

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biochimica e Biologia Molecolare

Ciclo XXIV

STUDIO DEL PROCESSO DI MATURAZIONE ED
ATTIVAZIONE DI FOSFOLIPASI A2 FUNGINE

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Andrea Mozzarelli

Tutor:

Chiar.mo Prof. Gianluigi Rossi

Dottoranda: Corsini Romina

INDICE

Capitolo 1	Introduzione: la fosfolipasi A2 di <i>Tuber borchii</i>	4
Capitolo 2	Caratterizzazione biochimica di TbSP1	29
Capitolo 3	Auto processamento di altre fosfolipasi A2 fungine	44
Capitolo 4	Fosfolipasi A2 batteriche e del regno animale	58
Bibliografia		66

CAPITOLO 1

Introduzione:

la fosfolipasi A2 di *Tuber borchii*

IL GENERE *Tuber*

Il tartufo è un fungo ascomiceta ipogeo appartenente al genere *Tuber*, famiglia delle *Tuberaceae*, ordine *Pezizales* [1, 2], che forma simbiosi mutualistiche con le radici di piante arboree ed arbustive come le querce, i pini, il nocciolo, il pioppo bianco, il carpino nero ed altri ancora. La simbiosi è necessaria per portare a termine il ciclo vitale. Per le loro proprietà organolettiche, i tartufi sono molto apprezzati e il loro commercio è molto sviluppato. Anche in campo scientifico l'interesse per queste specie è in crescita. A dimostrazione di ciò, troviamo numerose pubblicazioni al riguardo [3]. Inoltre è stato creato il sito web italiano dedicato al genere *Tuber*, dove sono disponibili database, metodi di identificazione molecolare, forum, e informazioni filogenetiche riguardanti il tartufo (<http://www.truffle.org>).

I cicli biologici delle diverse specie di tartufi non sono ancora del tutto conosciuti: lo sviluppo sotterraneo, infatti, ne complica lo studio. Tuttavia, sulla base della somiglianza con altri ascomiceti e dagli studi effettuati sul ciclo biologico di *Tuber melanosporum* è stato possibile identificare tre fasi di sviluppo [4]. (I) Nella fase vegetativa, dopo la quiescenza invernale, le spore che si trovano in condizioni climatiche e di terreno favorevoli cominciano a germinare. La germinazione delle spore pare venga stimolata dal maggior riscaldamento del suolo, dal suo maggior tasso di umidità, dalla ripresa vegetativa delle piante simbiotiche e dalla maggiore o forse differente produzione di essudati radicali. La germinazione dà origine ad un'ifa che, accrescendosi e ramificandosi, produce il micelio primario il cui patrimonio genetico è uguale a quello dell'ascospora da cui è nato. (II) Nella fase simbiotica il micelio si accresce insinuandosi nel terreno e si ramifica incuneandosi fra le particelle del suolo, creando una intricata rete di ife sotterranee. I miceli primari provenienti da ascospore diverse, in seguito al fenomeno dell'anastomosi danno luogo a filamenti miceliari che contengono due o più nuclei geneticamente diversi tra loro (micelio secondario). Il micelio secondario, che si accresce anch'esso nel terreno, quando incontra le radichette di una pianta con cui può entrare in simbiosi, si associa con esse avvolgendole progressivamente con uno strato di ife, fino a formare le micorrize. (III) Nella fase sporale, sotto l'azione di stimoli e processi metabolici non ancora noti, ma certamente legati alle modificazioni delle condizioni ambientali (umidità, temperatura, sbalzi termici, freddo, stato nutrizionale, quantità di foglie della pianta, ecc.) le ife bloccano il loro accrescimento, che potrebbe proseguire all'infinito, dando luogo allo stadio riproduttivo del fungo e quindi alla formazione dei carpofori. La maturazione dell'ascocarpo avviene dall'interno verso l'esterno e, una volta completata, il carpoforo emana il suo caratteristico profumo, dovuto alla formazione di composti aromatici (solforati),

percepibile anche a lunga distanza che si differenzia per tipo ed intensità a seconda della specie di tartufo. Dopo che è avvenuta la completa maturazione delle spore, il carpoforo si decompone, per fenomeni naturali di marcescenza o perché intaccato da animali che di esso si cibano. Le ascospore vengono così liberate nel terreno e il ciclo biologico ricomincia (Fig. 1).

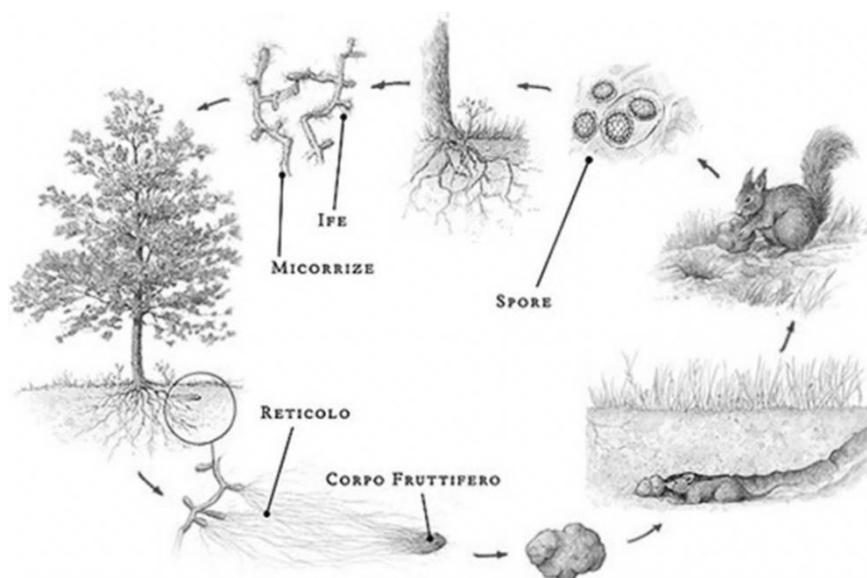


Figura 1
Ciclo biologico del tartufo

SIMBIOSI MICORRIZICA

La produzione dei corpi fruttiferi ipogei dei tartufi è legata alla realizzazione di una particolare associazione fra il micelio del fungo e le radici di alcuni alberi: la micorriza. La formazione di micorrize è un fenomeno molto diffuso ed interessa la quasi totalità delle specie vegetali; generalmente riguarda le radici secondarie, deputate all'assorbimento delle sostanze nutritive.

Dal punto di vista cellulare, alla base della formazione della micorriza sta il riconoscimento tra l'ospite ed il fungo, che avviene grazie a molecole diffusibili nella radice. Il riconoscimento porta all'interazione cellulare tra la radice e le ife, che è guidata da cambiamenti nell'espressione genica e proteica. L'instaurarsi di una simbiosi, perciò, comporta necessariamente una fase di riprogrammazione genica e una stretta comunicazione cellulare [5].

Sulla base delle caratteristiche morfologiche ed anatomiche le micorrize vengono suddivise in due grandi gruppi: le endomicorrize e le ectomicorrize.

Le endomicorrize vescicolo arbuscolari si instaurano tra Zigomiceti e piante erbacee, e sono caratterizzate da una penetrazione delle ife nel corpo della radice sia attraverso gli spazi intercellulari sia attraverso le cellule stesse. Le ectomicorrize sono caratteristiche delle piante forestali e di funghi come i Basidiomiceti e gli Ascomiceti. Le radici vengono avvolte da uno spesso strato di ife che prende il nome di micoclena o mantello, che ha una funzione di protezione e di accumulo di minerali, soprattutto fosfati. Dal mantello si sviluppano poi delle ife che si insinuano tra le cellule della radice, a formare il reticolo di Hartig: si genera così un'ampia superficie di contatto che consente lo scambio di sostanze nutritive tra i simbionti. Dal mantello si forma poi un micelio esterno che colonizza il terreno circostante e da cui si sviluppa il corpo fruttifero che può essere esterno (funghi epigei) oppure sotterraneo (funghi ipogei, es. i tartufi).

I tartufi unendosi alle radici delle piante, originano unicamente ectomicorrize.

Caratteristiche generali e ciclo vegetativo delle ectomicorrize

Le radici interessate dalle ectomicorrize sono le secondarie, quelle più corte, normalmente dotate di peli radicali, che hanno la funzione principale di assorbire le sostanze nutritive dal terreno. Tutta la superficie delle radichette è coinvolta nel processo di micorrizzazione; quando la colonizzazione fungina è completata, le radici ectomicorrizzate si riconoscono perché prive di peli radicali che vengono sostituiti, nella loro funzione dal denso feltro miceliare.

In natura le micorrize dei tartufi presentano un loro ciclo vegetativo, in relazione al ciclo biologico della pianta simbiote. In primavera le micorrize sono sede di intensa attività metabolica; in questa stagione dalle micorrize si sviluppano nuove ife che vanno a colonizzare sia il suolo circostante, sia le nuove radichette emesse nel frattempo dall'apparato radicale. Durante tutta l'estate l'attività di accrescimento e di ingrossamento delle micorrize continua con ritmi alterni a seconda delle condizioni idriche del terreno. In autunno, in seguito alla riduzione e al blocco della fotosintesi clorofilliana, che provoca alterazioni nello stato nutrizionale della pianta, il micelio arresta il suo sviluppo esclusivamente vegetativo e passa alla formazione del corpo fruttifero.

Funzioni ed utilità della simbiosi micorrizica

Le micorrize sono una tappa fondamentale del ciclo biologico del tartufo ma rappresentano anche un vantaggio per la pianta. In primo luogo c'è un maggiore vantaggio dal

punto di vista nutritivo: i funghi micorrizici rappresentano un vero e proprio apparato assorbente ausiliario, poiché le ife si espandono nel terreno circostante per diversi metri e possono così estrarre dal suolo una maggiore quantità di nutrienti. Le micorrize assicurano infatti una migliore assunzione dell'acqua e degli elementi minerali del terreno, in particolare quelli meno nobili. La micorrizzazione permette inoltre una migliore assunzione del fosforo, dell'azoto, del potassio, e di altri elementi come zinco, zolfo e rame. In particolare le piante micorrizzate assumono da tre a nove volte più fosforo e da due a sei volte più azoto delle piante non micorrizzate. Tale effetto è dovuto sia all'accresciuta superficie assorbente dell'apparato radicale sia ad un aumento del numero e delle dimensioni degli apici radicali. Inoltre, il fungo può solubilizzare composti insolubili presenti nel terreno, aumentando la disponibilità di elementi nutritivi. La pianta subisce il cosiddetto "effetto crescita", per cui la resa fotosintetica aumenta, e il 20% del carbonio totale prodotto dalla pianta può essere ceduto al fungo: il carbonio viene trasferito dalla pianta sotto forma di zuccheri quali saccarosio, glucosio e fruttosio che il fungo converte in trealosio in modo che non possa più essere riassorbito dalla pianta. Come conseguenza il fungo ha la possibilità di completare il suo ciclo vitale con la produzione di corpi fruttiferi, mentre la pianta sopporta meglio, rispetto ad una pianta non micorrizzata, le condizioni di stress dovute a scarsità di nutrienti.

Una condizione necessaria per l'instaurarsi della simbiosi è la scarsità di azoto nel terreno: se l'azoto è in eccesso, infatti, la pianta è in grado di assorbirne da sola una sufficiente quantità e sposta il metabolismo verso la sintesi proteica, non mettendo più zuccheri a disposizione del fungo [6]. In secondo luogo, i funghi sono in grado di resistere e inattivare a numerose sostanze tossiche, compresi i metalli pesanti: la pianta ospite sviluppa una maggiore tolleranza grazie a questa proprietà.

È stato osservato, inoltre, che molti prodotti metabolici fungini senza un apparente ruolo o a funzione ignota agiscono in realtà come fattori ormonali per la pianta.

Infine, la simbiosi ha anche un ruolo nella difesa della pianta da parte di organismi patogeni. La micorrizza infatti, costituisce una barriera fisica alla penetrazione di tali patogeni. Inoltre il fungo produce polisaccaridi che fungono da fitoalessine, cioè stimolatori della resistenza delle piante attaccate da patogeni: la pianta si trova così in uno stato d'allerta e può difendersi meglio da eventuali attacchi.

Tuber borchii

Tuber borchii è un tartufo bianco, chiamato volgarmente bianchetto o marzuolo per la crescita tardo invernale- primaverile, da non confondere con il più pregiato e conosciuto tartufo bianco d'Alba (*T. magnatum*). Ha un profumo meno intenso del tartufo bianco pregiato ed ha un caratteristico odore agliaceo. Predilige i terreni calcarei e argillosi e, a differenza di altre specie che prediligono pH tra 7 e 8, può tollerare suoli leggermente acidi [3]. Forma simbiosi con querce, faggi, pini e larici. E' uno dei tartufi più comuni specialmente nell'Europa meridionale e centrale, ha una notevole adattabilità ecologica.

Tuber borchii non ha particolare pregio gastronomico pur essendo commestibile ed è compreso tra le specie di tartufo commerciabili per la legge italiana. E' coltivato in alcune zone per lo più in via sperimentale. Questa specie, presente con le sue micorrize, ma anche con abbondanti fruttificazioni nei vivai e nelle piantagioni forestali, è stata oggetto, soprattutto in Francia, di studi per la forestazione. Con altri funghi micorrizici contribuisce allo sviluppo delle piante forestali.

E' stato possibile sviluppare in vitro sia i miceli sia le ectomicorrize [7]. La caratterizzazione biochimica dei miceli mostra che *T. borchii* può crescere su terreni contenenti glucosio o fruttosio come unica fonte di carbonio, ma non è in grado di utilizzare il saccarosio.

Negli ultimi anni è stata studiata con grande interesse l'espressione genica differenziale durante le varie fasi del ciclo vitale di *T. borchii* [8, 9, 10]. L'identificazione di come avviene la regolazione dei geni coinvolti nelle fasi del ciclo vitale porterà ad una migliore comprensione del meccanismo molecolare di questi processi.

Tuber melanosporum

Tuber melanosporum, noto comunemente come tartufo nero di Norcia, viene raccolto durante tutto il periodo invernale, ed in modo particolare nei primi mesi dell'anno, specialmente sotto querce, noccioli e carpini neri. E' un tartufo commestibile, molto pregiato dal punto di vista alimentare; il suo specifico sapore e il suo aromatico profumo lo rendono molto apprezzato in cucina dove dai francesi è considerato il migliore e quindi il più pregiato fra i "neri". Il tartufo nero pregiato presenta un areale di diffusione molto vasto, che comprende numerose nazioni d'Europa, dal Portogallo alla Bulgaria, anche se le più importanti per la produzione sono Francia, Spagna e Italia.

La vegetazione delle tartufaie naturali di *Tuber melanosporum* dell'Italia Centrale è caratterizzata dalla presenza quasi costante di alcune specie arboree, arbustive ed erbacce [11]. La specie arborea simbiote con la più alta frequenza nelle tartufaie è risultata la roverella ma a seconda delle zone può instaurare simbiosi anche con il leccio, il cerro, il carpino nero ed il nocciolo oltre che alcuni arbusti quali il ginepro, il ciliegio canino, la ginestra, il pruno, il biancospino e il corniolo.

Recentemente è stato portato a termine il sequenziamento del genoma di *T. melanosporum* [12]. Esso è stato il primo genoma di fungo simbiote e commestibile ad essere sequenziato. E' composto di circa 125Mb ed è tra i più lunghi e complessi genomi fungini sequenziati fino ad oggi. Il genoma deve la sua lunghezza alla presenza di numerosi elementi trasponibili ripetuti (58%). I geni codificanti per proteine sono solo 7500 circa e le famiglie di multigeni sono molto rare. L'analisi del genoma ha fornito la possibilità di approfondire lo studio delle basi molecolari della simbiosi, dell'anastomosi e della formazione del corpo fruttifero del tartufo.

Il sequenziamento ha portato alla realizzazione, da parte del *Tuber Genome Consortium* Franco-Italiano, del database online di *T.melanosporum*: TuberID .

FOSFOLIPASI

Le fosfolipasi formano una classe di enzimi ubiquitari che condividono la capacità di catalizzare l'idrolisi dei legami estere dei glicerofosfolipidi di membrana. Sono classificate in 4 gruppi diversi (A, B, C e D) a seconda della localizzazione del sito di idrolisi dell'acido grasso (Fig. 2).

Le fosfolipasi A permettono il rilascio di acidi grassi dai gruppi carboniosi dei gliceroli liberando un acido grasso libero e un lisofosfolipide. Sono ulteriormente suddivise in A1 e A2 in base alla loro attività di idrolisi dei legami rispettivamente in posizione sn-1 ed sn-2.

Fosfolipasi A2

Le fosfolipasi A2 sono state scoperte nel 1890 nel veleno di cobra e sono state successivamente identificate anche in altri serpenti e nel succo pancreatico di mammiferi. Gli studi svolti negli ultimi anni hanno evidenziato che le fosfolipasi A2 appartengono ad una grande famiglia di proteine strutturalmente e funzionalmente diverse, presenti in molti organismi e coinvolte in svariati processi biologici.

Inizialmente le PLA2s sono state divise in tre gruppi in base alla similarità di sequenza amminoacidica, ma negli ultimi decenni più membri di questa famiglia sono stati caratterizzati e il vecchio sistema di classificazione si è rivelato insufficiente a descrivere e distinguere questi enzimi.

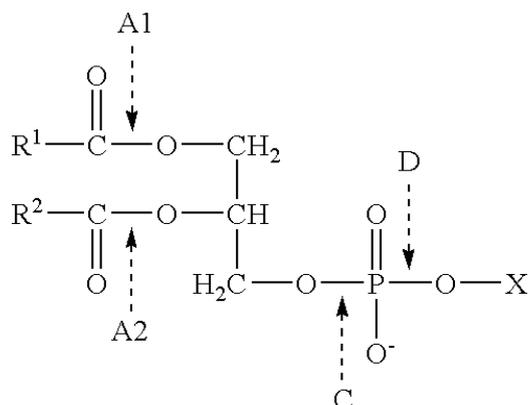


Figura 2
Idrolisi di fosfolipidi da parte delle fosfolipasi A1, A2, C e D.

Nel 1994 è stato introdotto un nuovo sistema di numerazione a gruppi [13] che si è continuamente allargato con la scoperta di nuove PLA2s [14, 15, 16].

Oggi sono note PLA2s da molti organismi diversi (rettili, mammiferi, insetti, piante, batteri, funghi), e la superfamiglia comprende 15 gruppi e sottogruppi diversi. La classificazione di questi enzimi è basata sulle loro caratteristiche catalitiche, funzionali e strutturali [17].

In seguito alla reazione catalizzata dalle PLA2, si liberano un acido grasso e un lisofosfolipide: entrambe queste molecole assumono ruoli importanti in numerosi processi biologici. Gli acidi grassi rilasciati (generalmente acido arachidonico, acido linoleico e acido linolenico) fungono da deposito di energia: le catene aciliche, infatti, possono essere degradate mediante ossidazione enzimatica. Inoltre, i fosfolipidi nelle membrane biologiche rappresentano una riserva di precursori di secondi messaggeri: i prodotti della lisi intervengono nei processi di traduzione del segnale. Gli acidi grassi svolgono questo ruolo grazie alla conversione in ossilipine, mediata da specifici enzimi ossidativi. L'altro prodotto della lisi, ossia il lisofosfolipide, rappresenta un'ulteriore classe di mediatori lipidici ed interviene nei processi di traduzione del segnale sia in maniera diretta sia, indirettamente, mediante perturbazione della membrana. Alcuni studi, infine, hanno consentito di identificare varie proteine solubili e di membrana in grado di legare le sPLA2: ciò suggerisce che le

sPLA2 stesse, e non solo i loro prodotti di reazione, possano fungere da segnali, legandosi ad alta affinità ad un recettore specifico [18].

Tra le PLA2 possono essere individuate cinque principali classi di enzimi: PLA2 secrete, PLA2 citosoliche Ca^{2+} -dipendenti, PLA2 Ca^{2+} -indipendenti, PAF acetilidrolasi e PLA2 lisosomiali. Ognuna di queste classi comprende enzimi coinvolti nel metabolismo dei lipidi e nella progressione di malattie, soprattutto cardiovascolari. C'è perciò un crescente interesse in campo farmaceutico e biotecnologico per lo studio e la caratterizzazione di questi enzimi [19].

PLA2 secretorie (sPLA2)

Il gruppo delle sPLA2 è costituito da 10 isozimi caratterizzati da un basso peso molecolare (14-19 kDa), un loop di legame del calcio ed un sito catalitico molto conservati, una mancanza di specificità verso fosfolipidi contenenti acido arachidonico e una struttura terziaria molto rigida conferita dalla presenza di 5-8 ponti disolfuro. Questi legami assicurano una resistenza sia alla denaturazione che alla proteolisi, caratteristica indispensabile per il mantenimento dell'attività nell'ambiente extracellulare. Una volta secreto, l'enzima si associa alla membrana esterna, dove può legare i recettori di membrana specifici oppure liberare acido arachidonico.

Per svolgere la loro azione, le sPLA2 sfruttano un residuo di istidina conservato; l'istidina è assistita da un residuo di aspartato nella polarizzazione di una molecola d'acqua, che poi attacca il gruppo carbonilico del substrato. Lo ione Ca^{2+} gioca un ruolo attivo nella catalisi stabilizzando l'intermedio tetraedrico che si forma durante la reazione.

Nei mammiferi le sPLA2 svolgono varie funzioni, prima fra tutte la digestione dei fosfolipidi assunti mediante la dieta [20]. Gli enzimi vengono prodotti nel pancreas ad alte concentrazioni come zimogeni inattivi; solo in seguito a secrezione, vengono attivati nel duodeno mediante rimozione di sette aminoacidi dall'N- terminale da parte della tripsina, e qui agiscono come enzimi digestivi.

Una seconda funzione svolta dalle sPLA2 è quella relativa alla comunicazione cellulare e alla trasduzione del segnale. In questo senso è particolarmente importante la produzione di acido arachidonico precursore della famiglia di composti eicosanoidi che svolgono un ruolo di ormoni paracrini [21]. Tra gli eicosanoidi vi sono i trombossani, le prostaglandine (ottenute grazie all'azione della ciclossigenasi) e i leucotrieni (derivati dalla reazione della lipossigenasi). Gli eicosanoidi sono noti mediare gli effetti di numerosi

processi intra- ed extracellulari che regolano lo sviluppo, le funzioni vascolari, la fisiologia renale e, soprattutto, la risposta infiammatoria in seguito ad infezione [17]. Gli enzimi stessi, legando i loro recettori delle cellule adiacenti, possono agire in modo paracrino per propagare la risposta all'infezione, mentre il lisofosfolipide liberato in seguito all'idrolisi può essere convertito nel precursore di PAF, un potente mediatore della risposta infiammatoria.

Anche nelle piante le sPLA2 sono coinvolte in numerosi processi e possono essere attivate diversi stimoli [22]. Il ruolo che le fosfolipasi A2 svolgono nelle piante non è ancora del tutto chiaro ma è probabile che, come negli animali, partecipino a processi di trasduzione del segnale. Questo intervento sarebbe mediato dai due prodotti liberati dell'azione della PLA2, che fungono da secondi messaggeri. L'acido grasso principalmente liberato è il linolenico, un acido poli-insaturo di 18 atomi di carbonio; esso viene indirizzato verso la via metabolica che converte gli octadecanoati in ossilipine, come l'acido jasmonico, un potente induttore della trascrizione genica [23]. La via è paragonabile a quella che, negli animali, porta alla produzione di eicosanoidi a partire dall'acido arachidonico.

