

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari"

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Sovraespressione, purificazione e
caratterizzazione cinetica della polimerasi DnaE
di *Deinococcus radiodurans*

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Alessandro Perrone

RELATORE

Chiar.mo Prof. Alejandro Hochkoepler

Sessione III

Anno Accademico 2014-2015

ABSTRACT – ITA

Il passo preliminare del presente elaborato è quello di mettere a punto un metodica solida e riproducibile per la sovraespressione della subunità α di *D. radiodurans* per via eterologa. L'ospite ideale per realizzare la sovraespressione è *E. coli*, microorganismo ampiamente discusso e impiegato per via della sua semplice manipolazione. Per realizzare la sovraespressione il ceppo di *E. coli* prescelto è stato trasformato con il plasmide pBAD-*dnaE* e la proteina in esame è stata ottenuta come corpi di inclusione (biologicamente inattiva). Successivamente alla fase di rinaturazione e alla purificazione tramite cromatografia liquida dell'enzima è stato possibile ottenere quantità sufficienti di proteina pura e biologicamente attiva con la quale condurre saggi spettrofotometrici di attività enzimatica per valutare il comportamento dell'enzima *in vitro* simulando le condizioni di substrato attese *in vivo*.

È proprio in quest'ultimo frangente che si condensa lo scopo di questo lavoro. La conduzione dei saggi di attività enzimatica in condizioni ricombinative e non ricombinative (quindi in presenza o meno di RecA_{Ec} nell'ambiente di reazione) ci ha consentito di comprendere meglio il comportamento della pol III- α durante la fase di *strand invasion* mediata dalla ricombinasi e la successiva sintesi del neofilamento, contribuendo a chiarire alcuni aspetti dei meccanismi che intervengono lungo la via di riparazione del genoma danneggiato in *D. radiodurans* ancora poco discussi. Inoltre l'elaborazione di un sistema di espressione per la singola subunità α getterebbe le basi per sviluppare un sistema di co-espressione più complesso ove siano coinvolte anche altre subunità dell'oloenzima (τ - δ - δ'), in modo da poter verificare la tipologia di subassemblaggio che spontaneamente avverrebbe *in vivo* e gli stimoli relativi tra le diverse subunità che ne migliorerebbero l'efficienza.

ABSTRACT – ENG

The first aim of the present study is to provide a robust and reproducible method to obtain the α subunit of *D. radiodurans* via heterologous overexpression. The ideal host to achieve the overexpression is *E. coli*, widely discussed and used microorganism because of its simple manipulation. For this reason, the chosen strain of *E. coli* was transformed with the pBAD-*dnaE* plasmid and the subunit α was obtained as inclusion bodies (biologically inactive). After the steps of refolding and purification by liquid

chromatography, it was possible to obtain enough pure and biologically active protein, with which conduct spectrophotometric enzyme activity assay to evaluate the behavior of the enzyme *in vitro* by simulating the expected substrate conditions *in vivo*.

It is precisely in this phase that condenses the purpose of this work. Carrying out the assays of enzymatic activity in recombinant and not recombinant conditions (therefore in the presence or not of RecA_{Ec} in the reaction medium) has allowed us to better understand the behavior of the pol III- α during the step of strand invasion mediated by recombinase and the following synthesis of new strand, helping to clarify some aspects of the mechanisms involved along the path for the recovery of the damaged genome in *D. radiodurans* that still remain unclear. In addition, the development of an expression system for the single subunit α would create the basis for developing a more complex system of co-expression for other subunits of the holoenzyme (τ - δ - δ'), which permits to check the type of subassembly that would occur naturally *in vivo* and relative influence between different subunits that would improve the efficiency.

SOMMARIO

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	5
1.1 Caratteristiche principali di <i>Deinococcus radiodurans</i>	5
1.2 Ruolo dello ione Mn ²⁺	6
1.3 Oltre i complessi di manganese: altri sistemi di protezione dallo stress ossidativo	8
1.3.1 <i>Cell-Cleaning Proteins</i>	9
1.4 Meccanismo di riparazione del DNA in <i>Deinococcus radiodurans</i>	10
1.5 Ricombinasi RecA	14
1.6 Processi di replicazione in <i>D. radiodurans</i>	14
1.7 Le DNA Polimerasi	15
1.7.1 DNA Polimerasi III	17
1.7.2 Il <i>Core</i>	17
1.7.3 Il <i>Clamp Loader</i>	18
1.7.4 Lo <i>Sliding Clamp</i>	19
1.7.5 La subunità α -917	19
1.8 Il meccanismo replicativo della Pol III	20
1.9 Sovraespressione della subunità α di <i>Deinococcus radiodurans</i> in <i>E. coli</i>	23
1.9.1 pBAD- α Dr	23
1.9.2 Corpi di inclusione	24
1.10 Scopo del lavoro	25
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI	27
2.1 MATERIALI	27
2.1.1 Ceppo batterico utilizzato	27
2.1.2 Plasmide	27

2.1.3	Reagenti	27
2.1.4	Terreni di coltura	28
2.2	METODI	29
2.2.1	Coltura batterica	29
2.2.2	Prove di espressione e solubilità	29
2.2.3	Solubilizzazione, dialisi e <i>refolding</i>	30
2.2.4	Cromatografia di affinità	31
2.2.4.1	Cibacron Blue	31
2.2.4.2	HiTrap Heparin	32
2.2.5	Elettroforesi SDS-PAGE	34
2.2.6	Saggi di attività	34
2.2.6.1	Saggio di attività polimerasica	35
2.2.6.2	Saggio di attività polimerasica in condizioni ricombinative	36
2.2.6.3	Saggio di attività ricombinativa	38
2.2.6.4	Saggio di attività esonucleasica	38
2.3	<i>Deinococcus radiodurans</i> : coltura, estrazione, purificazione	39
2.3.1	Coltura cellulare	39
2.3.2	Prove di lisi e purificazione	40
CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE		43
3.1	Prove di espressione e di solubilità e formazione dei corpi di inclusione	43
3.2	Purificazione	47
3.2.1	Cromatografia di affinità: Cibacron Blue	47
3.2.2	Cromatografia di affinità: HiTrap Heparin	48
3.3	Caratterizzazione enzimatica	50
3.3.1	Saggio di attività polimerasica	50
3.3.2	Saggio di attività polimerasica in condizioni ricombinative	52
3.3.3	Saggio di attività ricombinativa	55

3.3.4 Saggio di attività esonucleasica	56
3.4 <i>Deinococcus radiodurans</i> : prove di lisi e separazione dell'estratto grezzo	57
CAPITOLO 4: CONCLUSIONI	59
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUZIONE

1.1 Caratteristiche principali di *Deinococcus radiodurans*

Isolato per la prima volta nel 1956 da Arthur W. Anderson nel corso di un esperimento il cui scopo prevedeva la sterilizzazione della carne in scatola attraverso l'impiego intensivo di alte dosi di raggi γ (Anderson, A. W. et al. 1956), *Deinococcus radiodurans* si è da subito guadagnato un posto d'onore tra le altre specie microbiche conosciute fino a quel momento grazie alla sua straordinaria capacità non solo di resistere a massicce dosi di radiazioni ionizzanti, ma anche di possedere una sorta di vantaggio evolutivo, ancora non del tutto svelato, che gli consentirebbe di resistere inaspettatamente a diverse specie reattive all'ossigeno (ROS¹) generate da condizioni di stress ossidativo dovuto all'esposizione del microorganismo a fattori chimici o fisici quali l'essiccamento, radiazioni UV, mitomicina C (MMC) o perossido di idrogeno.

Deinococcus radiodurans (dal greco *deinos*, che significa strano o inusuale e *coccus*, che significa chicco) è un batterio Gram-positivo, rosso pigmentato, non sporigeno, non patogeno tipicamente aggregato in diadi o tetradi con un diametro medio di 1 μ m (fig. 1). Caratterizzato da un comportamento mesofilo presenta un ottimo di crescita intorno a 32°C in terreno TGY² arricchito di manganese e magnesio ma al contempo risulta molto sensibile a diversi antibiotici inibitori della sintesi dell'RNA, delle proteine e della parete cellulare (Slade, D. et Radman, M. 2011).

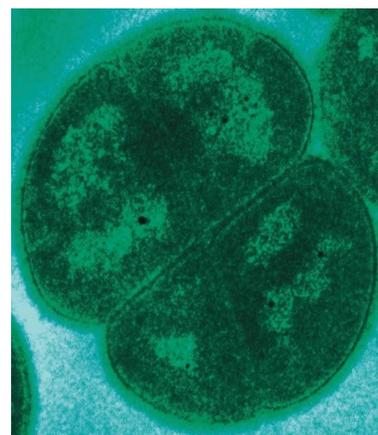


Figura 1. Tetrade di *Deinococcus radiodurans*. (Michael J. Daly, 2003)

Il genoma, costituito da 3.28-megabasi, è suddiviso in due cromosomi di 2'648'638 e 412'348 bp e due plasmidi di 177'466 e 45'704 bp, ed ha un numero di copie compreso tra 2 e 10 che dipende dalle condizioni di crescita e dal terreno di coltura impiegato. Come sarà evidenziato nei prossimi paragrafi, la natura poliploide di *Deinococcus radiodurans* è uno degli elementi decisivi per la sua estrema resistenza allo stress ossidativo. Anche la struttura cellulare di *D. radiodurans* possiede delle caratteristiche peculiari. Pur risultando positivo alla colorazione di Gram è dotato di una parete cellulare formata da 5 strati, al cui

¹ Reactive Oxygen Species

² Tryptone Glucose Yeast Extract

esterno sono legati i carotenoidi (che conferiscono la pigmentazione rossastra), la cui struttura molto complessa è tipica dei batteri Gram-negativi (Lancy, P. et al. 1978).

Di fondamentale importanza per la crescita e la resistenza di *D. radiodurans* è la presenza di glucosio come fonte di carbonio. Le vie attraverso le quali *D. radiodurans* è in grado di utilizzare il glucosio a disposizione forniscono alla cellula anche buona parte dei metaboliti precursori implicati nella riparazione del DNA danneggiato. Tra i diversi percorsi metabolici, il più attivo risulta essere la via dei pentoso fosfati responsabile della produzione di NADPH e ribosio-5-fosfato. È proprio l'esposizione ai raggi γ che pare indurre alti livelli di espressione dell'enzima Glucosio-6-fosfato deidrogenasi (Zhang, C. et al. 2005), il primo degli enzimi che intervengono lungo la via dei pentoso fosfati, confermando un coinvolgimento dei metaboliti prodotti nei meccanismi di protezione enzimatica e riparazione del DNA danneggiato. Il NADPH risultante dalla reazione catalizzata da G6PDH, oltre ad essere un precursore per la formazione dei nucleotidi, è impiegato anche come cofattore per la glutatione reduttasi e la tioredossina reduttasi, enzimi responsabili della riduzione della tioredossina e del glutatione, questi ultimi rispettivamente efficaci come antiossidanti nei confronti di cisteine ossidate e H_2O_2 . La conferma che il glucosio e la via dei pentoso fosfati giocano un ruolo decisivo nella protezione della cellula dallo stress ossidativo è rintracciabile nei ceppi *Δzwf* , nei quali è impedita l'espressione di G6PDH. Questi presentano un notevole aumento di sensibilità nei confronti delle radiazioni UV, H_2O_2 e MMC rispetto al ceppo *wild-type* (Liu, X. et al. 2008).

1.2 Ruolo dello ione Mn^{2+}

L'apparato metabolico di *D. radiodurans* non è utile soltanto per la difesa nei confronti dei ROS endogeni, ma anche verso lo stress ossidativo indotto da fattori esterni dotando la cellula dei metaboliti che complessati con Mn^{2+} fungono da *ROS-scavenger*.

Il manganese è presente nelle cellule di *D. radiodurans* in quantità sorprendentemente alte (da 0.2 mM a 4 mM) e la crescita del batterio in terreno minimo è enormemente influenzata dalla presenza di manganese al punto che una diminuzione o un aumento eccessivo della concentrazione di quest'ultimo può indurre stress ossidativi potenzialmente letali (Daly, M. J. et al. 2004).

La concentrazione intracellulare di Mn^{2+} è anche influenzata dall'esposizione alla radiazione ionizzante in questione. È infatti noto che *D. radiodurans* in seguito a

esposizione cronica ai raggi γ subisce danni alla parete cellulare, liberando in soluzione polisaccaridi, lipidi e diminuendo la quantità di acqua contenuta nella cellula. La disidratazione di fatto non permette altro che una concentrazione progressiva dello ione manganese, consentendone un impiego cineticamente meno limitante (Daly, M. J. et al. 2010).

Nello stadio iniziale della fase stazionaria di crescita, durante il quale la resistenza ai raggi γ è massima, *D. radiodurans* reca granuli elettrodensanti prodotti dal metabolismo dei polifosfati, che oltre ad essere impiegati dalla cellula come fonte di energia per la sintesi dell'ATP e come agenti fosforilanti per proteine, zuccheri e nucleosidi, sono la fonte principale di ortofosfato. L'azione sinergica dei complessi Mn^{2+} -ortofosfato si traduce in una protezione molto efficace del sistema enzimatico contro il radicale superossido, al punto da poter sopperire quasi completamente alla perdita dell'enzima superossido dismutasi in diversi microorganismi radio-resistenti (Archibald, F.S. et al. 1982). Il radicale superossido in questione non ha come obiettivo preferenziale quello di danneggiare il DNA, ma al contrario risulta essere molto dannoso per i cluster Fe-S (presenti in diverse metallo-proteine coinvolte nella catena respiratoria) liberando nel citosol Fe^{2+} che, dando luogo alla reazione di Fenton³, promuove la decomposizione radicalica di H_2O_2 liberando in soluzione il radicale ossidrile, il più reattivo tra i ROS fin ora citati (Dunford, H. B. 1987; Mello Filho, A. C. et al. 1984).

L'efficacia dei complessi Mn^{2+} -ortofosfato quali antiossidanti è stata dimostrata anche *in vitro*. L'ultrafiltrato⁴ dell'estratto cellulare di *D. radiodurans* si è dimostrato efficace nel preservare inalterata l'attività dell'endonucleasi di restrizione BamHI fino ad una dose di 4kGy di raggi γ , mentre la somministrazione di solo 150 Gy di raggi γ inattiva l'enzima in presenza di ultrafiltrati di *E. coli*, *P. putida* e *T. thermophilus* (Daly, M. J. et al. 2010).

Si è inoltre osservato che l'esposizione alle radiazioni ionizzanti produce un aumento di attività proteolitica, liberando amminoacidi e piccoli peptidi nel citosol. Sorprendentemente il Mn^{2+} coordinato con piccoli peptidi dà luogo ad un aumento ancora più consistente in termini di radio-resistenza. *In vitro* l'attività della endonucleasi succitata non risulta essere alterata da dosi fino a 22,5 kGy di raggi γ grazie all'ultrafiltrato di *D. radiodurans* recante polipeptidi artificiali e amminoacidi liberi in concentrazioni

³ Reazione di Fenton: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$

⁴ Ultrafiltrato realizzato tramite centrifugazione dell'estratto cellulare e ultrafiltrazione del surnatante con rimozione di tutti i componenti con massa > 3 kDa.

paragonabili a quelle osservate nelle cellule di *D. radiodurans* sottoposte a stress ossidativo.

Questa combinazione Mn^{2+} -peptide (anche in combinazione con ortofosfato) svolge un ruolo efficace laddove i complessi di Mn^{2+} -ortofosfato non dimostrano alcun effetto. La funzione di questa classe di complessi è quella di *ROS-scavenger* nei confronti di $OH\cdot$, riuscendo anche a decomporre cataliticamente H_2O_2 , assumendo in questo frangente un ruolo analogo a quello svolto dall'enzima catalasi (fig. 2).

Infine la presenza di Mn^{2+} è rilevante anche per l'effetto che ha sulle proteine Fe-S, quale vicariante del Fe^{2+} all'interno di cluster Fe-S, inibendo completamente la reazione di Fenton che porterebbe alla degradazione radicalica del perossido di idrogeno.

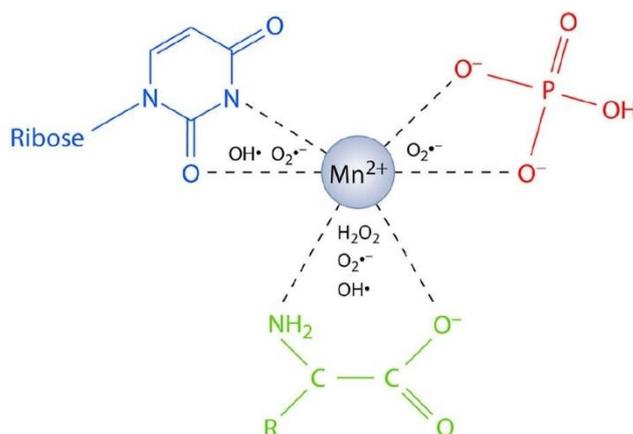


Figura 2. Complessi di Mn^{2+} . In coordinazione con lo ione ortofosfato è utile per la rimozione del radicale superossido (rosso). Con amminoacidi e piccoli peptidi i complessi sono efficaci contro il radicale superossido e decompongono cataliticamente H_2O_2 (verde). Mn^{2+} -nucleotide (o substrati analoghi recanti due carbonili separati da ammino-gruppi) in combinazione con ortofosfato rimuove i radicali idrossido e superossido (blu) (Basata su Michael J. Daly et al. 2010)

1.3 Oltre i complessi di manganese: altri sistemi di protezione dallo stress ossidativo

Seppure l'esposizione a radiazioni ionizzanti provochi danni gravissimi agli acidi nucleici, quello che contraddistingue i batteri radio-resistenti da quelli radio-sensibili è il livello di proteine danneggiate nella fase post irradiazione. In seguito ad una sufficientemente prolungata esposizione a radiazioni ionizzanti, infatti, entrambe le classi di microorganismi mostrano la stessa suscettibilità ai DSBs⁵, ma i batteri radio-sensibili presentano un contenuto molto più alto di proteine danneggiate a dimostrazione della carenza di tutti quei sistemi di protezione, talvolta anche selettivi, che permettono invece a *D. radiodurans* di poter sopravvivere in condizioni di stress ossidativo estremo.

⁵ Double-Strand Breaks

Parallelamente, dunque, ai sistemi di riparazione del DNA esistono una varietà di strategie che *D. radiodurans* può adottare per fronteggiare l'esposizione a stress ossidativi.

1.3.1 *Cell-Cleaning Proteins*

L'esposizione a stress ossidativo può generare nucleotidi e oligonucleotidi parzialmente o totalmente danneggiati, i quali possono essere la causa di mutazioni spontanee che si traducono il più delle volte in danni letali alla cellula. Il compito di detossificare la cellula da questi composti ossidati è affidato alla famiglia delle idrolasi NUDIX⁶ e alle proteasi Lon1 e Lon2.

Il genoma di *D. radiodurans* codifica per 23 idrolasi della famiglia NUDIX, 5 delle quali sono maggiormente espresse solo in seguito ad esposizione a radiazioni ionizzanti. Il loro compito è quello di bonificare e riciclare all'interno della cellula i nucleotidi danneggiati (dimeri di pirimidine, legami crociati tra due nucleotidi di due catene di DNA diverse, degradazione e funzionalizzazione delle basi azotate ad opera dei ROS) (Xu, W. et al. 2001).

Parallelamente alle idrolasi NUDIX che operano a spese dei componenti danneggiati del DNA, le proteasi Lon1 e Lon2 giocano un ruolo fondamentale nella degradazione e rimozione di proteine dalla struttura terziaria alterata. Tuttavia risulta ancora di difficile comprensione il perché una porzione di proteine venga protetta in maniera specifica dall'attività proteolitica. Su tutte, le più importanti ad essere preservate sono le subunità β e β' dell'RNA polimerasi, strumenti utilissimi per il recupero post-irradiazione che consentono una rapida re-sintetizzazione degli enzimi per il ripristino delle funzioni cellulari (Joshi, B., et al. 2004).

⁶ Nucleoside Diphosphate linked to X

1.4 Meccanismo di riparazione del DNA in *Deinococcus radiodurans*

Deinococcus radiodurans ha un vasta gamma di meccanismi di protezione nei confronti del DNA. Altrettanti sono i meccanismi di riparazione che questo microorganismo è in grado di utilizzare a suo vantaggio per ripristinare la funzione del genoma qualora venga danneggiato (fig. 3).

