

*Studi conformazionali di subunità gluteniniche
ad alto peso molecolare del frumento
mediante spettroscopia di dicroismo circolare*

S. Fisichella¹, A. Palermo¹, A. Savarino¹

¹ Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Catania, Viale A. Doria, 6 - 95125 Catania

1. Introduzione

Recentemente numerosi studi sono stati condotti su un particolare gruppo di proteine del glutine, le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW)^{1,2}, poiché è stato osservato che le proprietà fisiche dell'impasto e le qualità panificatorie della farina¹ dipendono dal tipo e dalla quantità di HMW presenti. Le subunità gluteniniche HMW hanno pesi molecolari che variano tra 65000 e 90000 Da e sono classificate nei tipi x- e y- in base alla loro mobilità elettroforetica. Le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare hanno una natura intrinsecamente elastica, questo è riconducibile alla struttura secondaria di queste proteine che possiedono tre domini strutturali: un dominio centrale ripetuto a spirale che separa le regioni N terminale e C terminale a struttura globulare ad α -elica. La regione centrale indicata con il nome di repeat²⁻³, ha una caratteristica conformazione beta-turn⁴, stabilizzata da interazioni idrofobiche che coinvolgono i residui di tirosina e da legami ad idrogeno, formati tra le catene laterali dei residui di glutammina e lo scheletro peptidico.

Per una maggiore comprensione della correlazione tra le proprietà tecnologiche dell'impasto e la struttura delle subunità gluteniniche⁵, è indispensabile condurre uno studio dettagliato delle varie conformazioni che queste proteine possono assumere. Scopo del presente lavoro è stato lo studio della struttura secondaria di tali subunità mediante misure di Dicroismo Circolare (CD) in soluzione⁵⁻⁸. In particolare è stato analizzato il polimorfismo conformazionale delle subunità gluteniniche 1Dx2, 1Bx7 e 1Dy12 indotto dall'urea e dall'urea in presenza dell'1% di Sodio Dodecilsolfato (SDS).

2. Parte sperimentale

Estrazione delle HMW

Per isolare le subunità HMW è stato adottato il metodo di Marchylo opportunamente modificato. La farina è stata impastata con acqua e successivamente lavata e centrifugata con una soluzione di NaCl 0,5 M allo scopo di allontanare amido, albumine e globuline in essa solubili. Il residuo è stato lavato più volte con acqua per eliminare il sale e dopo centrifugazione è

stato trattato con una soluzione di 1-propanolo al 50% (v/v) per portare in soluzione le gliadine. Dopo centrifugazione ed allontanamento del surnatante, il residuo è stato sospeso in 1-propanolo al 50% (v/v) e DTT all'1% (g/v) a 60°C per un'ora. Questo trattamento ha lo scopo di scindere i ponti disolfuro intra e inter-molecolari presenti nelle glutenine ad alto e basso peso molecolare, rendendole solubili.

Dopo centrifugazione, al surnatante è stato aggiunto 1-propanolo al fine di portare la concentrazione dal 50 al 60% (v/v). Le HMW precipitate a 4°C over night, sono state recuperate mediante centrifugazione, sciolte in tampone Tris-HCl 0.05 M a pH 8, contenente 1-propanolo al 50% (v/v) e urea 2M e ridotte con DTT 0.04 M per un'ora a 60° C. Successivamente le HMW sono state bloccate con 4-vinilpiridina 0.08 M per 15 minuti a 60°C; quindi dializzate contro acido acetico 1% (v/v) per 72 ore.

Purificazione delle HMW mediante RP-HPLC

L'analisi HPLC è stata effettuata con uno strumento Varian Prostar modello 230 equipaggiato con un detector Varian ADBC BOARD modello 320. I dati sono stati acquisiti da un PC usando il software Star Chromatography Workstation 5.

Le subunità gluteniniche HMW (Dx2, Dy12 e Bx7) utilizzate per effettuare gli spettri CD, sono state separate dall'estratto di Marchylo proveniente dalla farina Alisei 1° su una colonna semipreparativa Vydac C₁₈ (10m, , 25cm x 1cm d.i.), utilizzando il gradiente lineare di CH₃CN in H₂O, in presenza di TFA 0.05%, dal 27% al 45% v/v in 40 min con un flusso di 3 ml/min.