Anche il secondo prodotto dell'attività fosfolipasica, il lisofosfolipide, svolge un ruolo nella risposta a stimoli esterni. In particolare, la fosfatidilcolina è in grado di attivare le proteine chinasi, che potrebbero a loro volta agire sulle pompe H^+ -ATPasi portando ad una acidificazione della parete cellulare. Si pensa che il coinvolgimento delle PLA2 nei processi di traduzione del segnale sia associato soprattutto alla crescita cellulare, al gravitropismo e alla difesa da patogeni e da ferite.

Alcuni batteri, tra cui *Streptomyces violaceoruber* e *coelior*, e funghi quali *T. borchii* [24], *Helicosporium sp. HN1* [25] e *Aspergillus oryzae* [26] esprimono sPLA2 ma la funzione di questi enzimi *in vivo* non è stata, ad oggi, completamente chiarita. E' stato ipotizzato che la PLA2 di *Streptomyces* possa avere una funzione citotossica per gli altri microrganismi presenti nel suolo oppure che sia coinvolta nel metabolismo del calcio [27]. La PLA2 p15 di *Helicosporium* induce la crescita degli assoni in colture cellulari di ratto *in vitro*, ma non è stato proposto nessun ruolo *in vivo* per la proteina [28].

PLA2 citosoliche calcio-dipendenti (cPLA2)

Al gruppo delle PLA2 citosoliche appartengono tre isoenzimi ad elevato peso molecolare (maggiore di 60 kDa), che mostrano una netta preferenza per l'acido arachidonico in posizione sn-2 rispetto ad altri acidi grassi. Questi enzimi sono ubiquitari e, nei mammiferi, sono costitutivamente espressi in molte cellule e tessuti (pancreas, cervello, cuore e fegato).

Sono formati da due domini catalitici, A e B, separati da sequenze specifiche per ogni isoforma. In risposta all'aumento di Ca^{2+} intracellulare, la proteina viene traslocata a livello della membrana periplasmatica grazie ad un dominio di legame per lo ione. Il Ca^{2+} non ha alcun ruolo nella catalisi ma, mediando l'interazione con la membrana, favorisce l'interazione dell'enzima con il substrato.

Sebbene non sia stato completamente chiarito, il meccanismo catalitico delle cPLA2 è paragonabile a quello delle idrolasi a serina, con la formazione di un intermedio acil-enzima: la Ser catalitica porta all'attacco nucleofilo al legame estere in posizione *sn-2* mentre un residuo di aspartato contribuisce all'attivazione del centro catalitico.

L'attivazione delle cPLA2 avviene mediante la fosforilazione di due residui di Ser da parte di proteine chinasi attivate da mitogeni (MAPKs). Il processo di fosforilazione è necessario, ma non sufficiente all'attivazione, poiché è indispensabile anche la presenza di Ca^{2+} [17].

Le caratteristiche biochimiche principali delle cPLA2 (attivazione per fosforilazione, traslocazione sulla membrana, preferenza per l'acido arachidonico) fanno presupporre il coinvolgimento in un processo di segnale a cascata attivato dal recettore. In cellule che non esprimono le sPLA2, la liberazione della maggior parte di acido arachidonico è attribuibile alle cPLA2.

PLA2 intracellulari calcio-indipendenti (iPLA2)

Il terzo gruppo di PLA2 è di più recente scoperta e comprende per ora poche proteine provenienti soprattutto dal mondo animale. Questi enzimi mostrano alcune caratteristiche comuni sia alle sPLA2 sia alle cPLA2. Come le forme secretorie, le iPLA2 non presentano specificità per fosfolipidi contenenti acido arachidonico in posizione *sn-2* e non sono soggette a modificazioni post-traduzionali covalenti; con le cPLA2, invece, condividono la localizzazione intracellulare, il peso molecolare e il meccanismo catalitico dipendente da serina. Caratteristiche uniche delle iPLA2 sono l'indipendenza dal Ca^{2+} e la presenza di 8 motivi anchirina all'N-terminale: questi motivi ripetuti potrebbero servire all'oligomerizzazione dell'enzima [17].

Le iPLA2 di mammifero sono espresse in modo ubiquitario in vari tessuti e hanno un ruolo nel rimodellamento dei fosfolipidi di membrana mediante deacilazione costitutiva: in questo modo influenzano la distribuzione dell'acido arachidonico e la quantità relativa dei vari acidi grassi nei vari compartimenti subcellulari. Oltre al mantenimento dell'omeostasi dei

fosfolipidi, le iPLA2 sembrerebbero essere responsabili, anche se in minima parte, anche del rilascio di acido arachidonico stimolo-dipendente [19].

Le iPLA2 nelle piante sono rappresentate da una famiglia di glicoproteine chiamate PLP (patatin-like PLA2) [29, 30]. Queste proteine potrebbero essere coinvolte nei meccanismi di segnalazione delle situazioni di stress quali la presenza di patogeni [31], condizioni climatiche sfavorevoli o elevate salinità del terreno [32].

PAF acetilidrolasi e PLA2 lisosomiali

Le PAF acetilidrolasi sono state inizialmente identificate in mammiferi per la loro capacità di tagliare in posizione *sn*-2 il fattore di attivazione delle piastrine (PAF), liberando una molecola di acido grasso. In seguito è stata dimostrata la capacità di queste proteine di idrolizzare anche di- e triacilgliceroli e di ossidare i fosfolipidi presenti nelle LDL. Le PAF acetilidrolasi possiedono una triade catalitica Ser/His/Asp, a differenza delle altre PLA2 che presentano invece una diade catalitica. Questi enzimi hanno una funzione anti-infiammatoria, sono coinvolti nella protezione da stress ossidativo e rivestono un ruolo importante nello sviluppo del cervello [17,19].

Le PLA2 lisosomiali sono il gruppo più recente della superfamiglia delle PLA2 ad essere stato descritto. Le caratteristiche distintive di questo gruppo sono la presenza di una triade catalitica Ser/His/Asp e la localizzazione lisosomiale [17].

sPLA2 con meccanismo di auto processamento

Tutte le SPLA2 esaminate fino ad oggi presentano, come atteso, data la loro localizzazione extracellulare, un peptide di secrezione in posizione N-terminale che viene eliminato durante la fase di internalizzazione nel reticolo endoplasmatico. Le sPLA2 di origine animale appartenenti al gruppo IB e X possiedono inoltre una sequenza aggiuntiva a monte della porzione ammino-terminale della proteina [33]. La fosfolipasi A2 pancreatica umana pro-hG1B [34, 35] è una delle fosfolipasi A2 di questo tipo meglio caratterizzate. Pro-hG1B è uno zimogeno digestivo secreto dagli acini pancreatici nella sua forma inattiva. La proteina viene attivata dalla tripsina o dalla trombina nel duodeno mediante taglio enzimatico dei primi sette residui dal precursore pro-hG1B. Il peptide che viene rimosso prende il nome di PROP (PhospholipaseA2 Propeptide). La struttura tridimensionale della proteina, risolta ai raggi X, mostra che essa forma un trimero. Molto simile ad altre fosfolipasi A2 pancreatiche,

come quella bovina [36] e di maiale [37], la struttura di pro-hG1B consiste in un set di quattro eliche maggiori.

Il peptide PROP si inserisce nel sito catalitico della proteina in modo simile a quello che si osserva nello studio strutturale del legame di alcuni inibitori di G1B. [38, 39]. E' stata riportata recentemente in letteratura [40], la capacità della proteina di processare, *in vitro*, il peptide PROP dopo incubazione a 37°O/N, senza aggiunta di enzimi proteolitici. Questo suggerisce la possibilità di un meccanismo di attivazione mediante autoproteolisi .

La struttura di pro-hG1B presenta una triade di amminoacidi, molto simile a quella delle serina-proteasi, che potrebbe essere responsabile del taglio del legame peptidico Arg0-Ala1. Sovrapponendo la struttura della triade Asp102-His57-Ser95 della Tripsina (pdb code 1K1I) e Asp49-Arg0-Ser(-2) di pro-hG1B si ottiene un valore di RMDS di solo 1 Å. Nella molecola di pro-hG1B il ponte salino tra Asp49 e Arg0 potrebbe orientare l'NH₂ dell'Arg in modo che il gruppo guanidinio dell'arginina possa ottenere un protone dalla Ser-2. In questo modo l'OG deprotonato della ser-2 può attaccare il C carbonilico dell'arg0, portando alla formazione dell'ossianione. Questo porta alla rottura del legame peptidico e alla rimozione del prodotto aminico. I dati disponibili suggeriscono che la temperatura sia un fattore chiave per questo meccanismo di attivazione.

TbSP1, la fosfolipasi A2 DI *Tuber borchii*

TbSP1 (*Tuber borchii* secreted protein 1) è una fosfolipasi che si accumula nello strato interno della parete cellulare e nello spazio extracellulare in miceli, corpi fruttiferi e micorrize del fungo simbiotico *T. borchii* (Fig. 3 e 4). Un'analisi dei livelli di mRNA di TbSP1 in funghi cresciuti *in vivo* in differenti condizioni nutrizionali ha evidenziato una regolazione in risposta alla disponibilità di nutrienti. In particolare, terreni carenti di carbonio o di azoto, inducono un significativo aumento nell'espressione di TbSP1. Inoltre, considerando le differenti fasi del ciclo vitale del tartufo, TbSP1 risulta preferenzialmente espressa durante la fase di micorrizzazione. Quando le ife di *T. borchii* vengono cresciute come coltura axenica in laboratorio, TbSP1 viene secreta e si accumula nel terreno di crescita. Ha una massa di circa 20kDa, l'attività fosfolipasica risulta specifica per la posizione *sn*-2 dei fosfolipidi ed è priva di attività lisofosfolipasica: queste caratteristiche hanno consentito la sua classificazione come PLA2 secretoria. È stato possibile isolarne il cDNA corrispondente mediante sequenziamento dell'N-terminale, sintesi di oligonucleotidi degenerati e successiva amplificazione di una libreria di cDNA e ibridazione della sonda così ottenuta con una libreria di DNA genomico. Il

cDNA isolato codifica per una proteina di 211 aminoacidi dei quali i primi 31 sono di natura altamente idrofobica. Di questi 31 residui, i primi 19 fungono da segnale secretorio, mentre i restanti 12 vengono rimossi al momento della secrezione e l'enzima, mantenuto inattivo all'interno della cellula, viene in questo modo convertito nella corrispondente forma matura.

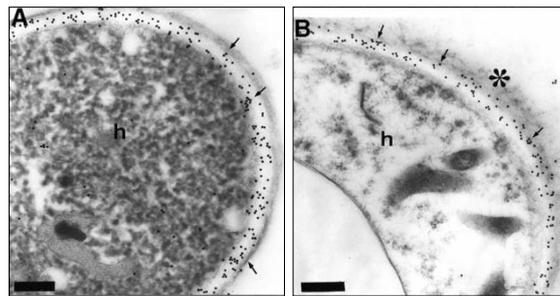


Figura 3
Immunolocalizzazione di TbSP1 nel micelio. (A) Iife di 30 giorni e (B) micelio completamente differenziato.

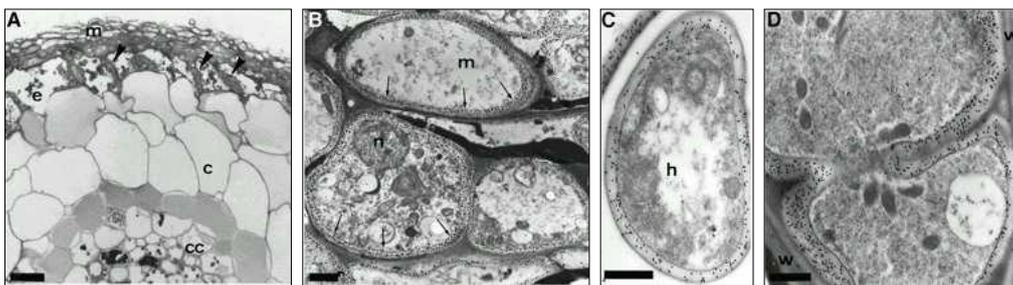


Figura 4
Immunoocalizzazione di TbSP1 nella micorriza. (A) Sezione di una ectomicorriza matura. (B), (C) e (D) Immunolocalizzazioni di TbSP1 su ectomicorriza matura nel mantello (m), nelle cellule corticali (c), nel cilindro centrale (cc), nell'ifa (h), e nel nucleo (n). Le frecce indicano i granuli d'oro, i triangoli neri il reticolo di Hartig.

Tra le sequenze omologhe a quella di TbSP1 analizzate in banca dati (Fig. 5), si è rivelata particolarmente interessante quella della PLA2 di *Streptomyces violaceoruber*, di cui è nota la struttura [41]. A differenza delle PLA2 di origine animale che presentano una struttura a β -sheet antiparallelo e tre α -eliche, la fosfolipasi A2 del batterio del suolo *S. violaceoruber* presenta una topologia di folding con cinque α -eliche e nessun β -sheet.

Sulla base delle caratteristiche di sequenza e dei saggi enzimatici eseguiti su TbSP1, è stato quindi possibile classificare la proteina come appartenente al gruppo XIV delle sPLA2. Questo gruppo comprende proteine provenienti da funghi o batteri filamentosi.

Sono state formulate diverse ipotesi sul ruolo *in vivo* di TbSP1. In primo luogo, dal momento che tutti i microrganismi che esprimono una proteina omologa sono filamentosi, è

possibile una relazione funzionale tra la proteina e la formazione di miceli; questo avverrebbe mediante rimodellamento della superficie ifale idrolizzando i fosfolipidi e/o inibendo gli enzimi coinvolti nella sintesi di polisaccaridi della parete cellulare. In secondo luogo, poiché si assiste ad una regolazione dei livelli di mRNA codificante per TbSP1 in risposta alla disponibilità di nutrienti, la proteina potrebbe avere un ruolo nella liberazione di acidi grassi da utilizzare come fonte di carbonio, poiché possono essere convertiti in precursori del glucosio attraverso il ciclo del glicolizzato. Infine, TbSP1 potrebbe essere coinvolta nel rimodellamento delle membrane e nella trasduzione del segnale durante le prime fasi della micorrizzazione grazie all'azione sia dell'acido grasso sia del lisofosfolipide biologicamente attivo che vengono liberati con la reazione fosfolipasica.

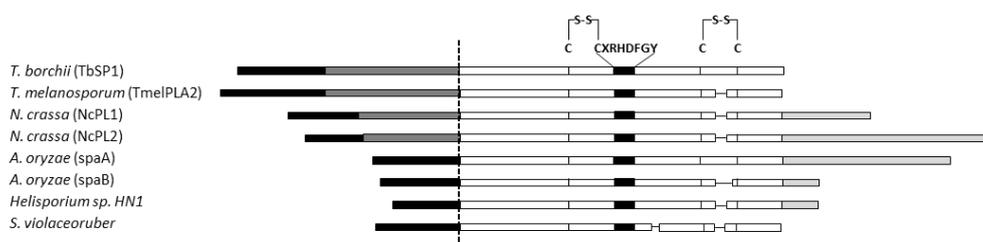


Figura 5

Rappresentazione schematica delle sequenze del gruppo XIV delle sPLA2. I peptidi di secrezione predetti sono mostrati in nero, i polipeptidi N-terminali e C-terminali in grigio scuro e chiaro, rispettivamente. L'inizio del dominio catalitico omologo tra le diverse PLA2 è segnalato dalla linea tratteggiata; sono inoltre evidenziati il sito catalitico conservato e le cisteine che formano i legami

Struttura di TbSP1

Nonostante la presenza preponderante di enzimi fungini nel gruppo XIV delle sPLA2, composto da proteine provenienti sia da procarioti che da eucarioti, non sono disponibili in letteratura informazioni sulla struttura di PLA2 da miceti. La struttura di TbSP1 risulta essere quindi la prima risolta.

TbSP1 ricombinante espressa in *E. coli* ceppo Origami2 (DE3) (Novagen) è stata cristallizzata e la struttura tridimensionale risolta con successo. Considerata l'omologia di sequenza di TbSP1 con la PLA2 di *S.violaceoruber* [42, 43], la struttura di quest'ultima è stata utilizzata come modello per il fitting. Inaspettatamente, la struttura tridimensionale di TbSP1 risulta deleta nella regione N-terminale ed il sito di taglio è posizionato intorno al residuo 85. Ne risulta una proteina con una massa molecolare di circa 14.5 kDa invece che i 22kDa attesi.

La struttura complessiva di TbSP1, così come quella della PLA2 del batterio *S.violaceoruber*, esibisce una topologia strutturale completamente diversa da quella delle PLA2 eucariotiche (Fig. 6). Inoltre, la geometria del putativo sito di legame per il calcio è differente da quella delle PLA2 eucariotiche. Infatti, mentre le PLA2 di classe I e II eucariotiche hanno una struttura a β -sheet antiparallela composta di due filamenti con 2 α -eliche, il folding di TbSP1 consiste in cinque α -eliche che formano due domini. Il dominio N-terminale include le eliche 1 e 2 mentre il dominio C-terminale è composto da tre eliche antiparallele impaccate (α 3, α 4 e α 5). I due domini sono connessi da un lungo loop che va dall' Asp125 alla Lys 145. Inoltre, a differenza delle PLA2 eucariotiche, che hanno 6-8 legami disolfuro, TbSP1, come il suo omologo di *S. violaceoruber*, presenta solo quattro Cys impegnate in due ponti disolfuro, Cys128—Cys144 e Cys180—Cys194. Questi legami conferiscono comunque rigidità sufficiente alla proteina per la sua attività enzimatica.

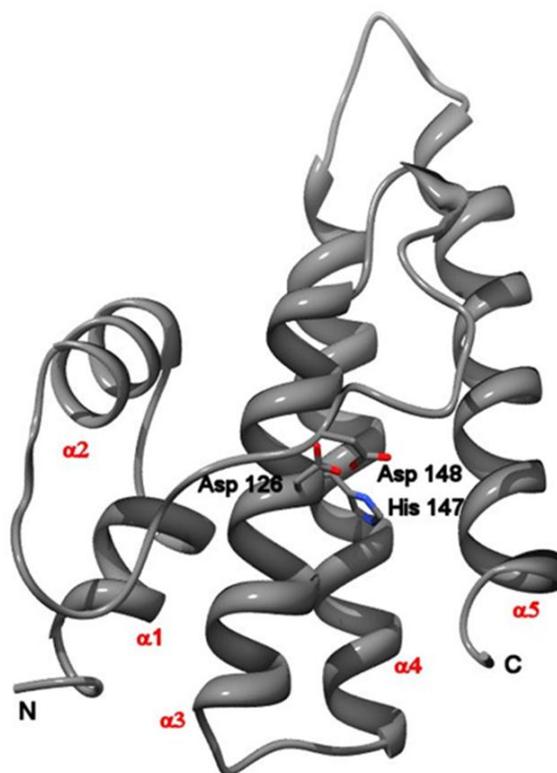


Figura 6

Struttura di TbSP1. Sono evidenziati i residui chiave Asp 126, His 147, Asp 148; in rosso sono indicate le 5 α -eliche, N e C indicano l'ammino e il carbossi- terminale della proteina, rispettivamente.

Dalla sovrapposizione del backbone di C α di TbSP1 con quello della PLA2 di *S. violaceoruber*, risulta un RMDS (scarto quadratico medio delle strutture) di 1.90Å e 2.08Å rispettivamente per la forma della proteina batterica legata al calcio e non legata. La

sovrapposizione del backbone delle due proteine evidenzia alcune significative differenze nella conformazione locale. In particolare, in TbSP1 il backbone dei primi tre residui all' N-terminale ha un orientamento differente, il turn tra le eliche 1 e 2 è più corto, la porzione finale del lungo segmento che connette le eliche 2 e 3 è spostato di circa 7.7Å tra la Pro132-Pro135 e il turn tra le eliche 4 e 5 è più lungo.

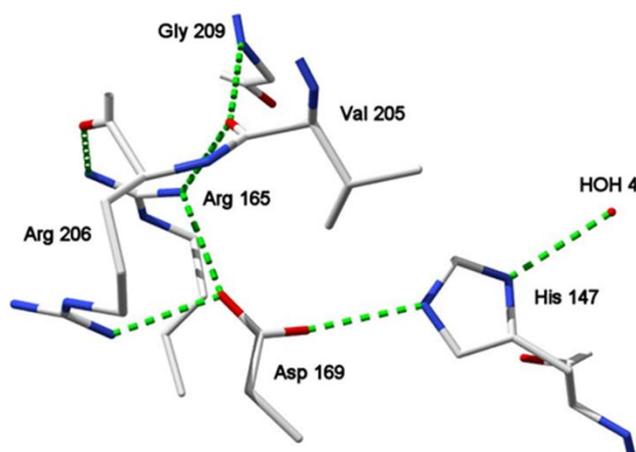


Figura 7

Sito catalitico di TbSP1. I legami idrogeno sono mostrati in verde e i residui amminoacidici sono rappresentati con la colorazione CPK; è inoltre evidenziata in verde una molecola d'acqua che partecipa al network dei legami idrogeno del sito attivo.

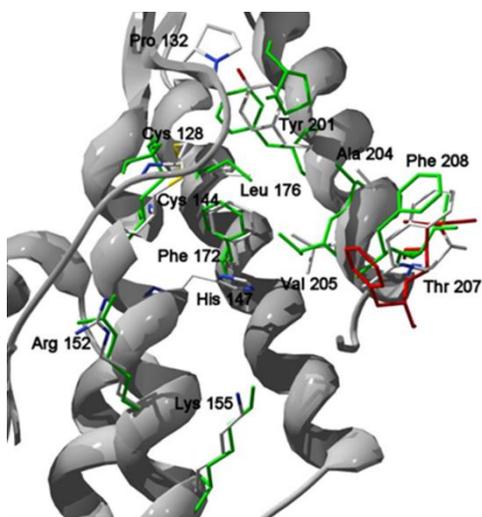


Figura 8

Sito di legame del substrato. I residui di TbSP1 coinvolti nel legame del substrato (colorazione CPK) sono sovrapposti ai corrispondenti residui delle forme legata al calcio (verde) e non legata al calcio (rosso) della PLA2 di *S. violaceoruber*. I numeri sono riferiti ai residui di TbSP1.

Come in altre fosfolipasi A2, il residuo responsabile della catalisi è un'istidina (His147), affiancata da un aspartato (Asp148) e stabilizzata da una estesa rete di legami idrogeno (Fig. 7). Il canale del substrato è composto da residui che risultano conservati: Cys 128, Pro 132, Cys 144, Phe 172, Leu 176, Tyr 201, Ala 204, Val 205, Thr 207 e Phe 208. Le uniche differenze con la proteina omologa di *Streptomyces* [42] sono la Met176 a sostituire una leucina, l'Ile207 a sostituire una treonina. Altri due residui conservati rispetto alla PLA2 di *Streptomyces* sono l'Arg152 e la Lys155 che si suppone possano interagire con il gruppo fosfato del substrato (Fig. 8).

