

Attualmente sono state isolate da diverse fonti un gran numero di NPP. Nella tabella 1, estrapolata dal sito “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (IUBMB), sono riportati la fonte di estrazione, l’organismo e il collegamento per la relativa referenza bibliografica di diverse NPP.

Tabella 1. NPP estratte da diverse fonti.

SOURCE TISSUE	ORGANISM	LITERATURE
blood platelet	Rattus norvegicus	696924
blood platelet	Rattus norvegicus	670644
blood serum	Homo sapiens	658672
blood serum	Homo sapiens	658934
bone	Homo sapiens	696406
brain	Rattus norvegicus	698337

brain	Rattus norvegicus	657747
cartilage	Homo sapiens	696406
cell culture	Dictyostelium discoideum	246818
cell culture	Haemophilus influenzae	246814
cell culture	Haemophilus parasuis	246809
cell culture	Proteus vulgaris	246832
cell culture	Saccharomyces sp.	246828
cerebellum	Rattus norvegicus	698337
cerebral cortex	Rattus norvegicus	698337
chondrocyte	Mus musculus	670360
chondrocyte	Sus scrofa	246807
colonic cancer cell	Homo sapiens	658934
corpus striatum	Rattus norvegicus	698337
glioma cell	Rattus sp.	246803
glioma cell	Rattus sp.	246804
heart	Homo sapiens	696406
hippocampus	Rattus norvegicus	698337
intestine	Bos taurus	246806
intestine	Rattus sp.	209921
kidney	Homo sapiens	696406
leaf	Glycine max	246808
leaf	Hordeum vulgare	658699

liver	Columba livia domestica	246833
liver	Homo sapiens	696406
liver	Mus musculus	246827
liver	Ovis aries aries	246829
liver	Rattus norvegicus	659733
liver	Rattus sp.	208378, 208379, 246825, 246830, 246831
lymphocyte	Mus musculus	246823
olfactory bulb	Rattus norvegicus	698337
osteoblast	Mus musculus	667143
placenta	Homo sapiens	208391, 246802, 246812
placenta	Homo sapiens	696406
SAOS-2 cell	Homo sapiens	667143
seedling	Lens esculenta	246801
semen	Bos taurus	246819
serum	Rattus norvegicus	696924
skin fibroblast	Homo sapiens	246802
spleen	Mus musculus	246823
testis	Homo sapiens	696406
tuber	Solanum tuberosum	246813, 246817, 246824, 246834, 659733

venom	Crotalus adamanteus	246806
venom	Crotalus durissus	659733

Oltre alle NPP da mammifero, ampiamente studiate e caratterizzate, alcune nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi sono state estratte da diverse fonti vegetali, come dal grano (*Triticum aestivum* L.) (Joye et al., 2010), dal riso (*Oryza sativa*) (Nanjo et al., 2006) dall'orzo (*Hordeum vulgare*) (Rodríguez-López et al., 2000), dalle foglie di soia (*Glycine max*) (Salvucci et al., 1995), dalla patata (Bartkiewicz et al., 1984), dal tabacco (Shinshi et al., 1976) e dai germogli di lenticchia (Medda et al., 2000).

La nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi estratta dal germe di grano (*Triticum aestivum* L.) (TaNPP) presenta un sito catalitico e alcune proprietà simili alle NPP di mammifero, tra queste, l'alto pH

ottimale, la glicosilazione, l'alta termostabilità e l'inibizione da EDTA e da AMP.

Sebbene la TaNPP e le NPP da riso e da orzo, caratterizzate recentemente, condividano alcune caratteristiche come l'alta termostabilità e la reattività alla concanavalina A, sono totalmente diverse nella sequenza aminoacidica e nel pH ottimale (Tabella 2), di conseguenza, la catalisi enzimatica di queste NPP probabilmente procede attraverso un meccanismo diverso.

Tabella 2. Comparazione della TaNPP con le NPP da riso e da orzo.

	TaNPP	NPP da riso	NPP da orzo
Massa molecolare	55 KDa	70 KDa	70 KDa
Substrato naturale	Nucleotidi	ADP-glucosio	ADP-glucosio
Glicosilazione	SI	SI	SI
Optimum di pH	12	6	5.6
Termostabilità	70 °C	60 °C	58 °C

I substrati idrolizzati con maggior efficienza dalla TaNPP sono i coenzimi nicotinamidici e l'ADP-ribosio e tra questi, l'enzima mostra la più alta affinità per l'ADP-ribosio; inoltre, l'affinità verso le forme ridotte dei coenzimi nicotinamidici risulta superiore a quella per le forme ossidate. L'enzima mostra anche attività verso CTP, GTP e TTP, ma l'efficienza catalitica (V_{\max}/K_m) è molto inferiore rispetto a quella per l'ADP-ribosio e per il NAD(P)H.

La TaNPP idrolizzando i nucleotidi, è probabilmente coinvolta nel loro riciclo (Goding, 2000); questo enzima potrebbe avere un ruolo chiave nella lavorazione del grano e nella qualità del prodotto finale, infatti è in grado di idrolizzare i coenzimi nicotinamidici che sono noti per essere coinvolti in diverse reazioni redox da cui dipende ad esempio la qualità delle proteine del frumento (Joye et al., 2010).

Tra i vari substrati idrolizzati dalle NPP purificate da riso e da orzo, ha grande rilevanza fisiologica l'ADP-glucosio (ADPG), precursore per la biosintesi dell'amido, che risulta il substrato preferenziale per questi enzimi che sono stati designati come AGPPasi. Tuttavia, queste AGPPasi oltre a controllare i livelli di ADPG, possono anche regolare i livelli intracellulari di nucleotidi glicosilati necessari per la biosintesi dei polisaccaridi della parete cellulare, delle glicoproteine e dei glicolipidi. Una difosfonucleotide fosfatasi/fosfodiesterasi è stata purificata dai semi di lupino giallo (*Lupinus luteus* L.) (Olczak et al., 2000), questa mostra anche un'attività fosfodiesterasica nei confronti della T-5'-*p*NPP e del bis-*p*-nitrofenilfosfato (bis-*p*NPP), tipici substrati artificiali delle NPP. La specificità di substrato di questo enzima è simile a quella della nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi estratta dalle foglie di soia, ad eccezione della bassa affinità nei confronti del GDP e del UDP-glucosio. Per la

fosfatasi/fosfodiesterasi da lupino giallo è stata osservata una parziale inibizione in presenza dei cationi Zn^{2+} e Mn^{2+} (1mM). Ca^{2+} e Mg^{2+} non hanno invece alcuna influenza sull'attività dell'enzima. L'EDTA non induce alcun blocco dell'attività suggerendo che i cationi bivalenti non sono coinvolti nell'attività catalitica dell'enzima.

La proteina estratta da lupino giallo è un monomero con una massa molecolare di 75 kDa e con un contenuto in carboidrati del 4,4 % (mannosio, N-acetilglucosamina, fucosio e xilosio).

Questo enzima potrebbe giocare un importante ruolo nella regolazione della disponibilità dei fosfonucleotidi a livello dei metabolismi della pianta.

La NPP purificata e caratterizzata dalle foglie di soia è una proteina che sembra accumularsi in seguito alla raccolta dei frutti. Questo è un enzima ottamerico e ciascun monomero ha una massa molecolare pari a 72 KD. L'enzima purificato idrolizza i nucleotidi glicosilati, i nucleotidi di- e trifosfato, la T-5'-pNPP,

mentre non idrolizza i nucleotidi monofosfato, gli zuccheri mono e difosfato o il NADH.

Questa specificità di substrati distingue la NPP da soia dalle altre NPP vegetali, infatti la sua sequenza N-terminale mostra alcune somiglianze con le NPP di mammifero (Salvucci et al., 1995).

Quest'ultima NPP mostra anche una grande somiglianza con la nucleotide pirofosfatasi di patata che, mediante gel filtrazione, mostra una massa molecolare di 343 KDa, mentre mediante SDS-PAGE si ottiene un'unica banda di 74 KDa, indicativa del fatto che la proteina è tetrameric. La nucleotide pirofosfatasi di patata mostra un'alta attività specifica nei confronti del NAD^+ , mentre pur idrolizzando vari substrati che presentano il *p*-nitrofenolo, sorprendentemente mostra una bassa attività specifica nei confronti del bis-*p*NPP.

La velocità di idrolisi della T-3'-*p*NPP è dieci volte più bassa rispetto a quella per la T-5'-*p*NPP. Inoltre il NAD^+ è un inibitore competitivo della T-5'-*p*NPP

e viceversa, indicando un comune sito catalitico per questi due substrati.

Una NPP è stata purificata dal tabacco. Questo enzima idrolizza la T-5'-*p*NPP, la T-3'-*p*NPP, i nucleotidi ciclici, l'ATP, i dinucleotidi e il NAD⁺, con un optimum di pH di circa 6. Questo enzima rimane completamente attivo in presenza di EDTA, indicando che non necessita dei cationi bivalenti per il meccanismo catalitico.

Infine una NPP è stata purificata dai germogli di lenticchia. Questo enzima monomero (75 KDa) idrolizza il NAD(P)/H, il FAD, le diadenosine oligofosfato. La NPP di lenticchia mostra una maggiore affinità per la forma ridotta dei coenzimi nicotinamici, ciò potrebbe suggerire un ruolo di questa NPP nella regolazione intracellulare del rapporto NADH/NAD.

L'attività dell'enzima incrementa in presenza di cationi divalenti come Ca²⁺, Mg²⁺ e Mn²⁺, mentre è inibita in presenza di Cu²⁺, Zn²⁺ e Ni²⁺.

a) Ruoli delle NPP vegetali.

Le NPP sono coinvolte in una vasta gamma di processi fisiologici nel corso della vita di una pianta. Joye et al. (2010) hanno riportato la purificazione di una NPP dal germe di grano (*Triticum aestivum* L), questo enzima, idrolizzando i coenzimi nicotinamidici, agenti redox e cofattori di diversi enzimi, possono influenzare la qualità grano. Alcune NPP idrolizzando i coenzimi nicotinaminici potrebbero modulare l'attività delle deidrogenasi e regolare l'equilibrio intracellulare NADH/NAD.

Le NPP vegetali possono giocare un ruolo cruciale nel regolare il flusso del carbonio proveniente dalla biosintesi dell'amido e della parete cellulare polisaccaridica ad altre vie metaboliche, in risposta alle esigenze fisiologiche della cellula (Rodríguez-López et al., 2000; Rodríguez-López et al., 2001; Olczak et al., 2000; Olczak et al., 2009). Inoltre, le NPP possono controllare la disponibilità di zuccheri

costitutivi dei nucleotidi. Nelle piante, i nucleotidi extracellulari come l'ATP, ADP e analoghi innescano un incremento della concentrazione citoplasmatica di ioni calcio; l'ATP extracellulare induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno e infine, l'ATP extracellulare sembra anche essere coinvolto nella crescita e nello sviluppo delle piante. Quindi, le NPP probabilmente giocano un ruolo importante nel modulare la cascata di segnali innescata dai nucleotidi (Goding et al. 2003). Infine le NPP vegetali, utilizzando come substrato l'ADP-glucosio, possono avere un ruolo chiave nella biosintesi dell'amido.

1.8. Scopo della ricerca

Come sopra riportato le nucleotidasi pirofosfatasi/fosfodiesterasi sono implicate in diversi processi metabolici a livello delle piante.

Il nostro gruppo di ricerca si è dedicato alla purificazione e alla caratterizzazione di due NPP estratte rispettivamente dal lattice dell'*Euphorbia characias* (ELNPP) (Figura 4) e dai frutti di *Opuntia ficus indica* (ONPP) (Figura 5).

La ELNPP è contenuta all'interno di cellule organizzate in strutture simili a vasi che attraversano diverse parti della pianta e che sono specializzate nella produzione di lattice. Quest'ultimo è un fluido biancastro dalla composizione complessa che comprende alcaloidi, terpenoidi, resine, amido, oli ed un certo numero di enzimi, tali sostanze nel loro insieme contribuiscono ai meccanismi di difesa della pianta, alla repulsione e uccisione di patogeni e alla cicatrizzazione delle aree ferite (Ko et al., 2003).

L'*Euphorbia characias* presenta un fusto legnoso, cespitoso e flessibile, rossastro e spoglio in basso, mentre appare verde e pubescente in alto. Le foglie sono fitte e disposte a spirale sul fusto, hanno un colore verde-bluastro con una nervatura centrale più chiara. I fiori unisessuali formano un'infiorescenza detta ciazio, che appare come un fiore unico composto da un ricettacolo a forma di coppa portante dei vistosi nettari trapezoidali di colore rosso-bruno; all'interno si trovano il fiore femminile giallo, mentre i fiori maschili, senza perianzio, sono ridotti a stami.

Questa pianta è distribuita nella regione mediterranea e nella costa portoghese e fiorisce da Gennaio ad Aprile.

È molto interessante il sistema adottato da questa pianta per la continuazione della specie, l'*E. characias* infatti, oltre a riuscire a lanciare i propri semi a oltre 3 metri di distanza con uno speciale sistema balistico, ha stretto un patto mutualistico con

alcune specie di formiche che, dopo aver trasportato i semi nel loro formicaio, ne consumano una piccola appendice che contiene lipidi (elaiosoma). In questo modo le formiche trasportano i semi in luoghi distanti (anche 70 metri) dalla pianta madre e spesso adatti alla germinazione.

Ancora poco è noto sulle caratteristiche biochimiche di questo lattice a causa della sua natura gommosa che rende complesso l'isolamento dei suoi componenti. Il nostro gruppo di ricerca ha identificato dal lattice di questa pianta una ammino ossidasi a rame (Padiglia et al., 1998), una perossidasi Ca^{2+} /calmodulina dipendente (Mura et al., 2005), un catalasi, una antiquitina e una calmodulina (Pintus et al., 2010).

Inoltre dal lattice dell' *E. characias* è stata identificata una lectina (Barbieri et al., 1983). Questo enzima, appartenente al gruppo delle RIP (ribosome inactivating protein), sembra essere coinvolto nei processi di difesa della pianta piuttosto che nella

biosintesi dei diterpeni del lattice (Appendino et al., 2000).



Figura 4. Pianta dell'*Euphorbia characias* e lattice estratto dalla pianta.

L'altra nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi è stata estratta dalla polpa dei frutti di *Opuntia ficus indica*, una pianta succulenta della famiglia delle Cactaceae, originaria del Messico e ampiamente distribuita anche nella zona Mediterranea e in sud Africa (Griffith, 2004) (Figura 5).



Figura 5. Cactus e frutti dell’*Opuntia ficus indica*.

