

**ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

---

Scuola di Farmacia, Biotecnologie e Scienze Motorie  
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Molecolari e Industriali

Tesi di Laurea

**Caratterizzazione dell'attività pirofosfatasica  
associata al dominio PHP della DNA  
Polimerasi III di *Escherichia coli***

Candidato:

**Fabio Lapenta**

Relatore:

**Prof. Alejandro Hochkoepler**

Correlatore:

**Alejandro Monton Silva**

III Sessione di Laurea

Anno Accademico 2012 - 2013



## INDICE

<b>CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 6</b>
1.1 DNA Polimerasi III in <i>Escherichia coli</i>	pag. 6
1.2 Core polimerasico $\alpha$ $\epsilon$ $\theta$	pag. 7
1.3 Sliding Clamp	pag. 9
1.4 Loading Clamp	pag. 10
1.5 Assemblaggio dell'Oloenzima Pol III	pag. 12
1.6 La Replicazione del genoma in <i>E. coli</i>	pag. 13
1.7 Struttura e funzione della subunità $\alpha$ in <i>Escherichia coli</i>	pag. 15
1.8 Il domino PHP	pag. 19
1.8.1 Conservazione interspecifica e ruolo del dominio PHP	pag. 21
1.8.2 Dominio PHP in <i>Escherichia coli</i>	pag. 24
1.8.2.1 Analogie tra il dominio PHP e le pirofosfatasi di tipo II	pag. 25
<b>CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI</b>	<b>pag. 28</b>
<b>CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 29</b>
3.1 MATERIALI	pag. 29
3.1.1 Ceppo batterico	pag. 29
3.1.2 Vettori plasmidici	pag. 29
3.1.3 Terreni di coltura	pag. 30
3.1.4 Colonne Cromatografiche	pag. 30
3.1.5 Tamponi	pag. 31
3.2 METODICHE	pag. 31
3.2.1 Trasformazione e preparazione stock	pag. 31
3.2.2 Crescita ed induzione	pag. 32
3.2.3 Prove di espressione e solubilità	pag. 33
3.2.4 Estrazione	pag. 33
3.2.5 Purificazione	pag. 34
3.2.6 Saggi di attività	pag. 35

3.2.6.1 Attività polimerasica e pirofosfatasica associata	pag. 35
3.2.6.2 Attività Pirofosfatasica	pag. 37
3.2.6.3 Attività esonucleasica	pag. 38
3.2.7 Analisi SDS-PAGE	pag. 36
3.2.8 Quantificazione delle proteine	pag. 39
3.2.9 Cinetiche di crescita	pag. 40

## **CAPITOLO 4 - RISULTATI** **pag. 41**

4.1 Prove di espressione e solubilità	pag. 41
4.2 Purificazione delle proteine	pag. 44
4.2.1 Cromatografia a scambio ionico (Q-Sepharose)	pag. 45
4.2.2 Cromatografia di affinità (Cibacron Blue)	pag. 46
4.2.3 Cromatografia di affinità (Hi-Trap Heparin)	pag. 47
4.2.4 Purificazione di $\alpha$ H12A e $\alpha$ D19A	pag. 48
4.2.5 Cromatografia per gel filtrazione (Sephacryl S300)	pag. 49
4.3 Saggi di attività	pag. 50
4.3.1 Saggi polimerasici	pag. 50
4.3.1.1 Cinetiche di reazione per la proteina $\alpha$ wt e le varianti $\alpha$ H12A e $\alpha$ D19A	pag. 52
4.3.1.2 Cinetiche di reazione per il complesso $\tau\alpha\epsilon\theta$ wt e la variante $\tau\alpha$ D201A $\epsilon\theta$	pag. 53
4.3.1.3 Cinetiche di reazione in presenza del core polimerasico $\alpha\epsilon\theta$	pag. 54
4.3.1.4 Dipendenza dell'attività pirofosfatasica dallo ione Manganese	pag. 55
4.3.2 Saggi pirofosfatasici	pag. 56
4.3.3 Attività esonucleasica	pag. 57
4.4 Cinetiche di crescita	pag. 58

## **CAPITOLO 5 - DISCUSSIONE** **pag. 59**

5.1 Mutazioni nel dominio PHP	pag. 59
5.1.1 Effetto delle mutazioni nei confronti dell'attività polimerasica e pirofosfatasica	pag. 59
5.1.2 Effetto delle mutazioni nei confronti dell'attività pirofosfatasica	pag. 61
5.1.3 Composizione del sito attivo e schema di reazione	pag. 62

5.2 Associazione trimerica del complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  pag. 65

**CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI pag. 67**

**CAPITOLO 7 – BIBLIOGRAFIA pag. 68**

## CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

### 1.1 DNA Polimerasi III in *Escherichia coli*

La DNA polimerasi III di *E. coli*, scoperta nel 1971 (Kornberg and Geftter, 1971) (Geftter, 1971), è stata la prima replicasi cellulare ad essere isolata. Lo studio dell'attività polimerasica nel ceppo di *E. coli* *polA*, mancante della polimerasi I (De Lucia and Cairns, 1969), ha permesso l'individuazione dapprima della polimerasi II e successivamente della polimerasi III. Grazie all'assenza della polimerasi I è stato possibile caratterizzare tali polimerasi, che rispetto alla polimerasi I risultano decisamente meno espresse. La polimerasi II e la polimerasi III sono infatti presenti rispettivamente a livello di 50 e 20 copie per cellula (Qui and Goodman, 1997) (McHenry and Kornberg, 1997), diversamente dalla pol I di cui sono state stimate circa 400 copie per cellula (Kornberg and Baker, 1992).

La replicasi di *E. coli*, come tutte le replicasi presenti in natura, può essere suddivisa in tre complessi funzionali ed è composta dall'assemblaggio di 10 diverse subunità. L'oloenzima della Polimerasi III (Pol III HE) viene infatti definito come l'associazione tra i cores catalitici formati dalle proteine  $\alpha$ ,  $\epsilon$  e  $\theta$ , un *clamp loader* formato dall'assemblaggio di  $\tau$   $\gamma$   $\delta$   $\delta'$   $\chi$   $\psi$  ed uno *Sliding clamp* composto dall'omodimero  $\beta_2$  (McHenry, 2011).

<u>Complesso</u>	<u>Subunità</u>	<u>Gene</u>	<u>Massa molecolare (kDa)</u>
<u>Core</u>	$\alpha$	<i>dnaE</i>	129.9
	$\epsilon$	<i>dnaQ</i>	27.5
	$\theta$	<i>holE</i>	8.6
<u>Clamp Loader</u>	$\gamma$	<i>dnaX</i>	47.5
	$\tau$	<i>dnaX</i>	71.1
	$\delta$	<i>holA</i>	38.7
	$\delta'$	<i>holB</i>	36.9
	$\chi$	<i>holC</i>	16.6
	$\psi$	<i>holD</i>	15.2
<u>Sliding Clamp</u>	$\beta$	<i>dnaN</i>	40.6

La polimerasi III di *E. coli* durante la replicazione del cromosoma è in grado di raggiungere un elevato livello di processività e durante la sintesi di una copia completa del genoma (4.6 Mb) riesce a raggiungere una velocità di incorporazione dei nucleotidi pari a circa 1000bp/s (Maki and Kornberg

1988). La subunità polimerasica  $\alpha$  da sola non possiede tuttavia le caratteristiche necessarie ad una processività così pronunciata né all'elevato grado di fedeltà replicativa osservato in vivo. E' infatti solo grazie all'associazione con gli altri fattori facenti parte dell'oloenzima che il complesso polimerasico raggiunge l'elevata velocità e l'alta fedeltà replicativa necessarie alla duplicazione del genoma.

## 1.2 Core polimerasico $\alpha$ $\epsilon$ $\theta$

Il core catalitico della Pol III è un eterotrimerico composto dalle subunità  $\alpha$ ,  $\epsilon$  e  $\theta$ , codificate rispettivamente dai geni *dnaE*, *dnaQ* ed *holE*. Le tre subunità formano un complesso estremamente stabile in rapporto 1:1:1. La subunità  $\alpha$  interagisce con  $\epsilon$  attraverso il suo dominio N-terminale, la quale a sua volta contatta  $\theta$ , tramite la sua regione N-terminale associandosi così in un trimero secondo uno schema lineare  $\alpha$ - $\epsilon$ - $\theta$ . (Studwell-Vaughan and O'Donnell, 1993).

La subunità  $\alpha$  è responsabile dell'attività polimerasica, fulcro dell'attività di tutto l'oloenzima Pol III, mentre  $\epsilon$  provvede all'attività esonucleasica 3'→5'. La subunità  $\theta$  non mostra un'attività catalitica, ma risulta importante nella stabilizzazione dell'assetto generale del trimero. Le tre subunità che compongono il core cooperano tra di loro e sono in grado di stimolarsi vicendevolmente. Ad esempio, l'associazione di  $\epsilon$  con la subunità  $\alpha$  ne aumenta l'attività esonucleasica da 10 a 80 volte (Maki and Kornberg, 1987), mentre l'interazione tra  $\epsilon$  e  $\theta$  incrementa sia la stabilità che l'attività esonucleasica di  $\epsilon$  (Studwell-Vaughan and O'Donnell, 1993) (Conte et al, 2012). Nei confronti della processività della subunità  $\alpha$ ,  $\epsilon$  stessa risulta avere un effetto stimolatorio, permettendo un aumento di attività di circa tre volte (Maki and Kornberg, 1987),

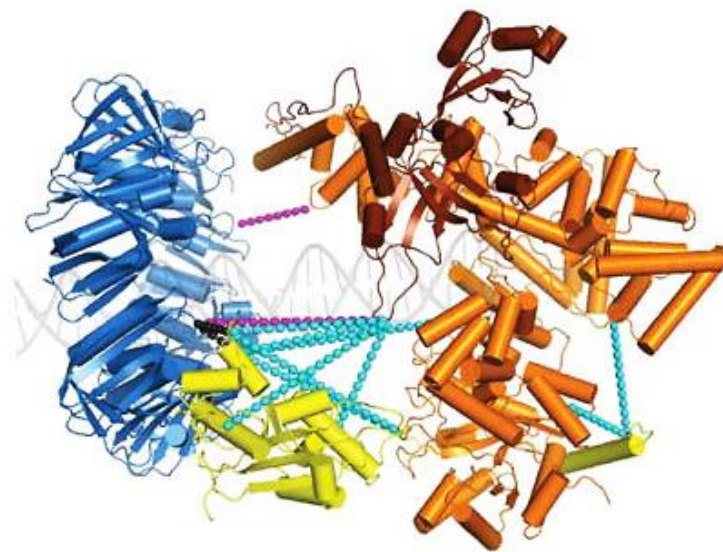
La subunità  $\alpha$  (DnaE), composta da 1160 amminoacidi, svolge nel complesso Pol III il ruolo chiave di subunità dedicata all'attività polimerasica, presenta una conformazione "a mano destra", tipica delle DNA polimerasi, mostrando una netta separazione strutturale tra il dominio catalitico "Palmo", il dominio deputato alle interazioni con il nucleotide entrante "Dita" ed il dominio "Pollice" coinvolto nei movimenti conformazionali e nel legame al DNA durante la catalisi. (Brautigam and Steitz, 1998)

La subunità  $\alpha$  prende contatto con la subunità esonucleasica  $\epsilon$  interagendovi tramite il dominio N-terminale PHP, interagisce con lo Sliding clamp e, tramite la subunità  $\tau$ , si ancora al complesso Loading clamp.

La subunità  $\epsilon$  (DnaQ) è un membro della superfamiglia delle DNasi DEDD, classificate in base alla

conservazione del motivo DEDD responsabile dell'attività esonucleasica (Zuo, 2001). È una proteina composta da 243 amminoacidi, organizzata in due domini funzionali collegati da una cerniera di quattro glutammine (Ozawa et al. 2008). Il dominio catalitico esplica la funzione di proofreading, e tramite la regione di collegamento, definita *Q-linker*, ε provvede al corretto orientamento nei confronti di α, permettendo lo svolgersi delle rispettive attività (Bressanin et al, 2009) (Ozawa et al, 2013).

La subunità ε ha il ruolo di ridurre la frequenza di mutazioni durante la replicazione del genoma, rimuovendo gli appaiamenti errati grazie alla sua attività di esonucleasi 3'→5'. È stato osservato infatti come mutazioni a carico del gene *dnaQ* portino alla comparsa di fenotipi fortemente mutatori. (Fijalkowska e Schaaper, 1996). Un'analisi strutturale portata a termine in un recente lavoro (Toste et al. 2013) ha messo in luce i siti di interazione tra la subunità α, ε ed il β clamp. L'analisi rivela come la coda C-terminale di ε ed il dominio PHP della polimerasi α interagiscano strettamente tra di loro, e come sia ε che il dominio C-terminale di α prendano contatto con il β clamp.



**Figura 1.1**

Modello del complesso Pol III: Subunità α in arancione (C-terminale in rosso) - β Clamp in celeste - subunità ε in giallo. Le linee tratteggiate indicano i legami crociati inter-molecolari: in turchese α - ε, in magenta α - β clamp, in nero β clamp - ε (Toste et al, 2013)

La presenza della subunità ε, posizionata tra il dominio PHP di α ed il β clamp, è in grado di stabilizzare l'interazione tra la polimerasi ed il β clamp stesso, permettendo di fatto l'incremento di processività della polimerasi DnaE (Dohrmann and McHenry, 2005). Il terzo componente del core è la subunità θ, una piccola proteina di soli 76 amminoacidi, codificata dal gene *holE*, non ha un'attività catalitica definita e prende contatto con la regione N-terminale della subunità ε al fine di stabilizzarla,

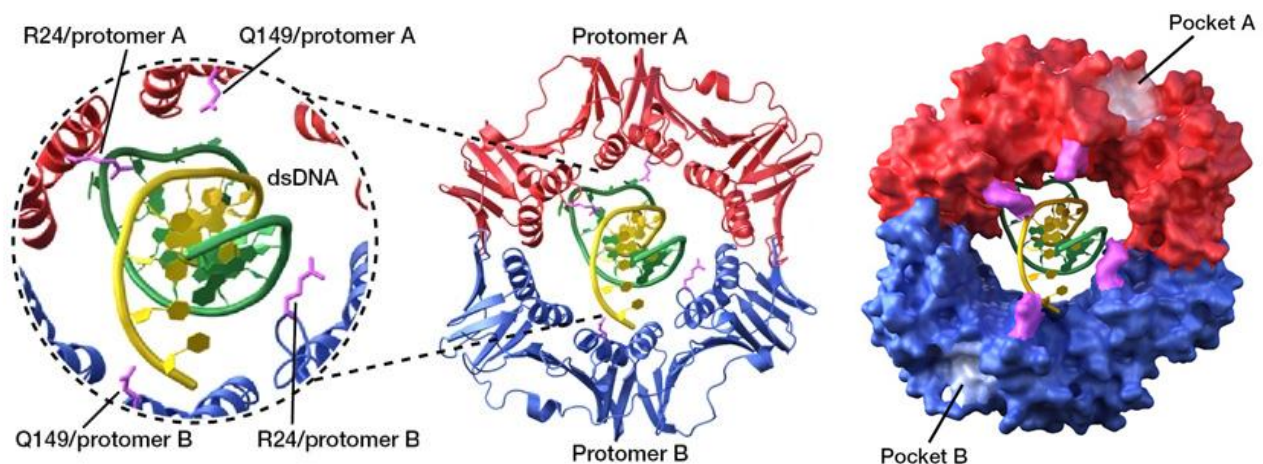


stimolandone l'attività di circa 2,5 volte (Perrino et al, 1999).

Il trimero così composto interagisce con il  $\beta$  clamp e con il Loading clamp, mediante  $\alpha$  che tramite il proprio dominio C-terminale prende contatto con  $\tau$  e con il  $\beta$  clamp (Dohrmann and McHenry, 2005)

### 1.3 Sliding Clamp

Lo Sliding clamp svolge un ruolo centrale nella replicazione garantendo una stabile interazione tra il DNA ed il core polimerasico. La struttura dell'omodimero  $\beta_2$ , risolta sia in presenza che in assenza del DNA (Kong et al, 1992) (Georgescu, 2008), mostra come il legame tra i due protomeri  $\beta$  formi un canale interno di circa 35 Å di diametro in grado di richiudersi attorno alla doppia elica del DNA. In particolare sono i residui Arginina 24 e Glutamina 149, facenti parte di due  $\alpha$  eliche cariche positivamente rivolte verso la doppia elica, che prendendo contatto con i fosfati del DNA e ne inducono un ripiegamento di circa 22° rispetto al suo asse di scorrimento (Georgescu, 2008).



**Figura 1.2**

Strutture del dimero  $\beta_2$  in associazione al DNA, in dettaglio gli amminoacidi R24 e Q149, e le tasche idrofobiche poste tra i domini II e III, deputate al legame con  $\alpha$  (Georgescu, 2008).

I movimenti conformazionali ed il caricamento dello Sliding clamp sul DNA sono governati dal complesso DnaX, chiamato appunto Loading clamp, che è in grado di associare il complesso  $\beta_2$  al DNA, a stretto contatto con il core polimerasico, garantendone così una più alta processività.

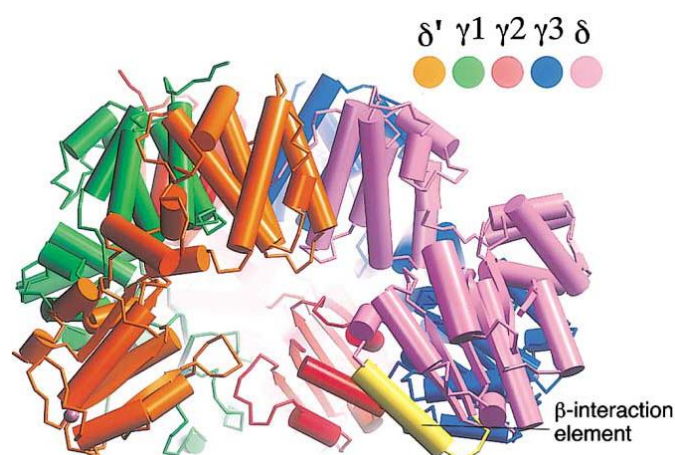
Il core polimerasico isolato mostra una velocità di polimerizzazione di circa 20 bp/s, con una processività di 1-10 basi. L'associazione con il dimero  $\beta_2$  permette il raggiungimento di valori nettamente più alti, con velocità fino a 750 bp/s ed una processività per di più di 50 kilobasi (Fay et al, 1981).

Il legame tra lo Sliding Clamp e la subunità polimerasica  $\alpha$  avviene a livello di una tasca idrofobica posta tra i domini II e III di un monomero  $\beta$  (Naktinis et al, 1996). Il dimero  $\beta_2$  possiede due tasche idrofobiche, una impiegata nel legame con  $\alpha$  e l'altra libera di stabilire interazioni con altre polimerasi. In caso di stalli durante la replicazione del DNA, lo Sliding clamp permette lo scambio delle polimerasi sul filamento in corso di sintesi, come ad esempio è stato osservato avvenire tra la polimerasi III e la polimerasi IV error prone (Indiani, 2005).

Tramite il sito di binding esposto, il  $\beta$  clamp interagisce anche con i componenti del complesso DnaX, con l'elicasi DnaB, ed al termine della sintesi di un frammento di Okazaki anche con la Polimerasi I (Lopez de Saro et al, 2003).

### 1.4 Loading Clamp

Il Loading Clamp è un oligomero composto dalle subunità  $\tau$  ed  $\gamma$  (entrambe codificate dal gene *dnaX*), in associazione alle subunità  $\delta$   $\delta'$   $\chi$   $\psi$ , codificate rispettivamente dai geni *holA*, *holB*, *holC* *holD*. Le diverse proteine si assemblano tra di loro a formare un anello pentamerico costituito da tre monomeri DnaX ( $\tau$  o  $\gamma$ ) in varia composizione, associati alle singole subunità  $\delta$  e  $\delta'$ . A questo complesso pentamerico si aggiungono le subunità  $\psi$  e  $\chi$  legate alle subunità DnaX ( $\tau$  o  $\gamma$ ) grazie all'interazione stabilita da  $\psi$  (Dallmann, 1995). Il complesso pentamerico ha il ruolo di contattare il primosoma, il core polimerasico  $\alpha\epsilon\theta$  ed il  $\beta$  Clamp, garantendo la coesione di più proteine in prossimità della forcella di replicazione e dirigere così il processo replicativo.

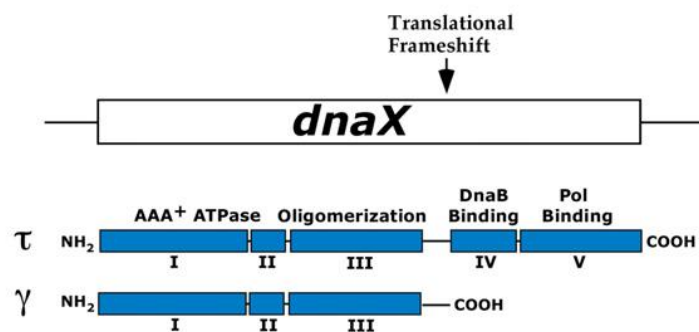


**Figura 1.3**

Struttura dell'anello pentamerico del complesso DnaX assemblato con 3 subunità  $\gamma$  (Jeruzalmi et al, 2001)

L'attività ATPasica del complesso, svolta dalle proteine  $\tau$  e  $\gamma$ , è atta al caricamento del dimero  $\beta_2$  sul DNA. Tramite l'interazione delle subunità  $\tau$  o  $\gamma$  con l'ATP si genera infatti un cambiamento conformazionale dell'intero complesso che permette alla subunità  $\delta$  di prendere contatto con lo Sliding clamp, che a sua volta assume una conformazione adatta al posizionamento del DNA all'interno del dimero  $\beta_2$ . L'asestamento del  $\beta$  clamp sul DNA stimola l'idrolisi dell'ATP ed il rilascio del complesso DnaX dal clamp  $\beta_2$  (Jeruzalmi et al, 2001). Il corretto posizionamento dello Sliding Clamp e del core polimerasico sul DNA da estendere è permesso dall'interazione che la subunità  $\chi$  stabilisce con la single strand binding protein (SSB) (Witte et al, 2003).

Le subunità  $\tau$  e  $\gamma$  sono frutto di una traduzione differenziata del gene *dnaX*. Durante la traduzione, nel 40% dei casi si verifica un frameshift ribosomiale che genera un codone di stop prematuro. Questo evento determina lo spostamento del frame arrestando la traduzione del gene *dnaX* così da generare la proteina tronca  $\gamma$  (Tsuchihashi, 1990).



