

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**



**DIPARTIMENTO DI FISICA**

**STUDIO DELLA REATTIVITÀ DI DUE  
EMOGLOBINE NON SIMBIOTICHE DI  
*Arabidopsis thaliana*: RUOLO DELLA  
DINAMICA E DELLA STRUTTURA  
PROTEICA**

**Elena Grandi**

***Supervisore: Professor Cristiano Viappiani***

**DOTTORATO DI RICERCA IN FISICA  
XX Ciclo – Gennaio 2008**



## Riassunto

La super famiglia delle emoglobine è composta da un vastissimo e sempre crescente numero di proteine presenti ad ogni livello dell'evoluzione, che presentano un'ampia diversificazione dal punto di vista delle funzioni biologiche. In particolare alcune delle emoglobine delle specie meno evolute, come batteri e piante, svolgono ruoli differenti da quelli di trasporto o stoccaggio dell'ossigeno propri delle emoglobine del sangue dei mammiferi superiori, fra cui la detossificazione da eccesso di NO. Una differenza importante fra questi due tipi di emoglobine è che le prime sono legate a due residui amminoacidici in assenza di ligando esogeno, in modo da completare i legami di coordinazione del ferro emico (esacoordinazione); le seconde hanno invece un legame di coordinazione libero nella forma deossi (pentacoordinazione). Dato che i ruoli biologici delle emoglobine esacoordinate non sono ancora chiari, e che emoproteine con questa caratteristica sono state trovate anche nell'uomo (per esempio la neuroglobina, presente nel cervello), è particolarmente interessante studiare la reattività di questo tipo di macromolecole nei confronti di ligandi esogeni. In questo lavoro sono state studiate le due proteine AHb1 ed AHb2 della pianta *Arabidopsis thaliana* attraverso cinetiche di rebinding di CO dopo fotolisi dovuta ad un impulso laser. Queste due proteine sono state scoperte da poco e sono ancora poco conosciute; i diversi livelli e modalità di espressione fanno pensare ad una funzione biologica differente. Inoltre, AHb1 presenta alcune somiglianze con la neuroglobina, fra cui l'espressione in condizioni ipossiche e la presenza di un esteso sistema di cavità all'interno della matrice proteica, e per entrambe le proteine è stato proposto il ruolo biologico di NO *scavenger*. La laser flash photolysis è una tecnica potente per mettere in evidenza il ruolo delle fluttuazioni molecolari e dei processi di migrazione del ligando all'interno della matrice proteica che definiscono l'interazione proteina-ligando, con possibili implicazioni funzionali. Dopo un capitolo introduttivo contenente una panoramica generale sulle emoproteine, in particolare sulle emoglobine di *Arabidopsis thaliana*, sono presentate alcune misure spettroscopiche di equilibrio volte a caratterizzare queste proteine dal punto di vista strutturale. Le misure di laser flash photolysis e l'analisi numerica associata presentate nei capitoli successivi forniscono un'analisi dettagliata della reattività di AHb1 ed AHb2 nei confronti del CO. In particolare, l'analisi permette di evidenziare la grande differenza dei ruoli delle dinamiche proteiche e della migrazione interna del ligando per le due proteine.



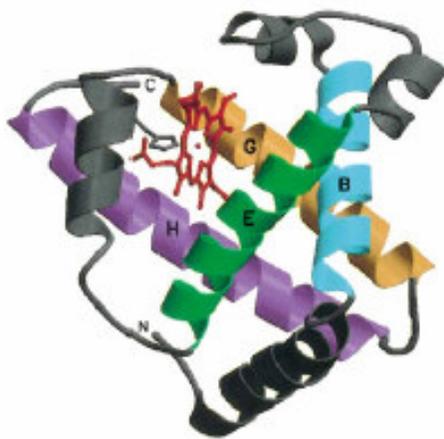
# CAPITOLO 1 : LE EMOGLOBINE

## 1.1 La super famiglia delle globine

Con il termine globine si raggruppa una varietà di proteine, strutturalmente e filogeneticamente correlate ma presenti in organismi di livelli evolutivi anche molto diversi fra loro, accomunate dal caratteristico *fold* globinico e dalla presenza del gruppo prostetico eme, che le rende in grado di legare l'ossigeno ed altre piccole molecole diatomiche. Le rappresentanti più famose di questa famiglia sono senza dubbio l'emoglobina, la proteina più studiata del mondo, presente nei globuli rossi e responsabile del trasporto dell'ossigeno (necessario alla respirazione ossidativa delle cellule) attraverso il sangue nei vertebrati, e la mioglobina, la prima proteina la cui struttura è stata risolta a raggi X (da John Kendrew e Max Perutz nel 1958) e la cui funzione è di immagazzinare l'ossigeno nei tessuti dei muscoli. Ma negli ultimi anni numerosi studi hanno messo in luce l'esistenza di un elevato numero di proteine appartenenti alla superfamiglia delle globine, classificate sulla base delle caratteristiche strutturali, funzionali ed evolutive, presenti non solo negli animali ma anche in batteri, protozoi, piante e funghi.

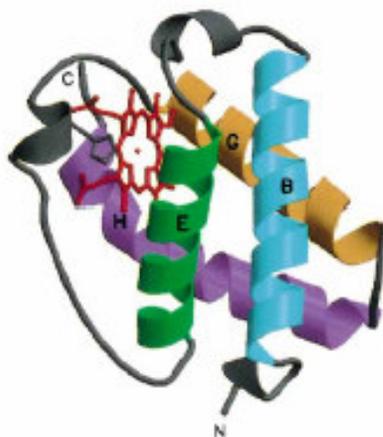
## 1.1.1 Fold globinico

Il *fold* globinico è una caratteristica delle globine, ed è conservato nella super famiglia, pur se con alcune varianti, anche se le strutture primarie di queste proteine possono variare in modo notevole, mantenendo una percentuale di identità di sequenza che può arrivare anche solo al 20% (indicazione di un'origine molto antica per questa superfamiglia). Sebbene la sequenza amminoacidica non debba essere mantenuta rigorosamente, il nucleo idrofobico della proteina deve essere preservato e affinché la struttura rimanga stabile e solubile la superficie a contatto con il solvente deve mantenere un carattere idrofilico. La più famosa mutazione nel *globin fold*, che si osserva nei malati di anemia falciforme, è un cambiamento da glutammato a valina in un amminoacido situato in una posizione esposta al solvente. La presenza di un amminoacido idrofobico sulla superficie proteica favorisce l'aggregazione intermolecolare, il che impedisce ai globuli rossi di assumere una forma corretta e di svolgere la loro funzione biologica. Dal momento che la mioglobina è stata la prima proteina di cui si sia risolta la struttura, il *fold* globinico è stata la prima struttura tridimensionale proteica scoperta. Il ripiegamento globinico è costituito quasi esclusivamente da  $\alpha$ -eliche e può essere schematizzato come un "sandwich" di due strati sovrapposti formati ciascuno da tre  $\alpha$ -eliche. Una o due altre  $\alpha$ -eliche completano la struttura, per cui il classico "*three-over-three globin fold*" risulta composto in tutto da 7 o 8  $\alpha$ -eliche. Convenzionalmente le  $\alpha$ -eliche vengono indicate convenzionalmente con le lettere da A ad H a partire dall'estremità amino-terminale. Per tutte le globine, la numerazione delle eliche e dei residui è mutuata da quella dell'emoglobina umana A, in modo da mantenere una nomenclatura omogenea.



**Figura 1.1:** Esempio di *globin fold* nella struttura terziaria della mioglobina di capodoglio. <sup>1</sup>

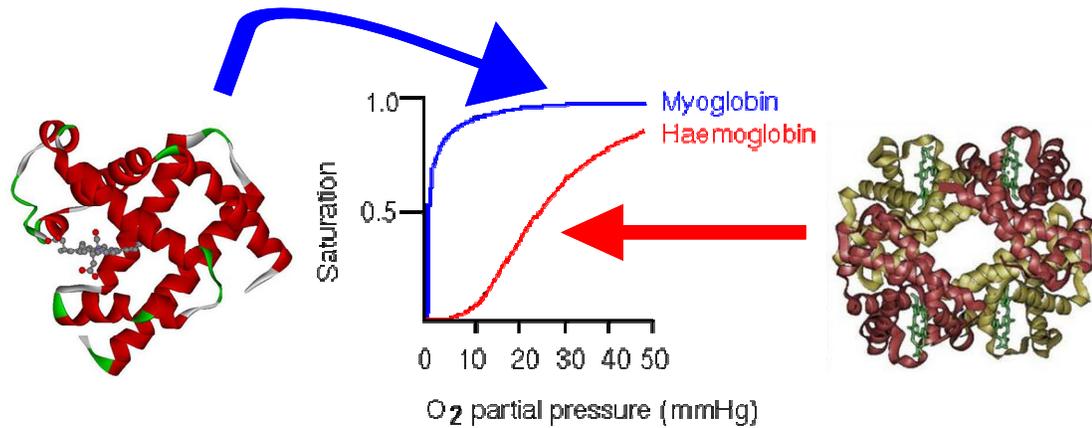
La catena polipeptidica delle globine è costituita da circa 150 residui; tuttavia recentemente sono state scoperte delle emoglobine “troncate”, più corte di circa 20-40 residui amminoacidici e aventi una struttura tridimensionale in parte differente. Queste cosiddette emoglobine troncate sono espresse in eubatteri, cianobatteri, protozoi e piante, e sono state divise in tre gruppi filogenetici (I, II, III) attraverso un’analisi della sequenza amminoacidica. La loro struttura si discosta dal classico ripiegamento globinico, anche se ne mantiene alcune caratteristiche. Le coppie di  $\alpha$ -eliche antiparallele B-E e G-H formano un sandwich “two-over-two”, che può essere visto come una riduzione ai minimi termini del “three-over-three globin fold”.<sup>1</sup> L’elica A e la regione CD-D sono quasi completamente assenti e l’elica F è in parte sostituita da un lungo *loop* preelica. Una caratteristica comune a tutte le emoglobine “troncate” finora studiate è la presenza di un tunnel apolare che collega la tasca distale dell’eme con il solvente; questo canale potrebbe avere un ruolo nel facilitare il legame di ligandi gassosi.<sup>2</sup> Un ulteriore sottogruppo è stato indicato con il nome di “mini-emoglobine” ed è caratterizzato da una sequenza ancora più breve. Le cosiddette “mini-emoglobine” costituiscono un ulteriore gruppo che comprende ad oggi un esiguo numero di rappresentanti. Tra questi vi è l’emoglobina del verme marino *Cerebratulus lacteus*, la più corta emoglobina finora nota, composta da soli 109 aminoacidi.<sup>3</sup> Le delezioni rispetto al classico ripiegamento globinico interessano zone diverse rispetto alle emoglobine troncate. Anche nelle mini-emoglobine è presente un canale idrofobico all’interno della matrice proteica.



**Figura 1.2:** *Two-over-two* globin fold nell’emoglobina troncata di *Paramecium caudatum*.<sup>1</sup>

### 1.1.1.1 Strutture quaternarie delle globine

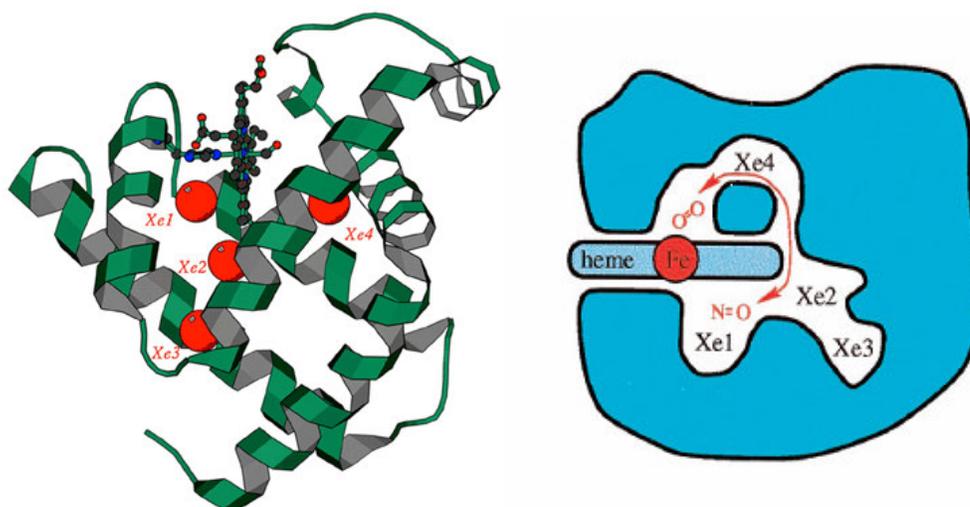
Nella super famiglia delle globine è presente una grande varietà per quanto riguarda la struttura quaternaria: si passa, infatti, da semplici monomeri a complessi costituiti da centinaia di subunità. Il più famoso esempio di globina monomerica è costituito dalla mioglobina. L'emoglobina è invece un tetramero, più precisamente un "dimero di dimeri" dato che le subunità di cui è composta (dette  $\alpha$  e  $\beta$ ) sono uguali a due a due, molto simili fra loro e alla mioglobina stessa. È particolarmente interessante in questo caso sottolineare il rapporto fra struttura e funzione di queste due proteine. L'emoglobina lega l'ossigeno nei polmoni, lo trasporta all'interno dell'organismo e lo cede ai tessuti, liberandoli inoltre da un accumulo di  $\text{CO}_2$ , che si lega ai gruppi ammino-terminali delle quattro catene globiniche. La mioglobina presente nei tessuti muscolari immagazzina l'ossigeno e lo rilascia in caso di intensa attività aerobica. Alle pressioni parziali di ossigeno degli alveoli polmonari ( $\text{PpO}_2 \sim 100 \text{ mmHg}$ ) l'emoglobina contenuta nel sangue è quasi completamente saturata con ossigeno; nei tessuti ( $\text{PpO}_2 \sim 25\text{-}30 \text{ mmHg}$ ) questa proteina rilascia in buona parte l'ossigeno che si lega alla mioglobina presente in loco, che ha un'affinità per l' $\text{O}_2$  molto maggiore di quella dell'emoglobina e lo lega pertanto in modo efficace a quelle pressioni parziali di ossigeno. Il processo di legame e di rilascio dell' $\text{O}_2$  da parte dell'emoglobina è strettamente correlato e controllato dalla struttura quaternaria della proteina: l'emoglobina infatti può esistere in due forme quaternarie, una ad alta affinità per l'ossigeno (forma R) ed una a bassa affinità (forma T). La proteina deossi è in uno stato a bassa affinità; il legame del primo ossigeno induce un cambiamento conformazionale (verso lo stato R) che aumenta l'affinità per i siti di legame restanti. Questo cambiamento conformazionale coinvolge il gruppo eme e attraverso l'elica F, a cui è legata l'istidina prossimale, si propaga anche alla struttura terziaria e quaternaria dell'emoglobina, e facilita il legame di altre molecole di ossigeno nei siti di legame della proteina rimasti liberi (binding cooperativo). Complessivamente il cambiamento dalla forma T alla forma R consiste in una rotazione di  $15^\circ$  e in uno spostamento di  $0.8 \text{ \AA}$  tra i due dimeri  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_2$ . Con lo stesso meccanismo, il rilascio della prima molecola di  $\text{O}_2$  alle pressioni parziali di ossigeno presenti nei tessuti innesca un meccanismo che permette all'emoglobina di rilasciare velocemente e in modo completo l'ossigeno accumulato.



**Figura 1.3:** La curva di legame dell'ossigeno all'emoglobina ha la forma (sigmoide) tipica delle interazioni cooperative (cooperatività positiva). Al contrario la curva di saturazione della mioglobina è iperbolica, come atteso per una reazione bimolecolare.

La mioglobina, al pari dell'emoglobina, è stata estensivamente studiata dal punto di vista del rapporto fra struttura e funzione. Nel 1984 è stata risolta la struttura tridimensionale di una met-mioglobina di capodoglio equilibrata con 7 atmosfere di gas Xenon; <sup>4</sup> questo ha permesso di stabilire l'esistenza di quattro grandi cavità idrofobiche all'interno della matrice proteica, identificate dai siti di legame dello Xe a queste alte pressioni (vedi figura 1.4). Le cavità, chiamate Xe1, Xe2, Xe3 e Xe4, sono significative in quanto la presenza di "buchi" all'interno della matrice proteica e di difetti di impacchettamento rappresentano un costo energetico e riducono la stabilità termodinamica complessiva della proteina; pertanto il fatto che siano stati conservati dall'evoluzione implica per essi una funzione ben definita. In particolare potrebbero essere importanti nello svolgimento dell'attività biologica della proteina, modulando le dinamiche interne e la reattività del ligando. Oltre che alla sua funzione principale di rifornimento di ossigeno e di diffusione di questo gas dalla periferia della cellula ai mitocondri, per la mioglobina nei muscoli cardiaci e dello scheletro è stato proposto un ruolo di *scavenger* dell'NO intracellulare. <sup>5</sup> Questa molecola è infatti un forte inibitore della citocromo *c* ossidasi, l'enzima terminale della catena respiratoria: concentrazioni di NO anche nel range del micromolare impediscono la respirazione cellulare, e i livelli di questa molecola salgono dopo ischemia e successiva riperfusione. L'NO reagirebbe con la mioglobina ossigenata secondo lo schema  $MbO_2 + NO \rightarrow met-Mb^+ + NO_3^-$  con grande rapidità, a causa del carattere di superossido acquisito dall'ossigeno una volta legato al gruppo eme <sup>6</sup> (la reazione  $O_2 + 2NO \rightarrow 2NO_2$  è molto più lenta). La proteina met-mioglobina riduttasi riporta poi la mioglobina nello stato di

ossidazione 2+ ed il ciclo può ricominciare. Dal momento che l'O<sub>2</sub> e l'NO si devono legare in successione, è stato proposto <sup>7</sup> che il sistema di cavità interne osservato abbia un ruolo nel favorire questo binding sequenziale. In particolare, come sarà trattato in seguito in modo più dettagliato, dovendo avvenire la reazione di detossificazione da NO a concentrazioni di questa molecola relativamente alte in presenza di livelli di O<sub>2</sub> particolarmente ridotti, i siti di docking interno potrebbero avere la funzione di “intrappolare” una molecola di NO per il tempo necessario perché si formi il legame fra l'eme e l'O<sub>2</sub>: si tratterebbe quindi di una strategia per assicurare un'elevata velocità della reazione di NO diossigenasi.



**Figura 1.4:** A sinistra rappresentazione dei siti di legame delle molecole di Xe all'interno della matrice proteica della mioglobina. <sup>7</sup> A destra, meccanismo proposto per la relazione dell'NO con la proteina ossigenata. La molecola di NO può muoversi dalla cavità Xe1 (sul lato prossimale dell'eme) attraverso il percorso indicato, fino a raggiungere la cavità distale e reagire con la molecola di O<sub>2</sub>. <sup>8</sup>

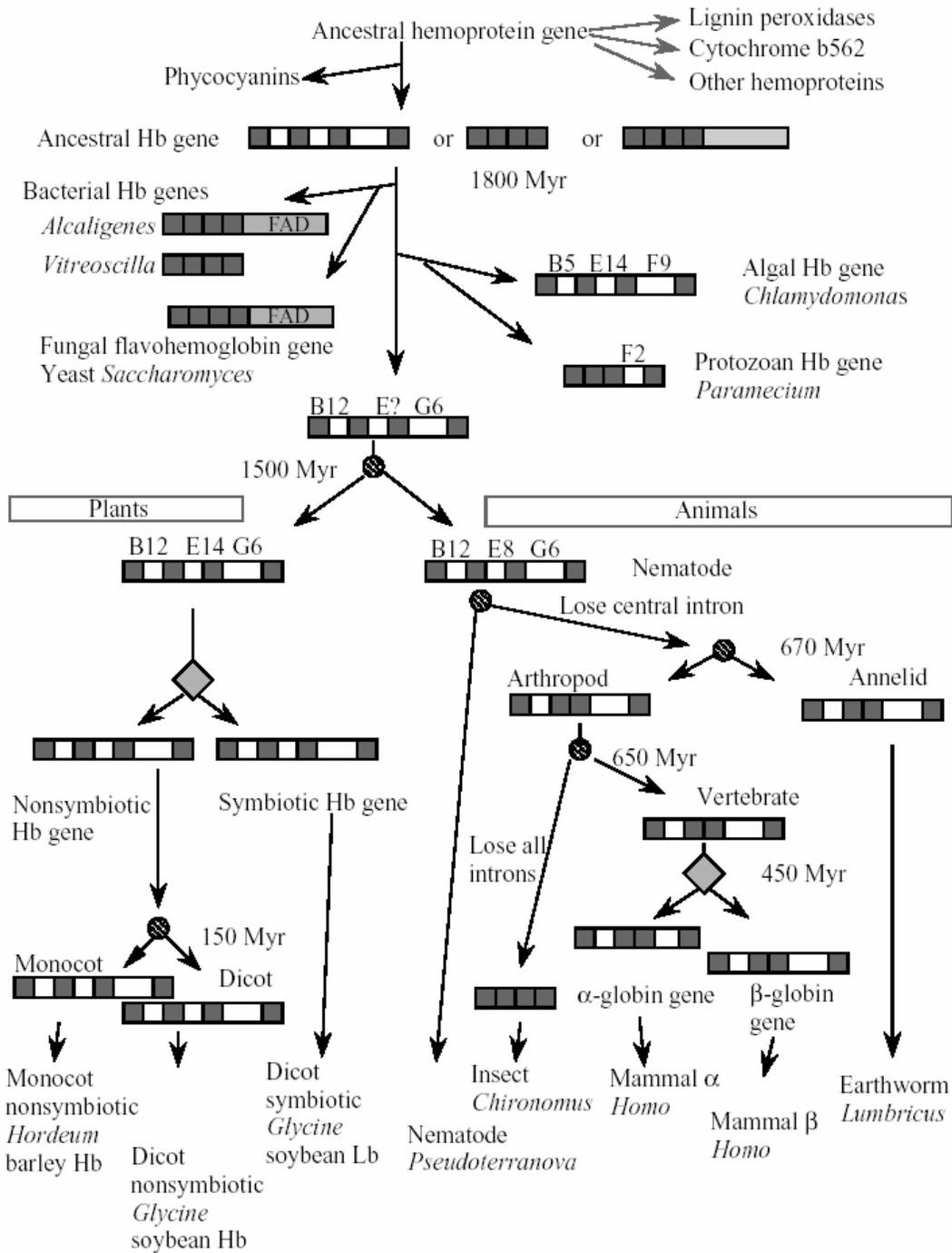
Anche le globine dimeriche sono piuttosto diffuse in natura. Ad esempio, sono dimeriche la citoglobina, presente nei vertebrati, l'emoglobina di riso rice Hb1, le emoglobine di *Scapharca* e di *Vitreoscilla*. I contatti intersubunità interessano zone diverse dei monomeri, per cui le strutture tridimensionali possono essere non sovrapponibili. Per alcune di queste proteine si riscontra un certo grado di cooperatività nel legame con l'O<sub>2</sub>. Mentre nei vertebrati il maggior livello di complessità è costituito dalle strutture tetrameriche, negli invertebrati si riscontra una più ampia varietà di stati di aggregazione. Sono state infatti individuate sia emoglobine multisubunità, in cui il numero di monomeri può arrivare fino a 144 unità, sia emoglobine multidominio. Queste ultime sono proteine originatesi per duplicazione genica e contenenti più domini aventi ripiegamento globinico. Le proteine multidominio possono a loro volta

aggregarsi a formare emoglobine multidominio multisubunità. Appare chiaro quindi come il *globin fold* in questi casi rappresenti una sorta di “mattoncino” per la costruzione di complessi aggregati, che mostrano interessanti simmetrie nella struttura. Esistono inoltre le cosiddette “globine di fusione”, in cui il dominio globinico è unito a uno non globinico. Dall’analisi filogenetica, appare probabile che queste proteine si siano evolute in seguito alla fusione del gene di una globina primitiva con il gene codificante per un’altra proteina avente attività trasduzionale o enzimatica. Un sottogruppo di queste sono le flavoemoglobine, espresse in batteri e funghi patogeni e costituite da un dominio globinico “classico” fuso ad un dominio avente attività ossidoreduttasica contenente un gruppo FAD e un gruppo NADH. In *Escherichia coli*, la flavoemoglobina Hmp è espressa in seguito ad un aumento della concentrazione di O<sub>2</sub> e di NO e catalizza l’ossidazione ossigeno-dipendente dell’NO. La reazione di nitrossidazione avviene a livello dell’eme globinico, grazie agli elettroni forniti da una molecola di NADH. Il trasferimento intramolecolare degli elettroni avviene attraverso il gruppo FAD.

### 1.1.1.2 Aspetti funzionali ed evolutivi

L’estesa diffusione delle emoglobine in tutto il regno vivente consente di ipotizzare che l’origine di queste proteine sia molto antica. Dallo studio delle funzioni svolte nei vari organismi, inoltre, emerge che le emoglobine possono svolgere funzioni diverse dal trasporto di ossigeno, quali funzioni catalitiche, di detossificazione o di sensori di ligandi gassosi. Il ruolo del gruppo ferro-porfirinico nel trasferimento di elettroni si è affermato ben presto durante l’evoluzione, come testimoniato dall’ubiquità dei citocromi, implicati in moltissime reazioni ossido-riduttive. L’atomo di ferro porfirinico, durante tali reazioni, passa ciclicamente da uno stato di ossidazione 2+ ad uno stato 3+. Ad un certo punto dell’evoluzione, stimabile intorno a circa 1800 milioni di anni fa, l’ossigeno iniziò ad accumularsi nell’atmosfera e probabilmente alcune emoproteine svilupparono delle capacità protettive nei confronti di questo potenziale agente tossico.<sup>9</sup> Alcune emoglobine avrebbero assunto il ruolo di *scavenger*, oltre che di ossigeno, anche di altre sostanze, quali NO e CO, attraverso un’attività catalitica ossido-riduttiva. Le flavoemoglobine, l’emoglobina troncata del *Mycobacterium tuberculosis*, l’emoglobina di *Ascaris suum* e persino la mioglobina dei vertebrati sarebbero esempi di emoglobine ancora oggi esistenti che conservano questo ruolo catalitico. La disponibilità dell’ossigeno come accettore finale di elettroni ha probabilmente dato impulso all’evoluzione di emoproteine in grado di legarlo reversibilmente. Una funzione di questo genere richiede che, a

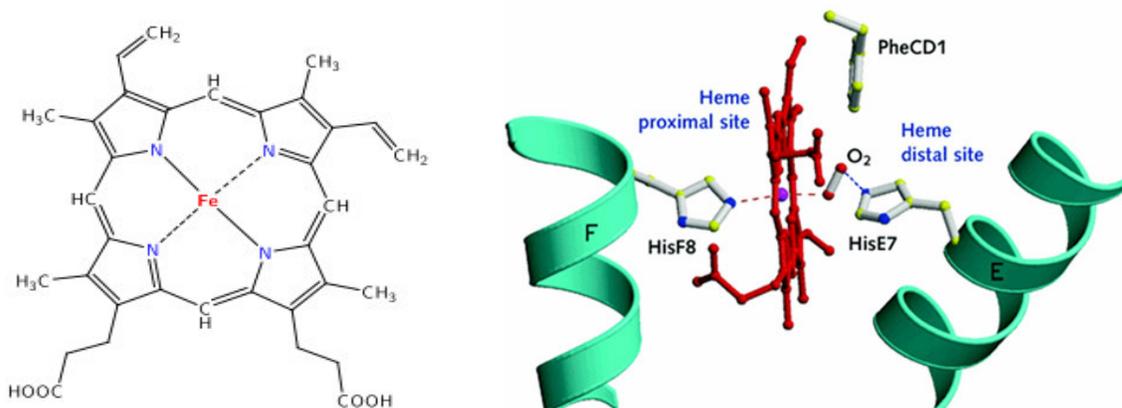
differenza dei citocromi, l'atomo di ferro rimanga nello stato di ossidazione 2+. Queste primitive emoglobine trasportanti ossigeno erano presumibilmente espresse in piccole quantità all'interno delle cellule e facilitavano il rifornimento di ossigeno per la respirazione ossidativa. Con l'evoluzione degli organismi multicellulari, si sono sviluppate strutture specializzate, come gli eritrociti, in cui vengono espressi alti livelli di emoglobine deputate al trasporto dell'ossigeno.<sup>10</sup> Negli organismi attuali, il trasporto di ossigeno è probabilmente il ruolo principale delle globine, ma non è l'unico: alcune globine fungono da sensori di ossigeno, altre da accettori finali di elettroni in cicli ossido-riduttivi. Negli invertebrati, in particolare, sono presenti emoglobine che intervengono nell'acquisizione di zolfo, il quale viene usato come accettore di elettroni nella catena respiratoria, o che hanno un ruolo nel fototropismo.<sup>9</sup> L'ipotesi dell'esistenza di una emoglobina ancestrale dalla quale si siano evolute tutte le emoglobine presenti in procarioti, funghi, piante ed animali è accattivante. L'analisi dei geni codificanti per le diverse emoglobine diffuse in natura sembra avallare questa ipotesi. Da questi studi è stata ipotizzata l'esistenza di un gene codificante per un'emoglobina ancestrale risalente a più di 1500 milioni di anni fa, prima della divergenza tra piante ed animali (figura 1.5). Sia all'interno del regno vegetale che di quello animale le diverse emoglobine oggi presenti si sarebbero generate per evoluzione divergente.<sup>10, 11</sup> Va in ultimo considerato che la funzione di molte emoglobine è tuttora sconosciuta. Studi sulle proprietà spettroscopiche, indagini per misurarne le affinità per ligandi gassosi, determinazione delle strutture tridimensionali tramite analisi a raggi X sono alcuni dei metodi utilizzati per ricavare informazioni di tipo strutturale e funzionale su tali proteine.



**Figura 1.5:** Schema per l'origine della famiglia delle emoglobine da un antenato comune: nel corso dei millenni le proteine si sarebbero poi specializzate per evoluzione divergente fino a dare vita alla grande varietà della superfamiglia delle emoglobine osservata oggi.<sup>10</sup>

## 1.1.2 Il gruppo Eme

L'altra caratteristica comune alla super famiglia delle globine è la presenza del gruppo eme, un gruppo prostetico (ovvero non proteico) che può essere legato alla proteina sia in modo covalente che in modo non covalente, anche se nella maggioranza dei casi questo legame è piuttosto debole. La Fe-protoporfirina IX è il gruppo prostetico delle globine; deriva da una macromolecola organica, la porfirina (una macromolecola eterociclica, altamente coniugata, composta da quattro subunità pirroliche interconnesse attraverso i loro carboni  $\alpha$  per mezzo di ponti metinici =CH) che coordina un atomo di ferro. Nella Fe-protoporfirina IX l'anello tetrapirrolico è sostituito con due gruppi vinilici in posizione 2 e 4, due gruppi propionilici in posizione 6 e 7 e quattro gruppi metilici nelle restanti posizioni (figura 1.6). L'atomo di ferro è coordinato dai quattro atomi di azoto degli anelli pirrolici, che sono tutti planari; inoltre in tutte le globine all'atomo di Fe dell'anello tetrapirrolico è legato un residuo di istidina detto prossimale (HisF8, utilizzando la numerazione classica utilizzata per l'HbA), che agisce come una base di Lewis donando un doppietto elettronico per "coordinare" il ferro, che agisce come un acido di Lewis. L'istidina prossimale è l'unico residuo conservato in tutte le globine conosciute, insieme a una fenilalanina (CD1) implicata nel processo di stabilizzazione dell'eme all'interno della matrice proteica. Per questo processo di stabilizzazione sono importanti anche le interazioni idrofobiche che il gruppo prostetico forma con le catene laterali di residui di leucina, isoleucina, valina e fenilalanina.



**Figura 1.6:** A sinistra raffigurazione schematica del gruppo eme B, il più comune fra le emoglobine. A destra è mostrato il legame diretto, all'interno della proteina, dell'eme con la catena laterale dell'istidina prossimale (a sinistra); il sesto legame di coordinazione è qui occupato dal ligando diatomico  $O_2$  stabilizzato da un altro residuo (istidina distale).<sup>12</sup>

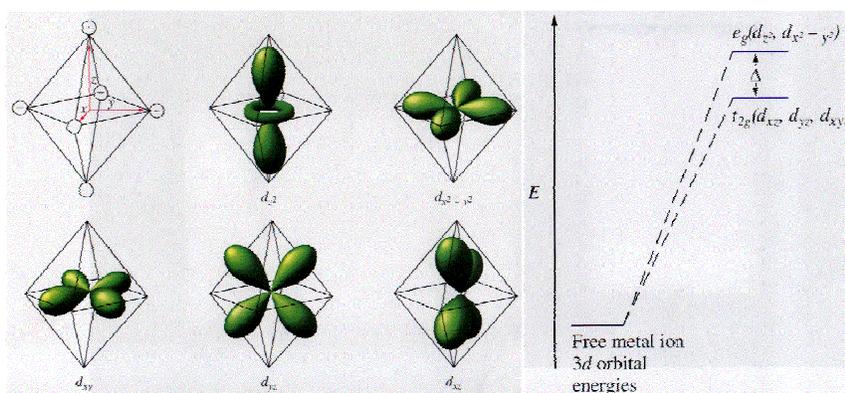
### 1.1.2.1 Stati elettronici dell'eme

L'atomo di ferro è legato direttamente agli azoti pirrolici in un composto di coordinazione (o complesso); infatti tutti i cationi di qualsiasi metallo della tavola periodica sono in grado di accettare in qualche misura densità elettronica e possono perciò coordinare attorno a sé dei gruppi donatori di elettroni, in numero superiore al proprio numero di ossidazione (carica elettrica). La capacità di formare legami direzionati abbastanza forti, accettando coppie elettroniche dalle molecole o dagli ioni circostanti, è una caratteristica degli elementi dei metalli di transizione. Il legame coordinativo è solitamente di media forza; esso infatti si colloca energeticamente fra le deboli interazioni intermolecolari presenti nei solidi e i legami ionici e covalenti, i più forti legami chimici noti. La geometria del composto è la più semplice e la più simmetrica possibile: per esempio se il metallo ha sei molecole uguali coordinate, si formerà un ottaedro regolare.

La teoria sulla struttura energetica dei composti di coordinazione è chiamata teoria del campo cristallino ed è basata sulla descrizione ionica del legame metallo-legante. Essa descrive il complesso come un metallo centrale carico positivamente e dai leganti carichi negativamente, i quali avvicinandosi al metallo centrale lo perturbano dal punto di vista energetico. L'entità della perturbazione sarà diversa per i vari orbitali  $d$  a seconda della loro orientazione spaziale rispetto a quella delle specie perturbanti. Questo rompe la simmetria energetica degli elettroni presenti negli orbitali  $d$ : in un campo ottaedrico si vengono così a formare due gruppi di orbitali la cui differenza di energia viene chiamata energia di separazione del campo cristallino ed è indicata con il simbolo  $\Delta_0$ . A seconda dell'entità di questa grandezza, confrontata con la repulsione elettrone-elettrone che si ha se due elettroni si trovano nello stesso orbitale, sono possibili configurazioni elettroniche diverse per lo stato fondamentale. Se la separazione che si verifica tra gli orbitali non è molto grande, è preferibile una disposizione elettronica ad alto spin: gli elettroni di legame si dispongono a spin paralleli in più sottolivelli possibili (massima molteplicità); se invece la perturbazione è molto forte e si ha quindi una grande separazione tra gli orbitali, può essere più conveniente appaiare gli elettroni di legame negli orbitali a energia più bassa (basso spin).

Il numero di coordinazione, ovvero il numero massimo di legami di coordinazione del ferro è sei: ci possono essere sei atomi (chiamati ligandi) attorno al ferro che mettono in condivisione gli elettroni di legame. Questo perché il ferro ha 6 elettroni dello strato  $3d$  in 5 orbitali, con quattro di questi elettroni non appaiati. Quando il ferro (allo stato ferroso) si lega con i quattro

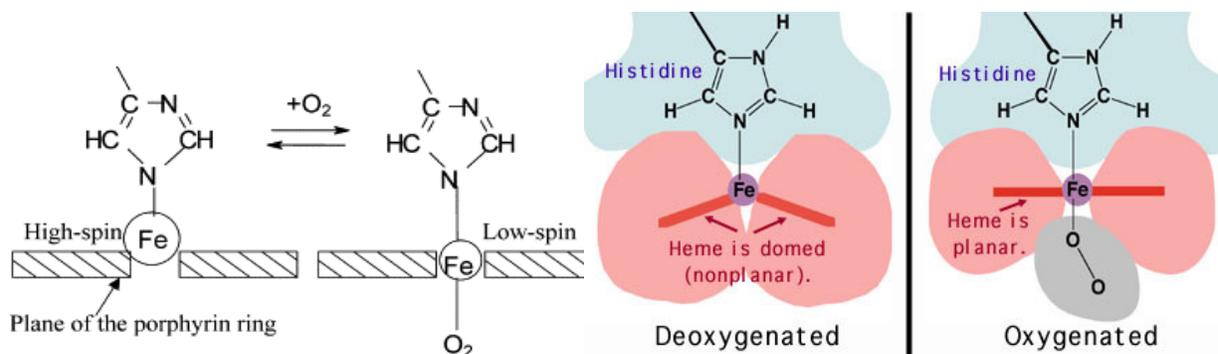
atomi di azoto pirrolici non ha più elettroni spaiati ed i legami che esso forma diventano legami di covalenza. L'atomo di ferro all'interno del gruppo eme può esistere nello stato di ossidazione  $\text{Fe}^{2+}$  (detto anche FeII, stato ridotto, o ferroso), che ha 6 elettroni di valenza in orbitali  $d$ , oppure  $\text{Fe}^{3+}$ , (FeIII, forma ossidata o ferrica), con 5 elettroni di valenza. In entrambi gli stati di ossidazione il numero di coordinazione del ferro è sei. Come si è detto i ligandi dello ione del ferro si devono disporre in una geometria di coordinazione ottagonale; la porfirina fornisce quattro legami di coordinazione e un altro viene creato con l'istidina prossimale: rimane quindi un legame di coordinazione libero. Nella maggior parte delle emoproteine (per esempio la mioglobina o l'emoglobina A), in assenza di ligandi esogeni questo sito di coordinazione è vuoto (o al limite occupato da una molecola d'acqua legata molto debolmente) e può essere quindi utilizzato per legare reversibilmente l' $\text{O}_2$ , ma anche altre molecole come CO e NO, o ioni come  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CN}^-$  o  $\text{N}_3^-$ . Quando una di queste molecole si lega si completa la coordinazione ottagonale dell'atomo di ferro. C'è un legame imprescindibile fra numero di coordinazione, struttura molecolare e proprietà magnetiche dell'eme. Quando il ferro è sottoforma di ione libero, i suoi orbitali di tipo  $d$  hanno tutti la stessa energia; all'interno del gruppo eme, lo ione ferro è legato alla protoporfirina e all'istidina: tali specie perturbano magneticamente gli orbitali  $d$ , creando la separazione dei livelli di cui si è discusso sopra. Ci sono cinque tipi di orbitali  $d$ , chiamati  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$ ,  $d_{x^2-y^2}$ ,  $d_{z^2}$ . Sotto l'influenza del "campo cristallino" i livelli di energia di questi orbitali si splittano; per i due orbitali  $d_{x^2-y^2}$  e  $d_{z^2}$ , che puntano nella direzione dei ligandi, si ha un aumento dell'energia dovuto alla repulsione fra gli elettroni dei ligandi e a quelli presenti in questi orbitali. Gli altri tre orbitali  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$  non puntano direttamente verso i ligandi pertanto la repulsione e la relativa variazione energetica è minore (figura 1.7).



**Figura 1.7:** Orientazione spaziale dei diversi tipi di orbitali  $d$  e rappresentazione dello *splitting* di campo cristallino delle energie di questi orbitali.

Dal web: <http://library.tedankara.k12.tr/chemistry/vol3/vol3.htm>.

Nelle configurazioni a basso spin, i 6 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o 5 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) elettroni di valenza si trovano tutti in orbitali  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$ , e gli orbitali antileganti  $d_{x^2-y^2}$ ,  $d_{z^2}$  sono vuoti. Quando i complessi sono ad alto spin gli orbitali  $d_{x^2-y^2}$  e  $d_{z^2}$  contengono ciascuno un elettrone. Fra alto e basso spin vi è anche una differenza nella lunghezza dei legami ferro-ligando, che nel primo caso sono più lunghi; questo vale sia per i legami assiali che per il macrociclo porfirinico, che quindi si allarga. Inoltre, nelle forme 6c l'atomo di ferro si trova più o meno nel piano dell'eme, mentre in quelle 5c è posizionato fuori dal piano dell'eme, verso il quinto ligando, l'istidina distale (figura 1.8), inducendo una contrazione della cavità della porfirina. Questo accade perché nel complesso 5c il campo perturbativo è tale che lo stato ad energia minima è ad alto spin e il ferro emico è troppo grande (il suo raggio è 92 pm nell'emoglobina A umana) per accomodarsi nell'anello porfirinico. Quando l' $\text{O}_2$  si lega il campo perturbativo cresce e aumenta la separazione dei livelli quel tanto che basta per rendere più favorevole la forma a basso spin: il raggio del ferro si contrae a 75 pm, e il ferro si dispone nell'anello tetrapirrolico (figura 1.8). Questo a sua volta fa sì che l'istidina distale si avvicini all'eme e, sempre nell'HbA umana, genera quella serie di cambiamenti strutturali che favoriscono i successivi legami dell' $\text{O}_2$ . Per altri ligandi assiali, la forza del campo può essere minore: è possibile dunque osservare forme ad alto spin anche in presenza di esacordinazione.



**Figura 1.8:** A sinistra, cambiamento nello stato di spin e di conseguenza nella dimensione dell'atomo di  $\text{Fe}^{2+}$  nell'emoglobina quando questa lega una molecola di  $\text{O}_2$ .<sup>13</sup> A destra, una visualizzazione dell'eme tale da far risaltare la non planarità dell'atomo di ferro nella forma deossi rispetto all'anello porfirinico e il suo avvicinamento spaziale verso l'istidina prossimale.

Dal web:[http://www.chemistry.wustl.edu/~courses/genchem/Tutorials/Hemoglobin/hemo\\_06.htm](http://www.chemistry.wustl.edu/~courses/genchem/Tutorials/Hemoglobin/hemo_06.htm)

## 1.2 Emoglobine pentacoordinate ed esacoordinate

L'emoglobina e la mioglobina costituiscono gli esempi meglio caratterizzati di globine pentacoordinate, di cui si è trattato finora: come già riportato, in assenza di ligandi esogeni, la sesta posizione di coordinazione, sul lato distale, rimane libera e l'atomo di ferro è spostato leggermente fuori dal piano dell'eme. Formando 5 legami di coordinazione,  $\text{Fe}^{2+}$  si trova in uno stato di alto spin e come si è detto è in grado di legare reversibilmente una molecola di  $\text{O}_2$  attraverso la valenza di coordinazione libera. Il legame dell' $\text{O}_2$  comporta il passaggio del ferro emico ad uno stato di basso spin, con il conseguente rientro dell'atomo di ferro nel piano dell'anello porfirinico. Un residuo di istidina detta "distale" stabilizza l'interazione con il ligando tramite un legame idrogeno. I residui che si affacciano sul lato distale stabilizzano in modo differente i diversi complessi, modulando l'affinità intrinseca dei ligandi per l'eme. Mentre ioni come  $\text{F}^-$  e  $\text{CN}^-$  si legano anche alla forma ossidata  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{O}_2$  è in grado di legare solamente la forma ridotta  $\text{Fe}^{2+}$ . Nonostante  $\text{F}^-$  e  $\text{CN}^-$  appaiano molto simili tra loro dal punto di vista elettronico, la fluorometemoglobina si presenta in uno stato di alto spin mentre nella cianomet-emoglobina il ferro è in uno stato di basso spin. Le proprietà elettroniche dell'eme, quindi, dipendono fortemente dal tipo di ligando con cui interagisce. Fino a poco tempo fa si riteneva che il gruppo eme nella forma non legata fosse pentacoordinato in tutte le globine. Grande curiosità ha destato quindi la scoperta delle cosiddette "emoglobine esacoordinate", nelle quali, anche in assenza di ligandi, l'atomo di ferro porfirinico, sia ferroso che ferrico, è coinvolto in sei legami, quattro con gli anelli pirrolici, uno con l'istidina prossimale e uno con un altro residuo (in genere anch'esso un'istidina) sul lato distale, nel sito tradizionale di legame dell'ossigeno o degli altri ligandi esogeni. Questa caratteristica fa sì che il ferro si presenti in uno stato di basso spin anche quando l'eme non è legato a ligandi esogeni. Le emoglobine funzionalmente attive nella forma pentacoordinata possono andare incontro a modificazioni irreversibili che portano alla formazione di derivati con esacoordinazione intramolecolare (emocromi ed emicromi), inattivi però nei confronti dei loro ligandi fisiologici. Anche in diverse emoproteine esacoordinate non globiniche, aventi spesso una funzione redox o catalitica (citocromi), il ligando endogeno non può generalmente essere spiazzato da ligandi esogeni. Al contrario, le emoglobine esacoordinate manifestano la propria funzione biologica in questo stato di coordinazione, legando reversibilmente piccoli ligandi diatomici, quali  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}$  e  $\text{NO}$ , in competizione con il ligando endogeno. In presenza di ligandi esogeni, le emoglobine

esacoordinate in forma ridotta passano ad uno stato di esacoordinazione extramolecolare, sempre a basso spin. In tali condizioni, anche mioglobina ed emoglobina ridotte passano ad uno stato esacoordinato a basso spin, per cui le differenze spettrali tra emoglobine penta- ed esacoordinate diventano meno evidenti e sono riconducibili ai diversi intorni in cui si trovano i cromofori.

Di solito il residuo che completa i legami di coordinazione del ferro in assenza di ligandi esogeni è l'istidina E7 (detta "distale"), che nella maggior parte dei casi è presente anche nelle emoglobine pentacoordinate, ma non lega direttamente l'eme: come già accennato ha comunque una funzione di stabilizzazione quando si ha il binding di un ligando, formando con esso un legame ad idrogeno. Nel caso dell'emoglobina A, HisE7 ha anche la funzione di favorire il legame dell'O<sub>2</sub> rispetto a quello del CO, che in assenza di questo residuo avrebbe un'affinità intrinseca per il ferro emico superiore di 25000 volte a quella dell'O<sub>2</sub>. Ma HisE7 "costringe" il CO a legarsi con un'angolazione sfavorevole, riducendo di oltre cento volte il rapporto fra le affinità.

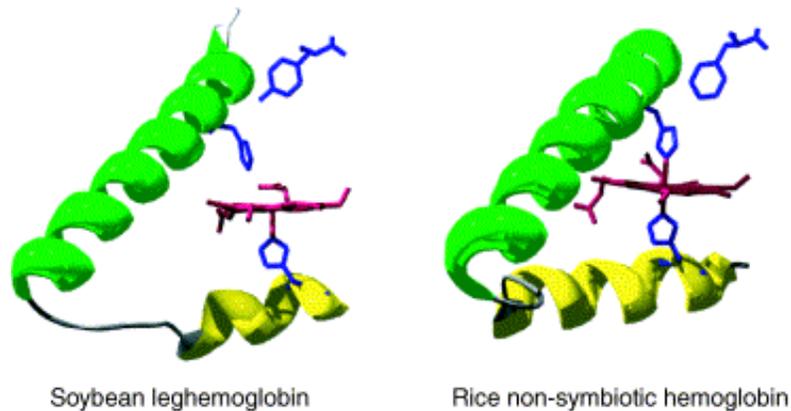
Nell'emoglobina esacoordinata di *Drosophila melanogaster* la regione N-terminale dell'elica E è disposta spazialmente in modo da trovarsi più vicina all'eme rispetto alle emoglobine pentacoordinate (per esempio mioglobina). Questa differenza strutturale è sufficiente a promuovere il legame diretto dell'istidina distale all'eme.<sup>14</sup> Anche in altre proteine esacoordinate (emoglobina di riso,<sup>15</sup> neuroglobina,<sup>16</sup> citoglobina<sup>17</sup>) si osserva un riposizionamento spaziale simile dell'elica E; l'esacoordinazione del ferro è dunque favorita da fattori strutturali. Pur essendo l'istidina E7 il residuo che più frequentemente occupa la sesta posizione di coordinazione del ferro (neuroglobine, citoglobine, emoglobine di piante), esistono esempi in cui lo stesso ruolo è svolto da altri residui, quali l'istidina E10 (emoglobina di *Chlamidomonas eugametos*) o la tirosina B10 (emoglobina troncata di *Synechocystis*).

Nonostante i legami di coordinazione del ferro emico siano completi anche in assenza di ligandi esogeni, le emoglobine esacoordinate sono in grado di legare O<sub>2</sub> e altre molecole diatomiche con affinità elevata, se paragonata a quella della maggior parte delle altre emoglobine e mioglobina.<sup>18</sup> Per spiegare questa caratteristica è stato ipotizzato che l'istidina distale si dissocia facilmente dal ferro ma rimanga abbastanza vicina da stabilizzare il ligando formando un forte legame ad idrogeno con esso.<sup>15,19</sup> Tuttavia l'effetto sul processo di legame è quello di un rallentamento, in quanto è probabile che la dissociazione dell'istidina distale richieda un riarrangiamento strutturale anche esteso della tasca distale.<sup>20</sup> Le proteine deossi possono presentarsi nella forma puramente esacoordinata, oppure è possibile che si crei un

equilibrio con lo stato pentacoordinato del ferro emico, in particolare nei casi in cui non vi sono estesi cambiamenti conformazionali fra le due specie. La costante di equilibrio può dipendere da svariati fattori; oltre alla temperatura <sup>21</sup> recentemente si è osservato che la frazione di forma esacoordinata nella neuroglobina e in altre proteine dipende dalla pressione cui è sottoposta la proteina e dalla viscosità del mezzo in cui si trova. <sup>22</sup>

Per quanto riguarda la forma ossidata di questo tipo di emoglobine, da misure di spettri di assorbimento UV-visibile risulta l'evidenza del mantenimento di una forma esacoordinata a basso spin, in tutto simile a quello della forma ossidata dei citocromi del tipo His-Fe-His. Contrariamente a metHb e metMb, in nessuna delle emoglobine esacoordinate fino ad ora studiate si è osservata coordinazione ad una molecola di acqua nella forma ossidata. Essendo l'acqua deprotonabile, un legame di questo tipo si manifesterebbe in una dipendenza dal pH delle proprietà spettrali. Sembrerebbe quindi che quasi tutte le emoglobine appartenenti a questo gruppo, in assenza di ligandi esogeni, rimangano nello stato esacoordinato tanto nella forma ridotta quanto in quella ossidata. Le strutture risolte fino ad oggi indicano che i ligandi assiali sono gli stessi indipendentemente dallo stato di ossidazione.

Il gruppo delle emoglobine con esacoordinazione intramolecolare rappresenta un soggetto di notevole e recente interesse nell'ambito della superfamiglia delle globine. Vi appartengono sia proteine con ripiegamento globinico "classico", sia emoglobine troncate e mini-emoglobine. Nell'ambito della superfamiglia delle globine l'esacoordinazione sembra quindi essersi affermata indipendentemente in più sottofamiglie, anche relativamente distanti dal punto di vista filogenetico. Tra i principali motivi di interesse per questo gruppo vi è la recente scoperta di emoglobine esacoordinate nei vertebrati ed in particolare nei mammiferi. Una ricerca sistematica nelle sequenze dei genomi umano e murino ha portato alla scoperta della neuroglobina, presente prevalentemente nel tessuto nervoso, e della citoglobina (o istoglobina), espressa pressoché in tutti i tessuti. Sono state trovate emoglobine esacoordinate anche nelle piante e nei microrganismi, dai cianobatteri ai protisti. Il fatto che questa caratteristica sia così diffusa in natura suggerisce una funzione conservata ancora da chiarire, forse un meccanismo intrinseco per la regolazione dell'affinità della proteina. Nel complesso, la superfamiglia delle emoglobine si è rivelata essere molto più estesa di quanto si ritenesse inizialmente e sembra sia stata in grado di sviluppare diverse funzioni sulla base dello stesso ripiegamento proteico e del medesimo gruppo prostetico.