Analisi CD delle HMW

Gli spettri CD sono stati eseguiti a temperatura ambiente con uno spettropolarimetro Jasco 810, i dati sono stati elaborati con il software Spectra Manager 1.5. Sono state utilizzate cuvette Hellma per UV in quarzo con cammino ottico da 0.1 cm.

Le subunità Dx2, Dy12 e Bx7 (circa 0.4mg/ml) sono state sciolte in acetato di sodio 0.01 M pH=3.5 in presenza di concentrazioni crescenti di urea (0-8 M), in assenza e in presenza dell'1% di SDS. Le scansioni sono state eseguite da 260 a 190 nm alla velocità di 10 nm/min.

3. Risultati e discussione

I cambiamenti conformazionali delle subunità gluteniniche 1Dx2, 1Bx7 e 1Dy12 sono stati studiati mediante spettroscopia CD in soluzione di acetato sodico 0.01 M pH=3.5, a temperatura ambiente, usando due diverse procedure di denaturazione. È stato registrato un set di spettri in presenza di diverse concentrazioni di urea (0-8 M), e un secondo set a differenti concentrazioni di urea (0-8 M) in presenza dell'1% di SDS.

Le subunità gluteniniche 1Dx2, 1Bx7 e 1Dy12 in soluzione di acetato sodico 0.01 M pH=3.5 mostrano (Figg.1-3) una conformazione prevalentemente disordinata caratterizzata da un massimo negativo al di sotto dei 200 nm presente in tutte e tre le subunità e da una debole spalla nell'intervallo 215-230 nm, presente solamente nelle subunità 1Dx2 e 1Bx7.

La presenza dell'SDS all'1% non induce processi di denaturazione ma promuove la formazione di strutture ordinate che possono essere caratterizzate mediante spettri CD di differenza (Fig.4), ottenuti sottraendo lo spettro in acetato da quello in SDS all'1%.

Lo spettro di differenza ottenuto per la subunità 1Dx2 (Fig.4), che mostra due massimi negativi intorno a 216 e 226 nm, non è tipico di una struttura definita ma può essere attribuito ad una media di varie conformazioni oppure all'assorbimento dei residui di tirosina nella proteina.

Per quanto riguarda la subunità 1Bx7 (Fig.4), lo spettro di differenza, che mostra due massimi negativi a 206 e 226 nm, è compatibile con una conformazione di tipo beta-turn I/III, che come è noto mostra uno spettro CD simile a quello di una α -elica¹⁰.

Infine lo spettro di differenza relativo alla subunità 1Dy12 (Fig.4) è tipico di una conformazione ad α -elica.

L'aggiunta di urea alla soluzione all'1% di SDS in acetato della subunità Dx2 (Fig.5) induce un processo di unfolding attraverso una doppia transizione. Nella prima transizione, l'urea 1 M distrugge la struttura ordinata promossa dall'SDS, e lo spettro rimane stabile a concentrazioni di urea superiori a 4 M. Durante la seconda transizione, che inizia a concentrazioni di urea 4 M e raggiunge il plateau ad urea 6 M, si ottiene una conformazione disordinata. Nella stessa figura è mostrata anche la curva tratteggiata che si ottiene in seguito all'aggiunta di urea alla soluzione della subunità 1Dx2 in acetato senza SDS. Si osserva che la sola urea induce due successive transizioni conformazionali. La prima transizione (urea 1-4 M) induce la stessa conformazione disordinata che si ottiene durante la seconda transizione del processo di unfolding sopra descritto. La seconda transizione (urea 4-8 M) promuove

invece la formazione di una conformazione del tipo poli-L-prolina II.

L'aggiunta di urea alla soluzione in acetato della subunità 1Bx7 induce una conformazione del tipo poli-L-prolina II (Fig.2) secondo un processo multistadio (Fig.6).

La struttura promossa dall'SDS nella subunità 1Bx7 è più stabile di quella indotta nella subunità 1Dx2. Quindi è necessario utilizzare urea 8 M per annullare l'effetto dell'SDS e attraverso due transizioni successive (Fig.6) la proteina assume una conformazione simile a quella adottata in acetato.

