



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.**  
Laurea di primo livello in **Biologia Molecolare**

**ELABORATO DI LAUREA**

**SUPEROSSIDO DISMUTASI A RAME E ZINCO DI  
*PAGETOPSIS MACROPTERUS*:  
CARATTERIZZAZIONE DELLA SEQUENZA  
CODIFICANTE DEL cDNA**

**Tutor : Dott. Gianfranco SANTOVITO**  
Dipartimento di Biologia

**Laureando: Nicola Busatto**

**ANNO ACCADEMICO 2005-2006**

# INDICE

## **1 INTRODUZIONE**

1.1 Le superossido dismutasi.....pag	3
1.2 La Cu,Zn-SOD.....pag	3
1.3 Evoluzione della SOD.....pag	4
1.4 L'Antartide.....pag	5

## **2 MATERIALI E METODI**

2.1 Organismo utilizzato.....pag	7
2.2 Estrazione di RNA totale da tessuto.....pag	7
2.3 Purificazione mRNA totale.....pag	8
2.4 Progettazione <i>primer</i> .....pag	9
2.5 Retrotrascrizione.....pag	10
2.6 Amplificazione del cDNA.....pag	10
2.7 Elettroforesi di controllo.....pag	11
2.8 Sequenziamento.....pag	12
2.9 Allineamento ed analisi filogenetica.....pag	12

## **3 RISULTATI E DISCUSSIONE**

3.1 Risultati dell'amplificazione e del sequenziamento del cDNA.....pag	13
3.2 Allineamento delle sequenze.....pag	14
3.3 Analisi e ricostruzione filogenetica.....pag	19
3.4 Conclusioni.....pag	21
Bibliografia.....pag	23

## **Abstract**

La presente tesi si colloca nell'ambito di un progetto volto a studiare l'evoluzione molecolare dell'enzima superossido dismutasi a rame e zinco nei teleostei antartici.

Precedenti ricerche condotte nei nostri laboratori, hanno permesso di ottenere numerose altre sequenze, relative alla superossido dismutasi a rame e zinco, in varie specie di *Notothenioidei* diffusi nel Mare di Ross, sia di cDNA completi che di parte di essi (codificanti, estremità 5' ed estremità 3') (Santovito et al., 2006).

In questa tesi è presentata l'attività di ricerca che ha avuto come risultato l'amplificazione e il sequenziamento della regione codificante del cDNA di *Pagetopsis macropterus*.

Tale sequenza è stata confrontata con quella di altri teleostei, sia antartici che non antartici, verificando il grado di conservazione di questo enzima, ricercando nuove conferme sull'andamento irregolare dell'evoluzione della superossido dismutasi a rame e zinco e proponendo un'analisi filogenetica che si inserisce in un più vasto studio riguardante la storia evolutiva dei teleostei che popolano l'Oceano Australe.

## 1 INTRODUZIONE

### 1.1 Le superossido dismutasi

Le superossido dismutasi (SOD) costituiscono una classe di metalloproteine ubiquitarie ad azione antiossidante, utilizzata dagli organismi aerobi come sistema di difesa contro la tossicità derivante dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS, come appunto lo ione superossido, vengono prodotti durante l'irraggiamento o come collaterali del metabolismo aerobico e sono in grado di danneggiare le macromolecole cellulari come acidi nucleici, carboidrati, lipidi e proteine.

Il meccanismo di difesa attuato dalle superossido dismutasi consiste nella catalizzazione della dismutazione dello ione superossido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) in ossigeno molecolare e acqua ossigenata.

Sono noti quattro tipi di SOD identificabili in base agli ioni presenti nel loro sito attivo e alla loro distribuzione negli organismi: la Cu,Zn-SOD presente principalmente nella frazione citosolica delle cellule eucariotiche, la Fe-SOD che si trova nei procarioti e in poche specie di eucarioti, la Mn-SOD associata ai mitocondri e ad alcuni procarioti e la NiSOD (Nakano et al., 1995)

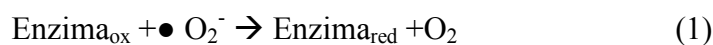
### 1.2 La Cu,Zn-SOD

La Cu,Zn superossido dismutasi, localizzata nel citosol, nei perossisomi, nei lisosomi, nel nucleo e nello spazio intermembranale del mitocondrio, è presente in forma di enzima omodimerico di circa 32 KDa contenente in ogni subunità un atomo di  $\text{Cu}^{2+}$  e uno di  $\text{Zn}^{2+}$ . È stata anche rilevata, in eucarioti superiori, una superossido dismutasi extracellulare (EC-SOD) contenente rame e zinco in forma di tetramero. Ogni subunità è organizzata in una struttura a barile appiattito formato da otto foglietti  $\beta$  antiparalleli uniti da 7 loop, con topologia a chiave greca (Bordo et al., 1999). Lo ione Cu è coordinato alla superficie del barile attraverso gli anelli imidazolici di quattro istidine (His 47, His 49, His 64, His 121), l'atomo di Zn è invece legato alla struttura a barile grazie a tre istidine (His 64, His 72, His 81) e ad un residuo di acido aspartico (Asp 84) (Santovito et al., 2006). La numerazione dei residui aminoacidici fa riferimento a quella di *T.bernacchi*.

Fig.1 Struttura tridimensionale della Cu,Zn SOD in forma omodimerica.



La reazione catalizzata dalla Cu,Zn SOD è una dismutazione che segue una cinetica di secondo ordine (Brunori e Rotilio, 1984):



Durante la reazione catalitica della Cu,Zn SOD lo ione  $\text{Cu}^{2+}$  è ciclicamente ridotto ed ossidato durante successive interazioni con il substrato superossido nel sito attivo. In una prima fase, un elettrone dallo ione superossido radicalico viene donato al centro catalitico con formazione di ossigeno molecolare e  $\text{Cu}^+$  che, a sua volta, dona un elettrone ad un secondo ione superossido che unendosi a due protoni, genera perossido di idrogeno (Bordo et al., 1994).

Apparentemente l'enzima reagisce con lo ione superossido con un meccanismo che prevede l'utilizzo solo di metà sito catalitico, nel quale l'attività di dismutazione è svolta principalmente dall'atomo di  $\text{Cu}^{2+}$ ; la rimozione dell'atomo di  $\text{Zn}^{2+}$  però diminuisce il potenziale redox del  $\text{Cu}^{2+}$  riducendo le capacità catalitiche dell'enzima. Lo ione di  $\text{Zn}^{2+}$  inoltre sembra sia stato incorporato nell'enzima con lo scopo di aumentare la stabilità del sito attivo.

In tutti i tipi di SOD le velocità delle reazioni (1) e (2) sono uguali. La Cu,Zn SOD estratta da eritrociti bovini, si differenzia dalle altre SOD poiché la sua attività è maggiormente indipendente dalle variazioni di pH, rispetto a quelle contenenti  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  la cui massima attività si riscontra tra pH 6 e 8.

Analisi condotte basandosi sulla struttura tridimensionale della Cu,Zn SOD bovina, allineata con altre diciannove sequenze omologhe, identificano un numero di residui invariati che hanno un rilevante ruolo strutturale o funzionale all'interno dell'enzima.

### 1.3 Evoluzione della SOD

Si ritiene che l'apparizione della SOD fu contemporanea alla proliferazione degli organismi fotosintetici, i quali cominciarono a produrre ossigeno circa due miliardi di anni fa. La varietà di enzimi antiossidanti evolse per neutralizzare gli effetti tossici dei sottoprodotti derivanti dall'utilizzo di ossigeno.

Lo studio delle omologie strutturali e delle sequenze aminoacidiche ha permesso di determinare l'esistenza di due principali famiglie di superossido dismutasi apparse nei procarioti nel medesimo periodo: le SODs contenenti Cu,Zn e quelle contenenti Fe, Mn o Ni. Nonostante entrambe le classi svolgano la stessa funzione, le grandi differenze tra le strutture cristalline, la presenza di diversi cofattori metallici e i diversi meccanismi catalitici rendono difficile ipotizzare un antenato comune.

