



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA**

Dipartimento di TERRITORIO E SISTEMI AGRO FORESTALI

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

**ANALISI MOLECOLARE DI CLONI DI *PICHIA PASTORIS* TRASFORMATI
PER L'ESPRESSIONE DI DUE PROTEASI FUNGINE**

Relatore:
Prof. LUCA SELLA

Laureanda:
JESSICA SPINELLI
Matricola n. 596464

ANNO ACCADEMICO 2010- 2011

INDICE

INDICE	3
RIASSUNTO	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUZIONE	9
<i>1.1 Le proteasi dei funghi fitopatogeni</i>	9
<i>1.2 Proteasi acido e aspartil proteasi</i>	10
<i>1.3 Espressione eterologa in Pichia pastoris</i>	12
2. SCOPO DELLA TESI	15
3. MATERIALI E METODI	17
<i>3.1 Pichia pastoris</i>	17
<i>3.2 Analisi delle colonie trasformate per la presenza dell'inserto</i>	18
3.2.1 CRESCITA COLONIE DI PICHIA PASTORIS TRASFORMATE.....	18
3.2.2 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DI PICHIA PASTORIS	19
3.2.3 QUANTIFICAZIONE DNA GENOMICO	19
3.2.4 DIGESTIONE DEL DNA GENOMICO CON ENZIMI DI DIGESTIONE	20
3.2.5 PREPARAZIONE DELLE SONDE E MARCATURA MEDIANTE PCR	20
3.2.6 SOUTHERN BLOT	22
<i>3.3 Analisi delle colonie trasformate per la presenza del trascritto</i>	23
3.3.1 INDUZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLE PROTEASI IN P. PASTORIS	23
3.3.2 ESTRAZIONE RNA TOTALE DI PICHIA PASTORIS	24
3.3.3 QUANTIFICAZIONE RNA	25
3.3.4 RT-PCR	25
<i>3.4 Analisi delle colonie trasformate per verificare la presenza delle</i> <i>proteine</i>	27
3.4.1 SDS-PAGE DEL FILTRATO COLTURALE	27
3.4.2 SAGGIO DI ATTIVITÀ PROTEASICA.....	27
4. RISULTATI	29
<i>4.1 Verifica presenza dell'inserto</i>	29
4.1.1 VERIFICA DELL'INSERZIONE DEL GENE DI INTERESSE	29
4.1.2 DIGESTIONE DEL DNA GENOMICO	30
4.1.3 PREPARAZIONE SONDE PER SOUTHERN BLOT.....	31
4.1.4 ANALISI SOUTHERN BLOT	31
<i>4.2 Verifica presenza del trascritto</i>	32
4.2.1 ESTRAZIONE RNA.....	32
4.2.2 RT-PCR.....	33
4.2.3 SDS-PAGE.....	34
4.2.4 SAGGIO DI ATTIVITÀ PROTEASICA.....	35
5. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	37
6. BIBLIOGRAFIA	39

RIASSUNTO

I funghi fitopatogeni secernono all'interno della pianta infettata numerosi enzimi degradativi, tra i quali le proteasi, che sembrano essere coinvolte oltre che nella colonizzazione del tessuto ospite e nell'approvvigionamento di sostanze azotate anche nella degradazione delle proteine antifungine prodotte dalle pianta come risposta di difesa all'attacco dei patogeni, denominate proteine PR (*pathogenesis related*). Il fungo necrotrofo *Sclerotinia minor* è risultato in grado di rimuovere efficacemente le proteine PR dell'acino d'uva, un tessuto ricco di queste proteine difensive. L'attività proteolitica di *S. minor* sembra ascrivibile soprattutto ad una proteasi aspartica (ASP) ed una proteasi acidica (ACP). Nel seguente lavoro si è voluto caratterizzare in modo più approfondito questi enzimi degradativi cercando di esprimerli in un sistema eterologo. I rispettivi geni codificanti sono stati quindi clonati e inseriti nel lievito *Pichia pastoris* tramite elettroporazione. Dopo aver verificato la presenza nelle colonie trasformate dei geni d'interesse *acp* e *asp*, l'espressione dei geni è stata analizzata mediante RT-PCR: le colonie di *P. pastoris* trasformate correttamente sono risultate in grado di trascrivere i due geni analizzati, tuttavia dalla successiva analisi dei profili proteici non è stato possibile individuare le bande proteiche attese. Un successivo saggio di attività ha confermato l'assenza di attività proteasica delle colonie saggiate. In conclusione si è dimostrato che le due proteasi di *S. minor*, appartenenti alla famiglia delle aspartil proteasi e alla famiglia delle proteasi acidiche, clonate in un sistema eterologo come *P. pastoris*, non sembrano essere tradotte o secrete in quantità apprezzabili sebbene i loro geni siano trascritti.

ABSTRACT

The phytopathogenic fungi secretes inside the plant a wide range of extracellular enzymes which can degrade the host cell wall components. These enzymes include proteases, which appear to be involved as well as in the colonization of host tissue, in the supply of nitrogenous substance and also in the degradation of pathogenesis related proteins (PR), secreted by plants. These have antimicrobial activity and are synthesized by plants to protect themselves from pathogen attack. *Sclerotinia minor* is an ubiquitous necrotrophic fungus that is able to remove effectively the proteins PR of grape berries, a tissue rich in defensive proteins. The proteolytic activity of *S. minor* seems attributable mainly to the aspartic protease (ASP) and to an acidic protease (ACP). In the following study I want to characterize these degradative enzymes, trying to express them in a heterologous system. The genes *acp* e *asp* have been cloned and inserted into the yeast *Pichia pastoris* by electroporation. The integration of interest genes into the *P. pastoris* genome was investigated by PCR: the rightly recombinant colonies of *P. pastoris* are able to transcribe genes *acp* and *asp*; however, subsequent analysis of protein profiles could not show the protein bands. A subsequent activity assay confirmed the absence of protease activity of tested colonies. Finally it has been demonstrated that the two proteases of *S. Minor* belonging to the family of aspartyl proteases and the family of acidic proteases, cloned in an heterologous system, such as *P. Pastoris*, do not seem to be translated or secreted in appreciable quantities although their genes are transcribed.

1. INTRODUZIONE

1.1 Le proteasi dei funghi fitopatogeni

In natura i funghi fitopatogeni, dopo aver superato la cuticola, si trovano a contatto con la parete cellulare delle cellule epidermiche che rappresenta un'importante barriera contro la penetrazione e colonizzazione del tessuto vegetale. Durante il processo infettivo i funghi fitopatogeni sintetizzano quindi numerosi enzimi extracellulari in grado di degradare i componenti polimerici della parete cellulare (CWDE, *Cell Wall Degrading Enzymes*) (Poussereau et al., 2001). I principali enzimi degradativi sono le pectinasi, le emicellulasi, le cellulasi e le proteasi. Tra queste, particolarmente studiate sono le proteasi, le quali potrebbero essere coinvolte nelle prime fasi del processo infettivo (Ten Have et al., 2004), nonostante il loro ruolo nell'interazione pianta-patogeno non sia ancora stato chiarito. A supportare l'ipotesi di un ruolo attivo delle proteasi nel corso del processo infettivo, sono stati identificati nelle piante numerosi inibitori di questi enzimi proteolitici (Poussereau et al., 2001a). In particolare si è visto che la concentrazione di questi inibitori aumenta durante l'infezione e costituisce probabilmente un meccanismo difensivo delle piante contro le proteasi secrete dai funghi. Le proteasi fungine svolgono probabilmente un ruolo molto importante sia nel processo infettivo che nell'approvvigionamento di sostanze nutritive (Rao et al., 1998). Infatti il fungo, grazie alla produzione e alla secrezione delle proteasi, riesce a degradare la componente proteica della parete ricavandone sostanze azotate che costituiscono un'importante fonte nutrizionale per il patogeno. Lo studio di espressione di un'aspartil proteasi extracellulare, secreta da *Penicillium roqueforti*, e di una proteasi acidica, secreta da *Sclerotinia sclerotiorum*, ha infatti confermato che queste proteasi risultano represses quando ci sono abbondanti fonti di sostanze azotate facilmente assimilabili (Gente et al., 1997; Poussereau et al., 2001). Agli enzimi proteolitici è stato inoltre attribuito un importante ruolo nelle modificazioni post-traduzionali riguardanti l'attivazione di altre proteasi secrete come pro-proteine (Y. Xia, 2004). Le proteasi extracellulari sono state dimostrate in grado di degradare anche numerose proteine inibitrici secrete dalla pianta per bloccare l'attività di enzimi prodotti dai patogeni durante il processo infettivo. In questo modo le proteasi contribuirebbero quindi a superare un importante meccanismo difensivo messo in atto dalle piante. (Girbau et al., 2004). Tra i meccanismi difensivi delle piante vi è anche la produzione di proteine PR (*pathogenesis related*), proteine

correlate con la patogenesi. Le proteine PR costituiscono un insieme eterogeneo di polipeptidi aventi in comune un ruolo difensivo e la cui sintesi è indotta nelle piante in risposta ad infezioni da patogeni. Generalmente le proteine PR si accumulano nei tessuti della pianta localmente e sistemicamente in seguito all'attacco dei patogeni, anche se alcune risultano costitutivamente espresse anche nelle piante sane (van Loon e van Strien, 2006). Solitamente queste proteine PR hanno basso peso molecolare e sono altamente resistenti alla degradazione proteolitica (Ferreira et al., 2007).

