

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Chimiche

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea in Scienze e tecnologie per l'ambiente

**ESPRESSIONE GENICA DELLA SOD1 CITOPLASMATICA IN
TREMATOMUS BERNACCHII COME RISPOSTA FISIOLGICA ALLE
VARIAZIONI DELLA TEMPERATURA AMBIENTALE**

Relatrice: Prof. Paola Irato

Correlatrice: Dott.ssa Elisabetta Piva

Laureanda: Arianna Marini
1225975

Anno accademico 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Antartide	1
1.2 Pesci antartici	4
1.3 Stress ossidativo e ROS	6
1.3.1 <i>Superossido dismutasi (SOD)</i>	7
2. SCOPO DELLA TESI	9
3. MATERIALI E METODI	10
3.1 Organismi utilizzati e trattamento	10
3.1.1 <i>Trematomus bernacchii</i>	11
3.2 Purificazione dell'RNA	12
3.2.1 <i>Estrazione dell'RNA</i>	12
3.2.2 <i>Precipitazione dell'RNA totale con LiCl</i>	13
3.2.3 <i>Analisi della purezza dell'RNA</i>	13
3.2.4 <i>Verifica dell'integrità dell'RNA</i>	14
3.3 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA	15
3.4 Amplificazione del cDNA tramite PCR	16
3.4.1 <i>Controllo dei primer tramite elettroforesi</i>	16
3.5 Analisi tramite Real Time PCR	17
3.5.1 <i>Verifica dell'efficienza di amplificazione dei primer</i>	17
3.5.2 <i>Amplificazione del cDNA tramite qPCR</i>	18
3.6 Elaborazione dei dati e analisi statistica	20
4. RISULTATI	21
5. DISCUSSIONE	22
6. BIBLIOGRAFIA	26
7. SITOGRAFIA	29

1. INTRODUZIONE

1.1 Antartide

L'Antartide è il continente più a sud del globo terrestre, con la sua superficie di circa 14 milioni di km², rappresenta il quarto continente più vasto della Terra. Situato nell'emisfero australe, comprende totalmente il Polo Sud ed è delimitato quasi completamente dal Circolo Polare Antartico (parallelo di latitudine 66° 33' sud).

Le terre emerse sono ricoperte dalla calotta glaciale antartica che, con uno spessore medio di 2000 m, rappresenta il 91% dei ghiacci del nostro pianeta, nonché la più grande riserva di acqua dolce. Inoltre, estendendosi anche sul mare, forma una piattaforma galleggiante ghiacciata; le due parti infatti sono divise dai Monti Transatlantici che permettono di identificare una calotta orientale sorretta dalla massa continentale e una calotta occidentale poggiata in gran parte sulle acque del mare e in parte su piccole placche che formano una sorta di arcipelago (ENEA UTA, 2014).

Il continente antartico è circondato dall'Oceano Antartico, detto anche Oceano Meridionale, comprendente i mari che bagnano questa regione, tra cui troviamo principalmente il Mare di Ross e il Mare di Weddel, i quali sono ampiamente coperti dalle piattaforme di ghiaccio più grandi dell'Antartide (dette rispettivamente "Ross Ice Shelf" e "Filchner-Ronne Ice Shelf"); i mari antartici non hanno una vera e propria delimitazione ma si concludono con l'incontro dell'Oceano Pacifico, Atlantico e Indiano. In particolare, il confine geografico è rappresentato dalla convergenza antartica, una fascia situata tra i 48° e i 61° di latitudine sud, in cui le acque dell'Oceano Meridionale e quelle degli oceani circostanti si incontrano senza però mescolarsi: le acque provenienti da sud, fredde, dense e poco salate, sprofondano sotto l'acqua più temperata e salata degli altri oceani creando così una corrente circumpolare antartica (ACC) con un ruolo primario anche nella regolazione del clima a livello globale (Figura 1). Grazie a quest'incontro tra le acque si genera una regione con caratteristiche maggiormente produttive in termini di nutrienti rispetto al resto del territorio antartico, rappresentando così un ambiente essenziale per l'alimentazione della fauna antartica oltre ad un confine naturale tra due climi ed ecosistemi differenti (Tynan, 1998).

Il clima è il più freddo e secco della Terra, ciò è dovuto alla posizione geografica, infatti durante l'inverno australe l'Antartide vede un semestre completamente buio.

L'assenza prolungata di radiazione solare comporta un notevole abbassamento della temperatura che è compresa tra -20°C e -30°C lungo le coste arrivando anche a -50°C nell'entroterra, trovando la sua minima finora registrata di -88°C nella stazione di Vostok nel centro dell'Antartide orientale. Le temperature rimangono molto basse anche d'estate, aggirandosi mediamente sui 0°C lungo le coste e -20°C all'interno.

A seguito della presenza dell'acqua sotto forma di ghiaccio, si genera un'atmosfera che presenta una bassa umidità e quindi scarse precipitazioni, ma anche delle masse d'aria molto fredda e densa da cui si originano forti venti catabatici, ovvero venti che soffiano lungo pendii topografici ghiacciati. Essi sono molto forti e turbolenti, con raffiche che possono raggiungere anche i 200km/h (Parish e Bromwich, 1987).

A causa delle sue caratteristiche estreme, l'Antartide è inabitabile stabilmente per l'uomo e in generale è vivibile per poche specie terrestri, mentre le sue acque rappresentano un'area ricca di nutrienti utili a creare un variegato ecosistema marino. Grazie all'azione dell'ACC, infatti, nell'Oceano Meridionale e in particolare nelle acque costiere troviamo specie marine endemiche poiché, al di sotto della Convergenza Antartica, l'ambiente è stabile con una temperatura media di -1.9°C e una salinità di circa $34,60\text{‰}$ (Seabrooke *et al.*, 1971). Le basse temperature aumentano la solubilità dei gas portando ad un'elevata concentrazione di O_2 e CO_2 , facilitando così l'utilizzo di questi gas da parte degli animali marini per la respirazione e delle alghe per la fotosintesi. Ne deriva una grande abbondanza di microrganismi marini che sono alla base della catena trofica.

Per questo motivo nel 1959 è stato stipulato il Trattato Antartico al cui interno troviamo la *Convenzione per la protezione delle risorse marine viventi in Antartide*, la cui finalità è quella di preservare la vita marina e l'integrità ambientale antartica. Tale Trattato afferma la libertà di ricerca scientifica nel continente antartico, notificando l'invio di spedizione o la costituzione di basi destinate alla ricerca. A tal proposito, la stazione italiana Mario Zucchelli è degna di nota. Situata lungo la costa del Mare di Ross (divenuto area marina protetta dal 2017), questa stazione è operativa dal 1988 ed accoglie i partecipanti delle spedizioni italiane, offre supporto logistico ai ricercatori che operano in campi remoti, e dispone di un acquario, laboratori utili ad effettuare vari tipi di analisi ed alcuni osservatori. L'atmosfera antartica ha, infatti, delle caratteristiche particolarmente adatte per le ricerche sugli effetti dei cambiamenti climatici sul continente e sulle connessioni con il resto del pianeta (ENEA UTA, 2014).

Il riscaldamento globale sta avendo un grande impatto soprattutto nella Penisola Antartica, quella parte di terra che attraversa il Circolo Polare Antartico, in cui si sta presentando un notevole scioglimento dei ghiacciai. Inoltre, si sta verificando una modifica dell'ecosistema marino, poiché gli organismi cercano di migrare verso le piattaforme continentali alla ricerca di temperature più fredde (Aronson *et al.*, 2009). Da non sottovalutare è anche l'impovertimento dell'ozono in atmosfera che, quindi, cessa di agire come schermo per le radiazioni UV; questa zona infatti ne è particolarmente soggetta per la presenza del Vortice Polare formato da nubi molto fredde che favoriscono la distruzione dell'ozono. Fortunatamente però, alcuni studi mostrano un trend positivo sull'andamento dell'ozono antartico negli ultimi anni (Kuttippurath e Nair, 2017).

