

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Biologia Cellulare, Molecolare e Industriale
Progetto n.3 - Microbiologia e Biotecnologie Industriali

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 05/E1 – BIOCHIMICA GENERALE E CLINICA

Settore Scientifico disciplinare: BIO/10 – BIOCHIMICA GENERALE

FUNZIONI DELLA SUBUNITÀ θ E DEL DOMINIO PHP DELLA
SUBUNITÀ α NEL CORE CATALITICO DELLA DNA POLIMERASI
III DI *Escherichia coli*

Presentata da: dott. EMANUELE CONTE

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. A. HOCHKOEPLER

prof. A. HOCHKOEPLER

Esame finale anno 2012

INDICE

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	6
1.1 La replicazione del DNA in <i>Escherichia coli</i>	6
1.2 Struttura della DNA polimerasi III	8
1.2.1 Il complesso DnaX.....	9
1.2.2 Il β Clamp.....	11
1.2.3 Il Core replicativo.....	14
1.3 La subunità α	16
1.4 La subunità ϵ	20
1.5 La subunità θ	23
1.6 La superfamiglia PHP	27
1.7 Il dominio PHP in <i>Escherichia coli</i>	29
1.8 Scopo della tesi	33
CAPITOLO 2 - MATERIALI E METODI	35
2.1 MATERIALI	35
2.1.1 Ceppi batterici.....	35
2.1.2 Vettori plasmidici.....	35
2.1.3 Terreni di coltura.....	37
2.1.4 Colonne cromatografiche.....	38
2.2 METODICHE GENERALI	39
2.2 A - Manipolazione del DNA	39
2.2.1 Elettroforesi in gel di agarosio.....	39
2.2.2 Estrazione del DNA da gel.....	39
2.2.3 Preparazione di cellule competenti per l'elettroporazione.....	39
2.2.4 Trasformazione mediante elettroporazione.....	40
2.2.5 Estrazione di DNA plasmidico.....	40

2.2 B - Manipolazione delle proteine	40
2.2.6 Quantificazione delle proteine	40
2.2.7 Analisi SDS-PAGE	41
2.2.8 Saggio ELISA indiretto.....	41
2.2.9 Spettrometria di massa	42
2.2 C - Saggi di attività	43
2.2.10 Saggio di attività esonucleasica	43
2.2.11 Saggio di attività pirofosfatase e polimerasica	43
2.2.12 Saggio di attività fosfatase	44
2.3 METODICHE PARTICOLARI	45
2.3.1 Cinetiche di crescita.....	45
2.3.2 Costruzione del vettore pGOOD.....	45
2.3.3 Costruzione dei vettori pGOOD1 e pGOOD2.....	46
2.3.4 Saggi per fenotipi mutatori.....	47
2.3.5 Analisi ex-vivo del ruolo di θ	48
2.3.6 Sovraespressione ed estrazione del dominio PHP	48
2.3.7 Purificazione del dominio PHP	49
2.3.8 Sovraespressione ed estrazione della subunit� α e del core polimerasico.....	50
2.3.9 Purificazione della subunit� α e del core polimerasico.....	50
2.3.10 Precipitazione del DNA dagli estratti proteici	51
CAPITOLO 3 – RISULTATI E DISCUSSIONE	52
3.1 Analisi del ruolo di θ	52
3.1.1 Effetto della delezione di <i>hoIE</i> (θ)	53
3.1.2 Effetto della sovraespressione di θ	56
3.1.3 Confronto con la subunit� omologa HOT	63
3.1.4 Effetto di θ in vivo.....	66
3.2 Analisi funzionale del dominio PHP	70
3.2.1 Espressione e purificazione del dominio PHP	70
3.2.2 Saggi di attivit� esonucleasica e fosfatase	74
3.2.3 Saggio di attivit� pirofosfatase.....	76
3.2.4 Espressione e purificazione della subunit� α	78
3.2.5 Saggio di attivit� pirofosfatase della subunit� α	81

3.3 Costruzione della famiglia di vettori pGOODs.....	84
3.4 Produzione del core $\alpha\theta$	88
3.4.1 Analisi dell'espressione a 37 °C	89
3.4.2 Analisi dell'espressione a 30 °C	91
3.4.3 Purificazione del core solubile.....	93
3.4.4 Purificazione del core dopo rimozione del DNA.....	98
CONCLUSIONI	106
BIBLIOGRAFIA.....	108

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

1.1 La replicazione del DNA in *Escherichia coli*

La DNA polimerasi III di *Escherichia coli* rappresenta il complesso enzimatico principale deputato a replicare fedelmente l'intero patrimonio genetico di 4.6 Mbp del batterio (Maki et al., 1988). L'oloenzima della polimerasi è costituito da 17 subunità di dieci tipi differenti e consiste in due core replicativi, due β -clamp ed un complesso γ . All'oloenzima si associano altre proteine con funzioni accessorie per la replicazione, ovvero l'elicasi DnaB, che ha il compito di svolgere la doppia elica del DNA per fornire alla polimerasi un filamento stampo a singola catena, la primasi DnaG, che sintetizza brevi primer di RNA lunghi circa 12 nucleotidi necessari per fornire alla polimerasi un'estremità 3'-OH per avviare la replicazione, e le single strand binding proteins (SSB), che prevengono la degradazione del DNA a singola catena e ne impediscono il riappaiamento con il filamento complementare (Figura 1).

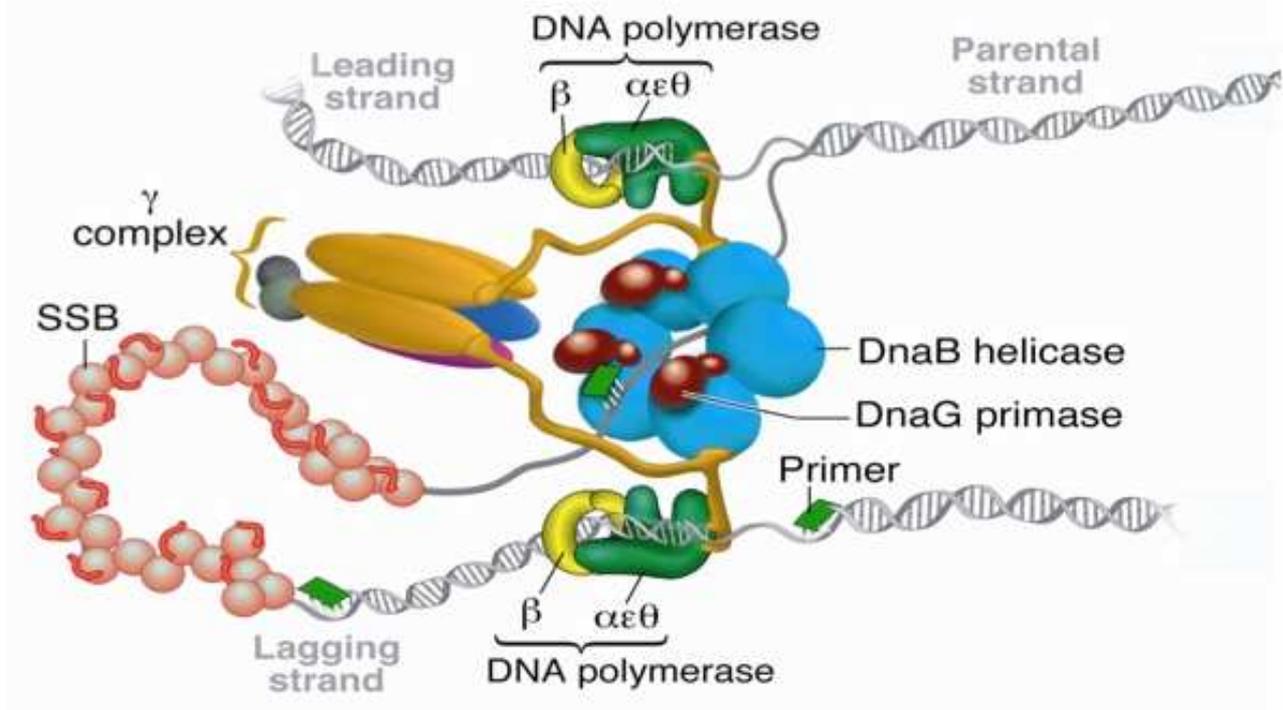


Figura1 (Tanner et al., 2008): DNA polimerasi III

La replicazione del cromosoma in *Escherichia coli* inizia nella regione *oriC* e procede in maniera bidirezionale su entrambi i filamenti con la formazione di due bolle replicative che procedono in direzione opposta l'una all'altra, fino ad incontrarsi in corrispondenza dei siti di terminazione *Ter*, localizzati nella parte del cromosoma opposta ad *oriC*. L'avvio della replicazione è strettamente coordinato al ciclo cellulare (Boye et al., 1996) e la sintesi di una copia completa del cromosoma richiede circa 40 minuti, se si assume una velocità di incorporazione di nuovi nucleotidi pari a 1000 bp/s. Il primo stadio del processo replicativo è lo svolgimento della doppia elica di DNA a livello della origine *oriC* da parte della elicasi DnaB, reso possibile dall'azione di denaturazione attuata dalla proteina DnaA su alcune sequenze ripetute in serie e ricche di appaiamenti A-T e dall'intervento della proteina DnaC, che si complessa a DnaB e la indirizza all'origine. Al DNA svolto si associano quindi le proteine SSB, che ne prevengono la degradazione da parte delle nucleasi e ne impediscono il riappaiamento. Poiché le DNA polimerasi necessitano come substrato per la propria azione di un'estremità 3'-OH che funga da innesco, questa viene fornita dalla primasi DnaG, una RNA polimerasi DNA dipendente che sintetizza dei primer di RNA di circa 12 nucleotidi di lunghezza. Poiché la reazione di polimerizzazione dei nucleotidi catalizzata dalla DNA polimerasi III avviene in senso obbligato in direzione 5'-3', questa può compiersi in maniera continua solo su un filamento stampo (leading) utilizzando un singolo primer di RNA e deve procedere in maniera discontinua sull'altro filamento (lagging) mediante la sintesi di brevi tratti di DNA di circa 1000-2000 bp, definiti frammenti di Okazaki (Okazaki et al., 1967). Ciò avviene poiché nel caso del filamento lagging il verso della replicazione è invertito rispetto all'orientamento 3'-5' del filamento medesimo, pertanto affinché la polimerasi possa legarsi con il giusto orientamento è necessario che questo si ripieghi a formare un'ansa di DNA a singola catena correttamente orientata. In corrispondenza di quest'ansa agisce la primasi DnaG, sintetizzando nuovi primers che consentano l'avvio di un nuovo stadio replicativo correttamente direzionato. Lo spostamento della polimerasi da un primer di innesco ad un altro al termine della sintesi di un frammento di Okazaki è mediato dalla subunità τ del complesso DnaX, che sfrutta l'energia prodotta dall'idrolisi di una molecola di ATP per determinare l'apertura del β clamp ed il distacco del core in modo che possa legarsi al nuovo primer. Poiché la sintesi dei frammenti di Okazaki è discontinua ed utilizza molti differenti inneschi la sequenza di DNA neosintetizzato richiede un processo di maturazione in cui i primer di RNA vengono sostituiti da sequenze di DNA ed i nick lasciati dalla DNA polimerasi

III vengono legati per saldare i frammenti in un unico filamento di DNA a doppia elica. Queste funzioni sono esplicate dalla polimerasi I, che rimuove i primer attraverso la sua attività esonucleasica 5'-3' e li sostituisce con frammenti di DNA sfruttando la sua attività polimerasica, e dalla DNA ligasi, che salda le estremità 3' lasciate libere dalle polimerasi al successivo nucleotide della catena. La fedeltà del processo replicativo è molto alta e risulta pari ad un errore ogni 10^9 - 10^{10} paia di basi, ovvero un errore ogni 1.000-10.000 repliche del genoma (Drake, 1991). A garantire il mantenimento di questo livello di fedeltà è l'intersezione di tre fattori, ovvero l'azione di selezione del nucleotide entrante esercitata dalla subunità α del core secondo le regole di appaiamento di Watson e Crick, che commette un errore ogni 10^5 - 10^6 bp, l'attività esonucleasica di proofreading della subunità ϵ , che aumenta la fedeltà di un fattore di 10^2 - 10^3 e l'azione esercitata dalle proteine MutH, MutL, MutS e MutU, che agiscono a livello post-replicativo riparando gli errori eventualmente commessi aggiungendo un fattore di fedeltà di 10^2 - 10^3 (Schaaper, 1993).

1.2 Struttura della DNA polimerasi III

Delle cinque DNA polimerasi espresse da *Escherichia coli* la DNA polimerasi III è l'unica a poter garantire una velocità, una processività ed un livello di fedeltà tali da poter replicare l'intero genoma in un tempo compatibile con quello di generazione del batterio, pur essendo presente nella cellula in un numero di copie molto basso, pari a circa 10-15 molecole per cellula (Kornberg e Geftter, 1972). L'oloenzima della DNA polimerasi III è costituito da 17 subunità di dieci tipi differenti ($2(\alpha\epsilon\theta)2\beta_2\gamma\tau_2\delta\delta'\chi\psi$) (Tabella 1) e si organizza in tre diversi sub-assemblaggi principali: due core replicativi α - ϵ - θ , due β -clamp, che aumentano la processività della replicazione, ed un complesso γ , il cui compito è favorire l'associazione dei due core al DNA, legandoli ai β -clamp.

	Subunità	Gene codificante	Massa molecolare (kDa)
CORE	α	<i>dnaE</i>	129.9
	ε	<i>dnaQ</i>	27.5
	θ	<i>holE</i>	8.6
COMPLESSO DnaX	γ	<i>dnaX</i>	47.5
	τ	<i>dnaX</i>	71.1
	δ	<i>holA</i>	38.7
	δ'	<i>holB</i>	36.9
	χ	<i>holC</i>	16.6
	ψ	<i>holD</i>	15.2
β CLAMP	β	<i>dnaN</i>	40.6

Tabella 1: subunità costituenti l'oloenzima della DNA polimerasi III

1.2.1 Il complesso DnaX

Nell'oloenzima i due core replicativi, deputati alla sintesi dei due filamenti stampo (leading e lagging), formano un dimero asimmetrico grazie all'azione del complesso DnaX, costituito da un dimero di τ associato ad una subunità γ (omologa di τ ma priva della porzione C-terminale, Glover e McHenry, 2001) e dalle altre subunità accessorie $\delta\delta'\chi\psi$. La subunità γ , di 47 kDa, è codificata dallo stesso gene *dnaX* che codifica τ , di 71 kDa, ma la sintesi delle due proteine si differenzia a livello traduzionale, in quanto nel 50% dei casi un frameshift ribosomiale porta all'interruzione precoce della traduzione, da cui consegue la produzione di γ (Tsuchihashi e Kornberg, 1990). τ è costituita da cinque domini, di cui solo i primi tre, responsabili dell'attività ATPasica e dell'oligomerizzazione, sono condivisi con γ , in cui sono invece assenti i siti di legame all'elicasi DnaB del dominio IV (Gao e McHenry, 2001 A) e alla subunità α del core del dominio V (Gao e McHenry, 2001 B). Sia τ che γ possiedono un'attività ATPasica il cui ruolo è quello di fornire l'energia necessaria ai cambiamenti conformazionali del complesso DnaX che guidano l'assemblaggio con il DNA ed il coordinamento degli spostamenti del core. Recentemente è stato proposto un modello alternativo per la struttura dell'oloenzima, in cui il complesso DnaX è formato da tre subunità τ in assenza di γ e porta legati tre core replicativi. Il

terzo core aggiuntivo interverrebbe per rendere più rapida la replicazione del filamento lagging, in modo da evitare un divario con la velocità di replicazione del filamento leading, avviando la maturazione di un nuovo frammento di Okazaki non appena la primasi sintetizza un primer e prima che sia terminata la sintesi del precedente. Alternativamente, il terzo core potrebbe avere solo funzione di riserva e non essere utilizzato nella replicazione attiva, ma intervenire solamente in caso di lesioni del DNA o di blocco del core su uno dei due filamenti (McInerney et al., 2007) (Figura 2).

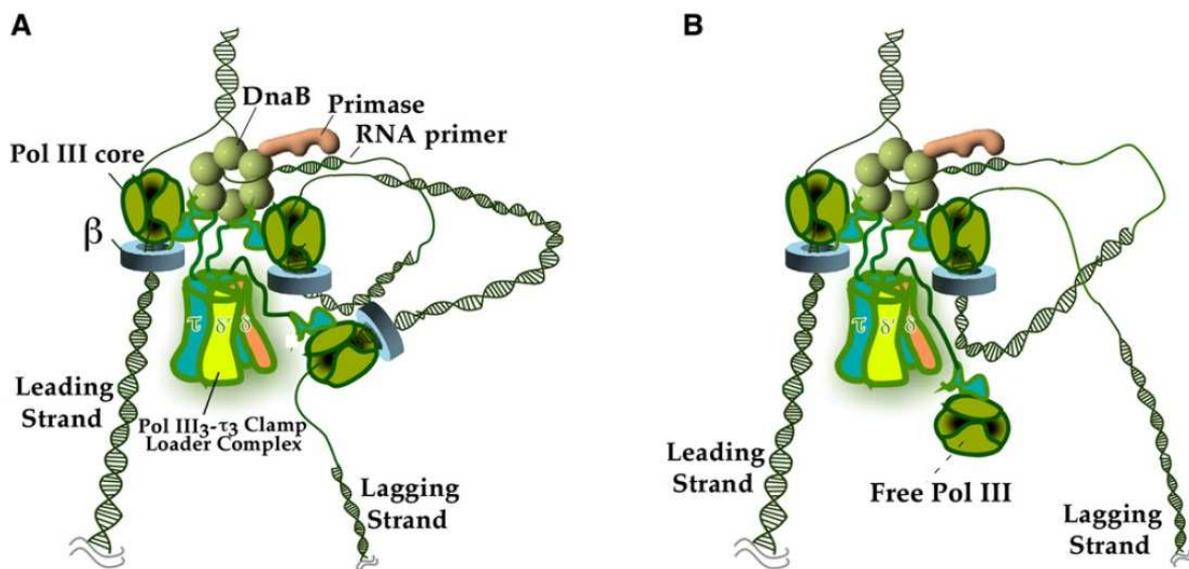


Figura 2 (McInerney et al., 2007): struttura del core trimerico. A) Maturazione contemporanea di due frammenti di Okazaki. B) Mantenimento del terzo core libero con funzione di riserva

All'interno del complesso DnaX le subunità δ' e ψ legano direttamente γ , mentre δ e χ si legano rispettivamente a δ' e ψ (Onrust et al., 1995). L'utilizzo di tecniche di cross-linking ha inoltre permesso di evidenziare che all'interno del complesso le subunità δ' e ψ si legano esclusivamente a γ e non a τ (Glover e McHenry, 2000). La struttura del complesso δ - γ ₃- δ' è stata risolta cristallograficamente, ed appare come un anello circolare aperto con δ e δ' situati ai due estremi (Jeruzalmi et al., 2001 A). È inoltre disponibile in letteratura anche il cristallo della subunità δ legata a β (Jeruzalmi et al., 2001 B), e l'analisi informatica delle due strutture ha permesso di chiarire le modalità di azione del complesso DnaX nel processo replicativo. La funzione di δ e δ' è di agevolare e coordinare l'apertura del β clamp durante le fasi di associazione-dissociazione nei confronti del DNA. In particolare, δ si lega al dimero di β

destabilizzandone l'interfaccia col DNA ed inducendone quindi la dissociazione in un processo che non richiede idrolisi di ATP (Jeruzalmi et al., 2001 B), mentre δ' regola quest'effetto legandosi a δ , chiudendo l'anello e prevenendone l'azione nei confronti del β clamp quando non necessaria (Turner et al., 1999). La funzione di χ e ψ all'interno del complesso DnaX non è ancora stata definita in maniera precisa, ma alcuni dati, come la struttura terziaria del sub-assemblaggio $\chi\psi$ (Gulbis et al., 2004), sono disponibili in letteratura. È stato dimostrato che χ lega le proteine SSB e che questo legame ha un ruolo nel distaccare la primasi dal DNA al termine della sintesi del primer prima del caricamento di β (Yuzhakov et al., 1999) e fornisce inoltre all'oloenzima la possibilità di procedere nella replicazione lungo un frammento di DNA a doppia catena per un breve tratto tramite un'azione di scostamento del filamento 5'-3' (Yuan e McHenry, 2009). La subunità ψ potrebbe invece essere coinvolta, oltre che nel legare χ a τ , nello stabilizzare o nel promuovere i cambiamenti conformazionali del complesso DnaX indotti dall'idrolisi dell'ATP da parte di τ per consentire l'apertura dell'anello di β . Quest'attività potrebbe fornire un ordinamento temporale durante il caricamento del β clamp al DNA, favorendone il legame al complesso DnaX prima del legame al DNA (Anderson et al., 2007).

1.2.2 Il β Clamp

Il β clamp rappresenta il fattore di processività più importante per la replicazione della DNA polimerasi III. Sebbene il core sia infatti in grado di replicare un filamento di DNA in presenza di un primer pur in assenza delle altre subunità dell'oloenzima, il legame al β clamp risulta fondamentale per raggiungere caratteristiche tali da consentire la replicazione dell'intero cromosoma. La presenza di β porta la processività e la velocità di reazione da valori iniziali pari a, rispettivamente, 1-10 bp e meno di 20 bp/s, nel caso del core libero, a più di 50 kilobasi e 750 bp/s, nel caso del core legato al β clamp (Jay et al., 1981). La struttura del β clamp è stata risolta mediante diffrattometria di raggi X, sia in assenza di un substrato (Kong et al., 1992) che in presenza di un filamento di DNA associato ad un primer (Georgescu et al., 2008). Il β clamp appare come un anello dimerico costituito da due protomeri, ciascuno formato da tre domini globulari, uniti da un legame testa-coda. L'arrangiamento dei protomeri genera due facce dell'anello fra loro distinte, con un lato che contiene le estremità C-terminali dei protomeri e l'altro che mostra le estremità N-terminali. Il legame fra i due protomeri forma al

centro dell'anello un canale di circa 35 Å di diametro, le cui pareti interne sono costituite da α eliche cariche positivamente in grado di ospitare un filamento di DNA a doppia elica. All'interno dell'anello il DNA assume un angolazione di 22° che, data la simmetria del dimero, consente un movimento ampio del filamento che potrebbe permetterne l'eventuale scambio fra due polimerasi che leghino lo stesso clamp contemporaneamente, come può avvenire ad esempio per la DNA polimerasi III e la DNA polimerasi IV (Indiani et al., 2005). A causare l'inclinazione del filamento è principalmente l'interazione del DNA con i residui R24 e Q149, esposti da loop superficiali della faccia C-terminale, che risultano funzionali al caricamento del β clamp sul DNA stesso (Georgescu et al., 2008) (Figura 3).

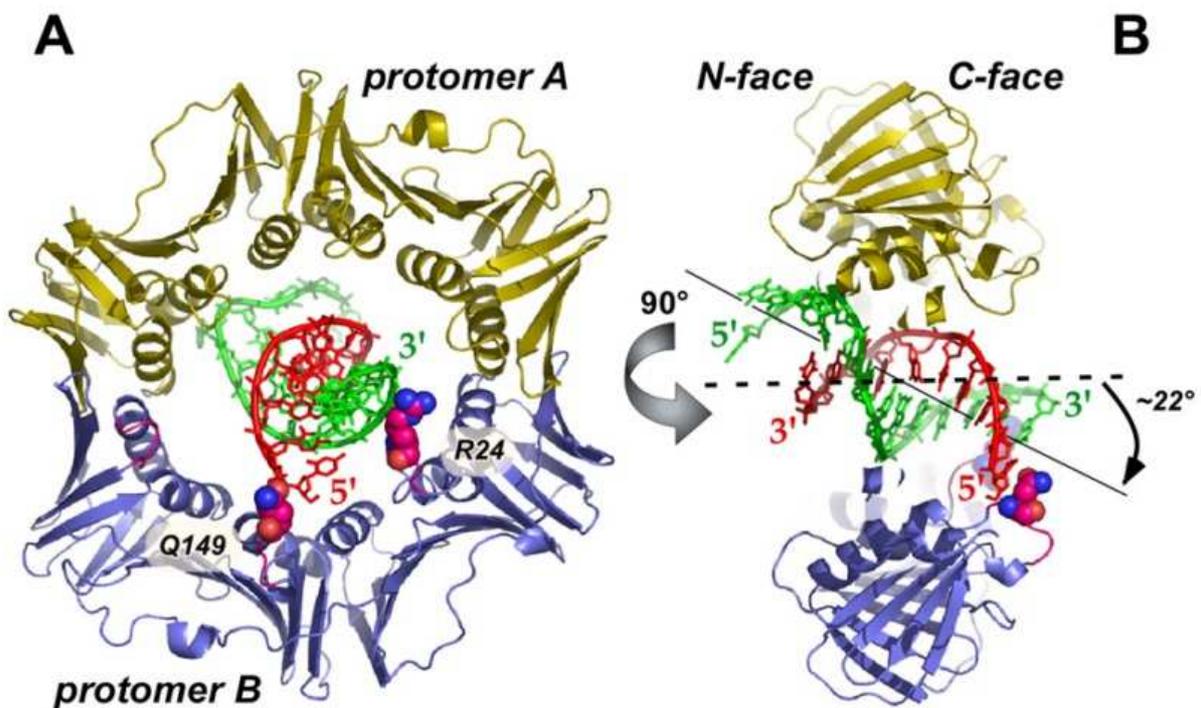


Figura 3 (Georgescu et al., 2008): A) visione frontale del β clamp legato al DNA con evidenziati i residui responsabili dell'angolazione del filamento B) sezione laterale tagliata del complesso

Il legame fra il dimero di β e la subunità α della DNA polimerasi III avviene lungo la faccia C-terminale, a livello di una tasca idrofobica situata fra i domini II e III di β (Naktinis et al., 1996). La medesima interazione è riscontrata nei legami tra il β clamp e le altre proteine che ad esso possono associarsi, ovvero le altre DNA polimerasi espresse dal batterio, le subunità δ e γ del complesso DnaX (López de Saro et al., 2003), l'elicasi DnaB, le proteine MutS e MutL

(López de Saro et al., 2006) e il fattore di regolazione del ciclo cellulare Hda (Kurz et al., 2004). La zona di legame al DNA compresa fra i residui H148 e R152 sul lato C-terminale è una regione essenziale per mantenere la funzionalità dell'oloenzima ed è inoltre implicata nello scambio di polimerasi durante la replicazione di filamenti di DNA danneggiato. L'associazione del β clamp alle polimerasi coinvolte nella replicazione mutagenica ne aumenta infatti la processività e ne garantisce l'accesso alla lesione. Il meccanismo di scambio fra la DNA polimerasi III e le DNA polimerasi II e IV, coinvolte nel processo, è controllato dalla differente affinità che esse presentano per β a seconda del suo stato di legame o meno al DNA. Studi condotti con mutanti di β hanno dimostrato che le DNA polimerasi II e IV competono col DNA nel legame a β in quanto interagiscono con la medesima regione, mentre questo non accade nel caso della DNA polimerasi III (Heltzel et al., 2009). Un meccanismo simile basato sulla competizione per lo stesso anello di β è alla base del processo di caricamento e distacco del core sul clamp da parte del complesso DnaX sul filamento lagging per la sintesi di un frammento di Okazaki. In questo caso β presenta un'elevata affinità per il complesso DnaX quando non è legata al DNA, mentre la sua forma complessata al DNA rende molto più affine il core replicativo, che può quindi scalzare il complesso di caricamento e legarsi al sito iniziando la replicazione (Ason et al., 2003). Al termine della sintesi del frammento il core diminuisce nuovamente l'affinità per β , passando da un'emivita del complesso di 5 minuti a meno di un secondo, ed è quindi in grado di slegarsi dal clamp per essere riciclato su un nuovo filamento. È stata avanzata l'ipotesi che l'anello di β rimasto sul filamento a seguito del distacco del core della DNA polimerasi III potrebbe essere utilizzato dalla DNA polimerasi I per la rimozione del primer di RNA, ed in seguito anche dalla DNA ligasi per la propria attività (López de Saro et al., 2003).

1.2.3 Il Core replicativo

Il core replicativo della DNA polimerasi III è costituito dalle tre subunità α , che replica il DNA, ϵ , che esercita un'attività di proofreading del filamento neosintetizzato, e θ , che è priva di attività enzimatica e svolge un ruolo strutturale stabilizzante. Le tre subunità sono arrangiate nell'ordine α - ϵ - θ , con ϵ a far da ponte fra le due subunità α e θ , prive di legami diretti (Studwell-Vaughan e O'Donnell, 1993). Il core interagisce col complesso DnaX e con il β clamp attraverso α , che lega le subunità τ e β attraverso il proprio dominio C-terminale (Figura 4).

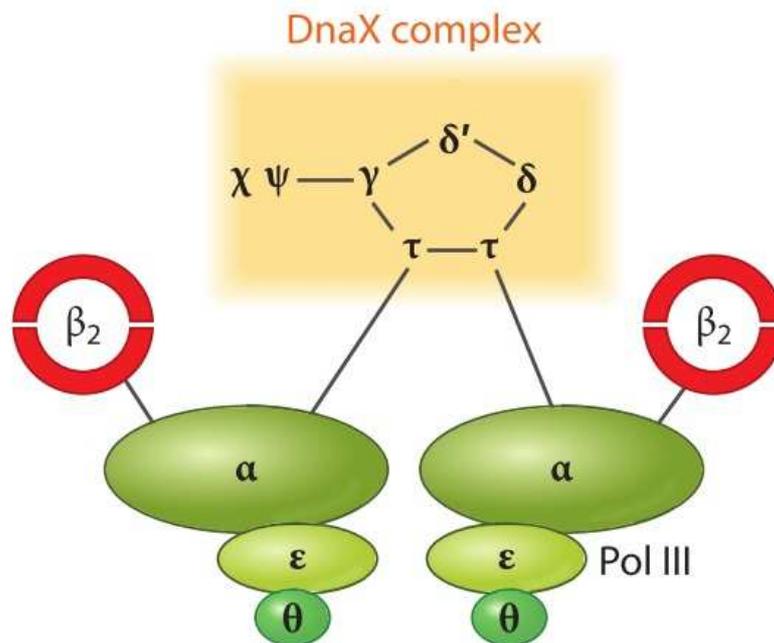


Figura 4 (McHenry, 2011): core replicativo e sue interazioni all'interno dell'olenzima

L'interazione fra le varie subunità stabilizza il complesso del core e migliora le sue attività catalitiche in maniera incrociata e reciproca. Il legame di ϵ ad α aumenta infatti sia processività che la velocità della reazione polimerasica, oltre a ridurre considerevolmente il numero di appaiamenti scorretti introdotti durante la replicazione. Allo stesso modo, il legame di α ad ϵ rende più efficiente la sua attività di proofreading di 10-80 volte (Maki e Kornberg, 1987), mentre il legame fra θ ed ϵ stabilizza quest'ultima e ne aumenta leggermente l'attività esonucleasica (Perrino et al., 1999). Anche l'interazione della subunità τ con il core ne aumenta la processività (Fay et al., 1982), che migliora ulteriormente se τ lega l'elicasi DnaB. La presenza delle subunità χ e ψ legate a τ rende inoltre il core in grado di replicare il DNA legato alle proteine SSB in assenza del β clamp (Glover e McHenry, 1998). La presenza

dell'attività polimerasica e dell'attività esonucleasica in due subunità distinte è una caratteristica unica delle polimerasi della famiglia C nei batteri Gram negativi, nei quali ϵ è una proteina conservata. L'esistenza di un significativo grado di omologia fra l'estremità N-terminale di ϵ e la stessa estremità nelle DNA polimerasi dei batteri Gram positivi rimanda ad un probabile progenitore comune in cui entrambe le funzioni erano associate ad un'unica proteina (Huang et al., 1997). Un ulteriore elemento a favore di questa ipotesi è rappresentato dalla subunità θ , conservata esclusivamente nei batteri Gram negativi nei quali la replicazione del DNA è affidata ad una polimerasi della famiglia C, che potrebbe essersi evoluta in seguito alla necessità strutturale di proteggere la singola subunità ϵ , altrimenti facilmente soggetta a proteolisi in vivo (Taft-Benz e Schaaper, 2004). Nel core ϵ è legata ad α attraverso la propria estremità C-terminale, che contiene un elemento Q-linker di legame fra proteine (Ozawa et al., 2008). La presenza di questo spaziatore rende il legame molto flessibile, con una possibilità di distanziamento di oltre 60 Å, il che suggerisce la possibilità che il passaggio del DNA contenente un appaiamento errato possa essere guidato dal sito di attività polimerasica di α al sito di attività esonucleasica di ϵ attraverso mutamenti nella conformazione di α piuttosto che tramite una traslocazione mediata da proteine. Nelle DNA polimerasi in cui le due funzioni sono esercitate dalla medesima proteina i due domini sono invece collegati fra loro da un canale in una struttura rigida che distanzia i siti attivi di circa 30 Å senza che vi sia possibilità di avvicinamento. Il forte rapporto strutturale che lega le tre proteine del core ne ha permesso la purificazione in una forma correttamente assemblata, nonostante fosse presente in una quantità molto esigua (circa 20 copie per cellula), a partire da un estratto proteico grezzo (McHenry e Crow, 1979). Per quanto il core sia stato in seguito purificato in maggior quantità dopo sovraespressione in *Escherichia coli* (Kim e McHenry, 1996), nessuna informazione cristallografica è stata mai ottenuta per il complesso a causa della purificazione incompleta e delle basse rese del processo.

1.3 La subunità α

La subunità α della DNA polimerasi III è deputata all'attività polimerasica a carico di entrambi i filamenti di DNA, leading e lagging, che replica con meccanismi differenti dettati dal loro diverso orientamento come descritto precedentemente. La struttura della subunità α è stata parzialmente risolta mediante diffrazione di raggi X (Lamers et al., 2006) di un frammento comprendente i residui da 1 a 917 dei 1160 totali, in cui è assente la porzione C-terminale dove si situa la zona di legame alla subunità τ (Figura 5).

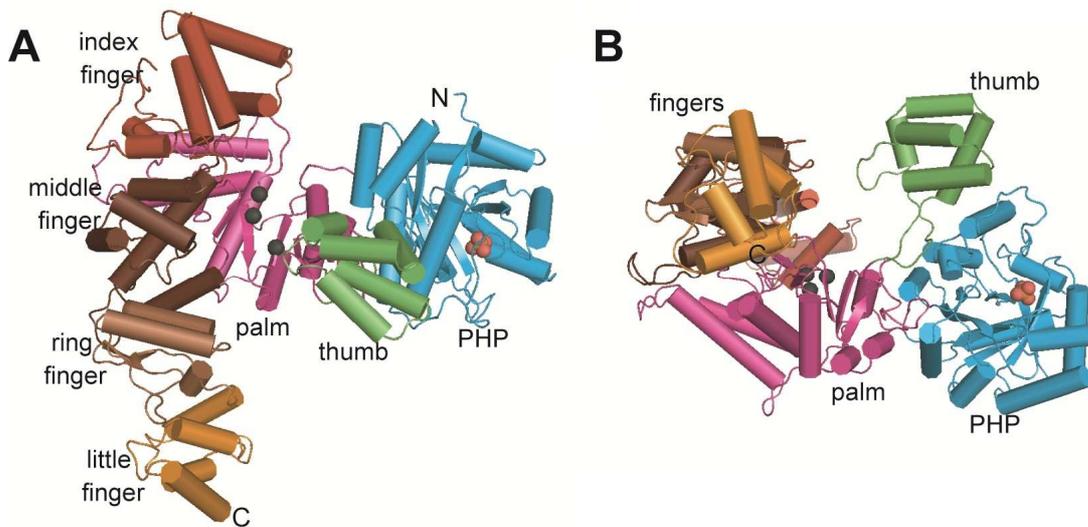


Figura 5 (Lamers et al., 2006): struttura terziaria della subunità α della DNA polimerasi III in visuale dall'alto (A) e laterale (B). Le sfere nere indicano i residui catalitici per la reazione polimerasica. Nella struttura si rileva la presenza di una molecola di fosfato, in rosso, legata al dominio PHP

L'analisi della struttura rivela una conformazione a mano destra, tipica di tutte le DNA polimerasi conosciute (Brautigam e Steitz, 1998), nelle quali si possono identificare un Palmo (residui 271-432 e 511-560), un Pollice (433-510), un dominio delle Dita (561-911), a sua volta divisibile in Indice (641-756), Medio (541-640 e 757-778), Anulare (779-838) e Mignolo (839-911), e un dominio PHP situato nella posizione corrispondente ad un ipotetico polso nella porzione N-terminale della proteina (1-270). Nella struttura è possibile definire una sequenza HtH, ripetuta due volte in tandem nella regione 833-889 ed inclusa nel dominio delle Dita nella zona di legame alla subunità β , ed un dominio OB-fold predetto attraverso studi di omologia della regione 964-1078. Questi ultimi due domini sono in grado di legare rispettivamente il DNA a doppia elica, in maniera aspecifica, ed il DNA a singola elica, a livello del residuo strettamente conservato F1031 (McCauley et al., 2008). Le caratteristiche del

legame al DNA a singola elica del motivo OB-fold presentano una sostanziale differenza rispetto a quelle di altre proteine con la medesima funzione, come le proteine SSB, in quanto mentre queste ultime sono in grado di stabilizzare attivamente le regioni di DNA denaturato indotte da fluttuazioni termiche transienti, la subunità α non può farlo. Ciò implica che il legame nella regione OB-fold può avvenire solo con un filamento di DNA che sia già stato denaturato in precedenza a seguito di altri processi durante la replicazione, come ad esempio il DNA svolto dall'elicasi DnaB o il DNA a singola elica prodotto dalla reazione di proofreading. Il sito attivo di α , in cui sono presenti i tre residui di aspartato catalitici conservati Asp401, Asp403 e Asp555 (Pritchard e McHenry, 1999), è costituito da un foglietto β a cinque filamenti, disposti nell'ordine 1-2-5-4-3, nel quale la simmetria antiparallela è interrotta dal filamento centrale come avviene nel caso delle polimerasi β della famiglia X (Davies et al., 1994). I primi due amminoacidi catalitici sono collocati nel secondo filamento, mentre il terzo aspartato si trova nel quinto filamento ad una distanza di 152 residui. Il meccanismo di reazione della polimerizzazione prevede l'attacco nucleofilo all'atomo di fosforo in α del 2-deossiribonucleotide trifosfato, selezionato sulla base delle regole di appaiamento di Watson e Crick, da parte del gruppo idrossilico dell'estremità 3' del primer con la formazione di un legame fosfodiesterico e la conseguente liberazione di una molecola di pirofosfato. Questa reazione è comune a tutte le polimerasi conosciute (Steitz et al., 1994) e si serve di due ioni divalenti Mg^{2+} (A e B), coordinati dai residui di aspartato del sito attivo. Lo ione A ha il ruolo di abbassare la costante di dissociazione acida del gruppo idrossilico del primer per facilitare la sua deprotonazione durante l'attacco nucleofilo, mentre il metallo B orienta la coda di fosfati del nucleotide entrante per la catalisi e stabilizza la carica negativa che si costituisce durante la formazione dello stato di transizione pentavalente. Un motivo GS, conservato nelle polimerasi β , è presente anche nella subunità α ed è costituito dalla glicina 363 e dalla serina 364, che forma un legame idrogeno con la coda di fosfati del nucleotide entrante, il quale si potrebbe così legare ad un loop che connette l'Indice al Medio nel dominio delle Dita. Basandosi sui dati diffrattometrici, è stato possibile modellare la struttura della subunità α in presenza di DNA, ipotizzando una modalità di legame comune a quella delle altre DNA polimerasi della famiglia C e sostenuta dalla presenza di residui fortemente conservati nelle presunte zone di contatto col filamento stampo (Lamers et al., 2006) (Figura 6).

