

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

FACOLTÀ DI SCIENZE MM. FF. NN.



DOTTORATO DI RICERCA

IN

AMBIENTE E TERRITORIO

ASPETTI CHIMICO-BIOLOGICI NELL'INTERAZIONE UOMO-AMBIENTE

XXII CICLO

TESI DI DOTTORATO

SESSIONE 2009 - 2010

**Caratterizzazione molecolare e funzionale della Polinucleotide
fosforilasi dall'eubatterio antartico *Pseudoalteromonas haloplanktis***

TUTOR

Chiar.mo Prof. Gennaro Raimo

COORDINATORE

Chiar.mo Prof. Fulvio Celico

DOTTORANDA

Dott.ssa Giovanna Evangelista

...Al mio angelo custode...

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare tutti coloro che in questi tre anni di Dottorato di Ricerca mi sono stati accanto....

...Grazie alla mia famiglia, ufficiale e ufficiosa, per il supporto durante i momenti difficili...

...Grazie al Prof. Gennaro Raimo, per la formazione professionale che mi ha aiutato a conseguire e per la preziosa guida nell'attività di Ricerca...

...Un Grazie al gruppo di Ricerca dell'Università di Napoli Federico II (Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche,) per la fruttuosa collaborazione nello svolgimento dell'attività sperimentale...

...Grazie alle dottoresse Patrizia Falasca e Filomena Incollingo, compagne delle tante giornate trascorse in laboratorio...

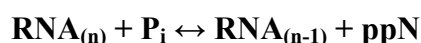
...Infine un Grazie alla mia forza di volontà.

Giovanna

Sommario

L'enzima polinucleotide fosforilasi (PNPasi, E.C. 2.7.7.8) è coinvolto nel metabolismo dei nucleotidi, sia negli eucarioti che nei procarioti. L'enzima catalizza la degradazione fosforolitica dell'RNA, rilasciando nucleosidi 5'-difosfato dall'estremità 3' del substrato, e la reazione inversa di polimerizzazione.

In questo lavoro è descritta la purificazione e la caratterizzazione biochimica della PNPasi isolata dall'eubatterio psicrofilo di origine Antartica *Pseudoalteromonas haloplanktis* (*Ph*, temperatura ottimale di crescita 4-20°C) identificata sulla base della sua capacità di catalizzare la seguente reazione reversibile:



L'enzima ha mostrato una struttura omotrimerica con un M_r pari a 255000, come valutato da analisi della massa molecolare in condizioni native e denaturanti. Utilizzando *software* bioinformatici dedicati sono state ottenute, a partire dalla sequenza amminoacidica, predizioni della struttura secondaria e terziaria del monomero. Inoltre, sono stati condotti studi sulla composizione amminoacidica che hanno permesso di evidenziare che la *Ph*PNPasi mostra i tipici adattamenti delle proteine psicrofile.

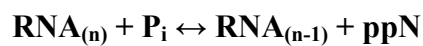
I parametri cinetici sono stati determinati a 15°C, utilizzando poli(A) come *primer* e GDP marcato come substrato. È stato valutato l'effetto sull'attività enzimatica di concentrazioni crescenti di GDP, consentendo di calcolare i parametri cinetici. L'attività della *Ph*PNPasi è risultata essere stimolata dalla presenza di alcuni cationi monovalenti nella miscela di reazione, caratteristica già evidenziata per un altri enzimi isolati da *P. haloplanktis*. Tra essi il CsCl ad una concentrazione 0,9 M è risultato il più efficace, aumentando l'attività dell'enzima di circa 7 volte.

L'attività enzimatica della *Ph*PNPasi aumenta con l'incremento della temperatura, raggiungendo un valore massimo a 40°C; oltre questa temperatura si osserva un decremento della velocità di reazione, probabilmente dovuto alla sua inattivazione termica. Nell'intervallo 0-40°C è stato calcolato un valore di energia di attivazione (E_a) pari a 87 kJ/mol.

La *PhPNPasi* è un enzima piuttosto sensibile al trattamento termico, infatti l'energia di attivazione della reazione di inattivazione termica nell'intervallo 30-70°C è risultata pari a 96,7 kJ/mol, valore significativamente più basso di quello osservato per altre proteine isolate da fonti mesofile o termofile. La termostabilità di questo enzima è stata valutata anche con analisi di tipo spettroscopico. Le curve di UV *melting* hanno mostrato una temperatura di semidenaturazione di 46°C, valore significativamente più alto di quello a cui si registra la massima attività catalitica. I risultati indicano che il centro catalico della *PhPNPasi* è molto meno stabile del resto della struttura della proteina.

Abstract

Polynucleotide phosphorylase (PNPase) is involved in the nucleotide metabolism pathway of both eukaryotes and prokaryotes. The enzyme catalyzes the phosphorolytic degradation of RNA, releasing nucleoside 5'-diphosphates from the 3' end of the substrate, and the reverse reaction of nucleoside 5'-diphosphate polymerization. In this work it's described the procedure of isolation and the characterization of PNPase from the psychrophilic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* (*Ph*, optimal growth condition 4-20°C), identified for its ability to catalyse the following reversible reaction:



*Ph*PNPase showed a homotrimeric structure of 255 kDa, as evaluated by molecular mass analysis under native and denatured conditions.

Using bioinformatic software, starting from the amino acid sequence, a prediction of the secondary and tertiary monomer structure have been obtained. Besides, studies on the amino acid composition have been carried out, thus evidencing that *Ph*PNPase shows the typical adaptation of proteins isolated from psychrophilic organisms.

The kinetic parameters have been determined at 15°C, using poly(A) as a primer and [³H]GDP as substrate. The effect of increasing concentration of [³H]GDP on the activity has been evaluated, thus allowing the determination of the kinetic parameters of the polymerization reaction. The activity of *Ph*PNPase is stimulated by selected monovalent cations added in the reaction mixture, a feature already observed for other enzymes isolated from *P. haloplanktis*. Among the cations tested, CsCl, added to 0.9 M final concentration, has resulted the most effective, enhancing *Ph*PNPase activity of about 7-fold. The effect of temperature on the activity and stability of *Ph*PNPase has also been tested. In particular, the activity of *Ph*PNPase increases with increasing temperature, reaching a maximum at 40°C; beyond this temperature a straight decay of the activity has been observed, due to thermal inactivation of the enzyme. In the 0-40°C interval, a value of 87 kJ/mol for the energy of activation of the reaction (E_a) has been calculated. Studies about the effect of temperature on *Ph*PNPase stability have shown that this

enzyme is a quite thermolabile protein; in fact, the E_a of the thermal inactivation reaction in the 30-70°C interval, is 96.7 kJ/mol, a value significantly lower than those observed for other proteins isolated from mesophilic and thermophilic sources. The thermostability of this enzyme has also been investigated by spectroscopic analysis. UV-melting curves have shown a temperature for half-denaturation of 46°C, a value significantly higher than that found for the maximum catalytic activity. These results indicate that the catalytic centre of *Ph*PNPase is less stable of the overall protein structure.

Elenco delle abbreviazioni

ADP	Adenosina difosfato
AFPs	antifreeze proteins
AI	Aliphatic Index
BSA	albumina bovina sierica
CSPs	cold shock proteins
CAPs	cold acclimatation proteins
Da	Dalton
DNA	acido desossiribonucleico
ΔG	variazione dell'energia libera
ΔH	variazione dell'entalpia
ΔS	variazione dell'entropia
E_a	energia di attivazione
<i>Ec</i>PNPasi	PNPasi in <i>Escherichia coli</i>
EPSs	esopolisaccaridi
GDP	Guanosina difosfato
GRAVY	Grand Average of Hydropathy
k_{cat}	costante catalitica
kDa	kilo Dalton
K_M	costante di Michaelis-Menten
M_r	massa molecolare relativa
mRNA	RNA messaggero
<i>Ph</i>PNPasi	PNPasi in <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
P_i	ortofosfato inorganico
PNPasi	poliribonucleotide fosforilasi
pppGpp	guanosina-3' difosfato-5' trifosfato
rRNA	RNA ribosomale
RNA	acido ribonucleico
SDS	sodio-dodecilsolfato
SDS-PAGE	elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS

ssRNA	RNA a singolo filamento
<i>Te</i>PNPasi	PNPasi in <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
T_{opt}	temperatura ottimale di crescita
Tris	tris(idrossimetil)amminometano
v	velocità
v_{max}	velocità massima

Codici degli amminoacidi proteinogenici

<u><i>Amminoacido</i></u>	<u><i>Codice a tre lettere</i></u>	<u><i>Codice ad una lettera</i></u>
acido aspartico	Asp	D
acido glutammico	Glu	E
alanina	Ala	A
arginina	Arg	R
asparagina	Asn	N
cisteina	Cys	C
fenilalanina	Phe	F
glutammina	Gln	Q
glicina	Gly	G
istidina	His	H
isoleucina	Ile	I
leucina	Leu	L
lisina	Lys	K
metionina	Met	M
prolina	Pro	P
serina	Ser	S
tirosina	Tyr	Y
treonina	Thr	T
triptofano	Trp	W
valina	Val	V

Indice

<i>Introduzione</i>	1
Capitolo I - LA PNPasi	5
I.1 - Introduzione.....	5
I.2 – L’attività catalitica della PNPasi	6
I.3 – Struttura della PNPasi.....	8
I.4 - Ruolo della PNPasi nel catabolismo dell’ mRNA.....	12
<i>I.4.a – Introduzione</i>	12
<i>I.4.b - Degradazione dell’RNA nei procarioti</i>	12
<i>I.4.c – Degradazione dell’RNA negli eucarioti</i>	14
I.5 - Mediazione dell’adattamento al freddo.....	15
CAPITOLO - II Scopo della Ricerca	18
II.1 - Introduzione	18
II.2 – La PNPasi da <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	19
CAPITOLO - III Materiali e Metodi	21
III.1 - Materiali.....	21
III.2 - Dosaggio enzimatico	22
<i>III.2.a - Dosaggio spettrofotometrico</i>	22
<i>III.2.b - Dosaggio radioisotopico</i>	24
III.3 - Coltura delle cellule di <i>P.haloplanktis</i> ed estrazione del contenuto cellulare .	25
III.4 - Purificazione della <i>PhPNPasi</i>	25
III.5 - Determinazione della massa molecolare della <i>PhPNPasi</i>	27
III.6 - Determinazione della sequenza N-terminale della <i>PhPNPasi</i>	27
III.7 - Parametri Cinetici	27
III.8 - Effetto dei cationi monovalenti sull’attività della <i>PhPNPasi</i>	28
III.9 - Termofilicità della <i>PhPNPasi</i>	28
III.10 - Stabilità termica della <i>PhPNPasi</i>	28
III.11 - Modello tridimensionale della <i>PhPNPasi</i>	29
III.12 - Relazione tra composizione amminoacidica delle PNPasi e temperatura ottimale di crescita	29
III.13 - Altri metodi.....	30
CAPITOLO IV - Risultati e Discussione	31
IV.1 - Proprietà molecolari della <i>PhPNPasi</i>	31
IV.2 - Proprietà funzionali della <i>PhPNPasi</i>	47
<i>IV.2.a – Parametri cinetici</i>	47
<i>IV.2.b - Effetto dei cationi monovalenti sull’attività della PhPNPasi</i>	49
<i>IV.2.c - Effetto della temperatura sull’attività polimerasica della PhPNPasi</i>	51
<i>IV.2.d - Effetto della Temperatura sulla stabilità della PhPNPasi</i>	53

Conclusioni	55
Bibliografia	57
Pubblicazioni su riviste scientifiche	64
- Molecular and Functional Characterization of Polynucleotide Phosphorylase from the Antarctic Eubacterium <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> .	
- Differential cold–adaptation among protein components of the thioredoxin system in the psychrophilic eubacterium <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC 125.	
- Key enzyme systems controlling the oxidative stress in the psychrophilic eubacterium <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> .	

Indice delle figure

Figura I.1 - Attività della PNPasi.	8
Figura I.2 - Successione dei domini nella struttura primaria della singola subunità dell'enzima PNPasi dall'N-terminale al C-terminale.	9
Figura I.3 - Rappresentazione schematica della PNPasi eubatterica ed eucariotica.	9
Figura I.4 - Monomero della PNPasi.	10
Figura I.5 - Struttura tridimensionale dell'enzima PNPasi.	11
Figura I.6 - PNPasi e altri componenti del degradosoma.	13
Figura III.1 - Schema di reazioni del dosaggio spettrofotometrico.	22
Figura III.2 – Analisi SDS-PAGE del percorso di purificazione.	26
Figura IV.1 - Organizzazione molecolare della PhPNPasi.	35
Figura IV.2 – Allineamento tra PhPNPasi, EcPNPasi e TePNPasi.	36
Figura IV.3 - Analisi della massa molecolare relativa media, dell'idrofobicità media e dell'indice alifatico dei residui amminoacidici presenti nelle strutture primarie di PNPasi isolate da microrganismi con T_{opt} diverse.	41
Figura IV.4 - Dendrogramma ottenuto dall'allineamento multiplo.	43
Figura IV.5 - Predizione di struttura secondaria.	44
Figura IV.6 - Grafico di Ramachandran della PhPNPasi.	45
Figura IV.7 - Individuazione dell'appartenenza della varie stringhe amminoacidiche a domini della struttura tridimensionale complessiva.	45
Figura IV.8 - Modello tridimensionale della struttura di un monomero di PhPNPasi.	46
Figura IV.9 – Attività enzimatica della PhPNPasi.	48
Figura IV.10 - Effetto dei cationi monovalenti sull'attività della PhPNPasi.	50
Figura IV.11 - Effetto della temperatura sull'attività polimerasica della PhPNPasi.	52
Figura IV.12 - Stabilità al calore della PhPNPasi.	54

Introduzione

Il concetto di ambiente è legato a quello di spazio.

In un'accezione comune l'ambiente si configura, infatti, come una porzione di spazio con caratteristiche tali da poter contenere vita, oppure suscettibile a farlo.

Condizione necessaria affinché uno spazio sia definibile ambiente è, dunque, che esso contenga vita, almeno potenzialmente.

Identificabile con l'ambiente non è tuttavia lo spazio comunemente inteso, ossia quello euclideo tridimensionale, ma una sua visione più ampia, denominata spazio ecologico. Quest'ultimo è uno spazio multidimensionale, identificato geometricamente con un "ipervolume", i cui limiti sono determinati da un insieme di parametri: i fattori ecologici.

Si tratta, nello specifico, di variabili di natura fisica, chimica, o biologica in grado di influire sul ciclo vitale degli organismi; esempi ne sono la pressione, la temperatura, la salinità, la disponibilità di acqua libera, di nutrienti. La maggior parte di essi è quantificabile, ossia esprimibile metricamente.

La presenza di determinate forme di vita in un dato ambiente dipende dalle coordinate biologico-fisico-chimiche che lo caratterizzano e la loro sopravvivenza nello stesso è funzione della loro attitudine a tollerare oscillazioni più o meno ampie dei valori di ciascun fattore.

Per ognuno dei fattori ecologici è infatti possibile definire un minimo e un massimo, entro i quali una data specie è vitale, e valori di *optimum*, in cui le sue funzioni vitali hanno il massimo successo. L'ampiezza dell'intervallo di tolleranza per un certo fattore presenta una variabilità che è non solo interspecifica, correlabile quindi alle differenze tra specie più o meno lontane dal punto di vista evolutivo, ma si caratterizza anche come intraspecifica.

Ed è proprio questa variabilità individuale tra organismi della stessa specie a rappresentare il parametro su cui agisce la selezione naturale per dirigere l'evoluzione della specie nel tempo.

In linea generale, quando uno o più fattori ecologici, che caratterizzano un dato ambiente, assumono valori particolarmente restrittivi si parla di ambiente estremo e di

specie estremofila relativamente ad una specie atta a vivere in esso.

E' intuibile che condizioni restrittive siano fortemente limitanti la biodiversità e che il loro perdurare nel tempo costituisca un ostacolo all'evoluzione. Il mutamento delle condizioni ambientali è infatti un fattore cardine per un qualsiasi percorso evolutivo; in un ambiente le cui condizioni rimangono inalterate, la pressione evolutiva tenderà a favorire sempre i medesimi organismi e a limitare con il tempo ulteriormente la biodiversità, permettendo il sopravvento di poche specie fortemente adattate. Per tali ragioni gli organismi estremofili sono generalmente molto antichi sotto il profilo filogenetico e caratterizzati da una relativa semplicità strutturale; si tratta, infatti, per la maggior parte, di organismi unicellulari e di pochi organismi pluricellulari.

La temperatura è uno dei più importanti fattori ecologici in quanto è in grado di influire sulla crescita e la sopravvivenza degli organismi in un dato ambiente e, di conseguenza, sulla loro distribuzione ed abbondanza sul nostro pianeta.

Generalmente i valori massimo e minimo che il parametro temperatura può assumere, per permettere l'esistenza, risultano rispettivamente pari a +85°C e -70°C. Tuttavia, come avviene per gli altri fattori ecologici, anche relativamente alla temperatura possono essere definite specie in grado di sopravvivere a condizioni estreme, al limite della resistenza per un sistema biologico. Ci sono, ad esempio, delle cisti dei *Rotiferi* adattate a vivere a temperature bassissime, prossime allo zero assoluto (-273°C), così come sono individuabili specie batteriche in zone interessate da fenomeni di vulcanismo (350°C).

In base alla temperatura ottimale di crescita è possibile suddividere gli organismi viventi in tre gruppi:

- *psicrofili*, *criofili* o *microtermi* che hanno un *optimum* di temperatura basso, minore di 15°C;
- *mesofili* o *mesotermi* con temperature ottimali di valore intermedio, intorno ai 37°C;
- *termofili* o *macrotermi* con un valore di *optimum* termico estremamente elevato, maggiore di 80°C; al limite della termofilia si collocano gli *ipertermofili*, che vivono a temperature ancora più alte.

Gli organismi appartenenti al primo e all'ultimo gruppo, vivendo in condizioni ambientali restrittive, possono a tutti gli effetti essere considerati estremofili e gli ambienti ecologici in cui vivono sono ascrivibili agli ambienti estremi.

In particolare, gli organismi psicrofili hanno dovuto evolvere una complessa serie di adattamenti biochimici per contrastare i vari effetti che l'abbassamento di

temperatura è in grado di provocare sui sistemi viventi. Tra questi sono annoverabili il rallentamento dei processi fisiologici, la modifica delle interazioni proteina-proteina, la riduzione della fluidità di membrana e della solubilità dei sali, l'aumento della viscosità dell'acqua e della solubilità dei gas, la stabilizzazione della struttura secondaria di RNA e DNA. L'abbassamento della temperatura comporta anche una riduzione del pH dei tamponi biologici, con influenza sulla solubilità delle proteine e la carica degli amminoacidi, in particolare dei residui di istidina (His).

A tali effetti gli organismi psicrofili hanno contrapposto una serie di adattamenti, il cui fine è quello di minimizzare l'impatto della bassa temperatura sulle singole cellule e sull'organismo nel suo complesso, quali: aumento della frazione insatura degli acidi grassi presenti nei fosfolipidi di membrana, aumento delle difese alle condizioni di *stress ossidativo*, sintesi di specifiche proteine note come *cold shock proteins* (CSPs) e *cold adaptation proteins* (CAPs), produzione di sostanze crioprotettive, adattamenti del *pool* proteico cellulare costitutivo (D'Amico et al., 2006).

E' proprio quest'ultimo aspetto, ed in particolare l'adattamento della frazione enzimatica alle basse temperature, a rappresentare un promettente campo di indagine tanto della ricerca di base, quanto di quella applicata.

Per contrastare l'effetto negativo della bassa temperatura sulla velocità di reazione, gli organismi psicrofili hanno evoluto enzimi specificatamente adattati, che consentono loro di mantenere un tasso metabolico paragonabile a quello degli organismi mesofili.

Questi enzimi presentano una elevata efficienza catalitica tra i 4-15°C, temperatura alla quale gli enzimi mesofili e termofili mostrano un'attività scarsa o addirittura nulla. Questa peculiarità li rende particolarmente adatti per quei settori dell'industria i cui processi necessitano di basse temperature. Inoltre, gli enzimi psicrofili potrebbero presentare un alto livello di stereospecificità, minimizzando l'innescarsi di reazioni chimiche secondarie indesiderate. La loro labilità termica potrebbe poi risultare particolarmente utile per l'inattivazione rapida dell'enzima quando richiesta (D'Amico et al., 2003, Feller & Gerday, 2003).

Altro settore di notevole interesse è lo studio della relazione struttura-funzione di enzimi isolati da organismi psicrofili. La funzione di una data proteina enzimatica è, infatti, in stretta connessione con la sua struttura. Gli enzimi psicrofili hanno evoluto specifici adattamenti strutturali che hanno avuto l'esito funzionale di contrastare l'effetto deleterio della bassa temperatura sulla velocità di reazione.

Le proteine e gli enzimi psicrofili rappresentano, quindi, una classe importante di macromolecole, nelle quali può essere approfondito il rapporto struttura-funzione, anche attraverso il confronto con le omologhe controparti in organismi mesofili e termofili. Tale raffronto consente di ampliare le conoscenze riguardo ai loro meccanismi di adattamento alle basse temperature (D'Amico et al., 2006; Siddiqui & Cavicchioli, 2006) e potrebbe fornire indicazioni sulle potenzialità di utilizzo in campo biotecnologico (Marx et al., 2004).

CAPITOLO I

La PNPasi

I.1 - Introduzione

Gli adattamenti di un organismo ad un dato ambiente si esplicano anzitutto a livello biochimico e molecolare e sono il risultato di variazioni nell'espressione genica. Tali modificazioni possono compiersi agendo direttamente sul depositario dell'informazione genica, il DNA, o sui vari attori che intervengono nel percorso che porta dai geni alle proteine, tra questi l'RNA messaggero (mRNA).

Il *turnover* dell'mRNA gioca infatti un ruolo sostanziale nella regolazione quali-quantitativa del *pool* proteico cellulare e, di conseguenza, nel controllo di processi metabolici, siano essi fisiologici o patologici (Parker & Song, 2004). Da quanto detto emerge il ruolo di primaria importanza assolto da processi di tale genere, nel modulare la risposta di un qualsiasi organismo al mutamento delle condizioni ambientali.

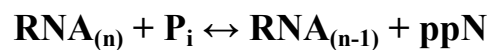
La preservazione della stabilità degli RNA messaggeri, così come l'induzione della loro degradazione, costituiscono processi molto complessi, che coinvolgono molteplici proteine che agiscono in sinergia, in alcuni casi in modo simultaneo, in altri in maniera sequenziale. Queste proteine, la maggior parte delle quali di natura enzimatica, sono molto conservate sotto il profilo evolutivo. Esse sono infatti rinvenibili dagli *Archaea*, agli Eubatteri, agli Eucarioti superiori, vale a dire dagli organismi più semplici a quelli più complessi. Ciò, unitamente alla preservazione della medesima funzione nei vari gradini della scala evolutiva, testimonia la notevole importanza rivestita dai *pathway* di *turnover* dell'RNA cui presiedono.

L'enzima Polinucleotide fosforilasi, argomento del presente lavoro di Tesi, è un componente fondamentale del complesso macchinario che dirige il metabolismo dell'RNA ed è per questo oggetto di numerosi studi.

I.2 – L'attività catalitica della PNPasi

L'enzima Polinucleotide fosforilasi (PNPasi, poliribonucleotide: ortofosfato nucleotidil-transferasi, EC 2.7.7.8) scoperta nel 1955, fu identificata come il primo enzima in grado di promuovere la formazione di RNA usando ribonucleotidi (Grunberg-Manago et al., 1955).

In particolare, la PNPasi è un enzima coinvolto nel metabolismo dell'RNA, sia esso di natura anabolica che catabolica. In chiave catabolica, l'enzima agisce nella degradazione delle molecole di acido ribonucleico catalizzando l'aggiunta reversibile di fosfato inorganico (P_i) all'RNA attraverso la formazione di un legame fosfodiesterico 5'-3'. Quest'aggiunta comporta il rilascio di un nucleotide difosfato dall'estremità 3':



L'azione continuativa di tale enzima sulla molecola di RNA comporta, dunque, una sua degradazione fosforolitica in direzione 3' → 5'.

Nella reazione inversa l'enzima può catalizzare la sintesi di RNA, usando come substrato nucleosidi difosfato. A differenza delle RNA polimerasi, questo enzima non richiede un *template* e non può copiarne uno. Infatti, in presenza di una miscela di ribonucleotidi difosfato (NDPs), la PNPasi catalizza una reazione di polimerizzazione che conduce alla produzione di un copolimero dalla sequenza casuale. A concentrazioni fisiologiche di P_i , composto che rappresenta un secondo substrato per l'enzima, la reazione favorita è quella diretta, mentre a basse concentrazioni di P_i prevale la polimerizzazione di RNA a singolo filamento.

La reazione catalizzata nei sistemi viventi è, quindi, una degradazione fosforolitica di RNA, che riveste notevole importanza sotto il profilo fisiologico (Coburn & Mackie, 1999).

La PNPasi è quindi una esorNasi, cioè un enzima in grado di degradare RNA partendo da una delle estremità della catena ribonucleica. In particolare, essa appartiene alla famiglia delle PDX esoribonucleasi, gruppo di proteine altamente conservato sotto il profilo evolutivo, presente nei tre domini in cui sono suddivisi gli organismi viventi. A differenza delle esorNasi che agiscono in maniera distributiva, dissociandosi dal

substrato ad ogni reazione di taglio, la PNPasi rimane legata al substrato permettendo tagli sequenziali, da cui risulta un processamento delle molecole di RNA a singolo filamento (ssRNA - *single strand RNA*) (Symmons et al., 2002).

Questo enzima è caratterizzato da alta processività, rimuove in maniera aspecifica nucleotidi 3', ma viene bloccata da uno *stem-loop* cioè da una struttura di RNA a doppio filamento (Coburn & Mackie, 1999; Blum et al., 1999). Affinchè una molecola di RNA possa essere degradata in maniera continua dalla PNPasi deve possedere, infatti, un 3'- *protruding* (ossia una sporgenza al terminale 3') di almeno 7-10 unità nucleotidiche.

All'interno della cellula, in realtà, la degradazione dell'RNA a singolo filamento può essere catalizzata da due diverse 3'-esoribonucleasi: la RNasi II e la PNPasi.

A differenza dell'enzima PNPasi che, come detto in precedenza, effettua una catalisi fosforolitica, la RNasi II catalizza una degradazione dell'RNA di tipo idrolitico che, paragonata alla precedente, comporta un maggior dispendio energetico. Nella reazione catalizzata dalla PNPasi, infatti, si formano legami fosfato ad alta energia prima che avvenga il distacco del nucleotide difosfato, cosa che, in condizioni di bassa temperatura, rende l'attività di questo enzima favorita rispetto a quella dell'RNasi II.

Oltre alla degradazione di substrati di RNA a singolo filamento e alla polimerizzazione degli stessi, alla PNPasi sono state attribuite numerose altre attività (Jones et al., 2003). Essa è infatti in grado di defosforilare il 5' dei substrati di RNA e di sottrarre nucleotidi al 5' (tale attività potrebbe regolare quella dell'RNasi E 5'-dipendente). La PNPasi di *S. antibioticus* (PNPasi/GPSI) ha inoltre un'attività addizionale in quanto è stata testata una sua attività guanosina pentafosfato sintetasi (guanosina-3'difosfato-5'trifosfato o pppGpp). Il pppGpp è un precursore del ppGpp (guanosina-3'difosfato-5'difosfato) che è un importante messaggero intracellulare della risposta strigente, della regolazione della sintesi dell'RNA ribosomiale (rRNA) e della differenziazione (inclusa la sintesi di antibiotici).

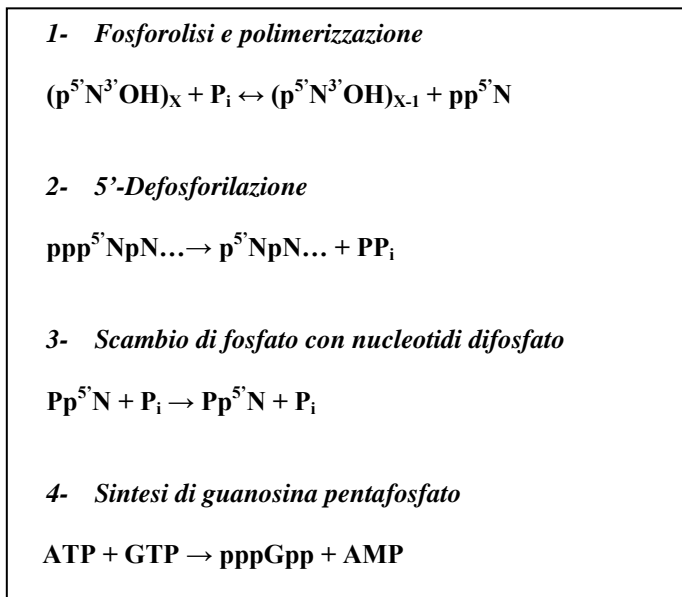


Figura I.1- Attività della PNPasi.

I.3 – Struttura della PNPasi

Notevoli chiarimenti in merito all'attività della PNPasi sono derivati dalla risoluzione della sua struttura tridimensionale (Symmons et al., 2000).

All'osservazione al microscopio elettronico, l'enzima isolato da cellule batteriche appare come un complesso triangolare dal diametro di 85-90 Å con un foro centrale. Ciò è indicativo della presenza di una struttura quaternaria. Effettivamente l'enzima è un complesso omotrimerico, in cui ciascuna subunità risulta formata da più di 700 residui; il numero preciso di amminoacidi varia al variare della specie.

Come accennato in precedenza, la PNPasi è espressa nella quasi totalità degli organismi viventi dai batteri alle piante, fino ai mammiferi superiori, con l'eccezione dei lieviti, nei quali la sua presenza non è stata al momento rilevata (Leszczyniecka et al., 2004).

In tutte le specie il monomero dell'enzima presenta una classica struttura a domini.

In particolare, ripiegamenti del *backbone* generano cinque domini (Symmons et al., 2000, 2002; Leszczyniecka et al., 2002, 2004, Zuo & Deutscher, 2001; Raijmakers et al., 2002). Si individuano anzitutto due domini omologhi che costituiscono un *core* centrale con diverso grado di identità con l'enzima RNasi PH isolata da *E. coli*, denominati pnp1 e pnp2 (*RPH like domains*). Questi due domini conferiscono al *core* strutturale della subunità una certa simmetria.

Oltre ai domini *RPH-like* nella subunità c'è un dominio ad α -elica, H, che connette i due domini di cui sopra, e due domini di legame all'RNA, denominati KH (*RNP K homology*) e S1 (che deve il suo nome alla proteina ribosomiale S1), presenti anche in altre *RNA binding protein*.

In particolare, procedendo dall'N-terminale al C-terminale, si hanno in successione pnp1, H, pnp2, KH e S1.



Figura I.2 - Successione dei domini nella struttura primaria della singola subunità dell'enzima PNPasi dall'N-terminale al C-terminale.

In realtà, il dominio H è connesso ai domini *RPH-like* per mezzo di due regioni di connessione, denominate *linker 1* e *linker 2*, che vengono convenzionalmente considerate appartenenti ai domini *RPH-like*.

Le PNPasi isolate dagli eucarioti superiori, siano essi animali o vegetali, preservano questa struttura modulare e se ne discostano unicamente per la presenza, all'N-terminale, di peptidi segnale di traslocazione subcellulare. La presenza di tali stringhe di residui determina una localizzazione della PNPasi a livello mitocondriale e cloroplastico (Piwowarski et al., 2003; Yehudai-Resheff et al., 2003; Sarkar et al., 2005).

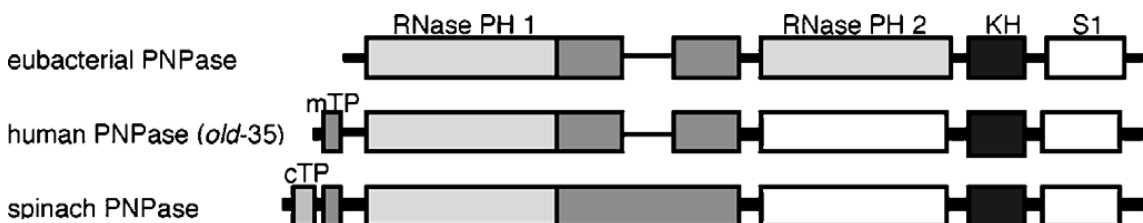


Figura I.3 - Rappresentazione schematica della PNPasi eubatterica ed eucariotica. In particolare, sono raffigurate le posizioni relative dei peptidi di transizione mitocondriale e cloroplastico (mTP e cTP rispettivamente), i due domini omologhi all'RNasi PH e i due domini di legame all'RNA KH e S1 (Sarkar & Fisher, 2006).

La posizione dei vari domini nella struttura tridimensionale della singola subunità è mostrata nell'immagine che segue.

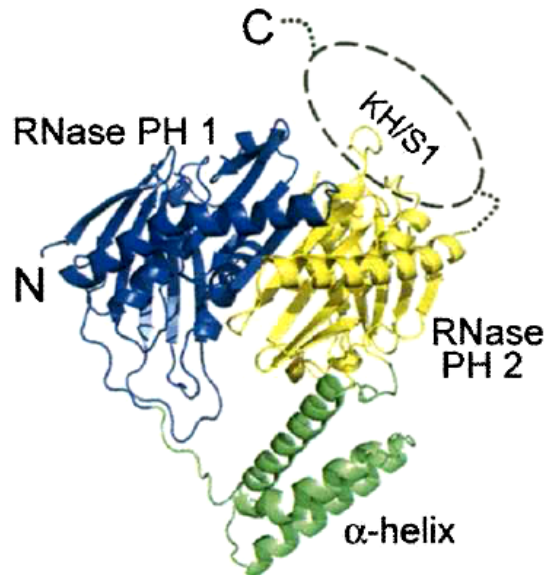


Figura I.4 - Monomero della PNPasi (Shi et al., 2008).

In realtà, nel cristallo i domini KH e S1 non mostrano una posizione fissa, ciò probabilmente attiene alla loro funzione di legame dell'RNA per la quale è necessaria una certa flessibilità.

La struttura complessiva dell'enzima è il risultato dell'associazione di tre subunità del tipo appena descritto che avviene a livello di specifiche regioni, denominate interfacce di trimerizzazione. La forma complessiva dell'enzima è simile ad una ciambella che circonda un canale centrale. Studi strutturali hanno suggerito che tale canale costituisce il sito più idoneo ad alloggiare la molecola di RNA a singolo filamento (Symmons et al., 2000, 2002).

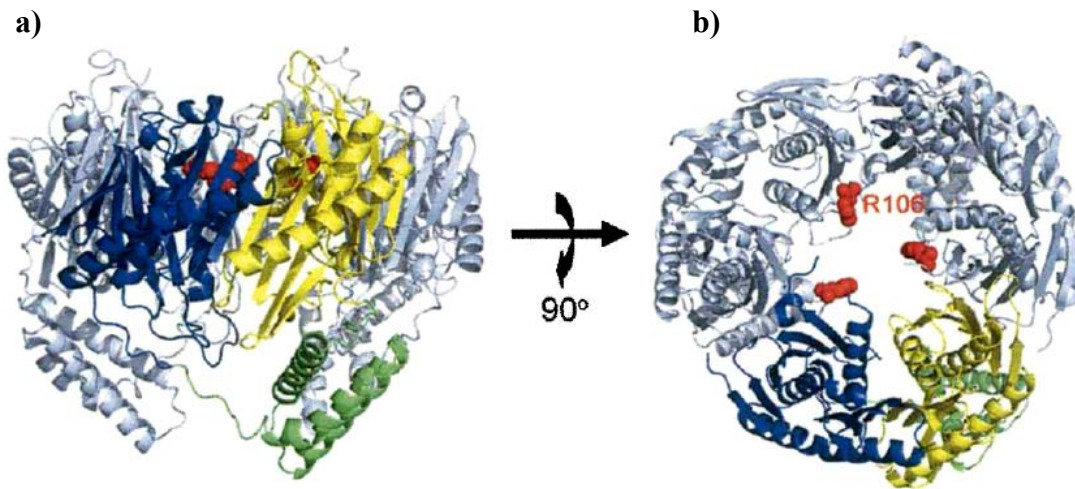


Figura I.5 - Struttura tridimensionale dell'enzima PNPasi. a) Vista laterale dell'enzima in cui uno dei monomeri appare colorato, gli altri due sono in grigio. b) Vista dall'alto dell'enzima trimerico in cui è visibile il canale centrale (Shi et al., 2008).