**Figura 1.9:** Confronto fra le forme deossi di un'emoglobina pentacoordinata (leg-emoglobina di soia, a sinistra) e una esacoordinata (Rice Hb1, emoglobina non simbiotica di riso) in cui si osserva la coordinazione diretta dell'istidina distale al ferro emico.<sup>23</sup>

## 1.2.1 Esempi di emoglobine esacoordinate

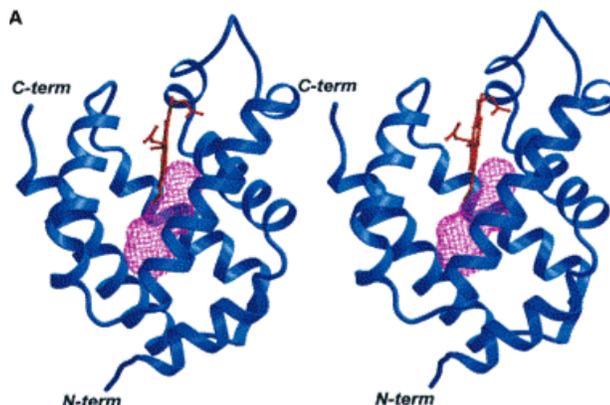
### Neuroglobina

La neuroglobina è una globina costituita da 151 amminoacidi (peso molecolare di circa 17 kDa) avente solo il 20-25% di identità di sequenza con le mioglobine e le emoglobine del sistema circolatorio di vertebrati. Nei mammiferi è espressa nel citoplasma di neuroni del sistema nervoso centrale e del sistema nervoso periferico, nel fluido cerebrospinale, nella retina e nei tessuti endocrini, anche se a concentrazioni enormemente più basse di quelle dell'emoglobina e della mioglobina. È una proteina intracellulare, monomericamente ed è strutturalmente molto simile alla mioglobina, nonostante mostri alcune peculiarità, come la presenza di cavità adiacenti alla tasca dell'eme: in particolare si osserva la presenza di una grossa cavità interna che connette le cavità distali e prossimali e il bulk attraverso un canale; sul lato distale il tunnel è connesso con altre due cavità minori. (vedi figura 1.10)<sup>24</sup> Questa proteina, scoperta nel 2000 da Thorsten Burmester *et al.*,<sup>25</sup> lega O<sub>2</sub> reversibilmente; l'affinità intrinseca per l'O<sub>2</sub> e il CO è molto alta ma dato che il *rate limiting step* del processo di legame è il distacco del ligando endogeno, si pensa che binding di queste molecole sia lento *in vivo*. Nonostante questa competizione la P<sub>50</sub> osservata è dell'ordine di 1-8 mmHg, comparabile con quella della mioglobina. La rottura di un ponte disolfuro tra le cisteine CD7 e D5 causa una diminuzione dell'affinità per l'O<sub>2</sub> all'incirca di un ordine di grandezza; questo meccanismo

potrebbe essere un modo per regolare il rilascio di ossigeno in base al potenziale ossidoriduttivo della cellula. La neuroglobina infatti libererebbe ossigeno attraverso la riduzione del ponte disolfuro, quindi in condizioni riducenti quali quelle che si osservano sotto stress ipossico, in modo da attenuare gli effetti dell'ipossia. Il meccanismo è stato però osservato solo *in vitro*.<sup>26</sup> Le velocità di legame con ligandi esogeni possono cambiare notevolmente al variare del pH e questo effetto è legato all'esacoordinazione dell'eme. La protonazione dell'istidina distale, infatti, provoca una maggiore accessibilità del solvente nella tasca dell'eme. Le molecole d'acqua creano un ostacolo all'ingresso di ligandi esterni maggiore rispetto a quello dell'istidina E7 nella forma neutra; perciò a bassi pH il binding risulta rallentato.<sup>27</sup>

Il ruolo biologico della neuroglobina è ancora tutt'altro che chiarito; sembra coinvolta nel processo di regolazione del livello di ossigeno cellulare, aumentando la disponibilità di questa molecola e di conseguenza la possibilità di sopravvivenza delle cellule ad uno stress ipossico.<sup>25</sup> La neuroglobina è in grado anche di legare l'NO (anche se con affinità minore delle Hbs e Mbs pentacoordinate) ed altre specie azotate che si accumulano nella cellula nei processi di ischemia e di riperfusione. La forma legata all'NO sembra essere in grado di funzionare da *scavenger* di perossinitrito, un potente agente ossidante generato in condizioni ischemiche,<sup>28</sup> anche se per ora non si sa se questo meccanismo chimico possa funzionare *in vivo*. Le alte concentrazioni di neuroglobina trovate nella retina di topo (circa 100  $\mu\text{M}$ ) lasciano supporre un ruolo della proteina nel rifornimento di ossigeno in questo tessuto, con lo stesso meccanismo della mioglobina. Al contrario nei neuroni i livelli di neuroglobina sembrano essere troppo bassi (circa 1  $\mu\text{M}$ ) per giustificare un ruolo del genere in condizioni fisiologiche, anche se il livello d'espressione non è uniforme in tutto il cervello: in certe regioni particolarmente attive i livelli di Ngb sono sufficienti per ipotizzare una funzione di stoccaggio dell'ossigeno. La Ngb si autoossida rapidamente a metNgb ( $\text{Fe}^{3+}$ ); perché questa proteina possa servire come riserva d'ossigeno occorre dunque postulare la presenza di una proteina finora non identificata con attività Ngb-riduttasica.<sup>29</sup> Studi volti a verificare una iper-espressione della proteina in situazioni di ipossia hanno fornito risultati contrastanti.<sup>30, 31</sup> Tuttavia, dai dati finora emersi, è ragionevole ipotizzare che la neuroglobina sia implicata nei processi di protezione del sistema nervoso da stress ischemico.<sup>30, 32</sup> Risulta chiaro, quindi, il notevole interesse nei confronti di questa globina quale potenziale target per la diagnosi e la terapia di malattie come ictus e disordini neurodegenerativi.<sup>29</sup> Un'ipotesi alternativa<sup>33</sup> prevede per la Ngb il ruolo di sensore intracellulare delle concentrazioni relative di NO ed  $\text{O}_2$ ; l'esteso cambiamento conformazionale

che la Ngb subisce nella forma legata <sup>34</sup> avalla questa proposta di ruolo di sensore indotto dallo stress involto in un processo di traduzione del segnale nel cervello. <sup>35</sup>

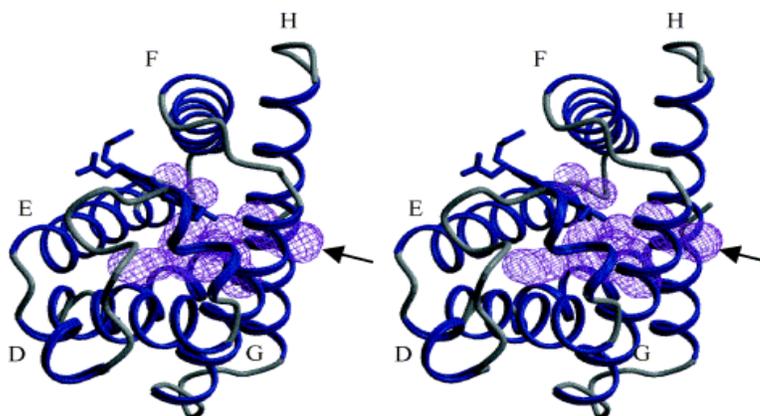


**Figura 1.10:** Struttura di deossi-Fe<sup>3+</sup> Ngb umana con indicazione del sistema di cavità presenti, che portano dalla cavità dell’eme alla superficie proteica. La superficie delle cavità è stata calcolata con un probe dal raggio di 1.4 Å (calcolato con il programma SURFNET; Laskowski, 1995). <sup>24</sup>

## Citoglobina

La citoglobina è stata la quarta emoglobina scoperta nei vertebrati <sup>36</sup> (la terza è stata la neuroglobina) e il suo nome deriva dalla grande diffusione nei tessuti dei mammiferi. La citoglobina e la mioglobina hanno un’identità di sequenza amminoacidica del 30% e sono quindi relativamente vicine dal punto di vista evolutivo. Questa proteina, così come la neuroglobina, mostra nei mammiferi una sequenza molto conservata. <sup>29</sup> È di dimensioni maggiori rispetto alla mioglobina, essendo costituita da 190 residui amminoacidici; mostra un “core” simile alla mioglobina e circa 20 residui in più ad entrambe le estremità. Secondo recenti studi formerebbe un omodimero. La struttura a raggi X della citoglobina ha confermato la presenza del tipico fold globinico, formato dai residui 8-171 mentre gli ultimi 20 residui sono in una conformazione disordinata. Inoltre nella citoglobina umana è emersa la presenza di un canale apolare nelle vicinanze dell’eme, che potrebbe servire come “tunnel” per il passaggio di ligandi gassosi e non sembra presentare correlazioni con il sistema di cavità presenti nella mioglobina nè con quello della neuroglobina. In ogni caso il fatto che tutte queste proteine presentino un sistema di cavità interne indica per queste una funzione biologica, con ogni probabilità legata alla migrazione e alla diffusione all’interno della matrice proteica del ligando del gruppo eme. Analogamente alla Ngb, anche la citoglobina in assenza di ligandi presenta

un'esacoordinazione intramolecolare, anche se sembra che esista un equilibrio con la forma pentacoordinata dell'eme.<sup>17</sup> Il legame con l'O<sub>2</sub> è reversibile e l'affinità è paragonabile a quella della neuroglobina. Anche la citoglobina forma un ponte disolfuro fra due cisteine, B2 ed E9, ma la rottura di questo causa una diminuzione dell'affinità per l'O<sub>2</sub> solo di un fattore 2.<sup>26</sup> Al contrario di quanto osservato per la neuroglobina, l'affinità della Cygb per l'O<sub>2</sub> non è influenzata dalle variazioni di pH.<sup>27</sup> La citoglobina è espressa in concentrazioni micromolari nel citoplasma dei fibroblasti in un'elevato numero di organi. In particolare, risulta essere presente in cellule coinvolte nella produzione della matrice extracellulare in organi viscerali e questo è uno dei motivi per cui è stato suggerito un suo possibile ruolo nella sintesi del collagene, ed il fatto che sia la produzione di collagene sia l'espressione di citoglobina aumentino in condizioni ipossiche sembra confermare questa teoria.<sup>37</sup> Alternativamente, potrebbe partecipare a qualche percorso biologico di segnalazione ancora sconosciuto, il cui scopo finale sarebbe di aumentare la produzione del collagene. La regolazione positiva in seguito ad ipossia rende tuttavia plausibile l'ipotesi che, analogamente alla mioglobina, questa proteina sia coinvolta nei processi di accumulo e distribuzione di ossigeno ai tessuti.<sup>29</sup>

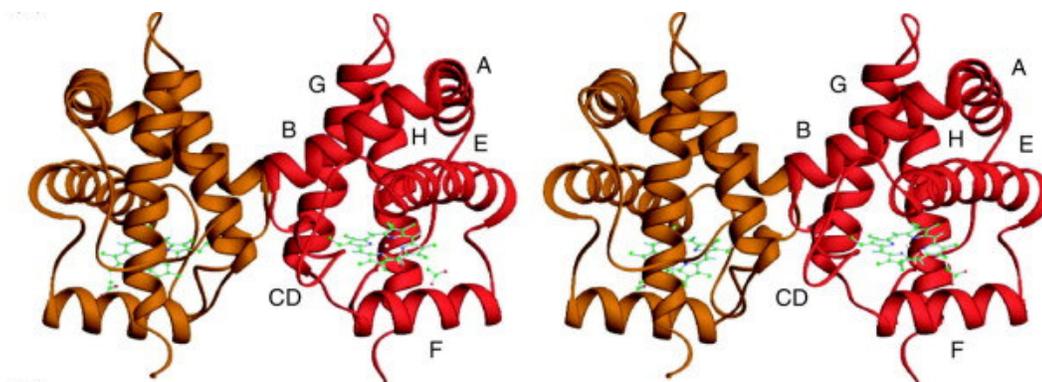


**Figura 1.11:** Cavità nella matrice proteica trovate nella struttura della citoglobina. La superficie delle cavità e del tunnel (in viola in figura) è stata definita con un *probe* di 1.4 Å di raggio. La freccia nera indica il punto di connessione fra le cavità interne e il solvente, di dimensioni piuttosto ridotte. La figura è stata disegnata usando MOLSCRIPT, BOBSCRIPT e Raster3D.<sup>17</sup>

## Emoglobina di riso (Rice Hb1)

Questa emoproteina è interessante in quanto è la prima emoglobina non simbiotica (vedi paragrafo 1.3) di cui sia stata risolta la struttura tridimensionale, molto simile a quella

dell'emoglobina simbiotica di soia Lba. Anche in questa proteina si osserva la coordinazione diretta delle catene laterali dell'istidina prossimale e di quella distale con il ferro emico. Si presenta sottoforma di dimero; le interazioni fra le due subunità coinvolgono le eliche G e la regione compresa fra le eliche B e C. Nonostante l'esacoordinazione, l'affinità per l'O<sub>2</sub> è molto elevata ( $K_D \sim 1$  nM); dati cristallografici sembrano suggerire che il binding del ligando sia accompagnato da un movimento dell'elica E verso l'alto e l'esterno e da un concomitante dissociarsi dell'istidina distale, che avviene molto velocemente. Inoltre anche l'angolo CD e l'elica D subiscono modificazioni conformazionali. I residui che contribuiscono maggiormente alle interazioni fra le due subunità sono molto conservati nella famiglia delle emoglobine non simbiotiche. A differenza di Ngb e Cygb, la Rice Hb1 non presenta un sistema esteso di cavità interne. Un'ipotesi per il ruolo biologico di questa proteina, ancora sconosciuto, è quella di "sensore" del livello di ossigeno: è infatti molto probabile che l'emoglobina di riso subisca estesi cambiamenti conformazionali quando lega O<sub>2</sub>. Infatti, nonostante la struttura cristallina dell'emoglobina di riso nella forma legata non sia stata ancora risolta, è invece nota la forma legata al ligando diatomico CN (cianuro) dell'emoglobina non simbiotica di orzo BarHb: le due proteine sono omologhe, con un 82% di identità di sequenza, la stessa interfaccia dimerica e costanti cinetiche e di equilibrio per l'esacoordinazione molto simili. Uno studio che confronta le strutture di Rice AHb1 nella forma deossi e CN-BarHb ha mostrato che avvengono estesi cambiamenti conformazionali in risposta al legame della molecola diatomico, soprattutto nelle regioni dell'elica E e dei loop CD ed EF.<sup>38</sup> Queste modificazioni strutturali potrebbero dare origine a una variazione di affinità per il binding di un'altra molecola con funzione regolatoria, a condizione che il binding avvenga nella regione compresa fra i residui 50 e 70. Rice Hb1 potrebbe quindi rapidamente agire da sensore in condizioni microaerobiche o anaerobiche.<sup>15</sup>



**Figura 1.12:** Rappresentazione della struttura della proteina dimerica Rice Hb1.<sup>15</sup>

## Emoglobine esacoordinate negli invertebrati

Diverse globine recentemente scoperte sono tuttora oggetto di studi che potrebbero fornire interessanti chiavi di lettura per la comprensione del ruolo biologico di queste proteine e dell'importanza dell'esacoordinazione intramolecolare nello svolgimento di tale ruolo. L'emoglobina del nematode *Ascaris lumbricoides*, per esempio, sembra poter agire come deossigenasi, utilizzando l'NO per consumare l'O<sub>2</sub>. Per lo svolgimento di questa funzione risultano importanti l'esacoordinazione del ferro e la presenza di un gruppo tiolico cisteinico coinvolto nella reazione ossido-riduttiva che porta alla detossificazione dell'O<sub>2</sub>.<sup>39</sup> Oggetto di studi recenti è anche l'emoglobina esacoordinata monomerica presente nell'insetto *Drosophila Melanogaster*. L'analisi della struttura cristallografica di questa proteina mette in luce la presenza di tre cavità nella matrice proteica. L'espressione intracellulare di tale globina indica che negli insetti il rifornimento di ossigeno può essere più complesso rispetto alla semplice diffusione attraverso il sistema dei tubuli tracheali, con trasporto e stoccaggio di ossigeno da parte di emoglobine.<sup>40</sup>

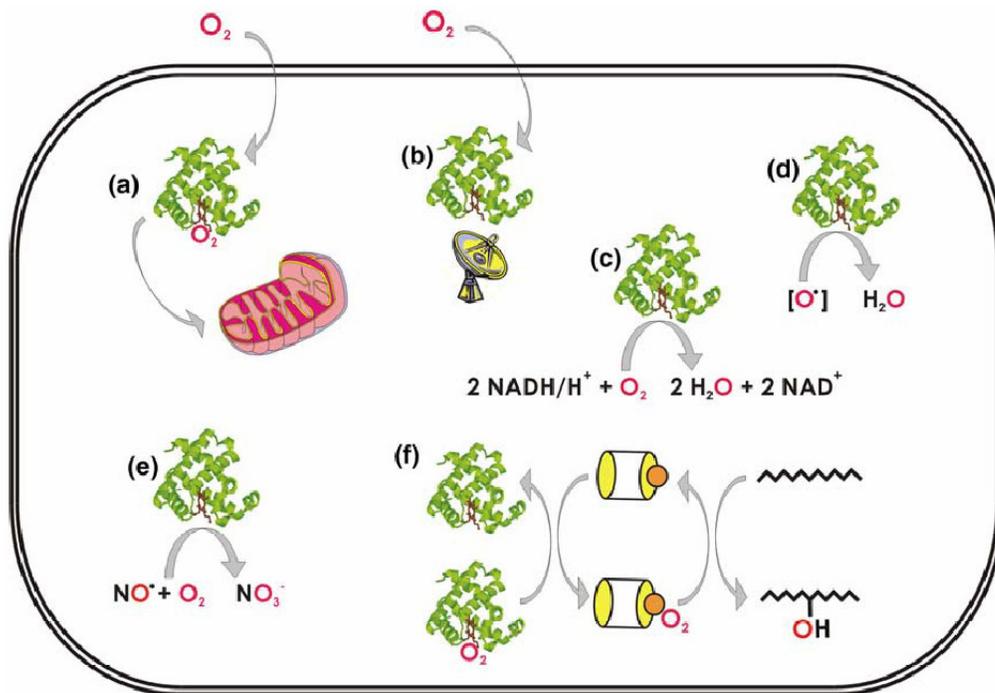
## Emoglobine esacoordinate nei microrganismi

L'agente eziologico della lebbra *Mycobacterium leprae* contiene un'emoglobina troncata esacoordinata (trHbO) che potrebbe essere coinvolta nei meccanismi di protezione del micobatterio nei confronti dell'NO prodotto dai macrofagi dell'organismo ospite. Tale ruolo è stato attribuito anche all'emoglobina troncata trHbN del *Mycobacterium tuberculosis* e appare importante come meccanismo di resistenza del microrganismo nella fase latente dell'infezione. La minore reattività della globina di *M. leprae* rispetto alla trHbN di *M. tuberculosis* potrebbe essere la causa della maggior suscettibilità del micobatterio della lebbra nei confronti dei derivati tossici dell'ossigeno e dell'azoto prodotti nei macrofagi.<sup>41</sup> Anche l'emoglobina troncata del cianobatterio unicellulare *Synechocystis* è esacoordinata e su di essa sono stati condotti interessanti studi cristallografici per mettere in luce la natura delle modificazioni conformazionali che si verificano in seguito al legame di ligandi esogeni. È emerso che la flessibilità della "cerniera" tra l'elica E e l'elica F è cruciale per modulare il legame di ligandi gassosi.<sup>42</sup>

## 1.2.2 Ruoli fisiologici delle emoglobine esacoordinate

Per diverse proteine trattate è stata discussa una probabile funzione biologica; tuttavia, in generale per questa recente famiglia di proteine le conoscenze sono ancora piuttosto scarse. È dunque utile riassumere le diverse ipotesi formulate sui ruoli fisiologici delle emoglobine esacoordinate. La diffusione delle queste proteine in pressoché tutto il mondo vivente pone importanti questioni sulla loro origine evolutiva e sul significato biochimico dell'esacoordinazione. Sono state formulate diverse ipotesi circa la funzione di queste proteine: per iniziare, potrebbero fungere da riserva di ossigeno o aiutare la diffusione di ossigeno verso i mitocondri all'interno delle cellule, analogamente alla mioglobina (punto *a* nella figura 1.13). Poiché le emoglobine esacoordinate sono espresse in concentrazioni micromolari nella maggior parte dei tessuti, il contributo che possono essere in grado di svolgere in questo senso appare limitato. Inoltre, per alcune, l'affinità per l'ossigeno è così elevata da impedirne il rilascio a concentrazioni fisiologicamente rilevanti. Per di più, le emoglobine esacoordinate tendono generalmente ad ossidarsi piuttosto facilmente, per cui, in assenza di una riduttasi in grado di ripristinare la forma ferrosa, il legame con l'ossigeno sarebbe presto impedito. Tuttavia lo stoccaggio di ossigeno è una funzione plausibile per quelle globine espresse in concentrazioni relativamente alte in alcuni tessuti. Un'altra possibilità è che le emoglobine esacoordinate funzionino da sensori di ossigeno (punto *b*), ipotesi verificata per ora solo in batteri o archeobatteri,<sup>43,44</sup> o siano coinvolte in un processo di trasmissione intracellulare di segnali; per verificare tale supposizione bisognerebbe però individuare delle proteine intracellulari in grado di interagire con la superficie globinica e finora non ci sono evidenze sperimentali. Molte emoglobine con esacoordinazione intramolecolare, anche di provenienza molto diversa dal punto di vista evolutivo, sono accomunate dal fatto che la loro espressione aumenta in condizioni di ipossia: è pertanto possibile che la funzione di queste proteine sia legata ad una risposta adattativa delle cellule per sopperire a basse tensioni di ossigeno. In quest'ottica potrebbero agire come ossidasi terminali (*c*), rigenerando il  $\text{NAD}^+$  per supportare la glicolisi e sostenere la produzione di ATP, ostacolata dal blocco della respirazione ossidativa; tuttavia finora questa ipotesi non è stata investigata a fondo. Inoltre, le emoglobine esacoordinate potrebbero avere il ruolo di *scavenger* di specie reattive dell'ossigeno (ROS) o dell'azoto (*d*), la produzione delle quali aumenta in condizioni ipossiche: si accumulano infatti per riperfusione dopo un'ischemia. Ci sono alcune prove a sostegno di tali ipotesi che rintracciano nelle emoglobine esacoordinate una primitiva funzione ossidoriduttasica. Sempre considerando la

possibilità del ferro eme di passare ciclicamente dalla forma ridotta a quella ossidata, si può ipotizzare che, in analogia con la mioglobina e con le flavoemoglobine, queste proteine possano agire come diossigenasi, trasformando il monossido d'azoto in eccesso in nitrato (*e*). Questo permetterebbe sia di detossificare l'eccesso di monossido d'azoto prodotto durante stress ipossici, sia di ripristinare i livelli di NAD ossidato. Un'ultima ipotesi prevede la capacità delle emoglobine esacoordinate di trasferire l'ossigeno ad enzimi citoplasmatici che lo utilizzano come substrato (*f*).<sup>29</sup> Nonostante le funzioni biologiche di queste proteine siano ancora in gran parte da chiarire, anche a causa della diffusione e della varietà di queste, appare evidente che l'esacoordinazione intramolecolare, essendo conservata in organismi anche molto lontani dal punto di vista evolutivo, deve rappresentare un meccanismo efficace per lo svolgimento dell'attività proteica. In particolare potrebbe trattarsi di una strategia molto sensibile per regolare l'affinità della proteina verso i ligandi esogeni. Gli studi sulle emoglobine esacoordinate continuano e progressivamente si aggiungono tasselli al quadro di comprensione complessivo.



**Figura 1.13:** Ipotetiche funzioni delle emoglobine esacoordinate intracellulari.<sup>29</sup>

### 1.3 Emoglobine nel regno vegetale

La presenza di emoglobine nelle piante fu accertata più di 60 anni fa, quando si individuaronero nei noduli di alcune leguminose delle proteine aventi caratteristiche simili a quelle delle globine. Tali cosiddette “leg-emoglobine” (Lbs) sono proteine monomeriche, strutturalmente molto simili alla mioglobina dei mammiferi, espresse in alte concentrazioni (mM) nei noduli delle radici delle leguminose (vedi figura 1.14). Dato che proteine di questo tipo sono state in seguito scoperte anche in piante non appartenenti alla famiglia delle leguminose<sup>45, 46</sup> si preferisce parlare più genericamente di emoglobine “simbiotiche”, riferendosi al ruolo da esse svolto nel facilitare l’attività dei batteri simbiotici coinvolti nel processo di fissazione dell’azoto. Tali batteri utilizzano il complesso enzimatico nitrogenasi per ridurre l’azoto atmosferico ad una forma utilizzabile per la biosintesi dei costituenti cellulari (cioè ammoniaca, subito protonata per formare uno ione ammonio poi usato per produrre l’amminoacido Gln). La riduzione dell’azoto richiede una notevole quantità di energia ed è quindi necessario un elevato apporto di ossigeno per sostenere la catena respiratoria, ossigeno che è apportato dalle Lbs, che lo legano fortemente e lo rendono disponibile ai batteri. Un secondo ruolo delle emoglobine simbiotiche è quello di mantenere la concentrazione di ossigeno libero sufficientemente bassa (circa 10 nM) per prevenire l’inibizione della nitrogenasi batterica. Questo gruppo di proteine assolve quindi contemporaneamente alle funzioni di trasporto e regolazione della concentrazione di ossigeno.<sup>47</sup> Le emoglobine simbiotiche sono pentacoordinate in assenza di ligandi.



**Figura 1.14:** Esempi di noduli fissatori di azoto presenti nelle radici di piante della famiglia delle leguminose (dal web).

Per molti anni si pensò che queste fossero le uniche emoglobine presenti nelle piante. Ma circa una ventina di anni fa fu identificato un altro gruppo di emoglobine, che risultò poi molto diffuso nel regno vegetale; queste emoglobine furono chiamate “non simbiotiche” (nsHbs). Queste proteine differiscono dalle emoglobine simbiotiche in quanto sono espresse pressochè in tutte le piante, comprese quella della famiglia delle leguminose, a concentrazioni molto basse (micromolari), e non sono coinvolte nel processo di fissazione dell’azoto; le informazioni circa il loro ruolo fisiologico sono tuttora scarse. La prima emoglobina non simbiotica fu scoperta nell’orzo basandosi sulla sua somiglianza con una emoglobina simbiotica di una pianta non leguminosa.<sup>48</sup> La sequenza nucleotidica della proteina dell’orzo ha facilitato l’identificazione delle nsHbs praticamente in tutte le specie di piante esaminate, come soia, riso, mais.<sup>19, 49</sup> A differenza delle emoglobine simbiotiche, queste proteine possono essere espresse non solo nelle radici ma anche nelle parti aeree di monocotiledoni e dicotiledoni. Hanno concentrazioni molto basse nei tessuti e un’affinità generalmente elevata per l’ossigeno. Caratteristica comune a tutte le emoglobine non simbiotiche è l’esacoordinazione dell’atomo di ferro anche in assenza di ligandi esogeni.

Sono state trovate due classi distinte di emoglobine non simbiotiche in una grande varietà di tessuti vegetali, suggerendo che queste proteine abbiano più di una funzione biologica.<sup>19, 50</sup> Le nsHbs appartenenti alla prima classe mostrano un’alta affinità per l’ossigeno e sono indotte da stress ipossico, mentre le proteine appartenenti alla seconda classe hanno minore affinità per l’ossigeno e sono indotte da basse temperature. Le nsHbs di classe I, o “*stress induced hemoglobins*”, interferiscono con il metabolismo e la crescita delle piante in condizioni di basse tensioni di ossigeno. Studi in cellule di mais trasformate con il gene codificante per la nsHb di orzo dimostrano che la sovraespressione di questa proteina permette di mantenere il livello di ATP durante situazioni di ipossia più elevato rispetto alle cellule wild-type. È evidente perciò il coinvolgimento diretto di queste globine nel mantenere lo stato energetico della cellula in assenza di fosforilazione ossidativa.<sup>51</sup> Le ipotesi sul ruolo fisiologico delle emoglobine non simbiotiche sono principalmente tre. Le nsHbs potrebbero essere proteine trasportatrici di ossigeno che legano questa molecola in condizioni di ipossia e facilitano la sua diffusione alle cellule che richiedono respirazione mitocondriale aerobica, oppure potrebbero agire da NADH-ossidasi che facilitano la produzione glicolitica di ATP in condizioni microaerobiche; infine potrebbero avere il ruolo di sensori di ossigeno (o altri piccoli ligandi), in quanto in risposta al legame o rilascio di questi subiscono sostanziali cambiamenti conformazionali, che potrebbero attivare altre proteine o enzimi dalle funzioni regolatorie specifiche.<sup>15</sup> La prima delle ipotesi di

cui sopra è la meno probabile a causa dell'elevata affinità per l'O<sub>2</sub>, che ne impedirebbe il rilascio a concentrazioni fisiologicamente rilevanti, delle lente cinetiche di dissociazione e delle basse concentrazioni nei tessuti. Inoltre, come già discusso nel paragrafo precedente, le emoglobine esacoordinate si ossidano facilmente, il che rende indispensabile la presenza di una proteina con funzione reduttasica per mantenere alti livelli di ossigeno legato; ci sono ancora poche evidenze sperimentali in questa direzione, anche a causa del fatto che questi organismi non sono stati ancora studiati a fondo. È anche improbabile che le nsHbs agiscano come semplici ossidasi in quanto la loro velocità di autoossidazione è troppo piccola a temperatura ambiente ( $t_{1/2} > 1$  h per l'emoglobina di riso RiceHb1).<sup>15</sup> Le nsHbO<sub>2</sub> devono reagire con qualche altro composto ossidante e con una flavoproteina affine per ossidare il NADH. Esempi di proteine che svolgono questa funzione sono le flavoemoglobine di *Alecaligenes*, *Escherichia coli* e di lievito. Queste proteine sono NO diossigenasi e sono formate da un dominio contenente un gruppo eme, che reagisce in successione con O<sub>2</sub> e NO, e un dominio flavoproteico che reagisce con il NADH.<sup>52, 53</sup> È possibile che le nsHbs siano NO diossigenasi che non hanno il dominio flavoproteico, ma possiedano una riduttasi corrispondente espressa da un gene separato. Tuttavia, in tutte le flavoproteine conosciute sono conservati i due residui GlnE7 e TyrB10, che si trovano nella tasca distale della porzione globinica della proteina, mentre tutte le nsHbs hanno rispettivamente istidina e fenilalanina nelle stesse posizioni. Per verificare o meno la terza ipotesi, bisognerebbe individuare delle proteine intracellulari in grado di interagire con la superficie globinica, e finora non ci sono evidenze sperimentali. Dal punto di vista evolutivo, le emoglobine simbiotiche sembrano essersi originate dalle più diffuse emoglobine non simbiotiche, in risposta alla richiesta di trasporto e *scavenging* di ossigeno nelle leguminose.

C'è poi un terzo gruppo di emoglobine presenti nelle piante, costituito da alcune emoglobine troncate, scoperte recentemente in diverse Angiosperme e Briofite.<sup>54</sup> Sembrano avere una distribuzione ubiquitaria e vengono espresse in modo indipendente rispetto alle altre emoglobine di pianta per cui hanno probabilmente una funzione diversa, tuttora sconosciuta.

### 1.3.1 Emoglobine di *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana*, detta comunemente **arabetta comune** (o semplicemente *Arabidopsis*, specialmente nella comunità scientifica) è una piccola pianta annuale o biennale appartenente alla famiglia delle Brassicaceae. Sebbene non sia di alcuna particolare importanza agronomica, è molto studiata in quanto è utilizzata come organismo modello per le scienze vegetali. La scelta di *Arabidopsis* come organismo modello per la genetica e la biologia molecolare e cellulare delle piante ha diverse ragioni. Le dimensioni relativamente contenute del suo genoma (circa 125 milioni di paia di nucleotidi, in soli cinque cromosomi) l'hanno resa una pianta ideale per la creazione di mappe genetiche e per il sequenziamento del genoma, il primo del regno vegetale ad essere stato completato, nel 2000. Da allora il punto focale della ricerca è diventato scoprire qual è la funzione di ognuno dei circa 26 mila geni contenuti. Altri vantaggi di *Arabidopsis* che l'hanno eletta ad organismo modello sono le piccole dimensioni, che la rendono ideale negli spazi sempre ristretti dei laboratori e delle serre negli istituti di ricerca, e il ciclo di vita breve: servono soltanto circa sei settimane (con variazioni tra la stagione invernale e quella estiva) dalla germinazione di una piantina fino a che questa, diventata adulta, produca propri semi. Questo fatto accelera notevolmente la ricerca che per altre specie vegetali richiede tempi molto più lunghi. Un ulteriore vantaggio di *Arabidopsis* è infine la semplicità con la quale si possono produrre piante transgeniche, tramite il processo di trasformazione genetica, sfruttando il batterio *Agrobacterium tumefaciens* per incorporare nuovo DNA nel genoma della pianta. Inoltre, data la somiglianza dell'organizzazione genica, gli studi su *Arabidopsis* possono fornire indicazioni utili su piante di interesse agroalimentare anche tassonomicamente distanti.

Il sequenziamento completo del genoma di *Arabidopsis thaliana* ha confermato la presenza in questa pianta di tre geni che codificano per altrettante emoglobine, classificate come AtGLB1 (o AHb1), AtGLB2 (o AHb2) e AtGLB3.

Dal punto di vista della sequenza, AHb1 è fortemente correlata alla famiglia delle emoglobine non simbiotiche di classe I, molto diffuse in una varietà di piante. Questa proteina è presente a bassi livelli nei tessuti delle radici della pianta e la sua espressione è fortemente indotta sia nelle radici che nelle foglie in presenza di bassi livelli di ossigeno, in misura maggiore tanto meno ossigeno è presente; l'espressione di AHb1 non sembra invece dipendere da temperatura, disidratazione, shock termico, stress ossidativi. Anche il trattamento con una

soluzione di saccarosio all'1% ne aumenta l'espressione.<sup>50</sup> Dal punto di vista strutturale, AHb1 sembra essere un omodimero. Le cinetiche di binding di O<sub>2</sub> e CO hanno messo in luce un'elevata affinità di questa proteina per l'O<sub>2</sub> (P<sub>50</sub>= 1.6 nM a pH 7 e 20° C, simili a quelle osservate per altre emoglobine appartenenti alla stessa classe, per esempio le emoglobine non simbiotiche di soia e riso). Abbassare il pH a 5 aumenta la P<sub>50</sub> fino a 6.7 nM, valore comunque più basso di quello di tutti i citocromi ossidasi di pianta conosciuti: è quindi improbabile che AHb1 possa fungere da trasportatore di ossigeno per queste ossidasi terminali. Inoltre la costante di dissociazione per l'O<sub>2</sub> (0.12 s<sup>-1</sup>) è più bassa dei valori tipici delle proteine trasportatrici di ossigeno, per esempio la leg-emoglobina A della soia. L'affinità per il CO è circa doppia rispetto a quella per l'ossigeno (vedi tabella 1.1). L'iper-espressione di AHb1 ottenuta in mutanti rende le piante di *Arabidopsis* molto più resistenti a condizioni di ipossia rispetto alla *wild-type* e inoltre ne stimola l'accrescimento. La mancanza di questi effetti in piante in cui è stato inserito un gene mutato per l'istidina E7 dimostra l'importanza del forte legame con l'ossigeno nel meccanismo d'azione di AHb1.<sup>55</sup>

Per quanto riguarda AHb2, l'identità di sequenza con AHb1 è solo del 69%. Da questo punto di vista AHb2 presenta più similitudini con le emoglobine simbiotiche di *Casuarina* e di legumi che con le emoglobine vegetali non simbiotiche. AHb2 è espressa a bassi livelli nelle foglie, ma non nelle radici; i livelli di espressione di questa proteina non sembrano dipendenti dai livelli di ossigeno o saccarosio, stress ossidativo o disidratazione, ma aumentano a basse temperature.<sup>50</sup> Anche dal punto di vista cinetico AHb2 differisce da AHb1: la sua affinità per l'ossigeno è molto minore (P<sub>50</sub>=130 nm a pH 7 e 20° C) e fortemente dipendente dal pH, fino ad arrivare a pH acido a raggiungere valori simili a quelli della leg-emoglobina A della soia nelle stesse condizioni. L'affinità per il CO è superiore di un fattore 26 rispetto a quella per l'O<sub>2</sub> (tabella 1.1). La somiglianza di AHb2 con le emoglobine simbiotiche fa nascere l'ipotesi che il gene di un'emoglobina di classe 2 possa essere il progenitore della classe dei geni delle emoglobine simbiotiche. La trasformazione in un'emoglobina simbiotica sembra essere stata associata a cambiamenti nell'espressione genica, portando ad alti livelli di espressione nei noduli delle radici, e ad alterazioni nelle proprietà di legame con l'O<sub>2</sub> della proteina.

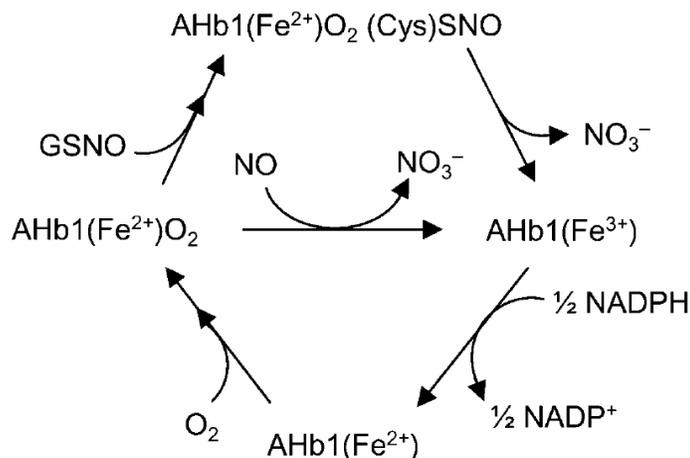
**Tabella 1.1:** Costanti di velocità ( $k'$ = associazione;  $k$ = dissociazione) e di equilibrio ( $K=k'/k$  = associazione) per la reazione con O<sub>2</sub> e CO di alcune emoglobine vegetali.<sup>56</sup>

Protein	$k'^{O_2}$ $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{O_2}$ $\text{s}^{-1}$	$K_{O_2}$ $\mu\text{M}^{-1}$	$k'^{CO}$ $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{CO}$ $\text{s}^{-1}$	$K_{CO}$ $\mu\text{M}^{-1}$
Nonsymbiotic Hbs <sup>a</sup>						
Rice wild-type Hb1	68	0.038	1800	72	0.001	7200
Rice Hb1-H77L	620	51	12	150	0.002	75,000
Barley Hb	2.4	0.028		0.21	0.0016	131
Arabidopsis Hb1	74	0.12	617	1.5	0.0012	1250
Arabidopsis Hb2	1	0.14	7	0.25	0.0013	192
Symbiotic Hbs <sup>b</sup>						
Soybean Lba	130	5.6	23	16	0.0084	1900
Lba-H16L	400	2.4	16	170	0.0024	71,000

<sup>a</sup> Data from Arredondo-Peter et al. (1997a), Duff et al. (1997), and Trevaskis et al. (1997).  
<sup>b</sup> Data from Hargrove et al. (1997).

L'affinità per l'O<sub>2</sub> di entrambe le emoproteine di *Arabidopsis* di cui si è trattato finora è troppo alta (soprattutto per AHb1) e le costanti di dissociazione troppo basse per rendere possibile un ruolo biologico di trasporto di ossigeno. Mentre per quel che riguarda AHb2 non ci sono ancora ipotesi plausibili sulla funzione biologica, per AHb1 sembra ormai accertato un ruolo nel metabolismo dell'NO, molecola molto comune negli organismi viventi in quanto coinvolta in molti processi biologici. È stato infatti dimostrato che, in analogia con quanto visto per la mioglobina, AHb1 agisce da NO *scavenger* e riduce i livelli di NO sotto stress ipossico, attraverso la produzione di S-nitrosoemoglobina. La proteina ossigenata può infatti essere ossidata da NO o da S-nitrosoglutatione (un composto nitrosilato che rappresenta un diffuso sistema di trasporto per l'NO nei sistemi biologici) con formazione di nitrati, come mostrato nello schema di figura 1.15. L'NO può legarsi al ferro emico, dove avverrebbe la reazione con l'ossigeno; in alternativa, potrebbe legarsi ad un residuo di cisteina presente nella tasca distale dell'eme, formando S-nitrosoemoglobina. La reazione procederebbe quindi verso la formazione di NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. In entrambi i casi, AHb1 si porta alla forma Fe<sup>3+</sup>. La metAHb1 può poi essere ridotta da NADPH, l'O<sub>2</sub> si può legare di nuovo ed il ciclo ricominciare. Questo sistema di redox cellulare non è stato ancora individuato; tuttavia l'analisi spettroscopica ha permesso di

confermare il meccanismo catalitico. La forma ridotta e deossigenata di AHb1 mostra infatti due picchi nella regione del visibile caratteristici del ferro eme con esacoordinazione intramolecolare. Trattando  $\text{Fe}^{2+}$ -AHb1 con un eccesso di NO si ottiene una variazione dello spettro di assorbimento che corrisponde al passaggio ad una nitrosil-AHb1. Segue poi una rapida ossidazione di AHb1 con contemporaneo accumulo di nitrati. Lo spettro finale ottenuto è perciò quello della met-AHb1, anche se si può ripristinare la forma ridotta per aggiunta di un eccesso di NADPH. Il trattamento di AHb1 con S-nitroso-glutatione porta alla trans-nitrosilazione di residui di cisteina della proteina con formazione di S-nitroso-AHb1. Anche l'NO legato al gruppo tiolico viene poi trasformato in nitrato. La S-nitroso-AHb1 è prodotta in modo endogeno da piante di *Arabidopsis thaliana* sottoposte a stress ipossici. Pertanto, questo secondo meccanismo di detossificazione dell'NO potrebbe avere un certo rilievo *in vivo*.<sup>57</sup>



**Figura 1.15:** Schema proposto per il meccanismo di reazione di AHb1 ossigenata con NO o S-nitrosoglutatione, con produzione di  $\text{NO}_3^-$  e forma ferrica della proteina. Il ciclo può proseguire solo se l'emoglobina ossidata viene poi ridotta.<sup>57</sup>

AHb1 sembra funzionalmente correlata all'emoglobina di *Ascaris*, proteina ponte, sia strutturalmente che funzionalmente, fra le emoglobine di batterio e di mammifero, che ha sviluppato un meccanismo dipendente da una cisteina per ottenere detossificazione da NO/O<sub>2</sub>. Questa proteina usa un residuo di cisteina per legare l'NO e ottenere così un abbassamento dei livelli di ossigeno: quest'ultimo infatti milioni di anni fa era assente nell'atmosfera che conteneva invece NO. L'O<sub>2</sub> era tossico per gli organismi di quell'epoca ed è per questo che le emoglobine più antiche legano l'O<sub>2</sub> così fortemente, in modo da abbassarne i livelli e poterlo poi consumare. L'evoluzione ha trasformato poi il ruolo di queste proteine in trasportatori di

ossigeno nei mammiferi superiori; in queste emoglobine l'NO è utilizzato per dilatare i vasi sanguigni e assistere così la consegna dell'ossigeno. Questa diversità funzionale è ottenuta attraverso una differente posizione della cisteina usata per legare l'NO. Nell'emoglobina di *Ascaris* la cisteina in questione è vicina al sito di legame dell'ossigeno, favorendo la reazione di deossigenazione; nelle emoglobine superiori, è posizionata nel lato opposto della molecola rispetto al sito di legame per l'O<sub>2</sub>, impedendo la reazione fra questo e l'NO e rendendo così possibile il trasporto dell'ossigeno e il rilascio del monossido di azoto. La funzione primordiale di detossificazione si è così evoluta in una funzione di trasporto.<sup>39</sup> AHb1 contiene due residui di cisteina, E15 e E16 nella tasca distale: uno di essi è omologo alla cisterna distale Cys E15 di *Ascaris*, rivelando affinità strutturali che si riflettono probabilmente in meccanismi d'azione *in vivo* simili.

Come sopra accennato, una terza emoglobina, AtGLB3, è presente in *Arabidopsis thaliana*. Appartiene al gruppo delle emoglobine “troncate”, è espressa sia nelle radici che nei tessuti aerei e sembra che la sua espressione sia ridotta in condizioni ipossiche. È circa 40 aminoacidi più corta di AHb1 e AHb2. AtGLB3 ha un'identità di sequenza di meno del 25% rispetto alle altre due globine di *Arabidopsis* e sembra essere molto più simile a globine *two-on-two* batteriche. È probabile che la famiglia delle emoglobine troncate di pianta abbia una storia evolutiva separata da quella delle altre emoglobine vegetali. Una caratteristica peculiare di AtGLB3 è la lenta conversione della forma ridotta esacoordinata ad una forma pentacoordinata in condizioni riducenti. Lo spettro della forma ridotta deossigenata ottenuta con sodio ditionito è inizialmente quello tipico di una forma esacoordinata, con due picchi tra i 500 nm e i 600 nm. Questa forma, però, non è stabile nel tempo e in meno di 30 minuti si verifica il passaggio ad una forma pentacoordinata, con un unico largo picco centrato a circa 548 nm. Questo strano comportamento potrebbe essere dovuto ad una lenta modificazione conformazionale che esclude il ligando interno dalla tasca distale. Poiché AtGLB3 è un dimero, è possibile che il distacco del ligando endogeno sia rallentato a causa della vicinanza tra la tasca dell'eme e l'interfaccia tra i due monomeri.<sup>54</sup>

Il ruolo fisiologico delle due emoglobine non simbiotiche di *Arabidopsis thaliana* AHb1 e AHb2 è ancora sconosciuto a causa di una caratterizzazione strutturale e funzionale molto limitata, dovuta anche alla scoperta piuttosto recente di queste proteine. Le diverse proprietà biologiche, in particolare condizioni e livelli di espressione, fanno comunque pensare a funzioni biologiche differenti; esperimenti sistematici sulle proprietà strutturali e funzionali di AHb1 ed

AHb2 sono pertanto necessari per poter arrivare a suggerire quali siano i loro ruoli funzionali *in vivo*. Inoltre, AHb1 sembra presentare affinità funzionali (e come si vedrà anche strutturali) con la neuroglobina, espressa anche nel cervello umano.

In questo lavoro di tesi si sono caratterizzate le due emoglobine AHb1 ed AHb2 da un punto di vista funzionale, determinando la loro reattività con il CO in soluzione ed in matrici di gel di silice. Questa caratterizzazione appare infatti preliminare ed essenziale per poter formulare ipotesi sulla funzione delle due proteine.

Le proteine sono state prima analizzate con spettroscopia all'equilibrio (di assorbimento e Raman Risonante) per indagare sulle proprietà strutturali del gruppo eme. Le variazioni delle proteine in presenza di un ligando esogeno sono state esplorate usando il monossido di carbonio, in quanto l'utilizzo di questa molecola presenta molteplici vantaggi fra cui la stabilità del legame Fe-CO e l'assenza di reazioni parassite che possono verificarsi se si impiegano altre molecole (per esempio con O<sub>2</sub> si osserva una rapida auto-ossidazione di AHb2 e il campione si degrada nell'arco di poche ore). Sono poi stati determinati i parametri cinetici per la reazione di queste due proteine con il CO (e successivamente anche con O<sub>2</sub> e NO) attraverso esperimenti di Stopped Flow e Laser Flash Photolysis, in una varietà di condizioni sperimentali per ottenere una caratterizzazione della reattività di AHb1 ed AHb2 il più completa possibile. Le misure effettuate sono descritte in dettaglio nei prossimi capitoli.

# CAPITOLO 2: CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA ED ESPERIMENTI DI RAPID MIXING

## 2.1 Purificazione delle emoglobine di *Arabidopsis thaliana*

### AHb1

Cellule BL21 di *Escherichia coli* (Novagen) sono state trasformate con un derivato del plasmide pET11a (Novagen, Madison, WI) contenente la sequenza di cDNA di AHb1. La proteina ricombinante è stata fatta esprimere a 37 °C, con induzione da IPTG. In seguito a lisi cellulare, si è addizionata emina per stabilizzare le emoproteine sovraesprese.<sup>57</sup> Il plasmide ricombinante e il protocollo di purificazione sono stati messi a punto dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Paola Dominici del Dipartimento Scientifico e Tecnologico dell'Università degli Studi di Verona, che ha fornito anche i lisati cellulari dai quali è stata purificata la proteina. I lisati (volume iniziale circa 40 ml) sono stati caricati su una colonna da circa 20 ml impaccata con resina Q Sepharose Fast Flow (Sigma) precedentemente equilibrata con tampone 20 mM tri-(idrossimetil)aminometano (Tris), 0.1mM DTT, pH 7.2. Dopo un'iniziale eluizione con il suddetto tampone, durante la quale AHb1 viene trattenuta dalla matrice a scambio anionico, si è proceduto con un gradiente di forza ionica da 20 mM a 100 mM Tris, 0.1 mM DTT, pH 7.2.

Questo ha permesso il distacco dalla resina della proteina, la cui presenza nelle frazioni di raccolta è stata verificata tramite gel elettroforesi.

Le frazioni più pure contenenti AHb1 sono state riunite e concentrate tramite sistema Amicon, quindi dializzate contro tampone 20 mM Tris, pH 8.5 e nuovamente concentrate. Si sono effettuati due cicli di dialisi. Il volume finale è di circa 5 ml. Il dializzato è stato caricato su una colonna impaccata con un'altra resina a scambio anionico (Q Sepharose High Performance) equilibrata con tampone 20 mM Tris, pH 8.5. Con lo stesso tampone è stata lavata la colonna, poi sviluppata con 180 ml di un gradiente lineare di forza ionica da 0 a 0.1 M NaCl nello stesso tampone a 2 cc/min. La purezza delle frazioni è stata verificata mediante SDS-page gel elettroforesi, per riunire le frazioni più pure contenenti AHb1. Le operazioni di impaccamento, lavaggio, eluizione, generazione di gradienti e raccolta delle frazioni sono state condotte con il sistema cromatografico Akta Prime (Amersham Pharmacia Biotech). Le frazioni più pure sono state concentrate tramite sistema Amicon (Millipore). Sono stati condotti quattro cicli di diluizione concentrazione con il tampone finale, 20 mM Tris, pH 7.2. Per ottenere un volume di circa 200  $\mu$ l, si è effettuata infine un'ulteriore concentrazione con Vivaspın (Sartorius) con membrane aventi limite di esclusione di 10 kD. La concentrazione finale dello stock è stata valutata in 2.4 mM, basandosi sul coefficiente di estinzione molare a 413 nm di  $73.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  riferito al monomero. Infine, lo stock è stato suddiviso in aliquote da circa 30  $\mu$ l congelate in azoto liquido e conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Tutti i passaggi della purificazione sono stati condotti a  $4^{\circ}\text{C}$ . Ad ogni passaggio si è valutato il rapporto AHb1/proteine totali monitorando il rapporto di assorbanza 413 nm/280 nm. Lo spettro corrisponde alla forma ossigenata.

## **AHb2**

Il protocollo di purificazione di AHb2 è simile a quello di AHb1, con la differenza che è sufficiente un unico passaggio in colonna. I lisati cellulari (volume iniziale di 40 ml) sono stati dializzati e concentrati contro tampone 50 mM Tris, 0.1 mM DTT, pH 7.2. Sono quindi stati caricati su una colonna impaccata con una resina Q Sepharose HP precedentemente equilibrata col suddetto tampone e dopo lavaggio si è proceduto con un gradiente lineare di forza ionica da 0 a 0.2 M NaCl nello stesso tampone (135 ml ad una velocità di 1.5 ml/min). Si è verificata la purezza delle frazioni, concentrate poi con sistema Amicon e Vivaspın. Si è ottenuto un volume finale di circa 200  $\mu$ l, aliquotato e congelato in azoto liquido. Lo spettro corrisponde alla forma ossidata, per la quale il coefficiente di estinzione riferito al monomero a 410 nm è di  $54.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

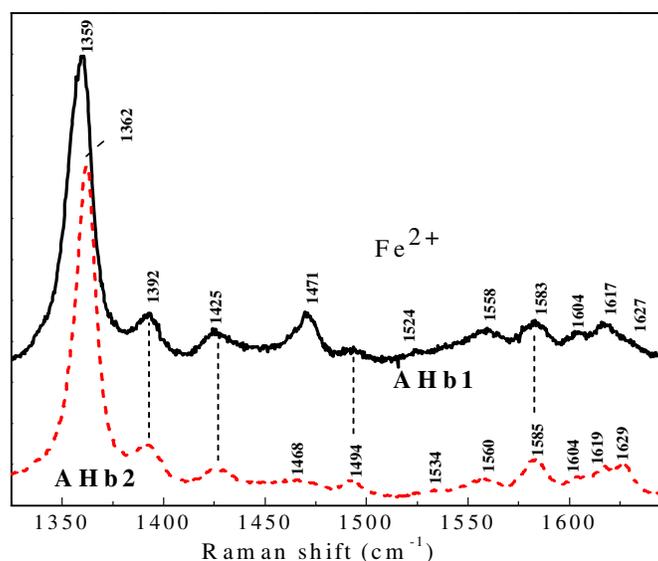
## 2.2 Analisi strutturale del gruppo eme di AHB1 e AHB2 mediante spettroscopia Raman Risonante

La spettroscopia Raman è una tecnica spettroscopica usata in fisica e chimica per studiare i modi vibrazionali, rotazionali o comunque a bassa frequenza in un sistema. Si basa sul principio dello scattering anelastico (Raman scattering) di luce monocromatica, di solito proveniente da un laser nel range del visibile, vicino infrarosso o vicino UV. La luce laser interagisce coi fononi o altri modi di eccitazione del sistema, facendo in modo che l'energia dei fotoni del laser aumenti o diminuisca; questa variazione di energia fornisce informazioni sui modi fononici del sistema. Nella spettroscopia Raman risonante, il laser è regolato in modo tale che l'energia dei fotoni incidenti coincida con quella di una transizione elettronica nella molecola o nel cristallo. Dal momento che l'energia di queste transizioni è diversa da una specie chimica ad un'altra, questa tecnica è divenuta utilizzabile solo dopo la diffusione dei laser regolabili (ovvero la cui lunghezza d'onda può essere variata, entro un certo range) nei primi anni 70. Quando la frequenza del fascio laser è vicina a quella di una transizione elettronica (risonanza), i modi vibrazionali associati a quella stessa transizione esibiscono un grande aumento nell'intensità dello scattering Raman, che solitamente predomina sui segnali Raman di tutte le altre transizioni. Per esempio, risonanza con una transizione  $\pi\text{-}\pi^*$  aumenta l'intensità dei modi di stretching dei legami  $\pi$  coinvolti nella transizione, mentre gli altri modi non subiscono variazioni di intensità. La spettroscopia Raman risonante è un metodo ampiamente utilizzato per ottenere informazioni strutturali sulle molecole biologiche. Eccitazione laser a diverse lunghezze d'onda origina diversi set di transizioni vibrazionali attraverso differenti meccanismi di scattering risonante, senza danneggiamento del campione. La risonanza elettronica eccita una singola transizione fra le tante possibili nella molecola; le bande vibrazionali selettivamente eccitate sono pertanto rappresentative della specifica conformazione della parte di molecola che stiamo studiando. Se si eccita in una regione spettrale in cui vi sono transizioni elettroniche permesse i modi vibrazionali maggiormente eccitati saranno gli stessi che si osservano nello spettro di assorbimento; precisamente possono essere o modi che connettono lo stato fondamentale con uno stato eccitato attraverso overlap di Franck-Condon, o modi in cui questa transizione si mescola con un'altra di energia più elevata. In particolare, per le proteine contenenti un gruppo eme, nella zona UV-visibile si osservano in assorbimento due principali transizioni elettroniche  $\pi\text{-}\pi^*$ , soggette a interazioni

configurazionali per cui per una delle due i dipoli di transizione si sommano e per l'altra si cancellano in larga parte dando origine ad una transizione ad energia minore. La più energetica ed intensa delle due ( $\epsilon \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) si osserva in tutte le metalloporfirine attorno a 400 nm ed è chiamata banda di Soret o  $\gamma$ . La transizione ad energia minore è detta banda  $\alpha$  e si trova circa a 550 nm; è circa un ordine di grandezza meno intensa della banda di Soret. La transizione che origina la banda  $\alpha$  può accoppiarsi tramite opportune vibrazioni a transizioni ad energie più alte; queste frequenze sono relativamente alte e danno origine a una banda laterale vibrazionale, chiamata banda  $\beta$ . Le bande  $\alpha$  e  $\beta$ , oltre ad essere sensibili allo stato di legame del ferro emico e a cambiamenti della struttura circostante come la banda di Soret, dipendono anche da altri fenomeni come il legame di una molecola d'acqua o di ligandi interni. Tuttavia il loro basso coefficiente di estinzione molare richiede l'uso di concentrazioni di proteina più alte. Gli spettri Raman risonante nella regione delle alte frequenze (1300-1700  $\text{cm}^{-1}$ ) sono caratterizzati dalla presenza di intense bande dovute alle vibrazioni di *stretching* dei legami  $\pi$  dell'anello porfirinico; queste bande sono chiamate "core size marker bands" in quanto sono fortemente dipendenti dalla dimensione dell'anello porfirinico e quindi dallo spin e dallo stato di coordinazione e di ossidazione dell'atomo di ferro emico. Una variazione di soli 0.01 Å nella dimensione dell'anello produce uno *shift* di 5-6  $\text{cm}^{-1}$  nella frequenza di queste bande. Per metalloporfirine planari, un aumento di dimensione si traduce in una diminuzione delle frequenze Raman. Si pensa che questa dipendenza derivi da cambiamenti nelle costanti di forza dei ponti metinici (in particolare lunghezza e angolo) quando la porfirina si espande o contrae. Come riportato nel paragrafo 1.1.2.1, le dimensioni dell'atomo di ferro e dell'anello porfirinico dipendono dallo spin e dallo stato di coordinazione: si comprende dunque facilmente che gli spettri Raman risonante forniscono molte informazioni sulle proprietà strutturali dell'eme. Le forme 6cHS, 5cHS e 6cLS possono essere chiaramente distinte sulla base delle loro frequenze RR.

