



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA
CHIMICA E TECNOLOGIA DEL FARMACO
XXI CICLO (2005-2008)**
Coordinatore: Prof. Gianni Podda

**MECCANISMO CATALITICO DELLA
PEROSSIDASI
DA *EUPHORBIA CHARACIAS***

Tutor:
Prof. Giovanni Floris

Tesi di dottorato di:
Dott.ssa Francesca Pintus

Anno Accademico 2007-2008

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1. Perossidasi-classificazione	3
1.2. Horseradish peroxidase (HRP).....	8
1.3. Meccanismo catalitico	11
1.4. Perossidasi estratta dal lattice dell' <i>Euphorbia characias</i> (ELP).....	22
1.5. Scopo della ricerca.....	27
2. MATERIALI E METODI	29
2.1. Purificazione della perossidasi estratta da <i>Euphorbia</i> <i>characias</i>	29
2.2. Spettrofotometria e fluorimetria.....	32
2.3. Dicroismo circolare	36
2.4. Ossigrafia	38
2.5. Studi di cinetica enzimatica.....	40
2.6. Inibizione enzimatica.....	48
2.7. Laser fotolisi.....	54
3. VIE CATALITICHE DELL'ELP NELLA REAZIONE CON IL PEROSSIDO D'IDROGENO.....	56
3.1. Pathway I : attività pseudo-catalasica.....	56
3.2. Pathway II: formazione del compound III.....	61

3.3. Pathway III: cinetica di inattivazione	66
3.4. Stopped flow	68
3.5. Conclusioni.....	74
4. EFFETTO DEGLI IONI NICHEL SULLA PEROSSIDASI ESTRATTA DAL LATTICE DELL' <i>EUPHORBIA CHARACIAS</i> .78	
4.1. Effetto degli ioni Nichel sull'attività perossidasi dell'ELP ...	78
4.2. Effetto degli ioni nichel sull'attività perossidasi dell'ELP in presenza di ioni Ca ²⁺	86
4.3. Effetto del nichel sulle proprietà spettrali dell'ELP.....	90
4.4. Esperimenti di stopped-flow	94
4.5. Studi di fluorescenza e di dicroismo circolare.....	97
4.6. Esperimenti di laser fotolisi.....	97
4.7. Influenza del nichel sulle vie catalitiche dell'ELP in assenza di substrato riducente	100
4.8. Conclusioni.....	102
5. CONCLUSIONI	106
BIBLIOGRAFIA	110
ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI.....	114
SEQUENZE PROTEICHE PUBBLICATE nella banca dati NCBI.....	116

1. INTRODUZIONE

1.1. Perossidasi-classificazione

Le perossidasi (EC 1.11.1.1-16) sono ossidoreduttasi che catalizzano l'ossidazione di vari composti organici ed inorganici sfruttando come donatore di elettroni perossido d'idrogeno, idroperossidi organici, peracidi ed ossidi inorganici come gli ioni periodato o clorito.

Le perossidasi sono enzimi ampiamente diffusi sia nel regno vegetale che in quello animale e sono stati isolati anche da batteri, muffe e microrganismi (Dunford and Stillman 1976). L'elevata distribuzione dell'enzima indica la sua notevole importanza biologica. Tuttavia, sebbene siano stati ampiamente purificati e caratterizzati, non è ancora chiaro il loro ruolo metabolico a causa dell'elevato numero di isoenzimi e di reazioni che questi catalizzano. Le perossidasi svolgono il ruolo di antiossidanti, proteggendo cellule, tessuti e organi dagli effetti tossici di perossidi prodotti *in vivo* dall'attività ossidasica.

La reazione generale perossido dipendente catalizzata da una perossidasi è descritta dall'equazione:



Le perossidasi possono contenere nei loro siti attivi, come cofattore redox, un residuo di cisteina (Perossiredoxine, EC 1.11.1.15) oppure residui di selenocisteina (Glutatione perossidasi, EC 1.11.1.9) ma la principale classe di perossidasi è rappresentata dalle eme-perossidasi (EC 1.11.1.7). Tali enzimi hanno come gruppo prostetico il ferroe-eme o Fe-protoporfirina IX legato ad una istidina prossimale, ad eccezione della cloroperossidasi, in cui il legame avviene con una cisteina.

Sono state purificate e cristallizzate diverse perossidasi tra cui quella da *Arthromyces ramosus*, l'ascorbato perossidasi, la perossidasi da arachide (Gajhede et al., 1997), la perossidasi da *Coprinus cinereus*, la citocromo C perossidasi, la lignina perossidasi, la mieloperossidasi, la prostaglandina H₂ sintasi (English and Tsapralis 1995), la cloroperossidasi da *Caldaromyces fumago* (Sundaramoorthy et al., 1995), la di-eme citocromo C perossidasi da *Pseudomonas aeruginosa* (Fulop et al., 1995), la manganese perossidasi, l'isozima C della Horseradish perossidasi, e la perossidasi da orzo (Henriksen et al., 1998). Il gruppo delle eme-perossidasi viene suddiviso in due superfamiglie (Figura 1) che distinguono gli enzimi di origine animale da quelli di origine fungina, batterica e vegetale (Passardi et al., 2007).

Le perossidasi animali si trovano nella saliva, nelle lacrime, nel latte e nella mucosa cervicale; tra queste la tiroide perossidasi, la mieloperossidasi e la lattoperossidasi.

La mieloperossidasi (MPO) è un'importante perossidasi animale presente nei mielociti e nei leucociti (Odajama 1980; Morozov et al., 1997). Per quanto le sue funzioni fisiologiche non siano completamente note, questo enzima sembra essere coinvolto nella formazione di ossidanti che hanno un ruolo determinante nella difesa da agenti patogeni e nella detossificazione di tossine batteriche (Hazen et al., 1996). Allo stesso tempo la MPO, in presenza di concentrazioni non tossiche di perossido d'idrogeno, può indurre citotossicità. Infatti, alla concentrazione plasmatica di ioni Cl^- , la mieloperossidasi è l'unico enzima umano in grado di convertire il perossido d'idrogeno in acido ipocloroso (HOCl). L'HOCl prodotto è una citotossina in grado di provocare danni ossidativi quali l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL), causa dell'origine di eventi aterosclerotici.

La lattoperossidasi (LPO) è una glicoproteina presente nel latte di differenti specie animali e nelle secrezioni di altre ghiandole di mammifero, quali quelle salivari. Al pari della mieloperossidasi, anch'essa è implicata nei meccanismi di difesa contro gli agenti patogeni; la LPO infatti generalmente utilizza il perossido

d'idrogeno in combinazione con alogeni e pseudoalogeni per generare i corrispondenti acidi ipoalogenosi, agenti ossidanti ad attività antibatterica (Hannuksela et al., 1994).

La superfamiglia delle perossidasi vegetali può essere ulteriormente suddivisa in tre classi in base alla similarità di sequenza.

La classe I include le perossidasi intracellulari come la citocromo c perossidasi e l'ascorbato perossidasi, enzimi fondamentali per la rimozione dei perossidi prodotti all'interno delle cellule delle piante superiori.

La classe II è composta da enzimi secreti da funghi quali la lignina perossidasi da *Phanerochaete chrysosporium* e la manganese perossidasi da *Coprinus cinereus*. Questi enzimi sono glicoproteine monomeriche coinvolte nella degradazione della lignina.

Infine la classe III include le perossidasi vegetali di secrezione, la perossidasi da arachide, la Horseradish perossidasi, la perossidasi da orzo, e la perossidasi dal lattice di *Euphorbia characias* (Floris et al., 1984). Tali perossidasi vegetali sono coinvolte nella regolazione della crescita e differenziazione cellulare, nella lignificazione della parete cellulare, nell'ossidazione di metaboliti essenziali per alcune reazioni di difesa da agenti patogeni e nel metabolismo degli alcaloidi (Rasmussen et al., 1997).

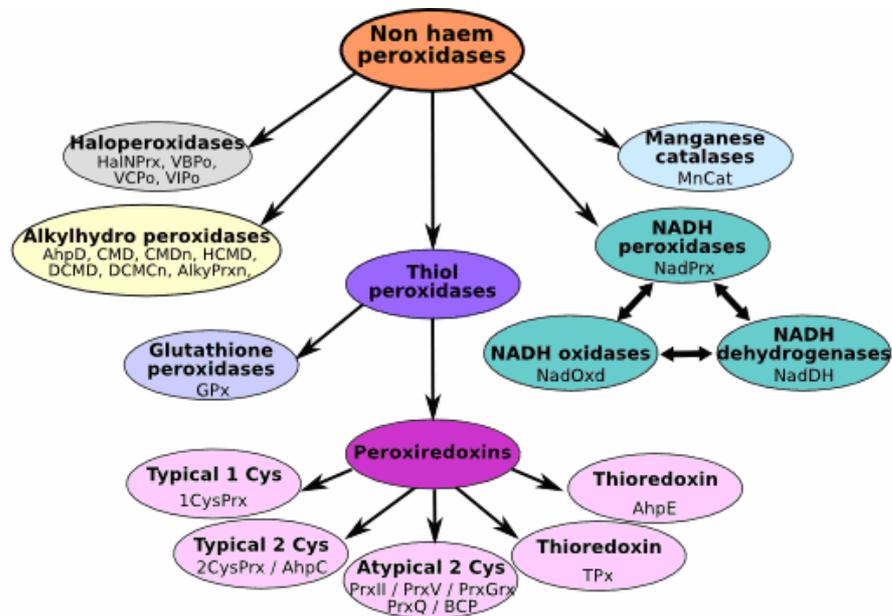
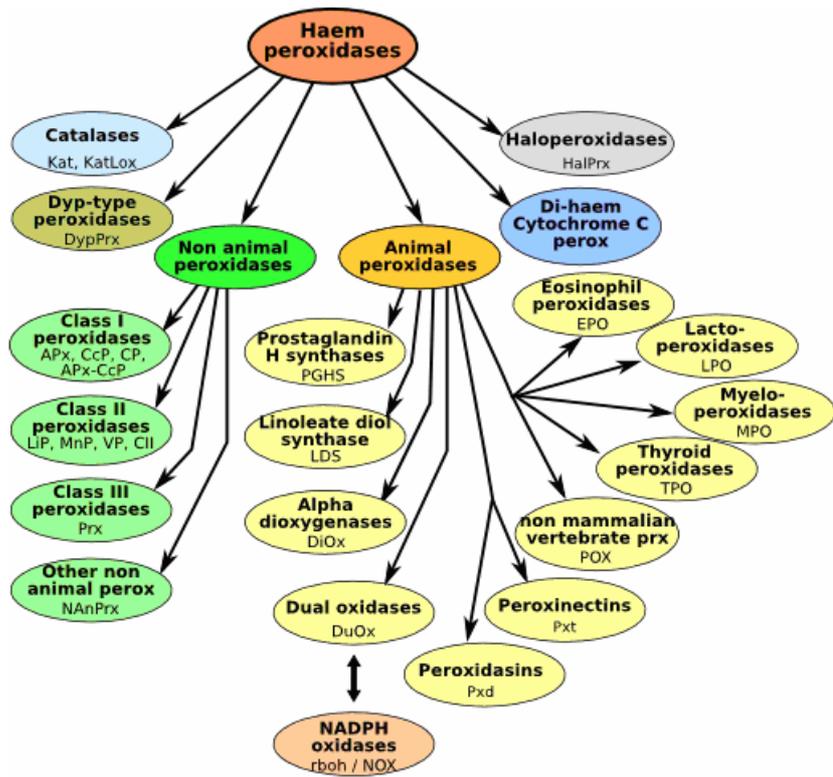


Figura 1. Rappresentazione schematica delle diverse classi di perossidasi.

1.2. Horseradish peroxidase (HRP)

Tra le perossidasi vegetali la più studiata e conosciuta è la Horseradish perossidasi (HRP), un enzima appartenente alla classe III delle perossidasi vegetali, estratto dalle radici dell'*Armoracia rusticana*, una crucifera perenne. Sebbene il suo ruolo fisiologico sia ancora incerto, considerando il grande numero di reazioni che catalizza, data la sua larga disponibilità e la facilità con cui viene purificata, essa è tra le più studiate. Esistono più di trenta isoforme dell'HRP, classificate in tre gruppi principali: acide, neutre e basiche. L'isozima C della Horseradish perossidasi (HRP-C) è l'isoforma più studiata. Essa è costituita da una singola catena polipeptidica glicosilata con massa molecolare di 33.900 Dalton, formata da 308 residui aminoacidici con 8 catene oligosaccaridiche (Welinder 1985). Sono inoltre presenti 8 residui di cisteina e 4 ponti disolfuro caratteristici delle perossidasi di classe III. Quattro ponti disolfuro sono presenti anche nelle perossidasi di classe II ma hanno una localizzazione diversa, mentre sono assenti negli enzimi di classe I.

L'enzima nativo contiene come gruppo prostetico organico, un Fe^{3+} ad alto spin in una protoporfirina IX, pentacoordinato con una istidina "prossimale" (His 42) il cui compito è quello di stabilizzare gli stati ad alta ossidazione dello ione ferro (Poulos et al., 1993). E'

inoltre presente un altro residuo di istidina noto come “distale” (His 170), che funziona da catalizzatore acido–base durante il ciclo catalitico.

Nella forma nativa dell’HRP–C sono inoltre presenti due moli di Ca^{2+} per mole di enzima; i siti di legame sono conosciuti come sito prossimale e distale in accordo con la loro collocazione relativa al piano porfirinico (Morishima et al., 1996). Lo ione calcio distale è strutturalmente coordinato ai seguenti residui amminoacidici presenti al di sopra del piano dell’eme: Asp₄₃, Val₄₆, Gly₄₈, Asp₅₀ e Ser₅₂. Gli amminoacidi che invece legano il calcio prossimale sono: Thr₁₇₁, Asp₂₂₂, Thr₂₂₅, Ile₂₂₈ e Asp₂₃₀ (Figura 2). Il ruolo di questi ioni è mantenere la struttura della tasca dell’eme atta all’espressione di un’alta attività catalitica dell’enzima. La rimozione degli ioni Ca^{2+} dalla HRP–C determina infatti un cambiamento nella struttura elettronica del ferro dell’eme, provocando un dimezzamento dell’attività enzimatica (Haschke and Friedhoff 1978; Shiro et al., 1986; Howes et al., 2001).

Dalla struttura primaria delle HRP-C emerge che il sito catalitico, necessario per il metabolismo del perossido di idrogeno, è altamente conservato ed un residuo di arginina (Arg 38) sembra avere un ruolo chiave durante il ciclo catalitico dell’enzima (Rodriguez-Lopez et al., 1996). E’ stato inoltre identificato un residuo di fenilalanina (Phe

179) importante per la formazione del complesso tra HRP e molecole aromatiche riducenti.

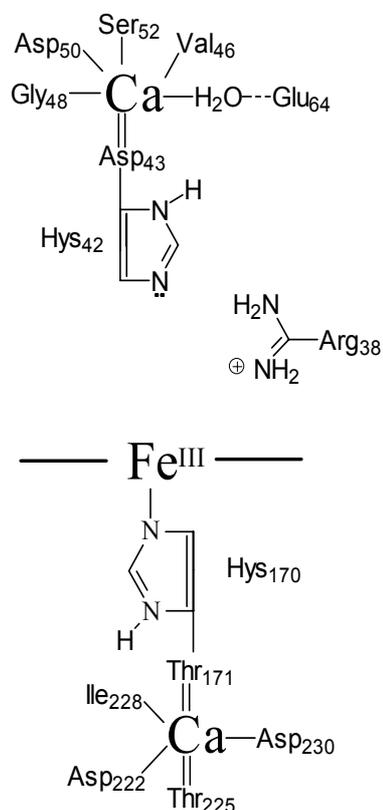


Figura 2. Rappresentazione schematica della disposizione degli ioni calcio nel sito prossimale e distale dell'HRP.

1.3. Meccanismo catalitico

Il ciclo catalitico dell'HRP, che viene utilizzata come modello per gli studi biochimici sulle perossidasi, consta essenzialmente di quattro passaggi (Figura 3) (Roman and Dunford 1972; Yamada and Yamazaki 1974; Poulos and Kraut 1980; Baek and Van Wart 1992; Burner and Obinger 1997; Isaac and Dawson 1999).

Nella forma nativa il ferro dell'eme, che si trova nello stato ferrico, reagisce con il perossido di idrogeno dalla parte distale dell'eme, generando un addotto idroperossido transitorio, il composto 0, il quale, trasformandosi rapidamente, genera un radicale cationico porfirina π ossoferrile, il composto I. Successivamente il composto I, in presenza di un substrato ricco di elettroni (DH_2), viene ridotto generando il composto II e un radicale cationico del substrato che in base al proprio grado di acidità, rilascerà ioni H^+ . In alternativa il substrato DH_2 può fornire un atomo di idrogeno (H^\bullet) per produrre DH e $Fe(IV)-OH$. Quest'ultimo può perdere un protone e divenire $Fe(IV)=O$. Un secondo DH_2 può reagire con il composto II e rigenerare lo stato ferrico iniziale.

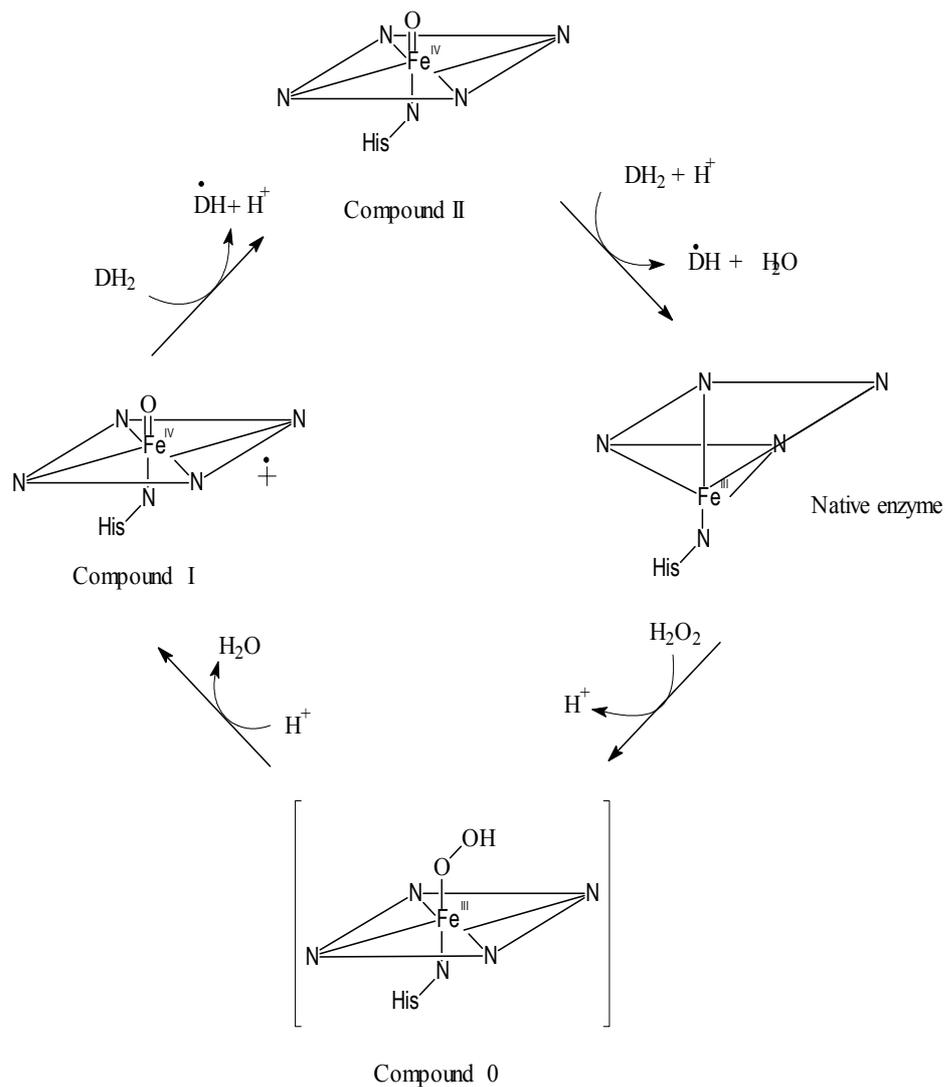


Figura 3. Ciclo catalitico della Horseradish perossidasi.

In questa reazione il substrato fornisce un H^\bullet , e il risultante Fe(III)-OH viene protonato e rilascia H_2O . Le due molecole radicaliche formate, instabili, formano una molecola di prodotto ossidato con due elettroni (D), e rigenerano una molecola di substrato (DH_2), come segue:



Nella Figura 4 sono rappresentati i tipici spettri di assorbimento dell'HRP nativo (con bande di assorbimento a 278, 401, 500 e 643 nm), del compound I (278, 401, 651 nm) e del compound II (278, 417, 525 e 576 nm).

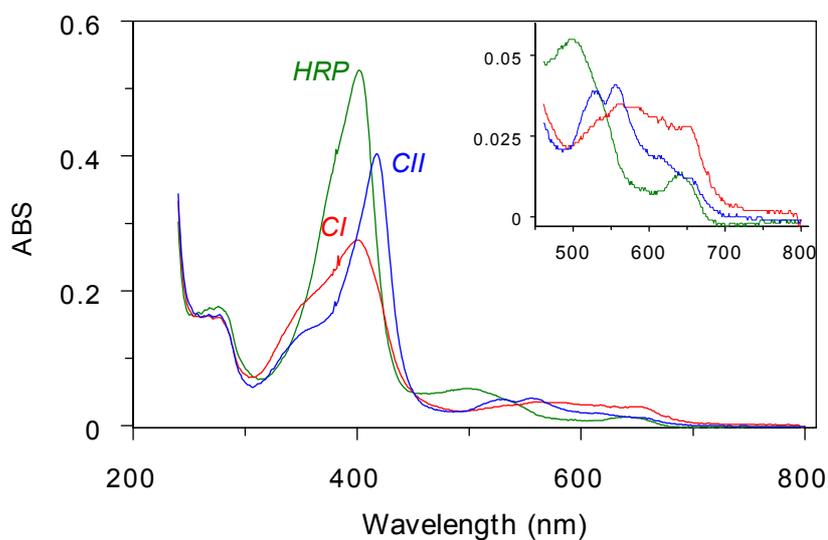


Figura 4. Spettro di assorbimento dell'HRP allo stato nativo, del compound I e del compound II. L'inset mostra l'ingrandimento degli spettri nella regione tra 450 e 800 nm.

