

**Università degli studi di Padova - Facoltà di scienze MM.FF.NN.
Laurea di primo livello in biologia molecolare**



Espressione eterologa, purificazione e saggio di attività della Fe-idrogenasi di *Enterobacter cloacae*

Violena Pietrobon

**Tutor: Prof.ssa Fernanda Rigoni
Co-tutor: Dott.ssa Sarah D'Adamo
Dipartimento di biologia**

Anno accademico 2006- 2007

IDROGENASI

La famiglia è suddivisa a seconda dei metalli presenti nel sito catalitico: NiFe, NiFeSe, Fe. Le prime due classi catalizzano prevalentemente l'ossidazione dell'idrogeno mentre le Fe-idrogenasi riducono protoni a idrogeno gassoso.

Evoluzione convergente: filogenesi distinta, set genici diversi e pathway di maturazione diversi.

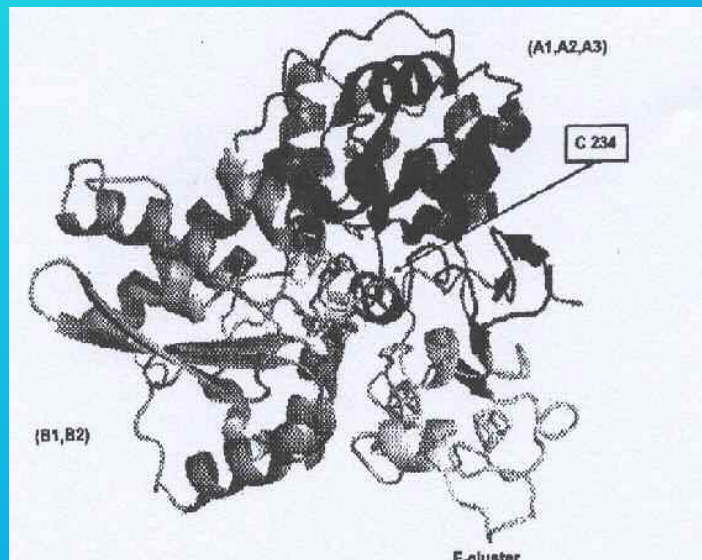


Fig.1 - Domini strutturali (F e H cluster) della Fe-idrogenasi di D. desulfuricans ottenuti con CATH. (.Tosatto S.C.E., et al., 2006)

Fe- IDROGENASI

- Alta similarità di sequenza tra le ferro idrogenasi (50%) con conservazione del dominio catalitico.
- Il sito catalitico è chiamato “H cluster”: consiste in un centro [4Fe-4S] unito tramite un residuo di cisteina ad un centro 2Fe-2S. Tali centri FeS, sono coordinati con molecole non proteiche come CO e CN.

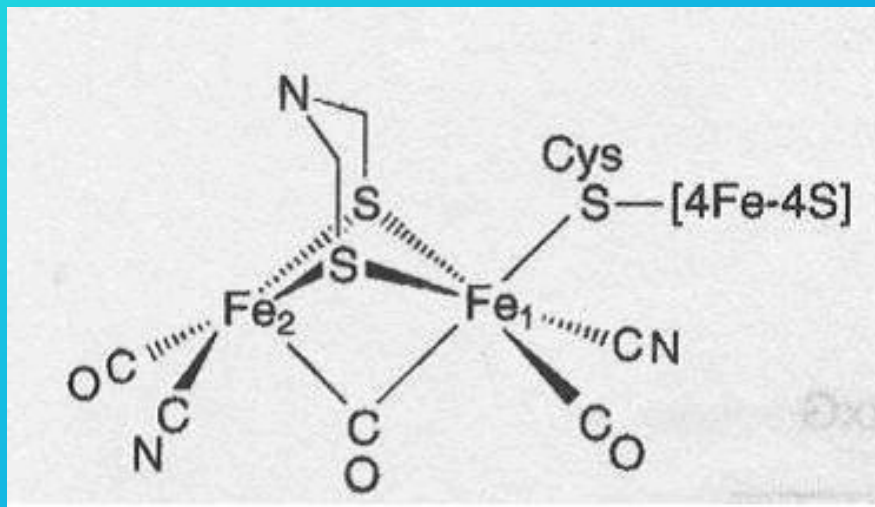


Fig 2 - Struttura chimica dell' H cluster di Fe-idrogenasi (Ghirardi M.L., et al, 2007)

- Inibizione irreversibile del sito catalitico da parte dell'ossigeno e reversibile da parte del CO.