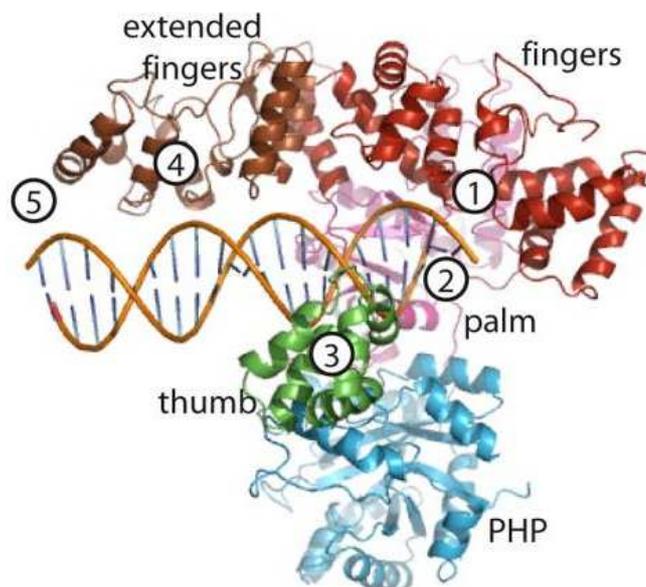


Figura 6 (Lamers e O'Donnell, 2008): modello della subunità α legata al DNA. Le indicazioni dei numeri sono riportate nel testo

Nel primo stadio del legame il DNA stampo a singola elica viene legato dal dominio delle Dita, indicato dal punto 1 in figura, e guidato verso il sito attivo, indicato dal punto 2, nel dominio del Palmo. Al termine dell'aggiunta del nuovo nucleotide alla catena nascente, il DNA a doppia elica neo-sintetizzato prende contatto con il dominio del Pollice (punto 3 in figura) lungo il proprio solco minore, lasciando il sito attivo mentre la polimerasi scorre sullo stampo continuando la sua attività. In seguito, il DNA interagisce con l'estesa porzione terminale del dominio delle Dita che caratterizza le DNA polimerasi della famiglia C (punto 4) ed entra nell'anello formato dal β clamp, legato ad α nel sito indicato nel punto 5 della figura. Il modello proposto ipotizza che il DNA contatti il sito attivo di α con un angolo di circa 30° rispetto all'orientamento del foglietto β che lo costituisce. Questa inclinazione differisce dal legame osservato nel cristallo della subunità α della DNA polimerasi III di *Thermus aquaticus* (Wing et al., 2008) e nelle DNA polimerasi β (Pellettier et al., 1994), in cui il DNA si orienta parallelamente al piano del foglietto, ma è in accordo con la conformazione del legame nella DNA polimerasi PolC di *Geobacillus kaustophilus*, in cui si osserva un'angolazione analoga (Evans et al., 2008). Questa differenza può essere sostanziale ed indicare l'esistenza di differenti modalità di legame del substrato nelle DNA polimerasi della famiglia C, o rappresentare diversi stadi della reazione di polimerizzazione. Il confronto fra la struttura della DNA PolC legata al substrato e quello della subunità α della DNA polimerasi III priva di

DNA permette infatti di ipotizzare che i domini del Palmo e delle Dita vadano incontro ad ampi cambiamenti conformazionali strettamente dipendenti dal legame col substrato, come avviene nelle polimerasi delle famiglie A e B (Steitz, 2006). In queste polimerasi il legame fra il nucleotide entrante e il DNA legato all'enzima porta alla chiusura dell'Indice, così come il suo rilascio ne permette la riapertura. Nel caso delle DNA polimerasi della famiglia C questo movimento potrebbe essere più esteso ed accompagnato da un cambiamento della disposizione del Palmo, che potrebbe riarrangiare i residui catalitici modificando il sito catalitico e quindi il legame col substrato. Un'ipotesi legata a questa flessibilità porta a pensare che lo stallo nella replicazione dovuto ad una lesione nel DNA possa indurre modificazioni conformazionali tali da agevolare il distacco della subunità α dal filamento danneggiato per consentire l'intervento delle DNA polimerasi della risposta SOS (Evans et al., 2008). Poiché la DNA polimerasi III è responsabile della replicazione del genoma in *Escherichia coli*, le mutazioni a carico del suo gene codificante *dnaE* che interferiscono con la sua attività producono ceppi presentanti un fenotipo mutatore. La maggior parte di queste mutazioni si situa nei domini del Palmo, delle Dita e del Pollice (coinvolti nella reazione catalitica, nella discriminazione del nucleotide entrante e nel legame al substrato), con poche eccezioni localizzate nel dominio PHP e nella zona di legame di α con β (Vandewiele et al., 2002). In alcuni casi l'insorgenza di mutazioni nel gene *dnaE* porta invece ad un effetto di riduzione del numero di errori commessi durante la replicazione e quindi ad un fenotipo antimutatore, in grado ad esempio di compensare la mancata funzionalità della subunità di proofreading ϵ o di altre proteine della risposta SOS come MutL (Fijalkowska e Schaaper, 1995). L'insorgenza di questo fenotipo è spiegabile con una maggior selettività nella scelta del nucleotide entrante da parte della polimerasi o con una maggior facilità di dissociazione dell'estremità del primer dal sito attivo a seguito di un inserimento scorretto.

1.4 La subunità ϵ

La subunità ϵ possiede un'attività 3'-5' esonucleasica, utile alla correzione degli errori introdotti durante la replicazione dalla subunità α , a cui è collegata con un legame flessibile nella zona compresa fra i residui F187-R213 della propria zona C-terminale (Bressanin et al., 2009). La conformazione dei primi 186 residui della porzione N-terminale di ϵ , contenente il sito attivo ed il sito di legame per θ (Perrino et al., 1999), è stata determinata sia singolarmente con tecniche di NMR (DeRose et al., 2002) che attraverso diffrazione di raggi X utilizzando un cristallo della proteina complessata a due atomi di Mn^{2+} e ad una molecola di timidina 5'-monofosfato (TMP), prodotto della reazione catalitica (Hamdan et al., 2002 A) (Figura 7).

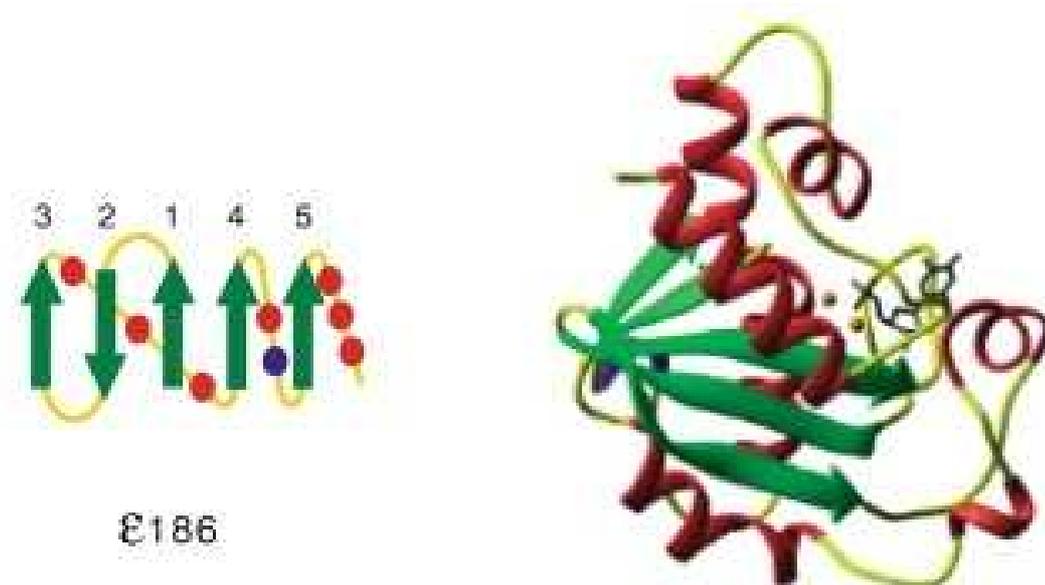


Figura 7 (Hamdan et al., 2002): struttura di $\epsilon 186$. I due ioni Mn^{2+} catalitici sono indicati come sfere rosse, mentre la molecola di TMP è rappresentata in viola

Dai dati disponibili si osserva che il dominio N-terminale di ϵ si organizza in sei α eliche che avvolgono un foglietto β a cinque filamenti fra loro paralleli, ad eccezione del filamento β_2 . Il sito attivo contenente i residui catalitici Asp12, Glu14 e Asp167 si situa in una tasca delimitata dal filamento β_1 e dalle eliche α_3 e α_7 e coordina i due cofattori metallici che intervengono nella reazione di idrolisi del legame fra i due nucleotidi. La natura degli ioni divalenti utilizzati in vivo non è stata determinata con certezza, ma studi in vitro mostrano che la proteina può sfruttare sia ioni Mg^{2+} che Mn^{2+} , con una reazione più veloce nel secondo caso (Hamdan et al., 2002 B). Il meccanismo della reazione esonucleasica è stato studiato mediante calcoli di

meccanica quantistica e molecolare (Cisneros et al., 2009) ed indica per uno dei due ioni un ruolo di facilitazione nella formazione di uno ione ossidrilico per l'attacco nucleofilo al fosfato del nucleotide da escindere, mentre il secondo metallo stabilizza la forma pentavalente del fosforo nello stato di transizione. In vivo il substrato minimo utilizzabile da ϵ nell'oloenzima è un frammento di almeno tre nucleotidi (Miller e Perrino, 1996). I residui catalitici D12, E14, D103, H162 e D167 sono situati all'interno di tre motivi conservati, detti EXO I (residui 8-21), EXO II (95-108) e EXO III ϵ (128-192). Questi motivi sono comuni a molte subunità di proofreading appartenenti a polimerasi della famiglia C e si ritrovano anche in altre esonucleasi, associate o meno a polimerasi, in cui il terzo motivo è però sostituito dal motivo EXO III (Blanco et al., 1992) (Figura 8).

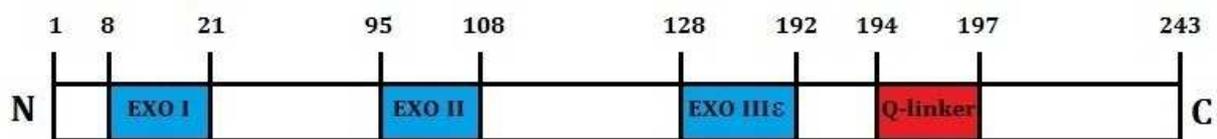


Figura 8: rappresentazione schematica della subunità ϵ con indicati i motivi EXO conservati

Oltre all'attività di proofreading durante la replicazione del cromosoma la subunità ϵ svolge un ruolo non del tutto chiarito anche nella risposta SOS provocata da alcuni specifici composti mutagenici. L'espressione del gene *dnaQ*, codificante per ϵ (Scheuermann et al., 1983), è infatti indotta a seguito dell'esposizione di *E. coli* a composti come il metilmetansolfonato (Quiñones et al., 1989), mentre mutazioni a suo carico portano ad una attivazione incompleta e parziale del sistema SOS a seguito dell'esposizione all'acido nalidixico (Pohlhaus et al., 2008). È interessante notare come quest'ultimo effetto sia legato specificamente al mutageno in esame e non si presenti quando allo stesso ceppo mutato viene somministrato un altro composto come la mitomicina C, in grado invece di far attivare correttamente la risposta SOS. Una simile risposta differenziata implica l'esistenza di una via di attivazione specifica che prevede un coinvolgimento essenziale della subunità ϵ , e di conseguenza un suo effettivo ruolo fisiologico oltre all'attività di proofreading. ϵ è inoltre probabilmente coinvolta anche nella replicazione trans-lesioni operata dalla DNA polimerasi V, essendo in grado di interagire fisicamente con entrambe le sue subunità UmuD e UmuD' (Sutton et al., 1999). Il legame fra ϵ e tali subunità si localizza alla sua estremità C terminale, ed una sua sovraespressione è in grado di annullare il

fenotipo cold-sensitive associato ad una sovraespressione contemporanea dei geni codificanti per la DNA polimerasi V, sebbene il meccanismo alla base di questo effetto non sia stato del tutto chiarito (Sutton et al., 2001). È stato riportato in letteratura che anche un aumento del superavvolgimento del DNA può portare ad un aumento dell'espressione del gene *dnaQ* (Quiñones e Neumann, 1997). Questa correlazione è interessante da un punto di vista fisiologico in quanto lo stato topologico del DNA varia in relazione alle condizioni ambientali come la temperatura, l'osmolarità, il livello di ossigeno disponibile ed il tipo di nutrienti, ed anche a seconda della fase cellulare o a seguito di una prolungata scarsità di risorse; pertanto, l'esistenza di una connessione fra queste variazioni ed il livello di espressione di ϵ permette di ipotizzare che la presenza di una più o meno marcata attività di proofreading abbia un ruolo nella mutagenesi adattativa di *Escherichia coli*. Un ulteriore livello di complessità nel ruolo rivestito da ϵ all'interno della cellula è riscontrabile in una recente pubblicazione, che mette in relazione la subunità di proofreading con il metabolismo centrale del carbonio (Maciag et al., 2012). È stato infatti osservato che l'introduzione in un ceppo contenente l'allele termosensibile *dnaQ49* della delezione di uno dei geni *pta* (codificante per la fostato acetiltrasferasi), *ackA* (acetato chinasi), *acnB* (aconitato idratasi) o *icdA* (isocitrato deidrogenasi), coinvolti nel metabolismo del carbonio, porta ad una sensibile riduzione del suo fenotipo mutatore. La subunità ϵ si caratterizza come una proteina altamente instabile facilmente soggetta a proteolisi in vivo, in particolare nella sua porzione C-terminale, e richiede l'assistenza di chaperones molecolari come DnaK per acquisire il suo corretto folding (Foster e Marinus, 1992). È stato infatti dimostrato che ceppi Δ *dnaK* acquisiscono un fenotipo termosensibile a 42 °C, in condizioni di bassa osmolarità, e che tale fenotipo può essere compensato da una sovraespressione di ϵ ad una temperatura consentita di 30 °C per cinque ore prima di portare la temperatura fino al valore altrimenti non sostenibile (Bressanin et al., 2009). L'estensione della degradazione da parte delle proteasi ClpP e GroL regola l'assemblaggio in vivo della DNA polimerasi III, poiché la zona di ϵ interessata dalla loro azione contiene l'area di legame alla subunità α e risulta pertanto un fattore limitante la disponibilità di subunità integra disponibile per l'incorporazione nel core. Questo dato suggerisce che la quantità di ϵ presente nella cellula debba essere in eccesso rispetto al rapporto stechiometrico con α , o che alternativamente parte di essa sia protetta dalla degradazione e sia mantenuta in una forma più stabile. L'instabilità della porzione C-terminale non consente di purificare facilmente in forma solubile l'intera subunità a seguito di

sovraespressione, in quanto gran parte della proteina non si conforma correttamente e forma aggregati, precipitando sotto forma di corpi inclusi (Scheuermann e Echols, 1984). Mutazioni a carico del gene *dnaQ* codificante per ϵ portano alla comparsa di fenotipi fortemente mutatori, in alcuni casi fino al punto da non essere vitali se non associati ad alleli antimutatori della subunità α (Fijalkowska e Schaaper, 1996). Le varianti più mutageniche di ϵ non letali si contraddistinguono per una frequenza di mutazioni introdotte pari ad un errore ogni 10^4 - 10^5 paia di basi replicate, superiore al fattore di fedeltà fornito alla replicazione dall'attività di proofreading, dell'ordine di 10^2 - 10^3 . Questo effetto deriva dal numero eccessivo di appaiamenti sbagliati inseriti durante la sintesi del nuovo filamento di DNA, che supera la capacità di correzione dei sistemi di riparo post-replicativi, saturandoli e portando all'accumulo di mutazioni (Schaaper e Radman, 1989). I mutanti di ϵ introducono trasversioni con una frequenza doppia rispetto alle transizioni (Wu et al., 1990) e possono presentare un fenotipo dominante, come nel caso dell'allele *mutD5*, o recessivo, come ad esempio *dnaQ49*. Nel primo caso ad essere mutati sono uno o più amminoacidi funzionali che portano ad una diminuzione o alla scomparsa dell'attività esonucleasica, mentre nel secondo caso le mutazioni sono a carico di residui necessari per il legame ad α (Taft-Benz e Schaaper, 1998).

1.5 La subunità θ

La subunità θ è la più piccola fra le proteine componenti il core catalitico, non ha un'attività enzimatica definita ed il suo gene codificante *holE* può essere deletato dal cromosoma senza portare ad un fenotipo rilevabile (Slater et al., 1994). Il gene *holE* ha un livello di espressione naturalmente basso a causa della presenza, nella sua sequenza, di un'elevata percentuale (10.5 %) di codoni rari, spesso associati ad un basso livello di espressione (Carter et al., 1993). Il ruolo di θ all'interno della DNA polimerasi III non è ancora stato determinato, ma i risultati di alcuni esperimenti permettono di ipotizzare una funzione associata al mantenimento della stabilità di ϵ . Studi condotti con ceppi privi del gene *holE* mostrano che l'assenza di θ porta ad un lieve aumento della mutagenicità spontanea in presenza di un allele wild type di ϵ , ma ad un incremento di un fattore fino a 10^3 nel caso in cui siano presenti alleli di ϵ mutagenici e termosensibili come *dnaQ49* (Taft-Benz e Schaaper, 2004). Questo effetto è rilevabile anche alla temperatura consentita di 30 °C ed è più evidente nei casi in cui la mutazione ricade nella zona di interazione fra ϵ ed α , il che porta a pensare che θ possa agire, direttamente o

indirettamente tramite la stabilizzazione di ϵ , per garantire un corretto assemblaggio del core. Una conferma parziale di questa ipotesi è data dal forte aumento della capacità di legame fra α ed ϵ in presenza di θ (Taft-Benz e Schaaper, 2004). È stato osservato che θ aumenta di circa tre volte l'attività di ϵ in vitro (Studwell-Vaughan e O'Donnell, 1993) ed è inoltre in grado di innalzare la temperatura di inattivazione termica di quest'ultima di 14 °C quando vi si lega a formare un complesso (Hamdan et al., 2002 B). L'associazione di θ con ϵ -186, inoltre, ne diminuisce la formazione di aggregati in miscele di solventi organici ed acqua (Gupta et al., 2004). Sequenze codificanti per omologhi di θ sono state ritrovate in molti enterobatteri Gram negativi in cui la replicasi è una DNA polimerasi della famiglia C, ma anche in due plasmidi di *Proteus vulgaris* e *Salmonella enterica* e nel genoma del batteriofago P1. Di questi omologhi, il più caratterizzato e più interessante per lo studio della funzione di θ è la proteina HOT (Homologous Of Theta) di P1, codificata dal gene *hot* (Lobocka et al., 2004), che presenta un grado di omologia con θ del 65 % ed un grado di identità del 53 %. Il batteriofago P1 replica infatti il proprio genoma utilizzando il sistema replicativo del batterio ospite e non codifica per una propria polimerasi, per cui la presenza di un gene codificante per un omologo di θ in un genoma compatto e limitato assegna a HOT, e di conseguenza alla stessa θ , un ruolo sicuramente importante anche se non identificato. Studi genetici hanno dimostrato che il gene *hot* è espresso sia durante la fase di profago che durante la fase litica, ma non è essenziale per la replicazione del fago, nemmeno nel caso in cui la cellula infettata sia priva del gene *hole* (Chikova e Schaaper, 2007). La proteina HOT può complementare l'assenza di θ nella stabilizzazione di alleli mutagenici di ϵ , ma in maniera peculiare rispetto alla sua omologa. Se alcuni alleli sono infatti stabilizzati allo stesso livello da entrambe le proteine, HOT può in altri casi avere un effetto maggiore, come nel caso di *dnaQ49*, o nullo, come nel caso di *dnaQ928*, indicando un diverso sistema di azione delle due subunità (Chikova e Schaaper, 2005). Su questo aspetto si possono notare differenze anche fra un ceppo privo del gene *hole* e lo stesso ceppo in cui *hot* ne complementa l'assenza. La presenza di *hot* non complementa né modifica la frequenza di mutazioni derivante dalla delezione di *hole*, ma ne cambia la specificità; nel caso del ceppo delecto predominano infatti le trasversioni A-T->T-A, mentre il ceppo esprime HOT inserisce un maggior numero di transizioni G-C->A-T, il che mostra nuovamente che le due proteine agiscono in maniera fra loro differente. Utilizzando chimere θ -HOT è stato inoltre possibile dimostrare che il fenotipo associato a HOT deriva dai primi 12 residui della sua estremità N-terminale (Chikova e Schaaper, 2006). La struttura di θ è stata

determinata mediante NMR in soluzione acquosa (Keniry et al., 2000), ottenendo tuttavia valori conformazionali distorti a causa dell'esposizione al solvente di zone idrofobiche, che è stato possibile risolvere correttamente solo mantenendo la proteina in una miscela acqua-etanolo (Mueller et al., 2005). HOT risulta invece più solubile, ed è stato possibile acquisire un suo spettro NMR in solvente acquoso (DeRose et al., 2004) (Figura 9).

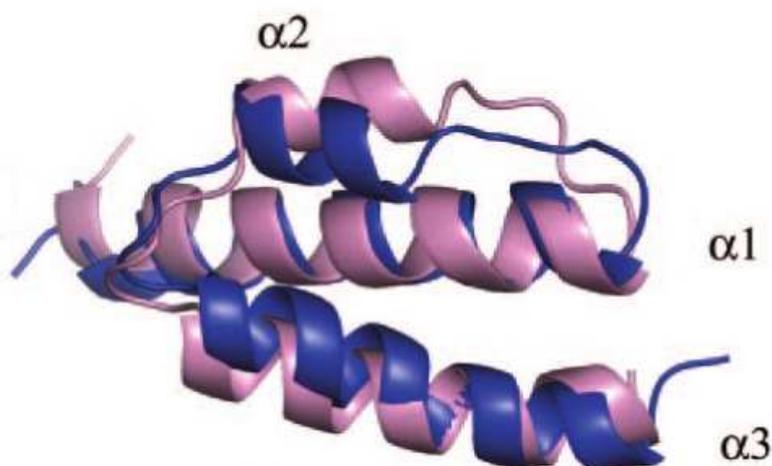


Figura 9 (Mueller et al., 2005): confronto fra le strutture di θ (in blu) e HOTA (in rosa)

Entrambe le proteine si organizzano in tre α -eliche nell'ordine $\alpha 3$ - $\alpha 1$ - $\alpha 2$, ma si distinguono principalmente per l'orientamento dell'elica $\alpha 2$ e per la conformazione dell'estremità N-terminale, che in θ contiene residui idrofobici assenti nella sequenza di HOTA, il che spiega le differenze di solubilità in acqua. Sia per θ (Keniry et al., 2006) che per HOTA (Kirby et al., 2006) sono stati ottenuti dati strutturali, con tecniche NMR nel primo caso e cristallografiche nel secondo, del complesso formato con $\epsilon 186$ (Figura 10).

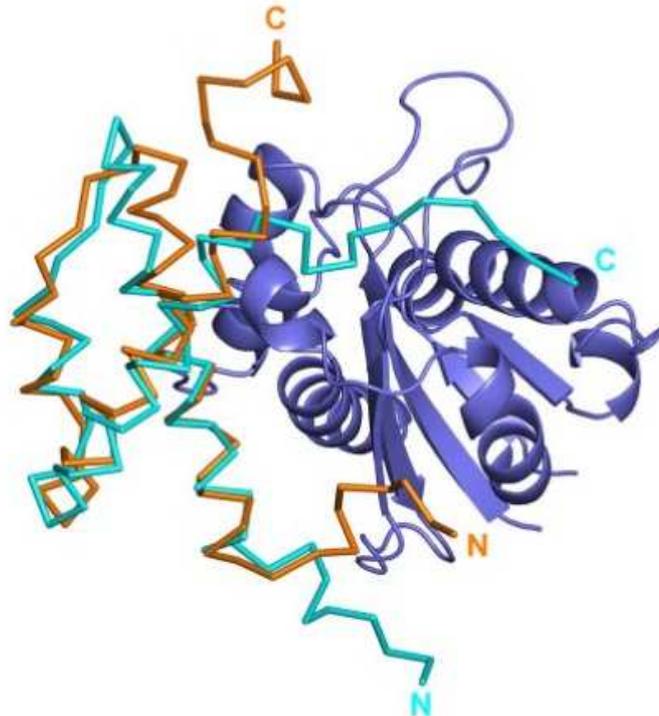


Figura 10 (Kirby et al., 2006): sovrapposizione delle strutture di θ (azzurro) e HOT (arancione) legate ad ϵ (blu)

Per quanto riguarda θ , la zona di legame coinvolge principalmente residui idrofobici esposti sulla superficie di entrambe le subunità (DeRose et al., 2003) ma non interessa direttamente il sito catalitico di ϵ . Precisamente, l'area di θ che interagisce maggiormente è costituita dall'elica $\alpha 1$, dai residui C-terminali dell'elica $\alpha 3$ e dai residui N-terminali, che sono i più vicini agli amminoacidi del sito attivo (Keniry et al., 2006). Per quanto riguarda HOT invece la struttura del complesso con $\epsilon 186$ è stata ottenuta in presenza del suo prodotto artificiale di reazione TMP e di ioni Mn^{2+} come precedentemente riportato per $\epsilon 186$ (Hamdan et al., 2002 A). Anche in questo caso l'area di HOT che interagisce con ϵ comprende principalmente i residui N-terminali della proteina e la porzione C-terminale dell'elica $\alpha 1$. In entrambi i casi le due aree di legame coprono un'ampia superficie idrofobica altrimenti esposta di ϵ , il che spiega l'effetto protettivo e stabilizzante esercitato dalle due proteine. HOT prende inoltre contatto con l'estremità libera del foglietto $\beta 3$ di ϵ stabilizzandola ulteriormente, poiché questo tipo di estremità tende ad agire come sito di interazioni aspecifiche (Richardson e Richardson, 2002).

1.6 La superfamiglia PHP

Il dominio PHP (Polymerase and Histidinol Phosphatase) è caratterizzato da quattro motivi conservati, contenenti istidine, individuati tramite analisi bioinformatiche nelle sequenze di polimerasi di diverse famiglie e di proteine a singolo dominio espresse in batteri, archea e lieviti (Aravind e Koonin, 1998) (Figura 11). Di queste ultime l'unica di cui sia stata finora individuata una funzione enzimatica definita è la istidinolo fosfatasi di lievito, che catalizza la reazione di idrolisi del legame fosfoesterico dell'istidinolo-fosfato, liberando istidinolo (Jones e Fink, 1982) nella via biosintetica dell'istidina. Altre proteine a dominio singolo sono state caratterizzate come fosfo-tirosino fosfatasi coinvolte nella biosintesi dei polisaccaridi della capsula in *Streptococcus pneumoniae*, in cui la proteina CpsB agisce defosforilando la proteina CpsD in presenza di Mn^{2+} (Morona et al., 2002), e in *Lactobacillus rhamnosus*, in cui la proteina WzB sembra svolgere un ruolo simile mostrando una peculiare dipendenza da ioni Cu^{2+} e Co^{2+} (LaPointe et al., 2008).

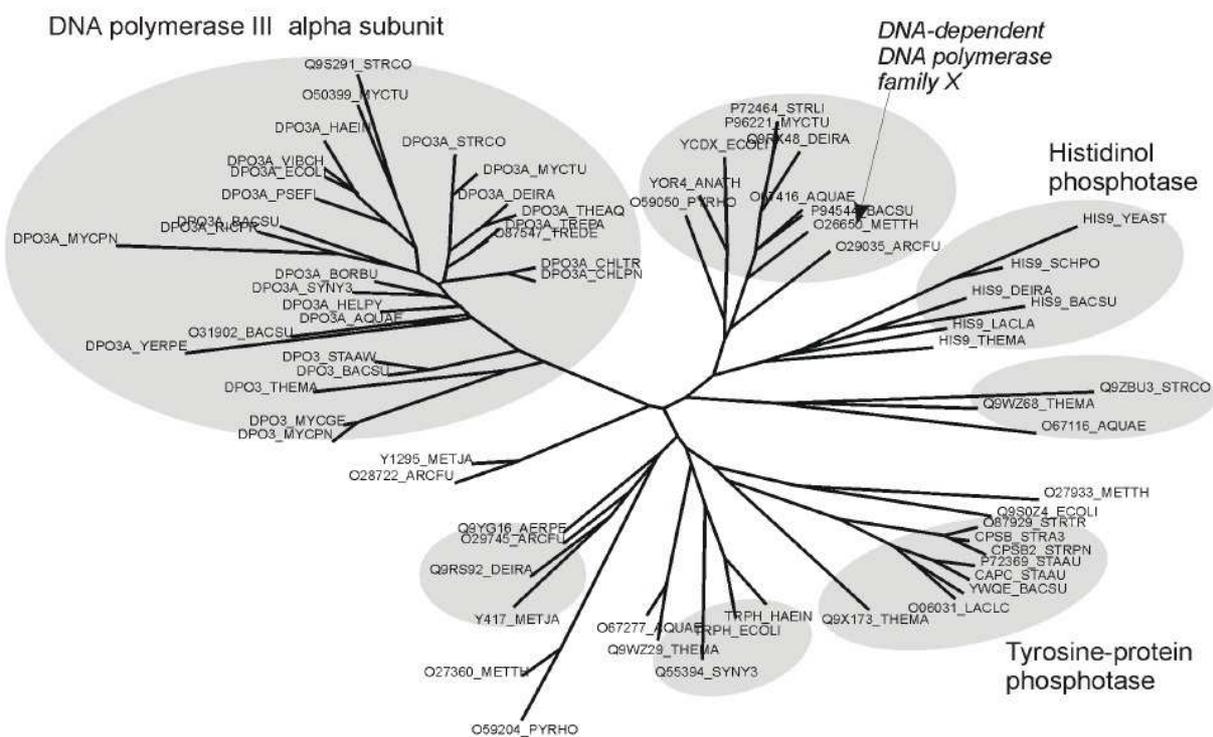


Figura 11 (Kalinina et al., 2009): albero filogenetico della famiglia di proteine contenenti il dominio PHP

La struttura del dominio è stata risolta per più proteine appartenenti a differenti specie, come l'istidinolo fosfato fosfatasi HB8 di *Thermus thermophilus* (Omi et al., 2007) e la proteina YcdX

a funzione ignota di *Escherichia coli* (Teplyakov et al., 2003) e si configura come un $\alpha_7\beta_7$ TIM barrell distorto. Una simile architettura a sette eliche e sette foglietti è comune solamente alla famiglia delle cellulasi (Spezio et al., 1993), da cui però le proteine con dominio PHP si differenziano sia per quanto riguarda la conformazione del possibile sito attivo sia per le funzioni enzimatiche riscontrate o ipotizzate. In banca dati sono inoltre disponibili informazioni strutturali relative a DNA polimerasi della famiglia X, in cui il dominio PHP si situa all'estremità C terminale della proteina, come la polimerasi PolX di *Deinococcus radiodurans* (Leulliot et al., 2009), e della famiglia C, in cui il dominio PHP si situa all'estremità N terminale, come le DNA polimerasi α di *Thermus aquaticus* (Bailey et al., 2006) e di *Escherichia coli* (Lamers et al., 2006). Una caratteristica delle polimerasi della famiglia C è inoltre l'orientamento assunto dal filamento β_4 , che risulta anti-parallelo rispetto agli altri. Nel caso delle polimerasi PolC la struttura del dominio PHP non è continua, ma contiene al suo interno un dominio avente attività esonucleasica 3'-5' inserito nel loop collegante il filamento β_3 a quello β_4 , come nel caso della PolC di *Geobacillus kaustophilus* (Evans et al., 2008). I residui di istidina e di aspartato in grado di coordinare ioni metallici a fini potenzialmente catalitici identificati nei motivi conservati si situano in corrispondenza dell'estremità C terminale dei filamenti β , ovvero la posizione canonica attesa del sito attivo nei barili $\alpha\beta$. I metalli coordinati all'interno del sito sono solitamente tre, ma nelle polimerasi batteriche del phylum Proteobacteria, come *Rickettsia*, *Escherichia coli* e *Haemophilus influenzae*, alcuni dei residui responsabili del legame sono sostituiti da altri non in grado di svolgere questo ruolo, indicando una possibile perdita di funzione o una limitazione nel numero di metalli coordinabili (Figura 12).

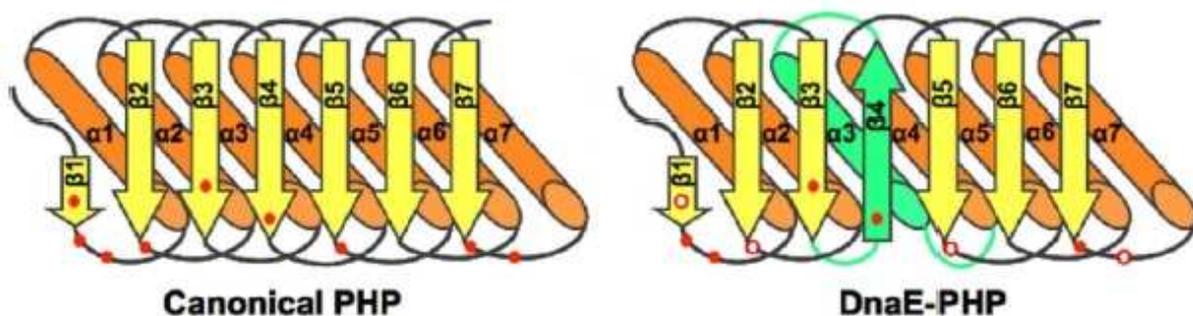


Figura 12 (Evans et al., 2008): struttura del barile $\alpha_7\beta_7$ del dominio PHP. I pallini rossi vuoti indicano i residui conservati assenti nella DNA polimerasi III di *Escherichia coli*

In alcune polimerasi il dominio PHP è stato associato ad un'attività 3'-5' esonucleasica dipendente da ioni metallici divalenti, come nel caso della DNA polimerasi X di *Bacillus subtilis*, che necessita di ioni Mn^{2+} , (Baños et al., 2008) e della DNA polimerasi α di *Thermus thermophilus*, che invece utilizza ioni Zn^{2+} ed è aggiuntiva alla medesima attività catalizzata dalla subunità esonucleasica ϵ (Stano et al., 2006). In *Bacillus subtilis* è stata inoltre identificata nello stesso dominio un'attività endonucleasica 3'-5' di siti apurinici e apirimidinici, anche questa Mn^{2+} dipendente (Baños et al., 2010). Esperimenti di delezione condotti sulla DNA polimerasi X di *Deinococcus radiodurans* hanno dimostrato che il dominio PHP, pur non avendo un'attività catalitica propria, riveste un importante ruolo strutturale per il mantenimento della funzionalità esonucleasica 3'-5' della proteina intera e del folding corretto (Blasius et al., 2006).

1.7 Il dominio PHP in *Escherichia coli*

Il dominio PHP nella subunità α della DNA polimerasi III di *Escherichia coli* comprende i primi 272 amminoacidi dell'estremità N terminale dell'enzima e si situa nella struttura tridimensionale a mano destra nella posizione corrispondente al polso, in stretto contatto con il dominio del pollice (Figura 5). La conformazione del dominio è quella di un barile $\alpha_7\beta_7$ con sette eliche disposte a circondare sette foglietti β tutti paralleli fra loro ad eccezione del foglietto β_4 , che si orienta in senso opposto. Nella struttura di α è possibile individuare un canale di dimensioni sufficienti a far scorrere una molecola di DNA che pone in collegamento il sito attivo polimerasico del palmo con una cavità nel dominio PHP. Il canale è delimitato da due loop, di cui il primo comprendente i residui 107-116 ed il secondo, che chiude superiormente la cavità, costituito dai residui 201-240. All'interno della tasca si ritrova nella struttura cristallografica una molecola di fosfato, possibile substrato o prodotto di una reazione enzimatica catalizzata nel sito (Lamers et al., 2006). La stessa cavità si ritrova in altre proteine della superfamiglia PHP e corrisponde al sito di coordinazione dei metalli, come nella proteina YcdX di *Escherichia coli* (Teplyakov et al., 2003) e nella subunità p30 della ribonucleasi P di *Pirococcus horikoshii* (Takagi et al., 2004), ma la configurazione dei residui funzionali è molto diversa. Nel dominio PHP della subunità α sono infatti assenti tre dei residui istidinici necessari per chelare gli ioni zinco nella proteina YcdX, mentre nel caso della ribonucleasi P i residui coinvolti nell'attività enzimatica sono rivolti verso la superficie della

proteina. Una maggiore similarità nella disposizione dei residui all'interno della tasca si riscontra invece con il sito attivo della pirofosfatasi II di *Streptococcus mutans* (Merckel et al., 2007) e della esonucleasi 5'-3' di filamenti a singola catena RecJ di *Thermus thermophilus* (Yamagata et al., 2002), entrambi enzimi appartenenti alla superfamiglia DHH (Asp, His, His) (Figura 13).

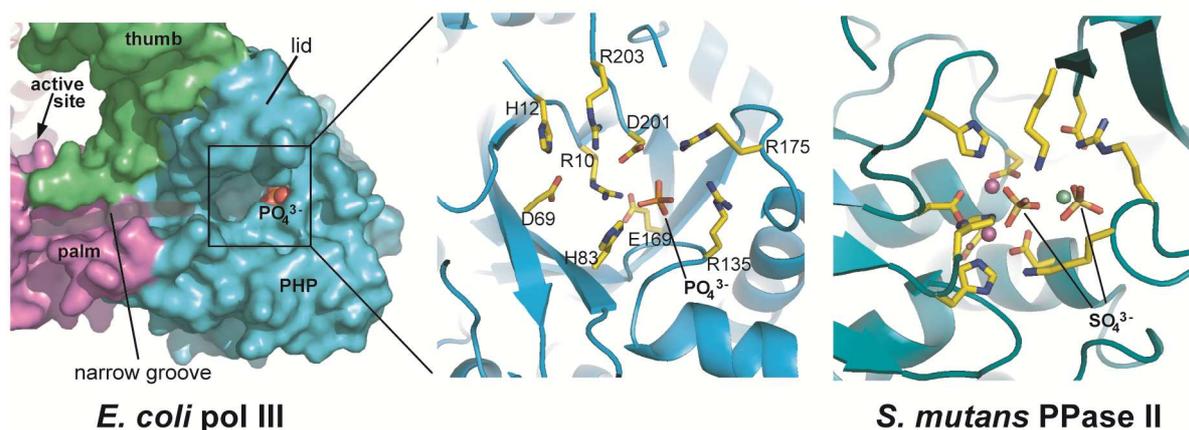


Figura 13 (Lamers et al., 2006): confronto fra il sito di legame del fosfato nella subunità α e il sito attivo della pirofosfatasi II di *S.mutans*. Le sfere verdi rappresentano ioni Mg^{2+} , le viola ioni Mn^{2+}

Il meccanismo di azione degli enzimi appartenenti alla famiglia delle pirofosfatasi II prevede il coordinamento di tre ioni metallici divalenti, ad esempio Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} e Co^{2+} , che possono occupare i siti di legame e favorire la reazione con diversa efficacia catalitica (Fabrichniy et al., 2004), il che permette di ipotizzare una disposizione simile anche per il dominio PHP. Il dominio PHP rappresenta il sito di interazione di α con la subunità ϵ . È stato infatti dimostrato che la delezione della porzione del gene *dnaE* codificante per i primi 60 residui del dominio PHP porta alla produzione di una subunità α incapace di legare ϵ (Wieczorek e McHenry, 2006). Il ceppo recante la delezione mostra inoltre una ridotta attività polimerasica, il che permette di associare al dominio PHP anche un ruolo importante nella funzionalità dell'enzima durante la replicazione, pur in assenza di interazioni dirette col sito catalitico. L'analisi di tre differenti mutanti a livello del residuo di aspartato D43 ha permesso di dimostrare che la capacità di legare ϵ e l'influenza nei confronti dell'attività catalitica di α non sono fra loro strettamente correlate, in quanto le diverse sostituzioni del residuo portano ad ottenere o entrambi gli effetti o solo uno dei due senza conseguenze significative sull'altro (Wieczorek e McHenry, 2006). È interessante notare come il residuo D43 sia strettamente conservato in tutte le sequenze di domini PHP sinora individuate, pur non essendo situato

all'interno della tasca del possibile sito attivo e non avendo pertanto un ruolo di coordinazione dei cofattori metallici, il che indica un suo probabile ruolo essenziale nel mantenimento di un corretto folding o nel coordinamento dell'attività enzimatica esercitata dal PHP con quella polimerasica della stessa α . Nel dominio PHP sono state caratterizzate anche altre tre mutazioni, *dnaE74* (G134R) (Sevastopoulos e Glaser, 1977), *dnaE511* (T260I) (Wechsler e Gross, 1971) e *mut1* (G133D) (Bierne et al., 1997), in nessun caso coinvolgenti residui inclusi nei motivi conservati, che portano a fenotipi mutatori e termosensibili (Figura 14).

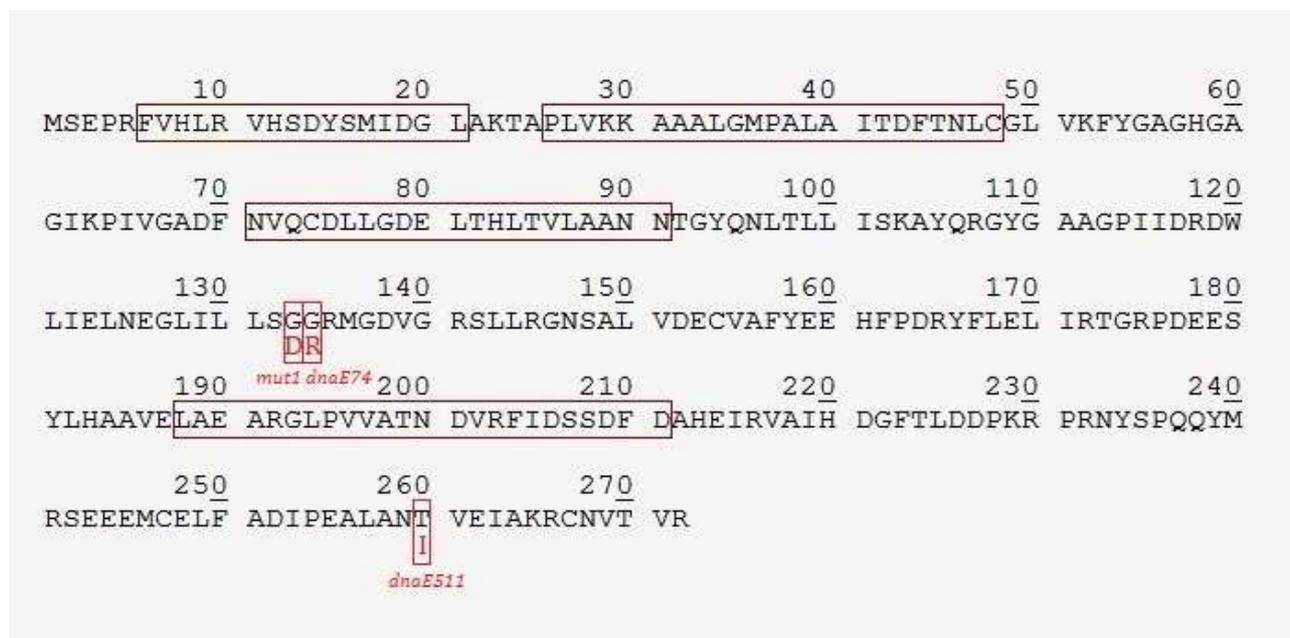


Figura 14: sequenza amminoacidica del dominio PHP con evidenziati i quattro motivi conservati ed i siti corrispondenti alle mutazioni caratterizzate

Nel caso dei ceppi *dnaE74* e *dnaE511* la frequenza di mutazioni osservata è stata associata ad una diminuzione dell'abilità dell'enzima di competere nel legame alle estremità 3' dei primer con le altre polimerasi aventi un minor grado di accuratezza replicativa, come la DNA polV, che introdurrebbero quindi un maggior numero di errori durante la replicazione del cromosoma (Vandewiele et al., 2002). Anche il ceppo *mut1* si caratterizza per una maggior dissociazione dell'enzima dal sito di replicazione a seguito dell'introduzione di nucleotidi errati che favorisce la ricombinazione omologa RecA-indipendente secondo un meccanismo comune ad altri ceppi mutatori in *dnaE* (Bierne et al., 1997). Il fatto che sia possibile trovare mutazioni nel dominio PHP che portino allo sviluppo di ceppi mutatori è un'ulteriore indicazione che porta ad ipotizzare un suo coinvolgimento attivo durante la replicazione del

DNA. Si può notare che due delle tre mutazioni, *dnaE74* e *mut1*, modificano due residui di glicina in sequenza al termine del foglietto β_5 , in prossimità dei presunti siti di coordinazione dei metalli. Ciò porta a pensare che il fenotipo osservato nei due mutanti sia dovuto ad una modificazione nella conformazione del potenziale sito attivo del dominio PHP.