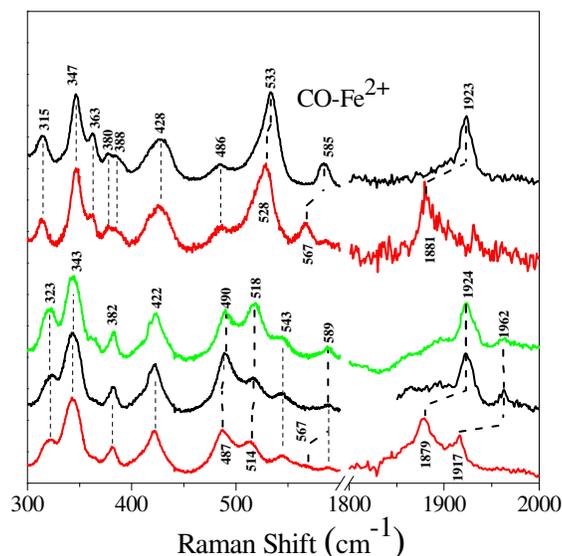
Le proteine AHb1 e AHb2 di *A. thaliana* nello stato  $\text{Fe}^{2+}$  sono state analizzate mediante spettri RR dal gruppo della Prof.ssa Giulietta Smulevich del Dipartimento di Chimica dell'Università di Firenze.<sup>58</sup> Gli spettri sono stati ottenuti a temperatura ambiente con eccitazione da parte della riga a 413.1 nm di un laser  $\text{Kr}^+$  (Coherent). La luce *back-scattered* da una provetta per NMR mantenuta in lenta rotazione è stata acquisita e focalizzata in uno spettrometro triplo funzionante in modalità sottrattiva, composto da due Acton Research SpectraPro 2300i e da uno SpectraPro 2500i nel passaggio finale, con un *grating* di 1800 o 3600 incisioni/mm e dotato di un detector CCD raffreddato ad azoto liquido (Roper Scientific

Princeton Instruments). Gli spettri sono stati calibrati con un'accuratezza di  $1 \text{ cm}^{-1}$  per bande intense ed isolate usando indene, acetonitrile e  $\text{CCl}_4$  come standards. Scopo dell'analisi era ottenere informazioni strutturali sul gruppo eme e sui cambiamenti conformazionali dovuti al legame del CO. I campioni deossi per la spettroscopia Raman risonante sono stati preparati aggiungendo una soluzione di ditionito di sodio (Fluka Chemicals) a una soluzione di proteina  $30 \mu\text{M}$ , che era stata precedentemente saturata d'azoto. La concentrazione finale di ditionito era  $20 \text{ mM}$ . Gli spettri RR delle proteine nello stato deossi nella regione delle alte frequenze hanno permesso di stabilire che AHb2, presentando le *core size marker bands* a  $1494 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) e  $1583 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ ) tipiche dei sistemi esacoordinati a basso spin,<sup>59</sup> si presenta in forma totalmente esacoordinata in assenza di ligandi esogeni. Anche in AHb1 queste bande sono presenti, ma si osserva anche una banda  $\nu_3$  a  $1471 \text{ cm}^{-1}$ , indice della presenza di un complesso pentacoordinato ad alto spin, confermata anche dallo *shift* della banda  $\nu_4$  da  $1362 \text{ cm}^{-1}$  in AHb2 a  $1359 \text{ cm}^{-1}$  in AHb1. La presenza di specie ad alto spin in equilibrio con specie 6c-basso spin è stata osservata anche nell'emoglobina di pomodoro<sup>60</sup> e di orzo.<sup>61</sup> Queste proteine hanno un gruppo eme nella forma dominante 6cLS e una piccola componente 6cHS in  $\text{Fe}^{3+}$ , mentre nella forma  $\text{Fe}^{2+}$  a pH neutro si osserva una piccola frazione di forma 5cHS.



**Figura 2.1:** Spettri RR nella regione ad alte frequenze di  $\text{Fe}^{2+}$  AHb1 (sopra, linea continua) ed AHb2 (sotto, linea tratteggiata), acquisiti utilizzando la linea a  $413.1 \text{ nm}$  di un laser  $\text{Kr}^+$  (Coherent) in eccitazione, con una potenza di  $20 \text{ mW}$  (AHb1) o  $10 \text{ mW}$  (AHb2).<sup>58</sup>

I complessi con il CO per le misure RR sono stati preparati saturando le soluzioni di proteine (a concentrazioni comprese fra 150 e 250  $\mu\text{M}$ ) con azoto, poi flussando  $^{12}\text{CO}$  (Rivoira) o aggiungendo  $^{13}\text{CO}$  (FluoroChem), ed infine aggiungendo ditionito ad una concentrazione di 20 mM. Gli spettri RR su proteine CO-bound sono stati acquisiti usando due diversi isotopi del carbonio per identificare le bande di vibrazione per lo stretching e il bending del legame Fe-CO: le frequenze vibrazionali correlate al ligando riflettono infatti la natura del legame con il ferro e le interazioni con la proteina. In particolare, interazioni polari e la formazione di un legame ad idrogeno fra il CO legato al ferro e il residuo distale aumentano la probabilità di donazione di elettroni dagli orbitali Fe- $d_{\pi}$  ai CO- $\pi^*$ . La conseguenza è che il legame Fe-C si rafforza e il legame C-O si indebolisce: pertanto le frequenze vibrazionali  $\nu(\text{FeC})$  crescono e le frequenze  $\nu(\text{CO})$  diminuiscono.<sup>62</sup> Per una larga classe di emoproteine e composti modello che legano il CO, in cui il quinto ligando è l'anello imidazolico dell'istidina prossimale, si è trovata una correlazione lineare fra le frequenze  $\nu(\text{FeC})$  e gli stretching  $\nu(\text{CO})$ . Nello spettro RR di CO-AHb1 i modi che coinvolgono il CO sono gli stretching  $\nu(\text{FeC})$  a  $533\text{ cm}^{-1}$  ( $528\text{ cm}^{-1}$  in  $^{13}\text{CO}$ ), il bending  $\delta(\text{FeCO})$  a  $585\text{ cm}^{-1}$  ( $567\text{ cm}^{-1}$  in  $^{13}\text{CO}$ ), e gli stretching  $\nu(\text{CO})$  a  $1923\text{ cm}^{-1}$  ( $1881\text{ cm}^{-1}$  in  $^{13}\text{CO}$ ). Gli spettri non variano nel range di pH da 6 a 8. Gli spettri RR di CO-AHb2 mostrano differenze significative. A pH neutro, l'intensa banda a  $490\text{ cm}^{-1}$  è assegnata allo stretching  $\nu(\text{FeC})$  sulla base dello shift isotopico di  $3\text{ cm}^{-1}$  in  $^{13}\text{CO}$ . A pH 8.3, appare una nuova banda di stretching  $\nu(\text{FeC})$  a  $518\text{ cm}^{-1}$  ( $514\text{ cm}^{-1}$  in  $^{13}\text{CO}$ ) e la banda a  $490\text{ cm}^{-1}$  decresce in concomitanza. Le altre bande sensibili agli isotopi si trovano a  $589\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta(\text{FeCO})$ ] ( $567\text{ cm}^{-1}$  in  $^{13}\text{CO}$ ),  $1924$  e  $1962\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{CO})$ ] ( $1879$ ,  $1917\text{ cm}^{-1}$  in  $^{13}\text{CO}$ ). Gli spettri RR di AHb1 e AHb2 legate al CO suggeriscono che le interazioni polari e i legami ad idrogeno fra il CO e i residui della tasca distale siano molto diversi per le due proteine.<sup>62, 63</sup> Le frequenze  $496/490\text{ cm}^{-1}$  dei modi  $\nu(\text{FeC})$  di AHb1/AHb2 e la frequenza del modo  $\nu(\text{CO})$  osservata per AHb2 ( $1962\text{ cm}^{-1}$ ) sono tipiche dei complessi dove il CO è circondato da un ambiente debolmente polare.<sup>64, 65</sup>



**Figura 2.2:** Sopra, spettri RR di CO-Fe<sup>2+</sup> AHb1 utilizzando <sup>12</sup>CO (nero) e <sup>13</sup>CO (rosso) in tampone Tris 0.1 M, pH=8.1. Sotto, spettri RR di CO-Fe<sup>2+</sup> AHb2 utilizzando <sup>12</sup>CO (nero) e <sup>13</sup>CO (rosso) in tampone fosfato 0.1 M, pH=7, e spettro <sup>12</sup>CO-Fe<sup>2+</sup> AHb2 in tampone Tris 50 mM, pH=8.3 (verde). La potenza del laser era 2 mW.<sup>58</sup>

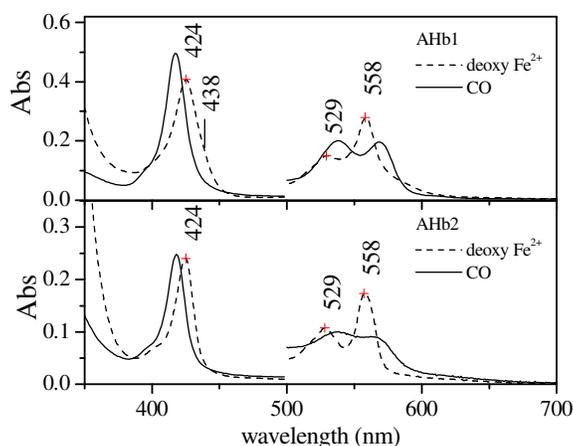
In particolare l'elevata intensità della banda a 490 cm<sup>-1</sup> osservata in AHb2 (in AHb1 la banda corrispondente a 496 cm<sup>-1</sup> è molto meno intensa) è una forte indicazione del fatto che le interazioni stabilizzanti fra i residui distali e il CO sono particolarmente deboli, e quindi la tasca distale è più "aperta".<sup>66</sup> Inoltre anche la differenza nella frequenza della banda  $\nu(\text{FeC})$  per AHb1 ed AHb2 (533 cm<sup>-1</sup> contro 518 cm<sup>-1</sup>) indica una ridotta facilità per la donazione elettronica dal Fe al CO per AHb2, e quindi interazioni stabilizzanti minori per il CO legato, che potrebbero essere conseguenza di un legame ad idrogeno più debole con l'istidina distale. Questa differenza potrebbe implicazioni funzionali, come già riportato per alcune emoproteine mutate<sup>67</sup> in cui la polarità della tasca distale era ridotta, per esempio attraverso la mutazione His64Leu: queste proteine presentavano un'affinità con l'ossigeno minore rispetto alla proteina *wild type*. Sui mutanti His64Leu e His64Ala sono stati eseguiti spettri RR che hanno mostrato basse frequenze  $\nu(\text{FeC})$ , tipiche delle forme "aperte" della tasca dell'eme.<sup>68</sup> L'affinità minore per l'O<sub>2</sub> mostrata da AHb2 rispetto ad AHb1 potrebbe pertanto essere correlata con la ridotta polarità del sito attivo. Le cavità distali di AHb1 e AHb2 presentano residui simili come polarità e capacità di formare legami ad idrogeno, e fra questi l'istidina distale è con grande probabilità il residuo con cui il CO interagisce maggiormente, attraverso la formazione di un legame ad idrogeno; pertanto le differenze spettrali viste potrebbero riflettere indirettamente

una diversa disposizione di questo residuo nelle due proteine quando queste legano il CO. In particolare l'istidina distale potrebbe avere maggiore libertà di movimento in AHb2: infatti, nonostante le cavità distali di AHb1 e AHb2 siano simili, anche una piccola differenza nella sequenza amminoacidica è sufficiente per modificare in modo ingente le interazioni fra il CO e la tasca distale, come è stato osservato per la proteina CCP(MI) (citocromo c perossidasi ricombinante).<sup>69, 70</sup> Anche uno studio RR recente su una forma mutante di una emoglobina non simbiotica di riso di tipo I<sup>71</sup> suggerisce la presenza di un'interazione fra il CO e l'istidina distale, dal momento che la sostituzione di questo residuo con una leucina causa la comparsa di una banda  $\nu(\text{CO})$  a numeri d'onda relativamente alti ( $1958 \text{ cm}^{-1}$ ), caratteristica tipica di ridotte interazioni polari. Anche mutazioni sul residuo fenilalanina B10, che nella proteina nativa si trova in stretta prossimità dell'istidina distale, riducono le interazioni polari fra il CO e la tasca distale, implicando un processo di stabilizzazione del ligando controllato da più residui.

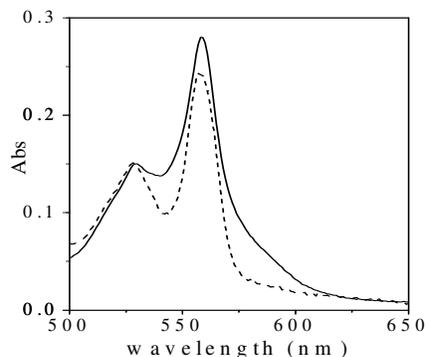
### **2.3 Spettri di assorbimento UV-visibile su AHb1 e AHb2**

Per quanto riguarda l'assorbimento UV-visibile, in assenza di legami esogeni le emoglobine esacoordinate nello stato ridotto presentano uno spettro tipico delle forme a basso spin, caratterizzato, nella regione del visibile, da bande  $\beta$  e  $\alpha$  distinte e da una banda di Soret spostata a lunghezze d'onda minori rispetto alle emoglobine pentacoordinate, nelle quali il picco si trova all'incirca a 430 nm (deossi-HbA). Queste caratteristiche spettrali accomunano le emoglobine esacoordinate alle emoproteine non globiniche con coordinazione His-Fe-His, tra cui ad esempio diversi citocromi. Gli spettri di assorbimento UV-visibile di AHb1 e AHb2 sono stati acquisiti utilizzando uno spettrofotometro Cary400 SCAN (Varian). La cuvette è mantenuta ad una temperatura di 20 °C tramite un termostato collegato al porta-cuvette. Gli stock di AHb1 e AHb2 sono stati diluiti con tampone 100 mM sodio fosfato a pH 7.0. Gli spettri confermano quanto finora riportato: per AHb2 si osservano picchi a 424 nm (banda di Soret), 529 nm (banda  $\beta$ ) e 558 nm (banda  $\alpha$ ), tipiche dei sistemi 6cLS. Lo spettro di assorbimento di AHb1 mostra picchi centrati sulle stesse lunghezze d'onda; tuttavia la presenza di pentacoordinazione dà origine a una spalla a 438 nm e allarga lo spettro fra la banda  $\beta$  e  $\alpha$  e a lunghezze d'onda maggiori di quelle del massimo della banda  $\alpha$  (figure 2.3 e 2.4). Inoltre il rapporto tra la banda  $\alpha$  e il minimo di assorbimento relativo a 540 nm è minore per AHb1 rispetto ad AHb2. Come

osservato per altre emoglobine esacoordinate, ciò indica la presenza di una frazione di forma pentacoordinata in equilibrio con la forma esacoordinata. Usando come riferimenti lo spettro di  $\text{Fe}^{2+}$  AHb2 deossi per la forma puramente esacoordinata e quello di una emoglobina A umana deossi sempre nello stato ferroso per la forma pentacoordinata, si può stimare che la frazione di eme nella forma 5cHS in  $\text{Fe}^{2+}$  AHb1 deossi sia circa del 40%. Una stima analoga si ottiene utilizzando lo spettro di assorbimento della forma ridotta del mutante HE7L di AHb1, per il quale si osserva la forma pentacoordinata pura. La forma carbossi-emoglobina viene ottenuta miscelando la proteina stock con tampone 100 mM sodio fosfato pH 7 in cui è stato fatto gorgogliare CO e aggiunto sodio ditionito. Lo spettro di assorbimento si modifica e i massimi si spostano per AHb1 a 417 nm (banda di Soret), 569 e 538 nm (bande  $\alpha$  e  $\beta$ ), per AHb2 rispettivamente a 418 nm, 562 nm, 538 nm. (figura 2.3). Il rapporto fra le assorbanze del massimo della banda di Soret nelle forme deossi- e carbossi- è diverso tra AHb1 e AHb2. Mentre per AHb1 tale rapporto è di 0.82, per AHb2 il rapporto è circa 1.



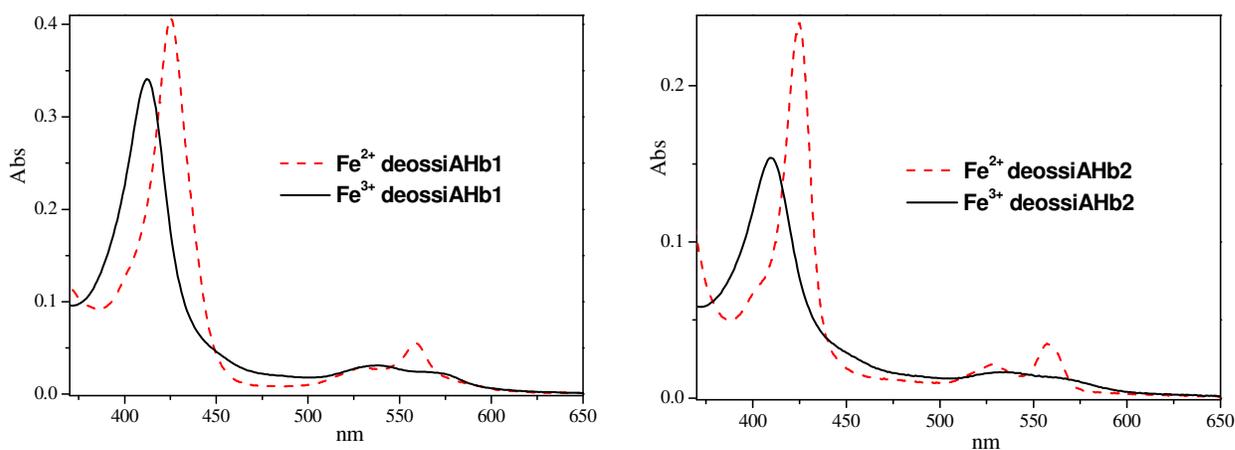
**Figura 2.3:** Spettri di assorbimento UV-visibile di  $\text{Fe}^{2+}$  COAHb1 (27 $\mu\text{M}$ ) e COAHb2 (14 $\mu\text{M}$ ). T=20°C.



**Figura 2.4:** Differenza spettrale fra le forme deossi di  $\text{Fe}^{2+}$ -AHb1 (curva continua) e  $\text{Fe}^{2+}$ -AHb2 (curva tratteggiata) nella zona delle bande  $\alpha$  e  $\beta$ .

### 2.3.1 Dipendenza degli spettri di assorbimento UV-visibile di AHb1 e AHb2 da stato di ossidazione del ferro, pH e ligando

Gli stock di AHb1 e AHb2 sono stati diluiti con tampone 100 mM sodio fosfato a pH 8.0 e 5.5 per studiare la dipendenza dal pH. La forma ridotta ( $\text{Fe}^{2+}$ ) è stata ottenuta aggiungendo 2 mM sodio ditionito ad una soluzione precedentemente deossigenata in flusso di elio per 30 minuti. La forma ossidata ( $\text{Fe}^{3+}$ ) è stata generata con 2 mM ferricianuro di potassio. Nel caso di AHb2 non si osservano cambiamenti spettrali per aggiunta di ferricianuro alla proteina stock poichè essa si trova già nello stato ossidato. Gli spettri di assorbimento per le due forme deossi  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  di AHb1 e di AHb2 sono riportati in Figura 2.5. Per formare la nitrosilemoglobina si utilizza il donatore di NO MAHMA NONOato. I NONOati sono stabili in ambiente basico e liberano NO in ambiente neutro o acido. Per questo si prepara una soluzione di NONOato 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in NaOH 10 mM, lavorando sempre in flusso di azoto e in ghiaccio per impedire che il NONOato si deteriori. L'aggiunta di tale soluzione ad una miscela contenente la proteina, 2mM sodio ditionito, pH 7.0, permette in pochi minuti la liberazione di NO.

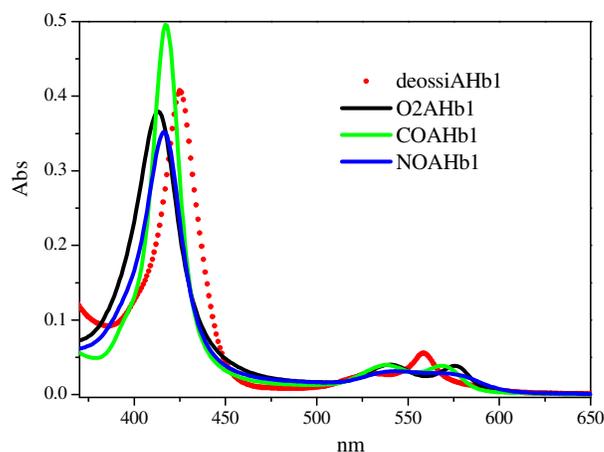


**Figura 2.5:** Variazione degli spettri di assorbimento UV-visibile delle forme deossi di AHb1 (a sinistra) ed AHb2 (a destra) a seconda dello stato di ossidazione del ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ = linea tratteggiata,  $\text{Fe}^{3+}$ = linea continua). La concentrazione delle proteine era 25.7  $\mu\text{M}$ .

#### Dipendenza dal ligando

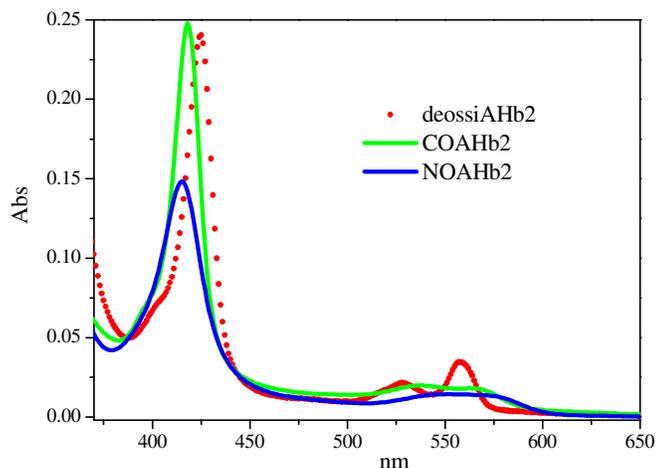
Aggiungendo  $\text{O}_2$ , CO ed NO alla forma deossi di AHb1 si ottengono spettri simili alle forme ossi, carbossi e nitroso dell'HbA, con due picchi  $\alpha$  e  $\beta$  di intensità relativa variabile.

AHb1 sembra quindi legare reversibilmente questi ligandi gassosi, portandosi ad uno stato di coordinazione del ferro simile a quello dell'HbA. Come già discusso, le piccole differenze spettrali osservate riflettono le modificazioni conformazionali e strutturali dell'eme e della tasca distale in risposta al binding dei diversi ligandi. La banda di Soret subisce in tutti i casi un *blue-shift* in presenza di ligandi, e si osserva sempre una notevole differenza spettrale con la forma deossi della proteina nella regione attorno ai 430 nm.



**Figura 2.6:** Variazione degli spettri di assorbimento UV-visibile di Fe<sup>2+</sup>-AHb1 in funzione della presenza e del tipo di ligando. Tutti gli spettri sono stati raccolti in tampone fosfato 100 mM a pH=7.0. La concentrazione delle proteine era 25.7  $\mu$ M.

AHb2 si comporta in modo analogo per quanto riguarda la reazione con CO ed NO, ma si ossida immediatamente in presenza di O<sub>2</sub>. Non è stato quindi possibile determinare lo spettro della forma ossi-AHb2. Lo spettro dei campioni purificati di AHb2 rimane pressochè identico dopo aggiunta di un agente ossidante quale ferricianuro di potassio, confermando che già nella purificazione, contrariamente ad AHb1, si porta alla forma ossidata. Questa notevole tendenza all'ossidazione è interessante sia per le relazioni struttura-reattività di questa emoproteina, sia per le implicazioni funzionali che ne deriverebbero. Se fosse accoppiata ad un efficiente sistema redox intracellulare che ne ripristinasse la forma ridotta in modo ciclico, AHb2 potrebbe, infatti, fungere da deossigenasi, per ridurre la concentrazione di ossigeno in date condizioni fisiologiche. Avrebbe quindi un ruolo paragonabile a quello dell'emoglobina esacoordinata di *Ascaris suum*.



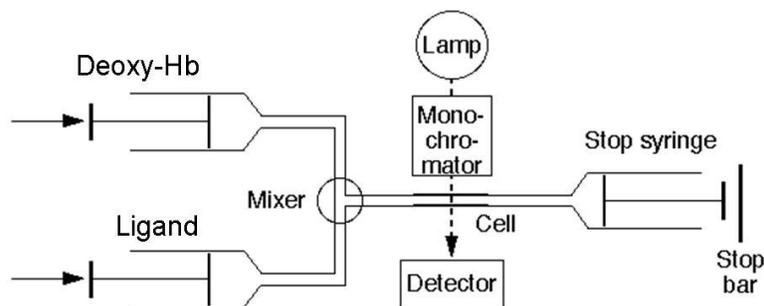
**Figura 2.7:** Variazione degli spettri di assorbimento UV-visibile di  $\text{Fe}^{2+}$ -AHb2 in funzione della presenza e del tipo di ligando. Tutti gli spettri sono stati raccolti in tampone fosfato 100 mM a  $\text{pH}=7.0$ . La concentrazione delle proteine era  $25.7 \mu\text{M}$ .

## Dipendenza dal pH

Sono stati raccolti spettri di assorbimento a pH acido (pH 5 o 5.5) e basico (pH 8.0) per verificare l'eventuale dipendenza delle proprietà spettroscopiche dalla concentrazione degli ioni  $\text{H}^+$ . Nell'HbA in forma ossidata, per esempio, il ferro può coordinare una molecola di  $\text{H}_2\text{O}$  o uno ione  $\text{OH}^-$ , in proporzione differente a seconda del pH della soluzione. Poiché l'eme presenta uno spettro di assorbimento diverso a seconda che sia legato all' $\text{H}_2\text{O}$  o all' $\text{OH}^-$ , gli spettri mostrano una caratteristica dipendenza dal pH. Per AHb1 e AHb2, invece, le proprietà spettrali sono risultate indipendenti dal pH. Negli spettri di AHb1 a pH 5.0 e 5.5 si osserva un picco a 620 nm la cui intensità aumenta passando dalla forma ossigenata a quella deossigenata e da questa a quella legata al CO. Questo andamento sembra in realtà più legato al tempo di permanenza della proteina a pH acido piuttosto che al tipo di ligando presente. Sarebbe quindi che tale picco si formi in seguito ad una parziale degradazione della proteina dovuta all'acidità del tampone. A conferma di ciò, l'intensità del picco è maggiore a pH 5.0 che a pH 5.5. Inoltre, l'intensità del picco differisce da preparazione a preparazione. A pH basico non si osserva alcuna variazione delle proprietà spettrali, nè per AHb1 nè per AHb2, neanche nelle forme ossidate ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Se ne deduce che il ferro nella forma 3+ non coordina una molecola di acqua ma mantiene il legame con l'istidina distale.

## 2.4 Cinetiche di legame del CO ad AHb1 ed AHb2 mediante stopped flow

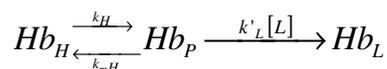
La tecnica dello stopped flow, molto utilizzata per ottenere informazioni su cinetiche di reazioni chimiche, è basata sul mescolamento rapido di piccoli volumi di due soluzioni e sul successivo monitoraggio delle variazioni spettroscopiche dovute all'interazione fra i due composti nella camera di reazione (*mixing chamber*). La soluzione mescolata passa attraverso una cella di flusso, per finire poi in una siringa di stop dove si arresta; quando questa siringa è piena, il pistone colpisce una barra di blocco, il che provoca l'arresto immediato del flusso. A questo punto un trigger attiva l'acquisizione dei dati: normalmente viene seguito nel tempo un segnale di tipo ottico (assorbanza, emissione di fluorescenza) correlato alla reazione chimica che avviene all'interno della cella di flusso. Il limite principale di questa tecnica è dato dal "tempo morto", dell'ordine dei millisecondi, ovvero il tempo che intercorre dal momento in cui le due soluzioni entrano nella camera di mescolamento a quando la turbolenza del mescolamento è terminata. La traccia cinetica durante il tempo morto non è attendibile e non va perciò considerata.



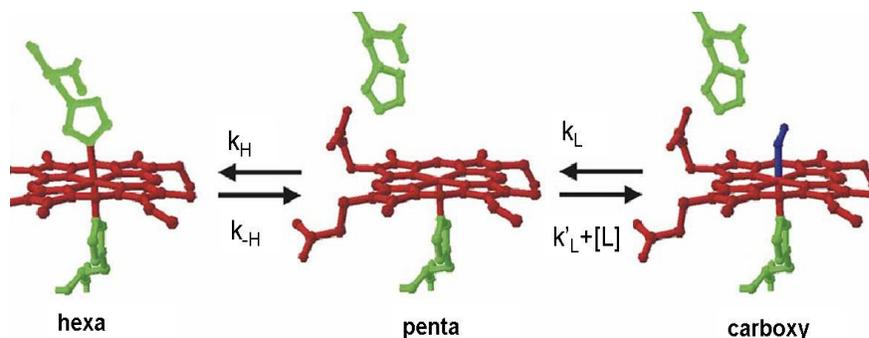
**Figura 2.8:** Rappresentazione schematica dell'apparato sperimentale per misure di *stopped flow* nella configurazione sperimentale che permette di misurare variazioni di assorbanza.

Gli esperimenti di stopped flow su emoglobine esacoordinate sono realizzati mescolando la proteina nella forma deossi con il ligando del quale si vuole studiare il binding in concentrazioni note. Dal momento che il ferro emico della proteina presenta una coordinazione completa in condizioni deossi, risulta evidente che il binding del ligando deve essere preceduto dal distacco dell'istidina distale. Se la reazione avviene in condizioni di pseudo primo ordine (ligando in grande eccesso rispetto alla proteina) e la costante di velocità di dissociazione del ligando  $k_L$  è

molto piccola rispetto alle altre, lo schema cinetico del processo può essere semplificato nel modo seguente:



dove  $k_H$  e  $k_{-H}$  sono rispettivamente le costanti di distacco e di binding dell'istidina distale,  $k'_L$  è la costante di velocità di binding del ligando e  $[L]$  è la concentrazione di questo (figura 2.9).



**Figura 2.9:** Schema di binding del ligando. La forma deossi ferrosa ha un residuo di istidina coordinato al sito di binding del ligando; questa si deve dissociare per formare la forma reattiva pentacoordinata.<sup>29</sup>

Sulla base del modello cinetico si può derivare la seguente equazione che descrive la costante di velocità osservata per il binding del ligando in seguito a mescolamento rapido al variare della concentrazione di ligando (cinetica monitorata dalle variazioni di assorbanza ad un'opportuna lunghezza d'onda):

$$k_{obs,H} = \frac{k_{-H}k'_L[L]}{k_{-H} + k_H + k'_L[L]}$$

L'equazione prevede una dipendenza di tipo iperbolico dalla concentrazione di ligando della costante di velocità apparente associata al decadimento esponenziale più lento (legame del ligando alla forma esacoordinata). Tuttavia se  $k'_L[L] \gg k_{-H} + k_H$ , condizione ottenibile ad alte concentrazioni di ligando, la costante di velocità della reazione osservata sarà  $k_{-H}$ , indipendentemente dalla concentrazione di ligando.<sup>72</sup>

## 2.4.1 Risultati sperimentali

Gli studi di stopped flow su soluzioni di AHb1 e AHb2 per studiare le cinetiche di binding del CO alle emoglobine di *Arabidopsis* sono stati condotti da collaboratori del Professor Mozzarelli presso il Dipartimento di Biochimica dell'Università degli studi di Parma. La scelta del CO come ligando per tali studi è dovuta a diversi fattori. Oltre alla stabilità del legame Fe-CO e all'assenza di reazioni chimiche parassite, negli esperimenti di stopped flow risulta conveniente poter utilizzare un eccesso di uno *scavenger* di ossigeno (sodio ditionito) per generare la forma deossigenata iniziale. Questa metodica sarebbe incompatibile con la determinazione delle cinetiche di binding all'O<sub>2</sub>. Nonostante il CO non sia un ligando di rilevanza fisiologica per AHb1 e AHb2, lo studio del binding e del rebinding del CO permette di ottenere informazioni che sono estendibili ad altri ligandi.

Si è verificata la dipendenza delle velocità delle varie fasi del binding dalla temperatura e dalla concentrazione di CO. L'apparecchio utilizzato è il sistema SX. 18 MV (Applied Photophysics) integrato con un spettrografo.

Per le misure a singola lunghezza d'onda è stata utilizzata una lampada continua allo Xe (75W) che emette luce policromatica verso un monocromatore (200 - 700 nm), il cui output è connesso tramite una fibra ottica all'unità di mescolamento. Nella cella di rivelazione è possibile scegliere tra due cammini ottici ortogonali, uno da 2 mm e uno da 10 mm. L'intensità della radiazione uscente è stata rilevata da un fotomoltiplicatore collegato ad un computer. Le soluzioni sono state caricate nelle due siringhe dell'unità di mescolamento e portate alla temperatura desiderata mediante un bagno di termostatazione. La pressione esercitata da un pistone sulle siringhe spinge le due soluzioni attraverso tubi di mescolamento che convergono in una camera di quarzo. L'evoluzione del sistema è monitorata misurando delle variazioni di assorbimento nel tempo.

Gli esperimenti a singola lunghezza d'onda hanno permesso di raccogliere letture a frequenza molto elevata e di effettuare una raccolta dati in scala logaritmica, in modo da poter seguire con un numero di punti adeguato tanto le fasi veloci quanto quelle lente. È stata utilizzata una lunghezza d'onda scelta in modo da massimizzare la differenza di assorbanza osservata, ovvero all'incirca 430 nm: infatti in questa regione spettrale la differenza fra gli spettri nella forma carbossi e deossi è particolarmente accentuata. Sono poi state effettuate misure di controllo ad altre lunghezze d'onda (417 nm e 425 nm) per verificare che la cinetica di binding potesse essere riprodotta in modo equivalente. La misurazione del tempo morto è

stata effettuata seguendo a 524 nm la reazione di riduzione del 2,6-diclorofenolindofenolo (DCIP) con acido ascorbico, a 20 °C. Si è operato a diverse concentrazioni di acido ascorbico, sempre in eccesso rispetto al DCIP, per cui si è ottenuto un decadimento mono-esponenziale dipendente dalla concentrazione di acido ascorbico (pseudo primo ordine). Il tempo morto è risultato essere di 1.5 ms per il cammino ottico da 10 mm e di 1.2 ms per il cammino ottico di 2 mm. Tale reazione è stata utilizzata inoltre per regolare il volume della *mixing chamber* in modo tale da eliminare le alterazioni delle tracce cinetiche a tempi superiori al tempo morto (intorno ai 10 millisecondi) osservate nei primi esperimenti. Questo effetto, di natura strumentale, è eliminato utilizzando un volume minimo della camera di mescolamento di circa 120 µl (corrispondente a 60 µl di ciascun reagente).

Per la preparazione dei campioni, due aliquote di tampone 100 mM sodio fosfato a pH 7.0 è stato fatto gorgogliare rispettivamente N<sub>2</sub> e CO per 30 minuti. Una volta deossigenate, si aggiunge ad entrambe una soluzione di sodio ditionito (concentrazione finale nel buffer 2 mM). La proteina viene diluita col tampone equilibrato in N<sub>2</sub> e questa soluzione è miscelata tramite lo stopped flow con il tampone contenente CO. La concentrazione della proteina nella soluzione utilizzata per la misura è circa 5 µM, sia per AHb1 che per AHb2. La concentrazione del CO nel tampone in cui è stato fatto gorgogliare il gas puro a temperatura ambiente è circa 1 mM. Per ottenere soluzioni con concentrazioni di CO minori di 1 mM si miscela nei rapporti appropriati il tampone con 1 mM CO con il tampone equilibrato con N<sub>2</sub>. Le concentrazioni di CO utilizzate variano da 0.05 mM a 0.5 mM, quindi il gas è sempre in grande eccesso nei confronti della proteina, in modo da poter usare l'approssimazione di pseudo primo ordine.

Per quel che riguarda AHb1, la cinetica di legame del CO alla proteina deossi è risultata bifasica, svelando la presenza di due fasi distinte dipendenti dalla temperatura e dalla concentrazione di CO, una molto rapida con tempi di vita apparenti nell'ordine di pochi millisecondi e una relativamente più lenta, con tempi vicini ai 100 millisecondi. Questo sembrerebbe suggerire due processi paralleli tra due forme a diversa velocità di legame, forme che possono essere ragionevolmente attribuite alla forma esacoordinata ed a quella pentacoordinata del ferro emico, sulla base delle indicazioni degli spettri RR e di assorbimento UV-visibile che predicano un equilibrio fra queste due specie nella forma deossi di AHb1. È evidente che la fase più veloce sarà originata dalle molecole di CO che si legano alla forma pentacoordinata dell'eme, mentre la frazione di proteina in cui l'istidina distale occupa il sesto legame di coordinazione del ferro reagirà con il CO in modo intrinsecamente più lento, essendo

il distacco dell'istidina distale il *rate limiting step* del processo di rebinding. Per AHb2 invece la cinetica osservata è sostanzialmente monoesponenziale, in accordo con l'ipotesi dell'esistenza dell'unica forma esacoordinata nella proteina deossi.

## Misure in funzione della temperatura

Sono stati effettuati esperimenti su AHb1 e AHb2 per valutare la dipendenza dalla temperatura (lavorando a 5, 10, 15, 20, 25 e 30°C) della velocità di legame al CO.

### AHb1

Per AHb1 si sono registrate le cinetiche a 430 nm con una concentrazione di CO nella *mixing chamber* di 0.05 mM. L'evoluzione temporale dell'assorbanza associata al processo è stata studiata a temperature comprese tra 5 e 30 °C. Il fitting delle cinetiche è stato effettuato con la seguente equazione (somma di due decadimenti esponenziali):

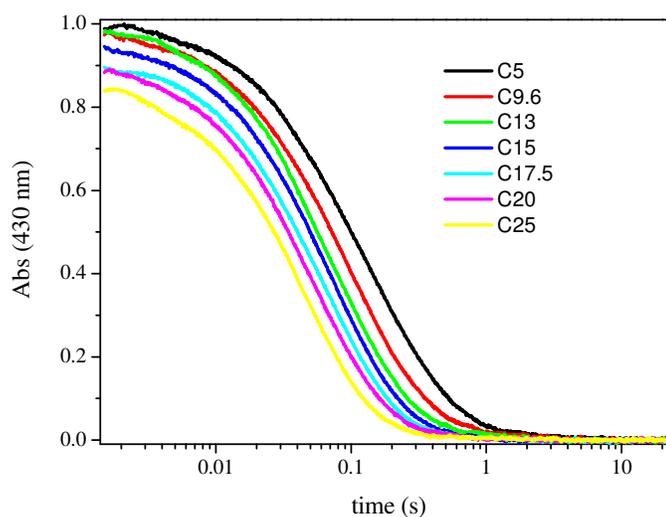
$$\Delta A = y_0 + A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} .$$

L'analisi delle tracce di assorbimento transiente come somma di esponenziali è possibile data la distanza temporale tra i due processi coinvolti nella transizione. La deviazione quadratica media del fitting è molto vicina ad 1, per cui sembra che le equazioni usate descrivano bene i dati sperimentali. A 5 °C, 0.5 mM CO, i  $\tau$  apparenti dei due processi sono di circa 4 millisecondi e 90 millisecondi. I valori delle costanti cinetiche ( $k_1 = 1/\tau_1$ ,  $k_2 = 1/\tau_2$ ) sono utilizzati per il calcolo dell'energia di attivazione dei due processi. Secondo l'equazione di Arrhenius, la costante di velocità di un processo dipende dalla temperatura secondo la relazione:

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

dove  $k$  è la costante di velocità apparente del processo,  $A$  è un fattore che tiene conto della frequenza delle collisioni tra i reagenti e della loro orientazione,  $E_a$  è l'energia di attivazione del processo,  $R$  è la costante dei gas e  $T$  la temperatura assoluta. Entrambi i processi cinetici

osservati per il legame del CO ad AHb1 sono attivati termicamente. I valori delle  $E_a$  risultano di 20.6 kJ/mole per il primo processo e di 37.8 kJ/mole per il secondo. Il valore di energia di attivazione misurato per il primo processo è associabile a piccole variazioni conformazionali della proteina. Al contrario il secondo processo sembra richiedere un'energia di attivazione di un ordine di grandezza normalmente associato a modificazioni più estese della matrice proteica, come quelle richieste dal distacco dell'istidina distale, come discusso in precedenza. Le ampiezze calcolate delle due fasi risultano simili fra loro, in accordo con la presenza di un equilibrio nella forma deossi in cui le due forme coesistono in proporzioni paragonabili.

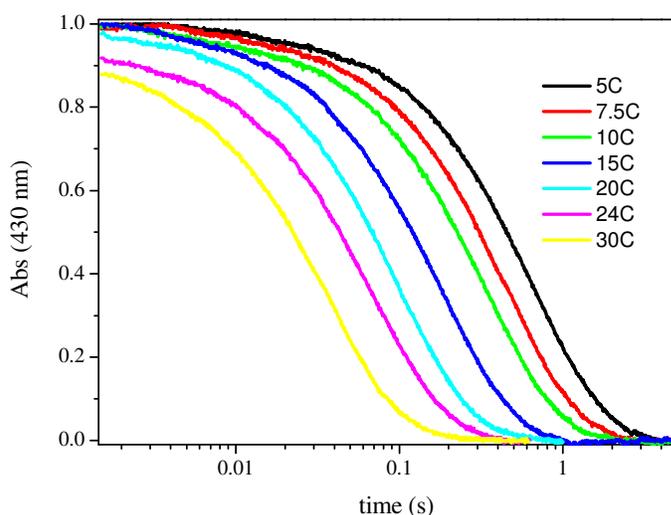


**Figura 2.10:** Cinetiche di reazione di  $\text{Fe}^{2+}$ -AHb1 con CO determinate con esperimenti di stopped flow in funzione della temperatura. Le curve sono normalizzate a quella a 5 °C, per la quale si suppone di non perdere cinetica nel tempo morto.

## AHb2

La dipendenza dalla temperatura delle velocità di binding è stata studiata anche per AHb2, nelle stesse condizioni usate per AHb1 e nello stesso range di temperature. Il legame del CO ad AHb2 è più lento rispetto a quello osservato per AHb1 alle corrispondenti temperature. Per tutte le tracce alle diverse temperature si osserva un decadimento sostanzialmente monoesponenziale dell'assorbanza. Nelle cinetiche più veloci (24 e 30 °C) è osservabile un'ulteriore fase lenta, con  $\tau$  dell'ordine di qualche secondo. Questa fase è più difficilmente rilevabile nelle tracce a temperature più basse. Nelle curve raccolte a temperature più basse, invece, sembrerebbe essere presente una fase molto rapida con  $\tau$  di pochi millisecondi, che non è possibile caratterizzare

con accuratezza a causa della vicinanza col tempo morto. Sia la fase lenta osservata a 24 e a 30 °C che la fase rapida visibile a temperature più basse presentano un'ampiezza molto piccola rispetto alla fase principale e sono presumibilmente dovute in parte ad effetti di tipo strumentale. Dall'equazione di Arrhenius con i valori della velocità osservata per la fase principale si ricava il valore dell'energia di attivazione del processo che è pari a 80.6 kJ/mol.



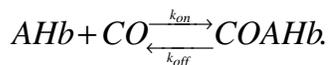
**Figura 2.11:** Cinetiche di reazione di  $\text{Fe}^{2+}$ -AHb2 con CO determinate con esperimenti di stopped flow in funzione della temperatura. Le curve sono normalizzate a quella a 5 °C.

## Misure in funzione della concentrazione di CO

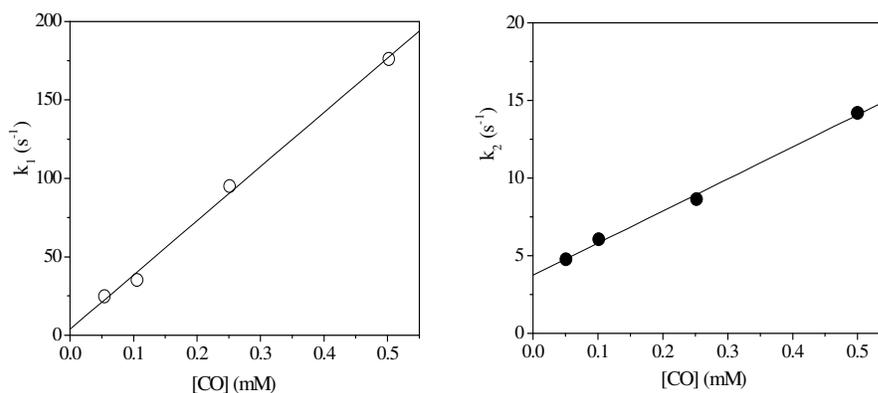
È stata studiata anche la dipendenza dalla concentrazione di CO delle costanti di velocità dei processi coinvolti nel legame. Si noti che in tutti gli esperimenti le concentrazioni di CO sono sempre mantenute sufficientemente elevate rispetto a quelle della proteina da poter assumere di essere in una situazione di pseudo primo ordine. Le velocità misurate, quindi, dipendono solo dalla concentrazione del CO e non da quella della proteina. In tali condizioni, le costanti di velocità microscopiche si possono estrapolare dalla velocità apparente di ciascun processo secondo la relazione:

$$\frac{1}{\tau} = k_{on} [CO] + k_{off}$$

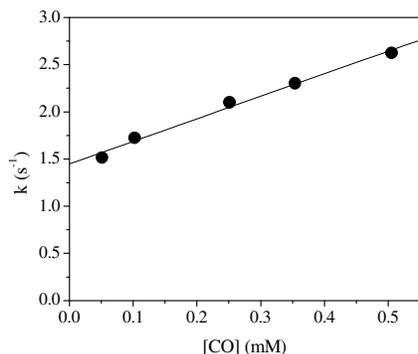
dove  $k_{on}$  e  $k_{off}$  sono le costanti di velocità della reazione:



Gli esperimenti sulle proteine sono stati effettuati a 5 °C per apprezzare meglio la fase rapida della cinetica che a temperature più alte tende ad essere così veloce da rientrare nel tempo morto, soprattutto per AHb1. Per analizzare le cinetiche si utilizza ancora una volta un'equazione biesponenziale. Per quanto riguarda AHb1, entrambi i processi sono influenzati dalla concentrazione di CO; le costanti determinate per il primo processo sono le seguenti:  $k_{on} = 344 \text{ s}^{-1}\text{mol}^{-1}$  e  $k_{off} = 5.0 \text{ s}^{-1}$ . Il secondo processo, più lento, ha  $k_{on} = 20.6 \text{ s}^{-1}\text{mol}^{-1}$  e  $k_{off} = 3.8 \text{ s}^{-1}$ . È interessante notare che le ampiezze dei due processi rimangono costanti alle diverse concentrazioni di CO; questo sembra suggerire due processi paralleli tra due forme a diversa velocità di legame: ancora una volta potrebbe trattarsi della forma esacoordinata e di quella pentacoordinata, oppure di due conformazioni diverse della proteina. La dipendenza della velocità di legame dalla concentrazione di CO è stata valutata anche per AHb2; le costanti di velocità del processo principale sono  $k_{on} = 2.4 \text{ s}^{-1}\text{mol}^{-1}$  e  $k_{off} = 1.5 \text{ s}^{-1}$ . Non è stato possibile raggiungere concentrazioni di CO sufficientemente elevate da osservare saturazione nelle costanti di velocità di legame (vedi figure 2.12 e 2.13), indice del raggiungimento della condizioni per cui si osserva direttamente la velocità di distacco dell'istidina distale.



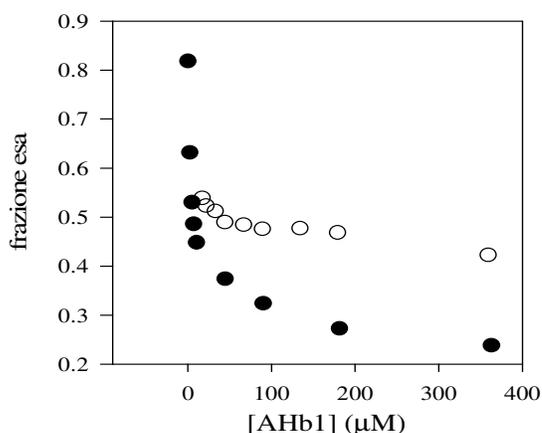
**Figura 2.12:** Costanti di velocità apparenti per le due fasi osservate in funzione della concentrazione di CO per AHb1. Le rette rappresentano il *best fit* ai dati sperimentali.



**Figura 2.13:** Plot delle costanti di velocità apparenti in funzione della concentrazione di CO per la reazione con AHb2.

## 2.5 Considerazioni sull'equilibrio esa-penta

La frazione di specie esacoordinata nella forma  $\text{Fe}^{2+}$  deossi di AHb1 mostra una dipendenza dalla concentrazione di proteina. Questa dipendenza, mostrata in figura 2.14, porta ad una modesta diminuzione della frazione di proteina esacoordinata all'aumentare della concentrazione. Questa variazione nella costante di equilibrio tra le forme 5c e 6c si accentua al passare del tempo trascorso dalla preparazione del campione.



**Figura 2.14:** Frazione di specie esacoordinata calcolata dal rapporto Abs558/Abs544 (utilizzando come riferimenti AHb2 per la forma puramente esacoordinata ed il mutante di AHb1 HE7L, in cui l'istidina distale è sostituita da una leucina, per la forma puramente pentacoordinata) in funzione della concentrazione di CO. I punti sperimentali rappresentati con i pallini vuoti si riferiscono ai dati raccolti immediatamente dopo la preparazione del campione mentre quelli corrispondenti ai pallini neri si riferiscono a spettri raccolti dopo molte ore dalla preparazione.

# CAPITOLO 3: LASER FLASH PHOTOLYSIS

## 3.1 Introduzione alla Flash Photolysis

La laser flash photolysis è una tecnica potente e ormai tradizionale per studiare sistemi fotochimici. Fu introdotta nel 1949 da Ronald Norrish e George Porter,<sup>73</sup> che sono stati successivamente insigniti, insieme a Manfred Eigen, del Premio Nobel per la Chimica nel 1967. Il principio su cui si basa questa tecnica è quello di indurre attraverso un lampo di luce (ottenuto utilizzando una lampada a flash o un laser) un processo in un sistema, il cui decorso temporale viene poi seguito monitorando con un altro fascio di luce le variazioni spettroscopiche ad un'opportuna lunghezza d'onda. La Flash Photolysis consente l'osservazione diretta della cinetica dei processi che seguono la fotoeccitazione con elevata risoluzione temporale, determinata essenzialmente dalla durata dell'impulso di eccitazione. Questa tecnica è comunemente usata per caratterizzare le proprietà ed i meccanismi di reazione di numerose specie transienti quali stati elettronici eccitati, radicali liberi, radicali ionici, fotoisomeri ecc.<sup>74</sup> Il campo di indagine tuttavia non si esaurisce nell'ambito delle reazioni fotochimiche ma può essere esteso a tutti quei processi in cui i prodotti di fotolisi reagiscono con altre specie presenti in soluzione. Si possono analizzare processi indotti dalla luce in

molecole organiche, polimeri, semiconduttori, nanoparticelle, cambiamenti conformazionali o percorsi di segnalazione indotti dalla luce in sistemi biologici, e altro ancora. Negli ultimi 40 anni questa tecnica è divenuta più potente e sofisticata grazie allo sviluppo delle componenti ottiche e dei laser pulsati, che hanno sostituito le lampade a flash come sorgenti di eccitazione, e che sono in grado di generare densità di energia molto maggiori assicurando dunque una migliore resa di reazione. Allo stesso tempo, è cresciuto l'interesse per la Flash Photolysis ed i campi di applicazione di questa tecnica si sono estesi, spaziando ora dalla chimica alla biologia, dalla fisica alle scienze dei materiali e dell'ambiente.

Più in dettaglio, nell'esperimento tipico di Flash Photolysis si utilizzano due fasci a lunghezze d'onda diverse: uno usato per la fotoeccitazione del campione (*pump*), di solito pulsato, e uno di sonda (*probe*), di solito continuo, per seguire la variazione delle proprietà ottiche del campione (spesso assorbimento) nel tempo. È quindi ovvio che si possono studiare sistemi in cui lo stato fondamentale ha una densità ottica, alla lunghezza d'onda del fascio di sonda, diversa da quello dello stato eccitato o del nuovo prodotto che si forma per un'avvenuta reazione chimica (rottura di un legame, fotoisomerizzazione, trasferimento di carica eccetera). Con la diffusione dei laser al nano, pico e femtosecondo è possibile ottenere un impulso di eccitazione talmente corto da poter studiare le cinetiche di reazione a tempi brevissimi dopo l'arrivo del flash di luce, ed investigare dunque i primissimi stadi del processo, cosa inimmaginabile fino a pochi decenni or sono.

## **Laser Flash Photolysis su emoproteine**

Lo studio del rebinding di ligandi diatomici gassosi ad emoproteine in soluzione in seguito a fotodissociazione del legame con l'atomo di Fe dell'eme, prodotta da un impulso di luce laser, è stato estensivamente utilizzato per comprendere i meccanismi molecolari alla base delle interazioni proteina-ligando.

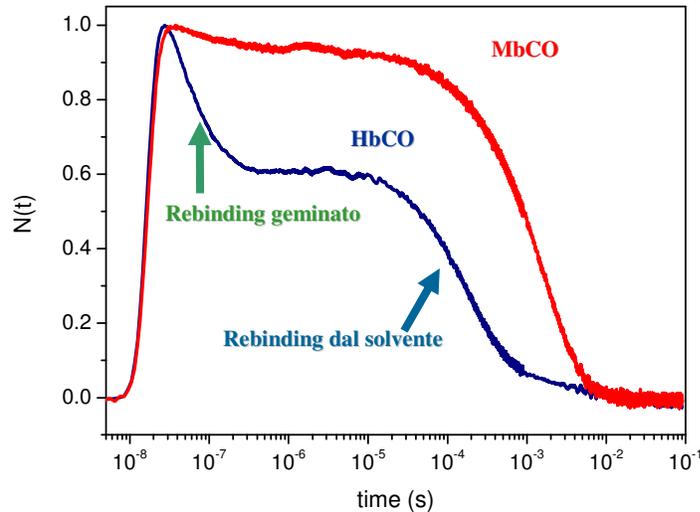
Le tecniche di assorbimento risolte in tempo si basano sull'utilizzo di un fascio di sonda che incide sul campione e viene utilizzato per seguire le variazioni spettrali indotte nel campione dall'eccitazione di un impulso laser. La tecnica che utilizza impulsi della durata di qualche nanosecondo prende il nome di Laser Flash Photolysis (LFP) al nanosecondo. Nella maggior parte dei casi queste tecniche permettono di seguire sia la scomparsa delle specie transienti generate dall'impulso di luce, sia la formazione di nuove specie. Il fascio di sonda è di solito

una sorgente di luce nella regione spettrale dell'UV-visibile-NIR, dove si osservano le variazioni indotte nelle transizioni elettroniche. La regione del vicino UV è di particolare interesse per le emoproteine, dal momento che in questo intervallo di lunghezze d'onda è localizzata la banda di Soret generata dall'assorbimento dell'eme, banda molto sensibile al legame fra ligando e ferro emico ed ai cambiamenti strutturali nelle vicinanze di quest'ultimo.