L’ *O. ficus indica* è una pianta perenne e spinosa con una crescita molto rapida. Il fusto è formato da modificazioni morfologiche dei rami, che sono di forma appiattita. Tali strutture vengono chiamate “cladodi” ma sono conosciuti più comunemente come “pale” e rappresentano dei veri e propri

serbatoi di acqua. I cladodi sono ricoperti da uno strato di cera per limitare la traspirazione. Al posto delle foglie sui cladodi si formano delle spine sottilissime, di colore giallo-bruno, molto irritanti. Un'altra particolarità sono gli stomi, responsabili degli scambi gassosi, i quali si aprono di notte restando chiusi di giorno, esattamente il contrario di ciò che avviene nella maggior parte delle piante, determinando in questo modo una riduzione della perdita di liquidi per traspirazione. Si tratta di una specie che viene coltivata da molto tempo ed è importante nelle economie agricole di tutto le parti aride e semiaride del mondo. I cladodi giovani vengono usati come verdura (Ruiz Pérez-Cacho et al., 2006) ma il principale valore commerciale è attribuito ai frutti, particolarmente dolci. Questi sono caratterizzati da diversi colori dovuti alla combinazione di due pigmenti, la betanina rosso-porpora e l'indicaxantina giallo-arancio (Butera et al., 2002). L' *O. ficus indica* ha diversi usi medicinali

e i suoi frutti possiedono proprietà antiossidanti. L'estratto dei frutti è utilizzato sia nelle industrie alimentari che in quelle farmaceutiche. Inoltre, il succo di fico d'india è ben caratterizzato per quanto riguarda il colore, l'acidità, il contenuto di zuccheri, i fenoli, i flavonoidi e le betalaine. Sebbene siano ben note la composizione chimica e le attività antiossidanti dei fichi d'india (Butera et al., 2002; Chavez-Santoscopy et al., 2009; Díaz Medina et al., 2007; Moßhammer et al., 2005; Nassar, 2008), poco si conosce sul contenuto e sulle proprietà delle proteine presenti nella polpa del frutto. In particolare, sono state isolate alcune proteine dai semi e dall'epicarpo dei frutti (Uchoa et al., 1998; Carillo-López et al., 2002), mentre nel 1994 il nostro gruppo di ricerca ha isolato dalla polpa dei frutti di *Opuntia* una perossidasi (Padiglia et al., 1995).

Questo lavoro di tesi è volto ad aggiungere un piccolo tassello ad un puzzle ben più grande che è

rappresentato dall'identificazione e caratterizzazione di nuove proteine e dalla comprensione del loro ruolo fisiologico. Tutto ciò ci permetterà di conoscere sempre meglio queste piante, consentendoci di avere una maggiore comprensione dei meccanismi regolatori e delle interazioni tra proteine.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Saggio enzimatico

L'attività enzimatica della ELNPP e della ONPP è stata rutinariamente saggiata utilizzando la T-5'-*p*NPP come substrato. La miscela di reazione (1 mL) è costituita da: tampone Na⁺-borato 100 mM pH 10.0, enzima e T-5'-*p*NPP. Oltre a pH 10.0, valore di pH in cui l'enzima mostra la migliore attività con questo substrato, l'attività è stata saggiata anche in altri tamponi ad altri valori di pH. La quantità di 4-nitrofenolato, formato nel corso della reazione, è stata determinata spettrofotometricamente seguendo l'incremento dell'assorbanza a 400 nm. A causa del variabile stato di ionizzazione del 4-nitrofenolo/4-nitrofenolato, nei vari esperimenti eseguiti a diversi valori di pH, sono stati usati i coefficienti

normalizzati in funzione di quello utilizzato a pH 8.0 ($\epsilon_{400} = 12,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L'attività verso la forma ossidata e ridotta dei coenzimi piridinici (NAD^+/NADH) è stata determinata utilizzando il tampone Tris/HCl 100 mM, pH 8.0 a 25 °C, seguendo la variazione di assorbanza a 340 nm e utilizzando come coefficiente di estinzione $\epsilon_{340} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In questo caso si utilizza un saggio enzimatico accoppiato in cui la riduzione del piruvato a lattato, catalizzata dalla lattato deidrogenasi (LDH), è associata all'ossidazione del NADH a NAD^+ .

2.2. L'elettroforesi

Per verificare se il processo di purificazione da noi adottato è stato realmente efficace, abbiamo utilizzato l'elettroforesi in condizioni non denaturanti come descritto da Gabriel et al. (1971).

La banda proteica con attività nucleotidico pirofosfatase/fosfodiesterase è stata messa in evidenza, dopo la corsa elettroforetica, immergendo il gel in tampone 100 mM Na⁺-borato, pH 10.0, contenente T-5'-pNPP 1 mM.

L'elettroforesi in condizioni denaturanti, in presenza di SDS, è stata effettuata secondo il metodo riportato da Weber e Osborne (1969). I campioni proteici sono stati portati a 100 °C per 5 min in tampone Tris/HCl 10 mM, pH 7.0, contenente 1 % di SDS, in presenza e in assenza di 2-mercaptoetanololo 100 mM.

2.3. Gel filtrazione e determinazione della massa molecolare

La determinazione della massa molecolare relativa (M_r) della ELNPP e della ONPP, in condizioni non denaturanti, è stata eseguita mediante la gel cromatografia utilizzando una colonna (2 cm × 10

cm) di Sephacryl S-200 equilibrata a 4 °C con tampone Tris/HCl 100 mM, pH 7.0, contenente 300 mM di NaCl, questo tampone è stato utilizzato anche per l'eluizione. Il coefficiente di distribuzione (K_d) è stato ottenuto come descritto da Gelotte (1960) utilizzando il blu destrano per misurare il volume escluso (V_o) e la tirosina per misurare il volume totale (V_i). Gli standard utilizzati sono: β -amilasi (200 kDa), alcool deidrogenasi (150 kDa), albumina da siero bovino (66 kDa), anidrasi carbonica (31 kDa) e citocromo c (12.4 kDa).

2.4. Determinazione della concentrazione delle proteine

Per determinare la quantità di proteine presente in una soluzione è stato impiegato il metodo di Bradford (1976), utilizzando l'albumina di siero

bovino (BSA) come proteina standard per la costruzione della curva di calibrazione.

In questo metodo, il Coomassie Brilliant Blue si combina con le proteine per dare un complesso colorante-proteina con un massimo di assorbimento a 595 nm.

2.5. Determinazione del fosfato inorganico

Per valutare la quantità di P_i presente nella miscela di reazione abbiamo utilizzato il metodo del malachite green (MG), utilizzando un kit commerciale (SensoLyte™ MG Phosphate Assay Kit). Questo saggio si basa sull'uso del reagente malachite green come indicatore colorimetrico che forma un composto colorato con il fosfato libero. La miscela di reazione assume un colore blu-verde e, dopo una incubazione di 20 minuti, tempo necessario per la stabilizzazione del complesso P_i -MG, si misura l'assorbanza a 630 nm. Per quantificare il fosfato

inorganico ci si riferisce ad una curva standard ottenuta trattando soluzioni di P_i a concentrazioni note (da 0.78 a 50 μM) con il malachite green.

2.6. Spettroscopia

Le attività enzimatiche della ELNPP e della ONPP sono state studiate misurando le variazioni del prodotto formatosi nell'unità di tempo mediante uno spettrofotometro Ultraspec 2100.

2.7. Deglicosilazione

La ELNPP e la ONPP sono proteine glicosilate e per quantificare il loro contenuto in carboidrati, sono state denaturate mediante un trattamento a 100 °C per 5 minuti, per poi essere deglicosilata mediante

l'utilizzo di N-glicosidasi (5 mg/mL) in tampone 50 mM Na-fosfato, pH 7.2, a 37 °C per 12 ore. Le proteine deglicosilate sono state analizzata mediante SDS-PAGE, confrontando la loro migrazione con quella di un campione di controllo non trattato con N-glicosidasi.

2.8. Analisi dei prodotti di reazione utilizzando diversi substrati

Alcuni substrati per la ELNPP e la ONPP sono stati incubati per 60 min, con l'enzima in tampone Tris/HCl 100 mM, pH 8.0, a 25 °C. Dopo l'incubazione, la reazione è stata bloccata mediante un trattamento a 97 °C per 5 min. Gli incubati sono stati centrifugati con successiva eliminazione del precipitato, mentre il surnatante viene recuperato. Aliquote di surnatante sono state diluite con acqua ultra pura per essere analizzate mediante la cromatografia ad alta risoluzione (HPLC Agilent 1100), utilizzando una colonna Zorbax 300 SB-C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm).

I prodotti della reazione sono stati studiati considerando i valori di assorbanza sia a 266 nm che a 340 nm. L'assegnazione dei picchi corrispondenti ai composti è stato effettuato confrontando i tempi di

ritenzione dei campioni rispetto a quelli ottenuti con i reagenti standard (Lazzarino et al.,1991).

2.9. Lo stopped flow

Lo stopped flow è uno strumento utilizzando per studiare la cinetica chimica di una reazione in soluzione. Quando due soluzioni contenenti i reagenti vengono miscelate, possono essere studiate utilizzando diversi metodi. Il tempo che intercorre tra la fine del miscelamento delle soluzioni e l'inizio delle osservazioni è definito tempo morto e nello stopped flow questo tempo viene ridotto a 1 o 2 millisecondi.

In questo apparecchio due siringhe di spinta garantiscono la miscelazione di piccoli e uguali volumi delle soluzioni contenenti i reagenti (Figura 6). Attraverso queste siringhe, le soluzioni raggiungono rapidamente una camera di miscelazione, per poi confluire in una cella di osservazione. Infine la miscela raggiunge una siringa di arresto, il cui

pistone bloccandosi contro un vincolo fisso è utilizzato sia per limitare il volume della soluzione da utilizzare che per interrompere bruscamente il flusso. Il blocco del pistone attiva la raccolta dei dati. I reagenti miscelati nella cella di osservazione possono essere studiati in termini di assorbimento, fluorescenza, light scattering, torbidità e trasmittanza. Nel nostro caso si considera l'assorbanza sfruttando una sorgente luminosa, un monocromatore ed un fotomoltiplicatore la cui corrente, opportunamente amplificata, viene letta dall'oscilloscopio. In alcuni degli esperimenti effettuati e discussi in questa tesi, il fotomoltiplicatore è stato sostituito con un rivelatore a fotodiodi e l'oscilloscopio con un personal computer; questo ha consentito di leggere spettri di assorbanza anziché singole lunghezze d'onda.

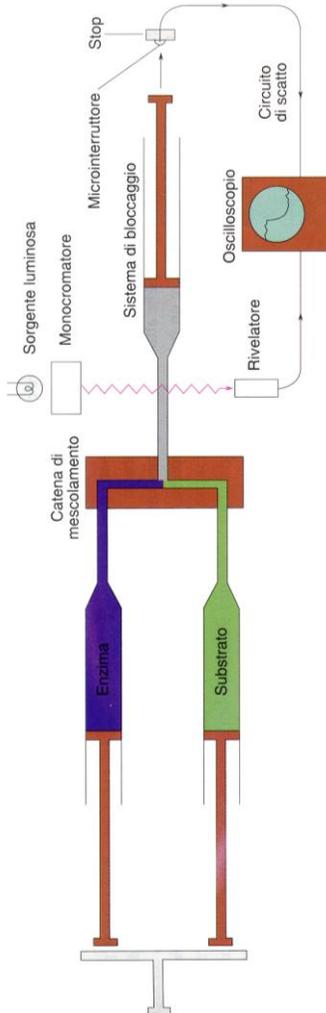


Figura 6. Tipico apparato per misurazioni a flusso interrotto.

Gli esperimenti di stopped-flow sono stati effettuati con un apparato Applied Photophysics MV 17 (Leatherhead, UK), con una camera di osservazione con un cammino ottico di 1 cm. L'analisi dei dati è stata eseguita per mezzo del programma Matlab.

Gli spettri di assorbanza ottenuti a vari intervalli di tempo dal mescolamento, sono stati ordinati in una matrice (A), in modo tale che ogni colonna corrisponde allo spettro in un dato momento, eseguito dopo la miscelazione; ogni riga rappresenta invece l'evoluzione temporale della miscela ad una singola lunghezza d'onda. I dati della matrice A sono sottoposti ad una trasformazione algoritmica (scomposizione a valori singolari, SVD), al fine di ottenere tre matrici: U, S, e V, essendo $A = U \times S \times V^T$. U, S e V non hanno significato fisico e chimico immediato, ma ciascuna colonna di U rappresenta lo spettro di una delle specie spettroscopiche determinate attraverso la SVD.

S è una matrice diagonale, in cui i valori diversi da 0 rappresentano un fattore di scala U. Quindi ciascuna colonna della matrice $U \times S$ ha lo stesso valore di uno spettro di assorbanza.

Ciascuna colonna V rappresenta il cambiamento nel tempo della specie spettroscopica identificata dai corrispondenti valori della colonna $U \times S$, e quindi contiene tutte le informazioni dipendenti dal tempo.

Dal momento che gli elementi diagonali di S sono sistemati in ordine decrescente, la SVD permette la rappresentazione di una estensione di dati per mezzo di pochi (di solito da 2 a 5) spettri differenti ($U \times S$) e della loro durata (V) (Antonini et al., 1996).

Non esiste nessuna procedura indipendente da modelli o schemi cinetici, che permetta di ottenere gli spettri delle vere specie chimiche che vengono a formarsi nel corso dell'esperimento. Comunque i valori significativi della colonna V possono essere trattati mediante regressione quantica non lineare,

come se fossero i profili temporali registrati ad una singola lunghezza d'onda.

Questa procedura è stata portata avanti attraverso il programma Facsimile (AEA technology, UK), dotato di due tipi di parametri: le costanti di velocità e le ampiezze. Le ampiezze calcolate, che rappresentano i valori di V corrispondenti agli spettri delle specie chimiche identificate con il modello utilizzato, sono state disposte in una nuova matrice chiamata V_{fit} , da cui la seguente equazione: $\varepsilon \times C = U \times S \times V_{\text{fit}}^T$ in cui la matrice ε rappresenta il coefficiente di estinzione stimato con il modello impiegato per calcolare le colonne V , che sono state selezionate come significative.

La procedura descritta mostra due difficoltà sostanziali: la selezione delle componenti significative della matrice $U \times S$ e la scelta del modello chimico per stabilire gli appropriati valori di V .

Per superare queste difficoltà, sono state applicate tre regole: (i) una specie spettroscopica è significativa se esiste una netta separazione tra bassa (segnale) e alta (rumore) frequenza, sia del suo spettro (colonna $U \times V$), che del tempo di corsa; (ii) tutte le specie spettroscopiche successive alle prime due consecutive che sono state scartate, sono scartate anch'esse, e (iii) le colonne di ε che corrispondono alle specie che si possono formare in condizioni di equilibrio, devono essere in accordo con gli spettri statici ottenuti indipendentemente.