La velocità di ossidazione del substrato ad opera del composto I dell'HRP è da 10 a 100 volte più rapida di quella ad opera del composto II (Dunford and Stillman 1976). Questo può dipendere da una differenza di energia di riorganizzazione tra i due processi. La riduzione del composto I a composto II necessita solamente di un elettrone sul radicale cationico porfirina π , mentre la riduzione del composto II allo stato ferrico richiede un elettrone e due protoni, così che possa essere rilasciata H_2O . In questo processo l'eme subisce una riorganizzazione a ferro pentacoordinato.

Nella Figura 5 è rappresentata in dettaglio la formazione del compound 0 e del compound I.

Come si può osservare dalla figura, quando l'HRP reagisce con il perossido d'idrogeno il residuo di istidina distale si comporta come una base, sottraendo un protone dal substrato perossido e portando alla formazione dell'idroperossido ferrico C0. A temperatura ambiente il C0 ha un'emivita di circa 0.05-0.1 ms quindi, data l'immediata conversione del C0 a CI, è stato possibile mettere in evidenza questa specie esclusivamente mediante studi di cinetica rapida eseguiti a basse temperature. Da tali studi è stato quindi identificato lo spettro d'assorbimento del C0 che presenta, rispetto all'enzima nativo, una transizione della banda di Soret a 400 nm e un caratteristico picco a 330 nm. Questi cambiamenti spettrali sono

dovuti probabilmente alla presenza di due forme del C0: un complesso Fe(III)-HOOH responsabile del cambiamento osservato a 400 nm e un complesso Fe(III)-OOH responsabile della banda a 330 nm.

Il residuo di arginina, che si trova in posizione distale rispetto al piano dell'eme (Arg 38), ha un ruolo chiave nella formazione del C0, favorendo il trasferimento del protone dal perossido d'idrogeno all'anello imidazolico dell'istidina distale (Harris and Loew 1996). Lo stesso residuo di arginina interviene nel passaggio successivo favorendo la rottura eterolitica del legame O–O e contemporaneamente l'istidina distale, ora protonata, reagisce come acido protonando il gruppo ossidrilico uscente. Si ha quindi la formazione del compound I e la liberazione di una molecola d'acqua.

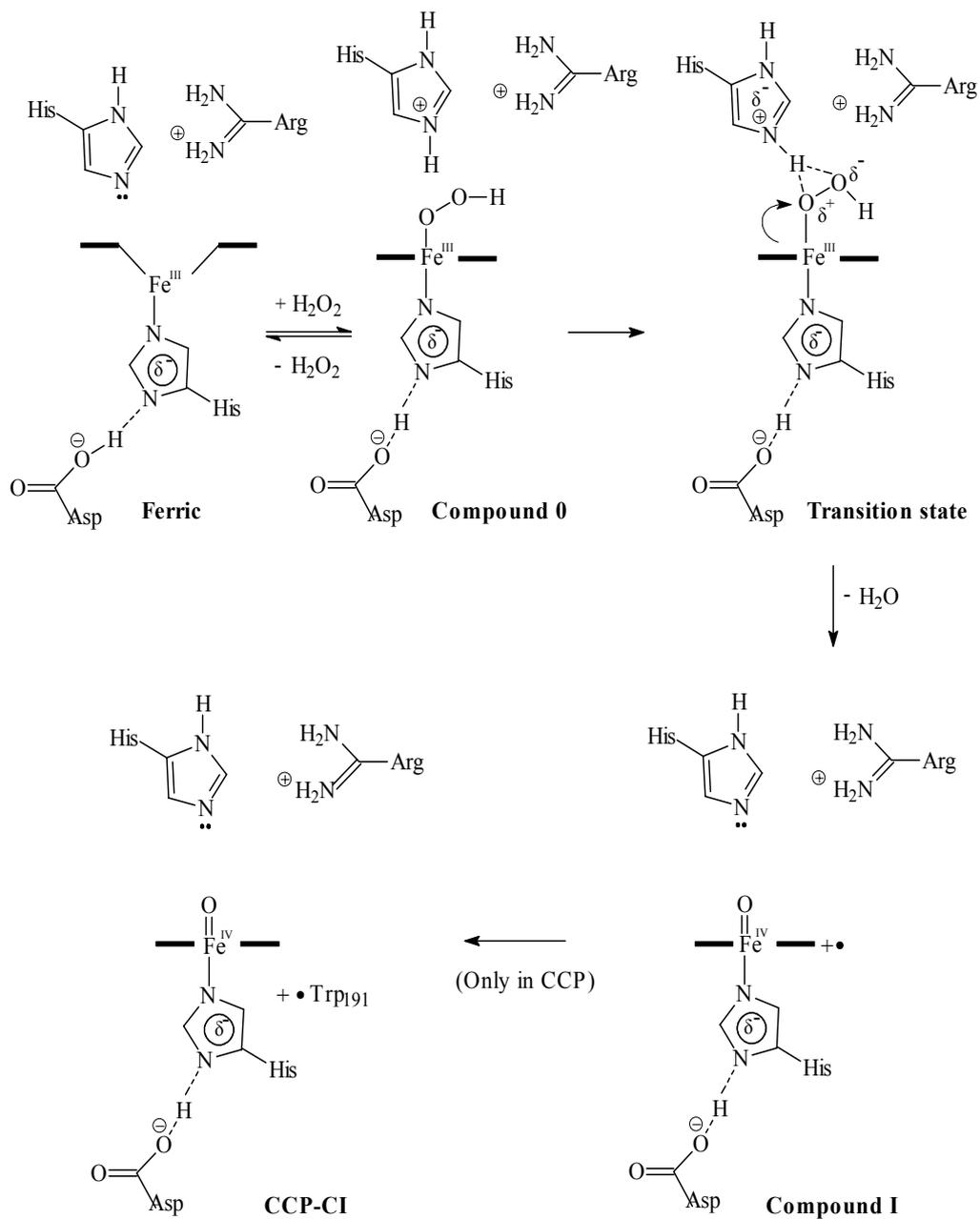


Figura 5. Meccanismo di formazione del compound I nell'HRP e nella citocromo c perossidasi (CCP).

Il compound I ha un caratteristico colore verde e presenta 2 equivalenti di ossidazione in più rispetto all'enzima nativo. Esistono 3 forme di risonanza che possono contribuire alla sua struttura (Figura 6).

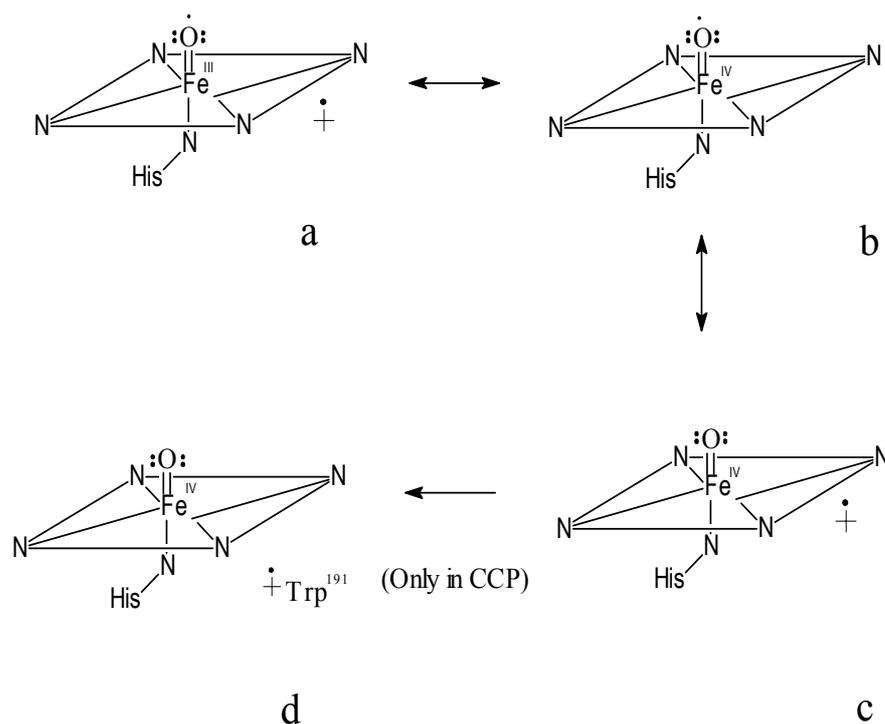


Figura 6. Possibili strutture di risonanza del compound I dell'HRP.

La forma predominante per l'HRP-CI è la struttura c, un radicale porfirina π osso-ferrile in cui un equivalente ossidante deriva dalla perdita di un elettrone dall'atomo di ferro, mentre il secondo elettrone è ceduto dall'anello porfirinico (Penner-Hahn et al., 1983). Lo spettro di assorbimento dell'HRP-CI infatti mostra un abbassamento della assorbanza a 400 nm che risulta dimezzata

rispetto all'enzima nativo: questa diminuzione dell'assorbanza è attribuita alla perdita dell'aromaticità dell'anello porfirinico in seguito all'ossidazione da parte del perossido. Con la formazione del radicale cationico scompaiono anche le bande a 500 e a 643 nm caratteristiche dello spettro dell'enzima nativo (Figura 4). La presenza del ferro nello stato di ossidazione +4 è stata evidenziata da studi di spettroscopia Mossbauer, mentre esperimenti EXAFS hanno dimostrato la presenza del complesso osso-ferrile in cui il legame Fe–O è di circa 1.64 Å (Schulz et al., 1979; Penner-Hahn et al., 1986).

Nella maggior parte delle perossidasi il compound I presenta le stesse caratteristiche chimiche e spettrali dell'HRP-CI. Fa eccezione la citocromo c perossidasi (CCP) (Figura 5 e 6d) in cui, in seguito alla reazione con il perossido d'idrogeno e alla formazione del CI, si ha un rapido trasferimento intramolecolare di un elettrone da un residuo aminoacidico (Trp 191), presente nel sito attivo, al radicale porfirinico appena formato. Il composto risultante ha sempre due equivalenti di ossidazione in più rispetto all'enzima nativo ma il radicale cationico non è presente nell'anello porfirinico e si trova a livello del triptofano 191. Data l'assenza del radicale cationico a livello dell'anello porfirinico, non si osserva quindi l'abbassamento dell'assorbanza a 400 nm e il CCP-CI mostra un colore rosso e

caratteristiche spettrali simili al compound II dell'HRP (Huyett et al., 1995).

L'HRP-compound II (HRP-CII) ha un tipico colore rosso e si forma in seguito alla riduzione del CI da parte di un substrato riducente mediante trasferimento di un elettrone al radicale cationico porfirina π . La spettroscopia Mossbauer ha confermato la presenza del ferro nello stato di ossidazione +4, mentre studi EXAFS hanno dimostrato che la lunghezza del legame Fe–O è pH dipendente, ipotizzando la presenza di 2 possibili strutture del CII. Al di sotto del pH 8.7 il CII contiene un il gruppo ossoferrile ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) in cui il legame Fe–O è pari a 1.6 Å, mentre a pH superiori l'ossigeno della specie ossoferrile è legato, mediante legame idrogeno, all'imidazolo del residuo di istidina distale ed il legame Fe–O è pari a 1.93 Å (Sitter et al., 1985) (Figura 7).

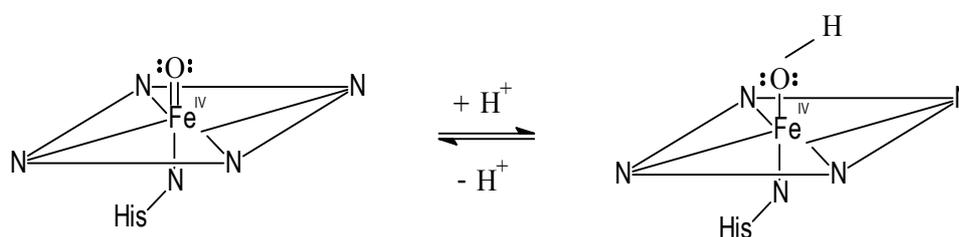


Figura 7. Strutture di risonanza del compound II al di sopra e al di sotto del pH 8.7.

Oltre al ciclo catalitico classico delle perossidasi finora descritto, l'HRP in presenza di un eccesso di perossido d'idrogeno ed in assenza di substrato riducente, può andare incontro ad altri differenti pathways:

a) riduzione dell' H_2O_2 ad H_2O con produzione di O_2 mediante una reazione pseudo-catalasica: l'enzima nativo è ossidato per formare il CI e successivamente ridotto allo stato ferrico iniziale ($1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 1$; vedi Figura 8);

b) formazione del CI, del CII, di una nuova specie chiamata compound III e ritorno all'enzima nativo, con la contemporanea produzione di anione superossido. Il CIII presenta 3 equivalenti di ossidazione in più rispetto all'enzima nativo ed il ferro lega l'ossigeno con formazione di un complesso ossoferroso Fe(II)-O_2 oppure Fe(II)-O_2^- ($1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 5 \rightarrow 6 \rightarrow 7 \rightarrow 1$);

c) perdita irreversibile dell'attività enzimatica e formazione di una specie inattiva (P670) con un caratteristico picco a 670 nm ($1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 8$).

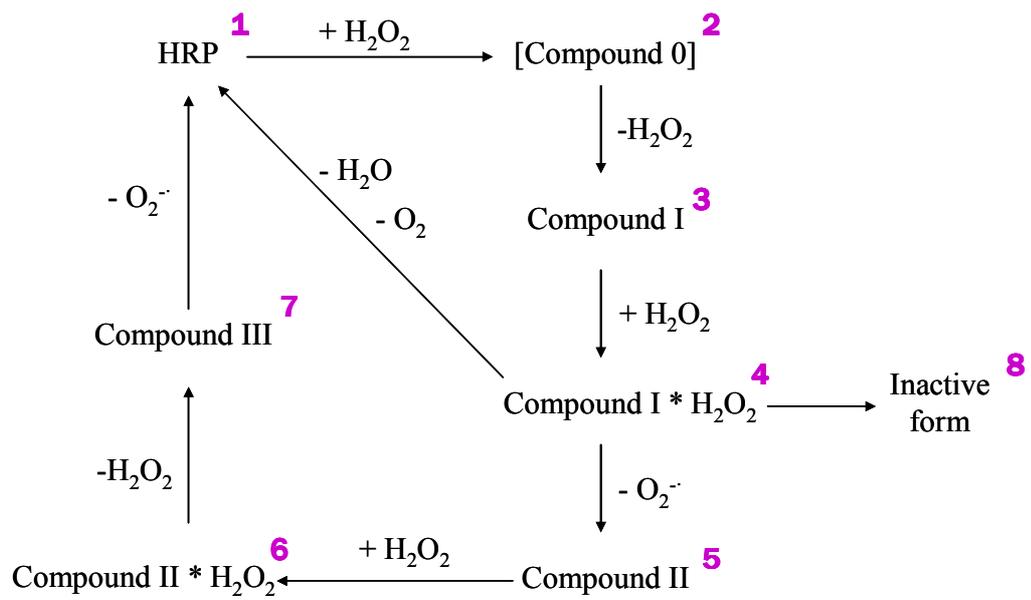


Figura 8. Vie catalitiche a cui va incontro l'HRP in presenza di H₂O₂ come unico substrato.

1.4. Perossidasi estratta dal lattice dell'*Euphorbia characias* (ELP)

Il nostro gruppo di ricerca si è dedicato alla purificazione e la caratterizzazione di una perossidasi dal lattice dell'*Euphorbia characias*, un arbusto mediterraneo perenne (Floris et al., 1984). Contenuto all'interno di cellule specializzate a laticiferi, che formano strutture simili a vasi che permeano diverse parti della pianta, il lattice è un fluido biancastro dalla complessa composizione che comprende alcaloidi, diterpeni ed un certo numero di enzimi che collettivamente provvedono ad un importante contributo nei meccanismi di difesa della pianta mediante repulsione ed uccisione dei patogeni e cicatrizzazione delle aree ferite (Ko et al., 2003).

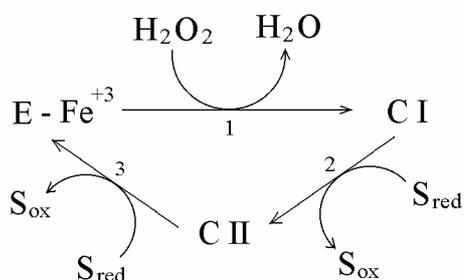
L'*Euphorbia* latex peroxidase (ELP) è una glicoproteina costituita da una singola catena polipeptidica con massa molecolare di 47000 Dalton, formata da 347 residui aminoacidici con una percentuale di glicosilazione pari a ~15%. L'analisi della sua sequenza amminoacidica ha rivelato la presenza di un peptide segnale tipico delle proteine di secrezione che si estende dalla metionina iniziale fino al ventiduesimo amminoacido; sono inoltre presenti 6 siti di N-glicosilazione e 8 residui di cisteina che, nella proteina nativa, daranno luogo alla formazione di 4 ponti disolfuro, in accordo con le caratteristiche delle altre perossidasi vegetali di classe III. L'analisi

bioinformatica della sequenza ha consentito inoltre di identificare un potenziale motivo IQ (VESIIQKELKKLFFKKDV) e un motivo 1-8-14 (LSLRKQAFKIVNDL) tipici delle proteine leganti la calmodulina. L'ELP infatti è risultata essere una calmodulin binding protein la cui attività catalitica è strettamente regolata dalla concentrazione di calcio esogeno (Mura et al., 2005).

L'ELP contiene come gruppo prostetico una Fe^{3+} -protoporfirina IX. A differenza dell'HRP-C precedentemente descritta, l'enzima purificato contiene solamente una mole di calcio per mole di enzima. Questo ione calcio endogeno è combinato saldamente al sito prossimale dell'ELP e gioca un ruolo chiave nel mantenimento della struttura del sito attivo e dell'intorno dell'eme. La rimozione di questo ione causa infatti cambiamenti della struttura elettronica del ferro dell'eme e la perdita totale dell'attività enzimatica.

In presenza di calcio esogeno, un secondo ione calcio può legare l'enzima nativo in un sito distale a bassa affinità e tale ione risulta necessario per l'espressione della massima efficienza catalitica dell'ELP. L'enzima nativo possiede infatti una bassa attività specifica per i substrati classici delle perossidasi ma, in presenza di ioni calcio esogeni, la sua efficienza catalitica aumenta di tre ordini di grandezza (Medda et al., 2003). Esperimenti di cinetica rapida hanno evidenziato che il Ca^{2+} influenza il ciclo catalitico della

perossidasi intervenendo principalmente nella formazione del compound I (step 1, schema 1).



Schema 1. Intermedi del ciclo catalitico dell'ELP nella reazione con il perossido d'idrogeno ed un substrato riducente.

In presenza di calcio infatti la velocità di formazione del C I (k_1) aumenta di circa 100 volte e lo step limitante della reazione è solamente la riduzione del C II ad enzima ferrico (k_3), come accade per la maggior parte delle perossidasi. Un fenomeno invece inusuale si verifica nella reazione dell'ELP in assenza di calcio poiché sia lo step 1 sia lo step 3 in queste condizioni sono limitanti la reazione, confermando l'importanza del calcio per la massima espressione dell'attività dell'enzima (Tabella 1).

Come è ben noto e in accordo con quanto riportato precedentemente la formazione del C I nelle perossidasi dipende dalla reattività catalitica dell'istidina distale come catalizzatore acido-base. Dopo

l'aggiunta di ioni Ca^{2+} , l'istidina distale probabilmente subisce un riorientamento, in conseguenza del quale vi è un aumento della basicità che, inducendo un riarrangiamento della cavità distale, porta ad un incremento del valore della k_1 (Tabella 1).

	k_1 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_2 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_3 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
ELP (enzima nativo)	7.7×10^4	1.3×10^7	2.8×10^4
ELP + ioni Ca^{2+} 10 mM	1.2×10^7	1.2×10^7	3.0×10^5

Tabella 1. Costanti cinetiche che descrivono la reazione dell'ELP in presenza di H_2O_2 e di un substrato riducente (acido ascorbico).

Confrontando la sequenza aminoacidica dell'ELP con altre perossidasi tra cui l'HRP è stato possibile identificare i 2 residui di istidina distale e prossimale (Hys_{50} e Hys_{179} rispettivamente) ed i residui amminiacidici che legano il Ca^{2+} : l' Asp_{51} , la Val_{54} , la Gly_{56} , l' Asp_{58} , e la Ser_{60} , per quanto riguarda la posizione distale e la Thr_{180} , l' Asp_{256} , la Thr_{259} , la Ile_{262} , e l' Asp_{265} per il dominio prossimale (Figura 9).