1.2 Proteasi acidiche e aspartil proteasi

Il genoma dei funghi fitopatogeni codifica per numerose proteasi, putativamente coinvolte sia nel processo infettivo che nella degradazione di polipeptidi delle piante per ricavarne sostanze azotate. Le proteasi sono attive in un ampio range di pH (tra 2.5 e 11) e hanno peso molecolare variabile, compreso tra 10 e 45 KDa (Rao et al., 1998). Le proteasi si raggruppano in diverse famiglie quali: serin proteasi, proteasi aspartiche, cistein proteasi, metallo proteasi e proteasi acidiche. Le famiglie delle proteasi acidiche e aspartiche sono abbondantemente studiate nei funghi necrotrofi *B. cinerea* e in *S. sclerotiorum* che possiedono nel loro genoma numerosi geni codificanti sequenze molto simili tra le due specie (Poussereau et al., 2001).

Sclerotinia sclerotiorum è un fungo necrotrofo ubiquitario in grado di infettare oltre 400 specie vegetali incluse molte culture economicamente importanti.

Botrytis cinerea è un fungo necrotrofo ed è un importante patogeno delle piante in quanto può infettare circa 235 specie vegetali (Jarvis, 1977). È in grado di colonizzare vari organi durante qualsiasi stadio di sviluppo e richiede l'espressione coordinata di molti enzimi degradativi, tra cui le proteasi.

L'analisi del genoma di *B. cinerea* ha permesso di identificare una famiglia genica di proteasi di tipo aspartico (ASP) costituita da 14 geni (*Bcap* 1–14) (ten Have et al., 2009). L'identificazione di membri della famiglia genica delle proteasi ASP in *B. cinerea* ha permesso di individuare numerosi geni ortologhi nel genoma di altri funghi filogeneticamente correlati quali *S. sclerotiorum* (ten Have et al., 2009). I geni *asp*, codificanti le aspartil proteasi, sono generalmente trascritti sotto forma di "pre-proteina"; ogni polipeptide è formato da un peptide segnale e da un pro-peptide di lunghezza variabile che viene rimosso tramite processamento post-traduzionale portando al rilascio della proteina matura.

La famiglia delle proteasi di tipo aspartico (ASP, aspartyl protease) rappresenta uno dei principali fattori di virulenza che vengono secreti all'interno della pianta da parte dei funghi fitopatogeni *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Questo è dimostrato dalla visibile riduzione di virulenza di questi funghi alla presenza degli inibitori specifici per le proteasi aspartiche, ovvero la pepstatina (Movahedi e Heale, 1990).

Una proteasi aspartica e una acidica sono state dimostrate essere espresse e secrete da *S. sclerotiorum* durante il processo infettivo su tessuti di girasole (Poussereau et al., 2001a, b). Il gene codificante l'aspartil proteasi è risultato espresso già dalle prime fasi dell'infezione, mentre il trascritto codificante la proteasi acidica è risultato indotto ad alti livelli nelle fasi successive, durante l'espansione delle lesioni necrotiche (Poussereau et al., 2001a, b). Nel secretoma del fungo sono state quindi identificate una proteasi acidica (identificata anche da Yajima et al. [2006] nel secretoma del fungo allevato in vitro su terreno minimale) di 24KDa, con un optimum di pH di 3, e una aspartil proteasi di 35KDa, che presenta un optimum di pH di 4.5 (Poussereau et al., 2001a, b). Il pH è uno dei parametri più importanti che riguardano gli ambienti in soluzione acquosa poiché può influenzare l'attività di singoli enzimi. I microorganismi sono particolarmente sensibili alla variazione del pH nell'ambiente; alcuni, tuttavia, sono in grado di resistere ad ampi range di pH. È stato dimostrato che *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* sono in grado di acidificare il tessuto ospite infettato sia attraverso l'utilizzo di alcuni fattori di patogenicità (es: proteasi) sia attraverso la secrezione di vari acidi organici come l'acido ossalico, al fine di creare un ambiente più adatto alla loro crescita (Manteau et al., 2002; Hegedus et al., 2005). Nessuno studio tuttavia è riuscito a dimostrare come il pH del tessuto della pianta ospite possa influenzare *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* nella sintesi dei suoi fattori di virulenza; è stata peraltro dimostrata una dipendenza tra pH e regolazione dei fattori di patogenicità di *B. cinerea* (Manteau et al., 2002).

Sclerotinia minor è un fungo fitopatogeno necrotrofo, geneticamente molto simile a *S. sclerotiorum*. È responsabile di gravi perdite economiche nelle colture, in particolar modo in lattuga e altre specie di asteraceae, determinando cali di produzione fino al 50%. Nel laboratorio dove ho svolto la tesi è stato accertato che *S. minor* è in grado di rimuovere le proteine PR presenti nell'acino d'uva, un tessuto molto ricco di proteine di patogenesi, normalmente resistenti alla degradazione proteolitica (Ferreira et al., 2007). La caseina si è rivelata essere un buon substrato capace di indurre elevati livelli di attività protesica. Un'analisi SDS-PAGE ha permesso di

evidenziare due bande proteiche principali: la prima di circa 34 kDa, la seconda di minore intensità di circa 25 kDa. Queste bande sono state prelevate da gel e dopo digestione triptica sono state analizzate mediante LC-MS/MS: le due proteine di 34 e 25 kDa sono risultate altamente simili, rispettivamente, ad una aspartil proteasi (SS1G_03181) e ad una proteasi di tipo acidico (SS1G_07836) di *S. sclerotiorum* con identità amminoacidica rispettivamente di 96,6% e 98%.

Dal genoma di *S. minor* sono stati quindi isolati e caratterizzati i geni codificanti la proteasi acidica e l'aspartil proteasi precedentemente identificate, rispettivamente nominati geni *acp* e *asp*. Per l'isolamento dei geni *asp* e *acp* dal genoma di *S. minor* si sono utilizzati primers disegnati in base alle sequenze dei geni SS1G_03181 e SS1G_07836 di *S. sclerotiorum*.

La proteasi aspartica matura di *S. minor* ha una sequenza nucleotidica di 984 pb ed una sequenza amminoacidica di 327 amminoacidi, con massa molecolare teorica di 34 kDa. Solitamente queste proteine hanno un optimum di pH intorno a 3.5 (Xia, 2004). La proteasi acidica di *S. minor*, mostra una sequenza nucleotidica di 759 pb ed una sequenza proteica di 252 amminoacidi, con massa molecolare della sola proteina matura di 26 kDa, in linea con i pesi molecolari classici delle proteasi acide (tra 9 e 62 kDa).

1.3 Espressione eterologa in *Pichia pastoris*

Per poter effettuare una più estesa caratterizzazione delle proteasi di *S. minor*, si è esplorata la possibilità di ottenere maggiori quantità di enzima esprimendo eterologamente i geni codificanti per ACP e ASP nel lievito *P. pastoris*. Sulla base delle sequenze nucleotidiche ottenute dal sequenziamento dei due geni di *S. minor*, sono stati costruiti i primers senso ed antisense per amplificare i frammenti genici codificanti la proteina matura da clonare nel vettore di espressione pPICZαA. I costrutti risultanti, pPICZαA/*asp* e pPICZαA/*acp*, sono stati utilizzati per trasformare *P. pastoris* tramite elettroporazione. Negli ultimi anni questo lievito metilotrofico si è dimostrato un sistema di grande efficienza per la produzione di una varietà di proteine eterologhe. La popolarità di questo sistema è da attribuire a diversi fattori: la semplicità delle tecniche di manipolazione genetica molecolare, la sua alta similarità a *Saccharomyces cerevisiae*, la capacità di *P. pastoris* di produrre proteine estranee sia intracellulari che extracellulari ad alti livelli, la capacità di eseguire molte modificazioni post-traduzionali simili a quelle di sistemi eucariotici e infine la

disponibilità del sistema d'espressione anche in kit commerciali. *P. pastoris* è un lievito metilotrofico, in quanto è in grado di sfruttare il metanolo come unica fonte di carbonio e di energia, anche se questo necessita di particolari vie metaboliche che coinvolgono diversi enzimi i quali sono espressi a notevoli livelli solo quando le cellule sono coltivate su metanolo. I due enzimi coinvolti nella via metabolica del metanolo sono l'enzima alcool ossidasi (AOX) e le diidrossiacetone sintasi (DHAS) (Cereghino et al.,1999).