**Figura 1.4**  
Rappresentazione dei domini delle proteine  $\tau$  e  $\gamma$  e del gene *dnaX* (McInerney, 2007).

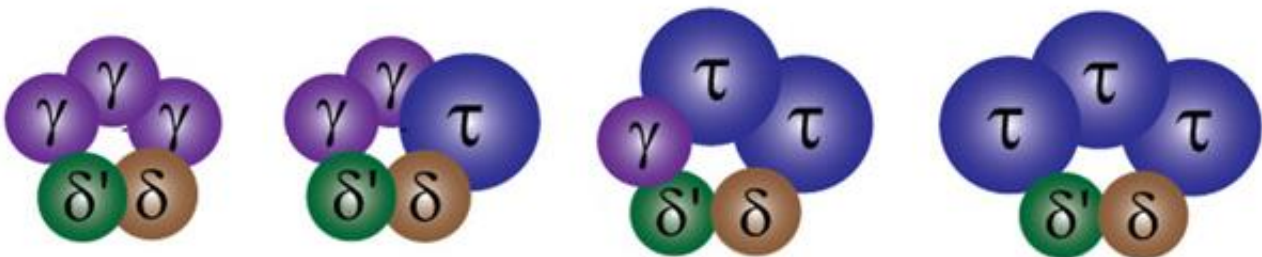
La subunità  $\gamma$  risulta identica al frammento comprendente i 431 residui N-terminali di  $\tau$  e possiede i primi tre domini deputati all'attività ATPasica e all'oligomerizzazione, mancando però dei domini preposti all'interazione con il core (dominio V) ed all'interazione con l'elicasi DnaB (dominio IV) (Tsuchihashi and Kornberg, 1990).

Durante la replicazione, l'organizzazione dell'oloenzima richiede che almeno due cores polimerasici si assemblino rispettivamente con le estremità C-terminali di due subunità  $\tau$ . La proteina  $\gamma$ , mancando di tale regione, non può garantire l'associazione al core polimerasico; pertanto, nei modelli proposti riguardo la composizione del replisoma il complesso DnaX risulta composto da almeno due subunità  $\tau$ .

## 1.5 Assemblaggio dell'Oloenzima Pol III

L'effettiva composizione dell'oloenzima Polimerasi III nel contesto replicativo non è ancora stabilita con certezza e l'ambiguità deriva principalmente dalla difficoltà di esaminare quale sia in vivo la precisa stechiometria dell'assemblaggio del pentamero centrale del Loading clamp.

Il modello classico prevede che le proteine  $\chi$  e  $\psi$  si associno al pentamero  $\gamma$   $\tau$   $\delta$  e  $\delta'$ , tuttavia sono state isolate tutte le possibili combinazioni di  $\tau$  e  $\gamma$  nell'assemblaggio del complesso DnaX (*Park et al 2010*).



**Figura 1.5**

Stati di oligomerizzazione del complesso pentamerico assemblato in vitro (*Park et al 2010*).

La caratterizzazione di un anello pentamerico  $\tau$   $\delta$   $\delta'$  assemblato in vitro con tre cores polimerasici ha introdotto la possibilità che il replisoma possa agire secondo un modello "trimerico" (*Mclnery, 2007*). Un oloenzima Pol III composto da tre cores polimerasici potrebbe disporsi in maniera tale da fornire due cores polimerasici attivi per la polimerizzazione del filamento *lagging*, garantendo così una velocità di sintesi paragonabile alla sintesi del filamento *leading*, come d'altronde è stato proposto avvenire anche nel complesso replicativo del batteriofago T7 (*Jhonson et al, 2007*). Il modello spiega come la polimerizzazione, in un caso continua ed in un altro discontinua, possa procedere in maniera parallela e simultanea per entrambi i filamenti.

La processività dei due tipi di assemblaggio, dimerico e trimerico, è stata comparata allestendo un sistema di replicazione a circolo rotante; in queste condizioni la variante contenente due cores polimerasici mostra una processività significativamente più bassa rispetto al complesso trimerico, sintetizzando oltretutto dei nuovi filamenti che presentano diverse interruzioni (*Gerorgescu et al, 2011*).

Queste osservazioni mettono in luce come un oloenzima contenente tre cores polimerasici, almeno in vitro, sia effettivamente più efficiente nella sintesi dei filamenti di Okazaki.

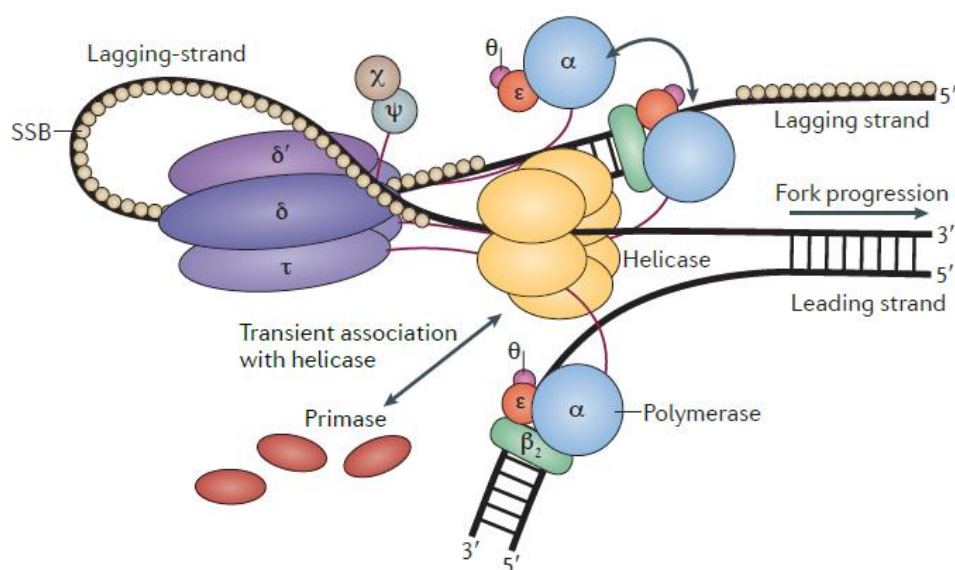
Oltretutto, analisi di fluorescenza di singole molecole hanno evidenziato come in vivo possa avvenire

un regolare ricambio di cores polimerasici sul filamento lagging (Lia et al, 2012), suggerendo che la sintesi dei frammenti di Okazaki possa essere svolta tramite l'attività coordinata di più polimerasi.

## 1.6 La Replicazione del genoma in *E. coli*

In *Escherichia coli* la duplicazione del genoma inizia con la formazione di una bolla di replicazione che dalla regione *oriC* si diparte per procedere in due direzioni opposte, fino al raggiungimento della regione di terminazione situata all'estremità opposta del cromosoma. Nella bolla di replicazione i filamenti di DNA vengono svolti e replicati in maniera parallela da almeno due cores polimerasici; ciò richiede l'attivazione di un complesso meccanismo di replicazione a carico di più proteine. L'oloenzima Pol III interagisce infatti con altre proteine facenti parte del complesso replicativo, quali l'elicasi DnaB, la primasi DnaG e la single strand binding protein.

L'inizio della replicazione vede il coinvolgimento della proteina DnaA, che riconosce delle sequenze proprie dell'origine di replicazione ed è in grado di operare una prima azione di rilassamento del DNA. Una volta che i filamenti di DNA sono svolti, l'elicasi replicativa DnaB insieme alla DNA primasi DnaG formano il primosoma (DnaB6 / DnaG3), che accompagnerà il complesso polimerasico per tutta la durata dell'evento replicativo. L'elicasi esamerica procedendo in direzione 5'→3' sul filamento *lagging* svolge il DNA. La primasi sintetizza dei corti primers di RNA per ogni frammento di Okazaki presente nel filamento *lagging* ed uno per il filamento *leading* (Mott and Berger, 2007).



**Figura 1.6**

Oloenzima Pol III, rappresentato secondo il modello "trimerico", in associazione alle proteine coinvolte nel meccanismo replicativo (Robinson, 2013).

La duplicazione del DNA inizia dai primers di RNA sintetizzati dalla proteina DnaG e procede in direzione parallela 5'→ 3' sui due filamenti; il processo replicativo avviene tramite un sistema di polimerizzazione alternato, continuo per il filamento leading e discontinuo per il filamento lagging. Il meccanismo di polimerizzazione discontinuo genera dei segmenti di DNA (frammenti di Okazaki) lunghi da 1000 a 2000 nucleotidi (*Okazaki et al, 1967*); ciò induce un ripiegamento del filamento *lagging* tra la forcella di replicazione ed il sito di ancoraggio delle polimerasi, regione nella quale l'associazione tra il singolo filamento e le SSB è in grado di prevenirne la degradazione.

Il clamp loader, tramite il contatto che stabilisce con l'elicasi DnaB, è in grado di assemblare il  $\beta$  clamp sui primers di RNA e garantire la stabile associazione del core polimerasico alla forcella di replicazione (*Kim, 1996*).

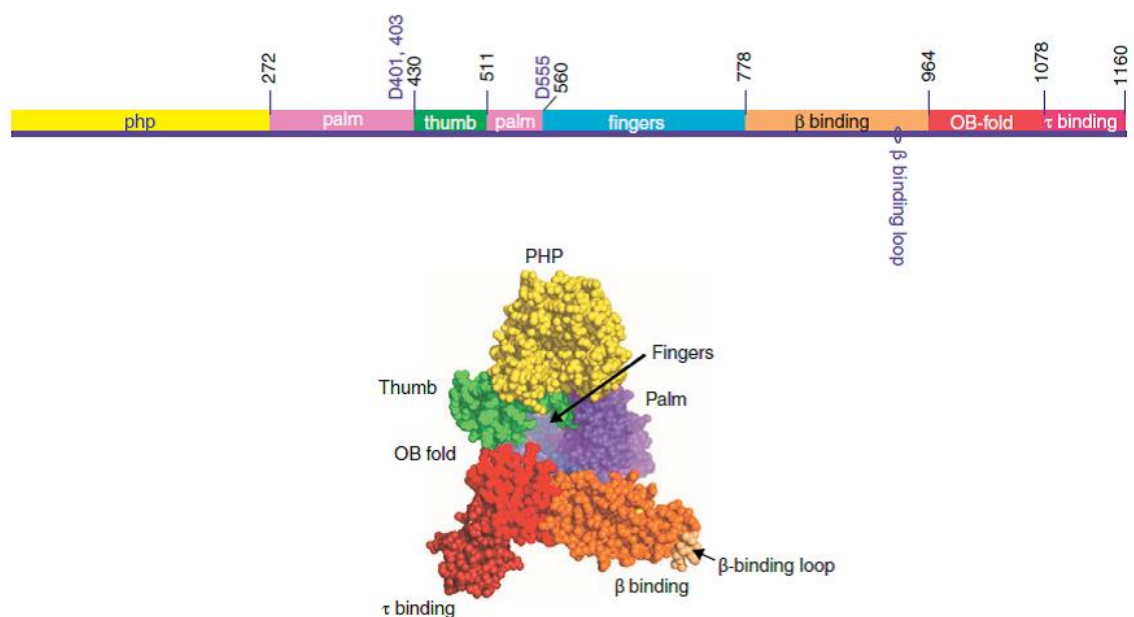
La polimerasi I rimuove i primer di RNA sostituendoli con dei filamenti di DNA, saldati in seguito dalla DNA Ligasi che porta alla formazione completa del filamento neo-sintetizzato.



## 1.7 Struttura e funzione della subunità $\alpha$ in *Escherichia coli*

Tra le polimerasi della famiglia C, deputate alla replicazione del genoma, la proteina DnaE risulta essere la più conservata, e sebbene in vari organismi batterici il complesso replicativo veda l'associazione di polimerasi diverse, in *Escherichia coli* l'attività replicativa è a carico unicamente della polimerasi DnaE (Timinskas et al, 2014).

La subunità  $\alpha$  risulta organizzata in otto domini, le cui funzioni si coordinano nell'attività polimerasica e nell'associazione agli altri componenti del replisoma. Dalla struttura risolta per diffrazione di raggi X (Lamers et al, 2006), mancante degli ultimi 243 residui, emerge come  $\alpha$  si conformi in un ripiegamento a mano destra classico delle DNA polimerasi, che consiste nei domini "Palmo", "Pollice" e "Dita". L'estremità N-terminale, caratterizzata da una struttura a barile  $\alpha/\beta$  distorto, prende il nome di dominio PHP mentre la regione C-terminale, non ancora risolta per la polimerasi di *E. coli*, possiede un dominio di legame al  $\beta$  clamp, un dominio a ripiegamento OB ed una regione deputata all'interazione con  $\tau$  (McHenry, 2011).



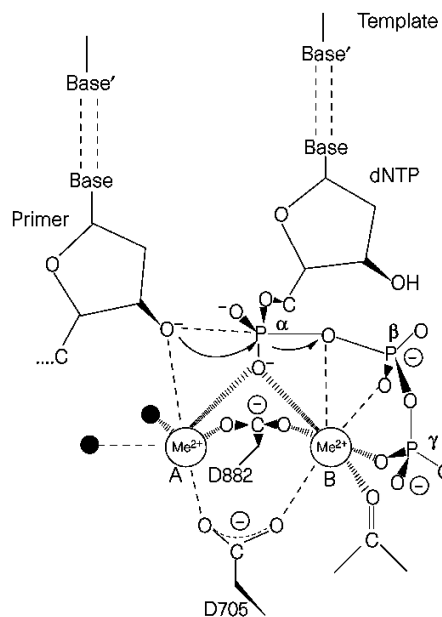
**Figura 1.7**

Struttura primaria e terziaria della subunità  $\alpha$  di *E. coli* (DnaE) (McHenry, 2011).

Il centro catalitico della proteina è rappresentato dal dominio "Palmo", costituito da cinque filamenti  $\beta$  misti che assumono un ripiegamento analogo alle polimerasi della superfamiglia Pol $\beta$  (Wing et al, 2008). Il dominio "Palmo" espone tre amminoacidi fondamentali per l'attività catalitica D401, D403

e D555 che coordinano due ioni  $Mg^{2+}$  necessari alla catalisi (Pritchard and McHenry 1999).

Il modello di reazione trasferasica ipotizzato (Brautigam and Steitz, 1998) prevede che uno ione metallico (B) sia posto tra il trifosfato del nucleotide entrante ed un'aspartato catalitico, mentre il secondo metallo (A) sia coordinato dal fosfato in  $\alpha$  del nucleotide entrante e dall'estremità 3'-OH del filamento estendibile.



### Figura 1.8

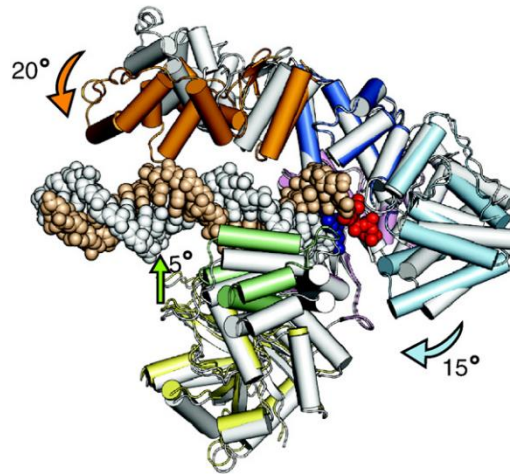
Meccanismo catalitico descritto per la polimerasi I di *E. coli* (Steitz, 1998).

Il meccanismo catalitico prevede che il metallo A attivi l'ossidrilico al 3'-OH del primer per l'attacco nucleofilo sul fosfato in  $\alpha$  del nucleotide entrante, mentre il metallo B stabilizzi il pirofosfato uscente, prodotto dalla reazione polimerasica (Brautigam and Steitz, 1998).

L'analisi della struttura del complesso ternario, ovvero l'associazione tra  $\alpha$ , il nucleotide trifosfato entrante ed il DNA, ottenuta con l'analoga proteina di *T. aquaticus* (Wing, 2008) permette delle considerazioni che per omologia di struttura e funzione si possono assumere anche per la proteina  $\alpha$  di *E. coli*.

Analizzando le differenze di ripiegamento tra l'oloenzima ed il complesso ternario emerge come, nel processo catalitico, la polimerasi sia portata ad assumere un ripiegamento intorno alla doppia elica di DNA, posizionata nella cavità posta tra i tre domini centrali.



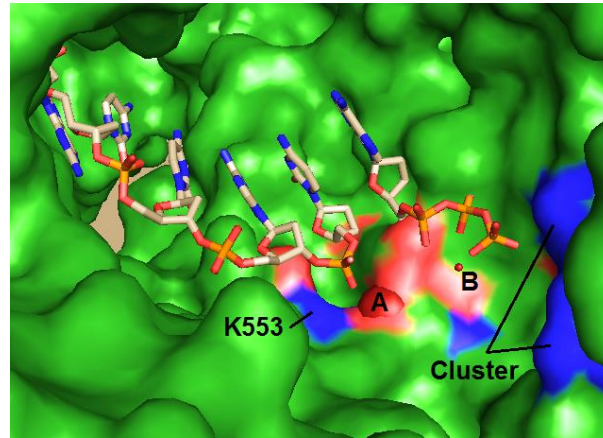


**Figura 1.9**

Confronto tra le strutture della subunità  $\alpha$  di *T. aquaticus*, apoenzima in grigio, complesso ternario con i domini rappresentati in scala cromatica (Wing, 2008).

Il dominio del "Pollice" si richiude intorno al DNA spostandosi di  $5^\circ$  e mediante due  $\alpha$  eliche cariche positivamente (residui 437-461 in *E. coli*) prende contatto con il solco minore della doppia elica. Il dominio delle "Dita" ruota di circa  $15^\circ$  gradi verso il DNA permettendo la formazione di un canale di ingresso per il nucleotide trifosfato entrante e la regione C-terminale ruota di circa  $20^\circ$  posizionando il sito di binding per lo sliding clamp in prossimità del duplex neosintetizzato. Il dominio OB fold, deputato all'interazione con il DNA a singolo filamento, si ripiega ulteriormente di  $10^\circ$  verso la regione a singola elica del DNA, compresa tra l'elicasi ed il sito catalitico della polimerasi (Wing, 2008).

Nella struttura della proteina DnaE in *E. coli* si nota un cluster di arginine, esposte in parte dal "Palmo" (R390 e R396) ed in parte dal dominio delle "Dita" (R709 e R710), deputate all'interazione con il fosfato in  $\gamma$  del nucleotide entrante (Lamers et al, 2006).



**Figura 1.10**

Sovrapposizione della tasca catalitica del complesso trimerico (Wing, 2008) con la struttura della subunità  $\alpha$  di *E. coli* (Lamers *et al*, 2006). In evidenza i metalli A e B, la lisina K553, il cluster di arginine e gli aspartati catalitici (in rosso).

Nel "Palmo" è presente anche un altro residuo coinvolto nel posizionamento dei substrati ed in quanto tale estremamente conservato, la lisina 553 che stabilizza il fosfato al 5' dell'ultima base del filamento da estendere (McHenry, 2011).

## 1.8 Il domino PHP

La famiglia delle proteine PHP (Polymerase and Histidinol Phosphatase) identificata nel 1998 è composta dall'omonimo dominio PHP delle polimerasi C, un analogo dominio nelle Polimerasi X e varie istidinolo e tirosina fosfatasi. La superfamiglia è stata identificata nel 1998 attraverso allineamenti di sequenze, basati sulla conservazione di quattro motivi contenenti istidine ed aspartati in posizioni atte alla coordinazione di ioni metallici (*Aravind and Koonin, 1998*).

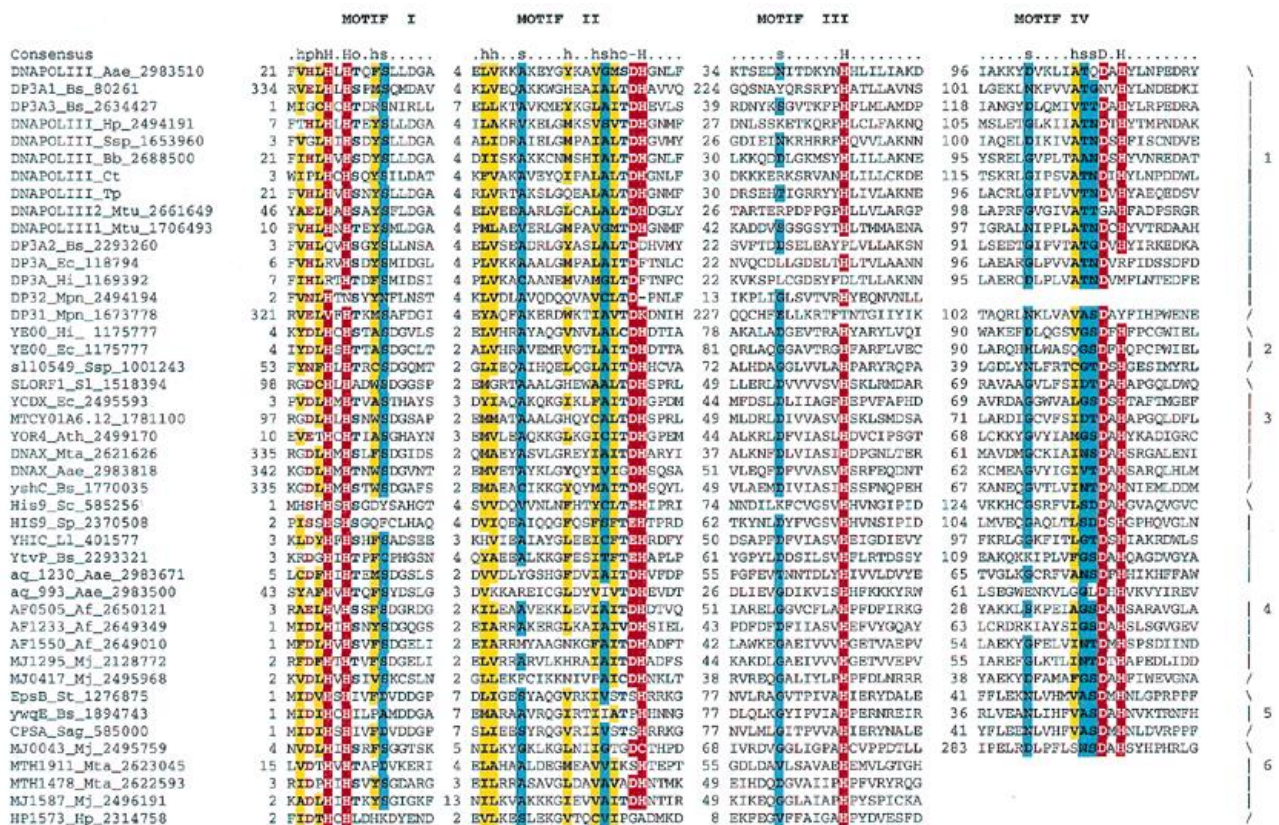
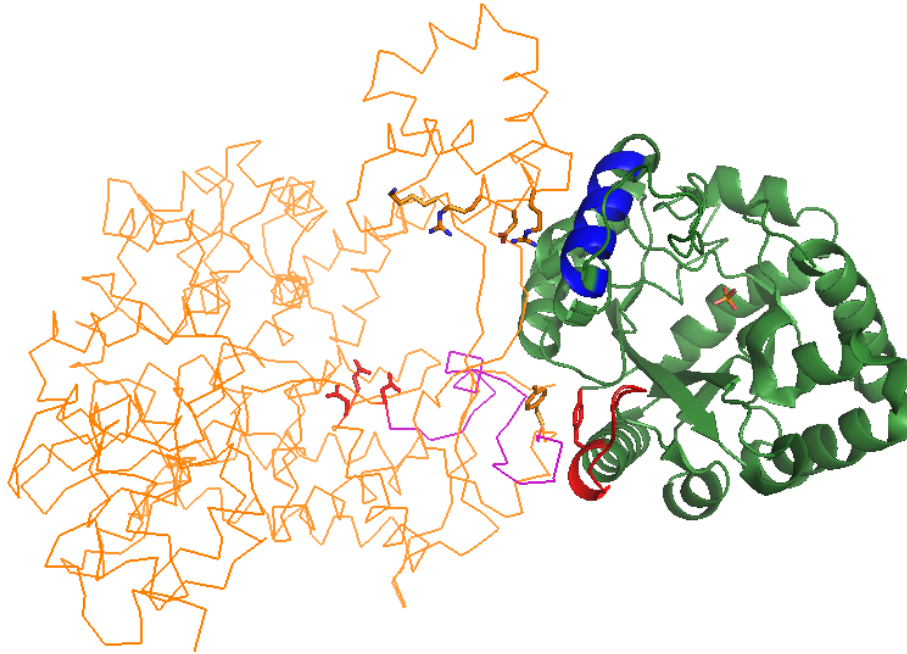


Figura 1.11

Allineamento di sequenza tra le proteine classificate nella famiglia PHP (*Aravind and Koonin, 1998*).