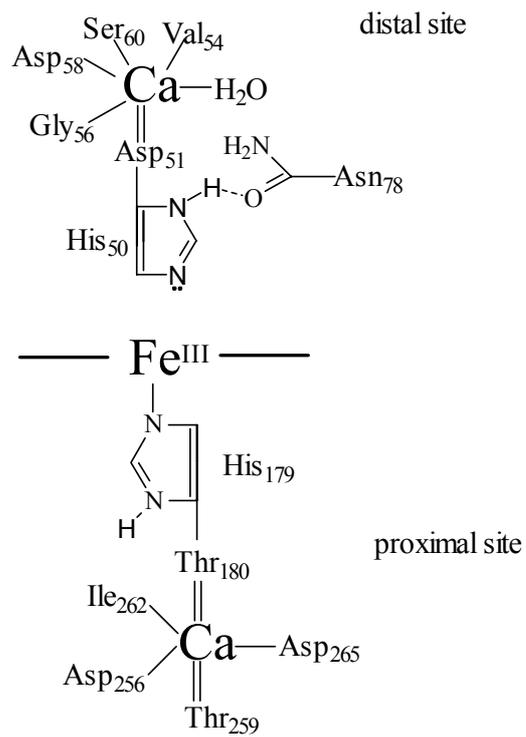


Figura 9. Struttura dei siti di legame per il calcio nell'ELP

1.5. Scopo della ricerca

La caratterizzazione cinetica dell'ELP ha permesso di identificare un ciclo catalitico pari a quello descritto per l'HRP con la formazione del compound 0 e successivamente del compound I in presenza di perossido d'idrogeno e del compound II in presenza di una specie riducente; come già descritto per l'HRP e per altre perossidasi il perossido d'idrogeno può agire sia da substrato ossidante che da riducente. Abbiamo quindi voluto studiare la reazione dell'ELP in presenza di perossido d'idrogeno come unico substrato e ci è stato possibile identificare 3 differenti vie catalitiche: una in cui l'enzima mostra un'attività pseudo-catalasica, trasformando il perossido d'idrogeno in ossigeno molecolare ed acqua; una seconda via catalitica che porta alla formazione del CIII; una terza via in cui, in presenza di un eccesso di perossido d'idrogeno, il substrato stesso diventa inibitore dell'enzima portando ad una inattivazione irreversibile dell'ELP. Abbiamo quindi studiato e caratterizzato cineticamente questi tre pathways.

Data l'importanza del calcio endogeno per l'attività catalitica della ELP, e visto il ruolo del calcio esogeno nelle varie vie catalitiche a cui può andare incontro l'enzima, nella seconda fase del lavoro abbiamo inoltre studiato l'effetto di altri ioni bivalenti sull'attività della perossidasi ed in particolare l'attenzione è stata rivolta al ruolo

che gli ioni Nichel. Il Ni^{2+} infatti ha mostrato di avere un duplice e particolare effetto sull'ELP poiché determina un decremento dell'attività enzimatica dando luogo ad una inibizione reversibile dell'enzima ma, in contemporanea presenza di ioni calcio, determina invece un incremento dell'attività catalitica dell'ELP.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Purificazione della perossidasi estratta da *Euphorbia characias*

La perossidasi da *Euphorbia characias* (ELP) viene estratta e purificata secondo un protocollo messo a punto dal nostro gruppo di ricerca (Floris et al., 1984).

Step 1. Polvere acetonica. Il lattice viene raccolto recidendo le parti superiori delle piante di *Euphorbia characias*, viene filtrato, congelato per circa 24 ore per essere poi liofilizzato per circa 48 ore. Il liofilizzato viene solubilizzato con acetone freddo e tenuto in agitazione a -20° 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.

Step 2. Precipitazione frazionata con solfato d'ammonio. L'omogenato è stato centrifugato in una centrifuga refrigerata BECKMAN J2 21 a 9000 rpm per 45 min. Il precipitato viene eliminato mentre si recupera il supernatante al quale si aggiunge solfato d'ammonio prima al 25%–80% di saturazione. Al 80% di saturazione si ottiene la precipitazione della perossidasi; il precipitato è stato solubilizzato in un minimo volume di tampone K-

fosfato 10 mM pH 7.0 e dializzato contro lo stesso tampone. Tutte le procedure sono state condotte a 4°C.

Step 3. Cromatografia su colonna di DEAE–cellulosa. La soluzione contenente la perossidasi è stata caricata su una colonna DEAE–cellulosa (Whatman) equilibrata con tampone K-fosfati 10 mM pH 7.0. In queste condizioni l'enzima non si lega alla fase stazionaria e viene subito eluito.

Step 4. Cromatografia su colonna di idrossiapatite. L'eluato derivante dal precedente step di purificazione viene fatto percolare su una colonna di idrossiapatite equilibrata con K-fosfati 10 mM pH 7.0. L'enzima si adsorbe sulla colonna che viene poi lavata con lo stesso tampone finché l'assorbanza dell'eluato a 280 nm è nulla. Si effettuano ulteriori lavaggi con lo stesso tampone a molarità crescenti (0.1 M, 0.2 M) ed infine si eluisce la perossidasi con tampone K-fosfati 0.4 M, pH 7.0.

Step 5. Cromatografia ad esclusione molecolare. L'eluato viene dializzato per circa 12 ore contro K-fosfati 5 mM pH 7.0 e centrifugato per rimuovere il materiale insolubile. Il surnatante viene invece caricato su una colonna per gel filtrazione SP-Sephadex 75 (Amersham) equilibrata con K-fosfati 5 mM pH 7.0.

Le frazioni con i valori più alti di attività specifica vengono raccolte e concentrate sottoponendole ad ultradialisi.

Della soluzione concentrata di ELP viene registrato lo spettro di assorbimento per valutare il rapporto R_z (Reinheitszahl), cioè il rapporto fra l'assorbanza a 401 nm e l'assorbanza a 278 nm che è indicativo del contenuto di eme. Soluzioni enzimatiche con valori di $R_z > 2$ sono considerate di buona qualità. L'enzima viene poi conservato a -20°C per essere utilizzato negli esperimenti successivi. L'enzima purificato presenta un'unica banda in isoelettrofocalizzazione ed in elettroforesi in condizioni non denaturanti e ciò esclude la presenza di forme isoenzimatiche.

2.2. Spettrofotometria e fluorimetria

La spettrofotometria è una branca della spettroscopia che si basa sull'interazione tra radiazioni elettromagnetiche di diverse lunghezze d'onda con la materia. Quando un raggio monocromatico attraversa un mezzo dielettrico non viene soltanto rifratto ma una sua parte viene assorbita dal mezzo stesso e convertita in calore. La spettrofotometria permette sia di ottenere spettri di assorbimento delle diverse molecole, sia di eseguire analisi quantitative.

Le misure di assorbanza sono infatti un comune metodo per determinare la concentrazione di macromolecole biologiche in soluzione; l'assorbanza è correlata linearmente alla concentrazione della sostanza assorbente secondo la legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

dove A è l'assorbanza, ϵ è il coefficiente di estinzione molare, c rappresenta la concentrazione molare, e l è il cammino ottico percorso dalla radiazione attraverso la soluzione del campione.

L'analisi qualitativa è invece basata sullo spettro di assorbimento che rappresenta il grafico dell'assorbimento della sostanza in esame, in funzione della lunghezza d'onda. Ogni sostanza ha il suo caratteristico spettro ed è quindi identificabile tramite esso. L'analisi degli spettri di assorbimento risulta importante anche nel corso di una reazione enzimatica poiché permette di visualizzare il passaggio

da una specie assorbente ad un'altra. Importanza rilevante assumono i punti isosbastici: con tale termine viene definita una lunghezza d'onda in cui non si ha cambiamento di assorbanza durante la trasformazione di una specie in un'altra. Se in una reazione infatti una specie assorbente viene convertita in un'altra specie assorbente e se gli spettri delle due specie si intersecano in un punto, qualsiasi spettro registrato durante tale reazione passerà per quel punto chiamato punto isosbastico. La presenza di un punto isosbastico indica che sono presenti solo due specie assorbenti durante la reazione.

Durante questo lavoro di tesi è stato utilizzato, per i saggi di attività e per gli spettri di assorbimento, uno spettrofotometro Ultrospec 2100 pro (Biochrom Ltd, Cambridge,UK) adottando cuvette con cammino ottico di 1 cm.

Per fluorescenza invece si intende la luminescenza che una sostanza presenta in seguito all'assorbimento di una radiazione elettromagnetica. È dovuta ad atomi o molecole che emettono radiazioni durante la transizione da un livello elettronico di maggior energia ad uno di minor energia. Sia gli atomi che le molecole possono cedere l'energia radiante assorbita sotto forma di energia luminosa per effetto della transizione di un elettrone da uno stato eccitato allo stato fondamentale con emissione di un fotone. Poiché

durante le transizioni fluorescenti si ha perdita di energia non luminosa, l'energia del fotone emesso è sempre minore dell'energia del fotone assorbito e la lunghezza d'onda della luce fluorescente è maggiore della lunghezza d'onda della luce eccitante.

Nella fluorescenza si distingue una luce eccitante e una luce che viene emessa per fluorescenza: per ogni sostanza fluorescente esiste una caratteristica radiazione capace di eccitare gli elettroni ed una caratteristica radiazione emessa durante il ritorno allo stato fondamentale. Dall'analisi delle radiazioni capaci di provocare la fluorescenza si può ottenere lo spettro di eccitamento; quando si analizza la luce emessa per fluorescenza si ottiene invece lo spettro di emissione.

L'efficienza della fluorescenza è detta resa quantica (R.Q.) ed è il rapporto tra il numero di quanti emessi ed il numero dei quanti assorbiti.

Gli enzimi contengono tre potenziali nuclei fluorescenti: la fenilalanina, la tirosina ed il triptofano. Negli enzimi che contengono questi amminoacidi aromatici la fluorescenza è dominata generalmente dai residui di triptofano, poiché la sua resa quantica di emissione (0.20) è maggiore dei rispettivi valori di tirosina (0.14) e di fenilalanina (0.04).

Le transizioni conformazionali di un enzima, in particolare la sua denaturazione, spesso causano cambi sostanziali nello spettro di emissione. L'emissione generata, ad esempio, dal triptofano in un enzima può essere più alta o più bassa di quella del triptofano libero in soluzione acquosa. Di conseguenza possono verificarsi sia l'aumento che il decremento in intensità di fluorescenza in seguito a denaturazione dell'enzima analizzato.

Durante il decadimento inoltre può avvenire il trasferimento di energia ad un altro gruppo della molecola stessa, fenomeno che viene chiamato "quencing" della fluorescenza. Poiché questo fenomeno può avvenire in enzimi durante il legame con ligandi, esso può essere utilizzato per studiare l'interazione enzima-ligando.

La spettrofluorimetria rappresenta quindi un metodo utile per monitorare cambiamenti conformazionali di un enzima in seguito all'interazione con ligandi e/o a destrutturazione.

Nel corso di questo lavoro per le determinazioni fluorimetriche è stato impiegato uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS-3 (Perkin-Elmer Ltd, Beaconsfield, UK) e cuvette con cammino ottico di 1 cm.

2.3. Dicroismo circolare

La radiazione elettromagnetica oscilla in tutte le direzioni ed è possibile selezionare in modo preferenziale le onde che oscillano su un singolo piano. A questo scopo si utilizza un materiale polarizzante come schermo polarizzatore (Polaroid) o un prisma Nicol. La polarimetria è una tecnica che essenzialmente misura la variazione dell'angolo del piano di polarizzazione dopo che la luce è passata attraverso una soluzione contenente una sostanza otticamente attiva. Quindi una radiazione luminosa polarizzata che interagisce con una molecola otticamente attiva, dà origine al fenomeno del dicroismo circolare. La luce, può essere polarizzata in modo diverso: su di un piano e circolarmente.

La spettroscopia in dicroismo circolare viene impiegata per lo studio della struttura tridimensionale delle macromolecole contenenti centri chirali. Questa tecnica utilizza la luce polarizzata circolarmente, che si ottiene sovrapponendo due onde di luce polarizzata su piani aventi la stessa lunghezza d'onda e intensità, ma diverse di un quarto nella fase della lunghezza d'onda e di 90° nei loro piani di polarizzazione. Sia la luce polarizzata su un piano che la luce polarizzata circolarmente può essere levogira (L) o destrogira (R). Il raggio risultante, dopo essere passato attraverso il campione, è la

ricombinazione delle componenti R e L e darà un raggio emergente di luce polarizzata elliticamente.

Generalmente uno spettro CD è un grafico dell'ellitticità in funzione della lunghezza d'onda. Il dicroismo circolare è una tecnica adoperata per studiare la struttura secondaria delle proteine. I legami peptidici infatti assorbono la luce a seconda di come sono disposti, cioè in rapporto alla struttura secondaria della proteina: α elica, β -sheet e random coil hanno differenti spettri di dicroismo circolare. In particolare le α eliche mostrano uno spettro CD netto e caratteristico nella regione del lontano UV (170-250 nm). Tale tecnica quindi si rivela molto utile per monitorare la transizione enzima nativo-enzima denaturato (in seguito alla perdita di elementi di struttura secondaria) oppure anche per determinare le relative proporzioni di strutture secondarie.

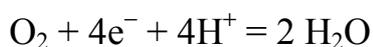
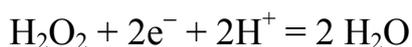
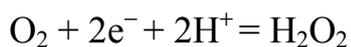
Gli spettri CD sono stati ottenuti utilizzando uno spettropolarimetro Jasco J-715 (Jasco Ltd, Hachioji City, Tokyo; Japan).

2.4. Ossigrafia

L'ossigrafia è una metodica che consente la determinazione polarografica del consumo di ossigeno. L'ossigeno può ridursi al catodo, originando una corrente proporzionale alla concentrazione dell'ossigeno in soluzione, quando viene applicato un voltaggio compreso tra 0,6 e 0,9 Volt agli elettrodi.

L'apparecchio di misura è l'ossigrafo, che consta di un elettrodo di misura (catodo) collegato tramite un ponte salino di KCl saturo con un elettrodo di riferimento (anodo). L'elettrodo di CLARK, utilizzato soprattutto per studiare le reazioni biochimiche, è costituito da un catodo di platino e un anodo d'argento, entrambi immersi nella soluzione concentrata di cloruro di potassio e separati dalla soluzione di saggio da una membrana, solitamente di teflon, che impedisce la contaminazione degli elettrodi da parte di sostanze presenti nella miscela di saggio.

Se nella soluzione da analizzare è contenuto ossigeno questo verrà ridotto al catodo secondo la reazione:



Nel circuito elettrico si verifica un passaggio di corrente (corrente di diffusione limite) direttamente proporzionale alla concentrazione di ossigeno presente nella soluzione.

La variazione dell'intensità di corrente in funzione del tempo si traduce in una registrazione grafica del consumo di ossigeno.

Per la determinazione del consumo di ossigeno abbiamo utilizzato un ossigrafo Hansatech munito di un elettrodo di Clark e collegato ad un PC munito di un software per l'analisi dei dati. Il segnale proveniente dall'elettrodo ad ossigeno viene visualizzato sullo schermo del PC come traccia e/o in forma numerica.

2.5. Studi di cinetica enzimatica

Per studiare la cinetica enzimatica dell'ELP abbiamo utilizzato due approcci sperimentali. Il primo è stato quello di compiere misurazioni delle velocità in condizioni in cui è valida l'approssimazione dello stato stazionario. In queste condizioni è possibile applicare l'equazione di Michaelis-Menten (Eq. 3), la quale mette in relazione la velocità iniziale di una reazione enzimatica (V_0) e la concentrazione di substrato ($[S]$).

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 3})$$

Come possiamo osservare dalla Figura 10A tale equazione appare graficamente come una iperbole rettangolare: a concentrazioni relativamente basse di substrato, la velocità iniziale della reazione aumenta in modo lineare con l'aumento della $[S]$, mentre a concentrazioni più elevate di substrato, la V_0 aumenta in misura sempre minore fino a raggiungere uno stato di saturazione in cui si avvicina alla velocità massima (V_{\max}). La concentrazione di substrato alla quale V_0 è metà della velocità massima corrisponde alla K_m , la costante di Michaelis. Per analizzare i dati sperimentali e ottenere una accurata determinazione dei valori di V_{\max} e della K_m

viene maggiormente utilizzata l'equazione di Lineweaver-Burk: questa equazione (Eq. 4) è stata ricavata calcolando il reciproco di entrambi i termini dell'equazione di Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Riportando in grafico i valori di $1/V_0$ in funzione di $1/[S]$ (grafico dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk) si ottiene una linea retta (Figura 10B), la quale ha una pendenza pari a K_m/V_{\max} , un'intercetta sull'asse delle ascisse che corrisponde a $-1/K_m$ ed un'intercetta sull'asse delle ordinate che corrisponde a $1/V_{\max}$.

Un altro parametro importante per lo studio ed il confronto di enzimi diversi è rappresentato dalla costante catalitica (o “numero di turnover”, k_{cat}), la quale indica il numero di molecole di substrato che vengono convertite in prodotto nell'unità di tempo da una molecola enzimatica quando è saturata con il substrato. Il fattore k_{cat}/K_m è inoltre utilizzato per confrontare l'efficienza catalitica di enzimi diversi poiché rappresenta una misura più accurata della specificità di substrato.

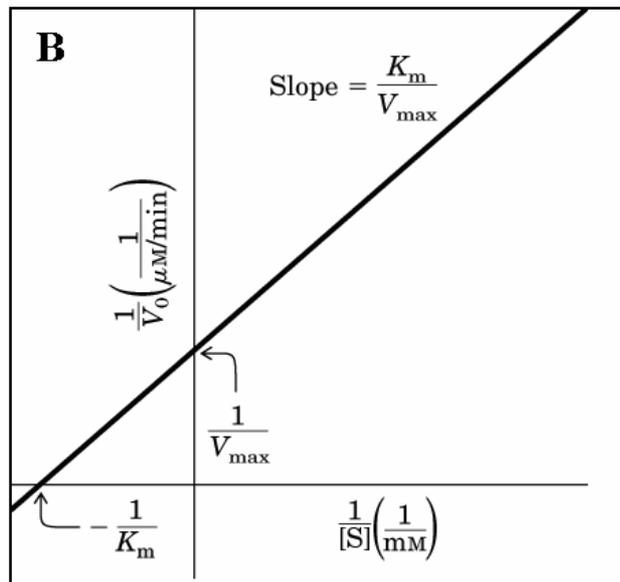
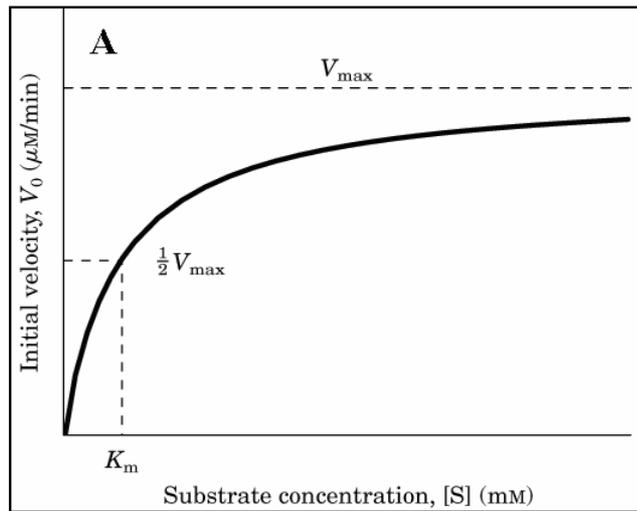


Figura 10. (A) Effetto della concentrazione di substrato sulla velocità iniziale di una reazione enzimatica. (B) Grafico di Lineweaver-Burk, da cui possono essere facilmente calcolate la V_{max} e la K_m .

Per conoscere maggiori dettagli circa il meccanismo d'azione degli enzimi, è invece necessario utilizzare un altro approccio sperimentale, eseguendo lo studio dei sistemi cinetici in stato prestazionario. Tali esperimenti richiedono l'utilizzo di tecniche particolari che consentono di cogliere eventi dell'ordine del msec, come ad esempio la tecnica a flusso interrotto o stopped flow.

L'apparato di mescolamento a flusso interrotto (stopped-flow) è costruito intorno a due componenti principali disposti in sequenza (Figura 11): la camera di mescolamento e la camera di osservazione.

I reagenti che devono essere mescolati sono contenuti in due siringhe di spinta e al comando dell'operatore un ugual volume delle due soluzioni viene spinto, attraverso la camera di mescolamento (si veda la figura), nella camera di osservazione ed infine nella siringa di arresto. Il pistone della siringa di arresto, bloccandosi contro un vincolo fisso, interrompe lo scorrere del flusso, istruendo l'oscilloscopio ad iniziare la raccolta dei dati. La trasmittanza della soluzione contenuta nella camera di osservazione viene rilevata in continuo per mezzo di 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 trasmittanza anziché singole lunghezze d'onda.

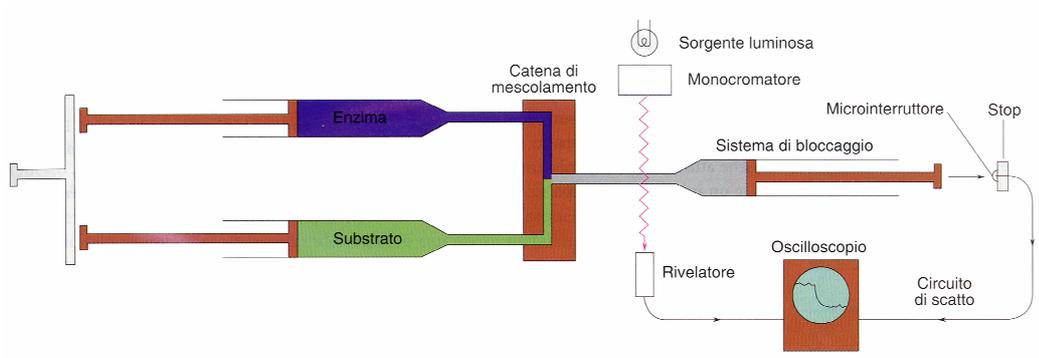


Figura 11. Tipico apparato per misurazioni a flusso interrotto

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

Gli spettri di assorbanza ottenuti a varie distanze 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: $\epsilon \times C = U \times S \times V_{fit}^T$ 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.

2.6. Inibizione enzimatica

Gli inibitori enzimatici (I) sono molecole capaci di legarsi ad un enzima e di diminuirne o bloccarne l'attività. La costante per la dissociazione di I dal complesso enzima-inibitore (EI) è definita costante di inibizione (K_i) ed è descritta dalla seguente equazione:

$$K_i = [E] [I] / [EI] \quad (\text{Eq. 5})$$

Lo studio degli inibitori rappresenta un metodo molto utile ed efficace capace di fornire numerose informazioni riguardo le caratteristiche biochimiche di un enzima.