2. SCOPO DELLA TESI

Durante il processo infettivo numerosi funghi fitopatogeni secernono all'interno della pianta specifici enzimi degradativi (CWDE) che a loro volta possono essere bloccati da specifici inibitori prodotti dalla pianta attaccata. Alcuni enzimi degradativi hanno il compito di bloccare o degradare questi inibitori e possono inoltre degradare alcuni prodotti di difesa delle piante, come ad esempio le proteine di patogenesi (proteine PR). Tra i CWDE, le proteasi svolgono un ruolo importante in questo senso. Studi recenti svolti nel laboratorio dove ho svolto la tesi hanno verificato che il fungo patogeno *Sclerotinia minor* rilascia attività proteasica ed è in grado di degradare o rimuovere le proteine PR. Questo fungo cresciuto in mezzo liquido contenente caseina, esprime elevate quantità di due proteasi che sono state purificate e sono risultate codificare per una aspartil proteasi e ad una proteasi di tipo acidico. Per poter caratterizzare più approfonditamente l'attività proteasica di *S. minor*, si è cercato di ottenere una maggiore quantità dei due enzimi esprimendo i rispettivi geni codificanti in un sistema eterologo, il lievito *Pichia pastoris*. In questa tesi oltre ad analizzare la presenza degli inserti *acp* e *asp* nelle colonie trasformate di *P. pastoris* mediante analisi Southern Blot, si è indagata la presenza dei corrispettivi trascritti e si è verificata mediante analisi SDS-PAGE la secrezione delle proteine di interesse. Infine è stato eseguito un saggio per verificare la presenza nell'estratto colturale dei lieviti trasformati di attività proteasica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 *Pichia pastoris*

Per l'espressione dei geni nel lievito *P.pastoris* è stato scelto il vettore pPICZαA (3593 bp), fornito dal kit *Easy Select™ Pichia Expression Kit* (Invitrogen). Questo vettore contiene importanti elementi (Fig.1) tra i quali il promotore AOX1 che permette l'espressione metanolo-indotta del gene d'interesse, specifici siti di restrizione unici (*Multiple Cloning Site*) ed una sequenza di terminazione della trascrizione (AOX1 TT). Infatti si possono indurre le cellule di *P.pastoris* trasformate a produrre la proteina di interesse aggiungendo metanolo nel substrato di coltura, poiché il gene di interesse si trova sotto il controllo di un promotore inducibile dalla presenza di metanolo. Per la secrezione della proteina ricombinante, all'estremità 3' del promotore AOX1, si trova la sequenza del fattore α che codifica per il peptide segnale di secrezione originario di *S. cerevisiae*. Il vettore pPICZαA contiene inoltre il gene marker *Sh ble*, (originario di *Streptoalloteichus hindustanus*) che conferisce resistenza all'antibiotico zeocina.

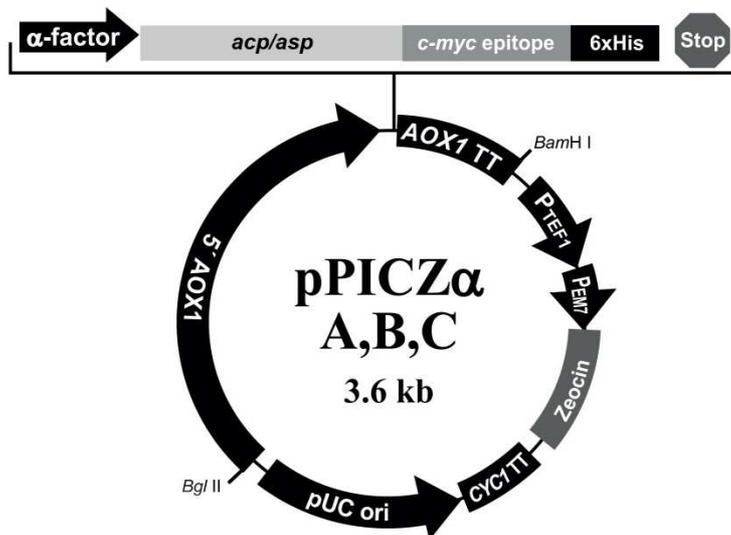


Figura 1 – Vettore pPICZαA (Invitrogen): Zeocina: fattore di selezione, AOX1: promotore alcool ossidasi, α- factor: fattore di secrezione.

I costrutti, pPICZαA/asp e pPICZαA/acp, contenenti rispettivamente le sequenze codificanti asp e acp ottenuti nel laboratorio dove ho svolto la tesi, sono stati utilizzati per trasformare il lievito tramite elettroporazione. Per la trasformazione è stato utilizzato un ceppo di *P. pastoris* WT *protease-deficient*, creato appositamente per

ridurre i rischi di degradazione delle proteine eterologhe e utile per poter misurare più facilmente l'eventuale attività delle proteasi espresse eterologamente.

Con entrambi i costrutti si sono ottenute numerose colonie putativamente trasformate che sono state caratterizzate nel presente lavoro di tesi. Le sequenze nucleotidiche inserite in *P. pastoris* codificano per le seguenti sequenze amminoacidiche:

- **Proteasi acidica matura: M.W. 24,33KDa**

1	APGTALRQER	AVKRAARTHG
21	NPVKYVEGPT	NKTDVSYSSN
41	WAGAVLVGTG	YTSVTGTFTA
61	PSPSTAGSGS	AWVGIDGDTC
81	GTAILQTGID	WTKSGNSITY
101	DAWYEWYPDY	AYDFSGISIS
121	AGDSIKVTVT	ASSKTTGTAT
141	VDNLTKGKSV	THTFSGGVDG
161	DLCEYNAEWI	VEDFEEGSSL
181	VQFANFGTVT	FTGASATQNG
201	QTVGVSGAQI	IDLQQNSVLT
221	SVSTSSSSVT	VKYV

- **Aspartil proteasi: M.W. 32,95 KDa**

1	KRQDSSVTAT	PADAAEYLIP
21	VTVGGQTLNL	DLDTGSADLW
41	VFSSLLSSSS	RSGHDIYTSS
61	KSSTYKSLSG	YSWDISYADG
81	SGASGVVGTD	TVTIGKTTVA
101	GQAVELATQV	SSEFVSDASD
121	GLVGMAFSSI	NTVYPRSQST
141	FFDNAVSSLN	SPIFAAYLPV
161	NADGAYDFGY	TDSNKYTGTL
181	TYTSVSSGNG	FWEFPSTSYK
201	VGSTVHSSNG	YTGIADTGTT
221	LILMSDATNS	AYYAQVKGAS
241	YSNSAGGYVF	PCSATLPTLS
261	FKIGNTYVTI	PSELLNYGVE
281	SGNTCYGALQ	SAGGGSQNIY
301	GDVFLNAYYV	VFDKSGPSLG
321	FAPSVSA	

3.2 Analisi delle colonie trasformate per la presenza dell'inserto

3.2.1 Crescita colonie di *Pichia pastoris* trasformate

12 colonie di *P. pastoris* (5 trasformate con il gene *acp*, 5 con il gene *asp*, una colonia *wilde type* [X33] e una colonia *WT protease-deficient* [SMD1168], nominata

P-) sono state fatte crescere in 5-10 mL di terreno di coltura liquido Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (YPD oYEPD, estratto di lievito 1%, peptone 2%, destrosio 2%). Le colonie sono state prelevate da piastre di *Yeast Peptone Dextrose* (YPD, composto da estratto di lievito 1%, peptone 2%, destrosio 2%, agar 2%) e le colture liquide, sono state messe in agitazione (250rpm) overnight a 28°C per la crescita. Questo brodo di coltura è particolarmente ricco e complesso e risulta essere adatto per la crescita generale di molti microrganismi.

3.2.2 Estrazione del DNA genomico di *Pichia pastoris*

Per estrarre il DNA genomico di *P. pastoris*, si è partiti dalle colonie coltivate in terreno liquido YPD. Dopo aver fatto crescere le colonie su questo terreno, si sono fatte precipitare le cellule di *P.pastoris* tramite centrifugazione a 3000 rpm per 5 min a temperatura ambiente. Sul fondo della falcon si è depositato il pellet che è stato asciugato capovolgendo la falcon per qualche istante. Il pellet è stato poi polverizzato con l'uso di un pestello adatto alla falcon, utilizzando l'azoto liquido, ed in seguito si sono aggiunti 2 mL di CTAB (2% CTAB; 100mM Tris-HCl pH=8; 20 mM EDTA; 1,4 M HCl; 1% PVP) addizionati con 20 µL β-mercaptoetanol. La miscela è stata vortexata ed incubata a 65°C per 1 h nel bagno term ostatico, per favorire un'efficace lisi cellulare. Successivamente, sono stati aggiunti alla miscela 2 mL di cloroformio + alcool isoamilico (24:1), si è mescolato e incubato per 1-2 h in agitazione in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 9000 rpm per 10-15 min, si è ottenuta una fase acquosa in cui è risospeso il DNA deproteinizzato. Il surnatante è stato recuperato, e precipitato con 2 mL di isopropanolo freddo e 200 µL di sodio acetato 3M pH=5.2. La miscela è stata mescolata invertendo l'eppendorf e incubata a -20°C per 30 min per favorire la precipitazione del DNA. Il campione è stato nuovamente centrifugato a velocità massima per 15-30 min e sul fondo dell'eppendorf si è quindi depositato il pellet, che è stato lavato con 1mL di etanolo 70% e centrifugato a velocità massima per 10-15 min. Il pellet di DNA è stato fatto asciugare all'aria per 15-20 min e si è infine risospeso in 100 µL di TE overnight a 4°C.

3.2.3 Quantificazione DNA genomico

Prima quantificare il DNA genomico, il campione è stato trattato con 1.5µL di RNasi A (2mg/mL), vortexato, centrifugato a 1000 rpm per pochi secondi e incubato a 37°C per 30 min; successivamente il DNA è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel

di agarosio 1% contenente 0,6 µg/mL di etidio di bromuro. Per valutare la dimensione delle bande ottenute è stato usato il marcatore di peso molecolare 1 Kb DNA Ladder (Fermentas).