Sebbene i punti (i) e (ii) possano essere in contrasto con il punto (iii), in questo lavoro ciò non si è mai verificato e i nostri parametri si sono limitati solitamente all'analisi di tre o quattro valori di colonna V .

E' interessante notare che tutta la procedura descritta può essere eseguita sugli spettri assoluti o differenziali (in genere rispetto a quello della specie che si popola alla fine della reazione): entrambi i

metodi sono stati provati. Da questi sono stati ottenuti risultati confrontabili, anche se è preferibile effettuare l'analisi su spettri differenziali perché la prima colonna di valori V ottenuta dalla SVD relativa allo spettro assoluto, di solito è scarsamente dipendente dal tempo e inoltre risulta difficile da calcolare.

3. RISULTATI

3.1. Purificazione, determinazione della massa molecolare e del contenuto in carboidrati della ELNPP

La ELNPP viene estratta e purificata secondo un protocollo messo a punto dal nostro gruppo di ricerca (Pintus et al., 2009).

Il lattice (400 mL) viene raccolto da diverse località del sud Sardegna, recidendo la parte superiore dei rami dell'*Euphorbia*, dopodiché viene filtrato e congelato a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ per circa 24 ore, per poi essere liofilizzato per circa 48 ore. Il liofilizzato è conservato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'uso.

Step 1. *Polvere acetonica*. Il liofilizzato viene solubilizzato con acetone freddo e tenuto in agitazione a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 45 minuti. Successivamente si filtra su buckner e si lava con acetone freddo. La

polvere acetonica anidra viene omogenata con acqua deionizzata tenendola in agitazione per due ore a 4 °C, per poi centrifugare a 9000 rpm per 30 minuti. Si recupera il surnatante che subisce il trattamento successivo.

Step 2. *Trattamento al calore.* Il surnatante ottenuto è stato portato a 60 °C per 30 minuti utilizzando un bagno termostatico. Per garantire il mantenimento della temperatura in modo omogeneo, il campione viene tenuto in continua agitazione. Dopo il trattamento al calore, il campione viene immerso in ghiaccio in modo tale da evitare la prosecuzione del trattamento, che oltre i trenta minuti causerebbe la denaturazione dell'enzima. Una volta raffreddato, il campione viene centrifugato a 9000 rpm per 30 minuti e si recupera il surnatante.

Step 3. *Precipitazione frazionata con solfato di ammonio.* Il surnatante ottenuto dopo il trattamento al calore è stato prima salato al 25 % mantenendolo in agitazione per 30 minuti a 4 °C. Dopo questa

prima salatura la ELNPP rimane in soluzione, il surnatante infatti viene recuperato e portato al 80 % di saturazione con il sale, tenendolo nuovamente in agitazione per 30 minuti a 4 °C. Con questa ultima salatura la ELNPP precipita, quindi dopo la centrifuga si recupera il precipitato che viene solubilizzato con 40 mL di tampone K-fosfato 10 mM, pH 7.0, e dializzato per 12 ore contro lo stesso tampone.

Step 4. *Cromatografia su DEAE-cellulosa.* Il dializzato viene fatto percolare su una colonna di DEAE-cellulosa (2.8 cm × 14 cm) equilibrata con tampone K-fosfato 10 mM, pH 7.0. In queste condizioni l'enzima non si lega alla fase stazionaria e l'eluato si raccoglie in provette mediante un raccoglitore di frazioni. In funzione della lettura dell' A_{280} e del saggio enzimatico si riunisce il contenuto delle varie provette. Il riunito viene poi concentrato e analizzato mediante elettroforesi.

Nella tabella 3 è indicata la procedura di purificazione che ha consentito di ottenere la ELNPP purificata 26 volte con una resa del 40 %.

La miscela proteica ottenuta da ogni step di purificazione è stata analizzata mediante elettroforesi. In SDS-PAGE, in presenza e in assenza di mercaptoetanololo, la ELNPP migra come una singola catena polipeptidica di 41 ± 2 kDa (Figura 7). Poichè è noto che le NPP siano glicosilate, è stata analizzata la corsa elettroforetica della ELNPP trattata con N-glicosidasi in SDS-PAGE. Comparando la mobilità della proteina in presenza di N-glicosidasi con la proteina di controllo non trattata si osserva una variazione della massa molecolare da 41 a 36 KDa, indicativa del fatto che la proteina contiene circa il 10-12 % di carboidrati (Figura7).

Tabella 3. Step di purificazione della ELNPP estratta dal lattice dell'*Euphorbia characias* (materiale di partenza: 400 mL di lattice).

Step	Proteine totali (mg)	Unità enzimatiche (unità)	Attività specifica (unità/mg)	Resa (%)	Purificazione
Polvere acetonica	3500	9500	2.7	100	1
Trattamento al calore (60 °C)	360	6665	18.5	70	6.8
Precipitazione frazionata con solfato di ammonio	210	5615	26.7	59	10
Cromatografia su DEAE-cellulosa	53	3780	71.3	40	26

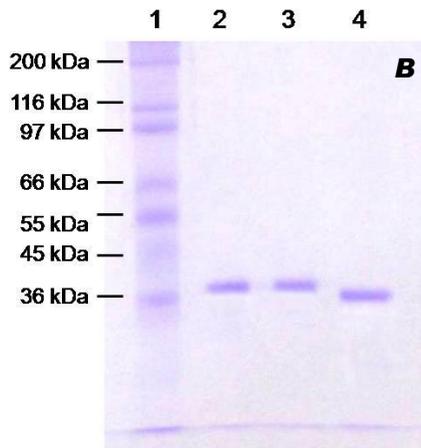
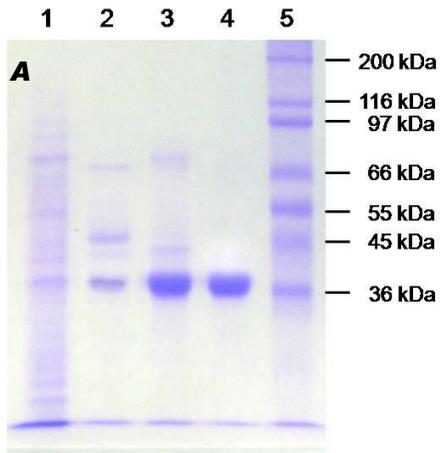


Figura 7. SDS-PAGE della NPP estratta da *Euphorbia characias*.

A: Linea 1: polvere acetonica (2 µg); linea 2: trattamento al calore (0.6 µg); linea 3: precipitazione frazionata con solfato di ammonio (0.6 µg); linea 4: cromatografia su DEAE–cellulosa (0.4 µg); linea 5: proteine standard a peso molecolare noto: Miosina da muscolo di coniglio (200 kDa), β-Galattosidasi da *E. coli* (116 kDa), Fosforilasi b da muscolo di coniglio (97 kDa), albumina da siero bovino (66 kDa), Glutamato deidrogenasi da fegato bovino (55 kDa), ovalbumina (45 kDa), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi da muscolo di coniglio (36 kDa),.

B: linea 1: standard di peso molecolare noto; linea 2: 0.17 µg della ELNPP in presenza di mercaptoetanolo; linea 3: 0.17 µg della ELNPP in assenza di mercaptoetanolo; linea 4: 0.17 µg della ELNPP deglicosilata.

Per determinare la M_r della ELNPP in condizioni non denaturanti, l'enzima è stato sottoposto a cromatografia su gel filtrazione mediante Sephacryl S-200. L'enzima viene eluito con un volume di 228 mL da cui si ricava una K_d di 0.335, corrispondente ad una proteina con massa molecolare di 80 ± 5

kDa, suggerendo dunque che la ELNPP è una proteina costituita da due identiche subunità (Figura 8).

La proteina purificata ha mostrato un massimo di assorbimento a 280 nm, ed è stato calcolato il coefficiente di estinzione ($12.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

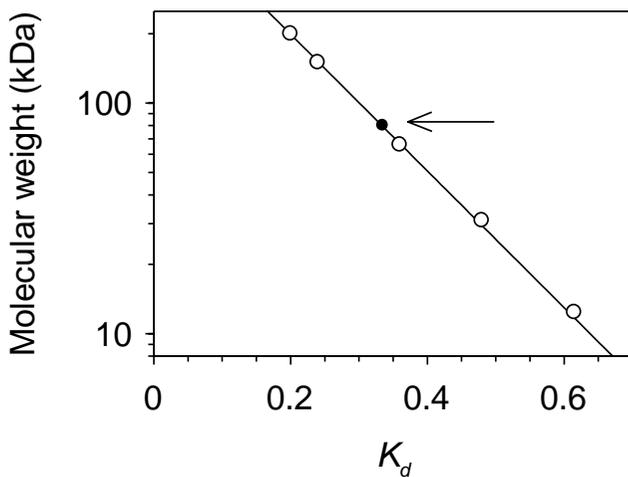


Figura 8. Determinazione della M_r in condizioni non denaturanti mediante cromatografia per esclusione molecolare: massa molecolare versus K_d .

3.2. Purificazione, determinazione della massa molecolare e del contenuto in carboidrati della ONPP

I fichi d'india sono stati raccolti da diverse piante del sud Sardegna, privati della buccia (epicarpo) e conservati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'utilizzo.

La ONPP è stata isolata dai frutti mediante la seguente procedura:

Step 1. *Omogenazione*. Cento fichi (~6000 g) sono stati omogenati con 3 L di tampone Tris/HCl 50 mM pH 7.0 utilizzando un waring blender. L'omogenato è stato poi centrifugato a 9000 rpm per 30 minuti, per favorire l'eliminazione di materiali grossolani che precipitano.

Step 2. *Precipitazione frazionata con solfato di ammonio*. Il surnatante è stato prima salato al 40 % mantenendolo in agitazione per 30 minuti a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, dopodiché il surnatante viene portato al 90 % di

saturazione con il sale, tenendolo in agitazione per 30 minuti a 4 °C e viene centrifugato a 9000 rpm per 30 minuti. Il precipitato viene solubilizzato con 40 mL di tampone Tris/HCl 50 mM, pH 7.0 e dializzato per 12 ore contro lo stesso tampone.

Step 3. *Trattamento al calore.* Il dializzato è stato portato a 75 °C per 30 minuti utilizzando un bagno termostatico. Con questa trattamento è possibile eliminare una grande quantità di proteine contaminanti che vanno così incontro a denaturazione contrariamente alla ONPP che risulta resistente a questa temperatura. Per garantire il mantenimento dei 75 °C in modo omogeneo, il campione viene mantenuto in continua agitazione. Immediatamente dopo il trattamento al calore, il campione viene immerso in ghiaccio per evitare la prosecuzione del medesimo trattamento che oltre i trenta minuti causerebbe la denaturazione della ONPP. Infine, si centrifuga a 9000 rpm per 30 minuti e si elimina il precipitato.

Step 4. *1^a cromatografia su DEAE-cellulosa.* Il surnatante recuperato dopo il trattamento a 75 °C viene fatto percolare su una colonna di DEAE-cellulosa equilibrata con tampone Tris/HCl 50 mM, pH 7.0. In queste condizioni la ONPP si lega alla fase stazionaria. La colonna viene lavata con lo stesso tampone finché l'assorbanza dell'eluato a 280 nm è circa zero. L'enzima viene poi eluito dalla fase stazionaria con lo stesso tampone a molarità più alta (150 mM, pH 7.0). L'eluato si raccoglie in provette mediante un raccoglitore di frazioni e in funzione della lettura dell' A_{280} e del saggio enzimatico si riunisce il contenuto delle varie provette. Il riunito viene dializzato per 12 ore contro tampone Tris/HCl 100 mM, pH 7.0.

Step 5. *2^a cromatografia su DEAE-cellulosa.* Il dializzato viene fatto percolare su una seconda colonna di DEAE-cellulosa equilibrata con tampone Tris/HCl 100 mM, pH 7.0, si lava la colonna con lo stesso tampone finché l' A_{280} dell'eluato è circa zero.

L'enzima viene poi eluito con tampone Tris/HCl 125 mM, pH 7.0. L'eluato riunito in funzione dell'assorbanza a 280 è stato poi concentrato per sottoporlo allo step di purificazione successivo.

Step 6. *Gel cromatografia mediante colonna di Sephacryl S-200*. Il concentrato viene caricato su una colonna di Sephacryl S-200 equilibrata a 4 °C con tampone Tris/HCl 100 mM, pH 7.0 contenente NaCl 300 mM. L'enzima viene eluito con lo stesso tampone, raccogliendolo in provette mediante un raccogliitore di frazioni. Dopo aver letto l' A_{280} di ciascuna frazione, si riuniscono quelle aventi l'attività specifica maggiore e si concentrano.

Questa procedura di purificazione è stata effettuata sui fichi d'india raccolti nella terza settimana di Agosto, mese in cui la ONPP mostra la maggior attività specifica (Tabella 4). Infatti questi frutti sono stati analizzati in termini di proteine totali, attività nucleotidica pirofosfatase/fosfodiesterase e attività

specifica, parametri che sono stati comparati con quelli ottenuti dai frutti raccolti da Giugno a Settembre, nella stessa località del sud Sardegna e dalla stessa pianta. L'analisi dell'omogenato ottenuto dai fichi d'india mostra un marcato incremento dell'attività nucleotidica pirofosfatase/fosfodiesterase da Giugno ad Agosto (Tabella 4) correlato alla maturazione del frutto che negli stessi mesi passa da una colorazione verde a una rossa. L'attività della ONPP ha un decremento a Settembre, probabilmente dovuto alla eccessiva maturazione del frutto. Da questi risultati si ipotizza che la ONPP potrebbe essere uno dei fattori che influenzano la maturazione dei frutti.

Tabella 4. Proteine totali, unità enzimatiche e attività specifica della ONPP misurate nella prima e nella terza settimana da Giugno a Settembre, usando 60 g di frutti omogenati in 30 mL di tampone Tris/HCl 50 mM, pH 7.0.

	Proteine (mg/ml)	Unità enzimatiche (U/mL)	Attività Specifica (U/mg)
Giugno			
1 ^a settimana	0.183	0.022	0.120
3 ^a settimana	0.289	0.102	0.353
Luglio			
1 ^a settimana	0.387	0.223	0.576
3 ^a settimana	0.395	0.278	0.704
Agosto			
1 ^a settimana	0.651	0.414	0.636
3 ^a settimana	0.510	0.412	0.808
Settembre			
1 ^a settimana	0.474	0.335	0.707
3 ^a settimana	0.480	0.290	0.604

Nella tabella 5 sono mostrati gli step di purificazione della ONPP, purificata 620 volte con una resa del 33.6 %.

