

*Studi funzionali e strutturali sul wild-type e sul
mutante M23K dell'ATP sintasi di
Rhodobacter capsulatus: ruolo dell'ADP e della
forza protonmotiva nell'attivazione dell'enzima
e nell'accoppiamento dell'idrolisi di ATP alla
traslocazione protonica*

Alberto Rebecchi

Anni Accademici 2005 - 2007

”O frati”, dissi ”che per cento milia
perigli siete giunti a l’occidente,
a questa tanto picciola vigilia
d’i nostri sensi ch’è del rimanente,
non vogliate negar l’esperienza
di retro al sol, del mondo senza gente.

Considerate la vostra semenza:
fatti non foste a viver come bruti,
ma per seguir virtute e canoscenza”.

Li miei compagni fec’io sì aguti,
con questa orazion picciola, al cammino
che a pena poscia li avrei ritenuti;
e volta nostra poppa nel mattino,
de’ remi facemmo ali al folle volo,
sempre acquistando dal lato mancino.

Inferno, canto XXVI vv. 111-126.

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Filogenesi e aspetti metabolici	1
1.1.1	Fotosintesi batterica	3
1.1.2	Teoria chemiosmotica	6
1.2	Struttura della F_0F_1 ATPasi	7
1.2.1	Caratteristiche strutturali del dominio F_1	9
1.2.2	Caratteristiche strutturali del dominio F_0	13
1.3	Ipotesi sul meccanismo catalitico della porzione F_1	15
1.4	Fenomeni di regolazione	19
1.5	Mutazioni di interesse per il presente lavoro di tesi	22
1.5.1	Accoppiamento energetico: ruolo della Met23 della subunità γ di <i>Rb. capsulatus</i>	22
1.5.2	Effetti del disaccoppiamento intrinseco sul movimento <i>up-down</i> della subunità ϵ , in relazione al movimento rotatorio della subunità γ in <i>E. coli</i>	22
2	Materiali e Metodi	25
2.1	Profilo genetico di <i>Rhodobacter capsulatus</i>	25
2.2	Terreni di crescita per <i>Rb. capsulatus</i>	26
2.3	Preparazione dei cromatofori	27
2.3.1	Quantificazione dei cromatofori	28
2.4	Misurazione dell'attività catalitica dell'ATPasi	29
2.4.1	Quantificazione dell'attività idrolitica basale	30
2.4.2	Quantificazione del flusso protonico transmembrana	33
2.5	Profilo genetico di <i>Escherichia coli</i>	35
2.6	Terreni e metodi per la crescita di <i>E. coli</i>	41

2.7	Purificazione dell'ATPasi di <i>E. coli</i>	45
2.7.1	Protocollo di purificazione	46
2.7.2	Metodi di purificazione	51
2.8	Elettroforesi SDS-PAGE	54
3	Risultati	57
3.1	Fotoattivazione in <i>Rb. capsulatus</i> wild-type e γ M23K	57
3.1.1	Idrolisi stimolata da $\Delta\mu_{H^+}$ in funzione del tempo di esposizione alla luce	58
3.1.2	Idrolisi stimolata da $\Delta\mu_{H^+}$ indotto da luce in <i>Rb. capsulatus</i> wild-type e nel mutante γ M23K	59
3.2	Autoattivazione indotta da $\Delta\mu_{H^+}$ in <i>Rb. capsulatus</i>	62
3.3	Regolazione dell'ATPasi in funzione della concentrazione di ADP	65
3.4	Proton pumping indotto da ATP nel mutante γ M23K	67
3.5	Misura del proton pumping in presenza di ADP 250 μ M	71
3.6	Misura del proton pumping in γ M23K	74
3.7	Misura del proton pumping nel WT	76
3.8	Disaccoppiamento intrinseco: effetto del P_i , ADP e $\Delta\psi$ nel WT	78
3.8.1	Calibrazione della sonda fluorescente 9-AA	79
3.8.2	Variazione del Δ pH e dell'attività idrolitica in funzione di ADP, P_i e $\Delta\psi$	83
3.9	Effetti degli inibitori di F_0 , F_1 e dell'ADP sull'ATPasi WT	89
3.9.1	Effetto dell'inibitore oligomicina e dell'ADP sull'ATPasi	89
3.9.2	Effetto dell'inibitore efrapeptina sull'ATPasi	93
3.9.3	Analisi dell'effetto degli inibitori di F_0 e F_1 in varie situazioni di disaccoppiamento	93
3.10	Azione dell'ADP e del $\Delta\psi$ sul proton pumping	98
4	Marcatura a fluorescenza per analisi FRET in <i>E. coli</i>	103
4.1	Analisi del procedimento di marcatura	105
4.2	Protocollo finale per la marcatura	115
5	Discussione	119
5.1	Effetti funzionali della mutazione γ M23K	119
5.2	ADP e P_i : efficienza di pompaggio protonico	121

<i>INDICE</i>	iii
5.3 Il meccanismo di regolazione dell'accoppiamento	125
Appendici	127
Bibliografia	128

Elenco delle figure

1.1	Albero filogenetico dei batteri	2
1.2	Catena fotosintetica	3
1.3	Catena fotosintetica	5
1.4	Modello schematico di ATPasi	8
1.5	Struttura dell'ATPasi	8
1.6	Struttura del complesso $\alpha\beta$	10
1.7	Struttura della subunità $\gamma\epsilon$ di bovino	11
1.8	Struttura della subunità ϵ di E. coli	12
1.9	Struttura della subunità c di E. coli	14
1.10	Struttura della subunità dell'anello c di F ₀ . coli	14
1.11	Binding change mechanism	16
1.12	Rotazione della subunità γ	17
1.13	Rotazione della subunità γ	18
1.14	Step di rotazione della subunità γ	19
1.15	Conformazione della subunità ϵ	21
2.1	Attività idrolitica monitorata per mezzo del Rosso Fenolo	31
2.2	Sistema accoppiato PK-LDH	32
2.3	Quantificazione del Proton Pumping indotto da idrolisi	34
2.4	Fermentatore	43
3.1	Attivazione dell'attività idrolitica stimolata da $\Delta\mu_{H^+}$	58
3.2	Idrolisi indotta da fotoattivazione in <i>Rb. capsulatus</i> wild type e in γ M23K	61
3.3	Autoattivazione da $\Delta\mu_{H^+}$ in <i>Rb. capsulatus</i> WT	63

3.4	Cinetiche di fotoattivazione e autoattivazione in <i>Rb. capsulatus</i> WT e nel mutante γ M23K	64
3.5	Regolazione dell'ATPasi in funzione della concentrazione di ADP . . .	67
3.6	Attività idrolitica in <i>Rb. capsulatus</i> Wild-type \pm 125 mM efrapeptina e nel mutante γ M23K	68
3.7	Pompaggio protonico in <i>Rb. capsulatus</i> wild-type \pm 125 nM efrapeptina e nel mutante	70
3.8	Modulazione dell'idrolisi in presenza di ADP 250 μ M	72
3.9	Modulazione del proton pumping in presenza di ADP 250 μ M	73
3.10	Variaizone dello stato stazionario di quenching nel mutante γ M23K	75
3.11	Modulazione del proton pumping allo stato stazionario nel wild-type	78
3.12	Risposta della 9-AA ai salti acido-base	80
3.13	Curva di taratura della fluorescenza della 9-AA in funzione del Δ pH	81
3.14	Formazione del Δ pH e dell'attività idrolitica in funzione del P_i in <i>Rb. capsulatus</i> B100.51	84
3.15	Formazione del Δ pH e dell'attività idrolitica in funzione dell'ADP presente regolato dal sistema PK-LDH in <i>Rb. capsulatus</i> B100.51 wild-type	85
3.16	Valori delle velocità idrolitiche e di Δ pH in funzione dell'ADP e del P_i in <i>Rb. capsulatus</i> B100.51 wild-type	87
3.17	Formazione del Δ pH in diverse condizioni di P_i e ADP	88
3.18	Attività di proton pumping in <i>Rb. capsulatus</i> wild-type parzialmente inibita da oligomicina	90
3.19	Variazione della velocità iniziale di <i>quenching</i> in funzione della concentrazione di oligomicina in <i>Rb. capsulatus</i> wild-type	91
3.20	Effetto della PK sull'attività idrolitica in funzione della concentrazione di oligomicina presente in <i>Rb. capsulatus</i> wild-type	92
3.21	Effetto dell'inibitore efrapeptina sull'attività catalitica di <i>Rb. capsulatus</i>	94
3.22	Variazione dello stato stazionario in funzione della PK aggiunta . . .	100
3.23	Variazione del $\Delta\psi$ in funzione della PK aggiunta in <i>Rb. capsulatus</i> wild-type	102
4.1	Gel con marcatura ATTO	107

4.2	Gel a marcatura pH dipendente	107
4.3	Gel a marcatura ligandi dipendente	108
4.4	Gel a marcatura Mg dipendente	109
4.5	Gel a marcatura Zn dipendente	110
4.6	Gel a marcatura Imidazolo:Zn dipendente	111
4.7	Marcatura finale	117

Elenco delle tabelle

2.1	Caratteristiche genetiche dei ceppi di <i>Rb. capsulatus</i>	26
2.2	Terreno RCV	27
2.3	Componenti per il saggio dell'attività idrolitica in <i>E. coli</i> e in <i>Rb. capsulatus</i>	32
2.4	Plasmidi utilizzati per i ceppi di <i>E. coli</i>	35
2.5	Caratteristiche del plasmide pET-16b	37
2.6	PCR: elementi e cicli per la mutazione ϵ H57C	38
2.7	Piano per la trasformazione di cellule competenti di <i>E. coli</i>	39
2.8	Caratteristiche genetiche dei ceppi competenti di <i>E. coli</i>	40
2.9	Terreni LB-Luria e 2YT per <i>E. coli</i>	41
2.10	Terreno per colture di <i>E. coli</i> in fermentatore	42
2.11	Terreni SOB e NZY ⁺	44
2.12	Buffer per ceppi competenti	45
2.13	Buffer per la purificazione del complesso EF _O F ₁ di <i>E. coli</i>	50
2.14	Caratteristiche tecniche delle colonne per FPLC e HPLC	51
2.15	Gel al 13% di acrilammide-bisacrilammide	55
2.16	Buffer per gel di Acrilammide-bisacrilammide	55
3.1	Velocità catalitiche del wild-type e del γ M23K mutante di <i>Rb. capsulatus</i>	59
3.2	Valori della costante k_{50}	96
4.1	Buffer per la marcatura dei mutanti ϵ 57 γ 106 e ϵ 114 γ 106 di <i>E. coli</i> .	106
4.2	Condizioni di marcatura dei doppi mutanti ϵ 57 γ 106 ed ϵ 114 γ 106 di <i>E. coli</i>	113

4.3	Condizioni finali di marcatura dei doppi mutanti $\epsilon 57\gamma 106$ ed $\epsilon 114\gamma 106$ di <i>E. coli</i>	116
-----	---	-----

Ringraziamenti

Desidero ringraziare sinceramente il prof. Bruno Andrea Melandri e la dott. Paola Turina per l'attenzione, la disponibilità e la puntualità scientifica profusa durante questi anni di dottorato passati insieme. Siete stati per me una fonte inesauribile alla quale attingere scienza e umanità. Grazie di cuore.

Una buona parte della mia esperienza in Germania presso l'Istituto di Chimica Fisica dell'Università di Friburgo non sarebbe stata possibile senza l'assistenza del prof. Peter Graeber a cui va tutta la mia stima e la mia riconoscenza per avermi messo nelle migliori condizioni per portare avanti il complesso progetto di ricerca pensato insieme. Inoltre un ringraziamento speciale a Jan Petersen con il quale a ho condiviso un'esperienza burrascosa ma scientificamente costruttiva.

Ringrazio tutti i miei colleghi, in particolare a Manuela D'Alessandro, Manuela Dezi e Francesco Francia, per aver reso ancora più lieta questa meravigliosa esperienza.

Infine, un ringraziamento sincero alla mia famiglia, a mio zio Bruno e ad Elisa che mi hanno sostenuto ed incoraggiato in ogni momento e che soprattutto hanno assecondato tutte le mie fantasie scientifiche!

Scopo della Tesi

E' stato riportato in letteratura come nell'ATPsintasi di *E. coli* l'introduzione della mutazione γ M23K diminuisca notevolmente l'efficienza di accoppiamento portando ad una consistente perdita dell'attività di pompaggio protonico transmembrana (32). In un precedente lavoro svolto nel nostro laboratorio si è deciso di riprodurre la mutazione γ M23K in *Rb. capsulatus* per per ampliare lo studio del fenotipo già osservato in *E. coli* usufruendo della catena respiratoria del batterio fotosintetico per generare $\Delta\mu_{H^+}$ transmembrana. Nella prima parte dei risultati (3.1-3.7) verranno messi a confronto il wild-type ed il mutante γ M23K di *Rb. capsulatus* indagando fenomeni di fotoattivazione e autoattivazione in presenza di $\Delta\mu_{H^+}$ e le rispettive efficienze di proton pumping.

Nella seconda parte (3.8-3.10) verrà esaminato il solo wild-type relativamente al fenomeno del disaccoppiamento intrinseco in funzione delle forze che costituiscono il $\Delta\mu_{H^+}$ ovvero i gradienti elettrico e protonico e della concentrazione dei ligandi naturali ADP e P_i . Verranno esaminate le interazioni tra i ligandi ed in particolare il ruolo del gradiente elettrico in associazione con l'ADP nel mantenere attivo il flusso protonico transmembrana.

Infine nella terza parte (??), si analizzeranno i risultati di labeling ottenuti sui mutanti ϵ 57 γ 106 and ϵ 114 γ 106 di *E. coli* disegnati per studi di FRET. In collaborazione con l'Istituto di Chimica Fisica dell'Università di Friburgo (Germania) abbiamo realizzato dei mutanti in grado di essere marcati con fluorofori per studi di FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) in bulk ed in singola molecola. Lo scopo è quello di poter osservare le diverse conformazioni assunte dalle due subunità ϵ e γ in funzione della concentrazione dei ligandi e delle singole componenti del $\Delta\mu_{H^+}$ presenti durante la reazione idrolitica. Per problemi sopraggiunti durante la marcatura dei mutanti non è stato possibile completare il progetto di FRET in singola molecola. E' stato però messo a punto un protocollo

per la marcatura di questi mutanti che darà la possibilità, in un secondo momento, di completare gli studi strutturali previsti dal progetto.

Capitolo 1

Introduzione

Tutti gli esseri viventi necessitano di energia per crescere, riprodursi e mantenersi poiché la materia vivente è formata da una struttura altamente organizzata di molecole, con bassa entropia rispetto all'ambiente. Le forme di energia che le cellule possono sfruttare sono in definitiva due:

- l'energia chimica, cioè contenuta in molecole assunte dall'ambiente e trasformate traendone lavoro chimico;
- l'energia radiante, sotto forma di luce assorbita da pigmenti.

Questi pigmenti diventano a loro volta i trasduttori in una forma di lavoro chimico, dato che l'assorbimento dell'energia della luce modifica la loro reattività chimica e permette di svolgere ancora lavoro chimico. Questi ultimi organismi sono detti fotosintetici, essendo appunto la fotosintesi il processo di trasformazione dell'energia luminosa in lavoro chimico. Il primo gruppo di organismi è definito come eterotrofo se le molecole assunte dall'ambiente sono molecole organiche e chemiolitotrofo se l'energia chimica è tratta da molecole inorganiche.

1.1 Filogenesi e aspetti metabolici

I batteri sono organismi unicellulari di dimensioni medie pari a $0,5-1 \mu$ di diametro e $2-5 \mu$ di lunghezza, per questo visibili solo al microscopio. L'analisi filogenetica, basta sul sequenziamento degli rRNA, ne consente la suddivisione in almeno dodici gruppi distinti (figura 1.1). Tra tutti i gruppi quello dei batteri rossi è il più ampio e vario dal punto di vista fisiologico; comprende cinque sottodivisioni, dette dei

batteri rossi α β γ δ ed ϵ . I batteri rossi fototrofi costituiscono il nucleo centrale di tre suddivisioni, mentre i microrganismi chemiorganotrofi e chemiolitotrofi sono distribuiti abbastanza omogeneamente in tutti i gruppi. Le suddivisioni γ ed ϵ contengono solo batteri non fototrofi.

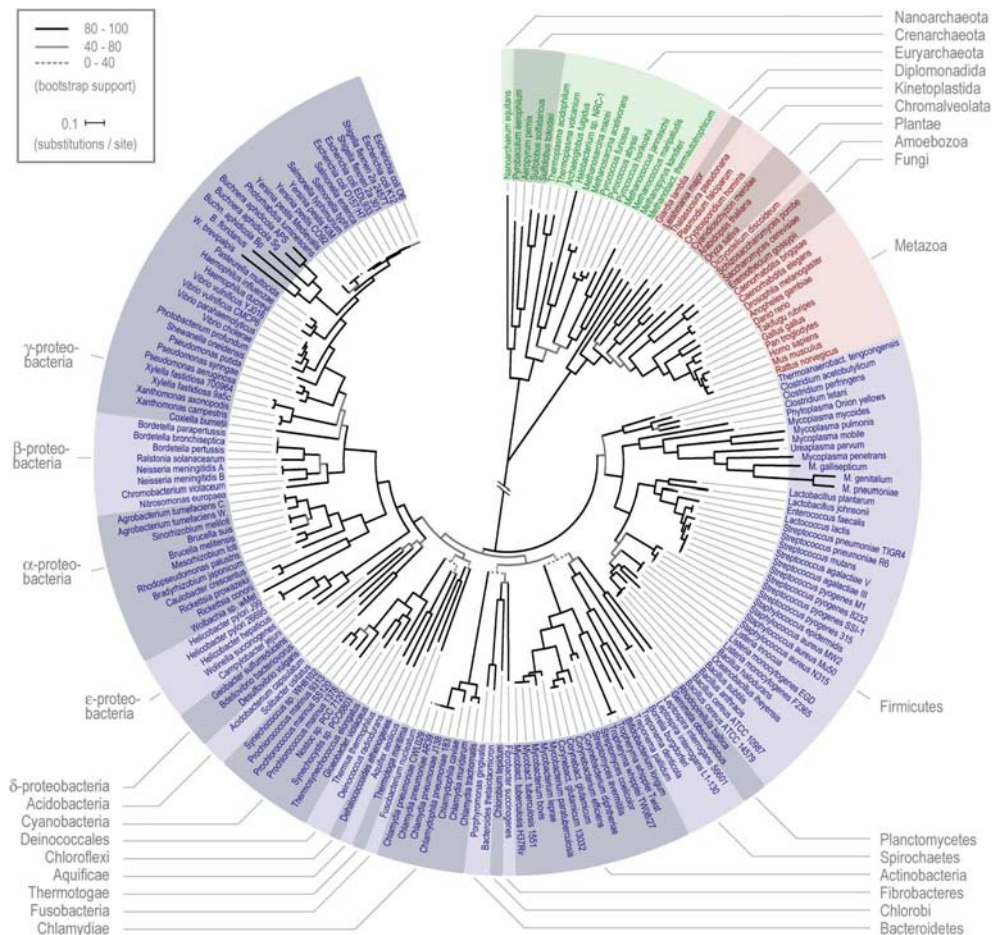


Figura 1.1: Albero filogenetico dettagliato dei batteri (www.chm.bris.ac.uk).

Le proprietà strutturali di *Rhodobacter capsulatus* permettono di classificarlo come batterio rosso α . Esso possiede una notevole versatilità metabolica che presenta un'invidiabile lista di condizioni di crescita:

- Fotoautotroficamente, fissando CO_2 alla luce;
- Fotoeterotroficamente, usando composti organici e alla luce;
- Chemioautotroficamente, al buio fissando CO_2 usando l'energia rilasciata nella respirazione aerobia dell' H_2

- Chemioeterotroficamente, al buio usando l'energia da respirazione aerobia ed anaerobia.

1.1.1 Fotosintesi batterica

L'apparato fotosintetico di *Rb. capsulatus* è ottenuto in un sistema di membrane intracitoplasmatico di morfologia vescicolare che può essere isolato dando origine a vescicole a polarità invertita dette cromatofori. Tale apparato fotosintetico risulta costituito da cinque complessi proteici (figura 1.2):

- centro di reazione fotosintetico (RC);
- complesso antenna 1 (LH1, B870);
- complesso antenna 2 (LH2, B800/850);
- ubiquinolo-citocromo c_2 ossidoreduttasi (complesso citocromo bc_1)
- ATP sintasi

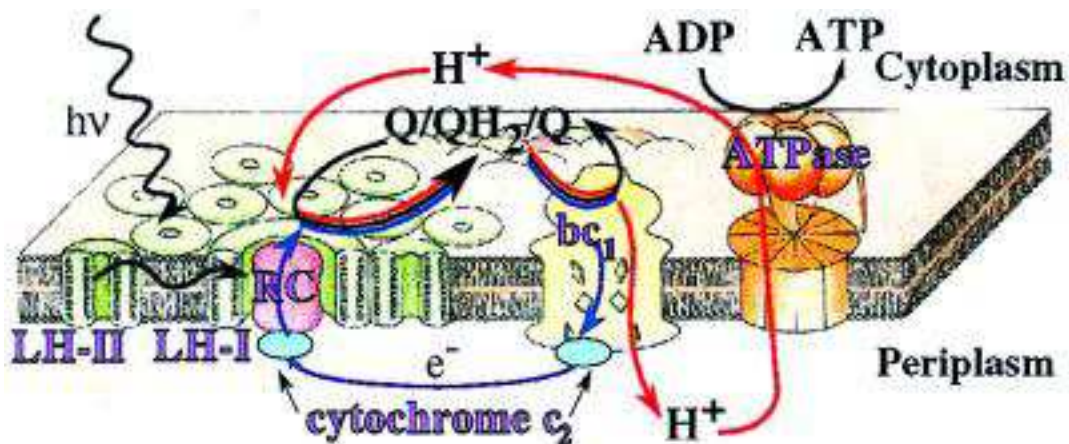


Figura 1.2: Modello di catena fotosintetica in *Rb. capsulatus*

Il complesso bc_1 e l'ATP sintasi sono comuni sia alla catena respiratoria che fotosintetica. Il centro di reazione batterico è stato cristallizzato e risolto tramite diffrazione ai raggi X (in *Rhodospseudomonas viridis* e *Rhodobacter sphaeroides*). Si sa quindi che è costituito da tre subunità polipeptidiche distinte in L, M ed H in base al peso molecolare apparente, organizzate in un totale di 11 α -eliche che attraversano la membrana e che sono parallele, con un'approssimazione di 35° , ad

una asse di rotazione binario. Le subunità L ed M hanno cinque α -eliche transmembrana ciascuna, mentre la subunità H ne ha solo una. Queste tre subunità sono associate a molecole di pigmenti e a cofattori implicati nel meccanismo fotosintetico; si tratta in particolare di quattro batterioclorofille, due batteriofeofitine, due chinoni e un atomo di ferro. Anche i nove gruppi prostetici sono simmetrici rispetto all'asse binario di rotazione.

Il complesso citocromo bc_1 *Rb. capsulatus* presenta 4 subunità, ma comprendendo anche gli eucarioti tale complesso risulta costituito da un numero variabile di subunità proteiche (3-11), tre delle quali contengono gruppi redox. Queste tre subunità, costituenti il *core* catalitico dell'enzima, sono rappresentate dal centro Fe-S di Rieske (2Fe2S), dal citocromo b (con due gruppi eme di tipo b, b_L e b_H) e dal citocromo c (con un gruppo eme di tipo c, e c_1). Il *core* catalitico ospita anche due siti attivi, uno per l'ossidazione di QH_2 (Q_o) e l'altro per la riduzione di Q (Q_i), collocati ai lati opposti della membrana.

Flusso fotosintetico di elettroni

I pigmenti antenna catturano la luce e la convogliano sul centro di reazione. L'assorbimento di energia eccita le due molecole di batterioclorofilla a (BChl a), dimero speciale del RC, convertendole in forti riducenti (passaggio di uno degli elettroni π dallo stato fondamentale al primo stato eccitato). Tale elettrone viene rapidamente trasferito a una molecola di batteriofeofitina, associata alla subunità L del centro di reazione. In tal modo si crea un radicale cationico del doppietto di batterioclorofille ($BChl_2^+$) e un radicale anionico della batteriofeofitina ($Bfeo^-$). La ricombinazione di carica tra i due radicali è prevenuta dal passaggio dell'elettrone dalla batteriofeofitina all'ubichinone, che è così ridotto a radicale anionico Q_A^- . L'elettrone è quindi trasferito al secondo chinone Q_B , che è l'accettore finale di elettroni. Tale trasferimento impedisce all'elettrone di ritornare da Q_A^- a $BChl_2^+$, poiché l'elettrone posto su Q_B^- ha una bassissima probabilità di ricombinazione con $BChl_2^+$. Il simultaneo passaggio di un elettrone dal citocromo c alla $BChl_2^+$ preclude poi la ricombinazione (figura 1.3).

La chimica dell'ossido-riduzione del chinone è la chiave della generazione del $\Delta\mu_{H^+}$ attraverso le membrane:

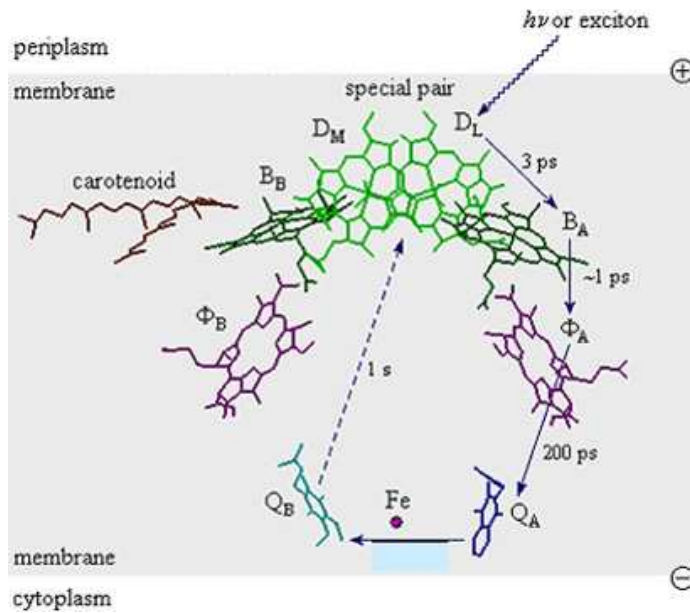
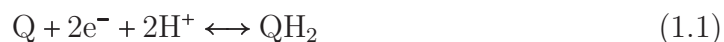


Figura 1.3: Schema temporale delle reazioni di trasferimento elettronico che avvengono nel centro di reazione fotosintetico batterico.



Infatti in fase di riduzione al sito Q_B , il chinone accetta due elettroni da due eventi fotochimici nel centro di reazione e, contemporaneamente, preleva due protoni dal citoplasma. L'ubichinolo così formatosi, essendo una molecola idrofobica, rimane intrappolato in soluzione nei lipidi della membrana e viene ossidato da un complesso bc_1 . All'interno di questo complesso un elettrone viene trasferito attraverso la catena ad alto potenziale comprendente il centro $2Fe-2S$ ed il citocromo c_1 , l'altro viene trasferito dalla catena a basso potenziale (emi b_L e b_H) ad un chinone legato al sito Q_i . Il completamento di due di questi cicli nel citocromo bc_1 determina l'ossidazione di due molecole QH_2 ed il rilascio di $4H^+$ attraverso il sito Q_o , contemporaneamente all'assunzione di $2H^+$ e alla riduzione di una molecola di Q nel sito Q_i . Quindi $2H^+$ vengono rilasciati da un lato della membrana per ogni QH_2 ossidato ed un elettrone è mosso attraverso la membrana. Tramite il citocromo c_2 , localizzato nello spazio periplasmatico, gli elettroni ritornano poi al centro di reazione. Tale citocromo funziona così da collegamento tra il complesso bc_1 ed il centro di reazione. Il flusso elettronico fotosintetico in questi batteri è perciò ciclico: il centro di reazione riduce l'ubichinone e ossida il citocromo c_2 , il bc_1 catalizza il processo inverso.

L'orientamento dei trasportatori degli elettroni nel doppio strato lipidico è tale da determinare una separazione di carica e la generazione di un gradiente di protoni. Questo stato energetico della membrana, provocato dai processi di trasporto degli elettroni, può essere usato direttamente per fare lavoro utile: l'ATPasi lo utilizza per sintetizzare ATP da ADP e P_i . Questo enzima è così in grado di sfruttare l'energia accumulata dalle pompe protoniche redox. La sintesi chemiosmotica di ATP è un processo universale e molto antico comune a tutti i fenomeni bioenergetici associati a membrane. La struttura ed il meccanismo catalitico dell'ATPasi risultano infatti conservati nel corso dell'evoluzione.

1.1.2 Teoria chemiosmotica

L'ipotesi chemiosmotica avanzata da Mitchell all'inizio degli anni Sessanta (28) rappresentò un contributo rivoluzionario per quei tempi poiché introduceva un meccanismo di accoppiamento radicalmente diverso da quelli fino ad allora conosciuti. Le assunzioni fondamentali della teoria chemiosmotica sono:

- Le membrane implicate nella traduzione energetica sono vescicolari, chiuse, impermeabili ai protoni eccetto per i percorsi coinvolti nelle traslocazioni di H^+ mediate da reazioni redox o catalizzate da proteine.
- L'energia è accumulata sotto forma di gradiente transmembrana di potenziale elettrochimico per i protoni:

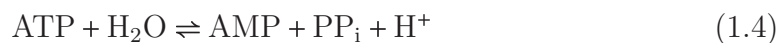
$$\Delta\mu_{H^+} = F * \Delta\Psi - 2,3RT * \Delta pH \quad (1.2)$$

- Essenziale è la vettorialità dei complessi di membrana e l'alternarsi di trasportatori di elettroni e carriers di protoni.
- La sintesi di ATP è accoppiata ad un flusso esoergonico di H^+ , guidato dal $\Delta\mu_{H^+}$. La reazione inversa di idrolisi determina una traslocazione di H^+ nella direzione opposta e genera un $\Delta\mu_{H^+}$ a spese dell'energia di idrolisi dell'ATP.
- Le sostanze in grado di trasportare protoni (i cosiddetti disaccoppianti) attraverso la membrana lipidica annullano il gradiente protonico e disaccoppiano il trasporto degli elettroni dalla fosforilazione.

Gran parte di queste assunzioni sono state ampiamente verificate nel corso degli anni, tanto che la teoria chemiosmotica è ora universalmente accettata.

1.2 Struttura della F_0F_1 ATPasi

Gli esseri viventi richiedono un continuo rifornimento di energia ed il più importante trasportatore cellulare di energia è lo ione adenosintrifosfato (ATP). L'ATP è un nucleotide costituito da una adenina, un ribosio ed una unità trifosfato; si tratta di una specie ricca di energia perché contiene due legami fosfoanidrici facilmente idrolizzabili:



dove per ogni reazione l'energia libera vale $\Delta G^{\text{O}l}$ o $-7,3 \text{ kcal/mol} = -30,5 \text{ kJ/mol}$.

L'ATPasi è il complesso enzimatico di membrana che accoppia reversibilmente la reazione chimica (sintesi o idrolisi di ATP) e un flusso protonico transmembrana (figura 1.4). Tale enzima è presente nelle membrane mitocondriali, cloroplastiche e nei batteri e risulta conservato in tutte le specie per struttura e funzione. Si ritiene che all'interno dei cloroplasti e dei mitocondri l'enzima funzioni prevalentemente in direzione di sintesi, sfruttando il potenziale elettrochimico dei protoni, o $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, generatosi attraverso la membrana durante il trasferimento di elettroni. Nei batteri come ad esempio in *E. coli* si ritiene, invece, che la direzione del funzionamento dell'enzima dipenda dalle condizioni di crescita. In condizioni aerobiche il sistema di trasporto degli elettroni, respiratorio o fotosintetico, genera un $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ attraverso la membrana plasmatica (dovuto al pompaggio di protoni dal lato citoplasmatico all'esterno della cellula) che viene sfruttato per sintetizzare ATP. In condizioni fermentative la F_0F_1 ATPasi idrolizza ATP agendo come pompa protonica; il $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ necessario per i processi cellulari (motilità flagellare e trasporto dei metaboliti) è generato dall'idrolisi di ATP accoppiata al pompaggio di protoni all'esterno della cellula.

Tutte le ATPasi sono costituite da due porzioni strutturalmente e funzionalmente distinte: una sezione estrinseca e catalitica, F_1 , ed una sezione intrinseca, F_0 , coinvolta nel trasporto protonico transmembrana. È possibile separare le due porzioni in vitro: F_1 mantiene la capacità di idrolizzare ATP ma non di sintetizzarlo, mentre la porzione F_0 rimasta sulla membrana permette il trasporto passivo

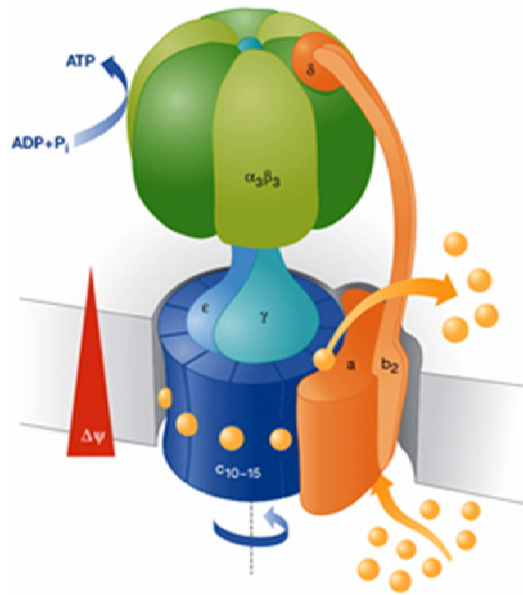


Figura 1.4: Modello schematico dell'ATPasi in cui la catalisi enzimatica genera un lavoro meccanico di tipo rotatorio a cui è associato il traslocamento protonico transmembrana.

dei protoni (1.4). Il numero di subunità presenti nel complesso enzimatico varia nei diversi organismi: otto nei batteri aerobi, nove nei batteri fotosintetici e nei cloroplasti, fino a sedici nei mitocondri. Si ritiene che le subunità aggiuntive presenti nei mitocondri svolgano principalmente un ruolo regolatorio.

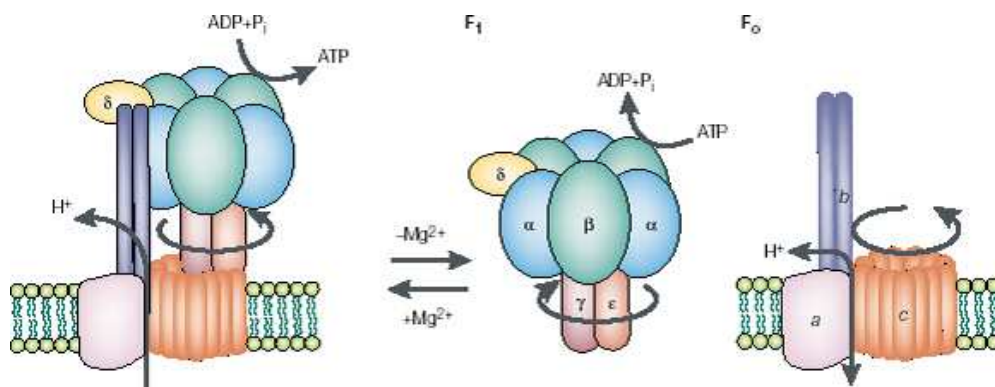


Figura 1.5: Struttura dell'ATPasi: l'enzima è composto da un complesso idrosolubile, F_1 , ed un complesso idrofobico transmembrana, F_0 . La rimozione di Mg^{2+} , a basse concentrazioni saline, permette l'estrazione di F_1 in acqua lasciando F_0 nella membrana.

Le otto differenti subunità di *E. coli* rappresentano il prototipo delle ATPasi di tipo F. La porzione F_1 è composta dalle subunità γ , β , γ , δ , ϵ con stechiometria 3:3:1:1:1 e la F_0 dalle subunità a,b,c con stechiometria ab_2c_{9-12} . Negli organismi fotosintetici, tra cui *Rb. capsulatus*, è presente una quarta subunità, b' , che si

ritiene derivi da una duplicazione genetica di b ; si ritiene che ci sia quindi un eterodimero bb' in sostituzione di b_2 . Nonostante la differenza nel numero di subunità le strutture terziarie e quaternarie risultano molto conservate nelle ATPasi delle varie specie, nonostante la grande distanza evolutiva. In alcuni casi addirittura costrutti preparati con subunità enzimatiche derivanti da organismi differenti si sono dimostrati funzionali.

1.2.1 Caratteristiche strutturali del dominio F_1

La porzione F_1 è una struttura ovoidale alta 80Å e larga 100Å costituita da 5 tipi di catene polipeptidiche presenti con stechiometria: $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Sono disponibili una serie di informazioni strutturali ad alta risoluzione di tale porzione dell'ATPasi. La cristallografia a raggi X della F_1 dell'enzima mitocondriale di cuore bovino del laboratorio di John Walker ((1)) ha permesso l'identificazione di più dell'85% dei residui aminoacidici delle subunità α e β e di parte della subunità γ . Nello stesso laboratorio è stata poi determinata la struttura di F_1 comprendente la struttura risolta dell'intera subunità γ e dell'omologo della subunità ϵ ((21)). Sono state pubblicate anche porzioni di struttura dell' F_1 di *E. coli* e di cloroplasti ((24)). Alla luce di queste informazioni il complesso F_1 risulta costituito da un trimero di eterodimeri $\alpha\beta$ disposte in maniera alternata intorno ad una cavità centrale contenente le regioni C-terminale e N-terminale, ad α -elica, della subunità.

Subunità $\alpha\beta$

Le subunità α e β sono omologhe (20% di identità), omologia che riguarda prevalentemente il dominio coinvolto nel legame dei nucleotidi. Presentano entrambe tre domini visibili in figura 1.6: una struttura β -barrel di 6 filamenti nella parte N-terminale; un dominio $\alpha\beta$ centrale con il sito di legame per i nucleotidi; un dominio di 6 α -eliche nella zona C-terminale della β che diventano 7 nella α . I domini β -barrel nella parte N-terminale delle subunità $\alpha\beta$ sono collegati a formare una corona sulla cima della porzione F_1 che sembra conferire stabilità all'intera struttura.

Le due subunità α e β presentano ripiegamenti pressoché identici, si differenziano però significativamente per il tipo e l'orientamento di alcuni aminoacidi costituenti il sito di legame nucleotidico localizzato all'interfaccia tra le subunità α e β . Ciò ha

dato una conferma strutturale del fatto che i tre siti nelle subunità α , a differenza di quelli presenti nelle subunità β , sono non catalitici. Si pensa che tali siti svolgano un ruolo strutturale ed eventualmente anche regolatorio dell'attività ATPasica sintetica.

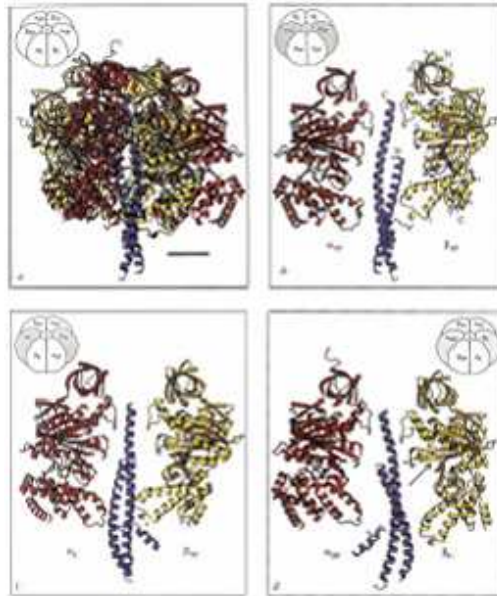


Figura 1.6: Struttura tridimensionale risolta da Walker mediante raggi X. Le subunità α sono in rosso, le β in giallo e le γ in viola. Nel primo riquadro è riportato l'assemblaggio di subunità $\alpha_3\beta_3\gamma$, nelle immagini successive sopra mostrate le interazioni della subunità γ con una coppia di α e β ((?)).

I siti catalitici si trovano nelle subunità β (all'interfaccia tra le subunità α e β); la struttura a raggi X riportata in figura ?? mostra che i tre siti hanno una diversa affinità per il substrato. La subunità β si presenta infatti in tre diverse conformazioni: β_{TP} , β_{DP} , β_E a seconda che vi sia legato AMP-PNP (5'-adenilimidofosfato, un analogo non idrolizzabile dell'ATP presente nel tampone di cristallizzazione), ADP o che sia privo di substrato. Il sito attivo sarà fortemente chiuso nel primo e nel secondo caso, molto aperto nel terzo. Queste caratteristiche di asimmetria sono consistenti con il modello di *binding change mechanism* (proposto da Boyer) secondo cui i tre siti catalitici non sono tra loro equivalenti, ma subiscono una transizione fra tre stadi funzionali diversi. Le tre subunità α hanno invece una conformazione simile.

Subunità γ

L' α -elica C-terminale, lunga 90Å, forma con l' α -elica N-terminale un superavvolgimento (*coiled-coil*) levogiro che si viene a trovare all'interno della cavità formata dall'assemblaggio delle subunità $\alpha_3\beta_3$ (figura 1.7). Una terza α -elica di γ , di 11 residui, è stata risolta e si trova nella parte bassa della cavità. L'estremità C-terminale termina in una fossetta profonda circa 15Å nella parte superiore, mentre l'estremità N-terminale si trova circa a metà del corpo centrale del complesso enzimatico.

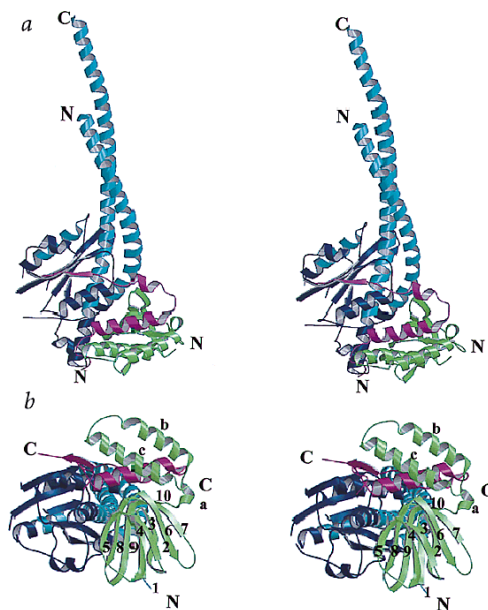


Figura 1.7: Immagine della subunità γ di bovino risolta ai raggi X. In blu la subunità γ in verde la δ e in magenta la ϵ . Nell'enzima mitocondriale la subunità equivalente alla ϵ di *E. coli* si presenta divisa in due subunità δ ed ϵ . (a) Visione stereo frontale. (b) Visione stereo, vista dalla membrana, ruotata di 90° rispetto ad (a).

Tale struttura asimmetrica all'interno della cavità dell'esamero fa sì che la subunità γ interagisca in modi diversi con la subunità β ; è stato perciò suggerito che tale diversità di interazione con la subunità γ determini, almeno in parte, la diversa conformazione delle tre subunità β .

Struttura della subunità ϵ

La struttura della subunità ϵ in soluzione è stata risolta mediante spettroscopia NMR (44), che ha rivelato un dominio N-terminale formato da un β -barrel a 10 filamenti ed un dominio C-terminale di 48 residui costituito da un motivo helix-loop-helix (HLH) (1.8). Da studi di cross-linking si sa che il dominio β -barrel

prende contatto con la porzione F_0 (subunità c) ed il motivo HLH con la base dell'esamero $\alpha_3\beta_3$.

Grazie al lavoro di Gibbons (21) e a quello di Rodgers e Wilce (2000), sono stati ottenuti cristalli ordinati delle $\gamma\epsilon$ sia inserite nel complesso F_1 che isolate. L'osservazione dei due tipi di cristalli ha messo in luce diversità strutturali a carico del motivo HLH della subunità ϵ .

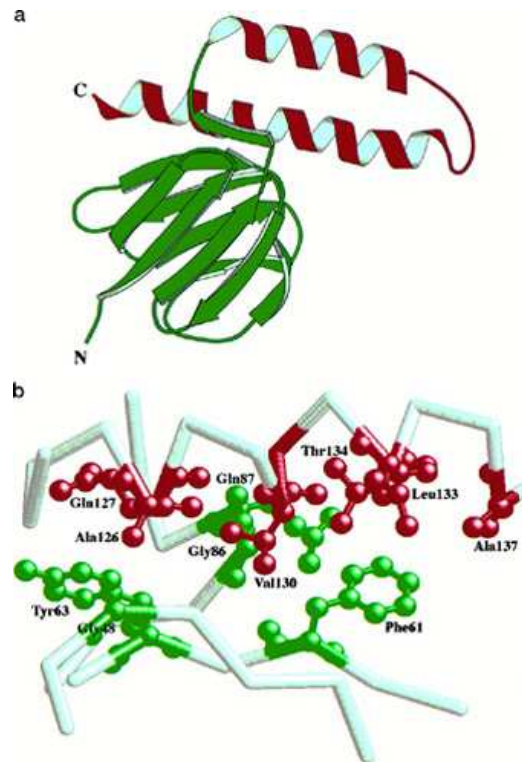


Figura 1.8: Immagine della subunità ϵ di *E. coli* risolta con spettroscopia NMR (a). (b) Interfaccia tra l'N-terminale del dominio β -barrel ed il C-terminale della α -elica. L'interfaccia è formata da 5 residui della porzione N-terminal del dominio β -barrel (in verde) e 7 residui dell' α -elica (in rosso).

Nelle strutture presentate da questi due gruppi viene essenzialmente confermata questa struttura secondaria della subunità ϵ (denominata subunità δ nell'enzima mitocondriale), con una interessante differenza presente nella struttura di Rodgers e Wilce: in quest'ultima infatti la regione ad α -elica non è a forcina, ma si presenta in conformazione estesa. Dati di cross-linking sembrano essere in accordo con una marcata mobilità di questo elemento strutturale anche nell'oloenzima, in funzione del tipo di substrato presente, lasciando ipotizzare un ruolo funzionale specifico di questa presunta mobilità conformazionale.