3.2.4 Digestione del DNA genomico con enzimi di digestione

Per la digestione del DNA genomico è stato utilizzato un enzima di restrizione specifico che taglia all'esterno dei costrutti di partenza contenuti nel vettore pPICZαA. Circa 5 µg di DNA genomico sono stati quindi digeriti con l'enzima di restrizione *Hind* III. La reazione è avvenuta in un volume totale di 500µL per i campioni ACP2/ACP3/ACP4/ACP4/ASP2/ASP4/ASP6/P-, mentre per ACP1/ASP3/ASP7 in un volume totale di 700µL contenenti tampone di digestione 1X e circa 30U di enzima di restrizione. La miscela è stata incubata a 37°C overnight. Dopo la digestione overnight un'aliquota dei campioni è stata sottoposta a corsa elettroforetica per accertarsi dell'avvenuta digestione. L'aliquota rimasta è stata precipitata aggiungendo un ugual volume di isopropanolo e incubando a -20°C overnight. Il giorno successivo i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 15 min a 4°C. Poiché non si è formato sul fondo dell'e ppendorf il pellet di DNA digerito, ad ogni campione si è aggiunto 1/10 di volume di sodio acetato (NaAc) e si è incubato nuovamente a -20°C per 4h. Poi i campioni sono stati ricentrifugati a 13000 rpm per 15 min a 4°C. I pellet ottenuti sono stati risospesi in 40 µL H₂O sterile.

3.2.5 Preparazione delle sonde e marcatura mediante PCR

Per poter individuare i frammenti d'interesse si procede con la marcatura non radioattiva tramite PCR delle due sonde, una specifica per il gene dell'aspartil proteasi e una per la proteasi acidica. Per amplificare la sonda è stato utilizzato come stampo il DNA plasmidico contenente rispettivamente i geni *asp* e *acp*. La marcatura è stata realizzata inserendo un uracile (dUTP) coniugato con la digossigenina negli amplificati. La miscela di reazione PCR ha un volume finale di 100 µL, ed è composta da:

- 2 µL DNA stampo plasmidico (25ng/ µL)
- 61µL H₂O
- 10 µL tampone 10X
- 6 µL MgCl₂ (stock 25mM)
- 5 µL dATP, 5 µL dGTP, 5 µL dCTP (stock 1mM)

- 4 µL dTTP (stock 1mM)
- 1 µL dUTP-digossigenina (stock 1mM)
- 1 µL primer forward (100ng)
- 1 µL primer reverse (100ng)
- 1 µL taq-polimerasi (5U/ µL)

Sono state preparate due miscele una per il gene *acp* e una per il gene *asp* e in ogni miscela sono stati messi i primers specifici.

Tabella1: Primers specifici per aspartil proteasi e proteasi acidica	
SsACPRev- <i>acp</i>	TTA AAC ATA CTT GAC AGT AAC GG
PAcPF1- <i>acp</i>	ATG AAG TTC TCC ATC GTT GCT
SSAP1Rev- <i>asp</i>	TTA TGC GGA AAC GCT TGG
SSAP2For- <i>asp</i>	CAC TCC GCA AGA GAC AAG AC

La sonda per il gene *acp* ha una lunghezza di 759 pb e non presenta sequenze introniche, mentre la sonda per il gene *asp* ha una lunghezza di 1467 pb e contiene un introne. Per l'amplificazione dei due geni codificanti le proteasi (ACP e ASP), sulla base delle sequenze nucleotidiche ottenute dal sequenziamento dei due geni sono state costruite coppie di primers, senso e antisenso, per ottenere la sequenza completa dei geni *acp* e *asp*. Per il gene *acp* è stato disegnato il primer forward (PacPF1) che amplifica l'intera sequenza del gene compresa la parte del peptide segnale; nel gene *asp* invece il primer forward (SSAP2For) è stato disegnato in modo tale da amplificare solamente la sequenza codificante la proteina matura.

Primers specifici per ***acp*** (XM_001591160.1)

SsACPRev TTA AAC ATA CTT GAC AGT AAC GG

PAcPF1 ATG AAG TTC TCC ATC GTT GCT

Lunghezza attesa del prodotto di amplificazione: 759pb

T. di appaiamento utilizzata = 55°C

Primers specifici per ***asp*** (XM_001595043)

SSAP1Rev TTA TGC GGA AAC GCT TGG

SSAP2For CAC TCC GCA AGA GAC AAG AC

Lunghezza attesa del prodotto di amplificazione: 992pb

T. di appaiamento utilizzata = 58°C

Il ciclo di amplificazione è stato ripetuto per 35 volte alle seguenti condizioni:

- 94°C per 1 min (fusion)
- 55-58°C per 30 sec (annealing rispettivamente *acp* e *asp*)
- 72°C per 2 min (elongation)

Le sonde sono state purificate in colonnina con kit commerciale *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Infine le sonde sono state quantificate visivamente su gel agarosio 1% (10ng/ µL per la sonda ACP e 7ng/ µL per ASP) e conservate a -20°C.

3.2.6 Southern Blot

Inizialmente si è preparato un gel grande di agarosio (1%) senza etidio di bromuro in tampone TAE (0,8 mM Tris, 0,4 mM Acido acetico, 0,04 mM EDTA, pH= 8). Prima di caricare i campioni di DNA digerito, si è proceduto con una incubazione a 65°C per 5 min, poi i campioni sono stati separati mediante corsa elettroforetica di 4 h a voltaggio costante (80V). Dopo la corsa il gel è stato colorato mettendolo in una soluzione di 150 mL di H₂O deionizzata contenente 7 µL etidio di bromuro (stock 10 mg/mL) per circa 10 min; questo per poter osservare meglio il DNA digerito. Infine il gel è stato lavato per 10 min in H₂O deionizzata.

Successivamente il gel è stato posto in agitazione per 45 min in soluzione denaturante (NaOH 0,5M; NaCl 1,5M) per permettere la denaturazione del DNA; poi in agitazione per altri 45 min in soluzione neutralizzante (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 1M pH=8), che riporta il pH a valori simili a quelli del tampone di trasferimento. Successivamente il DNA è stato trasferito per capillarità da gel a membrana di nylon con carica positiva, con cui forma legami idrogeno, ponti salini e interazioni idrofobiche, utilizzando come tampone di trasferimento SSC 10X (175.3 g/L NaCl, 88,2 g/L sodio citrato pH=7). Dopo 16 ore di trasferimento la membrana è stata lavata per 10 min con una soluzione SSC 2X, poi asciugata all'aria per circa 45 min. Il DNA trasferito è stato fissato mediante cottura in stufa a 80°C per circa 1 ora. Il filtro è stato poi incubato per 3h a 65°C in 25 mL di soluzione di pre-ibridazione (N-lauril sarcosina 0,1%, SDS 0,02%, SSC 5X); blocking reagent 0,5 % per evitare appaiamenti aspecifici DNA-sonda. Si è proceduto poi con l'ibridazione delle sonde ACP e ASP, precedentemente denaturate a 100°C per 5 min e raffreddate

immediatamente in ghiaccio per 1 min; le sonde sono state diluite nella soluzione di pre-ibridazione (5ng/cm² di membrane). Il filtro e la sonda sono stati incubati in agitazione a 65°C overnight, per consentirne l'ibridazione specifica. In seguito sono stati eseguiti lavaggi ad alta stringenza: 2 lavaggi da 25 mL in soluzione SSC 2X e SDS 0,1 % a 65 °C per 15 min e altri 2 lavaggi da 25 mL a 65°C per 30 min con una soluzione SSC 0,1X e SDS 0,1%. Il filtro è stato poi lavato in 50 mL di un tampone di lavaggio (Maleic Acid Buffer 1X [acido maleico 50 mM, NaCl 75 mM]; Tween 20, 0,3% [v/v]) per 5 min a temperatura ambiente ed è stato poi incubato in agitazione per 1 h in 50 mL di "Blocking solution" (Maleic Acid Buffer 1X, blocking reagent 1 % [w/v]). Alla soluzione è stato poi aggiunto l'anticorpo anti-digossigenina coniugato con la fosfatasi alcalina, prima centrifugato a 1300 rpm per 1 min e diluito 1:15000 nella "Blocking solution". Questo è stato fatto per permettere il rilevamento immunologico, mediante il quale i frammenti di DNA ibridati producono una reazione chemiluminescente che impressiona un lastra autoradiografica. Dopo incubazione in agitazione per 30 min a temperatura ambiente sono stati fatti due lavaggi di 15 min con il tampone di lavaggio per eliminare l'anticorpo in eccesso. Alla fine si è messo ad incubare il filtro per circa 5 min in 100 mL di tampone di rilevamento (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM), in cui è stato diluito 1:100 il CDP-Star (5 µL/cm² di membrana), substrato della reazione chemiluminescente. Il filtro è stato successivamente avvolto in una pellicola di cellophane trasparente, sono state tolte le bolle d'aria con della carta bagnata e si è messo ad incubare al buio per circa 10 min. La membrana è stata esposta sempre al buio ad una lastra autoradiografica per circa 4 ore, la quale è stata poi sviluppata mediante rapidi lavaggi di un paio di minuti in una soluzione di sviluppo e poi in una soluzione di fissaggio.