Come sopra riportato, nella procedura di purificazione è stata ripetuta per due volte la stessa cromatografia a scambio anionico, eluendo l'enzima incrementando la forza ionica della fase mobile. Utilizzando una singola DEAE e incrementando la forza ionica da 50 a 125 mM, abbiamo ottenuto un profilo di eluizione slargato, recuperando l'enzima con un'attività specifica bassa. Quindi abbiamo preferito eluire la ONPP dalla prima DEAE con tampone 150 mM, in questo modo si ottiene una perdita della quantità totale delle proteine e una resa accettabile della ONPP. A questo punto utilizzando per la seconda volta la DEAE e eluendo la ONPP con tampone 125 mM si ha un incremento dell'attività specifica, probabilmente dovuto alle diverse interazioni proteina-proteina e/o proteina-matrice. Anche se questa pratica non è consueta nelle

procedure di purificazione, ci ha permesso di ottenere l'enzima puro dopo gel cromatografia su colonna di Sephacryl S-200.

La proteina purificata ha mostrato un massimo di assorbimento a 280 nm, ed è stato calcolato il coefficiente di estinzione paria a $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Tabella 5. Purificazione della nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi dai frutti di *Opuntia ficus indica*.

Step	Proteine totali (mg)	Unità enzimatiche (unità)	Attività specifica (unità/mg)	Resa (%)	Purificazione
1. Omogenato	1844	1249	0.68	100	1
2. Precipitazione frazionata con solfato di ammonio	650	1043	1.6	83.5	2.4
3. Trattamento al calore (75 °C)	266	1041	3.9	83.3	5.8
4. 1^a cromatografia su DEAE-cellulosa	39	609	15.6	48.7	23
5. 2^a cromatografia su DEAE-cellulosa	2.3	447	194.3	35.8	286
6. Gel cromatografia su Sephacryl S-200	1	420	420	33.6	618

La ONPP purificata è stata analizzata mediante elettroforesi in condizioni non denaturanti, mediante SDS-PAGE e mediante gel cromatografia.

La miscela proteica ottenuta dopo l'ultimo step di purificazione viene caricata nel gel in due pozzetti. Dopo la corsa elettroforetica, il gel viene diviso in due parti, una parte viene colorata con Blu di Coomassie, rilevando un'unica banda proteica; la seconda parte del gel viene immersa in tampone Na^+ -borato pH 10.0 contenente il substrato T-5'-pNPP 1 mM che reagendo con la ONPP forma un prodotto cromoforo che si evidenzia come una banda gialla. Anche in questa seconda parte del gel è stata osservata una sola banda nella stessa posizione della banda rilevata con la colorazione con Blu di Coomassie.

Analizzando la corsa elettroforetica della ONPP in condizioni denaturanti e in presenza di mercaptoetanolo, l'enzima migra come una singola catena polipeptidica di 55 ± 4 kDa (Figura 9).

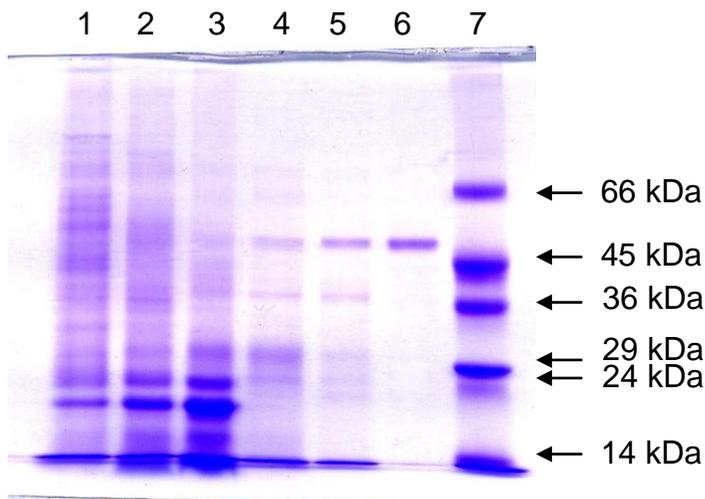


Figura 9. SDS-PAGE degli step di purificazione della ONPP.

Linea 1: omogenato (10 μg); linea 2: frazionamento con ammonio solfato (6.2 μg); linea 3: trattamento al calore (7.8 μg); linea 4: prima cromatografia su DEAE-cellulosa (8.0 μg); linea 5: seconda cromatografia su DEAE-cellulosa (5.3 μg); linea 6: cromatografia su Sephacryl S-200 (5.0 μg); linea 7: proteine standard di peso molecolare noto: albumina da siero bovino (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (36 kDa), anidrasi carbonica (29 kDa), tripsinogeno (24 kDa) e α -lactalbumina (14.2 kDa).

Per determinare il peso molecolare della ONPP in condizioni non denaturanti, l'enzima è stato sottoposto a cromatografia su gel filtrazione mediante Sephacryl S-200. L'enzima viene eluito con un volume di 210 mL, da cui si ricava una K_d di 0.28 corrispondente ad una proteina con massa molecolare di 105 ± 8 kDa, suggerendo dunque che, la ONPP è una proteina omodimerica (Figura 10).

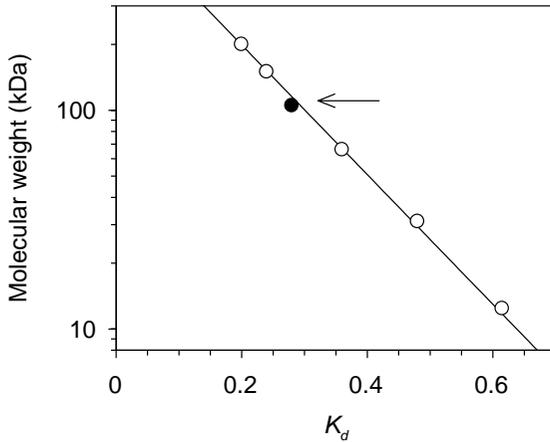


Figura 10. Determinazione della M_r in condizioni non denaturanti mediante cromatografia per esclusione molecolare: massa molecolare versus K_d .

Infine abbiamo studiato il comportamento elettroforetico in SDS-PAGE della ONPP trattata con N-glicosidasi rispetto a un campione proteico di controllo non trattato. Si osserva uno shift nella massa molecolare da 55 a 50 kDa e ciò suggerisce che la proteina ha un contenuto in carboidrati del 9–10 %.

3.3. Parametri cinetici della reazione della ELNPP e della ONPP

Gli studi di cinetica enzimatica sono volti a determinare quale sia la massima velocità di reazione alla quale lavora un enzima e quali siano le sue affinità di legame con i substrati e con gli inibitori. Per tale motivo nello studio della cinetica della ELNPP e della ONPP abbiamo determinato i parametri cinetici di: K_m che esprime l'affinità dell'enzima per un dato substrato; k_{cat} che indica l'attività catalitica che è definita come moli di substrato consumate per moli di siti attivi in 1 secondo; k_{cat}/K_m che è una misura più indicativa della specificità dell'enzima per il substrato.

L'idrolisi della T-5'-pNPP da parte della ELNPP e della ONPP è stata determinata in tampone Tris/HCl 100 mM, pH 8.0, utilizzando diverse concentrazioni di substrato, da 1 μ M a 2 mM per la ELNPP e da 0.1 mM a 4.0 mM per la ONPP.

I risultati indicano che l'attività enzimatica incrementa con l'aumentare della concentrazione di T-5'-pNPP, fino ad arrivare a concentrazioni di substrato saturanti.

Misurando la velocità iniziale di idrolisi delle miscele di reazione contenenti la stessa quantità di enzima e diverse quantità di substrato, e ponendo in un sistema di assi cartesiani la velocità in funzione delle diverse concentrazioni di enzima si ottiene una iperbole rettangolare il cui asintoto è la velocità massima (V_{\max}). Da questo grafico determiniamo la K_m , espressa come la concentrazione di substrato in corrispondenza della quale la velocità enzimatica è la metà della V_{\max} .

Per la ELNPP e per la ONPP, utilizzando la T-5'-pNPP come substrato, si ottengono rispettivamente i valori di K_m pari a $7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ e 0.027 mM , mentre i valori di k_{cat} sono rispettivamente pari a 2.78 e 1675 s^{-1} .

3.4. Altri substrati idrolizzati dalla ELNPP

Oltre che sulla T-5'-pNPP, la ELNPP mostra un'attività catalitica verso il bis-*p*NPP formando *p*-nitrofenolato. Inoltre idrolizza anche il legame pirofosforico del NAD(H) per generare AMP e NMN(H). La ELNPP mostra un'alta affinità per il NADH con un valore di K_m di 83 μ M, mentre per il bis-*p*NPP il valore di K_m è di 3.6 mM. A pH 8.0 il valore di k_{cat} per il bis-*p*NPP è di 0.070 s^{-1} . La grande differenza nel valore della K_m tra T-5'-pNPP e il bis-*p*NPP indica che la ELNPP preferisce i diesteri con un gruppo R' rappresentato dalla timidina, piuttosto che i diesteri con il gruppo R' rappresentato dal fenile. Inoltre, l'elevata somiglianza nei valori di K_m per la T-5'-pNPP e per il NADH suggerisce che l'enzima non abbia preferenze tra le pirimidine e le purine. I valori di k_{cat} , K_m e k_{cat}/K_m dell'enzima nei confronti di T-5'-pNPP, bis-*p*NPP e NADH sono riportati nella tabella 6.

Tabella 6. Alcuni parametri cinetici della NPP dal lattice di *E.characias*.
 [ELNPP] = 0.67 nmoli di siti attivi.

Substrati	Prodotti di reazione	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
T-5'-pNPP (Borato di Sodio pH 10.0)	TMP e <i>p</i> -nitrofenolato	2.78 ± 0.11	4.38 ± 0.18	0.63
T-5'-pNPP (Tris/HCl pH 8.0)	TMP e <i>p</i> - nitrofenolato	0.3 ± 0.02	0.007 ± 0.0003	42.8
Bis-pNPP (Tris/HCl pH 8.0)	<i>p</i> -Nitrofenol e <i>p</i> -nitrofenilfosfato	0.070 ± 0.006	3.6 ± 0.16	0.02
NADH (Tris/HCl pH 8.0)	NMNH e AMP	0.010 ± 0.002	0.083 ± 0.0058	0.12

Come riportato in tabella 7, la ELNPP è anche in grado di idrolizzare il legame pirofosforico del FAD formando FMN e AMP, e del ADP-ribosio producendo AMP e fosforibosio. La ELNPP idrolizza le diadenosine come l'Ap₂A e l'Ap₃A a AMP. Inoltre la ELNPP idrolizza l' Ap₄ formando AMP, e scinde solo il legame α - β fosfoanidridico dell'ATP. Anche l'ADP è idrolizzato a AMP. Infine, la ELNPP idrolizza il 3',5'-cAMP, ma molto lentamente e questo può essere spiegato dalla presenza del legame fosfodiesterico ciclico che probabilmente causa un ingombro sterico del sito catalitico della ELNPP.

L'AMP, non presentando legami pirofosforici o fosfodiesterici, non è un substrato per la ELNPP, infatti non riscontriamo la presenza di adenosina come prodotto di reazione, e questo ci permette di escludere un'attività 5'-nucleotidasica dell'enzima.

Non solo l'AMP non è un substrato per la ELNPP, ma è un inibitore competitivo e questo è stato

dimostrato mediante l'utilizzo del plot di Dixon, in cui si considera l'inverso della velocità di reazione ($1/v$) in funzione della concentrazione di inibitore $[I]$, utilizzando diverse concentrazioni di substrato.

L'inibizione dell'AMP sulla ELNPP è stata analizzata a pH 8.0 e 10.0, utilizzando tre concentrazioni di T-5'-pNPP come substrato (1, 0.5 e 0.25 mM). Dai risultati si evince che l'AMP è un inibitore competitivo dell'enzima con una K_i di 1.3 mM.

È stato inoltre dimostrato che la ELNPP è totalmente inattiva nei confronti del 4-nitrofenil fosfato un tipico substrato artificiale delle fosfatasi. Inoltre, utilizzando il saggio del molibdato-Malachite green, non viene rilevato il fosfato inorganico dopo aver incubato l'enzima da 1 a 24 ore con Ap_4 , ATP, glucosio-6-fosfato, fosfoenolpiruvato, bifosfoglicerato, inositolo-1-fosfato e piridossal-5-fosfato. Questi saggi sono stati eseguiti utilizzando una concentrazione di enzima 10 volte superiore a

quella utilizzata per l'attività nucleotide
pirofosfatasica/fodiesterasica.

Tutti questi risultati chiaramente escludono
un'attività fosfatasica per la ELNPP.

Tabella 7. Substrati e prodotti di reazione della ELNPP.

Substrati	Prodotti di reazione
T-5'-pNPP	TMP e <i>p</i> -nitrofenolato
Bis-pNPP	<i>p</i> - nitrofenolato e <i>p</i> -nitrofenilfosfato
NADH	NMNH e AMP
NAD ⁺	NMN e AMP
FAD	FMN e AMP
Ap ₂ A	AMP
Ap ₃ A	AMP
Ap ₄ A	AMP
3',5'-cAMP	AMP
Ap ₄	AMP
ATP	AMP
ADP	AMP
ADP-ribosio	AMP e fosforibosio

3.5. Altri substrati idrolizzati dalla ONPP

Anche la ONPP, oltre alla T-5'-pNPP, idrolizza il legame pirofosforico di NAD(P)(H). I valori di K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m per l'idrolisi di questi substrati sono riportati in tabella 8.

Come riportato nella stessa tabella 8, la ONPP idrolizza, anche se lentamente, il legame pirofosforico del FAD formando FMN e AMP; l'ADPG viene idrolizzato a glucosio-1-fosfato e AMP, l'UDPG a glucosio-1-fosfato e UMP, l'ADP-ribosio a AMP e fosforibosio. La ONPP idrolizza anche le diadenosine Ap₂A formando AMP, Ap₃A in AMP e Pi, Ap₄A in AMP e PPi. La ONPP scinde solo il legame α - β fosfoanidridico dell'ATP formando AMP e PPi. L'ADP è idrolizzato a AMP e Pi, l'UDP a UMP e Pi. Infine, la ONPP idrolizza il 3',5'-cAMP a AMP. Il turnover della reazione della ONPP con questi substrati è molto basso e vista la piccola quantità di prodotti di reazione rilevata dopo

24 ore di incubazione, non siamo stati in grado di misurare tutti i parametri cinetici per questi substrati nonostante l'uso di elevate quantità di enzima.

Inaspettatamente la ONPP non mostra alcuna attività catalitica nei confronti del bis-*p*NPP, neanche se vengono utilizzate concentrazioni di enzima 10 volte più alte di quelle utilizzate con la T-5'-*p*NPP.