Dal momento in cui è stata risolta la struttura tridimensionale dell'enzima, sono stati condotti numerosi studi finalizzati ad individuarne i domini funzionali, siano essi deputati alla catalisi vera e propria, o al legame con i substrati.

Studi di mutagenesi sito diretta hanno mostrato che, nei batteri, l'attività catalitica della PNPasi risulta localizzata principalmente nel dominio *pnp2* (Jarrige et al., 2002). Nei cloroplasti i due domini *RPH-like* hanno paragonabile attività fosforolitica che, nel caso del *pnp2*, risulta dipendente da poliadenilazione (Yehudai-Resheff et al., 2003). Come anticipato in precedenza, il legame della molecola di RNA spetta principalmente ai domini KH ed S1.

Ulteriori studi hanno suggerito la possibilità che avvenga in vivo l'associazione di più strutture trimeriche a formare degli omomultimeri. In particolare, la PNPasi presente nei cloroplasti è molto probabilmente un omoesamero derivante dall'associazione di due omotrimeri (Baginsky et al., 2001).

I.4 - Ruolo della PNPasi nel catabolismo dell'mRNA

I.4.a - Introduzione

Pur essendo un enzima multifunzionale, l'attività preponderante della PNPasi consiste nel catalizzare il catabolismo fosforolitico di molecole di mRNA a singolo filamento. L'attività di fosforolisi predomina, infatti, sulle altre, probabilmente per il ruolo centrale svolto da questa via del metabolismo dell'RNA nella regolazione dell'espressione genica. Come anticipato in precedenza, infatti, nonostante la reazione sia reversibile, il bilancio polimerizzazione/fosforolisi è, a concentrazioni fisiologiche di fosfato inorganico, fortemente sbilanciato a favore di quest'ultima.

Nel paragrafo a seguire è esaminato in dettaglio il ruolo svolto dalla PNPasi nel catabolismo dell'mRNA in organismi di diversa natura.

I.4.b - Degradazione dell'RNA nei procarioti

Come esposto in precedenza, la PNPasi è parte di un importante gruppo di enzimi coinvolti nella degradazione dell'RNA: le esoribonucleasi.

L'azione di questi enzimi sulla molecola di RNA può esplicarsi in direzione 5'→3' o nel verso opposto. Nei batteri, in cui l'azione delle esoribonucleasi è sinergica a quella delle endoribonucleasi, prevale la degradazione in direzione 3'→5', i cui attori principali sono la PNPasi e la RNasi II. Come anticipato in paragrafi precedenti, la prima ha un'attività di tipo fosforolitico, la seconda di tipo idrolitico (Mian, 1997, Zuo & Deutscher, 2001).

Studi condotti su *E. coli* hanno mostrato che la PNPasi, oltre ad agire come enzima libero, è anche presente come parte di un complesso multienzimatico: il degradosoma. In *E. coli* il degradosoma è un complesso di 460-500 kDa formato da quattro enzimi: l'endoribonucleasi RNasi E, la stessa PNPasi, *RhlB* (ATPasi ed elicasi DEAD-box RNA dipendente) e l'enzima glicolitico enolasi (Carpousis et al., 1994; Py et al., 1996; Miczak et al., 1996; Carpousis, 2002). Inoltre, ci sono altri componenti minori come una polifosfato chinasi, degli *chaperon* molecolari (DnaK e GroEL) e frammenti di RNA ribosomiale la cui funzione non è stata ancora del tutto elucidata (Miczak et al., 1996; Blum et al., 1997).

In particolare, all'elicasi spetta il compito di rimuovere le strutture a *stem-loop* che potrebbero impedire l'attività della PNPasi. Sull'RNA, sottoposto all'azione dell'elicasi, agisce quindi la RNasi E che dà inizio dell'attività degradativa. In seguito, le estremità

3'-protruding, generate dall'RNasi E, sono attaccate dalla PNPasi.

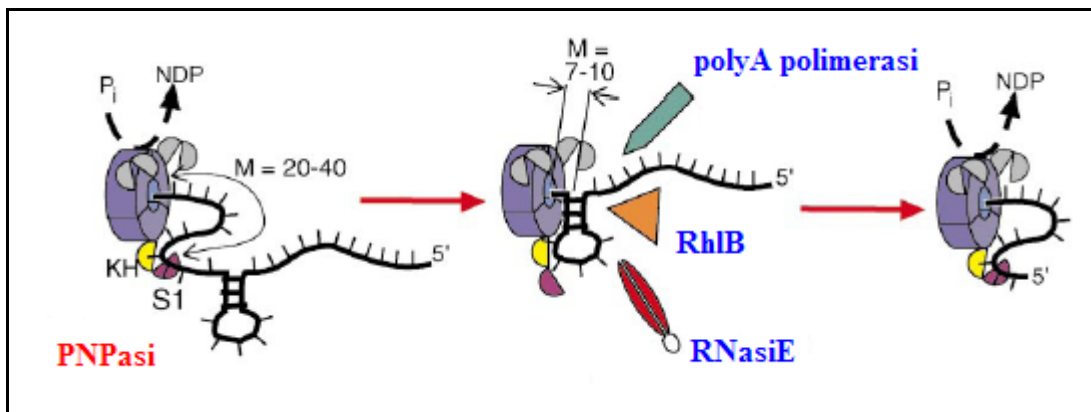


Figura I.6 - PNPasi e altri componenti del degradosoma.

L'enolasi, enzima glicolitico presente nel degradosoma, non ha una funzione nota nell'attività di processamento dell'RNA.

Quindi si può affermare che la PNPasi non è in grado di attaccare gli *stem-loop* di RNA che contengono estensioni terminali 3' di 6 nucleotidi, al contrario gli RNA stabili con un numero maggiore di residui al 3' vengono facilmente accorciati dall'enzima. Di conseguenza, la barriera per la digestione fosforolitica è rappresentata dallo stesso *stem-loop*. Ciò è ancora più evidente se si considerano i valori della K_M dell'enzima nei confronti di RNA bersaglio a singolo filamento di diversa lunghezza. L'affinità dell'enzima per il substrato è bassa nel caso di oligomeri corti (K_M compresa tra 50-250 mM), ma diventa elevata per oligomeri con lunghezza maggiore a 16 nucleotidi (K_M pari a circa 10 mM).

Come esposto in precedenza, la degradazione dell'RNA a singolo filamento è catalizzata sia dalla PNPasi che dall'RNasi II che esistono entrambe nella cellula come enzimi isolati. La capacità della PNPasi di associarsi ad altri enzimi a formare complessi multi-enzimatici, conferisce a questo enzima una elevata versatilità nell'attività degradativa, caratteristica non posseduta dalla RNasi II. La possibilità di agire in sinergia con altri enzimi fa sì che la PNPasi ovvii all'inconveniente della presenza di strutture secondarie e possa agire anche su RNA altamente strutturati.

I.4.c – Degradazione dell'RNA negli eucarioti

Negli eucarioti la degradazione dell'RNA operata dalle endoribonucleasi riveste un'importanza minoritaria, se paragonata a quella delle 3' e 5' esoribonucleasi (Jacobson & Peltz, 1996, Jacobs et al., 1998).

Come esposto in precedenza, ad oggi non è stata riscontrata la presenza dell'enzima PNPasi in cellule di lievito, considerato dagli studiosi un semplice modello di organismo eucariotico. I lieviti posseggono tuttavia una macchina degradativa dell'RNA che opera in direzione 3'→5' del tutto simile al degradosoma batterico: l'esosoma, presente anche negli eucarioti superiori e, sorprendentemente, in una forma un po' diversa negli *Archaea*. L'esosoma è un complesso multi enzimatico, a localizzazione sia citoplasmatica che nucleare, costituito da esoribonucleasi, molte delle quali omologhe all'RNasi PH, come la stessa PNPasi. Studi comparativi tra la struttura dell'esosoma e quella del degradosoma hanno evidenziato che ai sei domini *RPH like*, presenti nella PNPasi omotrimerica del degradosoma, corrispondono sei esoribonucleasi omologhe all'RNasi PH nell'esosoma. Inoltre è stata riscontrata la presenza di subunità contenenti domini S1 di legame all'RNA posizionati sulla superficie di una struttura ad anello delineata dall'interazione tra le esoribonucleasi (Mitchell & Tollervey, 2000; Raijmakers et al., 2002; Symmons et al., 2002).

Ciò ha permesso di ipotizzare una medesima funzione per il degradosoma batterico e l'esosoma di lievito.

L'esosoma è deputato al catabolismo dell'RNA 5.8S, degli snoRNA (*small nucleolar RNA*) e degli snRNA (*small nuclear RNA*), così come al meccanismo di *mRNA decay* (par. I.5) in direzione 3'→5' (Allmang et al., 1999).

Nel *pathway* degradativo 5'→3' agisce invece l'esonucleasi codificata dal gene *XRNI*.

A livello mitocondriale, nelle cellule di lievito è presente un complesso di 265 kDa formato dall'associazione 3'-esoribonucleasi NTP dipendenti ed elicasi (Min & Zassenhaus, 1991,1993).

La PNPasi fu ritenuta essere una proteina esclusivamente batterica fino al suo isolamento nei cloroplasti di *Spinacia oleracia*. In particolare, nei cloroplasti è stato identificato un complesso simile al degradosoma, che risulta tuttavia costituito dalla sola PNPasi, le cui subunità sembrerebbero associate a formare un omomultimero (Baginsky et al., 2001).

In seguito è stata riscontrata la presenza della PNPasi anche in altri organismi eucariotici come il *Mus musculus* e l'*Homo sapiens* (Leszczyniecka et al., 2002, 2003, 2004; Raijmakers et al., 2002).

L'individuazione della sua localizzazione sub-cellulare ha permesso di classificare questo enzima quale proteina di pertinenza del compartimento mitocondriale o cloroplastico, avvalorando ulteriormente la teoria endosimbiontica alla base dell'origine di tali organelli citoplasmatici. Esiste infatti anche una certa omologia funzionale tra PNPasi batteriche e PNPasi cloroplastiche. In entrambi i casi, infatti, all'attività propriamente fosforolitica si affianca un'attività poli(A) polimerasica. L'aggiunta di code di poli(A) agli RNA in degradazione è un processo comune a batteri, cloroplasti e mitocondri di cellule vegetali. In assenza dell'enzima specifico cui compete la catalisi di tale polimerizzazione: la poli(A) polimerasi, questo ruolo è assolto dalla PNPasi. Ciò si verifica nei cloroplasti; negli altri casi l'attività poli(A) polimerasica della PNPasi si affianca a quella della poli(A) polimerasi (Schuster et al., 1999, Regnier & Arraiano, 2000).

I.5 - Mediazione dell'adattamento al freddo

Sono in corso numerosi studi finalizzati a delucidare in quali processi fisiopatologici intervenga questo enzima multifunzionale. Uno dei primi ruoli che gli sono stati attribuiti si inserisce nel complesso meccanismo dell'adattamento degli organismi alle basse temperature in seguito a *shock* termico.

Un abbassamento repentino della temperatura comporta a livello cellulare cambiamenti nell'espressione genica, che fanno parte del meccanismo noto come risposta allo *shock* da freddo (*cold shock response*). La *cold shock response* è una complessa serie di eventi che si attivano in risposta alla crisi improvvisa dei valori di temperatura, non limitata agli organismi psicrofili. Essa è infatti parte integrante dell'adattamento al freddo di un qualsiasi organismo. Il risultato finale è la sintesi delle proteine dello *shock* da freddo o CSPs che fanno parte transitoriamente del *pool* proteico della cellula, fino a che i valori di temperatura non si stabilizzano (Jones et al., 1987; Yamanaka, 1999). Altra classe di proteine è quella delle *cold acclimation proteins* che fanno parte del normale *pool* proteico cellulare degli organismi che crescono in regimi di bassa temperatura.

In particolare, le CSPs regolano la sintesi proteica, agendo a vari livelli nel percorso che dal DNA porta all'mRNA e, infine, alle proteine. Esse sono coinvolte nelle fasi di

terminazione della trascrizione, di inizio della traduzione, nella traslazione; ad alcune di esse è inoltre attribuita la funzione di *chaperon* molecolari come GroEL (Tosco et al., 2003) o DnaK (Yoshimune et al., 2005), aventi il ruolo specifico di prevenire la formazione della struttura secondaria dell'RNA messaggero (mRNA). E' documentata anche una loro capacità di agire nella decarbossilazione del piruvato e nel superavvolgimento del DNA (Jones & Inouye, 1996); alcune, inoltre, hanno attività proteasica, altre intervengono nella regolazione della fluidità di membrana.

A differenza di quanto avviene per i messaggeri dei geni *housekeeping*, l'mRNA di molte CSPs ha una sequenza a valle della regione codificante che è complementare ad un tratto specifico dell'rRNA 16S, che aiuta ad assicurare che avvenga la fase di traslazione anche alle basse temperature.

Per quanto concerne le CAPs, come detto in precedenza, la loro sintesi è indotta permanentemente durante la crescita alle basse temperature, di conseguenza esse fanno parte del normale *pool* proteico degli psicrofili.

La PNPasi è un importante mediatore dell'adattamento degli organismi al freddo.

In condizioni normali di temperatura, l'espressione delle CSPs è soppressa a livello post-trascrizionale attraverso una spiccata attività degradativa nei confronti dei rispettivi mRNA. Questo meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale è noto come *mRNA decay*.

Al diminuire della temperatura si osserva una progressiva stabilizzazione dei trascritti, cui consegue la comparsa delle CSPs nel citoplasma. Studi specifici hanno dimostrato che la permanenza nel citoplasma degli mRNA delle CSPs non sarebbe da associare alla acquisizione di una maggiore resistenza alla degradazione degli stessi, quanto piuttosto alla inefficienza della macchina degradativa causata dallo *shock* termico. Per prevenire che si abbia un pericoloso accumulo di mRNA *cold shock*, a causa del perdurare delle condizioni di bassa temperatura, è necessario che si realizzi l'induzione/attivazione di un nuovo meccanismo degradativo. Infatti, al termine della fase di acclimatazione l'espressione delle CSPs è ridotta e incrementa di pari passo la sintesi del normale *pool* proteico, atto a garantire la ripresa delle normali funzioni cellulari (Thieringer et al., 1998).

A fungere da interruttore tra la fase di *shock* e quella di adattamento ci sono la PNPasi e la DeaD RNA elicasi che, come visto in precedenza, possono agire come proteine isolate o in qualità di componenti di complessi multi-enzimatici.

In particolare, l'espressione della PNPasi è indotta essa stessa dallo *shock* termico e la presenza di questo enzima è necessaria a garantire la sopravvivenza alle basse temperature (Beran & Simons, 2001). La PNPasi induce la degradazione selettiva degli mRNA delle CSPs, ma non di quelli codificanti altre proteine (Yamanaka & Inouye, 2001).

Il gene codificante la PNPasi (*pnp*) fa parte di un operone, di conseguenza nel citoplasma della cellula possono essere presenti mRNA mono e policistronici (Médigue et al. 2005). L'espressione del gene *pnp* è sottoposta a regolazione post-trascrizionale ad opera della stessa PNPasi (Jarrige et al., 2001; Robert-Le Meur & Portier, 1994;); nella fase di adattamento al freddo questo meccanismo è transitoriamente soppresso, di conseguenza si riscontra un incremento della concentrazione di mRNA codificante la PNPasi, principalmente dovuto ad una stabilizzazione del prodotto della trascrizione (Zangrossi et al., 2000; Mathy et al., 2001; Beran & Simons, 2001).

CAPITOLO II

Scopo della Ricerca

II.1 - Introduzione

Gli estremofili sono organismi adattati a vivere in condizioni ambientali restrittive: pH estremamente elevati o bassi (alcalofili e acidofili, rispettivamente), alta concentrazione di sali (alofili), alta pressione idrostatica (barofili) e alta (termofili e ipertermofili) o bassa (psicrofili) temperatura. L'adattamento degli estremofili a condizioni tanto "inospitali" per la vita è il frutto di un lungo processo evolutivo che li ha dotati di macromolecole fortemente adattate, che spesso risultano funzionali solo nell'*habitat* di pertinenza delle specie cui appartengono.

L'adattamento delle proteine alle temperature estreme, e il risultante effetto sulla stabilità e le proprietà catalitiche di queste molecole, sono stati descritti in molti lavori scientifici (D'Amico et al., 2003; Feller & Gerday, 1997).

I dati ottenuti indicano che la temperatura ottimale per gli enzimi rappresenta un compromesso tra la loro inattivazione termica e la velocità (o l'efficienza) della reazione catalizzata. Tuttavia, l'attività e la stabilità sono strettamente correlate; infatti gli enzimi termofili sono molto termostabili e acquisiscono un'efficienza catalitica funzionale solo alle alte temperature.

Più di recente, l'attenzione di molti studiosi è stata focalizzata sugli enzimi isolati da organismi psicrofili, quindi adattati al freddo, che sono caratterizzati dall'aver un'elevata efficienza catalitica a temperature alle quali la maggior parte degli enzimi mesofili, e tutti quelli termofili, mostrano un'attività scarsa o addirittura nulla. Inoltre, essi possiedono la capacità di andare incontro a cambiamenti conformazionali che favoriscono l'interazione con il substrato, compensando in tal modo lo scarso tasso di attività catalitica atteso alle basse temperature. Tuttavia, una tale flessibilità è responsabile di una marcata instabilità alla denaturazione, caratteristica comune delle proteine adattate al freddo.

II.2 – La PNPasi da *Pseudoalteromonas haloplanktis*

Gli enzimi psicrofili costituiscono un'importante classe di proteine nella quale può essere studiato il binomio struttura-funzione, anche attraverso il confronto con le controparti mesofile e termofile.

La PNPasi può essere considerata una molecola idonea per tale tipo di indagine, dal momento che è un enzima pressoché ubiquitario e le sue proprietà strutturali e funzionali sono state studiate in un'ampia varietà di organismi.

Questo enzima è un importante mediatore dell'adattamento degli organismi al freddo. Essa risulta infatti coinvolta nella degradazione dell'mRNA delle *cold shock proteins* durante la fase di transizione tra lo *shock* da freddo e l'adattamento vero e proprio dell'organismo alle nuove condizioni ambientali. La PNPasi, tuttavia, è una proteina multifunzionale; oltre alla capacità degradativa le sono infatti state attribuite numerose altre attività (Cap. I). Nello svolgimento delle proprie funzioni questo enzima interagisce con molteplici componenti cellulari, tra i quali i singoli nucleotidi, mRNA e rRNA, molecole polinucleotidiche, altri enzimi.

La caratterizzazione della PNPasi isolata da un microrganismo adattato al freddo potrà, dunque, estendere la nostra conoscenza sulle basi molecolari responsabili della stabilità delle proteine di origine psicrofila e sulla relazione struttura-funzione.

Inoltre, essendo una proteina enzimatica presente nella quasi totalità degli organismi viventi, la sequenza amminoacidica della PNPasi potrebbe essere usata come mezzo per contribuire a stabilirne le relazioni filogenetiche.

In questo lavoro di Tesi Sperimentale è descritta la caratterizzazione biochimica dell'enzima PNPasi isolato da *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (*Ph*), un eubatterio Gram-negativo isolato da sedimenti marini dell'Antartico in grado di crescere nell'intervallo di temperatura 4-20°C (Birolo et al., 2000).

Questo batterio è da molti studiosi considerato un vero e proprio laboratorio vivente, in quanto rappresenta un semplice modello di studio che esemplifica tutti gli adattamenti molecolari e biochimici della cellula alle basse temperature. *P. haloplanktis* ha infatti la capacità di rispondere agli *shock* termici mediante la produzione di proteine inducibili "GroEL-simili" (Tosco et al., 2003) e proteine antigelo, o AFPs, capaci di legarsi ai cristalli di ghiaccio (Tosco et al., 2003; D'Amico et al., 2006). Inoltre, in questo batterio la temperatura di crescita ha influenza sulla sintesi di lipo-oligosaccaridi ed esopolisaccaridi (EPSs), nonché di alcuni componenti lipidici di membrana (Corsaro et al., 2002, 2004). Molti tetralosi ed esopolisaccaridi potrebbero agire da crioprotettori

prevenendo fenomeni di aggregazione e denaturazione da freddo (D'Amico et al., 2006). Precedenti studi hanno elucidato le proprietà biochimiche di altre proteine enzimatiche isolate dalla medesima fonte: β -galattosidasi (Hoyoux et al., 2001), aspartato amminotransferasi (D'Amico et al., 2003), α -amilasi (Tutino et al., 2002; Srimathi et al., 2007) e EF-G (Ruggiero et al., 2007).

CAPITOLO III

Materiali e Metodi

III.1 - Materiali

Le resine cromatografiche Q-sepharose, Mono QTM 5/50 GL, Hi Prep 16/10 Phenyl FF, Superdex 200 10/300 GL, sono state acquistate dalla GE Healthcare. Il [³H]GDP (11 Ci/mmol) era della Amersham. La Guanosina difosfato (GDP), il NAD⁺, l'acido poliadenilico [poli(A)], il D-(+)-glucosio, il fosfoenolpiruvato (PEP), il sodio dodecilsolfato (SDS), la piruvato chinasi di tipo II da muscolo di coniglio (PK), l'esochinasi di tipo C-300 da lievito del pane (EK), la glucosio-6-fosfato deidrogenasi da *Leuconostoc mesenteroides* (G6PDH) e le proteine standard di peso molecolare erano della Sigma-Aldrich. Il materiale per l'elettroforesi ed i relativi standard proteici per SDS-PAGE erano della Bio-Rad. I restanti reagenti erano tutti di grado analitico.

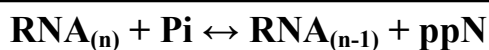
Sono stati utilizzati i seguenti tamponi:

- tampone A, 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl₂, 20 µg/mL poli(A), 1.5 mM PEP, 20 mM glucosio, 0.5 mM NAD⁺, 10 mM fosfato;
- tampone B, 20 mM Tris-HCl pH 7.8;
- tampone C: tampone B supplementato con 10 mM MgCl₂ e 50 mM KCl;
- tampone D: tampone B supplementato con 5 mM MgCl₂ e 10% Glicerolo.

Il ceppo di *P. haloplanktis* è stato gentilmente fornito dal Prof. C. Gerday (Università di Liegi, Belgio).

III.2 - Dosaggio enzimatico

L'attività enzimatica della PNPasi è stata dosata utilizzando sia un metodo spettrofotometrico che un dosaggio di tipo radioisotopico basati, l'uno sulla capacità dell'enzima di catalizzare la degradazione dell'ssRNA, l'altro la sua polimerizzazione.



III.2.a - Dosaggio spettrofotometrico

Durante il percorso di purificazione, la presenza della *Ph*PNPasi è stata rilevata fondamentalmente sfruttando la sua capacità di catalizzare il catabolismo fosforolitico del poli(A), adattando un dosaggio fotometrico riportato in letteratura (Fontanella et al., 1999).

1 mL della miscela di reazione standard conteneva: 0.6 U/mL PK, 2 U/mL HK e 4 U/mL G6PDH in tampone A. La reazione era fatta partire con l'aggiunta di una quantità appropriata del campione enzimatico ed era seguita in cinetica ad una temperatura controllata di 15°C, misurando l'incremento del valore dell'assorbanza a 340 nm, dovuto alla formazione del NADH.

In particolare, la tecnica di dosaggio si basa sul seguente schema di reazioni:

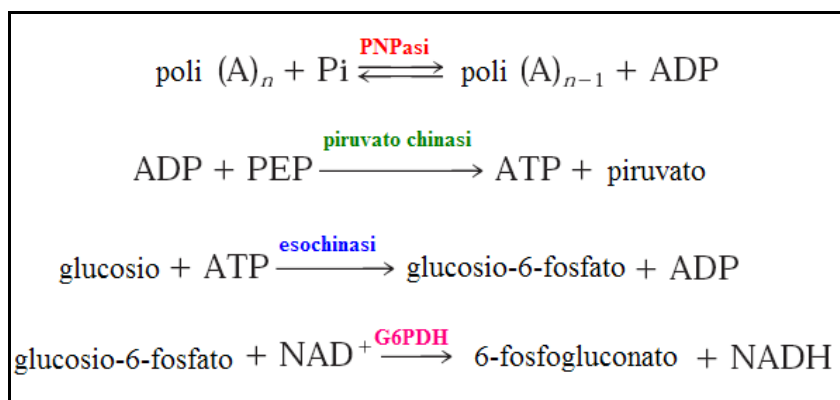


Figura III.1- Schema di reazioni del dosaggio spettrofotometrico.

Il tasso di comparsa dell'ADP è dato dalla seguente equazione:

$$\frac{d[\text{ADP}]}{dt} = A_{\text{PN}} - A_{\text{PK}} + A_{\text{HK}} \quad [1]$$

dove t è il tempo di reazione, A_{PN} è l'attività della PNPasi, A_{PK} è la quota di ADP sottratta dalla piruvato chinasi, e A_{HK} è la quantità di ADP generata dall'esochinasi. Poiché l'attività della piruvato chinasi è limitante rispetto all'attività dell'esochinasi, A_{HK} è uguale a A_{PK} e l'equazione di cui sopra diventa

$$\frac{d[\text{ADP}]}{dt} = A_{\text{PN}} \quad [2]$$

la cui forma integrata è

$$[\text{ADP}] = A_{\text{PN}} t + [\text{ADP}]_0 \quad [3]$$

Dove $[\text{ADP}]_0$ è la concentrazione di partenza dell'ADP, quando $t = 0$. Tuttavia, $[\text{ADP}]_0$ può essere approssimata a 0 poiché l'estratto cellulare è dializzato lungamente prima del dosaggio. Quindi l'equazione diventa

$$[\text{ADP}] = A_{\text{PN}} t \quad [4]$$

Tuttavia, il tasso di reazione, valutato misurando la comparsa di NADH, uguaglia il tasso della reazione catalizzata dalla piruvato chinasi, a causa del fatto che l'attività di questo enzima è limitante rispetto a quella sia dell'esochinasi che della glucosio-6-fosfato deidrogenasi. Se si assume che la K_M della piruvato chinasi per l'ADP (0.3 mM) è molto più alta della concentrazione del nucleotide in condizioni sperimentali, il tasso di reazione sarà dato da:

$$\frac{d[\text{NADH}]}{dt} = V_{\text{PK}} / K_{\text{PK}} [\text{ADP}] \quad [5]$$

dove V_{PK} e K_{PK} sono, rispettivamente, la velocità massima apparente e la K_M . Se l'equazione [4] è sostituita nell'equazione [5] si ottiene:

$$\frac{d[\text{NADH}]}{dt} = (V_{PK} / K_{PK}) A_{PN} t \quad [6]$$

che integrata diventa:

$$[\text{NADH}] = (V_{PK} A_{PN} / 2K_{PK}) t^2 + [\text{NADH}]_0 \quad [7]$$

Dato che, al tempo 0, il NADH è assente, l'equazione [7] può essere riscritta come segue:

$$[\text{NADH}] = (V_{PK} A_{PN} / 2K_{PK}) t^2 \quad [8]$$

Dall'equazione di cui sopra risulta che, mettendo in grafico la [NADH] in funzione del t^2 , si osserva tra le due grandezze una relazione lineare, con una pendenza proporzionale sia all'attività della PNPasi che della piruvato chinasi.

In queste condizioni sperimentali è stata messa in evidenza l'esistenza di una relazione di linearità tra la quantità di *Ph*PNPasi aggiunta alla miscela di reazione e la quantità di NADH formato.

L'attività enzimatica è stata espressa come $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-2}$ (Fontanella et al, 1999).

III.2.b - Dosaggio radioisotopico

Il dosaggio radioisotopico, utilizzato per la caratterizzazione biochimica della *Ph*PNPasi, si basa sulla capacità dell'enzima di catalizzare la sintesi di poliribonucleotidi.

La miscela di reazione standard conteneva 20 μM [^3H]GDP (s.a. 800-1200 cpm/pmol) e 1 mg/mL poli(A) in 300 μL di tampone C; la reazione, condotta a una temperatura di 15°C, era fatta partire con l'aggiunta di quantità appropriate di *Ph*PNPasi.

A prestabiliti intervalli di tempo erano prelevate aliquote di 40 μL che erano diluite in 900 μL di 10% acido tricloroacetico (TCA) freddo e quindi filtrate su nitrocellulosa. I filtri erano quindi lavati due volte con 10% TCA freddo, asciugati e sottoposti a conta della radioattività utilizzando un contatore a scintillazione liquida Tri-Carb 1500 (Packard). La formazione di poliribonucleotidi era valutata nel primo minuto di reazione, lasso di tempo in cui la quantità di poli([^3H]G) sintetizzato dalla *Ph*PNPasi è in relazione lineare con il tempo di incubazione.

L'attività specifica dell'enzima era riportata come moli di poli($[^3\text{H}]\text{G}$) polimerizzato/s/moli di *PhPNPasi*.

III.3 - Coltura delle cellule di *P.haloplanktis* ed estrazione del contenuto cellulare

Le cellule di *P. haloplanktis*, ceppo TAC125, venivano cresciute a 4°C per 3 giorni nel brodo di coltura LB e raccolte durante la fase esponenziale di crescita (Masullo et al., 2000).

Le cellule ottenute da una coltura di 10 L (35-40 g di pasta cellulare umida) venivano risospese nel tampone D (3 mL di tampone di lisi/g di cellule) e sottoposte a lisi meccanica effettuata con un distruttore cellulare (Costant Systems Ltd., UK) a 0,15 MPa.

Immediatamente dopo la lisi era aggiunto un inibitore delle proteasi, il PMSF, alla concentrazione finale pari a 1 mM. L'omogenato cellulare veniva quindi centrifugato a 4°C a 30000 g per 60 minuti, in modo da rimuovere i detriti cellulari e le cellule non lisate.

Il sovrnatante ottenuto (S-30) era ultracentrifugato a 100000 g per 2,5 ore alla temperatura di 4°C, ricavando il sovrnatante post-ribosomale (S-100).

III.4 - Purificazione della *PhPNPasi*

La *PhPNPasi* era isolata dal supernatante post-ribosomale di una pasta cellulare di *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125 preparata come precedentemente riportato.

La frazione S-100 era dializzata contro tampone B supplementato con 50 mM NaCl e applicata su una colonna Q-sepharose (60 x 1.6 cm), equilibrata con il medesimo tampone. La *PhPNPasi* era eluita con un gradiente lineare 50-500 mM NaCl in tampone B (volume totale 1200 mL), ad una velocità di flusso pari a 2.5 mL/min.

L'attività della *PhPNPasi* era ricercata nelle frazioni ottenute utilizzando il metodo spettrofotometrico descritto precedentemente (paragrafo III.2.a). Le frazioni risultate positive al dosaggio erano quindi esaminate mediante SDS-PAGE, riunite e dializzate contro tampone B supplementato con 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Il campione era quindi applicato su una colonna Hi Prep 16/10 Phenyl-sepharose FF equilibrata con lo stesso tampone

utilizzato per la dialisi. Le proteine legate alla resina erano eluite con un gradiente lineare inverso 1-0.02 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in tampone B (volume totale 300 mL) ad una velocità di flusso di 3 mL/min.

Le frazioni attive erano riunite e dializzate contro tampone B supplementato con 120 mM NaCl e quindi applicate su una colonna MonoQTM 5/50 GL equilibrata con lo stesso tampone della dialisi. La *PhPNPasi* era eluita con un gradiente lineare 120-400 mM NaCl in tampone B (volume totale 40 mL), ad una velocità di flusso di 1 mL/min. Le frazioni contenenti la *PhPNPasi* purificata all'omogeneità erano riunite, concentrate, dializzate contro tampone B supplementato con 40% glicerolo e conservate a -20°C fino al momento dell'uso. Seguendo questa procedura erano ottenuti circa 660 µg di *PhPNPasi* purificata partendo da 700 mg di proteine citosoliche estratte.

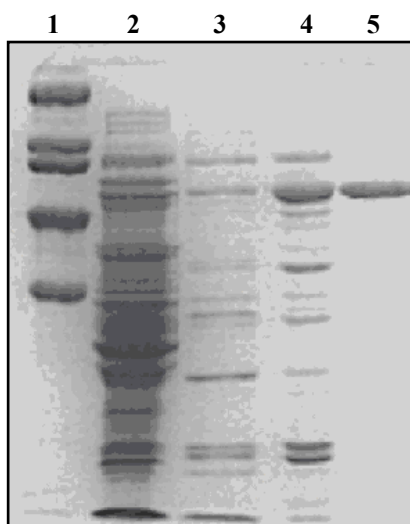


Figura III.2 - Analisi SDS-PAGE del percorso di purificazione:

- # 1: marker di peso molecolare miosina (M_r 200000), β -galattosidasi (M_r 116250), fosforilasi B (M_r 97400), albumina di siero bovino (BSA, M_r 66200) e ovalbumina (M_r 45000);
- # 2: Estratto cellulare (Campione Applicato su Q-sepharose);
- # 3: Campione Applicato su Phenil-Sepharose;
- # 4: Campione Applicato su Mono-Q;
- # 5: *PhPNPasi* purificata all'omogeneità.

III.5 - Determinazione della massa molecolare della *PhPNPasi*

Il peso molecolare in condizioni denaturanti è stato determinato mediante SDS-PAGE al 10% utilizzando un *Mini-PROTEAN electrophoresis system* (Bio-Rad).

Dopo le corse, il gel era colorato con Coomassie Brilliant Blue R-250. Le proteine utilizzate come standard di peso molecolare erano: miosina (M_r 200000), β -galattosidasi (M_r 116250), fosforilasi B (M_r 97400), albumina di siero bovino (BSA M_r 66200) e ovalbumina (M_r 45000).

Il peso molecolare della *PhPNPasi* in condizioni native è stato determinato mediante cromatografia per esclusione molecolare realizzata su una colonna Superdex 200 10/300 GL connessa ad un sistema FPLC computerizzato (GE Healthcare).

La colonna era equilibrata ad una temperatura di 4°C con tampone B contenente 100 mM KCl, mantenendo una velocità di flusso di 0.5 mL/min. La calibrazione era effettuata applicando separatamente 0.5-1.5 μ g delle seguenti proteine standard risospese in 100 μ L del tampone di eluizione: alcol deidrogenasi (M_r 282000), miosina (M_r 200000), fosforilasi B (M_r 97400), transferrina (M_r 80000), BSA (M_r 69000) e ovalbumina (M_r 46000).

III.6 - Determinazione della sequenza N-terminale della *PhPNPasi*

La sequenza amminoacidica N-Terminale della *PhPNPasi* purificata è stata determinata attraverso una degradazione di Edman graduale, effettuata con un sequenziatore automatico di proteine (Applied Biosystem), usando un campione della proteina trasferito su una membrana di PVDF (Amersham).

III.7 - Parametri Cinetici

I parametri cinetici della *PhPNPasi* sono stati derivati a 15°C, determinando la velocità di polimerizzazione del [3 H]G in funzione di differenti concentrazioni di [3 H]GDP (1-50 μ M; s.a. 3044 cpm/pmol). I dati sono stati analizzati con il metodo di Lineweaver-Burk, usando i valori medi di almeno tre esperimenti. L'errore standard non superava in nessun caso il 5-8%.

III.8 - Effetto dei cationi monovalenti sull'attività della *PhPNPasi*

E' stata valutata l'influenza sull'attività polimerasica della *PhPNPasi* di cationi monovalenti aggiunti nell'ambiente di reazione come sali di cloro. In particolare è stata valutata la capacità stimolatoria dei seguenti cationi: Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ e NH_4^+ .