Il dominio PHP nella Polimerasi  $\alpha$  corrisponde ai primi 270 aminoacidi della proteina e si ripiega a formare una struttura a barile  $\alpha/\beta$ , con il IV filamento  $\beta$  disposto in direzione antiparallela rispetto agli altri.

Tramite un loop (residui 104-114), il dominio PHP interagisce con la regione di collegamento tra il dominio "Pollice" ed il dominio "Palmo" che precede il filamento  $\beta$  contenente l'aspartato catalitico D555". Il PHP tramite un'  $\alpha$  elica (residui 211-221) prende un diretto contatto con una  $\alpha$  elica del "Pollice", quest'ultima coinvolta nei riassetamenti strutturali indotti dalla catalisi.



**Figura 1.12**

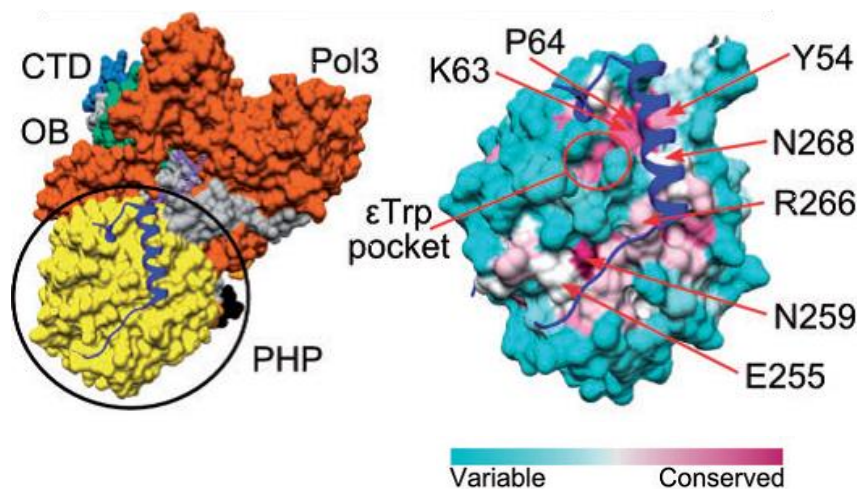
Struttura di  $\alpha$  (PDB: 2HQA), dominio PHP in verde. Loop 104-114 in rosso (in evidenza la Y529 che precede l'aspartato catalitico 555, la triade di aspartati in rosso, in viola la regione di collegamento). Si noti l' $\alpha$  elica 211-221 che contatta la regione del "Pollice" in grado di interagire con il DNA (in evidenza i residui carichi dell'elica del "Pollice").

Questo intimo contatto tra i vari domini catalitici suggerisce come durante il riassetamento generale della polimerasi, dovuto alla catalisi, il PHP in associazione al "Palmo", possa risentire dei cambiamenti conformazionali a carico del "Pollice", prendendo parte ad un riarrangiamento allosterico dell'intera proteina.

Recentemente è stato identificato il sito di legame tra il dominio PHP della proteina DnaE e la subunità  $\epsilon$ ; oltre le analisi di spettroscopia di massa accennate nel Paragrafo 1.2, la risoluzione di una struttura chimerica  $\alpha$ - $\epsilon$  ha permesso di comprendere la relazione che si instaura tra  $\epsilon$  ed il dominio PHP (Ozawa, 2013). Una proteina di fusione formata dalla regione C-terminale di  $\epsilon$ , collegata al dominio PHP attraverso un linker flessibile, ha permesso di comporre un modello di binding tra le due regioni proteiche. Ne risulta che la subunità  $\epsilon$  interagisce specificatamente con il dominio PHP, disponendo la sua regione C-terminale in prossimità del sito attivo del "Palmo", ripiegandosi intorno al PHP fino ad assestarsi nella regione compresa tra il "Pollice" e le "Dita". Il modello definito grazie ad analisi di spettrometria di massa associate a crosslinking, vede il posizionamento di  $\epsilon$  in adiacenza al duplex di DNA neosintetizzato, in stretta associazione al PHP, in una regione compresa tra la subunità  $\alpha$  ed il clamp  $\beta 2$  (Ozawa, 2013).



Ulteriori analisi di conservazione riguardo la superficie esposta del PHP hanno confermato la regione e le modalità di contatto con la proteina  $\epsilon$ , facendo luce sui residui coinvolti nell'interazione (Timinskas et al, 2014).



**Figura 1.13**

Posizionamento della regione C-terminale di  $\epsilon$  (in blu) sulla superficie del dominio PHP; nel dettaglio i residui emersi dalle analisi di conservazione (Timinskas et al, 2014).

### 1.8.1 Conservazione interspecifica e ruolo del dominio PHP

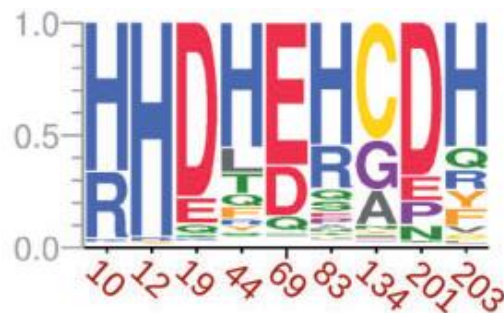
Il dominio PHP è risultato essere uno dei più conservati all'interno di diverse polimerasi replicative batteriche (Timinskas et al, 2014). La conservazione trasversale di questo dominio all'interno delle replicasi, utilizzate sia da batteri gram positivi che da gram negativi, suggerisce l'importanza del ruolo che assume nel contesto replicativo.

L'analogia di sequenza evidenziata tra il dominio PHP ed altre proteine con attività fosfoesterasica, ha permesso di ipotizzare un coinvolgimento del PHP nell'idrolisi, o nel meccanismo di rilascio, del pirofosfato prodotto dalla reazione polimerasica (Aravind and Koonin, 1998). Questo tipo di attività, non ancora descritta, promuoverebbe un costante spostamento dell'equilibrio della reazione polimerasica, risultando quindi fondamentale nel garantire la processività della polimerasi III.

Il dominio PHP, sia nelle Polimerasi C dei batteri gram positivi, come in *G. kaustophilus* (Evans et al, 2008), sia nelle polimerasi replicative di diversi batteri gram negativi, mostra un elevato grado di conservazione a livello strutturale.

In particolare la sequenza dei domini PHP risulta conservata nei confronti di un cluster, interno ai

quattro motivi propri delle proteine PHP (Aravind and Koonin, 1998), identificato da nove residui che formano un sito di coordinazione per gli ioni metallici. E' importante sottolineare che in alcuni batteri gram negativi del phylum dei *proteobacteria*, come ad esempio *Escherichia coli*, il dominio PHP della proteina DnaE presenta solo alcuni dei residui identificati nel cluster di coordinazione ai metalli.



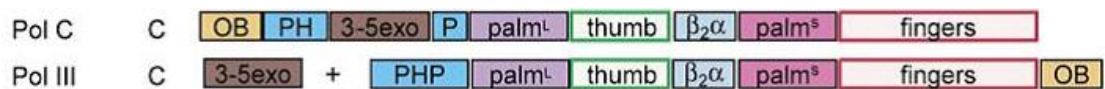
**Figura 1.14**

Rappresentazione della conservazione amminoacidica interspecifica nei confronti del cluster di coordinazione dei metalli nel PHP della proteina DnaE. Con riferimento alle posizioni 10, 12, 19, 44, 69, 83, 134, 201 e 203 della proteina DnaE in *E. coli* (Timinskas et al, 2014).

Il dominio PHP nella proteina DnaE di *T. thermophilus* (Stano, 2006) e di *T. aquaticus* (Wing, 2008) e nella polimerasi X del batterio gram positivo *B. subtilis* (Banos et al, 2008), risulta caratterizzato dall'estrema conservazione nei riguardi di tutti i nove gli amminoacidi del cluster di coordinazione. Nelle polimerasi di questi organismi inoltre il dominio PHP è stato associato ad un'attività esonucleasica 3'→5' metallo dipendente.

Il dominio PHP della proteina DnaE di *E. coli* non è associato ad alcuna attività esonucleasica, se non in maniera indiretta, tramite l'interazione che è in grado di stabilire con la subunità ε dedicata al proofreading, come emerso già dai primi lavori riguardanti la purificazione della subunità α isolata (Maki and Kornberg, 1985).

Anche il dominio PHP della polimerasi C di *G. kaustophilus*, nonostante conservi esattamente tutti i residui identificati nel cluster di coordinazione, non è coinvolto nell'attività esonucleasica 3'→5', se non tramite un sub-dominio, strutturalmente separato dal dominio PHP vero e proprio interno alla sua stessa sequenza.



**Figura 1.15**

Strutture primarie della Pol C e della Pol III (*Lamers et al, 2006*).

Queste differenze riguardanti la conservazione dell'attività esonucleasica interna o esterna alle replicasi, hanno portato ad ipotizzare come l'assestamento di tale attività possa essere avvenuto seguendo un modello di evoluzione divergente (*Huang et al, 1997*). In particolare potrebbe essersi verificata un'evoluzione delle diverse forme di replicasi a partire da un progenitore comune, composto sia da domini esonucleasici che da domini deputati all'attività polimerasica (come nel caso della Polimerasi I).

L'evoluzione di questo progenitore avrebbe portato o a sistemi di polimerasi associate ad esonucleasi indipendenti (come  $\alpha$  ed  $\epsilon$ ), o a singole proteine recanti entrambe le attività, come visto per la polimerasi III dei termofili e per la polimerasi C dei batteri gram positivi.

In particolare risulta che la proteina DnaE, a seconda degli organismi presi in considerazione, possa ricorrere a due diversi tipi di attività esonucleasica, una legata all'interazione che stabilisce con la subunità  $\epsilon$  e l'altra associata all'attività del dominio PHP.

È stato proposto che queste due modalità siano mutuamente esclusive e che questo tipo di duplicità possa essersi instaurato a seguito di un'evoluzione divergente.

Le proteine DnaE con un PHP contenente tutti i residui del cluster di coordinazione sono state identificate come progenitrici delle proteine che possiedono un PHP mancante di tali residui. Il modello mette in evidenza la possibilità che l'attività esonucleasica originariamente a carico del PHP sia stata successivamente soppiantata dall'interazione stabilitasi tra  $\alpha$  ed  $\epsilon$  (*Barros et al, 2013*).

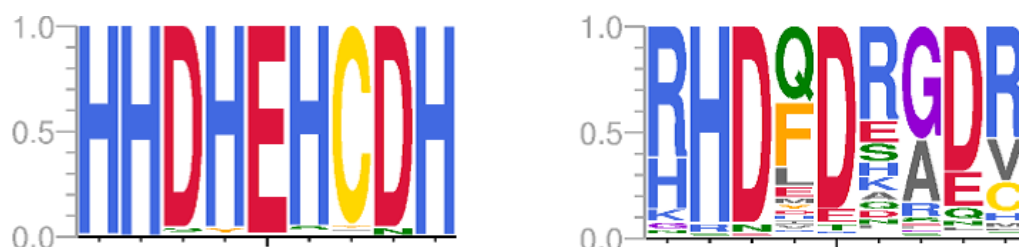
La situazione nei *proteobacteria* supporterebbe questo modello, in quanto la perdita dei residui del cluster risulta controbilanciata da un'estrema conservazione di cariche superficiali nelle regioni di interazione con  $\epsilon$ . Tuttavia, in altri *phyla*, come ad esempio nei *bacteroides*, sia il sito attivo del dominio PHP, che la regione di interazione con  $\epsilon$  risultano conservati in egual modo, suggerendo come questi due ruoli (sempre a carico del dominio PHP) non siano necessariamente incompatibili tra loro (*Timinskas et al, 2014*). O viceversa, che il cluster di coordinazione dei metalli non si sia conservato esclusivamente per svolgere la funzione esonucleasica.

Dato l'approccio impiegato nel costruire questi modelli rimangono ancora molti aspetti da indagare circa la ragione evolutiva di una così particolare conservazione a livello dei residui interni e di quelli superficiali del dominio PHP.

In ogni caso, nonostante l'elevata conservazione dei residui nel cluster di coordinazione dei metalli, trasversale per molte famiglie batteriche, solamente per alcuni organismi termofili il dominio PHP è stato associato ad un'attività esonucleasica.

### 1.8.2 Dominio PHP in *Escherichia coli*

Sebbene in *E. coli*, e più in generale nel *phyla* dei  $\gamma$ -*proteobacteria*, il dominio PHP di DnaE mostri un'elevata conservazione dei residui deputati all'interazione con la subunità  $\epsilon$ , e mantenga un ripiegamento analogo a quello assunto anche in altri organismi, la composizione del sito attivo risulta divergente da quella osservata in altre polimerasi batteriche. In particolare il cluster interno differisce per sei sostituzioni nei nove residui responsabili del legame ai metalli (Aravind and Koonin, 1998).



**Figura 1.16**

Rappresentazione della conservazione di sequenza del cluster di coordinazione nell'ambito di più famiglie batteriche (a sinistra) ed esclusivamente nei  $\gamma$ -*proteobacteria* (a destra). Con riferimento alle posizioni 10, 12, 19, 44, 69, 83, 134, 201 e 203 della proteina DnaE in *E. coli* (Timinskas et al, 2014).

Questa divergenza associata alla perdita di residui del cluster di coordinazione dei metalli suggerisce come il dominio PHP della polimerasi di *E. coli* (nella quale sono presenti sostituzioni di istidine in arginine) possa aver sviluppato un'attività secondaria non connessa all'attività esonucleasica di cui è responsabile nelle polimerasi termofile.



Nonostante la precisa funzione del dominio PHP nella subunità  $\alpha$  di *E. coli* sia ancora poco chiara, studi di mutagenesi sito specifica hanno messo in evidenza come l'attività polimerasica possa risentire di mutazioni nella regione del PHP. Ad esempio le mutazioni G134R, G133D e T260I, tutte mappate in ceppi mutatori suggeriscono quanto il corretto svolgersi del meccanismo polimerasico della proteina DnaE sia dipendente dall'integrità del PHP (*Sevastopoulos and Glaser 1977, Bierne et al, 1997, Wechsler and Gross, 1971*).

I mutanti nel dominio PHP N $\Delta$ 60 o N $\Delta$ 240, deleti della corrispondente regione N-terminale, oltre a non mostrare alcuna attività polimerasica sono del tutto incapaci di interagire con  $\alpha$  (*Kim and McHenry, 1996*).

Tramite una serie di mutazioni in questa regione, a carico dell'aspartato 43, è stato dimostrato come il coinvolgimento del dominio PHP nell'attività polimerasica non sia strettamente dovuto al legame che stabilisce con la subunità  $\epsilon$ . Infatti il mutante D43E mantiene l'attività polimerasica al livello della proteina wild type, mostrando tuttavia una debole affinità per  $\epsilon$ , mentre una sostituzione dell'aspartato 43 con una alanina (D43A) oltre a diminuire l'interazione tra  $\alpha$  ed  $\epsilon$  determina anche un netto decremento dell'attività polimerasica (*Wieczorek and McHenry, 2006*). Tali osservazioni suggeriscono come il gruppo carbossilico dell'aspartato 43 sia in qualche modo coinvolto nel corretto svolgersi dell'attività polimerasica dell'enzima.

Recentemente è stata introdotta l'ipotesi che in *E. coli* il dominio PHP della polimerasi DnaE abbia una valenza esclusivamente come elemento strutturale nei confronti della subunità  $\alpha$  medesima, ed abbia perso il sito di coordinazione dei metalli in quanto non più necessario all'attività esonucleasica, svolta univocamente dalla subunità  $\epsilon$  (*Barros et al, 2013*).

### **1.8.2.1 Analogie tra il dominio PHP e le pirofosfatasi di tipo II**

Con la risoluzione della struttura della proteina DnaE di *E. coli* è stata evidenziata la somiglianza del sito attivo del PHP con il sito catalitico delle pirofosfatasi di tipo II manganese dipendenti (*Lamers et al, 2006*). Diversamente dalle pirofosfatasi di tipo I, che presentano un sito di coordinazione per il magnesio, formato principalmente da aspartati, le pirofosfatasi di tipo II mostrano un sito di coordinazione per il manganese. La differenza è dovuta principalmente al tipo di coordinazione che lo ione stabilisce con due istidine presenti nel sito attivo delle pirofosfatasi di tipo II ed assenti in quelle di tipo I.

In particolare, nel sito attivo delle pirofosfatasi di tipo II sono presenti tre ioni metallici coordinati da

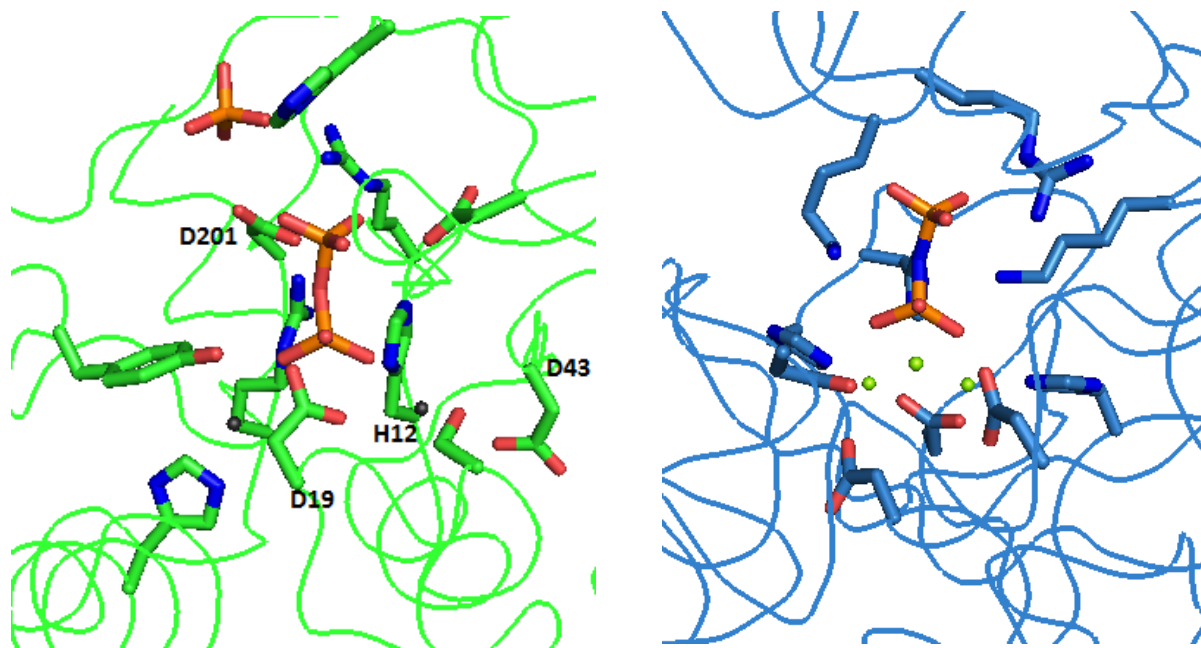
due istidine e quattro aspartati; inoltre, il pirofosfato si colloca nella tasca interna dell'enzima interagendo con due lisine, un'istidina ed un'arginina (Fabrichniy, 2006).

Nella regione interna del PHP si può notare una composizione analoga alle pirofosfatasi di tipo II. Inoltre, osservando la struttura della subunità  $\alpha$ , cristallizzata in tampone fosfato, si può notare la presenza di una molecola di ortofosfato nella cavità del PHP (Lamers et al, 2013), il che suggerisce l'esistenza di un potenziale sito di interazione per i fosfati all'interno di questo dominio.

Paragonando la regione interna del PHP con il sito attivo delle pirofosfatasi di tipo II, si può suddividere la popolazione amminoacidica in due gruppi:

- i) I residui deputati alla coordinazione dei metalli (H12 – S16 – D19 – D43 – H213 – Y234);
- ii) I residui deputati al posizionamento del substrato (R10 - H83 - D201 – R203).

Analogamente al sito attivo delle pirofosfatasi di tipo II, il gruppo di coordinazione dei metalli del PHP consta di due istidine e quattro residui carichi negativamente, mentre il gruppo di amminoacidi adiacente, deputato all'interazione con il substrato, presenta un'istidina e due arginine.



**Figura 1.17**

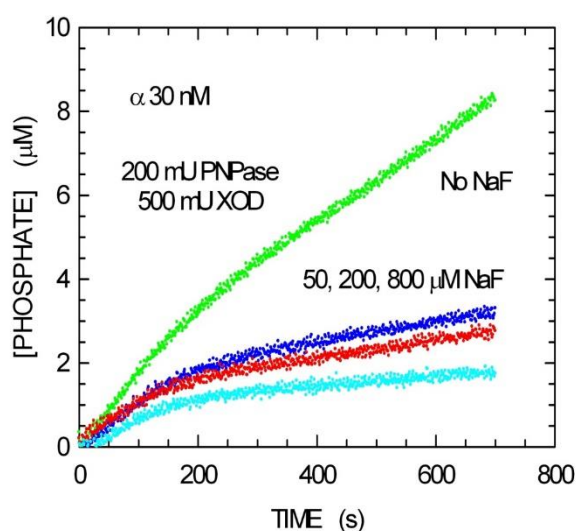
Strutture del dominio PHP di DnaE di *E. coli* PDB: 2HNH (verde, a sinistra) e del sito attivo della pirofosfatasi di tipo II di *B. subtilis* PDB: 2HAW (blu, a destra).