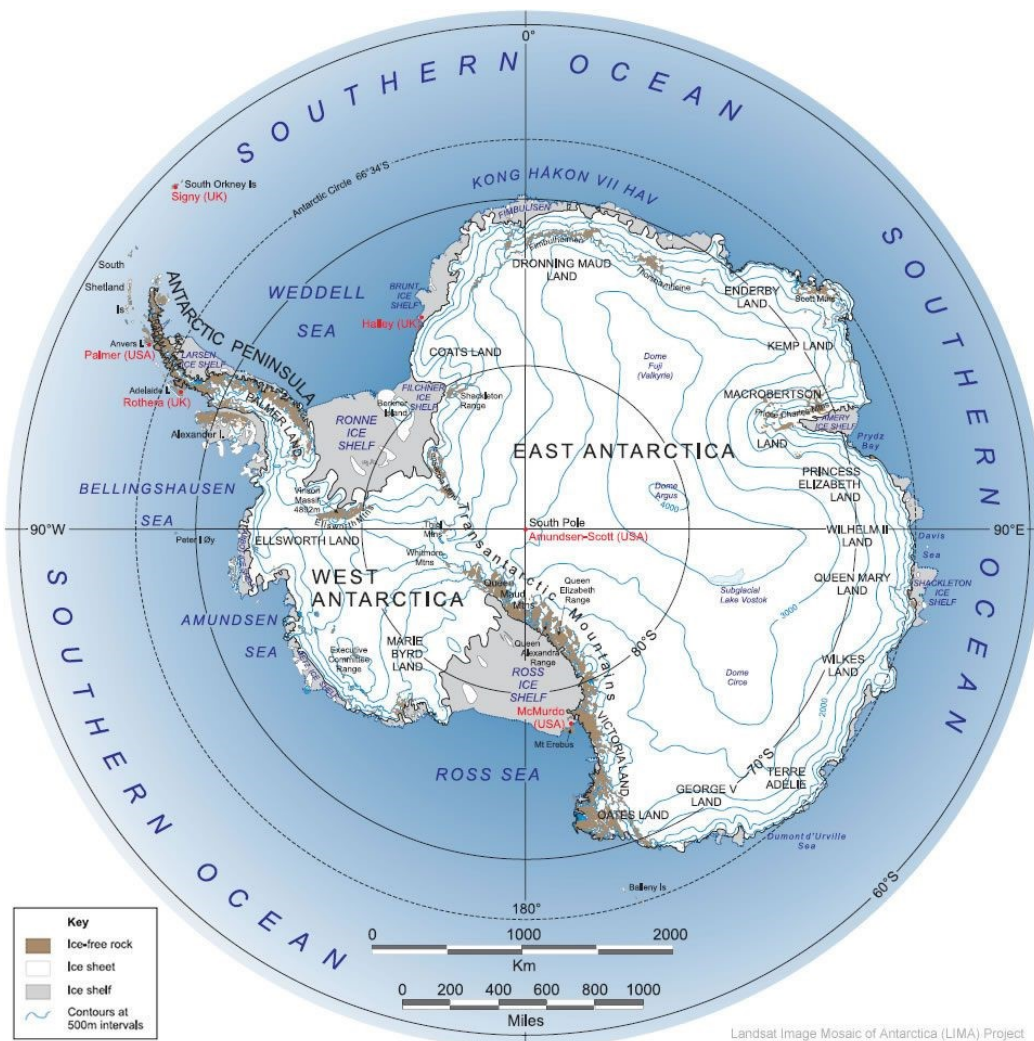


Figura 1: Mappa dell'Antartide (LIMA project)

1.2 Pesci antartici

I primi teleostei ebbero origine circa 200 milioni di anni fa, ma la fauna ittica moderna dell'Antartide ha una composizione diversa da quella che la precedette nel tempo geologico. Nonostante l'Oceano Antartico comprenda il 10% delle acque mondiali, la sua fauna ittica è composta da solo 274 specie, esse sono però quasi totalmente endemiche, tassonomicamente uniformi e rappresentano un'importante fonte di studio e ricerca scientifica. Poche infatti sono le specie di pesci antartici che, viste le condizioni ambientali estreme, hanno sviluppato degli adattamenti peculiari per poter sopravvivere. I pesci cartilaginei sono molto rari e solitamente limitati alle zone subantartiche, mentre tra i pesci di maggiore importanza troviamo il sottordine dei Nototenioidi, un gruppo di pesci ossei stenoalini specializzato per la vita nell'Oceano Meridionale, l'aumento anche solo di pochi gradi centigradi sarebbe per loro letale. Fattore chiave della loro evoluzione fu la formazione della corrente circumpolare antartica che, creando una barriera naturale, bloccò le migrazioni dalla zona antartica a quella sub-antartica e viceversa, stabilizzandoli così in nicchie ecologiche (Di Prisco, 1998).

I Nototenioidi sono dei teleostei principalmente bentonici, altamente dominanti nel Mare di Ross e comprendenti 8 famiglie; delle 274 specie ittiche totali che troviamo nell'Oceano Meridionale, 120 sono Nototenioidi e nello specifico 95 si trovano nella regione antartica.

Nel corso di milioni di anni, i pesci appartenenti a questo sottordine hanno sviluppato dei particolari adattamenti fisiologici e biochimici che li rendono organismi unici. Tra i più importanti adattamenti troviamo:

- Produzione di composti anticongelanti che agiscono da antigelo mantenendo allo stato liquido i fluidi corporei abbassandone il punto di congelamento, portandolo a -2.2°C ; le molecole responsabili sono in particolare glicoproteine o AFP (Anti Freeze Protein), sintetizzate nel pancreas esocrino e liberate nell'intestino.
- Capacità di galleggiamento passivo: come conseguenza all'assenza della vescica natatoria alcuni Nototenioidi hanno sviluppato delle ossa parzialmente cartilaginee e l'accumulo di grassi, questi infatti hanno peso specifico minore rispetto a quello dell'acqua circostante consentendo loro di condurre una vita pelagica (Devries e Eastman, 1978).

- Riduzione dell'emoglobina per contrastare l'aumento della viscosità del sangue dovuta alla bassa temperatura, quest'ultima però aumenta la solubilità dei gas garantendo quindi un'alta concentrazione di ossigeno nelle acque trovandosi anche in soluzione nel sangue. Questo adattamento è particolarmente evidente nella famiglia dei Cannictidi (detti icefish), in cui si verifica la completa assenza di emoglobina; questa mancanza è compensata da altri adattamenti quali l'aumento del volume ematico, aumento del diametro dei vasi sanguigni e di conseguenza diminuzione della resistenza periferica, elevata densità di capillari sanguigni e capacità di effettuare scambio di gas a livello cutaneo (Kock, 2005).

1.3 Stress ossidativo e ROS

Lo squilibrio tra la quantità di ossidanti e di antiossidanti all'interno di un organismo può portare ad un fenomeno che prende il nome di stress ossidativo, uno stato che porta danni a proteine, DNA e lipidi, accelerando il processo d'invecchiamento e aumentando il rischio di patologie di vario genere (Frisard e Ravussin, 2006).