Fe- IDROGENASI IN *E.CLOACAE*

- *E.cloacae* è un G-, anaerobio facoltativo.
- Costituita da 147 AA e massa molecolare di 16 kDa
- Questo enzima manca di alcune subunità regolatorie → data la mancanza di alcuni centri FeS, si presume un trasferimento diretto di elettroni al sito catalitico (H cluster).

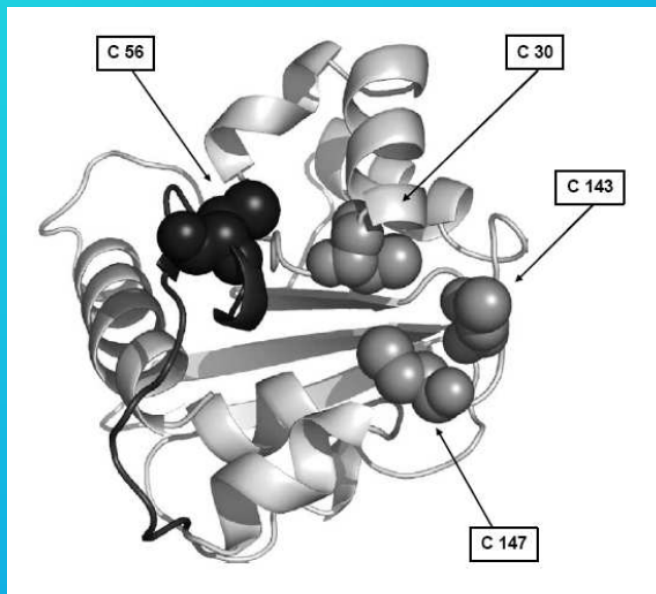


Fig. 3 - Modello strutturale della Fe-idrogenasi di *E.cloacae*. (Tosatto S.C.E., et al., 2006).

SCOPO DEL TIROCINIO

- Il lavoro svolto durante il tirocinio è consistito nell'espressione della ferro idrogenasi di *Enterobacter cloacae* in *Escherichia coli* e nella sua purificazione.
- Al fine di disporre di un enzima funzionale che ci consenta in un secondo momento di compiere test di attività e analisi strutturali attendibili, esso è stato purificato in condizioni di anaerobiosi.