La ricostruzione della storia evolutiva della Cu,Zn SOD, ricavata da allineamenti multipli di sequenze mostra come la SOD extracellulare si sia diversificata da quella citoplasmatica nei primi stadi dell'evoluzione, prima della differenziazione di funghi, piante e metazoi.

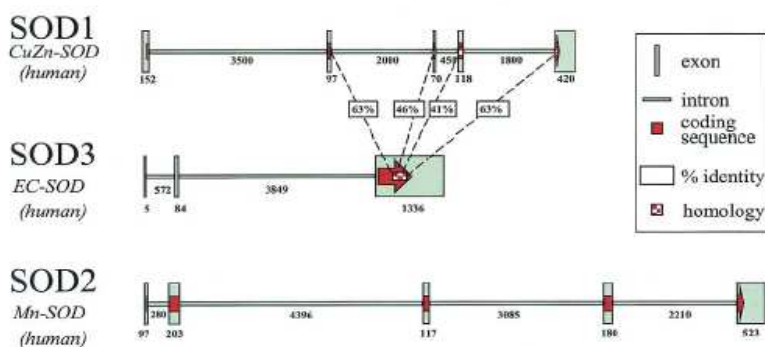


Fig.2 Organizzazione genomica di tre membri conosciuti della famiglia delle superossido dismutasi. SOD1 e SOD3 presentano omologie nella sequenza aminoacidica. SOD2 non presenta significative similarità con le altre due.

La sequenza genomica per la Cu,Zn SOD è stata identificata in *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*. L'organizzazione genomica del gene per la SOD mostra forti similarità tra le specie analizzate ed è caratterizzata da cinque esoni e quattro introni. La TATA box e la CCAAT box, oltre ad alcune regioni ricche in GC altamente conservate, sono localizzate in tutte e tre le specie con un pattern simile in prossimità delle regione promotoriali. Ciò suggerisce che intense pressioni evolutive abbiano preservato le regioni regolatorie chiave per questo gene (Zelko et al., 2002)

Secondo alcune ipotesi la Cu,Zn SOD si sarebbe evoluta implicando una duplicazione genica e l'aggiunta degli esoni I e III, inoltre la velocità con cui questa evoluzione avrebbe avuto luogo non sarebbe rimasta costante durante l'ultimo miliardo di anni, contrastando con la teoria dell'orologio molecolare. Infatti, mentre la Mn SOD è mutata in modo costante nel tempo, la Cu,Zn si è evoluta molto lentamente all'inizio e più rapidamente negli ultimi 100 milioni di anni. Una possibile spiegazione di questo fenomeno potrebbe essere ricercato nell'accumulo di cambiamenti deleteri nella sequenza aminoacidica che avrebbero causato un rallentamento del processo evolutivo, l'accumulo di mutazioni silenti avrebbe infine permesso l'uscita da questa situazione di stallo e un ritorno ad un processo evolutivo più rapido.

#### 1.4 L' Antartide

L'isolamento dell'Antartide e dell'Oceano Australe che lo circonda, dagli altri ecosistemi del pianeta rendono questo continente un luogo ideale per studi di evoluzione molecolare in quanto presenta numerosi endemismi caratterizzati da adattamenti alle estreme condizioni climatiche che contraddistinguono il luogo e da un elevato livello di biodiversità.

Limitato dal Continente Antartico a sud e dalla Convergenza Antartica a nord, l'Oceano Australe è stato considerato per lungo tempo come uno dei più grandi ecosistemi marini della terra. La Convergenza Antartica è la più intensa di una serie di flussi che scorrono verso est della Corrente Antartica Circumpolare (ACC). E' avvertibile come un cambiamento di temperatura in superficie ed è rilevabile anche a profondità superiori ai 1000m. La Convergenza Antartica dunque funge da barriera per lo scambio d'acqua tra nord e sud, generando una discontinuità biogeografia. Con l'esclusione di poche specie di mammiferi e uccelli marini, pochi taxa epipelagici o bentonici sono distribuiti sia all'interno che all'esterno dell'Oceano Australe.

Questa dunque la causa dell'alto grado di endemismi presenti in questa regione che si riscontrano nella fauna ittica e tra gli invertebrati e che sono tra l'altro indice di un lungo periodo di evoluzione in relativo isolamento.

La nascita dell'ACC è relativa alla frammentazione del supercontinente Gondwana e, in particolare, alla separazione dell'Australia dall'Antartide, e dell'America del Sud dalla Penisola Antartica, circa 22-25 milioni di anni fa con l'apertura del Passaggio di Drake. Recenti studi molecolari hanno proposto che proprio l'insorgenza dell'ACC sia stata la causa scatenante che ha portato alla speciazione di numerosi taxa marini (Clarke et al., 2005).

Dei numerosi gruppi di teleostei, solo i *Notothenioidei* riuscirono ad adattarsi ai cambiamenti delle condizioni ambientali quali il drastico abbassamento della temperatura, la presenza di ghiaccio marino e la riduzione dell'habitat.

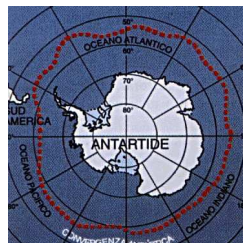


Fig.3 Immagine del Continente Antartico in cui è evidenziata la Convergenza Antartica.

Gli organismi antartici hanno dunque dovuto far fronte ad un ambiente in cui la temperatura è inferiore al punto di congelamento dei fluidi corporei sviluppando specializzazioni fisiologiche e biochimiche. Sette delle otto famiglie del sottordine dei *Notothenioidei* sono a sangue rosso e per resistere alle difficili condizioni hanno ridotto la quantità di eritrociti e di emoglobina (Hb) nel sangue, sostanze che favoriscono l'aumento della viscosità di quest'ultimo, contrastando in questo modo il rischio di congelamento (Di Prisco et al., 2000)

Inoltre le costanti condizioni fisico-chimiche dell'habitat hanno ridimensionato l'utilità di diversi tipi di emoglobine. Questa tendenza ha portato in un'altra famiglia, quella dei *Channichthyidae* (*icefish*) alla perdita del gene che codifica l'Hb, rendendoli così l'unico esempio di vertebrati adulti incapaci di sintetizzare emoglobina (Verde et al., 2006).

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Organismo utilizzato

La specie utilizzata è stata quella del teleosteo antartico *Pagetopsis macropterus*, della quale è stato prelevato un esemplare a Baia Terra Nova e la cui milza è stata inviata in Italia previo congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante la XVII spedizione italiana in Antartide (2001-2002).

*Pagetopsis Macropterus* appartiene alla classe degli *Actinopterygi*, ordine *Perciformes*, famiglia *Channichthyidae* e genere *Pagetopsis*, vive tra i  $60^{\circ}$  e i  $78^{\circ}$  di latitudine sud nell' Oceano Australe a profondità comprese tra i 5 e 655 m. Spesso però preferisce restare circa un metro sotto la superficie dell'acqua adagiato sulla sommità di spugne come la *Tetilla leptoderma*, dove probabilmente si avvantaggia del passaggio delle prede, come altri pesci o crostacei, di cui si nutre.

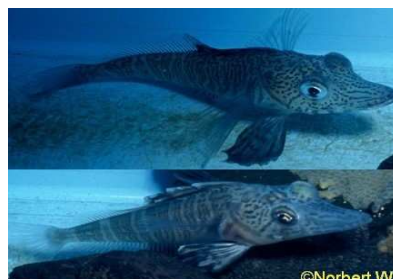


Fig.4 Alcune immagini del teleosteo antartico *Pagetopsis macropterus*

Il colore generalmente è oliva pallido con striature scure lungo il corpo, la cui forma e tonalità permettono di individuare l'età dell'individuo. Le dimensioni conosciute variano, a seconda dell'età e del sesso, da 12 a 260 mm (Miller, 1993). Una delle caratteristiche morfologiche più notevoli e che lo rendono riconoscibile consiste nelle pinne molto prominenti (specie quella dorsale) e raggiate che sono ancora più evidenti negli esemplari giovani. Proprio da questa particolarità ha origine il suo nome, infatti in greco *macropterus* significa dalla grande ala, in relazione proprio alla pinna dorsale.