Con il termine "ossidanti" sono intese le sostanze che tendono ad acquisire elettroni da altre che contemporaneamente ne perdono, ossidandosi, in una reazione di ossidoriduzione. L'elemento di maggiore importanza in questo tema è sicuramente l'ossigeno che rappresenta l'ossidante per eccellenza, esso in alcuni momenti dà luogo anche a specie reattive (ROS) utili alle funzionalità vitali dell'organismo, ad esempio all'attivazione del sistema immunitario. Gli antiossidanti entrano in gioco nella rimozione di queste sostanze per far sì che la loro concentrazione non superi la capacità fisiologica dell'organismo di sopportarle.

La formazione delle ROS è imputata ad agenti fisici, chimici e biologici come particolari inquinanti e radiazioni UV, oltre ad essere formate da processi propri della cellula. Tra i vari siti cellulari che danno origine alle specie reattive dell'ossigeno, la loro formazione è dovuta in maggior percentuale alla respirazione cellulare, che avviene a livello mitocondriale. Infatti, in seguito al trasferimento di elettroni attraverso i complessi proteici che formano la catena di trasporto degli elettroni, l'ossigeno agisce da accettore finale. A volte, però, può essere soggetto a riduzione parziale poiché, occasionalmente, qualche elettrone può sfuggire dalla catena di trasporto e reagire con l'ossigeno portando alla formazione di intermedi reattivi.

Le ROS possono essere radicaliche o non radicaliche; principalmente tra le prime troviamo il radicale superossido ($O_2^{\cdot-}$) e il radicale ossidrilico (OH^{\cdot}) mentre tra le non radicaliche troviamo il perossido di idrogeno (H_2O_2), meglio conosciuto come acqua ossigenata, e l'ossigeno singoletto (1O_2).

L'anione superossido non presenta una grande tossicità ma tramite determinate reazioni (Figura 2), può dar luogo alla formazione del radicale ossidrilico che, diversamente da $O_2^{\cdot-}$, è molto reattivo e quindi nocivo. L'ossigeno singoletto e il perossido di idrogeno invece sono ossidanti più moderati, ma se presenti in elevate quantità possono anch'essi rappresentare un pericolo per la cellula (Leuzzi *et al*, 2013).



Figura 2: Principali reazioni del radicale superossido

Come risposta alla formazione di queste specie dannose, l'organismo sintetizza delle molecole antiossidanti chiamate "scavenger" che agiscono contro le ROS tramite reazioni di ossidoriduzione, inattivandole o rimuovendole. Tra le più importanti ricordiamo la superossido dismutasi (SOD), la glutazione perossidasi (GPX), la catalasi (CAT) che hanno attività enzimatica, mentre altre come la vitamina A, vitamina C, vitamina E, il glutatione e le metallotioneine sono molecole non enzimatiche.

1.3.1 Superossido dismutasi (SOD)

Le superossido dismutasi sono una famiglia di enzimi antiossidanti il cui ruolo è quello di catalizzare la dismutazione dello ione superossido, formatosi in gran parte dalla respirazione cellulare, trasformandolo in molecole meno pericolose.

La dismutazione è un particolare tipo di reazione su due molecole uguali, quindi in questo caso su due molecole di $\text{O}_2^{\cdot-}$, in cui avvengono contemporaneamente una reazione di ossidazione e una reazione di riduzione. La SOD infatti strappa l'elettrone in più dal primo radicale superossido e lo trasferisce al secondo, in questo modo il primo verrà ossidato a ossigeno molecolare O_2 e il secondo ridotto a H_2O_2 (Figura 3).

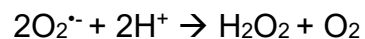


Figura 3: Reazione catalizzata dalla SOD

Anche l'acqua ossigenata, però, è una specie reattiva e per questo motivo la cellula andrà poi a distruggerla con l'utilizzo degli enzimi catalasi e glutazione perossidasi.

Le SOD possono essere di tre tipi, ognuna con una propria particolare struttura ma tutte accumulate dall'utilizzo di metalli pesanti per la catalisi:

- SOD1: contiene rame e zinco (Cu,Zn-SOD), si trova nel citoplasma degli eucarioti, nei cloroplasti di alcune piante e nello spazio periplasmatico di alcuni batteri.

- SOD2: contiene ferro o manganese (Fe-SOD o Mn-SOD), la prima si trova nei procarioti e nei cloroplasti, la seconda nei procarioti e nella matrice mitocondriale degli eucarioti.
- SOD3: contiene rame e zinco, quest'enzima è diretto agli spazi extracellulari (EC SOD) (Zelko *et al*, 2002).

La mancanza della corretta espressione delle SOD è stata recentemente studiata e i risultati hanno evidenziato diversi tipi di patologie, in base alla SOD mancante o espressa in quantità minore rispetto al dovuto; in particolare, alcune mutazioni genetiche del gene SOD1, codificante per l'enzima Cu,Zn-SOD, sono responsabili, a livello umano, della malattia neurodegenerativa Sclerosi laterale amiotrofica.

2. SCOPO DELLA TESI

Questa ricerca è stata avviata con lo scopo di studiare i livelli d'espressione del gene codificante l'enzima antiossidante Superossido dismutasi 1 citoplasmatica (Cu,Zn-SOD) in alcuni individui di *Trematomus bernacchii*, un pesce teleosteo antartico abbondantemente diffuso nelle zone costiere antartiche, sottoposto sperimentalmente all'aumento di temperatura, precisamente +1°C e + 3°C. Nel dettaglio è stata verificata l'espressione genica in due tessuti: il fegato e il muscolo.

Da qualche anno è divenuto sempre più importante lo studio degli effetti dei cambiamenti globali sugli ecosistemi e la loro comunità biotica, con particolare riguardo agli effetti dei cambiamenti climatici.

Di grande interesse è questo studio effettuato nei pesci antartici, poiché l'ambiente in cui vivono è notevolmente soggetto al riscaldamento globale che in futuro potrà influenzare il loro habitat e di conseguenza le loro condizioni fisiologiche. Nel corso del prossimo secolo, infatti, si prevede che gli effetti del cambiamento climatico sul continente e nell'oceano si aggraveranno (Lombardi *et al.*, 2021). Questi organismi marini sono abituati ad un clima estremo con temperature molto basse, di circa -1.9°C, e un'alta concentrazione di ossigeno nell'acqua e nei fluidi corporei. Per questo motivo è alta la probabilità di formazione di ROS, specie reattive dell'ossigeno, nonché il pericolo di stress ossidativo.

L'aumento della temperatura comporta una diminuzione della solubilità dei gas e quindi una minore disponibilità di ossigeno; è utile, perciò, studiare le risposte fisiologiche tessuto-specifiche degli organismi a queste alterazioni.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Organismi utilizzati e trattamento

Gli organismi utilizzati per questa ricerca sono degli esemplari di pesci antartici della specie *Trematomus bernacchii*, appartenenti all'ordine dei Perciformi, alla famiglia dei Nototenioidi e al genere *Trematomus*.

Gli individui sono stati campionati nella zona di Baia Terra Nova, nel Mare di Ross dov'è situata la stazione italiana "Mario Zucchelli", durante la XVII spedizione italiana in Antartide. Dopo essere stati pescati, sono stati introdotti in alcune vasche (Figura 4) contenenti acqua alla temperatura di -2° per circa 4 giorni, riproducendo in questo modo il loro ambiente naturale consentendo loro di acclimatarsi, permettendogli di rilassarsi dopo essere stati esposti allo stress dovuto alla pesca; dopodiché si è proceduto con l'esperimento. Per poterli sottoporre ad uno studio sugli effetti dell'aumento della temperatura dell'ambiente esterno, il trattamento deve avvenire in modo graduale. L'aumento della temperatura dell'acqua nell'acquario avveniva con intervalli di 2 ore, dove per ogni intervallo le condizioni termiche venivano innalzate di 0.1°C . Quando si raggiungeva l'incremento di 1°C , quindi ad esempio dopo aver effettuato il passaggio da -2°C a -1°C , i pesci venivano lasciati a quella temperatura ambientale altri 4 giorni per potersi nuovamente acclimatare, procedendo poi ancora con l'aumento di 0.1°C , e così via. Dopo 16 giorni i pesci, dunque, si sono acclimatati alla temperatura ambientale di $+1^{\circ}\text{C}$ e sono stati prelevati dalle vasche, mentre con un altro gruppo di individui l'esperimento è continuato fino alla temperatura di $+3^{\circ}\text{C}$.