I danni indotti al genoma presentano effetti diversi a seconda della causa che li genera. La mitomicina C causa legami crociati tra due catene adiacenti di DNA; le radiazioni UV provocano la dimerizzazione delle basi azotate pirimidiniche; H₂O₂ e altri ossidanti di natura chimica provocano danni ai nucleotidi. Basandosi su questa varietà, molto diversi saranno i meccanismi che entrano in gioco per riparare il DNA danneggiato:

- Inversione diretta del danno (DR⁷)
- Riparazione per escissione di una base o nucleotide (BER-NER⁸)
- Riparazione dell'appaiamento errato (MR⁹)
- Riparazione per ricombinazione omologa (HR¹⁰)

In ogni caso il danneggiamento si traduce in rotture del doppio filamento (DSBs) o del singolo filamento (SSBs¹¹), le seconde meno complesse da riparare rispetto alle prime. La resistenza di *D. radiodurans* gli consente di riparare 200 DSBs e 190 legami crociati tra catene di DNA prima di perdere vitalità. Questo non sembra essere dovuto al sistema enzimatico che interviene nei confronti del DNA, anzi pare non avere nulla di straordinariamente eccezionale. È vero, infatti, che la polimerasi I di *D. radiodurans* può essere completamente sostituita dall'omologa polimerasi di *E. coli*. Persino la ricombinasi RecA di *E. coli* può parzialmente sostituire la ricombinasi nativa di *D. radiodurans*.

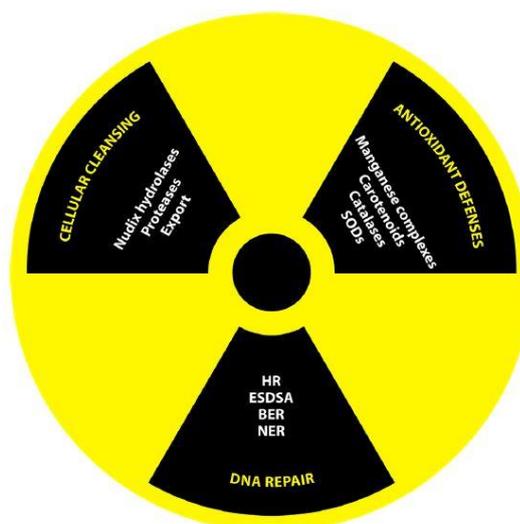


Figura 3. Fattori che contribuiscono alla resistenza di *D. radiodurans* alle radiazioni ionizzanti: proteine dedicate alla pulizia cellulare, difese di antiossidanti e sistemi di riparazione del DNA. (D. Slade, M. Radman. 2011)

⁷ Direct Damage Reversal

⁸ Base Excision Repair – Nucleotide Excision Repair

⁹ Mismatch Repair

¹⁰ Homologous Recombination

¹¹ Single-Strand Breaks

È dunque più probabile che il vantaggio evolutivo di *D. radiodurans* risieda in specifici enzimi che ancora non sono stati osservati in nessun'altra specie oppure dall'elevata ridondanza dei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella riparazione del DNA, tra cui 2 vie per la riparazione del danno da radiazioni UV (UvrABC e UVDE) e 23 geni della famiglia delle idrolasi NUDIX coinvolte nei meccanismi BER-NER.

Esistono diversi tipi di radiazioni ionizzanti, tutte derivanti dal decadimento radioattivo di un elemento: di natura elettromagnetica (raggi X e γ) o particolata (raggi α e β). La più penetrante, i raggi γ , produce 20 SSBs ogni DSB, questi ultimi potenzialmente letali in quanto impediscono la replicazione del genoma da parte della polimerasi III causando la morte della cellula.

Generalmente le rotture del doppio filamento avvengono in prossimità di due SSBs molto vicini nelle due catene antiparallele dello stesso dsDNA¹². L'indebolimento puntiforme della catena indurrebbe una rottura definitiva e la frammentazione del genoma.

Ma in *Deinococcus radiodurans* questo non avviene. La rottura del doppio filamento avviene come singolo evento, mostrando quindi una diretta interazione tra il fotone γ e il dsDNA. Paragonando il rapporto tra danni del singolo filamento (SSBs o danni ai nucleotidi) e DSBs di diversi microorganismi nei quali la rottura del doppio filamento avviene in più stadi con *D. radiodurans*, si osserva un valore minore suggerendo una rottura del filamento in un unico stadio (Burrell, A. D, et al. 1971). È il radicale OH \cdot infatti, generato dalla fotolisi dell'acqua presente nel citosol, a indurre danni alle basi. Il livello molto basso di questo tipo di danni, paragonati ai DSBs, potrebbe essere ricondotto al ruolo dei complessi Mn-peptide, efficaci antiossidanti nei confronti della specie radicalica in questione.

Mentre le rotture del singolo filamento sono facilmente affrontabili e superabili da *D. radiodurans* i DSBs subiscono un processo ricombinativo più lento e complesso per la loro riparazione. Il recupero cellulare avviene in 3 fasi consecutive: nella prima avviene la degradazione del DNA e una lenta fase di riparazione (fig. 4a); successivamente vi è una seconda fase durante la quale i frammenti vengono ricomposti e comincia la sintesi del DNA (fig. 4b); nella fase finale viene ripresa la crescita nel momento in cui la riparazione del DNA è conclusa (Slade, D. et al. 2009).

¹² Double Strand DNA

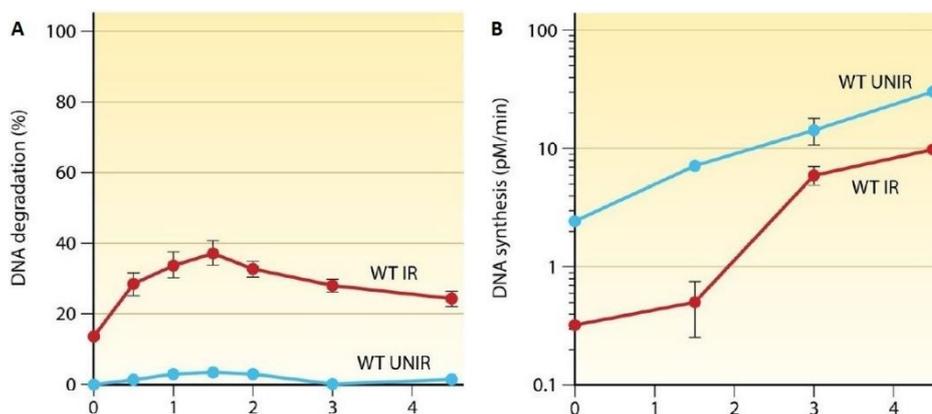


Figura 4. a) Degradazione del DNA misurata nei ceppi wild-type non irradiati (blu) e sottoposti a 7 kGy (rosso) di raggi γ ; b) Sintesi del DNA nei ceppi wild-type non irradiati e sottoposti all'esposizione di 7 kGy di raggi γ . (D. Slade, M. Radman. 2011)

La riparazione coinvolge due meccanismi consecutivi che operano a spese dei frammenti di DNA generati dall'esposizione ai raggi γ : ESDSA¹³ seguita da Ricombinazione Omologa per *Crossover*. Questo tipo di meccanismo sinergico è possibile grazie alla natura poliploide di *D. radiodurans*. Le rotture a carico del doppio filamento avvengono in siti diversi in maniera stocastica, dunque la probabilità che avvengano nello stesso punto di due cromosomi diversi è molto bassa. Ciò fornisce la possibilità di avere una porzione di DNA intatto in un cromosoma da usare come stampo per riparare la regione danneggiata nell'altro cromosoma. Da qui si deduce che la condizione necessaria e sufficiente affinché il danno possa essere superato è quella che *D. radiodurans* abbia almeno due copie del genoma. Tuttavia un aumento di copie del genoma non si traduce in una maggiore efficienza della ricombinazione omologa (Harsojo, S. et al. 1981; Hansen, M. T. 1978). La fase iniziale di questo lento processo di riparazione è affidata alla via di RecFOR. Il primo stadio del processo di riparazione è mediato dall'esonucleasi 5'-3' RecJ. RecJ ha il ruolo di digerire le estremità piatte del frammento di DNA fino ad una sequenza di riconoscimento χ che funge da segnale per il distacco di RecJ e il successivo intervento del pool di enzimi RecFOR in corrispondenza della sporgenza (*overhang*) appena formatasi. Questa fase è di fondamentale importanza per l'attività ricombinativa poiché prepara il DNA ad associarsi alla ricombinasi RecA. Senza questa via preliminare, in particolare senza l'intervento di RecJ non sarebbe possibile la formazione dell'*overhang*-3', l'associazione di RecA e la conseguente ricombinazione (D. Slade, M. Radman. 2011).

¹³ Extended Synthesis-Dependent Strand Annealing

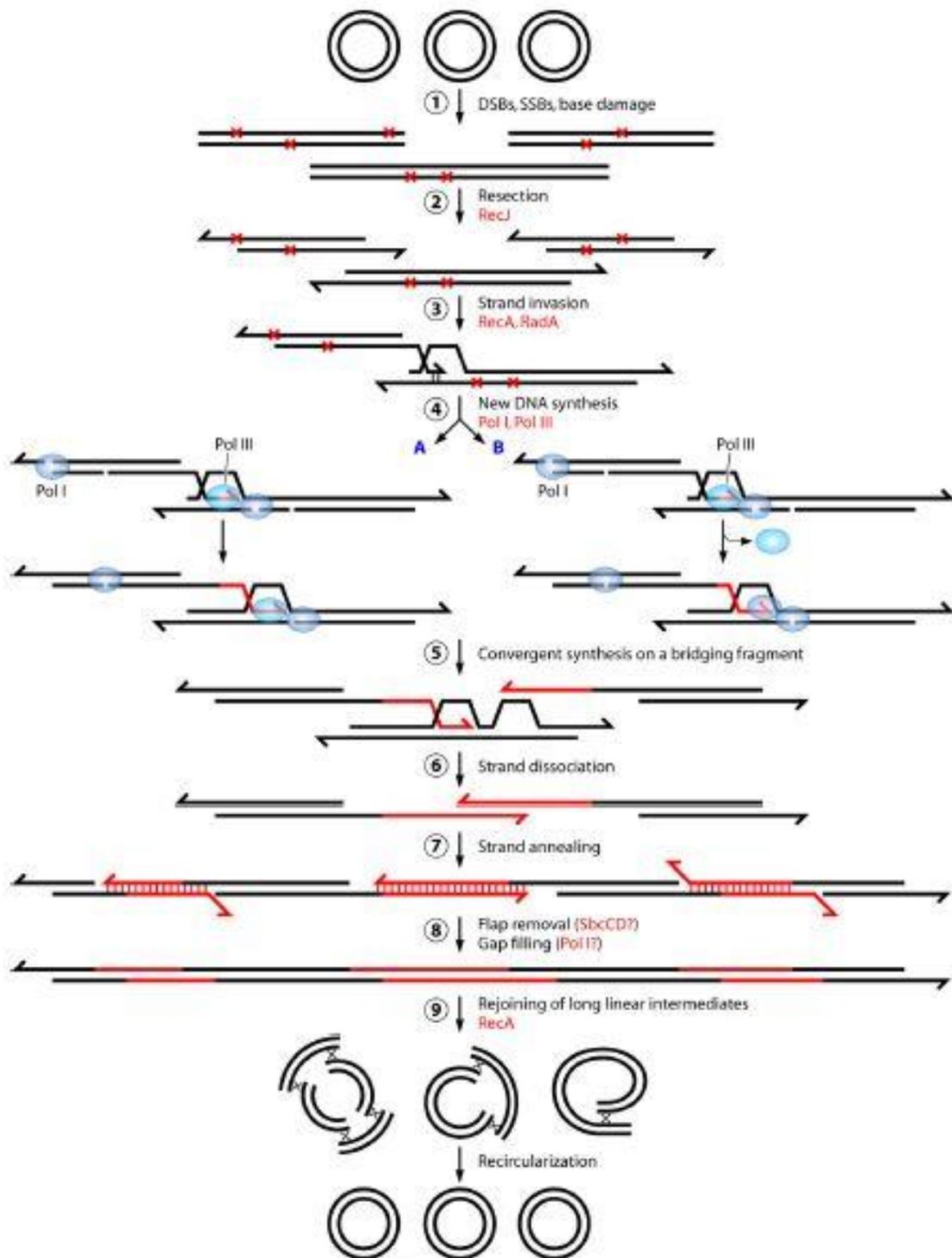


Figura 5: Meccanismo a due stadi per la riparazione del DNA nelle cellule di *D. radiodurans* sottoposte a radiazioni ionizzanti. Il materiale cromosomico di *D. radiodurans* subisce DSBs casuali producendo diversi frammenti (step 1). I frammenti di DNA vengono digeriti dall'esonucleasi RecJ in direzione 5'-3' creando degli overhang-3' (step 2) che, attraverso lo scambio di filamenti ad opera di RecA, fungono da primer all'interno del D loop mobile che si forma sul secondo frammento (step 3).

La sintesi del DNA è affidata alla Pol III (step 4) con l'ausilio della Pol I che colma le lacune a singolo filamento derivanti dal meccanismo BER o NER (A), oppure della Pol I da sola (B). La sintesi di due frammenti non contigui farà sì che convergano verso un terzo frammento che funge da ponte (step 5). Le due nuove estremità a singolo filamento appena formate dissocieranno dal filamento stampo (step 6) e appaieranno le estremità complementari dei singoli filamenti (step 7). Una nucleasi (SbcCD?) e La Pol I probabilmente interverrebbero rispettivamente per rimuovere i lembi di DNA non combacianti e unire le porzioni a doppio filamento (step 8). I nuovi frammenti di DNA così formati riformeranno i cromosomi circolari attraverso crossover RecA dipendente. (D. Slade, M. Radman. 2011)

1.5 Ricombinasi RecA

Questo enzima ha il ruolo di associarsi alla porzione a singolo filamento (*overhang-3'*) del dsDNA, con una stechiometria pari a 1:3 tra RecA e nucleotidi. Può usare come cofattore dATP per superare le lesioni a singolo filamento e legarsi al DNA, mentre in presenza di ATP come cofattore il legame di RecA è inibito da single-strand-binding proteins (SSBs).

La ricombinasi RecA di *D. radiodurans* si comporta in maniera totalmente diversa dall'omologa ricombinasi di *E. coli*. Mentre quest'ultima ha maggiore affinità verso il ssDNA, RecA di *D. radiodurans* ha una maggiore affinità per il dsDNA che presenta porzioni a singolo filamento. Infatti il legame di RecA alla regione a singolo filamento risulta lo stadio cineticamente lento, con formazione di complessi termodinamicamente stabili. Lo stadio veloce senza *lag-time* successivo al legame è lo scambio di filamenti di DNA. In queste condizioni RecA-Dr effettua una ricombinazione inversa rispetto a quella di RecA-Ec. Il motivo di questo comportamento è da ricercare nelle caratteristiche strutturali della ricombinasi di *D. radiodurans*. Presenta infatti una cavità nella quale il potenziale elettrostatico è maggiore rispetto a RecA-Ec che renderebbe più affine RecA-Dr al *backbone* del DNA a doppio filamento (Cox, M. M. et al 2002).

Concludendo, RecA-Dr è un enzima che si è evoluto spontaneamente verso una forma che gli permette di ricercare e interagire selettivamente con il DNA danneggiato nei punti in cui sono presenti DSBs e riparare il danno cercando altre regioni a dsDNA da sovrapporre per via ricombinativa.

Dunque, conclusa la fase ricombinativa, nel processo di riparazione interviene un'altra importante classe di enzimi, fondamentali per la riparazione e la sintesi estensiva dei nuovi filamenti di DNA. Si tratta della famiglia delle Polimerasi, una classe di enzimi essenziale non solo per la resistenza allo stress ossidativo ma anche per il normale metabolismo replicativo della cellula.

1.6 Processi di replicazione in *D. radiodurans*

Le DNA polimerasi identificate in *D. radiodurans* sono tre: Pol I, Pol III e Pol X. La Polimerasi I e III conservano il 41% e il 44% di omologia rispetto agli enzimi di *E. coli*. Analogamente a quanto accade in *E. coli*, la polimerasi I è necessaria per superare le lesioni di un singolo filamento e per la riparazione per escissione. Il coinvolgimento sostanziale della polimerasi I nei meccanismi di riparazione è avvalorato dal fatto che i ceppi mutanti

del gene *polA* (codificante per la Pol I) mostrano una sensibilità maggiore agli effetti di MMC, radiazioni UV e ionizzanti. Sorprendentemente la Polimerasi I di *D. radiodurans* non possiede proprietà speciali che influenzerebbero la resistenza del microorganismo allo stress ossidativo tanto che la delezione di *polA-Dr* e la sostituzione con *polA-Ec* non provoca danni letali e consente alla cellula di riparare le lesioni con la stessa efficienza del ceppo *wild-type* di *D. radiodurans* (Gutman, P. D. et al. 1994).

È invece l'oloenzima Pol III ad avere un peso considerevole sulla sintesi globale di DNA in *D. radiodurans*. Operando sinergicamente insieme alla Pol I, la Pol III è indispensabile per la sintesi del DNA e il recupero delle funzioni cellulari dopo i danni indotti dalle radiazioni ionizzanti. Il riarrangiamento molecolare del genoma frammentato infatti subisce un ritardo in caso di mancanza della sola Pol I, invece risulta totalmente abrogato in caso di assenza della Pol III. Il livello di espressione delle diverse subunità dell'oloenzima è influenzato dall'esposizione a radiazioni ionizzanti: mentre la subunità α non è sovraespressa in condizioni di stress ossidativo, la subunità β (richiesta per avere una sintesi processiva) e la subunità con attività esonucleasica in direzione 3'-5' sono maggiormente indotte in seguito ad irradiazione (Slade, D. et al. 2009; Liu, Y. et al. 2003).

L'ultima delle tre polimerasi individuate in *D. radiodurans* è la Pol X, enzima appartenente alle polimerasi della più ampia famiglia X. Tale polimerasi è dotata di tre attività enzimatiche: attività polimerasica dipendente dal Mn^{2+} , attività esonucleasica in direzione 3'-5' e l'attività connessa alla porzione che funge da 5'-deossiribosio fosfato liasi, quest'ultima richiesta per il corretto funzionamento del meccanismo di escissione di basi danneggiate (BER) (Blasius, M. et al 2006).

1.7 Le DNA polimerasi

Essendo le polimerasi di *D. radiodurans* ancora in fase di studio, per comprendere e descrivere meglio il comportamento di questa classe di enzimi assumeremo come oggetto di discussione dei prossimi paragrafi le polimerasi omologhe di *E. coli*, organismo ampiamente discusso in letteratura e considerato come modello per il metabolismo di altre specie microbiche.

Le polimerasi sono una classe di enzimi che catalizzano l'aggiunta di un nucleotide all'estremità 3'-OH di una catena di DNA parentale in fase di replicazione, utilizzando come stampo-guida il singolo filamento risultante dallo srotolamento della doppia elica. Diversi studi hanno permesso l'identificazione di sei famiglie di polimerasi: la famiglia A,

rappresentata dalla pol I; la famiglia B, dalla pol II; la famiglia C, esemplificata dalla subunità α della pol III; la famiglia D che include le polimerasi degli Archaea; la famiglia X, comprendente la pol β eucariotica; la famiglia Y, rappresentata dalla superfamiglia Umuc/DinB/Rev1/Rad30. In *E. coli* sono state individuate 5 delle tipologie di polimerasi fin ora studiate.

La DNA Polimerasi I (103 kDa), codificata dal gene *polA*, è la più abbondante polimerasi in *E. coli*, sebbene non sia la principale responsabile della replicazione del genoma. Costituito da una singola catena polipeptidica, per proteolisi può essere scissa in due frammenti principali: il frammento *Klenow* (68 kDa) e la subunità esonucleasica (35 kDa). Il frammento *Klenow* è dotato di una duplice attività enzimatica: una porzione con attività polimerasica 5'-3' e un'altra dotata di attività esonucleasica 3'-5'. Il secondo frammento possiede solo attività esonucleasica, questa volta in direzione inversa (5'-3'), che sinergicamente con la RNasi H è efficace per la rimozione dei primer generati sul filamento *lagging* durante la sintesi dei frammenti di *Okazaki*. Come già accennato in precedenza la Pol I svolge anche la funzione di *gap-filling* nelle regioni di DNA a singolo filamento dovute alle sollecitazioni indotte da radiazioni ionizzanti o, più generalmente, da stress ossidativo durante il meccanismo di *Nucleotide Excision Repair*.

La DNA Polimerasi II (89.9 kDa) è un enzima ad alta fedeltà replicativa (possiede attività esonucleasica 3'→5'), codificato dal gene *polB*, che svolge un'importante funzione di *gap filling*, legando le regioni a singolo filamento che bloccano l'intervento della Pol III, senza aver bisogno di primer a RNA. Inoltre, l'attività della Pol II è stimolata dalla presenza di SSB, particolari proteine che si legano al ssDNA, impedendo un riappaiamento spontaneo dei singoli filamenti dopo l'intervento dell'elicasi.