1.2.2 Caratteristiche strutturali del dominio F_0

Il dominio F_0 è la porzione integrale di membrana della ATPasi, attraverso la quale si realizza il passaggio transmembrana dei protoni, guidato dal relativo gradiente elettrochimico. La struttura globale del settore F_0 è stata esaminata mediante microscopia elettronica (4) e microscopia a forza atomica (39). Inizialmente si era ipotizzato un modello nel quale l'organizzazione di F_0 prevedeva le subunità a e b circondate da un anello di subunità c; attualmente si predilige un modello in cui il complesso ab_2 è collocato all'esterno dell'anello di subunità c, in accordo con i dati di microscopia sopra menzionati e con la localizzazione laterale del secondo stelo (formato da $b_2\delta$).

Il complesso F_0 più semplice si riscontra nei batteri aerobi nei quali è costituito dall'associazione di tre subunità: a e B laterali ad un anello di subunità c. Come già detto nei batteri fotosintetici come *Rb. capsulatus*, nei cianobatteri e nei cloroplasti, oltre a queste proteine, è presente una subunità supplementare nominata b' , analoga alla subunità b.

Subunità c

La struttura della subunità c, la più piccola del complesso, è stata recentemente risolta mediante spettroscopia NMR a diversi valori di pH (34); essa è costituita da una forcina di due α -eliche transmembrana legate attraverso un breve loop polare affacciato sul lato citoplasmatico (1.9)

All'apice della forcina sono localizzati tre residui conservati, Arg41-Glu42-Pro43 (numerazione di *E. coli*), che da studi di mutagenesi e cross-linking risultano interagire con la subunità ϵ di F_1 . Le due α -eliche (residui 10-31 e 54-76) risultano strettamente impaccate per l'intera lunghezza. Esse sono costituite interamente da residui non polari ad eccezione dell'Asp61 a livello del quale si ha una parziale interruzione della struttura ad α -elica. Tale residuo aminoacidico è localizzato al centro dell' α -elica C-terminale ed il suo gruppo funzionale -COOH è universalmente conservato come aspartato o glutammato. In base a studi di mutagenesi e all'inibizione dell'enzima in seguito a sua derivatizzazione con DCCD (dicicloesilcarbodiimide), si ritiene che questo residuo giochi un ruolo cruciale nel trasporto protonico attraverso la protonazione e la deprotonazione del suo gruppo carbossilico.

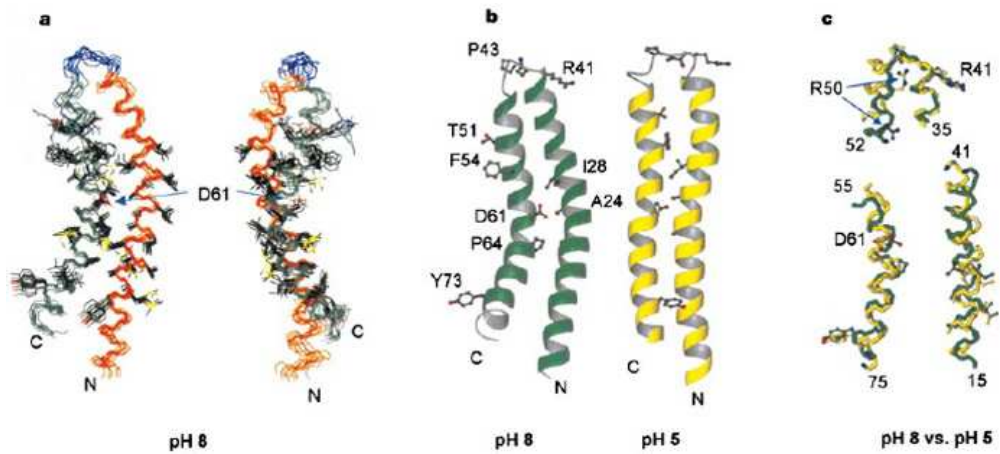


Figura 1.9: Struttura della subunità c a pH 8 e a pH 5. (a), Due viste del backbone della subunità c a pH 8. L'elica N-terminale è mostrata in arancione, il loop polare in blu e l'elica C-terminale verde. (b), Modello cartoon della subunità c deprotonata (verde) e protonata (yellow) c nei quali si evidenzia la rotazione dell'elica C-terminale a seguito della deprotonazione dell'Asp 61. (c), Sovrapposizione dell' elica N-terminale (destra), del loop polare (centro) e dell'elica C-terminale (sinistra) della struttura con Asp 61-deprotonata (verde) e di Asp 61-protonata (giallo).

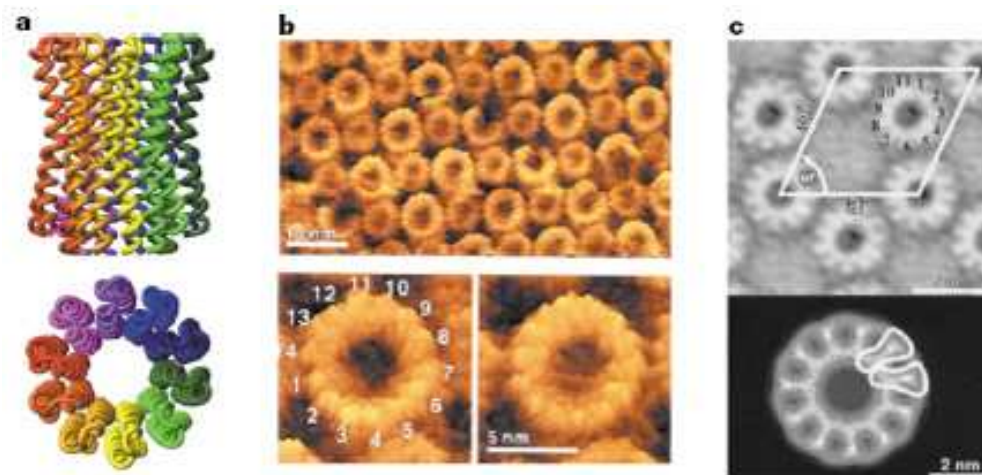


Figura 1.10: Monomeri di c nell'anello di F₀. (a) 10 copie nel lievito (40). (b) 14 nei cloroplasti (36). (c) 11 copie in *Ilyobacter tartaricus*.

Immagini di microscopia a forza atomica (36) hanno confermato un'organizzazione ad anello dei diversi monomeri. Nell'oligomero i monomeri sono impaccati in modo tale che le α -eliche formino due anelli concentrici, con l'elica N-terminale e quella C-terminale localizzate, si pensa, rispettivamente all'interno e all'esterno della struttura. Ne risulta una sorta di cilindro cavo con un diametro esterno di 55-60Å ed uno spazio interno con un diametro minimo di 11-12Å. La stechiometria della subunità c dell'anello F_0 non è ancora nota con esattezza; i valori ottenuti dai vari gruppi di ricerca oscillano da un minimo di 9 ad un massimo di 14. In figura 1.10 sono mostrate le 10 copie di tali subunità presenti nell'ATPasi mitocondriale di lievito (40), le 14 riscontrate nei cloroplasti (36) e le 1 copie individuate nell'enzima di *Ilyobacter tartaricus*.

1.3 Ipotesi sul meccanismo catalitico della porzione F_1

Il modello catalitico prevalentemente assunto per il meccanismo di azione della porzione F_1 dell'ATPasi è quello proposto da Boyer e dai suoi collaboratori (6). All'inizio degli anni 70, lo studio della distribuzione statistica di ^{18}O all'interno di tutti i prodotti formati dalla catalisi, essi dedussero che tutti i 3 siti partecipanti erano biochimicamente equivalenti, che il potenziale elettrochimico era coinvolto nel rilascio dell'ATP piuttosto che nella formazione del legame covalente dell'ATP e che tutti e tre i siti interagivano in modo altamente cooperativo. Queste evidenze sperimentali e le loro interpretazioni, portarono Boyer a proporre il *binding change mechanism*, meccanismo secondo il quale i siti catalitici, situati nelle subunità β , assumono ciclicamente, durante il turn over, 3 conformazioni interconvertibili tra loro in cui l'affinità per i ligandi varia (1.11). Il flusso protonico attraverso l'ATPasi favorirebbe l'interconversione tra i 3 siti; in ogni singolo momento le tre subunità catalitiche β in questo modo sarebbero intrinsecamente identiche, ma funzionalmente equivalenti.

Uno dei siti catalitici si troverebbe nella forma O (open site), che è aperta e presenta un'affinità molto bassa per i ligandi; un secondo sito si troverebbe nella forma L (loose site), che lega debolmente i substrati ed è cataliticamente inattivo; il terzo sito nella forma T (tight site), che lega saldamente i ligandi ed è attivo.

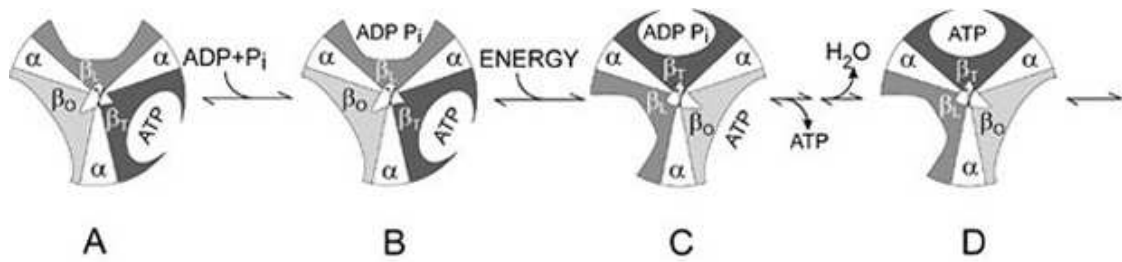


Figura 1.11: Modello catalitico del Binding Change Mechanism descritto nel testo.

Dopo che ADP e P_i si sono legati al sito L ad affinità intermedia, una modificazione conformazionale convertirebbe il sito O nel sito T ad alta affinità (ed in modo concertato anche il sito T nel sito L, ed il sito L in O) in cui l'ATP è stabilizzato e si forma reversibilmente. Successivamente alla reazione di sintesi, il rilascio di ATP richiederebbe una variazione conformazionale che converta lo stato T nello stato L ad affinità intermedia. Si avrebbe in tal modo una transizione concertata e ciclica tra i vari stati catalitici.

Intorno agli anni 80 Boyer propose una rotazione della subunità γ entro l'esamero $\alpha_3\beta_3$. Questa teoria della catalisi rotazionale, decisamente rivoluzionaria all'epoca, prevedeva che la differente affinità di legame per il substrato fosse causata dalla rotazione della subunità γ , immaginata in posizione assiale al centro dell'esamero. A sostegno delle evidenze cinetiche, su cui Boyer aveva fondato la sua teoria, venne il lavoro di Walker e collaboratori (1) i quali, attraverso la risoluzione atomica della struttura del complesso $(\alpha_3\beta_3)\gamma$, dimostrarono come dietro l'apparente simmetria, si celasse una disposizione delle singole subunità quanto mai asimmetrica. Risultava esserci infatti una corrispondenza tra i tre stati T, L ed O, proposti da Boyer e le tre conformazioni β_{TP} , β_{DP} , β_E . Dai dati strutturali raccolti da Walker era possibile ipotizzare che l'asimmetria del complesso fosse effettivamente associata alla posizione asimmetrica della subunità γ rispetto al barile $\alpha_3\beta_3$ e che le diverse interazioni della subunità γ con la β corrispondessero alle differenze strutturali dei siti catalitici.

Queste corrispondenze strutturali con l'ipotesi rotazionale hanno portato numerosi autori a sottoporre tali ipotesi a prova sperimentale. Sono apparse ben presto evidenze biochimiche (14), e spettroscopiche, in accordo con la postulata rotazione della γ , fino a quando un gruppo di ricercatori guidati da Kinoshita (31), ha ottenuto una visualizzazione diretta della rotazione della subunità γ indotta

da idrolisi di ATP. Questi autori hanno espresso in *E. coli* le subunità α , β e γ , opportunamente modificate, dell'ATPasi di un microrganismo termofilo ottenendo così l'espressione di una subunità β con una sequenza di 10 His all'estremità N-terminale in grado di fissare il complesso $\alpha_3\beta_3\gamma$ su un supporto di Ni-NTA (acido nitrilacetico). Anche il gene della subunità γ è stato modificato inserendo un residuo di cisteina, la modificazione del quale ha permesso l'ancoraggio di un filamento di actina, una proteina filamentosa resa fluorescente (1.12). L'osservazione con microscopia ad epifluorescenza di singole molecole ha dimostrato che la subunità γ compie rotazioni complete unidirezionali attorno al proprio asse in presenza di ATP. Tale rotazione era bloccata da inibitori specifici dell'idrolisi.

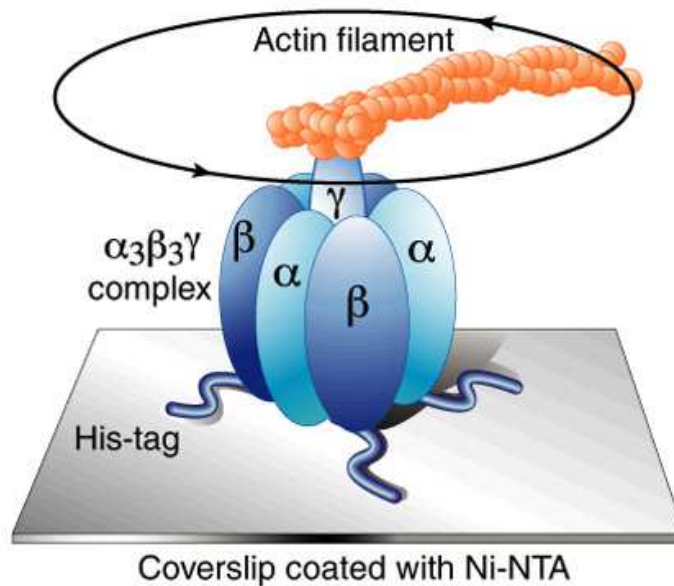


Figura 1.12: Rappresentazione schematica dell'assetto sperimentale ideato da Kinosita e collaboratori per dimostrare la rotazione della subunità γ (31).

Questo insieme di dati ha fatto sì che il modello di catalisi rotazionale fosse universalmente accettato tanto da conferire nel 1997 il premio Nobel per la chimica a Walker e Boyer. In analogia a quanto si verifica in un motore meccanico rotante, se una porzione (rotore) deve ruotare una seconda deve agire da parte esterna fissa (statore). Varie evidenze biochimiche sono state raccolte ed hanno permesso di identificare le subunità appartenenti alle due porzioni in *E. coli*: il rotore è presumibilmente formato da $c_9-14\epsilon\gamma$; mentre lo statore è composto dalle subunità $\alpha_3\beta_3\delta b_2 a$ (1.13).

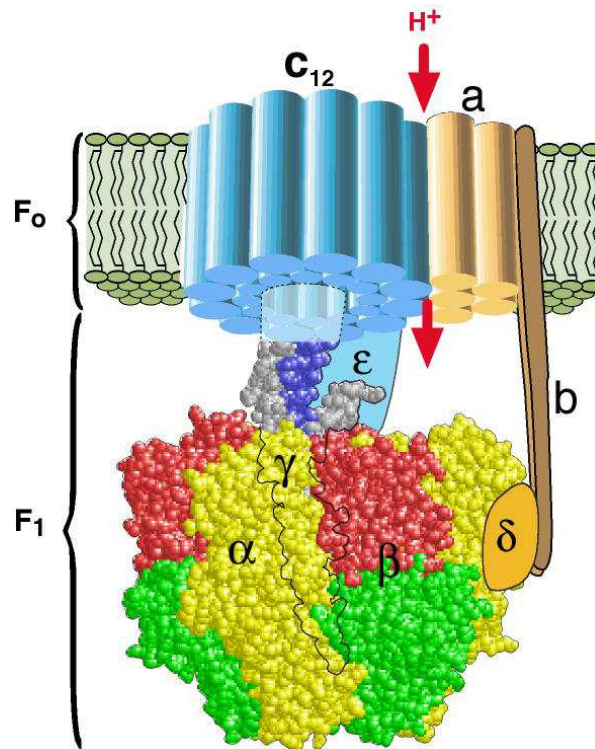


Figura 1.13: Rappresentazione schematica dell'assetto sperimentale ideato da Kinosita e collaboratori per dimostrare la rotazione della subunità γ ??.

Rotazione della subunità γ

La cinetica di rotazione della subunità γ è stata studiata in maniera molto approfondita (45). Gli autori hanno mostrato, mediante tecniche di epifluorescenza a singola molecola, che lo step rotatorio da 120° risulta essere, in realtà, suddiviso in due substeps da 90° e da 30° della durata, ciascuno di una frazione di millisecondo. In particolare sarebbe il legame dell'ATP al sito catalitico a guidare la rotazione da 90° , mentre il rilascio dei prodotti di idrolisi sarebbe associato alla successiva rotazione da 30° . Questi due eventi sarebbero separati da due reazioni meccanicamente silenti, ciascuna della durata di un millisecondo, che insieme costituirebbero la parte principale del ciclo idrolitico e che risulterebbero essere l'idrolisi dell'ATP legato ed il rilascio di uno dei due prodotti idrolitici (ADP o P_i). Dopo questo secondo evento, si verificherebbe la rotazione di 30° in corrispondenza del rilascio del secondo prodotto, la quale fa sì che l' F_1 sia re-inizializzato per il turno catalitico successivo (1.14).

Durante la reazione di sintesi dell'ATP il flusso protonico attraverso F_0 guiderebbe la rotazione di 30° della subunità $\gamma A' \rightarrow C$, determinando il passaggio dalla

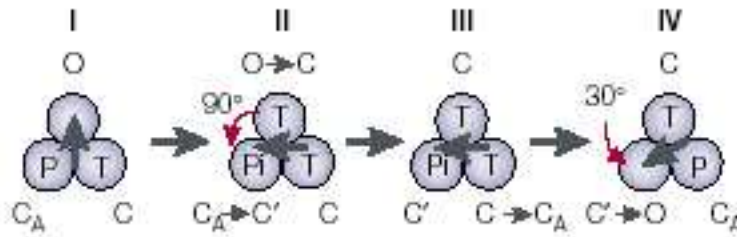


Figura 1.14: Schema del meccanismo proposto per la rotazione di γ (46).

forma β_E (sito catalitico vuoto) alla forma β_{DP} per assunzione dell'ADP dal mezzo. L'ulteriore rotazione di 90° ($\gamma_B \rightarrow A$) determinerebbe la riduzione dell'affinità per l'ATP nella subunità β a sinistra della freccia e questa molecola di ATP (precedentemente sintetizzata) verrebbe rilasciata. Si pensa che la subunità γ sia caratterizzata da un elevato grado di flessibilità interna che le permette di agire come un elemento elastico nell'accoppiare la rotazione dell'anello delle subunità c ai cambiamenti conformazionali dei siti catalitici. Postulare questa elasticità risulterebbe poi essenziale nel caso in cui il numero dei protoni traslocati per molecola di ATP sintetizzata non sia un numero intero, come ad esempio sembra verificarsi nel lievito in cui l'anello di subunità c è costituito da 10 monomeri (40).

1.4 Fenomeni di regolazione

Nonostante le F_0F_1 -ATPasi presentino un meccanismo di catalisi simile in tutti gli organismi, le caratteristiche di regolazione dell'attività catalitica sono diversificate. Nei cloroplasti l'enzima è regolato dalla ossidazione e dalla riduzione di un legame sulfidrilico tra due residui cisteinici localizzati in una sequenza cloroplasto-specifica della subunità γ . A controllare questo legame (ridotto alla luce e ossidato al buio), sono le tioredossine, che ricevono elettroni dalla catena di trasporto fotosintetica attraverso la ferredossina; l'attività dell'ATPasi è dunque strettamente associata all'attività della catena di trasporto fotosintetica.

Nei mitocondri l'attività enzimatica è inibita dal legame di una proteina basica di 9 kDa, il cui legame dipende dal pH. È stato proposto che all'abbassarsi del pH si ha la dissociazione di un tetramero non inibitorio della proteina in un dimero inibitorio che connette due ATPasi tramite le loro porzioni F_1 . Tutte le ATPasi (cloroplastiche, mitocondriali e batteriche) sono inoltre sensibili al Mg_2 -ADP, nel

senso che il legame di questa molecola a un sito catalitico determina l'interruzione dell'attività sintetico/catalitica da parte della porzione F_1 . Il legame di ATP ad un sito non catalitico nella subunità α facilita poi il rilascio del Mg_2 -ADP ricostituendo così l'attività catalitica (25).

In tutte le ATPasi è inoltre presente un inibitore endogeno rappresentato dalla subunità ϵ . Questa sarebbe soggetta ad un drastico cambiamento conformazionale tra una forma non inibitoria (detta down) ed una inibitoria (up). Ad essere coinvolta sarebbe l' α -elica C-terminale che nel primo caso poggierebbe sull'anello di subunità c, mentre nel secondo entrerebbe in contatto con l'esamero $\alpha_3\beta_3$ tramite interazione tra residui basici della subunità ϵ e quelli acidi della regione DELSEED conservata nella subunità β (1.15).

Ciò stabilizzerebbe l'associazione andando così a bloccare la rotazione. Sulla base dell'interpretazione di alcuni autori risulta che ad essere inibita è solo l'attività idrolitica, risultando l'attività sintetica mantenuta (41). Questa inibizione unidirezionale potrebbe essere intesa come in contrasto con il fatto che, in natura, tutti gli enzimi catalizzano sia la reazione diretta sia l'inversa, ed è impossibile bloccarne una senza andare ad interferire con l'altra. Di fatto l'enzima si comporta come se fosse in grado di percepire le condizioni favorevoli per la sintesi di ATP e si trasformasse in questo caso in una forma ad alta velocità di sintesi. E' noto che il $\Delta\mu_{H^+}$ è in grado di attivare l'enzima, e questo fenomeno è stato riscontrato in cloroplasti, mitocondri e batteri.

Anche l'ATPasi di *Rb. capsulatus* presenta tale fenomeno, che è stato studiato in questo laboratorio (43); in particolare risulta una dipendenza dal potenziale elettrico ($\Delta\psi$) molto più accentuata rispetto al potenziale osmotico (ΔpH). Il $\Delta\mu_{H^+}$ è in grado di stimolare l'attività catalitica dell'enzima può essere generato dalla catena fotosintetica di trasporto degli elettroni (fotoattivazione) o dall'attività idrolitica stessa (autoattivazione).

Un altro fenomeno che può essere considerato regolatorio è il disaccoppiamento intrinseco. Infatti si è visto come in realtà l'ATPasi, a basse concentrazioni di ADP e P_i (42), mostri un aumento dell'attività idrolitica a fronte di una diminuzione dell'attività di pompaggio transmembrana. Questo fenomeno è recentemente messo in luce dal nostro laboratorio e il lavoro di questa tesi ne ha ulteriormente indagato la natura, focalizzandosi in particolare sul ruolo che in questo fenomeno svolge la

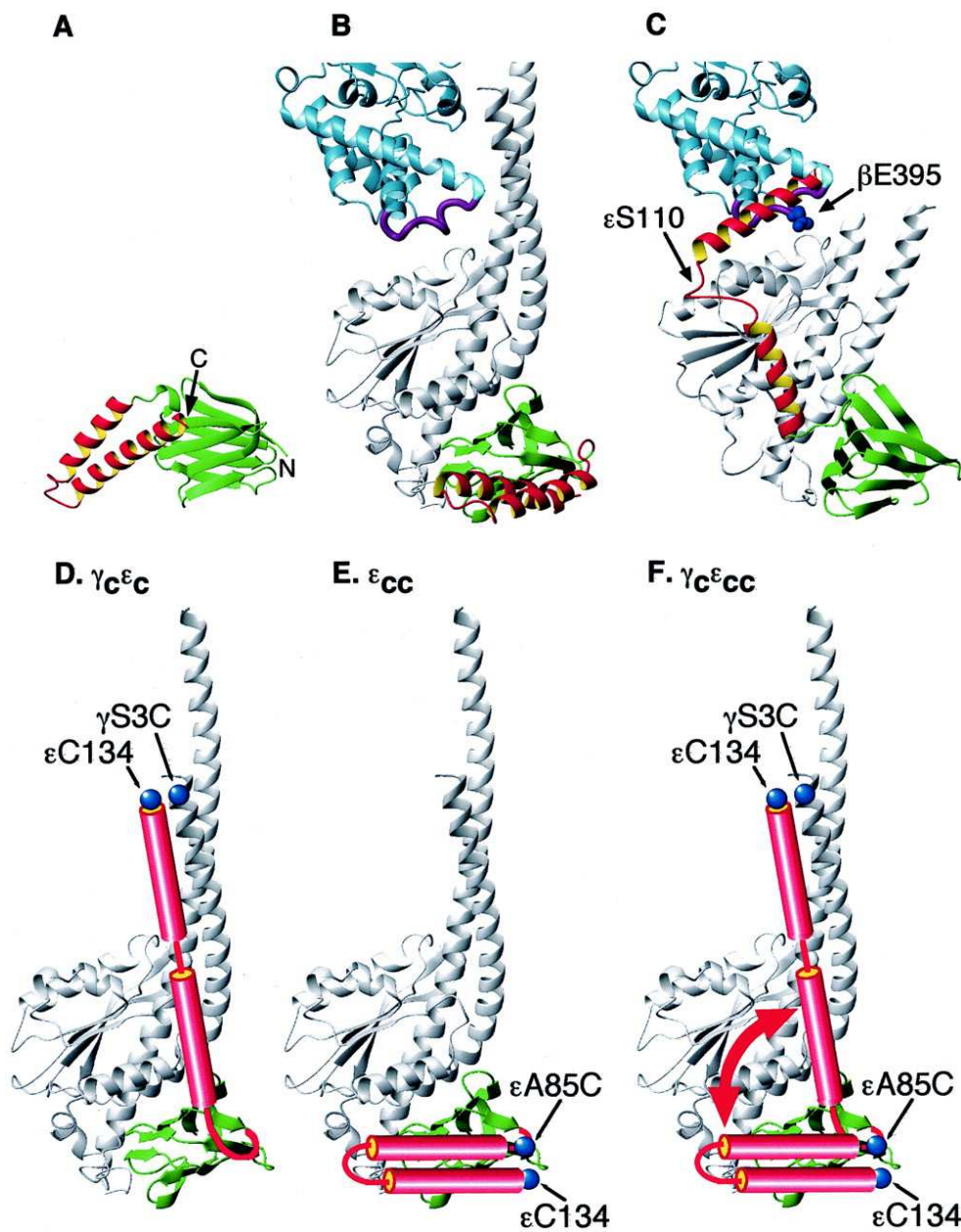


Figura 1.15: Conformazione della subunità ϵ . (A) Struttura della subunità isolata ϵ di *E. coli* (Wilkens 98 JBC). I domini N-terminale e C-terminale sono mostrati in verde e rosso, rispettivamente. (B) struttura della subunità δ (equivalente alla ϵ batterica di F_1) osservata nella F_1 di mitocondrio bovino (Gibbons NSC 2000). Qui sono riportate soltanto le subunità β_{TP} , γ , δ ed ϵ (non equivalente alla subunità batterica in F_1). Un loop che contiene la sequenza DELSEED è stato riportata in viola. (C) Struttura del complesso $\gamma'\epsilon$ di *E. coli* (Rodgers NSB 2000) sovrapposto alla subunità β_{TP} di bovino. Le sfere blu indicano il residuo $\beta E395$ della regione DELSEED (secondo residuo Glu). La distanza tra i $C\alpha$ dei residui βGlu^{381} e ϵSer^{108} è di 24-27Å, troppo grande per un cross-linking. (D-F) Elaborazioni schematiche di cross-link in $\gamma_c\epsilon_c - F_1$ (D), $\epsilon_{cc} - F_1$ (E) e $\gamma_c\epsilon_{cc} - F_1$ (F). Nella posizione *up*, il legame $\epsilon Cys^{134} - \gamma S3C$ è possibile, mentre nella posizione *down* si può formare il legame $\epsilon Cys^{134} - \epsilon A85C$ (suzuki jbc 03).

forza protonmotiva.

1.5 Mutazioni di interesse per il presente lavoro di tesi

1.5.1 Accoppiamento energetico: ruolo della Met23 della subunità γ di *Rb. capsulatus*

La prima parte del mio lavoro ha avuto come oggetto di ricerca la mutazione γ M23K nell'ATP sintasi di *Rb capsulatus*. La subunità γ dell'enzima occupa una posizione centrale tra i siti catalitici nelle subunità β ed il canale protonico nella porzione F_0 ; ciò determina il suo ruolo chiave nell'influenzare l'attività catalitica dell'enzima e nell'accoppiare tale attività alla traslocazione protonica. Particolarmente interessanti risultano gli studi mutagenetici realizzati sulla Met23 in *E. coli* (37). L'analisi di ceppi portanti la mutazione γ Met23 \rightarrow Lys o Arg ha mostrato normali livelli di attività ATPasica e valori molto bassi di pompaggio protonico pur essendo la porzione F_0 normalmente funzionante. Ciò ha portato gli autori a concludere che le mutazioni γ Met23 \rightarrow Lys e γ Met23 \rightarrow Arg sono responsabili di un disaccoppiamento tra ATP idrolisi e pompaggio di H_+ . La mutazione γ Met23 \rightarrow Lys inserita nell'ATPasi di un ceppo fotosintetico come *Rb. capsulatus* consente di esaminare il grado di accoppiamento del mutante traendo vantaggio dalla possibilità di generare un $\Delta\mu_{H^+}$ semplicemente fotoattivando il campione.

1.5.2 Effetti del disaccoppiamento intrinseco sul movimento *up-down* della subunità ϵ , in relazione al movimento rotatorio della subunità γ in *E. coli*

Alla luce dei risultati ottenuti in merito al disaccoppiamento intrinseco, un ulteriore scopo del mio lavoro è consistito nel realizzare mutanti di *E. coli* per osservare il movimento principale verticale up and down della subunità ϵ , in relazione al movimento rotatorio della subunità γ , mediante l'ausilio della tecnica FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfere). Oltre agli studi già illustrati in precedenza recenti lavori basati su cross-linking delle subunità γ ed ϵ hanno portato

alla conclusione che queste due subunità ruotino insieme all'interno del barile $\alpha_3\beta_3$ (46). Esperimenti che hanno coinvolto la singola porzione F_1 hanno dimostrato anch'essi il movimento della subunità ϵ (29). Sono stati quindi realizzati due doppi mutanti $\gamma T106C\epsilon Y114C$ e $\gamma T106C\epsilon H57C$ per poter marcare la proteina con fluorofori da utilizzare per studi di FRET. Perciò è stato necessario inserire le cisteine in posizioni che non alterassero né la rotazione dell'enzima né la conseguente attività enzimatica. Inoltre la posizione finale doveva garantire uno scambio energetico tra donatore e accettore sufficiente a garantire un segnale di FRET. Le cisteine sono state in quanto gruppi reattivi in grado di formare legami carbonio-zolfo con i tioli dei gruppi maleimidici dei fluorofori. Tenendo conto di queste necessità la posizione migliore per la subunità γ è risultata la sostituzione di una T in posizione 106, mentre per la subunità ϵ sono state sostituite la H 57 la Y 114. Per quanto riguarda la posizione 57, questa cisteina è stata posta al termine del barile β per osservare i movimenti della subunità sul piano parallelo alla membrana. La cisteina 114 invece è situata nel loop di collegamento tra le due α eliche e può considerarsi utile a monitorare il movimento verticale del C-terminale in relazione alla subunità γ .

Capitolo 2

Materiali e Metodi

2.1 Profilo genetico di *Rhodobacter capsulatus*

In questo lavoro sono stati utilizzati 3 ceppi di *Rhodobacter capsulatus* già presentati in altri lavori prodotti dal nostro laboratorio le cui caratteristiche verranno brevemente riportate di seguito (tabella 2.1).

La mutazione γ M23K è inserita nel plasmide pRCAT51.23K ed è il frutto di una serie di modifiche apportate al plasmide pTZ18R (5). Da quest'ultimo viene tagliato con *Eco*RI un frammento di 7,6 kb, contenete l'operone F₁ di *Rb. capsulatus* e ligato, mediante la T4 DNA ligasi, al plasmide pRCA50. La mutazione sito specifica in esame viene inserita nel plasmide per mezzo del quickchange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) usando i seguenti nucleotidi per la PCR: 5'-CAAGATCACGAAAGCGAAGCAGATGGTTCGCGG-3' e 5'-GTTCTAGTGCTTTCGCTTCGTCTACCAGCGCC-3'. L'introduzione della mutazione è stata confermata dall'analisi di restrizione effettuata con l'endonucleasi di restrizione *Hpy*-CH4V, che ha prodotto un frammento di 1600 bp nella zona mutata invece di 2 frammenti più piccoli di 900 e 700 bp altrimenti attesi. Il plasmide pRCA50 contenente la mutazione è stato identificato come pRCAT1. L'operone contenuto in pRCAT1 viene così trasferito nel plasmide a largo spettro pRK415[44] contenente la cassetta per la resistenza alla Tetraciclina (Tc). Il nuovo costruito con il nome di pRCA51.23K è introdotto nel ceppo WTB100 per mezzo di una coniugazione triparentale [43,45]. Per mezzo di questa procedura, la copia cromosomica dell'operone F₁ viene deleta e al suo posto inserita la cassetta per la resistenza alla Kanamicina (Kn) per mezzo del Gene Transfer Agent (GTA) e contemporaneamente inserito il

plasmide pRCA51.23K.

Lo pseudo wild type è stato costruito in parallelo al mutante sopra descritto con la stessa procedura. Questo ceppo porta il plasmide pRCA51 (con l'operone F_1) e una cassetta per la resistenza alla Kn al posto della copia cromosomica dell'operone F_1 . Questo ceppo verrà considerato come wild type all'interno di questo lavoro.

Infine il ceppo wild type B100 non porta cassette per la resistenza a nessun antibiotico poichè deriva direttamente dal ceppo wild type B10 modificato per mezzo di fagi. (da completare). Da un punto di vista fisiologico lo pseudo wild type ed il B100 non hanno mostrato differenze significative.

Ceppo	Plasmide	Bp	R _{crom}	R _{plasmide}	Referenze
γ M23K	pRCA51.23K	13336	Kn	Tc	(5)
PsWTB100.51	pRCA51	10862	Kn	Tc	(5)
WTB100	assente	-	-	-	(5)

Tabella 2.1: Caratteristiche genetiche dei ceppi di *Rb. capsulatus*.

2.2 Terreni di crescita per *Rb. capsulatus*

Rb. capsulatus cresce su diverse fonti di carbonio. In questo lavoro è stato scelto il terreno minimo RCV ¹ illustrato in tabella 2.2. Dopo aver preparato il terreno, sterilizzare in autoclave a 120 °C per 20 min e solo in seguito aggiungere gli antibiotici Tc (2 μ g/ml) e Kn (25 μ g/ml). Il ceppo viene cresciuto fotoeterotroficamente illuminando la coltura con due pannelli posti uno di fronte all'altro dotato ciascuno di 7 bulbi luminosi da 100 W ognuno ottenendo così un'intensità luminosa di circa 500 W/m². La temperatura dell'acqua viene mantenuta costantemente a 29 °C con una sistema di ricircolo regolato da due termometri digitali.

La coltura di *Rb. capsulatus* si sviluppa in 4 fasi successive in un arco di 96 h. Ad ogni passaggio la densità ottica (O.D.) è stata misurata con lo spettrofotometro Jasco V-550 a 578 nm e deve essere circa 1,2-1,4. Il rapporto, espresso in volume, tra batteri e terreno fresco è stato mantenuto sempre a $\frac{1}{10}$. Tutte le operazioni di trasferimento si svolgono sotto cappa biologica a flusso laminare e con materiale monouso. Nell'ultimo passaggio, al momento della raccolta, la crescita viene interrotta nella fase tardo esponenziale con un O.D. intorno a 1,8-2,0; le cellule vengono

¹RCV: *Rhodopseudomonas capsulatus* V° formulazione.

(a) Terreno RCV		(b) Elementi in tracce	
Componenti	Volume	Componenti	Quantità
(NH ₄) ₂ SO ₄ 10%	10 ml	MnSO ₄ * H ₂ O	397,5 mg
DL-acido malico 10%	40 ml	H ₃ BO ₃	700 mg
EDTA 1%	2 ml	Cu(NO ₃) ₂ * 3H ₂ O	10 mg
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1 ml	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	60 mg
Elementi in tracce	1 ml	NaNO ₄ * 7H ₂ O	187,5 mg
CaCl ₂ * 2H ₂ O 7,5%	1 ml		
FeSO ₄ * 7H ₂ O	2,4 ml		
Tiamina-HCl	1 ml		
KH ₂ PO ₄ &K ₂ HPO ₄ 10%	15 ml		
H ₂ O bidistillata	a 1 l		

Tabella 2.2: Terreno minimo RCV per *Rb. capsulatus* con volumi indicati per 1 l di soluzione. Gli elementi in tracce riportati nella tabella a fianco si riferiscono a 250 ml di soluzione madre. Per preparare le piastre Petri aggiungere al mezzo l'1% (w/v) di agar-agar.

centrifugate e conservate a -20 °C in attesa della preparazione dei cromatofori (vedi sezione 2.3).

Per conservare la mutazione nel tempo si preparano degli inoculi di colture batteriche in questo modo: partendo da colture batteriche conservate a -80 °C si seminano alcuni tubi di vetro da 20 ml di terreno RCV. Si lasciano crescere alla luce per 24 h a 30 °C. In seguito si piastrano su Petri di RCV o/n a 30 °C. Infine si raccoglie una singola colonia e si espande la coltura sempre in tubi di vetro da 20 ml facendoli crescere in condizioni anossigeniche come descritto in precedenza. Al termine aliquotare la coltura in tubi di plastica aggiungendo glicerolo al 20% e conservare a -80 °C.

2.3 Preparazione dei cromatofori

Le vescicole di cromatofori sono invaginazioni della membrana periplasmatica ricche di complessi fotosintetici. Si ottengono mediante rottura meccanica della parete cellulare producendo un'inversione della membrana cellulare. Di seguito viene illustrato il metodo:

1. Centrifugare la coltura batterica per 25 min a 4 °C a 13500 rpm (rivoluzioni per minuto) con un rotore ad angolo fisso Beckman JA 14. Gettare il supernatante e risospingere il pellet in un buffer di NaGlyGly (50 mM, MgCl₂ mM 2,5 mM a pH 7.4).

2. Ripetere il lavaggio con il buffer NaGlyGly nelle stesse condizioni descritte al punto 1. In caso fosse necessario interrompere la preparazione, congelare le cellule in azoto liquido e conservare a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. In presenza di cellule congelate risospenderle in buffer di NaGlyGly e solo in seguito procedere alla rottura meccanica con la French Press cell (Aminco) a 1000 Kg/cm^2 .
4. Ripetere il passaggio 3 e separare i cromatofori dalle cellule rimaste intere centrifugando il campione a 16000 rpm per 25 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. Per eliminare completamente ogni residuo di parete ed i granuli di riserva, ultracentrifugare il sovranatante per 90 min a 40000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con il rotore ad angolo fisso Ti50.2 Beckman. Al termine si avrà un pellet con due anelli concentrici ben distinti: quello interno di colore bianco è costituito da materiali di riserva (poli-idrossibutirrato); quello esterno di colore scuro contiene i cromatofori la cui colorazione dipende dalla concentrazione delle clorofille contenute in essi. Raccogliere soltanto quest'ultimo pellet avendo cura di non toccare i materiali di scarto e risospendere il campione in buffer di NaGlyGly.

2.3.1 Quantificazione dei cromatofori

La concentrazione totale nei cromatofori, espressa come batterioclorofilla, è stata stimata con il metodo Clayton (12) il quale è utilizzato per l'estrazione delle clorofille. Utilizzando le condizioni di crescita descritte a pagina 26, nei cromatofori il rapporto finale tra ATPasi e battericlorofilla è di circa $\frac{1}{300}$. La procedura per l'estrazione dei pigmenti e la determinazione della loro concentrazione, per mezzo di una curva di taratura, è riportata di seguito:

1. Diluire $20\text{ }\mu\text{l}$ di cromatofori in $480\text{ }\mu\text{l}$ di NaGlyGly (lo stesso riportato a 27) e riporre il campione in ghiaccio. Da questa soluzione prelevare diverse aliquote per avere una batteria di campioni a diversa concentrazione di cromatofori portandoli tutti ad un volume finale 1 ml con una soluzione di acetone/metanolo 7:2.
2. I campioni vengono centrifugati per 10 min a 14000 rpm con una centri-

guga da banco. Al termine raccogliere il soprannatante e determinare la concentrazione della batterioclorofilla misurando l'assorbanza a 772 nm.

3. Creare una retta di calibrazione con i valori di assorbanza di ciascun campione in funzione del volume di cromatofori aggiunto e applicare il valore del coefficiente angolare ottenuto alla formula di Lambert-Beer per ottenere la concentrazione finale di batterioclorofilla come indicato qui sotto:

$$[\text{Bchl}] = \frac{A * fd}{\varepsilon * d} \quad (2.1)$$

dove A è l'assorbanza di ogni campione, fd è il fattore di diluizione, ε è il coefficiente di estinazione molare della batterioclorofilla che misurato a 772 nm vale $75 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ e d è lo spessore della cuvetta con valore 1 cm.

2.4 Misurazione dell'attività catalitica dell'ATPasi

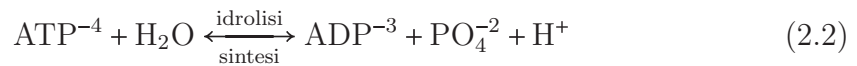
L'ATPasi catalizza la sintesi e l'idrolisi dell'ATP accoppiandola ad un flusso protonico attraverso la membrana plasmatica. Per misurare queste due attività sono state utilizzate tecniche spettrofotometriche per l'idrolisi e la sintesi, mentre per misurare il proton pumping transmembrana accoppiato, sono stati utilizzati probes fluorescenti. La velocità d'idrolisi viene misurata valutando la variazione di pH generata dai protoni scalari, coinvolti nella reazione enzimatica, a mezzo dell'indicatore di pH rosso fenolo. Durante l'idrolisi di ATP, l'enzima accoppia l'idrolisi alla formazione di un gradiente protonico $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. Per misurare i protoni vettoriali, che attraversano la membrana durante l'attività di proton pumping, abbiamo utilizzato diverse sonde fluorescenti della famiglia delle acridine, come l'ACMA e la 9-AA. Queste sonde sono dotate di una carica negativa, e si muovono attraverso la membrana seguendo il gradiente protonico: in caso di idrolisi la molecola lega un protone ed entra nella membrana determinando un calo, o *quenching*, della fluorescenza totale.² Questo è un metodo qualitativo non lineare che necessita di una taratura mediante l'applicazione di equazioni empiriche illustrate a pagina 79.

²Un volta all'interno del cromatoforo la sonda crea dei legami transitori con i lipidi la cui dinamica non è ancora del tutto nota.

2.4.1 Quantificazione dell'attività idrolitica basale

Rosso Fenolo

L'attività idrolitica viene misurata con l'indicatore colorimetrico di pH Rosso Fenolo. Diluire in una cuvetta di vetro cromatofori corrispondenti a $10\ \mu\text{M}$ BChl nel seguente buffer di misura: $0,5\ \text{mM}$ Tricina, $1\ \text{mM}$ MgCl_2 , $25\ \text{mM}$ KCl, $0,2\ \text{mM}$ acido succinico, $100\ \mu\text{M}$ Rosso Fenolo, pH 8,0. Le misurazioni avvengono a $25\ ^\circ\text{C}$. L'attività idrolitica determina la produzione di protoni scalari secondo la formula:



Le variazioni di pH della sospensione prodotte sono monitorate nel tempo calcolando la differenza di assorbanza $\Delta A_{625-587}$, utilizzando lo spettrofotometro Jasco V-550 a doppia lunghezza d'onda. La misura è calibrata dopo 300 s di reazione mediante 3 aggiunte successive di $25\ \mu\text{M}$ HCl (figura 2.1). La variazione finale di pH, registrata nella sospensione, alla fine della reazione non è mai superiore alle 0,3 unità. La variazione di concentrazione protonica viene convertita in variazione di concentrazione di ATP mediante la seguente formula [50]:

$$\frac{\text{mMATP}}{\text{MBChl} * \text{s}} = \frac{\text{mAbs}}{\text{min}} * \frac{1\ \text{min}}{60\ \text{s}} * \frac{25\ \mu\text{MH}^+}{\text{mAbs}} * \frac{\mu\text{MATP}}{0,94\ \mu\text{MH}^+} * \frac{1}{10\ \mu\text{MBChl}} \quad (2.3)$$

dove mAbs/min è il coefficiente angolare della regione lineare della traccia originale, $25\ \mu\text{MH}^+/\text{mAbs}$ è il valore di assorbanza registrato in seguito all'aggiunta di $25\ \mu\text{MH}^+$, $\mu\text{MATP}/0,94\ \mu\text{MH}^+$ sono le moli di H^+ rilasciate durante l'idrolisi enzimatica.

Il Rosso Fenolo è utilizzato anche per l'attività di sintesi. In tal caso la cuvetta è illuminata dall'alto per mezzo di una guida d'onda proveniente da una sorgente costituita da una lampada al quarzo-tungsteno da 250 W, la cui luce è filtrata da un filtro colorato con un cut-on a 780 nm. Il buffer di misura è lo stesso riportato per l'idrolisi e al posto dell'ATP viene aggiunto, al momento della misurazione, ADP $200\ \mu\text{M}$. Il valore della differenza di assorbanza $\Delta A_{625-587}$ in questo caso diminuisce (cresce il pH), mentre la calibrazione dell'attività enzimatica e la determinazione della velocità di sintesi vengono effettuate come riportato sopra.