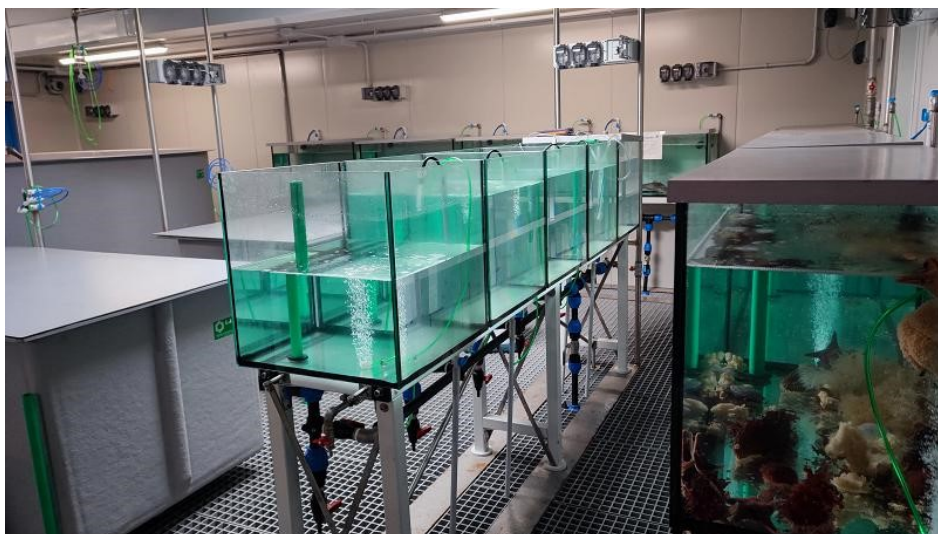


Figura 4: Il laboratorio acquario della stazione Mario Zucchelli (Bettini, A.)

3.1.1 *Trematomus bernacchii*



Figura 5: Esempio di *Trematomus bernacchii* (Antarctic Expedition: B-207-M)

T. bernacchii (Figura 5), conosciuto anche con il nome di “merluzzo rosso smeraldo”, è una delle specie antartiche più comuni presenti nel Mare di Ross. Si presenta con un colore di fondo marrone chiaro e 4 bande scure sulla parte dorsale del corpo.

Molti studi indicano che *Trematomus bernacchii* è un organismo bentonico ma, come molti Nototenioidi, ha un atteggiamento opportunistico: laddove ci siano prede disponibili più in superficie, manifesta allo stesso modo un comportamento predatorio. Nonostante la sua vita sia condotta fino ai 700 m di profondità, proprio a causa di questo carattere opportunistico è possibile trovare questa specie anche in superficie, e perciò solitamente rimane tra 0 m e 200 m di profondità (Gon e Heemstra, 1990).

Si ciba generalmente di invertebrati e di piccoli pesci, ma la sua dieta è molto variegata. Le femmine di *Trematomus bernacchii* possono essere lunghe fino a 35 cm e vivere fino a 21 anni, mentre i maschi arrivano ad una lunghezza di 28 cm con 16 anni di vita. Essendo stenotermi e adattati al freddo, al raggiungimento di una temperatura dell'acqua di +6°C questi pesci non sono più in grado di sopravvivere a causa del calore eccessivo (Brueggeman, 2022).

3.2 Purificazione dell'RNA

Per lo studio sono stati utilizzati campioni di fegato e muscolo, in particolare sono state utilizzate delle porzioni di tessuto conservate a -80° di 4 individui rimasti nelle vasche sperimentali fino a $+1^{\circ}\text{C}$ e 4 individui prelevati dopo aver raggiunto i $+3^{\circ}\text{C}$ (in entrambi i casi in seguito al processo di acclimatazione).

3.2.1 Estrazione dell'RNA

Prima di arrivare alla purificazione dell'RNA, il protocollo prevede essenzialmente 5 passaggi per poter estrarre l'RNA dai tessuti:

- *Omogeneizzazione*: dopo aver prelevato le porzioni (circa 100mg) di tessuto conservate in congelatore e averle trasferite in un'eppendorf, è stato aggiunto 1mL di TRIzol, una soluzione di fenolo e isotiocianato di guanidinio che contemporaneamente solubilizza il materiale biologico e denatura le proteine. Tramite l'utilizzo di un pestello e una lametta, manualmente si è proceduto allo sminuzzamento delle 8 porzioni di tessuto.
- *Separazione delle fasi*: l'aggiunta di 0,2 mL di cloroformio 99%, dopo aver centrifugato a 4°C , permette la divisione del composto in 3 fasi. La prima fase (detta "supernatante") contenente RNA, la seconda contenente proteine denaturate e DNA, e l'ultima contenente altri componenti cellulari (Figura 6).
- *Precipitazione dell'RNA*: viene estratto il supernatante da ogni eppendorf, facendo attenzione a non toccare la fase sottostante, e trasferito in una nuova eppendorf.

A questo punto si è proceduto con l'aggiunta di 0,5 mL di isopropanolo 99% e dopo una centrifugazione l'RNA totale è precipitato formando un pellet.

- *Lavaggio dell'RNA*: il nuovo supernatante è stato estratto e gettato, dopodiché aggiungendo 1 mL di EtOH al 75% al pellet e centrifugando, si è effettuato il lavaggio del precipitato per due volte.
- *Risospensione dell'RNA*: in seguito al lavaggio e alla rimozione dell'etanolo, il pellet viene fatto asciugare sotto cappa per poi essere risospeso in acqua RNAsi free e lasciato incubare per 2h.

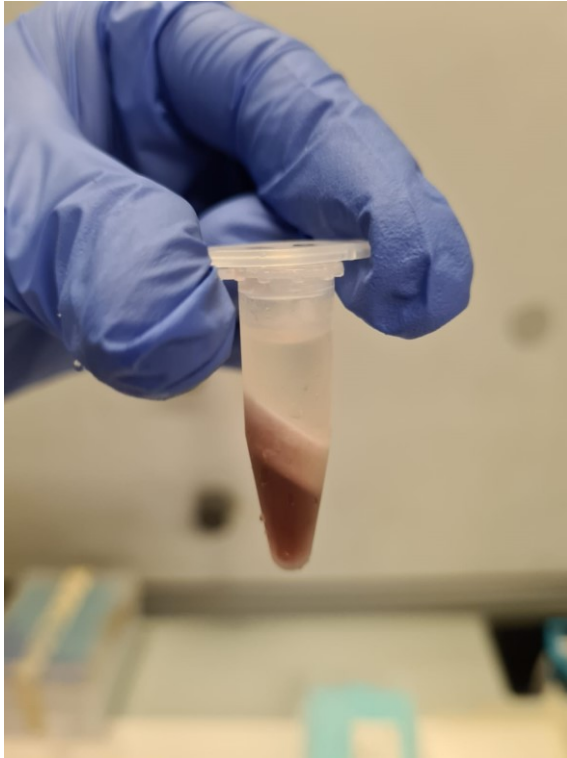


Figura 6: Divisione in 3 fasi di un campione di Fegato; la fase superiore acquosa contiene RNA, la seconda fase contiene DNA e proteine, la fase sottostante organica contiene PRImeZOL e altre componenti cellulari.