1.8 Scopo della tesi

Per quanto siano trascorsi più di 20 anni dall'identificazione della DNA polimerasi III come enzima responsabile della replicazione del genoma di *Escherichia coli*, non tutti gli aspetti relativi al ruolo svolto dalle sue subunità ed al suo meccanismo di azione sono stati rivelati. È stato osservato che le interazioni fra le tre subunità costituenti il core, disposte nell'ordine α - ϵ - θ , comportano reciproche stimolazioni dell'attività anche quando il legame non sia diretto, come nel caso di θ con α . Una particolare importanza sia dal punto di vista strutturale che funzionale è rivestita quindi dalle zone di contatto fra le differenti subunità, che, considerata la disposizione adottata, assegnano ad ϵ una funzione centrale, come dimostrato dal suo ruolo essenziale e limitante per l'assemblaggio del core (Bressanin et al., 2009). Lo studio condotto nel presente lavoro di Tesi si è quindi rivolto allo studio della funzione svolta degli interattori diretti di ϵ , ovvero la subunità θ , che interagisce con ϵ all'estremità N terminale di quest'ultima, ed il dominio PHP della subunità α , che invece prende contatto con l'estremità C terminale, per comprenderne la funzione specifica ed il ruolo esercitato all'interno del complesso. Sia per θ (Taft-Benz e Schaaper, 2004) che per il dominio PHP di α (Wieczorek e McHenry, 2006) è stato infatti ipotizzato un ruolo nel favorire un corretto assemblaggio del core. Per perseguire tale obiettivo, sono state condotte tre linee di ricerca parallele, miranti alla definizione dell'azione di θ , alla caratterizzazione funzionale del dominio PHP ed alla co-espressione delle tre proteine del core per ottenere un cristallo dell'intero complesso.

Per quanto concerne la prima linea, sono stati condotti esperimenti per definire l'azione di θ nei confronti di ϵ nei vari sub-assemblaggi in cui essa può essere presente nella cellula, per verificare verso quale stadio dell'assemblaggio del core se ne verifichi l'azione stabilizzante ipotizzata in letteratura (Taft-Benz e Schaaper, 2004). A questo fine sono stati progettati ed eseguiti esperimenti di delezione e sovraespressione di θ , determinandone l'effetto mediante cromatografie di gel filtrazione accoppiate a saggi di attività esonucleasica. In parallelo e con le stesse modalità è stato valutato anche l'effetto della proteina HOT, omologa di θ ed espressa dal batteriofago P1, per comprendere la ragione per cui un fago con un genoma ridotto codifichi per un omologo di una proteina dispensabile nel suo ospite. È stata inoltre condotta un'analisi in vivo dell'azione di θ valutando la sua capacità di complementare la delezione del gene *dnaK* in condizioni di bassa osmolarità ed alta temperatura, condizioni in cui la vitalità di *Escherichia coli* è strettamente dipendente dalla sovraespressione di ϵ per compensarne l'instabilità (Bressanin et al., 2009). Anche in questo caso è stato studiato come l'effetto nei

confronti della stabilità di ϵ si ripartisse fra i diversi sub-assemblaggi della DNA polimerasi dopo differenti tempi di coltura in condizioni destabilizzanti.

Un secondo scopo di questa tesi è stato quello di assegnare una funzione al dominio PHP della subunità α , al quale finora non è stata associata alcuna attività enzimatica. Partendo da uno studio condotto in silico sul possibile sito attivo del dominio, che ha riscontrato una similarità strutturale con le pirofosfatasi della famiglia II, è stata ipotizzata una possibile attività pirofosfatasica, che potrebbe essere in accordo con i dati strutturali disponibili. Per verificare quest'ipotesi la subunità α ed il singolo dominio PHP sono stati sovraespressi e purificati per essere sottoposti ad un saggio di attività pirofosfatasica appositamente messo a punto. Poiché per altre DNA polimerasi della famiglia C è stato dimostrato che il dominio PHP presenta un'attività esonucleasica aggiuntiva a quella della subunità ϵ (Stano et al., 2006) anche quest'ipotesi è stata valutata sperimentalmente con un apposito saggio.

Alla luce della mancanza di dati completi riguardanti le tre subunità del core, un terzo obiettivo è stato quello di mettere a punto un sistema di co-espressione di proteine basato su due plasmidi aventi origini di replicazione compatibili. Questo sistema ha permesso di esprimere contemporaneamente le tre subunità α , ϵ e θ , il cui complesso assemblato in vivo è stato purificato al fine di ottenerne il cristallo. Il medesimo sistema è stato inoltre modificato ed applicato alla costruzione di un ceppo di *Escherichia coli* mutatore condizionale fenotipicamente associato alla mutazione D12A della subunità *dnaQ*.

Nel complesso lo scopo finale del presente lavoro di Tesi è stato quello di approfondire le conoscenze riguardanti il core della DNA polimerasi III, definendo il ruolo della subunità θ e del dominio PHP di α al suo interno, sia da un punto di vista strutturale che funzionale.

CAPITOLO 2 - MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI

2.1.1 Ceppi batterici

Nel corso del presente lavoro di ricerca sono stati utilizzati i seguenti ceppi di *Escherichia coli*:

- BW25993 (F⁻, $\Delta(\text{araD-araB})567$, *rph-1*, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, *hsdR514*), *recA1907::cat-aadA*) (*Escherichia coli* Genetic Stock Center, CSGC, Yale) delecto o meno del gene *holE* ($\Delta\text{holE777}::\text{kan}$), eventualmente trasformato con uno fra i plasmidi: pBAD, pBAD-*holE* o pBAD-*hot*. La delezione del gene *holE* è stata ottenuta mediante trasduzione con il fago P1 utilizzando il ceppo JW1831-1 (CSGC, Yale) come donatore.
- BW25113 (F⁻, $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}::\text{rrnB-3}$), λ , *rph-1*, $\Delta(\text{rhaDrhaB})568$, *hsdR514*), *recA1907::cat-aadA*) (CSGC, Yale) delecto o meno del gene *dnaK* ($\Delta\text{dnaK734}::\text{kan}$) (CSGC, Yale) contenente uno dei seguenti plasmidi: pBAD, pBAD-*dnaQ*, pBAD-*holE* o pBAD-*hot*
- TOP10 (F⁻, *mcrA*, $\Delta(\text{mrr-hsdMRS-mcrBC})$, ΔlacX74 , ϕ 80*lacZDM15*, *endA1*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(\text{araA-leu})7697$, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str^R), *nupG*) (Invitrogen) trasformato con uno o più fra i plasmidi pBAD-*dnaE*, pBAD-*dnaE287*, pGOOD-*dnaQ*, pGOOD-*dnaQ-holE*, pBAD-*lacI*, pBAD-*lacI^{TS}*, pGOOD1-*dnaQD12A*

2.1.2 Vettori plasmidici

I vettori plasmidici utilizzati nel presente lavoro sono stati acquisiti dalle aziende indicate ed eventualmente digeriti con enzimi di restrizione forniti dalla NEB (New England Biolabs).

Il plasmide pBADHis B (Invitrogen) è un vettore di espressione con un origine di replicazione pBR322 della famiglia ColE1 nel quale l'espressione dei geni clonati nel polylinker è regolata dal promotore *araBAD*. In assenza di arabinosio l'espressione è repressa dalla proteina AraC, che in presenza di arabinosio funge da attivatore trascrizionale (Figura 15).

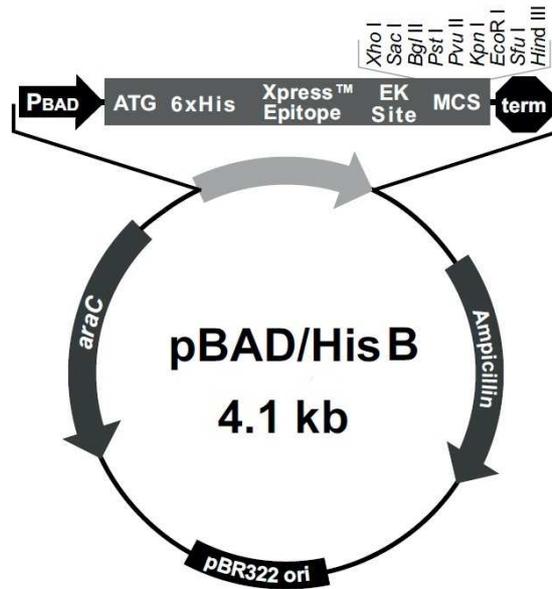


Figura 15: vettore di espressione pBADHis B (Invitrogen)

I costrutti pBAD-*dnaE*, pBAD-*dnaE287* e pBAD-*dnaQ* sono stati descritti in letteratura (Bressanin et al., 2009). I geni sintetici *holE*, *hot*, *dnaQ-holE*, *lacI*, *lacI^{TS}* e *dnaQD12A*, ai cui lati sono stati inseriti i siti di restrizione per gli enzimi NcoI e PstI, sono stati sintetizzati dalla ditta Entelechon (Bad Abbach, Germania) ed inseriti nei plasmidi pBAD e pGOOD, la cui costruzione è di seguito descritta, utilizzando i siti indicati. La T4 DNA ligasi (NEB) e la fosfatasi alcalina CIAP (Fermentas) sono state utilizzate seguendo il protocollo fornito dai produttori. Per la costruzione del nuovo vettore di espressione pGOOD sono stati utilizzati i due plasmidi pTRCHisB (Invitrogen) e pACYC184 (NEB). Il primo contiene un'origine di replicazione pBR322 ed un sistema di espressione inducibile mediante IPTG, il secondo contiene invece un'origine di replicazione p15A (Figura 16).

Le piastre di terreno solido sono state preparate aggiungendo ai terreni liquidi 15 g/l di agar prima della sterilizzazione, condotta in autoclave a 120 °C per 20 minuti. Per la selezione dei ceppi resistenti sono stati utilizzati i seguenti antibiotici, alle concentrazioni finali indicate:

- Ampicillina 100 µg/ml
- Kanamicina 40 µg/ml
- Tetraciclina 15 µg/ml
- Cloramfenicolo 20 µg/ml
- Rifampicina 100 µg/ml

2.1.4 Colonne cromatografiche

Per la purificazione degli estratti proteici sono state utilizzate le seguenti colonne cromatografiche (GE Healthcare), mantenute a 4 °C durante l'uso:

- Colonna Superdex 200 (gel filtrazione) di 1.6 X 70 cm, con un volume totale di 140 ml, caricata mediante un loop iniettore da 1 ml ad un flusso costante di 0.6 ml/min. La colonna è stata calibrata utilizzando i marcatori di peso molecolare dei kit "HMW and LMW Gel Filtration Calibration kits" (GE Healthcare)
- Colonna a scambio anionico Q-Sepharose FF di 1.6 X 25 cm, con un volume totale di 50 ml
- Colonna di affinità Cibacron Blue di 1.6 X 15 cm, con un volume totale di 20 ml
- Colonna di affinità HiTrap Heparin HP di 1.6 X 2.5 cm, con un volume totale di 5 ml
- Colonna a scambio anionico Resource-Q di 6.4 X 30 mm, con un volume totale di 1 ml

Tutte le cromatografie sono state condotte utilizzando un cromatografo GradiFrac (Pharmacia Biotech).

2.2 METODICHE GENERALI

2.2 A - Manipolazione del DNA

2.2.1 Elettroforesi in gel di agarosio

I gel per elettroforesi di DNA sono stati preparati ad una concentrazione pari allo 0.7% (peso/volume) di Certified Molecular Agarose (Bio-Rad), disciolto in tampone TAE (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA). Prima del caricamento ai campioni di DNA è stato aggiunto l'addensante DNA Loading Dye 6X (Fermentas) e la corsa è stata condotta impiegando tampone TAE in una camera elettroforetica Bio-Rad, mantenendo un voltaggio costante di 90 V per circa 45-50 minuti. Al termine della corsa la rilevazione delle bande è stata ottenuta incubando il gel in agitazione, per 30 minuti, in una soluzione acquosa di etidio bromuro 1 µg/ml ed analizzando i risultati con Molecular Imager Gel Doc (Bio-Rad).

2.2.2 Estrazione del DNA da gel

L'estrazione delle bande di DNA di interesse da gel d'agarosio è stata condotta utilizzando il kit Qiaquick spin kit (Qiagen) secondo il protocollo indicato dal produttore per le bande di dimensione inferiore a 3000 bp, mentre le bande di dimensioni superiori sono state estratte utilizzando il kit Freeze 'N Squeeze (Bio-Rad) come da indicazioni del fornitore. Il DNA eluito con questo secondo metodo è stato concentrato con filtri Montage-PCR (Millipore) e risospeso in un adeguato volume di acqua sterile.

2.2.3 Preparazione di cellule competenti per l'elettroporazione

Le cellule competenti per l'elettroporazione sono state preparate rilanciando 1:100 una coltura over-night in 25 ml di terreno LB fresco, eventualmente addizionato di antibiotici. Le cellule sono state coltivate in agitazione costante (180 rpm) a 37 °C, ad eccezione dei ceppi termosensibili (30 °C), fino al raggiungimento di una densità di popolazione equivalente ad un valore di assorbanza compreso fra 0.5 e 0.7. Le cellule sono state quindi mantenute in ghiaccio per 30 minuti e centrifugate a 4000 g per 15 minuti a 4 °C, eliminando il surnatante.

Il pellet è stato sottoposto a più cicli di lavaggio e centrifugazione nelle stesse condizioni con una soluzione di glicerolo al 10 % raffreddata in ghiaccio, risospesando il campione in un volume inizialmente pari al volume di coltura ed in seguito ridotto a 12, 5 e 2 ml. Il pellet ottenuto al termine dell'ultimo passaggio è stato risospeso in un volume di 1 ml e suddiviso in aliquote di 40 µl, conservate a -80°C.

2.2.4 Trasformazione mediante elettroporazione

Le aliquote di cellule competenti sono state scongelate e lasciate ad incubare in ghiaccio per 5 minuti dopo aver aggiunto da 1 a 6 µl di DNA plasmidico. La sospensione cellulare è stata quindi trasferita in una apposita cuvette (0.1 cm, Bio-Rad) per essere sottoposta ad un impulso di potenziale (1.8 kV, 200 ohm) mediante un elettroporatore GenePulsar II (Bio-Rad). Le cellule sono quindi state rapidamente risospese in 1 ml di terreno SOC mantenuto in ghiaccio e trasferite in una provetta Eppendorf da 1.5 ml per essere incubate a 37 °C e 180 rpm per un'ora. Al termine dell'incubazione, 100 µl di cellule sono state trasferite su una piastra di terreno LB solido, mentre le rimanenti sono state centrifugate a 13000 g per 2 minuti, risospese in 100 µl di surnatante e trasferite su una seconda piastra.

2.2.5 Estrazione di DNA plasmidico

L'estrazione del DNA plasmidico è stata effettuata utilizzando il kit Miniprep (Eppendorf) per le estrazioni analitiche ed il Plasmid Midi kit (Qiagen) per le estrazioni quantitative, utilizzando in entrambi i casi i protocolli forniti dal produttore. La quantificazione e la valutazione della purezza del DNA estratto e risospeso in acqua sterile sono state effettuate mediante determinazione dell'assorbanza a 230, 260, 280 e 320 nm utilizzando lo spettrofotometro GeneQuant Pro (Amersham Biosciences).

2.2 B - Manipolazione delle proteine

2.2.6 Quantificazione delle proteine

La determinazione della concentrazione proteica è stata effettuata secondo il metodo di Bradford (Bradford, 1976), valutando l'aumento di assorbanza a 595 nm del colorante

Coomassie Blue G-250 a seguito del legame con le proteine. La retta di taratura è stata determinata utilizzando come standard diluizioni opportune di una soluzione di albumina di siero bovino. Ogni determinazione è stata eseguita in doppio.

2.2.7 Analisi SDS-PAGE

L'analisi dei campioni proteici è stata condotta in gel di acrilamide preparati con reattivi Bio-Rad secondo il seguente protocollo:

	Running Gel	Stacking Gel
Acrilamide\bis-acrilamide	12,5%	4%
Tris-HCl pH=8,8	0,25 M	/
Tris-HCl pH=6,8	/	0,25 M
SDS	0,2%	0,2%
TEMED	0,1%	0,1%
Ammonio persolfato (APS)	0,25%	0,25%

Tabella 3: composizione dei gel di acrilamide

I campioni proteici sono stati risospesi in un tampone di caricamento denaturante 5X composto da Tris-HCL 500 mM pH 6.8, glicerolo 2.7 M, SDS 10 %, blu di bromofenolo 0.5 % e β -mercaptoetanololo 5 % e quindi bolliti per 5 minuti prima del caricamento. Le elettroforesi sono state effettuate in una cella Mini-Protean (Bio-Rad) per circa 2 ore a voltaggio costante (120 V), utilizzando un tampone di corsa Tris 25 mM, glicina 200 mM, SDS 5 mM. La colorazione delle bande proteiche del gel è stata effettuata mediante incubazione in agitazione in Coomassie brilliant blue R-250 per un'ora e mezza, seguita da due fasi di decolorazione in una soluzione di etanolo 30 % e acido acetico 10 %.

2.2.8 Saggio ELISA indiretto

L'identificazione di ϵ nelle frazioni cromatografiche è stata ottenuta mediante un saggio ELISA indiretto. I campioni sono stati diluiti ad una concentrazione di 20 μ g/ml, trasferendone 100

µl in una micropiastre di polistirene (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgio) e incubandoli a temperatura ambiente per due ore. I pozzetti sono stati quindi lavati tre volte con una soluzione Tris-Buffered-Saline (TBS), aggiungendo in seguito in ognuno 200 µl di BSA al 5% in TBS e incubando overnight a 4 °C. Dopo due lavaggi in TBS, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di anticorpo policlonale di coniglio anti-ε, descritto in precedenza (Bressanin et al., 2009), incubando per due ore. La rilevazione della proteina è stata quindi effettuata aggiungendo 200 µl di un anticorpo di capra anti-coniglio coniugato alla fosfatasi alcalina (Bio-Rad, Hercules, USA), diluito secondo le indicazioni del produttore, dopo aver lavato i pozzetti quattro volte con TBS. Al termine di un'incubazione di due ore i pozzetti sono stati nuovamente lavati quattro volte con TBS e la presenza dell'antigene è stata determinata utilizzando p-nitrofenil fosfato come substrato della fosfatasi alcalina (Harlow e Lane, 1988). La reazione è stata infine fermata aggiungendo NaOH 0.75 M, e l'assorbanza dei campioni è stata determinata con un lettore di micro piastre Bio-Rad 550.

2.2.9 Spettrometria di massa

L'eluizione delle proteine da gel di acrilamide e la seguente digestione con tripsina sono state effettuate come riportato in letteratura (Shevchenko et al., 2006). Per la separazione dei peptidi e la spettrometria di massa è stato utilizzato uno strumento Q-Tof Premier (Waters), equipaggiato con una sorgente di ioni nanospray, fornita di un apparato lock-mass per realizzare una correzione della calibrazione in tempo reale, ed accoppiato con un Waters nanoAcquity UPLC. I dati MS e MS/MS sono stati introdotti nel software Mascot (Matrix Science) per interrogare il database non ridondante di proteine del National Center for Biotechnology Information (NCBIInr). I parametri utilizzati sono stati i seguenti: finestra di accuratezza della massa per lo ione precursore, 50 ppm; finestra di accuratezza per gli ioni frammentati, 200 unità di millimassa; modificazione fissa, carbamidometilazione delle cisteine; modificazione variabile, ossidazione delle metionine.

2.2 C - Saggi di attività

2.2.10 Saggio di attività esonucleasica

I saggi per la determinazione dell'attività esonucleasica sono stati condotti secondo il protocollo pubblicato da Hamdan nel 2002 (Hamdan et al., 2002 B), basato sulla rilevazione spettrofotometrica a 420 nm del para-nitro fenolato prodotto per idrolisi del substrato artificiale 5'-p-nitrofenil estere della timidina 5' monofosfato (pNP-TMP) (Figura 17).

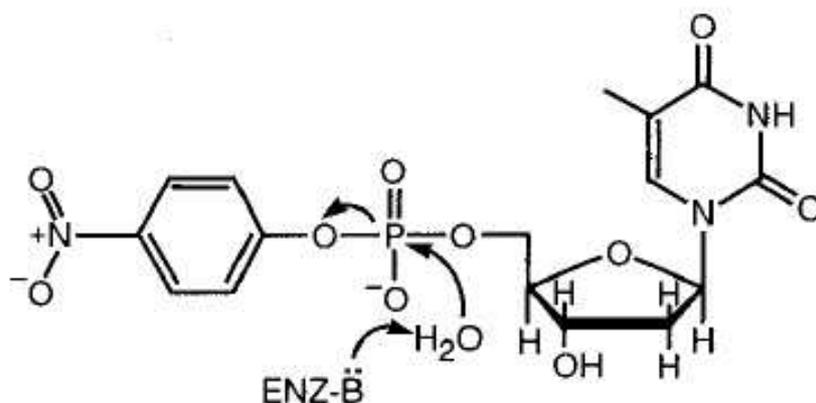


Figura 17 (Hamdan et al., 2002 B): Meccanismo di idrolisi del substrato pNP-TMP

Per dosare 140 μ l di campione in un volume finale di 200 μ l è stata utilizzata la seguente miscela di reazione: NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8, DTT 1 mM, MnCl₂ 10 mM, pNP-TMP 3 mM.

2.2.11 Saggio di attività pirofosfatasica e polimerasica

Per determinare l'attività polimerasica e l'attività pirofosfatasica è stata utilizzata una metodica messa a punto in laboratorio nel corso dell'attività di dottorato. Il saggio determina in continuo il fosfato inorganico prodotto dalla scissione del pirofosfato derivante dall'attività polimerasica attraverso una serie di reazioni enzimatiche accoppiate, indicate in tabella, che portano ad ottenere come prodotto finale una molecola di acido urico, il quale presenta una banda di assorbimento nell'ultravioletto caratterizzata da un massimo a 293 nm.

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

Tabella 4: reazioni del saggio di attività polimerasica

Nel corso delle misure è stato utilizzato uno spettrofotometro Perkin-Elmer $\lambda 19$ con una cuvette in quarzo da 1 cm ed un volume finale di reazione di 1 ml. Il substrato per la reazione polimerasica è costituito da un filamento di DNA a singola catena composto da 60 adenine al quale è stato aggiunto un ventamero di deossitimine con la funzione di primer per l'innescio della reazione. I due filamenti di DNA a singola catena sono stati sintetizzati dalla ditta Entelechon (Bad Abbach, Germania), mentre gli enzimi utilizzati sono stati acquisiti da Sigma Aldrich. La concentrazione finale dei componenti della miscela di reazione utilizzata è stata la seguente: Tris 100 mM pH 7.8, inosina 0.25 mM, pirofosfatasi 2.5 mU/ml, purina nucleoside fosforilasi 50 mU/ml, xantina ossidasi 500 mU/ml, MgCl_2 5 mM, Poly dA•Oligo dT 2.5 μM , dTTP 100 μM . Per saggiare l'effetto di differenti ioni divalenti nei confronti dell'attività polimerasica, nel saggio il MgCl_2 è stato eventualmente sostituito con un'uguale concentrazione di ZnCl_2 o MnCl_2 . Le misure di attività pirofosfatasica sono state condotte utilizzando il medesimo saggio eliminando dalla miscela di reazione la pirofosfatasi inorganica ed il DNA, sostituito da pirofosfato inorganico 10 mM. Il saggio è stato adattato all'utilizzo in micropiastra (volume finale 200 μl) aggiungendo alla miscela di reazione una concentrazione di INT (iodonitrotetrazolio) 0.5 mM, usato come accettore di elettroni dalla xantina ossidasi con conseguente produzione di formazano, il quale presenta una banda di assorbimento con un massimo a 490 nm.

2.2.12 Saggio di attività fosfatasica

L'attività fosfatasica è stata rilevata mediante un saggio spettrofotometrico basato sull'idrolisi del substrato artificiale para-nitrofenil fosfato (p-NPP), seguendo in continuo la produzione di p-nitrofenolato a 420 nm. La miscela di reazione utilizzata, del volume di 1 ml, conteneva Tris 100 mM pH 7.8, MgCl_2 10 mM, p-NPP 3 mM. Per valutare l'effetto dei metalli nei confronti

dell'attività, sono stati condotti esperimenti sostituendo il $MgCl_2$ con un'uguale concentrazione di $ZnCl_2$ o $MnCl_2$.

2.3 METODICHE PARTICOLARI

2.3.1 Cinetiche di crescita

Le cinetiche di crescita del ceppo BW25113 e di sue varianti genetiche sono state determinate seguendo spettrofotometricamente la variazione di assorbanza a 600 nm di colture cellulari di 25 ml. Tali colture sono state preparate, a partire da pre-culture overnight (rilanciate secondo una diluizione 1: 250), in terreno LB low salt (0,05 % NaCl), mantenute a 30 °C per 5 ore e quindi trasferite a 42 °C per il resto del periodo di tempo considerato, ad un'agitazione costante di 180 rpm. Qualora necessario, al terreno sono stati addizionati gli appropriati antibiotici selettivi. Le misurazioni sono state effettuate con un turbidimetro Biolog 21901.

2.3.2 Costruzione del vettore pGOOD

Il plasmide pGOOD è stato costruito a partire da un frammento del vettore commerciale pTrcHisB, contenente il sistema repressore/operatore *lac*, il polylinker ed un terminatore di trascrizione, e da un frammento del vettore pACYC184, contenente un marker di selezione per la tetraciclina e l'origine di replicazione p15A (Figura 18).

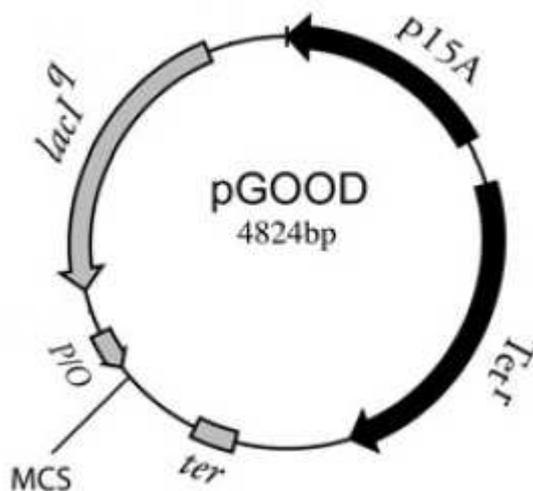


Figura 18: plasmide pGOOD. In grigio i frammenti derivanti dal plasmide pTrcHisB, in nero la porzione derivante dal pACYC184

Il vettore pTrcHisB è stato co-digerito con gli enzimi di restrizione BstZ17I e AlwNI, secondo le indicazioni fornite dal produttore, e quindi sottoposto ad una seconda reazione di digestione parziale per 4 ore a 37 °C con l'enzima SspI, utilizzato ad una concentrazione pari ad 1/20 di quella consigliata in un tampone di reazione Tris-acetato 20 mM pH 7.9, Magnesio-acetato 10 mM, Potassio-acetato 50 mM, ditiotritolo 1 mM. In tale tampone, l'enzima SspI mantiene il 50 % della propria attività massima. Il frammento desiderato, di 2470 paia di basi e corrispondente al sito di restrizione di SspI in posizione 176 sul plasmide, è stato purificato mediante elettroforesi e recuperato da gel con le metodiche descritte in precedenza. Il vettore pACYC184 è stato digerito con gli enzimi BstZ17I e MscI, purificando e recuperando da gel il frammento desiderato di 2345 paia di basi, successivamente defosforilato mediante trattamento con la fosfatasi alcalina CIAP (Fermentas). I due frammenti sono stati quindi ligati utilizzando la DNA ligasi T4 (Invitrogen). L'analisi di restrizione per la determinazione dell'orientamento dei frammenti a seguito della ligazione è stata effettuata con l'enzima SphI, analizzando su gel di agarosio il pattern di frammenti ottenuti a seguito della digestione.

2.3.3 Costruzione dei vettori pGOOD1 e pGOOD2

I plasmidi pGOOD1 e pGOOD2 sono stati costruiti a partire dal vettore pGOOD attraverso digestione completa con gli enzimi ApaI e NsiI, dopo la quale è stato recuperato da gel di agarosio il frammento corrispondente al plasmide privo del gene *lacI*. In sostituzione di tale gene sono stati inseriti due oligonucleotidi sintetici a doppio filamento, con estremità compatibili ai siti presenti sul plasmide e comprendenti le sequenze dell'operatore ideale *lacO_{id}* o dell'operatore *lacO₃*, che a seguito di ligazione hanno fornito rispettivamente i plasmidi pGOOD1 e pGOOD2 (Figura 19).

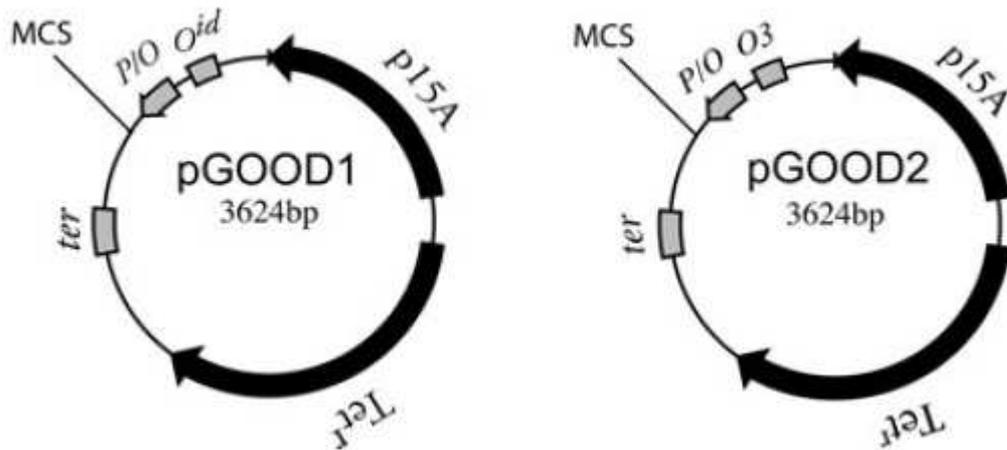


Figura 19: plasmidi pGOOD1 e pGOOD2

La distanza fra l'operatore $lacO_1$, già presente nel pGOOD nella regione p/O, e i nuovi operatori inseriti, $lacO_{id}$ o $lacO_3$, è pari a 200 paia di basi.

2.3.4 Saggi per fenotipi mutatori

Cellule competenti di *Escherichia coli* TOP10 sono state co-trasformate con il plasmide pGOOD1-*dnaQD12A* contenente una versione mutagenica di ϵ priva di attività (Fijalkowska e Schaaper, 1996) ed uno fra i vettori pBAD-*lacI* o pBAD-*lacI^{TS}*, contenenti rispettivamente il gene *lacI* o una sua versione termosensibile (Bukrinsky et al., 1988). Le cellule sono state precoltivate a 30 °C in terreno LB addizionato con arabinosio 13 mM, che induce l'espressione del gene inserito nel plasmide pBAD, e quindi diluite in rapporto 1:500 in terreno fresco LB-arabinosio 13 mM e coltivate alla medesima temperatura per 10 generazioni. Al termine della crescita, le cellule sono state quindi nuovamente diluite nello stesso terreno LB fresco contenente arabinosio e coltivate a 42 °C per ulteriori 10 generazioni. La frequenza di mutanti nella popolazione è stata determinata trasferendo un'aliquota delle culture coltivate a 30 o 42 °C su piastre LB-agar semplici o contenenti kanamicina 30 µg/ml, considerando tre colture indipendenti di ogni campione. La presenza di kanamicina nel terreno permette di selezionare i ceppi mutanti con una sensibilità maggiore di quella riscontrata con l'utilizzo della rifampicina (Monteiro et al., 2003).

2.3.5 Analisi ex-vivo del ruolo di θ

Le gel filtrazioni di estratti proteici isolati da ceppi BW25993 sono state effettuate con campioni ottenuti da colture coltivate over-night a 37 °C e quindi rilanciate con rapporto 1:500 in 100 ml di terreno LB fresco, eventualmente addizionato di antibiotici. In particolare, le colture sono state mantenute alla stessa temperatura per circa 4.5 ore fino al raggiungimento di una densità di popolazione equivalente ad un'assorbanza a 600 nm compresa fra 0.6 e 0.7. Le cellule sono state quindi raccolte per centrifugazione a 4000 g per 20 minuti e congelate a -80 °C. Nel caso di ceppi contenenti un plasmide, al raggiungimento della fase esponenziale di crescita, dopo circa 3.5 ore dal rilancio, è stata indotta l'espressione del gene clonato con arabinosio 1 mM, per un tempo di tre ore. I pellet cellulari sono stati risospesi in 5 ml di tampone Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM e quindi omogeneizzati meccanicamente con un potter, aggiungendo PMSF 1 mM. Successivamente, le cellule sono state sottoposte a tre cicli di sonicazione, in ghiaccio, usando un sonicatore W-385 Ultrasonics, impostato con una potenza di 6 W ed un programma con impulsi di 15 s intervallati da pause di 15 s per un tempo complessivo di 5 minuti. I campioni così ottenuti sono stati centrifugati a 4000 g per 20 minuti e quindi filtrati mediante filtri Albet Jacs con pori di 200 nm. La concentrazione proteica è stata dosata come precedentemente descritto e portata ad un valore di 5 mg/ml mediante diluizione con il tampone usato per la lisi, la cui composizione è la stessa del tampone utilizzato come fase eluente per la cromatografia. In colonna è stato iniettato 1 ml di campione e a partire dall'inizio dell'eluizione, condotta con un flusso costante di 0.6 ml/min, sono state raccolte frazioni di 1 ml, con le quali è stato eseguito un saggio di attività esonucleasica ed una quantificazione della concentrazione proteica mediante metodo micro-Bradford, utilizzando micro-piastre da 96 pozzetti. Le frazioni rappresentative dei picchi di attività di ϵ sono state utilizzate per determinare in triplicato l'attività esonucleasica e la concentrazione proteica. La medesima procedura è stata eseguita per le cromatografie condotte con campioni isolati da ceppi BW25113 caricando in colonna 2 mg di proteina.

2.3.6 Sovraespressione ed estrazione del dominio PHP

Il ceppo TOP10/pBAD-*dnaE287* è stato coltivato overnight a 37 °C con un'agitazione costante di 180 rpm in terreno LB addizionato di ampicillina; successivamente, tale pre-coltura è stata rilanciata 1:500 in 150 ml di terreno e coltivata per ulteriori 5 ore. L'espressione del gene è

stata indotta con arabinosio 13 mM overnight; successivamente, le cellule sono state centrifugate a 4000 g per 20 minuti, disaggregando il pellet con l'utilizzo di un potter dopo averlo risospeso in tampone Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, mantenendo un rapporto di 1:10 fra volume di risospensione e volume iniziale di coltura. Al campione è stata aggiunta PMSF 1 mM, effettuando quindi 3 cicli di sonicazione in ghiaccio con una potenza di 6W, impostando un programma di 1 min con fasi alterne di 15 secondi di sonicazione e 15 secondi di pausa, intervallando ogni ciclo con pause di 5 minuti in ghiaccio. Il campione è stato poi centrifugato a 4000 g per 20 minuti a 4 °C, risospeso nuovamente con rapporto 1:10 nel medesimo tampone con aggiunta di Triton 1 % ed incubato per un'ora in ghiaccio in agitazione, dopo di che è stato nuovamente centrifugato nelle stesse condizioni, lavato con lo stesso tampone e quindi ancora centrifugato. Il pellet ottenuto è stato risospeso in tampone Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, urea 6 M, DTT 5 mM con un rapporto di 20 ml di tampone per 100 mg di pellet, lasciato in incubazione a temperatura ambiente per due ore e quindi diluito in un tampone contenente glicerolo 40 % e privo di urea, in modo da dimezzarne la concentrazione e raggiungere una percentuale finale di glicerolo del 20%. Il campione è stato infine sottoposto a tre cicli di dialisi contro il medesimo tampone per abbassare ulteriormente la concentrazione di urea prima delle fasi di purificazione.

2.3.7 Purificazione del dominio PHP

La purificazione del dominio PHP è stata condotta con un passaggio in colonna a scambio anionico Q-Sepharose FF, seguito da una gel filtrazione eseguita con colonna Superdex 200. La cromatografia di scambio anionico è stata condotta in tampone Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, glicerolo 20%, DTT 5 mM con un flusso di 1 ml/min durante la fase di caricamento e 2 ml/min durante l'eluizione con gradiente fino a 1M di NaCl. Le frazioni rappresentative del picco del PHP recuperate a seguito dell'eluizione, di circa 6 ml l'una, sono state riunite e concentrate in una cella Amicon equipaggiata con una membrana YM-30 fino ad un volume di circa 2 ml, e successivamente caricate in colonna di gel filtrazione. La cromatografia è stata condotta ad un flusso di 0.6 ml al minuto, raccogliendo frazioni da 1 ml.

2.3.8 Sovraespressione ed estrazione della subunità α e del core polimerasico

E. coli TOP10/pBAD-*dnaE* e TOP10/pBAD-*dnaE*, pGOOD-*dnaQ-holE* sono stati coltivati a 30 °C, in LB addizionato di opportuni antibiotici, per sei ore, al termine delle quali l'espressione dei geni clonati nei plasmidi è stata indotta con 1 mM di arabinosio (per il gene *dnaE*) e 1 mM di IPTG (per i geni *dnaQ* e *holE*). Dopo l'induzione la crescita è proseguita per un tempo di 2 ore e 30 minuti, dopo di che le cellule sono state raccolte tramite centrifugazione a 4000 g per 20 minuti a 4 °C, risospese in tampone Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, PMSF 1 mM e quindi sottoposte a 7 cicli di sonicazione a 18 W di 2 minuti l'uno, suddivisi in fasi di 15 secondi di impulso e 15 secondi di pausa. Tra un ciclo e l'altro il campione è stato raffreddato in ghiaccio per 5 minuti. Al termine della sonicazione i campioni sono stati centrifugati a 4000 g per 20 min recuperando la frazione solubile.

2.3.9 Purificazione della subunità α e del core polimerasico

La purificazione della subunità α e del core polimerasico sono state condotte con il medesimo protocollo che ha previsto l'uso in sequenza di una colonna a scambio anionico Q-Sepharose FF, di una colonna di affinità Cibacron Blue, di una seconda colonna di affinità HiTrap Heparin HP ed infine, nel caso di α , di una colonna a scambio anionico ad alta efficienza ResourceQ. La frazione solubile ottenuta al termine dell'estrazione è stata caricata in colonna Q-Sepharose, condizionata col tampone di risospensione, ed un gradiente di NaCl fino a 600 mM è stato completato in 400 ml, raccogliendo frazioni da 6 ml ad un flusso di 2 ml/min. Al termine dell'eluizione le frazioni sono state diluite in rapporto 1:2 con un tampone Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM, glicerolo 40 %, DTT 5 mM per dimezzare la concentrazione di NaCl e raggiungere una concentrazione finale di glicerolo del 20 %. Le frazioni rappresentative di α o del core sono state quindi riunite e concentrate ad un volume di circa 40 ml utilizzando una cella Amicon equipaggiata con membrana YM100, procedendo in più passaggi con diluizioni seriali con un tampone della stessa composizione del campione ma privo di NaCl, in modo da portare la concentrazione finale di quest'ultimo a 50 mM. I campioni così ottenuti sono stati addizionati con MgCl₂ 5 mM e caricati in colonna Cibacron Blue, condizionata con Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM, glicerolo 20 %, DTT 5 mM, MgCl₂ 5 mM ad un flusso di 0.5 ml/min, effettuando un primo lavaggio ad una concentrazione di 200 mM di NaCl e quindi un'eluizione in un unico passaggio con una concentrazione di NaCl pari a 1 M. Il campione ottenuto è stato

sottoposto a tre passaggi di dialisi contro un tampone della stessa composizione di quello usato in colonna ma privo di NaCl e di MgCl₂ in modo da diminuire la concentrazione di entrambi i componenti. Al termine della dialisi i campioni sono stati nuovamente concentrati in cella Amicon equipaggiata con membrana YM100 e quindi caricati in una colonna HiTrap Heparin HP, condizionata con lo stesso tampone del campione. Un gradiente fino a 350 mM di NaCl è stato condotto in 10 ml a 1 ml/min raccogliendo frazioni di 600 µl, di cui quelle rappresentative del picco di α sono state raccolte, riunite, concentrate in cella e ricondizionate per ridurre la concentrazione di NaCl mediante diluizioni di tampone privo di sale ed infine caricate in colonna Resource Q ad un flusso di 0.4 ml/min. La concentrazione finale di NaCl al termine del gradiente è stata impostata pari a 500 mM di NaCl, da raggiungere in 15 ml.