Tabella 8. Substrati, prodotti della reazione e alcuni parametri cinetici della ONPP. Il tampone utilizzato è il Tris/HCl 100 mM pH 8.0.

Substrati	Prodotti di reazione	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1} s^{-1}$)
T-5'-pNPP	TMP e <i>p</i> -nitrofenolato	0.027 ± 0.003	1675 ± 98	62037
NAD⁺	NMN e AMP	3.2 ± 0.21	197 ± 16	62
NADH	NMNH e AMP	4.4 ± 0.36	828 ± 74	188
NADP⁺	NMN e adenosina 2',5' fosfato	0.38 ± 0.02	110 ± 13	289
NADPH	NMNH e adenosina 2',5' fosfato	0.65 ± 0.08	745 ± 68	1146
FAD	FMN e AMP	–	–	–
ADPG	AMP e glucosio-1-fosfato	–	–	–
UDPG	UMP e glucosio-1-fosfato	–	–	–
Ap₂A	AMP	–	–	–
Ap₃A	AMP e Pi	–	–	–
Ap₄A	AMP e Pi	–	–	–
3',5'-cAMP	AMP	–	–	–
ATP	AMP e Pi	–	–	–
ADP	AMP e Pi	–	–	–
UDP	UMP e Pi	–	–	–
ADP-ribosio	AMP e fosforibosio	–	–	–

Così come la ELNPP, anche la ONPP non idrolizza l'AMP, infatti non riscontriamo la presenza di adenosina come prodotto di reazione, questi risultati chiaramente escludono un'attività 5'-nucleotidasica dell'enzima.

L'effetto dell'AMP sull'attività della ONPP è stato determinato utilizzando diverse concentrazioni di AMP e T-5'-pNPP.

Costruendo un grafico in cui in ordinata si considera V (mmoli di substrato consumate al minuto/mg di enzima) e in ascissa si considerano le diverse concentrazioni di T-5'-pNPP, si ottengono delle curve da cui determiniamo il valore di $K_{m\text{-app}}$. Il valore di K_i si ottiene dal grafico di regressione lineare di $K_{m\text{-app}}/V_{\text{max}}$ in funzione della concentrazione di inibitore $[I]$, tale grafico è illustrato nella figura 11. Il valore di K_i corrisponde all'intersezione della retta nell'asse delle ascisse (Figura 11B) ed è pari a 1.1 mM.

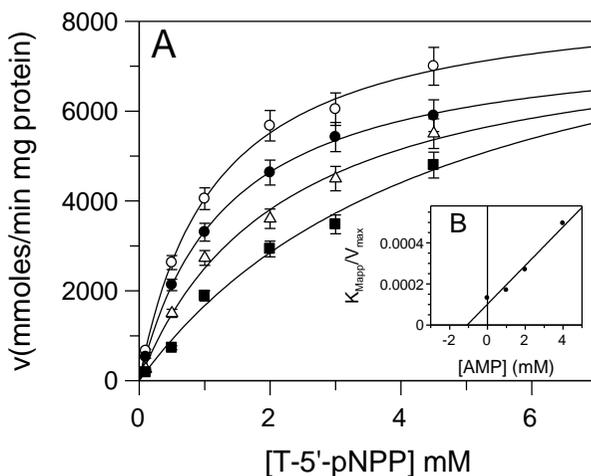


Figura 11. Influenza dell'AMP sull'attività della ONPP.

A: Effetto dell'AMP sull'attività della ONPP utilizzando diverse concentrazioni di T-5'-pNPP come substrato (da 0.1 mM a 4.5 mM). Le concentrazioni di AMP sono: 0 (○), 1 mM (●), 2 mM (△) e 4 mM (■). Il tampone utilizzato è il Na⁺-borato 100 mM, pH 10.0.

B: Plot della $K_{m,app}/V_{max}$ versus [AMP].

La ONPP è completamente inattiva nei confronti del 4-nitrofenil fosfato, un tipico substrato delle fosfatasi. Inoltre, dopo aver incubato l'enzima da 1 a 24 ore con ATP, glucosio-6-fosfato, fosfoenolpiruvato, bifosfoglicerato, inositolo-1-fosfato o piridossal-5-fosfato, non è stato riscontrato fosfato inorganico utilizzando il Kit del molibdato-Malachite green. Questo saggio è stato condotto utilizzando una concentrazione di enzima 10 volte più alta di quella utilizzata per misurare l'attività fosfodiesterasica della ONPP. Escludono quindi l'attività fosfatasica anche per la ONPP.

3.6. Effetto del pH

Tutti gli enzimi hanno “un optimum di pH” caratteristico, in corrispondenza del quale l’attività risulta essere massima. Questo valore ottimale di pH dipende dalla natura del tampone, dalla temperatura e dalla concentrazione del substrato. L’effetto del pH sull’attività enzimatica è dovuto alla variazione della struttura della proteina, in quanto gli enzimi contengono dei gruppi ionizzabili. Se lo stato di ionizzazione degli amminoacidi in una proteina viene alterato, come conseguenza si alterano i legami ionici che contribuiscono a determinare la forma tridimensionale della proteina stessa. Tuttavia, le ionizzazioni importanti sono quelle dei gruppi direttamente interessati alla catalisi nel sito attivo o quelle di gruppi in posizioni responsabili del mantenimento della conformazione attiva dell’enzima. Proprio perché le attività degli enzimi variano col pH, è stato studiato l’effetto di questo

parametro sull'attività delle NPP estratte dal lattice di *E. characias* e dai frutti di *O. ficus indica*.

L'effetto del pH sull'attività enzimatica della ELNPP è stato studiato in presenza dei seguenti tamponi (100 mM): Na-acetato (pH 5–6), K-fosfato (pH 6–7), Tris/HCl (pH 7.5–9), Na⁺-borato (pH 9–10) e Na₂CO₃ (pH 11–12).

Per ogni valore di pH in esame, ogni tampone è stato utilizzato a concentrazioni diverse, da 10 a 100 mM. Non è stato osservato alcun effetto di forza ionica per nessuno dei tamponi utilizzati.

I parametri cinetici della ELNPP per la T-5'-pNPP sono fortemente influenzati dal pH, dunque li abbiamo determinati a tutti i valori di pH sopra indicati.

La Figura 12 riporta il grafico della k_{cat} (moli di substrato consumate/moli di siti attivi in 1 secondo) in funzione del pH.

La ELNPP mostra a pH 10.0 il più alto valore di k_{cat} che è pari a 2.78 s^{-1} , circa 10 volte più alto di quello ottenuto a pH 8.0 (0.3 s^{-1}).

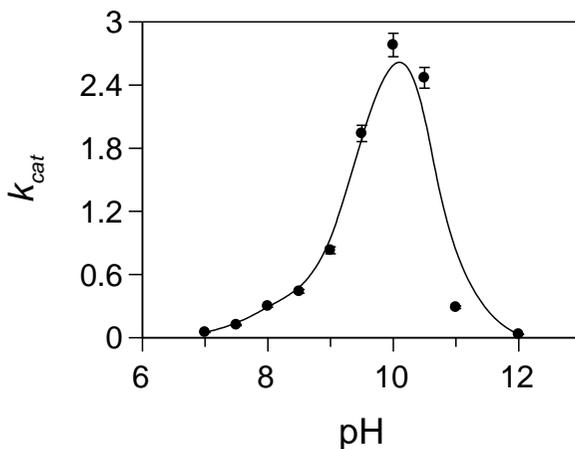


Figura 12. Effetto del pH sull'attività della NPP da *E. characias* utilizzando la T-5'-pNPP come substrato.

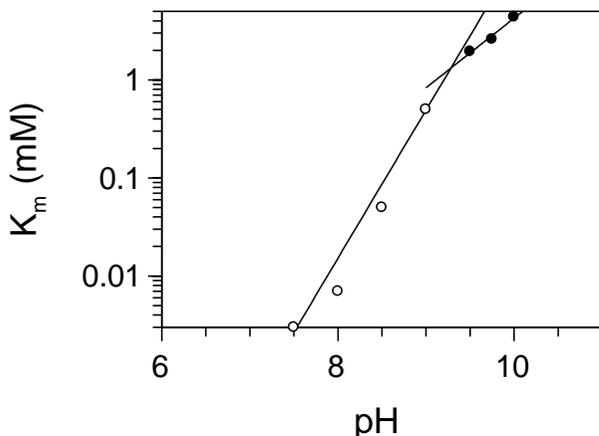


Figura 13. Effetto del pH sulla K_m della ELNPP utilizzando T-5'-pNPP come substrato.

Analizzando la variazione della K_m in funzione del pH si osserva che l'affinità dell'enzima per la T-5'-pNPP incrementa al diminuire dei valori di pH. Nel range di pH 10.0 \rightarrow 7.5 il valore di K_m si riduce più di 1100 volte con un $pK_a \cong 9$. La drastica perdita di attività a pH 11.0 che viene ripristinata quando il pH viene riportato a 10,0, potrebbe rispecchiare la denaturazione della proteina. Il logaritmo dei valori

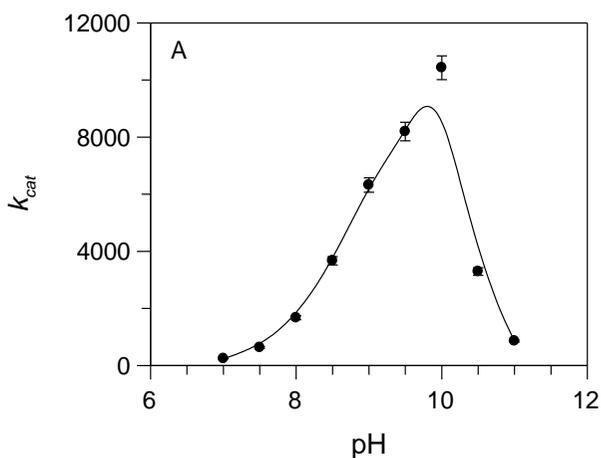
di K_m dell'enzima per la T-5'-pNPP in funzione del pH è mostrato in Figura 13.

Il valore della k_{cat}/K_m , una misura più indicativa della specificità dell'enzima per substrato, è pari $0.63 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $15.0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ rispettivamente a pH 10.0 e 7.5.

Per quanto riguarda la ONPP, l'effetto del pH sull'attività enzimatica è stato testato in presenza dei seguenti tamponi (100 mM): Tris/HCl (pH 7–9), Na^+ -borato (pH 9–10) e Na_2CO_3 (pH 10–11), utilizzando la T-5'-pNPP come substrato. Per tutti i valori di pH in esame, ogni tampone è stato utilizzato a concentrazioni diverse, da 10 a 100 mM, e per i tamponi utilizzati non è stato osservato alcun effetto di forza ionica. Anche in questo caso dal momento che i parametri cinetici della ONPP per T-5'-pNPP sono fortemente dipendenti dal pH, come già descritto per altri metallo-enzimi, abbiamo determinato con precisione i valori di K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m a tutti i valori di pH sopra citati. Il logaritmo

dei valori di K_m per la T-5'-pNPP in funzione del pH è mostrato nella Figura 14B. La dipendenza dei valori di K_m al variare del pH indica che l'affinità dell'enzima per la T-5'-pNPP aumenta quando i valori di pH diminuiscono. Nell'intervallo di pH da 10 a 7, il valore di K_m diminuisce di circa 40 volte (da 0.93 a 0.023 mM). Dal momento che diversi fattori, quali la ionizzazione dell'enzima libero, il complesso enzima-substrato e lo stesso substrato, potrebbero influenzare la K_m , abbiamo anche considerato i valori di k_{cat} e di k_{cat}/K_m , in funzione dei valori di pH. La correlazione dei valori di k_{cat} per la T-5'-pNPP al variare del pH è mostrata nella figura 14A. A pH 10 la ONPP mostra il valore più alto di k_{cat} , che è 10430 s^{-1} , circa 42 volte maggiore di quello riscontrato a pH 7.0 (246.4 s^{-1}). L'enzima perde la sua attività a pH 11.0, attività che può essere ripristinata quando il pH viene riportato a 10.0. La drastica perdita di attività a pH 11.0 potrebbe essere dovuta alla denaturazione dell'enzima, come

osservato per altre NPP. Nella figura 14C sono mostrati i valori di k_{cat}/K_m a pH 10, 9, 8 e 7, rispettivamente pari a 6.955, 105.383, 62.037 e 10.713 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$.



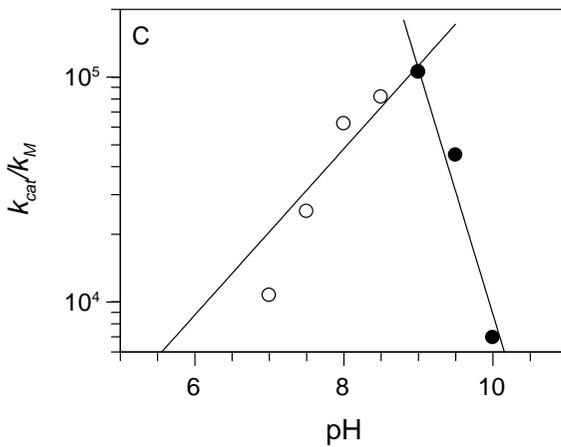
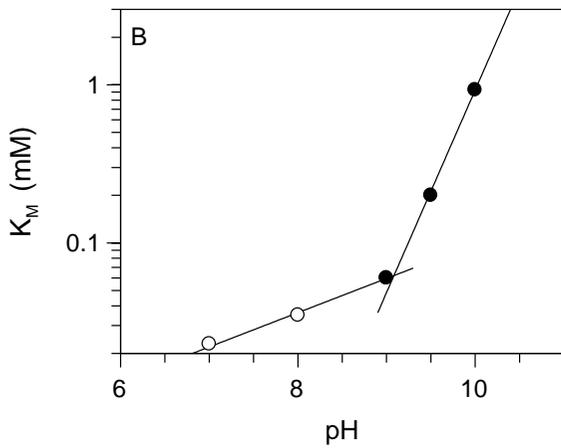


Figura 14. Effetto del pH sull'attività della ONPP utilizzando la T-5'-pNPP come substrato. Tamponi utilizzati (100 mM): Tris/HCl (pH 7–9), Na⁺-borato (pH 9–10) e Na⁺-carbonato (pH 10–11).

A: variazione della k_{cat} in funzione del pH;

B: variazione del logaritmo della K_m in funzione del pH.

C: variazione del logaritmo della k_{cat}/K_m in funzione del pH.

3.7. Effetto della temperatura

Gli effetti della temperatura sull'attività degli enzimi sono complessi e dipendono da alcune variabili del mezzo, come il pH, la composizione del tampone, la concentrazione del substrato e delle proteine presenti nella miscela di reazione.

Come in tutte le reazioni chimiche, con l'aumento della temperatura si ha un aumento dell'attività enzimatica secondo la legge di van't Hoff che è valida per le reazioni endotermiche.