Il ligando più utilizzato per questo tipo di esperimenti è il CO in quanto i complessi eme-CO sono facilmente fotodissociabili dalla luce visibile, che spezza il legame Fe-ligando senza reazioni secondarie. Inoltre il CO possiede solitamente un'alta affinità per il gruppo eme, il che assicura stabilità al complesso Fe-CO, ed ha un'altissima resa di fotodissociazione, assimilabile a 1. La differenza in assorbimento fra la specie carbossi e quella deossi può essere utilizzata per monitorare l'andamento temporale del processo di rebinding e caratterizzarne quindi la cinetica. Dal momento che il CO si rilega velocemente all'eme, la fotolisi può essere effettuata in modo ciclico in modo da poter mediare il segnale misurato in cicli successivi. Sono stati effettuati un numero impressionante di studi di cinetiche di rebinding su mioglobina<sup>75-81</sup> ed emoglobina<sup>82-87</sup> in una gran varietà di condizioni sperimentali. Più recentemente è stato caratterizzato il rebinding anche da altre emoproteine come la neuroglobina.<sup>88, 89</sup> Le fasi associate al rebinding ad emoproteine sono dunque state ben caratterizzate mediante questi esperimenti. Dopo la dissociazione dall'atomo di ferro, il ligando può migrare verso cavità interne alla matrice proteica dalle quali può reagire di nuovo con il Fe (**legame geminato**), oppure migrare verso il solvente attraverso canali di uscita, e successivamente reagire con la proteina con un processo mediato dalla diffusione. Questa fase cinetica è intrinsecamente più lenta dell'altra ed è detta **legame bimolecolare** (un esempio è mostrato in figura 3.1). Il legame geminato è un processo interno, del primo ordine: di conseguenza la velocità osservata è indipendente dalla concentrazione di ligando. Al contrario la velocità del secondo processo è proporzionale alla concentrazione di ligando libero in soluzione, indicando che si sta osservando una reazione bimolecolare fra ligando libero e proteina deossi. Le cinetiche di rebinding osservate risultano da una combinazione di dinamiche proteiche e migrazione del ligando attraverso la matrice proteica; la loro analisi fornisce dunque un sistema particolarmente ricco di informazioni sui meccanismi di interazione fra proteina e ligando, come sarà illustrato in dettaglio nelle prossime sezioni.

L'attività svolta nel corso di questi anni di Dottorato di Ricerca è stata focalizzata sull'acquisizione e l'analisi quantitativa di curve di rilegame di CO ad AHb1 ed AHb2 in

soluzione ed in gel di silice; una volta completato lo studio su questo ligando, si è cominciato ad investigare le dinamiche di rilegame di altre molecole, in particolare  $O_2$  ed  $NO$ , anche se gli esperimenti con questi ligandi sono ancora nelle prime fasi.



**Figura 3.1:** Esempi di curve di rebinding di CO dopo la fotolisi ad emoglobina (blu) e mioglobina (rosso), con indicazione delle due principali fasi del processo di rilegame.

## 3.2 Apparato sperimentale di Laser Flash photolysis

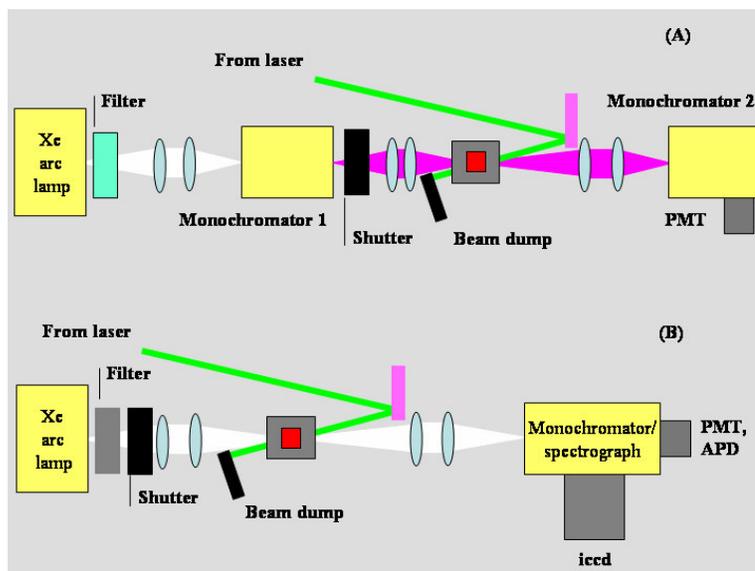
Sono stati utilizzati due principali setup per gli esperimenti di Laser Flash Photolysis (LFP) su AHb1 ed AHb2, per permettere l'acquisizione di tracce di assorbimento transiente a lunghezza d'onda singola o di spettri risolti in tempo con risoluzione temporale limitata dalla durata dell'impulso laser, quindi con alta sensibilità e versatilità. Per fotodissociare con grande efficienza il CO dalle emoproteine si è utilizzata la seconda armonica (532 nm) di un laser Nd:YAG (Qswitched); in particolare sono stati impiegati o un laser Surelite II-10 (Continuum) o un laser Handy Yag HYL-101 (Quanta System). La polarizzazione lineare del fascio è convertita in circolare per mezzo di un lamina  $\lambda/4$  per minimizzare eventuali effetti di fotoselezione. In entrambi i setup la geometria pump-probe è "quasi" collineare, mantenendo il laser angolato quel tanto che basta da non incidere direttamente sull'apparato di rivelazione. Con i setup descritti qui sotto è stata normalmente ottenuta una fotolisi praticamente completa del campione, con energie degli impulsi laser comprese fra 20 e 40 mJ, a seconda del campione.

Occorre essere in condizioni di fotolisi piena o approssimabile a tale in quanto per effettuare analisi quantitative è necessario conoscere le concentrazioni precise delle specie chimiche coinvolte nel processo (deossi-eme e CO). In tutti gli esperimenti, il parametro rilevante è il cambiamento di assorbimento  $\Delta A$  alla lunghezza d'onda di monitoraggio (436 nm), parametro correlato alle variazioni nella luce del fascio di sonda trasmessa attraverso il campione prima,  $I(t < t_0)$ , e dopo,  $I(t)$ , l'eccitazione da parte del laser, secondo questa equazione:

$$\Delta A(t) = -\log \frac{I(t)}{I(t < t_0)}.$$

Le tracce cinetiche sono state mediate su 100 segnali singoli, per migliorare il rapporto segnale/rumore (la deviazione standard del rumore decresce in modo proporzionale a  $\sqrt{n}$ , dove  $n$  è il numero di segnali mediati) ed aumentare inoltre la risoluzione verticale del segnale. Questo è utile soprattutto per la parte finale delle cinetica, che può interessare anche solo l'1% del segnale complessivo.

La frequenza di ripetizione è un parametro rilevante per l'esperimento in quanto il campione deve tornare nelle esatte condizioni iniziali nell'intervallo di tempo intercorrente fra due spari consecutivi del laser. Pertanto, a seconda del campione, possono essere necessarie frequenze di ripetizione molto basse (anche di 0.1 Hz) per consentire il ritorno del campione alla condizione precedente la fotolisi.



**Figura 3.2:** Setup sperimentali di Laser Flash Photolysis per misure di assorbimento transiente a lunghezza d'onda singola (A) e per acquisizione di spettri risolti in tempo (B).

Nel setup descritto in figura 3.2(A), i cambiamenti in assorbimento sono seguiti attraverso una lampada ad arco allo Xenon (150 W) continua, accoppiata ad un monocromatore 0.25-m (AMKO gmbh). Le tracce di assorbimento transiente sono poi misurate, dopo che la luce ha attraversato un secondo monocromatore da 0.125-m (77250, LOT-Oriel), utilizzando un fotomoltiplicatore (PMT) a 5 stadi (Applied Photophysics). La corrente viene fatta passare attraverso una resistenza di carico da 50  $\Omega$  e la conseguente differenza di potenziale viene digitalizzata per mezzo di un oscilloscopio digitale (LeCroy LT374, 500 MHz, 4 GS s<sup>-1</sup>; LeCroy 9370, 1 GHz, 1 GS s<sup>-1</sup>). Un apposito filtro diecrico (Omega optical) è posizionato fra la fenditura di uscita del monocromatore e il fotomoltiplicatore per rimuovere la luce diffusa residua, proveniente dal laser di pompa. Uno *shutter* veloce (Vincent Associates, Uniblitz VS35) è posto fra l'output del primo monocromatore e il portacampione; l'apertura dello *shutter* è controllata da un apposito microprocessore,<sup>90</sup> mentre il tempo di esposizione del campione alla luce è controllato dal driver dello *shutter* (Vincent Associates, Uniblitz VMM-T1). La temperatura del portacampione è accuratamente controllata (le fluttuazioni sono di meno di 0.1 °C) con un elemento Peltier.

I fotomoltiplicatori a 5 stadi sono rivelatori utilizzati tradizionalmente per la Laser Flash Photolysis,<sup>91</sup> in quanto sono gli unici con sensibilità sufficiente se nel setup sono presenti due monocromatori. Se l'esposizione del PMT all'intensa luce di rivelazione è limitata a poche centinaia di millisecondi, questo detector può sopportare agevolmente correnti dell'ordine di 2-4 mA,<sup>92</sup> correnti che portano ad un segnale di 100–200 mV quando vengono fatte cadere sulla resistenza di ingresso di 50  $\Omega$  di un oscilloscopio digitale, senza bisogno di ulteriori amplificazioni, e preservando perciò la larghezza di banda massima per il segnale. Inoltre gli oscilloscopi moderni hanno capacità molto basse (di solito inferiori ai 20 pF), il che origina valori RC che consentono una risoluzione temporale sulla scala di tempi dei nanosecondi. Scale di tempi più lunghe di poche centinaia di microsecondi possono essere rese disponibili limitando le correnti del PTM (per esempio usando un'intensità luminosa minore) e usando carichi maggiori per l'oscilloscopio.<sup>91</sup> La risoluzione verticale dell'ADC (Analog to Digital Converter) dell'oscilloscopio è di 8 bit nella modalità di acquisizione singola, il che richiede amplificazione del segnale e l'applicazione di un offset. I segnali sono mediati su 100 acquisizioni per ridurre il rumore casuale e aumentare la risoluzione verticale.

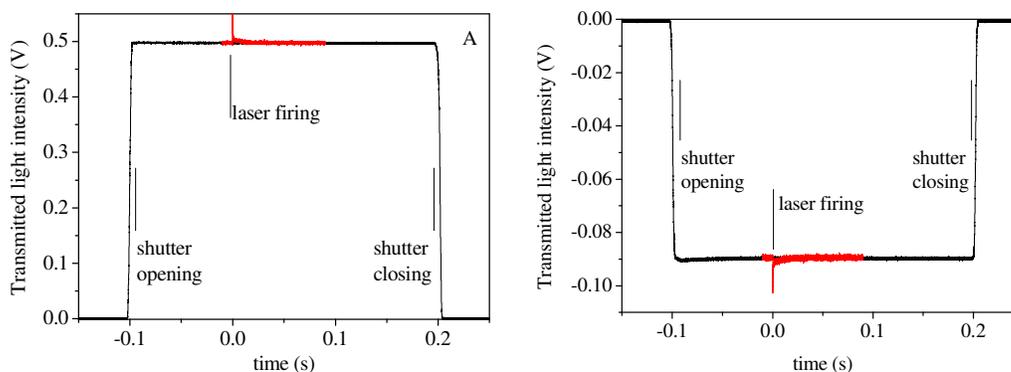
Un secondo setup sperimentale è rappresentato in figura 3.2(B);<sup>93</sup> in questo caso l'output continuo di una lampada ad arco allo Xe (75 Watt) è focalizzato sul portacampione, poi viene

collimato ed infine fatto entrare nelle fenditure di ingresso di un monocromatore/spettrografo MS257 (LOT-Oriel). Con questo setup possono essere misurati spettri-differenza di assorbimento risolti in tempo usando la porta di uscita *on-axis* dello spettrografo MS257, accoppiato con una CCD intensificata (Andor Technology, iStar DH734, 1024 × 1024 pixels). La CCD (acronimo di Charge Coupled Device) consiste in un circuito integrato formato da una griglia di elementi semiconduttori in grado di accumulare una carica elettrica (*charge*) proporzionale all'intensità della radiazione elettromagnetica che li colpisce. Questi elementi sono accoppiati (*coupled*) in modo che ognuno di essi, sollecitato da un impulso elettrico, possa trasferire la propria carica ad un altro elemento adiacente. Il segnale proveniente dalla CCD può essere intensificato se la si connette tramite una matrice di fibre ottiche a un micro-channel plate (MCP) per aumentare la sensibilità. La iCCD è stata di solito utilizzata nella modalità *full vertical binning* per aumentare la sensibilità e la velocità di acquisizione del segnale, e gli spettri sono stati misurati con un tempo di *gating* di 2.93 ns. Anche in questo setup, uno *shutter* veloce (Vincent Associates, Uniblitz VS35) è posizionato fra l'output della lampada a Xenon e il portacampione. L'esperimento tipico consiste nella misura della differenza spettrale fra il fotoprodotto e AHbCO a diversi ritardi temporali dopo la fotodissociazione. A seconda dell'intervallo temporale desiderato fra una misura e la successiva, sono acquisiti 100 o 120 spettri spaziatosi sul tempo in modo logaritmico (da 10 ns dopo il flash del laser a 0.1 s) per seguire fino in fondo il corso temporale della cinetica di rebinding del CO. Gli spettri sono ottenuti mediando 100 segnali *single-shot* per ogni ritardo temporale. La sincronizzazione complessiva dell'esperimento (sparo del laser, apertura dello *shutter*, acquisizione da parte della iCCD) è ottenuta mediante un apposito hardware.<sup>90</sup>

La porta di uscita *off-axis* del MS257 è utilizzata per monitorare le cinetiche a lunghezza d'onda singola. La luce monocromatica è raccolta dalla fenditura di uscita per mezzo di ottiche apposite, dopo essere passata attraverso un opportuno filtro dicroico (Omega optical) e focalizzata su un fotodiodo a valanga (APD) al silicio (Hamamatsu S2382) accoppiato con un amplificatore che trasforma il segnale di corrente in uno di voltaggio (Avtech AV149, 600 MHz). Anche per questo setup il segnale di voltaggio è digitalizzato da un oscilloscopio digitale (LeCroy LT374, 500 MHz, 4 GS s<sup>-1</sup>; LeCroy 9370, 1 GHz, 1 GS s<sup>-1</sup>).

I fotodiodi a valanga al silicio sono un'opzione per la rivelazione in apparati sperimentali in cui c'è un singolo monocromatore come in quello descritto; è stato mostrato che questo sistema è affidabile e abbastanza sensibile per applicazioni di assorbimento transiente con risoluzione al nanosecondo dal vicino UV al vicino infrarosso.<sup>93-95</sup>

Per quanto riguarda l'uso dello *shutter*, limitare il tempo di esposizione è indispensabile per i fotomoltiplicatori, mentre non è strettamente necessario per i fotodiodi, che possono sopportare correnti dell'ordine di grandezza dei mA per tempi lunghi. Tuttavia è sempre consigliabile limitare l'esposizione del campione, soprattutto quando esposto a luce bianca, per evitare danni fotoindotti. L'uso di lampade allo Xe richiede l'utilizzo di *shutters* con aree grandi, per permettere il passaggio di più luce possibile quando aperti; tuttavia questo fa sì che i tempi di apertura siano dell'ordine di qualche ms e che pertanto, come si può vedere in figura, il profilo temporale della corrente di output del PMT (a destra) sia caratterizzato da una crescita lenta in risposta all'apertura dello shutter, poi, di solito, da un *overshooting* che si stabilizza ad un valore stazionario entro 50-100 ms. È quindi necessario aspettare circa 100 ms dall'apertura dello *shutter* prima di dare il via allo sparo del laser. Se si osserva l'andamento temporale della corrente per quel che riguarda l'APD, si vede subito che da questo punto di vista c'è un grande vantaggio utilizzando quest'ultimo rivelatore, per il quale si raggiunge in tempo molto rapido un valore stabile, senza segni di *overshooting*. Dalla figura 3.3 si osserva anche che l'intervallo di tempo in cui si effettua la misura è sempre largamente compreso nell'intervallo temporale fra l'apertura e la chiusura dello *shutter*, per evitare effetti di “bordo”.



**Figura 3.3:** Segnali di voltaggio sull'oscilloscopio digitale (carico 50  $\Omega$ ).

(a) Intensità di luce trasmessa a 436 nm, monitorata dall'APD al silicio. Lo *shutter* si apre 100 ms prima dello sparo del laser. L'apertura dello *shutter* richiede circa 10 ms e l'intensità di luce si stabilizza velocemente ad un valore che si mantiene uguale fino alla chiusura dello *shutter*. Il livello di luce prima dello sparo del laser determina il valore di  $I(t < t_0)$ .

(b) Intensità di luce trasmessa a 436 nm monitorata da un fotomoltiplicatore a 5 stadi. Si noti il segno negativo del voltaggio misurato e il piccolo *overshoot* che si osserva dopo l'apertura dello *shutter*, effetto che svanisce entro 100 ms. Il segnale è acquisito nella regione “piatta”, circa 100 ms, che segue lo sparo laser.

La risoluzione temporale di questi apparati sperimentali di Laser Flash Photolysis è data in teoria dalla larghezza intrinseca dell'impulso laser, che per i moderni laser a stato solido è circa di 5 ns; ci sono tuttavia un certo numero di parametri e dettagli sperimentali che influenzano l'effettiva risoluzione temporale. Fra questi il più critico è l'intenso scattering della luce proveniente dal fascio di pompa che si genera quando il laser incide sulla cuvette o sulla lastra del gel: per questo motivo, quando si utilizzano fasci di pompa e sonda collineari, è necessario fare propagare i due fasci in versi opposti. Anche se l'allineamento è accurato, una quantità rilevante della luce di pompa entra comunque nel rivelatore, provocando un "acceramento" delle fasi temporali iniziali. Questo effetto può essere in generale ridotto drasticamente, o eliminato completamente in casi favorevoli, posizionando accuratamente i componenti ottici e inserendo elementi per arrestare il fascio in modo da bloccare riflessioni dalle ottiche, incluse quelle alle pareti della cuvette. Tra i componenti ottici da inserire nel cammino ottico del fascio di analisi, risulta indispensabile il posizionamento di un monocromatore davanti al rivelatore, in modo ridurre lo scattering della luce di pompa a livelli accettabili. Anche con questi accorgimenti, luce diffusa residua può raggiungere il rivelatore, e per questo motivo è consigliabile la presenza di uno specchio diecrico posto dopo la fenditura di uscita del monocromatore. La residua luce diffusa proveniente dal laser di pompa può essere sottratta dal segnale di luce trasmessa attraverso l'acquisizione di una baseline, ottenuta bloccando il fascio di sonda. Sottraendo la baseline dal segnale, solitamente si rimuovono gli artefatti sulla scale di tempi dei nanosecondi nel risultante segnale di assorbimento transiente, tranne che per i campioni che presentano un elevato livello di scattering, per i quali la risoluzione temporale può essere ridotta.

L'emissione di fluorescenza originata dalla fotoeccitazione del gruppo eme è trascurabile, contrariamente a quanto succede con la maggior parte delle molecole organiche; pertanto non crea problemi dal punto di vista della risoluzione temporale.

Una volta che lo scattering del laser è efficacemente abbattuto, la risoluzione temporale è determinata dalla larghezza di banda elettronica del sistema di rivelazione preso nel suo complesso; l'efficienza di ogni componente della catena di rivelazione deve essere ottimizzata se si vuole che la risoluzione temporale finale sia limitata dalla larghezza dell'impulso laser. Nell'esperimento tipico i segnali si estendono per diversi ordini di grandezza dal punto di vista temporale: pertanto il voltaggio deve essere campionato con un'alta frequenza per i primi microsecondi successivi all'impulso laser, per ricostruire la fase veloce della cinetica con una risoluzione adeguata. Questo accorgimento non è più necessario a scale di tempi più lunghi,

dove i dati sarebbero ridondanti e occuperebbero la memoria dell'oscilloscopio inutilmente. Per sopperire alla limitata memoria dell'oscilloscopio è dunque necessaria l'acquisizione del segnale su diverse basi temporali, al fine di coprire in maniera ottimale l'intero corso temporale della cinetica. Questo metodo presenta però lo svantaggio di richiedere tempi di acquisizione più lunghi, il che porta talvolta alla fotodegradazione del campione dovuta all'eccessiva fotolisi. Inoltre, le fluttuazioni nell'energia degli impulsi laser originano spesso segnali con ampiezze diverse, che devono essere dunque riscaldati, anche se talvolta non è agevole determinare i fattori di riscaldamento.

### **3.3 Misure di LFP su AHb1 e AHb2 in soluzione**

#### **3.3.1 Misure a lunghezza d'onda singola**

Per gli esperimenti di Laser Flash Photolysis, AHb1 e AHb2 sono state diluite in tampone fosfato di sodio 100 mM, 1 mM EDTA, a pH 7, precedentemente equilibrato con CO alla pressione di 1 atm e addizionato di sodio ditionito ad una concentrazione finale 2 mM. In questo modo si ottengono soluzioni con concentrazioni di CO disciolto di circa 1 mM a temperatura ambiente; campioni con concentrazioni di CO minori di questa sono preparati con opportune diluizioni. La concentrazione finale di proteina è nel range di 60-70  $\mu$ M.

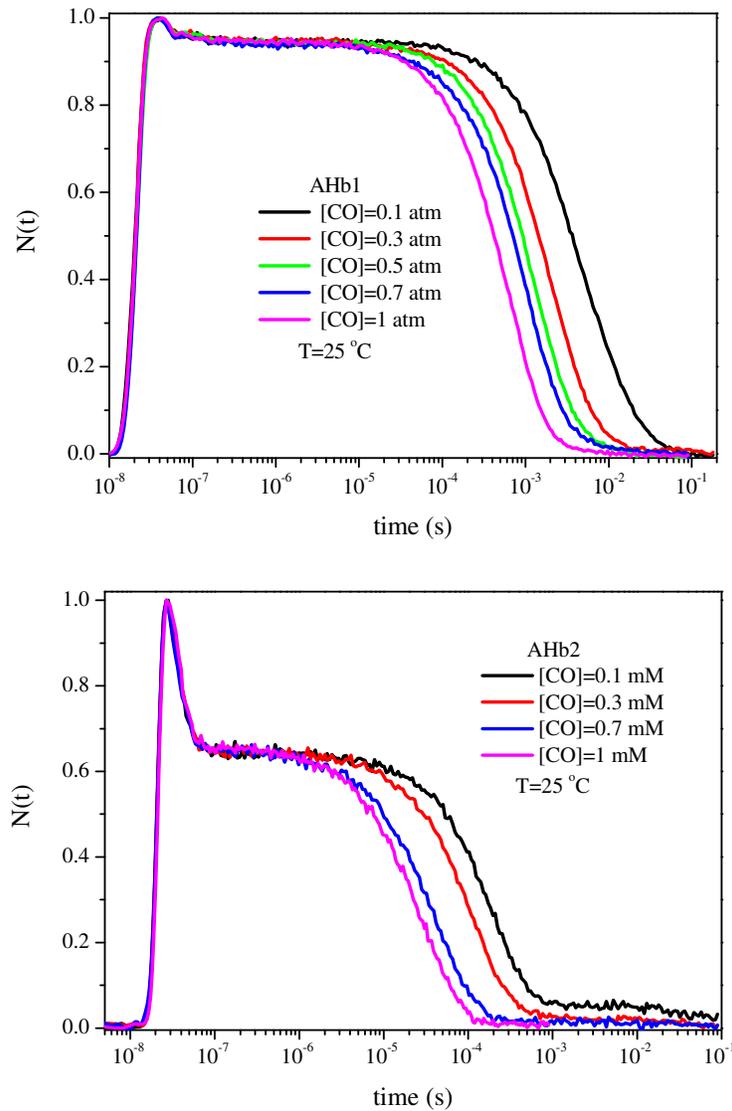
Per caratterizzare le fasi cinetiche della curva di rebinding sono state effettuate misure in funzione della temperatura (nel range da 10 a 30 °C; non si sono raggiunte temperature superiori per evitare di denaturare la proteina, mentre il limite inferiore è fissato dalle specifiche di funzionamento del Peltier) e della concentrazione di CO. L'utilizzo di una cuvette (dal cammino ottico di 2 mm) alla cui sommità è stato fuso un *reservoir* chiuso con un tappo dotato di un setto perforabile a tenuta di gas ha permesso di ottenere un'alta affidabilità per la stima della concentrazione di ligando, assicurando che per tutta la durata dell'esperimento la concentrazione di CO in equilibrio con la soluzione di proteina rimanesse costante. La velocità di ripetizione dell'esperimento variava da 0.3 a 0.1 Hz, per permettere che il campione ritornasse completamente nelle condizioni iniziali fra un impulso ed il successivo. Le curve sono state mediate su 100 segnali singoli. Solitamente sono stati acquisiti i segnali su tre scale di tempi: 1  $\mu$ s/divisione, 100  $\mu$ s/divisione, 10 ms/divisione; per ogni traccia sono stati acquisiti

50000 punti. I segnali di assorbimento transiente corrispondenti alle diverse scale di tempi sono poi stati uniti in un'unica curva, che è stata infine sottocampionata in modo da avere un sottoinsieme di 300 punti spazati con intervalli crescenti in modo esponenziale (costanti su scala logaritmica) per un'analisi più agevole e corretta dal punto di vista statistico.

Le curve sperimentali sono normalizzate a 1 al termine dell'impulso laser: in questo modo le cinetiche rispecchiano la frazione di proteina nello stato deossi in funzione del tempo dopo la fotolisi. In condizioni di fotolisi completa questo stato iniziale coincide con una concentrazione di specie deossi pari alla concentrazione totale della proteina; la concentrazione di proteina deossi diminuirà man mano che il CO si rilega.  $N(t)$  rappresenta pertanto la probabilità di sopravvivenza della specie deossi dell'eme al tempo  $t$ . La normalizzazione ad 1 è corretta qualora non ci sia un apprezzabile rilegame del CO fotodissociato durante l'impulso laser, condizione che impone che la velocità della cinetica di rilegame non sia troppo elevata. I punti scelti per la normalizzazione sono quelli che corrispondono alla fine dell'impulso laser ( $\sim 10$  ns dal suo inizio, come misurato da un fotodiodo PIN al silicio). Il valore iniziale misurato per AHb1 ed AHb2 può essere approssimato ad 1 in quanto la fotolisi è totale, come risulta entro l'errore sperimentale (10%) da esperimenti di resa di AHb1 e AHb2 usando l'emoglobina umana HbA come riferimento.<sup>58</sup> Per AHb2 questo procedimento potrebbe introdurre un piccolo errore sistematico, in quanto si osserva una fase di rebinding molto veloce e una parte di molecole di ligando fotodissociate potrebbe rilegare entro la fine dell'impulso laser: bisognerebbe effettuare misure con un laser al picosecondo per essere certi che questo non avvenga, ma finora non è stato possibile. In tutti i casi questo eventuale artefatto è minimizzato dalla corta durata dell'impulso laser (5 ns FWHM) e dall'ampia larghezza di banda del sistema di rivelazione, 500 MHz.

In figura 3.4 sono riportate le cinetiche di rilegame di CO ad AHb1 ed AHb2 in soluzione in funzione della pressione parziale di ligando, nel range che va da 0.1 a 1 atmosfere di CO (corrispondenti a concentrazioni da 0.1 a 1 mM di CO). La temperatura era controllata e fissata a 25 °C; le cinetiche sono state seguite attraverso il segnale di assorbimento transiente a 436 nm. Le curve di rebinding per le due proteine sono molto diverse; in particolare per AHb1 solo una frazione minore (stimabile in pochi percento) di molecole di CO fotodissociate si rilega al ferro emico sulla scala di tempi che va dai nanosecondi ai microsecondi. Al contrario per AHb2 questa fase di rilegame veloce interessa circa il 30% delle molecole fotodissociate. Per entrambe le proteine questa fase rapida è identificabile come rilegame geminato

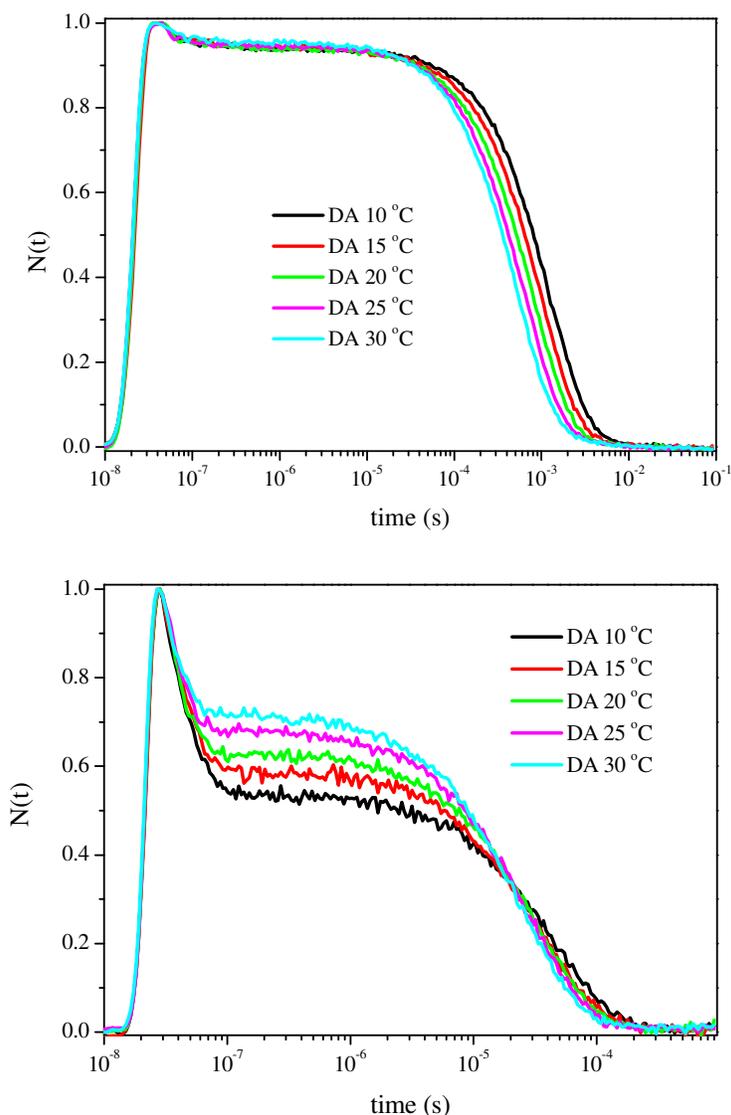
dall'indipendenza mostrata dalla concentrazione di CO che reagisce con la proteina, che dimostra che si tratta di un re-binding dall'interno della matrice proteica. La notevole dipendenza dalla concentrazione di CO del secondo processo fa sì che possa essere facilmente attribuito ad un rilegame dalla soluzione, reazione intrinsecamente bimolecolare. La velocità di rilegame del CO alle due proteine è molto differente, tanto che in AHb2 il processo si completa in un intervallo di tempo due ordini di grandezza inferiore rispetto ad AHb1. Osservando la "coda" temporale delle cinetiche, appare evidente la presenza di un processo lento: infatti, soprattutto per AHb2, si osserva una frazione di proteina, la cui entità cresce al diminuire della concentrazione di CO, che rimane nello stato deossi fino a tempi dell'ordine di 0.1 s. Anche se per AHb1 non si osservano due fasi nettamente distinte, osservando l'ultimo tratto delle curve si può notare come esso divenga più lento e più distribuito nel tempo al diminuire della concentrazione di CO. Sulla base di risultati analoghi ottenuti con altre proteine esacoordinate (per esempio la neuroglobina<sup>21, 89</sup> e l'emoglobina SOLly GBL1 di pomodoro<sup>60</sup>), l'origine di questa frazione di emoglobina che rilega il CO lentamente può essere ragionevolmente attribuita a proteine nelle quali i gruppi eme fotodissociati dal ligando esogeno hanno reagito con il competitore endogeno HisE7, e mostrano pertanto un'affinità verso il CO molto più bassa. Gli esperimenti di LFP forniscono pertanto anche informazioni sulla competizione fra ligando esogeno ed endogeno per la sesta posizione di coordinazione del ferro emico in AHb1 e AHb2. Oltre all'ampiezza, anche la forma della fase geminata è significativa: per AHb2 l'andamento temporale del processo è perfettamente ricostruibile con un decadimento esponenziale semplice, mentre i tentativi per riprodurre la fase geminata di AHb1 con un solo esponenziale, anche *stretched*, non ha dato buoni risultati; il processo è invece perfettamente fittato da due decadimenti esponenziali. Nel prossimo paragrafo questo risultato sarà approfondito e le sue implicazioni discusse.



**Figura 3.4:** Cinetiche di rilegame di CO ad AHb1 (sopra) ed AHb2 (sotto) da esperimenti di LFP in funzione della concentrazione di ligando. Nelle legende sono riportate le concentrazioni di CO a cui è stata misurata ogni cinetica.  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Ulteriori informazioni si ottengono dallo studio delle cinetiche di rebinding a lunghezza d'onda singola su soluzioni di AHb1 e AHb2 in funzione della temperatura. La risposta delle due proteine ad una variazione di temperatura per quanto riguarda il processo di migrazione del ligando all'interno della matrice proteica è infatti molto diversa. In AHb1 la fase geminata è solo marginalmente influenzata dalla variazione di temperatura, mentre in AHb2 la diminuzione di questa provoca un aumento sostanziale dell'ampiezza della fase di rebinding geminato. Questo risultato indica che, mentre per AHb1 il ligando fotodissociato può fuoriuscire facilmente dalla tasca distale, e la dinamica proteica non ha un ruolo rilevante in

questo processo, per AHb2 le fluttuazioni proteiche giocano un ruolo fondamentale nel regolare il passaggio del ligando dalla tasca distale al solvente, come dimostrato dai notevoli effetti della variazione di temperatura sulla velocità di rebinding. Inoltre, all'aumentare della temperatura si osserva un lieve aumento della frazione di molecole che permangono nello stato deossi a tempi lunghi, fase riconducibile al legame dell'istidina distale con il ferro emico, indicando che l'energia di attivazione per il processo di legame di HisE7 è più grande di quella relativa al processo di legame del CO.<sup>21</sup> Il geminato di AHb2 rimane monoesponenziale in tutto il range di temperature esaminato, con un tempo di vita apparente di 14 ns a 20 °C.



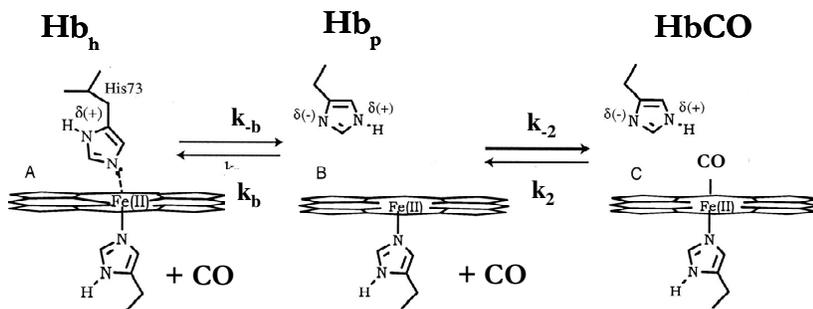
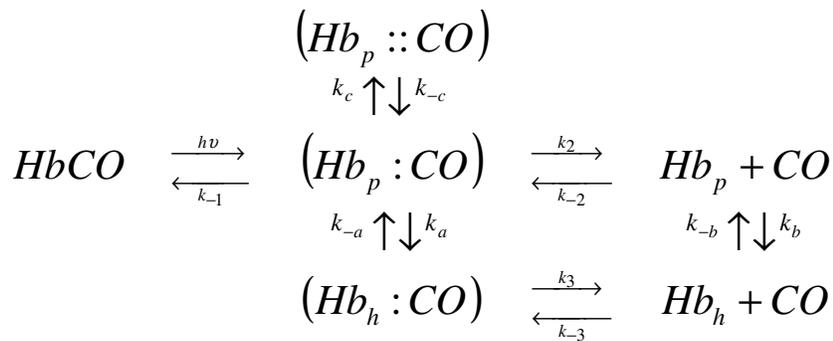
**Figura 3.5:** Cinetiche di rilegame di CO ad AHb1 (sopra) ed AHb2 (sotto) da esperimenti di LFP in funzione della temperatura, riportata nelle legende per ogni curva. [CO] = 1 mM.

### 3.3.1.1 Analisi dei dati

Sulla base delle caratteristiche delle cinetiche di legame del CO misurate con stopped flow e LFP, e tenendo in considerazione le proprietà strutturali emerse dalle analisi spettroscopiche all'equilibrio, è stato definito un modello cinetico che è stato poi utilizzato per descrivere quantitativamente le cinetiche di reazione osservate. Per favorire una costruzione verosimile di questo modello sono state anche sfruttate le ampie conoscenze su emoproteine molto più studiate: è infatti ormai accertato, da numerosi esperimenti sull'emoglobina A<sup>96, 97</sup> e sulla mioglobina<sup>77, 98, 99</sup> in un gran numero di condizioni sperimentali, che le dinamiche proteiche sono fondamentali nel modulare la funzione delle emoproteine. È stato accertato che in alcune emoproteine, che possiedono cavità idrofobiche interne alla matrice proteica, il ligando fotodissociato può migrare transientemente in queste cavità, e questo fenomeno ha un ruolo molto importante nel definire la funzione biologica delle proteine stesse, in quanto permette il *binding* simultaneo di più substrati e il confinamento di intermedi di reazione instabili.<sup>7</sup> In particolare, per la mioglobina è stato dimostrato che il ligando fotodissociato può accedere a cavità interne, o difetti di impacchettamento, con modalità definite dalle fluttuazioni proteiche.<sup>4, 100</sup> Misure criogeniche<sup>100</sup> e di cristallografia a raggi X<sup>101, 102</sup> hanno portato all'identificazione di siti di legame ben definiti all'interno della matrice proteica. Il docking temporaneo del ligando in questi siti dà luogo alla presenza di fasi cinetiche distinte nella cinetica di rebinding dall'interno della matrice proteica. Anche se solo per la mioglobina è stato inequivocabilmente dimostrato, sia dal punto di vista sperimentale<sup>103, 104</sup> che da quello teorico,<sup>105</sup> che la cinetica di rebinding è modulata in modo fondamentale dall'interazione fra i processi di binding del ligando, migrazione dello stesso e rilassamenti strutturali della proteina, tuttavia in varie emoproteine sono state ritrovate fasi cinetiche distinte nel processo di rebinding geminato dopo la fotolisi di complessi di queste proteine con il CO, indice di un percorso complesso di migrazione del ligando all'interno della matrice proteica. Esempi, oltre ovviamente alla mioglobina, sono le emoglobine troncate<sup>106</sup> e l'emoglobina umana A.<sup>107</sup>

Come accennato in precedenza, la fase di rebinding geminato osservata per AHb1 ha una forma non riproducibile perfettamente né da un decadimento esponenziale semplice né da un decadimento esponenziale stretched, lasciando intendere che i rilassamenti strutturali conseguenti alla fotolisi non sembrano essere all'origine della deviazione dal semplice decadimento esponenziale. In analogia a quanto osservato per altre emoproteine, la presenza di un sito di *docking* secondario potrebbe essere all'origine della cinetica osservata, ben descritta

da una somma di due decadimenti esponenziali. Se si vuole costruire un modello cinetico che tenga conto di tutte le caratteristiche delle curve sperimentali, almeno per quel che riguarda AHb1, bisogna dunque aggiungere una “trappola” in cui il ligando può migrare transientemente. Sarà poi necessario tenere conto, oltre ovviamente alla migrazione del ligando verso la soluzione, del binding competitivo fra istidina distale e ligando esogeno che segue la fotodissociazione di quest’ultimo.<sup>15, 60, 72, 89</sup> Lo schema cinetico utilizzato per le analisi numeriche delle curve è il seguente:



**Figura 3.6:** Schema proposto per gli equilibri fra i vari processi che entrano in gioco dopo la fotodissociazione del CO dall’eme (sopra). Le forme  $Hb_p \cdot CO$  ed  $Hb_h \cdot CO$  si riferiscono alla forma rispettivamente pentacoordinata ed esacoordinata del gruppo eme con il CO ancora all’interno della tasca distale;  $(Hb_p :: CO)$  indica un sito interno alla matrice proteica ma differente dalla tasca distale, mentre  $Hb_p + CO$  ed  $Hb_h + CO$  indicano le stesse forme dell’eme con il CO in soluzione.

Nello schema sono esplicitamente inclusi stati multipli di geminato, in analogia con analisi precedenti su mioglobina<sup>108</sup> ed emoglobina.<sup>107</sup> Il modello è stato semplificato trascurando la possibilità di formazione di esacoordinazione mentre il ligando si trova nella “trappola” (indicata con  $(Hb_p :: CO)$  nello schema), il che è accettabile dal momento che i tempi per il

binding dell'istidina distale sono molto più lunghi dei tempi di permanenza del ligando in questo sito di *docking*. Anche la possibilità di uscita in soluzione da questa “trappola” è stata trascurata. Tenendo conto degli equilibri chimici descritti dallo schema cinetico di cui sopra, è possibile modellizzare gli andamenti temporali delle concentrazioni delle specie coinvolte nel processo di rebinding attraverso questo schema di equazioni differenziali:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{PCO}]}{dt} = & -k_{-1}([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) - k_2([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) + k_{-2}([\text{P}_0 + \text{P}][\text{CO}_0] \\ & - k_a([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) + k_{-a}([\text{HCO}_0] + [\text{HCO}]) - k_c([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) \\ & + k_{-c}([\text{TRA}_0] + [\text{TRA}]) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{HCO}]}{dt} = & k_a([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) - k_{-a}([\text{HCO}_0] + [\text{HCO}]) + k_3([\text{HCO}_0 + \text{HCO}]) \\ & - k_{-3}([\text{H}_0] + [\text{H}][\text{CO}_0] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{P}]}{dt} = & -k_{-2}([\text{P}_0] + [\text{P}][\text{CO}_0] + k_2([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) + k_{-b}([\text{H}_0] + [\text{H}]) \\ & - k_b([\text{P}_0] + [\text{P}]) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{H}]}{dt} = & k_3([\text{HCO}_0] + [\text{HCO}]) - k_{-3}([\text{H}_0] + [\text{H}][\text{CO}_0] + k_b([\text{P}_0] + [\text{P}]) \\ & - k_{-b}([\text{H}_0] + [\text{H}]) \end{aligned}$$

$$\frac{d[\text{TRA}]}{dt} = k_c([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) - k_{-c}([\text{TRA}_0] + [\text{TRA}])$$

dove PCO rappresenta lo stato in cui l'eme è pentacoordinato ed il CO si trova all'interno della tasca distale, ovvero ( $Hb_p:CO$ ) nello schema 3.6, HCO la forma con eme esacoordinato e CO in tasca distale ( $Hb_h:CO$ ), P lo stato pentacoordinato con il CO in soluzione ( $Hb_p+CO$ ), H la specie esacoordinata con il CO in soluzione ( $Hb_h+CO$ ) e TRA indica la “trappola” ovvero il sito secondario di *docking* interno alla matrice proteica ( $Hb_p::CO$ ). Le condizioni iniziali sono calcolate prendendo come tempo zero l'istante immediatamente successivo alla fotolisi del CO. Nell'istante iniziale tutta la proteina è pensata nello stato  $Hb_p:CO$ ;  $PCO_0$  coincide dunque con

la concentrazione totale di proteina utilizzata, ammettendo una resa di fotolisi unitaria. La concentrazione iniziale di CO è stata corretta per la dipendenza della solubilità della molecola dalla temperatura.

Data la complessità di questo sistema di equazioni differenziali accoppiate, non è stato possibile ottenere una risoluzione analitica; le equazioni sono state pertanto risolte numericamente per mezzo della funzione ODE15s di MatLab 7.0 (The MathWorks, Inc.). L'accordo tra le curve sperimentali e le soluzioni numeriche ottenute mediante ODE15s è stato ottimizzato mediante una versione per MatLab del pacchetto di minimizzazione Minuit (CERN). I parametri di fitting comprendono le costanti di velocità e le concentrazioni iniziali dei reagenti. Queste ultime sono note a partire dalle condizioni di preparazione dei campioni e dalla configurazione sperimentale che consente di lavorare in fotolisi completa dei campioni. Le analisi numeriche forniscono, all'interno degli errori sperimentali, valori per le concentrazioni che sono consistenti con quelle note. Un'analisi di questo tipo è particolarmente potente perché consente di ricavare direttamente le costanti di velocità microscopiche specifiche per i vari processi che contribuiscono alla cinetica di rebinding: si ottengono pertanto informazioni dirette sulle fasi cinetiche in modo accurato e selettivo, al contrario di quanto avviene quando è possibile solo determinare costanti di velocità apparenti. In questo caso infatti la velocità osservata è comunque data da una combinazione di velocità di reazione dei vari processi microscopici, ma se non si è in grado di separarli l'informazione che si ottiene è molto meno completa.

Per migliorare l'accuratezza del fit, è stata eseguita un'analisi globale fra le curve di Laser Flash Photolysis e quelle alla stessa temperatura di stopped flow presentate nel paragrafo 2.4.1; è infatti evidente che, se lo schema cinetico proposto è corretto, entrambe le curve devono poter essere riprodotte con il sistema di equazioni differenziali sopra presentato, in quanto il sistema che si studia è lo stesso anche se si parte da diverse condizioni iniziali. In particolare negli esperimenti di stopped flow le condizioni di partenza prevedono una proteina completamente deossi ed il CO in soluzione: questa tecnica sarà pertanto particolarmente sensibile alle fasi cinetiche di legame del CO dalla soluzione, quindi all'equilibrio fra le forme 5cHS e 6cLS. In Laser Flash Photolysis invece la condizione iniziale è quella di proteina pentacoordinata con il CO all'interno della tasca dell'eme: la sensibilità maggiore si avrà pertanto nello stimare la competizione fra HisE7 e CO per il rilegame all'eme e più in generale il rebinding dall'interno della proteina. La complementarità di queste due tecniche rende il fit globale uno strumento molto utile per ottenere una serie completa ed affidabile di parametri cinetici. L'unico problema

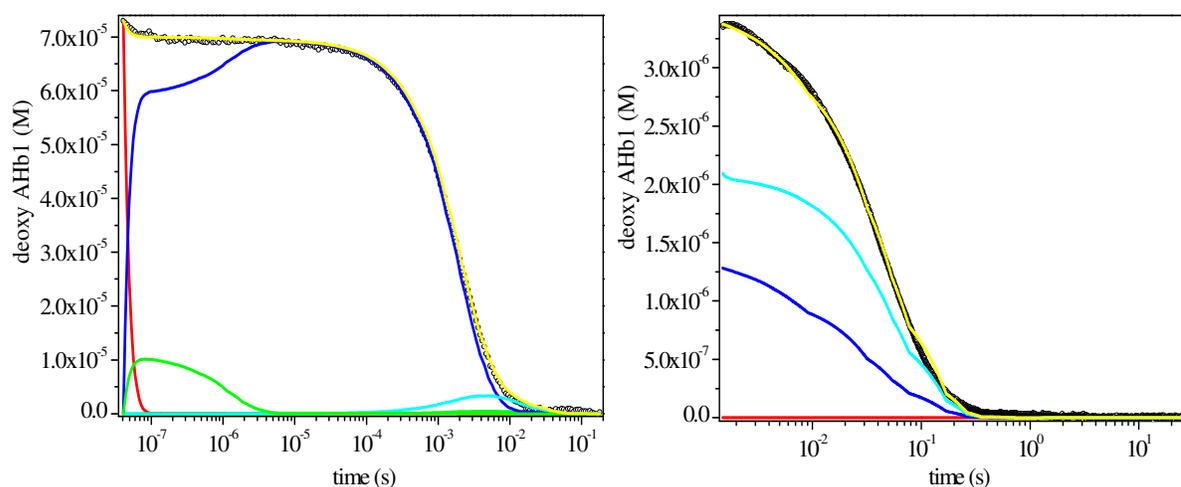
che comporta questo tipo di analisi è che per motivi legati ai setup sperimentali le misure di LFP e di stopped flow devono essere eseguite a concentrazioni di proteina differenti fra loro (circa 5  $\mu\text{M}$  per lo stopped flow e 70  $\mu\text{M}$  per la LFP). Questo sembra modificare l'entità della costante di equilibrio fra la forma pentacoordinata dell'eme e quella esacoordinata in cui il Fe è legato all'istidina distale (Figura 2.14). Dato che i parametri per il legame e distacco dell'istidina distale sono definiti con maggior precisione dalle curve di stopped flow, la stima finale di queste costanti di velocità ottenuta dall'analisi globale potrebbe essere affetta da un errore sistematico che sovrastima la frazione di forma esacoordinata.

L'analisi è stata effettuata nel range di temperature fra 10 e 30 °C, per ottenere informazioni sui parametri di attivazione per i vari processi. Nella figura 3.7 è riportato un esempio dei risultati dell'analisi numerica globale e nella figura 3.8 i plot di Eyring che forniscono i parametri termodinamici dei processi attivati termicamente, secondo l'equazione:

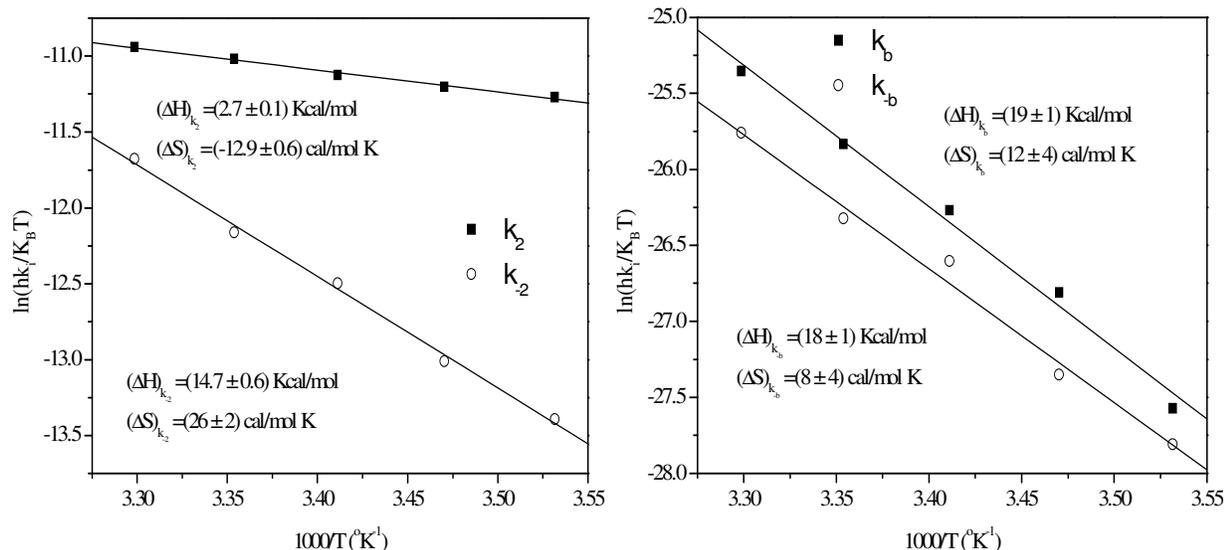
$$\ln\left(\frac{hk}{k_B T}\right) = \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}$$

dove  $R$  è la costante dei gas,  $h$  la costante di Planck e  $k_B$  la costante di Boltzmann.

Si vede dalla figura 3.7 per AHb1, e dalle successive figure per AHb2, che le curve sono ben riprodotte dal modello con un singolo set di parametri e che è possibile seguire nel tempo le variazioni nelle concentrazione di tutte le specie di reazione presenti.



**Figura 3.7:** Risultati dell'analisi globale delle cinetiche di binding del CO ad AHb1 da esperimenti di LFP (a sinistra,  $T=25\text{ °C}$ ,  $[\text{CO}] = 0.3\text{ mM}$ ) e stopped flow (a destra,  $T=25\text{ °C}$ ,  $[\text{CO}] = 0.05\text{ mM}$ ). I fit (linee gialle) sono sovrapposti ai dati sperimentali (cerchi). Le figure mostrano anche gli andamenti temporali delle specie coinvolte nel processo:  $Hb_p::\text{CO}$  (rosso),  $Hb_h::\text{CO}$  (verde),  $Hb_h$  (ciano),  $Hb_p$  (blu),  $Hb_p::\text{CO}$  (verde).

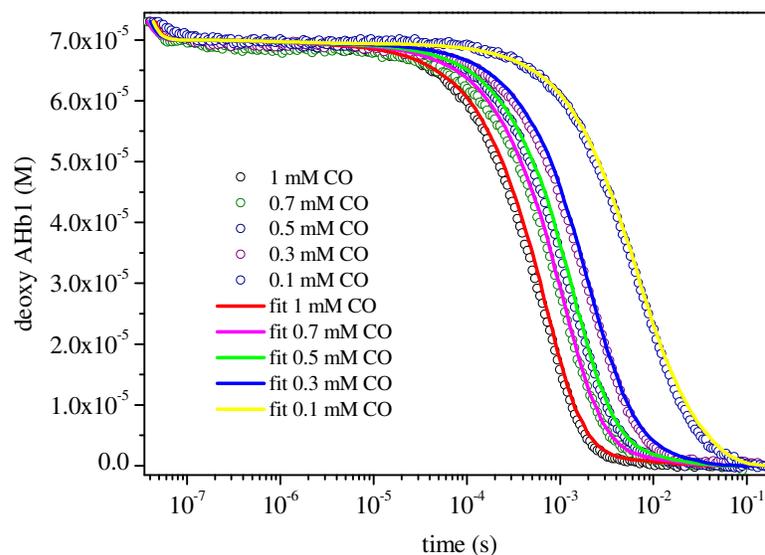


**Figura 3.8:** Grafici di Eyring per alcune delle costanti microscopiche determinate per AHb1 attraverso il fitting delle cinetiche di rebinding a diverse temperature (10-30 °C). Le entalpie  $\Delta H^\ddagger$  ed entropie  $\Delta S^\ddagger$  di attivazione, insieme alle costanti di velocità a 20 °C, sono riportate anche in Tabella 3.1.