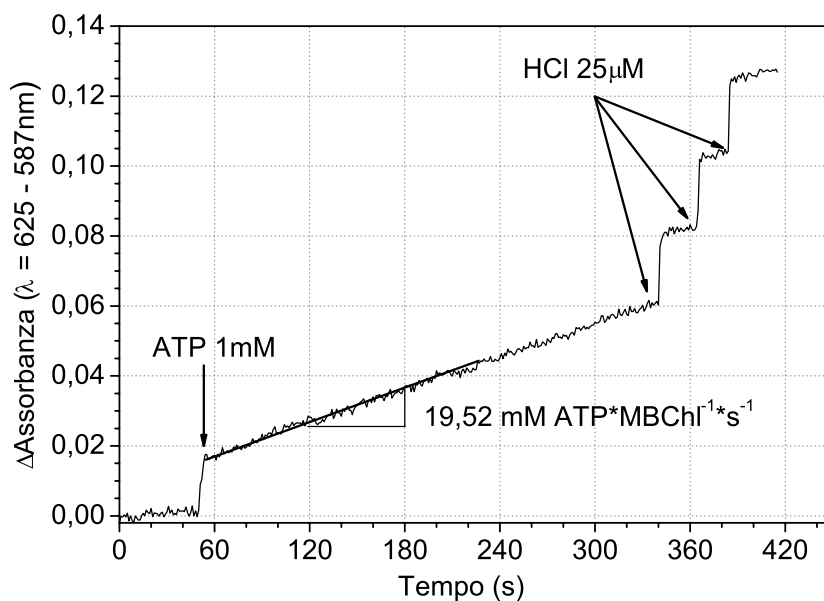


Figura 2.1: Attività idrolitica monitorata per mezzo del Rosso Fenolo in *Rb. capsulatus* WT. Le variazioni di pH della sospensione sono monitorate nel tempo calcolando la differenza di assorbanza misurata a 625 e a 587 nM. La misura è calibrata dopo 300 s di reazione mediante 3 aggiunte successive di 25 μ M HCl.

Quantificazione dell'attività idrolitica mediante il sistema accoppiato PK-LDH

Un sistema per misurare l'attività idrolitica mantenendo costante la concentrazione del prodotto ADP è il sistema di enzimi Piruvato Kinasi-Lattico Deidrogenasi (PK-LDH). In seguito all'attività idrolitica dell'ATPasi, la PK converte l'ADP prodotto in ATP defosforilando il FosfoEnolPiruvato (PEP) in piruvato. Contemporaneamente l'enzima LDH riduce quest'ultimo a L-lattato ossidando il coenzima NADH a NAD⁺. L'ossidazione di una mole di NADH è equivalente alla produzione di una mole di ADP da parte dell'ATPasi (figura 2.2). La variazione di assorbanza collegata all'ossidazione del NADH è misurata a 340 nm con lo spettrofotometro Jasco FP-550 impostato in singola lunghezza d'onda.

In una cuvetta di vetro è stata risospesa una sospensione di cromatofori 20 μ M BChl nel seguente buffer : 10 mM tricina, 2 mM PEP, 25 U/ml LDH, 2,5 mM KCN, 1 mM Pi, 5 μ M antimicina e 10 U/mlPK. In questo lavoro è stata misurata l'attività dell'ATPasi in presenza di PK ad una concentrazione variabile compresa tra 0,1 e 128 U/ml e di LDH fino a 50 U/ml. La velocità idrolitica in presenza della trappola per l'ADP è lineare come mostrato in figura 2.2. Per convertire la variazione di

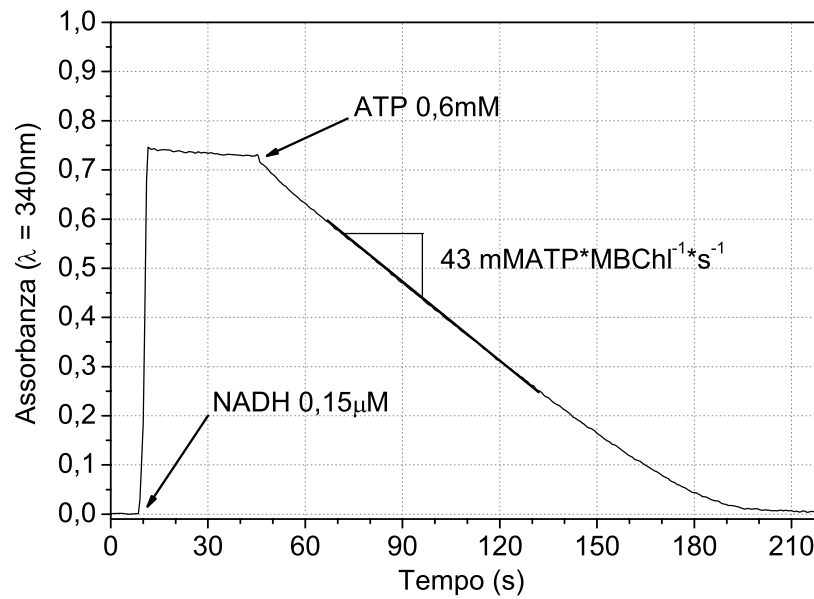


Figura 2.2: Sistema accoppiato PK-LDH per la rigenerazione del ATP idrolizzato dall'attività catalitica dell'ATP di *Rb. capsulatus*. Una sospensione di cromatofori viene risospesa nel buffer riportato nel testo. Al momento della registrazione, viene aggiunto NADH $0,15 \mu\text{M}$ e dopo la stabilizzazione del segnale l'idrolisi è innescata da ATP $0,6 \text{ mM}$. La velocità media è stata calcolata nella parte lineare della traccia in modo da non comprendere le prime ed ultime fasi dell'ossidazione del coenzima NADH.

Componenti	<i>E.coli</i>	<i>Rb. capsulatus</i>
Tris-HCl pH 8	100 mM	-
Tricina	-	10 mM
pH	8	8
KCl	25 mM	25 mM
MgCl ₂	4mM mM	1 mM
Antimicina	-	$5 \mu\text{M}$
Acido succinico	-	0,2 mM
KCN	-	2,5 mM
ATP	2 mM	0,6 mM
P _i	-	1 mM
PEP	2,5 mM	2 mM
NADH	0,4 mM	0,6 mM
LDH	16 U/ml*	25 U/ml
PK	18 U/ml**	0-30 U/ml

Tabella 2.3: Componenti per il saggio dell'attività idrolitica in *E. coli* e in *Rb. capsulatus*. *: 850 U/mg a 37°C. **: 599 U/mg a 37°C.

assorbanza del NADH in concentrazioni di ADP prodotto si applica la seguente formula:

$$V = \frac{m(A * s^{-1})}{\epsilon_{\text{NADH}}(mM^{-1} * A * cm^{-1}) * 1 \text{ cm}} * \frac{1}{20 \mu\text{MBChl}} \quad (2.4)$$

dove m è il coefficiente angolare relativo all'ossidazione del NADH calcolato dalla traccia originale e ϵ_{NADH} è il coefficiente di estinzione molare del coenzima misurato a 340 nm corrispondente a $6,22mM^{-1} * cm^{-1}$. Assunta infine l'equivalenza tra NADH ossidato e ATP idrolizzato si può esprimere la velocità idrolitica come $mMATP * BChl^{-1} * s^{-1}$.

Durante la purificazione dell'ATPasi di *E. coli* è stato necessario quantificare l'attività idrolitica dell'enzima. In questo caso è stato utilizzato il kit descritto nella tabella 2.3. Il procedimento è leggermente diverso da quello precedentemente descritto poiché viene aggiunto il campione in presenza di ATP. In questo modo non si registrano i primi istanti della velocità idrolitica dell'attività, ma solo quella media. Questo perché è sufficiente soltanto saggiare l'efficienza catalitica in termini qualitativi e non quantitativi.

2.4.2 Quantificazione del flusso protonico transmembrana

Come descritto in precedenza l'acridina, dotata di carica negativa, attraversa la membrana plasmatica in funzione dell'entità del gradiente protonico presente valutando il ΔpH accoppiato all'attività catalitica dell'ATPasi. La variazione del *quenching* è stata misurata con uno spettrofluorimetro Jasco FP-500 impostando la lunghezza d'onda d'eccitazione del fluoroforo a 412 nm e quella d'emissione a 480 nm.

Le misurazioni sono state effettuate a 25 °C e i cromatofori sono stati risospesi in una cuvetta al quarzo con il seguente buffer di misura: 1 mM Tricina, 50 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 1 mM P_i , 0,2 mM acido succinico e portato a pH 8,0 con HaOH. Gli effetti attinici dovuti alla luce di misura sono stati eliminati aggiungendo l'inibitore della catena respiratoria antimicina 5 μM e schermato il fascio con un filtro da 0,6 O.D. (Ealing no. 35-5818).

La cuvetta è stata incubata al buio per 10 min, si apre lo shutter (A) posto tra il campione e la sorgente della luce di misura, per registrare l'effetto di scattering delle membrane, e solo in seguito viene aggiunto ACMA 0,75 μM (figura 2.3). Una volta

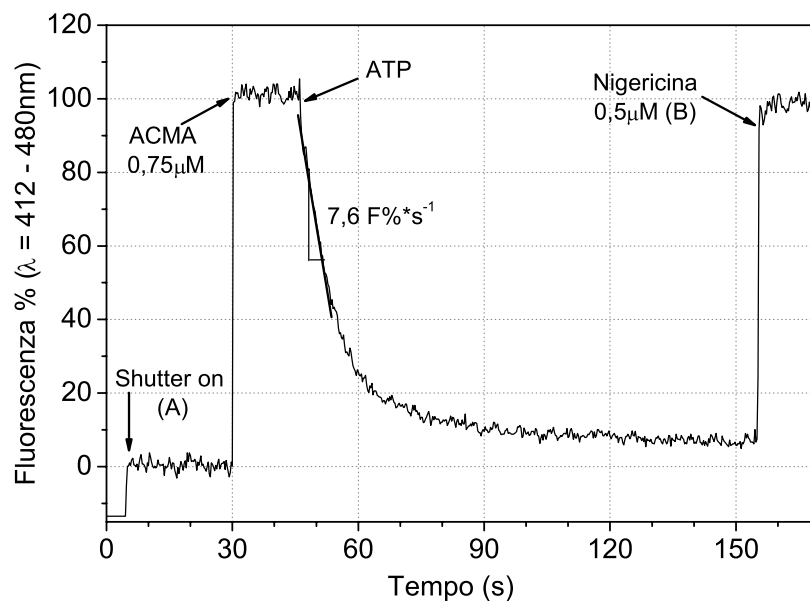


Figura 2.3: Quantificazione del Proton Pumping indotto da idrolisi in *Rb. capsulatus* WT per mezzo di sonde fluorescenti. (A): scattering della luce di misura ottenuto in seguito all'illuminazione del campione. Aggiungendo ATP 0,6 mM si genera il *quenching* di fluorescenza della sonda utilizzata (ACMA o 9-AA, vedi testo). (B): allo stato stazionario viene aggiunta nigericina 0,5 μ M per dissipare il gradiente protonico per determinare il valore massimo di fluorescenza.

stabilizzatosi il segnale di fluorescenza la reazione idrolitica è innescata con ATP 0,6 mM. Al termine in condizioni di stato stazionario il gradiente protonico viene dissipato aggiungendo nigericina 0,5 μ M (B). Questo serve per determinare il valore massimo di fluorescenza ottenibile escludendo artefatti prodotti dall'associazione tra ATP e sonda (*quenching* aspecifico) e come verifica della relazione tra *quenching* e Δ pH prodotto.

Per convertire il *quenching* di fluorescenza in valori percentuali (F%) viene utilizzata la seguente formula:

$$F(\%) = \frac{F - F_A}{F_B - F_A} * 100 \quad (2.5)$$

dove (F) è il segnale di fluorescenza in un dato momento, F_A indica il valore minimo (inteso come scattering generato dalle membrane in risposta alla luce di misura) e F_B come il valore massimo di fluorescenza ottenibile in presenza di nigericina. Questa formula è applicabile a tracce generate in seguito ad attività di idrolisi. Inoltre il protocollo ed il procedimento descritto è applicabile anche

alla 9-AA utilizzata in diversi esperimenti (vedi capitolo Risultati). Nel caso della 9-AA è necessario raddoppiare la concentrazione di cromatofori da utilizzare in quanto questa sonda restituisce un segnale più basso dell'ACMA, risultando però più facilmente calibrabile come descritto a pagina 79 dei risultati.

2.5 Profilo genetico di *Escherichia coli*

In questa parte sono illustrate le tecniche e le condizioni sviluppate nel laboratorio di Friburgo per preparare il doppio mutante in cisteine da utilizzare per misure di FRET (tabella 2.4).

Plasmide	Mutazione	Resistenza	Bp	Note
pRA100 WT	-	Cm	12668	
pRA114	γ T106C	Cm	12668	(2)
pRAP101	ϵ Y114C	Cm	12668	(2)
pRAP100	ϵ H57C	Cm	12668	(2)
pREB1A	γ T106C – ϵ Y114C	Cm	12668	(2)
pREB2A	γ T106C – ϵ H57C	Cm	12668	
pET-16b	ϵ H57C	Amp	5711	Novagen

Tabella 2.4: Plasmidi utilizzati per i ceppi di *E. coli* impiegati in misure di FRET.

I ceppi di *E. coli* hanno tutti un plasmide derivato dal tipo pRA100 che contiene l'intero operone *atp1* ed è selezionabile per la Cm. Da ciò si è partiti per inserire le mutazioni puntiformi in γ ed ϵ . Il plasmide pRA114 porta la mutazione γ T106C, mentre il pRAP101 e pRAP100 contengono rispettivamente le variazioni in ϵ Y114C e ϵ H57C come indicato nella tabella 2.4. Di seguito verrà illustrato il protocollo di digestione del plasmide per l'inserzione della mutazione puntiforme disegnata.

Protocollo di digestione del plasmide

I plasmidi pRA114, pRAP101 e pRAP100 sono stati digeriti con gli enzimi SacI e XhoI. Il primo taglia nella subunità β , mentre il secondo taglia nella prima parte della subunità α determinando un pattern di due frammenti dove il più corto contiene la subunità γ . E' stato preso un campione di quest'ultimo dalla digestione di pRA114 portante la mutazione γ T106C ed inserito in una preparazione complementare ottenuta dalla digestione dei plasmidi pRAP101 e pRAP100 con gli stessi enzimi. E' stato legato il frammento contenente la subunità γ con la ligasi

T4 ai due plasmidi appena trattati ottenendo la doppia mutazione. I plasmidi in seguito a questo trattamento sono stati identificati come pREB1A con la doppia mutazione γ T106C – ϵ Y114C e pREB2A recante le mutazioni in γ T106C – ϵ H57C. I plasmidi, infine, sono stati conservati a -80°C mentre gli enzimi per la digestione a -30°C . Di seguito si riporta il protocollo utilizzato:

1. Prendere $20\ \mu\text{l}$ di plasmide e metterlo in una eppendorf con $34\ \mu\text{l}$ di H_2O bidistillata autoclavata e $6\ \mu\text{l}$ di BSA.
2. Aggiungere alla soluzione $0,8\ \mu\text{l}$ di SacI e incubare o/n a 37°C .
3. Aggiungere $0,8\ \mu\text{l}$ di XhoI e incubare la soluzione a 37°C per 1 h.
4. Preparare un gel all'1% di agarosio. Lasciare la soluzione in microonde fino a che le particelle di agar non si siano dissolte e lasciare raffreddare per 5 min fino a raggiungere la temperatura di circa 60°C . Versare la soluzione nel letto di corsa e lasciare riposare per 30 min e una volta solidificato aggiungere il running buffer TBE 1x.
5. Per ogni campione mettere in una eppendorf $5\ \mu\text{l}$ di campione e $1\ \mu\text{l}$ di etidio bromuro. Il marker utilizzato è SM0403 (Fermentas). Caricare pRA114 (γ T106C), pRAP101 (ϵ Y114C), pRAP100 (ϵ H57C) e far correre il gel per 1 h a 86 V.
6. Con una fotocamera a fluorescenza verificare l'avvenuta digestione. Si osservano due bande: una più lunga di 9894 bp e un'altra più corta di 2774 bp, nella quale sono contenute sia la subunità γ che la α . Dal gel ritagliare la banda di 2774 bp del campione pRA114 e quelle di 9894 bp dagli altri due campioni e metterle ciascuna in un eppendorf.
7. Eliminare i residui di agarosio dal DNA ritagliato mediante il QIAGEN kit.
8. Determinare la concentrazione finale del campione misurando il valore di assorbanza A_1 a 260 nm. ³
9. Conservare i campioni di DNA estratti a -30°C .

³A 260 nm $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ di DNA misurano 1A e $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ a loro volta sono pari a 0,15 mM.

Protocollo di ligazione con T4-DNA ligasi

La T4-DNA ligasi permette di chiudere ad anello il DNA tagliato in precedenza. Di seguito viene riportato il protocollo:

1. Preparare due differenti soluzioni di DNA: in una eppendorf mettere in rapporto 1:1 il segmento 2774 bp del plasmide pRA114 ed il suo complementare del plasmide pRAP101. Ripetere l'operazione con il plasmide pRAP100.
2. In una eppendorf conservata in ghiaccio mettere 1 μ l di T4-ligasi, 10 μ l della soluzione di DNA preparata al punto 1, portare a volume di 30 μ l H₂O bidistillata ed incubare a 16 °C o/n.
3. Per interrompere il processo enzimatico trasferire il campione in un bagno d'acqua a 65 °C per 10 min.

Inserzione sito diretta di una mutazione puntiforme in *E. coli*

Per purificare la subunità ϵ della ATPasi F₀F₁ si è partiti dal ceppo di *E. coli* ϵ H57C contenente la singola mutazione. Il mutante contiene il plasmide pET-16b disegnato per ottenere una sovra produzione di proteina per la purificazione. Possiede infatti il promotore T7, necessario per ottenere un elevato numero di copie del trascritto e una sequenza di 6 His (His-Tag) poste all'N-terminale del gene della subunità ϵ , necessario per il recupero finale del prodotto proteico in una colonna a scambio ionico Ni-NTA. Le altre caratteristiche sono riportate in tabella 2.5.

pET-16b	bp
T7 Promotore	466-482
T7 inizio trascrizione	465
His*TAG	360-389
MCS (<i>NdeI</i> - <i>BamH I</i>)	319-335
T7 fine trascrizione	1213-259
lacI	869-1948
Origine pBR322	3885
<i>bla</i>	4646-5503

Tabella 2.5: Caratteristiche del plasmide pET-16b (5711 bp) utilizzato per la sintesi della subunità ϵ H57C.

Per inserire la cisteina ϵ H57C sono stati utilizzati due primer per PCR portanti la mutazione puntiforme: il primer *forward* disegnato per il filamento 5' – 3' ed

il *revers* per il filamento 3'–5' complementare. Questi primers inoltre hanno un elevato grado di affinità e di annealing con le regioni plasmidiche fiancheggianti la mutazione. Per la repliazione del plasmide è stata usata la polimerasi ad alta fedeltà PfuUltra limitando al massimo le inserzioni sito specifiche. Al termine della replicazione il DNA parentale è stato trattato con *dpnI*, il quale taglia tutti i filamenti emimetilati e metilati. Questo passaggio permette di eliminare tutte le copie parentali, senza mutazione e completamente metilate, ma anche quelle emimetilate in cui è presente un filamento originale ed uno portante la singola mutazione.

Di seguito viene illustrato il protocollo per l'inserzione della singola mutazione e la fase di amplificazione mediante PCR:

1. Preparare i campioni lavorando in una cabina a flusso laminare sterile con i componenti elencati in tabella 2.6. Preparare anche un controllo negativo senza aggiungere la DNA polimerasi.
2. Impostare la PCR con il programma riportato in tabella 2.6.
3. Alla fine dei cicli di PCR aggiungere in ogni campione 0,6 μl di *DpnI* (10 U/ μl). Incubare a 37 °C agitando per 1 h.
4. Prima e dopo il trattamento con *DpnI* prelevare un'aliquota di 3 μl da ogni campione per l'analisi elettroforetica.
5. Alla fine del ciclo prelevare 5–10 μl di campione per trasformare le cellule competenti XLI Blue di *E. coli* seguendo il protocollo illustrato a pagina 39.

(a) Elementi PCR			(b) Cicli PCR		
Elementi PCR	Concentrazione	Volume	Fase	T	Tempo
Plasmide	60 ng/ μl	1,2 μl	1	98 °C	25 s
Miscela dNTP	2 nmoli/ μl	3 μl	2	98 °C	25 s
Primer FW	20 pmoli/ μl	0,6 μl	3	56 °C	30 s
Primer RW	20 pmoli/ μl	0,6 μl	4	72 °C	45 s/kb
Buffer Phusion	5x	4 μl	5	4 °C	Costante
H ₂ O milliQ	100%	a 20 μl			
Polimerasi Phusion	1 U/ μl	0,4 μl			

Tabella 2.6: PCR: elementi e cicli per l'inserzione sito specifica della mutazione ϵH57C nel vettore pET-16b.

Le fasi 2, 3 e 4 vengono ripetute 16 volte.

Trasformazione delle cellule competenti

Per verificare l'inserzione e l'avvenuta ligazione nel plasmide, si è proceduto alla trasformazione delle cellule competenti di *E. coli*⁴ con i plasmidi pREB1A, PREB2A, pRA100, pRA101 e pRA114. L'inserzione è stata testata su differenti ceppi di cellule competenti per verificare quale fosse quella più idonea e come controllo negativo le cellule sono state cresciute in presenza di Cm ma senza il plasmide (tabella 2.7).

n°	Ceppo	Plasmide	Antibiotici	Crescita
1	XLI Gold	pREB1A	Cm	Positivo
2	XLI Gold	pREB2A	Cm	Positivo
3	XLI Gold	pRA100	Cm	Positivo
4	XLI Gold	pRA101	Cm	Positivo
5	XLI Gold	-	Cm	Negativo
6	XLI Gold	pRA114	Cm	Positivo
7	XLI Blue	pRA114	Cm	Positivo
8	XLI Blue	-	Cm	Negativo
9	Nova Blue	pRA114	Cm	Positivo
10	Nova Blue	-	Cm	Negativo
11	RAI	pRA114	Cm	Positivo
12	RAI	-	Cm	Negativo
A	XLI Gold	-	Tet/Km	Positivo
B	XLI Gold	-	Tet/Km/Cm	Negativo
C	XLI Blue	-	Tet	Positivo
D	XLI Blue	-	Km	Negativo
E	RAI	-	Tet/Km	Positivo
F	RAI	-	Tet/Km/Cm	Negativo

Tabella 2.7: Piano di trasformazione con ceppi di cellule competenti di *E. coli* per verificare l'inserzione delle mutazioni contenute nei plasmidi pREB1A, PREB2A, pRA100, pRA101 e pRA114. Tutti i plasmidi contengono la resistenza per il Cm e tutti i ceppi sono stati cresciuti in presenza degli antibiotici riportati. La condizione di crescita finale (positiva o negativa) è rappresentata dalla presenza di colonie nelle piastre Petri.

Di seguito si riporta il protocollo utilizzato:

1. Mettere in una eppendorf contenuta in ghiaccio 60 μ l di cellule competenti e 160 ng di plasmide (o lo stesso volume di acqua bidistillata nei controlli negativi) seguendo lo schema riportato in tabella 2.7 e incubare per 30 min.
2. Per favorire l'inserimento del plasmide nella cellula procedere con l'heat

⁴Per il protocollo di crescita delle cellule competenti vedere pagina 43.

shock: metter il campione in una bagno d'acqua esattamente a 42°C per 90s e subito dopo lasciare 2 min in ghiaccio.

3. Mettere in ogni eppendorf 600 μ l di terreno LB ed incubare per 1 h a 37°C.
4. Per ogni campione piastrare 200 μ l in una piastra Petri, precedentemente preparate con gli antibiotici riportati in tabella 2.7, ed incubare per 37°C o/n.

Ceppo	Genotipo	Resistenza	Caratteristiche	Note
XLI	<i>endA1 gyrA96(nal^R)</i>		Origine colonie	stratagene
Blue	<i>thi-1 recA1 relA1</i> <i>lac glnV44</i> <i>F'[:Tn10 proAB⁺</i> <i>lac^IΔ(lacZ)M15]</i> <i>hsdR17(r_k⁻m_k⁺)</i>	Tet	DNA Plasmidico Alto livello di trasformazione Adatto per grandi plasmidi Bassa espressione basale	
BL21 (DE3)	<i>F⁻, dcm, ompT,</i> <i>hsdS_B(r_B⁻m_B⁺),</i> <i>gal, λ(DE3)</i>	-	Alta espressione con i promotori T5 e T7 Bassa efficienza di trasformazione	stratagene
Nova	<i>endA1 hsdR17(rK12⁻)</i>		Alta espressione con i promotori T5 e T7	Novagen
Blue (DE3)	<i>mK12⁺ supE44 thi-1</i> <i>RecA1 gyrA96 relA1</i> <i>lac tonA F'[proA⁺B⁺</i> <i>lacI qZΔM15::Tn10](TetR)</i>	Tet	Bassa efficienza di trasformazione Crescita lenta	
RAI	<i>F⁻, thi1, rpsL,</i> <i>1100Δ(atpB - C), Δb0,</i> <i>Δcyo::kan ilv::Tn::10</i>	Tet Km	Espressione dell'ATPasi di E. coli Moderata efficienza di trasformazione	Invitrogen

Tabella 2.8: Caratteristiche genetiche dei ceppi competenti di E. coli impiegati per la trasformazione del doppi mutanti pREB1A e pREB2A.

La presenza di colonie negli esperimenti 1, 2, 3, 4 e 6 e la contemporanea assenza nel campione n°5 conferma che il processo di inserzione, nei ceppi con una (pRA100 e pRA101) due mutazioni (pREB1A e PREB2A), ha avuto successo. Un ulteriore conferma è l'assenza di colonie nel controllo (5). I campioni dal 7 al 12 mostrano la capacità di trasformazione del plasmide testato su diversi ceppi. I risultati ⁵ confermano che il ceppo XLI Gold ha una efficienza di trasformazione più alta sia di XLI Blue sia di RAI. Infine le piastre A, C ed E sono dei controlli per verificare le cassette per le resistenze contenute nei ceppi, mentre B, D ed F, confermano l'assenza delle resistenze per il Cm e la Km nei ceppi testati.

⁵Le immagini delle piastre (dati non riportati) mostrano una significativa differenza tra il numero di colonie presenti per ogni ceppo.

2.6 Terreni e metodi per la crescita di E. coli

I ceppi γ T106C- ϵ H57C e γ T106C- ϵ Y114C sono stati disegnati per produrre la proteina ATPasi in larghe quantità. Per questo motivo i ceppi sono stati cresciuti preparando una coltura finale di 30 l utilizzando il fermentatore in condizioni aerobiche e articolando la crescita in tre fasi intermedie sul terreno LB-Luria ⁶ (tabella 2.9).

Elementi	LB-Luria	2YT
Estratto di lievito (w/v)	1%	0,5%
Tryptone (w/v)	1%	1,6%
NaCl (w/v)	0,5%	0,5%

Tabella 2.9: Terreni LB-Luria e 2YT per precolture di E. coli. Per la preparazione delle piastre Petri aggiungere agar-agar all'1% (w/v).

Sono stati prelevati gli starter dei ceppi pREB1A e pREB2A, conservati in glicerolo al 15% a -80°C , e piastrati su Petri con terreno LB-Luria ed incubate o/n a 37°C . I ceppi pREB1a e pREB2a sono selezionati per la Tetraciclina (Tc), Kanamicina (Km) e Cloramfenicolo (Cm). In seguito è stata raccolta una singola colonia ed inoculata in un tubo di vetro contenente 10 ml di terreno LB-Luria. Sono stati aggiunti $30\ \mu\text{g/ml}$ di Km e di Cm ⁷, $12,5\ \mu\text{g/ml}$ di Tc ⁸ ed incubati per 7 h a 37°C facendo crescere la coltura in presenza di ossigeno.

Per l'ultimo preinoculo è stato utilizzato il terreno che verrà usato per la crescita con il fermentatore (tabella 2.10). Per questo motivo è stato preparato un terreno unico da 30 l. Sono stati aggiunti i componenti indicati nella tabella 2.9(a) e riempito il fermentatore con 30 l di H_2O bidistillata. A questo punto è stato rilevato un volume di 2 l e diviso in due beute da 2 l. In seguito è stato autoclavato il terreno delle due beute per 20 min a 120°C e una volta raggiunta la temperatura di 60°C sono stati aggiunti Km e Cm $30\ \mu\text{g/ml}$, Tc $12,5\ \mu\text{g/ml}$, 15 ml di glucosio, 1 ml di

⁶Lysogeny broth (LB), terreno ricco di nutrienti utilizzato principalmente per la crescita batterica. E' anche conosciuto come Luria broth o Luria-Bertani broth. Esistono tre formulazioni che generalmente differiscono nella concentrazione di NaCl, in modo da scegliere le condizioni osmotiche più adatte per il ceppo utilizzato. Le formulazioni a bassa concentrazione di sale, Lennox e Luria, sono quelle più indicate per le colture che richiedono antibiotici sensibili ai sali (fonte: Wikipedia).

⁷Il Cm è presente in ogni passaggio per conservare il plasmide ad ogni generazione.

⁸La Tc viene usata soltanto nelle precolture e non in quella finale in quanto sono stati riscontrati lag di crescita riconducibili a questo specifico antibiotico.

MgSO₄, e 2 ml di aminoacidi essenziali. Infine si è inoculato ogni beuta con 10 ml di precoltura batterica e lasciato incubare o/n a 37 °C.

(a) Terreno per il fermentatore		(b) Componenti da aggiungere al terreno autoclavato	
Componenti	Quantità	Componenti	Quantità
KH ₂ PO ₄	380,8 gr	Aminoacidi essenziali	56 ml
KOH	112 gr	MgSO ₄	28 ml
Tryptone	28 gr	Glucosio	420 ml
Estratto di lievito	14 gr	Cloramfenicolo	30 µg/ml
NaCl	28 gr	Tetraciclina	12,5 µg/ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	56 gr	Coltura batterica	21
Uracile	1,26 gr		
Elementi in tracce	28 ml		

(c) Elementi in tracce		(d) Aminoacidi essenziali	
Elementi in tracce	Quantità	Aminoacidi essenziali	Quantità
ZnCl ₂	15 mM	Arginina	250 mM
MnCl ₂ * 2H ₂ O	1 mM	Isoleucina	250 mM
H ₃ BO ₃	50 mM	Valina	350 mM
CaCl ₂ * 2H ₂ O	2,5 g/l	Thiamina	500 mg/l
CoCl ₂ * 6H ₂ O	1 mM	DHB	40 mM
FeCl ₂ * 2H ₂ O	3 mM		

Tabella 2.10: Terreno per colture di E. coli in fermentatore. (a): Elementi da aggiungere prima di autoclavare il terreno. (b): elementi termolabili o che possono precipitare, aggiungerli solo dopo la sterilizzazione. (c): composizione degli elementi in tracce. (d): elenco degli aminoacidi essenziali. Durante la preparazione della miscela sciogliere le polveri in una soluzione di NaOH 1 M precedentemente preparata per evitare la denaturazione degli aminoacidi. DHB: Ethyl-3,4-dihydroxybenzoate.

Il terreno contenuto nel fermentatore (28 l) è stato autoclavato per 20 min a 120 °C. Al termine sono stati aggiunti: 3 ml di Antifoam per prevenire la formazione di schiuma durante la crescita batterica, gli elementi riportati nella tabella 2.9(b), 28 ml di Cm e la coltura batterica contenuta nelle due beute. La crescita è avvenuta a 37 °C in presenza di un flusso d'aria costante mantenendo la pressione in entrata a 1,4 bar, quella interna a 1,2 bar ed agitando la coltura a 380 rpm. La crescita è stata interrotta quando la densità ottica (O.D.) ha raggiunto i valori di 1.4-1.6 (normalmente dopo 4 o 6 h). Infine sono stati raccolti i batteri e si è proceduto alla preparazione dei cromatofori come illustrato a pagina 45.

Il fermentatore NLF Il fermentatore utilizzato è il modello NLF Laboratory Fermenter della Bioengineering (figura 2.4) e consente la crescita di colture in con-

dizioni aerobie ed anaerobie. Per sterilizzare il terreno contenuto nella macchina è stato collegato un tubo che unisce la camicia esterna del fermentatore direttamente all'autoclave. Per procedere alla sterilizzazione della camera interna, riempire la macchina con 30l di acqua distillata, aprire il circuito dell'acqua collegato all'autoclave e sterilizzare per 20 min a 120 °C. Durante il ciclo aprire per pochi secondi la valvola di sicurezza e per alcuni minuti il filtro dell'aria in modo da sterilizzare tutti i componenti che collegano la parte interna del fermentatore con l'esterno.



Figura 2.4: Immagine del fermentatore utilizzato per la crescita di E. coli.

Il fermentatore è collegato anche con un compressore per mezzo di un collettore posto alla base della macchina. L'aria insufflata nella camera interna è regolata da due valvole: la prima apre e chiude il circuito dell'aria collegato al compressore; la seconda è una valvola di sfogo per la regolazione della pressione interna.

Terreni e metodi per la crescita delle cellule competenti

La preparazione delle cellule competenti per la trasformazione dei ceppi PREB1A e PREB2A di E. coli, necessita di particolari condizioni di sterilità. Per aumentare la capacità di assunzione del DNA esogeno, le cellule competenti vengono trattate in modo da aumentare i leak di membrana, ma questo incrementa anche le probabilità

di contaminazioni non controllate. Prima di procedere sterilizzare con alcol tutte le superfici e le attrezzature da utilizzare per la trasformazione, usare soltanto materiale monouso ed operare all'interno di una cabina a flusso laminare.

(a) Terreni SOB e NZY			(b) Elementi termolabili		
Elementi (w/v)	SOB	NZY ⁺	Elementi (mM)	SOB	NZY ⁺
Estratto di lievito	0,5%	0,5%	MgCl ₂	10	12,5
Triptone	2%	-	MgSO ₄ * 7H ₂ O	10	12,5
Caseina	-	1%	Glucosio	10	10
NaCl	0,06%	0,5%			
KCl (mM)	2,5	-			

Tabella 2.11: Terreni SOB e NZY⁺ per lo sviluppo dei ceppi competenti. (a): componenti da aggiungere per la preparazione del terreno. (b): elementi termolabili o che possono produrre precipitati: aggiungerli in seguito alla sterilizzazione del terreno. Il terreno NZY⁺ può essere utilizzato al posto del terreno LB-Luria (vedi tabella 2.9) solo all'interno di protocolli per la trasformazione batterica.

Il protocollo da noi adottato deriva dal protocollo di Hanahan normalmente utilizzato per la trasformazione della cellule competenti di *E. coli*. Per gli scopi di questa tesi sono stati utilizzati i ceppi RAI per la trasformazione con i plasmidi pREB1A e PREB2A ed il ceppo BL21 per la trasformazione con i plasmidi derivanti da pET16b. Il protocollo adottato per il ceppo RAI viene riportato di seguito, mentre i buffer ed i terreni impiegati sono descritti nella tabella 2.11:

1. Con un'ansa sterile seminare delle piastre Petri di terreno LB-Luria con cellule del ceppo RAI, prelevate dagli starter conservati a -80 °C, ed incubare a 37 °C o/n.
2. Seminare con una singola colonia un tubo di vetro contenente 10 ml di terreno LB-Luria, crescere in presenza di ossigeno a 37 °C o/n in agitazione a 120 rpm.
3. Prendere una beuta da 2l, riempirla con 200 ml di terreno SOB e sterilizzare a 120 °C per 20 min; in seguito aggiungere MgCl₂ 5 mM e MgSO₄ 5 mM. inoculare in ogni beuta 2,5 ml di precoltura. Crescere a 37 °C fino a raggiungere l'O.D. di 0,5.
4. Raccogliere le cellule utilizzando due falcon da 50 ml precedentemente raffreddate; centrifugarle per 10 min a 5000 rpm a 4 °C con rotore 3360 Megafuge 1.0R Heraeus.

5. Gettare il sovrantante avendo cura di non danneggiare il pellet. Da questo momento svolgere le operazioni sempre a 4 °C.
6. Risospendere il pellet in 83 ml di RF1 buffer ed incubare a 4 °C per 1 h.
7. Ripetere il passaggio 4 e 5.
8. Risospendere il pellet in 20 ml di RF2 buffer ed incubare in ghiaccio per 15 min.
9. Mettere in una eppendoref 100 – 120 μ l di cellule, congelarle in azoto liquido e conservarle a -80 °C.
10. Fare un controllo dell'efficienza di trasformazione⁹ delle cellule trasformandole con una quantità nota di DNA plasmidico.

Elementi (mM)	RF1	RF2
MnCl ₂ * 4H ₂ O	50	-
CH ₃ COOK	30	-
RbCl	100	10
CaCl ₂ * 2H ₂ O	10	75
Glicerolo (w/v)	15%	15%
MOPS	-	10

Tabella 2.12: Buffer utilizzati durante la crescita di ceppi competenti di *E.coli*. Il ph del buffer RF1 è aggiustato a 5,8 con CH₃COOH. Una volta preparate filtrare e sterilizzare le soluzioni.

2.7 Purificazione dell'ATPasi di *E. coli*

La purificazione dell'ATPasi dei mutanti $\epsilon 57\gamma 106$ e $\epsilon 57\gamma 106$ di *E. coli* descritta di seguito segue il protocollo adottato dal laboratorio di Friburgo. Il procedimento si articola in quattro giornate e consiste nell'estrazione della proteina di membrana partendo da cellule intere cresciute con il protocollo riportato a pagina 41. La coltura sviluppata con il fermentatore è stata raccolta e centrifugata a 10000 rpm per 5 min a 4 °C con il rotore JA-10.500 Beckman ed il pellet ottenuto è stato conservato a -80 °C. Le cellule sono state rotte con un procedimento meccanico per

⁹L'efficienza di rasformazione è calcolata come il numero di colonie per microgrammo di DNA (cfu/ μ g). Se si utilizza, per esempio, 0,1 ng di DNA plasmidico ottenendo 500 colonie, l'efficienza delle cellule è pari a $5 * 10^6$.

mezzo di una French Press Aminco a 1000 Kg/cm² ottenendo micelle lipidiche. In seguito sono state congelate in azoto liquido e conservate a -80 °C. Per l'estrazione proteica si è utilizzato il detergente MOPS-KOH, e la successiva purificazione è avvenuta per mezzo di due passaggi in FPLC alternati ad una fase di HPLC. La quantificazione della porzione attiva della proteina purificata è stata fatta testando l'attività idrolitica. Di seguito verrà illustrato l'intero procedimento diviso per giornate. Tutti i buffer utilizzati sono riportati nella tabella 2.13, mentre le caratteristiche delle colonne cromatografiche sono elencate in tabella 2.14.

2.7.1 Protocollo di purificazione

Il protocollo descritto di seguito è stato studiato per purificare 40 gr di cellule per volta. Ogni passaggio deve essere svolto a 4 °C. Prima di iniziare la purificazione, le cellule conservate a -80 °C vengono diluite in 300 ml di wash buffer (tabella 2.13) e incubate a 4 °C o/n. Nel primo giorno la coltura viene raccolta mediante centrifugazione, le cellule vengono rotte con la French Press Aminco e le vescicole prodotte conservate a -80 °C. Nel secondo giorno per mezzo di una serie di centrifugazioni vengono separate le micelle dalle cellule non rotte e da materiale di riserva. Le micelle, contenenti l'ATPasi, vengono solubilizzate e ulteriormente centrifugate ed il sovranatante finale contiene il materiale proteico pronto per il passaggio di purificazione mediante cromatografia. Nel terzo giorno il materiale proteico viene purificato con una colonna S300 di FPLC. Le principali frazioni vengono ulteriormente purificate per mezzo di un passaggio in HPLC con la colonna a scambio ionico HQ20. Infine le frazioni centrali vengono testate per verificare l'attività idrolitica. Se l'attività è buona le frazioni migliori vengono conservate o/n a 4 °C in una soluzione di PMSF 0,001%. Nell'ultimo giorno le frazioni vengono passate nella colonna di FPLC S400. In base al profilo cromatografico, delle frazioni migliori viene testata l'attività idrolitica, aliquotate in volumi di 500 µl, congelate in azoto liquido e conservate a -80 °C.

1° giorno

1. Risospendere le cellule in 300 ml di wash buffer (WB) e centrifugare a 9000 rpm con rotore beckman JA-10.500, per 10 min a 4 °C.

2. **Gettare il sovranatante**, risospendere il pellet in 300 ml e ripetere il passaggio 1.
3. **Gettare il sovranatante**, risospendere il pellet in 200 ml di French Press buffer (FPB) e filtrare la soluzione con una garza sterile. Riempire il cilindro della French press con 35 ml di campione e rompere le cellule con una pressione di 1,2 k Ψ . Mantenendo costante la pressione far gocciolare il liquido in uscita in un beker conservato in ghiaccio.
4. Aggiungere al campione un po' di polvere di deossiribonucleasi per digerire il DNA ed abbassare la viscosità del campione. Versare nuovamente 35 ml di campione nel cilindro e ripetere il passaggio 3. Il liquido in uscita viene congelato istantaneamente in azoto liquido e conservato a -80 °C.

2° giorno

Prima di iniziare la purificazione, preparare le colonne cromatografiche che verranno utilizzate nel terzo e quarto giorno. Equilibrare la colonna S-300 con il buffer A e lavare con acqua bidistillata la colonna S-400 (tabella 2.14). Infine impostare i parametri del Biocad come riportato a pagina 51.

1. Sciogliere le micelle conservate a -80 °C e centrifugarle 15 min a 13000 rpm a 4 °C con il rotore JA-20 Beckman; **gettare il pellet**.
2. Centrifugare il sovrinatante per 15 min a 14000 rpm a 4 °C con il rotore JA-20 Beckman; **gettare il pellet**.
3. Ultracentrifugare il pellet per 90 min a 50000 rpm a 4 °C con il rotore Ti-70 Beckman; **gettare il sovrinatante**.
4. Risospendere il pellet contenente le membrane nel *membrane buffer* (MB) (tabella 2.13) ed ultracentrifugare per 90 min a 54000 rpm a 4 °C con il rotore Ti-70 Beckman; **gettare il sovrinatante**.
5. Pesare il pellet di ogni tubo e sciogliere 1 gr di membrane in 10 ml di buffer per la solubilizzazione (SB). Con una piccola aliquota di buffer, preceden-

temente preparato, fare una soluzione all' 1,75%¹⁰ che verrà aggiunto alla rimanente soluzione proteica. Per evitare di esporre le proteine ad una elevata concentrazione di DDM, gocciolare la soluzione con una siringa agitando il campione per 30 min.

6. Centrifugare per 90 min a 54000 rpm a 4 °C con il rotore Ti-70 Beckman; **gettare il pellet**.
7. Aggiungere al sovrinatante PMSF 0,001%. In seguito aggiungere al campione una soluzione di ammonio solfato saturato al 45% (pH = 7,4) mantenendo in costante agitazione. Il volume di ammonio solfato da aggiungere viene calcolato in questo modo:

$$\text{Vol (ammonio)} = 0,82 * \text{Vol (sovrinatante)} \quad (2.6)$$

Agitare per 15 min in modo da ottenere un pellet leggermente torbido.

8. Centrifugare per 15 min a 17000 rpm a 4 °C con rotore JA-20 Beckman; **gettare il pellet** ed il sovrinatante deve apparire trasparente.
9. Aggiungere alla soluzione il seguente volume di ammonio solfato:

$$\text{Vol (ammonio)} = 0,57 * \text{Vol (sovrinatante)} \quad (2.7)$$

Aggiungere il sovrinatante goccia a goccia con una siringa mantenendo il campione in agitazione per 10 min.

10. Aggiungere il PMSF 0,001% e agitare o/n a 4 °C. Al termine la soluzione deve apparire torbida.

3° giorno

1. Centrifugare la soluzione per 15 min a 17000 rpm a 4 °C con il rotore JA-20 Beckman; **gettare il sovrinatante**.
2. Risospendere il pellet in 5 ml di buffer A con DDM 1%, filtrare la soluzione con un filtro 20µm *cut off* ed iniettare il campione nella colonna S-300. Impostare la velocità di flusso a 40 ml/h e raccogliere frazioni da 4 ml.

¹⁰Ad esempio, se si ottengono 7 gr di pellet, risospenderli in 70 ml di buffer. Il DDM da pesare per averlo concentrato all'1,75% sarà $70 \text{ ml} * 1,75 \% = 1,225 \text{ gr}$. In seguito sciogliere il DDM e aggiungerlo al campione facendolo gocciolare lentamente.

3. Equilibrare la colonna S-400 con il buffer C impostando la velocità di flusso a 20 ml/h. Questa colonna verrà utilizzata, nella quarta giornata, per la purificazione delle frazioni proteiche provenienti dalla HPLC.
4. Le frazioni di ATPasi da raccogliere vanno dalla 17/18° alla 25° e vengono conservate in ghiaccio.
5. Per ogni frazione di FPLC raccolta procedere con la purificazione in HPLC utilizzando la colonna a scambio ionico POROS HQ20 da 1,66 ml. La colonna è equilibrata con un gradiente contenente buffer B e KCl 3 M (vedi pagina 51).
6. La densità ottica dei campioni viene misurata con il detector a 280 nm e solo quelli con un O.D. maggiore di 0,5 vengono raccolti in frazioni da 1 ml.
7. Per ogni frazione di HPLC vengono scelte soltanto le frazioni con il rapporto migliore tra sali e concentrazione proteica. Verranno quindi eliminate le code contenenti o una bassa concentrazione proteica o un gradiente salino superiore al 25%.
8. Le frazioni raccolte vengono testate per l'attività idrolitica con il metodo LDH-HADH: prendere da una frazione centrale 20 μ l di campione, metterlo in una cuvetta di plastica da 1 ml e misurare a 340 nm la variazione di assorbanza del NADH.
9. Tutte le frazioni con una buona attività idrolitica vengono riunite e iniettate nella colonna S-300 per FPLC descritta nella quarta giornata. Per conservare o/n la proteina mettere il campione in un becker aggiungendo il seguente volume di ammonio:

$$\text{Vol (ammonio)} = 1,86 * \text{Vol (campione)} \quad (2.8)$$

Aggiungere l'ammonio solfato goccia a goccia con una siringa agitando il campione o/n a 4 °C.