Nella struttura del PHP è stata aggiunta una molecola di pirofosfato e due ioni metallici, posizionati nell'ipotetico sito attivo. Gli amminoacidi in evidenza nel PHP sono dall'alto: H83, R203, D69, D201, R10, H12, Y234, D43, D19, H213.

Gli amminoacidi in evidenza nel sito attivo della pirofosfatasi sono dall'alto: R296, K295, K205, H9, D149, H97, D13, D75, D15.

Non è ancora chiaro come il PHP possa svolgere una funzione pirofosfatasica, e sebbene si possa notare una cavità in prossimità del sito attivo del PHP, risulta posta in opposizione al sito dove avviene la reazione transferasica. Dalle conformazioni note della subunità  $\alpha$ , il pirofosfato prodotto dalla polimerizzazione del DNA per entrare nel sito attivo del PHP necessiterebbe quindi di un passaggio diffusivo, dal palmo al solvente.

In un precedente lavoro di tesi (*Perticarari S, Tesi di Laurea, Università di Bologna, AA2012 – 2013*) è stato osservato come un'attività pirofosfatasica intrinseca alla subunità  $\alpha$  sia soggetta ad inibizione da parte dello ione fluoruro. Tale situazione è analoga all'effetto inibitorio riscontrato per le pirofosfatasi sia di tipo I che di tipo II (*Samygina, 2007*).



**Figura 1.18**

Cinetiche di attività pirofosfatasica della proteina  $\alpha$  a diverse concentrazioni di Fluoruro (*Perticarari S, Tesi di Laurea, Università di Bologna, AA2012 – 2013*)

## CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI

Precedenti studi svolti nel laboratorio ospitante hanno riportato la presenza di un'attività pirofosftasica nella polimerasi  $\alpha$  di E. coli, descrivendo inoltre come questa reazione sia soggetta ad inibizione da parte dello ione fluoruro (*Conte E, Tesi di Dottorato, Università di Bologna, 2012*) (*Perticarari S, Tesi di Laurea, Università di Bologna, AA2012 - 2013*).

La regione proteica responsabile di questa reazione è stata localizzata purificando il dominio PHP isolato della polimerasi  $\alpha$ , che in una serie di saggi qualitativi ha mostrato possedere un'attività pirofosftasica. (*Gratani FL, Tesi di Laurea, Università di Bologna, AA 2010 - 2011*)

L'intento del presente lavoro riguarda l'individuazione del sito attivo per la reazione summenzionata. Attraverso la caratterizzazione di tre varianti della polimerasi  $\alpha$ , recanti mutazioni nel dominio PHP, si è voluto definire il sito catalitico per l'idrolisi nei confronti del pirofosfato ed il grado di interazione tra l'attività pirofosftasica e quella polimerasica.

## CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Ceppo batterico

In tutte le fasi del lavoro è stato utilizzato il ceppo di *Escherichia coli* TOP10 (F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1  $\lambda^-$ ).

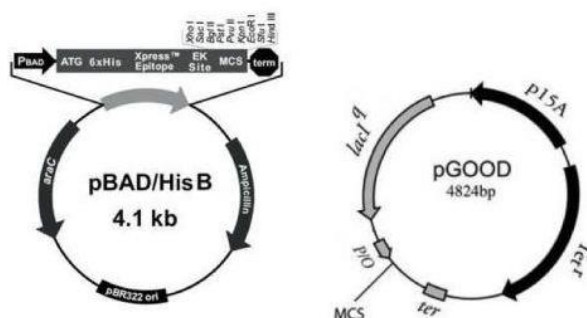
#### 3.1.2 Vettori plasmidici

I vettori utilizzati in questo lavoro derivano dai plasmidi pBAD-HisB (*Invitrogen*) e pGOOD (*Conte et al, 2011*).

Il plasmide pBAD-*dnaE* è stato costruito, a partire dal vettore commerciale pBAD-HisB, inserendo il gene *dnaE* (codificante la subunità  $\alpha$ ) tra i siti di restrizione per gli enzimi NcoI e PstI (*Bressanin et al, 2009*). I costrutti pBAD-*dnaED201A*, pBAD-*dnaEH12A*, pBAD-*dnaED19A*, utilizzati per esprimere i mutanti della proteina  $\alpha$  sono stati prodotti dalla Entelechon (*Bad Abbach, Germania*) mediante mutagenesi sito-specifica.

Il plasmide pBAD-HisB (*Invitrogen*) è un vettore di espressione composto da un'origine di replicazione pBR322 della famiglia ColE1, un gene che conferisce resistenza all'ampicillina e la regione di controllo trascrizionale dell'operone araBAD.

Il plasmide pGOOD-*dnaX-dnaQ-holE*, utilizzato per esprimere i geni codificanti le tre subunità  $\tau$ ,  $\epsilon$  e  $\theta$ , precedentemente assemblato presso il laboratorio ospitante (*Conte et al, 2011*) (*Ceccarelli A, Tesi di Laurea, Università di Bologna, AA2012 - 2013*) contiene la regione di controllo trascrizionale dell'operone *lac*, il gene di resistenza alla tetraciclina e l'origine di replicazione p15A.



**Figura 3.1**

Plasmidi pBAD-HisB (*Invitrogen*), pGOOD (*Conte et al, 2011*).

### 3.1.3 Terreni di coltura

Le colture sono state allevate in terreno LB (Luria-Bertani) composto da Triptone 10 g/L, Estratto di lievito 5 g/L, NaCl 10 g/L; i corrispondenti terreni solidi contengono in aggiunta Agar 15 g/L.

I ceppi sono stati coltivati, a seconda dei casi, in terreni ai quali è stata aggiunta Ampicillina 100 µg/mL o Tetraciclina 15 µg/mL.

Il terreno SOC utilizzato per la trasformazione dei ceppi è composto da Triptone 10 g/L, Estratto di lievito 5 g/L, NaCl 10 g/L, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 2.5 mM e Glucosio 2 g/L

### 3.1.4 Colonne Cromatografiche

Per la purificazione degli estratti proteici sono state utilizzate le seguenti colonne cromatografiche (GE Healthcare):

- Colonna a scambio anionico Q-Sepharose FF di 1.6 X 25 cm, con un volume totale di 50 ml
- Colonna di affinità Cibacron Blue di 1.6 X 15 cm, con un volume totale di 30 ml
- Colonna di affinità HiTrap-Heparin HP di 1.6 X 2.5 cm, con un volume totale di 5 ml
- Colonna per gel filtrazione Sephacryl S-300 da 1.6 X 70 cm, con un volume totale di 140 ml,

Tutte le cromatografie sono state condotte a 4 °C, eccetto il passaggio di affinità in HiTrap-Heparin condotto a temperatura ambiente, utilizzando un cromatografo GradiFrac (*Pharmacia Biotech*).

### 3.1.5 Tamponi

I Tamponi, indicati in tabella, sono stati tutti equilibrati a pH 8, filtrati con dischi di nitrocellulosa (0.22 µm) e sottoposti a vuoto prima di effettuare le cromatografie.

	A	QS-A	QS-B	C	DIL.	CB-A	CB-B	HH-A	HH-B	GF
<b>Tris-HCl</b>	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
<b>NaCl</b>	50 mM	50 mM	2 M	/	/	50 mM	2 M	50 mM	2 M	150 mM
<b>EDTA</b>	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
<b>DTT</b>	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
<b>Glicerolo*</b>	/	/	/	40%	20%	20%	20%	20%	20%	20%
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	/	/	/	/	/	5 mM	5 mM	/	/	/
<b>PMSF</b>	1 mM	/	/	/	/	/	/	/	/	/

\*Concentrazione di Glicerolo espressa in % v/v

#### Tabella 3.1

È riportata a composizione dei tamponi utilizzati durante i passaggi di purificazione.

## 3.2 METODICHE

### 3.2.1 Trasformazione e preparazione stock

Ad aliquote di 40 µL di cellule elettrocompetenti contenenti o meno il vettore pGOOD-*dnaX-dnaQ-holE* è stato aggiunto il costrutto di DNA, 2µL (3 ng) per pBAD-*dnaEH12A* e pBAD-*dnaED19A* ed 1 µL (1.5 ng) per pBAD-*dnaED201A*. Dopo un'incubazione di 5 minuti in ghiaccio le sospensioni cellulari sono state trasferite in apposite cuvette (0.1 cm, Bio-Rad) per essere sottoposte ad un impulso di potenziale (1.8 kV, 200 ohm) mediante un elettroporatore GenePulsar II (*Bio-Rad*). Successivamente le cellule sono state rapidamente risospese in 1 ml di terreno SOC mantenuto in ghiaccio ed incubate a 37 °C in agitazione a 180 rpm per un'ora.

Aliquote (100µL) diversamente concentrate delle colture così trattate sono state trasferite su Piastre Petri contenenti terreno solido selettivo.

I terreni utilizzati per coltivare i batteri dopo la trasformazione sono stati addizionati degli antibiotici opportuni: i) nel caso dei ceppi trasformati con i vari costrutti pBAD sono stati utilizzati terreni contenenti Ampicillina 100 µg/mL; ii) nel caso dei ceppi trasformati con entrambi i vettori, sia con il vettore pBAD che con quello pGOOD, i terreni utilizzati contenevano in aggiunta all'Ampicillina anche l'antibiotico Tetraciclina, alla concentrazione di 15 µg/mL.

Gli stock batterici sono stati preparati a partire da uno striscio su terreno solido selettivo, dopo la crescita su piastra; le singole colonie selezionate sono state inoculate in 1 mL di terreno selettivo e coltivate per 8 ore in agitazione a 37 °C. Al termine della crescita la coltura è stata diluita 1:250 in 25 mL di terreno selettivo fresco.

Dopo una crescita per 15 ore in agitazione a 37 °C, le cellule sono state raccolte per centrifugazione (4500 RPM per 20 minuti), risospese in terreno selettivo addizionato di Glicerolo (15% v/v) e conservate a -20 °C.

### **3.2.2 Crescita ed induzione**

Tutti i ceppi batterici sono stati coltivati seguendo un uguale protocollo di crescita.

A partire dagli stock conservati a -20 °C è stato effettuato uno striscio su piastre Petri, le quali sono state incubate overnight a 37 °C. Una singola colonia di ogni ceppo è stata trasferita in 4 mL di terreno selettivo e allevata in agitazione a 37 °C per 8 ore. Le colture sono state propagate in beute, con inoculi 1:500 e coltivate in agitazione a 30 °C per 15 ore.

Al termine della fase di crescita le cellule sono state indotte a sovra-esprimere le proteine di interesse mantenendo le colture in agitazione a 30 °C per altre 2 ore e 30 minuti, in presenza di 1 mM di Arabinosio e nel caso dei trasformanti recanti il vettore pGOOD anche di 1 mM di IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside).

Al termine dell'induzione le cellule sono state raccolte tramite centrifugazione a 4500 RPM per 20 min e conservate a -20°C.



### **3.2.3 Prove di espressione e solubilità**

Per verificare l'espressione e la solubilità delle proteine di interesse sono state effettuate in parallelo colture di cellule indotte e non indotte. Il profilo proteico di ciascuna coltura è stato confrontato mediante elettroforesi SDS-PAGE in gel di acrilamide.

Le cellule derivanti da 100 mL di coltura, raccolte tramite centrifugazione a 10.000 RPM per 10 min, sono state risospese in 40 mL di Tampone A, sottoposte a 3 cicli di sonicazione e l'estratto risultante centrifugato a 10.000 RPM a 4 °C per 10 minuti.

In questa fase, nel caso del campione derivante da cellule di *E. coli* TOP10 pBAD-*dnaED201A*, sono state aggiunte varie concentrazioni di detergenti e/o agenti risolubilizzanti (Triton X-100 1% v/v, SDS 1% - 0,1% p/v, Tween-20 1% v/v, NaCl 1M, DNase 40 U), l'estratto è stato quindi lasciato in blanda agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti ed infine sottoposto a centrifugazione per 10 minuti, a 10.000 RPM ed a 20°C.

La frazione solubile degli estratti proteici grezzi è stata opportunamente trattata come descritto nel paragrafo 2.2.7 e caricata in gel elettroforetico.

Sono state condotte anche alcune prove di espressione con pellet cellulari derivanti da 1 mL di coltura, raccolti per centrifugazione a 10.000 RPM per 10 minuti e sottoposti ad elettroforesi secondo le modalità descritte nel paragrafo 2.2.7.

### **3.2.4 Estrazione**

Per affrontare la purificazione di tutte le proteine isolate, i pellet cellulari derivanti da un volume di coltura pari a 3 L sono stati risospesi in 50 mL di tampone A, quindi sottoposti a 7 cicli di sonicazione a 18 W di due minuti ciascuno (cicli suddivisi in fasi di 15 secondi di impulso e 15 secondi di pausa) con un apparato misonix-Sonicator 3000. Tutti i passaggi sono stati effettuati in ghiaccio per evitare il surriscaldamento dell'estratto proteico grezzo.

Al termine della sonicazione il campione è stato centrifugato a 10.000 RPM per 10 min, la frazione solubile è stata filtrata su carta e sottoposta al primo passaggio di purificazione.

### 3.2.5 Purificazione

Il processo di purificazione seguito per tutte le proteine isolate ha previsto i seguenti passaggi in successione:

- i) Scambio anionico mediante colonna Q-Sepharose FF
- ii) Cromatografia di affinità con colonna Cibacron Blue
- iii) Ulteriore cromatografia di affinità tramite colonna HiTrap-Heparin;
- iv) Infine, solo nel caso del doppio trasformante pBAD-*dnaE* + pGOOD-*dnaX-dnaQ-holE* una cromatografia per gel filtrazione effettuata con resina Sephacryl S-300.

Al termine dell'estrazione, il campione è stato caricato ad un flusso di 1 mL/min in colonna Q-Sepharose precedentemente condizionata con Tampone QS-A. Dopo un lavaggio effettuato con circa cinque volumi di colonna di Tampone QS-A a 2 mL/min, l'eluizione è stata ottenuta tramite un gradiente di 400 mL effettuato con Tampone QS-B, fino al raggiungimento di una concentrazione finale di NaCl pari a 600 mM. Le frazioni di 6 mL, raccolte ad un flusso di 2 mL/min, sono state diluite 1:2 con tampone C al fine di dimezzare la concentrazione di sale e raggiungere una concentrazione finale di glicerolo pari al 20% v/v.

Tra un passaggio cromatografico ed il successivo le frazioni sono state congelate e ne sono state esaminate delle aliquote mediante SDS-PAGE. Le frazioni contenenti le proteine di interesse sono state riunite, diluite con Tampone DIL. al fine di raggiungere una concentrazione finale di NaCl pari a 50 mM ed infine riconcentrate fino ad un volume di circa 40 mL.

La concentrazione è stata effettuata utilizzando una cella per ultrafiltrazione Amicon equipaggiata con una membrana YM100 Millipore; al termine dell'operazione, il campione è stato nuovamente congelato.

Il caricamento nella colonna di affinità Cibacron Blue condizionata con Tampone CB-A è stato condotto ad un flusso di 0,5 mL/min, previa centrifugazione (10.000 RPM per 10 min) ed aggiunta di MgCl<sub>2</sub> 5 mM al campione.

È stato effettuato un primo lavaggio con circa cinque volumi di colonna del tampone di caricamento, per poi eluire con Tampone CB-B portando la concentrazione di NaCl prima a 150 mM e poi ad 1 M; entrambi i passaggi sono stati condotti ad un flusso di 2 mL/min.

Le frazioni eluite dalla colonna di affinità Cibacron Blue, alle quali è stato aggiunto EDTA 50 mM,

sono state congelate, analizzate mediante SDS-PAGE, successivamente riunite e sottoposte ad un passaggio di diluizione e ri-concentrazione analogo al precedente per abbattere la concentrazione di NaCl fino a 50 mM.

Il caricamento nella colonna di affinità HiTrap-Heparin, condizionata con tampone HH-A, è stato effettuato ad un flusso di 0,5 mL/min previa centrifugazione a 10.000 RPM per 10 min.

Dopo un primo lavaggio con Tampone HH-A pari a due volumi di colonna, sono state raccolte le frazioni in corrispondenza del gradiente di NaCl, ottenuto con Tampone HH-B fino al raggiungimento di una concentrazione finale di NaCl pari a 300 mM, in un volume di 50 mL ad un flusso di 1 mL/min. Le frazioni, esaminate mediante SDS-PAGE, sono state eventualmente riunite e concentrate utilizzando la cella per ultrafiltrazione Amicon con membrana YM100.

Solo per l'estratto proteico isolato da cellule contenenti i plasmidi pBAD-*dnaE* e pGOOD-*dnaX-dnaQ-holE* il protocollo di purificazione ha previsto il caricamento finale del campione in colonna Sephacryl S-300, calibrata utilizzando i marcatori di peso molecolare dei kit "HMW and LMW Gel Filtration Calibration kits" (GE Healthcare).

La colonna è stata equilibrata con Tampone GF, il caricamento di 1 mL delle frazioni concentrate dopo l'eluizione dalla colonna Hi-Trap Heparin è stato effettuato a 0.6 mL/min mediante un loop iniettore. Dopo la raccolta delle frazioni (0.9 mL) sono stati caricati in colonna 10 mg di tireoglobulina bovina (670 kDa).

### **3.2.6 Saggi di attività**

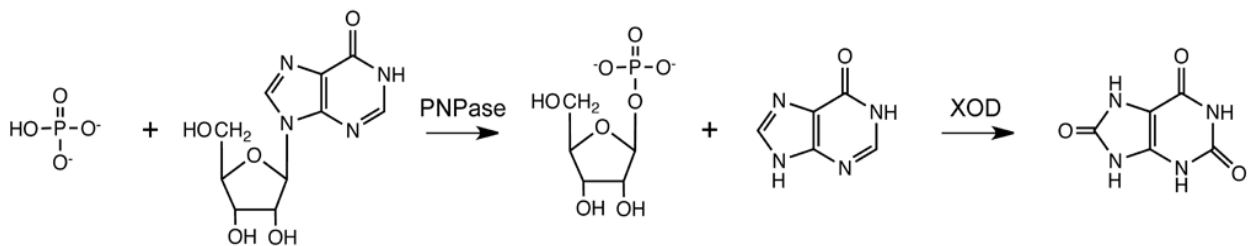
Per le determinazioni di attività è stato utilizzato uno spettrofotometro Perkin-Elmer  $\lambda$ 19 con cuvette di quarzo da 1 cm con volume finale di 1 mL o di 400  $\mu$ L. Gli enzimi utilizzati per i saggi accoppiati sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

#### **3.2.6.1 Attività polimerasica e pirofosfatasica associata**

Per determinare l'attività polimerasica e l'attività pirofosfatasica ad essa associata delle proteine purificate è stato utilizzato un saggio accoppiato che rivela in continuo la formazione del fosfato inorganico, generato dall'idrolisi del pirofosfato, prodotto finale della reazione di polimerizzazione del DNA.

In basso sono riportate le reazioni enzimatiche accoppiate che portano alla formazione di due molecole di acido urico per nucleotide aggiunto; quantificando l'acido urico prodotto è possibile quindi valutare in continuo l'attività polimerasica, grazie alla rilevazione dell'assorbanza a 293 nm, lunghezza d'onda alla quale l'acido urico presenta il massimo di assorbimento.

Enzima	Reazione
DNA polimerasi	$\text{DNA}_n + \text{dNTP} \rightarrow \text{DNA}_{(n+1)} + \text{PPi}$
Pirofosfatasi inorganica	$\text{PPi} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{Pi}$
Purina nucleoside fosforilasi	$\text{Inosina} + \text{Pi} \rightarrow \text{ipoxantina} + \text{ribosio-1-fosfato}$
Xantina ossidasi	$\text{Ipoxantina} + \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{acido urico} + \text{H}_2\text{O}_2$



**Figura 3.2**

Fasi di reazione che portano alla formazione di acido urico dal rilascio del fosfato (Suárez et al, 2012).

Il saggio è stato condotto sia in presenza che in assenza di Pirofosfatasi inorganica, allo scopo di rivelare il grado di attività pirofosfatasica associata all'attività polimerasica delle proteine purificate.

Il substrato per la reazione polimerasica è un DNA a doppio filamento, che permette l'estensione di 25 nucleotidi, formato dall'annealing tra un DNA stampo di 40 nt ed un DNA primer di 15 nt, entrambi prodotti dalla Entelechon (Bad Abbach, Germania).

STAMPO: 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGCGCGC-3'

PRIMER: 5'-GCGCGCGCTTTTTTTT-3'

La miscela standard di reazione è così composta:

<b>Tris-HCl pH 8</b>	100 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	5 mM
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	10 mM
<b>Inosina</b>	250 µM
<b>dsDNA</b>	1 µM
<b>Pirofosfatasi inorganica</b>	40 mU/mL
<b>Purina nucleoside fosforilasi</b>	50 mU/mL
<b>Xantina ossidasi</b>	500 mU/mL
<b>dTTP</b>	100 µM

### 3.2.6.2 Attività Pirofosfatasi

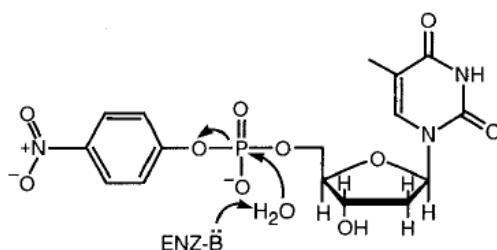
Per rilevare l'attività pirofosfatasi è stato utilizzato un saggio accoppiato analogo al precedente, utilizzando come substrato il pirofosfato in concentrazione finale pari a 1 mM e quantificando il fosfato prodotto tramite la variazione di assorbanza a 293 nm, generata dalla formazione di acido urico.

La miscela di reazione è così composta:

<b>Tris-HCl pH 8</b>	100 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	10 mM
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	200 µM
<b>Inosina</b>	250 µM
<b>Purina nucleoside fosforilasi</b>	50 mU/mL
<b>Xantina ossidasi</b>	500 mU/mL
<b>Pirofosfato</b>	1 mM

### 3.2.6.3 Attività esonucleasica

I saggi per rilevare l'attività esonucleasica delle proteine purificate sono stati condotti basandosi sul protocollo pubblicato da Hamdan nel 2002 (*Hamdan et al, 2002*). L'attività esonucleasica è stata determinata a 420 nm, massimo di assorbimento del p-nitrofenolato, rilasciato dall'enzima dal p-nitrofenil estere della timidina 5' monofosfato (pNP-TMP).



**Figura 3.3**

Meccanismo di reazione fosfoesterasica del pNP-TMP (*Hamdan, 2002*).