3.3 Analisi delle colonie trasformate per la presenza del trascritto

3.3.1 Induzione dell'espressione delle proteasi in *P. pastoris*

Le cellule trasformate di *P. pastoris*, prelevate da piastre di YPD sono state inoculate e fatte crescere in 5mL di soluzione BMGY (estratto di lievito 1%, peptone 2%, fosfato di potassio 100 mM pH 6.0, "Yeast Nitrogen Base" con ammonio solfato e senza amminoacidi (YNB) 1,34%, biotina 4 x 10⁻⁵%, glicerolo 1%) a 28°C in

agitazione (250 rpm). Questo terreno è utilizzato per il controllo del pH del mezzo colturale e per diminuire l'attività proteasica e generare biomassa.

Dopo 48 ore le cellule sono state centrifugate a 3000rpm per 5 min, il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 5 mL di BMMY (estratto di lievito 1%, peptone 2%, fosfato di potassio 100 mM pH 6.0, YNB 1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, metanolo 0,5%), contenente metanolo, al posto di glicerolo, per indurre l'espressione della proteina. Dopo aver risospeso il pellet in 5 mL di BMMY, le cellule sono state trasferite in beute contenenti 45mL di BMMY. Le colture di *P. pastoris* sono state incubate in agitazione (250 rpm) per 96 ore a circa 28°C, facendo attenzione a non superare i 30°C poiché questa temperatura potrebbe inibire l'espressione delle proteasi. Ogni 24 ore si sono indotte le colture di lievito con 0,25mL di metanolo al 100% in modo da mantenere nelle colture una concentrazione finale di 0,5%.

3.3.2 Estrazione RNA totale di *Pichia pastoris*

Le colonie di *P. pastoris* sono state allevate per 96 ore nel mezzo colturale BMMY. Dopo 3 giorni, sono stati prelevati 5 mL di questa coltura e al resto della coltura sono stati aggiunti altri 0,25 mL di metanolo. Al quarto giorno sono state recuperate le colonie di *P. pastoris* dal terreno liquido e la coltura è stata conservata in falcon da 50 mL a -20°C. Le estrazioni di RNA totale sono effettuate seguendo il protocollo per l'isolamento di RNA totale da *P. pastoris* dell'Invitrogen. Per l'estrazione si è partiti dai 5mL prelevati dalla coltura e si è centrifugato a 3500 rpm per 10 min a temperatura ambiente. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 400µL di Buffer AE (50mM acetato di sodio pH=5,3; 1mM EDTA). Successivamente sono stati aggiunti 40µL di SDS 10% e si è vortexato per qualche secondo e poi aggiunto un ugual volume (400-500µL) di fenolo, vortexato rapidamente e incubato a 65°C per 4 min in bagno termostato. In seguito si è proceduto con una incubazione a -80°C per 1 min per favorire la lisi della cellula. Trascorso il minuto l'eppendorf contenente questa miscela è stata centrifugata a massima velocità (13000 rpm) per 2 min a 4°C. Dopo la centrifuga la fase acquosa è stata trasferita in una nuova eppendorf e si è aggiunto un ugual volume di fenolo/cloroformio. Dopo aver vortexato velocemente e centrifugato a massima velocità per 2 min a 4°C, si è ottenuta una fase liquida, i surnatanti, che sono stati recuperati. A questi si sono aggiunti 40µL di sodio acetato 3M, pH=5,3 e 2,5 volumi di etanolo 100%. Successivamente il campione è stato di nuovo centrifugato a 13000 rpm per 15 min a 4°C, il pellet che si è formato sul fondo

dell'ependorf è stato lavato due volte con etanolo 80%, asciugato velocemente all'aria e risospeso in 40µL di H₂O Rnasi-Free.

3.3.3 Quantificazione RNA

Per verificare la concentrazione di RNA estratto si è fatta una prima analisi quantitativa mediante spettrometria. Un'aliquota di RNA estratto è stata prelevata e diluita 1:200 in H₂O Rnasi-free. I valori di assorbanza dei campioni sono stati letti allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm (assorbanza del RNA) in cuvette di quarzo. La quantità di RNA è calcolata in µg/mL. Per verificare la concentrazione di RNA totale è stata seguita la seguente formula:

$$[\text{RNA}] = A \cdot 40 \mu\text{g/mL} \cdot 200$$

A= assorbanza

200= fattore di diluizione.

Successivamente, i campioni di RNA sono stati separati su gel di agarosio 1%, dopo pretrattamento a 65°C per 10 min in bagnetto termos tato, ai quali è stato aggiunto precedentemente 0.1 µg di EtBr. Il gel è stato preparato sciogliendo l'agarosio in tampone TAE (0.8 mM Tris base, 0.4 mM acido acetico, 0.04 mM EDTA pH 8) sterilizzato tramite autoclavatura. La corsa è avvenuta a voltaggio costante per circa 15 min. La corsa elettroforetica ha permesso di ottenere una stima visiva dell'RNA estratto.

3.3.4 RT-PCR

La retrotrascrizione è stata eseguita per poter determinare se il gene di interesse è stato indotto e trascritto correttamente. La retrotrascrizione è avvenuta seguendo il protocollo ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega) che permette di retrotrascrivere l'RNA, dopo trattamento con DNasi in DNA complementare (cDNA). Inizialmente circa 500ng di RNA estratto è stato trattato con 1µl di DNasi (RNase-Free DNase, Promega) e 1 µl di buffer (DNase 10X Reaction Buffer) in una miscela di 10 µl per 30 minuti a 37°C. La reazione è stata bloccata con 1 µl di soluzione di stop (DNase Stop Solution) scaldando la soluzione a 70°C per 10 minuti. Per la retrotrascrizione sono stati utilizzati circa 500ng di oligo-dT. La miscela contenente RNA e primer reverse è stata trattata a 70°C per 5 min (per denaturare l'RNA e permettere l'appaiamento del primer); dopo 5 minuti di incubazione in ghiaccio si è preparato il campione per la reazione di retrotrascrizione aggiungendo 1X reaction

buffer, 1mM dNTPs, e in ultimo, 1 µl di enzima ImProm-II™ RT. Il protocollo prevede anche l'aggiunta di 1.8 mM MgCl₂ ma in questo caso non è stato addizionato poiché la quantità di MgCl₂ presente nel buffer DNase 10X Reaction Buffer è sufficiente per la mix di RT-PCR. La miscela di reazione era contenuta in un volume finale di 30µL.

Il ciclo è avvenuto alle seguenti condizioni:

- 25°C per 5 min (annealing)
- 42°C per 60 min (elongation)
- 70°C per 15 min

Il prodotto ottenuto dalla retrotrascrizione (cDNA) è stato utilizzato poi come stampo per successive reazioni di PCR.

Partendo da 5µL cDNA stampo (ottenuto con la retrotrascrizione) i geni *asp* e *acp* sono stati amplificati usando la Red Taq PCR Mastermix (Sigma) e i primers specifici per ciascun gene.

Primers specifici per ACP:

PACPF: 5'-ATGCA GAATTC GCCCCAGGTA CTGCCT-3'

SsACPRev 5'-TTA AAC ATA CTT GAC AGT AAC GG-3'

Lunghezza attesa dell'amplificato 705 pb

Primers specifici per ASP:

AsPnotF: 5'-ATGCA GCGGCCGC TCCTCTGTTACTGCTACTCCAG-

AsPxbaR: 5'-ATGCA TCTAGA TTAAGCGAAACCCAACTAGG-3'

Lunghezza attesa del frammento amplificato 954 pb

La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 50 µL contenente:

- 5 µL di cDNA
- 25 µL Red Taq PCR Mastermix (2X)
- 1 µL primer forward (100ng)
- 1 µL primer reverse (100ng)
- 18 µL H₂O

I cicli per l'amplificazione dei due geni sono riportati di seguito:

- 94°C per 1 min
 - 55°C per *acp* e 60°C per *asp*
 - 72°C per 1,5 min
- } 35 cicli

I prodotti di amplificazione sono stati separati elettroforeticamente su gel di agarosio 1%, per verificare l'avvenuta amplificazione.

3.4 Analisi delle colonie trasformate per verificare la presenza delle proteine

3.4.1 SDS-page del filtrato colturale

Le colonie trovate positive per la presenza dell'inserito del gene *acp* e *asp*, sono state analizzate con SDS-PAGE per vederne i profili proteici. 500 µL delle colture indotte sono stati centrifugati e a 10000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente e i surnatanti sono stati analizzati in gel di poliacrilamide (T=12%). A 20 µL di campione sono stati aggiunti altri 20 µL di Sample Buffer 1x (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, Blu di Bromofenolo 0,1%, glicerolo 10%, DTT 10 mg/ml), e dopo incubazione per 5 minuti a 95°C si è caricato su gel. Si quindi riempito la vaschetta di corsa con tampone di corsa 5X (15g/L di Tris-Base; 72g/L glicina e 5g/L SDS). Dopo 45 minuti, al termine della corsa, il gel è stato posto in una soluzione di fissaggio in lenta agitazione per un'ora. Passata l'ora il gel è stato prelevato e immerso in una soluzione di colorazione che contiene blu di Comassie e lasciato in lenta agitazione per circa due ore. Al termine della colorazione si è osservata la presenza/assenza delle bande che sono state confrontate con quelle del marker Low Range (Biorad).