Gli inibitori enzimatici sono suddivisi in due grandi classi: inibitori reversibili ed irreversibili.

Gli inibitori irreversibili instaurano un legame forte con l'enzima, formando spesso legami covalenti con i suoi residui aminoacidici.

Gli aminoacidi con funzioni catalitiche presenti nel sito attivo di un enzima possono essere identificati individuando i gruppi funzionali ai cui si lega covalentemente l'inibitore irreversibile.

Gli inibitori reversibili invece interagiscono più debolmente con l'enzima e possono quindi essere facilmente rimossi. Esistono diversi tipi di inibizione reversibile che possono essere distinti sperimentalmente in base agli effetti che determinano sul

comportamento cinetico degli enzimi. Un tipo comune di inibizione reversibile viene detta “competitiva”: un inibitore competitivo “compete” con il substrato per il legame al sito attivo dell’enzima (Figura 12a).

L’inibizione competitiva può essere annullata se il rapporto substrato/inibitore ha un valore abbastanza grande. Quando infatti la concentrazione di substrato è più elevata di quella dell’inibitore, la probabilità che una molecola di inibitore si leghi all’enzima diventa minima, di conseguenza quindi la reazione può procedere alla velocità massima. L’inibizione competitiva infatti non influisce sulla V_{\max} , bensì sulla K_m , infatti quanto maggiore è la quantità di I, tanto maggiore sarà la concentrazione di substrato necessaria per raggiungere $\frac{1}{2} V_{\max}$. In presenza quindi di quantità crescenti di inibitore competitivo, il valore di K_m aumenta e tale valore viene indicato come K_m “apparente”. Un sistema per determinare sperimentalmente se l’inibizione di un enzima è di tipo competitivo è rappresentato dall’utilizzo del grafico dei doppi reciproci (Figura 13A): possiamo osservare che le rette hanno un’intercetta comune ($1/V_{\max}$) mentre varia l’intercetta all’asse delle ascisse ($1/K_m$).

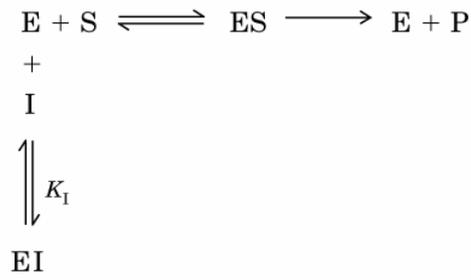
Nell’inibizione acompetitiva invece l’inibitore non si lega all’enzima libero ma ad un sito diverso da quello del substrato, presente solamente nel complesso enzima-substrato (ES) (Figura 12b). Dato

che, in presenza di un inibitore acompetitivo, una certa frazione di molecole di enzima è inattiva, si osserva una riduzione della V_{\max} che non può essere impedita dall'aggiunta di substrato poiché l'inibitore si lega direttamente al complesso ES.

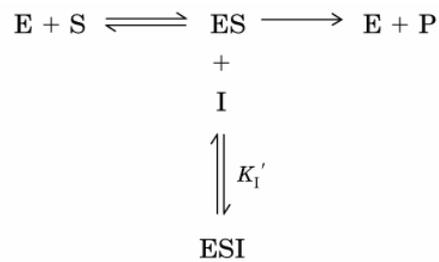
Dal punto di vista grafico le rette, che rappresentano le varie concentrazioni di un inibitore acompetitivo, appaiono parallele tra loro: hanno infatti la stessa pendenza ma valori di V_{\max} e K_m più bassi (Figura 13B).

Un altro tipo di inibizione reversibile è rappresentata dall'inibizione mista: in questo caso l'inibitore si lega ad un sito diverso da quello del substrato ma si può legare sia all'enzima libero sia al complesso ES (Figura 12c). In questo caso, quando un inibitore si lega ad E ed a ES con diversa affinità, il valore di V_{\max} diminuisce, mentre la K_m può sia aumentare che diminuire a seconda che il valore di K_i sia rispettivamente inferiore o superiore a quello della costante di inibizione per la reazione $ES \rightleftharpoons ESI$ (K_i') (Figura 13C1 e C2).

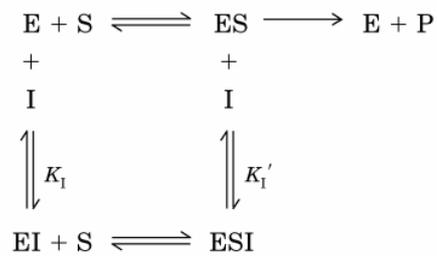
Nel caso particolare in cui K_i e K_i' sono uguali, cioè l'inibitore si lega non la stessa affinità ad E ed a ES, l'inibizione viene detta non competitiva. Come si può osservare dalla Figura 13C3, in questo caso si osserva una diminuzione della V_{\max} mentre la K_m risulta invariata.



(a) Competitive inhibition

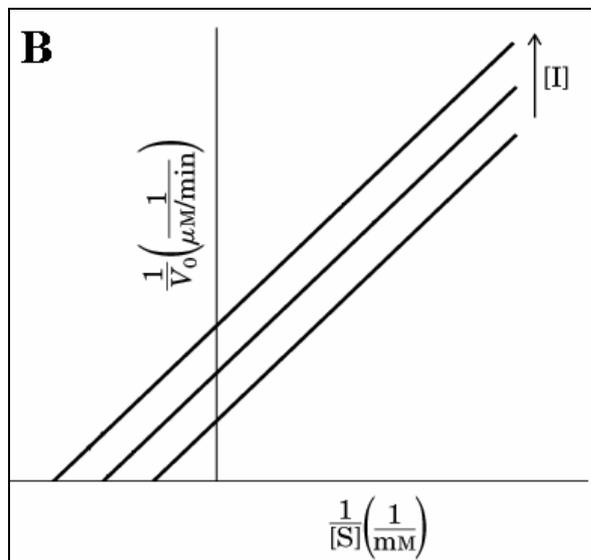
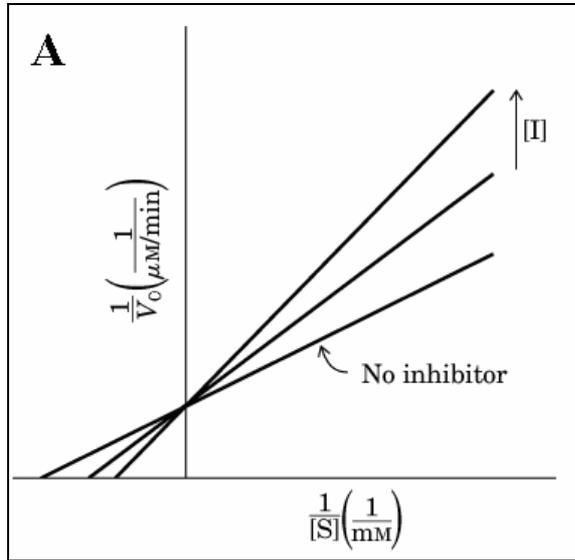


(b) Uncompetitive inhibition



(c) Mixed inhibition

Figura 12. Rappresentazione schematica del legame di un inibitore all'enzima nei diversi tipi di inibizione reversibile: inibizione competitiva, incompetitiva e mista.



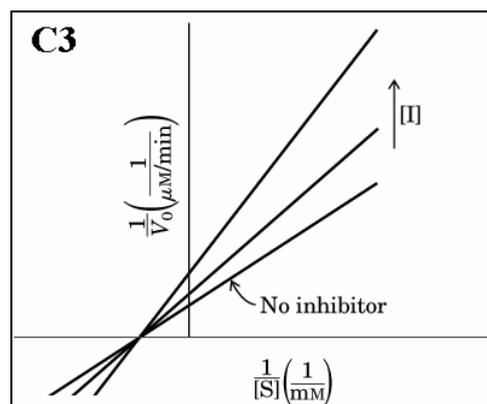
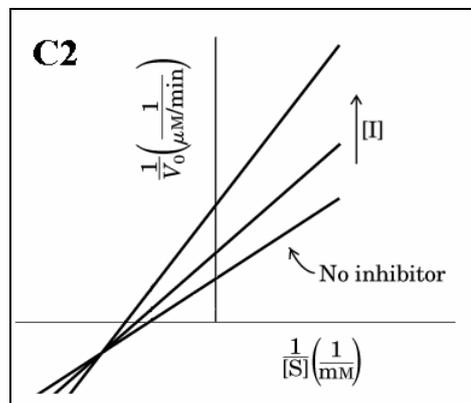
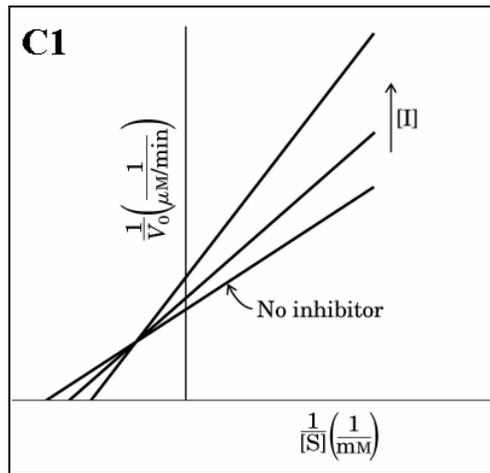


Figura 13. Grafico dei doppi reciproci per l'inibizione competitiva (A), acompetitiva (B) e mista (C1, C2 e C3).

2.7. Laser fotolisi

Alcuni legami chimici di interesse biologico presentano la peculiarità di essere fotosensibili, nel senso che un impulso di radiazione luminosa di opportuna frequenza è in grado di scinderli. A seconda del tipo di reazione chimica coinvolta il processo può essere reversibile o irreversibile. In entrambi i casi per iniziare la reazione in modo quasi istantaneo, si utilizzano degli impulsi di laser aventi un'intensità estremamente elevata ed una durata estremamente breve. In questo modo è possibile promuovere il passaggio da una specie legata A ad una specie non legata A*, la quale si definisce specie eccitata; se quest'ultima a seguito di una serie di reazioni chimiche è in grado di tornare alla specie legata A, allora il processo risulta reversibile altrimenti la specie A* rilascerà verso una nuova specie chimica B ed il processo sarà irreversibile. Questo protocollo sperimentale di fotolisi, può essere utilizzato con diverse tecniche spettroscopiche e consente pertanto di studiare con metodologie diverse i processi dinamici che seguono la formazione della specie eccitata.

In questa tesi, la fotolisi mediante un impulso laser del legame Fe^{2+} -CO è stata utilizzata per studiare i cambiamenti della ELP nella fase di ricombinazione con il CO in presenza di calcio, nichel o di entrambi gli ioni.

Gli esperimenti di Laser fotolisi sono stati condotti utilizzando un laser Nd:YAG (Quanta Systems, Milan, Italy) in grado di fornire a $\lambda = 532$ nm circa 80 mJ per pulso di durata fissa e pari a 5 ns. I flash colpiscono la cuvetta da fluorescenza, dal cammino ottico di 1 cm, contenente la soluzione in esame e la fase gassosa; la trasmittanza del campione viene raccolta a 90° rispetto al flash prodotto dal laser, amplificata, convertita in voltaggio e registrata mediante oscilloscopio digitale. Con questo apparecchio è stato possibile compiere le misurazioni in un range di tempo di nanosecondi e microsecondi.

3. VIE CATALITICHE DELL'ELP NELLA REAZIONE CON IL PEROSSIDO D'IDROGENO

3.1. Pathway I : attività pseudo-catalasica

L'attività pseudo-catalasica dell'ELP è stata determinata attraverso l'utilizzo dell'ossigrafo, monitorando la produzione di ossigeno in seguito all'incubazione dell'ELP con il perossido d'idrogeno in assenza di altri substrati riducenti. In queste condizioni infatti l'ELP è in grado di produrre ossigeno molecolare. La Figura 14 mostra il tracciato ossigrafico in cui si osserva un aumento della concentrazione di O₂ in seguito all'aggiunta di ELP (0.5 µM) alla miscela di reazione contenente H₂O₂ 40 mM in HEPES 100 mM a pH 7.0. Questa attività è stata svolta alla temperatura di 25°C e la velocità di produzione di ossigeno si determina dallo slope della traccia osservata nella fase iniziale e lineare della reazione in un tempo compreso tra 0 e 25 sec.

La perdita di linearità del tracciato che si osserva al termine della reazione indica che il processo di inattivazione dell'enzima da parte dell'H₂O₂ diventa rilevante (Sezione 3.3: cinetica d'inattivazione).

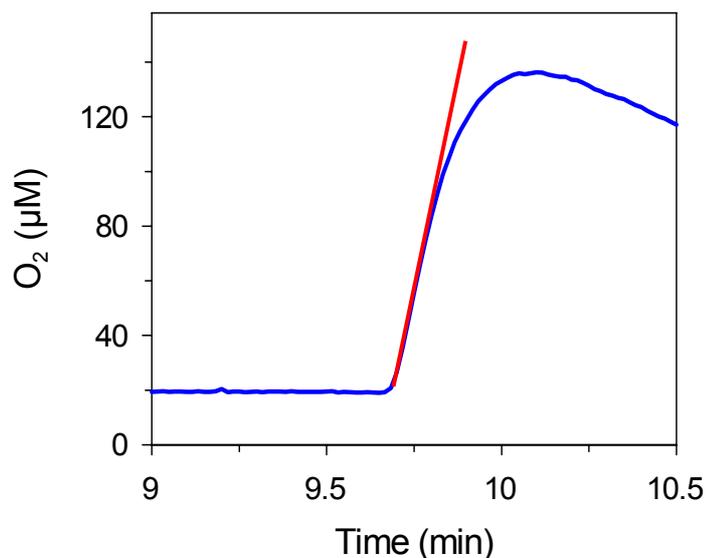


Figura 14. Produzione di ossigeno durante la reazione tra ELP (0.5 μM) e H_2O_2 (40 mM) in HEPES 100 mM a pH 7.0, a 25°C.

Il passo successivo è stato quello di verificare se la quantità di ossigeno prodotto fosse effettivamente dovuta all'attività catalasica dell'ELP. Abbiamo quindi misurato la produzione di ossigeno a diverse concentrazioni di ELP in un range da 0 a 0.5 μM . La produzione di ossigeno risulta essere correlata linearmente alla concentrazione di enzima (Figura 15) ed è stato calcolato che la quantità di ossigeno prodotto in 25 sec (prima che diventi rilevante l'effetto di inattivazione enzimatica) è 350 volte maggiore della concentrazione di ELP e questo risultato indica chiaramente un turnover dell'enzima nel rilascio dell' O_2 .

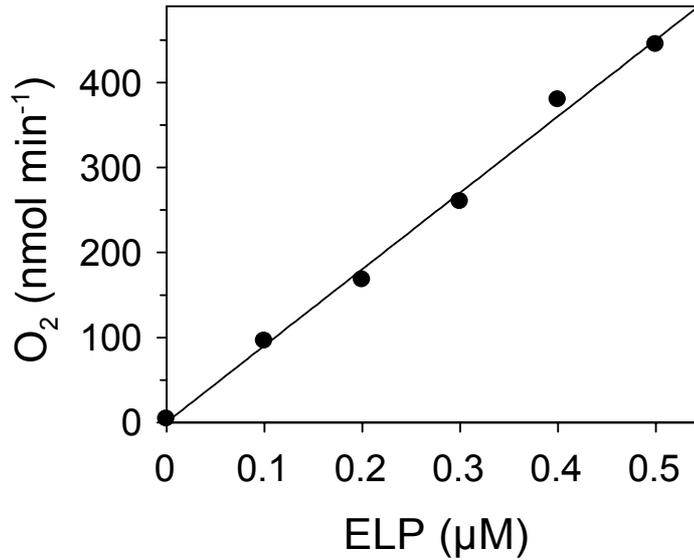


Figura 15. Velocità di produzione di ossigeno al variare della concentrazione di ELP; la reazione inizia in seguito all'aggiunta di enzima (range 0-0.5 μM) alla miscela di reazione contenente H₂O₂ 40 mM in HEPES 100 mM a pH 7.0.

Una volta evidenziata l'attività catalasica dell'ELP abbiamo voluto studiarne le caratteristiche e quindi abbiamo esaminato l'effetto del pH e i parametri cinetici quali K_m e k_{cat} .

L'effetto del pH sull'attività dell'ELP è stato studiato utilizzando i tamponi Na⁺-acetato, HEPES e Na⁺-borato. La curva del pH mostra un optimum di attività in HEPES a pH 7.0 (Figura 16).

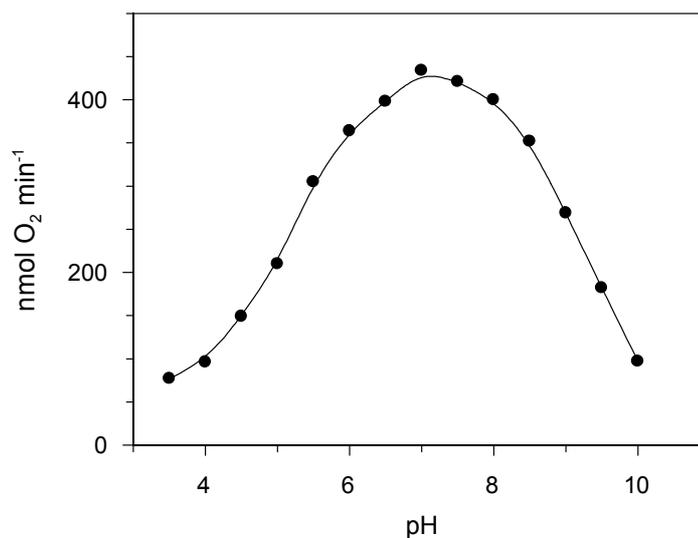


Figura 16. Effetto del pH sull'attività pseudo-catalasica dell'ELP. I tamponi usati sono Na⁺-acetato 100 mM, pH 3.3-5.5; HEPES 100 mM, pH 6.0-8.0; Na⁺-borato 100 mM, pH 8.5-10.0.

Il valore della K_m per l'H₂O₂ è stato calcolato mediante il plot dei doppi reciproci, misurando la produzione di ossigeno al variare della concentrazione di perossido d'idrogeno (in un range tra 0.1 e 0.5 mM) ed è risultato essere 8 ± 0.73 mM, valore simile a quello riportato per l'HRP e per altre perossidasi. E' stata inoltre calcolata la k_{cat} che è risultata essere 14.73 ed il rapporto k_{cat}/K_m pari a 1.84 mM⁻¹ s⁻¹ (Tabella 2).

Enzymes	K_m (mM)	k_{cat} (s⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM⁻¹ s⁻¹)
LiP	8.6 ± 0.4	2.87 ± 0.21	0.33
ARP	10.2 ± 2.3	1.15 ± 0.09	0.11
HRP-C	4.0 ± 0.6	1.78 ± 0.12	0.44
ELP	8.0 ± 0.73	14.73 ± 1.1	1.84

Tabella 2. Parametri cinetici dell'attività pseudo-catalasica dell'ELP paragonati a quelli dell'HRP-C, della perossidasi da *Artromyces ramosus* (ARP) e della lignina perossidasi da *Phanerochaete chrysosporium* (LiP).

Come descritto precedentemente, il calcio gioca un ruolo chiave nel regolare l'attività catalitica dell'ELP; l'attività perossidasi dell'enzima infatti aumenta notevolmente in presenza di Ca²⁺ 10 mM. Abbiamo quindi studiato l'effetto degli ioni calcio anche sull'attività catalasica dell'ELP. In presenza di H₂O₂ 40 mM e di Ca²⁺ 10 mM la produzione di ossigeno derivante dall'attività catalasica dell'ELP appare ridotta fino al 55% ed il decremento è dipendente dalla concentrazione degli ioni calcio (Tabella 3).

[Ca²⁺] mM	Activity nmol O₂ min⁻¹
0	483 ± 20
0.1	458 ± 32
1.0	340 ± 30
2.0	314 ± 24
5.0	294 ± 24
10.0	265 ± 18

Tabella 3. Attività pseudo-catalasica dell'ELP (0.5 μM) in presenza di diverse concentrazioni di ioni calcio e di H₂O₂ 40 mM.

3.2. Pathway II: formazione del compound III

La seconda via catalitica è stata studiata osservando i cambiamenti degli spettri di assorbimento dell'enzima nativo in seguito all'aggiunta di H₂O₂. In HEPES 100 mM a pH 7.0, l'enzima nativo presenta delle caratteristiche bande di assorbimento a 277, 401, 495 e 638 nm. Il CI, con caratteristiche bande a 277, 399 e 650 nm è prodotto dalla reazione dell'ELP con una quantità stechiometrica di perossido d'idrogeno. Il CII si ottiene a partire dal CI in seguito all'aggiunta di due equivalenti di H₂O₂ e presenta delle bande a 277, 417, 522 e 555 nm. Lo spettro del CII è del tutto simile a quello che si ottiene quando al CI viene aggiunta una quantità stechiometrica di

substrato riducente (ad esempio acido ascorbico). L'aggiunta di un eccesso di perossido d'idrogeno all'enzima, con un rapporto enzima:H₂O₂ di 1:1000, genera il compound III, con bande di assorbimento a 277, 413, 542 e 576 nm (Figura 17).