Elementi	WB	FPB	MB	SB	A	B	C
Tris-HCl (mM)	50	20	50	-	-	-	-
MES-KOH (mM)	-	-	-	20	-	-	-
Tricina-KOH (mM)	-	-	-	20	-	-	-
MOPS-KOH (mM)	-	-	-	-	40	80	40
pH	8	8	8	7	7,5	7,5	7,5
KCl (mM)	-	140	100	-	80	160	80
MgCl ₂ (mM)	-	5	5	5	4	8	4
PABA (mM)	-	5	5	-	-	-	-
DTT (mM)	-	2	2	2	2	4	2
Glicerolo (v/v)%	-	10	10	-	10	20	10
Saccarosio (w/v)%	-	-	2	-	2	4	2
PMSF (%)	-	0,002	-	0,001	0,001	0,002	-
DDM (%)	-	-	-	-	0,1	0,2	0,1

Tabella 2.13: Buffer per la purificazione del complesso EF_OF₁ di E. coli. DDM e PMSF sono aggiunti freschi ogni volta. FPB.: French Press Buffer; MB: Buffer di Membrana; SB: Buffer di Solubilizzazione. Buffer A, B e C devono essere filtrati prima di equilibrare le colonne cromatografiche.

4° giorno

1. Centrifugare la soluzione per 15 min a 17000 rpm a 4 °C con rotore JA-20 Beckman; **gettare il sovranatante**.
2. Preparare 1 ml di buffer C con DDM all'1% e risospendere il pellet.
3. Centrifugare il campione in una eppendorf per 5 min a 28000 rpm con rotore HFA 28,1 n°3740 Biofuge 28RS a 4 °C. Con questo passaggio vengono eliminate le particelle più grandi.
4. Iniettare il sovrinatante nella colonna S-400, impostare la velocità di flusso a 20 ml/h e raccogliere l'eluato in frazioni da 5 ml.
5. In base al profilo del cromatogramma in uscita raccogliere le frazioni centrali del picco e misurare l'attività idrolitica con il saggio LDH-NADH illustrato nel passaggio 8 del terzo giorno. Per verificare il profilo proteico dell'eluato, prendere 20 μ l di ogni frazione e preparare una corsa elettroforetica con un gel Laemli al 13% 2.8.
6. Le frazioni ad elevata attività idrolitica vengono aliquotate in capillari da 500 μ l, congelati e conservati in azoto liquido.

2.7.2 Metodi di purificazione

I passaggi di estrazione e purificazione del complesso EF_0F_1 di E. coli in FPLC e HPLC permettono di ottenere un prodotto omogeneo, puro e con un'elevata attività catalitica. Di seguito verranno le caratteristiche tecniche delle colonne cromatografiche e le impostazioni adottate sulle macchine utilizzate per la purificazione.

	1° FPLC	HPLC	2° FPLC
Modello colonna	S-300	HQ20/M	S-400
Lunghezza (cm)	40	10	100
Diametro (cm)	3	4,6	1,5
Buffer	A	B	C
Velocità di flusso E (ml/h)	40		20
Velocità di flusso C (ml/h)	40	3,5	20
λ detector (nm)	280	280	280
Volume frazione (ml)	4	1	5

Tabella 2.14: Caratteristiche tecniche delle colonne per FPLC e HPLC utilizzate per la purificazione dell'ATPasi di E. coli. Velocità di flusso E: velocità di flusso impostata durante il passaggio per equilibrare la colonna con il buffer specifico. Velocità di flusso C: velocità di flusso impostata per eluare il campione.

FPLC con colonna S-300

Lavare la colonna con acqua bidistillata e successivamente equilibrarla con il buffer A, impostando la velocità di flusso a 40 (ml/h). Iniettare il materiale proteico e raccogliere le frazioni centrali del primo picco in uscita. Ogni frazione ha un volume di 4 ml.

HPLC con colonna HQ20/M

La purificazione in HPLC viene eseguita con il Biocad Perspective Biosystems per mezzo della colonna a scambio ionico HQ20/M. Il programma completo dura 20 min ed è impostato in quattro fasi: fase di equilibratura con buffer B; fase di caricamento del campione; fase di lavaggio; fase di eluazione. Di seguito sono presentate le caratteristiche tecniche:

1. Fase di equilibratura da 0 min a 3,35 min divisa in step A e B.
 - (a) Purge segment

- 0,00 ml Set column offline
- 0,00 ml Set solvent blend: Buffer B 50%, H₂O 50%
- 0,00 ml Set flow rate 5,00 ml/min
- 0,00 ml Set sample Loop to inject position
- 8,00 ml Set flow rate 3,50 ml/min
- 8,29 ml Set sample Loop to load position
- 8,29 ml Set column 1 Inline

(b) Step segment

- 0,00 CV Solvent blend: Buffer B 50%, H₂O 50%
- 0,00 CV Reset fraction collector
- 3,50 CV Zero UV detector
- 3,50 CV End solvent blend: Buffer B 50%, H₂O 50%

2. Fase di caricamento da 3,35 min a 5,05 min

(a) Injection segment

- 0,00 min Load sample into loop: 3,85 ml: 1: sample in Buffer B
0,00 mg/ml
- 0,00 min Data collection start
- 1,70 min Inject sample

3. Fase di lavaggio da 5,05 min a 6,37 min

(a) Step segment

- 0,00 CV Set solvent blend: Buffer B 50%, H₂O 50%
- 2,80 CV End solvent blend: Buffer B 50%, H₂O 50%

4. Fase di eluazione da 6,37 min a 19,67 min

(a) Gradient segment from 6,37 min to 12,07 min

- 0,00 CV Start gradient: Buffer B 50%, H₂O 50%
- 7,00 CV Start fraction collection frac 1,00 ml (9,70 min)
- 12,00 CV End gradient: Buffer B 50%, H₂O 25%, KCl 25%.

(b) Gradient segment from 12,07 min to 13,97 min

- 0,00 CV Start gradient: Buffer B 50%, H₂O 25%, KCl 25%.
- 4,00 CV Stop fraction collection (13,97 min)
- 4,00 CV End gradient: Buffer B 50%, KCl 50%.

(c) Step segment from 13,97 min to 19,67 min

- 0,00 CV Set solvent gradient: Buffer B 50%, KCl 50%.
- 12,00 CV Pump Off
- 12,00 CV end solvent blend: Buffer B 50%, KCl 50%.

Nella prima fase per equilibrare la colonna si utilizza una miscela di buffer B al 50% e acqua. Il Biocad imposta il detector, il collettore e la pompa per caricare il campione. Nella seconda fase avviene il caricamento e l'iniezione del campione nella colonna di prefiltraggio. Nella terza fase si ha un lavaggio del sistema con buffer B al 50% e acqua.

La fase di eluazione richiede un gradiente di forza ionica in grado di cambiare l'affinità del campione per la colonna permettendone la fuoriuscita. Il buffer B utilizzato è sempre al 50% ma la concentrazione di KCl varia da 0 al 50% in proporzioni inverse rispetto all'acqua. Nel primo passaggio (gradient segment A) il KCl sale da 0 al 25%; nella fase centrale arriva fino al 50% per rimanere costante fino alla fine. Nell'ultima fase la concentrazione del sale (step segment C) cresce, in modo da eliminare ogni impurità dalla colonna. Il risultato finale del processo è quello di ottenere due picchi distinti che eluiscono a due differenti concentrazioni di sale:

- Il primo eluisce dopo 8 min all'11% di KCl. Il valore di assorbimento del picco, misurato a 280 nm, è compresa tra 0,5 e 1,7 in funzione della frazione iniettata. Ogni campione viene raccolto in frazioni da 1 ml che verranno purificate in FPLC.
- Il secondo picco viene scartato poiché eluisce soltanto in presenza di un'elevata forza ionica, dove la concentrazione del KCl è del 25%. La proteina eluate in queste condizioni perde le caratteristiche fisiologiche e non è biologicamente attiva.

Al termine di ogni processo di eluazione, la macchina esegue un ciclo di lavaggio con buffer B al 50% in modo da abbassare la concentrazione di sale riportandola ai valori iniziali.

FPLC con colonna S-400

Lavare con acqua bidistillata la colonna S-400 e successivamente equilibrarla con il buffer C impostando la velocità di flusso a 20 ml/h. Iniettare i campioni provenienti dal biocad e raccogliere frazioni da 5 ml. Queste ultime vengono suddivise in capillari da 0,5 ml, congelati e conservati in azoto liquido.

2.8 Elettroforesi SDS-PAGE

L'elettroforesi SDS-PAGE è l'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di dodecilsolfato di sodio (SDS). Nella preparazione del gel si aggiungono in quantità equimolari un catalizzatore, l'ammonio persolfato (APS) ed uno stabilizzatore di radicali, NNNN'-tetrametiletildiamina (TEMED). Le proteine vengono sciolte in una soluzione di SDS in modo da rompere i legami non covalenti, mentre per la riduzione dei ponti disolfuro si aggiunge β -Mercaptoetanolo. Il tipo di gel da noi utilizzato è composto da due parti. La prima si chiama RESOLVING GEL, si trova alla base del gel, serve per separare le proteine durante la corsa elettroforetica e la composizione dell'acrilammide-bis acrilammide varia dall'8% al 16% a seconda delle dimensioni delle proteine presenti. La seconda è detta STACKING GEL, ospita i pozzetti dei campioni ed ha la concentrazione dell'acrilammide-bisacrilammide è del 4%. Questa parte del gel serve per allineare tutte le proteine contenute in ciascun pozzetto evitando artefatti durante la corsa dovuti alla natura del campione.

La soluzione del resolving gel è stata preparata aggiungendo i componenti indicati nella tabella 2.15 e versando circa 3,5 ml tra i due vetri separati da spaziatori di spessore 0,75 mm. In seguito, abbiamo aggiunto la soluzione per lo stacking gel ed inserito il pettine per i pozzetti. Il campione è stato diluito in un tampone di denaturazione contenente: blu di bromofenolo allo 0,3%, SDS al 3% e β -Mercaptoetanolo al 10%. I campioni sono stati riscaldati a 95 °C per 10 min ed in seguito caricati sui pozzetti. Il marker di riferimento per i pesi molecolari, utilizzato per i campioni contenenti le subunità dell'ATPasi EF_0F_1 , è il PAGERULER PRESTAINED PROTEIN LADDER #SM0671 della Fermentas.

Inserire il gel nella cella elettroforetica e riempire le camere interna ed esterna rispettivamente con il buffer catodico e anodico (tabella 2.16). Applicare una corrente di 22 mA finché i campioni rimangono nella fase di stacking gel e aumentare

Gel	MilliQ ml	Buffer ml	Acrilammide/Bis ml	SDS 20% μ l	AMPS μ l	TEMED μ l	Vol ml
Resolving	1,53	1,25	2,2	25	25	10	5
Stacking	3	1,25	1,3	25	50	20	6

Tabella 2.15: Componenti per un gel al 13% di acrilammide-bisacrilammide. I volumi indicati sono sufficienti per la preparazione di un resolving e di 2 stacking gel. Nello stacking gel l'acrilammide/bisacrilammide viene diluita ad una concentrazione finale del 4%.

a 40 mA una volta che i campioni sono entrati nel resolving gel. Il voltaggio viene mantenuto costante per tutta la corsa e può essere regolato fino a 200 V. Dopo aver fatto correre i campioni per 1 h e 30 min circa, il gel viene fotografato con una fotocamera a fluorescenza per osservare i campioni fluorescenti ed in seguito fissato con il Comassie Blue. Il gel viene immerso in una soluzione di Comassie Blue ed etanolo per 30 min per fissare il colorante alle proteine. In seguito per eliminare il colorante in eccesso, il gel viene immerso in una soluzione di etanolo al 40% e acido acetico al 10% fino ad ottenere la completa decolorazione del gel ad eccezione delle bande del campione. Al termine il gel è stato conservato in acqua bidistillata.

Componenti	Catodo	Anodo	SDS-Gel	Stacking	Resolving
TRIS-HCl (M)	0,1	0,2	3	0,5	1,5
SDS (w/v %)	0,1	-	0,3	0,4	0,4
TRICINA (M)	0,1	-	-	-	-
pH	8	8,9	8,45	6,8	8,8

Tabella 2.16: Composizione dei buffer utilizzati per un gel di acrilammide-bisacrilammide. Catodo e anodo: buffer per la camera interna ed esterna della cella elettroforetica. SDS-Gel: buffer per diluire i campioni. Stacking e Resolving: buffer per la parte superiore ed inferiore del gel.

Capitolo 3

Risultati

3.1 Fotoattivazione in *Rb. capsulatus* wild-type e γ M23K

Illuminando i cromatofori di *Rb. capsulatus* la catena fotosintetica pompa protoni verso il lume interno generando un gradiente elettrochimico. In questa situazione se viene innescata l'attività idrolitica dell'ATPasi si misurano velocità superiori a quella basali, misurate in cromatofori mantenuti al buio. Questo fenomeno, che prende il nome di fotoattivazione, non è però osservabile completamente in presenza di un $\Delta\mu_{H^+}$ a causa del fatto che quest'ultimo esercita una back pressure sulla reazione di idrolisi stessa. Infatti, se da un lato il gradiente elettrochimico stimola l'attività idrolitica, dall'altra la ostacola poichè la catena respiratoria pompa protoni nella stessa direzione dell'ATPasi durante l'attività idrolitica. Per osservare completamente l'aumento della velocità idrolitica indotta dalla luce, è necessario dissipare il gradiente elettrochimico disaccoppiando le membrane con nigericina e valinomicina. Così facendo si può misurare l'aumento dell'attività enzimatica contestualmente alla dissipazione della back pressure. Di seguito al punto 3.1.1 illustreremo il protocollo sviluppato per ottenere le condizioni migliori di illuminazione e di disaccoppiamento per esprimere il fenomeno dell'autoattivazione in *Rb. capsulatus* wild-type, mentre al punto 3.1.2 verranno presentati i dati mettendo a confronto il wild-type ed il mutante γ M23K.

3.1.1 Idrolisi stimolata da $\Delta\mu_{H^+}$ in funzione del tempo di esposizione alla luce

Per individuare il tempo di illuminazione adottato nell'esperimento descritto nella figura 3.2 una soluzione di cromatofori $10\ \mu\text{M}$ BChl è stata illuminata per un tempo variabile da una fonte di luce bianca della potenza di 250 W (figura 3.1). Subito dopo viene innescata l'attività idrolitica aggiungendo ATP 0,6 mM e simultaneamente la back pressure del $\Delta\mu_{H^+}$ viene annullata per mezzo della miscela di disaccoppianti saturanti nigericina e valinomicina $0,4\ \mu\text{M}$.

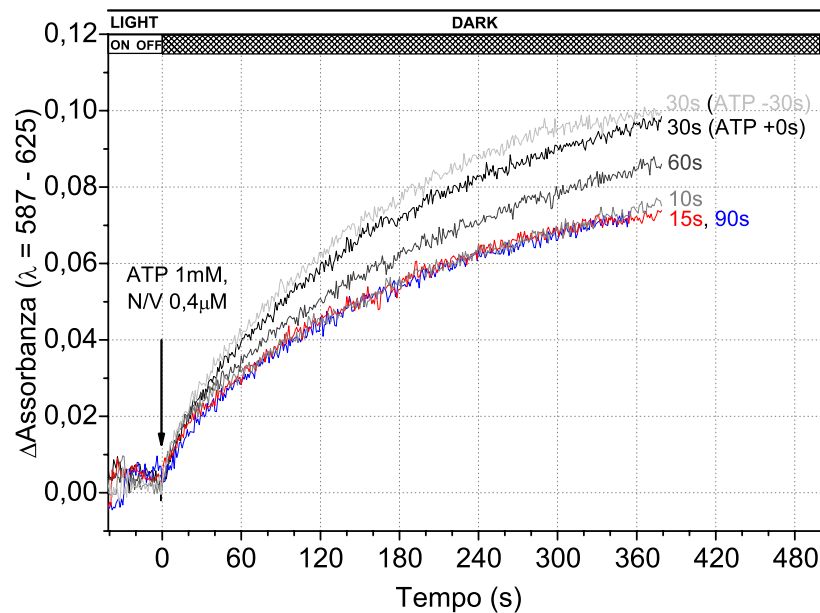


Figura 3.1: Attivazione dell'attività idrolitica stimolata da $\Delta\mu_{H^+}$ in funzione del tempo di esposizione alla fonte luminosa in *Rb. capsulatus* WT. Una soluzione di cromatofori $10\ \mu\text{M}$ viene diluita nel buffer utilizzato per il saggio del Rosso Fenolo (vedi Materiali e Metodi). Il campione è illuminato da una fonte di luce bianca (250 W) al quarzo-tungsteno e filtrata da una vetro colorato con cut-on a 780 nm. Quando viene spenta la luce, la reazione idrolitica è innescata aggiungendo ATP 1 mM e contemporaneamente la back pressure del $\Delta\mu_{H^+}$ viene annullata con una miscela di disaccoppianti nigericina e valinomicina $0,4\ \mu\text{M}$ (N/V).

Come mostrato in figura 3.1 l'attività idrolitica dipende dal tempo di esposizione alla luce con un andamento bifasico rivelando il picco di massima efficienza corrispondente a 30 s di illuminazione. Per ragioni ancora non indagate se il tempo di esposizione alla luce risulta minore o maggiore la velocità idrolitica osservata in seguito al parziale disaccoppiamento è inferiore. Inoltre la presenza dell'ATP

con luce accesa (traccia grigio chiara) o con luce spenta (traccia nera) non altera il risultato finale.

3.1.2 Idrolisi stimolata da $\Delta\mu_{H^+}$ indotto da luce in *Rb. capsulatus* wild-type e nel mutante γ M23K

La fotoattivazione è stata riprodotta in questo lavoro in cromatofori di *Rb. capsulatus* wild-type e nel mutante γ Met23Lys intere (figura 3.2A). In una cuvetta di vetro la sospensione di cromatofori viene illuminata per 30 s. Dopo 25 s di luce è stato aggiunto ATP 1 mM (prima freccia) e dopo altri 5 s (seconda freccia) viene spenta la luce e contemporaneamente si aggiungono i disaccoppianti 0,4 μ M nigericina e valinomicina per dissipare parzialmente il $\Delta\mu_{H^+}$, generato dalla catena respiratoria fotosintetica. L'effetto che si osserva è un aumento progressivo della velocità idrolitica che persiste per diversi minuti nel wild-type, mentre si esaurisce velocemente nel mutante. Per confermare che l'aumento dell'attività idrolitica osservata sia accoppiato al trasporto dei protoni attraverso F_0 (tracce b e d figura 3.2A), i campioni sono stati incubati con oligomicina, inibitore specifico che si lega alla subunità F_0 bloccando la traslocazione protonica. A conferma di ciò si osserva un'attività decisamente inferiore al controllo in entrambi i ceppi. Per calcolare la velocità idrolitica della popolazione di ATPasi sensibile all'oligomicina, la traccia ottenuta con l'inibitore è stata pertanto sottratta a quella registrata senza l'oligomicina come riportato in figura 3.2B.

	Idrolisi		Sintesi
	basale	30 s luce	luce continua
Wild-type	13 \pm 3	134 \pm 14	175 \pm 7
γ M23K	4 \pm 1	88 \pm 12	97 \pm 5

Tabella 3.1: Velocità catalitiche del wild-type e del γ M23K mutante di *Rb. capsulatus*. La velocità idrolitica è rilevata con il rosso fenolo in condizioni basali (buio) o mediante preilluminazione con luce da 250 W per 30 s. La sintesi è stata misurata con il sistema luciferina-luciferasi in condizioni di luce continua. Tutti i valori sono espressi in $\text{mMATP} * \text{M}^{-1}\text{BChl} * \text{s}^{-1}$.

Dopo la sottrazione (traccia a-b, figura 3.2B), la velocità idrolitica iniziale è risultata di 134 $\text{mMATP} * \text{M}^{-1}\text{BChl} * \text{s}^{-1}$ per il wild-type e di 88 $\text{mMATP} * \text{M}^{-1}\text{BChl} * \text{s}^{-1}$ per il mutante γ Met23Lys (traccia c-d, figura 3.2B). Le velocità assolute risultano abbastanza simili, ma il dato interessante è la velocità di decadimento del fenomeno

della fotoattivazione. Infatti per il wild-type il tempo di dimezzamento è di 28 s, mentre è di soli 5 s per il mutante. La temporanea ed elevata velocità idrolitica osservata nel mutante γ M23K, sebbene decada molto velocemente, è stata riprodotta in diverse preparazioni ed i valori delle velocità catalitiche riportati sono il risultato del miglior fit applicato ai dati originali (figura 3.2B) dal quale è stato ottenuto il valore di decadimento del fenomeno.

La tabella 3.1 riporta i dati relativi alla velocità idrolitica basale e quelli della sintesi ottenuti in luce continua. Osserviamo come il mutante abbia una velocità basale 3,25 volte più bassa rispetto al wild-type ma solo di 1,8 volte più bassa se confrontiamo le velocità di sintesi. Se si energizzano le membrane creando un gradiente elettrochimico per effetto dell'illuminazione, si ottiene invece una diminuzione del rapporto tra le attività idrolitiche dei ceppi che scende da 3,25 a 1,5, sebbene la fotoattivazione del mutante abbia un tempo di dimezzamento 5,6 volte più breve rispetto al wild-type. Questi valori indicano come il mutante sia sostanzialmente inibito, a causa della mutazione, di più in termini di efficienza idrolitica basale e molto meno per quanto riguarda la sintesi. In presenza di un gradiente elettrochimico, invece, l'idrolisi del mutante aumenta di 22 volte e di circa 10 nel caso del wild-type.

Una possibile interpretazione del fenomeno della fotoattivazione, visto come attivatore dell'enzima, è che, in presenza di un consistente $\Delta\mu_{H^+}$ l'ATPasi sia indotta a rilasciare una molecola di ADP inibitorio dal sito β DP. In questo modo l'enzima passa dallo stato metastabile iniziale alla conformazione attivata, promuovendo l'attività idrolitica. Questa ipotesi è supportata anche da dati (figura 3.5) relativi all'aumento della velocità idrolitica in funzione della concentrazione di ADP presente nel mezzo osservata sia nel wild-type che nel mutante. Infatti come riportato dalla letteratura l'ADP ha un ruolo inibitorio nei confronti dell'attività idrolitica. In presenza però di un gradiente elettrochimico è ipotizzabile un cambio di conformazione dell'enzima che determini il rilascio dell'ADP favorendo l'attività idrolitica altrimenti inibita dall'aumento progressivo del ligando.

Fino a questo punto si è studiata la risposta del wild-type e del mutante al $\Delta\mu_{H^+}$ generato dalla luce prima di innescare l'attività idrolitica. Anche durante la reazione però viene generato un gradiente elettrochimico dallo stesso enzima che è osservabile seguendo il protocollo descritto in questa sezione. L'attivazione da

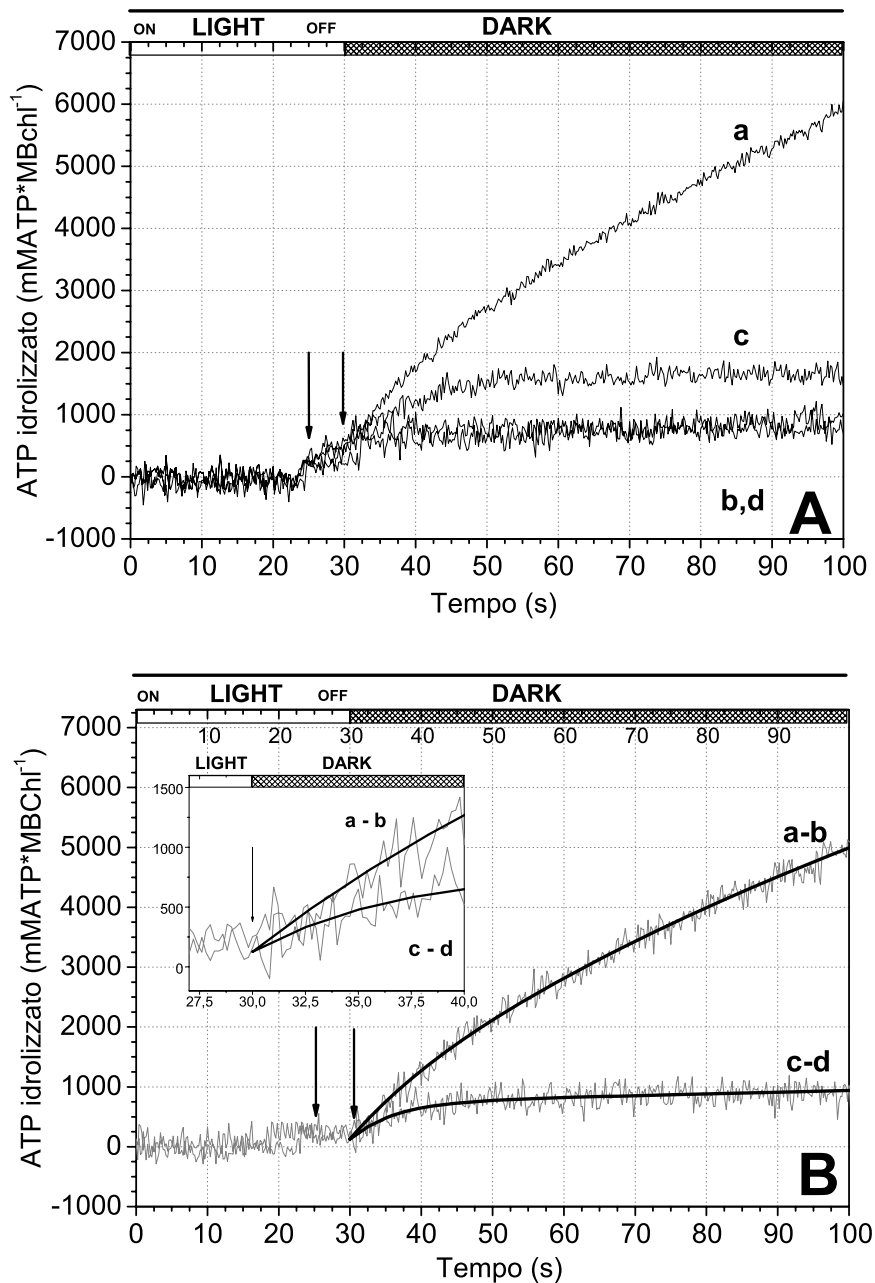


Figura 3.2: Idrolisi indotta da fotoattivazione in *Rb. capsulatus* wild type e in γ M23K. La variazione di ATP viene monitorata dalla variazione di assorbimento del Rosso Fenolo come riportato nei Materiali e Metodi. In una cuvetta di vetro la sospensione $10\mu\text{M}$ BChl di cromatofori viene illuminata per 30s. Dopo 25s di luce ATP 1mM viene aggiunto (prima freccia) e dopo altri 5s (seconda freccia) viene spenta la luce e contemporaneamente sono aggiunti i disaccoppianti $0,4\mu\text{M}$ nigericina e valinomicina. Le tracce sono state corrette per la diluizione e per il piccolo cambio di assorbimento in seguito alla variazione di pH dovuto all'aggiunta dell'ATP. (Pannello A) Traccia a, wild-type senza inibitori; traccia b, wild type incubato con $20\mu\text{g/ml}$ oligomicina; traccia c, wild type γ M23K senza inibitori; traccia d, γ M23K incubato con $20\mu\text{g/ml}$ oligomicina. Ogni traccia è la media di due misure. (Pannello B) Per rilevare l'attività oligomicina insensibile, le tracce in presenza dell'inibitore sono state sottratte dalle tracce registrate senza oligomicina. Traccia a-b, wild type; traccia c-d: γ M23K. Le linee continue rappresentano il miglior fit bi-esponenziale applicato ai dati. La velocità iniziale è di 134 e $88\text{mMATP} \cdot \text{M}^{-1}\text{BChl} \cdot \text{s}^{-1}$ per il wild-type e per il mutante γ M23K, rispettivamente. L'insero mostra l'ingrandimento degli stessi dati nelle prime fasi della reazione.

$\Delta\mu_{H^+}$, generato dall'ATPasi in membrane tenute al buio, è un fenomeno chiamato autoattivazione e verrà discusso nella prossima sezione 3.2.

3.2 Autoattivazione indotta da $\Delta\mu_{H^+}$ in *Rb. capsulatus*

Nella sezione 3.1 abbiamo visto come sia possibile ottenere un aumento della velocità idrolitica in presenza di un $\Delta\mu_{H^+}$ generato dalla luce. Questo fenomeno si può verificare anche in presenza di membrane non illuminate poichè durante la reazione catalitica l'ATPasi genera un gradiente elettrochimico accoppiando l'idrolisi dell'ATP alla traslocazione protonica. Questo genera un aumento della velocità idrolitica, che prende il nome di autoattivazione, ma risulta maggiore rispetto a quella basale anche se inferiore a quella misurata durante la fotoattivazione. Le prime osservazioni in merito al fenomeno vennero svolte dal nostro laboratorio agli inizi degli anni novanta. In questa sezione si intende studiare l'autoattivazione dell'ATPasi nei ceppi di *Rb. capsulatus* wild-type per verificare la riproducibilità del fenomeno già osservato e studiarne gli effetti sul mutante γ M23K particolarmente deficitario nella attività idrolitica.

La figura 3.3 mostra l'effetto di autoattivazione nel wild-type in funzione del tempo di reazione. Una sospensione di cromatofori viene risospesa $10\ \mu\text{M}$ BChl nel buffer di misura del saggio Rosso fenolo (vedi Materiali e Metodi). La reazione idrolitica viene innescata aggiungendo ATP $0,6\ \text{mM}$ e dopo 1 min vengono aggiunti i disaccoppianti nigericina e valinomicina $0,4\ \mu\text{M}$ (freccia nera, traccia rossa). Nelle tracce verde, blu e cyan i disaccoppianti vengono aggiunti rispettivamente dopo 2, 3 e 5 min dall'inizio della reazione; mentre nella traccia nera sono stati aggiunti insieme all'ATP.

Per quanto riguarda il mutante γ M23K la figura 3.2 mostrava una attivazione da $\Delta\mu_{H^+}$ da luce transitoria ma significativa. Per questo motivo si volute indagare l'effetto della autoattivazione anche in questo ceppo senza però osservare nessuna differenza rispetto alla attività basale (tracce non mostrate). Infatti, innescando la reazione idrolitica con ATP e disaccoppiando le membrane dopo gli stessi intervalli di tempo, la velocità osservata rimane costante nel tempo e non aumenta come nel caso del wild-type.

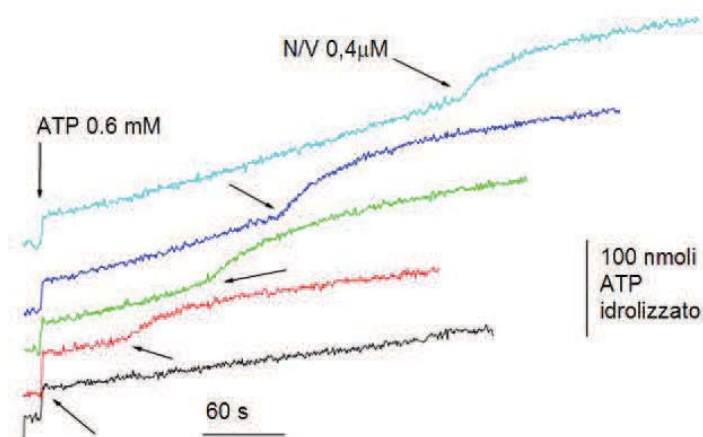


Figura 3.3: le tracce mostrano il transiente della velocità idrolitica prodotta dal $\Delta\mu_{H^+}$ in *Rb. capsulatus* WT. Una soluzione di cromatofori viene diluita $10\ \mu\text{M}$ BChl nel buffer di misura del saggio Rosso fenolo (vedi Materiali e Metodi). La reazione idrolitica viene innescata aggiungendo ATP $0,6\ \text{mM}$ e dopo 1 min vengono aggiunti i disaccoppianti nigericina e valinomicina $0,4\ \mu\text{M}$ (freccia nera, traccia rossa). Nelle tracce verde, blu e cian i disaccoppianti vengono aggiunti rispettivamente dopo 2, 3 e 5 min dall'inizio della reazione; mentre nella traccia nera sono stati aggiunti insieme all'ATP.

Il grafico 3.4 riporta le velocità idrolitiche del wild-type e del mutante misurate in diverse condizioni. La serie (\square) mostra i dati relativi all'autoattivazione e si osserva come questo fenomeno sia strettamente dipendente dalla durata della reazione misurata. La velocità iniziale, misurata subito dopo l'aggiunta di disaccoppianti, aumenta progressivamente in funzione del tempo fino a raggiungere un valore di saturazione dopo circa 5-6 min di reazione. La serie (\circ) si riferisce alla velocità basale misurata in assenza di disaccoppianti in cui si può notare come la back pressure agisca limitando l'attività idrolitica. Inoltre come confronto è stata riportata anche la velocità idrolitica indotta da un gradiente elettrochimico indotto da luce. Si osserva come il fenomeno della fotoattivazione risulti maggiore soltanto di 3 volte circa rispetto all'autoattivazione. Infine viene riportato in grafico anche l'andamento del mutante (\blacktriangle) per mostrare come questo ceppo non venga stimolato dal $\Delta\mu_{H^+}$ generatosi durante la reazione.

Questa differenza tra fotoattivazione ed autoattivazione è in linea con la natura del mutante γM23K . Infatti se in presenza di una elevato $\Delta\mu_{H^+}$ indotto da luce, l'aumento della velocità idrolitica è risultata alta ma transitoria, in presen-

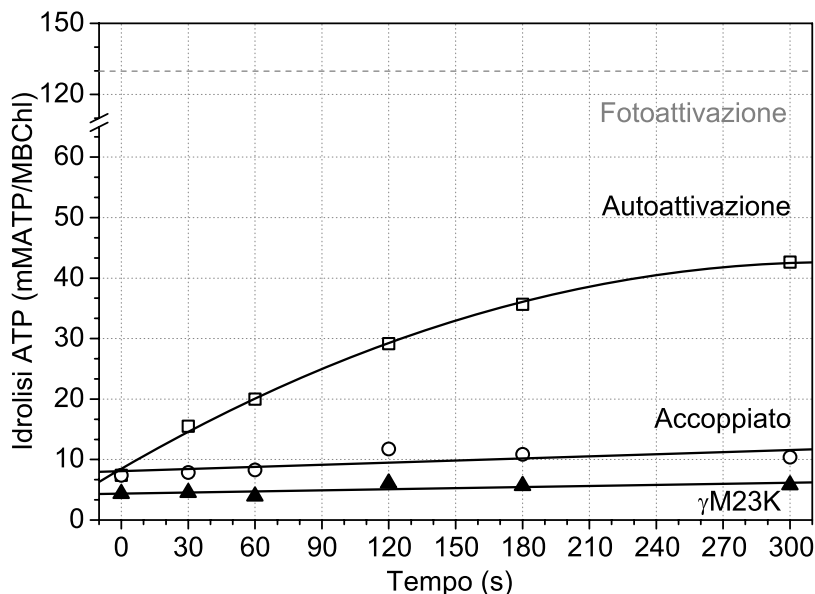


Figura 3.4: Cinetiche di fotoattivazione e autoattivazione in *Rb. capsulatus* wild-type e nel mutante γ M23K. Ogni serie di dati rappresenta una risposta dell'enzima alla condizione energetica della membrana. \blacktriangle : velocità misurata in seguito all'aggiunta dei disaccoppianti durante l'attività idrolitica in cromatofori di γ M23K. \bullet : velocità basale del wild-type rilevata in funzione del tempo. \circ : velocità misurata in seguito all'aggiunta dei disaccoppianti durante l'attività idrolitica del wild-type. Fotoattivazione: le membrane sono illuminate per 30 s (vedi figura 3.2) e subito dopo l'aggiunta di ATP vengono disaccoppiate. Dati ottenuti con un saggio di Rosso Fenolo, provenienti dall'attività idrolitica di una soluzione di cromatofori $10\ \mu\text{M}$ BChl innescata da ATP $0,6\ \text{mM}$.

za di un minore $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, come quello generato dall'attività idrolitica (più bassa nel mutante), non si registra nessuna variazione di velocità idrolitica e nessun effetto autoattivante.

Il fenomeno dell'attivazione dell'ATPasi, indotto da $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ generato dalla luce o dall'attività catalitica stessa (43), può essere associato al rilascio dell'ADP inibitorio con una dimostrazione diretta del meccanismo come già osservato nei cloroplasti (38). L'inibizione dell'attività catalitica indotta da MgADP è un fenomeno ben noto sia nell'ATPasi F_0F_1 sia nella porzione F_1 (17). Infatti è stato dimostrato come il legame (o il mancato rilascio) dell'MgADP al sito catalitico ad alta affinità inattivi l'enzima in termini di attività idrolitica (19; 27): il MgADP inibitorio viene rilasciato in seguito all'energizzazione della membrana (da parte della catena fotosintetica) (15). Diversi studi su F_0F_1 di batteri, cloroplasti e mitocondri hanno dimostrato che dopo l'energizzazione della membrana l'attività dell'ATPasi aumenta notevolmente [26-32], suggerendo che l'ADP ad alta affinità sia la cau-

sa dell'inibizione. Il mutante in questa situazione mostra un'affinità per l'ADP maggiore rispetto al wild-type. La figura 3.2 mostra come sia possibile attivare il mutante in presenza di un elevato $\Delta\mu_{H^+}$, mentre non avviene lo stesso se questo gradiente risulta più basso come nel caso dell'autoattivazione. In conclusione la mutazione aumentando l'affinità per l'ADP alza la soglia di $\Delta\mu_{H^+}$ necessario per promuovere il passaggio da uno stato metastabile ad uno attivato. Nel wild-type, dove l'affinità per l'ADP è più bassa è possibile osservare un effetto attivatore già in presenza di gradienti più bassi generati durante l'idrolisi.

Alla luce dei dati fin qui proposti, emerge come in *Rb. capsulatus* l'attività idrolitica sia soggetta a fenomeni di attivazione da $\Delta\mu_{H^+}$. Nella prossima sezione si prenderà in considerazione la relazione tra ADP e $\Delta\mu_{H^+}$ in funzione dell'attività catalitica nel wild-type e nel mutante γ M23K per verificare le possibili relazioni tra i cambi di conformazione e le ripercussioni a livello catalitico fin qui ipotizzate. Verrà studiata quindi l'attività idrolitica in presenza delle singole componenti del $\Delta\mu_{H^+}$, il gradiente elettrico ed il gradiente protonico, variando la concentrazione di ADP presente durante la reazione con la trappola PK-LDH.

3.3 Regolazione dell'ATPasi in funzione della concentrazione di ADP

Nelle sezioni 3.1 e 3.2 è emersa la relazione tra l'attivazione idrolitica dell'ATPasi ed il gradiente elettrochimico presente durante la reazione nel wild-type e nel mutante γ M23K di *Rb. capsulatus*. Inoltre è stato proposto che alla base del meccanismo di attivazione dell'enzima ci fosse il rilascio dell'ADP inibitorio. In questa sezione verranno studiati gli effetti dell'ADP sull'attività idrolitica nei due ceppi batterici in presenza delle due componenti del gradiente elettrochimico, il Δ pH ed il $\Delta\psi$. Per mantenere costante la concentrazione dell'ADP presente durante la reazione è stato utilizzato il saggio PK-LDH riportato nei Materiali e Metodi.

Una sospensione di cromatofori 10 μ M BChl è stata risospesa nel buffer per il saggio della PK-LDH e la reazione idrolitica è stata innescata con ATP 0,6 mM. La figura (3.5) riporta le velocità idrolitiche registrate in funzione della concentrazione di PK aggiunta alle membrane prima dell'inizio della reazione. I due ceppi di *Rb. capsulatus* sono stati analizzati anche in assenza della componente elettrica

incubando i cromatofori con valinomicina $1 \mu\text{M}$. Dalla figura 3.5 si vede come la velocità idrolitica aumenti in funzione della PK aggiunta e come questo effetto tenda ad un valore asintotico già dopo 1 U/ml di PK. L'idrolisi basale misurata nel wild-type vale $17 \pm 3 \text{ mMATP} * \text{MBChl}^{-1} *^{-1}$ (media di tre misure), mentre quella del mutante vale $4 \pm 1 \text{ mMATP} * \text{MBChl}^{-1} *^{-1}$ (media di tre misure). Nel wild-type (\square) si osserva un aumento rapido della velocità fino a 3 volte quella basale, mentre di almeno 7 volte nel caso del mutante γM23K (\circ). Se prendiamo in considerazione le velocità idrolitiche misurate in condizioni di PK saturante il rapporto delle velocità tra il wild-type ed il mutante vale circa 1,5. Questo indica come l'effetto inibitorio dell'ADP, già ampiamente descritto in letteratura, venga confermato da questo lavoro.

Analizzando le velocità idrolitiche dei due ceppi in assenza della componente elettrica, notiamo che le differenze aumentano. Infatti incubando con valinomicina $1 \mu\text{M}$ si annulla il $\Delta\psi$ e la velocità idrolitica dipende soltanto dalla differenza di pH generata durante la reazione catalitica. In questo caso il wild-type (\blacksquare) non mostra sostanziali differenze rispetto alla serie di dati descritti in precedenza. Invece nel mutante la componente elettrica risulta importante per incrementare la velocità idrolitica, poichè in assenza di $\Delta\psi$ la velocità massima registrata, in condizioni di PK saturante, è soltanto 5 volte superiore a quella basale (\bullet). Inoltre il rapporto tra le velocità dei due ceppi, in presenza di PK 4 U/ml , sale da 1,5 a 4 rivelando come l'azione del $\Delta\psi$ sia più rilevante nel mutante che nel wild-type.

In base a questi dati si può confermare come l'ADP risulti inibitorio per l'attività idrolitica del wild-type e soprattutto del mutante, poichè è in questo ceppo che si registrano gli incrementi maggiori della velocità rispetto a quelli basali misurati in assenza di PK. Inoltre si è visto come il $\Delta\psi$ abbia un ruolo importante nel mantenere attivo l'enzima durante l'attività catalitica. La presenza del $\Delta\psi$ e la progressiva diminuzione dell'ADP inibitorio fanno sì che l'attività catalitica dell'ATPasi del wild-type aumenti di tre volte, ma nello stesso tempo il gradiente elettrico non influisce in misura significativa. Nel mutante, invece, la presenza del $\Delta\psi$ risulta essere un ruolo molto importante. Questo conferma che, in presenza della mutazione, l'affinità per l'ADP aumenta e l'effetto del $\Delta\psi$ non riesce, da solo, ad attivare l'enzima. In presenza di PK, invece, l'azione del gradiente elettrico permette di attivare l'enzima e sopperire all'azione inibitoria della mutazione, il

cui effetto è minore se l'ADP inibitorio è convertito in gran parte dalla PK.

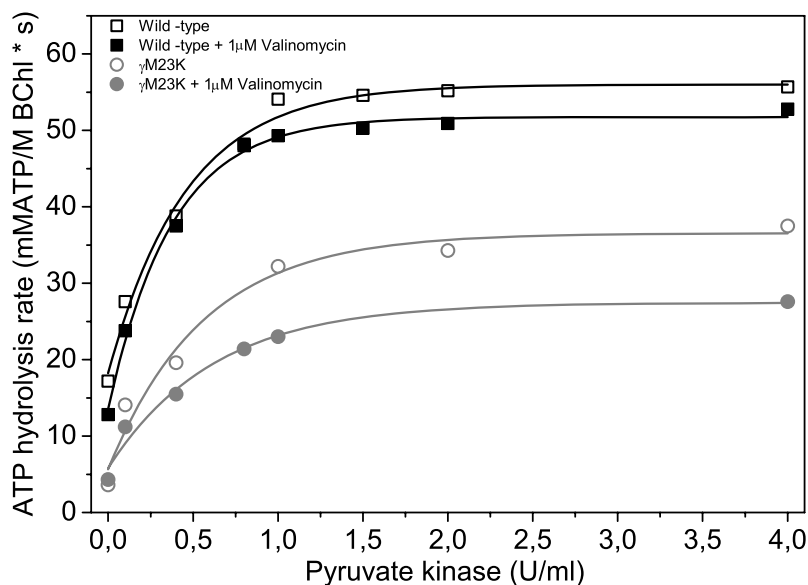


Figura 3.5: Regolazione dell'ATPasi in funzione della concentrazione di ADP in cromatofori wild-type e mutanti γ M23K di *Rb. capsulatus* in presenza del sistema accoppiato PK-LDH. Misure effettuate diluendo una soluzione di cromatofori 10 μ M Bchl nel buffer del saggio PK-LDH descritto nei Materiali e Metodi. Nelle misure in assenza di PK-LDH, invece, le velocità sono state misurate con il sistema del Rosso Fenolo riportato nei Materiali e Metodi. Quadrati e tondi pieni: cromatofori incubati con valinomicina 1 μ M.

Finora gli effetti del $\Delta\mu_{H^+}$ e dell'ADP sono stati studiati considerando solo l'idrolisi dell'ATP. Nella prossima sezione analizzeremo la formazione del gradiente protonico durante l'attività idrolitica basale: valuteremo le differenze tra i ceppi e, mediante l'inibitore efrappetina, specifico per F_1 , il wild-type verrà inibito fino ad ottenere gli stessi valori di attività idrolitica del mutante. Inoltre, come è avvenuto in questa sezione, si studierà l'attività di catalisi enzimatica in funzione dei singoli componenti del $\Delta\mu_{H^+}$.

3.4 Proton pumping indotto da ATP nel mutante γ M23K

L'accoppiamento dell'ATPasi si basa sul presupposto che l'attività idrolitica sia associata ad una corrispondente attività di pompaggio protonico transmembrana. In presenza quindi di un deficit dell'attività idrolitica, come documentato in let-

teratura per il mutante di γ M23K in *E.coli* (32) e da noi nelle sezioni precedenti, ci si attende un livello di Δ pH inferiore. Se questo è vero condizionando artificialmente l'attività idrolitica dell'enzima con l'inibitore efrapeptina specifico per F_1 , si otterrà una riduzione della normale attività idrolitica del wild-type in modo da ricondurlo ai livelli del mutante γ M23K.