### 2.2 Estrazione di RNA totale da tessuto.

Il campione di milza, prelevato dal *Pagetopsis macropterus*, è stato omogenato per mezzo di un'azione meccanica (uso di un pestello) in presenza di 1ml di *TRIzol* contenete guanidina isotiocianato, che è in grado di lisare le cellule del tessuto, e fenolo, che è necessario per l'estrazione dell'RNA con il metodo del fenolo-cloroformio.



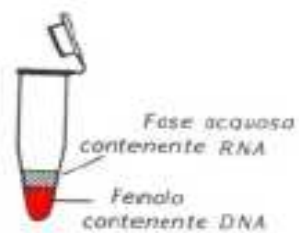


Fig.5 Separazione del DNA e dell'RNA totale attraverso il metodo del fenolo-cloroformio

All'omogenato si aggiungono 0,2 ml di cloroformio per ogni ml di sospensione e si procede ad una centrifugazione a 11600 rcf in stanza fredda per 15 minuti. Dopo la centrifugazione si evidenziano tre fasi: quella trasparente, acquosa nella parte più alta dell'*epENDORF* contenete l'RNA, una contenente il fenolo in cui sono presenti i residui generati dalla lisi cellulare (proteine, lipidi, frammenti di organelli e della membrana cellulare) ed un pellet formato dal DNA. Trasferita la fase acquosa contenente l'RNA totale in una nuova *epENDORF* si procede con l'aggiunta di 0,5 ml di alcool isopropilico che causa la precipitazione dell'RNA. Dopo una centrifugazione a 11600 rcf si provvede ad eliminare l'alcool isopropilico e si effettua un lavaggio con etanolo 75%. Una nuova breve centrifugazione a 7400 rcf permetterà la sedimentazione dell'RNA sul fondo della provetta. L'eliminazione dell'etanolo, utilizzato per il lavaggio, verrà effettuata semplicemente tramite evaporazione, lasciando l'*epENDORF* aperta sotto cappa sterile. Il pellet ottenuto verrà risospeso infine in acqua RNase free.

Affinché queste operazioni vengano effettuate con successo è fondamentale che tutta la vetreria, i puntali, l'acqua utilizzata sia per la risospensione che per la preparazione dei reagenti, ottenuti per diluizione di sostanze madri, e quant'altro debba venire a contatto con l'RNA siano stati sottoposti a trattamento DEPC. Il di-etil-pirocarbonato (DEPC) è un composto chimico in grado di prevenire la degradazione dell'RNA ad opera delle RNasi.

La quantificazione dell'RNA estratto viene effettuata misurando, grazie all'utilizzo di uno spettrofotometro, l'assorbanza a 260nm; il rapporto tra l'assorbanza a 260nm e a 280nm fornisce un indice della purezza dell'RNA e della presenza di eventuali contaminanti quali DNA o proteine.

### 2.3 Purificazione mRNA da RNA totale.

La separazione del mRNA dall'RNA totale è stata effettuata utilizzando il kit *NucleoTrap mRNA*.

Molte delle molecole di mRNA eucariotiche contengono sequenze relativamente lunghe (fino a 200 residui) di poli(A) all'estremità 3' e questa caratteristica ci permette di isolarle dalla restante frazione di RNA totale. Il kit *NucleoTrap* contiene delle sferette di lattice alle quali sono legati covalentemente dei residui di oligo(dT). In condizioni di alta salinità le molecole di mRNA andranno ad ibridare attraverso le loro sequenze poli(A) con gli oligo(dT), legandosi così alle perline.

L'ibrido A-(dT) risultante può essere destabilizzato in presenza di bassa forza ionica, permettendo così l'eluizione dell' poli(A) mRNA con acqua RNasi-free.



Fig.6 Colonnine per purificazione dell'mRNA, presenti nel kit *NucleoTrap mRNA*.

Le fasi di ligazione, lavaggio, ed eluizione dell'mRNA vengono effettuate in una colonnina, fornita con il kit, dotata di filtro, inserita in una *ependorf* che ci permetterà di raccogliere alla fine del procedimento l'RNA messaggero.

## 2.4 Progettazione *primer*

I *primer* utilizzati per l'amplificazione del cDNA di *Pagetopsis macropterus*, non sono stati realizzati in modo esclusivo per questa specie e dunque sono stati progettati basandosi sulle regioni più conservate del gene della Cu,Zn SOD, permettendone così l'utilizzo su un numero di specie il più ampio possibile. Queste regioni sono state ricavate dai risultati di allineamenti effettuati tra diversi teleostei con il programma *LALIGN*, dal risultato dei quali sono state eliminate le regioni di mis-appaiamento. Il tool bioinformatico utilizzato per la costruzione dei *primer* è *PRIMER 3*, che a partire dalle sequenze conservate, preparate in precedenza, ha identificato gli oligonucleotidi che più si avvicinavano alle specifiche richieste come temperatura di *annealing*, percentuale di coppie G-C e lunghezza.

I *primer* in questione sono stati realizzati partendo dalla sequenza completa del teleosteo antartico *Trematomus bernacchii*.

Nome del <i>primer</i>	Sequenza
SOD FW1	5'-TTGGGCGTCCTTTGAAACTA-3'
SOD RE1	5'-GGATGGGACAAGGTTAAGCA-3'

Tab.1 Nomi e relative sequenze dei *primer* utilizzati.

## 2.5 Retrotrascrizione

Ottenuto l'mRNA dal tessuto della milza di *Pagetopsis macropterus*, è iniziata la fase di sintesi della prima elica del cDNA effettuata attraverso la trascrizione inversa del messaggero.

In una *ependorf thin walled* è stata preparata la seguente mix di reazione (mix1):

- 6,1 µl H<sub>2</sub>O DEPC
- 4,0 µl *Improm II 5X buffer*
- 2,4 µl MgCl<sub>2</sub> 25mM
- 1,0 µl dNTP mix 10mM
- 0,5 µl *Rnasin*

In un'altra *ependorf* è stata preparata una seconda mix di reazione (mix2):

- 4,0 µl mRNA
- 1,0 µl oligo(dT) *primer*

La mix2 è stata incubata per 5' a +70°C e successivamente per 4' a +4 °C

A questo punto la mix2 è stata unita alla mix1 ed è stato aggiunto come ultimo reagente 1,0 µl di *Improm II RT*, l'enzima che opererà la retrotrascrizione.

Il termociclatore è stato programmato con le seguenti modalità:

- 25°C per 5'
- 42°C per 60'
- 70°C per 15'

## 2.6 Amplificazione del cDNA

Un potente metodo per amplificare particolari segmenti di DNA è rappresentato dalla reazione di polimerizzazione a catena o PCR (*polymerase chain reaction*), realizzata *in vitro*. La PCR utilizza l'enzima DNA polimerasi che catalizza la reazione di sintesi del DNA, ripetuta per più cicli, a partire da un substrato di deossinucleotidi, su uno stampo di DNA a singolo filamento.