3.4.2 Saggio di attività proteasica

Le colonie trovate positive per la presenza dell'inserito sono state saggiate anche per l'attività proteasica. 500µL di filtrati colturale delle colture indotte per 96h sono stati centrifugati a 10000 rpm per 5 min e i surnatanti recuperati sono stati analizzati per l'attività proteasica. È stata quindi preparata una soluzione di agarosio 0.8% che è stata distribuita in piastre Petri con diametro 90mm e lasciata solidificare. Una volta che il gel si è solidificato, a questo si sono aggiunti 2mL di emoglobina 1% a pH3 che è stata lasciata adsorbire per 30 minuti. Come controllo positivo dell'attività proteasica è stata utilizzata la pepsina 0,05% in tampone di glicina-HCl a pH3. Con una Pasteur di vetro si sono praticati dei fori del diametro di 6mm nel terreno contenuto nella piastra Petri, e con un fora tappi si sono praticati dei fori dal diametro di 1 cm. Per ogni piastra sono stati fatti 7 fori per i vari campioni da testare (i 5 campioni contenenti i geni di interesse, il wilde type P- e la pepsina come controllo

positivo). Nella piastra con i fori del diametro di 6mm sono stati caricati 25 μ L di campione e 10 μ L di pepsina, mentre nella piastra con i fori da 1 cm si sono caricati 50 μ L di campione e 15 μ L di pepsina; le piastre sono state poi incubate a 37°C per 2h. Al termine del periodo di incubazione le piastre sono state colorate con una soluzione di colorazione (1% Comassie brilliant blu R in 50% etanolo 12% TCA) per circa un'ora. Passata la fase di colorazione si è decolorato il gel di agarosio con una soluzione decolorante (30% etanolo, 7,5% acido acetico e 5% TCA). Il gel è rimasto in questa soluzione per circa 2h. L'attività delle proteasi dovrebbe visualizzarsi come un alone bianco intorno ai tondelli su sfondo blu. L'alone bianco corrisponde all'emoglobina digerita dalle proteasi.

4.RISULTATI

4.1 Verifica presenza dell'inserto

4.1.1 Verifica dell'inserzione del gene di interesse

I geni codificanti per le proteasi aspartica (ASP) ed acidica (ACP) sono stati isolati dal genoma di *S. minor* grazie all'utilizzo di primers disegnati in base alle sequenze dei geni SS1G_03181 e SS1G_07836 di *S. sclerotiorum* (il cui genoma è stato completamente sequenziato), ipotizzando un'alta omologia tra le due specie. Le colonie di *P. pastoris* trasformate con i vettori pPICZ α A contenenti rispettivamente i due geni codificanti le proteasi di interesse, sono state fatte crescere in 5-10 mL di terreno di coltura liquido YPD e messe in agitazione (250rpm) overnight a 28°C per la crescita. Dalle cellule è stato quindi estratto e quantificato il DNA genomico. Per valutare la dimensione delle bande ottenute è stato usato il marcatore di peso molecolare 1 Kb DNA Ladder (Fig.2 e Fig.3).

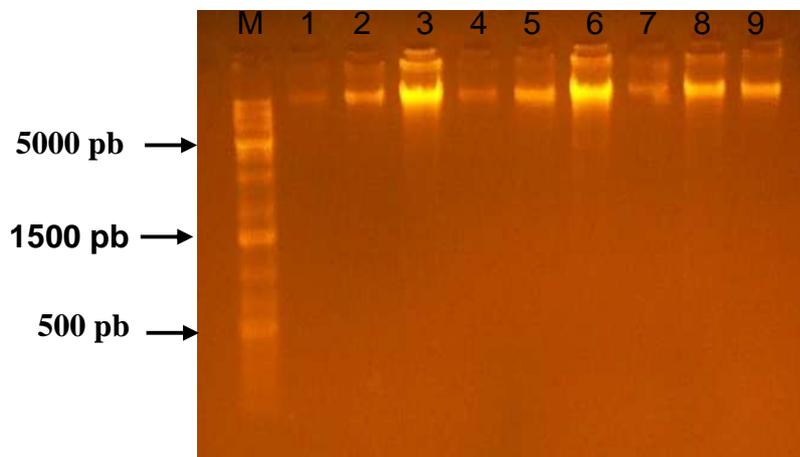


Figura 2- Elettroforesi su gel di agarosio 1% del DNA genomico estratto dalle colture trasformate di *P. pastoris*. **1:**ACP1; **2:** ACP5; **3:** ASP4; **4:** ASP7; **5:** ACP3; **6:**ACP2; **7:**ASP3; **8:**ASP6; **9:**ASP2; **M:** 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas)

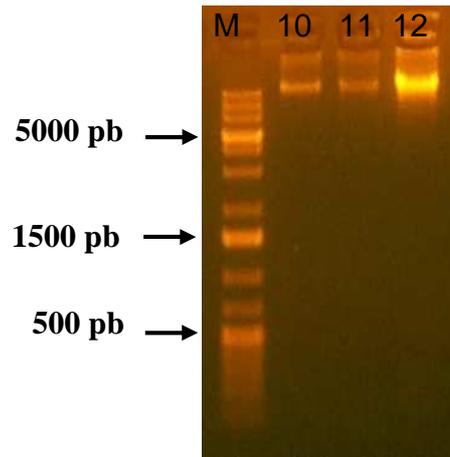


Figura 3- Elettroforesi su gel di agarosio 1% del DNA genomico estratto dalle colture trasformate di *P. pastoris*. **M:** 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas); **10:** ACP4; **11:** *Pichia* WT; **12:** *Pichia* WT proteasi - (P-).

4.1.2 Digestione del DNA genomico

I DNA genomici estratti sono stati trattati con un enzima di restrizione specifico, *Hind*III. Questo enzima è stato selezionato per digerire i DNA genomici poichè taglia all'esterno dei costrutti utilizzati per trasformare il lievito. La miscela è stata incubata a 37°C overnight e il giorno seguente l'avvenuta di gestione è stata accertata mediante corsa elettroforetica (Fig.4).

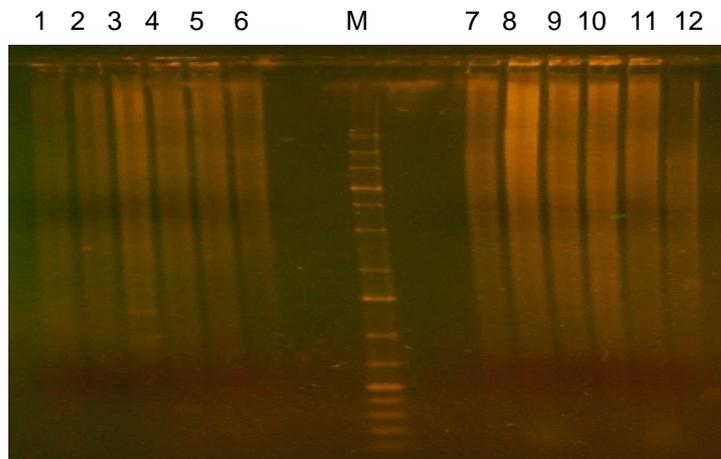


Figura 4- Elettroforesi su gel di agarosio 1% del risultato della digestione dei DNA genomici di *P. pastoris* con l'enzima *Hind* III. **M:** 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas); **1-5:** digestione delle colonie trasformate con gene *acp* (ACP1, ACP2, ACP3, ACP4, ACP5); **6:** *Pichia* WT (proteasi P-); **7-11:** digestione delle colonie trasformate con gene *asp* (ASP2, ASP3, ASP4, ASP6, ASP7); **12:** *Pichia* WT

4.1.3 Preparazione sonde per Southern blot

Per poter verificare mediante analisi Southern blot la presenza dell'inserto nel genoma delle colonie trasformate di lievito, si sono disegnati dei primers che amplificassero le sequenze complete dei geni *asp* e *acp*. In questo modo si sono prodotte mediante PCR delle sonde marcate con digossigenine specifiche per i due geni d'interesse. I prodotti PCR ottenuti sono stati separati in gel di agarosio 1% e le sonde sono state quindi purificate e quantificate. Per valutare dimensione e quantità delle bande ottenute è stato usato il marcatore di peso molecolare 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (Fig.5).

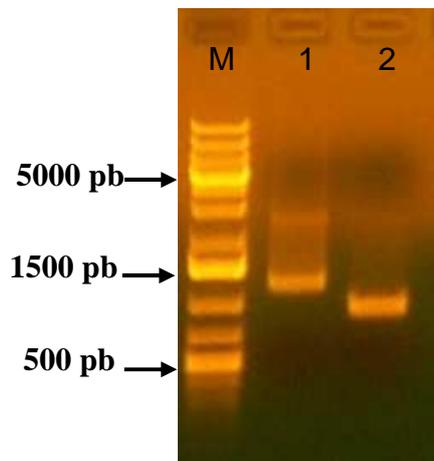


Figura 5- Elettroforesi su gel di agarosio delle sonde marcate *acp* e *asp* ottenute mediante PCR. **M:** 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas); **1:** prodotto di amplificazione della sonda *asp*; **2:** prodotto di amplificazione della sonda *acp*. Le sonde marcate contengono dei nucleotidi dUTP coniugati a digossigenina.

