



Unione Europea



REGIONE CAMPANIA



P.O.R.
Campania
FSE 2007-2013

La tua
Campania
cresce in
Europa

PROGETTO STRAIN
“Strategie Terapeutiche Innovative”
POR Campania FSE 2007/2013
CUP B25B0900000000

Relazione dell'attività di ricerca svolta nell'ambito disciplinare

“Metalloproteine in miniatura”.

Assegno di ricerca: Agosto 2013 – luglio 2014

Dr.ssa Rosa Vitale

Obiettivi

L'attività di ricerca è stata indirizzata verso lo sviluppo di nuovi modelli di metalloproteine in miniatura, appartenenti alla famiglia dei Mimochromes, e la loro caratterizzazione strutturale e funzionale. Tali modelli di eme-proteine, dotati di attività perossidasi, e caratterizzati da dimensioni notevolmente ridotte rispetto agli enzimi naturali, possono essere efficacemente impiegati in ambito biotecnologico, ad esempio per lo sviluppo di dispositivi immunodiagnostici con elevate prestazioni.

I Mimochromes sono addotti eme-peptidi sintetici progettati per riprodurre il sito attivo delle eme-proteine naturali. La loro tipica struttura a *sandwich* “elica-eme-elica” è stata impiegata per costruire un sistema asimmetrico, denominato Mimochrome VI (MC6) e caratterizzato dall'attività catalitica perossidasi verso diversi substrati, tra cui l'acido 2,2'-Azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS).

Fe^{III}-MC6 è costituito da una catena peptidica di 14 residui, definita tetradecapeptide o TD, ed una catena di 10 residui, denominata decapeptide o D, entrambe legate covalentemente ai gruppi propionici della deuterioemina IX. Un residuo d'istidina (His⁶) è posto al centro della catena TD per coordinare lo ione metallico (Fe^{III}) nell'eme. La catena del decapeptide, in posizione distale all'eme, non presenta residui in grado di coordinare il metallo ed è progettata per permettere il facile accesso di piccole molecole all'eme (figura 1). Entrambe le catene peptidiche ricoprono un ruolo centrale nella modulazione della reattività catalitica, mediante la selezione degli stati di coordinazione e di spin, la regolazione dell'accesso dei substrati al sito attivo e la protezione del catalizzatore da fenomeni di *bleaching* ossidativo.

Secondo questi presupposti, si è deciso di studiare il ruolo delle catene peptidiche nella modulazione della reattività catalitica di MC6, valutando il ruolo dei residui di acido glutammico in posizione 2 (E²) e di arginina in posizione 10 (R¹⁰), in entrambe le catene, D e TD. Nel modello di MC6, questi residui, posti rispettivamente alle estremità N e C-terminali, contribuiscono a stabilizzare le due α -eliche peptidiche, attraverso interazioni carica-dipolo, e la struttura terziaria del *sandwich*, mediante interazioni ioniche inter-catena (figura 1).

Attività svolte e risultati conseguiti

Allo scopo di verificare il ruolo di questi quattro residui carichi, sono state introdotte sostituzioni puntuali nelle catene peptidiche con una leucina, ottenendo quattro analoghi di MC6: E²L TD e R¹⁰L TD, recanti la sostituzione sul tetradecapeptide, ed E²L D e R¹⁰L D, con la modifica sul decapeptide. La leucina è stata selezionata per la sostituzione poiché è caratterizzata da un'elevata propensione a formare strutture elicoidali e, pertanto, permette di mantenere intatta la struttura secondaria delle catene peptidiche modificate.

Inoltre, la grandezza e la natura idrofobica della catena laterale di questo residuo gli consentono di instaurare interazioni con la deuteroporfirina che stabilizzino la struttura terziaria a *sandwich* di MC6.

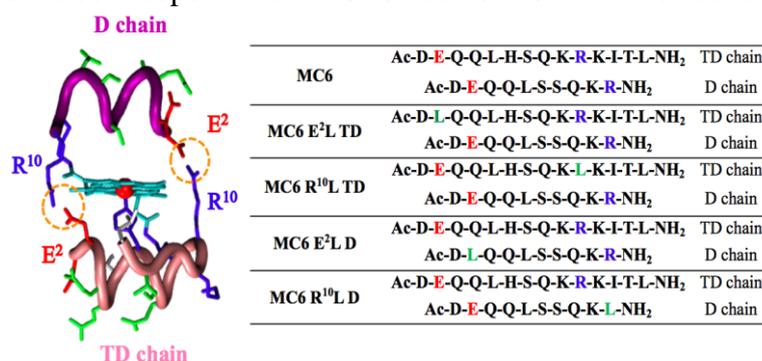


Figura 1 Modello di Fe^{III}-MC6: le coppie ioniche R¹⁰-E² sono evidenziate in arancione; tabella: sequenze peptidiche di MC6 e analoghi: i residui acidi, basici e apolari, in posizione 2 e 10, sono indicati in rosso, blu e verde, rispettivamente.