2.3.10 Precipitazione del DNA dagli estratti proteici

Prima del caricamento in colonna Q-Sepharose FF la frazione di proteine solubili estratta come precedentemente descritto da *E.coli* TOP10/pBAD-*dnaE*,pGOOD-*dnaQ-holE* è stata trattata con una concentrazione pari all'1 % (p/v) di streptomicina solfato, per eliminare il DNA e le DNA-binding proteins associate a quest'ultimo. Dopo l'aggiunta dell'antibiotico i campioni sono stati incubati per 20 minuti in ghiaccio e quindi centrifugati a 10000 g per 20 minuti a 4 °C per recuperare la frazione solubile priva di DNA, utilizzata nei successivi passaggi di purificazione.

CAPITOLO 3 – RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Analisi del ruolo di θ

Gli studi sinora condotti riguardo alla subunità θ hanno evidenziato come il suo legame ad ϵ ne aumenti la stabilità (Taft-Benz e Schaaper, 2004) e ne incrementi di circa tre volte l'attività esonucleasica (Studwell-Vaughan e O'Donnell, 1993), migliorandone inoltre la solubilità grazie alla copertura di siti idrofobici altrimenti esposti sulla sua superficie (DeRose et al., 2003). Questi esperimenti, pur fornendo validi indizi sulla funzione di θ , sono stati tuttavia condotti esclusivamente in vitro o utilizzando forme mutate di ϵ , il che non permette di ottenere un quadro preciso dei rapporti fra le due proteine in condizioni fisiologiche. In *Escherichia coli* wild type la delezione di θ sembra infatti non produrre effetti fenotipici osservabili, se si eccettua un lieve aumento della frequenza di mutazioni (Slater et al., 1994); inoltre, poiché la subunità θ non presenta un'attività enzimatica propria non può essere rilevata in maniera diretta mediante saggi biochimici. Per poter comprendere il suo ruolo nella fisiologia del core sono stati pertanto condotti esperimenti che riproducessero il più fedelmente possibile lo stato delle proteine in vivo. Il primo approccio ha previsto lo studio dell'influenza di θ nei confronti dei diversi stati di assemblaggio di ϵ , che in vivo può essere presente in forma monomeric, dimerica, assemblata nel core o come subunità integrata nell'oloenzima Pol III. La forma dimerica di ϵ , in particolare, è stata per la prima volta identificata dal gruppo di ricerca presso il quale questa tesi è stata svolta ed ulteriormente caratterizzata durante il periodo di dottorato. La metodica utilizzata a questo fine è stata il confronto fra i profili di attività di ϵ in estratti proteici solubili totali, sottoposti a cromatografia ad esclusione molecolare, isolati da *Escherichia coli* BW25993 in condizioni di variabilità dell'espressione di θ . La cromatografia di gel filtrazione consente di separare le diverse forme di ϵ in base alla loro massa molecolare, senza tuttavia influire significativamente riguardo al loro stato di associazione/dissociazione.

3.1.1 Effetto della delezione di *hole* (θ)

Il primo confronto diretto è stato effettuato tra estratti proteici isolati da *E. coli* delecto o meno del gene *hole* (si ricorda che questo gene codifica per θ) (Figura 20).

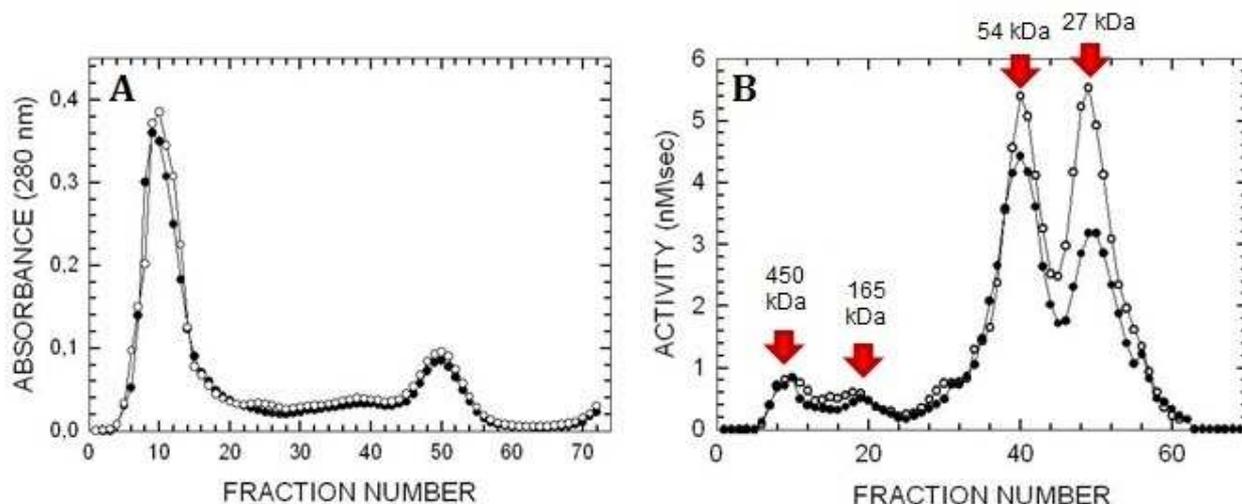


Figura 20: confronto fra ceppi di *Escherichia coli* BW25993 wild type (pallini bianchi) e $\Delta hole$ (pallini neri). A: cromatogrammi di gel filtrazione. B: profili di attività esonucleasica nelle frazioni cromatografiche

Gli esperimenti di gel filtrazione sono stati condotti caricando un uguale quantità (5 mg) di proteine in entrambi i casi, sottoponendo le frazioni ottenute ad un saggio di attività esonucleasica. L'analisi dei cromatogrammi mostra una quasi perfetta sovrapposizione fra i profili dei due ceppi utilizzati, il che indica che l'assenza di θ non porta a modifiche sostanziali nel pattern proteico di *Escherichia coli*. L'unica differenza osservabile è un lieve decremento nella concentrazione proteica a livello delle frazioni 24-28 nel ceppo $\Delta hole$, imputabile ad un effetto indiretto della delezione inserita. Nel grafico di attività esonucleasica è invece riscontrabile una significativa riduzione dell'attività di ϵ sia a livello della sua forma monomerica (27 kDa) che dimerica (54 kDa), mentre lo stesso sembra invece non accadere per i due picchi rappresentanti il core (165 kDa) e l'oloenzima (450 kDa) della DNA polimerasi III, coerentemente con l'assenza di un fenotipo osservabile nella crescita di *Escherichia coli*. Per poter assegnare rilevanza statistica alle differenze osservate i saggi di attività delle frazioni rappresentative dei picchi d'attività sono stati ripetuti in triplicato, normalizzando i dati ottenuti in base alla quantità di proteina presente, determinata col metodo di Bradford (Figura 21).

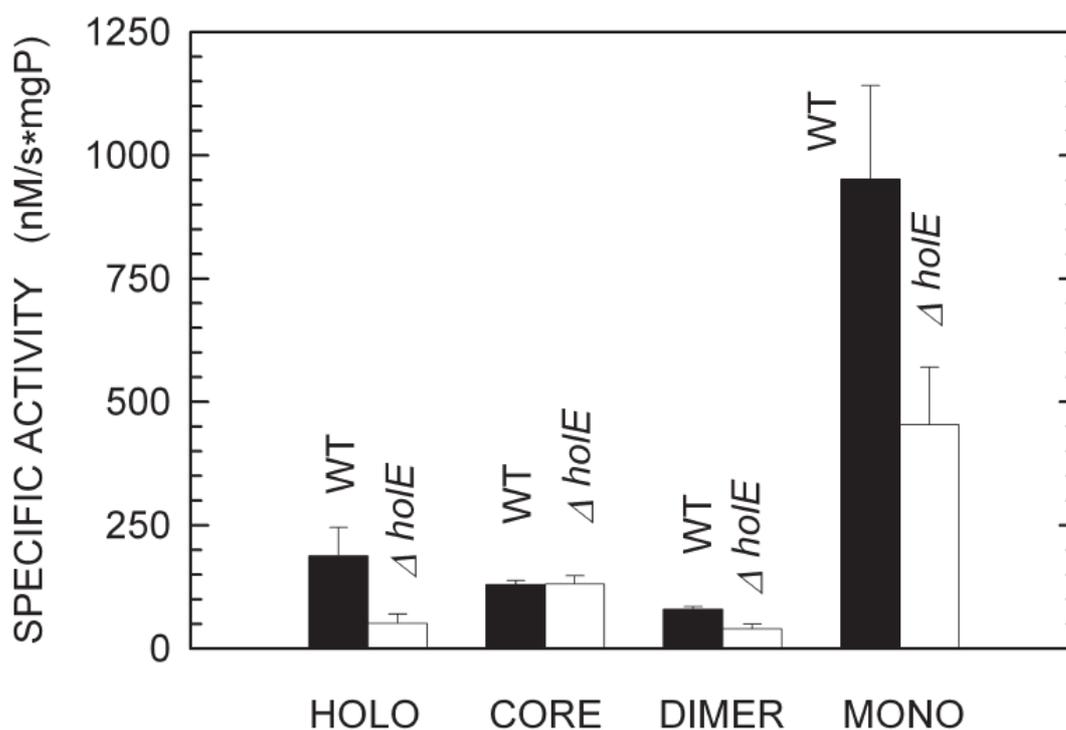


Figura 21: analisi in triplicato delle frazioni corrispondenti ai picchi di attività di ϵ

Il profilo ottenuto indica una diminuzione di circa il 50 % dell'attività per la forma libera di ϵ e di circa il 25% per la forma dimerica, mentre non si riscontrano differenze a livello del core. Anche l'attività dell'oloenzima sembra subire una riduzione, ma questa non è evidentemente tale da influenzare la velocità di replicazione del batterio. A questo riguardo va considerato che pur essendo i due estratti proteici derivanti da cellule in piena fase esponenziale di crescita il numero di copie di DNA polimerasi III necessario è comunque molto limitato, nell'ordine delle 20 copie per cellula (McHenry e Crow, 1979). Il calo di attività del monomero potrebbe però essere responsabile del lieve effetto mutatore osservato nel ceppo delecto (Taft-Benz e Schaaper, 2004). Da questi dati si può quindi dedurre che l'assenza di θ abbia un effetto destabilizzante nei confronti di ϵ , in particolare per quanto riguarda la sua forma monomerica, ma che un tale grado di instabilità non sia comunque un fattore sufficiente a limitare il corretto assemblaggio del core e dell'oloenzima ai livelli necessari per la replicazione. Quanto osservato è in accordo con l'ipotesi avanzata in letteratura che ϵ sia presente in eccesso nella cellula, o in una forma stabile resistente alla proteolisi (Bressanin et al., 2009), quale potrebbe essere la forma dimerica. Per approfondire la natura di questa nuova forma di ϵ finora mai descritta un'aliquota della frazione 40, rappresentante la sommità

del picco di attività del dimero, è stata caricata in SDS-PAGE per separarne le proteine componenti. Tre bande corrispondenti a proteine di massa simile a quella di ϵ (nell'intervallo 20-35 kDa), sono state tagliate ed eluite dal gel per essere analizzate mediante spettrometria di massa (Figura 22).

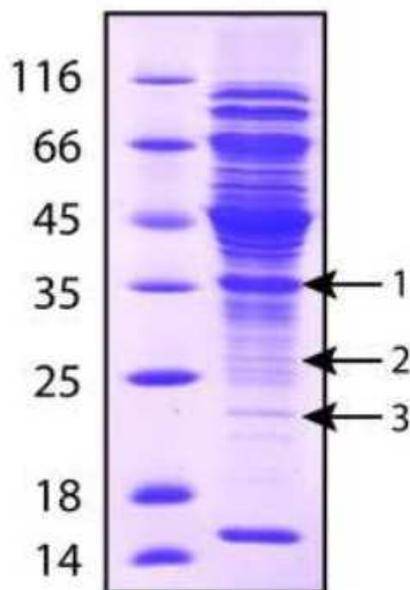


Figura 22 A: SDS-PAGE della frazione 40. Le bande tagliate dal gel sono indicate dalle frecce

1 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A)			1 (Cysteine synthase B)		
Peptide	Determined Mr (Da)	Theoretical Mr (Da)	Peptide	Determined Mr (Da)	Theoretical Mr (Da)
47-61	1709.74	1709.80	31-41	1084.51	1084.55
125-132	950.43	950.45	31-43	1355.63	1355.68
125-138	1582.71	1582.75	44-54	1160.09	1160.11
185-192	839.40	839.41	105-115	1176.64	1176.67
199-213	1400.69	1400.73	124-132	1031.48	1031.51
214-225	1223.69	1223.72			
233-246	1494.80	1494.84			
250-257	922.47	922.48			
297-307	1160.60	1160.62			
308-321	1674.69	1674.75			

2 (ϵ subunit)			3 (Alkyl hydroperoxide reductase, subunit C)		
Peptide	Determined Mr (Da)	Theoretical Mr (Da)	Peptide	Determined Mr (Da)	Theoretical Mr (Da)
19-40	1310.72	1310.76	18-27	1178.56	1178.58
41-55	1828.91	1828.97	81-91	1215.56	1215.59
42-55	1672.83	1672.87	81-93	1456.73	1456.77
126-134	930.48	930.50	94-106	1364.64	1364.68
126-135	1058.58	1058.61	113-120	903.38	903.39
142-150	1018.45	1018.49	144-150	788.38	788.40
213-227	1656.76	1656.81			

Figura 22 B: identificazione dei peptidi mediante spettrometria di massa

I risultati ottenuti confermano la presenza di ϵ all'interno della frazione ed evidenziano inoltre altre possibili proteine interagenti, come la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi, la cisteina sintasi e la subunità C dell'alchil idrossido reductasi. A determinare il picco di attività della frazione potrebbe quindi essere un omodimero ϵ - ϵ , la cui funzione può essere quella di conservare la subunità in una forma meno soggetta a degradazione, o un eterodimero formato da ϵ con una delle proteine identificate. A questo proposito va notato come un recente lavoro (Maciag et al., 2012) metta in correlazione l'attività di ϵ con il metabolismo centrale del carbonio, il che rende plausibile l'esistenza di un rapporto diretto con la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi, mentre non sono disponibili dati relativi a possibili interazioni con le altre due proteine. Data la similarità delle masse molecolari, non può essere esclusa l'ipotesi di una coesistenza di due o più forme dimeriche differenti.

3.1.2 Effetto della sovraespressione di θ

Avendo riscontrato un aumento dell'instabilità di ϵ in assenza di θ , *Escherichia coli* BW25993 Δ hole è stato trasformato col plasmide pBAD-hole per studiare gli effetti di una sovraespressione di θ riguardo agli stati di associazione di ϵ e al ripristino del livello fisiologico di quest'ultima. Per controllare che l'espressione della proteina non avesse effetti tossici deleteri, la cinetica di crescita del ceppo trasformato è stata seguita determinando

spettrofotometricamente l'aumento di torbidità della sospensione di coltura in rapporto al medesimo ceppo contenente il plasmide pBAD privo di inserti (Figura 23).

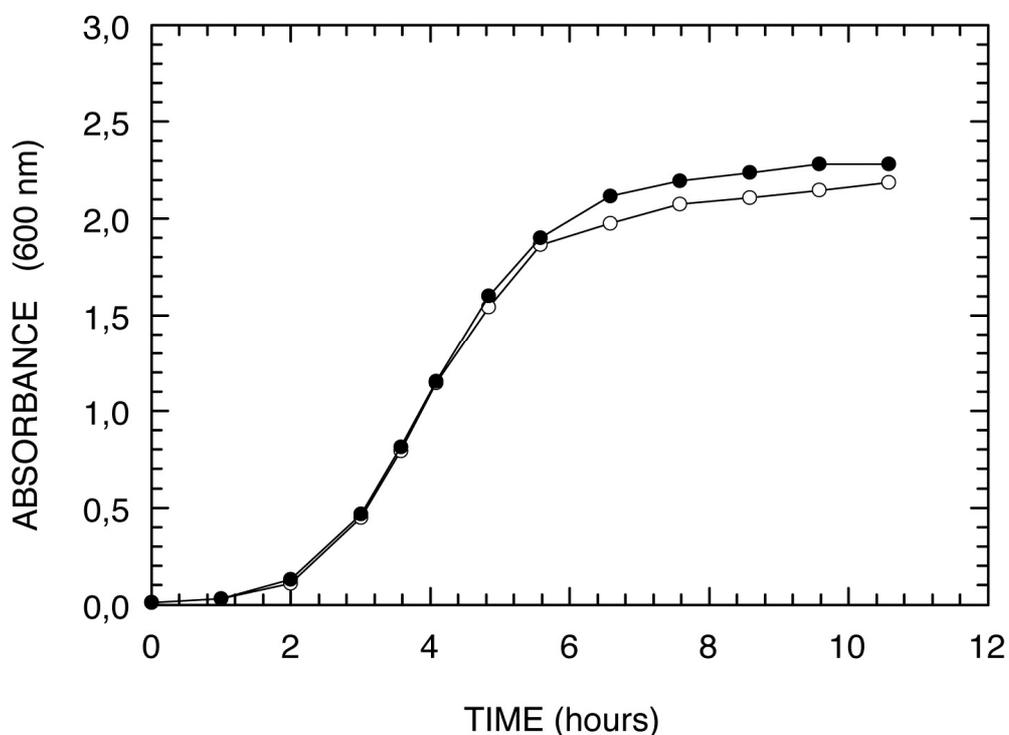


Figura 23: cinetica di crescita di BW25993 trasformato con i plasmidi pBAD (pallini bianchi) e pBAD_{holeE} (pallini neri)

Risulta evidente come la sovraespressione, effettuata in fase logaritmica di crescita dopo circa 3,5 ore dall'inoculo, non solo non abbia conseguenze negative, ma induca anzi dopo circa due ore un lieve aumento della biomassa. Per seguire la produzione di θ in seguito alla induzione dell'espressione, le cellule sono state pertanto raccolte dopo 1, 2 o 3 ore dall'aggiunta di arabinosio. Da questi campioni si è proceduto ad estrarre le proteine solubili per separarle mediante gel filtrazione; dai cromatogrammi è evidente l'aumento di concentrazione di θ (in corrispondenza della massa molecolare attesa), come confermato anche dal dosaggio col metodo di Bradford (Figura 24).

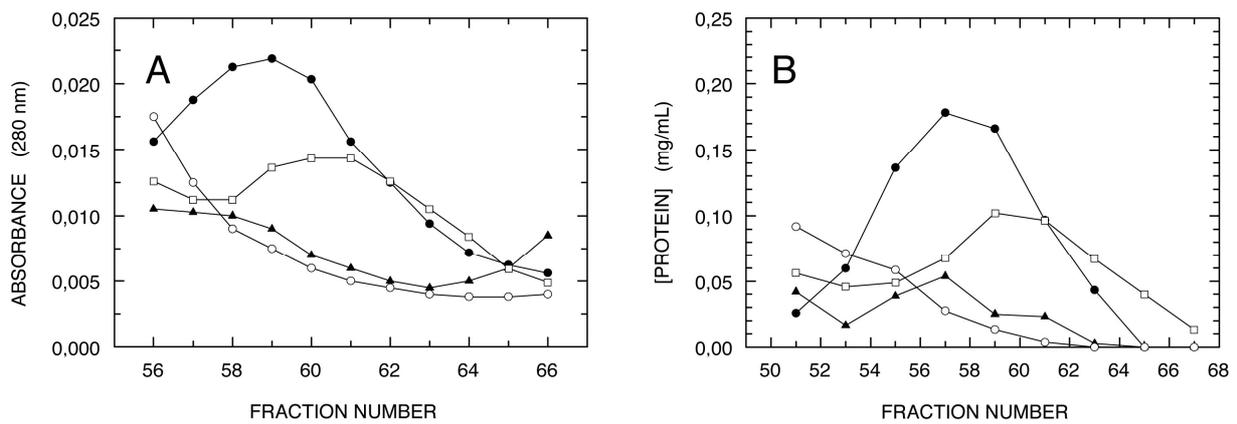


Figura 24: espressione nel tempo di θ dopo 1 h (triangoli neri), 2 h (quadrati bianchi) e 3 h (pallini neri) in confronto con un controllo (pallini bianchi). A - dettaglio del cromatogramma. B - dosaggio proteico col metodo di Bradford

La comparsa di un picco marcato di θ si verifica due ore dopo l'induzione, in accordo con l'aumento di biomassa osservato nella curva di crescita. Le frazioni isolate sono state quindi utilizzate per effettuare un saggio di attività esonucleasica, il cui risultato è stato espresso come attività specifica (per milligrammo di proteina). Ciò perché, pur essendo stata introdotta in colonna un'uguale quantità di proteina (5 mg) sia per il campione di controllo che per quello contenente θ sovraespressa, è necessario tener conto che nel secondo caso θ rappresenta una frazione significativa delle proteine totali, il che comporta il caricamento di una minor quantità delle altre proteine (Figura 25).

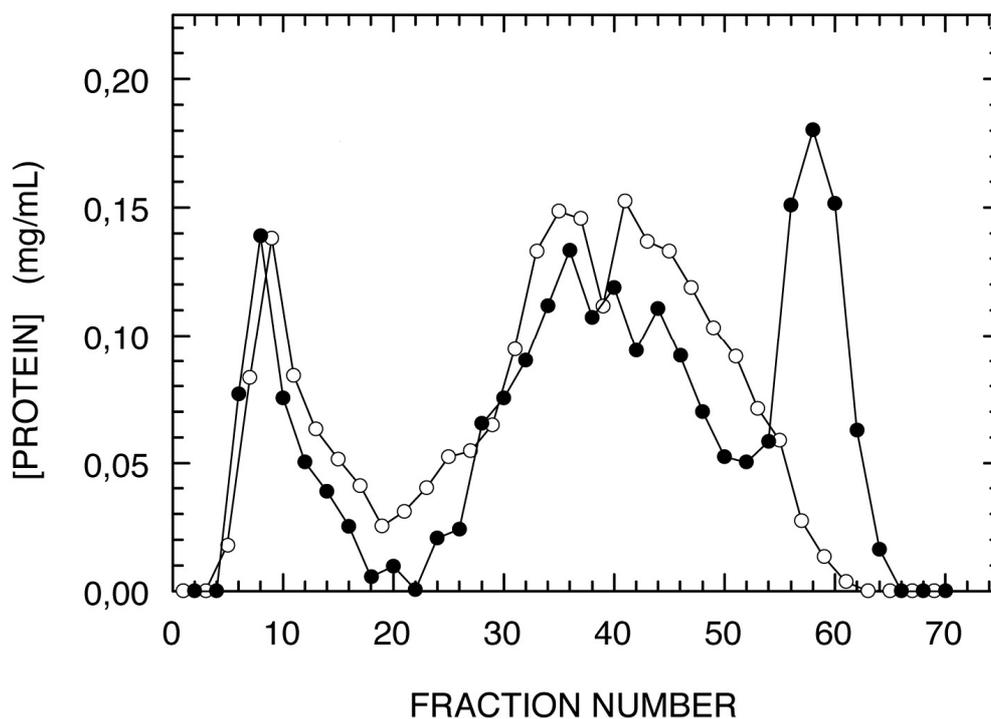


Figura 25: quantificazione proteica delle frazioni cromatografiche del ceppo di controllo (pallini bianchi) e del ceppo esprimente θ (pallini neri) derivanti da proteine estratte tre ore dopo l'induzione

Dal grafico si osserva che dopo un'induzione di tre ore la quantità di proteina sovraespressa è stimabile a circa il 20% delle proteine solubili totali. Le frazioni rappresentative del monomero di ϵ (frazione 49), del dimero (39), del core di Pol III (16) e dell'oloenzima di quest'ultima (10) sono state quindi saggate per l'attività esonucleasica (in triplicato) per ciascuno dei tre tempi di induzione (Figura 26).

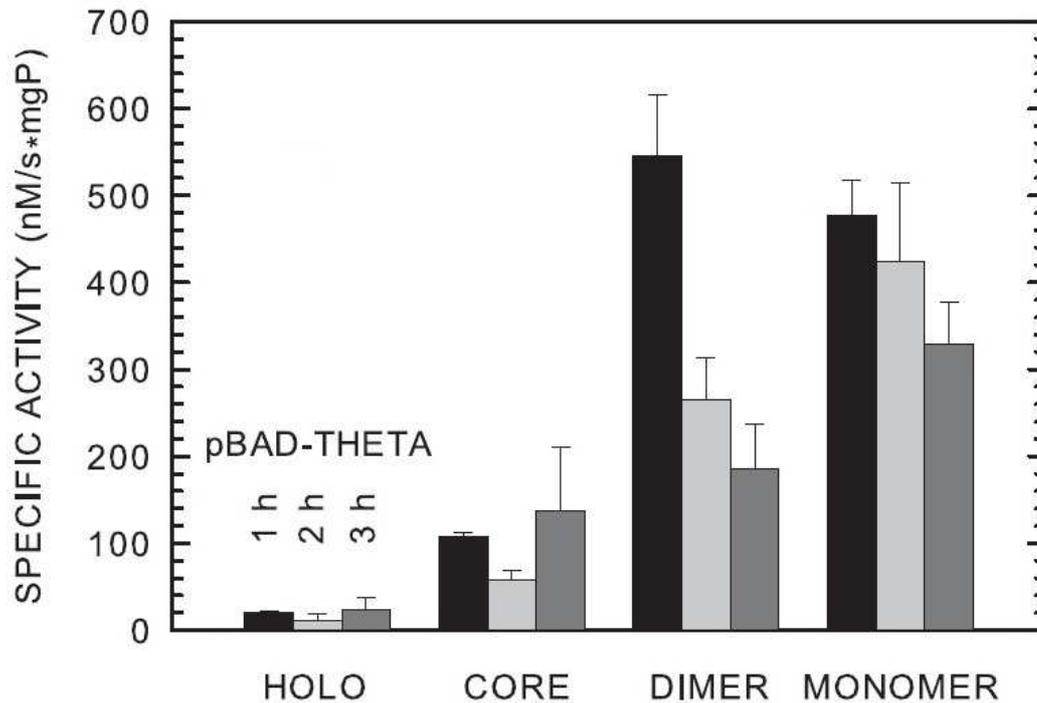


Figura 26: attività specifica esonucleasica dell'estratto proteico del ceppo BW25993-pBAD θ dopo 1 h (nero), 2 h (grigio chiaro) o 3 h (grigio scuro) dall'induzione con arabinosio

Si può notare come all'aumentare della quantità di θ la forma di ϵ maggiormente influenzata sia quella dimerica, la cui attività diminuisce drasticamente due ore dopo l'induzione. Questa osservazione permette di ipotizzare un effetto di θ come fattore regolante la funzione sinora ignota del dimero, sfavorendone la formazione o disaggregandolo. Per quanto anche la forma monomerica subisca un decremento, la lieve entità di quest'ultimo è probabilmente dovuta al raggiungimento di una fase di crescita più avanzata nella quale la replicazione del DNA richiede una minor quantità di ϵ libera. Gli assemblaggi del core e dell'oloenzima risultano anch'essi modificati in maniera non significativa, tenendo conto del raggiungimento della fase stazionaria. Per confermare gli effetti riscontrati a seguito dell'espressione di θ è stato quindi effettuato un confronto con un ceppo di controllo contenente il plasmide pBAD privo di inserti coltivato nelle medesime condizioni ed anch'esso addizionato di arabinosio in fase logaritmica. Poiché nelle condizioni utilizzate l'estrazione delle proteine è stata condotta dopo tre ore dall'induzione, il profilo di attività di ϵ riflette la sua ripartizione in vivo durante la fase stazionaria (Figura 27).

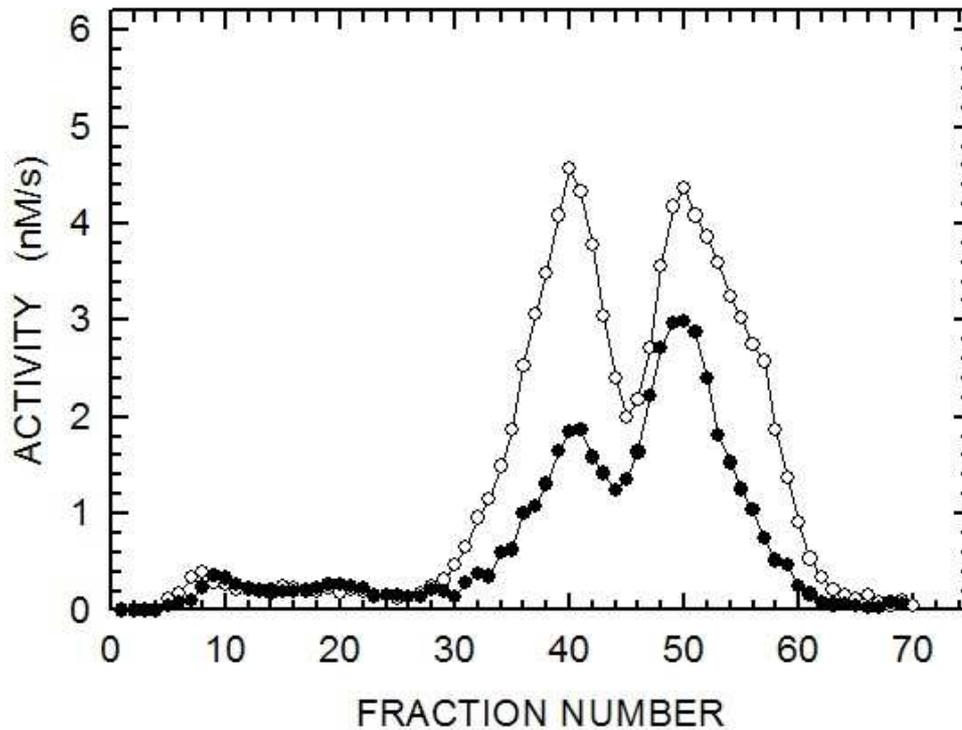


Figura 27: attività esonucleasica delle frazioni cromatografiche dei ceppi BW25993-pBAD (pallini bianchi) e BW25993-pBAD_{hole} (pallini neri)

Dal grafico è possibile evidenziare un aumento della simmetria del picco di ϵ monomeric, ad indicare la probabile assenza di forme degradate a causa dell'effetto protettivo della sovraespressione di θ . In presenza di quest'ultima si può inoltre rilevare un cambiamento del rapporto fra il dimero ed il monomero di ϵ , che rispetto ad una situazione di quasi parità nel controllo viene sbilanciato nettamente a favore della forma libera quando θ è sovraespressa. Come nei casi precedentemente illustrati, le attività di ϵ sono state normalizzate in base alla concentrazione di proteina delle singole frazioni esprimendo il valore in attività specifica e saggiando in triplicato le frazioni relative ai picchi di interesse (Figura 28).

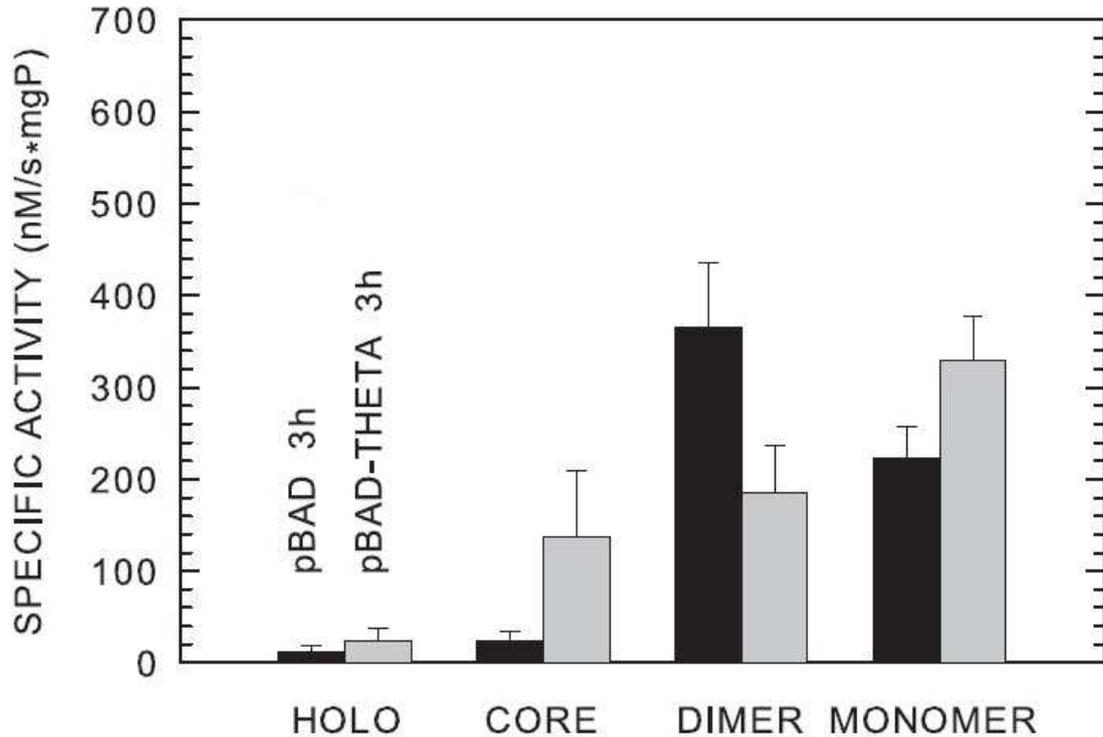


Figura 28: attività specifica esonucleasica di estratti proteici dei ceppi BW25993-pBAD (nero) e BW25993-pBAD θ LE (grigio) dopo 3 ore dall'induzione

Neal pattern di distribuzione di ϵ nel ceppo sovraesprimente θ risalta come quest'ultima abbia chiaramente stimolato tutte le forme di ϵ ad eccezione del dimero, nei confronti del quale esercita invece l'azione opposta. In particolare, mentre la differenza riguardante l'oloenzima non può essere considerata del tutto attendibile a causa della scarsa quantità di proteina presente nelle frazioni, le frazioni del core e del monomero presentano un'attività significativamente maggiore rispetto al controllo. Questi dati confermano quindi la capacità di θ di aumentare la stabilità di ϵ , proteggendola dall'attività proteolitica, e di favorirne l'assemblaggio all'interno del core. A questo proposito va sottolineato come, a causa della contenuta massa molecolare di θ , non sia possibile discriminare fra ϵ monomericamente ed il complesso ϵ - θ . Dato questo limite, non è quindi possibile determinare se l'effetto di stabilizzazione sia dovuto ad un legame diretto di θ con ϵ o se quest'azione si eserciti attraverso una funzione di assistenza al folding. E' opportuno citare, a questo proposito, che è stato dimostrato che θ appartiene all'interattoma della proteina YbbN (Butland et al., 2005), una tioredossina che oltre a svolgere una funzione di chaperone molecolare presenta anche un legame diretto con la proteasi DnaK e lo chaperone GroEL (Kthiri et al., 2008). Queste due

proteine sono implicate nel mantenimento della corretta struttura terziaria di ϵ (Bressanin et al., 2009), per cui la stabilizzazione da parte di θ potrebbe essere dovuta ad un suo coinvolgimento diretto o indiretto nel reclutamento di uno chaperone, o ad una sua propria attività di assistenza al folding. Poiché la presenza di θ produce un lieve aumento nell'attività di ϵ (Studwell-Vaughan e O'Donnell, 1993) è stato condotto un saggio ELISA indiretto con anticorpi anti- ϵ per verificare se le differenze osservate fossero causate solamente da un incremento dell'attività o da un effettivo aumento della quantità di proteina. Il saggio è stato effettuato con le frazioni contenenti il monomero o il dimero, e se nel primo caso non ha evidenziato differenze significative, nel secondo caso ha indicato una diminuzione del 20 % della concentrazione di ϵ . Si può quindi affermare che θ agisce attivamente a livello del dimero dissociando ϵ dal suo interattore, sia esso una seconda subunità ϵ associata in una forma stabile di conservazione o un'altra proteina non identificata. Pur non conoscendo la composizione esatta del dimero, questo ruolo di θ risulta molto interessante e potrebbe dar ragione di una sua funzione nella cellula come fattore di regolazione della distribuzione di ϵ fra differenti funzioni enzimatiche. Oltre all'attività di proofreading ϵ è stata infatti implicata con modalità non del tutto chiarite in numerosi altri meccanismi riguardanti non solo la replicazione del DNA ma anche il ciclo metabolico del carbonio ed il ciclo cellulare. La possibilità di un suo coinvolgimento all'interno di differenti pathways richiede sicuramente l'esistenza di un fattore di controllo, che sovrintenda alla ripartizione di ϵ a seconda delle necessità, e questo compito potrebbe essere pertanto svolto da θ .

3.1.3 Confronto con la subunità omologa HOT

In parallelo agli esperimenti descritti, il ceppo BW25993 $\Delta holE$ è stato trasformato anche col plasmide pBAD-*hot*, così da poter attuare un confronto fra l'effetto di θ e quello della proteina omologa HOT del batteriofago P1. Questa analisi è stata condotta per comprendere la necessità di questa proteina per il fago, in quanto la sua espressione sembra essere ridondante rispetto alla subunità θ , espressa dal batterio ospite. Il ceppo recipiente è stato quindi coltivato nelle stesse condizioni del ceppo sovraesprimente θ o del controllo contenente il plasmide pBAD vuoto, inducendo l'espressione di HOT per tre ore a partire dalla fase logaritmica di crescita. La presenza di HOT è stata quindi confermata dosando le proteine nelle frazioni ottenute a seguito della cromatografia ad esclusione molecolare dell'estratto

proteico solubile totale (Figura 29), tramite la quale si è stimata una sovraespressione pari a circa il 15% del totale. Si è quindi effettuato un saggio di attività esonucleasica con le frazioni corrispondenti alle diverse forme di ϵ , ripetendo l'analisi in triplicato (Figura 30).

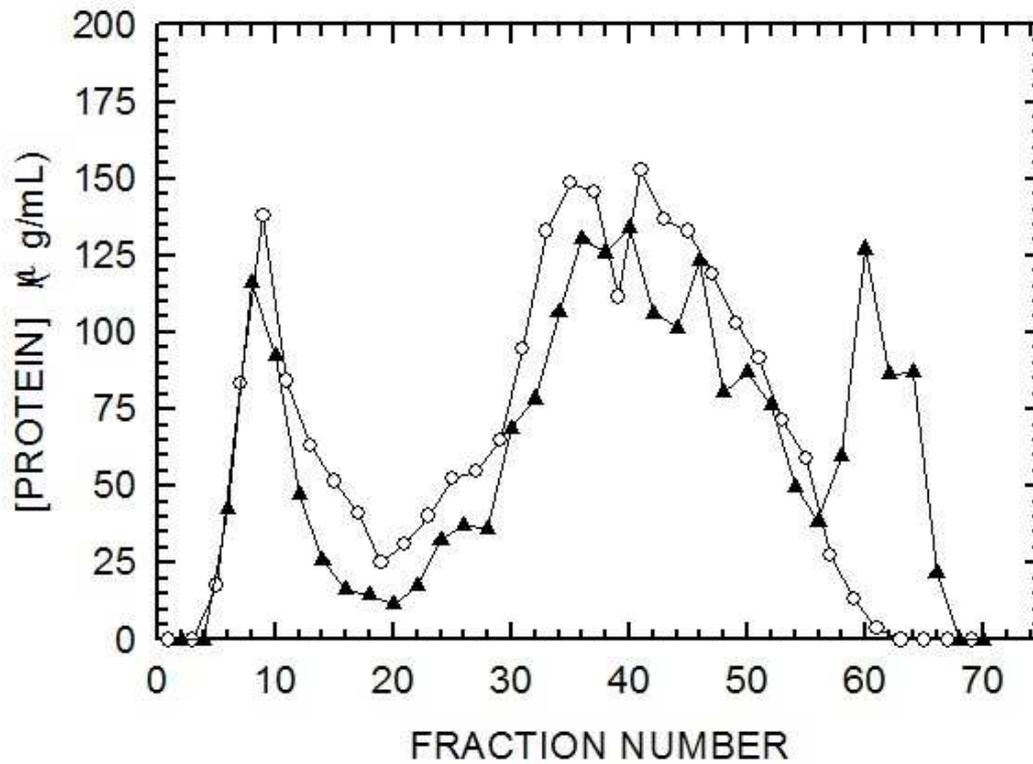


Figura 29: quantificazione proteica delle frazioni cromatografiche del ceppo di controllo (pallini bianchi) e del ceppo esprime HOTA (triangoli neri) derivanti da proteine estratte tre ore dopo l'induzione

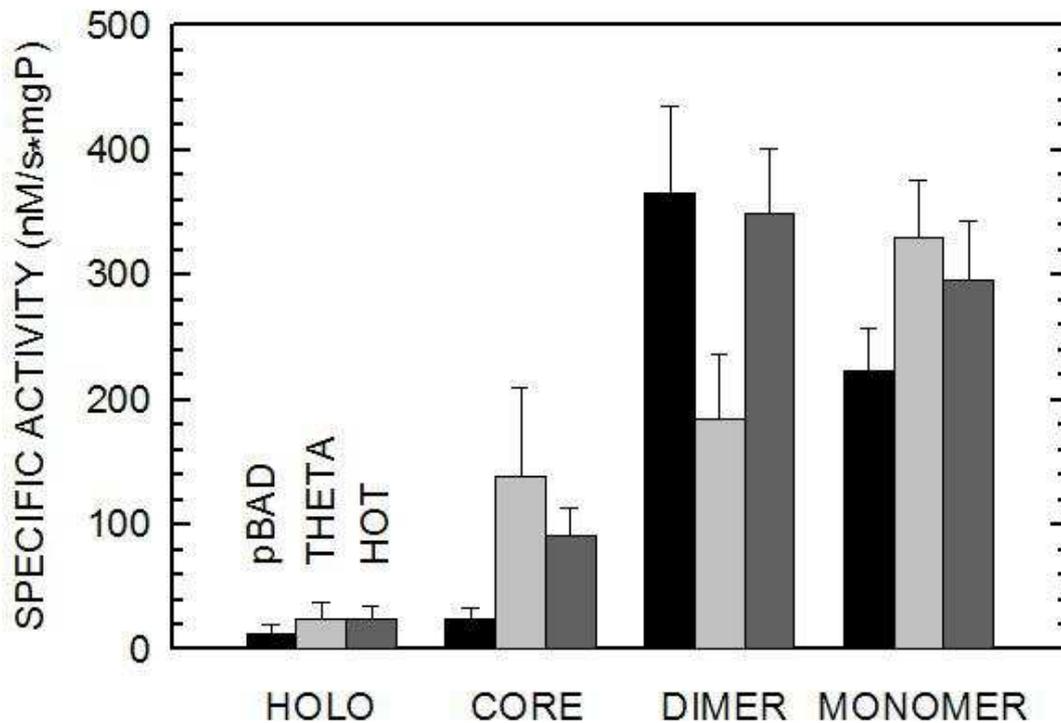


Figura 30: attività specifica esonucleasica di estratti proteici dei ceppi BW25993-pBAD (nero), BW25993-pBAD $holE$ (grigio chiaro) e BW25993-pBAD hot (grigio scuro) dopo 3 ore dall'induzione

Raffrontando l'attività di ϵ in condizioni di espressione di HOT con i profili ottenuti nel ceppo di controllo e nel ceppo sovraesprimente θ si possono evidenziare differenze interessanti. Per quanto HOT risulti in grado di stabilizzare ϵ in forma di monomero, associata al core o all'oloenzima, la sua efficacia sembra inferiore rispetto a quella di θ . La differenza più evidente si verifica tuttavia a livello del dimerico di ϵ , nei confronti del quale HOT non dimostra alcun effetto significativo. Questa diversità di azione conferma l'ipotesi che, nonostante l'omologia strutturale, HOT abbia un ruolo non identico rispetto a θ . Va sottolineato come gli esperimenti descritti siano stati condotti in un ceppo delevato per il gene $holE$ e pertanto in condizioni non identiche a quelle in cui HOT può trovarsi ad agire in presenza di θ . La sua azione in un ceppo wild type potrebbe infatti esercitarsi sia come fattore complementante, aumentando ulteriormente la stabilità di ϵ , che come competitore della subunità nativa. Il gene $holE$ è infatti espresso in quantità scarsa nella cellula (Carter et al., 1993), ed in una condizione di aumentata attività della DNA polimerasi III durante la replicazione del genoma fagico il suo effetto stabilizzante potrebbe non essere sufficiente a garantire un'adeguata concentrazione di ϵ . In questo caso il batteriofago potrebbe trovare vantaggio nell'esprimere una proteina che stabilizzi ulteriormente la subunità di proofreading per aumentare la sua efficienza

replicativa. Una seconda possibilità, che non esclude la prima, è che la proteina HOT possa competere con θ nella sua azione sul dimero di ϵ , svolgendo un ruolo opposto, impedendone la dissociazione ed incanalando quindi ϵ verso un pathway metabolico più favorevole per il fago rispetto ad un altro. Una simile ipotesi potrebbe essere valutata eseguendo esperimenti di sovraespressione di HOT in un ceppo wild type o verificando il suo effetto in cellule di *Escherichia coli* naturalmente infettate dal batteriofago P1.