Il calcio non è presente nel modello di TbSP1 ma è stato comunque possibile, mediante comparazione con la struttura della PLA2 di *S. violaceoruber*, ipotizzare quali siano i residui coinvolti nel legame con lo ione. Inoltre, pur senza il calcio, la struttura risolta di TbSP1 esibisce una forma compatta e mantiene la sua rigidità conformazionale. Infatti, il valore del "B factor" (parametro proporzionale alla flessibilità degli atomi di una struttura) per tutti gli atomi di TbSP1 è più vicino a quello osservato nella forma legata al calcio della PLA2 di *Streptomyces*, piuttosto che a quella priva dello ione (Fig. 9).

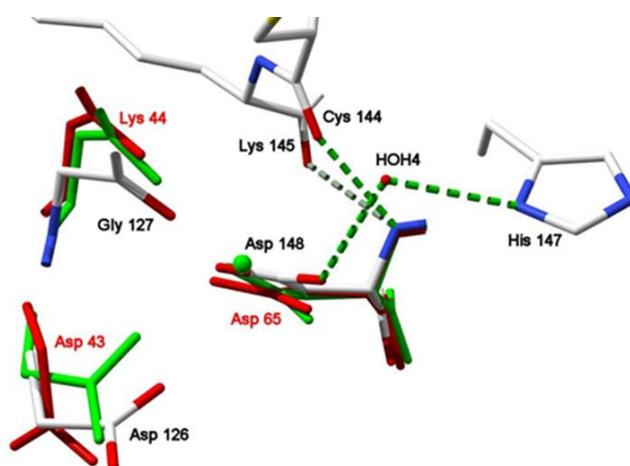


Figura 9

Sito di legame del calcio predetto. Sovrapposizione dei residui coinvolti nel legame col calcio delle forme legata (verde) e non legata (rosso) al calcio della PLA2 di *S. violaceoruber* con i corrispondenti amminoacidi di TbSP1 (colorazione CPK). La sfera verde rappresenta lo ione Ca^{2+} , mentre i legami idrogeno e la molecola d'acqua sono rappresentati da linee verdi tratteggiate e una sfera rossa, rispettivamente.

Autodigestione di TbSP1

L'analisi di diffrazione ai raggi X dei cristalli di TbSP1 ha portato all'identificazione di una proteina di massa molecolare inferiore a quella attesa (14.5kDa invece di 20kDa per la proteina senza coda di istidine, 6xHis-tag, e 22kDa per la proteina con 6xHis-tag). Tale

risultato è stato confermato dall'esame mediante spettrometria di massa della proteina ottenuta da cristalli disciolti di TbSP1 nei quali è presente un frammento delle dimensioni di circa 14.5kDa. Per verificare se l'evento di auto processamento osservato nel cristallo fosse riproducibile, TbSP1 ricombinante isolata da *E. coli* Origami 2 (DE3) (Novagen) è stata utilizzata per saggi di digestione *in vitro*. La proteina è stata incubata O/N a 37° ed i campioni sono stati poi analizzati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF ed elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE). In entrambi a casi è stata rilevata la presenza di un frammento proteico principale di massa molecolare comparabile a quello osservato nei cristalli (14.5kDa circa). Nel caso della proteina ricombinante si assiste inoltre alla digestione a valle di alcuni residui della coda di istidine, con la formazione di frammenti delle dimensioni di circa 20kDa. Il prodotto di digestione di 14.5kDa della proteina purificata dal ceppo di *E. coli* BL21 CodonPlus, la cui cinetica di digestione risulta molto veloce, è in grado di processarsi ulteriormente generando un frammento di 13.9kDa quando incubata per un lungo periodo di tempo (15 e più ore).

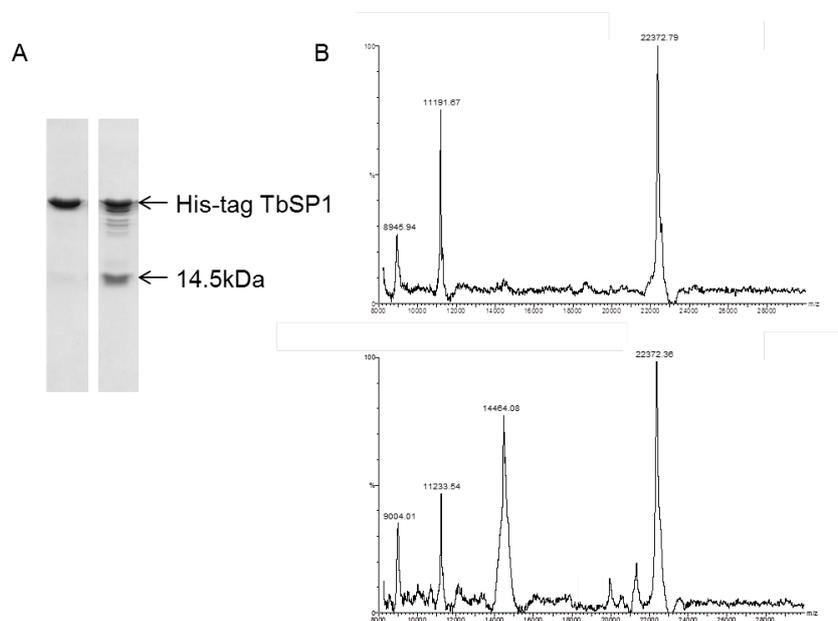


Figura 10.

Auto processamento di TbSP1. (A) Profilo SDS-PAGE di TbSP1 ricombinante purificata da ceppo BL21 Origami (lane 1, T₀ controllo) e la stessa proteina incubata a 37°C per 15 h ad una concentrazione di 20 μM (lane 2, T₁₅). (B) Analisi MALDI-TOF del T₀ (sopra) e T₁₅ (sotto) dei campioni di proteina utilizzati nel pannello A.

Esperimenti successivi eseguiti sulla proteina purificata da micelio hanno evidenziato la presenza della forma digerita di TbSP1, confermando che il processo di maturazione

avviene anche *in vivo*. Inoltre, il sito di taglio delle due proteine risulta essere localizzato nella medesima regione (Fig. 10 e 11).

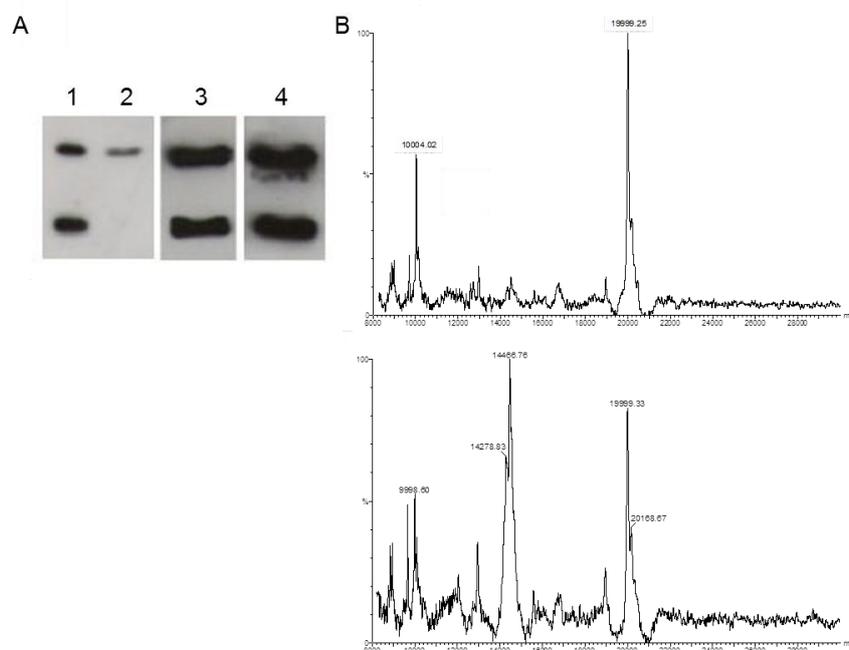


Figura 11.

Attivazione mediante auto proteolisi di TbSP1 isolata da miceli di *T. borchii*. (A) Analisi mediante western blotting di estratti acquosi (5 µg di proteina per ogni estratto) derivati da miceli di *T. borchii* cresciuti per 14 giorni in terreno completo e quindi cresciuti per altri 7 giorni nello stesso terreno (lane 2), in terreno privo di azoto (lane 3) e in terreno privo di fonti di carbonio (lane 4). Un campione di TbSP1 parzialmente digerita è stato caricato come marker nella lane 1. (B) Analisi MALDI-TOF di TbSP1 (20 µM) purificata da miceli di *T. borchii* (sopra, T₀) e la stessa proteina incubata a 37° C per 15 h (sotto, T₁₅).

L'ipotesi di un ruolo fisiologico del meccanismo di digestione è inoltre supportata dal fatto che si osserva un aumento significativo (circa 80 volte) dell'attività fosfolipasica nel frammento di 14.5kDa rispetto alla proteina intera.

Esperimenti *in vitro* di caratterizzazione del processo di auto digestione hanno permesso di scoprire che la velocità di tale processo è dipendente dalla concentrazione di proteina.

Nonostante i saggi eseguiti su TbSP1 purificata dai due ceppi di *E. coli* CodonPlus ed Origami2 portino agli stessi risultati sperimentali per quanto riguarda la localizzazione del sito di taglio, la cinetica della proteina da Origami2 e da CodonPlus è significativamente diversa, con la proteina purificata da quest'ultimo ceppo che risulta più veloce nella digestione rispetto a quella isolata da Origami2. Analogamente, la proteina purificata dalla

frazione solubile di entrambi i ceppi mostra una velocità di proteolisi molto maggiore rispetto a quella ottenuta dai corpi di inclusione batterici. Il motivo di questa differenza non è stato ancora chiarito. Tutte le proteine purificate mostrano all'analisi mediante spettrometria di massa MALDI-TOF il peso molecolare atteso e non presentano pertanto modificazioni covalenti (o comunque non è stato possibile osservarle con le tecniche impiegate). I risultati ottenuti potrebbero quindi essere spiegati ipotizzando la presenza di differenze strutturali locali che influenzano l'attività dei diversi pool proteici purificati. Per quanto riguarda i possibili siti di modificazione post-trasduzionale, sono stati identificati in TbSP1 alcuni siti potenziali di fosforilazione mediante analisi computazionale della sequenza. Tuttavia esperimenti mirati hanno dimostrato che la fosforilazione di questi siti, sebbene possibile, non influenza la velocità di auto digestione della proteina.

Al fine di spiegare le differenze esistenti tra le proteine purificate dai due ceppi devono essere presi in considerazione altri fattori tra cui il sistema di espressione dal momento che CodonPlus ed Origami2 possiedono caratteristiche diverse. In particolare l'ambiente riducente del ceppo *E. coli* Origami2 (DE3) favorisce la formazione dei ponti disolfuro, incrementando la probabilità di un folding corretto della proteina. Questo potrebbe essere la causa di alcune differenze sub-strutturali tra le proteine espresse nei due ceppi batterici.

E' stata presa in considerazione la possibilità che l'attività proteolitica sia in realtà dovuta alla presenza di un contaminante, ma diverse evidenze sperimentali raccolte contrastano con questa ipotesi. In primo luogo, TbSP1 ottenuta da micelio di *T. borchii* e da due differenti ceppi batterici (sia dalla frazione solubile che da quella insolubile) esibisce le stesse proprietà di proteolisi (anche se la velocità di reazione della TbSP1 da pellet è molto bassa). Inoltre le proteine sono state purificate impiegando diverse procedure ed è inverosimile l'ipotesi di una contaminazione della stessa proteasi di tutti i prodotti finali. In aggiunta, dopo aver caricato singolarmente le forme di TbSP1 intera e digerita su di una colonna cromatografia ad esclusione dimensionale, viene rivelata per TbSP1 la capacità di auto digerirsi, mentre il frammento di 14.5kDa mantiene la capacità di digerire substrati *in trans*.

Numerosi esperimenti hanno dimostrato che il meccanismo del processo di digestione di TbSP1 è di tipo intermolecolare e che il sito proteasico è localizzato sul prodotto di digestione. La proteina infatti, riconosce e taglia specificamente sia alcune forme "inattivate" di TbSP1 (TbSP1 da corpi di inclusione ed inattivata ad alte temperature), sia un mutante di

fusione in cui la porzione N-terminale di TbSP1 (aa 32-119) è stata fusa con la GFP (Green Fluorescent Protein). Inoltre TbSP1 è in grado di processare una forma inattivata della proteina omologa del fungo filamentoso *Neurospora crassa* (NcPL1). Il taglio di NcPL1 avviene nella porzione N-terminale. Inoltre, allineando le sequenze delle due fosfolipasi, il sito di taglio delle due proteine risulta essere localizzato nella stessa regione.

E' importante considerare che, nonostante i risultati riportati sopra indichino la presenza di un meccanismo di reazione bimolecolare, non può essere escluso che il primo step del processamento sia di tipo intramolecolare, come riportato in letteratura per alcuni meccanismi di autoproteolisi [44, 45].

Per distinguere tra un'azione endo- o esoproteasica di TbSP1 è stata creata una proteina di fusione in cui l'N-terminale dell'enzima è stato legato al C-terminale della tireossidina batterica. Nella proteina di fusione Trx-TbSP1, il residuo N-terminale di TbSP1 è bloccato, poiché legato al C-terminale della Trx. Dopo incubazione viene recuperato il frammento di 14.5kDa e la parte complementare della proteina di fusione, con e senza la coda di istidine. Questo ha permesso di concludere che il processo di digestione di TbSP1 non necessita di un residuo libero nella porzione N-terminale. La proteina quindi agisce come endoproteasi.

Identificazione dei residui responsabili dell'attività proteasica di TbSP1

Le attività fosfolipasica e proteasica di TbSP1 coinvolgono residui differenti; come indicato dalla sostituzione dell'istidina catalitica 147, conservata nel gruppo XIV delle PLA2, che abolisce completamente l'attività fosfolipasica, ma non ha alcun effetto sulla reazione di proteolisi.

Indicazioni preliminari sui putativi residui coinvolti nell'attività di proteolisi di TbSP1, sono state ottenute identificando specifici inibitori della proteina. Ulteriori informazioni sono state acquisite dall'analisi e dal confronto delle sequenze conservate della proteina con quelle di altre fosfolipasi A2 e dallo studio della struttura tridimensionale del frammento di 14.5kDa in modo da risalire ad eventuali siti accessibili dell'enzima.

Sono stati osservati gli effetti di alcuni ioni sulle reazioni di digestione e fosfolipasica. In particolare l'idrolisi di fosfolipidi non può avvenire se non viene aggiunto calcio alla soluzione di reazione. L'attività proteasica invece, pur essendo modestamente stimolata (10%) dalla presenza di Ca^{2+} e Sr^{2+} , non necessita dell'aggiunta di cationi esogeni in soluzione. La presenza di agenti chelanti, quali EDTA, CDTA, EGTA e BAPTA, inibisce

entrambe le attività della proteina. Alcuni altri composti, come DTT, β -mercaptoetanololo, ATP e buffer fosfato mostrano un parziale effetto inibitorio nell'attività proteolitica ma nessuno di essi induce una perdita di attività completa ed irreversibile.

PMSF e AEBSF, inibitori delle serina-proteasi, bloccano quasi completamente il processo di digestione dopo 24h di incubazione a 37°. Nonostante il PMSF sia un inibitore irreversibile, dopo 48h di incubazione la digestione diventa di nuovo rivelabile. Questo comportamento tuttavia è stato già ottenuto e riportato in letteratura [46]. L'inibizione da parte di questi composti ha portato a supporre che sia coinvolto un residuo di serina nel processo di digestione. Gli inibitori delle serina proteasi potrebbero, nel caso di TbSP1, inibire sia una serina catalitica, sia legarsi ad una delle numerose serine presenti nella regione di taglio limitando in questo modo la proteolisi. Questa seconda ipotesi risulta meno probabile dal momento che un mutante delle serine nella regione di taglio, che mostra una marcata diminuzione del processo di proteolisi, viene ulteriormente rallentato nella digestione dall'aggiunta di PMSF in soluzione.

Tenuto conto di tutte le informazioni raccolte, sono stati prodotti diversi mutanti in putativi residui coinvolti nella proteolisi. Di tutti i mutanti creati, due hanno perso l'attività fosfolipasica, dal momento che le mutazioni erano localizzate in prossimità del sito catalitico della proteina o alteravano il sito di legame per il calcio ma in nessuno dei casi veniva diminuita o abolita la capacità di digestione.

Analisi della regione di taglio di TbSP1

Gli esperimenti di proteolisi limitata sono impiegati per lo studio dell'organizzazione strutturale delle proteine [47] e sono stati condotti con TbSP1 purificata da Origami in presenza di proteasi specifiche quali V8 di *Staphylococcus aureus* e Chimotripsina. È interessante notare che, nonostante siano presenti molti potenziali siti di taglio su TbSP1 da parte delle proteasi utilizzate, i risultati sperimentali indicano la presenza di un solo punto di taglio, localizzato nella regione di auto processamento (Fig. 12). Inoltre il frammento che ne deriva, di dimensioni simili a quelle del frammento di 14.5kDa prodotto dalla digestione di TbSP1 wt, presenta, come atteso, una aumentata attività fosfolipasica e mantiene la capacità di processare substrati eterologhi. Nel loro insieme i risultati degli esperimenti di proteolisi limitata forniscono quindi importanti informazioni sulla struttura della proteina intera, suggerendo la presenza di due domini distinti, connessi da una porzione esposta e flessibile e quindi accessibile alle proteasi.

Come accennato nel precedente paragrafo, è stato creato un mutante di TbSP1 in cui le numerose serine della regione del sito di taglio sono state sostituite con alanine. Questo mutante ha permesso di valutare l'importanza della specificità di sequenza del processo di proteolisi. Il mutante mostra una diminuzione drammatica della velocità di auto processamento, così come diminuisce notevolmente l'efficienza di digestione *in trans* da parte del frammento di 14.5kDa. Questi dati dimostrano quindi l'importanza della conservazione di quella porzione proteica per il corretto riconoscimento del sito di taglio.

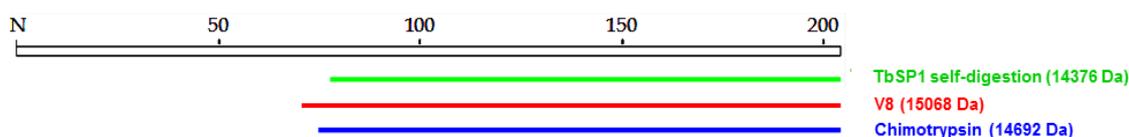


Figura 12.

Proteolisi limitata di TbSP1. Localizzazione e dimensioni dei prodotti di digestione principali rivelati dopo incubazione. In verde: auto digestione di TbSP1; in rosso e blu, proteolisi limitata di TBSP1 da parte di V8 e chimotripsina, rispettivamente.

L'importanza della conservazione del motivo strutturale per il riconoscimento della regione di taglio della proteina è stata dimostrata clonando la sequenza del sito di gestione (aa 78-99) nel loop della Trx di *E. coli*. La Trx può fare da scaffold per l'inserzione di peptidi di media lunghezza; i peptidi inseriti risultano così esposti al solvente e questa caratteristica è stata sfruttata per esempio nello screening di librerie di peptidi [48, 49] o per la sintesi di anticorpi [50]. La proteina chimerica Trx-TbSP1, incubata con il frammento 14.5kDa, non subisce alcun processo di digestione. Il risultato di tale esperimento può essere spiegato ipotizzando un errato folding della regione oppure dal fatto che sono necessari altri residui, oltre ai 22 inseriti, per il riconoscimento da parte di TbSP1-14.5kDa. Nel complesso questi dati prospettano l'importanza sia della sequenza primaria, sia della struttura tridimensionale nel processo di autodigestione.

SCOPO DEL LAVORO

Esperimenti condotti precedentemente hanno dimostrato che il meccanismo del processo di digestione di TbSP1 è di tipo intermolecolare, che la proteina agisce come endoproteasi e che il sito proteasico è localizzato sul frammento di 14.5 kDa ed è distinto dal sito fosfolipasico.

Nel capitolo 2 del presente lavoro di tesi viene descritta l'ulteriore caratterizzazione biochimica di TbSP1 con la determinazione dei parametri cinetici della reazione fosfolipasica così come delle costanti di affinità per il calcio di TbSP1. E' stata inoltre analizzata l'importanza della presenza dello ione calcio in relazione alle due attività di TbSP1 e sono stati condotti esperimenti al fine di identificare i residui responsabili dell'attività proteasica. Nel capitolo 3 TbSP1 viene confrontata con altre fosfolipasi A2 fungine. In particolare è stata indagata la possibilità che due proteine da *T. melanosporum* e *N. crassa*, omologhe a TbSP1, abbiano lo stesso meccanismo di maturazione ed attivazione. Nel capitolo 4 viene analizzata l'attività fosfolipasica e l'eventuale capacità di digestione *in trans* di una forma stabile di TbSP1 da parte di alcune tra le principali PLA2 descritte in letteratura.

CAPITOLO 2

Caratterizzazione biochimica di TbSP1

Esperimenti precedenti hanno mostrato che TbSP1 va incontro ad autoprocessamento quando incubata a 37°. La reazione di digestione è di tipo endoproteasico ed intermolecolare ed è inibita da due classi di molecole: inibitori delle proteasi a serina e agenti chelanti. Nel presente capitolo viene descritta l'ulteriore caratterizzazione biochimica di TbSP1. In particolare sono stati effettuati gli esperimenti volti a determinare i parametri cinetici della reazione fosfolipasica così come sono state determinate le costanti di affinità per il calcio di TbSP1. E' stata inoltre analizzata l'importanza della presenza dello ione calcio in relazione alle due attività di TbSP1. Infine sono stati condotti esperimenti al fine di identificare i residui responsabili dell'attività proteasica alla luce anche di nuove conoscenze acquisite in letteratura.

PROCEDURE SPERIMENTALI

Espressione e purificazione di TbSP1

L'espressione della proteina è stata indotta mediante l'aggiunta al terreno di coltura di IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside, Sigma-Aldrich) a concentrazione 1 mM e successiva incubazione dei batteri per 4h a 37°. In seguito le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione e lisate con una prima sonicazione in tampone Tris/HCl 25 mM pH 8.0 con NaCl 500 mM, lisozima 0.2 mg/ml, Tween 20 allo 0.16% in presenza di inibitori delle proteasi: 0.5 mM benzamidina, 1µM leupeptina e 1 µM pepstatina A (Sigma-Aldrich). Il lisato cellulare è stato centrifugato ed il pellet, contenente i corpi di inclusione batterici, è stato sottoposto ad una seconda sonicazione in tampone Tris/HCl 20 mM pH 8.0 con NaCl 500 mM, Urea 2 M e Triton X-100 al 2% (Sigma-Aldrich). Dopo una ulteriore centrifugazione il pellet è stato risospeso in tampone guanidinio idrocloruro (Tris/HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, β-mercaptoetanolo 1 mM e guanidinio idrocloruro 6 M, Sigma-Aldrich) e tenuto in agitazione per 30-60 minuti a temperatura ambiente. La soluzione è stata poi dializzata in tubo da dialisi 3500MW contro 2l di tampone denaturante (Tris/HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, β-mercaptoetanolo 1 mM, urea 6 M). La proteina è stata rinaturata mediante gradiente in urea da 6 M a 0 M.