Le Polimerasi IV e V, rispettivamente codificate dai geni *dinB* e *UmuD'2C*, dette anche DNA polimerasi *error-prone*, aumentano la loro concentrazione nella cellula in condizioni di necessità. Esse, infatti, intervengono in quei processi in cui la Pol III risulta bloccata durante la sua attività a causa di alcuni tipi di lesioni presenti nella catena di DNA. La loro azione elimina, con poca fedeltà, la lesione e permette nuovamente l'aggancio della pol III al DNA.

Per quanto concerne la DNA Polimerasi III, la struttura e le sue funzioni saranno spiegate più dettagliatamente nel paragrafo successivo.

1.7.1 DNA Polimerasi III

L'oloenzima Pol III, osservato per la prima volta nel 1970 da Thomas Kornberg e Malcolm Gefter, è il principale responsabile della replicazione del genoma in *E. coli*, incorporando dNTPs alla velocità di 1000 bp/secondo ad altissima fedeltà. La pol III è composta da 9 subunità distribuite in 4 gruppi funzionali (fig. 6): due *cores* catalitici composti entrambi dall'eterodimero $\alpha\epsilon\theta$; un *clamp loader* formato dall'assemblaggio $3\tau, \delta, \delta', \chi, \psi$; uno *sliding clamp* composto dall'omodimero β_2 . La formazione di due *cores* in associazione con due subunità τ dà origine a quella che viene definita pol III', mentre due *cores* che interagiscono con il *clamp loader* vengono definiti come Pol III*. L'aggiunta degli *sliding clamp* β_2 alla pol III* dà luogo all'oloenzima pol III (Kornberg, T. and Gefter, M. L. 1974; Haredeen, D. R. and Kelly, T. J. 1996).

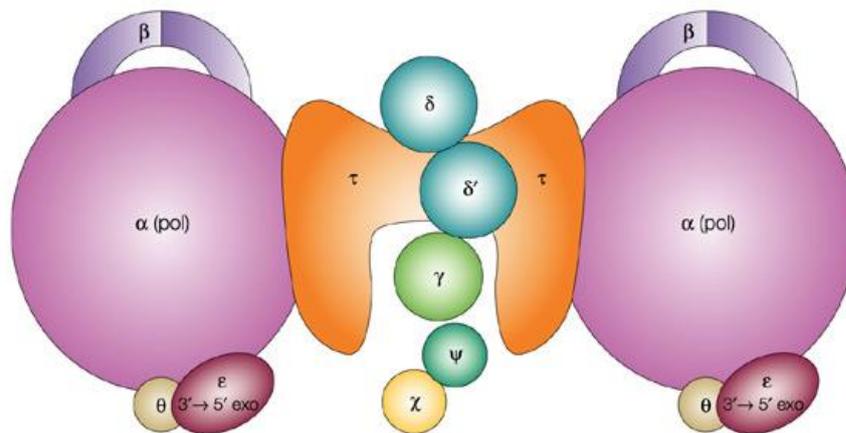


Figura 6. Rappresentazione schematica dell'oloenzima Pol III.
(Igor V. Shevelev et al. 2002)

1.7.2 Il Core

Il *core* catalitico dell'oloenzima Pol III è formato dall'assemblaggio delle subunità α (129.9 kDa), ϵ (27 kDa) e θ (8.7 kDa), codificate rispettivamente dai geni *dnaE*, *dnaQ* e *holE*. L'assemblaggio lineare segue lo schema α - ϵ - θ , con ϵ che, dal punto di vista strutturale, funge da ponte tra le subunità α e θ .

L'unica tra le tre subunità del complesso del *core* che è dotata di attività polimerasica è la subunità α , ma gli aspetti strutturali più importanti saranno discussi più dettagliatamente nei prossimi paragrafi.

La subunità ϵ (codificata dal gene *dnaQ*) è invece quella responsabile dell'attività esonucleasica in direzione 3'-5' all'interno del *core*, migliorando la fedeltà replicativa della

subunità α adiacente. La subunità ϵ è una proteina conservata e di fondamentale importanza presente in tutti i gram-negativi, mentre non è stata rintracciata nessuna proteina omologa espressa in batteri gram-positivi. Tuttavia è stato constatato un alto grado di omologia tra la regione N-terminale di DnaQ e la porzione N-terminale delle polimerasi dei gram-negativi (Ozawa, K. et al. 2008). Esistono infatti due subdomini della subunità ϵ : il dominio N-terminale essenziale per l'attività esonucleasica e il dominio C-terminale deputato al legame con la subunità α .

La subunità θ non dimostra avere alcuna attività enzimatica. È interessante notare a tal proposito che se da un lato *dnaE* e *dnaQ* sono geni essenziali per l'attività replicativa, dall'altro *holE* non sembra produrre effetti letali nel caso in cui la sua espressione fosse inibita. Questo ci conduce ad un ruolo di supporto strutturale di θ che si traduce in un miglioramento dell'attività esonucleasica di ϵ e la formazione di un complesso più stabile tra α e ϵ (Lifsics, M. R. et al. 1994). La subunità ϵ è intrinsecamente instabile poiché *in vitro* tende ad aggregare e precipitare mentre *in vivo* la regione C-terminale è facile bersaglio delle proteasi ClpP e GroL. Il legame con θ le conferirebbe dunque una maggiore stabilità migliorandone per estensione anche la sua attività.

È proprio questo campo di influenze, insieme al *clamp loader* e allo *sliding clamp*, che genera l'alta fedeltà replicativa e l'elevata processività dell'oloenzima Pol III.

1.7.3 Il *Clamp Loader*

Il *clamp loader* è un complesso multiproteico formato da 7 subunità 3τ , δ , δ' , χ , ψ , che operando sinergicamente permettono sia l'aggancio degli *sliding clamps* sui primers a RNA presenti nel ssDNA, sia la sintesi dei due filamenti di DNA sugli stampi (*leading* e *lagging*), collegando i *cores* catalitici sia tra di loro che all'elicasi (McInerney, P. et al. 2007). Le subunità τ dotate di attività ATPasica, legando ATP producono un cambiamento conformazionale in δ , detta "chiave inglese", che ora può agganciare e aprire lo *sliding clamp*, mentre è δ' , chiamata "statore", a modulare il contatto tra β e δ (Jeruzalmi, D. et al. 2001). Le proteine χ e ψ invece non posseggono alcuna proprietà catalitica ma si dimostrano utili dal punto di vista strutturale: ψ supporta e stabilizza l'assemblaggio tra 3τ , δ e δ' oltre che fare da ponte tra τ e χ , che invece promuove la nucleofilamentazione del ssDNA da parte delle SSB, al fine di proteggerlo dal riappaiamento (fig. 7).

Solo una volta che è avvenuto il *legame* tra i β *clamps* e il resto dell'assemblaggio l'oloenzima diventa più veloce e più processivo.

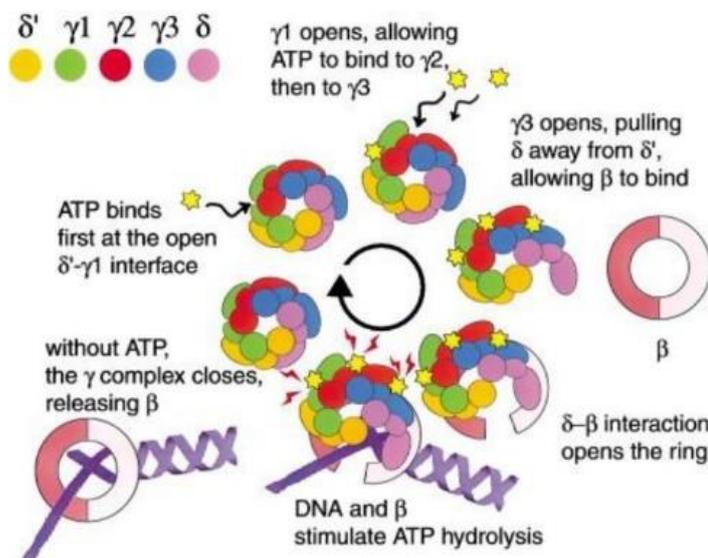


Figura 7. Meccanismo di caricamento e apertura del β -clamp da parte del clamp loader. (Jeruzalmi, O'Donnell and Kuriyan 2001)

1.7.4 Sliding Clamp

Lo *sliding clamp* è composto da un dmero β unito ad anello con una cavità di circa 35 Å. La presenza di una arginina e una glutammina disposte in maniera decentrata rispetto alla cavità fa sì che il ssDNA una volta legato sia inclinato di 22 gradi rispetto all'asse, agevolando di fatto l'aggiunta di nucleotidi da parte di α e le fasi di distacco e aggancio da una polimerasi all'altra in caso di necessità (Jeruzalmi, D. et al. 2001).

1.7.5 La subunità α -917

La subunità α è una proteina di 1160 amminoacidi di cui si conosce solo la struttura terziaria di una sua forma tronca, ovvero priva degli amminoacidi dal 918 al 1160 presenti nella regione C-terminale (Lamers, M. H. et al. 2006). La sua struttura si può riassumere in 4 domini ben distinti: palmo (residui 271-432 e 511-560), dita (residui 561-911), pollice (residui 433-510) e il dominio PHP (residui 1-255) (fig. 8). Al centro, tra palmo, dita e pollice vi è la cavità catalitica in grado di accogliere il DNA mediante l'interazione con i residui basici presenti. Il dominio del palmo presenta una regione ad alto grado di conservazione tra le altre polimerasi fin ora conosciute: mostra la presenza all'interno del foglietto formato da 5 filamenti β della triade catalitica costituita da 3 aspartati. Due di questi aspartati sono atti a coordinare il magnesio utile per il meccanismo

fosfotransferasico, mentre il terzo attiva l'ossidrile-3' rendendolo più nucleofilo e reattivo verso il fosfato- α del nucleotide entrante. A valle del sito attivo, in cui avviene l'aggiunta del nucleotide, è collocata una seconda cavità tra il dominio PHP e il palmo. È in questa regione che avverrebbe l'idrolisi del pirofosfato risultante dalla reazione di polimerizzazione. Successivi studi sul dominio PHP della polimerasi di *T. thermophilus* hanno evidenziato anche un'attività esonucleasica 3'-5' zinco dipendente; ciò farebbe supporre che il dominio PHP assista l'attività esonucleasica rimuovendo quei substrati verso i quali la subunità ϵ non risulta efficace (3'-fosfoglicolati e/o 3'-aldeidi- α - β -insature).

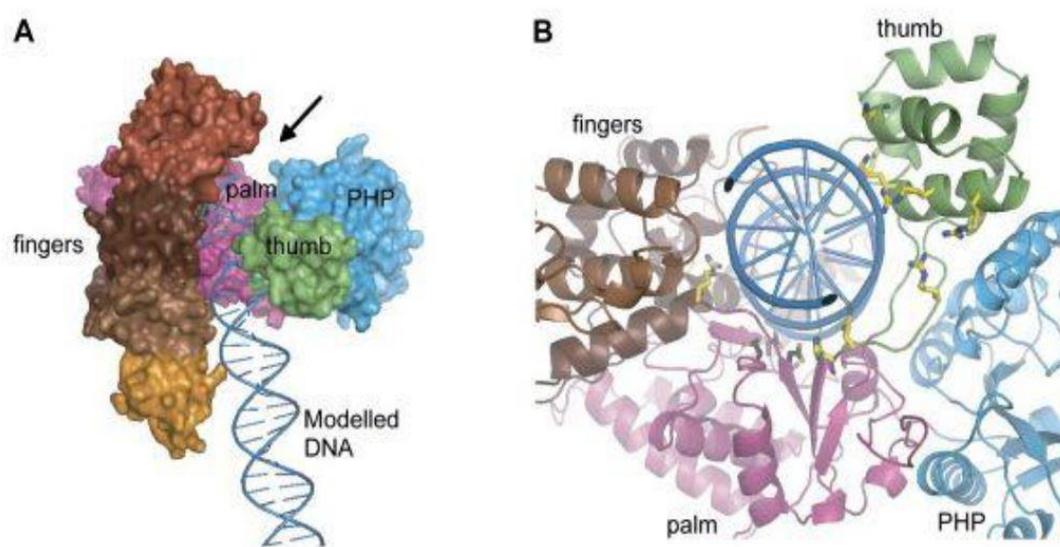


Figura 8. a) Rappresentazione subunità α e i suoi domini strutturali; b) Dettaglio del solco in cui viene accolto il DNA. In giallo sono evidenziati i residui carichi positivamente che interagiscono con il backbone del DNA. (Lamers et al. 2006)

1.8 Meccanismo replicativo della Pol III

La struttura antiparallela del DNA dà luogo ad un meccanismo di replicazione del genoma molto complesso in quanto i “movimenti” dei due *core*, operanti sui filamenti *leading* e *lagging*, sono vincolati dal fatto che hanno attività polimerasica solo in direzione 5'-3'. La conseguenza di questo vincolo è che il filamento *leading* sarà sintetizzato in maniera continua mentre il filamento *lagging* sarà sintetizzato in maniera discontinua, generando porzioni a singolo filamento e porzioni a doppio filamento, detti frammenti di *Okazaki* (McHenry, C. S. 2003).

L'azione preliminare è svolta dall'elicasi DnaG, una enzima toroidale con una cavità sufficientemente ampia da poter accogliere il dsDNA, che ha il compito di dividere le eliche del DNA. L'elicasi DnaG è dotata inoltre di 3 primasi ad essa legate che, immediatamente a valle del ssDNA risultante, depositano i primer ad RNA su entrambi i filamenti, indispensabili per l'attività della subunità α (Corn, J. E. et al. 2006). Una volta terminata la sintesi dei primer, interviene il *clamp loader* ad agevolare il legame di un β -*clamp* per *core* così da iniziare la sintesi, che per il filamento *lagging* procederà fino all'aggiunta di 1-2 kb. L'allineamento dei due filamenti di DNA porta alla formazione di un *loop* del filamento *lagging* che dopo la sintesi del frammento di *Okazaki* subirà un distacco (fig. 9).

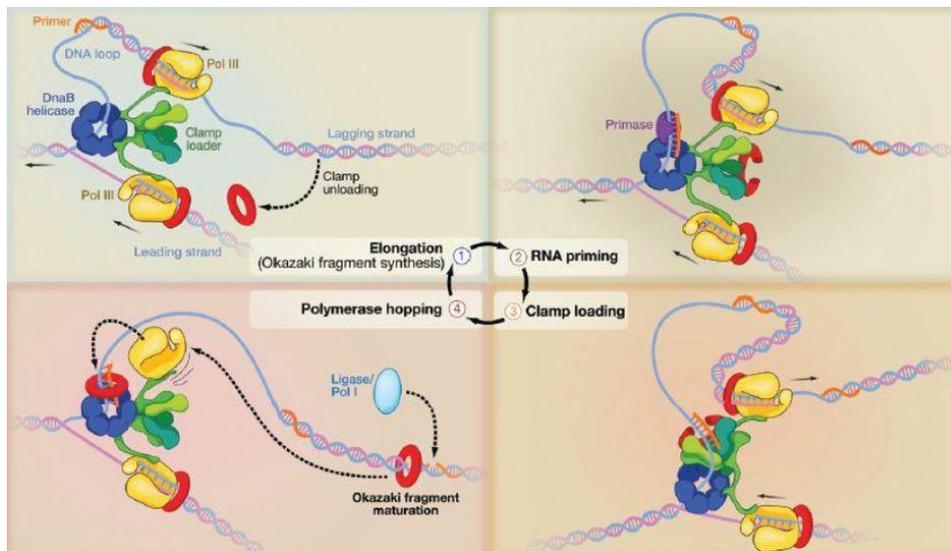


Figura 9. Meccanismo di sintesi del DNA sul filamento lagging da parte della DNA polimerasi III. (Yao and O'Donnell, 2010)

Il *core* si dissocia dal β -*clamp* operante sul filamento *lagging*, che ora avrà la possibilità di legarsi ad un altro β -*clamp* già “caricato” sul *clamp loader* dell'oloenzima. Successivamente al distacco saranno la pol I e la ligasi che interverranno rispettivamente per rimuovere i primer e unire i frammenti di *Okazaki*, rendendo il filamento continuo.

Il comportamento dell'enzima durante la fase di collasso del *loop* è descritto da due meccanismi: il modello a collisione e il modello del segnale o del rilascio prematuro. Il modello di rilascio a collisione prevede il distacco del β -*clamp* quando il *core* a cui è associato incontra l'estremità-5' di un frammento di *Okazaki* precedentemente sintetizzato. Nel caso del modello di rilascio con segnale invece il distacco sarebbe indotto dalla formazione dell'innesco di RNA posto a monte, prescindendo dal fatto che la sintesi del frammento di *Okazaki* sia stata completata o meno. Un ruolo importante in entrambi i

processi è svolto dalla porzione τ_c di τ . L'estremità C-terminale di α è associata sia al β -*clamp* sia al *clamp loader* tramite τ_c , ed è proprio in corrispondenza del segnale che quest'ultima interagirà con α provocando il distacco del β -*clamp* e l'aggancio con quello più a monte.

I modelli suggeriti hanno però il limite di considerare un *clamp loader* che contiene solo due subunità τ , mentre studi sul comportamento della proteina *in vivo* mostrano un assemblaggio preferenziale di un *clamp-loader* recante 3 subunità τ con la possibilità di poter legare tre *cores* che lavorano simultaneamente (fig. 10) (A. Hochkoepler, A. Stefan et al. 2015). Due *cores* operanti sul filamento *lagging* e uno sul filamento *leading* migliorano l'efficienza dell'oloenzima pol III compensando le diverse velocità di sintesi sui filamenti *leading* e *lagging*. Bisogna inoltre considerare che durante la replicazione del genoma in *E. coli* la sintesi del filamento *leading* non avviene in maniera totalmente continua in quanto l'oloenzima può incontrare degli ostacoli durante la replicazione, ad esempio l'evento in cui sullo stesso filamento sta agendo contemporaneamente una RNA polimerasi in fase di trascrizione. In questo caso la collisione dei due sistemi provoca il distacco sia dello *sliding clamp* sia dell'RNA polilmerasi, ma questo ostacolo viene oltrepassato utilizzando come innesco il filamento di mRNA lasciato dall'RNA polilmerasi, sul quale si aggancerà un nuovo *sliding clamp* associato ad un *core*. Un altro caso in cui la sintesi del *leading strand* potrebbe essere resa discontinua è il caso in cui la Pol III incontri un danno nel dsDNA. Quest'ultimo impedimento causerebbe il distacco della Pol III, che, in caso di appaiamento errato, verrebbe sostituita dalla Pol II oppure, nei casi in cui le lesioni sono così gravi da rendere la pol II inefficace, dalla pol IV/V, preferendo l'impiego di polimerasi a bassa fedeltà replicativa (Georgescu, R. E. et al. 2010).

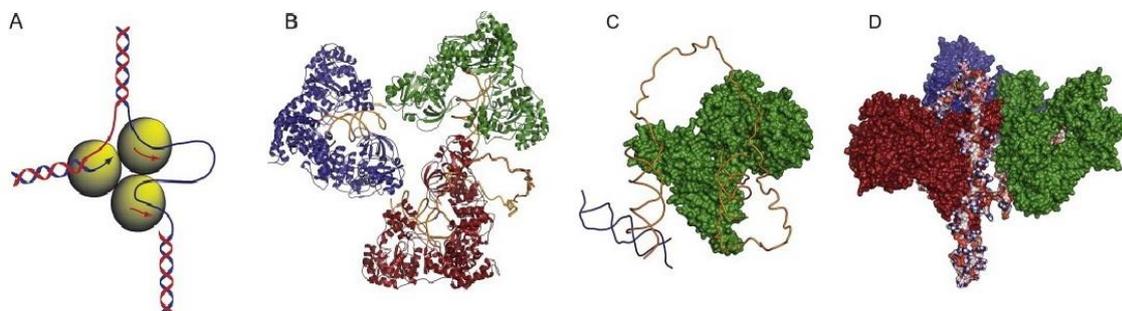


Figura 10. Modello molecolare di una replicasi trimerica. a) Rappresentazione di 3 subunità α implicate simultaneamente nella replicazione dei filamenti *leading* (freccia blu) e *lagging* (freccia rossa). b) Modello parziale di una replicasi trimerica associata a un DNA con uno e due primer. c) Dettaglio del DNA associato ad una singola subunità α . d) Vista laterale del modello riportato in figura 10B. (A. Hochkoepler, A. Stefan et al. 2015)

1.9 Sovraespressione della subunità α di *Deinococcus radiodurans* in *E. coli*

La complessità del modello dell'oloenzima pol III di *E. coli*, discussa nei precedenti paragrafi, si traduce in un processo estremamente laborioso per la sovraespressione di tutto l'enzima o anche solo di un parziale subassemblaggio della polimerasi III di *Deinococcus radiodurans* in *E. coli*. Questo conduce alla necessità di un'indagine preliminare sulla singola subunità α -Dr. L'estrazione e la purificazione della subunità α di *D. radiodurans* dal microorganismo risulta comunque un processo con pesanti limitazioni. Infatti la subunità α è espressa a livelli molto bassi, se paragonati a quelli di *E. coli*; inoltre, non si verifica un aumento di espressione neppure in seguito ad esposizione a radiazioni ionizzanti (Slade, D. et al. 2009). Questo fattore impedisce di purificare quantità sufficienti di α da poter utilizzare per caratterizzazioni successive.