La miscela di reazione prevede la seguente composizione:

<b>Tris-HCl pH 8</b>	100 mM
<b>MnCl</b>	1 mM
<b>pNP-TMP</b>	3.3 mM

### 3.2.7 Analisi SDS-PAGE

L'elettroforesi discontinua in gel di acrilamide è stata effettuata in condizioni denaturanti utilizzando reagenti Bio-Rad.

Composizione Gel:	Running Gel	Stacking Gel
<b>Acrilamide*</b>	12,5% o 10%	4,0%
<b>Tris-HCl</b>	0,25 M - pH 8,8	0,25 M - pH 6,8
<b>SDS*</b>	0,2%	0,2%
<b>TEMED*</b>	0,1%	0,1%
<b>Ammonio Persolfato*</b>	0,25%	0,25%

\*Concentrazione espressa in % p/v

I campioni da caricare in gel sono stati risospesi con Sample buffer 5X, sottoposti ad un trattamento a 100 °C per 5 minuti, centrifugati a 7.000 RPM per 1 minuto e caricati in gel (16 µL).

Composizione Sample Buffer 5X:

<b>Tris-HCl</b>	500 mM - pH 6,8
<b>SDS *</b>	10%
<b>Blu di Bromofenolo*</b>	0,5 %
<b>β-mercaptoetanol*</b>	5 %

\*Concentrazione espressa in % p/v

Ad aliquote pari a 20 µL dei campioni derivanti o da frazioni cromatografiche o da frazioni solubili degli estratti grezzi sono stati aggiunti 5 µL di Sample Buffer 5x, mentre i pellet cellulari derivanti da 1 mL di coltura sono stati risospesi in 80 µL di acqua e 20 µL di Sample Buffer.

I marcatori di peso molecolare utilizzati (Fermentans) sono composti da standard quali β-galattosidasi (116.0 kDa), Albumina di siero bovino (66.2 kDa), Ovalbumina (45.0 kDa), Lattato deidrogenasi (35.0 kDa), REasi Bsp 98I (25.0 kDa), β-lattoglobulina (18.4 kDa), Lisozima (14.4 kDa).

La corsa elettroforetica è stata effettuata in un apparato Mini-Protean (Bio-Rad) ad un voltaggio costante di 120 V, utilizzando un tampone di corsa Tris 25 mM, glicina 200 mM, SDS 5 mM. La colorazione del gel è stata eseguita con immersione in Coomassie Brilliant Blue R-250 per 30 minuti mantenendo il gel in agitazione, con decolorazione in una soluzione di etanolo 30 % v/v e acido acetico 10 % v/v.

### **3.2.8 Quantificazione delle proteine**

La stima della concentrazione proteica totale dei campioni è stata ottenuta secondo il metodo Bradford (*Bradford, 1976*) con reagenti Bio-Rad, in un volume finale di 200 µL. L'assorbanza è stata registrata a 595 nm con un lettore Bio-Rad (Model 550).

La taratura è stata opportunamente condotta con diluizioni di Albumina di siero bovino e tutte le prove sono state effettuate in doppio.

### **3.2.9 Cinetiche di crescita**

Per ottenere le cinetiche di crescita, a partire dai rispettivi stock, le cellule sono state pre-coltivate in terreno selettivo solido per 15 ore a 37 °C. Singole colonie sono state trasferite in 1 mL di terreno selettivo liquido e coltivate per 8 ore a 37 °C in agitazione (180rpm), diluite 1:500 e allevate per altre 15 ore. A partire dalle colture così ottenute, le beute contenenti il terreno selettivo, con o senza l'induttore sono state inoculate 1:500 e mantenute a 37 °C in agitazione (180 RPM) per tutta la durata del saggio.

La trasmittanza delle colture (600 nm) è stata misurata prima e dopo l'inoculo, con registrazioni ad intervalli di un'ora; le determinazioni sono state effettuate con un turbidimetro BioLog 21901.



## CAPITOLO 4 - RISULTATI

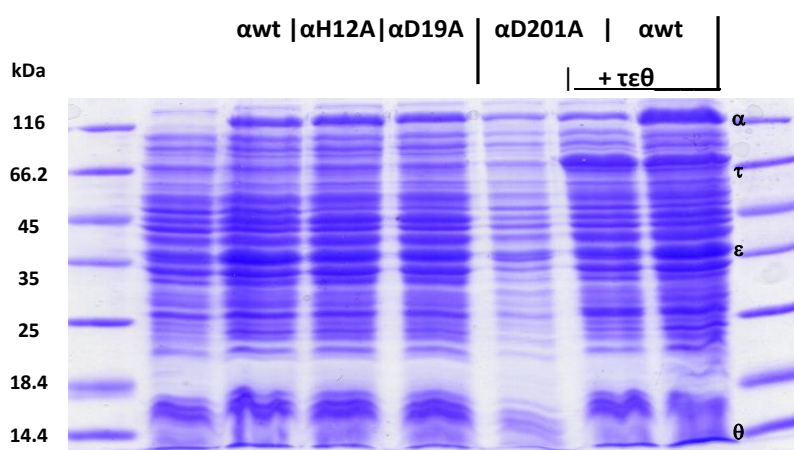
Nel presente elaborato sono trattate l'espressione, la purificazione e la caratterizzazione delle seguenti proteine:

- Subunità  $\alpha$  wild type della DNA polimerasi III di *E. coli*
- $\alpha$ H12A
- $\alpha$ D19A
- Complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$
- Complesso  $\tau\alpha$ D201A $\epsilon\theta$

Per quanto concerne il mutante  $\alpha$ D201A, come è emerso da precedenti lavori (*Perticarari S, Tesi di Laurea, Università di Bologna, AA2012 - 2013*), la scarsa solubilità ne ha impedito una corretta purificazione. Da ciò è scaturita la scelta di esprimere il mutante  $\alpha$ D201A in associazione alle altre subunità del core polimerasico  $\epsilon$  e  $\theta$  ed alla subunità  $\tau$ . Assemblando infatti il complesso  $\tau\alpha$ D201A $\epsilon\theta$  è stato possibile purificare e caratterizzare questo mutante senza incorrere in problematiche derivanti dalla scarsa solubilità o dalla parziale degradazione della proteina  $\alpha$ D201A espressa singolarmente.

### 4.1 Prove di espressione e solubilità

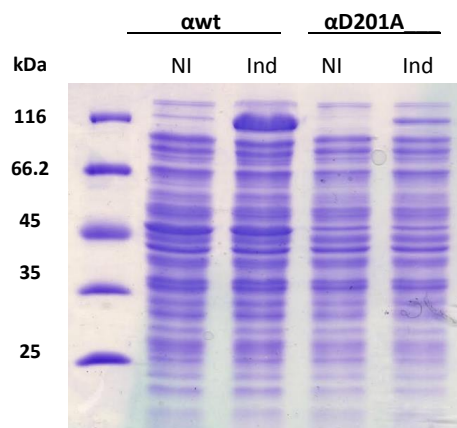
Il livello di espressione delle proteine  $\alpha$ H12A,  $\alpha$ D19A è risultato paragonabile a quello osservato con la proteina  $\alpha$  wild type. Anche nel caso della co-espressione del complesso  $\tau\alpha$ D201A $\epsilon\theta$  il livello di espressione è risultato paragonabile all'analogo complesso recante la proteina  $\alpha$  wild type.



**Figura 4.1**

SDS-PAGE di estratti proteici grezzi isolati da *E. coli* TOP10 indotto alla sovraespressione delle seguenti proteine (da sinistra verso destra): controllo negativo (plasmide pBAD vuoto);  $\alpha$  wild type;  $\alpha$ H12A;  $\alpha$  D19A;  $\alpha$ D201A;  $\tau\alpha$ D201A $\epsilon\theta$ ;  $\tau\alpha\epsilon\theta$  wild type, i marcatori di peso molecolare sono situati alle estremità del gel.

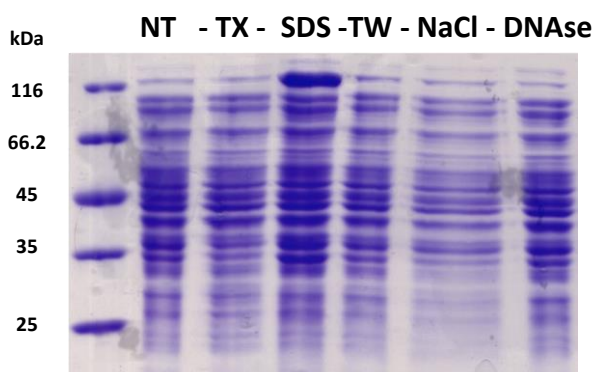
Il mutante  $\alpha$ D201A, nonostante mostri un livello di espressione paragonabile alla proteina  $\alpha$  wild type, presenta un grado di solubilità nettamente inferiore, come mostrato nella Figura 4.2.



**Figura 4.2**

SDS-PAGE di estratti proteici grezzi isolati da *E. coli* TOP10 indotto o meno alla sovraespressione di  $\alpha$  wild type o  $\alpha$ D201A. Da destra: Marcatori;  $\alpha$  wild type non indotta;  $\alpha$  wild type Indotta;  $\alpha$ D201A non indotta;  $\alpha$ D201A Indotta.

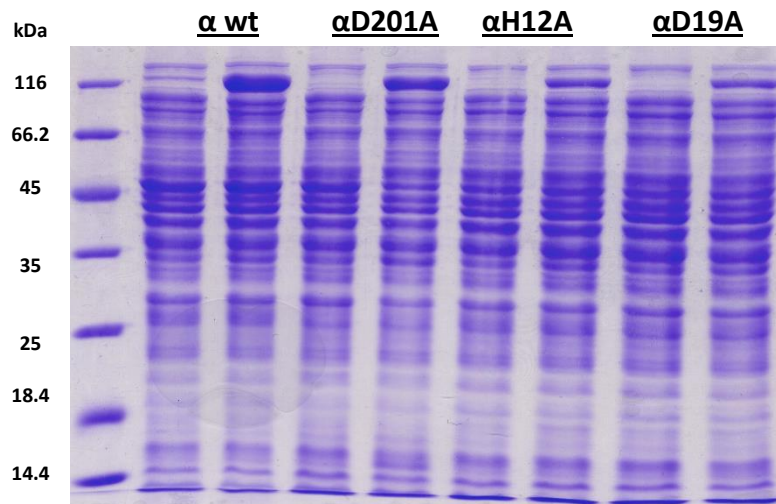
Sono stati effettuati esperimenti per valutare la solubilità della proteina mutante  $\alpha$ D201A. In particolare, sono stati sperimentati diversi composti per verificarne la eventuale capacità di solubilizzare tale proteina. Come si evince dalla figura 4.3, solamente il Sodio Dodecil Solfato (SDS) ad una concentrazione pari allo 0,1% p/v è stato in grado di mantenere la proteina  $\alpha$ D201A nella frazione solubile dell'estratto proteico grezzo.



**Figura 4.3**

Esperimenti di solubilizzazione della proteina  $\alpha$ D201A in estratti proteici grezzi. Marcatori; Campione non trattato(NT), Triton X-100 1% v/v (TX), SDS 0,1% p/v (SDS), Tween-20 1% v/v(TW), NaCl 1M (NaCl), DNase 40 U (DNase).

La solubilità in tampone di lisi, delle varianti  $\alpha$ H12A e  $\alpha$ D19A risulta nettamente superiore rispetto a quella del mutante  $\alpha$ D201A, come riportato in figura 4.4. La variante  $\alpha$ D201A è stata quindi risolubilizzata con SDS (0,1% p/v).



**Figura 4.4**

Frazioni solubili degli estratti proteici grezzi contenenti la proteina  $\alpha$  o sue varianti.

Marcatori;  $\alpha$  wt Non Indotta - Indotta;  $\alpha$  D201A + SDS 0,1% p/v Non Indotta – Indotta;  $\alpha$ H12A Non Indotta - Indotta;  $\alpha$  D19A Non Indotta - Indotta;

## 4.2 Purificazione delle proteine

La procedura utilizzata per la purificazione della proteina  $\alpha$  wild type è stata impiegata, senza alcuna modificazione, per purificare le varianti sito-specifiche della medesima proteina. Di seguito sono mostrati esclusivamente i cromatogrammi e le corrispondenti analisi SDS-PAGE rappresentativi di ogni stadio di purificazione del complesso  $\tau\alpha D201A\epsilon\theta$ . Le procedure sono descritte nel paragrafo 3.2.5.

Nonostante la risolubilizzazione effettuata con SDS, non è stato possibile portare a termine la purificazione della proteina  $\alpha D201A$ , se non co-esprimendola in associazione alle subunità  $\tau$ ,  $\epsilon$  e  $\theta$ ; il complesso  $\tau\alpha D201A\epsilon\theta$  è stato purificato seguendo la stessa procedura di purificazione del complesso wild type e senza alcuna aggiunta di agenti solubilizzanti.

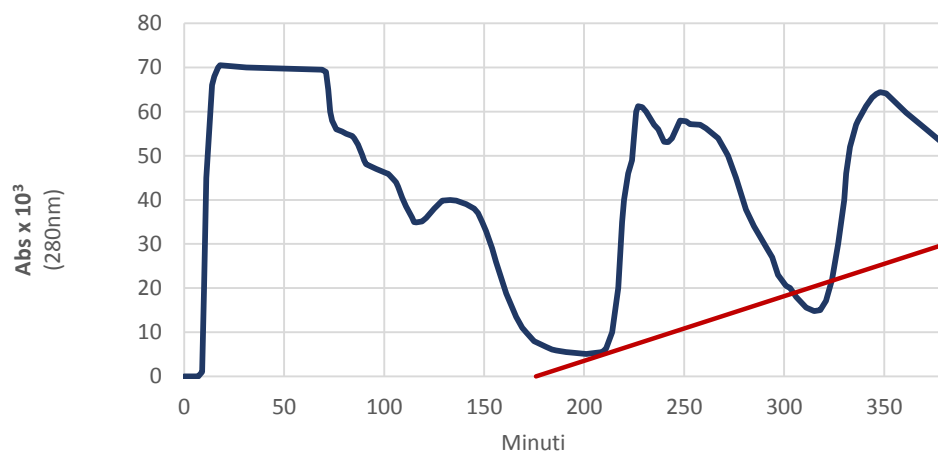
I successivi stadi di purificazione sono stati:

- Cromatografia a scambio anionico (colonna Q-Sepharose)
- Cromatografia di affinità (colonna Cibacron Blue)
- Cromatografia di affinità (colonna Hi-Trap Heparin)

Solamente nel caso del complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  wild type la purificazione è proseguita con un ulteriore stadio, utilizzando una colonna per gel filtrazione Sephacryl S300.

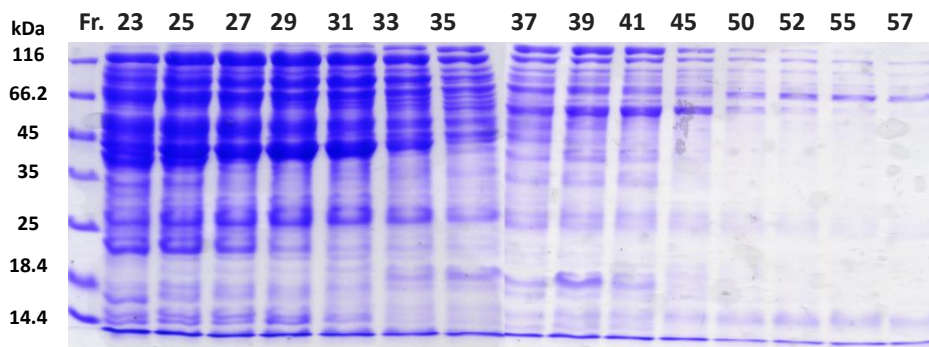
#### 4.2.1 Cromatografia a scambio ionico (Q-Sepharose)

Il primo stadio di purificazione è consistito in una cromatografia a scambio ionico; dal profilo di eluizione sono visibili il fronte di eluizione ed il rilascio di proteine dalla colonna in presenza del tampone di condizionamento. Applicando un gradiente di NaCl sono stato osservati due picchi principali, nel primo dei quali si ritrova la proteina  $\alpha$  o il complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$ , nel secondo sono invece presenti gli acidi nucleici estratti.



**Figura 4.5**

Cromatogramma della purificazione mediante colonna Q-Sepharose della variante  $\tau\alpha D201A\epsilon\theta$ .



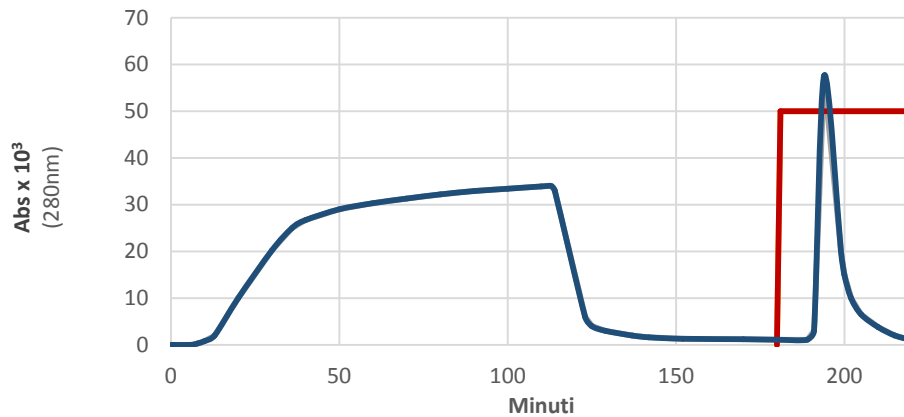
**Figura 4.6**

Analisi SDS-PAGE delle frazioni 23 - 25 - 27 - 29 - 31 - 33 - 35 - 37 - 39 - 41 - 45 - 50 - 52 - 55 - 57 eluite dalla colonna Q-Sepharose.

Si può notare la presenza delle proteine appartenenti al complesso  $\tau\alpha D201A\epsilon\theta$  nelle parti del gel indicate in figura. Le frazioni dalla 24 alla 36 sono state riunite e concentrate per proseguire con il secondo stadio di purificazione.

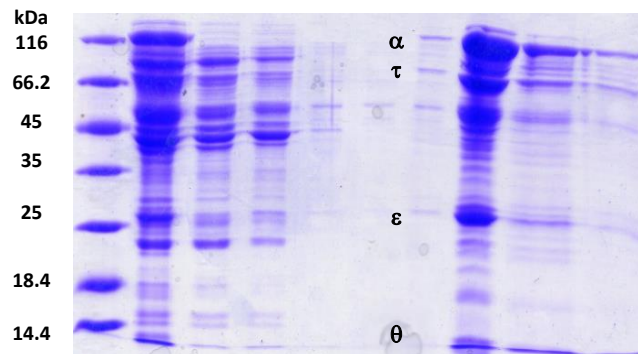
#### 4.2.2 Cromatografia di affinità (Cibacron Blue)

Questa cromatografia, esclusivamente per la purificazione del complesso  $\tau\alpha D201A\epsilon\theta$  ha previsto un'eluizione senza un iniziale lavaggio con tampone CB-B al 5%, passaggio effettuato invece per tutte le altre separazioni in colonna Cibacron Blue. Il volume delle principali frazioni raccolte, denominate Testa, Cuore, Coda, è stato rispettivamente di 3, 15 e 20 ml.



**Figura 4.7**

Cromatogramma della purificazione in colonna Cibacron Blue del complesso  $\tau\alpha D201A\epsilon\theta$



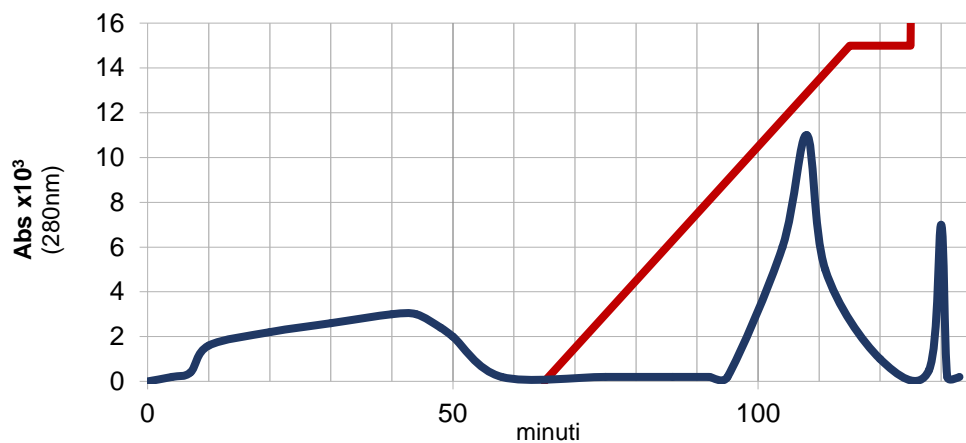
**Figura 4.8**

Analisi SDS-PAGE delle frazioni separate mediante colonna Cibacron Blue. Sono stati analizzati i seguenti campioni (da sinistra a destra):

Marker – Input – Lavaggio I – Lavaggio II – 150 min – 170 min – Testa – Cuore – Coda - Fine

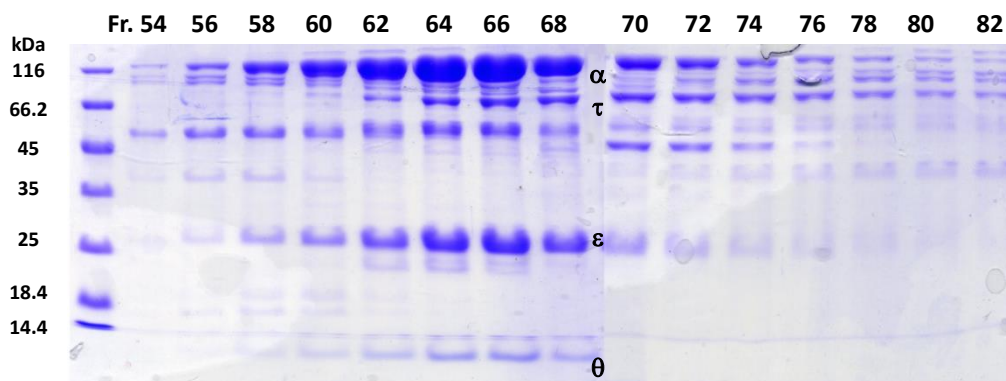
### 4.2.3 Cromatografia di affinità (Hi-Trap Heparin)

In questo stadio di purificazione sono state utilizzate le frazioni Cuore e Coda (riunite), isolate con la precedente cromatografia. Mediante la colonna HiTrap Heparin si è ottenuta una buona separazione del complesso di interesse da altre proteine in grado di interagire con gli acidi nucleici; ad esempio si può notare il secondo picco stabilito osservato al termine del gradiente di NaCl. In tale picco è risultata essere presente RNA polimerasi.