La DNA polimerasi sintetizza DNA in direzione 5' → 3' e può aggiungere nucleotidi sfruttando un gruppo -OH libero, reso disponibile da un oligonucleotide che ha funzione di primer, che verrà allungato, a partire dall'estremità 3' generando un filamento a doppia elica. Durante il primo ed ogni successivo ciclo di reazione, l'estensione di ogni oligonucleotide sullo stampo originale produrrà una nuova molecola di DNA a singolo filamento di lunghezza indefinita. Questi

lunghi filamenti fungeranno da stampi per il *primer forward* o *reverse*, durante i cicli successivi, e l'estensione di questi *primer* da parte della polimerasi produrrà molecole di una lunghezza definita. Queste molecole fungeranno anch'esse come stampi per i due *primer*, producendo altre molecole di grandezza definita. In questo modo si svilupperà una reazione a catena che porterà all'accumulo di uno specifico DNA a doppio filamento, in maniera esponenziale rispetto al numero di cicli di reazione.

In una *epENDORF thin walled* è stata preparata la seguente mix di reazione:

- 33 µl H<sub>2</sub>O sterile
- 5 µl *buffer* 5X
- 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> 50mM
- 1,0 µl dNTP mix 10mM
- 2,0 µl *primer* fw
- 2,0 µl *primer* re
- 5,0 µl cDNA

Infine è stato aggiunto come reagente 0,5 µl di *EuroTaq*

Il termociclatore è stato programmato con le seguenti modalità:

- 94°C per 2'
- 94°C per 1' } per 35 cicli
- 51°C per 1' }
- 72°C per 2' }
- 72°C per 7'

## 2.7 Elettroforesi di controllo

Amplificato il cDNA della Cu,Zn SOD di *Pagetopsis macropterus* attraverso PCR, si è provveduto a verificare l'efficienza della reazione per mezzo di una elettroforesi di controllo.

L'elettroforesi è una tecnica che permette di separare frammenti di DNA, in funzione del peso molecolare. Il DNA, carico negativamente a causa dei residui di fosfato presenti nel suo scheletro, in presenza di un campo elettrico tende a migrare verso l'anodo. I frammenti possono essere separati utilizzando una griglia molecolare costituita da un gel di agarosio (o di poliacrilammide): maggiore sarà il loro peso molecolare, maggiore sarà la loro difficoltà ad attraversare le maglie dell'agarosio polimerizzato, impiegando così più tempo a migrare. L'uso di un

*marker* costituito da una serie di frammenti di dimensione nota, permette, grazie ad un confronto, di ottenere una stima verosimile delle dimensioni dei frammenti separati. La visualizzazione del risultato è possibile sfruttando la proprietà di alcune molecole intercalanti, come il Bromuro di etidio, di rendersi visibili, se irraggiate con luce UV, e di legarsi alle molecole di acidi nucleici. Variando la concentrazione di agarosio si ottengono maglie più o meno fitte, da usare in relazione alla dimensione del frammento permettendoci di ottenere una capacità di risoluzione funzionale alle nostre esigenze.

L'elettroforesi di controllo è stata effettuata utilizzando un gel di agarosio all'1,5%.

## 2.8 Sequenziamento

Il sequenziamento è stato effettuato presso i laboratori della *BMR Genomics* s.r.l, che utilizza sequenziatori *ABI 3730XL* a 96 capillari e *ABI 3100* a 16 capillari.

Per ottenere la sequenza viene allestita una reazione di PCR utilizzando come mix di dNTP dei dideossiribonucleotidi marcati con differenti fluorocromi. I dideossiribonucleotidi, in quanto privi del gruppo 3'-OH, non permettono la crescita della catena dal momento che la DNA polimerasi non può formare un legame fosfodiesterico in assenza di tale gruppo. Ogni prodotto di PCR, a cui è legato il proprio colorante base-specifico viene fatto correre in un gel elettroforetico denaturante ed eccitato da un laser. Ogni fluorocromo emette dunque luce ad una determinata lunghezza d'onda, caratteristica e riconoscibile. Un filtro, quindi, separa le emissioni che vengono convogliate ad un fotomoltiplicatore e qui i segnali vengono captati da un elaboratore che fornisce i risultati.

Il campione, contenente il cDNA amplificato di *Pagetopsis macropterus*, è stato inviato al sequenziamento con il *primer* RE1.

## 2.9 Allineamento ed analisi filogenetica

La sequenza ottenuta è stata confrontata con le codificanti per la Cu,Zn SOD di altri teleostei, presenti nel *database* di *Entrez*, collegato a numerose risorse quali *GenBank*, *RefSeq* e *PDB*.

Il programma utilizzato per la traduzione aminoacidica della sequenza nucleotidica è *stato Expasy Translate tool*.

Gli allineamenti globali tra due o più sequenze nucleotidiche sono stati effettuati con programmi bioinformatici quali *LALIGN* e *CLUSTAL W*.

Per l'analisi filogenetica, e la costruzione dei relativi alberi è stato utilizzato il programma *MEGA 3.1* con in metodi *Minimum Evolution*, *Maximum Parsimony* e *Neighbor-Joining*.

### 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Risultati dell'amplificazione e del sequenziamento del cDNA

L'elettroforesi di controllo del prodotto di PCR, per la sequenza codificante della Cu,Zn SOD di *Pagetosis macropterus*, ha evidenziato una banda di circa 600 paia di basi, compatibile con la regione amplificata compresa tra i *primer*.

Marker *P. macropterus*

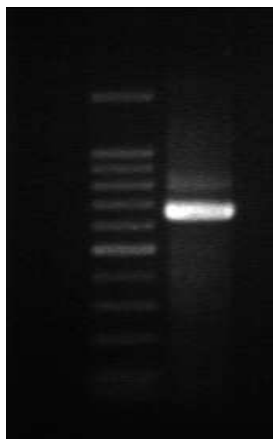


Fig.7 Elettroforesi di controllo per i prodotti della reazione di PCR utilizzata per amplificare la regione di DNA di nostro interesse. Per l'elettroforesi si è utilizzato un gel di agarosio alla concentrazione dell'1,5%.

E' stato possibile procedere alla diretta purificazione del prodotto di PCR, utilizzando il kit *NucleoSpin Extract II*.

Il sequenziamento ha dato come risultato un frammento di 628 paia di basi, la cui traduzione aminoacidica possiamo vedere in figura 8. La sequenza codificante è formata da 492bp e codifica per una proteina formata da 163 residui aminoacidici in cui si riscontrano gli aminoacidi normalmente conservati anche in altri teleostei. La sequenza codificante è compresa tra una sequenza di 30bp che è parte della regione 5' UTR, ed una sequenza di 106 bp che è parte della regione 3' UTR.

```
ttgtggcgttcctttgaaactactgcaaac atg gtt ata aaa gcg gtg tgt gtg ttg aaa
                                     M V I K A V C V L K 10
gga gct gga gag gct agc ggg act gtc ttc ttc gag cag gag aat gat tca tcc cct gtg
G A G E A S G T V F F E Q E N D S S P V 30
aag ctg act gga gaa atc aaa ggc ctt act cct ggt gag cat ggt ttc cat gtc cat gct
K L T G E I K G L T P G E H G F H V H A 50
ttt gga gac aat aca aac ggg tgc atg agt gca ggc cct cac ttc aat ccc cac aac aag
F G D N T N G C M S A G P H F N P H N K 70
aat cat gcc ggt cct act gat gca aat agg cat gtt gga gac ctg ggg aat gtg act gct
N H A G P T D A N R H V G D L G N V T A 90
gca gct gat aat gtt gca aag ctc gac atc acg gac aag atg atc acc ctt gct ggc caa
A A D N V A K L D I T D K M I T L A G Q 110
tac tct att att ggc aga acc atg gtg atc cat gag aag gcc gac gac ctg gga aaa gga
Y S I I G R T M V I H E K A D D L G K G 130
ggc aat gag gag agt gta aag aca ggc aat gct ggt gga cgt ctg gcc tgt gga gtc atc
G N E E S V K T G N A G G R L A C G V I 150
ggc atc gcc cag gaa aca ctt tgc caa cac atg cag cac tga aaactatttctcccatcgcaactta
G I A Q E T L C Q H M Q H -
Caaagaccaacatagctactcgatgtgacagtctgacatttccaataggatgtggtattgccctgagcttccaaaggcccca
```

Fig.8 Risultato del sequenziamento del prodotto di amplificazione del cDNA di *P. Macropterus* e traduzione della sequenza codificante la Cu,Zn SOD.