3.1.4 Effetto di θ in vivo

Per studiare l'effetto della subunità θ in vivo è stato sfruttato un fenotipo associato alla delezione del gene *dnaK*, codificante per l'omonimo chaperone; è opportuno sottolineare che in ceppi $\Delta dnaK$ l'instabilità di ϵ risulta letale per *Escherichia coli* (Foster e Marinus, 1992). A 42 °C ed in condizioni di bassa osmolarità, infatti, la vitalità del ceppo deleto può essere mantenuta solo a seguito di una sovraespressione di ϵ in condizioni permissive precedentemente all'aumento di temperatura (Bressanin et al., 2009). Si è voluto quindi osservare se la sovraespressione di θ nelle medesime condizioni potesse essere un fattore sufficiente a complementare l'instabilità di ϵ , attuando allo stesso tempo un confronto funzionale con la proteina HOT. *Escherichia coli* BW25113 $\Delta dnaK$ è stato quindi trasformato con i plasmidi pBAD, pBAD-*dnaQ*, pBAD-*holE* o pBAD-*hot* e coltivato per 5 ore a 30 °C in terreno a bassa concentrazione di NaCl ed in presenza di arabinosio come induttore. Al termine di questa prima fase di crescita, la temperatura è stata innalzata a 42 °C, determinando l'aumento della densità di popolazione nel tempo. La stessa procedura è stata adottata per il ceppo BW25113 DnaK⁺, utilizzato come controllo di riferimento (Figura 31).

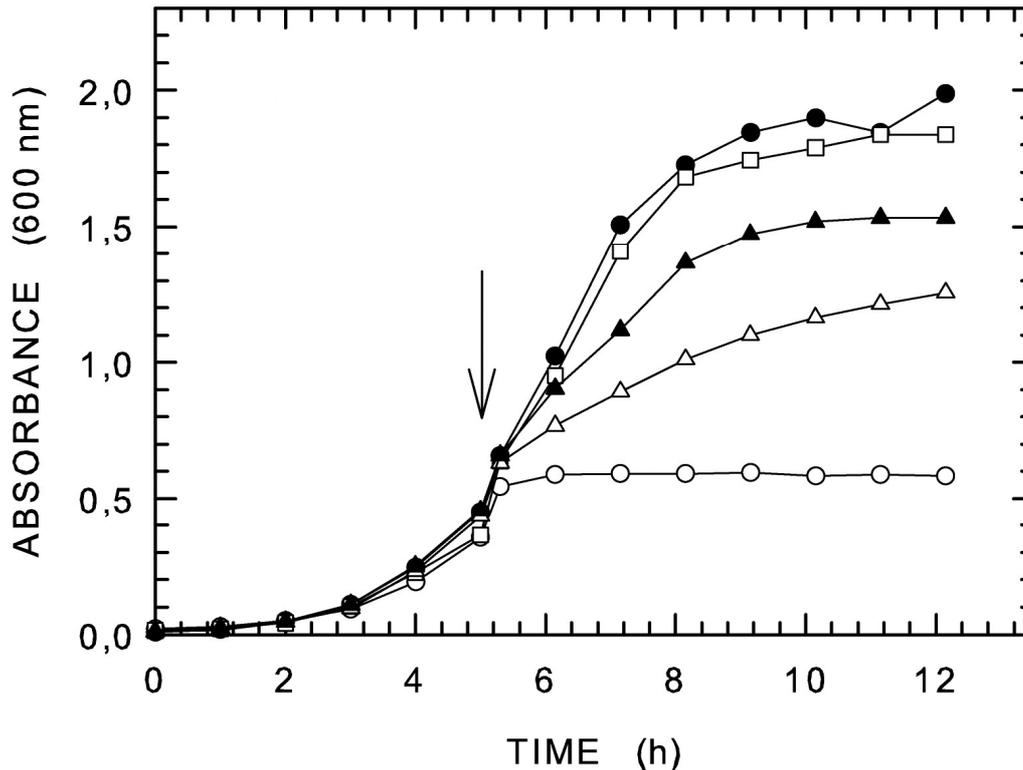
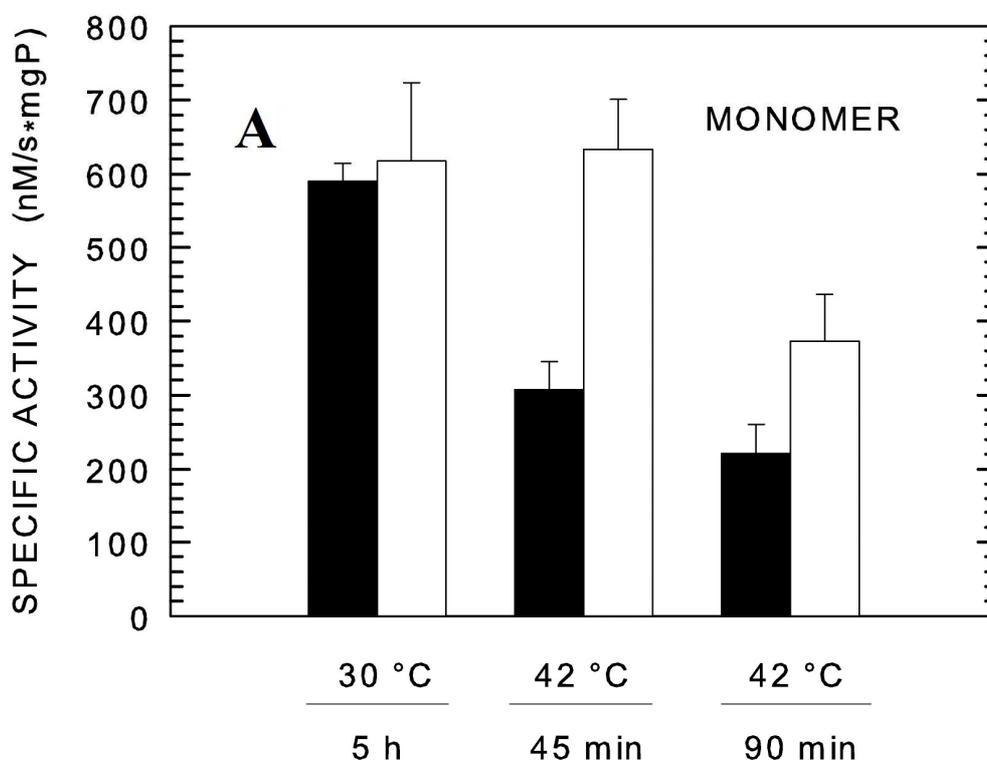


Figura 31: cinetica di crescita di *Escherichia coli* BW25113 Δ *dnaK* contenente il plasmide pBAD (pallini bianchi), pBAD-*hot* (triangoli bianchi), pBAD-*holE* (triangoli neri) o pBAD-*dnaQ* (quadrati vuoti). I pallini neri rappresentano il ceppo BW25113 DnaK⁺. Il momento del passaggio di temperatura da 30 a 42 °C è indicato dalla freccia

Le cinetiche osservate per il ceppo Δ *dnaK* ed il ceppo DnaK⁺ rispecchiano il fenotipo descritto in letteratura: successivamente all'aumento di temperatura, la crescita del ceppo delecto si interrompe dopo 30 minuti, al completamento del ciclo replicativo in corso. Allo stesso modo, la complementazione a seguito della sovraespressione di ϵ conferma la causa dell'interruzione di crescita nell'assenza di un corretto folding associato alla conseguente degradazione proteolitica della subunità di proofreading. In accordo con l'ipotesi alla base dell'esperimento, si può notare un evidente effetto di complementazione sia da parte di θ che di H_{OT}, con un effetto molto più marcato nel primo caso, sebbene non completo. La velocità di crescita ed il livello di biomassa finale raggiunto risultano infatti inferiori rispetto al ceppo nel quale è stata sovraespressa la subunità ϵ . In particolare, se dal grafico si può stimare un tempo di replicazione di 19 minuti per il ceppo DnaK⁺ e di 23 minuti per il ceppo contenente il plasmide pBAD-*dnaQ*, per i ceppi sovraesprimenti θ e H_{OT} i corrispondenti tempi salgono rispettivamente a 42 e 120 minuti. Ad influire su questi parametri sono il numero e la velocità

delle bolle replicative, che determinano la velocità di replicazione e sono direttamente correlati alla stabilità di ϵ , e la quantità di subunità ϵ integra presente nella cellula al momento dell'aumento di temperatura. Posta l'impossibilità per ϵ di conformarsi correttamente a 42 °C, il numero di cicli replicativi attuabili sarà infatti determinato dalla sua concentrazione iniziale, che di conseguenza stabilirà la quantità di biomassa prodotta al termine della crescita. La differenza di effetto fra θ e H_{OT} assume quindi una valenza di indicatore della loro diversa efficacia stabilizzante, in accordo con quanto osservato negli esperimenti di sovraespressione riportati nella figura 30. Quanto appena descritto rappresenta il primo fenotipo di crescita associato a θ sinora mai caratterizzato. Per approfondire questo aspetto e comprendere in che modo l'effetto di θ sia responsabile del ripristino della vitalità sono stati raccolti campioni da colture dei ceppi contenenti il plasmide pBAD o pBAD-*holE*, coltivati e indotti nelle condizioni utilizzate per la cinetica dopo diversi tempi dall'aumento di temperatura. Da questi campioni sono state estratte le proteine solubili, caricandole in colonna di gel filtrazione. Data la scarsa quantità di proteina totale, non è stato possibile determinare l'attività nelle frazioni corrispondenti all'oloenzima ed al core, ma è invece stato seguito l'andamento dell'attività di ϵ nelle frazioni del monomero e del dimero (Figura 32).



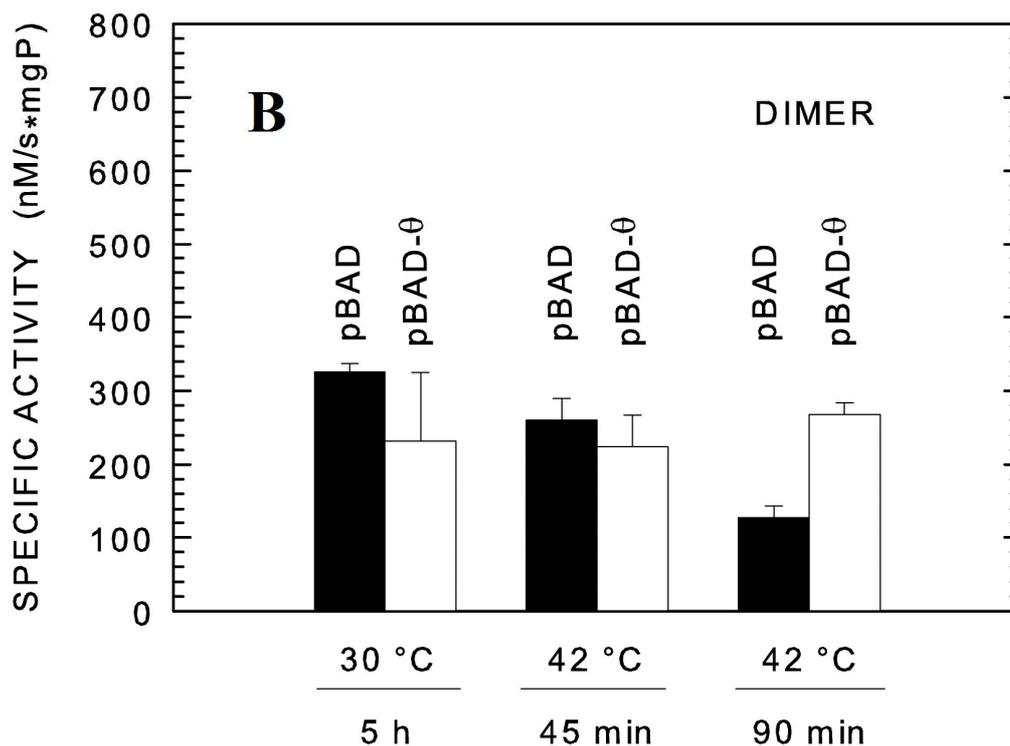


Figura 32: attività specifica delle frazioni del monomero (A) e del dimero (B) di ϵ in BW25113 Δ *dnaK* contenente il plasmide pBAD (barre nere) o pBAD-*holE* (barre bianche)

Si può notare come nel ceppo di controllo sia l'attività del dimero che quella del monomero di ϵ diminuiscano costantemente all'aumentare del tempo trascorso dall'esposizione alla temperatura non permissiva. In particolare, mentre nei primi 45 minuti il dimero subisce solo una lieve riduzione, l'attività del monomero decresce drasticamente del 50 %, il che rende ragione del blocco della replicazione. Nel ceppo sovraesprimente θ il profilo è nettamente diverso e permette di avanzare alcune ipotesi. Innanzitutto l'attività del dimero non cambia significativamente nemmeno 90 minuti dopo lo shift a 42°C, rimanendo costante nel tempo e uguale al livello assunto dal ceppo di controllo dopo le 5 ore di crescita a 30 °C. Ciò suggerisce che la sua funzione non sia essenziale per la crescita ma si eserciti in altro modo. L'attività di ϵ monomeric resterà invece stabile ai livelli precedenti l'incremento di temperatura per i primi 45 minuti, giustificando la vitalità, e mostra una diminuzione di circa il 50 % solo nell'ultimo valore registrato. Nel complesso, queste indicazioni definiscono per θ un ruolo di protezione nei confronti in particolare della forma libera di ϵ , la quale risulta così disponibile per l'assemblaggio all'interno dell'oloenzima.

3.2 Analisi funzionale del dominio PHP

Il dominio PHP è costituito dai primi 272 residui dell'estremità N-terminale della subunità α e si situa nella struttura a mano destra della proteina nella posizione del polso, in esteso contatto col dominio del Pollice (Lamers et al., 2006). È stato dimostrato che il dominio PHP rappresenta la zona di interazione con la subunità ϵ , ed oltre a possedere una funzione strutturale potrebbe inoltre essere coinvolto anche nell'attività polimerasica (Wieczorek e McHenry, 2006). Per quanto l'architettura conformazionale del dominio, un barile $\alpha_7\beta_7$, sia condivisa esclusivamente con la famiglia delle cellulasi (Spezio et al., 2003), a livello del possibile sito attivo individuato in base alle caratteristiche della struttura terziaria non è presente alcuna omologia, mentre si può riscontrare un certo grado di similarità con le pirofosfatasi della famiglia II (Lamers et al., 2006). A partire da questa considerazione è stata ipotizzata per il dominio PHP una possibile attività pirofosfatase che utilizzi come substrato il pirofosfato prodotto nel sito catalitico di α durante la reazione di polimerizzazione. È infatti opinione comune che l'idrolisi di questa molecola contribuisca a fornire l'energia necessaria per il procedimento della reazione, ma sinora non è mai stato individuato alcun enzima specificamente coinvolto in questo processo. Si è quindi proceduto a sovraesprimere e purificare sia la subunità α che il singolo dominio PHP, per verificare la loro capacità di catalizzare una reazione di scissione del pirofosfato mediante un saggio di attività appositamente progettato. Poiché per altre polimerasi della famiglia C presentanti un dominio PHP questo ultimo è stato associato ad un'attività esonucleasica (Stano et al., 2006), anche quest'ipotesi è stata verificata sperimentalmente. Allo stesso modo, data la similarità nel processo catalitico, si è proceduto a verificare la possibilità che il dominio PHP presentasse un'attività fosfatase.

3.2.1 Espressione e purificazione del dominio PHP

Per purificare il singolo dominio PHP della subunità α è stata utilizzato come vettore d'espressione il plasmide pBAD-*dnaE287*, precedentemente costruito e descritto in letteratura (Bressanin et al., 2009). Nel vettore è presente la sequenza del gene *dnaE* codificante per i primi 287 residui di α , ovvero i 272 residui del dominio PHP seguiti da una coda di residui idrofobici. Questa regione di α presenta un punto isoelettrico di 4.92 ed una massa molecolare di circa 32 kDa, ed è stata purificata a partire da corpi inclusi dopo aver indotto overnight

l'espressione del gene in *Escherichia coli* TOP10, utilizzando arabinosio 13 mM. L'estrazione della proteina è stata condotta mediante trattamento con urea 6 M della frazione insolubile ottenuta dopo la centrifugazione del prodotto di sonicazione delle cellule. L'urea è stata in seguito eliminata attraverso tre cicli di dialisi, mantenendo le proteine disaggregate facendo raggiungere al campione una concentrazione di glicerolo del 20% e aggiungendo DTT sino ad un valore finale di 5 mM. Le proteine così condizionate sono state sottoposte ad una cromatografia a scambio anionico con un tampone a pH 8 per sfruttare il basso punto isoelettrico del PHP (Figura 33).

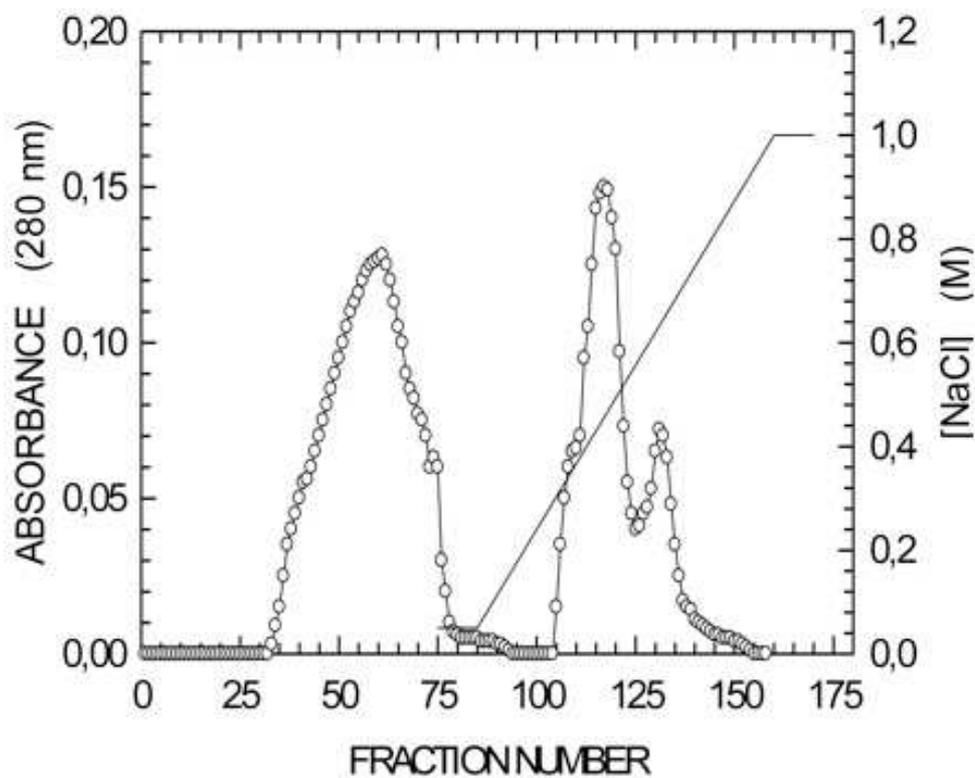


Figura 33: cromatografia a scambio anionico della frazione proteica insolubile di *Escherichia coli* TOP10-pBADdnaE287 dopo sovraespressione overnight

Nel cromatogramma è evidente la presenza di un picco di eluizione abbastanza stretto, relativo al dominio PHP, il cui massimo ricade nella frazione 117, in corrispondenza di una concentrazione di NaCl pari a 0,5 M (Figura 34).

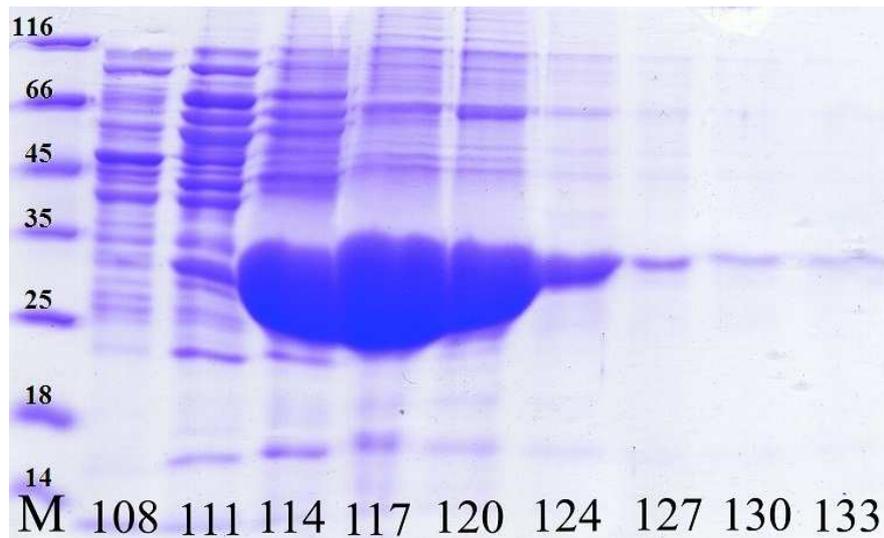


Figura 34: SDS-PAGE delle frazioni risultanti dalla cromatografia a scambio anionico

Dall'elettroforesi delle frazioni si può notare come la proteina sovraespressa si concentri in un numero ristretto di frazioni e risulti assolutamente predominante in queste ultime. Per migliorare il grado di purezza e discriminare forme del PHP non correttamente conformate e quindi suscettibili di fenomeni aggregativi, le frazioni più rappresentative del picco di eluizione sono state raccolte e concentrate per essere caricate in colonna di gel filtrazione (Figura 35).

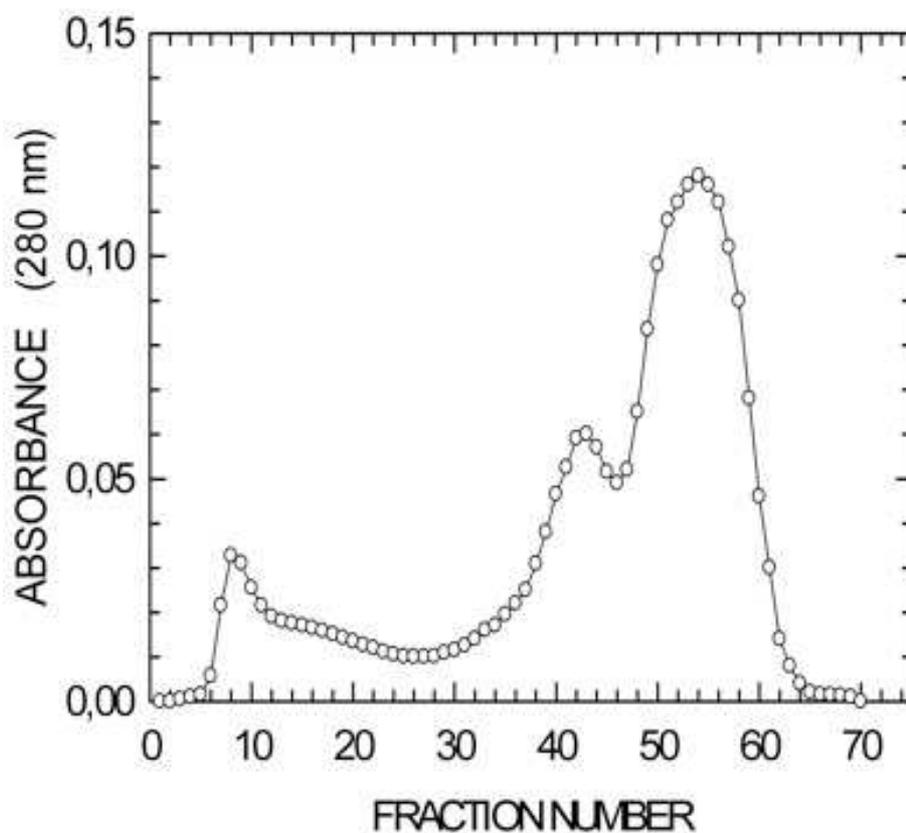


Figura 35: cromatografia di gel filtrazione delle frazioni riunite dopo cromatografia di scambio anionico

La presenza di due picchi di eluizione precedenti quello corrispondente alla corretta massa molecolare del dominio PHP, centrato in corrispondenza della frazione 54, indica la presenza di forme aggregate, come confermato dal caricamento in SDS-PAGE (Figura 36).

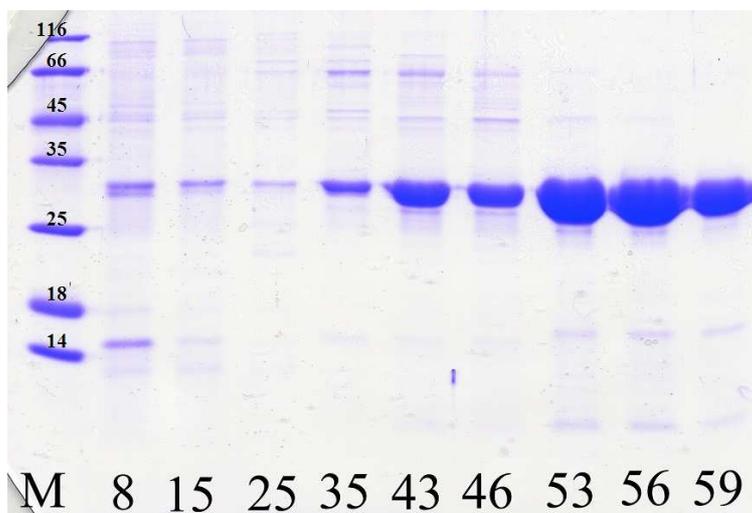


Figura 36: SDS-PAGE delle frazioni risultanti dalla cromatografia di gel filtrazione

Dall'analisi della ripartizione del PHP nei tre diversi picchi si può notare come la maggioranza della proteina sia presente nel terzo picco in uno stato monomero correttamente conformato e presenti un buon grado di purezza, sufficiente per poter condurre dei saggi di attività.

3.2.2 Saggi di attività esonucleasica e fosfatasica

Una delle reazioni associate al dominio PHP in DNA polimerasi della famiglia C (Stano et al., 2006) e della famiglia X (Baños et al., 2008) è un'attività esonucleasica, nel primo caso aggiuntiva a quella della subunità ϵ di proofreading. Per valutare la possibilità che anche in *Escherichia coli* il dominio PHP della replicasi presentasse una simile funzione, la proteina purificata è stata sottoposta al medesimo saggio di attività esonucleasica utilizzato per identificare la subunità ϵ , usando il substrato sintetico TMP-pNP (Hamdan et al., 2002 B). Come possibile cofattore metallico sono stati utilizzati tre differenti ioni divalenti, fra i più comuni cofattori per le esonucleasi, ovvero magnesio, zinco e manganese (Figura 37).

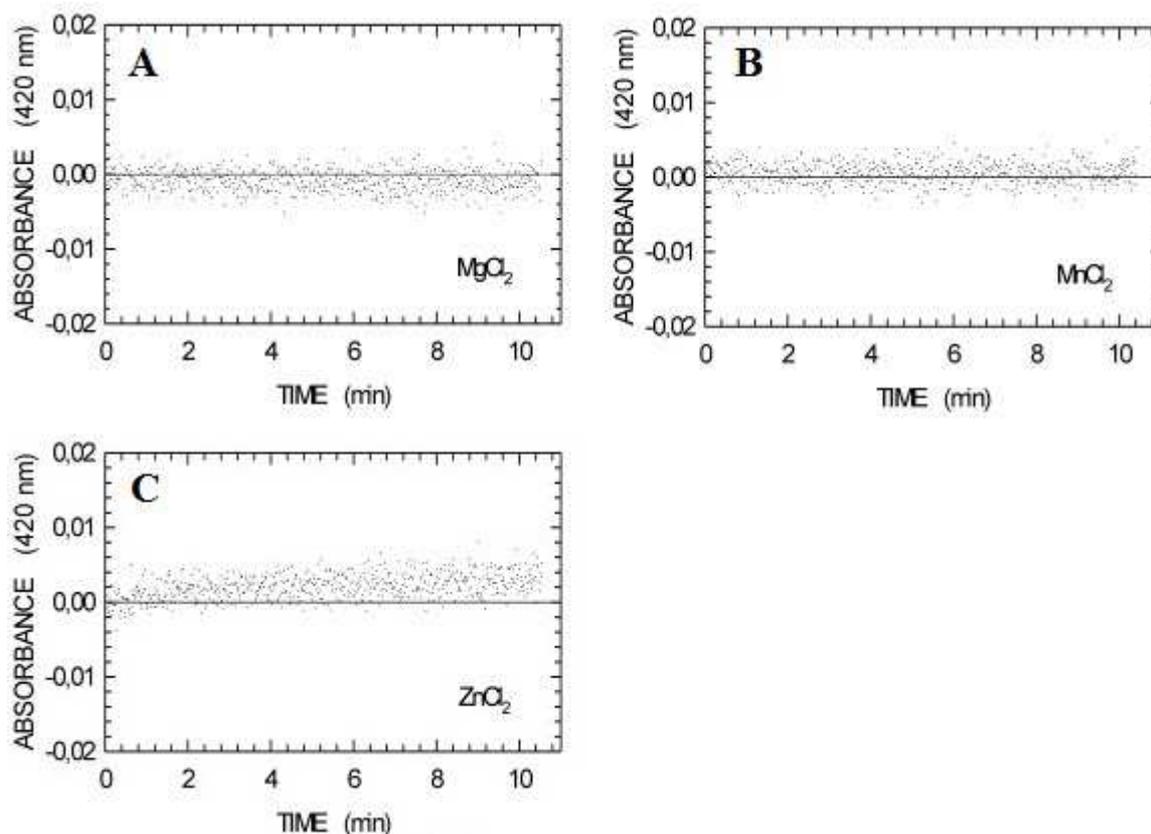


Figura 37: saggi di attività esonucleasica del dominio PHP condotti con $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $ZnCl_2$

Come si può osservare nei grafici riportati, in nessuno dei tre casi è stata riscontrata attività, il che permette di escludere che la funzione del PHP sia la medesima della subunità di proofreading. Questi dati non escludono tuttavia che il dominio in esame possa essere comunque coinvolto nell'attività di ϵ in maniera strutturale, fungendo come canalizzatore del filamento di DNA contenente un appaiamento errato fra il sito attivo di α ed il sito catalitico esonucleasico. Poiché tutte le attività connesse ai domini PHP sinora dimostrate sono di tipo idrolitico, una seconda analisi funzionale cui è stata sottoposta la proteina è stato un saggio di attività fosfatase, condotto con un metodo spettrofotometrico valutando la produzione di p-nitrofenolato a partire da p-nitrofenil fosfato. Anche in questo caso il saggio è stato condotto con i tre differenti metalli utilizzati nel saggio esonucleasico, non riscontrando alcuna attività per nessuno di essi (Figura 38).

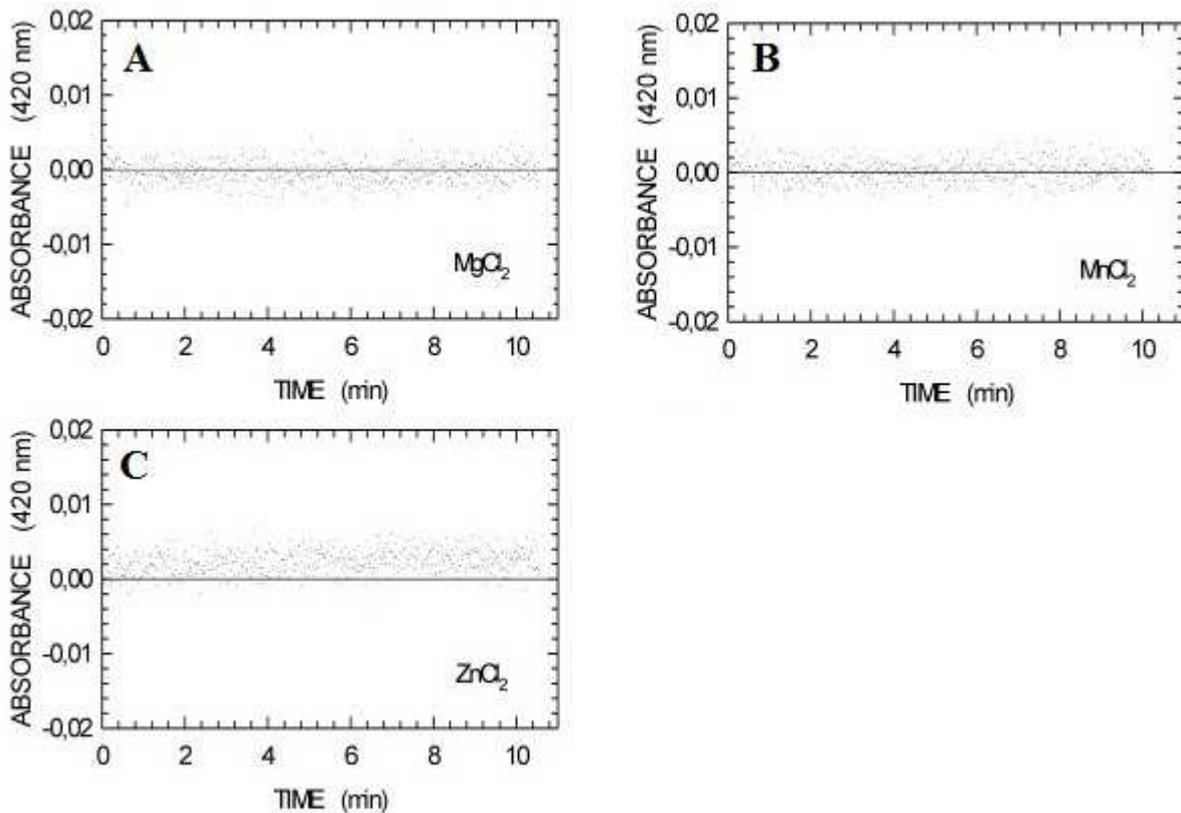


Figura 38: saggi di attività fosfatase del dominio PHP condotti con MgCl₂, MnCl₂ e ZnCl₂

3.2.3 Saggio di attività pirofosfatase

Per poter determinare la presenza di un'eventuale attività pirofosfatase associata al dominio PHP è stato utilizzato un saggio di attività specifico per la rilevazione dei fosfati, messo a punto durante il periodo di dottorato. Il saggio è stato progettato per seguire in continuo l'andamento delle reazioni catalizzate dalle DNA polimerasi e si basa sulla determinazione spettrofotometrica dell'acido urico, prodotto al termine di una serie di reazioni enzimatiche accoppiate. Il substrato di partenza nel saggio è una sequenza poliadeninica di 60 nucleotidi alla quale si associa un ventamero di deossitimine che funge da primer per l'azione della DNA polimerasi. La molecola di pirofosfato prodotta durante la reazione polimerasica viene idrolizzata ad opera della pirofosfatase inorganica in due molecole di fosfato, ciascuna delle quali è utilizzata dalla purina nucleoside fosforilasi per fosforilare una molecola di inosina. L'ipoxantina così ottenuta diventa quindi substrato della xantina ossidasi, la quale in presenza di ossigeno ed acqua genera come prodotto finale acido urico, il quale presenta un massimo di assorbanza a 293 nm. Il saggio è stato validato utilizzando una preparazione commerciale del frammento Klenow della DNA polimerasi I di *Escherichia coli* (Figura 39).

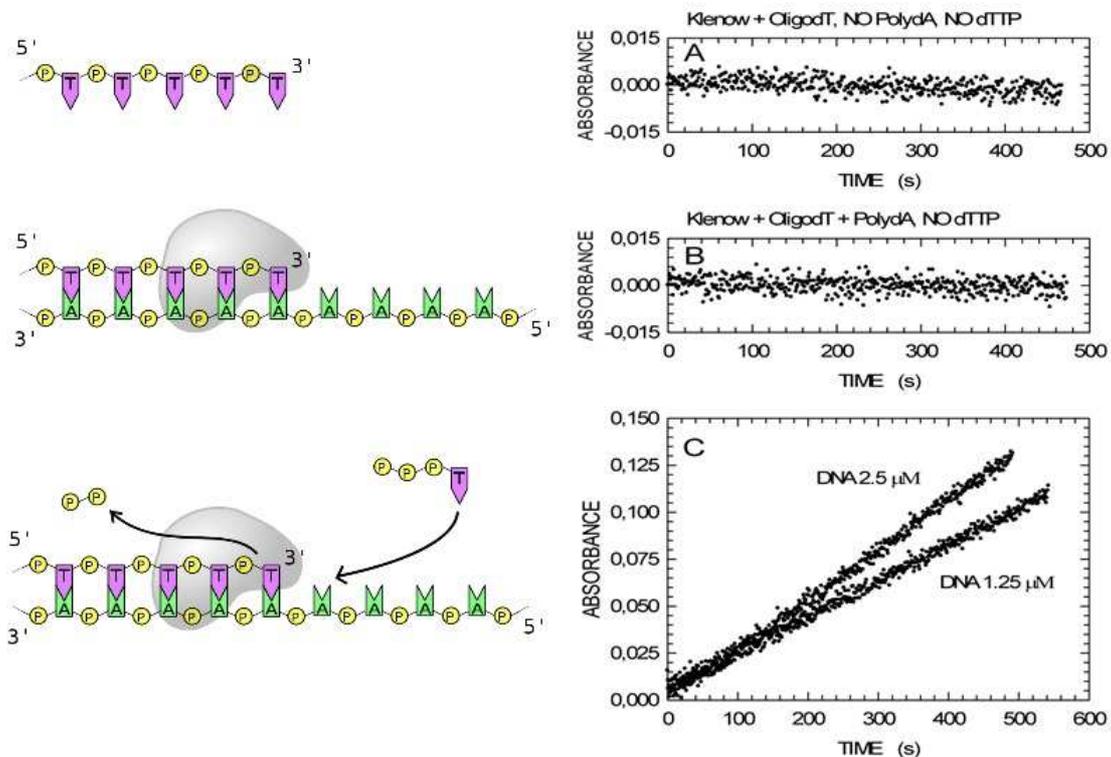


Figura 39: validazione del saggio di attività polimerasica. A – saggio condotto in assenza di entrambi i substrati della reazione polimerasica. B – saggio condotto in assenza di dTTP. C – saggio completo condotto con due differenti concentrazioni di frammento di Klenow

Dalle prove condotte in assenza di substrato si evidenzia come il saggio non presenti nessun rumore di fondo che possa disturbare la lettura del segnale, il quale è rilevabile solo in presenza di tutti i componenti necessari e risulta inoltre essere proporzionale alla quantità di polimerasi aggiunta alla miscela di reazione. Va evidenziato come, data la stechiometria delle reazioni coinvolte nel saggio, ad ogni molecola di pirofosfato prodotta durante la polimerizzazione corrispondano due molecole di acido urico, il che amplifica il segnale finale garantendo una lettura più sensibile. Per adattare il saggio alla rilevazione di un'attività pirofosfatasica nel dominio PHP la pirofosfatasi inorganica è stata eliminata dalla miscela di reazione ed il DNA è stato sostituito con pirofosfato inorganico (Figura 40).