**Figura 4.9**

Cromatogramma della separazione in colonna Hi-Trap Heparin del complesso  $\tau\alpha D201A\varepsilon\theta$

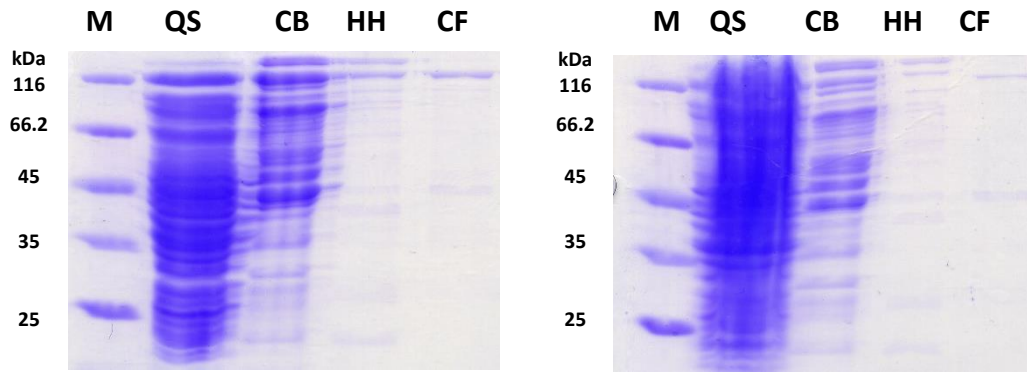


**Figura 4.10**

Analisi SDS-PAGE della separazione in colonna Hi-Trap Heparin del complesso  $\tau\alpha D201A\varepsilon\theta$ . Sono riportate le frazioni 54 – 56 – 58 – 60 – 62 – 64 – 66 – 68 – 70 – 72 – 74 – 76 – 78 – 80 – 82.

#### 4.2.4 Purificazione di $\alpha$ H12A e $\alpha$ D19A

Per la purificazione delle proteine  $\alpha$ H12A e  $\alpha$ D19A è riportata unicamente l'analisi SDS-PAGE relativa ai tre stadi di purificazione effettuati. Nella parte destra di entrambi i gel sono presenti i campioni utilizzati per i saggi di attività.



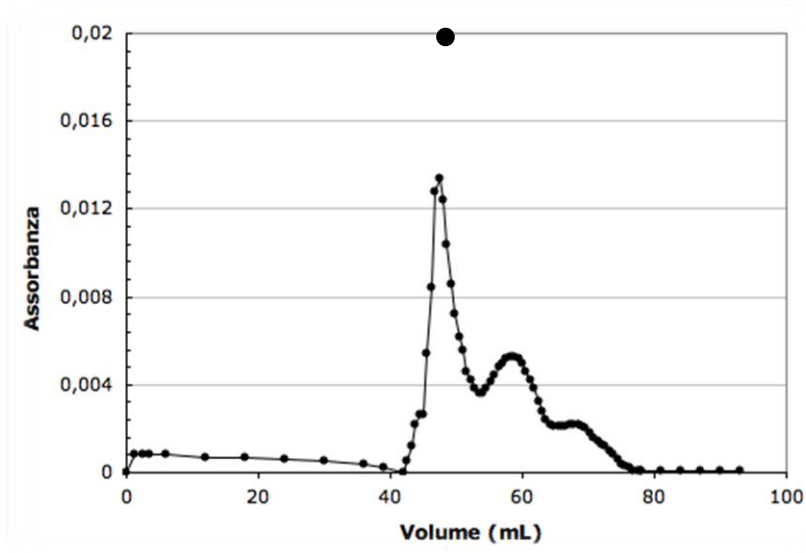
**Figura 4.11**

Analisi SDS-PAGE degli stadi di purificazione delle varianti  $\alpha$ H12A (a sinistra) e  $\alpha$ D19A (a destra). Nei gel sono presenti: Input in Q-Sepharose (QS), Input in Cibacron (CB), Input in Hi-Trap Heparin (HH), Campione finale(CF).



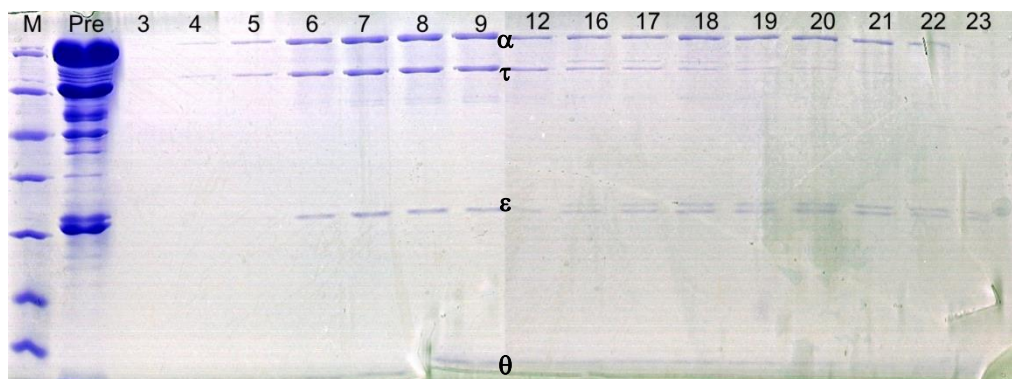
#### 4.2.5 Cromatografia per gel filtrazione (Sephacryl S300)

L'ultimo stadio di purificazione, effettuato unicamente per il complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  wild type, ha consentito l'analisi dello stato di oligomerizzazione di tale complesso, stimandone la massa molecolare mediante gel filtrazione.



**Figura 4.12**

Cromatogramma della gel filtrazione effettuata per il complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  wild type. Nell'asse superiore è indicato il volume di eluizione dello standard di massa molecolare Tireoglobulina (660 kDa)



**Figura 4.13**

Analisi SDS-PAGE di frazioni eluite dalla colonna Sephacryl S300

L'eluizione del complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$ , avvenuta con lo stesso volume osservato per la tireoglobulina (circa 50 ml), permette di stimare la massa molecolare del complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  pari a circa 660 kDa, il valore dello standard. La massa molecolare attesa, per un complesso trimerico  $\tau_3\alpha_3\epsilon_3\theta_3$ , è di circa 711 kDa. Pertanto, queste prime analisi suggeriscono che il complesso sia trimerico; nel calcolare la concentrazione proteica dei complessi  $\tau\alpha\epsilon\theta$  è stato utilizzato questo tipo di assemblaggio, successivamente commentato e convalidato da ulteriori osservazioni.

## 4.3 Saggi di attività

### 4.3.1 Saggi polimerasici

I saggi di attività polimerasica delle proteine isolate sono stati condotti in presenza o meno di Pirofosfatasi inorganica, per valutarne sia l'attività polimerasica che quella pirofosfatasica associata.

I mutanti  $\alpha$ H12A e  $\alpha$ D19A hanno mostrato entrambi una netta diminuzione dell'attività polimerasica, rispettivamente pari a circa l'80% e il 60% rispetto alla proteina  $\alpha$  wild type.

Confrontando tra di loro le attività polimerasiche dei complessi  $\tau\alpha\epsilon\theta$  e  $\tau\alpha$ D201A $\epsilon\theta$  con il complesso mutante è stato osservato un aumento di circa due volte della velocità di reazione.

	[E] nM	Pol+PPase (nM/s)	Att. Specifica s <sup>-1</sup>	Rapporto / wt
<b><math>\alpha</math> wt</b>	17,0	24,8	1,5	/
<b><math>\alpha</math> H12A</b>	17,0	4,9	0,3	20%
<b><math>\alpha</math> D19A</b>	13,0	8,0	0,6	42%
<b><math>\tau\alpha\epsilon\theta</math> wt</b>	5,0	19,9	4,0	/
<b><math>\tau\alpha</math>D201A<math>\epsilon\theta</math></b>	3,2	24,5	7,7	192%

**Tabella 4.1**

Sono riportate le attività polimerasiche in presenza di pirofosfatasi esogena e dei rapporti tra le attività dei mutanti rispetto all'attività delle controparti wild type.

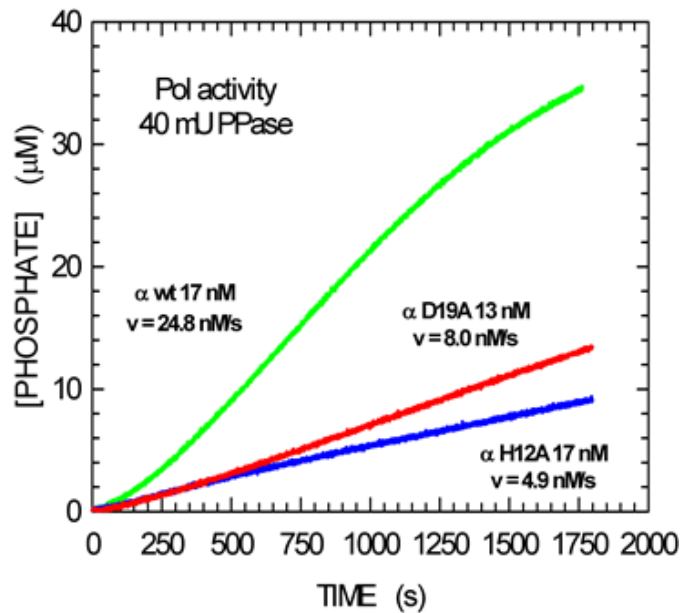
Per l'attività polimerasica rilevata in assenza di pirofosfatasi esogena è stato osservato un decremento generale nell'attività massima ed un decremento non parallelo tra i mutanti e le forme wild type. Di seguito sono riportate le cinetiche di reazione osservate. Tali risultati saranno discussi nel prossimo capitolo.

	[E] nM	Pol-PPase(nM/s)	Att. Specifica s <sup>-1</sup>	Rapporto / wt
<b>α wt</b>	17,0	17,3	1,0	/
<b>α H12A</b>	17,0	1,8	0,1	10%
<b>α D19A</b>	13,0	2,9	0,2	22%
<b>ταεθ wt</b>	5,0	14,7	2,9	/
<b>ταD201Aεθ</b>	3,2	13,2	4,1	140%

**Tabella 4.2**

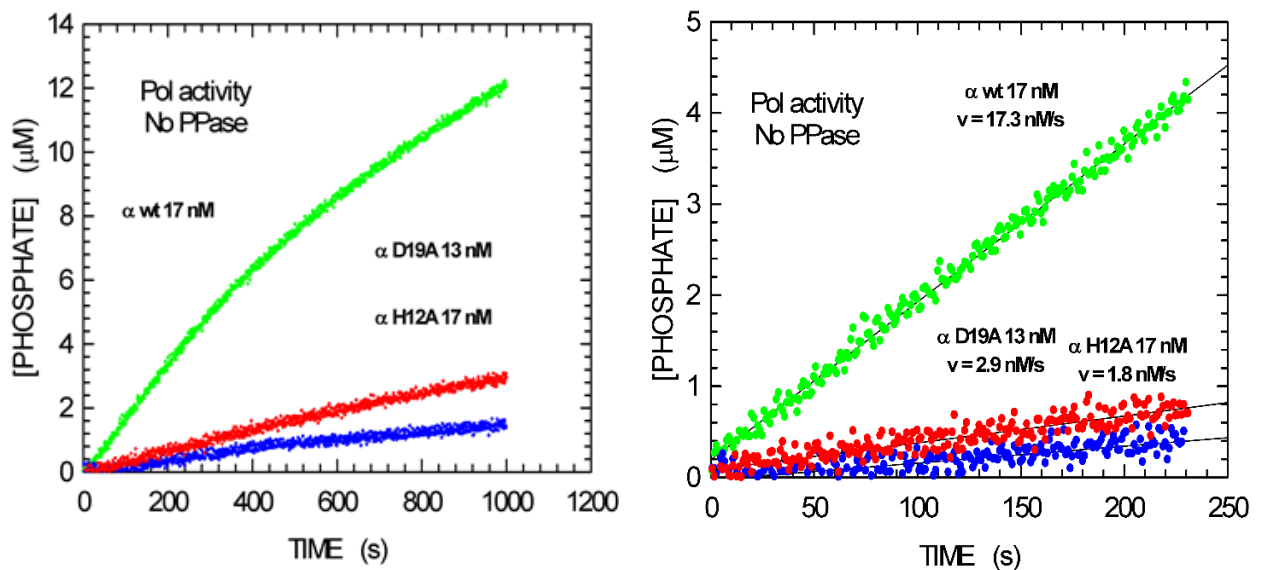
Sono Riportate le attività polimerasiche in assenza di pirofosfatasi esogena e dei rapporti tra le attività dei mutanti rispetto all'attività delle controparti wild type.

#### 4.3.1.1 Cinetiche di reazione per la proteina $\alpha$ wt e le varianti $\alpha$ H12A e $\alpha$ D19A



**Figura 4.14**

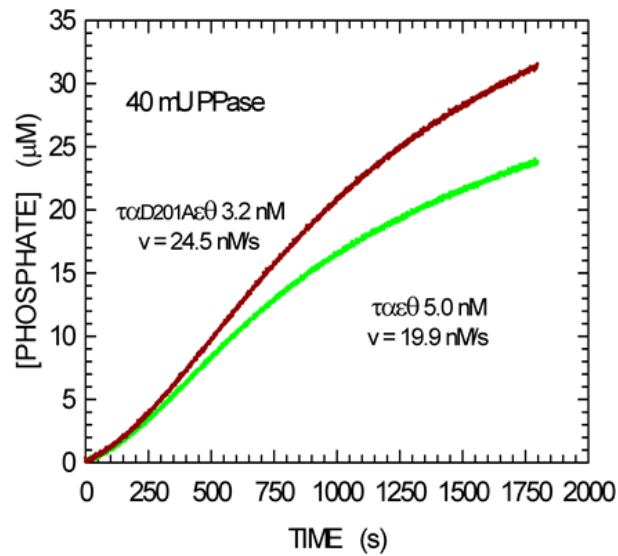
Attività polimerasica in presenza delle proteine  $\alpha$  wild type (in verde),  $\alpha$ H12A (in blu) ed  $\alpha$ D19A (in rosso).



**Figura 4.15**

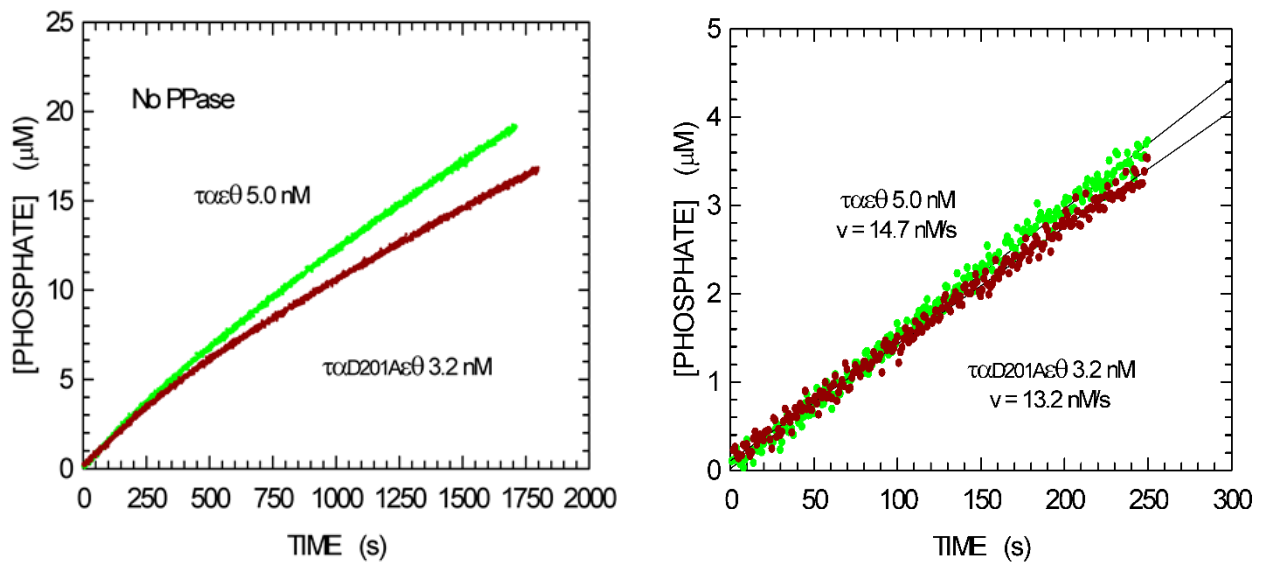
Attività polimerasica in presenza delle proteine  $\alpha$  wild type,  $\alpha$ H12A,  $\alpha$  D19A ed in assenza di Pirofosfatasi inorganica. Nel pannello a destra è mostrato il dettaglio delle velocità iniziali, utilizzate per il calcolo dell'attività.

#### 4.3.1.2 Cinetiche di reazione per il complesso $\tau\alpha\epsilon\theta$ wt e la variante $\tau\alpha D201A\epsilon\theta$



**Figura 4.16**

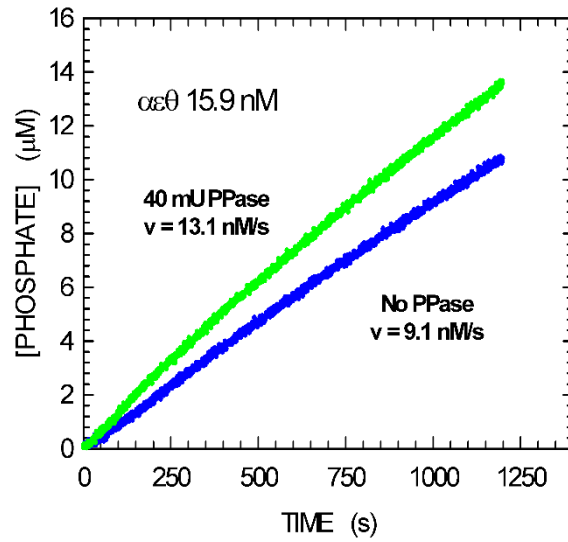
Attività polimerasica in presenza delle proteine  $\tau\alpha\epsilon\theta$  (in verde) o  $\tau\alpha D201A\epsilon\theta$  (in rosso).



**Figura 4.17**

Attività polimerasica in presenza delle proteine  $\tau\alpha\epsilon\theta$  o  $\tau\alpha D201A\epsilon\theta$  ed in assenza di Pirofosfatasi inorganica. Nel pannello a destra è mostrato il dettaglio delle velocità iniziali, utilizzate per il calcolo dell'attività.

### 4.3.1.3 Cinetiche di reazione in presenza del core polimerasico $\alpha\epsilon\theta$

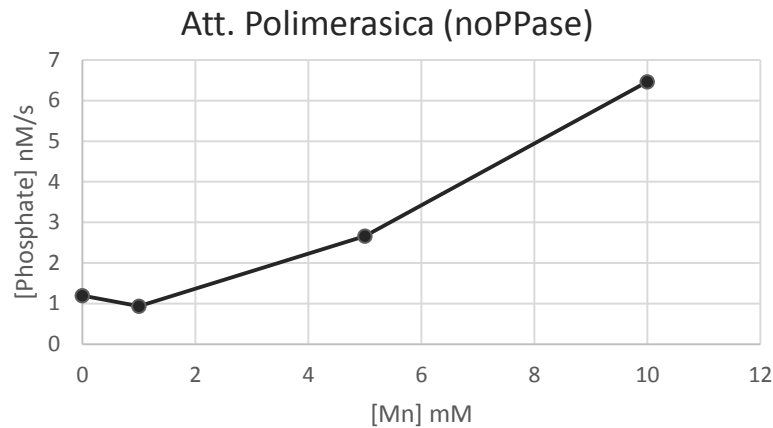


**Figura 4.18**

Attività polimerasica in presenza (verde) ed in assenza (blu) di pirofosfatasi esogena.

#### 4.3.1.4 Dipendenza dell'attività pirofosfataseica dallo ione Manganese

Alla luce dei saggi polimerasici effettuati in assenza di pirofosfatasi esogena è stato messo in evidenza come la reazione pirofosfataseica della proteina  $\alpha$  wild type sia dipendente dalla concentrazione dello ione manganese.



**Figura 4.19**

Attività polimerasica in assenza di pirofosfatasi esogena. Saggi effettuati con 17 nM di proteina  $\alpha$  wild type, 10 mM di  $MgCl_2$  e diverse concentrazioni di  $MnCl_2$  (0, 5, 10 mM).

Solamente nei saggi in assenza di pirofosfatasi esogena si nota la dipendenza dell'attività nei confronti della concentrazione di Manganese. Come mostrato nella tabella sottostante, la reazione in presenza di pirofosfatasi esogena non risente dell'aumento della concentrazione di Manganese.

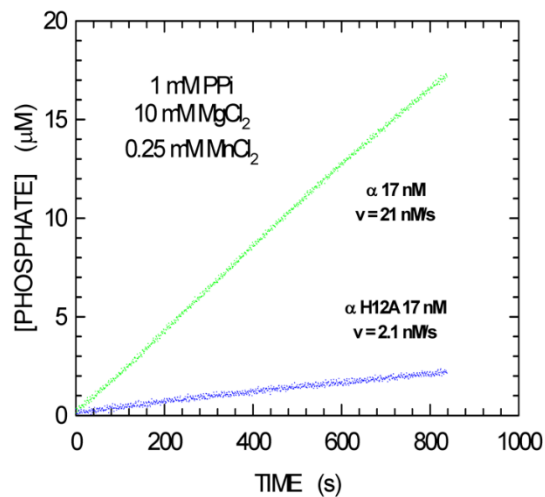
	[MnCl <sub>2</sub> ] 0 mM	[MnCl <sub>2</sub> ] 10 mM
$\alpha$ wt - PPase	4 nM/s	11.3 nM/s
$\alpha$ wt + PPase	12.6 nM/s	12.4 nM/s

**Tabella 4.3**

Sono riportate le velocità delle reazioni polimerasiche, in presenza o in assenza di pirofosfatasi esogena. I saggi sono stati effettuati a diverse concentrazioni di Manganese, fissando la concentrazione di Magnesio pari a 5 mM e quella della proteina  $\alpha$  wild type a 17 nM.

### 4.3.2 Saggi pirofosfatasici

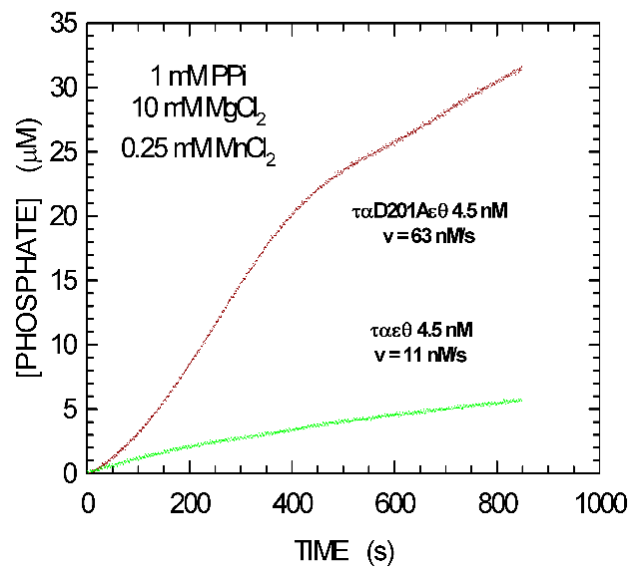
I Saggi dell'attività pirofosfatasica, effettuati in presenza di 1 mM di pirofosfato come substrato, hanno mostrato come il mutante  $\alpha$ H12A abbia una attività nettamente inferiore rispetto alla proteina  $\alpha$  wild type.