### 3.2 Allineamento delle sequenze

Si è valutata la conservazione della sequenza nucleotidica per la Cu,Zn SOD di *Pagetopsis macropterus* confrontandola con quella corrispondente in altre specie di teleostei, antartici e non antartici, utilizzando il programma bioinformatico LALIGN. Il livello di conservazione, quantificabile attraverso il valore di identità, è sempre maggiore del 70%. L'identità maggiore è stata rilevata con gli altri teleostei antartici (in grassetto nella tabella) e soprattutto con *C. hamatus*, appartenente alla stessa famiglia, quella dei *Channichthyidae*, di *P. macropterus*.

NOME SPECIE	IDENTITA'
<b><i>Chionodraco hamatus</i></b>	94.3%
<b><i>Cygnodraco mawsoni</i></b>	92.5%
<b><i>Trematomus newnesi</i></b>	92.1%
<b><i>Trematomus pennellii</i></b>	92.1%
<b><i>Trematomus hansonii</i></b>	91.9%
<b><i>Trematomus bernacchii</i></b>	91.7%
<i>Epinephelus coioides</i>	84.6%
<i>Epinephelus malabaricus</i>	84.3%
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	83.9%
<i>Pagrus major</i>	82.3%
<i>Acanthopagrus aschlegeli</i>	80.5%
<i>Oreochromis mossambicus</i>	79.9%
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	72.4%
<i>Salmo salar</i>	71.1%
<i>Danio rerio</i>	70.5%

Tab.2 Il confronto tra la sequenza nucleotidica della Cu,Zn SOD di *P. macropterus* con altri teleostei ha evidenziato elevati valori di identità.

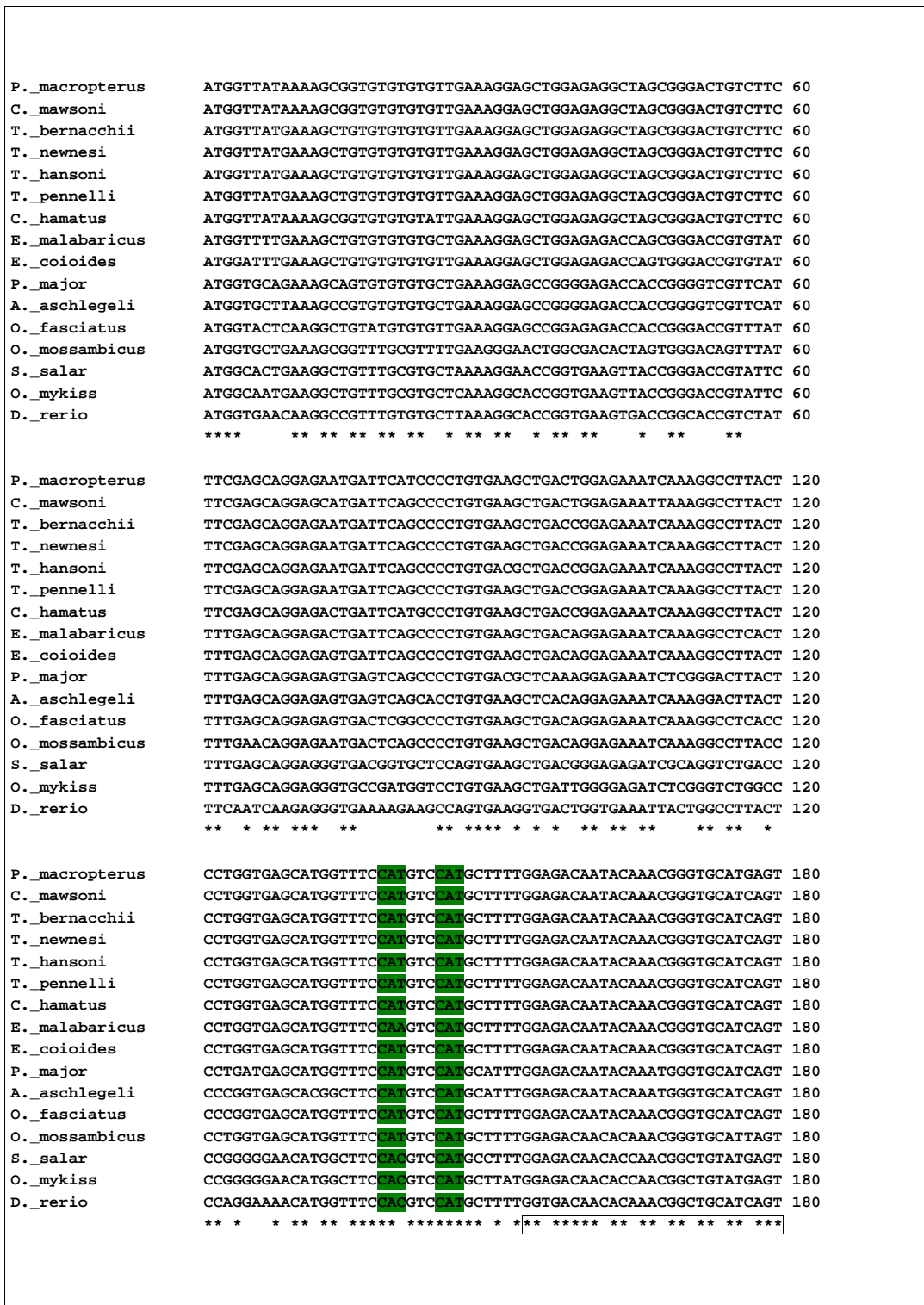


Fig.9 In questa figura viene presentato, attraverso il risultato del multiallineamento eseguito con CLUSTALW, il confronto tra le diverse sequenze nucleotidiche codificanti la Cu,ZN SOD. Gli asterischi indicano (\*) i nucleotidi conservati in tutte le sequenze prese in esame.