III.9 - Termofilicità della *PhPNPasi*

L'effetto della temperatura sull'abilità della *PhPNPasi* di promuovere la sintesi di poli(^3H)G è stato misurato nell'intervallo di temperature compreso tra 0-55°C. La miscela di reazione, dal volume di 250 μL preparato in tampone C, conteneva 5.8 μM ^3H GDP (s.a. 1853 cpm/pmol), 1 mg/mL poli(A) e 47 pmol di *PhPNPasi*. La reazione era seguita in cinetica; ad appropriati intervalli di tempo, dalle miscele di reazione venivano prelevate aliquote di 40 μL che venivano quindi trattate come riportato nel Paragrafo III.2.b.

III.10 - Stabilità termica della *PhPNPasi*

La stabilità termica della *PhPNPasi* è stata valutata sia con cinetiche di inattivazione termica che con curve spettroscopiche di *melting*.

Negli esperimenti di inattivazione termica, una soluzione della proteina ad una concentrazione di 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ veniva esposta a differenti temperature (30-70°C) e, a prestabiliti intervalli di tempo, erano prelevate delle aliquote che erano immediatamente raffreddate in ghiaccio per almeno 30 minuti. L'attività residua della *PhPNPasi* era determinata alla temperatura di 15°C utilizzando il dosaggio spettrofotometrico riportato in precedenza (paragrafo III.2.a). Il valore della costante di inattivazione termica (k_{in}) ad ogni temperatura è stato determinato misurando l'attività residua dopo incubazione (A_t); è stata attribuita attività pari al 100% ad un campione di *PhPNPasi* conservato a 0°C durante tutto il corso dell'esperimento (A_0). I dati sono stati quindi analizzati secondo una cinetica di I ordine.

La denaturazione al calore della *PhPNPasi* è stata valutata con curve UV di *melting*, misurando la differenza tra i valori di assorbanza a 274 nm and 286 nm ($A_{274}-A_{286}$) nell'intervallo di temperature compreso tra 10-60°C, utilizzando uno spettrofotometro Cary 1E dotato di controllo elettronico della temperatura (Varian).

L'incremento di temperatura era impostato a 0.2°C/min. La differenza $A_{274}-A_{286}$, valutata per ogni grado di incremento termico, è stata posta in grafico in funzione della temperatura.

III.11 - Modello tridimensionale della *Ph*PNPasi

La sequenza amminoacidica del monomero della *Ph*PNPasi è stata inserita sul server SwissModel (Peitsch, 1996), e la sua struttura tridimensionale è stata determinata utilizzando le strutture tridimensionali note di 40 differenti PNPasi. Il modello tridimensionale ottenuto è stato visualizzato utilizzando il software RasMol (Bernstein, 2000) e MolMol (Koradi et al., 1996).

III.12 - Relazione tra composizione amminoacidica delle PNPasi e temperatura ottimale di crescita

Per questo studio sono stati considerati 75 microrganismi di origine eubatterica e archeobatterica, selezionati in base alla loro diversa temperatura ottimale di crescita.

Il valore della T_{opt} di ciascun microrganismo è stato ottenuto dalla sezione *GenomeProject* del sito web www.pubmed.com o dal sito www.microbewiki.keyon.edu; le sequenze amminoacidiche delle rispettive PNPasi sono state ricavate dal sito BRENDA *Enzyme Database (the Comprehensive Enzyme Information System)*.

Dalla composizione amminoacidica delle suddette proteine sono stati ricavati i valori di idrofobicità media (Kyte & Doolittle, 1982) e di massa relativa/residuo amminoacidico utilizzando le seguenti equazioni:

$$\text{Massa relativa media} = \frac{\sum_{i=1}^{i=20} (\text{massa}_{\text{aai}} \times N_{\text{aai}})}{N}$$

$$\text{Idrofobicità media} = \frac{\sum_{i=1}^{i=20} (\text{idrofobicità}_{\text{aai}} \times N_{\text{aai}})}{N}$$

dove $mass_{aa_i}$ e idrofobicità $_{aa_i}$ sono i valori della massa molecolare e dell'idrofobicità di un generico amminoacido i , n_{aa_i} è il numero di volte in cui tale residuo compare nella struttura primaria e N rappresenta il numero totale degli amminoacidi di ogni singola catena polipeptidica.

I valori di massa relativa media e di idrofobicità media ottenuti per ciascuna PNPasi, sono stati riportati in grafico in funzione delle temperature di crescita dei rispettivi microrganismi.

E' stata pertanto determinata la relazione esistente tra i parametri considerati e le diverse temperature di crescita dei microrganismi (De Vendittis et al., 2008).

Inoltre, utilizzando il programma ProtParam (Gasteiger et al., 2005), è stato calcolato per ciascuna sequenza amminoacidica l'Indice Alifatico (*Aliphatic Index*), fattore correlato alla termostabilità (Ikai, 1980). Anche in questo caso i valori ottenuti sono stati posti in grafico in funzione della T_{opt} per evidenziare la relazione esistente fra le due variabili .

III.13 - Altri metodi

L'SDS-PAGE era effettuata su un gel di poliacrilammide al 10% secondo il metodo descritto da Laemmli (Laemmli, 1970).

La concentrazione dei campioni proteici era stimata con il metodo di Bradford (Bradford, 1976), utilizzando albumina di siero bovino come standard.

L'analisi di sequenza, gli allineamenti e la predizione di struttura secondaria, terziaria e dei domini funzionali sono stati realizzati con l'ausilio di un sistema di *software* dedicati all'analisi di sequenze amminoacidiche che utilizzano i programmi PALIGN (Myers & Miller, 1988), CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988), ProfSec (Rost et al., 2004), e Prosite (Hulo et al., 2007).

CAPITOLO IV

Risultati e Discussione

IV.1 - Proprietà molecolari della *Ph*PNPasi

Il peso molecolare della *Ph*PNPasi purificata all'omogeneità è stato determinato sia in condizioni native che denaturanti. L'analisi in condizioni native, effettuata mediante la cromatografia per esclusione molecolare, ha rivelato una massa molecolare di circa 255000 Da (Fig. IV.1 A), mentre la determinazione effettuata attraverso SDS-PAGE ha permesso di attribuire alla proteina una massa molecolare di 79000 Da (Fig. IV.1 B). Ciò ha permesso di concludere che la *Ph*PNPasi è una proteina omotrimerica, proprietà già riportata per le altre PNPasi sinora caratterizzate. Il valore più elevato del peso molecolare determinato con la gel filtrazione, rispetto a quello calcolato sulla base della struttura primaria (M_r , 227000; Médigue et al., 2005), può essere imputato ad una conformazione meno compatta della PNPasi di origine psicrofila, rispetto alle proteine di origine mesofila utilizzate per la calibrazione della colonna. Questo particolare comportamento è stato già riportato per altre proteine isolate dallo stesso microrganismo (Masullo et al., 2000; De Vendittis et al., 2008).

La sequenza dei primi 15 residui amminoacidici della proteina purificata è stata determinata come descritto nel Paragrafo III.6, risultando QAIKEFQLGHTVTL. Questa sequenza N-terminale è sovrapponibile a quella presente nella banca dati TREMBL ottenuta traducendo la sequenza del gene presente nel genoma di *P. haloplanktis*, codificante la putativa PNPasi (Médigue et al 2005). L'unica eccezione riscontrata è quella relativa alla metionina iniziale, residuo che risulta presente nella sequenza depositata, ma è assente nella proteina purificata.

L'allineamento multiplo tra la sequenza amminoacidica della *Ph*PNPasi e quella dell'omologo enzima di origine mesofila, *Ec*PNPasi (da *Escherichia coli* T_{opt} 37°C) e termofila, *Te*PNPasi (da *Thermoanaerobacter ethanolicus* T_{opt} 60°C), riportato in Fig. IV.2, ha messo in evidenza un'identità di sequenza rispettivamente del 70,9% e 49,1%. L'analisi comparativa delle tre composizioni amminoacidiche percentuali ha mostrato

un più elevato contenuto di Gly e un ridotto contenuto in Pro e Arg nell'enzima psicrofilo. Inoltre la *PhPNPasi* ha un numero inferiore di residui carichi sia positivamente (Arg + Lys) che negativamente (Asp + Glu) rispetto alla *EcPNPasi* e ancor più rispetto alla *TePNPasi*. E' stato riscontrato invece un andamento opposto per i residui polari non carichi, il cui numero decresce progressivamente procedendo dalla *PhPNPasi* alla *EcPNPasi* e infine alla *TePNPasi* (rispettivamente 126, 124 e 92 residui totali polari non carichi). Di conseguenza è possibile concludere che l'adattamento della PNPasi alle basse temperature potrebbe aver implicato piccole variazioni nella struttura primaria il cui risultato è una riduzione del numero di coppie ioniche e un maggior numero di residui polari (Farias & Bonato, 2003; Haney et al., 1999).

Inoltre è stato condotto uno studio bioinformatico finalizzato a chiarire se, come è stato evidenziato per altre proteine (De Vendittis et al., 2008), anche per la PNPasi esista una particolare correlazione tra alcuni parametri relativi alla composizione amminoacidica, quali l'idrofobicità media (GRAVY - *Grand Average of Hydropathy*; Kyte & Doolittle, 1982), il peso molecolare medio/residuo amminoacidico e l'indice alifatico (Ikai, 1980), e la temperatura di crescita. In particolare, è stato effettuato uno studio comparativo basato sull'analisi della composizione amminoacidica di PNPasi appartenenti a 75 microrganismi (sia di origine eubatterica che archaeobatterica), elencati in Tabella IV.1, caratterizzati da diverse temperature ottimali di crescita.

I valori relativi ai parametri di cui sopra sono stati riportati in grafico in funzione della temperatura di crescita del rispettivo microrganismo. Come si può osservare dai grafici (Fig. IV.3), il peso molecolare medio (A) dei residui amminoacidici aumenta all'aumentare della temperatura di crescita del microrganismo, così come avviene anche per l'indice alifatico, indicatore della termostabilità complessiva della proteina (C). Andamento opposto si osserva invece per l'idrofobicità media (B). Il primo dato è in linea con quanto osservato in studi precedenti, il secondo è in contrapposizione con l'andamento osservato su altre proteine (De Vendittis et al., 2008).

In entrambi i grafici, la dispersione dei dati si è adattata bene ad una regressione lineare. In particolare, l'analisi secondo il test di significatività ha indicato che le regressioni lineari sono risultate significative con un *p-value* inferiore a 0,0001.

Utilizzando il programma CLUSTAL è stato inoltre realizzato un allineamento multiplo con le medesime sequenze, finalizzato a delineare un dendrogramma che mettesse in luce le distanze evolutive tra gli organismi, sulla base del grado di omologia

di sequenza (Fig. IV.4). La *PhPNPasi*, come era prevedibile ipotizzare, ha mostrato un elevato grado di omologia di sequenza con le *PNPasi* di origine psicrofila e una distanza evolutiva via via maggiore andando dai mesofili ai termofili.

Nell'ambito della struttura primaria alcune regioni sono risultate maggiormente conservate di altre, in particolare i domini 1 e 2, comuni alle esonucleasi, e i domini di legame all'RNA S1 e KH (Matus-Ortega et al., 2007).

Questi dati nel loro complesso sono in linea con la strategia di adattamento a diverse condizioni di temperatura comunemente utilizzata dalle proteine. In generale questo processo evolutivo coinvolge piccoli cambiamenti nella sequenza amminoacidica, anche se la struttura molecolare complessiva della proteina rimane grossomodo inalterata. L'alta flessibilità degli enzimi adattati al freddo è, in genere, espressione dell'utilizzo di residui di minori dimensioni, caratterizzati da minore idrofobicità rispetto agli omologhi isolati nei mesofili e, soprattutto, nei termofili. Questi ultimi, infatti, dovendosi adattare a condizioni ambientali esattamente opposte a quelle che caratterizzano gli ambienti freddi, sono invece ricchi di residui di grandi dimensioni e molto idrofobici (De Vendittis, 2008).

Con l'ausilio di vari *software* bioinformatici sono state ottenute delle predizioni strutturali partendo dalla sequenza amminoacidica.

In particolare, utilizzando il programma PROFsec è stata realizzata una predizione della struttura secondaria (Rost et al., 2004). Nell'ambito dell'intera sequenza della singola subunità sono individuate stringhe di residui associabili a quattro classi di struttura secondaria:

- struttura “tutta α ”, con un contenuto di α -eliche superiore al 45% ed un contenuto di filamenti- β inferiore al 5%;
- struttura “tutta β ”, con un contenuto di α -eliche inferiore al 5% ed un contenuto di filamenti- β superiore al 45%;
- struttura “ α - β ”, con un contenuto di α -eliche superiore al 30% ed un contenuto di filamenti- β superiore al 20%;
- struttura mista.

Nel complesso la proteina è costituita per il 29,10% da α -eliche, per il 27,12% da filamenti- β e per il 43,79% da *loop* (Fig. IV.5).

La proteina ha quindi, in base a questa predizione, una struttura complessiva di tipo α - β , con regioni in cui predomina l'uno piuttosto che l'altro elemento di struttura secondaria e viceversa.

A confermare quanto detto è stato anche il grafico di *Ramachandran* ottenuto attraverso il programma *MolMol*, utilizzando il file *pdb* relativo al modello tridimensionale della *PhPNPasi* (Fig. IV.6).

Utilizzando un programma disponibile in rete per la ricerca di *pattern* e motivi funzionali, la struttura primaria della singola subunità dell'enzima *PhPNPasi* è stata confrontata con una serie di *template* presenti nel *database PROSITE* (banca dati di motivi proteici associati a funzioni o strutture particolari).

Nell'ambito della sequenza amminoacidica della *PhPNPasi*, sulla base della percentuale di similarità, sono state individuate stringhe di residui associabili a particolari domini (Fig. IV.6).

Utilizzando *SWISSMODEL*, programma di modellamento per omologia che individua, a partire dalla struttura primaria, la struttura tridimensionale di una proteina basandosi sul grado di similarità con altre sequenze proteiche a struttura nota, è stato possibile effettuare una predizione della struttura tridimensionale dell'enzima *PhPNPasi* (Fig.IV.7).

In particolare, il modello 3D putativo della *PhPNPasi* è stato ottenuto utilizzando circa 40 *template* presenti nella banca dati *pdb*, tra cui quelli aventi maggiore identità di sequenza con l'enzima oggetto di studio sono:

- *Isro.pdb*, corrispondente alla struttura tridimensionale del dominio S1 della PNPasi isolata da *E. coli*, avente con la *PhPNPasi* il 75% di identità di sequenza (Bycroft et al., 1997);
- *1e3ha.pdb*, corrispondente alla PNPasi estratta da *S. antibioticus* (Symmons et al., 2000) ottenuta con SEMET, avente il 48,20% identità di sequenza;
- *1e3pA.pdb*, corrispondente alla PNPasi estratta da *S. antibioticus* (Symmons et al., 2000) ottenuta con tungstato, avente il 45,04% identità di sequenza.

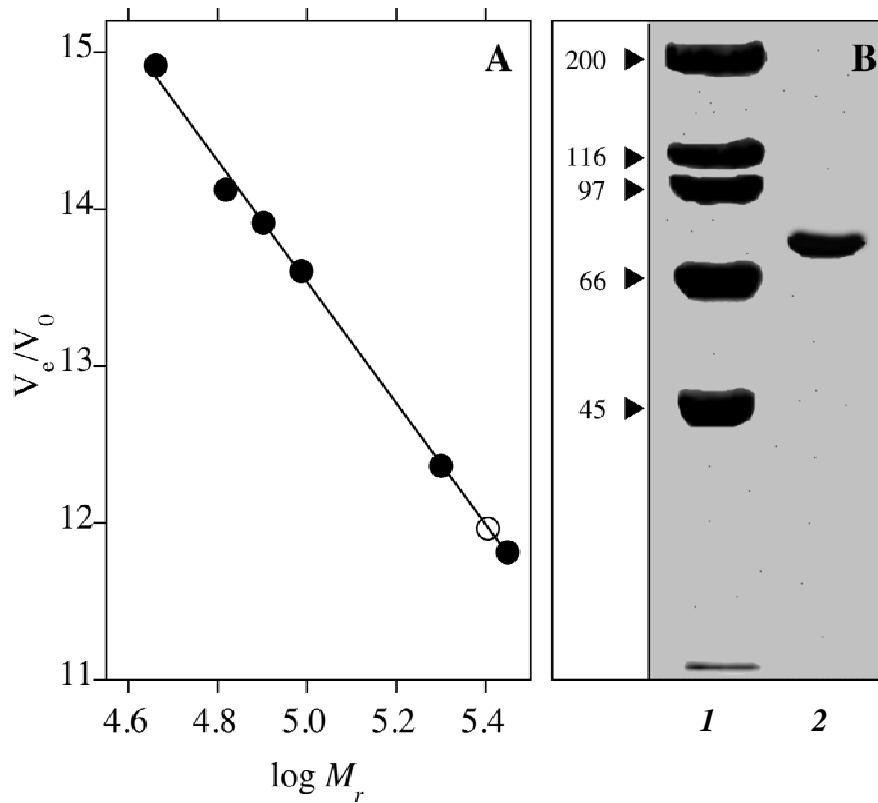


Figura IV.1 - Organizzazione molecolare della *PhPNPasi*. (A) Eluizione su gel filtrazione. La colonna è stata equilibrata e calibrata come descritto nel testo. L'eluizione è indicata con i cerchi pieni per gli standard di peso molecolare e con un cerchio vuoto per la *PhPNPasi*. (B) SDS-PAGE della *PhPNPasi*. 1: M_r standards (i pesi molecolari sono indicati sulla sinistra in kDa); 2: comportamento elettroforetico di 2 μg di *PhPNPasi* pura.

```

Ph -MQAI I KEFQLGQHTVTTLETGAIARQADGAVLASIGDTSVLVTVVGKREAPGQDFPLT 59
Ec MLNP I VRKFQYQGHTVTTLETGMMARQATAAMVMSDDTAVFVTVVGQKKAKPGQDFPLT 60
Te -MEERTFEMELAGRKLLVQIGKVAQQANGAAWVKYGDTVVLVTACASKEPREGIDFFPLT 59
  :: . . . . . : : * : * : * : * . * . . . * * : * * . . . : * * * * *

Ph VNYQERMYAAGRIPGGFLKREGRPNDDGETLIARLIDRPIRPLFPSPGFVNEVQVIATVVS 119
Ec VNYQERTYAAGRIPGSFFRREGRPSEGETLIARLIDRPIRPLFPPEGFVNEVQVIATVVS 120
Te VEYEERLYSVGKIPGGFIKREGKPKSEKAILSARLIDRPIRPLFPHGVRNDVQVIATVLS 119
  * : * : * * * : . : * * * * . * : : * * * : . : * * * * * * * * : * : * * * * * : * * : * * * * * : * * : * * * * *

Ph NPEIQPDMVALIGTSAALAI SGIPFSGPIGATRVGYIDGEYVLNPTLKELEESKLDLVVA 179
Ec NPQVNPDI VAMIGASAALSLSGIPFNGPIGAARVGYINDQYVLNPTQDELKESKLDLVVA 180
Te DDPVQPEIVAMIGSSVALSISDIPFNGPTGAVAVGLVDGQFIINPNHEQREKSLMHLVVS 179
  : : : : : * : * : * : * . * : * : * . * * * . * * * . * * : : : : : * * . : : * : . * * :

Ph GTDNAVLMVESEADVLAEDIMLGAVVYGHEQAQAIITAIKEFKAEAGKPTWDWTAPAKNV 239
Ec GTEAAVLMVESEAQLLSEDQMLGAVVFGHEQQQVVIQININELVKEAGKPRWDWQPEVNE 240
Te GTKDAIVMVEAGAKEIPEETMLDAIMYAHEYIKQIVEFIEGIVKEVGVKSEVILHEIDK 239
  * * . * : * * * : * . : . : * * . * : * : * * * * . * * : : : * : : * . * * * :

Ph SLEEKVASIAADKVGEAYRITDKVARKEALGVAKDEVVAVLTSSELAEGESLDKQIEGKIF 299
Ec ALNARVAALAEARLSDAYRITDKQERYAQVDVIKSETIATL---LAEDETLDENELGEIL 297
Te DLEEKVRAYATEKIYNALRTAEKKERNLNDKVEQEVLEHF---KEEYDNLADLDEVL 295
  * : * : * * : : * * * : * * * * . : . : * . : : * . : : : : :

Ph GSLEKKIVRGRI AAGEKRIDGREPDMIRALDVMTGVLPRTHGSAIFTRGETQALVTATLG 359
Ec HAIEKNVRSRVLAGEPRIDGREKDMIRGLDVRTGVLPRTHGSAIFTRGETQALVTATLG 357
Te YNIMKEQMRKMITEERIRVDGRGLDIRPIWCEVGVLPTRTHGSAIFTRGQTQVLTVALTG 355
  : * : * : * : . * : * * * * * * * : . * * * * * * * * * * * * * . * * * * *

Ph TERDSQLIDDLTGTHKNHFMLNYPFPFCVGETGFVGSPPKRREIGHGNLAKRGIAAVMPT 419
Ec TARDAQVLDELMEGERTDTFLFHYNFPYSVGETGMVGSPPKRREIGHGR LAKRGVLA VMPD 417
Te ALGDIQILDGIGDEEAKRYMHYFNFPYSVGEVRPLRGPGRREIGHGALAE RALEPVIPS 415
  : * * : * : . . . : : * * * * : * * * . : * * * * * * * * * * * : * * *

Ph LTEFPYSIRVVSEITESNGSSSMASVCGTSLALMNAGVPIKASVAGIAMGLVKEDDKFVV 479
Ec MDKFPYTVRVVSEITESNGSSSMASVCGASLALMDAGVPIKAAVAGIAMGLVKEGDNYVV 477
Te EEEFPYTIRLVSEVLSSNGSTSQASVCGSTLALMDAGVPIKAPVAGVAMGLIKEGDVVSV 475
  : * * * : * : * * * : . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Ph LSDILGDEDHLDGDMDFKVAGTAGGITALQMDIKIEGITQEIMQIALKQAKAARLHILEVM 539
Ec LSDILGDEDHLDGDMDFKVAGSRDGI SALQMDIKIEGITKEIMQVALNQA GARLHLLGVM 537
Te LTDIQGIEDFLGDMDFKVAGTEKGITAIQMDIKIPGIDKEILKMALEKARRGRRLYILSKM 535
  * : * * * * * . * * * * * * * * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Ph DKAISAPSEELSQFAPRIYTMKIPQKIAEVIGKGGATIRQLTEETGTTIEIGDDGTIKI 599
Ec EQAINAPRGDISEFAPRIHTIKINPKIKDVIKGGSVIRALTEETGTTIEIEDDGTVKI 597
Te LEVIKEPRKQLSVYAPRVIRMVVDPEKIREIIGPGGKTISKIIAETGVKIDIEEDGRLYI 595
  : . * . * : : * * * * : : * * : * * * * * . * : * * * . * * : * * * : *

Ph AATDGESAANAISRIEQLTAELEVGTIYEGKVVRIVDFGAFVNILPGKDGLVHISQISTE 659
Ec AATDGEKAKHAIRRIEIEITAEIEVGRVYTGKVTIRIVDFGAFVAIGGKEGLVHISQIADK 657
Te TASDLRSGERAKQMIEAITKDIAVGEIYLGKVLRI TPFGAFVEIAPGKEGLVHISKLSKK 655
  : * : * . . . . * * * * : : * * : * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * : :

Ph RVNNTDHLSEGQEVKVKVLEVDQRGRVRLSIKEAMESAAPAADPTDA----- 708
Ec RVEKVTDYLQMGQEVVVKVLEVDQRGRIRLSIKEATEQSQPAAAPEAPAAEQGE 711
Te RVQKVEDVVKVGGDILVKVTDIDKLGRI SLSRKDALPDEEEEEERN----- 700
  * * : * * * . : * : : * * * : : * * : * * * * * .

```

Figura IV.2 – Allineamento tra *Ph*PNPasi, *Ec*PNPasi e *Te*PNPasi. Confronto tra la struttura primaria della *Ph*PNPasi e quella dell’omologa proteina da *Escherichia coli* (*Ec*) e da *Thermoanaerobacter ethanolicus* (*Te*). Gli asterischi e i puntini indicano rispettivamente identità di sequenza e sostituzioni amminoacidiche conservative.

Tab. IV.1 - Microrganismi le cui PNPaSi sono state utilizzate per l'allineamento e per lo studio di sequenza, e relative temperature ottimali di crescita.

Microrganismo	T_{opt} (°C)
<i>Acidothermus cellulolyticus</i> (strain ATCC 43068 / 11B)	55
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> LAA1	57
<i>Aliivibrio salmonicida</i> (strain LF11238)	12
<i>Anaerocellum thermophilum</i> (strain DSM 6725 / Z-1320)	70
<i>Anoxybacillus flavithermus</i> (strain DSM 21510 / WK1)	62,5
<i>Aspergillus niger</i> (strain CBS 513,88 / FGSC A1513)	30
<i>Bacillus halodurans</i>	42
<i>Bacillus licheniformis</i> (strain DSM 13 / ATCC 14580)	42
<i>Bacillus pumilus</i> (strain SAFR-032)	10
<i>Bacteroides fragilis</i>	35
<i>Borrelia duttonii</i> (strain Ly)	35,5
<i>Brucella abortus</i>	37
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (strain ATCC 43494 / DSM 8903)	70
<i>Carboxythermus hydrogenoformans</i> (strain Z-2901 / DSM 6008)	72
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> (strain ATCC 29366 / DSM 635 / J-10-fl)	56
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	37
<i>Clostridium thermocellum</i> (strain ATCC 27405 / DSM 1237)	52
<i>Colwellia psychrerythraea</i> (strain 34H / ATCC BAA-681)	8
<i>Colwellia psychrerythraea</i> (strain 34H / ATCC BAA-681)	8
<i>Deinococcus geothermali</i> (strain DSM 11300)	50
<i>Desulfotalea psychrophila</i>	7
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> (strain Hildenborough / ATCC 29579 / NCIMB 8303)	37
<i>Fervidobacterium nodosum</i> (strain ATCC 35602 / DSM 5306 / Rt17-B1)	70
<i>Flavobacterium psychrophilum</i> (strain JIP02/86 / ATCC 49511)	18
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (strain NG80-2)	50
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	22,5
<i>Listeria innocua</i>	22
<i>Moorella thermoacetica</i> (strain ATCC 39073)	60
<i>Mycobacterium bovis</i> (strain BCG / Pasteur 1173P2)	37
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	37
<i>Natranaerobius thermophilus</i> (strain ATCC BAA-1301 / DSM 18059 / JW/NM-WN-LF)	55
<i>Octadecabacter antarcticus</i> 238	7
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> (strain DSM 13744 / JCM 10971 / SI)	55
<i>Photobacterium profundum</i>	15
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> (strain T6c / BAA-1087)	23
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> (strain TAC 125)	15
<i>Pseudomonas putida</i>	27

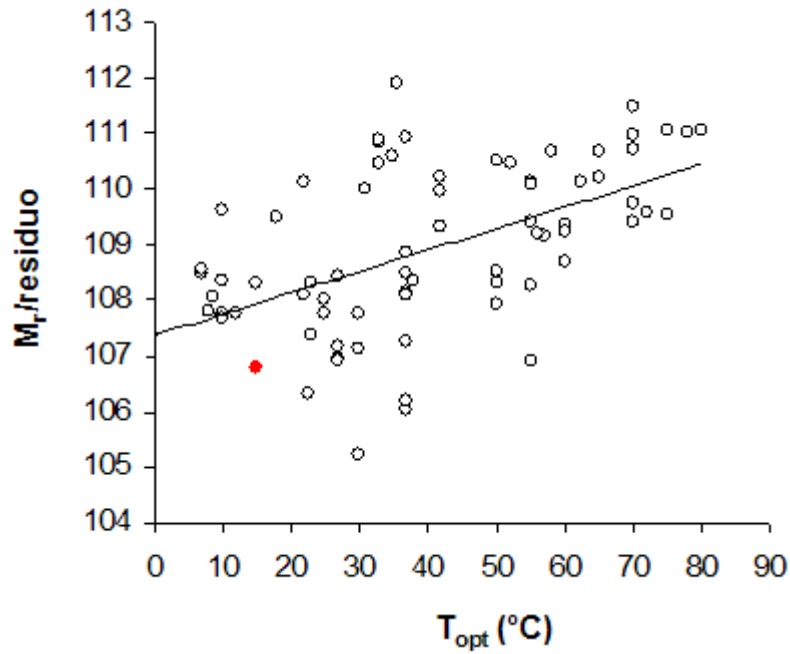
Microrganismo	T_{opt} (°C)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv, <i>syringae</i> (strain B728a)	27
<i>Psychrobacter arcticus</i> (strain DSM 17307 / 273-4)	8,75
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> (strain K5)	22
<i>Psychromonas ingrahamii</i> (strain 37)	10
<i>Ralstonia eutropha</i> (strain JMP134)	30
<i>Roseiflexus castenholzii</i> (strain DSM 13941 / HLO8)	50
<i>Roseobacter denitrificans</i> (strain ATCC 33942 / OCh 114)	25
<i>Rubrobacter xylanophilus</i> (strain DSM 9941 / NBRC 16129)	60
<i>Saccharophagus degradans</i> (strain 2-40 / ATCC 43961 / DSM 17024)	30
<i>Salmonella typhimurium</i>	38
<i>Shewanella frigidimarina</i> (strain NCIMB 400)	25
<i>Shewanella halifaxensis</i> (strain HAW-EB4)	10
<i>Shewanella sediminis</i> (strain HAW-EB3)	10
<i>Shigella flexneri</i>	37
<i>Shigella flexneri</i> serotype 5b (strain 8401)	37
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain JH9)	33
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MRSA252)	33
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (strain ATCC 35984 / RP62A)	33
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp, <i>saprophyticus</i> (strain ATCC 15305 / DSM 20229)	31
<i>Streptococcus thermophilus</i> (strain CNRZ 1066)	42
<i>Streptomyces coelicolor</i>	23
<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	60
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	75
<i>Thermobifida fusca</i> (strain YX)	50
<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> (strain ATCC 51303 / DSM 11347 / YP87)	65
<i>Thermomicrobium roseum</i> (strain ATCC 27502 / DSM 5159 / P-2)	70
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> (strain BP-1)	55
<i>Thermotoga lettingae</i> (strain ATCC BAA-301 / DSM 14385 / TMO)	65
<i>Thermotoga maritima</i>	80
<i>Thermotoga petrophila</i> (strain RKU-1 / ATCC BAA-488 / DSM 13995)	78
<i>Thermus aquaticus</i> Y51MC23	70
<i>Thermus thermophilus</i>	75
<i>Xanthomonas campestris</i> pv, <i>vesicatoria</i> (strain 85-10)	37
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv, <i>oryzae</i>	27
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv, <i>oryzae</i> (strain MAFF 311018)	27
<i>Xylella fastidiosa</i> Ann-1	27
<i>Yersinia pestis</i> bv, <i>Antiqua</i> (strain Angola)	37

Tab. IV.2 – Dati relativi alle PNPasi utilizzate per l'allineamento e per lo studio di sequenza: Numero di residui (N_{aa}), Massa molecolare relativa (M_r), Indice Alifatico (AI) e indice di idrofobicità (GRAVY).