**Figura 4.20**

Cinetiche delle reazioni pirofosfatasiche catalizzate della proteine  $\alpha$  wild type (in verde) o  $\alpha$ H12A (in blu).

Diversamente dalla variante  $\alpha$ H12A, il mutante  $\tau\alpha$ D201 $\epsilon$  $\theta$  presenta un'attività di idrolisi del pirofosfato significativamente più elevata rispetto al complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  wild type.



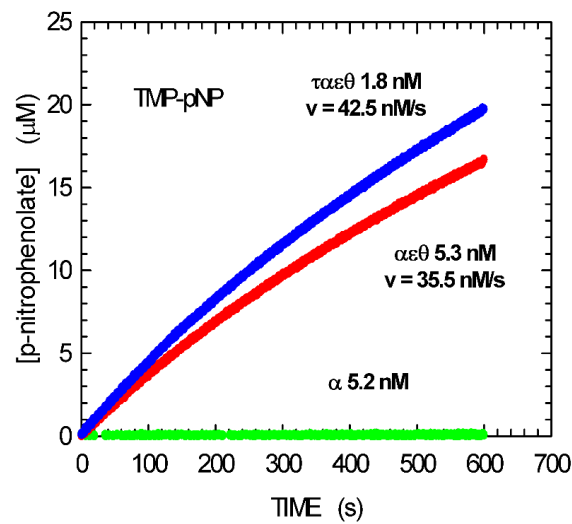
**Figura 4.21**

Attività pirofosfatasica del complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  wild type (in verde) e del complesso  $\tau\alpha$ D201 $\epsilon$  $\theta$  (in rosso).



### 4.3.3 Attività esonucleasica

I saggi di attività esonucleasica hanno mostrato come il complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  catalizzi questo tipo di reazione ad una velocità paragonabile a quella osservata con il core  $\alpha\epsilon\theta$  presente ad una concentrazione tre volte superiore. I medesimi saggi hanno inoltre dimostrato come la proteina  $\alpha$  manchi di questo tipo di attività

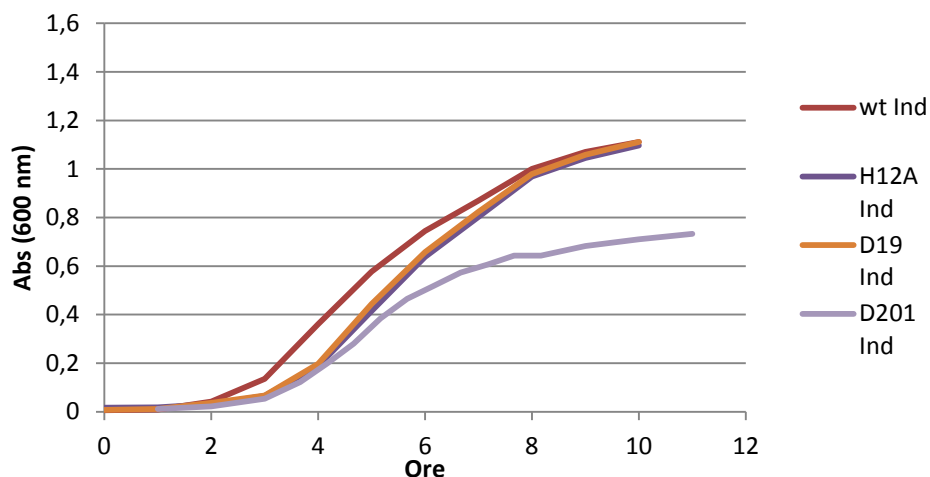


**Figura 4.22**

Attività esonucleasica 3'-5', rilevata con il substrato pNP-TMP, delle proteine  $\alpha$  wt (in verde), core  $\alpha\epsilon\theta$  (in rosso) e complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  (in blu).

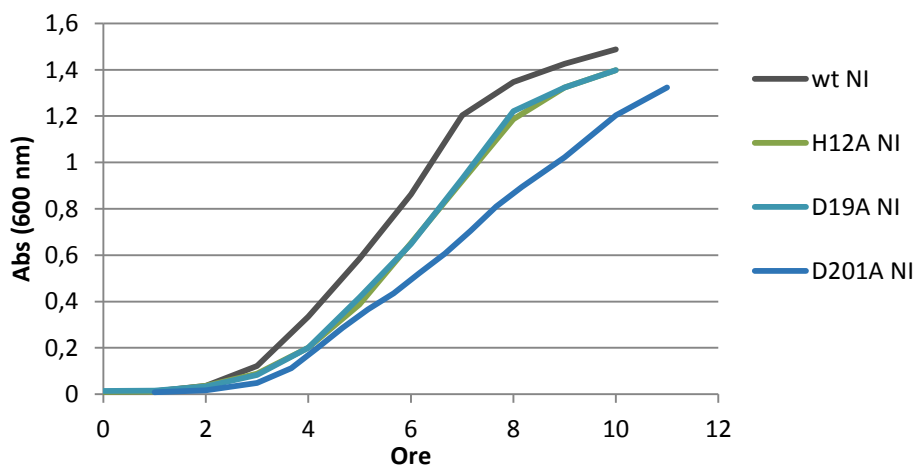
#### 4.4 Cinetiche di crescita

I fenotipi conferiti dalla sovraespressione dei mutanti  $\alpha$ H12A  $\alpha$ D19A e  $\alpha$ D201, rispetto a quanto osservato in seguito alla sovraespressione della proteina  $\alpha$  wild type, mostrano in generale una significativa diminuzione della velocità di crescita.



**Figura 4.23**

Curve di crescita di *E. coli* TOP10 indotto alla sovraespressione delle proteine indicate.



**Figura 4.24**

Curve di crescita di *E. coli* TOP10 non indotto alla sovraespressione delle proteine indicate.

L'effetto delle varianti sito-specifiche di  $\alpha$  nei confronti della velocità di crescita evidente anche nelle colture non indotte, sottolinea come quello provocato dalla variante  $\alpha$ D201 sia estremamente più pronunciato rispetto a quanto osservato in tutti gli altri casi. Il fenotipo conferito dalle varianti  $\alpha$ H12A e  $\alpha$ D19A è analogo, composto da due distinte fasi di crescita. Nelle prime cinque ore di coltura si può notare un comportamento simile a quello provocato da  $\alpha$ D201A e solamente in seguito, probabilmente a causa dell'insorgenza di un fenotipo resistente, la crescita è ripristinata al livello osservato in presenza della proteina wild type.

## CAPITOLO 5 - DISCUSSIONE

### 5.1 Mutazioni nel dominio PHP

#### 5.1.1 Effetto delle mutazioni nei confronti dell'attività polimerasica e pirofosfatasica

La netta diminuzione dell'attività polimerasica osservata nei mutanti H12A e D19A dimostra come questi due amminoacidi, seppure non direttamente coinvolti nella reazione polimerasica, ne influenzino in maniera significativa lo svolgimento. Contrariamente, la mutazione  $\alpha$ D201A stimola l'attività polimerasica del complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$ , incrementandone la velocità di due volte.

Questi dati indicano che gli amminoacidi soggetti a sostituzione sito-specifica influenzano l'attività polimerasica secondo due diverse modalità.

Con i saggi di attività polimerasica effettuati in presenza o in assenza di pirofosfatasi esogena si può determinare la velocità di idrolisi del pirofosfato generato dalla reazione polimerasica, mettendo in evidenza il rapporto che si instaura tra le due attività catalitiche della proteina esaminata. Questo rapporto è indicativo del grado di interazione tra la funzione polimerasica primaria della polimerasi  $\alpha$  e l'attività pirofosfatasica ad essa associata.

	$\alpha$ wt		$\alpha$ H12A		$\alpha$ D19A		$\tau\alpha\epsilon\theta$ wt		$\tau\alpha$ D201A $\epsilon\theta$		$\alpha\epsilon\theta$ wt	
PPase	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Att. s <sup>-1</sup>	1.5	1.0	0.3	0.1	0.6	0.2	4.0	2.9	7.7	4.1	0.8	0.6
Rapp.	0.70		<u>0.37</u>		<u>0.36</u>		0.74		<u>0.54</u>		0.69	

**Tabella 5.1**

Rapporti tra le velocità polimerasiche in assenza ed in presenza di pirofosfatasi esogena per le proteine indicate.

In assenza di pirofosfatasi esogena, la proteina  $\alpha$  wild type manifesta una attività polimerasica pari al 70% della velocità di reazione osservata in presenza di un eccesso di pirofosfatasi inorganica.

Ciò suggerisce come l'attività pirofosfatasica intrinseca alla proteina  $\alpha$  sia limitante nei confronti della massima capacità polimerasica.

Le osservazioni ottenute con il core polimerasico  $\alpha\epsilon\theta$  e con il complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  wild type, mettono in evidenza un analogo rapporto tra l'attività polimerasica in presenza ed in assenza di pirofosfatasi

esogena; questi ulteriore risultati consolidano in maniera significativa i dati relativi alla proteina  $\alpha$  wild type.

Nel caso dei due mutanti  $\alpha$ H12A e  $\alpha$ D19A, il rapporto tra la velocità polimerasica in assenza e in presenza di pirofosfatasi esogena è pari a circa il 36%, suggerendo una diminuzione della capacità pirofosfataseica di circa due volte rispetto alla proteina wild type. Tali osservazioni indicano come questi due amminoacidi, in egual misura, svolgano un'importante funzione nell'attività pirofosfataseica.

Associando questi risultati al decremento osservato per l'attività polimerasica, emerge come con entrambe queste due mutazioni si sia agito in primo luogo nei confronti del sito dove ha luogo l'attività pirofosfataseica, e come il malfunzionamento di quest'ultimo abbia influenzato drasticamente l'attività polimerasica.

Si può quindi ritenere che questi dati indichino come le due reazioni siano strettamente connesse tra loro, e nel caso in cui si impedisca al dominio PHP di idrolizzare il pirofosfato prodotto dalla polimerizzazione del DNA, anche questa reazione risulta inibita.

Analogamente alla subunità  $\alpha$  wild type isolata ed al core  $\alpha\epsilon\theta$ , anche il complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  wild type mostra un rapporto tra le attività polimerasiche, in presenza ed in assenza di pirofosfatasi, pari a circa il 70%.

Il complesso  $\tau\alpha$ D201A $\epsilon\theta$ , è in grado di svolgere l'attività polimerasica ad una velocità superiore di quasi un fattore due rispetto al complesso wild type; tuttavia, analogamente alla situazione evidenziata per gli altri mutanti, mostra un rapporto tra le attività in presenza ed in assenza di pirofosfatasi esogena nettamente inferiore al 70%.

L'assenza di un parallelo incremento della velocità polimerasica in assenza di pirofosfatasi esogena (pari solo al 53% della velocità polimerasica massima) suggerisce che la mutazione  $\alpha$ D201A determini un certo grado di disaccoppiamento tra le due reazioni.

Questo effetto può essere spiegato ipotizzando che per il sito attivo del dominio PHP l'aspartato 201 giochi un ruolo chiave nel regolare il livello di interazione tra la reazione pirofosfataseica e quella polimerasica.

### 5.1.2 Effetto delle mutazioni nei confronti dell'attività pirofosfatasica

Determinando l'attività pirofosfatasica utilizzando come substrato pirofosfato sodico (in assenza di DNA) il mutante  $\alpha$ H12A ha mostrato una capacità di idrolisi pari a solamente un decimo dell'attività osservata con la proteina  $\alpha$  wild type. Ciò conferma che con la mutazione  $\alpha$ H12A si sia negativamente influenzata l'attività pirofosfatasica.

Per il mutante  $\alpha$ D19A, data la scarsa resa di purificazione, non è stato possibile effettuare questo tipo di saggi, ma data l'omologia di comportamento riscontrata con i saggi di attività polimerasica, per l'attività pirofosfatasica è ragionevole ipotizzare un andamento simile a quello osservato con il mutante  $\alpha$ H12A.

	[E] nM	Attività nM/s	Att. specifica s <sup>-1</sup>	Mutante / wt
$\alpha$ wt	17,0	21	1,23	/
$\alpha$ H12A	17,0	2.1	0,12	0.1
$\tau\alpha\epsilon\theta$ wt	4.5	11	2.44	/
$\tau\alpha$ D201A $\epsilon\theta$	4.5	63	14	<u>5.7</u>

**Tabella 5.2**

Attività pirofosfatasiche delle proteine indicate in rapporto all'attività delle controparti wild type.

L'attività pirofosfatasica del complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  wild type, considerando l'associazione trimerica che dovrebbe garantire un'attività tre volte superiore, risulta leggermente inferiore all'attività della proteina  $\alpha$  isolata, probabilmente a seguito della presenza delle altre subunità.

Il mutante  $\tau\alpha$ D201A $\epsilon\theta$  mostra tuttavia una attività pirofosfatasica quasi sei volte superiore rispetto all'attività del complesso wild type; questo dato, associato all'aumento nei confronti dell'attività polimerasica precedentemente descritto, indica chiaramente come con la mutazione  $\alpha$ D201A l'attività pirofosfatasica del dominio PHP sia stata nettamente stimolata.

In una situazione diametralmente opposta a quella riscontrata per i mutanti  $\alpha$ H12A e  $\alpha$ D19A, la variante  $\alpha$ D201A è in grado di garantire il raggiungimento di una velocità polimerasica molto più elevata della controparte wild type.

### 5.1.3 Composizione del sito attivo e schema di reazione

Seppure non sia possibile definire il sito attivo del dominio PHP nella sua completezza, i dati ottenuti nel presente lavoro permettono di descrivere sommariamente il ruolo, nel meccanismo di reazione pirofosfatasico, assunto dai residui sottoposti a sostituzione sito-specifica.

Le analogie tra il sito catalitico della pirofosfatasi II di *B. subtilis* e quello del dominio PHP della polimerasi DnaE di *E. coli*, riportate nell'introduzione, mostrano come in entrambe le proteine si possa notare la presenza di due insiemi di amminoacidi aventi funzioni distinte. L'istidina 12 e l'aspartato 19 fanno parte del gruppo di amminoacidi coinvolti nella coordinazione degli ioni metallici. Diversamente, l'aspartato 201, trovandosi all'estremità opposta del sito attivo, all'interfaccia con il solvente, interagisce con le cariche negative dei fosfati e ne controlla il rilascio.

La dipendenza dell'attività pirofosfatasica nei confronti dello ione Manganese rimarca ulteriormente la similitudine tra il meccanismo catalitico delle due proteine. È interessante notare come solamente le pirofosfatasi di tipo II, che possiedono due istidine coinvolte nella coordinazione dei metalli catalitici, siano attivate dalla presenza dello ione Manganese. Le pirofosfatasi di tipo I, caratterizzate da un sito attivo in cui si ritrovano solamente residui acidi, richiedono la presenza del Magnesio quale attivatore. La caratteristica peculiare del tipo di coordinazione conferito dalla presenza di due istidine è l'elevata affinità nei confronti del Manganese.

I saggi di attività pirofosfatasica sono stati eseguiti con una concentrazione di Manganese molto bassa, pari a 250  $\mu\text{M}$ ; l'assenza di attività osservata nel caso in cui nel saggio non si aggiunga Manganese (dati non riportati) indica come l'attivazione del meccanismo di idrolisi del pirofosfato sia garantita da basse concentrazioni del catione divalente.

La dipendenza dell'attività pirofosfatasica da questo ione metallico, evidenziata dai saggi di attività polimerasica e riportata nel capitolo precedente (paragrafo 4.3.1.4), indica come ad elevate concentrazioni (5-10 mM) di Manganese non si raggiunga un livello di saturazione e la velocità della reazione pirofosfatasica aumenti in maniera monotona all'aumentare della concentrazione del catione divalente.

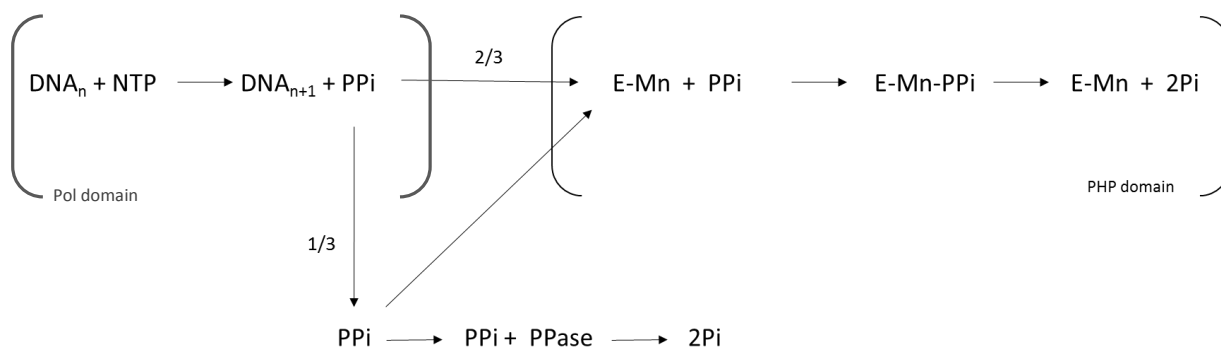
Inoltre, il fatto che l'idrolisi del pirofosfato, contestuale all'attività polimerasica sia attivata solo in presenza di concentrazioni di Manganese superiori a 1 mM, suggerisce che probabilmente il pirofosfato prodotto dalla reazione polimerasica necessita di uno ione Manganese per essere idrolizzato. Tale elevata concentrazione di Manganese potrebbe essere necessaria se si ipotizza che il pirofosfato non si dissocia dall'enzima per legarsi successivamente al dominio PHP, bensì che sia

trasferito dal dominio del Polmo a quello PHP senza interagire con il solvente. Nei saggi di attività pirofosfatasica effettuati con pirofosfato sodico, è infatti sufficiente una bassissima concentrazione di Manganese per attivare la catalisi. Questa evidenza permette di ipotizzare la presenza un meccanismo di transito del pirofosfato all'interno dell'enzima, dal sito polimerasico a quello pirofosfatasico.

La quantità di pirofosfato prodotto dalla reazione di polimerizzazione che il dominio PHP wild type è incapace di idrolizzare risulta essere circa 1/3 del totale. Da ciò si può dedurre come l'accoppiamento tra l'attività polimerasica e quella pirofosfatasica della proteina  $\alpha$  non sia completa, e come l'idrolisi del pirofosfato a carico del PHP avvenga ad un ritmo più lento, probabilmente a causa di una fase diffusiva o di uno stadio lento nel transito del pirofosfato dal sito di polimerizzazione al dominio PHP.

Le tre mutazioni introdotte, come si evince dai rapporti tra le attività polimerasiche in presenza ed in assenza di pirofosfatasi esogena, fanno diminuire il livello di accoppiamento tra le due reazioni.

Considerando l'insieme dei risultati ottenuti, si può ipotizzare un modello di reazione per descrivere i diversi comportamenti osservati per la proteina wild type e per i mutanti sito specifici.



**Figura 5.1**

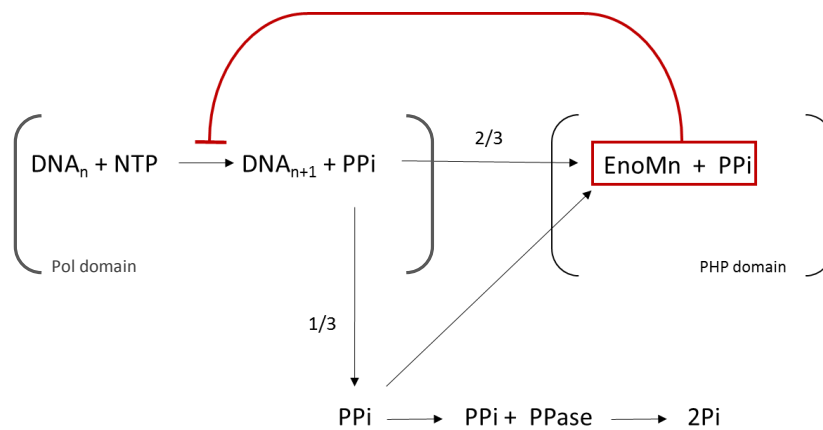
Schema di reazione generale per la proteina  $\alpha$  wild type; viene mostrato l'accoppiamento tra l'attività polimerasica, l'attività pirofosfatasica intrinseca (a carico del dominio PHP) e l'attività pirofosfatasica esogena (PPase). È inoltre riportato il meccanismo di accesso del pirofosfato nel caso in cui sia direttamente aggiunto in soluzione

Nello schema riportato, la reazione pirofosfatasica catalizzata dal dominio PHP prevede la

formazione di un complesso pirofosfato-proteina. Questa associazione, nel modello, è garantita dai metalli posti nel sito di coordinazione.

I mutanti  $\alpha$ H12A e  $\alpha$ D19A non essendo in grado di coordinare correttamente gli ioni metallici perdono del tutto l'attività pirofosfatasica.

Il fatto che nei mutanti  $\alpha$ H12A ed  $\alpha$ D19A la reazione polimerasica risulti molto inibita anche in presenza di pirofosfatasi esogena suggerisce la possibilità che possa avere luogo un meccanismo di reazione intramolecolare accoppiato; ad esempio, attraverso un possibile canale interno in grado di permettere al pirofosfato generato di passare dal sito polimerasico a quello pirofosfatasico e di essere quindi idrolizzato. Nel caso in cui si renda il dominio PHP incapace di idrolizzare il pirofosfato prodotto dalla reazione polimerasica, questa ultima reazione, risentendo della presenza del pirofosfato, ne risulterebbe inibita.