4.1.4 Analisi Southern Blot

Dopo estrazione e digestione dei DNA con *HindIII*, i campioni sono stati sottoposti all'analisi Southern. Questa tecnica di ibridazione in situ permette di verificare la presenza dei geni *asp* e *acp* e di individuare possibili integrazioni multiple. I filtri sono stati ibridati con due sonde differenti: una sonda specifica per la proteasi acidica e una sonda specifica per il gene che codifica l'aspartil proteasi. Il risultato ottenuto ha permesso di dimostrare che solo tre colonie trasformate con il gene *acp* e due colonie con il gene *asp* erano trasformate correttamente poiché presentavano un

segnale di ibridazione mentre gli altri campioni non presentavano l'inserto (Fig.6 e Fig.7). Inoltre un campione trasformato per *asp* (ASP3) mostrava un'inserzione multipla del costrutto (Fig.7).

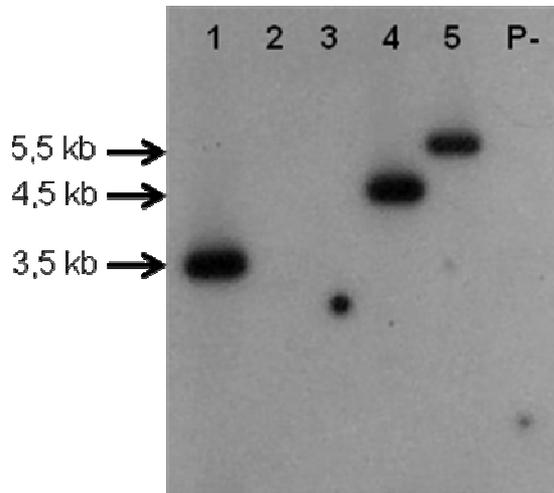


Figura 6- Filtri ibridati con la sonda ACP. Solo tre campioni sono risultati positivi per l'inserto: 1: ACP1
2: ACP2; 3: ACP3; 4: ACP4; 5: ACP5; 6: *Pichia P-*.

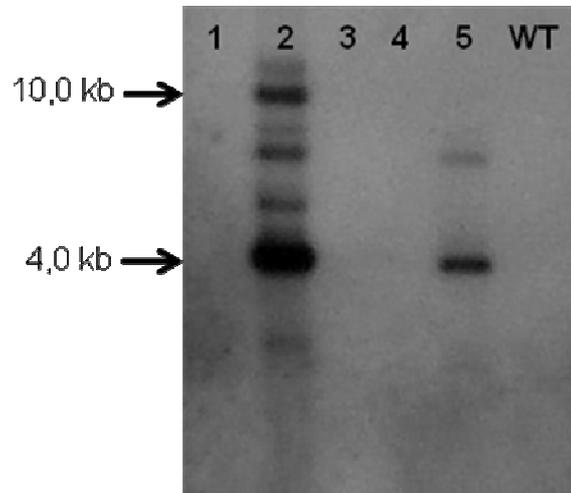


Figura 7- Filtri ibridati con la sonda ASP. Solo due campioni sono risultati positivi per l'inserto: 1:ASP2;
2: ASP3; 3:ASP4; 4:ASP6; 5: ASP7; 6: *Pichia WT*.

4.2 Verifica presenza del trascritto

4.2.1 Estrazione RNA

Per verificare la presenza del trascritto nelle colonie correttamente trasformate con i costrutti ACP o ASP, si è estratto l'RNA totale dalle colonie di *P. pastoris* indotte con metanolo 100% ogni 24h per 4 giorni. Dopo l'estrazione, l'RNA è stato fatto correre su gel di agarosio 1% in condizioni denaturanti per verificare la quantità e l'integrità dell'RNA totale (Fig. 8).

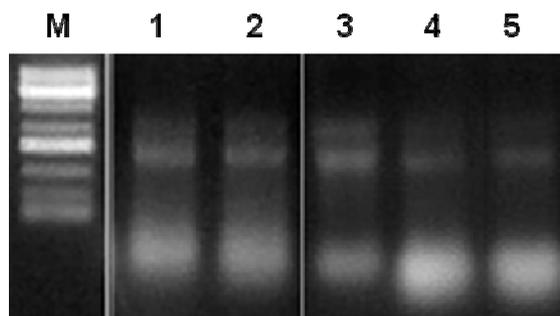


Figura 8- Elettroforesi su gel di agarosio 1% dell'estrazione di RNA da colonie di *P. pastoris*, dopo induzione con metanolo 100% a 96h. **M:** 1 kb DNA Ladder Plus; **1:** ASP3; **2:** ACP1; **3:** ACP5; **4:** ACP4; **5:** ASP7

4.2.2 RT-PCR

Dopo estrazione dell'RNA, si è proceduto con una reazione di RT-PCR per verificare se i geni di interesse fossero effettivamente trascritti nelle cellule indotte da metanolo. In una prima fase l'RNA è stato retrotrascritto utilizzando come oligonucleotide reverse un oligo-dT. Il cDNA così ottenuto è stato quindi utilizzato come stampo per amplificare i geni di interesse mediante l'uso di primers specifici. Per il gene *acp* si sono selezionati i primers specifici tenendo conto che si deve amplificare una porzione di gene senza il peptide segnale. Per l'amplificazione del gene *asp* si sono utilizzati primers specifici in grado di amplificare solo la regione del gene codificante la proteina matura. I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati analizzati su gel agarosio (Fig.9 e 10). Il risultato ottenuto ha permesso di confermare che tutte le colonie analizzate trascrivevano attivamente il gene codificante le proteasi di interesse.

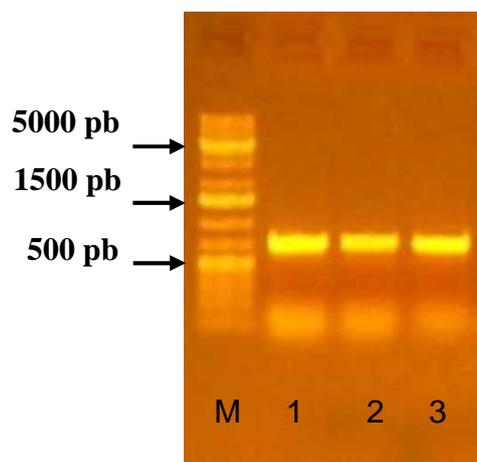


Figura 9- Elettroforesi su gel di agarosio 1% dei prodotti RT- PCR delle colonie di *P. pastoris* trasformate con il gene *acp*. **M:** 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas); **1:** ACP1; **2:** ACP4; **3:** ACP5.

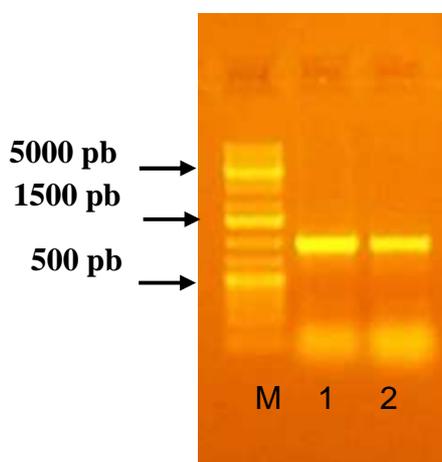


Figura 10- Elettroforesi su gel di agarosio 1% dei prodotti RT- PCR delle colonie di *P. pastoris* trasformate con il gene *asp*. **M:** 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas); **1:** ASP3; **2:** ASP7.

4.2.3 SDS-PAGE

Le due colonie di *P. pastoris* trasformate correttamente con il gene *asp* e le tre trasformate con *acp*, risultate inoltre in grado di trascrivere il gene di interesse, sono state fatte crescere in terreno liquido con aggiunta di metanolo ogni 24 ore allo scopo di indurre l'espressione delle proteasi eterologhe. Il profilo proteico dei filtrati colturali delle colonie di *P. pastoris* trasformate, è stato quindi confrontato con il profilo delle colonie non trasformate, anch'esse sottoposte ad induzione con metanolo (Fig.11).

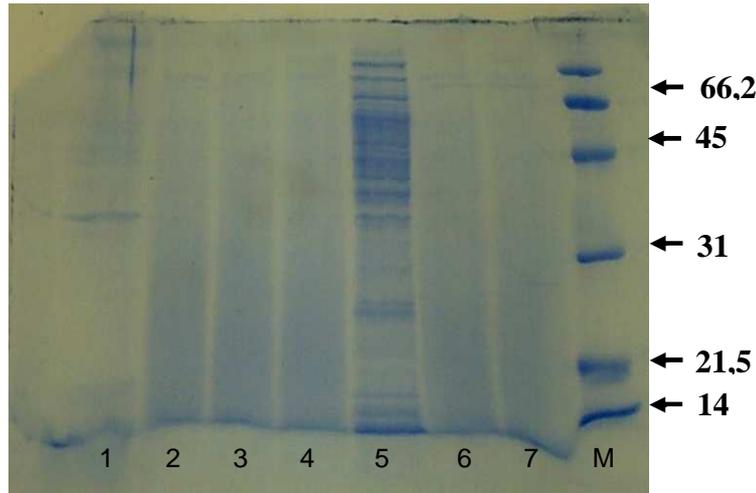


Figura 11 – Profili elettroforetici ottenuti mediante SDS-PAGE di aliquote dei filtrati colturali di colonie di *P. pastoris* trasformate con *acp* ed *asp* e sottoposte ad induzione con metanolo. **M**: marker Low Range (Biorad), **1**: colonia WT non trasformata (*Pi* -); **2-3-4**: colonie ACP1-ACP4-ACP5 trasformate con il gene *acp*; **5**: colonia WT non trasformata; **6-7**: colonie ASP3-ASP7 trasformate con il gene *asp*.