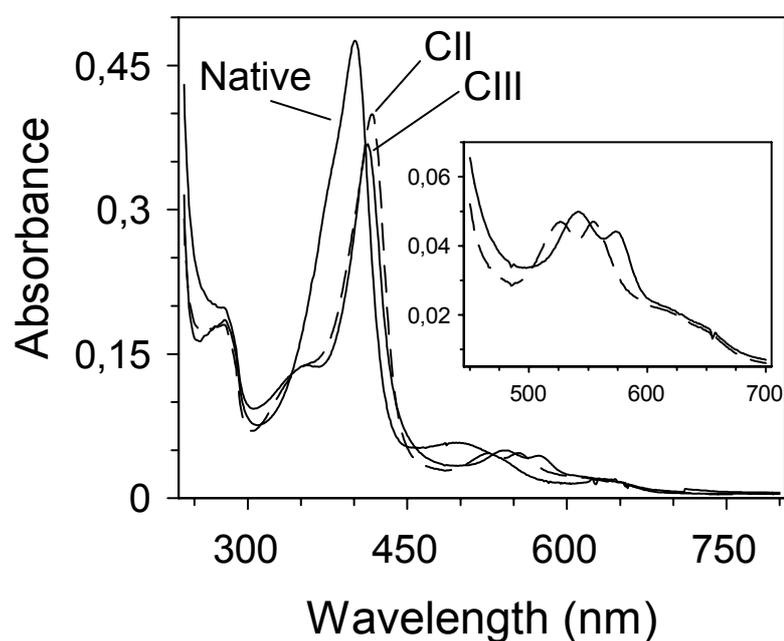


Figura 17. Spettro di assorbimento dell'ELP (3.7 μM) allo stato nativo, del CII (linea tratteggiata) e del CIII in HEPES 100 mM, pH 7.0. L'inset mostra un ingrandimento dello spettro di assorbimento del CII e del CIII nella zona del visibile tra 400 e 700 nm.

Il CIII non è un composto stabile infatti il suo spettro scompare entro pochi minuti e la sua scomparsa è associata alla perdita di attività enzimatica (Figura 18A). Diversi risultati si ottengono in presenza di ioni calcio. In presenza di Ca^{2+} 10 mM l'enzima va incontro a perdita di attività enzimatica e alla scomparsa della banda a 401 nm. La scomparsa del CIII è però più lenta e la perdita irreversibile dell'attività enzimatica è accompagnata dalla formazione della specie inattiva P670. Questa specie è spesso transitoria e difficile da evidenziare nelle perossidasi mentre, nella reazione fra ELP e H_2O_2 , in presenza di ioni calcio, tale specie si accumula, raggiunge il suo massimo di assorbimento dopo circa 20 minuti e si degrada con un tempo di dimezzamento di 48 ore a 4 °C (Figura 18B).

Abbiamo inoltre effettuato un'analisi fluorimetrica per evidenziare eventuali cambiamenti nella struttura secondaria o terziaria dell'ELP in seguito alla formazione del P670.

Dalla sequenza nucleotidica del gene codificante la perossidasi da *Euphorbia characias* (Mura et al., 2005; GenBank accession number AY586601), risulta la presenza di un singolo residuo di triptofano (Trp_{12}). Tale triptofano è responsabile dello spettro di fluorescenza dell'ELP che mostra un massimo a 336 nm quando viene eccitata a 295 nm. La specie P670 presenta uno spettro di fluorescenza del

tutto simile a quello dell'ELP nativo e ciò indica che la formazione di tale specie inattiva non comporta notevoli cambiamenti nella conformazione nativa della proteina.

È ben noto, anche dallo studio dell'HRP (Dunford and Stillman, 1976), che il compound III rilascia l'anione superossido con il ritorno dell'enzima allo stato ferrico nativo. La perdita dell'attività enzimatica dell'ELP e la formazione del P670 in presenza di ioni calcio implica che ci sia una terza via catalitica nella reazione dell'ELP con il perossido d'idrogeno.

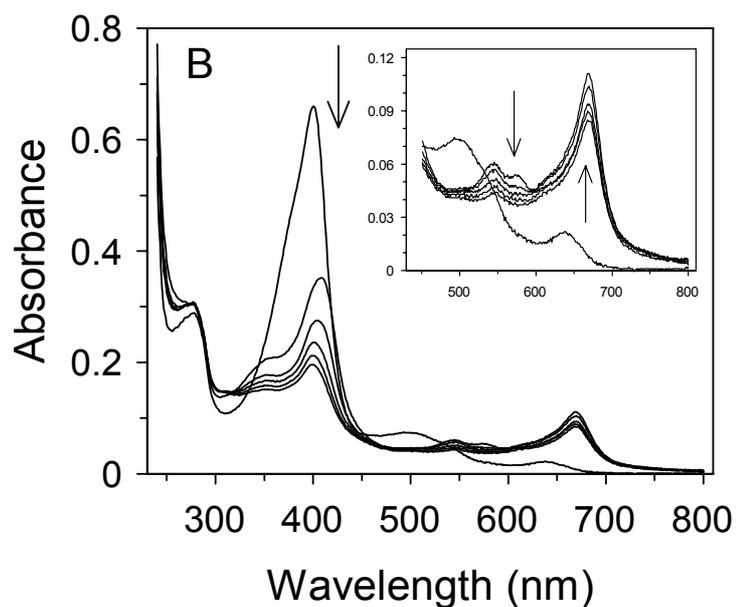
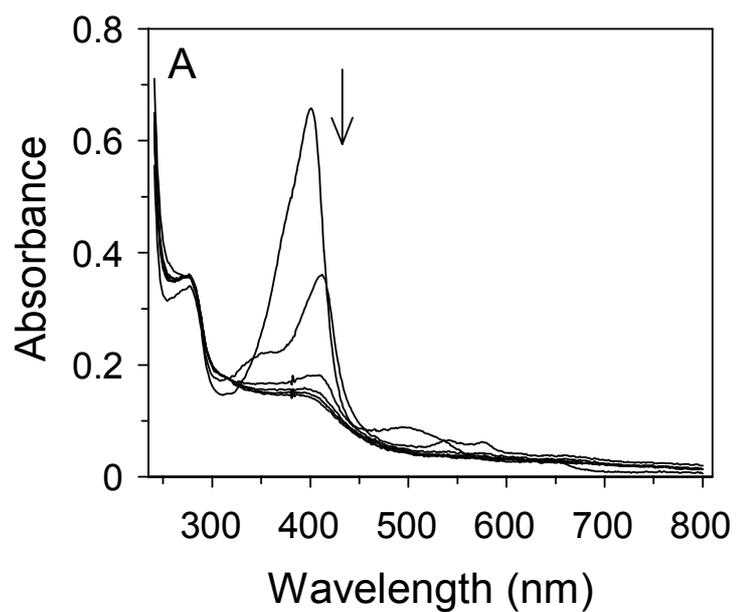


Figura 18. Spettri di assorbimento dell'ELP (5 μM) allo stato nativo e dopo aggiunta di perossido d'idrogeno 5 mM in assenza (A) ed in presenza di ioni Ca^{2+} 10 mM (B). Condizioni sperimentali: HEPES 100 mM pH 7.0 e temperatura di 25°C.

3.3. Pathway III: cinetica di inattivazione

L'inattivazione tempo-dipendente dell'enzima è stata studiata incubando l'ELP 1 μM in tampone HEPES 100 mM a pH 7.0, ad una temperatura di 25 °C con differenti concentrazioni di H_2O_2 (0.25, 0.5, 1, 2 mM) in assenza ed in presenza di ioni Ca^{2+} 10 mM. Ad intervalli di tempo vengono prelevate delle aliquote e testate spettrofotometricamente in modo da verificare la perdita o meno dell'attività perossidasi dell'ELP. Tale attività è stata misurata a 25°C, seguendo l'aumento dell'assorbanza a 415 nm risultante dalla formazione del prodotto radicalico cationico dell'ABTS ($\epsilon_{415} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizzato come substrato riducente. La miscela standard di reazione è composta da H_2O_2 25 mM, ABTS 10 mM in tampone Na^+ -acetato 100 mM a pH 5.75.

La Figura 19 mostra che l'inibizione dell'enzima è proporzionale all'incremento della concentrazione di perossido d'idrogeno. Dal grafico dei doppi reciproci delle k_{app} in funzione delle concentrazioni di H_2O_2 è possibile ricavare, dall'intercetta positiva con l'asse delle ordinate, una costante di inattivazione k_{inh} di $4.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e, dall'intercetta con l'asse delle ascisse, una costante apparente di inibizione K_i di 1.67 mM. Simili risultati si ottengono in presenza di calcio e risultano del tutto simili a quelli riportati per la cinetica

d'inattivazione dell'HRP e di altre perossidasi, come riportato nella tabella 4.

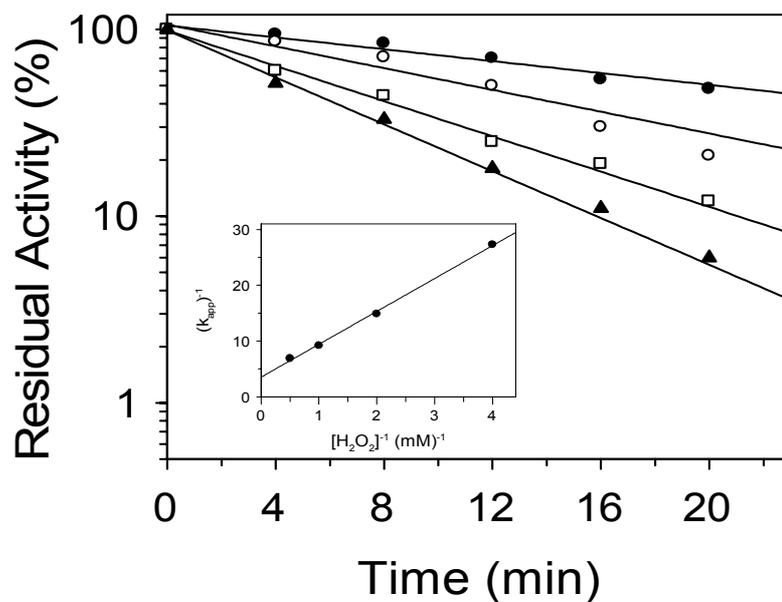


Figura 19. Inattivazione dell'ELP nella reazione con il perossido d'idrogeno. Le concentrazioni di H_2O_2 utilizzate sono: 0.25 mM (●), 0.5 mM (○), 1 mM (□) e 2 mM (▲). L'inset mostra il grafico dei doppi reciproci delle k_{app} in funzione delle concentrazioni di perossido d'idrogeno.

Enzymes	K_i (mM)	k_{inh} ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)
LiP	6.1 ± 0.45	20.0 ± 3
ARP	3.83 ± 0.35	1.37 ± 0.27
HRP-C	1.3 ± 0.2	3.92 ± 0.06
ELP	1.67 ± 0.15	4.71 ± 0.52

Tabella 4. Parametri cinetici per la reazione di inattivazione dell'ELP paragonati a quelli di altre perossidasi.

3.4. Stopped flow

Le reazioni dell'ELP con il perossido d'idrogeno e l'inibizione enzimatica causata da questo substrato-suicida è stata inoltre studiata con tecniche di cinetica rapida (stopped-flow). Questi studi hanno messo in evidenza l'importanza del calcio nel modulare la velocità delle vie catalitiche e nell'accumulo dei diversi intermedi di reazione.

La reazione iniziale dell'ELP ($2.3 \mu\text{M}$) con il perossido d'idrogeno a concentrazioni tra 3 e $50 \mu\text{M}$, in presenza di calcio (10 mM), mostra 2 andamenti distinti con costanti di velocità molto diverse fra loro: un processo veloce con una costante di velocità pari a $80\text{-}500 \text{ s}^{-1}$, a

seconda della concentrazione di H_2O_2 utilizzata, ed un processo lento con una costante di velocità di circa 3 s^{-1} , indipendente dalla concentrazione di perossido d'idrogeno (Figura 20).

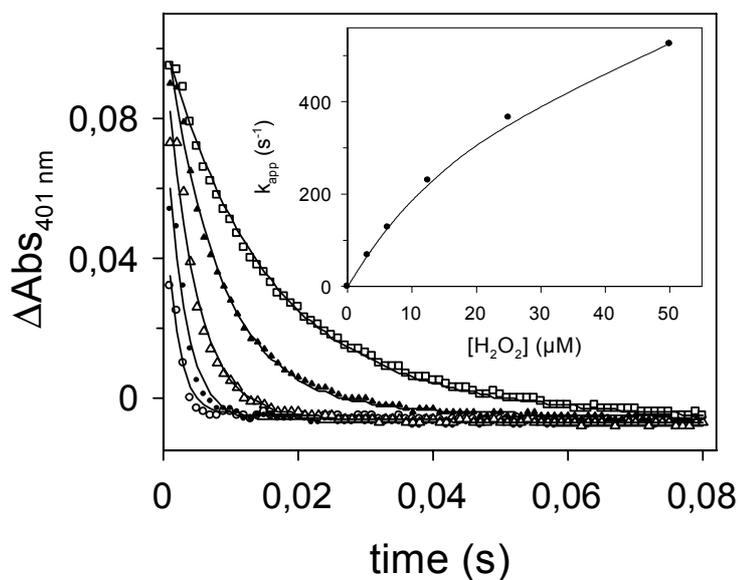


Figura 20. Reazione dell'ELP ($2.3 \mu\text{M}$) con il perossido d'idrogeno in presenza di Ca^{2+} 10 mM . Le concentrazioni di H_2O_2 sono: $3.1 \mu\text{M}$ (\square), $6.2 \mu\text{M}$ (\blacktriangle), $12.5 \mu\text{M}$ (\triangle), $25 \mu\text{M}$ (\bullet) e $50 \mu\text{M}$ (\circ). Nell'inset sono riportati i valori delle k_{app} in funzione delle concentrazioni di H_2O_2 .

Dall'analisi degli spettri la reazione più veloce è stata identificata come la fase di formazione del CI. Il compound I si forma mediante il seguente meccanismo cinetico:



La reazione può verificarsi in 2 differenti condizioni:

- a) l'enzima ferrico ed il perossido d'idrogeno possono essere in equilibrio con il C0 il quale successivamente si trasforma in maniera irreversibile nel compound I;
- b) il meccanismo di reazione è costituito da due step sequenziali e semi-irreversibili.

Nelle condizioni da noi utilizzate per le reazioni non è possibile stabilire con certezza se la dissociazione del C0 è più o meno rilevante poiché tale intermedio di reazione non si accumula abbastanza da poter essere identificato con chiarezza.

Ipotizzando che si venga a creare un rapido equilibrio tra l'ELP ed il C0, la costante di velocità apparente per la formazione del CI si può calcolare mediante la seguente equazione:

$$k_{\text{app}} = k_{\text{intr}} [\text{H}_2\text{O}_2]/([\text{H}_2\text{O}_2] + K) \quad (\text{Eq. 7})$$

dove la k_{app} è la costante di velocità del processo veloce, k_{intr} è la costante di velocità per la conversione del C0 in CI, mentre K è la

costante di equilibrio per la dissociazione del C0 ad enzima ferrico e H_2O_2 .

La k_{app} ha una dipendenza iperbolica dalla concentrazione di perossido d'idrogeno (Figura 20-inset) e, dal grafico dei doppi reciproci, è possibile ricavare i valori di $k_{\text{intr}} = 950 \text{ s}^{-1}$ (intercetta con l'asse delle ordinate) e di $K = 38 \text{ }\mu\text{M}$ (intercetta con l'asse delle ascisse).

Ipotizzando invece che la dissociazione del C0 ad ELP e H_2O_2 sia trascurabile, il valore di K non può essere determinato ed il valore di k_{intr} può essere considerato del tutto simile a quello calcolato dall'Eq. 7 ($\sim 1000 \text{ s}^{-1}$).

La fase lenta invece, osservata dopo la formazione del CI, ha una velocità pari a $\sim 3 \text{ s}^{-1}$, ed è indipendente dalla concentrazione di substrato. Tale fase non può essere identificata come un singolo processo ma probabilmente rappresenta l'unione di più reazioni contemporanee: il CI infatti può intraprendere pathways distinti e paralleli tra loro.

In assenza di ioni calcio il CI si accumula ad una velocità 100 volte più bassa, come già precedentemente osservato (Medda et al., 2003). Di conseguenza, specialmente a basse concentrazioni di H_2O_2 , la formazione del CI si sovrappone ai successivi step di reazione ed il

CI rappresenta solamente una piccola parte dell'enzima totale (Figura 21).

In seguito alla formazione del CI, l'enzima entra in una fase di stato stazionario in cui la miscela di reazione è costituita da vari intermedi il cui accumulo varia sensibilmente in presenza o in assenza di ioni calcio.

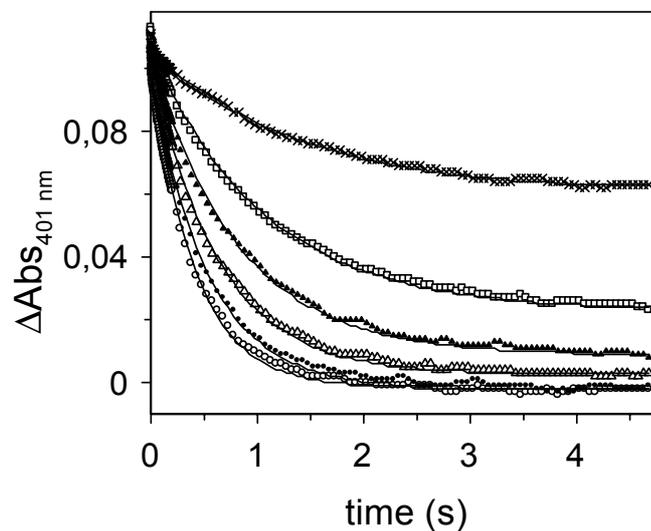


Figura 21. Reazione dell'ELP (2.3 μM) con il perossido d'idrogeno in assenza di ioni calcio. Le concentrazioni di H₂O₂ sono: 3.1 μM (×), 6.2 μM (□), 12.5 μM (▲), 25 μM (Δ), 50 μM (●) e 100 μM (○).

Analizzando gli spettri di assorbimento dell'enzima in presenza di H₂O₂ e di Ca²⁺ si è potuto osservare che la miscela di reazione è

costituita dal CI, CII, CIII mentre l'enzima ferrico è presente ad una concentrazione molto bassa. In assenza di Ca^{2+} la miscela è costituita principalmente dal CIII, mentre le altre specie sono scarsamente popolate.

L'inattivazione dell'enzima, con la progressiva e totale scomparsa della banda a 401 nm caratteristica dell'eme, causa la fine dello stato stazionario.

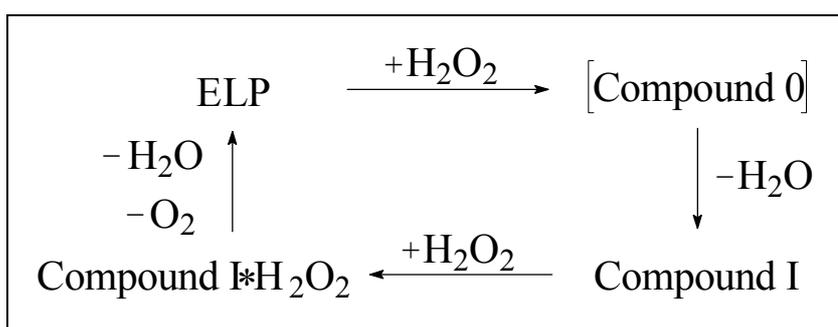
In presenza di Ca^{2+} l'inattivazione è associata alla comparsa della specie con banda di assorbimento a 670 nm, il P670. Tale specie, alla concentrazione più alta di H_2O_2 testata (2.5 mM), si forma con una velocità pari a $\sim 0.01 \text{ s}^{-1}$ e decade con la stessa velocità, trasformandosi in un'altra specie inattiva incolore.

In assenza di Ca^{2+} il P670 è difficile da evidenziare poiché in tali condizioni non si accumula, probabilmente per la bassa concentrazione del suo precursore CI.

La velocità di inattivazione dell'enzima, e quindi la sua trasformazione nella specie incolore inattiva è comunque identica in entrambe le condizioni ed è quindi indipendente dalla presenza o meno degli ioni calcio.

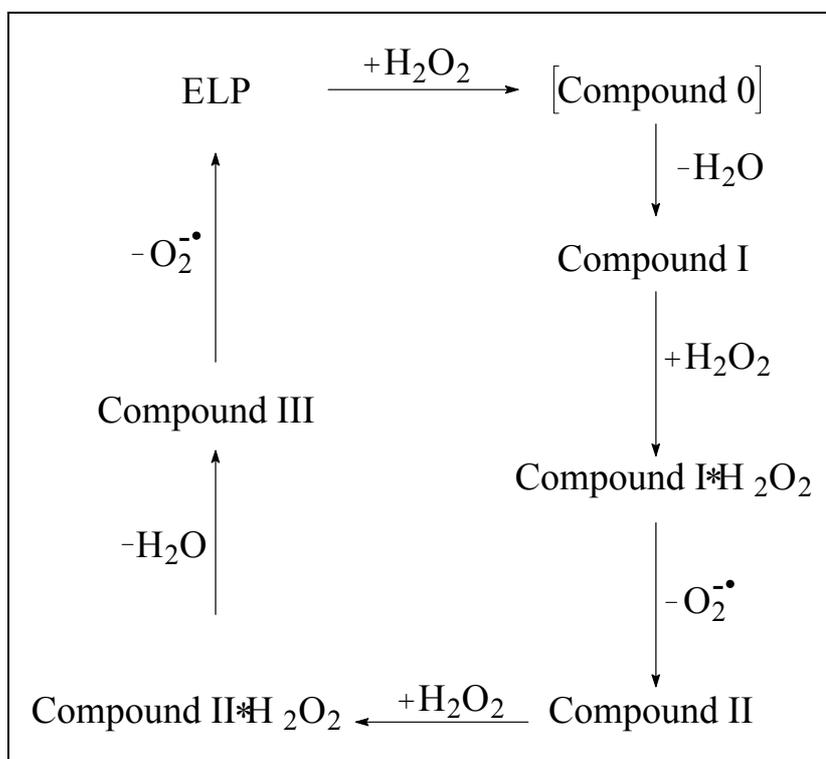
3.5. Conclusioni

Il lavoro svolto ha permesso di identificare e caratterizzare tre diverse vie catalitiche a cui va incontro l'ELP in presenza di perossido d'idrogeno come unico substrato, in assenza quindi di substrati riducenti. La prima via catalitica implica un'attività pseudo-catalasica (Schema 2): l' H_2O_2 inizialmente ossida l'enzima nativo formando l'idroperossido transitorio C0 dal quale, in seguito al rilascio di una molecola d'acqua, si forma il radicale cationico CI con entrambi gli equivalenti di ossidazione del H_2O_2 trasferiti all'enzima. Il CI reagisce nuovamente con l' H_2O_2 che agisce in questo caso come substrato riducente rigenerando lo stato ferrico iniziale con il contemporaneo rilascio di H_2O ed ossigeno molecolare (Schema 2).