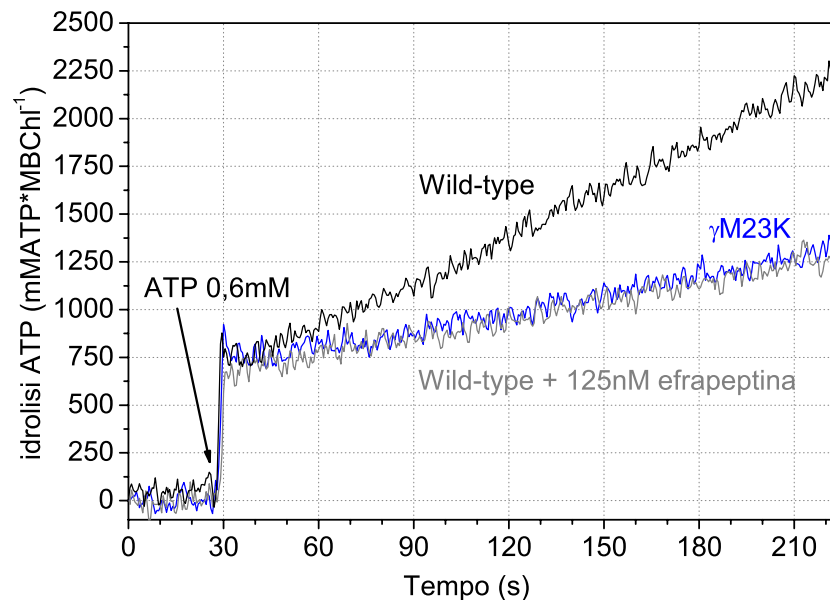


Figura 3.6: Attività idrolitica in *Rb. capsulatus* Wild-type \pm 125mM efrapeptina e nel mutante γ M23K. La reazione idrolitica è stata monitorata con il saggio del Rosso Fenolo descritto nei Materiali e Metodi. Una sospensione di cromatofori $10 \mu\text{M}$ BChl viene risospesa nel buffer di misura e la reazione innescata con ATP 0,6mM (freccia). WT + 125 mM efrapeptina: i cromatofori sono stati incubati per 10 min con efrapeptina prima dell'inizio della reazione idrolitica.

La figura 3.6 mostra l'attività idrolitica del wild-type e del mutante in funzione del tempo di reazione. Una sospensione di cromatofori $10 \mu\text{M}$ BChl viene risospesa nel buffer di misura per il saggio del Rosso Fenolo (vedi Materiali e Metodi) e la reazione è innescata con ATP 0,6 mM (freccia). L'andamento dell'attività idrolitica viene seguito attraverso l'ossidazione del Rosso Fenolo per mezzo di uno spettrofotometro a doppia lunghezza d'onda (587 - 625 nm). La figura mostra le tracce dell'attività idrolitica basale del wild-type (nera) e del mutante (blu) le cui velocità valgono rispettivamente $8 \text{ mMATP} * \text{BChl}^{-1} * \text{s}^{-1}$ e $4 \text{ mMATP} * \text{BChl}^{-1} * \text{s}^{-1}$. A questo punto il wild-type è stato riportato all'attività enzimatica del mutante incubandolo con efrapeptina 125 nM (grigia) ed ottenendo la stessa velocità idrolitica.

In parallelo è stato monitorato, nelle stesse condizioni, anche il proton pumping generato dall'attività idrolitica, utilizzando il saggio dell'ACMA (vedi Materiali e Metodi). Una sospensione di cromatofori $10\ \mu\text{M}$ è stata risospesa nel buffer di misura del saggio dell'ACMA e l'idrolisi è stata innescata con ATP $0,6\ \text{mM}$ (3.7A). Una volta raggiunto lo stato stazionario si sono disaccoppiate le membrane aggiungendo nigericina $0,5\ \mu\text{M}$ riportando la fluorescenza al valore iniziale. Nel wild-type, in seguito ad una elevata velocità iniziale, si raggiunge lo stato stazionario entro circa $60\ \text{s}$ dall'inizio della reazione. Nel mutante e nel wild-type inibito si osserva invece un andamento molto diverso. Il quenching di fluorescenza risulta costante nel tempo e solo dopo diversi minuti viene raggiunto lo stesso stato stazionario del wild-type. L'esperimento di proton pumping è stato ripetuto anche in presenza di valinomicina $1\ \mu\text{M}$ e riportato in figura 3.7B. Se in assenza di valinomicina il mutante raggiunge gli stessi livelli di fluorescenza del wild-type, ma in tempi molto più lunghi, in presenza del disaccoppiante la differenza tra gli stati stazionari è maggiore ed essi non convergono. Nel caso del wild-type inibito inizialmente l'andamento di quenching di fluorescenza si sovrappone completamente a quello del mutante, ma con il passare dei minuti la traccia del wild-type inibito registra un valore di quenching sensibilmente maggiore rispetto al mutante.

Confrontando l'andamento dell'attività catalitica con il profilo del proton pumping associato notiamo che entrambi i ceppi sono accoppiati allo stesso modo. A fronte di una elevata attività catalitica si registra una consistente attività di pompaggio per il wild-type e lo stesso vale per il mutante anche se in misura molto minore. Se il wild-type viene inibito con $125\ \text{nM}$ efrapeptina, per ottenere la stessa velocità catalitica del mutante, anche per il proton pumping si ottiene lo stesso effetto. Sulla base di questi dati sembra che l'enzima mutante sia accoppiato tanto quanto il wild-type. Anche in questo caso la componente elettrica del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ risulta attivare il proton pumping sia nel mutante che nel wild-type inibito, in quanto la sua assenza sembra favorire l'azione inibitoria del'ADP prodotto durante la reazione catalitica.

In questa sezione abbiamo affrontato il tema dell'accoppiamento misurando l'attività catalitica in assenza di ADP aggiunto. Nella prossima sezione studieremo i ceppi wild-type ed il mutante γ M23K in presenza di ADP.

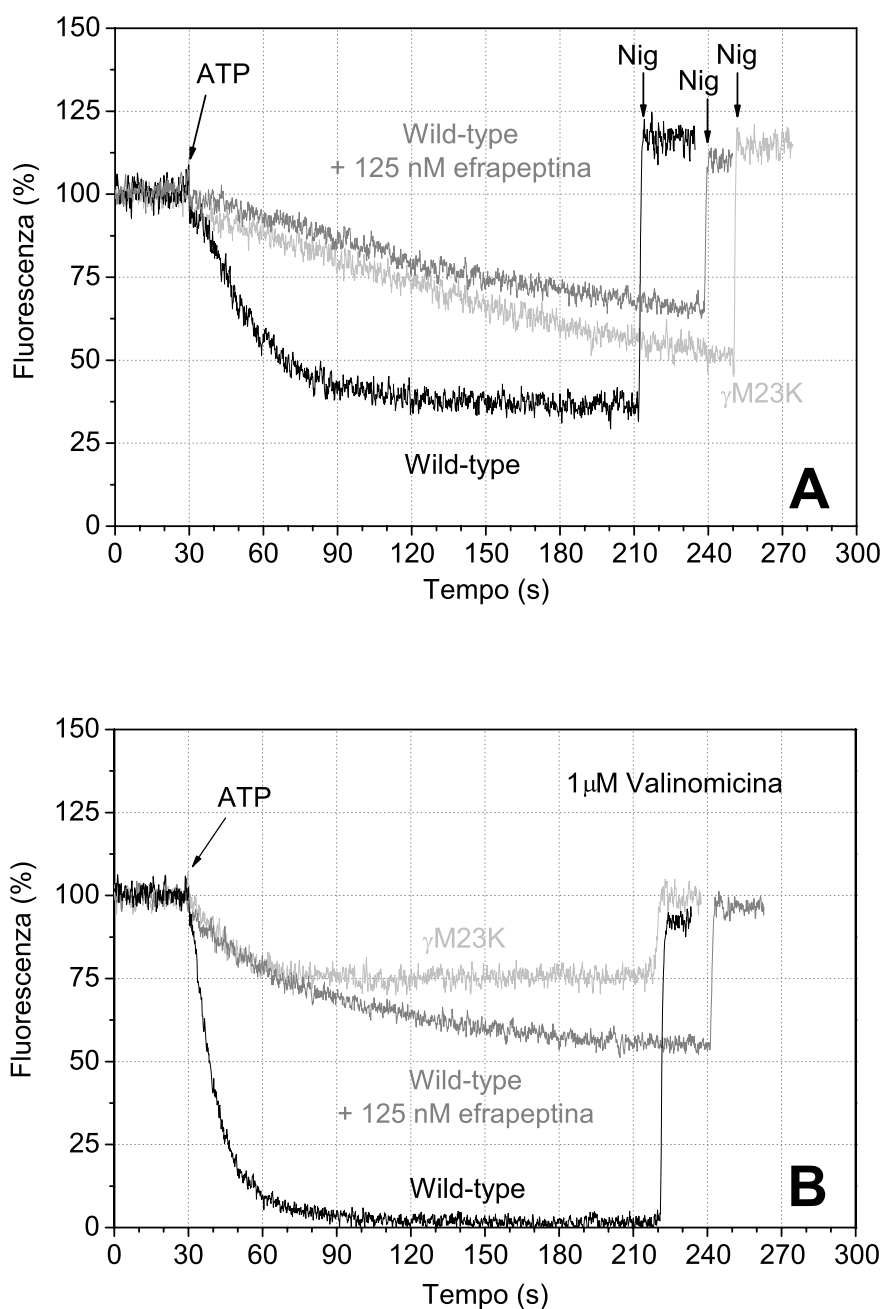


Figura 3.7: Pompaggio protonico in *Rb. capsulatus* wild-type \pm 125 nM efraeptina e nel mutante γ M23K. Una sospensione di 10 μ M BChl di cromatofori è stata risospesa nel buffer per il saggio dell'ACMA descritto nei Materiali e Metodi. L'inibizione riportata nel wild-type corrisponde al livello minimo di efraeptina per ottenere le stesse condizioni di pompaggio e di idrolisi osservate nel mutante. L'ACMA viene aggiunta ad una concentrazione di 0,75 μ M, mentre la reazione viene innescata da 0,6 mM ATP. La fluorescenza viene riportata ai valori finali con 0,5 μ M nigericina (freccie). (A): pompaggio protonico in presenza di $\Delta\psi$. (B): stesse condizioni di (A) ma i campioni sono in presenza di 1 μ M valinomicina.

3.5 Misura del proton pumping in presenza di ADP 250 μM

Come illustrato in figura 3.7 è possibile inibire l'attività catalitica dell'ATPasi di *Rb. capsulatus* wild-type fino ai livelli del mutante γM23K con efrapeptina. Nelle successive misure, l'attività catalitica è stata inibita con alte concentrazioni di ADP. L'attività idrolitica è stata studiata facendo reagire una sospensione di cromatofori 10 μM BChl con ATP 0,6 mM e monitorata attraverso il saggio del Rosso Fenolo (vedi Materiali e Metodi). Le figure 3.8A e 3.8B riportano l'attività idrolitica rispettivamente del wild-type e del mutante nelle diverse condizioni. In condizioni normali la velocità idrolitica del wild-type vale $10 \text{ mMATP} * \text{BChl}^{-1} * \text{s}^{-1}$, mentre il mutante è di $4,5 \text{ mMATP} * \text{BChl}^{-1} * \text{s}^{-1}$. La concentrazione di ADP a cui il wild-type ha ostrato la stessa velocità di idrolisi del mutante è risultata essere 250 μM .

A questo punto il proton pumping associato all'attività idrolitica è stato nuovamente misurato con il saggio dell'ACMA (vedi Materiali e Metodi). Nella figura 3.9A è riassunto l'andamento del wild-type. In assenza di valinomicina quest'ultimo pompa più lentamente nella parte iniziale ma lo stato stazionario che si raggiunge è simile a quello in presenza di valinomicina. Invece se inibito con ADP 250 μM il quenching di fluorescenza cala circa del 50%, ed in presenza di valinomicina non si osserva quasi nessuna attività di pompaggio. Esaminando la figura 3.9B, si nota che se il wild-type viene inibito con ADP mostra lo stesso profilo del mutante, sia in assenza che in presenza di valinomicina.

La figura 3.8A mostra come l'attività idrolitica venga inibita nel wild-type dall'ADP inibitorio e come la leggera stimolazione dell'idrolisi, che si osserva aggiungendo valinomicina non si verifica né sul wild-type né sul mutante, in presenza di ADP 250 μM (figura 3.8B). Per quanto riguarda il pompaggio protonico la presenza dell'ADP risulta fortemente inibitoria per il wild-type e la presenza della valinomicina accentua questa inibizione. Infatti se in presenza di ADP inibitorio si registra ancora un'attività di pompaggio, in assenza del gradiente elettrico questa attività di pompaggio risulta drasticamente ridotta. Questi dati confermano da un lato che l'enzima mutato sembra essere accoppiato tanto quanto il wild-type, e dall'altro che l'ADP e la componente elettrica del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ hanno un ruolo chiave nell'attivazione

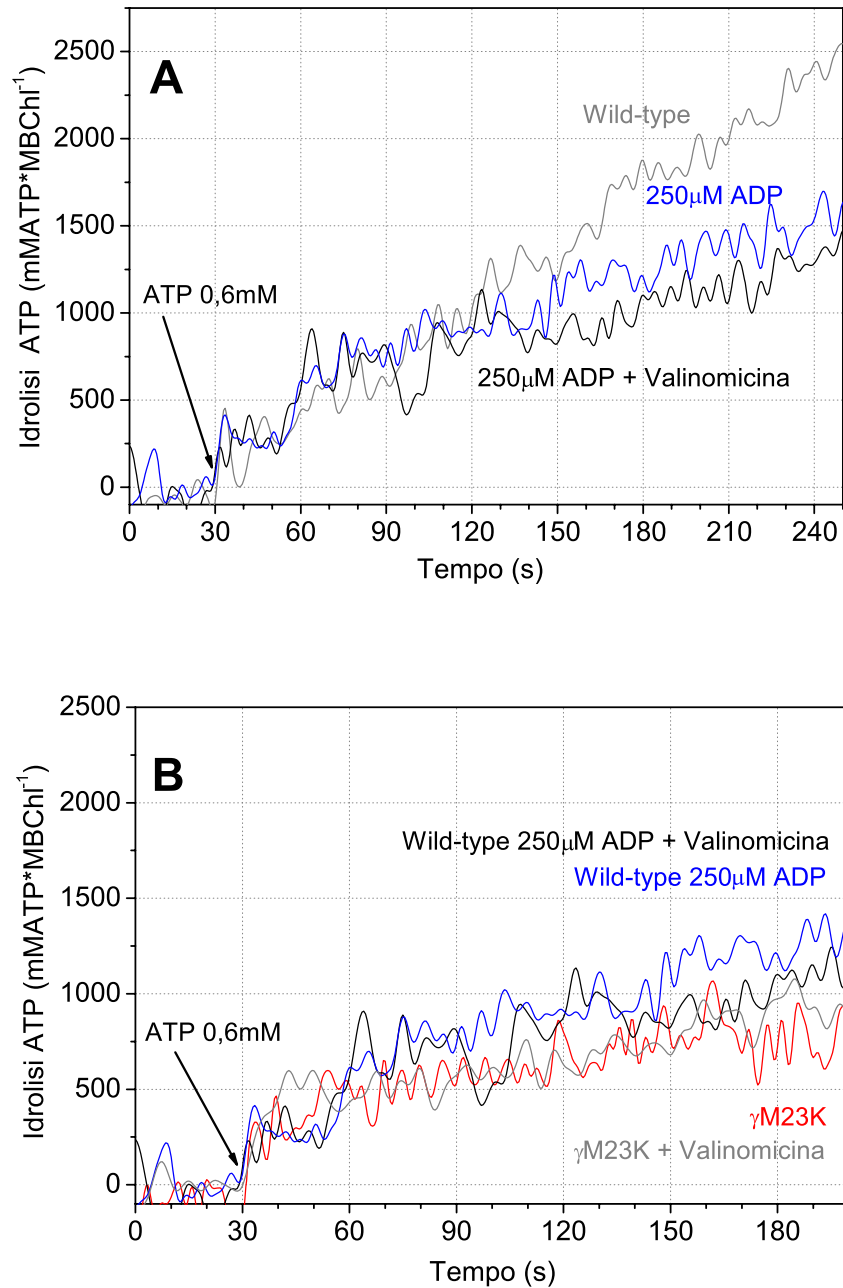


Figura 3.8: Effetti dell'ADP ad alte concentrazioni sull'idrolisi in *Rb. capsulatus* wild-type e confronto con il mutante γ M23K. Una sospensione di cromatofori $10 \mu\text{M}$ BChl è stata risospesa nel buffer di misura della sonda Rosso Fenolo (vedi Materiali e Metodi) e la reazione idrolitica è stata innescata con ATP $0,6 \text{ mM}$ (freccia). L'idrolisi è stata misurata attraverso la variazione di assorbanza della sonda. (A): Attività del wild-type incubato con ADP $250 \mu\text{M}$ \pm valinomicina $1 \mu\text{M}$ e senza inibitore. (B): Confronto tra il wild-type incubato con ADP $250 \mu\text{M}$ \pm valinomicina $1 \mu\text{M}$ ed il mutante con \pm valinomicina $1 \mu\text{M}$.

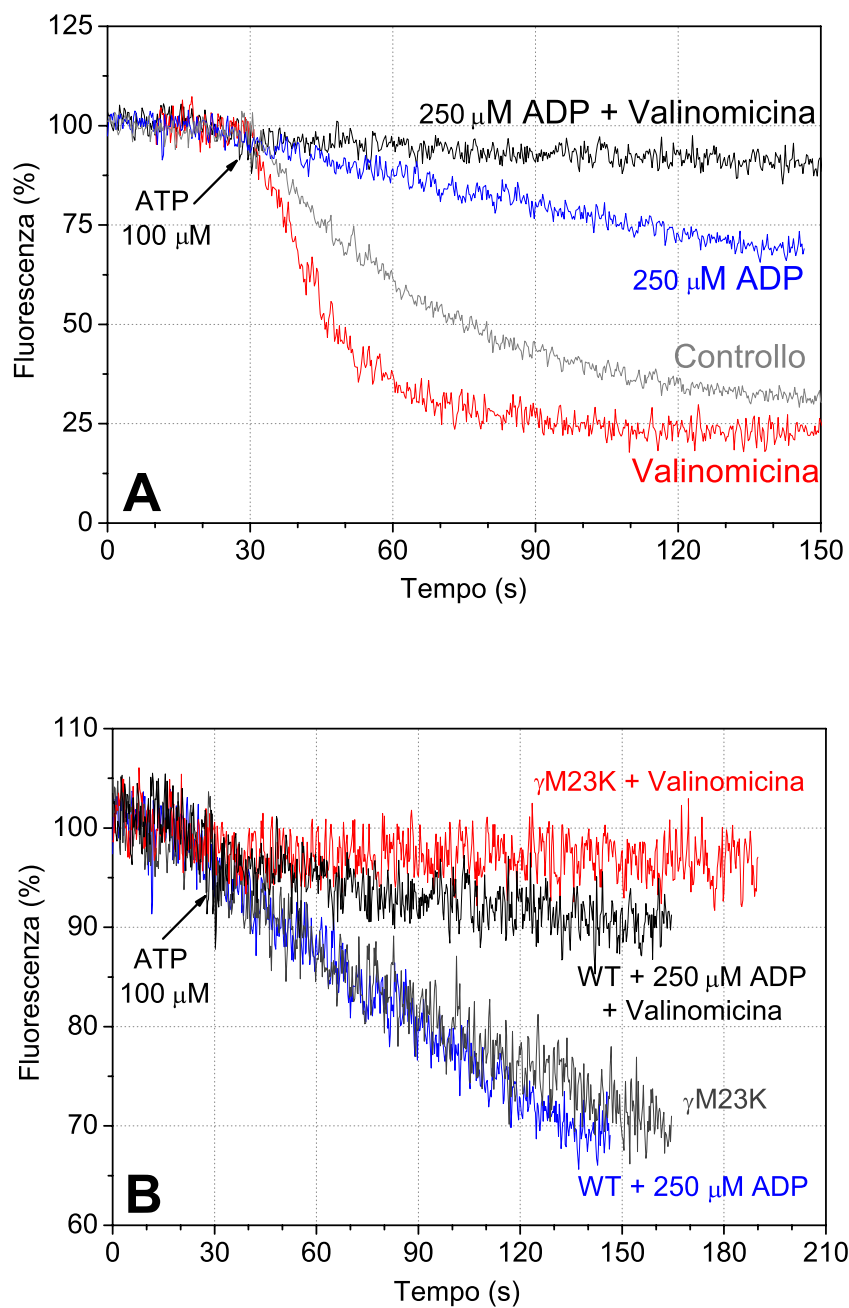


Figura 3.9: Effetti dell'ADP ad alte concentrazioni sul pompaggio protonico in *Rb. capsulatus* wild-type e nel mutante γM23K . Una soluzione di cromatofori 10 μM è stata diluita nel buffer di misura della sonda ACMA (vedi Materiali e Metodi) e la reazione idrolitica è stata innescata con ATP 0,6 mM. Il proton pumping associato all'idrolisi è stato misurato attraverso il quenching di fluorescenza della sonda. (A): Attività del wild-type incubato con ADP 250 μM \pm valinomicina 1 μM e senza inibitore \pm valinomicina 1 μM . (B): Confronto tra il wild-type incubato con ADP 250 μM \pm valinomicina 1 μM ed il mutante con \pm valinomicina 1 μM .

dell'ATPasi. In particolare l'azione del gradiente elettrico assume, anche nel caso dell'inibizione da ADP, un effetto attivante promuovendo sia la catalisi enzimatica che, soprattutto, l'attività di pompaggio.

Fin qui si è studiato come ricondurre il wild-type a condizioni di attività simili al mutante partendo da enzimi preincubati con inibitori osservando i primi istanti di reazione. Nella prossima sezione verranno mostrate misure in cui viene perturbato lo stato stazionario di quenching, generato durante l'attività idrolitica, per comprendere il comportamento del wild-type e del mutante γ M23K in una situazione di equilibrio dinamico.

3.6 Misura del proton pumping in γ M23K

Gli effetti dell'ADP e del $\Delta\psi$ finora osservati si riferiscono a campioni preincubati in presenza di ADP, a varie concentrazioni limite, o con ionofori, come la valinomicina, per dissipare il gradiente elettrico, mantenendo sempre stabili le condizioni sperimentali durante tutto il corso delle misure d'idrolisi o di proton pumping. In questa sezione saranno misurati gli effetti di ADP e $\Delta\psi$ durante la fase di stato stazionario di quenching generato durante l'attività idrolitica.

L'attività di proton pumping viene innescata da 0,6 mM ATP e osservata in cromatofori di γ M23K incubati alternativamente con 1 μ M valinomicina, oppure 50 U/ml PK, oppure con entrambi come illustrato in figura 3.10A (tracce nera, blu e rossa rispettivamente). Il proton pumping che si genera risulta decisamente inferiore rispetto al controllo riportato (traccia grigia) e come già confermato in esperimenti riportati in questo lavoro (figura 3.7B e 3.9A). Se l'ADP prodotto viene convertito in nuovo ATP dalla PK aggiunta o se il gradiente elettrico viene dissipato dall'aggiunta di valinomicina, allo stato stazionario si osserva un drastico rallentamento del flusso di protoni transmembrana pompato dall'enzima (figura 3.10A, traccia grigia). La traccia grigia della figura 3.10A è stata poi ripetuta invertendo le aggiunte per poi confrontare il livello finale di *quenching* come illustrato nella figura 3.10B. Nella traccia grigia, annullando il $\Delta\psi$, si osserva un rapido aumento del quenching di fluorescenza, già descritto in letteratura (9), e la successiva diminuzione del flusso protonico; con l'aggiunta di PK, si riporta il flusso a valori molto vicini a quelli di partenza. Confrontando questi due set sperimentali,

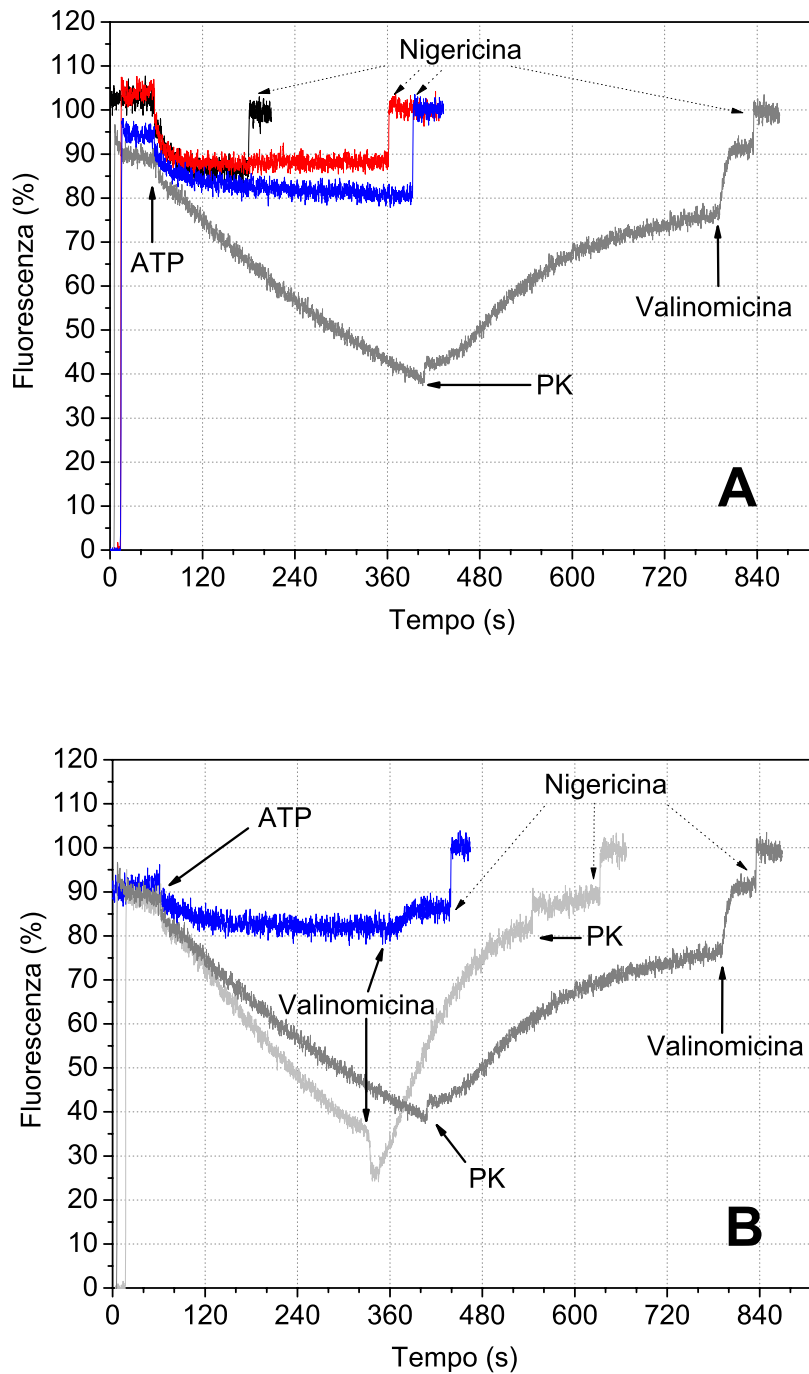


Figura 3.10: Quenching di fluorescenza indotto dall'attività idrolitica nel mutante γ M23K di *Rb. capsulatus*. Una sospensione di cromatofori è stata risospesa nel buffer per il saggio dell'ACMA (vedi Materiali e Metodi) e l'attività idrolitica è stata innescata con ATP 0,6 mM. La fluorescenza è stata riportata ai valori iniziali disaccoppiando le membrane con nigericina 0,5 μ M (freccie tratteggiate). Le aggiunte di 0,6 mM ATP, 50 U/ml PK, 1 μ M valinomicina sono indicate dalle frecce nere. (A) nero: incubato con 1 μ M valinomicina; blu: incubato con 50 U/ml PK; rosso: incubato con 50 U/ml PK e 1 μ M valinomicina; grigio: 50 U/ml PK e 1 μ M valinomicina aggiunte durante la misura. (B) blu: incubato con 50 U/ml PK; grigio: 50 U/ml PK e 1 μ M valinomicina aggiunte nell'ordine durante la misura; grigio chiaro: 1 μ M valinomicina e 50 U/ml PK aggiunte nell'ordine durante la misura.

si osserva un diverso andamento del calo di proton pumping, ma il risultato finale, in assenza di ADP e di $\Delta\psi$ è assolutamente riproducibile. Come ulteriore controllo si è verificato l'effetto della PK allo stato stazionario con valinomicina preincubata registrando gli stessi risultati finali appena descritti (non mostrato).

In conclusione, gli effetti dell'assenza del $\Delta\psi$ e del ADP singolarmente o insieme portano agli stessi risultati. Inoltre la loro azione regolatoria sull'ATPasi si ha nella fase preattivata (figura 3.10A), ma anche allo stato stazionario. Se confrontiamo l'attività idrolitica del mutante con l'attività di pompaggio in presenza di PK e valinomicina vediamo come l'assenza di ADP ed il $\Delta\psi$ esercitino un effetto opposto sulle due attività enzimatiche. In presenza di PK e di $\Delta\psi$ osserviamo un aumento della velocità idrolitica di circa 7 volte (figura 3.5), a fronte di un'attività di pompaggio fortemente ridotta (figura 3.10B traccia blu). In questa particolare situazione l'effetto dell'ADP e del $\Delta\psi$ sull'attività dell'ATPasi lo interpretiamo come un fenomeno di disaccoppiamento intrinseco nel quale l'attività idrolitica non è accoppiata alla normale attività di pompaggio.

Se nella sezione 3.4 abbiamo escluso che la mutazione possa alterare l'accoppiamento dell'enzima, alla luce di questi dati possiamo affermare che la contemporanea assenza dell'ADP e la presenza di una gradiente elettrico promuovono il disaccoppiamento intrinseco dell'ATPasi. Per confermare questo fenomeno osservato nel mutante, nella prossima sezione applicheremo lo stesso protocollo sperimentale al wild-type per verificare gli effetti dell'ADP e del $\Delta\psi$ appena descritti.

3.7 Misura del proton pumping nel WT

Nella sezione 3.6 abbiamo studiato gli effetti dell'ADP e del $\Delta\psi$ durante lo stato stazionario dell'attività di proton pumping. Abbiamo visto nel mutante γ M23K come risulti instabile questa fase del pompaggio se viene meno l'ADP o il gradiente elettrico. Il proton pumping allo stato stazionario può essere sì rallentato transitoriamente dall'azione della valinomicina (9), la quale dissipa il gradiente elettrico attraverso il trasporto transmembrana dello ione potassio, ma non viene totalmente inibito come nel caso del mutante γ M23K da noi osservato. Per valutare se si tratti di una caratteristica intrinseca all'enzima oppure sia l'effetto della mutazione, in questa sezione ripeteremo lo stesso protocollo sul wild-type.

Una sospensione di cromatofori wild-type è stata risospesa nel buffer per il saggio dell'ACMA e la reazione idrolitica è stata innescata aggiungendo ATP 0,6 mM (figura 3.11, freccia). Una volta raggiunto lo stato stazionario sono stati aggiunti PK e valinomicina come indicato dalle frecce. Infine la fluorescenza è stata riportata ai valori iniziali disaccoppiando le membrane con nigericina 0,5 μ M (frecce tratteggiate). Se al wild-type vengono aggiunte 50 U/ml PK (traccia grigio scura, prima freccia) si osserva un leggero aumento del *quenching*. Se in seguito viene dissipato il $\Delta\psi$ (valinomicina, seconda freccia), si ottiene un progressivo rallentamento del flusso protonico con lo stesso andamento osservato nel mutante γ M23K (figura 3.10).

Invertendo le aggiunte (traccia grigio chiara) il fenomeno cambia: si verifica un aumento repentino del *quenching* e una lenta risalita senza però superare il valore di partenza. Solo in seguito all'aggiunta di PK si verifica una forte diminuzione del pompaggio che raggiunge i livelli della traccia grigio scura. Come controllo il proton pumping del wild-type è stato misurato in presenza di sola valinomicina (traccia nera), ma anche con PK e valinomicina (traccia rossa). La prima condizione rivela un leggero aumento del pompaggio consistente con altri esperimenti (figura 3.9), mentre nel secondo caso si osserva una dipendenza del proton pumping da ADP e dal gradiente elettrico durante la fase di preincubazione dell'attività idrolitica.

L'aspetto che distingue il wild-type dal mutante è l'effetto della PK sullo stato stazionario. Nel mutante abbiamo osservato una diminuzione del *quenching* anche in presenza di $\Delta\psi$ (3.10). In questo caso aggiungendo PK, non solo non rallenta il flusso protonico, ma anzi lo stato stazionario risulta maggiore. Al contrario, in presenza di valinomicina, il wild-type mostra lo stesso fenotipo del mutante. Da questi esperimenti si nota come nel wild-type non ci sia solo un fattore preposto al controllo dello stato stazionario. Infatti apparentemente il solo $\Delta\psi$ (figura 3.11, traccia grigio scura) è in grado di mantenere attivo il pompaggio ma, aggiungendo valinomicina, il proton pumping dipende in gran parte dalla presenza dell'ADP (traccia grigio chiara). Per questo motivo in condizioni normali (wild-type) il flusso protonico allo stato stazionario dipende prevalentemente dal gradiente elettrico presente, ma se viene dissipato, l'ADP risulta determinante per mantenere accoppiato il sistema. Il mutante, che viene attivato meno dell'azione del $\Delta\psi$, risente in misura maggiore della presenza dell'ADP in questa fase.

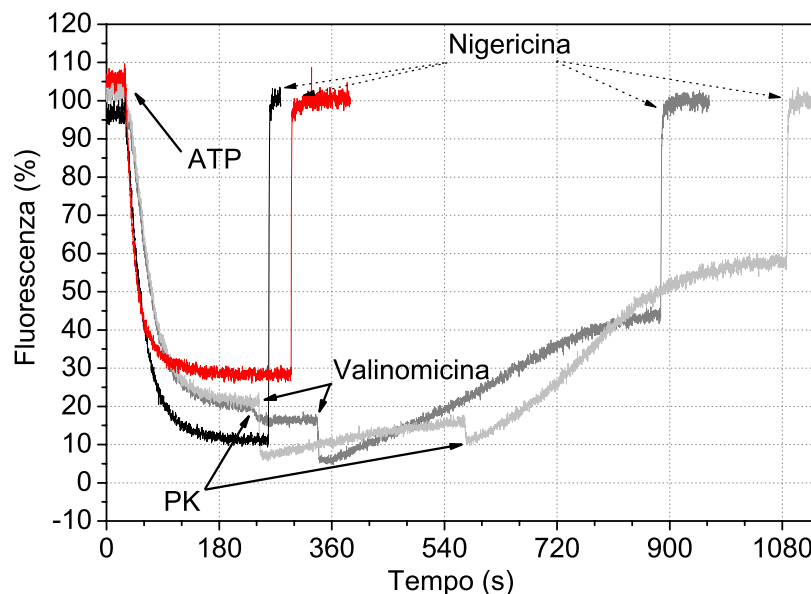


Figura 3.11: Modulazione del proton pumping allo stato stazionario in cromatofori di *Rb. capsulatus* wild-type. Una sospensione di cromatofori $10 \mu\text{M}$ BChl è stata risospesa nel buffer per il saggio dell'ACMA (vedi Materiali e Metodi) e l'attività idrolitica è stata innescata aggiungendo ATP $0,6 \text{ mM}$ (freccia). La fluorescenza è stata riportata ai valori iniziali aggiungendo nigericina $0,5 \mu\text{M}$ (freccie tratteggiate). Le aggiunte di PK 50 U/ml e valinomicina $1 \mu\text{M}$ sono indicate dalle frecce. Nero: preincubato con valinomicina. Rosso: preincubato con PK e valinomicina. Grigio scuro: controllo, PK e valinomicina aggiunte nell'ordine. Grigio chiaro: controllo, valinomicina e PK aggiunte nell'ordine.

Possiamo quindi concludere che approssimativamente i fenomeni regolatori sono analoghi nel wild-type e nel mutante, in quanto sia il gradiente elettrico che l'ADP contribuiscono a mantenere lo stato accoppiato. La differenza è principalmente quantitativa: mentre nel wild-type l'elevata attività di pompaggio contribuisce a mantenere un elevato gradiente di pH anche quando venga dissipato il gradiente elettrico e sia sottratto l'ADP prodotto, nel mutante, la ridotta attività di pompaggio più evidenti gli effetti sia del $\Delta\psi$ che dell'ADP.

3.8 Disaccoppiamento intrinseco: effetto del P_i , ADP e $\Delta\psi$ nel WT

L'ATPasi sembra avere un'elevata efficienza nel trasferire l'energia tra una subunità e l'altra mediante il suo meccanismo rotatorio (46). Diversi studi hanno tuttavia dato indicazioni di un disaccoppiamento tra la reazione idrolitica ed il trasporto

protonico associato, indotto sia da mutazioni, sia da modificazioni chimiche (11) o da ligandi non fisiologici come il Ca^{2+} (33) e il solfito (7). Nel nostro laboratorio sono state recentemente ottenute evidenze di un disaccoppiamento intrinseco modulato dai fisiologici ADP e P_i . Inoltre in questo lavoro abbiamo già avuto modo di illustrare il fenomeno di disaccoppiamento nel mutante (sezione 3.6) nel wild-type (sezione 3.7). Alla luce di questi dati, il fenomeno dell'alta conduttanza protonica attraverso F_0 a basse concentrazioni di ADP o P_i , già note in cloroplasti (23), e in batteri fotosintetici (18), sono state considerate casi di disaccoppiamento intrinseco. In questa sezione, verrà ampliato lo studio del disaccoppiamento intrinseco nell'enzima nativo di *Rb. capsulatus* in funzione di ADP e P_i . Inoltre, come aspetto nuovo del disaccoppiamento verrà indagato il ruolo del $\Delta\psi$. Di seguito verrà illustrato il procedimento utilizzato per calibrare il quenching di fluorescenza della sonda 9-AA ricavando così il ΔpH riportato nelle figure 3.14A e 3.15A.

3.8.1 Calibrazione della sonda fluorescente 9-AA

La 9-aminoacridina (9-AA) ($C_{13} - H_{10} - N_2$) è un'altra acridina fluorescente che oltre all'ACMA (aminochloromethoxyacridina), è stata utilizzata in questa tesi per misurare il *quenching* indotto dall'attività idrolitica. Rispetto alla sonda ACMA è meno sensibile e richiede una maggiore concentrazione di cromatofori per ottenere lo stesso segnale ma al contempo la calibrazione è più semplice.

Il metodo per ottenere una curva di calibrazione è quello dei salti acido base: per ogni campione è stato impostato un valore di pH iniziale compreso tra 8 e 5,0 e dopo equilibratura a questi valori di pH, vengono rapidamente riportati ai valori di pH di partenza (8,0) direttamente nella cuvetta di misura. Si determina in tal modo un ΔpH transmembrana transitorio di 3 unità e durante il transiente si registra la fluorescenza della 9-AA. In questi esperimenti l'ATPasi viene completamente inibita dall'oligomicina aggiunta $20 \mu g/ml$ per rallentare l'efflusso di protoni in seguito all'imposizione del ΔpH . Inoltre i potenziali di diffusione vengono dissipati da valinomicina $1 \mu M$ e KCl 1 M. La cuvetta viene incubata per 30 min al valore di pH imposto per equilibrare i cromatofori.

In figura 3.12 viene mostrato il transiente di fluorescenza in seguito ad un salto di 3,2 unità di pH (linea nera). Al termine della reazione viene aggiunta nigericina $0,5 \mu M$ per verificare la dissipazione completa del gradiente protonico. Dal

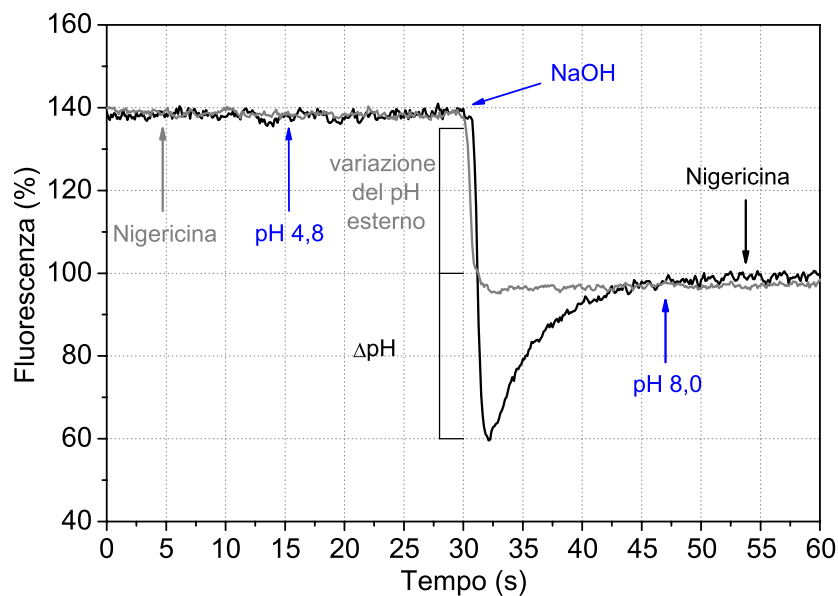


Figura 3.12: Risposta della 9-AA ai salti acido-base in *Rb. capsulatus* WT. Una sospensione di cromatofori $20\ \mu\text{MBCl}$ è stata risospesa nel buffer di misura (vedi testo) con l'aggiunta di $1\ \mu\text{M}$ valinomicina e $20\ \mu\text{g/ml}$ oligomicina. Traccia nera: il campione portato a pH 4,8 con HCl 1 M e incubato per 30 min. In successione viene aggiunto il fluoroforo e un volume noto di NaOH per riportare il pH a 8,0. La nigericina è aggiunta come controllo per determinare il valore massimo di fluorescenza in membrane disaccoppiate. Traccia grigia: il campione è nelle stesse condizioni sperimentali descritte per la traccia nera ma in presenza di $0,5\ \mu\text{M}$ nigericina per osservare la risposta aspecifica del fluoroforo in assenza di $\Delta\mu_{\text{H}^+}$.

momento che il segnale finale si pone ad un livello di fluorescenza intermedio tra il valore iniziale ed il picco è necessario verificare a cosa corrisponde la prima parte della differenza di fluorescenza registrata. Per questo motivo viene incubato un campione con lo stesso valore iniziale di pH, in questo caso 4,8, ma in presenza di nigericina in modo da osservare il fenomeno in presenza di membrane disaccoppiate (traccia grigia). Si osserva quindi che il salto di fluorescenza dipende dalla improvvisa variazione di pH e non dalle proprietà di permeabilità della membrana.

Per descrivere la differenza di fluorescenza misurata in funzione del valore di ΔpH imposto nel salto acido base imposto, abbiamo utilizzato un'equazione esponenziale ricavata da esperimenti condotti su membrane dello stesso tipo (8). Partendo dall'equazione 2.5 (vedi Materiali e Metodi) ogni differenza di fluorescenza, ottenuta in funzione del salto acido-base registrato, (figura 3.13) viene normalizzata ponendo prendendo come valore minimo quello di scattering delle membrane $F(A)$ (non mostrato in figura 3.12) e come valore massimo di fluorescenza $F(B)$,

ottenuto dopo l'aggiunta della nigericina (freccia nera).

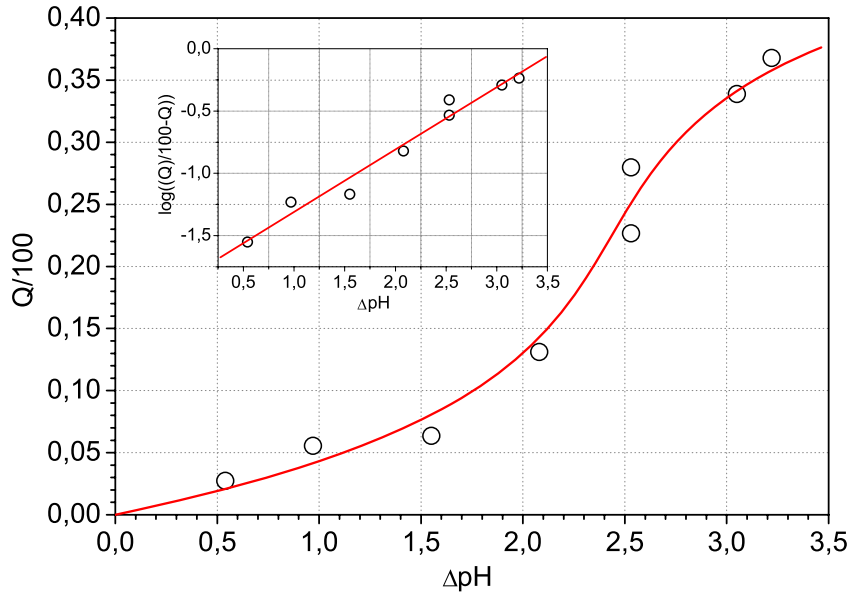


Figura 3.13: Curva di taratura della fluorescenza della 9-AA in funzione del ΔpH in *Rb. capsulatus* WT. I punti sperimentali sono stati fittati con l'equazione 3.2 ottenendo il miglior fit con questi valori: $P1 = 20,2 \pm 1,6$; $P2 = 0,70 \pm 0,06$; $P3 = -8,20 \pm 1$. Insetto: la linearizzazione dei dati sperimentali è stata possibile applicando la funzione 3.3 ottenendo con il miglior fit i seguenti valori: $A = -1,76 \pm 0,09$; $B = 0,47 \pm 0,04$.