ESPRESSIONE ETEROLOGA

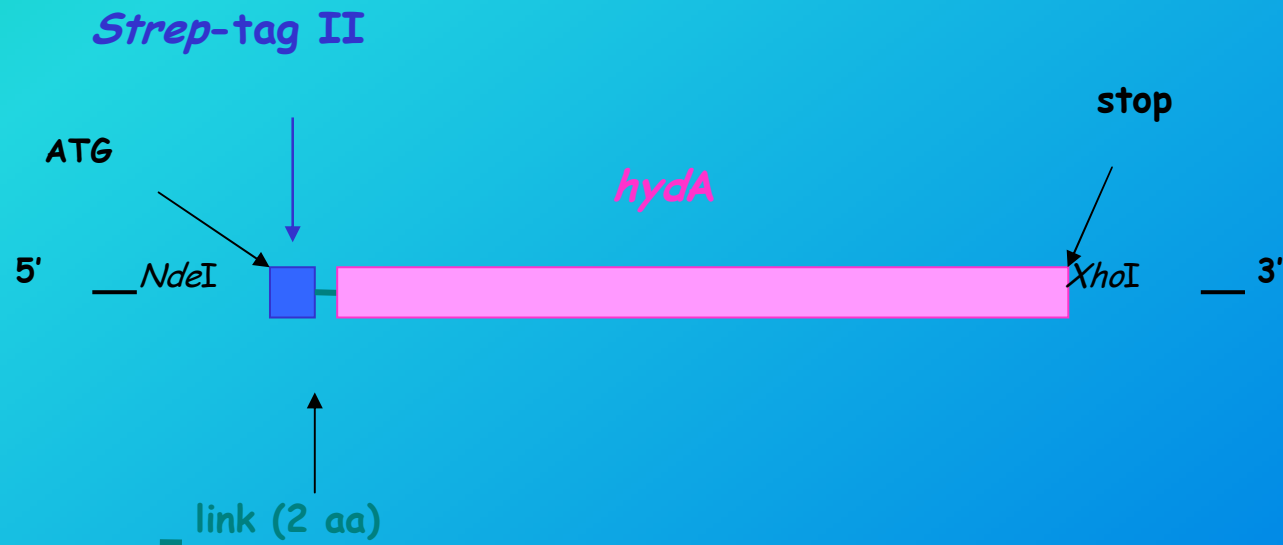


Fig.4 - Sintesi del gene *hydA*

Gene sintetizzato → PCR per aggiungere il gene che codifica per Strep-Tag II

ESPRESSIONE ETEROLOGA

1) TRASFORMAZIONE CHIMICA BATTERICA

- gene per T7 RNA polimerasi → lacUV5
- vettore di espressione hydA



Fig.5 – coltura di E.coli

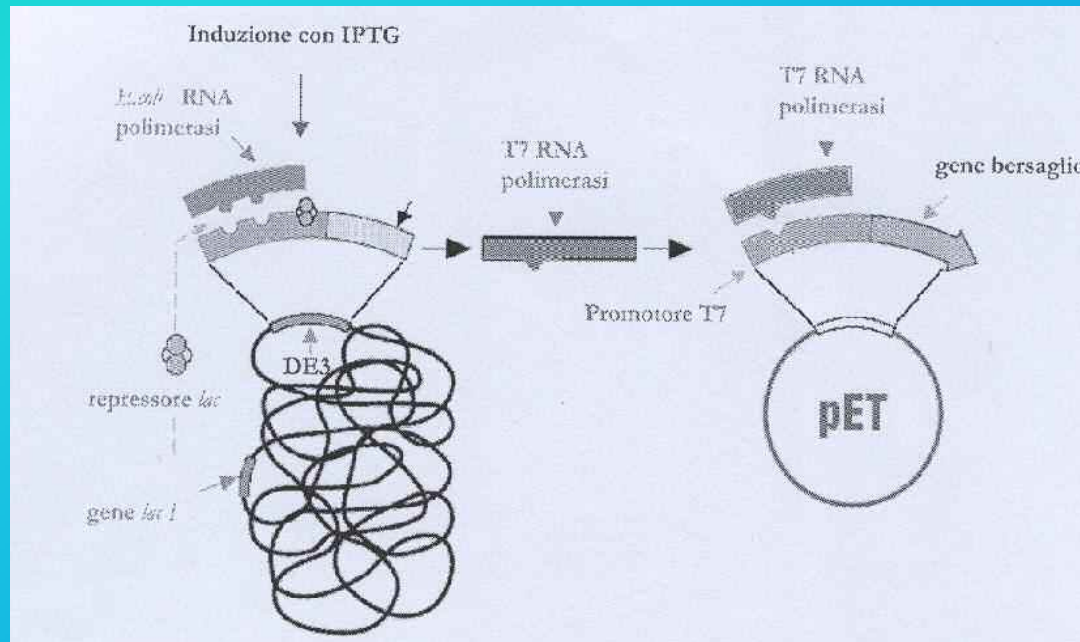


Fig. 6- Meccanismo di induzione

- 2) **FERMENTAZIONE E INDUZIONE:** terreno M63, bioreattore BioFlo 110, ferro citrato, IPTG → aerobiosi e anaerobiosi
- 3) **SONICAZIONE:** surnatante con proteina solubile, pellet con corpi inclusione.

PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA TRAMITE CROMATOGRAFIA DI AFFINITA'