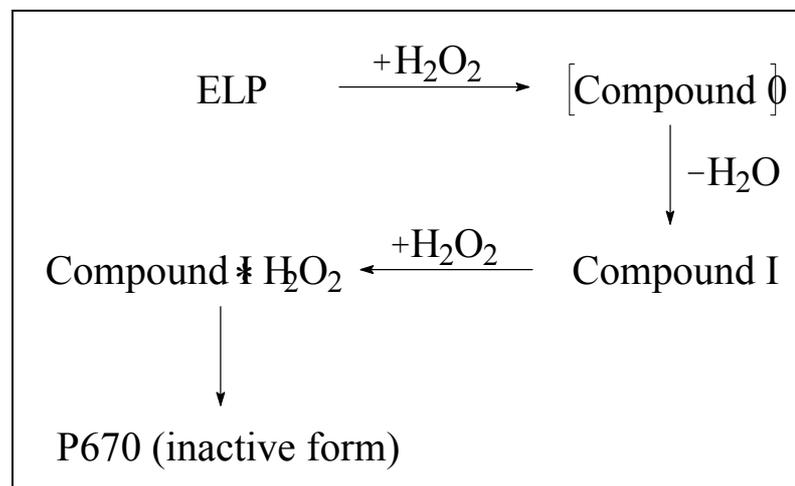
Schema 2. Pathway I: attività pseudo-catalasica dell'ELP.

La seconda via catalitica procede come il pathway I fino alla formazione del complesso compound I*H₂O₂ dal quale, mediante rilascio di anione superossido, si forma il CII. Il CII reagisce nuovamente con il perossido d'idrogeno generando l'ossiperossidasi, il CIII, con stato di ossidazione +6. L'enzima ritorna infine allo stato nativo in seguito al rilascio di un altro anione superossido (Schema 3).



Schema 3. Pathway II: formazione del compound III.

Infine la terza via catalitica comporta la perdita irreversibile dell'attività enzimatica dell'ELP, suggerendo il ruolo del perossido d'idrogeno come substrato suicida. Come si può osservare dallo schema 4 la reazione procede come precedentemente descritto fino alla formazione della specie compound I*H₂O₂, a questo punto non viene rigenerato lo stato ferrico iniziale ma l'enzima va incontro alla formazione di specie inattive.



Schema 4. Pathway III: inattivazione dell'ELP.

Il calcio gioca un ruolo chiave nel determinare il destino del compound I*H₂O₂, specie comune a tutti i pathways, spingendo la reazione principalmente verso la 2^a e 3^a via catalitica. In presenza di calcio infatti si osserva una riduzione dell'attività catalasica del 55%, associata alla rapida formazione dei CII, CIII e del P670. In

tali condizioni il CIII è più stabile e la sua scomparsa, più lenta rispetto a quanto osservato in assenza di calcio, è accompagnata dalla formazione della specie P670. Dall'analisi degli spettri di assorbimento non si evidenziano punti isosbastici e ciò indica che tale specie non si forma direttamente dal CIII ma, data la complessità del meccanismo catalitico, probabilmente sono presenti altri intermedi che popolano la miscela di reazione.

Tutti questi risultati confermano l'importanza degli ioni Ca^{2+} nel regolare non solo l'attività perossidasi dell'ELP, ma anche le vie catalitiche a cui va incontro l'enzima nella reazione con il perossido d'idrogeno.

4. EFFETTO DEGLI IONI NICHEL SULLA PEROSSIDASI ESTRATTA DAL LATTICE DELL'*EUPHORBIA CHARACIAS*

In questa fase del lavoro è stato studiato l'effetto del nichel sull'attività catalitica dell'ELP mediante tecniche spettrofotometriche, di cinetica rapida, di laser fotolisi e di dicroismo circolare. È stato studiato l'effetto di tale ione bivalente non solo sulla classica attività perossidasi dell'ELP, ma anche sulle altre vie catalitiche a cui può andare incontro l'enzima, descritte nella sezione precedente.

4.1. Effetto degli ioni Nichel sull'attività perossidasi dell'ELP

L'attività catalitica dell'ELP è stata saggiata utilizzando H_2O_2 e ABTS come substrati, in tampone TRIS/HCl 100 mM, pH 7.0. Mediante il grafico di Lineweaver-Burk, abbiamo calcolato il valore di K_m per l' H_2O_2 , che è risultato pari a 0.12 mM, in presenza di dosi saturanti di ABTS (10 mM). Allo stesso modo, a concentrazioni saturanti di H_2O_2 (25 mM), abbiamo calcolato la K_m per l'ABTS, pari a 0.55 mM. Utilizzando concentrazioni saturanti di entrambi i substrati, l'enzima nativo mostra inoltre una k_{cat} pari a $\sim 170 \text{ s}^{-1}$ (Tabella 5).

	ELP
K_m ABTS (mM) ^a	0.55 ± 0.02
k_{cat} (s ⁻¹)	170 ± 11
k_{cat}/K_m ABTS (mM ⁻¹ s ⁻¹)	311
K_m H ₂ O ₂ (mM) ^b	0.12 ± 0.018
k_{cat}/K_m H ₂ O ₂ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	1425

Tabella 5. Parametri cinetici dell'ELP in TRIS/HCl 100 mM, pH 7.0. ^aUsando concentrazioni saturanti di H₂O₂ (25 mM); ^busando concentrazioni saturanti di ABTS (10 mM).

L'effetto del nichel sull'attività perossidasi dell'ELP è stato studiato inizialmente seguendo la variazione della costante catalitica in funzione della concentrazione di ioni Ni²⁺, utilizzando concentrazioni saturanti di entrambi i substrati. Come si può osservare dalla Figura 22, il nichel causa un decremento dell'attività catalitica dell'enzima con un'inibizione massima a concentrazioni di Ni²⁺ pari o superiori a 30 mM.

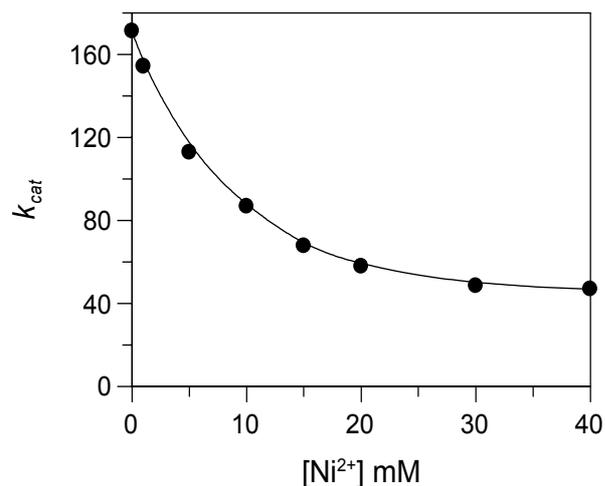


Figura 22. Effetto degli ioni nichel sull'attività catalitica dell'ELP.

Dato che la perossidasi è un enzima che utilizza, nel suo ciclo catalitico, due diversi substrati: l' H_2O_2 ed un substrato riducente quale l'ABTS, la sua velocità di reazione è quindi influenzata dal meccanismo con cui l'enzima reagisce con entrambe le molecole. Abbiamo quindi effettuato ulteriori prove per verificare se l'effetto inibitorio del Ni^{2+} si esplicasse a livello della reazione dell'enzima con il perossido d'idrogeno piuttosto che con il secondo substrato.

A concentrazione saturante di ABTS, abbiamo misurato le attività variando la concentrazione di perossido d'idrogeno in un range tra 0.05 e 0.2 mM, in presenza di quattro diverse concentrazioni di Ni^{2+} (0-4 mM). Il grafico dei doppi reciproci ($1/V$ vs. $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$) mostra

delle rette con un intercetta comune nell'asse delle ordinate (Figura 23A). Questo profilo grafico è caratteristico di un'inibizione di tipo competitivo. Riportando in grafico la pendenza delle rette ($K_{m,app}/V_{max}$) in funzione della concentrazione di ioni nichel è possibile calcolare il valore di K_i pari a 0.82 mM (Figura 23B). Il fatto però che il nichel non abolisca completamente l'attività catalitica dell'ELP fa ipotizzare che il meccanismo di inibizione non sia una tipica competizione con il sito attivo dell'enzima, ma che si tratti piuttosto di un'inibizione allosterica di tipo pseudo-competitivo. L'ELP infatti, anche a dosi saturanti di nichel (30 o 40 mM; vedi Figura 22) mantiene un minimo di attività perossidasi.

Allo stesso modo l'effetto del nichel è stato saggiato studiando l'attività al variare delle concentrazioni di ABTS in presenza di H_2O_2 25 mM. In questo caso, considerando 3 diverse concentrazioni di Ni^{2+} (1, 5 e 10 mM), dal grafico dei doppi reciproci otteniamo delle rette parallele tra loro; questo profilo grafico è indicativo di una inibizione di tipo acompetitivo. Anche in questo caso abbiamo calcolato la K_i riportando in grafico gli inversi delle V_{max} (intercetta con l'asse delle ordinate) in funzione della concentrazione di nichel; l'intercetta con l'asse delle ascisse ci fornisce il valore della K_i che risulta pari a 6.36 mM (Figura 24A e B). Tale valore è del tutto simile alla K_i ottenuta utilizzando concentrazioni saturanti sia di

H₂O₂ che di ABTS, perciò il nichel sembra non interferire nella reazione tra l'enzima ed il substrato riducente, ma compete esclusivamente con il perossido d'idrogeno.

Per confermare ulteriormente tale ipotesi abbiamo ripetuto le stesse prove in presenza di H₂O₂ 5 mM, una concentrazione considerata ancora saturante, dato il valore molto basso della K_m per il perossido d'idrogeno in assenza di nichel (Tabella 5). Anche in tali condizioni sperimentali il grafico dei doppi reciproci mostra delle rette parallele tra loro, confermando che non vi è competizione tra il nichel e l'ABTS, ma in questo caso la K_i risulta essere 1.36 mM (Figure 24 C e D).

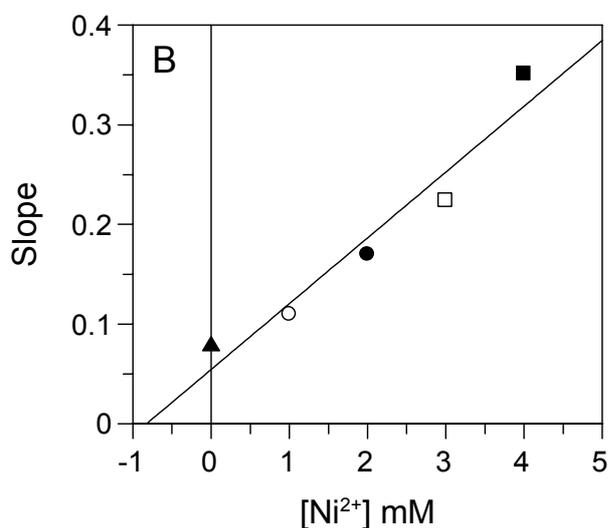
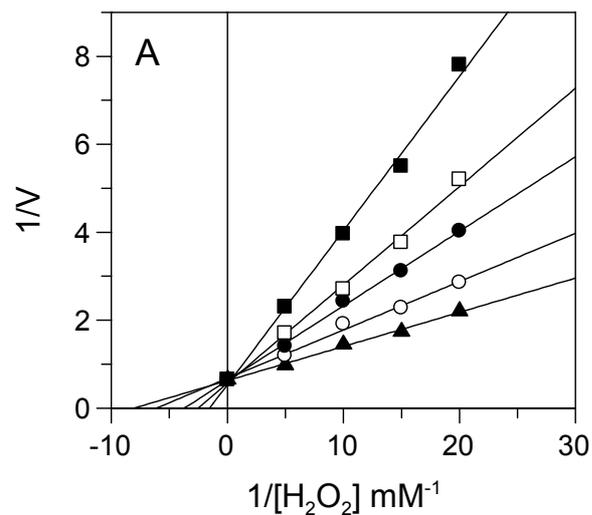


Figura 23. Grafico dei doppi reciproci ($1/V$ in funzione di $1/[H_2O_2]$). (A) La miscela di reazione contiene ELP 4 nM, ABTS 10 mM ed H_2O_2 a diverse concentrazioni, in TRIS/HCl 100 mM a pH 7.0. Le concentrazioni di Ni^{2+} sono: 0 (\blacktriangle), 1 mM (\circ), 2 mM (\bullet), 3 mM (\square) e 4 mM (\blacksquare). (B) le pendenze delle rette ottenute in (A) sono riportate in funzione della concentrazione di Ni^{2+} .

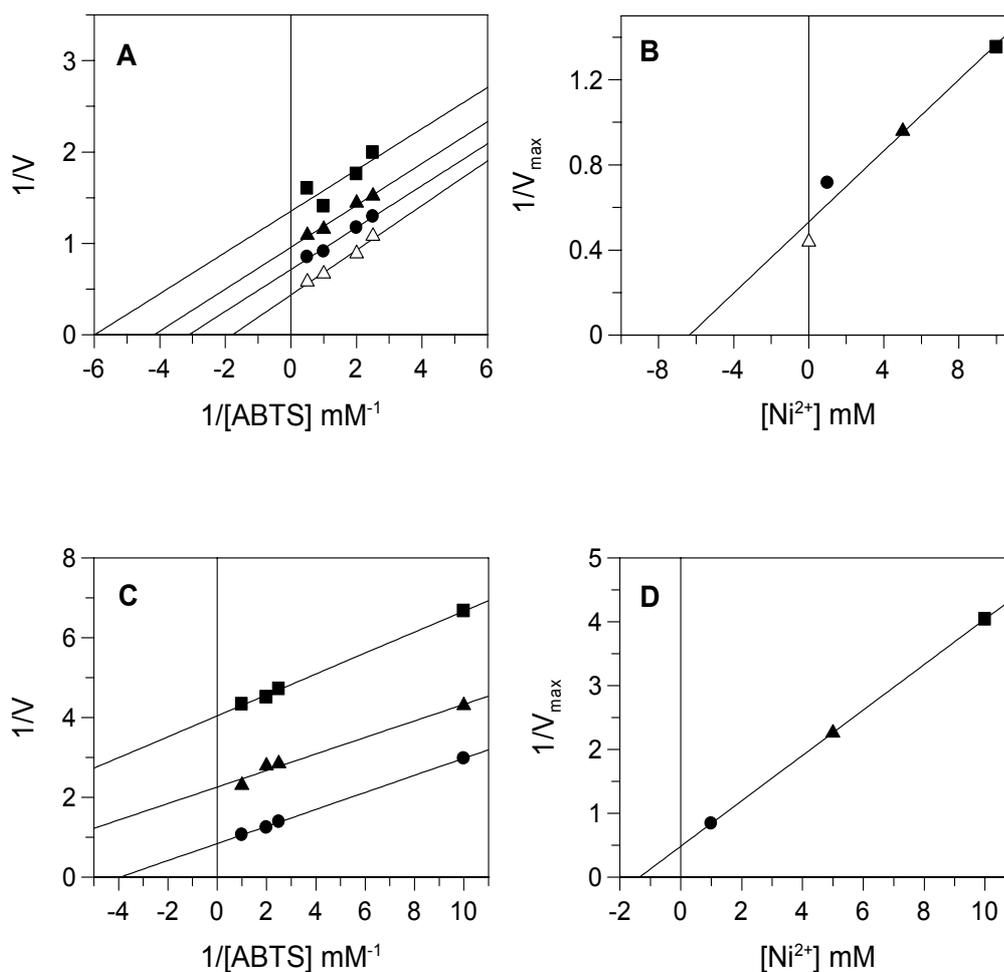


Figura 24. Grafico dei doppi reciproci ($1/V$ in funzione di $1/[ABTS]$). (A) La miscela di reazione contiene ELP 5.8 nM, H_2O_2 25 mM e ABTS a concentrazioni variabili, in TRIS/HCl 100 mM a pH 7.0. Le concentrazioni di Ni^{2+} sono: 0 (Δ), 1 mM (\bullet), 5 mM (\blacktriangle) e 10 mM (\blacksquare). (B) I valori di $1/V_{max}$ calcolati da (A) sono riportati in funzione della concentrazione di nichel. (C) Le condizioni sperimentali sono le stesse riportate in (A) ma l' H_2O_2 è 5 mM e le concentrazioni di Ni^{2+} sono: 1 mM (\bullet), 5 mM (\blacktriangle) e 10 mM (\blacksquare). (D) I valori di $1/V_{max}$ calcolati da (C) sono riportati in funzione della concentrazione di nichel.

La dipendenza della k_{cat} dalla concentrazione di Ni^{2+} (Figura 22) appare graficamente come un'iperbole rettangolare ed i dati possono essere ricondotti alla seguente equazione:

$$k_{\text{cat}} = k_{\text{cat},0} - \frac{k_{\text{cat},0} - k_{\text{cat},\infty}}{1 + (K_{i,\text{app}}/[\text{Ni}^{2+}])}$$

dove $k_{\text{cat},0}$ e $k_{\text{cat},\infty}$ sono i valori di k_{cat} rispettivamente in assenza ed in presenza di concentrazioni saturanti di Ni^{2+} , mentre $K_{i,\text{app}}$ è uguale alle concentrazione di Ni^{2+} che produce il 50% dell'inibizione massima. Da tale equazione viene calcolato un valore di $K_{i,\text{app}}$ pari a 8.3 mM in accordo con il risultato ottenuto utilizzando H_2O_2 25 mM a concentrazioni variabili di ABTS ($K_i = 6.36$ mM).

Questi risultati confermano l'ipotesi di una competizione tra il nichel ed il perossido d'idrogeno, come è mostrato graficamente nella Figura 25, nella quale si può osservare come la K_i apparente dipenda linearmente dall' H_2O_2 mentre è influenzata scarsamente dalla concentrazione di ABTS.

L'inibizione del nichel è reversibile, infatti tale effetto viene perso dopo dialisi contro Tris/HCl 100 mM pH 7.0 o filtrazione attraverso Sephacryl S-200.

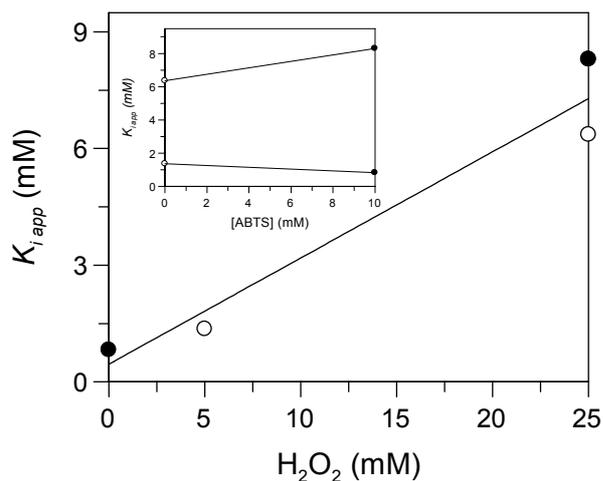


Figura 25. Variazione della K_i apparente in funzione della concentrazione di H_2O_2 . (●) in presenza di ABTS 10 mM; (○) in assenza di ABTS. Inset: gli stessi dati sono riportati in funzione della concentrazione di ABTS.

4.2. Effetto degli ioni nichel sull'attività perossidasi dell'ELP in presenza di ioni Ca^{2+}

Il calcio, come evidenziato dagli studi di caratterizzazione biochimica dell'ELP, gioca un ruolo chiave nel regolare l'attività catalitica di tale proteina. Nel corso di questo lavoro abbiamo studiato l'effetto del calcio sull'ELP in tampone TRIS/HCl 100 mM a pH 7.0; in queste condizioni sperimentali il Ca^{2+} causa un incremento dell'attività catalitica dell'ELP (Figura 26), che raggiunge il suo massimo alla concentrazione di calcio 10 mM, con

un valore di k_{cat} di $\sim 270 \text{ s}^{-1}$ e con valori di K_m per l' H_2O_2 e per l'ABTS pari a 0.074 e 0.4 mM rispettivamente (Tabella 6).

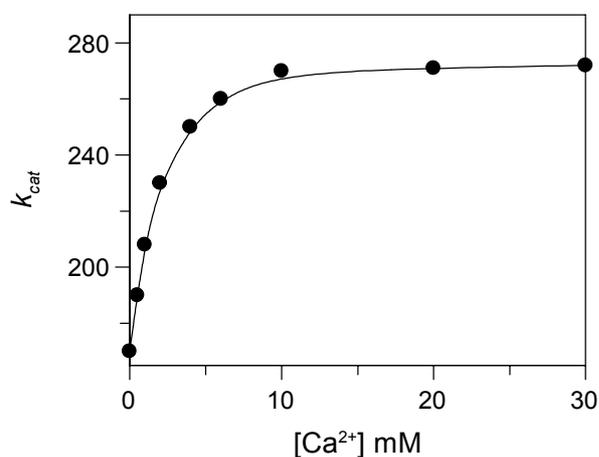


Figura 26. Effetto degli ioni Ca^{2+} sull'attività catalitica dell'ELP.

Il passo successivo è stato quello di studiare l'effetto del nichel sull'ELP in contemporanea presenza di ioni Ca^{2+} .

Inizialmente abbiamo studiato l'effetto del nichel utilizzando concentrazioni saturanti di entrambi i substrati (H_2O_2 25 mM; ABTS 10 mM) in presenza di Ca^{2+} 10 mM. A differenza di quanto osservato in assenza di calcio, in tali condizioni il Ni^{2+} causa un incremento dose-dipendente dell'attività catalitica dell'ELP che raggiunge il suo massimo a concentrazione di nichel 30 mM con un valore di k_{cat} pari a 980 s^{-1} (Figura 27).