Le proteine ricombinanti ottenute dopo la dialisi e dal surnatante della prima sonicazione, sono state caricate separatamente su una colonna cromatografica di affinità HisTrap FF Crude (1ml, GE Healthcare). L'eluizione è stata effettuata in gradiente lineare di imidazolo da 20 mM a 500 mM in tampone Tris/HCl 20 mM pH 8.0 e NaCl 500 mM

utilizzando il sistema di purificazione ÄKTAprime FPLC (Pharmacia/Amersham Biosciences). Le proteine sono state in seguito purificate ad omogeneità mediante cromatografia di scambio anionico MonoQ HiTrap FF (1ml, GE Healthcare) ed eluizione in gradiente di NaCl da 0 a 500 mM. La purezza delle frazioni proteiche è stata determinata mediante gel di poliacrilammide-SDS al 15% [51].

Saggio di attività fosfolipasica

L'attività fosfolipasica delle PLA2 è stata misurata utilizzando il saggio colorimetrico commerciale (NEFA-C, Wako) per la quantificazione degli acidi grassi non esterificati. In breve il saggio prevede l'impiego di due reazioni sequenziali effettuate in soluzioni A e B. Il saggio di attività fosfolipasica è stato eseguito in tampone HEPES pH 8.0, NaCl 150 mM e CaCl₂ 30 mM impiegando come substrato 2.5 mM 2-linoleoyl-1palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Sigma-Aldrich) solubilizzato in 0,5% Triton X-100. Per la determinazione della costante di affinità per il substrato sono state utilizzate concentrazioni crescenti di 2-linoleoyl-1palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine da 0 mM a 30 mM solubilizzato in Triton X-100 da 0.5% a 3%. Le concentrazioni di fosfolipasi impiegate variano da 25nM a 1µM. Il tempo di incubazione standard per la reazione è di 10 minuti a 37°C. A 125µl di soluzione A (contenente ACS, acyl-CoA synthetase, ATP e CoA, coenzima A) sono stati aggiunti 5 µl di soluzione di reazione. Dopo 3 minuti di incubazione a 37°C, vengono aggiunti 250 µl di soluzione B (contenente MEHA, N-ethyl-N-(β-hydroxyethyl)aniline, ACOD, acyl-CoA oxidase, e POD, peroxidase) e la reazione viene incubata a 37°C per altri 4,5 minuti. Gli acidi grassi liberati durante la reazione, trattati con ACS in presenza di ATP e di CoA, portano alla formazione di acil-CoA. L'addizione alla reazione di ACOD porta alla formazione di acqua ossigenata che, in presenza di perossidasi, reagisce con il 4-aminophenazone e MEHA portando alla formazione del prodotto finale, una chinone-immina, che dà una colorazione rossa alla soluzione. L'assorbanza del campione, misurata a 546 nm è proporzionale alla concentrazione di acidi grassi liberi ed è utilizzata per risalire all'attività fosfolipasica degli enzimi, impiegando come riferimento una soluzione a concentrazione nota di acido oleico.

Saggio di attività proteasica

L'attività proteasica della proteina e dei mutanti è stata testata, in condizioni standard, mediante incubazione a 37° dei campioni proteici ad una concentrazione di 30 µM, per un tempo variabile da 1 h a 16 h a seconda del tipo di saggio.

I campioni incubati sono stati in seguito analizzati sia su gel di poliacrilammide al 15% che mediante spettrometria di massa (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight, MALDI-TOFMS).

Analisi di spettrometria di massa

Per l'analisi MALDI-TOFMS, i campioni sono stati mescolati in rapporto 1:1 (v/v) con acido trifluoroacetico all'1% (TFA, Sigma-Aldrich). Per eliminare eventuali sali presenti, i campioni sono stati caricati su puntali ZipTip C18 lavati precedentemente con acetonitrile e TFA allo 0.1%. In seguito è stato effettuato un lavaggio con 10 µl di TFA allo 0.1% e la proteina è stata quindi eluita con 2 µl di water matrix solution (Sigma-Aldrich) contenente acido sinapinico 10mg/ml, acetonitrile al 70% e TFA allo 0.1%. I campioni sono stati poi depositati su una piastra, seccati con un flusso di azoto e analizzati in modalità lineare positiva con MALDI-LR (Waters-Micromass Co., Manchester, UK). Lo strumento funziona con i seguenti parametri: generatore di voltaggio a 15000 V, voltaggio pulsato a 1550 V e rivelatore 1800 V MCP.

D126N forward	GGGTAACCTGGATTGGTTCTATA AAT GGCTGCA
D126N reverse	GCC ATT ATCAGACCAATCCAGGTTACCC
D148N forward	GGGCTTCAATTTCTGGACAGCTGTAAACGTCACA AAT TCGGGTAC
D148N reverse	CCGAA ATT GTGACGTTTACAGCTGCCAGGAAATTGAAGCCCGC
S95-103A forward	CAGTAAGCGCCGCTCTGTCACCGGT GGCT GACACGGACCGCCTGCTGTAT GCT
S95-103A reverse	AGC ATACAGCAGGCGGTCCGTGT AGC CACCGGTGACAGAGCGGCGCTTACTGAGCT
TbSP1 gene sintetico	<u>CATATGGGTAACGCCGAAGTGATTGCCGAACAGACAGGTGACGTCCAGATTTCAACACAC</u> AGATTACGGAACCAACGGGTGAGGGAGATAGAGGAGACGTTGCTGACGAAACAAACCTGT CGACCGACATTGTTCCAGAAACCGAAGCAGCAAGCTTTGCCGCGAGCTCAGTAAGCGCCGC TCTGTACCCGGTGAGTGACACGGACCGCCTGCTGTATAGTACTGCCATGCCGGCATTCTGA CAGCAAAACGTAACAAAAACCGGGTAACCTGGATTGGTCTGATGATGGCTGCAGCAAAAG CCCAGATCGTCCCGCGGGCTTCAATTTCTGGACAGCTGTAAACGTCACGATTTCCGGGTACC GTAACTATAAAAAACAACACCGCTTTACCGAGGCCAATCGTAAACGTATCGACGACAACCTC AAAAAAGACCTGTACAACGAGTGTGCCAAATATTCCGGGCTGGAGTCTTGAAAGGTGTAG CCTGCCGTAAAATTGCCAACACCTATTATGATGCCGTTTCGTACCTTTGGTTGGCTGTAGGGA TCCCTCGAG

Tabella 1.

Sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per la creazione di mutanti e gene sintetico per TbSP1. In grassetto sono evidenziate le mutazioni, I siti di restrizione sono sottolineati.

Clonaggio dei mutanti

I mutanti del sito di legame del calcio (D126N e D148N) e il mutante S95-103A sono stati ottenuti mediante mutagenesi a cassetta a partire da un gene sintetico di TbSP1 (Tab. 1) in cui sono stati inseriti vari siti di restrizione unici posizionati in modo da rendere possibile la

escissione selettiva di porzioni del gene. I frammenti *SmaI-PstI*, *SacI-KpnI* e *SacI e ScaI* del gene sintetico sono stati sostituiti con gli oligonucleotidi recanti le mutazioni D126N, D148N e S95-103A rispettivamente. Nella tabella 1 sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per introdurre le mutazioni.

I geni codificanti per i mutanti sono stati quindi clonati nel vettore di espressione pET28b ed i plasmidi risultanti sono stati utilizzati per trasformare cellule *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene).

Il mutante S124L-D126A-R152A è stato progettato come riportato in tabella 2 ed il gene sintetico è stato acquistato presso la ditta Eurofins. Il gene recante le mutazioni, inserito nel vettore pCR2.1 è stato digerito con l'enzima di restrizione *NdeI* e successivamente introdotto mediante procedura di ligazione nel vettore di espressione pET28b.

Espressione e purificazione dei mutanti

L'induzione dell'espressione delle proteine e la successiva purificazione sono state eseguite come indicato in precedenza per TbSP1. Per la purificazione da corpi di inclusione dei mutanti S95-103A e S124L-D126A-R152A è stata utilizzata una tecnica di solubilizzazione in Arginina [52]. In breve, dopo la sonicazione dell'estratto batterico, i pellet sono stati lavati per tre volte con una soluzione di Tris-HCl pH8 50 mM e NaCl 200 mM e quindi centrifugati. I pellet sono stati poi risospesi in una soluzione di Tris HCl pH 8 50 mM, NaCl 200 mM e Arginina 2 M e lasciati in agitazione per 20 h a 4° C. Le soluzioni sono state quindi centrifugate e sono stati recuperati i surnatanti contenenti le proteine solubilizzate. I campioni sono stati analizzati sia mediante SDS-PAGE al 15% sia con spettrometria di massa (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight, MALDI-TOFMS).

Rimozione del calcio da TbSP1

La rimozione del Ca²⁺ da TbSP1 (120µM) è stata ottenuta trattando la proteina con EDTA 5 mM a temperatura ambiente per 1 h. Al fine di rimuovere l'eccesso di EDTA, il campione è stato caricato su di una colonna di gel-filtrazione Vivapure IEX Mini H (Sartorius Stedim). Il passaggio in colonna è stato ripetuto per tre volte. Le colonne sono state equilibrate con tampone Tris-HCl 20 mM pH8 prima dell'utilizzo. La proteina dopo eluizione è stata concentrata a 160 µM.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Determinazione dei parametri cinetici per l'attività fosfolipasica di TbSP1

Al fine di determinare i parametri cinetici relativi all'attività fosfolipasica di TbSP1, è stata costruita una curva di saturazione del substrato incubando TbSP1, sia nella forma intera che in quella digerita, in presenza di concentrazioni crescenti di substrato (da 0,5 μM a 30 mM). Saggi preliminari hanno permesso di identificare le concentrazioni adeguate delle due forme di TbSP1 da utilizzare (1 μM per TbSP1 e 50 nM per TbSP1-14.5 kDa).

La caratterizzazione cinetica delle fosfolipasi è piuttosto complessa poiché l'attività misurata dipende in modo significativo dallo stato di aggregazione del substrato (micelle o liposomi) e dalle dimensioni degli aggregati. Nonostante i risultati presentati di seguito siano limitati alla misura di attività apparenti con substrati ad aggregazione micellare, è comunque possibile trarre delle conclusioni generali sul funzionamento della proteina. I valori di $K_{m(\text{app})}$ ottenuti, di 2.6 mM e 1.2 mM rispettivamente per TbSP1 e TbSP1-14.5kDa (Fig. 13), sono in linea con quanto riportato in letteratura per altre PLA2 [53] e indicano che non sono presenti significative differenze di affinità per il substrato tra la forma intera e digerita di TbSP1. La velocità con cui le reazioni avvengono è invece significativamente diversa. TbSP1-14,5kDa ha mostrato infatti una aumentata attività fosfolipasica rispetto alla forma intera della proteina (circa 60 volte), confermando i risultati ottenuti in precedenza sia sulla proteina ricombinante che su quella isolata da micelio. Un'ulteriore conferma del significato fisiologico del processo di auto processamento deriva dal monitoraggio della digestione e dell'attività fosfolipasica in parallelo, in funzione del tempo di incubazione. Come mostrato in Fig. 14, l'attività della PLA2 aumenta con l'accumularsi del frammento di digestione per raggiungere un valore finale che risulta di circa 50 volte maggiore rispetto a quello misurato per la proteina intera.

Il sito di legame per il calcio

La geometria di coordinazione dello ione Ca^{2+} predetta per TbSP1, identificata grazie alla sovrapposizione della struttura tridimensionale di TbSP1 con quella di *S. violaceoruber*, è simile a quella di altre fosfolipasi A2 batteriche, mentre differisce notevolmente da quella delle PLA2 eucariotiche. I putativi residui coinvolti nel legame col calcio sono l'Asp126, l'Asp148 e la Gly127.

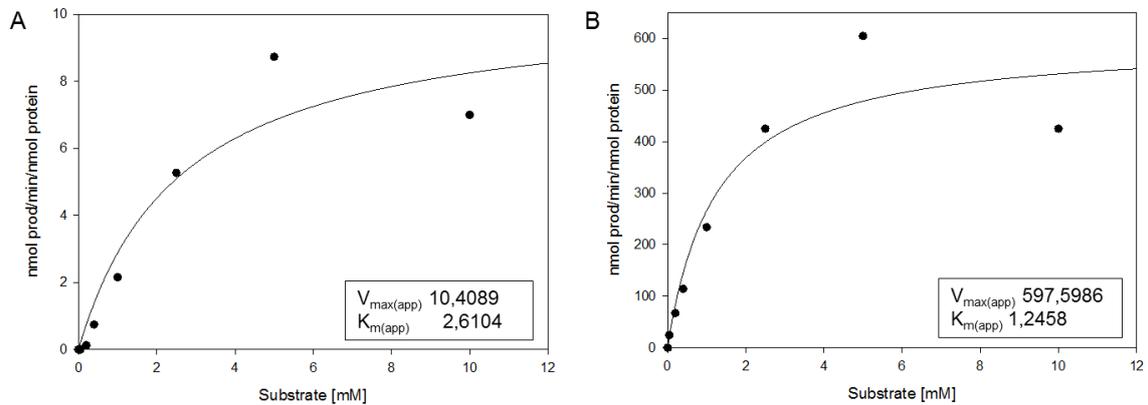


Figura 13.
Curva di saturazione del substrato di TbSP1. (A) Attività di TbSP1-22 kDa e (B) attività di TbSP1 14.5 kDa.

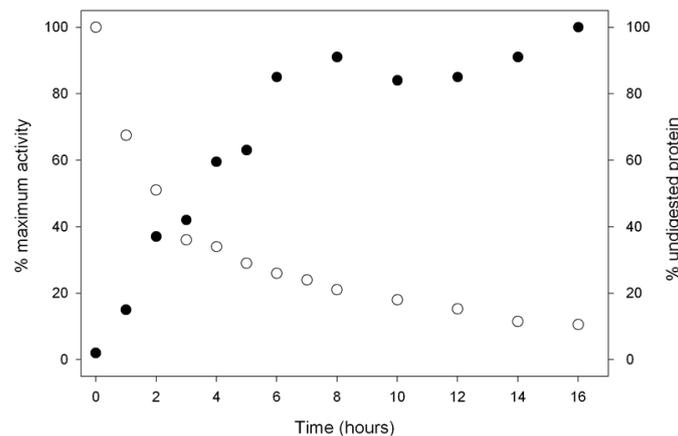


Figura 14.
Attivazione di TbSP1. Attività proteasica e fosfolipasica di TbSP1 misurate in parallelo, in funzione del tempo, su campioni di TbSP1 ricombinante (120 μ M) incubata a 37° C. L'attività fosfolipasica massima dopo 16 h (con un residuo pari al 10% di proteina non digerita) è risultata 415 nmol prod/min/ng enzima.

La costante di dissociazione della proteina per il calcio è stata misurata mediante titolazione della reazione di idrolisi di fosfolipidi con Ca^{2+} (1 μ M - 200mM). Come mostrato in Fig. 15 la proteina possiede una elevata affinità per lo ione e le $k_{d(\text{app})}$ risultano rispettivamente 142 μ M e 101 μ M per la forma intera e digerita.

E' stato in precedenza dimostrato che l'idrolisi di fosfolipidi non può avvenire se non viene aggiunto calcio alla soluzione di reazione mentre l'attività proteasica, pur essendo stimolata dalla presenza di Ca^{2+} e Sr^{2+} , non necessita dell'aggiunta di cationi esogeni in soluzione (Fig. 16, colonne 1 e 2). Per verificare se i cationi bivalenti abbiano un ruolo nella reazione di proteolisi è stato allestito un esperimento in cui TbSP1-origami (30 μ M) incubata in precedenza con EDTA 5 mM è stata caricata in una colonna cromatografica di gel-

filtrazione con un cut-off di 6 kDa che permette l'eluizione della proteina ma trattiene il chelante e gli eventuali ioni ad esso legati. In seguito la proteina sottoposta a trattamento di rimozione degli ioni è stata incubata a 37° O/N e si è osservato che questa è in grado di auto digerirsi (Fig. 16, colonna 3). Questo risultato suggerisce che la reazione di proteolisi di TbSP1 non necessita di ioni legati alla proteina.

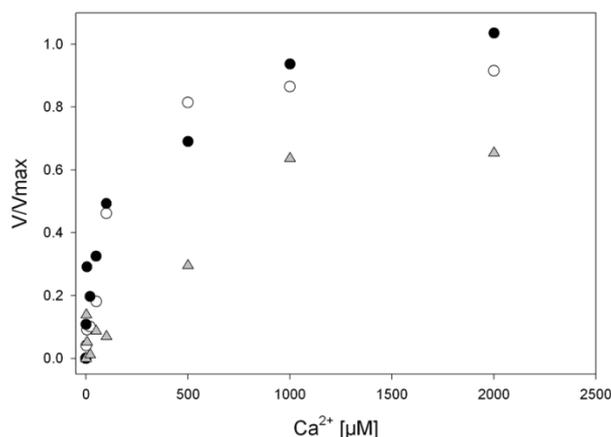


Figura 15.

Curva di saturazione del calcio. Idrolisi del substrato a concentrazioni crescenti di calcio da parte di TbSP1-22 kDa (500 nM, cerchi bianchi); TbSP1-14.5 kDa (12.5 nM, cerchi neri); e del mutante D126N (1 μM, triangoli).

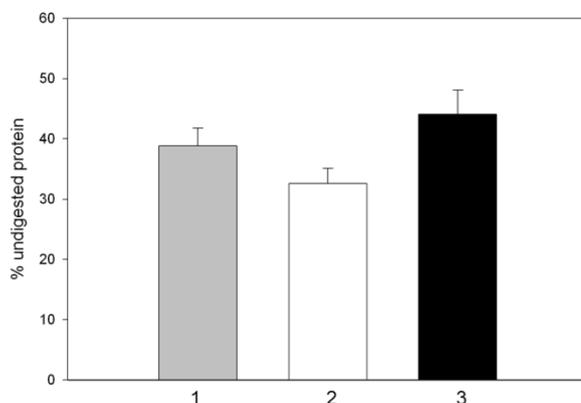


Figura 16.

Attività proteasica di TbSP1 in presenza ed assenza di ioni esogeni. % di TbSP1-origami (30 μM) non digerita dopo incubazione O/N a 37° C in presenza di calcio 20 mM (1), senza aggiunta di ioni esogeni (2) e dopo preincubazione con EDTA 5 mM, seguita da cromatografia di gel filtrazione (3).

L'ipotesi è supportata anche dalla sostituzione dei due residui coinvolti nella coordinazione del calcio, Asp126 e Asp148 con asparagina: nonostante il considerevole aumento della costante di dissociazione per lo ione (887 μM per D126N e 200 mM per D148N, Fig. 15) e una conseguente severa riduzione dell'attività fosfolipasica, la mutazione non ha alcun effetto sul processo di digestione (Fig. 17).

L'aggiunta di Mg^{2+} (20 mM), che inibisce la reazione di digestione di TbSP1 wt, non modifica la capacità dei due mutanti del sito di legame del calcio di digerirsi. Le modificazioni apportate con le mutazioni D126N e D148N bloccano quindi l'effetto inibitorio del magnesio, che non viene legato nel sito deputato al legame del calcio e quindi non può esercitare il suo effetto inibitorio.

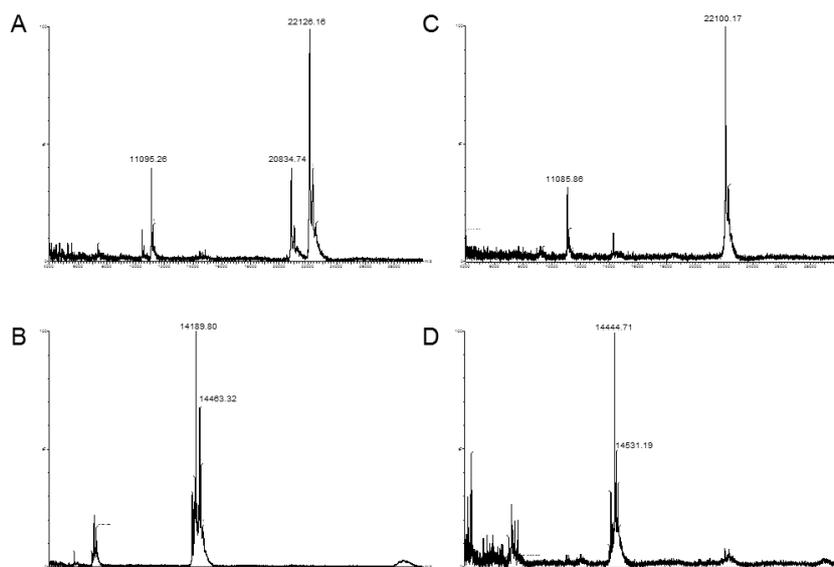


Figura 17.

Attività proteasica dei mutanti del sito di legame del calcio. Mutanti D126N e D148N (30 μ M, A e B, rispettivamente) e le stesse proteine dopo incubazione O/N a 37° (C e D, rispettivamente).

Effetto inibitorio di agenti chelanti

E' stato osservato in passato che alcuni agenti chelanti, quali ad esempio EDTA, inibiscono entrambe le attività enzimatiche della proteina. Mentre l'inibizione dell'attività fosfolipasica di TbSP1 da parte dell'EDTA può essere spiegata attraverso il semplice effetto chelante con sequestro dello ione Ca^{2+} , alla luce di quanto descritto nel paragrafo precedente, la stessa spiegazione non può essere ritenuta valida per quanto riguarda l'inibizione della reazione di proteolisi. L'inibizione della reazione di digestione che si osserva quando la proteina viene incubata con l'EDTA non è imputabile alla rimozione del calcio dal sito di legame, non essendo lo ione indispensabile per la reazione di proteolisi, ma piuttosto ad un effetto diretto del composto sulla proteina.

Per confermare questa ipotesi sono stati eseguiti numerosi esperimenti. In primo luogo sono stati effettuati dei saggi di autodigestione su TbSP1-Origami (40 μ M) in presenza di concentrazioni crescenti di EDTA (10 μ M-10 mM) (Fig. 18, A). L'inibizione del 50%

dell'attività di autodigestione di TbSP1 avviene ad una concentrazione di EDTA di circa 100 μM (Fig. 18, B). Considerando che la K_d dell'EDTA stimata per il calcio è di circa 0.08 μM , nel caso di una inibizione mediante sequestro dello ione, ci si aspetta che l'inibizione della reazione proteolitica di TbSP1 avvenga a valori estremamente bassi di concentrazione del chelante, inferiori a 1 μM . Poiché i valori ottenuti sono in disaccordo con questo tipo di modello, è possibile ipotizzare che l'inibizione da parte del chelante avvenga invece mediante un meccanismo di interazione diretta con il sito proteasico di TbSP1 e non per sottrazione dello ione. L'aggiunta di un largo eccesso di Ca^{2+} (20 mM, concentrazione molto superiore alla k_d della proteina per il calcio) o altri cationi bivalenti che legano il chelante, quali ad esempio il manganese, permette di revertire l'inibizione da EDTA (dati non mostrati).