L'SDS induce una struttura più stabile nella subunità 1Dy12 rispetto a quelle indotte nelle subunità 1Dx2 e 1Bx7. Infatti l'aggiunta di urea fino a concentrazione 8 M causa una transizione a due stadi (Fig.7) senza eliminare completamente l'effetto dell'SDS. Come per le altre subunità, l'aggiunta di urea alla soluzione in acetato della subunità 1Dy12 promuove la formazione di una conformazione del tipo poli-L-prolina II (Fig.3) secondo un processo a due stadi (Fig.7).

4. Conclusioni

Le subunità HMW studiate, nelle condizioni sperimentali scelte, non esibiscono alcuna resistenza all'SDS che, a sua volta, non si comporta come un agente denaturante ma promuove strutture ordinate a secondo della sequenza delle proteine.

L'aggiunta di urea alla soluzione di SDS-acetato delle subunità 1Dx2, 1Bx7 e 1Dy12 distrugge sempre le strutture ordinate promosse dall'SDS, mentre in soluzione di acetato non induce processi di unfolding ma causa delle transizioni conformazionali che portano alla formazione di strutture del tipo poli-L-prolina II¹¹.

La mancanza di un processo finale di unfolding non ci permette di stabilire una scala di stabilità conformazionale fra le tre subunità HMW studiate.

Tutti i cambiamenti indotti dall'urea avvengono secondo processi a più stadi che in letteratura sono riportati come caratteristici di proteine costituite da più domini.

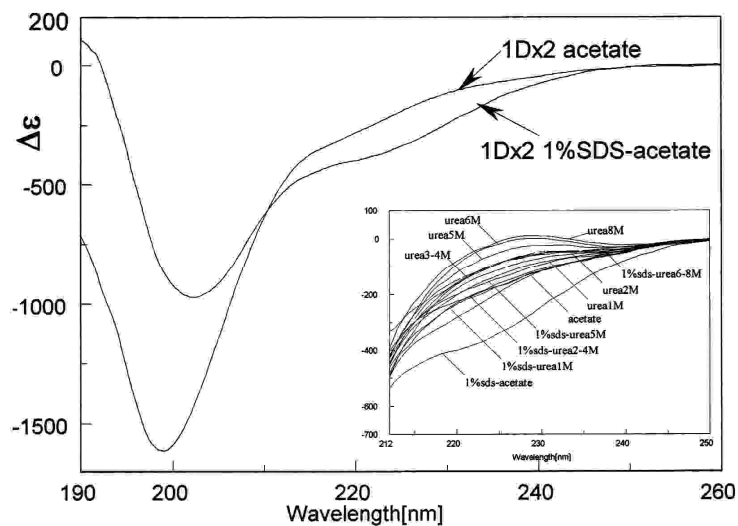


Fig.1 - Spettri CD della subunità HMW1Dx2 a temperatura ambiente: a) in sodio acetato 10mM pH=3.5 e in SDS 1%; b) in presenza di urea (0-8M) e di urea (0-8M) con SDS 1%.

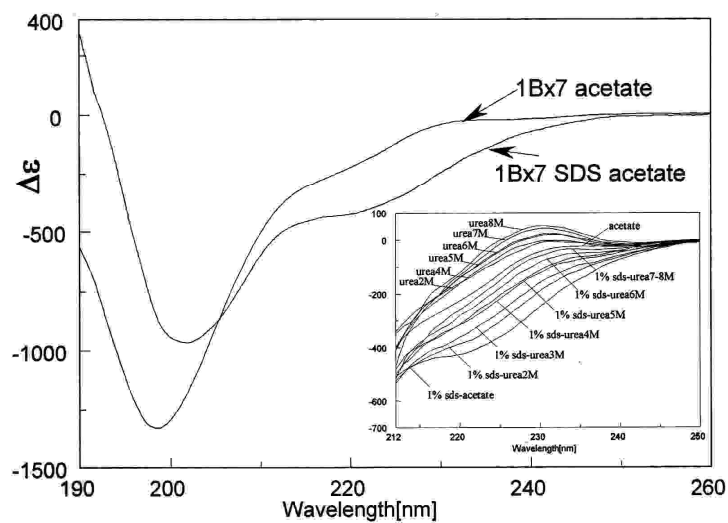


Fig.2 - Spettri CD della subunità HMW 1Bx7 a temperatura ambiente: a) in sodio acetato 10mM pH=3.5 e in SDS 1%; b) in presenza di urea (0-8M) e di urea (0-8M) con SDS 1%.