La sintesi dei quattro composti è stata condotta, analogamente ai precursori della famiglia dei Mimochromes, combinando principi di sintesi peptidica in fase solida e in soluzione. Le catene peptidiche, sintetizzate mediante chimica Fmoc (fluorenilmetilossicarbonile), sono state accoppiate in soluzione all'anello della deuteroporfirina IX. Dopo la rimozione dei gruppi protettori ortogonali, e l'inserzione dello ione ferrico, i quattro analoghi sono stati purificati e analizzati mediante HPLC-MS. L'analisi LCMS di tutti i composti sintetizzati, ottenuti tutti con elevata purezza (> 95%), ha confermato l'identità dei composti. I parametri analitici relativi ai prodotti ottenuti sono riassunti in tabella.

Tabella 1 Parametri analitici LC-MS.

Fe ^{III} -MC6 analoghi	t _r (min)	Massa misurata (Da)	Massa teorica (Da)
E ² L TD	49.49	3535.42±0.08	3536.75
R ¹⁰ L TD	48.51	3508.90±1.60	3509.67
E ² L D	50.09	3536.06±0.92	3536.75
R ¹⁰ L D	48.81	3507.06±0.66	3509.67

Lo *screening* funzionale è stato condotto nelle condizioni sperimentali utilizzate in precedenza per il precursore Fe^{III}-MC6 (50 mM tampone fosfato a pH 6,5, 50% TFE, v/v, a 25 °C) per evidenziare le proprietà catalitiche degli analoghi Fe^{III}-MC6. Le dipendenze nei confronti sia ABTS e H₂O₂ sono state analizzate secondo un modello cinetico di Michaelis-Menten a due substrati indipendenti per determinare i parametri cinetici (tabella 2).

Tabella 2 Parametri per la cinetica allo stato stazionario, relativi a MC6 e analoghi. I parametri corrispondenti ottenuti per l'HRP sono riportati, per il confronto

Enzyme	pH	H ₂ O ₂		ABTS		T.O.N. 10 ⁻³	
		K _m (mM)	K _m 10 ² (mM)	k _{cat} 10 ⁻² (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m 10 ⁻³ (mM s ⁻¹)		
MC6	6.5	44 ± 2	8.4 ± 0.2	3.7 ± 0.1	8.4 ± 0.6	4.4 ± 0.2	4.0
E ² L(TD)-MC6	6.5	31 ± 2	5.0 ± 0.4	7.8 ± 0.6	25 ± 3	16 ± 2	5.9
R ¹⁰ L(TD)-MC6	6.5	54 ± 2	3.8 ± 0.1	6.8 ± 0.3	13 ± 1	18 ± 1	5.6
E ² L(D)-MC6	6.5	96 ± 7	11 ± 1	3.8 ± 0.3	4.0 ± 0.6	3.4 ± 0.6	3.6
R ¹⁰ L(D)-MC6	6.5	18 ± 1	3.0 ± 0.2	1.7 ± 0.1	9 ± 1	5.7 ± 0.7	3.3
HRP	4.6	0.85 ± 0.01	107 ± 1	62 ± 1	(7.3 ± 0.2) 10 ³	5.8 ± 0.1	50
HRP ^d	7.0	(1.15 ± 0.01) 10 ⁻²	(5.1 ± 1.2) 10 ²	0.52 ± 0.04	(4.6 ± 0.5) 10 ³	(1.0 ± 0.3) 10 ⁻²	0.3

Dal confronto con MC6, emerge che le proprietà catalitiche sono notevolmente aumentate nei composti con la sostituzione sulla catena TD. Le prestazioni migliori sono state ottenute per l'analogo E²L TD-MC6, che ha mostrato un miglioramento per la k_{cat} e per le efficienze catalitiche per entrambi i substrati.

Al contrario, gli analoghi con la sostituzione sulla catena D tendono a mostrare una reattività quasi inalterata, ad eccezione dell'analogo E²L D-MC6, che è il peggiore tra i catalizzatori.

Tutti analoghi MC6 sono in grado di eseguire diverse migliaia *turnovers*, senza subire degradazione ossidativa. L'analisi dei numeri di *turnover* (TON) riflette un miglioramento nei composti E²L TD-MC6 e R¹⁰L TD-MC6, e una diminuzione nelle corrispondenti varianti del decapeptide.

L'analogo E²L TD è stato selezionato per una caratterizzazione più dettagliata, finalizzata alla comprensione degli effetti strutturali e funzionali della sostituzione amminoacidica.

Il ruolo del pH sulla selezione degli stati di coordinazione e di spin è stato investigato mediante spettroscopia di assorbimento UV-vis e dicroismo circolare magnetico. A pH acidi (pH \approx 2.0) la molecola mostra le caratteristiche spettroscopiche tipiche di sistemi emici ad alto spin con due molecole di acqua coordinate al ferro. All'aumentare del pH (2.0 < pH < 4.7), gli spostamenti osservati, sia nelle bande degli spettri di assorbimento UV-vis che in quelle degli spettri MCD, suggeriscono un cambiamento nello stato di coordinazione e un inalterato stato di alto spin, in analogia a quanto osservato per il precursore MC6. Tale cambiamento è stato spiegato con la deprotonazione dell'anello imidazolico del residuo d'istidina e la conseguente coordinazione dello ione ferrico. A pH ancora superiori (pH > 5), la molecola di acqua, nella sesta posizione di coordinazione al ferro, è sostituita da uno ione OH⁻ che comporta un leggero contributo del basso spin.