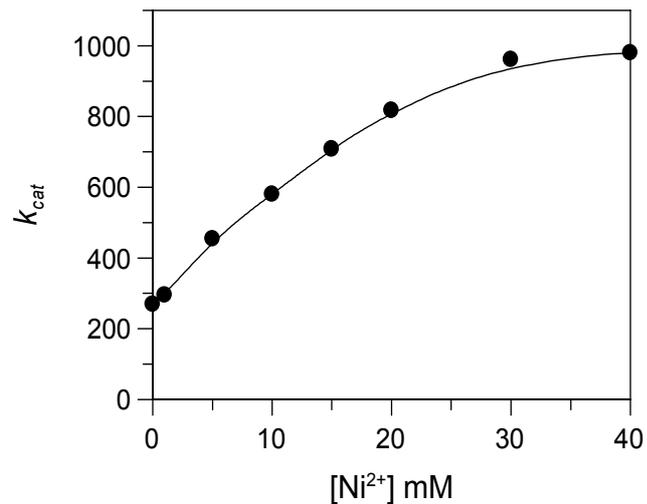


Figura 27. Effetto degli ioni Ni²⁺ sull'attività catalitica dell'ELP in presenza di Ca²⁺ 10 mM.

Abbiamo inoltre determinato la K_m per l'H₂O₂ (0.06 mM) e per l'ABTS (2.8 mM) e il rapporto k_{cat}/K_m (Tabella 6).

L'attivazione del nichel è reversibile, infatti tale effetto viene perso dopo dialisi contro Tris/HCl 100 mM pH 7.0 o filtrazione attraverso Sephacryl S-200.

	ELP	ELP/Ca ²⁺	ELP/Ca ²⁺ /Ni ²⁺
K_m ABTS (mM) ^a	0.55 ± 0.02	0.4 ± 0.015	2.8 ± 0.17
k_{cat} (s ⁻¹)	170 ± 11	270 ± 21	980 ± 53
k_{cat}/K_m ABTS (mM ⁻¹ s ⁻¹)	311	675	350
K_m H ₂ O ₂ (mM) ^b	0.12 ± 0.018	0.074 ± 0.005	0.06 ± 0.004
k_{cat}/K_m H ₂ O ₂ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	1425	3650	16330

Tabella 6. Parametri cinetici dell'ELP nativo, in presenza di Ca²⁺ 10 mM ed in contemporanea presenza di Ca²⁺ 10 mM e Ni²⁺ 30 mM in TRIS/HCl 100 mM, pH 7.0.

^aUsando concentrazioni saturanti di H₂O₂ (25 mM); ^busando concentrazioni saturanti di ABTS (10 mM).

Questi risultati mostrano che il nichel esercita un duplice effetto sull'ELP: in assenza di calcio provoca un'inibizione della sua attività catalitica, la quale risulta invece incrementata in presenza di Ca²⁺ 10 mM. Per capire quale fosse la concentrazione minima di calcio alla quale prevale l'effetto attivante del nichel, abbiamo effettuato delle prove mantenendo costante la concentrazione di Ni²⁺ (30 mM) e variando la concentrazione di calcio. Come si può osservare dalla tabella 7, il Ca²⁺ 50 μM non ha nessun effetto sull'attività dell'enzima nativo che rimane costante con una k_{cat} di 170 s⁻¹, ma protegge l'enzima dall'effetto inibitorio del nichel.

Questo comportamento può essere spiegato ipotizzando che entrambi gli ioni competano per uno stesso sito per il quale il Ca^{2+} mostra un'affinità maggiore rispetto al nichel.

	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$ without Ni^{2+}	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1}) + \text{Ni}^{2+}$ (30 mM)
ELP (native enzyme)	170 ± 11	40 ± 8
ELP + 50 μM Ca^{2+}	170 ± 11	170 ± 11
ELP + 1 mM Ca^{2+}	208 ± 38	630 ± 48
ELP + 4 mM Ca^{2+}	250 ± 42	750 ± 68
ELP + 10 mM Ca^{2+}	270 ± 21	980 ± 53

Tabella 7. Parametri cinetici dell'ELP nativo in TRIS/HCl 100 mM, pH 7.0, in presenza di diverse concentrazioni di Ca^{2+} ed in contemporanea presenza di Ni^{2+} 30 mM.

4.3. Effetto del nichel sulle proprietà spettrali dell'ELP

Dopo aver caratterizzato cinematicamente l'effetto del nichel sull'attività perossidasi dell'ELP la nostra attenzione è stata rivolta all'analisi delle modificazioni spettrali dell'enzima in presenza di tale ione ed in assenza e presenza di ioni calcio. La

Figura 28 mostra il tipico spettro di assorbimento dell'ELP allo stato nativo (in tampone TRIS/HCl 100 mM pH 7.0), del composto I che l'enzima forma in seguito all'aggiunta di una quantità stechiometrica di H_2O_2 e del composto II formatosi in seguito all'aggiunta di un donatore di elettroni (ad esempio l'acido ascorbico). Nella tabella 8 sono indicati i coefficienti di estinzione dell'enzima nativo e delle due specie intermedie del ciclo catalitico.

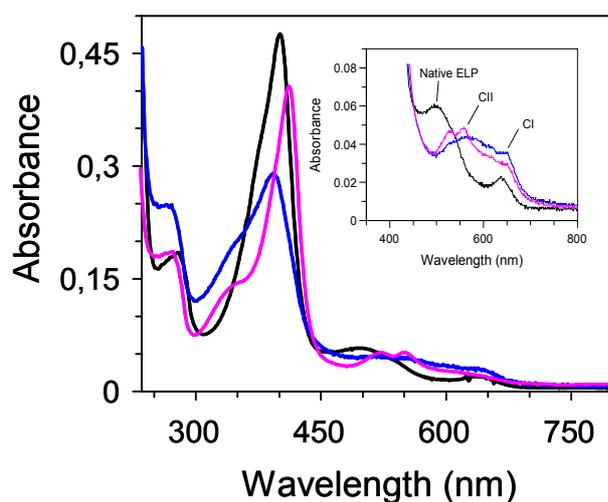


Figura 28. Spettro di assorbimento dell'ELP (3.6 μ M) in TRIS/HCl 100 mM pH 7.0. Enzima nativo (—); Compound I (—); Compound II (—). L'inset rappresenta l'ingrandimento dello spettro nella regione del visibile compresa tra i 400 e 800 nm.

Native ELP ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	Compound I ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	Compound II ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
$\epsilon_{278} = 66.7$	--	--
$\epsilon_{401} = 130.7$	$\epsilon_{398} = 80.6$	$\epsilon_{417} = 120.5$
$\epsilon_{495} = 16.3$	--	$\epsilon_{522} = 15$
$\epsilon_{637} = 5.15$	$\epsilon_{651} = 9$	$\epsilon_{555} = 12.6$

Tabella 8. Coefficienti di estinzione dell'ELP, del compound I e del compound II in TRIS/HCl 100 mM pH 7.0.

Lo spettro di assorbanza dell'ELP nativo in presenza di nichel 30 mM appare del tutto simile a quello dell'enzima nativo. L'aggiunta di perossido d'idrogeno porta alla formazione del compound I ma, in presenza di acido ascorbico non si osserva, come ci si aspetterebbe, la formazione del CII bensì si assiste alla progressiva scomparsa dello spettro del CI con il ritorno dell'enzima allo stato ferrico iniziale. In tale processo sono stati osservati 2 punti isosbastici a 450 e 540 nm (Figura 29A e B). La stessa prova è stata eseguita in presenza contemporanea di Ca²⁺ 10 mM e Ni²⁺ 30 mM ed anche in questo caso non si osserva la formazione del compound II.

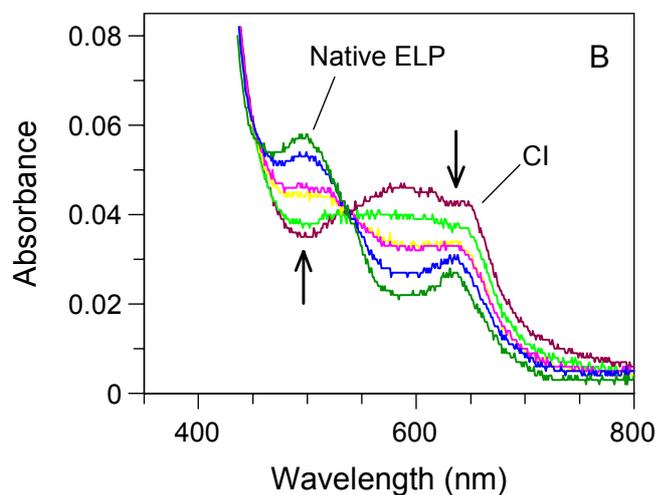
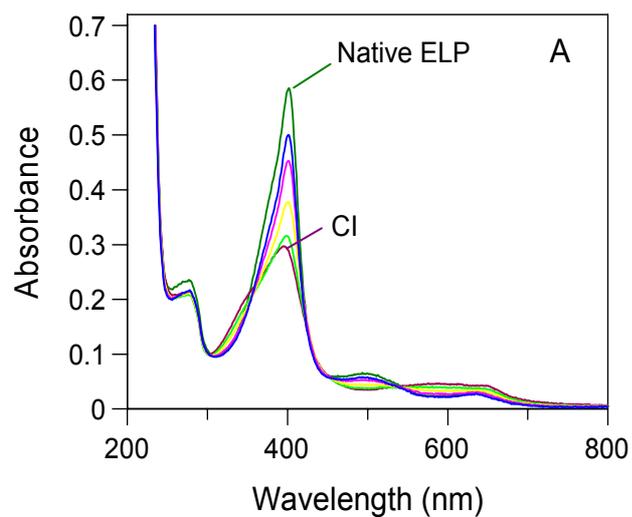


Figura 29. (A) Spettri di assorbimento della ELP (4.5 μM) nella reazione con l'H₂O₂ e l'acido ascorbico in presenza di Ni²⁺ 30 mM. (B) Ingrandimento dello spettro (A) nella regione del visibile compresa tra i 400 e 800 nm. Le frecce indicano la scomparsa del Cl e il ritorno dell'enzima allo stato ferrico dopo l'aggiunta di una quantità stechiometrica di acido ascorbico.

4.4. Esperimenti di stopped-flow

La reazione dell'ELP con il perossido d'idrogeno è stata studiata mediante cinetica rapida per poter comprendere meglio l'effetto del nichel su tale step di reazione.

In assenza di calcio e nichel, la reazione dell'ELP con il perossido d'idrogeno mostra un andamento bifasico, in cui possiamo osservare un processo iniziale veloce, con una costante di velocità pari a 80 s^{-1} , ed una fase successiva più lenta la cui costante di velocità è pari a 0.5 s^{-1} (Figura 30A). Tale risultato è in accordo con l'ipotesi dell'esistenza di due forme dell'enzima in equilibrio tra loro (Medda et al., 2003), le quali reagiscono con l' H_2O_2 con velocità differenti.

In presenza di nichel l'equilibrio conformazionale è spostato in favore della forma enzimatica che reagisce più lentamente: la fase veloce della reazione infatti presenta una costante di velocità identica a quella osservata in assenza di nichel (80 s^{-1}), ma la durata di tale fase è ridotta quasi a zero. La fase lenta invece risulta predominante e la costante di velocità è pari a 0.5 s^{-1} , così come nella reazione dell'enzima nativo. Dall'analisi degli spettri di assorbimento possiamo osservare una riduzione della velocità di formazione del compound I in presenza di nichel, in accordo con le prove di cinetica descritte precedentemente (paragrafo 4.2) in cui l'attività catalitica dell'ELP risulta diminuita in seguito alla

competizione del Ni^{2+} con $\text{l}'\text{H}_2\text{O}_2$. Lo spettro finale (spettro d – Figura 30B) non risulta un compound I puro ma probabilmente tale specie è il risultato di una parziale formazione del compound II.

L'effetto opposto si può osservare in presenza di calcio ed assenza di nichel: l'equilibrio conformazionale in questo caso è spostato in favore della forma enzimatica più reattiva. La formazione del compound I è nettamente più veloce e termina infatti entro i 63 ms (spettri b e c – Figura 30C); nel processo è rilevabile la sola fase veloce con la stessa costante di velocità determinata nelle prove in assenza ed in presenza di nichel (80 s^{-1}).

In contemporanea presenza di calcio e nichel l'effetto del Ca^{2+} è predominante e l'enzima è convertito anche in questo caso nella forma che reagisce più velocemente (Figura 30D). In queste condizioni è presente un secondo processo cinetico, diverso però dalla fase lenta descritta precedentemente, con una costante di velocità di $\sim 4 \text{ s}^{-1}$. Tale processo probabilmente è dovuto alla parziale formazione del compound II, che sembra essere favorita dalla presenza del nichel.

Questi risultati mostrano che la formazione del compound I è influenzata enormemente dalla presenza, nella miscela di reazione, di calcio e nichel, confermando che tali ioni esplicano la propria azione interferendo nel legame dell'ELP con $\text{l}'\text{H}_2\text{O}_2$.

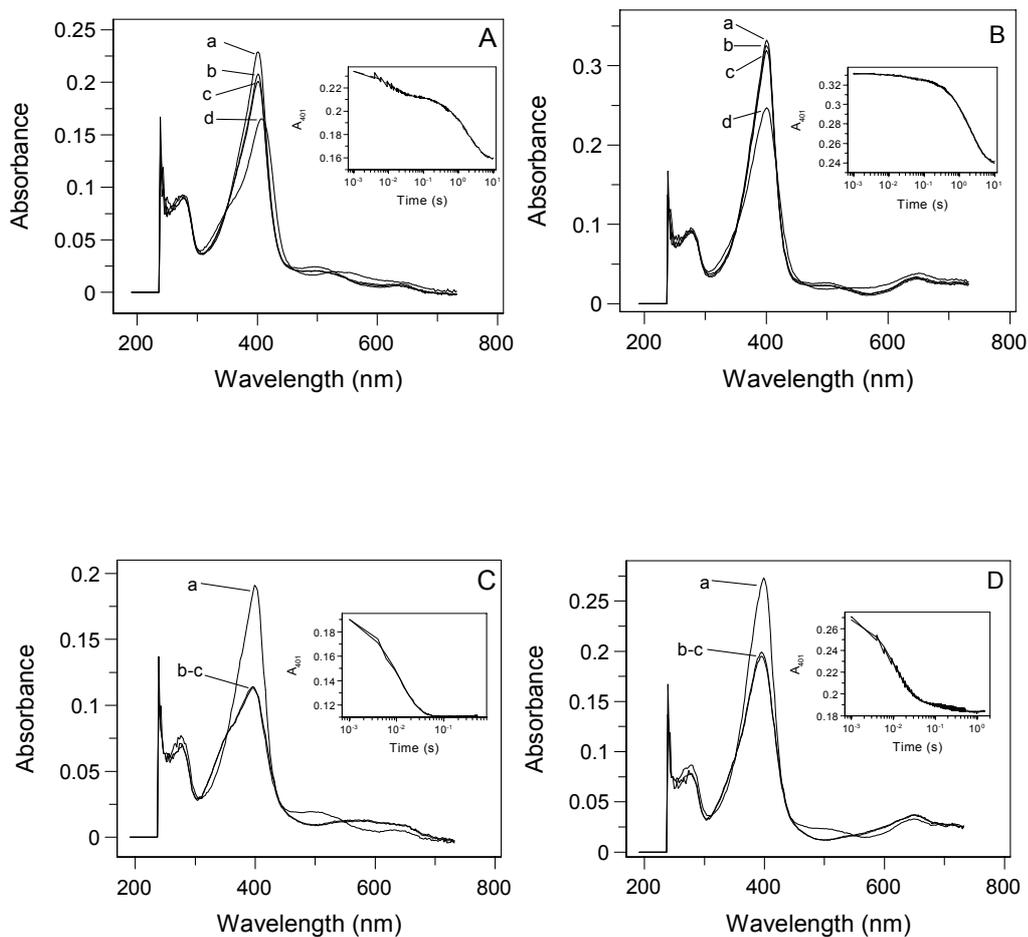


Figura 30. Modificazioni spettrali dell'ELP (4 μM) durante la reazione con l' H_2O_2 (16 μM) in TRIS/HCl 100 mM pH 7.0, registrate mediante la tecnica di stopped-flow. Gli spettri di assorbanza sono stati registrati a: t = 2 ms (a), 63 ms (b), 300 ms (c) e 10 s (d). (A) in assenza di Ca^{2+} e di Ni^{2+} ; (B) in presenza di Ni^{2+} 30 mM; (C) in presenza di Ca^{2+} 10 mM; (D) in presenza di Ca^{2+} 10 mM e Ni^{2+} 30 mM.

4.5. Studi di fluorescenza e di dicroismo circolare

L'ELP mostra uno spettro di emissione di fluorescenza con un massimo a 336 nm quando si eccita a 295 nm e tale spettro risulta invariato in presenza ioni Ni^{2+} . Allo stesso modo gli spettri CD dell'ELP nativa non mostrano modificazioni significative, dopo l'aggiunta di Ni^{2+} 30 mM, né nella regione UV (a 195 e 210 nm) né a livello della banda di Soret. Questo risultato indica che, in seguito all'aggiunta di nichel, non vi sono grossi cambiamenti nella struttura secondaria e terziaria dell'ELP.

4.6. Esperimenti di laser fotolisi

L'*Euphorbia* perossidasi è stata ridotta con sodio ditionito, equilibrata con CO e sottoposta a laser fotolisi. La velocità di ricombinazione del monossido di carbonio è stata misurata a pH 7.0, in TRIS/HCl 100 mM, in assenza ed in presenza di Ca^{2+} e Ni^{2+} (10 e 30 mM rispettivamente). La ricombinazione dell'ELP con il CO appare come un processo bifasico, costituito da una fase veloce ed una lenta, attribuibile alla presenza di due alternative conformazioni strutturali dell'enzima che si interconvertono tra loro. Le costanti di velocità dei due processi sono pari a $4.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (fase veloce) e $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (fase lenta). Il calcio ed il nichel si legano in maniera

diversa alle due conformazioni dell'ELP, modificando la relativa durata delle due fasi.

In presenza di nichel (30 mM) l'equilibrio è spostato verso la conformazione che reagisce più velocemente mentre in presenza di solo calcio (10 mM) si ha l'effetto opposto ed il legame con il CO appare più lento rispetto a quanto osservato per l'enzima nativo.

La Figura 31A mostra i differenti spettri della fase lenta e veloce di legame con il CO in presenza di Ca^{2+} . In presenza di calcio e nichel la conformazione che reagisce più lentamente con il CO è ulteriormente favorita e si assiste ad una riduzione della durata della fase veloce, mentre predomina la fase lenta di riassociazione del monossido di carbonio (Figura 31B).

Tali risultati, se confrontati con quelli ottenuti dalle prove cinetiche, suggeriscono che la conformazione dell'enzima che reagisce lentamente con il CO è anche la forma cataliticamente più attiva e confermano il duplice effetto del nichel in assenza ed in presenza di calcio.

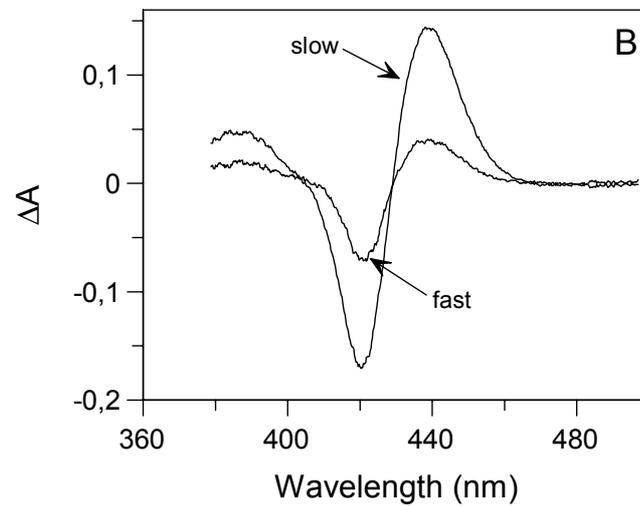
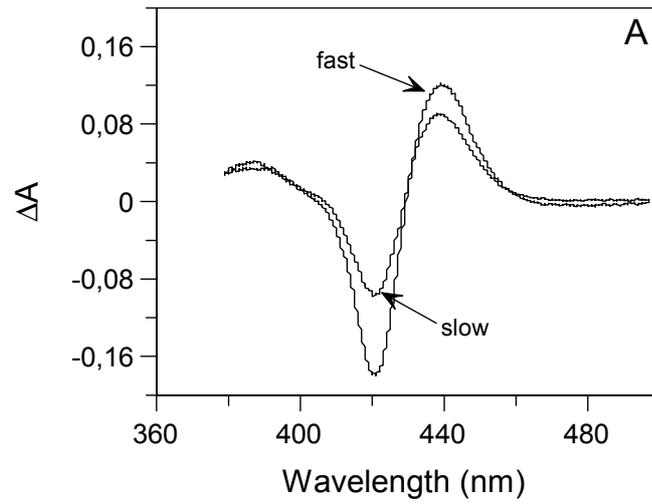


Figura 31. Spettri dei processi di ricombinazione del CO con l'ELP in seguito a laser fotolisi, in presenza di calcio 10 mM (A) ed in presenza di calcio 10 mM e nichel 30 mM (B).

4.7. Influenza del nichel sulle vie catalitiche dell'ELP in assenza di substrato riducente

Come descritto dettagliatamente nella sezione precedente (paragrafo 3.1), l'ELP è capace di produrre ossigeno molecolare se incubata con perossido d'idrogeno, in assenza di substrato riducente. Abbiamo quindi studiato l'effetto del nichel su tale via catalitica alternativa dell'enzima. In presenza di H_2O_2 40 mM e Ni^{2+} 30 mM la produzione di ossigeno dovuta all'attività catalasica dell'ELP appare ridotta al 55%, esattamente come osservato in presenza di soli ioni calcio (paragrafo 3.1). Simile inibizione dell'attività è stata ottenuta effettuando le prove in contemporanea presenza di Ca^{2+} 10 mM e Ni^{2+} 30 mM. Tali risultati portano ad ipotizzare che, come osservato per il calcio, anche il nichel possa influire sul destino del compound I, indirizzando l'enzima verso la formazione del compound III oppure delle specie inattive. Queste altre due vie catalitiche sono state quindi studiate in presenza di nichel.