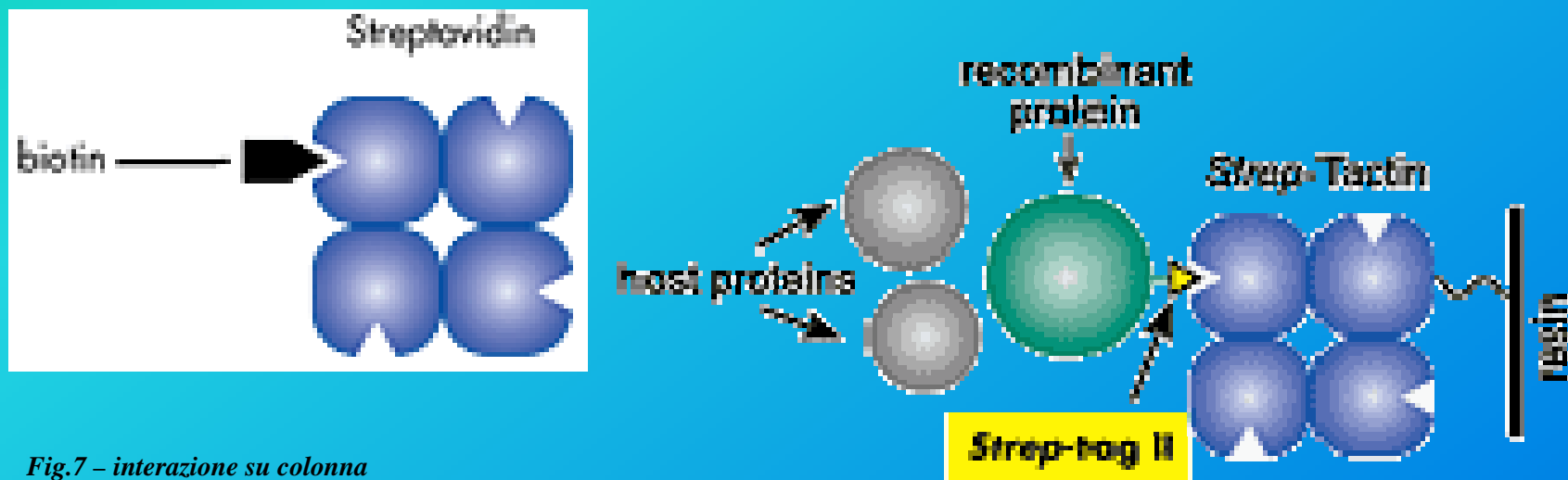


Fig.7 - interazione su colonna

La proteina contenente lo Strep-Tag II interagisce con la fase stazionaria Strep-Tactin emulando il legame biotina-streptavidina.

La colonna viene eluita con buffer E contenente destiobiotina.

RISULTATI CON SDS PAGE

- Come si può vedere dal gel, la resa di purificazione della proteina solubile, è piuttosto modesta, questo perché essa risulta presente nella frazione solubile del lisato totale, solo in minima parte → precipitano nei corpi di inclusione.

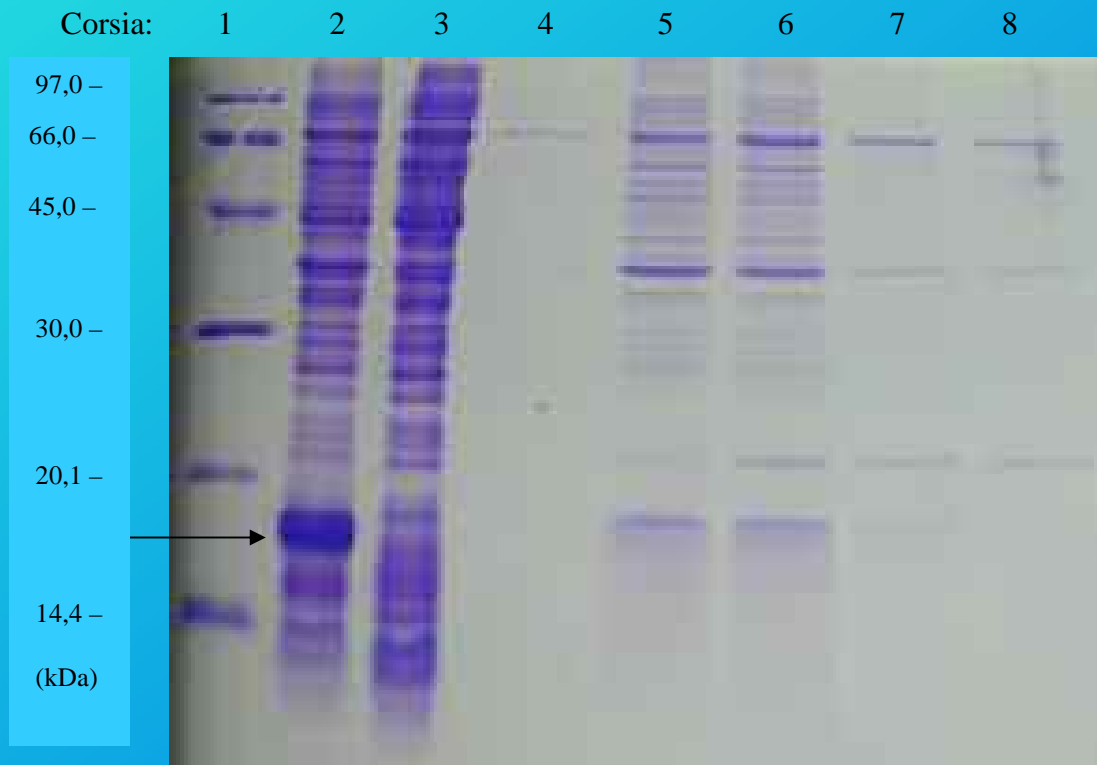
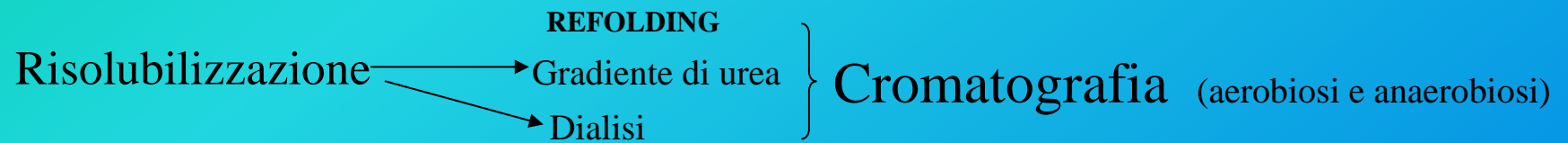