Il modello, originariamente proposto da Schuldiner (35) per interpretare le variazioni di fluorescenza energia dipendenti, assume che il fluoroforo si redistribuisca a cavallo della membrana in funzione del gradiente protonico presente, e la percentuale di quenching rifletta il rapporto di distribuzione tra la sonda all'interno e all'esterno della membrana. In accordo con il modello la 9-AA si comporta come una amina debole, essendo nella forma non protonata A^- permeabile alla membrana secondo un gradiente di diffusione, mentre nella forma protonata A^+ completamente impermeabile al doppio strato lipidico. Di conseguenza il fluoroforo si distribuisce secondo il ΔpH , come risultato dell'equilibrio tra la diffusione e la protonazione. In termini quantitativi questo equilibrio si può esprimere in questo modo:

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{out}} - \text{pH}_{\text{in}} = \log \frac{[A_{\text{in}}^-]}{[A_{\text{out}}^-]} = \log \frac{Q}{100 - Q} \quad (3.1)$$

dove A^- è la concentrazione totale del fluoroforo interno ed esterno al cromatoforo e Q è la percentuale di quenching di fluorescenza. L'uso di questi parametri,

in relazione alla concentrazione di 9-AA, implica l'assunzione che l'intensità di fluorescenza sia proporzionale alla concentrazione del fluoroforo presente nella fase esterna, senza nessun contributo da parte della porzione presente all'interno del cromatoforo. I valori sperimentali vengono messi in grafico in funzione del ΔpH generato durante i salti acido-base registrati e analizzati con la seguente equazione (figura 3.13):

$$\Delta\text{pH} = \frac{P1 * Q}{P2 - Q} * \exp\left(\frac{Q}{P2 - Q}\right) + P3 * Q \quad (3.2)$$

dove Q è il *quenching* di fluorescenza e $P1$, $P2$ e $P3$ sono parametri empirici. L'equazione 3.2 contenente i tre parametri empirici $P1$, $P2$ e $P3$ è stata sviluppata da un modello di risposta della 9-AA al ΔpH in cui si tiene conto non solo della distribuzione fra il volume interno ed esterno della vescicola (35), ma anche della ripartizione dell'amina fra le fasi acquose e i lipidi di membrana (8; 10). La conversione nella formula $\text{Log}\left(\frac{Q}{100-Q}\right)$ vs ΔpH linearizza l'equazione 3.2; il grafico lineare può essere espresso come

$$\text{Log}\left(\frac{Q}{100-Q}\right) = A + B * \Delta\text{pH} \quad (3.3)$$

Nel caso specifico della calibrazione riportato in figura 3.13 si ottiene:

$$\text{Log}\left(\frac{Q}{100-Q}\right) = 0,47\Delta\text{pH} - 1,76 \quad (3.4)$$

da cui

$$\begin{aligned} \Delta\text{pH} &= \frac{1}{0,47} * \text{Log}\frac{Q}{100-Q} + \frac{1,76}{0,47} = \\ &= 2,13 * \log\frac{Q}{100-Q} + 3,74 \end{aligned} \quad (3.5)$$

dove 1,76 è il valore dell'intercetta con ΔpH nullo (A) e 0,47 il coefficiente angolare del fit lineare (B).

Dalla funzione 3.3 si osserva come sia possibile linearizzare la risposta della sonda 9-AA in funzione del ΔpH presente. Le evidenze quantitative di questo modello sono riportate in letteratura sia in sistemi naturali che in membrane isolate. In cloroplasti ad esempio è stata dimostrata una buona correlazione tra il ΔpH stimato con la 9-AA e $[^{14}\text{C}]$ metilamina o NH_4^+ (35).

3.8.2 Variazione del ΔpH e dell'attività idrolitica in funzione di ADP, P_i e $\Delta\psi$

In figura 3.14 l'attività idrolitica è innescata da ATP 0,6 mM ed il proton pumping generatosi in funzione del P_i è stato monitorato con la sonda fluorescente 9-AA 0,75 μM e il *quenching* così ottenuto è stato convertito in ΔpH con il metodo riportato nella sezione 3.8.1. Le misure sono state condotte in presenza di 1 μM valinomicina per dissipare il gradiente elettrico. Le tracce mostrano l'andamento della formazione del ΔpH in funzione della concentrazione di P_i nel ceppo B100.51 wild-type di *Rb. capsulatus*. Il pompaggio protonico, misurato dopo 90 s di reazione, è fortemente dipendente dal P_i presente in quanto passa da circa 2,75 a 3,5 unità di pH.

Come già riportato dal nostro laboratorio (42), il ligando P_i stimola l'accoppiamento del pompaggio protonico all'attività idrolitica. Per verificare l'accoppiamento dell'enzima, nelle stesse condizioni sperimentali, è stata misurata anche l'idrolisi mediante la tecnica del Rosso Fenolo (figura 3.14). Le tracce rivelano una dipendenza da P_i con andamento bifasico. La velocità massima di reazione, misurata dopo 90 s, cresce da 5,4 fino a 9,0 con 200 μM P_i e cala leggermente in con 1000 mM di P_i . Si è inoltre valutato anche l'effetto dell'ADP presente durante la misura, mantenendo costanti i valori del P_i e sempre in presenza di 1 μM valinomicina, (figura 3.15). La concentrazione dell'ADP viene regolata dal sistema PK (vedi Materiali e Metodi) che converte ADP in ATP defosforilando il PEP a piruvato. In presenza di PK, la velocità idrolitica è stata misurata accoppiando la PK alla reazione della LDH e alla conseguente variazione di assorbanza del NADH in funzione del tempo (figura 3.15B). In assenza di PK, invece, è stato utilizzato il saggio della 9-AA per il proton pumping e del Rosso Fenolo per l'idrolisi come già riportato per la figura 3.14. La reazione idrolitica, in entrambi i casi, è stata innescata aggiungendo ATP 0,6 mM.

I risultati del proton pumping mostrano una dipendenza dall'ADP presente durante la reazione. Infatti il ΔpH scende da 3,44 a 2,66 unità in presenza di 128 U/ml di PK (figura 3.15A). La velocità idrolitica, al contrario, viene fortemente stimolata poiché già con 0,5 U/ml di PK la velocità sale a $32,7 \text{ mM ATP} \cdot \text{BChl}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e con 128 U/ml di PK il valore aumenta di 10 volte rispetto alla velocità basale, passando da $7,30$ a $74,9 \text{ mM ATP} \cdot \text{BChl}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (figura 3.15B). La rapida diminuzione

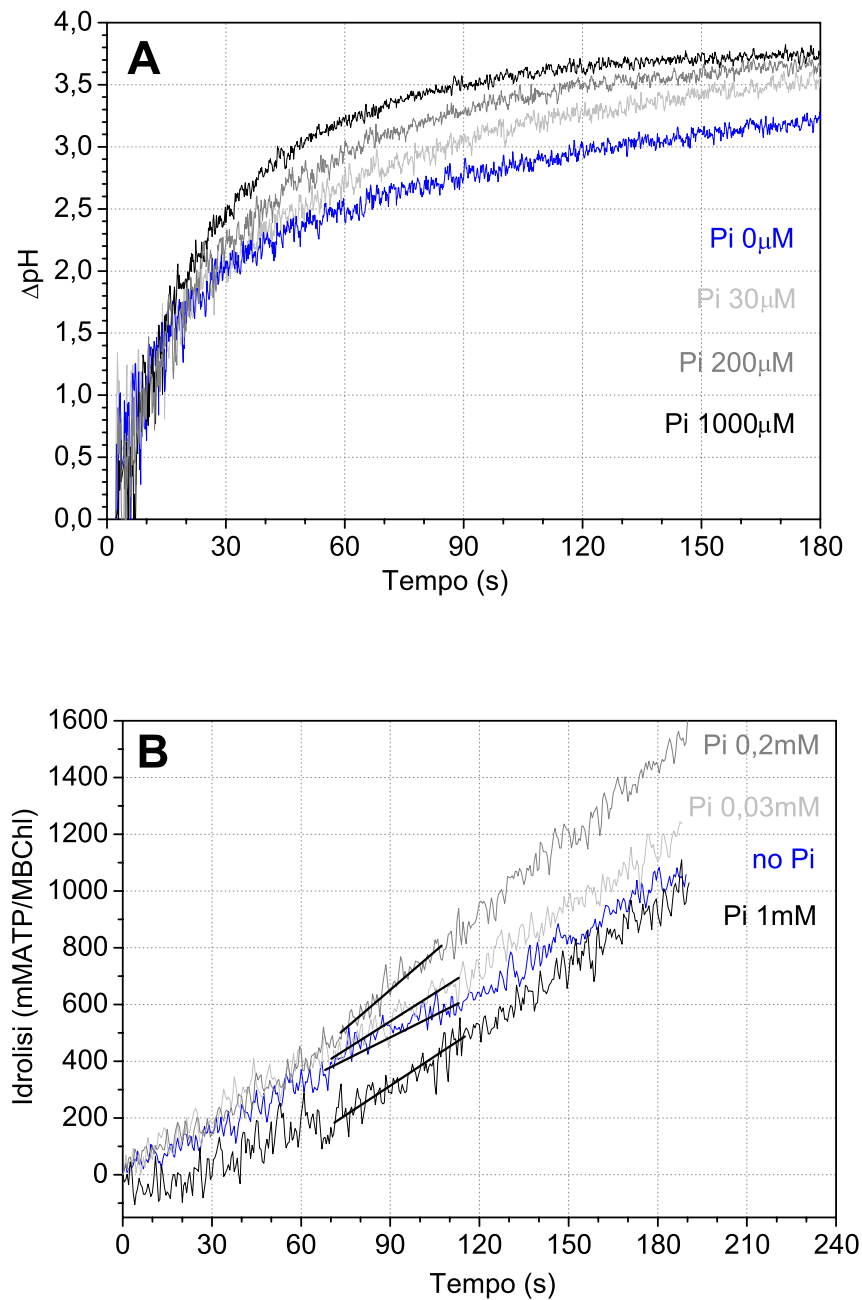


Figura 3.14: Formazione del ΔpH e attività in funzione del P_i in *Rb. capsulatus* B100.51. (A) Una soluzione di cromatofori 20 μM è stata diluita nel buffer di misura e l'attività idrolitica è stata innescata aggiungendo ATP 0,6 mM in presenza di 1 μM valinomicina. Il quenching di fluorescenza misurato con la sonda 9-AA 0,75 μM è stato trasformato in ΔpH come riportato nella sezione 3.8.1. Blu: 0 P_i ; grigio chiaro: 30 μM ; grigio: 200 μM ; nero: 1000 μM . (B) Attività idrolitica basale misurata in funzione del P_i aggiunto. Le variazioni di concentrazione di ATP sono state misurate con la sonda Rosso Fenolo pH dipendente nelle stesse condizioni del proton pumping (vedi materiali e metodi). Blu: 0 P_i ; grigio chiaro: 30 μM ; grigio: 200 μM ; nero: 1000 μM . La velocità media è stata calcolata a circa 90 s dall'inizio della reazione (rette nere).

3.8. DISACCOPIAMENTO INTRINSECO: EFFETTO DEL P_i , ADP E $\Delta\psi$ NEL WT85

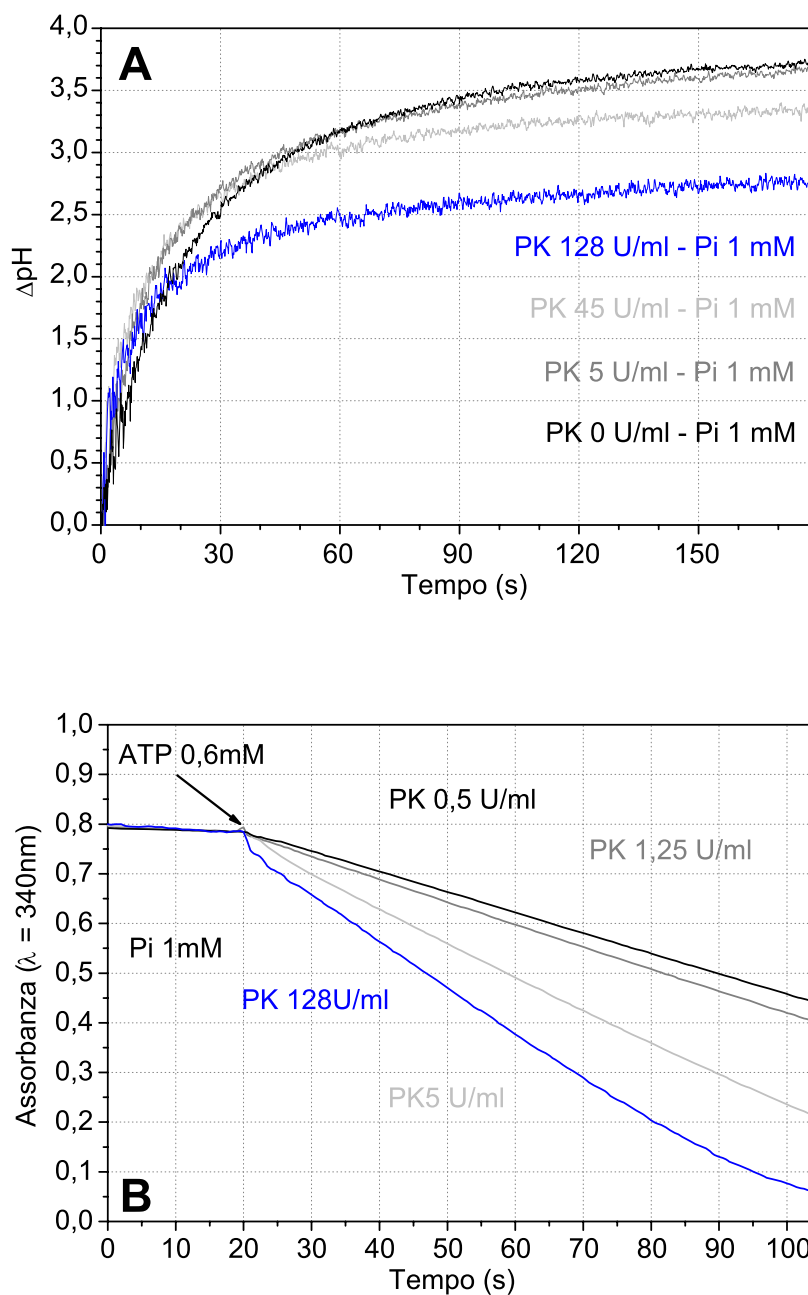


Figura 3.15: Formazione del ΔpH e dell'attività idrolitica in funzione dell'ADP presente regolato dal sistema PK-LDH e con 1 mM P_i in *Rb. capsulatus* B100.51 wild-type. Una soluzione di cromatofori $20 \mu M$ è stata diluita nel buffer di misura e l'attività idrolitica è stata innescata aggiungendo ATP 0,6mM in presenza di $1 \mu M$ valinomicina. (A) Proton pumping misurato in funzione della PK aggiunta ed in presenza di 1 mM P_i . Il quenching di fluorescenza misurato con la sonda 9-AA $0,75 \mu M$ è stato trasformato in ΔpH come riportato nella sezione 3.8.1. Blu: 128 U/ml PK; grigio chiaro: 45 U/ml PK; grigio: 5 U/ml PK; nero: 0 U/ml PK. (B) Attività idrolitica basale misurata in funzione della PK aggiunta. Le variazioni di concentrazione di ATP sono state misurate con la sonda Rosso Fenolo pH dipendente nelle stesse condizioni del proton pumping (vedi materiali e metodi). Blu: 128 U/ml PK; grigio chiaro: 5 U/ml PK; grigio: 1,25 U/ml PK; nero: 0,5 U/ml PK. La velocità media è stata calcolata nella parte centrale della reazione.

di NADH, ben osservabil in particolare in presenza di alte concentrazioni di PK (traccia blu ??B), dipende dalla concentrazione dell'ADP contaminante presente nell'ATP aggiunto, poichè questo effetto si verifica anche in assenza di cromatofori. La percentuale di ADP, presente nella soluzione di ATP da noi usata, è stata misurata essere nell'ordine dell'1% circa. A parità di velocità di produzione di ADP da parte dell'ATPasi, all'aumentare della concentrazione di PK nel saggio si ottiene una diminuzione della concentrazione di ADP allo stato stazionario. In stato stazionario la velocità idrolitica bilancia la velocità della reazione della PK come riportato qui sotto:

$$v(\text{idrolisiATP}) = v(\text{PK}) = \frac{V_{\max}^{\text{ADP}} * [\text{ADP}]_{\text{ss}}}{[\text{ADP}]_{\text{ss}} + K_{\text{M}}^{\text{ADP}}} \quad (3.6)$$

dove V_{\max}^{ADP} e $K_{\text{M}}^{\text{ADP}}$ sono le costanti di Michaelis-Menten della reazione della PK: la prima è una funzione dell'attività della PK in U/ml e la seconda vale 0,3 mM (43). La concentrazione di ADP in stato stazionario che si ricava da questa formula, $[\text{ADP}]_{\text{ss}}$, deve essere considerata in termini qualitativi in quanto la competizione tra ATP e ADP e le altre alterazioni della reazione cinetica dell'attività della PK non sono state considerate.

La figura 3.16 riassume le velocità di pompaggio e idrolitiche misurate nelle condizioni appena descritte. I dati ottenuti in presenza di PK e di 1 mM P_i mostrano un accoppiamento molto differente da quello presentato in funzione del solo P_i . Come già anticipato in precedenza in funzione della concentrazione di P_i l'attività idrolitica risulta bifasica ed il pompaggio aumenta all'aumentare del P_i presente (figura 3.16A). Mantenendo costante la concentrazione di P_i , e misurando le attività dell'ATPasi in funzione dell'ADP presente, osserviamo come il proton pumping risenta negativamente dell'assenza dell'ADP, e come invece l'idrolisi sia attivata anche di dieci volte (figura 3.16B). I valori del ΔpH e dell'attività idrolitica sono stati riportati in funzione dell'ADP presente allo stato stazionario, $[\text{ADP}]_{\text{ss}}$, calcolato con l'equazione 3.6 (3.16B.). In base a questi dati possiamo dire che, mentre l'attività idrolitica decuplica, il ΔpH prodotto cala in funzione della PK presente nel mezzo, indicando un progressivo disaccoppiamento intrinseco dell'ATPasi all'aumentare della concentrazione della PK aggiunta, ossia quando la concentrazione in stato stazionario di ADP diminuisce a valori sub-micromolari.

La figura 3.17 riporta le condizioni limite fin qui studiate. In assenza di PK

3.8. DISACCOUPIAMENTO INTRINSECO: EFFETTO DEL P_i , ADP E $\Delta\psi$ NEL WT87

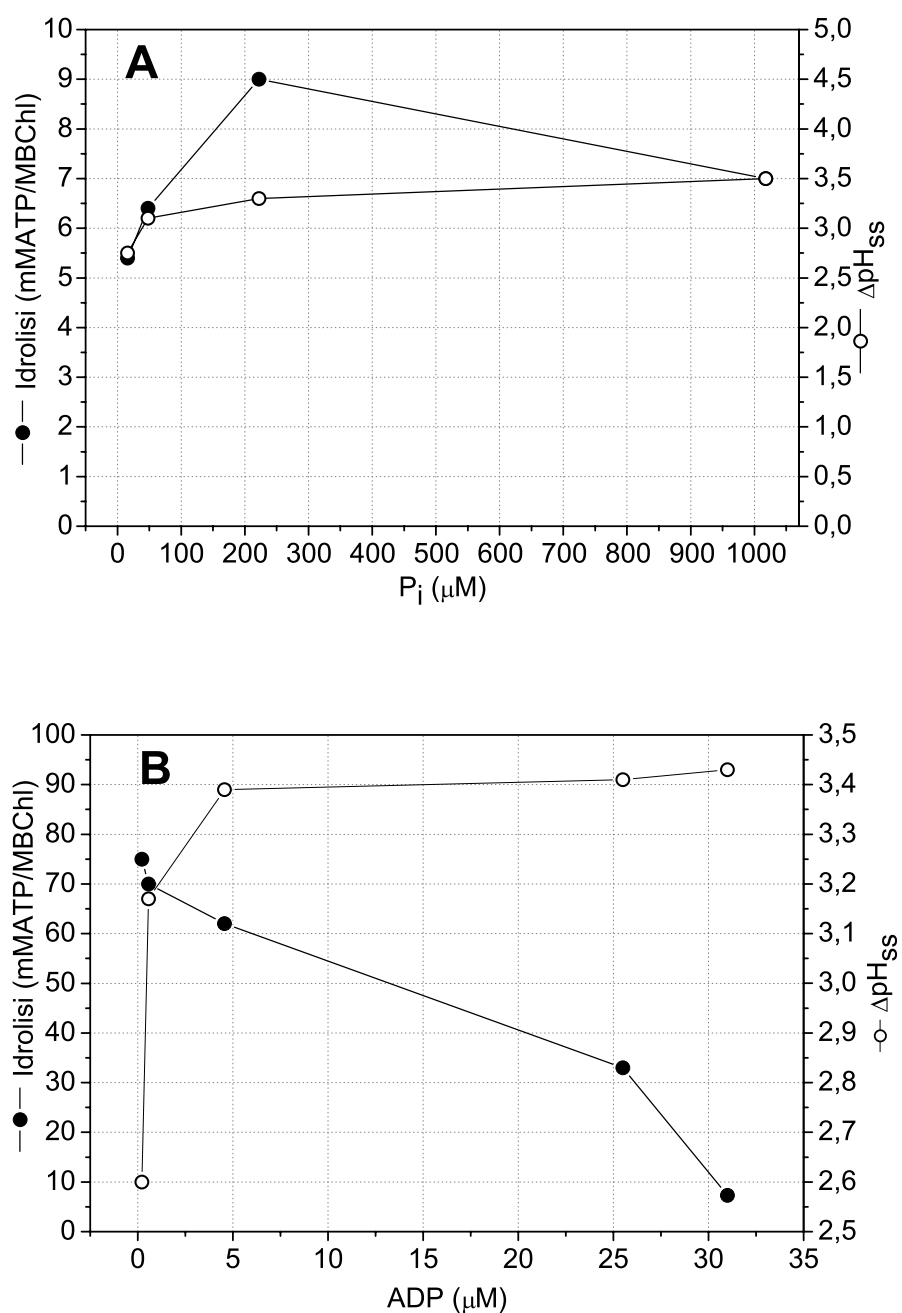


Figura 3.16: Valori delle velocità idrolitiche e di ΔpH in funzione dell'ADP e del P_i in *Rb. capsulatus* B100.51 wild-type. I valori riportati sono stati ricavati dalle figure 3.14 e 3.15. (A) Le concentrazioni di P_i si riferiscono a quelle aggiunte in cuvetta prima della reazione. (B) Le concentrazioni di ADP sono state calcolate applicando l'equazione 3.6 presentata nel testo.

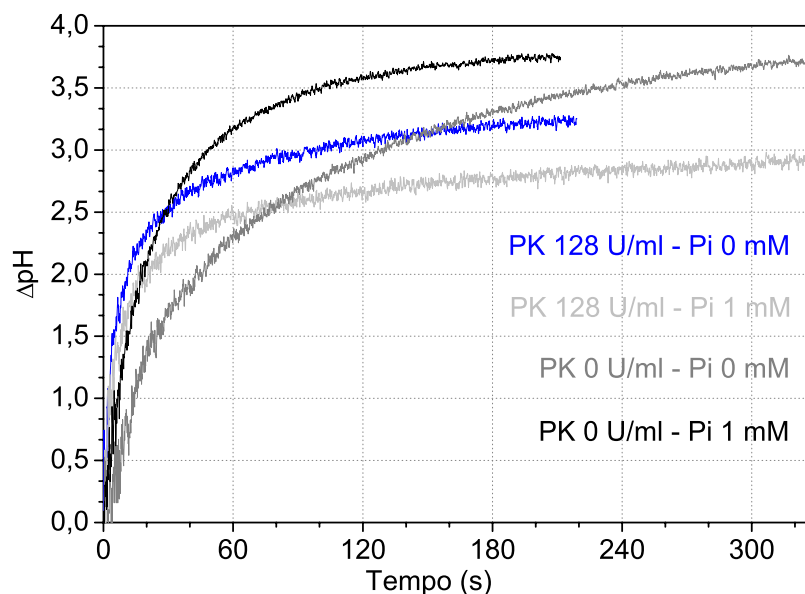


Figura 3.17: Formazione del ΔpH in diverse condizioni di P_i e ADP in *Rb. capsulatus*. Le relative concentrazioni sono riportate in figura.

(tracce grigia e nera), il P_i $1000 \mu\text{M}$ stimola la velocità iniziale e permette di raggiungere, in meno tempo, gli stessi valori di ΔpH misurati nelle tracce senza P_i esogeno. Al contrario, in presenza della massima concentrazione di PK (128 U/ml) PK, e quindi della minima concentrazione di ADP, $1000 \mu\text{M}$ P_i risulta inibitorio rispetto alla condizione in cui è presente soltanto quello prodotto dall'attività idrolitica (tracce grigio chiaro e blu, rispettivamente). Inoltre in queste condizioni e in assenza di P_i , l'attività idrolitica è ulteriormente stimolata rispetto all'assenza di PK arrivando fino a $85 \text{ mM ATP} * \text{MBC hl}^{-1} * \text{s}^{-1}$. L'effetto del P_i risulta, quindi, attivante o inibitorio per il proton pumping in funzione della concentrazione di ADP presente nel mezzo. A fronte di un forte aumento della velocità idrolitica (fino a 10 volte) il ΔpH risulta inibito del 25% circa. Infine, la velocità di formazione e lo stato stazionario dipendono dall'ADP che condiziona a sua volta l'effetto del P_i sul ΔpH .

Nella prossima sezione verranno presentati i dati relativi al pompaggio protonico e all'attività idrolitica dell'ATPasi prodotti dall'inibizione selettiva delle porzioni F_0 ed F_1 rispettivamente con efrapeptina ed oligomicina.

3.9 Effetti degli inibitori di F_0 , F_1 e dell'ADP sull'ATPasi WT

L'ATPasi è finemente regolata nell'attività catalitica e di pompaggio protonico ed esistono diversi inibitori in grado di condizionare l'attività delle due porzioni F_0 ed F_1 . Ad esempio la porzione F_0 è molto sensibile all'oligomicina, che si lega alle subunità c del rotore, mentre la porzione F_1 viene inibita da efraeptina, che si lega nella regione di contatto tra il rotore e lo statore compresa tra le subunità γ e β . In entrambi i casi si osserva sia una diminuzione dell'attività idrolitica che di quella protonica. Nelle sezioni 3.6 e 3.7 abbiamo osservato la diminuzione del proton pumping ad opera della PK nel mutante γ M23K (figura 3.10) e nel wild-type (figura 3.11). Nel mutante l'azione dell'ADP si manifesta indipendentemente dalla presenza della componente elettrica, mentre nel wild-type la diminuzione del pompaggio dipende strettamente dall'aggiunta di valinomicina.

In altre parole la presenza dell'ADP, insieme al $\Delta\psi$, sembra essere indispensabile per conservare l'attività di pompaggio durante la fase di stato stazionario. Nel mutante, invece, sembra che l'ADP sia in grado, da solo, di modificare la velocità di pompaggio. In questa sezione vengono riportate misure sull'effetto dell'ADP durante l'attività idrolitica, ed il proton pumping associato, in funzione della concentrazione degli inibitori di F_0 e di F_1 .

3.9.1 Effetto dell'inibitore oligomicina e dell'ADP sull'ATPasi

La figura 3.18 mostra il *quenching* di fluorescenza in seguito all'aggiunta di 0,6 mM ATP in cromatofori wild-type incubati a varie concentrazioni di oligomicina. Dopo 180 s di misura viene aggiunta PK 20 U/ml (frecche nere). Infine viene dissipato il gradiente elettrico con valinomicina 1 μ M (frecche rosse) e solo in seguito la fluorescenza viene riportata ai valori iniziali con 0,5 μ M nigericina.

La traccia nera mostra l'attività del wild-type in assenza di inibitori. Come già riportato in figura 3.11 e 3.15, la diminuzione dell'ADP presente nello stato stazionario ad opera della PK promuove l'attività idrolitica ed il pompaggio protonico associato in queste particolari condizioni. Se si aggiunge valinomicina si osserva un progressivo calo del pompaggio in seguito alla dissipazione del gradiente elettrico.

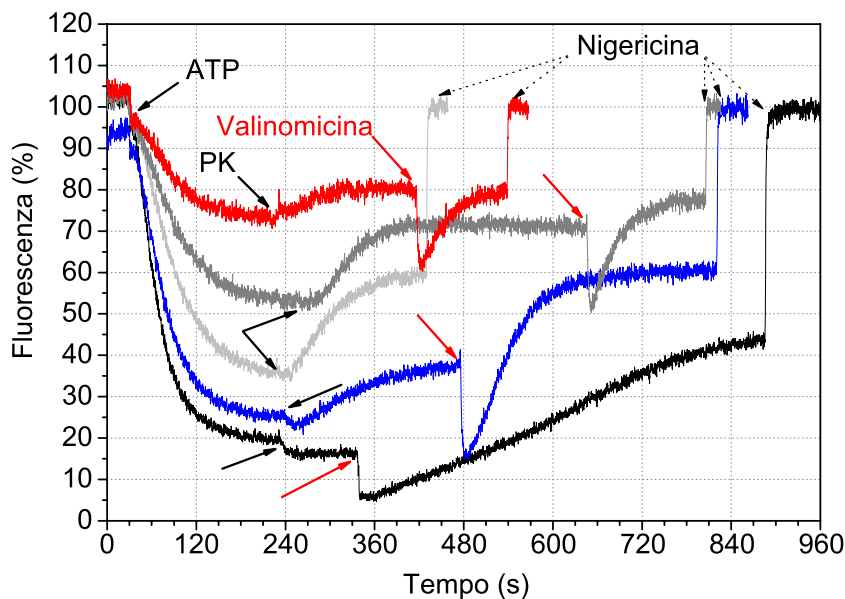


Figura 3.18: Attività di proton pumping in *Rb. capsulatus* wild-type parzialmente inibita da oligomicina. I cromatofori sono stati risospesi nel buffer di misura $10 \mu\text{M}$ BChl (vedi materiali e metodi). La reazione è stata monitorata con la sonda fluorescente ACMA $0,75 \mu\text{M}$ ed innescata aggiungendo ATP $0,6 \text{ mM}$. Dopo 180 s di reazione viene aggiunta PK 50 U/ml (frecche nere). In seguito viene dissipato il gradiente elettrico con valinomicina $1 \mu\text{M}$ (frecche rosse) e la fluorescenza riportata ai valori iniziali con nigericina $0,5 \mu\text{M}$ (frecche tratteggiate). Traccia nera: $0 \mu\text{M}$ oligomicina; blu: $0,05 \mu\text{M}$; grigio chiaro: $0,1 \mu\text{M}$; grigio: $0,3 \mu\text{M}$; rosso: $0,4 \mu\text{M}$.

Incubando il campione con $0,05 \mu\text{M}$ oligomicina (traccia blu), si osserva un valore inferiore di fluorescenza allo stato stazionario rispetto al wild-type; aumentando fino a $1 \mu\text{M}$ oligomicina si verifica la progressiva inibizione del pompaggio (vedi anche figura 3.19B). Dopo 180 s di reazione, nelle tracce in presenza di inibitore, aggiungendo 20 U/ml PK si ha una forte rallentamento del pompaggio protonico stimolato dall'idrolisi. L'oligomicina determina la diminuzione del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ prodotto e la rapida diminuzione dell'ADP causa un calo del pompaggio nella fase di stato stazionario. Aggiungendo infine valinomicina vediamo come si riduca ulteriormente il valore finale di *quenching* in seguito alla dissipazione del gradiente elettrico. Questo calo varia a seconda del valore di *quenching* misurato allo stato stazionario (dopo 3 min di reazione).

L'oligomicina altera quindi il pompaggio protonico allo stato stazionario ma anche la velocità iniziale come riportato in figura 3.19. Se la velocità iniziale cala di 10 volte incubando il campione con $1 \mu\text{M}$ oligomicina (figura 3.19A, traccia nera), lo stato stazionario diminuisce di 5 volte passando dall'80% al 16%

3.9. EFFETTI DEGLI INIBITORI DI F_0 , F_1 E DELL'ADP SULL'ATPASI WT91

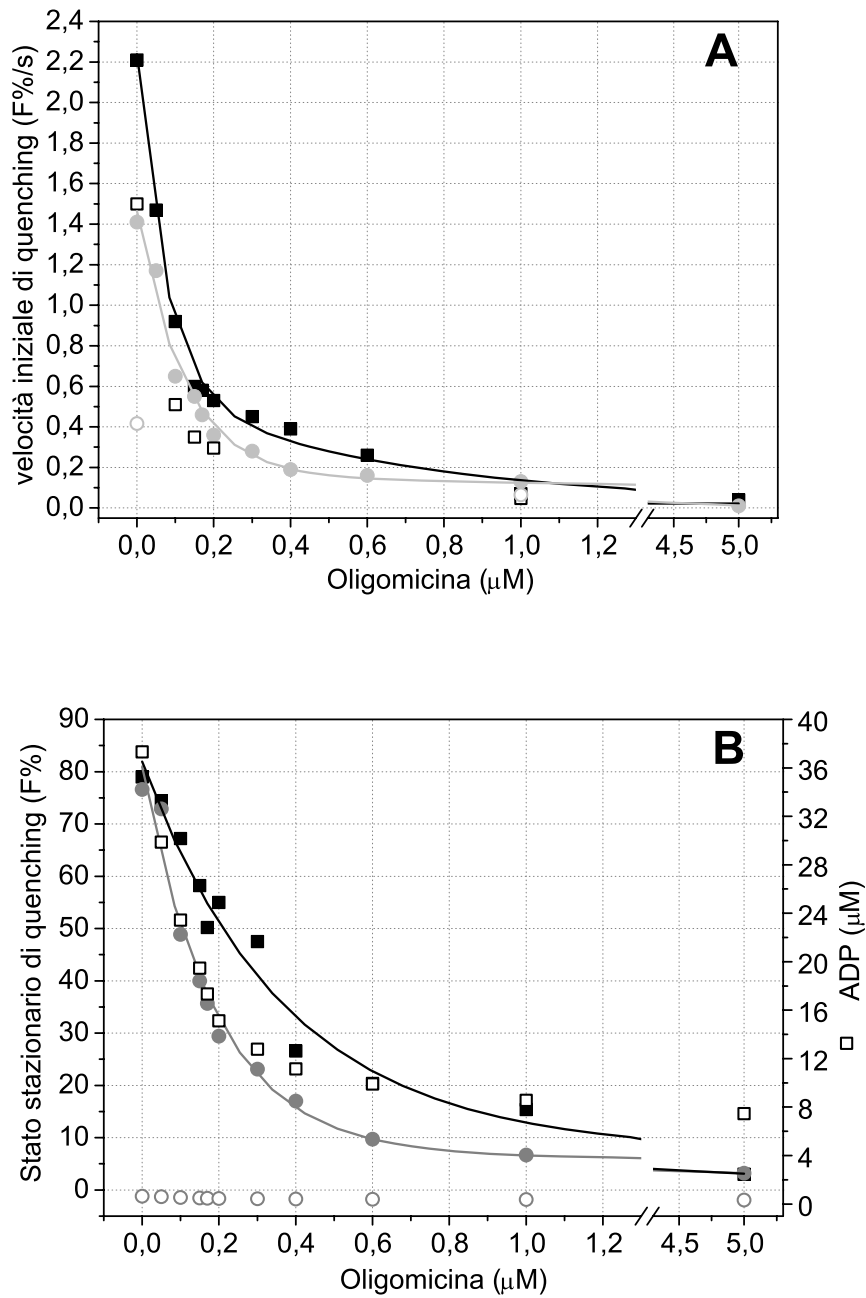


Figura 3.19: Variazione della velocità iniziale di *quenching* in funzione della concentrazione di oligomicina in *Rb. capsulatus* wild-type. (A) Velocità iniziale di *quenching* espressa in F%/s: ■: controllo, k_{50} 73 nM oligomicina; ●: in presenza di 20 U/ml PK, k_{50} 123 nM oligomicina; □: con valinomicina 1 μM sempre presente; ○: in presenza di 20 U/ml PK e valinomicina 1 μM. (B): *quenching* di fluorescenza rilevato dopo 3 min di reazione espresso in F%/s: ■: controllo, k_{50} 150 nM oligomicina; ●: in presenza di 20 U/ml PK, k_{50} 177 nM oligomicina; □: Valori teorici di ADP (μM) calcolati dopo 3 min di reazione; ○: valori teorici di ADP (μM) calcolati in presenza di 20 U/ml PK.

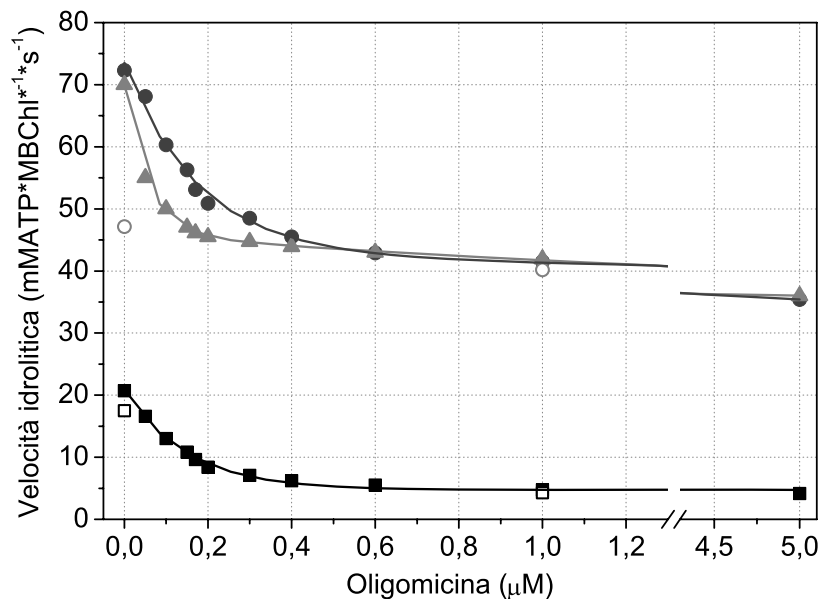


Figura 3.20: Effetto della PK sull'attività idrolitica in funzione della concentrazione di oligomicina presente in *Rb. capsulatus* wild-type. Una soluzione di cromatofori $10 \mu\text{M}$ BChl è stata risospesa nel buffer di misura per il Rosso Fenolo per l'idrolisi basale e per l'idrolisi in presenza di PK (vedi Materiali e Metodi). ■: idrolisi basale; □: idrolisi basale in presenza di $1 \mu\text{M}$ valinomicina. ●: idrolisi in presenza di 20 U/ml PK; ○: idrolisi in presenza di 20 U/ml PK e $1 \mu\text{M}$ valinomicina. ▲: dopo 180 s di idrolisi basale vengono aggiunte 20 U/ml PK.

(figura 3.19B, traccia nera). Applicando lo stesso protocollo abbiamo misurato anche l'attività idrolitica per osservare lo stato di accoppiamento dell'enzima in funzione della concentrazione di inibitore aggiunto. Si osserva un andamento analogo (figura 3.20, ■) poichè, incubando con $1 \mu\text{M}$, la velocità passa da 20 a circa $5 \text{ mMATP} * \text{BChl}^{-1} * \text{s}^{-1}$.

Abbiamo ripetuto poi tutte le misure incubando i cromatofori in presenza di oligomicina e PK. La reazione viene osservata nelle stesse condizioni ma dopo 180 s invece della PK viene aggiunta valinomicina $1 \mu\text{M}$. Infine si riporta la fluorescenza ai valori iniziali con nigericina $0,5 \mu\text{M}$. I valori delle velocità e dello stato stazionario, misurati in queste condizioni, sono riportati rispettivamente nelle figure 3.19A e 3.19B (●). Incubando con PK la velocità idrolitica basale aumenta di 2,5 volte passando da 20 a $75 \text{ mMATP} * \text{BChl}^{-1} * \text{s}^{-1}$. In funzione della concentrazione dell'inibitore la velocità cala rapidamente mostrando una popolazione di ATPasi insensibile all'oligomicina. Infatti, in presenza di concentrazioni di inibitore saturanti, la velocità si dimezza rispetto al controllo ma risulta quasi di un fattore due più alta di quella misurata con il rosso fenolo (35 e $20 \text{ mMATP} * \text{BChl}^{-1} * \text{s}^{-1}$,

3.9. EFFETTI DEGLI INIBITORI DI F_0 , F_1 E DELL'ADP SULL'ATPASI WT93

rispettivamente). Infine per osservare l'idrolisi nelle condizioni descritte per il proton pumping nella figura 3.18, abbiamo eseguito gli esperimenti aggiungendo la PK al 180° s di reazione (figura 3.20, ▲), osservando un aumento della velocità in linea con gli esperimenti eseguiti in presenza della PK fin dall'inizio della reazione (●).

3.9.2 Effetto dell'inibitore efraeptina sull'ATPasi

Per indagare gli effetti dell'ADP sulla subunità F_1 i cromatofori sono stati incubati con efraeptina a diverse concentrazioni. Le velocità idrolitica, di proton pumping e lo stato stazionario sono riportate nelle figure 3.21A e 3.21B. L'andamento dell'idrolisi produce un decadimento esponenziale in funzione della concentrazione dell'inibitore analogo a quello già visto per l'oligomicina. In presenza di 400 nM efraeptina, la velocità basale passa da 10,5 a 3,4 mM ATP * BChl⁻¹ * s⁻¹. Quest'ultimo valore si ottiene anche aggiungendo oligomicina saturante (figura 3.21A, traccia rossa). Studiando invece il proton pumping, osserviamo un andamento sigmoide sia per la velocità iniziale sia per lo stato stazionario, molto diverso da quello visto per l'inibitore F_0 (figura 3.21B). Anche in questo caso 400 nM efraeptina sono sufficienti per annullare completamente la velocità iniziale e la fluorescenza allo stato stazionario.

3.9.3 Analisi dell'effetto degli inibitori di F_0 e F_1 in varie situazioni di disaccoppiamento

Tutte le serie di dati fin qui descritte sono state messe in grafico in funzione della concentrazione di inibitore per determinare la k_{50} , ovvero la concentrazione di inibitore necessaria per ridurre del 50% l'attività osservata. Questa costante è stata determinata fittando le serie di dati riportati in precedenza con funzioni esponenziali. Per le serie della velocità iniziale di *quenching*, della velocità di idrolisi sia in funzione dell'oligomicina che dell'idrolisi in funzione dell'efraeptina, si è applicata una funzione con andamento biesponenziale decrescente del tipo

$$y = A_1 * e^{\left(\frac{-x}{k_1}\right)} + A_2 * e^{\left(\frac{-x}{k_2}\right)} \quad (3.7)$$

dove A_1 è l'ampiezza, k_1 e k_2 la costante di tempo per ogni esponenziale. Es-

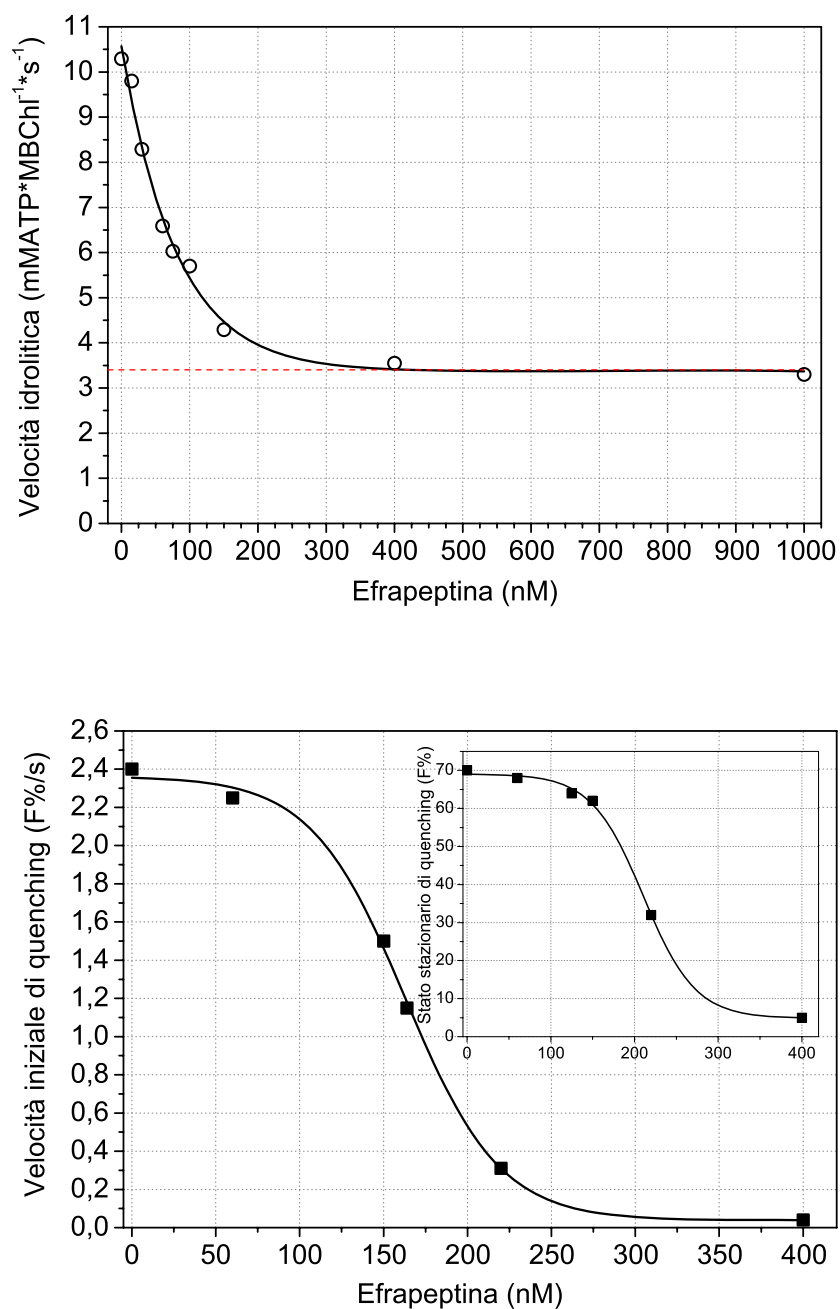


Figura 3.21: Effetto dell'inibitore efrapeptina sull'attività catalitica di *Rb. capsulatus*. I dati riportati si riferiscono ad una sospensione di cromatofori risospesa nel buffer di misura alla concentrazione di $20 \mu\text{M}$ BChl (vedi Materiali e Metodi) e innescando l'attività idrolitica con $0,6 \text{ mM}$ ATP. (A) I dati sono stati elaborati con la funzione biesponenziale descritta nel testo e il valore k_{50} è riportato nella tabella 3.2. La linea tratteggiata corrisponde al valore della velocità idrolitica inibita con oligomicina saturante $20 \mu\text{g}/\text{ml}$. (B) Andamento della velocità iniziale dello stato stazionario (inserto) del quenching di fluorescenza della sonda 9-AA in funzione dell'efrapeptina aggiunta. Entrambe le serie di dati sono state elaborate con la funzione sigmoide di Boltzmann descritta nel testo. Il valore k_{50} riportato in tabella 3.2 corrisponde al parametro X_0 della funzione.

3.9. EFFETTI DEGLI INIBITORI DI F_0 , F_1 E DELL'ADP SULL'ATPASI WT95

sendo la seconda componente molto ridotta, abbiamo considerato solo i valori di k_1 , costante di tempo della prima parte dei dati fittati nella curva dell'inibitore (vedi tabella 3.2). Invece, per quanto riguarda l'andamento della velocità iniziale e dello stato stazionario misurati in funzione della concentrazione di efrapeptina, è stata applicata la sigmoide di Boltzman

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\left(\frac{x-x_0}{dx}\right)}} \quad (3.8)$$

dove x_0 corrisponde alla metà del valore di partenza dell'attività osservata, parametro confrontabile con la k_{50} della funzione 3.7.