**Figura 5.2**

Schema di reazione per i mutanti  $\alpha$ H12A e  $\alpha$ D19A; con la formazione del complesso *EnoMn* si intende la ridotta capacità del dominio PHP di coordinare gli ioni metallici. La freccia rossa indica l'inibizione nei confronti della reazione polimerasica

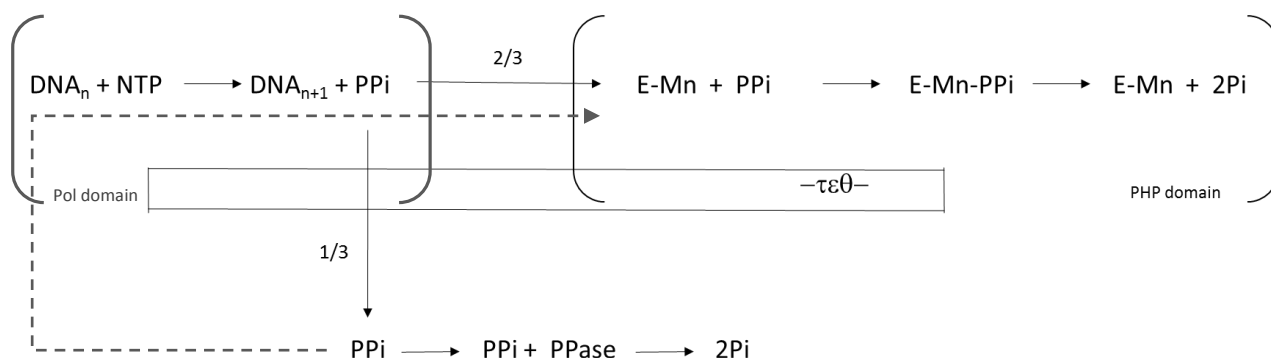
La situazione riguardante il complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  risulta analoga a quella della proteina  $\alpha$  isolata solamente per quanto riguarda l'attività polimerasica, mentre l'attività pirofosfatasica delle due forme wild type risulta significativamente diversa.

Nel complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  wild type il dominio PHP non sembra avere un'accessibilità diretta per il pirofosfato in soluzione; infatti, il complesso trimero dovrebbe mostrare un'attività tre volte superiore alla proteina  $\alpha$ , mentre dai risultati emerge come questa attività sia solamente il doppio di quella manifestata dalla proteina  $\alpha$  isolata.

Queste due diverse proteine, considerando il complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  come trimero, possiedono un'analogia



capacità polimerasica e mostrano un'attività pirofosfatica associata paragonabile; tuttavia, se si considera la reazione di idrolisi del pirofosfato in soluzione (piuttosto che quello prodotto dalla reazione polimerasica) il complesso  $\tau\epsilon\theta$  perde un terzo dell'attività attesa. Ciò suggerisce che, differentemente dalla proteina  $\alpha$  isolata, il complesso  $\tau\epsilon\theta$  possa garantire l'accesso al pirofosfato prevalentemente grazie ad un canale di collegamento tra il dominio del Palmo e quello PHP.



**Figura 5.3**

Schema di reazione per il complesso  $\tau\epsilon\theta$  wild type nel quale la diffusione del pirofosfato dalla soluzione al dominio PHP risulta inibita dalla presenza delle subunità  $\tau\epsilon\theta$

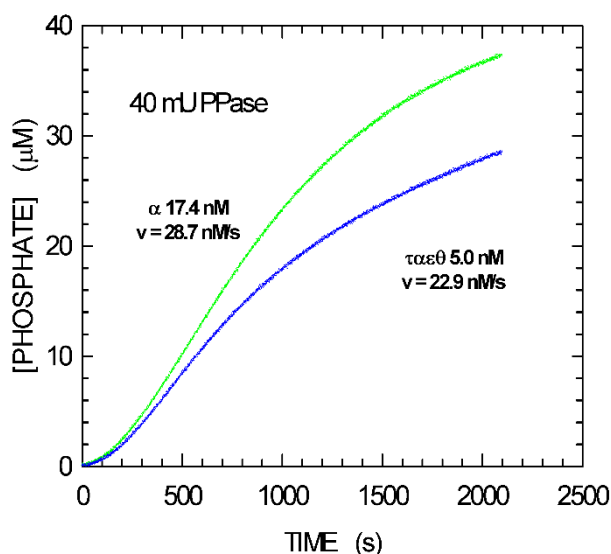
Il mutante  $\tau\alpha D201A\epsilon\theta$ , contrariamente al complesso wild type, mostra un'elevata capacità di idrolisi del pirofosfato in soluzione. Ciò suggerisce che, nonostante l'associazione della proteina  $\alpha$  con le subunità  $\tau\epsilon\theta$  sfavorisca la diffusione del pirofosfato dalla soluzione al dominio PHP, la sostituzione dell'aspartato 201 con un'alanina sia in grado di stimolare l'attività pirofosfatica.

## 5.2 Associazione trimerica del complesso $\tau\alpha\epsilon\theta$

Diversi risultati indicano lo stato di oligomerizzazione assunto dal complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$ . In primo luogo il comportamento in gel filtrazione della proteina purificata, descritto e commentato nel paragrafo 4.2.5, ha fornito un'indicazione riguardo lo stato trimerico del complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$ . Inoltre, i saggi di attività polimerasica ed esonucleasica 3'-5' hanno confermato come il complesso sia un trimero formato da tre sub-assemblaggi  $\tau\alpha\epsilon\theta$ .

In particolare, la forma trimerica del complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  è messa in luce dai saggi polimerasici, grazie ai quali si è potuto osservare che il complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  sia in grado di svolgere un'attività polimerasica paragonabile a quella raggiunta da una concentrazione della proteina  $\alpha$  tre volte superiore.

Dalle determinazioni di attività si può comunque osservare un differente andamento della reazione; si può infatti notare come per il complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  la reazione tenda a rallentare in anticipo rispetto a quanto si verifica in presenza della proteina  $\alpha$  isolata. Ciò potrebbe indicare come, nonostante all'inizio della reazione tutte e tre le subunità  $\alpha$  del complesso siano attive, con il procedere della polimerizzazione il doppio filamento di DNA in fase di sintesi possa causare un ingombro sterico impedendo al complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  di procedere nella reazione alla massima velocità.



**Figura 5.4**

Attività polimerasica in presenza di pirofosfatasi esogena in presenza della proteina  $\alpha$  wild type (in verde) o del complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  (in blu)

Analogamente, i saggi di attività esonucleasica riportati nel paragrafo 4.3.3 hanno rivelato come anche la subunità  $\epsilon$  presenti un'associazione trimerica nel complesso; infatti, l'attività di quest'ultimo è risultata analoga all'attività esonucleasica raggiunta dal core  $\alpha\epsilon\theta$  presente in concentrazione tre volte superiore.

Il livello di associazione della subunità  $\tau$ , come si evince dai gel elettroforetici del complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  purificato, risulta analogo alle altre proteine presenti nel complesso. Inoltre la presenza di tre subunità  $\alpha$  potrebbe essere spiegata solamente attraverso la presenza di tre subunità  $\tau$  che, legandosi tra loro grazie ai domini di oligomerizzazione, sono in grado di garantire l'associazione alle tre polimerasi tramite i domini di interazione.

Per quanto riguarda la subunità  $\theta$ , il fatto che tra il core  $\alpha\epsilon\theta$  ed il complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  ci sia un rapporto di attività esonucleasica pari a tre volte superiore per il complesso, fa supporre che analogamente a quanto noto per il core polimerasico, anche nel complesso  $\tau\alpha\epsilon\theta$  le subunità  $\theta$  si associno quelle  $\epsilon$  secondo una stechiometria 1:1.

## CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI

La attività pirofosfatasica della polimerasi  $\alpha$  di *E. coli* ed il rapporto che instaura con l'attività polimerasica, come descritto nel presente elaborato, rappresentano un'osservazione di assoluta novità, non essendo mai stato riportato in letteratura alcun dato in proposito. Nonostante il presente lavoro necessiti di ulteriori indagini, il modello riportato nella discussione, basato su tre varianti sito-specifiche della polimerasi  $\alpha$ , propone un ruolo per i diversi amminoacidi nel meccanismo dell'attività pirofosfatasica del dominio PHP.

I tre mutanti isolati hanno mostrato come i differenti amminoacidi coinvolti abbiano una diversa implicazione nel meccanismo pirofosfatasico. Nel caso delle varianti  $\alpha$ H12A ed  $\alpha$ D19A la reazione di idrolisi del pirofosfato è fortemente inibita, mentre nel mutante  $\tau$ D201A $\epsilon\theta$  la stessa reazione è nettamente stimolata. Questi risultati identificano con una certa stringenza il sito catalitico del dominio PHP e forniscono, in aggiunta, delle indicazioni sull'accoppiamento tra l'attività di questo dominio ed il meccanismo polimerasico.

L'altra evidenza emersa durante il presente lavoro, ossia la definizione dello stato di oligomerizzazione delle subunità  $\tau\alpha\epsilon\theta$  della DNA polimerasi III di *E. coli*, è in accordo con modelli proposti da un crescente numero di lavori tendenti a suggerire come la replicazione del genoma batterico possa essere espletata da una replicasi trimerica.

La capacità della subunità  $\tau$  di favorire la formazione in vivo di un complesso composto da tre cores polimerasici risulta un'osservazione rilevante per poter affermare che il replisoma di *E. coli*, in presenza di un Loading clamp privo di subunità  $\gamma$ , possa associarsi con tre cores polimerasici attivi e guidare la replicazione dei due filamenti di DNA in maniera diversa da quanto proposto nei modelli classici.

## CAPITOLO 7 – BIBLIOGRAFIA

**Aravind and Koonin (1998)**

Phosphoesterase domains associated with DNA polymerases of diverse origins  
Nucleic Acids Research, 26; 16: 3746–3752

**Baños, Lázaro, Villar, Salas and de Vega. (2008)**

Editing of misaligned 3'-termini by an intrinsic 3'-5' exonuclease activity residing in the PHP domain of a family X DNA polymerase.  
Nucleic Acids Res, 36(18): 5736-5749

**Barros, Guenther, Kelch, Anaya, Prabhakar, O'Donnell, Kuriyan and Lamers (2013)**

A structural role for the PHP domain in *E. coli* DNA polymerase III.  
BMC Struct Biol, 14, 13:8.

**Bierne, Vilette, Ehrlich and Michel (1997)**

Isolation of a dnaE mutation which enhances RecA-independent homologous recombination in the *Escherichia coli* chromosome.  
Molecular Microbiology, 24(6): 1225-1234

**Bradford (1976)**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Anal Biochem, 7; 72: 248-254.

**Brautigam and Steitz (1998)**

Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes.  
Curr. Opin. Struct. Biol, 8, 54–63.

**Bressanin, Stefan, Piaz, Cianchetta, Reggiani and Hochkoepler (2009)**

Proteolysis of the proofreading subunit controls the assembly of *Escherichia coli* DNA polymerase III catalytic core.  
Biochim Biophys Acta, 1794(11):1606-1615

**Ceccarelli A, Tesi di Laurea, Università di Bologna (AA 2012 - 2013)**

Coespressione in *E. coli* delle subunità  $\alpha$ ,  $\tau$ ,  $\epsilon$  e  $\theta$  della DNA polimerasi III.

**Conte, Landolfi, Vincelli, Stefan, Hochkoepler (2011)**

pGOODs: new plasmids for the co-expression of proteins in *Escherichia coli*.  
Biotechnol Lett, 33(9): 1815-1821.

**Conte E, Tesi di Dottorato, Università di Bologna (2012)**

Funzioni della subunità  $\theta$  e del dominio PHP della subunità  $\alpha$  nel core catalitico della DNA polimerasi III di *Escherichia coli*.

**Conte, Vincelli, Schaaper, Bressanin, Stefan, Dal Piaz and Hochkoepler (2012)**

Stabilization of the *Escherichia coli* DNA polymerase III  $\epsilon$  subunit by the  $\theta$  subunit favors in vivo assembly of the Pol III catalytic core.

Arch Biochem Biophys, 15; 523(2): 135-143

**Dallmann, Thimmig and McHenry (1995)**

DnaX complex of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. Central role of tau in initiation complex assembly and in determining the functional asymmetry of holoenzyme.

J Biol Chem. 270:29555-29562

**De Lucia and Cairns (1969)**

Isolation of an *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase.

Nature, 20; 224(5225): 1164-1166.

**Dohrmann and McHenry (2005)**

A bipartite polymerase-processivity factor interaction: only the internal beta binding site of the alpha subunit is required for processive replication by the DNA polymerase III holoenzyme.

J Mol Biol 8; 350(2): 228-239.

**Evans, Davies, Bullard, Christensen, Green, Guiles, Pata, Ribble, Janjic, Jarvis (2008)**

Structure of PolC reveals unique DNA binding and fidelity determinants.

PNAS, 30; 105(52): 20695-20700

**Fabrichniy, Lehtiö, Tammenkoski, Zyryanov, Oksanen, Baykov, Lahti and Goldman (2007)**

A trimetal site and substrate distortion in a family II inorganic pyrophosphatase.

J Biol Chem. 12; 282(2): 1422-1431.

**Fay, Johanson, McHenry and Bambara (1981)**

Size Classes of Products Synthesized Processively by DNA Polymerase III and DNA Polymerase III Holoenzyme of *Escherichia coli*.

J Biol Chem, 256: 976-983

**Fijalkowska and Schaaper (1996)**

Mutants in the Exo I motif of *Escherichia coli* dnaQ: defective proofreading and inviability due to error catastrophe.

PNAS 2; 93(7): 2856-2861.

**Gefter, Hirota, Kornberg, Wechsler and Barnoux (1971)**

Analysis of DNA Polymerases II and III in Mutants of *Escherichia coli* Thermosensitive for DNA Synthesis

PNAS, 68; 12: 3150-3153

**Georgescu, Kim, Yurieva, Kuriyan, Kong and O'Donnell M (2008)**

Structure of a sliding clamp on DNA.

Cell 11; 132(1): 43-54

**Georgescu, Kurth and O'Donnell (2011)**

Single-molecule studies reveal the function of a third polymerase in the replisome.  
Nat Struct Mol Biol, 11; 19(1): 113-116

**Gratani FL, Tesi di Laurea, Università di Bologna (AA 2010 - 2011)**

Analisi funzionale del Dominio PHP della polimerasi III di *Escherichia coli*

**Hamdan, Bulloch, Thompson, Beck, Yang, Crowther, Lilley, Carr, Ollis, Brown and Dixon (2002)**

Hydrolysis of the 5'-p-nitrophenyl ester of TMP by the proofreading exonuclease (epsilon) subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III.  
Biochemistry, 23; 41(16): 5266-5275.

**Huang, Braithwaite and Ito (1997)**

Evolution of dnaQ, the gene encoding the editing 3' to 5' exonuclease subunit of DNA polymerase III holoenzyme in Gram-negative bacteria.  
FEBS Lett, 2; 400(1): 94-98.

**Indiani, McInerney, Georgescu, Goodman and O'Donnell (2005)**

A sliding-clamp toolbelt binds high- and low-fidelity DNA polymerases simultaneously.  
Mol Cell, 16; 19(6): 805-815.

**Jeruzalmi, O'Donnell and Kuriyan (2001)**

Crystal Structure of the Processivity Clamp Loader Gamma ( $\gamma$ ) Complex of *E. coli* DNA Polymerase III  
Cell, 106: 429-441

**Johnson, Bai, Smith, Patel and Wang (2007)**

Single Molecule Studies Reveal Dynamics of DNA Unwinding by the Ring-Shaped T7 Helicase  
Cell, 29; 129(7): 1299-1309.

**Kim and McHenry (1996)**

Biotin tagging deletion analysis of domain limits involved in protein-macromolecular interactions. Mapping the tau binding domain of the DNA polymerase III alpha subunit.  
J Biol Chem, 23; 271(34): 20690-20698.

**Kim, Dallmann, McHenry and Marians (1996)**

$\tau$  couples the leading- and lagging-strand polymerases at the *Escherichia coli* DNA replication fork.  
J. Biol. Chem, 271: 21406-21412

**Kong, Onrust, O'Donnell and Kuriyan (1992)**

Three-dimensional structure of the  $\beta$  subunit of *E. coli* DNA polymerase III Holoenzyme: a sliding DNA clamp.  
Cell, 8; 69(3): 425-437

**Kornberg and Baker (1992)**

DNA Replication (2nd edit.) W.H. Freeman and Co, New York

**Kornberg and Gefter (1971).**

Purification and DNA Synthesis in Cell-Free Extracts: Properties of DNA Polymerase II  
PNAS, 68; 4: 761-764

**Lamers, Georgescu, Lee, O'Donnell and Kuriyan (2006)**

Crystal structure of the catalytic alpha subunit of *E. coli* replicative DNA polymerase III.  
Cell, 8; 126(5): 881-892.

**Lia, Michel and Allemand (2012)**

Polymerase exchange during Okazaki fragment synthesis observed in living cells.  
Science, 20; 335(6066): 328-331

**Lopez de Saro, Georgescu, Goodman and O'Donnell (2003)**

Competitive processivity-clamp usage by DNA polymerases during DNA replication and repair.  
EMBO J 22(23): 6408-6418

**Maki and Kornberg (1985)**

The polymerase subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. II. Purification of the alpha subunit, devoid of nuclease activities.  
J Biol Chem, 25; 260(24): 12987-12992.

**Maki and Kornberg (1987)**

Proofreading by DNA polymerase III of *Escherichia coli* depends on cooperative interaction of the polymerase and exonuclease subunits.  
PNAS, 84(13):4389-4392

**Maki and Kornberg (1988)**

DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. III. Distinctive processive polymerases reconstituted from purified subunits.  
J Biol Chem, 15; 263(14): 6561-6569

**McHenry (2011)**

DNA Replicases from a Bacterial Perspective  
Annu. Rev. Biochem, 80: 403-436

**McHenry and Kornberg (1997)**

DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. Purification and resolution into subunits.  
J Biol Chem, 25; 252(18): 6478-6484.

**McInerney, Johnson, Katz and O'Donnell M (2007)**

Characterization of a triple DNA polymerase replisome.  
Mol Cell, 17; 27(4): 527-538.

**Mott and Berger (2007)**

DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria.  
Nat Rev. Microbiol, 5: 343–354

**Naktinis, Turner and O'Donnell (1996)**

A Molecular Switch in a Replication Machine Defined by an Internal Competition for Protein Rings.  
Cell, 84: 137-145

**Okazaki, Okazaki, Sakabe and Sugimoto (1967)**

Mechanism of DNA replication possible discontinuity of DNA chain growth.  
Japanese Journal of Medical Science & Biology, 20(3): 255-260

**Ozawa, Jergic, Park, Dixon and Otting (2008).**

The proofreading exonuclease subunit  $\epsilon$  of *Escherichia coli* DNA polymerase III is tethered to the polymerase subunit  $\alpha$  via a flexible linker  
Nucleic Acids Research, 36(15): 5074-5082

**Ozawa, Horan, Robinson, Yagi, Hill, Jergic, Xu, Loscha, Li, Tehei, Oakley, Otting, Huber, Dixon. (2013)**

Proofreading exonuclease on a tether: the complex between the *E. coli* DNA polymerase III subunits  $\alpha$ , epsilon  $\epsilon$  and  $\beta$  reveals a highly flexible arrangement of the proofreading domain.  
Nucleic Acids Res, 1; 41(10): 5354-5367

**Park, Jergic, Politis, Ruotolo, Hirshberg, Jessop, Beck, Barsky, O'Donnell, Dixon and Robinson (2010)**

A single subunit directs the assembly of the *Escherichia coli* DNA sliding clamp loader.  
Structure, 10; 18(3): 285-292

**Perrino, Harvey and McNeill (1999)**

Two Functional Domains of the  $\epsilon$  Subunit of DNA Polymerase III.  
Biochemistry, 38(48): 16001-16009

**Perticarari S, Tesi di Laurea, Università di Bologna (AA2012 - 2013)**

Caratteristiche biochimiche e fenotipiche della variante D201A del dominio PHP della polimerasi  $\alpha$  di *Escherichia coli*.

**Pritchard and McHenry (1999)**

Identification of the acidic residues in the active site of DNA polymerase III.  
J Mol Biol, 22;285(3): 1067-1080.

**Qui and Goodman (1997)**

The *Escherichia coli polB* Locus Is Identical to *dinA*, the Structural Gene for DNA Polymerase II  
CHARACTERIZATION OF Pol II PURIFIED FROM *ApoB* MUTANT.  
J Biol Chem, 28; 272: 8611-8617.



**Robinson and Van Oijen (2013)**

Bacterial replication, transcription and translation: mechanistic insights from single-molecule biochemical studies.

Nat Rev Microbiol, 11(5): 303-315

**Samygina, Moiseev, Rodina, Vorobyeva, Popov, Kurilova, Nazarova, Avaeva and Bartunik (2007)**

Reversible inhibition of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase by fluoride: trapped catalytic intermediates in cryo-crystallographic studies.

J Mol. Biol, 366: 1305-1317.

**Sevastopoulos and Glaser (1977)**

Mutator action by *Escherichia coli* strains carrying dnaE mutations.

PNAS, 74: 3450–3497

**Stano, Chen and McHenry (2006)**

A coproofreading Zn<sup>2+</sup>-dependent exonuclease within a bacterial replicase

Nucleic Acids Research, 36; 18: 5736–5749

**Steitz (1998)**

Structural biology: A mechanism for all polymerases

Nature, 391: 231-232

**Studwell-Vaughan and O'Donnel (1993)**

DNA polymerase III accessory proteins. V. Theta encoded by holE.

J Biol Chem, 5; 268(16): 11785-11791

**Suárez, Stefan, Lemma, Conte and Hochkoeppler (2012)**

Continuous enzyme-coupled assay of phosphate- or pyrophosphate-releasing enzymes.

Biotechniques, 53(2): 99-103

**Timinskas, Balvociute, Timinskas and Venclovas (2014)**

Comprehensive analysis of DNA polymerase III  $\alpha$  subunits and their homologs in bacterial genomes

Nucleic Acids Res, 1;42(3): 1393-1413.

**Toste Rêgo, Holding, Kent and Lamers (2013)**

Architecture of the Pol III-clamp exonuclease complex reveals key roles of the exonuclease subunit in processive DNA synthesis and repair.

EMBO J, 2; 32(9): 1334-1343

**Tsuchihashi and Kornberg (1990)**

Translational frameshifting generates the  $\gamma$  subunit of DNA polymerase III holoenzyme.

PNAS, 87(7): 2516-2520

**Wechsler and Gross (1971)**

*Escherichia coli* mutants temperature-sensitive for DNA synthesis.  
Molecular & General Genetics, 113: 273–284

**Wieczorek and McHenry (2006)**

The NH<sub>2</sub>-terminal PHP domain of the  $\alpha$  subunit binds the  $\epsilon$  proofreading subunit of the *Escherichia coli* Replicase.  
J Biol Chem, 5; 281(18): 12561-12567

**Wing, Bailey and Steitz (2008)**

Insights into the Replisome from the Structure of a Ternary Complex of the DNA Polymerase III  $\alpha$ -Subunit.  
J Mol Biol, 2008, 17; 382(4): 859-869

**Witte, Urbanke and Curth (2003)**

DNA polymerase III chi subunit ties single-stranded DNA binding protein to the bacterial replication machinery.  
Nucleic Acids Res, 1; 31(15): 4434-4440.

**Zuo, Deutscher (2001)**

Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution.  
Nucleic Acids Res, 29:1017–1026.