Fig.8 – Gel SDS PAGE al 15% di poliacrilammide, colorato con Coomassie brilliant blue 0,1%. Ordine di caricamento: 1) Pesi molecolari 2) Frazione insolubile del lisato totale 3) Frazione solubile del lisato totale 4) Ultimo lavaggio prima dell' eluizione 5-8) Frazioni eluite 1-4, 40 μ L.

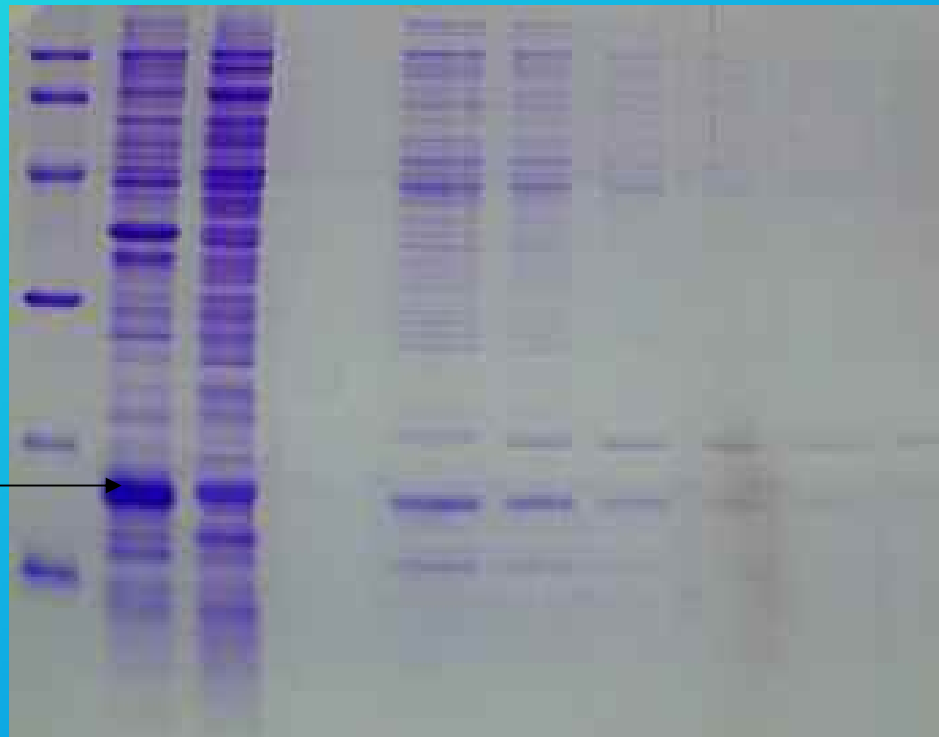
ESTRAZIONE DAI CORPI DI INCLUSIONE E REFOLDING



RISULTATI CON SDS PAGE

Corsia: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

97,0 –
66,0 –
45,0 –
30,0 –
20,1 –
14,4 –
(kDa)



Netto incremento della quantità di proteina purificata, poiché si è riusciti ad estrarla dai corpi di inclusione. Tuttavia quasi il 50% della proteina riprecipita nella frazione insolubile.