Si è scelto dunque di percorrere la via dell'espressione eterologa. Il gene *dnaE* di *Deinococcus radiodurans* è stato clonato nel vettore d'espressione pBAD. Il plasmide, oltre a contenere il gene codificante per la subunità α , possiede anche il marcatore di resistenza all'ampicillina utile per selezionare le cellule correttamente trasformate da quelle che non hanno ricevuto il plasmide in seguito al processo di elettroporazione. Di conseguenza, condurre la coltura del ceppo di *E. coli* trasformato con pBAD- α Dr in terreno contenente ampicillina assicura la crescita selettiva delle cellule recanti il plasmide.

1.9.1 pBAD- α Dr

È il vettore d'espressione, ad alto numero di copie, impiegato nella sovraespressione della subunità α -Dr in *E. coli*. Nel vettore, attraverso l'utilizzo di enzimi di restrizione, è stato clonato il gene *dnaE-Dr* a monte del quale si trova il promotore P_{BAD} che ne regola l'espressione.

La trascrizione del gene *dnaE-Dr* è regolata dalla regione di controllo posta a monte del primo. Tale regione è costituita dal gene *araC*, che codifica il repressore/attivatore AraC, e dalla coppia operatore/promotore. La molecola repressore AraC, in forma dimerica, si lega ai siti *araO2* e *araI1*, provocando la formazione di un'ansa che impedisce all'RNA polimerasi di legarsi al sito del promotore, formato da due

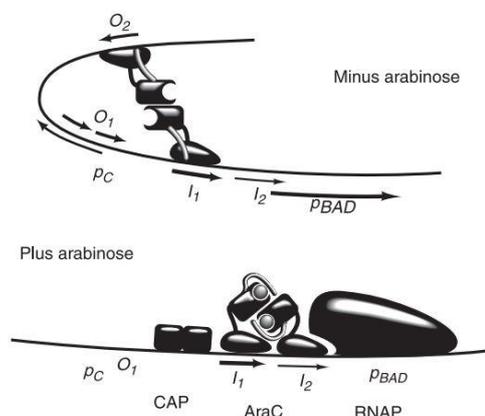


Figura 11. Rappresentazione della regolazione dell'operone *L-arabinosio*. (Robert Schleif, 2000)

sequenze separate e poste a -35 e -10 nucleotidi dal sito di inizio della trascrizione. Quando è presente l'arabinosio (induttore della trascrizione), questo si legherà ad AraC, inducendo un cambiamento conformazionale e impedendone il legame al DNA. Una molecola del dimero AraC si legherà al sito araI1, lasciando araI2 disponibile per il legame ad un altro monomero. In queste condizioni l'accesso della RNA polimerasi al promotore è favorito e la trascrizione può avere inizio (fig. 11).

1.9.2 Copri di inclusione

Precedenti ricerche riguardanti l'espressione e la purificazione della polimerasi α di *Deinococcus radiodurans* hanno evidenziato la formazione di una associazione apparentemente irreversibile tra la subunità α -Dr e l'RNA polimerasi di *E. coli* (Randi L., Tesi di Laurea Magistrale, Università di Bologna, A.A. 2013/2014). Questo impedisce la quantificazione di α -Dr in seguito a purificazione e potrebbe alterare l'attività polimerasica della DNA polimerasi. Prolungando i tempi di induzione si provoca invece la formazione di aggregati insolubili della subunità α -Dr che formano grani densi di proteina inattiva denominati corpi di inclusione.

I corpi di inclusione sono aggregati proteici di dimensioni considerevoli, la cui formazione avviene per diffusione della proteina nella sua forma solubile verso un sito di nucleazione generato dall'accumulo locale dell'enzima provocato generalmente da lunghi tempi di induzione. Il vantaggio di produrre la subunità α come corpi di inclusione consente di aggirare il problema del legame con l'RNA polimerasi, in quanto la proteina contenuta all'interno del grano contiene poche impurezze. D'altro canto le proteine contenute nei corpi di inclusione sono caratterizzate da conformazioni disordinate e da assenza di attività.

Ciò obbliga ad adottare due fasi preliminari alla purificazione, ovvero la solubilizzazione dei corpi di inclusione ed il successivo *refolding* della proteina bersaglio, per ripristinarne la struttura terziaria nativa con il conseguente recupero dell'attività enzimatica.

1.10 Scopo del lavoro

Il passo preliminare del presente elaborato è quello di mettere a punto un metodo solido e riproducibile per la sovraespressione della subunità α di *D. radiodurans* per via eterologa. L'ospite ideale per realizzare la sovraespressione è *E. coli*, microorganismo ampiamente discusso e impiegato per via della sua semplice manipolazione. Il ceppo di *E. coli* prescelto per la trasformazione con il plasmide pBAD-*dnaE* ha dato risultati poco soddisfacenti in termini di espressione della proteina nella sua forma solubile, motivo per cui si è rivolta l'attenzione alla possibilità di produrre la subunità α come corpi di inclusione, consentendo di aumentare la quantità di proteina prodotta (seppur in forma inattiva) e di evitare il legame irreversibile con l'RNA polimerasi.

Stabilito un protocollo ottimale per la produzione e l'estrazione da *E. coli* dei corpi di inclusione della proteina in esame, il lavoro si sposta verso un'indagine sul protocollo di solubilizzazione della proteina inattiva e di *refolding* alla forma nativa biologicamente attiva.

Successivamente alla purificazione tramite cromatografia liquida dell'enzima rinaturato è stato possibile ottenere quantità sufficienti di proteina pura e biologicamente attiva con la quale condurre saggi spettrofotometrici di attività enzimatica per valutare il comportamento dell'enzima *in vitro* simulando le condizioni di substrato attese *in vivo*.

È proprio in quest'ultimo frangente che si condensa lo scopo di questo lavoro. La conduzione dei saggi di attività enzimatica in condizioni ricombinative e non ricombinative (quindi in presenza o meno di RecA_{Ec} nell'ambiente di reazione) ci ha consentito di comprendere meglio il comportamento della pol III- α durante la fase di *strand invasion* mediata dalla ricombinasi e la successiva sintesi del neofilamento, contribuendo a chiarire alcuni aspetti dei meccanismi che intervengono lungo la via di riparazione del genoma danneggiato in *D. radiodurans* ancora poco discussi. Inoltre l'elaborazione di un sistema di espressione per la singola subunità α getterebbe le basi per sviluppare un sistema di co-espressione più complesso ove siano coinvolte anche altre subunità dell'oloenzima (τ - δ - δ'), in modo da poter verificare la tipologia di subassembaggio che spontaneamente avverrebbe *in vivo* e gli stimoli relativi tra le diverse subunità che ne migliorerebbero l'efficienza.

MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI

2.1.1 Ceppo batterico utilizzato

E. coli BW25993 (*lacI^q*, *hsdR514*, Δ *araBAD*_{AH33}, Δ *rhaBAD*_{LD78}), trasformato con il plasmide pBAD-*dnaE*¹, utilizzato per le prove di espressione e solubilità.

E. coli TOP10 (*F-*, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdMRS-mcrBC*), Δ *lacX74*, ϕ 80*lacZDM15*, *endA1*, *recA1*, *araD139*, Δ (*araA-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(*StrR*), *nupG*), trasformato con il plasmide pBAD-*dnaE*, utilizzato per ottenere i corpi di inclusione.

2.1.2 Plasmide

Il plasmide pBAD-*dnaE*, derivante dal plasmide commerciale pBAD-HisB (Invitrogen) (fig. 12) e assemblato precedentemente presso il laboratorio ospitante, è il vettore d'espressione nel quale è stato clonato il gene *dnaE* di *D. radiodurans* tra i siti di taglio NcoI (CCATGG che contiene la tripletta ATG che fungerà da *start codon* a monte di *dnaE* per l'RNA polimerasi) e PstI, mediante opportuni enzimi di restrizione. Il plasmide pBAD-*dnaE*, oltre a contenere il gene codificante per la subunità α di *D. radiodurans* (per il resto della trattazione sarà chiamata semplicemente subunità α), possiede la regione di controllo trascrizionale dell'operone *araBAD*, il marcatore recante il gene di resistenza all'ampicillina e l'origine di replicazione pBR322;

è inoltre un plasmide ad alto numero di copie (20- 25 per cellula).

2.1.3 Reagenti

I saggi di attività enzimatica hanno richiesto l'impiego dei seguenti enzimi per la caratterizzazione dell'attività polimerasica (in condizioni ricombinative e non):

- PPasi (Pirofosfatasi inorganica)

¹ *dnaE* di *D. radiodurans*

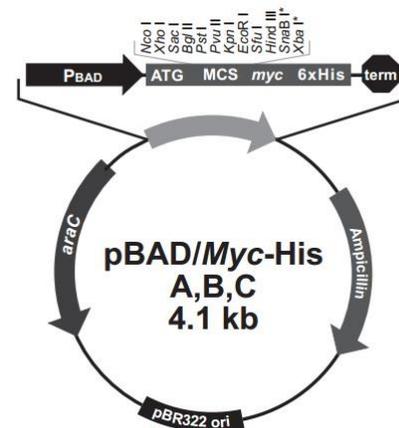


Figura 12. Rappresentazione schematica del plasmide pBAD-His. (Invitrogen)

- PNPasi (Purina nucleoside fosforilasi)
- XOD (Xantina ossidasi)
- RecA di *E. coli* (Recombinant A)
- LDH (L-lattato deidrogenasi)
- PK (Piruvato Chinasi)

E l'utilizzo dei seguenti substrati:

- Inosina
- β -NADH
- dNTPs (deossinucleotidi trifosfato)
- PNP-TMP (para-nitrofenol-timidina-5'-monofosfato; solo per attività esonucleasica)
- DNA attivato di timo di vitello
- DNA 40mer (polyA)
- DNA 75mer (polyA)

2.1.4 Terreni di coltura

Per coltivare i ceppi di *E. coli* BW25993 ed *E. coli* TOP10 è stato impiegato terreno di coltura Luria-Bertani, composto da:

- Triptone 10 g/l
- Estratto di lievito 5 g/l
- NaCl 10 g/l
- Agar 15 g/l (presente solo nella formulazione per terreno solido per coltura in piastra)

Al terreno di coltura sterilizzato tramite trattamento in autoclave con vapore a 120° C per 20 minuti viene aggiunta Ampicillina (100 μ g/ml finali) per la selezione del ceppo trasformante con il plasmide pBAD-*dnaE*.

2.2 METODI

2.2.1 Coltura Batterica

I ceppi di *E. coli* BW25993 ed *E. coli* TOP10, trasformati con il plasmide pBAD-*dnaE* sono stati coltivati preliminarmente in piastra su terreno solido Luria-Bertani (da ora in avanti sarà citato con l'acronimo LB) additivato dell'antibiotico specifico per la selezione.

Ottenuta la coltura in piastra una singola colonia del microorganismo viene prelevata e trasferita in 1 ml di terreno liquido LB al fine di preparare una pre-coltura da inoculare successivamente in terreno fresco per rilanciare la crescita in un volume maggiore. La coltivazione del preinoculo è stata effettuata per 15 ore a 37°C. La diluizione del preinoculo in volumi di coltura più grandi, per ottenere una quantità maggiore di biomassa, è stata effettuata secondo le modalità discusse nei prossimi paragrafi.

2.2.2 Prove di espressione e solubilità

Con l'obiettivo di indagare il livello di espressione della subunità α -Dr in *E. coli* sono state effettuate una serie di colture preliminari al fine di individuare le condizioni ottimali di crescita alle quali la proteina di interesse fosse espressa nella maggior quantità e nella sua forma solubile.

Il pre-inoculo di *E. coli* BW25993 succitato è stato diluito (rispettivamente 1:250 e 1:125) in due colture parallele condotte a 30°C e 37° da 25 ml ciascuna. Successivamente alla crescita² le colture sono state divise in 8 aliquote da 5 ml (4 per la coltura condotta a 30°C e 4 per quella a 37°C) per poter indurre l'espressione³ con arabinosio⁴ combinando le diverse temperature di crescita con quelle di induzione.

I campioni risultanti, il cui estratto grezzo sarà analizzato successivamente in elettroforesi SDS-PAGE, sono i seguenti:

- *E. coli* BW25993, crescita 37°C e induzione a 37°C
- *E. coli* BW25993, crescita 37°C e induzione a 30°C
- *E. coli* BW25993, crescita 37°C, non indotto a 37°C (controllo negativo)
- *E. coli* BW25993, crescita 37°C, non indotto a 30°C (controllo negativo)
- *E. coli* BW25993, crescita 30°C e induzione a 30°C
- *E. coli* BW25993, crescita 30°C e induzione a 37°C

² 9 ore

³ 8 ore

⁴ 1 mM finale

- *E. coli* BW25993, crescita 30°C, non indotto a 30°C (controllo negativo)
- *E. coli* BW25993, crescita 30°C, non indotto a 37°C (controllo negativo)

Il secondo stadio di questa indagine preliminare si è rivolto allo studio dell'effetto di diversi tempi di induzione sull'espressione a temperature costanti. Le colture cellulari sono state realizzate secondo lo schema seguente:

- *E. coli* BW25993, crescita 30°C e induzione a 30°C per 3 o 8 ore
- *E. coli* BW25993, crescita 37°C e induzione a 37°C per 3 o 8 ore

I risultati ottenuti, discussi più accuratamente nella prossima sezione, dopo l'analisi dei campioni grezzi hanno portato a considerare di indurre l'espressione della proteina per intervalli di tempo più lunghi, generando un accumulo che porterebbe alla formazione di corpi di inclusione della subunità α . Il protocollo elaborato è stato il seguente:

- Preparazione di preinoculo di *E. coli* TOP10, da singola colonia, contenente LB-ampicillina e crescita overnight;
- Rilancio 1:500 del preinoculo in 250 ml di coltura⁵ e crescita per 9 ore;
- Induzione con arabinosio⁶ per 15 ore.

Il pellet di cellule raccolto tramite centrifugazione⁷ è stato risospeso in 30 ml di tampone di lisi⁸ e sottoposto a sonicazione. Con l'impiego di ultrasuoni viene provocata la lisi della parete cellulare permettendo la successiva raccolta del precipitato, costituito perlopiù da corpi di inclusione, mediante centrifugazione⁹.

Al fine di rimuovere la maggior parte di materiale idrofobico che co-precipita insieme ai corpi inclusi, il pellet risultante dalla sonicazione è stato sottoposto a 3 lavaggi con tampone contenente TRITON X-100 (0,1 % v/v finale), un detergente neutro che agevola la solubilizzazione dei residui di materiale proteico insolubile lasciando i corpi inclusi della subunità α pressochè puri.

2.2.3 Solubilizzazione, dialisi e *refolding*

Studi precedenti riguardanti la solubilizzazione e il successivo refolding delle proteine hanno fornito le informazioni necessarie per individuare (Brown, W. C. et al, 1993) un protocollo ottimale per la denaturazione reversibile con urea 6 M e il recupero della struttura terziaria della subunità α .

⁵ Sono state realizzate 6 incubazioni parallele da 250 ml al fine di ottenere 1,5 l di coltura cellulare.

⁶ 1 mM finale.

⁷ Ad un'accelerazione di 4000 g per 45 minuti usando contenitori da 400 ml per centrifuga.

⁸ TRIS HCl 50 mM a pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 5mM, DTT 2.5 mM.

⁹ Ad un'accelerazione di 4000 g per 20 minuti.

Sono stati disciolti 250 mg di corpi inclusi in 25 ml di tampone denaturante¹⁰ e lasciati in agitazione per 3 ore. In questo modo si è osservata una progressiva perdita di torbidità del campione, indice dell'avvenuta solubilizzazione degli aggregati proteici.

La fase successiva è consistita nella rimozione controllata dell'urea contenuta nel tampone tramite una dialisi con gradiente di concentrazione a stadi. Ad ogni stadio di dialisi è stata abbattuta gradualmente la concentrazione di urea mediante l'impiego di 4 diversi tamponi contenenti urea a concentrazione via via decrescente:

- TRIS-HCl 200 mM a pH 8 // NaCl 500 mM // MgCl₂ 2 mM // β-mercaptoetanolo 5 mM // Urea 4 M;
- TRIS-HCl 100 mM a pH 8 // NaCl 500 mM // MgCl₂ 2 mM // β-mercaptoetanolo 5 mM // Urea 2 M;
- TRIS-HCl 50 mM a pH 8 // NaCl 200 mM // MgCl₂ 2 mM // β-mercaptoetanolo 5 mM // Urea 1 M;
- TRIS-HCl 50 mM a pH 8 // NaCl 50 mM // MgCl₂ 2 mM // β-mercaptoetanolo 5 mM // Glicerolo 10% v/v.

Prima di passare alle fasi di purificazione il campione deve essere di nuovo sottoposto a dialisi contro un tampone non contenente MgCl₂¹¹. Questo passaggio è necessario per sostituire il riducente β-mercaptoetanolo con il più efficace DTT¹² e per abbattere la concentrazione di MgCl₂, che altrimenti porterebbe alla saturazione dell'eparina, nel caso in cui venga usata questo tipo di fase stazionaria.

2.2.4 Cromatografia di affinità

La purificazione dell'enzima α ha richiesto l'impiego di due cromatografie di affinità, utilizzando due colonne con fasi stazionarie differenti.

2.2.4.1 Cibacron Blue

Utilizzato originariamente come colorante per tessuti, il cromoforo Cibacron Blue 3G-A è stato oggetto di studio durante gli anni 70 (Thompson, S.T. et al. 1976) per la sua pseudo-specificità nel legare un ampio spettro di proteine. Sia libero in soluzione ed ancora

¹⁰ TRIS-HCl 200 mM a pH 8, NaCl 500 mM, β-mercaptoetanolo 5 mM e urea 6 M

¹¹ TRIS-HCl 50 mM a pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 2.5 mM, Glicerolo 10% v/v.

¹² Ditiotreitolo ((2S,3S)-1,4-Bis-sulfanilbutano-2,3-diolo)

di più quando è coniugato alla matrice di destrano¹³, il colorante Cibacron Blue 3G-A mostra una notevole affinità per quella che viene chiamata “dinucleotide fold” o Piega di Rossmann, un motivo strutturale formato da α -eliche e foglietti- β , alternati tra loro secondo lo schema β - α - β - α - β , conservato in molte proteine che sono in grado di legare nucleotidi come le deidrogenasi, DNA polimerasi e RNA polimerasi.

I coloranti generalmente sono costituiti da una porzione apolare (gruppi aromatici) e un'altra polare (gruppi solfonati), ma il cromoforo Cibacron Blue 3G-A (fig. 13) rappresenta la sintesi di tutte le caratteristiche strutturali e stereochemiche atte a simulare il ruolo di un nucleotide favorendo il legame della subunità α alla fase stazionaria della colonna.

L'eluizione¹⁴ in questo caso, a differenza del prossimo stadio di purificazione, non viene effettuata applicando un gradiente di NaCl ma imponendo il passaggio della fase mobile contenente NaCl 1 M, dal momento che la subunità α sarà l'unica in grado di interagire con il colorante. Raccolta la frazione relativa al picco derivante dall'eluizione del campione, la si è sottoposta a dialisi preliminare per l'abbattimento della concentrazione di MgCl₂, non necessario e interferente con il prossimo stadio di purificazione.

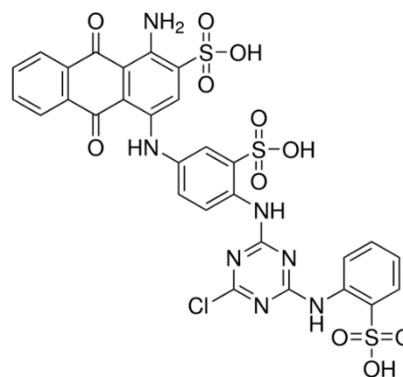


Figura 13. Struttura del colorante Cibacron Blue 3G-A. (Sigma-Aldrich)

2.2.4.2 HiTrap Heparin

Anche questo passaggio di purificazione si basa sull'affinità della fase stazionaria nei confronti di alcune classi di proteine.