I buoni risultati numerici illustrati dalle figure 3.7 e 3.8 per AHb1 mostrano che il modello è consistente con le curve sperimentali; la piccola fase geminata di questa proteina e l'alta velocità per il processo di uscita in soluzione ( $k_2$ ) suggeriscono l'esistenza di un agevole canale di uscita per il ligando dalla tasca distale verso il solvente. La fase geminata di AHb1 è inoltre ben descritta dalla competizione fra l'uscita del CO in soluzione e la migrazione temporanea di questo con velocità abbastanza elevata ( $k_c$ ) in un sito secondario di *docking*, da cui poi il ligando torna in tasca distale (con velocità data da  $k_{-c}$ ) e può uscire poi in soluzione. La popolazione della trappola dipende dalla temperatura in modo molto debole, suggerendo che la via di accesso a questa dalla tasca distale sia "aperta" e non richieda assistenza da parte della dinamica proteica, per esempio con movimento di catene laterali di amminoacidi. L'analisi dei dati ha evidenziato che il ruolo degli equilibri interni fra forma esacoordinata e pentacoordinata dell'eme (costanti di velocità  $k_3$ ,  $k_{-3}$ ,  $k_a$ ,  $k_{-a}$ ) nel determinare la cinetica di rebinding è minimo. Le analisi forniscono invariabilmente valori per queste costanti di velocità che sono di ordini di grandezza inferiori a quelle relative agli altri processi: questi processi sono stati pertanto trascurati nel seguito delle analisi. L'evoluzione temporale delle specie transienti visibili nella curva di stopped flow per AHb1 in figura 3.7 evidenzia gli effetti della presenza di un equilibrio fra la forma esacoordinata e quella pentacoordinata della proteina nello stato deossi: i contributi relativi delle due specie alla cinetica di rebinding complessiva sono chiaramente distinguibili. Nelle curve di LFP invece solo a tempi dell'ordine dei millisecondi si inizia ad osservare

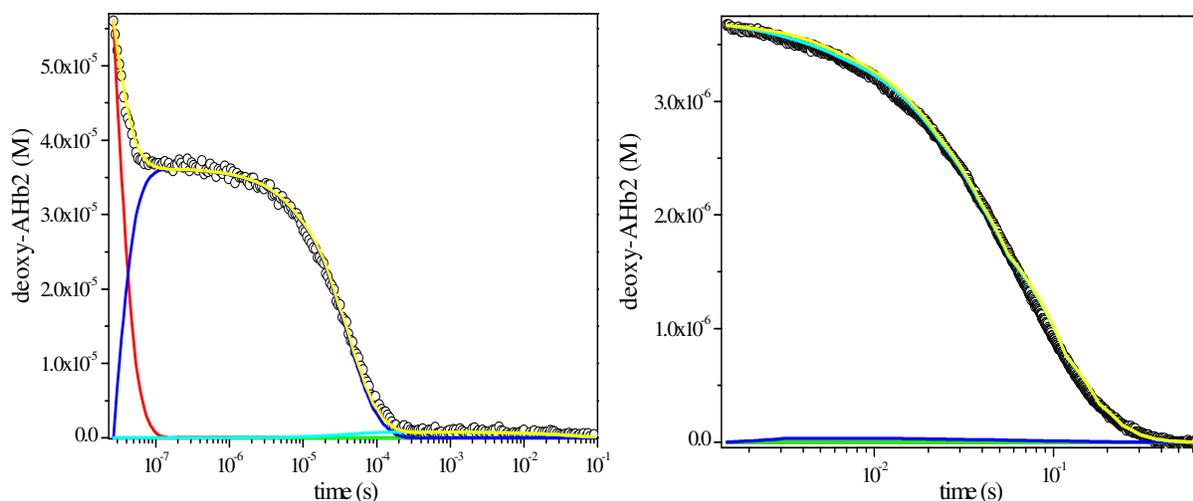
competizione fra l'istidina distale ed il CO: la formazione di una frazione di proteina la cui esacoordinazione è completata da HisE7 è rappresentata dalla linea ciano. Su scale di tempi ancora più lunghe questa specie transiente scompare per lasciare il posto alla proteina carbossi. Le costanti di velocità microscopiche  $k_b$  e  $k_{-b}$  sembrano riprodurre fedelmente entrambe le curve nonostante la dipendenza dell'equilibrio esa/penta dalla concentrazione di proteina, ma va sottolineato che l'ampiezza del processo di legame di HisE7 è molto piccola nelle curve di LFP, il che le rende poco sensibili alla variazione di questi parametri. Fittando la curva di stopped flow di figura con un doppio decadimento esponenziale si sono ottenuti tempi di vita di 41 ms (35%) e 120 ms (65%): due specie che rilegano su scale di tempi molto diversi e le cui frazioni sono in accordo con la proporzione, stimata da spettri di assorbimento all'equilibrio come visto nel paragrafo 2.3, fra la forma 5cHS (40%) e 6cLS (60%).

I risultati numerici ottenuti dall'analisi di cui sopra ad una data temperatura sono stati verificati ed ottimizzati mediante un fit globale sulle cinetiche di LFP acquisite in funzione della concentrazione di CO alla stessa temperatura. Se i parametri cinetici sono esatti, le stesse costanti di velocità devono infatti poter riprodurre tutte le curve, al variare unicamente dalla concentrazione di CO. Come si può osservare in figura 3.9, tutte le cinetiche sono descritte accuratamente dai parametri ottenuti attraverso l'analisi globale, con correzioni minime per le costanti di velocità e le concentrazioni di CO, confermando l'accuratezza del modello e la stabilità dei parametri ottenuti.

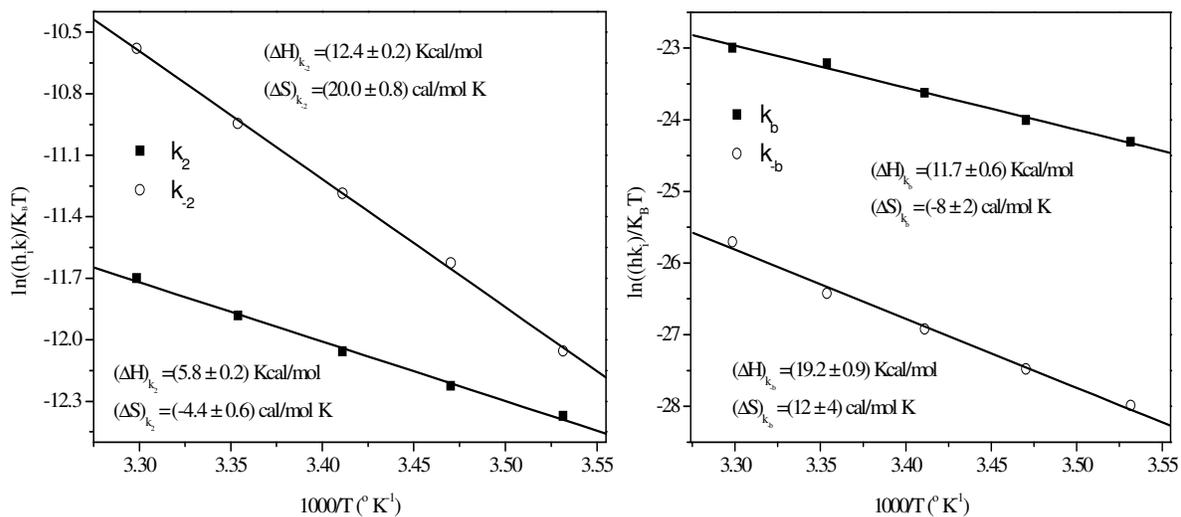


**Figura 3.9:** Risultati dell'analisi globale sulle cinetiche di rebinding del CO ad AHb1 da esperimenti di LFP a diverse concentrazioni di CO; T= 25 °C. I dati sperimentali sono rappresentati dai cerchi, e le linee rappresentano i risultati ottenuti dai fit migliori utilizzando lo schema di equazioni differenziali sopra presentato. I colori che indicano le diverse pressioni parziali di CO sono indicati nella legenda.

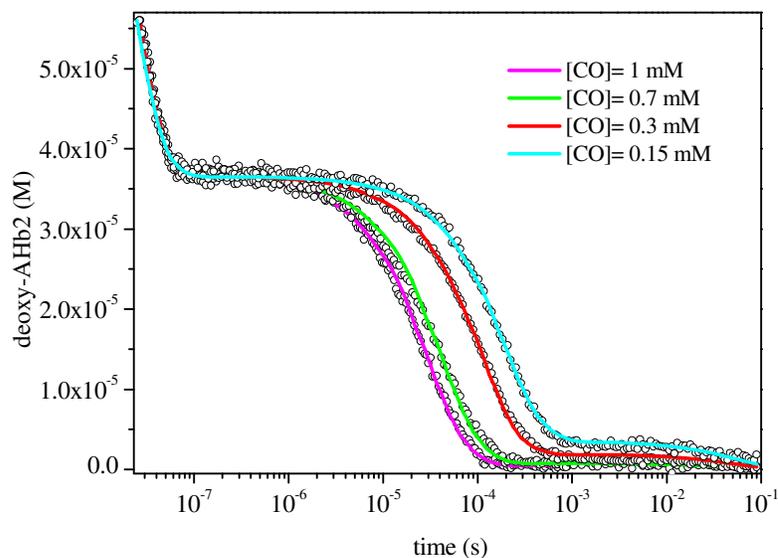
Per quanto riguarda AHb2, per descrivere la cinetica di re-binding del CO è sufficiente un modello semplificato (vedi figura 3.10 per un esempio). Nelle curve di LFP si osserva una sola fase di re-binding geminato, senza evidenze per il *docking* del ligando in siti secondari interni alla matrice proteica; il CO raggiunge dunque il solvente attraverso un processo fortemente dipendente dalla temperatura e pertanto regolato dalla dinamica proteica e dalle fluttuazioni conformazionali che possono aprire canali di uscita verso la soluzione. L'andamento temporale delle curve di stopped flow è interamente determinato dal distacco dell'istidina distale che precede il legame fra eme e CO, in accordo con i risultati degli spettri Raman e di assorbimento che prevedevano una proteina deossi puramente esacoordinata. Dalle curve di LFP risulta inoltre che HisE7 compete con il CO per il sesto legame di coordinazione dell'eme nel range di tempi delle centinaia di microsecondi, per venire poi lentamente rimpiazzata dal CO; il processo si completa entro 1 s. La separazione temporale fra l'evento di legame dell'istidina distale al ferro emico e il successivo distacco ha permesso di distinguere questi processi molto chiaramente nelle curve di LFP. Anche in questo caso gli equilibri interni sono molto lenti rispetto agli altri processi, per cui non incidono nel definire la cinetica di rilegame; di conseguenza le costanti di velocità associate a questi ( $k_3$ ,  $k_{-3}$ ,  $k_a$ ,  $k_{-a}$ ) sono di nuovo trascurabili. Anche per AHb2 le analisi sono state eseguite in funzione della temperatura, per ottenere i parametri di attivazione dei vari processi coinvolti nel definire il re-binding (figura 3.11); un'analisi globale delle cinetiche di legame del CO a seguito della fotolisi in funzione della concentrazione di CO ha confermato la stabilità dei risultati numerici ottenuti (figura 3.12).



**Figura 3.10:** Risultati dell'analisi globale delle cinetiche di binding del CO ad AHb2 da esperimenti di LFP (a sinistra, T= 25 °C, [CO] = 0.7 mM) e stopped flow (a destra, T= 25 °C, [CO] = 0.05 mM). I fit (linee gialle) sono sovrapposti ai dati sperimentali (cerchi). Le figure mostrano anche gli andamenti temporali delle specie coinvolte nel processo:  $Hb_p:CO$  (rosso),  $Hb_h:CO$  (verde),  $Hb_h$  (ciano),  $Hb_p$  (blu).



**Figura 3.11:** Grafici di Eyring per alcune delle costanti microscopiche determinate per AHb2 attraverso il fitting delle cinetiche di rebinding a diverse temperature (10-30 °C). Le entalpie  $\Delta H^{\ddagger}$  ed entropie  $\Delta S^{\ddagger}$  di attivazione, insieme alle costanti di velocità a 20 °C, sono riportate anche in Tabella 3.1.



**Figura 3.12:** Risultati dell'analisi globale sulle cinetiche di rebinding del CO ad AHb2 da esperimenti di LFP a diverse concentrazioni di CO;  $T = 25$  °C. I dati sperimentali sono rappresentati dai cerchi, e le linee rappresentano i risultati ottenuti dai fit migliori utilizzando lo schema di equazioni differenziali sopra presentato. I colori che indicano le diverse pressioni parziali di CO sono indicati nella legenda.

**Tabella 3.1:** Costanti di velocità microscopiche a 20 °C, entropie ed entalpie di attivazione per i vari processi implicati nella definizione della cinetica di rebinding del CO, ottenuti da fit globali su dati di LFP e stopped flow.

	AHb1			AHb2		
	$k$	$\Delta S^\ddagger$ (cal/mol K)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$k$	$\Delta S^\ddagger$ (cal/mol K)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)
$k_{-1}$ ( $10^6 \text{ s}^{-1}$ )	5.13	-	-	22.2	-	-
$k_2$ ( $10^7 \text{ s}^{-1}$ )	9	$-12.9 \pm 0.6$	$2.7 \pm 0.1$	3.5	$-4.4 \pm 0.6$	$5.8 \pm 0.2$
$k_{-2}$ ( $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	2.26	$26 \pm 2$	$14.7 \pm 0.6$	7.7	$20.0 \pm 0.8$	$12.4 \pm 0.2$
$k_b$ ( $\text{s}^{-1}$ )	23.5	$12 \pm 4$	$19 \pm 1$	334	$-8 \pm 2$	$11.7 \pm 0.6$
$k_{-b}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	14.5	$8 \pm 4$	$18 \pm 1$	12	$12 \pm 4$	$19.2 \pm 0.9$
$k_c$ ( $10^7 \text{ s}^{-1}$ )	2.07	-	-	-	-	-
$k_{-c}$ ( $10^7 \text{ s}^{-1}$ )	0.25	-	-	-	-	-

La differenza nell'ampiezza della fase geminata osservata per le due proteine è principalmente dovuta ai differenti valori di  $k_{-1}$  (vedi tabella 3.1); il processo di rilegame diretto dalla tasca dell'eme non presenta attivazione termica nel range di temperature indagato, come osservato per mioglobina,<sup>108, 109</sup> HbA umana<sup>110</sup> e neuroglobina.<sup>88, 89</sup>

Negli esperimenti di stopped flow, la cinetica di binding ad alte concentrazioni di CO in AHb2 è determinata in larga misura dalla costante di velocità di dissociazione di HisE7 ( $k_{-b}$ ),<sup>89</sup> così come la fase lenta della cinetica bifasica osservata negli esperimenti di stopped flow su AHb1; in questi ultimi, la parte veloce è invece dovuta al rebinding alla forma 5cHS. Il valore di  $k_{-b}$ , molto simile per le due proteine, è compatibile con determinazioni precedenti ( $\sim 40 \text{ s}^{-1}$ ).

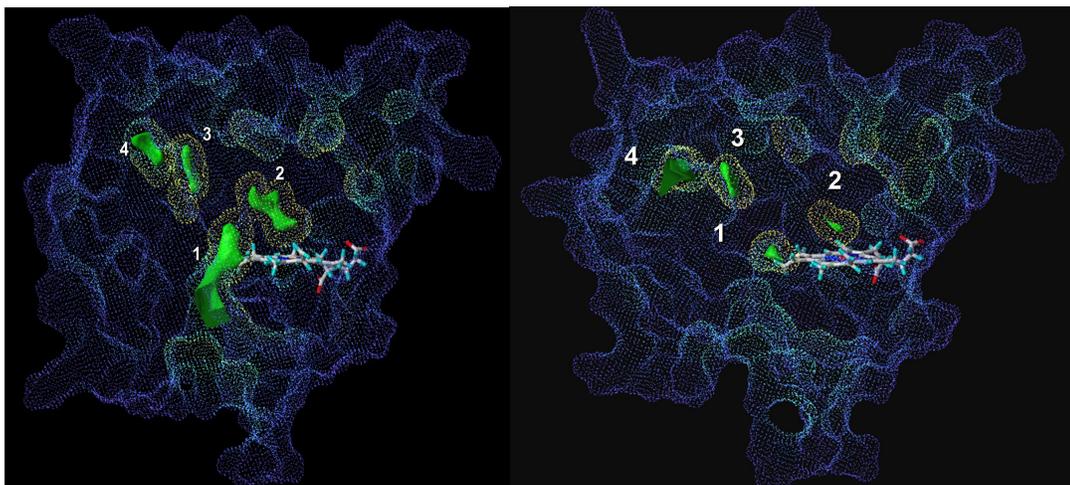
<sup>21</sup> In AHb1 i valori di  $k_b$  e  $k_{-b}$  sono confrontabili fra loro, in accordo con la presenza di un equilibrio fra le forme 5cHS e 6cLS nello stato deossi  $\text{Fe}^{2+}$ , come visto anche per la proteina SOLly GLB1 di pomodoro;<sup>60</sup> al contrario in AHb2 nella forma deossi  $\text{Fe}^{2+}$  è fortemente favorito lo stato 6c dal momento che  $k_b \gg k_{-b}$ . Per entrambe le proteine, il valore relativamente piccolo di  $k_b$  rispetto alle costanti di velocità degli altri processi fa sì che il ligando endogeno si leghi all'eme con scarsa efficienza nella scala di tempi degli esperimenti di LFP. L'evidenza sperimentale della fase lenta di sostituzione dell'istidina distale da parte del CO è molto più marcata nelle curve di rebinding di AHb2 a causa dei più grandi valori delle costanti di velocità  $k_{-2}$  e  $k_b$  di questa proteina.

Per quanto riguarda i parametri di attivazione ottenuti dai plot di Eyring, per il processo di rilegame dalla soluzione (costante di velocità associata  $k_2$ ) i valori dell'entalpia di attivazione e dell'entropia risultano molto simili per le due proteine (vedi tabella 3.1), suggerendo che la barriera sia determinata dalla viscosità della soluzione.<sup>89</sup> Il processo di uscita in soluzione ( $k_2$ ) presenta invece una barriera più elevata in AHb2. Lo step di legame dell'istidina distale ( $k_b$ ) è caratterizzato da una barriera entalpica minore in AHb2 rispetto ad AHb1, in accordo con il fatto che in AHb2 il legame di HisE7 è più favorito e dunque questa fase è più visibile che non in AHb1. I termini entropici sono invece molto simili. Per quanto riguarda il processo di distacco dell'istidina distale ( $k_b$ ) la barriere entalpiche (18-19 kcal/mol) ed entropiche sono le stesse per entrambe le proteine. Determinazioni precedenti dei parametri di attivazione per  $k_b$  in un'emoglobina di *A. thaliana* hanno fornito valori di entalpia di 22.5 kcal/mol,<sup>21</sup> risultato confrontabile con quanto ottenuto dall'analisi descritta sopra, che risulta pertanto ragionevole. Un'altra conferma viene dai valori ottenuti per l'entalpia di attivazione associata al distacco del ligando endogeno nella neuroglobina umana<sup>21</sup> e di topo,<sup>89</sup> rispettivamente 24 kcal/mol e  $25 \pm 1$  kcal/mol.

### 3.3.1.2 Discussione dei risultati

Questi primi risultati sull'analisi di cinetiche di rilegame di CO alle due emoglobine di *A. thaliana* mostrano che ci sono profonde differenze nella reattività di queste due proteine. In particolare è ricca di implicazioni la diversità della fase di rebinding geminato, sia nella forma e nell'ampiezza che nella dipendenza dalla temperatura. Infatti, trattandosi di un rilegame dall'interno della matrice proteica, rispecchia il percorso di migrazione del ligando attraverso questa e verso il solvente. Non essendo per il momento disponibili dati strutturali cristallografici di AHb1 ed AHb2, per mettere in relazione le cinetiche osservate con le strutture proteiche queste ultime sono state simulate per *homology modeling*<sup>111</sup> con il programma SwissPdbViewer usando la struttura cristallina dell'emoglobina di riso Hb1 (codice PDB 1d8u) come *template*. AHb1 ed AHb2 presentano un'affinità di sequenza con rice Hb1 rispettivamente del 66% e del 54%. Le strutture terziarie delle due proteine di *Arabidopsis* sono state ottenute sostituendo la struttura primaria dell'emoglobina di riso con la sequenza amminoacidica di AHb1 ed AHb2 usando i *tools* MUTATE e CHARMM di SwissPdbViewer. Questo metodo si è infatti dimostrato piuttosto affidabile nel predire la struttura terziaria di altre

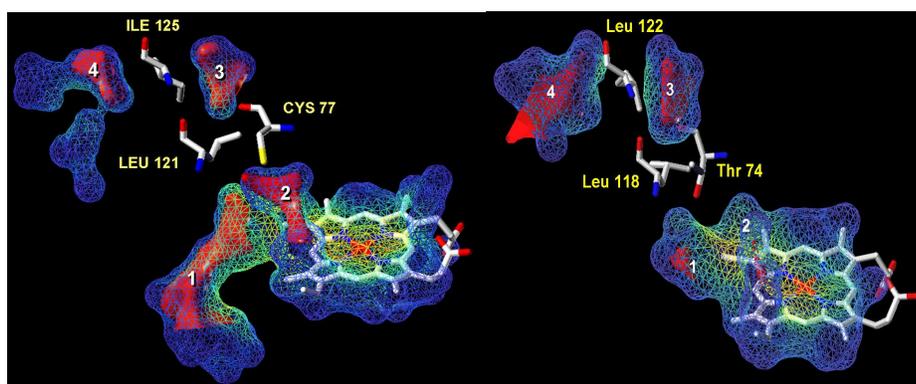
emoglobine di pianta, come la leg-emoglobina della soia.<sup>111</sup> Le strutture ottenute sono poi state analizzate con Sybil versione 7.0 ([www.tripos.com](http://www.tripos.com)); gli idrogeni sono stati aggiunti usando i *tools* Biopolymer e Built/Edit e la loro energia è stata minimizzata con l'algoritmo di Powell su 1500 cicli. A questo punto è stata effettuata un'analisi della posizione e dell'accessibilità delle cavità interne alle due proteine utilizzando il *tool* di Sybil MOLCAD per costruire le superfici di Connolly per le intere proteine, servendosi di una sfera dal raggio di 1.4 Å di raggio come *probe*.<sup>110</sup> La sfera, rotolando sulla superficie accessibile della proteina, ricostruisce le zone concave e convesse di questa, in base alla presenza di atomi esposti al solvente oppure disposti in modo tale da formare cavità. La figura 3.13 ricostruisce le strutture terziarie di AHb1 ed AHb2, colorate in funzione della profondità della cavità rinvenute, calcolata utilizzando una seconda sfera di *probe* dal raggio di 6 Å, incapace dunque di introdursi nella cavità più piccole. La distanza fra le mappe di superficie generate da questi due *probe* fornisce una misura diretta della profondità delle cavità.<sup>112</sup> Le regioni proteiche che si protendono verso l'esterno sono riportate in blu, mentre le cavità sono verdi, gialle e arancioni al crescere della profondità. Inoltre le superfici di AHb1 ed AHb2 sono state analizzate con un *probe* dal raggio decrescente (fino ad 1 Å) per indagare più a fondo l'accessibilità dei potenziali siti di binding e dei percorsi di migrazione per il CO. Non sono stati osservati cambiamenti sostanziali nelle superfici, a parte un ovvio aumento nella dimensione delle cavità al diminuire del raggio del *probe*. Le cavità sono poi state analizzate direttamente con il programma PASS,<sup>113</sup> disponibile su internet (<http://www.ccl.net/cca/software/UNIX/pass/overview.shtml>). È stata inclusa la presenza di tutti gli atomi di idrogeno usando l'opzione *hydrogen*, e l'accessibilità dei tunnel interni è stata investigata utilizzando un *probe* di default dal raggio di 1.5 Å. L'area ed il volume delle cavità identificate sono poi stati stimati con il software Grasp (<http://trantor.bioc.columbia.edu/grasp/>),<sup>114</sup> e sono riassunti in tabella 3.2. Infine è stato identificato il carattere idrofobico di queste cavità utilizzando il software di *modeling* molecolare GRID versione 22°,<sup>115</sup> ([www.moldiscovery.com](http://www.moldiscovery.com)) usando un atomo di Xe come *probe*; questa procedura, testata recentemente sulla mioglobina,<sup>110</sup> ha riprodotto correttamente le quattro cavità Xe1, Xe2, Xe3 e Xe4 identificate con cristallografia a raggi X.<sup>4</sup> Le regioni energeticamente e stericamente favorevoli alla presenza di queste cavità idrofobiche, che potrebbero avere un ruolo nel modulare la dinamica del ligando, sono colorate in verde in figura 3.13.



**Figura 3.13:** Profili per le superfici di Connolly e dislocazione delle cavità interne identificate per AHb1 (a sinistra) ed AHb2 (a destra). Le superfici puntinate sono state costruite usando il tool MOLCAD di Sybyl in funzione della profondità (vedi testo). Le regioni contornate in verde corrispondono ai punti di maggior probabilità di binding dello Xe (cavità idrofobiche), identificate con il software GRID. Tutte le cavità non indicate in figura sono isolate, o connesse direttamente al solvente.  
58

**Tabella 3.2:** Superfici e volume delle cavità rinvenute da PASS in AHb1 ed AHb2, calcolate usando Grasp (vedi testo).  
58

cavity #	1	2	3	4	total
		AHb1			
area ( $\text{\AA}^2$ )	212	145	109	166	632
volume ( $\text{\AA}^3$ )	150	83	67	113	412
		AHb2			
area ( $\text{\AA}^2$ )	60	67	71	140	338
volume ( $\text{\AA}^3$ )	33	33	43	96	205



**Figura 3.14:** Visione ravvicinata del sistema di cavità di AHb1 (a sinistra) ed AHb2 (a destra). Il gruppo eme e i residui critici per la comunicazione fra le varie cavità sono mostrati in *capped sticks*. Le regioni stericamente ed energeticamente favorevoli per il binding idrofobico dello Xe sono disegnate in rosso.  
58

La differenza nell'estensione e nel volume delle cavità per le mappe della superficie di Connolly costruite per AHb1 ed AHb2 è evidente a prima vista ed è confermata dai valori numerici di area e volume di queste cavità (tabella 3.2; calcolati come descritto sopra con il programma Grasp). Particolarmente significativa è la presenza, in AHb1, di un profondo canale idrofobico (indicato nelle figure come cavità 1) che connette la tasca dell'eme con il solvente attraverso la cavità distale (cavità 2), ed in generale di un sistema di cavità esteso ed interconnesso (figura 3.14). Il canale idrofobico è assente nell'emoglobina omologa di riso utilizzata come *template* per costruire le strutture tridimensionali delle proteine di *Arabidopsis*, in cui si ha solo una piccola cavità posizionata sopra il gruppo eme, dal volume di appena 24 Å<sup>3</sup>. Inoltre in AHb1 si osserva anche una profonda cavità (numero 4) sulla superficie proteica, accessibile dalla tasca distale attraverso un'altra cavità (numero 3) con il movimento di pochi amminoacidi. In AHb2, il canale idrofobico presente in AHb1 è ostruito dalla catena laterale di Leu 147; in AHb1 il corrispondente residuo è un'alanina, amminoacido dalla catena laterale con un piccolo ingombro sterico che permette quindi la comunicazione con l'esterno. Pertanto in AHb2 la cavità distale non è direttamente accessibile dal solvente; inoltre la cavità 1 è molto ridotta rispetto alla corrispondente in AHb1. In AHb2 anche la comunicazione fra le cavità 1 e 2 è interrotta, a causa della presenza dei residui Phe32 e Val 114 (in AHb1 i corrispettivi sono Le35 e Ala117, entrambi più piccoli), e la ridotta dimensione delle cavità 2 e 3 suggerisce una migrazione del ligando all'interno della matrice proteica più difficoltosa, quindi maggiormente dipendente dalla dinamica della proteina. Sempre in AHb2, la cavità 4 è connessa direttamente con il solvente su un lato, mentre sull'altro è collegata alla cavità 3 attraverso il movimento della catena laterale di Leu122. Il volume totale delle cavità presenti in AHb1 è simile ma leggermente maggiore di quello dei canali apolari finora studiati di neuroglobina e proteine troncate,<sup>116</sup> anche se un paragone quantitativo è reso difficoltoso dalle diverse tecniche e condizioni utilizzate per identificare le cavità e stimarne il volume. In tutti i casi, si può affermare che la struttura di AHb1 sembra permettere una rapida migrazione di ligandi dalla tasca dell'eme ad altri siti di binding interni alla matrice proteica o verso il solvente, in generale accordo con il carattere della fase cinetica di rebinding geminato osservata per questa proteina attraverso gli esperimenti di LFP: il geminato è infatti scarsamente dipendente dalla temperatura (poca influenza da parte della dinamica proteica in quanto le cavità sono ben interconnesse fra loro), non è rappresentabile da un esponenziale semplice (presenza di più siti di *docking* all'interno della proteina che originano fasi distinte di rebinding geminato) ed è di ampiezza molto piccola, in accordo con la presenza del grande canale idrofobico attraverso cui

il CO può facilmente uscire in soluzione. Fasi geminate piccole a temperatura ambiente sono state riportate anche per soluzioni di neuroglobina<sup>89</sup> e per emoglobine troncate;<sup>117</sup> in effetti il tunnel apolare di AHb1 ricorda fortemente i canali idrofobici trovati nelle emoglobine troncate,<sup>106, 116, 118</sup> e nella neuroglobina,<sup>24, 34</sup> anche se non c'è una grossa sovrapposizione fra le zone interessate dal sistema di cavità per queste proteine. Per AHb2, invece, l'assenza del tunnel apolare e la scarsa interconnessione fra le cavità sono in accordo con una fase di rebinding geminato più ampia, monoesponenziale (solo dalla tasca distale) e fortemente modulata dalla dinamica proteica (le fluttuazioni proteiche aumentano con la temperatura).

Va comunque ricordato che, nonostante l'affidabilità del metodo utilizzato per ricostruire le strutture di AHb1 ed AHb2, non è detto che i dettagli sulle posizioni e sul volume delle cavità siano corretti, in quanto sono determinati su strutture costruite per *homology modeling* su un'emoglobina di riso nello stato Fe<sup>3+</sup>. Inoltre la struttura CO-bound potrebbe essere differente da quelle sopra presentate, a causa di riarrangiamenti conformazionali dovuti al legame del CO, come è stato visto per la neuroglobina.<sup>34</sup> Solo quando si saranno ottenute le strutture cristalline di AHb1 ed AHb2 si potranno avere informazioni certe; tuttavia le caratteristiche delle strutture presentate si accordano in modo molto soddisfacente con i dati sperimentali, il che se non una conferma è comunque un'indicazione della bontà dei risultati ottenuti. Si può certamente dire che per AHb1 ed AHb2 le interazioni fra i residui della cavità distale, il gruppo eme ed il ligando sono significativamente diverse. La grande differenza nella reattività verso ligandi esogeni sembra essere correlata ad un sistema di cavità idrofobiche interne molto diverso per le due proteine. Come sarà discusso nel seguito in modo più completo, questa caratteristica, insieme alle diverse modalità e livelli di espressione, fa pensare ad una funzione biologica distinta per le due proteine di *Arabidopsis*. In particolare, diverse delle proprietà funzionali e strutturali di AHb1 sembrano correlate a quelle di proteine (neuroglobina, emoglobine troncate) per cui è stata proposta una funzione biologica di NO *scavenger*, ruolo proposto anche per la stessa AHb1 (paragrafo 1.3.1).

### 3.3.2 Spettri di assorbimento transiente

Lo studio dell'evoluzione temporale dello spettro di assorbimento successivamente alla fotolisi rappresenta una importante sorgente di informazioni sulla natura dei processi che avvengono. Tale caratterizzazione ha consentito di evidenziare fenomeni di rilassamento strutturale in mioglobina ed emoglobina<sup>77, 119-121</sup> distinguendoli dal processo di legame del CO all'eme, grazie alle diverse caratteristiche spettrali.

Sono state pertanto effettuate misure per determinare gli spettri differenza in funzione del tempo a seguito di fotolisi su soluzioni di COAHb1 e COAHb2. Si sono effettuati un numero limitato di esperimenti a temperatura ambiente per valutare la presenza di possibili rilassamenti strutturali e le loro caratteristiche spettrali. Tale approccio consente anche di individuare opportune regioni spettrali in cui si possa riconoscere un contributo dovuto esclusivamente al processo di legame del CO, in modo da utilizzare le informazioni cinetiche per poter studiare la semplice reattività in assenza di fenomeni sovrapposti di natura strutturale. Una volta fatto questo è possibile limitarsi agli studi a singola lunghezza d'onda, certamente più versatili, ed in grado di fornire informazioni più precise sul decorso temporale dei processi di legame. Inoltre, a causa della loro durata temporale (circa 5-6 ore), gli esperimenti in cui si determinano spettri risolti nel tempo possono portare più facilmente alla degradazione del campione. Da ultimo, conviene osservare che la risoluzione temporale di questi esperimenti è inferiore a quella degli esperimenti a singola lunghezza d'onda, a causa della vicinanza della regione spettrale di monitoraggio (di solito 380-480 nm) alla lunghezza d'onda degli impulsi laser (532 nm). Questo rende difficile lo studio delle fasi più veloci del processo di re-binding con il conseguente effetto, soprattutto per AHb2, di perdere una parte consistente della cinetica. Nonostante le numerose difficoltà sperimentali, i risultati delle misure effettuate consentono di trarre importanti conclusioni.

Come già discusso nel paragrafo 3.2, l'esperimento consiste nella misura dello spettro di AHbCO (quindi prima dell'arrivo dell'impulso laser) e del fotoprodotto, a diversi ritardi temporali dopo la fotodissociazione, a temperatura ambiente. Si ottiene quindi una serie di spettri-differenza (fotoprodotto meno forma legata al CO all'equilibrio) su cui è possibile effettuare un'analisi SVD (Singular Value Decomposition).<sup>122</sup> L'analisi SVD presentata in seguito è stata eseguita con MatLab (TheMathworks, Inc., Natick, MA). Nel caso in esame la matrice di dati D è composta da valori di assorbimento misurati in funzione di due variabili: la lunghezza d'onda definisce le righe ed il ritardo temporale dall'impulso laser a cui si acquisisce

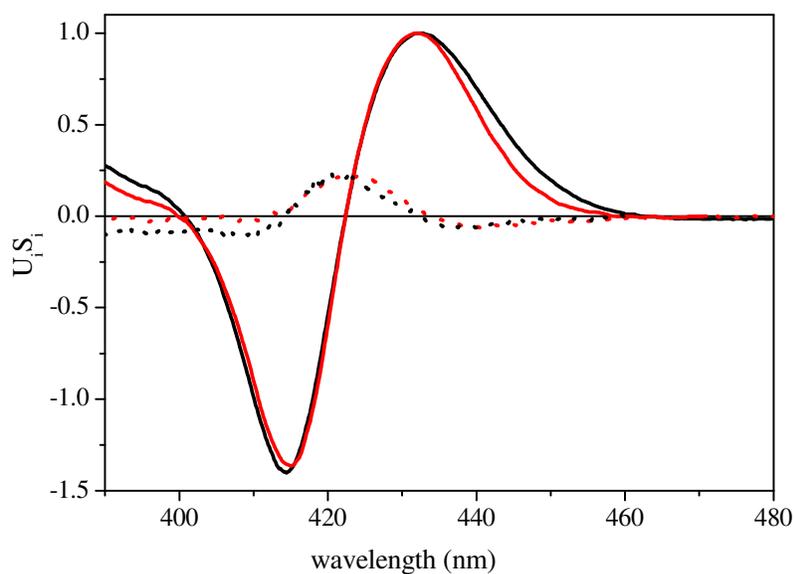
il segnale (precisamente l'intervallo temporale fra l'arrivo del fascio di fotolisi e l'abilitazione dell'intensificatore di immagine della CCD) le colonne. L'analisi di Singular Value Decomposition su D può essere scritta come:

$$D = USV^T$$

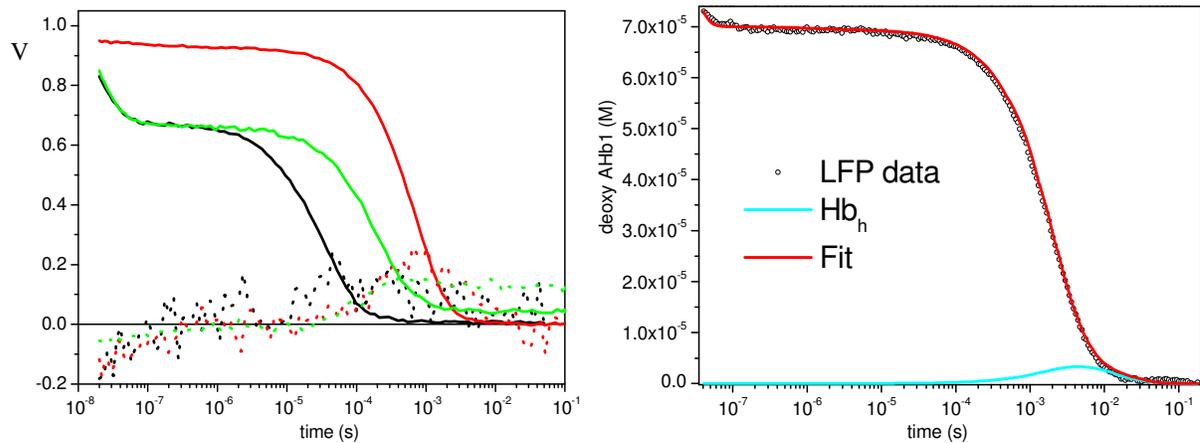
dove le colonne della matrice U sono un set di spettri linearmente indipendenti che formano una base ortonormale, le colonne di V descrivono la dipendenza dal tempo delle ampiezze di questi spettri ( $V^T$  è la matrice trasposta di V) ed S è una matrice quadrata diagonale dai valori singolari non negativi che corrispondono alla radice quadrata degli autovalori per i vettori in U (che rappresentano gli autovettori di  $DD^T$ ) e V (che rappresentano gli autovettori di  $D^TD$ ). Molti dei componenti di alto ordine dell'SVD non contengono informazioni spettrali; sono rumore, con una dipendenza temporale casuale. Un primo criterio per la selezione dei componenti utilizzabili è l'entità dei valori singolari associati: più sono alti più sono significativi. Si può poi effettuare un'ulteriore verifica valutando l'autocorrelazione delle colonne corrispondenti di U e V e conservando solo le componenti per cui l'autocorrelazione risulta superiore a 0.8.<sup>122</sup> Alla fine dell'analisi quello che si ottiene sono le componenti non correlate fra loro, ovvero generate da processi fisici indipendenti, dello spettro-differenza, e la loro evoluzione temporale.

Negli esperimenti di LFP su AHb1 ed AHb2 solo le prime due componenti calcolate dall'analisi sono state ritenute dotate di significato fisico (figura 3.15). La prima, con il valore singolare più alto, è associata al cambiamento spettrale fra la specie carbossi della proteina e quella deossi, e riproduce quindi la cinetica di rebinding del ligando. In effetti, l'andamento temporale dell'ampiezza associata a questa componente dovrebbe essere sovrapponibile (entro gli inevitabili errori sperimentali) con le cinetiche misurate a lunghezza d'onda singola nelle stesse condizioni sperimentali, cosa che in effetti avviene, come mostrato in figura 3.17. La seconda componente ottenuta dall'analisi SVD, pur se di intensità molto minore rispetto alla prima (i valori singolari sono  $S_1 = 26.9$  contro  $S_2 = 0.4$  per AHb1 e  $S_1 = 9.6$  contro  $S_2 = 0.16$  per AHb2, ad 1 mM CO, il che dà origine a un rapporto segnale/rumore molto peggiore) è comunque molto interessante in quanto la sua forma spettrale è molto simile a quella dello spettro differenza per la sostituzione dell'istidina distale da parte del CO in neuroglobina.<sup>21</sup> Inoltre, per entrambe le proteine,  $V_2$  ricorda molto da vicino l'evoluzione temporale della specie 6cLS ottenuta nel corso dell'analisi numerica delle cinetiche di rebinding di CO ad AHb1 ed AHb2 a lunghezza d'onda singola (figura 3.16). Le misure di spettri di assorbimento

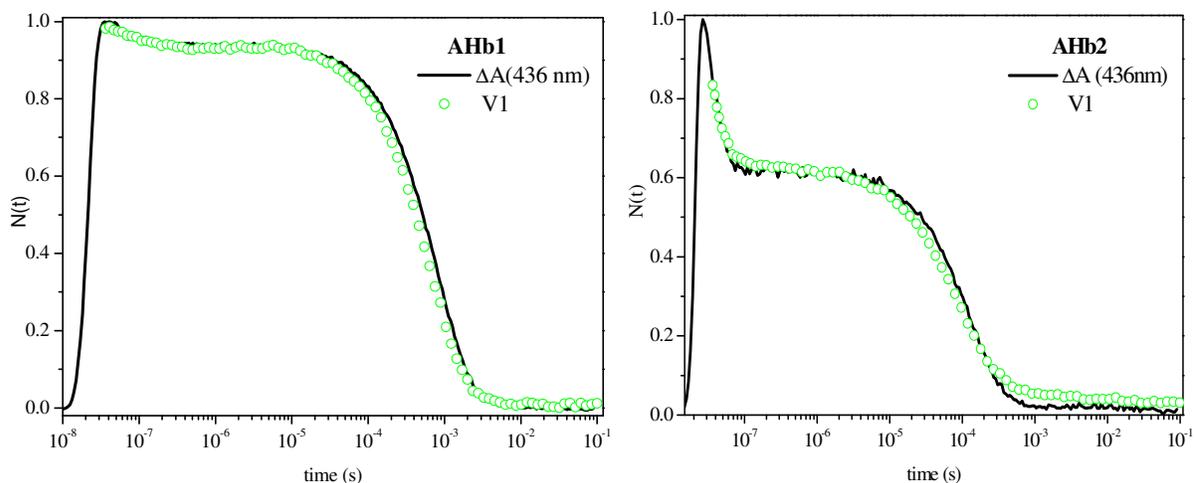
risolti in tempo su soluzioni di AHb1 ed AHb2 hanno pertanto fornito un forte sostegno all'ipotesi dell'esistenza di una competizione fra il CO e l'istidina distale per il sesto legame di coordinazione del ferro emico. Tra le informazioni fondamentali ottenute dall'analisi spettrale, rientra anche quella relativa alle lunghezze d'onda ottimali per seguire le cinetiche di legame a lunghezza d'onda singola. Anche se, come si è osservato, la seconda componente spettrale risulta molto piccola rispetto alla prima, che è quella relativa al legame del CO, ad alcune lunghezze d'onda la sovrapposizione potrebbe portare ad errori sistematici nella ricostruzione delle cinetiche di legame. L'uso della lunghezza d'onda 436 nm minimizza questi artefatti in quanto, come si può dedurre dalla figura 3.15, la prima componente spettrale ha praticamente un massimo (che si osserva a 432 nm) mentre la seconda componente spettrale è nulla.



**Figura 3.15:** Prima ( $U_1$ , linea solida) e seconda ( $U_2$ , linea tratteggiata) componente spettrale ottenute da analisi SVD su spettri risolti in tempo a seguito di fotolisi su soluzioni di COAHb1 (in rosso) e COAHb2 (in nero). Gli spettri  $U_2S_2$  sono mostrati in scala  $10\times$ .



**Figura 3.16:** A sinistra profili temporali per le ampiezze  $V_1$  (curve continue) e  $V_2$  (curve tratteggiate) delle prime due componenti ottenute dall'analisi SVD su spettri risolti in tempo di AHb1 (in rosso), AHb2 (in nero) a  $[CO] = 1\text{ mM}$  e AHb2 a  $0.5\text{ mM}$  CO (in verde).  $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ . Si noti la somiglianza, per entrambe le proteine, fra l'evoluzione temporale di  $V_2$  e quella della specie dell'eme esacoordinato ottenuta dall'analisi numerica discussa nel paragrafo 3.3.1.1, mostrata nella linea ciano dell'esempio sulla destra (AHb1,  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $[CO] = 0.3\text{ mM}$ ).

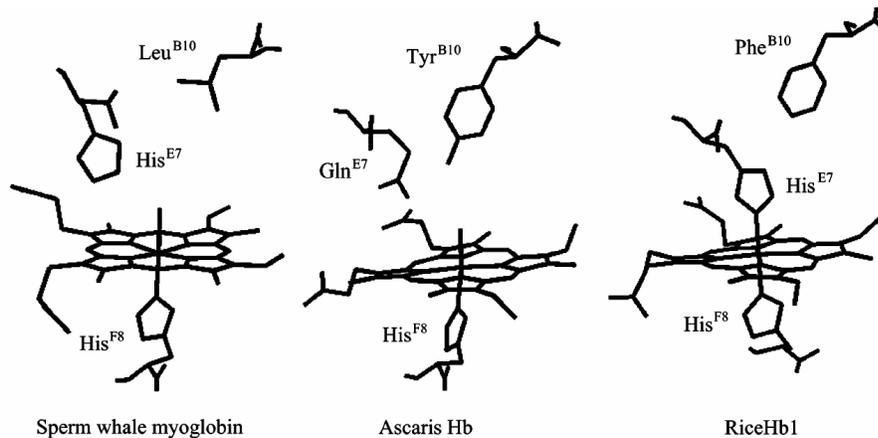


**Figura 3.17:** Confronto fra cinetiche di legame di CO per esperimenti di LFP su AHb1 (a sinistra) ed AHb2 (a destra) a lunghezza d'onda singola (linea continua) e andamento temporale  $V_1$  della prima componente spettrale  $U_1$  ottenuta dall'analisi SVD su spettri risolti in tempo (pallini), nelle stesse condizioni sperimentali (AHb1:  $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $[CO] = 1\text{ mM}$ ; AHb2:  $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $[CO] = 0.3\text{ mM}$ ). Si noti la perdita di segnale che si osserva in AHb2 nelle fasi più veloci della cinetica per  $V_1$ .

### 3.3.3 Misure su mutanti di AHb1

Una verifica diretta del coinvolgimento dell'istidina distale nel modulare la reattività di AHb1 verso il CO è stata ottenuta con lo studio del mutante HisE7Leu, in cui questo residuo è stato sostituito con una leucina. È stata inoltre realizzata anche la mutazione PheB10Leu in quanto questo residuo interagisce con l'istidina distale nei complessi del CO modulandone la reattività. Le proteine mutate sono state realizzate dal gruppo della Professoressa Paola Dominici dell'Università degli Studi di Verona. Esperimenti di caratterizzazione dei complessi mediante Raman Risonante sono stati effettuati dal gruppo della Professoressa Smulevich di Firenze.

È probabile che PheB10 rivesta un'importanza particolare nel definire la reattività della tasca distale, come suggerito dalla sua posizione, prossima al residuo E7 (vedi figura 3.18): sia nelle emoglobine di mammiferi sia in quelle di organismi meno evoluti, questi due residui sono vicini e subiscono interazioni. In particolare, nelle emoglobine trasportatrici di ossigeno dei mammiferi in posizione B10 si trova una leucina altamente conservata, che non interagisce direttamente con il ligando ma influenza il binding orientando HisE7 in una posizione favorevole per formare un legame ad idrogeno con l'O<sub>2</sub>. Anche nelle emoglobine trasportatrici di ossigeno delle piante (leg-emoglobine) il residuo in posizione B10 ha questo ruolo di regolazione fine dell'affinità. Alcune emoglobine, come quelle troncate di *Ascaris suum* e del mollusco *Lucina pectinata*, o i domini globinici delle flavoemoglobine batteriche e di lievito (vedi paragrafo 1.1.1.1), che hanno funzioni biologiche non del tutto chiarite, presentano la combinazione TyrB10/GlnE7 nella tasca dell'eme e la tirosina B10 interagisce direttamente con l'O<sub>2</sub> legato stabilizzandolo con un legame ad idrogeno. Questo fa sì che l'affinità per l'ossigeno di queste proteine sia troppo alta perché possano rivestire il ruolo di trasportatrici di ossigeno, ma è stato provato che la combinazione TyrB10/GlnE7 è efficace per reazioni di *scavenging* e detossificazione come la NO diossigenasi. Per quanto riguarda le emoglobine non simbiotiche (esacoordinate) di pianta, in posizione B10 si trova una fenilalanina conservata, spazialmente molto vicina ad HisE7 (figura 3.18). Per l'emoglobina Hb1 di riso è stato dimostrato, attraverso misure spettroscopiche e cristallografiche,<sup>123</sup> che PheB10 è un elemento regolatorio importante sia per l'esacoordinazione sia per il processo di binding del ligando: la sua sostituzione provoca infatti una destabilizzazione della struttura proteica nella forma ferrosa e legata all'O<sub>2</sub>, il che risulta in un binding dell'ossigeno molto meno efficiente; nella forma ferrica PheB10 è l'unico residuo che permette il binding di ligandi con alta affinità.

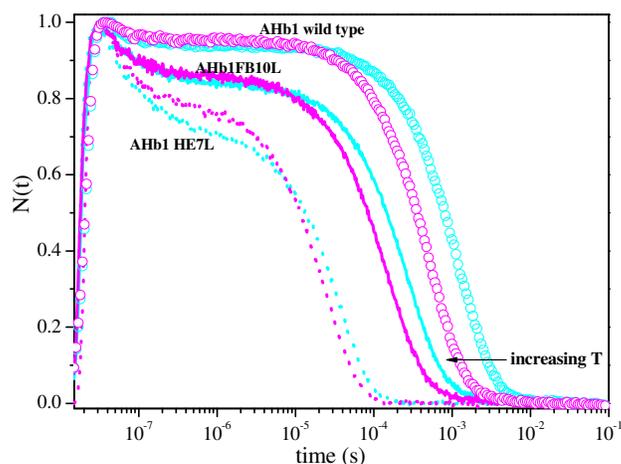


**Figura 3.18:** Gruppo eme e residui F8 (istidina prossimale), E7 e B10 in un'emoglobina trasportatrice di ossigeno di mammifero (mioglobina di capodoglio, a sinistra), quella troncata di *Ascaris* (al centro) e l'emoglobina non simbiotica di riso Hb1 (a destra).<sup>123</sup>

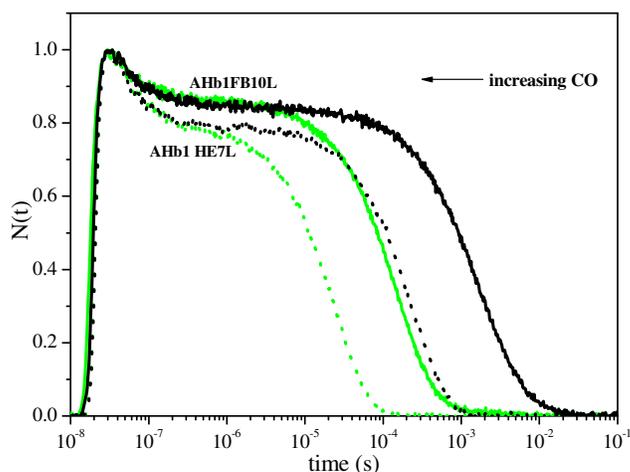
Le figure 3.19 e 3.20 esemplificano gli effetti sulle cinetiche di rebinding del CO a seguito di Laser Flash Photolysis su soluzioni di AHb1 HisE7Leu e AHb1 PheB10Leu. Nella figura 3.19 viene mostrato per un paragone più agevole anche il segnale misurato per la proteina *wild-type*. Gli effetti più evidenti delle mutazioni sono un aumento consistente dell'entità del legame geminato e della velocità di legame dalla soluzione. Nel caso di HE7L, inoltre, la cinetica del legame bimolecolare risulta priva della coda a tempi lunghi, presente nella proteina *wild type* e legata al legame competitivo dell'istidina distale.

Anche per questi campioni gli esperimenti sono stati effettuati in funzione della temperatura e della concentrazione di CO per identificare e caratterizzare le varie fasi del processo di rebinding. L'effetto dell'aumento della temperatura è per tutte le proteine quello di una diminuzione nell'ampiezza del rebinding geminato e di un concomitante velocizzarsi del processo di rebinding dalla soluzione (figura 3.19). Il rebinding geminato è per entrambi i mutanti, specie per HE7L, più ampio rispetto alla proteina wt, e mentre l'effetto della temperatura su questa fase è modesto per FB10L, il geminato di HE7L mostra una maggiore sensibilità alla temperatura. Questo suggerisce che il ruolo di HisE7 sia più importante nel modulare la dinamica della tasca dell'eme rispetto a quello di PheB10, per quel che riguarda il rebinding del ligando. In ogni modo l'aumento del rebinding geminato nei mutanti implica che entrambe le mutazioni sfavoriscono l'uscita del ligando verso il solvente. Un'altra caratteristica delle cinetiche di rebinding a FB10L e HE7L è la velocizzazione del processo globale di rebinding rispetto ad AHb1 wt. Per il mutante HE7L questo effetto è anche legato all'assenza

della reazione di legame competitivo da parte dell'istidina distale, che porta all'insorgere di una fase lenta nella cinetica, per cui il distacco dell'istidina distale rappresenta il *rate limiting step* del processo complessivo di rebinding. Un aumento di velocità si osserva anche per FB10L, suggerendo che le velocità di legame e distacco dell'istidina distale siano influenzate dalla sostituzione in posizione B10. La dipendenza delle curve dalla concentrazione di CO (figura 3.20) mostra chiaramente la separazione fra la fase di rebinding geminato (indipendente dalla concentrazione di CO) e il rebinding bimolecolare dalla soluzione, come già discusso nel paragrafo 3.1 per la proteina *wild-type*.

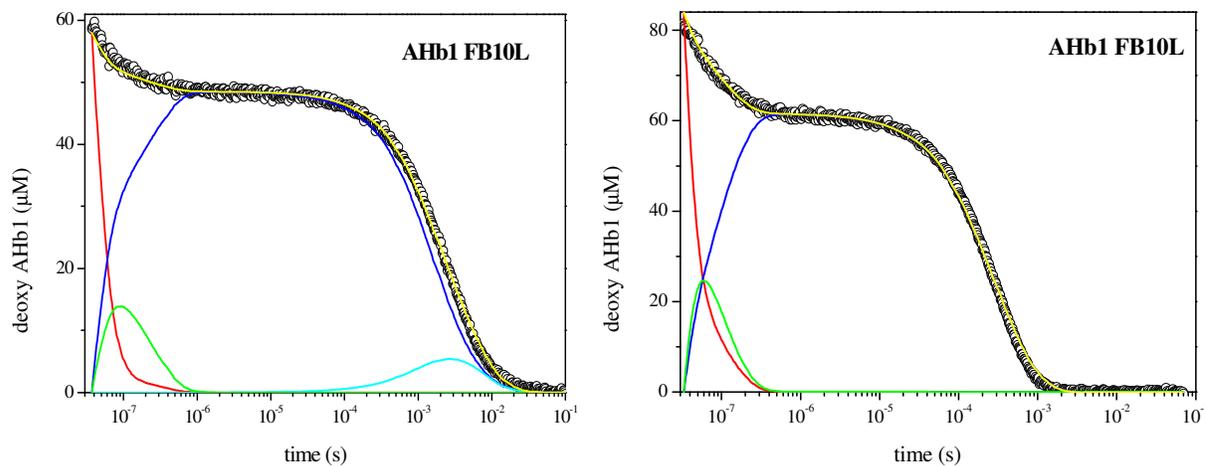


**Figura 3.19:** Esempi di cinetiche di rebinding per AHb1 wt (pallini), AHb1 FB10L (linea continua) e AHb1 HE7L (linea tratteggiata), per soluzioni equilibrate con 1 mM CO a  $T=30^\circ\text{C}$  (curve magenta) e  $T= 10^\circ\text{C}$  (curve ciano). La concentrazione di proteina era 60-70  $\mu\text{M}$ .