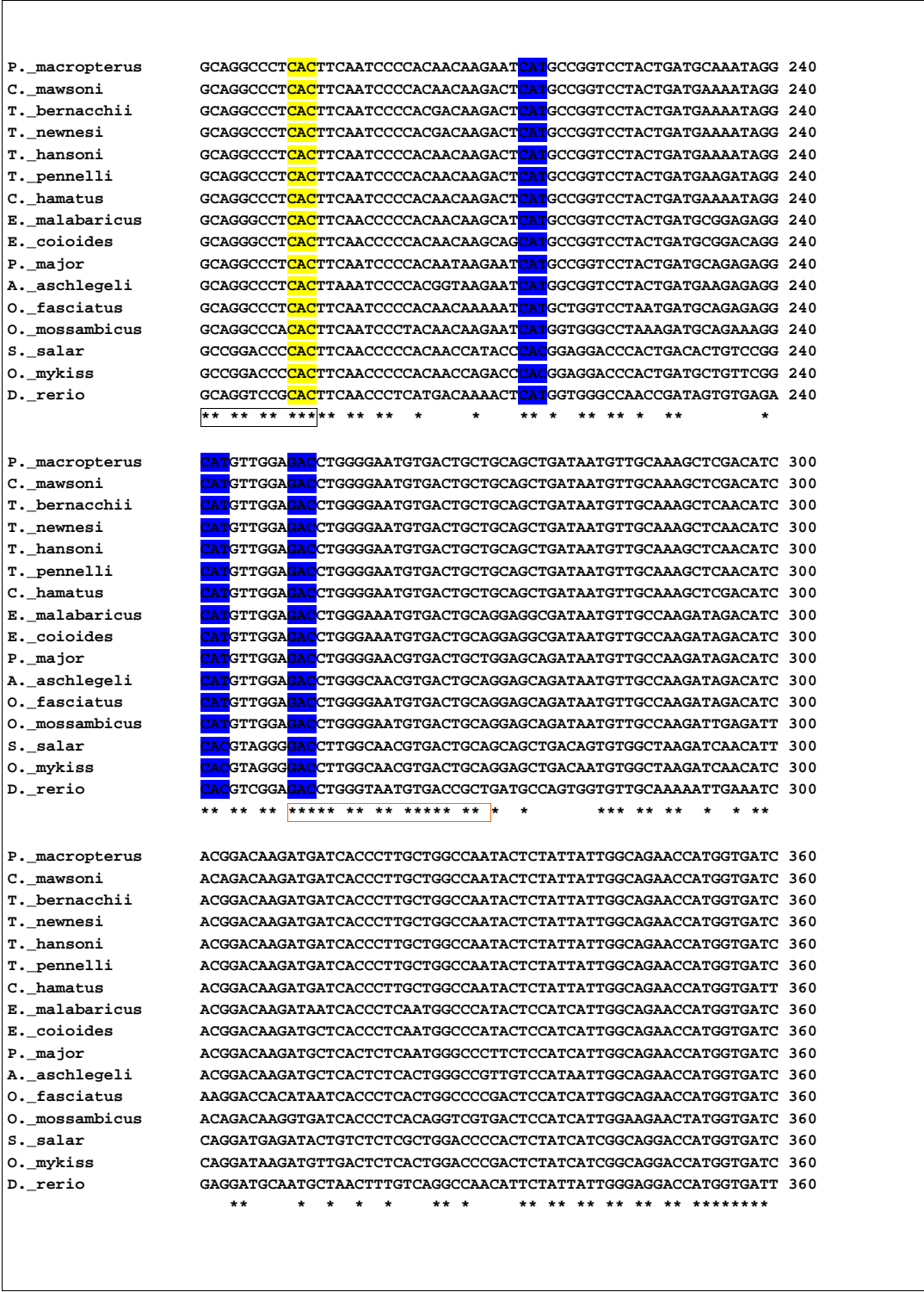


Fig.10 Multiallineamento eseguito con CLUSTALW (continua da pag 13).

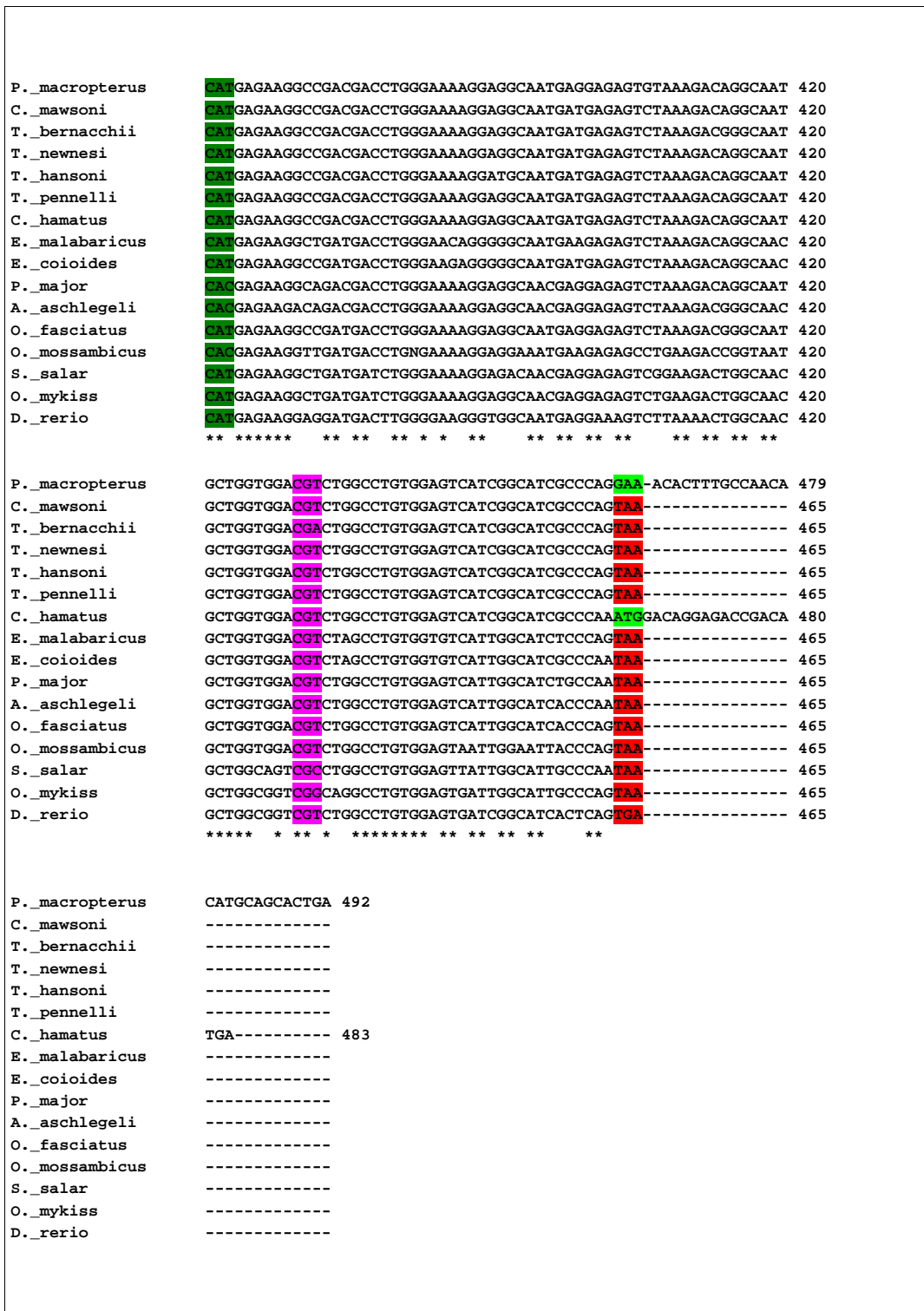


Fig.11 Multiallineamento eseguito con CLUSTALW (continua da pag 14).

L'enzima evidenzia un elevato livello di conservazione, come già riscontrato attraverso i confronti effettuati con LALIGN. In particolare risultano conservati i codoni che codificano per aminoacidi o sequenze peptidiche fondamentali per il mantenimento della funzionalità del centro catalitico.

- le His47, His49, His121 che coordinano lo ione Cu nel sito attivo (evidenziate in verde)
- le His72, His81, Asp84 che coordinano lo ione Zn nel sito attivo (indicate in blu)
- l'His64 che lega attraverso il suo anello imidazolico sia lo ione Cu che lo ione Zn (indicata in giallo)
- l'Arg144 che guida l'anione superossido verso lo ione Cu all'interno del sito attivo, stabilizzandone il legame (indicata in fucsia)
- la regione compresa tra la Guanina154 e la Citosina192 (corrispondente alla posizione aminoacidica tra 52 e 64) che forma un loop che protrude dalla proteina e forma l'unico ponte disolfuro (indicata nel riquadro nero)
- la regione compresa tra la Guanina250 e la Timina270 (corrispondente alla posizione aminoacidica tra 84 e 90) che forma un foglietto  $\beta$  che supporta il centro catalitico e stabilizza la struttura a barile dell'enzima (indicato nel riquadro arancione).

Nonostante nei siti strutturalmente e cataliticamente rilevanti per l'enzima vi siano delle differenze a livello della sequenza nucleotidica, esse determinano mutazioni sinonime, dal momento che non comportano variazioni nella sequenza aminoacidica. Dall'allineamento emerge chiaramente una peculiarità che distingue la sequenza di *P. macropterus*: essa infatti risulta essere, rispetto alle altre, extranumeraria per 27 bp, corrispondenti ad una sequenza di 9 aminoacidi all'estremità C-terminale. Questa particolarità può essere spiegata con un fenomeno di mutazione che ha colpito il codone di stop (probabilmente TAA dato che questo è conservato in tutti gli altri teleostei antartici analizzati, generando, attraverso la transversione T-G il codone GAA (evidenziato in verde chiaro), codificante Glu.