L'eparina (fig. 14), conosciuta principalmente per le sue capacità anticoagulanti, è un glicosaminoglicano altamente solfato che possiede la capacità di legare tutte le proteine che interagiscono con gli acidi nucleici come le DNA polimerasi e le RNA polimerasi, simulando la struttura polianionica del DNA. La selettività e il potere separativo, analogamente a quanto menzionato riguardo al colorante Cibacron Blue, risultano ancora

¹³ Probabilmente dovuto al fatto che la Piega di Rossmann risulta “aperta” abbastanza da accogliere il cromoforo e la matrice di destrano, quando invece altri tipi di enzimi che posseggono un sito di legame per nucleotide non presentano la stessa accessibilità (Thompson, S.T. et al. 1976).

¹⁴ Composizione tamponi di eluizione per Cibacron Blue: A) TRIS-HCl 50 mM a pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 2.5 mM, glicerolo 10% v/v. B) TRIS-HCl 50 mM a pH 8, NaCl 2 M, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 2.5 mM, glicerolo 10% v/v.

più accentuati quando la molecola di eparina è legata alla matrice di agarosio della fase stazionaria.

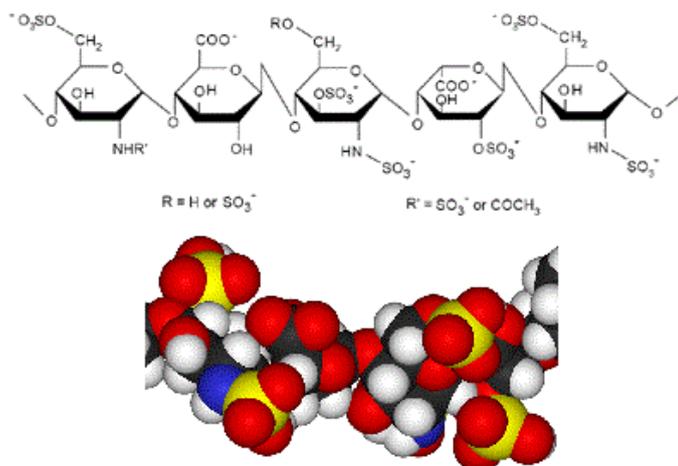


Figura 14. Struttura dell'eparina e rappresentazione 3D

Al momento del caricamento del campione ottenuto dalla dialisi del campione eluito dalla colonna Cibacron Blue, solo la frazione attiva¹⁵ della miscela di proteine formerà interazioni stabili con la fase stazionaria e verrà trattenuta dall'eparina. Tutte le altre proteine derivanti da un processo di refolding che ha portato ad una struttura terziaria scorretta non interagiranno con la fase stazionaria e verranno, dunque, eluite con il fronte, rilevate spettrofotometricamente e raccolte in un'unica frazione denominata *flow-through*.

Terminata la fase di caricamento e lavaggio, è stato applicato un gradiente di forza ionica¹⁶ fino ad indurre il rilascio da parte dell'eparina e l'eluizione dell'enzima¹⁷. Sin dall'inizio dell'applicazione del gradiente di forza ionica l'eluato è stato raccolto in frazioni, rilevate spettrofotometricamente dal detector posto a valle del sistema cromatografico. Mediante i picchi dal cromatogramma è stato possibile individuare quelle frazioni che contenevano presumibilmente la subunità di interesse e che di conseguenza sono state sottoposte ad indagine elettroforetica per visualizzarne la composizione.

¹⁵ Contenente solo la subunità α che ha recuperato la corretta struttura terziaria del sito di legame con il DNA (delimitato dai subdomini palmo, pollice e dita).

¹⁶ Da 50 mM a 600 mM di NaCl in 50 ml raccogliendo frazioni da 0.9 ml

¹⁷ Composizione tamponi di eluizione per HiTrap Heparin: A) TRIS-HCl 50 mM a pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 2.5 mM, glicerolo 10% v/v. B) TRIS-HCl 50 mM a pH 8, NaCl 2 M, EDTA 1 mM, DTT 2.5 mM, glicerolo 10% v/v.

2.2.5 Elettroforesi SDS-PAGE

Gli estratti grezzi delle prove di espressione preliminari e le frazioni di interesse derivanti dal processo di purificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi SDS-PAGE¹⁸. Messa a punto nel 1964 (Ornstein, L. 1964) e successivamente implementata, l'elettroforesi SDS-PAGE è una tecnica consente di indentificare le componenti proteiche presenti in una miscela tramite l'azione denaturante dell'SDS, del β -mercaptoetanololo e del calore. Le proteine sottoposte a bollitura infatti subiscono una denaturazione irreversibile della struttura terziaria e permettendo di eliminare eventuali differenze di migrazione delle proteine dovute alla loro forma caratteristica. Contemporaneamente, l'azione dell'SDS, contenuto nel sample buffer¹⁹ con cui viene precedentemente trattato il campione, rende negativamente carica la superficie proteine. La carica negativa netta, impartita dal tensioattivo, unita all'applicazione del potenziale elettrico alla cella permette alle proteine di "correre" in gel formati da poliacrilammide²⁰, che fungono da setaccio molecolare separandole in base alla massa molecolare.

L'elettroforesi è stata effettuata in celle MiniProtean BioRad con voltaggio costante a 120V, per una durata di circa 2 ore. Al termine della corsa elettroforetica, il gel è stato immerso in una soluzione di *Coomassie Blue Brilliant R-250* e lasciato in agitazione per due ore al fine di agevolare la penetrazione nel gel e la formazione del complesso colorante-proteina.

A ciò è seguita la fase di decolorazione (*destaining*) durante la quale il gel viene immerso in una soluzione di etanolo 30% e acido acetico 10%, al fine di rimuovere l'eccesso di colorante e rendere evidenti il *pattern* proteico presente nel campione di interesse.

2.2.6 Saggi di attività

Al fine di comprendere meglio le caratteristiche enzimatiche della subunità α sono stati effettuati saggi specifici per caratterizzare la reazione di polimerizzazione del DNA ed evidenziare l'eventuale presenza di un'attività ricombinativa

¹⁸ *Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

¹⁹ Composizione Sample Buffer 5X: TRIS-HCl, pH 6.8, 500 mM; glicerolo 2.7 M; SDS 10%; blu di bromofenolo 0.5%; β -mercaptoetanololo 5%.

²⁰ Composizione STACKING GEL: Acrilammide 4%; tris-HCl, pH 6.8, 0.25 M; SDS 0.2%; temed 0.1%; APS 0.25%. Composizione RUNNING GEL: Acrilammide 12,5%; TRIS-HCl, pH 8.8, 0.25 M; SDS 0.2%; temed 0.1%; APS 0.25%.

intrinseca indipendente dall'intervento di RecA_{Ec}, studiandone il comportamento in condizioni ricombinative.

2.2.6.1 Saggio di attività polimerasica

La reazione, catalizzata dalla subunità α , consiste nell'incorporazione di nucleotidi ad una catena di DNA parentale; tale reazione genera come sottoprodotto pirofosfato inorganico (PP_i) con una stechiometria 1:1 tra nucleotide aggiunto e PP_i prodotto. Il saggio di attività si basa sulla presenza *in vitro* di enzimi detti accoppianti, che idrolizzando il PP_i ne permettono la rilevazione indiretta. Il PP_i viene processato dall'enzima PPasi²¹ producendo due molecole di ortofosfato, il quale subisce una serie di reazioni successive, ad opera della PNPasi²² e XOD²³, che porteranno alla formazione di acido urico, questa volta con la stechiometrica 2:1 tra acido urico prodotto e nucleotide aggiunto. Mediante questo tipo di saggio è possibile seguire la cinetica di reazione misurando l'assorbanza a 293 nm dell'acido urico in funzione del tempo.

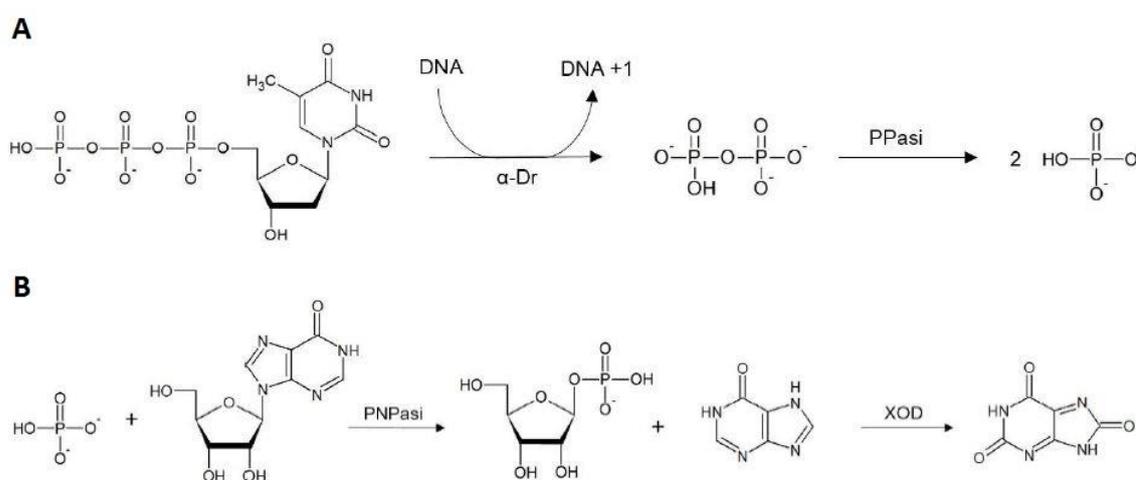


Figura 15. a) Reazione di aggiunta di un nucleotide al DNA in fase di replicazione e la conseguente produzione di ortofosfato ad opera della PPasi; b) Fasi di reazione che, dal rilascio di fosfato portano alla formazione di acido urico.

La reazione è stata condotta in cuvette di quarzo da 1 ml con la seguente miscela di reazione²⁴:

- TRIS-HCl a pH 8 100 mM
- MgCl₂ 5 mM

²¹ Pirofosfatasi inorganica

²² Purina nucleoside fosforilasi

²³ Xantina ossidasi

²⁴ Concentrazioni finali

- Inosina 0.25 mM
- Pol III – α Dr 35 nM
- DNA (40mer, 60 mer (polyA) o DNA attivato) 1 μ M
- PPasi 10 mU/ml
- PNPasi 50 mU/ml
- XOD 500 mU/ml
- dTTPs o dNTPs²⁵ 100 μ M

2.2.6.2 Saggio di attività polimerasica in condizioni ricombinative

Per evidenziare un'eventuale dipendenza dell'attività polimerasica della subunità α dalla presenza nell'ambiente di reazione della ricombinasi RecA di *E. coli* è stato elaborato un saggio combinato che permette di rilevare indipendentemente e allo stesso tempo i contributi relativi derivanti dall'attività polimerasica e dall'attività ricombinativa (idrolisi di ATP da parte di RecA).

Sono stati progettati due DNA artificiali in grado di ricombinare: il primo a doppio filamento (A e B) con un'estremità 3'-overhang e il secondo a singolo filamento (C).

A: 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATATATATATATATATATGCTGGTGG-3'
 B: 3'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATATATATATATATATATA-5'

C: 3'-TATATATATATATATATATACGACCACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-5'

Il 3'-overhang del filamento A contiene la sequenza χ (in nero), simulando di fatto l'estremità che genererebbe l'enzima RecJ nelle prime fasi di riparazione del genoma danneggiato. Inoltre, la sequenza χ funge anche da segnale per il distacco di RecJ e il successivo intervento di RecA. In questo modo il filamento C, essendo stato progettato in modo da avere una regione complementare a χ , può formare una regione a doppio filamento con il 3'-overhang presente sul filamento A. Solo mediante l'intervento di RecA viene scalzato il filamento B e il filamento C si appaia definitivamente alla sequenza complementare presente su A (in rosso) (fig. 16).

A questo punto può iniziare la polimerizzazione da parte della subunità α che sfrutterà l'estremità 3' del filamento C come primer proseguendo la polimerizzazione in direzione 3'. Senza l'evento ricombinativo la polimerizzazione non avverrebbe in quanto l'unico nucleotide aggiunto alla miscela di reazione è il dTTP²⁶.

²⁵ Per il saggio con DNA attivato di timo di vitello

²⁶ Deossitimidina trifosfato

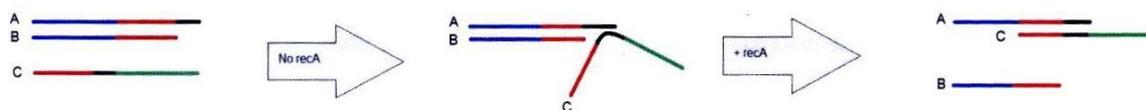


Figura 16. Fasi del processo ricombinativo. Annealing della sequenza χ e strand invasion del filamento C ad opera di RecA.

Durante la fase di nucleofilamentazione RecA idrolizza una molecola di ATP per ogni tripletta di ssDNA a cui si lega generando ortofosfato e ADP, mentre la subunità α durante la polimerizzazione libera pirofosfato che viene scisso in ortofosfato il quale viene utilizzato dagli enzimi accoppianti per formare acido urico. I diversi prodotti finali di reazione, ADP e acido urico, permettono di determinare indipendentemente l'assorbanza delle due specie in soluzione in funzione del tempo.

Mentre l'ortofosfato derivante dall'idrolisi dell'ATP contribuisce alla formazione di acido urico insieme a quello prodotto dalla polimerizzazione, l'ADP intraprende un percorso differente. Ad opera dell'enzima PK²⁷, l'ADP viene fosforilato e ripristinato ad ATP a scapito del PEP²⁸ che invece si defosforila andando a formare piruvato. Il piruvato risultante reagisce con β -NADH mediante l'enzima LDH²⁹ per formare acido lattico e NAD^+ .

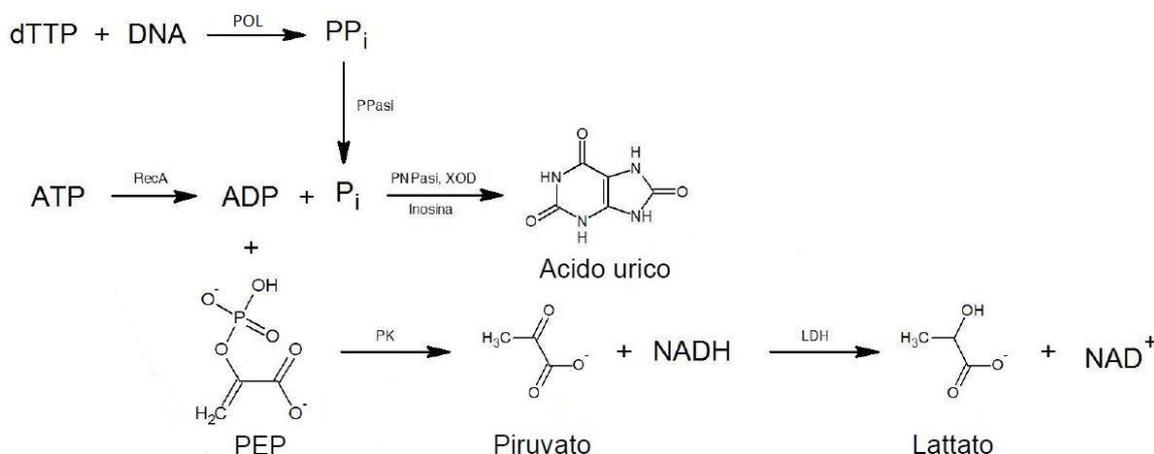


Figura 17. Schema di reazione del saggio di attività polimerasica con enzimi accoppianti (PK e LDH) in condizioni ricombinative.

Effettuando una serie di spettri ad intervalli di tempo prefissati si può osservare l'aumento di assorbanza dovuto alla formazione di acido urico a 293 nm e il calo di assorbanza del NADH consumato dalla LDH a 340 nm. Elaborando le intensità delle bande di assorbimento in funzione del tempo si ottengono delle cinetiche delle due attività (ricombinativa e polimerasica) misurate simultaneamente.

²⁷ Piruvato chinasi

²⁸ Fosfoenol piruvato

²⁹ Lattato deidrogenasi

La miscela di reazione è stata ottenuta miscelando in una cuvetta di quarzo i seguenti reagenti:

- TRIS-HCl a pH 8 100 mM
- MgCl₂ 10 mM
- KCl 20 mM
- Inosina 250 μM
- PEP 500 μM
- β-NADH 250 μM
- ATP 100 μM
- RecA 1 μM
- PPasi 40 mU/mL
- PNPasi 50 mU/mL
- XOD 500 mU/mL
- PK 1,5 U/mL
- LDH 6 U/mL
- dTTP 100 μM
- ssDNA 1 μM
- dsDNA 1 μM
- Pol III - αDr 35 nM

2.2.6.3 Saggio di attività ricombinativa

Per valutare la possibilità che la subunità α possa avere una attività ricombinativa intrinseca oltre a quella polimerasica è stato sfruttato il saggio di attività precedentemente discusso ma condotto in assenza di RecA e ATP. Una eventuale variazione di assorbanza a 293 nm è dovuta in questo caso alla ricombinazione del DNA substrato da parte della subunità α e alla successiva polimerizzazione del filamento C.

La miscela di reazione è stata formulata mantenendo le stesse concentrazioni dei reagenti del saggio precedente in una cuvetta di quarzo da 1 ml.

2.2.6.4 Saggio di attività esonucleasica

Il protocollo messo a punto per questo saggio prevede la simulazione di un *mismatch* mediante un nucleotide artificiale, ovvero il para-nitrofenol-timidina-5'-monofosfato (PNP-TMP). In seguito all'appaiamento errato l'eventuale attività esonucleasica della subunità α idrolizza il PNP-TMP, liberando in soluzione para-nitrofenolato dal caratteristico colore giallo, il quale a pH 8 è molto stabile e assorbe ad una lunghezza d'onda di 420 nm. Il metodo si basa sulla rilevazione dell'assorbanza, in funzione del tempo, del PNP liberato in soluzione che è funzione dell'attività enzimatica.

La miscela di reazione è stata preparata in una cuvetta da 1 ml unendo i seguenti reagenti:

- TRIS-HCl 100 mM a pH 8
- MnCl₂ 1 mM

- PNP-TMP 3 mM
- Pol III – α Dr 35 nM

2.3 *Deinococcus radiodurans*: coltura, estrazione, purificazione

Con lo scopo di isolare la subunità α direttamente dal microorganismo originario si è deciso di effettuare una coltura cellulare di *D. radiodurans* e di separare mediante cromatografia le componenti dell'estratto cellulare grezzo.

2.3.1 Coltura cellulare

Per realizzare la coltura del ceppo *D. radiodurans* R1 è stato usato terreno TGY composto da:

- Triptone 10 g/l
- Glucosio 5 g/l
- NaCl 5 g/l
- Estratto di lievito 5 g/l
- Agar 15 g/l (per la preparazione di terreno solido in piastra)

In questo caso il terreno di coltura non è stato trattato con antibiotici in quanto *D. radiodurans* non reca alcun plasmide, quindi nessun marcatore di resistenza ad uno specifico antibiotico.

Preliminarmente sono state effettuate due colture, della durata di 16 ore e da 24 ore, per valutare la velocità di duplicazione cellulare e il tempo necessario per arrivare alla fine della fase esponenziale della crescita del microorganismo.

Il protocollo ottimale per ottenere una quantità sufficiente di biomassa è stato individuato nelle seguenti condizioni:

- Crescita in terreno solido su piastra¹
- Preparazione preinoculo da singola colonia in 5 ml di TGY²
- Rilancio di 1 ml di preinoculo in 20 ml di terreno fresco e crescita per 24 ore
- Rilancio di 2 ml della coltura precedente in 200 ml di TGY fresco³ e crescita per 24 ore.

Tutte le fasi di crescita summenzionate sono state effettuate a 30° C.

¹ 48 ore

² 15 ore

³ Sono state effettuate 6 batch di coltura per un totale di 1,2 L

Il pellet di cellule ottenuto mediante centrifugazione della coltura di *D. radiodurans* è stato risospeso e suddiviso in aliquote, necessarie nelle fasi successive per effettuare prove di lisi e la successiva separazione attraverso cromatografia a scambio ionico della miscela proteica estratta.

2.3.2 Prove di lisi e purificazione

Come discusso nel capitolo introduttivo, *D. radiodurans* possiede delle caratteristiche che lo rendono unico anche dal punto di vista strutturale. Pur risultando un batterio gram-positivo possiede una complessa parete cellulare multistrato, molto più simile a quella dei procarioti gram-negativi. Tuttavia il protocollo elaborato per la lisi di *E. coli* non risulta allo stesso modo efficace con *D. radiodurans*, motivo per cui sono state effettuate delle prove per individuare le condizioni ottimali di estrazione. Si è studiata l'azione preliminare del lisozima sulla parete cellulare e l'influenza di diversi fattori fisici, quali la sonicazione, l'agitazione con biglie di vetro e cicli di congelamento e scongelamento.