3.2.2 Precipitazione dell'RNA totale con LiCl

Dopo l'incubazione di 2h in acqua RNAsi free, il campione viene scaldato a 40°C e centrifugato, portando così alla formazione di un nuovo supernatante.

Quest'ultimo viene trasferito in un'altra eppendorf e, come fase finale della purificazione dell'RNA, fatto precipitare tramite l'aggiunta di LiCl 8M e lasciato incubare overnight a 4°C. La precipitazione tramite LiCl infatti offre grandi vantaggi rispetto ad altri metodi di precipitazione dell'RNA poiché questo reagente è meno efficiente nei confronti di DNA, proteine e carboidrati (Barlow *et al.*, 1963).

Il giorno seguente il campione viene lavato due volte con EtOH, lasciato risospendere ancora in H₂O RNAsi free, incubato per 2h e infine riscaldato.

3.2.3 Analisi della purezza dell'RNA

La qualità dell'RNA viene misurata tramite il Nanodrop, uno spettrofotometro che permette di effettuare un'analisi spettroscopica UV-Vis utilizzando 1µL di soluzione. Tra le sue varie funzioni, è in grado di misurare la purezza dell'RNA estratto (assorbanza 280 nm determina la presenza di proteine e 230 nm determina la

presenza di carboidrati o sostanze chimiche rimaste nel campione nella fase di isolamento) e la concentrazione del campione (assorbanza 260 nm), elementi di nostro interesse per la verifica della purezza dell'RNA.

In particolare, gli indici della purezza del campione sono i rapporti di assorbanza:

- A_{260}/A_{280} che dev'essere compreso tra 1.8 e 2.2 perché l'RNA sia puro; se il rapporto è minore di 1.8 ci può essere una contaminazione da proteine o fenolo, se il rapporto è maggiore di 2.2 ci può essere una contaminazione da DNA o fenolo.
- A_{260}/A_{230} che dev'essere di circa 2.0, infatti se il rapporto è minore può indicare contaminazione da carboidrati, fenolo, peptidi o altri composti aromatici.

Nel caso in cui alcuni campioni siano risultati troppo concentrati, sono stati in seguito diluiti con un'opportuna quantità di H₂O RNAsi free.

3.2.4 Verifica dell'integrità dell'RNA

Quest'ultimo passaggio di verifica dell'integrità dell'RNA è stato effettuato tramite elettroforesi in gel di agarosio all'1%. Si tratta di un metodo utile per l'analisi e la separazione degli acidi nucleici che, essendo carichi negativamente, quando vengono posti in un campo elettrico migrano verso l'anodo, carico positivamente.

Si formano delle bande poiché i frammenti di RNA migrano più o meno velocemente in base alla loro grandezza; viene inoltre inserito un colorante nei campioni cosicché le bande formate dall'acido nucleico siano visibili ad una luce UV.

In questo caso, per verificare l'effettiva integrità dell'RNA, si dovevano presentare due bande rappresentanti l'RNA ribosomiale 28S e 18S (Figura 7).

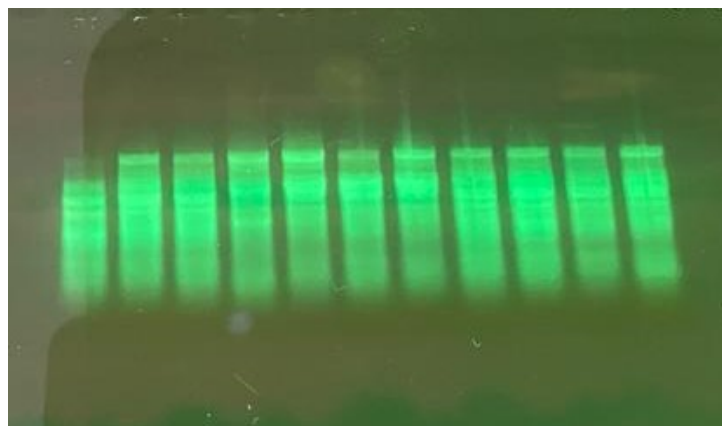


Figura 7: Visualizzazione delle bande di rRNA 28S e 18S

3.3 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA

La retrotrascrizione dell'acido ribonucleico in cDNA (o DNA complementare) avviene tramite l'utilizzo del kit "cDNA Synthesis kit" prodotto da biotechrabbit. Viene preparata una mix contenente:

- 2µl di dNTP Mix
- 0,5µl di RNase Inhibitor
- 0,5µl di Oligo(dT)
- 4µl di 5x Reverse Transcriptase Buffer
- 1µl di RNA Template
- 1µl di RevertUP™
- 11µl di PCR Grade Water

La mix deve avere un volume totale di 20µl per la retrotrascrizione di un singolo campione, perciò tutte le quantità sono state proporzionate al numero di RNA da retrotrascrivere.

L'Oligo(dT) contiene il primer d'innescio per l'enzima trascrittasi inversa che sintetizza il cDNA, questo oligonucleotide si ibrida alla coda di poli(A) all'estremità 3' dell'RNA messaggero, che rappresenta il 2.5% dell'RNA totale.

La sintesi del cDNA è stata effettuata in termociclatore (uno strumento in grado di programmare temporalmente, in modo automatico, la temperatura) con il seguente programma:

- 50°C per 1 ora
- 99°C per 5 minuti

3.4 Amplificazione del cDNA tramite PCR

La PCR (reazione a catena della polimerasi) permette l'amplificazione di una porzione di DNA, in una reazione catalizzata dall'enzima DNA polimerasi termostabile. Nel 1988, infatti, fu isolata una DNA polimerasi termostabile prodotta dal batterio termoresistente *Thermus aquaticus* (Taq DNA Polimerasi). L'uso di quest'enzima ha consentito di effettuare la fase di estensione a 72°C, aumentando la resa e la specificità dei prodotti di reazione e, soprattutto, ha reso possibile l'automazione del processo (Mengoni e Scialpi, 2008).

I primer d'innescio che permettono alla polimerasi di iniziare la reazione sono stati ricavati da ricerche precedenti di altri studenti dell'Università di Padova.

Ad ogni cDNA (1µl) da amplificare è stata aggiunta la seguente miscela di reazione, ottenuta dal kit "2X YourTaq™ PCR Master Mix" prodotto da biotechrabbit:

- 25µl di 2X YourTaq™ PCR Master Mix
- 1µl di Primer forward
- 1µl di Primer reverse
- 22µl di Nuclease free water

Dopo aver delicatamente agitato e poi centrifugato, si passa all'incubazione nel termociclatore con il seguente programma:

- 95°C per 2 minuti
 - 95°C per 30 secondi (denaturazione)
 - 63°C per 30 secondi (annealing)
 - 72°C per 30 secondi (extension)
 - 72°C per 5 minuti
- } 35 cicli

3.4.1 Controllo dei primer tramite elettroforesi

Per verificare il corretto appaiamento dei primer avvenuto durante la PCR, è stato effettuata l'elettroforesi su gel di Agarosio al 2%.

3.5 Analisi tramite Real Time PCR

La Real Time PCR (o qPCR) è un metodo quantitativo di PCR basato sulla relazione tra la velocità con cui il prodotto di PCR viene generato e la concentrazione originaria delle specie di mRNA di interesse; questa tecnologia quindi unisce amplificazione e quantificazione in un'unica reazione. La quantificazione del cDNA amplificato è evidenziata dall'aggiunta di coloranti chimici che emettono forte fluorescenza (es. SYBR Green) solo quando si legano al DNA a doppio filamento. Questo avviene durante la fase di accumulo dei prodotti della PCR e ad ogni ciclo di amplificazione, in questo modo è possibile monitorare l'amplificazione nel corso della fase esponenziale, permettendo di avere risultati molto più accurati rispetto a quelli della PCR tradizionale.