Di notevole interesse è che anche *C. hamatus*, componente della famiglia dei *Channichthyidae* insieme a *P. macropterus*, che possiede una Cu,Zn SOD più lunga dei classici 154aa. (la sua sequenza nucleotidica infatti è più lunga di 18bp rispetto a quella degli altri teleostei). Si potrebbe pertanto formulare l'ipotesi, da verificare, che questa caratteristica rappresenti un aspetto peculiare degli *icefish*. Risulterebbe estremamente interessante dunque poter confrontare queste sequenze con quelle di altri *Channichthyidae*, in modo da valutare se questa caratteristica possa essere un tratto distintivo di questa famiglia di teleostei e se questa mutazione, che coinvolge uno degli enzimi fondamentali nel metabolismo

dell'ossigeno, possa essere in qualche modo collegata alla loro particolare fisiologia.

Inoltre una comparazione tra le due sequenze nucleotidiche extranumerarie di *P. macropterus* e *C. hamatus*, effettuata con LALIGN, rivela un valore di identità notevolmente più basso (39.3%) di quello ottenuto allineando le due intere sequenze (94.3%, cfr. tab.2). Questo dato può indurci a ipotizzare che tale regione extranumeraria codifichi per una catena polipeptidica che non ricopre un ruolo fondamentale per la proteina e che, quindi, possa accumulare un alto numero di mutazioni, dal momento che ciò non comporta variazioni funzionali significative.

		10	20
<i>P. macropterus</i>	-ACACTTTGCCAACACATGCAGCACTGA		
	::	::	:::
<i>C. hamatus</i>	GACAGGAGACCGACA-----TGA		
		10	

Tab.3 Confronto, effettuato con LALIGN delle sequenze nucleotidiche extranumerarie di *P. macropterus* e *C. hamatus*, presenti all'estremità 3' della codificante.

### 3.3 Analisi e ricostruzione filogenetica

Sono stati realizzati diversi alberi filogenetici utilizzando il programma MEGA 3.1, basandosi sui dati ottenuti dall'allineamento multiplo effettuato con CLUSTALW. L'analisi è stata condotta su 5000 repliche. In Fig.12 è presentato un albero filogenetico costruito con l'algoritmo Minimum Evolution (pairwise deletion) utilizzando il modello Tamura-Kumar. Nelle Fig.13 e Fig.14 sono indicati due alberi filogenetici costruiti entrambi tramite l'algoritmo Neighbor Joining (pairwise deletion) con i modelli, rispettivamente, Number of differences e Tajima-Nei.

Il *cluster* formato dai taxa dei teleostei antartici è evidenziato in colore blu.

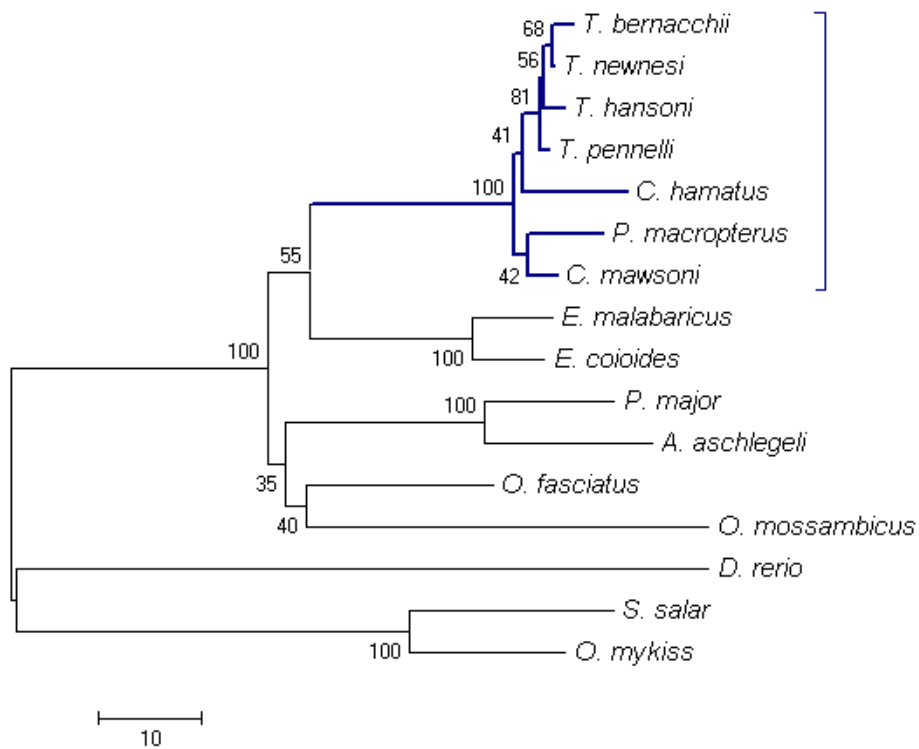


Fig.12 Albero filogenetico costruito con l'algoritmo Minimum Evolution (Tamura-Kumar).

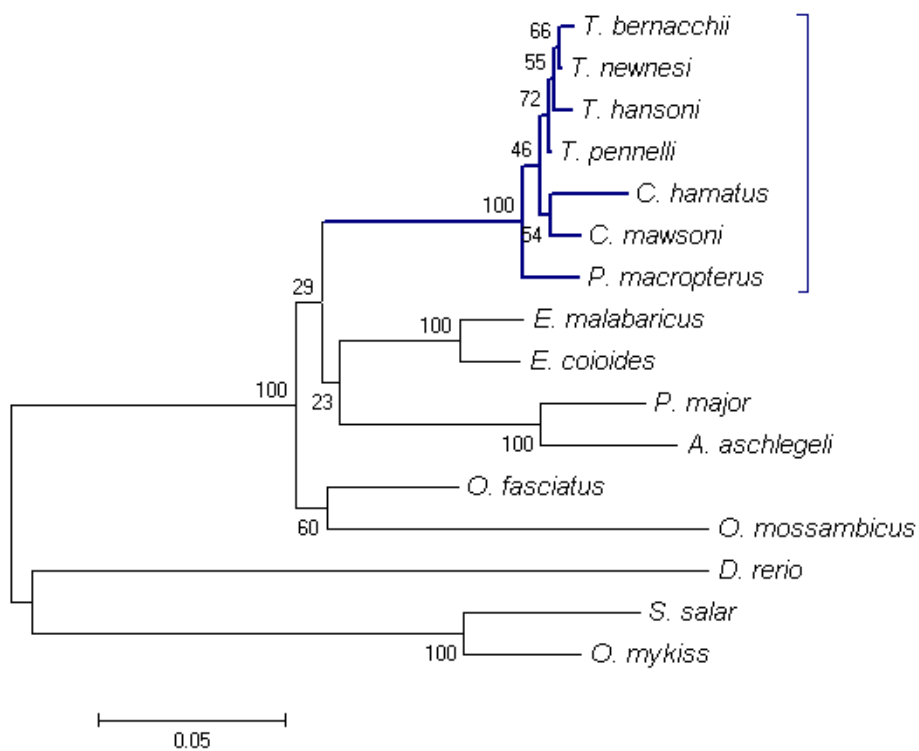


Fig.13 Albero filogenetico costruito con l'algoritmo Neighbor Joining (Number of differences).