Le prove effettuate sono state effettuate su 5 aliquote di cellule relative a circa 60 ml di coltura ciascuna:

- Risospensione del pellet in 2 ml di lisozima⁴, incubazione per 1 ora e 3 cicli di sonicazione
- Risospensione del pellet in 2 ml di lisozima, incubazione per 1 ora e 3 cicli di congelamento e scongelamento
- Risospensione del pellet in 2 ml di lisozima, incubazione per 1 ora e agitazione con biglie
- Risospensione del pellet in 2 ml di lisozima, incubazione per 1 ora, 3 cicli di sonicazione e agitazione con biglie
- Solo sonicazione (3 cicli)

L'estratto proteico di ogni aliquota è stato quantificato tramite saggio colorimetrico micro-Bradford per stabilire quali siano le condizioni che portano ad un resa di estrazione maggiore.

I risultati ottenuti da queste prove hanno consentito di elaborare un sistema di lisi costituito dai seguenti interventi:

- Risospensione del pellet in 2 ml di lisozima e incubazione per 1 ora
- 6 cicli di sonicazione

⁴ Lisozima 10 mg/ml per tutte le prove

- 2 cicli di French press

Questa procedura è stata effettuata con un pellet di cellule relativo a 500 ml di coltura e l'estratto proteico è stato sottoposto ad elettroforesi SDS-PAGE e successivamente separato tramite cromatografia a scambio ionico⁵.

Le proteine rilevate tramite elettroforesi SDS-PAGE nelle frazioni risultanti dalla cromatografia a scambio ionico sono state identificate mediante analisi di massa.

⁵ Composizione tamponi di eluizione per scambio ionico: A) TRIS-HCl 50 mM a pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 2.5 mM, glicerolo 10% v/v. B) TRIS-HCl 50 mM a pH 8, NaCl 2 M, EDTA 1 mM, DTT 2.5 mM, glicerolo 10% v/v.

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Prove di espressione e di solubilità e formazione dei corpi di inclusione

L'estratto cellulare grezzo di ogni campione risultante dalle prove di espressione, condotte secondo le modalità descritte nel paragrafo 2.2.2, è stato analizzato mediante elettroforesi SDS-PAGE. Di seguito sono mostrati i due gel relativi all'analisi elettroforetica dei campioni alle prove di crescita e di induzione a temperature diverse.

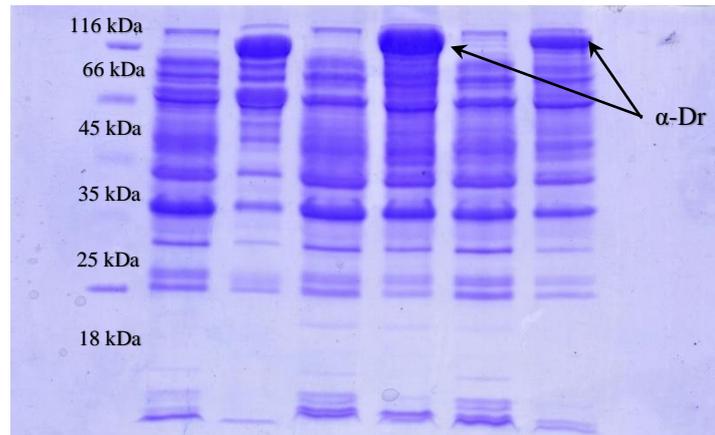


Figura 19. Elettroforesi SDS-PAGE dell'estratto proteico delle colture cellulari condotte a 30° C e 37° C, entrambe indotte a 37° C per 8 ore.

LANE 1) Marker; LANE 2) *E. coli* TOP 10 pBAD-dnaE pGOOD-dnaX-dnaQ-holE non indotto; LANE 3) *E. coli* TOP 10 pBAD-dnaE pGOOD-dnaX-dnaQ-holE indotto; LANE 4) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE (Dr), crescita 37° C, non indotto 37° C; LANE 5) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE (Dr), crescita 37° C, indotto 37° C; LANE 6) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE (Dr), crescita 30° C, non indotto 37° C; LANE 7) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE (Dr), crescita 30° C, indotto 37° C;

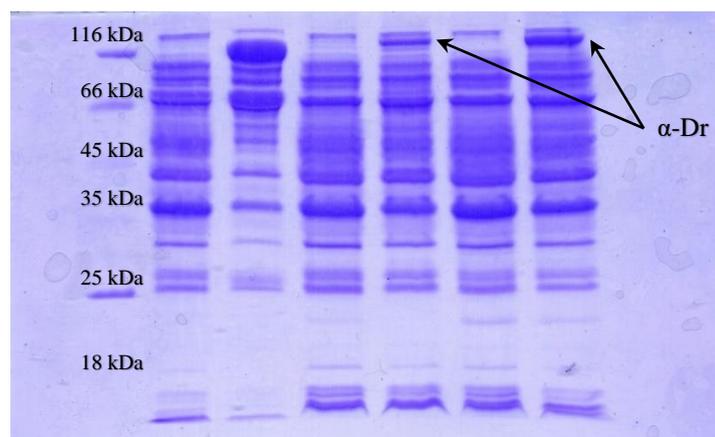


Figura 18. Elettroforesi SDS-PAGE dell'estratto proteico delle colture cellulari condotte a 30° C e 37° C, entrambe indotte a 30° C per 8 ore.

LANE 1) Marker; LANE 2) *E. coli* TOP 10 pBAD-dnaE pGOOD-dnaX-dnaQ-holE non indotto; LANE 3) *E. coli* TOP 10 pBAD-dnaE pGOOD-dnaX-dnaQ-holE indotto; LANE 4) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE (Dr), crescita 30° C, non indotto 30° C; LANE 5) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE (Dr), crescita 30° C, indotto 30° C; LANE 6) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE (Dr), crescita 37° C, non indotto 30° C; LANE 7) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE (Dr), crescita 37° C, indotto 30° C;

La concentrazione degli estratti proteici è stata normalizzata diluendo o concentrando le colture cellulari fino ad ottenere un'OD¹ pari ad 1. I pellets di cellule ottenuti sono stati trattati direttamente con *Sample Buffer*² e bollitura per favorire la lisi della parete e la fuoriuscita dell'estratto proteico. Dai risultati ottenuti emerge un alto livello di espressione della subunità α per le colture condotte e indotte a 37° C (fig. 18), evidenziato dai controlli negativi dei campioni non indotti, mentre si rileva una diminuzione di espressione per i campioni la cui crescita è stata condotta a 30° C (fig. 19). Sono stati inclusi nella corsa elettroforetica anche gli estratti da *E. coli* TOP10, indotto (controllo positivo) e non indotto (controllo negativo) e recante i plasmidi codificanti per il subassemblaggio τ - α - ϵ - θ della pol III di *E. coli*, del quale si conosce l'efficienza del sistema di espressione.

Per quanto riguarda le induzioni effettuate a 30° C si riscontra un calo di espressione della subunità α generalizzato, seppur è constatabile un leggero aumento per quei campioni la cui crescita è stata condotta a 37° C.

Questa prima fase ci ha consentito di saggiare il grado di espressione ma non ci ha fornito informazioni circa la solubilità delle proteine estratte in quanto il trattamento con gli agenti denaturanti è stato effettuato a spese dell'estratto grezzo totale e non con la frazione solubile. Le informazioni sulla solubilità della proteina in esame sono state ottenute con la fase successiva di questa indagine preliminare. Di seguito sono stato riportati i gel elettroforetici relativi alle prove di espressione con le quali si è voluto studiare l'effetto del tempo di induzione sulla qualità della porzione solubile.

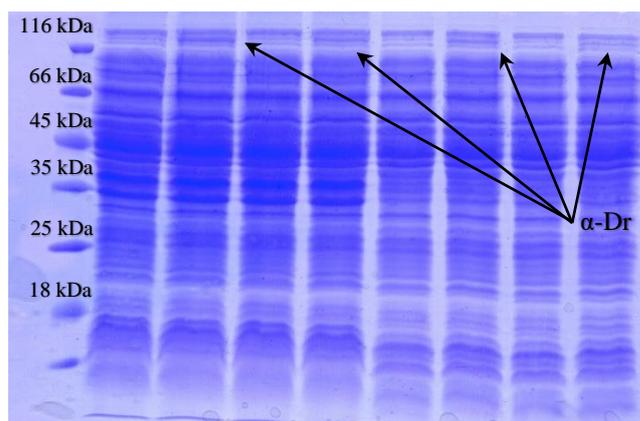


Figura 20. Elettroforesi SDS-PAGE dell'estratto dalla coltura condotta a 30° C a diversi tempi di induzione. LANE 1) Marker; LANE 2) *E. coli* BW25993 pBAD-*dnaE* sonicato, non indotto 3 ore; LANE 3) *E. coli* BW25993 pBAD-*dnaE* sonicato, indotto 3 ore; LANE 4) *E. coli* BW25993 pBAD-*dnaE* sonicato, non indotto 8 ore; LANE 5) *E. coli* BW25993 pBAD-*dnaE* sonicato, indotto 8 ore; LANE 6) *E. coli* BW25993 pBAD-*dnaE* surnatante, non indotto 3 ore; LANE 7) *E. coli* BW25993 pBAD-*dnaE* surnatante, indotto 3 ore; LANE 8) *E. coli* BW25993 pBAD-*dnaE* surnatante, non indotto 8 ore; LANE 9) *E. coli* BW25993 pBAD-*dnaE* surnatante, indotto 8 ore.

¹ Optical Density

² Composizione *Sample Buffer* 5X: TRIS-HCl, pH 6.8, 500 mM; glicerolo 2.7 M; SDS 10%; blu di bromofenolo 0.5%; β -mercaptoetanololo 5%.

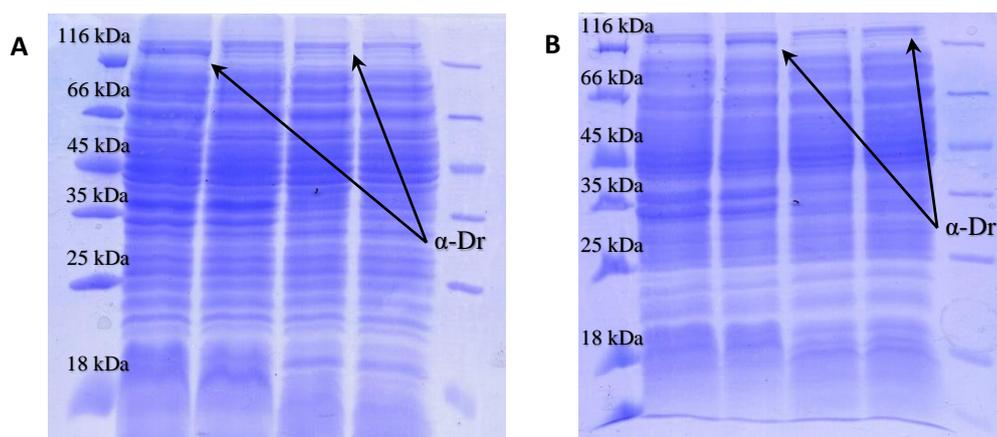


Figura 21. Elettroforesi SDS-PAGE dell'estratto dalla coltura condotta a 37° C a diversi tempi di induzione. a) LANE 1) Marker; LANE2) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE sonicato, indotto 3 ore; LANE 3) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE sonicato, non indotto 3 ore; LANE 4) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE surnatante, indotto 3 ore; LANE 5) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE sonicato, non indotto 3 ore; b) LANE 1) Marker; LANE 2) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE sonicato, non indotto 8 ore; LANE 3) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE sonicato, indotto 8 ore; LANE 4) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE surnatante, non indotto 8 ore; LANE 5) *E. coli* BW25993 pBAD-dnaE surnatante, indotto 8 ore.

Ogni campione di coltura cellulare è stato sottoposto a sonicazione e successiva centrifugazione¹ per eliminare la porzione proteica insolubile formata principalmente da proteine di membrana e proteine dalla struttura terziaria alterata che porta ad aggregazione e conseguente precipitazione.

I campioni non indotti presenti nei gel sono sfruttati anche in questo caso come controllo negativo per evidenziare la presenza della subunità α nei campioni indotti.

Dall'analisi elettroforetica è emerso che coltivando e inducendo il ceppo di *E. coli* BW25993 a 37° C (fig 21A e 21B) non vi è traccia della proteina in esame nell'estratto solubile dell'indotto a 3 o 8 ore (surnatante), seppure i livelli di espressione fossero generalmente molto più alti del ceppo coltivato e indotto a 30° C. Questo può essere dovuto alla produzione della proteina in esame sotto forma di corpi di inclusione, ovviamente assenti nel surnatante.

La presenza della subunità α è riscontrabile invece nella porzione solubile (surnatante) dell'estratto di *E. coli* BW25993 coltivato e indotto a 30° C (fig. 20), seppure si può apprezzare una leggera diminuzione della quantità di proteina solubile per il surnatante della coltura indotta per 8 ore, dovuta probabilmente a fenomeni degradativi oppure, come nel caso precedente, alla formazione di corpi di inclusione generati dall'accumulo locale della subunità α .

¹ Ad una accelerazione di 16000 g per 20 minuti

Il livello di espressione in queste condizioni non risulta sufficientemente alto da consentire di avere una quantità di proteina sufficiente derivante dalla purificazione per analisi successive. Si è quindi deciso di sfruttare la formazione dei corpi di inclusione, dilatando i tempi di induzione, ottenendo facilmente elevate quantità della subunità α anche se in forma inattiva.

I corpi inclusi sono stati ottenuti secondo il protocollo discusso nella sezione 2.2.2 del capitolo precedente e sono stati analizzati tramite elettroforesi SDS-PAGE. A seguire sono mostrati i risultati ottenuti su gel di poliacrilammide.

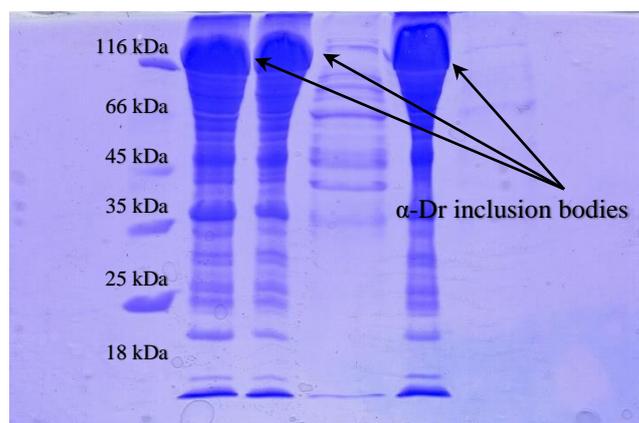


Figura 22. Elettroforesi SDS-PAGE dei corpi inclusi della subunità α . LANE 1) Marker; LANE 2) Estratto totale dopo la sonicazione; LANE 3) Pellet contenente corpi inclusi dopo il primo lavaggio; LANE 4) Surnatante ottenuto dal primo lavaggio dei corpi inclusi; LANE 5) Pellet contenente i corpi inclusi dopo il secondo lavaggio; LANE 6) Surnatante ottenuto dal secondo lavaggio dei corpi inclusi.

L'analisi elettroforetica ha confermato l'ipotesi della formazione di corpi inclusi che mediante i successivi lavaggi con TRITON X-100 sono diventati il prodotto maggioritario del precipitato insolubile (fig. 22), rendendo di fatto più semplice una successiva separazione cromatografica, previa solubilizzazione e *refolding* delle proteine contenute nella miscela.

3.2 Purificazione

3.2.1 Cromatografia di affinità: Cibacron Blue

Successivamente alla fase di dialisi durante la quale buona parte dei corpi inclusi riassumono la propria struttura terziaria nativa, è stata effettuata la prima fase di purificazione mediante cromatografia liquida con resina Cibacron Blue seguendo la procedura discussa nel capitolo precedente.

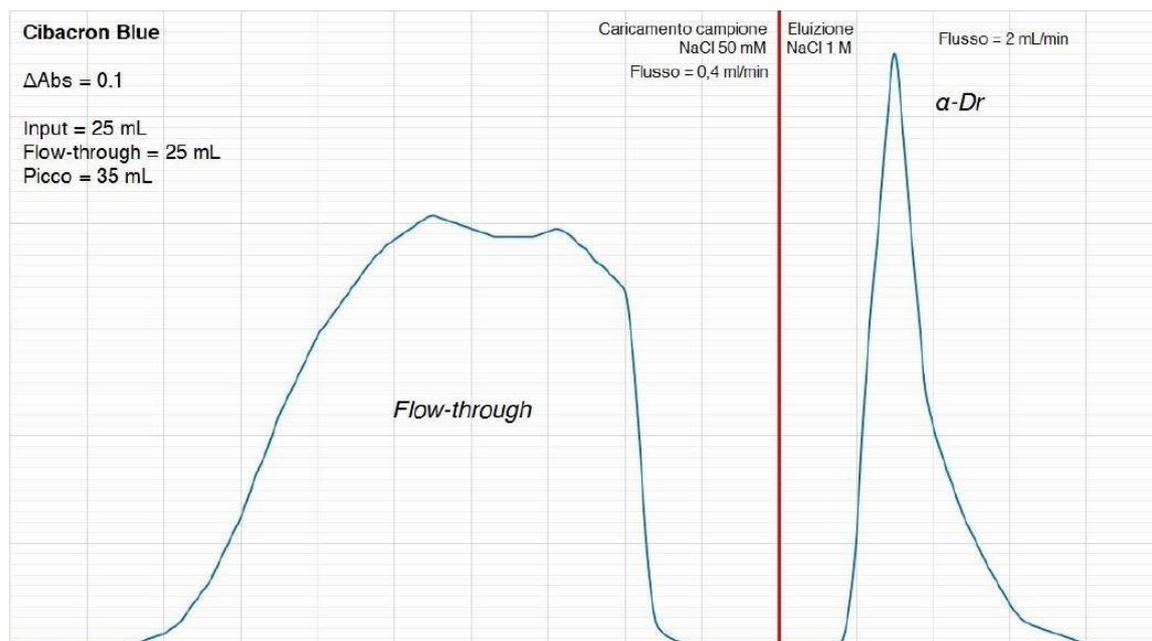


Figura 23. Cromatogramma Cibacron Blue.

Il cromatogramma (fig. 23) mostra un picco molto evidente dovuto alla presenza della subunità α che è stata quantificata, insieme al contenuto proteico nel *flow-through* e nell'input, mediante saggio colorimetrico micro-Bradford che ha portato ai seguenti risultati:

	Volume	Concentrazione	Massa	Resa
Input	25 ml	273 $\mu\text{g/mL}$	6.82 mg	/
Flow-through	25 ml	85 $\mu\text{g/mL}$	2.13 mg	31.3 %
Picco	30 ml	99 $\mu\text{g/mL}$	2.96 mg	43.4 %
Coda	30 ml	28 $\mu\text{g/mL}$	0.84 mg	12.3 %

Tabella 1. Contenuto proteico delle frazioni risultanti dalla purificazione con Cibacron Blue. Dei 6.82 mg di proteina caricati in colonna il 43.4% ha recuperato una struttura terziaria ottimale per favorire il legame con il colorante Cibacron Blue.

L'analisi SDS-PAGE ha permesso di rivelare il contenuto di ogni frazione e constatare qualitativamente il grado di purezza ottenuto da questo stadio di purificazione.

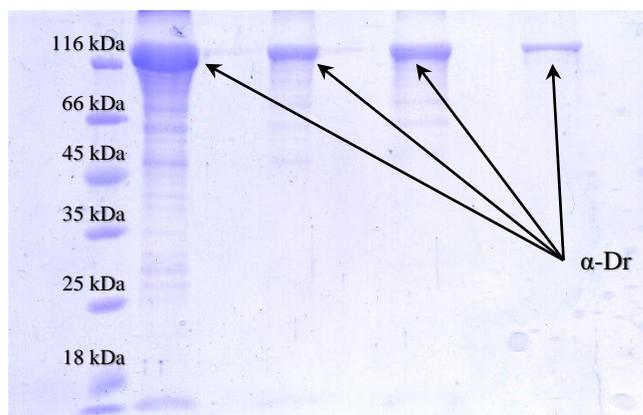


Figura 24. Gel elettroforetico delle frazioni ottenute. LANE 1) Marker; LANE 2) Input; LANE 3) flow-through; LANE 4) Picco; LANE 5) Coda.