È stato utilizzato il kit "2x qPCR SyGreen Mix Separate ROX", prodotto da Pcrbiosystem, per la formazione della mix, avente le seguenti quantità e componenti:

- 1ml di *2x qPCRBIO SyGreen Mix No-ROX*
- 2µl di *50µM ROX Additive*

A 1µl di cDNA di ogni campione sono stati aggiunti:

- 5µl di 2x qPCR SyGreen
- 1µl di primer reverse
- 1µl di primer forward
- 2µl di RNase free water

Si ha quindi un totale di 10µl per ogni pozzetto della piastra.

Le stesse quantità e componenti sono stati utilizzati sia per la verifica dell'efficienza di amplificazione dei primer, sia per l'amplificazione del cDNA.

3.5.1 Verifica dell'efficienza di amplificazione dei primer

Si è verificata l'efficienza di amplificazione sia dei geni target, sia dei geni housekeeping; quest'ultimi sono comunemente descritti come geni di riferimento poiché sempre espressi e non risentono dei trattamenti sperimentali; per questo sono utilizzati per normalizzare i livelli d'espressione dei geni target dei campioni (Vandesompele *et al.*, 2009), e in particolare sono stati utilizzati i geni GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) e Beta-actina.

Per poter procedere abbiamo costruito la curva standard tramite diluizioni seriali di cDNA, con un triplicato tecnico per ogni diluizione e aggiungendo ad ognuno la miscela di reazione precedentemente descritta. Questa curva viene creata graficando il logaritmo della concentrazione di cDNA in funzione dei Ct (ciclo-soglia) ottenuti con una coppia di primer; il ciclo-soglia è inteso come il numero del ciclo in cui viene raggiunto un determinato valore minimo di quantità di prodotto. Interpolando i punti si ottiene una retta, la cui pendenza è direttamente correlata all'efficienza dei primer. Una buona efficienza indica una buona quantificazione del trascritto.

3.5.2 Amplificazione del cDNA tramite qPCR

Dalla verifica dell'efficienza di amplificazione dei primer sono state scelte le coppie di primer maggiormente efficienti. Anche in questo caso abbiamo sottoposto ad amplificazione i geni target e i due geni housekeeping e, per ognuno di essi, abbiamo effettuato un triplicato tecnico aggiungendo la mix di reazione descritta al punto 3.5.

La miscela è stata incubata nel termociclatore con il seguente programma:

- 95°C per 2 minuti
 - 95°C per 20 secondi
 - 60°C per 1 minuto
 - 95°C per 15 secondi
 - 60°C per 1 minuto
 - 95°C per 15 secondi
 - 60°C per 15 secondi
- } 38 cicli

Al termine della reazione di PCR, il software fornito con lo strumento costruisce delle curve di analisi del segnale, tra le quali troviamo la curva di amplificazione e la curva di dissociazione. La curva di amplificazione (Figura 8) descrive l'aumento di fluorescenza in funzione del numero di cicli di PCR e viene scelto arbitrariamente un livello soglia (rappresentato dalla linea di soglia) che taglia la fase esponenziale. Il numero del ciclo in cui la fase esponenziale della curva di amplificazione del campione è tagliata dalla linea di soglia è il ciclo-soglia (Ct), ne consegue che più basso è il Ct minori saranno i cicli necessari per raggiungere un determinato valore minimo di ammontare di prodotto.

La curva di dissociazione, invece, descrive la variazione della fluorescenza in funzione della temperatura ed è utile per il controllo della specificità dei primer (Figura 9).

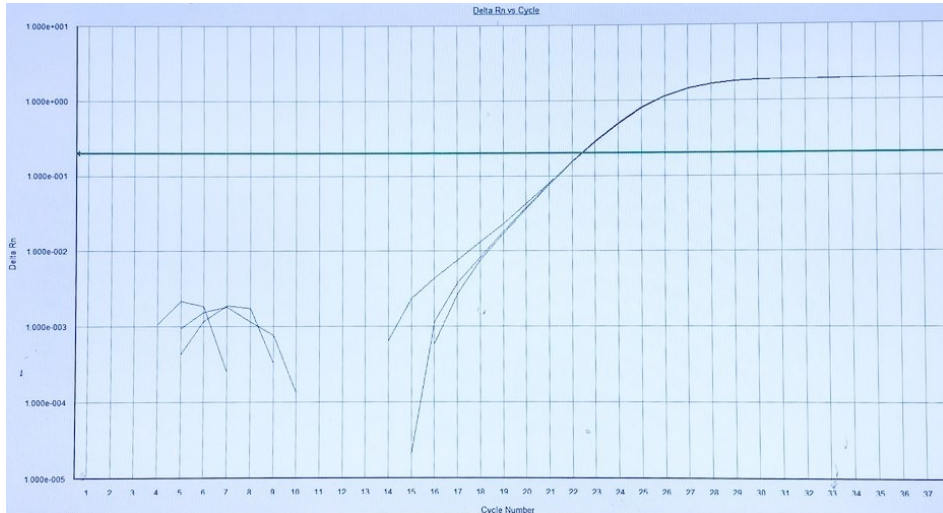


Figura 8: Curva di amplificazione del gene target SOD1; la fase esponenziale è tagliata dalla linea-soglia (linea verde) in cui è identificabile il punto Ct (punto d'intersezione).

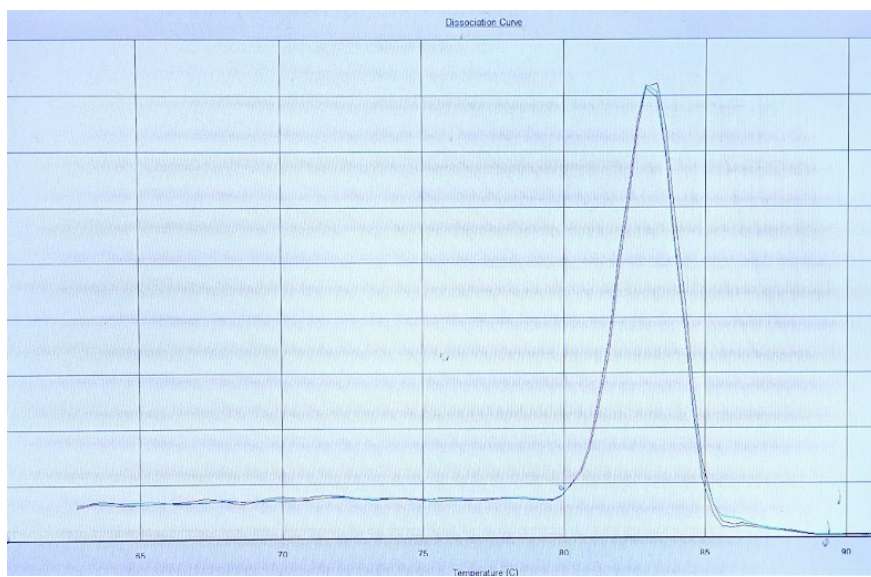


Figura 9: Curva di dissociazione in forma derivata dell'amplificazione del gene SOD1

3.6 Elaborazione dei dati e analisi statistica

I valori ottenuti dalla Real Time PCR sono stati elaborati secondo il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, che consente di quantificare i livelli di espressione genica relativa tra diversi campioni, utilizzando per il calcolo direttamente i cicli-soglia generati dalla qPCR. Questo modello assume l'ipotesi che sia i geni target che quelli di riferimento siano amplificati con un'efficienza che si avvicina al 100% (Jensen, 2012), questo presupposto è stato precedentemente verificato tramite la curva standard.