Il quoziente di aumento della velocità della reazione per un aumento della temperatura di 10 °C (Q_{10}), è di circa 2. Tuttavia, superato un certo valore di temperatura, viene accelerata la perdita dell'attività enzimatica indotta dalla denaturazione termica delle proteine, con conseguente diminuzione della velocità di reazione. Fino a circa 50 °C si ha sostanzialmente un aumento della velocità della reazione enzimatica ma, a temperature superiori si riscontra la

denaturazione della proteina che dipende anche dal tempo di esposizione dell'enzima al calore.

La variazione della velocità di reazione con la temperatura, prescindendo da fenomeni di denaturazione, può essere espressa dall'equazione di Arrhenius :

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

dove:

- k è la costante di velocità;
- A è il fattore di frequenza degli urti tra molecole;
- E_a è l'energia di attivazione;
- R è la costante dei gas;
- T è la temperatura espressa in Kelvin.

Quindi, costruendo un grafico in cui si considera il logaritmo della velocità enzimatica nei confronti dell'inverso della temperatura assoluta si ottiene una

retta (che corrisponde all'equazione Arrhenius), da cui si può calcolare l'energia di attivazione della reazione (ΔH), espressa dall'equazione:

$$\Delta H = 4.560 \cdot m$$

dove:

$$4.560 = 2.303 \cdot 1.98$$

- 2.303 è il valore ottenuto dalla conversione del logaritmo naturale in quello esponenziale.
- 1.98 è il valore della costante dei gas.

$$m = \frac{\log \text{ nmoli di substrato consumate al min}}{1/T}$$

In questo lavoro di tesi è stato preso in esame l'effetto della temperatura sull'idrolisi della T-5'-*p*NPP da parte della ELNPP e della ONPP, in un range di temperature da 20 a 70 °C .

Per la ELNPP abbiamo esaminato la stabilità termica, incubando preventivamente l'enzima per 30 minuti alle temperature da 40 a 70 °C in 1 mL di tampone Tris/HCl 100 mM, pH 8.0.

Ad intervalli di 5 minuti, in un ora totale di incubazione, un' aliquota di 5 µl viene prelevata per testare l'attività enzimatica a 25 °C. Dai risultati ottenuti si evince che, l'enzima non mostra alcuna perdita dell'attività in seguito ad incubazione a 60 °C

sino a 30 min, mentre a 70 °C si ha una totale inattivazione.

Nella figura 15 si può osservare il grafico che riporta il logaritmo della velocità in funzione dell'inverso della temperatura assoluta (plot di Arrhenius) per la ELNPP. Da tale grafico si calcola una energia di attivazione della reazione pari a 2.4 Kcal/mole.

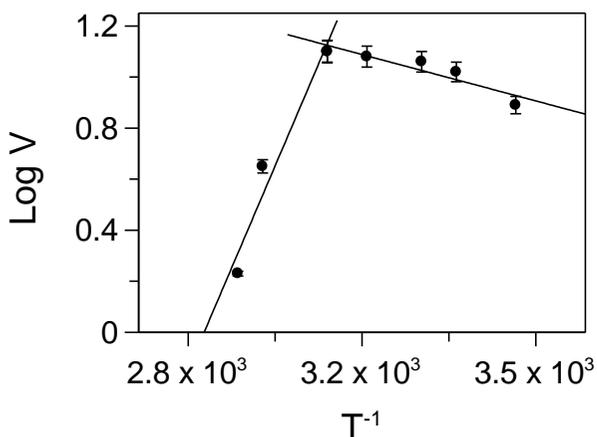


Figura 15. Effetto della temperature sulla reazione catalizzata dalla ELNPP. La reazione è stata saggiata nelle temperature comprese tra 20 e 70 °C, in

tampone 100 mM Na⁺-borato, pH 10.0. [ELNPP] = 0.07 nmoli di siti attivi. V = nmolT-5'-pNPP/min.

Anche nel caso della ONPP abbiamo analizzato l'effetto della temperatura sulla velocità della reazione e dal plot di Arrhenius (Figura 16), a temperature inferiori rispetto a quelle che inducono la denaturazione dell'enzima, si ha una linea retta da cui si calcola una energia di attivazione pari a 5.5 Kcal/mole.

Inoltre, l'enzima è stato incubato a 75 °C in 1 mL di tampone Tris/HCl 100 mM, pH 8.0. Ad intervalli di 5 minuti, in un'ora totale di incubazione, un'aliquota di 5 µl viene prelevata per testare l'attività dell'enzima a 25 °C. Dai risultati ottenuti si deduce che l'enzima non mostra alcuna perdita dell'attività in seguito ad incubazione a 75 °C sino a 30 min.

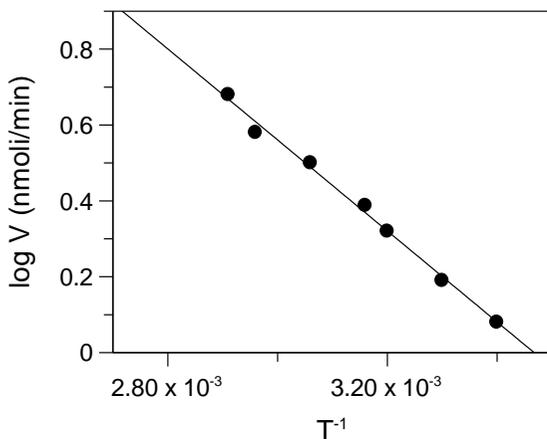


Figura 16. Effetto della temperatura sulla reazione catalizzata dalla ONPP. La reazione è stata saggiata in un range di temperature di 20–70 °C, in tampone 100 mM Na⁺-borato, pH 10.0. [ONPP] = 0.000015 nmoli di siti attivi. V = nmol T-5'-pNPP/min.

3.8 . Contenuto dei metalli ed effetto dell'EDTA

La ELNPP è una proteina che presenta 1 mole di Ca^{2+} e 1 mole di Mg^{2+} per mole di subunità. Più precisamente, la ELNPP è un metallo enzima, contenente 0.11 % di Ca^{2+} e 0.07 % di Mg^{2+} . Su questa base abbiamo calcolato una massa molecolare minima rispettivamente di 36.4 e di 34.7 kDa.

Come aspettato per i metallo enzimi, l'attività della ELNPP è bloccata in presenza di EDTA, chelante dei metalli. La presenza di quattro gruppi carbossilici $-\text{COOH}$ e di due atomi di azoto (Figura 17) fa sì che la molecola di EDTA sia in grado di formare complessi stabili con moltissimi cationi (Figura 17).

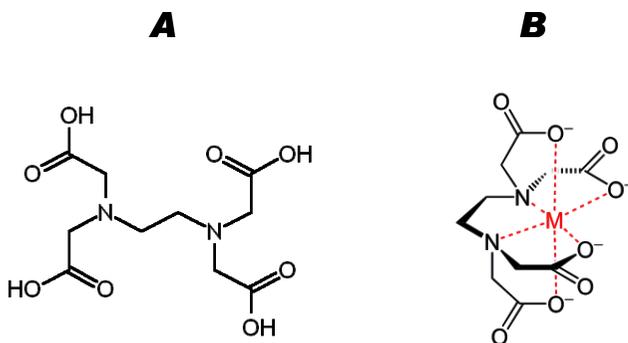


Figura 17. Struttura dell'EDTA (A) e formazione di un complesso EDTA-metallo (B).

La ELNPP è stata incubata a 25 °C in Tris/HCl 100 mM pH 7.5 con EDTA 2 mM per 18 ore e poi dializzata. Se tra l'EDTA ed i metalli esiste una forte interazione, la dialisi sarà in grado di allontanare l'EDTA che porterà via con sé lo ione; se invece l'EDTA è legato debolmente al metallo, l'agente chelante verrà comunque allontanato senza aver scalzato alcuno ione. L'enzima in presenza di EDTA

risulta avere un'attività del 1-2 %. Dopo la dialisi la ELNPP non riprende l'attività confermando l'ipotesi che l'EDTA abbia chelato i metalli indispensabili per l'attività dell'enzima.

Dopo aver ottenuto i suddetti risultati, abbiamo cercato di capire se il nostro enzima, dopo trattamento con EDTA, fosse in grado di legare nuovamente a sé i metalli e di ripristinare in modo completo l'attività catalitica. L'aggiunta di Ca^{2+} 1 mM ci ha permesso di osservare una ripresa parziale dell'attività enzimatica (43 %), mentre con l'aggiunta del solo Mg^{2+} 1 mM abbiamo registrato un'attività del 2 %. Abbiamo ripetuto le prove a concentrazioni più alte di Mg^{2+} e Ca^{2+} (10 mM – 30 mM) e per quanto riguarda il magnesio, non si osserva alcun ripristino dell'attività, mentre per quanto riguarda gli ioni calcio, alla concentrazione di 10 mM si osserva un ripristino quasi totale dell'attività enzimatica (95 %).

Questi risultati sono stati confermati dall'assorbimento atomico, indicando che l'EDTA è capace di rimuovere il Ca^{2+} presente nella ELNPP, mentre il magnesio, con la stessa procedura non viene rimosso, dunque questo ultimo catione risulta fortemente legato all'enzima. Inoltre abbiamo analizzato l'influenza di diversi metalli sull'attività della ELNPP. Ca^{2+} e Mg^{2+} non hanno alcun effetto sull'attività enzimatica, il Mn^{2+} incrementa leggermente l'attività dell'enzima. Cd^{2+} e Co^{2+} hanno un effetto inibitorio, mentre è emerso un forte potere inibitorio indotto dal Ni^{2+} e dallo Zn^{2+} (Tabella 9).

Tabella 9. Effetto di vari cationi divalenti sull'attività enzimatica della ELNPP. Tampone utilizzato Tris/HCl 100 mM pH 8.

Cationi divalenti (30 mM)	% di attività della ELNPP
Blank (senza ioni metallici)	100
Ni ²⁺	14
Zn ²⁺	20
Cd ²⁺	66
Co ²⁺	72
Ca ²⁺	100
Mg ²⁺	103
Mn ²⁺	202

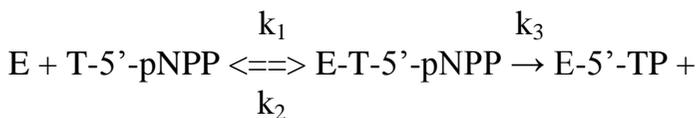
Anche la ONPP contiene 1 mole di Ca^{2+} e 1 mole di Mg^{2+} per mole di subunità. Infatti, anche la ONPP è un metallo enzima contenente 0,075 % di Ca^{2+} e 0.05 % di Mg^{2+} . Su questa base abbiamo calcolato una massa molecolare minima rispettivamente di 53.4 e 48.6 kDa.

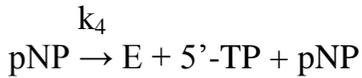
Anche la ONPP incubata in presenza di EDTA 1 mM perde l'attività enzimatica. Tuttavia, dopo la dialisi contro tampone Tris/HCl 100 mM, pH 8.0, o dopo gel filtrazione su una colonna di Sephacryl S-200 (a 4 °C; utilizzando tampone Tris/HCl 100 mM, pH 8.0), l'enzima recupera interamente la sua attività catalitica, indicando che l'EDTA non è capace di rimuovere gli ioni metallici indispensabili per l'attività della ONPP.

3.9. Studio dello stato pre-stazionario

Per conoscere maggiori dettagli circa il meccanismo catalitico della ELNPP e della ONPP è necessario lo studio dei sistemi cinetici in stato prestazionario. Tali esperimenti richiedono l'utilizzo di tecniche particolari che consentono di cogliere eventi dell'ordine del millisecondo, come ad esempio la tecnica a flusso interrotto o stopped flow.

Quando la ELNPP viene rapidamente miscelata con la T-5'-pNPP nello stopped flow, l'idrolisi della prima molecola di substrato si verifica più rapidamente di quella delle molecole successive, vale a dire che lo stato stazionario è preceduto da una cinetica più veloce (Figura 18). Questa osservazione non è affatto inusuale in questo tipo di enzimi e si spiega mediante il seguente Schema:





dove pNP è il 4-nitrofenolato.

In tale schema vengono evidenziate tre specie di enzima e quattro costanti cinetiche che noi chiamiamo k_1 , k_2 , k_3 e k_4 . Inoltre, il fatto che noi osserviamo un processo più veloce che precede lo stato stazionario implica che $k_3 \gg k_4$. Tali requisiti sono coerenti con ciò che è noto per enzimi simili (Bollen et al., 2000).

Le equazioni differenziali che derivano dallo schema sono:

$$d[E] / dt = [E-TP]k_4 + [E-TPP]k_2 - [E][S]k_1$$

$$d[E-TPP] / dt = [E][S]k_1 - [E-TPP](k_2+k_3)$$

$$d[E-TP] / dt = [E-TPP]k_3 - [E-TP]k_4$$

Lo stato prestazionario è dominato dalle primi due reazioni e viene limitato da una $[S]k_1$ o k_3 , a seconda della concentrazione del substrato, mentre il tasso di stato stazionario è limitato da una $[S]k_1$ o k_4 , a seconda della concentrazione del substrato. I rapporti tra le costanti intrinseche k_1 e k_4 e i parametri di stato stazionario sono i seguenti:

$$k_{\text{cat}} = k_3k_4 / (k_3 + k_4)$$

$$K_m = (k_2k_4 + k_3k_4) / (k_1k_3 + k_1k_4)$$

La Figura 18 mostra un tipico time course, registrato con lo stopped flow utilizzando 3 μM di enzima e T-5'-pNPP da 12 a 100 μM (lunghezza d'onda analizzata a 400 nm; T = 25 °C, tampone Tris/HCl pH 8,0).

L'asse delle ordinate della figura rappresenta la concentrazione del prodotto che assorbe a 400 nm (P nello schema). Al fine di simulare gli spettri mediante integrazione numerica è stata utilizzata la

seguinte serie di costanti di velocità: $k_1 = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 2 \text{ s}^{-1}$; $k_3 = 8 \text{ s}^{-1}$; $k_4 = 0.4 \text{ s}^{-1}$.

Da queste costanti di velocità possono essere calcolati i seguenti parametri dello stato stazionario:

$$k_{\text{cat}} = 0.426 \text{ s}^{-1}, K_m = 5.3 \text{ }\mu\text{M}.$$

Utilizzando il bis-*p*NPP come substrato, non è stato osservato alcun stato pre-stazionario. Ciò può essere dovuto al valore elevato di K_m per questo substrato, che fa sì che solo una frazione dell'enzima sia attivo nelle condizioni sperimentali e pregiudica così la discriminazione tra lo stato pre-stazionario e quello stazionario.