**Figura 3.20:** Cinetiche di rebinding ai mutanti FB10L (60  $\mu\text{M}$ , linea solida) e HE7L (80  $\mu\text{M}$ , pallini) di AHb1, per soluzioni equilibrate con 1 mM CO (curve verdi) e 0.1 mM CO (curve nere).  $T=30^\circ\text{C}$ .

Anche queste curve sono state analizzate seguendo lo schema cinetico di figura 3.6, seguendo i suggerimenti emersi dall'analisi effettuata su AHb1 wt. Nel caso del mutante HE7L le specie  $Hb_h$  e  $(Hb_h : CO)$  sono state rimosse dal modello in quanto misure di spettroscopia di assorbimento UV-visibile e Raman Risonante hanno mostrato che il gruppo eme è puramente pentacoordinato in assenza di ligandi esogeni (dati non mostrati), come era ovvio aspettarsi data l'assenza dell'istidina distale che completa l'esacoordinazione intramolecolare. E' stata eseguita un'analisi globale delle cinetiche di rebinding ottenute a diverse concentrazioni di CO, per migliorare l'attendibilità dei risultati del fit come spiegato nel paragrafo 3.3.1.1. Questa analisi globale è stata effettuata ad ogni temperatura nel range 10-40 °C, e dalla dipendenza dalla temperatura delle costanti di velocità sono stati determinati i parametri di attivazione dei processi. In figura 3.21 è riportato un esempio dei risultati dell'analisi numerica delle curve di rebinding, mentre la tabella 3.3 riassume i risultati ottenuti insieme alle entalpie ed alle entropie di attivazione determinati dai plot di Eyring per le costanti di velocità microscopiche. Anche in questo caso il modello utilizzato si è rivelato adatto a descrivere le curve in modo completo ed accurato in tutte le condizioni sperimentali testate; questo mostra la solidità del modello stesso e la sue efficacia nello studiare la risposta di AHb1 a mutazioni puntiformi.



**Figura 3.21:** Analisi delle cinetiche di rebinding del CO ai mutanti di AHb1 FB10L (a sinistra) e HE7L (a destra), a 0.1 mM CO e  $T = 10$  °C. I fit (linee gialle) sono sovrapposti ai dati sperimentali (cerchietti). Nelle figure sono riportati anche gli andamenti temporali delle specie coinvolte nel rebinding:  $Hb_p:CO$  (rosso),  $Hb_p::CO$  (verde),  $Hb_h$  (ciano, solo per FB10L),  $Hb_p$  (blu).

L'aumento nel rilegame geminato nelle proteine contenenti una mutazione sembra essere causato da processi interni differenti. Mentre  $k_1$  non subisce variazioni per il mutante FB10L

rispetto al valore osservato per AHB1 *wild-type*, la sostituzione HisE7Leu provoca un consistente aumento per questa costante di velocità. L'assenza di attivazione termica per  $k_{-1}$  rimane una caratteristica costante di tutti i campioni esaminati. La costante di velocità per il processo di uscita del ligando in soluzione,  $k_2$ , diminuisce di un fattore 3 rispetto alla wt in entrambe le proteine mutate, ma gli effetti delle due mutazioni sui parametri termodinamici per questo processo sono differenti. La costante di velocità  $k_{-2}$  (rientro del ligando dalla soluzione all'interno della matrice proteica) è fortemente aumentata in HE7L, con una concomitante riduzione dei parametri di attivazione (cosa che però si osserva anche in FB10L, ma in questo caso non ci sono effetti della mutazione sul valore di  $k_{-2}$ ). Le costanti di velocità per il binding e il distacco dell'istidina distale sono accresciute dalla mutazione FB10L; inoltre per questo processo si osserva una costante di equilibrio  $K_H$  fra la forma 6cLS e 5cHS pari a 0.5, la quale indica che la forma pentacoordinata è favorita rispetto alla forma esacoordinata, al contrario di quanto succede alla proteina wt ( $K_H = 1.6$ ). Con questa costante di equilibrio, nella forma deossi della proteina FB10L sarà presente un 33% di forma 6cLS, rispetto al 61% della wt. La frazione di specie esacoordinata determinata dall'analisi numerica sulle curve di LFP è in accordo con quanto stimato da misure di spettroscopia di assorbimento (dati non mostrati). Va comunque sottolineato che i valori per le costanti  $k_{-b}$  e  $k_b$  stimati dall'analisi numerica sulle curve di LFP sono soggetti ad un significativo errore in quanto la frazione di proteina con esacoordinazione endogena che si forma sulle scale di tempi della LFP è piccola, con conseguente incertezza nella determinazione delle costanti di velocità per il processo. Pertanto questi numeri non possono essere considerati definitivi, ma solo delle stime preliminari, da consolidare con esperimenti di stopped flow, previsti per il futuro.

Per quanto riguarda la popolazione della trappola, la cui presenza si osserva in tutte le proteine esaminate, gli effetti delle due mutazioni sulla popolazione di questa sono piccoli, indicando che le sostituzioni amminoacidiche effettuate non sono influenti nel definire il processo di migrazione in questo sito di *docking* interno. È importante rimarcare il fatto che la cinetica di rebinding di AHb1 HE7L è perfettamente riprodotta dal modello cinetico semplificato in cui non si ammette la possibilità di esacoordinazione intramolecolare: questa è un'ulteriore conferma della correttezza dell'attribuzione del processo lento visto nelle altre proteine (e dall'analisi SVD su spettri risolti in tempo) alla formazione e successiva sparizione della forma bisistidinica dell'eme.

I risultati dell'analisi su queste proteine contenenti mutazioni puntiformi in posizione E7 e B10 confermano un ruolo fondamentale per l'istidina distale nel modulare la dinamica di

legame all'interno della tasca dell'eme e di conseguenza la reattività della proteina verso ligandi esogeni. La sostituzione di questo residuo con una leucina conduce infatti a variazioni macroscopiche nella cinetica di rilegame del CO, in particolare a una velocità di rebinding complessivo più elevata e a una fase geminata più ampia. Entrambi gli effetti sono stati osservati anche nella mioglobina contenente la stessa mutazione HE7L.<sup>124</sup> Le differenze osservate fra AHb1 wt e il mutante FB10L possono essere attribuite ad un effetto indiretto della sostituzione di questo residuo sull'istidina distale. I dati RR suggeriscono che questo residuo si trovi in un'orientazione diversa nel mutante rispetto alla wt, nella forma legata al CO della proteina; questo potrebbe essere dovuto all'assenza, nel mutante, dell'ingombro sterico dovuto all'anello benzenico della fenilalanina. L'istidina distale in FB10L sembra inoltre essere in posizione leggermente più distante dal CO. Un'interazione fra Phe B10 e His E7 potrebbe anche spiegare la variazione nell'equilibrio fra la forma esacoordinata e pentacoordinata dell'eme osservata nel mutante FB10L.

**Tabella 3.3:** Costanti di velocità microscopiche per AHb1 e per i mutanti FB10L e HE7L ottenute dall'analisi sui dati di laser flash photolysis, a 20 °C. Le entalpie ( $\Delta H^\ddagger$ ) e le entropie ( $\Delta S^\ddagger$ ) di attivazione sono state stimate da un fit lineare al plot di Eyring per ciascuna costante di velocità microscopica  $k_i$ , in accordo con l'equazione presentata nel paragrafo 3.3.1.1, nel range di temperatura 10-40 °C.

	wt			FB10L			HE7L		
	$k$	$\Delta S^\ddagger$ (cal/mol K)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$k$	$\Delta S^\ddagger$ (cal/mol K)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$k$	$\Delta S^\ddagger$ (cal/mol K)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)
$k_1$ ( $10^6$ s <sup>-1</sup> )	5.13	-	-	5.2	-	-	8	-	-
$k_2$ ( $10^7$ s <sup>-1</sup> )	9	-12.9 ± 0.6	2.7 ± 0.1	3	-21.2 ± 0.4	0.9 ± 0.1	2.7	-14.8 ± 0.9	2.8 ± 0.3
$k_2$ ( $10^7$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2.26	26 ± 2	14.7 ± 0.6	2.8	6.5 ± 0.7	9.1 ± 0.2	16	4.8 ± 1.5	7.6 ± 0.4
$k_b$ (s <sup>-1</sup> )	23.5	8 ± 4	18 ± 1	178	-22.1 ± 0.6	0.7 ± 0.2	-	-	-
$k_{-b}$ (s <sup>-1</sup> )	14.5	12 ± 4	19 ± 1	356	-34 ± 2	3.8 ± 0.5	-	-	-
$k_c$ ( $10^7$ s <sup>-1</sup> )	2.07	-	-	1.5	-	-	3.5	-	-
$k_{-c}$ ( $10^7$ s <sup>-1</sup> )	0.25	-	-	0.72	-	-	3.5	-	-

### 3.3.4 Misure di cinetiche di legame ad AHb1 utilizzando O<sub>2</sub> ed NO come ligandi

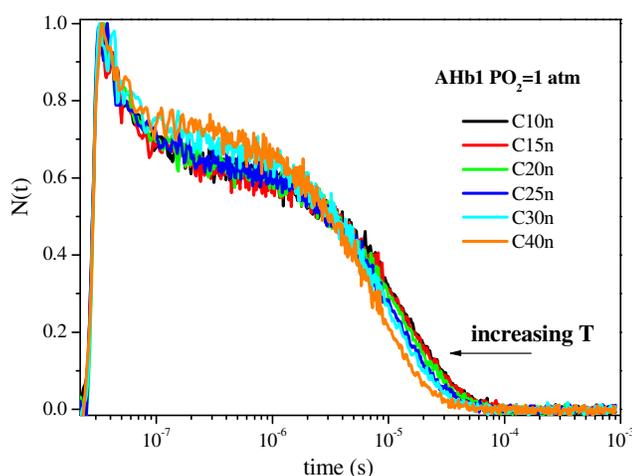
Completata la caratterizzazione delle proteine utilizzando il CO come ligando è stato eseguito uno studio preliminare sulle cinetiche di legame di O<sub>2</sub> ed NO su soluzioni di AHb1; il CO è stato infatti utilizzato a causa dei molteplici vantaggi presentati nei paragrafi precedenti, ma non è un ligando di rilevanza fisiologica per AHb1 come lo sono invece O<sub>2</sub> ed NO. Nel paragrafo 1.3.1 è stato discusso il ruolo biologico di NO-diossigenasi di questa proteina; questa reazione richiede il binding sequenziale di due ligandi, NO ed O<sub>2</sub>, ed il successivo rilascio del prodotto nitrato. Il sistema di cavità idrofobiche di AHb1 potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nell'assistere la funzione di NO *scavenger*, in quanto le cavità potrebbero servire ad immagazzinare l'NO in attesa che l'O<sub>2</sub> si leghi all'eme, in modo da garantire una elevata velocità nella reazione. Lo studio della reattività di questa proteina in risposta alla fotodissociazione di questi due ligandi può dunque fornire informazioni molto utili per aumentare la comprensione sui meccanismi di interazione fra AHb1 e queste molecole, e sulle possibili implicazioni funzionali. La lunghezza d'onda per monitorare le cinetiche di assorbimento transiente è stata mantenuta a 436 nm. Non sono stati effettuati spettri risolti in tempo, per cui non si hanno stime della eventuale presenza di contributi alle variazioni di assorbimento derivanti da rilassamenti strutturali. Tuttavia, per quanto visto nel caso del CO, non ci si attendono sovrapposizioni consistenti dei segnali derivanti dal processo di legame a variazioni spettrali di altra origine alla lunghezza d'onda di osservazione. La concentrazione finale di proteina è stata mantenuta nel range 70-80 µM, anche se la concentrazione "effettiva" utilizzata per l'analisi numerica deve tenere conto delle basse rese di fotolisi di questi due ligandi, che sono state determinate per confronto con i segnali osservati a seguito della fotolisi di COAHb, ottenendo una resa del 35% per l'ossigeno e del 20% per il monossido di azoto.

Analoghi esperimenti con AHb2 non sono stati effettuati in quanto questa proteina mostra una forte tendenza all'ossidazione in presenza di O<sub>2</sub>.

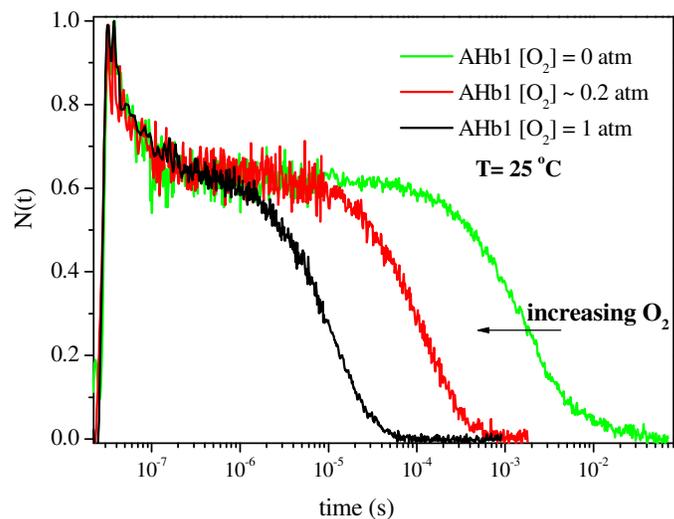
Per caratterizzare la reattività di AHb1 con l'O<sub>2</sub> sono state eseguite misure in funzione della temperatura (10-40 °C) e della pressione parziale di ligando (1 atm O<sub>2</sub>; 0.2 atm O<sub>2</sub>, corrispondenti alla pressione atmosferica; 0 atm O<sub>2</sub> ovvero una soluzione in cui O<sub>2</sub>AHb2 viene flussata con azoto puro in modo tale che l'ossigeno venga spiazzato e rimangano solo le molecole legate alla proteina). Questo per identificare e separare le diverse fasi del re-binding, come già descritto nei casi precedenti. In figura 3.22 è riportata la dipendenza dalla temperatura

delle curve misurate ad 1 atm O<sub>2</sub> (corrispondente ad una concentrazione di 284 μM a 20 °C); la figura 3.23 esemplifica invece la dipendenza delle cinetiche dalla concentrazione di ligando. Le differenze con le curve ottenute dal rilegame del CO sono molte: l'ampiezza della fase geminata aumenta vistosamente, anche se permane una sostanziale indipendenza dalla temperatura (le misure a temperature più alte sono poco affidabili, in quanto sono state acquisite per ultime ed il campione comincia a degradarsi dopo qualche ora dalla preparazione, a causa della presenza di un processo di autoossidazione), e la cinetica nel suo complesso si velocizza: il processo di legame di O<sub>2</sub> dalla soluzione è decisamente favorito rispetto al CO, e si completa in un intervallo di tempo circa 1000 volte inferiore rispetto a quello misurato per il CO, a parità di concentrazione di ligando e temperatura.

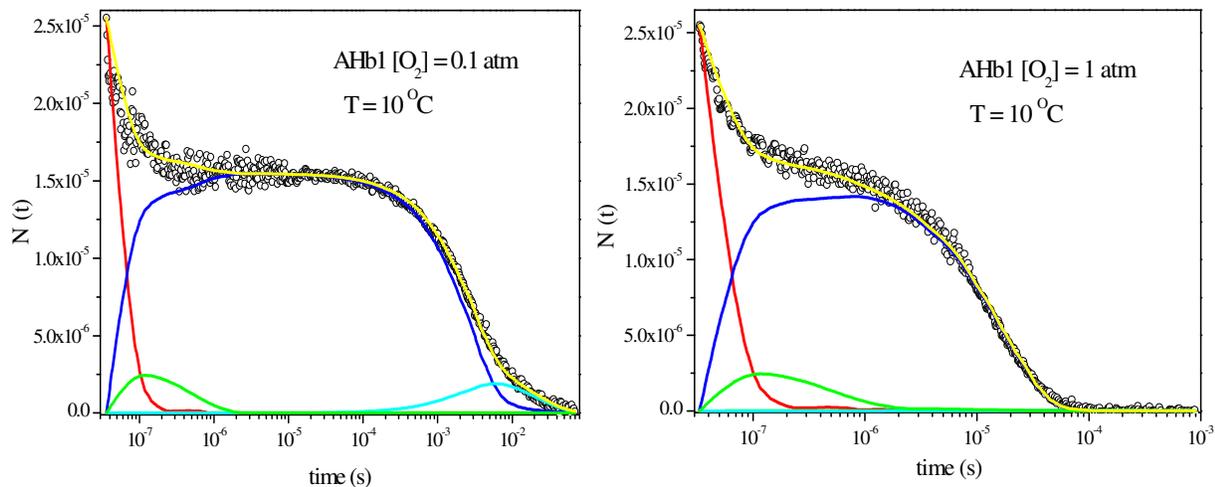
L'analisi numerica è stata eseguita con le stessa modalità dei casi precedenti in quanto è evidente che lo schema cinetico non è influenzato dalla natura del ligando. Non è stato possibile eseguire fit globali dai risultati affidabili fra le curve di LFP e quelle di stopped flow, in quanto la frazione di molecole nello stato pentacoordinato lega ad una velocità così elevata da ricadere nel tempo morto dello strumento. Si è pertanto effettuata un'analisi globale fra le curve di LFP misurate alla stessa temperatura ed a diverse pressioni parziali di O<sub>2</sub> (0 atm e 1 atm O<sub>2</sub>). In figura 3.24 è riportato un'esempio dei fit ottenuti dalla risoluzione numerica del sistema di equazioni differenziali riportato nel paragrafo 3.3.1.1, ed in tabella 3.4 le costanti di velocità microscopiche ottenute dall'analisi a 20 °C.



**Figura 3.22:** Cinetiche di rilegame di O<sub>2</sub> dopo fotolisi su una soluzione di AHb1 (75 μM) in funzione della temperatura. La pressione parziale di O<sub>2</sub> in soluzione era 1 atm.



**Figura 3.23:** Confronto fra le cinetiche di rilegame di  $O_2$  dopo fotolisi su una soluzione di AHb1 (75  $\mu\text{M}$ ) in funzione della pressione parziale di ligando a  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ .



**Figura 3.24:** Risultati dell'analisi globale delle cinetiche di rebinding di  $O_2$  ad AHb1 da esperimenti di LFP eseguiti a 0.1 atm  $O_2$  (a sinistra) ed 1 atm  $O_2$  (a destra). I fit (linee gialle) sono sovrapposti ai dati sperimentali (cerchi). Le figure mostrano anche gli andamenti temporali delle specie coinvolte nel processo di rebinding:  $Hb_p:CO$  (rosso),  $Hb_h$  (ciano),  $Hb_p$  (blu),  $Hb_p::CO$  (verde). La concentrazione di proteina fotolizzata è pari ad un terzo della concentrazione totale (75  $\mu\text{M}$ ).

**Tabella 3.4:** Costanti di velocità microscopiche ottenute dall'analisi di curve di rebinding di O<sub>2</sub> ad AHb1 in soluzione a T= 20 °C. Le entalpie di attivazione  $\Delta H^\ddagger$  e le entropie  $\Delta S^\ddagger$  sono state stimate da un fit lineare al plot di Eyring per ciascuna costante di velocità microscopica  $k_i$  in accordo con l'equazione presentata nel paragrafo 3.3.1.1 nel range di temperatura 10-40 °C.

	$k$	$\Delta S^\ddagger$ (cal/mol K)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)
$k_{-1}$ ( $10^7$ s <sup>-1</sup> )	1.2	-	-
$k_2$ ( $10^7$ s <sup>-1</sup> )	1.89	-	-
$k_{-2}$ ( $10^8$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	4.71	7 ± 1	3.3 ± 0.4
$k_b$ (s <sup>-1</sup> )	139	-11.9 ± 0.5	10.7 ± 0.2
$k_{-b}$ (s <sup>-1</sup> )	134	-12 ± 1	10.7 ± 0.3
$k_c$ ( $10^7$ s <sup>-1</sup> )	0.39	-	-
$k_{-c}$ ( $10^7$ s <sup>-1</sup> )	0.23	-	-

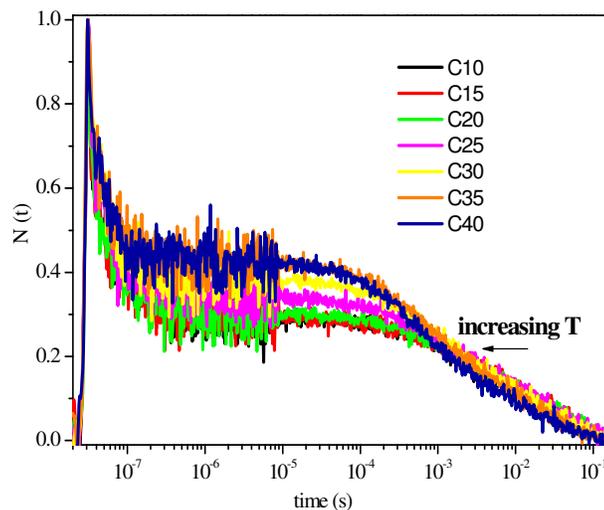
Dal confronto dei risultati riportati in tabella 3.4 con quelli ottenuti dall'analisi delle curve di rebinding del CO a soluzioni di AHb1, si può osservare che la costante di velocità  $k_{-1}$  subisce un aumento di circa 3 volte, con un conseguente aumento della fase geminata, la cui ampiezza è attorno al 30% del totale. Il grande incremento della velocità complessiva della reazione è causato principalmente dall'enorme aumento di  $k_{-2}$  per la ricombinazione del ligando dalla soluzione ( $4 \times 10^8$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> contro  $2.26 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>). Anche da questa analisi si deduce l'esistenza di un sito di docking per il ligando nelle vicinanze della tasca dell'eme, ma le costanti di velocità microscopiche relative a questo processo di migrazione interna sembrerebbero affermare che l'accessibilità di questa cavità sia minore per l'ossigeno;  $k_c$  è infatti 5 volte minore rispetto al valore ottenuto dall'analisi di rilegame del CO. La combinazione dei valori di  $k_{-1}$ ,  $k_2$  (quasi quattro volte minore per l'uscita in soluzione dell'ossigeno) e  $k_{-2}$  (venti volte maggiore per la fase di rientro dalla soluzione dell'O<sub>2</sub> rispetto al CO, e con una barriera d'attivazione molto minore) descrive dal punto di vista quantitativo le differenze osservate nella curva sperimentale di rilegame dell'ossigeno rispetto a quella ottenuta con il CO, ovvero la maggior ampiezza della fase geminata e la maggiore velocità complessiva del processo di rebinding bimolecolare. Le costanti  $k_b$  e  $k_{-b}$ , relative al legame e al distacco dell'istidina distale, risultano decisamente maggiori di quelle ottenute dall'analisi numerica sulle curve di rilegame del CO e molto simili fra di loro. La costante di equilibrio fra la forma esa e la forma pentacoordinata per la proteina deossi ( $K=k_b/k_{-b}$ ) è circa 1, valore che va confrontato con la determinazione fatta per gli esperimenti di legame del CO, per i quali era stato ottenuto un

valore di 1.6. La causa di questa discrepanza va verosimilmente cercata nel diverso procedimento seguito per l'analisi delle cinetiche di legame con l'ossigeno, effettuata sulle sole cinetiche di LFP.

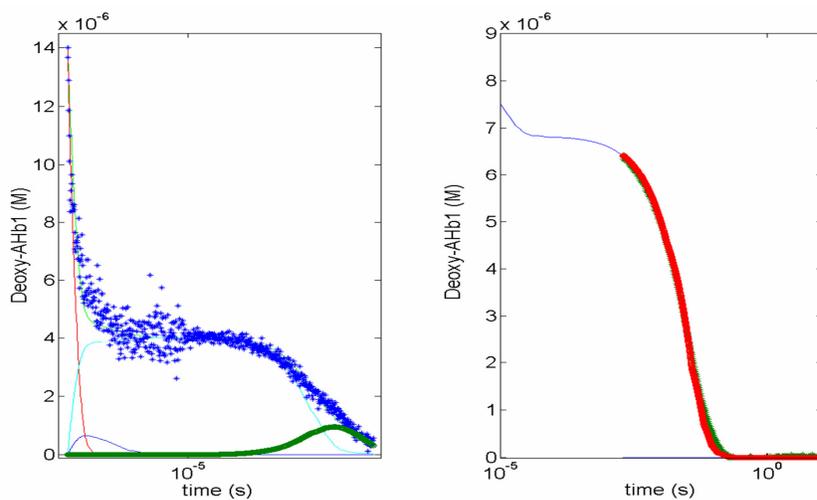
Le misure con NO come ligando sono state realizzate su soluzioni di NOAHb1 saturate con azoto, in modo da rallentare la reazione bimolecolare e poterla ben separare dalla fase geminata. Inoltre è necessario lavorare a concentrazioni più basse possibili di NO in quanto questa molecola reagisce con l'O<sub>2</sub> eventualmente presente nell'ambiente, generando NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e degradando il campione nell'arco di poche ore. In figura 3.25 è presentata la dipendenza dalla temperatura delle curve di laser flash photolysis misurate in queste condizioni sperimentali.

Le analisi sono in questo caso state effettuate simultaneamente sulle cinetiche di LFP e quelle di stopped flow: come per le cinetiche ottenute dal mescolamento di AHb1 ed O<sub>2</sub>, le misure di legame di NO presentano una fase molto veloce che ricade completamente nel tempo morto ma, a differenza del caso precedente, è stato possibile ricostruire il decorso complessivo della cinetica. Chiamando infatti A la frazione della forma esacoordinata della proteina all'equilibrio, questa è data da  $c_{tot}k_b/(k_b+k_{-b})$ , mentre la frazione di forma pentacoordinata sarà data da  $c_{tot} - A$ . Si può ricostruire la cinetica di stopped flow anche a tempi inferiori al millisecondo e, come si può vedere dalla figura 3.26, il raccordo del fit con la curva sperimentale è molto buono. È stato possibile effettuare questa analisi globale solo su tre temperature, pertanto non ci sono stime attendibili dei parametri termodinamici dei processi ed i risultati presentati sulle costanti di velocità microscopiche sono da considerarsi solo indicazioni, in attesa di approfondire lo studio su NOAHb1.

I risultati dell'analisi razionalizzano l'ulteriore aumento del rilegame geminato, che risulta qui essere quasi 10 volte più veloce rispetto alle cinetiche con CO: la costante di rilegame diretto all'eme  $k_{-1}$  arriva ad assumere un valore di  $5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ , il che spiega l'ampiezza della fase geminata, circa il 60-70% del totale. L'uscita in soluzione ed il rilegame da questa subiscono variazioni della stessa entità osservata usando O<sub>2</sub> come ligando, con  $k_2 = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  e  $k_{-2} = 4.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Si osserva come negli altri casi la presenza di una "trappola" sul percorso del ligando all'interno della proteina, in concorrenza all'uscita in soluzione; le costanti di velocità per la migrazione del ligando in questo sito di docking sono molto simili a quelle trovate per l'ossigeno.



**Figura 3.25:** Cinetiche di rebinding di NO dopo fotolisi di NOAHb1 in soluzione satura di azoto. La temperatura per ogni curva è riportata in legenda. [AHb1] = 73  $\mu\text{M}$ .

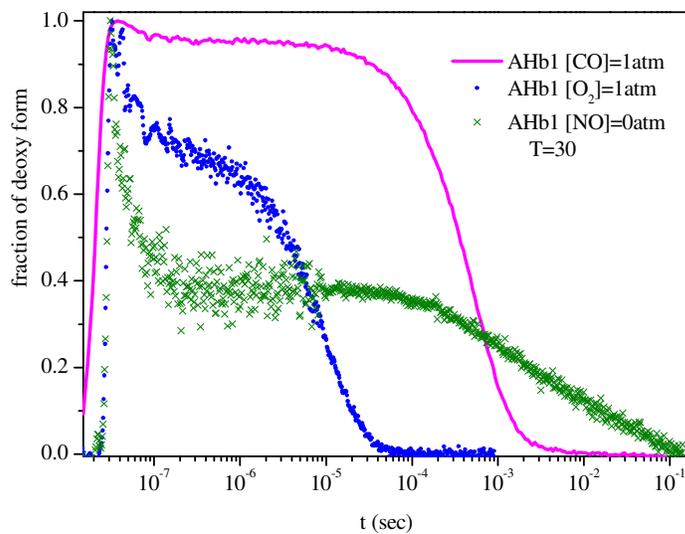


**Figura 3.26:** Risultati dell'analisi globale delle cinetiche di binding di NO ad AHb1 da esperimenti di LFP (a sinistra,  $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , soluzione satura di azoto, [AHb1] fotolizzata = 14  $\mu\text{M}$ ) e stopped flow (a destra,  $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , [NO]=0.5 mM, [AHb1] = 9  $\mu\text{M}$ ). I fit sono sovrapposti ai dati sperimentali. Le figure mostrano anche gli andamenti temporali delle specie coinvolte nel processo. La parte iniziale della cinetica di stopped flow, che rappresenta il legame veloce alla forma pentacoordinata è ricostruita a partire dai parametri stimati. La parte visibile della cinetica è interamente riconducibile al rilegame alla forma esacoordinata dell'eme.

Per quanto riguarda le costanti di velocità microscopiche relative al legame ed al distacco dell'istidina distale  $k_b$  e  $k_{-b}$ , l'analisi sembrerebbe rivelare un deciso spostamento dell'equilibrio verso la forma esacoordinata dell'eme ( $k_b = 95\text{ s}^{-1}$  contro  $k_{-b} = 30\text{ s}^{-1}$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  corrispondenti ad

una costante di equilibrio pari a 3 contro l'1.6 ottenuto per il CO); questo è probabilmente dovuto ad una stima imprecisa di questa analisi, che come detto è solo preliminare, anche se non sono da escludere effetti generati da differenze nelle condizioni sperimentali.

Queste prime misure di flash photolysis su AHb1 utilizzando  $O_2$  e NO come ligandi sono molto informative, in quanto permettono di affermare che la reattività di AHb1 per questi due ligandi è molto maggiore di quella per il CO (tre curve esemplificative sono mostrate in figura 3.27), e questo può essere messo in connessione con la presunta funzione biologica di AHb1, che richiede una grande velocità di reazione della proteina con entrambe le molecole. Purtroppo l'instabilità di questi campioni e la reazione di autodegradazione osservata rende difficile la realizzazione di misure in gel, ma lo studio del rebinding di questi ligandi proseguirà caratterizzando la reattività di AHb1 in una serie di condizioni sperimentali in modo da ottenere un quadro più completo possibile delle interazioni fra proteina e ligando.



**Figura 3.27:** Confronto fra le cinetiche di rilegame ottenute da esperimenti di LFP su AHb1 in soluzione utilizzando come ligando CO (curva continua rosa),  $O_2$  (pallini blu) e NO (croci verdi). La misura con l'NO non è direttamente confrontabile con le altre due per quanto riguarda la fase bimolecolare, a causa della diversa concentrazione di ligando utilizzata: è però possibile apprezzare il grande aumento nella fase di rilegame geminato.

### 3.4 Misure di LFP su AHb1 e AHb2 incapsulate in gel di silice

Come discusso nei paragrafi precedenti, l'analisi della fase geminata di cinetiche di rebinding dopo fotolisi di ligandi bimolecolari ad emoproteine è particolarmente ricca di informazioni, oltre che sulla dinamica della struttura macromolecolare, sulla migrazione del ligando all'interno della matrice proteica e quindi sulla presenza di siti di docking interni che potrebbero avere importanti implicazioni funzionali. In mioglobina ed emoglobina la cinetica di legame del CO dopo fotolisi a temperature criogeniche indica l'esistenza di una distribuzione congelata di sottostati conformazionali funzionalmente distinti.<sup>75, 125</sup> Se si aumenta la temperatura questi stati si mediano termicamente e si osservano nuove fasi cinetiche<sup>79, 98, 126</sup> che apparentemente portano ad un effetto inverso della temperatura sulle cinetiche osservate. Questa evidenza sperimentale è stata interpretata in modi differenti, per esempio invocando l'esistenza di rilassamenti conformazionali con un associato aumento di barriere energetiche.<sup>76, 77, 127, 128</sup> Più di recente si è fatta avanti l'ipotesi dell'esistenza di percorsi che conducono a siti di docking temporaneo all'interno della matrice proteica, da cui poi il ligando rilega con tempi più lunghi,<sup>129, 130</sup> suggerita dall'identificazione, nella mioglobina, di difetti di impacchettamento noti come cavità Xe1, Xe2, Xe3, Xe4.<sup>131, 132</sup> Esperimenti di cristallografia a temperature criogeniche su cristalli di complessi del CO di mioglobina hanno evidenziato la presenza del ligando fotodissociato all'interno delle cavità, in modo dipendente dalla temperatura.<sup>100, 101, 131-134</sup> La presenza di fasi cinetiche multiple nel legame geminato osservate negli esperimenti di LFP ha dunque ricevuto una nuova interpretazione strutturale, come risultato della presenza di "trappole" cinetiche per i ligandi fotodissociati.<sup>99, 107, 110, 135-143</sup> Diretta conferma della migrazione dei ligandi fotodissociati all'interno delle cavità dello Xe in cristalli di mioglobina è venuta da studi di cristallografia risolta in tempo.<sup>102, 104, 144</sup> Un ruolo della dinamica proteica non è comunque da escludere, e un modello che descrive i fattori strutturali sovrapposti ad una modulazione da parte della proteina è stato recentemente proposto per la mioglobina.<sup>108</sup> Esperimenti di cristallografia a raggi X risolta in tempo su mutanti di mioglobina hanno infatti confermato la presenza di rilassamenti strutturali seguenti alla fotolisi, insieme alla migrazione del CO dalla cavità distale (Xe4) a quella prossimale (Xe1).<sup>145</sup> Come già accennato nei paragrafi precedenti, la presenza di cavità interne e difetti di impacchettamento pare rappresentare una strategia comune di piccole proteine globulari per lo

svolgimento della loro funzione biologica, rendendole in grado di controllare la diffusione del ligando dal sito attivo al solvente;<sup>7</sup> il vantaggio funzionale compensa così la riduzione della stabilità termodinamica che queste cavità interne comportano per la proteina. Anche per AHb1, come visto nel paragrafo precedente, le analisi delle curve di LFP su proteina in soluzione ed i dati strutturali ottenuti per *homology modeling* portano a ipotizzare un ruolo di siti interni di docking temporaneo del ligando nel definire la cinetica di rilegame.

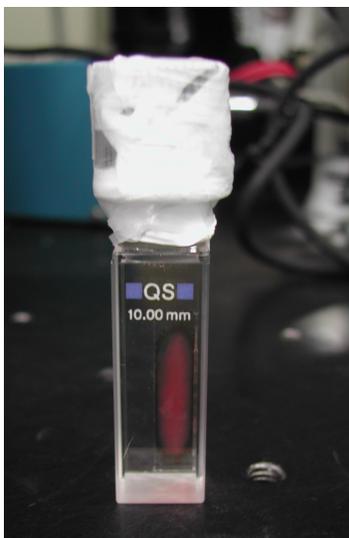
Per aumentare la sensibilità della fase geminata preservando però l'energia cinetica associata al movimento termico a temperatura ambiente, quindi senza effetti dovuti alle basse temperature, un metodo molto utilizzato è quello di incapsulare le proteine in gel di silice nanoporosi e umidi<sup>146</sup> anche in presenza di glicerolo per aumentare la viscosità.<sup>109, 110, 143, 147-149</sup> Questo è infatti un approccio particolarmente promettente per l'immobilizzazione di proteine; molecole di solvente e cosoluti possono diffondere tra i pori della matrice silicea, mentre le macromolecole proteiche non possono fuoriuscire nell'ambiente circostante. Diversi studi hanno provato che mioglobina ed emoglobina incapsulate in gel mantengono le loro proprietà spettroscopiche e funzionali.<sup>150-154</sup>

L'effetto di confinamento dovuto ai pori del gel e l'aumento di viscosità, dovuto alla ridotta mobilità della catena polipeptidica, contribuiscono a ridurre la probabilità di uscita in soluzione per il ligando. La diminuzione di solubilità del CO in glicerolo favorisce infine gli stati legati del CO all'interno della matrice proteica. L'effetto è dunque quello di aumentare la probabilità di diffusione competitiva verso siti interni,<sup>106, 138</sup> e quindi l'ampiezza della fase geminata, amplificando così la separazione delle distinte fasi cinetiche nel processo di rilegame geminato e consentendo il loro studio anche a temperatura ambiente. Sia l'incapsulamento in gel sia l'aumento della viscosità favoriscono dal punto di vista termodinamico stati transienti come quelli associati al docking del ligando all'interno della matrice proteica.<sup>107, 109, 110, 147</sup> L'incapsulazione in gel di silice modifica la cinetica di rebinding con modalità strettamente correlate alla struttura e dinamica proteica; pertanto attraverso esperimenti di LFP in funzione della temperatura e della concentrazione di CO su proteine in gel di silice si può chiarire in modo più completo il diverso ruolo della migrazione del ligando e delle dinamiche proteiche nel rilegame di CO ad AHb1 ed AHb2, e contribuire a svelare le implicazioni funzionali della diversa reattività di queste due proteine.

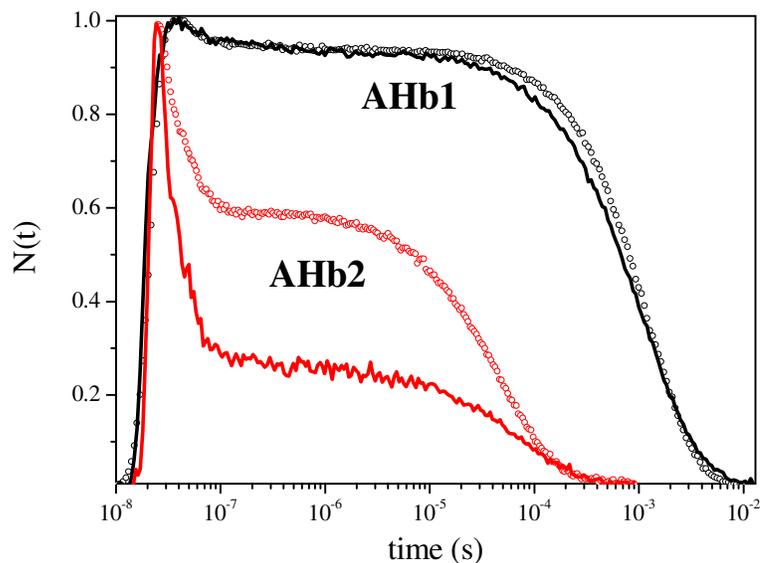
### 3.4.1 Cinetiche di legame a gel di COAHb1 e COAHb2

Lo studio delle proteine incapsulate in gel di silice è stato realizzato in collaborazione con il dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare dell'Università degli Studi di Parma. In particolare il gruppo del Professor Mozzarelli si è occupato della preparazione dei campioni, un esempio dei quali è riportato in figura 3.28. L'incapsulamento di AHb1 ed AHb2 in gel di silice è stato realizzato seguendo il protocollo riportato da Shibayama e Saigo <sup>151</sup> con alcune modifiche. Una soluzione contenente tetrametil-ortosilicato (TMOS), acqua e acido cloridrico è stata sonicata a 4 °C per 20 minuti. Un volume uguale di soluzione deossigenata contenente fosfato di sodio 10 mM a pH 6 è stata poi aggiunta al sol, che è stato in seguito deossigenato a 4 °C per 40 minuti sotto flusso di azoto. Infine al sol è stata aggiunta anaerobicamente una soluzione 200 µM di AHb1 o AHb2 in tampone fosfato 50 mM, a pH 7.2, equilibrata con 1 atm CO. La miscela risultante è stata deposta su lastre di quarzo in condizioni anaerobiche. La formazione del gel è avvenuta in circa 20 minuti. I gel così ottenuti sono stati conservati anaerobicamente in un tampone contenente fosfato 100 mM, 1 mM EDTA, 5 mM ditionito di sodio, a pH 7. Prima degli esperimenti, i gel sono stati immersi in una soluzione acquosa (tampone fosfato 100 mM, 1 mM EDTA, e 2 mM di ditionito di sodio, a pH 7) precedentemente equilibrata con una miscela di CO ed NO dalla pressione parziale di CO nota. Le dimensioni dei pori del gel sono paragonabili con quelle delle proteine (20-40 Å). La concentrazione finale delle proteine è dell'ordine di 50-100 µM. Nella figura 3.29 è mostrato il confronto per le misure in soluzione ed in gel su AHb1 ed AHb2 nelle stesse condizioni sperimentali: è subito evidente che l'incapsulamento in gel ha effetti del tutto differenti sulle due proteine. Su AHb1 la differenza fra le curve in soluzione o in gel è infatti molto piccola: la fase geminata è praticamente identica, sia come forma che come ampiezza. L'unica diversità nelle cinetiche si osserva nella fase bimolecolare, che nel gel ha una forma un po' più allargata. Questo risultato conferma la scarsa influenza della dinamica proteica sulla cinetica di rilegame per AHb1, come osservato anche dalla scarsa dipendenza dalla temperatura delle curve in soluzione e dal ritrovamento (mediante *homology modeling*, vedi paragrafo 3.3.1.2) di un tunnel idrofobico nella struttura proteica che connette direttamente la tasca distale al solvente, permettendo al ligando di uscire in soluzione con facilità. Anche in gel la fase geminata rimane non esponenziale, confermando lo stoccaggio temporaneo del ligando in siti di docking interni alla matrice proteica.

Per contro, quando AHb2 è incapsulata in gel di silice la fase geminata subisce un grande aumento nell'ampiezza, pur mantenendo un carattere di decadimento monoesponenziale con un tempo di vita al limite della risoluzione sperimentale (circa 10 ns). Il segnale riportato in figura 3.29 sembra suggerire la presenza di una seconda fase cinetica su scale di tempi più corte, che necessiterebbe di una risoluzione dell'apparato sperimentale al picosecondo per essere investigata. Il caso di AHb2 è un esempio paradigmatico dell'effetto che si ottiene imponendo vincoli sui moti della proteina quando questi sono particolarmente importanti nel definire la cinetica di rebinding. La frazione di ligandi fotodissociati che riesce ad uscire dalla matrice proteica verso il solvente decresce all'aumentare dei vincoli esercitati sulla proteina a parità di temperatura, e questo suggerisce fortemente che i movimenti della proteina, che sono sfavoriti nel gel, abbiano un ruolo decisivo nel processo di migrazione del ligando fotodissociato verso il solvente. Anche per AHb2 le misure effettuate su proteine incapsulate in gel di silice sono quindi una conferma dell'assenza di connessioni dirette fra la tasca distale e il solvente. Inoltre le tracce mostrate in figura 3.29 per AHb2 suggeriscono che nel gel il CO è favorito nella competizione con il ligando endogeno, come dimostrato dall'assorbimento residuo minore a 1 ms.



**Figura 3.28:** Esempio di campione utilizzato per misurare le cinetiche di rilegame di CO dopo fotolisi su gel di proteina; si noti che la cuvette è dotata di un *reservoir* da saturare con CO per assicurare che la concentrazione di ligando si mantenga costante nel corso dell'esperimento.



**Figura 3.29:** Confronto fra le cinetiche di rilegamento del CO ad AHb1 (linee nere) e AHb2 (linee rosse) in soluzione (cerchietti) ed in gel (linea continua) a 10 °C e 1 mM CO.

Le curve ottenute dagli esperimenti con le proteine incapsulate in gel di silice sono state analizzate con le stesse modalità descritte nel paragrafo 3.3.1.1, e utilizzando lo stesso schema cinetico di figura 3.6. L'analisi numerica ha riprodotto tutte le curve in modo accurato, nel range di temperature considerato (10–40 °C), per entrambe le proteine. Non è stato possibile in questo caso effettuare un fit globale fra curve di LFP e di stopped flow in quanto la metodologia di stopped flow è intrinsecamente impossibile da applicare a misure su campioni all'interno di gel; è stata pertanto eseguita solo l'analisi numerica delle curve di LFP in funzione della temperatura, con la conseguenza di avere informazioni meno precise sulle costanti che definiscono l'equilibrio fra la forma pentacoordinata e quella esacoordinata dell'eme. Per migliorare l'accuratezza della stima dei parametri per il legame ed il distacco dell'istidina distale, per AHb1 la frazione delle due specie all'equilibrio è stata stimata mediante spettroscopia di assorbimento sui gel deossi.<sup>155</sup> I gel di COAHb1 sono stati fotolizzati (quindi convertiti alla forma deossi Fe<sup>2+</sup>) esponendo i campioni a luce bianca per 5-20 minuti subito prima di raccogliere gli spettri, che sono stati acquisiti nel range 380-700 nm usando un microspettrofotometro Zeiss MPM03 dotato di un obiettivo ×10 UV–visibile Ultrafluor.<sup>156, 157</sup> Il gel è stato caricato anaerobicamente su una cella a flusso Dvorak–Stotler in presenza di ditionito di sodio e tenuto sotto flusso di elio per tutta la durata degli esperimenti.

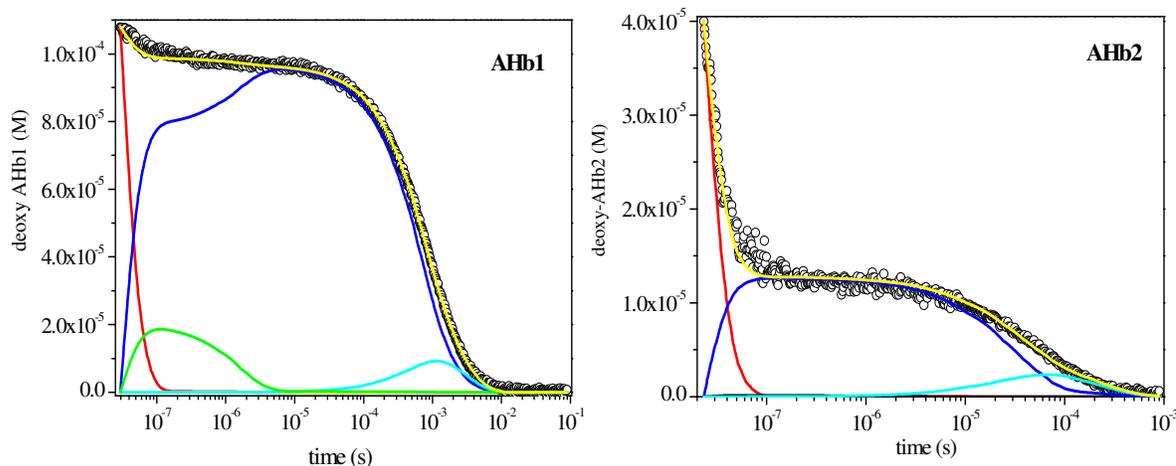
La frazione delle specie 5cHS e 6cLS è stata stimata usando lo spettro del mutante HE7L (paragrafo 3.3.3) come riferimento per la forma puramente pentacoordinata dell'eme e lo

spettro di deossi-AHb2 come riferimento per la forma puramente esacoordinata. Lo spettro del campione di AHb1 incapsulato nella forma legata al CO e poi fotolizzato (concentrazione di proteina 143  $\mu\text{M}$ ) mostra una predominanza della forma 5cHS, la forma 6cLS rappresentando solo il 13% delle molecole (dal 61% che si aveva in soluzione). Questa informazione è stata aggiunta alle equazioni differenziali che descrivono le curve di rebinding. Per quanto riguarda AHb2, non è stato invece possibile fotolizzare la proteina complessata con il CO incapsulata in gel di silice in modo apprezzabile, quindi non è stato possibile effettuare una stima della frazione delle due specie all'equilibrio.

Nella figura 3.30 è riportato un esempio dell'analisi numerica effettuata sulle cinetiche di rebinding di CO ottenute da esperimenti di LFP su proteine incapsulate in gel di silice. Il modello cinetico riproduce in modo impreciso le cinetiche solo nella fase geminata, il che potrebbe essere dovuto alla presenza di un riarrangiamento strutturale in questa fase che porta ad un segnale di assorbimento transiente sovrapposto a quello che trae origine dalla reazione di legame del CO. Le costanti di velocità ottenute per l'analisi a 20 °C sono riportate nella tabella 3.5, insieme ai parametri di attivazione, ottenuti dalle misure in funzione della temperatura. Alcune delle costanti di velocità microscopiche presentano valori simili a quelli determinati dalle misure in soluzione, con l'importante eccezione del processo di legame e distacco dell'istidina distale.

La struttura del gel sembra accelerare la reazione con il ligando endogeno per entrambe le proteine, portando a costanti di velocità maggiori di un fattore 10 rispetto a quelle trovate in soluzione per AHb1, e di un fattore 100 per AHb2. Tuttavia, a causa del concomitante aumento della velocità di distacco, l'incapsulamento in gel favorisce il binding del CO rispetto a quello del ligando endogeno. L'impossibilità ad effettuare esperimenti di stopped flow e la piccola ampiezza del processo nelle curve di LFP rendono difficoltosa e probabilmente imprecisa la stima di queste costanti di velocità microscopiche. In ogni caso, i valori di  $k_b$  e  $k_{-b}$  ottenuti con questa analisi suggeriscono che per entrambe le proteine, quando sono incapsulate in gel di silice, sia presente un equilibrio fra la forma 5cHS e quella 6cLS dell'eme nello stato deossi. Per la forma deossi di AHb2 in equilibrio, le misure di LFP sembrano indicare che la frazione di forma esacoordinata dell'eme passi dal 97% della soluzione al 47% del gel. Le barriere entalpiche per il binding di HisE7 sono molto più piccole che in soluzione, per AHb2 ma soprattutto per AHb1. La variazione maggiore sembra essere nei valori dell'entropia, che qui diventano negativi, anche se i numeri non sono precisi in quanto soggetti a un grande errore. La velocità di ingresso nel sito di docking secondario per AHb1 è dimezzata e quella di uscita è

raddoppiata nel gel. Infine l'aumento di tre volte della costante di velocità per il rebinding diretto dalla tasca distale  $k_{-1}$  in AHb2 spiega l'ampiezza della fase geminata, molto maggiore che in soluzione (vedi tabella 3.1).



**Figura 3.30:** Analisi di cinetiche di rebinding a AHb1 (a sinistra) ed AHb2 (a destra) incapsulate in gel di silice, a  $T=25^{\circ}\text{C}$  e  $[\text{CO}] = 1 \text{ atm}$ . I fit (linee gialle) sono sovrapposti ai dati sperimentali (cerchietti). Nelle figure sono mostrati anche gli andamenti temporali delle specie coinvolte nel processo di rebinding, e precisamente  $Hb_p:CO$  (rosso),  $Hb_p::CO$  (verde),  $Hb_h$  (ciano),  $Hb_p$  (blu).

**Tabella 3.5:** Costanti di velocità microscopiche ottenute dall'analisi globale in funzione della concentrazione di  $[\text{CO}]$  delle curve di laser flash photolysis su AHb1 e AHb2 incapsulate in gel di silice, a  $20^{\circ}\text{C}$ . Le entalpie di attivazione e le entropie sono state stimate dal plot lineare di Eyring per ciascuna costante di velocità microscopica  $k_i$  nel range di temperatura  $10\text{-}40^{\circ}\text{C}$ , secondo l'equazione presentata nel paragrafo 3.3.1.1.

	AHb1			AHb2		
	$k$	$\Delta S^{\ddagger}$ (cal/mol K)	$\Delta H^{\ddagger}$ (kcal/mol)	$k$	$\Delta S^{\ddagger}$ (cal/mol K)	$\Delta H^{\ddagger}$ (kcal/mol)
$k_1 (10^6 \text{ s}^{-1})$	4.78	-	-	56	-	-
$k_2 (10^7 \text{ s}^{-1})$	5.04	-	-	3.7	$1 \pm 2$	$7.4 \pm 0.5$
$k_2$ ( $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	1.6	$3 \pm 2$	$8.6 \pm 0.5$	4.9	$18 \pm 1$	$12.1 \pm 0.4$
$k_b (\text{s}^{-1})$	103	$-26 \pm 3$	$7 \pm 1$	14000	$-15 \pm 6$	$7 \pm 2$
$k_{-b} (\text{s}^{-1})$	691	$-22 \pm 3$	$6.8 \pm 0.9$	15000	$-7 \pm 6$	$10 \pm 2$
$k_c (10^7 \text{ s}^{-1})$	1.16	-	-	-	-	-
$k_{-c} (10^7 \text{ s}^{-1})$	0.52	$-10 \pm 3$	$5 \pm 1$	-	-	-

### 3.4.1.1 Analisi dei dati con MEM

Le curve di rebinding misurate nel gel, soprattutto in presenza di glicerolo (si veda oltre), mostrano un grado di complessità che richiede una stima indipendente da modelli pregressi sul numero di specie coinvolte nelle reazioni osservate.