Fig. 9- Gel SDS PAGE al 15% di poliacrilammide, colorato con Coomassie brilliant blue 0,1%. Ordine di caricamento: 1) pesi molecolari 2) Pellet ottenuto dopo il refolding 3) Surnatante ottenuto dopo il refolding 4) vuoto 5-10) Frazioni eluite dalla colonna 1-6 40µL.

TEST DELLA FERROZINA

- Obiettivo: proteina pura per studi strutturali (EPR e cristallografia a raggi X) e in conformazione nativa per saggio d'attività.
- Per verificare la presenza di ferro nella proteina e testarne successivamente l'attività: test della Ferrozina.
- Contaminanti in cromatografia → cellule trasformate senza inserto per avere profilo cromatografico dei soli contaminanti da usare come controllo negativo.
 - Campione 1: dalla cromatografia della frazione solubile del lisato cellulare di batteri, trasformati con un plasmide senza inserto proteico → pET
 - Campione 2: dalla cromatografia della frazione solubile del lisato cellulare, derivante dai batteri trasformati con il vettore di espressione contenente hydA → HydA.
- Per eseguire il test della Ferrozina è necessario avere una concentrazione totale di proteina uguale tra i due campioni, quindi è stata dosata la concentrazione con il micro BCA.

QUANTIFICAZIONE DELLA PROTEINA TRAMITE MICRO BCA

Retta taratura: concentrazione = $(A-0,00523)/0,02966 \rightarrow$ fitting:99,5%

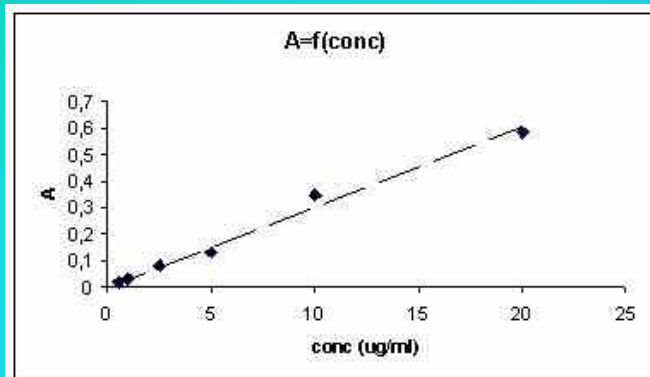


Fig. 10 retta taratura ottenuta con concentrazioni diverse di soluzioni standard di BSA

Riassunto dei valori ottenuti con micro BCA:

| | | | |
|-------------------|-------|--------|--------|
| | | pET | HydA |
| Assorbanza (A) | 1:100 | 0,0115 | 0,0335 |
| | 1:50 | 0,0215 | 0,0465 |
| Conc media(ug/ml) | | 24,00 | 82,40 |

Da questi risultati si può notare che, mediamente, nel campione dove era presente l'insero proteico, c'è una concentrazione molto maggiore di proteina rispetto al campione con solo il plasmide.

Pertanto, per il successivo test della Ferrozina, è necessario diluire il campione contenente HydA in modo da ottenere un'egual concentrazione dei due campioni \rightarrow rapporto 1:3

RISULTATI TEST DELLA FERROZINA (SPETTRO DI ASSORBIMENTO FE-FERROZINA)