3.2.2 Cromatografia di affinità: HiTrap Heparin

Dopo aver sottoposto a dialisi per l'eliminazione del $MgCl_2$ la frazione relativa al picco dello stadio cromatografico precedente, quest'ultima è stata ulteriormente purificata mediante HiTrap Heparin secondo le modalità discusse nel capitolo precedente.

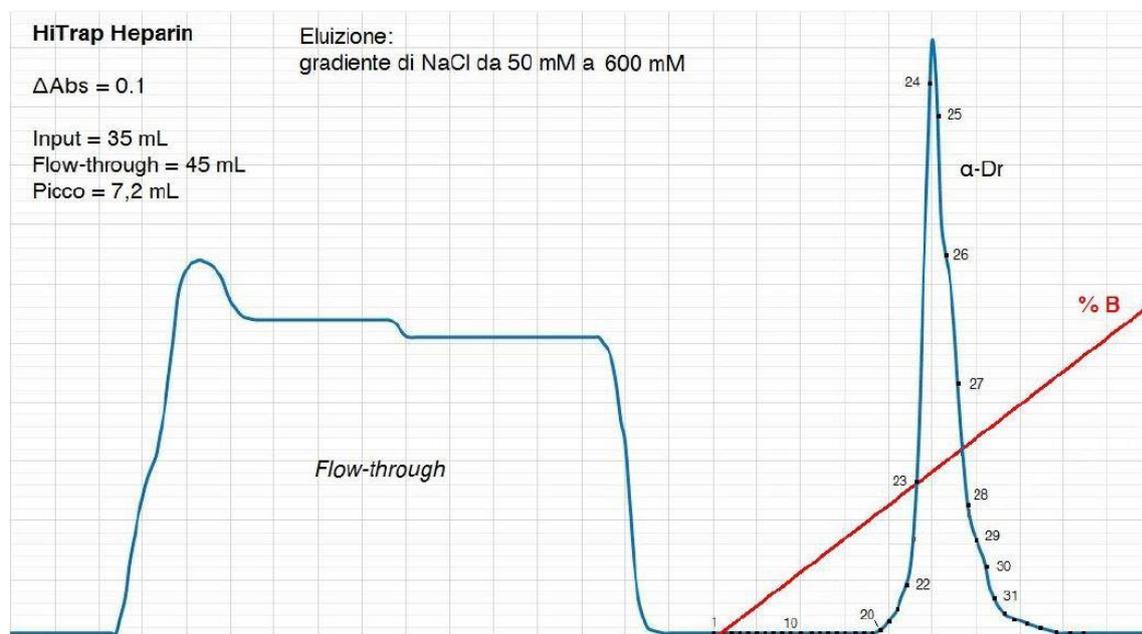


Figura 25. Cromatogramma HiTrap Heparin.

Il contenuto proteico delle varie frazioni del cromatogramma è stato determinato quantitativamente mediante saggio colorimetrico micro-Bradford con i seguenti risultati:

	Volume	Concentrazione	Massa	Resa
Input	35 ml	84 µg/mL	2.94 mg	/
Flow-through	45 ml	42 µg/mL	1.89 mg	64.3 %
Frazione 24	0.9 ml	141 µg/mL	126 mg	/
Picco	7.2 ml	126 µg/mL	0.906 mg	30.8 %

Tabella 2. Contenuto proteico delle frazioni raccolte dalla purificazione con HiTrap Heparin. Dei 2.94 mg di proteina caricati in colonna, solo il 30.8% (ovvero il 13.4 % sui 6.82 mg di proteina caricati in Cibacron Blue) la struttura terziaria adatta al legame con l'eparina.

Le frazioni che compongono il picco mostrato dal cromatogramma (fig. 25) sono state analizzate mediante elettroforesi SDS-PAGE per verificare la presenza della subunità α .

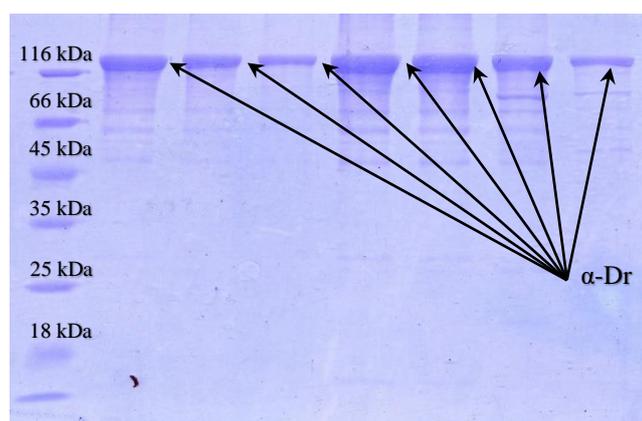


Figura 26. Dettaglio delle frazioni componenti il picco osservato sul cromatogramma per HiTrap Heparin. Da sinistra verso destra: Marker, Input, FT, fraz. 22, 24, 25, 27, 29.

Si può notare dal gel elettroforetico che l'andamento dell'intensità colorimetrica delle bande della subunità α è consistente con il picco mostrato sul cromatogramma.

3.3 Caratterizzazione enzimatica

3.3.1 Saggio di attività polimerasica

Mediante questo tipo di saggio è stato analizzato l'effetto di diverse variabili sull'attività della subunità α , a partire dalla verifica del substrato più affine a questo enzima. A questo scopo sono stati impiegati due DNA artificiali, un 40-mero e un 75-mero, entrambi recanti un *overhang* polyA di lunghezze diverse, rispettivamente di 25 e 60 nucleotidi, e un primer complementare al polyA da 15 nucleotidi. Sfruttando la reazione caratteristica della subunità α , descritta al paragrafo 2.2.6.1, è possibile monitorare la variazione di assorbanza dell'acido urico in funzione del tempo. Conoscendo il suo coefficiente di estinzione molare ($12,65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e la stechiometria della reazione sono state tracciate le seguenti curve cinetiche espresse in termini di ortofosfato prodotto in funzione del tempo.

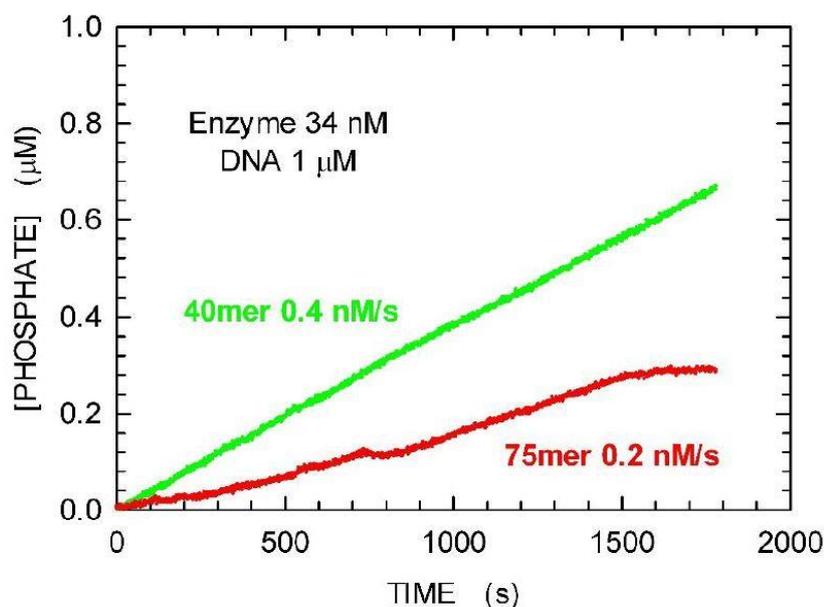


Figura 27. Attività polimerasica della subunità α di *D. radiodurans* in presenza dei differenti DNA, 40-mero e 75-mero.

Il grafico mostra che il substrato maggiormente affine alla polimerasi di *D. radiodurans* è il 40-mero (fig. 27). L'andamento lineare e la maggior pendenza della curva cinetica riguardante il 40-mero sono un indice di maggiore velocità di reazione e superiore processività dell'enzima.

Il secondo parametro indagato è stata l'influenza dei cationi secondari nell'ambiente di reazione sull'attività polimerasica della subunità α di *D. radiodurans* in relazione con

l'omologa polimerasi di *E. coli*. A tal proposito sono state valutate le cinetiche di reazione di entrambi gli enzimi in presenza di KCl e NaCl 200 mM.

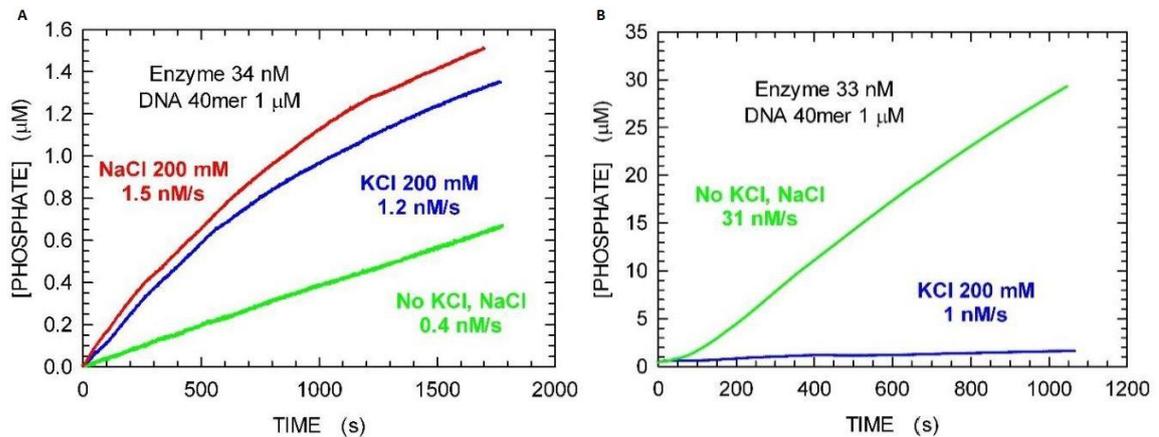


Figura 28. Attività polimerasica di α -Dr (A) e di α -Ec (B) in presenza di cationi secondari.

Nelle condizioni mostrate i due enzimi, α -Dr e α -Ec, mostrano comportamenti nettamente opposti (fig. 28). In assenza di cationi secondari la subunità α di *E. coli* catalizza la reazione ad una velocità maggiore rispetto all'enzima di *D. radiodurans* (verde), ma in presenza di KCl 200 mM la polimerasi di *E. coli* risulta fortemente inibita (la velocità di reazione cala di 30 volte) mentre l'attività di α -Dr aumenta di 3 volte. Allo stesso tempo non si riscontrano differenze significative tra l'attivazione provocata da KCl (blu) e NaCl (rosso). Per questo motivo si potrebbe affermare che l'attivazione non è da attribuire ad un ruolo specifico dei cationi K^+ ed Na^+ ma ad un aumento generale della forza ionica. Si osservi, inoltre, come l'aumento di forza ionica conduca ad una perdita di linearità delle cinetiche di reazione in entrambi in casi.

Si è voluto testare, infine, l'effetto di un terzo tipo di substrato, il DNA attivato di timo di vitello, sull'attività polimerasica della subunità α di *D. radiodurans* in relazione con l'omologo enzima di *E. coli*.

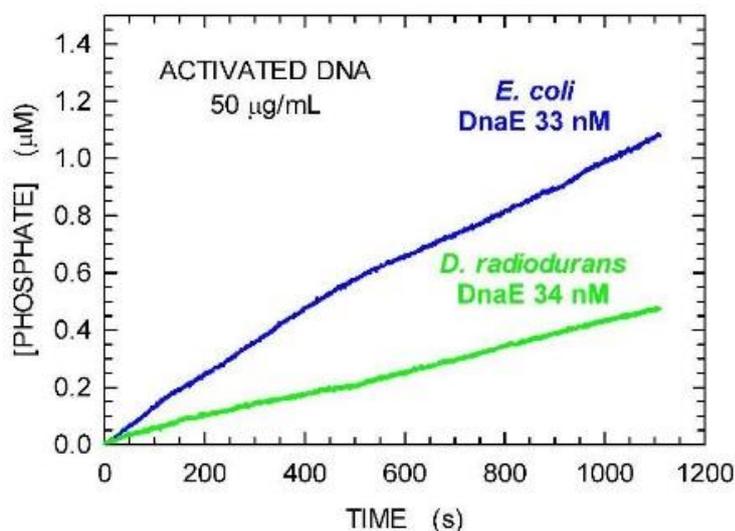


Figura 29. Attività polimerasica di α -Dr (verde) e α -Ec (blu) in presenza di DNA attivato di timo di vitello come substrato.

Anche in queste condizioni di reazione i due enzimi mostrano comportamenti opposti. In presenza di questo tipo di substrato, in un certo senso meno “artificiale²”, l'attività polimerasica di *E. coli* subisce un calo pari a 30 volte rispetto all'attività posseduta in presenza di un DNA 40-mero, mentre quella di *D. radiodurans* mostra un leggero miglioramento. Anche l'andamento delle cinetiche è molto caratteristico: entrambe presentano andamenti lineari con cambi di pendenza repentini. Mentre per α -Ec la pendenza diminuisce progressivamente, per α -Dr si osserva che la velocità di reazione aumenta dopo ciascun intervallo a regime lineare.

3.3.2 Saggio di attività polimerasica in condizioni ricombinative

Prima si saggiare l'attività polimerasica in condizioni ricombinative si è ritenuto opportuno verificare la validità del saggio combinato, conducendo una prova in bianco senza la subunità α , determinando così l'attività della sola ricombinasi RecA di *E. coli*. La formazione del complesso RecA-ssDNA porta all'idrolisi di una molecola di ATP formando ADP e ortofosfato, i quali andranno a generare due segnali distinti, ma con un

² Il DNA attivato di timo di vitello è un filamento di DNA sottoposto a sonicazione, motivo per il quale presenta porzioni a singolo e a doppio filamento. Le porzioni a doppio filamento fungono da primer per la polimerizzazione del singolo filamento.

rapporto reciproco pari al rapporto tra i coefficienti di estinzione molare dell'acido urico e del β -NADH.

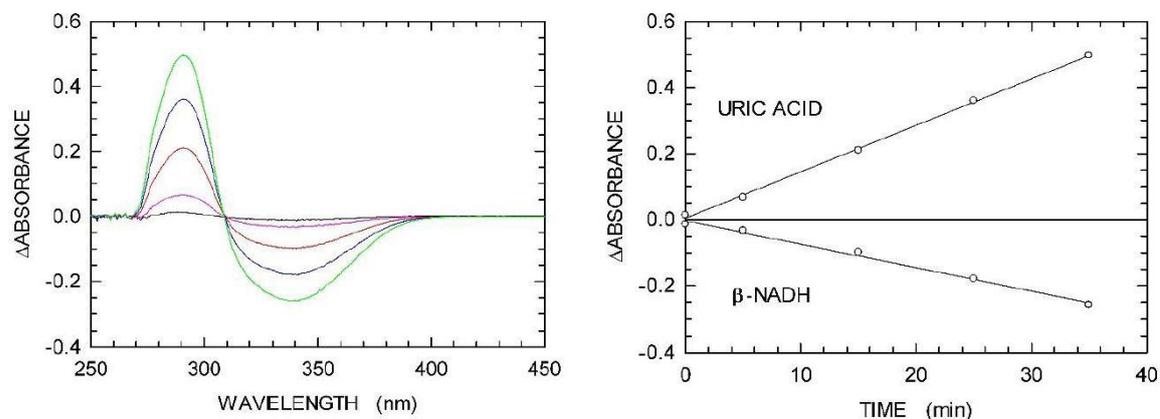


Figura 30. Controllo negativo del saggio di attività polimerasica in condizioni ricombinative. A sinistra sono riportati gli spettri di assorbimento registrati dopo 0, 5, 15, 25, 35 minuti dall'inizio di reazione. Il grafico a destra mostra le intensità delle bande di assorbimento in funzione del tempo.

La banda a 293 nm mostra un aumento dovuto alla formazione di acido urico mentre la banda 340 nm diminuisce, indicativa del consumo di β -NADH. Esprimendo le intensità delle bande in funzione del tempo, dagli spettri di assorbimento si può apprezzare che il rapporto tra le pendenze delle due rette è pari a quello tra gli ϵ delle due specie chimiche analizzate.

$$\frac{\epsilon_{\text{acido urico}}}{\epsilon_{\beta\text{-NADH}}} = \frac{12.65 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}}{6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}} = 2.033 \cong \frac{\Delta Abs_{\text{acido urico}}}{\Delta Abs_{\beta\text{-NADH}}}$$

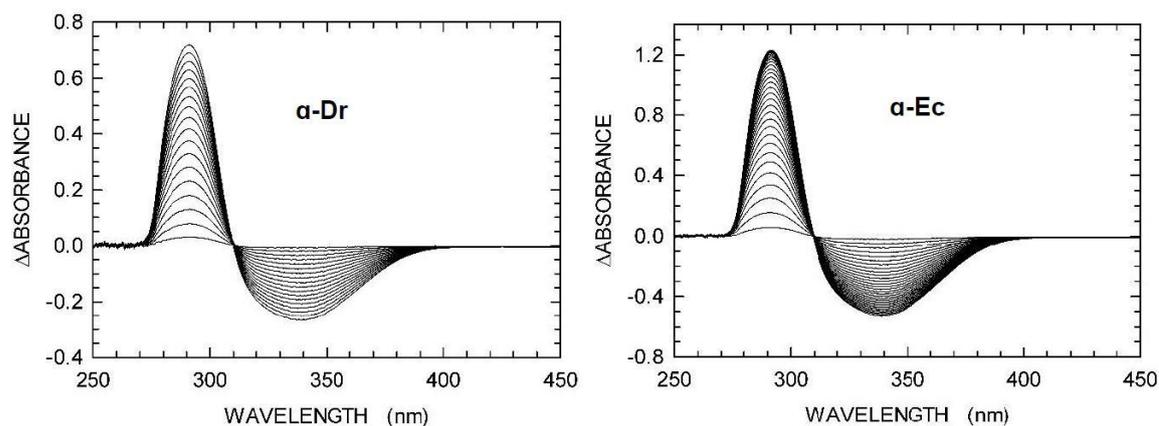


Figura 31. Spettri di assorbimento relativi all'attività polimerasica in condizioni ricombinative acquisiti ogni 10 minuti dall'inizio della reazione. A sinistra: attività di α -D. radiodurans; a destra: attività di α -E. coli.

Una volta verificata l'affidabilità del metodo lo si è utilizzato per determinare l'attività polimerasica in presenza di RecA della subunità α di *D. radiodurans* paragonandola all'attività polimerasica nelle stesse condizioni delle enzima di *E. coli*.

Rielaborando le intensità delle bande a 293 nm e 340 nm (fig. 31) in funzione del tempo si sono ottenute le cinetiche di reazione per entrambi gli enzimi.

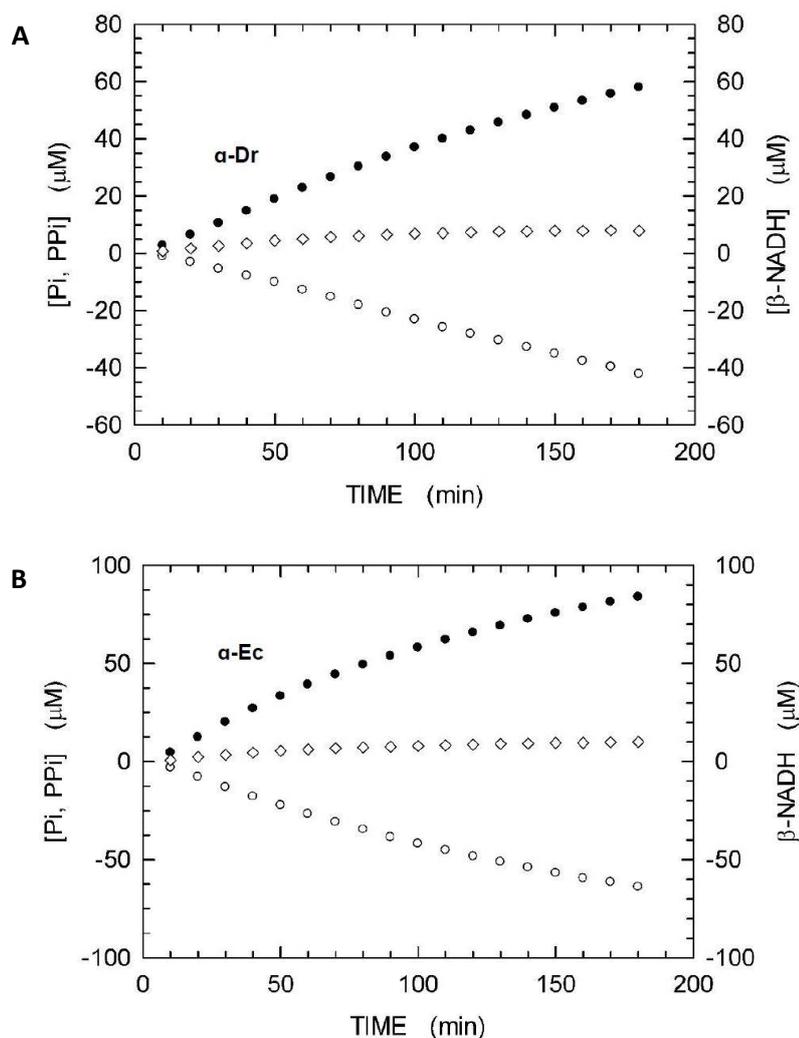


Figura 32. Cinetiche di reazione per l'attività polimerasica in condizioni ricombinative per α -Dr ed α -Ec

- Segnale generato dalla somma dei fosfati prodotti sia dall'idrolisi del pirofosfato (aggiunta nucleotide) che dall'idrolisi dell'ATP.
 - Segnale dovuto al consumo di β -NADH, corrispondente all'attività della sola RecA.
- ◇ Pirofosfati liberati dalla polimerizzazione del DNA in funzione del tempo. La curva è stata ottenuta sottraendo ai valori dei fosfati totali liberati in soluzione il valore corrispondente di NADH consumato tenendo conto dei coefficienti stechiometrici. La curva risultante rappresenta la cinetica di reazione dell'aggiunta dei nucleotidi al ssDNA.