Dai profili proteici ottenuti non è stato possibile individuare le bande proteiche attese di 25 kDa per la proteasi acidica, e 34 kDa per la proteasi aspartica.

4.2.4 Saggio di attività proteasica

Per valutare l'espressione delle due proteasi è stata inoltre saggiata l'attività proteasica dei filtrati colturali che risultavano positivi per l'inserzione del gene d'interesse dopo 96 ore d'induzione con metanolo. L'attività proteasica è stata saggiata su emoglobina 1% utilizzata come substrato. Dopo due ore di incubazione a 37°C e dopo aver trattato il gel con soluzioni di colorazione e di decolorazione che permettono di rilevare l'attività proteasica, si è notato che solo la pepsina utilizzata come proteasi di controllo è riuscita a degradare l'emoglobina mentre tutte le colonie trasformate di *P. pastoris*, che risultavano positive per l'inserto e il trascritto non hanno mostrato attività proteasica (Fig.12).

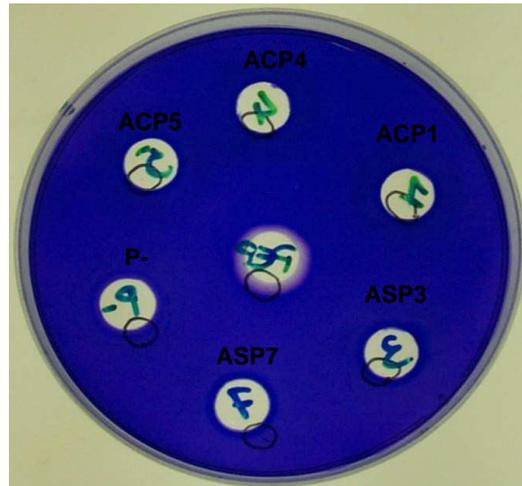


Figura 12 – Saggio dell'attività proteasica delle colonie trasformate di *P. pastoris* mediante CUP-PLATE con emoglobina1%. Solamente la pepsina mostra attività proteasica, in quanto è presente un alone bianco attorno al tondello e questo sta a significare che l'emoglobina è stata degradata.

5. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Diversi lavori (Poussereau et al., 2001; Rao et al., 1998) hanno dimostrato il coinvolgimento di numerosi enzimi proteolitici fungini durante il processo infettivo nella degradazione dei componenti strutturali della parete, nell'ottenimento di sostanze azotate dalle proteine (Rao et al., 1998) e nella rimozione delle proteine PR con azione antifungina (Girbau et al., 2004), solitamente resistenti a degradazione proteolitica (Ferreira et al., 2007). Le proteine PR sono un insieme di polipeptidi con ruolo difensivo la cui sintesi è indotta nelle piante in risposta all'attacco di patogeni. *S. minor* ha mostrato una maggiore capacità, rispetto ad altri funghi analizzati quali *S. sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*, di rimuovere le proteine PR. L'attività proteasica di questo fungo è ascrivibile in particolare a due proteasi, una acidica (ACP) e una aspartica (ASP). Per poter caratterizzare più a fondo queste due proteine, si sono isolati i rispettivi geni codificanti *acp* e *asp* da *S. minor* e si è esplorata la possibilità di ottenere maggiori quantità di questi enzimi mediante espressione in un sistema eterologo, il lievito *Pichia pastoris*. Questo tentativo ha portato a risultati soddisfacenti per quanto riguarda l'efficienza della trasformazione tramite elettroporazione ma non per quanto concerne l'induzione dell'espressione delle proteasi esogene. Alcune colonie di *P. pastoris*, indotte con metanolo sono risultate infatti positive per la presenza del trascritto. Tuttavia i profili proteici ottenuti mediante SDS-PAGE dei filtrati colturali di queste colonie hanno dato risultati negativi, infatti non è stato possibile identificare nel secretoma di *P. pastoris* le bande che si attendevano attorno ai 26 e 34 KDa corrispondenti rispettivamente a ACP e ASP. A questo punto si è fatta un'ulteriore analisi per cercare di capire se nel filtrato colturale vi fosse una certa attività proteasica, anche se pur lieve. Si è quindi saggiata l'attività proteasica delle colonie trasformate su emoglobina ma non si hanno avuto esiti positivi. Questo risultato può essere attribuito a molti fattori: in primo luogo la ridotta espressione dell'attività proteasica potrebbe dipendere da un insufficiente apporto di metanolo o dalla possibile degradazione delle proteasi esogene da parte di proteasi endogene di *P. pastoris*. Tuttavia questo fenomeno dovrebbe essere limitato poiché per la trasformazione si è utilizzato un ceppo di *P. pastoris* "protease-deficient" (SMD1168), creato appositamente per ridurre i rischi di degradazione proteica. Altri fattori esterni potrebbero aver influito negativamente: ad

esempio la temperatura, il pH e la composizione del mezzo colturale. Questi fattori possono influenzare i processi di folding proteico e degradativi delle proteine eterologhe durante la fase di crescita del lievito. Un'ulteriore causa che potrebbe spiegare la mancata attività proteasica è la glicosilazione, una modificazione post-traduzionale che consiste nell'aggiungere zuccheri alla catena peptidica. *P. pastoris* è infatti in grado di eseguire tale tipo di modificazioni post-traduzionali. Questo tipo di modificazione potrebbe causare un cambiamento conformazionale della molecola tale da alterare o ridurre l'attività. In conclusione, i dati ottenuti nella presente tesi dimostrano che le due proteasi di *S. minor*, appartenenti alla famiglia delle aspartil proteasi e alla famiglia delle proteasi acidiche, clonate in un sistema eterologo come *P. pastoris* nonostante i loro geni siano correttamente trascritti non sembrano essere tradotte in quantità apprezzabili o secrete sotto forma di proteina matura foldata correttamente. Uno studio (Vallejo et al., 2008) condotto su una proteasi aspartica ha infatti dimostrato che solamente le colonie trasformate di *P. pastoris* contenente la sequenza del gene della pro-proteina secernono proteine nella forma attiva nel surnatante colturale, mentre le colonie che contenevano la proteina matura non mostravano attività proteasica. Inoltre non si può dire con certezza che non vi sia attività proteasica in quanto in questa tesi si sono analizzate solamente le proteine extracellulari presenti nel surnatante. Questo risultato può essere un punto di partenza per ulteriori analisi per verificare se la mancata attività proteasica è data da una localizzazione errata della proteina poiché potrebbe essere espressa all'interno della cellula.

6. BIBLIOGRAFIA

- Cereghino Joan Lin, James M. Cregg, 1999. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Picchia pastoris*. *Microbiology Reviews*, 24: 45-66.
- Ferreira R. B., Monteiro S., Freitas R., Santos C. N., Chen Z., Batista L. M., Duarte J., Broges A., Teixeira A. R. 2007. The role of plant proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 8: 1-24.
- Gente S., Durand Poussereau N., Fevre M. 1997. Controls of the expression of *aspA* protease gene from *Penicillium roqueforti*. *Molecular and General Genetics*, 256: 557-565.
- Girbau T., Stummer B. E., Pocock K. F., Baldock G. A., Scott E. S., Waters E. J. 2004. The effect of *Uncinula necator* (powdery mildew) and *Botrytis cinerea* infection of grapes on the levels of haze-forming pathogenesis-related proteins in grape juice and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10: 125-133.
- Hegedus DD, Rimmer SR, 2005. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “ to be or not to be” a pathogen?. *FEMS Microbiology Letters*, 251: 177-184.
- Jarvis M. R. 1977. Botryotina and Botrytis species: taxonomy, physiology and pathogenicity. *Monogr Res Branch Can Dept Agric* 15.
- Manteau S., Abouna S., Lambert B., Legendre L. 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Microbiology Ecology*, 43: 359-366.
- Movahedi S., Heale J.B. 1990. The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host

tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36: 303-324.

- Poussereau N., Creton S., Billion-Grand G., Rascle C., Fevre M. 2001a. Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiology*, 147: 717-726.

- Poussereau N., Gente S., Rascle C., Billion-Grand G., Fevre M. 2001b. *aspS* encoding an unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis. *Microbiology Letters*, 194: 27-32.

- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62: 597-635.

- ten Have A., Dekkers E., Kay J., Phylip L. H., van Kan J. A. L. 2004. An aspartic proteinase family in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* contains members with novel features. *Microbiology*, 150: 2475-2489.

- ten Have A., Espino J. J., Dekkers E., Van Sluyter S. C., Brito N., Kay J., González C., van Kan J. A. L. 2009. The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 53–65.

- Vallejo J. A., Ageitos J. M., Poza M., Villa T. G. 2008. Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin in *Pichia pastoris*. *Journal of Agriculture and food chemistry*, 22: 10606-10610.

- van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 135-162.

- Xia Y. 2004. Proteases in pathogenesis and plant defence. *Cellular Microbiology*, 6: 905–913.

- Yajima W., Kav N.N. 2006. The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proteomics* 6: 5995-6007.