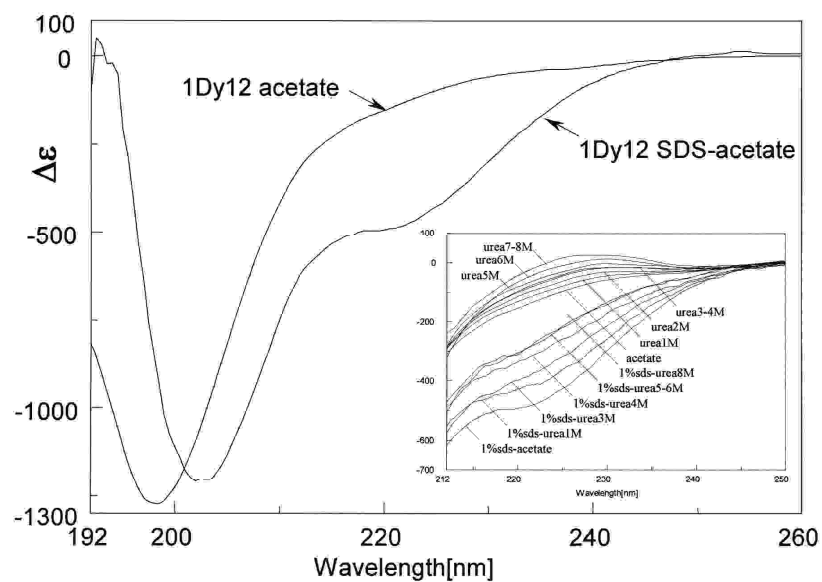


Fig. 3 - Spettri CD della subunità HMW1Dy12 a temperatura ambiente: a) in sodio acetato 10mM pH=3.5 e in SDS 1%; b) in presenza di urea (0-8M) e di urea (0-8M) con SDS 1%.

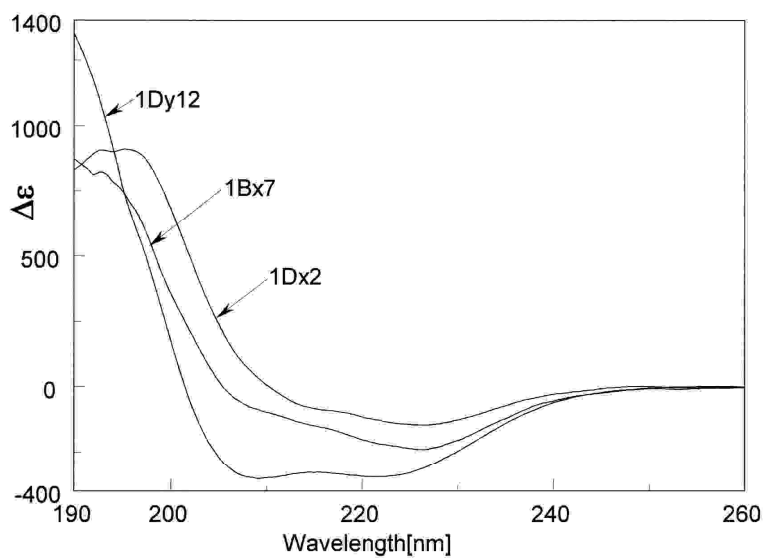


Fig. 4 - Spettri CD di differenza delle subunità 1Dx2, 1Bx7 e 1Dy12, ottenuti sottraendo spettri in acetato di sodio da quelli in acetato con SDS 1%.

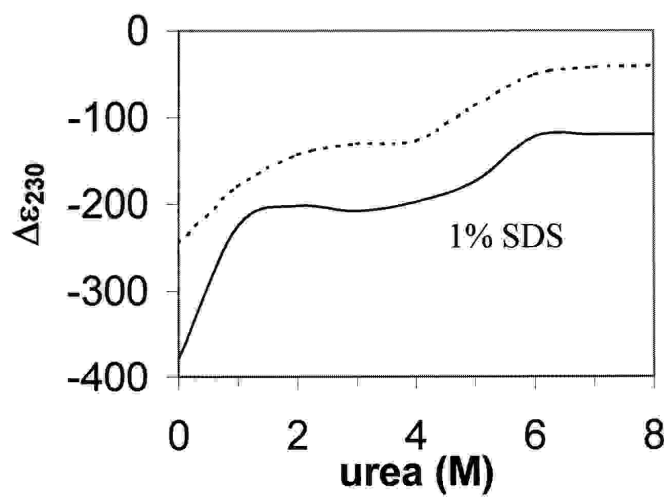


Fig. 5 - Curva di denaturazione della subunità 1Dx2 indotta dall'urea in assenza e in presenza di SDS 1%.