Per avere informazioni più precise sul numero e il peso relativo delle diverse fasi cinetiche, si sono stimate le distribuzioni di tempi di vita associate alle curve di legame misurate mediante il programma MemExp (versione 3.0) scritto da P.J. Steinbach.<sup>158, 159</sup> MEM è un metodo numerico in cui viene utilizzato un algoritmo matematico detto Metodo di Massima Entropia (MEM, Maximum Entropy Method) accoppiato a un metodo di ottimizzazione basato sui minimi quadrati non lineare (nonlinear least squares, NLS) o di massima probabilità (maximum likelihood, ML), per analizzare un generico segnale dipendente dal tempo in termini di distribuzioni discrete ed indipendenti di tempi di vita. Questo approccio presenta il vantaggio di non richiedere alcuna ipotesi a priori sulla forma e sul numero delle bande nella distribuzione dei tempi di vita, nella quale la presenza di una fase cinetica è segnalata dalla presenza di una banda. Il risultato dell'analisi MEM sulle curve sperimentali di rebinding è pertanto una distribuzione di tempi di vita logaritmici,  $g(\log \tau)$ , senza restrizioni sulla forma funzionale, nei termini della quale la curva osservata si può scrivere come:

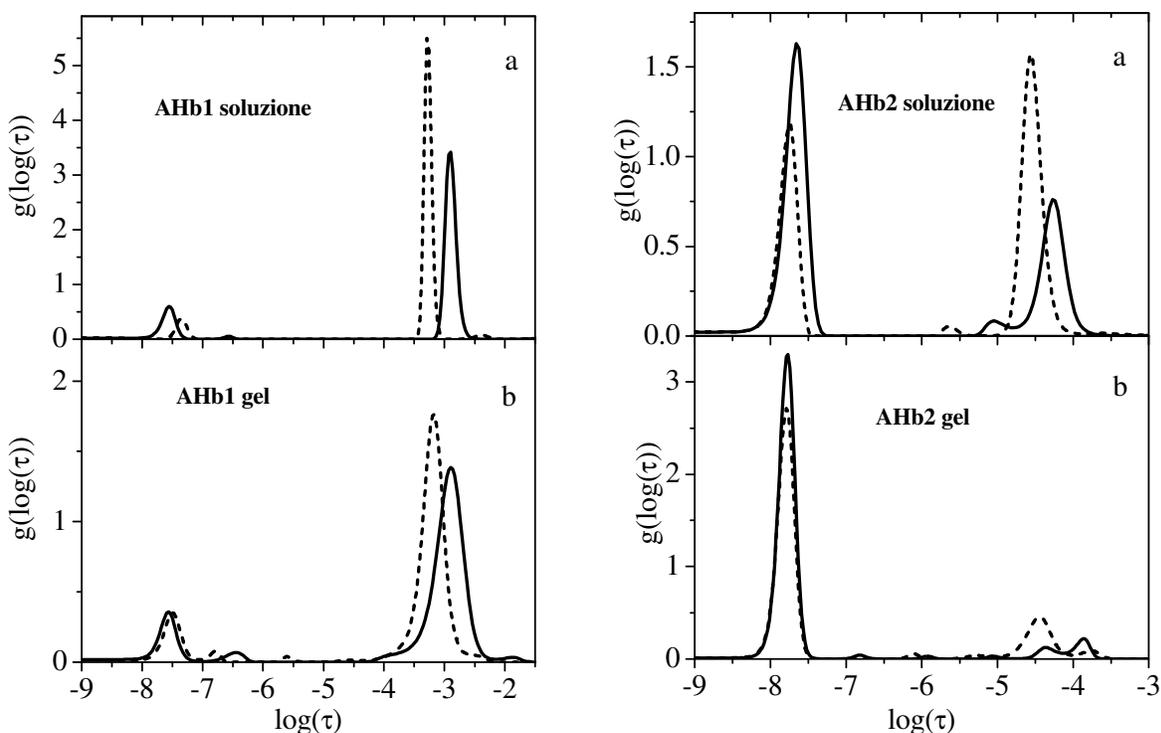
$$N(t) = D_0 \int_{-\infty}^{+\infty} g(\log \tau) e^{-t/\tau} d \log \tau ;$$

la distribuzione  $g(\log \tau)$  si ottiene numericamente dai dati sperimentali: MemExp raccomanda automaticamente una descrizione della distribuzione dei tempi di vita della cinetica ottimale, in modo che risulta immediatamente possibile una stima del numero delle fasi cinetiche e degli intermedi di reazione. La qualità dei fit su cinetiche di rebinding di CO ad AHb1 ed AHb2 è stata sempre eccellente, con i residui che oscillavano attorno allo zero in modo casuale.

Per procedere ad una analisi quantitativa delle distribuzioni di tempi di vita ottenute si può cercare di riprodurre la distribuzione ottenuta da MemExp mediante una combinazione lineare di curve Gaussiane.<sup>107, 109, 160</sup> Questo risulta particolarmente utile nei casi in cui lo schema di reazione permette la determinazione della soluzione analitica del sistema di equazioni differenziali accoppiate. In questi casi le costanti di velocità microscopiche dei processi possono essere ricavate dalle velocità apparenti (medie) determinate dalle distribuzioni ottenute con MEM.<sup>109, 161</sup> Qualora lo schema di reazione risulti troppo complesso, questo approccio non è praticabile e l'analisi MEM fornisce essenzialmente una descrizione qualitativa.

In certi casi, come in quello dell'analisi delle curve di rebinding di CO ad AHb1 ed AHb2 in soluzione, una descrizione molto buona della cinetica è ottenuta utilizzando schemi di reazione con costanti di velocità uniche come visto nel paragrafo 3.3.1.1, senza bisogno di ricorrere alle distribuzioni di tempi di vita. Questo non è sempre vero: per esempio nel caso dell'analisi di cinetiche di rebinding di CO a mioglobina o emoglobina incapsulate in gel di silice, utilizzando tempi di vita unici le code a tempi lunghi delle curve non sono ben riprodotte, suggerendo che in questi campioni fossero presenti fenomeni di eterogeneità strutturale e/o rilassamenti strutturali su tempi lunghi.<sup>109, 110</sup>

L'analisi con MEM delle cinetiche di legame di CO ad AHb1 ed AHb2 incapsulate in gel di silice conferma il quadro qualitativo emerso dall'analisi ottenuta attraverso le soluzioni numeriche del sistema di equazioni differenziali accoppiate associate al modello cinetico. Le differenze già rimarcate tra le curve di legame del CO misurate per soluzioni omogenee e quelle misurate per proteine incapsulate in gel (ed emerse in modo quantitativo dall'analisi mediante lo schema cinetico) si possono ritrovare nelle distribuzioni ottenute con il MEM. In figura 3.31 è mostrato il confronto fra l'analisi MEM su AHb1 ed AHb2 in soluzione ed in gel. Per le cinetiche in soluzione a 10 °C di AHb1, MEM trova una fase geminata di ampiezza molto piccola e con due distribuzioni di tempi di vita, anche se una è appena distinguibile, con picchi a  $\log(\tau) = -7.56$  e  $-6.56$  (ulteriore conferma del fatto che il rebinding geminato avviene da due siti distinti). La banda stretta ed intensa osservata a  $\log(\tau) = -2.9$  è dovuta alla ricombinazione bimolecolare, mediata dalla diffusione. Nel gel si osservano distribuzioni per i tempi di vita più allargate rispetto a quelle corrispondenti in soluzione, il che potrebbe essere dovuto al contributo di diversi fattori. La struttura del gel potrebbe avere effetti sui rilassamenti strutturali necessari per il binding competitivo dell'istidina distale, in particolare favorendo una maggiore efficienza nella competizione di questo ligando con il CO (come mostrato dall'aumento delle costanti di velocità microscopiche relative al binding e al distacco dell'istidina distale rispetto a quelle osservate in soluzione). È anche possibile che il gel evidenzia la presenza di eterogeneità strutturale, dovuta all'intrappolamento di conformazioni leggermente diverse di AHb1, caratterizzate da velocità di legame un po' differenti. In ogni caso questo spiega la forma più allargata della fase bimolecolare della cinetica di rebinding osservata in gel rispetto a quella in soluzione, come osservato nel paragrafo precedente.



**Figura 3.31:** Distribuzioni di tempi di vita ottenuti dall'analisi MEM su AHb1 (a sinistra) e AHb2 (a destra), in soluzione (a) ed in gel (b), a  $T = 10\text{ °C}$  (linee continue) e  $T = 30\text{ °C}$  (linee tratteggiate).

Anche se la banda principale della fase geminata appare scarsamente influenzata dal gel, la presenza di questo risulta comunque in una dipendenza meno intensa dalla temperatura ( $\log(\tau) = -7.56$  a  $10\text{ °C}$ ,  $\log(\tau) = -7.50$  a  $30\text{ °C}$ ) rispetto a quella osservata in soluzione, dove la variazione era da  $-7.56$  a  $10\text{ °C}$  a  $-7.35$  a  $30\text{ °C}$ . La banda secondaria associata al rebinding geminato è più distinguibile nelle misure in gel e mostra una chiara dipendenza dalla temperatura. Questo suggerisce che la migrazione nel sito di docking secondario sia leggermente favorita quando AHb1 è incapsulata in gel di silice. Su scale di tempi più lunghe, nell'analisi MEM della proteina incapsulata in gel si osservano tre picchi distinti: a  $10\text{ °C}$ , quello che si ha a  $\log(\tau) = -4$ , più che altro una spalla, può essere ragionevolmente attribuito al binding del ligando endogeno, il picco ampio e largo centrato a  $\log(\tau) = -2.9$  al binding del CO alla forma 5cHS, e l'ultimo centrato a  $\log(\tau) = -1.9$  al distacco dell'istidina distale in quella frazione di molecole dove questa si era precedentemente legata. Si vede quindi che anche l'analisi MEM può essere interpretata in modo completo e soddisfacente utilizzando lo schema cinetico di figura 3.6. In soluzione la separazione fra i picchi a tempi maggiori è molto meno evidente: l'unico picco visibile, oltre alla banda intensa e stretta associata al rilegame del CO

dalla soluzione alla forma pentacoordinata dell'eme, è quello centrato a  $\log(\tau) = -2.38$  a 30 °C, originato probabilmente dal distacco dell'istidina distale.

L'analisi MEM conferma dal punto di vista qualitativo che gli effetti dell'incapsulamento in gel sulla cinetica di rebinding di CO ad AHb2 sono completamente differenti da quelli osservati su AHb1. La cinetica è in questo caso molto diversa da quella in soluzione: l'ampiezza della fase geminata è molto maggiore (figura 3.31) e la distribuzione di tempi di vita è stretta in entrambe le condizioni, come atteso a causa del carattere mono-esponenziale del decadimento. Come osservato per AHb1, in gel la posizione del picco della fase geminata ( $\log(\tau) = -7.77$  a 10 °C) è scarsamente influenzata dalla temperatura, mentre la banda corrispondente in soluzione mostra attivazione termica. Dall'analisi MEM non c'è evidenza di fasi aggiuntive nel rilegame geminato, mostrando che nelle condizioni sperimentali finora indagate non c'è modulazione della cinetica da parte di siti di docking secondari, in accordo con quanto proposto nei paragrafi 3.3.1.1 e 3.3.1.2. I picchi che si osservano nelle analisi dei segnali di rebinding misurati per gel di AHb2 nel range dei microsecondi sono troppo piccoli per essere attribuiti con certezza ad un processo specifico, e potrebbero essere semplicemente rumore. Nell'analisi MEM delle curve in soluzione è possibile riconoscere il processo di legame dell'istidina distale nel picco a  $\log(\tau) = -5$  a 10 °C; l'ampia banda a tempi maggiori è attribuibile al binding del CO alla forma pentacoordinata dell'eme, ed il picco appena percettibile a tempi ancora più lunghi alla sostituzione del CO all'istidina distale, ancora una volta in accordo con il modello finora presentato. Questi ultimi due picchi sono presenti anche nell'analisi MEM sui gel, anche se con ampiezza molto minore a causa del fatto che gran parte delle molecole di CO rilega dall'interno della matrice proteica.

L'analisi MEM è stata introdotta per identificare con precisione le diverse fasi cinetiche e razionalizzare le differenze osservate fra le cinetiche di rilegame di CO in soluzione ed il gel di silice. Nel prossimo paragrafo verranno presentati e discussi i risultati degli esperimenti di Laser Flash Photolysis sulle proteine incapsulate in gel di silice immersi in glicerolo puro, in condizioni di alta viscosità. Come si vedrà l'analisi MEM è stata in questo caso utilizzata per apportare modifiche, supportate dai risultati dell'analisi stessa, al modello cinetico utilizzato finora per descrivere le curve di rebinding del CO.

### 3.4.2 Misure di LFP su AHb1 e AHb2 incapsulate in gel di silice in presenza di glicerolo

Come già discusso in dettaglio nel paragrafo 3.4, l'aumento della viscosità del mezzo e la diminuzione di solubilità del CO dovuta alla presenza di glicerolo, insieme all'incapsulamento delle proteine in gel di silice con conseguente effetto di confinamento dovuto ai pori del gel, è un metodo potente per favorire, amplificare e separare i processi veloci interni alla matrice proteica preservando l'energia termica presente a temperatura ambiente. L'analisi di curve di rebinding ottenute in condizioni di alta viscosità è pertanto particolarmente informativa sui percorsi di migrazione del ligando all'interno della matrice proteica. Come si vedrà, questi processi sono qualitativamente e quantitativamente differenti per le due proteine AHb1 ed AHb2, proprietà che potrebbe avere una rilevanza funzionale.

L'uso del glicerolo per aumentare la viscosità di proteine incapsulate in gel è stato introdotto da Friedman e collaboratori per amplificare la sensibilità della fase geminata in cinetiche di rebinding di CO ad emoproteine.<sup>149, 162</sup> Un risultato ormai accertato è che il rapporto fra la frazione di glicerolo e quella di acqua presenti in soluzione ha un effetto marcato sul numero e sulle ampiezze relative delle fasi cinetiche.<sup>107, 109, 110, 147, 163</sup> In presenza di glicerolo puro è probabile che il ridotto contenuto di acqua all'interno dei pori del gel influenzi le dinamiche delle molecole di acqua di solvatazione oltre che l'accoppiamento fra la dinamica proteica e il solvente.<sup>164, 165</sup>

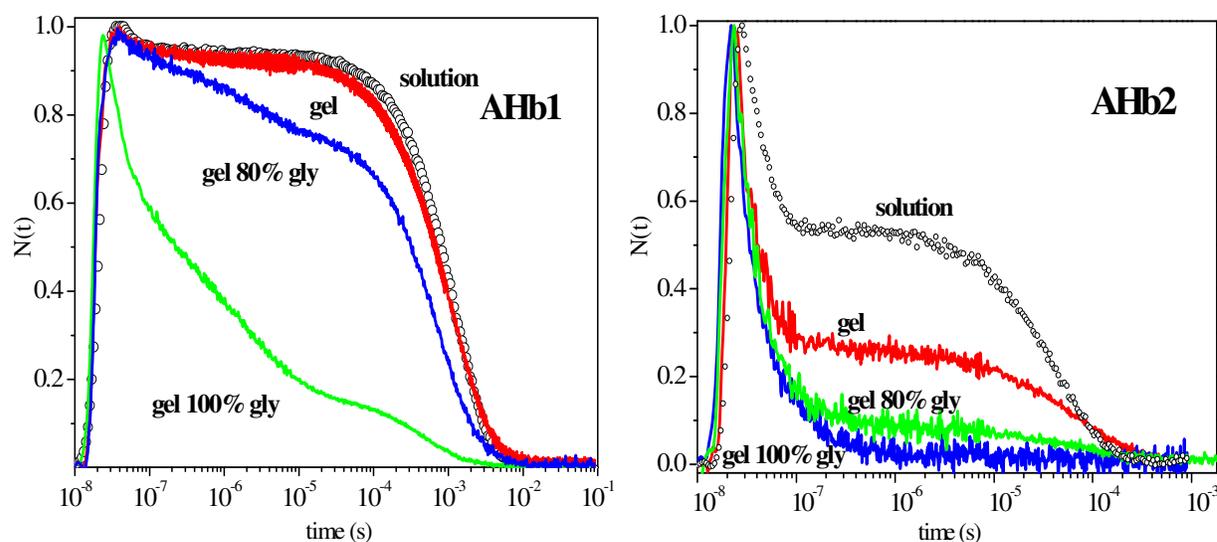
La preparazione dei campioni è stata eseguita in modo identico a quello descritto nel paragrafo 3.4.1, tranne che per lo step finale, nel quale il gel viene immerso in una soluzione dalla composizione percentuale di glicerolo nota. Per consentire che il sistema si porti all'equilibrio in queste condizioni di elevatissima viscosità, si lascia poi equilibrare il gel immerso nella soluzione per almeno 3 giorni a 4 °C.

In figura 3.32 è mostrato l'effetto del glicerolo sulle cinetiche di rebinding di CO dopo fotodissociazione per COAHb1 e COAHb2 incapsulate in gel di silice; per confronto nella figura sono riportate anche le curve ottenute in soluzione e in gel in assenza di glicerolo.

Come già osservato per il gel, l'aumento di viscosità del mezzo ha un effetto molto diverso per le due proteine. In AHb2 l'effetto è quello di un enorme aumento nell'ampiezza del rilegame geminato, più intenso tanto più è alta la viscosità. Il rilegame dell'interno della matrice proteica è talmente efficiente che in proteine immerse in glicerolo 100% a 10 °C (figura 3.32) solo l'1% delle molecole di CO riesce ad uscire in soluzione. Ma l'effetto più interessante

si ha sicuramente per AHb1: anche per questa proteina si ha un grande aumento del rilegame geminato, già visibile all'80% di glicerolo ma molto evidente al 100%. Tuttavia la caratteristica più significativa che emerge da queste curve di legame in condizioni di alta viscosità è la inequivocabile presenza di più fasi cinetiche distinte nel legame geminato, come sarà discusso in dettaglio nei prossimi paragrafi.

In figura 3.32 si può apprezzare la grande differenza fra le cinetiche misurate in presenza di 80% glicerolo e quelle in glicerolo puro, specie per AHb1. Questo implica che l'interazione fra la proteina e l'ambiente circostante sia modulata dalla presenza del glicerolo: in particolare, il grande aumento della viscosità che si osserva quando ci si avvicina a una frazione di glicerolo del 100%<sup>166</sup> e i grandi effetti osservati nelle cinetiche di rebinding dopo la rimozione delle molecole di acqua di idratazione residue da vetri di trealosio<sup>99, 163, 167</sup> suggeriscono che sia effetti di viscosità che di idratazione contribuiscono a dare origine al grande aumento di rilegame geminato che si osserva quando ci si avvicina a 100% glicerolo.

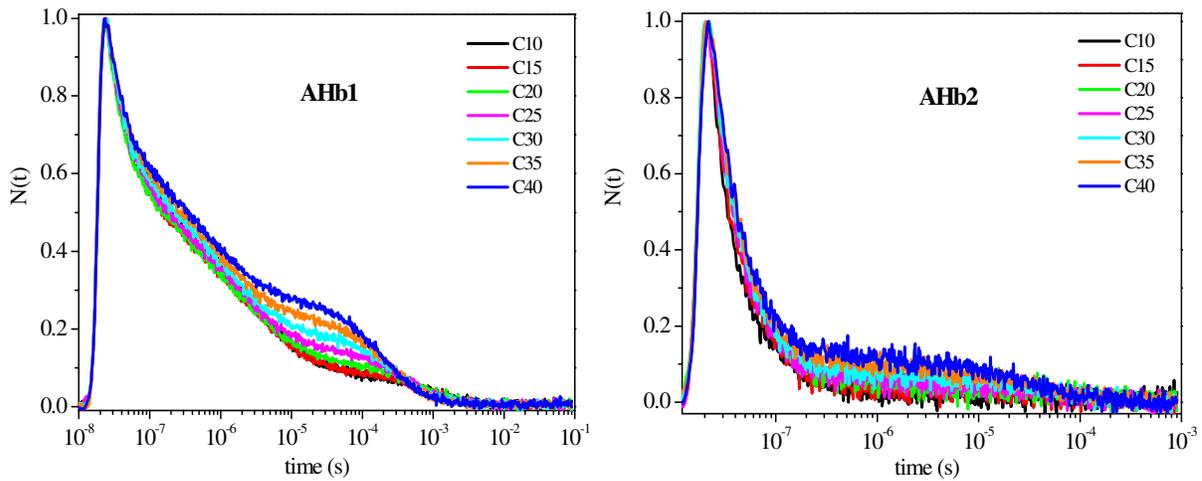


**Figura 3.32:** Confronto fra cinetiche di rebinding di CO dopo fotolisi di COAHb1 (a sinistra) e COAHb2 (a destra) acquisite per una soluzione omogenea (pallini) e per gel immersi in una soluzione tampone (curva rossa), in una soluzione contenente glicerolo all'80% (curva blu) ed in glicerolo puro (100%, curva verde). Tutte le curve sono state misurate a  $T=10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $[\text{CO}] = 1\text{ mM}$ .

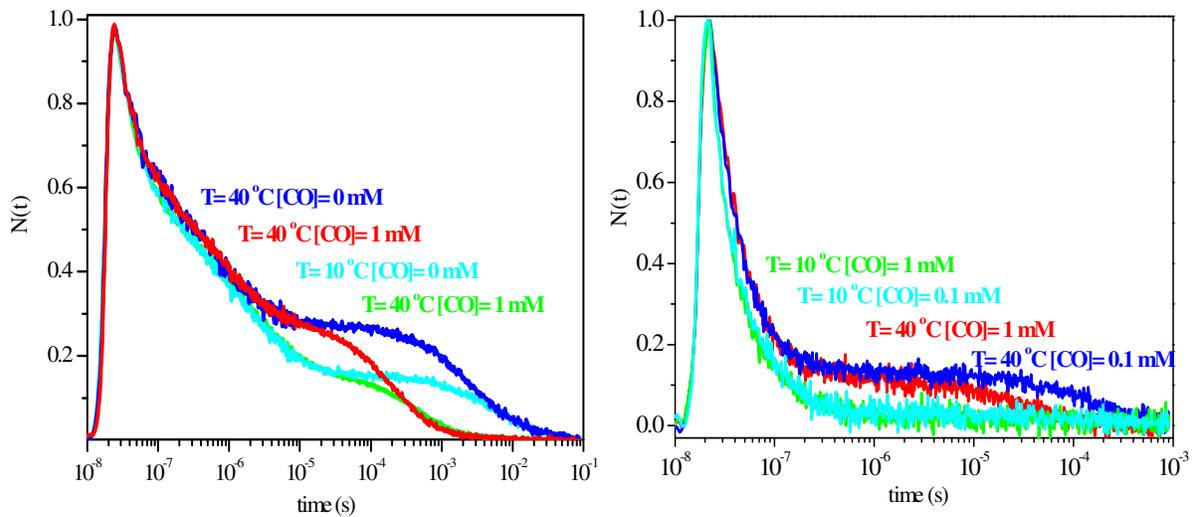
Gli esperimenti sono stati effettuati in funzione della temperatura (nel range  $10\text{-}40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) su gel immersi in soluzioni equilibrate con tre diverse pressioni parziali di CO: 1 atm, 0.1 atm e 0 atm, corrispondente ad una soluzione in cui il CO disciolto è stato rimosso saturandola di azoto puro, lasciando quindi solo le molecole di CO legate alla proteina. Nella figura 3.33 sono riportati i

risultati degli esperimenti in funzione della temperatura, mentre nella figura 3.34 vengono confrontati gli effetti relativi della temperatura e della concentrazione di CO per alcune condizioni sperimentali selezionate. L'assoluta indipendenza della fase più veloce dalla concentrazione di CO consente di identificarla con un processo di rilegame dall'interno della matrice proteica. Grazie alla dipendenza dalla concentrazione di ligando, a tempi più lunghi è riconoscibile per AHb1 una fase di rilegame bimolecolare di molecole di CO dal solvente, con efficienza enormemente ridotta rispetto alla soluzione. La presenza di un processo del secondo ordine in AHb1 in queste condizioni di alta viscosità è indicazione del fatto che il processo di scambio fra l'interno della matrice proteica e il solvente sia relativamente agevole, con ogni probabilità assistito dal tunnel idrofobico identificato nella struttura determinata con *homology modeling* (paragrafo 3.3.1.2). Anche in AHb2 si osserva la presenza di una fase bimolecolare di ampiezza molto piccola, ma solo ad alte temperature, alle quali una piccola parte delle molecole di CO (al massimo il 10%) riesce ad uscire in soluzione. In questo caso, sono le fluttuazioni proteiche a permettere l'uscita di una piccola frazione di molecole di CO in soluzione anche ad alta viscosità, come confermato dal fatto che la fase bimolecolare si osserva solo alle temperature più alte. L'ampiezza della fase geminata decresce all'aumentare della temperatura in AHb1 (soprattutto nel range di tempi da 100 ns a 20  $\mu$ s, mentre la fase sotto i 100 ns è scarsamente influenzata dalla temperatura), diversamente da quanto visto in soluzione e nei gel immersi in soluzione acquosa, suggerendo che in queste condizioni di elevata viscosità l'uscita del ligando in soluzione sia assistita dalla dinamica proteica e che il processo presenti quindi una barriera di attivazione, ovvero che il rebinding all'eme sia favorito sul processo di uscita in soluzione all'abbassarsi della temperatura a causa della maggiore energia di attivazione del processo di uscita. Nei prossimi paragrafi questo punto sarà approfondito. In AHb2, l'ampiezza della fase geminata decresce dal 99% a 10 °C al 90% a 40 °C.

Le cinetiche di rebinding del CO sono state analizzate utilizzando approcci differenti per evidenziare i ruoli relativi delle fasi cinetiche. Dai risultati di questo studio si è poi costruito lo schema cinetico necessario per riprodurre fedelmente le curve sperimentali.



**Figura 3.33:** Cinetiche di rebinding di CO dopo fotolisi su gel immersi in 100% glicerolo di AHb1 (a sinistra) ed AHb2 (a destra) in funzione della temperatura. Le temperature di acquisizione per ogni curva sono riportate in legenda. [CO] = 1 mM.

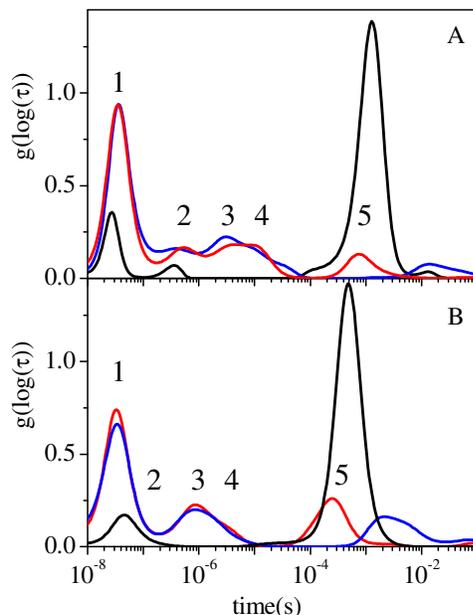


**Figura 3.34:** Cinetiche di rebinding di CO dopo fotolisi su gel immersi in 100% glicerolo di AHb1 (a sinistra) ed AHb2 (a destra) a due temperature selezionate (10 °C e 40 °C) e a due concentrazioni di CO (1 mM e 0 mM per AHb1, 1 mM e 0.1 mM per AHb2).

### **3.4.2.1 Analisi MEM delle cinetiche di legame del CO a gel di AHb1 ed AHb2 immersi in glicerolo**

#### **AHb1**

L'analisi sulle cinetiche di rebinding di CO ad AHb1 incapsulata in gel di silice ed in presenza di 100% glicerolo mostra con chiarezza la presenza di fasi distinte nel rilegame geminato, consistente con l'esistenza di processi di migrazione del ligando in un sistema di cavità interne alla matrice proteica. La figura 3.35, in cui è riportato il confronto fra i risultati dell'analisi MEM sulle curve misurate per gel in soluzione acquosa ed in 100% glicerolo, evidenzia innanzitutto l'effetto di aumento dell'ampiezza del rilegame geminato. Le distribuzioni dei tempi di vita associati alla fase geminata nei gel di AHb1 immersi in glicerolo mostrano bande strutturate con picchi distinti a 30 ns (picco indicato in figura 3.35 con il numero (1)), 500 ns (2), 3  $\mu$ s (3) e 10  $\mu$ s (4) a 10 °C. A 40 °C sono invece distinguibili solo tre bande. Questi picchi sono scarsamente dipendenti dalla concentrazione di CO (confronto fra linea rossa e linea blu di figura 3.35), il che conferma quanto affermato nel paragrafo precedente sulla natura unimolecolare di questi processi. La dipendenza dalla temperatura di queste bande (confronto fra pannello superiore ed inferiore di figura 3.35) suggerisce l'esistenza di una barriera di attivazione per queste fasi cinetiche. La banda a tempi più brevi è ragionevolmente attribuibile al rebinding dal sito primario di docking all'interno della tasca distale; questo processo mostra un'ampiezza ed una posizione (passa da 30 ns a 10 °C a 48 ns a 40 °C) dipendenti dalla temperatura nel range analizzato. L'ampiezza di questa banda è particolarmente accresciuta dalla presenza di glicerolo, a significare che l'aumento di viscosità favorisce in modo marcato l'evento di ricombinazione del ligando dal sito primario di docking nella tasca dell'eme.



**Figura 3.35:** Distribuzioni di tempi di vita ottenute con MEM per cinetiche di rebinding di CO a gel di COAHb1 immersi in soluzione acquosa (linea nera), in 100% glicerolo ad 1 atm CO (linea rossa) ed in 100% glicerolo in soluzione satura di azoto (linea blu).  $T=10\text{ }^{\circ}\text{C}$  per il pannello A e  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$  per il pannello B.

Le altre bande associate a fasi cinetiche di rilegame del CO dall'interno della matrice proteica mostrano attivazione termica: la banda 2 probabilmente si fonde con la prima, e le rimanenti si spostano a tempi più brevi. Supponendo che queste bande riflettano la migrazione del ligando in cavità idrofobiche interne alla matrice proteica, ci si attende che esse mostrino velocità e ampiezze (efficienze) dipendenti dalla temperatura e dalla viscosità. L'effetto apparente di dipendenza inversa dalla temperatura delle cinetiche di figura 3.34 può essere così razionalizzato, ammettendo l'esistenza di processi attivati termicamente di migrazione del ligando dalla tasca dell'eme a siti secondari di docking ed in soluzione. Come osservato per altre emoglobine, l'aumento della temperatura favorisce l'uscita in soluzione del ligando, con un aumento dell'ampiezza della parte più lenta della cinetica di rebinding.

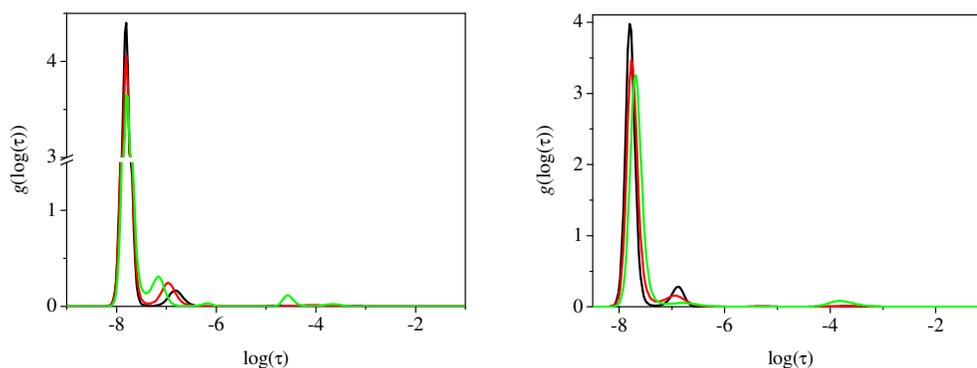
La forte dipendenza dalla concentrazione di CO del picco della banda indicata in figura con il numero 5, che passa da 750  $\mu\text{s}$  ad 1 atm CO a 14 ms in soluzione satura di azoto, indica chiaramente che si tratta di un processo di secondo ordine di rilegame dalla soluzione, confermando che il CO è ancora in grado di fuoriuscire dalla matrice proteica di AHb1 in queste condizioni sperimentali. In accordo con questa attribuzione, il processo presenta una notevole attivazione termica, con tempi di vita apparenti che scendono a 250  $\mu\text{s}$  (1 atm CO) e 2 ms (0 atm CO) a 40  $^{\circ}\text{C}$ . L'effetto del glicerolo su questa banda è ovviamente quello di una forte

diminuzione dell'ampiezza rispetto alla corrispondente osservata in gel immerso in soluzione acquosa; ad esempio a 10 °C e 1 atm CO la banda in glicerolo ha un'ampiezza che è solo il 10% di quella in gel in assenza di glicerolo (figura 3.35).

## AHb2

Dall'analisi MEM delle cinetiche di rebinding di CO a gel di AHb2 immersi in glicerolo puro si ottiene una distribuzione di tempi di vita con un picco principale a  $\log(\tau) \sim 7.8$  a 10 °C che si sposta a tempi leggermente maggiori all'aumentare della temperatura (figura 3.36). Un secondo picco di ampiezza molto più piccola e fortemente dipendente dalla temperatura è presente a  $\log(\tau) \sim 6.8$  sempre a 10 °C, suggerendo la presenza di un processo in cui il CO si rilega da un sito secondario di docking, a differenza dei risultati ottenuti finora sulle misure in soluzione e gel in soluzione acquosa, che indicavano la presenza di un unico processo nella fase di rebinding geminato. Su scale di tempi maggiori, l'analisi MEM riflette il processo, dall'ampiezza molto piccola, tanto da divenire visibile solo a 40 °C, di rebinding dalla soluzione.

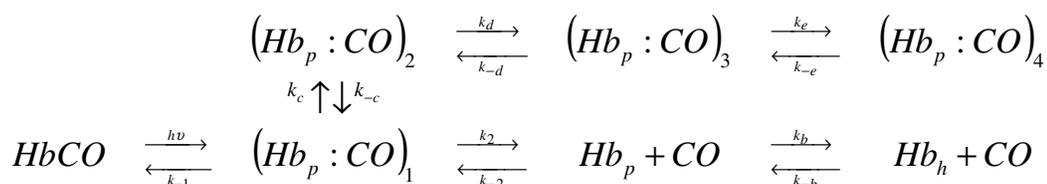
L'analisi MEM su curve di rebinding ad AHb2 sembra affermare che in condizioni di alta viscosità anche per questa proteina si osserva un processo di migrazione del ligando in siti di docking secondari interni alla matrice proteica, anche se in misura molto minore rispetto a quanto trovato per AHb1, la struttura della quale è infatti molto più ricca di cavità interconnesse e di grandi dimensioni rispetto a quella di AHb2, secondo i risultati dell'*homology modeling*.



**Figura 3.36:** Distribuzioni di tempi di vita ottenuti dall'analisi MEM di cinetiche di rebinding del CO a gel di AHb2 in 100% glicerolo equilibrato con 1 mM CO (sinistra) e 0.1 mM CO (a destra) alle temperature di 10 °C (linea nera), 15 °C (linea rossa) e 40 °C (linea verde).

### 3.4.2.2 Analisi numerica delle cinetiche di legame del CO a gel di AHb1 ed AHb2 in glicerolo

I risultati dell'analisi MEM sulle cinetiche di legame del CO a gel di AHb1 suggeriscono la presenza di tre siti di docking all'interno della matrice proteica, oltre alla tasca distale dell'eme; è pertanto necessario modificare il modello cinetico finora utilizzato per modellizzare le cinetiche sperimentali, almeno per quanto riguarda AHb1, aggiungendo due "trappole" a quella considerata finora:



Lo schema è semplificato da alcune approssimazioni ragionevoli: le trappole sono raggiungibili solamente in modo sequenziale, come sembra suggerire lo studio di *homology modeling* (figura 3.13 e 3.14), e dal momento che nessuna cavità si affaccia direttamente sul solvente, l'uscita in soluzione richiede che il ligando ritorni nel sito primario di docking, nella vicinanza del quale si trova il tunnel apolare connesso con l'esterno (figura 3.13). È inoltre trascurata la possibilità di formazione di esacoordinazione mentre il ligando si trova all'interno delle trappole, date le diverse scale temporali dei processi. La nomenclatura è la stessa presentata in figura 3.6, a parte il fatto che le trappole sono indicate con un numero progressivo. Lo schema prevede dunque la migrazione del ligando dalla tasca distale attraverso una serie di siti di docking temporanei, da cui il CO rilega su tempi più lunghi rispetto a quelli osservati per il sito primario di docking; la competizione tra questa migrazione e l'uscita in solvente determina l'ampiezza della ricombinazione geminata. Nello schema è ovviamente inserita anche la competizione fra CO ed istidina distale per il sesto legame di coordinazione dell'eme, ma dati i tempi lunghi della reazione di legame dell'istidina, questa competizione è stata presa in considerazione solo quando il ligando è uscito in soluzione, come già visto sulle analisi in soluzione ed in gel di silice.

Anche lo schema di equazioni differenziali derivato dal modello cinetico per descrivere gli andamenti temporali delle concentrazioni delle specie coinvolte nel processo di rebinding dovrà essere ovviamente modificato di conseguenza, per accogliere la possibilità di stoccaggio del ligando nei due "nuovi" siti di docking.

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{PCO}]}{dt} = & -k_{-1}([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) - k_2([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) + k_{-2}([\text{P}_0] + [\text{P}])[\text{CO}_0] \\ & - k_a([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) + k_{-a}([\text{HCO}_0] + [\text{HCO}]) - k_c([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) \\ & + k_{-c}([\text{TRA}_0] + [\text{TRA}_1]) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{HCO}]}{dt} = & k_a([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) - k_{-a}([\text{HCO}_0] + [\text{HCO}]) + k_3([\text{HCO}_0] + [\text{HCO}]) \\ & - k_{-3}([\text{H}_0] + [\text{H}])[\text{CO}_0] \end{aligned}$$

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = -k_{-2}([\text{P}_0] + [\text{P}])[\text{CO}_0] + k_2([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) + k_{-b}([\text{H}_0] + [\text{H}]) - k_b([\text{P}_0] + [\text{P}])$$

$$\frac{d[\text{H}]}{dt} = k_3([\text{HCO}_0] + [\text{HCO}]) - k_{-3}([\text{H}_0] + [\text{H}])[\text{CO}_0] + k_b([\text{P}_0] + [\text{P}]) - k_{-b}([\text{H}_0] + [\text{H}])$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{TRA}_1]}{dt} = & k_c([\text{PCO}_0] + [\text{PCO}]) - k_{-c}([\text{TRA}_{1_0}] + [\text{TRA}_1]) + k_{-d}([\text{TRA}_{2_0}] + [\text{TRA}_2]) \\ & - k_d([\text{TRA}_{1_0}] + [\text{TRA}_1]) \end{aligned}$$

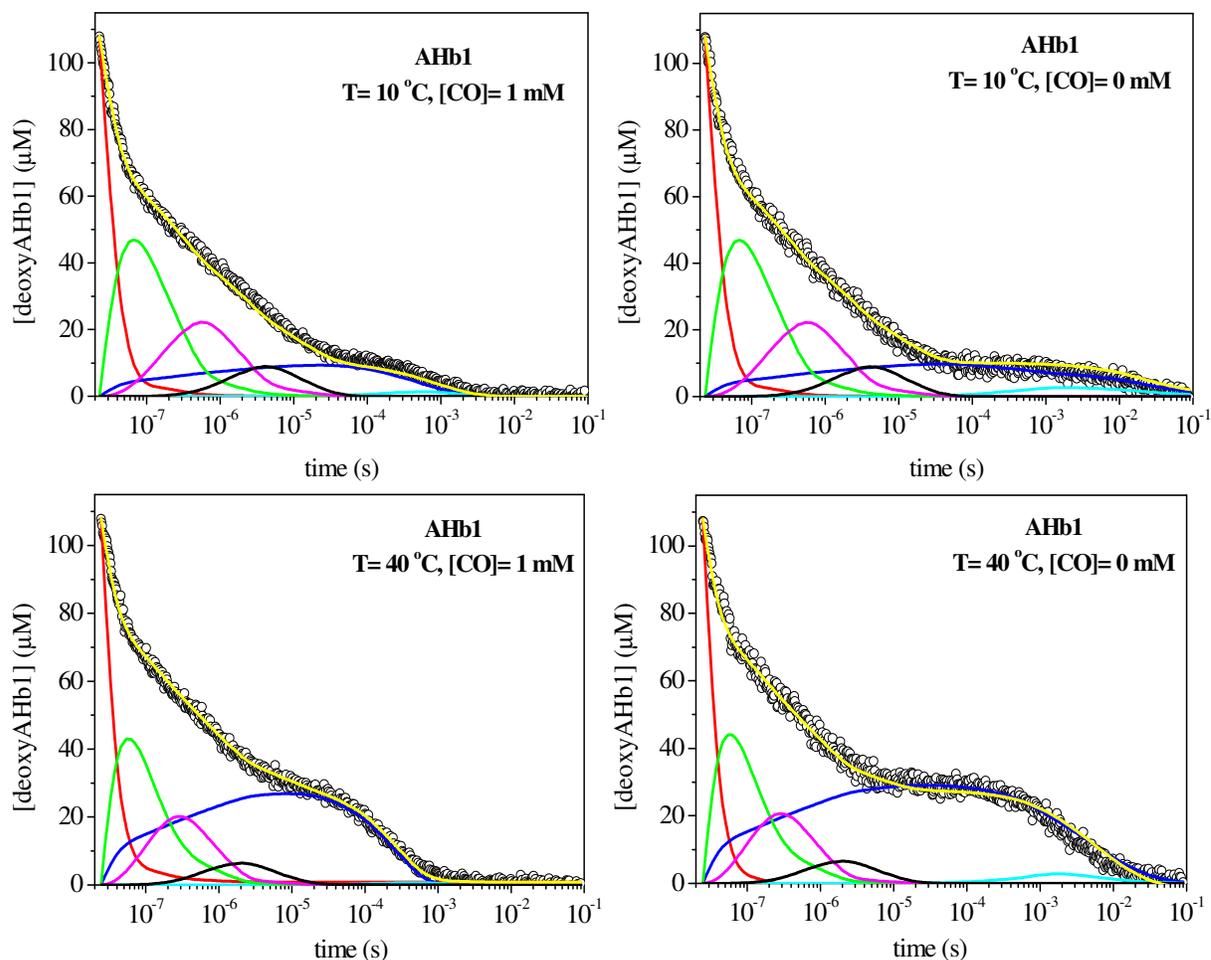
$$\begin{aligned} \frac{d[\text{TRA}_2]}{dt} = & k_d([\text{TRA}_{1_0}] + [\text{TRA}_1]) - k_{-d}([\text{TRA}_{2_0}] + [\text{TRA}_2]) + k_{-e}([\text{TRA}_{3_0}] + [\text{TRA}_3]) \\ & - k_e([\text{TRA}_{2_0}] + [\text{TRA}_2]) \end{aligned}$$

$$\frac{d[\text{TRA}_3]}{dt} = +k_e([\text{TRA}_{2_0}] + [\text{TRA}_2]) - k_{-e}([\text{TRA}_{3_0}] + [\text{TRA}_3])$$

dove  $\text{TRA}_1$ ,  $\text{TRA}_2$  e  $\text{TRA}_3$  corrispondono rispettivamente alle specie  $(\text{Hb}_p \cdot \text{CO})_2$ ,  $(\text{Hb}_p \cdot \text{CO})_3$  e  $(\text{Hb}_p \cdot \text{CO})_4$  dello schema cinetico.

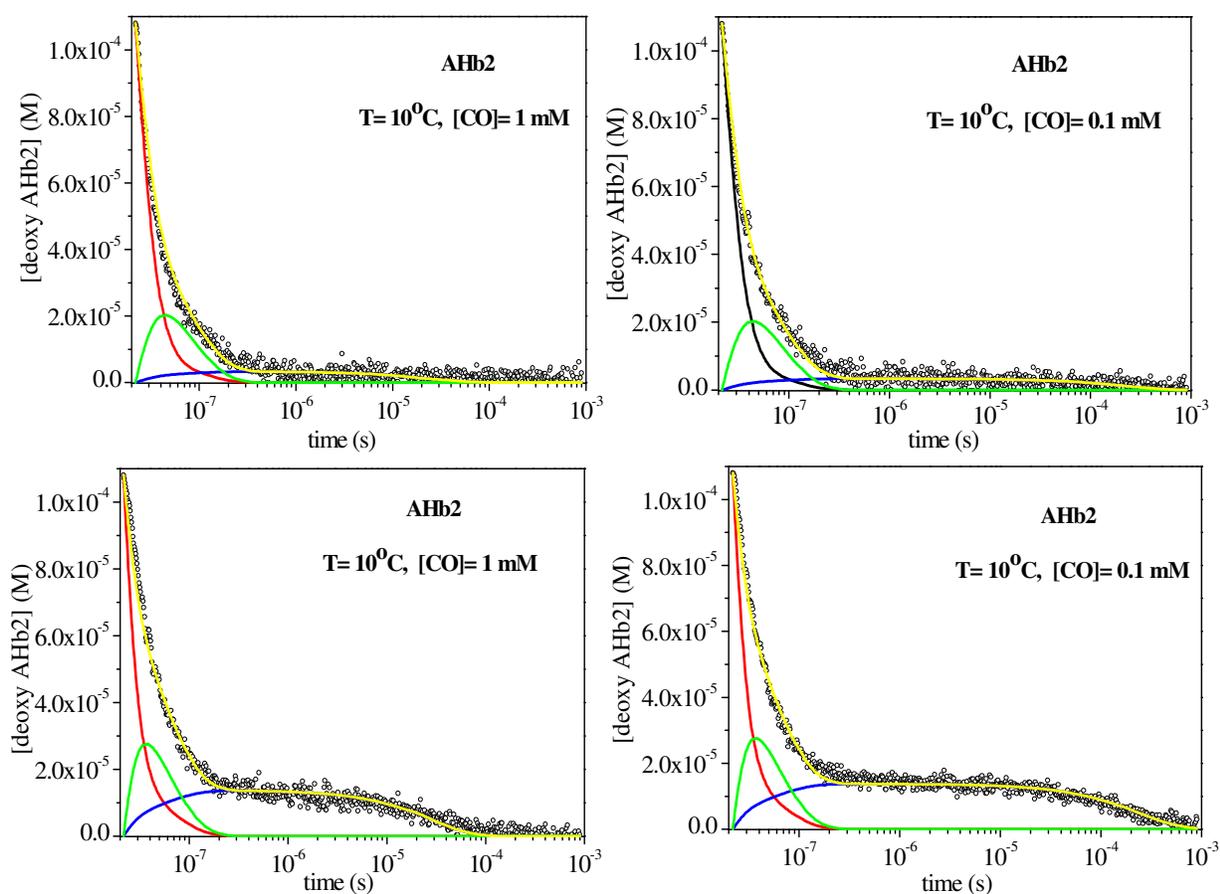
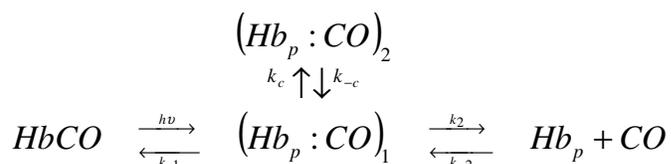
Come già descritto nel paragrafo 3.3.1.1, le equazioni differenziali sono state risolte numericamente (con la funzione ODE15s di MatLab 7.0) e le costanti di velocità microscopiche sono state ottimizzate per ottenere il miglior fit sui dati sperimentali attraverso una versione per MatLab del pacchetto di minimizzazione Minuit (CERN). Come nei casi precedenti, è stata effettuata un'analisi globale sulle curve acquisite alla stessa temperatura (nel range 10-40 °C) ed in soluzioni contenenti la stessa concentrazione di glicerolo, a diverse pressioni parziali di CO (1, 0.1 e 0 atm, ovvero in soluzione saturata con azoto puro) per ottenere una maggiore affidabilità nei risultati. Dalla dipendenza dalla temperatura delle costanti di velocità per i vari processi sono stati stimati i parametri termodinamici costruendo i plot di Eyring, che sono sempre risultati lineari. Nelle figure 3.37 e 3.38 sono riportati alcuni esempi dei risultati

dell'analisi numerica sulle cinetiche di re-binding di AHb1 ed AHb2 incapsulati in gel di silice e in presenza di 100% glicerolo; si vede che l'espansione del modello suggerita dai risultati delle analisi MEM permette di ricostruire le curve sperimentali in maniera eccellente, a tutte le temperature e le concentrazioni di CO analizzate. La tabella 3.6 mostra i risultati dell'analisi per AHb1 ed AHb2 riportando entropie ed entalpie di attivazione e le costanti di velocità a 20 °C.



**Figura 3.37:** Esempi di risultati dell'analisi globale sulle cinetiche di re-binding di CO a gel di AHb1 immersi in 100% glicerolo e saturati con 1 atm CO (a sinistra) o 1 atm N<sub>2</sub> (a destra), a T= 10 °C (sopra) e T= 40 °C (sotto). I fit (linee gialle) sono sovrapposti ai dati sperimentali (cerchietti). Nelle figure sono riportati anche gli andamenti temporali delle specie rilevanti nel definire la cinetica di re-binding:  $(Hb_p:CO)_1$  (rosso);  $(Hb_p:CO)_2$  (verde, TRA<sub>1</sub> nello schema di equazioni differenziali);  $(Hb_p:CO)_3$  (magenta, TRA<sub>2</sub>);  $(Hb_p:CO)_4$  (nero, TRA<sub>3</sub>); Hb<sub>n</sub> (ciano) e Hb<sub>p</sub> (blu). Il modello con tre siti di docking secondari, proposto sulla scorta dei risultati dell'analisi MEM, riproduce perfettamente le curve sperimentali.

Data l'evidenza di un solo sito di docking secondario interno alla proteina e considerando la scarsa efficienza della competizione di HisE7, dovuta al fatto che il rilegame del CO avviene quasi esclusivamente dall'interno della matrice proteica (quindi con tempi più brevi di quelli di formazione di esacoordinazione intramolecolare), lo schema cinetico minimo necessario per descrivere le cinetiche di legame del CO a gel di AHb2 risulta decisamente più semplice rispetto al caso di AHb1:



**Figura 3.38:** Esempi di risultati dell'analisi globale sulle cinetiche di rebinding di CO a gel di AHb2 immersi in 100% glicerolo e saturati con 1 atm CO (a sinistra) o 0.1 atm CO (a destra), a T= 10 °C (sopra) e T= 40 °C (sotto). I fit (linee gialle) sono sovrapposti ai dati sperimentali (cerchietti). Nelle figure sono riportati anche gli andamenti temporali delle specie rilevanti nel definire la cinetica di rebinding: (Hbp:CO)<sub>1</sub> (rosso); (Hbp:CO)<sub>2</sub> (verde, TRA<sub>1</sub> nello schema di equazioni differenziali) e Hb<sub>p</sub> (blu) La formazione di specie esacoordinata non è identificabile a causa della scarsa probabilità di uscita in soluzione delle molecole di CO. Anche in questo caso, le curve sperimentali sono perfettamente fittate seguendo i risultati dell'analisi MEM (un sito secondario di docking oltre alla tasca distale).

**Tabella 3.6:** Costanti di velocità microscopiche ottenute per AHb1 e AHb2 in gel di silice 100% glicerolo dai fit delle curve di laser flash photolysis a 20 °C. Le entalpie ( $\Delta H^\ddagger$ ) e le entropie ( $\Delta S^\ddagger$ ) di attivazione sono state stimate dai grafici lineari di Eyring per ciascuna costante di velocità  $k_i$ ; l'analisi è stata eseguita nel range di temperature 10-40 °C.

	AHb1 Gel+ gly 100%			AHb2 Gel+ gly 100%		
	$k$	$\Delta S^\ddagger$ (cal/mol K)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$k$	$\Delta S^\ddagger$ (cal/mol K)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)
$k_{-1}$ ( $10^6 \text{ s}^{-1}$ )	26	-	-	63	-	-
$k_2$ ( $10^7 \text{ s}^{-1}$ )	0.4	$-5.6 \pm 0.8$	$6.6 \pm 0.2$	0.36	$-4 \pm 1$	$7.2 \pm 0.4$
$k_{-2}$ ( $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	0.7	$8 \pm 4$	$10 \pm 1$	18.5	$-7 \pm 1$	$3.9 \pm 0.3$
$k_b$ ( $\text{s}^{-1}$ )	101	$-24 \pm 3$	$7 \pm 1$	-	-	-
$k_{-b}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	337	$-22 \pm 3$	$7 \pm 1$	-	-	-
$k_c$ ( $10^7 \text{ s}^{-1}$ )	4	-	-	4.0	$-9 \pm 2$	$4.2 \pm 0.7$
$k_{-c}$ ( $10^7 \text{ s}^{-1}$ )	0.51	$-21.1 \pm 0.6$	$1.9 \pm 0.2$	2.9	$-11 \pm 2$	$3.8 \pm 0.7$
$k_d$ ( $10^6 \text{ s}^{-1}$ )	3.2	$-17 \pm 1$	$3.4 \pm 0.3$	-	-	-
$k_{-d}$ ( $10^6 \text{ s}^{-1}$ )	1.2	$-3 \pm 1$	$8.1 \pm 0.4$	-	-	-
$k_e$ ( $10^5 \text{ s}^{-1}$ )	4	-	-	-	-	-
$k_{-e}$ ( $10^5 \text{ s}^{-1}$ )	2.9	-	-	-	-	-

Dalle curve di entrambe le proteine si nota subito che la popolazione delle trappole interne alla matrice proteica è praticamente indipendente dalla pressione parziale di CO presente nella soluzione in cui sono immersi i gel, mentre una variazione di temperatura ha un grande effetto sia sulle ampiezze sia sui tempi di vita di questi intermedi. In particolare la popolazione di  $(Hb_p:CO)_4$  in AHb1 è apprezzabile fino a 30  $\mu\text{s}$  a 10 °C, mentre a 40 °C l'intermedio scompare dopo circa 10  $\mu\text{s}$ .

Ancora una volta per entrambe le proteine si ritrova la mancanza di attivazione termica per  $k_{-1}$  nel range di temperature investigato. Questo parametro per AHb1 aumenta di 5 volte quando il gel è immerso in glicerolo puro (tabelle 3.5 e 3.6), mentre la costante di velocità  $k_2$  per l'uscita in soluzione del ligando decresce almeno di un fattore 10 rispetto a quella osservata in soluzione (tabella 3.1), confermando dal punto di vista quantitativo che, in condizioni di alta viscosità, il rilegame geminato è molto più favorito dell'uscita in soluzione. L'uscita in soluzione del ligando fotodissociato è un processo attivato termicamente, con una barriera che sembra aumentare con la frazione di glicerolo in soluzione, anche se questo risultato è legato

almeno in parte al fatto che la solubilità del CO decresce all'aumentare della concentrazione di glicerolo.<sup>147</sup>

Sempre per AHb1, l'aumento di 4 volte nel valore di  $k_c$  (costante di velocità per la migrazione del CO nella cavità direttamente connessa con la tasca distale) fa sì che la ricombinazione geminata possa prolungarsi per tempi maggiori rispetto a quelli osservati per le misure in assenza di glicerolo, a causa dello stoccaggio del ligando nei vari siti di docking all'interno della matrice proteica. Un effetto equivalente sull'ampiezza della ricombinazione geminata è stato osservato in presenza di glicerolo anche per altre emoproteine come la mioglobina<sup>107, 109, 110, 143, 147, 149, 163</sup> ed emoglobine troncate.<sup>106</sup>

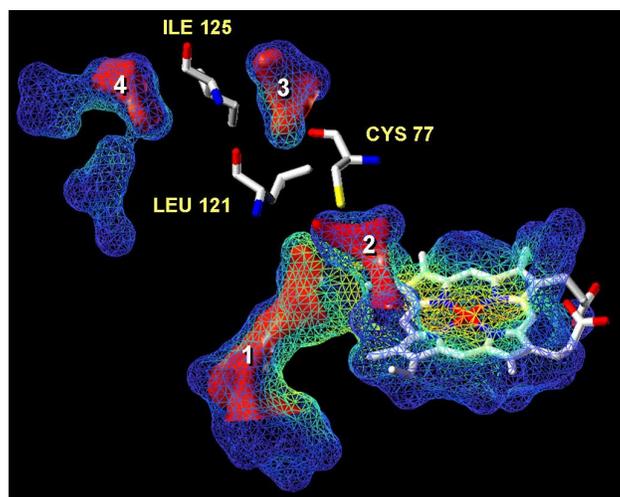
Per quanto riguarda AHb2, l'ulteriore aumento della costante di velocità di legame dal sito primario di docking e la forte diminuzione della  $k_2$  per l'uscita in soluzione, in parte dovuta alla minore solubilità del CO in glicerolo ( $k_2$  è 10 volte minore rispetto a quella trovata nella proteina incapsulata in gel in soluzione tampone) sono una conferma quantitativa dell'evidenza che il rilegame avviene quasi totalmente dall'interno della matrice proteica. Il fatto che in condizioni di alta viscosità il rilegame geminato non sia più riproducibile da un esponenziale semplice, e nello schema cinetico sia necessario aggiungere un sito di docking secondario per riprodurre in modo soddisfacente le curve sperimentali, è in perfetto accordo con i risultati dell'analisi MEM, che forniva due fasi cinetiche distinte per il rilegame geminato ad AHb2 in queste condizioni di alta viscosità. La "trappola" si popola con una velocità simile a quella osservata per il sito di docking più vicino alla tasca dell'eme in AHb1 nelle stesse condizioni, ma in AHb2 il ligando fuoriesce più rapidamente: l'intermedio scompare in 200 ns, e insieme alla scarsa probabilità di uscita in soluzione questo rende conto della velocità molto maggiore del processo complessivo di re-binding ad AHb2 rispetto ad AHb1. In queste condizioni si è dunque osservata la presenza di almeno un sito di docking secondario anche per AHb2, anche se per quanto detto sopra appare improbabile che questo possa avere implicazioni funzionali come invece sembra avvenire per AHb1.