Anche in questo caso l'aggiunta di un eccesso di perossido d'idrogeno all'enzima nativo (rapporto H_2O_2 :enzima = 1000:1) porta alla scomparsa della banda di Soret e alla formazione del compound III. Tale specie però, in presenza di Ni^{2+} 30 mM, scompare più velocemente con la contemporanea formazione della specie inattiva P670. Questa specie si forma rapidamente ma altrettanto rapido è il

suo decremento con la comparsa di una nuova specie inattiva con banda di assorbimento a 619 nm che raggiunge il suo massimo dopo circa 16 ore (Figura 32).

La stessa prova è stata eseguita in presenza contemporanea di ioni calcio e nichel. Il nichel esplica la stessa azione vista precedentemente ma in questo caso si ha un accumulo maggiore del P670, dovuto all'effetto del Ca^{2+} , che evolve nuovamente nella specie che assorbe a 619 nm, la quale in tali condizioni raggiunge il suo massimo valore dopo ~24 ore.

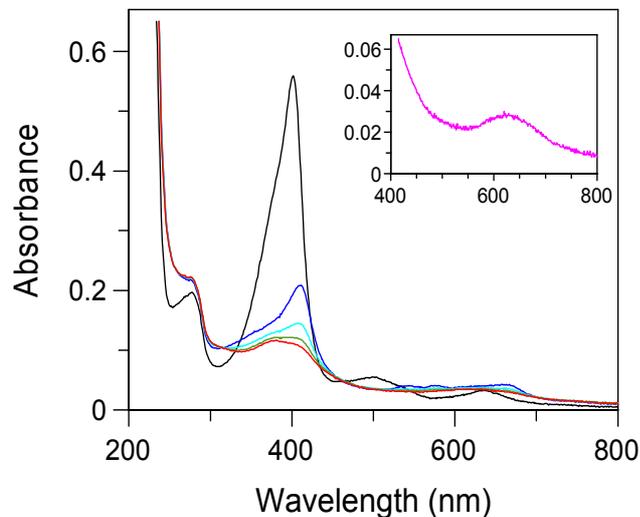


Figura 32. Spettro di assorbimento della ELP (4.2 μM) in presenza di Ni^{2+} 30 mM e di H_2O_2 5 mM. L'ingrandimento mostra la specie inattiva con massimo di assorbimento a 619 nm.

4.8. Conclusioni

La perossidasi estratta dal lattice dell'*Euphorbia characias* è un enzima la cui attività catalitica risulta estremamente regolata dalla presenza di ioni calcio esogeni.

Nel corso di questa fase del lavoro di tesi abbiamo studiato l'effetto di un altro catione bivalente, il nichel, il quale è risultato essere un inibitore reversibile dell'enzima. Tale inibizione si esplica a livello della reazione dell'ELP con il perossido d'idrogeno con un profilo grafico caratteristico di un'inibizione di tipo competitivo. Il legame del nichel all'enzima però non comporta alcuna modificazione a livello della banda di Soret e questo suggerisce che il Ni^{2+} non si leghi né direttamente al ferro dell'eme, né in una posizione tale da causare una perturbazione a livello del gruppo prostetico, come suggerito dalle prove di fluorescenza effettuate. Il fatto inoltre che l'ELP mantenga un minimo di attività catalitica anche in presenza di alte concentrazioni di ioni nichel fa supporre che l'inibizione sia di tipo allosterico piuttosto che prettamente competitivo.

L'enzima infatti è normalmente stabile in due alternative conformazioni strutturali ma in presenza di calcio, di nichel o di entrambi gli ioni, l'equilibrio viene spostato verso una o l'altra conformazione, come confermato dagli esperimenti di stopped flow e di laser fotolisi. In presenza di ioni calcio la perossidasi è

convertita nella forma più attiva (ELP-Ca²⁺), mentre la conformazione allosterica stabilizzata dal nichel forma il compound I più lentamente (ELP-Ni²⁺). Abbiamo quindi dimostrato che la combinazione dell'ELP con l'H₂O₂ insieme con gli ioni calcio o nichel non è indipendente ma l'enzima libero, il complesso ELP-Ca²⁺ ed il complesso ELP-Ni²⁺ hanno differenti affinità per il substrato. Come è ben noto la formazione del composto I nelle perossidasi dipende dalla reattività catalitica dell'istidina distale come catalizzatore acido-base; i risultati ottenuti suggeriscono quindi che i cambiamenti conformazionali allosterici inducano un diverso riorientamento dell'istidina distale responsabile dei differenti effetti osservati.

Non è stata osservata invece nessuna competizione tra nichel ed ABTS e ciò implica che le due conformazioni allosteriche hanno la stessa reattività nei confronti del substrato riducente.

Oltre alla classica attività perossidasi, il nichel influenza anche le altre vie catalitiche a cui va incontro l'ELP in presenza di H₂O₂ come unico substrato: in presenza di nichel infatti l'attività pseudo-catalasica dell'enzima appare ridotta al 55 %, stesso risultato ottenuto in presenza di soli ioni calcio ed in contemporanea presenza di Ca²⁺ e Ni²⁺. Allo stesso tempo invece viene accelerata la formazione della specie inattiva P670, la quale degrada velocemente

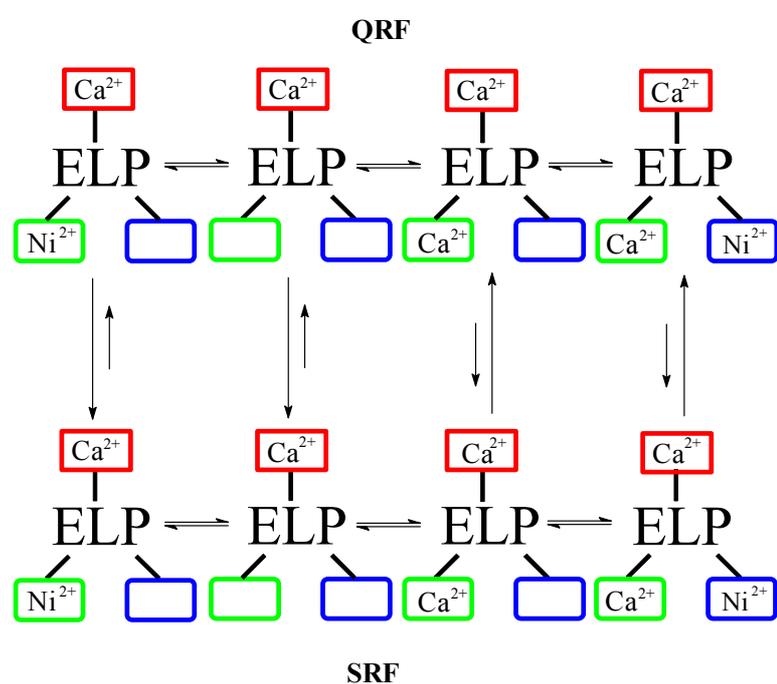
con formazione di una nuova specie, ugualmente inattiva, che assorbe a 619 nm.

Come osservato dagli esperimenti di laser fotolisi il nichel influenza anche la ricombinazione dell'ELP con il CO esercitando un effetto opposto in assenza ed in presenza di ioni calcio: in assenza di Ca^{2+} , il nichel sposta l'equilibrio verso la forma dell'enzima che reagisce più velocemente con il CO e tale conformazione è anche quella cataliticamente meno attiva. Un effetto opposto si osserva invece in presenza di calcio, in cui è predominante la conformazione dell'ELP che reagisce più lentamente con il monossido di carbonio, ma che ha un'attività perossidasiica maggiore.

Tutti questi risultati portano ad ipotizzare che ci siano due siti di legame per il nichel, uno specifico per questo ione (sito Ni), l'altro (sito Ni/Ca), corrispondente allo stesso sito distale a bassa affinità occupato dal calcio esogeno quando presente (Schema 5). Questo sito (sito Ni/Ca), nella ELP nativa è vuoto e l'enzima ha una bassa attività catalitica; in presenza di calcio tale sito è occupato da questo ione e si ottiene un notevole incremento dell'attività enzimatica. In presenza di ioni nichel, questi si localizzano in entrambi i siti (sito Ni e sito Ni/Ca), portando all'inibizione dell'attività enzimatica.

In presenza di entrambi gli ioni, il calcio, avendo una maggiore affinità, occupa il sito Ni/Ca, impedendo il legame del nichel in

questo sito (e quindi la sua attività inibitoria), e determina un incremento dell'attività enzimatica; il nichel di conseguenza si localizza soltanto nel suo sito specifico (sito Ni) e tale legame amplifica l'effetto del calcio presente nel sito Ni/Ca e questo si traduce in un ulteriore incremento dell'attività enzimatica.



Schema 5. Rappresentazione dei siti di legame dell'enzima nativo per il calcio costitutivo (rosso), per il calcio e per il nichel (sito Ni/Ca; verde) e per il sito specifico per il nichel (sito Ni; blu). La sigla QRF (Quickly Reaction Form) rappresenta la forma dell'enzima che reagisce più velocemente, mentre SRF (Slowly Reaction Form) la conformazione che reagisce più lentamente.

5. CONCLUSIONI

Le perossidasi rappresentano una classe ubiquitaria di enzimi che rivestono un'importanza fondamentale proteggendo la cellula dalle specie reattive dell'ossigeno che si formano in condizioni di stress ossidativo.

L'attività delle perossidasi è molto importante per regolare la concentrazione di H_2O_2 l'interno delle cellule. Il perossido d'idrogeno rappresenta una molecola chiave coinvolta in numerosi processi cellulari. Nelle piante, come in tutti gli organismi viventi, una importante fonte di perossido di idrogeno è rappresentata dalla reazione di dismutazione dell'anione superossido che si forma in seguito a situazioni di stress cellulare oppure può essere prodotto dall'azione di enzimi quali le NADPH ossidasi o le amine ossidasi. Il perossido d'idrogeno può essere dannoso per la cellula poiché può provocare danni al DNA ed alle proteine, è coinvolto nel processo di apoptosi, ed inoltre può provocare fenomeni quali la perossidazione lipidica. Allo stesso tempo però è una molecola importante nei processi di risposta della cellula a stress biotici ed abiotici. Modula infatti l'espressione di alcuni geni codificanti per proteine implicate nei processi di difesa della pianta contro agenti patogeni. E' stato inoltre dimostrato il coinvolgimento dell' H_2O_2 nel processo di

chiusura degli stomi in seguito stress idrico: in condizioni di siccità infatti le piante producono acido abscissico, il quale provoca l'aumento della concentrazione cellulare di perossido d'idrogeno che, in seguito all'apertura dei canali del calcio, innesca una serie di reazioni responsabili della chiusura degli stomi.

Nel corso di questo lavoro di tesi è stato studiato il meccanismo d'azione della perossidasi estratta dal lattice dell'*Euphorbia characias* utilizzando il perossido d'idrogeno come substrato sia ossidante, sia riducente.

L'*Euphorbia characias* è una pianta ampiamente diffusa in Sardegna ed in paesi europei che si affacciano nel bacino del Mediterraneo. Si tratta di una pianta perenne il cui habitat è rappresentato da luoghi assolati con terreni aridi caratterizzati da elevata salinità. Questa pianta può quindi rappresentare un modello ed uno strumento di indagine molto utile per lo studio di enzimi che vengono espressi nelle piante in risposta agli stress biotici e abiotici.

Questo lavoro di tesi ha permesso una caratterizzazione del meccanismo catalitico dell'ELP mediante lo studio del classico meccanismo d'azione delle perossidasi con formazione del compound 0, del compound I ed infine del compound II. Utilizzando H_2O_2 come unico substrato è stato possibile evidenziare e descrivere cinematicamente le altre vie catalitiche a cui può andare incontro tale

perossidasi: una via pseudo-catalasica in cui l'enzima nativo è ossidato per formare il CI e successivamente ridotto allo stato ferrico iniziale con formazione di ossigeno; una seconda via in cui si ha la formazione di una nuova specie chiamata compound III che si trasforma nuovamente nell'enzima nativo, con la contemporanea produzione di anione superossido; una terza via in cui abbiamo evidenziando il ruolo del perossido d'idrogeno come substrato suicida dell'ELP che infatti viene inattivato in maniera irreversibile con la formazione della specie inattiva P670.

La perossidasi da *E. characias* ha una caratteristica peculiare rispetto alle altre perossidasi infatti presenta, nel suo sito attivo, un solo calcio endogeno strettamente legato e mostra bassa affinità nei confronti dei substrati classici delle perossidasi. Può invece legare un secondo ione calcio in un sito a bassa affinità ma necessario per la massima espressione dell'attività catalitica dell'enzima. Abbiamo dimostrato che il calcio svolge un ruolo chiave non solo nel regolare l'attività perossidasi dell'ELP ma influenza anche la sua attività catalasica e le altre vie catalitiche a cui può andare incontro l'enzima. Abbiamo inoltre dimostrato che l'attività di tale enzima è strettamente correlata alla presenza di cationi bivalenti. Infatti, oltre al Ca^{2+} , anche il Ni^{2+} può modulare negativamente o positivamente l'attività dell'ELP. Il nichel infatti si è dimostrato essere un inibitore

pseudo-competitivo dell'enzima nei confronti del perossido d'idrogeno, mentre non influisce sulla reazione dell'ELP con il substrato riducente ABTS. In contemporanea presenza di ioni calcio, il nichel esplica un'azione opposta; si lega infatti ad un sito specifico ed induce modificazioni conformazionali della proteina che causano un incremento dell'attività perossidasi dell'ELP. Il nichel influisce anche sugli altri pathways catalitici e sulla reattività del Fe^{2+} nei confronti del CO, come dimostrato dagli studi di cinetica rapida e di laser fotolisi.

I risultati ottenuti hanno quindi permesso una ulteriore caratterizzazione strutturale e cinetica dell'ELP e hanno confermato il ruolo chiave del calcio nel meccanismo di regolazione dell'attività catalitica di tale perossidasi.

BIBLIOGRAFIA

- Antonini, G., Bellelli, A., Brunori, M., and Falcioni, G. (1996). *Biochem. J.* **314**, 533–540.

- Baek, H.K., and Van Wart, H.E. (1992). *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 718–725.

- Burner, U., and Obinger, C. (1997). *FEBS Lett.* **411**, 269–274.

- Dunford, H.B., and Stillman, J.S. (1976). *Coord. Chem. Rev.* **19**, 187-251.

- English, A.M., and Tsaprailis, G. (1995). *Adv. Inorg. Chem.* **43**, 79-125.

- Floris, G., Medda, R., and Rinaldi, A. (1984). *Phytochem.* **23**, 953–956.

- Fulop, V., Ridout, C.J., Greenwood, C., and Hajdu, J. (1995). *Structure* **3**, 1225-1233.

- Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T., and Poulos, T.L. (1997). *Nat. Struct. Biol.* **4**, 1032-1038.

- Hannuksela, S., Tenovuo, J., Roger, V., Lenander-Lumikari, M., and Ekstrand, J. (1994). *Caries Res.* **28**, 429-34

- Harris, D.L., and Loew, G.H. (1996). *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10588-10594.
- Haschke, R.H., and Friedhoff, J.M. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 1039-1042.
- Hazen, S.L., Hsu, F.F., Mueller, D.M., Crowley, J.R., and Heinecke, J.K. (1996). *J.Clin. Invest.* **98**, 1283-1289.
- Henriksen, A., Welinder, K., and Gajhede, M. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 2241-2248.
- Howes, B.D., Feis, A., Raimondi, L., and Indiani, C. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 40704-40711.
- Huyett, J.E., Doan, P.E., Gurbiel, R., Houseman, A.L.P., Sivaraja, M., Goodin, D.B., and Hoffman, B.M. (1995). *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9033-9041.
- Isaac, I.S., and Dawson, J.H. (1999). *Essays in Biochemistry*, Vol. 34, D.P. Ballou, ed. (Portland Press, U.K.), 51–69.
- Ko, J.H., Chow, K.S., and Han, K.H. (2003). *Plant. Mol. Biol.* **53**, 479-492.
- Medda, R., Padiglia, A., Longu, S., Bellelli, A., Arcovito, A., Cavallo, S., Pedersen, J.Z., and Floris, G. (2003). *Biochemistry* **42**, 8909–8918.

- Morishima, I., Kurono, M., and Shiro, Y. (1996). *J. Biol. Chem.* **261**, 9391–9399.
- Morozov, V.I., Tsyplenkoz, P.V., Kokrykov, V.N., Volkov, K.N., and Vinogradova, N.A. (1997). *Biochemistry (Moscow)* **62**, 623-630.
- Mura, A., Medda, R., Longu, S., Floris, G., Rinaldi, A.C., and Padiglia, A. (2005). *Biochem.* **44**, 14120-14130.
- Odajima, T. (1980). *J. Biochem.* , **87**, 379-391.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teiera, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., and Dunand, C. (2007). *Phytochemistry* **68**, 1605-1611.
- Penner-Hahn, J., McMurry, T.J., Renner, M., Latos-Grazynsky, L., Eble, K.S., Davis, I.M., Balch, A.L., Groves, J.T., Dawson, J.H., and Hodgson, K.O. (1983). *J. Biol. Chem.* **258**, 12761-12764.
- Penner-Hahn, J., Eble, K.S., McMurry, T.J., Renner, M., Balch, A.L., Groves, J.T., Dawson, J.H., and Hodgson, K.O. (1986). *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7819-7825.
- Poulos, T.L., and Kraut, J. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**, 8199–8205.
- Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H., and Gold, M.H. (1993). *J. Biol. Chem* **268**, 4429–4440.

- Rasmussen, C.B., Henriksen, A., Abelskov, K., Jensen, R.B., Rasmussen, S.K., Hejgaard, J., and Welinder, K.G. (1997). *Physiol. Plant.* **100**, 102–110.
- Rodriguez-Lopez, J.N., Smith, A.T., and Thorneley, R.N.F. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 4023-4030.
- Roman, R., and Dunford, H.B. (1972). *Biochemistry* **11**, 2076–2083.
- Schulz, C.E., Devaney, P.W., Winkler, H., Debrunner, P.G., Doan, N., Chang, R., Rutter, R., and Hager, L.P. (1979). *FEBS Lett.* **103**, 102-105.
- Shiro, Y., Kurono, M., and Morishima, I. (1986). *J. Biol. Chem.* **261**, 9382-9390.
- Sitter, A.J., Reczek, C.M., and Turner, J. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 7515-7522.
- Sundaramoorthy, M., Turner, J., and Poulos, T.L. (1995). *Structure* **3**, 1367-1377.
- Welinder, K.G. (1985). *Eur. J. Biochem.* **151**, 497–450.
- Yamada, H., and Yamazaki, I. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* **165**, 728–738.

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

01) Catalytic pathways of *Euphorbia characias* peroxidase reacting with hydrogen peroxide

A. Mura, **F. Pintus**, P. Lai, A. Padiglia, A. Bellelli, G. Floris, and R. Medda

Biol. Chem. 387, 559-567 (2006)

02) Properties of copper-free pig kidney amine oxidase: role of topa quinone

A. Mura, A. Padiglia, R. Medda, **F. Pintus**, A. Finazzi Agrò and G. Floris

FEBS Letters 580, 4317-4324 (2006)

03) Catalase and Antiquitin from *Euphorbia characias*: two proteins involved in plant defense?

A. Mura, **F. Pintus**, R. Medda, G. Floris, A. C. Rinaldi, and A. Padiglia

Biochemistry Moscow 72, 501-508 (2007)

04) An important lysine residue in copper/quinone containing amine oxidases

A. Mura, R. Anedda, **F. Pintus**, M. Casu, A. Padiglia, G. Floris and R. Medda

FEBS Journal 274, 2585–2595 (2007)

05) Purification of *Euphorbia characias* Latex Peroxidase By Calmodulin–Affinity Chromatography

F.Pintus and A.Mura

It.J.Biochemistry 56, 1-5 (2007)

06) 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)

07) Structural changes and aggregation process of Cu/containing amine oxidase in the presence of 2,2,2'-trifluoroethanol

M. Amani, R. Yousefi, A.A. Moosavi-Movahedi, **F. Pintus**, A. Mura, G. Floris, B.I. Kurganov and A.A. Saboury

Protein & Peptide Letters 15, 521-527 (2008)

08) 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)

SEQUENZE PROTEICHE PUBBLICATE NELLA BANCA DATI NCBI

AAS97959 Peroxidase precursor *Euphorbia characias*

(Mura, A., **Pintus, F.**, Longu, S., Medda, R., Floris, G., Mignogna, G. and Padiglia, A.) 2004

AAx09646 Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1 *Euphorbia characias*

(Mura, A., **Pintus, F.**, Utzeri, S., Longu, S., Medda, R., Floris, G. and Padiglia, A.) 2005

AAx88799 Catalase *Euphorbia characias*

(**Pintus, F.**, Mura, A., Utzeri, S., Longu, S., Medda, R., Floris, G. and Padiglia, A.) 2005

AAy33920 Polyubiquitin *Euphorbia characias*

(Mura, A., **Pintus, F.**, Utzeri, S., Longu, S., Medda, R., Floris, G. and Padiglia, A.) 2005

ABM53666 Copper/zinc superoxide dismutase *Euphorbia characias*

(**Pintus, F.**, Mura, A., Utzeri, S., Contini, A., Medda, R., Floris, G. and Padiglia, A.) 2007

ABM53667 Heat shock protein 70 *Euphorbia characias*

(Mura, A., **Pintus, F.**, Pistis, G., Pintus, A., Medda, R., Floris, G. and Padiglia, A.) 2007