Per verificare che i risultati ottenuti fossero statisticamente significativi, è stata effettuata l'analisi della varianza a una via (ANOVA), seguita dal test di Student-Newman-Keuls.

4. RISULTATI

I dati risultanti dalle analisi dell'espressione genica della SOD1 in fegato e muscolo, evidenziano una diminuzione statisticamente significativa dell'espressione genica passando da +1°C a +3°C in entrambi i tessuti. In particolare, nel fegato la diminuzione è di circa il 60% con una $p < 0,001$, mentre nel muscolo è attorno al 30%, con una $p < 0,01$ (Figura 10).

Confrontando i due tessuti alla medesima temperatura è risultato che, sia a +1°C che a +3°C, i livelli di mRNA nel fegato sono circa 3 volte maggiori rispetto a quelli del muscolo, con una $p < 0,001$ ad entrambe le temperature (Figura 11).

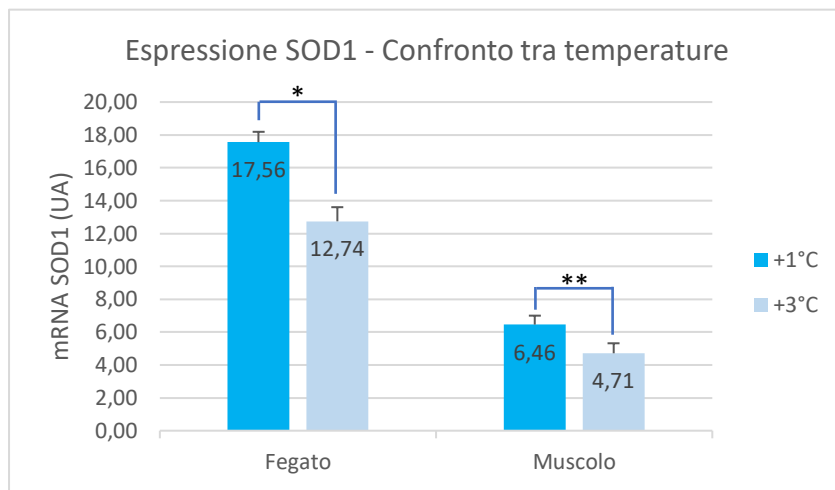


Figura 10: Confronto dell'espressione genica della SOD1 nello stesso tessuto a temperature diverse; le barre di errore rappresentano la deviazione standard ($p < 0.001$ (*), $p < 0.01$ (**)).

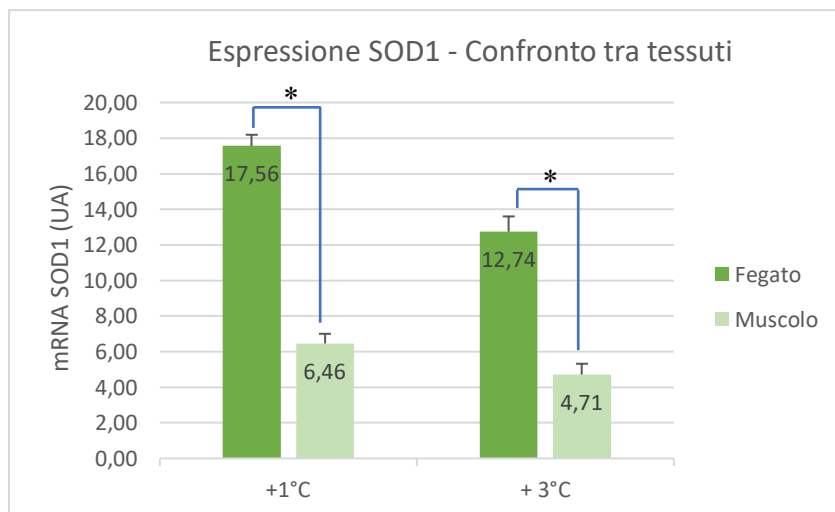


Figura 11: Confronto dell'espressione genica della SOD1 alla stessa temperatura in tessuti differenti ($p < 0.001$ (*)).

5. DISCUSSIONE

È ormai noto a tutti l'impatto che i cambiamenti globali stanno avendo sul nostro pianeta e, specialmente negli ultimi anni, stiamo assistendo ad importanti cambiamenti climatici; si stanno infatti modificando in modo evidente le temperature medie stagionali alle quali eravamo abituati.

Questi cambiamenti climatici sono in particolare molto pericolosi per le specie stenoterme adattate ad un determinato tipo di ambiente, in quanto anche una piccola alterazione termica potrebbe essere per loro dannosa o addirittura mortale. Gli organismi polari potrebbero vedere il loro habitat naturale ridursi fortemente, sia per il restringimento dell'habitat termico sia a causa dello scioglimento dei ghiacciai. Questi sono fattori che, se non tenuti sotto controllo, possono portare anche all'estinzione della specie se questa non riesce a rispondere in maniera efficace al cambiamento.

Il riscaldamento degli oceani comporta una diminuzione della solubilità dei gas, ragione per cui le acque vanno incontro a deossigenazione, ovvero ad una diminuzione dell'ossigeno disciolto, con conseguenze per la produttività degli oceani, il ciclo dei nutrienti e in generale per l'habitat marino. Sono previste diminuzioni dall'1 al 7% dell'O₂ oceanico globale nel prossimo secolo, con diminuzioni che continueranno per mille anni o più nel futuro (Keeling *et al.*, 2010).

La minore disponibilità di ossigeno influisce sulla fisiologia e sul comportamento degli organismi marini che devono far fronte a questa variazione, originando delle problematiche che si propagano attraverso l'intera catena trofica dell'ecosistema.

Di particolare rilevanza questa tematica si presenta nell'ambiente antartico, dove troviamo organismi che hanno sviluppato adattamenti specifici per poter vivere in acque a temperature di circa -2°C con elevata pressione parziale dell'ossigeno, risultando così maggiormente vulnerabili agli incrementi termici. Se da una parte questa facile accessibilità all'ossigeno rappresenta una condizione positiva per il trasporto in tutti gli organi, dall'altra porta rischi a livello fisiologico a causa della formazione delle ROS, specie reattive dell'ossigeno, che mettono in pericolo la salute dell'organismo provocando stress ossidativo se presenti in eccesso. È proprio per questo che i pesci antartici hanno sviluppato dei sistemi di difesa, tra i quali la produzione abbondante di enzimi antiossidanti, in grado di contrastare queste sostanze chimiche reattive.

In questo studio l'attenzione è stata rivolta all'espressione genica dell'enzima antiossidante SOD1, in grado di reagire con il radicale superossido generando acqua ossigenata e ossigeno molecolare. È stato analizzato il modo in cui varia l'espressione genica di quest'enzima in funzione della temperatura, cercando di capire quali potrebbero essere le conseguenze e l'impatto del riscaldamento globale sugli organismi. Gli studi sono stati effettuati su esemplari appartenenti alla specie *Trematomus bernacchii*, specie ampiamente diffusa nelle aree costiere antartiche; nello specifico sono stati analizzati i livelli di RNAmessaggero nel fegato e nel muscolo. In primo luogo, è stata confrontata la differente espressione genica nei due tessuti testati, e abbiamo rilevato una maggiore espressione nel fegato rispetto al muscolo. Ciò è dovuto alla vita che questi animali conducono, facendo parte degli organismi bentonici non hanno particolare richiesta d'ossigeno a livello muscolare a causa della loro bassa attività metabolica, pertanto quest'organo è soggetto a minor rischio di stress ossidativo; inoltre, per essere sottoposti all'esperimento, essi sono stati posti all'interno di vasche di grandezza molto ridotta limitando le loro possibilità di movimento. D'altra parte, il fegato assume un ruolo fondamentale per il metabolismo dell'organismo in quanto contribuisce all'eliminazione delle sostanze tossiche, con meccanismi di detossificazione da xenobiotici e da ROS, rappresentando così un organo più a rischio di stress ossidativo e quindi necessitando maggiormente di difese antiossidanti.