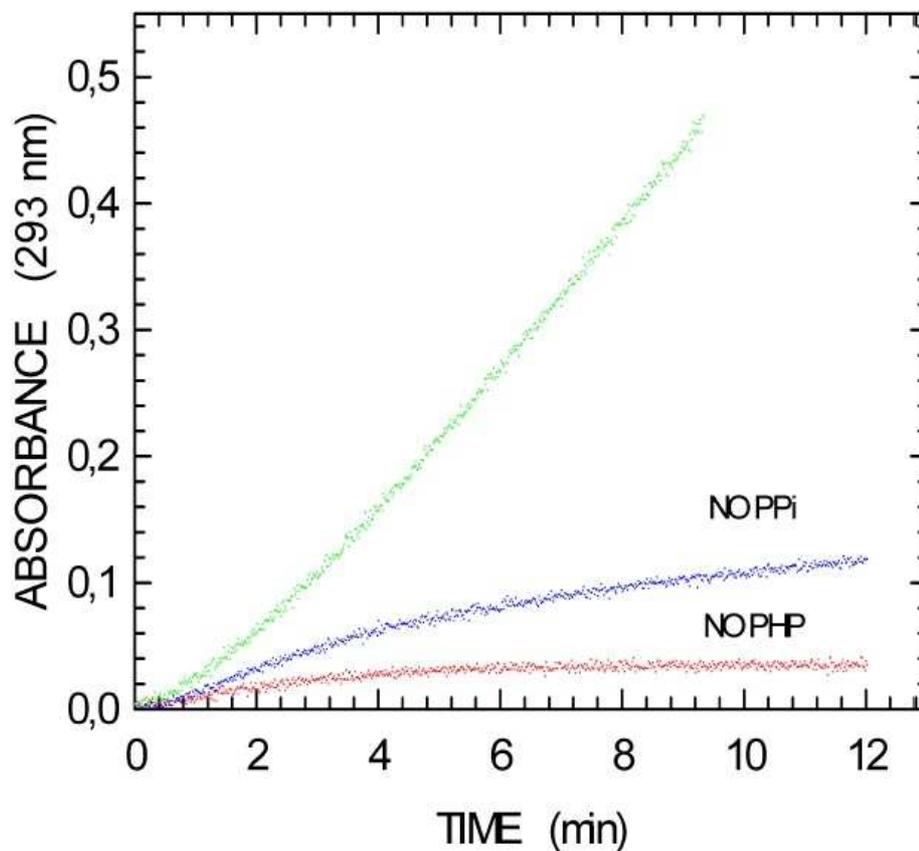


Figura 40: saggio di attività pirofosfatasica nel dominio PHP. L'attività è stata testata in assenza di PHP (punti rossi), in assenza di pirofosfato (punti blu) e con la miscela di reazione completa contenente Mg^{2+} (punti verdi)

Il risultato del saggio mostra una chiara attività pirofosfatasica, imputabile al dominio PHP, che si mantiene lineare in un ampio intervallo di tempo raggiungendo un'assorbanza di 0,5 in 10 minuti. Mentre in un controllo al quale non è stato aggiunto il dominio PHP non si riscontra

nessun aumento significativo di assorbanza, in un saggio al quale non sia fornito pirofosfato inorganico è possibile rilevare una lieve attività. Tale risultato è probabilmente imputabile ad una contaminazione di pirofosfato o di ioni fosfato nell'acqua utilizzata durante la purificazione dell'enzima o a molecole legate allo stesso dominio PHP e con esso purificate. Tuttavia, essendo questo contaminante rapidamente consumato, come si evidenzia dal rapido raggiungimento di uno stato stazionario, il suo effetto non risulta influente sull'attività determinata per il dominio PHP.

3.2.4 Espressione e purificazione della subunità α

Per confermare la presenza di un'attività pirofosfatasica associata al dominio PHP e studiarne la funzione nell'enzima nel suo complesso si è proceduto ad esprimere e purificare l'intera subunità α . Il protocollo seguito ha previsto l'induzione dell'espressione con arabinosio 1 mM per un tempo di 150 minuti ad una temperatura di 30 °C, per ridurre la possibilità di aggregazione dovuta al mancato raggiungimento di una conformazione corretta. Dopo l'estrazione delle proteine totali mediante sonicazione, la fase solubile è stata sottoposta ad un primo passaggio di purificazione in una colonna cromatografica di scambio anionico (Figura 41).

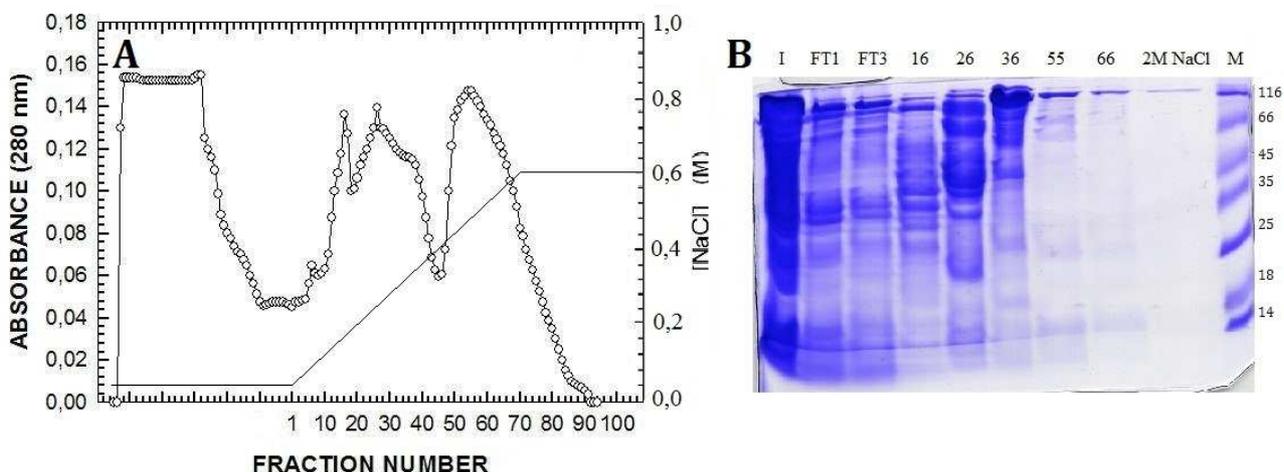


Figura 41: cromatogramma della cromatografia a scambio anionico Q-Sepharose FF (A) e SDS-PAGE (B) delle frazioni eluite

Come si può evidenziare dall'analisi elettroforetica delle frazioni, l'intensità della banda corrispondente ad α raggiunge il suo massimo nella frazione 36, ad una concentrazione di

NaCl pari a 0,3 M. Una parte della proteina sovraespressa non legatasi alla colonna viene persa nel flow through, probabilmente a causa di un folding non corretto. La presenza di DNA nel sito attivo può invece giustificare l'eluizione di forme di α ad una concentrazione 2 M di NaCl, in quanto l'aumento di cariche negative presenti può generare un legame molto più resistente all'aumento di forza ionica della fase eluente. Al termine della cromatografia, le frazioni corrispondenti al picco di eluizione di α sono state raccolte e condizionate con un tampone contenente glicerolo per inibire l'aggregazione e stabilizzare il campione durante il mantenimento a -20 °C. Prima del caricamento nella successiva colonna (Cibacron Blue), il campione è stato concentrato per ridurre il volume e quindi condizionato con MgCl₂, la cui funzione è di aumentare l'affinità di legame di α per la resina. Il composto legato alla resina emula infatti la struttura di un nucleotide, che nel sito attivo della polimerasi viene coordinato da due ioni Mg²⁺. La fase di eluizione è avvenuta in un singolo passaggio con NaCl 1M dopo aver eseguito un lavaggio ad una concentrazione pari a 150 mM (Figura 42).

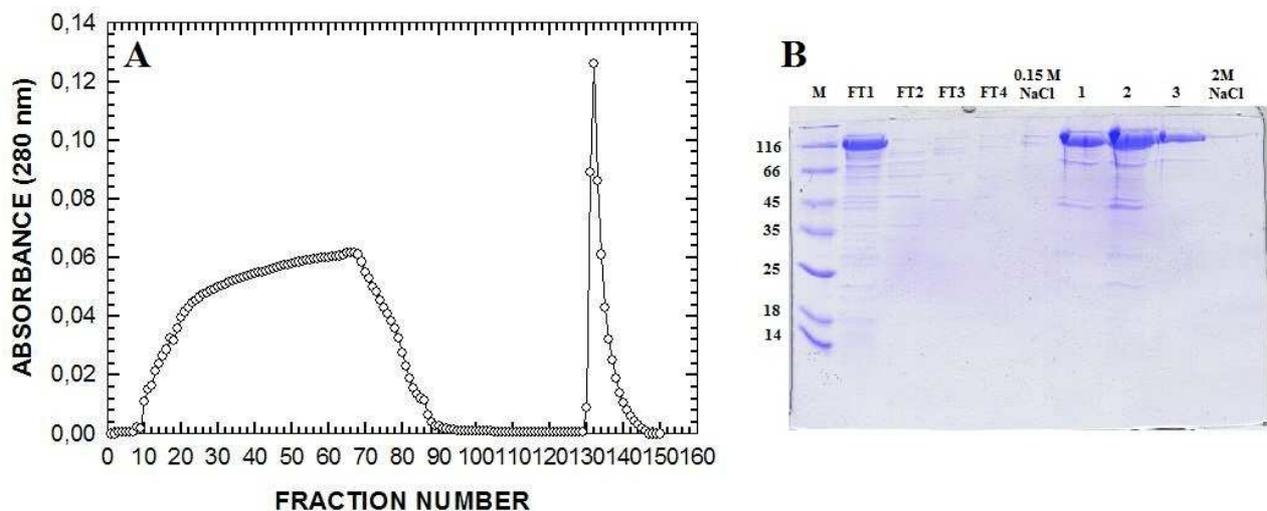


Figura 42: A - cromatogramma della cromatografia di affinità. B - SDS-PAGE delle frazioni eluite: nell'ordine i quattro flow through (FT1-4) raccolti dalla frazione 10 alla 90, testa (2), cuore (3) e coda (4) del picco eluito a 0,4 M NaCl nelle frazioni da 130 a 147

Dal gel si può notare come la proteina sovraespressa si concentri nelle frazioni relative alla testa, al cuore ed alla coda del picco eluito con 1M NaCl, mentre non sia presente nei flow through e quasi del tutto assente nel lavaggio effettuato con 2M NaCl. Il campione ottenuto è stato quindi sottoposto a tre cicli di dialisi per diminuire la concentrazione di NaCl ed eliminare il magnesio, quindi concentrato per ultrafiltrazione e caricato in colonna di affinità HiTrap Heparin HP. Questo passaggio è stato previsto per sfruttare la somiglianza strutturale

fra l'eparina legata alla resina ed una corta molecola di DNA. Dopo il caricamento in colonna, l'eluizione di α è avvenuta ad una concentrazione di NaCl pari a 0.25 M (Figura 43).

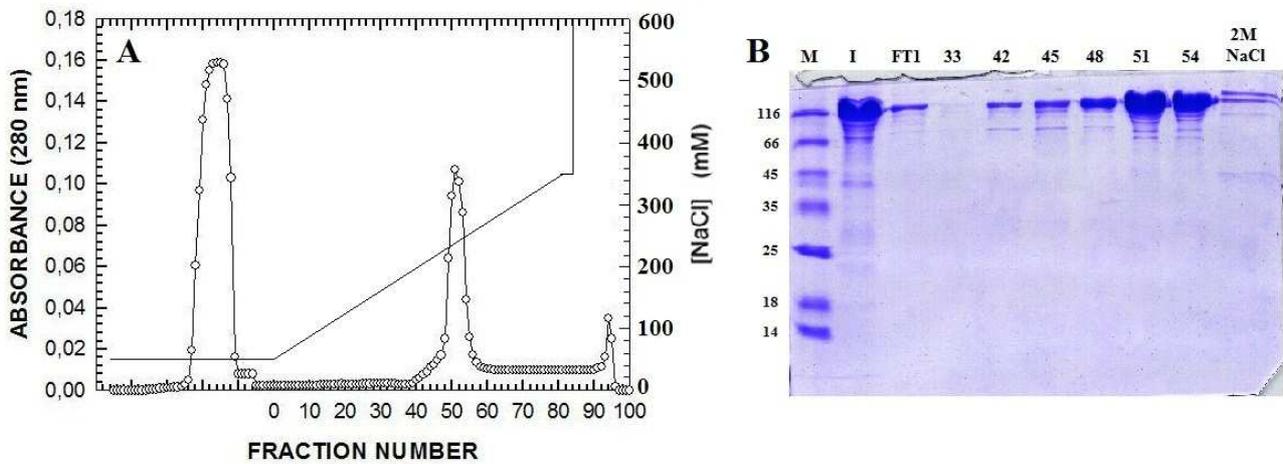


Figura 43: cromatogramma della colonna di affinità HiTrap Heparin HP (A) e SDS-PAGE delle frazioni di eluizione (B)

Dopo il passaggio nella colonna HiTrap Heparin HP la banda corrispondente ad α appare concentrata e purificata dalla maggior parte dei contaminanti di massa molecolare inferiore, oltre che da una banda di massa molecolare superiore che eluisce esclusivamente durante il lavaggio con NaCl 2 M. Le frazioni del picco di purificazione sono state raccolte, diluite con tampone privo di NaCl per abbassarne il titolo e quindi nuovamente concentrate prima del caricamento in una colonna a scambio anionico ad alta efficienza (Figura 44).

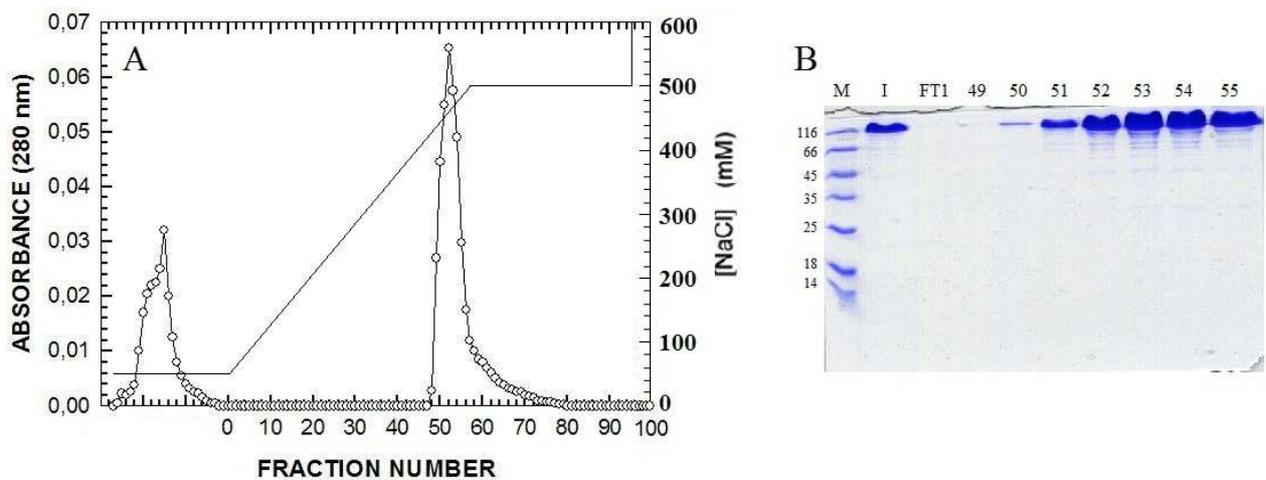


Figura 44: cromatogramma (A) e SDS-PAGE (B) delle frazioni di eluizione della colonna a scambio anionico Resource Q

L'eluizione di α si è verificata ad una concentrazione pari a 0.45 M di NaCl, in corrispondenza della quale si può osservare mediante elettroforesi una banda molto concentrata con un buon grado di purezza. Nonostante i passaggi di purificazione eseguiti, non è stato possibile eliminare dal campione alcune bande di massa molecolare leggermente inferiore ad α , il cui profilo di eluizione segue lo stesso andamento. Una possibile interpretazione è che queste bande rappresentino forme parzialmente degradate di α che si formano durante la preparazione dei campioni da caricare in SDS-PAGE, o che in alternativa corrispondano a proteine interagenti con la subunità stessa.

3.2.5 Saggio di attività pirofosfatasica della subunità α

Per cercare di assegnare all'attività pirofosfatasica riscontrata nel dominio PHP un ruolo nel contesto della reazione polimerasica catalizzata dalla subunità α , quest'ultima è stata sottoposta a saggi di attività specificamente progettati. Come primo passaggio, la funzionalità della preparazione di α purificata è stata determinata con un saggio di attività polimerasica, valutando in parallelo la presenza di attività pirofosfatasica (Figura 45).

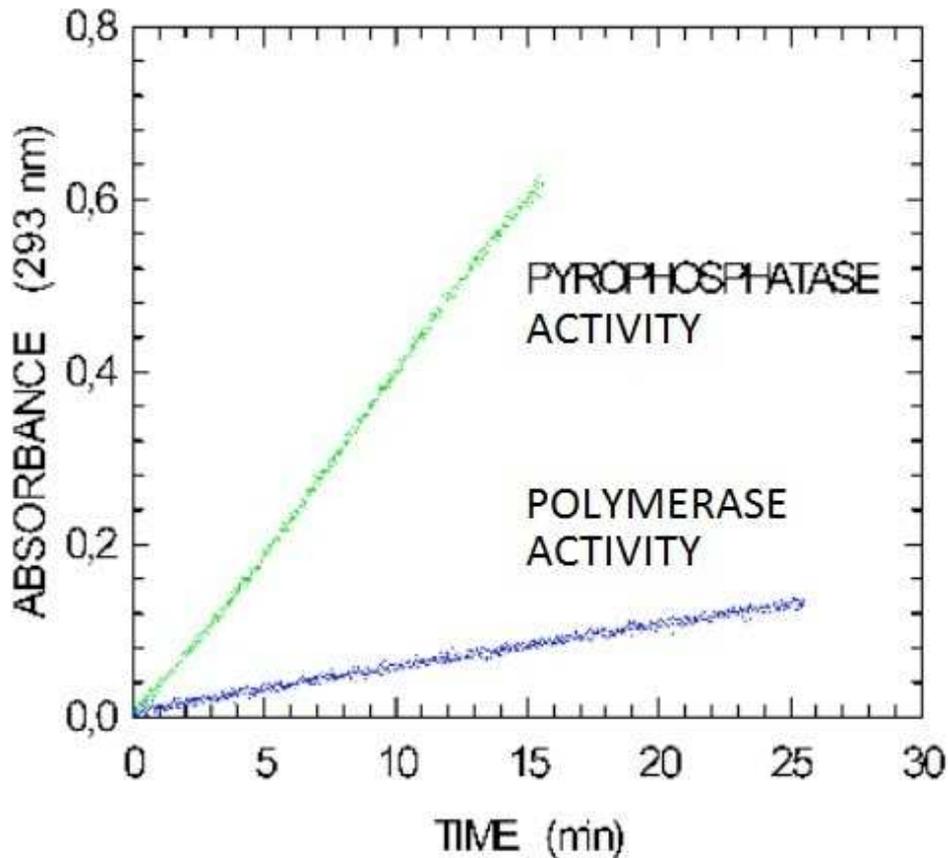


Figura 45: saggio di attività pirofosfatase (pallini verdi) e polimerasica (pallini blu) condotti sulla subunità α

Dal grafico si può osservare come la subunità α sia in grado di catalizzare correttamente la reazione di polimerizzazione, il che indica il mantenimento della giusta conformazione nativa. L'attività pirofosfatase rilevata mediante l'uso dell'apposito saggio conferma quanto già osservato nel singolo dominio PHP e ne aumenta il grado di confidenza; essendo infatti il profilo di purificazione differente per le due preparazioni del PHP e di α , la presenza di attività in entrambe rappresenta un ulteriore livello di certezza che essa non sia dovuta a contaminanti. È stata quindi valutata la possibilità che l'attività pirofosfatase del dominio PHP potesse essere in grado di fornire l'energia richiesta per la catalisi della reazione polimerasica, adattando il saggio a questo scopo. La metodica adottata ha previsto l'uso del saggio di attività polimerasica, alla cui miscela di reazione non è stata però aggiunta la pirofosfatasi inorganica. In assenza di enzima esogeno la liberazione di molecole di fosfato sarà quindi provocata esclusivamente dall'attività pirofosfatase del dominio PHP (Figura 46).

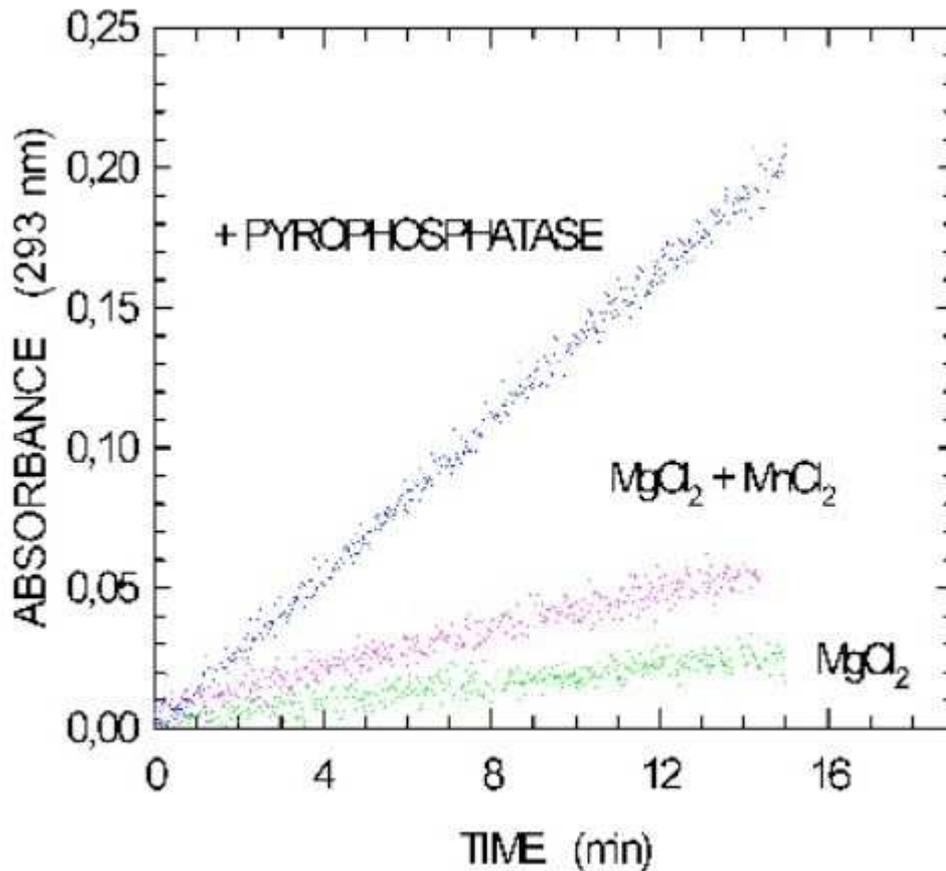


Figura 46: saggio di attività polimerasica della subunità α condotto in assenza di pirofosfatasi esogena utilizzando $MgCl_2$ (pallini verdi) o $MgCl_2 + MnCl_2$ (pallini rossi) come cofattori metallici. I pallini blu indicano un saggio di controllo positivo in presenza di pirofosfatasi inorganica

Il risultato dell'esperimento mostra che pur mantenendo una velocità inferiore rispetto al controllo contenente pirofosfatasi esogena, il dominio PHP è in grado di scindere il pirofosfato prodotto da α durante la polimerizzazione. Questa osservazione consente quindi di pensare che un simile accoppiamento delle due attività possa avvenire anche durante la reazione della DNA polimerasi III in vivo, fornendo l'energia necessaria al suo proseguimento. Un riscontro strutturale a supporto di quest'ipotesi si ritrova nella struttura cristallografica di α (Lamers et al., 2006), in cui si può evidenziare l'esistenza di un canale di collegamento diretto fra il sito attivo polimerasico e quello presunto del PHP verso il quale potrebbe essere indirizzata la molecola di pirofosfato prodotta dall'allungamento del filamento di DNA. Ripetendo il saggio in presenza di ioni Mn^{2+} come secondo cofattore metallico si può inoltre riscontrare un lieve aumento dell'attività pirofosfatase, il che fornisce un indizio sul metallo coordinato dal PHP.

Data però l'impostazione del saggio, che richiede necessariamente la presenza di ioni Mg^{2+} utilizzati dalla stessa subunità α così come dagli altri enzimi presenti, il sistema non consente di giungere ad una risposta precisa riguardo alla reale natura del cofattore metallico necessario al dominio PHP. Considerando il ruolo strutturale del dominio e la natura mobile della zona di legame strutturale fra il PHP e la restante porzione di α , sarebbe di interesse poter valutare la differenza di attività pirofosfatase in presenza anche della subunità ϵ .

3.3 Costruzione della famiglia di vettori pGOODs

Uno degli obiettivi del presente lavoro di ricerca è stato quello di produrre e purificare il complesso completo del core polimerasico per perseguirne la cristallizzazione. A questo scopo è stato progettato e realizzato un nuovo sistema di co-espressione di proteine, basato su due plasmidi con origini di replicazione compatibili e caratteristiche adeguate allo scopo. Poiché uno dei problemi principali riscontrati nell'espressione contemporanea di più proteine è legato al bilanciamento del rapporto molare, questa problematica è stata affrontata disegnando due plasmidi a differente numero di copie, tra i quali fosse inoltre possibile un semplice interscambio dei geni clonati. Volendo includere nel sistema il plasmide commerciale ad alto numero di copie pBAD, il nuovo plasmide è stato quindi costruito utilizzando un'origine di replicazione p15A (a basso numero di copie), ricavando il polylinker da un plasmide della stessa serie del primo. La condivisione del medesimo sito multiplo di clonaggio consente di trasferire agevolmente i geni clonati fra i due plasmidi, variandone quindi il livello di espressione relativo. Oltre agli elementi descritti il nuovo plasmide, denominato pGOOD, contiene un marker di resistenza per la tetraciclina, il sistema repressore/operatore *lac*, regolato da IPTG e indipendente dall'induzione mediante arabinosio del pBAD, ed un terminatore di trascrizione (Figura 47).

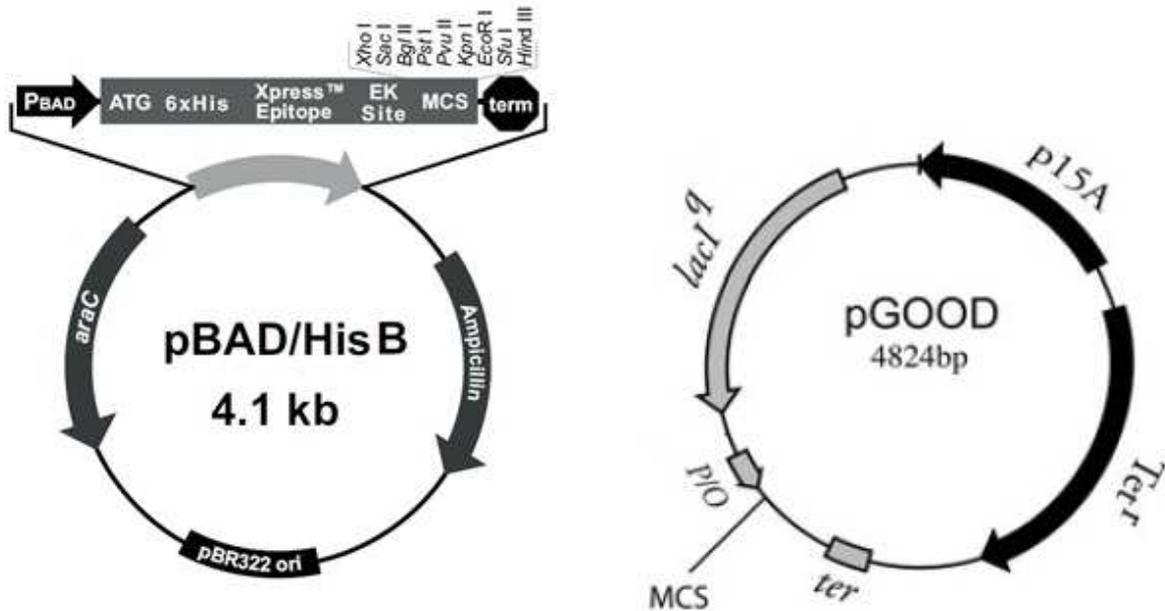


Figura 47: i due plasmidi pBAD e pGOOD alla base del sistema di coespressione

Il funzionamento del metodo è stato verificato clonando nel pBAD il gene *dnaE*, codificante per α (130 kDa) e nel pGOOD il gene *dnaQ*, codificante per ϵ (27 kDa), co-trasformando quindi lo stesso ospite (*Escherichia coli* TOP10) con i due plasmidi e conducendo una prova di espressione in presenza di uno, nessuno o entrambi gli induttori (Figura 48).

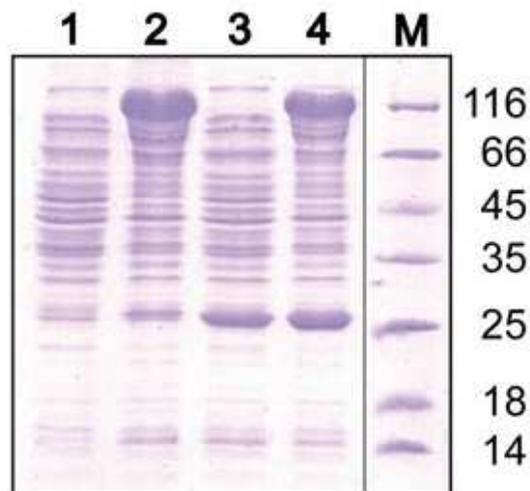


Figura 48: Estratto proteico totale da *E. coli* TOP10/pBAD-*dnaE*/pGOOD-*dnaQ*. 1- campione non indotto. 2 - induzione con arabinosio. 3 - induzione con IPTG. 4 - doppia induzione con arabinosio e IPTG

Dal profilo di espressione si può notare come l'induzione dei due plasmidi sia facilmente regolabile in maniera indipendente o contemporanea. Il fatto che in presenza di solo arabinosio si possa comunque rilevare una banda di ϵ più intensa del controllo è spiegabile con l'effetto di protezione esercitato dalla subunità α , abbondantemente espressa. Dall'analisi dei campioni sottoposti ad elettroforesi si può inoltre notare la differente stringenza dei due sistemi di induzione. In assenza di arabinosio e IPTG, infatti, si può comunque rilevare la presenza di una lieve banda di espressione corrispondente ad ϵ , in accordo con quanto noto sull'esistenza di un certo livello di espressione basale nei vettori regolati dal sistema *lac*, mentre ciò non accade per il promotore PBAD, più strettamente regolato (Guzman et al., 1995). Per estendere le possibilità di utilizzazione del sistema e garantire un controllo dell'espressione fortemente regolato, a partire dal pGOOD sono state costruite due sue varianti di dimensioni inferiori, nelle quali il gene *lacI* è stato rimosso e sostituito dalla sequenza dell'operatore ideale *lacO_{id}*, a dare il pGOOD1, o dall'operatore *lacO₃*, producendo il pGOOD2 (Figura 49).

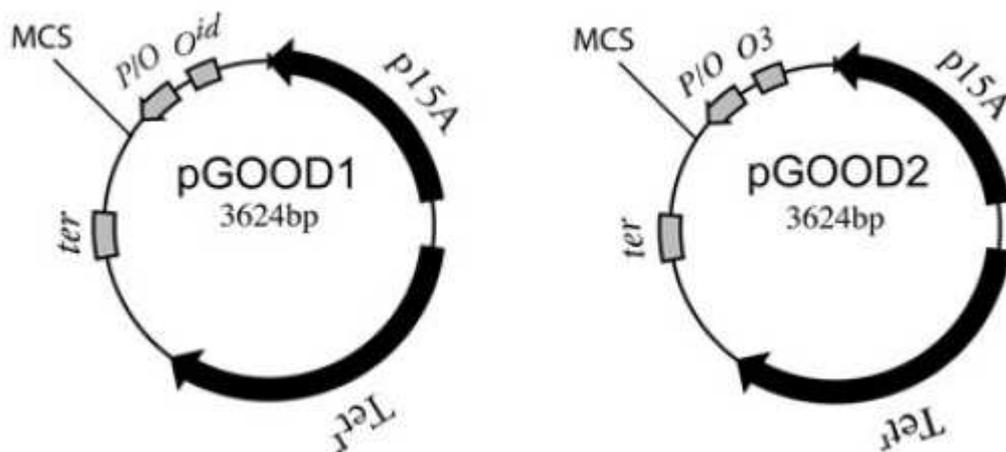


Figura 49: plasmidi pGOOD1 e pGOOD2

L'aggiunta di un secondo operatore aumenta l'efficienza di repressione del sistema da parte del repressore LacI (Oehler et al., 1994), il cui gene è stato clonato all'interno del plasmide pBAD sotto il controllo dell'omonimo promotore, regolato da AraC. Con questa configurazione, aggiungendo arabinosio al terreno di crescita l'espressione del gene inserito nel pGOOD1 o nel pGOOD2 resta strettamente inibita dall'elevata concentrazione di repressore espresso dal pBAD. Inserendo in quest'ultimo una versione termosensibile di LacI

è inoltre possibile controllare mediante un semplice shift di temperatura l'espressione dei geni clonati nei pGOOD. Per verificare la validità del sistema, nel vettore pGOOD1 è stato clonato il gene *dnaQD12A*, codificante per una variante mutagenica di ϵ priva di attività di proofreading (Fijalkowska e Schaaper, 1996), co-trasformando *Escherichia coli* TOP10 con il plasmide pGOOD1-*dnaQD12A* ed il vettore pBAD-*lacI* o quello pBAD-*lacI^{TS}*. I due ceppi ottenuti sono stati quindi cresciuti a 30 °C e 42 °C, ovvero in condizioni di stabilità o instabilità del repressore LacI, determinando la frequenza di mutazioni. Per ottenere opportuni controlli di riferimento, il medesimo ceppo è stato co-trasformato con il plasmide pGOOD1 vuoto ed una delle due versioni del plasmide pBAD-*lacI* (Figura 50).

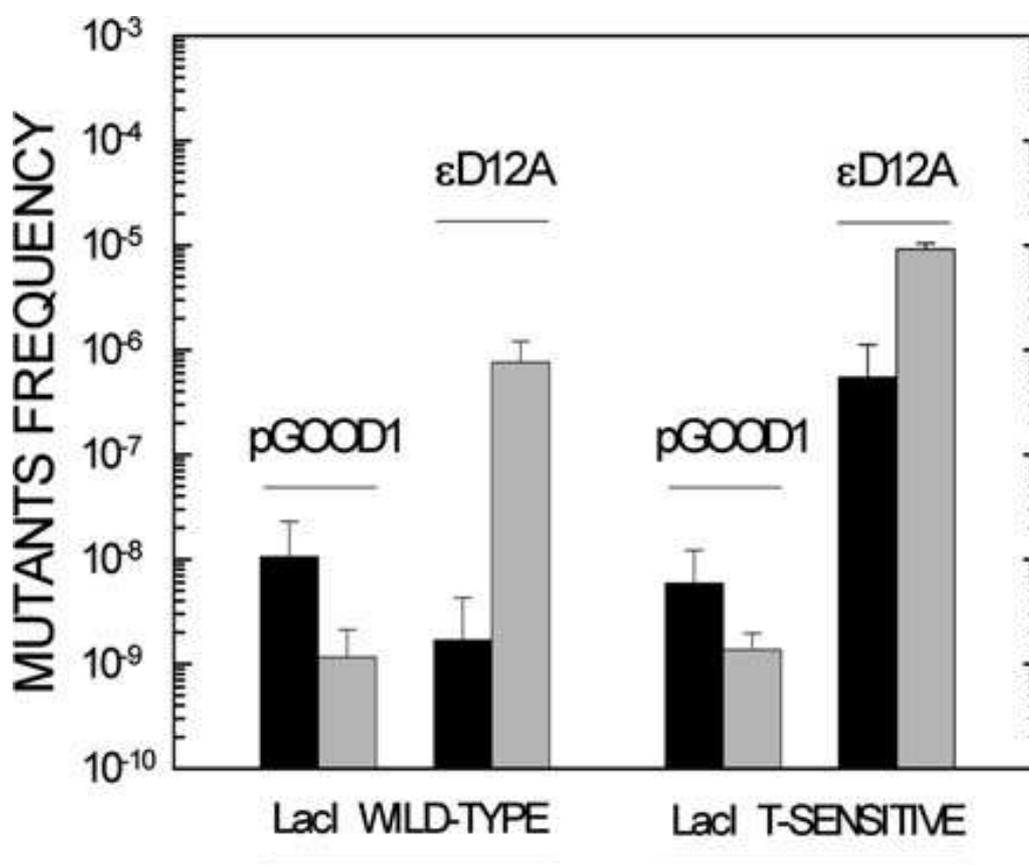


Figura 50: frequenza di mutazioni nei ceppi TOP10-pGOOD1 e TOP10-pGOOD1*dnaQD12A* coltivati a 30 °C (barre nere) in presenza di arabinosio e in seguito a 42 °C (barre grigie) in assenza di induttore

Si può osservare come il ceppo contenente il plasmide pGOOD1-*dnaQD12A* sotto il controllo del repressore LacI wild type non mostri incrementi di mutazioni quando allevato a 30 °C, mentre a 42 °C presenti una frequenza di mutazioni superiore di tre ordini di grandezza rispetto al controllo. Si può quindi dedurre che alla temperatura più elevata il repressore LacI non sia completamente stabile, o in alternativa si leghi con minor affinità agli operatori. Nel

caso del TOP10/pGOOD1-*dnaQD12A*, pBAD*lacI^{TS}* si può invece osservare una differenza di due ordini di grandezza nella frequenza di mutazioni rispetto al controllo durante la crescita a 30 °C, che sale a quattro ordini di grandezza a 42 °C. Questi dati indicano una presumibile instabilità del repressore *LacI^{TS}* anche alla temperatura permissiva, il che genera di conseguenza l'espressione della forma mutagenica di ϵ , giustificando la variazione osservata. Nel complesso il sistema di co-espressione costruito con la versione wild type di *LacI* si dimostra quindi efficiente nel reprimere l'espressione di geni anche estremamente tossici, e nel caso specifico di *dnaQD12A* può essere utilizzato per ottenere un mutatore condizionale totalmente regolabile. Utilizzando invece la versione termosensibile di *LacI* il sistema si dimostra utile per ottenere un ceppo ad elevata mutagenicità.

3.4 Produzione del core $\alpha\epsilon\theta$

I dati strutturali sinora noti riguardanti il core della DNA polimerasi III si basano su informazioni incomplete, derivanti da strutture parziali delle singole subunità α , ϵ e θ , dimostratesi tutte particolarmente difficili da isolare e purificare. In letteratura sono stati elaborati diversi protocolli per purificare le tre subunità assemblate, sia a partire da un estratto proteico grezzo (McHenry e Crow, 1979) che dalle singole subunità purificate separatamente ed assemblate in vitro (Studwell-Vaughan e O'Donnell, 1993). In tutti i casi, la resa del processo si è dimostrata molto bassa, arrivando ad un massimo del 5,2 %, con un profilo di purificazione non ottimale. È stata quindi intentata la sovraespressione contemporanea delle tre proteine in un unico ospite, clonando i tre geni codificanti nella sequenza *dnaQ*(ϵ)-*holE*(θ)-*dnaE*(α) in un vettore di espressione sotto il controllo dello stesso promotore (Kim e McHenry, 1996). Il vantaggio di questo approccio è di esprimere in vivo il complesso trimerico, garantendone il corretto folding. Tuttavia, il clonaggio in sequenza determina effetti di polarità trascrizionale che incidono in particolar modo nei confronti del gene *dnaE*, più distante dal promotore, specialmente considerando la sua lunghezza di più di 3400 paia di basi. L'effetto risultante è quindi la produzione di una ridotta quantità di α , che, dato lo sbilanciamento rispetto alle altre due proteine, porta all'accumulo di forme eterodimeriche solubili ϵ - θ e di complessi ϵ - ϵ insolubili, con una conseguente diminuzione della resa finale di purificazione. Per questi motivi, per ottenere una quantità di core purificato tale da consentirne la cristallizzazione, nel presente lavoro di Tesi è stato impostato

un sistema di co-espressione basato sui due plasmidi pBAD e pGOOD, clonando il gene *dnaE* nel primo ed i due geni *dnaQ-holE* nel secondo. Il clonaggio individuale della subunità α , limitante la resa in tutti i processi illustrati, in un plasmide a più elevato numero di copie rispetto a quello esprime ϵ e θ può in questo modo compensarne la maggior difficoltà di sintesi. Il differente sistema di espressione dei due vettori (induzione con arabinosio ed IPTG di pBAD e pGOOD, rispettivamente), garantisce inoltre la possibilità di regolare indipendentemente la produzione delle subunità per compensarne i rapporti molari. Sfruttando queste caratteristiche sono quindi state indagate diverse metodiche per arrivare a migliorare le rese di espressione e purificazione, sia esprimendo il core sotto forma di corpi inclusi che in forma solubile.