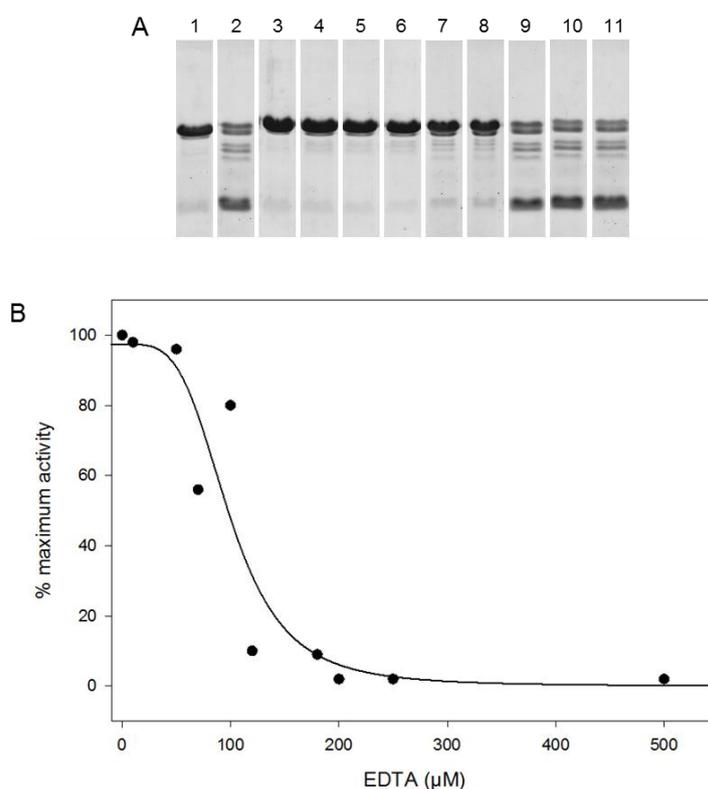


Figura 18.

Attività proteasica di TbSP1 in funzione della concentrazione di EDTA. (A) SDS-PAGE di TbSP1 40 μM (lane 1) e in presenza di EDTA 10 mM (lane 3) e della stessa proteina incubata O/N a 37° C senza chelanti (lane 2) e in presenza di concentrazioni crescenti di EDTA (lane 4, EDTA 10 mM; lane 5, EDTA 5 mM; lane 6, EDTA 1 mM; lane 7, EDTA 500 μM ; lane 8, EDTA 200 μM ; lane 9, EDTA 100 μM ; lane 10, EDTA 50 μM ; lane 11, EDTA 10 μM). (B) % di attività proteasica massima in funzione della concentrazione di EDTA. La costante di inibizione apparente $K_{i(\text{app})}$ calcolata è 98 μM EDTA.

E' stato dimostrato che la reazione di proteolisi è inibita da EDTA anche nel caso dei due mutanti del sito di legame del calcio, nonostante questi abbiano severamente diminuito la

loro capacità di legare lo ione (dati non mostrati). Un largo eccesso di calcio permette la ripresa della digestione dopo incubazione con EDTA (200 μ M) del mutante D148N, che ha un'affinità estremamente bassa per lo ione (dati non mostrati).

Gli esperimenti dedicati allo studio del sito di legame per il calcio hanno dimostrato che questo risulta indispensabile per la reazione fosfolipasica di TbSP1 ma non per quella di auto proteolisi. La reazione di digestione viene inibita dall'EDTA che agisce probabilmente mediante una interazione diretta con il sito catalitico e non per sequestro dello ione.

E' stato precedentemente dimostrato che altri chelanti, quali CDTA, EGTA e BAPTA ed alcuni altri composti come DTT, β -mercaptoetanololo, ATP e buffer fosfato inibiscono l'auto processamento di TbSP1. Tutti questi composti, nonostante abbiano strutture e funzioni diverse, presentano dei gruppi carichi negativamente in comune con l'EDTA. Si può quindi ipotizzare che l'effetto inibitorio di queste molecole sia riconducibile alla presenza di questi gruppi funzionali, che potrebbero instaurare delle interazioni con i residui responsabili della reazione di proteolisi.

Ricerca dei residui responsabili dell'attività proteasica

I numerosi esperimenti eseguiti in precedenza volti a determinare quali residui siano coinvolti nella reazione di proteolisi di TbSP1 non hanno avuto esito positivo. Nonostante questo è stato possibile dimostrare che residui differenti sono responsabili delle due distinte attività della proteina. Infatti la sostituzione dell'istidina catalitica 147, conservata nel gruppo XIV delle PLA2, abolisce completamente la reazione fosfolipasica ma non ha alcun effetto sulla reazione di proteolisi.

Nel presente paragrafo verrà illustrata la progettazione e la realizzazione di due mutanti in residui ritenuti potenzialmente coinvolti nella reazione di proteolisi.

Tra i mutanti di TbSP1 costruiti in passato particolare importanza riveste quello in cui 7 residui di serina nella regione di taglio sono stati sostituiti con alanina (TbSP1-S/A). Tale mutante ha mostrato una notevole riduzione dell'attività di auto processamento (per la proteina 20 μ M il tempo di dimezzamento passa da 1 h e 30 min a 30 h) così come della digestione da parte del frammento di 14.5 kDa di TbSP1. L'effetto delle mutazioni S/A sottolinea il ruolo delle serine del sito di taglio e a tal proposito è possibile formulare due ipotesi: il sito attivo si trova nella regione in cui avviene la proteolisi e quindi il considerevole aumento del tempo di dimezzamento dipende dalla sostituzione di un residuo coinvolto nella

catalisi, oppure la riduzione dell'attività di digestione dipende da un minore riconoscimento del sito di taglio ed il sito catalitico è localizzato altrove.

Considerato che in letteratura sono riportati numerosi casi in cui nel processo di auto digestione l'attività catalitica è associata ad un residuo localizzato in prossimità del sito in cui avviene la proteolisi [54], si è rivelato interessante mutare anche le rimanenti serine della regione di taglio che non erano state modificate in precedenza per verificare un loro possibile ruolo catalitico. In particolare sono state mutate in alanine la Ser95 e la Ser103, a valle del sito di digestione (Ser86).

Il mutante S95-103A incubato a 37°C per 4 h subisce auto digestione (Fig. 19). Inoltre a tempi più lunghi (15 e più ore) si osserva la quasi completa degradazione della proteina. L'attività fosfolipasica del mutante risulta conservata e paragonabile a quella del wt, sia per la forma intera che per il frammento di 14.5 kDa (dati non mostrati). Le mutazioni introdotte non hanno quindi alterato l'attività proteasica della proteina, ma ne hanno diminuito la stabilità.

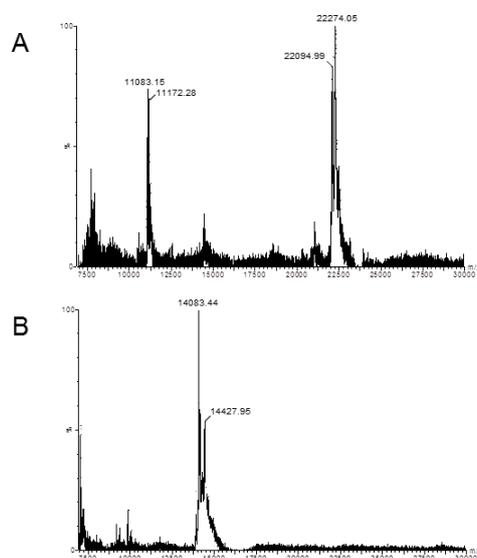


Figura 19.

Attività proteasica del mutante S95-103A. Mutante S95-103A (30 μM, A) e la stessa proteina dopo incubazione per 4 h a 37° (B).

In uno studio recente sulla struttura della fosfolipasiA2 pancreatica umana pro-hG1B [55] viene proposto un meccanismo di attivazione mediante autoproteolisi dei primi sette residui all'N-terminale, catalizzato dalla triade Asp49-Arg0-Ser(-2), simile a quella della tripsina. Le sequenze primarie di TbSP1 e pro-hG1B sono molto diverse, così come sono diverse le strutture e le dimensioni del frammento di proteina che viene rimosso. E' stata però

trovata una somiglianza nella disposizione spaziale tra la triade catalitica proposta per pro-hG1B e tre residui di TbSP1 (Fig. 20): Ser124 e Asp126, localizzati sul lungo segmento che connette le eliche $\alpha 2$ e $\alpha 3$ e Arg152, sull'elica $\alpha 4$. Nella pro-hG1B i residui intorno alla Ser(-2) potrebbero determinare la deprotonazione della serina che risulterebbe in questo modo in grado di attaccare il carbonio carbonilico dell'Arg0. Nella TbSP1, la Ser124 potrebbe promuovere il taglio dell'N-terminale a monte della Ser86. I residui Ser124, Asp126 e Arg152 sono conservati in altre PLA2 del gruppo XIV quali le fosfolipasi di *S. violaceoruber*, di *N. crassa* e di *Helicosporium*, mentre nella PLA2 di *T. melanosporum* solo la Ser124 è sostituita da una treonina.

L'esistenza di una serina catalitica potrebbe spiegare l'inibizione dell'attività proteolitica osservata in presenza di PMSF. L'Arg152 nel sito catalitico inoltre, potrebbe essere la causa dell'inibizione della reazione protasica che si rileva in presenza di alcune molecole cariche negativamente quali l'EDTA o l'ATP.

Per verificare l'ipotesi di un coinvolgimento dei tre residui sopra indicati e sovrapponibili alla triade catalitica proposta per la PLA2 umana, nell'attività di proteolisi di TbSP1, è stato creato il triplo mutante S124L-D148A-R152A.

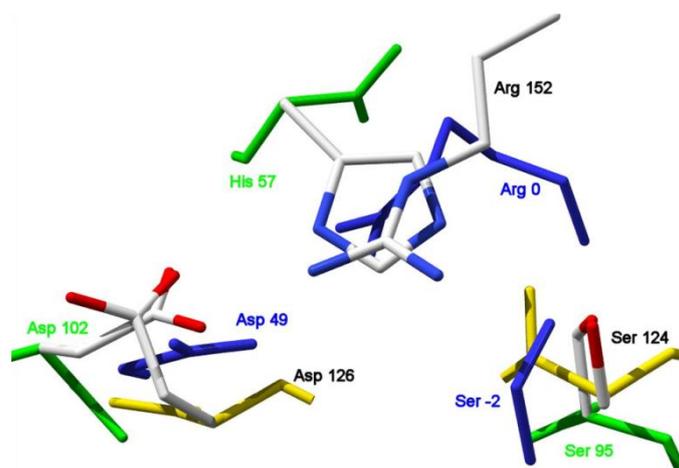


Figura 20.

Struttura tridimensionale del putativo sito proteasico di TbSP1. Sovrapposizione dei residui del sito catalitico della tripsina (backbone in verde), dei residui proposti come sito proteasico della fosfolipasi A2 pancreatica umana pro-hG1B (backbone in blu) e i residui potenzialmente coinvolti nella reazione di proteolisi di TbSP1 (backbone in giallo).

La purificazione del mutante da entrambi i ceppi cellulari di *E. coli* utilizzati per l'induzione dell'espressione (BL21 CodonPlus e Origami2), sia dalla frazione solubile che dai corpi di inclusione risolubilizzati in un tampone contenente arginina, si è rivelata particolarmente problematica. Infatti, già durante il caricamento dei lisati batterici in colonna

cromatografica di affinità (HisTrap, GE Healthcare) la proteina tende a perdere la coda di istidine indispensabile per la purificazione. Il mutante è stato tuttavia isolato, anche se in quantità molto ridotte.

La proteina purificata è molto instabile, ma è stato comunque possibile rilevare l'attività di digestione in tempi brevi. (Fig. 21). Già dopo un'ora di incubazione infatti, si osserva la completa scomparsa della proteina intera e la formazione del frammento 14.5 kDa.

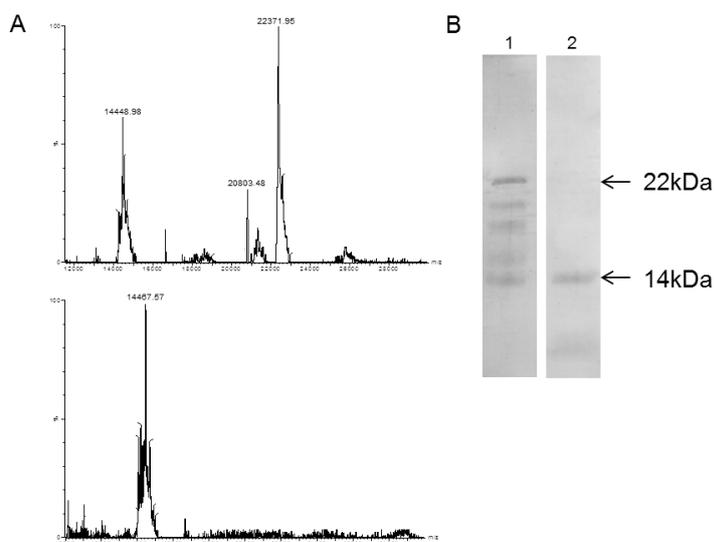


Figura 21.

Attività proteasica del mutante S124L-D148A-R152A. (A) Analisi MALDI-TOF del mutante S124L-D148A-R152A (30 μ M, T_0 sopra) e la stessa proteina dopo incubazione per 1 h a 37° (T_{1h} sotto). (B) Gli stessi campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE (lane 1, T_0 ; lane 2, T_{1h}).

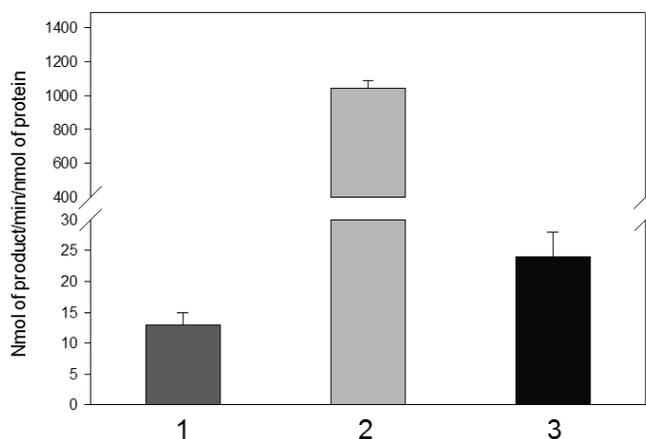


Figura 22.

Attività fosfolipasica del mutante S124L-D148A-R152A. Misura dell'attività fosfolipasica di (1) TbSP1-22 kDa; (2) TbSP1-14.5 kDa e del mutante S124L-D148A-R152A dopo un'ora di incubazione a 37° C.

L'attività fosfolipasica del mutante, testata sulla proteina appena purificata ed incubata per 1h, 2h e 4h, risulta molto ridotta rispetto al wt, e non è possibile apprezzare un aumento significativo della reazione dopo la digestione del frammento di 14.5 kDa a causa della sua instabilità (Fig. 22). La proteina infatti, oltre ad alla mutazione dell'Asp126, coinvolto nel legame con il calcio (che dovrebbe essere però "bilanciata" da una aggiunta di eccesso di calcio nella reazione di idrolisi dei fosfolipidi), è mutata in uno nei residui (Arg152) che si suppone interagisca con il gruppo fosfato del substrato [41]. E' perciò atteso che le mutazioni introdotte comportino una minore affinità per il substrato e di conseguenza una attività fosfolipasica ridotta rispetto al wt.

Nonostante l'elevata similarità di struttura tra la triade catalitica della tripsina, di quella ipotizzata come sito proteasico per la fosfolipasi A2 umana e la triade mutata in TbSP1, le modificazioni apportate nel mutante S124L-D148A-R152A non influenzano la capacità di digestione di TbSP1 ed è possibile quindi concludere che i tre amminoacidi non sono responsabili del processo di proteolisi. La proteina risulta molto instabile, e dopo la digestione, va incontro a completa degradazione molto velocemente.

Quindi, contrariamente alle attese, nessuno dei mutanti prodotti ha mostrato di risentire dei cambiamenti di sequenza introdotti per quanto riguarda la capacità di auto processamento. Solo la mutazione delle serine della regione di taglio in alanine rallenta in modo drammatico l'attività proteolitica di TbSP1. La mutazione di tutte le altre serine presenti nella sequenza primaria (oltre alle Ser 95, 103 e 124 e a quelle presenti nel sito di taglio in passato sono stati creati altri mutanti dei residui serinici) della proteina non comporta nessun cambiamento significativo della reazione di digestione. Resta quindi da capire quali siano i residui chiave per l'attività auto proteolitica di TbSP1. Alla luce dei nuovi dati acquisiti è probabile che per la ricerca del sito proteasico sia necessario focalizzare l'attenzione proprio sulla sequenza della zona di taglio e sostituire singolarmente le serine presenti con amminoacidi con un ingombro sterico maggiore per verificare quali siano i residui indispensabili per la reazione di proteolisi.

CAPITOLO 3

Auto processamento di altre fosfolipasi A2 fungine

PLA2 fungine

TbSP1 condivide alcune importanti caratteristiche della struttura primaria con la proteina omologa di *Streptomyces violaceoruber*, inclusi la sequenza consenso del sito attivo CXRHDF e la presenza di due soli ponti disolfuro. Tuttavia, una differenza significativa è la presenza della porzione di 85 amminoacidi interposta tra il peptide segnale e l'inizio della regione omologa all'enzima batterico (Fig. 5, Introduzione). Recentemente sono state caratterizzate altre tre fosfolipasi A2 omologhe a TbSP1: SpaA e SpaB di *Aspergillus oryzae* e p15 di *Helicospirium* [56, 57] a cui manca però il polipeptide sopramenzionato. Inoltre sono state identificate le sequenze di alcune PLA2 appartenenti al gruppo XIV nel genoma di molti altri funghi filamentosi e batteri recentemente sequenziati, ma nessuna di queste sembra possedere il peptide N-terminale presente in TbSP1 tranne la PLA2 del fungo *Tuber melanosporum* [12].

La fosfolipasi A2 di *Tuber melanosporum*, TmelPLA2, è stata identificata, come proteina molto rappresentata, da una analisi degli estratti proteici di miceli cresciuti *in vitro*. Il cDNA isolato codifica per una proteina di 216 amminoacidi e, dall'allineamento con TbSP1, risulta una identità di sequenza del 71% (Fig. 24). Questa elevata somiglianza ha permesso di ipotizzare anche per TmelPLA2 l'esistenza del medesimo meccanismo di attivazione mediante auto proteolisi identificato in TbSP1. L'allineamento di TmelPLA2 con TbSP1 e altre sPLA2 animali e vegetali ha consentito inoltre di individuare la presenza e la conservazione della diade catalitica His155-Asp156 e della regione di legame del calcio (D134; G135; D156). La massa molecolare risulta essere 23578.4 Da e il punto isoelettrico calcolato è 9.06. I primi 39 aminoacidi sono di natura idrofobica e, come per TbSP1 è possibile ipotizzare che questa regione della proteina funga da peptide segnale secretorio e di regolazione, che viene rimosso durante la maturazione.

NcPL1 è una delle due fosfolipasi A2 del fungo filamentoso *Neurospora crassa* appartenente al gruppo XIV delle PLA2 secrete. Anche NcPL1 presenta una elevata omologia di sequenza con TbSP1. Dall'allineamento delle due proteine viene evidenziata la presenza, in NcPL1, di una sequenza aggiuntiva al C-terminale rispetto al core centrale conservato. (Fig. 5, Introduzione). Sono già state clonate in un vettore di espressione le sequenze codificanti per la proteina intera (21.4 kDa) e per una forma deleta all'N-terminale (NcPL1-del, 17.4 kDa) e le proteine purificate da corpi di inclusione di *E. coli*. NcPL1-del ha mostrato una aumentata attività fosfolipasica rispetto alla forma intera perciò è stata ipotizzata anche per

questa fosfolipasi la presenza di un meccanismo di attivazione mediante proteolisi simile a quello identificato in TbSP1.

```

      *           20           *           40           *           60           *
TmelPLA2 : MVKIAAILLIMGVLANAAALPVSEFAAAPISEFAALVKRGNAATIAAESSDIPDFSVQLTHEPTGEGDRGN : 70
TbSP1    : MVKIAAILLIMGILANAAAPVSEF-----AALVKRGNAEVIAEQTEDVPDFNTQITEPTGEGDRGD : 62
          MVKIAAI6LLMG6LANAAA6PVSEF          AAL KRGNA IA 23 D6PDF Q6T PTGEGDRG1

      80           *           100          *           120          *           140
TmelPLA2 : VT DQTDLSRDIIPETQAASFAADADCAASSPRSVTDRLLYSTTMGAFLTAKRNRNERNLDWTDGCSNSP : 140
TbSP1    : VADETNLSTDIVPETEAASFAASSVSAALSEVSDTDRLLYSTAMPFLTAKRNKNERNLDWSDDGCSKSP : 132
          V D2T1LS DI6PET2AASFAA AA SP S TDRLLYST M AFLTAKRN4NP NLDW3DDGCS SP

      *           160          *           180          *           200          *
TmelPLA2 : DKFAGFNFLDSCRHDFGYRNYKKQRFTEGNRKRVDNMFKKDLYECSKHGEP---IGSACRRIADTTY : 207
TbSP1    : DRFAGFNFLDSCRHDFGYRNYKKQRFTEANRKRIDDNFKKDLYECAKYSGLSEWKGVACRKIANTYY : 202
          D4FAGFNFLDSCRHDFGYRNYKKQ RFTE NRKR6D1NFKKDLY EC K G G ACR4IAIITY

TmelPLA2 : TAVRFGGL : 216
TbSP1    : LAVRFGGL : 211
          AVR FG L

```

Figura 24
Allineamento delle fosfolipasi A2 di *T. borchii* e *T. melanosporum*.

NcPL1 purificata da corpi di inclusione è stata utilizzata come substrato per la reazione di digestione in trans di TbSP1 (come illustrato nel capitolo introduttivo). La reazione porta alla formazione di un frammento di circa 17.9kDa con un sito di taglio che risulta localizzato nella regione omologa a quella in cui avviene la proteolisi di TbSP1.

Nel presente capitolo vengono descritti la caratterizzazione ed il confronto delle fosfolipasi A2 di *T. melanosporum* e *N. crassa* con TbSP1. In particolare è stata indagata la possibilità che le due proteine abbiano lo stesso meccanismo di maturazione ed attivazione di TbSP1. Inoltre, sono stati effettuati gli esperimenti volti a determinare i parametri cinetici della reazione fosfolipasica di TmelPLA2 e le costanti di affinità per il calcio.

Procedure sperimentali

Clonaggio, espressione e purificazione di TmelPLA2 e NcPL1 ricombinanti

Il gene di Tmel PLA2 privo della sequenza che codifica per il peptide di secrezione (aa 1-39) è stato amplificato mediante PCR a partire dal cDNA da micelio di *Tuber melanosporum*. Il gene è stato quindi clonato nel vettore di espressione pET28b. Quest'ultimo è stato utilizzato per la trasformazione mediante elettroporazione di cellule di *Escherichia coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene). (Fig. 25).