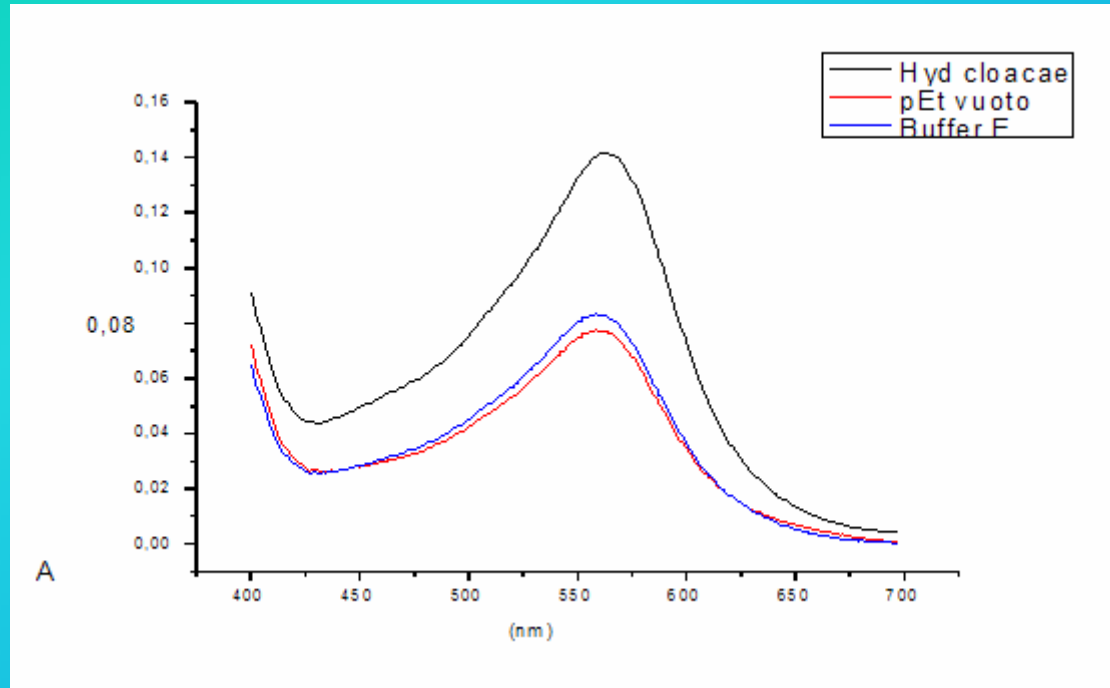


Fig.11- Spettro di assorbimento del complesso Fe-ferrozina. In nero è riportata l'assorbanza relativa al campione derivante dalla cromatografia, che presenta la proteina HydA. La curva rossa rappresenta l'assorbanza del controllo negativo, la curva blu rappresenta l'assorbanza del buffer (blank).

L'assorbimento relativo al campione che presenta proteina è nettamente superiore al controllo negativo, che invece, è praticamente identico al rumore di fondo rappresentato dal blank. → i contaminanti presenti assieme a HydA nella cromatografia, non legano ferro.

$$\Delta c = 7,5 \mu\text{M} - 2,1 \mu\text{M} = 5,4 \mu\text{M} \text{ (effettiva concentrazione di ferro della proteina di interesse).}$$

La proteina purificata contiene effettivamente ferro e che, probabilmente, è in conformazione nativa.

SAGGIO DI ATTIVITA'

SPETTROFOTOMETRO

Miscela di reazione: metilviologeno ossidato, degasato, in ambiente anaerobico → saturato con idrogeno gassoso e successivamente, si inietta la proteina (in anaerobiosi).

Essa compie la reazione di ossidazione di H_2 e si producono elettroni, che vanno a ridurre il metilviologeno (assorbe a 604 nm).

Come controllo negativo si è utilizzata la miscela di reazione, sottoposta alle medesime condizioni, ma senza l'introduzione della proteina .

Sembra esserci una leggera variazione di assorbanza, tuttavia tali esperimenti verranno ripetuti e confermati utilizzando anche, come secondo controllo negativo, i campioni purificati dalle cellule trasformate con il vettore senza inserto.

GAS CROMATOGRAFO

Misura l'evoluzione di idrogeno gassoso



Fig.13 - spettrofotometro



Fig. 12 – gas cromatografo

CONCLUSIONI

Le procedure descritte sono state utili per cercare di mettere a punto un percorso di purificazione ottimale.

E' stato possibile osservare la presenza di ferro nella proteina, cosa che suggerisce che HydA sia in forma nativa e possa essere utilizzata per analisi strutturali, mediante spettroscopia EPR e cristallografia a raggi X.

I dati di attività dell'enzima ottenuti, sono preliminari e devono essere confermati sia ripetendo il test basato sull'uso del metilviologeno, sia mettendo a punto la procedura per misurare H₂ con il gas cromatografo.

Ringraziamenti:

Prof.ssa Fernanda Rigoni

Dott.ssa Sarah D'Adamo

Tutti i componenti del laboratorio del Prof.Giacometti



Fig.14 autovettura a idrogeno