3.4.1 Analisi dell'espressione a 37 °C

Volendo ottenere una buona resa di purificazione, il primo protocollo studiato ha previsto l'espressione del core, dopo 5 ore iniziali di coltura, ad una temperatura di 37 °C per un tempo di 150 minuti. L'espressione è stata in questo caso indotta con arabinosio e IPTG, entrambi 1 mM. Le proteine sono state estratte mediante sonicazione in tampone contenente Tris 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM. Per discriminare il core correttamente assemblato da eventuali forme di aggregazione, dopo una prima centrifugazione di 20 minuti a 4000 g il surnatante ottenuto è stato nuovamente centrifugato per ulteriori 20 minuti a 16000 g, in modo da precipitare complessi di dimensioni eccessive. Allo stesso tempo, il pellet ricavato dalla prima centrifugazione è stato lavato con una soluzione di Triton X-100 (1 %) per eliminare i residui di membrana e di proteine a questa associate, ed infine solubilizzato in tampone Tris 50 mM pH 8, in presenza di glicerolo 40 % e DTT 5 mM. Questa soluzione è stata quindi sottoposta ad un nuovo ciclo di sonicazione, seguito da centrifugazione a 16000 g. Da questa indagine è stato possibile ottenere un profilo completo della ripartizione del core al termine della fase di espressione, che ha portato alle rese illustrate in tabella partendo da 150 ml di coltura iniziale (Figura 51).



Figura 51: SDS-PAGE del surnatante 4000g (corsia 1), del pellet risolubilizzato (2) e del pellet risolubilizzato dopo centrifugazione a 16000g (3) e dosaggio ripartizione delle proteine nei differenti campioni.

Dai dati ottenuti è possibile notare come nel campione solubile derivante dalla prima estrazione il core rappresenti circa il 20 % della proteina totale, di cui il 50 % è rappresentato da forme aggregate eliminate con una centrifugazione ad accelerazione maggiore. La maggior parte delle proteine sovraesprese si ritrova invece nella frazione insolubile, dalla quale la maggior parte della proteina non viene risolubilizzata, nemmeno in presenza di glicerolo e DTT, diminuendo drasticamente la resa di recupero. Per definire il grado di aggregazione, le proteine solubili totali e il pellet risolubilizzato sono stati analizzati mediante gel filtrazione, sottoponendo le frazioni ottenute ad un saggio di attività esonucleasica (Figura 52).

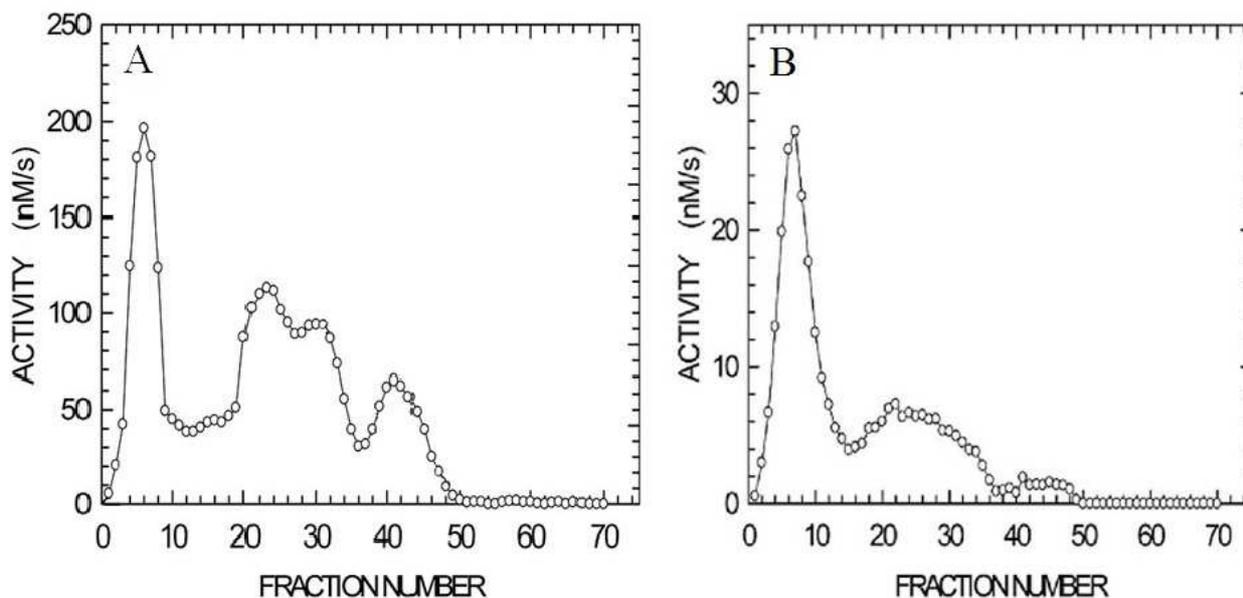


Figura 52: cromatogrammi di gel filtrazione delle proteine solubili totali (A) e del pellet risolubilizzato (B)

In entrambi i casi analizzati, la maggior parte del core è presente sotto forma di aggregati che eluiscono rapidamente dalla colonna con un picco di assorbanza il cui massimo corrisponde alla frazione 6. Nella frazione solubile, oltre al picco di attività corrispondente alla massa molecolare del core (massimo in corrispondenza della frazione 23), sono visibili anche un picco a questo convoluto, indicante probabili forme degradate di α legate ad ϵ , ed il picco di attività del dimero di ϵ , caratterizzato da un massimo nella frazione 42. Il risultato delle analisi condotte indica quindi una difficoltà da parte delle proteine di assemblarsi correttamente nelle condizioni di espressione utilizzate; pertanto, si è deciso di modificare la procedura, effettuando la coltura e la successiva induzione a 30 °C, nella speranza di ottenere materiale più solubile.

3.4.2 Analisi dell'espressione a 30 °C

Considerato il maggior tempo di replicazione ad una temperatura di 30 °C rispetto a 37 °C, le cellule sono state allevate per 6 ore prima di indurle con arabinosio e IPTG, entrambi 1 mM, per 150 minuti. Nella fase di estrazione delle proteine mediante sonicazione sono stati impiegati due differenti tamponi, oltre a quello utilizzato nel protocollo precedente, sostituendo il Tris con MES 50 mM a pH 6,5, o aggiungendo al Tris glicerolo 20 % e DTT 5 mM.

Per allontanare le forme aggregate del core, dopo aver recuperato la frazione solubile con una centrifugazione a 4000 g per 20 minuti, i campioni sono stati filtrati con dispositivi da 0,22 μm . Nel caso del tampone contenente glicerolo, la filtrazione è stata sostituita da una centrifugazione a 16000 g. Le proteine solubili sono state quindi separate mediante cromatografia di gel filtrazione, analizzando le frazioni con il saggio di attività esonucleasica e dosandole con la metodica di Bradford (Figura 53).

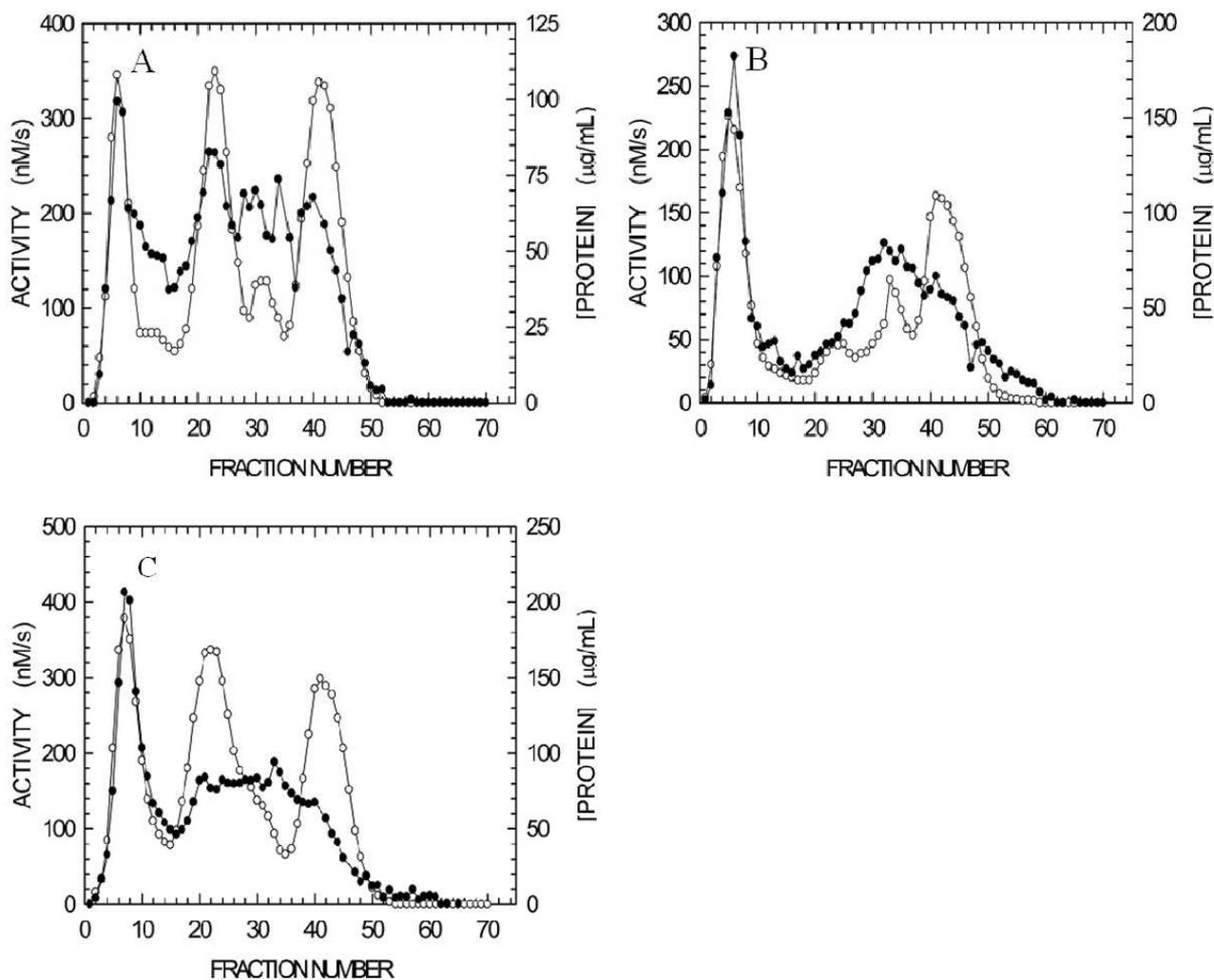


Figura 53: attività esonucleasica (pallini bianchi) e concentrazione proteica (pallini neri) nelle frazioni cromatografiche delle proteine solubili estratte con tampone Tris 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM (A), con tampone MES a pH 6,5 (B) o Tris in presenza di glicerolo e DTT (C)

Fra le tre condizioni valutate si può notare come la maggior attività del picco corrispondente al core (massimo nella frazione 23) sia presente nel caso del tampone già utilizzato nell'estrazione a 37 °C, mentre l'abbassamento del pH ad un valore di 6,5 ha portato ad un

aumento di forme degradate di α associate ad ϵ . L'aggiunta di glicerolo e DTT non ha invece portato ad aumenti significativi, indicando come la sola diminuzione della temperatura sia stato un fattore sufficiente a triplicare l'attività del core correttamente assemblato rispetto all'espressione a 37 °C. Si è quindi deciso di proseguire effettuando le colture a 30 °C ed estraendo le proteine con Tris a pH 8, in assenza di glicerolo o DTT, come tampone standard.

3.4.3 Purificazione del core solubile

Per ottenere una sufficiente preparazione di core purificato si è partiti da una quantità di proteina iniziale pari a 104 mg. Fra le procedure di purificazione pubblicate in letteratura sono riportate metodiche fra loro discordanti, in quanto mentre alcuni lavori illustrano passaggi cromatografici con resine a scambio cationico per purificare il core assemblato (Kim e McHenry, 1996), in altri si utilizzano resine a scambio anionico basate sul principio opposto per studiare il sub-assemblaggio α - ϵ (Studwell e O'Donnell, 1990). Considerando i punti isoelettrici di α , ϵ e θ , pari rispettivamente a 5.16, 5.54 e 9.15, è evidente come nelle condizioni di pH (8) del tampone di estrazione solo la più piccola delle tre proteine sia carica positivamente, mentre le altre due mostrano una carica negativa netta. Si è perciò scelto di utilizzare per il primo passaggio di purificazione la resina Q-Sepharose FF (scambiatrice di anioni), impostando un gradiente di NaCl fino a 500 mM e valutando l'attività esonucleasica delle frazioni e la loro concentrazione proteica (Figura 53).

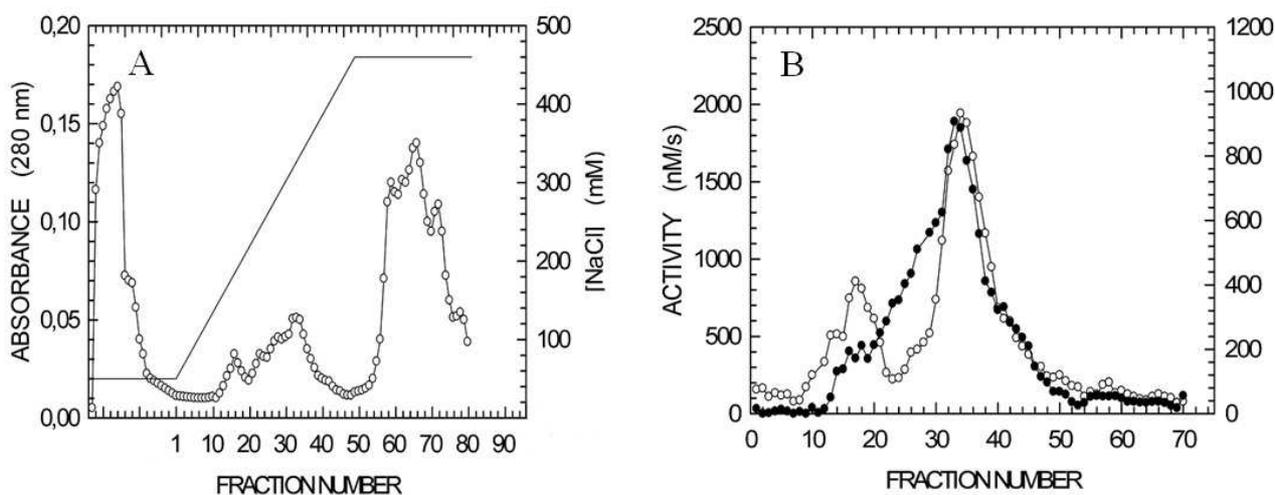


Figura 53: A - cromatogramma della cromatografia a scambio anionico. B - attività esonucleasica (pallini bianchi) e dosaggio proteico (pallini neri) delle frazioni cromatografiche

Le frazioni raccolte al termine della cromatografia sono state diluite 1:2 con un tampone privo di NaCl, contenente invece glicerolo e DTT, per dimezzare la concentrazione di NaCl e raggiungere una concentrazione pari al 20 % dell'antiaggregante e 5 mM del riducente. Dopo il passaggio in colonna il picco del core, assegnato in base al saggio di attività, è presente intorno alla frazione 33, corrispondente ad una concentrazione di circa 320 mM di NaCl. Questo valore della forza ionica necessaria per l'eluizione è superiore a quanto riportato in letteratura per il complesso α - ϵ e la subunità α purificati con una colonna FPLC MonoQ, eluiti ad una concentrazione di NaCl pari a rispettivamente 260 e 300 mM (Studwell e O'Donnell, 1990). Una simile differenza può essere dovuta ad un cambiamento conformazionale dovuto alla presenza di θ che provochi l'esposizione di un maggior numero di cariche negative o più probabilmente alla presenza di DNA legato ad α , che aumenta l'affinità alla resina. Le frazioni rappresentative dei due picchi principali di attività riscontrati sono state analizzate mediante SDS-PAGE, per osservarne il profilo (Figura 54).

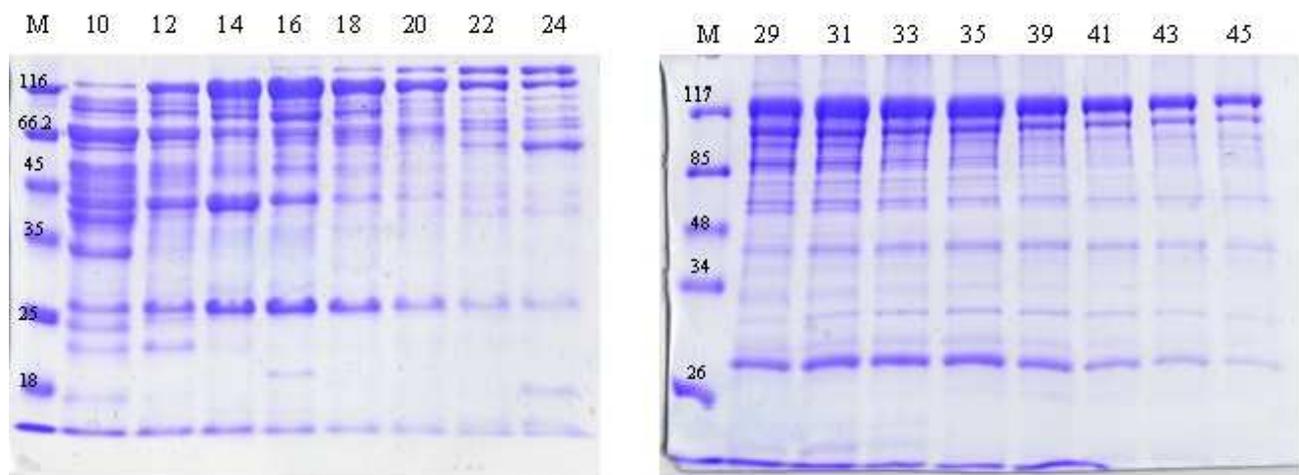


Figura 54: SDS-PAGE delle frazioni derivanti dalla cromatografia di scambio anionico Q-Sepharose FF

Sia nel primo picco, con massimo nella frazione 17, che nel secondo, con massimo nella frazione 32, si può osservare la presenza del core sovraespresso, evidentemente ripartito in due diverse forme. Tuttavia, considerando la maggior quantità e la miglior corrispondenza fra attività registrata e concentrazione di proteina presente nelle frazioni, si è scelto di proseguire la purificazione con la proteina eluita nel secondo picco. Per passare alla fase di purificazione successiva le frazioni dalla 33 alla 37 sono quindi state riunite e addizionate con $MgCl_2$ 5 mM prima di essere caricate in colonna di affinità Cibacron Blue (Figura 55).

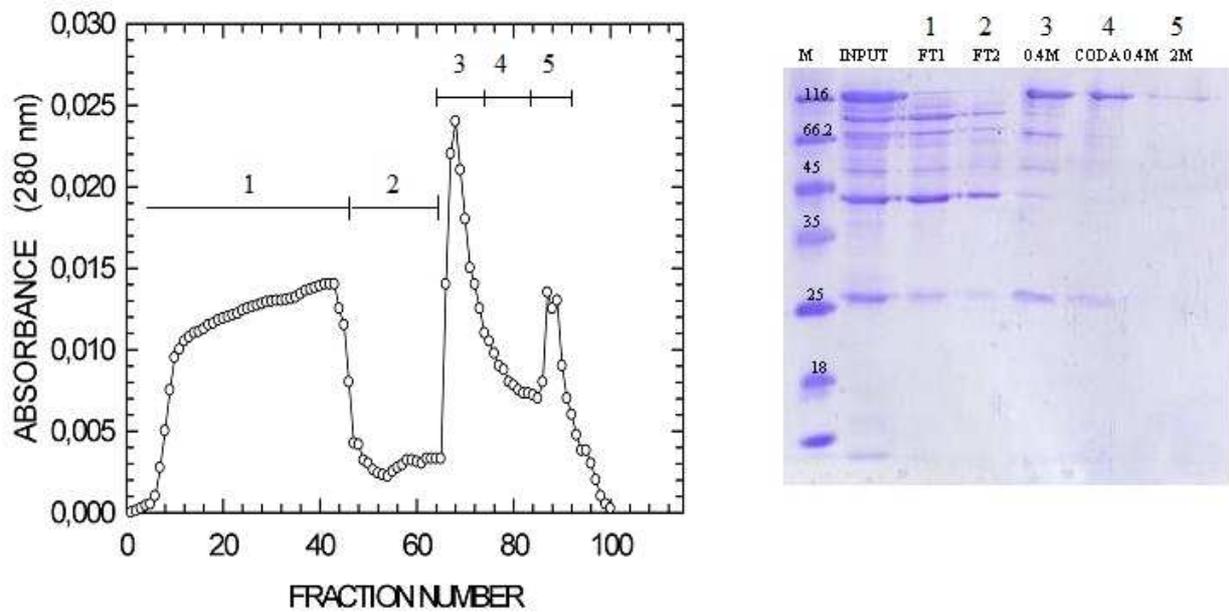


Figura 55: A - cromatografia di affinità Cibacron Blue. Il passaggio ad una concentrazione di NaCl 0,4 M è iniziato dal segmento 3, il lavaggio con NaCl 2M dal segmento 5. B - SDS-PAGE dei campioni eluiti dalla colonna. I numeri indicano la corrispondente frazione sul cromatogramma

L'eluizione delle proteine dalla resina è stata effettuata in un unico passaggio ad una concentrazione di NaCl pari a 0.4 M, a cui è seguito un lavaggio con una soluzione di NaCl 2M. Dal profilo dei campioni in SDS-PAGE si può riscontrare come gran parte dei contaminanti venga eliminato con il flow through, mentre le bande corrispondenti ad α (130 kDa) ed ϵ (27 kDa) si concentrano principalmente nel picco e nella coda di eluizione. Come ulteriore passaggio di purificazione, e per valutare il mantenimento di un corretto folding nei passaggi già eseguiti, il campione, costituito dal picco e dalla coda di eluizione a 0.4 M NaCl, è stato caricato in una colonna per gel filtrazione, dopo essere stato concentrato in una cella da ultrafiltrazione AMICON, equipaggiata con una membrana YM da 100 kDa, fino ad un volume di 1 ml. Con le diverse frazioni ottenute sono stati eseguiti il saggio di attività esonucleasica ed il dosaggio delle proteine col metodo di Bradford (Figura 56).

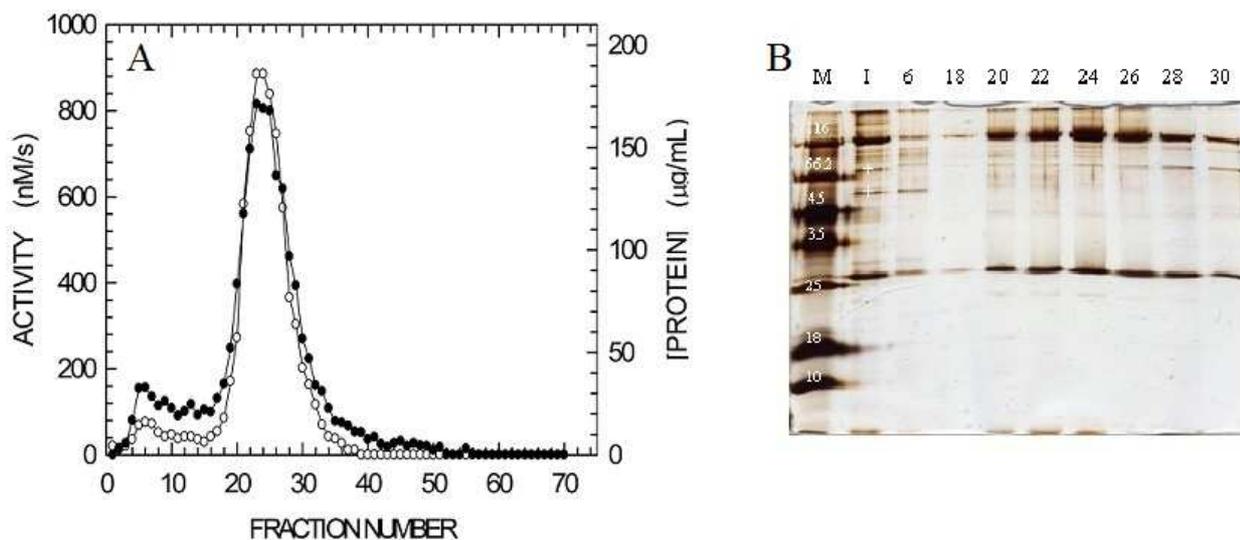


Figura 56: A - attività esonucleasica (pallini bianchi) e concentrazione proteica (pallini neri) nelle frazioni derivanti da cromatografia di gel filtrazione. B - SDS-PAGE delle frazioni indicate sul gel, dove I è l'input

Il profilo di attività osservato rivela due picchi, centrati in corrispondenza delle frazioni 6 e 24. Nel primo picco, rappresentante forme aggregate ad alta massa molecolare, si osserva un rapporto fra α ed ϵ sbilanciato in favore della subunità di proofreading di 27 kDa; questa sproporzione fa presupporre che l'attività rilevata dal saggio sia data in prevalenza da forme aggregate di ϵ , espressa in eccesso. Il profilo del core nel secondo picco mostra dopo colorazione con Silver Staining di avere un buon grado di purezza, con scarsa presenza di contaminanti, soprattutto se di basso peso molecolare. Al termine della purificazione, le frazioni rappresentative di ogni passaggio effettuato sono state analizzate con un saggio di attività polimerasica per seguire l'andamento di α . Tutti i dati ottenuti dai saggi sono stati elaborati per valutare la resa finale del processo, ottenendo i valori riportati nelle tabelle.

Attività esonucleasica (1 Unità esonucleasica = 1 μM p-NP/s)					
	Attività (μM/s)	Volume (ml)	Proteina (mg)	Unità totali	Attività specifica (μM/s*mgP)
Estratto	6.98	52.0	104.0	363 (100)	3.5
Q-Sepharose	1.55	50.5	15.0	78 (21)	5.2
Cibacron Blue	0.99	61.0	10.0	60 (17)	6.0
Amicon YM100	8.34	3.0	3.6	25 (7)	6.9
Superdex 200	1.03	18.0	2.3	18 (5)	7.8

Tabella 5: attività esonucleasica nei passaggi di purificazione

Attività polimerasica (1 Unità polimerasica = 1 μM PP_i/min)					
	Attività (μM/s)	Volume (ml)	Proteina (mg)	Unità totali	Attività specifica (μM/s*mgP)
Estratto	1.43	52.0	104.0	74 (100)	0.71
Q-Sepharose	0.93	50.5	15.0	47 (64)	3.13
Cibacron Blue	0.75	61.0	10.0	46 (62)	4.60
Amicon YM100	6.40	3.0	3.6	19 (26)	5.28
Superdex 200	0.76	18.0	2.3	14 (19)	6.09

Tabella 6: attività polimerasica nei passaggi di purificazione

Dalla tabella si evince che al termine della purificazione si recuperano il 5% delle unità iniziali di ϵ ed il 19% delle unità di α , con un calo della resa verificatosi soprattutto nella fase di concentrazione per ultrafiltrazione, durante la quale si è perso il 60% della proteina.

Nonostante quindi l'aggiunta di glicerolo e DTT al termine del passaggio in colonna Q-Sepharose, la proteina tende comunque ad aggregare all'aumentare della concentrazione, probabilmente anche a causa dei contaminanti presenti. Si può notare come nell'estratto solubile iniziale il rapporto fra α ed ϵ non sia equimolare, ma caratterizzato da un eccesso di ϵ . La diminuzione della quantità di quest'ultima dopo il primo passaggio di purificazione è infatti di tre volte maggiore rispetto al calo di α , ad indicare un allontanamento della subunità ϵ in eccedenza. Anche il passaggio in Cibacron Blue ha contribuito a bilanciare il livello delle due subunità, portando ad una riduzione del 23 % di ϵ rispetto ad α , mentre nelle fasi successive il calo di attività è proporzionale per le due proteine, ad indicare il raggiungimento del rapporto equimolare. Il punto critico che si può evidenziare nel processo illustrato risiede quindi soprattutto nella tendenza del core a formare aggregati, in special modo all'aumentare della sua concentrazione. Per risolvere questo problema si è quindi sperimentata una variante del protocollo di purificazione che limitasse la presenza di fattori aggreganti, inserendo un trattamento con streptomicina dell'estratto proteico iniziale, per eliminare il DNA contaminante. La presenza di DNA, oltre a rendere disomogeneo il campione in vista di una sua cristallizzazione, limita infatti la possibilità di purificare il core utilizzando sia resine di scambio ionico che resine di affinità mimetiche per il substrato, e potrebbe rendere il campione più tendente all'aggregazione. Volendo inoltre ridurre la necessità di concentrare le proteine in una fase non avanzata di purezza, la cromatografia di gel filtrazione è stata sostituita con passaggi differenti, che non richiedono la riduzione del volume di caricamento.

3.4.4 Purificazione del core dopo rimozione del DNA

Nel nuovo protocollo, prima del caricamento in colonna di scambio anionico, l'estratto contenente le proteine solubili derivante dalla sonicazione è stato trattato con streptomicina solfato, il cui effetto è la precipitazione specifica degli acidi nucleici e delle proteine ad essi legate (Liang et al., 2009). Prima di procedere con un trattamento dell'intero campione, sono state valutate diverse quantità di antibiotico, verificandone l'effetto mediante SDS-PAGE ed elettroforesi in gel di agarosio (Figura 57).

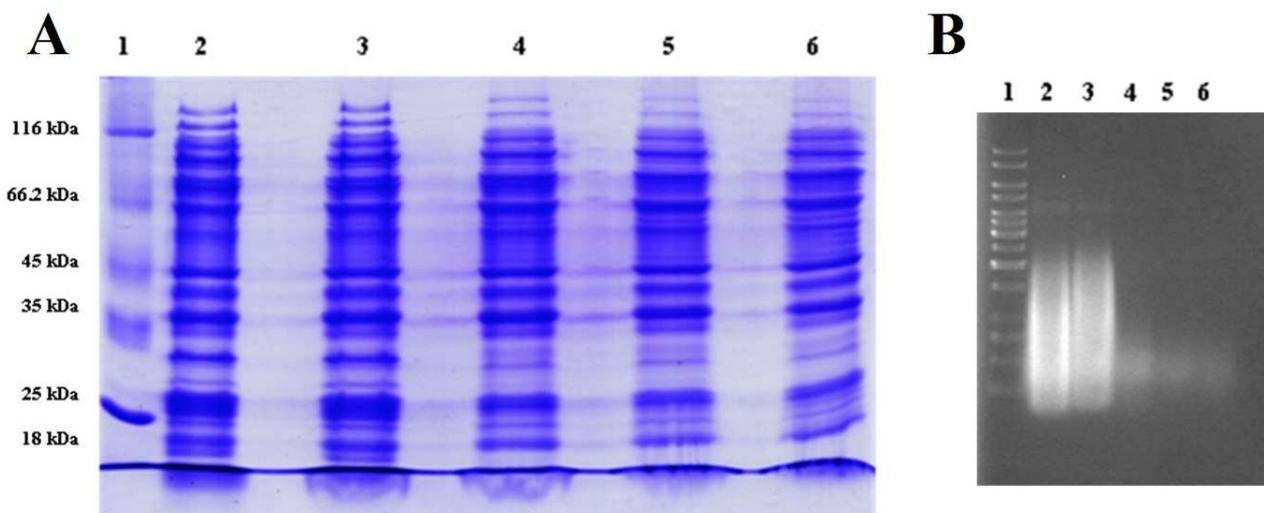


Figura 57: SDS-PAGE (A) ed elettroforesi su gel di agarosio (B) delle prove di precipitazione con streptomicina solfato ad una concentrazione p/v di 0.25% (3), 0.5% (4), 0.75% (5) e 1% (6) in raffronto ad un controllo non trattato (1)

L'effetto migliore sembra essere provocato da streptomicina all'1 %; in queste condizioni si verifica infatti la rimozione di alcune proteine contaminanti, associata ad una eliminazione quasi totale del DNA. A questa concentrazione dell'antibiotico, si può inoltre evidenziare una sensibile riduzione di intensità delle bande relative ad α e ϵ , ovvero della frazione del core legata al DNA, che sarebbe di conseguenza eliminata durante i successivi passaggi di purificazione. Al termine della centrifugazione successiva al trattamento con streptomicina si è quindi proceduto a sottoporre la frazione solubile del campione a cromatografia di scambio anionico (colonna Q-Sepharose FF), eluendo con un gradiente di NaCl fino a 600 mM (Figura 58).

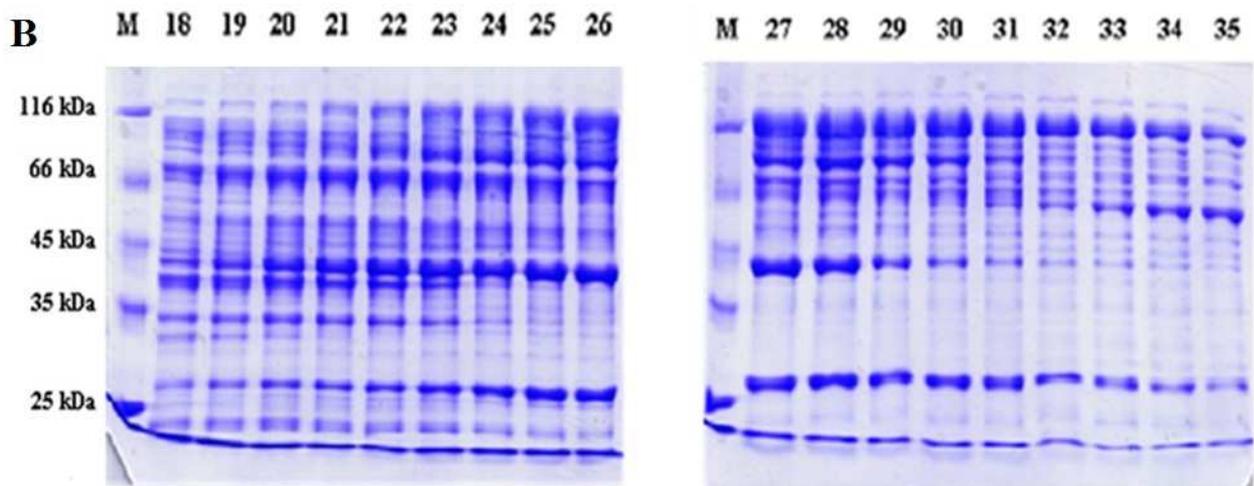
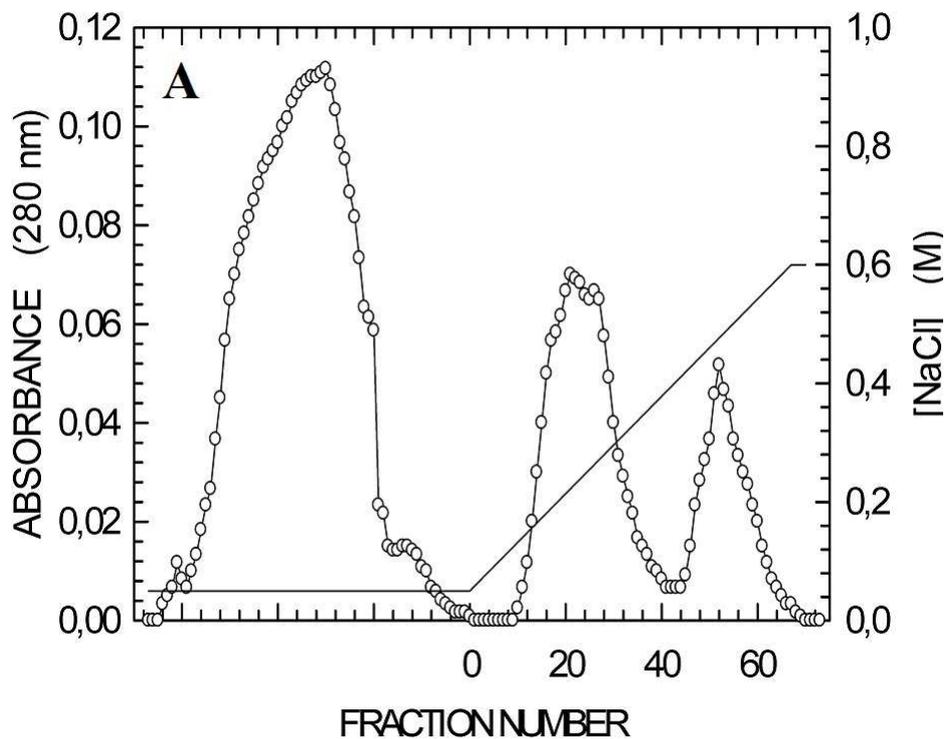


Figura 58: cromatogramma della cromatografia a scambio anionico Q-Sepharose FF (A) e SDS-PAGE (B) delle frazioni corrispondenti al picco di eluzione

A differenza di quanto osservato con la precedente procedura (Figura 53), l'eluizione del core è avvenuta con un significativo anticipo, ad una concentrazione di 260 mM di NaCl, ad indicare che la maggior ritenzione era dovuta, nel caso precedente, alla presenza di DNA contaminante. Le frazioni cromatografiche ottenute sono state sottoposte ad un dosaggio proteico col

metodo di Bradford, ad un saggio di attività esonucleasica e ad un saggio per rilevarne l'attività polimerasica (Figura 59).

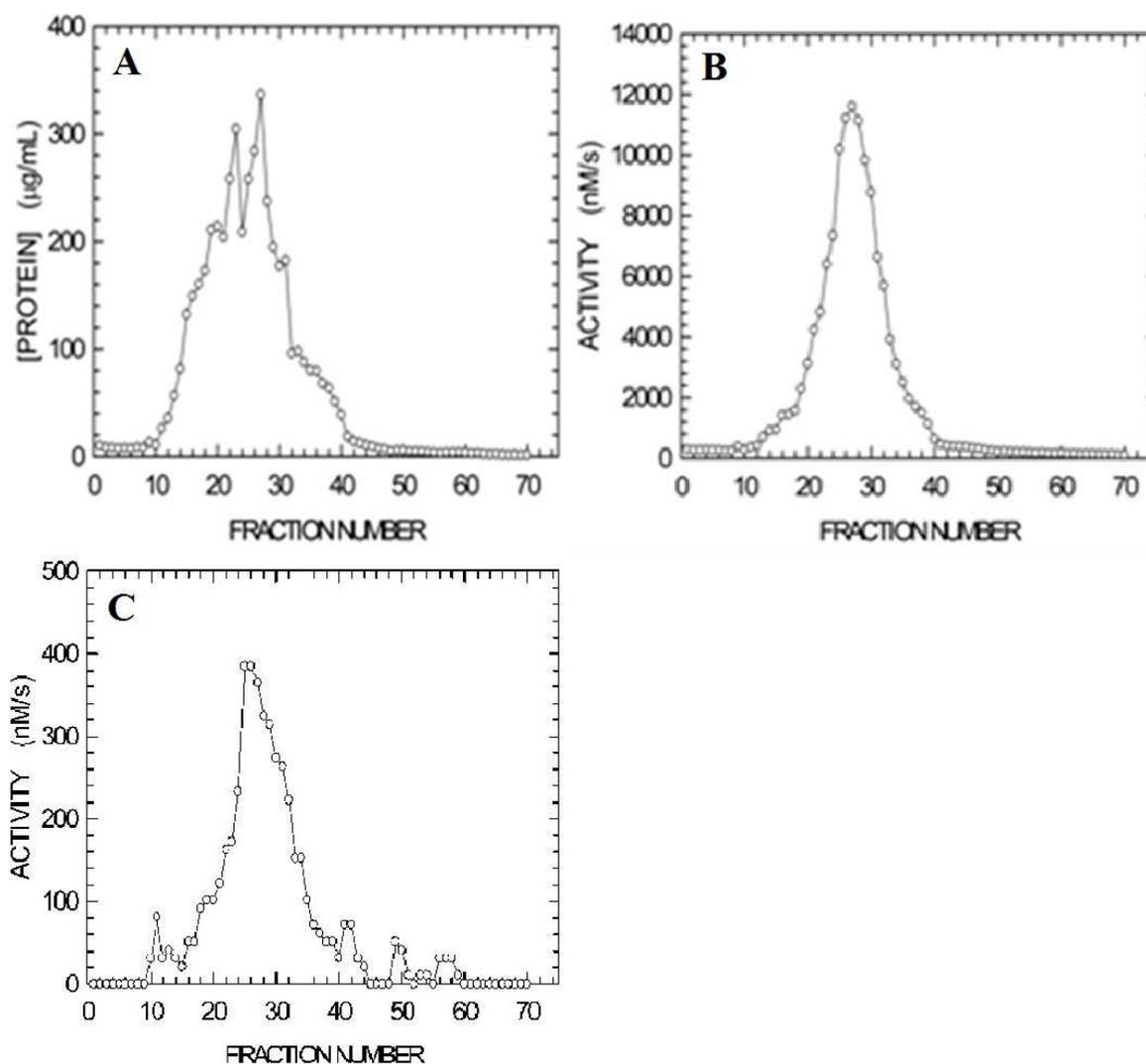


Figura 59: dosaggio proteico (A), saggio di attività esonucleasica (B) e saggio di attività polimerasica (C) delle frazioni cromatografiche

I profili di attività determinati sono coerenti fra loro e col dosaggio proteico nell'indicare il primo picco osservato nel cromatogramma come corrispondente all'eluizione del core, con un massimo nella frazione 27. Dai dati ottenuti dai saggi si può dedurre nelle frazioni fra la 22 e la 35 un recupero del 15 % dell'attività di ϵ e del 26.5 % dell'attività di α ; pertanto, queste frazioni sono state riunite per essere sottoposte a cromatografia di affinità. Anche in questo caso, i campioni sono stati portati ad una concentrazione di glicerolo pari al 20 % e DTT 5 mM con un tampone privo di NaCl, ed in seguito di un passaggio di concentrazione sono stati

addizionati con $MgCl_2$ 5 mM prima del caricamento. La fase di eluizione è stata condotta con un passaggio a 1 M di NaCl seguito da un lavaggio con NaCl 2 M per eliminare le impurezze rimaste legate alla resina (Figura 60).