Per ottenere la proteina di fusione GST-NcPL1, il gene di NcPL1 è stato amplificato mediante PCR a partire dal cDNA di micelio di *Neurospora crassa*. Il gene in seguito è stato clonato in frame con la sequenza della GST nel vettore di espressione pGEX-GST (Promega).

Il vettore così ottenuto è stato utilizzato per la trasformazione mediante elettroporazione di cellule Rosetta-gami (DE3)pLysS, (Novagen).

Per confrontare la proteina di fusione con il wt, è stata riespressa NcPL1 priva della sequenza codificante il peptide di secrezione (aa 1-19) a partire da cellule BL21 Star (Novagen).

- A MVKIAAILLLMGVLANAALPVSEPAAPISEPAALVKRGNAATIAAESSDIPDFSVQLTHPTGEGDRGNVTDQTDLS
RDIIIPETQAASFAADADQAASSPRSVTDRLLYSTTMGAFLTAKRNRNPRNLDWTDGCSNSPDKPAGFNFLDSCKR
HDFGYRNYKKQRRFTEGNRKRVDNFKKDYKECSKHFGPIGSACRRIADTYTAVRRFGGL
216aa; MW 23578.4Da; pI 9.60
- B MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGNAATIAAESSDIPDFSVQLTHPTGEGDRGNVTDQTDLSRDIIIPETQAASFAADA
DQAASSPRSVTDRLLYSTTMGAFLTAKRNRNPRNLDWTDGCSNSPDKPAGFNFLDSCKRHDFGYRNYKKQRRF
TEGNRKRVDNFKKDYKECSKHFGPIGSACRRIADTYTAVRRFGGL
198aa; MW 22009.2Da pI 9.10

Figura 25

Sequenza amminoacidica di TmelPLA2. Sequenza della proteina wt (A) e della proteina ricombinante (B).

L'espressione e la purificazione di TmelPLA2 dalla frazione solubile e di NcPL1 da corpi di inclusione sono state eseguite come descritto in precedenza per TbSP1.

Per quanto riguarda invece la proteina di fusione GST-NcPL1, dopo l'espressione ottenuta inducendo le cellule con IPTG 1mM per 48 h a 20°, la proteina di fusione GST-NcPL1 è stata purificata sia da corpi di inclusione batterici che dalla frazione solubile. La lisi delle cellule ed il recupero delle proteine dai corpi di inclusione batterici sono state effettuate come descritto in precedenza per TbSP1. Le proteine ricombinanti ottenute dopo la dialisi e dal surnatante della prima sonicazione sono state caricate su una colonna cromatografica di affinità GSTrap FF (1 ml, GE Healthcare). L'eluizione è stata effettuata in gradiente lineare di glutatione da 0 a 10 mM in tampone Tris/HCl 50 mM pH 8.0 utilizzando il sistema di purificazione ÄCTAprime FPLC (Pharmacia/Amersham Biosciences). Le proteine sono state in seguito purificate ad omogeneità mediante un passaggio in colonna a scambio anionico MonoQ FF (1ml, GE Healthcare) ed eluizione in gradiente di NaCl da 0 a 500 mM. La purezza delle frazioni proteiche è stata determinata mediante gel di poliacrilammide-SDS al 15% [51].

Saggio di attività fosfolipaisca e proteasica

I saggi di attività fosfolipaisca e proteasica sono stati eseguiti come descritto in precedenza per TbSP1. Dopo il saggio di auto digestione, i campioni sono stati analizzati su gel di poliacrilammide al 15% che mediante spettrometria di massa (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight, MALDI-TOFMS).

Saggio di proteolisi limitata

Per i saggi di proteolisi limitata sono state utilizzate chimotripsina (Sigma-Aldrich) con un rapporto proteasi: PLA2 di 1:100 (w/w) e la proteasi V8 di *Staphilococcus aureus* (Sigma-Aldrich) con un rapporto 1:300 (w/w). Le reazioni sono state allestite in Tris/HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM e proteina a concentrazione 0.5 µg/µl o 1 µg/µl. I tempi di incubazione sono di 10' per la chimotripsina e 30', 60' e 3h per V8. Ai campioni incubati per tempi lunghi (1 h o 3 h) è stato aggiunto EDTA 10 mM per evitare la reazione di auto digestione. Come controllo la proteina 1µg/ µl è stata incubata con EDTA 10 mM per 3 h.

I prodotti di proteolisi sono stati analizzati su gel di poliacrilamide-SDS al 15% e mediante spettrometria di massa MALDI-TOFMS.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Pattern di digestione di TmelPLA2 ed NcPL1

TmelPLA2 è stata espressa in *E. coli* ceppo di BL21 CodonPlus e, così come accade per TbSP1, è stata recuperata quasi completamente dai corpi di inclusione batterici e purificata dopo una procedura di denaturazione e rinaturazione; solamente il 5% circa della proteina totale è stato isolato e purificato dalla frazione solubile. Entrambe le forme purificate, quella solubile e quella da corpi di inclusione, sottoposte al saggio di auto proteolisi, risultano in grado di digerirsi producendo dei frammenti di circa 14 kDa. La velocità della reazione di proteolisi è paragonabile a quella di TbSP1 per quanto riguarda la proteina purificata dalla frazione solubile (da ora, TmelPLA2-surnatante, Fig. 26, A e B), mentre la proteina purificata dai corpi di inclusione batterici (da ora TmelPLA2-pellet) si digerisce più velocemente e dopo incubazione O/N risulta completamente degradata, a differenza di TbSP1-pellet la quale presenta un'attività proteasica molto bassa (Fig. 27). La digestione della proteina purificata dalla frazione solubile porta alla formazione di un frammento principale avente una massa di 14076Da (da ora TmelPLA2-14kDa). Il sito di taglio della proteina, a valle del residuo

Asp93, risulta coincidere con quello di TbSP1-CodonPlus mentre è di un residuo a valle rispetto alla TbSP1-Origami (Fig. 26, C). Nonostante la specificità del taglio sia diversa, la regione in cui avviene la proteolisi di TmelPLA2 coincide con quella di TbSP1, confermando l'ipotesi secondo cui queste fosfolipasi presentano una regione flessibile ed esposta, sensibile alla proteolisi. Durante il processo di digestione si assiste inoltre alla formazione di altri due frammenti meno abbondanti, visibili sia in spettrometria di massa MALDI-TOF, sia su gel di poli-acrilammide. I frammenti hanno una massa osservata di 20780Da e 21833 e i siti di taglio corrispondenti si trovano nella regione del 6xHis-tag (Fig. 28). Questo fenomeno di digestione della coda di istidina era già stato osservato in precedenza per TbSP1.

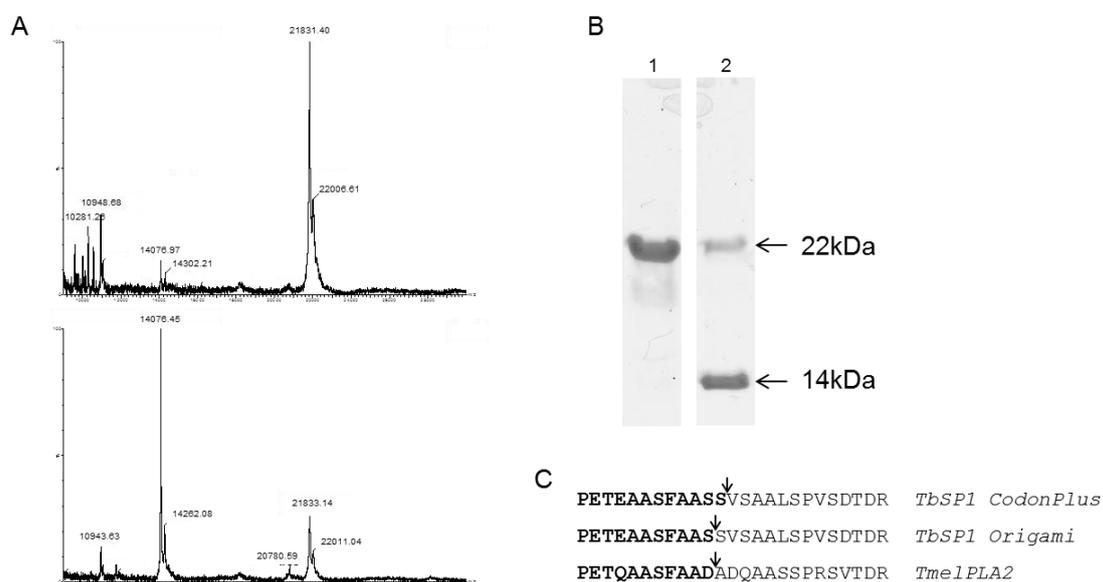


Figura 26

Attività proteasica di TmelPLA2-surnatante. (A) Analisi MALDI-TOF di TmelPLA2 ricombinante purificata dalla frazione solubile di ceppo BL21 CodonPlus (sopra, controllo T_0) e la stessa proteina incubata a 37°C per 15 h ad una concentrazione di 20 μ M (sotto, T_{15h}). (B) Profilo SDS-PAGE dei campioni di proteina utilizzati nel pannello A (lane 1, T_0 ; lane 2, T_{15h}). (C) Mappa dei siti di taglio identificati mediante analisi MALDI-TOF dei prodotti di digestione di TbSP1 purificata da ceppi BL21 CodonPlus e Origami e di TmelPLA2 purificata da ceppo BL21 CodonPlus.

Il frammento complementare a TmelPLA2-14 kDa, di circa 6 o 8 kDa (con e senza il 6xHistag), risulta essere molto instabile ma, a differenza di quanto accade per TbSP1, incubando la proteina per tempi brevi (massimo 4 h), questo risulta rilevabile (Fig. 27).

L'ipotesi che la proteolisi di TbSP1 avvenga con meccanismo intermolecolare è stata confermata da numerosi esperimenti. TbSP1 è infatti in grado di digerire *in trans* sia sé stessa che la proteina omologa NcPL1. Al fine di acquisire informazioni sul tipo di reazione di TmelPLA2, TbSP1-pellet, che presenta una attività di auto processamento molto bassa, è stata

utilizzata come substrato per una reazione di digestione. TmelPLA2-14.5kDa (10 μ M) inaspettatamente non è in grado di digerire *in trans* TbSP1 (dati non mostrati). E' possibile che dietro la mancata digestione di TbSP1 da parte di TmelPLA2-14kDa, ci sia una diversa selettività, come suggerisce la presenza di residui differenti a monte del punto in cui vengono tagliate le proteine. Non è stato purtroppo possibile verificare se il meccanismo della reazione di proteolisi i TmelPLA2 sia intermolecolare con un esperimento di digestione omologa della proteina intera da parte del frammento di 14 kDa, dal momento che non è stata ottenuta una forma di TmelPLA2 inattiva per la proteolisi e quindi stabile. Considerata però la somiglianza con la proteina omologa di *T. borchii* è plausibile pensare che il meccanismo di digestione sia il medesimo, nonostante i dati sperimentali non supportino tale ipotesi.

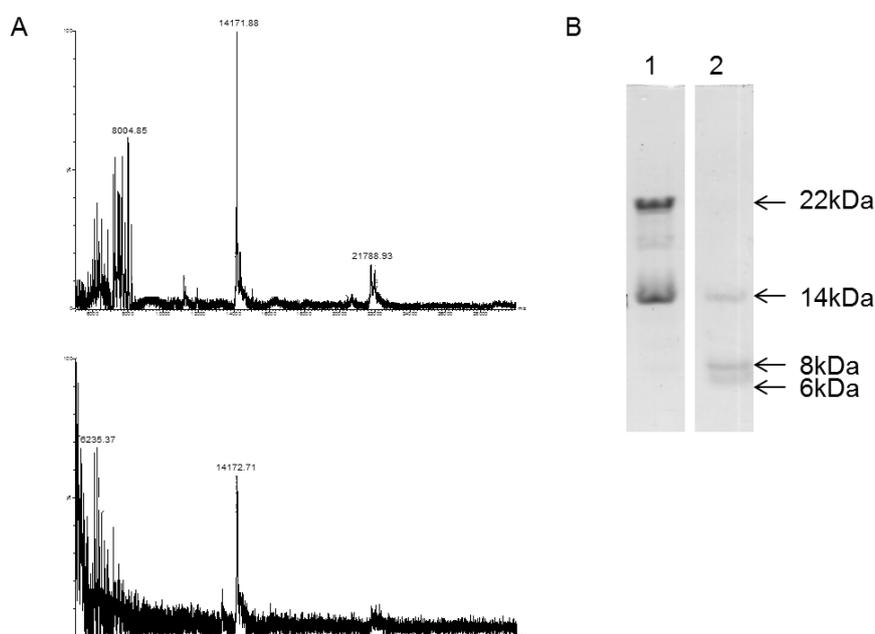


Figura 27

Attività proteasica di TmelPLA2-pellet. (A) Analisi MALDI-TOF di TmelPLA2 ricombinante purificata da corpi di inclusione di ceppo BL21 CodonPlus (sopra, controllo T_0) e la stessa proteina incubata a 37°C per 4 h ad una concentrazione di 20 μ M (sotto, T_{4h}). (B) Profilo SDS-PAGE dei campioni di proteina utilizzati nel pannello A (lane 1, T_0 ; lane 2, T_{4h}).



Figura 28

Proteolisi della coda di istidine di TmelPLA2. Mappa dei siti di taglio sulla sequenza del 6xHistag identificati mediante analisi MALDI-TOF dei prodotti di digestione di TmelPLA2 purificata da ceppo BL21 CodonPlus.

Anche la fosfolipasi A2 di *N. crassa*, NcPL1, presenta una elevata omologia di sequenza con TbSP1 (Fig. 29) e ha mostrato, in passato, una attivazione della reazione fosfolipasica in seguito alla delezione della porzione N-terminale, facendo ipotizzare la presenza in generale di un meccanismo di maturazione mediante autodigestione per le PLA2 fungine. NcPL1 in precedenza è stata purificata solamente da corpi di inclusione batterici in quanto la proteina era risultata poco solubile. Per ovviare a questo inconveniente, è stata impiegata la strategia della fusione con GST. La fusione di geni codificanti per proteine d'interesse con il gene per la GST (glutathione S-transferase) è stata ampiamente utilizzata per aumentare l'espressione, la purificazione e la solubilità di proteine ricombinanti espresse in *E. coli* [58]. La proteina target viene clonata nei vettori pGEX, che presentano la sequenza per la GST localizzata nella porzione N-terminale. La GST fusa con la proteina di interesse può fungere da chaperone e facilitarne il folding. Inoltre la proteina di fusione risulta più solubile e non si rende necessario recuperarla dai corpi di inclusione batterici. In seguito, la proteina di fusione può essere purificata facilmente utilizzando una colonna cromatografica di affinità con una matrice cui è legato glutatione. Tra la proteina di interesse e la GST è presente un sito trombinico che permette la rimozione della porzione N-terminale mediante incubazione con trombina e di ottenere quindi la proteina ricombinante in forma isolata [59, 60].

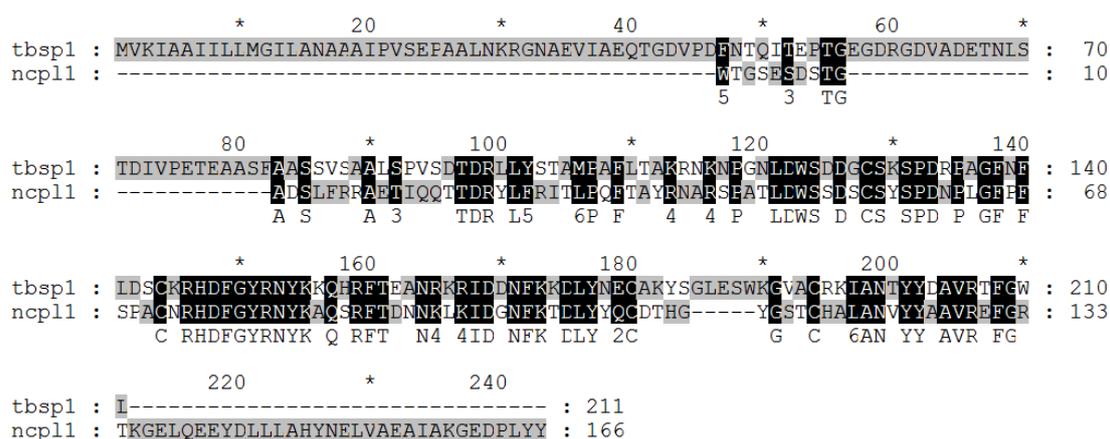


Figura 29
Allineamento delle fosfolipasi A2 di *T. borchii* e *N. crassa*.

Nel caso di GST-NcPL1, utilizzando per l'espressione il ceppo di *E. coli* Rosetta-gami (DE3)pLysS (Novagen), con una induzione di due giorni a 20°, si ottiene un buon livello di solubilità.

Al termine della procedura di purificazione della proteina di fusione si osserva immediatamente, sia su gel di acrilammide che dall'analisi MALDI-TOF, la formazione di due frammenti di digestione. La reazione di autodigestione è stata confermata dall'analisi dei prodotti di incubazione O/N a 37°C. Si ottiene in questo caso la pressoché completa scomparsa della proteina di fusione intera (45.5 kDa) e l'aumento dell'intensità del segnale di due frammenti di digestione, presenti già all'inizio dell'esperimento (di circa 28.6 kDa e 17.9 kDa), oltre alla formazione di due nuovi frammenti di circa 26.4 kDa e 17.1 kDa (Fig. 30). Il frammento di circa 17.9kDa ha dimensioni analoghe a quello generato, in esperimenti precedenti, incubando la forma insolubile di NcPL1 con una piccola aliquota di TbSP1-14.5 kDa, mentre quello di 28.6 kDa corrisponde alla porzione complementare della proteina di fusione (GST-NcPL1-Nterminale). Allineando le sequenze di TbSP1 ed NcPL1 risulta evidente come il sito di taglio per la proteina di *N. crassa* sia localizzato nella medesima regione in cui avviene la proteolisi di TbSP1 (Fig 31, A). La formazione dei frammenti di 17123 Da e 26445 Da deriva probabilmente da una ulteriore digestione della proteina e della porzione complementare nella sequenza consenso per la trombina (Fig. 31, B).

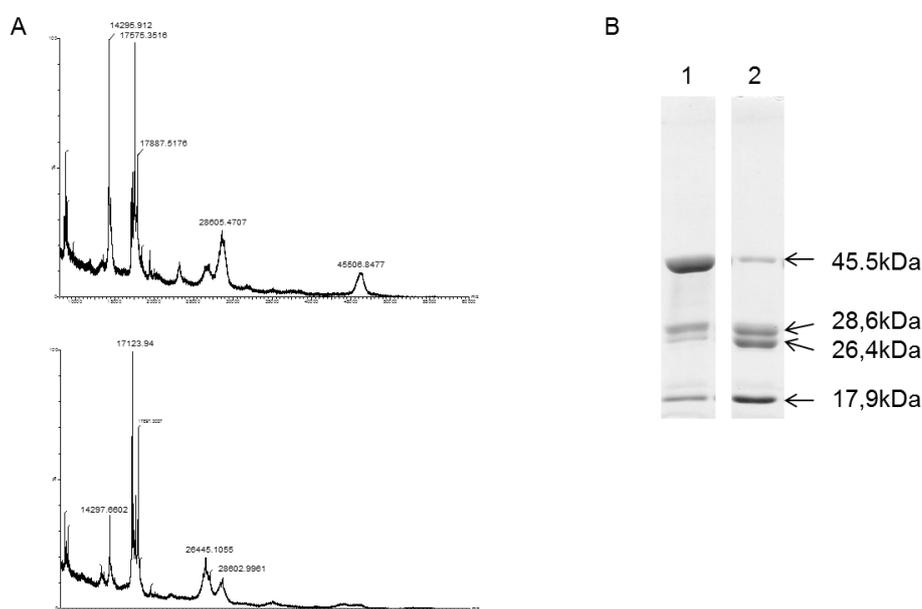


Figura 30

Attività proteasica di GST-NcPL1 (A) Analisi MALDI-TOF di GST-NcPL1 ricombinante purificata da corpi di inclusione di ceppo RosettaGami (sopra, controllo T_0) e la stessa proteina incubata a 37°C per 15 h ad una concentrazione di 20 μ M (sotto, T_{15h}). (B) Profilo SDS-PAGE dei campioni di proteina utilizzati nel pannello A (lane 1, T_0 ; lane 2, T_{15h}).

Inoltre, il frammento di 17.9 kDa di NcPL1 è in grado di rimuovere specificamente la porzione N-terminale di TbSP1-pellet portando alla formazione di un prodotto di dimensioni identiche a quelle che si osservano dopo autodigestione di TbSP1-CodonPlus (Fig. 32).

Diversamente da quanto osservato precedentemente, i nuovi dati relativi all'attività proteasica di NcPL1 nuovamente purificata da corpi di inclusione batterici, mostrano la formazione di un frammento di digestione principale di 17809Da dopo incubazione della proteina a 37°C per 4h (dati non mostrati). Le dimensioni del frammento sono molto simili a quelle ottenute in passato incubando NcPL1 con una piccola aliquota di TbSP1-14.5 kDa e dopo incubazione della proteina di fusione GST-NcPL1.

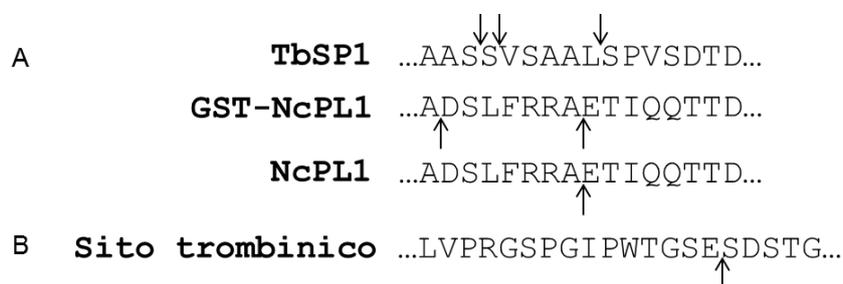


Figura 31

Proteolisi di NcPL1. (A) Mappa dei siti di taglio identificati mediante analisi MALDI-TOF dei prodotti di digestione di TbSP1 purificata da ceppi BL21 CodonPlus, Origami e da micelio, di GST-NcPL1 purificata da ceppo RosettaGami e di NcPL1 purificata da ceppo BL21 Star. (B) . Mappa dei siti di taglio sulla sequenza consenso per la trombina identificati mediante analisi MALDI-TOF dei prodotti di digestione di GST-NcPL1 purificata da ceppo RosettaGami.