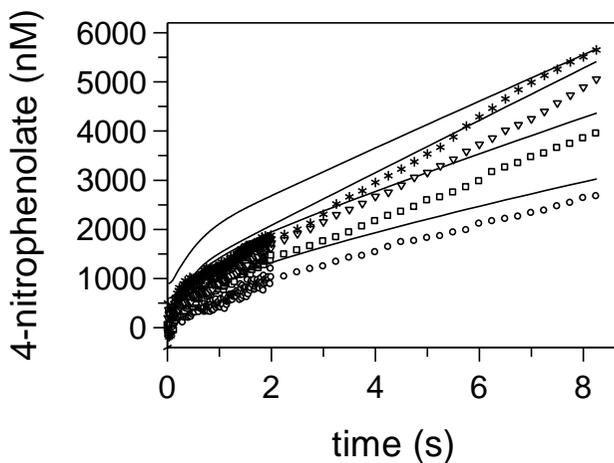


Figura 18. Time course dello stato prestazionario della ELNPP. La ELNPP (3.0 μM) è stata miscelata con 100 μM (□*), 50 μM (∇), 25 μM (□) e 12.5 μM (○) di T-5'-pNPP.

3.10. Determinazione dei residui di istidina e dei gruppi sulfidrilici della ELNPP

Il dietilpicrocarbonato (DEPC) reagisce con gli azoti imidazolici dei residui istidinici delle proteine formando il derivato carbetossiistidina; questa reazione può essere seguita spettrofotometricamente misurando l'incremento dell'assorbanza a 240 nm. È possibile quindi determinare il numero dei residui di istidina presenti nella proteina in funzione del ΔA_{240} della carbetossistidina utilizzando il coefficiente di estinzione $\epsilon_{240\text{nm}} = 3200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Sono stati condotti degli esperimenti incubando la ELNPP per 60 minuti con 0.25 mM di DEPC in tampone 100 mM K-fosfato pH 7.5 (non si utilizza il tampone Tris/HCl data la rapida degradazione di questo reattivo in tale tampone). A diversi intervalli di tempo vengono prelevate delle aliquote dalla miscela di reazione e di queste viene saggiata l'attività enzimatica in condizioni standard. Quando

l'assorbanza a 240 nm è costante, l'enzima risulta irreversibilmente inibito e si titolano 3 residui di istidina per monomero (Figura 19).

L'inattivazione di un'enzima mediante il DEPC può essere correlata con la modificazione di un residuo di istidina solo se l'idrossilamina, responsabile della rimozione del gruppo carbetossi dal derivato carbetossiistidina, riattiva l'enzima (Miles E. W. 1977). Infatti, dopo aver aggiunto idrossilamina 20 mM nell'incubato, a cui segue una dialisi di 20 ore in tampone K-fosfato 100 mM, pH 7.5, l'attività della ELNPP viene nuovamente ripristinata.

È noto che il DEPC possa reagire oltre che con l'istidina con diversi residui nucleofili, tra cui la tirosina. La O-carbetossilazione di un residuo di tirosina viene determinata seguendo il decremento dell'assorbanza a 278 nm, ma la reazione del DEPC con la ELNPP non comporta nessun cambiamento spettrofotometrico a 278 nm, e ciò esclude dunque una modificazione dei residui di tirosina.

I reagenti specifici per le modificazioni dei residui di arginina (fenilgliossale) o per gli amino gruppi (2,4-dinitro-1-fluorobenzene) non hanno alcuna influenza sull'attività della ELNPP.

Dagli esperimenti effettuati è stata quindi osservata una inattivazione irreversibile della ELNPP da parte del DEPC, e i dati sono chiaramente correlati alla modificazione dei residui di istidina il cui ruolo proposto è quello di coordinare gli ioni metallici, come osservato in diverse NPP.

Inoltre, al fine di rilevare la presenza di gruppi sulfidrilici liberi, la ELNPP è stata incubata con un reattivo come il 2,2'-ditio-dipiridina (PDS) che reagisce con i tioli formando il corrispondente tiopiridone, la cui formazione può essere determinata seguendo la variazione dell'assorbanza a 324 nm. Con tale reattivo vengono titolati due gruppi sulfidrilici per monomero e l'enzima risulta irreversibilmente inattivato.

Poichè è improbabile che i gruppi-SH siano coinvolti nel meccanismo catalitico delle NPP, riteniamo che i gruppi sulfidrilici della ELNPP siano necessari per il mantenimento della conformazione nativa della proteina.

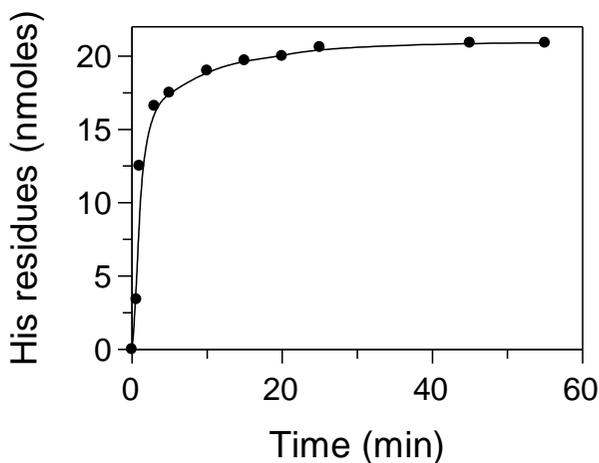


Figura 19. Titolazione della ELNPP con DEPC.

4. CONCLUSIONI

Le nucleotidasi pirofosfatasi/fosfodiesterasi sono un gruppo di enzimi ampiamente distribuito nei procarioti, eucarioti inferiori, piante e mammiferi che, generano nucleosidi 5'-monofosfato da una varietà di nucleotidi e loro derivati.

La ELNPP estratta dal lattice dell'*E. characia*, è una metallo proteina con una massa molecolare di 80 ± 5 kDa, formata da due identiche subunità ognuna contenente uno ione Ca^{2+} e uno ione Mg^{2+} . Tuttavia mentre il Mg^{2+} risulta fortemente legato all'enzima, il Ca^{2+} può essere facilmente rimosso mediante un trattamento con EDTA. L'enzima privato del Ca^{2+} perde completamente l'attività catalitica, la quale può essere totalmente ripristinata incubando l'enzima inattivo in presenza di ioni Ca^{2+} .

La ONPP, purificata dai frutti di *Opuntia ficus indica*, mostra una massa molecolare di 105 ± 8 kDa ed è costituita da due identiche subunità. Anche in

questo enzima in ogni subunità è presente uno ione Ca^{2+} e uno ione Mg^{2+} .

Sia la ELNPP che la ONPP sono proteine glicosilate, hanno un optimum di pH a 10.0, sono stabili ad alte temperature e inibite dall'EDTA e dall'AMP.

Questi enzimi idrolizzano con maggiore efficienza il substrato artificiale T-5'-*p*NPP generando la timidina 5'-monofosfato e il p-nitrofenolo come prodotti finali. Però la ONPP non mostra alcuna attività catalitica verso il bis-*p*NPP, un altro substrato artificiale idrolizzato da altre nucleotidasi/pirofosfatasi/fofosfodiesterasi compresa la ELNPP.

Attualmente il substrato fisiologico delle NPP vegetali non è stato ancora identificato ma questi enzimi sembrano essere implicati nella regolazione del flusso del carbonio proveniente dalla biosintesi dell'amido e della parete cellulare polisaccaridica ad altre vie metaboliche, in risposta alle esigenze fisiologiche della cellula.

La NPP estratta dal frumento (*Triticum aestivum L.*) (Joye et al., 2010) è strettamente correlata alle NPP di mammifero, ed idrolizzando i coenzimi nicotinamidici, agenti redox e cofattori di diversi enzimi, possono influenzare la lavorazione del grano e, quindi, essere importanti per la qualità del prodotto finale.

Guèra e Sabater (2002) hanno analizzato le variazioni del complesso NADH deidrogenasi durante la maturazione del pepe e del pomodoro. Il complesso NADH deidrogenasi è presente prevalentemente nel pericarpo esterno del pomodoro, mentre risulta uniformemente distribuito nel pericarpo del pepe. In entrambi i casi, è stata osservata una diminuzione della quantità totale del complesso NADH deidrogenasi nel corso dello sviluppo dei frutti dallo stadio verde a quello rosso. Questa diminuzione corrisponde alla contemporanea diminuzione nel contenuto e nell'attività del complesso NADH deidrogenasi. Questi risultati

suggeriscono che la funzione del complesso NADH deidrogenasi, probabilmente legata ad una catena di trasporto degli elettroni plastidiali, può essere importante durante la maturazione e lo sviluppo del frutto.

Attualmente non siamo in grado di suggerire l'esatto ruolo fisiologico della ELNPP e della ONPP. Tuttavia l'alta efficienza catalitica di idrolisi di NAD(P)(H), rispetto all'attività molto bassa verso tutti gli altri substrati naturali saggiati, suggerisce che questi enzimi possano modulare l'attività delle deidrogenasi. Inoltre, la preferenza per i nucleotidi ridotti potrebbe suggerire un ruolo nella regolazione intracellulare del rapporto NAD(P)H/NAD(P). Infine il significativo aumento dell'attività enzimatica della ONPP da giugno ad agosto correlato con la possibile modulazione dell'attività delle deidrogenasi ci porta ad ipotizzare che la ONPP possa essere uno dei fattori che influenzano la maturazione dei frutti.

Visti i diversi ruoli delle NPP nelle piante, sono indispensabili ulteriori indagini per inquadrare la ELNPP e la ONPP in un processo metabolico più ampio in modo tale da chiarire definitivamente il loro ruolo fisiologico.

BIBLIOGRAFIA

- Andoh, K., Jin-Hua, P., Terashima, K., Nakamura, H., and Sano, K. 1999. Genomic structure and promoter analysis of the ecto-phosphodiesterase I gene (*PDNP3*) expressed in glial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1446**:213–224.
- Antonini, G., Bellelli, A., Brunori, M., and Falcioni, G. 1996. Kinetic and spectroscopic properties of the cyanide complex of ferrous hemoglobins I and IV from trout blood. *Biochem. J.* **314**, 533–540.
- Appendino, G., Belloro, E., Tron, G. C., Jakupovic, J., and Ballero, M. 2000. Polycyclic diterpenoids from *Euphorbia characias*. *Fitoterapia* **71**: 134–142.
- Barbieri, L., Falasca, A., Franceschi, C., Licastro, F., Rossi, C. A., and Stirpe, F. 1983. Purification and properties of two lectins from the latex of the euphorbiaceous plants *Hura crepitans* L. (sand-

- box tree) and *Euphorbia characias* L. (Mediterranean spurge). *Biochem. J.* **215**:433–439.
- Bartkiewicz, M., Sierakowska, H., and Shugar, D. 1984. Nucleotide pyrophosphatase from potato tubers. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **143**:419–426.
- Belli, S. I., Sali, A., and Goding, J. W. 1994. Divalent cations stabilize the conformation of plasma cell membrane glycoprotein PC-1 (alkaline phosphodiesterase I). *Biochem. J.* **304**:75–80.
- Bollen, M., Gijsbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W., and Stefan, C. 2000. Nucleotide Pyrophosphatases/Phosphodiesterases on the Move. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**:393–432.
- Bossemeyer, D. 1994. The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element. *Trends Biochem. Sci.* **19**:201–205.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
- Buckley, M. F., Loveland, K. A., McKinstry, W. J., Garson, O. M., and Goding, J. W. 1990. Plasma cell membrane glycoprotein PC-1. cDNA cloning of the human molecule, amino acid sequence and chromosomal location. *J. Biol. Chem.* **265**:17506–17511.
- Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Buongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., Kohen, R., and Livrea, M. A. 2002. Antioxidant activities of Sicilian Prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J. Agricult. Food Chem.* **50**:6895–6901.
- Carillo-López, A., Cruz-Hernández, A., Cárabez-Trejo, A., Guevara-Lara, F., and Paredes-López, O. 2002. Hydrolytic activity and ultrastructural

- changes in fruit skins from two prickly pear (*Opuntia* sp.) varieties during storage. *J. Agricult. Food Chem.* **50**:1681–1685.
- Chavez-Santoscoy, R. A., Gutierrez-Uribe, J. A., and Serna-Saldívar, S. O. 2009. Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine Prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. *Plant Foods Hum. Nutr.* **64**:146–152.
- Deissler, H., Lottspeich, F., and Rajewsky, M. F. 1995. Affinity purification and cDNA cloning of rat neural differentiation and tumor cell surface antigen gp130RB13-6 reveals relationship to human and murine PC-1. *J. Biol. Chem.* **270**:9849–9855.
- Díaz Medina, E. M., Rodríguez Rodríguez, E. M., and Díaz Romero, C. 2007. Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food Chem.* **103**:38–45.

- El-Moatassim, C., Dornand, J., and Mani, J-C. 1992. Extracellular ATP and cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1134**:31–45.
- Funakoshi, I., Kato, H., Horie, K., Yano, T., Hori, Y., Kobayashi, H., Inoue, T., Suzuki, H., Fukui, S., Tsukahara, M., Kajii, T., and Yamashina, I. 1992. Molecular cloning of cDNAs for human fibroblast nucleotide pyrophosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**:180–187.
- Gabriel, O. 1971. Analytical disc gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **22**:565–578.
- Galperin, M. Y., Bairoch, A., and Koonin, E. G. 1998. A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactorindependent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases. *Protein Sci.* **7**:1829–1835.
- Gasmi, L., Cartwright, J. L., and McLennan, A. G. 1998. The hydrolytic activity of bovine adrenal medullary plasma membranes towards

diadenosine polyphosphates is due to alkaline phosphodiesterase-I. *Biochim. Biophys. Acta* **1405**:121–127.

Gelotte, B. 1960. Studies on gel filtration. Sorption properties of the bed material Sephadex. *J. Chromatogr.* **3**:330–342.

Gijsbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W., and Bollen, M. 2001. Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* **276**: 1361–1368

Gijsbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W., and Bollen, M. 2003. Functional characterization of the non-catalytic ectodomains of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP1. *Biochem. J.* **371**: 321–330.

Goding, J. W. 2000. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. *J. Leukoc. Biol.* **67**:285–311.