Microrganismo	N_{aa}	M_r	AI	GRAVY
<i>Acidothermus cellulolyticus</i> (strain ATCC 43068 / 11B)	782	83621,3	93,48	-0,105
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> LAA1	735	80224,8	95,5	-0,222
<i>Aliivibrio salmonicida</i> (strain LF11238)	718	77365,6	96,04	-0,041
<i>Anaerocellum thermophilum</i> (strain DSM 6725 / Z-1320)	643	71357,3	96,89	-0,174
<i>Anoxybacillus flavithermus</i> (strain DSM 21510 / WK1)	702	77299	97,32	-0,187
<i>Aspergillus niger</i> (strain CBS 513,88 / FGSC A1513)	248	26096,8	92,86	0
<i>Bacillus halodurans</i>	704	77581,8	97,74	-0,235
<i>Bacillus licheniformis</i> (strain DSM 13 / ATCC 14580)	705	77532,9	96,35	-0,23
<i>Bacillus pumilus</i> (strain SAFR-032)	705	77293,6	97,19	-0,22
<i>Bacteroides fragilis</i>	708	78308,7	89,56	89,56
<i>Borrelia duttonii</i> (strain Ly)	717	80238,8	95,03	-0,254
<i>Brucella abortus</i>	714	77729,7	90,69	-0,154
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (strain ATCC 43494 / DSM 8903)	701	77603,7	99,29	-0,178
<i>Carboxydotherrnus hydrogeniformans</i> (strain Z-2901 / DSM 6008)	731	80114,9	104,54	-0,121
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> (strain ATCC 29366 / DSM 635 / J-10-fl)	755	82432,2	91,59	-0,219
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	703	77989,5	92,03	-0,246
<i>Clostridium thermocellum</i> (strain ATCC 27405 / DSM 1237)	700	77317,8	98,69	-0,179
<i>Colwellia psychrerythraea</i> (strain 34H / ATCC BAA-681)	705	75988,7	96,4	-0,066
<i>Colwellia psychrerythraea</i> (strain 34H / ATCC BAA-681)	646	69537,4	96,01	-0,037
<i>Deinococcus geothermalis</i> (strain DSM 11300)	721	78096,2	96,63	-0,188
<i>Desulfotalea psychrophila</i>	692	75081,9	99,45	-0,066
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> (strain Hildenborough / ATCC 29579 / NCIMB 8303)	760	82198,9	93,2	-0,186
<i>Fervidobacterium nodosum</i> (strain ATCC 35602 / DSM 5306 / Rt17-B1)	693	77259,8	94,62	-0,167
<i>Flavobacterium psychrophilum</i> (strain JIP02/86 / ATCC 49511)	711	77852,3	94,26	-0,124
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (strain NG80-2)	722	79796,7	99,09	-0,244
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	761	80919,7	96,83	-0,034
<i>Listeria innocua</i>	723	79607	91,99	-0,307
<i>Moorella thermoacetica</i> (strain ATCC 39073)	747	81686,9	98,96	-0,178
<i>Mycobacterium bovis</i> (strain BCG / Pasteur 1173P2)	752	79734,6	97,55	0,044
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	763	81027,1	95,43	-0,016
<i>Natranaerobius thermophilus</i> (strain ATCC BAA-1301 / DSM 18059 / JW/NM-WN-LF)	718	79043	96,11	-0,362
<i>Octadecabacter antarcticus</i> 238	710	77083,9	87,63	-0,168
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> (strain DSM 13744 / JCM 10971 / SI)	734	80314,5	99,2	-0,122
<i>Photobacterium profundum</i>	707	76579,2	92,96	-0,116
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> (strain T6c / BAA-1087)	703	76142,9	94,2	-0,086
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> (strain TAC 125)	708	75599,5	99,21	-0,009

Microrganismo	N_{aa}	M_r	AI	GRAVY
<i>Pseudomonas putida</i>	701	74984,7	93,52	-0,034
<i>Pseudomonas syringae</i> pv, <i>syringae</i> (strain B728a)	701	74941,9	96,03	-0,012
<i>Psychrobacter arcticus</i> (strain DSM 17307 / 273-4)	700	75651,8	95,33	-0,132
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> (strain K5)	700	75681,8	95,06	-0,14
<i>Psychromonas ingrahamii</i> (strain 37)	698	75643,2	94,17	-0,11
<i>Ralstonia eutropha</i> (strain JMP134)	728	77990,4	96,11	-0,103
<i>Roseiflexus castenholzii</i> (strain DSM 13941 / HLO8)	746	80952,5	91,94	-0,192
<i>Roseobacter denitrificans</i> (strain ATCC 33942 / OCh 114)	711	76803,5	88,78	-0,146
<i>Rubrobacter xylanophilus</i> (strain DSM 9941 / NBRC 16129)	686	74939,3	96,92	-0,213
<i>Saccharophagus degradans</i> (strain 2-40 / ATCC 43961 / DSM 17024)	722	77809,5	90,54	-0,178
<i>Salmonella typhimurium</i>	711	77038,8	95,32	-0,133
<i>Shewanella frigidimarina</i> (strain NCIMB 400)	698	75211,9	97,64	-0,053
<i>Shewanella halifaxensis</i> (strain HAW-EB4)	704	75841,4	96,08	-0,081
<i>Shewanella sediminis</i> (strain HAW-EB3)	704	75810,3	96,79	-0,067
<i>Shigella flexneri</i>	711	77115,9	95,32	-0,1450
<i>Shigella flexneri</i> serotype 5b (strain 8401)	711,	77115,9	95,32	-0,1450
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain JH9)	698	77362	698	77362
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MRSA252)	698	77392,1	93,18	-0,34
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (strain ATCC 35984 / RP62A)	701	77444,1	94,99	-0,301
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp, <i>saprophyticus</i> (strain ATCC 15305 / DSM 20229)	697	76671,5	95,54	-0,253
<i>Streptococcus thermophilus</i> (strain CNRZ 1066)	741	80999	95,17	-0,154
<i>Streptomyces coelicolor</i>	739	79359,6	94,97	-0,103
<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	762	82820,3	88,79	-0,239
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	707	78519,7	101,16	-0,211
<i>Thermobifida fusca</i> (strain YX)	767	82792,1	91,76	-0,184
<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> (strain ATCC 51303 / DSM 11347 / YP87)	710	78251,7	102,17	-0,124
<i>Thermomicrobium roseum</i> (strain ATCC 27502 / DSM 5159 / P-2)	790	86688,2	94,06	-0,281
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> (strain BP-1)	715	77424,4	108,01	-0,024
<i>Thermotoga lettingae</i> (strain ATCC BAA-301 / DSM 14385 / TMO)	710	78570,7	102,27	-0,142
<i>Thermotoga maritima</i>	708	78621,1	101,26	-0,147
<i>Thermotoga petrophila</i> (strain RKU-1 / ATCC BAA-488 / DSM 13995)	708	78591,1	101,4	-0,143
<i>Thermus aquaticus</i> Y51MC23	713	77997,8	99,97	-0,182
<i>Thermus thermophilus</i>	718	78646,6	99,55	-0,191
<i>Xanthomonas campestris</i> pv, <i>vesicatoria</i> (strain 85-10)	704	75509,5	96,73	-0,062
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv, <i>oryzae</i>	704	75434,4	97,16	-0,052
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv, <i>oryzae</i> (strain MAFF 311018)	704	75434,4	97,16	-0,052
<i>Xylella fastidiosa</i> Ann-1	700	75902,3	101,39	-0,038
<i>Yersinia pestis</i> bv, <i>Antiqua</i> (strain Angola)	705	76195,9	95,74	-0,093

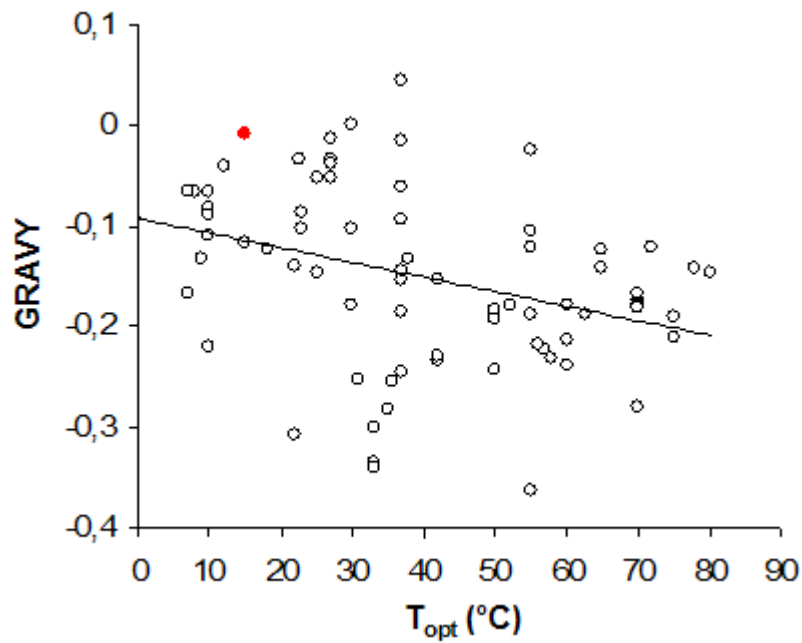
A)



$$y = 0,0385x + 107,37$$

$$R^2 = 0,294$$

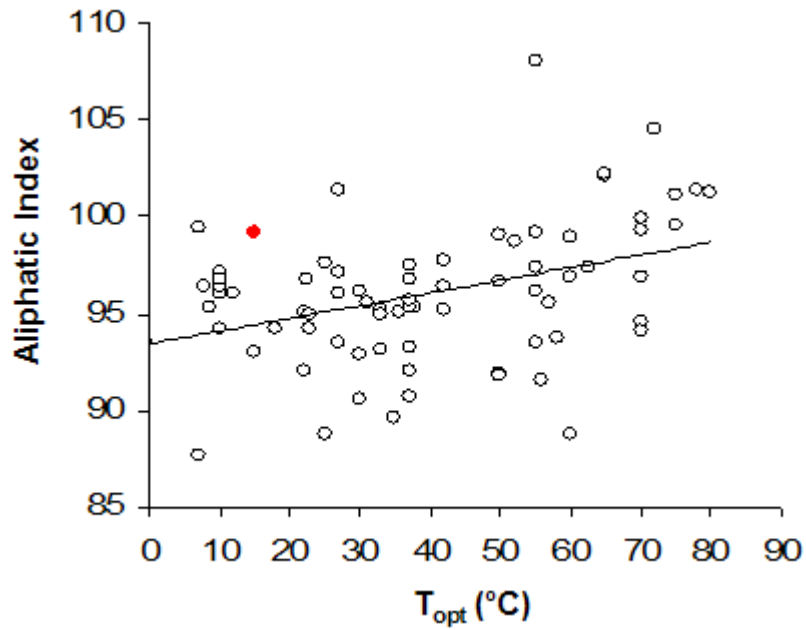
B)



$$y = -0,0015x - 0,0925$$

$$R^2 = 0,1208$$

C)



$$y = 0,0656x + 93,45$$

$$R^2 = 0,1455$$

Figura IV.3 - Analisi della massa molecolare relativa media, dell'idrofobicità media e dell'indice alifatico delle strutture primarie di PNPasi isolate da microrganismi con T_{opt} diverse. I grafici mostrano l'andamento dei valori del peso molecolare medio per residuo (A), dell'idrofobicità media (B) e dell'indice alifatico (C) delle PNPasi di 75 microrganismi procariotici. In rosso è evidenziata la *Ph*PNPasi.

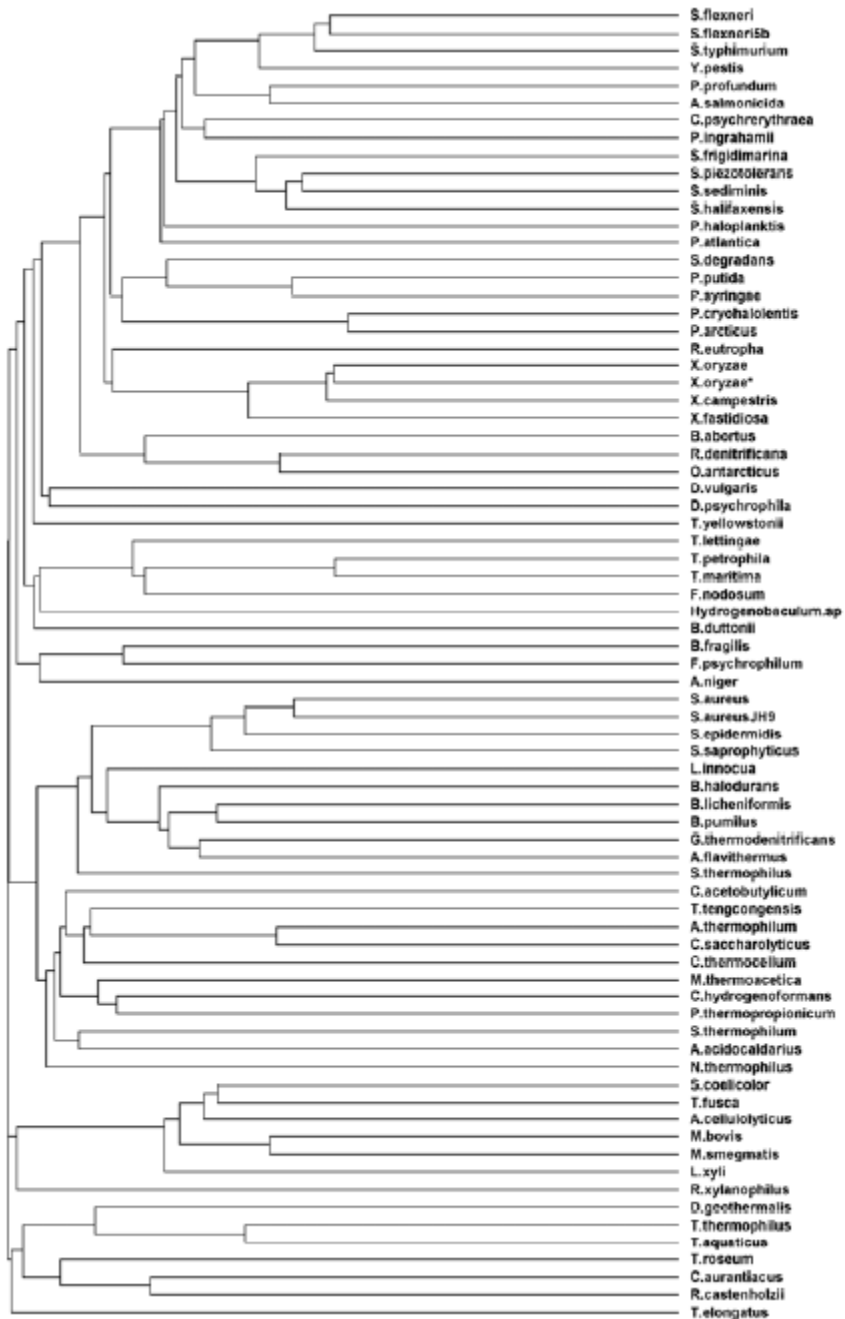


Figura IV.4 - Dendrogramma ottenuto dall'allineamento multiplo Utilizzando il programma CLUSTAL sono state allineate le sequenze amminoacidiche di 75 PNPasi diverse.



Figura IV.5 – Predizione di struttura secondaria.

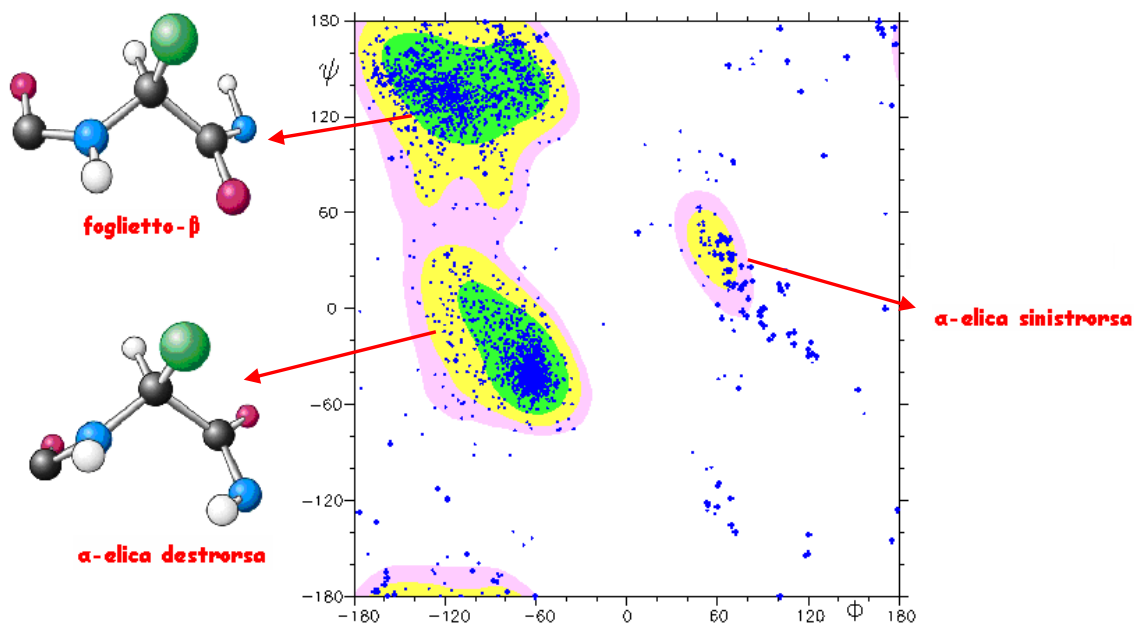


Figura IV.6 - Grafico di Ramachandran della *PhPNPasi*. ϕ (phi) e ψ (psi) rappresentano i legami semplici intorno ai quali sono possibili rotazioni.

```

MQAIIKEFQLGQHIVTLETGAIARQADGAVLASIGDTSVLTVVVGKREAPGQDFFPLTVNYQERMYAAGRIPGGFLKRE
SRPNDGETLIARLIDRPIRPLFPSPGFVNEVQVIATVVSVNPEIQPDMVALIGTSAALAIISGIFSGPIGATRUVGYIDGEY
VLNPTLKELEESKLDLVVAGTDNAVLMVSEADVLAEDIMLGAVVYGHEQAQAIITAIKEFKAEAGKPTWDWTAPAKNVS
LEEKVASIAADKVGEAYRITDKVARKEALGVAKDEVVAVLISELAEGESLDKQEIIGKIFGSLEKKIVRGRIAAAGEKRIDG
REFDMIRALDVMTGVLPRTHGSAIFTRGETQALVTATLGTERDSQLIDDLTGTHKNHFMLNYNFPFCVGETGFVGSPPKR
REIGHGNLAKRGIAAVMPTLTFPYSIRVVSEITESSNGSSSMASVCGTSLALMNAGVPIKASVAGIAMGLVKEDDKFVVL
SDILGDEDHLGDMDFKVAGTAGGITALQMDIKIEGITQEIMQIALKQAKAARLHILEVMDKAIAPSEELSQFAPRITYT
KIPQKKIAEVIGKGGATIRQLTEETGTNIEIGDDGTIKIAATDGESAAANASRLEQLTAELEVGTIYEGKVVRIVDFGAF
VNILPGKDGLVHISQISTERVNNVTDHLSSEGQEVKVKVLEVDQRGRVRLSIK EAMESAAPAADAPTDA

```

- *Dominio 1 della famiglia delle 3'-esoribonucleasi*
- *Dominio 2 della famiglia delle 3'-esoribonucleasi*
- *Dominio KH di legame all'RNA*
- *Dominio S1 di legame all'RNA*

Figura IV.7 - Individuazione dell'appartenenza delle varie stringhe amminoacidiche a domini della struttura tridimensionale complessiva.

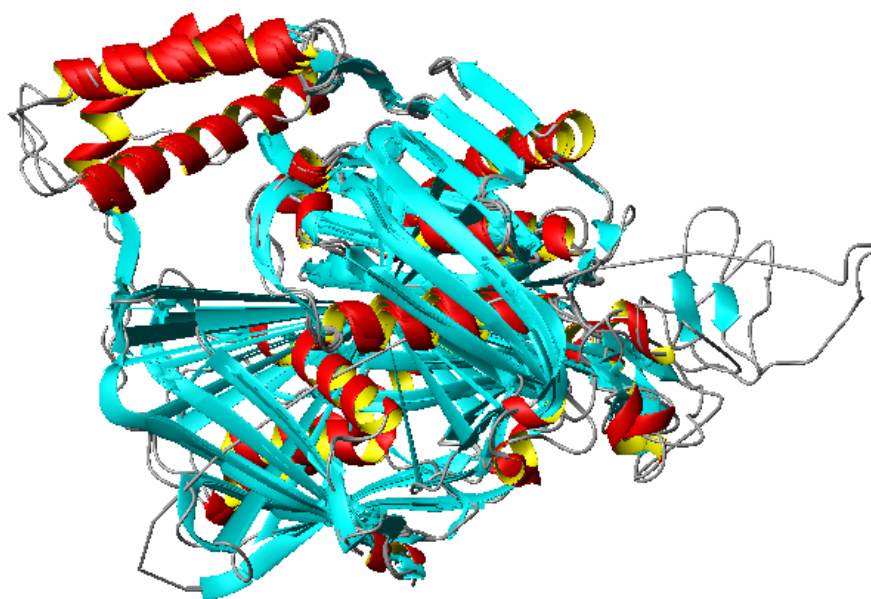


Figura IV.8 - Modello tridimensionale della struttura di un monomero di *PhPNPasi*.

IV.2 - Proprietà funzionali della *Ph*PNPasi

IV.2.a – Parametri cinetici

L'attività della *Ph*PNPasi è stata determinata rilevando sia la sua capacità di catalizzare la degradazione del poli(A) (Fig. IV.9 A) che la sintesi di poliribonucleotidi (Fig. IV.9B). In particolare, la reazione di polimerizzazione necessita un *primer* e a tale scopo è stato utilizzato nel presente lavoro il poli(A) anche se in alternativa potrebbero essere utilizzati il *Ph*-rRNA, piuttosto che il *Ph*-tRNA a singolo filamento (non mostrato). Per entrambe le attività la velocità di reazione era linearmente dipendente dalla quantità di enzima utilizzato (non mostrato). In queste condizioni sperimentali i parametri cinetici della reazione di polimerizzazione determinati ad una temperatura di 15°C sono pari a 10.3 μM per la K_M nei confronti del [^3H]GDP e $3.8 \cdot 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ per la k_{cat} .

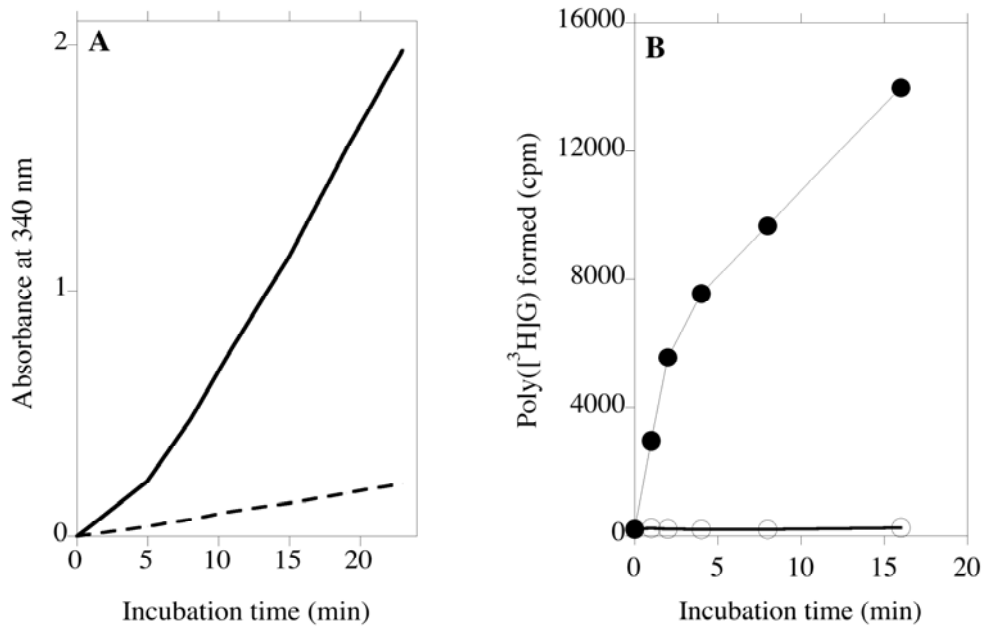


Figura IV.9 – Attività enzimatica della *PhPNPasi*. (A) **Degradazione del poli(A).** La miscela di reazione è stata preparata come descritto nella sezione dei Metodi. La reazione era innescata dall'aggiunta di 8 pmol di una preparazione di *PhPNPasi*. L'attività era seguita per 30 minuti alla temperatura di 15°C, valutando l'incremento dell'assorbanza a 340 nm (linea continua). L'andamento del controllo negativo (linea discontinua) è stato ottenuto eseguendo l'esperimento nelle medesime condizioni sperimentali, ma in assenza di enzima. (B) **Attività di polimerizzazione di poliribonucleotidi.** 300 µL di tampone C sono stati supplementati con 20 µM [³H]GDP (a. s. 1200 cpm/pmol) e 1 mg/mL poli(A); la reazione veniva fatta partire aggiungendo alla miscela di reazione 70 pmol di *PhPNPasi*, incubandola a 15°C. Agli intervalli di tempo indicati, erano prelevate aliquote di 40 µL che erano poi trattate come descritto nella sezione dei Metodi e quindi contate per la radioattività (cerchi pieni). E' stata considerata controllo negativo dell'esperimento la quantità di [³H]GDP incorporato nelle stesse condizioni sperimentali, ma in assenza di enzima (cerchi vuoti).

IV.2.b - Effetto dei cationi monovalenti sull'attività della PhPNPasi

E' stata valutata anche l'influenza sull'attività enzimatica dei cationi monovalenti (Fig. IV.10). Tutti i cloruri, aggiunti alla miscela di reazione, si sono mostrati in grado di stimolare l'attività dell'enzima anche se a diversi livelli; il massimo effetto stimolatorio era inoltre raggiunto a concentrazioni differenti per ogni sale. Questo comportamento è già stato messo in evidenza per la PNPasi isolata da *Streptomyces aureofaciens* (Erickson & Grosch, 1977) e per altre proteine isolate da *P. haloplanktis* (Srimathi et al, 2007).

Tra i sali utilizzati il CsCl ad una concentrazione finale di 0.9 M è risultato avere un'attività di stimolazione più significativa, inducendo un aumento dell'attività polimerasica dell'enzima di circa 7 volte. In tali condizioni è stata osservata una variazione di entrambi i parametri cinetici; infatti la K_M nei confronti del $[^3\text{H}]\text{GDP}$ diviene pari a circa 40 μM e la k_{cat} a $3.8 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, determinando un incremento dell'efficienza catalitica di 1.5 volte.

La stimolazione esercitata da elevate concentrazioni di sali sull'attività della PhPNPasi, così come per altre proteine di origine psicrofila, potrebbe suggerire un ruolo regolatorio dei cationi monovalenti sul meccanismo d'azione di questi enzimi. In particolare, negli enzimi psicrofili oligomerici potrebbe essere coinvolto l'adattamento delle interazioni tra i monomeri (Tronelli et al., 2007). Da questo punto di vista non possono essere escluse piccole modifiche strutturali della PhPNPasi indotte dalle elevate concentrazioni di sali.

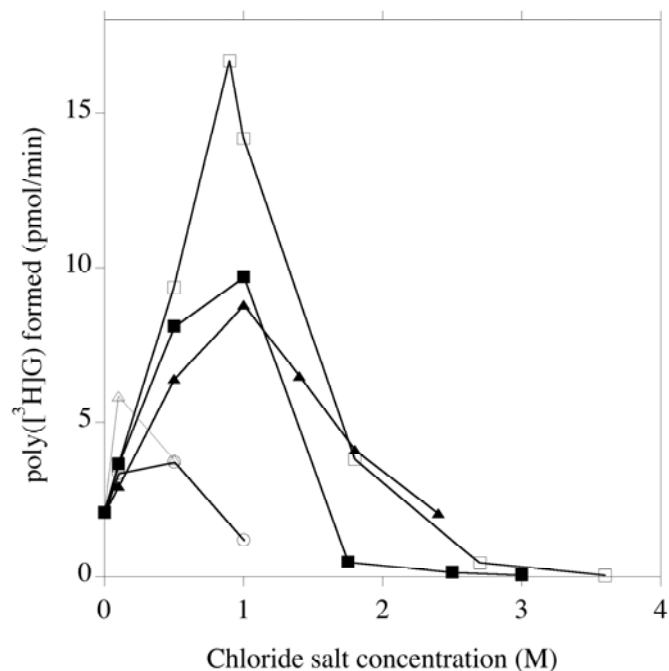


Figura IV.10 - Effetto dei cationi monovalenti sull'attività della *PhPNPasi*.

L'effetto è stato valutato su miscele di reazione contenenti, in volume finale di 250 μL di tampone C supplementato con 10 mM MgCl_2 , 20 μM [^3H]GDP (a.s. 1155 cpm/pmol), 1 mg/mL poli(A) e i seguenti cationi monovalenti, aggiunti come sali di cloro, alle concentrazioni finali indicate in figura: Li^+ (\circ), Na^+ (\blacksquare), K^+ (\blacktriangle), Cs^+ (\square) e NH_4^+ (\triangle). Le miscele venivano incubate a 15°C e la reazione era innescata dall'aggiunta di 12 μg di *PhPNPasi*. La reazione era seguita in cinetica, prelevando, ad appropriati tempi di incubazione, aliquote di 40 μL , diluite in 900 μL di 10% TCA freddo e trattate come descritto nel Paragrafo III.2.b

IV.2.c - Effetto della temperatura sull'attività polimerasica della PhPNPasi

La termofilicità della PhPNPasi è stata valutata misurando la velocità di polimerizzazione del [³H]G a temperature prestabilite. I risultati, riportati in Fig. (IV.11 A) hanno evidenziato che la velocità di polimerizzazione aumenta fino a 40°C, una temperatura almeno 20°C superiore alla T_{opt} di *P. haloplanktis*. Al di sopra di tale valore di temperatura è stata osservata una riduzione repentina della velocità, dovuta all'inattivazione termica dell'enzima. Nell'intervallo di temperature 5-40°C il grafico di Arrhenius corrispondente ha mostrato un andamento lineare (Fig. IV.11 B) da cui è stato possibile derivare un valore dell'energia di attivazione (E_a) di 87 kJ/mol. Questo valore è simile a quello riportato per i fattori di allungamento Tu e G isolati dalla stessa fonte (Masullo et al., 2000; Ruggiero et al., 2007). Gli altri parametri termodinamici di attivazione calcolati a 15°C sono risultati pari a 78.1 kJ/mol, 28.5 J/mol/K e 66.8 kJ/mol rispettivamente per il ΔH^* , il ΔS^* e il ΔG^* , indicando che lo stato di transizione della reazione è entropicamente favorito.

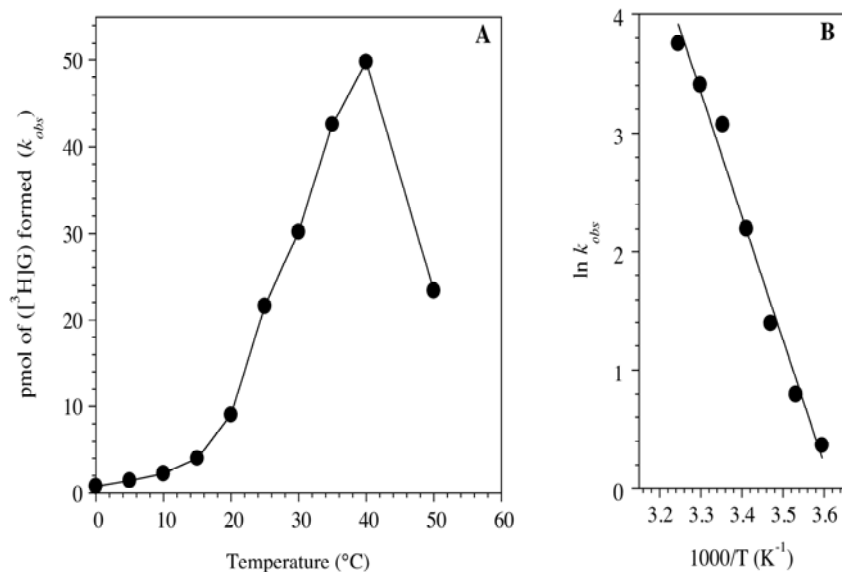


Figura IV.11 - Effetto della temperatura sull'attività polimerasica della *PhPNPasi*. (A) Polimerizzazione del poli(G) catalizzata dalla *PhPNPasi* nell'intervallo di temperature compreso tra 0-50°C. Ad ogni temperatura la miscela di reazione era preparata come riportato nella sezione dei Metodi. I valori delle k_{obs} sono stati calcolati come pmol di $[^3H]GDP$ polimerizzati per secondo di incubazione per pmol di enzima. (B) I dati ottenuti nell'intervallo 5-40°C del precedente esperimento sono stati trattati secondo l'equazione di Arrhenius.

IV.2.d - Effetto della Temperatura sulla stabilità della PhPNPasi

La resistenza al calore di questo enzima psicrofilo è stata valutata attraverso esperimenti di UV *melting* condotti nell'intervallo di temperature 10-60°C. I risultati sono riportati in Fig. IV.12 A e mostrano che l'enzima ha una temperatura di semi-denaturazione pari a circa 46°C.

La resistenza al calore della PhPNPasi è stata valutata anche utilizzando un differente approccio sperimentale; in particolare, sono state condotte cinetiche di inattivazione al calore a differenti temperature comprese tra 30 e 70°C (Fig. IV.12 B). In queste condizioni sperimentali l'inattivazione al calore segue una cinetica di primo ordine ad ogni temperatura testata, con valori di $t_{1/2}$ di 19.6, 4.3, 1.3, 0.4 e 0.17 min rispettivamente a 30, 40, 50, 60 e 70°C. Le costanti di inattivazione termica di primo ordine, analizzate secondo l'equazione di Arrhenius (Fig. IV.12 C), hanno permesso di determinare il valore dell' E_a del processo di inattivazione termica risultato pari a 96.7 kJ/mol. Questo valore è significativamente più basso di quelli determinati per altre proteine isolate da microrganismi mesofili e, ancor più, termofili (Masullo et al., 1993). Il confronto tra la temperatura di denaturazione e i risultati degli esperimenti di inattivazione termica suggerisce che il centro catalitico della PhPNPasi è più incline a subire denaturazione al calore rispetto all'intera molecola. Questo è in linea con quanto riscontrato per altre proteine isolate da *P.haloplanktis* (Masullo et al., 2000; Ruggiero et al., 2007). Tale proprietà può essere messa in relazione all'elevata flessibilità posseduta dal sito attivo degli enzimi psicrofili, fenomeno risultante dal processo di adattamento molecolare alle basse temperature (D'Amico et al., 2006; Zeldovich et al., 2007).

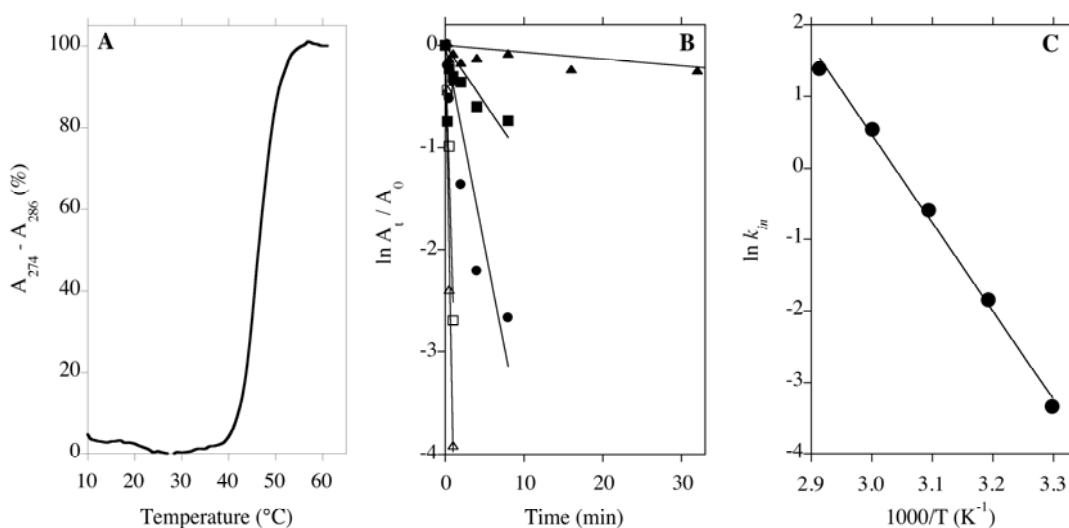


Figura IV.12 - Stabilità al calore della *PhPNPasi*. (A) Curva di *UV melting* di un campione 5 μM di *PhPNPasi*. (B) Resistenza all'inattivazione termica. Una soluzione di *PhPNPasi* alla concentrazione di 5 μM è stata incubata in tampone A in un volume finale di 700 μL a 30 (▲), 40 (■), 50 (●), 60 (□) e 70°C (Δ). Agli intervalli di tempo indicati venivano prelevate aliquote di 60 μL sulle quali era determinata l'attività (A_t) residua attraverso il dosaggio spettrofotometrico eseguito come descritto nella sezione dei Metodi. I risultati sono stati espressi come A_t/A_0 considerando l'attività di un campione di *PhPNPasi* mantenuto a 0°C durante tutto il corso dell'esperimento pari al 100% (A_0). (C) I valori di k_{in} nell'intervallo di temperature compreso tra 30-70°C ottenuti dal precedente esperimento, sono stati elaborati in modo da tracciare il *plot* di Arrhenius della reazione di inattivazione termica.

Conclusioni

L'enzima PNPasi è stato isolato dall'estratto cellulare del batterio antartico *Pseudoalteromonas haloplanktis*.

La caratterizzazione molecolare ha evidenziato che si tratta di un enzima che in condizioni native si presenta omotrimerico, così come si verifica per tutte le PNPasi sino ad ora isolate e caratterizzate, avente un peso molecolare di circa 255 kDa. E' stata determinata la sequenza N-terminale dell'enzima purificato; tale sequenza risulta sovrapponibile alla sequenza amminoacidica del relativo enzima, derivata dal genoma di *P. haloplanktis*, sequenziato da un gruppo di ricercatori belgi (Medigue, 2005). L'analisi della intera *open reading frame* (ORF) ha evidenziato una significativa omologia di sequenza con PNPasi da altri organismi. Pertanto, questa sequenza è stata utilizzata per condurre una serie di indagini relative alla struttura primaria. Utilizzando degli opportuni supporti informatici sono stati determinati alcuni parametri chimico-fisici dell'enzima di interesse, alcuni dei quali utilizzati a conferma dei risultati sperimentali.

Da allineamenti multipli risulta che la struttura primaria dell'enzima, se posta a confronto con quella della controparte mesofila e termofila, si caratterizza per la presenza di adattamenti specifici alle basse temperature, concordi con quanto evidenziato in studi precedenti inerenti gli enzimi psicrofili (Feller & Gerday, 1997, 2003, De Vendittis et al., 2008). Sono stati inoltre condotti studi volti a caratterizzare la struttura secondaria e terziaria dell'enzima sulla base della struttura primaria. Tali indagini hanno evidenziato che la *Ph*PNPasi, possiede una struttura secondaria di tipo $\alpha\beta$ e preserva la tipica organizzazione modulare delle altre PNPasi già caratterizzate.

Sotto il profilo funzionale, è stata valutata la capacità dell'enzima purificato di catalizzare sia la reazione di fosforolisi di poliribonucleotidi, che quella inversa di polimerizzazione. Per entrambe le attività la velocità di reazione è risultata linearmente dipendente dalla quantità di enzima utilizzato. I parametri cinetici della reazione di polimerizzazione determinati ad una temperatura di 15°C, sono risultati pari a 10,3 μM per la K_M nei confronti del [^3H]GDP e $3,8 \cdot 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ per la k_{cat} .

E' stata valutata anche l'influenza sull'attività enzimatica dei cationi monovalenti. Tutti i cloruri, aggiunti singolarmente alle miscele di reazione, si sono mostrati in grado di stimolare l'attività dell'enzima, anche se in modo più o meno marcato a seconda del catione presente. Infatti, tra i sali utilizzati il CsCl, aggiunto ad una concentrazione finale di 0.9 M, è risultato possedere l'attività di stimolazione più elevata.

La termofilicità della *PhPNPasi* è stata valutata misurando la velocità di polimerizzazione del [³H]G a temperature programmate. L'elaborazione dei dati ottenuti ha permesso di ottenere il valore dell'energia di attivazione della reazione risultata pari a 87 kJ/mol, valore in linea con l'origine psicrofila del microrganismo. Gli altri parametri termodinamici di attivazione calcolati a 15°C sono risultati pari a 78,1 kJ/mol, 28,5 J/mol/K e 66,8 kJ/mol rispettivamente per il ΔH^* , il ΔS^* e il ΔG^* , indicando che lo stato di transizione della reazione è entropicamente favorito.