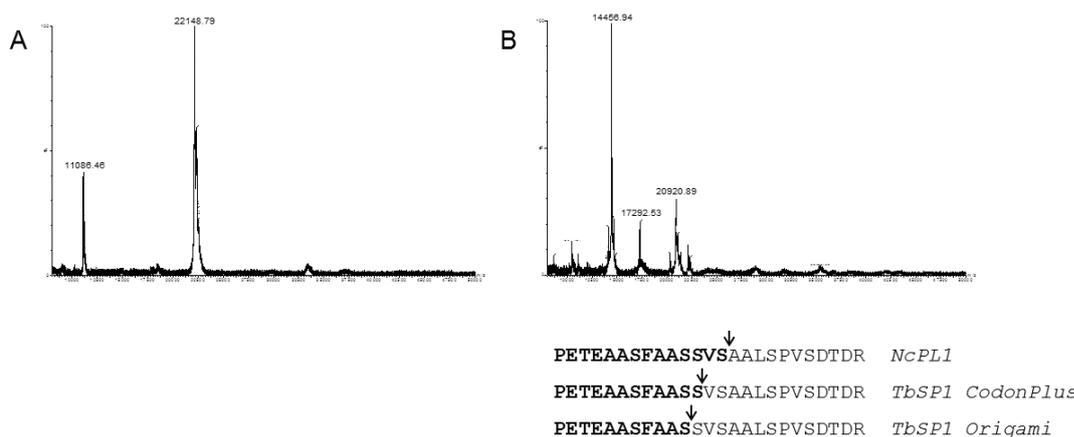


Figura 32

Attività proteasica di GST-NcPL1 (A) Analisi MALDI-TOF di TbSP1-pellet ricombinante (30 µM) purificata da corpi di inclusione di ceppo BL21 CodonPlus dopo 4 h di incubazione a 37° C e (B) la stessa proteina incubata a 37°C per 4 h con il frammento di digestione di NcPL1. (C) Mappa dei siti di taglio identificati mediante analisi MALDI-TOF dei prodotti di digestione di TbSP1-pellet incubata con NcPL1 (sopra), confrontata con il pattern di digestione di TbSP1 purificata da ceppo BL21 CodonPlus e Origami.

Gli esperimenti condotti con TmelPLA2, con la forma di NcPL1 resa solubile dalla fusione con GST, e con NcPL1 wt nuovamente purificata, indicano che esiste un meccanismo generale di attivazione delle PLA2 fungine mediante auto-rimozione della porzione N-terminale. Non è stato possibile risalire ai motivi per cui la proteina di *N. crassa*, che in precedenza era risultata stabile e non in grado di effettuare la reazione di auto digestione, abbia evidenziato in ultima analisi una attività proteasica paragonabile a quella di TbSP1. Probabilmente la causa è da ricercarsi in piccole ma significative differenze non ancora identificate nella preparazione dei campioni che hanno compromesso in passato la capacità di digestione di NcPL1.

Studio dell'organizzazione strutturale delle PLA2 fungine

Esperimenti precedenti di proteolisi limitata hanno evidenziato in TbSP1 ed NcPL1 la presenza di due domini distinti collegati da una regione flessibile ed esposta.

Per verificare se l'organizzazione strutturale di TmelPLA2 sia pragonabile a quella di TbSP1, sono stati effettuati dei saggi di proteolisi limitata incubando la proteina con proteasi per un breve periodo di tempo. Sono state utilizzate le proteasi V8 di *Staphilococcus aureus* e la chimotripsina che hanno elevata e distinta specificità: la proteasi V8 di *S.aureus* taglia al C-terminale di residui di natura acida (Asp e Glu) mentre la chimotripsina riconosce Leu e residui aromatici (Tyr, Trp, Phe). Nella figura (Fig. 33) sono riportati i potenziali siti di taglio sulla sequenza di TmelPLA2 da parte delle due proteasi. Nel caso in cui TmelPLA2 (50 μ M) venga incubata per 30' con la proteasi V8 si ha la formazione di un unico frammento con massa molecolare 15036. Utilizzando il software PAWS per l'analisi del pattern di digestione, il sito di taglio corrispondente al frammento ottenuto è stato identificato nella porzione C-terminale del Glu84. La digestione di TmelPLA2 da parte della chimotripsina porta alla formazione di un frammento di massa 14488 che corrisponde al taglio a valle del residuo di Phe90. Entrambe le digestioni avvengono qualche residuo a monte del sito di autodigestione e nella stessa regione in cui vengono proteolizzate TbSP1 ed NcPL1 utilizzando le stesse proteasi (Fig. 34).

A 1 M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M G N A A T I A A E 30
 31 s s d I P D f s v q l t h p t g e G D r g n v t d Q T D I s 60
 61 r d I I P E t q a a s f a a d A D q a a s s p r s v t d R L 90
 91 L Y S T T M G A F L T A K R N R N P R N L D w t d D g c s n 120
 121 s p d K P A G F N F L D s c k r h d F G Y R N Y K K Q R R F 150
 151 T E g n r k r v d N N F K K D l y k e C S K H F G P I G S A 180
 181 C R R I A D t y y t a v r r f g g l 198

B 1 M G S S H H H H H S S G L v p r g s h m g n a a t i a a e 30
 31 s s d i p d f s v q l t h p t g e g d r g n v t d q t d I S 60
 61 R D I I P E T Q A A S F a a d a d q a a s s p r s v t d r l 90
 91 L y S T T M G A F I T A K R N R N P R N L d w T D D G C S N 120
 121 S P D K P A G F n f L d s c k r h d f G Y r n y K K Q R R F 150
 151 t e g n r k r v d n n f K K D L y K E C S K H F g p i g s a 180
 181 c r r i a d t y Y t a v r r f G G L 198

Figura 33
Proteolisi limitata. Potenziali residui riconosciuti dalle proteasi V8 (A) e chimotripsina (B) sulla sequenza di TmelPLA2.

Gli esperimenti di proteolisi limitata effettuati su TmelPLA2 confermano in pieno quanto evidenziato in passato per TbSP1 e NcPL1: di numerosi potenziali siti di taglio delle proteasi sulla sequenza di Tmel PLA2, vengono riconosciuti solo residui localizzati nella regione target di auto processamento. Questi dati supportano ulteriormente l'ipotesi della presenza di una regione esposta che funge da sito di taglio per tutte le fosfolipasi A2 fungine fin qui analizzate. In particolare i risultati ottenuti dagli esperimenti di proteolisi limitata, unitamente allo studio della reazione di auto processamento di TbSP1, TmelPLA2 ed NcPL1 indicano che la struttura delle fosfolipasi è composta di due domini distinti e compatti, ad eccezione della regione di taglio che collega le due porzioni delle proteine. Quest'ultima risulta presumibilmente esposta e quindi sensibile alla proteolisi.

PETEAAASFAASSVSAALSPVSDTDR *TbSP1 Origami*
 PETQAASFAADADQAASSPRSVTDR *TmelPLA2*
 WTGSESSTG...ADSLFRAETIQQT *NcPL1*

Figura 34
Proteolisi limitata. Allineamento delle regioni di taglio di TbSP1-Origami, TmelPLA2, ed NcPL1. Le frecce nere indicano i residui in cui avviene l'auto digestione; i triangoli blu la digestione da parte della chimotripsina; i triangoli rossi la digestione da parte della proteasi V8 di *S. aureus*.

Caratterizzazione biochimica di TmelPLA2

La rilevanza fisiologica del processo di maturazione di TbSP1, dimostrato *in vitro*, è supportata dall'identificazione della reazione di autoproteolisi nella proteina purificata da micelio. Il fatto che l'attività fosfolipatica della proteina aumenti di 50-80 volte nella forma

digerita rispetto a quella intera indica l'esistenza di una modulazione dell'attività fosfolipasica associata al processo di maturazione. In modo analogo a quanto accade per TbSP1 ed NcPL1, anche nel caso di TmelPLA2 l'attività fosfolipasica risulta aumentata nella forma digerita rispetto alla proteina intera (circa 70 volte, Fig. 35, 1 e 2). E' stata misurata l'attività fosfolipasica anche dei frammenti derivati dalla digestione mediante proteolisi limitata ed anche in questo caso si assiste, come atteso, ad un suo notevole incremento (rispettivamente di circa 65 e 95 volte per V8 e chimotripsina) rispetto alla forma intera della proteina (Fig. 35, 3 e 4). Anche in TmelPLA2 è quindi presente il processo di digestione con modalità molto simili a quelle di TbSP1, tanto da ipotizzare che la maturazione rivesta anche in questo caso un ruolo fisiologico, indispensabile per l'attivazione della reazione fosfolipasica della proteina. Con lo scopo di valutare se, oltre al processo di digestione, esistano forti analogie tra TmelPLA2 e TbSP1, sono stati determinati i parametri cinetici relativi alla proteina isolata da *T. melanosporum*. Tali parametri sono stati ottenuti monitorando la reazione fosfolipasica di TmelPLA2 in presenza di concentrazioni crescenti di substrato. I valori di $K_{m(app)}$ ottenuti, di 3 mM e 1.5 mM rispettivamente per TmelPLA2 e TmelPLA2-14kDa, sono in linea con quanto osservato precedentemente per TbSP1 e indicano che non sono presenti significative differenze di affinità per il substrato tra la forma intera e digerita della proteina.

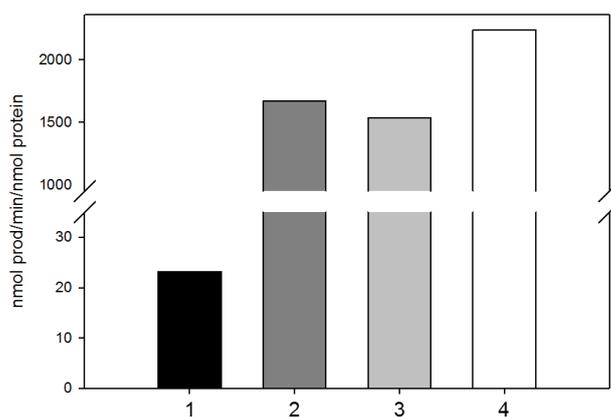


Figura 35

Attività fosfolipasica di TmelPLA2. Attività fosfolipasica di TmelPLA2-21 kDa (1), di TmelPLA2-14 kDa (2), dei frammenti di digestione di TmelPLA2 da parte delle proteasi V8 di *S. aureus* (3) e chimotripsina (4).

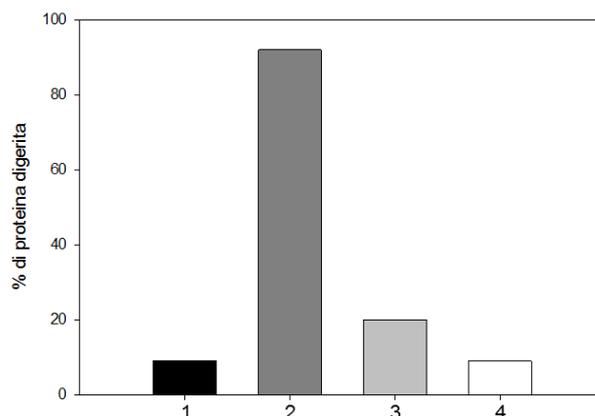


Figura 36

Attività proteasica di TmelPLA2 in presenza degli inibitori di TbSP1. % di auto digestione di TmelPLA2 (1; % iniziale di proteina digerita: 9%), di TmelPLA2 incubata per 15 h a 37° C (2) e della proteina incubata nelle stesse condizioni in presenza degli inibitori PMSF 10 mM (3) ed EDTA 10 mM (4).

L'affinità della proteina per lo ione Ca^{2+} è stata misurata mediante saturazione dell'attività fosfolipasica a concentrazioni crescenti di calcio. Il valori di $K_{d(\text{app})}$ ottenuti per la proteina intera (21.6 mM) e per la forma digerita (405 μM) dimostrano un significativo incremento di affinità per lo ione nel passaggio dalla forma intera a quella digerita di TmelPLA2 (dati non mostrati). Assumendo che le stime di affinità siano attendibili, la minore k_d nella forma digerita potrebbe riflettere specifiche differenze strutturali e funzionali non ancora identificate della proteina da *T. melanosporum* rispetto a quella di *T. borchii*.

I numerosi esperimenti condotti precedentemente hanno permesso di evidenziare come, in TbSP1, la reazione fosfolipasica sia strettamente dipendente da calcio, mentre l'attività proteasica non richieda la presenza di ioni aggiunti. E' stata quindi approfondita la dipendenza dell'auto digestione di TmelPLA2 da ioni e, come per la proteina omologa di *T. borchii*, la reazione non è vincolata alla presenza di ioni esogeni.

E' stata poi analizzata la cinetica della reazione di proteolisi di TmelPLA2 in funzione della presenza di quei composti che inibiscono l'auto digestione di TbSP1, in particolare l'inibitore delle proteasi a serina PMSF e il chelante EDTA. Questa analisi rivela la pressoché totale inibizione dell'attività proteasica di TmelPLA2 (30 μM) in presenza di EDTA a concentrazione 10mM e una inibizione del 90% circa del processo di formazione del frammento di 14 kDa in presenza di PMSF 10mM, dopo 15 ore di incubazione (Fig. 36).

Quindi come TbSP1, anche il suo ortologo di *Tuber melanosporum* risulta sensibile agli stessi inibitori. L'insieme di questi dati supportano l'ipotesi che le due proteine presentino una struttura simile del sito proteasico e che un residuo di serina, ad oggi non identificato, sia presente nel sito attivo per la proteolisi delle fosfolipasi.

CAPITOLO 4

Fosfolipasi A2 batteriche e del regno animale

Numerose PLA2 secretorie di specie diverse sono state caratterizzate negli ultimi anni [61]. La maggior parte di queste sono enzimi secreti dal pancreas di mammiferi o presenti nei liquidi biologici (liquido sinoviale, essudati) e nel veleno di serpenti, insetti o altri animali (scorpioni) [62, 63, 64, 65]. Pur derivando da organismi differenti, queste fosfolipasi presentano importanti e numerose caratteristiche in comune. Sono caratterizzate da un basso peso molecolare (13-15 kDa), presentano un'istidina catalitica conservata, un atomo di calcio nel sito catalitico e da quattro a sei legami disolfuro. Le PLA2 pancreatiche sono necessarie in natura per la digestione di composti fosfolipidici e mostrano una attività maggiore nei confronti strutture lipidiche organizzate come liposomi e vescicole piuttosto che con substrati dispersi [66]. Le PLA2 presenti nei veleni permettono l'immobilizzazione della preda promuovendo la lisi cellulare. La maggior parte di queste proteine vengono secrete come zimogeni ed attivate mediante la rimozione di un propeptide.

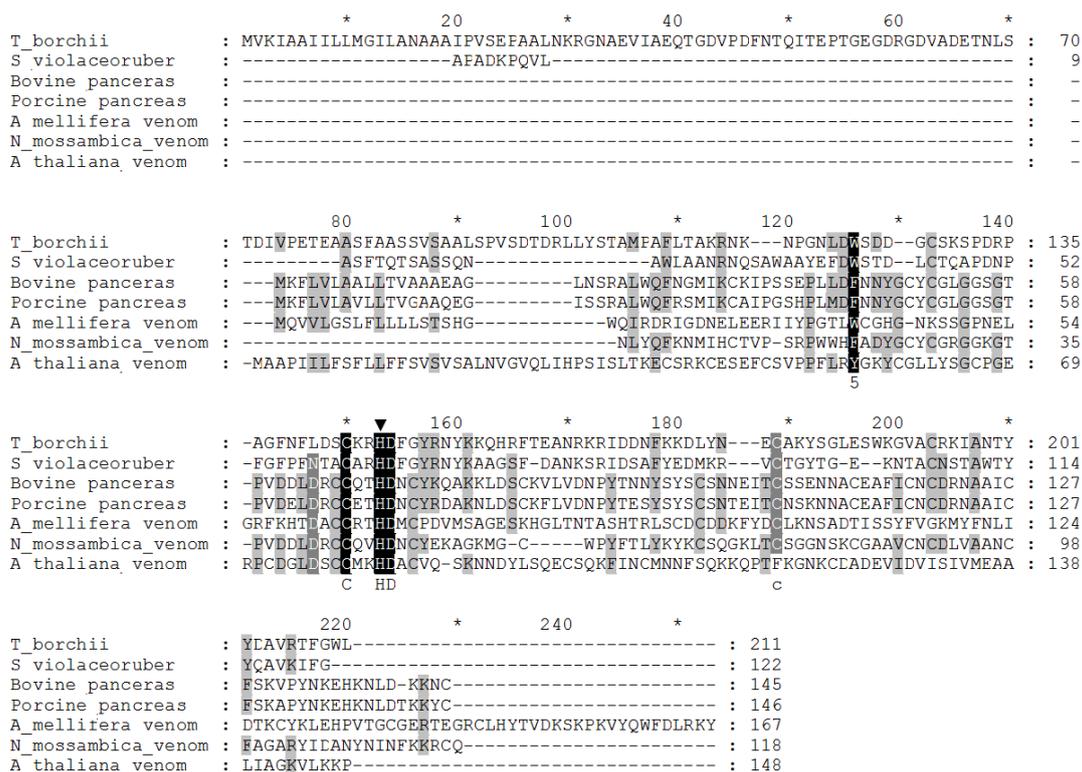


Figura 37

Allineamento delle sequenze di fosfolipasi A2 da organismi differenti. Confronto della sequenza amminoacidica di TbSP1 con le sequenze delle PLA2 del batterio *S. violaceoruber*, di pancreas di bovino e di maiale, di veleni d'ape e del serpente *N. mossambica mossambica* e della pianta *A. thaliana*.

E' in continuo aumento il numero di fosfolipasi identificate in batteri, funghi e protozoi [67]. In particolare è stata descritta la struttura della PLA2 di *Streptomyces violaceoruber* [43] che presenta una elevata similarità di sequenza e di struttura con TbSP1.

Le prime PLA2 di piante descritte sono state purificate da olmo e riso [68, 69, 70]. In seguito sono state caratterizzate le quattro isoforme di PLA2 di *Arabidopsis thaliana* le quali presentano una significativa similarità di sequenza per il sito attivo e per il sito di legame del calcio delle PLA2 animali, mentre l'identità di sequenza complessiva è del 15% circa.

Come descritto nel precedente capitolo, oltre a TbSP1, anche in altre fosfolipasi fungine quali TmelPLA2 ed NcPL1, è stato evidenziato un processo di auto digestione che porta all'attivazione delle proteine con un incremento significativo dell'attività fosfolipasica. E' stato inoltre dimostrato che i frammenti di digestione di TbSP1 ed NcPL1 possiedono una attività endoproteasica che si manifesta con la digestione *in trans* dei rispettivi substrati.

In questa sezione viene analizzata l'attività fosfolipasica e l'eventuale capacità di digestione *in trans* di una forma stabile di TbSP1 da parte di alcune tra le principali PLA2 descritte in letteratura e disponibili in commercio. Sono stati condotti esperimenti sulla proteina che risulta strutturalmente più simile a TbSP1, la fosfolipasi A2 del batterio *Streptomyces violaceoruber*, così come sono state prese in considerazione fosfolipasi strutturalmente diverse quali le fosfolipasi A2 da pancreas bovino, da pancreas di maiale, da veleno di *Naja mossambica mossambica* e da veleno di ape (Fig. 37).

PROCEDURE SPERIMENTALI

Espressione e purificazione di TbSP1

L'espressione e la purificazione di TbSP1 sono state effettuate come indicato in precedenza.

Saggi di attività fosfolipasica e proteasica

I saggi di attività proteolitica e fosfolipasica sono stati eseguiti come descritto in precedenza per TbSP1. Le reazioni di proteolisi sono state eseguite per tempi variabili da 30 minuti a 15 ore utilizzando TbSP1-pellet ad una concentrazione pari a 100 μ M, mentre le PLA2 da testare sono state incubate a concentrazioni da 0,2 a 100 μ M.

I test di attività proteasica in presenza di PMSF sulle fosfolipasi A2 da pancreas bovino e di maiale sono stati eseguiti preincubando le proteine per 10 min con PMSF 5 mM. In seguito è stata aggiunta TbSP1 e i mix di reazione lasciati incubare per altri 5 min nel caso della PLA2 di maiale e 4 h per la PLA2 bovina. I campioni incubati per i saggi di proteolisi sono stati analizzati sia su gel di poliacrilammide al 15% che mediante spettrometria di massa

(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight, MALDI-TOFMS). Tutte le fosfolipasiA2 utilizzate sono di Sigma-Aldrich.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Saggi di attività proteasica

Alcune delle PLA2 disponibili in commercio (PLA2 da *S. violaceoruber*, da pancreas bovino, da pancreas di maiale, da veleno di *Naja mossambica* e da veleno di ape) sono state incubate in presenza di un potenziale substrato costituito da una forma di TbSP1 inattiva per l'auto proteolisi, purificata da corpi di inclusione batterici, al fine di valutare la loro eventuale capacità e specificità di digestione *in trans*.

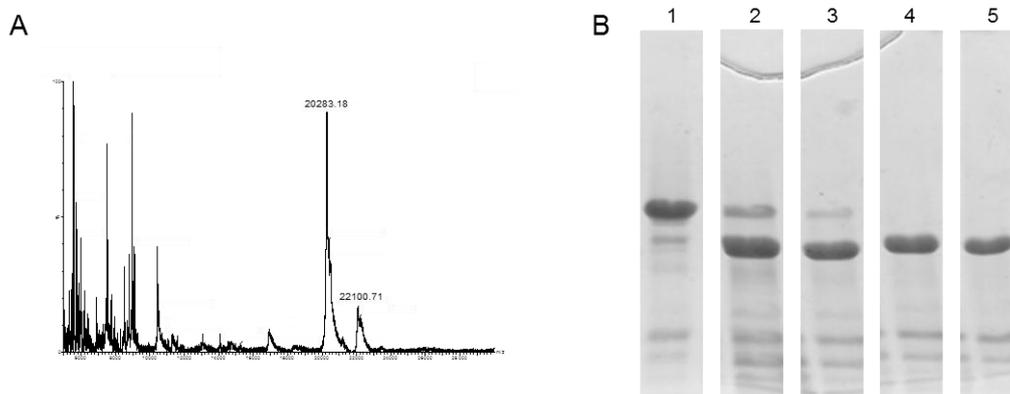


Figura 38

Attività proteasica della PLA2 da pancreas di maiale. (A) Analisi MALDI-TOF di TbSP1-pellet ricombinante purificata da corpi di inclusione di ceppo BL21 CodonPlus (100 μ M) incubata a 37°C per 1 h in presenza della PLA2 da pancreas di maiale (2 μ M). (B) Profilo SDS-PAGE di TbSP1-pellet (100 μ M) incubata per 1 h a 37°C (lane 1) e della stessa proteina incubata in presenza della PLA2 da pancreas di maiale (2 μ M): lane 2, T₀; lane 2, T_{10min}; lane 3, T_{30min}; lane 4, T_{1h}.

Delle proteine analizzate, solo le PLA2 da pancreas di maiale e bovino sono in grado di digerire TbSP1. La prima digerisce la regione del 6xHistag formando un frammento di circa 20.3 kDa in tempi molto brevi e a concentrazioni molto basse (2 μ M) (Fig. 38); tuttavia non vi è alcuna evidenza del riconoscimento di un sito che porti alla formazione di un frammento di circa 14.5kDa, così come avviene per TbSP1. Inoltre, se incubata per tempi più lunghi (4 e più ore), la PLA2 di pancreas di maiale causa la completa degradazione di TbSP1, che non viene più rilevata né con SDS-PAGE né mediante analisi MALDI-TOF. La seconda è l'unica che dà origine ad un prodotto di digestione di circa 14670Da (6h di incubazione, 50 μ M PLA2 bovine pancreas) (Fig. 39), che ha dimensioni simili a quello della forma matura

di TbSP1. Tutte le altre fosfolipasi analizzate non sono in grado di digerire TbSP1. Anche la PLA2 di *S. violaceoruber*, pur avendo sequenza e struttura molto affini a TbSP1, non risulta in grado di digerire la proteina nella forma inattiva.