## Conclusioni

In questa tesi di dottorato è stata caratterizzata la reattività per il monossido di carbonio di due emoglobine non simbiotiche di *Arabidopsis thaliana* (AHb1 ed AHb2) attraverso esperimenti di laser flash photolysis al nanosecondo. Le cinetiche di rebinding del CO sono state misurate al variare di diversi parametri chimico fisici quali la viscosità e la temperatura, anche utilizzando la tecnica di immobilizzazione all'interno di gel di silice nanoporosi. I diversi effetti di queste condizioni sperimentali sulla cinetica di legame alle due proteine suggeriscono un diverso ruolo della dinamica proteica sulla reattività. In condizioni di alta viscosità, la cinetica di rebinding del CO ad AHb1 suggerisce la presenza di processi di migrazione del ligando fotodissociato attraverso una serie di siti di stoccaggio temporaneo. Per contro, il rebinding ad AHb2 è molto influenzato dalla dinamica della proteina, mentre gli effetti prodotti dalla migrazione sembrano essere piccoli. Per poter meglio caratterizzare i processi di migrazione e di coinvolgimento della dinamica delle due proteine sono state condotte misure in condizioni di elevata viscosità, immergendo i gel di COAHb1 e COAHb2 in glicerolo puro. Questo sfavorisce l'uscita del CO verso il solvente e permette di amplificare e separare i processi di migrazione all'interno della matrice proteica.

Le conoscenze sull'interconnessione fra le dinamiche proteiche e reattività si sono accresciute negli ultimi anni; anche grazie ai risultati ottenuti mediante tecniche di cristallografia risolta in tempo. Grazie a questi progressi, l'esistenza di cavità idrofobiche in grado di intrappolare temporaneamente il ligando è stata dimostrata in maniera inequivocabile ed è ormai accettata come una delle spiegazioni per l'osservazione di molteplici fasi cinetiche distinte di rebinding geminato in esperimenti di laser flash photolysis in condizioni di alta viscosità. Le molteplici fasi cinetiche presenti nel legame geminato osservate per le curve di rebinding ai gel di COAHb1 in glicerolo possono pertanto essere messe in relazione con la presenza di cavità idrofobiche interne alla matrice proteica ed accessibili dalla tasca distale dell'eme, in cui il ligando può transientemente migrare, e da cui può poi rilegare a tempi differenti. Il sistema di cavità nella struttura tridimensionale di AHb1 costruita per *homology modeling* (paragrafo 3.3.1.2) fornisce un quadro strutturale per identificare potenziali siti di legame per il CO all'interno della matrice. Il sito di *docking* primario si trova presumibilmente all'interno della cavità indicata con 2 in figura 3.39, sul lato distale. È possibile che nelle cavità indicate con 1, 3 e 4 in figura 3.39 si trovino i siti di *docking* aggiuntivi per il ligando

fotodissociato, ma dall'analisi condotta non è ovviamente possibile un'identificazione precisa delle cavità corrispondenti a ciascuna fase cinetica.



**Figura 3.39:** Sistema di cavità in AHb1 costruito per homology modeling (paragrafo 3.3.1.2); nella figura sono mostrati anche i residui che regolano l'accessibilità di questi siti di docking.

La possibilità di “intrappolare” il ligando all'interno della matrice proteica per tempi (per AHb1 fino a decine di microsecondi, vedi paragrafo 3.4.2.2) molto maggiori di quelli che si avrebbero in assenza di questi siti secondari può essere correlata ad un meccanismo funzionale. In particolare l'ipotesi provata *in vitro* e proposta *in vivo* per il ruolo di AHb1 è che la proteina agisca come NO diossigenasi (paragrafo 1.3.1); come già discusso, questa reazione richiede il binding sequenziale di O<sub>2</sub> ed NO in quanto quest'ultima molecola reagisce con la forma ossigenata della proteina. Dato che AHb1 è espressa in condizioni di ipossia, in cui si osserva un aumento della concentrazione di NO, i siti di *docking* secondari osservati in AHb1 potrebbero servire per immagazzinare l'NO in attesa che una molecola di ossigeno si leghi all'eme e assicurare così un'elevata velocità alla reazione complessiva di detossificazione da NO.<sup>57</sup> Inoltre lo stoccaggio di molecole di NO all'interno della proteina potrebbe anche rappresentare un meccanismo fine per la regolazione di questa reazione.

Questa ipotesi sul meccanismo di funzionamento basata sul *docking* dell'NO in cavità idrofobiche situate all'interno della matrice proteica, è stata proposta per altre emoglobine come neuroglobina<sup>33</sup>, mioglobina<sup>5</sup> ed emoglobine troncate<sup>169</sup>. In particolare nelle emoglobine troncate di *M. tuberculosis*, *P. caudatum* e *C. eugametos* la conversione da NO a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> che

avviene nella tasca distale dell'eme potrebbe essere promossa non solo da un network di legami idrogeno che polarizza la molecola di O<sub>2</sub> legata all'eme ma anche da una diffusione facilitata dei partner di reazione (ovvero O<sub>2</sub> ed NO) dalla soluzione alla tasca distale dell'eme, dall'accumulo di reagenti lungo il tunnel idrofobico e dalla rimozione rapida del prodotto di reazione dalla cavità dell'eme verso la soluzione.<sup>110</sup> La caratterizzazione dell'esistenza e dell'accessibilità di siti di *docking* e della reattività di ciascun intermedio è pertanto un passo fondamentale per indicare un possibile ruolo di queste "riserve di reagenti" nel metabolismo dell'NO.

Per quanto riguarda AHb2, gli effetti della variazione di temperatura e viscosità sulle cinetiche di re-binding del CO a questa proteina suggeriscono che il percorso di migrazione del ligando all'interno della matrice proteica sia molto più semplice: solo in condizioni di altissima viscosità si rende visibile il re-binding da un singolo sito secondario, mentre le dinamiche proteiche influenzano in modo decisivo la probabilità di uscita in soluzione. Anche se non è possibile connettere queste informazioni ad un possibile ruolo biologico della proteina, è chiaro che in AHb2 il ligando ha poche probabilità di essere conservato temporaneamente in stati metastabili all'interno della proteina.

## Riferimenti Bibliografici

1. Pesce, A., M. Bolognesi, P. Ascenzi, and M. Milani, *Truncated hemoglobins: trimming the classical 'three-over-three' globin fold to a minimal size*. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2001. 29(3): p. 123-125(3).
2. Pesce, A., M. Couture, S. Dewilde, M. Guertin, K. Yamauchi, P. Ascenzi, L. Moens, and M. Bolognesi, *A novel two-over-two alpha-helical sandwich fold is characteristic of the truncated hemoglobin family*. *The EMBO Journal*, 2000. 19(11): p. 2424-2434.
3. Pesce, A., M. Nardini, S. Dewilde, E. Geuens, K. Yamauchi, P. Ascenzi, A.F. Riggs, L. Moens, and M. Bolognesi, *The 109 Residue Nerve Tissue Minihemoglobin from *Cerebratulus lacteus* Highlights Striking Structural Plasticity of the  $\alpha$ -Helical Globin Fold*. *Structure*, 2002. 10: p. 725-735.
4. Tilton, R.F., I.D. Kuntz, and G.A. Petsko, *Cavities in proteins: structure of a metmyoglobin xenon complex solved to 1.9 Å*. *Biochemistry*, 1984. 23(13): p. 2849-2857.
5. Brunori, M., *Nitric oxide, cytochrome-c oxidase and myoglobin*. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001. 26(1): p. 21-23.
6. Weiss, J.J., *NATURE OF THE IRON-OXYGEN BOND IN OXYHAEMOGLOBIN*. *Nature*, 1964. 202: p. 83-84.
7. Brunori, M. and Q.H. Gibson, *Cavities and packing defects in the structural dynamics of myoglobin*. *EMBO reports* 2, 2001. 2(8): p. 674-679.
8. Frauenfelder, H., B.H. McMahon, R.H. Austin, K. Chu, and J.T. Groves, *The role of structure, energy landscape, dynamics, and allostery in the enzymatic function of myoglobin*. *PNAS*, 2001. 98(5): p. 2370-2374.
9. Kiger, L. and H. Wajcman, *L'hémoglobine, des micro-organismes à l'homme : un motif structural unique, des fonctions multiples*. *Haemoglobin from microorganism to man: a single protein folding, a variety of functions*. *Comptes Rendus Biologies*, 2002. 325(12): p. 1159-1174.
10. Hardison, R.C., *A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria*. *PNAS*, 1996. 93(12): p. 5675-5679.
11. Hardison, R., *Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression*. *Journal of Experimental Biology*, 1998. 201(8): p. 1099-1117.
12. Pesce, A., M. Bolognesi, A. Bocedi, P. Ascenzi, S. Dewilde, L. Moens, T. Hankeln, and T. Burmester, *Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family*. *EMBO reports*, 2002. 3(12): p. 1146-1151.
13. Horváth, O., R. Huszánk, Z. Valicsek, and G. Lendvay, *Photophysics and photochemistry of kinetically labile, water-soluble porphyrin complexes*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2006. 250(13-14): p. 1792-1803.
14. Sanctis, D.d., S. Dewilde, C. Vornrhein, A. Pesce, L. Moens, P. Ascenzi, T. Hankeln, T. Burmester, M. Ponassi, M. Nardini, and M. Bolognesi, *Bishistidyl Heme Hexacoordination, a Key Structural Property in *Drosophila melanogaster* Hemoglobin*. *J. Biol. Chem.*, 2005. 280(29): p. 27222-27229.
15. Hargrove, M., E. Brucker, B. Stec, G. Sarath, R. Arredondo-Peter, R. Klucas, J. Olson, and J. G. Phillips, *Crystal structure of a nonsymbiotic plant hemoglobin*. *Structure*, 2000. 8(9): p. 1005-1014.

16. Pesce, A., S. Dewilde, M. Nardini, L. Moens, P. Ascenzi, T. Hankeln, T. Burmester, and M. Bolognesi, *The human brain hexacoordinated neuroglobin three-dimensional structure*. *Micron*, 2003. 35(1-2): p. 63-65.
17. DeSanctis, D., S. Dewilde, A. Pesce, L. Moens, P. Ascenzi, T. Hankeln, T. Burmester, and M. Bolognesi, *Crystal Structure of Cytoglobin: The Fourth Globin Type Discovered in Man Displays Heme Hexa-coordination*. *Journal of Molecular Biology*, 2004. 336(4): p. 917-927.
18. Kundu, S., S.A. Premer, J.A. Hoy, I. James T. Trent, and M.S. Hargrove, *Direct Measurement of Equilibrium Constants for High-Affinity Hemoglobins*. *Biophys. J.*, 2003. 84: p. 3931-3940.
19. Arredondo-Peter, R., M.S. Hargrove, G. Sarath, J.F. Moran, J. Lohrman, J.S. Olson, and R.V. Klucas, *Rice hemoglobins. Gene cloning, analysis, and O<sub>2</sub>-binding kinetics of a recombinant synthesized in Escherichia Coli*. *Plant Physiol.*, 1997. 115: p. 1259-1266.
20. Milani, M., A. Pesce, M. Nardini, H. Ouellet, Y. Ouellet, S. Dewilde, A. Bocedi, P. Ascenzi, M. Guertin, L. Moens, J.M. Friedman, J.B. Wittenberg, and M. Bolognesi, *Structural bases for heme binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005. 99(1): p. 97-109.
21. Uzan, J., S. Dewilde, T. Burmester, T. Hankeln, L. Moens, D. Hamdane, M.C. Marden, and L. Kiger, *Neuroglobin and Other Hexacoordinated Hemoglobins Show a Weak Temperature Dependence of Oxygen Binding*. *Biophys. J.*, 2004. 87: p. 1186-1195.
22. Hamdane, D., L. Kiger, G.H.B. Hoa, S. Dewilde, J. Uzan, T. Burmester, T. Hankeln, L. Moens, and M.C. Marden, *High pressure enhances hexacoordination in neuroglobin and other globins*. *J Biol Chem.*, 2005. 280: p. 36809-14.
23. Kundu, S., I. James T. Trent, and M.S. Hargrove, *Plants, humans and hemoglobins*. *Trends in Plant Science*, 2003. 8(8): p. 387-393.
24. Pesce, A., S. Dewilde, M. Nardini, L. Moens, P. Ascenzi, T. Hankeln, T. Burmester, and M. Bolognesi., *Human Brain Neuroglobin Structure Reveals a Distinct Mode of Controlling Oxygen Affinity*. *Structure*, 2003. 11(9): p. 1087-1095.
25. Burmester, T., B. Weich, S. Reinhardt, and T. Hankeln, *A vertebrate globin expressed in the brain*. *Nature*, 2000. 407: p. 520-523.
26. Hamdane, D., L. Kiger, S. Dewilde, B.N. Green, A. Pesce, J. Uzan, T. Burmester, T. Hankeln, M. Bolognesi, L. Moens, and M.C. Marden, *The Redox State of the Cell Regulates the Ligand Binding Affinity of Human Neuroglobin and Cytoglobin*. *J. Biol. Chem.*, 2003. 278: p. 51713-51721.
27. Fago, A., C. Hundahl, S. Dewilde, K. Gilany, L. Moens, and R.E. Weber, *Allosteric Regulation and Temperature Dependence of Oxygen Binding in Human Neuroglobin and Cytoglobin: MOLECULAR MECHANISMS AND PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE*. *J. Biol. Chem.*, 2004. 279: p. 44417-44426.
28. Herold, S., A. Fago, R.E. Weber, S. Dewild, and L. Moens, *Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress*. *J. Biol. Chem*, 2004. 279(22): p. 22841-22847.
29. Hankeln, T., B. Ebner, C. Fuchs, F. Gerlach, M. Haberkamp, T.L. Laufs, A. Roesner, M. Schmidt, B. Weich, S. Wystub, S. Saaler-Reinhardt, S. Reuss, M. Bolognesi, D. DeSanctis, M.C. Marden, L. Kiger, L. Moens, S. Dewilde, E. Nevo, A. Avivi, R.E. Weber, A. Fago, and T. Burmester, *Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family*. *J. Inorg Biochem*, 2005. 99: p. 110-119.
30. Sun, Y., K. Jin, X.O. Mao, Y. Zhu, and D.A. Greenberg, *Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury*. *PNAS*, 2001. 98: p. 15306-15311.

31. Mammen, P.P.A., J.M. Shelton, S.C. Goetsch, S.C. Williams, J.A. Richardson, M.G. Garry, and D.J. Garry, *Neuroglobin, A Novel Member of the Globin Family, Is Expressed in Focal Regions of the Brain*. J. Histochem. Cytochem, 2002. 50: p. 1591-1598.
32. Sun, Y., K. Jin, A. Peel, X.O. Mao, L. Xie, and D.A. Greenberg, *Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo*. PNAS, 2003. 100: p. 3497-3500.
33. Brunori, M., A. Giuffrè, K. Nienhaus, G.U. Nienhaus, F.M. Scandurra, and B. Vallone, *Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: Functional pathways and conformational changes*. PNAS, 2005. 102: p. 8483-8488.
34. Vallone, B., K. Nienhaus, A. Matthes, M. Brunori, and U. Nienhaus, *The structure of carbonmonoxy neuroglobin reveals a heme-sliding mechanism for control of ligand affinity*. PNAS, 2004. 101: p. 17351-17356.
35. Brunori, M. and B. Vallone, *A globin for the brain*. The FASEB Journal., 2006. 20: p. 2192-2197.
36. Kawada, N., D.B. Kristensen, K. Asahina, K. Nakatani, Y. Minamiyama, S. Seki, and K. Yoshizato, *Characterization of a Stellate Cell Activation-associated Protein (STAP) with Peroxidase Activity Found in Rat Hepatic Stellate Cells*. J. Biol. Chem., 2001. 276(27): p. 25318-25323.
37. Schmidt, M., F. Gerlach, A. Avivi, T. Laufs, S. Wystub, J.C. Simpson, E. Nevo, S. Saaler-Reinhardt, S. Reuss, T. Hankeln, and T. Burmester, *Cytoglobin Is a Respiratory Protein in Connective Tissue and Neurons, Which Is Up-regulated by Hypoxia*. 2004. 279(9): p. 8063-8069.
38. Hoy, J.A., H. Robinson, J.T. Trent, S. Kakar, B.J. Smagge, and M.S. Hargrove, *Plant hemoglobins: A molecular fossil record for the evolution of oxygen transport*. Journal of Molecular Biology, 2007. 371: p. 168-179.
39. Minning, D.M., A.J. Gow, J. Bonaventura, R. Braun, M. Dewhirst, D.E. Goldberg, and J.S. Stamler, *Ascaris haemoglobin is a nitric oxide-activated deoxygenase*. Nature, 1999. 401: p. 497 - 502.
40. Hankeln, T., V. Jaenicke, L. Kiger, S. Dewilde, G. Ungerechts, M. Schmidt, J. Urban, M.C. Marden, L. Moens, and T. Burmester, *Characterization of Drosophila Hemoglobin EVIDENCE FOR HEMOGLOBIN-MEDIATED RESPIRATION IN INSECTS*. J. Biol. Chem, 2002. 277(32): p. 29012-29017.
41. Ascenzi, P., G. Fabozzi, A. Petrucca, C. Ciaccio, M. Coletta, G. DeSanctis, M. Bolognesi, M. Milani, and P. Visca, *The truncated hemoglobin from Mycobacterium leprae*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. 294(5): p. 1064-1070.
42. James T. Trent, I., S. Kundu, J.A. Hoy, and M.S. Hargrove, *Crystallographic Analysis of Synechocystis Cyanoglobin Reveals the Structural Changes Accompanying Ligand Binding in a Hexacoordinate Hemoglobin*. Journal of Molecular Biology, 2004. 341(4): p. 1097-1108.
43. Freitas, T.A.K., S. Hou, E.M. Dioum, J.A. Saito, J. Newhouse, G. Gonzalez, M.-A. Gilles-Gonzalez, and M. Alam, *Ancestral hemoglobins in Archaea*. PNAS, 2004. 101: p. 6675-6680.
44. Freitas, T.A.K., J.A. Saito, S. Hou, and M. Alam, *Globin-coupled sensors, protoglobins, and the last universal common ancestor*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2005. 99(1): p. 23-33.

45. Appleby, C.A., J.D. Tjepkema, and M.J. Trinick, *Hemoglobin in a nonleguminous plant, Parasponia: possible genetic origin and function in nitrogen fixation*. Science, 1983. 220: p. 951-953.
46. Bogusz, D., C.A. Appleby, J. Landsmann, E.S. Dennis, M.J. Trinick, and W.J. Peacock, *Functioning haemoglobin genes in non-nodulating plants*. Nature, 1988. 331: p. 178-180.
47. Appleby, C.A., *Leghemoglobins and Rhizobium respiration*. Annu. Rev. Plant Physiol., 1984. 35: p. 443-478.
48. Taylor, E.R., X.Z. Nie, A.W. MacGregor, and R.D. Hill, *A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions*. Plant Molecular Biology, 1994. 24(6): p. 853-862.
49. Andersson, C.R., E.O. Jensen, D.J. Llewellyn, E.S. Dennis, and W.J. Peacock, *A new hemoglobin gene from soybean; a role for hemoglobins in all plants*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996. 93: p. 5682-5687.
50. Trevaskis, B., R.A. Watts, C.R. Andersson, D.J. Llewellyn, M.S. Hargrove, J.S. Olson, E.S. Dennis, and W.J. Peacock, *Two hemoglobin genes in Arabidopsis Thaliana: the evolutionary origin of leghemoglobins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. 95: p. 12230-12234.
51. Sowa, A.W., S.M.G. Duff, M.G. Guy, and R.D. Hill, *Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia*. PNAS, 1998. 95: p. 10317-13021.
52. Zhu, H. and A.F. Riggs, *Yeast Flavohemoglobin is an Ancient Protein Related to Globins and a Reductase Family*. PNAS, 1992. 89: p. 5015-5019.
53. Gardner, P.R., A.M. Gardner, L.A. Martin, and A.L. Salzman, *Nitric oxide dioxygenase: An enzymic function for flavohemoglobin*. PNAS, 1998. 95: p. 10378-10383.
54. Watts, R.A., P.W. Hunt, A.N. Hvitved, M.S. Hargrove, W.J. Peacock, and E.S. Dennis, *A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms*. PNAS, 2001. 98(18): p. 10119-10124.
55. Hunt, P.W., E.J. Klok, B. Trevaskis, R.A. Watts, M.H. Ellis, W.J. Peacock, and E.S. Dennis, *Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in Arabidopsis thaliana*. PNAS, 2002. 99(26): p. 17197-17202.
56. Arredondo-Peter, R., M.S. Hargrove, J.F. Moran, G. Sarath, and R.V. Klucas, *Plant Hemoglobins*. Plant Physiol., 1998. 118: p. 1121-1125.
57. Perazzolli, M., P. Dominici, M.C. Romero-Puertas, E. Zago, J. Zeier, M. Sonoda, C. Lamb, and M. Delledonne, *Arabidopsis Nonsymbiotic Hemoglobin AHb1 Modulates Nitric Oxide Bioactivity*. the plant cell, 2004. 16: p. 2785-2794.
58. Bruno, S., S. Faggiano, F. Spyrakis, A. Mozzarelli, S. Abbruzzetti, E. Grandi, C. Viappiani, A. Feis, S. Mackowiak, G. Smulevich, E. Cacciatori, and P. Dominici, *The Reactivity with CO of AHb1 and AHb2 from Arabidopsis thaliana is Controlled by the Distal HisE7 and Internal Hydrophobic Cavities*. JACS, 2007. 129(10): p. 2880 -2889.
59. Spiro, T.G. and X.Y. Li, *Resonance Raman Spectra of Heme and Metalloproteins; Spiro, T.G., Ed. Biochemical applications of Raman Spectroscopy, 1988. 3; John Wiley & Sons: New York: p. 1-37.*
60. Ioanitescu, A.I., S. Dewilde, L. Kiger, M.C. Marden, L. Moens, and S.V. Doorslaer, *Characterization of Nonsymbiotic Tomato Hemoglobin*. Biophys. J., 2005. 89: p. 2628-2639.
61. Das, T.K., H.C. Lee, S.M.G. Duff, R.D. Hill, J. Peisach, D.L. Rousseau, B.A. Wittenberg, and J.B. Wittenberg, *The Heme Environment in Barley Hemoglobin*. J. Biol. Chem., 1999. 274: p. 4220-4224.

62. Ray, G.B., X.Y. Li, J.A. Ibers, J.L. Sessler, and T.G. Spiro, *How far can proteins bend the FeCO unit? Distal polar and steric effects in heme proteins and models*. J. Am. Chem. Soc., 1994. 116(1): p. 162-176.
63. Li, T., M.L. Quillin, G.N. Phillips, and J.S. Olson, *Structural Determinants of the Stretching Frequency of CO Bound to Myoglobin*. Biochemistry, 1994. 33(6): p. 1433-1446.
64. Sage, J.T., D. Morikis, and P.M. Champion, *Spectroscopic studies of myoglobin at low pH: heme structure and ligation*. Biochemistry, 1991. 30(5): p. 1222 - 1227.
65. Smulevich, G., M. Paoli, G.D. Sanctis, A.R. Mantini, F. Ascoli, and M. Coletta, *Spectroscopic Evidence for a Conformational Transition in Horseradish Peroxidase at Very Low pH*. Biochemistry, 1997. 36(3): p. 640 - 649.
66. Morikis, D., P.M. Champion, B.A. Springer, and S.G. Sligar, *Resonance Raman investigations of site-directed mutants of myoglobin: effects of distal histidine replacement*. Biochemistry, 1989. 28(11): p. 4791-4800.
67. Springer, B.A., S.G. Sligar, J.S. Olson, and G.N.J. Phillips, *Mechanisms of Ligand Recognition in Myoglobin*. Chemical Reviews, 1994. 94(3): p. 699-714.
68. Hester, R.E., J.N. Moore, and C.L. Anderton, *A chemometric analysis of the resonance Raman spectra of mutant carbonmonoxy-myoglobins reveals the effects of polarity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology, 1997. 1338(1): p. 107-120.
69. Wang, J., J.M. Mauro, S.L. Edwards, S.J. Oatley, L.A. Fishel, V.A. Ashford, N.H. Xuong, and J. Kraut, *X-ray structures of recombinant yeast cytochrome c peroxidase and three heme-cleft mutants prepared by site-directed mutagenesis*. Biochemistry, 1990. 29(31): p. 7160 - 7173.
70. Smulevich, G., J.M. Mauro, L.A. Fishel, A.M. English, J. Kraut, and T.G. Spiro, *Cytochrome c peroxidase mutant active site structures probed by resonance Raman and infrared signatures of the CO adducts*. Biochemistry, 1988. 27(15): p. 5486 - 5492.
71. Smagghe, B.J., G. Sarath, E. Ross, J.-L. Hilbert, and M.S. Hargrove, *Slow Ligand Binding Kinetics Dominate Ferrous Hexacoordinate Hemoglobin Reactivities and Reveal Differences between Plants and Other Species*. Biochemistry, 2006. 45(2): p. 561-570.
72. Trent III, J.T., A.N. Hvitved, and M.S. Hargrove, *A Model for Ligand Binding to Hexacoordinate Hemoglobins*. Biochemistry, 2001. 40(20): p. 6155 -6163.
73. Norrish, R.G.W. and G. Porter, *Chemical Reactions produced by very high light intensities*. Nature, 1949. 164: p. 658.
74. Redmond, R.W., *Photobiology in medicine*, Plenum Press. 1993.
75. Austin, R.H., K.W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, and I.C. Gunsalus, *Dynamics of ligand binding to myoglobin*. Biochemistry, 1975. 14: p. 5355–5373.
76. Beece, D., L. Eisenstein, H. Frauenfelder, D. Good, M.C. Marden, L. Reinisch, A.H. Reynolds, L.B. Sorensen, and K.T. Yue, *Solvent Viscosity and Protein Dynamics*,. Biochemistry, 1980. 19: p. 5147-5157.
77. Ansari, A., C.M. Jones, E.R. Henry, J. Hofrichter, and W. Eaton, *Conformational Relaxation and Ligand Binding in Myoglobin*. Biochemistry, 1994. 33: p. 5128–5145.
78. Henry, E.R., J.H. Sommer, J. Hofrichter, and W.A. Eaton, *Geminate Recombination of Carbon Monoxide to Myoglobin*. J. Mol. Biol., 1983. 166: p. 443-451.
79. Steinbach, P.J., A. Ansari, J. Berendzen, D. Braunstein, K. Chu, B.R. Cowen, D. Ehrenstein, H. Frauenfelder, J.B. Johnson, and et.al, *Ligand binding to heme proteins: connection between dynamics and function*. Biochemistry, 1991. 30: p. 3988–4001.

80. Esquerra, R.M., R.A. Goldbeck, D.B. Kim-Shapiro, and D.S. Kliger, *Spectroscopic evidence for nanosecond protein relaxation after photodissociation of myoglobin-CO*. *Biochemistry*, 1998. 37: p. 17527-17536.
81. McMahon, B.H., B.P. Stojkovic, P.J. Hay, R.L. Martin, and A.E. Garcia, *Microscopic model of carbon monoxide binding to myoglobin*. *J. Chem. Phys.*, 2000. 113: p. 6831-6850.
82. Horfrichter, J., J.H. Sommer, E.R. Henry, and W.A. Eaton, *Nanosecond absorption spectroscopy of hemoglobin: Elementary processes in kinetic cooperativity*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1983. 80: p. 2235-2239.
83. Murray, L.P., J. Hofrichter, E.R. Henry, and W.A. Eaton, *Time-resolved optical spectroscopy and structural dynamics following photodissociation of carbonmonoxyhemoglobin*. *Biophys. Chem.*, 1988. 29: p. 63-76.
84. Findsen, E.W., J.M. Friedman, and M.R. Ondrias, *Effect of Solvent Viscosity on the Heme-Pocket Dynamics of Photolyzed (Carbonmonoxy)hemoglobin*. *Biochemistry*, 1988. 27: p. 8719-8724.
85. Goldbeck, R.A., S.J. Paquette, S.C. Björling, and D.S. Kliger, *Allosteric Intermediates in Hemoglobin. 2. Kinetic Modeling of HbCO Photolysis*. *Biochemistry*, 1996. 35: p. 8628-8639.
86. Esquerra, R.M., R.A. Goldbeck, S.H. Reaney, A.M. Batchelder, Y. Wen, J.W. Lewis, and D.S. Kliger, *Multiple Geminant Ligand Recombinations in Human Hemoglobin*. *Biophys. J.*, 2000. 78: p. 3227-3239.
87. Goldbeck, R.A., S.J. Paquette, and D.S. Kliger, *The Effect of Water on the Rate of Conformational Change in Protein Allostery*. *Biophys. J.*, 2001. 81: p. 2919-2934.
88. Dewilde, S., L. Kiger, T. Burmester, T. Hankeln, V. Baudin-Creuzza, T. Aerts, M.C. Marden, R. Caubergs, and L. Moens, *Biochemical Characterization and Ligand Binding Properties of Neuroglobin, a Novel Member of the Globin Family*. *J. Biol. Chem.*, 2001. 276: p. 38949 - 38955.
89. Kriegl, T.J.M., A.J. Bhattacharyya, K. Nienhaus, P. Deng, O. Minkow, and G.U. Nienhaus, *Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin*. *PNAS*, 2002. 99: p. 7792-7797.
90. Banderini, A., S. Sottini, and C. Viappiani, *Method for detecting extended real-time kinetics in nanosecond laser flash photolysis experiments*. *Rev. Sci. Instrum.*, 2004. 75: p. 2257-2261.
91. Bonneau, R., J. Wirz, and A.D. Zuberbuehler, *Methods for the analysis of transient absorbance data*. *Pure Appl. Chem.*, 1997. 69: p. 979-992.
92. Fenster, A., J.C. LeBlanc, W.B. Taylor, and H.E. Jones, *Linearity and fatigue in photomultipliers*. *Rev. Sci. Instrum.*, 1973. 44: p. 689-694.
93. Abbruzzetti, S., S. Sottini, C. Viappiani, and J.E.T. Corrie, *Kinetics of Proton Release after Flash Photolysis of 1-(2-Nitrophenyl)ethyl Sulfate (Caged Sulfate) in Aqueous Solution*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005. 127(27): p. 9865-9874.
94. Viappiani, C., S. Abbruzzetti, J.R. Small, L.J. Libertini, and E.W. Small, *An experimental methodology for measuring volume changes in proton transfer reactions in aqueous solutions*. *Biophys. Chem.*, 1998. 73: p. 13-22.
95. Abbruzzetti, S., C. Viappiani, S. Bruno, and A. Mozzarelli, *Enhanced geminant ligand rebinding upon photo-dissociation of silica gelembedded myoglobin-CO*. *Chem. Phys. Lett.*, 2001. 346: p. 430-436.
96. Eaton, W.A., E.R. Henry, J. Hofrichter, and A. Mozzarelli, *Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood?* *Nat. Struc. Biol.*, 1999. 6(4): p. 351-358.

97. Viappiani, C., S. Bettati, S. Bruno, L. Ronda, S. Abbruzzetti, A. Mozzarelli, and W.A. Eaton, *New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels*. PNAS, 2004. 101: p. 14414-14419.
98. Kleinert, T., W. Doster, H. Leyser, W. Petry, V. Schwarz, and M. Settles, *Solvent Composition and Viscosity Effects on the Kinetics of CO Binding to Horse Myoglobin*. Biochemistry, 1998. 37(2): p. 717-733.
99. Librizzi, F., C. Viappiani, S. Abbruzzetti, and L. Cordone, *Residual water modulates the dynamics of the protein and of the external matrix in "trehalose coated " MbCO: An infrared and flash-photolysis study*. J. Chem. Phys., 2002. 116(3): p. 1193-1200.
100. Ostermann, A., R. Waschipky, F.G. Parak, and G.U. Nienhaus, *Ligand binding and conformational motions in myoglobin*. 2000. 404: p. 205-208.
101. Schlichting, I., J. Berendzen, G.N. Phillips, and R.M. Sweet, *Crystal structure of photolysed carbonmonoxy-myoglobin*. Nature, 1994. 371: p. 808-812.
102. Schotte, F., M. Lim, T.A. Jackson, A.V. Smirnov, J. Soman, J.S. Olson, J. George N. Phillips, M. Wulff, and P.A. Anfinrud, *Watching a Protein as it Functions with 150-ps Time-Resolved X-ray Crystallography*. Science, 2003. 300: p. 1944-1947.
103. Schmidt, M., K. Nienhaus, R. Pahl, A. Krasselt, S. Anderson, F. Parak, G.U. Nienhaus, and V. Srajer, *Ligand migration pathway and protein dynamics in myoglobin: A time-resolved crystallographic study on L29W MbCO*. PNAS, 2005. 102: p. 11704-11709.
104. Bourgeois, D., B. Vallone, A. Arcovito, G. Sciara, F. Schotte, P.A. Anfinrud, and M. Brunori, *Extended subnanosecond structural dynamics of myoglobin revealed by Laue crystallography*. PNAS, 2006. 103: p. 4924-4929.
105. Agmon, N., *Coupling of Protein Relaxation to Ligand Binding and Migration in Myoglobin*. Biophys. J., 2004. 87: p. 1537-1543.
106. Samuni, U., D. Dantsker, A. Ray, J.B. Wittenberg, B.A. Wittenberg, S. Dewilde, L. Moens, Y. Ouellet, M. Guertin, and J.M. Friedman, *Kinetic Modulation in Carbonmonoxy Derivatives of Truncated Hemoglobins: THE ROLE OF DISTAL HEME POCKET RESIDUES AND EXTENDED APOLAR TUNNEL*. J. Biol. Chem, 2003. 278: p. 27241-27250.
107. Sottini, S., S. Abbruzzetti, C. Viappiani, S. Bettati, L. Ronda, and A. Mozzarelli, *Evidence for Two Geminant Rebinding States Following Laser Photolysis of R State Hemoglobin Encapsulated in Wet Silica Gels*. J. Phys. Chem. B, 2005. 109(23): p. 11411-11413.
108. Dantsker, D., U. Samuni, J.M. Friedman, and N. Agmon, *A Hierarchy of Functionally Importance Relaxations within Myoglobin Based on Solvent Effects, Mutations and Kinetic Model*. Model, Biochim. Biophys. Acta: and Proteomics, 2005. 1749: p. 234-251.
109. Sottini, S., S. Abbruzzetti, C. Viappiani, L. Ronda, and A. Mozzarelli, *Determination of Microscopic Rate Constants for CO Binding and Migration in Myoglobin Encapsulated in Silica Gels*. J. Phys. Chem. B, 2005. 109(41): p. 19523 - 19528.
110. Sottini, S., S. Abbruzzetti, F. Spyraakis, S. Bettati, L. Ronda, A. Mozzarelli, and C. Viappiani, *Geminant Rebinding in R-State Hemoglobin: Kinetic and Computational Evidence for Multiple Hydrophobic Pockets*. JACS, 2005. 127(49): p. 17427 - 17432.
111. Sáenz-Rivera, J., G. Sarath, and R. Arredondo-Peter, *Modeling the tertiary structure of a maize (Zea mays ssp. mays) non-symbiotic hemoglobin*. Plant Physiology and Biochemistry, 2004. 42(11): p. 891-897.
112. Keil, M., T.E. Exner, and J. Brickmann, *Pattern recognition strategies for molecular surfaces: III. Binding site prediction with a neural network*. Journal of Computational Chemistry, 2003. 25(6): p. 779-789.

113. Binkowski, T.A., S. Naghibzadeh, and J. Liang, *CASTp: Computed Atlas of Surface Topography of proteins*. Nucleic Acids Res, 2003. 31: p. 3352-3355.
114. Nicholls, A., K. Sharp, and B. Honig, *Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons*. Proteins, 1991. 11: p. 281-296.
115. Goodford, P.J., *A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules*. Journal of Medicinal Chemistry, 1985. 28(7): p. 849-857.
116. Milani, M., A. Pesce, Y. Ouellet, S. Dewilde, J. Friedman, P. Ascenzi, M. Guertin, and M. Bolognesi, *Heme-Ligand Tunneling in Group I Truncated Hemoglobins*. J. Biol. Chem., 2004. 279(21520-21525).
117. Giangiacomo, L., A. Ilari, A. Boffi, V. Morea, and E. Chiancone, *The Truncated Oxygen-avid Hemoglobin from Bacillus subtilis: X-RAY STRUCTURE AND LIGAND BINDING PROPERTIES*. J. Biol. Chem, 2005. 280: p. 9192-9202.
118. Milani, M., A. Pesce, Y. Ouellet, P. Ascenzi, M. Guertin, and M. Bolognesi, *Mycobacterium tuberculosis hemoglobin N displays a protein tunnel suited for O<sub>2</sub> diffusion to the heme*. The EMBO Journal, 2001. 20: p. 3902-3909.
119. Jones, C.M., A. Ansari, E.R. Henry, G.W. Christoph, J. Hofrichter, and W.A. Eaton, *Speed of intersubunit communication in proteins*. Biochemistry, 1992. 31(6692-6702).
120. Henry, E.R., C.M. Jones, J. Hofrichter, and W.A. Eaton, *Can a two-state MWC allosteric model explain hemoglobin kinetics?* Biochemistry, 1997. 36: p. 6511-6528.
121. Chen, E., R.A. Goldberg, and D.S. Kliger, *Nanosecond time-resolved spectroscopy of biomolecular processes*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structures, 1997. 26: p. 327-355.
122. Henry, E.R. and J. Hofrichter, *Singular value decomposition: application to analysis of experimental data*. Numerical computer methods, ed. L. Brand and M. L. Johnson, Academic Press, Inc., San Diego, 1992: p. 129-192.
123. Smagghe, B.J., S. Kundu, J.A. Hoy, P. Halder, T.R. Weiland, A. Savage, A. Venugopal, M. Goodman, S. Premer, and M.S. Hargrove., *Role of Phenylalanine B10 in Plant Nonsymbiotic Hemoglobins*. Biochemistry, 2006. 45(32): p. 9735 -9745.
124. Carver, T.E., R.J. Rohlf, J.S. Olson, Q.H. Gibson, R.S. Blackmore, B.A. Springer, and S.G. Sligar, *Analysis of the kinetic barriers for ligand binding to sperm whale myoglobin using site-directed mutagenesis and laser photolysis techniques*. J. Biol. Chem., 1990. 265(32): p. 20007-20020.
125. Austin, R.H., K. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, I.C. Gunsalus, and V.P. Marshall, *Dynamics of Carbon Monoxide Binding by Heme Proteins*. Science, 1973. 181(4099): p. 541-543.
126. Agmon, N., W. Doster, and F. Post, *The transition from inhomogeneous to homogeneous kinetics in CO binding to myoglobin*. Biophys. J., 1994. 66(5): p. 1612-1622.
127. Agmon, N. and J.J. Hopfield, *CO binding to heme proteins: A model for barrier height distributions and slow conformational changes*. J. Chem. Phys., 1983. 79(4): p. 2042-2053.
128. Ansari, A., C.M. Jones, E.R. Henry, J. Hofrichter, and W.A. Eaton, *The role of solvent viscosity in the dynamics of protein conformational changes*. Science, 1992. 256: p. 1796-1798.
129. Powers, L., B. Chance, M. Chance, B. Campbell, J. Friedman, S. Khalid, C. Kumar, A. Naqui, K.S. Reddy, and Y. Zhou, *Kinetic, structural, and spectroscopic identification*

- of geminate states of myoglobin: a ligand binding site on the reaction pathway.* Biochemistry, 1987. 26(15): p. 4785 - 4796.
130. Srajer, V., L. Reinisch, and P.M. Champion, *Investigation of laser-induced long-lived states of photolyzed MbCO.* Biochemistry, 1991. 30(20): p. 4886 - 4895.
  131. Hartmann, H., S. Zinser, P. Komninos, R.T. Schneider, G.U. Nienhaus, and F. Parak, *X-ray structure determination of a metastable state of carbonmonoxy myoglobin after photodissociation.* PNAS, 1996. 93(14): p. 7013-7016.
  132. Brunori, M., B. Vallone, F. Cutruzzola, C. Travaglini-Allocatelli, J. Berendzen, K. Chu, R.M. Sweet, and I. Schlichting, *The role of cavities in protein dynamics: Crystal structure of a photolytic intermediate of a mutant myoglobin.* PNAS, 2000. 97(5): p. 2058-2063.
  133. Vojtechovsky, J., K. Chu, J. Berendzen, R.M. Sweet, and I. Schlichting, *Crystal structures of myoglobin-ligand complexes at near-atomic resolution.* Biophysical Journal, 1999. 77(4): p. 2153-2174.
  134. Srajer, V., Z. Ren, T.Y. Teng, M. Schmidt, T. Ursby, D. Bourgeois, C. Pradervand, W. Schildkamp, M. Wulff, and K. Moffat, *Protein Conformational Relaxation and Ligand Migration in Myoglobin: A Nanosecond to Millisecond Molecular Movie from Time-Resolved Laue X-ray Diffraction.* Biochemistry, 2001. 40: p. 13802-13815.
  135. Brunori, M., F. Cutruzzola, C. Savino, C. Travaglini-Allocatelli, B. Vallone, and Q.H. Gibson, *Structural Dynamics of Ligand Diffusion in the Protein Matrix: A Study on a New Myoglobin Mutant Y(B10) Q(E7) R(E10).* Biophysical Journal, 1999. 76: p. 1259-1269.
  136. Scott, E.E. and Q.H. Gibson, *Ligand Migration in Sperm Whale Myoglobin.* Biochemistry, 1997. 36: p. 11909-11917.
  137. Scott, E.E., Q.H. Gibson, and J.S. Olson, *Mapping the Pathways for O<sub>2</sub> Entry Into and Exit from Myoglobin.* Journal of Biological Chemistry, 2001. 276: p. 5177-5188.
  138. Dantsker, D., U. Samuni, A.J. Friedman, M. Yang, A. Ray, and J.M. Friedman, *Geminate rebinding in trehalose-glass embedded myoglobins reveals residue-specific control of intramolecular trajectories.* Journal of Molecular Biology, 2002. 315(2): p. 239-251.
  139. Nienhaus, K., P. Deng, J.M. Kriegl, and G.U. Nienhaus, *Structural Dynamics of Myoglobin: Effect of Internal Cavities on Ligand Migration and Binding.* Biochemistry, 2003. 42: p. 9647-9658.
  140. Nienhaus, K., P. Deng, J.M. Kriegl, and G.U. Nienhaus, *Structural Dynamics of Myoglobin: Spectroscopic and Structural Characterization of Ligand Docking Sites in Myoglobin Mutant L29W.* Biochemistry, 2003. 42: p. 9633-9646.
  141. Tetreau, C., Y. Blouquit, E. Novikov, E. Quiniou, and D. Lavalette, *Competition with Xenon Elicits Ligand Migration and Escape Pathways in Myoglobin.* Biophysical Journal, 2004. 86: p. 435-447.
  142. Abbruzzetti, S., S. Giuffrida, S. Sottini, C. Viappiani, and L. Cordone, *Light-Induced Protein-Matrix Uncoupling and Protein Relaxation in Dry Samples of Trehalose Coated MbCO at Room Temperature.* Cell Biochemistry and Biophysics, 2005. 43: p. 431-438.
  143. Dantsker, D., C. Roche, U. Samuni, G. Blouin, J.S. Olson, and J.M. Friedman, *The Position 68(E11) Side Chain in Myoglobin Regulates Ligand Capture, Bond Formation with Heme Iron, and Internal Movement into the Xenon Cavities.* J. Biol. Chem, 2005. 280: p. 38740 - 38755.
  144. Hummer, G., F. Schotte, and P.A. Anfinrud, *Unveiling functional protein motions with picosecond x-ray crystallography and molecular dynamics simulations.* Proceedings of the National Academy of Science USA, 2004. 101: p. 15330-15334.

145. Bourgeois, D., B. Vallone, F. Schotte, A. Arcovito, A.E. Miele, G. Sciara, M. Wulff, P. Anfinrud, and M. Brunori, *Complex landscape of protein structural dynamics unveiled by nanosecond Laue crystallography*. PNAS, 2003. 100(15): p. 8704-8709.
146. Bettati, S., B. Pioselli, B. Campanini, C. Viappiani, and A. Mozzarelli, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. Nalwa, H. S., Ed.; American Scientific Publishers: Valencia, CA, 2004; 2004. 9: p. 81-103.
147. Sottini, S., C. Viappiani, L. Ronda, S. Bettati, and A. Mozzarelli, *CO Rebinding Kinetics to Myoglobin- and R-State-Hemoglobin-Doped Silica Gels in the Presence of Glycerol*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. 108(24): p. 8475 - 8484.
148. Samuni, U., C.J. Roche, D. Dantsker, L.J. Juszczak, and J.M. Friedman, *Modulation of Reactivity and Conformation within the T-Quaternary State of Human Hemoglobin: The Combined Use of Mutagenesis and Sol-Gel Encapsulation*. Biochemistry, 2006. 45(9): p. 2820 - 2835.
149. Khan, I., C.F. Shannon, D. Dantsker, A.J. Friedman, J. Perez-Gonzalez-de-Apodaca, and J.M. Friedman, *Sol-Gel Trapping of Functional Intermediates of Hemoglobin: Geminate and Bimolecular Recombination Studies*. Biochemistry, 2000. 39(51): p. 16099 - 16109.
150. Ellerby, L.M., C.R. Nishida, F. Nishida, S.A. Yamanaka, B. Dunn, J.S. Valentine, and J.I. Zink, *Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method*. Science, 1992. 255: p. 1113-1115.
151. Shibayama, N. and S. Saigo, *Fixation of the Quaternary Structures of Human Adult Haemoglobin by Encapsulation in Transparent Porous Silica Gels*. Journal of Molecular Biology, 1995. 251(2): p. 203-209.
152. Shibayama, N. and S. Saigo, *Kinetics of the Allosteric Transition in Hemoglobin within Silicate Sol-Gels*. JACS, 1999. 121(2): p. 444-445.
153. Bettati, S. and A. Mozzarelli, *T State Hemoglobin Binds Oxygen Noncooperatively with Allosteric Effects of Protons, Inositol Hexaphosphate, and Chloride*. J. Biol. Chem., 1997. 272: p. 32050-32055.
154. Juszczak, L.J. and J.M. Friedman, *UV Resonance Raman Spectra of Ligand Binding Intermediates of Sol-Gel Encapsulated Hemoglobin*. J. Biol. Chem, 1999. 274: p. 30357 - 30360.
155. Bruno, S., S. Faggiano, F. Spyrakis, A. Mozzarelli, E. Cacciatori, P. Dominici, E. Grandi, S. Abbruzzetti, and C. Viappiani., *Different roles of protein dynamics and ligand migration in non-symbiotic hemoglobins AHb1 and AHb2 from Arabidopsis thaliana*. Gene, 2007. 398: p. 224–233.
156. Bettati, S., Mozzarelli, A., *T state hemoglobin binds oxygen noncooperatively with allosteric effects of protons, inositol hexaphosphate and chloride*. J. Biol. Chem., 1997. 272: p. 32050–32055.
157. Bruno, S., M. Bonaccio, S. Bettati, C. Rivetti, C. Viappiani, S. Abbruzzetti, and A. Mozzarelli, *High and low oxygen affinity conformations of T state hemoglobin*. Protein Sci., 2001. 10: p. 2401-2407.
158. Steinbach, P.J., *Inferring lifetime distributions from kinetics by maximizing entropy using a bootstrapped model*. J Chem Inf Comput Sci., 2002. 42(6): p. 1476-1478.
159. Steinbach, P.J., R. Ionescu, and C.R. Matthews, *Analysis of Kinetics Using a Hybrid Maximum-Entropy/Nonlinear-Least-Squares Method: Application to Protein Folding*. Biophys. J., 2002. 82: p. 2244-2255.
160. Tetreau, C., Y. Blouquit, E. Novikov, E. Quiniou, and D. Lavalette, *Competition with Xenon Elicits Ligand Migration and Escape Pathways in Myoglobin*. Biophys. J., 2004. 86: p. 435-447.

161. Tetreau, C. and D. Lavalette., *Dominant features of protein reaction dynamics: Conformational relaxation and ligand migration*. Biochim. Biophys. Acta, 2005. 1724: p. 411-424.
162. Khan, I., D. Dantsker, U. Samuni, A.J. Friedman, C. Bonaventura, B. Manjula, S.A. Acharya, and J.M. Friedman, *93 Modified Hemoglobin: Kinetic and Conformational Consequences*. Biochemistry, 2001. 40(25): p. 7581 - 7592.
163. Samuni, U., D. Dantsker, C.J. Roche, and J.M. Friedman, *Ligand recombination and a hierarchy of solvent slaved dynamics: The origin of kinetic phases in hemoproteins*. Gene, 2007. 398(1): p. 234-248.
164. Navati, M.S., A. Ray, J. Shamir, and J.M. Friedman, *Probing Solvation-Shell Hydrogen Binding in Glassy and Sol-Gel Matrixes through Vibronic Sideband Luminescence Spectroscopy*. J. Phys. Chem. B, 2004. 108(4): p. 1321 - 1327.
165. Roche, C.J., F. Guo, and J.M. Friedman, *Molecular Level Probing of Preferential Hydration and Its Modulation by Osmolytes through the Use of Pyranine Complexed to Hemoglobin*. J. Biol. Chem, 2006. 281: p. 38757 - 38768.
166. Sheely, M.L., *Glycerol viscosity tables*. Ind. Eng. Chem., 1932. 24: p. 1060-1064.
167. Cordone, L., G. Cottone, S. Giuffrida, G. Palazzo, G. Venturoli, and C. Viappiani, *Internal dynamics and protein-matrix coupling in trehalose-coated proteins*. Biochim. Biophys. Acta, 2005. 1749(2): p. 252-281.
168. Frauenfelder, H., P.W. Fenimore, and B.H. McMahon, *Hydration, slaving and protein function*. Biophysical Chemistry, 2002. 98(1-2): p. 35-48.
169. Bidon-Chanal, A., M.A. Martí, A. Crespo, M. Milani, M. Orozco, M. Bolognesi, F.J.L. 1, and D.A. Estrin, *Ligand-induced dynamical regulation of NO conversion in Mycobacterium tuberculosis truncated hemoglobin-N*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2006. 64(2): p. 457-464.

# INDICE

<b>CAPITOLO 1: LE EMOGLOBINE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 La super famiglia delle globine</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Fold Globinico.....	2
1.1.1.1 Strutture quaternarie delle globine.....	4
1.1.1.2 Aspetti funzionali ed evolutivi.....	7
1.1.2 Il gruppo eme.....	10
1.1.2.1 Stati elettronici dell'eme.....	11
<b>1.2 Emoglobine pentacoordinate ed esacoordinate</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 Esempi di emoglobine esacoordinate.....	17
1.2.2 Ruoli fisiologici delle emoglobine esacoordinate.....	23
<b>1.3 Emoglobine nel regno vegetale</b> .....	<b>25</b>
1.3.1 Emoglobine di <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	28
<b>CAPITOLO 2: CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA</b>	
<b>ED ESPERIMENTI DI RAPID MIXING</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1 Purificazione delle emoglobine di <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	<b>34</b>
<b>2.2 Analisi strutturale del gruppo eme di AHb1 e AHb2</b>	
<b>mediante spettroscopia Raman Risonante</b> .....	<b>36</b>
<b>2.3 Spettri di assorbimento UV-visibile su AHb1 e AHb2</b> .....	<b>41</b>
2.3.1 Dipendenza degli spettri di assorbimento UV-visibile di AHb1 e	
AHb2 da stato di ossidazione del ferro, pH e ligando.....	43
<b>2.4 Cinetiche di legame del CO ad AHb1 ed AHb2 mediante stopped</b>	
<b>flow</b> .....	<b>46</b>
2.4.1 Risultati sperimentali.....	48
<b>2.5 Considerazioni sull'equilibrio esa-penta</b> .....	<b>54</b>

<b>CAPITOLO 3: LASER FLASH PHOTOLYSIS</b> .....	<b>55</b>
<b>3.1 Introduzione alla Flash Photolysis</b> .....	<b>55</b>
<b>3.2 Apparato sperimentale di Laser Flash photolysis</b> .....	<b>58</b>
<b>3.3 Misure di LFP su AHb1 e AHb2 in soluzione</b> .....	<b>64</b>
3.3.1 Misure a lunghezza d'onda singola.....	64
3.3.1.1 Analisi dei dati.....	69
3.3.1.2 Discussione dei risultati.....	79
3.3.2 Spettri di assorbimento transiente.....	84
3.3.3 Misure su mutanti di AHb1.....	88
3.3.4 Misure di cinetiche di legame ad AHb1 utilizzando O <sub>2</sub> ed NO come ligandi.....	94
<b>3.4 Misure di LFP su AHb1 e AHb2 incapsulate in gel di silice</b> .....	<b>101</b>
3.4.1 Cinetiche di legame a gel di COAHb1 e COAHb2.....	103
3.4.1.1 Analisi dei dati con MEM.....	108
3.4.2 Misure di LFP su AHb1 e AHb2 incapsulate in gel di silice in presenza di glicerolo.....	112
3.4.2.1 Analisi MEM delle cinetiche di legame del CO a gel di AHb1 ed AHb2 immersi in glicerolo.....	116
3.4.2.2 Analisi numerica delle cinetiche di legame del CO a gel di AHb1 ed AHb2 in glicerolo.....	119
<b>Conclusioni</b> .....	<b>125</b>
<b>Riferimenti Bibliografici</b> .....	<b>128</b>

**Per aver seguito la mia attività di ricerca in questi anni, un grandissimo  
ringraziamento a**

Prof. Cristiano Viappiani  
Dott.ssa Stefania Abbruzzetti  
**Dipartimento di Fisica**  
**Università di Parma**

Un particolare ringraziamento ai gruppi che hanno collaborato alla realizzazione  
delle misure presentate in questa tesi

**Dipartimento Scientifico e Tecnologico**  
**Università di Verona**

Prof.ssa Paola Dominici  
Dott.ssa Elena Cacciatori

**Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare**  
**Università di Parma**

Prof. Andrea Mozzarelli  
Dott. Stefano Bruno  
Dott.ssa Serena Faggiano  
Dott.ssa Francesca Spyraakis

**Dipartimento di Chimica**  
**Università di Firenze**  
Prof. ssa Giulietta Smulevich  
Dott. Alessandro Feis  
Dott. Stephan Mackowiak