La resistenza al calore di questo enzima psicrofilo è stata valutata attraverso un duplice approccio sperimentale: gli esperimenti di UV *melting* e le cinetiche di inattivazione al calore. Il confronto tra i dati ottenuti in entrambe le tipologie sperimentali di studio suggerisce che il centro catalitico della *PhPNPasi* è più incline a subire denaturazione al calore rispetto all'intera molecola.

Sarebbe interessante investigare sul meccanismo catalitico al fine di individuarne le caratteristiche principali, quali, ad esempio, la tipologia di reazione a due substrati catalizzata, l'eventuale presenza di effetti cooperativi tra le subunità, ecc. Infine, potrebbero essere condotti degli studi volti a chiarire ulteriormente il ruolo fisiologico dell'enzima PNPasi in questo eubatterio psicrofilo, studiando il suo profilo di espressione in diverse condizioni di coltura.

Bibliografia

- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., Tollervey, D. (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.*, **18(19)**, 5399-410.
- Baginsky, S., Shteiman-Kotler, A., Liveanu, V., Yehudai-Resheff, S., Bellaoui, M., Settlage, R. E. (2001) Chloroplast PNPase exists as a homomultimer enzyme complex that is distinct from the *Escherichia coli* degradosome. *RNA*, **7 (10)**, 1464–1475.
- Beran, R.K., Simons, R.W. (2001) Cold-temperature induction of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase occurs by reversal of its autoregulation. *Mol. Microbiol.*, **39**, 112-125.
- Bernstein, H.J., (2000) Recent changes to RasMol, recombining the variants. *Trends Biochem Sci.*, **25(9)**, 453-455.
- Birolo, L., Tutino, M.L., Fontanella, B., Gerday, C., Mainolfi, K., Pascarella, S., Sannia, G., Vinci, F., Marino, G. (2000) Aspartate aminotransferase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. Cloning, expression, properties and molecular Modelling. *Eur J Biochem*, **267**, 2790-2802.
- Blum, E., Py, B., Carpousis, A. J., Higgins, C. F. (1997) Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol Microbiol*, **26**, 387–398.
- Blum, E., Py, B., Carpousis, A.J., Higgins, C.F. (1999) Polyadenylation promotes degradation of 3'-structured RNA by *Escherichia coli* mRNA degradosome in vitro. *J. Biol. Chem.*, **274** 4009-4016.
- Bradford, M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **102**, 248-254.
- Bycroft, M., Hubbard, T.J., Proctor, M., Freund, S.M. (1997) The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell(Cambridge,Mass.)*, **88**, 235-242.
- Carpousis, A. J. (2002) The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem Soc Trans*, **30**, 150–155.
- Carpousis, A.J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C., Krisch, H.M. (1994) Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell*, **76**, 889–900.

- Coburn, G.A., & Mackie, G.A. (1999) Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twist. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **62**, 55-108.
- Corsaro, M.M., Dal Piaz F., Lanzetta, R., Parrilli M. (2002) Lipid A structure of *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125: use of electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of fatty acid distribution. *Journal of mass spectrometry*, **37**, 5, 481-488.
- Corsaro, M.M., Lanzetta, R., Parrilli E., Parrilli M., Tutino, M.L., Ummarino, S., (2004) Influence of Growth Temperature on Lipid and Phosphate Contents of Surface Polysaccharides from the Antarctic Bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. *Journal of Bacteriology*, **186**, 1, 29-34.
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.C., Feller, G., Gerday, C. (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports*, **7**, 385–389.
- D'Amico, S., Marx, J.C., Gerday, C., Feller, G. (2003) Activity-Stability Relationships in Extremophilic Enzymes. *The Journal Of Biological Chemistry*, **278**, 7891–7896.
- De Vendittis, E., Castellano, I., Cotugno, R., Rocco, M.R., Raimo, G., Masullo, M. (2008) Adaptation of model proteins from cold to hot environments involves continuous and small adjustments of average parameters related to amino acid composition. *Journal of theoretical Biology*, **250**, 156-171.
- Erickson, R.J. & Grosch J.C. (1977) Isolation and characterization of a polynucleotide phosphorylase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Bacteriol.* **130**(2), 869–876.
- Farias, S.T. & Bonato, M.C.M. (2003) Preferred amino acids and thermostability. *Genet. Mol. Res.*, **2** (4), 383-393.
- Feller, G. & Gerday, C. (1997) Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell. Mol. Life Sci.*, **53**, 830–841.
- Feller, G. & Gerday, C. (2003) Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, **1**, 200-208.
- Fontanella, L., Pozzuolo, S., Costanzo, A., Favaro, R., Deho, G., Tortora, P. (1999) Photometric Assay for Polynucleotide Phosphorylase. *Analytical Biochemistry*, **269**, 353–358.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 571-607.
- Grunberg-Manago, M., Oritz, P.J., Ochoa, S. (1955) Enzymatic synthesis of nucleic acidlike polynucleotides. *Science*, **122**, 907-910.
- Haney, P.J., Badger, H.J., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R., Olsen, G.J. (1999) Thermal adaptation analysed by comparison of protein sequences from mesophilic and

- extremely thermophilic *Methanococcus* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3578-3583.
- Higgins, D.G., Sharp, P.M. (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*. **73**(1), 237-244.
- Hoyoux, A., Jennes, I., Dubois, P., Genicot, S., Dubail, F., François, J.M., Baise, E., Feller, G., Gerday, C. (2001) Cold-Adapted β -Galactosidase from the Antarctic Psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4, 1529-1535.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., Cuče, B., De Castro, E., Lachaize, C., Langendijk-Genevaux, P.S., Sigrist, C.J.A. (Nov 14 2007) The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res.*
- Ikai, A.J. (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J. Biochem.*, **88**, 1895-1898.
- Jacobs, J. S., Anderson, A. R. and Parker, R. P. (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.*, **17**, 1497-1506.
- Jacobson, A. & Peltz, S. W. (1996) Interrelationships of the Pathways of mRNA Decay and Translation in Eukaryotic Cells. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 693-739.
- Jarrige, A., Brechemier-Baey, D., Mathy, N., Duche, O., Portier, C. (2002) Mutational analysis of polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **321**, 397-409.
- Jarrige, A.C., Mathy, N., Portier, C. (2001) PNPase autocontrols its expression by degrading a double stranded structure in the pnp mRNA leader. *EMBO J.*, **20**, 6845-6855.
- Jones, G.H., Symmons, M.F., Hankins, J.S., Mackie, G.A. (2003) Overexpression and purification of untagged polynucleotide phosphorylases. *Protein Expression and Purification*, **32**, 202-209.
- Jones, P.G. & Inouye M., (1996) RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol. Microbiol.*, **21**, 1207-1218.
- Jones, P.G., VanBogelen, R.A., Neidhardt, F.C. (1987) Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **169**, 2092-2095.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132.
- Koradi, R., Billeter, M., Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*. **14**, 1, 51-55.

- Laemmli, UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leszczyniecka, M., De Salle, R., Kang, D.C., Fisher, P.B., (2004) The origin of polynucleotide phosphorylase domains. *Mol Phylogenet Evol*, **31**, 123-130.
- Leszczyniecka, M., Kang, D.C., Sarkar, D., Su, Z.Z., Holmes, M., Valerie, K., Fisher, P.B. (2002) Identification and cloning of human polynucleotide phosphorylase, hPNPase old-35, in the context of terminal differentiation and cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 16636-16641.
- Leszczyniecka, M., Su, Z.Z., Kang, D.C., Sarkar, D., Fisher, P.B. (2003) Expression regulation and genomic organization of human polynucleotide phosphorylase, hPNPaseold-35, a type I interferon inducible early response gene. *Gene*, **316**, 143–156.
- Marx, J.C., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Delille, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Huston, A.L., Sonan, G., Feller, G., Gerday, C. (2004) A perspective on cold enzymes: current knowledge and frequently asked questions. *Cell. Mol. Biol.*, **50** (5), 643-55.
- Masullo, M., Arcari, P., de Paola, B., Parmeggiani, A., Bocchini, V. (2000) Psychrophilic Elongation Factor Tu from the Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* Sp. TAC II 25. Biochemical characterization and cloning of the encoding gene. *Biochemistry*, **39**, 15531-15539.
- Masullo, M., Raimo, G., Bocchini, V. (1993) Resistance of archaeobacterial aEF-1 alpha.GDP against denaturation by heat and urea. *Biochim Biophys Acta*, **1162**(1-2), 35-39.
- Mathy, N., Jarrige, A.C., Robert-Le Meur, M., Portier, C. (2001) Increased expression of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase at low temperatures is linked to a decrease in the efficiency of autocontrol. *J. Bacteriol.*, **183**, 3848-3854.
- Matus-Ortega, M.E., Regonesi, M.E., Pina-Escobedo, A., Tortora, P., Deho, G., Garcia-Mena, J. (2007) The KH and S1 domains of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase are necessary for autoregulation and growth at low temperature. *Biochim. Biophys. Acta*. **1769**, 194–203.
- Médigue, C., Krin, E., Pascal, G., Barbe, V., Bernsel, A., Bertin, P.N., Cheung, F., Cruveiller, S., D'Amico, S., Duilio, A., Fang, G., Feller, G., Ho C., Mangelot, S., Marino, G., Nilsson, J., Parrilli, E., Rocha, E.P.C., Rouy, Z., Sekowska, A., Tutino, M.L., Vallenet, D., von Heijne, G., Danchin, A., (2005) Coping with cold: The genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Research*, **15**, 1325-1335.
- Mian, I.S., 1997 Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, II PH and D. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3187-3195.
- Miczak, A., Kaberdin, V. R., Wei, C. L., Lin-Chao, S. (1996) Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3865–3869.

- Min, J.J., Zassenhaus, H.P. (1991) Characterization of a novel NTP-dependent 3' exoribonuclease from yeast mitochondria. *SAAS Bull Biochem Biotechnol.*, **4**, 1–5.
- Min, J.J., Zassenhaus, H.P. (1993) A nucleoside triphosphate-regulated, 3' exonucleolytic mechanism is involved in turnover of yeast mitochondrial RNAs. *J Bacteriol.*, **175** (19), 6245–6253.
- Mitchell, P. & Tollervey, D. (2000) Musing on the structural organization of the exosome complex. *Nat Struct Biol*, **7**, 843–846.
- Myers, E.W. & Miller, W. (1988) Description of the alignment method used in program PALIGN. *CABIOS*, **4**, 11–17
- Parker, R. & Song, H. (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 121-127.
- Peitsch, M.C. (1996) ProMod and Swiss-Model: Internetbased tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 274-279.
- Piowowski, J., Grzechnik, P., Dziembowski, A., Dmochowska, A., Minczuk, M., Stepień, P.P. (2003) Human polynucleotide phosphorylase, hPNPase, is localized in mitochondria. *J Mol Biol*, **329**, 853–857.
- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M., Carpousis, A.J. (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature*, **381**, 169–172.
- Raijmakers, R., Egberts, W.V., Van Venrooij, W.J., Pruijn, G.J. (2002) Protein–protein interactions between human exosome components support the assembly of RNase PH-type subunits into a six-membered PNPase-like ring. *J. Mol. Biol.*, **323**, 653-663.
- Regnier, P. & Arraiano, C. M. (2000) Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *BioEssays*, **22**, 235–244.
- Robert-Le Meur, M., Portier, C. (1994) Polynucleotide phosphorylase of *Escherichia coli* induces the degradation of its RNase III processed messenger by preventing its translation. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 397-403
- Rost, B., Yachdav, G., Liu, J., (2004) The PredictProtein Server. *Nucleic Acids Research*, **32**, (Web Server issue):W321-W326.
- Ruggiero, I., Raimo, G., Palma, M., Arcari, P., Masullo, M. (2007). Molecular and functional properties of the psychrophilic elongation factor G from the Antarctic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. *Extremophiles*, **5**, 699-709.
- Sarkar, D. & Fisher, P.B. Polynucleotide phosphorylase: an evolutionary conserved gene with an expanding repertoire of functions. *Pharmacol Ther*, 2006, **112**, 243-263.
- Sarkar, D., Park, E. S., Emdad, L., Randolph, A., Valerie, K., Fisher, P. B. (2005) Defining the domains of human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseOLD-35) mediating cellular senescence. *Mol Cell Biol*, **25**, 7333–7343.

- Schuster, G., Lisitsky, I., & Klaff, P. (1999) Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol*, **120**, 937–944.
- Shi, Z., Yang, W.Z., Lin-Chao S., Chak K.Fu.; Yuan H.S. (2008) Crystal structure of *Escherichia coli* PNPase: central channel residues are involved in processive RNA degradation. *RNA* (New York, N.Y.), **14**(11), 2361-71.
- Siddiqui, K.S., Cavicchioli, R. (2006) Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 403-33.
- Srimathi, S., Jayaraman, G., Feller, G., Danielsson, B., Narayanan, P.R. (2007) Intrinsic halotolerance of the psychrophilic alpha-amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Extremophiles*, **11**(3), 505-515.
- Symmons, M.F., Jones, G.H., Luisi B.F., (2000) A Duplicated Fold Is the Structural Basis for Polynucleotide Phosphorylase Catalytic Activity, Processivity, and Regulation. *Structure*, **8**, 1215-1226, Elsevier Science Ltd
- Symmons, M.F., Williams, M.G., Luisi, B.F., Jones, G.H., Carpousis, A.J. (2002) Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases. *Trends in biochemical sciences* **27** (1),11-18
- Thieringer, H.A., Jones, P.G., Inouye, M. (1998). Cold shock and adaptation. *Bioessays*, **20**,49-57.
- Tosco, A., Birolo, L., Madonna, S., Lolli, G., Sannia, G., Marino, G., (2003) GroEL from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125: molecular characterization and gene cloning. *Extremophiles*, **7**, 17-28.
- Tronelli, D., Maugini, E., Bossa, F., Pascarella, S. (2007) Structural adaptation to low temperatures--analysis of the subunit interface of oligomeric psychrophilic enzymes. *FEBS J.* **274**(17), 4595-4608.
- Tutino, M.L., Parrilli, E., Giaquinto, L., Duilio, A., Sannia, G., Feller, G., Marino, G. (2002) Secretion of α -amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAB23: two different pathways in different hosts. *J Bacteriol*, **184**, 5814-5817
- Yamanaka, K. & Inouye, M. (2001). Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **183**, 2808–2816.
- Yamanaka, K. (1999) Cold shock response in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **1**, 193–202.
- Yehudai-Resheff, S., Portnoy, V., Yogev, S., Adir, N., Schuster, G. (2003) Domain analysis of the chloroplast polynucleotide phosphorylase reveals discrete functions in RNA degradation, polyadenylation, and sequence homology to exosome proteins. *Plant Cell*. **15**, 2003-2019.

Yoshimune, K., Galkin, A., Kulakova, L., Yoshimura, T., Esaki, N., (2005) Cold-active DnaK of an Antarctic psychrotroph *Shewanella* sp. Ac10 supporting the growth of dnaK-null mutant of *Escherichia coli* at cold temperatures. *Extremophiles*, **9**, 145-150.

Zangrossi, S., Briani, F., Ghisotti, D., Regonesi, M.E., Tortora, P., Dehò, G. (2000) Transcriptional and post-transcriptional control of polynucleotide phosphorylase during cold acclimation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **36**, 1470-1480

Zeldovich, K.B., Chen, P., Shakhnovich, E.I. (2007). Protein stability imposes limits on organism complexity and speed of molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104** (41), 16152-16157.

Zuo, Y. & Deutscher M.P., (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Oxford Journals, Nucleic Acid Research*, **29**, No5, 1017-1026.

Molecular and Functional Characterization of Polynucleotide Phosphorylase from the Antarctic Eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*

G. Evangelista^{1,†}, P. Falasca^{1,†}, I. Ruggiero^{2,3}, M. Masullo^{2,3} and G. Raimo^{1,2,3,*}

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambiente e Territorio, C/da Fonte Lappone, I-86090, Pesche (IS), Italy;

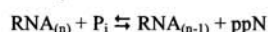
²Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Via S. Pansini 5, I-80131, Napoli, Italy; ³Dipartimento di Scienze Farmacobiologiche, Università di Catanzaro "Magna Graecia", Roccelletta di Borgia, I-88021, Catanzaro, Italy

Abstract: Polyribonucleotide phosphorylase from the psychrophilic Antarctic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* (PhPNPase) has been purified. This enzyme catalyzes both the RNA polymerisation and degradation reaction, showing the highest activity at temperatures below 40°C. PhPNPase is quite sensitive to heat treatment and it is endowed with remarkable halotolerance.

Keywords: RNA metabolism, cold adapted enzymes, activity-stability relationship.

INTRODUCTION

Polynucleotide phosphorylase (PNPase, polyribonucleotide: orthophosphate nucleotidyl-transferase, EC 2.7.7.8), discovered in 1955, was identified as the first enzyme able to promote the formation of RNA using ribonucleotides [1]. Unlike RNA polymerases, this enzyme does not require and cannot copy a template and, when added to a mixture of ribonucleotide diphosphates (ppNs), forms a random copolymer. In addition, the enzyme catalyses the phosphorolysis of oligo- and poly-ribonucleotides, producing ribonucleoside 5'-diphosphates (ppN). As a phosphorylase, PNPase acts as a processive exoRNase, an enzyme that degrades a molecule of single strand RNA (ssRNA) through successive cleavages; furthermore, PNPase remains tightly bound to its substrate during catalysis [2]. PNPase uses phosphate (P_i) to hydrolyse phosphodiester bonds, a reaction that, unlike cleavage, is mostly reversible. Therefore, according to the following scheme, the direction of PNPase activity, either degradation or polymerization, can be controlled by the relative concentrations of ppN and P_i:



where n is the length of the RNA in nucleotidyl units.

As the intracellular P_i concentration is usually high, the primary physiological role of PNPase is thought to be the 3'→5' phosphorolytic degradation of RNA [3, 4]. Indeed, this function could include the control of RNA quality by eliminating defective molecules [5-7], the regulation of the virulence and persistence of pathogenic bacteria [8], the RNA processing [9]. However, PNPase activity is sometimes involved in the polymerization of heteropolymeric tails [10, 11]. In *E. coli* part of the PNPase content forms a high molecular weight complex termed degradosome containing en-

doribonuclease RNase E, an RNA helicase, enolase and probably other proteins [12]. PNPase has been found in all types of bacteria [3], higher eukaryotes [13, 14]; in plants and animals the encoding genes are mainly localized in organelles [15].

The PNPase gene (*pnp*) encodes a 80-100 kDa polypeptide composed of five evolutionary conserved domains: two N-terminal core domains, homologous to *E. coli* RNase PH interspaced with an α-helical domain, and two 'K homology' (KH) and S1 C-terminal RNA-binding domains [16]. RNase PH, a 3'→5' phosphorolytic exonuclease, is responsible for the processing of the 3' ends of tRNA precursor [17]; the KH domain was originally identified in the human RNA-binding K protein [18], and the S1 domain is similar to the RNA-binding protein S1 of *E. coli* ribosome [19]. The eubacterial PNPase is composed of three identical subunits forming a doughnut-shaped structure with a central hole capable of accommodating an RNA strand [20]. Interestingly, the three-dimensional structures of the bacterial PNPase [20] and of the archaeal exosome core of RNase PH [21] are highly homologous, suggesting that the molecular mechanisms of action of PNPase and RNase PH may be very similar [21, 22]. PNPase is thus a structurally complex enzyme engaged in multiple interactions and has been utilized in the control of different phenotypic traits. Despite the evolutionary conservation and the physiological relevance of RNA degradation, PNPase does not seem to be essential for bacterial species survival tested so far, possibly because of functional redundancy in RNA turnover and quality control pathways [5, 23, 24]. Nevertheless, PNPase plays a key role in cold adaptation since it is essential for growth at low temperatures in psychrotrophic mesophiles [25, 26]. In *E. coli* the PNPase gene is not required for growth at 37°C, but is essential for viability at low temperatures [26-28]. Therefore, it has been proposed that this enzyme is involved in the "cold shock response" together with the product of the other genes, namely RecA, NusA, as well as the A subunit of DNA gyrase [29, 30]. In addition, PNPase is likely involved in the degradation of mRNAs coding for Cold Shock Proteins dur-

*Address correspondence to this author at the Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambiente e Territorio, Università del Molise, C/da Fonte Lappone, I-86090, Pesche (IS), Italy; Tel: +39-0874-404114; Fax: +39-0874-404123; E-mail: raimo@unimol.it

†G. Evangelista and P. Falasca equally contributed to realize this work.

ing the transition between cold shock and the actual adaptation to colder environmental conditions [31]. These observations support the hypothesis that the presence of both functional RNA binding domain is sufficient to sustain the growth of *E. coli* in a cold environment. The expression of *pnp* is post-transcriptionally regulated by PNPase [32-35]; in the cold adaptation phase, the *pnp* autogenous regulatory mechanism is transiently suppressed and therefore the amount of the mRNA coding for PNPase increases up to ten-fold, mainly because of its stabilization [28, 36, 37]. However, the molecular basis of this phenotype and the essential role played by PNPase in cold adaptation have not been completely elucidated [38], even though studies on the role of RNA interacting enzymes in cold adapted microorganisms has been recently undertaken [39]. Under this regard, PNPase in psychrophilic eubacteria should exhibit a constitutive physiological role, as these microorganisms live in habitats where the temperature is around the freezing point of water.

In order to contribute to the understanding of the biochemical role of PNPase in cold adapted microorganisms, we describe in this report the molecular and biochemical characterization of PNPase isolated from the psychrotolerant eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125 (*Ph*), a microorganism isolated from Antarctic marine sediments, able to grow in a quite broad range of temperatures (4-20°C), thus adapting its biochemical machinery to function either in the cold or in moderate temperature conditions.

MATERIALS AND METHODS

Q-sepharose chromatographic resin, Mono QTM 5/50 GL, Hi Prep 16/10 Phenyl FF, Superdex 200 10/300 GL were from GE Healthcare. [³H]GDP (11 Ci/mmol) was from Amersham. Guanosine diphosphate (GDP), NAD⁺, polyadenylic acid (poly(A)), D-(+)-glucose, phosphoenolpyruvate (PEP), sodium dodecyl sulphate (SDS), type II rabbit muscle pyruvate kinase (PK), type C-300 bakers yeast exokinase (EK), *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-P-dehydrogenase (G6PDH) and gel filtration molecular weight protein standards were from Sigma-Aldrich. Electrophoretic materials and SDS molecular weight protein standards were from Bio-Rad. All other chemicals were of analytical grade.

The following buffers were used: buffer A, 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl₂, 20 μg/mL poly(A), 1.5 mM PEP, 20 mM glucose, 0.5 mM NAD⁺, 10 mM phosphate; buffer B, 20 mM Tris-HCl pH 7.8; buffer C, buffer B supplemented with 10 mM MgCl₂ and 50 mM KCl. The reported pH values were adjusted at the temperatures at which each buffer was used.

P. haloplanktis strain was kindly supplied by Prof. C. Gerday (University of Liege, Belgium).

Enzyme Assay

*Ph*PNPase activity was assayed using either a photometric or a radiometric method, based on the ability of the enzyme to catalyse both degradation and polymerization of ssRNA, respectively.

During the purification procedure, the presence of *Ph*PNPase was checked by its ability to catalyse the degrada-

tion of poly(A), adapting a photometric assay reported in the literature [40]. The standard reaction mixture contained 0.6 U/mL PK, 2 U/mL HK and 4 U/mL G6PDH in 1 mL final volume of buffer A. The reaction was started by the addition of appropriate amounts of the enzyme sample and was followed kinetically at 15°C by measuring the increase in the absorbance at 340 nm due to NADH formation. Under these experimental conditions a linear relationship was found between the amount of *Ph*PNPase added to reaction mixture and the amount of NADH formed. The activity was expressed as μM • min⁻² [40].

The radiometric assay employed for the biochemical characterization of *Ph*PNPase was based on the determination of the ability of the enzyme to synthesize polyribonucleotides. Unless otherwise indicated, the standard mixture contained 20 μM [³H]GDP (s.a. 800-1200 cpm/pmol) and 1 mg/mL poly(A) in 300 μL of buffer C; the reaction, carried out at 15°C, started with the addition of proper amounts of *Ph*PNPase. At selected time intervals, 40-μL aliquots were withdrawn and diluted in 900 μL of cold 10% trichloroacetic acid (TCA) and filtered on nitrocellulose. Filters were washed twice with cold 10% TCA, dried and counted for radioactivity using a Tri-Carb 1500 liquid scintillation counter (Packard). The rate of polyribonucleotide formation was evaluated in the first minute of the reaction, where the amount of poly([³H]G) synthesized by *Ph*PNPase was linearly dependent on the incubation time. The specific activity of the enzyme was reported as mol of poly([³H]G) polymerised/s/mol of *Ph*PNPase.

Purification of *Ph*PNPase

*Ph*PNPase was isolated from a post-ribosomal supernatant (S-100) of a *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125 cell paste prepared as reported [41]. The S-100 fraction was dialyzed against buffer B supplemented with 50 mM NaCl and applied to a Q-sepharose column (60 x 1.6 cm), equilibrated with the same buffer. *Ph*PNPase was eluted with a linear 50-500 mM NaCl gradient in buffer B (total volume 1200 mL) at a flow rate of 2.5 mL/min. Fractions were analyzed by SDS-PAGE and checked for *Ph*PNPase activity using the photometric method described above [40]. Active fractions were pooled together and dialysed with buffer B supplemented with 1 M (NH₄)₂SO₄. The sample was then applied to a Hi Prep 16/10 Phenyl-sepharose FF column, equilibrated with the same buffer. Bound proteins were eluted by a linear 1 - 0.02 M (NH₄)₂SO₄ inverse gradient in buffer B (total volume 300 mL) at a flow rate of 3 mL/min. Active fractions were dialyzed against buffer B supplemented with 120 mM NaCl and loaded onto a Mono QTM 5/50 GL, equilibrated with the same buffer. *Ph*PNPase was eluted with a linear 120-400 mM NaCl gradient in buffer B (40 mL total volume) at a flow rate of 1 mL/min. Active fractions containing homogeneous *Ph*PNPase were collected, concentrated, dialyzed against buffer B supplemented with 40% glycerol and stored at -20°C until use. Following this procedure, nearly 660 μg of pure *Ph*PNPase from 700 mg of cytosolic protein extract were obtained.

Determination of the Molecular Mass of *Ph*PNPase

The molecular weight of *Ph*PNPase under non denaturing conditions was estimated by gel filtration on Superdex 200

10/300 GL connected to a computer assisted FPLC apparatus (GE Healthcare). The column was equilibrated at 4°C at a flow rate of 0.5 mL/min with buffer B containing 100 mM KCl and calibrated through separate runs of 0.5-1.5 µg in 110 µL elution buffer of the following protein standards: alcohol dehydrogenase (M_r 282000), myosin (M_r 200000), phosphorylase B (M_r 97400), transferrin (M_r 80000), bovine serum albumin (BSA, M_r 69000) and ovalbumin (M_r 46000). The molecular weight under denaturing conditions was determined by 10% polyacrylamide SDS-PAGE using a Mini-PROTEAN electrophoresis system (Bio-Rad). After the run, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The molecular mass protein standards were: myosin (M_r 200000), β -galactosidase (M_r 116250), phosphorylase B (M_r 97400), BSA (M_r 66200), ovalbumin (M_r 45000).

Determination of the N-Terminal Sequence of *PhPNPase*

The N-terminal amino acid sequence of the purified *PhPNPase* was determined by stepwise Edman degradation in an automated protein sequencer (Applied Biosystem), using an electroblotted protein sample on PVDF (Amersham) membrane, following its separation on SDS-PAGE.

Kinetic Parameters

The kinetic parameters of the *PhPNPase* reaction were derived measuring the rate of [3 H]G polymerization at 15°C determined at different [3 H]GDP concentrations (1-50 µM; s.a. 3044 cpm/pmol); data were analysed by the Lineweaver-Burk method, plotting the average values of at least three different experiments. The standard error never exceeded 5-8%.

Thermophilicity of *PhPNPase*

The effect of temperature on the ability of *PhPNPase* to sustain poly([3 H]G) synthesis was measured in the 0-55°C temperature interval. The 250 µL reaction mixture prepared in buffer C contained 5.8 µM [3 H]GDP (s.a. 1853 cpm/pmol), 1 mg/mL poly(A) and 47 pmol of *PhPNPase*. The reaction was followed kinetically and at appropriate time intervals, 40 µL aliquots were withdrawn and treated as reported above.

Thermal Stability of *PhPNPase*

The thermal stability of *PhPNPase* was evaluated by both heat inactivation kinetics and spectroscopic melting curves. In the heat inactivation experiments, a 24 µg/mL protein solution was exposed to different temperatures (30-70°C) and at selected time intervals aliquots were withdrawn and immediately chilled on ice for at least 30 min. The residual *PhPNPase* activity was determined at 15°C by the photometric assay as reported above. The value of the heat inactivation rate constant (k_{in}) at each temperature was estimated by measuring the residual activity after the incubation (A_t); the activity of a *PhPNPase* sample kept at 0°C was taken as 100% (A_0). The data were then analysed according to a first order kinetics.

The heat denaturation of *PhPNPase* was evaluated by UV melting curves, measuring the difference in the absorbance at 274 nm and 286 nm ($A_{274}-A_{286}$) in the temperature range

10-60°C using a computer-assisted Cary 1E spectrophotometer equipped with an electronic temperature controller (Varian). The increase in temperature was set to 0.2°C/min and the $A_{274}-A_{286}$ difference was recorded at every degree, normalized between 0 and 100%, and plotted versus the temperature.

Other Methods

SDS-PAGE was carried out on 10% polyacrylamide gel according to the method of Laemmli [42]. Proteins were estimated by the method of Bradford [43] using bovine serum albumin as standard. Sequence analysis and alignment were established with the help of a protein analysis software system packed with programs PALIGN [44] and CLUSTAL [45].

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular Properties of *PhPNPase*

The molecular weight of purified *PhPNPase* was determined under either native or denaturing conditions. Analyzed by gel filtration, native *PhPNPase* revealed a molecular mass of about 255000 Da (Fig. 1A), whereas when analyzed by SDS-PAGE, *PhPNPase* showed a molecular mass of 79000 Da (Fig. 1B). This behaviour indicated that *PhPNPase* is a homotrimeric protein, a property already reported for all the other PNPases known to date. The slightly higher molecular weight found on gel filtration with respect to the theoretical M_r of 227000 [46] could be due to a less compact conformation of the cold-adapted PNPase with respect to the mesophilic proteins used for the calibration of the column, a property already reported for other proteins isolated from the same eubacterium [41,47].

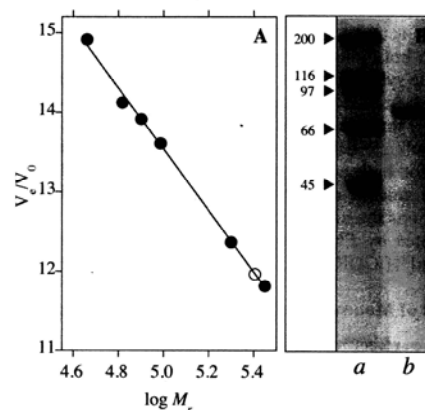


Figure 1. Molecular properties of *PhPNPase*. (A) Elution on gel filtration. The elution of M_r standards and *PhPNPase* was indicated by filled and empty symbols, respectively. (B) SDS-PAGE. Lane a: Molecular mass markers (the size is indicated on the left in kDa). Lane b: electrophoretic behaviour of 2 µg of pure *PhPNPase*.

The sequence of the first 15 amino acid residues was established by automatic sequencing analysis performed on

the isolated protein. The N-terminal sequence found (QAIKEFQLGHTVTL), was identical to that of the putative PNPase identified in the *P. haloplanktis* genome [46] with the exception of the absence of initial methionine in the purified protein. The availability of the complete amino acid sequence of *Ph*PNPase allowed to obtain a multiple alignment among the primary structures of homologue enzymes isolated from 45 different sources (not shown). The highest amino acid sequence identity was found with that of *Enterobacteriaceae*. Furthermore, in the primary structure of *Ph*PNPase, highly conserved regions can be identified, such as those corresponding to domains 1 and 2 of PNPase; these regions share common features with domains S1 and KH of exonuclease involved in RNA binding [16]. The multiple alignment among the amino acid sequence of *Ph*PNPase and that of eubacterial mesophilic and thermophilic ones (Fig. 2) revealed 70.9 % and 49.1 % amino acid identity with PNPase from *Escherichia coli* (*Ec*PNPase, T_{opt} 37°C) and *Thermoanaerobacter ethanolicus* (*Te*PNPase, T_{opt} 60°C), respectively. The comparative analysis among these three primary structures showed a higher content of Gly and a lower content of Pro and Arg in the psychrophilic enzyme. Furthermore, *Ph*PNPase possesses a lower number of positive (Arg + Lys) and negative (Asp + Glu) charged residues with respect to the amount present in *Ec*PNPase and even more in *Te*PNPase. An opposite behaviour was found when the analysis was carried out on the number of polar uncharged residues. In fact, this number progressively decreased from *Ph*PNPase to *Ec*PNPase and *Te*PNPase (126, 124 and 92 total polar uncharged residues, respectively). Therefore, the adaptation of PNPase to a cold environment might involve a reduced numbers of ion pairs and an increased number of polar residues.

Functional Properties of *Ph*PNPase

The activity of *Ph*PNPase was assessed by its ability to sustain both poly(A) degradation (Fig. 3A) and polyribonucleotide synthesis (Fig. 3B). In particular, the polymerisation reaction needed a primer and for this purpose we have used poly(A) throughout this work, even though *Ph*-rRNA rather than bulk *Ph*-rRNA can be used instead (not shown). However, for both activities the reaction rate linearly depended on the amount of enzyme added (not shown). Under these conditions the kinetic parameters of the polymerase reaction promoted by *Ph*PNPase measured at 15°C accounted for a K_M for [³H]GDP of 10.3 μM and for a k_{cat} of $3.8 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$.