Osservando più nel dettaglio i primi 60 minuti di reazione si nota che la polimerizzazione del DNA tende a rallentare, fino quasi a fermarsi completamente per entrambi gli enzimi, seppure ci siano delle sostanziali differenze per quanto riguarda l'andamento stesso della cinetica di reazione. Ponendo a confronto il dettaglio dei primi 60 minuti di entrambe le cinetiche si osserva che la subunità α di *D. radiodurans* catalizza

la reazione di polimerizzazione ad una velocità inferiore rispetto a quella di *E. coli* ma mantiene un andamento lineare per un tempo di reazione maggiore, confermando la maggiore processività di α -Dr in queste condizioni (fig. 33).

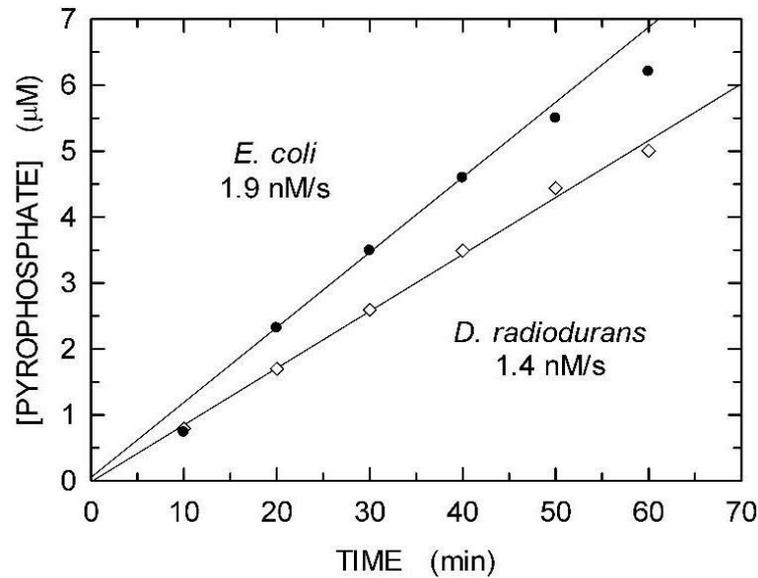


Figura 33. Dettaglio sui primi 60 minuti della cinetica di reazione per α -Dr e α -Ec.

Le velocità iniziali delle due reazioni rivelano ancora una volta un comportamento divergente delle due subunità α . Confrontando i valori di velocità iniziali discussi in precedenza (fig. 28) si evince che la polimerasi di *E. coli* è fortemente inibita dall'attività di RecA mentre l'attività della polimerasi di *D. radiodurans* risulta attivata.

3.3.3 Saggio di attività ricombinativa

Secondo le modalità discusse al paragrafo 2.2.6.3 sono state effettuate delle misure di attività ricombinativa in assenza di RecA-Ec e ATP.

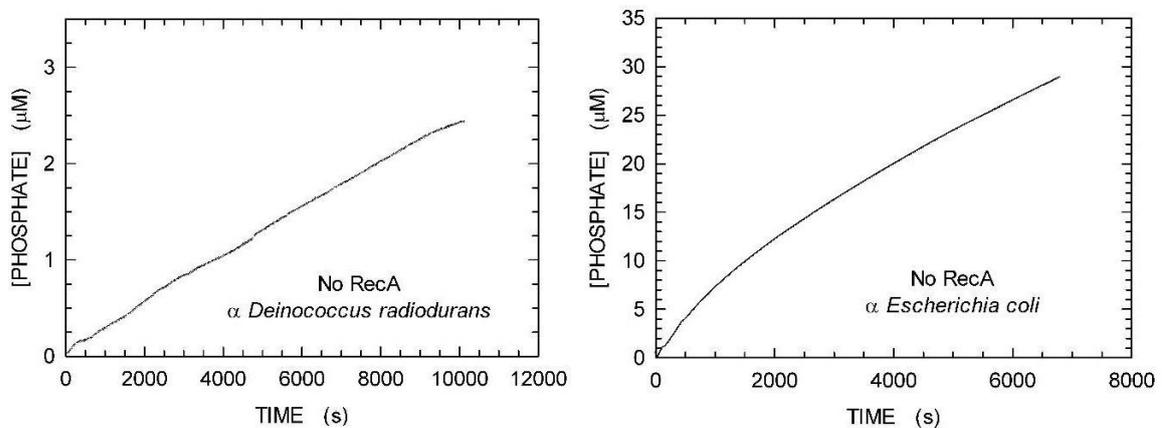


Figura 34. Attività ricombinativa intrinseca della subunità α di *D. radiodurans* (sinistra) e *E. coli* (destra).

In queste condizioni la variazione di assorbanza a 293 nm in funzione del tempo sarà dovuta alla sola polimerizzazione del filamento C (ssDNA). La condizione affinché questo avvenga è che la stessa subunità α possieda attività ricombinativa intrinseca, permettendo lo scambio di filamenti. Senza questo evento non vi è nessun sito di innesco sui substrati per effettuare la polimerizzazione essendo presente nell'ambiente di reazione solo dTTP. La capacità ricombinativa della subunità α di *D. radiodurans* è stata confrontata con quella dell'omologa proteina di *E. coli*.

Quanto mostrato in figura evidenzia una capacità maggiore della subunità α di *E. coli* di polimerizzare il DNA in condizioni di assenza di RecA e ATP, quindi di ricombinare i filamenti (AB e C) presenti all'inizio della reazione. La subunità α di *D. radiodurans* risulta, invece, fortemente inibita dall'assenza di RecA, il che si traduce in una velocità di reazione nettamente inferiore a quella posseduta in presenza della ricombinasi RecA con questo tipo di substrati (fig. 34).

3.3.4 Saggio di attività esonucleasica

Questo saggio, condotto secondo le modalità discusse nella sezione dedicata del capitolo precedente, è volto ad individuare un possibile dominio con attività esonucleasica intrinseca alla subunità. Dalle cinetiche di reazione si evince che in queste condizioni la subunità α non possiede alcuna attività esonucleasica, facendo supporre che l'alta fedeltà replicativa sia basata sull'influenza reciproca delle diverse subunità che compongono l'oloenzima della polimerasi III di *D. radiodurans*.

3.4 *Deinococcus radiodurans*: prove di lisi e separazione dell'estratto grezzo

Le prove di lisi effettuate secondo le modalità (discusse precedentemente al paragrafo 2.3.2 sui pellet derivanti dalla coltura di *D. radiodurans*) e sottoposte ad analisi mediante metodo micro-Bradford hanno prodotto i seguenti risultati:

		3 cicli	
Solo Sonicazione		6.08 µg/ml	
		- Sonicazione	+ Sonicazione (3 cicli)
Liozima // Freeze and Thaw		7.56 µg/ml	14.8 µg/ml
		3 minuti³	6 minuti
Liozima // biglie		9 µg/ml	7.7 µg/ml
Liozima // sonicazione // biglie		11.2 µg/ml	10.6 µg/ml
		9 minuti	
		3 cicli	
Liozima // sonicazione		26.3 µg/ml	

Tabella 3. Risultati delle prove di lisi. Ogni pellet analizzato corrisponde a circa 60 ml di coltura di *D. radiodurans*.

Come mostrato in tabella i risultati più soddisfacenti si sono ottenuti mediante il trattamento delle cellule con liozima e la successiva sonicazione. Nelle altre condizioni indagate si è riscontrata una scarsa efficacia dei sistemi di lisi, talvolta anche accompagnata da fenomeni degradativi. Si può osservare infatti che la concentrazione dell'estratto proteico solubile per i campioni sottoposti all'agitazione meccanica in presenza di biglie di vetro diminuisce progressivamente all'aumentare del tempo di trattamento.

Da queste osservazioni è stato elaborato il sistema di lisi (paragrafo 2.3.2) per ottenere l'estratto solubile da separare mediante cromatografia a scambio ionico. Il contenuto proteico dell'input è stato analizzato sempre tramite metodo micro-Bradford e ha prodotto i seguenti risultati:

Input	Volume	Concentrazione	Massa
Liozima // Sonicazione (6 cicli) // French press (2 cicli)	19 ml	0.146 mg/ml	2.8 mg

Tabella 4. Analisi quantitativa del contenuto proteico dell'estratto solubile corrispondente a 500 ml di coltura di *D. radiodurans* successivamente caricato in colonna a scambio ionico.

³ Di agitazione con biglie.

Le frazioni interessanti ottenute dalla cromatografia a scambio ionico sono state analizzate mediante elettroforesi SDS-PAGE per identificare il loro contenuto.

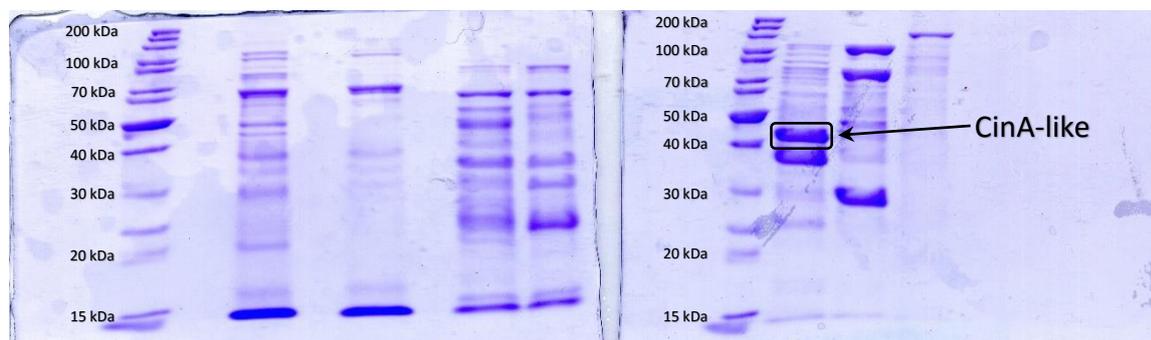


Figura 35. Dettaglio delle frazioni di interesse derivanti dalla cromatografia a scambio ionico. Da sinistra verso destra: Marker, Input, FT, 25, 26, marker, 32, 35, 51.

Le proteine corrispondenti ad alcune bande sono state identificate qualitativamente tramite analisi di spettrometria di massa. Purtroppo non è stata riscontrata la presenza della subunità α , probabilmente per via dei suoi bassissimi livelli di espressione. Di particolare interesse è risultata essere invece la frazione 32. Dall'analisi di massa del contenuto della banda indicata nel gel elettroforetico (fig. 35) è stata rilevata la presenza di *CinA⁴-like protein*: si tratta di una proteina il cui gene è stato localizzato nello stesso operone policistronico in cui è presente anche il gene codificante per RecA e per una 2'-5' RNA ligasi. Il suo ruolo non è ancora del tutto chiarito, ma gli alti livelli di espressione durante la fase di competenza cellulare e in seguito a danneggiamento del genoma fanno supporre un suo coinvolgimento nelle vie di riparazione del genoma danneggiato. Pare infatti che in *S. pneumoniae*, CinA leghi RecA e la trasporterebbe verso la membrana cellulare, il che potrebbe essere un passaggio importante anche per l'associazione del genoma di *D. radiodurans* con la membrana cellulare durante la fase di riparazione dei DSBs (Burrell, A. D. et al. 1971).

⁴ Competence-damage inducible protein A

CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha permesso di identificare un sistema di sovraespressione e purificazione, solido e riproducibile, per l'isolamento della subunità α di *D. radiodurans* ottenuta mediante espressione eterologa in *E. coli*. Inoltre le difficoltà incontrate durante le prime fasi dello studio hanno indotto a mettere a punto una procedura per la solubilizzazione dei corpi di inclusione e la rinaturazione, che si è rivelata riproducibile e con rese soddisfacenti. Ciò è ancor più significativo se si considera la complessità della rinaturazione di proteine dalla massa considerevole come la subunità α .

Come già accennato in precedenza, lo stadio successivo dello studio della polimerasi III di *D. radiodurans* potrebbe essere la trasformazione di *E. coli* con due plasmidi: il pBAD- α Dr e il pGOOD- $\tau\delta\delta'$ Dr, rispettivamente recanti il marcatore di resistenza all'ampicillina e alla tetraciclina. Un sistema di espressione concepito in questo modo consentirebbe di poter verificare il tipo di subassemblaggio spontaneo *in vivo* e l'influenza reciproca tra la subunità α e il *clamp loader* minimo ($\tau\delta\delta'$) per quanto riguarda l'attività polimerasica.

In merito alla caratterizzazione dell'attività enzimatica della subunità α si sono osservate velocità di reazione generalmente contenute. Anche l'indagine dell'influenza di ulteriori fattori, come la presenza di cationi (Mn^{2+}) in soluzione, concentrazioni elevate di $MgCl_2$ o la presenza di substrati diversi, non hanno migliorato in maniera sorprendente la velocità della reazione catalizzata dall'enzima. I dati raccolti in merito all'attività polimerasica in condizioni ricombinative sembrano suggerire che l'elemento chiave per uguagliare le velocità dell'enzima *in vitro* con quelle dimostrate *in vivo* sia di natura proteica: RecA. Non avendo a disposizione la ricombinasi propria di *D. radiodurans* per gli esperimenti è stata usata la ricombinasi omologa di *E. coli* (RecA-Ec). Questo ha permesso di avere risposte promettenti riguardo all'attività enzimatica, ma pur sempre parziali in quanto RecA di *E. coli* riesce a supplire solo parzialmente all'assenza della ricombinasi nativa in *D. radiodurans* (Schlesinger, D. J. 2007) (paragrafo 1.5).

In conclusione, la possibilità di riuscire ad assemblare direttamente *in vivo* un complesso proteico più simile all'oloenzima pol III e di verificarne l'attività con la ricombinasi RecA di *D. radiodurans* potrebbe definire aspetti ancora poco chiari riguardanti i modelli di riparazione per ricombinazione del genoma in batteri radio-resistenti.

BIBLIOGRAFIA

Anderson, A. W., H. C. Nordan, R. F. Cain, G. Parrish, and D. Duggan. 1956. Studies on a radio-resistant micrococcus. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol.* **10**: 575–577.

Slade, D., & Radman, M. 2011. Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75**: 133–191.

Lancy, P., Jr., and R. G. Murray. 1978. The envelope of *Micrococcus radiodurans*: isolation, purification, and preliminary analysis of the wall layers. *Can. J. Microbiol.* **24**: 162–176.

Zhang, C., et al. 2005. Proteomic analysis of *Deinococcus radiodurans* recovering from gamma-irradiation. *Proteomics* **5**: 138–143.

Liu, X., et al. 2008. Resistance of *Deinococcus radiodurans* to mutagenesis is facilitated by pentose phosphate pathway in the *mutS1* mutant background. *Curr. Microbiol.* **57**: 66–71.

Daly, M. J., et al. 2004. Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* **306**: 1025–1028.

Daly, M. J., et al. 2010. Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* **5**: e12570.

Archibald, F. S., and I. Fridovich. 1982. The scavenging of superoxide radical by manganese complexes: in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* **214**: 452–463.

Dunford, H. B. 1987. Free radicals in iron-containing systems. *Free Radic. Biol. Med.* **3**: 405–421.

Mello Filho, A. C., and R. Meneghini. 1984. In vivo formation of singlestrand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **781**: 56–63.

Xu, W., J. Shen, C. A. Dunn, S. Desai, and M. J. Bessman. 2001. The Nudix hydrolases of *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* **39**: 286–290.

Joshi, B., R. Schmid, K. Altendorf, and S. K. Apte. 2004. Protein recycling is a major component of post-irradiation recovery in *Deinococcus radiodurans* strain R1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**: 1112–1117.

Burrell, A. D., P. Feldschreiber, and C. J. Dean. 1971. DNA-membrane association and the repair of double breaks in X-irradiated *Micrococcus radiodurans*. *Biochim. Biophys. Acta* **247**: 38–53.

Slade, D., A. B. Lindner, G. Paul, and M. Radman. 2009. Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell* **136**: 1044–1055.

Harsojo, S. Kitayama, and A. Matsuyama. 1981. Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*. *J. Biochem.* **90**: 877–880.

Hansen, M. T. 1978. Multiplicity of genome equivalents in the radiationresistant bacterium *Micrococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **134**: 71–75.

Kim, J. I., and M. M. Cox. 2002. The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 7917–7921.

Gutman, P. D., P. Fuchs, and K. W. Minton. 1994. Restoration of the DNA damage resistance of *Deinococcus radiodurans* DNA polymerase mutants by *Escherichia coli* DNA polymerase I and Klenow fragment. *Mutat. Res.* **314**: 87–97.

Liu, Y., et al. 2003. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 4191–4196.

Blasius, M., I. Shevelev, E. Jolivet, S. Sommer, and U. Hubscher. 2006. DNA polymerase X from *Deinococcus radiodurans* possesses a structuremodulated 3'→5' exonuclease activity involved in radioresistance. *Mol. Microbiol.* **60**: 165–176.

Kornberg, T., and Gefter, M. L. 1974. Deoxyribonucleic acid polymerase 3 (*Escherichia coli* K12). *Methods Enzymol.* **29**: 22-26.

Herendeen, D. R. and Kelly, T. J. 1996. DNA polymerase III: running rings around the fork. *Cell* **84**: 5-8.

Ozawa, K. et al. 2008. The proofreading exonuclease subunit epsilon of *Escherichia coli* DNA polymerase III is tethered to the polymerase subunit alpha via a flexible linker. *Nucleic Acid Res.* **36**: 5074-82.

Lifsics, M. R. et al. 1994. *holE*, the Gene Coding for the θ Subunit of DNA Polymerase III of *Escherichia coli*: Characterization of a *holE* Mutant and Comparison with a *dnaQ* (6-Subunit) Mutant. *J. Bacteriol.* **176**: 815-821

McInerney, P. et al. 2007. Characterization of a triple DNA polymerase replisome. *Cell* **27**: 527-538.

Jeruzalmi, D. et al. 2001. Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (γ) complex of *E. coli* DNA Polymerase III. *J. Cell* **106**: 429-441.

Lamers, M. H. et al. 2006. Crystal structure of the catalytic α subunit of *E. coli* replicative DNA Polymerase III. *Cell* **126**: 881-892.

McHenry, C. S. 2003. Chromosomal replicases as asymmetric dimers: studies of subunit arrangement and functional consequences. *Molecular Microbiology* **49**: 1157–1165.

Corn, J. E., and Berger, J. M. 2006. Regulation of bacterial priming and daughter strand synthesis through helicase-primase interactions. *Nucleic Acids Research* **34**: 4082–4088.

Hochkoepler, A., and Stefan, A., et al. 2015. Simultaneous ternary extension of DNA catalyzed by a trimeric replicase assembled in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **462**: 14-20.

Georgescu, R. E., Yao, N. Y., and O'Donnell, M. 2010. Single-molecule analysis of the *Escherichia coli* replisome and use of clamps to bypass replication barriers. *FEBS Letters* **584**: 2596–2605.

Brown, W. C., Duncan, J. A., and Campbell J. L. 1993. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta overproduced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**: 982-990.

Thompson, S. T., and Stellwagen E. 1976. Binding of Cibacron blue F3GA to proteins containing the dinucleotide fold PNAS **73**: 361-365.

Ornstein, L. 1964. Disc Electrophoresis. Background and theory. *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**: 321-349.

Schlesinger, D. J. 2007. Role of RecA in DNA damage repair in *Deinococcus radiodurans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **274**: 342–347.