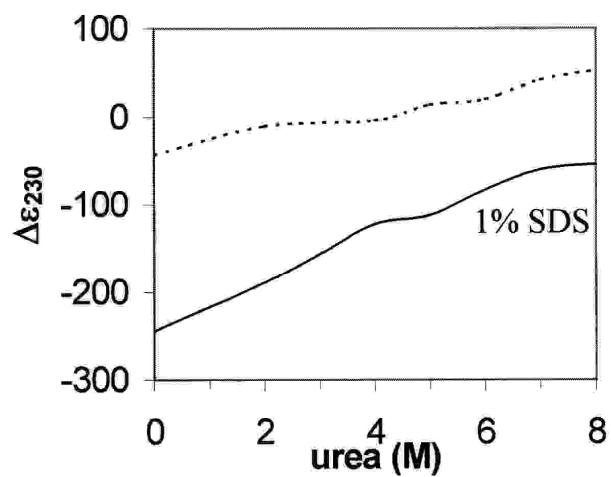


Fig. 6 - Curva di denaturazione della subunità 1Bx7 indotta dall'urea in assenza e in presenza di SDS 1%.

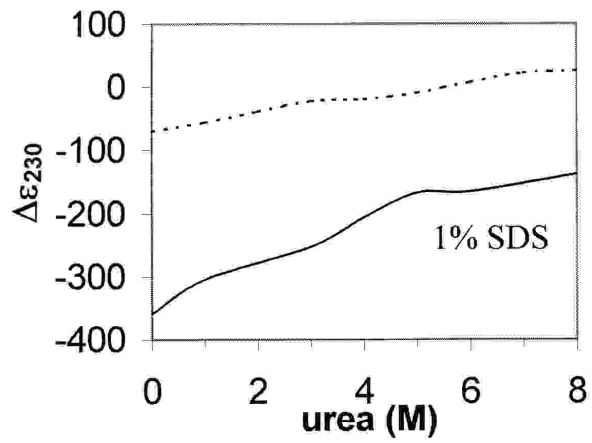


Fig.7 - Curva di denaturazione della subunità 1Dy12 indotta dall'urea in assenza e in presenza di SDS 1 %.

Bibliografia

- Buonocore F., Hickman D. R., Caporale C., Porceddu E., Lafiandra D., Tatham A. S. e Shewry P. R. (1996), *J Cereal Sci*, 23, 55-60.
- Field J. M., Tatham A. S. e Shewry P. R. (1987), *Biochem J*, 247, 215-221.
- Gilbert S. M., Wellner N., Belton P. S., Greenfield J. A., Siligardi G., Shewry P. R. e Tatham A. S. (2000), *Biochim Biophys Acta*, 1479, 135-146.
- Miles M. S., Carr H. J., McMaster T., Belton P. S., Morris V. J., Field, J. M., Shewry P. R. e Tatham A. S. (1991), *Proc Natl Acad Sci*, 88, 68-71.
- Ng P. K.W., Radaelli R., Vaccino P., Acerbi M. e Pogna N. E (1993), *Gluten Proteins*, Association of Cereal Research, Detmold, Germany, p.161.
- Payne P. I. (1987), *Ann Rev Plant Physiol*, 38 141-153.
- Perczel A. e Hollòsi M. (1996), *Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, Plenum Press, New York, pp. 285-380.
- Shewry P. R., Halford N. G. e Tatham A. S. (1992), *J Cereal Sci*, 15, 105-120.
- Tatham A. S., Shewry P. R. e Mifflin B. J. (1984), *FEBS Lett*, 177, 205-208.
- Tatham A. S. e Shewry P. R. (1995), *J Cereal Sci*, 22, 1-16.
- Thomson N. H., Miles M. J., Popineau Y., Harries J., Shewry P. R. e Tatham A. S. (1999), *Biochim Biophys Acta*, 1430, 359-366.