- Goding, J. W., Grobben, B., and Slegers, H. 2003. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim. Biophys. Acta* **1638**:1–19.
- Griffith, M. P. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *Am. J. Bot.* **91**: 1915–1921.
- Guéra, A., and Sabater, B. 2002. Changes in the protein and activity levels of the plastid NADH-plastoquinone-oxidoreductase complex during fruit development. *Plant Physiol. Biochem.* **40**:423–429.
- Heldin, C. H., Wasteson, A., Fryklund, L., and Westermark, B. 1991. Somatomedin B: mitogenic activity derived from contaminant epidermal growth factor. *Science* **213**:1122–1123.
- Hickman, S., Wong-Yip, Y. P., Rebbe, N. F., and Greco, J. M. 1985. Formation of lipid-linked

- oligosaccharides by MOPC 315 plasmacytoma cells. Decreased synthesis by a nonsecretory variant. *J. Biol. Chem.* **260**:6098–6106.
- Holtz, K. M. and Kantrowitz, E. R. 1999. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Lett.* **462**:7–11.
- Hosoda, N., Hoshino, S-I., Kanda, Y., and Katada, T. 1999. Inhibition of phosphodiesterase/pyrophosphatase activity of PC-1 by its association with glycosaminoglycans. *Eur. J. Biochem.* **265**:763–770.
- Jin-Hua, P., Goding, J. W., Nakamura, H., and Sano, K. 1997. Molecular cloning and chromosomal localization of PD-I β (*PDNP3*), a new member of the human phosphodiesterase I genes. *Genomics* **45**:412–415.
- Joye, I. J., Beliën, T., Brijs, K., Proost, P., Soetaert, W., and Delcour, J.A. 2010. Characterisation of the first wheat (*Triticum aestivum* L.) nucleotide

- pyrophosphatase/phosphodiesterase resembling mammalian counterparts. *J. Cereal Sci.* **51**:326–336.
- Kelly, S. J., Dardinger, D. E., and Butler, L. G. 1975. Hydrolysis of phosphonate esters catalyzed by 5'-nucleotide phosphodiesterase. *Biochemistry* **14**:4983–4988.
- Ko, J. H., Chow, K. S., Han, K. H.. 2003. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Mol. Biol.* **53**: 479–492.
- Lazarowski, E. R., Boucher, R. C., and Harden, T. K. 2000. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J. Biol. Chem.* **275**:31061–31068.
- Lazzarino, G., Di Pierro, D., Gavazzi, B., Cerroni, L., and Giardina, B. 1991. Simultaneous

- separation of malondialdehyde, ascorbic acid, and adenine nucleotide derivatives from biological samples by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **197**:191–196.
- Lee, H. Y., Murata, J., Clair, T., Polymeropoulos, M. H., Torres, R., Manrow, R. E., Liotta, L. A., and Stracke, M. L. 1996. Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**:714–719.
- Medda, R., Padiglia, A., Lorrai, A., Murgia, B., Finazzi Agrò, A., Castagnola, M., and Floris, G. 2000. Purification and properties of a nucleotide pyrophosphatase from lentil seedlings. *J. Protein Chem.* **19**:209–214.
- Miles, E. W. 1997. Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol.* **47**:431–442.
- Moe, O. W., Jr. and Butler, L. G. 1983. The catalytic mechanism of bovine intestinal 5'-nucleotide

- phosphodiesterase. pH and inhibition studies. *J. Biol. Chem.* **258**:6941–6946.
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C., and Carle, R. 2005. Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus* cacti and betalain-containing model solutions derived therefrom. *Food Res. Int.* **38**:975–981.
- Mura, A., Medda, R., Longu, S., Floris, G., Rinaldi, A.C., and Padiglia, A. 2005. A Ca²⁺/calmodulin-binding peroxidase from *Euphorbia* latex. Novel aspects of calcium-hydrogen peroxide cross-talk in the regulation of plant defenses. *Biochemistry* **44**:14120–14130.
- Nanjo, Y., Oka, H., Ikarashi, N., Kaneko, K., Kitajima, A., Mitsui, T., Muñoz, F. J., Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., and Pozueta-Romero, J. 2006. Rice plastidial N-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-Golgi to the chloroplast

- through the secretory pathway. *Plant Cell*. **18**: 2582–2592.
- Narita, M., Goji, J., Nakamura, H., and Sano, K. 1994. Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-I α) from rat brain. *J. Biol. Chem.* **269**:28235–28242.
- Nassar, A. G. 2008. Chemical composition and functional properties of prickly pear (*Opuntia ficus indica*) seeds flour and protein concentrate. *Word Journal of Dairy & Food Sciences* **3**:11–16.
- Olczak, M., Ciuraszkiewicz, J., Wójtowicz, H., Maszczak, D., and Olczak, T. 2009. Diphosphonucleotide phosphatase/phosphodiesterase from yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) contains an iron-manganese center. *FEBS LETT.* **583**:3280–3284.
- Olczak, M., Kobialka, M., and Watorek, W. 2000. Characterization of diphosphonucleotide phosphatase/phosphodiesterase from yellow lupin

- (*Lupinus luteus*) seeds. *Biochim. Biophys. Acta* **1478**:239–247.
- Padiglia, A., Cruciani, E., Pazzaglia, G., Medda, R., and Floris, G. 1995. Purification and characterization of *Opuntia* Peroxidase. *Phytochem.* **38**:295–297.
- Padiglia, A., Medda, R., Lorrain, A., Murgia, B., Pedersen, J. Z., Finazzi Agró, A., and Floris, G. 1998. Characterization of *Euphorbia characias* latex amine oxidase. *Plant Physiol.* **117**:1363–1371.
- Palocci, C., Soro, S., Cernia, E., Fiorillo, F., Belsito, C. M. A., Monacelli, B., Delle Monache, G., and Pasqua, G. 2003. Lipolytic isoenzymes from *Euphorbia* latex. *Plant Sci.* **165**:577–582.
- Pintus, F., Spanò, D., Bellelli, A., Angelucci, F., Floris, G., and Medda, R. 2009. Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from *Euphorbia characias* latex: purification and characterization. *Plant Sci.* **177**:636–642.

- Pintus, F., Medda, R., Rinaldi, A. C., Spanò, D., and Floris, G. 2010. Euphorbia latex biochemistry: Complex interactions in a complex environment. *Plant Biosystems*. **144**:381–391.
- Razzell, W.E. 1963. Phosphodiesterases. In: *Methods in Enzymology*, Colowick, S. P., and Kaplan, N.O., Eds., Academic Press, San Diego, **6**:236–258.
- Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Zanduetta-Criado, A., and Pozueta-Romero, J. 2000. Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 8705–8710.
- Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Zanduetta-Criado, A., Moreno-Bruna, B., Muñoz, F. J., Akazawa, T., and Pozueta-Romero, J. 2001. Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) are distinct

oligomers of HvGLP1, a germin-like protein. *FEBS Letters*. **490**:44–48.

Ruiz Pérez-Cacho, M. P., Galán-Soldevilla, H., Corrales García, J., and Hernández Montes, A. 2006. Sensory characterization of nopalitos (*Opuntia* spp.). *Food Res. Int.* **39**:285–293.

Salvucci, M. E., and Crafts-Brandner, S. J. 1995. Purification and properties of a unique nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I that accumulates in soybean leaves in response to fruit removal. *Plant Physiol.* **108**:1269–1276.

Sakagami, H., Aoki, J., Natori, Y., Nishikawa, K., Kakehi, Y., Natori, Y., and Arai, H. 2005. Biochemical and molecular characterization of a novel coline specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *J. Biol. Chem.* **280**:23084–23093.

- Schwartz, I., Seger, D., and Shaltiel, S. 1999. Vitronectin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **31**:539–544.
- Shinshi, H., Miwa, M., Kato, K., Noguchi, M., and Matsushima, T. 1976. A novel phosphodiesterase from cultured tobacco cells. *Biochemistry.* **15**:2185–2190.
- Stefan, C. 1999. The function and regulation of nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases in rat liver. *Acta Biomedica Lovaniensa* **192**, Leuven University Press, Leuven, Belgium.
- Stracke, M. L., Årestad, A., Levine, M., Krutzsch, H. C., and Liotta, L. A. 1995. Autotaxin is an *N*-linked glycoprotein but the sugar moieties are not needed for its stimulation of cellular motility. *Melanoma Res.* **5**:203–209.
- Stracke, M. L., Krutzsch, H. C., Unsworth, E. J., Årestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E., and Liotta, L. A. 1992. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a

- novel motility-stimulating protein. *J. Biol. Chem.* **267**:2524–2529.
- Strynadka, N. C. J. and James, M. N. G. 1989. Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:951–998.
- Takahashi, T., Old, L. J., and Boyse, E. A. 1970. Surface alloantigens of plasma cells. *J. Exp. Med.* **131**:1325–1341.
- Uchoa, A. F., Souza, P. A. S., Zarate, R. M. L., Gomes-Filho, E., and Campos, F. A. P. 1998. Isolation and characterization of a reserve protein from the seeds of *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**:757–761.
- Uhlen-Hansen, L. and Yanagishita, M. 1993. Differential effect of brefeldin A on the biosynthesis of heparan sulfate and chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans in rat ovarian granulosa cells in culture. *J. Biol. Chem.* **268**:17370–17376.

- Uriarte, M., Stalmans, W., Hickman, S., and Bollen, M. 1995. Regulation of purified hepatic PC-1 (phosphodiesterase-I/nucleotide pyrophosphatase) by threonine auto(de)phosphorylation and by binding of acidic fibroblast growth factor. *Biochem. J.* **306**:271–277.
- Weber, K., and Osborne, M. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**:4406–4412.
- Yamashina, I., Yoshida, H., Fukui, S., and Funakoshi, I. 1983. Biochemical studies on Lowe's syndrome. *Mol. Cell. Biochem.* **52**:107–124.
- Zalatan, J. G., Fenn, T. D., Brunger, A. T., and Herschlag, D. 2006. Structural and functional comparisons of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and alkaline phosphatase: implications for mechanism and evolution. *Biochemistry* **45**: 9788–9803.

Zimmermann, H., Beaudoin, A. R., Bollen, M., Goding, J. W., Guidotti, G., Kirley, T.L., Robson, S. C., and Sano, K. 2000. Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface. In: *Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases*. Vanduffel, L. and Lemmens, R., Eds., Shaker Publishing B. V., Maastricht, The Netherlands, pp. 1–8.

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

1) Allosteric modulation of Euphorbia peroxidase by nickel ions

F. Pintus, A. Mura, A. Bellelli, A. Arcovito, **D. Spanò**, A. Pintus, G. Floris, R. Medda
FEBS Journal 275, 1201-1212 (2008)

2) Tyramine oxidation by copper/TPQ amine oxidase and peroxidase from *Euphorbia characias* latex

A. Mura, F. Pintus, A. Fais, S. Porcu, M. Corda, **D. Spanò**, R. Medda, G. Floris
Archives of Biochemistry and Biophysics 475, 18-24 (2008)

3) Activity and Structural Changes of Euphorbia characias Peroxidase in the Presence of Trifluoroethanol

F. Pintus, A. Mura, C. Rinaldi, A. Contini, **D. Spanò**, R. Medda, G. Floris
Protein J 27, 434-439 (2008)

4) The role of copper amine oxidases in the metabolism of polyamines and their therapeutic implications.

E. Agosinelli, G. Tempera, E. Tandurella, F. Pintus, **D. Spanò**, R. Medda and G. Floris
In: Biological aspects of biogenic amines, polyamines and conjugates, Transworld Research Network, Dandrifosse Ed., 33-49 (2009)

5) Nucleotide pyrophosphatase/
phosphodiesterase from *Euphorbia characias*
latex: purification and characterization.

F. Pintus, **D. Spanò**, A. Bellelli, F. Angelucci, G. Floris and R. Medda
Plant Science 177, 636–642 (2009)

6) Catabolic pathways for arginine and methylated arginines by plant and mammalian copper amine oxidases.

F. Pintus, A. Contini, A. Finazzi Agrò, G. Floris, S. Porcu, A. Fais, **D. Spanò** and R. Medda

J. Iran. Chem. Soc. 6, 849-856 (2009)

7) Oxidation of di- and polyamines: in vitro effect of amino aldehydes on the vitalità of *Leishmania promastigotes*.

S. Massa, **D. Spanò**, F. Pintus, R. Medda and G. Floris

Med. Chem. Res. 19, 77–83 (2010)

8) *Euphorbia* latex biochemistry: complex interactions in a complex environment

F. Pintus, R. Medda, A.C. Rinaldi, **D. Spanò** and G. Floris.

Plant Biosys. 144, 381-391 (2010)

9) Euphorbia Peroxidase Catalyzes Thiocyanate Oxidation in Two Different Ways, the Distal Calcium Ion Playing an Essential Role

F. Pintus, **D. Spanò**, A. Bellelli, F. Angelucci, A.M. Scorciapino, R. Anedda, R. Medda, G. Floris

Biochemistry. 49, 8739-8747 (2010)

10) Purification and characterisation of a soluble nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruits

D. Spanò, F. Pintus, R. Pes, R. Medda, G. Floris
Food Research International, In Press (2010)

**SEQUENZE DEPOSITATE NELLA BANCA
DATI NCBI**

HM641814 *Euphorbia characias* purple acid
phosphatase mRNA, partial cds

Spanò, D., Corongiu, S., Pes, R., Medda, R., Floris,
G. and Pintus, F.

ADM16565 Purple Acid Phosphatase (*Euphorbia
characias*)

Spanò, D., Corongiu, S., Pes, R., Medda, R., Floris,
G. and Pintus, F.

Ringraziamenti

Questi tre anni di Dottorato di ricerca mi hanno dato tanto e per questo devo ringraziare tutti quelli che mi hanno accompagnato in questo periodo di studio e di duro lavoro: il direttore, i professori, i ricercatori, gli assegnisti, i dottorandi e i tirocinanti del dipartimento Scienze Applicate ai Biosistemi, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare.

A due persone più di tutte voglio rivolgere i miei ringraziamenti:

al Prof. Floris e alla Prof.ssa Medda che mi hanno trasmesso la passione per la ricerca, l'importanza di imparare cose nuove e mi hanno insegnato l'ottimismo e le soddisfazioni che si possono ottenere da questo lavoro. Quello che vi rivolgo è un grazie pieno di affetto per le opportunità che mi avete offerto.

Un grande grazie a Francesca che non ha mai smesso di sostenermi per tutti questi tre anni, perché il lavoro

è tanto e faticoso ma noi siamo in due e lavorando sempre insieme ci siamo aiutate in ogni momento.

Non esiste una misura del grazie che devo fare alla mia famiglia: papà Lillino, mamma Gabriella, i miei fratelli Emanuele ed Elisa, grazie grazie grazie perché voi siete la mia vera forza nella vita e nel lavoro.

Grazie ai miei nonni che mi hanno donato tanto amore, grazie a tutti i parenti e gli amici che hanno sempre fatto il tifo per me.

Lascio alla fine il più dolce grazie che va ad Elio che da dieci anni mi accompagna e mi sostiene in tutto, che insieme a me ha vissuto le gioie e i sacrifici di tutto il mio percorso di studio, pronto a festeggiare con me ogni traguardo raggiunto e pronto a farmi forza quando si sono presentati gli ostacoli.

Grazie a tutti