Effect of Monovalent Cations on *Ph*PNPase Activity

The effect of monovalent cations on the activity of *Ph*PNPase was also checked (Fig. 4). All the chloride salts added were able to stimulate the polymerase activity of *Ph*PNPase, even though to a different extent. The maximum stimulatory effect was reached at different concentration for each salt. This behaviour has already been reported in PNPase isolated from *Streptomyces aureofaciens* [48] and also for other proteins isolated from *P. haloplanktis* [49]. Among the salts used CsCl at 0.9 M final concentration was the most effective, enhancing the *Ph*PNPase activity of about 7-fold. Interestingly, under these conditions both kinetic parameters of the *Ph*PNPase polymerase reaction were affected. In fact, the K_M for [³H]GDP and the k_{cat} become 40

Ph	-MQAIKEFQLGHTVTLLETGAIARQADGAVLASIGDTSVLTAVVGVKREAPGQDFPFLT	59
Ec	MLNPIVRFYQYQHTVTLTETGMARQATAAVVMSMDTAVFVTVGGKAKAGQDFPFLT	60
Te	-MEERTFEMELAGKLLVIGIKVQAQANGAAVVKYGDVTVLVATACASKEPRGIDFPFLT	59
Ph	VNYQERYTAAGRIPOGFLKREGRPNDETTIARLDRIPLRFPFGFVNEQVIATVSV	119
Ec	VNYQERTTAAGRIPOGFRFRKRPSEGETLIARLDRIPLRFPFGFVNEQVIATVSV	120
Te	VEYERLISVVKIPGGFIRKRGKPSKAILSRILDRIPRFLPFHGRVMDVQVATVLSV	119
Ph	NPEIQPMVALIGTSAALAISGIFPSPGIGATRVGIDGRVYLNPTLKELESKLDLVA	179
Ec	NPQVDFIVAMIGASAALSLSGIFPSPGIGAARVYINDQVYLNPTQDELKESKLDLVA	180
Te	DPDQVEIVAMIGSSVALSISDIFPSPGTAVAVGLVDGQPIINPNHEQREKSLMHLVVS	179
Ph	GTDNAVLMVESEADVLADIMLGAVVYGHQAQAIITAIKEFKAEAGKPTWDWTAAPKN	239
Ec	GTEAAVMVESEAQLLSDQMLGAVVYGHQEQVVIQINELVKEAGKPRWDQPEPPNE	240
Te	GTKDAIVMVEGAKAIPEETMLDAIMYAHYIKIVFIEIGIVEGVVFKSEVILHEDIK	239
Ph	SLEKVASIADKVGAYRITDKVARKEALGVADVVAVLTSELAGESLDKQIGIKIF	299
Ec	ALNARVAALAEARLSDAYRITDKQRYAQVDVVKSTIATL--LAEDBTLDNEIGIIL	297
Te	DLEKVRAYATEKIYNALRTEAKKERNDLDKVEVLEHP---KEEYPNDIADIDEVL	295
Ph	GSLEKKIVGRGRIAGEKRIDGEPDMIRALDVMYGLVPRTHGSAIFTRGETQALVTATLG	359
Ec	HAIKHNVRSRVLAGEPRIDGREDMIRGLDVRVTGLPRTHGSAIFTRGETQALVTATLG	357
Te	YIMKQKRMITEERIVDGKGLDDIRFVCEVGLVPRTHGSAIFTRGETQALVTATLG	355
Ph	TERDSQLIDDLTGHKNHFMNPNYPPFVGTGTFVGSPPKREIGHGNLAKRGIAAVMPT	419
Ec	TARDAQVLDELMEERTDFLPHYVYPPFVGTGTFVGSPPKREIGHGNLAKRGIAAVMPT	417
Te	ALGDIQLDGIIDGDEBAKRYMHNPPFVGTGTFVGSPPKREIGHGALAEERALEPVIPT	415
Ph	LTEFPYSIRVSEITESSSSMAVCGTSLALMAGVPIKASVAGIAMLGKEDDKFV	479
Ec	MDKFPYTVVSEITESSSSMAVCGSLALMAGVPIKAAVAGIAMLGKEDDKFV	477
Te	EEFPYTRIVSEVLSNSGTSQAVSCSTLALMAGVPIKAVAGVAMLIKEDDQVSV	475
Ph	LSDLGDEHLDGDMDFKAVAGTAGGITALQMDIKIRGITQIMQIALKQAARLHILEVM	539
Ec	LSDLGDEHLDGDMDFKAVAGSDGISALQMDIKIRGITKEMIQVALNQAARLHILEVM	537
Te	LTDIQGIREDPLGDMDFKAVAGTEKGITATQMDIKIPGIDKELIMALEKARGRLYLSKM	535
Ph	DKAISAPSEHLSQFAPRIITWKIPQKIAEVIIGKGGATIRQLTETGTTIIGIDGDTLKI	599
Ec	EQAINAPRGDISFPAPRIHTIKINPKIKVDIIGKGGVIRALTEGTTIIEEDDGTVKI	597
Te	LEVIKFRKGLSVYAPRVIRWVDFEIKIRIIGCGKTIKSIKIAETGVKIDIEEDGRYI	595
Ph	AATDGSAANALSRIEQLTAELEVGTIYEGKVRIYDPGAFVNIPLGKDLVHISQISTE	659
Ec	AATDGKAKHARRIEETAEIEVGRVYTKVTRIVDPGAFVNIPLGKDLVHISQISQAD	657
Te	TASDLRSGERAKMIRAITKDIYAVGTYLGVLRITPFGAFVNIPLGKDLVHISKLSKK	655
Ph	RVMVYDHLSEQQRVYKVLVDVDRGCRVRLSIEKAMESAADAAPTDA-----	708
Ec	RVEVYDYLQGRVYVYKVLVDVDRGCRIRLSIEKATESOAAPEAPEAEOGE	711
Te	RQVRVYDVKVGGDILVYKVTIDIKLGRISLSRKLALDPEEHEERN-----	700

Figure 2. Multiple alignment of selected PNPase amino acid sequences. Comparison of the *Ph*PNPase primary structure with the homologous proteins from *Escherichia coli* (*Ec*) and from *Thermoanaerobacter ethanolicus* (*Te*). Asterisks and dots indicate sequence identities and conservative substitutions, respectively.

μM and $23.8 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, respectively, accounting for a 1.5-fold increase in catalytic efficiency. Therefore, the stimulation of the activity by high salts concentration on *Ph*PNPase and other psychrophilic proteins, may indicate a possible common regulatory role exerted by monovalent cations in the mechanism of action of the enzyme. This finding should be more important for psychrophilic oligomeric enzymes in which the adaptation of the interaction between their monomers has also to be considered [50]. Under this regard, a structural role played by high concentration of selected salts in *Ph*PNPase cannot be excluded.

Effect of Temperature on the *Ph*PNPase Polymerase Activity

The thermophilicity of *Ph*PNPase was evaluated by measuring the rate of [³H]G polymerisation at selected tem-

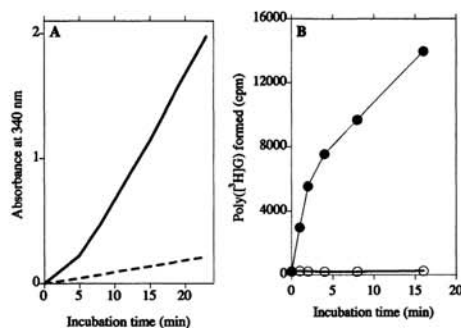


Figure 3. Activity of *PhPNPase*. (A) Degradation of poly(A). The reaction mixture was prepared as described in the Methods section. The reaction was started by the addition of 8 pmol of *PhPNPase*. The activity was followed at 15°C by measuring the increase in the absorbance at 340 nm (continuous line). A blank was run in the absence of the enzyme (discontinuous line). (B) Polyribonucleotide polymerisation activity. 300 μ L of buffer C were supplemented with 20 μ M [3 H]GDP (a.s. 1200 cpm/pmol) and 1 mg/mL poly(A); the reaction was carried out at 15°C and started with the addition of 70 pmol of *PhPNPase*. At the indicated time intervals, 40- μ L aliquots were taken and treated as described in the Methods section (filled circles). The amount of [3 H]GDP incorporated in the absence of the enzyme was also shown (empty circles).

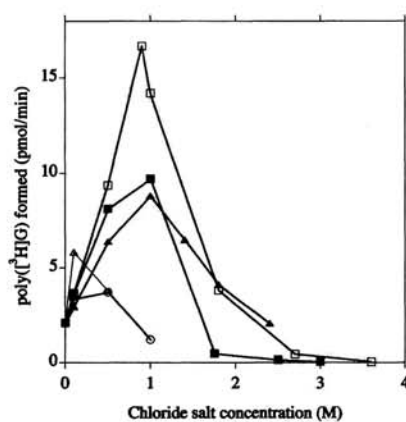


Figure 4. Effect of monovalent cations on the activity of *PhPNPase*. A 250 μ L final volume of buffer C was supplemented with 10 mM MgCl_2 , 20 μ M [3 H]GDP (a.s. 1155 cpm/pmol) and 1 mg/mL poly(A) and the following monovalent cations, added as chloride salts, at the indicated final concentration: Li^+ (○), Na^+ (■), K^+ (▲), Cs^+ (□) and NH_4^+ (△). The reaction was carried out at 15°C and started by adding 12 μ g of *PhPNPase* and was followed kinetically; at appropriate times 40- μ L aliquots were withdrawn, diluted in 900 μ L cold 10% TCA and then filtered as described in Methods.

peratures. The results reported in Fig. (5A) showed that the rate of polymerization increased up to 40°C, a temperature at

least 20°C higher than the T_{opt} of *P. haloplanktis*. Above this temperature a lower activity was found, likely due to the heat inactivation of the enzyme. In the 5–40°C interval the corresponding Arrhenius plot was linear (Fig. 5B), from which an energy of activation (E_a) of 87 kJ/mol could be derived. This value is similar to those reported for the activity of the elongation factors Tu and G, isolated from the same source [41,51]. The other thermodynamic parameters of activation calculated at 15°C were 78.1 kJ/mol, 28.5 J/mol/K and 66.8 kJ/mol for ΔH^* , ΔS^* and ΔG^* respectively, thus indicating that the transition state of the reaction is entropically favoured.

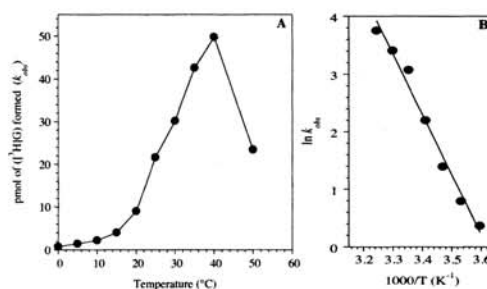


Figure 5. Effect of temperature on the polymerase activity of *PhPNPase*. (A) poly([3 H]G) polymerization catalysed by *PhPNPase* in the 0–50°C temperature interval. At each temperature the reaction mixture was prepared as reported in the Methods section. The k_{obs} were calculated as pmoles of [3 H]GDP polymerized per sec per pmol of the enzyme. (B) The data in the 5–40°C interval were treated according to the Arrhenius equation.

Effect of Temperature on the Stability of *PhPNPase*

To investigate the heat resistance of this psychrophilic enzyme, the heat denaturation of *PhPNPase* was followed by UV melting curves in the interval 10–60°C. The results reported in Fig. (6A) indicate that the temperature for half denaturation of the protein was approximately 46°C. Using a different experimental approach, the heat resistance of *PhPNPase* was evaluated through heat inactivation kinetics realised at different temperatures, ranging from 30 to 70°C (Fig. 6B). Under these conditions the heat inactivation process followed a first order kinetics at each temperature tested, with $t_{1/2}$ values of 19.6, 4.3, 1.3, 0.4 and 0.17 min at 30, 40, 50, 60 and 70°C, respectively. The first order heat inactivation constants analyzed according to the Arrhenius equation (Fig. 6C) indicates that the E_a of the heat inactivation process was 96.7 kJ/mol. This value was significantly lower than that determined for other proteins from mesophilic and even more from thermophilic microorganisms [52]. The comparison between the half-denaturation and the heat inactivation experiments suggested that the catalytic centre of *PhPNPase* was more prone to heat denaturation than the entire molecule. This finding is coherent with observations on other proteins isolated from the *P. haloplanktis* [41,51]. This property could be related to the high flexibility possessed by the catalytic centre of the psychrophilic enzymes challenging their cold adaptation [53–55].

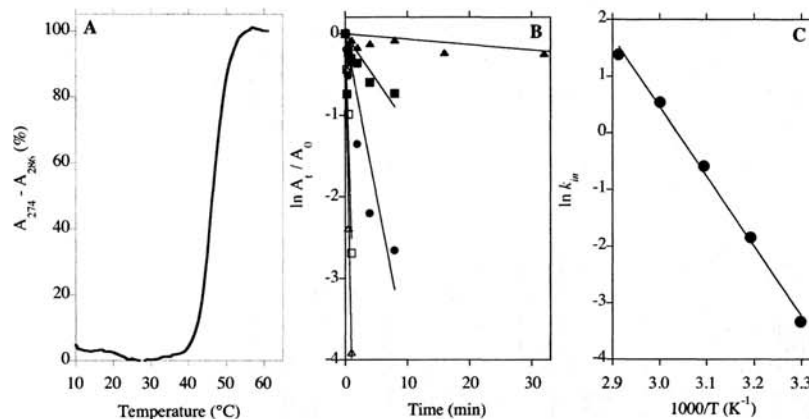


Figure 6. Heat stability of PhPNPase. (A) UV melting curve of a 5 μM PhPNPase sample. (B) Heat inactivation. A 5 μM solution of PhPNPase in a 700 μL final volume of buffer A was incubated in a stoppered tube at 30 (\blacktriangle), 40 (\blacksquare), 50 (\bullet), 60 (\square) and 70°C (\triangle). At the indicated times, 60- μL aliquots were withdrawn and the residual activity was evaluated at 15°C by the photometric assay as described in the Methods section. The results were expressed as the A_t/A_0 considering as 100% the activity of a PhPNPase sample kept at 0°C. (C) In the 30-70°C temperature interval the k_{in} values obtained from the experiment reported in B were treated according to the Arrhenius equation.

In conclusion, the data reported in this paper agree with recent reports in which the growth temperature adaptation of proteins is based on some common strategies [47, 56]. In general, this evolutionary process might involve small changes in the amino acid composition not affecting the overall three dimensional structure of the protein. Under this regard, the higher flexibility of cold-adapted enzymes can be generally achieved through the usage of smaller-size, and less hydrophobic residues, with respect to mesophilic and thermophilic ones [47].

REFERENCES

- [1] Grunberg-Manago, M.; Ortiz, P.J.; Ochoa, S. Enzymatic synthesis of nucleic acid like polynucleotides. *Science*, **1955**, *122*, 907-910.
- [2] Symmons, M.F.; Williams, M.G.; Luisi, B.F.; Jones, G.H.; Carposis, A.J. Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases. *Trends Biochem. Sci.*, **2002**, *27*, 11-18.
- [3] Littauer, U.Z.; Soreq, H. In *The Enzymes*; Boyer, P., Ed., Academic Press, New York, NY, **1982**, Vol. XV, pp. 517-553.
- [4] Coburn, G.A.; Mackie, G.A. Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **1999**, *62*, 55-108.
- [5] Cheng, Z.F.; Deutscher, M.P. Quality control of ribosomal RNA mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 6388-6393.
- [6] Li, Z.; Reimers, S.; Pandit, S.; Deutscher M.P. RNA quality control: degradation of defective transfer RNA. *EMBO J.*, **2002**, *21*, 1132-1138.
- [7] Houseley, J.; LaCava, J.; Tollervey, D. RNA-quality control by the exosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2006**, *7*, 529-539.
- [8] Clements, M.O.; Eriksson, S.; Thompson, A.; Lucchini, S.; Hinton, J.C.; Normark, S.; Rhen, M. Polynucleotide phosphorylase is a global regulator of virulence and persistency in *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 8784-8789.
- [9] Perrin, R.; Meyer, E.H.; Zaepfel, M.; Kim, Y.J.; Mache, R.; Grienberger, J.M.; Gualberto, J.M.; Gagliardi, D. Two exoribonucleases act sequentially to process mature 3'-ends of atp9 mRNAs in *Arabidopsis* mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 25440-25446.
- [10] Mohanty, B.K.; Kushner, S.R. Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' to 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 11966-11971.
- [11] Deutscher, M.P.; Li, Z. Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **2001**, *66*, 67-105.
- [12] Carposis, A.J. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.*, **2007**, *61*, 71-87.
- [13] Sarkar, D.; Fisher, P.B. Polynucleotide phosphorylase: an evolutionary conserved gene with an expanding repertoire of functions. *Pharmacol. Ther.*, **2006**, *112*, 243-263.
- [14] Slomovic, S.; Portnoy, V.; Yehudai-Resheff, S.; Bronshtein, E.; Schuster, G. Polynucleotide phosphorylase and the archaeal exosome as poly(A)-polymerases. *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, *1779*, 247-255.
- [15] Littauer, U.Z. From polynucleotide phosphorylase to neurobiology. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 38889-38897.
- [16] Matus-Ortega, M. E.; Regonesi, M. E.; Piña-Escobedo, A.; Tortora, P.; Dehò, G.; Garcia-Mena, J. The KH and S1 domains of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase are necessary for autoregulation and growth at low temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1769*, 194-203.
- [17] Kelly, K.O.; Deutscher, M.P. Characterization of *Escherichia coli* RNase PH. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 17153-17158.
- [18] Siomi, H.; Matunis, M.J.; Michael, W.M.; Dreyfuss, G. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucl. Acids Res.*, **1993**, *21*, 1193-1198.
- [19] Bycroft, M.; Hubbard, T.J.; Proctor, M.; Freund, S.M.; Murzin, A.G. The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell*, **1998**, *88*, 235-242.
- [20] Symmons, M.F.; Jones, G.H.; Luisi, B.F. A duplicated fold is the structural basis for polynucleotide phosphorylase catalytic activity, processivity, and regulation. *Structure*, **2000**, *8*, 1215-1226.
- [21] Lorentzen, E.; Walter, P.; Fribourg, S.; Evguenieva-Hackenberg, E.; Klug, G.; Conti, E. The archaeal exosome core is a hexameric ring structure with three catalytic subunits. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2005**, *12*, 575-581.
- [22] Pruijn, G.J.M. Doughnuts dealing with RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2005**, *12*, 562-564.
- [23] Cheng, Z.F.; Zuo, Y.; Li, Z.; Rudd, K.E.; Deutscher, M.P. The *vacB* gene required for virulence in *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* encodes the exoribonuclease RNase R. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 14077-14080.

- [24] Donovan, W.P.; Kushner, S.R. Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, *83*, 120-124.
- [25] Goverde, R.L.; Huis in't Veld, J.H.J.; Kusters, J.G.; Mooi, F.R. The psychrotrophic bacterium *Yersinia enterocolitica* requires expression of *pnp*, the gene for polynucleotide phosphorylase, for growth at low temperature (5 degrees C). *Mol. Microbiol.*, **1998**, *28*, 555-569.
- [26] Luttinger, A.; Hahn, J.; Dubnau, D. Polynucleotide phosphorylase is necessary for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **1996**, *19*, 343-356.
- [27] Piazza, F.; Zappone, M.; Sana, M.; Briani, F.; Deho, G. Polynucleotide phosphorylase of *Escherichia coli* is required for the establishment of bacteriophage P4 immunity. *J. Bacteriol.*, **1996**, *178*, 5513-5521.
- [28] Zangrossi, S.; Briani, F.; Ghisotti, D.; Regonesi, M.E.; Tortora, P.; Dehò, G. Transcriptional and post-transcriptional control of polynucleotide phosphorylase during cold acclimation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **2000**, *36*, 1470-1480.
- [29] Jones, P.G.; van Bogelen, R.A.; Neidhardt, F.C. Induction of protein in response to low temperatures in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **1987**, *169*, 2092-2095.
- [30] Goldstein, J.; Pollitt, N.S.; Inoué, M. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 283-287.
- [31] Favaro, R.; Dehò, G. Polynucleotide phosphorylase-deficient mutants of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, **2003**, *185*, 5279-5286.
- [32] Robert-Le Meur, M.; Portier, C. Polynucleotide phosphorylase of *Escherichia coli* induces the degradation of its RNase III processed messenger by preventing its translation. *Nucl. Acids Res.*, **1994**, *22*, 397-403.
- [33] Jarrige, A.C.; Mathy, N.; Portier, C. PNPase autocontrols its expression by degrading a double-stranded structure in the *pnp* mRNA leader. *EMBO J.*, **2001**, *20*, 6845-6855.
- [34] Jarrige, A.; Brechemier-Baey, D.; Mathy, N.; Duche, O.; Portier, C. Mutational analysis of polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **2002**, *321*, 397-409.
- [35] Regonesi, M.E.; Briani, F.; Ghetta, A.; Zangrossi, S.; Ghiotti, D.; Tortora, P.; Dehò, G. A mutation in polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli* impairing RNA binding and degradosome stability. *Nucl. Acids Res.*, **2004**, *32*, 1006-1017.
- [36] Mathy, N.; Jarrige, A.C.; Robert-Le Meur, M.; Portier, C. Increased expression of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase at low temperatures is linked to a decrease in the efficiency of autocontrol. *J. Bacteriol.*, **2001**, *183*, 3848-3854.
- [37] Beran, R.K.; Simons, R.W. Cold-temperature induction of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase occurs by reversal of its autoregulation. *Mol. Microbiol.*, **2001**, *39*, 112-125.
- [38] Gualerzi, C.O.; Giuliodori, A.M.; Pon, C.L. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J. Mol. Biol.*, **2003**, *331*, 527-539.
- [39] Purusharth, R.I.; Madhuri, B.; Ray, M.K. Exoribonuclease R in *Pseudomonas syringae* is Essential for Growth at Low Temperature and Plays a Novel Role in the 3' End Processing of 16 and 5 S Ribosomal RNA. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 16267-16277.
- [40] Fontanella, L.; Pozzuolo, S.; Costanzo, A.; Favaro, R.; Deho, G.; Tortora, P. Photometric Assay for Polynucleotide Phosphorylase. *Anal. Biochem.*, **1999**, *269*, 353-358.
- [41] Masullo, M.; Arcari, P.; de Paola, B.; Parmeggiani, A.; Bocchini, V. Psychrophilic elongation factor Tu from the Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* sp. TAC II 25. Biochemical characterization and cloning of the encoding gene. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 15531-15539.
- [42] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, *227*, 680-685.
- [43] Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **1976**, *102*, 248-254.
- [44] Myers, E. W.; Miller, W. Description of the alignment method used in program PALIGN. *CABIOS*, **1988**, *4*, 11-23.
- [45] Higgins, D.G.; Sharp, P.M. CLUSTAL: a package for performing multiple alignment on a microcomputer. *Gene*, **1988**, *73*, 237-244.
- [46] Médigue, C.; Krin, E.; Pascal, G.; Barbe, V.; Bernsel, A.; Bertin, P.N.; Cheung, F.; Cruveiller, S.; D'Amico, S.; Duilio, A.; Fang, G.; Feller, G.; Ho, C.; Mangenot, S.; Marino, G.; Nilsson, J.; Parrilli, E.; Rocha, E.P.C.; Rouy, Z.; Sekowska, A.; Tutino, M.L.; Vallenet, D.; von Heijne, G.; Danchin, A. Coping with cold: The genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Res.*, **2005**, *15*, 1325-1335.
- [47] De Vendittis, E.; Castellano, I.; Cotugno, R.; Ruocco, M.R.; Raimo, G.; Masullo, M. Adaptation of model proteins from cold to hot environments involve continuous and small adjustments of average parameters related to amino acid composition. *J. Theor. Biol.*, **2008**, *250*, 156-171.
- [48] Erickson, R.J.; Grosch, J.C. Isolation and characterization of a polynucleotide phosphorylase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Bacteriol.*, **1977**, *130*, 869-876.
- [49] Srimathi, S.; Jayaraman G.; Feller G.; Danielsson B.; Narayanan, P. R. Intrinsic halotolerance of the psychrophilic α -amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Extremophiles*, **2007**, *11*, 505-515.
- [50] Tronelli, D.; Maugini, E.; Bossa, F.; Pascarella, S. Structural adaptation to low temperatures - analysis of the subunit interface of oligomeric psychrophilic enzymes. *FEBS J.*, **2007**, *274*, 4595-4608.
- [51] Ruggiero, I.; Raimo, G.; Palma, M.; Arcari, P.; Masullo, M. Molecular and functional properties of the psychrophilic elongation factor G from the Antarctic Eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. *Extremophiles*, **2007**, *11*, 699-709.
- [52] Masullo, M.; Raimo, G.; Bocchini, V. Resistance of archaeobacterial α EF-1 α -GDP against denaturation by heat and urea. *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, *1162*, 35-39.
- [53] D'Amico, S.; Collins, T.; Marx, J.C.; Feller, G.; Gerday, C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep.*, **2006**, *7*, 385-389.
- [54] Siddiqui, K.S.; Cavicchioli, R. Cold-adapted enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, **2006**, *26*, 403-433.
- [55] Feller, G.; Gerday, C. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell. Mol. Life Sci.*, **1997**, *53*, 830-841.
- [56] Zeldovich K.B.; Berezovsky I.N.; Shakhnovich E.I. Protein and DNA sequence determinants of thermophilic adaptation. *PLOS Comput. Biol.*, **2007**, *3*, 62-72.

Differential cold-adaptation among protein components of the thioredoxin system in the psychrophilic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125

Roberta Cotugno,^a Maria Rosaria Ruocco,^a Salvatore Marco,^a Patrizia Falasca,^b Giovanna Evangelista,^b Gennaro Raimo,^{ab} Angela Chambery,^c Antimo Di Maro,^c Mariorosario Masullo^{*ad} and Emmanuele De Vendittis^{*a}

Received 20th October 2008, Accepted 20th February 2009

First published as an Advance Article on the web 23rd March 2009

DOI: 10.1039/b818467d

Thioredoxin and thioredoxin reductase from the psychrophilic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* were obtained as recombinant His-tagged proteins (*rPhTrx* and *rPhTrxR*, respectively). *rPhTrxR* is organised as a homodimeric flavoenzyme, whereas *rPhTrx* is a small monomeric protein, both containing a functional disulfide bridge. However, three additional cysteines are present as free thiols in purified *rPhTrxR*. When individually tested in specific assays, *rPhTrxR* and *rPhTrx* display a full activity at low temperatures, an indispensable requirement for cold-adapted proteins. In particular, *rPhTrxR* catalyses the NADPH dependent reduction of DTNB and *rPhTrx* provokes the insulin precipitation in the presence of DTT. The analysis of the effect of temperature on these reactions indicates that *rPhTrxR* is more cold-adapted than *rPhTrx*, having a higher psychrophilicity. The combined activity of *rPhTrxR* and *rPhTrx*, tested in a reconstituted assay containing NADPH as electrons donor and human insulin as the thioredoxin substrate, demonstrates a direct functional interaction between the purified recombinant components of the thioredoxin system of *P. haloplanktis*. Furthermore, the NADPH-dependent reduction of *rPhTrx* catalysed by *rPhTrxR* is fully reversible and allows the determination of its redox potential, whose value is in the range of other bacterial and archaeal thioredoxins. The analysis of the thermostability of *rPhTrxR* points to its discrete heat resistance. However, *rPhTrx* is much more heat resistant, with a half inactivation time of about 4 h at 95 °C. This exceptional heat resistance for a psychrophilic protein is significantly decreased by the reduction of the disulfide bridge of *rPhTrx*. Functionality, thermodependence and thermostability of the *P. haloplanktis* thioredoxin system point to the relevance of this key mechanism for the preservation of the reduced state of cytoplasmic proteins even in a cold-adapted source.

Introduction

The thioredoxin system, involved in the preservation of the reduced state of cytoplasmic proteins, includes two ubiquitous key components of the intracellular redox balance, namely thioredoxin (Trx) and thioredoxin reductase (TrxR).^{1,2} Trx is a small monomeric protein containing the conserved CXXC sequence, in which the vicinal cysteines form a reversible disulfide bridge;³ a similar motif with two active cysteines is also present in the homodimeric TrxR, a NADPH-dependent flavoenzyme.^{4–6} The reduction of protein targets involves

oscillation between the oxidised and reduced forms of both cysteine motifs of the Trx/TrxR system, using NADPH as electrons donor and the FAD/FADH₂ oscillation in the TrxR active site. While the size of Trx (10–15 kDa) is sufficiently conserved among the different living domains, two structurally unrelated groups have been identified for TrxR, namely type I high molecular mass (55–58 kDa per subunit) isolated from higher eukaryotes, and type II low molecular mass (around 35 kDa per subunit) from lower eukaryotes and prokaryotes.⁴ The number of the specific protein targets in the Trx/TrxR system appears more limited in eubacteria and archaea, with respect to eukarya.¹ Nevertheless, a certain redundancy of this enzymatic defence mechanism, probably related to the requirement of a precise control of the redox state of cellular proteins, is observed in some eubacteria.⁷

Recently, the study of the thioredoxin system also looked at some extremophilic microorganisms, such as the (hyper)-thermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus*,^{8–10} *Aeropyrum pernix*,¹¹ *Pyrococcus horikoshii*,¹² and *Thermoplasma acidophilum*,¹³ thus proving the crucial role of this system in a heat-adapted source. *Vice versa*, less information is available

^a Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Via S. Pansini 5, 80131 Napoli, Italy.

E-mail: devendittis@dbbm.unina.it; Fax: +39 081 7463653

^b Dipartimento di Scienze e Tecnologie dell'Ambiente e del Territorio, Università del Molise, Contrada Fonte Lappone, 86090 Pesche (IS), Italy

^c Dipartimento di Scienze della Vita, II Università di Napoli, Via Vivaldi 43, 81100 Caserta, Italy

^d Dipartimento di Scienze Farmacobiologiche, Università di Catanzaro "Magna Graecia", 88021 Roccelletta di Borgia (CZ), Italy. E-mail: masullo@unicz.it; Fax: +39 0961 391040

regarding the thioredoxin system in cold-adapted microorganisms. Among psychrophilic sources, the Antarctic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* is interesting for its growth environment in cold sea water, a condition favouring oxygen solubility at low temperatures, and increasing the stability of reactive oxygen species (ROS) produced during cellular metabolism. However, in *P. haloplanktis* the possible increased ROS exposure is counteracted by depletion of the genes involved in the molybdopterin-dependent metabolism, one of the ROS producing sources.¹⁴ The characterisation of a highly efficient iron-containing superoxide dismutase (SOD) in *P. haloplanktis* and the extreme reactivity of its unique cysteine residue towards the reducing agent β -mercaptoethanol¹⁵ or oxidised glutathione¹⁶ suggest that this psychrophilic microorganism possesses the defence mechanisms against ROS. This hypothesis is strengthened by the identification in the *P. haloplanktis* genome of a single SOD gene and of another key element in the early ROS defence, namely catalase.¹⁴ Also, the preservation of the reduced state of cytoplasmic proteins is an apparently key process of *P. haloplanktis*, because of the putative identification of single components of the Trx/TrxR system in its genome.¹⁴ On the other hand, the enzymatic pathway for disulfide bond formation showed some distinctive features with respect to mesophilic counterparts.¹⁷ Differently from some eubacteria or archaea possessing various types of SOD and/or components of the thioredoxin system, the *P. haloplanktis* genome apparently lacks redundant genes involved in this redox control, a finding probably related to the specific growth environment of this psychrophilic eubacterium.

This work addresses the characterisation of the components of the Trx/TrxR system in *P. haloplanktis* through the heterologous expression of the TrxR (*trxB*) and Trx (*trxA*) genes and the biochemical investigation on the recombinant proteins.

Experimental

Chemicals, enzymes, and buffers

FAD, β -NADPH, β -NADP⁺, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), dithiothreitol (DTT), β -mercaptoethanol, isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG) and human insulin (10 mg mL⁻¹) were from Sigma-Aldrich. Aquacide IIA was from Calbiochem. Restriction/modifying enzymes were from GE Healthcare. Plasmid pGEM T-easy was from Promega. Vector pET-22b(+) and the *E. coli* BL21(DE3) strain were from Novagen. Anti-His antibodies were from Santa Cruz, and the chemiluminescent SuperSignal West Pico kit was from Pierce. The chromatographic medium Ni-NTA agarose was from Qiagen. Oligonucleotide synthesis and nucleotide sequencing was carried out by Primm. HPLC-grade solvents were obtained from Carlo Erba. All other chemicals were of analytical grade.

The following buffers were used: buffer A, 20 mM Tris-Cl, pH 7.8; buffer B, 100 mM sodium phosphate, pH 7.8, 1 mM EDTA; buffer C, 100 mM potassium phosphate, pH 7.8, 10 mM EDTA; buffer D, 100 mM potassium phosphate, pH 7.0, 10 mM EDTA.

Vectors for heterologous expression of genes encoding Trx and TrxR from *P. haloplanktis*

The genomic DNA from *P. haloplanktis* was prepared as described.¹⁸ Transformation of bacterial strains, preparation of plasmids and other details of DNA recombinant technology were as previously described.¹⁹ The complete coding sequence of the *PhTrxR* gene (*trxB*; GeneID, 3710321) was amplified by PCR, using the genomic DNA from *P. haloplanktis* as a template, and the oligonucleotides 5'-A₋₁₁GGAAAAACAT-ATG-**ACT-GAA-GCA-AA**₁₄-3' (forward primer) and 5'-A₉₆₁-**CTT-AAC-AGC-CTC-GAG-ATT-ATC-TAA**-A₉₃₆-3' (reverse primer). Numbering in primers begins from the starting codon (italics), whereas bold letters indicate mismatches introduced to create the *NdeI* and *XhoI* restriction cloning sites. The 972 bp PCR product obtained was cloned into the pGEM T-easy plasmid and sequenced to confirm the identity with the *PhTrxR* gene. After digestion of the recombinant plasmid with *NdeI* and *XhoI*, the 948 bp fragment, containing the *PhTrxR* gene, was cloned into the prokaryotic expression vector pET-22b(+) previously digested with the same endonucleases. The new construct (6312 bp) was controlled by restriction analysis and named v*PhTrxR*.

An identical strategy was followed for engineering a vector for the heterologous expression of the *PhTrx* gene (*trxA*; GeneID, 3710320). Oligonucleotides used for PCR amplification of its complete coding sequence were the forward primer 5'-C₋₁₁GGAGAGCCAT-ATG-AGC-GAG-AA₁₁-3' and the reverse primer 5'-T₃₃₇TGT-TTA-AAT-CTC-GAG-ATT-GTT-TTC-T₃₁₂-3' and the amplified DNA segment extended 348 bp. After subcloning in pGEM T-easy and final cloning in pET-22b(+) using the endonucleases *NdeI* and *XhoI*, the new engineered plasmid (5688 bp) was named v*PhTrx*.

Expression of *PhTrx* and *PhTrxR* genes in *E. coli* and purification of His-tagged heterologous products

The vectors v*PhTrxR* and v*PhTrx* were used to transform the *E. coli* BL21(DE3) strain, an inducible system for the expression of heterologous genes upon the addition of IPTG. In a typical experiment, a preculture of each transformant, grown at 37 °C overnight in 20 ml Luria-Bertani medium containing 0.1 mg mL⁻¹ ampicillin, was inoculated into a 2 L flask of the same medium. After growth at 37 °C up to 0.6 OD₆₀₀, the culture was induced with 100 μ g mL⁻¹ IPTG and grown up to additional 3 h. Bacterial cells were collected by centrifugation, resuspended in buffer A, and then lysed by a cell disruption system (Constant Systems Ltd., UK) at 1.5 kbar. Before further treatment, the cell homogenate was supplemented with 50 μ M FAD, to improve flavin incorporation into the recombinant *PhTrxR*. The sample was then centrifuged at 30 000 \times g for 1 h and the supernatant (S-30) was used as the starting material for the purification of the recombinant product. Using this expression system, the extrapeptide E(H)₆ was fused to the C-terminal residue of both recombinant products. The His-tagged proteins, identified by immunostaining with anti-His antibodies, were purified by Ni²⁺-agarose affinity chromatography. To this aim, the S-30 (30 mL) was added in batch to 4 mL of Ni-NTA agarose, equilibrated in buffer A.

After incubation overnight, the slurry was poured in a column and extensively washed with buffer A. For the purification of the recombinant *PhTrxR*, bound proteins were stepwise eluted with 60 mL of buffer A supplemented with 10 mM, 50 mM or 200 mM imidazole-Cl, respectively. A similar procedure was used for the purification of recombinant *PhTrx*; however, the stepwise elution started with 20 mM imidazole-Cl instead of 10 mM imidazole-Cl. Pure protein fractions were pooled together, concentrated with Aquacide IIA, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in buffer A supplemented with 50% (v/v) glycerol. Purified recombinant *PhTrxR* and *PhTrx* were named *rPhTrxR* and *rPhTrx*, respectively.

Determination of FAD bound to *rPhTrxR*

rPhTrxR samples (1.3–7.5 μM) were incubated overnight at room temperature in the presence of 6 M guanidinium-Cl in buffer A. Fluorescence measurements on the denatured protein samples were realised with a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian). Excitation wavelength was set at 375 nm and emission was recorded at 528 nm; the excitation and emission slits were set at 10 nm. The amount of FAD bound to the protein was derived from the comparison with a calibration curve made with FAD solutions at known concentration.