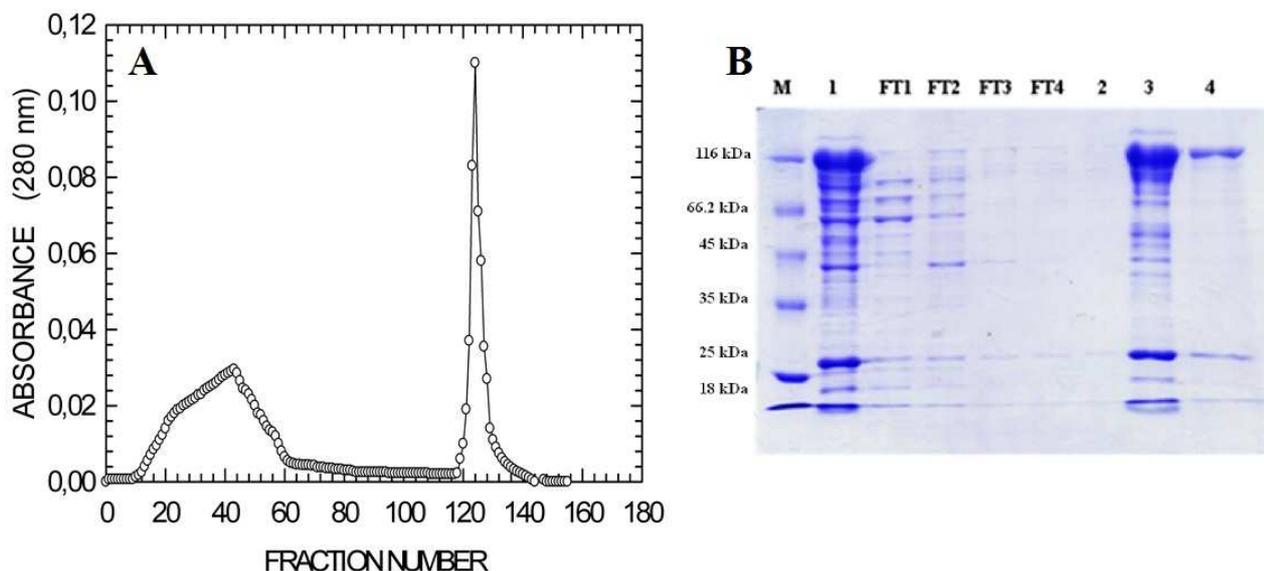


Figura 60: A - cromatogramma della cromatografia di affinità Cibacron Blue. B - SDS-PAGE delle frazioni eluite: nell'ordine input (1), i quattro flow through raccolti dalla frazione 10 alla 90, testa (2), cuore (3) e coda (4) del picco eluito a 0,4 M NaCl nelle frazioni da 113 a 153

Si può notare come il recupero del core a seguito del passaggio in colonna sia quasi totale, con un netto miglioramento del grado di purezza evidenziabile dalla scomparsa completa di alcune bande contaminanti. I saggi di attività ed il dosaggio proteico a cui sono state sottoposte le frazioni indica che nel picco è presente l'83% della proteina caricata in colonna, che mantiene l'86% dell'attività esonucleasica e il 55% di quella polimerasica. Rispetto all'estrazione iniziale, nelle frazioni conservate si è quindi mantenuto il 13 % di attività esonucleasica e il 14 % di quella polimerasica. Per migliorare il grado di purezza del core recuperato si è deciso di procedere con una colonna di affinità HiTrap Heparin HP, modificando la procedura precedentemente utilizzata, per evitare di dover concentrare il campione rischiando la sua aggregazione. Il campione è stato quindi condizionato con successivi passaggi di diluizione e concentrazione per riportare la sua concentrazione di NaCl ad un valore di 50 mM ed eliminare il magnesio, procedendo poi al caricamento in colonna ed all'eluizione con un gradiente di NaCl fino a 350 mM (Figura 61).

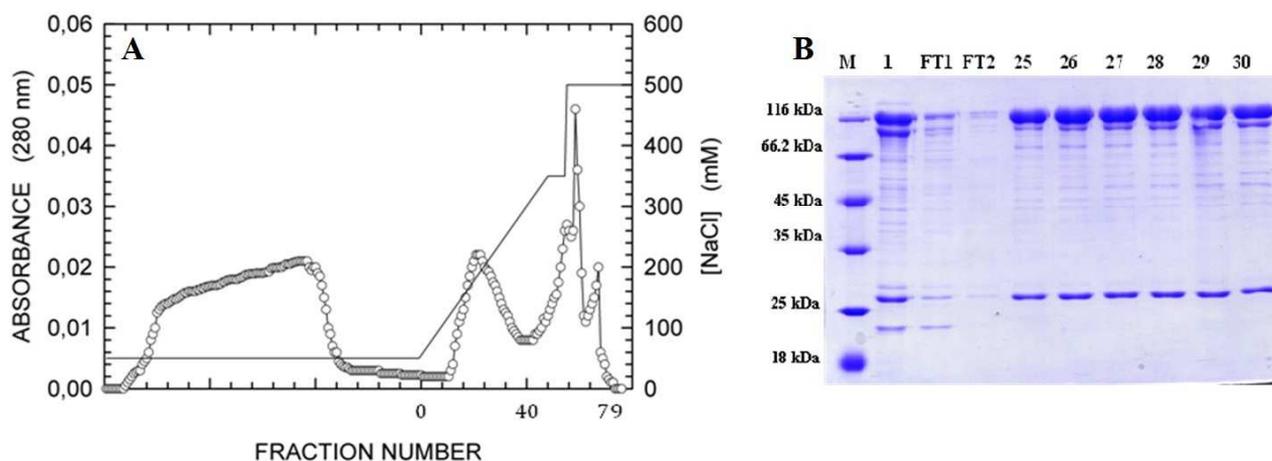


Figura 61: A - cromatogramma della cromatografia di affinità HiTrap Heparin HP. B - SDS-PAGE delle frazioni di eluizione del picco

L'eluizione del core si è avuta ad una concentrazione di 190 mM di NaCl, e dall'analisi elettroforetica è possibile osservare un aumento della purezza del core nelle frazioni nel picco, centrato intorno alla frazione 28. Le diverse frazioni sono state analizzate per valutarne la concentrazione proteica, l'attività esonucleasica e quella polimerasica (Figura 62).

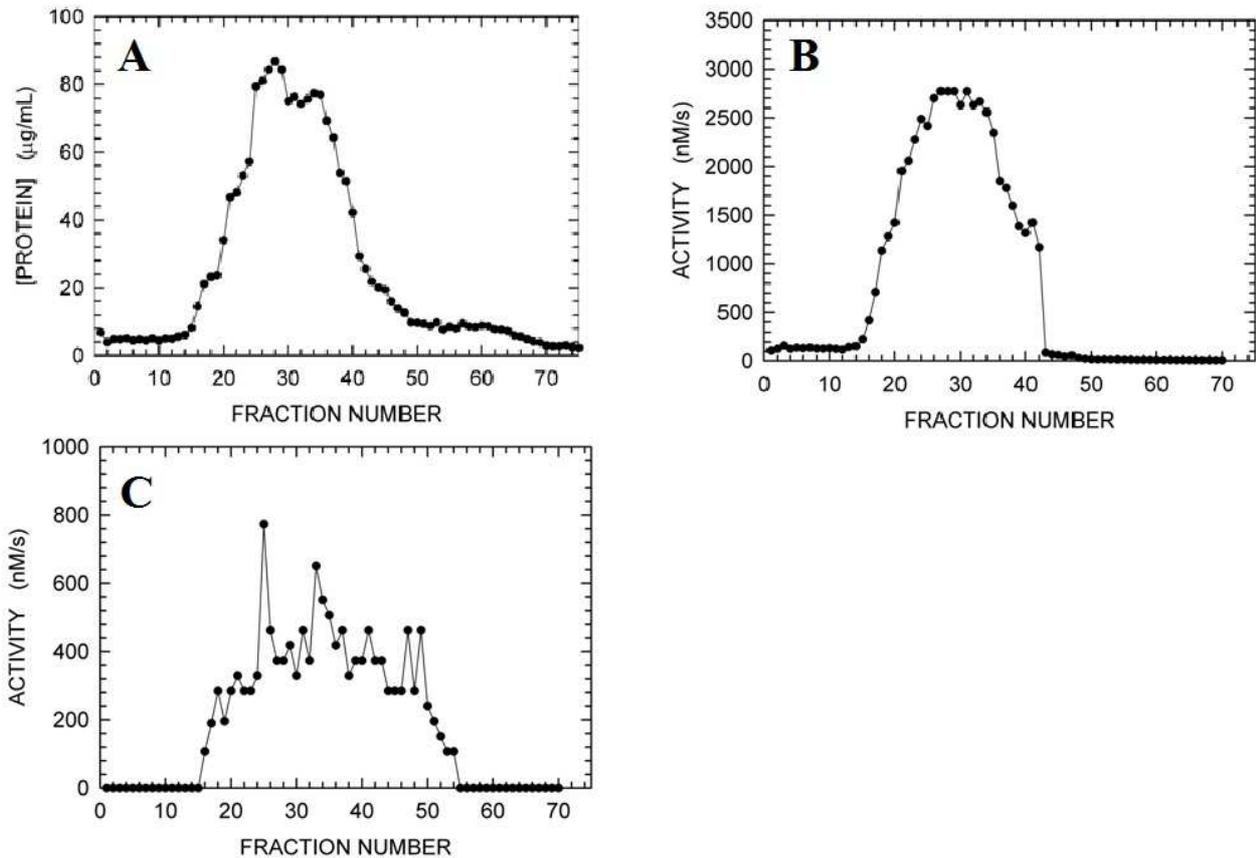


Figura 62: dosaggio proteico (A), attività esonucleasica (B) e attività polimerasica (C) nelle frazioni derivanti dal passaggio in colonna di affinità HiTrap Heparin HP

Dai profili di distribuzione della concentrazione di proteine e delle attività è possibile osservare come il core si distribuisca nelle frazioni dalla 15 alla 42, in maniera abbastanza omogenea. Al termine dell'eluizione sono stati recuperati il 50% dell'attività esonucleasica e il 52 % di quella polimerasica rispetto al campione iniettato in colonna. Nel complesso, la quantità di proteina recuperata dopo il trattamento con streptomina ed i tre stadi di purificazione è pari al 5.7 % rispetto all'estratto totale di partenza. Come nel protocollo illustrato precedentemente, anche in questi passaggi si ha una maggior riduzione dell'attività di ϵ rispetto ad α , dovuta ad un eccesso di espressione della prima rispetto alla seconda. Va comunque considerata la non completa attendibilità del saggio polimerasico (condotto in micropiastre), che mostra un decremento delle attività totali fino al secondo passaggio ed un aumento nella fase successiva. Un simile risultato indica la necessità di riconsiderare l'impostazione del saggio stesso per migliorarne l'affidabilità. Effettuando un confronto col

protocollo di purificazione precedente, si può evidenziare un netto miglioramento sia della resa che della purezza del core catalitico. Al termine della purificazione, infatti, la quantità di proteina recuperata è pari al 5,7% contro il 2,2% della prima procedura adottata, ed anche l'attività esonucleasica specifica risulta essere di circa 20 volte superiore. La miglior resa del processo è quindi da imputare al trattamento iniziale con streptomina, che ha consentito di eliminare in un singolo passaggio la porzione di core legata al DNA aumentando quindi l'affinità del campione per le resine. La sostituzione della cromatografia di gel filtrazione con la cromatografia di affinità con colonna HiTrap Heparin ha inoltre permesso di evitare una concentrazione spinta delle proteine in uno stadio di purificazione non avanzato, nel quale la presenza di contaminanti può costituire un fattore di aggregazione. Per poter ottenere un grado di purezza sufficiente per consentire l'analisi diffrattometrica a raggi X del complesso del core sarà necessario incrementarne ulteriormente la purezza, garantendo allo stesso tempo le elevate concentrazioni proteiche richieste per l'ottenimento di un cristallo. Un simile risultato potrebbe essere raggiunto proseguendo la purificazione con una cromatografia a scambio anionico ad alta efficienza (ad esempio mediante colonna ResourceQ o MonoQ), la quale, oltre ad eliminare ulteriori contaminanti, potrebbe consentire l'eluizione del campione in forma sensibilmente concentrata.

CONCLUSIONI

Nell'ambito di questa Tesi sono state perseguite tre principali linee di ricerca, con lo scopo di approfondire le conoscenze riguardanti il ruolo esercitato dalla subunità θ e dal dominio PHP della subunità α nel funzionamento della DNA polimerasi III.

Per quanto riguarda lo studio della subunità θ , sono stati condotti esperimenti *ex-vivo* ed *in vivo* che hanno dimostrato un suo significativo effetto di protezione nei confronti della subunità ϵ , deputata al proofreading. Questa azione si esercita in particolar modo in condizioni destabilizzanti per ϵ , quale può essere l'assenza dello chaperone molecolare DnaK associata ad una crescita ad alta temperatura in un terreno a bassa osmolarità (Foster e Marinus, 1992). Questo riscontro ha permesso di associare a θ un fenotipo di crescita, che risulta essere il primo sinora caratterizzato. Nel corso degli esperimenti condotti è stata inoltre osservata e descritta una nuova forma di associazione dimerica di ϵ , nei confronti della quale θ esercita un effetto rilevante, provocandone la dissociazione. Le evidenze sperimentali ottenute hanno permesso di avanzare diverse ipotesi riguardo alla natura di questo complesso, che potrebbe rappresentare un omodimero di ϵ resistente alla proteolisi, alla quale è soggetto il monomero *in vivo* (Bressanin et al., 2009). Alternativamente, il dimero potrebbe essere formato dall'associazione di ϵ con un'altra proteina ed avere un ruolo in altri processi metabolici; con questo assunto, θ potrebbe quindi rappresentare un fattore di regolazione della ripartizione di ϵ fra le diverse funzioni in cui può essere coinvolta. È stata condotta anche un'analisi funzionale della proteina HOT del batteriofago P1, omologa di θ ed espressa durante tutte le fasi dell'infezione fagica (Chikova e Schaaper, 2007). I risultati ottenuti indicano anche per HOT una funzione protettiva nei confronti della subunità ϵ monomerica, ma mostrano al contempo un'assenza di effetto nei confronti della forma dimerica, il che indica una differenza sostanziale nella modalità di azione rispetto alla subunità θ .

La seconda tematica di ricerca affrontata ha riguardato lo studio funzionale del dominio PHP della subunità α , per il quale non è riportato in letteratura alcun riferimento ad attività enzimatiche. Dopo uno studio *in silico* dei dati riguardanti l'ipotetico sito catalitico del PHP

individuato nella struttura terziaria di α (Lamers et al., 2006), è stata proposta per il dominio un'attività pirofosfatasica. Per studiare quest'ipotesi è stato messo a punto, validato ed utilizzato un saggio per seguire in continuo la liberazione di molecole di fosfato o pirofosfato con un metodo spettrofotometrico. L'uso di tale saggio ha permesso di individuare nel dominio PHP un'attività pirofosfatasica, dimostratasi sufficiente per consentire il proseguimento della reazione di polimerizzazione catalizzata dalla subunità α . Sono state inoltre eseguite analisi che hanno portato ad escludere l'associazione del dominio PHP ad un'attività esonucleasica, ritrovata invece in altre polimerasi della famiglia C (Stano et al., 2006).

Un terzo obiettivo del presente lavoro di Tesi è stato mettere a punto una procedura per l'espressione contemporanea delle tre subunità α , ϵ e θ , il cui complesso assemblato in vivo è stato purificato al fine di ottenerne un cristallo. Per raggiungere questo scopo è stato progettato e realizzato un sistema di co-espressione di proteine basato su due plasmidi aventi origini di replicazione compatibili. Una modificazione di questo sistema ha inoltre permesso la sua applicazione per la costruzione di un ceppo di *Escherichia coli* mutatore condizionale fenotipicamente associato alla mutazione D12A della subunità ϵ , la cui funzionalità è stata dimostrata sperimentalmente.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, S. G., Williams, C. R., O'Donnell, M., & Bloom, L. B. (2007).** A function for the ψ subunit in loading the *Escherichia coli* DNA polymerase sliding clamp. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**(10), 7035-45
- Aravind, L., & Koonin, E. V. (1998).** Phosphoesterase domains associated with DNA polymerases of diverse origins. *Nucleic Acids Research*, **26**(16), 3746-52
- Ason, B., Handayani, R., Williams, C. R., Bertram, J. G., Hingorani, M. M., O'Donnell, M., Goodman, M. F., & Bloom, L. B. (2003).** Mechanism of Loading the *Escherichia coli* DNA Polymerase III β Sliding Clamp on DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**(12), 10033-10040
- Bailey, S., Wing, R. A., & Steitz, T. A. (2006).** The structure of *T. aquaticus* DNA polymerase III is distinct from eukaryotic replicative DNA polymerases. *Cell*, **126**(5), 893-904
- Baños, B., Lázaro, J. M., Villar, L., Salas, M., & de Vega, M. (2008).** Editing of misaligned 3' - termini by an intrinsic 3' - 5' exonuclease activity residing in the PHP domain of a family X DNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, **36**(18), 5736-5749
- Baños, B., Villar, L., Salas, M., & de Vega, M. (2010).** Intrinsic apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease activity enables *Bacillus subtilis* DNA polymerase X to recognize, incise, and further repair abasic sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(45), 19219-24
- Bierne, H., Vilette, D., Ehrlich, S. D., & Michel, B. (1997).** Isolation of a *dnaE* mutation which enhances RecA-independent homologous recombination in the *Escherichia coli* chromosome. *Molecular Microbiology*, **24**(6), 1225-34
- Blanco, L., Bernad, A., & Salas, M. (1992).** Evidence favouring the hypothesis of a conserved 3'-5' exonuclease active site in DNA-dependent DNA polymerases. *Gene*, **112**(1), 139-44

- Blasius, M., Shevelev, I., Jolivet, E., Sommer, S., & Hübscher, U. (2006).** DNA polymerase X from *Deinococcus radiodurans* possesses a structure-modulated 3'→5' exonuclease activity involved in radioresistance. *Molecular Microbiology*, **60**(1), 165-76
- Boye, E., Stokke, T., Kleckner, N., & Skarstad, K. (1996).** Coordinating DNA replication initiation with cell growth: Differential roles for DnaA and SeqA proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 12206-12211
- Brautigam, C.A., & Steitz, T.A. (1998).** Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Current Opinions in Structural Biology*, **8**, 54–63
- Bressanin, D., Stefan, A., Piazz, F. D., Cianchetta, S., Reggiani, L., & Hochkoepler, A. (2009).** Proteolysis of the proofreading subunit controls the assembly of *Escherichia coli* DNA polymerase III catalytic core. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1794**(11), 1606-15
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254
- Bukrinsky, M. I., Barsov, E. V., & Shilov, A. A. (1988).** Multicopy expression vector based on temperature-regulated *lac* repressor: expression of human immunodeficiency virus *env* gene in *Escherichia coli*. *Gene*, **70**, 415-417
- Butland, G., Peregrín-Alvarez, J. M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J., & Emili, A. (2005).** Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature*, **433**(7025), 531-7
- Carter, J. R., Franden, M. A, Aebersold, R., Kim, D. R., & McHenry, C. S. (1993).** Isolation, sequencing and overexpression of the gene encoding the θ subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *Nucleic Acids Research*, **21**(14), 3281-6
- Chikova, A. K., & Schaaper, R. M. (2005).** The Bacteriophage P1 *hot* Gene Product Can Substitute for the *Escherichia coli* DNA Polymerase III θ Subunit. *Journal of Bacteriology*, **187**(16), 5528-5536

- Chikova, A. K., & Schaaper, R. M. (2006).** Mutator and antimutator effects of the bacteriophage P1 *hot* gene product. *Journal of Bacteriology*, **188**(16), 5831-8
- Chikova, A. K., & Schaaper, R. M. (2007).** The bacteriophage P1 *hot* gene, encoding a homolog of the *E. coli* DNA polymerase III θ subunit, is expressed during both lysogenic and lytic growth stages. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **624**, 1-8
- Cisneros, G. A., Perera, L., Schaaper, R. M., Pedersen, L. C., London, R. E., Pedersen, L. G., & Darden, T. A. (2009).** Reaction mechanism of the ϵ subunit of *E. coli* DNA polymerase III: insights into active site metal coordination and catalytically significant residues. *Journal of the American Chemical Society*, **131**(4), 1550-6
- Davies, J. F., II, Almassy, R. J., Hostomska, Z., Ferre, R. A., and Hostomsky, Z. (1994).** 2.3 Å crystal structure of the catalytic domain of DNA polymerase β . *Cell* **76**, 1123-1133
- DeRose, E. F., Li, D., Darden, T., Harvey, S., Perrino, F. W., Schaaper, R. M., & London, R. E. (2002).** Model for the catalytic domain of the proofreading ϵ subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III based on NMR structural data. *Biochemistry*, **41**(1), 94-110
- DeRose, E. F., Darden, T., Harvey, S., Gabel, S., Perrino, F. W., Schaaper, R. M., & London, R. E. (2003).** Elucidation of the ϵ - θ subunit interface of *Escherichia coli* DNA polymerase III by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **42**(13), 3635-44
- DeRose, E. F., Kirby, T. W., Mueller, G. a, Chikova, A. K., Schaaper, R. M., & London, R. E. (2004).** Phage like it HOT: solution structure of the bacteriophage P1-encoded HOT protein, a homolog of the θ subunit of *E. coli* DNA polymerase III. *Structure*, **12**(12), 2221-31
- Drake J., W. (1991).** A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**(16), 7160-7164
- Evans, R. J., Davies, D. R., Bullard, J. M., Christensen, J., Green, L. S., Guiles, J. W., Pata, J. D., Ribble, W. K., Janjic, N., & Jarvis, T. C. (2008).** Structure of PolC reveals unique DNA binding and fidelity determinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(52), 20695-700

- Fabrichniy, I. P., Lehtiö, L., Salminen, A., Zyryanov, A. B., Baykov, A. A., Lahti, R., & Goldman, A. (2004).** Structural studies of metal ions in family II pyrophosphatases: the requirement for a Janus ion. *Biochemistry*, **43**, 14403-14411
- Fay, P. J., Johanson, K. O., McHenry, C. S., & Bambara, R. A. (1982).** Size classes of products synthesized processively by two subassemblies of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, (257), 5692-99
- Fijalkowska, I. J., & Schaaper, R. M. (1995).** Effects of *Escherichia coli dnaE* Antimutator Alleles in a Proofreading-Deficient *mutD5* Strain. *Journal of Bacteriology*, **177**(20), 5979-5986
- Fijalkowska, I. J., & Schaaper, R. M. (1996).** Mutants in the Exo I motif of *Escherichia coli dnaQ*: defective proofreading and inviability due to error catastrophe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(7), 2856-61
- Foster, P. L., & Marinus, M. G. (1992).** Levels of ϵ , an essential replication subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III, are controlled by heat shock proteins. *Journal of Bacteriology*, **174**(23), 7509-16
- Gao, D., & McHenry C. S. (2001) A.** τ Binds and Organizes *Escherichia coli* Replication Proteins through Distinct Domains. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(6), 4441-4446
- Gao, D., & McHenry C. S. (2001) B.** τ Binds and Organizes *Escherichia coli* Replication Proteins through Distinct Domains. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(6), 4433-4440
- Georgescu, R. E., Kim, S.-S., Yurieva, O., Kuriyan, J., Kong, X.-P., & O'Donnell, M. (2008).** Structure of a sliding clamp on DNA. *Cell*, **132**(1), 43-54
- Glover, B. P., McHenry, C. S. (1998).** The $\chi\psi$ subunits of DNA polymerase III holoenzyme bind to single-stranded DNA-binding protein (SSB) and facilitate replication of a SSB-coated template. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 23476-84
- Glover, B. P., & McHenry, C. S. (2000).** The DnaX-binding Subunits δ' and ψ Are Bound to γ and Not τ in the DNA Polymerase III. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**(5), 3017-3020
- Glover, B. P., & McHenry, C. S. (2001).** The DNA polymerase III holoenzyme: an asymmetric dimeric replicative complex with leading and lagging strand polymerases. *Cell*, **105**(7), 925-34

- Gulbis, J. M., Kazmirski, S. L., Finkelstein, J., Kelman, Z., O'Donnell, M., & Kuriyan J. (2004).** Crystal structure of the $\chi:\psi$ sub-assembly of the *Escherichia coli* DNA polymerase clamp-loader complex. *European Journal of Biochemistry*, **271**(2), 439-49
- Gupta, R., Hamdan, S. M., Dixon, N. E., Sheil, M. M., & Beck, J. L. (2004).** Application of electrospray ionization mass spectrometry to study the hydrophobic interaction between the ϵ and θ subunits of DNA polymerase III. *Protein Science*, **13**, 2878-2887
- Guzman, L., Belin, D., Carson, M., & Beckwith, J. (1995).** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology*, **177**, 4121-4130
- Hamdan, S., Carr, P. D., Brown, S. E., Ollis, D. L., & Dixon, N. E. (2002) (A).** Structural basis for proofreading during replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Structure*, **10**(4), 535-46
- Hamdan, S., Bulloch, E. M., Thompson, P. R., Beck, J. L., Yang, J. Y., Crowther, J. a, Lilley, P. E., Carr, P. D, Ollis, D. L., Brown, S. E., & Dixon, N. E. (2002) (B).** Hydrolysis of the 5'- p - Nitrophenyl Ester of TMP by the Proofreading Exonuclease (ϵ) Subunit of *Escherichia coli* DNA Polymerase III. *Biochemistry*, **41**(16), 5266-5275
- Harlow, E., & Lane, D. (1988).** Antibodies: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Heltzel, J., Scouten Ponticelli, S. K., Sanders, L. H., Duzen, J. M., Cody, V., Pace, J., Snell, E., & Sutton, M. D. (2009).** Sliding Clamp-DNA Interactions are Required for Viability and Contribute to DNA Polymerase Management in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, **387**(1), 74-91
- Huang, Y., Braithwaite, D. K., & Ito, J. (1997).** Evolution of *dnaQ*, the gene encoding the editing 3' to 5' exonuclease subunit of DNA polymerase III holoenzyme in Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*, **400**, 94-98
- Indiani, C., McInerney, P., Georgescu, R., Goodman, M. F., & O'Donnell, M. (2005).** A sliding-clamp toolbelt binds high- and low-fidelity DNA polymerases simultaneously. *Molecular Cell*, **19**(6), 805-15

- Jay, P. J., Johanson, K. O., McHenry, C. S., & Bambara, R. A. (1981).** Size Classes of Products Synthesized Processively by DNA Polymerase III and DNA Polymerase III Holoenzyme of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, **256**, 976-983
- Jeruzalmi, D., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2001) (A).** Crystal structure of the processivity clamp loader γ (gamma) complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell*, **106**(4), 429-41
- Jeruzalmi, D., Yurieva, O., Zhao, Y., Young, M., Stewart, J., Hingorani, M., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2001) (B).** Mechanism of processivity clamp opening by the delta subunit wrench of the clamp loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell*, **106**(4), 417-28
- Jones, E.W. & Fink, G.R. (1982)** in Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (eds), *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Vol. 2, pp. 264-299
- Kalinina, O. V., Gelfand, M. S., & Russell, R. B. (2009).** Combining specificity determining and conserved residues improves functional site prediction. *BMC Bioinformatics*, **10**, 174
- Keniry, M. A., Berthon, H. A., Yang, J. Y., Miles, C. S., & Dixon, N. E. (2000).** NMR solution structure of the θ subunit of DNA polymerase III from *Escherichia coli*. *Protein Science*. **9**, 721-733
- Keniry, M. A., Park, A. Y., Owen, E. A., Hamdan, S. M., Pintacuda, G., Otting, G., & Dixon, N. E. (2006).** Structure of the θ subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III in complex with the ϵ subunit. *Journal of Bacteriology*, **188**(12), 4464-73
- Kim, D. R., & McHenry, C. S. (1996).** In vivo assembly of overproduced DNA polymerase III. Overproduction, purification, and characterization of the α , α - ϵ , and α - ϵ - θ subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**(34), 20681-9
- Kirby, T. W., Harvey, S., DeRose, E. F., Chalov, S., Chikova, A. K., Perrino, F. W., Schaaper, R. M., et al. (2006).** Structure of the *Escherichia coli* DNA polymerase III ϵ -HOT proofreading complex. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**(50), 38466-71
- Kong, X. P., Onrust, R., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (1992).** Three-dimensional structure of the β subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell*, **69**(3), 425-37

- Kornberg, T., & Gefter, M., L. (1972).** Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Cell-free Extracts. *The Journal of Biological Chemistry*, **247**(17), 5369-5375
- Kthiri, F., Le, H. T., Tagourti, J., Kern, R., Malki, A., Caldas, T., Abdallah, J., Landoulsi, A., & Richarme, G. (2008).** The thioredoxin homolog YbbN functions as a chaperone rather than as an oxidoreductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **374**(4), 668-72
- Kurz, M., Dalrymple, B., Wijffels, G., & Kongsuwan, K. (2004).** Interaction of the sliding clamp β -subunit and Hda, a DnaA-related protein. *Journal of Bacteriology*, **186**(11), 3508-15
- Lamers, M. H., Georgescu, R. E., Lee, S. G., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2006).** Crystal structure of the catalytic alpha subunit of *E. coli* replicative DNA polymerase III. *Cell*, **126**(5), 881-92
- Lamers, M. H., & O'Donnell, M. (2008).** A consensus view of DNA binding by the C family of replicative DNA polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(52), 20565-20566
- LaPointe, G., Atlan, D., & Gilbert, C. (2008).** Characterization and site-directed mutagenesis of Wzb, an O-phosphatase from *Lactobacillus rhamnosus*. *BMC Biochemistry*, **9**, 10
- Liang, J., Niu, Q., Xu, X., Luo, Y., Zhou, X., Deng, Z., & Wang, Z. (2009).** Effective elimination of nucleic acids from bacterial protein samples for optimized blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **30**(14), 2454-9
- Lobocka, M. B., Rose, D. J., Plunkett III, G., Rusin, M., Samojedny, A., Lehnerr, H., Yarmolinsky, M. B., & Blattner, F. R. (2004).** Genome of bacteriophage P1. *Journal of Bacteriology*, **186**, 7032-7068
- López de Saro, F. J., Georgescu, R. E., Goodman, M. F., & O'Donnell, M. (2003).** Competitive processivity-clamp usage by DNA polymerases during DNA replication and repair. *The EMBO journal*, **22**(23), 6408-18
- López de Saro, F. J., Marinus, M. G., Modrich, P., & O'Donnell, M. (2006).** The β Sliding Clamp Binds to Multiple Sites within MutL and MutS. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**(20), 14340-14349

- Maciąg, M., Nowicki, D., Szalewska-Pałasz, A., & Węgrzyn, G. (2012).** Central carbon metabolism influences fidelity of DNA replication in *Escherichia coli*. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **731**, 99-106
- Maki, H., & Kornberg, A. (1987).** Proofreading by DNA polymerase III of *Escherichia coli* depends on cooperative interaction of the polymerase and exonuclease subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**(13), 4389-92
- Maki, H., Maki, S., & Kornberg, A. (1988).** DNA Polymerase III Holoenzyme of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **263**(14), 6570-6578
- McCauley, M. J., Shokri, L., Sefcikova, J., Venclovas, Č., Beuning, P. J., & Williams, M. C. (2008).** Distinct Double- and Single-Stranded DNA Binding of *E. coli* Replicative DNA Polymerase III α Subunit. *ACS Chemical Biology*, **3**(9), 577-587
- McHenry, C. S., & Crow, W. (1979).** DNA Polymerase III of *Escherichia coli*. Purification and Identification of Subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, **254**(5), 1748-1753
- McHenry, C. S. (2011).** DNA replicases from a bacterial perspective. *Annual Review of Biochemistry*, **80**, 403-36
- McInerney, P., Johnson, A., Katz, F., & O'Donnell, M. (2007).** Characterization of a triple DNA polymerase replisome. *Molecular Cell*, **27**(4), 527-38
- Merckel, M. C., Fabrichniy, I. P., Salminen, A., Kalkkinen, N., Baykov, A., A., Lahti, R., & Goldman, A. (2001).** Crystal structure of *Streptococcus mutans* pyrophosphatase: a new fold for an old mechanism. *Structure*, **9**(4), 289-97
- Miller, H., & Perrino, F. W. (1996).** Kinetic mechanism of the 3'->5' proofreading exonuclease of DNA polymerase III. Analysis by steady state and pre-steady state methods. *Biochemistry*, **35**, 12919-12925
- Monteiro, A. C. M., Ferreira, R. C. C., Padilla, G., Ferreira, L. C. S., & Costa, S. O. P. (2003).** Environmental and genetic factors affecting mutability to aminoglycoside antibiotics among *Escherichia coli* K12 strains. *Genetics and Molecular Biology*, **26**, 221-227

- Morona, J. K., Morona, R., Miller, D. C., & Paton, J. C. (2002).** *Streptococcus pneumoniae* Capsule Biosynthesis Protein CpsB Is a Novel Manganese-Dependent Phosphotyrosine-Protein Phosphatase. *Journal of Bacteriology*, **184**(2), 577-583
- Mueller, G. A., Kirby, T. W., DeRose, E. F., Li, D., Schaaper, R. M., & London, R. E. (2005).** Nuclear Magnetic Resonance Solution Structure of the *Escherichia coli* DNA Polymerase III θ Subunit. *Journal of Bacteriology*, **187**(20), 7081-7089
- Naktinis, V., Turner, J., & O'Donnell, M. (1996).** A Molecular Switch in a Replication Machine Defined by an Internal Competition for Protein Rings. *Cell*, **84**, 137-145
- Oehler, S., Amouyal, M., Kolkhof, P., von Wicken-Bergmann, B., & Müller-Hill, B. (1994).** Quality and position of the three *lac* operators of *E.coli* define efficiency of repression. *EMBO Journal*, **13**, 3348-3355
- Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., & Sugimoto, K. (1967).** Mechanism of DNA replication possible discontinuity of DNA chain growth. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, **20** (3), 255-60
- Omi, R., Goto, M., Miyahara, I., Manzoku, M., Ebihara, A., & Hirotsu, K. (2007).** Crystal structure of monofunctional histidinol phosphate phosphatase from *Thermus thermophilus* HB8. *Biochemistry*, **46**(44), 12618-27
- Onrust, R., Finkelstein, J., Naktinis, V., Turner, J., Fang, L., & O'Donnell, M. (1995).** Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader and sliding clamps in one holoenzyme particle. I. Organization of the clamp loader. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 13348-13357
- Ozawa, K., Jergic, S., Park, A. Y., Dixon, N. E., & Otting, G. (2008).** The proofreading exonuclease subunit ϵ of *Escherichia coli* DNA polymerase III is tethered to the polymerase subunit α via a flexible linker. *Nucleic Acids Research*, **36**(15), 5074-5082
- Pelletier, H., Sawaya, M. R., Kumar, A., Wilson, S. H., Kraut, J. (1994).** Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase β , a DNA template-primer, and ddCTP. *Science*, **264**, 1891-1903

- Perrino, F. W., Harvey, S., & McNeill, S. M. (1999).** Two Functional Domains of the ϵ Subunit of DNA Polymerase III. *Biochemistry*, **38**(48), 16001-9
- Pohlhaus, J. R., Long, D. T., O'Reilly, E., & Kreuzer, K. N. (2008).** The ϵ subunit of DNA polymerase III Is involved in the nalidixic acid-induced SOS response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **190**(15), 5239-47
- Pritchard, A. E., & McHenry, C. S. (1999).** Identification of the acidic residues in the active site of DNA polymerase III. *Journal of Molecular Biology*, **285**, 1067-1080
- Quiñones, A., Kaasch, J., Kaasch, M., & Messer, W. (1989).** Induction of *dnaN* and *dnaQ* gene expression in *Escherichia coli* by alkylation damage to DNA. *The EMBO journal*, **8**(2), 587-93
- Quiñones, A., & Neumann, S. (1997).** The *ssb-113* allele suppresses the *dnaQ49* mutator and alters DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **25**(2), 237-46
- Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2002).** Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(5), 2754-9
- Schaaper, R. M., & Radman, M. (1989).** The extreme mutator effect of *Escherichia coli mutD5* results from saturation of mismatch repair by excessive DNA replication errors. *The EMBO Journal*, **8**(11), 3511-3516
- Schaaper, R. M. (1993).** Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**(32), 23762-5
- Scheuermann, R., Tam, S., Burgers, P. M., Lu, C., & Echols, H. (1983).** Identification of the ϵ -subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme as the *dnaQ* gene product: a fidelity subunit for DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**, 7085-7089
- Scheuermann, R. H. and Echols, H. (1984).** A separate editing exonuclease for DNA replication: the subunit ϵ of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**, 7747-7751

- Sevastopoulos, C. G., & Glaser, D. A. (1977).** Mutator action by *Escherichia coli* strains carrying *dnaE* mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 3450–3497
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006).** In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, **1**(6), 2856-2860
- Slater, S. C., Lifsics, M. R., O'Donnell, M., & Maurer, R. (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* (ϵ -subunit) mutant. *Journal of Bacteriology*, **176**(3), 815-21
- Spezio M., Wilson D. B., & Karplus P. A. (1993).** Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase. *Biochemistry*, **32**(38), 9906-16
- Stano, N. M., Chen, J., & McHenry, C. S. (2006).** A coproofreading Zn^{2+} -dependent exonuclease within a bacterial replicase. *Nature Structural & Molecular Biology*, **13**(5), 458-9
- Steitz, T. A., Smerdon, S. J., Jager, J., & Joyce, C. M. (1994).** A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science*, **266**, 2022-2025
- Steitz, T. A. (2006).** Visualizing polynucleotide polymerase machines at work. *EMBO Journal*, **25**, 3458–3468
- Studwell, P. S., & O'Donnell, M. (1990).** Processive Replication is Contingent on the Exonuclease Subunit of DNA Polymerase III Holoenzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, **255**(2), 1171-1178
- Studwell-Vaughan, P. S., & O'Donnell, M. (1993).** DNA polymerase III accessory proteins. V. θ encoded by *holE*. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**(16), 11785-11791
- Sutton, M. D., Opperman, T., & Walker., G. C. (1999).** The *Escherichia coli* SOS mutagenesis proteins UmuD and UmuD' interact physically with the replicative DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 12373–12378

- Sutton, M. D., Murli, S., Opperman, T., Klein, C., & Walker, G. C. (2001).** *umuDC-dnaQ* Interaction and Its Implications for Cell Cycle Regulation and SOS Mutagenesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **183**(3), 1085-1089
- Taft-Benz, S. A., & Schaaper, R. M. (1998).** Mutational analysis of the 3'->5' proofreading exonuclease of *Escherichia coli* DNA polymerase III. *Nucleic Acids Research*, **26**(17), 4005-4011
- Taft-Benz, S. A., & Schaaper, R. M. (2004).** The θ Subunit of *Escherichia coli* DNA Polymerase III: a Role in Stabilizing the ϵ Proofreading Subunit. *Journal of Bacteriology*, **186**(9), 2774-2780
- Takagi, H., Watanabe, M., Kakuta, Y., Kamachi, R., Numata, T., Tanaka, I., & Kimura, M. (2004).** Crystal structure of the ribonuclease P protein Ph1877p from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **319**(3), 787-94
- Tanner, N. A, Hamdan, S. M., Jergic, S., Loscha, K. V., Schaeffer, P. M., Dixon, N. E., & van Oijen, A. M. (2008).** Single-molecule studies of fork dynamics in *Escherichia coli* DNA replication. *Nature Structural & Molecular Biology*, **15**(2), 170-6
- Teplyakov, A., Obmolova, G., Khil, P. P., Howard, A. J., Camerini-Otero, R. D., & Gilliland, G. L. (2003).** Crystal structure of the *Escherichia coli* YcdX protein reveals a trinuclear zinc active site. *Proteins*, **51**(2), 315-8
- Tsuchihashi, Z., & Kornberg, A. (1990).** Translational frameshifting generates the γ subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**(7), 2516-20
- Turner, J., Hingorani, M. M., Kelman, Z., & O'Donnell, M. (1999).** The internal workings of a DNA polymerase clamp-loading machine. *The EMBO journal*, **18**(3), 771-83
- Vandewiele, D., Fernández de Henestrosa, A. R., Timms, A. R., Bridges, B. A., & Woodgate, R. (2002).** Sequence analysis and phenotypes of five temperature sensitive mutator alleles of *dnaE*, encoding modified alpha-catalytic subunits of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *Mutation Research*, **499**(1), 85-95
- Wechsler, J. A., & Gross, J. D. (1971).** *Escherichia coli* mutants temperature-sensitive for DNA synthesis. *Molecular & General Genetics*. **113**, 273-284

- Wieczorek, A., & McHenry, C. S. (2006).** The NH₂-terminal php domain of the alpha subunit of the *Escherichia coli* replicase binds the epsilon proofreading subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**(18), 12561-7
- Wing, R. A, Bailey, S., & Steitz, T. A. (2008).** Insights into the replisome from the structure of a ternary complex of the DNA polymerase III α -subunit. *Journal of Molecular Biology*, **382**(4), 859-69
- Wu, T. H., Clarke, C. H., & Marinus, M. G. (1990).** Specificity of *Escherichia coli* *mutD* and *mutL* mutator strains. *Gene*, **87**(1), 1-5
- Yamagata, A., Kakuta, Y., Masui, R., & Fukuyama, K. (2002).** The crystal structure of exonuclease RecJ bound to Mn²⁺ ion suggests how its characteristic motifs are involved in exonuclease activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(9), 5908-12
- Yuan, Q., & McHenry, C. S. (2009).** Strand displacement by DNA polymerase III occurs through a τ - ψ - χ link to single-stranded DNA-binding protein coating the lagging strand template. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**(46), 31672-9
- Yuzhakov, A., Kelman, Z., & O'Donnell, M. (1999).** Trading Places on DNA – A Three-Point Switch Underlies Primer Handoff from Primase to the Replicative DNA Polymerase. *Cell*, **96**, 153-163