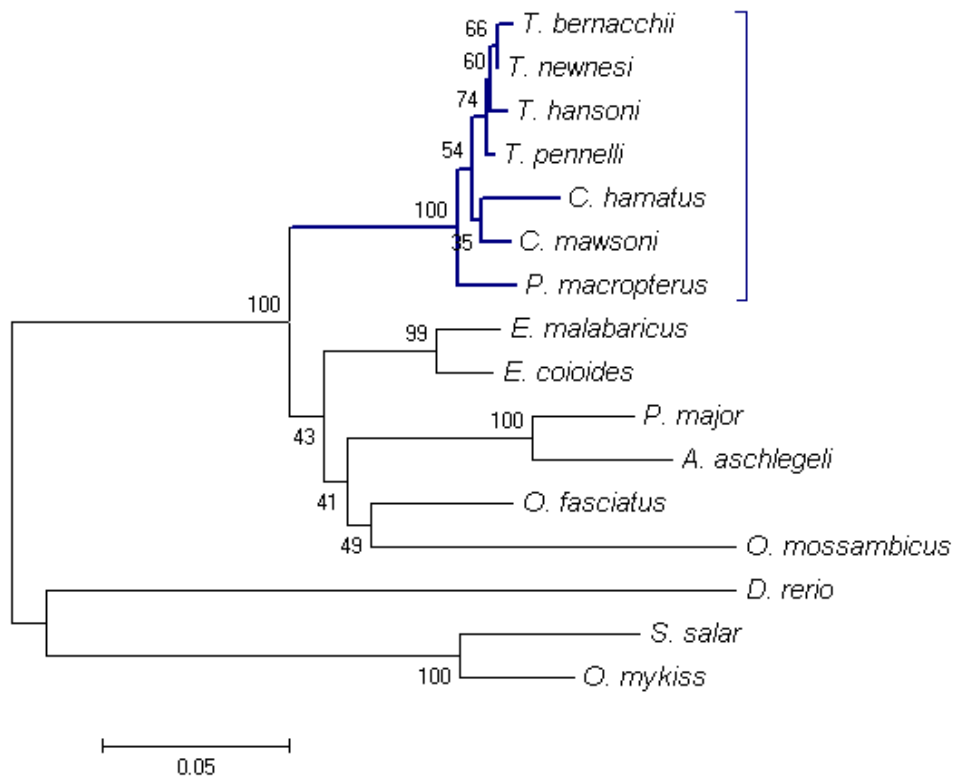


Fig.14 Albero filogenetico costruito con l'algoritmo Neighbor Joining (Tajima-Nei).

In tutti gli alberi si distingue un *cluster* che comprende tutte le specie di teleostei antartici analizzate (*Notothenioidei*) e che si differenzia visibilmente da tutti gli altri gruppi di teleostei non antartici, con altissimi valori di *bootstrap* (100 %). All'interno di questo *cluster* risulta evidente il clade formato delle Cu,Zn SOD del genere *Trematomus*, con un *bootstrap* superiore al 70%. Sorprende invece il risultato ottenuto riguardo *P.macropterus*, in quanto la sua sequenza non risulta mai clusterizzata con quella di *C.hamatus*, anche se i valori di *bootstrap* non sono molto elevati (35-54%).

### 3.4 Conclusioni

L'ipotesi dell'orologio molecolare nell'evoluzione nasce dall'osservazione che il numero di differenze aminoacidiche in una data proteina appare proporzionale al tempo trascorso dal momento in cui si è originata la divergenza tra due organismi confrontati. Questa proporzionalità fu giustificata con l'ipotesi che molte sostituzioni aminoacidiche (e quindi nucleotidiche) possano non coinvolgere aspetti funzionali (Ayala, 1997).

I risultati dell'analisi filogenetica condotta, però, non sembrerebbero accordarsi con questa teoria. Infatti risulta evidente che la Cu,Zn SOD appartenente alle

specie antartiche sono strettamente correlate tra loro, separandosi nettamente da quelle presenti negli altri teleostei non antartici. Considerando che l'isolamento biogeografico che ha prodotto questa deriva genetica si è generato in tempi geologici brevi (circa 25 milioni di anni fa), ne risulta che la Cu,Zn SOD dei *Notothenioidei* si è differenziata in un periodo relativamente ristretto, dimostrando una velocità evolutiva discontinua (Clarke et al., 2005).

In questo processo devono essere intervenute in modo decisivo però anche le particolari condizioni ambientali che hanno causato forti spinte evolutive; la bassa temperatura delle acque dell'Oceano Australe, infatti, aumenta notevolmente la solubilità dell'ossigeno, favorendo la formazione di ROS e quindi l'evoluzione di meccanismi di difesa antiossidante estremamente efficienti.

Ovviamente il ridotto numero di sequenze disponibili rende questo risultato assolutamente provvisorio e sarà pertanto necessario caratterizzare numerose altre sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche di altri teleostei antartici prima di giungere ad una visione più chiara e completa dell'evoluzione della metalloproteina Cu, Zn SOD.

### **Bibliografia citata.**

**Ayala FJ. (1997)** Vagaries of the molecular clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94(15):7776-83.

**Bordo D, Djinovic K, Bolognesi M. (1994)** Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase family. *J Mol Biol.*, 238(3):366-86.

**Bordo D, Matak D, Djinovic-Carugo K, Rosano C, Pesce A, Bolognesi M, Stroppolo ME, Falconi M, Battistoni A, Desideri A (1999)** Evolutionary constraints for dimer formation in prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutase. *J Mol Biol.*, 285(1):283-96.

**Brunori M., Rotilio G. (1984)** Biochemistry of oxygen radical species. *Methods Enzymol.*, 105:22-35.

**Clarke A, Barnes DK, Hodgson DA. (2005)** How isolated is Antarctica? *Trends Ecol Evol.*, 20(1):1-3.

**Di Prisco G, Carratore V, Cocca E, Riccio A, Tamburrini M. (2000)** Molecular structure and functional adaptation of hemoglobins from Antarctic marine organism. *Ital j Zool.*, SUPPLEMENT 1:37-46.

**Miller R G. (1993)** History and atlas of the fishes of the Antarctic Ocean. Carson City, Nevada: *Foresta Institute for Ocean and Mountain Studies*. pp: 400-403.

**Nakano T, Sato M, Takeuchi M. (1995)** Unique molecular properties of superoxide dismutase from teleost fish skin. *FEBS Lett.*, 360(2):197-201.

**Santovito G, Cassini A, Piccinni E. (2006)** Cu,Zn superoxide dismutase from *Trematomus bernacchii*: functional conservation and erratic molecular evolution in Antarctic teleosts. *Comp Biochem Physiol.*, Part C 143:444-454.

**Verde C, Parisi E, di Prisco G. (2006)** The evolution of thermal adaptation in polar fish. *Gene.*, [Epub ahead of print].

**Zelko I N, Mariani T J, Folz R J. (2002)** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.*, 33(3): 37-49.



### **Bibliografia consultata**

**Ayala FJ. (1986)** On the virtues and pitfalls of the molecular evolutionary clock. *J Hered.*, 77(4):226-35.

**Near T J, Pesavento J J, Cheng C H. (2004)** Phylogenetic investigations of Antarctic notothenioid fishes (Perciformes: Notothenioidei) using complete gene sequences of the mitochondrial encoded 16S rRNA. *Mol Phylogenet Evol.*, 32(3):881-91.

**Valle G, Helmer Citterich M, Attimonelli M, Pesole G. (2003)** Introduzione alla bioinformatica. Eds: Marchetti R Bologna (Italia): *Zanichelli*.

**Watson J D, Barker T A, Bell S P, Gann A, Levine M, Losick R. (2004)** Molecular biology of the gene. Eds: Smith J. San Francisco (California-USA): *Pearson/Benjamin Cummings*.

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare sentitamente Gianfranco Santovito per il tempo che mi ha dedicato durante questo periodo di tirocinio.

Ringrazio Alessia e Rigers per l'infinita pazienza che hanno dimostrato durante i due mesi di lavoro in laboratorio e per i preziosi consigli e suggerimenti.

Ringrazio i miei genitori e tutta la mia famiglia, che mi hanno permesso di raggiungere questo traguardo.

Ringrazio Alessandro per l'insostituibile aiuto che mi ha fornito in questi anni di studio.

Ringrazio tutti gli amici incontrati all'Università di Padova che hanno reso questa esperienza piacevole.