Il ruolo del cosolvente 2,2,2-Trifluoroetano, sulla strutturazione delle catene peptidiche e della struttura terziaria del mini-enzima, è stato investigato mediante spettroscopia in dicroismo circolare. Gli spettri di E²LTD MC6 sono stati acquisiti utilizzando come solvente il tampone fosfato a pH 4.7 a diverse concentrazioni del cosolvente strutturante trifluoroetano (TFE). In assenza di TFE, le catene peptidiche sono scarsamente elicoidali e l'intera molecola appare poco strutturata, a causa delle ridotte interazioni porfirina-peptide. Con l'aggiunta di TFE, il contenuto elicoidale aumenta fino al 30% e le interazioni dei peptidi con l'anello porfirinico aumentano, come dimostrato dall'intensificazione dell'effetto Cotton nella regione di assorbimento della banda di Soret.

Il ruolo strutturale del pH e del TFE è stato correlato all'efficienza catalitica dell'enzima sintetico. L'andamento della velocità iniziale della reazione di ossidazione dell'ABTS (v_i) in funzione del pH mostra un profilo a campana, con un massimo di attività a pH 6.5. La prima transizione, osservata a pH \approx 5, è stata interpretata come conseguenza della deprotonazione di un residuo amminoacidico acido, probabilmente il Glu² sulla catena D, che comporti una stabilizzazione strutturale della molecola. La seconda transizione a pH \approx 7 è stata invece collegata alla coordinazione del gruppo ossidrilico nella sesta posizione, che ostacoli l'accesso del perossido d'idrogeno al sito attivo e l'innesco della reazione catalitica.

La spettroscopia di assorbimento UV-vis è stata impiegata per una preliminare caratterizzazione del meccanismo della reazione ossidativa catalizzata da E²LTD-MC6. All'aggiunta di un'equivalente di H₂O₂ lo spettro di assorbimento UV-vis si modifica, mostrando caratteristiche proprie del composto I, con un centro FeIV=O*⁺, cioè il primo intermedio nel ciclo perossidasi delle eme-proteine naturali (Es. perossidasi da rafano). Tale analogo del composto I, in assenza di un co-substrato riducente, si riduce spontaneamente, tornando al punto di partenza in maniera quasi-reversibile.

La caratterizzazione spettroscopica mediante CD, MCD e assorbimento UV-vis, ha dimostrato che nelle condizioni di massima reattività (tampone fosfato 50 mM, pH 6.5, 50% v/v TFE), la molecola presenta una buona strutturazione delle catene peptidiche e del *sandwich* tridimensionale. Lo stato di coordinazione della molecola è per il 50% His-Fe^{III}-H₂O e per il 50% His-Fe^{III}-OH⁻, e lo ione ferrico è prevalentemente nello stato di alto spin, con un piccolo contributo del basso spin, dovuto alla coordinazione dello ione OH⁻. In particolare, lo spettro MCD suggerisce che il sito distale di Fe^{III}-E²L TD-MC6 sia poco strutturato e molto simile a quello della mioglobina. A differenza della mioglobina, la

presenza di un residuo di arginina distale, R¹⁰ sulla catena D, rende possibile l'instaurazione di un'interazione a ponte idrogeno con il sesto legante dello ione metallico. Questa considerazione è basata sull'analisi della posizione della banda di trasferimento di carica (CT) negli spettri MCD.

In conclusione, attraverso un approccio “*bottom-up*”, basato sul design degli analoghi, la sintesi e lo *screening* funzionale, è stato possibile selezionare un analogo, Fe^{III}-E²L TD-MC6, che mostra una migliore reattività enzimatica rispetto al suo precursore.

Tecniche spettroscopiche combinate, di dicroismo circolare (CD), di dicroismo circolare magnetico (MCD) e di assorbimento UV-Vis, hanno permesso lo studio delle caratteristiche strutturali e funzionali del nuovo mini-enzima. Dagli studi condotti è emerso che un residuo di arginina (R) esposto sul sito distale dell'eme, è in grado di legare il sesto legante assiale dell'eme mediante ponte a idrogeno. Tal evidenza suggerisce che questo residuo di arginina potrebbe assistere la catalisi, facilitando la formazione composto I, in analogia alla funzione del residuo R³⁸ nella perossidasi da rafano (HRP).

Descrizione della struttura ospitante:

Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Napoli “Federico II”,
Via Cintia 21, 80126 Napoli, Italia.

Riferimenti del tutor scientifico

Prof. Vincenzo Pavone, Professore di chimica generale e inorganica (CHIM/03).

Dipartimento di Biologia - Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Complesso Monte Sant'Angelo,
Via Cintia 21, 80126 Napoli.

Telefono: 081-674399

E-mail: vincenzo.pavone@unina.it

Sito web docenti: www.docenti.unina.it/vincenzo.pavone