Ellman assay for cysteine determination

The total number of cysteine residues and the presence of disulfide bonds in *rPhTrxR* and *rPhTrx* was determined by the Ellman assay.²⁰ In order to obtain the complete reduction of all cysteine residues, 25 μM protein was incubated for 20 min at room temperature in buffer B, containing 6 M guanidinium-Cl and 50 mM DTT as a reducing agent. Samples were then extensively dialysed against 0.1 M acetic acid, containing 6 M guanidinium-Cl, in order to remove the excess DTT and to stabilise the free thiol groups. Titration of cysteines was realised by incubating 2.5–9 μM of either oxidised or reduced protein in buffer B, containing 6 M guanidinium-Cl and 0.15 mM DTNB. The number of cysteines was derived from the absorbance at 412 nm, due to the formation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB), using $\epsilon_{\text{M}} = 13\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Enzymatic assays for *rPhTrxR* and *rPhTrx*

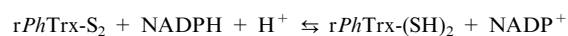
Enzymatic assays were carried out in a Cary 1E spectrophotometer (Varian), equipped with an electronic temperature controller; the cuvette containing the assay mixture was preincubated at the selected temperature, before starting the reaction. The activity of *rPhTrxR* was measured through its ability to reduce DTNB in the presence of NADPH as electrons donor.²¹ Indeed, DTNB is reduced to two molecules of TNB. For routine analysis the assay mixture contained 5 mM DTNB and different aliquots of *rPhTrxR* in 1 mL final volume of buffer C. The reaction began with the addition of 200 μM final concentration of NADPH. The absorbance increase at 412 nm was followed kinetically up to 2 min, to determine the initial rate of the reaction. Blanks run in the absence of *rPhTrxR* were subtracted. One unit (U) of activity was defined as the amount of enzyme that caused the conversion of 1 μmol DTNB in one min. The specific activity of

rPhTrxR was expressed as $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$. For the evaluation of the kinetic parameters of the DTNB reduction assay, Lineweaver–Burk plots of the activity data were drawn, using substrate concentrations (0.4–5.0 mM DTNB) almost equally distributed in the reciprocal x -axis around the K_{m} of the reaction. Linearity in double reciprocal plots was evaluated through the squared correlation coefficient r^2 , which in most cases was higher than 0.98. Energy of activation and thermodynamic parameters of activation were calculated according to standard equations.

The functionality of *rPhTrx* was evaluated by the thiol-disulfide oxidoreductase activity of the psychrophilic protein in the presence of DTT as electrons donor, and human insulin as substrate.²² The reaction was followed by monitoring the increase in absorbance at 650 nm, due to precipitation of the reduced β -chain of insulin. The assay mixture contained 0.13 mM human insulin and 0.5–10 μM *rPhTrx* in 0.5 mL final volume of buffer C. The reaction started with the addition of DTT at 200 μM final concentration and was followed kinetically up to 60 min, to determine the rate of insulin reduction in the linear part of the increase in the absorbance at 650 nm. The activity of *rPhTrx* was directly expressed through the $\Delta A_{650}\text{ min}^{-1}$.

In order to evaluate the combined activity of *rPhTrxR* and *rPhTrx* in a complete thioredoxin system, NADPH was used as electron donor and human insulin as the thioredoxin substrate.^{23–24} The assay mixture contained 0.13 mM human insulin, 1 μM *rPhTrxR* and 1–10 μM *rPhTrx* in 1 mL final volume of buffer C. The reaction began with the addition of NADPH at 200 μM final concentration and was followed by monitoring insulin precipitation at 650 nm.

To determine the redox potential of the thioredoxin system, the reversibility of the NADPH-dependent reduction of *rPhTrx* catalysed by *rPhTrxR* was evaluated according to the following reaction scheme:



where *rPhTrx-S₂* and *rPhTrx-(SH)₂* are the oxidised and reduced form of *rPhTrx*, respectively. The assay was realised either at 10 $^{\circ}\text{C}$ or 25 $^{\circ}\text{C}$, essentially as previously reported.¹¹ The reaction mixture contained 10–25 μM *rPhTrx* (in its initial *rPhTrx-S₂* form) and 50 μM NADPH in buffer D. The direct reaction started with the addition of 50 nM *rPhTrxR* and was followed through the NADPH absorbance at 340 nm ($\epsilon_{\text{M}} = 6220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). When the amount of NADPH consumed, stoichiometrically equivalent to the *rPhTrx-(SH)₂* formed, reached an equilibrium, the reverse reaction started with the addition of 1200 μM NADP^+ , which led to the formation of *rPhTrx-S₂*, measured through the amount of NADPH regenerated. After a few minutes, a new equilibrium was reached and the final concentrations of *rPhTrx-S₂*, *rPhTrx-(SH)₂*, NADPH and NADP^+ were used for calculating the redox potential according to the Nernst equation:

$$E_{(rPhTrx)}^{0'} = E_{(NADP^+)}^{0'} + \frac{RT}{nF} \times \ln \frac{[\text{NADP}^+][rPhTrx-(SH)_2]}{[\text{NADPH}][rPhTrx-S_2]}$$

using a value of -0.324 V for $E_{(NADP^+)}^{0'}$.²⁵

Spectroscopic methods

Thermal denaturation of *rPhTrxR* and *rPhTrx* was followed by means of UV or fluorescence measurements realised on Cary 1E spectrophotometer (Varian) or Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian), respectively, equipped with an electronic temperature controller. The increase in temperature was set at $0.2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, and absorbance/fluorescence were recorded at every $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ increase. The difference of absorbance $A_{286} - A_{274}$ was used to obtain the UV melting curves, according to previously described protocols.^{26,27} *Vice versa*, a combination of various excitation and emission wavelengths was used to obtain the fluorescence melting curves. Fluorescence values were corrected for the temperature-dependent quenching.

Other methods

The mass spectrometry analysis was realised on protein samples desalted by RP-HPLC, as previously reported.^{17,28} Protein concentration was determined by the method of Bradford,²⁹ using bovine serum albumin as standard. Protein purity was evaluated by SDS/PAGE according to standard protocols.³⁰ Immunoblotting experiments for the identification of His-tagged protein bands were carried as previously described in the presence of anti-His antibodies.^{19,31} The chemiluminescent reagents of the SuperSignal West Pico kit were used to reveal immunoreactive protein bands. The quaternary structure of *rPhTrxR* was evaluated by gel filtration on a Superdex 75 10/300 GL column.

Results

Expression and purification of recombinant TrxR and Trx from *Pseudoalteromonas haloplanktis*

Genes encoding TrxR and Trx from the psychrophilic eubacterium *P. haloplanktis* have been successfully expressed in the *E. coli* strain BL21(DE3), using the pET-22b(+) vector. Indeed, both components of the thioredoxin system were purified as recombinant His-tagged proteins. The SDS/PAGE of total extracts obtained from a BL21(DE3)/*vPhTrxR* culture grown in different conditions (Fig. 1A) revealed that the highest expression was achieved after 3 h induction, even though the greatest difference between IPTG-induced and not induced culture was after 1 h. This latter condition was judged preferable, when setting up the production of purified *rPhTrxR*, because a lot of His-tagged protein accumulated in the insoluble fraction from cell homogenate after 3 h induction. Furthermore, the amount of recombinant protein in the S-30 fraction after 1 h IPTG induction was judged convenient for its purification by the Ni-NTA Agarose chromatography. Indeed, when 10 mM imidazole-Cl was present in the elution buffer, only a small amount of the His-tagged protein was collected. However, this sample was discarded because containing a higher mass protein contaminant (not shown). *Vice versa*, most of the heterologous product was eluted by 50 mM imidazole-Cl. Fractions containing homogenous recombinant protein were pooled together and concentrated. The yield was nearly 25 mg of purified *rPhTrxR* from 2 L culture.

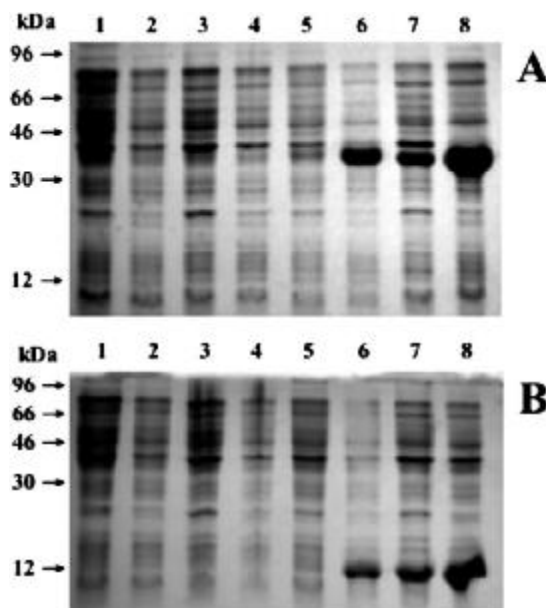


Fig. 1 SDS-PAGE of total protein extracts obtained from cultures producing *rPhTrxR* and *rPhTrx*. **A** Cultures (1 mL) of the *E. coli* BL21(DE3) strain transformed with pET-22b(+) (lanes 1–4) or *vPhTrxR* (lanes 5–8) were grown at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ up to 0.6 OD_{600} ; cultures were then allowed to grow for additional 1 h (lanes 1, 2, 5, 6) or 3 h (lanes 3, 4, 7, 8) in the absence (lanes 1, 3, 5, 7) or in the presence of $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ IPTG (lanes 2, 4, 6, 8). After collection of the bacterial cells, $50\text{ }\mu\text{L}$ of sample buffer for SDS-PAGE was added to each pellet, and $20\text{ }\mu\text{L}$ of the resuspended material obtained after centrifugation was analysed on a 14% polyacrylamide gel. **B** Cultures (1 mL) of the *E. coli* BL21(DE3) strain transformed with pET-22b(+) (lanes 1–4) or *vPhTrx* (lanes 5–8) were treated as indicated in **A** with the exception that the protein samples were analysed on a 16% polyacrylamide gel. Migration of standards of molecular mass is reported on the left.

A similar approach led to purification of *rPhTrx* from the BL21(DE3)/*vPhTrx* culture. Also in this case, the highest expression was obtained after 3 h induction and the greatest difference between induced and not induced culture was after 1 h (Fig. 1B). However, in this case, the preferred condition for production of *rPhTrx* was 3 h IPTG induction, because most of the heterologous product remained in the S-30 fraction. The purification of *rPhTrx* was realised through the Ni-NTA Agarose chromatography; in this case, complete recovery of homogenous recombinant protein was attained using 20 mM imidazole-Cl. The yield was nearly 15 mg of purified *rPhTrx* from 2 L culture.

Molecular properties of *rPhTrxR* and *rPhTrx*

rPhTrxR and *rPhTrx* were homogenous on SDS/PAGE and showed an electrophoretic mobility of 34 kDa or 12 kDa, respectively (Fig. 2). The M_r values of these recombinant proteins were also analysed by ESI/Q-TOF mass spectrometry. Two peaks were obtained with the *rPhTrxR* sample and the weight of the heaviest component (34732.4 ± 0.4) was in good agreement with the theoretical M_r of *rPhTrxR* (34731.9); this value was deduced from the amino acid

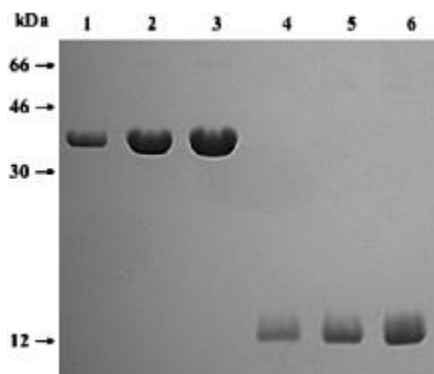


Fig. 2 SDS-PAGE of purified *rPhTrxR* and *rPhTrx*. Increasing amounts of *rPhTrxR* (2, 4 and 6 μg in lanes 1–3) and *rPhTrx* (5, 10 and 15 μg in lanes 4–6) were analysed on a 14% polyacrylamide gel. Migration of standards of molecular mass is reported on the left.

sequence, considering His-tail and one postulated disulfide bridge. The other component (34601.2 ± 0.3) was explained with the loss of initial methionine in part of the *rPhTrxR* molecules. One peak was obtained from the ESI/Q-TOF analysis of the *rPhTrx* sample, with an experimental M_r of 12682.6 ± 0.1 , a value indicating that the initial methionine was absent in all molecules present in the *rPhTrx* sample. Also in this case, this value was in good agreement with theoretical M_r of *rPhTrx* (12683.4), considering His-tail, one postulated disulfide bridge and loss of initial methionine. The M_r of *rPhTrxR* and *rPhTrx* was also determined under native conditions by gel-filtration chromatography. *rPhTrxR* eluted as a single peak with an apparent molecular mass of 70 kDa, whereas the elution time of *rPhTrx* corresponded to 12 kDa. These data indicate that *rPhTrxR* has a homodimeric organisation, whereas *rPhTrx* is a small monomeric protein.

As expected for a flavoenzyme, *rPhTrxR* had the typical absorption bands at 375 and 450 nm due to the FAD moiety; the fluorescence spectra of *rPhTrxR* confirmed the presence of FAD, because of an emission band at 519 nm obtained upon excitation at 280 nm or 375 nm (not shown). When *rPhTrxR* was denatured in the presence of guanidinium-Cl, the 519 nm emission maximum shifted to 528 nm, with a concomitant increase in quantum yield. The position of this fluorescence maximum corresponded to that of free FAD in solution. The quantum yield of denatured *rPhTrxR* samples excited at 375 nm linearly increased with the protein concentration. Therefore, after comparison with a FAD calibration curve, it was possible to determine the amount of cofactor bound to different preparations of *rPhTrxR* (Fig. 3). When no FAD was added into cell homogenate, the calculated ratio of FAD bound/*rPhTrxR* subunit (mol/mol) was 0.39. However, when the cell homogenate was supplemented with 50 μM FAD, the ratio approached the expected 1 : 1 stoichiometry, as confirmed by two different preparations displaying a ratio of 0.92 and 0.98, respectively.

Five and two cysteine residues, respectively, are present in the amino acid sequences of *PhTrxR* and *PhTrx* deduced from the corresponding genes.¹⁴ The Ellman assay was used to determine the total number of cysteines and the presence of

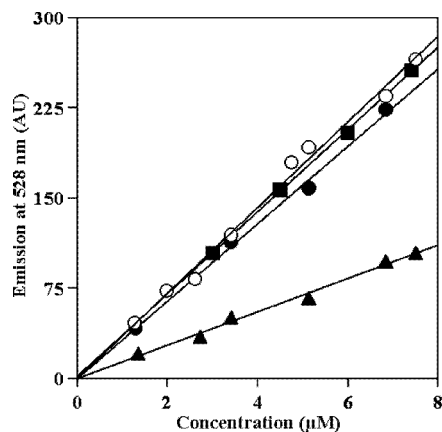


Fig. 3 Determination of the FAD content in *rPhTrxR*. The flavin emission of three preparations of *rPhTrxR* was measured after guanidinium-Cl denaturation, as indicated in Experimental. The individual *rPhTrxR* preparations were prepared without (filled triangles) or upon the addition of 50 μM FAD (filled circles or squares) during the lysis of the cell homogenate from the BL21(DE3)/*rPhTrxR* culture. A FAD calibration curve was obtained from the emission of the indicated concentrations of free FAD (open circles).

disulfide bridges in the recombinant proteins obtained in the present work. The purification procedure of *rPhTrxR* and *rPhTrx* did not involve the use of thiol reagents; therefore, it is likely that recombinant products were purified in their active (oxidised) state, with cysteines of the conserved CXXC sequence motif engaged in a disulfide bridge. On the other hand, this oxidised state could be converted in the corresponding inactive reduced state by a DTT treatment, which led to the formation of two free cysteines. Using the Ellman assay, 2.8 cysteines/subunit or essentially no cysteine were found in the oxidised states of *rPhTrxR* or *rPhTrx*, respectively; *vice versa*, 4.7 or 1.7 cysteines were found in the reduced *rPhTrxR* or *rPhTrx*, respectively. Therefore, both *rPhTrxR* and *rPhTrx* possess the postulated disulfide bridge in their purified oxidised state; candidates for the formation of this disulfide bridge are cysteines of the conserved CXXC consensus motif. The data also indicate that the remaining three cysteines in *rPhTrxR* are present as free sulfidryl groups in the purified oxidised state of the recombinant flavoenzyme.

Biochemical properties of *rPhTrxR* and *rPhTrx*

The thiol–disulfide oxidoreductase activity of *rPhTrxR* was measured by its ability to reduce DTNB in the presence of NADPH as electrons donor. When comparing the specific activity of *rPhTrxR* samples prepared without or upon FAD supplementation, significantly lower values of activity were obtained with samples containing an under-stoichiometric FAD content. Therefore, the following experiments were all performed on *rPhTrxR* samples containing a stoichiometric FAD/*rPhTrxR* ratio.

In order to obtain the kinetic parameters of the reaction and to evaluate the thermodependence of the flavoenzyme, the activity of *rPhTrxR* was assayed in the temperature interval 10–40 $^{\circ}\text{C}$ in the presence of increasing concentrations of

Table 1 Effect of temperature on the kinetic parameters of the DTNB reduction activity of *rPhTrxR*

Temperature/ °C	V_{\max} / U mg ⁻¹	K_m for DTNB/ mM	k_{cat} /s ⁻¹	k_{cat}/K_m 1/ mM
10.0	3.26	1.39	3.78	2.72
12.5	3.53	1.01	4.09	4.03
15.0	4.43	1.82	5.13	2.81
17.5	5.74	2.18	6.65	3.05
20.0	5.96	1.90	6.90	3.64
22.5	5.83	2.27	6.74	2.97
25.0	6.27	1.73	7.26	4.19
27.5	6.90	2.33	7.99	3.42
30.0	6.99	1.61	8.10	5.04
35.0	6.43	1.44	7.44	5.17
40.0	5.34	0.94	6.18	6.58

Values of V_{\max} and K_m for DTNB were derived from Lineweaver–Burk plots and represent the average of two determinations made with different protein preparations; errors never exceeded 8% of the reported value. For the calculation of k_{cat} , 1 mol of *rPhTrxR* corresponded to 69464 grams.

DTNB; the kinetic parameters are reported in Table 1. Figures related to V_{\max} pointed to a measurable activity even at the lowest temperature tested, *i.e.* 10 °C, a typical feature of a psychrophilic enzyme. The V_{\max} and the related k_{cat} moderately increased up to 30 °C and then slightly decreased. *Vice versa*, the effect of temperature on K_m was almost negligible. As a consequence, the catalytic efficiency of the flavoenzyme, evaluated through the k_{cat}/K_m ratio, increased only 1.9 fold in the 10–30 °C interval.

The functionality of *rPhTrx* in the temperature interval 10–40 °C was assessed by its thiol–disulfide oxidoreductase activity on human insulin in the presence of DTT. As shown in Fig. 4, the rate of insulin reduction at 10 °C increased with the *rPhTrx* concentration; concomitantly, the lag phase from insulin precipitation progressively decreased. Therefore, *rPhTrx* displays its activity even at low temperatures, an indispensable feature for a psychrophilic protein. The rate of

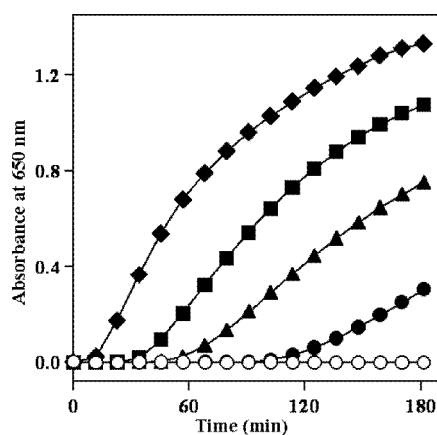


Fig. 4 Thiol–disulfide oxidoreductase activity of *rPhTrx*. The assay was carried out at 10 °C as indicated in the Experimental section either in the absence (open circles) or in the presence of 0.56 μM *rPhTrx* (filled circles), 1.12 μM *rPhTrx* (filled triangles), 2.24 μM *rPhTrx* (filled squares), 5.60 μM *rPhTrx* (filled diamonds).

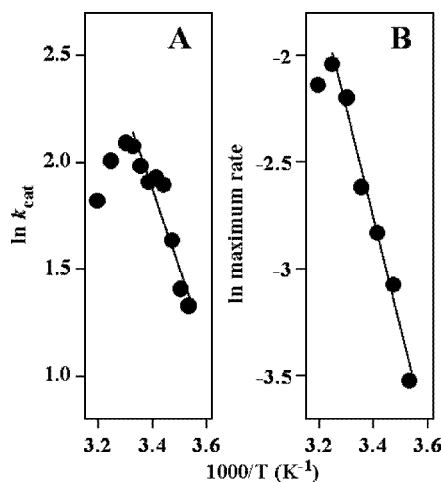


Fig. 5 Arrhenius analysis of the activities supported by *rPhTrxR* and *rPhTrx*. *A* The k_{cat} values of the DTNB reduction activity of *rPhTrxR* were taken from Table 1. The linear fit of the data covers the 10–27.5 °C temperature interval. *B* The V_{\max} values of the thiol–disulfide oxidoreductase activity of *rPhTrx* in the presence of DTT were derived from double reciprocal plots of the data obtained from assays as that reported in Fig. 4, carried out at the indicated temperatures. For other details see the Results section. The linear fit of the data covers the 10–35 °C temperature interval.

insulin precipitation measured in the linear increase of the absorbance was plotted *versus* the *rPhTrx* concentration in a double reciprocal graph aimed at evaluating the apparent maximum rate of the reaction. In the 10–30 °C interval this kinetic parameter progressively increased by 3.8 fold, a value significantly higher than that obtained for the DTNB reduction activity of *rPhTrxR*. The maximum rate continued its increase till 35 °C and then slightly decreased. Therefore, the activity of *rPhTrx* shows a greater thermodependence compared to *rPhTrxR*.

To better evaluate the different effect of temperature on the activity of *rPhTrxR* and *rPhTrx*, an Arrhenius analysis has been realised (Fig. 5). Concerning *rPhTrxR* (Fig. 5A), a linear fit of the data in the temperature interval below 30 °C gave a value for the energy of activation of 30.3 kJ mol⁻¹. Among the thermodynamic parameters of activation calculated at 10 °C ($\Delta H^* = 28.0$ kJ mol⁻¹; $\Delta S^* = -134$ J mol⁻¹ K⁻¹; $\Delta G^* = 65.9$ kJ mol⁻¹), the entropy of activation had a negative value. These findings indicate that the DTNB reduction activity catalysed by *rPhTrxR* has counteracting thermodynamic parameters, because of the low enthalpic factor and unfavourable entropy. Concerning *rPhTrx* (Fig. 5B), a higher energy of activation (42.5 kJ mol⁻¹) was obtained from a linear fit of the data in the temperature interval up to 35 °C. The greater energy requested by *rPhTrx* to reach the activated state suggests a different temperature responsiveness of the activities catalysed by *rPhTrxR* and *rPhTrx*.

The availability of both components of the thioredoxin system of *P. haloplanktis* allowed an evaluation of their biochemical properties in a reconstituted assay containing

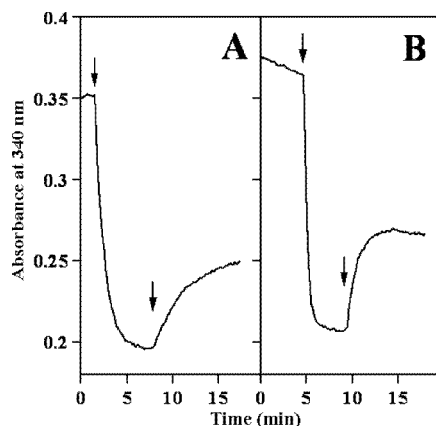


Fig. 6 Reversibility of the NADPH-dependent reduction of *rPhTrx* catalysed by *rPhTrxR* at 10 °C (A) or 25 °C (B). Reduction and reoxidation of *rPhTrx* was measured through the NADPH absorbance in a reaction mixture containing 25 μM *rPhTrx* and 50 μM NADPH in buffer D. The sequential additions of 50 nM *rPhTrxR* and 1200 μM NADP⁺ is indicated by arrows. The absorbance values have been corrected for dilution factors and NADP⁺ absorption due to contaminants. The redox potential of *rPhTrx* was calculated from each equilibrium concentration of *rPhTrx*-(SH)₂, *rPhTrx*-S₂, NADP⁺, NADPH. Other details are indicated in the Experimental.

rPhTrxR, *rPhTrx*, NADPH as electron donor and human insulin as the thioredoxin substrate. Also in this case, the rate of insulin reduction at 10 °C increased at increasing *rPhTrx* concentration and the lag phase from insulin precipitation decreased (not shown); furthermore, the precipitation began at significantly shorter times (about 3 fold) compared to those observed with thioredoxin alone. These findings prove the functionality of the recombinant reconstituted thioredoxin system of *P. haloplanktis*.

The time course of NADPH-dependent reduction of *rPhTrx* catalysed by *rPhTrxR* in the reconstituted thioredoxin system of *P. haloplanktis* was analysed to study the reversibility of the reaction in the absence of insulin precipitation. As shown in Fig. 6, reduction and reoxidation of the disulfide bond in *rPhTrx* was reversible at both 10 °C (Fig. 6A) and 25 °C (Fig. 6B). This behaviour allowed the determination of the redox potential of the *rPhTrx*-(SH)₂/*rPhTrx*-S₂ pair and the calculated $E^{0'}$ is -0.276 V at both temperatures.

Heat stability of *rPhTrxR* and *rPhTrx*

As shown in the previous section, the DTNB reduction activity catalysed by *rPhTrxR* had a slight decrease above 30 °C. This finding prompted an examination of the heat inactivation profile of the psychrophilic flavoenzyme. Samples of *rPhTrxR* were incubated for 10 min at different temperatures and their residual activity was then measured at 25 °C by the DTNB reduction assay. As shown in Fig. 7, *rPhTrxR* was stable well above 30 °C, as its half-inactivation temperature was 59.4 °C.

The heat stability of *rPhTrxR* was also investigated through fluorescence measurements, in order to evaluate the thermal denaturation of the psychrophilic flavoenzyme. The fluorescence melting curves of *rPhTrxR* were realised using a

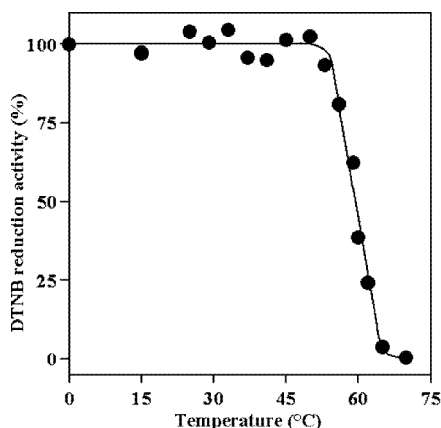


Fig. 7 Heat inactivation profile of *rPhTrxR*. A solution containing 0.3 mg mL⁻¹ *rPhTrxR* in buffer A was divided into 100 μL aliquots. After the exposure for 10 min at the indicated temperatures, the aliquots were immediately chilled on ice for at least 30 min. The residual activity of the various *rPhTrxR* aliquots was measured through the DTNB reduction assay at 25 °C on 8, 16 and 24 μL aliquots. The activity of an untreated aliquot kept at 0 °C was defined as 100% activity.

combination of various excitation and emission wavelengths to follow the temperature-dependent conformational changes of the enzyme in the region of aromatic residues or flavine bound cofactor (Fig. 8). The three melting curves representing the emission of aromatic residues had similar shapes, even though significant variations emerged in the emission yield (Fig. 8A). The calculated melting temperatures ranged between 55.9 °C and 57.3 °C, thus similar to the

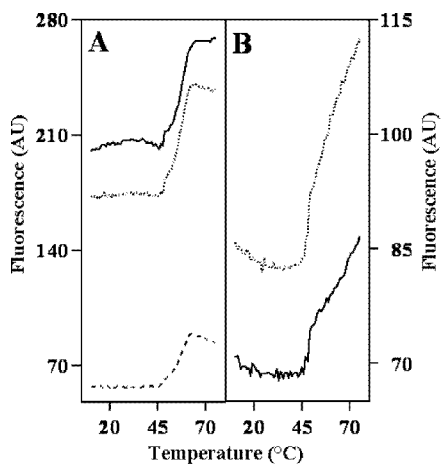


Fig. 8 Fluorescence melting curves of *rPhTrxR*. A solution containing 0.13 mg mL⁻¹ *rPhTrxR* in buffer A was placed in a 500 μL stopped fluorescence cuvette. Excitation and emission slits of 10 nm were used. A Fluorescence of aromatic residues: λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 310 nm (continuous line); λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 330 nm (dotted line); λ_{ex} 295 nm, λ_{em} 343 nm (dashed line). B Fluorescence of flavine: λ_{ex} 375 nm, λ_{em} 519 nm (continuous line); λ_{ex} 450 nm, λ_{em} 519 nm (dotted line). Fluorescence was expressed as arbitrary units (AU). Other details are indicated in the Experimental.

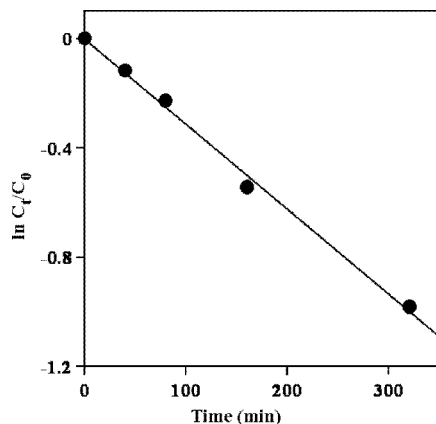


Fig. 9 Kinetics of inactivation of rPhTrx at 95 °C. A solution containing 0.3 mg mL⁻¹ rPhTrx in buffer A was divided in 100 µL aliquots. Each aliquot was incubated at 95 °C for the time indicated and then immediately chilled on ice. The residual activity of the various rPhTrx aliquots was measured at 25 °C through the insulin precipitation assay in the presence of DTT at a final rPhTrx concentration of 2.0 µM. The rate of insulin precipitation, determined as indicated in the Experimental, was compared to that measured on untreated aliquot kept at 0 °C. C_t and C₀ are the activities determined from the aliquots exposed at the time *t* and that of the untreated sample, respectively.

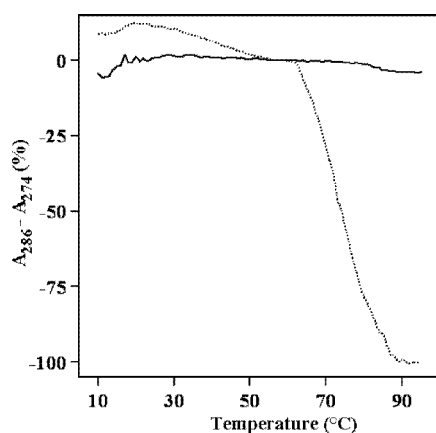


Fig. 10 UV melting curves of rPhTrx. A solution containing 0.13 mg mL⁻¹ rPhTrx in buffer A was placed in a 1 mL cuvette before (continuous line) or after a 30 min treatment at room temperature with 200 µM DTT (dotted line).

half-inactivation temperature of 59.4 °C. When considering the flavine emission, the shape of the two profiles obtained at different excitation wavelengths impaired an evaluation of the melting temperature (Fig. 8B), even though the emission yield started to increase at the same temperature observed in Fig. 8A.

The heat inactivation of rPhTrx pointed to its exceptional stability, because no significant decrease of the insulin reduction activity occurred after 10 min exposure of this protein at 100 °C. The inactivation kinetics of rPhTrx at 95 °C confirmed this finding, as the calculated $t_{1/2}$ in the first

order kinetics was 222 min (Fig. 9). The heat stability of rPhTrx was also investigated through UV melting curves in two different experimental conditions (Fig. 10). The profile obtained on the purified protein in its oxidised state confirmed the exceptional heat resistance of this psychrophilic protein, because no apparent denaturation occurred in the indicated temperature interval. *Vice versa*, a typical denaturation profile was obtained when rPhTrx was previously reduced with DTT. Under these reducing conditions, the recombinant protein showed a melting temperature of 74 °C.

Discussion

The present study extends our knowledge on ROS adaptation in *Pseudoalteromonas haloplanktis*, a microorganism living in a cold sea environment, and therefore adapted to increased oxygen solubility and enhanced ROS stability.¹⁴ A previous work showed that the early ROS defence, such as that against the superoxide anion, is provided with the high efficiency of the Fe-SOD isolated from *P. haloplanktis*.¹⁵ In this work, a repair mechanism after ROS damages has been examined through the characterisation of the thioredoxin system of *P. haloplanktis*, functioning in restoration of the reduced state of cellular proteins. Both components of this system have been purified as recombinant proteins and subjected to a characterisation, including the study of their molecular and functional properties, with a focus on thermostability and thermostability.

rPhTrxR belongs to the type II low molecular mass TrxR family and is organised as a homodimer, a feature common to other homologous enzymes.⁴ The mass spectrometry analysis indicated that the initial methionine of this recombinant enzyme is removed only from part of the purified protein sample; however, this micro-heterogeneity does not apparently affect the biochemical properties. Addition of FAD during the preparation of the cell homogenate from the heterologous expression system is crucial to reach a stoichiometric FAD content in rPhTrxR; in fact, the presence of an under-stoichiometric FAD amount dramatically reduces its specific activity. Fluorescence spectra of rPhTrxR indicate the occurrence of a fluorescence resonance energy transfer between aromatic residues and bound FAD. Furthermore, the significant red-shift of the fluorescence maximum due to flavine emission upon guanidinium-Cl denaturation indicates that the FAD moiety is located in a hydrophobic region of the protein molecule. The nucleotide sequence of the PhTrxR gene predicts the presence of five cysteine residues. The Ellman assay on the purified recombinant enzyme indicated that two cysteines, putatively those of the conserved sequence motif C₁₃₆ATC, are engaged in a functional disulfide bridge; the remaining three cysteines, namely C₇, C₁₀₆ and C₃₀₃, are present as free thiols in the purified oxidised state of the recombinant flavoenzyme. The other component of the thioredoxin system, rPhTrx, is organised as a small monomeric protein, a feature common to the homologous protein from other prokaryotic sources. The Ellman assay indicated that rPhTrx contains only two cysteines, belonging to the consensus sequence C₃₃GPC and engaged in a functional disulfide bridge.

In order to study the thermodependence of each component of the thioredoxin system, the activity of r*Ph*TrxR and r*Ph*Trx has been first individually tested in assays realised at different temperatures, using a temperature interval covering the cold environment of *P. haloplanktis*. Either r*Ph*TrxR or r*Ph*Trx displays a measurable activity at 10 °C, an indispensable requirement for cold-adapted proteins. Interestingly, the activity of these proteins at low temperatures is in the range of that reported for the corresponding mesophilic and (hyper)thermophilic counterparts at the corresponding working temperatures.^{8,10,11,22,32} Because of the cold environment, in which psychrophilic proteins usually sustain activities, the corresponding catalysed reactions display a low thermodependence and a small enthalpic factor.^{33,34} Under this concern, r*Ph*TrxR is more cold-adapted than r*Ph*Trx, because its activity is more psychrophilic and endowed with a smaller enthalpic factor. The best psychrophilic adaptation of r*Ph*TrxR could reside in the greater flexibility required for the flavoenzyme, undergoing a large conformational change during catalysis.³⁵

To assess the reconstitution and functionality of the thioredoxin system of *P. haloplanktis*, the combined activity of r*Ph*TrxR and r*Ph*Trx has been tested. The activity at 10 °C, higher than that measured with r*Ph*Trx alone, indicates that these proteins display a direct functional interaction aimed at the preservation of the reduced state of cellular proteins. This result suggests that r*Ph*TrxR and r*Ph*Trx are the recombinant forms of the corresponding endogenous components of the thioredoxin system in *P. haloplanktis*. The functionality of the reconstituted thioredoxin system was also confirmed by its reversibility when it was analysed in the absence of insulin precipitation. The calculated $E^{0'}$ of -0.276 V is in the range of the known $E^{0'}$ values assigned to other Trx-(SH)₂/Trx-S₂ redox pairs in bacterial or archaeal microorganisms.^{11,36}

Psychrophilic proteins usually possess an increased flexibility, which in most cases leads to a decreased stability compared to mesophilic counterparts.³⁷ Despite its psychrophilic origin, r*Ph*TrxR possesses a discrete heat resistance, around 40 °C above the maximum growth temperature of *P. haloplanktis*. This result indicates that the progressive slight decrease in the DTNB reduction activity of r*Ph*TrxR observed at temperatures above 30 °C cannot be explained through a trivial heat sensitivity of the enzyme. An explanation for this behaviour resides in a possible lower heat resistance displayed by r*Ph*TrxR, when exploiting its catalytic action at temperatures above 30 °C. However, other explanations cannot be excluded, as for example those related to the multifactorial experimental conditions used for measuring the effect of temperature on the activity.