In base a quest'analisi, in assenza di PK sono necessari 150 nM oligomicina per dimezzare la velocità idrolitica basale, 73 nM per la velocità di proton pumping e 410 nM per dimezzare lo stato stazionario (tabella 3.2, serie O). In presenza di PK pre-incubata, esponendo quindi l'ATPasi a minime concentrazioni di ADP fin dalle fasi precedenti l'attività idrolitica, vediamo come questi valori di k_{50} mutino significativamente. La $K_{50(i)}$ della velocità iniziale di pompaggio vale 123 nM, 190 nM quella dello stato stazionario e 177 nM per la velocità idrolitica media. In stato stazionario in assenza del ligando la k_{50} si dimezza quindi da 410 nM a 190 nM. Per quanto riguarda l'idrolisi, l'assenza dell'ADP promuove l'aumento della velocità idrolitica poiché la k_{50} passa da 150 nM a 177 nM in presenza di PK. A conferma di ciò, aggiungendo PK durante la reazione ($O + PK_a$), la k_{50} dello stato stazionario si riduce da 190 nM a 84 nM mentre quella della velocità idrolitica scende da 177 nM a 56 nM. Riassumendo, se si inibisce l'attività di pompaggio della porzione F_0 con oligomicina, notiamo come nel wild-type vi sia una progressiva diminuzione del flusso protonico se viene tolto l'ADP durante lo stato stazionario.

Il mutante $\gamma M23K$, che ha una capacità di catalisi minore, in presenza di concentrazioni bassissime di ADP registra una forte diminuzione dell'attività di pompaggio. Se poi viene aggiunta PK allo stato stazionario, il *quenching* cala progressivamente anche in presenza di un $\Delta\psi$ residuo (figura 3.10). In questo set di dati (figura 3.18) il wild-type, in presenza di oligomicina e di $\Delta\psi$, denuncia lo stesso andamento del mutante. Questi dati del wild-type, studiati inibendo l'attività con oligomicina, confermano quindi la tesi per cui vi sia, tra l'attività di pompaggio e la concentrazione di ADP presente nel corso della reazione, quella relazione già emersa nelle sezioni 3.6 e 3.7, dove si analizzava il proton pumping in presenza della

Serie	k_{50} (nM)	V_{iH^+} (nM)	Q_{SS} (nM)	V_{iATP} (nM)	R_{Vi} (V_{iH^+}/V_{iATP})	R_2 (Q_{SS}/V_{iATP})
(O)	$k_{50(o)}$	73 ± 14	410 ± 60	150 ± 8	$0,49 \pm 0,10$	$2,73 \pm 0,43$
(O + PK _i)	$k_{50(i)}$	123 ± 17	190 ± 30	177 ± 20	$0,69 \pm 0,12$	$1,07 \pm 0,18$
(O + PK _a)	$k_{50(a)}$	-	84 ± 17	56 ± 3	-	$1,52 \pm 0,32$
(E)	$k_{50(e)}$	163 ± 3	210 ± 3	80 ± 7	$2,04 \pm 0,17$	$2,63 \pm 0,23$

Tabella 3.2: Valori della costante k_{50} riferita alle serie di dati delle velocità iniziali di pompaggio (V_{iH^+}), di *quenching* allo stato stazionario (Q_{SS}) e delle velocità idrolitiche medie (V_{iATP}), ottenuti in funzione della concentrazione dell'inibitore aggiunto in *Rb. capsulatus* wild-type (figure 3.19, 3.20, 3.21). La velocità idrolitica risulta costante per molti minuti e può essere utilizzata per entrambi i rapporti. (O): campione in presenza di oligomicina; (O + PK_i): campione in presenza di oligomicina e PK 20 U/ml; (O + PK_a): campione in presenza di oligomicina e PK aggiunta dopo 3 min di reazione; (E): campione in presenza di efraeptina.

PK e del $\Delta\psi$. Infine osservando i valori delle k_{50} delle dipendenze da efraeptina (tabella 3.2, E) notiamo che occorrono 80 nM di inibitore per dimezzare la velocità idrolitica, 163 nM per la velocità iniziale di proton pumping e 210 nM per lo stato stazionario.

In questa sezione sono stati utilizzati due inibitori, efraeptina ed oligomicina, il primo specifico per la porzione F_0 , il secondo per la F_1 . In teoria, inibendo l'enzima con oligomicina, dovremmo osservare una diminuzione sia dell'attività di pompaggio protonico, sia dell'attività idrolitica nelle stesse proporzioni. Questo perchè agendo sulla porzione F_0 , in un regime catalitico accoppiato dovremmo ottenere anche una corrispondente inibizione dell'attività idrolitica. Viceversa, inibendo la porzione F_1 dell'ATPasi con efraeptina, dovremmo ottenere un calo dell'attività idrolitica uguale a quello dell'attività di pompaggio ad essa associato. Il grado di affinità di ciascun inibitore per la porzione di ATPasi interessata è indicato dal valore delle singole k_{50} riportate in tabella 3.2. Per convenzione si considera il grado di accoppiamento dell'enzima rapportando il numero di protoni traslocati per ATP catalizzato. In questa tesi abbiamo preso come misura relativa del grado di accoppiamento il rapporto tra le k_{50} del pompaggio, V_{iH^+} e Q_{SS} , e la k_{50} dell'attività idrolitica V_{iATP} . La tabella 3.2 riporta i rapporti R_{Vi} e R_2 , dove R_{Vi} si riferisce, come già ricordato, al rapporto tra le k_{50} delle velocità iniziali di *quenching* e quella d'idrolisi, mentre R_2 è il rapporto tra le k_{50} del *quenching* in stato stazionario e della velocità idrolitica. Attraverso il valore di questi rapporti possiamo spiegare il grado di accoppiamento dell'enzima nelle prime fasi delle attività catalitiche (R_{Vi}) e nella fase di stato stazionario (R_2) in determinate condizioni di $\Delta\mu_{H^+}$ e

3.9. EFFETTI DEGLI INIBITORI DI F_0 , F_1 E DELL'ADP SULL'ATPASI WT97

di concentrazione di ADP. In presenza di particolari condizioni di $\Delta\mu_{H^+}$ e di concentrazione di ADP possiamo osservare fenomeni di disaccoppiamento intrinseco attraverso l'analisi dei due rapporti appena illustrati.

Dai valori delle singole k_{50} elencate nella tabella 3.2 risulta un'alta affinità di ciascun inibitore per la porzione specifica, ma un'efficacia diversa sull'attività catalitica di quella opposta. Risulta infatti che per la serie dell'oligomicina la $K_{50(o)}$ della velocità iniziale del proton pumping è più bassa di quella della velocità media idrolitica; viceversa per quanto riguarda la serie dell'efrapeptina, la $K_{50(e)}$ della velocità di proton pumping è maggiore di quella della velocità idrolitica. Nelle prime fasi dell'attività catalitica in cui il $\Delta\mu_{H^+}$ e l'ADP non hanno ancora raggiunto i valori massimi, il $R_{Vi(e)}$ della serie efrapeptina vale 2,04 mentre il $R_{Vi(o)}$ (oligomicina) vale 0,49. Risulta che l'inibizione con efrapeptina agisce sull'attività idrolitica di F_1 nella stessa misura in cui l'oligomicina lo fa sul pompaggio di F_0 . Se però viene aggiunta PK prima della misura (serie (O + PK_i)) $R_{Vi(i)}$ vale 0,69.

Durante la fase di stato stazionario i valori dei rapporti $R_{2(e)}$, della serie dell'efrapeptina, e $R_{2(o)}$, della serie oligomicina, entro i limiti dell'errore sperimentale si possono considerare uguali poichè valgono rispettivamente 2,63 e 2,73. In questa situazione in cui è presente un elevato $\Delta\mu_{H^+}$, la F_0 risente meno dell'effetto inibitorio dell'oligomicina a causa dell'ADP prodotto durante l'attività idrolitica. Infatti entrambi gli inibitori agiscono con lo stesso effetto sulle due porzioni dell'enzima. Analizzando le serie di dati in cui viene variata la concentrazione di ADP durante la misura possiamo parlare invece di disaccoppiamento intrinseco. Questa tesi è sostenuta dai valori dei rapporti $R_{2(i)}$ e $R_{2(a)}$, rispettivamente 1,07 e 1,52. Entro i limiti dell'errore indicato, questi due rapporti sono molto simili tra loro ma significativamente diversi da quelli misurati in assenza di PK (2,73 e 2,63). L'ADP risulta quindi un elemento importante per la regolazione del grado di accoppiamento intrinseco dell'ATPasi.

Come riportato nella sezione 3.8, le velocità iniziali di pompaggio sono stimulate dalla progressiva diminuzione dell'ADP presente (figura 3.15); parallelamente la $K_{50(i)}$ vale 123 nM contro 73 nM del controllo. Al contrario lo stato stazionario risente della progressiva diminuzione del ligando, passando da 3,75 a 2,80 unità di pH e di conseguenza la $K_{50(i)}$ vale 190 nM contro 410 nM del controllo. Per l'idrolisi, infine, si ha un effetto attivante per la velocità media, che passa da 20

a $75 \text{ mM ATP} * \text{BChl}^{-1} * \text{s}^{-1}$ e qui la $K_{50(i)}$ vale 177 nM contro 155 nM del controllo. Se l'ADP viene eliminato durante la reazione la velocità risulta sempre alta ma la $K_{50(a)}$ diminuisce di 3 volte poichè l'assenza del ligando destabilizza la conformazione.

Per concludere, in queste condizioni di parziale inibizione da oligomicina ed efraeptina si conferma che in mancanza di ADP si osserva un progressivo aumento dell'attività idrolitica al fronte di una forte diminuzione del pompaggio protonico. Nella prossima sezione, alla luce del ruolo assunto dall'ADP, si studierà il ruolo dei due distinti componenti del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, ΔpH e $\Delta\psi$, in funzione della concentrazione dell'ADP presente durante lo stato stazionario.

3.10 Azione dell'ADP e del $\Delta\psi$ sul proton pumping

Il $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ che si genera in seguito all'attività catalitica è composto dal ΔpH e dal $\Delta\psi$. Queste due componenti evolvono nel corso della reazione con un andamento specifico. Se viene stimolata l'attività catalitica dell'ATPasi, il potenziale sale fino al valore di saturazione di circa $230\text{-}250\text{mV}$ entro 100ms dall'inizio della reazione. Il ΔpH prodotto dalla reazione comincia a formarsi non prima di 50ms , rimanendo, in termini di voltaggio, decisamente inferiore rispetto al gradiente elettrico (mel 1978, febs letters). La formazione del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ risulta differente se osservata in un intervallo temporale più lungo (bac-mel 1977, EJB). Infatti il $\Delta\psi$ dopo un rapido aumento inizia a diminuire; al contrario il ΔpH cresce fino ad un valore massimo per calare solo leggermente nei minuti successivi. Se gli andamenti delle singole componenti risultano speculari nel corso della reazione, il $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, una volta raggiunto il valore massimo, si mantiene costante.

Nelle sezioni precedenti si è visto come il valore del ΔpH dipenda fortemente dalla presenza dei ligandi ADP e P_i . Nella sezione 3.8 è emersa una dipendenza del ΔpH dalla combinazione dell'ADP e del P_i presenti durante tutta la durata dell'attività catalitica, mentre nella sezione 3.9 si è vista la dipendenza del pompaggio protonico dalla concentrazione dell'ADP presente, in particolare nello stato stazionario. Fino a questo punto è stato analizzato soprattutto l'andamento del gradiente protonico in assenza del gradiente elettrico. In questa sezione invece

verranno studiate singolarmente tutte e due le componenti del $\Delta\mu_{H^+}$, osservando il proton pumping durante lo stato stazionario in funzione della variazione della concentrazione della PK aggiunta durante la misura. La formazione della sola componente di ΔpH transmembrana verrà monitorata, in presenza di valinomicina (cioè sopprimendo la componente elettrica), per mezzo della variazione di *quenching* della sonda ACMA; la conseguente formazione del gradiente elettrico, in presenza di nigericina, verrà invece seguita attraverso la variazione di assorbimento della sonda Oxonolo VI (cioè sopprimendo il ΔpH).

La figura 3.22A mostra l'attività di pompaggio protonico di una sospensione $10\ \mu M$ BChl di cromatofori di *Rb. capsulatus* in funzione del tempo di reazione in presenza di $1\ \mu M$ valinomicina. L'attività viene innescata da ATP $0,6\ mM$ e dopo $120\ s$ viene aggiunta PK nelle concentrazioni indicate in figura. Dopo non meno di altri $180\ s$ la reazione viene interrotta riportando la fluorescenza ai valori iniziali con nigericina $0,5\ \mu M$. In figura sono riportate alcune tracce esemplificative della dipendenza del *quenching* in funzione della concentrazione di PK aggiunta. Il controllo mostra una stabilità del flusso (traccia nera), entro i tempi di osservazione, mentre l'aggiunta di appena $2,5\ U/ml$ PK (traccia blu) determina un rallentamento del pompaggio protonico, e questo rallentamento è ancora più marcato ad alte concentrazioni di PK ($20\ U/ml$, traccia grigio chiara). Analoghe misure sono state condotte in assenza di valinomicina (tracce non mostrate).

La figura 3.22B mostra la variazione relativa del *quenching* ottenuto in seguito all'aggiunta della PK. Fatto 100 il valore di *quenching* misurato dopo $5\ min$ di reazione, durante lo stato stazionario della misura di controllo (figura 3.22A, traccia nera), i dati relativi alle altre tracce corrispondono al calo di *quenching* in percentuale rispetto al valore di riferimento. In presenza di valinomicina (figura 3.22B, ●), il *quenching* cala del 36% aggiungendo $30\ U/ml$ di PK. La diminuzione è progressiva e dipende dalla diminuzione della concentrazione di ADP presente allo stato stazionario. Il *quenching* in assenza di valinomicina (○), invece, rimane sostanzialmente invariato, se si eccettua un leggero aumento in corrispondenza di $2,5\ U/ml$ di PK.

Una prima conclusione è quindi che il proton pumping non risente della variazione della concentrazione di ADP allo stato stazionario se è presente il $\Delta\psi$; inoltre fino a $2,5\ U/ml$ PK il ligando risulta un attivatore del pompaggio. In sua assenza,

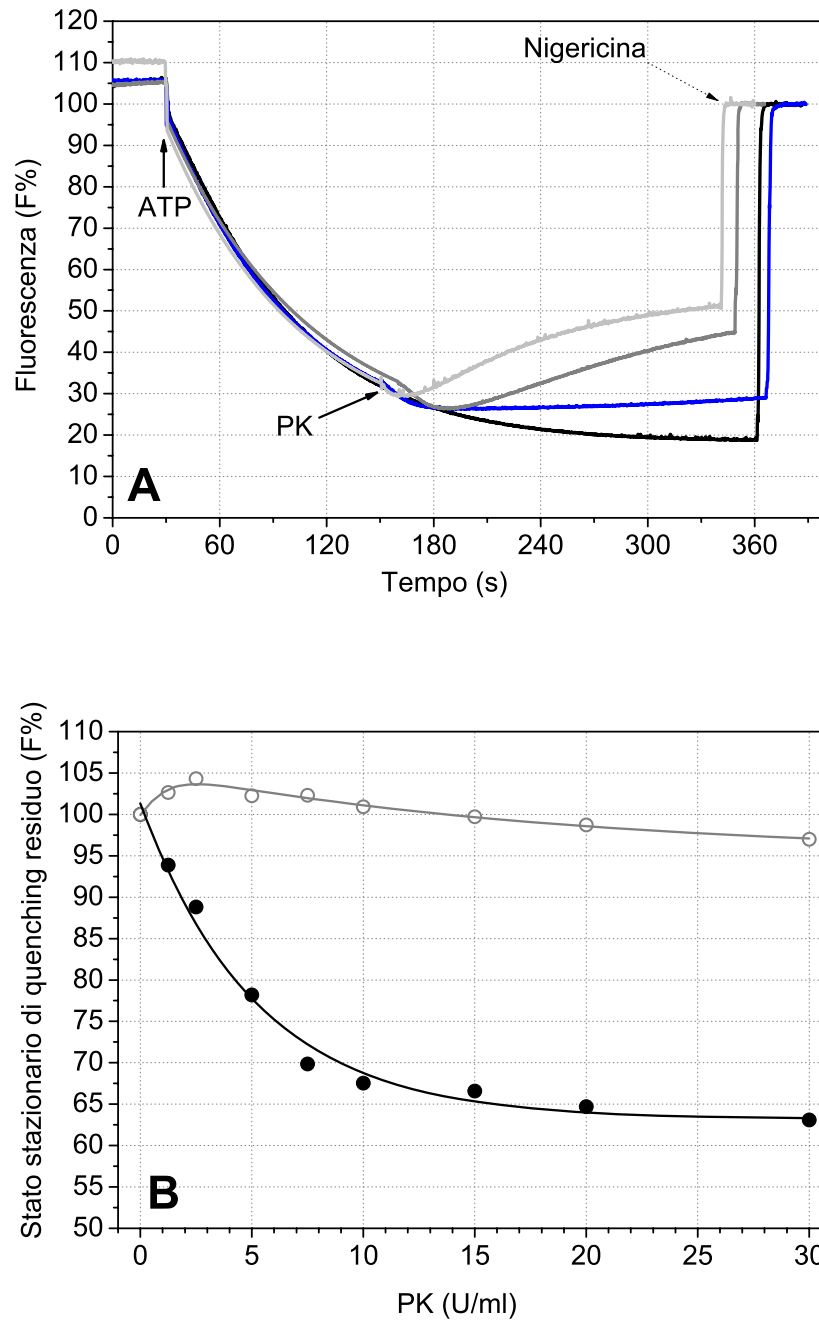


Figura 3.22: Variazione dello stato stazionario in funzione della PK aggiunta dopo 300 s di reazione in *Rb. capsulatus* wild-type. Una sospensione di cromatofori $10\ \mu\text{M}$ BChl è stata risospesa nel buffer di misura per la sonda ACMA (vedi Materiali e Metodi). (A) La variazione di *quenching* della sonda ACMA $0,75\ \mu\text{M}$ viene innescata con ATP $0,6\ \text{mM}$ ed in presenza di valinomicina $1\ \mu\text{M}$. In ogni traccia, dopo 2 min di reazione, viene aggiunta PK a diverse concentrazioni: nero 0 U/ml; blue $2,5\ \text{U/ml}$; grigio $7,5\ \text{U/ml}$; grigio chiaro $20\ \text{U/ml}$. Dopo circa 3 minuti la fluorescenza è stata riportata ai valori iniziali con nigericina $0,5\ \mu\text{M}$. (B) I valori di fluorescenza, osservati dopo 300 s dall'aggiunta di ATP, vengono riportati in grafico in funzione della concentrazione di PK aggiunta. I valori si riferiscono al rapporto misurato tra ogni valore e quello di riferimento (controllo) considerato come valore massimo. ○: stato stazionario di quenching in presenza in assenza di ionofori; ●: stato stazionario di quenching in presenza di $1\ \mu\text{M}$ valinomicina.

invece, l'ADP assume un ruolo di controllo nel mantenere attivo il pompaggio, poichè in funzione della variazione di PK si osserva un marcato calo del quenching.

Verificata la relazione tra ADP e ΔpH , si è voluto osservare l'andamento del $\Delta\psi$ in funzione della concentrazione del ligando. La variazione del gradiente elettrico, durante l'attività idrolitica, è stata monitorata attraverso le variazioni di assorbimento della sonda Oxonolo VI con uno spettrofotometro a doppia lunghezza d'onda (587 e a 625 nm). È stato dimostrato che queste variazioni di assorbanza sono in relazione alle variazioni del potenziale elettrico transmembrana (3). Per misurare la sola componente elettrica, senza l'influenza del gradiente protonico, è stata aggiunta nigericina $0,5 \mu\text{M}$ in cuvetta prima dell'inizio della reazione. La figura 3.23A mostra l'andamento dell'assorbanza al variare della concentrazione di PK aggiunta durante lo stato stazionario. La reazione viene innescata con ATP $0,6 \text{ mM}$ e dopo 120 s viene aggiunta in cuvetta PK a concentrazione variabile. Dopo 300 s di reazione il gradiente elettrico residuo viene dissipato aggiungendo valinomicina $1 \mu\text{M}$. Per osservare l'andamento dell'assorbanza in assenza di ΔpH , le misure sono state ripetute in presenza di nigericina $0,5 \mu\text{M}$ (tracce non riportate). La figura 3.23B riporta la variazione in percentuale dell'assorbanza in funzione della concentrazione di PK aggiunta durante lo stato stazionario. Ogni punto rappresenta il rapporto tra il valore di assorbanza registrato dopo 300 s di reazione ed il valore di riferimento misurato in assenza di PK considerato come 100%. In presenza del solo $\Delta\psi$ (●) si osserva un progressivo calo dell'assorbanza in funzione della PK che può essere anche del 60-65% alle più alte concentrazioni di PK. In presenza di entrambe le forze (○) questo effetto si osserva in misura minore ottenendo però un calo del 30-40%. Il confronto tra le serie con \pm nigericina conferma che il $\Delta\psi$ cala in funzione della concentrazione di PK presente (○). Inoltre se una delle due componenti viene meno questo effetto si accentua, come confermato dall'analisi del ΔpH se misurato in assenza di valinomicina (figura 3.22B, ●).

In conclusione possiamo affermare che l'enzima può essere indotto in uno stato di disaccoppiamento intrinseco in funzione della concentrazione di ADP presente. In presenza di PK a fronte di un forte aumento dell'attività idrolitica si osserva una decisa diminuzione del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ e questo fenomeno aumenta se viene meno una delle due componenti del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, e quindi il valore ottenuto di $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ è minore.

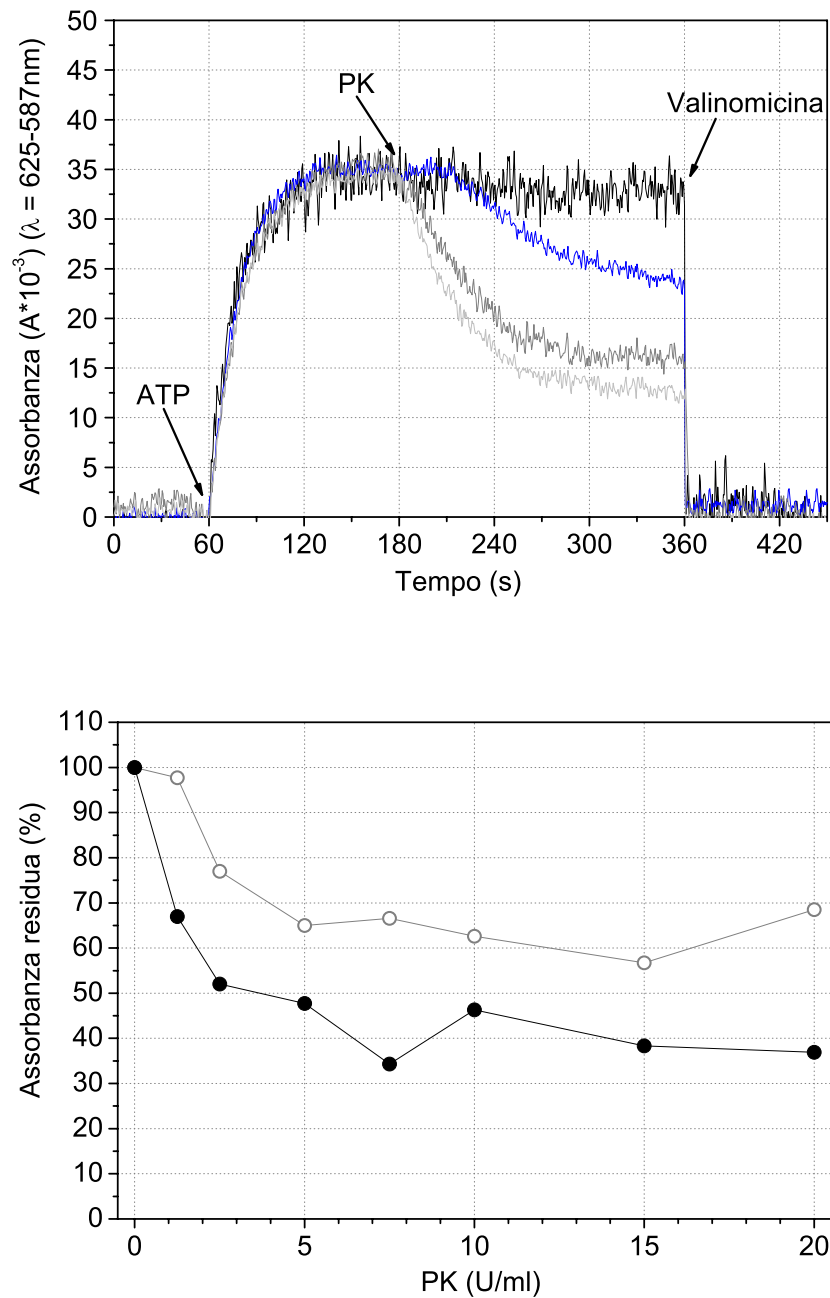


Figura 3.23: Variazione del $\Delta\psi$ in funzione della PK aggiunta in *Rb. capsulatus* wild-type. Una sospensione di cromatofori è stata risospesa nel buffer di misura descritto nei Materiali e Metodi a una concentrazione di 10 μM . (A) La variazione di assorbanza della sonda Oxonolo VI 3 μM viene innescata con ATP 0,6 mM ed in presenza di nigericina 0,5 μM . In ogni traccia, dopo 2 min di reazione, è stata aggiunta PK a diverse concentrazioni: nero 0 U/ml; blue 1,25 U/ml; grigio 10 U/ml; grigio chiaro 20 U/ml. Dopo 300 s di reazione l'assorbanza viene riportata ai valori iniziali con valinomicina 0,5 μM . (B) I valori di assorbanza osservati dopo 300 s di reazione vengono riportati in grafico in funzione della concentrazione di PK aggiunta. I valori si riferiscono al rapporto misurato tra ogni valore e quello del controllo considerato come valore massimo. ○: in assenza di nigericina; ●: in presenza di 0,5 μM nigericina.

Capitolo 4

Marcatura a fluorescenza per analisi FRET in *E. coli*

Gli esperimenti condotti sull'ATPasi di *Rb. capsulatus* illustrati in questo lavoro hanno permesso di stabilire una relazione tra l'ADP ed il $\Delta\psi$, nella regolazione dell'attività catalitica e dell'attivazione dell'ATPasi. Per collegare i fenomeni osservati in ambito fisiologico a cambiamenti strutturali e a interazioni tra le subunità è necessario adottare delle tecniche d'indagine diverse. A questo scopo, in collaborazione con l'Istituto di Chimica Fisica di Friburgo, è stato messo a punto un progetto per la realizzazione di mutanti di *E. coli* per studiare questa relazione con la tecnica FRET. E' noto da tempo che le subunità ϵ e γ sono coinvolte nella nell'attività catalitica dell'ATPasi (46), ma l'interpretazione degli esperimenti presenti in letteratura non conferma definitivamente se la subunità ϵ sia coinvolta solo nella catalisi o anche nella regolazione enzimatica. L'obiettivo è quindi quello di verificare il possibile coinvolgimento del movimento up and down della regione c-terminale della subunità ϵ nella particolare condizione di disaccoppiamento intrinseco determinato dal $\Delta\psi$ e dalla concentrazione dei ligandi ADP e Pi resenti durante la reazione catalitica.

Mediante l'osservazione a fluorescenza in singola molecola (19), è stato possibile sviluppare un metodo che permette l'osservazione delle subunità in movimento di complessi F_0F_1 inseriti in membrane durante l'attività catalitica (20). Questo metodo si basa sul trasferimento dell'energia per risonanza (FRET) tra due molecole fluorescenti che sono covalentemente legate all'enzima. In accordo con la teoria di Förster, l'efficienza del trasferimento enegetico dipende in primo luogo

dalla distanza tra i fluorofori (13). L'efficienza FRET, E_{FRET} , può essere misurata dalle intensità delle fluorescenze del donatore F_D e dell'accettore F_A come illustrato nella seguente formula:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{F_A}{F_A + \gamma F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{DA}^6} \quad (4.1)$$

dove R_0 è il raggio di Förster e r_{DA} è la distanza tra il donatore e l'accettore.

Con l'ausilio di un microscopio confocale è possibile misurare i fotoni fluorescenti emessi dal donatore e quelli intercettati dall'accettore con una sensibilità dell'ordine della singola molecola. L'intensità della fluorescenza nei canali del donatore e dell'accettore viene registrata simultaneamente con fotodiodi (APD) dotati di appositi filtri. La diffusione del fluoroforo attraverso il volume confocale produce l'osservazione di un elevato numero di fotoni durante il tempo di transito. Inoltre la fluorescenza è emessa isotropicamente nello spazio e l'obiettivo del microscopio raccoglie soltanto quelle emesse in questa direzione e durante il tragitto alcuni fotoni vengono persi dagli specchi dicroici e dai filtri del sistema APD. Tutti questi fattori vengono tenuti in considerazione per calcolare la E_{FRET} e di conseguenza il numero di fotoni misurati nel tempo.

Per l'osservazione del movimento delle subunità γ ed ϵ è stato deciso di inserire due mutazioni, per il legame con i fluorofori, una per ogni subunità. La sostituzione degli aminoacidi nativi con le cisteine permette di formare legami covalenti con i fluorofori ATTO e TMR impiegati nelle misure di FRET. L'obiettivo è quello di verificare il movimento delle singole subunità ma anche le eventuali variazioni delle distanze fra donatore e accettore. Ad esempio per osservare il movimento della subunità ϵ si è pensato a due punti in particolare. Il primo localizzato in posizione 57 al fine di studiare i movimenti del barile beta; il secondo in posizione 114, per osservare i movimenti up and down della porzione c-terminale della subunità. Per quanto riguarda la subunità γ è stato deciso di inserire la cys in posizione 106 come avvenuto per esperimenti passati in cui si è registrato un buon segnale di FRET. Sono stati costruiti quindi i mutanti di *E. coli* $\epsilon\text{H57C}\gamma\text{T106C}$ e $\epsilon\text{Y114C}\gamma\text{T106C}$ (vedi Materiali e Metodi), realizzati inserendo una doppia mutazione nel plasmide che porta l'operone *atp1* per la sintesi delle subunità dell'ATPasi.

Di seguito verranno mostrati gli esperimenti di marcatura dei doppi mutanti con entrambi i fluorofori. Questi esperimenti sono il primo passo esplorativo per

individuare le condizioni migliori di marcatura da adottare. Nel corso di questo lavoro tutti i principali parametri coinvolti nella marcatura sono stati studiati per escludere ogni possibilità di artefatti ottenendo infine un protocollo di massima per la marcatura del doppio mutante.

Durante il soggiorno presso l'Istituto di Chimica Fisica di Friburgo non è stato possibile portare a termine l'intero progetto, ma ne sono stati risolti i principali problemi relativi alla marcatura. Partendo da questi dati sarà possibile, in un prossimo futuro, effettuare misure di FRET in cui l'attività catalitica dell'ATPasi verrà studiata in funzione della concentrazione di ADP, Pi ed in funzione delle componenti del $\Delta\mu_{H^+}$, il $\Delta\psi$ ed il ΔpH . Queste condizioni intendono studiare i movimenti relativi della subunità ϵ rispetto alla subunità γ e derivante dalla loro rotazione in un contesto di disaccoppiamento intrinseco da noi ampiamente messo in luce nel corso di questo lavoro.

4.1 Analisi del procedimento di marcatura

L'ATPasi da quando viene estratta dalle membrane fosfolipidiche fino al momento della marcatura viene conservata in buffer specifici per proteine di membrana per ridurre al minimo ogni conseguenza negativa sulla stabilità strutturale e sull'attività catalitica. Anche nel caso della marcatura si sono cercate le condizioni migliori per ottenere un risultato finale che non denaturasse la struttura e le funzionalità originali. La tabella 4.2 mostra i parametri tenuti in considerazione durante le fasi della marcatura per gli esperimenti descritti di seguito. Ad esempio sono stati testati entrambi i fluorofori ATTO (A) e TMR (T), insieme o separatamente, il rapporto di marcatura (F:P) tra fluoroforo (F) e proteina (P), il tempo d'incubazione del fluoroforo per la marcatura (T), ed infine il tipo di buffer utilizzato al determinato valore di pH. Il procedimento di marcatura dei mutanti di *E. coli* $\epsilon 57\gamma 106$ e $\epsilon 114\gamma 106$ e la natura dei fluorofori a cui si farà riferimento sono riportati nei Materiali e Metodi.

Per quanto riguarda la marcatura si è pensato di utilizzare sia un singolo fluoroforo per volta (ATTO o TMR) sia entrambi contemporaneamente in modo da ottenere con un solo passaggio una doppia marcatura. Questa tecnica comporta dei vantaggi, dal momento che permette di ottenere una proteina marcata con

	L1	GA	GB	GC	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
MOPS 50 mM	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
DDM 0,1%	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
MgCl ₂ (mM)	0,1	0,1	-	0,1	0,1	1,5	-	-	0,1	-	-
Glicerolo 10%	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZnCl ₂ (mM)	-	-	-	-	-	-	0,1	1,5	1,5	0,1	0,1
Imidazolo (mM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	1
pH	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

Tabella 4.1: Buffer per la marcatura dei mutanti $\epsilon 57\gamma 106$ e $\epsilon 114\gamma 106$ di E. coli. La presenza o l'assenza dei composti è indicata dei segni (+) e (-).

due fluorofori in un passaggio solo, ma anche lo svantaggio di avere il 50% della popolazione proteica marcata nei due punti dallo stesso fluoroforo. Come primo esperimento (tabella 4.1, linee 1-15) è stato adottato un protocollo già utilizzato dal laboratorio di Friburgo. Il campione è stato marcato con (A) e (T) nel rapporto di 1:3 ed incubato con il fluoroforo per 5, 10 e 15 min. La concentrazione proteica utilizzata è compresa tra 2 e 10 μM . La proteina F_0F_1 con la mutazione in $\epsilon 57$ (o $\epsilon 114$) ed in $\gamma 106$ è stata esposta interamente ai due fluorofori ed il risultato finale sarà una miscela contenente tante combinazioni di marcatura. Statisticamente i due fluorofori dovrebbero marcare al 50% i siti disponibili in ϵ e in γ . La figura 4.1 mostra come effettivamente si siano marcate ϵ e γ , ma anche le subunità α e β . Questo primo esperimento conferma la buona riuscita della sostituzione degli aminoacidi nativi con le cisteine in ϵ e in γ , ma la marcatura delle subunità α e β ci porta a considerare dei possibili problemi di stabilità strutturale dell'intera proteina e di una conseguente maggiore accessibilità di cisteine in α e β normalmente non reattive dovuti al protocollo di marcatura utilizzato, anche se durante i precedenti passaggi di purificazione l'attività catalitica non ha mostrato variazioni significative rispetto ad altre situazioni.

Il problema di avere 4 subunità fortemente marcate come in questo caso pone dei seri limiti all'indagine FRET, poiché con quattro sorgenti risulta impossibile accertare quale subunità sia l'accettore e quale il donatore. Per questo motivo è stato preparato un piano di studio relativo ad ogni singolo parametro per individuare la causa che ha portato alla marcatura di diverse cisteine presenti nel barile $\alpha_3\beta_3$ normalmente non esposte. Un secondo approccio è consistito nel variare il rapporto (F:P), il tempo di esposizione della proteina al fluoroforo, la temperatura ed il pH del buffer utilizzato, in modo da agire principalmente sulla porzione ma-

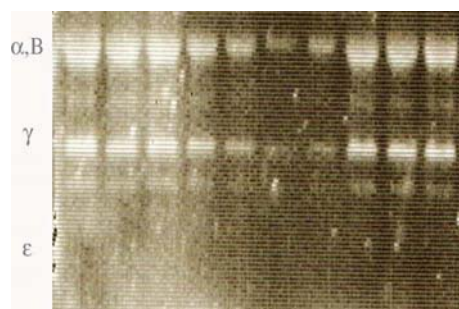


Figura 4.1: Corsa elettroforetica dei campioni 1-9 della tabella 4.2. Gel retroilluminato da una lampada UV. I pozzetti contengono nell'ordine da destra il ladder, e i campioni dall'1 al 9 riportati in tabella.

leimidica del fluoroforo responsabile del legame C-S con la cisteina (linee 16-19). Anche in questo caso però si ottiene una evidente marcatura delle subunità α e β maggiore anche delle subunità ϵ e γ .

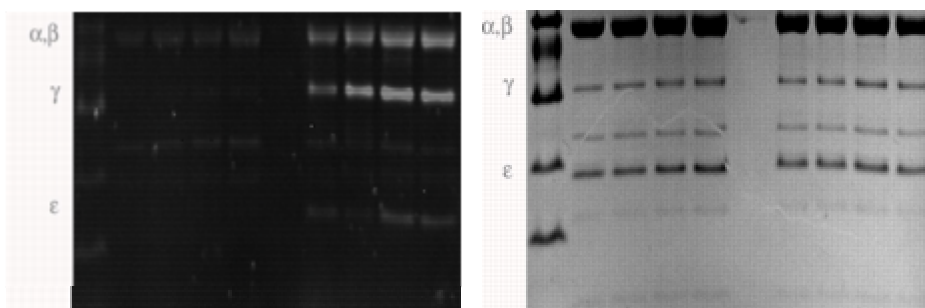


Figura 4.2: Corsa elettroforetica dei campioni 16-19 della tabella 4.2. A sinistra è riportato il gel retroilluminato da una lampada UV; a destra lo stesso gel colorato con il comassie blue. I pozzetti contengono nell'ordine da destra il ladder, e i campioni dal 16 al 19 riportati in tabella. I primi 4 sono stati marcati solo con ATTO mentre con solo TMR gli altri.

Apparentemente la variazione di tutti questi parametri, all'interno dell'intervallo considerato, non influisce sul risultato finale. In virtù di ciò si è ipotizzato che la proteina, nel corso della marcatura, si trovasse in una particolare conformazione non idonea alla marcatura selettiva. L'obiettivo di questa serie di esperimenti è quella di verificare gli eventuali cambi di conformazione delle subunità α e β in presenza di nucleotidi specifici. Perciò abbiamo incubato l'ATPasi in presenza di ADP, ATP e dell'inibitore AMP-PNP (linee 23-32). Da questo momento in poi la proteina sarà marcata solo con il fluoroforo TMR poiché risulta più evidente al momento dell'osservazione con la fotocamera a fluorescenza. La presenza dei nucleotidi non altera significativamente il profilo di marcatura già emerso negli altri esperimenti. Infatti le subunità α e β sono quelle più marcate; l'unica differenza riguarda il rapporto di marcatura tra ϵ e γ dove quest'ultima risulta meno marca-

ta. Anche il tentativo di aumentare il tempo di marcatura a 4 min (linea 32) non modifica il risultato finale.

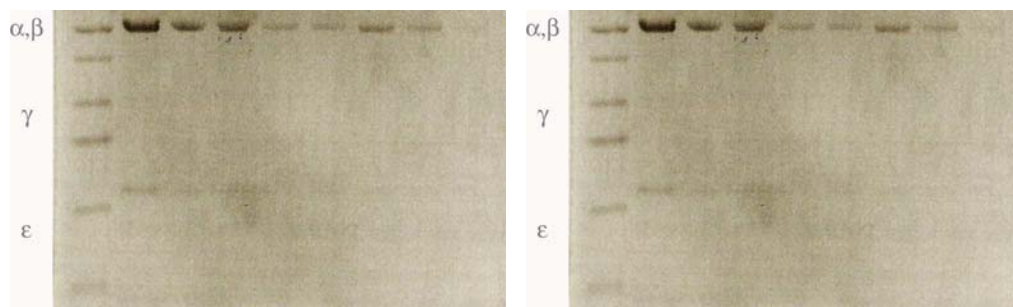


Figura 4.3: Corsa elettroforetica dei campioni 23-32 della tabella 4.2. A sinistra è riportato il gel retroilluminato da una lampada UV; a destra lo stesso gel colorato con il comassie blue. I pozzetti contengono nell'ordine da destra il ladder, e i campioni dal 23 al 32 riportati in tabella. I primi 4 sono stati marcati in con un rapporto F:P 1:10 per 1 min, mentre gli altri 4 con un rapporto F:P 1:1 per 30 min.

Gli esperimenti fin qui condotti sono stati fatti con campioni provenienti da frazioni proteiche del mutante $\epsilon 114\gamma 106$. Per escludere possibili alterazioni strutturali proprie di una particolare frazione di FPLC, tre differenti frazioni di ciascun mutante sono state marcate come indicato in tabella (linee 33-36). Il risultato finale non mostra significative differenze poiché α e β sono sempre più marcate di ϵ e γ . Questo esperimento conferma l'uniformità delle frazioni proteiche appartenenti ad uno stesso picco in uscita dalla FPLC.

L'ultimo parametro non ancora modificato è il tipo di buffer utilizzato. Il buffer L1, i cui elementi sono elencati in tabella 4.1, è la soluzione più utilizzata per proteine di membrana. Per escludere tutte le possibili cause, sono stati preparati una serie di buffer al 10% di glicerolo (GA, GB e GC), verificando sia l'effetto del $MgCl_2$ sia del DDM sulla stabilità proteica. Le combinazioni di marcatura scelte sono il risultato di un compromesso tra concentrazione del fluoroforo e tempo di esposizione ad esso da parte della proteina. Si è scelto quindi un rapporto F:P alto pari a 1:1, cercando di diminuire la temperatura di labeling fino a $-5^\circ C$ per minimizzare gli effetti di sovradosaggio del fluoroforo (linee 37-45). Queste condizioni di bassa temperatura non alterano la stabilità della proteina poichè è presente nel buffer il glicerolo, utilizzato normalmente per la conservazione di materiale biologico a temperature inferiori a quelle qui utilizzate. In termini di marcatura la contemporanea presenza del glicerolo e del DDM (GA e GB) aumentano la stabilità della proteina riducendo di molto la marcatura delle subunità α e β . Per

questa ragione sono stati inclusi nei successivi buffer B1-B7 utilizzati.

A questo punto tutti i parametri sono stati modificati e, entro i limiti da noi esplorati, non si è ottenuto nessun protocollo in grado di evitare completamente la marcaura delle subunità α e β . Un ulteriore approccio è capire quale sia il rapporto tra gruppi disolfuro e tioli delle cisteine presenti nella struttura proteica in modo da trarne delle conclusioni sulla stabilità strutturale. Si è proceduto variando la concentrazione del $MgCl_2$ (B1 e B2) e sostituendolo con lo $ZnCl_2$ (B3 e B4). E' noto infatti che lo Zn presente ad alte concentrazioni abbassa il pK_a del SH delle cisteine favorendo la conformazione S^- (22) stabilizzando l'aminoacido (26).

Inoltre a queste condizioni la marcatura è stata condizionata variando il numero di legami disolfuro e tiolici presenti nella proteina incubando il campione con β -Mercaptoetanololo ossidato (β ME-OX) e tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP) (linee 46-61). I gruppi tiolici S-H di due cisteine formano un ponte disolfuro S-S dando una cistina. Il β ME ed il TCEP sono dei riducenti che rompono i legami S-S ottenendo di nuovo due gruppi S-H. Il TCEP, a differenza del β ME non contiene gruppi S-H, è più selettivo del β ME per i legami S-S e li riduce a tioli in modo irreversibile. Il β ME-OX da noi usato è stato realizzato in laboratorio ossidando una soluzione di β ME.

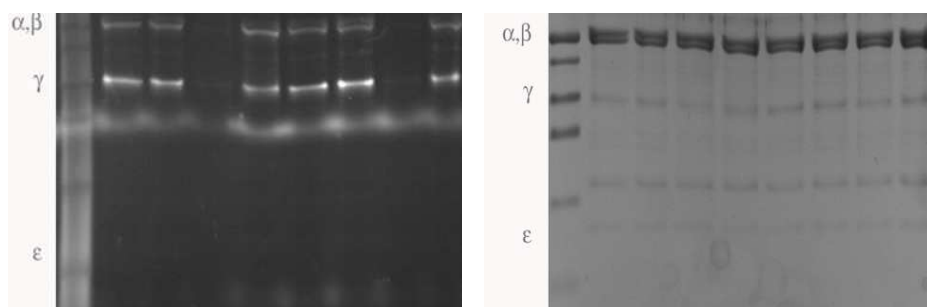


Figura 4.4: Corsa elettroforetica dei campioni 46-53 della tabella 4.2. A sinistra è riportato il gel retroilluminato da una lampada UV; a destra lo stesso gel colorato con il comassie blue. I pozzetti contengono nell'ordine da destra il ladder, e i campioni dal 46 al 53 riportati in tabella.

Le proteine vengono incubate per 30 min in presenza di β ME-OX in modo da ossidare preventivamente i legami disulfidici delle cisteine. Incubando contemporaneamente il campione con TCEP vengono ridotti tutti i legami S-S formati dal β ME-OX a S-H in modo irreversibile, impedendo la formazione di un legame C-S con il maleimide. Il campione viene passato in una colonna di sephadex G-50 equilibrata con buffer B1 per eliminare il β ME-OX ed il TCEP ed infine marca-

to con il fluoroforo maleimidico. In queste condizioni la concentrazione di MgCl_2 (0,1-1,5 mM) non condiziona la marcatura. Si osserva inoltre che le subunità α e β si marcano con meno intensità rispetto alla subunità γ , mentre la ϵ non è stata rilevata.