I dati sperimentali relativi alla PLA2 da pancreas bovino suggeriscono quindi che essa agisca come una proteasi, digerendo la regione esposta di TbSP1 così come avviene incubando la proteina con NcPL1 e le proteasi V8 e chimotripsina.

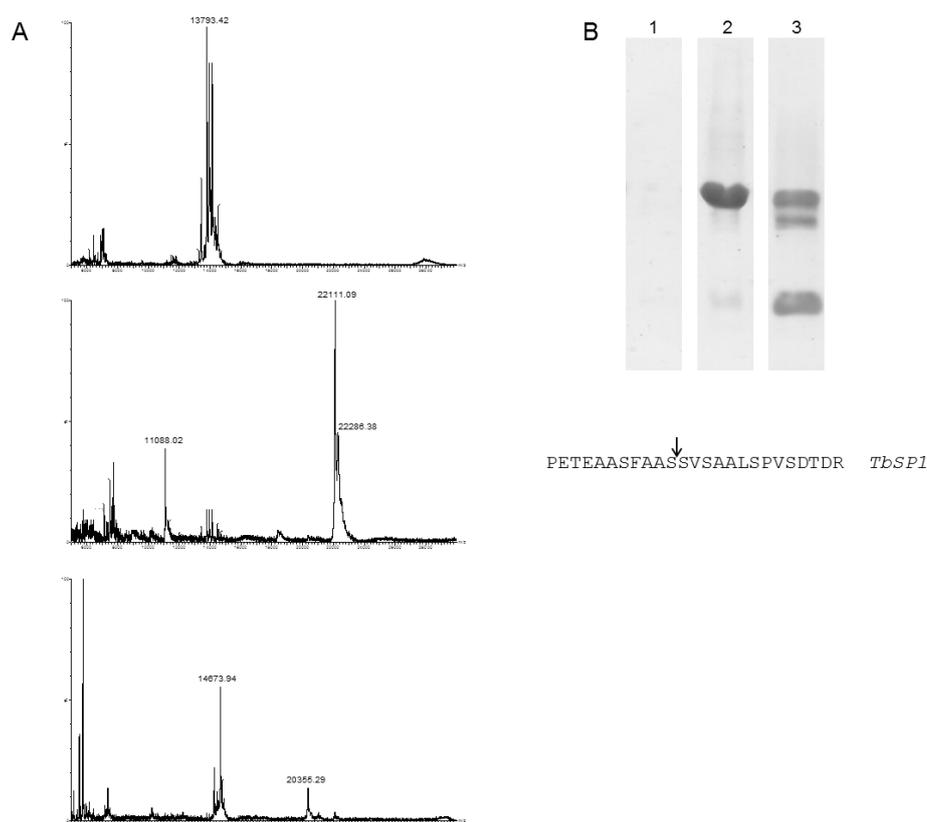


Figura 39

Attività proteasica della PLA2 da pancreas bovino. (A) Analisi MALDI-TOF della PLA2 da pancreas bovino 50 μ M (sopra), di TbSP1-pellet ricombinante purificata da corpi di inclusione di ceppo BL21 CodonPlus (100 μ M) incubata con la PLA2 da pancreas bovino 50 μ M (al centro e delle stesse proteine incubate per 6 h a 37° C (sotto). (B) Profilo SDS-PAGE dei campioni di proteine utilizzati nel pannello A (lane 1, PLA2 da pancreas bovino; lane 2, TbSP1-pellet e PLA2 da pancreas bovino T₀; lane 3, TbSP1-pellet e PLA2 da pancreas bovino T_{6h}). (C) Mappa dei siti di taglio identificati mediante analisi MALDI-TOF dei prodotti di digestione di TbSP1-pellet incubata con la PLA2 da pancreas bovino (triangolo grigio) confrontato con il sito di auto digestione (TbSP1-Origami, freccia nera).

Confrontando le sequenze delle PLA2 di pancreas bovino e di maiale con quelle di PLA2 isolate in altre specie, si nota una significativa somiglianza con la PLA2 di pancreas umano di cui è stato ipotizzato il meccanismo di auto digestione in cui riveste un ruolo chiave un residuo di serina [40] (Fig. 40). E' stato eseguito quindi un esperimento allo scopo di

verificare se le due PLA2 che tagliano TbSP1 si comportassero come serina proteasi, così come ipotizzato per la PLA2 umana e per TbSP1. L'inibitore delle serina proteasi PMSF, preincubato con le due fosfolipasi, è risultato attivo sulla PLA2 da pancreas bovino ma non su quella da pancreas di maiale. Questo risultato conferma l'ipotesi che la PLA2 da pancreas bovino possieda una attività proteasica dipendente da serina in grado di produrre un frammento di 14.5 kDa dalla digestione di TbSP1. La PLA2 di maiale è in grado di condurre una reazione di proteolisi ma non taglia specificamente la sequenza di TbSP1 nella regione che porta all'attivazione della proteina. Tutte le altre fosfolipasi testate non mostrano la capacità di digerire *in trans*.

```

          *           20           *           40           *           60           *
human pancreas : DSGISPRAVWQFRKMIKCVIPEGSDEFFLEFYNNGCYCGLGGSGTPVDELKCCQTHDNCYDQAKKLDSCRF : 70
bovine pancreas : -----ALWQFNGMIKCKTESSEFFLDFNNGCYCGLGGSGTPVDELRCCTHDNCYKQAKKLDSCRF : 63
porcine pancreas : -----ALWQFNSMIKCAIEGSHFLMDFNNGCYCGLGGSGTPVDELRCCEETHDNCYRDAKRLDSCRF : 63
          A6WQFr MIKC IPgS PL6d5NNGCYCGLGGSGTPVDeLL4CC2THDNCY qAKkLDSCkF

          80           *           100           *           120           *
human pancreas : LLENFYTHIYSYSCSGSAITCSRNKBCAEAFICNCDRNAAICFSKAFYNKAHKNLDTKKYQCS : 133
bovine pancreas : LVENFYTNYSYSCSNNEITCSSENNACEAFICNCDRNAAICFSKVEYNKEHKNLDTKKNG-- : 123
porcine pancreas : LVENFYTESYSYSCSNTEITCSNRNNAACEAFICNCDRNAAICFSKAFYNKEHKNLDTKKMG-- : 124
          L6ENFYT YSYSCSn eITCSkNnaCEAFICNCDRNAAICFSKaFYNKeHKNLDTKKYc

```

Figura 40

Allineamento delle sequenze di fosfolipasi A2 da mammiferi. Confronto della sequenza amminoacidica delle PLA2 da pancreas umano e di quelle commerciali da pancreas di bovino e di maiale.

Saggi di attività fosfolipasica

Al fine di confrontare l'attività enzimatica delle PLA2 di diverse specie sono stati eseguiti dei saggi di attività fosfolipasica nelle condizioni sperimentali impiegate precedentemente per TbSP1. Le proteine sono state utilizzate a concentrazioni da 50 nM a 10 µM, con il substrato 2-linoleoyl-1palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ad una concentrazione 2.5 mM in presenza ed assenza di calcio.

Solo le PLA2 di mammifero non mostrano attività fosfolipasica nelle condizioni impiegate. E' noto in letteratura che questi enzimi sono pienamente attivi nelle reazioni con liposomi e membrane cellulari [71] perciò la mancata attività fosfolipasica è probabilmente dovuta all'impossibilità dell'enzima di essere adsorbito mediante l'IRS (interfacial recognition site) agli aggregati fosfolipidici che ne inducono l'attivazione.

L'attività fosfolipasica della PLA2 di *Streptomyces violaceoruber* risulta essere strettamente dipendente dall'aggiunta di calcio esogeno e risulta essere simile a quella misurata per TbSP1 nella forma intera. (Fig. 41).

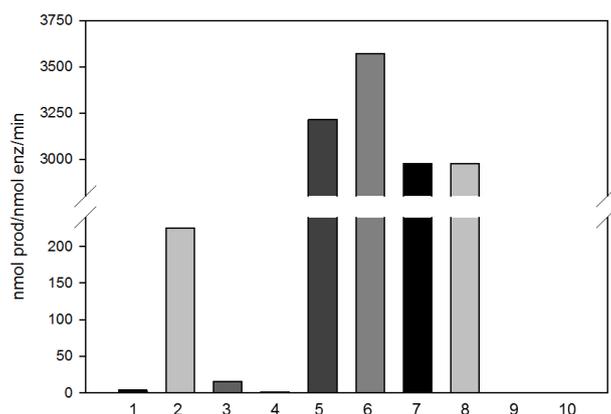


Figura 41

Attività fosfolipasica delle fosfolipasi A2 commerciali. Attività fosfolipasica di TbSP1-21 kDa (1), TbSP1-14 kDa (2), e delle PLA2 da *S. violaceoruber* in presenza (3) o assenza di calcio esogeno (4), da veleno d'ape in presenza (5) o assenza di calcio esogeno (6), da veleno di *N. mossambica mossambica* in presenza (7) o assenza di calcio esogeno (8) e da pancreas bovino (9) e di maiale (10).

Inaspettatamente le fosfolipasi da veleno di ape e di *Naja mossambica mossambica* risultano conservare la capacità di idrolizzare acidi grassi anche in assenza di calcio, nonostante in letteratura sia nota la dipendenza dallo ione. Questo risultato può essere spiegato dal fatto che il calcio è già presente nella preparazione proteica commerciale ad una concentrazione sufficiente per poter consentire all'enzima di catalizzare la reazione fosfolipasica. Come riportato in Fig. 41 i valori di attività degli enzimi da veleno d'ape e *N. mossambica mossambica* risultano circa 15 volte superiori a quelli ottenuti per TbSP1 nel medesimo esperimento.

BIBLIOGRAFIA

1. O'Donnell K, Cigelnik E, Weber NS, Trappe JM. Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia* 1997; 89: 48-65.
2. Percudani R, Trevisi A, Zambonelli A, Ottonello S. Molecular phylogeny of truffles (Pezizales : Terfeziaceae, *Tuberaceae*) derived from nuclear rDNA sequence analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1999; 13: 169-180.
3. Mello A, Murat C, Bonfante P. Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 260: 1-8.
4. Lanfranco L, Arlorio M, Matteucci A, Bonfante P. Truffles, their life cycle and molecular characterization. In: Stocchi V, Bonfante P, Nuti M (eds.), *Biotechnology of ectomycorrhizae. Molecular approaches*. New York: Plenum Press; 1995: 139-150.
5. Martin F, Tagu D. Developmental biology of a plant-fungus symbiosis: the ectomycorrhiza. In: Varma A, Hock B (eds.), *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1999: 51-73.
6. Buscot F, Munch JC, Charcosset JY, Gardes M, Nehls U, Hampp R. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *Fems Microbiology Reviews* 2000; 24: 601-614.
7. Mello A, Murat C, Bonfante P. Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 260: 1-8.
8. Sisti D, Giomaro G, Rossi I, Ceccaroli P, Citterio B, Stocchi V, Zambonelli A, Benedetti PA. In vitro mycorrhizal synthesis of micropropagated *Tilia platyphyllos* Scop. plantlets with *Tuber borchii* Vittad mycelium in pure culture. *Acta Horticult* 1998; 457: 379-387.
9. Menotta M, Amicucci A, Sisti D, Gioacchini AM, Stocchi V. Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vittad. and *Tilia americana* L. *Curr Genet* 2004; 46: 158-165.
10. Lacourt I, Duplessis S, Abba S, Bonfante P, Martin F. Isolation and characterization of differentially expressed genes in the mycelium and fruit body of *Tuber borchii*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 4574-4582.
11. Gabella S, Abba S, Duplessis S, Montanini B, Martin F, Bonfante P. Transcript profiling reveals novel marker genes involved in fruiting body formation in *Tuber borchii*. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 1599-1602.

11. Bencivenga M, Calandra R, Granetti B. Ricerche sui terreni e sulla flora delle tartufoie naturali di *Tuber melanosporum* Vitt. dell'Italia Centrale. Atti del II Congr. Intern. sul Tartufo: 337-374, 1988.
12. Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A, Amicucci A, Amselem J, Anthouard V, Arcioni S, Artiguenave F, Aury JM, Ballario P, Bolchi A, Brenna A, Brun A, Buée M, Cantarel B, Chevalier G, Couloux A, Da Silva C, Denoeud F, Duplessis S, Ghignone S, Hilselberger B, Iotti M, Marçais B, Mello A, Miranda M, Pacioni G, Quesneville H, Riccioni C, Ruotolo R, Splivallo R, Stocchi V, Tisserant E, Viscomi AR, Zambonelli A, Zampieri E, Henrissat B, Lebrun MH, Paolocci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 2010; 464:1033-8.
13. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* 1994; 269: 13057-13060.
14. Dennis EA. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 1-2.
15. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 1-19.
16. Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* 2002; 531: 2-6.
17. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761: 1246-1259.
18. Valentin E, Lambeau G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 59-70.
19. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure/function, mechanism and signaling. *J Lipid Res* 2009; Suppl:S237-42.
20. Lambeau G, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 495-520.
21. Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* 2002; 531: 2-6.
22. Lee HY, Bahn SC, Shin JS, Hwang I, Back K, Doelling JH, Ryu SB. Multiple forms of secretory phospholipase A2 in plants. *Prog Lipid Res* 2005; 44: 52-67.

23. Laxalt AM, Munnik T. Phospholipid signalling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 2002; 5: 332-338.
24. Soragni E, Bolchi A, Balestrini R, Gambaretto C, Percudani R, Bonfante P, Ottonello S. A nutrient-regulated, dual localization phospholipase A(2) in the symbiotic fungus *Tuber borchii*. *EMBO J* 2001; 20: 5079-5090.
25. Wakatsuki S, Yokoyama T, Nakashima S, Nishimura A, Arioka M, Kitamoto K. Molecular cloning, functional expression and characterization of p15, a novel fungal protein with potent neurite-inducing activity in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1522: 74-81.
26. Nakahama T, Nakanishi Y, Viscomi AR, Takaya K, Kitamoto K, Ottonello S, Arioka M. Distinct enzymatic and cellular characteristics of two secretory phospholipases A2 in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol.* 2010 Apr;47(4):318-31.
27. Jovel SR, Kumagai T, Danshiitsoodol N, Matoba Y, Nishimura M, Sugiyama M. Purification and characterization of the second *Streptomyces* phospholipase A2 refolded from an inclusion body. *Protein Expr Purif* 2006; 50: 82-88
28. Nakashima S, Ikeno Y, Yokoyama T, Kuwana M, Bolchi A, Ottonello S, Kitamoto K, Arioka M. Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells. *Biochem J.* 2003 Dec 15;376(Pt 3):655-66.
29. Senda K, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K. A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin. *Plant Cell Physiol* 1996; 37: 347-353.
30. Hirschberg HJ, Simons JW, Dekker N, Egmond MR. Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur J Biochem* 2001; 268: 5037-5044.
31. Holk A, Rietz S, Zahn M, Quader H, Scherer GF. Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction. *Plant Physiol* 2002; 130: 90-101
32. Narusaka Y, Narusaka M, Seki M, Fujita M, Ishida J, Nakashima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Kamiya A, Park P, Kobayashi M, Shinozaki K. Expression Profiles of *Arabidopsis* Phospholipase A IIA Gene in Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Cell Physiol* 2003; 44: 1246-1252.

33. Murakami, M, Taketomi, Y, Miki, Y, Sato, H, Hirabayashi, T, and Yamamoto, K. Recent progress in phospholipase A₂ research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 152-192.
34. Mayer, JM, Rau, B, Siech, M, and Beger, HG. Local and systemic zymogen activation in human acute pancreatitis. *Digestion* 2000; 62: 164-170.
35. Eskola, JU, Nevalainen, TJ, and Aho, HJ. Purification and characterization of human pancreatic phospholipase A₂. *Clin Chem* 1983; 29: 1772-1776.
36. Steiner, RA, Rozeboom, HJ, de Vries, A, Kalk, KH, Murshudov, GN, Wilson, KS, and Dijkstra, B. W. X-ray structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ at atomic resolution.) *Acta Crystallogr D*; 2001; 57: 516-526.
37. Thunnissen, MM, Franken, PA, de Haas, GH., Drenth, J, Kalk, KH, Verheij, HM, and Dijkstra, BW. Crystal structure of a porcine pancreatic phospholipase A₂ mutant. A large conformational change caused by the F63V point mutation. *J Mol Biol*; 1993; 232: 839-855.
38. Grataroli, R, Dijkman, R, Dutilh, CE, van der Ouderaa, F, De Haas, GH, and Figarella, C. Studies on phospholipase A₂ and its enzyme from human pancreatic juice. Catalytic properties and sequence of the N-terminal region. *Eur J Biochem*; 1982; 122: 111-117.
39. de Haas, GH, Postema, NM, Nieuwenhuizen, W, and van Deenen, LL. Purification and properties of an anionic zymogen of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim Biophys Acta*; 1968; 159: 118-129.
40. Wei X, Lina Y, Yumei F, Ling C. and Jinsong L. Structure insight into the activation mechanism of human pancreatic phospholipase A₂. *J Biol Chem*; 2009 Jun 12; 284(24):16659-6.
41. Sugiyama M, Ohtani K, Izuhara M, Koike T, Suzuki K, Imamura S, Misaki H. A novel prokaryotic phospholipase A₂. Characterization, gene cloning, and solution structure. *J Biol Chem*. 2002 May 31;277(22):20051-8.
42. Matoba Y, Katsube Y, Sugiyama M. The crystal structure of prokaryotic phospholipase A₂ *J Biol Chem*. 2002 May 31;277(22):20059-69.
43. Matoba Y, Sugiyama M Atomic resolution structure of prokaryotic phospholipase A₂: analysis of internal motion and implication for a catalytic mechanism. *Proteins*. 2003 May 15;51(3):453-69.

44. Khan AR, James MN. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* 1998; 7: 815-836.
45. Kassell B, Kay J. Zymogens of proteolytic enzymes. *Science* 1973; 180: 1022-1027.
46. Ghosh K, Pal A, Chattopadhyaya R. pH-dependent autocleavage of lambda repressor occurs in the operator-bound form: characterization of lambda repressor autocleavage. *Biochem J* 2004; 379: 325-330.
47. Fontana A, de Laureto PP, Spolaore B, Frare E, Picotti P, Zambonin M. Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim Pol* 2004; 51: 299-321.
48. Westerlund-Wikstrom B. Peptide display on bacterial flagella: principles and applications. *Int J Med Microbiol* 2000; 290: 223-230.
49. Skerra A. Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18: 295-304.
50. Moretto N, Bolchi A, Rivetti C, Imbimbo BP, Villetti G, Pietrini V, Polonelli L, Del SS, Smith KM, Ferrante RJ, Ottonello S. Conformation-sensitive antibodies against alzheimer amyloid-beta by immunization with a thioredoxin-constrained B-cell epitope peptide. *J Biol Chem* 2007; 282: 11436-11445.
51. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
52. Das U, Hariprasad G, Ethayathulla AS, Manral P, Das TK, Pasha S, Mann A, Ganguli M, Verma AK, Bhat R, Chandrayan SK, Ahmed S, Sharma S, Kaur P, Singh TP, Srinivasan A. Inhibition of protein aggregation: supramolecular assemblies of arginine hold the key. *PLoS One*. 2007 Nov 14;2(11):e1176.
53. Mansfeld J, Ulbrich-Hofmann R. Secretory phospholipase A2-alpha from *Arabidopsis thaliana*: functional parameters and substrate preference. *Chem Phys Lipids*. 2007 Dec;150(2):156-66.
54. Schirrmeister J, Friedrich L, Wenzel M, Hoppe M, Wolf C, Göttfert M, Zehner S. 9. Characterization of the self-cleaving effector protein NopE1 of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol*; 2011; 193(15):3733-9.
55. Wei X, Lina Y, Yumei F, Ling C and Jinsong L. Structure insight into the activation mechanism of human pancreatic phospholipase A2. *J Biol Chem*; 2009; 284(24):16659-6.
56. Nakahama, T, Nakanishi, Y, Viscomi, AR, Takaya, K, Kitamoto, K, Ottonello, S, and Arioka, M. Distinct enzymatic and cellular characteristics of two secretory

- phospholipases A2 in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol*; 2010; 47:318-331.
57. Nakashima S, Ikeno Y, Yokoyama T, Kuwana M, Bolchi A, Ottonello S, Kitamoto K, Arioka M. Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells. *Biochem J*; 2003; 376: 655-666.
 58. Arjun Thapa¹, Md. Shahnawaz¹, Pratap Karki¹, Giri Raj Dahal¹, Md. Golam Sharoar¹, Song Yub Shin¹, Jung Sup Lee¹, Byungyun Cho², and Il-Seon Park¹. Purification of inclusion body-forming peptides and proteins in soluble form by fusion to *Escherichia coli* thermostable proteins. *BioTechniques* 2008; 44:787-796.
 59. Harper S, Speicher DW. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol*; 2011; 681:259-80.
 60. Harper S, Speicher DW. Expression and purification of GST fusion proteins. *Curr Protoc Protein Sci*; 2008; Chapter 6:Unit 6.6.
 61. Murakami M, Taketomi Y, Sato H, Yamamoto K. Secreted phospholipase A2 revisited. *J Biochem*; 2011; 150(3):233-55.
 62. Steiner RA, Rozeboom HJ, de Vries A, Kalk KH, Murshudov GN, Wilson KS, Dijkstra BW. X-ray structure of bovine pancreatic phospholipase A2 at atomic resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*; 2001; 57(Pt 4):516-26.
 63. van den Berg B, Tessari M, de Haas GH, Verheij HM, Boelens R, Kaptein R. Solution structure of porcine pancreatic phospholipase A2. *EMBO J*; 1995; 14(17):4123-31.
 64. Nicolas JP, Lin Y, Lambeau G, Ghomashchi F, Lazdunski M, Gelb MHA. Localization of structural elements of bee venom phospholipase A2 involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. *J Biol Chem*; 1997; 272(11):7173-81.
 65. Renetseder R, Brunie S, Dijkstra BW, Drenth J, Sigler PB. A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J Biol Chem*; 1985; 260(21):11627-34.
 66. Bahnson BJ. Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A2: insight from the anion-assisted dimer. *Arch Biochem Biophys*; 2005; 433(1):96-106.
 67. Sitkiewicz I, Stockbauer KE, Musser JM. Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol*; 2007; 2:63-9.
 68. Johanna M. Plant phospholipases A2: perspectives on biotechnological applications. *Biotechnol Lett*; 2009; (9):1373-80.

69. Stahl U, Ek B, Stymne S. Purification and characterization of a low-molecular-weight phospholipase A2 from developing seeds of elm. *Plant Physiol*; 1998; 117:197–205.
70. Stahl U, Lee M, Sjobahl S. Plant low-molecularweight phospholipase A2S (PLA2s) are structurally related to the animal secretory PLA2s and are present as a family of isoforms in rice (*Oryza sativa*). *Plant Mol Biol*; 1999; 41: 481–490.
71. Ray S, Scott JL, Tatulian SA. Effects of lipid phase transition and membrane surface charge on the interfacial activation of phospholipase A2. *Biochemistry*. 2007; 46(45):13089-100.