Le analisi dei livelli dell'attività enzimatica in funzione della temperatura hanno riscontrato un decremento sia nel fegato che nel muscolo al passaggio da +1°C a +3°C. Questo dato ha confermato le previsioni, in quanto ci si aspettava una diminuzione d'espressione genica a causa della minore solubilità dei gas a temperature più alte: minore ossigeno disciolto nelle acque significa anche minore probabilità di formazione di ROS, quindi minore necessità di produzione di enzimi antiossidanti. In studi precedenti effettuati sulle branchie di *T. bernacchii*, infatti, è stato dimostrato come, ad aumenti moderati di temperatura, l'attività enzimatica di SOD1 citoplasmatica diminuisca; aumentando la temperatura oltre i +3°C, però, si è osservato un rapido aumento e a +5°C è stato rilevato un incremento del 20% rispetto alle temperature di controllo (Mantoan, 2005). Questo ci consente di affermare quindi che il decremento è reversibile, ne consegue che non si tratta di un'inattivazione dell'enzima ma di una minore espressione del messaggero nella fase di diminuzione. Le condizioni ambientali, perciò, diventano critiche per *T. bernacchii* oltre i +3°C,

probabilmente a causa della grave condizione d'ipossia che rappresenta un ambiente molto stressante per l'organismo. L'ipossia, infatti, rappresenta uno dei fattori che favorisce la formazione di ROS e, di conseguenza, l'incremento di trascrizione genica di SOD1 a causa della riattivazione del sistema di difesa antiossidante da parte dell'organismo per contrastare l'aumento di ione superossido $O_2^{\cdot-}$.

Lo studio effettuato ha quindi permesso di vedere una diminuzione dell'espressione genica della SOD1 citoplasmatica all'aumentare della temperatura. In studi futuri sarebbe opportuno valutare anche l'attività enzimatica della SOD.

6. BIBLIOGRAFIA

ARONSON, RICHARD B., MOODY, RYAN M., IVANY, LINDA C., BLAKE, DANIEL B., WERNER JOHN E., GLASS, A., Climate Change and Trophic Response of the Antarctic Bottom Fauna. *Plos One*, 2009, **4**: e4385

BARLOW, J.J., MATHIAS, A.P., WILLIAMSON, R., A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1963, **13**: 61-66

BETTINI, A., Forme strane e occhi di ghiaccio: i pesci antartici nell'acquario della Stazione Mario Zucchelli. *RaiNews24*, 2022.

BRUEGGEMAN, P., Underwater field guide to Ross island & McMurdo sound. *Antarctica, Chordata*, 2022, **6**: 46-56.

DEVRIES, A.L., EASTMAN, J.T., Lipid Sacs as a Buoyancy Adaptation in an Antarctic Fish. *Nature*, 1978, **271**: 352-353.

DI PRISCO, G., I pesci - evoluzione e adattamento alle basse temperature. *In Antartide, Museo Nazionale dell'Antartide, Felice Ippolito*, 1998.

DONEY, SCOTT C., RUCKELSHAUS, M., EMMETT DUFFY, J., BARRY, J.P., CHAN, F., ENGLISH, C. A., GALINDO, H.M., GREBMEIER, J.M., HOLLOWED, A.B., KNOWLTON, N., POLOVINA, J., RABALAIS, N.N., SYDEMAN, W.J., TALLEY, L.D., Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 2012, **4**: 11-37.

ENEA UTA (UNITÀ TECNICA ANTARTIDE), Italia in Antartide. 2014.

FRISARD, M., RAVUSSIN, E., Energy Metabolism and Oxidative Stress. *Endocrine*, 2006, **29**: 27-32.

GON, O., HEEMSTRA, P.C., *Fishes of the Southern Ocean*, 1990.

HOFMANN, G.E., BUCKLEY, B.A., AIRAKSINEN, S., KEEN, J.E., SOMERO, G.N., Heat-shock protein expression is absent in the antarctic fish *Trematomus bernacchii* (family Nototheniidae). *The Journal of Experimental Biology*, 2000, **203**: 2331-2339.

JENSEN, E.C., Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction to Measure mRNA: Use, Limitations, and Presentation of Results. *The Anatomical Record*, 2012, **295**: 1-3.

KEELING, R.F., KÖRTZINGER, A., GRUBER, N., Ocean Deoxygenation in a Warming World». *Annual Review of Marine Science*, 2010, **2**: 199-229.

KOCK, K.H., Antarctic icefishes (Channichthyidae): a unique family of fishes. A review, Part I. *Polar Biol*, 2005, **28**, 862–895.

KUTTIPPURATH, J., NAIR, P.J., The Signs of Antarctic Ozone Hole Recovery. *Scientific Reports*, 2017, **7**: 585.

LEUZZI, U., BELLOCCO, E., BARRECA, D., L'ossigeno e la formazione di composti tossici in *Biochimica della nutrizione*, Zanichelli, 2013, 273-282

LIMA PROJECT (LANDSAT IMAGE MOSAIC OF ANTARCTICA), Antarctica Overview Map.

LOMBARDI, C., KUKLINSKI, P., BORDONE, A., SPIRANDELLI, E., RAITERI, G., Assessment of Annual Physico-Chemical Variability via High-Temporal Resolution Monitoring in an Antarctic Shallow Coastal Site (Terra Nova Bay, Ross Sea). *Minerals*, 2021, **11**(374): 1-19.

MANTOAN, M., *Induzione di enzimi antiossidanti in risposta a variazioni di temperature in teleostei antartici*. Università degli studi di Padova, 2005.

MENGONI, A., SCIALPI, A., *La PCR e le sue varianti. Quaderno di laboratorio*. Firenze University Press, 2008.

PARISH, T.R., BROMWICH, D.H., The Surface Windfield over the Antarctic Ice Sheets. *Nature*, 1987, **328**: 51-54

SACCON, R.A., BUNTON-STASYSHYN, R.K.A., FISHER, E.M.C., FRATTA, P., Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis?. *Brain*, 2013, **136**: 2342–2358.

SEABROOKE, J.M., HUFFORD, G.L., ELDER, R.B., Formation of Antarctic Bottom Water in the Weddell Sea. *Journal of Geophysical Research (1896-1977)*, 1971, **76**: 2164–2178.

TYNAN, C.T., Ecological Importance of the Southern Boundary of the Antarctic Circumpolar Current. *Nature*, 1998, **392**: 708-710.

VANDESOMPELE, J., KUBISTA, M., PFAFFL, M.W., Reference gene validation software for improved normalization in *Real-time PCR: current technology and applications*, Logan, J., Edwards, K., Saunders, N. (Eds); Caister Academic Press, 2009, **4**: 47-64.

ZELKO, I.N, MARIANI, T.J., FOLZ, R.J., Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, **33**: 337-349.

7. SITOGRAFIA

ANTARCTIC EXPEDITION: B-207-M, *Antarctic organism*. <https://antarctica-ecofishiology.github.io/animals.html>. Consultato 17 novembre 2022.

PIANETA CHIMICA, *Superossido dismutasi*. https://www.pianetachimica.it/mol_mese/mol_mese_2007/10_Superossido/Superossido_1.htm. Consultato 14 novembre 2022.

IL CLIMA IN ANTARTIDE, *Considerazioni generali con particolare riferimento all'area di Baia Terra Nova*. http://www.meteorologia.it/colombo/clima_in_antartide.htm. Consultato 7 novembre 2022.