The other component of the thioredoxin system, r*Ph*Trx, is curiously and exceptionally heat resistant in spite of its psychrophilic origin. For instance, about 4 h are needed to provoke a half-inactivation of r*Ph*Trx at 95 °C. The UV melting curves confirm this noticeable heat resistance because no significant denaturation of r*Ph*Trx occurs up to 95 °C. A relevant role for the heat resistance of the protein is played by the disulfide bridge present in the oxidised native state of r*Ph*Trx, because after its reduction, a conventional denaturation profile is observed with a calculated melting

temperature of 74 °C. Therefore, besides its functional task in the catalytic electron transfer to the target oxidised protein substrate, the disulfide bridge of r*Ph*Trx has an important structural role.

In conclusion, the data presented in this work indicate that the redox homeostasis in the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* can profit of a full active thioredoxin system. Future research on the role of the sulfur metabolism in this microorganism becomes extremely important because of the high reactivity of free cysteine residues possessed by *Ph*SOD¹⁶ and *Ph*TrxR (unpublished observation). For this reason, a functional system aimed at the restoration of the reduced state of cytoplasmic proteins after an oxidant treatment seems essential for growth and survival of this microorganism.

Abbreviations

DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid
DTT	dithiothreitol
IPTG	isopropyl- β -thiogalactopyranoside
ROS	reactive oxygen species
SOD	superoxide dismutase
Trx	thioredoxin
TrxR	thioredoxin reductase
r <i>Ph</i> Trx	recombinant Trx from <i>P. haloplanktis</i>
r <i>Ph</i> TrxR	recombinant TrxR from <i>P. haloplanktis</i>
TNB	5-thio-2-nitrobenzoic acid

Acknowledgements

This work was supported by grants to MM and EDV from MIUR (PRIN 2007), and funds to AC and ADM from the II Università di Napoli, Italy.

References

- 1 E. S. Arnér and A. Holmgren, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 6102–6109.
- 2 A. Holmgren, *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 13963–13966.
- 3 A. Holmgren, *Annu. Rev. Biochem.*, 1985, **54**, 237–271.
- 4 R. P. Hirt, S. Müller, T. M. Embley and G. H. Coombs, *Trends Parasitol.*, 2002, **18**, 302–308.
- 5 D. Mustacich and G. Powis, *Biochem. J.*, 2000, **346**, 1–8.
- 6 C. H. Williams, L. D. Arscott, S. Müller, B. W. Lennon, M. L. Ludwig, P. F. Wang, D. M. Veine, K. Becker and R. H. Schirmer, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 6110–6117.
- 7 F. Åslund and J. Beckwith, *J. Bacteriol.*, 1999, **181**, 1375–1379.
- 8 M. R. Ruocco, A. Ruggiero, L. Masullo, P. Arcari and M. Masullo, *Biochimie*, 2004, **86**, 883–892.
- 9 E. Pedone, D. Limauro, R. D'Alterio, M. Rossi and S. Bartolucci, *FEBS J.*, 2006, **273**, 5407–5420.
- 10 P. Grimaldi, M. R. Ruocco, M. A. Lanzotti, A. Ruggiero, I. Ruggiero, P. Arcari, L. Vitagliano and M. Masullo, *Extremophiles*, 2008, **12**, 553–562.
- 11 S. Jeon and K. Ishikawa, *Eur. J. Biochem.*, 2002, **269**, 5423–5430.
- 12 Y. Kashima and K. Ishikawa, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, **418**, 179–185.
- 13 H. H. Hernandez, O. A. Jaquez, M. J. Hamill, S. J. Elliott and C. L. Drennan, *Biochemistry*, 2008, **47**, 9728–9737.
- 14 C. Medigue, E. Krin, G. Pascal, V. Barbe, A. Bernsel, P. N. Bertin, F. Cheung, S. Cruveiller, S. D'Amico, A. Duilio, G. Fang, G. Feller, C. Ho, S. Manganot, G. Marino, J. Nilsson, E. Parrilli, E. P. Rocha, Z. Rouy A. Sekowska, M. L. Tutino, D. Vallenet, G. von Heijne and A. Danchin, *Genome Res.*, 2005, **15**, 1325–1335.

-
- 15 I. Castellano, A. Di Maro, M. R. Ruocco, A. Chambery, M. T. Di Martino, G. Parlato, M. Masullo and E. De Vendittis, *Biochimie*, 2006, **88**, 1377–1389.
 - 16 I. Castellano, M. R. Ruocco, F. Cecere, A. Di Maro, A. Chambery, A. Michniewicz, G. Parlato, M. Masullo and E. De Vendittis, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1784**, 816–826.
 - 17 S. Madonna, R. Papa, L. Birolo, F. Autore, N. Doti, G. Marino, E. Quemeneur, G. Sannia, M. L. Tutino and A. Duilio, *Extremophiles*, 2006, **10**, 41–51.
 - 18 M. Masullo, P. Arcari, B. de Paola, A. Parmeggiani and V. Bocchini, *Biochemistry*, 2000, **39**, 15531–15539.
 - 19 T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
 - 20 T. E. Creighton, in *Protein Structure a Practical Approach*, ed. T. E. Creighton, Oxford University Press, Oxford, UK, 1989, pp. 155–167.
 - 21 A. Holmgren and M. Björnstedt, *Methods Enzymol.*, 1995, **252**, 199–208.
 - 22 A. Holmgren, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 9627–9632.
 - 23 A. Holmgren, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 9113–9119.
 - 24 G. Spyrou, E. Enmark, A. Miranda-Vizuete and J. Gustaffson, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 2936–2941.
 - 25 P. A. Loach, in *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, ed. G. D. Fasman, CRC Press, Boca Raton FL, 3rd edn, 1976, vol. 1, pp. 122–130.
 - 26 S. Lapanje, *Physicochemical aspects of protein denaturation*, J. Wiley & Sons, New York, 1978.
 - 27 P. Arcari, M. Masullo, A. Arcucci, G. Ianniciello, B. de Paola and V. Bocchini, *Biochemistry*, 1999, **38**, 12288–12295.
 - 28 R. Dosi, A. Di Maro, A. Chambery, G. Colonna, S. Costantini, G. Geraci and A. Parente, *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 2006, **145**, 230–238.
 - 29 M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248–254.
 - 30 U. K. Laemmli, *Nature*, 1970, **227**, 680–685.
 - 31 D. J. Kroll, H. Abdel-Malek Abdel-Hafiz, T. Marcell, S. Simpson, C. Y. Chen, A. Gutierrez-Hartmann, J. W. Lustbader and J. P. Hoefler, *DNA Cell. Biol.*, 1993, **12**, 441–453.
 - 32 A. J. Prongay, D. R. Engelke and C. H. Williams, *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 2656–2664.
 - 33 D. Georgette, V. Blaise, T. Collins, S. D'Amico, E. Gratia, A. Hoyoux, J. C. Marx, G. Sonan, G. Feller and C. Gerday, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2004, **28**, 25–42.
 - 34 K. S. Siddiqui and R. Cavicchioli, *Annu. Rev. Biochem.*, 2006, **75**, 403–433.
 - 35 G. Waksman, T. S. Krishna, C. H. Williams Jr. and J. Kuriyan, *J. Mol. Biol.*, 1994, **236**, 800–816.
 - 36 G. Krause, J. Lundstrom, J. L. Barea, C. Pueyo de la Cuesta and A. Holmgren, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 9494–9500.
 - 37 S. D'Amico, T. Collins, J. C. Marx, G. Feller and C. Gerday, *EMBO Rep.*, 2006, **7**, 385–389.

Key enzyme systems controlling the oxidative stress in the psychrophilic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*

Emmanuele De Vendittis¹, Roberta Cotugno¹, Immacolata Castellano¹, Francesca Cecere¹, Pasquale Grimaldi^{1,4}, Immacolata Ruggiero¹, Ilaria Bonifacio¹, Giuseppina Salomone¹, Patrizia Falasca², Giovanna Evangelista², Andzelika Michniewicz³, Giuseppe Parlato³, Maria Rosaria Ruocco¹, Mariorosario Masullo^{1,4} and Gennaro Raimo^{1,2,*}

¹Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Via S. Pansini 5, I-80131 Napoli, ²Dipartimento di Scienze e Tecnologie dell'Ambiente e del Territorio, Università del Molise, Contrada Fonte Lappone, I-86090 Pesche (IS), ³Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica "Gaetano Salvatore", Università di Catanzaro "Magna Graecia", Via T. Campanella 115, I-88100 Catanzaro, ⁴Dipartimento di Scienze Farmacobiologiche, Università di Catanzaro "Magna Graecia", Complesso "Nini Barbieri", I-88021 Roccelletta di Borgia (CZ), Italy

ABSTRACT

This work reports properties of typical enzyme redox systems in *Pseudoalteromonas haloplanktis* (*Ph*), a psychrophilic eubacterium isolated from marine Antarctic sediments. The enzymes investigated are superoxide dismutase (*PhSOD*) and the components of the thioredoxin system, namely thioredoxin (*PhTrx*) and thioredoxin reductase (*PhTrxR*), altogether involved in the homeostasis of reactive oxygen species (ROS). This control in *P. haloplanktis* is likely crucial, because of the increased oxygen solubility in cold sea water. The enzymatic defence includes a preventive action by *PhSOD* and the repair activity of the thioredoxin system. *PhSOD* was purified as a homodimeric iron-containing enzyme, displaying a high specific activity even at low temperatures. The enzyme keeps its activity at temperatures well above the maximum growth temperature of *P. haloplanktis*. Interestingly, *PhSOD* has a highly reactive cysteine covalently modified by β -mercaptoethanol or oxidized glutathione. The enzyme is also modified by peroxynitrite, a harmful ROS, which in other

SODs reacts with a specific conserved tyrosine. These modifications regulate the *PhSOD* functions, acting on enzyme activity and/or sensibility toward physiological inactivators. Both components of the thioredoxin system in *P. haloplanktis* (*PhTrxR* and *PhTrx*) were obtained as recombinant His-tagged proteins. *PhTrx* is a small monomeric protein, whereas *PhTrxR* is a NADPH-dependent homodimeric flavoenzyme. When studying the effect of temperature on the *PhTrxR* activity, maximum levels were reached at 30°C. Concerning recombinant *PhTrx*, it reduces the insulin disulfide in the presence of DTT as electron donor. These key elements regulate the redox homeostasis in *P. haloplanktis* and contribute to the efficient protection of this microorganism against ROS.

KEYWORDS: *Pseudoalteromonas haloplanktis*, psychrophile, superoxide dismutase, thioredoxin system, sulfhydryl reactivity

ABBREVIATIONS

DTNB, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid; GSH, GSSG, and GSNO, reduced, oxidized, and nitrosylated form of glutathione, respectively; *PhSOD*, *SOD* from *P. haloplanktis*; β me-*PhSOD*,

*Corresponding author
raimo@unimol.it

PhSOD modified by β -mercaptoethanol; *PhTrx* and *PhTrxR*, recombinant Trx and TrxR from *P. haloplanktis*; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; Trx, thioredoxin; TrxR, thioredoxin reductase.

INTRODUCTION

An efficient control of the cellular redox potential is crucial for survival and growth progression of living species belonging to all phylogenetic kingdoms and adapted to different growth environments. Several cellular systems are involved in such a control, finely regulated by complex molecular mechanisms. All these processes are mainly relevant for aerobic sources, whose metabolism is based on the oxygen consumption. The metabolic transformation of this gas in water involves formation of intermediate oxygen-derived compounds, including radicals, ions and uncharged molecules, collectively named reactive oxygen species (ROS). These harmful compounds have a short half-life, but show a high reactivity toward several cellular components. Therefore, the evolution of aerobic organisms has led to the development of defence mechanisms against the toxicity of ROS, because their altered intracellular level may cause severe cellular damages [1].

The first ROS generated by the oxygen consumption is the superoxide anion, the precursor of more dangerous ROS [2, 3]. A key enzyme involved in the protection mechanism against ROS is superoxide dismutase (SOD), that catalyses superoxide dismutation in oxygen and hydrogen peroxide [2, 4, 5]. This latter compound is also a ROS and, as a consequence, it must be eliminated by other enzymes, such as catalase or peroxidase. Therefore, SOD acts as the first cellular defence against damages caused by oxidative stress.

While SOD eliminates ROS, other enzymatic systems act as ROS producers. An alteration in the mechanisms involved in ROS production/elimination causes an unbalance of the redox homeostasis. Therefore, during evolution, organisms have developed several systems to control the cellular redox state. Under this regard, the thioredoxin system is a powerful redox machinery widely distributed in nature and involved in several cellular functions [6, 7]. The basic role of

the thioredoxin system is played in the preservation of the reduced state of cytoplasmic proteins. This system includes two ubiquitous key components, thioredoxin (Trx) and thioredoxin reductase (TrxR) [6, 8]. The relevant function of this system is associated to the finding that, while extracellular proteins are rich in stabilizing disulfide bridges according to the oxidative state of the extracellular environment, the intracellular proteins are maintained in a reduced state. Under these conditions, intracellular proteins contain free sulfhydryl groups, being the disulfide bridges quite rare [9].

The ROS challenge in the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*

The wide distribution of microorganisms in nature involves their colonization of extreme habitats, such as the cold marine environments. Indeed, an increasing number of prokaryotes adapted to these growth conditions is being discovered. The eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* belongs to these psychrophilic sources, being isolated from Antarctic sea [10]. It grows in the 4-20°C temperature interval, with an optimum growth at 15°C. The studies on this psychrophile include characterization of components involved in protein synthesis [11-13], lipo-polysaccharides metabolism [14-17, and references therein], general metabolism [18-21], as well as the complete sequencing of its genome [10]. Furthermore, some biotechnological applications of the macromolecules of *P. haloplanktis* have been described [22-24]. The properties of the psychrophilic proteins have been summarized in some reports [25-27].

Our attention has been focused on a problem linked to the cold environment of *P. haloplanktis*, *i.e.* its adaptation to the protection against ROS. Indeed, the low temperatures should favour the oxygen solubility and increase the stability of toxic radical species. On the other hand, the *P. haloplanktis* genome lacks genes involved in the molybdopterin-dependent metabolism [10], a source for the endogenous production of ROS in other eubacteria. It is known that the deleterious effects of ROS are also controlled by components of the sulphur metabolism, involving small molecules or enzymatic systems, each containing sulfhydryl groups, alternatively present as free thiols or disulfide bridges. Indeed, *P. haloplanktis* contains enzymes for the direct ROS protection,

such as SOD or catalase, and various components involved in the scavenging of the ROS-produced modifications, as those provoked by an oxidative stress. These features make *P. haloplanktis* an appropriate source for studying adaptation to the protection against ROS under cold conditions, as well as in the related sulphur metabolism [10].

The redox systems chosen to study ROS adaptation in *P. haloplanktis* are the enzyme SOD and the components of the thioredoxin system, Trx and TrxR. Properties of SOD and Trx/TrxR have already been characterised in phylogenetically distant sources and in microorganisms adapted to extreme environments, such as the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* [28-34]. Therefore, this investigation is also useful for studying evolutionary and structure-function relationship of these enzyme systems.

Superoxide dismutase from *P. haloplanktis*

SOD is an ubiquitous metal enzyme, catalysing the dismutation of two superoxide anions into oxygen and hydrogen peroxide. Even though its catalytic mechanism is conserved throughout phylogenetically distant organisms, SODs are usually classified in two main structurally unrelated families, on the basis of the metal content in the active site: Cu/Zn-SOD, mostly found in the cytoplasm of eukaryotes, and the ubiquitous Fe- and Mn-SOD, found in eubacteria, archaea and mitochondria [4, 5]. Because of its presence in all living species, this latter family probably plays the most crucial role in the early control of the ROS level.

SOD isolated from *P. haloplanktis* (*PhSOD*) is an iron-containing enzyme, as evaluated by its Fe content of 0.75 atoms per subunit [35]. The enzyme is organized as a homodimer, as evaluated by the comparison of its mass on SDS-PAGE (22 kDa) and gel-filtration chromatography under native conditions (46 kDa). *PhSOD* is endowed with a high specific activity measured with the cytochrome *c* reduction inhibition assay. Remarkably, the activity remains elevated even at low temperatures. The specific activity measured at 15°C and referred to the enzyme metal content is 13,900 U/mg, a value significantly higher than that of other mesophilic eubacterial Fe- and Mn-SODs. Moreover, heat inactivation studies on *PhSOD* proved that its thermal stability is well

above the maximum growth temperature of *P. haloplanktis*, because the psychrophilic enzyme is half-inactivated after 10-min incubation at 54°C. The study of the effects provoked by typical inhibitors/inactivators of Fe- and Mn-SODs indicates that *PhSOD* is inhibited by sodium azide and inactivated by hydrogen peroxide. Furthermore, the psychrophilic enzyme is very sensitive to inactivation by peroxynitrite, a highly toxic ROS formed through a reaction between superoxide and nitric oxide. In case of the closely related human Mn-SOD, this compound causes the inactivation of the enzyme [36], through modification of a conserved tyrosine (Tyr34) to 3-nitrotyrosine [37].

An interesting finding from the study on the molecular properties of *PhSOD* is also the discovery of the high reactivity of its unique cysteine (Cys57) [35]. This residue forms a disulfide adduct with β -mercaptoethanol, when this reducing agent is added during the purification procedure. This covalently modified *PhSOD* was hereafter named β me-*PhSOD*.

Altogether these findings prompted a deeper evaluation on the covalent modifications occurring on *PhSOD*, with a particular focus on the possible regulation of the enzyme function by cellular thiols and on its protection against physiological inactivators.

To investigate whether peroxynitrite inactivation of the psychrophilic enzyme involved formation of 3-nitrotyrosine, *PhSOD* and β me-*PhSOD* were treated with increasing concentration of peroxynitrite and then analysed by Western blotting using anti-nitrotyrosine antibodies. As shown in Fig. 1, the immunoreactivity of *PhSOD* and β me-*PhSOD* increases with the concentration of peroxynitrite, even though to a different extent. This finding suggests the formation of 3-nitrotyrosine in both protein samples. We suggest that even in *PhSOD* the target residue of peroxynitrite is Tyr34, a conserved position of the second coordination shell of the metal ion, located in the channel that drives superoxide to the active site. An interesting finding of Fig. 1 is the lower sensitivity displayed by β me-*PhSOD* toward peroxynitrite, mainly observed at low concentration of this inactivator. This result was confirmed by inactivation profiles of *PhSOD* and β me-*PhSOD* treated with increasing concentration of peroxynitrite. Therefore, the

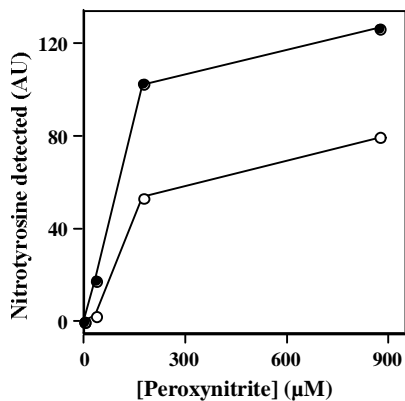


Fig. 1. Tyrosine nitration by peroxynitrite on *PhSOD* and β me-*PhSOD*. A solution of 100 μ g/mL of *PhSOD* (filled circles) or β me-*PhSOD* (open circles) in 100 mM potassium phosphate, pH 7.8, 0.1 mM Na_2EDTA was incubated at 25°C for 30 min in the presence of the indicated concentration of peroxynitrite. Aliquots of 30 μ l were analysed by Western blotting using anti-nitrotyrosine antibodies and the immunoreactivity was revealed by chemiluminescence. The nitrotyrosine detection signal was quantified by scanning densitometry and reported as Arbitrary Units (AU).

formation of the β -mercaptoethanol adduct on Cys57 has a protective effect on the inactivation and/or modification of *PhSOD* by peroxynitrite.

We have investigated whether other cellular thiols, such as glutathione (GSH) or its oxidized (GSSG) or nitrosylated (GSNO) form, were able to cause a covalent modification on the psychrophilic enzyme and regulate its antioxidant function. To this aim, *PhSOD* was treated with increasing concentration of different glutathione forms and analysed by Western blotting using anti-glutathione antibodies. Indeed, immunoreactive protein bands were present in samples treated with GSSG or GSNO; furthermore, the immunoreactivity increased with the concentration of these glutathione forms. On the other hand, GSH was ineffective. This result suggests the formation of a mixed disulfide bridge between Cys57 and a glutathione moiety. To confirm S-glutathionylation of the psychrophilic enzyme on its unique cysteine residue, a recombinant *PhSOD* and two Cys57 mutants were purified from an *Escherichia coli* expression system; the recombinant *PhSOD* treated with GSSG or GSNO immunoreacted with

the anti-glutathione antibodies, whereas both Cys57 mutants did not. To our knowledge, *PhSOD* is the first example of a S-glutathionylated enzyme belonging to the Fe- and Mn-SOD family.

The S-glutathionylation of *PhSOD* did not cause a significant variation of the specific activity of the psychrophilic enzyme. However, this covalent modification of *PhSOD* was relevant to its antioxidant function. Indeed, as shown in Fig. 2, *PhSOD* treated with GSSG showed a nitration level significantly lower compared to that of untreated *PhSOD*. Therefore, also the S-glutathionylation of *PhSOD* seems to protect the enzyme toward the highly toxic ROS peroxynitrite. These findings suggest that cellular thiols could regulate the functions of the psychrophilic enzyme, while keeping its functionality under oxidative stress conditions. Moreover, the modified *PhSOD* could also act as a regulator of the GSH/GSSG ratio.

The thioredoxin system in *P. haloplanktis*

Among the two components of the thioredoxin system, Trx is a small monomeric protein containing the conserved CXXC sequence, in

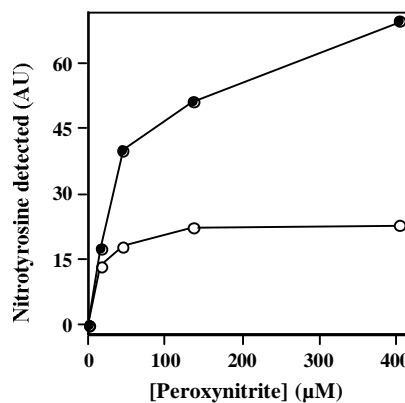


Fig. 2. Tyrosine nitration by peroxynitrite on *PhSOD* and GSSG-treated *PhSOD*. A solution of *PhSOD* 50 μ g/mL was treated at 25°C for 1 hour in the absence (filled circles) or in the presence of 1 mM GSSG (open circles). After removal of the unbound glutathione forms, aliquots of the reactions were incubated at 25°C for 30 min with the indicated concentration of peroxynitrite and then analysed by Western blotting as reported in Fig. 1.

which the two cysteines form a reversible disulfide bridge [38]; a similar motif with two active cysteines is also present in the homodimeric TrxR, a NADPH-dependent flavoenzyme [7, 39, 40]. The redox cycle, including NADPH as electron donor and the FAD/FADH₂ oscillation in the active site of TrxR, allows the sequential formation of the reduced forms of TrxR, and in turn of Trx, both originating from their respective S-S inactive state. The redox cycle is completed when the active free thiols of Trx transfer their reducing equivalents to S-S bonds in target proteins possibly generated upon exposure to oxidative stress conditions. While the size of Trx (10-15 kDa) is shared among the different living domains, two structurally unrelated groups have been identified for TrxR, namely type I high molecular mass (55-58 kDa per subunit) isolated from higher eukaryotes, and type II low molecular mass (around 35 kDa per subunit) from lower eukaryotes, and prokaryotes [40].

Recently, the study of the thioredoxin system regarded also some extremophilic microorganisms adapted to high temperature environments [33, 34, 41, 42], thus proving the crucial role of this system in a heat-adapted source. Vice versa, less information is available regarding the thioredoxin system in cold-adapted microorganisms. In the genome of *P. haloplanktis* the components of the Trx/TrxR system have been putatively identified [10]. Differently from some eubacteria or archaea, possessing various isoforms and/or components of the thioredoxin system, the *P. haloplanktis* genome apparently lacks this redundancy, a finding probably related to the specific growth environment of this psychrophile.

This work reports the initial characterization of the components of the thioredoxin system in *P. haloplanktis* through the heterologous expression in *E. coli* of the genes encoding TrxR and Trx. Both recombinant products, named *PhTrxR* and *PhTrx*, respectively, were purified as His-tagged proteins. When fractionated by SDS-PAGE, *PhTrxR* and *PhTrx* were homogenous and showed an electrophoretic mobility of 35 kDa and 12 kDa, respectively. Vice versa, the molecular mass determined under native conditions by gel-filtration gave values of 70 kDa and 12 kDa for *PhTrxR* and *PhTrx*, respectively. This finding indicates that *PhTrxR* has a homodimeric

organization, whereas *PhTrx* is a small monomeric protein.

PhTrxR was purified as a flavoenzyme even though the determined ratio of FAD bound/subunit was as low as 0.39 mol/mol. However, when the cell homogenate of the expressing system was supplemented with 50 μ M FAD, the flavin content approached the expected 1:1 stoichiometry.

The thiol-disulfide oxidoreductase activity of *PhTrxR* was measured by its ability to reduce DTNB in the presence of NADPH as electron donor. In order to evaluate the thermophilicity of the flavoenzyme, the DTNB reduction activity of *PhTrxR* was assayed in the temperature interval 10-40°C. As shown in Fig. 3, the V_{\max} of the reaction showed a 2.14-fold increase in the temperature interval 10-30°C; afterwards a slight decrease of the activity was observed. These features, namely the significant activity measured

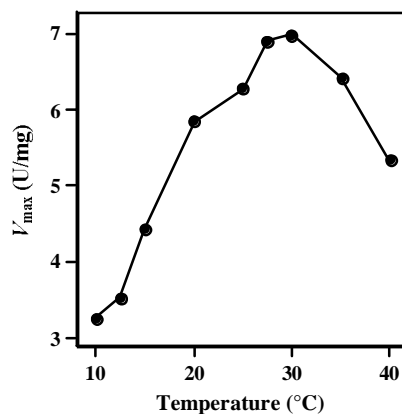


Fig. 3. Effect of temperature on the thiol-disulfide oxidoreductase activity of *PhTrxR*. Activity was measured by the DTNB reduction assay in the presence of NADPH as electron donor. The assay mixture contained 0.15 - 5 mM DTNB and 7.5 μ g/mL *PhTrxR* in 1 mL of 100 mM potassium phosphate, pH 7.8, 10 mM EDTA. The reaction started with the addition of 200 μ M NADPH. The absorbance increase at 412 nm was followed kinetically, to determine the initial rate of the reaction. Blanks run in the absence of *PhTrxR* were subtracted. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that caused the conversion of 1 μ mol DTNB in one min. Values of V_{\max} were derived from double-reciprocal plots and reported as U/mg.

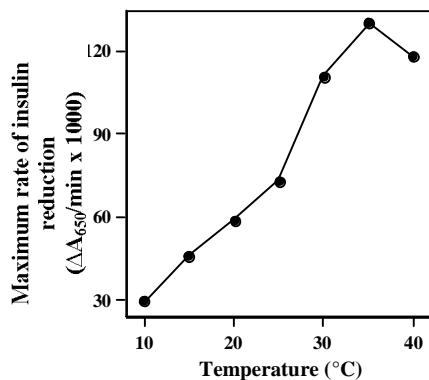


Fig. 4. Effect of temperature on the thiol-disulfide oxidoreductase activity of *PhTrx*. Activity was evaluated by a reduction assay using dithiothreitol as electron donor and human insulin as substrate. The reaction is followed by monitoring the increase in absorbance at 650 nm, due to precipitation of the reduced β -chain of insulin. The assay mixture contained 0.13 mM human insulin and 0.5 - 10 μ M *PhTrx* in 0.5 mL of 100 mM potassium phosphate, pH 7.8, 10 mM EDTA. The reaction started with the addition of 200 μ M dithiothreitol and was followed kinetically to determine the initial rate of insulin reduction. The maximum rate was derived from double-reciprocal plots and reported as $\Delta A_{650}/\text{min}$.

even at low temperatures and the low effect of temperature on the enzymatic reaction, reflect the psychrophilic adaptation of *PhTrxR*.

The functionality of *PhTrx* was assessed by its thiol-disulfide oxidoreductase activity in the presence of dithiothreitol as electron donor and human insulin as substrate. As shown in Fig. 4, the maximum rate of insulin reduction increased with increasing temperature (3.76-fold in the interval 10-30°C). These studies proved the functionality of *PhTrx* even at low temperatures, as expected for a cold-adapted protein. However, the psychrophilic adaptation of *PhTrx* differs from that of *PhTrxR*, because of greater temperature responsiveness.

CONCLUDING REMARKS

The results reported in this paper indicate that SOD and Trx/TrxR are key elements regulating the redox homeostasis even in a psychrophilic eubacterium. The cold-adaptation of *P. haloplanktis* in the direct protection against ROS is provided

with the high specific activity of *PhSOD*. Furthermore, the efficiency of the thioredoxin system is crucial in the preservation of the reduced state of cellular proteins. It is intriguing that, at least for *PhSOD*, the regulation of the antioxidant function includes the participation of the reactivity of specific sulfhydryl groups. We can speculate that a closer cooperation between SOD and thioredoxin system in *P. haloplanktis* should take place.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Ministero dell'Università e della Ricerca (PRIN). The *P. haloplanktis* TAC 125 strain was kindly supplied by Prof. Charles Gerday, University of Liege (Belgium).

REFERENCES

1. Fridovich, I. 1978, *Science*, 201, 875.
2. Fridovich, I. 1989, *J. Biol. Chem.*, 264, 7761.
3. Henle, E. S., and Linn, S. 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 19095.
4. McCord, J. M., Boyle, J. A., Day, E. D. Jr, Rizzolo, L. J., and Salin M. L. 1977, in *Superoxide and superoxide dismutases* (Michelson, A. M., McCord, J. M., and Fridovich, I., Eds.) Academic, New York, 129.
5. Bannister, J. V., Bannister, W. H., and Rotilio, G. 1987, *CRC Crit. Res. Biochem.*, 22, 111.
6. Arner, E. S. J., and Holmgren, A. 2000, *Eur. J. Biochem.*, 267, 6102.
7. Williams, C. H., Arscott, L. D., Muller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P. F., Veine, D. M., Becker, K., and Schirmer, R. H. 2000, *Eur. J. Biochem.*, 267, 6110.
8. Holmgren, A. 1989, *J. Biol. Chem.*, 264, 13963.
9. Gilbert, H. F. 1990, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 63, 69.
10. Medigue, C., Krin, E., Pascal, G., Barbe, V., Bernsel, A., Bertin, P. N., Cheung, F., Cruveiller, S., D'Amico, S., Duilio, A., Fang, G., Feller, G., Ho, C., Mangenot, S., Marino, G., Nilsson, J., Parrilli, E., Rocha, E. P., Rouy, Z., Sekowska, A., Tutino, M. L., Vallenet, D., von Heijne, G., and Danchin, A. 2005, *Genome Res.*, 15, 1325.

11. Masullo, M., Arcari, P., de Paola, B., Parmeggiani, A., and Bocchini, V. 2000, *Biochemistry*, 39, 15531.
12. Raimo, G., Lombardo, B., Masullo, M., Lamberti, A., Longo, O., and Arcari, P. 2004, *Biochemistry*, 43, 14759.
13. Ruggiero, I., Raimo, G., Palma, M., Arcari, P., and Masullo, M. 2007, *Extremophiles*, 11, 699.
14. Corsaro, M. M., Lanzetta, R., Parrilli, E., Parrilli, M., and Tutino, M. L. 2001, *Eur. J. Biochem.*, 268, 5092.
15. Corsaro, M. M., Lanzetta, R., Parrilli, E., Parrilli, M., Tutino, M. L., and Ummarino, S. 2004, *J. Bacteriol.*, 186, 29.
16. Siddiqui, K. S., Poljak, A., Guilhaus, M., De Francisci, D., Curmi, P. M., Feller, G., D'Amico, S., Gerday, C., Uversky, V. N., and Cavicchioli, R. 2006, *Proteins*, 64, 486.
17. Sonan, G. K., Receveur-Brechot, V., Duez, C., Aghajari, N., Czjzek, M., Haser, R., and Gerday, C. 2007, *Biochem. J.*, 407, 293.
18. Birolo, L., Tutino, M. L., Fontanella, B., Gerday, C., Mainolfi, K., Pascarella, S., Sannia, G., Vinci, F., and Marino, G. 2000, *Eur. J. Biochem.*, 267, 2790.
19. Tosco, A., Birolo, L., Madonna, S., Lolli, G., Sannia, G., and Marino, G. 2003, *Extremophiles*, 7, 17.
20. Aurilia, V., Parracino, A., Saviano, M., Rossi, M., and D'Auria, S. 2007, *Gene*, 397, 51.
21. Madonna, S., Papa, R., Birolo, L., Autore, F., Doti, N., Marino, G., Quemeneur, E., Sannia, G., Tutino, M. L., and Duilio, A. 2006, *Extremophiles*, 10, 41.
22. Cusano, A. M., Parrilli, E., Marino, G., and Tutino, M. L. 2006, *Microb. Cell Fact.* 14, 5.
23. Vigentini, I., Merico, A., Tutino, M. L., Compagno, C., and Marino, G. 2006, *J. Biotechnol.*, 127, 141.
24. Papa, R., Rippa, V., Sannia, G., Marino, G., and Duilio, A. 2007, *J. Biotechnol.*, 127, 199.
25. D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., and Gerday, C. 2006, *EMBO Rep.*, 7, 385.
26. Siddiqui, K. S., and Cavicchioli, R. 2006, *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 403.
27. De Vendittis, E., Castellano, I., Cotugno, R., Ruocco, M. R., Raimo, G., and Masullo, M. 2007, *J. Theor. Biol.*, 250, 156.
28. Dello Russo, A., Rullo, R., Nitti, G., Masullo, M., and Bocchini, V. 1997 *Biochim. Biophys. Acta*, 1343, 23.
29. Ursby, T., Adinolfi, B. S., Al-Karadaghi, S., De Vendittis, E., and Bocchini, V. 1999, *J. Mol. Biol.*, 287, 189.
30. Cannio, R., D'Angelo, A., Rossi, M., and Bartolucci, S. 2000, *Eur. J. Biochem.*, 267, 235.
31. De Vendittis, E., Ursby, T., Rullo, R., Gogliettino, M. A., Masullo, M., and Bocchini, V. 2001, *Eur. J. Biochem.*, 268, 1794.
32. Gogliettino, M. A., Tanfani, F., Sciré, A., Ursby, T., Adinolfi, B. S., Cacciamani, T., and De Vendittis, E. 2004, *Biochemistry*, 43, 2199.
33. Ruocco, M. R., Ruggiero, A., Masullo, L., Arcari, P., and Masullo, M., 2004, *Biochimie*, 86, 883.
34. Pedone, E., Limauro, D., D'Alterio, R., Rossi, M., and Bartolucci, S. 2006, *FEBS J.*, 273, 5407.
35. Castellano, I., Di Maro, A., Ruocco, M. R., Chambery, A., Parente, A., Di Martino, M. T., Parlato, G., Masullo, M., and De Vendittis, E. 2006, *Biochimie*, 88, 1377.
36. Mac Millan-Crow, L. A., Crow, J. P., Kerby, J. D., Beckman, J. S., and Tompson, J. A. 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 11853.
37. Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T., and Murayama, K. 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 14085.
38. Holmgren, A. 1985, *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 237.
39. Mustacich, D., and Powis, G. 2000, *Biochem. J.*, 346, 1.
40. Hirt, R. P., Müller, S., Embley, T. M., and Coombs, G. H. 2002, *Trends Parasitol.*, 18, 302.
41. Jeon, S., and Ishikawa, K. 2002, *Eur. J. Biochem.*, 269, 5423.
42. Kashima, Y., and Ishikawa, K. 2003, *Arch. Biochem. Biophys.*, 418, 179.

Received: 9 October 2007