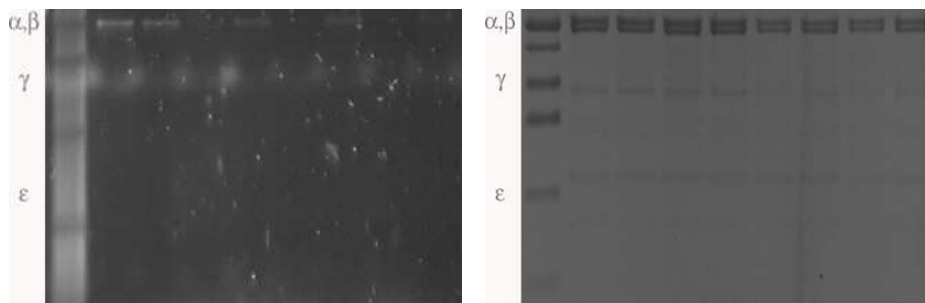


Figura 4.5: Corsa elettroforetica dei campioni 54-61 della tabella 4.2. A sinistra è riportato il gel retroilluminato da una lampada UV; a destra lo stesso gel colorato con il comassie blue. I pozzetti contengono nell'ordine da destra il ladder, e i campioni dal 54 al 61 riportati in tabella.

In presenza di MgCl_2 (figura 4.4), i campioni trattati con β -ME mostrano un elevato numero di gruppi tiolici presenti al momento della marcatura. Se confrontiamo il livello di marcatura ottenuto nei precedenti esperimenti, in assenza di β ME-OX, notiamo un calo della fluorescenza nelle subunità α e β , una completa assenza di fluorofori nella subunità ϵ , mentre la γ non subisce variazioni. Nel gel le linee 1,2 e 4 mostrano le cys-H ridotte, non raggiunte dal β ME-OX e quindi marcate. Sono in maggioranza presenti nelle subunità γ , α e β ; quelle presenti in ϵ sono state tutte ossidate. Questo vuol dire che una buona parte delle cys-H delle subunità α e β durante la marcatura sono in forma ridotta ed esposte agli ossidanti come β ME-OX. Aggiungendo TCEP, linea 3, i legami S-S vengono ridotti irreversibilmente e non più marcabili dal gruppo maleimidico del fluoroforo. Il TCEP, nonostante il maggior ingombro sterico di β ME, è più selettivo per i legami S-S e riesce a raggiungere tutti i gruppi ossidati. In presenza di ZnCl_2 (figura 4.5), le subunità α , β ed ϵ non vengono mai marcate. La subunità γ si marca in presenza di β ME-OX (e non con TCEP), ma soltanto ad elevate concentrazioni di ZnCl_2 e di β ME:P si marca debolmente.

In conclusione, il procedimento qui adottato di ossidare e successivamente ridurre irreversibilmente le cys-H è attendibile poiché questi aminoacidi sono tutti raggiungibili in quanto il β ME-OX riesce ad ossidare numerose cys-H le quali sono esposte all'azione riducente del TCEP (linea 3). Quelle cys che si marcano in pre-

senza di TCEP (la minima parte) sono quelle ridotte non raggiunte da β ME-OX o quelle in forma ossidata non raggiunte da TCEP. La struttura proteica, al momento della marcatura, è organizzata in modo tale da favorire l'esposizione di cys-H ad ossidanti (β ME-OX). Il rapporto tra β ME:P utilizzato per questo gel, in presenza di MgCl_2 non influisce sul risultato finale. Già in presenza di 0,1 mM ZnCl_2 si osserva una marcatura solo della subunità γ , ma con ZnCl_2 1,5 mM, anche la subunità γ risulta debolmente marcata. Questo è dovuto all'azione dello ZnCl_2 poiché, abbassando il pK_a delle cys, sposta l'equilibrio verso la conformazione ossidata impedendo così la marcatura da parte del fluoroforo.

Dopo aver verificato sperimentalmente l'azione dello ZnCl_2 sull'equilibrio chimico delle cisteine, comportando la marcatura della subunità γ e non quella delle subunità α e β , abbiamo deciso di preincubare la proteina in presenza di ZnCl_2 0,1 mM. Le linee 56-63 illustrano un diverso metodo studiato per combinare gli effetti positivi dello ZnCl_2 sulla marcatura senza modificare la struttura generale dell'enzima.

Si è proceduto incubando i campioni per 30 min in una soluzione di ZnCl_2 0,1 mM ed imidazolo scegliendo due rapporti Imidazolo/ ZnCl_2 : 3:1 e 10:1 come riportato in tabella 4.2. E' stato utilizzato l'imidazolo come competitore per il catione contro le cisteine (22). Per eliminare l'imidazolo i campioni sono stati lavati in una colonna di sephadex G50. Si marcano con TMR 1:1 per 1 min. I campioni 62-65 vengono marcati in presenza di MgCl_2 mentre i campioni 66-69 anche in presenza di ZnCl_2 1,5 mM (vedi tabella 4.1). Infine si interrompe la reazione con imidazolo in eccesso.

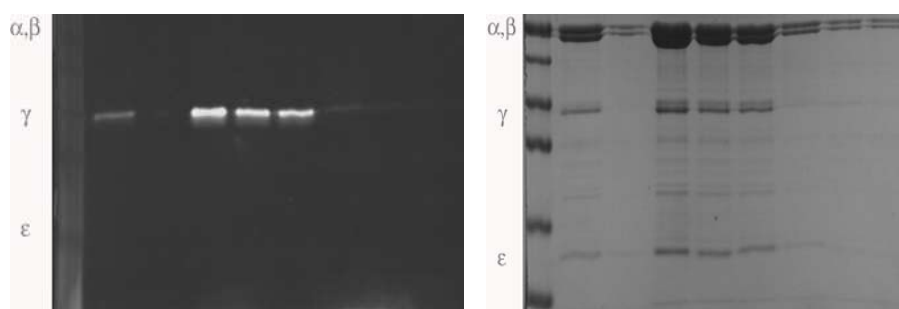


Figura 4.6: Corsa elettroforetica dei campioni 62-69 della tabella 4.2. A sinistra è riportato il gel retroilluminato da una lampada UV; a destra lo stesso gel colorato con il comassie blue. I pozzetti contengono nell'ordine da destra il ladder, e i campioni dal 62 al 69 riportati in tabella.

Dal risultato del gel emerge la completa scomparsa della marcatura delle subu-

nità α , β ed ϵ . I campioni 62, 64-66, a differenza degli altri mostrano una buona marcatura della subunità γ , all'interno del range osservato per ciascun parametro preso in considerazione. Questo suggerisce che si può utilizzare lo ZnCl_2 insieme all'imidazolo, a basse concentrazioni, per favorire la sola marcatura della subunità γ . Inoltre il MgCl_2 , anche a basse concentrazioni, compensa l'effetto destabilizzante dello ZnCl_2 presente ad alte concentrazioni (campione 66).

Tabella 4.2: Condizioni di marcatura dei doppi mutanti $\epsilon 57\gamma 106$ ed $\epsilon 114\gamma 106$ di E. coli. L: linea di corsa del gel. F: fluoroforo, ATTO 647N (A), TMR 532 (T); F:P rapporto fluoroforo:proteina; LT: tempo di esposizione del campione al fluoroforo; P: concentrazione della proteina espressa in μM ; Buffer: tipo di buffer e relativo valore di pH utilizzato per la marcatura (vedi tabella 4.1); T($^{\circ}\text{C}$): temperatura di incubazione dei campioni durante la marcatura; 23-32:ATPasi incubata con i nucleotidi indicati. 46-61: campioni incubati con $\beta\text{ME-OX}$ nel rapporto indicato; TCEP: campioni incubati con una miscela di $\beta\text{ME-OX}$ e di TCEP 1 mM. 62-69: campioni incubati con buffer contenente imidazolo/ ZnCl_2 nei rapporti indicati in tabella 4.1.

L	F	F:P	LT	P	Buffer	T	Note
1	A,T	1:3	5'	10	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	
2	A,T	1:3	10'	10	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	
3	A,T	1:3	15'	10	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	
4	A,T	1:3	1'	5	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	
5	A,T	1:3	10'	5	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	
6	A,T	1:3	15'	5	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	
7	A,T	1:3	1'	2	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	
8	A,T	1:3	10'	2	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	
9	A,T	1:3	15'	2	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	
10	A,T	1:3	1'	5	L1 6,5	4 $^{\circ}\text{C}$	
11	A,T	1:3	10'	5	L1 6,5	4 $^{\circ}\text{C}$	
12	A,T	1:3	15'	5	L1 6,5	4 $^{\circ}\text{C}$	
13	A,T	1:3	1'	2	L1 6,5	4 $^{\circ}\text{C}$	
14	A,T	1:3	10'	2	L1 6,5	4 $^{\circ}\text{C}$	
15	A,T	1:3	15'	2	L1 6,5	4 $^{\circ}\text{C}$	
16	A,T	1:5	$\leq 1'$	2	L1 6,5	4 $^{\circ}\text{C}$	
17	A,T	1:5	$\leq 1'$	2	L1 7,5	4 $^{\circ}\text{C}$	
18	A,T	1:5	$\leq 1'$	2	L1 7,9	4 $^{\circ}\text{C}$	
19	A,T	1:5	$\leq 1'$	2	L1 7	25 $^{\circ}\text{C}$	
20	A,T	1:5	$\leq 1'$	2	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	
21	A,T	1:1	30''	2	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	
22	T	1:10	1'	2	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	+ ATP
23	T	1:1	30''	1	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	+ ATP
24	T	1:10	1'	2	L1 7	4 $^{\circ}\text{C}$	+ ADP

continua

continua

L	F	F:P	LT	P	Buffer	T	Notes
25	T	1:1	30''	1	L1 7	4 °C	+ ADP
26	T	1:10	1'	2	L1 7	4 °C	+ AMPPNP
27	T	1:1	30''	1	L1 7	4 °C	+ AMPPNP
28	T	1:10	1'	2	L1 7	4 °C	Controllo
29	T	1:1	30''	1	L1 7	4 °C	Controllo
30	T	1:1	10''	2	L1 7	4 °C	Controllo
31	T	1:1	30''	2	L1 7	4 °C	Controllo
32	T	1:1	4'	2	L1 7	4 °C	Controllo
33	T	1:10	1'	2	L1 7	4 °C	F20, 24, 28 ϵ 114 γ 106
34	T	1:1	30''	2	L1 7	4 °C	F20, 24, 28 ϵ 114 γ 106
35	T	1:10	1'	2	L1 7	4 °C	F21, 23, 26 ϵ 57 γ 106
36	T	1:1	30''	2	L1 7	4 °C	F21, 23, 26 ϵ 57 γ 106
37	T	1:1	1''	2	GA 6,3	-5 °C	
38	T	1:1	10''	2	GA 6,3	-5 °C	
39	T	1:1	30''	2	GA 6,3	-5 °C	
40	T	1:1	1''	2	GB 6,3	-5 °C	
41	T	1:1	10''	2	GB 6,3	-5 °C	
42	T	1:1	30''	2	GB 6,3	-5 °C	
43	T	1:1	1''	2	GC 6,3	-5 °C	
44	T	1:1	10''	2	GC 6,3	-5 °C	
45	T	1:1	30''	2	GC 6,3	-5 °C	
46	T	1:1	30'	2	B1 7	4 °C	β M:P 1:1
47	T	1:1	30'	2	B1 7	4 °C	β M:P 2:1
48	T	1:1	30'	2	B1 7	4 °C	β M:P 10:1 + TCEP
49	T	1:1	30'	2	B1 7	4 °C	β M:P 10:1
50	T	1:1	30'	2	B2 7	4 °C	β M:P 1:1
51	T	1:1	30'	2	B2 7	4 °C	β M:P 2:1
52	T	1:1	30'	2	B2 7	4 °C	β M:P 10:1 + TCEP
53	T	1:1	30'	2	B2 7	4 °C	β M:P 10:1

continua

continua

L	F	F:P	LT	P	Buffer	T	Notes
54	T	1:1	30'	2	B3 7	4 °C	β M:P 1:1
55	T	1:1	30'	2	B3 7	4 °C	β M:P 2:1
56	T	1:1	30'	2	B3 7	4 °C	β M:P 10:1 + TCEP
57	T	1:1	30'	2	B3 7	4 °C	β M:P 10:1
58	T	1:1	30'	2	B4 7	4 °C	β M:P 1:1
59	T	1:1	30'	2	B4 7	4 °C	β M:P 2:1
60	T	1:1	30'	2	B4 7	4 °C	β M:P 10:1 + TCEP
61	T	1:1	30'	2	B4 7	4 °C	β M:P 10:1
62	T	1:1	30'	2	B1 7	4 °C	preincubato con B6
63	T	1:1	30'	2	B1 7	4 °C	preincubato con B7
64	T	1:1	30'	10	B1 7	4 °C	preincubato con B6
65	T	1:1	30'	10	B1 7	4 °C	preincubato con B7
66	T	1:1	30'	2	B5 7	4 °C	preincubato con B6
67	T	1:1	30'	2	B5 7	4 °C	preincubato con B7
68	T	1:1	30'	10	B5 7	4 °C	preincubato con B6
69	T	1:1	30'	10	B5 7	4 °C	preincubato con B7

4.2 Protocollo finale per la marcatura

In seguito alle prove svolte e fin qui descritte si è giunti a mettere a punto un protocollo finale che permettesse di ottenere la marcatura selettiva delle sole subunità γ ed ϵ . Le conclusioni tratte dagli esperimenti illustrati in tabella 4.2 suggeriscono che la struttura dell'enzima, al momento della marcatura, non sia nella condizione nativa. Lo scopo di questo esperimento è verificare se l'ammonio utilizzato per la concentrazione dei campioni sia responsabile dei cambiamenti strutturali ipotizzati. Se questo è vero il passaggio successivo è quello di verificare che la soluzione di imidazolo:ZnCl₂ ripristini le condizioni native favorendo una marcatura selettiva per le subunità in esame.

L'esperimento prende in considerazione diverse frazioni proteiche provenienti dai ceppi ϵ 57 γ 106 ed ϵ 114 γ 106 di E. coli (tabella 4.3). In particolare per il mutante

$\epsilon 57\gamma 106$ la frazione 21 è stata ulteriormente purificata con un passaggio in HPLC supplementare per verificare eventuali sottopopolazioni della proteina non ancora individuate. L'analisi cromatografica ha escluso questa possibilità restituendo un solo picco, da cui è stata scelta la frazione più concentrata (C1, campioni 4 e 5). Tutti i campioni tranne il 3° ed il 4° sono stati concentrati o in presenza di NH_4 o con tubi centricon (Pb1). Dove indicato i campioni vengono passati in colonne di sephadex G50 per equilibrarli con il buffer B6, contenente imidazolo: ZnCl_2 in rapporto 3:1, ed incubati per 1 h. Al termine tutti i campioni, tranne il 1° e l'8° vengono passati di nuovo in una colonna sephadex G50 equilibrata con il buffer di marcatura B1 per eliminare l' NH_4 e la soluzione di imidazolo: ZnCl_2 aggiunta in precedenza. Il procedimento di marcatura finale è lo stesso per tutti i campioni: vengono incubati per 1 min con TMR in rapporto 1:1. La reazione è stata interrotta interrotta passando il campione in una colonna di sephadex G50 equilibrata con buffer B1.

L	Condizioni di preincubazione					Condizioni di marcatura					
	Frazione	μM	Pb1	Pb2	T	1° C	F	F:P	T	Buffer	2° C
1	F25 $\epsilon 57$	28	NH_4	-	-	-	T	1:2	1'	B1	B1
2	F25 $\epsilon 57$	28	NH_4	B6	60'	B1	T	1:2	1'	B1	B1
3	F25 $\epsilon 57$	2,7	BP	-	-	B1	T	1:2	1'	B1	B1
4	F25 $\epsilon 57$	2,7	BP	B6	60'	B1	T	1:2	1'	B1	B1
5	FC1 $\epsilon 57$	2,4	NH_4	-	-	B1	T	1:2	1'	B1	B1
6	FC1 $\epsilon 57$	1,2	Cen	-	-	B1	T	1:2	1'	B1	B1
7	F23 $\epsilon 57$	11	NH_4	B6	60'	B1	T	1:2	1'	B1	B1
8	F20 $\epsilon 114$	3,4	NH_4	-	-	-	T	1:2	1'	B1	B1
9	F20 $\epsilon 114$	3,4	NH_4	B6	60'	B1	T	1:2	1'	B1	B1

Tabella 4.3: La tabella riporta tutte le fasi e le condizioni adottate prima e durante il processo di marcatura dei mutanti $\epsilon 57\gamma 106$ ed $\epsilon 114\gamma 106$ di *E. coli*. Condizioni preliminari. Frazione: identificazione della frazione proteica di FPLC finale espressa in μM per ogni ceppo. Pb1: indica la modalità di concentrazione NH_4 o tubi centricon (cen); BP: campioni non centrifugati e diluiti nel buffer originale. Pb2: scambio in colonna sephadex G50 del buffer con quello indicato. T: periodo di incubazione nel buffer espresso in colonna Pb2. Condizioni di marcaura: proteina $3\mu\text{M}$. 1°C: passaggio in colonna sephadex G50 per equilibrare il campione con buffer B1. F: tipo di fluoroforo utilizzato. F:P: rapporto fluoroforo:proteina. T: tempo di incubazione. Buffer: il campione viene marcato con buffer B1. 2°C: ultimo passaggio in colonna sephadex G50 per interrompere la marcatura ed equilibrare il campione in buffer B1. Nel gel la concentrazione finale di ogni campione è di circa $1,5\mu\text{M}$.

La figura 4.7 mostra il gel ottenuto seguendo il protocollo appena descritto. Il complesso $\alpha_3\beta_3$ non si marca mai se non nel 1° ed 8° campione. Le subunità γ ed ϵ si marcano sempre e l'intensità corrisponde alla concentrazione finale delle singole subunità presenti nel gel. In presenza di NH_4^+ , la soluzione imidazolo: ZnCl_2

permette una marcatura più selettiva delle subunità d'interesse. In conclusione questo esperimento suggerisce che una causa molto probabile della mancata marcatura selettiva delle subunità γ ed ϵ sia da ricollegare alla presenza residua di NH_4 utilizzato per la concentrazione delle frazioni. Una soluzione, in futuro potrà essere quella di preincubare i campioni con una soluzione di imidazolo: ZnCl_2 in modo da favorire la marcatura delle subunità previste.

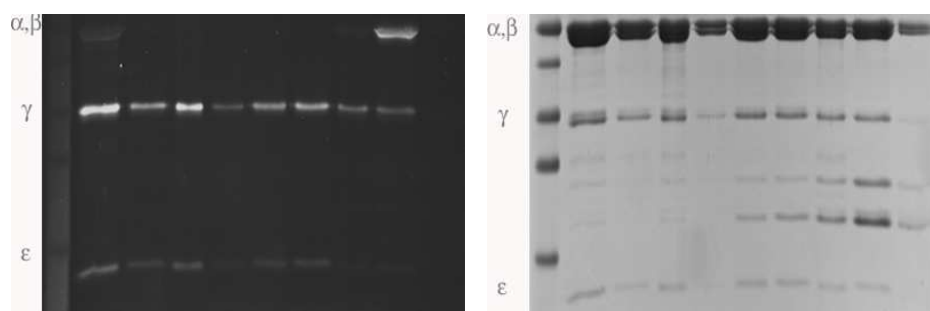


Figura 4.7: Corsa elettroforetica dei campioni riportati nella tabella 4.2. A sinistra è riportato il gel retroilluminato da una lampada UV; a destra lo stesso gel colorato con il comassie blue.

Capitolo 5

Discussione

5.1 Effetti funzionali della mutazione sito specifica γ M23K

Il mutante γ M23K è stato prodotto mediante mutagenesi sito specifica in *Rb. capsulatus B100*. La mutazione è stata prescelta in quanto una mutazione analoga sembra causare in *E. coli* un disaccoppiamento parziale fra la idrolisi di ATP ed il pompaggio di protoni (30); in effetti la posizione γ M23 è localizzata nel punto principale di contatto fra la subunità γ e le tre subunità β , che vengono contattate a turno durante la rotazione del rotore rispetto lo statore. L'introduzione della stessa mutazione in *Rb. capsulatus B100* ha permesso una analisi più dettagliata del fenotipo in quanto questo sistema fotosintetico batterico offre grandi vantaggi per quanto riguarda la risoluzione temporale delle reazioni redox e la misura dei componenti del $\Delta\mu_{H^+}$ ($\Delta\psi$ e ΔpH).

Le misure descritte in questa tesi dimostrano che la mutazione di per sé causa una sensibile riduzione della attività catalitica di idrolisi dell'ATP, mentre è ancora chiaramente presente una attività di pompaggio dei protoni. Quando l'attività idrolitica del ceppo wild type è ridotta, a mezzo dell'inibitore di F_1 efrapeptina, a livelli confrontabili a quelli del mutante γ M23K (Figura 3.6) anche la velocità di traslocazione protonica risulta sovrapponibile a quella del mutante M23K (figura 3.7).

E' noto che l'instaurarsi di un $\Delta\mu_{H^+}$ attraverso la membrana dei cromatofori causa un'attivazione dell'attività ATPasica, ciò avviene quando il $\Delta\mu_{H^+}$ è prodotto

sia dalla catena fotosintetica (fotoattivazione, figura 3.2) che dall'idrolisi di ATP (autoattivazione, figura 3.3). Lo stato attivato dell'enzima è metastabile e può essere osservato per un transiente di alcune decine di secondi solo a seguito dell'aggiunta di disaccoppianti, che, abbattendo il $\Delta\mu_{H^+}$, eliminano la back pressure esercitata dal $\Delta\mu_{H^+}$ sulla velocità di idrolisi. Il fenomeno della fotoattivazione è ben descritto in figura 3.2 per il wild type ed è confrontato con il comportamento del mutante. Anche nel mutante l'illuminazione provoca un deciso aumento della velocità di idrolisi misurabile dopo l'aggiunta di disaccoppianti, aumento confrontabile a quello del wild type(16). Lo stato metastabile nel mutante tuttavia decade molto più velocemente ($t_{\frac{1}{2}} = 28s$ nel wild-type, e $t_{\frac{1}{2}} = 5s$ nel mutante). Il fenomeno di attivazione dell'enzima è quindi non alterato dalla mutazione ma lo stato attivato è reso molto più instabile.

Il fenomeno della attivazione è legato al rilascio di un ADP (ADP inibitorio) che occupa uno dei siti catalitici in assenza di fosfato e provoca in tal modo un blocco del meccanismo rotatorio della catalisi (46). Il superamento dello stato inibito è causato dalla rotazione del rotore (sia causato da $\Delta\mu_{H^+}$ o anche da rotazione forzata meccanicamente (31)). Sia la bassa attività idrolitica che l'instabilità dello stato attivato nel mutante M23K possono quindi essere fatte risalire alla maggior affinità dell'ADP inibitorio. L'ADP prodotto dalla reazione di idrolisi può venire rimosso a mezzo di una trappola enzimatica contenente PEP e piruvato kinasi, a loro volta accoppiata con Lattico deidrogenasi che ossida il NADH. E' questa la più diffusa tecnica di misura della attività ATPasica, che ha però come effetto non secondario l'eliminazione immediata dell'ADP prodotto dalla reazione di idrolisi. L'uso della trappola a PK per l'ADP ha un effetto marcatamente stimolante sulla ATPasi nel wild type, ed anche, in misura del tutto confrontabile, sull'ATPasi del mutante M23K. Ciò conferma che il meccanismo di idrolisi è del tutto adeguato nel mutante e che la bassa attività ATPasica osservata è solo frutto della maggior affinità per l'ADP inibitorio.

La Metionina 23 nella subunità del mutante γ è posta in posizione adiacente ad una corona di aminoacidi cationici che contorna tutta la base della subunità del mutante γ . Questa corona positiva determina il percorso durante la rotazione della estremità più vicina alla membrana delle tre subunità β , che contengono una sequenza molto conservata di aminoacidi anionici e quindi carichi negativamente (la

sequenza DELSEED). Poichè la corona positiva non è posta ad altezza costante attorno alla subunità γ la rotazione produce un innalzamento o abbassamento della porzione DELSEED delle subunità β , e questa deformazione è collegata alla variazione conformazionale dei siti catalitici ed alla loro affinità per i nucleotidi adeninici (modello dell'alternate binding). L'introduzione nel mutante γ M23K di un aminoacido positivo additivo produce una asimmetria nella distribuzione delle cariche elettriche e produce un punto privilegiato di interazione di una subunità β nel corso della rotazione. In maniera molto significativa nella struttura dell' F_1 bovino (1) la Met 23 γ è adiacente ad una subunità β contenente ADP nel sito catalitico ed che si ritiene corrispondere alla struttura dell'enzima inibito da ADP inibitorio.

In conclusione i nostri studi suggeriscono che gli effetti funzionali della mutazione γ M23K siano interpretabili come un aumento dell'affinità dell'ADP che si traduce in una maggiore stabilità dello stato inibito e quindi un più rapido decadimento dello stato attivato. La bassa attività ATPasica e la labilità dello stato attivato impedisce inoltre di osservare il fenomeno dell'autoattivazione dell'ATPasi come dimostrato in figura 3.3.

5.2 ADP e P_i come modulatori della efficienza di pompaggio protonico

Come si è discusso più sopra l'utilizzazione della trappola PEP/PK per la misura dell'attività idrolitica si traduce in un drastico abbassamento della concentrazione dell'ADP prodotto dalla reazione. In precedenti lavori è stato dimostrato (42) che quando questa trappola per l'ADP è presente anche nel saggio di misura della traslocazione protonica (condotto a mezzo della sonda fluorescente ACMA) si osserva un inaspettato abbassamento della velocità iniziale e dello stato stazionario del quenching di fluorescenza che è una misura indiretta della formazione di un Δ pH. Abbiamo anche dimostrato in precedenza che lo ione fosfato (P_i) è necessario (a concentrazioni ca 100 μ M) per ottenere un accoppiamento ottimale fra idrolisi di ATP e trasporto di protoni. Questo meccanismo di regolazione dell'accoppiamento è stato definito disaccoppiamento intrinseco della ATPasi. In questa tesi si è cercato di chiarire le interazioni fra ADP e P_i , la rilevanza per questi fenomeni del

valore del $\Delta\mu_{H^+}$ e dei suoi componenti $\Delta\psi$ e ΔpH , e della cinetica di transizione fra i vari stati funzionali diversamente accoppiati.

La bassa attività catalitica e la maggiore affinità per l'ADP (inibitorio) nel mutante γ M23K ha inizialmente facilitato l'osservazione dei fenomeni di disaccoppiamento intrinseco. Come si vede chiaramente nella figura 3.15 la preincubazione delle membrane con PEP/PK diminuisce drasticamente la traslocazione di protoni, abbassando sia la velocità iniziale che il valore in stato stazionario e del quenching. Queste diminuzioni sono accentuate ulteriormente se l'aggiunta di valinomicina $1 \mu M$ previene la formazione di $\Delta\psi$, che è la componente quantitativamente più rilevante del $\Delta\mu_{H^+}$ per tempi brevi di reazione. Al contrario, quando sia la trappola PEP/PK che la valinomicina sono omessi dal saggio il trasporto protonico prosegue, seppure a velocità ridotta, fino a raggiungere livelli di ΔpH molto elevati, confrontabili al wild type, mentre la successiva aggiunta di PK e di valinomicina riduce immediatamente la risposta dell'ACMA, indice di una diminuita velocità di pompaggio protonico. Lo stato stazionario che si ottiene dopo le due aggiunte è del tutto comparabile a quelli raggiunti preincubando le membrane con PEP/PK e valinomicina prima dell'aggiunta di ATP. Gli esperimenti di figura (?) danno anche qualche idea sulla cinetica della transizione indotta da PEP/PK; il raggiungimento del nuovo stato stazionario dopo l'aggiunta richiede alcuni minuti il che indica una transizione lenta e graduale dell'efficienza di pompaggio, anche se la risposta di fluorescenza rispecchia sia la cinetica di decadimento del ΔpH , che la residua velocità di trasporto protonico nello stato funzionale dell'enzima gradualmente disaccoppiato. E' bene sottolineare che l'andamento della traslocazione protonica non ha alcuna corrispondenza negli effetti della valinomicina e della trappola PEP/PK sulla velocità di idrolisi dell'ATP che viene stimolata e non diminuita dalle aggiunte. Questa divergenza della risposta giustifica la nostra affermazione che l'efficienza del pompaggio viene diminuita quando la concentrazione di ADP (e di fosfato) sono tenute basse, e/o quando lo ionoforo valinomicina abolisce il .

I fenomeni documentati nel mutante M23K sono osservabili anche nel wild type, anche se questo richiede obbligatoriamente l'associazione della trappola PEP/PK e di valinomicina per osservare l'inibizione del pompaggio. Tutti i fenomeni nel wild type sono meno accentuati e gli stati stazionari ottenuti nelle varie condizioni sono in genere più elevati. Questi risultati, che sono giustificati sia dalla maggiore ca-

pacità catalitica che dalla minore affinità per l'ADP inibitorio rispetto al mutante, sono tuttavia la prova sperimentale delle proprietà regolatorie ad opera dell'ADP e del $\Delta\mu_{H^+}$ anche nel wild type.

Queste conclusioni sono state poste su un piano più quantitativo dopo che un metodo di calibrazione della risposta dell'amina fluorescente ha permesso di convertire i dati di fluorescenza in valori di ΔpH . A tale scopo l'ACMA, utilizzata di routine, è stata sostituita con la monoamina fluorescente 9-amino-acridina (9AA) che risponde in maniera analoga al pH transmembrana. Questa sonda, essendo meno idrofobica dell'ACMA è meno sensibile al pH e richiede l'utilizzo di una maggior quantità di vescicole (da 10 a 20 μM batterioclorofilla) per ottenere risposte quantitativamente rilevanti. La sua risposta è tuttavia agevolmente calibrabile mediante salti artificiali di pH ed il fitting delle risposte ottenute a ΔpH noto può essere descritto mediante un modello di distribuzione transmembrana e partizione fra lipidi e fasi acquose (8). Gli esperimenti con 9AA pienamente confermano i risultati qualitativi ottenuti con l'ACMA, dimostrando che il fosfato (a concentrazioni fra 50 e 1000 M) stimola il pompaggio, con effetti non significativi sulla velocità di idrolisi. Al contrario la diminuzione di ADP per rimozione da parte della trappola PEP/PK causa una diminuzione della velocità di pompaggio accompagnata da una marcata stimolazione della velocità di idrolisi. Una valutazione dei risultati, sulla base del rapporto fra velocità della variazione iniziale del ΔpH , rispetto alla corrispondente velocità di idrolisi, dimostra che l'efficienza del pompaggio protonico diminuisce di un fattore più di 10 volte, in corrispondenza ad una diminuzione della velocità di pompaggio di circa 1,5 volte causata da 128 U/ml di PK (figura 3.14A) a fronte della stimolazione di circa 10 volte dell'attività idrolitica (figura 3.15B).

La valutazione delle concentrazioni di ADP durante un saggio di idrolisi in presenza della trappola PEP/PK può essere ottenuta imponendo le condizioni di cinetica stazionaria per l'[ADP], prodotto dall'idrolisi e consumato dalla PK. In base a questi calcoli gli effetti accoppianti dell'ADP si manifestano a concentrazioni superiori al micromolare, mentre quando a seguito dell'aggiunta di grandi attività di PK, la concentrazione stazionaria di ADP è mantenuta a livelli sub-micromolari l'efficienza di pompaggio protonico è diminuita drasticamente (figura 3.16B). Gli effetti stimolatori del fosfato hanno invece un loro massimo per $[\text{Pi}] \approx 200 \mu\text{M}$ (figura 3.16A).

Anche gli effetti degli inibitori oligomicina ed efraeptina sono a sostegno del concetto di regolazione dell'efficienza di pompaggio protonico. L'oligomicina, inibitore del settore F_0 dell'ATP sintasi, blocca la traslocazione protonica transmembrana (probabilmente tramite un blocco della rotazione del complesso delle subunità c); questa inibizione della funzionalità di F_0 si trasmette al settore F_1 , manifestandosi come inibizione dell'attività idrolitica. Al contrario l'efraeptina si lega all'interfaccia fra la subunità γ e una delle subunità β , ostacolando la rotazione nel settore F_1 . Questo meccanismo causa un'inibizione diretta della catalisi idrolitica rotazionale e, solo di riflesso, nell'inibizione della traslocazione protonica attraverso F_0 . Negli esperimenti illustrati in 3.18, le aggiunte successive di PK e di valinomicina sono state fatte su cromatofori parzialmente inibiti con concentrazioni crescenti di oligomicina. Le principali osservazioni che si possono fare su questi risultati sperimentali sono le seguenti:

- la parziale inibizione dell'attività idrolitica rende non più indispensabile la aggiunta di valinomicina per osservare gli effetti inibitori della PK. In altre parole, la parziale inibizione da oligomicina produce un comportamento simile a quello osservato nel mutante γ M23K, dovuto presumibilmente alla attività idrolitica, ridotta in maniera analoga dall'inibitore nel wild type o dalla mutazione nel mutante;
- la valutazione del valore di K_{50} per la diminuzione degli stati stazionari di pH in presenza o in assenza di PK (sia pre-incubata che aggiunta durante il corso della reazione) dimostra che il valore di Δ pH è molto più resistente all'inibizione da oligomicina quando l'ADP prodotto non è rimosso dalla trappola PEP/PK (tabella 3.2), indice ancora di una variabilità degli effetti di inibitori di F_0 sulla attività di F_1 , quando sia modificata la concentrazione di ADP nel mezzo.

Infine gli esperimenti di figura 3.23, dimostrano che, quando si valuti il valore del potenziale di membrana ($\Delta\psi$) con un'apposita sonda fluorescente (Oxonolo VI), l'effetto disaccoppiante della trappola PEP/PK è pienamente confermato. L'aggiunta dello ionoforo nigericina, che, abolendo il Δ pH, diminuisce il valore assoluto del $\Delta\mu_{H^+}$, accentua il fenomeno, che è tuttavia rilevabile anche in assenza di ionofori. Questo risultato suggerisce che il $\Delta\psi$ è una grandezza più sensibile

all'effetto della PK, essendo il normalmente la componente più rilevante del $\Delta\mu_{H^+}$ complessivo.

In definitiva l'insieme dei risultati dimostra che sia il fosfato, che l'ADP esercitano un'azione regolatoria sull'accoppiamento fra idrolisi di ATP e trasporto protonico nella ATP sintasi di *Rb. capsulatus*. Le affinità del sito di legame del fosfato (concentrazioni sub -millimolari) e dell'ADP sono consistenti con le proprietà dei siti catalitici. Tuttavia la bifasicità della risposta all'ADP, che stimola l'accoppiamento a concentrazioni sub-micromolari, ma inibisce l'idrolisi e di conseguenza il pompaggio protonico a concentrazioni micromolari, suggerisce la non identità fra ADP regolatorio dell'accoppiamento e ADP inibitorio. La cinetica di transizione fra gli stati a diverso grado di accoppiamento sembra abbastanza lenta, in accordo con l'ipotesi di una rilevante variazione conformazionale all'interno della ATP sintasi.

5.3 Ipotesi sulla base strutturale del meccanismo di regolazione dell'accoppiamento

La subunità che con ogni probabilità è coinvolta nel meccanismo di regolazione dell'accoppiamento del trasporto protonico è la subunità ϵ . Nei batteri questa proteina è formata da un dominio N-terminale a struttura di barile beta, e da una estremità C-terminale che forma una coppia di due alfa eliche. Vi sono molte evidenze che quest'ultima porzione può subire drastiche variazioni conformazionali, passando da una struttura raccolta a forcina di alfa eliche, adesa al barile beta, ad una struttura estesa che pone le due eliche parallelamente alla superelica della subunità γ . Quest'ultima conformazione deve necessariamente interferire con il meccanismo rotatorio della subunità γ rispetto al trimero $\alpha_3\beta_3$. L'aggiunta di nucleotidi adenilici, che presumibilmente si legano ai siti catalitici, influenzano la posizione della porzione C-terminale della subunità ϵ , l'ATP favorendo la posizione raccolta e l'ADP la posizione estesa (46). E' quindi molto probabile che l'aggiunta della PK, modificando la concentrazione di ADP a cui è esposto l'enzima, influenzi l'accoppiamento tramite modificazioni strutturali della subunità ϵ . Il piano di lavoro futuro prevede di cercare di evidenziare i movimenti strutturali della subunità ϵ rispetto alla subunità γ mediante la FRET. Sono stati prodotti dei doppi mutanti

contenenti cisteine in un punto prestabilito della subunità γ (γ T106C) ed in una di due posizioni alternative sulla subunità ϵ (ϵ H57C sul barile beta, ed ϵ Y114C fra le due eliche C-terminali). E' stata anche messa punto un protocollo per la marcatura di una coppia di cisteine con derivati maleimidici di due fluorofori (ATTO e TMR), legati covalentemente alla proteina tramite le cisteine introdotte. Sono state poste in tal modo le premesse per le misure di FRET in singola molecola che saranno nel futuro tentate in collaborazione con il Laboratorio del Prof. Graeber, Univetsità di Friburgo.

Appendici

Bibliografia

- [1] ABRAHAMS, J., LESLIE, A., LUTTER, R., AND WALKER, J. Structure at 2,8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 6491 (Aug 1994), 621–8.
- [2] AGGELER, R., AND CAPALDI, R. A. Cross-linking of the gamma subunit of the Escherichia coli ATPase (ecf1) via cysteines introduced by site-directed mutagenesis. *JBC* 267, 30 (Oct 1992), 21355–9.
- [3] BASHFORD, C., AND J.C., S. *Meth. Enzymol.*, 60, 569–588.
- [4] BIRKENHAGER, R., HOPPERT, M., DECKERS-HEBESTREIT, G., MAYER, F., AND ATELDORF, K. . *Eur J Biochem* 230, 1 (1995), 58–67.
- [5] BORGHESE, R., CRIMI, M., FAVA, L., AND MELANDRI, B. The ATP synthase atpHagdc (f1) operon from Rhodospirillum rubrum. *J. Bacteriol.*, 180 (1998), 416–421.
- [6] BOYER, P. . *BBA* 3, 1140 (1993), 215–50.
- [7] CAPPELLINI, P., TURINA, P., FREGNI, V., AND MELANDRI, B. Sulfite stimulates the ATP hydrolysis activity of but not proton translocation by the ATP synthase of Rhodospirillum rubrum and interferes with its activation by electrochemical gradient. *Eur. J. Biochem*, 248 (1997), 496–506.
- [8] CASADIO, R. Measurements of transmembrane pH differences of low extents in bacterial chromatophores. *Eur Biophys J*, 19 (1991), 189–201.
- [9] CASADIO, R., BACCARINI-MELANDRI, A., AND MELANDRI, B. A. Limited cooperativity in the coupling between flow and photosynthetic ATP synthesis. *FEBS Letters* 87, 2 (Mar 1978), 323–328.

- [10] CASADIO, R., AND MELANDRI, B. Calibration of the response of 9-amino acridine fluorescence to transmembrane pH differences in bacterial chromatophores. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 238, 1 (Apr 1985), 219–228.
- [11] CIPRIANO, D., BI, Y., AND DUNN, S. D. Genetic fusions of globular proteins to the epsilon subunit of the escherichia coli atp synthase: Implications for in vivo rotational catalysis and epsilon subunit function. *J. Biol. Chem.*, 277 (2002), 16782–16790.
- [12] CLAYTON, R. *Absorption spectra of photosynthetic bacteria and their chlorophylls*. H. Gest, A. San Pietro, L.P. Vernon (Eds.), 1997.
- [13] DROBINSKAYA, I., KOZLOV, I., MURATALIEV, M., AND VULFSON, E. Tightly bound adenosine diphosphate, which inhibits the activity of mitochondrial f1-atpase, is located at the catalytic site of the enzyme. *FEBS Lett.*, 182, 419–424.
- [14] DUNCAN, T., BULYGIN, V., ZHOU, Y., HUTCHEON, M., AND CROSS, H. *PNAS USA* 92, 24 (1995), 10964–8.
- [15] FENIOUK, B., MULKIDJANIAN, A., AND JUNGE, W. Proton slip in the atp synthase of rhodobacter capsulatus: induction, proton conduction, and nucleotide dependence. *Biochim. Biophys. Acta*, 1706 (2005), 184–194.
- [16] FENIOUK, B., REBECCHI, A., GIOVANNINI, D., ANEFORS, S., MULKIDJANIAN, A., W., J., AND TURINA, P. MELANDRI, B. Met23lys mutation in rhodobacters capsulatus impairs the activation of atp hydrolysis by protonmotive force. *BBA*, 1767 (2007), 1319–1330.
- [17] FENIOUK, B., SUZUKI, T., AND YOSHIDA, M. The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of fof1 atp synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757 (2006), 326–338.
- [18] FENIOUK, B. A., CHEREPANOV, D. A., JUNGE, W., AND MULKIDJANIAN, A. Y. Atp-synthase of rhodobacter capsulatus: Coupling of proton flow through f0 to reactions in f1 under the atp synthesis and slip conditions. *FEBS Lett.*, 445 (1999), 409–414.

- [19] FITIN, A., VASILYEVA, E., AND VINOGRADOV, A. An inhibitory high affinity binding site for adp in the oligomycin-sensitive atpase of beef heart submitochondrial particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 86 (1979).
- [20] FROMME, P., AND GRAEBER, P. Activation-inactivation and uni-site catalysis by the reconstituted atpsynthase from chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1016 (1990), 29–42.
- [21] GIBBONS, C., MONTGOMERY, M., LESLIE, A., AND WALKER, J. *Nat. Struct. Biol.* 1, 7 (2000), 1055–1061.
- [22] GOECKEL, P., VAHRENKAMP, H., AND A.D., Z. Zinc complexes of cysteine, histidine and derivatives thereof: potentiometric determination of their compositions and stabilities. *Helvetica Chimica Acta* 76 (1993), 511–520.
- [23] GROTH, G., AND JUNGE, W. Proton slip of the chloroplast atpase: Its nucleotide dependence, energetic threshold, and relation to an alternating site mechanism of catalysis. *Biochemistry*, 32 (1993), 8103–8111.
- [24] GROTH, G., AND POHL, H. *JBC* 276, 2 (2001), 1345–52.
- [25] JAULT, J., AND ALLISON, W. . *JBC* 268, 3 (1993), 1558–66.
- [26] MARTELL, A., AND SMITH, R. *Absorption spectra of photosynthetic bacteria and their chlorophylls*. Plenum Press, New York, 1974.
- [27] MILGROM, Y., AND BOYER, P. The adp that binds tightly to nucleotide-depleted mitochondrial f1-atpase and inhibits catalysis is bound at a catalytic site. *Biochim. Biophys. Acta*, 1020 (1990), 43–48.
- [28] MITCHELL, P. *Nature* 8, 191 (Jul 1961), 144–8.
- [29] NAKAMOTO, R., KETCHUM, C., KUO, P., PESKOVA, Y., AND SHAWI, M. Molecular mechanisms of rotational catalysis in the f0f1 atp synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1458 (2000), 289–299.
- [30] NAKAMOTO, R., MAEDA, M., AND M., F. The gamma subunit of the escherichia coli atp synthase. mutations in the carboxyl-terminal region restore energy coupling to the amino-terminal mutant gamma met23lys. *JBC* 268, 2 (Jan 1993), 867–72.

- [31] NOJI, H., YASUDA, R., YOSHIDA, M., AND KINOSITA, JR, M. K. Direct observation of the rotation of f1-atpase. *Nature* 386, 6622 (Mar 1997), 299–302.
- [32] OMOTE, H., SAMBONMATSU, N., SAITO, K., SAMBONGI, Y., IWAMOTO-KIHARA, A., YANAGIDA, T., WADA, Y., AND FUTAI, M. The gamma-subunit rotation and torque generation in f1-atpase from wildtype or uncoupled mutant escherichia coli. *PNAS U. S. A.*, 96 (1999), 7780–7784.
- [33] PICK, U., AND WEISS, M. A light-dependent dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ca-atpase activity in chloroplasts which is not coupled to proton translocation. *Eur. J. Biochem.*, 173 (1988), 623–628.
- [34] RASTOGI, V., AND M.E., G. Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the atp synthase. *Nature* 402, 18 (Nov 1999), 263–268.
- [35] SCHULDINER, S., ROTTENBERG, H., AND AVRON, M. *Eur. J. Biochem*, 25 (1972), 64–70.
- [36] SEELERT, H., POETSCH, A., DENCHER, N., ENGEL, A., H., S., AND MULLER, D. . *Nature* 405, 6786, 418–9.
- [37] SHAWI, M., KETCHUM, C., AND NAKAMOTO, R. The escherichia coli fof1 gammam23k uncoupling mutant has a higher k0.5 for pi. transition state analysis of this mutant and others reveals that synthesis and hydrolysis utilize the same kinetic pathway. *Biochemistry*, 36 (1997), 12961–12969.
- [38] SHERMAN, P., AND WIMMER, M. Activation of atpase of spinach coupling factor 1. release of tightly bound adp from the soluble enzyme. *Eur. J. Biochem.*, 139 (1984), 367–371.
- [39] SINGH, S., TURINA, P., BUSTAMANTE, C., AND KELLER, D. C. R. Topographical structure of membrane-bound escherichia coli fif0 atp synthase in aqueous buffer. *FEBS Letters*, 397 (1996), 30–34.
- [40] STOCK, D., GIBBONS, C., ARECHAGA, I., LESLIE, A., AND WALKER, J. . *Curr Opin Struct Biol* 10, 6 (2000), 672–9.

- [41] TSUNODA, S., RODGERS, A., AGGELER, R., WILCE, M., YOSHIDA, M., AND CAPALDI, R. Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial flf0 atp synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *PNAS* 98, 12 (Jun 2001), 6560–6564.
- [42] TURINA, P., GIOVANNINI, D., GUBELLINI, F., AND MELANDRI, B. Physiological ligands adp and pi modulate the degree of intrinsic coupling in the atp synthase of the photosynthetic bacterium rhodobacter capsulatus. *Biochemistry*, 43 (2004), 11126–11134.
- [43] TURINA, P., RUMBERG, B., MELANDRI, B., AND GRABER, P. Activation of the h+atp synthase in the photosynthetic bacterium rhodobacter capsulatus. *JBC* 267, 16 (Jun 1992), 11057–11063.
- [44] WILKENS, S., AND CAPALDI, R. Solution structure of the e subunit of the f1-atpase from escherichia coli and interactions of this subunit with b subunits in the complex. *JBC* 273, 41 (Oct 1998), 26645–26651.
- [45] YASUDA, R., NOJI, H., YOSHIDA, M., KINOSITA, K., AND ITOH, H. *Nature* 410, 6831 (2001), 898–904.
- [46] YOSHIDA, M., AND MUNHEYUKI, E. HISABORI, T. Atp synthase: A marvellous rotary engine of the cell. *Nature* 2, 670 (Sep 2001), 669–677.